

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660090

研究課題名(和文)腸炎ビブリオVNC状態誘導の分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of the VNC induction of *Vibrio parahaemolyticus*

研究代表者

木村 誠 (Kimura, Makoto)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：10204992

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)：我々は腸炎ビブリオゲノム中のスーパーインテグロン(SI)に大腸菌トキシン/アンチトキシン(TA)システム・DinJ/YafQの相当遺伝子(vp1842/vp1843)を見出し、そのトキシンの遺伝子産物をVp1843、アンチトキシンノ遺伝子産物をVp1842と命名した。本研究では、Vp1843はDNAの1本鎖を加水分化するDNAエンドヌクレアーゼ活性を持つことを明らかにするとともに、vp1842/vp1843はプラスミドに見出しされたTAシステムと同様に、腸炎ビブリオゲノム中のSIの安定・維持に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the inhibitory potency of Vp1843 with *Escherichia coli* DNA gyrase (Gyr). The result showed that Vp1843, like other ParE toxins, significantly inhibited DNA gyrase, giving rise to a linearized DNA, and that the antitoxin Vp1842 neutralized its DNA gyrase inhibitory activity. Finally, we explored whether vp1842/vp1843 is involved in induction into the VNC state by preparing a mutant strain (42/43), in which vp1842/vp1843 in the *V. parahaemolyticus* genome were knocked out by homologous recombination. The result suggested that vp1842/vp1843 is not involved in the induction into the VNC state. However, we found that the vp1843 expression in *E. coli* cells strongly induced chromosomal DNA degradation. On the basis of these observations, we suggest that vp1842/vp1843 plays a role in stabilization of the *V. parahaemolyticus* genome.

研究分野：生物化学

キーワード：腸炎ビブリオ トキシン/アンチトキシン DNAエンドヌクレアーゼ

1. 研究開始当初の背景

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) は、日本や中国を含む東アジア沿岸地域において、多発している急性食中毒原因菌である。腸炎ビブリオは環境変化に伴い、通常の培養条件では培養できない状態へ移行することが知られている。1982年、Colwellらのグループは、この通常の培養条件では培養できない状態を“Viable but Non-Culturable (VNC)”状態と提唱した。その後、多くの病原菌を含む細菌にも同様の現象が見出され、VNC状態が異常環境下における「細菌の生き残り戦略」と推定されているが、その誘導に関わる分子やその作用機構に関しては未解明である。最近、このVNC状態へ入道にトキシン/アンチトキシン (TA) システムが関与していることが示唆されている。TAシステムは原核生物のゲノムやプラスミドに存在し、ゲノムの安定化や細胞ストレス耐性因子として機能している。一方、ビブリオ属やシュードモナス属ゲノム中に存在するスーパーインテグロン (SI) は多くの機能未知遺伝子を含み、その構造から薬剤耐性可動因子の祖先と推定されている。

2. 研究の目的

我々は腸炎ビブリオゲノム中のSIに大腸菌TAシステム・DinJ/YafQの相当遺伝子 (*vp1842/vp1843*) を見出し、そのトキシンの遺伝子産物をVp1843、アンチトキシンノ遺伝子産物をVp1842と命名した。続いて、大腸菌トキシン・YafQがタンパク質合成反応を阻害することから、Vp1843の同活性を検討したところ、Vp1843はその阻害活性を示さなかった。さらに、本研究過程で、Vp1843は大腸菌YafQに類似しているとともに、大腸菌プラスミド由来トキシンで、DNAジャイレースの阻害活性をもつParEとも類似していることを見出した。本研究では、Vp1843の生理活性を特定するとともに、*vp1842/vp1843*のVNC状態誘導への関与について検討した。

3. 研究の方法

腸炎ビブリオ由来トキシン・Vp1843のDNAジャイレース阻害活性は、酵素として大腸菌DNAジャイレースを、基質として弛緩型プラスミドpBR322を用い、その反応性生物は1%アガロース電気泳動により分析した。Vp1843のエンドヌクレアーゼ活性は、弛緩型プラスミドpBR322を基質として用いて行った。トキシン遺伝子・*vp1843*および*vp1842/vp1843*の大腸菌内での発現には、プラスミド (pBAD/Myc-HisA) を用い、アラビノースで誘導することにより行った。*vp1842/vp1843*の腸炎ビブリオノックアウト株の作成は、相同組換え用ベクター・pYAK1を用いて行い、腸炎ビブリオのVNC状態への誘導は、1.85%食塩中10°Cにより行った。

