

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06288

研究課題名（和文）コレラ菌における突然変異バイアスとビルレンス変調に関する研究

研究課題名（英文）A Study on Mutation Bias and Virulence Modulation in *Vibrio cholerae*

研究代表者

岡田 和久（OKADA, Kazuhisa）

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授（常勤）

研究者番号：40420434

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：コレラ菌は栄養が制限された水中環境でも生存することが知られており、そのような飢餓ストレス下での環境適応を理解することは重要である。本研究は、コレラ菌における栄養制限下でのゲノムDNAおよび表現型の変化を経時的に追跡し、解析した。その結果、鞭毛関連遺伝子に選択的に突然変異が発生すること、鞭毛運動の制御がコレラ菌の長期増殖能の維持に關与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌の進化における非ランダム突然変異と適応的突然変異の役割についての理解は十分ではない。本研究は、コレラ菌を貧栄養下で培養すると、鞭毛運動に関わる遺伝子に選択的に変異が発生し、それに伴う運動性の欠損が、コレラ菌の増殖能の維持に關連することを示した。世界に拡散し流行を起こすコレラ菌の水中環境における生存戦略を理解することは、その拡散を防ぐ上で重要である。本研究の成果は感染症の進化や耐性の発生メカニズムに関する新たな洞察を提供し、新しい予防策や治療法の開発に役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：*Vibrio cholerae* is known to survive in aquatic environments with limited nutrient supply, highlighting the importance of understanding its adaptation strategies under starvation stress. In this study, we analyzed *V. cholerae* under nutrient restriction over time to track genomic and phenotypic changes. Our findings suggest that selective mutations occur in flagella-related genes, and the regulation of flagellar motility contributes to the long-term culturability of *V. cholerae*.

研究分野：細菌学

キーワード：コレラ菌 変異 環境適応 鞭毛運動 VNC

1. 研究開始当初の背景

自然突然変異はランダムに起こるか非ランダムかについては重要な研究対象であり、病原細菌の進化や癌をはじめとする人の疾患の発生にも関与する。ランダムな突然変異がゲノムに発生すると、時として生命に有利な変化が生じることもあるが、多くの場合は有害な変化が発生したり、あるいは特段の変化をもたらさない。一方で、適応的突然変異というものも議論されているが、これまでに十分な証拠は得られていない。筆者は世界に拡散し流行を引き起こすコレラ菌の水中環境における生存戦略を理解することを目的とし、コレラ菌を長期培養しながら生じる変化を経時的に解析した際に、鞭毛関連遺伝子に選択的に変異が生じる現象を観察した。

2. 研究の目的

コレラ菌の特殊環境下で認められた非ランダムな突然変異の存在について検証し、また、その変異がコレラ菌にもたらす意義について理解する。

3. 研究の方法

供試株とその完全ゲノム配列の決定

コレラ菌 MS84A 株を供試株として使用した。本菌株は、2010 年にタイで発生したコレラ流行時に、患者から分離した株で、第七次コレラパンデミックエルトールの第 3 波の群に分類される。ゲノム配列は Illumina 社の Miseq シークエンサーと Oxford Nanopore 社の MinION シークエンサーでそれぞれゲノム配列を読み、最終的に Unicycler によりハイブリッドアセンブリを行い、完全ゲノムを決定した(アクセッション番号 CP077060-CP077061)。BUSCO スコアは 99.8% でありゲノムアセンブリの品質が高いことが示唆された(1,445 個のピブリオ目のコア遺伝子のうち、アセンブリしたゲノム中に見つかった遺伝子数の割合)。各種遺伝子欠損株は、ダブルクロスオーバーによる相同組み換えで、標的遺伝子を欠損させて作製した。

培養条件

コレラ菌は LB 寒天培地上にコロニーを形成させた後、シングルコロニーを LB 培地に播種し、増菌培養を行った。その後、リン酸緩衝生理食塩水(Sigma 社)でリンスした菌懸濁液(25 μ l)を、14 mL のポリスチレンチューブに分注した 5 mL の M9、M9 (グルコースを含まない)あるいは人工海水(40 g/L sea salt, Sigma 社)に加え、37 °C で静置培養した。培養中の水の蒸発を補うため、適宜、滅菌精製水を加えた。コレラ菌の長期培養には、M9 最少培地(2 g/l グルコース(0.2%), 0.1 mM CaCl₂, 2.0 mM MgSO₄, M9 minimal salts(Difco 社))を用いた。

菌数のカウント

培養液中の総菌数は、SLGC 細菌カウンター (Minato Medical Science 社) を使用してカウントし、培養可能菌数(コロニー形成単位: CFU) は、LB 寒天上での希釈プレート法によって決定した。生菌数は、LIVE/DEAD BacLight キット(L13152; Invitrogen 社) を使用して決定した。

運動性試験および細胞内 ATP 測定

LB 寒天培地にコロニーを形成後、0.3% の寒天を含む、LB 培地または M9 培地の中心部に、無菌爪楊枝で播種し、37 °C で 24 時間放置後、その寒天培地上に拡散した菌の移動直径を測定することで運動能を評価した。細胞内 ATP 量の測定は ENLITEN ATP Assay (Promega 社) を使用し、放出された発光は Centro LB960 ルミノメーターで測定した。

変異の検出

コレラ菌に生じた変異の検出は、まず、対象とするコロニーを増菌後、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen 社) を用いてゲノム DNA を調整し、Miseq シークエンサーによりシークエンスリード配列を得た(Bioproject no. PRJNA714234)。得られたリード配列を breseq プログラムで参照完全ゲノムにマッピングし、ミスマッチ箇所を検索した。

本研究の実験方法の詳細は、DOI: <https://doi.org/10.1128/msystems.00109-23> に記載。

4. 研究成果

長期培養におけるコレラ菌の増殖能および運動能の低下

コレラ菌を M9 最少培地で最大 300 日間、37 °C で静置培養した(図 1A)。約 10⁵ CFU/ml のコレラ菌を摂取した翌日、培養可能菌数が 10⁷ CFU/ml に増加し、その後、増殖曲線は 2 つの段階が示された。初期段階は急速な減少があり(30 日目まで)、その後は徐々に培養可能菌数が減少した。培養 30 日目は、3x10⁴ CFU/ml であったが、300 日目には 2x10³ CFU/ml に減少した。SYTO 9 およびヨウ化プロピジウムで染色してカウントした生菌数については、30 日目に全菌数の 80% 相当数であったが、その後は緩やかな減少を示した(図 1B)。一方、30 日目の培養可能菌数は、全菌数の 0.5% に相当し、ほとんどの生菌が、生きていない状態(VNC)に移行したと考えられる。

培養中のコレラ菌の運動能を時間経過ごとに測定した結果、3 つの主要な運動パターンが観察された(図 1C)。培養 5 日目には、0.1% が部分的な運動性を示し、0.4% は非運動性を示したが、30 日目から 60 日目の間に運動能の急激な変化が認められた(図 1D)。また、運動性を示す集団においても経過的に運動による移動度の低下を示した(図 1E)。運動性が欠損している分離株に対

して新しい LB 培地に再播種し、再培養を行い、運動性の復帰を試験したが、部分的に運動性を示す 19 株のうち 11 株が、非運動性の 37 株中 9 株が低頻度 (0.03-0.39%) で運動性を復帰させたが、大部分の株では復帰はみられなかった。非運動性を示す 5 株について、透過型電子顕微鏡で観察した結果、2 株は正常な単一の鞭毛を示し、他の 3 株は細く短い異常な極性鞭毛構造を示した。ゲノム解読の結果、前者の 2 株は鞭毛モーター遺伝子 (*pomA*, *motX*) の欠損が確認され、後者の 3 株では鞭毛装置およびその調節に関わる遺伝子 (*flhA*, *flrC*, *fliF*) に変異があることがわかった。

運動性の低下・欠損はコレラ菌の増殖能の維持に關与する

自然発生した運動性欠損 (MD) 変異株 5 株と、人工的に同遺伝子を欠失させたノックアウト (KO) 株 (*flhA*, *flrC*, *fliF*, *pomA* および *motX*) 及び野生型 (WT) 株を用いて次に示す実験を行った。細胞内 ATP レベルは WT、MD 変異株、および KO 変異株に差は認められなかった (図 2A)。また、細胞内 ATP レベルは 2 日目以降、低い状態のままであった。総菌数に差はないが、培養 30 日目において、MD および KO 変異株は WT 株よりも培養可能菌数が多いことを示した (図 2B)。30 日目を過ぎると、WT も運動能の低下および欠陥が著しく認められてくることから、30 日目以降は、変異株と平行して培養可能菌数が徐々に減少するものと考えられる。

