

下痢症患者より分離された *Escherichia coli* O44 の制限酵素 *Eco*O44I の精製

宮原美知子・篠原 信之*・三瀬 勝利

Purification of *Eco*O44I restriction endonuclease in *Escherichia coli* O44 isolated from an affected human

Michiko Miyahara, Nobuyuki Shinohara, Katsutoshi Mise

A restriction endonuclease (ENase) designated *Eco*O44I was purified without non-specific nucleases from enteropathogenic *Escherichia coli* O44 Hiromi strain of affected human origin. The yield was 1, 100 units/g of wet cells. The *Eco*O44I ENase recognized and cleaved the specific sequence of 5'-GGTCTC-3' (1/5) as was the case with *Eco*31I or *Bsa*I ENase. Because of the stability and high yield, *Eco*O44I would be useful for recombinant DNA technology after isolation of *Eco*O44-positive, avirulent mutant strains of *E. coli* O44 Hiromi.

Keywords : restriction endonuclease, enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O44, *Eco*O44I restriction endonuclease, *Eco*31I restriction endonuclease, food-poisoning bacteria

(Received May 31, 1996)

緒 言

大腸菌からの制限酵素は *Eco*RI をはじめ、多数のものが見いだされている¹⁻³⁾。しかし、病原大腸菌の制限酵素はほとんど見いだされていない。我々の研究室ではヒトおよび動物由来の病原大腸菌から数種の制限酵素を発見し、そのうち三種のものが企業化され遺伝子操作に使用されている⁴⁻⁶⁾。

我々は本報告で1980年代後半愛媛県で分離された病原大腸菌を使って制限酵素のスクリーニング研究を行い、5'-GGTCTC-3' という非パルンドローム配列を認識する *Eco*O44I 制限酵素を見いだしたので、その精製と性質を報告する。なお、本酵素の産生菌は腸管病原性大腸菌血清型 O44 である。

実験方法

1. 菌株と培地

使用した病原性大腸菌 10 株は患者由来株で、すべて 1980 年代後半愛媛県で分離されたものである。病原性大腸菌には、腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*; EPEC)、腸管毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *E. coli*; ETEC)、および腸管侵入性大腸菌 (enteroinvasive *E. coli*; EIEC) が含まれる。菌株の培養には BHI 培地と LB 培地⁷⁾ を使用した。

2. 酵素類と DNA

前報⁸⁾と同様、宝酒造⁸⁾、東洋紡⁸⁾、日本ジーン⁸⁾および New England Biolabs より購入した。

3. 制限酵素の検出と制限切断解析

前報⁹⁾と原則的に同一の方法 (=リゾチーム溶菌法¹⁰⁾) によっている。制限酵素の検出実験は最低 3 回反復追試した。

4. *Eco*O44I 制限酵素の精製法

E. coli O44I Hiromi 株からの *Eco*O44I 制限酵素の精製法を Table 1 にまとめる。最終分画には非特異的ヌクレアーゼは検出されなかった。

実験結果

1. 病原大腸菌 O44 からの制限酵素の検出

検索した病原大腸菌 10 株はすべてリゾチームで良く溶菌した。このうち 1 株、すなわち *E. coli* O44 Hiromi 株から 1 種類の制限酵素が検出され、Smith と Nathans の命名法¹¹⁾により *Eco*O44I と命名した。本菌は 1987 年夏、愛媛県の A 中学の散発的下痢症患者の一人から分離されたものである。当時 500 人の中学生のうちで十数名が下痢を起こしたが、発生は小規模で予後良好、原因等が特定できなかった。食中毒事件としては扱われなかった。本菌は病原性機構から enteropathogenic *E. coli* として分類されている。

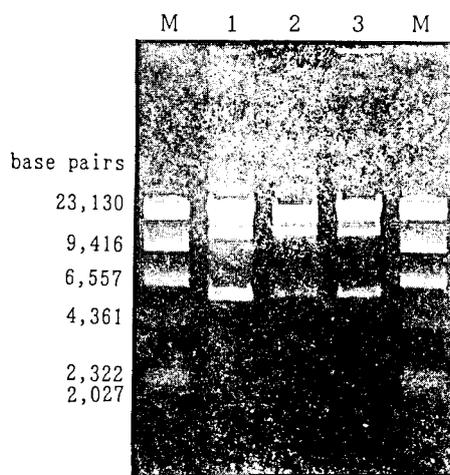
2. *Eco*O44I 制限酵素の精製と特異性

Table 1 に示した方法により、湿重量 23 g の菌体から

* 愛媛県立医療技術短期大学

Table 1. Procedure for purification of *Eco*O44I ENase from *E. coli* O44 Hiromi

Step	Procedure
1.	Twenty-three g of <i>E. coli</i> O44 Hiromi cells grown overnight in BHI broth were disrupted by sonication.
2.	The cell lysate was centrifuged at 40,000 rpm for 100 min in a Hitachi 55p-72 rotor to remove cell debris.
3.	PEI (polyethyleneimine) was slowly added to the supernatant at a final concentration of 1%.
4.	<i>Eco</i> O44I ENase was recovered from the PEI pellet by repeated extraction with buffer A supplemented with 200 mM NaCl as described in Miyahara et al. ⁹ .
5.	The extract containing <i>Eco</i> O44I was applied to heparin-agarose column chromatography. <i>Eco</i> O44I eluted at 480 ~610 mM NaCl.
6.	The <i>Eco</i> O44I fraction obtained in step 5 were applied to MonoQ anion column chromatography (Pharmacia LKB, Uppsala). <i>Eco</i> O44I eluted at 500 mM NaCl. The yield of <i>Eco</i> O44I was 1,100 units/g of wet cells.

