

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850051

研究課題名(和文) 水平伝播型発光遺伝子(lux)のクオラムセンシングによる発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of quorum sensing regulation of expression of horizontally transferred luminescence genes (lux).

研究代表者

Urbanczyk Henryk (Urbanczyk, Henryk)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：80546896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：クオラムセンシング(QS)は、細菌密度の変化に応答して遺伝子発現を制御する重要なプロセスである。本研究では海洋細菌*Vibrio chagasii*と*Photobacterium aquimaris*の発光遺伝子のQS発現調節を解析した。2種4株の全ゲノム配列決定後、発光遺伝子のゲノムの位置を特定した。QS調節遺伝子のホモログ同定をおこなったが、*P. aquimaris*では確認されなかった。進化解析の結果、発光遺伝子は水平伝播により他のビブリオ種から伝達されたことを示した。*V. chagasii*の培地増殖中の発光遺伝子の発現量を定量した結果、発光遺伝子の発現はQSを経て制御されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Quorum sensing (QS) control of gene expression is an important process that allows bacteria to regulate gene expression in response to changes in cell density. We analyzed QS regulation of expression of luminescence genes in two species of marine bacteria, *Vibrio chagasii* and *Photobacterium aquimaris*. We completed whole genome sequencing of four representative strains from the two species. Evolutionary analysis indicated that luminescence genes of the two species were horizontally transferred from other Vibrionaceae species. We also identified homologues of QS regulatory genes in the two species. Later, we analyzed expression of luminescence genes during growth in rich medium. The expression analysis revealed that luminescence genes expression is controlled via a QS mechanism. Current research focuses on creation of mutant strains with disrupted QS genes. This research is a pioneering analysis of regulation of horizontally transferred luminescence genes of Vibrionaceae.

研究分野：海洋微生物

キーワード：Vibrio クオラムセンシング

1. 研究開始当初の背景

クオラムセンシング(QS)と呼ばれる細菌間の情報伝達機構は、細菌密度に依存して遺伝子発現を調整するプロセスである。QSによって細菌群集は、病原性の発現、バイオフィーム形成および栄養分の獲得などの集団活動を調整している。現在では、多くの細菌種にQS機構の存在が確認されており、QSの分子メカニズム、特に細菌-宿主間の相互関係におけるQSを介した遺伝子制御のメカニズムに関する研究が盛んに行われている。

通常、遺伝形質は母細胞から娘細胞へと垂直伝播により継承されるが、病原遺伝子など様々な遺伝子が、遺伝子水平伝播(HGT)と呼ばれるプロセスにより細菌間で頻りに伝播される。HGTプロセスは、可動性の遺伝子の伝播を促進し、細菌の進化に重要な役割を果たす。この細菌進化は時として、薬剤耐性や新規の病原遺伝子の獲得など、我々人類にとって非常に厄介な問題をもたらす。国内外において病原遺伝子のQSによる制御機構の研究が数多く行われてきたが、外来性遺伝子獲得の背景にあるHGTプロセスとQS調節の関係性は、明らかにされてこなかった。

水平伝播された外来性遺伝子を効率的に利用するためには、QSなどの制御系を介して既存の遺伝子と協調して発現される必要がある。しかしながら今日のQS研究において、制御される遺伝子の伝播様式の相違は識別されておらず、また伝達様式の違いがQS機構に反映されるのか否かは不明のままである。

研究代表者はビブリオ科のゲノム進化の研究において、ハウスキーピング遺伝子系統樹と機能性遺伝子系統樹間の不一致について、各遺伝子が異なる進化史を持つことを見出した。ゲノム解析の結果、生物発光に関与する発光遺伝子を垂直伝播により継承した菌株と、水平伝播により外部から獲得した菌株があることを発見した(Urbanczyk et al, 2008, 2012)。ビブリオ科細菌の発光遺伝子は、細菌が海洋動物と寄生あるいは共生関係を維持するために重要な役割を果たしており、一部の細菌では魚類に対する病原性にも関与している。この発光遺伝子は、QSにより発現制御されていることが知られる。