4. 研究成果

(1) Vp1843の生理活性について

大腸菌DNAジャイレースは、ATPの存在下弛緩型DNAにスーパーコイルを導入する活性を持つとともに、ATP非存在下では、その逆反応・スーパーコイルDNAの弛緩活性を持つことが知られている。まず、精製したVp1843を用いて、大腸菌DNAジャイレースのスーパーコイル導入活性に対する影響を検討したところ、Vp1843はその導入活性を僅かに阻害しているように見えた。そこで次に、スーパーコイルDNAの弛緩活性に対する影響を検討したところ、Vp1843はその活性を阻害せず、むしろ増強している事が推定された。この結果より、Vp1843は大腸菌DNAジャイレース活性を阻害するのではなく、むしろDNAの1本鎖を切断することにより、スーパーコイルDNAを弛緩していることが示唆された。そこで、Vp1843のDNAエンドヌクレアーゼ活性をプラスミドpBR322を基質として検討したところ、確かにVp1843がエンドヌクレアーゼ活性を持つことが明らかになった。また、この活性は、Vp1842の存在下では抑制された。この結果より、Vp1843の強い大腸菌抑制活性は、Vp1843のDNAエンドヌクレアーゼ活性に

よるものであることが強く示唆された。

(2) Vp1843の生理的機能について

相同組換えによって *vp1842/vp1843* を欠失した腸炎ビブリオ変異株 (Δ *vp1842/vp1843*) を作成し、低温低塩 (10 °C, 1.85% NaCl) 条件下で VNC への移行を検討した。その結果、変異株は野生株と同様に約 10 日間で VNC へ移行したことから、*vp1842/vp1843* は VNC への誘導には関与していないことがわかった。続いて、*vp1843* を強制発現したビブリオ菌の作成を試みたが得ることはできなかった。そこで、*vp1843* を発現した大腸菌の表現型を検討したところ、大腸菌の形態がフィラメント状に変化し、ゲノム DNA が分解されていることが明らかになった。以上の結果より、*vp1842/vp1843* は、プラズミドに見出しされた TA システムと同様に、SI の安定・維持に関与していることが示唆された。

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3件)

M. Hino, H. Takagi, T. Miyoshi, T. Uchiumi, T. Nakashima, Y. Kakuta, and M. Kimura, Characterization of putative toxin-antitoxin systems in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. App. Microbiol.*, **117**, 185-195 (2014).

J. Zhang, H. Ito, M. Hino, and M. Kimura, A RelE/ParE superfamily toxin in *Vibrio parahaemolyticus* has DNA nicking endonuclease activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **489**, 29-34 (2017).

J. Zhang, S. Taniguchi, H. Ito, K. Iiyama, M. Hino, T. Katayama, and M. Kimura, Expression of the *Vibrio parahaemolyticus* toxin in *Escherichia coli* results in chromosomal DNA degradation. *Biosci. Biotechnol.*

Biochem. in press (2017).

[学会発表](計5件)

張晶、伊藤寛倫、中島崇、木村誠、腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) スーパーインテグロンに存在する TA システム・*vpparD/vpparE* の機能解析、第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2016年11月30日~12月2日。

木村誠、張晶、伊藤寛倫、腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) スーパーインテグロンの TA システムに関する研究、第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2016年11月30日~12月2日。

張晶、伊藤寛倫、中島崇、木村誠、腸炎ビブリオ由来アンチトキシン/トキシンの生理機能に関する研究、日本農芸化学会2016年度西日本支部大会、長崎大学文教キャンパス、2016年9月15日、16日。

伊藤寛倫、張晶、中島崇、木村誠、腸炎ビブリオ由来トキシン・VpParE の DNA ジャイレース阻害活性とその様式、日本農芸化学会2016年度西日本支部大会、長崎大学文教キャンパス、2016年9月15日、16日。

張晶、伊藤寛倫、木村誠、腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) のトキシン・VP1843 の機能解析、日本農芸化学会2016年度大会、札幌コンベンションセンター、2016年3月27日~30日。

[図書](計0件)

[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

6．研究組織

(1)研究代表者

木村 誠 (KIMURA Makoto)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：10204992

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4)研究協力者

なし ()