

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2007~2008

課題番号:19790325

研究課題名(和文) 大腸菌における O 抗原の変換メカニズムの解析

研究課題名(英文) Genomic comparison of the O-antigen biosynthesis gene clusters of *Escherichia coli* strains.

研究代表者

井口 純 (IGUCHI ATSUSHI)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・研究員

研究者番号:00437948

研究成果の概要:本研究では、O 抗原コード領域とその周辺領域を株間で比較することにより、水平伝播領域の特定および入れ換わった領域の特徴を調べた。その結果、複数の大腸菌株で O 抗原コード領域を含む大きな領域が水平伝播により入れ換わったことが明らかとなった。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

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: 遺伝

1. 研究開始当初の背景

細菌ゲノム解析により、外来性遺伝子の水平伝播にはバクテリオファージや Pathogenicity Island などの「mobile element」が関わっていることは様々な菌種で明らかとなってきた。しかし、構造的に mobile element とは認められないケースも多く、そういった外来性遺伝子の伝達メカニズムはほとんど明らかになっていない。グラム陰性菌における O 抗原合成遺伝子領域の入れ替わりはその代表的なものである。グラム陰性菌の O 抗原(血清)型は菌体表層に存在するリポ多糖(LPS)の糖鎖構造によって決定

され、大腸菌では現在1から181のO抗原型が認められている。O抗原の合成をコードする遺伝子群はオペロンを形成し、G+C含量が染色体の平均よりも極端に低いことから外来性であると考えられている。これまでに20種類以上のO抗原合成オペロンの塩基配列(それぞれ10~20-kbp)が決定され、各抗原が独自のオペロンを形成していることや染色体上の同じ座位に存在することがわかっている。一方、下痢原性大腸菌に属するEPECとTypicalなEHECは一部共通した病原因子を保有することから、EPECはTypicalなEHECの原型と考えられている。EHEC O157:H7では、EPEC O55:H7のO抗原合

成オペロンが O157 のそれに組換わり、加えて志賀毒素遺伝子 (stx) をはじめとする病原性関連遺伝子の獲得を経て、EHEC O157:H7 が誕生したというシナリオが提唱されている (Lukas, J Bac, 2005,187: 1783-)。さらに EPEC O55:H7 と EHEC O157:H7 間の O 抗原合成オペロンの比較が行われ、抗原の変換は部分的な変異ではなく、オペロン全体が入れ替わることにより起こることが示唆されている (Wang, J Bac, 2002, 184: 2620-)。しかし、組換え領域は未だ特定できておらず、O 抗原の変換メカニズムは不明なままである。

さらに我々は、系統的に明らかに離れているにもかかわらず、同じ O55 抗原型を発現している 3 種類の菌株を分離している。これらの菌株に関しては、O55 抗原合成オペロンがそれぞれの祖先株に水平伝播し共有するに至ったのではないかと予想したが、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

(1) 系統の異なる血清型 O55 大腸菌株を用い、O55 抗原合成遺伝子領域とその周辺領域を詳細に解析し、組換え箇所の特定とその構造的特徴を解析する。

(2) 系統的に近縁であることが明らかな大腸菌 O157 株と O55 株を用い、O 抗原合成遺伝子領域とその周辺領域を詳細に解析し、組換え箇所の特定とその構造的特徴を解析する。

以上の結果から、「多系統への O55 抗原合成オペロンの水平伝播メカニズム」と「O55:H7 から O157:H7 への O 抗原の変換メカニズム」を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 染色体上の 7 つの house-keeping 遺伝子の塩基配列を基に、解析に用いる菌株の系統関係を明らかにする。

(2) 全塩基配列が決定している O157 Sakai ベースでのマイクロアレイを用いて各菌株の遺伝子が保有する遺伝子を解析する。特に、O 抗原合成オペロンに隣接する領域 (his オペロンと colanic acid 合成オペロン; いずれも House keeping オペロン) は詳細に解析し、次に行う PCR-RFLP のプライマー・デザインに役立てる。

