

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08826

研究課題名(和文) ビブリオコレラを二系統に分類する遺伝子座MS6\_A0927の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of MS6\_A0927, a locus that classifies *Vibrio cholerae* into two lineages

研究代表者

岡田 和久 (OKADA, KAZUHISA)

大阪大学・微生物病研究所・講師

研究者番号：40420434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：コレラ菌(ビブリオコレラ)は200以上の血清型や遺伝的多様性があるが、遺伝子座MS6\_A0927にM遺伝子又はLH遺伝子のどちらかを有して進化したと考えられた。本研究ではMS6\_A0927の破壊株及びMとLH遺伝子を置き換えたハイブリット株を作製し、当該遺伝子の機能解析を行った。M遺伝子を有する場合、コレラ菌はメタンチオールを単一硫黄源として、嫌気下で有意に増殖した。また、メタンチオールの濃度を上げていくと、特定の培地において増殖誘導期が遅延する現象も見出した。コレラ菌のM遺伝子はO-アセチルホモセリンスルフヒドリラーゼ活性を持ち、メタンチオールからメチオニンを合成することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コレラ菌により、世界では年間数百万人の患者と10万人前後の死者が推定されている。本研究では、コレラ菌が進化の過程で二者択一的に選択した遺伝子について解析し、M遺伝子を有するコレラ菌が、一定の栄養制限環境下でメタンチオールを効率的に利用し、有意に増殖することを見出した。メタンチオールは沼などの環境中やヒトや動物の血液、脳、およびその他の組織中にも存在するが、一部のコレラ菌がM遺伝子を選択して有することの生物学的意義の理解については、今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Vibrio cholerae has more than 200 serogroups and remarkable genetic diversity. Our previous study revealed that V. cholerae has evolved by selecting either the M or LH gene at the locus MS6\_A0927. We constructed deletion mutant strains of MS6\_A0927 and hybrid strains, in which M and LH genes were exchanged. The strains with the M gene showed significant growth with methanethiol as the sole sulfur source. In addition, it was found that increase in methanethiol concentration delayed the lag-phase in a specific medium. The product of the M gene of V. cholerae may perform the function of O-acetyl-homoserine-sulfhydrylase, converting methanethiol to methionine.

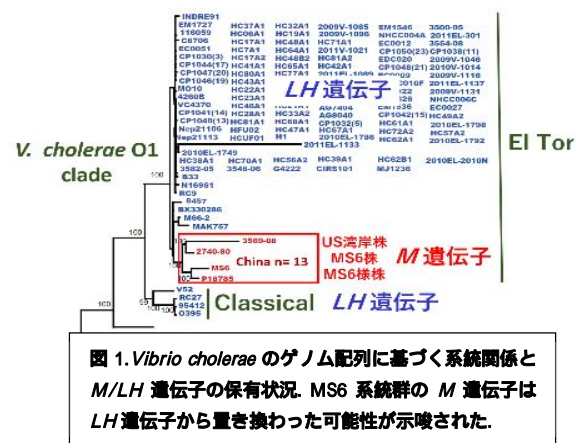
研究分野：細菌学

キーワード：コレラ 進化 病原性 環境適応

## 1. 研究開始当初の背景

*V. cholerae* はヒトおよび環境から広く分離されており、200 以上の血清型や変化に富むゲノム構造が見出されている。通常 *V. cholerae* O1 血清型が流行し、ヒトに重篤なコレラを引き起こす。一方で、非 O1 血清型は散発的な発生事例にとどまるが、腸管外感染も引き起こすことも知られており、菌血症、敗血症などの全身症状を伴う患者も報告されている。*V. cholerae* O1 血清型の中にはタイの MS6 株や US 湾岸株(US Gulf Coast clone)<sup>1</sup> の様に主要病原因子(コレラ毒素 CT および定着因子 TCP)を有しているが、流行や重症下痢の感染患者が報告されていない遺伝学的系統が存在する。MS6 株とパンデミック株の比較ゲノム解析を行ったところ、小染色体上の遺伝子座 MS6\_A0927 に大きな違いを認めた。この遺伝子座には流行株では *LH* 遺伝子があり、中国<sup>2</sup> 及び台湾の MS6 様株<sup>3</sup> と US 湾岸株は MS6 株と相同な *M* 遺伝子を有していた。なお、131 種以上の血清型を含む *V. cholerae* は当該遺伝子座によって 2 系統に分別された<sup>4</sup>。

