

# 逆転写酵素遺伝子を含むレトロンによる病原性発現調節とゲノム多様性との関係

● 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 multicopy single-stranded DNA (msDNA) と呼ばれる RNA-DNA 複合体の合成を行っており、グラム陰性細菌に広く分布している。逆転写酵素遺伝子は、ゲノム上で msDNA をコードする領域 (*msr-msd*) とともにレトロンと呼ばれるオペロンを形成しており、一種の可動性遺伝子だと考えられている。これまでのところ逆転写酵素や msDNA の生理的意義について、詳細は明らかになっていない。

病原細菌由来の msDNA は、一本鎖 DNA のステム部分が安定な二本鎖構造となっている。そこで、研究代表者は、msDNA が核酸医薬品として利用されているデコイ核酸のように転写制御因子を結合する、あるいは DNA アプタマーとして他の代謝系などに影響を与えることによって他の遺伝子の発現制御を行っているのではないかと仮説を立てた。

また、これまでに研究代表者が行った研究成果として、コレラ菌の野生株と逆転写酵素欠損株との遺伝子発現状況を比較するマイクロアレイの結果より、コレラ菌の病原性関連遺伝子群（コレラ毒素遺伝子 *ctxAB* や腸管定着因子の遺伝子 *tcpA* など）の発現量に大きな違いが見られており、逆転写酵素あるいは msDNA による病原性関連遺伝子群の発現制御が示唆されている。さらに、*Salmonella* の逆転写酵素欠損変異株は野生株よりもマウスに対する病原性が強くなっていることが示されている。本研究では、この病原性関連遺伝子群発現制御の詳細なメカニズムを明らかにすることを大きな目的としている。また、上記の仮説を支持する結果としてコレラ菌内で msDNA に結合するタンパク質の存在も明らかにしている。本研究によって得られる成果は、病原性発現ネットワークの新たな分子メカニズムを解明する可能性を持っており、それを明らかにすることによって細菌感染症の新たな治療法の開発に結びつく可能性がある。また、代表者の msDNA のデコイ核酸仮説（DNA アプタマー仮説）が実証されれば、遺伝子の転写制御研究という基礎的な分野でも、まったく新しい転写制御形式を提唱するものであり各研究分野に与えるインパクトは極めて大きいと考えている。

## <2008 年度の研究の当初計画>

### (1) 種々の病原細菌よりレトロンの単離・同定

まず種々の病原細菌からレトロンの単離・同定を行う。レトロンの有無を調べるためには、逆転写酵素産物である msDNA の有無を調べる方法が一般的である。新たな msDNA が発見された場合は、その塩基配列を解析し、逆転写酵素遺伝子を含むレトロンのクローニングを行う。逆転写酵素遺伝子を含むゲノム配列が明らかになっている病原細菌においては、PCR を用いてレトロンのクローニングを行う。

### (2) 逆転写酵素遺伝子欠損株の作製と関連遺伝子群の網羅的発

## 現解析

研究代表者は、レトロンの機能として msDNA が他の遺伝子（特に病原性関連遺伝子群）の発現制御に関与しているのではないかと考えている。そこで、マイクロアレイを用いて野生株と逆転写酵素欠損変異株との遺伝子の発現状況の違いを網羅的に調べる。コレラ菌以外に *Salmonella* やその他の病原細菌で逆転写酵素遺伝子欠損変異株を作製し、マイクロアレイで解析を行った後、個々の遺伝子に関して詳細な遺伝子発現状況の解析を行う。さらに、レトロンには逆転写酵素遺伝子以外の機能未知の他の遺伝子が存在しているが、それらについても同様の解析を行う。

