

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790424

研究課題名（和文） グラム陰性菌の O 抗原変換メカニズムの解析

研究課題名（英文） Research into the exchanges of the O antigen in Gram-negative bacteria

研究代表者

井口 純（IGUCHI ATSUSHI）

宮崎大学・IR 推進機構・助教

研究者番号：00437948

研究成果の概要（和文）：本研究ではグラム陰性菌の O 抗原変換メカニズムの解明を目的とし、多系統に分岐する大腸菌 O157 株を用いて O 抗原オペロン領域とその周辺領域（約 59 kb）の塩基配列を決定し、株間での比較解析を行った。その結果、多系統に存在する O157 株の出現には、2 種類の異なる O157 抗原オペロンの水平伝播が関与していること、さらに、相同性の違いから予想される組換え箇所の一部が、ある繰り返し配列の挿入箇所と一致しており、この繰り返し配列が O 抗原オペロンの水平伝播に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：I investigated *Escherichia coli* O157 strains belonging to multiple lineages different from that of the O157:H7 strains. Nucleotide sequences of the chromosomal region (about 59 kb) covering the O157-antigen gene clusters and its flanking regions revealed that sequences of O157-antigen gene clusters were divided into two distinct groups at sequence level. Interestingly, distribution of the two types of the O157-antigen gene clusters did not follow the phylogenetic lineages of the strains, suggesting that the horizontal transfer of both types of O157-antigen locus has occurred independently among *E. coli* strains. Additionally, we found the repeat sequences in the junction points of sequence similarity, suggesting that the repeat sequences were associated with the genomic rearrangement around the O-antigen gene clusters.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

グラム陰性菌の表層に形成されるリポ多糖（LPS）は、O 抗原、コア多糖、リピド A の 3 つの部分から成っている。O 抗原は、構成される糖の組み合わせによって異なる抗原

性を示し、これを利用して菌株の血清型別が行われている。

大腸菌では現在 170 種類を超える O 抗原（血清）型が認められており、そのうちの約 40 種類で O 抗原合成オペロンの塩基配列が決定されている。それぞれの抗原型株が特有の

オペロン〔5~20kb (5 から 18 個の遺伝子を含む)〕を保有することや、ほぼ全てのオペロンが染色体上の同じ座位に存在することが分かっている。グラム陰性菌内に広がる多様な O 抗原型の存在や、申請者のこれまでの研究などから、O 抗原の変換には種や属を越えたオペロンの水平伝播が原因であると考えられているが、その積極的とも思える O 抗原オペロンの入れ替わりが起こるメカニズムについてはほとんどわかっていない。

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」の関与がよくみられるが、O 抗原合成オペロンの伝播には mobile element としての構造は見られていない。コレラ菌では、キチン質が外来 DNA を取込みやすい状態 (コンピテント) へと誘導することが見出され、そのシステムを用いた実験では共培養した菌株の O 抗原合成オペロンが水平伝播し、O 抗原型が変化すると報告されている (Blokesch, PLoS Pathog, 2007, 3:81-)。しかし、その詳細なメカニズムについてはわかっていない。

大腸菌における O157 抗原型は腸管出血性大腸菌の代表的な O 抗原であり、その糖鎖構造や O 抗原オペロンの塩基配列が既に決定している。また、O157 は大腸菌 O55 の祖先株より O 抗原オペロン領域が入れ替わったことにより派生したと考えられている。

2. 研究の目的

グラム陰性菌における O 抗原変換のメカニズムを解明するため、大腸菌の O157 抗原合成オペロンに注目し、以下の 3 点について研究を進めた。

(1) ヒトや環境から O157 抗原発現株を分離し、同定・分類するとともに O157 オペロン保有株の分布および各株の進化系統関係を明らかにする。

(2) 各株の O157 抗原オペロンおよびその周辺領域の塩基配列を決定し、株間での比較解析により O157 抗原オペロンの構造および O 抗原変換メカニズムに関わる特徴的な配列を調べる。

(3) O 抗原の多様性と、さまざまな環境ストレスに対する感受性との関係について調べる。

3. 研究の方法

(1) 臨床および食品検体より分離した O157 株について、染色体上の 7 つの housekeeping

遺伝子の塩基配列を基に、進化系統解析 (Multi-locus sequence analysis : MLST) を行った。

(2) H 抗原型の血清学および遺伝学的型別を行った、さらに、これまでに知られている大腸菌の病原性関連遺伝子について、その保有を PCR により確認した。

(3) O157 抗原オペロンの相同性または多様性を確認する為に、O157 オペロン領域とその周辺領域 (約 60kb) を 5 つの区分に分けて PRC-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism : 制限酵素断片長多型) 解析を行った。O 抗原オペロンを挟み込むプライマーをデザインし、PRC にて増幅後、制限酵素 *Hinc* による処理をしてその泳動パターンを比較した。

(4) 各株の O 抗原コード領域とその周辺領域の塩基配列 (各 60kb) をショットガン法により決定し、既に塩基配列が決定している O157:H7 株の情報も加えて、詳細な比較解析を行った。

(5) 配列比較により明らかとなった O 抗原側鎖長調節遺伝子の多様性に注目し、その欠失株および相補株を作成し、配列の多様性と側鎖長の調節の関係を調べた。さらにそれら変異株を用いてヒト血清および抗菌薬に対する感受性試験を行った。

4. 研究成果

(1) 抗 O157 免疫磁気ビーズを用いて、牛糞便や下水などから O157 抗原を発現している菌株の分離を試みた。しかし、O157 抗原発現株は分離できなかった。