*LH* 遺伝子は *Vibrio* 属細菌の中で唯一 *V. cholerae* のみに確認されており、*M* 遺伝子は *V. cholerae* の近縁種である *V. mimicus* などにも保有が認められている。*V. cholerae* は元来、*M* 遺伝子を有していたが、O1 血清型の祖先において何らかの有利性のために *LH* 遺伝子を獲得し優勢に分離されるようになった。一方で、MS6 系統群は *LH* から *M* 遺伝子に再度置き換わったことを想定している(図 1)。 *V. cholerae* が、*M* 遺伝子あるいは *LH* 遺伝子のどちらか一方を選択して進化してきたことに注目し、この 2 系統の *V. cholerae* の環境中での生存有利性の違いやビルレンスとの関連性について追究することにした。



## 2. 研究の目的

*V. cholerae* の MS6\_A0927 破壊株及び *M* と *LH* を入れ替えたハイブリット株を用いて、当該遺伝子座の機能解析を行い、この 2 系統の *V. cholerae* の環境中での生存有利性の違いやビルレンスとの関連性について明らかにする。

## 3. 研究の方法

1) *Vibrio cholerae* 供試菌株の選択: 以前にゲノム配列を決定したコレラ毒素産生性の O1 血清型 *V. cholerae* MS6 株 (*M*+)、32426 株 (*LH*+)、34244 株 (*LH*+)、28626 株 (*LH*+) の 4 株を用いた。

2) 変異株・相補株の作製: 標的欠失領域の両側の 5'領域及び 3'領域(各 800bp 程度)を pYAK-1 ベクターに挿入し、インテグレーションプラスミドとし、エレクトロポレーションにより *E. coli* BW19851 pir に導入し、形質転換体をスクリーニングした。その質転換体を対象とする *V. cholerae* 株と接合させることにより、プラスミドを *E. coli* から *V. cholerae* へ伝達させ、ダブルクロスオーバーの相同組換えにより、*V. cholerae* の遺伝子を欠失させた。また、相補株の作製もまた、同様な相同組換えあるいは当該遺伝子の発現プラスミドの導入により行った。さらに、*M* 遺伝子と *LH* 遺伝子を入れ替えた、ハイブリッド株も作製した。一部の株にお

いては、イルミナシークエンサーを用いたゲノムシークエンスによる塩基配列の確認及び RNA-seq 解析による遺伝子発現解析を行った。

### 3) 増殖能の変化

培地、温度、pH、酸素濃度などの条件を変えて、野生株と遺伝子破壊株、ハイブリッド株の増殖曲線を比較した。また、コレラ毒素産生能、運動能やバイオフィーム形成能等のデータも取得した。

## 4. 研究成果

ダブルクロスオーバーの相同組換えにより当該遺伝子座を破壊した *V. cholerae* を 4 株作製した。次に、野生株(親株)及び破壊株間の表現型を比較したところ、4 株の破壊株中 3 株は、特に違いを認めなかったが、*LH* 遺伝子を破壊した 32426 (*LH*) 株は、親株に比して通常の栄養培地では増殖能に差はないが、貧栄養培地では増殖能の遅延、運動性の低下、バイオフィーム形成能の増加、カタラーゼ産生の増加、ゼラチン/カゼインの分解能の低下が認められた。また、コレラ毒素産生能を GM1 ガングリオシドを抗原とする ELISA によって測定した結果、32426 株が 647 ng/mL であるのに対し、その破壊株は 25 ng/mL と約 25 倍の減少が確認された。当該破壊株に特異的に認められた現象であるので、次にその野生株と欠損株の RNA シークエンス解析を行い、各遺伝子の転写発現量を比較した。32426 (*LH*) 株とその親株に対して RNA シークエンス解析を行い、各遺伝子の転写発現量を比較した。その結果、32426 (*LH*) 株において *rpoS* 及び *mutS* 遺伝子の発現が確認されなかったことから、当該遺伝子領域に対して PCR 及びシークエンスを行ったところ、*rpoS-mutS* 領域が脱落していることが分かった。さらにコレラ毒素の転写活性化因子である *ToxR* 遺伝子などに突然変異が起きており、途中で終始コドンが生じていた。32426 (*LH*) 株の *ToxR* の発現量は親株より有意に高かったが、コレラ毒素遺伝子の発現量は低かった。これは *ToxR* 遺伝子の変異の影響により 32426 (*LH*) 株のコレラ毒素産生の低下をもたらした可能性がある。この 32426 株においてもダブルクロスオーバー相同組換えにより *LH* 遺伝子を破壊したのだが、標的以外の遺伝子にも変異が生じてしまっている

