

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460532

研究課題名(和文)レトロンとmsDNAによる病原性発現制御とゲノム進化における役割

研究課題名(英文) Roles of retron and msDNA in regulation of virulence expression and genome evolution

研究代表者

島本 整 (Shimamoto, Tadashi)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：90187443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：コレラ菌のレトロン-Vc95の逆転写酵素遺伝子(ret)の下流に存在する2つのORF(orf540, orf205)がコードする機能未知のタンパク質と相互作用する可能性のあるタンパク質を探索した。候補の1つとして嫌気性呼吸に関連する遺伝子群を制御するArcBタンパク質が得られた。arcB遺伝子欠損変異株はカイコ幼虫に対する病原性が低いことが明らかとなった。msDNA-Vc95に結合するタンパク質についても解析を行った。候補の1つであるVC0176タンパク質を精製し、VC0177プロモーター領域とmsDNA-Vc95への結合を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Relationship between pathogenicity and retron-Vc95 in *Vibrio cholerae* 01/0139 serotypes has been investigated in this study. Candidate proteins that can interact with ORF540 or ORF205, encoded by the genes located downstream of the ret gene, of unknown functions were searched. One of the candidates, ArcB that regulates genes related to anaerobic respiration, was found. The arcB-defective mutant was found to have lower pathogenicity to silk worm larvae than the wild type. VC0176 protein, one of the candidate proteins that can bind to msDNA-Vc95, was purified. Binding of the VC0176 protein to the promoter region of VC0177 gene and msDNA-Vc95 was confirmed.

研究分野：食品衛生学，分子細菌学

キーワード：病原性 レトロン コレラ菌 msDNA ビブリオ

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ピブリオ、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ンがなく、病原性とレトロンの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) におけるレトロン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 msDNA) 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ン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、レトロン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ン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、本研究計画を支持するデータとなっている。

研究代表者らのその後の解析結果よりコレラ菌のレトロンを構成する逆転写酵素遺伝子 (*ret*) の下流の機能未知の 2 つの ORF がコレラ菌の病原性発現調節ネットワークの重要な因子である ToxRS に何らかの影響を与えている可能性が示唆されている。一方、逆転写酵素または msDNA は、別の細胞内情

報伝達経路に影響を与えている可能性が考えられた。以上の解析結果は、マイクロアレイの遺伝子発現状況のみでなく、カイコを用いたコレラ菌変異株の病原性解析の結果からも確認されている。

そして、レトロンは、多くの状況証拠から可動性遺伝因子と考えられており、研究代表者の研究によって腸炎ピブリオのレトロン-Vp96 の場合は、インテグラーゼ遺伝子などとともに染色体中に挿入されていることが明らかになっている。また、*V. mimicus* のレトロン-Vm85 も腸炎ピブリオの場合と同じ tRNA dihydrouridine synthase 遺伝子内にインテグラーゼ遺伝子などとともに挿入されている。さらに、*V. cholerae* のレトロン挿入領域は、ある種の *V. cholerae* non-O1/non-O139 では別のレトロンと置換しており、レトロンが可動性遺伝因子である証拠の 1 つとなっている。その他の *V. cholerae* non-O1/non-O139 ではレトロンとは無関係の DNA 断片と置換しており、*V. cholerae* におけるゲノムの多様性を生み出している。

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、レトロン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。コレラ菌のレトロンの場合、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、レトロン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。大腸菌のレトロンの場合、ファージゲノムの一部としてレトロンが含まれている場合が多いが、病原細菌のレトロン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ン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因子である **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* のレトロンの転移にインテ

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、コレラ菌のレトロンと病原細菌全般のレトロン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ンの単離・同定を行う。次いで、レトロン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ンの機能未知の ORF の機能解析を行う。レトロン内の機能未知の ORF 産物とシグナル伝達系で相互作用するタンパク質を酵母の 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。病原性とレトロンとの関係性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、レトロン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。また、さまざまな薬剤耐性菌が保有するインテグロンについて、逆転写酵素の関与が示唆されていることから、薬剤退席菌についても解析を行う。

4. 研究成果

(1) コレラ菌のレトロン-Vc95 に含まれる機能未知遺伝子 (*orf540*, *orf205*) の機能解析

コレラ菌のレトロン-Vc95 の逆転写酵素遺伝子 (*ret*) の下流に存在する2つの ORF (*orf540*, *orf205*) の機能解析を行った。まず、ORF540 および ORF205 と相互作用するタンパク質を探索するため、yeast two hybrid 法を用いて解析を行った。その結果、ORF540 と相互作用するタンパク質として、二成分制御系のハイブリッド型センサー・キナーゼタンパク質で嫌気呼吸下での遺伝子発現制御に関与する ArcB が候補の1つとして見つかった。そこで、コレラ菌において、*arcB* 遺伝子の欠損変異株を作製し、マイクロアレイ法に替わる遺伝子の網羅的解析法である RNA-seq 法を利用して野生株と変異株の遺伝子発現状況を比較した。その結果、*arcB* 遺伝子欠損株において代謝系の遺伝子を中心に370以上の遺伝子の発現量に影響が認められた。さらに、カイコ幼虫に対する病原性は、野生株よりも *arcB* 変異株の方が低いことがわかった。

