九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

腸炎ビブリオ(Vibrio parahaemolyticus)の”生きているが培養できない”(VBNC)状態とその誘導因子に関する研究

日野，まど香

https://doi.org/10.15017/1470641

出版情報：九州大学，2014，博士（システム生命科学），論文博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

KYUSHU UNIVERSITY

第１章　序論

一部の細菌は、ある環境下では生きているが、通常の寒天平板培地や液体培地では培養することができない生理状態になっていることが知られている。1985 年にこのように通常の培養条件では培養できないものの何らかの生理活性を示す生理状態を、米国・メリーランド大学の Colwell らは、VBNC（viable but nonculturable）状態と提唱した [1)]。現在までに、大腸菌、カンピロバクター、サルモネラなどの食中毒原因菌をはじめ 50 種以上の細菌がこの VBNC 状態に移行することが報告されている [2)]。この VBNC への移行の要因の多くは、低温、飢餓条件であるが、紫外線などの太陽光線、塩分などの浸透圧、通気、乾燥、各種の金属塩、塩素処理などによる例も報告されている [3)]。

食品衛生法で定められている食中毒菌の検査法の多くは、寒天平板培地を用いる培養法である。つまり、VBNC 状態の菌の存在は細菌が生きているにも関わらず検出できないために、細菌汚染の度合いの判定を誤ることを示唆する。そのため、VBNC 状態に移行した菌を通常の状態に回復させ培地上で検出できるようにする必要がある。これまでに VBNC 状態の *Vibrio cholerae* に温和な加熱を加えたり [4)]、大腸菌 O157 に H_2O_2 を分解する化合物を加えたりすることで [5)]、コロニー形成能が回復することが示されているが、その回復は十分でない。

また、VBNC 状態の病原菌の毒性についても研究が行われており、大腸菌や *Legionella pneumophila* は VBNC 状態であっても毒性を保持していたと報告されている [6, 7)]。また、ネズミの腸管を繰り返し通過させると、*Campylobacter jejuni* の VBNC 細胞が培養できるようになり、毒性も回復することが証明されている [8)]。したがって病原菌は VBNC 状態であっても公衆衛生及び食品衛生において脅威となることから、VBNC 状態の解明は非常に重要であると考えられる。

VBNC 状態とは、生きているが培養できない状態のものの総称であるため異なったメ

カニズムが含まれるが、その一つとして細菌が生き残るためにストレス環境下で休眠状態となったものがあるといわれている。VBNC に関与する特異的な因子は不明であるが、近年、Hayes と Low は VBNC にトキシン／アンチトキシン（TA）システムが関与していると推測している[9]。

TA システムは、細胞死や細胞の増殖阻止をもたらすトキシンと、その毒性を抑制するアンチトキシンより構成されている。当初は F-プラスミドが大腸菌内で増殖を維持するために獲得した分子装置と考えられていたが[10]、1993 年に大腸菌の染色体上にも存在することが見出され[11]、様々な環境ストレスに応じて DNA 複製やタンパク質合成反応を調節する細菌の生き残り戦略に関与する分子と考えられている[12]。TA システムは、その構成やアンチトキシンの性質によって、タイプⅠ～Ⅴの 5 種に分類されておりその中でもタイプⅡ型が最もよく研究されている。タイプⅡ型は、安定なトキシンタンパク質と不安定なアンチトキシンタンパク質から構成されており、通常はトキシンとアンチトキシンが複合体を形成することで、トキシンの毒性を抑制している[13]。また、複合体とアンチトキシンは、自身のオペロンのプロモーターに結合することで転写の制御もしている（Fig. 1-1A）[14、15]。しかし、アミノ酸飢餓や炭素源の枯渇などの環境ストレスにさらされると、Lon、ClpXp あるいは ClpAP のようなプロテアーゼによってアンチトキシンが分解され、遊離したトキシンにより増殖抑制や細胞死に至る（Fig. 1-1B）[16、17]。トキシンの毒性のメカニズムは多様で、タイプⅡ型だけでも、ジャイレース阻害、mRNA の分解、タンパク質合成阻害、ペプチドグリカン生合成阻害がある[18]。大腸菌では、染色体上に少なくとも 36 種の TA システム遺伝子を保有しており、タイプⅡ型の 6 種の TA システム *relBE*、*mazEF*、*chpBIK*、*yefM/yoeB*、*dinJ/yafQ*、*mqsA/mqsR* は、その生化学的性質についてもよく研究されている。また、RelBE、MazEF、YefM/YoeB、MqsRA は、トキシンとアンチトキシンの複合体、もしくはトキシンの構造も明らかにされている。これらの研究により、MazF と ChpB はリボソーム非依存性の mRNA interferase[19、20]、

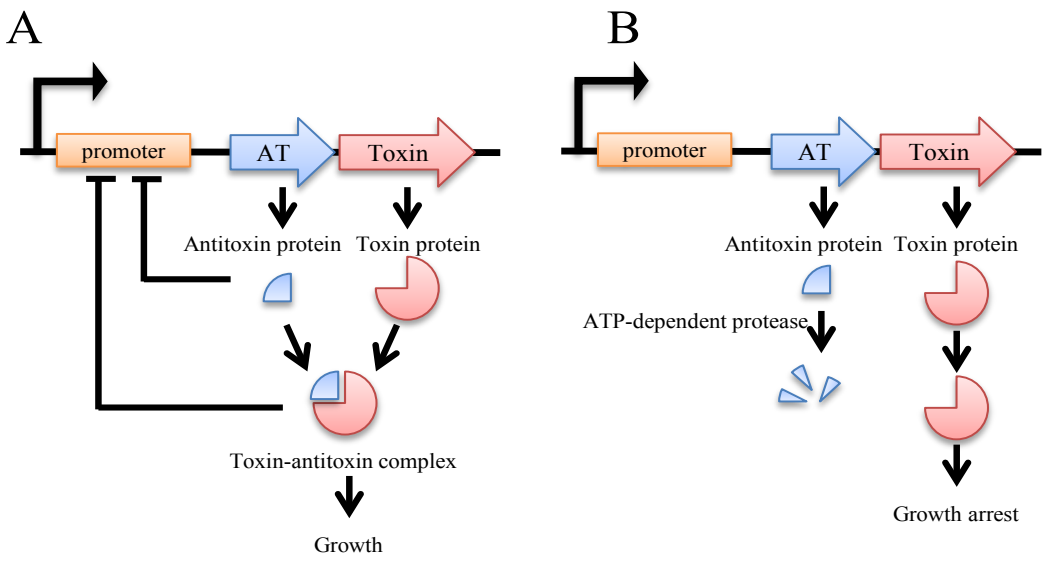


Fig. 1-1 Regulation of type II TA system under normal condition (A) and stress condition (B). The figure was cited from the reference 15.

RelE、YoeB 及び YafQ はリボソームの A サイトで mRNA を切断するリボソーム依存性の mRNA interferase であることが報告されている [21、22、23]。

本研究では、日本において細菌性食中毒の原因菌として常に上位を占め、衛生上問題とされている腸炎ビブリオ食中毒の原因菌である腸炎ビブリオ（*Vibrio parahaemolyticus*）に着目した。腸炎ビブリオは海洋に広く分布する好塩性（至適塩濃度 3%）のグラム陰性の短桿菌で、TDH（thermostable direct hemolysin）と呼ばれるタンパク質の耐熱性溶血毒、及びその類似溶血毒である TRH（TDH-related hemolysin）を産生する [24]。発育温度域は 10～42℃であるが最適温度域は 35～37℃で、10℃以下では発育しない。また、pH 5.6～9.6 で発育するが、最適 pH は 7.6～8.0 である。最適条件での発育世代時間は約 9 分であり、大腸菌等と比べ増殖がきわめて速いのが特長である。普通、細菌の染色体は 1 個の環状の DNA であるが、腸炎ビブリオの染色体は約 320 万と 190 万塩基対の 2 本の環状 DNA からなることも知られている [25]。この菌のコロニー形成能は、海水の温度と密接な関係をもち、実際、環境からの検出も夏期に集中して起こり、冬期にほとん

ど検出されない[26]。そのため、VBNC の概念が提起されて以来、腸炎ビブリオは冬期の間は VBNC 状態になって存在していると考えられている[27]。これまでに腸炎ビブリオが VBNC 状態に移行する条件やその回復ついてはいくつか報告がされているが[28、29]、VBNC 状態について十分に解明はできおらず、また、腸炎ビブリオの TA システムに関しての報告はない。本研究対象と同じビブリオ属の中では、*V. cholerae* が最も研究が進んでおり、保有している 13 個の TA システムのうち、*higBA* がコードするトキシン及びアンチトキシンの生化学的特性が報告されている[30、31]。*V. cholerae* も VBNC 状態に移行することは知られているが、VBNC と TA システムの関連については報告はない。

以上の背景から、本研究では、新たな食中毒菌汚染判定法開発のための基礎情報を提供することを目的として、腸炎ビブリオの VBNC 状態誘導因子について検討するとともに、VBNC 状態誘導へ関与が示唆されている TA システムの生化学的性質について検討した。

本学位論文では、第 2 章で腸炎ビブリオが VBNC 状態に移行する条件を調べ、VBNC 状態に移行した際の形態変化について観察を行った。また、VBNC 状態の腸炎ビブリオも培養可能な培地の探索も行った。第 3 章ではゲノム検索により腸炎ビブリオが TA システムを保有しているか検討し、第 4 章では見つかった TA 推定遺伝子が TA システムとして機能するか検討した。最後に、第 5～7 章では大腸菌を用いて TA 推定遺伝子の組換え体を作製し、発現精製後、それらの生化学的性質及び毒性について検討した。

第２章　腸炎ビブリオの VBNC 状態への誘導及び回復条件の検討

2-1　緒言

腸炎ビブリオは夏期は多く検出されるのに対して冬期は検出されなくなるため、VBNC 状態になって冬を過ごしていると考えられている。また、腸炎ビブリオと同じビブリオ属である *V. vulnificus* は、人工海水中で 5℃で 2～3 週間培養すると [32]、また *V. cholerae* O1 は栄養物をほとんど含まない培地中で、15℃で 1 ヵ月以上培養すると VBNC 状態に移行することが報告されている [33]。そこで本章では、1. 低温・低栄養、2. 低温・低栄養・低塩分、3. 中温・低栄養の 3 つ環境下で腸炎ビブリオがどのように VBNC 状態に移行するか調べた。また、VBNC 状態に移行した菌の形態の変化についても走査電子顕微鏡により観察した。

また、最近になり従来の寒天平板培地法による細菌の検出は、培養に時間がかかることや、VBNC 細菌の検出が難しく細菌数を過少評価してしまうといった欠点があるために、蛍光活性染色法 [34]や蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH 法）[35、36]、遺伝子増殖法（*in situ* PCR 法 [37]、*in situ* LAMP 法 [38]）、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE 法）[39]などが提唱されている。しかしながら、これらの手法は高額機器や高度な技術が必要であり、寒天平板培地法の簡便性には及ばない。そこで、VBNC 状態の細菌も培養できるような寒天平板培地を作製することを目的として、VBNC 状態から回復作用をもつ物質の探索を行った。なお、回復作用について調べる物質は、低栄養環境から普通寒天培地のような高栄養環境に移行させると、生理機構の撹乱（metabolic imbalance）が生じ、活性酸素が発生され細胞に損傷を与えているのではないかとの報告があるため [40]、種々の抗酸化物質と H_2O_2 消去作用をもつピルビン酸ナトリウムとした。

2-2　実験材料と方法

2-2-1　供試菌株

腸炎ビブリオは、*V. parahaemolyticus* WP-1（血清型 ; O4:K12、TDH＋、RIMD2210086）を用いた。なお本菌株は、九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食料化学工学講座食品衛生化学分野より分譲して頂いた。

2-2-2　VBNC 状態への誘導

腸炎ビブリオを 3%食塩添加普通ブイヨン（栄研化学）液体培地 5 ml に接種し、37℃にて 17 時間振とう培養を行なった。前培養液 100 µl を新しい液体培地 5 ml に加え、対数増殖期（OD_{660}=0.3）まで培養した。集菌後、3%食塩水で 3 回洗浄し 10^6 CFU/ml となるように 3%食塩水に懸濁し、10℃にて静置培養した。なお、低塩分の際には食塩水を 1.85%、中温の際には静置培養を 37℃に変えて行った。

2-2-3　菌数計測法

VBNC 状態へ誘導処理をした菌液に、Live/Dead BacLight bacterium viability kit（Molecular Probes）を終濃度 0.3%(v/v)になるように添加し、10 分間暗室に放置することで染色した。この染色法は、細胞膜の完全性による染色液の浸透性を利用した方法で、膜の損傷している菌体は赤色に無傷の菌体は緑に染まる。試料 2.5 µl をスライドグラスにのせ、気泡が入らないようにしてカバーグラスをかけ、落射型蛍光顕微鏡（OLYMPUS BX-FLA）にて、励起フィルター450～480 nm、吸収フィルター515 nm またはダイクロイックミラー500 nm を用いて、緑色に染色された菌を計測し生菌数を算出した。また、カバーグラスをバクテリア計算盤（サンリート硝子）上にのせたのち、菌懸濁液を一滴、計算盤上のカバーグラスの間に入れ、位相差顕微鏡（OLYMPUS BX-PHD）にてチャンバー内に分布する菌数を計測し、全菌数を算出した。培養可能菌数は、菌液を 10 倍連

続希釈後、1.85％食塩添加普通寒天培地に 100 µl 塗抹し、37℃で一晩培養することにより生じたコロニーを計測し算出した。

2-2-4　走査電子顕微鏡による観察

低温・低栄養・低塩分環境下で VBNC 状態へ誘導処理をした菌液を 3,500 rpm で 5 分間遠心し、集菌した。2％グルタルアルデヒド、3％NaCl、0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.4）を 500 µl 加え、室温で 2 時間振とうし固定した。固定後、0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.4）で洗浄し、1％オスミウム酸、3％塩化ナトリウム、0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.4）を 500 µl 加え、氷温で 1 時間振とうし再度固定した。固定化した菌体を 50％、70％、90％、100％エタノールで緩やかに脱水後、25％、50％、75％、100％ブタノールで徐々に置換した。0.1 %ポリリジン（Poly-lysine hydrobromide、MW 7,000-150,000、Sigma）でコーティングした SEMpore（日本電子）上に菌液をのせ、液体窒素を用いて完全に凍結させた。凍結させた試料は、そのまま走査電子顕微鏡(JSM-5500LV、日本電子)の試料室に入れ、低真空モード（真空度 30 Pa）で約 1 時間放置することで乾燥させた。乾燥が完了した試料は、イオンスパッター装置（JFC-1600、日本電子）を用いて 10 nm の厚さに白金をコーティングしたのち、走査電子顕微鏡を用いて高真空モード、加速電圧 15 kV、スポットサイズ 8～15 で観察を行った。

2-2-5　VBNC 状態からの回復物質の探索

低温・低栄養・低塩分環境下で VBNC 状態へ誘導処理した 5 と 6 日目の菌液 100 µl を、試薬を添加した寒天培地と無添加培地に塗抹した。その後、試薬を添加した寒天培地上に生じたコロニー数から算出される培養可能菌数と無添加培地のコロニー数から算出される培養可能菌数を比較し、添加試薬の回復作用の有無を検討した。添加試薬には、水溶性の抗酸化物質（ASA；アスコルビン酸、SAS；アスコルビン酸ナトリウム）

や油溶性の抗酸化物質（EPC；プロトカテキュ酸エチル、BHA；ブチルヒドロキシアニソール、BHT；ジブチルヒドロキシトルエン）、さらに、H_2O_2消去作用をもつピルビン酸ナトリウム（SPV）を用いた。油溶性の抗酸化物質はエタノールに、水溶性の抗酸化物質は水に溶解し、オートクレーブ滅菌後 50℃程度にさました培地に、0.00001～0.01%になるように添加した。ピルビン酸ナトリウムは、終濃度が 0.001～10%になるように計り取り、培地とともにオートクレーブ滅菌した。

2-3　実験結果

2-3-1　VBNC 状態への誘導（低温・低栄養環境下）

低温（10℃）、低栄養（3%NaCl）環境下で静置培養を行った結果、培養可能菌数は時間の経過とともにゆるやかに減少し、28 日目には観察されなくなった（Fig. 2-1）。この間の生菌数について蛍光顕微鏡で観察した結果、低温・低栄養処理を開始した数日間に多少菌数が減少したが、その後ほとんど変化がなく、培養可能な菌が観察されない 28 日でも 5.0×10^4 CFU/ml の生菌が存在していた。つまり、腸炎ビブリオは、低温・低栄養環境下で VBNC 状態に移行することがわかった。

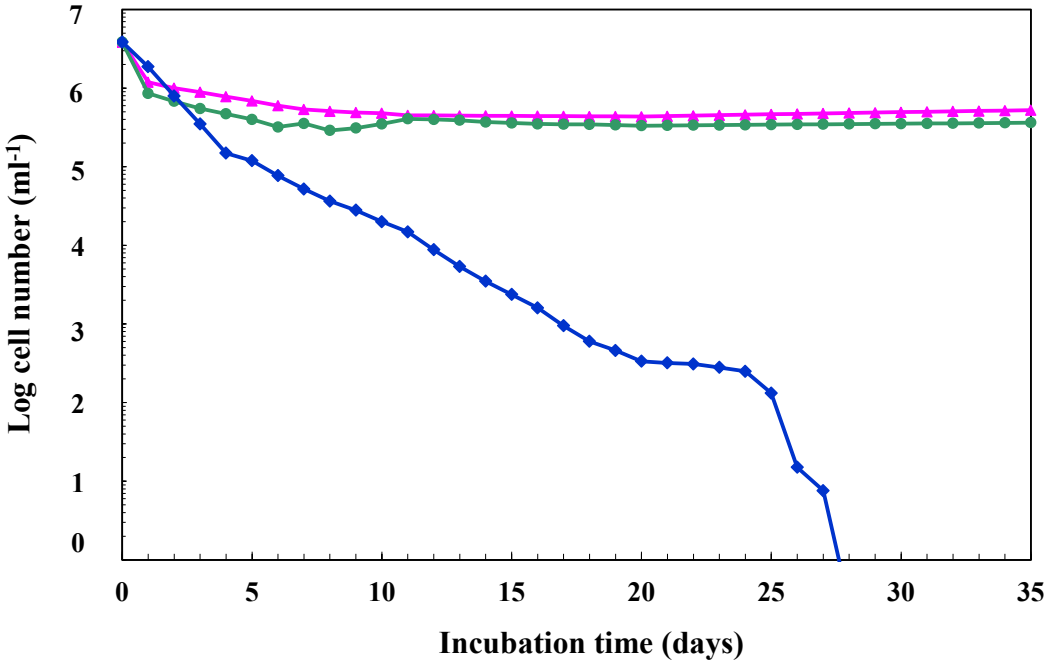


Fig. 2-1 Counts of *V. parahaemolyticus* incubated in 3% NaCl at 10℃. The total cell counts (▲), culturable counts (◆) and viable counts (●) are shown.

2-3-2　VBNC 状態への誘導（低温・低栄養・低塩分環境下）

低温（10℃）、低栄養・低塩分（1.85%）環境下で静置培養を行った結果、培養可能菌数は 3 段階の減少変化を示すことがわかった（Fig. 2-2）。つまり、はじめに培養可能菌数の直線的な減少（4 日間）後、減少がほとんど観察されない時期（3 日間）を経て、再び減少（3 日間）を示し、10 日目には培養可能な菌が観察されなくなった。一方、生菌数はゆるやかに多少減少したものの 10 日目でもまだ 5.0×10^4 CFU/ml 存在していた。このことから、低温・低栄養・低塩分処理により、腸炎ビブリオが VBNC 状態に移行することが明らかとなった。また、その移行は、低温・低栄養のときだけよりも早く、細菌にとってストレスとなる因子が多いほど、早く移行することがわかった。

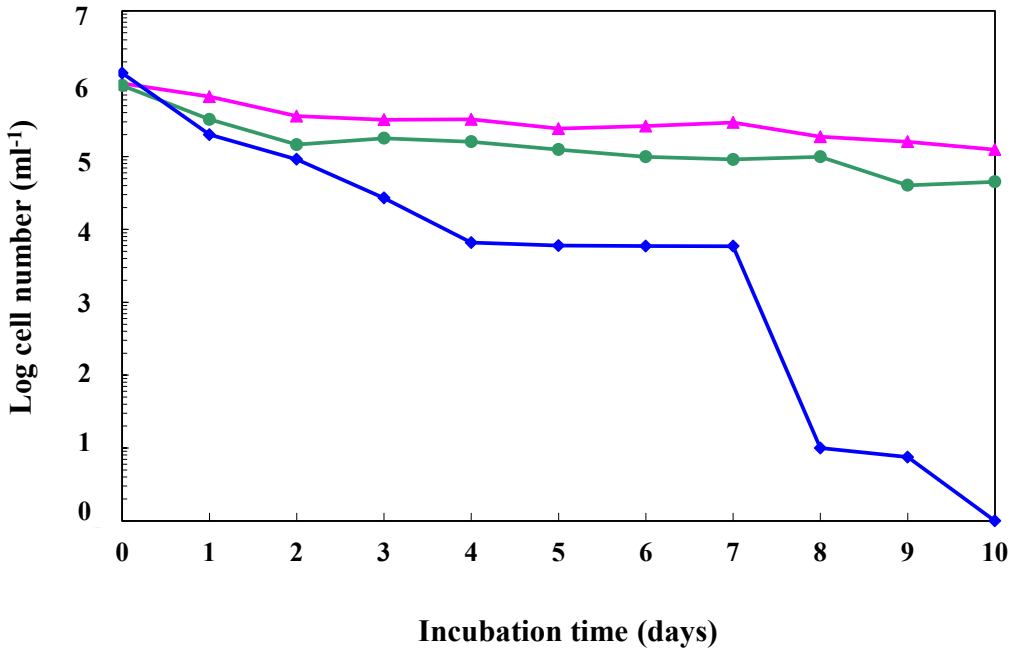


Fig. 2-2 Counts of *V. parahaemolyticus* incubated in 1.85% NaCl at 10℃. The total cell counts (▲), culturable counts (◆) and viable counts (●) are shown.

2-3-3　VBNC 状態への誘導（中温・低栄養環境下）

中温（37℃）、低栄養（3%NaCl）環境下で静置培養を行った結果、他の環境下と異なり直線的に培養可能菌数は減少し、50 時間（約 2 日）で培養可能な菌は観察されなくなった（Fig. 2-3）。その際の生菌数は 1.0×10^4 CFU/ml で、この環境下でも VBNC 状態に移行していることがわかった。しかしながら、培養可能菌数及び生菌数の減少は他の環境下より大きく、VBNC 状態でいる期間は他の環境下より短いと推測される。

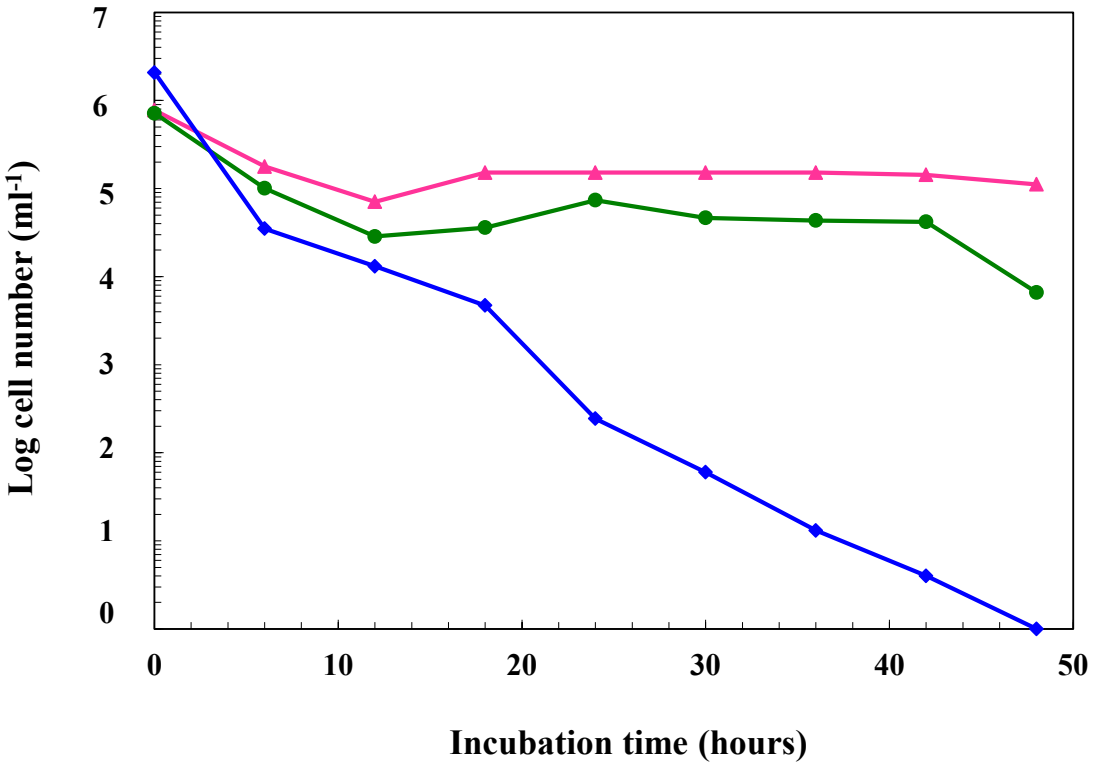


Fig. 2-3 Counts of *V. parahaemolyticus* incubated in 3% NaCl at 37℃. The total cell counts (▲), culturable counts (◆) and viable counts (●) are shown.

2-3-4　形態変化

低温（10℃）、低栄養・低塩分（1.85%）環境下での菌の形態の変化について、走査型電子顕微鏡で観察した結果、腸炎ビブリオの対数増殖期細胞は桿菌であったが、3 日目では丸みをおび、16 日目ではほとんどの菌が球形化していた（Fig. 2-4）。このことから、低温・低栄養・低塩分環境下を VBNC 状態になって生き延びている細胞は、球形化していることがわかった。

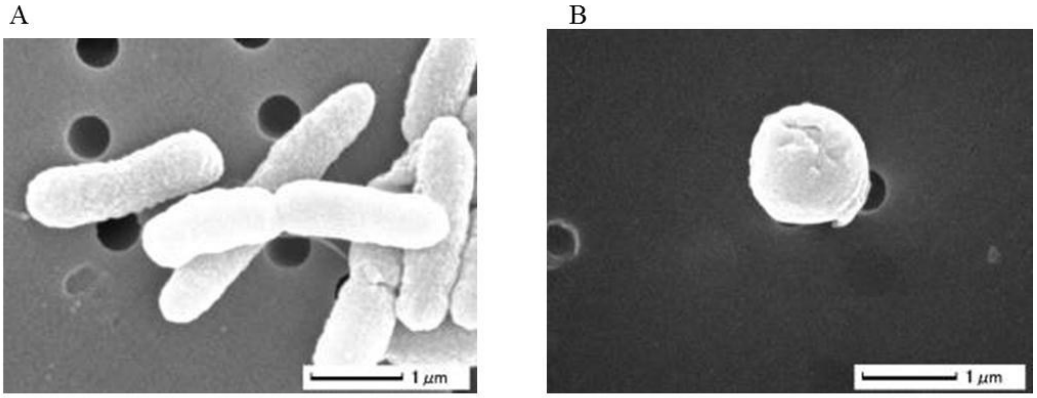


Fig. 2-4 Scanning electron micrographs of *V. parahaemolyticus*. (A) Log-phase cells. (B) Cells incubated for 16 days in 1.85% NaCl at 10℃.

2-3-5　VBNC 状態からの回復に及ぼす抗酸化物質の影響

VBNC 処理開始後 5 及び 6 日目の腸炎ビブリオ菌液を用いて、抗酸化物質に VBNC 状態からの回復作用があるか調べた（Fig. 2-5）。得られた無添加培地及び抗酸化物質添加培地での菌数をクラスカル・ウォリス検定により比較した結果、VBNC 処理開始後 5 及び 6 日目ともに有意な増加はみられなかった。つまり、油溶性と水溶性ともに抗酸化物質に VBNC 状態からの回復作用がないことがわかった。また、VBNC 処理開始後 5 日目では、0.01％EPC、0.01％BHT 及び 0.00001％SAS 添加培地に塗抹したときに、無添加培地に塗抹したときと比較して、菌数が有意に減少していた（すべて $p<0.05$）。VBNC 処理開始後 6 日目では、0.01％EPC と 0.01％BHT 添加培地に塗抹したときに、菌数が無添加培地と比較して減少していたが有意差はみられなかった。この理由については不明であり、今後の研究課題である。

なお、油溶性抗酸化物質を培地に添加する際に、培地中に加えられたエタノール（0.001％～0.0001％）の影響について確認したところ、コロニー数の増減は見られず、添加エタノールの影響はなかった。

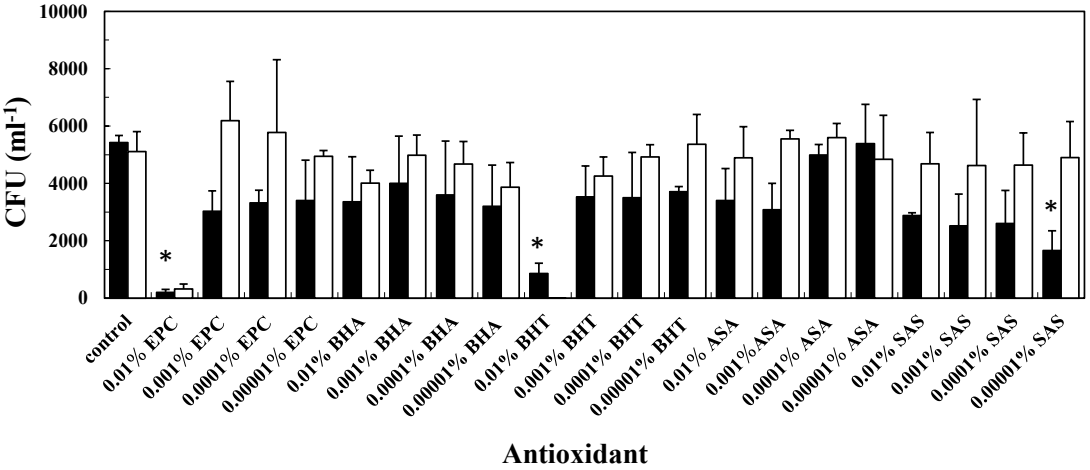


Fig. 2-5 Resuscitation of nonculturable *V. parahaemolyticus* by the addition of antioxidants to agar plates. Colony counts of cells incubated in 1.85% NaCl at 10℃ for 5 day (solid bars), 6 days (open bars). Significant decreases in colony counts as compared with controls are marked by asterisks (＊, $P < 0.05$). The results describe the average of three independent experiments. Error bars indicate standard deviations. EPC, Ethyl protocatechuate; BHA, Butyl hydroxyanisold; BHT, Butyl hydroxytoluene; ASA, Ascorbic acid; SAS. Sodium ascorbate.

2-3-6　VBNC 状態からの回復に及ぼすピルビン酸ナトリウムの影響

ピルビン酸ナトリウム（SPV）に VBNC 状態からの回復作用があるか調べた結果、VBNC 処理開始後 5 日目では、1%ピルビン酸ナトリウム添加培地に無添加培地の約 2.1 倍、VBNC 処理開始後 6 日目では無添加培地の約 5.6 倍のコロニーが形成された（Fig. 2-6）。先と同様の検定を行った結果、VBNC 処理開始後 6 日目の菌液を 1%ピルビン酸ナトリウム添加培地に塗抹した場合のみ、無添加培地と比較して有意な（$p<0.05$）菌数の増加がみられた。また、ピルビン酸ナトリウムの添加によって、生菌がどの程度培養可能になっているか検討したところ、無添加培地では実際の生菌の 4.4%しか培養できないのに対して、１%ピルビン酸ナトリウムを添加したときには、実際の生菌の 9.4%（5 日目）及び 31.3%(6 日目)まで培養可能になっていた。

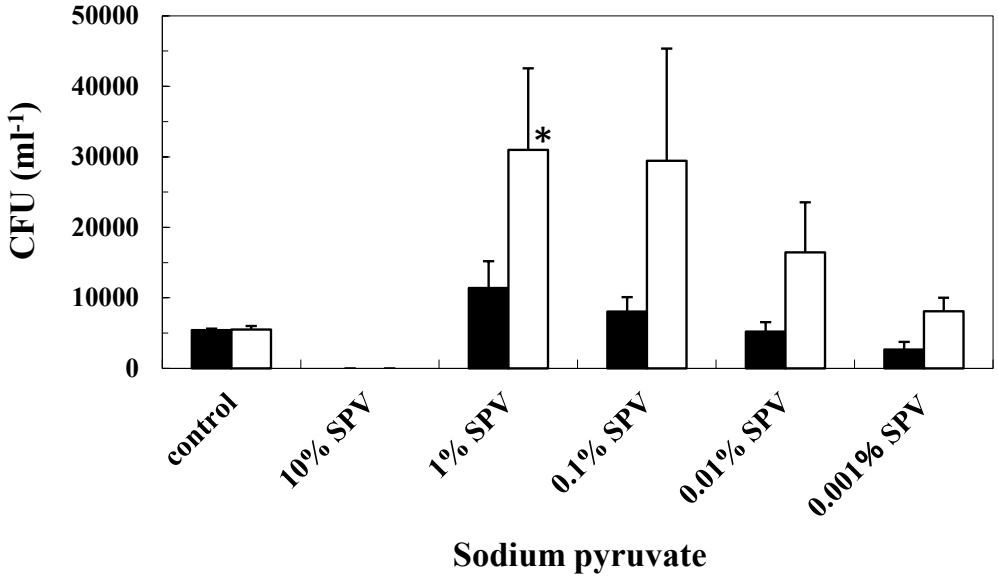


Fig. 2-6 Resuscitation of nonculturable *V. parahaemolyticus* by the addition of sodium pyruvate (SPV) to agar plates. Colony counts of cells incubated in 1.85% NaCl at 10℃ for 5 day (solid bars) and 6 days (open bars). Significant decreases in colony counts as compared with controls are marked by asterisks. The results describe the average of three independent experiments. Error bars indicate standard deviations.

2-4　考察

本章では、食中毒菌である腸炎ビブリオの対数増殖期細胞が、1. 低温（10℃）、低栄養（3%NaCl）、2. 低温（10℃）、低栄養・低塩分（1.85%）、3. 中温（37℃）、低栄養（3%NaCl）の 3 つの環境下でどのように VBNC 状態に移行するか調べた。その結果、3 つの環境下すべてで腸炎ビブリオは VBNC 状態に移行することがわかった。低温条件下の 2 条件の培養可能菌数及び生菌数の減少パターンは似ていたが、低塩分のストレスが多い方がより早く、生きている細菌のすべてが VBNC 状態に移行した。3 つの環境の中では中温・低栄養条件が最も早く、すべての細菌が VBNC 状態に移行したが，生菌数の減少が他の環境下より大きくその期間は短いと推測される。先の報告で、同じビブリオ属である *V. vulnificus* は人工海水、5℃で 2～3 週間培養すると VBNC 状態に移行すること [32]、*V. cholerae* O1 は、栄養物をほとんど含まない培地で 15℃で 1 ヵ月以上培養すると VBNC 状態に移行することが報告されている [33]。このことから、低栄養と低温の 2 つの因子がビブリオ属菌が VBNC 状態に移行するのに大きな因子であるといえる。

次に、VBNC 状態に移行した際の腸炎ビブリオの菌の形態について観察した結果、桿状から球形に変化していることが分かった。この点についても、他のビブリオ属と比較したところ、*V. vulnificus* は、人工海水中で 5℃で培養すると桿菌から球菌へ形態変化すること [32]、*V. cholerae* は，栄養素の欠乏により小型化することが報告されていることから [41]、今回明らかになった現象はこれらビブリオ属菌に共通した特徴であるかもしれない。

最後に、抗酸化物質（アスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリム、プロトカテキュ酸エチル、BHA、BHT）やピルビン酸ナトリウムが、VBNC 状態からの回復作用があるか検討した。VBNC 処理開始後 5 及び 6 日目の菌に抗酸化物質を添加しても回復作用は見られなかったが、1%ピルビン酸ナトリウムを添加したとき、5 日目の菌では無添加培

地の 2.1 倍、6 日目の菌では無添加培地の 5.6 倍のコロニーが形成された。つまり、無添加培地では実際の生菌の 4.4%しか培養できないのに対して、1%ピルビン酸ナトリウムを添加したときには、実際の生菌の 9.4%（5 日目）及び 31.3%（6 日目）まで培養可能になっていた。ピルビン酸ナトリウムは、活性酸素のスカベンジャー作用を有する物質であるため、先の報告[40]と同様に活性酸素が寒天培地上にコロニー形成する際の障害となっていることが考えられる。しかしながら、中野ら[42]と同様に、本研究でも標準偏差に示すように実験毎に回復作用にばらつきが大きく、回復にはさらに多様な因子が関係すると推測された。

以上より、ピルビン酸ナトリウムには VBNC 状態からの回復作用があることが示唆されたが、十分な回復作用ではないため、今後はさらに回復作用のある物質の検索や培養方法の検討をする必要がある。また、VBNC 状態に移行するメカニズムの解明も重要である。

2-5　小括

腸炎ビブリオが VBNC 状態に移行する条件を調べた結果、低温（10℃）、低栄養・低塩分（1.85%）環境下におくとゆるやかに VBNC 状態に移行し、約 10 日ですべての細胞が VBNC 状態に移行することが明らかとなった。また、VBNC 状態に移行すると腸炎ビブリオは球形化することもわかった。さらに、VBNC 状態から回復作用のある物質を探索したところ、今回調べた抗酸化物質にその効果はみられなかったが、ピルビン酸ナトリウムには多少の回復効果があることが示された。

第３章　腸炎ビブリオの TA システム遺伝子の検索

3-1　緒言

ほとんどの細菌は細胞の成長や死を調節するために、数多くの TA システムを有している[43、44]。例えば、大腸菌 K-12 のゲノム上には TA システム遺伝子が少なくとも 36 存在することが報告されている[45]。TA システムは、アンチトキシンの性質及び TA システムの構成により 5 つのタイプ（タイプ I ～V）に分類されており、アンチトキシンによるトキシンの活性の制御の方法は、タイプにより著しく異なっている（Fig. 3-1、Table 3-1）。

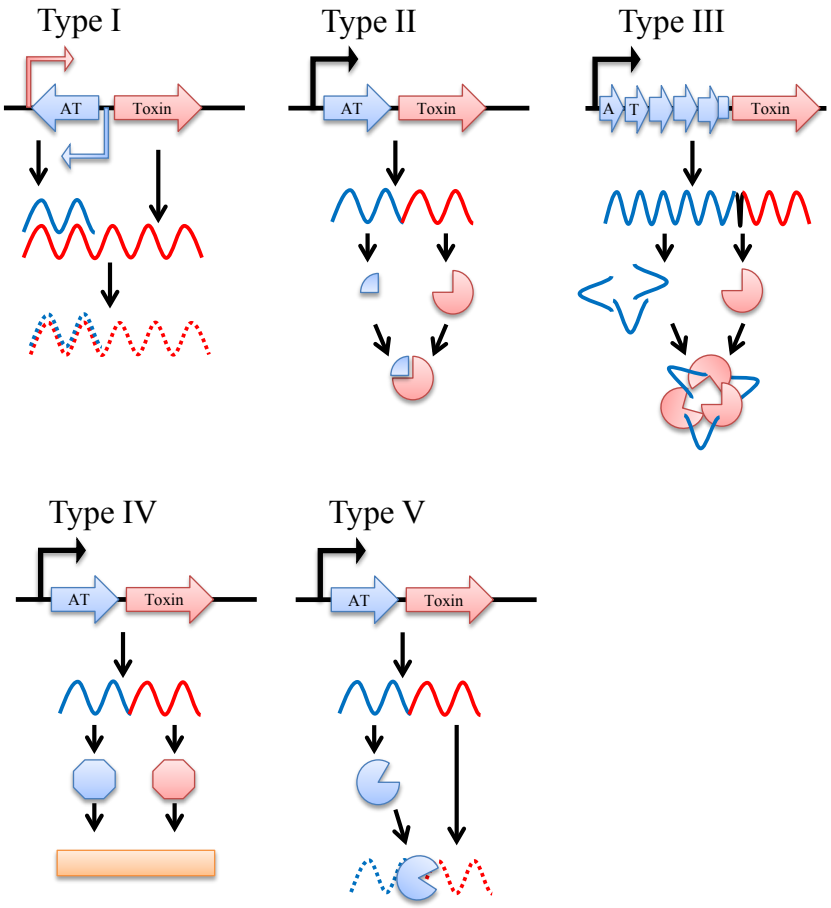


Fig. 3-1 Schematic representations of the currently known TA types. Toxin genes and proteins are depicted in red color, antitoxins (AT) in blue, mRNA as sinus curves. The figure was cited from the reference 18.

Table 3-1 The five currently known TA system types.

	Chemical nature of		Toxin inactivation mechanism
	Toxin	Antitoxin	
TypeI	Protein	RNA	Toxin's mRNA transcript is intercepted by the RNA antitoxin.
TypeII	Protein	Protein	Toxicity is prevented by formation of a TA complex.
TypeIII	Protein	RNA	Antitoxin inhibits toxicity by directly binding the toxin protein.
TypeIV	Protein	Protein	The toxin protein inhibits a target molecule, whereas the antitoxin molecule counteracts its effect.
TypeV	Protein	Protein	The mRNA encoding the small toxin is cleaved by the antitoxin.

The table was cited from the reference 18.

これら 5 つの TA システムのうちタイプⅡが最もよく研究されている。タイプⅡの TA システムは、一般的に安定なトキシンと分解されやすいアンチトキシンをコードする 2 つの遺伝子より構成され、通常数塩基がオーバーラップしている[46、47]。また、ほとんどの場合、トキシンの遺伝子の上流にアンチトキシンの遺伝子が位置しており、トキシンよりも先にアンチトキシンが産生されるようになっている[48]。タイプⅡの TA システムとして、大腸菌の *dinJ/yafQ*[49]、*yefM/yoeB*[50]、*relB/relE*[51]、*mazE/mazF*[52、53]、*chpS/chpB* (*chpBI/chpBK*)[20]、*mqsA/mqsR*[54、55]及び *V. cholerae* の *higB/higA*[30、31]などの生化学的性質及びその構造について明らかにされている。しかしながら、腸炎ビブリオの TA システムに関する報告はない。

本章では、腸炎ビブリオのゲノム上に TA システム遺伝子を保有しているのか検討した。また、TA システムではトキシンとアンチトキシンの複合体あるいはアンチトキシンがプロモーターの回文配列に結合して転写を抑制することが知られている[56、57]。そこで、見つかった遺伝子クラスターのプロモーター領域に回文配列が存在するかについても調べた。

3-2　実験方法

3-2-1　アミノ酸相同性に基づく TA システム遺伝子の検索

大腸菌の 6 種の TA システム（*dinJ/yafQ*、*yefM/yoeB*、*relB/relE*、*mazE/mazF*、*chpS/chpB*、*mqsA/mqsR*）及び *V. cholerae* の *higB/higA* の遺伝子産物のアミノ酸配列を指標として、World Wide Web (WWW)を用いた BLAST（http://blast.genome.jp/tools/blast）により腸炎ビブリオ RIMD2210633 株のゲノムデータベースについて検索をした。その際、これまで報告されている大腸菌と *V. cholerae* の TA システムと同じサイズで、2 つの遺伝子が隣接しているものに絞って検索をした（Table 3-2）。

Table 3-2 TA systems in *E. coli* and *V. cholerae*.

Bacteria	Operon	Protein	Toxin or antitoxin	Amino acids	Molecular mass(kDa)
E. coli	*mazEmazF*	MazE	Antitoxin	82	9.4
		MazF	Toxin	111	12.1
	chpBIchpBK	ChpBI	Antitoxin	83	9.3
		ChpBK	Toxin	116	12.5
	mqsRmqsA	MqsR	Toxin	98	11.2
		MqsA	Antitoxin	131	14.7
	relBrelE	RelB	Antitoxin	79	9.1
		RelE	Toxin	95	11.2
	yefMyoeB	YefM	Antitoxin	83	9.3
		YoeB	Toxin	84	10.2
	dinJyafQ	DinJ	Antitoxin	86	9.4
		YafQ	Toxin	92	10.8
V. cholerae	*higBA*	HigB	Toxin	117	13.8
		HigA	Antitoxin	105	11.7

3-2-2　アミノ酸配列の解析

腸炎ビブリオ由来推定 TA システムの遺伝子産物と既報の他生物由来の TA システムの遺伝子産物のアミノ酸配列の同一性を比較するために、CLUSTALW (http://blast.genome.jp/tools/clustalw)を用いて、多重配列アライメントを行った。

3-3　実験結果

3-3-1　TA システム遺伝子の検索

BLAST 解析をした結果、*vp1829/vp1830* と *vp1842/vp1843* の 2 種が *dinJ/yafQ* と相同性を示し、*vp1821/vp1820* が *yefM/yoeB* と相同性を示した。その他 5 つの TA システムと相同性の高い遺伝子クラスターは存在しなかった。さらに、各アミノ酸配列の同一性について、CLUSTALW を用いて解析した（Table 3-3）。

Table 3-3 Toxin-antitoxin homologues from *V. parahaemolyticus.*

Putative TA system	Protein	Amino acids	*E. coli* TA system	Identity
vp1821/vp1820	VP1821	99	YefM	45
	VP1820	90	YoeB	63
vp1829/vp1830	VP1829	94	DinJ	23
	VP1830	92	YafQ	18
vp1842/vp1843	VP1842	117	DinJ	22
	VP1843	92	YafQ	17

vp1829/vp1830 と *vp1842/vp1843* の遺伝子産物と、大腸菌の TA システムである *dinJ/yafQ* の遺伝子産物の同一性は約 20%であまり高くなかったが、*vp1821/vp1820* の遺伝子産物と *yefM/yoeB* の遺伝子産物は、約 50%の高い同一性を示した。腸炎ビブリオと大腸菌の TA システムタンパク質のアミノ酸配列の比較は、Fig. 3-2 及び Fig. 3-3 に示す。さらに、DinJ と相同性の高かった VP1829 と VP1842 を比較すると、VP1842 の方が N 末端側にアミノ酸が 23 残基長いが同一性は 96.8%で非常に高かった。また、VP1830 と VP1843 ではアミノ酸数は同じで、同一性は 90.2%で非常に高く、*vp1829/vp1830* と *vp1842/vp1843* の 2 つの遺伝子クラスターは非常に類似していることがわかった。一方、*V. cholerae* の *higB/higA* の遺伝子産物のアミノ酸配列を指標とした場合は、高い相同性を示すタンパク質は見つからなかった。

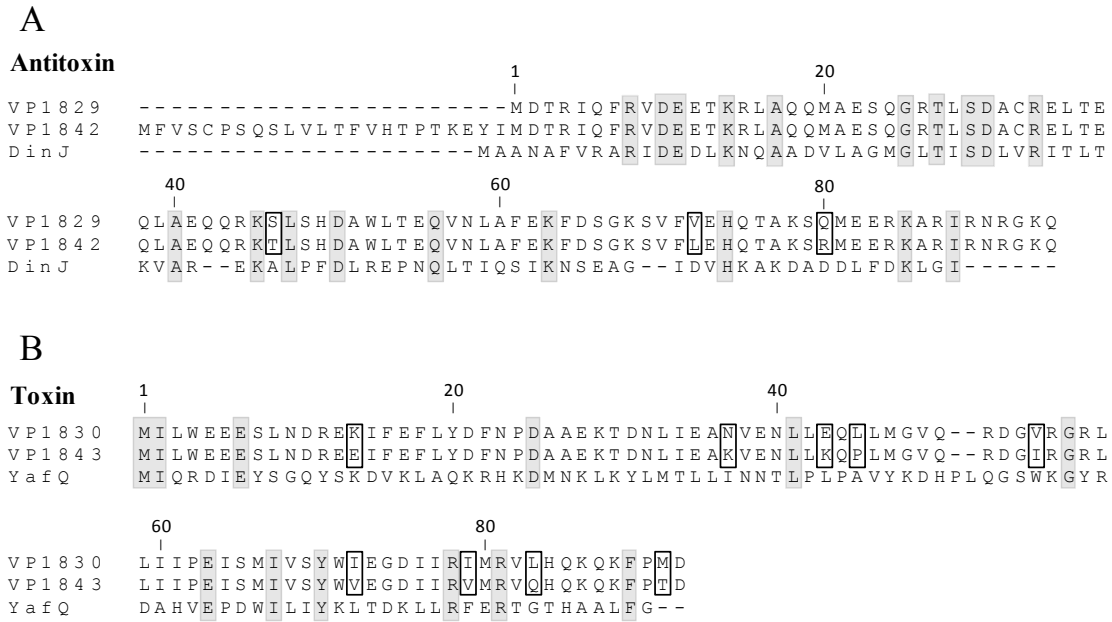


Fig. 3-2 Alignment of *V. parahaemolyticus* proteins with their homologues, DinJ/YafQ, in *E. coli* cells. Amino acids conserved completely in three proteins are indicated by grey boxes. Amino acid exchanges in the *V. parahaemolyticus* proteins are boxed. (A) Sequence alignments of DinJ antitoxin and its homologues. (B) Sequence alignments of YafQ toxin and its homologues.

A

```
Antitoxin   1                    20                   40                   60
            |                    |                    |                    |
VP1821      MKTILVPLNVHVEVLMRIVSFTEARNGLKAVLDGVVNDADTTVITRRDSEDAVVMSLDYY
YefM        ---------------MRTISYSEARQNLSATMMKAVEDHAPILITRQNGEACVLMSLEEY

                                 80
                                 |
VP1821      NSLMETVHLLRSPQNVEHLNRSIAQYRAGKTTARELIDE
YefM        NSLEETAYLLRSPANARRLMDSIDSLKSGKGTEKDIIE-
```

B

```
Toxin       1                    20                   40                   60
            |                    |                    |                    |
VP1820      MMSSSQRLLSWTDDAWDDYLYWQTQDKKTLKRINKLINDVKRSPFEGIGKPEPLKENLSG
YoeB        ------MKLIWSEESWDDYLYWQETDKRIVKKINELIKDTRRTPFEGKGKPEPLKHNLSG

                                 80
                                 |
VP1820      FWSRRIDDTNRLVYAVDDQAITIISCRYHY
YoeB        FWSRRITEEHRLVYAVTDDSLLIAACRYHY
```

Fig. 3-3 Alignment of *V. parahaemolyticus* proteins with their homologues, YefM/YoeB, in *E. coli* cells. Amino acids conserved completely in two proteins are indicated by grey boxes. (A) Sequence alignments of YefM antitoxin and its homologue. (B) Sequence alignments of YoeB toxin and its homologue.