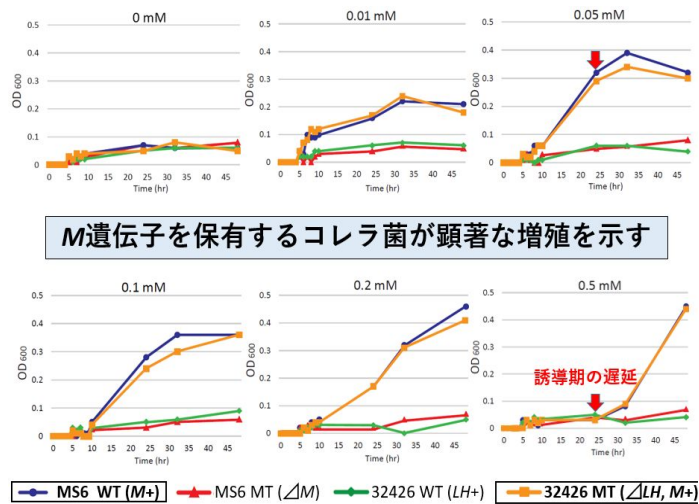


図2. 栄養制限環境下において、メタネオール(0.01~0.5 mM)を添加すると *M* 遺伝子を有するコレラ菌が顕著に増殖する。

する ELISA によって測定した結果、32426 株が 647 ng/mL であるのに対し、その破壊株は 25 ng/mL と約 25 倍の減少が確認された。当該破壊株に特異的に認められた現象であるので、次にその野生株と欠損株の RNA シークエンス解析を行い、各遺伝子の転写発現量を比較した。32426 (*LH*) 株とその親株に対して RNA シークエンス解析を行い、各遺伝子の転写発現量を比較した。その結果、32426 (*LH*) 株において *rpoS* 及び *mutS* 遺伝子の発現が確認されなかったことから、当該遺伝子領域に対して PCR 及びシークエンスを行ったところ、*rpoS-mutS* 領域が脱落していることが分かった。さらにコレラ毒素の転写活性化因子である *ToxR* 遺伝子などに突然変異が起きており、途中で終始コドンが生じていた。32426 (*LH*) 株の *ToxR* の発現量は親株より有意に高かったが、コレラ毒素遺伝子の発現量は低かった。これは *ToxR* 遺伝子の変異の影響により 32426 (*LH*) 株のコレラ毒素産生の低下をもたらした可能性がある。この 32426 株においてもダブルクロスオーバー相同組換えにより *LH* 遺伝子を破壊したのだが、標的以外の遺伝子にも変異が生じてしまっている

表1. *LH* 遺伝子破壊株に検出された点突然変異(親株(32426)のゲノムに対する比較)

