

称号及び氏名 博士（獣医学）楠本 正博

学位授与の日付 平成18年2月20日

論文名 「Study for the mechanisms of IS1203_v transposition in Shiga toxin-producing
Escherichia coli 」

(志賀毒素産生性大腸菌における IS1203_v の転移機構に関する研究)

論文審査委員 主査 山崎 伸二

副査 馬場栄一郎

副査 小崎 俊司

論文要旨

志賀毒素産生性大腸菌（Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; STEC）感染症の散発事例や集団事例が多発し、特に小児や老人では、溶血性尿毒症症候群や脳症を併発し死亡するケースも見られることから、世界的に大きな問題となっている。1996年には、堺市において世界で類を見ない大規模集団食中毒事例が発生し、我が国においても大きな社会問題となった。STECの感染源は家畜であることから、動物由来感染症としての公衆衛生上の対策は獣医学領域においても重要な課題である。

STECの最も重要な病原因子は免疫学的に異なる2種類の志賀毒素（Stx）すなわち、Stx1とStx2であり、ともに毒素活性（28SリボゾームRNAの分解によるタンパク合成阻害）を示すAサブユニットと、細胞表面のレセプターであるGb3（グロボトリアシルセラミド）に結合するBサブユニットからなる。1997年、申請者は、より迅速かつ簡便なSTEC検出法の確立を目指し、2種類のStx遺伝子（*stx1* および *stx2*）を一度のPCRで型別できるマルチプレックスPCRを開発した。本キットの性能評価の過程で、ある種のSTEC O157:H7株が通常より長い*stx2* 遺伝子に由来するPCR産物を生成すること、また、この*stx2* 遺伝子が挿入配列（insertion sequence; IS）により不活性化されていることを見いだした。

ISの転移機構は①非複製的（カット&ペースト）転移、②複製的転移の2種類に大別される。もし上記の*stx2* 遺伝子に含まれるIS（IS1203_vと命名した）が非複製的な機構で転移し、正確な切り出し（precise excision）が起これば、その転移は宿主のStx2産生性を変化さ

せることになる。またゲノム解析の結果、IS1203vはSTEC O157:H7 堺株（以下堺株）において最も多くのコピー数が存在するが、大腸菌 K-12 株（以下 K-12 株）には存在せず、これまでに解析されてきた非病原性大腸菌に由来する IS とは異なる性質を持っている可能性がある。そこで本研究では、STEC における IS1203v の転移機構を解明することを目的とした。

第 1 章 STEC の *stx* 遺伝子に挿入された IS1203v の発見

IS は細菌の主要な転移因子であり、700 種類以上の IS がおよそ 20 のファミリーに分類されている。ある種の STEC O157:H7 株において、Stx2 の B サブユニットをコードする部分に IS が挿入された *stx2* 遺伝子を見いだした。この IS の塩基配列を解析したところ、STEC O111:H-で同定された IS1203 と約 100% の高い相同性を有していることから IS1203v と命名した。IS1203v はその両末端 25 bp からなる「逆向き繰り返し配列」と、2 つの open reading frame (ORF; ORFa および ORFb) から構成され、ORFa の 3'末端と ORFb の 5'末端は 1 bp 重複していた。

また、様々な STEC 分離株について *stx* 遺伝子を調べた結果、IS1203v が挿入された *stx2* 遺伝子を保有する STEC O157:H7 株を新たに見いだした。両 STEC 株の *stx2* 遺伝子を比較したところ、IS1203v の配列および *stx2* 遺伝子上の挿入位置は全く同じであるが、*stx2* 遺伝子の配列は異なっていた。したがって、両 *stx2* 遺伝子への IS1203v の挿入は独立して起こり、このような IS の挿入によって不活性化された *stx* 遺伝子を保有する STEC 株は自然界に広く分布している可能性が考えられた。