WT 株は、グルコースを含まない M9 培地 (炭素源なし) で培養 30 日目に、人工海水では 17 日目に、全菌が VNC 状態に移行した (図 2C, D)。これに対して、運動欠損株はより長期間、増殖能を維持した。人工海水中の WT 株においても、14 日目に運動欠損株を確認し、計 3 株のゲノムを確認したところ、全てに鞭毛関連遺伝子 (*flhA* および *fliM*) に変異があることを確認した。この変異現象は M9 培地に限定される訳ではないことが示唆された。

次に、ポリミキシン B (PMB) による鞭毛運動の阻害と増殖能に与える影響について解析した。

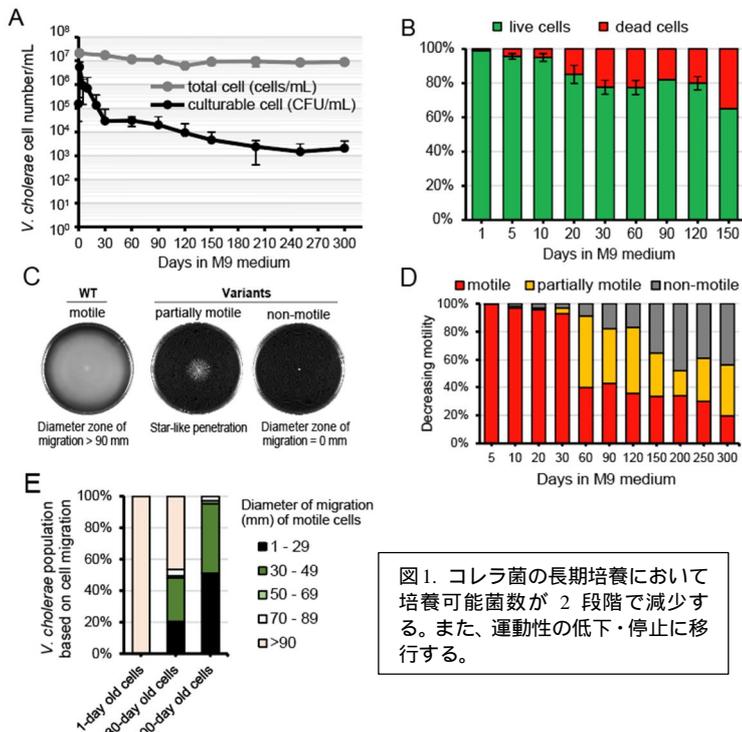


図 1. コレラ菌の長期培養において培養可能菌数が 2 段階で減少する。また、運動性の低下・停止に移行する。

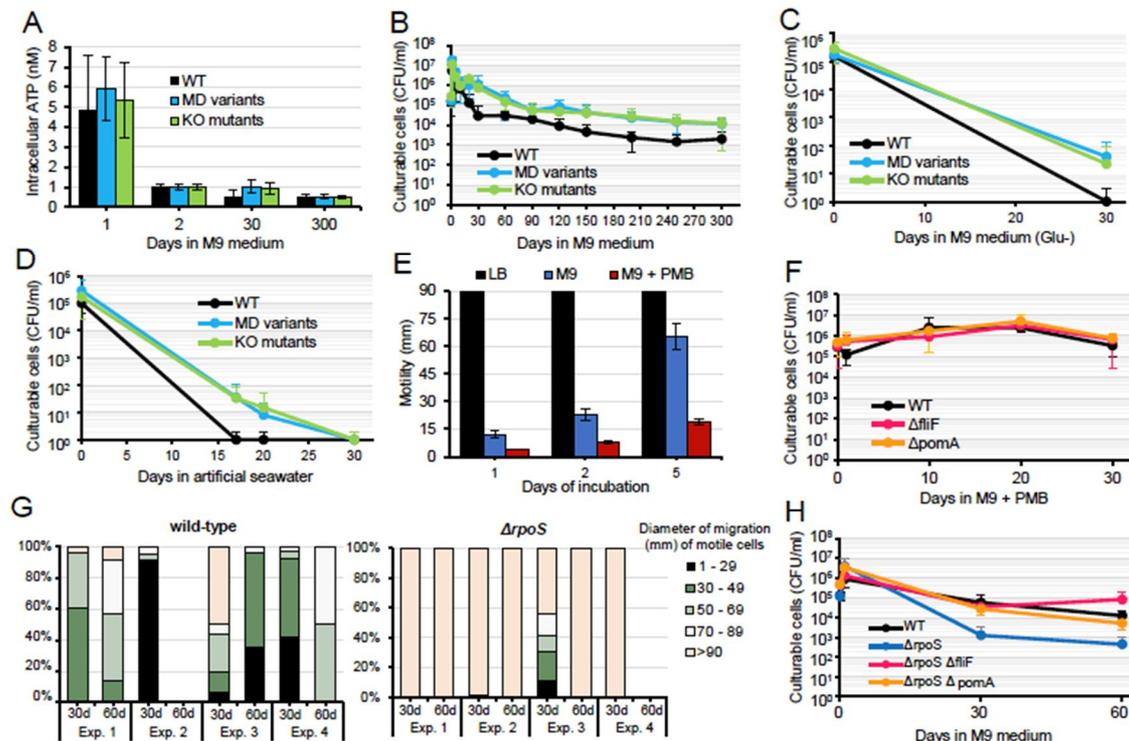


図 2 運動性欠損コレラ菌は、運動性をもつ野生株よりも高く培養能を維持する。

コレラ菌 MS84A 株の最少阻止濃度の半分量の PMB を 0.3% の寒天を含む M9 培地に添加したところ、PMB を添加しない培地に比較して、コレラ菌の運動が抑制されていることを確認した(図 2E)。そこで、PMB 添加の M9 培地に、WT 株および KO 変異株(*fliF* および *pomA*) を播種し、培養可能菌数をカウントしたところ、30 日経過後においても、WT 株は KO 変異株と同等で、PMB 無添加の条件よりも高い培養可能菌数を示した。化学物質や物理的要因による運動性の阻害においても、増殖能が維持される可能性を示唆した(図 2F)。

次に *rpoS* 遺伝子の欠損による影響を解析した。*RpoS* は、多くのグラム陰性細菌が飢餓やストレスに耐えるためのグローバルな適応応答の制御に関与することが知られている。そこで *rpoS* 遺伝子を欠損させたところ、30 日目及び 60 日目でも WT に比して、高い運動性を示した(4 回の独立実験データより)(図 2G)。高い運動性を維持する *rpoS* 変異株は WT よりも培養可能な菌数が、著しく低下した(図 2H)。そこで *rpoS* に加えて鞭毛関連遺伝子(*fliF* または *pomA*) を欠損させたところ、培養可能な菌数が WT レベルまで上昇した。これらの結果から、*rpoS* は鞭毛運動の制御に関連し、コレラ菌の長期にわたる培養能の維持に重要な役割をもつことを示唆する。

300 日間培養した WT 株、MD および KO 変異株に栄養源(LB)を与え、37 °C で静置培養した結果、運動欠損株は、培養開始 8 時間後に WT 株よりも速い増殖を示した(図 3AB)。図 3C の Experiment 1(Exp. 1)では、培養液から運動欠損株のみ分離されるようになり、また同現象は、図 2G の WT 株(Exp. 2)および *rpoS* 変異株(Exp. 4)の培養液でも認められ、長期培養において、増殖能を維持する運動性株は先に検出されなくなることが示された。

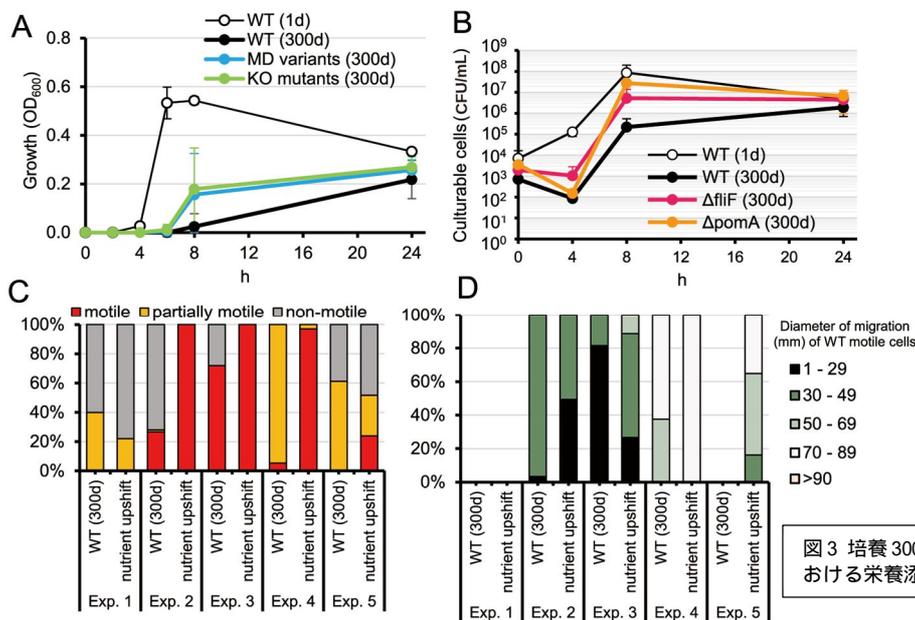


図 3 培養 300 日目のコレラ菌における栄養添加後の増殖変化

鞭毛関連遺伝子の選択的な変異

長期培養における変異発生のパターンについて解析した。異なる変異が生じたクローン株をできるだけ多く得るため、60 日目の培養液から 30 個のコロニーをランダムに選択し、各コロニーについて 6 つの表現型確認試験(コロニーサイズ、運動能、溶血能、タンパク質分解能、カタラーゼ活性能、およびバイオフィーム形成能)を行い、これらの試験結果に基づいてコロニーを一定の基準でグループ化し、各グループから 1 つのコロニーを無作為に選択した。最終的に 4 回の独立実験から計 29 のクローン株を得た。その 29 株中 20 株(69%)は運動欠損株であり、9 株(31%)は運動性を示した。また、全ゲノム解読の結果、29 株中 22 株(75.9%)に鞭毛関連遺伝子に変異を検出した。29 株で計 152 の変異が検出され、1 株あたり平均 4.9 個の遺伝子の変異が検出された。その中で DNA 修復に関与する *mutS* 遺伝子に変異がみられた 2 株は平均で 12.5 個の遺伝子に変異を示した。そこで、*mutS* の変異株を作製し 60 日間培養した結果、平均 23 個の遺伝子に変異を検出した。*mutS* の欠損は、本培養条件下において、変異をより高確率で発生させることが示唆された。

次に、コレラ菌ゲノムに生じる突然変異を経時的に追跡した。コレラ菌の培養液から、培養開始 10 日目、20 日目、30 日目、60 日目の各タイミングで、それぞれ 4 コロニーずつ分離選択し、2 回の独立実験により、計 32 株を解析した。32 株中 18 株(56.3%)に鞭毛関連遺伝子に変異を確認した。

本研究では、最終的に計 73 株の長期培養後のクローン株のゲノム配列を解析したが、うち 52 株に鞭毛関連遺伝子に変異を認めた。変異を受けた鞭毛関連遺伝子の種類は 17 あり、挿入、脱落、塩基置換と多様なパターンの変異が見られた。また、各株において複数の鞭毛関連遺伝子に変異が同時に見られることは稀であった。したがって、鞭毛運動に関する遺伝子に対する変異圧が存在する可能性が推測された。また、培養開始 30 日目までの変異解析によると、鞭毛関連遺

伝子以外のほぼ全ての遺伝子及び非コード領域は高く保存されていたことから (図 4)、鞭毛関連遺伝子の選択的変異であると結論づけた。

長期バッチ培養後、代謝関連遺伝子の変異や病原性関連因子 (CTX ファージ等) および大規模な DNA 領域 (約 35 kb) を欠損した様々なクローン株が認められた (図 5)。また、コレラ毒素非産生クローンの出現も確認した。VNC 状態に移行したコレラ菌の一部は、羊血液寒天培に移して培養すると、VNC 状態から増殖能を回復させることをも示唆された (研究の結果の詳細は、DOI: <https://doi.org/10.1128/msystems.00109-23> を参照)。

本研究は、貧栄養環境下でのコレラ菌の挙動に焦点を当て、特定の機能に関わる遺伝子群に選択的な突然変異が引き起こされることを明らかにした。また、コレラ菌は栄養制限下で鞭毛運動を速やかに抑制することで増殖能を維持し、栄養源に曝された際には他の細菌と競合しながら迅速に増殖することができ、長期生存に有利になると考えられる。しかし、このような環境下での増殖能の維持は、多くの DNA 領域の脱落や変異がゲノムに蓄積するため、大部分のクローン株は多様な環境での生存が不利となり、淘汰されると考えられる。

本研究にはいくつかの限界がある。培養には主に人工合成培地を用いており、また 37 の静置培養で、pH も 7.0 付近で維持されている。さらに、得られた結果は、凝集塊を含まない浮遊菌の結果に基づいている。ヒトから排出されるコレラ菌はバイオフィーム様の凝集体も存在し、このような凝集体には物理的な運動停止や VNC 状態に至った菌が混在すると考えられる。そのため、複雑な菌凝集体に関するゲノムの完全性と培養能の維持についての理解は、今後の課題として取り組む必要がある。

