

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07551

研究課題名(和文) コレラ菌における染色体数のバリエーションに関する研究

研究課題名(英文) Research on chromosome number variation in *Vibrio cholerae*

研究代表者

山本 章治 (Yamamoto, Shouji)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：80469957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：コレラ菌の染色体の数は2本と考えられてきたが、近年2本の染色体が融合して1本になった菌株が同定されつつある。本研究は染色体数の変動が起こるしくみと生存戦略に果たす役割を明らかにする目的で行われ、以下の知見が得られた：1) コレラ菌の染色体数の変動をモニターするための実験系を確立し、単一染色体株V060002の染色体を1本から2本に分離することに成功した；2) 2本の染色体をもつ株の方が1本の染色体を持つ株に比べて低温(25℃)での増殖が早かった；3) V060002のゲノムにコードされた遺伝子領域Vibrio Genomic Island 1 (VGI1) が染色体の単一化に関わ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

本研究では初めてコレラ菌の1本の染色体を2本に分離することに成功するとともに、同一の遺伝的背景において染色体数の違いのみの影響を解析することが可能な実験系を確立した。その結果、2本の染色体をもつ株の方が1本の染色体を持つ株に比べてコレラ菌の生息環境に近い25℃での増殖能が高いことが判明し、コレラ菌が2本の染色体をもつことの意義を提案することができた。また、コレラ菌の染色体は外来性遺伝子の獲得によって1本になる場合があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The number of chromosomes in *V. cholerae* has been thought to be two, but recently, strains in which two chromosomes are fused into single chromosome have been identified. This study was conducted to elucidate the mechanism of chromosome number variation and its role in survival strategies, and the following findings were obtained: 1) An experimental system was established to monitor chromosome number variation in *V. cholerae*, and a single chromosome strain, V060002, was successfully separated from single to two chromosomes; 2) The strain with two chromosomes grew faster at low temperatures (25°C) than the strain with single chromosome; 3) Vibrio Genomic Island 1 (VGI1), a gene cluster encoded in the genome of V060002, was suggested to be involved in chromosome singularization.

研究分野：細菌学 分子遺伝学

キーワード：コレラ菌 染色体数 増殖能 生息環境 外来性遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

コレラ菌はコレラを引き起こす病原細菌であり、大きさが異なる2本の染色体を有している。このうち、大染色体 (chr1) は大腸菌染色体の複製と同様な機構によって行われるが、小染色体 (chr2) はプラスミドの複製機構に類似しており、特異的な開始蛋白質 RctB の作用が必須である。これまでコレラ菌の染色体数は2本と考えられてきたが、最近の研究により2本の染色体が相同組換えによって融合し、1本になった菌株が同定されつつある。このことから、コレラ菌の染色体数は必ずしも2本とは決まっておらず、変動している可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、(1) 染色体数の変動がコレラ菌の生存戦略に果たす役割、(2) 2本の染色体が単一化するメカニズムの2点について明らかにすることを目的として行われた。

### 3. 研究の方法

#### 染色体数をモニターするためのレポーター系の確立

本研究で用いる V60002 などの単一染色体株 (SC 株) の DNA 複製は chr1 と chr2 の両方の起点 (それぞれ *ori1* と *ori2*) から開始されるものの、*ori2* からの開始は必須ではない。これに対して、典型的な2本の染色体をもつ株 (TC 株) では、chr1 とは独立に chr2 を複製する必要があるため、*ori2* からの開始は必須となる。SC 株と TC 株における *ori2* 特異的な複製開始蛋白質 RctB の必須性の違いを利用して以下のように染色体数をモニターするレポーター系を構築した。まず、プラスミド R6K の *ori* (*oriR6K*) とラクトース分解酵素遺伝子 (*lacZ*) をコードする pAH125 に *ori2-rctB* 領域の配列とアンピシリン耐性遺伝子 (*bla*) を挿入して pSY-VCchrN を構築するとともに、pSY-VCchrN を導入する宿主として V60002 の *rctB* と *lacZ* を欠失させた株 (TAV0008) を構築した。TAV0008 では仮に染色体が2本に分離した場合、chr2 を維持できないため致死となる。一方、TAV0008 に pSY-VCchrN を導入した株 (TAV0009) では染色体上の *rctB* の欠失変異が相補されるため、仮に染色体が2本に分離したとしても chr2 を維持することが可能である。pSY-VCchrN は *ori2* を含んでいるものの非常に不安定なため、プラスミドの選択薬剤であるアンピシリンを加えずに TAV0009 を培養した場合、複製に *rctB* を必要としない単一染色体の状態であれば容易に脱落するが、2本の染色体に分離されれば複製に *rctB* が必須となるため安定に維持されることが予想される。つまりこの培養条件下では pSY-VCchrN の有無を指標にして染色体数をモニターできる可能性がある。具体的には pSY-VCchrN を運ぶ TC 株 N16961 から *rctB* と *lacZ* を欠失させた株 (TAV0002) を構築し、TAV0002 と TAV0009 をアンピシリンを含まない非選択培地で一晚培養した後の pSY-VCchrN の保有率を比較した。pSY-VCchrN は *lacZ* をコードしているため、このプラスミドを保有しているコロニーは X-gal を含む寒天培地で青色を呈する (Lac<sup>+</sup>)。pSY-VCchrN の保有率は以下の式によって算出した。

$$\text{pSY-VCchrN の保有率 (\%)} = 100 \times \text{Lac}^+ \text{ のコロニー数} / \text{全体のコロニー数}$$

#### SC 株から TC 株のスクリーニング

研究の方法 で TAV0009 から得られた Lac<sup>+</sup> のコロニーについて chr1 と chr2 の組換え部位を特異的に増幅するプライマーを用いて PCR を行うとともに、PFGE によって染色体数を確認した。

#### TC 株から SC 株のスクリーニング

研究の方法 で得られた TC 株 (TAV0013) を非選択培地で培養した後に X-gal を含む寒天培地に塗布した。得られたコロニーのうち、青色を呈さない pSY-VCchrN が脱落したコロニー (Lac<sup>-</sup>) を SC 株と判定した。また、必要に応じて PCR や PFGE により染色体数を確認した。

#### SC 株と TC 株の表現型の比較

研究の方法 で得られた TC 株 TAV0013 は *rctB* の欠失変異や pSY-VCchrN をもっており、親株の V60002 とは遺伝的背景が異なる。そこで TAV0013 の *rctB* 欠失変異を野生型に戻すとともに、pSY-VCchrN を欠落させた株 (V60002TC) を構築し、V60002 と同じ遺伝的背景に改変した。V60002 と V60002TC について増殖能、形態、コレラ毒素産生性などの様々な表現型を解析した。また、TC 株である N16961 をベースにした SC 株 (N16961SC) についても、TAV0002 を出発点として SC 株をスクリーニングした後、N16961 と遺伝的背景を同一化することによって構築した。

#### *Vibrio* Genomic Island I (VGI1) が染色体数の変動に及ぼす影響

V60002 のゲノムには *Salmonella* Genomic Island (SGI1) と高い相同性をもつ遺伝子領域 (*Vibrio* Genomic Island 1: VGI1 と命名) がコードされている。VGI1 は約 28 kb からなるプラスミド様のエレメントであるが、単独では自己複製できない。VGI1 の染色体からの切り出しと複製が活性化するためには、IncA/C タイプのヘルパープラスミド (pVCR94 など) と共存させる必要がある。まず、研究の方法 で得られた TAV0013 に pVCR94 を導入し (TAV0135)、VGI1 全体を欠失させた株 (TAV0142)、染色体からの VGI1 の切り出しに関わる *int* を欠失させた株 (TAV0212)、VGI1 の複製に関わる *rep* を欠失させた株 (TAV0214) を構築した。以上の TC 株において染色体数が2本から1本になる頻度を研究の方法 と同様にして解析した。

