

機関番号：10105

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21880005

研究課題名（和文）サルモネラの VBNC 状態におけるストレス応答関連シグマ因子 RpoS の役割

研究課題名（英文） Role of general stress sigma factor RpoS in *Salmonella* VBNC state

研究代表者

楠本 晃子 (KUSUMOTO AKIKO)

帯広畜産大学・動物・食品衛生研究センター・助教

研究者番号：60535326

研究成果の概要（和文）：サルモネラにおいて、ストレス応答関連シグマ因子 RpoS は生きてはいるが培養できない (Viable But Non-Culturable, VBNC) 状態への移行を遅らせた。*Salmonella* Typhimurium LT2 株は RpoS 発現量低下のために、*S. Oranienburg* 株は *rpoS* 遺伝子のミスセンス変異のために、野生型 RpoS を持つ *S. Dublin* に比べて、すみやかに VBNC 状態に陥ることが推測された。

研究成果の概要（英文）：General stress sigma factor RpoS delayed induction of viable but non-culturable (VBNC) state in *Salmonella*. Compared to *S. Dublin* harboring wild-type RpoS, *S. Typhimurium* strain LT2 and *S. Oranienburg* entered VBNC state rapidly due to lower levels of RpoS and missense mutation in *rpoS* gene, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：食品科学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：VBNC, VNC, ストレス応答, シグマ因子, RpoS, サルモネラ

1. 研究開始当初の背景

環境ストレス下で、食中毒原因菌を含む様々な細菌は生きてはいるが培養できない (Viable But Non-Culturable, VBNC) 状態に陥る。VBNC 状態の細菌は通常の培地で増殖しないが、生命活動を維持している。そのため、VBNC 状態の細菌は培養による通常の細菌検査では検出できず、VBNC 状態の病原性細菌の食品への混入は食品衛生上非常に重要な問題である。しかし、細菌が VBNC 状態に陥る分子基盤は分かっていない。本研究は、様々な環境ストレス下での生存に重要な役割を果たすことが知られているシグマ因子

RpoS (σ^{38})に着目した。ストレス下で RpoS はストレス応答に関する遺伝子群の発現をグローバルに制御することが知られているが、VBNC 状態におけるその役割に関する報告は乏しい。

2. 研究の目的

細菌が VBNC 状態に陥る分子メカニズムの解明を目指した。そのために、本研究では、様々なストレス下での生存に重要な役割を果たすシグマ因子 RpoS (σ^{38})に着目し、RpoS のサルモネラの VBNC 誘導における役割を明らかにすることを目的とした。この研究を

通じ、VBNC 細菌の検出法の開発のための知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

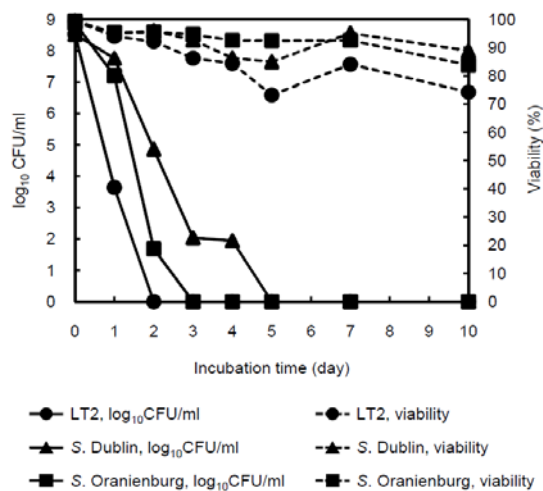
食中毒原因菌である *Salmonella enterica* の 14 血清型 15 株の *rpoS* 遺伝子配列を調べ、遺伝子配列の異なる 3 血清型 (*S. Typhimurium* LT2 株、*S. Dublin* 株、*S. Oranienburg* 株) を用い、*in vitro* VBNC 誘導実験をおこなった。*RpoS* の役割および *rpoS* 遺伝子配列の違いの VBNC 誘導への影響を調べるために、*rpoS* 遺伝子欠失とプラスミドからの *rpoS* 遺伝子発現が VBNC 誘導へどのような影響を与えるか調べた。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① *Salmonella enterica* subsp. *enterica* の 14 血清型 15 株の *rpoS* 遺伝子の塩基配列を調べた。15 株中 10 株は同一のアミノ酸配列の RpoS タンパク質を持つことが分かった (野生型 RpoS)。*Salmonella Typhimurium* LT2 株も野生型 RpoS タンパク質を持つが、1 番目のアミノ酸であるメチオニンをコードしているコドンが ATG ではなく alternative initiation codon の TTG になっていた (*rpoS*^{TTG})。 *S. Oranienburg* 株は 118 番目のアミノ酸のアスパラギン酸がアスパラギンに置換されていた (RpoS D118N)。また、ウェスタンブロッティング法によって LT2 株、*S. Oranienburg* 株、野生型 *rpoS* 遺伝子を持つ *S. Dublin* 株の細胞内 RpoS 量を調べたところ、*S. Oranienburg* 株と *S. Dublin* 株では著しい差は見られなかったが、LT2 株は他 2 株に比べて RpoS 量が少ないことが分かった。