### (3) カイコを利用した逆転写酵素遺伝子欠損株の病原性解析

欠損変異株と野生株との病原性の比較は、カイコを利用して検定する。この方法はすでに確立されており、病原細菌の新たな病原因子の探索系として注目されている。

### (4) msDNA 結合タンパク質の単離・解析

msDNA は、その構造的特徴から転写制御因子を吸収することによって他の遺伝子の発現調節を行うデコイ核酸や DNA アプタマーとして機能する可能性が考えられている。特にコレラ菌においては、病原性遺伝子の発現調節に関与している可能性があり、すでに msDNA の DNA 部分に特異的に結合するタンパク質の存在が明らかになっている。そこで、磁気ビーズを利用して msDNA に結合するタンパク質の単離・解析を行う。

## <2008 年度の成果>

### (1) 種々の病原細菌よりレトロンの単離・同定

コレラ菌の類縁菌である *Vibrio mimicus* より新たなレトロンを単離し、解析を行った。*V. mimicus* CS30 株由来のレトロン-Vm85 は、遺伝子構成や逆転写酵素産物である msDNA-Vm85 の塩基配列・推定二次構造が *Salmonella* 由来のレトロン-St85、msDNA-St85 と似ていることが明らかになった。さらに、レトロン-Vm85 の周辺の塩基配列を解析したところ、腸炎ピブリオのレトロン-Vp96 と同様に、ファージの integrase や recombinase に類似の遺伝子が見つかり、レトロンを含む約 12 kb の可動性遺伝因子が direct repeat を介して dihydrouridine synthase 遺伝子内に挿入されていることが明らかになった。また、*V. mimicus* CS18 株は、別のレトロンを保有しており、msDNA の配列を利用した inverse PCR 法によってレトロンの配列の一部が明らかになっている。

さらに、パレスチナ由来の多剤耐性大腸菌からは、以前 *Salmonella* Enteritidis で発見されたプラスミド性のレトロンと類似のレトロンが見つかった。この大腸菌も *S. Enteritidis* の場合と同様に特徴的な二本鎖 DNA を合成していると考えられた。

### (2) 逆転写酵素遺伝子欠損株の作製と関連遺伝子群の網羅的発現解析

レトロロン及び msDNA の機能解析を目的としてレトロロン -Vc95 を保有する O139 コレラ菌 (*V. cholerae* O139) 野生株 (MDO-6), *ret* 遺伝子欠損変異株, *ret* 遺伝子相補株, msDNA 大量産生株の 4 株を用いた比較解析を行った。病原性関連遺伝子の発現を誘導する AKI 培地で培養した 4 株から RNA を調製し, DNA マイクロアレイを用いて発現量の異なる遺伝子を網羅的に調べた。その結果, コレラ菌の ToxRS-ToxT 発現制御系による調節を受ける病原性遺伝子である *ompU*, *toxR*, *toxS* の発現量が野生株と比較して, *ret* 遺伝子欠損変異株で 2.0 倍以上に上昇し, 病原性に関与すると考えられる他の 2 遺伝子 (VC1317, VC1579) の発現量は 1/12 以下に低下した。これらの遺伝子の発現変化は *ret* 遺伝子相補株において回復しなかったこと, およびレトロロン -Vc95 内に含まれている *ret* 遺伝子下流の機能未知の遺伝子 (*orf540*, *orf205*) の発現量が *ret* 遺伝子内へのアンピシリン耐性遺伝子の挿入による極性効果を受けて低下していたことから, 上記の病原性関連遺伝子はレトロロン内の他の遺伝子の影響を受けているものと推測された。

一方, 野生株と *ret* 遺伝子欠損変異株との間で発現量に差があり *ret* 遺伝子相補株において発現量の回復が認められた遺伝子も複数検出されており, これらの遺伝子は *ret* 遺伝子に直接あるいは間接的に影響を受けていると考えられることから今後の解析によって *ret* 遺伝子の機能解析につながるものと期待される。