3-3-2　プロモーター領域の回文配列の探索

BLAST 検索により見出された 3 つの遺伝子クラスターのプロモーター領域に、回文配列が存在しているのか検討した。その結果、すべてのプロモーター領域に回文配列が存在していることがわかった。大腸菌の *yefM* はプロモーター領域に TGTACA モチーフが 2 つ存在することが報告されているが [56]、今回 *yefM* のホモログとして見出された *vp1821* のプロモーター領域にもそのモチーフが 2 つ存在していた（Fig. 3-4）。

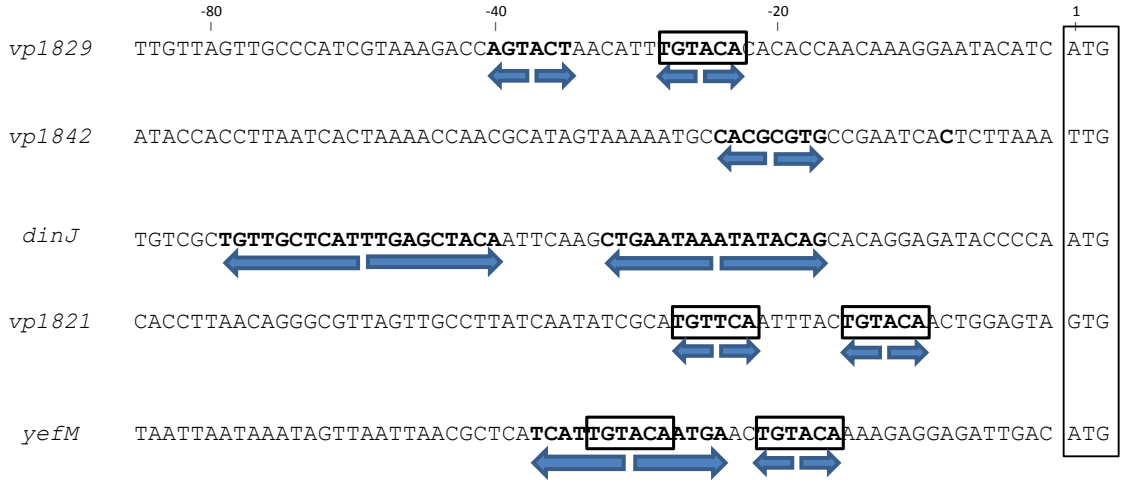


Fig. 3-4 Nucleotide sequences upstream from promoter regions of *dinJ*, *yefM* and their homologues. Possible palindromic sequences upstream of the gene clusters are indicated by opposing arrows. The TGTACA motifs are boxed.

また、*dinJ* では、その上流に 2 つの回文配列があり、その 1 つは LexA と非常に相同性が高いことが報告されている [58]。今回 *dinJ* のホモログとして見出された *vp1829* と *vp1842* の上流にも回文配列がみつかったが、*dinJ* の回文配列とは異なっていた。また、*vp1829* と *vp1842* の回文配列の相同性も低かった。しかしながら、*vp1829* の上流に存在する回文配列が *vp1842* の翻訳配列内に存在するか確認したところ、*vp1842* の 42～47 に *vp1829* と全く同じ TGTACA モチーフが存在することがわかった（Fig. 3-5）。*vp1842* の遺伝子産物（VP1842）は、*vp1829* の遺伝子産物（VP1829）と比較すると N 末端に

23 残基長いが、この TGTACA モチーフはこの領域に存在していた。

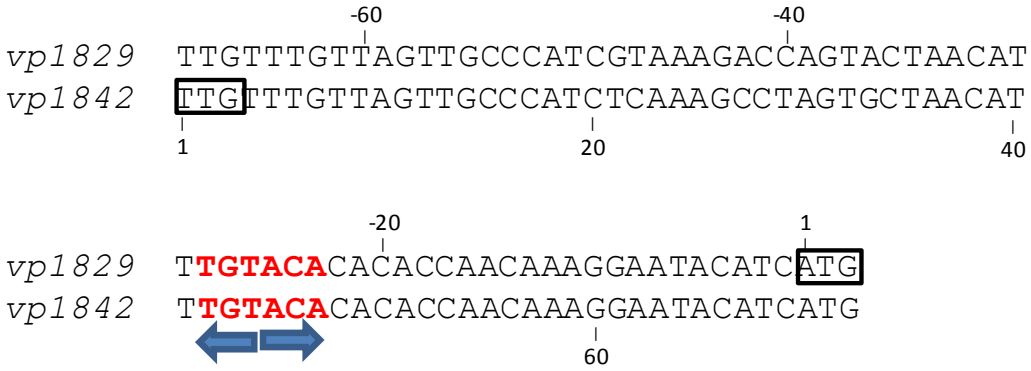


Fig. 3-5 Alignment of nucleotide sequences around promoters of *vp1829* and *vp1842*. Possible palindromic sequences upstream of the gene clusters are indicated by opposing arrows. The initiation codons are boxed.

3-4　考察

本章では、大腸菌の 6 種の TA システム（*dinJ/yafQ*、*yefM/yoeB*、*relB/relE*、*mazE/mazF*、*chpS/chpB*、*mqsA/mqsR*）及び *V. cholerae* の *higB/higA* の遺伝子産物のアミノ酸配列を指標として、腸炎ビブリオの TA システムと推測される遺伝子の検索を BLAST により行った。その結果、*vp1829/vp1830* と *vp1842/vp1843* が *dinJ/yafQ* と相同性を示し、*vp1821/vp1820* が *yefM/yoeB* と相同性を示した。CLUSTALW 解析により、これら 3 つの中では、*vp1821/vp1820* が大腸菌の TA システムと最も高い同一性を示すことがわかった。さらに、遺伝子の配置について比較したところ、大腸菌の *yefM/yoeB* は 4 塩基オーバーラップしているのに対して、そのホモログである *vp1821/vp1820* は 11 塩基オーバーラップしていた。また、大腸菌の *dinJ/yafQ* は、*dinJ* と *yafQ* の間に 2 塩基存在しているのに対して、そのホモログである *vp1829/vp1830* と *vp1842/vp1843* はともに 4 塩基オーバーラップしており、今回見つかった腸炎ビブリオの遺伝子は大腸菌の遺伝子配置と若干の相違がみられた（Fig. 3-6）。また、それぞれの遺伝子から推定されるタンパク質の

性質について調べたところ、YefM/YoeB と VP1821/VP1820 は、同じようにアンチトキシンが酸性タンパク質で、トキシンが塩基性タンパク質であったが、DinJ/YafQ はアンチトキシンが酸性でトキシンが塩基性であるのに対し、VP1829/VP1830 と VP1842/VP1843 はアンチトキシンが弱塩基性でトキシンが酸性とその性質が異なっていた（Table 3-4）。

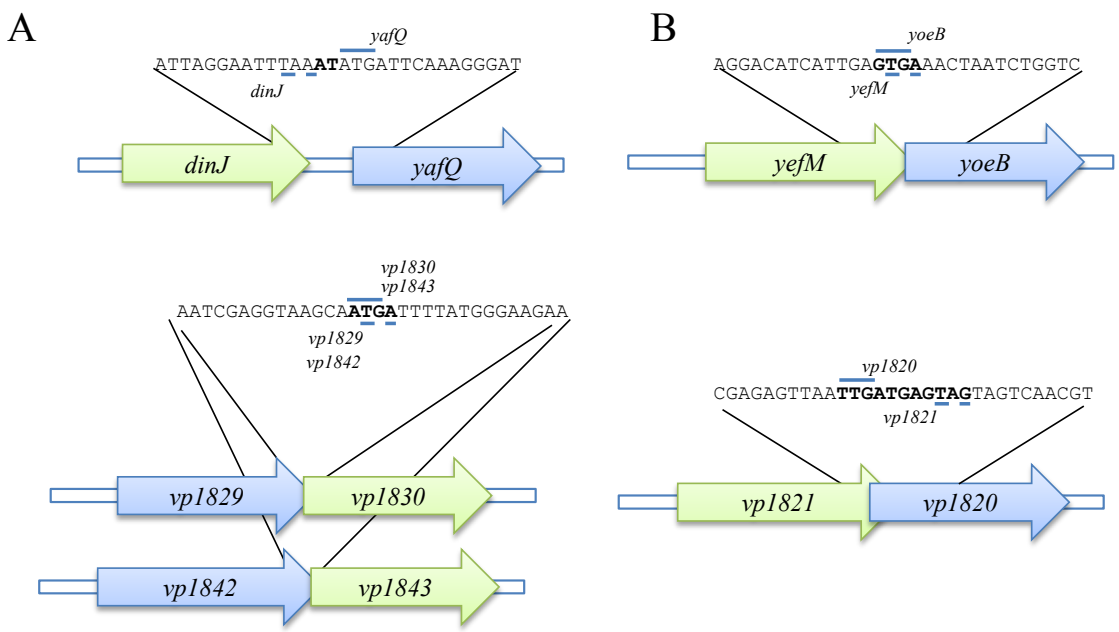


Fig. 3-6 Gene organization of putative *V. parahaemolyticus* TA systems and their homologues, *dinJ/yafQ* and *yefM/yoeB*, in *E. coli* cells. Initiation and termination codons are highlighted by straight and broken lines, respectively. Acidic and basic proteins are shown in green and blue, respectively.

Table 3-4 Calculated pI of TA system proteins of *E. coli* and *V. parahaemolyticus.*

Strain	Antitoxin	pI	Toxin	pI
E. coli	DinJ	5.28	YafQ	9.52
	YefM	5.13	YoeB	7.86
V. parahaemolyticus	VP1821	5.56	VP1820	7.83
	VP1829	7.92	VP1830	4.55
	VP1842	8.66	VP1843	4.66

また、今回みつかったタンパク質のアミノ酸配列を指標として BLAST 検索を行った結果、VP1821/VP1820 は海洋細菌である *Shewanella sediminis* の Ssed3814（YefM protein）/Ssed3815（hypothetical protein）と、VP1829/VP1830 と VP1842/VP1843 はともに *V. vulnificus* の VVA0313（RelB protein）/VVA0314（plasmid stabilization system protein）と高い相同性を示した。同じビブリオ属である *V. cholerae* の *higB/higA* の遺伝子産物のアミノ酸配列を指標とした場合は、相同性の高い遺伝子クラスターは見つからなかった。これは、TA システムは水平伝播により細菌が獲得していると推察されることから、同じビブリオ属であっても保有している TA システムは異なると考えられる。また、*V. cholerae* では染色体Ⅱ上に TA システム遺伝子が存在しているが、今回見つかった腸炎ビブリオの TA システムと推測される 3 つの遺伝子クラスターはすべて染色体Ⅰ上に見つかった。これは、*V. cholerae* では染色体Ⅱ上にスーパーインテグロンが存在するが、腸炎ビブリオでは染色体Ⅰ上に存在することに一致する [59]。

さらに、今回みつかった遺伝子クラスターのプロモーター領域には、大腸菌の *yefM* や *dinJ* と同様に回文配列が存在していた。VP1821 のアミノ酸配列は YefM と相同性が高かったが、*vp1821* のプロモーターにも *yefM* と同様に TGTACA モチーフが 2 つ存在し、*vp1821/vp1820* が TA システムのオペロンであることが強く示唆された。一方、*vp1829* と *vp1842* のプロモーター領域に存在する回文配列は、相同性のあった *dinJ* の回文配列

とは異なっており、また、推定されるタンパク質の等電点も異なることから、*vp1829/vp1830* と *vp1842/vp1843* は新たな TA システムである可能性も考えられた。

3-5　小括

大腸菌の 6 種の TA システム（*dinJ/yafQ*、*yefM/yoeB*、*relB/relE*、*mazE/mazF*、*chpS/chpB*、*mqsA/mqsR*）及び *V. cholerae* の *higB/higA* の遺伝子産物のアミノ酸配列を指標として、BLAST により腸炎ビブリオの TA システムの検索を行った。その結果、*dinJ/yafQ* と相同性を示す *vp1829/vp1830* と *vp1842/vp1843* と、*yefM/yoeB* と相同性を示す *vp1821/vp1820* が見出された。3 つの遺伝子クラスターともに配列の上流に回文配列があり、TA システムであることが推測された。しかし、遺伝子の配置及び遺伝子から推定されるタンパク質の性質を調べると、*vp1821/vp1820* は大腸菌の TA システムと共通点が多いが、*vp1829/vp1830* と *vp1842/vp1843* は異なることが多く、新たな TA システムの可能性も考えられた。

第４章　腸炎ビブリオの TA システム遺伝子の同定

4-1　緒言

前章で行ったゲノム情報検索により、腸炎ビブリオには 3 つの TA システムがあることが推測された。本研究ではその中でも、*dinJ/yafQ* と相同性が高い *vp1829/vp1830* と *vp1842/1843* に着目し、この 2 つの遺伝子クラスターが TA システムであるか同定を試みた。

まず、*dinJ/yafQ* などのタイプⅡ型の TA システムは、1 つのプロモーターによりアンチトキシンとトキシンが共転写されることが明らかとなっているため、RT-PCR により *vp1829/vp1830* 及び *vp1842/vp1843* が他の TA システムと同様にオペロンを形成し、ポリシストロン性 mRNA として転写されているか検討をした。

また、タイプⅡ型の TA システムのトキシンは細菌の増殖を阻害し、さらにその毒性はアンチトキシンと複合体を形成することで抑制されることが知られている [44]。そこで、トキシンと推測される *vp1830* と *vp1843* 及びアンチトキシンとの複合体 *vp1829/vp1830* と *vp1842/vp1843* を pBAD/Myc-A ベクターを用いて大腸菌内に組み込み、増殖能に与える影響を調べた。本実験は、当初、発現ベクターpET-22b と大腸菌 JM109 を用いて行った。大腸菌 JM109 は T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有していないため、挿入遺伝子の発現は行われないはずだが、他のプロモーターにより *vp1843* が発現してしまい *vp1843* を挿入したプラスミドを構築することができなかった。しかし、その過程で自然突然変異により生じた VP1843 の変異体を解析すると、45 番目のプロリンのコドン（CCT）が VP1830 の相当アミノ酸であるロイシンのコドン（CTT）に変化していた。そこで、VP1843 の毒性に関わるアミノ酸について明らかにするために、VP1830 の 9 つの変異体（K14E、N37K、E43K、L45P、V54I、I72V、I79V、L83Q、M91T）を作製し、大腸菌の増殖に与える影響を調べた。最後に、VP1843 の毒性について構造の観点から考察するために

VP1843 の推定高次構造モデルを作製した。

4-2　実験材料と方法

4-2-1　菌株

大腸菌は、JM109 (*recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *hsdR*17(r_K^- m_K^+), *e*14$^-$ (*mcrA*$^-$), *supE*44, *relA*1, Δ (*lac-proAB*)/F'〔*traD*36, *proAB*$^+$, *lac I*^{q}ZΔM15〕)、BL21 (DE3) codon plus RIL (F$^-$, *omp, hsdS*$_B$ (r_B^- m_B^-), *dcm*+ Tet^r, *ga,l λ l*(DE3) *endA* Hte [*argU ileY leuW* Cam^r])、LMG194 (F$^-$,ΔlacX74, gal E, thi, rpsL, ΔphoA(pvu Ⅱ) Δara714leu::Tn10)を使用した。腸炎ビブリオは、ゲノム解析が終了している *V. parahaemolyticus* O3:K6 株（TDH＋、RIMD2210633）を使用した。

4-2-2　培地及び試薬

大腸菌 JM109 と BL21 (DE3) codon plus RIL 株の培養には LB 培地（1% peptone、0.5% Yeast Extract、1%NaCl）、LMG194 株の培養には RM 培地（1×M9 Salts、2%Casamino Acid、1 mM $MgCl_2$）を用いた。10×M9　Salts は、Na_2HPO_4 60 g、KH_2PO_4 30 g、NaCl 5 g、NH_4Cl 10 g を約 900 ml の水に溶解し、10 M NaOH で pH 7.4 に調整後水で 1 L にし、オートクレーブにかけ冷却後、1 M のチミン水溶液を 1 ml 加え作製した。なお、プラスミドを含む場合は、アンピシリンが 50 μg/ml になるように加えた。寒天培地は、各培地にバクトアガー及びアンピシリンを各 1.5%、50 μg/ml になるように加えたものを用いた。腸炎ビブリオは、第 2 章と同様に培養した。RNA の抽出には RNeasy Mini Kit（Qiagen）、変異体の作製には PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit（タカラバイオ）を用い、その他の試薬は特級を用いた。

4-2-3　プラスミドベクター

1）pET-22b

目的遺伝子は、pET-22b（Novagen）上の強力な T7 ファージプロモーター下流に挿入され、宿主大腸菌により供給される T7 RNA ポリメラーゼにより強力に転写することができる。この T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子は宿主大腸菌染色体内に組み込まれており、lacUV5 プロモーター下流に位置するため、IPTG 添加による誘導で発現をコントロールできる。また、T7 ファージプロモーター下流に PelB 配列を持っており、組み込み方によっては目的遺伝子の N 末端に PelB 配列、または C 末端に His-tag をつけることもできる。

2）pBAD/Myc-His A

目的遺伝子は、pBAD/Myc-His A （Invitrogen）上の araBAD プロモーター下流に挿入されて、L-アラビノースの添加により発現させることができる。また、グルコースを加えることで cAMP レベルが低下し、未誘導の時の発現レベルを抑制できる。組み込み方によっては目的遺伝子の C 末端に myc epitope tag 及び His tag を付けることができる。

4-2-4　腸炎ビブリオからの RNA の抽出及び RT-PCR

腸炎ビブリオを 3%食塩添加普通ブイヨン液体培地に接種後、対数増殖期（OD_{660}=0.3）まで培養した。培養液 1 ml を集菌後、1 mg/ml リゾチームを 100 µl 加え溶菌し、RNasey Mini Kit を用いて RNA を抽出した。なお、完全にゲノム DNA を取り除くために、抽出過程及び抽出後の 2 回、DNase による分解を行った。Table 4-1 に示した特異的プライマー及び Reverse Transcriptase（Promega）を用いて得られた RNA から cDNA を合成後、cDNA を鋳型として KOD DNA polymerase（TOYOBO）を用いて PCR を行い、*vp1829/vp1830* と *vp1842/vp1843* が 1 つのオペロンとして転写されているかを確認した。

PCR による条件は、変性；98℃、10 秒、アニーリング；55℃、30 秒、伸長；68℃、30 秒である。なお、ポジティブコントロールとしてゲノム DNA、ネガティブコントロールとして逆転写反応を行ってない RNA を用いて PCR を行った。

Table 4-1 Oligonucleotides used in this study.

oligonucleotide	Sequence(5'-3')
1829-F	GAATACCAT**ATG**GACACTAGAATTCAA
1830-R	AGGAAGCTCGAGATCCATAGGAAATTT
1842-F	CACTCTCAT**ATG**TTTGTTAGTTGCCCA
1843-R	AAGAAGCTCGAGATCCGTAGGGAATTT

Restriction enzyme recognition sites are underlined, and initiation codons are highlighted in bold letters.

4-2-5　組換え DNA 実験

制限酵素（Fermentas）による DNA の切断は、添付の緩衝液を使用して各制限酵素について製造者が推奨する方法によって行った。また、DNA 断片の連結には Ligation-Convenience Kit（ニッポンジーン）を使用した。さらに、PCR 法による DNA の増幅には KOD DNA polymerase（TOYOBO）を、コロニーPCR には Go*Taq* DNA Polymerase（Promega）用いた。DNA の精製には Wizard Plus Minipreps DNA Purification System（Promega）を用いた。

4-2-6　pBAD/Myc-His A ベクターを用いた発現プラスミドの構築

pBAD/Myc-His A ベクターに *vp1830*、*vp1843*、*yafQ*、*vp1829/vp1830*、*vp1842/vp1843*、*dinJ/yafQ* の遺伝子を組み込むために PCR で用いるプライマーを作製した。その際、5'

側に *Nco*I、3'側 *Hin*dⅢの制限酵素サイトを導入した。作製したプライマーの配列を Table 4-2 に示す。

Table 4-2 Oligonucleotides used in this study.

oligonucleotide	Sequence(5'-3')
1829pBAD-F	CAAAGGCCATGGATATGGACACTAGAAT
1842pBAD-F	CGAATCACCATGGATATGTTTGTTAGTTG
183043pBAD-F	GTAATCGACCATGGAT**ATG**ATTTTATGGG
dinJpBAD-F	AGGAGCCATGGAT**ATG**GCTGCTAACGCGT
yafQpBAD-F	TTAGGACCATGGAT**ATG**ATTCAAAGGGAT
1830pBAD-R	CCAGAGGAAGCTT**TCA**ATCCATAGGAAAT
1843pBAD-R	CCAGAGGAAGCTT**TCA**ATCCGTAGGGAAT
yafQpBAD-R	CGGAAGAAGCTT**TTA**CCCAAAGAGCGCC

Restriction enzyme recognition sites are underlined, and initiation and termination codons are highlighted in bold letters.

作製したプライマーを用いて腸炎ビブリオのゲノム DNA を鋳型として、PCR により目的遺伝子の増幅を行った。PCR で増幅した DNA 断片は、精製後、制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化した pBAD/Myc-His A ベクターへクローニングした。ヒートショックにより大腸菌 LMG194 を形質転換し、コロニーPCR により目的の遺伝子が挿入されていることを確認後、ファスマック社にシーケンス解析を依頼し遺伝子配列の確認を行った。構築できたプラスミドは、pBAD-*vp1830*、pBAD-*vp1843*、pBAD-*yafQ*、pBAD-*vp1829/vp1830*、pBAD-*vp1842/vp1843*、pBAD-*dinJ/yafQ* と名付けた。

4-2-7　*vp1830* 及び *vp1843* 発現時の増殖曲線の作成

4-2-6 で構築した pBAD-*vp1830*、pBAD-*vp1843*、pBAD-*yafQ*、pBAD-*vp1829/vp1830*、pBAD-*vp1842/vp1843*、pBAD-*dinJ/yafQ* を有する発現用大腸菌を、37℃で 0.2%グルコースを含む RM 培地 40 ml にて OD_{590} が約 0.5 になるまで培養した。洗浄後、半分にわけ新しい RM 培地を 20 ml 加え、一方には 0.2%グルコース、もう一方には 0.2%アラビノースを添加し、37℃で振とう培養した。その際、発現したタンパク質が増殖における影響をみるために、30 分もしくは 1 時間毎に 590 nm における濁度を計測した。

4-2-8　pET-22b ベクターを用いた発現プラスミドの構築

pET-22b ベクターに *vp1830* と *vp1843* 遺伝子を組み込むために、まず PCR で用いるプライマーを作製した (Table 4-3) 。その際、発現ベクターに組み込むために 5'プライマー、3'プライマーそれぞれに制限酵素 *Nde*I と *Xho*I サイトを導入した。なお、3'プライマーは Table 4-1 で示した 1830-R と 1843-R を使用した。ベクターは pET-22b、大腸菌は JM109 を用い、4-2-6 と同様に発現プラスミドの構築を行った。構築したプラスミドを pET22b-*vp1830* と名付けた。

Table 4-3 Oligonucleotide used in this study.

oligonucleotide	Sequence(5'-3')
183043-F	TCGAGGTAACAT**ATG**ATTTTATGGGAAGAA

Restriction enzyme recognition site is underlined, and initiation codon is highlighted in bold letters.

4-2-9　VP1830 変異体の大腸菌増殖に対する影響

VP1830 のアミノ酸配列を VP1843 のアミノ酸配列に 1 か所ずつ変異した変異体（K14E、N37K、E43K、L45P、V54I、I72V、I79V、L83Q、M91T）を、4-2-8 で作製した pET22b-*vp1830*

プラスミドを鋳型として PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit を用いて作製した。ただし L83Q と M91T の変異体は、PCR により変異後、*Nde*I と *Xho*I で消化し pET-22b ベクターに挿入することで得た。VP1830 の変異した箇所を VP1843 のアミノ酸配列の比較とともに Fig. 4-1 に示す。変異反応後精製し、ヒートショック法により JM109 株を形質転換した。得られたコロニーのプラスミドの塩基配列を解析し、変異が入っていることを確認した。このプラスミド 200 ng を用いて JM109 100 µl を形質転換し LB 培地 20 ml に接種した。その後、37℃で振とう培養し、1 もしくは 2 時間毎に濁度を測定した。また、同様に BL21(DE3)RIL 株の形質転換も行い、LB 培地で培養後 OD_{590} が 0.5 に達したら終濃度が 1 mM になるように IPTG を添加し、1 時間毎に濁度を測定した。なお、L45P の変異の入ったプラスミドは作製することができなかったため、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit を用いて変異をかけた反応溶液を使用した。

```
           1                       20                      40
           |                       |                       |
VP1830     MILWEEESLNDREKIFEFLYDFNPDAAEKTDNLIEANVENLLEQLLMGVQRDGVRGRL
VP1843     MILWEEESLNDREEIFEFLYDFNPDAAEKTDNLIEAKVENLLKQPLMGVQRDGIRGRL

            60                      80
            |                       |
VP1830     LIIPEISMIVSYWIEGDIIRIMRVLHQKQKFPMD
VP1843     LIIPEISMIVSYWVEGDIIRVMRVQHQKQKFPTD
```

Fig. 4-1 Alignment of VP1830 and VP1843. Amino acid exchanges in the VP1830 and VP1843 are boxed. Mutated amino acids are shown by red letters.

4-2-10 VP1843 の推定高次構造モデルの作成

VP1843 の推定高次構造モデルを PDB において最も相同性の高かった *Caulobacter crescentus* の ParE (PDB code 3KXE) を鋳型として、Swiss-Model Server (http://swissmodel.expasy.org)を用いて構築し、PyMOL (http://www.pymol.org)を用いて構造を表示した。

4-3　実験結果

4-3-1　RT-PCR

腸炎ビブリオの対数増殖期細胞中で、*vp1829/vp1830* 及び *vp1842/vp1843* が転写されているのか、さらにそれがポリシストロン性の mRNA であるのかを確認するために RT-PCR を行った（Fig.4-2）。*vp1829/vp1830* と *vp1842/1843* のサイズはそれぞれ 564 と 633 塩基であるが、どちらも推定サイズに単一のバンドが検出され、ポリシストロン性の mRNA として転写されており、オペロンを形成していることがわかった。

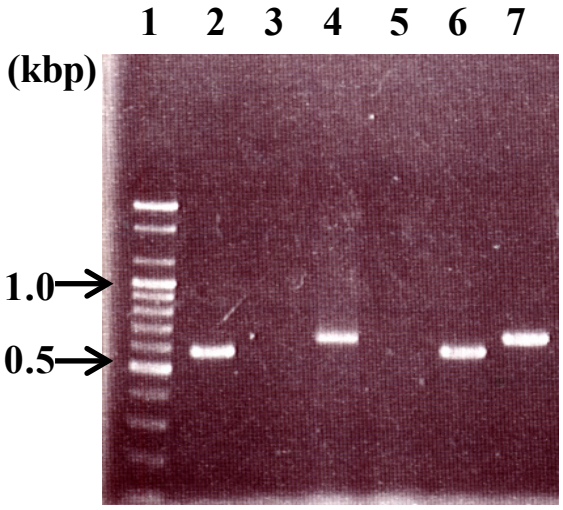


Fig. 4-2 RT-PCR of *vp1829/vp1830* and *vp1842/vp1843*. Lane 1, a 100 bp ladder marker; lane 2, RT-PCR for *vp1829/vp1830*; lane 3, RT-PCR for *vp1829/vp1830* without RT; lane 4, RT-PCR for *vp1842/vp1843,* lane 5, RT-PCR for *vp1842/vp1843* without RT; lane 6 and 7, PCR for *vp1829/vp1843* and *vp1842/vp1843* using the *V. parahaemolyticus* genomic DNA as a template, respectively.