#### 4. 研究成果

##### 染色体数をモニターするためのレポーター系の確立

*rctB* の欠失変異を有する TC 株 TAV0002 および SC 株 TAV0009 を用いて非選択培養後の pSY-VCchrN の保持率を調べたところ、TAV0002 ではほぼ 100%であったが、逆に TAV0009 ではわずかに  $9.77 \times 10^{-3}\%$  であり、ほぼ 100%が脱落していた。この結果から、本レポーター系では pSY-VCchrN の有無を指標にして染色体数をモニターできることがわかった。

##### SC 株から TC 株のスクリーニング

上述のように、非選択培養後における TAV0009 の pSY-VCchrN 保有率 (すなわち SC 株から TC 株への変動頻度) は  $9.77 \times 10^{-3}\%$  であり、ほんのわずかであった。このうち数個のコロニーを単離して研究の方法に従って PCR と PFGE を行なったところ、いずれも染色体が 2 本であることが確認され、TAV0013 とした。

##### TC 株から SC 株のスクリーニング

TAV0013 の非選択培養後に pSY-VCchrN 保有率を調べたところ、 $1.31 \times 10^{-1}\%$  であった。この値は SC 株から TC 株への変動頻度 ( $9.77 \times 10^{-3}\%$ ) よりも約 13 倍高かった。この結果から、V060002 の染色体数の変動は可逆的であり、1 本から 2 本になるよりも、2 本から 1 本になりやすいことが示唆された。

##### SC 株と TC 株の表現型の比較

V060002 の遺伝的背景において増殖能、形態、コレラ毒素産生性を調べた。形態とコレラ毒素産生性には有意な差がみられなかったが、増殖能には明らかな差がみられた。37 での増殖能には変化がみられなかったものの、25 での倍加時間は TC 株が 47 分、SC 株が 57 分であった。42 でも TC 株が 45 分、SC 株が 57 分といずれも TC 株の方が高い増殖能を示した。N16961 の遺伝的背景においても同様の検証を行なったところ、25 での増殖能のみに差がみられ、TC 株の方が倍加時間が短くなっていた (TC 株が 29 分、SC 株が 35 分)。以上の結果から、V060002 と N16961 の両方の遺伝的背景において SC 株に比べて TC 株の方が 25 での増殖能が高いことがわかった。

##### *Vibrio* Genomic Island 1 (VG11) が染色体数の変動に及ぼす影響

TAV0135 の TC 株から SC 株への変動頻度は pVCR94 が存在しない場合 (TAV0013) に比べて約 96 倍にまで高くなったが、VG11 全体を欠失させた場合 (TAV0142) では検出限界以下にまで低下したことから、VG11 の活性化が染色体の単一化に関与していることが示唆された。このプロセスに関わる遺伝子を同定するために、VG11 に様々な欠失変異を導入して同様の解析を行ったところ、染色体からの切り出しに必須な *int* もしくは複製開始因子をコードする *rep* を欠失した株 (それぞれ TAV0212 と TAV0214) においても VG11 全体を欠く TAV0142 と同レベルにまで低下していた。