(3) O157 Whole Genome PCR Scanning 法

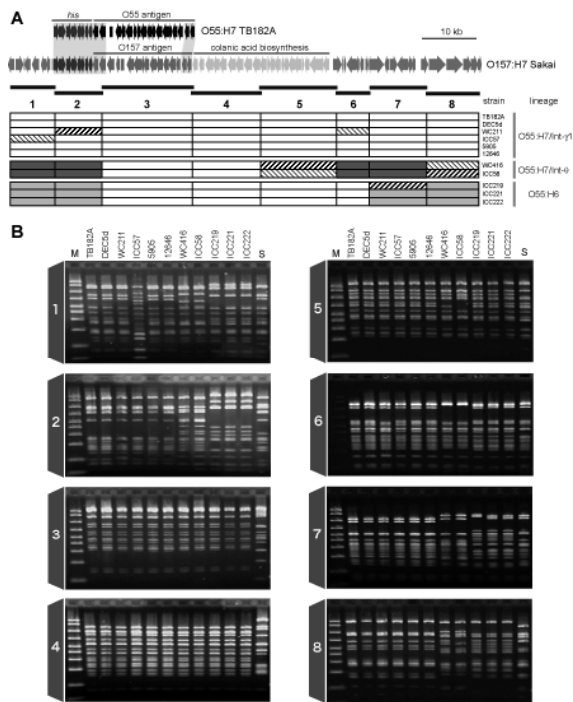
(Ohnishi, PNAS, 2002, 99: 17043-) で使われているプライマーを用い、上記 14 株について O 抗原合成オペロンを含む周辺領域 (9 セグメント、約 100-kbp) が増幅されるかを確認する。もし増幅されない場合は、マイクロアレイの結果をもとに多くの菌株で保存性の高い遺伝子上にプライマーをデザインして増幅させる。増幅産物は 2 種類以上の制限酵素でそれぞれ切断して泳動パターンを比較し、保存性の高い領域と多様性がみられる領域に区分し、およそその組換え箇所を推定する。

(4) 各系統の O55 株から代表株を 1 株選び、両端の組換え部位を含む O55 抗原合成オペロン全体をシーケンスする。シーケンスにはランダムショットガンを用いる。

(5) 塩基配列の相同性を比較し、各系統への O55 抗原合成オペロンを含む領域の組換え箇所の特定とその構造的特徴を解析する。同時に、既に配列が明らかとなっている O157:H7 株の O157 抗原合成オペロン周辺と、O55:H7 の O 抗原合成オペロン周辺の配列を比較し、組換え箇所の特定とその構造的特徴を解析する。以上の結果から、O 抗原の変換メカニズムの特異性や共通性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 異なる進化系統群に属する O55 抗原型株について、O 抗原コード領域周辺の塩基配列 (約 65kb) を決定して比較解析を行った。その結果、明らかな変異頻度の違いから、それぞれの O55 抗原型株は共通する O 抗原コード領域 (約 20kb) を含む 40kb 以上の領域を水平伝播により獲得し、O55 抗原型株へと変化したことがわかった。組換え予想部位には IS や繰り返し配列など特別な配列は見出されなかった。



図、3系統に属するO55菌株のPCR-RFLP解析結果

(2) O157株の全ゲノム配列を基に作製したマイクロアレイを用いてCGH解析を行った結果、O55株では複数のプロファージ領域とO157抗原コード領域を保有していなかった。加えて、O抗原コード領域周辺(約120 kb)では他の領域と比べてシグナルが明らかに弱く、配列の多様化が予想された。O55抗原コード領域とその周辺領域(計170 kb)の塩基配列を決定し、比較解析を行った結果、O抗原コード領域(約20 kb)を含む約130 kbもの領域が水平伝播により入れ替わったことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

Iguchi A, Ooka T, Ogura Y, Asadulghani, Nakayama K, Frankel G, Hayashi T, Genomic comparison of the O-antigen biosynthesis gene clusters of *Escherichia coli* O55 strains belonging to three distinct lineages. *Microbiology*, 2008, vol. 154, p. 559-570、査読有り

Iguchi A, Thomson N R, Ogura Y, Saunders D, Ooka T, Henderson I R, Harris D, Asadulghani M, Kurokawa K, Dean P,

Kenny B, Quail M A, Thurston S, Dougan G, Hayashi T, Parkhill J, Frankel G, The complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *E. coli* O127:H6 strain E2348/69. *2009*, vol. 191, p. 347-354、査読有り

Leopold R S, Magrini V, Holt J N, Shaikh N, Mardis R E, Cagno J, Ogura Y, Iguchi A, Hayashi T, Mellmann A, Karch H, Besser E T, Sawyer A S, Whittam S T, Tarr I P, The Emergence and Constrained Radiations of *Escherichia coli* O157: A Precise Reconstruction. *PNAS*, 2009, vol. 106, p. 8713-8718、査読有り

Asadulghani M, Ogura Y, Ooka T, Itoh T, Sawaguchi A, Iguchi A, Nakayama K, Hayashi T. The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage-prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants. *PLoS Pathogen* (in press)、査読有り

[学会発表] (計5件)

井口純, 他、大腸菌におけるO抗原合成遺伝子群を含む水平伝播領域の解析、第11回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2007年8月

井口純, 他、大腸菌におけるO抗原をコードする領域の組換え過程の解析、第2回ゲノム微生物学会年会、2008年3月

井口純, 他、大腸菌におけるO抗原をコードする領域の組換え過程、第81回日本細菌学会総会、2008年3月

井口純, 他、腸管病原性大腸菌(EPEC) E2348/69株のゲノム解析、第3回ゲノム微生物学会年会、2009年3月

井口純, 他(ワークショップ)、The complete genome sequence and comparative genome analysis of EPEC O127:H6 strain E2348/69、第82回日本細菌学会総会、2009年3月

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

井口 純 (IGUCHI ATSUSHI)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・研究員

研究者番号：00437948

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし