

平成30年6月22日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08484

研究課題名(和文) ISが関与する新たなO157志賀毒素産生機構の解明

研究課題名(英文) Identification of an IS-related Shiga toxin-production system in O157

研究代表者

楠本 正博 (KUSUMOTO, Masahiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・上級研究員

研究者番号：40548210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：挿入配列(IS)は最も単純な可動性遺伝因子であり、腸管出血性大腸菌(EHEC) O157のゲノムには数多くのISが存在している。本研究では、O157ゲノムにおいて最も多いISであるIS629が、本菌の主要な病原因子である志賀毒素2型(Stx2)の産生にも関与することを明らかにした。O157においてStx2の産生はSOS応答およびそれに続くStx2ファージの誘導により促進されることが知られているが、IS629はSOS応答とは無関係にStx2およびStx2ファージを誘導した。本研究成果は、ISがその可動性によりゲノムを多様化するだけでなく、O157における毒素産生にも関与していることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Insertion sequence (IS) elements are the simplest mobile genetic elements, and there are many copies of IS elements in the genome of enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) O157. In this study, we showed that IS629, the most abundant IS elements in the O157 genome, was responsible for the production of Shiga toxin 2 (Stx2) which is the major virulence factor of EHEC. In O157, the production of Stx2 is known to be enhanced by the SOS response and following the Stx2 phage induction, but IS629 induced Stx2 and the Stx2 phage independently of SOS response. Our data suggest that IS elements promote not only bacterial genome diversification with their mobility but also toxin production in O157.

研究分野：細菌学

キーワード：腸管出血性大腸菌 O157 志賀毒素 IS629

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157 のゲノムは大腸菌に共通の基本骨格と主に外来性遺伝子からなる 0157 特異的な領域からなり、後者には病原因子の他に数多くの可動性遺伝因子 (MGE) が含まれている。ファージや挿入配列 (IS) などの MGE は、一般に、細菌が毒素などの病原因子や薬剤耐性因子を獲得するために重要な役割を果たすと考えられているが、進化系統解析と詳細な比較ゲノム解析を組み合わせた近年の研究により、特に IS629 がゲノム構造の変化を引き起こすことで 0157 ゲノムが多様性を獲得することが分かってきた (引用文献)。

(2) IS の研究は古くから行われており、ドナー DNA (転移元) から切り出された IS 分子が別の場所に転移するメカニズムの理解は進んでいる。その一方で、これまで「転移する際に IS が染色体から切り出されてしまうと細菌は生存できない」と考えられており、IS が切り出された後に残されるドナー DNA は何らかの方法で修復されることが予想されてきた。そこに関わる因子として、研究代表者らは、0157 ゲノムからの IS の切り出しを促進する IS-excision enhancer (IEE) を新たに発見した (図 1) (引用文献)。また、IEE は、0157 ゲノムが IS を介して多様性を獲得する際にも重要な役割を果たすと考えられている (引用文献)。

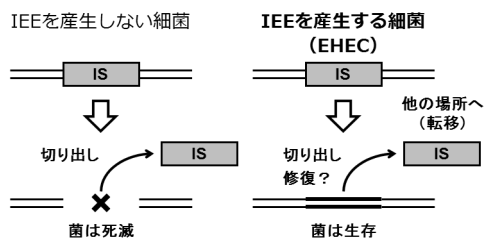


図1. ISの切り出しおよび転移

(3) EHEC の主要な病原因子である志賀毒素 (Stx) には Stx1 および Stx2 があり、両者をコードする遺伝子 (*stx1* および *stx2*) はそれぞれ染色体のプロファージ領域に存在する。0157 ではマイトマイシン C (MMC) を添加すると SOS 応答により Stx2 ファージが誘導され、*stx2* 遺伝子のコピー数および転写量が増えた結果、Stx2 の産生量が大きく増加する (引用文献)。一方、Stx1 の産生には *stx1* 遺伝子の上流にある Stx1 プロモーターが主に関わっており、Stx2 のようなファージの誘導はあまり起こらない (引用文献) など、Stx1 と Stx2 では毒素産生機構が異なることが知られている。

(4) EHEC で最初に解析された 0157 Sakai 株のゲノムには 25 種類、116 コピーの IS があり、中でも IS629 (過去には IS1203v と呼ばれていた) が最も多く、23 コピーが染色体およびプラスミド上に存在している (引用文

献)。0157 において IS629 はアクティブに転移しており、*stx* 遺伝子への IS629 の挿入により本遺伝子が不活性化された (すなわち完全な Stx が産生されない) 菌株の事例が、研究代表者らの報告 (引用文献) を機に数多く報告されている。また、IS629 の挿入により不活性化された *stx2* 遺伝子から IS629 が切り出され、本遺伝子が再活性化することも、研究代表者らにより報告されている (引用文献)。