研究代表者は、HGTにより外部から取り込まれた発光遺伝子が発現し光生成するために、受容細菌のQSを介して、どのように発現制御されているのかを明らかにするため、細菌密度と生物発光の相間性について検討するため予備実験を行った。

予備実験の結果、分析したすべての垂直伝播型発光遺伝子を有する菌株では、QS依存的に発現制御され発光を呈した(すなわち、培養液が一定の細菌密度に達した時のみ、遺伝子発現が起こる)。一方、水平伝播型発光遺伝子を有する菌株には、QS依存的に発現制御され発光を呈した株と、細菌密度に依存せず発光を呈した株の2タイプが存在した。

水平伝播により外部から取り込まれた遺伝子が、一部の株では垂直伝播した遺伝子と同様な発現挙動を示した点は非常に興味深い。さらに他の株では、水平伝播した遺伝子がQSに制御されない発現挙動を示したことから、QSとは異なる別の遺伝子発現調節機構が存在する可能性が推察された。予備実験から得られた結果は、今後のQS研究や外来性病原遺伝子の発現機構の解明をさらに推進する上で非常に有益な知見であり、水平伝播型発光遺伝子と垂直伝播型発光遺伝子を対象とした本研究の着想に至った。

<引用文献>

1. Urbanczyk H., Furukawa T., Yamamoto Y., Dunlap P. V., Natural replacement of vertically inherited *lux-rib* genes of *Photobacterium aquimaris* by horizontally acquired homologs, *Environmental Microbiology Reports*, 4, 2012, 412-416.
2. Urbanczyk H., Ast J. C., Kaeding A. J., Oliver J. D., Dunlap P. V., Phylogenetic analysis of the incidence of *lux* gene horizontal transfer in *Vibrionaceae*, *Journal of Bacteriology*, 190, 2008, 3494-3504.

2. 研究の目的

本研究は、細菌クオラムセンシング(QS)研究において、これまで検討されていなかった遺伝子伝播様式に着目し、垂直伝播型および水平伝播型の発光遺伝子のQSを介した発現調節機構を明らかにすることを目的とした。水平伝播により獲得した外来性遺伝子の効率的利用のためのQS調節、垂直伝播型遺伝子とのQS調節を比較し、遺伝子発現を制御している分子メカニズムの相違と、水平伝播型発光遺伝子の発現制御機構の全体像を解明する。

3. 研究の方法

(1). 全ゲノム配列の決定およびQS遺伝子の同定

本研究では、ビブリオ科(ガンマプロテオバクテリア綱)から *Vibrio chagasii* および *Photobacterium aquimaris* の2菌種を選抜し、解析する。

まず研究の第一段階として、発光遺伝子の発現を制御するQS遺伝子を同定するため、2菌種の全ゲノム配列を決定する。次世代シーケンサーにより得られるドラフトゲノム配列は、アセンブリ後アノテーションを行う。

発光遺伝子の発現に関与するQS遺伝子の同定は、これまでのビブリオQS研究において同定されているホモログ遺伝子の検索によって行う。予備研究から *V. chagasii* と *P. aquimaris* において、他のビブリオ科細菌で見られたQS遺伝子と類似した配列を確認し

ている(データ未掲載)。 *V. chagasii* および *P. aquimaris* の QS 遺伝子数、それらの塩基配列および染色体上の位置を特定する。

(2). 富栄養培地中での増殖における発光遺伝子の QS 制御の調査

V. chagasii (21N-12 株および SB-52 株) および *P. aquimaris* (NBRC 104633^T 株および BS-1 株) の発光遺伝子発現における QS 調節の有無を確認するため、富栄養培地で増殖中の細菌密度と発光を測定する。2 菌種の生物発光は発光遺伝子発現の産物であるルシフェラーゼにより産生される。発光遺伝子発現に相当する光生成量は、GloMAX 20/20 ルミノメーター(Promega)により測定する。

