

## 論 文 要 旨

**Diversification of *Escherichia albertii* H-antigens and  
Development of H-Genotyping PCR**

新興下痢症病原体 *Escherichia albertii* における  
鞭毛 H 抗原遺伝子型の多様性と遺伝子型別法の開発

中 江 広 治

**【序論及び目的】**

*Escherichia albertii* は、*Escherichia* 属に属するグラム陰性通性嫌気性桿菌で、*Escherichia coli* の近縁菌種として 2003 年に新たに命名された新興下痢症病原体の一つである。本菌による複数のアウトブレイクが報告されており、集団感染の探知や疫学情報のサーベイランスのため、型別法の開発は急務である。*E. coli* では O 抗原と H 抗原による型別法が既に用いられており、我々の研究グループでは、近年 *E. albertii* の O 抗原コード領域の多様性を明らかにし、その多様性を利用した O 抗原遺伝子型別法 (EAO-genotyping PCR) を開発したが、H 抗原 (鞭毛遺伝子 *fliC* が規定する) については解析されておらず、型別法も未だ構築されていない。今回、これまでにゲノム配列が決定されている *E. albertii* 243 株の *fliC* 遺伝子を既知の *E. coli* の 53 種の *fliC* 遺伝子と比較し、*fliC* 遺伝子の塩基配列の多様性を解明するとともに、243 株の系統関係と *fliC* 遺伝子型との相関を明らかにした。さらに、multiplex PCR を利用した *E. albertii* の迅速 H 抗原遺伝子型別法 (EAH-genotyping PCR) の開発を試みた。

**【材料及び方法】**① *fliC* 遺伝子の系統解析

材料：公共データベースに登録されている 243 株の *E. albertii* のゲノム配列と既知の *E. coli* H 抗原コード遺伝子 (H1-H56)

方法：*E. albertii* CB9786 株の *fliA* と *fliD* の配列を blastn で検索 (E-value の閾値を 0.01) し、243 株の *E. albertii* の *fliC* 遺伝子を含む領域を抽出した。同定された各株の *fliC* 遺伝子の多様性を検討し、さらに同定された *fliC* 遺伝子配列と *E. coli* H 抗原遺伝子配列について MEGA6 を用いて系統解析し、Neighbor-joining tree を作成した。

## ② multiplex EAH-genotyping PCR の開発

材料：*E. albertii* H-genotype (EAHg) の *fliC* 遺伝子とアミノ酸配列、*Salmonella* Typhimurium における flagellin (鞭毛タンパク質) のアミノ酸配列および日本国内で分離された *E. albertii* 92 株

方法：EAHg の代表株と *S. Typhimurium* の flagellin のアミノ酸配列を clustalW で比較し、機能ドメインの保存性を調べた。さらに EAHg の代表株の塩基配列を clustalW で比較し、得られた結果から EAHg を同定できる multiplex PCR 系を開発した。開発した PCR 系を日本国内で分離された *E. albertii* 92 株を用いて検証した。

### ③ EAHg の分布

材料：243 株の *E. albertii* のゲノム配列と O 抗原遺伝子型 (EAOg) および本研究で同定した EAHg

方法：Prokka で遺伝子配列の注釈付け (アノテーション) を行い、Roary で core gene を同定 (cut-off 値 90%) し、SNP を抽出した。Core gene の配列が同じ株を除き、Maximum-likelihood (ML) Tree を作成し、EAOg および EAHg をマッピングした。

## 【結果】

### ① *fliC* 遺伝子の系統解析

*E. albertii* 243 株のうち、231 株で *fliC* 遺伝子が同定された。同定された 231 株の *fliC* 遺伝子配列をクラスタリング解析した結果、73 種類に分類され、そのうち 42 種は単一株 (singleton) で、31 種は複数株が同一配列だったため cluster 1-31 とした。73 種の *fliC* 遺伝子と既知の *E. coli* の H 抗原型の 53 種の *fliC* 遺伝子について系統解析を行ったところ、*E. albertii* は *E. coli* とは別の単系統の枝を形成した。*E. albertii* の *fliC* 遺伝子について塩基配列の相同性から 4 つのグループに分け、それぞれ *E. albertii* H-genotype1-4 (EAHg1-EAHg4) と命名した。

### ② multiplex EAH-genotyping PCR の開発

*E. albertii* の H 抗原は *S. Typhimurium* の flagellin と比較しても内部ドメインである D0、D1 ドメインは高度に保存され、表面ドメインである D2、D3 ドメインは多様性があった。EAHg1-EAHg4 の塩基配列レベルでも同様だったため、4 種の EAHg の高度に保存された配列から EAHg 共通プライマーとなる Forward primer、多様性のある配列から各 EAHg 特異的プライマーとなる Reverse primer を設計した。4 種類の EAHg の代表株を用いて設計したプライマーセットの特異性を検証した結果、各遺伝子型で標的とするサイズの PCR 産物が得られ、*E. albertii* 92 株の分離株はすべて EAHg1-EAHg4 のいずれかに分類できた。対象とした 92 株中 EAHg4 (48 株, 43.6%) が最多で、公共データベースに登録されている 243 株の *E. albertii* においても EAHg4 (109 株, 44.9%) が最多であり、*E. albertii* の *fliC* 遺伝子は EAHg4 が主流だった。

### ③ EAHg の分布

非常に近縁である株の EAHg は同じであったが、各 EAHg は複数の系統に分布しており、EAHg と EAOg の分布にも相関はなかった。

## 【結論及び考察】

*E. albertii* においても、*E. coli* の *fliC* 遺伝子と同様に flagellin の内部ドメインである D0、D1 ドメインの配列は高度に保存され、表面ドメインである D2、D3 ドメインの配列は多様性があったことから、*fliC* 遺伝子は宿主における、ある種の免疫学的選択あるいは環境的選択を受けていると考えられる。また、*E. albertii* の *fliC* 遺伝子を解析した結果 H 抗原型は 4 種類しか同定されず、*E. coli* の H 抗原型が 53 種類あることと比較し、極めて多様性が低いことがわかった。このことは *E. albertii* が限られた自然宿主や環境においてのみ生息し、鞭毛が生活サイクルの限られた段階で発現、機能している可能性を示唆していると考えられ、*E. albertii* の鞭毛が低温かつ限られた栄養条件下のみで形成されるという知見からも裏付けられる。本研究によって *E. albertii* における 4 種類の H 抗原型をもとに構築した EAH-genotyping PCR 系を開発することができた。EAH-genotyping PCR 系は EAO-genotyping PCR 系と組み合わせて使用することにより、*E. albertii* による感染症の疫学研究に有用なツールになると考えられる。今後さらに解析する株を増やし、EAHg 型の多様性のさらなる解析や新規の EAHg 型の有無を検証する必要がある。