

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07113

研究課題名（和文）逆転写酵素遺伝子を含むレトロンによるコレラ菌の病原性発現調節機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of the regulatory mechanism of virulence expression by the retron containing reverse transcriptase gene in *Vibrio cholerae*

研究代表者

島本 整 (Shimamoto, Tadashi)

広島大学・統合生命科学研究科（生）・教授

研究者番号：90187443

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：コレラ菌の逆転写酵素遺伝子（ret）を含むレトロン-Vc95は、病原性発現との関連が示唆されている。そこで、レトロンの発現状況を簡便にモニタリングするために、 β -グルクロニダーゼ遺伝子（gusA）をレトロンのプロモーター下に挿入したレポーター株を作製し、さまざまな培養条件でレトロンの発現状況を解析した。その結果、NaClや鉄キレート剤の添加、窒素源や炭素源の欠乏状態などさまざまなストレス条件下でレトロンの発現量が低下することを明らかにした。

また、コレラ菌と同じビブリオ属細菌である *Vibrio mimicus* のレトロン-Vm85の構造を明らかにし、レトロンの水平伝播の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は研究代表者が始めた病原細菌における逆転写酵素とmsDNAに関する研究成果に基づくものであり、独創的なものである。機能が明らかにされていなかった逆転写酵素とmsDNAおよびレトロンについて、病原細菌を研究している他の研究者はほとんど注目していなかった。本研究によって得られる成果は、病原性発現ネットワークの新たな分子メカニズムを解明する可能性を持っている。また、代表者のmsDNAデコイ核酸仮説（DNAアプタマー仮説）が実証されれば、遺伝子の転写制御研究という基礎的な分野でも、これまでに報告されていない新しい転写制御形式を提唱するものであり各研究分野に与えるインパクトは大きい。

研究成果の概要（英文）：Retron-Vc95, which contains the reverse transcriptase gene (ret) of *Vibrio cholerae*, has been suggested to be associated with virulence expression. In order to easily monitor the expression of retron, a reporter strain with the β -glucuronidase gene (gusA) inserted under the promoter of retron was created, and the expression of retron was analyzed under various culture conditions. The expression of retron was found to be decreased under various stress conditions, such as the addition of NaCl and iron chelators, and the deficiency of nitrogen and carbon sources.

In addition, the structure of retron-Vm85 in *V. mimicus*, a bacterium of the same genus as *V. cholerae*, was clarified, suggesting the possibility of horizontal transmission of retron.

研究分野：分子病原微生物学

キーワード：レトロン 逆転写酵素 msDNA *Vibrio cholerae* *Vibrio mimicus* コレラ菌 arcAB

1. 研究開始当初の背景

細菌逆転写酵素は、細胞内で multicopy single-stranded DNA (msDNA) と呼ばれる RNA-DNA 複合体の合成を行っている(図1)。逆転写酵素遺伝子 (*ret*) は、ゲノム上で msDNA をコードする領域 (*msr-msd*) とともにレトロンと呼ばれるオペロンを形成しており、一種の可動性遺伝子だと考えられている。逆転写酵素や msDNA の生理的意義について、詳細は明らかになっていなかった。特に、病原細菌由来の msDNA は、他の細菌由来の msDNA と異なり一本鎖 DNA のステム部分が安定な二本鎖構造となっており(図1)、何らかの DNA 結合性タンパク質の結合が予想される。研究代表者は、msDNA が核酸医薬品として利用されているデコイ核酸や DNA アプタマーのように転写制御因子などと結合することによって他の遺伝子の発現制御を行っているのではないかという仮説を立てた(図2)。

コレラ菌 (*Vibrio cholerae* O1, O139) は流行性コレラの原因菌であり、熱帯、亜熱帯地域を中心に多くの感染を引き起こしている。主要な病原因子としてコレラ毒素 (CTX) と腸管定着因子 (TcpA) を保有している。これまでの研究代表者らの研究によって、*V. cholerae* が保有するレトロン-Vc95 は流行性コレラの原因となる血清型 O1 と O139 株には存在し、それ以外の血清型 (non-O1, non-O139) には基本的に存在しないことが明らかになっており、コレラ菌の病原性とレトロン-Vc95 との関連性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究は研究代表者が始めた病原細菌における逆転写酵素と msDNA に関する研究成果に基づくものであり、研究代表者の考えたまったく独創的なものである。これまでに機能が明らかになっていない逆転写酵素と msDNA およびレトロンについて、病原細菌を研究している他の研究者は誰も注目していなかった。本研究によって得られる成果は、病原性発現ネットワークの新たな分子メカニズムを解明する可能性を持っている。また、代表者の msDNA デコイ核酸仮説 (DNA アプタマー仮説) が実証されれば、遺伝子の転写制御研究という基礎的な分野でも、これまでに報告されていない新しい転写制御形式を提唱するものであり各研究分野に与えるインパクトは極めて大きいと考えている。

