

***Escherichia coli* O103 O-antigen polymerase遺伝子塩基配列の保存性に関する検討**

八柳 潤 齊藤志保子 今野貴之

我々は昨年度 *Escherichia coli* O103 抗原特異検出用 PCR 法を報告した。しかし、本 PCR 法において標的遺伝子とした *E. coli* O103 O-antigen polymerase 遺伝子の塩基配列の保存性が証明されていなかったことから、*E. coli* O103 の血清型参照株である H515b 株、秋田県内で分離された EHEC O103 など計 14 株を供試して *E. coli* O103 O-antigen polymerase 遺伝子の全長 1149bp の塩基配列を比較した。その結果、*E. coli* O103 の O-antigen polymerase 遺伝子の塩基配列の保存性は非常に高いことが確認された。一般的に PCR 法においては塩基配列の保存性が可能な限り高い領域が標的遺伝子に選定される。今回の結果から、昨年度報告した O103 抗原特異検出・同定用 PCR 法では偽陰性が発生する可能性が極めて少ないことが示された。本 PCR 法は国内の地方衛生研究所においても広く実施可能であることから、各地方衛生研究所における EHEC O103 の検査体制の整備にも寄与するものと考えられた。

1. はじめに

腸管出血性大腸菌（EHEC）はベロ毒素（VT）を産生する大腸菌であり、ヒトに下痢、激しい腹痛、出血性大腸炎、ときに致命的となる溶血性尿毒症候群や脳炎を惹起する¹⁾。患者からの分離例が特に多い血清型は O157:H7 であるが、秋田県ではこれまで下痢症患者から O26、O103、O121、O91、O111 などの血清型の EHEC も分離されている²⁾。1996 年に国内で初めてとなる EHEC O103 による感染事例が県内で確認されて以来、EHEC O103 感染者の発生が毎年確認されている。

近年、大腸菌の O 抗原合成遺伝子オペロンの塩基配列が解読され、O121⁴⁾、O157⁵⁾、O111⁶⁾、O91⁷⁾ 抗原を特異的に検出可能な PCR 法が報告されており、血清型の決定に応用されている。しかし、*Escherichia coli* O103 については県内における分離頻度が高いにもかかわらず、*E. coli* O103 O 抗原合成遺伝子オペロンの塩基配列が解読されていなかったことから、O103 抗原特異検出用 PCR 法は導入できなかった。このため、我々は平成 13 年度から 15 年度に実施した「腸管出血性大腸菌の感染疫学解明に関する調査研究」⁸⁾の中で *E. coli* O103 O 抗原合成遺伝子オペロンの塩基配列を解読して O103 抗原特異検出用 PCR 法の確立を試み、その結果を昨年度の本誌上に報告した⁹⁾。一般的に、PCR により細菌などが保有する特定の遺伝子を検出しようとす

る際には、異なる菌株間でも標的遺伝子の塩基配列が同一であること、すなわち標的遺伝子の塩基配列が保存されていなければ偽陰性が生じる。このため、細菌の遺伝子診断においては、その細菌に特異的な毒素など、塩基配列の保存性が高いと考えられている「機能タンパク質」の構造遺伝子が標的遺伝子に選定される場合が多い。しかしながら、機能タンパク質であるにもかかわらず 3'領域の塩基配列の保存性が低インチミン¹⁰⁾のような例外もあり、この場合は保存性の高い 5'領域が標的とされている。また、ノロウイルス¹¹⁾やサボウイルス¹²⁾¹³⁾の PCR による検出系を確立する際には、多数のウイルスの塩基配列を比較することにより、塩基配列の保存性が可能な限り高い領域が標的遺伝子に選定されている。このように、標的遺伝子の塩基配列保存性に関する知見を得ておくことは、PCR による細菌などの特定の遺伝子の検出系を確立する際に極めて重要である。しかし、O103 を含む *E. coli* O 抗原合成遺伝子の塩基配列保存性に関することは報告されていない。