4-3-2　*vp1830* 及び *vp1843* 発現の大腸菌増殖に対する影響

腸炎ビブリオのトキシンと推測される *vp1830* 及び *vp1843* と大腸菌のトキシンである *yafQ* 及び各複合体 *vp1829/vp1830*、*vp1842/vp1843*、*dinJ/yafQ* を発現させ、大腸菌の増殖に与える影響をみた（Fig. 4-3）。グルコースの存在下では、大腸菌の増殖に大きな影響はみられなかったが、アラビノース存在下では、*vp1843* と *yafQ* を発現するプラスミドを有する大腸菌の増殖が強く阻害された。また、この *vp1843* 発現による阻害は、*yafQ* 発現による阻害より強いものであった。一方、アラビノース存在下での *vp1830*、*vp1829/vp1830*、*vp1842/vp1843*、*dinJ/yafQ* の発現は、大腸菌の増殖に影響を与えなかった。このことから、*vp1842/vp1843* は腸炎ビブリオの TA システムとして働くことが示唆された。

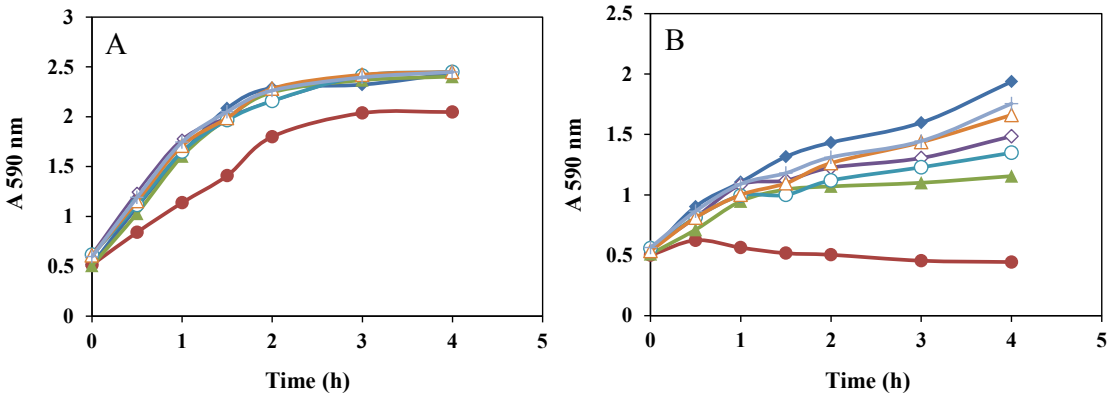


Fig. 4-3 Effects of the expression of *V. parahaemolyticus* toxin genes and of *E. coli* *dinJ/yafQ* on the cell growth of *E. coli* in the presence of 0.2% glucose (A) or 0.2% arabinose (B). ●, *vp1843*; ○, *vp1842/vp1843*; ◆, *vp1830*; ◇, *vp1829/vp1830*; ▲, *yafQ*; △, *dinJ/yafQ*; +, pBAD.

4-3-3　VP1830 変異体の大腸菌増殖に対する影響

pET-22b ベクターを用いて *vp1830* 及び *vp1843* を発現するプラスミドの構築を試みた結果、*vp1830* をベクターに挿入することができたが、*vp1843* はできなかった。しかしながら、*vp1843* をベクターにクローニングする過程で、VP1843 の 45 番目のプロリンのコドン（CCT）が VP1830 の相当アミノ酸であるロイシンのコドン（CTT）に自然に変異した VP1843 変異体を得ることができた。このことより、VP1843 は非常に毒性が高く、その毒性に 45 番目のプロリンが大きく寄与していることが示唆された。そこで、このことについて検証し、さらにその他の重要なアミノ酸を同定するために、VP1830 のアミノ酸を VP1843 のアミノ酸に変異した 9 種の変異体を作製し、大腸菌 JM109 の増殖に与える影響を調べた。まず、変異体を作製した結果、8 つの変異体を作製できたが、VP1830 の 45 番目のロイシンを VP1843 のプロリンに変異したプラスミドは作成することができなかった。そのため、L45P の変異体のみ PrimeSTAR mutagenesis kit を用いて変異反応をした溶液をそのまま使用し、変異ができた 8 つのプラスミドとともに大腸菌 JM109 を形質転換し、増殖に与える影響を調べた（Fig. 4-4）。その結果、大腸菌 JM109 であるにも関わらず N37K、L45P の変異体は完全に増殖が阻害された。一方、K14E、E43K、V54I、I72V、I79V、L83Q、M91T の変異体は、大腸菌の増殖に全く影響を与えなかった。

後者 7 つの変異体の増殖に与える影響をさらに検証するために、IPTG の添加により目的遺伝子の発現を誘導できる BL21 (DE3) codon plus RIL を形質転換し調べた（Fig. 4-5）。その結果、7 つすべての変異体は大腸菌の増殖に影響を与えず、VP1843 の毒性には、37 番目のリジンと 45 番目のプロリンが重要であることが明らかとなった。また、7 つの VP1830 変異体の発現チェックを SDS-PAGE で行ったところ、すべて発現していたが K14E の変異体のバンドだけ他より高い位置にシフトしていた。5-3-4 で後述したように VP1843 のバンドが VP1830 のバンドより高い位置に検出されることから、14 番

目のグルタミン酸が VP1843 の電気泳動の挙動に関係していることが示唆された。

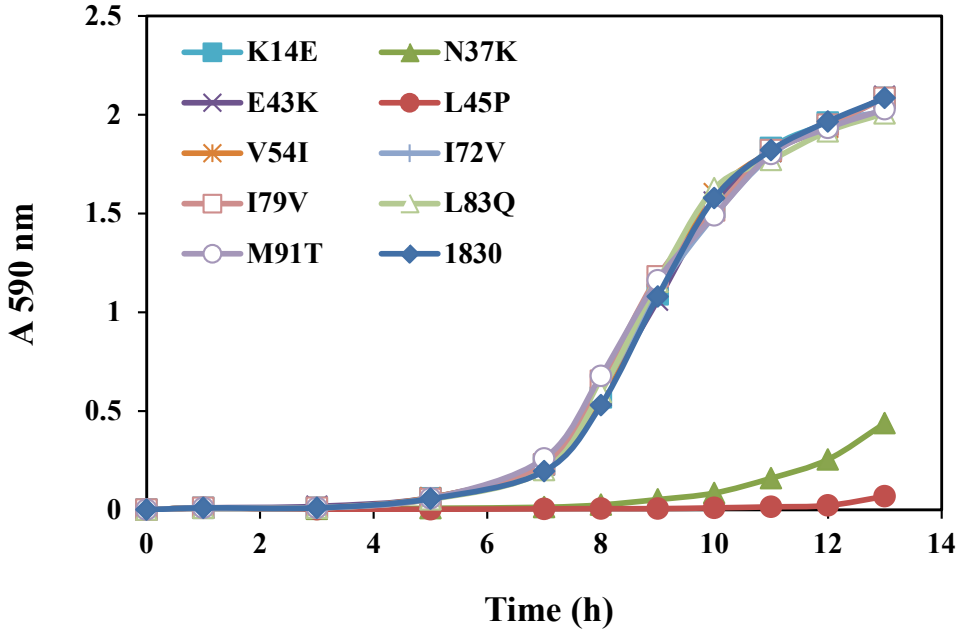
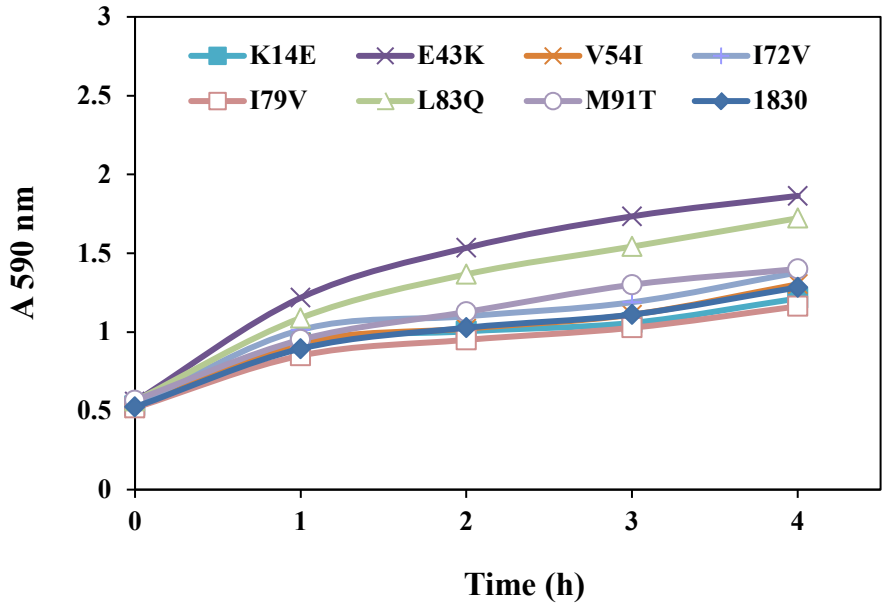


Fig. 4-4 Growth curves of *E. coli* JM109 cells harboring pET22b-*vp1830* and its mutant genes. ◆, *vp1830*; ■, K14E; ▲, N37K; ×, E43K, ●, L45P; ＊, V54I; ＋, I72V; □, I79V; △, L83Q; ○, M91T.

A



B

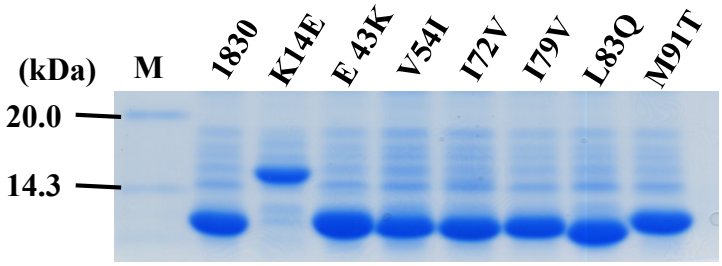


Fig. 4-5 Essential amino acid residues for the VP1843 toxicity. (A) Growth curves of *E. coli* BL21(DE3) codon RIL cells harboring pET22b-*vp1830* and its mutant genes. (B) Detection of the expressed proteins by SDS gel electrophoretic analysis.

4-4　考察

本章では、ゲノム解析で見出された *vp1829/vp1830* と *vp1842/vp1843* が腸炎ビブリオの TA システムであるか検討した。タイプⅡ型の TA システムのアンチトキシンとトキシンの mRNA は同じプロモーターにより共転写されるため、まず、*vp1829/vp1830* と *vp1842/vp1843* の転写の有無について RT-PCR によって確認した。その結果、ともにポリシストロン性の mRNA として転写されていることから、オペロンを形成していることが明らかとなった。次に、トキシンと推定される VP1830 及び VP1843 の毒性について、pBAD/Myc-His A ベクター及び pET-22b ベクターを用いて組換え体を作製し検討した。その結果、*vp1830* の発現は大腸菌の増殖を阻害しなかったが、*vp1843* の発現は大腸菌の増殖を阻害したことから、VP1830 は毒性を有せず、VP1843 は毒性を有していることがわかった。また、YafQ が DinJ と複合体を形成することで毒性が抑制されるのと同様に、VP1843 の毒性が VP1842 によって抑制されることも示された。これらのことから、*vp1842/vp1843* が腸炎ビブリオの TA システムとして機能していることが強く示唆された。さらに、VP1830 のアミノ酸を VP1843 のアミノ酸に変えた 9 つの変異体を作製することにより、37 番目のリジンと 45 番目のプロリンが、VP1843 の毒性に大きく寄与していることが明らかとなった。また、14 番目のグルタミン酸は、VP1843 の電気泳動の挙動に関係していることも示された。そこで、*C. crescentus* ParE の構造に基づいて VP1843 の推定高次構造モデルを作製したところ、Fig. 4-6 のように 14 番目のグルタミン酸と 37 番目のリジンは、それぞれ α1 と α2 上に位置し、その側鎖は分子表面に位置していた。また、45 番目のプロリンは、α2 と α3 の間に位置し長い α2 の形成を妨害しているようであった。以上から、VP1843 の N 末端のヘリックス（特に α2）が、VP1843 の毒性に重要であることが推察された。これまでに、VP1843 のホモログである YafQ は、50、63、87 番目のヒスチジン、67 番目のアスパラギン酸、68 番目のチロシン、83 番目のアルギニン、91 番目のヒスチジンを変異させると mRNA を切断出来なくなる

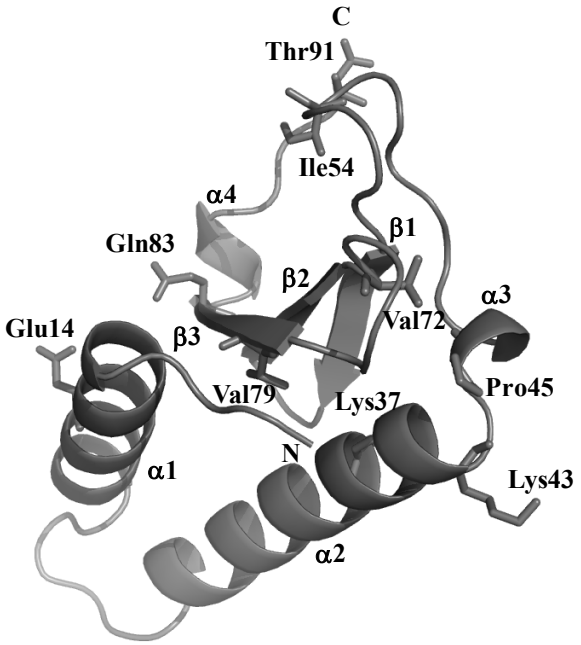


Fig. 4-6 A three-dimensional model of VP1843. The secondary structures are labeled, and N and C termini are indicated. The side chains of amino acids exchanged between VP1843 and VP1830 are indicated.

ことから、これらのアミノ酸が YafQ の毒性に関与していると推測されている[58]。また、YafQ と同じファミリーである RelE（*E. coli*）は 81 と 83 番目のアルギニン[60]、ParE （*C. crescentus*）は C 末端の 10 個のアミノ酸が毒性に関与していると示されている[61]。さらに、タイプⅡ型のトキシンではあるが RelE とは別のファミリーである MazF（*Bacillus anthracis*）は、59 番目のヒスチジンと 78 番目のグルタミン酸が酵素活性に重要であると報告されている。これらの 4 つのトキシンは C 末端側に位置する酸性または塩基性のアミノ酸が毒性に関与しており、今回示された VP1843 の毒性に重要なアミノ酸とは位置及び性質が異なっていた。そのため VP1843 は他のトキシンと異なった作用機構により毒性を発揮していることが示唆された。

本章の実験で pET-22b ベクターを用いた場合、*vp1843* を挿入したプラスミドと

VP1830 の L45P 変異体は、JM109 であっても作製することができなかった。pBAD/Myc-His A を用いると *vp1843* をベクターに挿入することができたが、培養すると *vp1843* の発現誘導前であるにも関わらず、O.D.が 0.5 に達するのに他の菌の培養時間の倍の時間を要し、十分に遺伝子発現を制御することができなかった。以上から、VP1843 の毒性は YafQ と比べて非常に強いことが示唆された。

4-5　小括

本章では、*vp1829/vp1830* と *vp1842/vp1843* が TA システムであるか同定を試みた。RT-PCR の結果、ともにポリシストロン性の mRNA として転写されていることがわかった。また、*vp1843* を大腸菌内で発現させると増殖は阻害されたが、*vp1842* と *vp1843* を同時に発現させると増殖が阻害されなかった。以上のことから、*vp1842/vp1843* は、TA システムであることが示唆された。一方、*vp1830* の発現は大腸菌の増殖に影響を与えず、*vp1829/vp1830* が TA システムとして機能しているか不明であった。さらに、VP1830 の変異体を作製することで、VP1843 の毒性には、N 末端の領域の 37 番目のリジンと 45 番目のプロリンが重要であることも明らかとなった。

第５章　腸炎ビブリオ TA システムのクローニング及び大腸菌内での発現と精製

5-1　緒言

前章の結果から *vp1829/vp1830* が TA システムであるかは不明であったが、*vp1842/vp1843* が TA システムであることが推測された。そこで、これらをさらに明らかにするために、本章では、pET-22b ベクターを用いてこれらの遺伝子を発現可能なプラスミドの構築を試みた。VP1842 はデーターベース上では TTG から翻訳が開始されることようになっているため、VP1829 と比較すると N 末端側に 23 残基長い。この部分には VP1829 と同じ回文配列があるため、24 番目のメチオニン（ATG）が翻訳開始点の可能性がある。そのため VP1842 の N 末端の 23 残基を欠損させた *vp1842/vp1843* を発現するプラスミドもあわせて構築した。その後、構築できたプラスミドを用いて大腸菌内で大量発現を行い、アンチトキシンとトキシンからなる複合体とトキシンを精製した。なお、比較対象として用いる *dinJ/yafQ* と *yafQ* のクローニング、タンパク質の発現と精製もあわせて行った。

5-2　実験材料と方法

5-2-1　菌株

大腸菌は、前章と同じ JM109、BL21 (DE3) codon plus RIL を使用した。また、腸炎ビブリオも同様の菌株を用いた。

5-2-2　pET-22b ベクターを用いた発現プラスミドの構築

4-2-6 と同様に、pET-22b ベクターに *vp1829/vp1830*、*vp1842/vp1843*、*dinJ/yafQ* を組み込み、発現プラスミドを構築した。*vp1829/vp1830*、*vp1842/vp1843* は Table 4-1、*dinJ/yafQ* は Table 5-1 に示したプライマーを使用した。なお、VP1842 の N 末端を 23 残基欠損さ

せる際は、5'側のプライマーとして 1829-F プライマーを用いた。構築したプラスミドは塩基配列を確認後、pET22b-*vp1829/vp1830*、pET22b-*vp1842/vp1843*、pET22b-⊿*N23vp1842/vp1843*、pET22b-*dinJ/yafQ* と名付けた。

Table 5-1 Oligonucleotides used in this study.

oligonucleotide	Sequence(5'-3')
dinJ-F	GATACCCAT**ATG**GCTGCTAACGCGTTTGTT
YafQ-R	AAGCGGCTCGAGCCCAAAGAGCGCCGCGTG

Restriction enzyme recognition sites are underlined, and initiation codons are highlighted in bold letters.

5-2-3　*vp1829/vp1830* と *vp1830* の発現及び精製

pET22b-*vp1829/vp1830* または pET22b-*vp1830* プラスミドを用いて発現用大腸菌 BL21(DE3)codon plus RIL をヒートショック法により形質転換した。得られたコロニーを 50 μg/ml を含む LB 培地に接種し、対数増殖期まで 37℃で培養した。その培養液を新しい LB 培地に少量加え、A_{590} が約 0.6 になるまで 37℃で培養後、IPTG（終濃度 1 mM）を加えさらに 4 時間培養することで、目的タンパク質の発現を行った。集菌後、ソニケーションバッファー（50 mM Tris-HCl、pH 8.0、1 mM EDTA、300 mM NaCl）で懸濁し、超音波により菌体を破砕し 35,000 rpm で 30 分遠心分離した。

次に、COSMOGEL His-Accept カラム（ナカライテスク）による精製を試みた。樹脂の 2 倍量の 100 mM $NiSO_4$ でカラムに Ni^{2+} を固定後、結合緩衝液（50 mM Tris-HCl、pH 8.0、500 mM NaCl）でカラムを平衡化した。平衡化したカラムに遠心分離後の上清を供し、樹脂の 6 倍量の結合緩衝液 及び 2 倍量の洗浄緩衝液（50 mM Tris-HCl、pH 8.0、500 mM NaCl、10 mM imidazole）で洗浄した。その後、4 倍量の溶出緩衝液（50 mM Tris-HCl、pH 8.0、500 mM NaCl、400 mM imidazole）により目的タンパク質を溶出した。各精製画

分については SDS-PAGE により確認した。溶出画分を 500 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl（pH 8.0）に一晩透析後、ゲル濾過 Sephacryl S-200 カラム（1.4×70 cm）でさらに精製を試みた。検出されたピークをもとに各フラクションを SDS-PAGE によって確認し、濃縮し精製標品とした。なお、VP1829/VP1830 のタンパク質は複合体として発現していることを確認するために、精製標品を RP-HPLC に供し各ピークを分取後、プロテインシークエンサーにより N 末端のアミノ酸配列を解析した。

5-2-4　*vp1842/vp1843* と *vp1843* の発現及び精製

pET22b-⊿*N23vp1842/vp1843* を用いて 5-2-3 に記載したように *vp1842/vp1843* の発現及び精製を行った。さらに、VP1843 を分取するために、精製した⊿N23VP1842/VP1843 を 0.1% TFA で平衡化した RP-HPLC カラム（4.6×250 nm、COSMOSIL 5C4-AR-300、ナカライテスク）に供した。アセトニトリルの濃度勾配により溶出した VP1843 を、あらかじめ 0.3 M NaCl を含む 2 M Tris-HCl（pH 7.8）を 1 ml 入れた三角フラスコで分取した。中性であることを確認後、すぐに 0.3 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl（pH 7.8）で透析した。最後に濃縮して、精製標品とした。

5-2-5　*dinJ/yafQ* と *yafQ* の発現及び精製

pET22b-*dinJ/yafQ* を用いて 5-2-3 に記載したように *dinJ/yafQ* の発現及び精製を行った。

YafQ は、松尾氏が報告した手法に準じて精製を行った [62]。5-2-3 に準じて COSMOGEL His-Accept カラムによる精製まで行った DinJ/YafQ を 8 M Urea を含む 20 mM Tris-HCl（pH 7.5）で透析し、複合体を単体に分離した。その後、SP Sepharose Fast Flow カラム（GE Healthcare）に供し、NaCl の 0～1 M の濃度勾配により DinJ と YafQ を分画した。SDS-PAGE により目的サイズのバンドのみられた画分をプールし、Slow dialysis により巻き戻しを行った。最後に、500 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl（pH 7.5）に透析し、

濃縮して精製標品とした。

5-3　実験結果

5-3-1　*vp1829/vp1830* の発現及び精製

発現チェックの結果、推定サイズに目的タンパク質の発現を確認できたので精製を行った。ゲル濾過 Sephacryl S-200 カラムでの溶出パターンを Fig. 5-1 に示す。SDS-PAGE の結果、24～31 のフラクションに VP1829（11.0 kDa）と VP1830（12.0 kDa）のバンド及び VP1829/VP1830 複合体と推測されるバンドがみられたため、この画分をプールし精製標品とした。また、この精製標品を RP-HPLC に供した結果、2 つのピークがみられ精製標品は複合体であることが確認された (Fig. 5-2)。さらに、精製標品の SDS-PAGE の泳動結果をみると 50～90 kDa 付近に複数のバンドがみられたが、RP-HPLC では 2 つのピークしかみられなかったことから、精製標品に他のタンパク質が夾雑しているのではなく、VP1829 と VP1830 が会合していると推測された。なお、RP-HPLC で得られたピークについてアミノ酸の N 末端解析をした結果、溶出時間が約 26 分のピークが VP1829 で、約 37 分のピークが VP1830 であることが確認できた。

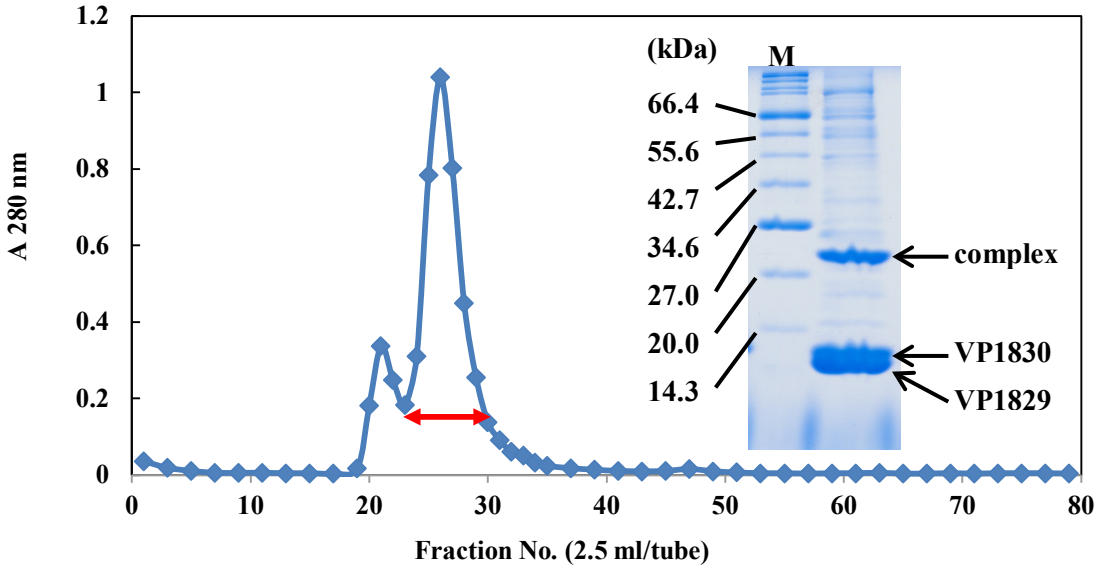


Fig. 5-1 Purification of VP1829/VP1830 by gel filtration chromatography on a Sephacryl S-200 column in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 500 mM NaCl. The fractions indicated by a red arrow were pooled and subjected to SDS-PAGE. The result of SDS-PAGE analysis of purified VP1829/VP1830 is shown in the insert.

