

Insertion Sequence の挿入が Stx 2 遺伝子翻訳を ストップさせた理由

真子俊博・楠本正博*

福岡市保健環境研究所 保健科学部門

*東洋紡 敦賀バイオ研究所

The Reason why the Insertion of Insertion Sequence Stopped Stx2-gene Translation

Toshihiro MAKUO・Masahiro KUSUMOTO

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要旨

Stx2 産生の低い O157:H7 についてシーケンスを行ったところ Stx 2 遺伝子に Insertion Sequence (IS1203)の挿入が認められた。

IS1203 は Stx 2 遺伝子の A サブユニットの後半に挿入がみられ、その塩基は 1382bp であった。塩基配列は標準株（堺株）に対して 18 塩基異なりアミノ酸レベルでも 2 個が違っていた。塩基配列解析の結果、IS1203V にはストップコドンが数カ所に見られ、このために Stx 2 の遺伝子翻訳が IS1203 の所でストップし Stx 2 の産生が抑制されたものと考えられた。

Key Words : O157 : H 7 , Stx 2 , Insertion Sequence , IS1203

はじめに

腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 は 1999 年に全ゲノムが解読され染色体の基本構造が明らかになり、インターネット上に公開された¹⁾。このゲノム解析に用いられた株は 1996 年に堺市を中心に集団発生時に分離された株で、Sakai 株と命名されている。堺株のゲノムは非病原性大腸菌 K-12 に比べ遺伝子が約 20 %大きく、その多くがファージやファージ様の遺伝子で O157 の病原性の代表とされる Stx 1, Stx 2 遺伝子もファージによって運ばれている。

今回、Stx 2 遺伝子の存在が認められるにもかかわらず、Stx 2 産生性の極めて低い O157:H7 株 (EH809) についてシーケンス解析を行ったところ、Stx 2 遺伝子に IS の挿入が確認されたのでその結果を報告する。

材料および方法

ペロ毒素の定量はマイトマイシン C を添加した CAYE 培地に菌を接種後、一夜浸透培養した。翌日培養液をポリミキシン B 処理後 15000rpm 5 分遠心した上清を用い、デンカ生研の VTEC-RPLA キットを用いて毒素の定量を行った。菌株は平成 13 年に下痢患者より分離された O157:H7 (VT1,2) を用いた。毒素遺伝子の確認は One shot PCR typing kit (タカラ) および東洋紡より分与された PCR 試薬を用いた。シーケンス解析は東洋紡敦賀バイオ研究所へ依頼した。

結 果

O157:H7 の VT1 定量値は RPLA 法で 3200 倍で VT2 は 16 倍であった。Stx 遺伝子は VT1 ではコントロール株と同じ位置にバンドが認められたが、VT2 ではコントロール株と同じ位置にはバンドが見られなかった。しかし、1.7kb の位置にバンドが認められた (図 1)。

Stx2 の塩基配列を Table 1 に示した。上段の配列は標

Table 1 Complete nucleotide sequence of the Insertion Sequence (IS1203V) in a Shiga Toxin 2 gene of O157:H7

