

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

八柳 潤 大谷 勝実¹⁾ 齊藤志保子 今野 貴之

E. coli O103 : H8 H515b 株を使用して *E. coli* O103 O 抗原合成遺伝子オペロン全領域の塩基配列を解読し、O103 抗原特異的検出・同定 PCR 法用プライマーを設計した。O103 O 抗原合成遺伝子オペロンを含む11,950塩基の DNA 増幅断片を解析し O103抗原の生合成に関与していると考えられる O-antigen flippase と O-antigen polymerase 遺伝子を特定した。それらの遺伝子を標的とするプライマーセットを設計し、*E. coli* O103 : H8 H515b 株、*E. coli* O103: H2 PMK5株、県内で分離された EHEC O103および O103以外の血清型の対象株を使用して検討した結果、いずれのプライマーセットも O103抗原を特異的に検出・同定可能であることが確認された。O103特異的検出・同定用 PCR 法を確立したことにより、EHEC O103の検査精度の向上が期待される。

キーワード：*E. coli* O103 O 抗原合成遺伝子オペロン、*E. coli* O103 : H8 H515b 株、O-antigen flippase、O-antigen polymerase、O103特異的検出・同定用 PCR 法

I 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⁾。これらのうち EHEC O103 による感染事例は1996年に県内での発生が初めて確認され、国内で初めてとなる報告をして以来³⁾、毎年患者の発生が確認されている。また、EHEC O121は O157以外の EHEC としては唯一患者に溶血性尿毒症症候群を惹起することが確認された⁴⁾。従って、これらの血清型の EHEC を迅速、高精度に検出・同定することは感染症対策上も重要である。分離された EHEC の血清型を決定する際には市販の型別用血清キットが汎用されているが、現行のキットには O103、O121、O91用の型別血清は含まれていないために、当所ではこれらの血清を WHO の協力研究機関である Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark から輸入している。しかしながら、それらの血清は高価であると共に特異性が低いことを経験している。このため、我々は良質の国産型別血清の市販や、より適切な血清型の決定方法を開発する必要性を指摘してきた⁴⁾。

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、O121³⁾、O157⁵⁾、O111⁷⁾、O91⁸⁾ 抗原を特異的に検出可能な PCR 法が報告されている。当所においてもこれらの PCR 法を導入し、これらの EHEC 感染事例発生時の行政検査に応用することにより検査精度の向上を実現した。しかしながら、*E. coli* O103 O 抗原合成遺伝子オペロンの塩基配列は解読されていないため、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年度に実施した調査研究事業「腸管出血性大腸菌の感染疫学解明に関する調査研究」⁹⁾の中で *E. coli* O103 O 抗原合成遺伝子オペロンの塩基配列解読を実施し、O103 抗原特異検出用 PCR 法の確立を試みたのでその成果の概要を報告する。

II 方 法

1. 供試菌株

E. coli O103 O 抗原合成遺伝子オペロンの塩基配列解読には Statens Serum Institut の Dr. Flemming Scheutz から購入した、*E. coli* O103の血清型参照用標準菌株である *E. coli* O103 : H8 H515b 株を供試した（表1）。設計したプライマーを使用した PCR 法の特異性の確認には表1に示す大腸菌菌株を使用した。