ORF205 と相互作用するタンパク質として、glutamate-1-semialdehyde aminotransferase (HemL) が見つかった。HemL はヘムの前駆体の合成に関与していることから、呼吸や鉄獲得などさまざまな生理的機能に関与している可能性が示唆された。コレラ菌の生理的

機能の調節と病原性との関係について、今後詳しい解析が必要である。

また、コレラ菌の O1 血清型株には classical (古典型) と El Tor (エルトル型) の2つの生物型があり、いずれもレトロン-Vc95 を含んでいる。しかし、classical 株の *orf540* には1塩基の欠失があるためフレームシフトが発生し、*orf540* が2つの領域に分断されていることがわかった。Classical 株のレトロンの発現を調べたところ、*orf540* の分断による極性効果で下流側の *orf205* の発現量が低下していることが明らかとなった。また、一部の病原性関連遺伝子の発現量も低下していたことから、Classical と El Tor 株の間で病原性に関するレトロンの役割が異なっていることが示唆された。

(2) コレラ菌の msDNA-Vc95 が制御する遺伝子と msDNA 結合タンパク質の解析

これまでの研究で、msDNA-Vc95 の DNA ステム部分がデコイとして機能し、病原性関連遺伝子の発現調節を行っている可能性を提唱してきた。*ret* 遺伝子欠損変異株と野生株の間で遺伝子発現の網羅的解析を行った以前の結果より、VSP-1 (Vibrio seventh pandemic) と呼ばれる pathogenicity island 内に含まれる VC0176 と VC0177 の2つの転写制御因子と考えられる遺伝子と msDNA との関係性が示唆されていた。そこで、VC0176 タンパク質を精製し、ゲルシフト法によって VC0176 と VC0177 遺伝子のプロモーター領域への結合、および msDNA-Vc95 の DNA 部分への結合を解析した。その結果、いずれの DNA に対しても VC0176 タンパク質は結合することが明らかとなり、msDNA がデコイとして機能する可能性が示唆された。

さらに、VC0176 タンパク質が結合するゲノム領域を解析するため、ChIP-seq 法による解析を行った結果、VC0176 が発現制御に関与している可能性のある遺伝子群が見つかった。今後の詳細な解析が必要である。

一方、msDNA-Vc95 の DNA 部分を磁気ビーズに結合させ、コレラ菌の細胞抽出液中から msDNA 結合タンパク質を探索した。得られたタンパク質を LC-MS/MS 法によって同定し、複数の候補となるタンパク質を得ることができた。今後、詳細な解析を進める予定である。

(3) *Vibrio mimicus* のレトロンの解析

コレラ菌と類似の *V. mimicus* において新たに発見されたレトロン-Vm129 は、*ret* 遺伝子以外に機能未知の膜タンパク質をコードする *orf319* を含んでいる。*ret* 遺伝子と *orf319* の欠損変異株を作製し、カイコ幼虫に対する病原性を野生株と比較したところ、若干病原性が強くなっていることがわかった。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計12件)

