

## 病原細菌のゲノム進化におけるレトロンとインテグロンの役割

●島本 整

広島大学大学院生物圏科学研究科

### 〈研究の目的と進め方〉

細菌逆転写酵素は、細胞内でcDNA産物である multicopy single-stranded DNA (msDNA) と呼ばれる RNA-DNA複合体の合成に必須の酵素であり、大腸菌など多くの細菌においてその存在が知られている。細菌逆転写酵素遺伝子は、ゲノム上でmsDNA合成のための鋳型プライマー領域とともに“レトロン”と呼ばれるオペロンを形成しており、一種のレトロエレメントだと考えられている。これまでのところ細菌逆転写酵素およびそのcDNA産物であるmsDNAの生理的意義について、詳細は明らかになっていない。一方、インテグロンは、グラム陰性細菌に広く存在している可動性遺伝因子であり、薬剤耐性遺伝子の細菌間の伝播に関与していることが知られている。

近年、種々の病原細菌のゲノム配列が明らかになりつつある。病原細菌は、厳しい条件の中で宿主と接触し、感染を成立させなければならない。その際に、一般細菌よりも速い速度でゲノムを変化させることで厳しい条件に適応していると考えられている。そのような細菌ゲノムの突然変異や再編成などに逆転写酵素を含むレトロンが関与している可能性が考えられている。また、インテグロンは、薬剤耐性遺伝子の獲得に寄与しており、病原細菌ゲノムのダイナミズムの一端を担っていると考えている。さらに、インテグロンの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説もある。本研究では、レトロンとインテグロンの構造と機能を明らかにすることによって細菌ゲノム進化の過程の一端を明らかにすることを目的としている。

研究代表者は、これまでの研究で、ビブリオ属の細菌やサルモネラなどにおいてレトロンの構造を明らかにしてきた。レトロンは細菌ゲノム上の他の遺伝子領域と比べるとGC含量やコドン使用頻度などの点で明らかに異なっており、逆転写酵素遺伝子を含むある種の可動性因子だと考えられている。もし、レトロンが可動性因子であるなら、細菌ゲノムの突然変異や再編成あるいは病原因子や薬剤耐性遺伝子などの運搬に関与している可能性がある。本研究では、逆転写酵素およびレトロンの機能を明らかにすることによってレトロンの可動性への関与について検討する。一方、コレラ菌などの病原細菌ではインテグロンが細菌の薬剤耐性化やゲノムの構造変化に重要な働きをしていることが知られている。研究代表者のこれまでの研究で、病原細菌のゲノムにインテグロンがかなり広範囲に分布していることがわかってきた。この影響についても詳細に解析する。そして、レトロンとインテグロンの関連性についても検討する。

### 〈研究開始時の研究計画〉

種々の病原細菌（下痢原性大腸菌、コレラ菌、*V. vulnificus*、*V. fluvialis*、*V. mimicus*、*Salmonella*など）におけるレトロンとインテグロンの分布状況を調べる。また、新たなレトロンやインテグロンが見つかった場合には、クローニングと構造解析を行う。

研究代表者は、これまでにすでにコレラ菌のレトロン内に存在する逆転写酵素遺伝子の欠損変異株を単離し、野生株と種々の比較を行うことによって逆転写酵素およびレトロンの機能解析を行ってきた。今後、DNAマイクロアレイ（DNAチップ）を利用することによって変異株において発現量が影響を受ける遺伝子を同定し、レトロンの機能を明らかにする。

病原細菌由来のmsDNAは特殊な構造をしており、一本鎖DNA部分が二本鎖DNAとして機能する可能性を持っている。そこで、msDNAが特定のDNA結合タンパク質を吸着しているかどうかを調べるためにmsDNA結合タンパク質を単離解析する。これによってmsDNAやレトロンの機能を明らかにすることができる。

### 〈研究期間の成果〉

これまでの解析で、新たに*Salmonella enterica* serovar Typhimurium由来のレトロンの詳細な解析を行い、msDNA-St85の構造解析を行った。このレトロンは、*S. Typhimurium*の多剤耐性株であるDT104株にも見つかり、この株では複数の薬剤耐性遺伝子を含む pathogenicity islandとレトロンが隣接して存在している。また、流行性コレラの原因となる*Vibrio cholerae* O1/O139株（コレラ菌）には普遍的にレトロンが存在しているのに対して、コレラを引き起こさない non-O1/non-O139株では一部の例外を除いてレトロンが存在しておらず、レトロン領域にゲノム構造の多様性が認められた。さらに例外的に non-O1/non-O139株で発見されたレトロンでは、レトロン領域の前後で数多くの変異が見つかり、ゲノムのレトロン領域の多様性が明らかになった。一方、*V. vulnificus*からも新たなmsDNAの単離に成功した。さらに、ゲノム配列が明らかになっている *V. vulnificus* YJ016株では、逆転写酵素遺伝子がスーパーインテグロン内に存在していることを発見した。薬剤耐性遺伝子の転移に関与しているインテグロンの場合、転移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説があることから本研究ではインテグロンの解析も同時に行った。これまでに *V. fluvialis*、*V. cholerae*、*Salmonella*、毒素源性大腸菌（enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC）、腸管侵入性大腸菌（enteroinvasive *E. coli*, EIEC）、などから数多くのインテグロンを検出し、インテグロン内の遺伝子カセット（薬剤耐性遺伝子）の構造解析を行った。その結果、これまでに知られていなかった新たな遺伝子を複数発見し、同じ細菌種内でもインテグロンによるゲノム構造の違いを示すことができた。特に、*Salmonella*では、新たな遺伝子構成のクラス2インテグロンを発見した。さらに、これまで *V. cholerae*においてのみ存在が報告されていた接合伝達性トランスポゾン的一种である SXT elementを *V. fluvialis*で発見し、詳しい解析を行った。SXT elementには複数の薬剤耐性遺伝子が含まれており、細菌の多剤耐性の伝播に関与していると考えられている。SXT elementが *V. cholerae*以外の他種の細菌で発見された意義

は大きい。その他に、*V. cholerae*で初めてクラス2インテグロンの検出にも成功している。腸管出血性大腸菌O157:H7では、多剤耐性化が接合伝達性のプラスミドに含まれる薬剤耐性遺伝子が原因となっていることを明らかにした。

流行性コレラの原因となる*V. cholerae* O1/O139株(コレラ菌)には普遍的にレトロンが存在しているのに対して、コレラを引き起こさないnon-O1/non-O139株では一部の例外を除いてレトロンが存在しておらず、レトロン領域にゲノム構造の多様性が認められた。

コレラ菌の逆転写酵素遺伝子欠失変異株と野生株との比較より、変異株においてcatalase/peroxidase遺伝子の発現量の低下が観察された。この事実は、変異株の過酸化水素を含む培地での成育が阻害されたことから確認されている。さらに、逆転写酵素遺伝子欠損変異株と野生株の間で遺伝子の発現状況の違いを網羅的に解析するために、DNAマイクロアレイを用いた解析を行った。その結果、変異株では、コレラ毒素遺伝子(ctxAB)や腸管定着因子遺伝子(tcpA)などの病原性に関連のある遺伝子群の発現が10倍から数10倍に上昇していることが明らかになった。この結果は、逆転写酵素およびそのcDNA産物であるmsDNAがコレラ菌の病原性関連遺伝子の発現調節に密接に関与していることを示唆している。この結果に基づいて、デコイ核酸の様なmsDNAによる転写制御因子の吸着を介した遺伝子発現制御のモデルを提唱した。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

逆転写酵素遺伝子を含むレトロンの研究は、国内外で極めてユニークなテーマである。研究期間中、唯一チェコのグループよりSalmonellaのレトロンに関する論文が報告されている。しかし、彼らはmsDNAの構造解析を行っておらず、不十分な解析結果であった。それ以外には、レトロンに関連する報告は行われていない。また、インテグロンに関する研究は、国内外で多く行われているが、レトロンとの関連性の報告はない。インテグロンに関する研究代表者による研究成果は、まったく新しい遺伝子の発見(aac(3)-Id, pspなど)や新たな遺伝子構成のクラス2インテグロンの発見、*V. cholerae*で初めてのクラス2インテグロンの発見など多岐にわたっている。これらの研究成果は、薬剤耐性分野ではインパクトファクターの高い学会誌に掲載されており、高く評価されている。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