第 2 章 IS1203v の転移機構の解析と志賀毒素の再活性化

非複製的転移では IS がドナー DNA から切り出され (excision)、ターゲット DNA に挿入される。その際、IS の正確な切り出しが起これば、転移前に IS により不活性化されていた遺伝子が再活性化される。複製的転移では転移前の IS の複製物が別の部位に挿入されるため、IS がドナー DNA とターゲット DNA の両方に存在することになり、非複製的転移で見られる遺伝子の再活性化は起こらない。そこで、本章では、IS1203v の転移がどちらの機構で起こるかについて解析した。その結果、IS1203v の転移は、-1 フレームシフトによって ORFa と ORFb が融合した ORFab タンパク質が転移酵素 (transposase) として機能し、非複製的機構で起こることが判明した。また、ドナー DNA (*stx2* 遺伝子) から切り出された IS1203v は、その両末端で挿入時に複製した短い「繰り返し配列」を挟んだ環状の構造で存在し、正確な切り出しによって野生型の *stx2* 遺伝子が生成することが分かった。

次に、IS1203v が挿入された *stx2* 遺伝子を保有する STEC O157:H7 株 (野生株) を培養し、IS1203v の正確な切り出しによって生成した野生型の *stx2* 遺伝子を保有する変異株を単離した。両株の Stx 産生性を調べたところ、野生株では見られなかった培養上清への Stx2 の産

生が、変異株では検出された。つまり、IS1203v の正確な切り出しによって STEC O157:H7 の Stx2 産生性が変化し得ることが示唆された。

第 3 章 IS1203v の切り出し反応の宿主依存的な活性化

IS1203v に薬剤耐性遺伝子を挿入し、IS1203v のプラスミドからの切り出しを宿主の薬剤耐性の変化に反映させるアッセイ系を構築した。このアッセイ系を用いて、堺株および K-12 株における IS1203v の切り出しが起こる頻度を測定したところ、転移酵素の過剰発現の有無に関わらず堺株で高い値を示した。次に、様々な血清型および遺伝子型の STEC (10 株) と志賀毒素非産生性の大腸菌 (*eae*⁺ 2 株と K-12 株) を用いて同様のアッセイを行ったところ、IS1203v の切り出しが起こる頻度が高いグループ (STEC 9 株) と低いグループ (STEC 1 株と志賀毒素非産生性大腸菌 3 株) に二分され、その分類は IS1203v の有無と一致した。このことから、ゲノム上に IS1203v を保有する STEC (9 株) では、IS1203v の切り出しが高頻度に行われることが示唆された。堺株および K-12 株では、ゲノム構造の大部分は共通であることから、堺株に特異的なゲノム領域に IS1203v の転移を活性化させる遺伝子が存在する可能性が考えられた。

総括

1. 由来の異なる 2 株の STEC O157:H7 において、IS1203v が挿入された *stx2* 遺伝子を見いだした。両株において、IS1203v の配列および *stx2* 遺伝子上の挿入位置は全く同じであるが、*stx2* 遺伝子の配列は異なっていた。
2. IS1203v の転移機構を解析した結果、-1 フレームシフトによって生成した ORF_{ab} 融合タンパク質が転移酵素として機能し、IS1203v を非複製的機構で転移させることを明らかにした。
3. 切り出された IS1203v は、挿入時に複製した「繰り返し配列」を挟んだ環状の構造で存在し、また、IS1203v の正確な切り出しによって、上記の挿入不活性化された *stx2* 遺伝子が野生型に戻り、宿主の Stx2 産生性が変化し得ることを明らかにした。
4. 様々な血清型および遺伝子型の STEC 分離株について IS1203v の切り出しが起こる頻度を測定し、ゲノム上に IS1203v を保有する株では、IS1203v を保有しない株より高頻度に IS1203v の切り出しが起こることを明らかにした。