Fig. 1. Cleavage patterns of λ DNA after digestion with *Eco*O44I and *Bsa*I (*Eco*31I isoschizomer)

Lane 1, phage λ DNA+*Eco*O44I; 2, λ DNA+*Eco*O44I+*Bsa*I; 3, λ DNA+*Bsa*I; M, molecular size marker (*Hind*III-cleaved λ DNA)

26,000 unitsの*Eco*O44Iを精製することができた。*E. coli* O44 Hiromiにおける*Eco*O44Iの収量はかなり高く1g当たり1,100 units以上のものが得られたことになる。本酵素は安定で、精製中失活することはなかった。

全塩基配列の決定されている基質DNAの切断パターンとコンピューター解析より、*Eco*O44Iは5'-GGTCTC-3' (1/5)を認識・切断する*Eco*31I¹²⁾と*Bsa*I(市販品)のアイソシゾマーであることが推定された。このため上記*Eco*O44Iと*Bsa*I酵素の混合切断実験を行い(Fig. 1),両者がアイソシゾマーであることを確認した。また、両酵素によって得られたpBR322 DNAの切断断片の結合実験から、*Eco*O44Iは*Eco*31Iと同一の場所、すなわち5'-GGTCTC-3' (1/5)を切断することを確認した(宮原、未発表)。

また、この*Eco*O44Iは、対照実験に使用した*Bsa*Iと比較すると、反応至適温度が、37と55℃であり、至適塩濃度も50と100 mM NaClと条件の違いが大きかった。

考察と要約

1987年愛媛県で散発的下痢患者から分離された enteropathogenic *E. coli* O44 Hiromi 株より 5'-GGTCTC-3' を認識する制限酵素 *Eco*O44I を精製し、その特徴づけを行った。*Eco*O44I の prototype は *Eco*31I であり、すでに A. Janulaitis の研究室で *E. coli* より 20 数種にのぼるアイソシゾマーが分離されている。しかし、我々の知る限り、*Eco*31I のアイソシゾマーが病原性大腸菌から分離されたという報告はない。また、*Bsa*I は既に市販されているが反応温度が 55℃ と特殊である。更に、塩濃度においても *Eco*O44I は多く制限酵素の切断に使われる 50 mM NaCl 塩濃度が至適濃度であることから、他の制限酵素と同時に反応させることもでき *Bsa*I より、利用しやすい制限酵素であると思われる。*Eco*O44I は安定であり、かつ *E. coli* O44 Hiromi 株より比較的容易に高収率で精製できるため、制限酵素陽性で、非病原性変異株が得られれば、*Eco*31I 産生菌の入手が難しいわが国では、企業化が可能と思われる。

なお、5'-GGTCTC-3' を認識する制限酵素は *Bacillus* 属菌や *Vibrio* 属菌でも見いだされている^{2,3,8)}。興味深いことに腸炎ピブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) から 2 種類のアイソシゾマーが発見された⁸⁾ ことである。これらのことは *Eco*31I アイソシゾマーが自然界に比較的広く存在している可能性を示唆するものであろう。

文 献

- 1) Yoshimori, R., Roulland-Dussoix, D., Boyer, H. W.: *J. Bacteriol.*, **112**, 1275~1279 (1972)
- 2) Roberts, R. J., Macelis, D.: *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3125~3137 (1993)
- 3) Kessler, C., Manta, V.: *Gene*, **92**, 1~248 (1990)
- 4) Yoshida, Y., Mise, K.: *J. Bacteriol.*, **165**, 357~362 (1986)
- 5) Mise, K., Nakajima, K., Terakado, N., Ishidate, Jr., M.: *Gene*, **44**, 165~169 (1986)
- 6) Miyahara, M., Mise, K., Kimizuka, F., Matsumoto, H., Terawaki, Y.: *Gene*, **113**, 135~136 (1992)

- 7) Lennox, E. S.: *Virology*, **1**, 190~206 (1955)
- 8) 宮原美知子, 藤原理恵, 三瀬勝利, 島田俊雄, 松下 秀, 工藤泰雄, 石渡尚子, 谷村顕雄: 食衛誌, **35**, 605~609 (1994)
- 9) 宮原美知子, 島田俊雄, 三瀬勝利: 食衛誌, **35**, 599~604 (1994)
- 10) Miyahara, M., Mise, K.: *Analytica Chimica Acta*, **213**, 273~277 (1988)
- 11) Smith, H. O., Nathans, D.: *J. Mol. Biol.*, **83**, 419~423 (1973)
- 12) Butkus, V., Bitinaite, J., Bersulyte, D., Janulaitis, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **826**, 208~212 (1985)