磁気ビーズにmsDNAを固定化し、コレラ菌細胞抽出液からmsDNA結合タンパク質の精製を試みたが、msDNA結合タンパク質の単離はできなかった。予想以上に発現量の少ないタンパク質のようであること、また磁気ビーズに対する非特異的な吸着が多かったことなどが原因であると考えられる。

#### 〈今後の課題〉

上記のmsDNA結合タンパク質の単離は、今後の大きな課題である。msDNA結合タンパク質の解析によって逆転写酵素やmsDNAの機能が明らかになるのみでなく、これまで知られていない全く新たな遺伝子発現制御法が明らかになる可能性を秘めている。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1.0312120916

Ahmed, A. M., and Shimamoto, T., msDNA-St85, a

multicopy single-stranded DNA isolated from Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2 with the genomic analysis of its retron, FEMS Microbiol. Lett. 224, 291-297 (2003).

2.0406141521

Ahmed, A. M., Nakagawa, T., Arakawa, E., Ramamurthy, T., Shinoda, S., and Shimamoto, T., New aminoglycoside acetyltransferase gene, aac(3)-Id, in class 1 integron from a multidrug-resistant strain of *Vibrio fluvialis* isolated from an infant aged 6 months, J. Antimicrob. Chemother. 53(6), 947-951 (2004).

3.0406142159

Ahmed, A. M., and Shimamoto, T., Plasmid-encoded class 1 integron carrying sat, phosphoserine phosphatase gene and aadA2 from enterotoxigenic *Escherichia coli* O159 in Japan, FEMS Microbiol. Lett. 235(2), 243-248 (2004).

4.0409090737

Ahmed, A. M., Nakano, H., and Shimamoto, T., The first characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Salmonella* in Japan, J. Antimicrob. Chemother. 54(1), 283-284 (2004).

5.0412031512

Inouye, M., Ke, H., Yashio, A., Yamanaka, K., Nariya, H., Shimamoto, T., and Inouye, S., Complex formation between a putative 66-residue thumb domain of bacterial reverse transcriptase RT-Ec86 and the primer recognition RNA, J. Biol. Chem. 279(49), 50735-50742 (2004).

6.0501051340

Ahmed, A. M., Shinoda, S., and Shimamoto, T., A variant type of *Vibrio cholerae* SXT element in a multidrug-resistant strain of *Vibrio fluvialis*, FEMS Microbiol. Lett. 242(2), 241-247 (2005).

7.0503021046

Ahmed, A. M., Miyoshi, S., Shinoda, S., and Shimamoto, T., Molecular characterization of a multidrug-resistant strain of enteroinvasive *Escherichia coli* O164 isolated in Japan, J. Med. Microbiol. 54(3), 273-278 (2005).

8.0508101036

Ahmed, A. M., Nakano, H., and Shimamoto, T., Molecular characterization of integrons in non-typhoid *Salmonella* serovars isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron, J. Antimicrob. Chemother. 55(3), 371-374 (2005).

9.0508101046

Ahmed, A. M., Furuta, K., Shimomura, K., Kawamoto, H., and Shimamoto, T., Characterization of a multidrug-resistant isolate of *Salmonella* Paratyphi B from Japan, J. Antimicrob. Chemother. 56(1), 250-250a (2005).

10.0602101054

Ahmed, A. M., Kawamoto, H., Inouye, K., Hashiwata, Y., Sasaki, M., Seno, M., and Shimamoto, T., Genomic analysis of a multidrug-resistant strain of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 causing a family outbreak in Japan, J. Med. Microbiol. 54(9), 867-872 (2005).

11. Ahmed, A. M., Kawaguchi, F., and Shimamoto, T., Class 2 integrons in *Vibrio cholerae*, J. Med. Microbiol. in press.