

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590543

研究課題名(和文) O157ゲノムからのIS切り出しを促進する新規タンパク質IEEの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of function of IEE, a novel enhancer for IS excision in O157

## 研究代表者

楠本 正博 (KUSUMOTO, Masahiro)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所 細菌・寄生虫研究領域・主任研究員

研究者番号：40548210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：IEE (IS-excision enhancer) は、腸管出血性大腸菌 (EHEC) において挿入配列 (IS) の切り出しおよび様々なゲノム欠失によるゲノムの多様化に関与する。本研究では、IEEがSpLE1 integrative elementを介して伝播し得ること、また、IEEがISだけでなくSpLE1の切り出しにも関与することを明らかにした。本研究結果は、IEEがIS転移酵素またはSpLE1 integraseとの協働により、ISまたはSpLE1の切り出しにそれぞれ関与する多機能タンパク質であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Insertion sequence (IS)-excision enhancer (IEE) promotes excision of IS elements and generates various genomic deletions that lead to the diversification of the bacterial genome in enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC). In this study, we show that IEE can be transferred via SpLE1 integrative element and promotes not only IS excision but also excision of the SpLE1. Our data suggested that IEE may be a multifunctional protein that promotes excision of IS elements or SpLE1 in cooperation with IS transposase or SpLE1 integrase, respectively.

研究分野：細菌学

キーワード：腸管出血性大腸菌 O157 IEE integrative element 切り出し

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が含まれている。ファージや挿入配列 (IS) などの可動性遺伝因子は、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、さらに、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 の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)。また、研究代表者らは 0157 ゲノム上に多数存在する IS629 の分布パターンをマルチプレックス PCR により解析する IS printing 法を開発し (引用文献) 実用化されている。

(2) 研究代表者らは最近、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 (引用文献)。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、これまで細菌では「転移する際に IS が染色体から切り出されてしまうと菌が生存できない」と考えられてきた。したがって 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るものの、そのメカニズムは現在に至っても未だに説明されておらず、IEE の発見により今ようやくブラックボックスを開こうという段階にある。IS の切り出しが起こる (切り出しが起こっても菌が生存している) ためにはドナーDNA すなわちゲノムの修復が不可欠であり、そこに IEE が関与すると考えられる (図 1)。

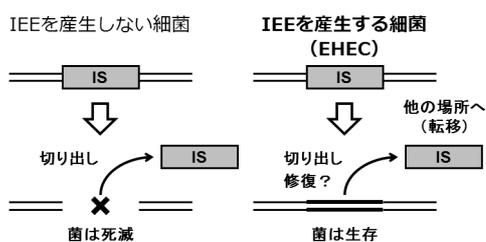


図1. IEEの役割

(3) 0157 に IEE と IS629 転移酵素 (TPase) を供給し、一晩の培養により得た派生株を IS printing 法で解析したところ、IEE を供給した場合は様々な位置のバンドが消失したが (図 2: 上) 供給しない場合には変化が見られなかった (図 2: 下)。バンドの消失はその位置に対応する IS629 周辺の構造変化を表すため、派生株を詳細に解析した結果、IS629 の切り出しおよび数タイプに分類されるゲノム欠失が IEE と IS629 TPase により引き起こされることが分かった。大変興味深いことに、0157 分離株を用いた比較ゲノム解析の結

果、観察されたすべてのタイプのゲノム欠失が自然界でも起こっていることが示唆されている (引用文献)。したがって、0157 ゲノムが IS を介して多様性を獲得する際にも IEE が重要な役割を果たすと考えられる。

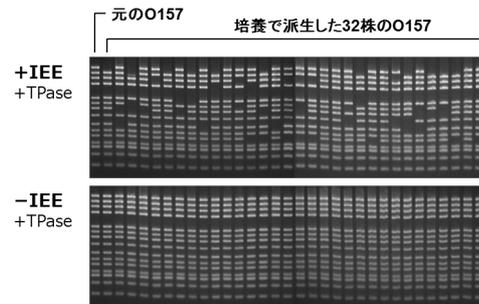


図2. IEEとTPaseによるゲノムの多様化

2. 研究の目的

IEE 産生遺伝子 (*iee* 遺伝子) は 0157 のゲノム解析で初めて塩基配列が明らかとなった遺伝子であり、本研究の申請時 (2011 年 10 月) において (2015 年 4 月の時点でも) データベース上に IEE と明確な類似性を有する既知タンパク質は存在しないため、IEE の生物学的な機能は全く不明であった。したがって細菌の細胞内で IEE が担っている役割を解明するためには、IS の切り出しに特化して関与する因子としてだけでなく、総合的な DNA 修復システム、例えばゲノムのメンテナンスや細胞分裂などに関わる可能性も含めて幅広く考える必要があった。そこで本研究では、0157 が多様性を獲得し進化するメカニズムの解明を目指し、様々な切り口で IEE が持つ生物学的な機能または活性の種類を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 一般に細胞においてタンパク質が機能を発現する際には他の生体分子と相互作用し、それらが機能するための複合体を形成する。また、細胞内では多くの生体分子の存在量およびタイミングが細胞周期または様々なシグナル応答経路の中で厳密に制御されている。大腸菌は古くからモデル生物として様々な研究が行われており、多くの因子について遺伝子ネットワークやパスウェイに関するデータが蓄積されていることから、IEE (*iee* 遺伝子) の発現と相関する因子 (遺伝子) を探索することで IEE が持つ生物学的な意義を知るための手がかりを得られる可能性が高い。そこで、0157 の IEE 過剰発現株と *iee* 遺伝子欠失株について DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行い、IEE の発現と相関して発現量が変動する遺伝子群、すなわち IEE により発現が誘導または抑制される因子の特定を試みた。