2. *E. coli* O103 O 抗原合成遺伝子オペロンの増幅

E. coli O103 : H8 H515b 株の染色体遺伝子を High Pure PCR-Template-Preparation Kit（Roche）により抽出・精製した。精製した染色体遺伝子をテンプレー

¹⁾ 山形県衛生研究所

表 1 供試菌株一覧

血清型	菌株番号	入手先	備 考
O103 : H8	H515b	Statens Serum Institut	血清型参照用標準菌株
O103 : H2	PMK5	Dr. E. Oswald ^{a)}	Intimin ϵ 型標準菌株
O103 : H2	EC281	県内臨床分離株	1996年家族内感染事例
O103	EC3096	県内保菌者分離株	1999年無症状保菌者
O103	EC3647	県内臨床分離株	2000年散発下痢症患者
O103	EC3928	県内臨床分離株	2000年散発下痢症患者
O103	EC4018	県内臨床分離株	2000年家族内感染事例
O103	EC5087	県内臨床分離株	2001年家族内感染事例
O103	EC6121	県内臨床分離株	2002年散発下痢症患者
O103	EC7401	県内臨床分離株	2002年散発下痢症患者
O103	EC7409	県内臨床分離株	2003年散発下痢症患者
O103	EC8960	県内臨床分離株	2003年散発下痢症患者
O121 : H10	39W	Statens Serum Institut	血清型参照用標準菌株
O123 : H16	43W	Statens Serum Institut	血清型参照用標準菌株
O91 : NM	H307b	Statens Serum Institut	血清型参照用標準菌株
O145 : NM	E1385(3)	Statens Serum Institut	血清型参照用標準菌株
O153 : H7	14097	Statens Serum Institut	血清型参照用標準菌株
O165 : NM	3866-54	Statens Serum Institut	血清型参照用標準菌株
OX3		Statens Serum Institut	血清型参照用標準菌株
O26	H19	Dr. E. Oswald ^{a)}	Intimin β 型標準菌株
O157 : H7	EDL931	Dr. Y. Kudoh	
O157 : H7	EDL933	Dr. James B. Kaper ^{b)}	1982年米国集団事例

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

b) Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, USA

トとして、Expand Long Template PCR System (Roche) により *E. coli* O103 O 抗原合成遺伝子オペロンを増幅した。プライマーには当該遺伝子の 5' Conserved region である Jump Start と 3' Conserved region である Gnd を標的とする、Fratamiko らが報告³⁾した Jump Start Sens primer と Gnd Antisens primer を使用した。

3. *E. coli* O103 O 抗原合成遺伝子オペロンの塩基配列解析

E. coli O103 : H8 H515b 株の O103 O 抗原合成遺伝子オペロン全長を含む DNA 増幅断片をテンプレートとして、最初に Jump Start Sens primer と Gnd Antisens primer を使用したダイレクトシーケンスにより塩基配列を解読した。解読された配列に基づき、約600塩基内側に増幅用プライマーを設計した。それらのプライマーを使用して *E. coli* O103 O 抗原合成遺伝子オペロンを再び増幅し、当該プライマーを使用したダイレクトシーケンスにより塩基配列を解読した。この方法を繰り返し、16回の解析により *E. coli* O103 O 抗原合成

遺伝子オペロン全領域の塩基配列が解読された。

4. *E. coli* O103 O 抗原合成遺伝子オペロンの構成遺伝子の特定

Open Reading Frame (ORF) の特定には DNASIS software (Hitachi Software Engineering Co.) を使用した。特定された ORF の塩基配列を同 software によりアミノ酸配列に変換した後、Updated version of the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program at the National Center for Biotechnology Information server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) online search によりコードされているタンパク質を特定した。

