

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：ゲノム解析に資する下痢原性細菌感染症サーベイランスの強化及びゲノム解析を利用した迅速診断法の開発に向けた研究

2. 研究開発代表者：伊豫田 淳（国立感染症研究所 細菌第一部）

3. 研究開発の成果

腸管出血性大腸菌（EHEC）O26 の分離株には、重症例から分離頻度の高い特定の系統（志賀毒素遺伝子 *stx2* 単独保有型の ST21 または ST29）が国内外で知られていたが、その詳細については不明であった。今年度の研究から、全ゲノム配列（WGS）を用いた SNP 解析によって O26 の ST29 は大きく 2 つの亜系統に分類され、このうちの一方は他方に比べて Stx2 産生性と培養細胞（ベロ細胞）への毒性が高く、無菌マウスへの感染実験でも高病原性を示すことが明らかとなった。以上の成果から、①WGS からの SNP 抽出による系統解析、②Stx 産生性解析、③ベロ細胞での毒性解析、④無菌マウス感染モデル、からなる EHEC の病原性評価系が確立されつつあると考えられる。その他については以下の項目ごとに報告する。

(1) ゲノム配列解析候補株の選定：2014 年以降に分離された HUS 患者由来株の解析から、Stx に加えてサチラーゼ毒素（SubAB）を保有する特定の血清型株が新規に分離されていること、2011 年のドイツでの集団発生由来株と同様に EHEC と腸管凝集接着性大腸菌とのハイブリッド型株（血清型は O104:H4 以外）が血便患者から分離されていることを明らかにし、今後の WGS 解析候補株とした。さらに、主要 7 血清群の Stx サブタイプの分布を解析し、特定の O 群で非定型な Stx サブタイプを保有する株が複数あることを示した。(2)ゲノム配列解析：①O26 の WGS を用いた SNP 抽出による系統解析（上記の通り）；②主要 O 群のうち、O145 と O121 について Stx2 ファージ挿入部位とファージの全塩基配列決定を進め、O121 はゲノム全体だけでなく Stx2 ファージ配列レベルでも多様性が低いことを明らかにしたが、Stx2 産生レベルは菌株によって異なることから、ファージ以外に Stx2 レベルを規定する配列が存在する可能性が示唆された；③H26 年までに分離された HUS 患者由来の LEE 非保有型 EHEC のすべての株についてドラフトゲノム配列解析を行い、病原性遺伝子の分布解析を行った結果、H22 年以降に HUS 患者由来株として分離された全ての株（n=5）はサブタイプ SubAB₁ がプラスミド上にコードされていた。既存の接着因子を保有しない血清型 O115:H10 は大きく異なる 2 系統に分類された；④O121 の散在的集団発生由来株を用いて WGS を用いた SNP 解析のためのパイプラインを確立すると共に WGS から集発株に特異的な配列を抽出し、それらを簡易に検出する PCR 法を構築した。一連の解析手法は菌株間の同一性を解析する有効な分子疫学的解析ツールになることを示した。(3) 病原性の評価：①EHEC O26 の病原性評価系の確立（上記）；②当初 H28 年度に計画していた SubAB のストレスグラニュー形成機構の解明が進み、論文発表の成果を得た。臨床トライアル中の PKC 活性化剤 XX を用いて SubAB の細胞致死阻害機構を解析した。本薬剤の毒素活性阻害機構の解析は EHEC 感染症の治療薬開発に貢献できるものと期待される；③SubAB 阻害剤の開発：4 価ペプチドライブラリーシート合成技術を確立し、Stx2a B サブユニットと 1 アミノ酸の相違しかない Stx2d B に特異的な阻害薬を同定した。この成果は、今後 SubAB の B サブユニットを標的とした制御分子同定に向けて大きな推進力となると期待される。(4)分離同定法の改良・提案：①O 血清群の遺伝学的同定法である Og タイピング法の実用化を開始した。従来の型別法との整合性解析から新規 O-genotype（8 種類）を同定し、その PCR 検出系を開発した；②大腸菌全 H 型標準株のべん毛繊維遺伝子（*fliC*）の塩基配列を取得解析し、分離頻度の高い O 群に見られる 10 種類の H 型について各々を検出する PCR 法を開発した。