1. Soliman, A. M., Khalifa, H. O., Ahmed, A.

- M., Shimamoto, Toshi, Shimamoto, Tadashi, Emergence of NDM-5-producing clinical *Escherichia coli* isolate in Egypt, Int. J. Infect. Dis., 査読有, 2016, in press.
2. Khalifa, H. O., Soliman, A. M., Ahmed, A. M., Shimamoto, Toshi, Shimamoto, Tadashi, NDM-4 and NDM-5-producing *Klebsiella pneumoniae* coinfection in a 6-month-old infant, Antimicrob. Agents Chemother., 査読有, 2016, in press.
 3. Khalifa, H. O., Ahmed, A. M., Oreiby, A. F., Eid, A. M., Shimamoto, Toshi, Shimamoto, Tadashi, Characterization of plasmid-mediated colistin resistance gene, *mcr-1*, in *Escherichia coli* isolated from animals in Egypt, Int. J. Antimicrob. Agents, 査読有, 2016, in press.
 4. Elnahriry, S. S., Khalifa, H. O., Soliman, A. M., Ahmed, A. M., Hussein, A. H., Shimamoto, Toshi, Shimamoto, Tadashi, Emergence of plasmid-mediated colistin resistance gene, *mcr-1*, in a clinical *Escherichia coli* isolate from Egypt, Antimicrob. Agents Chemother., 査読有, 60, 2016, 3249-3250, DOI: 10.1128/AAC.00269-16.
 5. Ahmed, A. M., Maruyama, A., Khalifa, H. O., Shimamoto, Toshi, Shimamoto, Tadashi, Seafood as a reservoir of Gram-negative bacteria carrying integrons and antimicrobial resistance genes in Japan, Biomed. Environ. Sci., 査読有, 28, 2015, 924-927, DOI: 10.3967/bes2015.128.
 6. Ahmed, A. M., Shimamoto, Tadashi, Molecular characterization of multidrug-resistant *Shigella* spp. of food origin, Int. J. Food Microbiol., 査読有, 194, 2015, 78-82, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.013.
 7. Hammad, A. M., Hassan, H. A., Shimamoto, Tadashi, Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian raw milk cheese, Food Control, 査読有, 50, 2015, 815-820, DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.10.020.
 8. Ahmed, A. M., Shimamoto, Tadashi, Molecular analysis of multidrug resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from meat and dairy products, Int. J. Food Microbiol., 査読有, 193, 2015, 68-73, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.014.
 9. Ahmed, A. M., Shimamoto, Toshi, Shimamoto, Tadashi, Characterization of integrons and resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolated from meat and dairy products in Egypt, Int. J. Food Microbiol., 査読有, 189, 2014, 39-44, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.031.
 10. Ahmed, A. M., Shimamoto, Tadashi, Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt, Int. J. Food Microbiol., 査読有, 168-169, 2014, 57-62, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.014.
 11. Hammad, A. M., Shimamoto, Toshi, Shimamoto, Tadashi, Genetic characterization of antibiotic resistance and virulence factors in *Enterococcus* spp. from Japanese retail ready-to-eat raw fish, Food Microbiol., 査読有, 38, 2014, 62-66, DOI: 10.1016/j.fm.2013.08.010.
 12. Ahmed, A. M., Shimamoto, Toshi, Shimamoto, Tadashi, Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers, Int. J. Med. Microbiol., 査読有, 303, 2013, 475-483, DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.06.009.
- 〔学会発表〕(計 9件)
1. 湯ノ谷 学, 島本 敏, 島本 整, コレラ菌の病原性発現調節におけるレトロンと msDNA の機能解析, 第 89 回日本細菌学会総会, 2016 年 3 月 24 日, 大阪市
 2. Toshi Shimamoto, Gaku Yunotani, Tadashi Shimamoto, Characterization of msDNA binding proteins in *Vibrio cholerae*, 日米医学協力研究会コレラ・細菌性腸管感染症専門部会 2015 年度日本側総会, 2015 年 7 月 30 日, 京都市
 3. エン 智群, 島本 敏, 湯ノ谷 学, 成谷 宏文, 桑原 知巳, 島本 整, O1 エルトール型コレラ菌のレトロン-Vc95 内機能未知遺伝子 orf540 の機能解析, 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月 26 日, 岐阜市
 4. 井本 圭祐, 島本 敏, エン 智群, 湯ノ谷 学, 島本 整, コレラ菌のレトロン-Vc95 内機能未知遺伝子 orf540 の古典型とエルトール型における機能の違い, 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月 26 日, 岐阜市
 5. 湯ノ谷 学, 島本 敏, 神本 真紀, 島本 整, レトロンと msDNA によるコレラ菌 (*Vibrio cholerae*) の病原性発現制御機構, 第 67 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2014 年 10 月 4 日, 徳島市
 6. Gaku Yunotani, Toshi Shimamoto, Zhiqun Yan, Maki Kamimoto, Tadashi Shimamoto, Roles of retron-Vc95 in virulence regulation of *Vibrio cholerae*, 日米医学協力研究会コレラ・細菌性腸管感染症専門部会 2014 年度日本側総会, 2014 年 8 月 7 日, 京都市
 7. 島本 敏, 成谷 宏文, 桑原 知巳, 島本 整, O1 エルトール型コレラ菌のレトロン-Vc95 内機能未知遺伝子 orf205 の機能解析, 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3

- 月 28 日，東京都江戸川区
8. 田島 安紗子，島本 敏，島本 整，変異株を利用した *Vibrio mimicus* のレトロンの機能解析，第 47 回腸炎ビブリオシンポジウム，2013 年 11 月 15 日，広島県東広島市
 9. Miho Kawabata, Maki Kamimoto, Toshi Shimamoto, Tadashi Shimamoto, Plasmid-derived retron of *Escherichia coli* clinical isolate is closely related to retron of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ,日米医学協力研究会コレラ・細菌性腸管感染症専門部会 2013 年度日本側総会，2013 年 8 月 8 日，京都市

〔図書〕(計 2 件)

1. 島本 整，島本 敏，近代出版，腸炎ビブリオ(第 集)，2013，362 (338-345)
2. Rasel Das, Tadashi Shimamoto, Mohammad Arifuzzaman, LAMBERT Academic Press, Bacterial Satellite DNA: A Novel Dimension in Bacterial Pathogenicity, 2013, 74

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：9 0 1 8 7 4 4 3

(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：7 0 5 8 3 1 3 6
(平成 25 年度～平成 26 年度)