本研究において、IS1203v は非複製的な機構で転移し、その挿入または正確な切り出しによって遺伝子の挿入不活性化または再活性化に関与すること、すなわち、STEC の Stx 産生性に影響を与えることを示した。STEC に特異的に存在する IS1203v の転移は他の病原性因

子の産生にも影響している可能性も考えられる。本研究で使用した、IS1203v が挿入された *stx2* 遺伝子を保有する STEC 株はすべてウシ由来株であり、ウシの腸内環境が IS1203v の転移に影響を与え、STEC の多様性を高めている可能性もある。IS1203v と STEC の多様性や病原性との関係については、今後の検討課題である。

審査結果の要旨

志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; STEC) 感染症の散発事例や集団事例が多発し、特に小児や老人では、溶血性尿毒症症候群や脳症を併発し死亡するケースも見られることから、世界的に大きな問題となっている。1996 年には、堺市において世界で類を見ない大規模集団食中毒事例が発生し、我が国においても大きな社会問題となった。STEC の感染源は家畜であることから、動物由来感染症としての公衆衛生上の対策は獣医学領域においても重要な課題である。

申請者は、より迅速かつ簡便な STEC 検出法の確立を目指し、2 種類の Stx 遺伝子 (*stx1* および *stx2*) を一度の PCR で型別できるマルチプレックス PCR を開発し、本キットの性能評価の過程で、ある種の STEC O157:H7 株が通常より長い *stx2* 遺伝子に由来する PCR 産物を生成すること、また、この *stx2* 遺伝子が挿入配列 (insertion sequence; IS) により不活性化されていることを見いだした。IS の転移機構は①非複製的 (カット&ペースト) 転移、②複製的転移の 2 種類に大別される。もし上記の *stx2* 遺伝子に含まれる IS (IS1203v と命名した) が非複製的な機構で転移し、正確な切り出し (precise excision) が起これば、その転移は宿主の Stx2 産生性を変化させることになる。またゲノム解析の結果、IS1203v は STEC O157:H7 堺株 (以下堺株) において最も多くのコピー数が存在するが、大腸菌 K-12 株 (以下 K-12 株) には存在せず、これまでに解析されてきた非病原性大腸菌に由来する IS とは異なる性質を持っている可能性がある。そこで本研究では、STEC における IS1203v の転移機構を解明し以下の知見を得た。

1. 様々な STEC 分離株の *stx* 遺伝子を調べた結果、由来の異なる 2 株の STEC O157:H7 に、IS1203v が挿入された *stx2* 遺伝子を見いだした。両株において、IS1203v の配列および *stx2* 遺伝子上の挿入位置は全く同じであるが、*stx2* 遺伝子の配列は異なっていた。

2. IS1203v の転移機構を解析した結果、-1 フレームシフトによって生成した ORF_{ab} 融合タンパク質が転移酵素として機能し、IS1203v を非複製的機構で転移させることを明らかにした。

3. 切り出された IS1203v は、挿入時に複製した「繰り返し配列」を挟んだ環状の構造で存

在し、また、IS1203v の正確な切り出しによって、上記の挿入不活性化された *stx2* 遺伝子が野生型に戻り、宿主の Stx2 産生性が復帰し得ることを明らかにした。

4. 様々な血清型および遺伝子型の STEC 分離株について IS1203v の切り出しが起る頻度を測定し、ゲノム上に IS1203v を保有する株では、IS1203v を保有しない株より高頻度に IS1203v の切り出しが起ることを明らかにした。

本研究において、IS1203v は非複製的な機構で転移し、その挿入または正確な切り出しによって遺伝子の挿入不活性化または再活性化に関与すること、すなわち、STEC の Stx 産生性に影響を与えることを示した。本研究によって得られた知見は、IS の新たな転移機構解明にとどまらず、IS の転移と STEC の病原性発現に大きく関わることから、獣医公衆衛生学や分子遺伝学の発展に大きく貢献するものと評価できる。本論文の審査および学力確認の結果をあわせて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。