2. 研究の目的

Stx は国内で継続的に年間 4,000 名前後の感染者が出ている EHEC の主要な病原因子の一つであり、毒性、作用機序、各種バリエーション (アミノ酸変異体) の存在、大腸菌やファージの遺伝学的系統との関連など様々な観点から精力的な研究が行われている。しかしこれまで、毒素産生と MGE である IS との関連を示した報告は、上述の *stx* 遺伝子への IS の挿入および切り出しによる遺伝子の不活性化および再活性化のみである。また、IS の研究も古くから行われているが、その MGE としての機能 (転移など) に関する報告がほとんどである。そこで本研究では、EHEC の病原性発現に関する新しい分子メカニズムを解き明かし、さらには自身の転移やゲノムの多様化など MGE として核酸配列の改変を引き起こすと考えられてきた IS の新たな一面を見出すことを目指し、0157 における IS629 と Stx 産生との未知な関連性の発見およびそのメカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) IS629 は、転移酵素 (TPase) をコードする遺伝子の両端に TPase 結合部位となる 25 bp の逆向き繰り返し配列 (IR) を持つ。転移の際には、発現した IS629 TPase が IR に結合し、IEE との協働によりゲノムから切り出され、TPase の働きにより IS629 の DNA が他の場所に挿入される (図 2)。

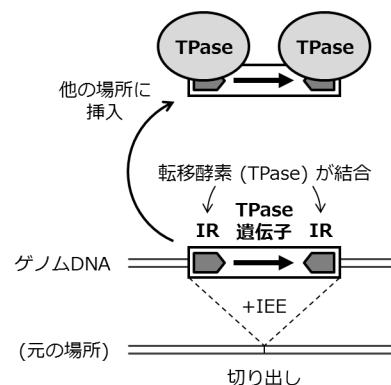


図2. IS629の転移

IS629 に含まれる遺伝子が TPase をコードするものだけであることから、IS629 TPase が本研究における一つの鍵となる。そこで、まずは 0157 の 5,236 遺伝子 (全 ORF の 96% に相

当) DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析により、O157 に IS629 TPase を供給した場合に発現量が2倍以上変動する遺伝子(領域)を特定した。

(2) O157 ゲノムに 23 コピー存在する IS629 の影響を調べるため、ゲノム上の IS629 をすべて欠失させた変異株 (O157 ΔIS629) と野生型の O157 について、IS629 TPase を供給した場合の *stx* 遺伝子のコピー数 (DNA 量) および発現量 (mRNA 量) の変化を、それぞれリアルタイム PCR/RT-PCR を用いて解析した。

(3) IS629 TPase (タンパク質) のどの部位が *Stx* の産生に影響するか調べるため、様々な IS629 TPase 変異体 (アミノ酸置換体や欠失変異体) を作製し、O157 における各変異体の *stx2* 遺伝子発現への影響をリアルタイム RT-PCR により評価した。

(4) O157 および O157 ΔIS629 において SOS 応答によりファージを誘導する MMC を添加した場合、IS629 TPase を供給した場合のそれぞれについて、*stx1* 遺伝子、*stx2* およびその近隣のプロファージ遺伝子、SOS 応答関連遺伝子群 (21 遺伝子) の発現量をリアルタイム RT-PCR を用いて比較解析した。

(5) *Stx1* は a, c, d, *Stx2* は a~g のサブタイプに分類され、*Stx1a*, *Stx2a*, *Stx2c* の一つまたは複数を生産する EHEC がヒトから多く分離されている。一方、豚の重要な疾病である浮腫病の事例では (ヒト由来 EHEC では少ない) *Stx2e* を生産する大腸菌が多く分離

され、他のサブタイプの *Stx2* や *Stx1* を生産する大腸菌の分離はほとんど見られない。このように豚由来大腸菌は、IS と *Stx* 産生との関係が EHEC とは異なる大腸菌でも成立するかを調べる上で良い材料になると考えられる。そこで、国内で豚から分離された *Stx2e* 産生性大腸菌について、血清型、遺伝学的系統、IS629 保有状況などを解析した。

4. 研究成果

(1) DNA マイクロアレイ解析の結果、O157 への IS629 TPase の供給により発現量が増加した遺伝子は 168、減少した遺伝子は 30 であった。増加した 168 遺伝子のうち 139 (83%) がプロファージ上にあり、特に Sp5 (*Stx2* プロファージ) については、遺伝子発現量の増加率が全体で最も高い *stx2* 遺伝子をはじめ最多の 71 遺伝子が含まれていた (図 1)。一方で、減少した 30 遺伝子のうち 17 (57%) がべん毛に関連し、プロファージに関連する遺伝子は含まれていなかった。