(2) IEE (ホモログ) は細菌に広く存在するが、ゲノム配列が解読され *iee* 遺伝子を保有

することが判明した大腸菌のほぼすべてが EHEC であった(引用文献)。その特異性より IEE の機能や *iee* 遺伝子の伝播に関する手がかりを得られる可能性が高いため、動物から分離された大腸菌(主に豚および鶏由来の非 EHEC 約 250 株)について *iee* 遺伝子保有株のスクリーニングを行った。

#### 4. 研究成果

(1) DNA マイクロアレイ解析の結果、O157 において IEE を過剰発現させても有意な遺伝子発現変動を確認できなかったが、O157 の *iee* 遺伝子欠失株において IEE を過剰発現させると、DNA 複製に参与する一本鎖 DNA 結合タンパク質(*ssb*)や *dinI*、*recN*、*recA* など DNA ダメージ応答に参与する遺伝子の発現が増

加した。そこで、リアルタイム RT-PCR を用いてこれらの遺伝子の発現を詳細に解析したが、IEE による顕著な遺伝子発現の誘導は観察できなかった。

(2) 動物由来大腸菌における *iee* 遺伝子保有株スクリーニングの結果、豚から分離された毒素原性大腸菌(ETEC) O139 および O149 のうち、一部の系統が *iee* 遺伝子を保有することが明らかになった。これまでにゲノム解析された大腸菌について7種類のハウスキーピング遺伝子(*adh*、*fumC*、*gyrB*、*icd*、*mdh*、*purA*、*recA*)を用いて系統解析を行ったところ、*iee* 遺伝子を保有する群と保有しない群が系統樹上で混在することから、本遺伝子の水平伝播が示唆された(図3: *iee* 遺伝子保有株、*iee* が非保有株、太字が豚由来 ETEC O139 および O149)。

(3) EHEC O157 において、*iee* 遺伝子は SpLE1 (約 90 kb の integrative element) 上に存在している。そこで、*iee* 遺伝子保有 ETEC における本遺伝子周辺の塩基配列を解析したところ、O157 の SpLE1 と極めて類似していた(図4: 灰色が高度に保存された領域)。このことから、*iee* 遺伝子は SpLE1 を介して EHEC および ETEC の間で伝播したことが推測される。また、多くのプロファージは integrase (*int*) 遺伝子の下流に excisionase (*xis*) 遺伝子を持ち、excisionase がプロファージの切り出しに参与するが、SpLE1 に *xis* 遺伝子は存在せず、*int* 遺伝子の下流に(*xis* とは長さも配列も大きく異なる) *iee* 遺伝子が存在している(図4: 先頭の青色が *int* 遺伝子、橙色が *iee* 遺伝子)。