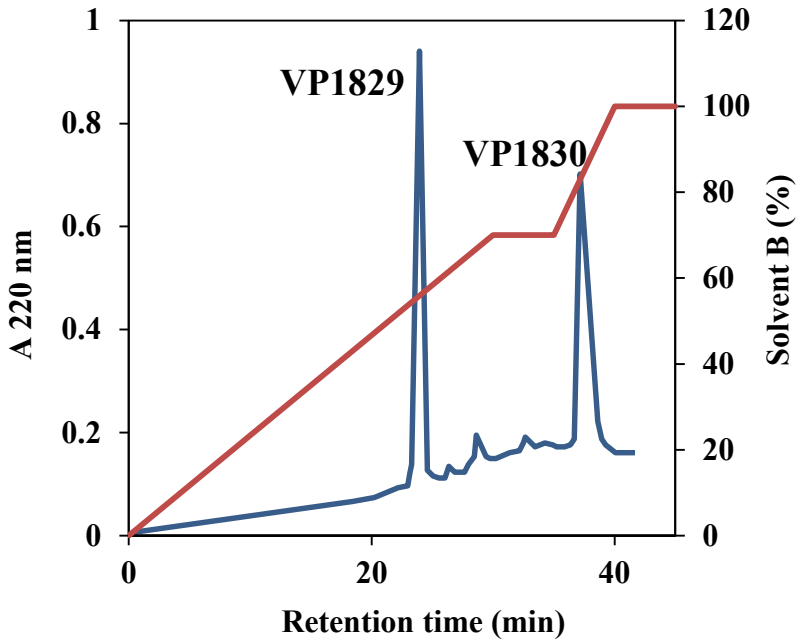


Fig. 5-2 RP-HPLC separation of VP1829 and VP1830.

5-3-2　*vp1830* の発現及び精製

発現チェックの結果、推定サイズに目的タンパク質の発現を確認できたので精製を行った。ゲル濾過 Sephacryl S-200 カラムでの溶出パターンを Fig. 5-3 に示す。SDS-PAGE で確認したところ、17～21 のフラクションに推定サイズ（12.0 kDa）のバンドを確認することができたため、フラクションを回収し濃縮後精製標品とした。なお、RP-HPLC により、VP1830 の単一のピークがみられることを確認した。

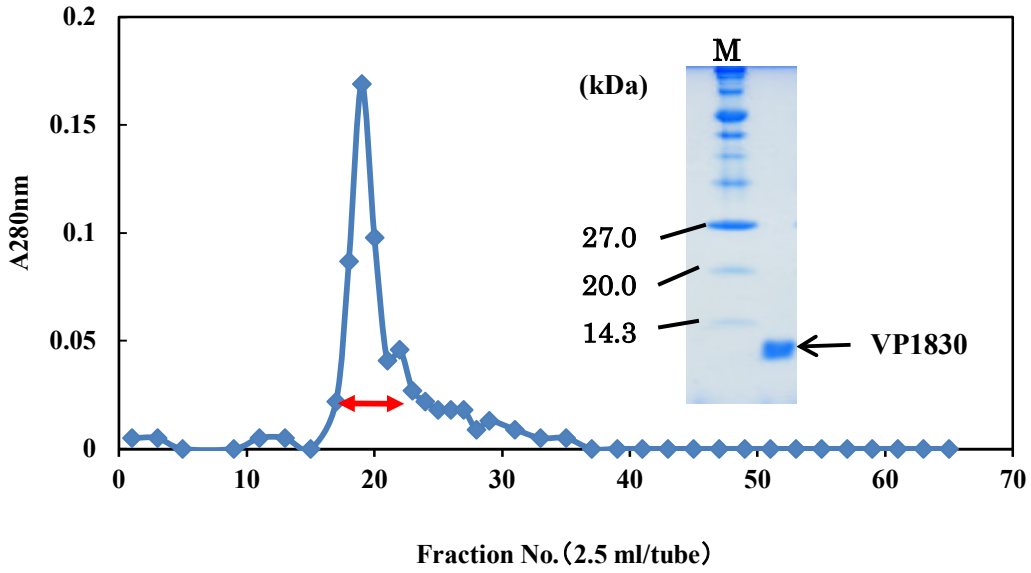


Fig. 5-3 Purification of VP1830 by gel filtration chromatography on a Sephacryl S-200 column in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 500 mM NaCl. The fractions indicated by a red arrow were pooled and subjected to SDS-PAGE. The result of SDS-PAGE analysis of purified VP1830 is shown in the insert.

5-3-3　*vp1842/vp1843* の発現及び精製

データーベースに登録されている全長の *vp1842/vp1843* の発現を試みたところ、封入体を形成し巻き戻すことができなかった。しかしながら、VP1842 の N 末端側を 23 残基欠損させると、上清画分に目的タンパク質が発現した。そこで、5-2-4 に示した方法で精製を行った。VP1842 の N 末端を 23 残基欠損させても VP1843 と複合体を形成し、アフィニティーカラム及びゲルろ過カラムで精製することができた。ゲル濾過 Sephacryl S-200 カラムでの溶出パターンを Fig. 5-4 に示す。SDS-PAGE の結果、28～37 のフラクションに⊿N23VP1842（11.1 kDa）と VP1843（12.0 kDa）タンパク質のバンドがみられたため、この画分をプールし⊿N23VP1842/VP1843 複合体の精製標品とした。この精製標品を RP-HPLC に供した結果、2 つのピークがみられ複合体であることが確認された（Fig. 5-5）。また、SDS-PAGE の結果から、⊿N23VP1842 と VP1843 の複合体も会合していることが推測された。RP-HPLC の各ピークについてアミノ酸の N 末端解析をした結果、溶出時間が約 26 分のピークが⊿N23VP1842 で、約 31 分のピークが VP1843 であることが確認できた。以上から、 ⊿N23VP1842/VP1843 を VP1842/VP1843 とし、生化学的性質の分析に用いることとした。

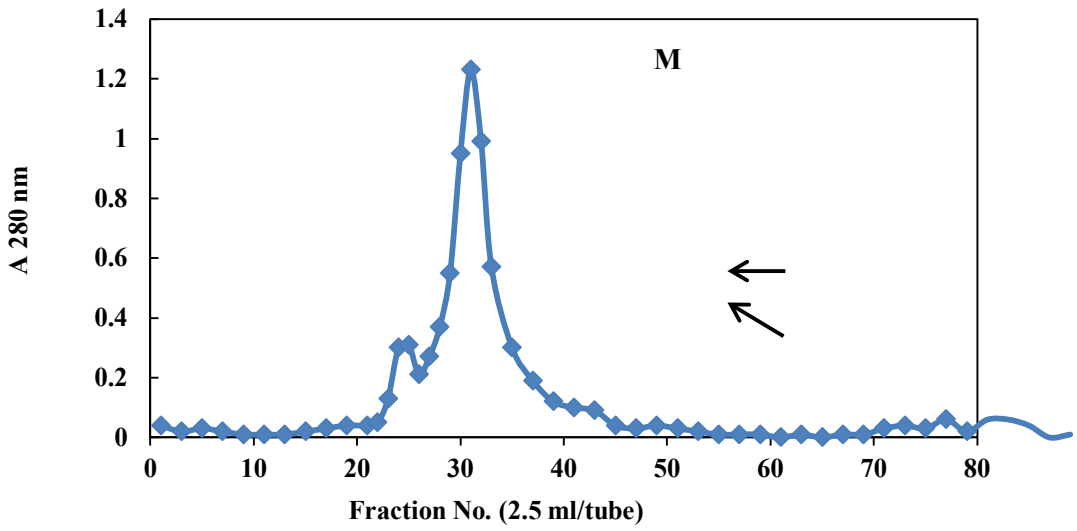


Fig. 5-4 Purification of ⊿N23VP1842/VP1843 by gel filtration chromatography on a Sephacryl S-200 column in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 500 mM NaCl. The fractions indicated by a red arrow were pooled and subjected to SDS-PAGE. The result of SDS-PAGE analysis of purified ⊿N23VP1842/VP1843 is shown in the insert.

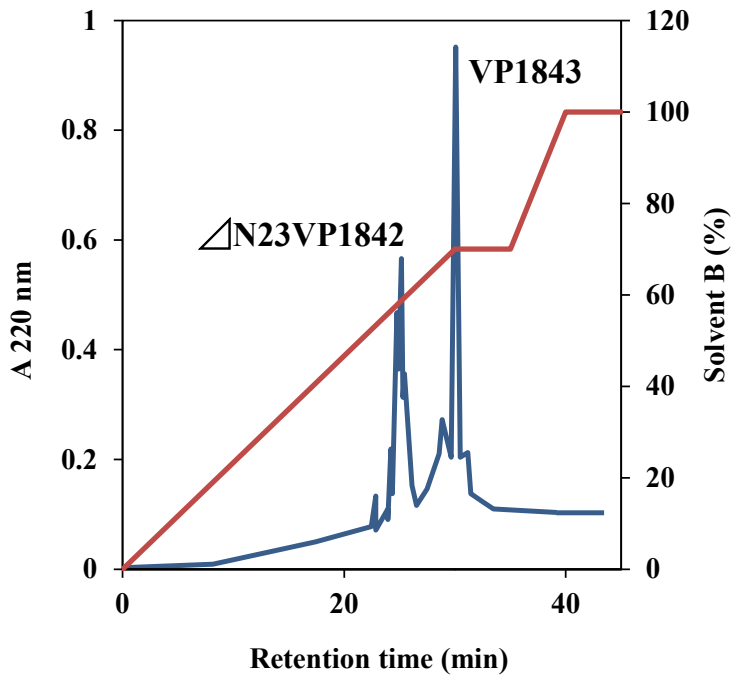


Fig. 5-5 RP-HPLC separation of ⊿N23VP1842 and VP1843.

5-3-4　VP1843 の精製

VP1843 は、5-2-4 に示した方法に従って精製標品を得た後、SDS-PAGE により確認を行った（Fig. 5-6）。VP1843 と VP1830 の推定分子量はともに 11 kDa であるが、VP1843 のバンドは VP1830 より高い位置にみられた。

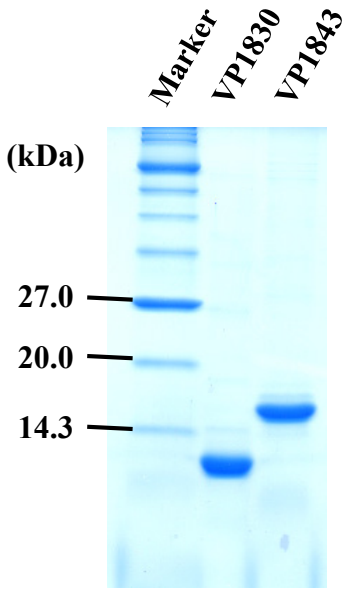


Fig. 5-6 SDS-polyacrylamide gel electrophoretic analysis of VP1843 and VP1830. Proteins (4 µg) were separated on 15% SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue.

5-3-5　*dinJ/yafQ* の発現及び精製

発現チェックの結果、推定サイズに目的タンパク質の発現を確認できたので精製を行った。ゲル濾過 Sephacryl S-200 カラムでの溶出パターンを Fig. 5-7 に示す。SDS-PAGE の結果、21～28 のフラクションに DinJ（9.4 kDa）と YafQ（11.9 kDa）のバンドがみられたため、この画分をプールし精製標品とした。VP1829/VP1830 や VP1842/VP1843 と違い、会合はみられなかった。この精製標品を RP-HPLC に供した結果、2 つのピークがみられ複合体であることが確認された（Fig. 5-8）。また、各ピークについてアミノ酸の N 末端解析をした結果、溶出時間が約 31 分のピークが DinJ で、約 28 分のピークが YafQ であることが確認できた。

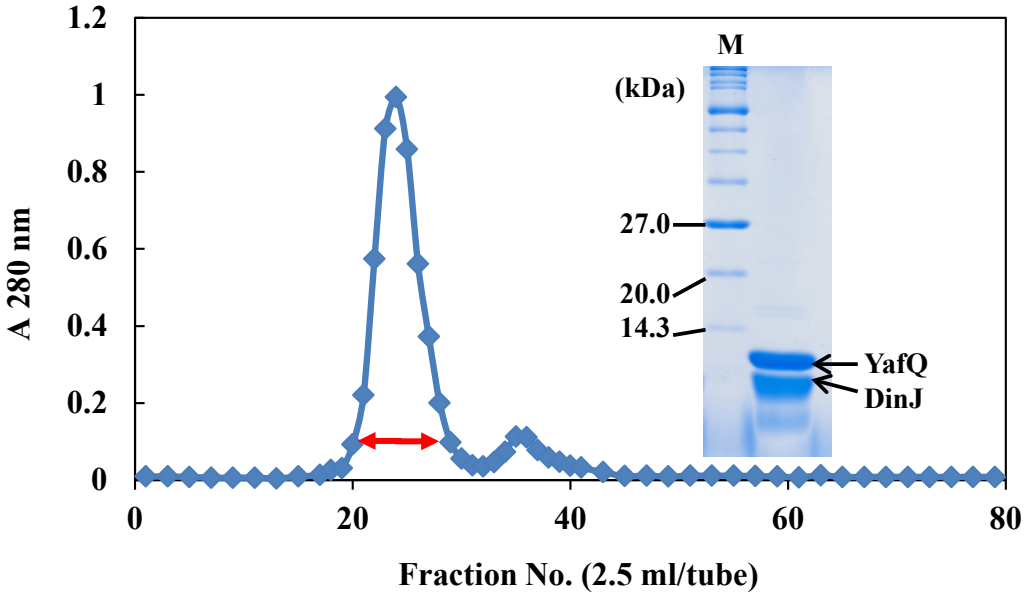


Fig. 5-7 Purification of DinJ/YafQ by gel filtration chromatography on a Sephacryl S-200 column in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 500 mM NaCl. The fractions indicated by a red arrow were pooled and subjected to SDS-PAGE. The result of SDS-PAGE analysis of purified DinJ/YafQ is shown in the insert.

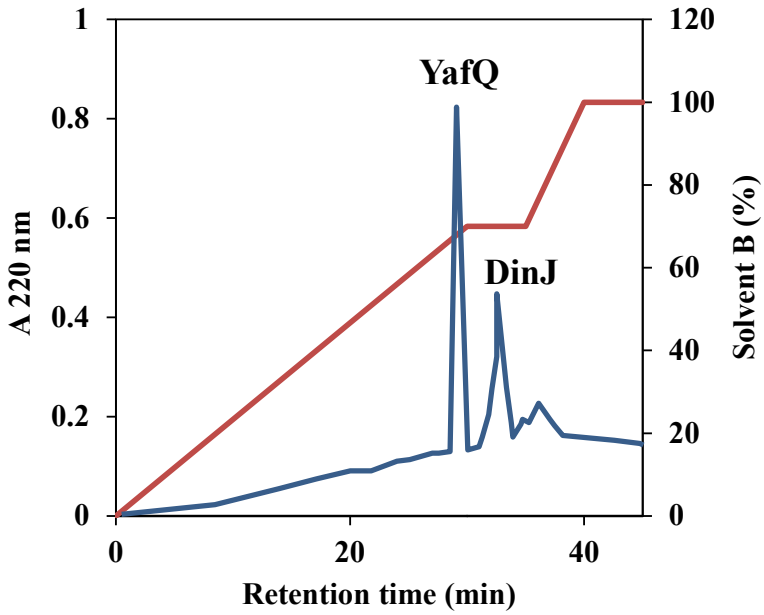


Fig. 5-8 RP-HPLC separation of DinJ and YafQ.

5-3-6　YafQ の精製

8 M Urea で DinJ/YafQ 複合体を単体に分離後、SP Sepharose Fast Flow カラムに供した結果を Fig. 5-9 に示す。SDS-PAGE の結果、48～57 のフラクションに YafQ（11.9 kDa）のバンドがみられたため、プールし slow dialysis により巻き戻しを行った。巻き戻し後、SDS-PAGE により目的のサイズに単一のバンドがみられることを確認した。

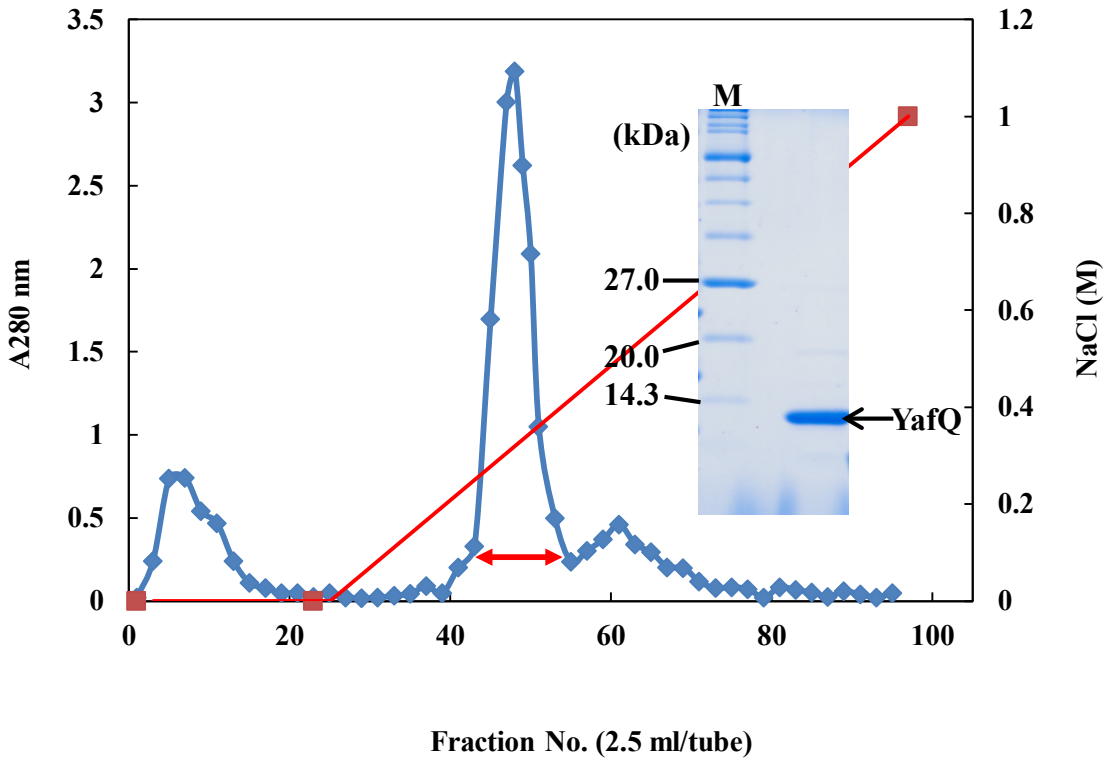


Fig. 5-9 Purification of YafQ by ion exchange chromatography on a SP Sepharose Fast Flow column in 20 mM Tris-HCl, pH7.5, containing 8 M Urea. The fractions indicated by a red arrow were pooled and subjected to SDS-PAGE. The result of SDS-PAGE analysis of purified YafQ is shown in the insert.

5-4　考察

本章では *vp1829/vp1830*、*vp1842/vp1843* 及び *dinJ/yafQ* を発現するプラスミドを構築し、大腸菌内で発現及び精製を行った。VP1842/VP1843 を得るために、データーベースに登録してある全長の VP1842 を発現させると封入体を形成し、巻き戻しもうまくいかなかった。しかしながら、VP1829 と同じ長さとなるように N 末端の 23 残基を欠損させると、上清画分に発現し、アフィニティーカラムで精製を行うことができた。VP1843 の C 末端のみに His-tag がついていることから、⊿N23VP1842 が VP1843 と複合体を形成しているといえる。TA システムの中で、アンチトキシンタンパク質とトキシンタンパク質が複合体を形成するのはⅡ型の TA システムであることから、*vp1842/vp1843* はⅡ型の TA システムであることがわかった。また、データーベース上では TTG が *vp1842* の開始コドンとされ、VP1842 は VP1829 と比較して N 末端に 23 残基長いが、今回の精製結果から *vp1842* の本来の翻訳開始点は、データーベースとは異なり、24 番目のメチオニン（ATG）である可能性が高いことが示唆された。以上のように、VP1842/VP1843 を得るために N 末端を欠損させる必要があったが、VP1829 は VP1830 と、VP1842 は VP1843 と、DinJ は YafQ と複合体を形成したため、複合体はすべて同じ手法で精製標品を得ることができた。

一方、推定トキシンである VP1830、VP1843 及び YafQ は、すべて別々の手法を用いて精製を行った。YafQ の分取法はすでに確立されており、8 M 尿素存在下で DinJ/YafQ を単体に分離後、イオン交換カラムにより分取した。VP1830 もこの手法を用いて、VP1829/VP1830 からの分取を試みたが、複合体をうまく分離することができなかった。DinJ/YafQ におけるアンチトキシンとトキシンの相互作用と VP1829/VP1830 における相互作用の仕方が、異なっていることが推測される。実際、精製した複合体を SDS-PAGE に供したとき、VP1829/VP1830 のみが複合体とみられるバンドがかなり濃く検出されていた。VP1830 は、他のトキシンと異なりトキシンだけを含むプラスミドを構築できて

いたため、その発現プラスミドを用い発現精製を行った。これは、前章で *vp1830* を大腸菌内で発現させても、大腸菌の増殖を抑制しなかったことと一致する。一方、プラスミドを構築できなかった VP1843 は精製した複合体から RP-HPLC で分取する手法とした。この手法は、VP1843 のピークだけを分取するため非常に純度が高いが、1 度に少量しか分取できないという欠点があるので、今後は、大量に分取できる手法を構築する必要がある。

5-5　小括

本章では、VP1829/VP1830、VP1842/VP1843、DinJ/YafQ、VP1830、VP1843、YafQ を得るために、プラスミドを構築し大腸菌内で発現及び精製を行った。VP1842/VP1843 を得るために、VP1842 の N 末端側の 23 残基を欠損させる必要があったが、3 つの複合体ともに推定トキシンと推定アンチトキシンが複合体を形成しており、アフィニティーカラム、ゲルろ過カラムによって精製標品を得ることができた。この結果と 4 章の結果より、*vp1842/vp1843* はⅡ型の TA システムであることがわかった。一方、トキシンと推測される VP1843 と YafQ はベクターに組み込むことができなかったので、複合体として発現、精製後、トキシンのみを分離した。一方、VP1830 は、ベクターに組み込むことができたので、複合体と同様に精製を行い精製標品を得た。

第 6 章　VP1830 及び VP1843 の生化学的性質

6-1　諸言

第 4 章で *vp1843* の発現は大腸菌の増殖を阻害すること、第 5 章で VP1842 と VP1843 は複合体を形成することが示されたため、*vp1842/vp1843* はタイプⅡ型の TA システムであることがわかった。一方、VP1829/VP1830 は、VP1842/VP1843 のアミノ酸配列と非常に類似しているにも関わらず、VP1830 の毒性は検出できなかった。

タイプⅡ型の TA システムについては多くの研究が行われ、以下のことが明らかにされている。まず、タイプⅡ型の TA システムは、プロモーターにある回文配列にトキシン／アンチトキシン複合体が結合することによってオペロンの発現調節を行っている[56、57]。その際、複合体がオペロンの転写抑制因子として働くために、YefM と YoeB はヘテロ三量体（$YefM_2$-YoeB）、RelB と RelE はヘテロ四量体（$(RelB\text{-}RelE)_2$）、MazE と MazF はヘテロ六量体（$MazF_2$-$MazE_2$-$MazF_2$）を形成することが知られている[50、51、52]。次に、タイプⅡ型のトキシンの毒性は多岐にわたるが、多くはエンドリボヌクレアーゼであることも示されている。代表的なものに、翻訳過程の mRNA をリボソームの A 部位で特異的に切断するリボソーム依存性のリボヌクレアーゼである RelE と、リボヌクレーゼに依存せず一本鎖 RNA 中の ACA 配列を特異的に認識するリボヌクレアーゼである MazF がある。また、数は少ないが ParE のように 、DNA ジャイレースを阻害することで DNA の複製を阻害するトキシンも知られている[63]。

そこで、本章では VP1843 と VP1830 の生化学的性質を、これまで知られているタイプⅡ型の性質と比較することにより明らかとし、VP1843 の毒性の作用機構について検討した。

6-2　実験材料と方法

6-2-1　菌株

リボソーム抽出用の大腸菌として Q13 株（met-、tyr-、RNase I-、Hfr）を使用した。

6-2-2　試薬

DNA ジャイレース及び pUC19 は New England Biolabs より、Ciprofloxacin 塩酸塩は Enzo Life Science より購入した。Rapid Translation System RTS、*E. coli* HY Kit は Roche 社製を用いた。

6-2-3　ゲルシフトアッセイによる回文配列との結合能の検討

腸炎ビブリオのゲノム DNA を鋳型として、*vp1829* または *vp1842* の翻訳開始点から上流-200～-101 と-100～-1 の 100 bp 及び *vp1842* の-31～69 の 100 bp を PCR により増幅した。なお、*vp1842* の-31～69 は、*vp1829* の-100～-1 の配列に相当する。Table 6-1 に示したプライマーを用いて、変性 ; 98℃、10 秒、アニーリング ; 57℃、30 秒、伸長 ; 68℃、10 秒の条件で PCR を行った。

Table 6-1 Oligonucleotides used in this study.

番号	配列(5'-3')	増幅遺伝子
1	AAAATGCCACGCGTGCCGAATCACT	*vp1829*の翻訳開始点からの上流配列（-100～-1）及び*vp1842*の-31～69配列
2	GATGTATTCCTTTGTTGGTGTGTGTA	
3	TCCATTTTTCCTCCAAGCACATAACG	*vp1829*の翻訳開始点からの上流配列（-200～-101）
4	ACAGTGCGTCGGTTTTAGTGATTATGGT	
5	ATTAAGGTGTGAGGCACGCAATACGATGC	*vp1842*の翻訳開始点からの上流配列（-100～-1）
6	GAGTGATTCGGCACGCGTGGCATTT	
7	CGTCAGTTAATTCACCATTAATTG	*vp1842*の翻訳開始点からの上流配列（-200～-101）
8	GGATAGCAGGAGTTTTGTATGCCTCG	

アガロースゲル電気泳動により増幅を確認後、精製し DNA 断片を得た。この DNA と前章で精製した VP1829/VP1830 と VP1842/VP1843 を用いて以下のようにしてゲルシフトアッセイを行った。まず、5×binding buffer（50% glycerol、5 mM EDTA、5 mM DTT、25 mM $MgCl_2$、500 mM KCl、50 mM Tris-HCl、pH 8.0）1 µl、DNA 200 ng、適当濃度のタンパク質を加え、水で全量が 10 µl になるように反応溶液を調製した。この際、タンパク質量は DNA とのモル比が 0、40、60、80 になるようにした。反応溶液を 37℃で 30 分間インキュベート後、2%アガロースゲルにて電気泳動を行った。最後に、エチジウムブロマイドで染色し DNA を検出した。

6-2-4　ゲルろ過クロマトグラフィーによる会合形成能の検討

精製した VP1829/VP1830 または VP1842/VP1843 を 0.5 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl（pH 8.0）で平衡化したゲルろ過クロマトグラフィーHiLoad 16/60 Superdex 200 に供し、A280 nm で吸光度を測定した。

6-2-5　リボヌクレアーゼ活性の測定

基質となる pre-$tRNA^{Phe}$ と mRNA を以下のように作製した。まず、pre-$tRNA^{Phe}$ 作製するために pUC19 にクローニングされている *Pyrococcus horikoshii* の pre-$tRNA^{Phe}$ 遺伝子を、mRNA を作製するために pET-3a の開始コドンの後に終止コドンである TAG がくるように設計された遺伝子を鋳型として PCR を行い、DNA を増幅した。増幅した DNA を精製後、これを鋳型として *in vitro* 転写を 37℃で 5 時間行った。反応後、鋳型 DNA を分解させるために DNase を加え 37℃で 30～60 分反応させた後、0.5 M EDTA を加え反応を停止させた。その後、DEAE カラムにより目的の pre-$tRNA^{Phe}$ または mRNA の精製を行い、2%アガロースゲル電気泳動により目的画分をプールした。最後に、pre-$tRNA^{Phe}$ の場合は Sephadex G-75 カラムでミリ Q に置換し、mRNA の場合はエタノ

ール沈殿後ミリ Q に溶解した。この得られた基質を用いて以下のように、リボヌクレアーゼ活性を測定した。

まず、合成した pre-tRNA^{Phe} または mRNA1.5 μg に、10 μl のタンパク質（1、20、100 pmol）を含む 100 mM Tris-HCl（pH 7.0）を加え、RNase-free 水で全量が 20 μl になるように反応溶液を調整した。反応溶液を 37℃で 30 分インキュベート後、水飽和フェノールで除タンパク処理し、100%エタノール及び 3M 酢酸ナトリウム溶液を加え-20℃に一晩おくことで RNA を沈殿させた。70%エタノールで洗浄後、ペレットを真空乾燥させ、2 μl の RNase-free 水に溶解した。さらに、RNA loading dye に混和後、95℃で 5 分反応させ、8 M 尿素による変性 10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。150 V で 90 分泳動後、0.1%トルイジンブルーを含む 10 mM Tris-HCl（pH 7.5）で染色し、水で脱色して RNA を検出した。

6-2-6　大腸菌無細胞系を用いたタンパク質合成阻害活性の測定

Rapid Translation System RTS、*E. coli* HY Kit (Roche)を用いて、タンパク質合成阻害活性の測定を行った。大腸菌 Lysate 3.0 μl、Reaction Mix 2.5 μl、アミノ酸混合液 3.0 μl、メチオニン溶液 0.25 μl、Reconstitution buffer 1.25 μl、GFP コントロールプラスミド（200 ng/μl） 0.125 μl に、終濃度が 20 μM になるようにタンパク質が加え、全量が 12.5 μl になるように MQ 水を用いて反応液の容量を調整した。その後、反応液を 37℃で 150 分インキュベートした。合成された GFP を GFP 抗体を用いてウエスタンブロットにより検出した。

6-2-7　Poly(Phe)合成活性の測定

Poly(Phe)合成活性は、^{14}C-Phe-tRNA を用いて polyU 依存の poly(Phe)合成量を測定した [64)]。100 μl の反応系に、大腸菌 70S リボソーム 5 pmol、タンパク質 1000 pmol、GTP

（終濃度 0.25 mM）、polyU 0.5 μg、リコンビナント大腸菌 EF-G 0.5 μg、リコンビナント大腸菌 EF-Tu 2.0 μg、^{14}C-Phe-tRNA 40 pmol を添加した。反応液の組成は、50 mM Tris-HCl（pH7.6）、 5 mM $MgCl_2$、100 mM NH_4Cl、0.2 mM DTT である。

リボソーム、polyU、タンパク質の三成分を混合し、37℃で 5 分インキュベートした後に、RI 反応溶液（^{14}C-Phe-tRNA、GTP、EF-G、EF-Tu）と 37℃で 3 分反応させた。10 mg/ml BSA 5 μl と 5%TCA 1 ml を添加して反応を止め、95℃で 10 分間加熱した後、氷上で 10 分間静置し合成されたペプチドを沈殿させた。サンプルを GC-50 フィルター（ADVANTEC）で濾過及び洗浄（1 ml の 5%TCA で 3 回）することによってフィルター上に残った ^{14}C-poly(Phe)の放射線量を液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

6-2-8　リボソーム結合活性の測定

リボソームの作製を以下のように行った。大腸菌 Q-13 株を 25 μg/ml のカナマイシンを含む LB 培地（40 ml）で一晩培養した。その後、菌体を 25 μg/ml のカナマイシンを含む LB 培地 4 L に接種し、OD_{600}=0.4～0.5 になるまで 37℃で培養した。培養した菌体を 5,000 rpm、10 分間の遠心により集菌し、-80℃で冷凍した。冷凍した菌体量と同量の酸化アルミナを加え、乳鉢内で乳棒を用いて細胞破砕を行った。約 15 分間破砕後、DNase（50～70 unit/mg）を加えさらに約 15 分間破砕を行った。バッファーA（20 mM Tris-HCl、pH 8.0、10mM $Mg(CH_3COO)_2$、20 mM NH_4Cl、5 mM 2-メルカプトエタノール）を、菌体量の約 2 倍加え、12,000 rpm、20 分間遠心を行った。遠心後上清画分をとり、18,000 rpm、30 分間遠心を行った。遠心分離後の上清 11 ml を、混ざらないように 1.1 M スクロースを含むバッファーA 11 ml の上にのせ、43,000 rpm、14 時間超遠心を行った。アスピレーターで上清を吸引後、遠沈管を倒立させて内壁を乾燥させた。その後、バッファーA を加えペレットを溶解し、この溶液をリボソーム溶液とした。

超好熱性アーキア RelE（aRelE）は、mRNA 存在下でリボソームと結合することが知られているため、mRNA を添加して VP1830 と VP1843 のリボソーム結合能を調べた。mRNA は、6-2-5 で作製したものを用いた。まず、高次構造を壊すために mRNA 0.5 pmol を 75℃、5 分加熱し、氷上に 5 分放置した。精製したリボソーム 0.5 pmol、バッファーA、水を添加し、37℃で 10 分予備加温した。その後、タンパク質 2.0 pmol 添加し、氷上に 10 分おいたのち 37℃で 30 分間反応させた。この反応液を、1%グリセロール添加したバッファーA を含む 10%（w/v）スクロース溶液と 30%（w/v）スクロース溶液より作製した 10～30%スクロース密度勾配の上にのせ、40,000 rpm で 4 時間の超遠心（スウィングローターは BECKMAN SW41 を使用）をかけることで、リボソームに結合したタンパク質と結合していないタンパク質にわけた。超遠心後、上部より 1 ml ずつ分取し、吸光度を測定した。各サンプルに終濃度が 20%になるように TCA を加え、氷上で 1 時間放置した。15,000 rpm で 30 分間遠心を行った後、沈殿を氷冷アセトンで洗浄した。洗浄後、サンプルを乾燥させ、40 µl のサンプルバッファーに溶解し、15%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。その後、一次抗体に His-tag 抗体（MBL）、二次抗体に Mouse-IgG (Fc specific)-peroxidase（SIGMA）抗体を用いてウエスタンブロットにより検出を行った。

6-2-9　ジャイレース阻害活性の測定

pUC19（250 ng）に、タンパク質（5、25、50 pmol）を含むバッファー（35 mM Tris-HCl、pH 7.5、24 mM KCl、4 mM $MgCl_2$、2 mM DTT、1.75 mM ATP、5 mM spermidine、6.5% glycerol、0.1 mg albumin） を 2 µl 加え、全量が 10 µl になるように MQ 水を用いて反応液の容量を調整した。37℃で 15 分インキュベート後、ジャイレース 0.5 unit を加え 37℃で 30 分反応させた。その後、反応停止液（0.05 M EDTA、0.05 M Tris-HCl、pH 7.5）を 7.5 µl 加え、1%アガロースゲル電気泳動を行った。最後に、エチジウムブロマイドで染

色しDNAを検出した。

6-3　実験結果

6-3-1　ゲルシフトアッセイによる回文配列との結合能

一般にTAシステムでは、複合体はプロモーター領域の回文配列に直接結合することで転写を制御している。そこで、VP1829/VP1830及びVP1842/VP1842が、遺伝子の上流にある回文配列を含む領域に結合するか、ゲルシフトアッセイにより調べた。なお、3章でも示したように、*vp1842*は配列上流にも回文配列があるが（Fig. 3-4）、翻訳配列内に*vp1829*と同じ回文配列が存在しているので（Fig. 3-5）、VP1842/VP1843については2つの回文配列への結合について検討した。その結果、VP1829/VP1830は、回文配列（TGTACA）を含む-100～-1のDNA断片とゲルシフトを示したが、回文配列を含まない-200～-101のDNA断片とはゲルシフトを示さなかった（Fig. 6-1A）。一方、VP1842/VP1843は、VP1829と同じ回文配列（TGTACA）を含む-31～69のDNA断片とゲルシフトを示したが、データーベース上で開始コドンとされるTTG上流の回文配列（CACGCGTG）を含む-100～-1と回文配列を含まない-200～-101のDNA断片とはゲルシフトを示さなかった（Fig. 6-1B）。また、VP1830またはVP1843が回文配列を含む領域と結合するか検討したところゲルシフトはみられず、トキシンだけでは回文配列に結合しないことが示された（データ示さず）。

以上のことから、VP1829/VP1830及びVP1842/VP1843は、TGTACA配列を認識して結合していることが推測された。また、*vp1842*の開始コドンはデーターベース上でTTGとされているが、本章でも24番目のアミノ酸であるメチオニンのATGが本来の開始コドンであると強く示唆された。

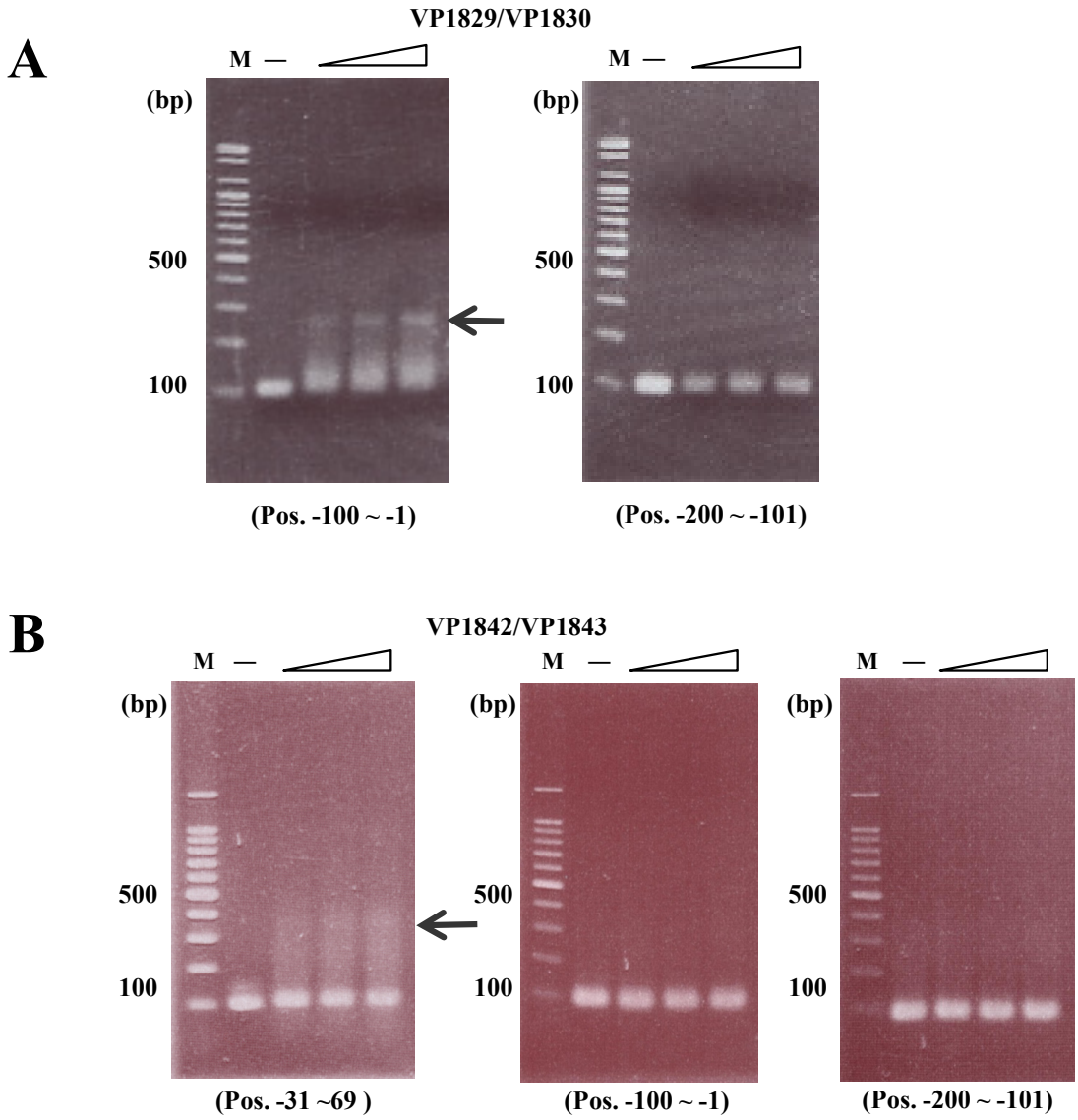


Fig. 6-1 Gel shift assay for the interaction of the complexes, VP1829/VP1830 (A) and VP1842/VP1843 (B), with or without palindromic sequences. Arrows indicate shifted DNA bands.

6-3-2　ゲルろ過クロマトグラフィーによる会合形成能

6-3-1 の結果より、VP1829/VP1830 及び VP1842/VP1843 は回文配列に特異的に結合することにより、自らのオペロンの転写を抑制するリプレッサーとして機能していることが推測された。通常、リプレッサーは二量体として機能していることから、VP1829/VP1830 及び VP1842/VP1843 も二量体化していることが推定された。そこで、VP1829/VP1830 及び VP1842/VP1843 のおよその分子量について、ゲルろ過クロマトグラフィーにより調べた（Fig. 6-2）。その結果、2 つの複合体の分子量はともに約 55 kDa であるわかった。この 2 つの複合体の分子量は計算上は 23 kDa であるため、溶液上では推定どおり $(VP1829/VP1830)_2$ 及び $(VP1842/VP1843)_2$ のヘテロ四量体として存在していることが示された。

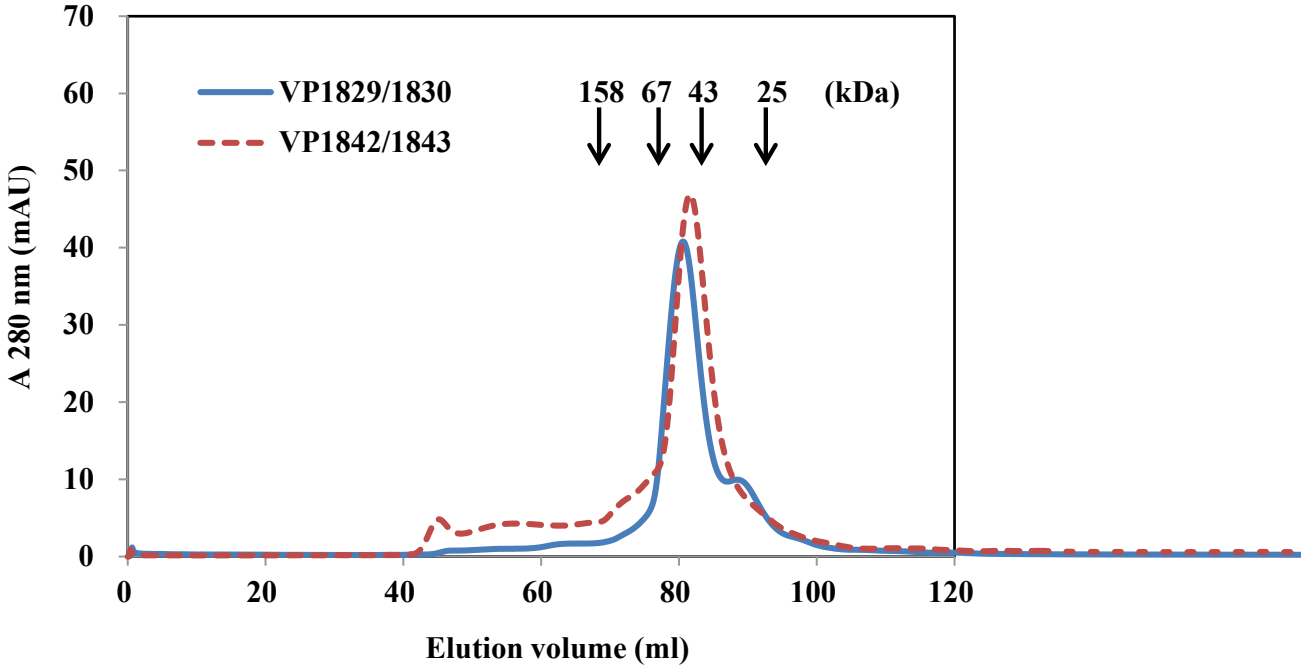


Fig. 6-2 Gel filtration of the two complexes on a HiLoad 16/60 Superdex 200 (1.6 cm × 60 cm) in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 0.5 M NaCl. The arrows indicate the estimated elution positions for 158 kDa, 67 kDa, 43 kDa and 25 kDa proteins. The molecular mass marker proteins used were aldorase (158 kDa), albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa) and α-chymotrypsinogen (25 kDa).

6-3-3　リボヌクレアーゼ活性

YafQ を比較対象として、リボソーム非存在下における VP1830 及び VP1843 のリボヌクレアーゼ活性を pre-tRNA^{Phe} 及び mRNA を基質として検討した（Fig. 6-3）。その結果、YafQ に比べると活性は著しく低いが、VP1830 と VP1843 ともにリボソーム非存在下でわずかに RNA を切断することが分かった。また、pre-tRNA^{Phe} と mRNA のどちらを基質とした場合でも、VP1830 と VP1843 の 2 つの活性にあまり差はなかった。

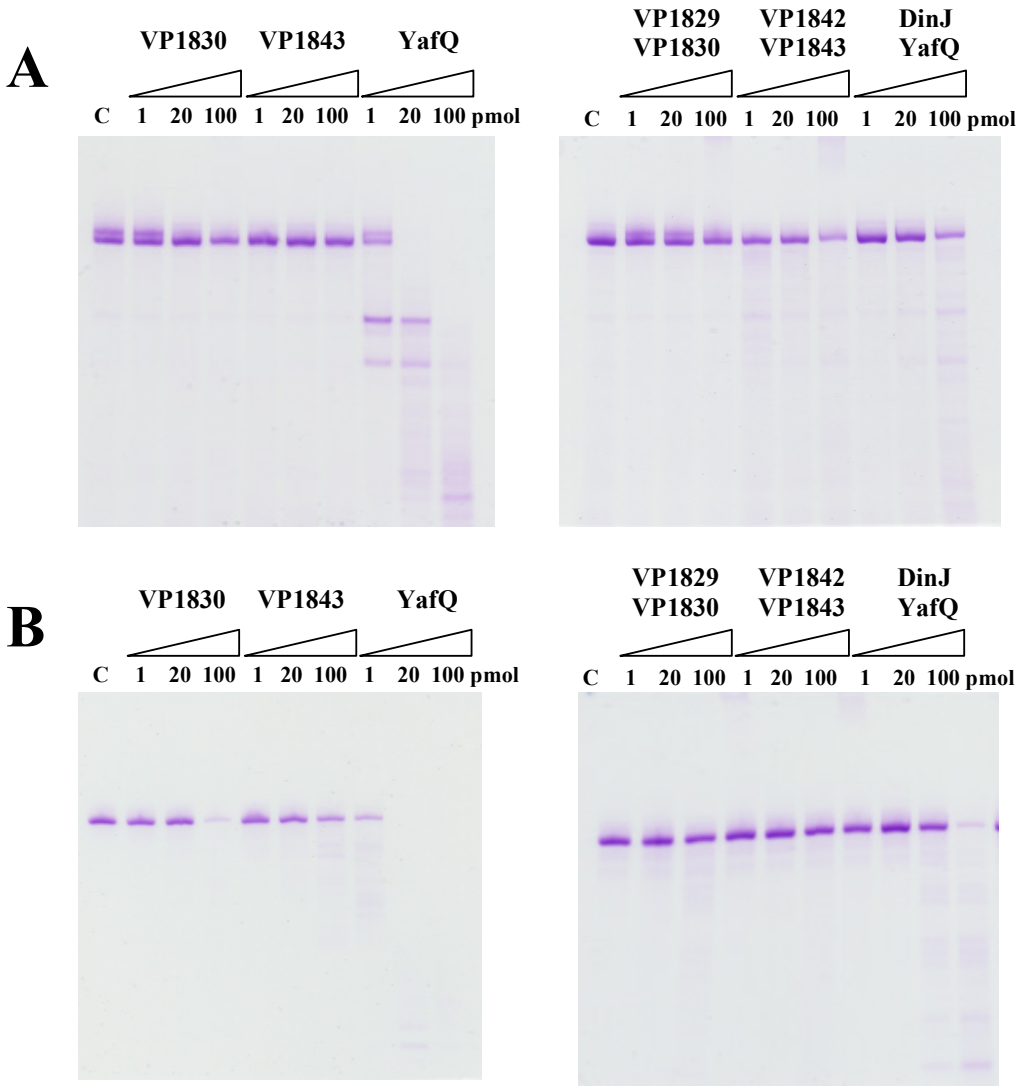


Fig. 6-3 RNase activities of toxins (left) and TA complexes (right) using pre-tRNA^{phe} (A) or mRNA (B) as a substrate.

6-3-4　大腸菌無細胞系を用いたタンパク質合成阻害活性

VP1829/VP1830、VP1830、VP1842/VP1843 及び VP1843 のタンパク質合成阻害活性を、DinJ/YafQ と YafQ を指標として調べた（Fig. 6-4）。大腸菌のトキシンタンパク質である YafQ を加えたときはコントロールに比べてバンドが薄くなっており、これまで報告されているようにタンパク質の合成が阻害された。また、DinJ/YafQ 複合体であればトキシンの毒性が抑えられタンパク質の合成を阻害しなかった。一方、腸炎ビブリオの推定トキシンを加えたときはバンドに変化がなく、VP1830 も VP1843 のどちらもタンパク質の合成阻害活性を有しないことが明らかとなった。

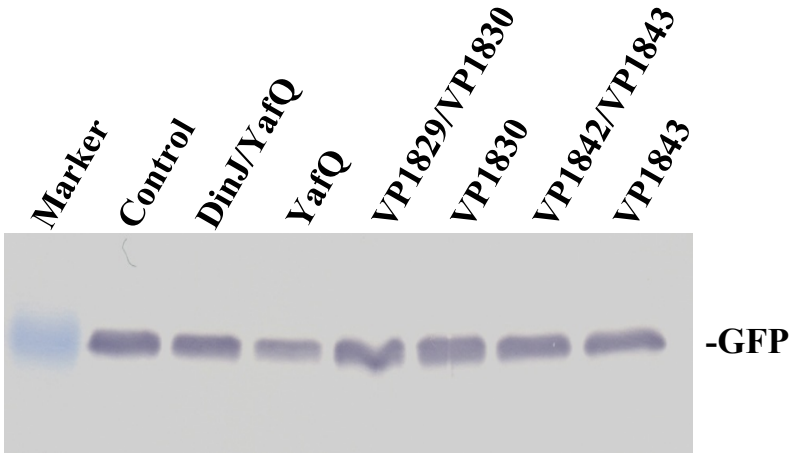


Fig. 6-4 GFP synthesis using Rapid Translation System RTS, *E.coli* HY.

