

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 年度～2009 年度

課題番号：20790338

研究課題名 (和文) 腸管出血性大腸菌の新規 DNA 修復機構の同定と機能解析

研究課題名 (英文) Identification and characterization of a new DNA double strand break repair pathway in enterohemorrhagic *Escherichia coli*

研究代表者

大岡 唯祐 (OOKA TADASUKE)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：50363594

研究成果の概要 (和文)：腸管出血性大腸菌においてトランスポゾン的一种である挿入配列 (IS) の excision を促進する新規因子として、IEE (IS excision enhancer) を同定した。また、腸管出血性大腸菌 O157 における IEE の機能解析から、その反応が IS3 にコードされている転移酵素との相互作用により起こることを明らかにした。加えて、この IEE のホモログが、腸管出血性大腸菌だけでなく系統関係を超えた様々な菌種に存在し、遺伝子水平伝播により多種多様な菌種にその分布を拡大したことを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：We identified a new factor that promote the excision of insertion sequence element (IS) in enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and named the protein as IS-excision enhancer (IEE). From the functional analyses, IEE promote the excision of IS3 members from the *Escherichia coli* O157 genome by combined action with IS transposase. In addition, homologs of IEE were widely distributed in a variety of bacterial species by horizontal gene transfer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：微生物、細菌、ゲノム、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

全ての生物にとって DNA 二本鎖切断 (DSB) は、生命の維持に関わる重篤な DNA 損傷である。その修復機構として、大腸菌では RecA 組換え酵素を介した相同組換え機構 (homologous recombination) は存在するが、相

同性のない切断部位を直接結合修復する末端修復機構 (non-homologous end-joining [NHEJ] system) は存在しないとされている。申請者は、腸管出血性大腸菌 (EHEC) のゲノム多様性解析から、O157 や O26 などの腸管出血性大腸菌に、既知の NHEJ 関連遺伝子

とは異なる全く新しい NHEJ 機構が存在する可能性を見出していた。EHEC のような病原菌に NHEJ 機構が存在することは、DNA 損傷を誘発する環境要因や変異原に対する抵抗性因子として、環境中での EHEC の生存に関係している可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では、O157 の血清型を持つ株を含む EHEC に存在する新規 NHEJ 関連因子を同定し、その修復機構の分子メカニズムと生理的な役割を明らかにすること、さらに、同定された NHEJ 関連因子について、様々な菌種における保有状況を調べることが目的とした。

3. 研究の方法

1) NHEJ 関連遺伝子の同定：

挿入配列の一つである IS3 ファミリーに属する IS は挿入部位から excision する際に DSB が形成されると考えられている。このことから、IS3 ファミリーの一つである IS629 の excision 頻度（つまり、DSB 修復を起こす頻度）の違いを以下に示す excision 解析法により検定した。

IS629 の転移酵素 (Tnp) の遺伝子をテトラサイクリン (Tc) 耐性遺伝子と入れ替えた IS629-Tcr がアンピシリン (Ap) 耐性遺伝子内に挿入されたプラスミド

pER-ISTC を各株に導入し、別のプラスミド pTNPs-AB から供給した Tnp による IS629-Tcr の excision と repair の頻度を Ap 耐性の獲得を指標にして検出した (図 1)。解析対象には、堺株を含む O157 株 9 株、他の EHEC 21 株 (O26、O111、O103 の合計 21 株) を使い、excision と repair の頻度の高い株を抽出した。

さらに、excision 解析に用いた 30 株のマイクロアレイによる遺伝子レパートリー解析の結果から頻度の高い株に特異的に存在する遺伝子群の同定を行った。

2) 遺伝子破壊株を用いた excision 頻度の検定：

項目 1)において同定された遺伝子群について、O157:H7 堺株の遺伝子破壊株を作製し、excision 頻度検定法により、野生型と比べて頻度が低下する、つまり、修復が起こる頻度が低下する遺伝子を同定した。

3) 新規 NHEJ 関連候補遺伝子の機能解析：

候補 ORF を発現ベクターにクローニングして候補蛋白質を精製し、in vitro で NHEJ に関わる活性を調べた。また、候補蛋白質が単独で NHEJ に作用するかどうか等を調べた。

また、腸管出血性大腸菌 O157:H7 堺株に関して、IEE 及び IS 転移酵素が存在する in vivo 環境下における IS629 の excision 現象について、東洋紡との共同開発 (特願 2006-155279) で作製した O157 IS-printing system を用いて検定した。さらに、excision が生じた部位周辺の配列を決定し、IEE によるゲノム再編成への影響を調べた。

4) 新規 NHEJ 関連候補遺伝子の菌種間における分布：

同定した候補遺伝子についての相同性検索を行い、どのような菌種が保有しているか、また、保有する菌種については、ゲノム上どのような領域に存在するかを調べた。さらに、ホモログ間での相同性と機能ドメインの有無についても解析した。