III 結 果

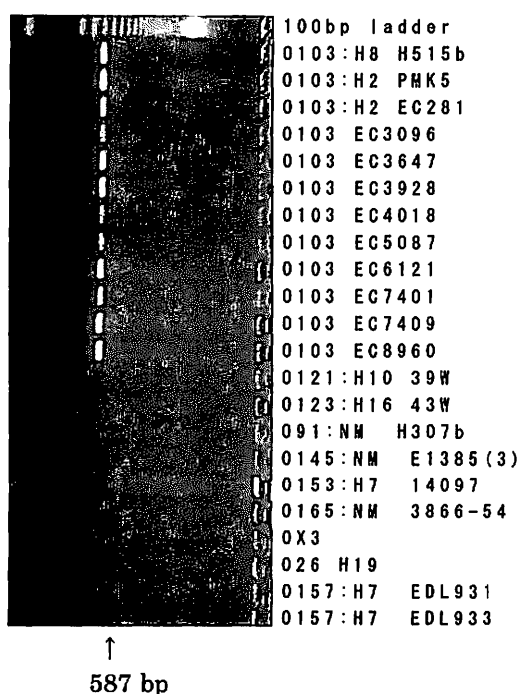
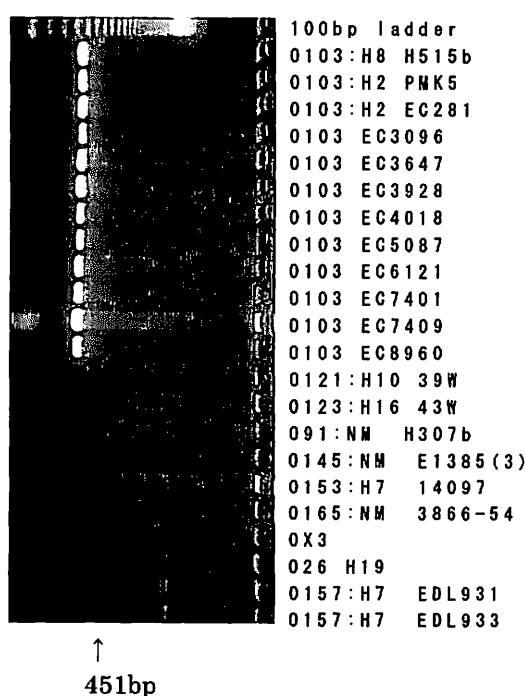
Expand Long Template PCR System (Roche) を使用した PCR により、O103 O 抗原合成遺伝子オペロン全長を含む11,950塩基の DNA 増幅断片が得られ、その塩基配列を解析した結果、表 2 に示す12の ORF が特定された。これらのうち、O103抗原の特異的生合成に

表2 *E. coli* O103 O 抗原合成遺伝子オペロンの構成遺伝子

塩基番号	ORF 名称	遺伝子サイズ	タンパク質の名称
269-1153	ORF1	885 bp	dTDP-D-glucose 4, 6-dehydratase
1150-2022	ORF2	873 bp	dTDP-glucose pyrophosphorylase
2015-2422	ORF3	408 bp	dTDP-6-deoxy-3, 4-keto-hexulose isomerase
2415-2948	ORF4	534 bp	Butyl transferase
2960-4066	ORF5	1107 bp	Amino transferase
4054-5319	ORF6	1266 bp	O-antigen flippase
5323-6309	ORF7	987 bp	Glycosyl transferase
6312-7202	ORF8	891 bp	Glycosyl transferase
7202-8350	ORF9	1149 bp	O-antigen polymerase
8353-9444	ORF10	1092 bp	Glycosyl transferase
9630-10751	ORF11	1122 bp	Galactosyl transferase
10830-11858	ORF12	1029 bp	UDP-galactose-4-epimerase

関与している遺伝子は ORF 6 の O-antigen flippase (*wzx*) と ORF9 の O-antigen polymerase (*wzy*) であると考えられた。実際、BLAST による Similarity search において、これらの ORF とホモロジーが高い遺伝子は検出されなかった。このことから、*wzx* の 587 bp を標的とする *rfb*O103 *wzx*F プライマーと *rfb*O103 *wzx*R プライマーを、また、*wzy* の 451bp を標的とする *rfb*O103 *wzy*F プライマーと *rfb*O103 *wzy*R プライマーを設計して *E. coli* O103 O 抗原合成遺伝子オペロンの

の特異的検出 PCR 法の開発を試みた。その結果、図 1 に示すとおり、いずれのプライマーセットを使用しても *E. coli* O103 : H8 H515b 株、*E. coli* O103 : H2 PMK5 株および県内で分離された EHEC O103 臨床分離株から設計値と同サイズの増幅断片が得られることが確認された。これに対して、対象としたその他の血清型の株からは増幅断片が得られなかった。以上の結果は、今回設計したプライマーセットが EHEC O103 の特異的検出・同定に実用可能であることを示していた。

図1 *wzx* および *wzy* を標的とした O103 抗原特異検出・同定 PCR 法の特異性 (1.5% Agarose gel)O-antigen flippase *wzx*O-antigen polymerase *wzy*