本研究では、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) の野生株と逆転写酵素欠損株との間で見られた病原性関連遺伝子の発現状況の違いから、病原細菌の逆転写酵素による病原性関連遺伝子群発現制御の詳細なメカニズムを明らかにすることを大きな目的としている。そのために、大きく分けて2つのアプローチを行う。1つは、msDNA による遺伝子発現制御が行われているかどうかを検証することである。すなわち、msDNA がデコイ核酸または DNA アプタマーとして機能するかどうかを検証する。2つ目は、レトロンに含まれる他の機能未知の ORF と病原性発現制御との間の関係を調べることである。コレラ菌のレトロンの場合、ORF540 タンパク質は、ヌクレオチド結合モチーフを含んでいることから何らかの機能を有していると考えられており、これまでの two hybrid 法を用いた解析結果より二成分制御系の ArcAB との関係が示唆されている。以上の点を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) レトロンのレポーター株の作製とレトロンの誘導 (抑制) 条件の解析

コレラ菌が保有しない β -グルクロニダーゼ遺伝子 (*gusA*) をレポーター遺伝子としてレトロンのプロモーター下に挿入した transcriptional fusion を構築し、生理的条件下でのレトロン誘導条件を検討する(図3)。レトロンが大量発現または発現抑制されるような条件が見つければ、msDNA の合成からデコイ DNA (または DNA アプタマー) としての機能を介したコレラ菌の新たな病原性発現ネットワークの一端を明らかにすることができる。

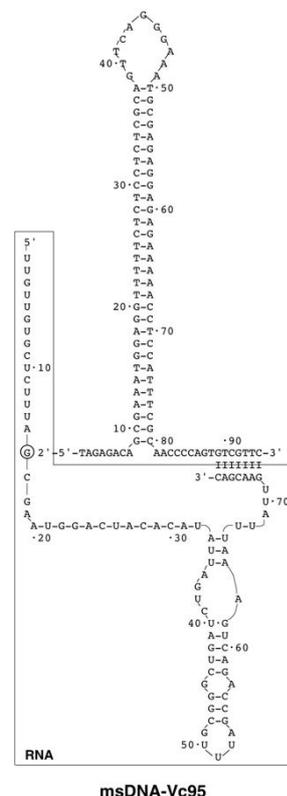


図1 コレラ菌由来の msDNA-Vc95 の推定二次構造。枠で囲まれた部分が RNA でそれ以外の部分が DNA である。

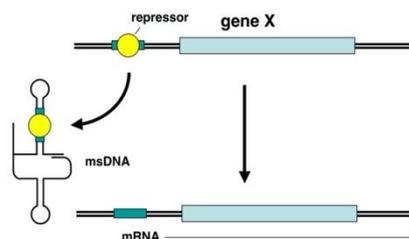


図2 msDNA のデコイ核酸仮説。msDNA の DNA ステム部分がリプレッサーをオペレーターから奪い取ってしまうと遺伝子 X の発現が誘導される。

(2) レトロン内の機能未知遺伝子の機能解析

レトロン-Vc95 内の *ret* 遺伝子下流には 2 つの機能未知の ORF (*orf540*, *orf205*) が存在している。特に *orf540* はヌクレオチド結合モチーフの配列を含んでおり、病原性に関連する何らかの機能を有していると考えられる。これまでに好気・嫌気条件の遺伝子発現調節に関与する二成分制御系の histidine kinase である ArcB と ORF540 タンパク質との関連性が示唆されている。そこで、*arcB* 遺伝子の欠損変異株を作製し、コレラ菌野生株と比較することによって病原性などとの関連性を明らかにする。

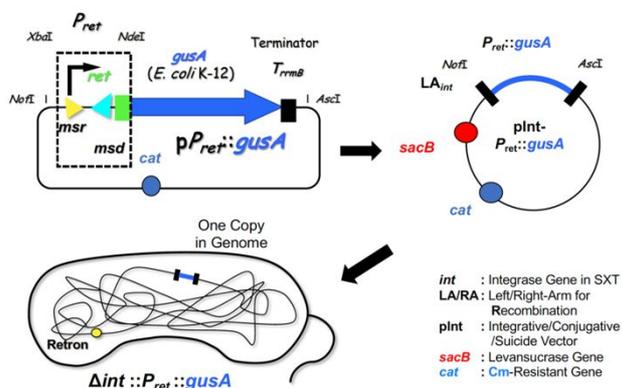


図3 コレラ菌 GusA レポーター株の構築。

(3) コレラ菌以外のレトロンの解析およびレトロンの可動性の解析

レトロンは可動性遺伝因子の一種と考えられてきたが、明確な証拠は明らかになっていなかった。しかし、これまでの解析で腸炎ビブリオ (*V. parahaemolyticus*) のレトロン-Vp96 や *V. mimicus* のレトロン-Vm85 のように転移に関連する遺伝子とレトロンが近接して存在する例が見つかるようになってきた。そこで、近年蓄積されてきたゲノムデータを利用して比較ゲノム解析を行い、レトロン近傍領域の構造解析を行うことによってレトロンの可動性遺伝因子としての可能性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) レトロンのレポーター株の作製とレトロンの誘導 (抑制) 条件の解析

V. cholerae O139 株を親株とし、suicide vector を利用して -グルクロナダーゼ遺伝子 (*gusA*) をレトロンのプロモーター下に組み込んだ DNA 断片を SXT エLEMENTのインテグラーゼ遺伝子 (*int*) 内に挿入し、レポーター株を作製した (図3)。このレポーター株を用いて種々の培養条件下におけるレトロンのプロモーター活性を調べた。NaCl を添加した場合、濃度の増加に伴って活性の低下が認められ、0.5 M では約 1/2、0.75 M では約 1/3 に低下した (図4)。また、窒素源と炭素源の欠乏状態では、プロモーター活性は約 1/2 程度に低下したが、リン酸欠乏状態ではほとんど活性に影響はなかった。さらに、鉄のキレート剤 (bipyridyl) によって培地中の鉄イオンを制限するとプロモーター活性は約 2/3 程度に低下した。以上の結果より、コレラ菌のレトロン-Vc95 は、さまざまなストレス環境下で発現量が低下することが明らかになった。これらのレトロンの発現が抑制される条件は、コレラ菌が宿主に感染する小腸の環境に近いのではないかと考えられる。

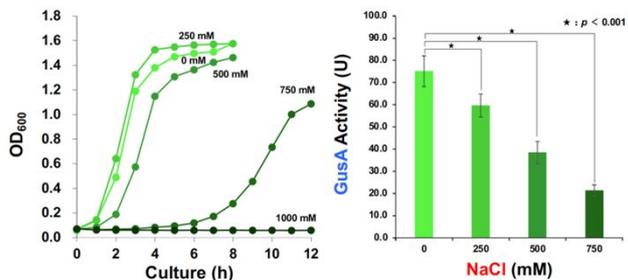


図4 レトロン-Vc95 のプロモーター活性に対する NaCl の効果。(左)コレラ菌レポーター株の M9+ カザミノ酸+グルコース培地に異なる濃度の NaCl を添加した培地における増殖曲線。(右)コレラ菌レポーター株における GusA 活性。

(2) レトロン内の機能未知遺伝子の機能解析

レトロン-Vc95 において *ret* 遺伝子に次ぐ 2 番目の ORF である *orf540* はその配列にヌクレオチド結合モチーフを有しており、これまでの研究代表者らの解析によって好気・嫌気条件の遺伝子発現調節に関与する二成分制御系の histidine kinase である ArcB と関係があることが示唆されている。ArcB に対する response regulator である ArcA はリン酸化されることによってさまざまな遺伝子の発現調節を行う転写制御因子である。*V. cholerae* O139 株を親株とし、*arcA* と *arcB* の欠損変異株を作製してカイコ幼虫に対する病原性を比較した。その結果、いずれの変異株も野生株と比較して病原性の低下が認められた (図5)。さらに、ArcA と ArcB タンパク質を精製し、ゲルシフトアッセイを行った結果、複数の遺伝子のプロモーター