4. 研究成果

1) NHEJ 関連遺伝子の同定：

30 株の EHEC についての excision 解析から、9 株が高い頻度を示すことが明らかになった。さらに、マイクロアレイによる遺伝子レパートリー解析の結果との比較から、頻度の高い 9 株に特異的に存在する 31 遺伝子を同定した。

2) 遺伝子破壊株を用いた excision 頻度の検定：

項目 1)で同定された 31 遺伝子について、大腸菌研究で汎用されている Wanner 法を用いて遺伝子破壊株を作製した。これらの株について excision 頻度検定を行った結果、遺伝子破壊により頻度が低下する遺伝子を 1 個同定することに成功した。

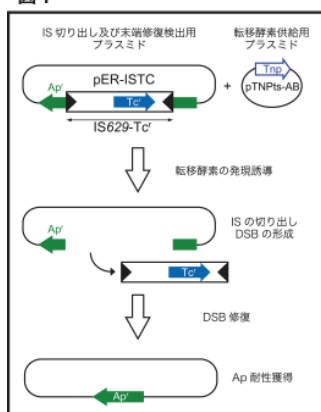
3) 新規 NHEJ 関連候補遺伝子の機能解析：

項目 2) で同定された遺伝子を発現ベクターにクローニングして精製を試みたが、可溶性蛋白質としての精製が困難であったため、O157 堺株や非病原性大腸菌 K-12 株において発現させ、NHEJ の分子メカニズム解析を進めた。その結果、この蛋白質が IS の転移酵素との相互作用により機能し、この蛋白質が存在することで挿入配列の excision が促進されることが明らかとなった。これまで、このような因子は同定されておらず、全く新しい発見であることから、この蛋白質を IEE (IS excision enhancer) と名付けた。

また、IS-printing system を用いた IS629 excision 現象の解析とそれに続くゲノム構造解析から、IEE が IS の excision を介して様々なタイプの欠失を引き起こしていることも明らかとなった。

今後は、IEE が IS とどのような分子メカニズムで機能するかを調べると共に、二本鎖 DNA 切断作用を示す変異原等を用いて、挿

図 1



IS の excision 以外の NHEJ における IEE の役割についても検討する予定である。

4) 新規 NHEJ 関連候補遺伝子の菌種間における分布:

IEE についての同源性検索の結果、大腸菌においては、全く進化系統の異なる株に存在し、その局在は O157:H7 堺株においてファージ様配列の一つとして同定されている SpLE1 領域であることが明らかとなった。また、多種多様な菌種にそのホモログが存在すること、さらには、ホモログ間で保存性の高い領域に DEXD ヘリケースモチーフなどの DNA 結合性の機能ドメインが存在することも明らかとなった。加えて、ホモログを保有する株についての詳細なゲノム解析から、この遺伝子がファージやプラスミドなどの可動性遺伝因子を介した水平伝播によりその分布を拡げた可能性を見出された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① T. Ooka, Y. Ogura, Md. Asadulghani, M. Ohnishi, K. Nakayama, J. Terajima, H. Watanabe, T. Hayashi: Inference of the impact of insertion sequence (IS) elements on bacterial genome diversification through analysis of small-size structural polymorphisms in *Escherichia coli* O157 genomes. *Genome Res.* 査読有 19:1809-1816, 2009.
- ② T. Ooka, J. Terajima, M. Kusumoto, A. Iguchi, K. Kurokawa, Y. Ogura, M. Asadulghani, K. Nakayama, K. Murase, M. Ohnishi, S. Iyoda, H. Watanabe, T. Hayashi: Development of a multiplex PCR-based rapid typing method 1 for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *J. Clin. Microbiol.* 査読有 47(9):2888-2894, 2009.
- ③ Y. Ogura, T. Ooka, A. Iguchi, H. Toh, Md. Asadulghani, K. Oshima, T. Kodama, H. Abe, K. Nakayama, K. Kurokawa, T. Tobe, M. Hattori, T. Hayashi: Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 査読有 106(42):17939-17944, 2009.
- ④ Md. Asadulghani, Y. Ogura, T. Ooka, T. Itoh, A. Sawaguchi, A. Iguchi, K. Nakayama, T. Hayashi: The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage-prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants. *PLoS Pathog.* 査読有 5(5):e1000408, 2009.
- ⑤ A. Miyahara, N. Nakanishi, T. Ooka, T. Hayashi, N. Sugimoto, T. Tobe: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector EspL2 induces actin microfilament aggregation through annexin 2 activation. *Cell Microbiol.* 査読有 11(2): 337-350, 2009.

⑥ A. Iguchi, N.R. Thomson, Y. Ogura, D. Saunders, T. Ooka, I.R. Henderson, D. Harris, Asadulghani, K. Kurokawa, P. Dean, B. Kenny, M.A. Quail, S. Thurston, G. Dougan, T. Hayashi, J. Parkhill, *G. Frankel: The complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *E. coli* O127:H6 strain E2348/69. *J. Bacteriol.* 査読有 191(1):347-354, 2009.

