

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570009

研究課題名(和文)大規模ゲノムの可逆的な逆位による表現型スイッチングについて

研究課題名(英文)Bacterial Phenotype Switching via Large-Scale Chromosome Flip-Flop Inversion

研究代表者

崔 龍洙 (Cui, Longzhu)

北里大学・付置研究所・部長補佐

研究者番号：50306932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、黄色ブドウ球菌において、宿主免疫の回避能力を持つが抗菌薬感性のsmall colony variant型と抗菌薬耐性能力を持つ正常型(large colony variant)の性質の異なる菌が、お互いに頻繁に遷移しながら共存してヘテロ細胞集団を形成することを発見し、この状態が患者に持続感染を引き起こす原因であることを明らかにした。

また、そのヘテロ性質の形成と維持は、細菌が過酷な環境に生き残るための生存戦略であることと、その表現型スイッチングとヘテロ性質の形成・維持の遺伝学的メカニズムは、細菌の自己染色体の巨大ゲノムが頻繁に可逆的に逆位することであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study found that a bacterium that generates a reversible, large-scale inversion of its chromosome (about half of its total genome) at high frequencies of up to once every four generations. This inversion switches on or off bacterial phenotypes, including colony morphology, antibiotic susceptibility, hemolytic activity, and expression of dozens of genes. Quantitative measurements and mathematical analyses indicate that this reversible switching is stochastic but self-organized so as to maintain two forms of stable cell populations (i.e., small colony variant, normal colony variant) as a bet-hedging strategy. Thus, this heritable and reversible genome fluctuation seems to govern the bacterial life cycle; it has a profound impact on the course and outcomes of bacterial infections.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：ゲノム構築 ゲノム再編 ゲノム維持 ゲノム逆位 表現型スイッチング

## 1. 研究開始当初の背景

当初申請者らは、黄色ブドウ球菌のβ-ラクタム剤耐性と感受性、small colony variant(SCV)と Large colony variant(LCV)の全く“正反対”の phenotype が大規模ゲノムの可逆的な逆位 (Flip-Flop 逆位と呼ぶ) によって switching する事を見出した。その switching は、細菌のヘテロ性質の発現と生存に関与していることが示唆され、そのことを明らかにすることを旨とし、当研究を更に推進するため、研究費の申請を行なった。

## 2. 研究の目的

大規模ゲノムの Flip-Flop 逆位と表現型 switching の遺伝学的機構を明らかにすると同時に、細菌のヘテロ性質とその意義の解明を目指す。

具体的には、研究期間内に次の7点を明らかにすることを旨とする：

- (1)ゲノム Flip-Flop 逆位の機構を解明すると同時に、ゲノム[逆位と復帰]の発生をモニター出来る監視システムを確立する。
- (2)その逆位を調節するファクターを同定する。
- (3)ゲノム Flip-Flop 逆位がもたらす表現型 switching のメカニズムを解明すると同時に、細菌に与える生物学的影響を明らかにする。
- (4) Mu50w 株における SCV と LCV の相互遷移の頻度には著しい差があったが (研究背景参照)、2つの細胞集団は安定して共存し、ヘテロ性質を有していたことから、(ゲノム逆位による) 遷移には自己触媒反応等が関与していることが明らかである。その自己触媒反応のメカニズムを解明する。
- (5) ゲノム逆位により発生した LCV 株の高度メチシリン耐性化のメカニズムを明らかにする。
- (6) ゲノム逆位がもたらす SCV 株 (持続感染力を持つ) の発生メカニズムを解明する。
- (7)得られた情報に基づき、可逆的なゲノム再編成とヘテロ性質に関する理論体系を構築する。

