

バクテリアの挿入因子によるゲノム再編の解析

●大坪栄一 ◆大坪久子 ◆土本 卓

東京大学・分子細胞生物学研究所

〈研究の目的と進め方〉

多くのゲノムの全塩基配列が決定されたことによって、遺伝子の同定と機能の解析は著しく進んでいるが、遺伝子以外の領域の解析はあまりなされていない。このような状況下で、本研究の目的は、大腸菌K-12株のMG1655と最近全塩基配列が決定されたW3110間のISの分布の違いからゲノム動態を明らかにすること、高熱抗酸菌 *Sulfolobus tokodaii* ゲノム上のISを同定し、古細菌においてもISがゲノム再編に関与していることを解明すること、大腸菌K-12株MG1655のゲノム配列に基づいて他の種々の大腸菌ゲノムに生じた挿入・欠失・重複・逆位などの変異を同定し、これらをパターン化し得られる系統樹から大腸菌系統の関係を解析することである。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) 大腸菌K-12株のMG1655とW3110ゲノム間のISの分布の違いからゲノム動態を明らかにすること、
- 2) *S. tokodaii* ゲノム上のISを同定し、古細菌におけるISのゲノム再編への関与を解明すること、
- 3) 大腸菌K-12株MG1655のゲノム配列に基づいて他の種々の大腸菌ゲノムに生じた挿入・欠失・重複・逆位などの変異を同定し、これらをパターン化し得られる系統樹から大腸菌系統の近縁関係を解析すること。

〈研究期間の成果〉

- 1) 大腸菌K-12株MG1655とW3110間のISの分布に大きな違いを見出した。J. Lederbergが初めて使用したK-12のゲノムが、50年の間に塩基置換変異以上にISにより激しく変えられることが分かった。
- 2) 古細菌 *S. tokodaii* ゲノム上には、驚いたことに、7つのファミリーに属する17種類のIS（全て新規因子）が222コピーも存在することが分かった。各ISを挟む領域に転移の標的配列が重複しているかどうか、各ISがtruncateしているかどうか知ることによって、50%以上のISの隣接領域でゲノム再編が起こっていることが分かった。このことは、古細菌でも、ISがゲノム再編に深く関わっていることを示す。この結果は、将来、他の古細菌ゲノムの解析の基礎になるものと考えられる。
- 3) 大腸菌K-12株MG1655ゲノムの配列を基に、他の大腸菌（K-12株W3110とJE5519、*E. coli* C、ECOR コレクションの6株）の0-10分に相当する領域（約465 kb）を、5 kb 毎の間隔でハイブリダイズするプライマーを使用してPCRを行った。MG1655から生じるものとは大きさが異なるDNAの塩基配列を決定し、MG1655のそれと比較した結果、挿入、欠失、置換、重複などの変異が存在し、中には任意の幾つかの株で共通に見られるものがあつた。そこで、これら変異の有無を0, 1でバーコード化し、得られたバーコードを用いて系統樹を作成した。また、幾つかのハウスキーピング遺伝

子の塩基配列を決定して得られた系統樹と比較することによって、ここで得られた系統樹が妥当なものであることを示した。

さらに我々は、感染研から分与された合計68種のEnterohemorrhagic, Shiga-toxigenic, Enteroinvasive, Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Uropathogenic大腸菌と赤痢菌(*S. flexneri*, *S. sonnei*)のゲノム上の有用マーカー変異の有無を解析し、この結果に基づいて系統樹を作成することによって、大腸菌が異なるいくつかのクラスターを成すこと、その中でO157数株は1つのクラスターに、しかし、Shiga-toxigenic大腸菌は少なくとも3つのクラスターに分かれることを示唆する結果を得た。このことは、医学的分類が必ずしも生物学的分類とは一致しないことを示すが、病原のShiga毒素がフェージ等によって水平移動することを考えれば驚くことではなく、本方法で生物学的に真の分類と系統の関係が解明できたことを意味する。また、*S. flexneri* 3系統が大腸菌の種々のクラスター内の特異的な1群であることを示すことができた。

〈国内外での成果の位置づけ〉

変異の有無を0, 1でバーコード化して得られる系統樹は、これまでのハウスキーピング遺伝子の塩基配列による系統樹より簡便に作成でき、遺伝的距離が大きくなるので、近縁種の系統の区別がつきやすく、多種多様な大腸菌の分類と系統関係の解析に有用である。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

