

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07025

研究課題名（和文）レトロンとmsDNAによるビブリオ属細菌の病原性発現調節ネットワークの解析

研究課題名（英文）Analysis of regulatory network of virulence expression in *Vibrio* spp. by retron and msDNA

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：*Vibrio cholerae*のレトロン-Vc95より産生される機能未知のORF540は、嫌気条件下での遺伝子発現調節に關与する二成分制御系のsensor kinaseであるArcBとの相互作用が示唆されており、本研究でArcB ArcA HapR バイオフィーム形成の発現調節経路を明らかにした。また、hapR遺伝子には、コレラの原因となる血清型01と0139の株が保有するhapR2とそれ以外の*V. cholerae*が保有するhapR1の二つのタイプが存在していることを明らかにした。そして、この知見に基づき血清型01と0139の株のみを選択的に検出することが可能なPCR法を新たに開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により*Vibrio cholerae*の病原因子の一つであるバイオフィームの形成に関する発現調節機構について新たな経路を明らかにすることができた。これによってコレラの感染・発症を防ぐための新たな標的が明らかになった。本研究によって得られた成果は、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。さらに、コレラの原因となる01と0139株を食品中から選択的に検出する方法を確立することができたことから、コレラ流行地域から輸入される食品（魚介類など）の安全性を事前に確認することができる。

研究成果の概要（英文）：ORF540, whose function is unknown and produced by retron-Vc95 of *Vibrio cholerae*, has been suggested to interact with ArcB, a sensor kinase of the two-component control system involved in gene expression regulation under anaerobic conditions. In this study, we clarified the expression regulation pathway of ArcB ArcA HapR biofilm formation. We also clarified that there are two types of hapR genes: hapR2, which is possessed by cholera-causing serotype 01 and 0139 strains, and hapR1, which is possessed by other *V. cholerae* strains. Based on this knowledge, we developed a new PCR method that can selectively detect only cholera-causing serotype 01 and 0139 strains.

研究分野：食品衛生微生物学

キーワード：レトロン msDNA コレラ菌 病原性 バイオフィーム *Vibrio cholerae* *Vibrio mimicus*

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細菌逆転写酵素 (RT) 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)。RT 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、一種の可動性遺伝因子であると考えられている。これまでのところ RT や msDNA の生理的意義について、詳細は明らかになっていない。特に、コレラ菌のような病原細菌由来の 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) 何らかの機能を有していると考えられている。

これまでの研究代表者の研究から、*Vibrio cholerae* はコレラの原因となる血清型 O1 と O139 株のみが基本的にレトロン-Vc95 を保有しており、コレラの原因とならない non-O1, non-O139 血清型株は基本的にレトロンを保有していないことが明らかとなっている。このことから、*V. cholerae* ではレトロンと病原性発現との関連性が示唆されている。*V. cholerae* のレトロン-Vc95 には、*msr-msd* と *ret* 遺伝子以外に機能未知の二つの ORF (*orf540*, *orf205*) が含まれており、msDNA 以外に ORF540 と ORF205 が病原性発現と何らかの関係があることが推測されている (図 2)。特に、ORF540 は、アミノ酸配列にヌクレオチド結合モチーフが含まれているため、何らかの機能を有してい

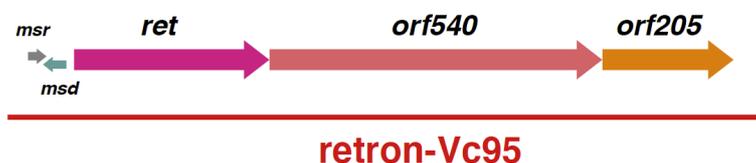


図 2 コレラ菌由来のレトロン-Vc95 の遺伝子構成。  
*msr-msd* と *ret* 遺伝子以外に機能未知の二つの ORF (*orf540*, *orf205*) が含まれる。