## 3. 研究の方法

(1). ゲノム Flip-Flop 逆位の機構の解明  
全ゲノム塩基配列を決定した SCV パターン株 Mu50W1 と LCV パターン株 Mu50W2 をモデルにして進める。

a) 逆位を起こす core 領域及びその breakpoint を同定する。そのため、まず、この2株間のゲノム構造の相違を解析し、inversion が起きた領域を同定する。

b) a) で同定した領域を検証する。同定された inversion 領域の破壊変異株、及び同領域の塩基配列を逆向きにした変異株等を作製し、その機能を更に追求する。

c) 全ゲノムスケールでの評価：

上記に特定されたゲノム inversion 領域の構成と、細菌に多く存在する IS、トランスポゾン、及び配列相同性が高い paralogue 領域等

との関連性を研究する。さらに、IS、トランスポゾン、phage 等の転移に関連する物質との関係も調査する。

d) ゲノム複製 Ori-Ter 軸との関連性の追求：  
上記の可逆的なゲノム逆位は、ゲノム複製の Ori と Ter を軸にほぼ対称的な左右逆転となっており、ゲノム複製における左右の replichore のバランス関係を追求する。これは、ゲノム逆位のメカニズムの解明につながる。このため、Ori-Ter (origin-terminus) アンバランス変異株の作製も必要である。現在モデル株を用いて、これらの変異株は作製中である。

e) 「GFP-レポーター遺伝子」カセットを用いて、ゲノム逆位の発生をモニターするシステムを確立する。

(2). ゲノム逆位を調停するファクターの同定：

ゲノム逆位を調節するファクターを同定することは、この逆位の始動、維持、頻度の変化、及びシグナルの感知と制御などに関連する因子を解明することである。これは、最終的に可逆的なゲノム逆位の生物学的な意義と、その制御メカニズムを明らかにすることにつながる。

a) トランスクリプトーム、プロテオーム解析。上記1で作製した関連株 (Mu50W1 と Mu50W2 株、遷移を完全に止めた SCV と LCV 変異株等) を用いて、ゲノム逆位がゲノムの複製や遺伝子の転写などに及ぼす影響を調査する。主に Microarray, RT-PCR, Northern Hybridization, 二次元電気泳動等の方法で行う

b) ゲノム逆位を調節するファクターの検索。全ゲノムスケールで得られた上記 a) のデータをクラスタリング (多次元のデータを低次元のデータに集約する方法) や、データマイニング法 (多次元データからの法則性を抽出する方法) を用いて、逆位に関連する遺伝子 (群) を同定する。

c) 関連遺伝子 (群) の評価と検証。上記 b) で検索し、List Up した遺伝子 (群) に対して、それらの欠損株、過剰発現株及びアンチセンス発現株を作製し、個々の遺伝子がゲノム逆位に対する影響を評価する。場合によっては、ここで作製した変異株を用いて、上記の a と b のステップを繰り返す。

d) SOS 応答システム、Bacteria phage 等との関連性の究明。ゲノム修復でよく見られる相同組換え、非相同末端再結合、SOS 応答システム機構などとの関連性を追求する。特に、recA オペロンと関連する homologous recombination システムの関与を調査する。

(3). 自己触媒反応のメカニズムの解明。  
Mu50w 株は、性質が異なる SCV と LCV から構成されている。また、SCV と LCV の相互の遷移は、その頻度が著しく異なる (研究背景を参考)。しかし、Mu50w 株は安定して2つの状態を保つヘテロ性質を有することから、この (ゲノム逆位による) 遷移には、自己触媒反

応等を必要とすることが明らかである。この自己触媒反応のメカニズムを解明する。特にクオラムセンシング(quorum sensing, QS)系統に着目して研究を進める。具体的には、a) SCV と LCV の共存・競争関係 (ヘテロ性質) を解析する。SCV 株と LCV 株の相互依存、抑制関係を解明する。特に、細菌の増殖段階における相互の影響、及びそれぞれの菌が産生する、シグナリングの関連物質に着目して研究を進める。また、Lotka-Volterra 方程式で定義された相互依存、抑制関係を解析する。

b) クオラムセンシング(quorum sensing, QS)系統の関与を調査する。ブドウ球菌には、幾つかのクオラムセンシング(quorum sensing, QS)系統が同定されている(agr, sarA など)。これらの関与を調査する。

