

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22536

研究課題名（和文）偏性細胞内寄生菌（リケッチア）における接合伝達系の解析と遺伝子操作技術への応用

研究課題名（英文）Analysis of conjugation system in obligate intracellular bacteria (Rickettsia) and its application to the gene manipulation system

研究代表者

林 哲也 (Hayashi, Tetsuya)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：10173014

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、新規リケッチア菌種(Ca. *Rickettsia longicornis*)とそのプラスミド(pRlon)を解析対象として、偏性細胞内寄生菌でのプラスミド接合伝達系の存在の証明、pLON接合伝達能を活かした遺伝子改変系の開発とこれを用いた細胞内増殖必須遺伝子の網羅的な同定を試みた。その結果、染色体上RAGE(ICEの一種)にもpRlonと異なる接合伝達系が存在することが明らかになったが、他のリケッチアのRAGEやプラスミドとの比較解析の結果、pRlonを含む全ての接合伝達系には複数の偽遺伝子化が認められ、現存するリケッチアの接合伝達系は機能を失っていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、偏性細胞内寄生菌であるリケッチアの新菌種のゲノム解析によって見出したプラスミドに着目し、これまでに報告の無い偏性細胞内寄生菌での接合による遺伝子伝達系の存在の証明、さらにこのプラスミドの接合系を利用したリケッチアでの遺伝子改変系の開発とこれを用いた増殖必須遺伝子の網羅的同定に挑戦した。染色体上のRAGEと呼ばれる遺伝子上にも新たな接合伝達系を同定できたが、既知のリケッチアのRAGEやプラスミドと比較解析を行った結果、解析した全ての接合系には複数の偽遺伝子（失活した遺伝子）が存在することが明らかとなった。この知見は、現存するリケッチアの接合伝達系は機能を失っていることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：We analyzed a novel *Rickettsia* species (Ca, *R. longicornis*) and its plasmid (pRlon) to show the presence of plasmid-mediated conjugation systems in obligate intracellular bacteria, develop a gene manipulation system based on the conjugation system of pRlon, and systematically identify the *Rickettsia* genes essential for their growth in host cells. We found that a conjugation system different from that of pRlon is encoded by an integrative conjugative element (ICE) called *Rickettsia* Amplified genetic element (RAGE) in *Rickettsia*. However, systematic comparison of conjugation systems of all conjugation systems so far found in *Rickettsia* revealed that all conjugation systems, including those found in Ca. *R. longicornis*, contained multiple pseudogenes. This result indicates that all conjugation systems present in *Rickettsia* currently circulating in the world have been inactivated.

研究分野：細菌学分野

キーワード：リケッチア ゲノム解析 プラスミド ICE 接合伝達 遺伝子改変系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リケッチアの中の一群である紅斑熱群リケッチアは、経卵感染によってマダニ内で維持され、その吸血によってヒトに感染する。偏性細胞内寄生菌であるリケッチアでは、一般的な細菌と大きく異なり、取扱いが極めて煩雑であり(培養細胞を必要とし、病原性リケッチアがBSL3となっているため、P3 実験室での取り扱いが必要であることなど)、効率的な遺伝解析ツールの開発が難しいことなどから、紅斑熱群リケッチアだけでなく、別グループである発疹熱群リケッチアにおいても、病原性や宿主との相互作用の解析のみならず、生物学的性状の基本的な解析(例えば細胞内増殖に必要な遺伝子群の同定など)も進んでいなかった。

こういった状況の中で、日本紅斑熱リケッチアの近縁種で非病原性のリケッチア(現在は *Ca. Rickettsia longicornis* として新菌種提唱されている)のゲノム解析を新たに行ったところから、このリケッチア菌種が接合伝達遺伝子群をコードするプラスミド(pRIon)を保有することを見出した。また、このプラスミドが *Ca. R. longicornis* で広く存在し、配列も非常によく保存されていることが明らかになり、接合伝達遺伝子群の機能も保存されている可能性が示唆された。

一方、リケッチアなどの偏性細胞内寄生菌では、プラスミドの存在や接合伝達関連遺伝子の存在はゲノム解析によって見出されてはいたものの、プラスミドの接合を介した遺伝子伝達系が実際に機能していることを示す報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究では、*Ca. R. longicornis* のゲノム解析によって偶然見出された pLON プラスミドが接合伝達遺伝子群をコードすることに着目し、(1) *Ca. R. longicornis* と日本紅斑熱リケッチアおよび pRIon プラスミドを用いて、偏性細胞内寄生菌であるリケッチアにも機能的なプラスミド接合伝達系が存在することを明らかにするとともに、(2) pRIon の接合伝達系を利用してリケッチアにおける効率の良い遺伝子改変系(ランダムトランスポゾン挿入変異導入系)を開発し、さらに(3) 遺伝子改変系を用いてリケッチアの細胞内増殖に必要な遺伝子の網羅的な探索・同定を行うことに挑戦した。

3. 研究の方法

(1) pRIon 上の遺伝子および他のリケッチア菌種で見出されているプラスミド上の遺伝子を精査して改めてアノテーションを行った。

(2) pRIon の接合伝達遺伝子群と他のリケッチアプラスミド上で同定した接合伝達遺伝子群との比較解析を行った。

(3) 上記の解析と並行して、日本紅斑熱及び極東紅斑熱リケッチアと *Ca. R. longicornis* との比較ゲノム解析を行った結果、*Ca. R. longicornis* の染色体上の RAGE と呼ばれる遺伝子上にも pRIon のものとは異なる接合伝達関連遺伝子群が存在することが明らかになったため、これについても精査を行い、他のリケッチアの RAGE との比較解析を行った。

(4) 上記の解析の結果、pRIon を含む全ての接合伝達系には複数の偽遺伝子化が認められ、現存するリケッチアの接合伝達系は機能を失っていることが明らかになった。そのため、pRIon の接合伝達系を利用した遺伝子操作系(ランダムトランスポゾン挿入変異導入系)の開発は断念した。しかし、pRIon の複製系自体は大腸菌とのシャトルベクターに利用できるため、このシャト

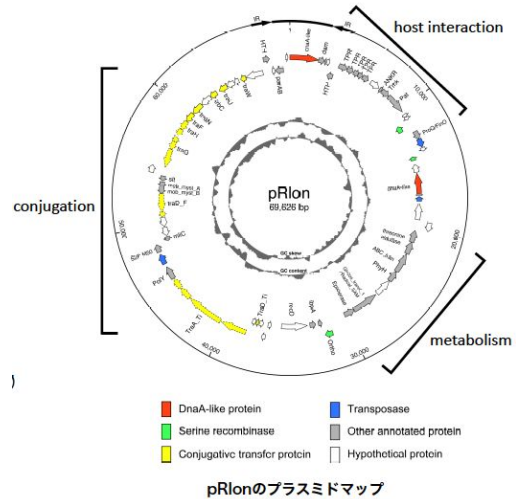
ルベクターに、蛍光タンパク質遺伝子(プラスミドマーカー)とリファンピシン耐性遺伝子(転移マーカー)をコードするように改変した mariner トランスポゾンを組み合わせたランダムトランスポゾン挿入変異導入系のデザインを行うとともに、P3 実験室の整備等を行い、*Ca. R. longicornis* の長期継代培養によって培養条件や増殖特性を確認するとともに、pRlon の安定性の確認と脱落株の取得を目指した。

4. 研究成果

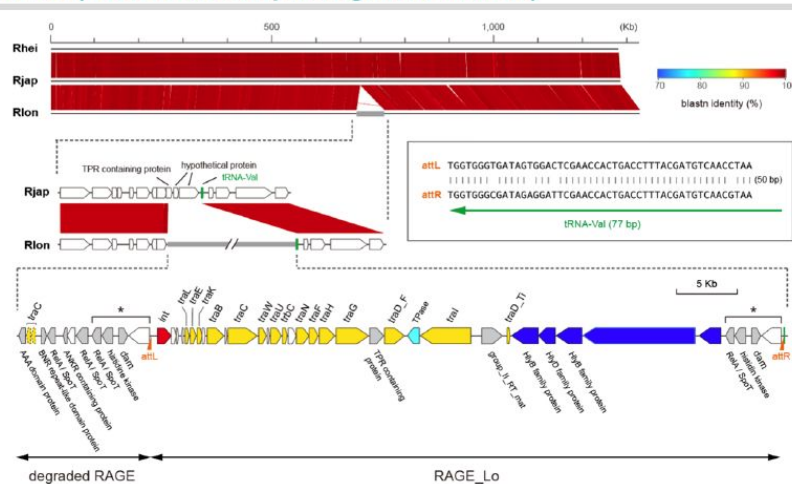
(1) pRlon の配列を精査し、改めてアノテーションを行い、接合伝達関連遺伝子群および他の機能遺伝子群を正確に同定した(右図)。

(2) 他のリケッチア菌種で見出されているプラスミド上の遺伝子を精査して改めてアノテーションを行い、既知のリケッチアプラスミド上に存在する接合伝達関連遺伝子群を網羅的に同定した。

(3) 日本紅斑熱リケッチア、極東紅斑熱リケッチアとの比較ゲノム解析から、*Ca. R. longicornis* の染色体上に新たな RAGE (Amplified Rickettsia Genetic Element ; いわゆる integrative conjugative element あるいは ICE と総称され可動遺伝因子の一種)を同定した。また、これがコードする pRlon 上のもとは異なる接合伝達関連遺伝子群をコードすることを見出した(下図)。さらに、RAGE の配列の精査と他のリケッチアで見出されている RAGE の接合伝達関連遺伝子群との比較解析を行った。



ICE / RAGE (Rickettsiales amplified genetic element)



(4) リケッチアのプラスミドあるいは RAGE 上に同定した全ての接合伝達系遺伝子群の比較解析の結果、pRlon を含む全ての接合伝達系には複数の偽遺伝子化が存在することが明らかになった。この結果は、現存するリケッチアの接合伝達系は機能を失っていることを示唆し、その獲得がリケッチアの進化のかなり早い段階で起きた可能性が高いこと、また現在の地球上に存在する全てあるいはほとんどのリケッチアの生活環においては接合による遺伝子伝達が起きていないことを意味する。

(4) 上記の結果は本研究にとって極めて残念なものであったが、pLON 上には 1 型分泌系とそのエフェクターが存在するという、リケッチアでは初めて知見も得られた(上図の青色の遺伝子セット)。現在、日本紅斑熱リケッチア、極東紅斑熱リケッチアとの比較ゲノム解析の結果と

もに、論文発表の準備中である。

(5) 上記の結果を受けて、接合伝達能を利用した遺伝子操作系の開発は断念せざるを得なかった。しかし、pRlon の複製系自体は大腸菌とのシャトルベクターに利用できると考え、このシャトルベクターにトランスポゾンを組み合わせた遺伝子改変システムの開発に向けて、前項に記載したようなベクターのデザインと構築を進めている途中である。また、これに関連して、*Ca. R. longicornis* の長期継代を行い、培養条件や増殖特性を確認するとともに、pRlon の安定性の確認と脱落株の取得を目指したが、新型コロナウイルス感染症の影響で *Ca. R. longicornis* の長期培養の中断を余儀なくされた。さらに培養系の再立ち上げに時間を要したこと、また pRlon の安定性が予想以上に高かったことから、至適培養条件等は設定できたが、まだ pRlon 脱落株の取得ができていない状況である。自然脱落株の取得が難しい場合、エレクトロポレーションと相同組換えによる pRlon の複製開始タンパク質コード遺伝子の破壊、あるいは *Ca. R. longicornis* での解析をスキップして、日本紅斑熱リケッチアでのランダムトランスポゾン挿入変異株の取得を行う必要があると考えている。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kasama K, Fujita H, Yamamoto S, Ooka T, Gotoh Y, Ogura Y, Ando S, Hayashi T.	4. 巻 6
2. 論文標題 Genomic Features of Rickettsia heilongjiangensis Revealed by Intraspecies Comparison and Detailed Comparison With Rickettsia japonica	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2019.02787	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kentaro Kasama, Hiromi Fujita, Tadasuke Ooka, Yasuhiro Gotoh, Shuji Ando, Tetsuya Hayashi
2. 発表標題 1.Low genomic diversity of Rickettsia heilongjiangensis revealed by genomic comparison of Japanese and Chinese isolates
3. 学会等名 APRC2 (2nd Asia-Pacific Rickettsia Conference) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笠間健太郎, 藤田博己, 山本正悟, 大岡唯祐, 後藤恭宏, 小椋義俊, 安藤秀二, 林哲也
2. 発表標題 比較ゲノム解析による極東紅斑熱リケッチア日本分離株のゲノム特性の解明
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林哲也
2. 発表標題 4.次世代シーケンサの活用によって広がる細菌のゲノム研究
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笠間健太郎, 後藤恭宏, 藤田博己, 山本正悟, 小椋義俊, 安藤秀二, 林哲也
2. 発表標題 2.Genome analysis of “Candidatus Rickettsia longicornii” revealed unique mobile genetic elements
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笠間健太郎, 後藤恭宏, 藤田博己, 山本正悟, 小椋義俊, 安藤秀二, 林哲也
2. 発表標題 1.Genome analysis of “Candidatus Rickettsia longicornii” revealed unique mobile genetic elements
3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------