

腸管出血性大腸菌 O157 の多様化に関与する新規タンパク質 IEE の性状解析

楠本正博¹⁾

Characterization of a novel protein IEE responsible for the diversification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157

Masahiro KUSUMOTO¹⁾

背景と目的

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) による感染症は、日本を含む多くの国で大きな問題となっている。EHEC は血性下痢と激しい腹痛を主症状とする出血性大腸炎を惹起するが、本菌が特に恐ろしいのは、極めて少ない菌量で感染が成立し、溶血性尿毒症候群や脳症など生死に関わる重篤な合併症を数%の頻度で引き起こすことである。EHEC は人にも動物にも感染するが多くの家畜には病原性を示さず、特に本菌を保有する健康な牛を起点とする食品汚染が社会において深刻な問題となっている。

1996 年には大阪府堺市において 6,000 人以上に及ぶ大規模な EHEC O157 集団感染事例が発生し、さらに全国各地で様々な規模の流行が多発し、一種のパニック状態に陥った。最近でも 2011 年には富山県など複数の県にわたって EHEC O111 および O157 による集団感染事例が発生したほか、同年ドイツでは非典型的な EHEC O104 による大規模な集団感染事例が発生し、国内外で死者を含む多数の感染者が出たことは記憶に新しい。富山県の事例は従来の EHEC 感染症に比べて感染者の重症化率が高い点が特徴的であり、またドイツの事例では典型的な EHEC とは異なる腸管付着因子を保有する新型、すなわち種類の異なる大腸菌とのハイブリッド型と考えられる菌が原因であった。これらの事例は、進化の過程でゲノムが多様性を獲得し、さらには新たな病原因子の遺伝子を獲得することで、より病原性の高い EHEC が出現していることを示唆する。

EHEC O157 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 O157 特異的な領域からなり、後者には病原因子の他に多くの可動性遺伝因子が含まれている¹⁾。フェージや挿入配列 (insertion sequence: 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 O157 ゲノムが多様性を獲得することがわかってきた²⁾。なお、このことを利用した新たな分子疫学的解析技術として、O157 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 法が実用化されている³⁾。IS-excision enhancer (IEE) は細菌ゲノムからの IS の切り出しを促進する新規タンパク質であり、O157 においては IEE と IS629 転移酵素 (transposase: TPase) が協働することでゲノムからの 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引き起こされることから、O157 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⁴⁾。

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⁵⁾。その一方で、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、そのメカニズムは未だに解明されておらず、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

1) 農研機構 動物衛生研究所 細菌・寄生虫研究領域

欠であり、そこにIEEが関与すると考えられる。しかしIEE産生遺伝子(*iee*)はO157のゲノム解析で初めて塩基配列が明らかになった遺伝子であり、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(2013年7月現在においても)存在しないため、IEEの生物学的な機能は全く不明である。本研究では、細菌の細胞内でIEEが担っている役割を解明するための第一段階として、IEEタンパク質の性状を明らかにすることを目的とした。

研究の概要

1. タンパク質タグの付加がIEEに与える影響の解析

マルトース結合タンパク質(MBP)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、FLAGなどは他の分子との特異的親和性を利用したアフィニティタグとして用いられ、タグをつけたタンパク質の単離精製、固定化、他分子との相互作用の解析など、タンパク質の機能解析において強力なツールとなる。IEEの細胞内での機能を解明するに当たり、まずはこれらのタンパク質タグの付加

がIEEと、IEEとの相互作用が予想されるIS629 TPaseの生理的あるいは物理化学的性質に与える影響について検討した。

ドナープラスミドからのIS629の切り出しが起こると宿主大腸菌の薬剤耐性が変化する既報のIS切り出し効率測定法⁶⁾を利用して、IEEまたはIS629 TPaseへのタンパク質タグ(N末端MBP, N末端GST, N末端FLAG, C末端FLAGの4種類)の付加が大腸菌K-12株におけるIS切り出し効率に与える影響をそれぞれ評価した(図1A)。その結果、これら4種類のタグをIEEに付加しても、タグを付加しない場合と同等のIS切り出し効率が確認されたが、IS629 TPaseについてはいずれのタグを付加した場合も顕著なIS切り出し効率の低下がみられた(図1B)。少なくともIS切り出しに関しては、IEEの活性はタグ付加の影響を受けず、IS629 TPaseの活性は末端に付加したタグにより阻害されることが判明した。IS629の切り出し(および転移)にはIS両末端へのIS629 TPaseの結合が必要であるが、その複合体形成をTPase末端に付加したタグが阻害した可能性が考えられる。

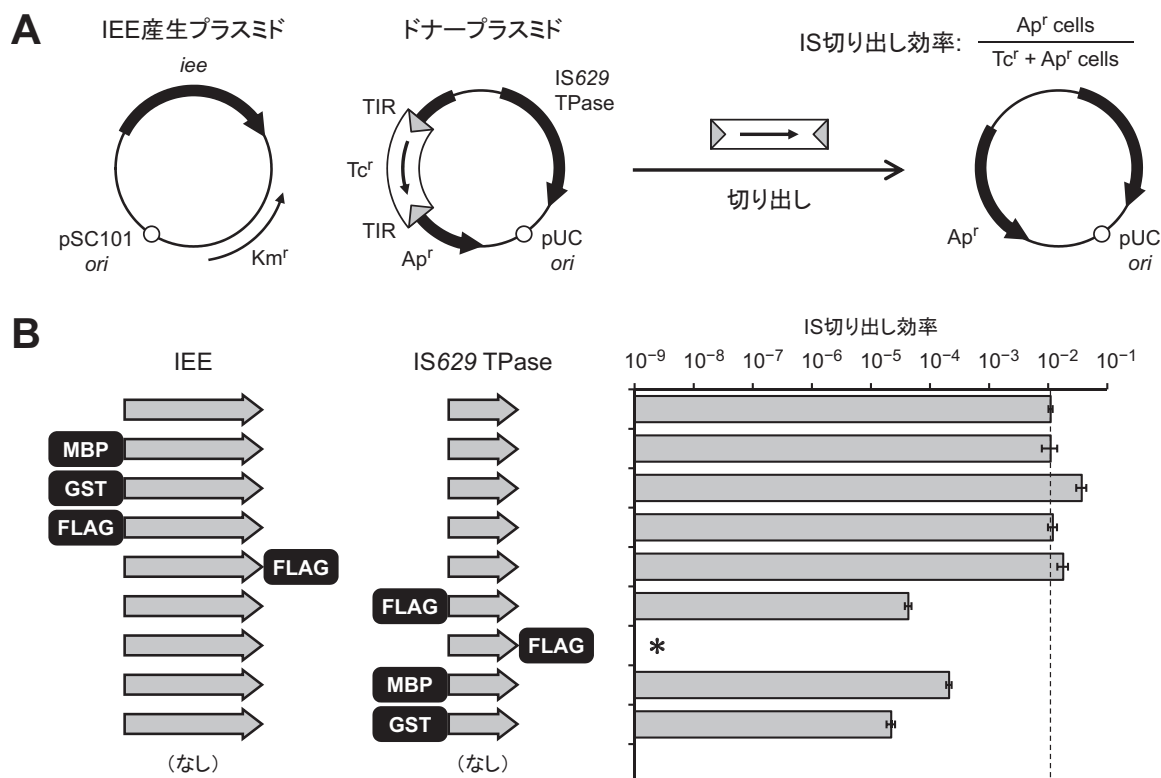


図1. IEE および IS629 TPase へのタグ付加の影響

(A) ドナープラスミドからのIS629の切り出しが起こると宿主大腸菌の薬剤耐性がテトラサイクリン(Tc)耐性からアンピシリン(Ap)耐性に変化するため、Tc耐性コロニーに対するAp耐性コロニーの出現率がIS切り出し効率となる。(B) 左側にIEEまたはIS629 TPaseに付加したタンパク質タグの種類および位置、右側に大腸菌K-12株におけるIS切り出し効率を表す。*: 菌の発育不良のためIS切り出し効率を測定できなかった。

IEE および IS629 TPase は溶解度が低く、*in vitro* 解析に必要な大量のタンパク質を得るために過剰発現させると凝集し、不溶性になるため解析に使用できない。一般に、N 末端 MBP や N 末端 GST などの付加によりタンパク質が可溶性になる場合があることが知られているため、N 末端 MBP を付加した IEE および IS629 TPase について、大腸菌で過剰発現させ、アミロース担体を用いたアフィニティ精製を行った。図 2 に示す通り、IS629 TPase は N 末端 MBP の付加により発現したタンパク質の大半が培養上清すなわち可溶性画分に存在し、アフィニティ精製後も可溶性を維持することができた。一方で、IEE はタグ付加によっても溶解性が改善されず、発現したタンパク質のほぼ全量が不溶性画分に存在した。

タンパク質タグの付加により、IEE は生理的性質（IS 切り出し効率）は維持されるが物理化学的性質すなわち溶解性は改善されず、IS629 TPase は逆に溶解性は改善されるが生理的性質が低下した。これらの結果は、タグを付加した精製タンパク質を用いた IEE および IS629 TPase の *in vitro* 機能解析は困難であることを示唆する。

2. 不溶性画分からのリフォールディング

凝集した不溶性のタンパク質が溶解性および生理的性質を回復するためには、リフォールディングと呼ばれる

タンパク質本来の高次構造の再生が必要となる。通常、タンパク質のリフォールディングは、高濃度の変性剤により可溶化された変性タンパク質溶液の希釈により達成される。透析などの操作により変性剤は変性効果がなくなる程度にまで希釈され、その過程で変性タンパク質の自発的な折りたたみ（フォールディング）が行われる。変性剤として尿素、塩酸グアニジン、各種界面活性剤などについてスクリーニングした結果、N-ラウロイルサルコシンを用いることで野生型の（タグを付加していない）IEE および IS629 TPase を可溶性タンパク質として精製することができた（図 3）。ただし、両者ともに精製タンパク質の安定性が低く、特に IEE は可溶性の維持に 20% 濃度以上のグリセリンが必要であった。すなわち、様々な酵素活性の測定や相互作用の検出など、タンパク質の *in vitro* 機能解析における各種の反応を阻害する可能性が高い溶液組成でなければ可溶性の維持が困難であった。

残された課題

本研究で明らかになったように、IEE の生物学的な機能を解明するためには、大腸菌の細胞内で維持できる程度の発現量で検討可能な手法を用いて機能解析を行う必要がある。例えば、DNA マイクロアレイを用いた網羅

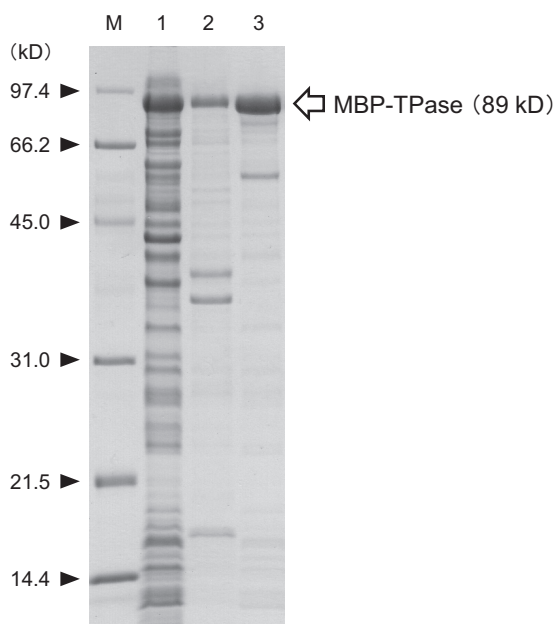


図 2. N 末端 MBP を付加した IS629 TPase の溶解性
レーン M, サイズマーカー；レーン 1, 培養上清（可溶性画分）；レーン 2, 培養時の不溶性画分；レーン 3, アミロース担体を用いたアフィニティ精製後のタンパク質溶液。

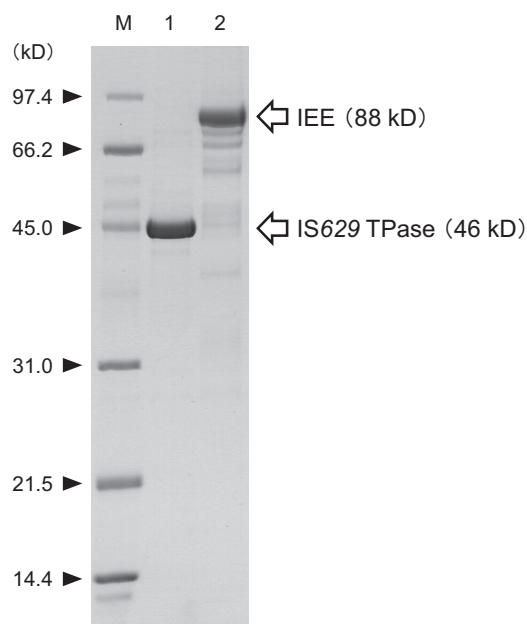


図 3. 不溶性画分からのリフォールディングにより得られた IEE および IS629 TPase
レーン M, サイズマーカー；レーン 1, IS629 TPase；レーン 2, IEE。

的な遺伝子発現解析を行い、IEE や IS629 TPase, あるいは IS の転移に関連する宿主因子などの遺伝子発現に連動して発現量が変化する遺伝子群を特定することにより、細菌における IEE の役割を (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) ゲノムのメンテナンスや細胞分裂など総合的な DNA 修復システムに関わる可能性も含めて幅広く検討することができると考えられる。また、IEE はタンパク質タグを付加しても生理的性質が変化しないことから、ChIP-seq (ChIP-chip) やプルダウンアッセイなどを用いた相互作用解析も有効であり、細胞内で IEE と結合するタンパク質または核酸 (の配列) を探索することで IEE の機能を理解することができると予想される。現在、平成 24 ~ 26 年度科研費 (基盤 C) を獲得し、DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を進めている。

IS の切り出しにおいてドナー DNA が修復されるメカニズムは、長年にわたる IS 研究の歴史において現在に至るまで未解明の課題である。IS がドナー DNA すなわちゲノムから切り出される際に修復が行われなければ、細菌は生存することができない。IEE を産生する EHEC において IS の転移を介してゲノムが多様化していることは、換言すれば IS が切り出される際に IEE が行う修復によってゲノム構造が維持された結果である。EHEC は食品媒介性の深刻な人獣共通感染症を引き起こす。将来、本研究を含む一連の成果と、EHEC の病原性解析や疫学研究を組み合わせた応用研究により、EHEC がゲノムに数多くの IS を保有することや IEE を産生することのメリットとデメリットがみえてくるはずであり、そこで得られた知見を EHEC の制御技術の開発に発展させることが可能となるかもしれない。

謝 辞

本研究は平成 24 年度動物衛生研究所重点強化研究課題として実施した。

引用文献

- 1) Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., et al.: Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* 8, 11-22 (2001).
- 2) Ooka, T., Ogura, Y., Asadulghani, M., et al.: 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).
- 3) Ooka, T., Terajima, J., Kusumoto, M., et al.: Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2888-2894 (2009).
- 4) Kusumoto, M., Ooka, T., Nishiya, Y., et al.: Insertion sequence-excision enhancer removes transposable elements from bacterial genomes and induces various genomic deletions. *Nat. Commun.* 2, 152 (2011).
- 5) Chandler, M. & Mahillon, J. : Insertion sequence revisited. In: *Mobile DNA II* (Craig, N.L., Craigie, R., Gellert, M., et al. eds.). ASM Press. 305-366 (2002).
- 6) Kusumoto, M., Suzuki, R., Nishiya, Y., et al.: Host-dependent activation of IS1203v excision in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* 97, 406-411 (2004).