(4). Flip-Flop 逆位が細菌に与えた影響を解明する。ゲノム Flip-Flop 逆位がもたらす表現型の変化のメカニズムを解明する。同時に、細菌に与える生物学的影響を明らかにする。方法は、安定した SCV、LCV 株(作製した変異株)及びモデル株(Mu50W の SCV と LCV)を用いて行なう。特に、昨年度の(前頁) SCV と LCV 株におけるトランスクリプトーム、プロテオームの実験結果を踏まえながら、ゲノム逆位がもたらす細菌の生理、生化、生物学的な変化を明らかにする。

(5). ゲノム逆位によるβ-ラクタム薬剤高度耐性のメカニズムを解明する。

ここでは、ゲノム逆位によるβ-ラクタム薬剤高度耐性化の分子メカニズムを解明する。まず、ゲノム逆位がもたらしたβ-ラクタム薬剤耐性株(LCV)の個々の遺伝子と、β-ラクタム薬剤感受性株(SCV)の機能変化を比較研究する。また、今まで同定されたβ-ラクタム薬剤の高度耐性化に関連する遺伝子(現在7数個遺伝子が当研究で同定されている)との関係も追求する。

(6). ゲノム逆位がもたらす SCV 株(持続感染力を持つ)の発生メカニズムを解明する。

LCV から SCV への表現型の変化のメカニズムは、基本的に項目1から項目5と同じ方法を用いて行なう。ただし、遺伝学的な変化を明らかにした上で、通常的手法で行なう。

ゲノム逆位は、他の菌種でもよく見られる現象であり、同様の逆位が起こっている可能性は十分に考えられる。最後に、本研究は全く新しい発見に基づいて行なう研究であるため、研究手法の面で確立されていない部分も多々あるため、研究手法、手技面では、新たな技術を取り入れ、修正しながら進めていく。

#### 4. 研究成果

本研究を通じて、我々は黄色ブドウ球菌において、宿主免疫の回避能力を持つが抗菌薬感受性の small colony variant(SCV)型と抗菌薬耐性能力を持つ正常型(large colony variant, LCV)の性質の異なる菌が、お互いに頻りに遷移しながら共存してヘテロ細胞

集団を形成することを発見し、この状態が患者に持続感染を引き起こす原因であることを明らかにした(図1)。また、そのヘテロ性質の形成と維持は、細菌が過酷な環境に生き残るための生存戦略であることも明らかにした。更に、その表現型スイッチング(SCV と LCV 間のお互いの遷移)とヘテロ性質の形成・維持の遺伝学的メカニズムは、細菌の自己染色体の巨大ゲノムが頻りに可逆的に逆位することで生じている現象(Flip-Flop inversion)を発見し、この研究成果は昨年の Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS)にて発表された[1]。

細菌の進化過程において、生き残りをかけた bet-hedging 戦略としてのヘテロ性質は、迅速に環境に順応する手段として極めて有益である。上記の SCV は感染初期から持続感染において免疫系を逃れる形態として、抗菌薬に暴露されれば LCV として生き残る形態に変化して、生き残りをかけた戦術を展開している。このような現象は他菌種を含めて表現系としては捉えられていたが、遺伝学メカニズムは謎のままであった。本研究では、ヘテロ性質(表現系)として、β-ラクタム薬耐性と感性、溶血毒素の産生と非産生が同一菌で生じる事を詳細に検討し、そこに SCV と LCV が深く関与している現象を発見した。さらに、この SCV と LCV の遺伝学メカニズムが Flip-Flop inversion である事を突き止め、世界的で初めて SCV と LCV の遺伝学的メカニズムを解明した。また LCV が SCV に比べ増殖速度が約 1.6 倍早いにも関わらず、SCV と LCV の割合は常に一定の割合で存在していることを見出し(図2)、それに関わる遺伝子の機能も解明した。細菌が環境変化に応じて、自己染色体の巨大ゲノムのスイッチングを介し、生き残りに適した表現型を生じることで、再燃や難治性の原因に寄与していると考えられる(図3)。

上記の研究成果は、未だに多くの謎にまつまれている病原微生物の感染能力を解き明かす画期的な発見であり、今後の病原性微生物の病原性や耐性、再燃や難治性の原因解明や治療法に大きく寄与する業績であると考えている。

#### 参考文献

1. Longzhu cui, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2012 June 19; 109(25): E1647-1656

Figure 1.

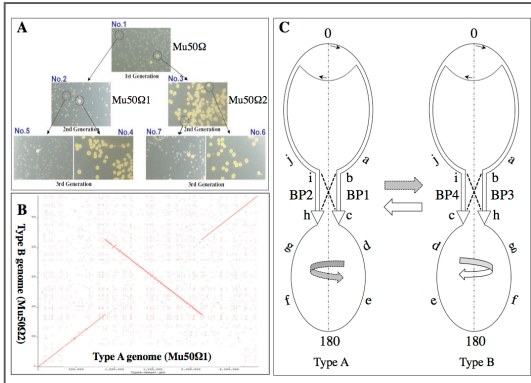


Figure 1. Characteristics of *S. aureus* Mu50 $\Omega$  and its derivatives. Cell populations of Mu50 $\Omega$  consist of two forms of cells that produce small- and normal-sized colonies on agar plates (A). Small colony descendants (small colony variant, SCV, e.g., Mu50 $\Omega$ 1) produce cell populations that mainly form small colonies with a minor proportion of normal colonies (A: No. 2, 5, 7), whereas normal colony descendants (normal colony variant, NCV, e.g., Mu50 $\Omega$ 2) produce cell populations that mainly form normal colonies with a small proportion of small colonies (A: No. 3, 4, 6), thus reflecting colony-phenotype conversion. Genomic comparisons indicate that approximately half of the chromosome genome of SCV is inverted relative to that of NCV (B). An additional study reveals that the phenotype conversion between NCV and SCV is mediated by reversible genome inversion through two mutually homologous loci present in the left and right chromosome replichores (C).

Figure 2.

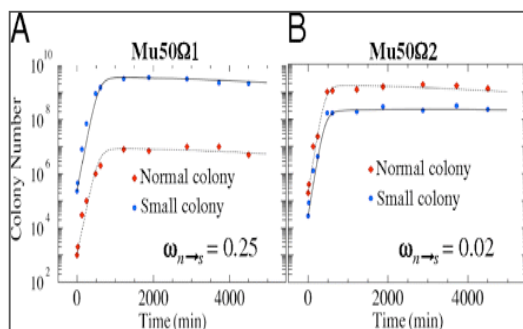


Figure 2. Asymmetrical probabilities of genome flip-flop inversions in Mu50 $\Omega$ 1 and Mu50 $\Omega$ 2. Growth curves of Mu50 $\Omega$ 1 and Mu50 $\Omega$ 2 in the batch cultures are shown as a function of time. The points shown with blue circles and red diamonds indicate the number of cells with type A and type B genomes, respectively. The solid and dotted lines are the calculations with

generalized Lotka-Volterra equations applied to the competitive growth of bacteria with type A and type B genomes, where the optimal values of the parameters are chosen to fit the experimental data (SI Materials and Methods). Note that the ratio of cell number with type A to type B genome is almost constant for both Mu50 $\Omega$ 1 and Mu50 $\Omega$ 2 and that the reversion rate from NCV to SCV (Graphic) is 12.5-fold higher in Mu50 $\Omega$ 1 compared with Mu50 $\Omega$ 2.

Figure 3.