そこで、大阪府で 1995 年から 2006 年にヒトおよび食品より分離された志賀毒素を産生しない大腸菌 O157 株を大阪府立公衆衛生研究所より分譲していただき、本研究に供試した。

(2) 志賀毒素を産生しない大腸菌 O157 の一部は、H45 H16, H39 など、様々な鞭毛 H 抗原型を示した。これら多様な H 抗原型を示す菌株 (O157:non-H7) の進化系統を MLST により解析したところ、典型的な腸管出血性 O157 (:H7) とは異なる複数の進化系統に属することが明らかとなった (図 1)。

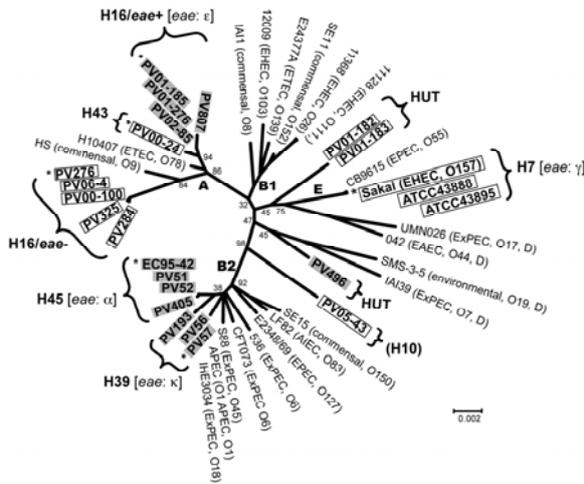


図1. 大腸菌 O157:H7/non-H7 株と代表的な大腸菌 21 株の進化系統解析の結果 枠で囲った菌株が大腸菌 O157:H7/non-H7 を示す。

(3) PCR-RFLP の結果、O157 オペロン領域では良く保存された 2 つのパターンが観察されたのに対し、その周辺領域は系統間で全く異なるパターンを示した。よって 0 抗原オペロンの塩基配列は株間で高度に保存されている可能性が示唆された。

(4) 0 抗原オペロン上の O157 抗原合成に必要な *rfbE* (*per*) 遺伝子の配列比較を行った結果、配列の相同性により「Sakai type」および「PV01-185 type」と名付けた 2 つのタイプに分類された(図2)。異なる進化系統に属する各グループの代表株(計5株)について 0 抗原コード領域とその周辺領域の塩基配列(各 60kb)を決定し、既に配列が決定している O157:H7 Sakai 株の情報に加えて、6 株間での比較解析を行った。その結果、遺伝子構成はすべて同じであること(図3)、さらに

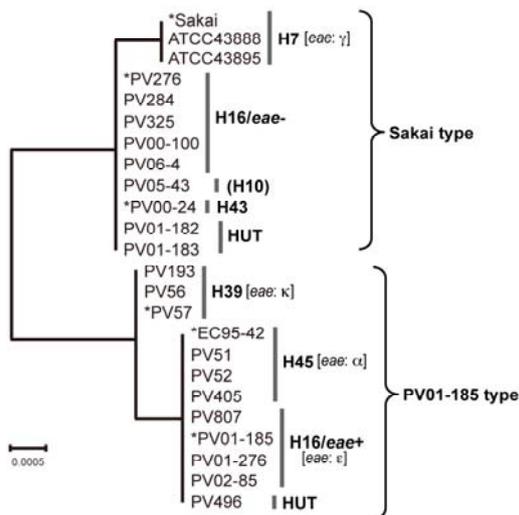


図2. *rfbE* 遺伝子の系統解析の結果

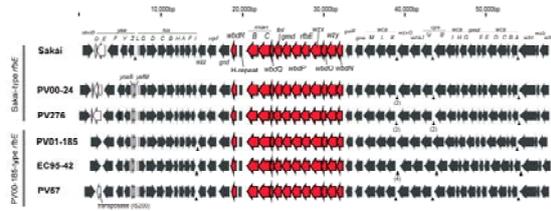


図3. 大腸菌 O157:H7/non-H7 株 6 株の O157 抗原オペロンとその周辺領域の遺伝子構成 (赤い矢印が 0 抗原合成に関わる遺伝子を示す)

塩基配列レベルで *rfbE* のタイプと一致する 2 つのタイプに分類されることがわかった。しかし各株の進化系統と 2 タイプの O157 抗原合成遺伝子群の分布が一致しないことから(図1)、それら 2 タイプの O157 抗原合成遺伝子群が大腸菌株間を独立して水平伝播していると推測された。

加えて、詳細な比較解析により、O157 抗原合成遺伝子群の周辺領域に特徴的な繰り返し配列 (REP 配列: repetitive extragenic palindromic sequence) を見つけた。REP 配列の挿入箇所の一部が、組換え箇所であると予想される相同性が極端に変化する境界領域に一致したことから、0 抗原オペロンの水平伝播に REP 配列が関与している可能性が示唆された。REP 配列はさまざまな機能を有することがこれまでに報告されているが、水平伝播との関連については知られておらず、今後はこの配列にも注目して研究を進めたいと考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

井口 純、他、典型的 O157 株と非典型的 O157 株の 0 抗原コード領域の比較、第 14 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、平成 22 年 7 月 22 日、宮崎(ワールドコンベンションセンター・サミット)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

井口 純 (IGUCHI ATSUSHI)
宮崎大学・IR推進機構・助教
研究者番号：00437948

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし