医学研究実習レポート

結核菌の挿入配列 IS *6110* と分子疫学

新潟大学医学部3年
田中　淳一・信下　智広

指導：細菌学教室
種池　郁恵・小原　竜軌・山本　達男

Insertion Sequence IS *6110* of *Mycobacterium tuberculosis* and Molecular Epidemiology

Junichi TANAKA and Tomohiro NOBUSHITA

School of Medicine, Niigata University

Supervisor: Ikue TANEIKE,
Tatsuki OHARA and Prof. Tatsuo YAMAMOTO

Department of Bacteriology

Mycobacterium tuberculosis possesses multiple copies of an insertion sequence IS *6110* on the chromosome. Based on the difference in the location and copy number of IS *6110*, each *M. tuberculosis* strain isolated from patients can usually be identified by DNA hybridization. This technique has widely been employed for molecular epidemiology of tuberculosis which remains a major public health problem in both developing and developed countries. In case of *M. tuberculosis* which possesses no or only a few copies of IS *6110*, other IS sequences such as IS *1081* have been targeted in the analysis.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, insertion sequence (IS), molecular epidemiology, restriction fragment length polymorphisum (RFLP) analysis
結核菌，挿入配列（IS），分子疫学，制限酵素断片長多型（RFLP）分析

は じ め に

細菌の染色体 DNA には可動性 DNA と呼んでいる DNA 断片が存在していて，進化の過程で，染色体の再構築や遺伝子の発現調節に関与してきたと考えられている[1]．挿入配列（insertion sequence, IS）は，こ

Reprint requests to: Department of Bacteriology, Niigata University School of Medicine, 757 Ichibanchou, Asahimachidori, Niigata, 951-8510, JAPAN.

別刷請求先：　〒951-8510 新潟市旭町通1番町757
新潟大学医学部細菌学教室

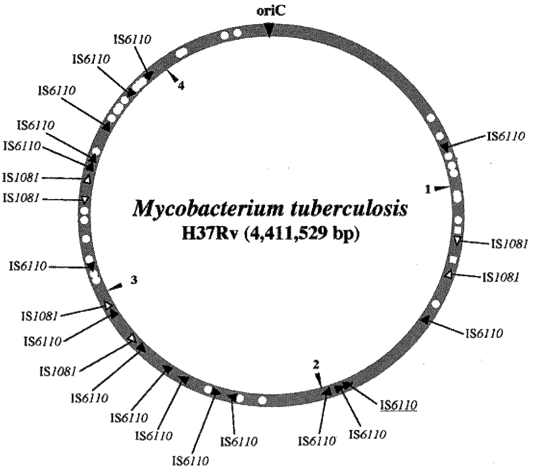

図1　結核菌 H37Rv 株上に分布する IS *6110* と IS *1081*

ゲノム上の IS *6110* と IS *1081* の矢印は挿入位置と方向を示す．文献2，4，26とパスツール研究所のホームページから引用．

のような可動性 DNA の一つで，転移（transposition）で働く酵素（transposase）をコードする遺伝子とその両端に位置する反復配列からなる最も簡単な DNA 構造である．

結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）にも IS が存在していて[2]，他の細菌の場合と同様で，染色体の再構築などに関与してきたと考えられる．

結核は開発途上国のみならず先進国の人々の命をも脅かす深刻な感染症である．年間の死亡者数は300万人で，単独の感染症としては最高の数値となっている．また，我が国でも，集団感染などが制御不能な状態で，昨年（平成11年）7月には厚生省が結核緊急事態宣言を発表している．

このような状況下，結核菌の場合には，IS がハイブリダイゼーションの標的として利用され，結核の感染経路を特定する為の分子疫学解析（restriction fragment length polymorphisum, RFLP）に利用されてきた[3]．本総説では，分子疫学解析に利用されている結核菌の IS について内外の知見をまとめ，我が国の結核の分子疫学解析を考える．

染色体ゲノム上での IS の分布

結核菌のゲノムは約440万塩基対の環状構造で，その上に28種類の IS が同定されている[3)4]．このうち，結核の分子疫学解析に最もよく利用されてきたものは IS *6110* で[5]，全ゲノムが解読された H37Rv 株の場合には17個のコピーが確認された（**図1**）．その中の一つは欠損配列であった．

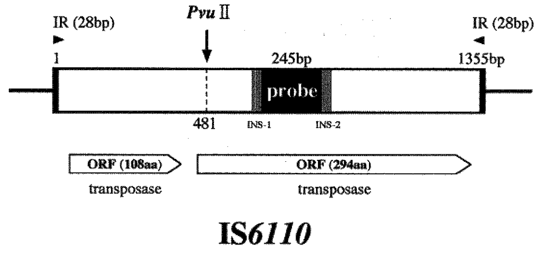

図2　IS *6110* の構造

文献3とパスツール研究所のホームページから引用．

IS *6110* の構造

IS *6110* は長さが1355塩基対で，両端に長さ28塩基対の逆向反復配列（inverted repeats, IR）が存在し，内部にはトランスポゼース（転移酵素）をコードすると考えられる2つの open reading frame（ORF）が存在した（**図2**）．

分子疫学で利用しているプローブ（長さ245塩基対）[3] は，トランスポゼース遺伝子配列の一部で，INS－1と INS－2の2つのプライマーを使った PCR で増幅されている．染色体上に分布する IS *6110* のコピー数を調べる為に，IS *6110* を1カ所だけ切断する制限酵素（*Pvu*II）が用いられる．その切断箇所はプローブ配列の左側で，トランスポゼース遺伝子配列の5'末端側に位置している（**図2**）．

IS *6110* を使った分子疫学解析

実際の実験では，分離培養した結核菌から DNA を抽出し，制限酵素 *Pvu*II によって切断する．次に，切断 DNA 断片をアガロースゲル電気泳動し，ナイロン膜に転写して，ナイロン膜上に DNA 断片を固定する．これに，ジゴキシゲニンで標識した IS *6110* プローブを加え，ハイブリダイゼーションを行う．最後に化学発光物質を加えて，X 線フィルム上でバンドを検出して，分析を行う[3)6]．

世界各地で報告された結核菌ゲノム当たりの IS *6110* コピー数を図3にまとめた．ヨーロッパの場合には，お

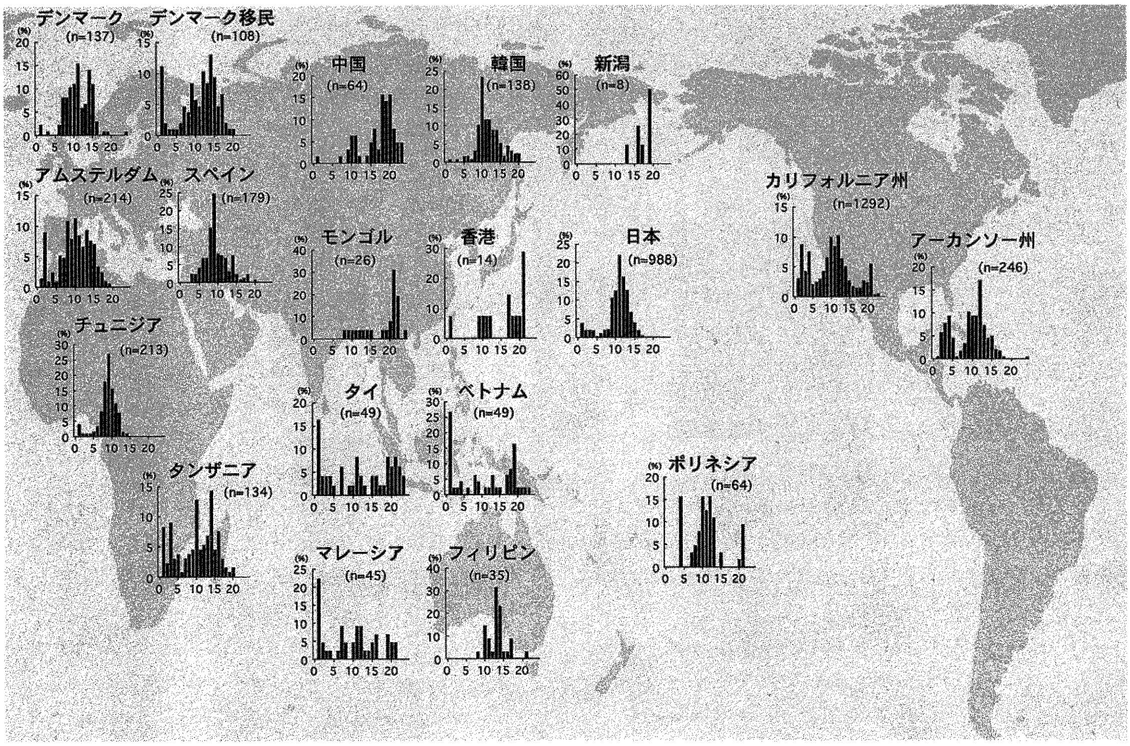

図3　世界各地で分離される結核菌がもつ IS *6110* のコピー数の分布

おむね6～15コピー/ゲノムに集中していて[7)－9)]，デンマークではこの範囲に92％が属していた[10)]．5コピー/ゲノム以下の場合には，81％がアジア，アフリカの移民によるもので，16コピー/ゲノム以上では，3分の2がソマリア，パキスタンからの移民によるものであった．

スペインで行われた調査では，平均コピー数は9.5コピー/ゲノムで，91％が5～14コピー/ゲノムに分布していた[11)]．また全体の38％が類似したクラスターに属していて，相互に近縁な菌であった．スペインの結核は蔓延状態ではないが，活動型の流行が続いている．

これに対して，オランダやフランスの場合には，クラスターに属している菌の割合が少なく，由来が異なる多数の菌による感染が起きている．

アフリカでは，結核が蔓延していて，限られた型の結核菌が数多く検出される．一般に，ヨーロッパに比べるとコピー数が少ない傾向にある[12)]．チュニジアの場合には，95％が6コピー/ゲノム以上で，75％が6～10コピー/ゲノムに分布した[13)]．また，クラスターを形成する類縁菌の割合が特に高かった．

タンザニアでは，34％が1～6コピー/ゲノムをもち，全体の8％が1コピー/ゲノムであった[14)]．チュニジアに比べて，タンザニアでのコピー数が広範囲に分布するのは，タンザニアの首都ダルエスサラーム（調査地域）がアジアやアラブからの移民が多く，東アフリカでの貿易の中心地で，人の出入りが激しいことが考えられた．

アジアでは，コピー数の多少によって3つの群に分けられる[15)]．韓国，フィリピン，日本[16)]では，8～15コピー/ゲノムに大部分が分布する．北京ファミリーの割合が高い中国，モンゴル，香港では大部分が15～24コピー/ゲノムに分布する．中国で89％，モンゴルで50％がそれに該当した[17)]．一方，ベトナム，タイ，マレーシアでは，多数が5コピー/ゲノム以下に分布していた．

オーストラリアで，ベトナム人由来株とそれ以外の株の間で比較解析が行われた[18)]．ベトナム由来株の平均は8コピー/ゲノムで，それ以外の菌株の平均は12コピー/ゲノムであった．オーストラリア株は，コピー数に幅広い広がりを見せていた．

フランス領ポリネシアの場合，平均コピー数は11/ゲ

ノムで，86%が4～13コピー/ゲノムに分布した[19]．クラスターを形成する類似菌が数多く検出されていて，活動性結核による感染が示唆された．

結核の感染が深刻なフランス領西インド諸島の場合には，大部分が4～5コピー/ゲノムと8～9コピー/ゲノムの範囲に分布した[20]．

アメリカの西海岸の場合には，59%が6～15コピー/ゲノムに，25%が1～5コピー/ゲノムに分布していた[21]．0コピー/ゲノムも0.2%の割合で検出された．また低コピー数のものにクラスターを形成する類縁株の割合が多かった．

IS *6110* が使えない場合の分子疫学解析

IS *6110* のコピー数が0や1/ゲノムの場合には IS *6110* を使って分子疫学解析をすることができない．その場合には，IS *1081*（長さ1324塩基対で，両末端に15塩基対の反復配列をもち，*Pvu*II で1カ所のみ切断される）[15)18)] や IS *1547* [22)] が使用された．IS *1081* は結核菌と *M. bovis* BCG の鑑別にも用いられる．また，30コピー/ゲノムも存在する繰り返し配列（direct-repeat element, *Nde*II で切断される）[23)24)] が米国などで分子疫学解析に利用されている．

お わ り に

結核菌の場合，菌株毎（患者毎）に IS *6110* の存在様式が異なる．IS *6110* を1個もつ菌株もあれば，10個，あるいは20個以上もつ菌株もある．新潟株では15個前後もっていた[4)]．さらに，DNA 上の挿入位置と挿入方向も菌株毎に異なる．結果として，患者株の DNA を分離して，IS *6110* を1カ所だけ切断する制限酵素で切断し，IS *6110* をもった DNA 断片の数とサイズを電気泳動で解析すると，菌株毎に異なったパターンが得られる．臨床分離株を一つ一つ特定することができることから，この解析方法を DNA 指紋法とも呼んでいる．結核の分子疫学解析の世界的な標準解析法である．複数の結核感染が発生した場合には迅速に分子疫学解析し，感染経路の把握に努めなければならない．なお，非定型抗酸菌である MAC は IS *6110* をもたないので，分子疫学解析には IS *1245* が用いられる[25)]．

参 考 文 献

1) **Mahillon, J., Leonard, C., and Chandler, M.**: IS elements as constituents of bacterial genomes. Res. Microbiol., **150**: 675～687, 1999.

2) **Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry Ⅲ, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.-A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S. and Barrell, B.G.**: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature, **393**: 537～544, 1998.

3) **van Embden J.D., Cave, M.D., Crawford, J.T., Dale, J.W., Eisenach, K.D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R., Shinnick, T.M. and Small, P.M.**: Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J. Clin. Microbiol., **31**: 406～409, 1993.

4) **Gordon, S.V., Heym, B., Parkhill, J., Barrell, B. and Cole, S.T.**: New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Microbiology, **145**: 881～892, 1999.

5) **Hermans, P.W.M., van Soolingen, D., Dale, J.W., Schuitema, A.R.J., McAdam, R.A., Catty, D. and van Embden, J.D.A.**: Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol., **28**: 2051～2058, 1990.

6) **Ohara, T., Taneike, I., Gejyo, F., Tsuchiya, T. and Yamamoto, T.**: Molecular epidemiology of intrafamilial *Mycobacterium tuberculosis* infections in Niigata, Japan. Acta Med. Biol., **47**: 169～173, 1999.

7) **Gutierrez, M.C., Vincent, V., Aubert, D., Bizet, J., Gaillot, O., Lebrun, L., Le Pandeven, C., Le Pennec, M.P., Mathieu, D., Offredo C., Pangon, B. and Pierre-Audigier, C.**: Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. J. Clin. Microbiol., **36**: 486～

492, 1998.

8) **Goyal, M., Ormerod, L.P. and Shaw, R.J.**: Epidemiology of an outbreak of drug-resistant tuberculosis in the U.K. using restriction fragment length polymorphism. Clin. Sci., **86**: 749～751, 1994.

9) **Torrea, G., Offredo, C., Simonet, M., Gicquel, B., Berche, P. and Pierre-Audigier, C.**: Evaluation of tuberculosis transmission in a community by 1 year of systematic typing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. J. Clin. Microbiol., **34**: 1043～1049, 1996.

10) **Yang, Z.H., de Haas, P.E.W., Wachmann, C.H., van Soolingen, D., van Embden, J.D.A. and Andersen, A.B.**: Molecular epidemiology of *Tuberculosis* in Denmark in 1992. J. Clin. Microbiol., **33**: 2077～2081, 1995.

11) **Safi, H., Aznar, J. and Palomares, J.C.**: Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated during a 3-year period (1993 to 1995) in Seville, Spain. J. Clin. Microbiol., **35**: 2472～2476, 1997.

12) **Hermans, P.W.M., Messadi, F., Guebrexabher, H., van Soolingen, D., de Haas, P.E.W., Heersma, H., de Neeling, H., Ayoub, A., Portaels, F., Frommel, D., Zribi, M. and van Embden, J.D.A.**: Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and The Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. J. Infect. Dis., **171**: 1504～1513, 1995.