6-3-5　Poly(Phe)合成活性

VP1829/VP1830、VP1830、VP1842/VP1843 及び VP1843 の polyU 依存の poly(Phe)合成活性を、DinJ/YafQ と YafQ を指標として調べた。トキシン等のタンパク質を添加していないサンプルの活性を 100%として、その他のサンプルの活性を Fig. 6-5 に示す。大腸菌の TA システムでは、複合体のときは合成は阻害されなかったが、トキシンである YafQ を用いたときは約 20%程度まで阻害された。一方、腸炎ビブリオでは、複合体のときは合成が阻害され、トキシンと推定される VP1830 と VP1843 のときは全く阻害されず、むしろ促進されているようであった。この結果から、*vp1829/vp1830* と *vp1842/vp1843* は、これまで知られている TA システムと機能が異なることが推測された。

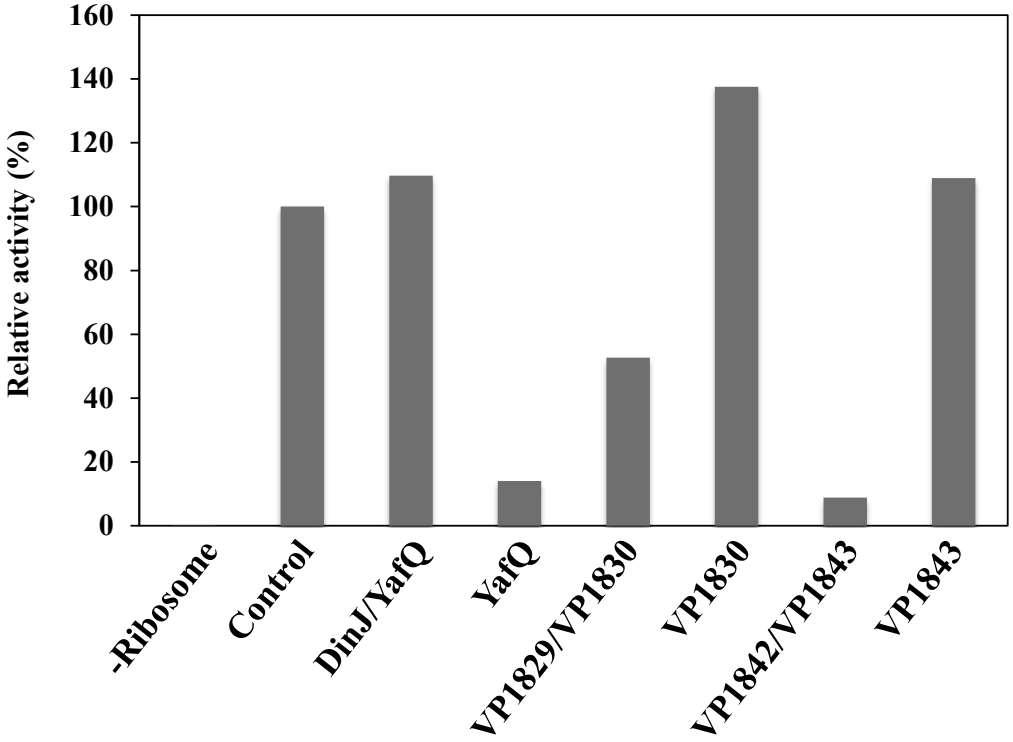


Fig. 6-5 Poly(phe) synthesis dependent on polyU. The activity without proteins were taken as 100%.

6-3-6　リボソーム結合能

YafQ はリボソームに結合することが知られているので、VP1843 と VP1830 のリボソーム結合能について調べた（Fig. 6-6）。吸光度の測定によりスクロースグレージェントの 7～9 ml の画分にリボソームが分布していた。タンパク質のみの場合は、一番上の画分にしかバンドが検出されないのに対して、mRNA とリボソームを加えた場合は、7～9 ml の画分にバンドが検出され、VP1843 及び VP1830 は YafQ と同様にリボソームと結合していることが明らかとなった。これより、VP1843 の毒性はリボソームに関係していないことが推測された。

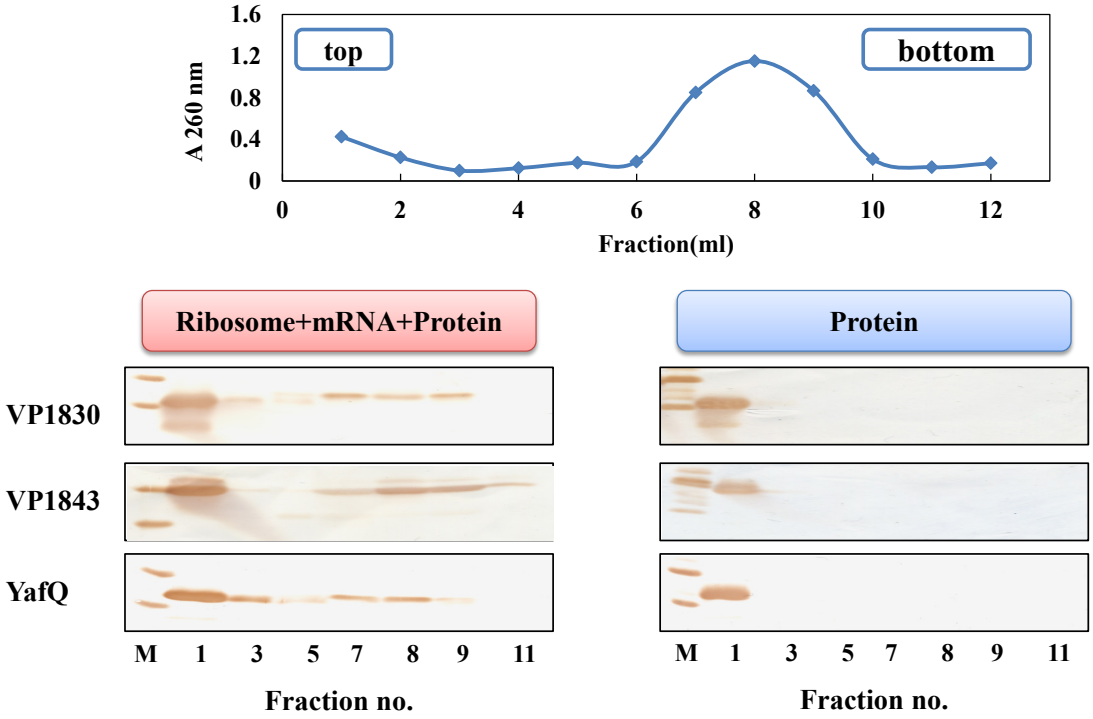


Fig. 6-6 Ribosome-binding activity of VP1830, VP1843 and YafQ. The upper panel indicates the elution pattern of the 70S ribosome by centrifugation. The lower panels indicate Western blotting analyses of the fractions obtained by centrifugation.

6-3-7　ジャイレース阻害活性

タイプⅡ型のトキシンであるCcdBとParEは、DNAジャイレースを阻害することで、DNA複製を阻害することが知られている。VP1843とVP1830は、PDBに登録されているタンパク質のうち*C. crescentus*のParEと最も高い相同性を有していることが示されているので、pUC19を基質としてVP1830とVP1843のジャイレース阻害活性について調べた（Fig. 6-7）。その結果、ParEは9 pmolからジャイレース阻害活性がみられ、30 pmolでは完全にジャイレースを阻害することが報告されているにも関わらず[63]、50 pmolまで添加したが、VP1830とVP1843はYafQと同様にジャイレース阻害を示さなかった。この結果より、VP1843及びVP1830は、DNAジャイレース阻害活性をもたないことがわかった。

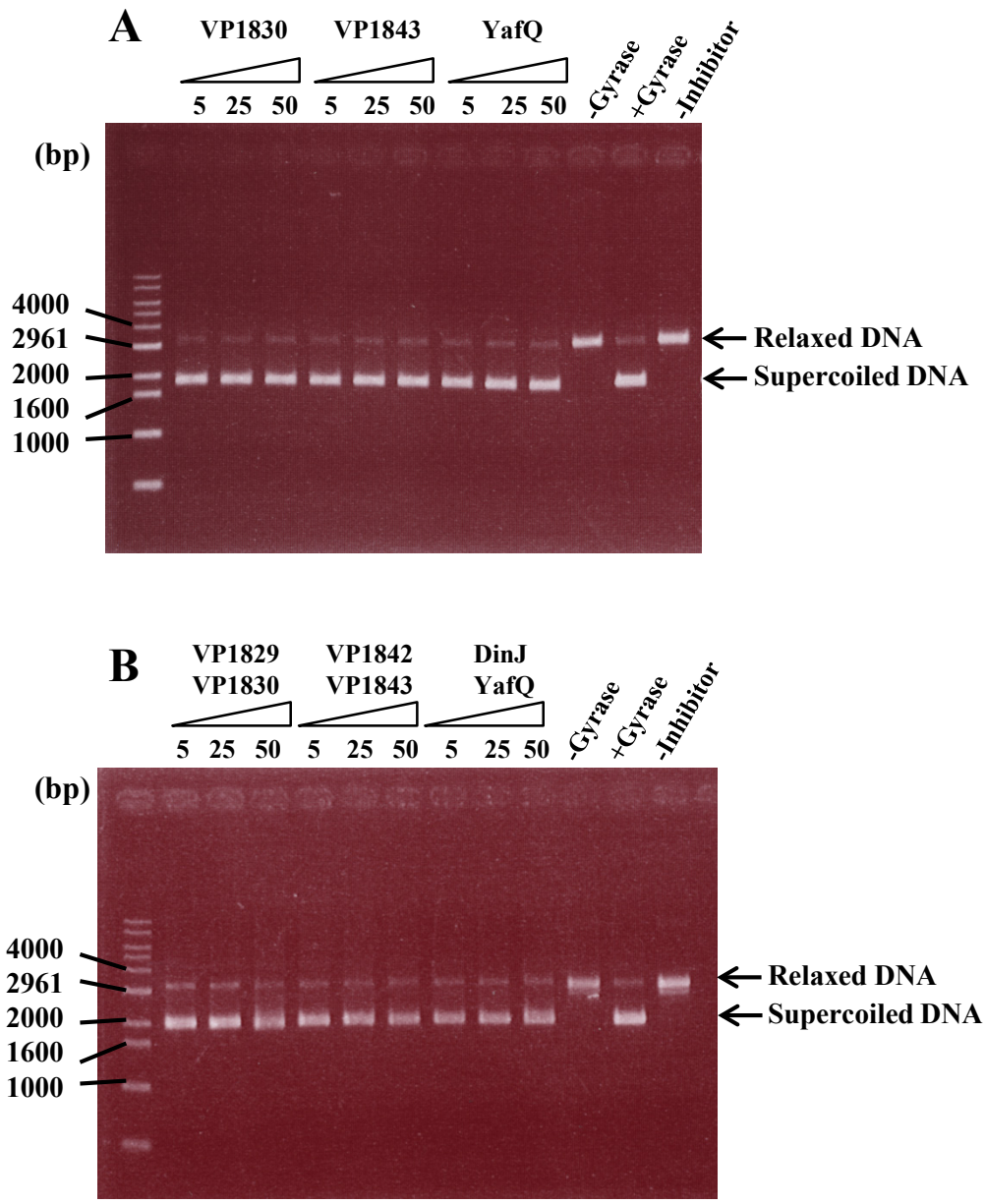


Fig. 6-7 Gyrase inhibition assays of toxins (A) and complexes (B). The positions of relaxed DNA and supercoiled DNA are indicated.

6-4　考察

本章では、*vp1829/vp1830* と *vp1842/vp1843* が、タイプⅡ型の TA システムであるか確認を行った。

まず、複合体のプロモーター領域の回文配列への結合について、ゲルシフトアッセイにより調べた。その結果、VP1829/VP1830 は TGTACA 配列を認識して結合することがわかった。また、VP1842/VP1843 のプロモーター領域には CACGCG の回文配列が存在したが、この配列には結合せず、24 番目のメチオニン上流に存在する TGTACA 配列を認識して結合することがわかった。また、複合体の分子量を調べた結果、RelB/RelE と同じように VP1829/VP1830 と VP1842/VP1843 はともにヘテロ四量体を形成することも明らかとなった。このことから、VP1829/VP1830 と VP1842/VP1843 は、これまで知られたタイプⅡ型の TA システムと同様に、回文配列に複合体が挟み込むように結合することで転写を調節していると考えられる。さらに詳細に検討すると、VP1829/VP1830 と VP1842/VP1843 の複合体が認識する配列は、ホモログの DinJ/YafQ とは異なっていたが、YefM/YoeB と同じであった [56]。しかし、YefM/YoeB はヘテロ三量体を形成することから、転写調節のメカニズムは全く同じものではないと推測される。また、今回のゲルシフトの結果と前章での精製結果とあわせて考えると、VP1842 の実際の翻訳は VP1829 と同じ 24 番目のメチオニン（ATG）から開始されることが強く示唆された。

第 4 章で VP1843 はトキシンとして機能していることが推測されたが、VP1830 はトキシンとして機能しているのか不明であった。そこで、この 2 つのタンパク質が、タイプⅡ型のトキシンが示す性質を有しているか確認をした。なお、VP1830 及び VP1843 と YafQ の同一性は 18 と 17%でありやや低いが、他のトキシンと比べると YafQ との相同性が最も高いので比較対象とした。その結果、VP1830 と VP1843 は、ともにリボソームに結合しわずかに RNase 活性を示したが、タンパク質合成阻害活性は示さないことがわかった。また、VP1830 と VP1843 が示した RNase 活性は同程度であり、YafQ と

比較すると非常に弱いことから、VP1843 が示す毒性には関係ないと思われる。また、ジャイレース阻害活性についても調べたが、ジャイレース阻害活性もなかった。以上のことから、VP1843 の毒性はこれまで一般に知られているタイプⅡ型のメカニズムとは異なることが推測された。

6-5　小括

本章では、*vp1829/vp1830* と *vp1842/vp1843* が、タイプⅡ型の TA システムであるか確認を行った。ゲルろ過クロマトグラフィーとゲルシフトアッセイの結果、VP1829/VP1830 と VP1842/VP1843 は、これまで知られているタイプⅡ型の TA システムと同様に会合体を形成し、回文配列に結合することが明らかとなった。しかしながら、VP1830 と VP1843 は、タイプⅡ型のトキシンにみられるタンパク質合成阻害活性、リボヌクレアーゼ活性、ジャイレース阻害活性のどれも示さず、VP1843 の毒性はこれまで知られているタイプⅡの毒性とは異なることが推測された。

第 7 章　*vp1843* 発現時の細胞形態に対する影響

7-1　緒言

前章より VP1843 の毒性は、RelE や ParE のタイプⅡ型にみられるタンパク質合成阻害やジャイレース阻害によるものでないことが示された。近年、大腸菌に新たな TA システムが見出され、トキシンである YeeV が細胞骨格タンパク質の重合を阻害し、形態変化をもたらすことが示されている [65]。YeeV（CbtA）は、チューブリン様タンパク質である FtsZ に作用するトキシンである。FtsZ は、分裂箇所の細胞膜の内側に局在し自己重合することにより、FtsZ リングとよばれる分裂環を形成する。隔壁形成時にこの分裂環が収縮することにより、細胞分裂が引き起こされるため、FtsZ は細胞の分化に必須なタンパク質であるといえる。また、YeeV は、アクチン様タンパク質である MreB にも作用する。MreB はらせん状に配置され、桿菌の形を維持するのに重要なタンパク質である。Tan らは、大腸菌内で YeeV を発現させるとレモン型に細胞が変形すること見出した。また、この YeeV の C 末端を 52 残基欠損させる（N 末端の 73 残基存在）と MreB に作用できなくなるが FtsZ とはまだ相互作用できるため、細胞がフィラメント状になることを報告している。さらに、SOS 遺伝子である *sulA* の発現により FtsZ が阻害されることで、大腸菌がフィラメント状になることも明らかにされていることから、FtsZ の機能を阻害すると細胞がフィラメント状になるといえる。YeeV はタイプⅣ型のトキシンで、アンチトキシンと複合体を形成しないためタイプⅡ型の VP1843 と相違があり、さらにそれらのアミノ酸配列にも相同性がみられないが、本章では VP1843 の毒性について明らかにするために、*vp1843* 発現時の大腸菌の形態に与える影響及びその要因について調べた。

7-2　実験方法

7-2-1　*vp1843* 発現時の形態の観察

4-2-7 に記述した方法により、アラビノース存在下で *vp1830*、*vp1843*、*yafQ*、*vp1829/vp1830*、*vp1842/vp1843*、*dinJ/yafQ* を発現させた。発現 0 及び 3 時間の菌液を適当濃度に調整後、位相差顕微鏡（OLYMPUS BX-PHD）にて観察した。また、*vp1843* を発現した大腸菌については、2-2-3 に示した方法に従って蛍光染色し、生死についても判断した。

7-2-2　腸炎ビブリオの *mreB* と *ftsZ* ホモログの検索

大腸菌に存在する細胞骨格タンパク質をコードする *mreB* 及び *ftsZ* が、腸炎ビブリオゲノムに存在しているか、3-2-1 と同様に BLAST により検索をした。

7-2-3　pET-22b ベクターを用いた *vp2691* と *vp0464* 発現プラスミドの構築及び発現

pET-22b ベクターに *vp2691*（*mreB*）、*vp0464*（*ftsZ*）遺伝子を組み込むために、まず PCR で用いるプライマーを作製した (Table 7-1) 。その際、発現ベクターに組み込むた

Table 7-1 Oligonucleotides used in this study.

oligonucleotide	Sequence(5'-3')
2691-F	GAGCGAGGCAT**ATG**TTTAAGAAACTTCGTGG
2691-R	CACCACTCGAG**TTA**TTCTTCAGAGAACAGATC
0464-F	GGAGACAGCAT**ATG**TTTGAACCGATGATG
0464-R	ATGGGTCTCGAG**TTA**ATCAGCCTGACGAC

Restriction enzyme recognition sites are underlined, and initiation and termination codons are highlighted in bold letters.

めに、5'プライマー、3'プライマーそれぞれに制限酵素 *Nde*I と *Xho*I サイトを導入した。今回は His-Tag は不要なため、終止コドンをつぶさず作製した。

プラスミドの構築は 4-2-6 及び 4-2-8 に示した方法に従って行い、作製したプラスミドを pET-*vp2691* と pET-*vp0464* と名付けた。このプラスミドを用いて発現用大腸菌 BL21(DE3)codon plus RIL をヒートショック法により形質転換した。得られたコロニーを 50 μg/ml を含む LB 培地に接種し、対数増殖期まで 37℃で培養した。その培養液を新しい LB 培地に少量加え、A_{590} が約 0.3～0.4 になるまで 37℃で培養後、IPTG（終濃度 0.5 mM）を加え *vp2691* の場合は 30℃、*vp0464* の場合は 37℃で 3 時間培養することで、目的タンパク質の発現を行った。集菌後、VP2691 は 50 mM Tris-HCl（pH 8.0）、50 mM KCl、1 mM DTT、0.3 mM $MgCl_2$ のソニケーションバッファー、VP0464 は 50 mM HEPES-KOH（pH 7.5）、10 mM $MgCl_2$、200 mM KCl、0.1 mM EDTA のソニケーションバッファーに懸濁し、超音波により菌体を破砕した。遠心分離により得られた上清を VP2691（MreB）、VP464（FtsZ）溶液とした。

7-2-4　プルダウンアッセイを用いた VP1843 と細胞骨格タンパク質（VP2691 と VP0464）との相互作用

7-2-3 で用いたソニケーションバッファーで平衡化した His タグビーズ 50 μl に、His タグ配列を有する VP1830 または VP1843（50 μg）、VP2691 または VP464（100 μl）を加えソニケーションバッファーで全量を 200 μl とし、4℃で一晩、ローテーター上で混和した。1,000 g で 1 分間遠心し、上清を捨てた後、ソニケーションバッファーで 3 回洗浄し、2×SDS-PAGE バッファー（125 mM Tris-HCl、pH 6.8、2% グリセロール、4% SDS、0.05% BPB、10 mM EDTA）60 μl を直接ビーズに加えた。沸騰水中に 3 分おいた後、15%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、CBB 染色によりタンパク質の検出を行った。

7-3　実験結果

7-3-1　*vp1843* 発現時の形態の観察

発現プラスミド pBAD/Myc-HisA の araBAD プロモーターにより *vp1830*、*vp1843*、*yafQ*、*vp1829/vp1830*、*vp1842/vp1843*、*dinJ/yafQ* を発現させたときの形態への影響を調べた（Fig. 7-1）。その結果、アラビノースによりそれぞれのトキシンを発現させると、*vp1843* を発現させた場合は大腸菌がフィラメント状になったが、*vp1830* 及び *yafQ* を発現させた場合は菌の形態に変化はみられなかった。また、*vp1843* と同時に *vp1842* を発現させると、形態の変化が抑えられていた。興味深いことに、プラスミド pBAD-*vp1843* を有する大腸菌は、発現を誘導する前から一部がフィラメント状に変化していた（Fig.7-1A）。*araBAD* プロモーターでも完全に *vp1843* の発現を抑制できないことが推測される。実際、プラスミド pBAD-*vp1843* を有する培養液の濁度が 0.5 になる時間は、遺伝子の発現を誘導していないにもかかわらず、他のプラスミドを有する場合の約 2 倍かかったことからも納得できる。

さらに、*vp1843* を発現した大腸菌の生死を判別するために、*vp1843* の発現を誘導後 3 時間の大腸菌を蛍光染色し、蛍光顕微鏡により観察をした（Fig. 7-1C）。その結果 *vp1843* を発現した大腸菌は、他の大腸菌よりも細菌の長さが非常に長くなっていたが、ほとんどが緑に染色されており生きていることが示された。

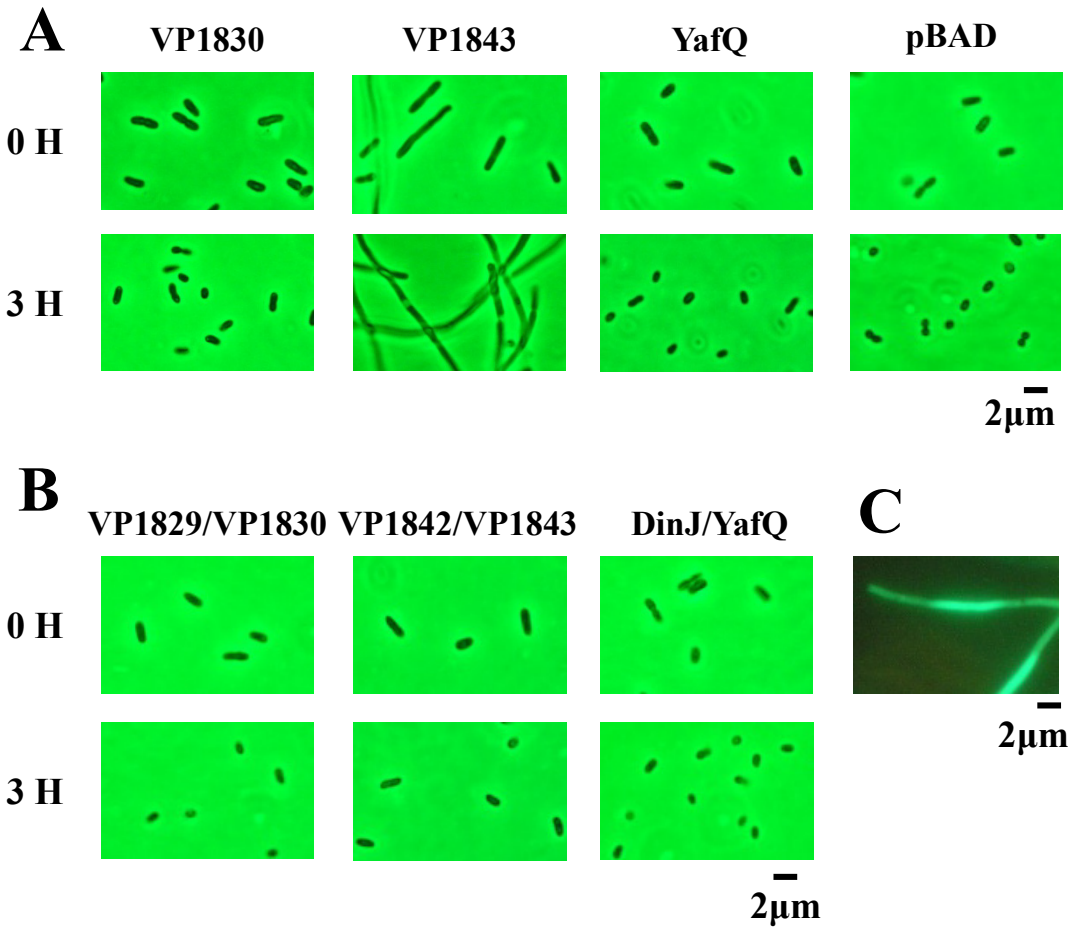


Fig. 7-1 Morphological changes by expression of *V. parahaemolyticus* genes. A, Phase contrast images of fixed *E. coli* cells bearing the expression plasmids containing putative toxin genes grown in liquid cultures in the presence of 0.2% arabinose. B, Phase contrast images of fixed *E. coli* cells bearing the expression plasmids containing putative toxin-antitoxin genes grown in liquid cultures in the presence of 0.2% arabinose. C, LIVE/DEAD *Bac*Light™ fluorescence microscopy of *E. coli* cells bearing the expression plasmid containing *vp1843*.

