

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月23日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390083

 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病原性発現調節と
可動性遺伝因子としての役割

 研究課題名（英文） Regulation of virulence expression by retron including reverse
transcriptase gene and roles as mobile genetic elements

研究代表者

島本 整 (SHIMAMOTO TADASHI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号：90187443

研究成果の概要（和文）：

コレラ菌 (*Vibrio cholerae* O139) のレトロン-Vc95 の逆転写酵素遺伝子下流に存在する *orf540* がコレラ菌の病原性と関係があることを明らかにした。また, *V. cholerae* non-O1, non-O139 の環境分離株と *V. mimicus* 臨床分離株より新たなレトロンを分離・同定し, 塩基配列の解析を行った。さらに, 大腸菌臨床分離株のプラスミド性レトロンと *Yersinia frederiksenii* のレトロンについても解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

The *orf540* gene present downstream of the reverse transcriptase gene (*ret*) in retron-Vc95 was found to be related to pathogenicity in *Vibrio cholerae* O139. New retrons were isolated and identified from a clinical isolate of *V. cholerae* non-O1, non-O139 and an environmental isolate of *V. mimicus*. Plasmid-derived retron of a clinical isolate of *Escherichia coli* and new retron of *Yersinia frederiksenii* were also analysed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：病原性・分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：病原性, 遺伝子発現制御, 逆転写酵素, ゲノム, *Vibrio cholerae*, レトロン, msDNA

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。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, 一種の可動性遺伝因子だと考えられている。これまでのところ逆転写酵素や msDNA の生理

的意義について, 詳細は明らかになっていない。

研究代表者は, これまでの細菌逆転写酵素とレトロンに関する研究の過程でコレラ菌や腸炎ビブリオ, サルモネラなどの病原細菌由来のレトロンを数多く発見してきた。流行性コレラの原因菌である *Vibrio cholerae* の血清型 O1/O139 にはレトロンが存在しているが, それ以外の血清型の *V. cholerae*

non-O1/non-O139 には基本的にレトロソクがなく、病原性とレトロソク存在との間に何らかの関連性があることが示唆されていた。また、病原細菌由来の msDNA は、他の 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、何らかの DNA 結合性タンパク質が結合することが予想される。そこで、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を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。さらに、研究代表者がコレラ菌 (*V. cholerae* O139) におけるレトロソクの役割を調べる過程で野生株と逆転写酵素遺伝子欠損変異株の間で遺伝子の発現状況の違いをマイクロアレイで調べた結果、コレラ毒素遺伝子 (*ctxAB*) や腸管定着因子 (*tcpA*) などの一連の病原性関連遺伝子が逆転写酵素欠損変異株において極端に発現量が上昇していることが明らかになった。これは、逆転写酵素 (あるいはレトロソク) とコレラ菌の病原性との関連性を示唆する画期的な結果である。研究代表者らのコレラ菌における結果を支持する報告として、Pilousova らが *Salmonella* Typhimurium において逆転写酵素遺伝子欠損変異株とレトロソク欠損変異株を作製し、マウスを用いて病原性の変化を調べたところ、逆転写酵素欠損株は野生株よりも病原性が強くなっており、レトロソク欠損株はさらに病原性が強くなっていることを報告している (Vet. Microbiol., 111, 191-197, 2005)。以上の結果は、逆転写酵素のみならずレトロソク内の機能未知の遺伝子も病原細菌の病原性発現調節に関与していることを意味しており、本研究計画の基礎となっている。

2. 研究の目的

本研究では、*V. 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、レトロソク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。コレラ菌のレトロソクの場合、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、マイクロアレイの結果からも ToxRS 発現制御ネットワ