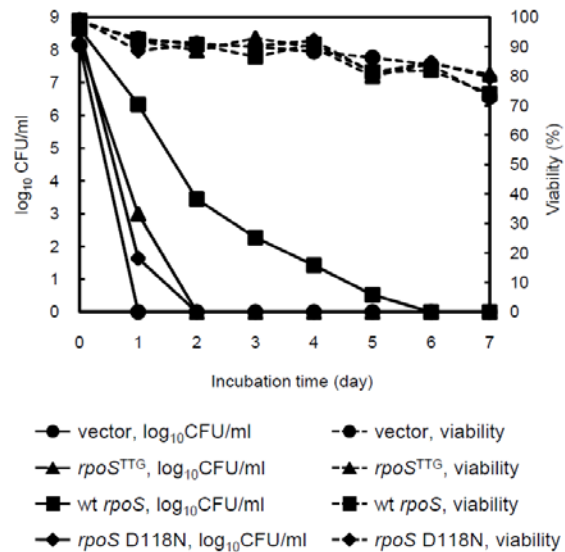
②



定常期のサルモネラを 0.85% 食塩水で洗浄後、7% 食塩水に懸濁し、37°C で培養するこ

とで VBNC 状態へ誘導した。LB 培地におけるコロニー形成 (colony forming unit, CFU) を調べることでサルモネラの増殖能の変化を調べた。BacLight bacterial viability kit (Invitrogen) を用いてサルモネラの細胞膜の損傷を調べ、損傷のない細胞膜を持つ細胞を生細胞とし、生存能を評価した。本研究では、増殖能が低下しているにもかかわらず (10 CFU/mL 未満)、高い生存率を維持している状態を VBNC 状態と定義した。LT2 株は 7% 食塩水中での培養 2 日目に、*S. Oranienburg* 株は 3 日目に VBNC 状態に陥った。一方、*S. Dublin* 株は VBNC 状態になるのに 5 日も要した。

③



rpoS 遺伝子欠失株は 1 日で VBNC 状態に陥ったが、野生型 *rpoS* 遺伝子を発現すると、VBNC 状態になるのに 6 日も要した。しかし、*rpoS*^{TTG} 遺伝子や *rpoS* D118N 遺伝子を発現しても 2 日で VBNC 状態に陥り、VBNC 誘導にかかる日数はわずかに延びただけであった。

①~③の研究成果をまとめると、ストレス応答関連シグマ因子 RpoS はサルモネラの VBNC 状態への移行には必須ではないが、移行を遅らせることが明らかとなった。LT2 株は *rpoS* 遺伝子が alternative initiation codon の TTG で始まるため、翻訳効率が低下し、RpoS タンパク質量が少ない。したがって、野生型 *rpoS* 遺伝子を持つ *S. Dublin* 株に比べ、すみやかに VBNC 状態へ移行できたと考えられる。一方、*rpoS* 遺伝子に 1 アミノ酸置換変異 (*rpoS* D118N) を持つ *S. Oranienburg* 株はこの変異のために LT2 株同様にすみやかに VBNC 状態に陥ると考えられる。RpoS は σ^{70} ファミリーに属し、D118 を含む領域はこのファミリーのタンパク質間で最も保存性の高い領域である。

また、RpoD (σ^{70})で RpoS D118 に相当する残基は保存されており、この残基に変異を導入すると、シグマ因子としての機能が失われることが知られている。これらの知見から、RpoS D118N もシグマ因子としての機能が低下することが推測され、*S. Oranienburg* 株は RpoS の機能低下のために、VBNC 状態へすみやかに移行できるのかもしれない。

(2) 本研究の国内外における位置づけとそのインパクト

VBNC 状態の細菌は食品検査でおこなわれる微生物検査では検出できないため、食品衛生の分野で細菌の VBNC 状態は注目を集めている。また、河川、湖沼、海水、土壌などの自然環境中で、多くの細菌は VBNC 状態で潜んでいると考えられている。コレラや腸炎ビブリオなどの病原性のビブリオ属も環境中で VBNC 状態に陥っていると考えられている。抗生物質などに耐性を示すバイオフィルム中の細菌も VBNC 状態に陥っているのではないかと考えられている。致死的なストレス下で、病原細菌を含む様々な細菌が VBNC 状態に陥ることが知られている。このように、食品衛生分野のみならず、環境微生物学、医学、歯学、薬学などの分野でも細菌の VBNC 状態は重要な課題であり、解明すべき現象である。しかし、その分子メカニズムに関する知見は非常に乏しい。国内での VBNC を研究する者は非常に少なく、国外でも同様である。さらに、VBNC 研究者の中でも、遺伝学的、分子生物学的、生化学的手法などを用いて、その分子メカニズムの解明を目指すものはごく少数である。重要な研究課題にも関わらず、研究者人口が非常に少ない本研究分野において、本研究はサルモネラ VBNC 誘導に関する新たな知見を提供し、細菌の VBNC 状態の分子メカニズムの研究に大きく貢献するものである。

多くの細菌は VBNC 状態に陥るのに数週間あるいは数カ月要するのに対し、本研究ではわずか数日でサルモネラは VBNC 状態になった。本研究で用いられた手法は短時間で VBNC 状態に誘導できるので、研究を進める上で非常に有利である。さらに、VBNC 状態のサルモネラは 70%以上ととても高い。高い生存率は、分子生物学的手法での解析に大変有用である。本研究は VBNC 研究のモデルとなりうる素材と手法を提案したという点においても、国内外の VBNC 研究に大きく貢献するものである。

(3) 今後の展望

本研究はサルモネラの VBNC 状態への移行における RpoS の役割を明らかにした。RpoS は VBNC 状態へ陥ること自体には必須ではないが、VBNC 状態への移行に要する時

間に影響を与えることが分かった。今後は、塩ストレス下における RpoS が制御する遺伝子群をマイクロアレイや ChIP on chip などの網羅的解析によって同定し、VBNC 誘導時における増殖能の維持に関わる遺伝子の同定を目指したい。

本研究で RpoS は VBNC 状態に必須ではないことが分かった。VBNC 状態の分子メカニズムを解明するために、今後は、VBNC 変異株の取得と解析をおこない、VBNC 状態に必須な遺伝子を同定したいと考えている。

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 5 件)

① Conversion of mono-polar to peritrichous flagellation in *Vibrio alginolyticus*.

Kojima M, Nishioka N, Kusumoto A, Yagasaki J, Fukuda T, Homma M.

Microbiology and Immunology. 2011 Feb;55(2):76-83. 査読有

② Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from commercial asazuke (Japanese light pickles).

Maklon K, Minami A, Kusumoto A, Takeshi K, Nguyen TB, Makino S, Kawamoto K.

International journal of food microbiology. 2010 May 15;139(3):134-139. 査読有

③ *Salmonella* Typhimurium isolated from healthy pigs and their ability of horizontal transfer of multidrug resistance and virulence genes.

Nguyen Thi Bich Thuy, Koichi Takeshi, Akiko Kusumoto, Sou-ichi Makino, Keiko Kawamoto.

Bioscience and Microflora. Vol. 28 (2009), No. 4 pp.135-143. 査読有

④ Mutational analysis of the GTP-binding motif of FlhF which regulates the number and placement of the polar flagellum in *Vibrio alginolyticus*.

Kusumoto A, Nishioka N, Kojima S, Homma M.

Journal of Biochemistry (Tokyo). 2009 Nov;146(5):643-650. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① ストレス応答関連シグマ因子 RpoS はサルモネラの VBNC 状態への移行を遅らせる

楠本晃子、原田俊彦、牧野壮一、川本恵子

第 151 回日本獣医学会学術集会

平成 23 年 3 月 30 日-4 月 1 日

東京農工大

大会中止のため要旨集による発表

② サルモネラ VBNC におけるストレス応答関連シグマ因子 RpoS の役割

楠本晃子、牧野壮一、川本恵子

第 150 回日本獣医学会学術集会

平成 22 年 9 月 16-18 日

帯広畜産大学

③サルモネラの生きているが培養できない
(VBNC)状態におけるストレス応答関連シグ
マ因子 RpoS の役割

楠本晃子、牧野壮一、川本恵子

第 78 回日本細菌学会北海道支部・第 28 回日
本クラミジア研究会合同学術集会

平成 22 年 9 月 3-4 日

北海道大学および酪農学園大学

④サルモネラの生きているが培養できない
状態への移行におけるストレス応答関連シ
グマ因子 RpoS の役割

楠本晃子、牧野壮一、川本恵子

第 7 回 21 世紀大腸菌研究会

平成 22 年 6 月 3-4 日

グリーンピア阿蘇

〔図書〕(計 1 件)

①牧野壮一、楠本晃子

チクサン出版社、獣医微生物学実験マニユア
ル 第 3 章 固形培地とコロニー観察

2009 年、p. 28-35

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠本 晃子 (KUSUMOTO AKIKO)

帯広畜産大学、動物・食品衛生研究センタ

一、助教

研究者番号：60535326

(2) 研究分担者

なし