⑦ K. Oshima, H. Toh, Y. Ogura, H. Sasamoto, H. Morita, S.-H. Park, T. Ooka, S. Iyoda, T.D. Taylor, T. Hayashi, K. Itoh, M. Hattori: Complete genome sequence and comparative analysis of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE11 isolated from a healthy adult. *DNA Res.* 査読有 15(6):375-386, 2008.

⑧ Y. Ogura, H. Abe, K. Katsura, K. Kurokawa, Asadulghani, A. Iguchi, T. Ooka, K. Nakayama, A. Yamashita, M. Hattori, T. Tobe, T. Hayashi: Systematic identification and sequence analysis of the genomic islands of the enteropathogenic *Escherichia coli* strain B171-8 by the combined use of Whole Genome PCR Scanning and fosmid mapping. *J. Bacteriol.* 査読有 190(21):6948-6960, 2008.

⑨ K. Nakayama, A. Yamashita, K. Kurokawa, T. Morimoto, M. Ogawa, M. Fukuhara, H. Urakami, M. Ohnishi, I. Uchiyama, Y. Ogura, T. Ooka, K. Oshima, A. Tamura, M. Hattori, T. Hayashi: The whole-genome sequencing of the obligate intracellular bacterium *Orientia tsutsugamushi* revealed massive gene amplification during reductive genome evolution. *DNA Res.* 査読有 15:185-199, 2008.

⑩ T. Yano, K. K. Moe, K. Yamazaki, T. Ooka, T. Hayashi, N. Misawa: Identification of candidate pathogens of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle from quantitative 16S rRNA clonal analysis. *Vet. Microbiol.* 査読有 in press.

⑪ 小椋義俊, 大岡唯祐, 林哲也: ゲノム解析から見えてきた腸管出血性大腸菌の毒素及び病原因子の新知見, 化学療法の領域 査読無 25(5):767-777, 2009.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 大岡唯祐, 小椋義俊, 中山恵介, 小林秀樹, 林哲也: 腸管出血性大腸菌(EHEC)及び腸管病原性大腸菌(EPEC)における3型分泌系(T3SS)の進化, 第83回日本細菌学会総会, 3/27-29, 2010, 横浜.
- ② 大岡唯祐, 小椋義俊, 中山恵介, 小林秀樹, 林哲也: 病原性大腸菌における3型分泌系(T3SS)の進化, 第4回ゲノム微生物学会年会, 3/7-9, 2010, 福岡.
- ③ 大岡唯祐, 小椋義俊, 村瀬一典, Islam Md. Rakibul, 中山恵介, 林哲也: 腸管出血性大腸菌(EHEC)及び腸管病原性大腸菌(EPEC)にお

ける III 型分泌系コード領域 (LEE) の構造比較解析. 若手研究者育成のためのワークショップ～若手コロセウム (III) in 宮崎～.

10/27, 2009. 宮崎

④ 大岡唯祐, 小椋義俊, 井口純, Md Asadulghani, 中山恵介, 小林秀樹, 寺嶋淳, 渡邊治雄, 林哲也: 腸管出血性大腸菌(EHEC)及び腸管病原性大腸菌(EPEC)における LEE 領域の多様性解析. 日本分子生物学会 第 9 回春季シンポジウム, 5/11, 2009, 宮崎.

⑤ 大岡唯祐, 小椋義俊, 井口純, Asadulghani, 中山恵介, 小林秀樹, 寺嶋淳, 渡邊治雄, 林哲也: 腸管出血性大腸菌(EHEC)及び腸管病原性大腸菌(EPEC)における LEE 領域の多様性解析. 第82回日本細菌学会総会, 3/12-14, 2009, 名古屋

⑥ 楠本正博, 大岡唯祐, 西矢芳昭, 小椋義俊, 林哲也: STECにおいてISの転移に関与する因子の同定. 第82回日本細菌学会総会, 3/12-14, 2009, 名古屋

⑦ 大岡唯祐, 小椋義俊, 井口純, Asadulghani, 中山恵介, 小林秀樹, 寺嶋淳, 渡邊治雄, 林哲也: 病原性大腸菌の III 型分泌システムをコードする LEE 領域に関する多様性解析. 第3回ゲノム微生物学会年会, 3/5-7, 2009, 東京

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 1 件)

名称: 微生物の識別方法、及び該方法に使用するプライマー並びに識別キット

発明者: 大岡唯祐、林哲也

権利者: 大岡唯祐、林哲也

番号: 特願 2006-155279

出願年月日: 2006 年 6 月 2 日

国内外の別: 国内

[その他]

商品化された製品: O157 IS-printing system
(発売元: TOYOBO)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大岡 唯祐 (OOKA TADASUKE)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 5 0 3 6 3 5 9 4