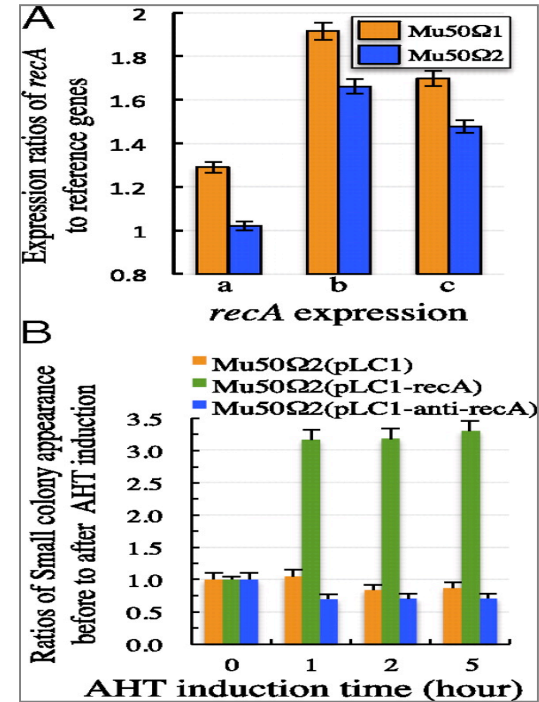


Figure 3. Overexpression of *recA* increases the rate of NCV to SCV conversion. (A) Expression level of *recA* was normalized with the expression level of genes 16S-rRNA1 (a), *gyrB* (b), and *pta* (c), respectively. Data shown are three independent determinations with double-set experiments. Note that *recA* was highly expressed in Mu50 $\Omega$ 1 compared with Mu50 $\Omega$ 2. To study the impact of *recA* on the reversion between SCV and NCV, the whole *recA* and its 522-bp-long antisense fragment with the covering promoter region were cloned under *tetO*/*xyl* promoter of pLC1 (Fig. 9) to construct pLC1-*recA* and pLC1-anti-*recA*. The resulting vectors were introduced into Mu50 $\Omega$ 2 cells of genome type B to test the conversion rate from NCV to SCV in comparison to the control strain, which was introduced in control vector pLC1. (B) Note that although overexpression of *recA* antisense reduced the rate of NCV to SCV conversion slightly, the overexpression of *recA* increased the rate of NCV to SCV conversion

about threefold, indicating an association between genome inversion and the *recA* expression level. Data shown are from three independent experiments. AHT, anhydrotetracycline.

## 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 1 件)

- (1) Longzhu cui, et al. Longzhu cui, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2012 June 19; 109(25): E1647-1656 Proc Natl Acad Sci USA. 2012 June 19; 109(25): E1647-1656

[学会発表] (計 5 件)

- (1) Longzhu Cui, Hui-min Neoh, Akira Iwamoto and Keiichi Hiramatsu. Reversible Chromosome Inversion and Bacterial Heterogeneous Population. 第 85 回日本細菌学会総会(長崎), 2012 年 3 月 27-29 日. WS4-5/P1-162. 日本細菌学雑誌 2012: 67(1).
- (2) Longzhu Cui. Staphylococcal Phenotype Switching via a Large-scale Genome Flip-Flop. Inversion. Speaker at symposium. 15th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections (15th ISSI), 26-30 August, 2012, Lyon, France.  
<http://isssi2012.univ-lyon1.fr/en/pages/isssi-2012-program>
- (3) 崔龍洙、松井秀仁、花木秀明. 微生物ゲノムの大規模 Flip-Flop 逆位による表現型のスイッチングについて. 第 26 回バイオサイエンスフォーラム/第 16 回北里微生物アカデミー. 2013 年 8 月 8 日 (北里大学相模原キャンパス L2 号館)
- (4) Longzhu Cui, Akira Iwamoto, Hiramatsu Keiichi and Hideaki Hanaki. Reversible Chromosome Inversion and Phenotype Switching of Staphylococcal SCV. Gordon Research Conference, Staphylococcal Diseases, July 28 - August 2, 2013, Waterville Valley Resort, Waterville Valley, NH, USA.
- (5) 崔龍洙、松井秀仁、花木秀明. オキサシリン感受性 MRSA における  $\beta$ -ラクタム高度耐性化の遺伝学的背景について. 第 87 回日本細菌学会総会. 2014 年 3 月 26 日~3 月 28 日(東京・タワーホール船堀).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

崔龍洙 (Cui Longzhu)

北里大学・附属研究所・部長補佐

研究者番号: 50306932