今回、秋田県内でこれまでに分離された EHEC O103 臨床分離株などを使用して、昨年度報告した O103 抗原特異検出用 PCR 法において標的遺伝子とした *E. coli* O103 O-antigen polymerase 遺伝子の塩基配列の保存性について検討した。

2. 方法

2.1 供試菌株

E. coli O103 の血清型参照株である H515b 株、フランスで分離された EHEC O103 であり itimin e の標準株である pmk5 株、そして秋田県内で分離された EHEC O103 11 株、EPEC O103 1 株、計 14 株を供試した (表 1)。

2.2 *E. coli* O103 O-antigen polymerase 遺伝子の塩基配列解析

表 2 に示すプライマー O103wzyseqF および O103wzyseqR を使用した PCR により、供試株から *E. coli* O103 O-antigen polymerase 遺伝子の全長 1149bp を含む 1288bp の増幅断片を得た。得られた断片をアガロースゲル電気泳動と QIA Quick Gel Extraction Kit (Qiagen) により精製し、BigDye Terminator V3.1 (Applied Bio) と表 2 に示すシーケンスプライマーを使用してダイレクトシーケンスを実施した。

2.3 *E. coli* O103 O-antigen polymerase 遺伝子の塩基配列解析

得られた *E. coli* O103 O-antigen polymerase 遺伝子の塩基配列は DNASIS software (Hitachi Software Engineering Co.) 及び CLASTAL W を使用して解析した。

3. 結果と考察

供試した 14 株の全てから O103wzyseqF および O103wzyseqR を使用した PCR により 1288bp の増幅断片が得られた。その増幅断片をダイレクトシーケンスすることにより判明した、14 株の *E. coli* O103 O-antigen polymerase 遺伝子 1149bp の塩基配列を比較した結果を図 1 に、塩基配列から演繹されたアミノ酸配列の比較結果を図 2 に示した。*E. coli* O103 の血清型参照株である H515b 株の O-antigen polymerase 遺伝子の塩基配列と比較して、EC5087 を除く 12 株の O-antigen polymerase 遺伝子の塩基配列は 1149bp 中に 8 カ所 (69, 143, 204, 470, 691, 847, 885, 1139)、EC5087 は 5 カ所 (69, 204, 470, 691, 1139) に塩基置換が認められるのみであった。特に、H515b 株と EC5087 を除く 12 株については、O-antigen polymerase 遺伝子の塩基配列はほぼ完全に一致していた (図 1)。アミノ酸配列レベルでも同様に H515b と EC5087 を除く 12 株の配列

はほぼ一致し、H515b 株と比較して 5 カ所 (48, 157, 231, 283, 380)、EC5087 には H515b 株と比較して 2 カ所 (231, 380) にアミノ酸置換が認められた。なお、塩基配列にみとめられた前記 8 カ所の置換のうち、69, 204, 885 の 3 カ所はアミノ酸配列に置換を伴わない「サイレントミューテーション」であった。これらの結果は、*E. coli* O103 O-antigen polymerase 遺伝子の塩基配列の保存性が非常に高いことを示していた。

秋田県において下痢症患者から分離される EHEC の血清群で最も多い型は O157 であり、O26、O103、O121 がそれに次ぐ。また、給食従事者などの無症状保菌者からは O91 の分離例が多い。O103、O121、O91 用の型別血清はこれまで市販されていなかったが、最近、これらの国産型別血清がようやく市販されるようになった。EHEC の血清型を決定するための方法としては、従来から広く実施されている型別用抗血清を使用する免疫学的方法と、最近報告が散見される O 抗原合成遺伝子オペロンを標的とする遺伝子学的方法がある。当所においては、すでに O121⁴⁾、O157⁵⁾、O111⁶⁾、O91⁷⁾ 抗原特異検出・同定用 PCR を導入し、これらの EHEC の血清型決定に際して免疫学的方法と遺伝子学的方法を併用することにより、検査精度の向上を実現してきた。*E. coli* O103 については昨年報告⁸⁾したとおり、O103 抗原特異的検出・同定用 PCR 法を確立したことにより、EHEC O103 の型別についても検査精度の向上が期待される。大腸菌 O 抗原の特異的検出・同定用 PCR 法は EHEC の検出や同定に有用な方法であり、その標的遺伝子としては血清群特異的であるとされている^{14, 15)} O-antigen polymerase 遺伝子と O-antigen flippase 遺伝子が選定されている。これらの遺伝子は血清群特異的であると考えられているが、その塩基配列が実際に保存されているかどうかは確認されていない。このため、今回、我々は *E. coli* O103 14 株の O-antigen polymerase 遺伝子全長の塩基配列を決定し、塩基配列を比較した。その結果、*E. coli* O103 の O-antigen polymerase 遺伝子の塩基配列の保存性は非常に高いことが確認された。このことから、昨年の本誌に報告した O103 抗原特異検出用 PCR 法において標的遺伝子の変異に起因する偽陰性が発生する可能性は極めて少ないものと推察された。