13) **Chevrel-Dellagi, D., Abderrahman, A., Haltiti, R., Koubaji, H., Gicquel, B. and Dellagi, K.**: Large-scale DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. J. Clin. Microbiol., **31**: 2446～2450, 1993.

14) **Yang, Z.H., Mtoni, I., Chonde, M., Mwasekaga, M., Fuursted, K., Askgard, D.S., Bennedsen, J., de Haas P.E.W., van Soolingen, D., van Embden, J.D.A. and Andersen, A.B.**: DNA fingerprinting and phenotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients in Tanzania. J. Clin. Microbiol., **33**: 1064～1069, 1995.

15) **Park, Y.-K., Bai G.-H. and Kim, S.-J.**: Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from countries in the western pacific region. J. Clin. Microbiol., **38**: 191～197, 2000.

16) **高橋光良, 鹿住祐子, 平野和重, 深澤　豊, 阿部千代治**: RFLP 分析による結核感染の疫学. 結核, **70**: 553～559, 1995.

17) **van Soolingen, D., Qian, L., de Haas, P.E.W., Douglas, J.T., Traore, H., Portaels, F., Qing, H.Z., Enkhsaikan, D., Nymadawa, P. and van Embden, J.D.A.**: Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. J. Clin. Microbiol., **33**: 3234～3238, 1995.

18) **Yuen, L.K.W., Ross, B.C., Jackson, K.M. and Dwyer, B.**: Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. J. Clin. Microbiol., **31**: 1615～1618, 1993.

19) **Torrea, G., Levee, G., Grimont, P., Martin, C., Chanteau, S. and Gicquel, B.**: Chromosomal DNA fingerprinting analysis using the insertion sequence IS *6110* and the repetitive element DR as strain-specific markers for epidemiological study of Tuberculosis in French Polynesia. J. Clin. Microbiol., **33**: 1899～1904, 1995.

20) **Horgen, L., Sola, C., Devallois, A., Goh, K.S. and Rastogi, N.**: Follow up of *Mycobacterium tuberculosis* transmission in the French West Indies by IS *6110* DNA fingerprinting and DR-based spoligotyping. FEMS Immunol. Med. Microbiol., **21**: 203～212, 1998.

21) **Yang, Z., Barnes, P.F., Chaves, F., Eisenach, K.D., Weis, S.E., Bates, J.H. and Cave, M.D.**: Diversity of DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. J. Clin. Microbiol., **36**: 1003～1007, 1998.

22) **Fang, Z., Doig, C., Morrison, N., Watt, B. and Forbes, K.J.**: Characterization of IS1547, a new member of the IS *900* family in the *Mycobacterium tuberculosis* complex, and its association with IS *6110. J. Bacteriol.,* **181**: 1021～1024, 1999.

23) **Ross, B.C., Raios, K., Jackson, K. and Dwyer, B.**: Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. J. Clin. Microbiol., **30**: 942～946, 1992.

24) **Wilson, R.W., Yang, Z., Kelley, M., Cave, M.D., Pogoda, J.M., Wallace, R.J., Jr., Cegielski, J.P., Dunbar, D.F., Bergmire-Sweat, D., Elliott, L.B. and Barnes, P.F.**: Evidence from molecular fingerprinting of limited spread of drug-resistant tuberculosis in Texas. J. Clin. Microbiol., **37**: 3255～3259, 1999.

25) **Guerrero, C., Bernasconi, C., Burki, D., Bodmer, T. and Telenti, A.**: A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS *1245*, is a specific target for analysis of strain relatedness. J. Clin. Microbiol., **33**: 304～307, 1995.

26) **Kurepina, N.E., Sreevatsan, S., Plikaytis, B.B., Bifani, P.J., Connell, N.D., Donnelly, R.J., van Sooligen, D., Musser, J.M. and Kreiswirth, B.N.**: Characterization on the phylogenetic distribution and chromosomal insertion sites of five IS *6110* elements in *Mycobacterium tuberculosis*: non-random integration in the *dnaA-dnaN* region. Tuber. Lung Dis., **79**: 31～42, 1998.