1960 年代に大腸菌の染色体が 1 本であることが証明されて以来、それが原核生物の特徴の一つと見なされてきたが、ポストゲノム時代になると複数の染色体を持つ細菌種が急速に同定され始め、約 10%の細菌種が 2 本以上の染色体を持つことが判明している (*Trends Microbiol* 2010 18:141-148)。しかしながら、「細菌の染色体数にはなぜバリエーションがあるのか？」という問いに対する解答は未だ推測の域を出ず、矛盾点も多い。例えば複数の染色体を持つ細菌については、ゲノムの巨大化に伴う複製や増殖への負荷を軽減するために染色体を複数に分断せざるを得なくなったという説に対して、なぜわざわざ複数の染色体のメンテナンスを必要とする複雑な方向に進化したのかという反論や、*Myxococcus xanthus* の染色体は 9 Mb と巨大でありながら、その数は 1 本であるという事実が投げかけられている (*Mol Microbiol* 2005 56:1129-1138)。また、*Brucella suis* (*Mol Microbiol* 1998 27:99-106) や *Sinorhizobium meliloti* (*Genome Res* 2003 13:1810-1817) では、同一種内でも染色体数のバリエーションが見られる場合もある。以上の背景から、「細菌の染色体数にはなぜバリエーションがあるのか？」という問題を総じて論じることは非常に難しいものの、少なくとも各細菌種における染色体数と生存戦略の因果関係を見出すことは生物学的に重要であり、将来的には合成生物学の分野において人工細胞のゲノムを設計する上で必要な情報の一つとなると考えられる (*FEMS Microbiol Rev* 2015 39:871-891)。

コレラ菌などのビブリオ属細菌は 2 本の染色体を持っており、その複製と分配のメカニズムは複数の染色体を持つ細菌の中では最もよく研究されてきたが、「なぜ染色体数が 2 本に決められているのか？」という問題について直接的に取り組んだ研究は少ない。Institut Pasteur の Val らは、コレラ菌において染色体 2 の複製に必須な遺伝子をロックアウトすると、染色体 1 と染色体 2 が相同部位間で組換えを起こして融合し、1 本の染色体ができることを示した (*Mol Microbiol* 2014 91:665-678)。しかしながら、この単一染色体株は遺伝的背景が親株と大きく異なるため、両者の表現型の違いについて解析することはできなかった。本研究では初めて 1 本の染色体を 2 本に分離することに成功するとともに、同一の遺伝的背景において染色体数の違い

のみの影響を解析することが可能な実験系を確立した。染色体数のみが異なる株を構築して様々な表現型を比較した結果、SC 株に比べて TC 株の方が 25 °C での増殖能が高いことが明らかになった。25 °C はコレラ菌が元来生息する水環境の温度に近いことから、環境中での生存に有利に働くように 2 本の染色体を維持してきた可能性が考えられる。しかしながら、V060002 はこの仮説に反して 1 本の染色体を維持しているが、これは本株に特異的な遺伝子領域 VG11 に起因する例外的な現象かもしれない。VG11 はヘルパープラスミドの存在下で染色体から切り出された後に自己複製し、接合伝達によって別の菌に移動すると考えられる。この一連のプロセスが V060002 染色体の単一化におよぼす影響について調べたところ、ヘルパープラスミドによる VG11 の活性化が染色体の単一化を誘発することを明らかにした。また、VG11 にコードされた *int* もしくは *rep* の欠失株を用いた解析から、VG11 が染色体から切り出され、自己複製することが単一染色体化に必要であることが示唆された。以上のことから、V060002 の染色体は以前は 2 本であったが、外から VG11 が獲得された後に IncA/C プラスミドなどを介して活性化したことによって 1 本になったのかもしれない。なお、染色体の単一化を誘発するメカニズムと単一染色体を維持することの意義については今後の課題である。

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 Klancher Catherine A., Yamamoto Shouji, Dalia Triana N., Dalia Ankur B.	4. 巻 117
2. 論文標題 ChiS is a noncanonical DNA-binding hybrid sensor kinase that directly regulates the chitin utilization program in <i>Vibrio cholerae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 20180 ~ 20189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2001768117	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 0件）

1. 発表者名 山本章治
2. 発表標題 単一染色体を保有するコレラ菌株の解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山本章治	4. 発行年 2019年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 4
3. 書名 消化器病学サイエンス	

〔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
研究協力者	東 孝真  (Azuma Takamasa)		

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
---------	---------