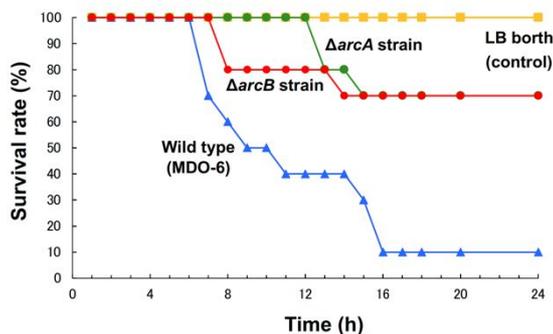


図5 コレラ菌 (*V. cholerae* O139) と *arcA*, *arcB* 変異株のカイコ幼虫に対する病原性。それぞれの菌液を 10 頭のカイコ幼虫の腸管に摂取し、生存を調べた。

領域に結合することを明らかにした。これまでの RNA-Seq 解析で ArcAB はさまざまな好気・嫌気条件の遺伝子発現調節に関与していることが明らかになっており、レトロソームと関係することで環境中の好气的条件から宿主腸管内の嫌气的条件への適応と生存に関与している可能性が示唆された。

(3) コレラ菌以外のレトロソームの解析およびレトロソームの可動性の解析

V. mimicus はコレラ菌と同じビブリオ属細菌であり、食中毒の原因となる病原菌である。*V. mimicus* CS30 株が保有するレトロソーム-Vm85 と周辺の塩基配列を解析したところ、direct repeat に挟まれたレトロソームと integrase などの遺伝子を含む約 12 kb の領域が tRNA dihydrouridine synthase 遺伝子内に挿入された構造となっていた。この領域の配列をデータベースで検索したところ、*V. vulnificus* と *V. metoecus* の株に極めて類似性の高いレトロソームを含む遺伝領域が存在していることが明らかになった。この結果は、direct repeat に挟まれた遺伝領域が可動性遺伝因子として細菌間を転移している可能性を示唆している。また、魚病病原体である *V. anguillarum* にも類似の遺伝領域の存在が明らかになったが、興味深いことにレトロソームが欠失していた。これは、レトロソームと 12 kb の遺伝領域が二段階で挿入された可能性を示唆しており、レトロソーム自体も可動性遺伝因子として機能している可能性を示唆している。

一方、腸炎ビブリオ (*V. parahaemolyticus*) が保有するレトロソーム-Vp96 もレトロソーム-Vm85 の周辺領域と類似の配列内に存在しており、同様に tRNA dihydrouridine synthase 遺伝子内に挿入された構造となっていた。この結果は、両方のレトロソームが可動性遺伝因子として機能している可能性を示唆しており、今後の検証が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Toshi Shimamoto, Zhiqun Yan, Hirofumi Nariya, Tadashi Shimamoto
2. 発表標題 Functional characterization of the Arc two-component signal transduction system in <i>Vibrio cholerae</i>
3. 学会等名 United States-Japan Cooperative Medical Science Program: 53rd Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島本 敏, 石田 洋二郎, 成谷 宏文, 島本 整
2. 発表標題 <i>Vibrio mimicus</i> のレトロンの構造と機能解析
3. 学会等名 第52回ビブリオシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirofumi Nariya, Taiki Tamura, Ahmed M. Soliman, Toshi Shimamoto, Tadashi Shimamoto
2. 発表標題 Analysis of physiological functions of galR-lacZ cluster in <i>Vibrio cholerae</i>
3. 学会等名 United States-Japan Cooperative Medical Science Program: 54th Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 成谷 宏文, 張 吟可, Ahmed M. Soliman, 島本 敏, 島本 整
2. 発表標題 GusAレポーターシステムを利用したコレラ菌レトロンの発現解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島本 敏, 石田 洋二郎, 成谷 宏文, 島本 整
2. 発表標題 Vibrio mimicusのレトロンの構造と水平伝播の可能性
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021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
研究分担者	成谷 宏文 (Nariya Hirofumi) (30452668)	十文字学園女子大学・人間生活学部・教授 (32415)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Rutgers University	St. Jude Children's Research Hospital	