(2) リアルタイム PCR/RT-PCR の結果、O157 では IS629 TPase の供給により *stx2* 遺伝子のコピー数 (図 4) および発現量 (図 5) とともに増加したことから、*Stx2* ファージが誘導されたと考えられる。また、O157 ΔIS629 では *stx2* 遺伝子の DNA 量および発現量ともに変化が見られなかったことから、これらの現象はゲノム上の IS629 (TPase 結合配列である IR を含む DNA) を必要とする TPase 特異的な反応と考えられる。なお、両株ともにコントロールとして用いた *iee* 遺伝子のコピー数および発現量の変化は見られなかった。

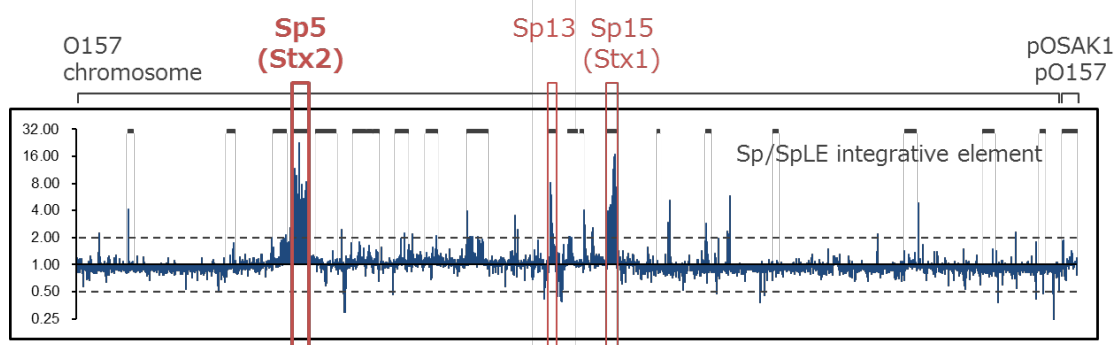


図3. IS629 TPaseの供給により発現量に変動したO157遺伝子群

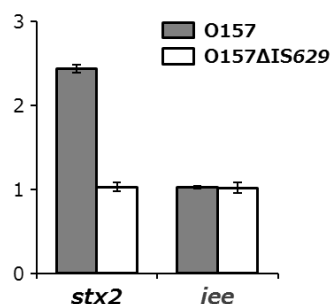


図4. IS629 TPaseの供給による*stx2* および*iee*遺伝子コピー数の変化

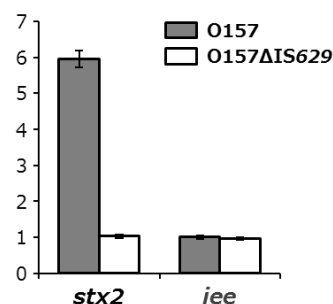


図5. IS629 TPaseの供給による*stx2* および*iee*遺伝子発現量の変化

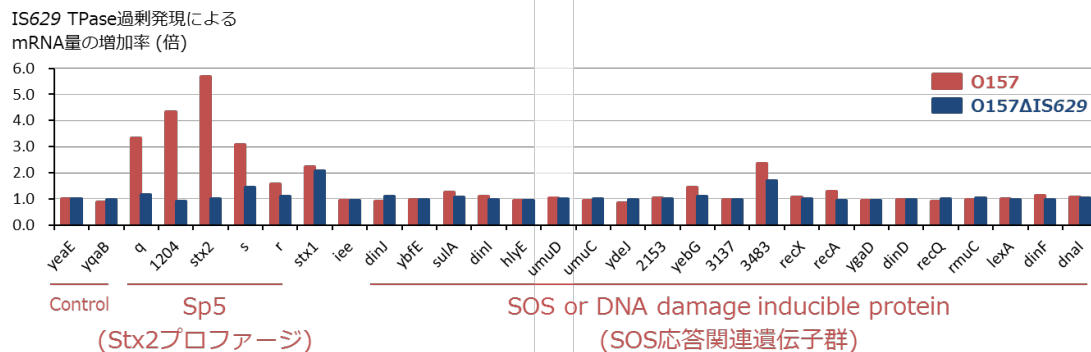


図6. IS629 TPaseがSOS応答関連遺伝子群の発現に与える影響

(3) IS629 TPase は 2 つのドメイン (DNA 結合に参与する ORFa および転移反応に参与する ORFb) からなる。ORFb の推定活性部位にアミノ酸置換を導入した (ゲノム DNA に結合するが DNA を切断しない) 変異体、ORFa と ORFb の遺伝子間に一塩基を挿入して両者を分断した変異体、ORFa または ORFb のみの欠失変異体などを作成して検討した結果、O157 における *stx2* 遺伝子の発現には ORFa が関与することが明らかになった。