標準株 (堺株) 0157:H7(809) アミノ酸配列

```

ATGAAGTGTATATTATTTAAATGGGTACTGTGCCTGTTACTGGGTTTTCTTCGGTATCCTATCCCGGGAGTTACGATAGACTTTTCGACCCAAC
.....C.....A.....T....
M K C I L F K W V L C L L L G F S S V S Y S R E F T I D F S T Q

AAAGTTATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGACCCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACACACCCACCGGGCAGTTA
.....A.....
Q S Y V S S L N S I R T E I S T P L E H I S Q G T T S V S V Q I N H T P P G S

TTTTGCTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCTATCAGGCGCGTTTGGACCATCTTCGTCTGATTATTGAGCAAAATAATTTATATGTGGCCGGTTCGTTAATACGGCAACAAATA
.....
Y F A V D I R G L D V Y Q A R F D H L R L I I E Q N N L Y V A G F V N T A T N

CTTTCTACCGTTTTTTCAGATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACACCGTTTCCATGACACCGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTGTGCGAGCGCTGGAACGTTCC
.....
T F Y R F S D F T H I S V P G V T T V S M T T D S S Y T T L Q R V A A L E R S

GGAATGCAATCAGTCGTCACCTACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTGTCACCTGTCAC
.....
G M Q I S R H S L V S S Y L A L M E F S G N T M T R D A S R A V L R F V T V T

AGCAGAAGCCTTACGCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGAGCTGGACCTCACTCTGAACTGGGGGC
.....
A E A L R F R Q I Q R E F R Q A L S E T A P V Y T M T P G D V D L T L N W G

GAATCAGCAATGTGCTTCGGGAGTATCGGGGAGAGGATGGTGTGAGAGTGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAGCGATACTGGGGACTGTGGCCGTTATACTGAATTGCCAT
.....G.....C.....T....
R I S N V L P E Y R G E D G V R V G R I S F N N I S A I L G T V A V I L N C H

CATCAGGGGGCGGTTCTGTTCGCGCGTGAATGAAGAGAGTCAACCAGAATGTGAGATAACTGGCGACAGGCTGTTATAAAAATAACAATACATTATGGGAAAGTAATACAGC
.....T.....C.....
H Q G A R S V R A V N E E S Q P E C Q I T G D R P V I K I N N T L W E S N T A

GAATGTGAGATAACTGGCGACAGGCTGTTATAAAAATAACAATACATTATGGGAAAGTAATACAGCTGCAGCGTTTCTGAACAGAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTAA
.....C.....
E C Q I T G D R P V I K I N N T L W E S N T A A A F L N R K S Q F L Y T T G K

ATAAATGAAGAAGATGTTTATGCGGTTTTATTTGCATTAGCTTCTGTTAATGCAATGGCGGCGATTGTGCTAAAGGTAATAATGAGTTTTCAAGTATAATGAGGATGACACAT
.....C.....A.....T....
* M K K M F M A V L F A L A S V N A M A A D C A K G K I E F S K Y N E N D T

TTACAGTGAAGTTGACGGGAAAGAACTGACAGCAGTCGCTGGAATCTGCAACCGTTACTGCAAAAGTCTCAGTTGACAGGAATGACTGTCACAATCAAATCCAGTACCTGTGAA
.....C.....A.....G.....C.....
F T V K V A G K E Y W T S R W N L Q P L L Q S A Q L T G M T V T I K S S T C E

TCAGGCTCCGATTGCTGAAGTGCAGTTTAAATGACTGA
.....
S G S G F A E V Q F N N D *

```

▲ が IS 挿入場所

Table 2 Insertion Sequence (IS1203V)

```

tgaaccgccccgggttcttgagagtggtttatctgtgaactcaggctgccagatcatcgtttccgatggaagcataataagcttttctgcttctgccggaggagatggcc
cagccttcccagcaatcgtcgattgttataccagtcacccacggttagtggtgccagttccacttctgcacgggttttccagctcttacggtgtattacctccgcttgtaaagac
cattgatgtctcagccatcgctgtgtcatagagtcgcctgtactccctgttgatgccagtaacccggctcttttagtcgctccgtatagccagtgacacatactgagagc
ctttatcgctgtgatggatgggtgccagacggacacggggcccaaacgctgtccagcgcatccagcacgaatgtcgtttccatagacgatgagaccgccacccca
cgatgtatccggcaaacacatcaatgataaacgccacatagacgaagccctgccatgtgctgacgtaagtaaatcagccaccacagctggtcaggtcgttctgccac
gaactgacggtttacgcggtgcctgcggcaacggctttccggctgatggctgtacggaccttttaccggaagacaccggcaagtcataaccgcatgagacgt
gccactgtacatctggccacctgattccttcccgaacaactgacgccagactttacgcacacgttacacctgatgattttcatcgtatagcgctgtatctctcttcagc
cagtcgtcgtgctgcgcacgggcactgcgtttatccggatgatgtcgtgttgctgacaatggtaatacgttgacggggcaatatgcagttcgtgcataccggtccgac
cccgtactgctcacgcagcttatccagcagtggtcatcttttccagagcggtgcgaactccgccttcgaaaataagcggaagcctggcgaaggatatcgttactgcg
gcgcatgtcacgattttcacgttccagctctttcagacgctgacgttcagcgctggtgagcccaccatcaccgccccgggtatcccgtcatcgtggcgaaccgagacac
gcagagtctccggctacagccaatcttggggcaatggaacaaattccgcccactgtgagtcattatcctgactttccagaaccatacgaatgcccgtgacgg
acttcgggggaaaaacagatatttttagtcatcctgtttacctcttttcagggagtttagtctccaggatttcggggcggttcaggcg

```

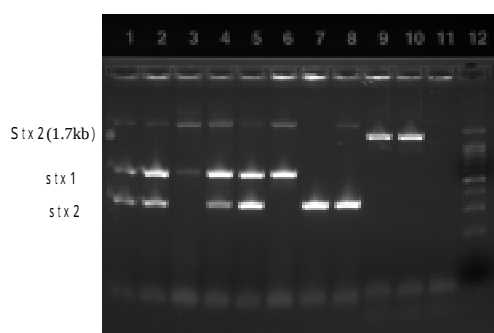


図1 Stx 遺伝子の全長 PCR の反応性

No. 1 ~ 8 の Stx1,2 (市販プライマーによる)

No. 6 - EH809 株, No. 9, 10 は分与プライマーの PCR 像 (1.7kb の位置にバンドを認める)

準株 (堺株) の Stx2 全長配列で中段は試験株の配列で塩基の異なる部分のみ表示し, 3 段目はアミノ酸の配列を示した. 挿入箇所は▲で示し, その挿入配列を Table 2 に示した. その結果, Stx 2 の A サブユニットの後半に 1306 塩基の遺伝子断片が挿入されていた. 断片の塩基配列は Insertion Sequence であり, IS1203 と高い相関性が見られた.

Stx 2 の全塩基配列について精査した結果, 堺株の Stx 2 の塩基配列に比べ 20 塩基異なり, アミノ酸レベルでも 2 つのアミノ酸が異なっていた. Insertion Sequence (IS1203) の挿入により毒素遺伝子翻訳の際のコドンの読み枠がずれており (フレームシフト), さらに Insertion Sequence の配列内に数個のストップコドンが認められた.

考 察

公開された O157 : H7 のゲノムには Insertion Sequence も多数組み込まれている¹⁾. 今回の O157 の Stx 2 遺伝子内に挿入が見られた Insertion Sequence は O157 の中でも最多の IS628 の一種の IS1203 であった. Insertion Sequence はトランスポゾン的一种であり, 遺伝子上を任意に移動するのであるが, この移動や挿入する際に両端の一部の遺伝子が挿入箇所に残され, そのために塩基配列のフレームシフトが起こる可能性がある. 病原細菌ではトランスポゾンが頻繁に移動や挿入が起こることが考えられるものの, その病原性には直接変化として現れないと捉えられてきた. しかし, Kusumoto²⁾らは O157 の Insertion Sequence が挿入された株について詳細に調

べ, Insertion Sequence の挿入が Stx のバリエーションを生じていることや, 数株の O157 株に起こっていると報告している. さらに, Insertion Sequence の挿入箇所は菌株により異なり Stx2 遺伝子内で一定せず, 塩基配列も色々と異なるとしている. また, 古田ら³⁾は Stx1, Stx2 遺伝子の SSCP 解析で Stx2 遺伝子に種類の異なるパターンがあり, Stx 2 遺伝子の増幅バンドから抽出した DNA を用いてシーケンスした結果, 数百 bp のシーケンスにおいてもいくつかの塩基が違っていることを報告している.

このことは, 同じ血清型の EHEC 株においてもその毒素遺伝子にかなりの頻度で塩基が異なることを示しており, PCR を主体とした現在の検査体制では遺伝子の増幅が行われない可能性もある. 特に, Stx 2 バリエーションの問題は免疫学的な検査でしか判明しないことから, Stx 2 遺伝子の検査手法を検討する必要がある.

O157 : H7 は Stx 2 毒素を産生し, 病原性が強い. しかも, Stx 2 遺伝子は 1 コピーでこの毒素がコードされた遺伝子は菌の分裂により毒素が産生されるが, その産生レベルは低い. 遺伝子レベルでみた場合 Stx 2 の産生は A, B 両サブユニットとも開始コドンより始まり, 最後のストップコドンで終了している. この遺伝子内に IS が挿入されることによりこの遺伝子の翻訳は挿入された遺伝子の前まで翻訳が進むものの, IS 遺伝子により翻訳が制限され IS 内にあるストップコドンによって翻訳が止まってしまう. また, ファージやトランスポゾンなどが遺伝子内に挿入された場合, それが 3 塩基の倍数の配列であったとしても挿入遺伝子がコードするペプチド鎖が毒素遺伝子産物であるポリペプチド鎖を分断するかたちで挿入されることから, 機能するタンパク産物にはならないものと考えられる.