ると考えられている。これまでに、ORF540 の機能を明らかにする目的で、yeast two-hybrid 法によって ORF540 と相互作用するタンパク質を検索したところ、候補タンパク質の一つとして嫌気条件での遺伝子発現調節に関与する二成分制御系の sensor kinase である ArcB が見ついている。ArcB の response regulator である ArcA については、コレラ菌の欠損変異株の解析から病原性因子の発現制御に関与していることが明らかにされている (Sengupta et al., 2003; Xi et al., 2020)。シグナル伝達経路で ArcA の上流にある ArcB がコレラ菌レトロンの ORF540 と相互作用するのであれば、レトロンと病原性との関係を明らかにすることができる (図 3)。

### 2. 研究の目的

本研究は、コレラ菌 (*V. cholerae* O1, O139) の病原性発現調節機構とレトロンとの関係を明らかにすることを主な目的としている。レトロン-Vc95 より発現した逆転写酵素の産物である msDNA-Vc95 の役割や機能未知の二つの ORF 産物である ORF540 と ORF205 の機能を明らかにすることによってコレラ菌の病原性とレトロンの関係を明らかにする。本研究によって得られる成果は、病原細菌の病原性発現ネットワークの新たな案分しメカニズムを解明する可能性を持っている。また、msDNA の新たな役割を明らかにすることによって、これまでに知られていない新たな転写制御形式を提唱することも可能であると考えている。

### 3. 研究の方法

#### (1) *Vibrio cholerae* の *arcAB* 遺伝子への変異導入と ArcAB リン酸化部位の解析

他の細菌の ArcA と ArcB とのアミノ酸配列の比較によってリン酸アミノ酸残基を推測し、

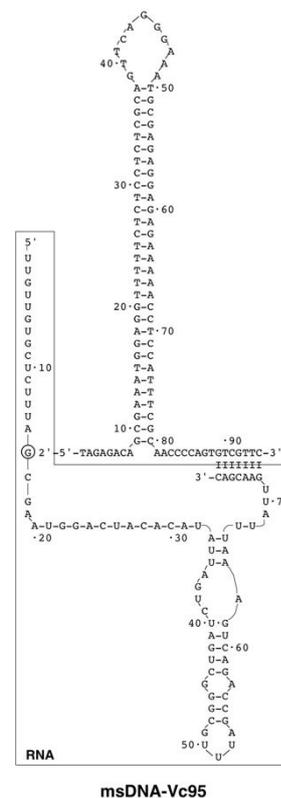


図 1 コレラ菌由来の msDNA-Vc95 の推定二次構造。枠で囲まれた部分が RNA でそれ以外の部分が DNA である。

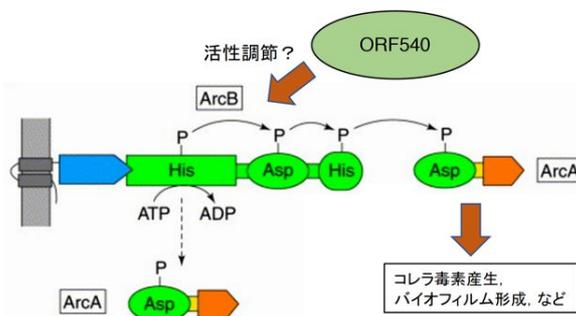


図 3 ORF540 と ArcAB の関係のモデル

部位特異的変異導入によって *V. cholerae* の *arcA*、*arcB* 遺伝子の該当コドンに変異を導入した。そして、野生株と変異株の ArcA と ArcB タンパク質を精製し、Phos-tag SDS-PAGE によってリン酸化の有無を解析した。

### (2) *Vibrio cholerae* の HapR の配列多型解析

研究代表者が保有するインド、バングラデシュ、日本で分離された *V. cholerae* の *hapR* 遺伝子の塩基配列を解析し、データベースに登録されている *V. cholerae* ゲノム配列から *hapR* 遺伝子配列を選択して ClustalW によって比較解析を行った。

得られた共通配列の情報に基づいて *V. cholerae* O1, O139 血清型株の *hapR2* ハプログループの検出に特異的なプライマーをデザインした。そして、市販魚介類に *V. cholerae* を混入させて PCR による検出を試みた。

### (3) *Vibrio mimicus* の新たなレトロンの解析

*V. mimicus* CS30 株が産生する msDNA の DNA 部分の塩基配列を Maxam-Gilbert 法によって解析し、その配列情報に基づいて *V. mimicus* のレトロンをクローニングし、塩基配列を解析した。得られた塩基配列の情報に基づいて、他のレトロンの遺伝子配列と比較解析を行った。また、レトロンの周辺領域の配列をレトロンを含まない *V. mimicus* や他のビブリオ属細菌の同領域と比較解析することにより、レトロンのゲノム挿入部位を特定した。

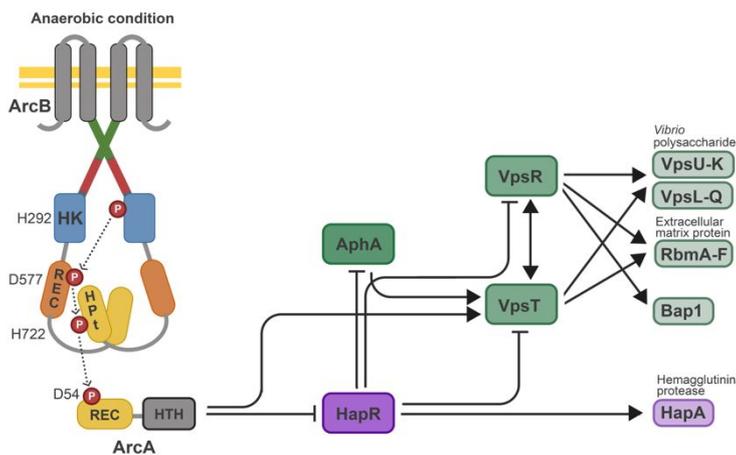


図4 コレラ菌の ArcAB による HapR を介したバイオフィルム形成の発現制御ネットワーク

## 4. 研究成果

### (1) コレラ菌の ArcAB タンパク質の機能解析

コレラ菌は、二成分制御系である ArcAB システムを介して、好気性、微好気性、嫌気性の呼吸条件に応じてバイオフィルム形成などの病原因子の発現を切り替えることができる。本研究では、ArcB と ArcA のリン酸化部位における変異株を作製し、Phos-tag SDS-PAGE を利用して ArcB H292 D577 H722 ArcA D54 のリン酸リレーを行うアミノ酸残基を特定した(図4)。また、ArcAB システムが好気性および嫌気性の両条件下でバイオフィルム形成に関与することも明らかにした。バイオフィルム形成の関する ArcAB の正の調節には、コレラ菌のクオラムセンシングシステムにおける高細胞密度のマスターレギュレーターである HapR が関与していることが明らかになった。ArcB を介してリン酸化された ArcA (P-ArcA) は *hapR* 遺伝子の転写を抑制し、HapR が抑制していた下流側のバイオフィルム形成に関与する遺伝子群を発現させ、バイオフィルムの分解を促進するプロテアーゼ遺伝子 (*hapA*) の発現を抑制することによって、嫌気的条件下でのバイオフィルム形成を促進する(図4)。本研究では、酸素制限下でのコレラ菌のバイオフィルム形成に ArcBA システムが重要な役割を果たしていることが

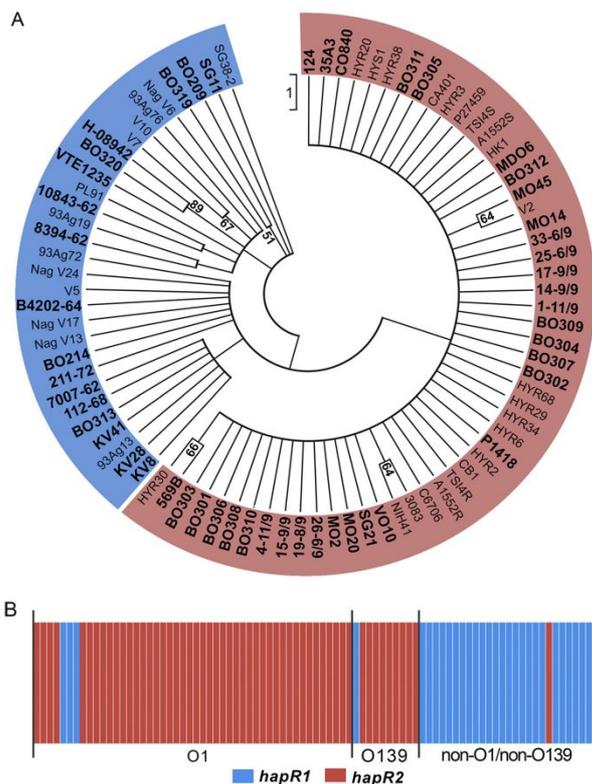


図5 (A) *V. cholerae* の *hapR* 遺伝子コード領域の系統解析。85 株の *V. cholerae* の *hapR* 遺伝子配列より二つの主要な系統が明らかになった (*hapR1* [青], *hapR2* [赤])。 (B) *hapR* 遺伝子のベイズ解析結果。

明らかにすることができた。

(2) *Vibrio cholerae* の HapR の配列多型とバイオフィーム形成に及ぼす影響

*Vibrio cholerae* におけるバイオフィーム形成のマスター調節因子である *hapR* 遺伝子の配列変異がバイオフィーム形成に及ぼす影響について調べた。本研究では、コレラの原因となる菌株 (O1, O139 血清型株) とそれ以外の株 (non-O1, non-O139 血清型株) 計 85 株について、*hapR* 遺伝子の配列を解析し、好気性および嫌気性条件下におけるバイオフィーム形成を計測した。*hapR* 遺伝子の系統解析の結果、それぞれの菌株の *hapR* 遺伝子は、大きく二つのハプログループに分かれることが明らかになった (図 5)。O1, O139 血清型株は基本的に *hapR2* ハプログループ、non-O1, non-O139 血清型株は基本的に *hapR1* ハプログループに属することがわかった (図 5)。*hapR1* では多くの一塩基多型が見つかり、多様性が認められた。一方、*hapR2* では挿入や欠失が多く認められたが、*hapR1* のような多様性は認められなかった。HapR はバイオフィーム形成を抑制する調節因子であるため、欠失変異やフレームシフト変異はバイオフィーム形成に大きな影響を与えることが推測される。実際、バイオフィームを測定したところ、欠失変異やフレームシフト変異含む HapR を保有する株は、バイオフィーム形成が促進され、バイオフィームの分解を行うプロテアーゼ遺伝子の発現が抑制されていた。

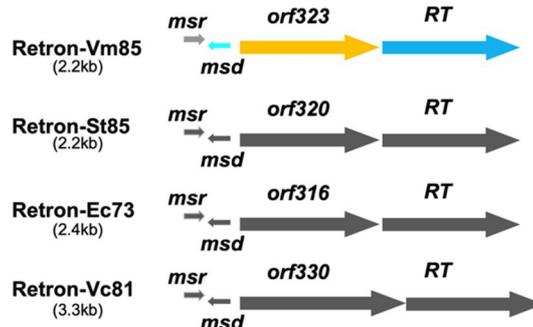


図 6 *V. mimicus* のレトロン -Vm85、*Salmonella Typhimurium* のレトロン-St85、大腸菌のレトロン-Ec73、*V. cholerae* のレトロン-Vc81 の遺伝子構成

(3) *hapR* 遺伝子の配列多型特異的 PCR 法によるコレラ病原性 *V. cholerae* 検出法の開発

前述のように、バイオフィーム形成のマスター調節因子の遺伝子 *hapR* は、コレラの原因となる菌株 (O1, O139 血清型株) とそれ以外の株 (non-O1, non-O139 血清型株) で大きく二つの系統 (*hapR2*, *hapR1*) に分かれることが明らかになっている。この特徴を利用して、*hapR2* グループの遺伝子を特異的に検出するプライマー配列をデザインし、*hapR2* 特異的な PCR 法を開発した。そして、この PCR 法を魚介類中に含まれる *V. cholerae* の検出に応用した。輸入魚介類に含まれる可能性がある *V. cholerae* を直接 *hapR2* 特異的 PCR 法によって検出することにより、危険性の高い *V. cholerae* O1, O139 血清型株の国内市場への侵入を未然に防ぐことができるようになる。

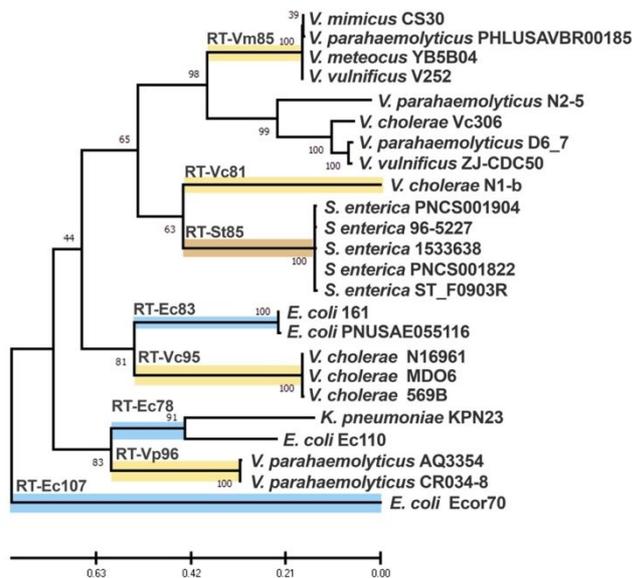


図 7 レトロン逆転写酵素 (RT) のアミノ酸配列に基づく系統解析

(4) *Vibrio mimicus* の新たなレトロンの解析

*Vibrio mimicus* より新たなレトロン-Vm85 を発見し、解析を行った。このレトロンは、*msr*-*msd* 領域、機能未知の

*orf323*、逆転写酵素遺伝子 (*ret*) によって構成されており、サルモネラのレトロン-St85 と同じ遺伝子構成であった (図 6)。逆転写

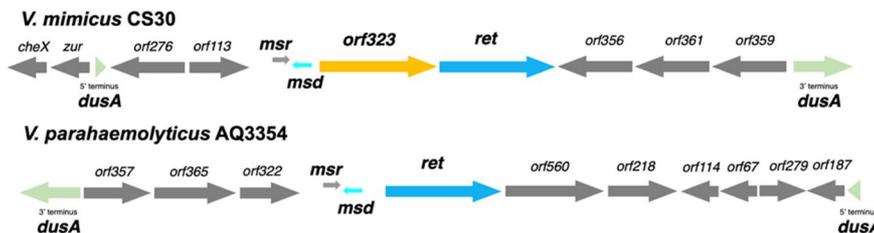


図 8 *V. mimicus* のレトロン-Vm85 と *V. parahaemolyticus* のレトロン-Vp96 の挿入部位付近の周辺領域の遺伝子構成

酵素 (RT-Vm85) のアミノ酸配列は、*V. metoecus*、*V. parahaemolyticus* および *V. vulnificus* の RT と高い相同性を示した (図 7)。また、機能未知の ORF323 のアミノ酸配列は、サルモネラ (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) のレトロンに含まれる ORF と密接な関係を示すことが明らかになった。さらに、レトロン-Vm85 の周辺領域の塩基配列を解析し、他の細菌ゲノムと比較したところ、レトロン-Vm85 が tRNA ジヒドロウリジン合成酵素遺伝子 (*dusA*) に挿入されていることが明らかになった (図 8)。*V. parahaemolyticus* のレトロン-Vp96 も同様に *dusA* 遺伝子に挿入されており、レトロンが可動性遺伝因子として機能していることが示唆された。特に、レトロン-Vm85 の場合、二段階で *dusA* 遺伝子挿入された形跡が認められたことから、レトロン周辺に存在するインテグラーゼなどの遺伝子を含む可動性遺伝因子として機能するのみならず、レトロン単独でも転移する可能性が考えられた。

#### <引用文献>

Sengupta N., Paul K., Chowdhury R. The global regulator ArcA modulates expression of virulence factors in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.*, 71:5583-5589, 2003.

Xi D., Yang S., Liu Q., Li Y., Li Y., Yan J., Wang X., Ning K., Cao B. The response regulator ArcA enhances biofilm formation in the vpsT manner under the anaerobic condition in *Vibrio cholerae*. *Microb. Pathog.*, 144:104197, 2020.

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 0件）

1. 著者名 Caigoy Jant Cres, Shimamoto Toshi, Mukhopadhyay Asish Kumar, Shinoda Sumio, Shimamoto Tadashi	4. 巻 88
2. 論文標題 Sequence polymorphisms in <i>Vibrio cholerae</i> HapR affect biofilm formation under aerobic and anaerobic conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01044-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/aem.01044-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Jant Cres Caigoy, Toshi Shimamoto, Asish Kumar Mukhopadhyay, Sumio Shinoda, Tadashi Shimamoto
2. 発表標題 HapR phylogeny and sequence polymorphisms influence biofilm formation of <i>Vibrio cholerae</i>
3. 学会等名 ASM Microbe 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jant Cres Caigoy, Toshi Shimamoto, Tadashi Shimamoto
2. 発表標題 Development of a simple allele-specific PCR for the detection of pathogenic <i>Vibrio cholerae</i> strains
3. 学会等名 第75回日本細菌学会中国四国支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jant Cres Caigoy, Toshi Shimamoto, Asish Kumar Mukhopadhyay, Sumio Shinoda, Tadashi Shimamoto
2. 発表標題 Sequence polymorphisms in the hapR gene influence the biofilm formation of <i>Vibrio cholerae</i> under normoxic and anoxic conditions
3. 学会等名 第54回ビブリオシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jant Cres Caigoy, Toshi Shimamoto, Tadashi Shimamoto
2. 発表標題 ArcB/ArcA regulatory system modulates anaerobic biofilm formation of <i>Vibrio cholerae</i> through HapR
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jant Cres Caigoy, Toshi Shimamoto, Asish Kuma Mukhopadhyay, Sumio Shinoda, Tadashi Shimamoto
2. 発表標題 Sequence polymorphism in hapR of <i>Vibrio cholerae</i> affects biofilm formation under aerobic and anaerobic conditions
3. 学会等名 第74回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jant Cres Caigoy, Toshi Shimamoto, Asish Kuma Mukhopadhyay, Sumio Shinoda, Tadashi Shimamoto
2. 発表標題 Sequence mutations in <i>Vibrio cholerae</i> hapR affects gene function and biofilm formation
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jant Cres Caigoy, Toshi Shimamoto, Tadashi Shimamoto
2. 発表標題 A SNP-based molecular marker for the detection of pathogenic <i>Vibrio cholerae</i> strains in seafood
3. 学会等名 第55回ピブリオシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福田響輝, 島本敏, 成谷宏文, 島本整
2. 発表標題 コレラ菌のレトロン内機能未知遺伝子の生物型の違いによる機能への影響
3. 学会等名 第76回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jant Cres Caigoy, Hirofumi Nariya, Toshi Shimamoto, Zhiqun Yan, Tadashi Shimamoto
2. 発表標題 Biofilm regulation of the oxygen-regulated two-component system ArcAB via quorum sensing in Vibrio cholerae
3. 学会等名 57th United States - Japan Cooperative Medical Science Program Joint Panel Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jant Cres Caigoy, Hirofumi Nariya, Toshi Shimamoto, Zhiqun Yan, Tadashi Shimamoto
2. 発表標題 New regulatory network via ArcAB and quorum sensing system of Vibrio cholerae biofilm formation
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
研究協力者	カイゴイ ジャン・クレス  (Caigoy Jant Cres)	広島大学・大学院統合生命科学研究科・研究員  (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	島本 敏  (Shimamoto Toshi)	広島大学・大学院統合生命科学研究科・研究員    (15401)	

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