IV 考 察

EHEC O103は欧州諸国において以前から下痢症患者からの分離頻度が高く、溶血性尿毒症症候群を惹起することが報告されている¹⁰⁾が、国内における分離報告は非常に少ない。その理由の一つは、O103型別用血清が市販されていないために医療機関や臨床検査機関では本菌を検出することができないことであると推察される。また、型別用血清が市販されていないために、地方衛生研究所においてもO103の同定は困難である。このように、現在、国内におけるEHEC O103の検査体制は整っていないがたい状況にある。従って、国内における本菌感染者の発生実態は明らかではない。EHEC O103を医療機関において検出するための方法としては、検査精度に大きな問題があるものの、EHECが産生するエンテロヘモリジンを検出するEHT培地を使用するスクリーニング検査方法があるが、スクリーニング陽性となった株についてVT遺伝子の存在を確認する確定検査を実施する必要がある。秋田県においては、医療機関検査室と当所の連携が確立されており、EHT培地スクリーニング検査陽性株については全て当所でVT遺伝子保有の確認検査を実施している。これにより、秋田県では年間数事例のEHEC O103感染事例が確認されている。このことは、秋田県だけではなく、国内においてもEHEC O103感染事例は発生していることを示唆しており、国内における本菌の検査体制を整備する必要がある。分離されたEHECの血清型を決定するための方法としては、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O121⁵⁾、O157²⁾、O111⁷⁾、O91⁸⁾抗原特異検出・同定用PCRを導入し、これらの血清型の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。実際、EHEC O121の型別に使用する型別用血清は、O103型別用血清と同様に、Statens Serum Institutからの輸入品であり、特異性に問題があるが、本菌の血清型を決定する際に遺伝子学的方法を併用することにより検査精度が向上することを確認している。今回、O103抗原特異検出・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が向上するものと推察される。さらに、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る。一方、国内の医療機関や臨床検査機関においてEHEC O103等を検査可能とするためには、良質・安価な国産型別血清の市販が必須である。

V ま と め

- *E. coli* O103の血清型参照用標準菌株である *E. coli* O103 : H8 H515b 株を使用して *E. coli* O103 O 抗原合成遺伝子オペロン全領域の塩基配列の解読に成功し、*E. coli* O103 O 抗原合成遺伝子オペロンが12のORFから成ることを明らかにした。
- O103抗原の特異的生合成に関与すると考えられるO-antigen flippase (*wzx*) と O-antigen polymerase (*wzy*) 遺伝子を特定し、*wzx* の587bpを標的とする *rfb*O103 *wzx*F プライマーと *rfb*O103 *wzx*R プライマーを、また、*wzy* の451bpを標的とする *rfb*O103 *wzy*F プライマーと *rfb*O103 *wzy*R プライマーを設計した。
- *E. coli* O103 : H8 H515b 株、*E. coli* O103 : H2 PMK 5株、県内で分離されたEHEC O103臨床分離株およびその他の血清型の対象株を使用して検討した結果、いずれのプライマーセットを使用してもO103抗原を特異的に検出・同定可能であることが確認された。
- O103特異検出・同定用PCR法を確立したことにより、EHEC O103の検査精度の向上が期待される。さらに、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る。

VI 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) Yatsuyanagi, J. et al. A case of Hemolytic-uremic syndrome associated with Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O121 infection caused by drinking water contaminated with bovine feces. Jap. J. Infect. Dis., 2002 ; 55 : 174-176.
- 5) Fratomiko, 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.
- 6) 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.
- 7) Paton, A.W. and Paton, J.C. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Mutiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. J. Clin. Microbiol., 1998 ; 36 : 598–602.
- 8) 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.
- 9) 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, 2005 ; 48 : 45–53.
- 10) Caplioli, A. and Tozzi, A.E. Epidemiology of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections in Continental Europe. in *Escherichia coli* O157 : H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains. Kaper, J.P. and O'Brien, A.D. ed., American Society for Microbiology Press, Washington D.C., 1998 : 38–48.