O157 の Stx 遺伝子はファージに由来するものであるが, このファージは菌体内で溶原化の状態にあり, 毒素の産生もファージに付属するプロモーターにより産生を制限されている. しかし, 紫外線や薬剤などの刺激により溶菌サイクルとなり多量のファージが湧出される結果 Stx2 遺伝子の転写が多量に引き起こされる. 当研究所ではこの刺激薬にマイトマイシン C を用い, EHEC の検出率の向上をはかっている⁴⁾. すなわち EHEC の毒素産生を高め, 高感度な方法で検査し毒素の検出がみられた検体について集中的に検査を行っている. この結果, 血清型に左右されずに EHEC の検査が可能となり, 特に型別不能株の検出率は他都市に比べて高い. しかし, 一方でこの薬剤刺激にまったく反応しない株も見られる. 多くの EHEC 株はマイトマイシン C の刺激で数百倍 (平均 40 倍) 近く産生が高まるのであるが, あまり反応しない株や, まったく影響を受けない株も見られる.

産生性の悪い 10 株について IS 挿入の可能性を調べたが、1 株のみで他の株では IS 挿入は認められなかった。ではなぜ毒素遺伝子があるにもかかわらず、産生が悪いのであろうか。これについてはプロモーターなどの関連遺伝子の調査も必要であろうが、溶菌サイクルの回避や、Stx 遺伝子内の変異など遺伝子内の何らかの変化により起こっているのではあると思われる。最近、磯部ら⁵⁾は下痢患者より分離した O128:HUM 株の Stx 2 遺伝子が Stx バリエントである Stx2f であり、しかも市販プライマーを使用した PCR では Stx 2 遺伝子は確認ができなかったとしている。当所の分離株も短い断片を増幅する市販 PCR キットでは増幅が確認されなかったが、やや大きな断片を増幅するプライマーの選択により確認が可能であった。しかし、実際には標準株のバンド位置ではなく Insertion Sequence の挿入のために 1.7kb の位置にバンドが見いだされた。

大西⁶⁾は O157 のゲノム解析で全ゲノム PCR スキャニング法によって O157 の菌株間で高い多様性があることを報告している。それによると、個々のファージやコピー数、内部配列など高い頻度で変化しており、特に Stx2 遺伝子では 8 株中 6 株が標準株の位置と異なる場所にあり、Stx1 ファージと同一位置にあるとしている。さらに、全体でも菌株により Stx2 遺伝子のみでなく、ゲノム上で色々な組み替えや置換が起こっていることを報告している。これらの変化や多様性が菌の検査上でどのような形として現れてくるものかは今後の研究に待つほかはないが、位置の変化や移動によって塩基のフレームシフトが容易に起こることから、Stx の産生性の減少や消失なども考えておく必要がある。

現在、EHEC の検査では PCR 法が最も信頼できる方法として定着しているが、用いるプライマーの選択により結果に影響がでる可能性を考えておく必要がある。Stx 1, 2 のバリエントは今後も広がっていくであろうし、菌自体の遺伝子変異も起こりうることなど柔軟な対応が必要と考える。

文 献

- 1) Hayashi, T, *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) Kusumoto, M, *et al* : identification of an insertion sequence, IS1203 variant, in a Shiga toxin 2 gene of *Escherichia coli* O157:H7, *J. Biosci. Bioeng*, 87(1), 93-96, 1999
- 3) 古田喜美, 他: リアルタイム PCR および SSCP 法を用いた志賀毒素 STX1, STX2 の毒素型別・遺伝子型別に関する研究, 広島市衛研年報, 23, 43-48, 2004
- 4) 真子俊博, 他: マイトマイシン C による EHEC の stx 産生性, 亜テルル酸カリウム感受性, 溶血性に関する疫学的研究, 福岡市保環研所報 26, 82-87, 2001
- 5) 磯部順子, 他: 下痢患者からの stx f 遺伝子保有志賀毒素産生性大腸菌 O128:HUM の分離, 感染症学雑誌, 78(12), 1000-1004, 2004
- 6) 大西 真: 大腸菌ゲノムの多様性に関する研究, 日本細菌学雑誌, 59(3), 449-455, 2004