昨年度の研究により O103 抗原の特異的検出・同定用 PCR 法を確立し、今回の研究によりその PCR 方については偽陰性が発生する可能性が極めて少ないことを示す知見が得られた。この PCR 法は国内の地方衛生研究所においても広く実施可能であることから、各地方衛生研究所における EHEC O103 の検査体制の整備にも寄与するものと考えられた。

4. まとめ

・*E. coli* O103 の血清型参照株である H515b 株、県内分離株など 14 株を供試して *E. coli* O103 O-antigen polymerase 遺伝子 1149bp の塩基配列を比較した結果、*E. coli* O103 の O-antigen polymerase 遺伝子の塩基配列の保存性は非常に高いことが確認された。このことから、昨年度報告した O103 抗原特異的検出・同定用 PCR 法について、偽陰性が発生する可能性が極めて小さいことが示された。

・この PCR 法は国内の地方衛生研究所においても広く実施可能であることから、各地方衛生研究所における EHEC O103 の検査体制の整備にも寄与するものと考えられた。

5. 文献

- 1) Karmali, M.A. Infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin. Microb. Rev., 1989 ; 2 : 15 - 38.
- 2) 八柳 潤, 齊藤志保子, 佐藤晴美. 秋田県における平成 3 - 14 年度の EHEC 感染事例発生状況と感染給食従事者の陰性化確認で経験した問題点. 秋田県衛生科学研究所報, 2003 ; 47 : 19 - 23.
- 3) 齊藤志保子, 他. 牛が感染源と考えられた Vero 毒素産生性大腸菌 O103:H2 による家族内感染事例. 感染症誌, 1998 ; 72 : 703 - 713.
- 4) Fratamico, P. et al. Sequence of the *Escherichia coli* O121 O-Antigen Gene Cluster and Detection of Enterohemorrhagic *E. coli* O121 by PCR Amplification of the *wzx* and *wzy* Genes. J. Clin. Microbiol., 2003 ; 41 : 3379 - 3383.
- 5) Maurer, J.J. et al. Development of Primers to O-antigen Biosynthesis Genes for Specific Detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. Appl. Environ.

Microbiol., 1999 ; 65 : 2954 - 2960.

6) Paton, A.W. and Paton, J.C. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. J. Clin. Microbiol., 1998 ; 36 : 598 - 602.

7) Perelle, S. et al. Identification of the O-antigen biosynthesis genes of *Escherichia coli* O91 and development of a O91 PCR serotyping test. J. Appl. Microbiol., 2002 ; 93 : 758 - 764.

8) 八柳 潤, 齊藤志保子, 今野貴之. 腸管出血性大腸菌 (EHEC) の感染疫学解明に関する調査研究. 秋田県衛生科学研究所報, 2003 ; 48 : 45 - 53.

9) 八柳 潤, 大谷勝実, 齊藤志保子, 今野貴之. *Escherichia coli* O103 O 抗原合成遺伝子オペロンの塩基配列解読と腸管出血性大腸菌 O103 特異的検出・同定 PCR 法の開発. 秋田県衛生科学研究所報, 2004 ; 49 : 27 - 31.