(4) O157 および O157 IS629 とともに、MMC を添加すると *stx2* および近隣遺伝子、SOS 応答関連遺伝子の発現量がどちらも増加した。一方、IS629 TPase を供給した場合は、O157 において *stx2* および近隣遺伝子の発現量が増加したが、O157 IS629 では大きな変化が見られず、また両者ともに SOS 応答関連遺伝子の発現量にはほとんど変化が見られなかった (図 6)。なお、IS629 TPase の供給により *stx1* 遺伝子の発現量も増加したが、*stx2* 遺伝子に比べて増加量は少なく、またゲノム上の IS629 の有無とも関連していなかった。したがって、IS629 TPase は Stx1 より Stx2 の産生に大きく関与し、それは SOS 応答とは異なるメカニズムによることが示唆された。

(5) 国内で下痢または浮腫病の豚から分離された病原性大腸菌 967 株について、血清型や遺伝学的系統、IS629 保有状況などを解析したところ、約 6 割が *stx2e* 遺伝子を保有していたが、*stx2e* 遺伝子保有株は IS629 を保有していなかった (IS629 はエンテロトキシンを産生する毒素原性大腸菌に多く分布していた)。Stx2e については、EHEC が多く産生する Stx2a などと比べると産生メカニズムに不明な点も多いため、産生株や Stx2e プロファージの遺伝学的系統と、Stx2e 産生量との関連を詳細に解析する研究などが今後必要と思われる。その中で、Stx2e 産生株が多く保有する IS の存在、または Stx2e 産生に関与する IS の存在などが明らかになるかもしれない。

(6) 以上の検討により、EHEC O157 のゲノムに多コピー存在する IS629 が Stx2 の産生

に参与すること、それは IS629 (DNA) および IS629 TPase (特に ORFa) の両方を必要とする TPase 特異的な作用であり、これまでに知られた SOS 応答とは異なるメカニズムによる Stx2 プロファージ遺伝子の発現および Stx2 フェージの誘導を伴うことが明らかになった。本研究成果は、MGE である IS がその可動性によりゲノムを多様化するだけでなく、O157 における毒素産生 (または特定のフェージの誘導) にも関与していることを示唆する。

< 引用文献 >

Ooka, T., Ogura, Y., Asadulghani, M., Ohnishi, M., Nakayama, K., Terajima, J., Watanabe, H., Hayashi, T. 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.*, 19, 1809-1816 (2009)

Kusumoto, M., Ooka, T., Nishiya, Y., Ogura, Y., Saito, T., Sekine, Y., Iwata, T., Akiba, M., Hayashi, T. Insertion sequence-excision enhancer removes transposable elements from bacterial genomes and induces various genomic deletions. *Nat. Commun.*, 2, 152 (2011)

Shimizu, T., Ohta, Y., Noda, M. Shiga toxin 2 is specifically released from bacterial cells by two different mechanisms. *Infect. Immun.*, 77, 2813-2823 (2009)

Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Shiba, T., Hattori, M., Shinagawa, H. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic

comparison with a laboratory strain K-12. DNA Res., 8, 11-22 (2001)

Kusumoto, M., Nishiya, Y., Kawamura, Y. Identification of an insertion sequence, IS1203 variant, in a Shiga toxin 2 gene of *Escherichia coli* O157:H7. J. Biosci. Bioeng., 87, 93-96 (1999)

Kusumoto, M., Nishiya, Y., Kawamura, Y., Shinagawa, K. Reactivation of insertional inactivated Shiga toxin 2 genes of *Escherichia coli* O157:H7 caused by nonreplicative transposition of the insertion sequence. Appl. Environ. Microbiol., 66, 1133-1138 (2000)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Kusumoto, M., Hikoda, Y., Fujii, Y., Murata, M., Miyoshi, H., Ogura, Y., Gotoh, Y., Iwata, T., Hayashi, T., Akiba, M. Emergence of a multidrug-resistant Shiga toxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* lineage in diseased swine in Japan. J. Clin. Microbiol., 54, 1074-1081, 2016, 査読有

Kusumoto, M., Ogura, Y., Gotoh, Y., Iwata, T., Hayashi, T., Akiba, M. Colistin-resistant *mcr-1*-positive pathogenic *Escherichia coli* in swine, Japan, 2007-2014. Emerg. Infect. Dis., 22, 1315-1317, 2016, 査読有

6 . 研究組織

(1)研究代表者

楠本 正博 (KUSUMOTO, Masahiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 越境性感染症研究領域上級研究員

研究者番号：40548210