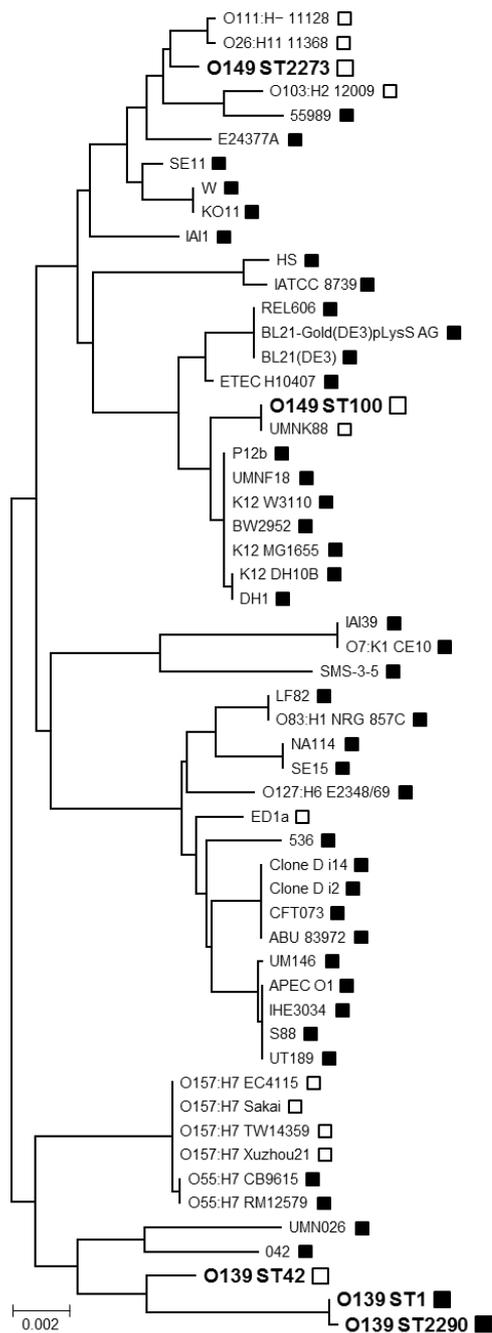


図3. 大腸菌の系統関係

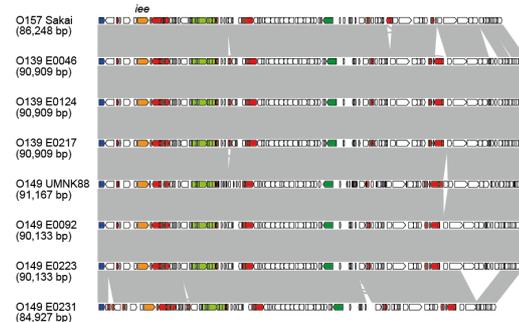


図4. SpLE1の遺伝子構造

(4) SpLE1 の切り出しが起こるか、またその頻度を確認するため、SpLE1 の両末端に分断したアンピシリン(Ap)耐性遺伝子を挿入した O157 変異株を作製した。すなわち、本変異株において SpLE1 の切り出しが起こると、分断した Ap 耐性遺伝子が野生型に戻り菌が Ap 耐性に変化するため、Ap 耐性菌の出現率が SpLE1 の切り出し頻度となる。本変異株の *iee* 遺伝子欠失変異株(図5: GMSS624)と、その SpLE1 の長さを段階的に変化させた変異株(図5: GMSS642/GMSS643/GMSS640)について、IEE を供給した場合および供給しない場

合における SpLE1 の切り出し頻度をそれぞれ測定した。その結果、IEE の供給により切り出し頻度が大きく上昇し、その頻度は SpLE1 の長さに依存することが判明した(図5)。さらに、SpLE1 上の *int* 遺伝子を欠失させると IEE を供給した状態でも SpLE1 の切り出しは起こらず、そこに integrase を供給すると切り出し頻度が大きく上昇した。

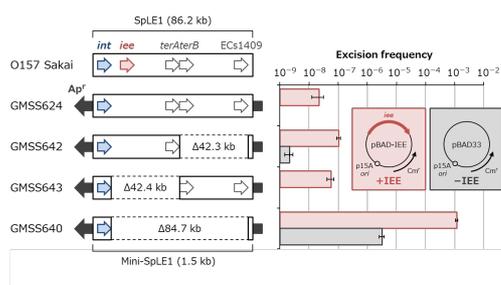


図5. IEEによるSpLE1の切り出し

(5) 以上の検討により、*iee* 遺伝子を含む SpLE1 integrative element は可動性遺伝因子であり、IEE (*iee* 遺伝子) は SpLE1 を介して EHEC および ETEC の間で伝播したと考えられること、また、IEE は (IS だけでなく) SpLE1 にも作用する、すなわち IEE は DNA に対する作用機序が異なると考えられている IS TPase および SpLE1 integrase のそれぞれと協働することで、IS および SpLE1 両方の切り出しに関与する多機能タンパク質であることが明らかになった。

#### < 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)

Ooka, T., Terajima, J., Kusumoto, M., Iguchi, A., Kurokawa, K., Ogura, Y., Asadulghani, M., Nakayama, K., Murase, K., Ohnishi, M., Iyoda, S., Watanabe, H., Hayashi, T. Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *J. Clin. Microbiol.*, 47, 2888-2894 (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)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Kusumoto, M., Fukamizu, D., Ogura, Y., Yoshida, E., Yamamoto, F., Iwata, T., Ooka, T., Akiba, M., Hayashi, T. Lineage-specific distribution of insertion sequence excision enhancer in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from swine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(4), 1394-1402, 2014, 査読有

[学会発表](計4件)

楠本正博、豚由来病原性大腸菌の進化系統と保有遺伝子の多様性、平成26年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会、2015年2月15日、岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

楠本正博、深水大、小椋義俊、吉田英二、山本史子、岩田剛敏、大岡唯祐、秋庭正人、林哲也、ブタから分離された毒素原性大腸菌が保有する腸管出血性大腸菌プロファージ様エレメントの解析、第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月9日、北海道大学(北海道・札幌市)

楠本正博、小椋義俊、大岡唯祐、李謙一、岩田剛敏、秋庭正人、林哲也、IEEはプロファージ様エレメント SpLE1 の転移にも関与する、第18回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2014年7月16日、同志社大学(京都府・京都市)

楠本正博、小椋義俊、岩田剛敏、大岡唯祐、秋庭正人、林哲也、ブタから分離された大腸菌における腸管出血性大腸菌 O157 プロファージ様エレメントの分布、第86回日本細菌学会総会、2013年3月18日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠本 正博 (KUSUMOTO, Masahiro)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 細菌・寄生虫研究領域・主任研究員  
研究者番号: 40548210