10) Oswald, E. et al. Typing of Intimin Genes in Human and Animal Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli*: Characterization of a New Intimin Variant. Infect. Immun., 2000 ; 68 : 64 - 71.

11) Kageyama, T. et al. Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. J. Clin. Microbiol., 2003 ; 41 : 1548 - 1557.

12) Chan, M.C.W. et al. Sapovirus detection by quantitative real-time RT-PCR in clinical stool specimens. J. Virol. Method., 2006 ; Online Publication (www.sciencedirect.com).

13) Oka, T. et al. Detection of Human Sapovirus by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. J. Med. Virol., 2006 ; 78 : 1347 - 1353.

14) Wang, L. et al. Sequence of the *E. coli* O104 antigen gene cluster and identification of O104 specific genes. Gene, 2001 ; 270 : 231-236.

15) Wang, L. et al. Sequencing of *Escherichia coli* O111 O-antigen gene cluster and identification of O111-specific genes. J. Clin. Microbiol., 1998 ; 36 : 3182 - 3187.

表1 供試菌株一覧

血清型	菌株番号	入手先	病原遺伝子	備 考
0103:H8	H515b	Statens Serum Institut	—	血清型参照用標準菌株
0103:H2	PMK5	Dr. E. Oswald ^{a)}	VT-1 eaeA	Intimin ε 型標準菌株
0103:H2	EC281	県内臨床分離株	VT-1 eaeA	1996年家族内感染事例
0103	EC1591	県内保菌者分離株	VT-1 eaeA	1998年無症状保菌者
0103	EC2711	県内保菌者分離株	VT-1 eaeA	1999年無症状保菌者
0103	EC3096	県内保菌者分離株	VT-1 eaeA	1999年無症状保菌者
0103	EC3647	県内臨床分離株	VT-1 eaeA	2000年散発下痢症患者
0103	EC3648	県内保菌者分離株	VT-1 eaeA	2000年無症状保菌者
0103	EC3753	県内保菌者分離株	VT-1 eaeA	2000年無症状保菌者
0103	EC3785	県内保菌者分離株	VT-1 eaeA	2000年無症状保菌者
0103	EC3928	県内臨床分離株	VT-1 eaeA	2000年散発下痢症患者
0103	EC4018	県内臨床分離株	VT-1 eaeA	2000年家族内感染事例
0103	EC5087	県内臨床分離株	VT-1 eaeA	2001年家族内感染事例
0103	EC5243	県内集団事例分離株	VT-1 eaeA	2001年施設内感染事例
0103	EC11460	県内臨床分離株	eaeA	2006年散発下痢症患者

a) Unite INRA-ENVT de Microbiologie Molecularie, Ecole Veterinaire de Toulouse, Cedex, France

表2 *E. coli* 0103 O-antigen polymerase遺伝子増幅・シーケンス用プライマー

名 称	配 列 (5'→ 3')	位置 (EF027106)
O103wzyseqF	GGA-TGC-GAT-TTT-ACA-GAT-ACT-T	7123-7144
O103wzyseqM	TTA-ATG-AAC-CAT-TAT-TTT-TG	7530-7549
O103wzyseqR	GTT-TTT-CAG-CCC-CAC-CTA-AT	8390-8410

秋田県健康環境センター年報 第1号 2005

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
H515b	ATGTATATATTATCAATGGCTATACCATTTATTTTCATATCGTTGTGTGGCATCGATTAGTCATCAAAGTGCATTTCGTTTATTATTCATAGATTTTTCAGTCTAAGTTTC												
pmk5								G					
EC281								G					
EC1591								G					
EC2711								G					
EC3096								G					
EC3647								G					
EC3648								G					
EC3753								G					
EC3785								G					
EC3928								G					
EC4018								G					
EC5087								G					
EC5243								G					
EC11460								G					
	121	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
H515b	TTTTCATATTATACAAATGGCGTGGATTGGAGTGTATTATCTAAGATTATCGAGGATGAGGGGTTATTTACCTCGTTTGAATTTGGGTTTGTATTATTTTAAAGCTATTGCTATT												
pmk5			A					G		G			
EC281			A							G			
EC1591			A							G			
EC2711			A							G			
EC3096			A							G			
EC3647			A							G			
EC3648			A							G			
EC3753			A							G			
EC3785			A							G			
EC3928			A							G			
EC4018			A							G			
EC5087										G			
EC5243			A							G			
EC11460			A							G			
	241	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
H515b	GTTTCAGATGATAATTTTGGCTTGGCAATTTTACTCTATTATTTCTCTGTTTGTATTGCTCTCATTAAATTTGAAAAATACAAAGTTAATGAACCATTTTGGGATGCTTTTA												
pmk5													G
EC281													
EC1591													
EC2711													
EC3096													
EC3647													
EC3648													
EC3753													
EC3785													
EC3928													
EC4018													
EC5087													
EC5243													
EC11460													
	361	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
H515b	TTGTTATTTGGCTACAACCTTTTITAGAGCAGTTACGTCATTAATCTGGCATGTATAATAGTATTTTATGCGATGCTATTATACAATCAAAATAAAAATCTTATAGAATTGTATATTG												
pmk5													C
EC281													C
EC1591													C
EC2711													C
EC3096													C
EC3647													C
EC3648													C
EC3753													C
EC3785													C
EC3928													C
EC4018													C
EC5087													C
EC5243													C
EC11460													C
	481	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
H515b	GTTATAACAGCATCAACTTTTTCATGTGCTGCGAGTAATAATTTACCGACAATCTTTTAACTCTCTTTAGAAATGTGACTACTTTTATCATAATTACGGTATCCTCAATTACAAGTATT												
pmk5													
EC281													
EC1591													
EC2711													
EC3096													
EC3647													
EC3648													
EC3753													
EC3785													
EC3928													
EC4018													G
EC5087													
EC5243													
EC11460													
	601	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720
H515b	GTGGTATTATGATAGCACTTTATTCAGCTATATCCTCTCTTGTGCTGCTATGAGCTTTGTTTGTGCTAAATTTGATTATTATTTGCAATCAATCCAGTTGCTCAAAATTTGGTTGGCTA												
pmk5										A			
EC281										A			
EC1591										A			
EC2711										A			
EC3096										A			
EC3647										A			
EC3648										A			
EC3753										A			
EC3785										A			
EC3928										A			
EC4018										A			
EC5087										A			
EC5243										A			
EC11460										A			G

	721	730	740	750	760	770	780	790	800	810	820	830	840
H515b	AATATACCTTGATGCTTTATTTATTTATTTACATGCGTTATAGAAATGCAATTGATAGACAGATAAATATAAATATATTAACGCGAATTATTTGCTTGGTTCTGTTATTCATCTGTTTC												
pmk5	-----												
EC281	-----												
EC1591	-----												
EC2711	-----												
EC3096	-----												
EC3647	-----												
EC3648	-----												
EC3753	-----												
EC3785	-----												
EC3928	-----												
EC4018	-----												
EC5087	-----												
EC5243	-----												
EC11460	-----												

	841	850	860	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960
H515b	AGTGGATCGATTACTTTTCTGGCTCGCGTGTGTTTTTATTTTACCTTTGTAGGTGTTTATATATACTGCTATTCAATTAATGACAAGACCCCGCGGCTATTGCTATTAATAATTTCAAT												
pmk5	A-----T-----												
EC281	A-----T-----												
EC1591	A-----T-----												
EC2711	A-----T-----												
EC3096	A-----T-----												
EC3647	A-----T-----												
EC3648	A-----T-----												
EC3753	A-----T-----												
EC3785	A-----T-----												
EC3928	A-----T-----												
EC4018	A-----T-----												
EC5087	-----												
EC5243	A-----T-----												
EC11460	A-----T-----												

	961	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080
H515b	ACGTTAGTATTGGCTGCCITTTGTTAATGTAAGTACTTTTATTTGAACITTTGCATCCTATTTTAGAAATGAGCAAGCCCCGTTGGGTTTTATAATATGAACITTTCAATTTTTAACACATTT												
pmk5	-----G-----												
EC281	-----												
EC1591	-----												
EC2711	-----												
EC3096	-----												
EC3647	-----												
EC3648	-----												
EC3753	-----G-----												
EC3785	-----												
EC3928	-----												
EC4018	-----												
EC5087	-----												
EC5243	-----												
EC11460	-----												

	1081	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1149
H515b	AATGATAATTATCTTAGAACGAAACGCATACGATAAATATTTTAAAGGAATGCAGGCGACGCTGGATTAA							
pmk5	-----A-----							
EC281	-----A-----							
EC1591	-----A-----							
EC2711	-----A-----							
EC3096	-----A-----							
EC3647	-----A-----							
EC3648	-----A-----							
EC3753	-----A-----							
EC3785	-----A-----							
EC3928	-----A-----							
EC4018	-----A-----							
EC5087	-----A-----							
EC5243	-----A-----							
EC11460	-----A-----							

図1 供試14株の*E. coli* O103 O-antigen polymerase遺伝子塩基配列

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
H515b	MYILSMAIPLFFISLCWHRFSHOTQVAFRLLFIVFFSLSFSSYYTNGVDWSVYYLRFIEDEGLFTSFEGFVILKLLIVSDDNFGLAIIILYYFLCFVLLSLIKKYKVNEPLFLGCLL												
pmk5	-----E-----V-----W-----												
EC281	-----E-----												
EC1591	-----E-----												
EC2711	-----E-----												
EC3096	-----E-----												
EC3647	-----E-----												
EC3648	-----E-----												
EC3753	-----E-----												
EC3785	-----E-----												
EC3928	-----E-----												
EC4018	-----E-----												
EC5087	-----E-----												
EC5243	-----E-----												
EC11460	-----E-----												

	121	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
H515b	LLFGYNLFLEQLRQLLACIVFYAMLLYNQNKNLIELCIVITASTFHVSAVILPTIFLISFRNVTTFIITVSSITSIVVFMIALYSAISSLAAMSFVFAKIDYYLHQYPPVLFNGWL												
pmk5	-----S-----N-----												
EC281	-----S-----N-----												
EC1591	-----S-----N-----												
EC2711	-----S-----N-----												
EC3096	-----S-----N-----												
EC3647	-----S-----N-----												
EC3648	-----S-----N-----												
EC3753	-----S-----N-----												
EC3785	-----S-----N-----												
EC3928	-----S-----N-----												
EC4018	-----S-----M-----N-----												
EC5087	-----S-----N-----												
EC5243	-----S-----N-----												
EC11460	-----S-----L-----N-----G-----												

	241	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
H515b	NILDALFILFYMYRNAIDRQININILTRIIFVGSVHLFSGSITFLARVCFYFYFVGVIYCYSLNDKTPRVFAIKNFNTLVLAAFVNVVLLNFASYFRNEQAPVGFYNNMFQFFNTF												
pmk5	-----T-----C-----												
EC281	-----T-----												
EC1591	-----T-----												
EC2711	-----T-----												
EC3096	-----T-----												
EC3647	-----T-----												
EC3648	-----T-----												
EC3753	-----T-----												
EC3785	-----T-----S-----												
EC3928	-----T-----												
EC4018	-----T-----												
EC5087	-----T-----												
EC5243	-----T-----												
EC11460	-----T-----												

	361	370	382
H515b	NDNYLRTNAYDKYFKGMQGSVD		
pmk5	-----N-----		
EC281	-----N-----		
EC1591	-----N-----		
EC2711	-----N-----		
EC3096	-----N-----		
EC3647	-----N-----		
EC3648	-----N-----		
EC3753	-----N-----		
EC3785	-----N-----		
EC3928	-----N-----		
EC4018	-----N-----		
EC5087	-----N-----		
EC5243	-----N-----		
EC11460	-----N-----		

図2 供試14株の*E. coli* O103 O-antigen polymeraseアミノ酸配列