(3). RT-PCR による発光遺伝子および QS 遺伝子発現量の比較

各細菌株の発光遺伝子および QS 遺伝子(or ホモログ)の発現量を RT-PCR で定量する。富栄養培地中で増殖中の細菌株をサンプリングし発光遺伝子の発現制御の QS 因子の関与の有無を特定する。RT-PCR プライマーは、全ゲノム配列から設計する。

(4). 表現型解析

発光遺伝子発現に関与する QS 因子を特定するため、生物発光を利用した表現型解析を行う。全ゲノム配列から同定された各 QS 遺伝子(or ホモログ)の遺伝子破壊変異株を作製する。ビブリオ科細菌の変異株は、Morris and Visick (Molecular Microbiology, 2013) および Ng ら (Molecular Microbiology, 2011) の部位特異的変異誘発法に従い作製する。

4. 研究成果

(1-1). 4 菌株の全ゲノム配列決定

Vibrio chagasii の 2 菌株(21N-12、SB-52) および *Photobacterium aquimaris* の 2 菌株(NBRC 104633^T、BS-1) からゲノム DNA の抽出を行った。抽出は DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を使用した。ゲノム DNA のライブラリを Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina) を使用して調整後、Illumina MiSeq プラットフォームを使用してドラフトゲノム配列を得た。Velvet 版 1.2.05 を使用してアセンブル後、配列決定した。得られた 4 菌株のゲノム配列は、blastn アルゴリズム (BLAST-2.3.0+ パッケージの一部) を使用して発光遺伝子と QS 調節遺伝子のホモロジー検索を行った。

その結果、*V. chagasii* の 2 菌株については完全な発光遺伝子オペロンを同定した。また QS 調節遺伝子(*luxO*、*luxR* と *luxU*) のホモログを同定した。*P. aquimaris* の 2 菌株についても完全な発光オペロンを同定したが、QS 調節遺伝子のホモログを同定することはできなかった。公共のゲノム・データベースには *Vibrio* 属や *Aliivibrio* 属などさまざまな種の遺伝子配列が構築されているが、*P. aquimaris*

の QS 調節遺伝子と一致するホモログは、確認されなかった。この結果から、*P. aquimaris* の発光遺伝子の調節が他の *Vibrio* のものとは異なることが考えられる。

(1-2). 発光遺伝子伝子の進化解析。

(1-1)の結果より、*V. chagasii* と *P. aquimaris* で同定された発光遺伝子について詳細な進化史を解析することを試みた。2 種で同定された発光遺伝子の塩基配列は、他のビブリオ科の発光遺伝子の配列と比較するため、推定アミノ酸配列に基づき MacClade 4.08 を用いてアライメントした。アライメント後、TNT 1.1 を用いた最大節約法により解析し、FigTree 1.4.0 を使用して系統樹を作製した。

解析の結果、*V. chagasii* の発光遺伝子は他のビブリオ科種から水平伝播されたことを示した。*V. chagasii* 21N-12 の発光遺伝子は、‘Harveyi クレード’ から、SB-52 の発光遺伝子は *V. orientaris* に関連した細菌から水平伝播されたことを示した。予備研究での短配列解析では、SB-52 の発光遺伝子は垂直伝播由来であると推測されたが、SB-52 菌株の発光遺伝子も水平伝播により伝達されたことが本研究から明らかにされた。

P. aquimaris NBRC 104633^T 系統発生分析でも、発光遺伝子が他の *Photobacterium* 属種から水平伝播されたことを示した。しかしながら、*P. aquimaris* の BS-1 系統発生分析では、発光遺伝子の進化史を決定することができなかった。*Photobacterium* 属については *Vibrio* 属と比べて公共のデータベースに蓄積されている発光遺伝子の付加的な配列情報が少なく、本研究期間内で進化史を決定づけることができなかったためである。