特になし。

〈今後の課題〉

本特定研究において計画した研究は、ほぼ計画通り終了したと考える。特に(3)に関する研究は、感染研から分与された合計68種の病原性大腸菌と近縁とされる赤痢菌を解析し、病原性の由来、及び、赤痢菌との系統関係を明らかにできたものであり、興味ある結果が得られたと考えている。

本研究で対象としたバクテリアの挿入因子ISは、自身がコードするトランスポゼースの働きにより転移すると共に、その能力によりゲノムを改変する因子として注目されている。我々は、本特定領域研究で種々様々なISを同定し、これらがいくつかのファミリーを形成していること、中でも、挿入因子IS1に関しては、構造が著しく異なるファミリーを成すメンバーが、らん藻、古細菌を含む多様な細菌に存在するという興味ある事実を明らかにした。挿入因子IS1は、最初に記載された転移因子であり、多薬剤耐性、エントロトキシン遺伝子の転移による伝播にも関わっている最小の因子であり、我々が1978年に転移因子としては初めて全塩基配列を決定したものである。このIS1は、他の因子とは異なり、2つのorfから翻訳時

のフレームシフトを介してトランスポゼースを産生する、非常に興味のある研究対象である。IS1ファミリーを成す構造的に多様なメンバーのトランスポゼースには、ジンクフィンガーモチーフ、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフや、レトロウイルスなどで同定されている転移組み換え触媒活性を司る3つの酸性アミノ酸から構成されるDDEモチーフなど、の特徴のある構造が保存されていることが見出された。トランスポゾンの転移反応は、トランスポゼースが自身の末端を認識結合し、2つのトランスポゼース分子と両IR DNAを含む複合体（トランスポゾーム）を形成し、自身の末端と転移の標的となるDNA鎖との組み換え(ストランド トランスファー)反応に大別されるが、本研究で見出された構造に基づいて、IS1 トランスポゼースのドメイン構造と各ドメインの機能の解析が可能であり、今後この解析を通してIS1の転移の分子機構が明らかにできるのではないかと考えている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0403301222
Kato, N., Yamazoe, K., Han, C.-G., and Ohtsubo, E. New insertion sequence elements in the upstream region of *cfiA* in imipenem-resistant *Bacteroides fragilis* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 979-985 (2003)
2. 0403301237
Choi, S., Shinya Ohta, and Ohtsubo, E. A novel IS element, IS621, of the IS110/IS492 family transposes to a specific site in repetitive extragenic palindromic sequences in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185, 4891-4900 (2003).
3. 0403301249
Ohtsubo, E., Minematsu, H., Tsuchida, K., Ohtsubo, H., and Sekine, Y. Intermediate molecules generated by transposase in the pathways of transposition of bacterial insertion element IS3. *Adv. Biophys.* 38: 125-139 (2004)
4. 0403301254
Ohta, S., Yoshimura, E., and Ohtsubo, E. Involvement of two domains with helix-turn-helix and zinc finger motifs in the binding of IS1 transposase to terminal inverted repeats. *Mol. Microbiol.* 53:193-202 (2004)
5.
Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T., Wanner, B. L., Mori, H., and Horiuchi, T. Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol. Syst. Biol.* in press (2005)
6.
Sakaguchi, Y., Hayashi, T., Kurokawa, K., Nakayama, K., Oshima, K., Fujinaga, Y., Ohnishi, M., Ohtsubo, E., Hattori, M., and Ogma, K. The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* in press (2005)

〈参考論文〉

- Cheng, C., Motohashi, R., Tsuchimoto, S, Fukuta, Y., Ohtsubo H., and Ohtsubo E. Polyphyletic origin of cultivated rice: based on the interspersed pattern of SINEs. *Mol. Biol. Evol.* 20:67-75 (2003)
- Ohtsubo, H., Cheng, C., Tsuchimoto, S., and Ohtsubo E. Rice retroposon p-SINE1 and origin of the cultivated rice. *Breed. Sci.* 58: 1-11 (2004)

Xu, J.-H., Osawa, I., Tsuchimoto, S., Ohtsubo, H., and Ohtsubo, E. Two new SINE elements, p-SINE2 and p-SINE3, from rice. *Genes Genet. Syst. Genes Genet. Syst.* 80: 161-171 (2005)

Xu, J.-H., Kurata, N., Akimoto, M., Ohtsubo, H., and Ohtsubo, E. Identification and characterization of Australian wild rice strains of *Oryza meridionalis* and *Oryza rufipogon* by SINE insertion polymorphism. *Genes Genet. Syst.* 80: 129-134 (2005)