(3) カイコを利用した逆転写酵素遺伝子欠損株の病原性解析

(2) で述べたコレラ菌 4 株をそれぞれカイコの血リンパと腸管に接種し, 病原性の比較を行った。その結果, いずれもカイコに対する病原性の強さは, msDNA 大量産生株>野生株> *ret* 遺伝子相補株> *ret* 遺伝子欠損変異株, の順となり, msDNA の産生量に対応していた。一方, リアルタイム PCR 法で調べた *ompU* 遺伝子の発現量は, msDNA 大量産生株<野生株< *ret* 遺伝子相補株< *ret* 遺伝子欠損変異株, と逆の相関関係を示した。この結果は, (2) で述べたマイクロアレイの結果と一致しており, カイコに対する病原性に関しても逆転写酵素 (レトロロン) の関与が示された。

(4) 薬剤耐性菌における薬剤耐性遺伝子を含む可動性遺伝子の解析

可動性遺伝子の 1 つであるインテグロンは, 薬剤耐性遺伝子を内部の遺伝子カセットとして含んでいることが知られている。逆転写酵素の機能の 1 つとしてインテグロンの遺伝子カセットの形成が推測されており, 薬剤耐性遺伝子の解析が逆転写酵素の機能解析につながる可能性がある。今年度は, エジプトにおける下痢症の子牛由来の大腸菌とチーズ由来の腸内細菌について薬剤耐性遺伝子の解析を行った (成果公表リスト 1 と 2)。いずれの分離株からもクラス 1 とクラス 2 のインテグロンが検出された。しかし, チーズ由来の大腸菌からアミノグリコシド耐性遺伝子 *aadA22* が見つかった以外は特に目新しい遺伝子はなかった。

<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ロンに関する研究は, 国内外を含めて非常にユニークな研究テーマである。これまでにチェコの研究グループ (Rychlik ら) が *Salmonella* Typhimurium 由来のレトロロン -St85 に関して病原性との関連性の観点から研究を行っており, 逆転写酵素およびレトロロン内の機能未知の遺伝子のいずれもが *S. Typhimurium* の病原性に関与していることが示されている。この結果は, コレラ菌における研究代表者の研究成果と一致

している。しかし, 彼らはレトロロンと病原性の関与に関するメカニズムについてはまったく解析を行っておらず, コレラ菌における全遺伝子の網羅的解析を含む本研究成果は貴重である。また, 以前より研究代表者が行ってきた薬剤耐性遺伝子とレトロロンの関連性に注目している点は, 他に例がなくきわめてユニークである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

msDNA は, その構造的特徴から転写制御因子を吸収することによって他の遺伝子の発現調節を行うデコイ核酸として機能すると考えている。そのため, msDNA 結合タンパク質を単離・解析することが必要である。本年度の当初の予定では msDNA 結合タンパク質を単離する予定であったが, 対象とするタンパク質がコレラ菌内で予想以上に発現量が少なく, 解析に足りるだけのタンパク質量が得られていない。

<今後の課題>

上述のように, msDNA 結合タンパク質の解析は, 逆転写酵素およびレトロロンの機能解析を行う上で重要な意味を持っている。次年度の研究の大きなテーマの 1 つである。さらに, *ret* 遺伝子相補株において発現量が回復した遺伝子は, 逆転写酵素あるいは msDNA によって直接あるいは間接的に影響を受けている遺伝子である。特に 1 つの遺伝子は転写制御因子の遺伝子であることから msDNA によるデコイ核酸の標的となる可能性がある。この点も次年度の研究で明らかにしていく予定である。

<成果公表リスト>

1)論文/プロシーディング

1. 0901152049

Ahmed, A.M., Younis, E.E., Osman, S.A., Ishida, Y., El-Khodery, S.A., and Shimamoto, T.: Genetic analysis of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from diarrheic neonatal calves, *Vet. Microbiol.*, in press.

2. 0901161307

Hammad, A.M., Ishida, Y., and Shimamoto, T.: Prevalence and molecular characterization of ampicillin resistant *Enterobacteriaceae* isolated from traditional Egyptian Domiati cheese, *J. Food Prot.*, in press.