Reference Position	Type	Reference	Allele	Amino acid change
61924	SNV	G	A	diguanylate cyclase/phosphodiesterase (GGDEF & EAL domains) with PAS/PAC sensor(s);p.Gln232*
115837	SNV	A	G	C-di-GMP phosphodiesterase MbaA, repressor of biofilm formation;p.Tyr194His
166716	SNV	C	T	Peptidase B (EC 3.4.11.23);p.Ser201Leu
242620	SNV	A	G	inner membrane protein, putative;p.Glu950Gly
253496	Deletion	G	-	Toxin co-regulated pilus biosynthesis protein C, outer membrane protein;p.Leu304fs
407123	SNV	C	T	Transcriptional activator <i>ToxR</i> ;p.Trp217*
684044	SNV	C	T	Molybdopterin binding motif, ClnA N-terminal domain / C-terminal domain of ClnA type E;p.Pro1125e
748381	SNV	A	G	Conserved protein YqX with nucleoside triphosphate hydrolase domain;p.Thr46Ala
1255106	SNV	T	C	Type I restriction-modification system, restriction subunit R (EC 3.1.21.3);p.Asn8145er
1424089	SNV	T	C	Signal transduction histidine kinase regulating C4-dicarboxylate transport system;p.Met300Thr
1459343	Insertion	-	A	Septum site-determining protein MinD;p.Thr34fs
1586307	SNV	T	C	DNA-binding response regulator, AraC family;p.Ser582Gly
1639085	Insertion	-	C	Flagellar regulatory protein FlcQ;p.Val462fs
1930967	SNV	G	A	rRNA small subunit methyltransferase H;p.Pro78Ser
1963749	SNV	G	A	ADP-heptose synthase (EC 2.7.-.-) / D-glycero-beta-D-manno-heptose 7-phosphate kinase;p.His1591Yr
2023461	SNV	G	A	3-isopropylmalate dehydrogenase (EC 1.1.1.85);p.Met267Ile
2131023	SNV	G	A	Succinylglutamic semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.71);p.Ala98Val
2467035	SNV	G	A	Response regulator;p.Glu85Lys
2563037	Deletion	A	-	Mannose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.8);p.Thr74fs
2717125	Insertion	-	G	MSHA biogenesis protein MshQ;p.Val321fs
2755362	Insertion	-	T	DnaI-like protein DjlA;p.Ser171fs
2947934	SNV	A	G	FIG1L2035D; hypothetical protein;p.Tyr200Cys
2959725	SNV	C	A	hypothetical protein;p.Leu28Ile
2959731	SNV	C	A	hypothetical protein;p.Arg30Ser
2973745	Insertion	-	A	FIG0056045f; hypothetical protein;p.Val1179fs
3608075	SNV	A	G	FIG1L20110B; hypothetical protein;p.Asn25Ser
3883498	SNV	C	T	Predicted lysine transporter, NhaC family;p.Ala39Thr

ことが明らかとなった(表1)。この予期せぬ現象は、本研究課題の進捗に大きな影響を与えたが、*V. cholerae* がストレス環境下で、短期間にゲノムを変化させ、コレラ毒素産生、運動性、バイオフィルム形成、プロテアーゼ産生などを劇的に変化させる現象をみとめた。再度、当該株の *LH* 遺伝子の破壊を試み、ゲノム配列を確認したが、*LH* 遺伝子以外には変異は確認されなかった。コレラ菌がなぜこの様に劇的に変異したのかについて、現在原因の解明を進めている。

*M* 遺伝子と *LH* 遺伝子を入れ替えたハイブリット株の作製が出来たため、これらの株も含めて表現型の変化を培地、温度、酸素濃度などの条件を変えて試験したところ、*M* 遺伝子を有する野生株(MS6)と *LH* 遺伝子を *M* 遺伝子に置き換えたハイブリット株(32426 *LH, M+*)が、嫌気条件の栄養制限培地で、*M* 遺伝子破壊株及び *LH* に置き換えた MS6 株と比して、メタンチオールを単一硫黄源として、有意な増殖を示した。また、添加メタンチオールの濃度を上げていくと、特定の培地において増殖誘導期が遅延する現象も見出した。コレラ菌の *M* 遺伝子は O-アセチルホモセリンスルフヒドリラーゼ活性を持ち、メタンチオールからメチオニンを効率的に合成することが示唆された。

#### <引用文献>

1. Okada K. *et al.*, Comparative Genomic Characterization of a Thailand-Myanmar Isolate, MS6, of *Vibrio cholerae* O1 El Tor, which Is Phylogenetically Related to a “ US Gulf Coast ” Clone (2014) PLoS One, 9(6); e38120.
2. Luo Y. *et al.*, US Gulf-like toxigenic O1 *Vibrio cholerae* causing sporadic cholera outbreaks in China (2016), J Infect, 72(5); 564-572
3. Tu YH, *et al.*, Emergence of *Vibrio cholerae* O1 Sequence Type 75 in Taiwan (2020), Emerg Infect Dis, 26(1);164-166.
4. Okada K. *et al.*, *Vibrio cholerae* embraces two major evolutionary traits as revealed by targeted gene sequencing (2018), Sci Rep, 8;1631.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okada Kazuhisa, Wongboot Warawan, Chantaroj Siriporn, Natakuathung Wirongrong, Roobthaisong Amonrattana, Kamjumphol Watcharaporn, Maruyama Fumito, Takemura Taichiro, Nakagawa Ichiro, Ohnishi Makoto, Hamada Shigeyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Vibrio cholerae embraces two major evolutionary traits as revealed by targeted gene sequencing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1631
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-19995-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazuhisa Okada, Shigeyuki Hamada
2. 発表標題 Vibrio cholerae are classified into two lineages based on the gene constitution of locus MS6_A0927
3. 学会等名 ASM Conference on Vibrio2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----