ークと関係していることが示唆されている。この点を明らかにする。

一方、レトロソクの可動性メカニズムを明らかにすることおよび薬剤耐性遺伝子の転移との関係を明らかにすることも本研究の目的の1つである。大腸菌のレトロソクの場合、ファージゲノムの一部としてレトロソクが含まれている場合が多いが、病原細菌のレトロソクの場合は多種多様である。本研究ではまだ明らかになっていない病原細菌のレトロソクの転移機構を明らかにしたい。また、薬剤耐性遺伝子を含む可動性遺伝子であるインテグロンは、細菌の多剤耐性化の原因の1つと考えられており、感染症の治療における大きな問題となっている。インテグロンの耐性遺伝子カセットの形成に逆転写酵素が関与しているという仮説が提唱されていることや *S. Typhimurium* のレトロソクの転移にインテグロンのインテグラーゼが関与している可能性などから、両者の関連性を明らかにすることも本研究の目的の1つである。

3. 研究の方法

本研究では、コレラ菌のレトロソクと病原細菌全般のレトロソクの解析も並行して行うため、種々の病原細菌におけるレトロソクの単離・同定を行う。次いで、レトロソクの欠損変異株の作製とマイクロアレイによる全遺伝子発現量の網羅的な解析によって影響を受ける遺伝子群を同定し、逆転写酵素やレトロソクの機能未知の ORF の機能解析を行う。レトロソク内の機能未知の ORF 産物とシグナル伝達系で相互作用するタンパク質を大腸菌の Two hybrid 法を利用して単離・同定する。さらに、msDNA が細胞内デコイ核酸として機能していることを明らかにするために、msDNA 結合磁気ビーズを用いてコレラ菌細胞抽出液より結合タンパク質を単離精製し、同定する。候補となるタンパク質を大量精製し、ゲルシフト法などによって msDNA への直接結合を見る。病原性とレトロソクとの関係を調べるためにはカイコを用いた病原性解析を行う。また、レトロソクの転移性および薬剤耐性遺伝子の転移との関係を *in vitro* と *in vivo* の系を用いて明らかにする。

4. 研究成果

コレラ菌 (*Vibrio cholerae* O139) のレトロソク-Vc95 の逆転写酵素遺伝子 (*ret*) 下流に存在する *orf540* 遺伝子の機能解析を行った。*orf540* 遺伝子の欠損変異株を作製し、マイクロアレイやカイコ幼虫に対する病原性解析などで野生株との比較を行った。その結果、変異株において病原性関連遺伝子の VC1317 (*virK*) と鉄の獲得に関与する VC1579 (enterobactin synthetase component F-related protein) の発現量が低下しており、

ヌクレオチド結合配列を有する ORF540 は、コレラ菌の病原性と密接な関係があることを明らかにした。また、*V. cholerae* non-O1, non-O139 の環境分離株と *V. mimicus* 臨床分離株より新たなレトロンを同定し (レトロン-Vc154, レトロン-Vm129), 塩基配列の解析を行った。いずれのレトロンもレトロン非保有株のゲノム塩基配列との比較解析から、ゲノムへの挿入配列が明らかになり、レトロンの可動性を示唆する重要な成果が得られた。

V. cholerae のレトロン-Vc95 (あるいは msDNA-Vc95) の関与が示唆されている ORF である VC0176 (putative transcriptional regulator) と VC0177 (putative response regulator) の解析を進めた。VC0176 に His-tag を付加し、精製したタンパク質を用いて gel shift assay を行ったところ、msDNA-Vc95 への特異的な結合が観察された。しかし、VC0176 の欠損変異株を作製してマイクロアレイを利用した網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、野生株と大きく発現量の異なる遺伝子の発見には至らなかった。また、レトロン-Vc95 における三番目の ORF である *orf205* の欠損変異株を作製した。また、大腸菌のプラスミド性レトロンについても解析を行い、以前、Rychlik らが報告した *Salmonella* Enteritidis 由来のプラスミド性レトロンと同じものであることを明らかにした。

これまでの研究で *V. cholerae* O139 MDO-6 株を親株として、レトロン-Vc95 の逆転写酵素遺伝子 (*ret*) と 2 つの ORF (*orf540*, *orf205*) の欠損変異株を作製して研究を進めてきた。その研究過程で、親株 (MDO-6) と *ret* 変異株 (TSC-11) の病原性発現制御遺伝子 *toxR* に自然突然変異が存在していることが明らかとなり、新たに O1 El Tor 株を親株としてレトロン内の各遺伝子の欠損変異株を作製し直した。同様に、msDNA-Vc95 やレトロン-Vc95 との関係が示唆されている VC0176 と VC0177 の 2 つの ORF についても、再度変異株の作製をやり直し、解析を進めている。また、腸炎ビブリオのレトロン-Vp96 の詳細な解析を行い、コレラ菌のレトロン-Vc95 との類似性を明らかにした。さらに、*V. mimicus* や *Yersinia frederiksenii* の新たなレトロンについても解析を進めた。その他に、以前解析を行っていた腸管出血性大腸菌 O157:H7 の多剤耐性プラスミドの全塩基配列を明らかにし、インテグロンを含む可動性遺伝因子等の詳細な構造を明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Toshi Shimamoto, Ashraf M. Ahmed, Tadashi Shimamoto, A novel retron of *Vibrio parahaemolyticus* is closely related to retron-Vc95 of *Vibrio cholerae*. *Journal of Microbiology*, 査読有, 2013, in press.
2. Ahmed M. Hammad, Tadashi Shimamoto, Genetic analysis of multiple antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from diseased broilers in Egypt. *Microbiology and Immunology*, 査読有, 56, 2012, 254-261.
3. Ahmed M. Hammad, Wataru Watanabe, Tomoko Fujii, Tadashi Shimamoto, Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. *International Journal of Food Microbiology*, 査読有, 156, 2012, 286-289.
4. 島本 整, 島本 敏, 抗菌薬の MIC と生菌整腸薬の適応は? *薬局*, 査読無, 62, 2011, 423-427.
5. Ashraf M. Ahmed, Tadashi Shimamoto, Molecular characterization of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis in Egypt. *Microbiology and Immunology*, 査読有, 55, 2011, 318-327.
6. Kumiko Inouye, Saori Tanimoto, Maki Kamimoto, Toshi Shimamoto, Tadashi Shimamoto, Two novel retron elements are replaced with retron-Vc95 in *Vibrio cholerae*. *Microbiology and Immunology*, 査読有, 55, 2011, 310-313.
7. Ahmed M. Hammad, Tadashi Shimamoto, Asymptomatic intramammary infection with multidrug-resistant Gram-negative bacteria in a research dairy farm: incidence and genetic basis of resistance. *Journal of Veterinary Medical Science*, 査読有, 73, 2011, 1089-1092.
8. Rasel Das, Tadashi Shimamoto, Sultan Mohammad Zahid Hosen, Mohammad Arifuzzaman, Comparative study of different msDNA (multicopy single-stranded DNA) structures and phylogenetic comparison of reverse transcriptases (RTs): evidence for vertical inheritance. *Bioinformatics*, 査読有, 7, 2011, 174-179.
9. Rasel Das, Tadashi Shimamoto, Mohammad Arifuzzaman, A novel msDNA (multi-copy single-stranded DNA) strain present in *Yersinia frederiksenii* ATCC 33641 contig01029 enteropathogenic bacteria with the genomic analysis of its retron. *Journal of Pathogens*, 査読有, 2011, 2011, Article ID 693769.
10. 島本 整, 農業領域で使用される抗菌薬と耐性菌汚染. *臨床と微生物*, 査読無, 37, 2010, 679-683.

〔学会発表〕(計 16 件)

1. Toshi Shimamoto, Mizuki Yamamoto, Ashraf M. Ahmed, Tadashi Shimamoto, Complete sequence of a novel multidrug resistance plasmid isolated from a clinical strain of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. 47th Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections, 2012年12月12日, 千葉市
2. Rasel Das, Tadashi Shimamoto, Mohammad Arifuzzaman, Novel retron in enteropathogenic *Yersinia frederiksenii*. 47th Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections, 2012年12月12日, 千葉市
3. 島本 整, 田島 安紗子, 山下 拓未, 神本 真紀, 島本 敏, *Vibrio mimicus* の逆転写酵素遺伝子を含むレトロンの構造と機能. 第 46 回腸炎ビブリオシンポジウム, 2012年11月16日, 大分県由布市
4. 山本 瑞季, 島本 敏, 島本 整, 腸管出血性大腸菌 O157:H7 より分離した多剤耐性プラスミド pMDR157 の解析. 第 65 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2012年10月20日, 徳島市
5. 島本 整, 神本 真紀, 島本 敏, 大腸菌臨床株における sdsDNA 合成に関するプラスミド性レトロンの解析. 第 85 回日本細菌学会総会, 2012年3月27日, 長崎市
6. Takumi Yamashita, Maki Kamimoto, Toshi Shimamoto, Tadashi Shimamoto, Functional characterization of *orf540* of retron-Vc95 in *Vibrio cholerae*. US-Japan Cooperative Medical Science Program Cholera and Other Bacterial Enteric Infections 46th Conference, 13 Dec 2011, Kolkata, India
7. 渡邊 亘, 藤井 知子, 島本 整, 刺身より分離したメチシリン耐性および感受性ブドウ球菌における病原性遺伝子と薬剤耐性遺伝子の解析. 第 64 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2011年10月22日, 岡山市
8. 島本 敏, 山下 拓未, 神本 真紀, 島本 整, *Vibrio cholerae* と *Vibrio mimicus* におけるレトロンの類似性と多様性. 第 45 回腸炎ビブリオシンポジウム, 2011年10月20日, 東京都新宿区
9. Ahmed M. Hammad, Wataru Watanabe, Tomoko Fujii, Tadashi Shimamoto, Characterization of methicillin-resistant and -susceptible Staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. 2nd ASM-ESCMID Conference on Methicillin-resistant Staphylococci in Animals: Veterinary and Public Health

Implications, 10 Sep 2011, Washington, DC, USA

10. Takumi Yamashita, Miho Kawabata, Kumiko Inouye, Maki Kamimoto, Toshi Shimamoto, Tadashi Shimamoto, A novel, potentially mobile, retron element (retron-Vc154) in a non-O1, non-O139 serotype strain of *Vibrio cholerae*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011年9月6日, 札幌市
11. Maki Kamimoto, Takumi Yamashita, Toshi Shimamoto, Tadashi Shimamoto, Functional analysis of *orf540* of retron-Vc95 in *Vibrio cholerae*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011年9月6日, 札幌市
12. 島本 整, コレラ菌の病原性とレトロエレメントとの関係. 第 4 回感染病態研究フロンティア, 2011年8月6日, 吹田市
13. 山下 拓未, 川端 美帆, 井上 句美子, 神本 真紀, 島本 敏, 島本 整, ビブリオ属細菌における新規逆転写酵素遺伝子とレトロンの解析. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 2010年12月8日, 神戸市
14. Miho Kawabata, Takumi Yamashita, Kumiko Inouye, Maki Kamimoto, Toshi Shimamoto, Tadashi Shimamoto, A novel retron element and its chromosomal insertion site in *Vibrio mimicus*. 45th US-Japan Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections, 2010年12月7日, 京都市
15. 山下 拓未, 川端 美帆, 井上 句美子, 神本 真紀, 島本 敏, 島本 整, ビブリオ属細菌ゲノムにおけるレトロンの多様性. 第 44 回腸炎ビブリオシンポジウム, 2010年11月26日, 秋田市
16. 藤井 知子, 渡邊 亘, 島本 整, 市販の刺身より分離した *Bacillus cereus* の病原性遺伝子と薬剤感受性の解析. 第 63 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2010年10月16日, 松山市

〔図書〕(計 1 件)

1. 島本 整, 島本 敏, 逆転写酵素とレトロノ, 腸炎ビブリオ(第 IV 集), 近代出版, 2013, 印刷中.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島本 整 (SHIMAMOTO TADASHI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授
研究者番号: 90187443

(2)研究分担者

島本 敏 (SHIMAMOTO TOSHI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・助教

研究者番号：70583136

(3)連携研究者

()

研究者番号：