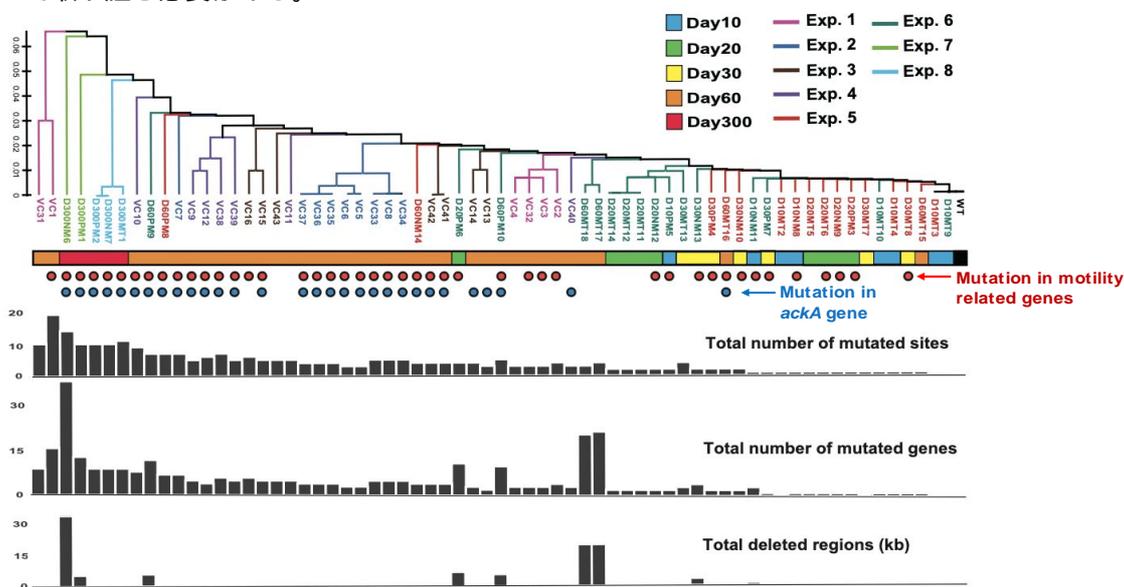
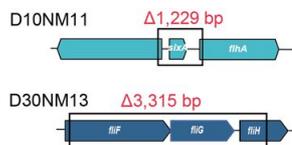
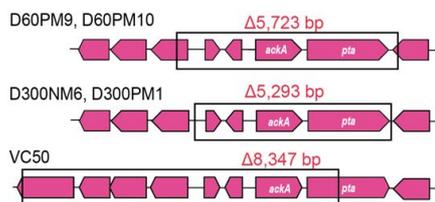


図 4 コレラ菌 MS84 株の経時的解析に基づく突然変異プロファイルと遺伝的関連性

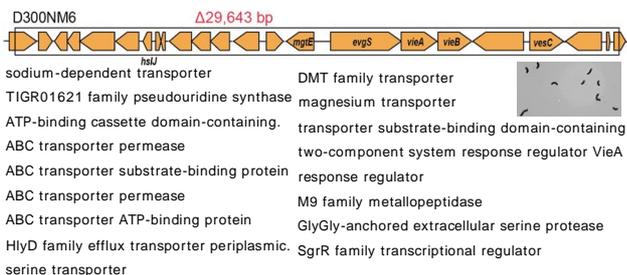
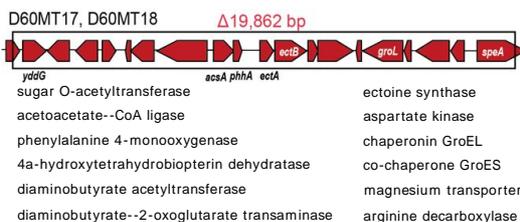
Gene loss in flagella gene related regions



Gene loss in the regions containing the acetate kinase ackA



Gene loss in a large region



Gene loss of virulence genes (CTX phage)



図 5 コレラ菌 MS84 株の長期培養後に認められた遺伝子欠損領域

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, Roobthaisong Amonrattana, Hamada Shigeyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Flagella-related gene mutations in <i>Vibrio cholerae</i> during extended cultivation in nutrient-limited media impair cell motility and prolong culturability	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mSystems	6. 最初と最後の頁 e00109-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSystems.00109-23	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 Okada Kazuhisa, Roobthaisong Amonrattana, Hamada Shigeyuki
2. 発表標題 Extended <i>Vibrio cholerae</i> cultivation induces flagella genes mutation with prolonged culturability
3. 学会等名 第97回日本細菌学会総会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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