(2). 富栄養培地中での増殖における発光遺伝子の QS 制御の調査

本研究では *V. chagasii* 2 つの菌株について富栄養培地で対数増殖期の発光遺伝子の発現を分析した。(1-1)での結果から、*P. aquimaris* の QS 調節遺伝子を同定することができなかったため、以降の研究は *V. chagasii* の 2 菌株に集中した。

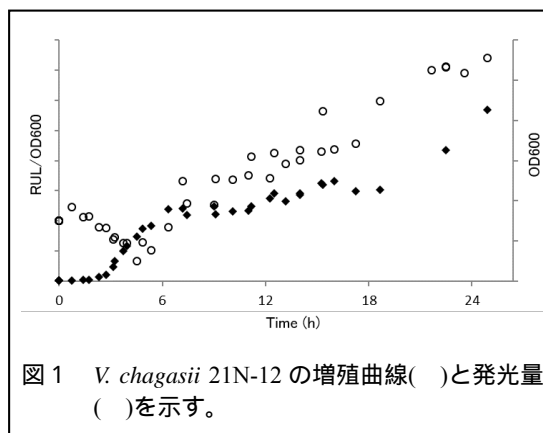


図1 *V. chagasii* 21N-12 の増殖曲線(○)と発光量(●)を示す。

2 菌株はそれぞれ LSW-70 液体培地に植菌し、26 で培養した。培養液は 2、3 時間毎に OD600 を測定し、最大 24 時間まで測定した。同時に GloMAX 20/20 ルミノメーター (Promega) 使用し、発光を測定した。OD600 と発光測定の結果、菌体の増殖に伴い発光量の増大が確認された。以上の結果は発光遺伝子の調節がクオラムセンシングにより制御されることを示した (図 1)。

(3). RT-PCR による発光遺伝子および QS 遺伝子発現量の比較

各細菌培養液は RT-PCR 分析のため RNeasy Protect Bacteria Mini Kit (Qiagen) からトータル RNA を抽出した。単離したトータル RNA から各遺伝子 mRNA のフラグメントの逆転写と増幅を QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) を用いて反応を行なった。RT-PCR 分析のためのプライマーは、全ゲノム配列に基づいて設計された。

RT-PCR の結果、*V. chagasii* の 2 菌株で、発光遺伝子は QS 様機構により発現制御されていることが明らかになった。RT-PCR 分析結果は、*V. chagasii* で発光の QS 規制を支持する結果であった。発光遺伝子はそれぞれ異なるドナーに由来していたが、両菌株の発光調節は、同程度であった。

(4). *V. chagasii* 欠失変異体の作製

QS 制御に関与する遺伝子の詳細な役割を特定するため、*V. chagasii* 株の QS 調節遺伝子破壊変異株の作製を試みている。QS 調節遺伝子である *luxR* および *luxO* の 2 遺伝子の破壊に焦点を当てる。

初めに *luxR* と *luxO* の断片配列の PCR 増幅を行った。増幅のためのプライマーは、全ゲノム配列データに基づいて設計した。上記 PCR 増幅断片を TOPO ベクター (Invitrogen) に組み込み、大腸菌に形質転換を行った。次に各 *lux* 遺伝子のクローン断片から欠失配列を有する *lux* 遺伝子断片を作製するために制限酵素を用いて切断した。現在、R6K-ori スーサイドベクター pKTN701 に欠失配列を有する *lux* 遺伝子の断片のサブクローニングを開始したところである。

本研究では *V. chagasii* の発光遺伝子が QS 様機構により発現制御されていることが明らかになったが、QS 制御に関与する遺伝子の役割を特定するためさらに解析が必要である。今後、QS 遺伝子破壊変異株の解析により、水平伝播に由来する発光遺伝子の QS 制御に関してさらなる知見が得られると考える。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

Urbanczyk Henryk (URBANCZYK, Henryk)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：80546896