7-3-2　腸炎ビブリオの細胞骨格タンパク質

腸炎ビブリオの細胞骨格タンパク質について BLAST により検索を行った結果、VP2691 と VP0464 が大腸菌の MreB と FtsZ のホモログであることがわかった。CLUSTALW で多重配列アライメントを行った結果を Fig. 7-2 と Fig. 7-3 に示す。これらの同一性について調べたところ、VP2691 と MreB は約 92%、VP0464 と FtsZ は約 78% の同一性があることがわかった。

```
                            20                  40                  60
                             |                   |                   |
MreB   MLKKFRGMFSNDLSIDLGTANTLIYVKGQGIVLNEPSVVAIRQDRAGSPKSVAAVGHDAK
VP2691 MFKKLRGMFSNDLSIDLGTANTLIYVKGQGIVLDEPSVVAIRQDRVGSAKSVAAVGHAAK
       *:**:****************************:***********.**.******** **

                            80                  100                 120
                             |                   |                   |
MreB   QMLGRTPGNIAAIRPMKDGVIADFFVTEKMLQHFIKQVHSNSFMRPSPRVLVCVPVGATQ
VP2691 QMLGRTPGNISAIRPMKDGVIADFYVTEKMLQHFIKQVHDNSILKPSPRVLVCVPCGSTQ
       **********:*************:**************.**:::********** *:**

                            140                 160                 180
                             |                   |                   |
MreB   VERRAIRESAQGAGAREVFLIEEPMAAAIGAGLPVSEATGSMVVDIGGGTTEVAVISLNG
VP2691 VERRAIRESALGAGAREVYLIDEPMAAAIGAGLRVSEPTGSMVVDIGGGTTEVAVISLNG
       ********** *******:**:*********** ***.**********************

                            200                 220                 240
                             |                   |                   |
MreB   VVYSSSVRIGGDRFDEAIINYVRRNYGSLIGEATAERIKHEIGSAYPGDEVREIEVRGRN
VP2691 VVYSSSVRIGGDRFDEAVINYVRRNYGSLIGEATAEKIKHEIGSAYPGDEVQEIEVRGRN
       *****************:******************:**************:********

                            260                 280                 300
                             |                   |                   |
MreB   LAEGVPRGFTLNSNEILEALQEPLTGIVSAVMVALEQCPPELASDISERGMVLTGGGALL
VP2691 LAEGVPRSFSLNSNEILEALQEPLSGIVSAVMVALEQCPPELASDISENGMVLTGGGALL
       *******.*:**************:************************.***********

                            320                 340
                             |                   |
MreB   RNLDRLLMEETGIPVVVAEDPLTCVARGGGKALEMIDMHGGDLFSEE
VP2691 KDLDRLLMEETGIPVVIAEDPLTCVARGGGKALEMIDMHGGDLFSEE
       ::**************:******************************
```

Fig. 7-2 Alignment of *V. parahaemolyticus* protein VP2691 with its homologue, MreB, in *E. coli* cells.

```
                          20                  40                  60
                           |                   |                   |
ftsZ   MFEP-MELTNDAVIKVIGVGGGGGNAVEHMVRERIEGVEFFAVNTDAQALRKTAVGQTIQ
VP0464 MFEPMMEMSDDAVIKVVGVGGGGGNAVEHMVRESIEGVEFISVNTDAQALRKTSVGNVIQ
       **** **:::******:*************** ******::***********:**:.**

                          80                  100                 120
                           |                   |                   |
ftsZ   IGSGITKGLGAGANPEVGRNAADEDRDALRAALEGADMVFIAAGMGGGTGTGAAPVVAEV
VP0464 IGGDITKGLGAGANPQVGREAALEDRDRIKDSLTGADMVFIAAGMGGGTGTGAAPVIAEV
       **..***********:***:** **** :: :* **********************:***

                          140                 160                 180
                           |                   |                   |
ftsZ   AKDLGILTVAVVTKPFNFEGKKRMAFAEQGITELSKHVDSLITIPNDKLLKVLGRGISLL
VP0464 AKELGILTVAVVTKPFSFEGKKRLAFAEQGIDELSKHVDSLITIPNEKLLKVLGRGVTLL
       **:**************.******:******* **************:*********::**

                          200                 220                 240
                           |                   |                   |
ftsZ   DAFGAANDVLKGAVQGIAELITRPGLMNVDFADVRTVMSEMGYAMMGSGVASGEDRAEEA
VP0464 EAFASANDVLKNAVQGIAELITRPGMINVDFADVRTVMSEMGHAMMGSGIAKGEDRAEEA
       :**.:******.*************::***************:******:*.********

                          260                 280                 300
                           |                   |                   |
ftsZ   AEMAISSPLLEDIDLSGARGVLVNITAGFDLRLDEFETVGNTIRAFASDNATVVIGTSLD
VP0464 AEMAISSPLLEDIDLAGARGVLVNITAGLDMRLDEFETVGNTVKAFASDNATVVIGTSLD
       ***************:************:*:***********::***************

                          320                 340                 360
                           |                   |                   |
ftsZ   PDMNDELRVTVVATGIGMDKRPEITLVTNKQVQQPVMDRYQQHGMAPLTQEQKPVAKVVN
VP0464 PDMTDEIRVTVVATGIGNERKPDITLVAGGKAKVASAPQAQPQQVAATQAEEKPAQTLQN
       ***.**:********** :::*:****:. :.: .   : * : :*.   *:**. .: *

                                                   380
                                                    |
ftsZ   DN-------------------------APQTAKEPDYLDIPAFLRKQAD
VP0464 QVQEKPQVTPQPTNTVSSSPAAGQSSAAPKQEKESGYLDIPAFLRRQAD
       :                          **:  **..*********:***
```

Fig. 7-3 Alignment of *V. parahaemolyticus* protein VP0464 with its homologue, FtsZ, in *E. coli* cells.

7-3-3　VP1843 と細胞骨格タンパク質（VP2691、VP0464）との相互作用

大腸菌のトキシン YeeV は、細胞骨格タンパク質である FtsZ と MreB と直接作用することで細胞分化を阻害し、形態変化をもたらすことが示されているので、プルダウンアッセイにより VP1843 と VP2691（MreB）または VP0464（FtsZ）の相互作用について調べた（Fig. 7-4）。比較対象として VP1830 を用いた。VP1843 は自身の His タグによりビーズに結合したため溶出画分にバンドがみられたが、VP2691 も VP0464 もフロースルー画分にバンドがみられ、VP1843 は VP2691 と VP464 と相互作用しないことが示された。VP1830 も同様の結果であった。

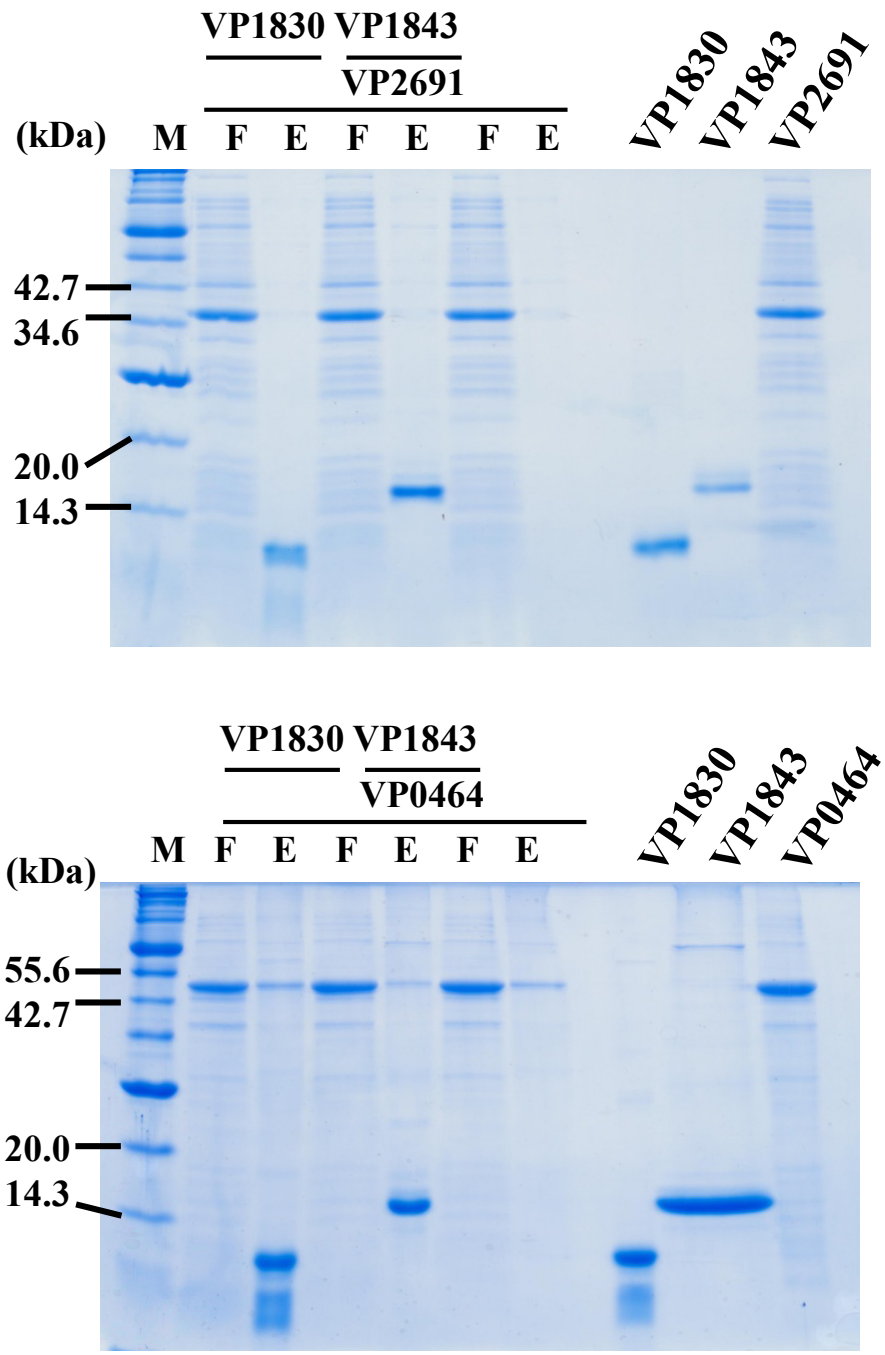


Fig. 7-4 Pull down assays for examining a specific interaction between VP1843 and cytoskeletal proteins (VP2691 and VP464). F, flow-through; E; elution.

7-4 考察

本章では、VP1843 の毒性について明らかにするために、*vp1843* の発現が細胞の形態に与える影響について調べた。その結果、*vp1843* を発現させると大腸菌がフィラメント状に変化することがわかった。また、その形態変化は *vp1843* とともに *vp1842* を発現させると抑制されることも示された。このことから、VP1843 の毒性は細胞形態に関与するものであるといえる。近年、大腸菌のトキシンである YeeV が細胞骨格タンパク質の重合を阻害し、大腸菌の形態変化をもたらすことが示されている。YeeV は、タイプⅣ型に属するトキシンで、アンチトキシンと複合体を形成しない。また、YeeV はアミノ酸数 124 で、VP1843 と配列の相同性はない。そのため、VP1843 は YeeV と毒性のメカニズムは異なることが推測されたが、YeeV が相互作用する FtsZ や MreB は、細胞分裂において非常に重要な因子でこれらの遺伝子が変異した株は、細胞がフィラメント状に成長することが知られている。そのため、プルダウンアッセイにより、VP1843 と大腸菌の MreB と FtsZ とホモログである VP2691 と VP0464 との相互作用について調べたが、相互作用はみられなかった。これまでの研究により、FtsZ や MreB は、多くのタンパク質と相互作用することにより、細胞骨格タンパク質として機能していることが推察されている。今回の結果より、VP1842/VP1843 は、FtsZ や MreB 以外の細胞骨格に関わるタンパク質を標的とすることにより毒性を発揮していることが推察された。

また、*vp1843* を発現させることによりフィラメント状になった大腸菌を蛍光染色すると生きていることが示された。この結果と第 4 章の結果と合わせて考えると、*vp1843* を発現させると細菌の増殖はできないが生きているおり、*vp1843* が発現した状態は「生きているが培養できない」状態であるといえる。さらに、VBNC 状態に移行した細菌は形態変化することが知られていることから、*vp1842/vp1843* は大腸菌の TA システムで VBNC 状態に関与していることが示された。

7-5　小括

本章では、VP1843 の毒性について明らかにすることを目的に行った。その結果、VP1843 の毒性は細胞の形態変化を伴うものであることが明らかとなった。また、*vp1843* を発現させると大腸菌の形態はフィラメント状になるが、生きていることも示された。しかしながら、タイプⅣ型トキシンである YeeV と同じように細胞骨格タンパク質である FtsZ や MreB とは相互作用せず、その他の細胞骨格タンパク質と相互作用することにより、細胞形態の変化をもたらしていることが推定された。

第８章　総括

腸炎ビブリオをはじめとした食中毒菌の多くは、ストレス環境下で生き残るために、VBNC 状態となることが報告されている。多くの研究から、VBNC 状態とは細菌の生き残りのための環境ストレス応答であると推測されているが、正確な役割はわかっておらず、またその誘導因子に関する知見は乏しい。食品衛生法で定められている食中毒菌検査法の大部分は培養法であるため、細菌が VBNC 状態で存在すると、細菌を検出することができず、細菌汚染の度合いの判定を誤ることを示唆する。近年、細菌ストレス応答因子の一つである TA システムが VBNC 状態誘導に関与していることが示唆されているが、実証されていない。本研究では、新たな食中毒細菌汚染判定法開発のための基礎情報を提供することを目的として、腸炎ビブリオの VBNC 状態誘導因子について検討するとともに、VBNC 状態誘導への関与が示唆されている TA システムの生化学的性質について検討した。

第 2 章では、腸炎ビブリオが VBNC 状態に移行する条件を調べた。1．低温（10℃）、低栄養（3%NaCl）、2．低温（10℃）、低栄養・低塩分（1.85%）、3．中温（37℃）・低栄養（3%NaCl）の 3 条件ともに VBNC 状態に移行したが、実験的に VBNC 細胞を得るには、低温（10℃）、低栄養・低塩分（1.85%）環境下が最もよいことが明らかとなった。また、VBNC 状態では腸炎ビブリオは球形化することも示された。さらに、VBNC 状態の腸炎ビブリオも培養可能な培地の探索も行ったところ、今回用いた抗生物質では回復作用はみられず、ピルビン酸ナトリウムのみが回復作用することがわかった。

第 3 章では、腸炎ビブリオの TA システム遺伝子の検索を行った。大腸菌の 6 種の TA システム（*dinJ/yafQ*、*yefM/yoeB*、*relB/relE*、*mazE/mazF*、*chpS/chpB*、*mqsA/mqsR*）及び *V. cholerae* の *higB/higA* の遺伝子産物のアミノ酸配列を指標とした結果、*dinJ/yafQ* のホモログである *vp1829/vp1830* と *vp1842/vp1843* を、*yefM/yoeB* のホモログである

vp1821/vp1820 を有していることがわかった。また、これらの遺伝子には既報の TA システムと同様に遺伝子上流に回文配列が存在していることも判明した。さらに、遺伝子の配置及び遺伝子から推定されるタンパク質の性質を調べると、*vp1821/vp1820* は *E. coli* の TA システムと共通点が多いが、*vp1829/vp1830* と *vp1842/vp1843* は異なる点が多くあり新たな TA システムである可能性が考えられた。

第 4 章では、*vp1829/vp1830* と *vp1842/1843* に着目し、この 2 つが TA システムであることの同定を試みた。RT-PCR の結果、両遺伝子群ともにポリシストロン性の mRNA として転写されていることがわかり、オペロンを形成していることが示された。また、*vp1843* を大腸菌内で発現させると増殖は阻害されたが、*vp1842* と *vp1843* を同時に発現させると増殖が阻害されなかった。以上のことから、*vp1842/vp1843* は TA システムであり、VP1829 がアンチトキシン、VP1830 がトキシンとして機能していることが判明した。一方、VP1830 は VP1843 とアミノ酸が 9 個しか相違がないにも関わらず、*vp1830* を発現させても増殖は阻害されなかった。そこで、VP1830 の 9 個のアミノ酸を VP1843 の相当アミノ酸へ置換したに変異体を作製し大腸菌の増殖に与える影響を調べることにより、VP1843 の毒性に重要なアミノ酸残基の特定を試みた。その結果、VP1843 の毒性には 37 番目のリジンと 45 番目のプロリンが重要であることが明らかとなった。推定高次構造モデルでは、37 番目のリジンはα2 ヘリックス上に存在し、45 番目のプロリンは、α2 とα3 ヘリックの間にまるで 1 つのα ヘリックを切断するかのように存在していた。このことから、VP1843 の N 末端のα2 ヘリックスがその機能に重要であることがわかった。

第 5 章では、後の章で VP1830、VP1843、VP1829/VP1830、VP1842/VP1843 の性質を分析するために、これらを発現するプラスミドを構築し大腸菌内で発現及び精製を行った。VP1842/VP1843 を得るために、VP1842 の N 末端側の 23 残基を欠損させる必要があったが、すべて目的の精製標品を得ることができた。また、VP1829 は VP1830 と、

VP1842 は VP1843 と複合体を形成していることも示され、第 4 章で VP1843 は大腸菌の増殖を阻害したことから、*vp1842/vp1843* はタイプⅡ型の TA システムと推測された。

第 6 章では、VP1843 と VP1830 の生化学的性質をこれまで知られているタイプⅡ型の性質と比較することにより明らかとし、VP1843 の毒性の作用機構について検討した。ゲルろ過クロマトグラフィーとゲルシフトアッセイの結果、VP1842/VP1843 は、これまで知られているタイプⅡ型の TA システムと同様にヘテロ四量体を形成し、回文配列に結合することが明らかとなった。しかしながら、VP1843 はタイプⅡ型のトキシンにみられるタンパク質合成阻害活性、リボヌクレアーゼ活性、ジャイレース阻害活性のどれも示さず、VP1843 の毒性は既報のタイプⅡ型の毒性とは異なることが推測された。また、ゲルシフトの結果及び第 5 章での精製結果より、*vp1842* の翻訳開始点は、データーベースの開始コドンと異なり 24 番目のメチオニンであると示唆された。一方、VP1830 は、第 4 章で大腸菌の増殖阻害をせずトキシンではないようであったが、本章でもタイプⅡ型のトキシンの活性を示さなかった。しかしながら、VP1829/VP1830 は、VP1842/VP1843 と同様にヘテロ四量体を形成し、回文配列に結合することから、*vp1842/vp1843* のリプレッサーとして機能している可能性が考えられる。

第 7 章では、VP1843 の毒性について明らかするために、既報のタイプⅡ型以外のトキシンでみられる性質について確認した。その結果、*vp1843* を大腸菌内で発現させると大腸菌はフィラメント状になり、VP1843 の毒性は形態に影響をもたらすものであることが明らかとなった。また、*vp1843* 発現時の大腸菌を蛍光染色すると、細胞膜は損傷しておらず生きていることも示された。第 4 章の結果と合わせて考えると、*vp1843* を発現させると大腸菌は VBNC 状態になっていることが判明した。さらに、タイプⅣ型トキシンである YeeV と同じように細胞骨格タンパク質である FtsZ 及び MreB と相互作用することで毒性を発揮していることが考えらえたが、プルダウンアッセイを行った結果、VP1843 と FtsZ 及び MreB ホモログは相互作用を示さず、VP1843 の毒性のメカ

ニズムは解明できなかった。

以上から本研究で明らかとなったことをまとめる。腸炎ビブリオは、低温（10℃）、低栄養・低塩分（1.85%）環境下におくと約 10 日で VBNC 状態に移行し、桿状から球形に形態が変化する。*vp1842/vp1843* は腸炎ビブリオの TA システムとして機能しており、VP1843 は細胞の増殖を抑制するトキシンで、VP1842 は VP1843 と複合体を形成することで VP1843 の毒性を抑制するアンチトキシンである。VP1842 と VP1843 は複合体を形成することから、*vp1842/vp1843* はタイプⅡ型の TA システムに分類される。しかしながら、VP1843 は既報のタイプⅡ型のトキシン活性とは異なる細菌の形態変化をもたらすトキシンであり、その機能には 37 番目のリジンと 45 番目のプロリンが大きく寄与している。通常、細胞形態の変化は、細胞分裂の異常であることが知られていることから、VP1843 は細胞分裂に関わる分子の機能を阻害する新規なタイプⅡ型トキシンであると推測された。また、*vp1842/vp1843* は、*V. alginolyticus*、*V. anguillarum*、*V. cholerae*、*V. harveyi*、*V. splendidus* などのビブリオ属に広く保存されており、VP1843 は VBNC 状態の特徴である形態変化をもたらすことからも [66、67]、*vp1842/vp1843* は VBNC 状態の誘導に関係する因子の 1 つであると示された。

最後に今後の展望について述べる。まず、VP1843 のターゲットを明らかにし、どのように毒性を発揮しているか明らかにする必要がある。VP1843 は pET-22b ベクターを用いたとき、JM109 であってもクローンを得ることができず、得られたクローンは塩基配列が自然突然変異をしていた。これまでにタイプⅡ型でこのような性質を示すものとして、epsilon/zeta がある [68]。Zeta トキシンは uridine diphosphate-N-acetylglucosamine（UNAG）をリン酸化することで、ペプチドグリカン生合成の最初のステップを触媒する酵素である Mur を阻害し、細胞の成長を抑制する。Zeta トキシンは 250 アミノ酸か

ら構成されており、ホスフォトランスフェラーゼ様構造に折りたたまれていることが知られているため、VP1843 との相同性を調べたが、VP1843 はアミノ酸数が 92 と大きく異なり、また構造的な相同性も見られなかった。このことから VP1843 は Zeta トキシンと同じ作用ではないと思われるが、同じタイプⅡ型ということから、VP1843 の毒性はペプチドグリカン生合成に関係している可能性があり、今後 VP1843 の ATP 加水分解活性の有無を検討する必要がある。

また、腸炎ビブリオの *in vivo* での *vp1842/vp1843* の機能について確認する必要がある。これまでに *Mycobacterium smegmatis* 内で VapC トキシンを発現させると形態が変化し、休眠状態になることが明らかにされている [69]。既に、腸炎ビブリオの遺伝子組換え系が確立されていることから、VP1842/VP1843 のノックアウト株の調製、及び VP1843 の大量発現株を調製し、VBNC 状態への移行を確認することにより、TA システムと VBNC 状態の関連性を明確にすることが期待される。

最近、多くの病原菌が薬剤耐性をもつ細胞（persisters）を形成し、多数の抗生物質に対して抵抗性を獲得して生存していることが明らかとなっている [70、71]。さらに、この薬剤耐性細胞の形成は原核細胞にとどまらず、真核細胞のがん細胞にも同様の現象が知られており、抗がん剤耐性がん細胞が問題になっている。現在までの原核細胞の薬剤耐性細胞に関する研究から、その誘導に TA システムが関わっていることが強く示唆されている。本研究対象である腸炎ビブリオの VBNC 状態は薬剤耐性細胞と深く関わる現象である。今回の腸炎ビブリオの TA システムの VBNC 状態関与に関する研究成果は、“細菌の生き残り戦略”である VBNC 状態誘導機構を解明するもので、*Mycobacterium tuberculosis* や *Helicobacter pylori* 等の多くの病原菌や抗がん剤耐性がん細胞根絶に向けた薬剤開発のための重要な基礎情報を提供するものと期待している。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました九州大学大学院農学研究院　木村誠教授に深甚なる謝意を表します。

本研究を行うにあたり、御懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました九州大学並びに西九州大学　名誉教授　波多野昌二先生に、心から感謝の意を表します。

本研究の副査をお引き受けいただき、懇切なるご指導を賜りました九州大学大学院農学研究院　伊東信教授に心からの感謝の意を表します。

本研究中、終始有益なるご指導を賜りました九州大学大学院農学研究院　角田佳充准教授、中島崇助教に心から感謝の意を表します。

本研究は、共同研究者の皆様の協力により成果を得ることができました。新潟大学理学部・生物学科　内海利男教授、新潟大学研究推進機構・超域学術院　三好智博助教、熊本大学理学部　高木久徳博士、九州大学大学院システム生命科学府博士課程三年　張晶さんに心から謝意を表します。

本研究を行うにあたり、実験材料の提供ならびに有益なるご助言を頂きました九州大学大学院農学研究院　宮本敬久教授、本城賢一准教授、生物化学研究室の川口喜郎さん、上田敏史さん、大嶋浩介さん、森美佐子さんに、心より御礼を申し上げます。

最後に、九州大学　生物化学研究室の皆様とともに過ごせたことを心から感謝いたします。

参考文献

1) R.R. Colwell, P.R. Brayton, D.J. Grimes, D.B. Roszak, S.A. Huq, L.M. Palmer (1985) Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio/Technology*, **3**, 817-820.

2) J.D. Oliver (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **34**, 415-425.

3) M.J. Gauthier (2000) Environmental parameters associated with the viable but nonculturable. In Nonculturable microorganisms in the environment, 87-112. (ASM Press, Washington, DC)

4) S.N. Wai, T. Moriya, K. Kondo, H. Misumi, A. Amako (1996) Resuscitation of *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 from a viable but nonculturable state by heat shock. *FEMS Microbiol. Lett.*, **136**, 187-191.

5) Y. Mizunoe, S.N. Wai, A. Takade, S. Yoshida (1999) Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H_2O_2-degrading compounds. *Arch. Microbiol.*, **172**, 63-67.

6) M. Pommepuy, M. Butin, A. Derrien, M. Gourmelon, R.R. Colwell, M. Cormier (1996) Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Appl. Environ. Microbiol.,* **62**, 4621-4626.

7) D. Hussong, R.R. Colwell, M. O'Brien, E. Weiss, A.D. Pearson, R.M. Weiner, W.D. Burge (1987) Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media. *Bio/Technology*, **5**, 947-952.

8) S.K. Saha, S. Saha, S.C. Sanyal (1991) Recovery of injured *Campylobacter jejuni* cells

after animal passage. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3388-3389.

9) C.S. Hayes, D.A. Low (2009) Signals of growth regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.,* **12**, 667-673.

10) T. Ogura, S. Hiraga (1983) Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4784-4788.

11) Y. Masuda, K. Miyakawa, Y. Nishimura, E. Ohtsubo (1993) *chpA* and *chpB*, *Escherichia coli* chromosomal homologs of the *pem* locus responsible for stable maintenance of plasmid R100. *J. Bacteriol.*, **175**, 6850-6856.

12) M. Christensen-Dalsgaard, M.G. Jorgensen, K. Gerdes (2010) Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses. *Mol. Microbiol.,* **75**, 333-348.

13) C. Galvani, J. Terry, E.E. Ishiguro (2001) Purification of the RelB and RelE proteins of *Escherichia coli*: RelE binds to RelB and to ribosomes. *J. Bacteriol.,* **183**, 2700-2703.

14) M. Gotfredsen, K. Gerdes (1998) The *Escherichia coli relBE* genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Mol. Microbiol.*, **29**, 1065-1076.

15) Y. Yamaguchi, J.H. Park, M. Inouye (2011) Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. *Annu. Rev. Genet.*, **45**, 61-79.

16) S.K. Christensen, M. Mikkelsen, K. Pedersen, K. Gerdes (2001) RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **98**, 14328-14333.

17) S.K. Christensen, G. Maenhaut-Michel, N. Mine, S. Gottesman, K. Gerdes, L. van Melderen (2004) Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in *Escherichia coli*: involvement of the *yefM-yoeB* toxin-antitoxin system. *Mol. Microbiol.*, **51**, 1705-1717.

18) C.F. Schuster, R. Bertram (2013) Toxin–antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. *FEMS Microbiol. Lett.*, **340**, 73-85.

19) Y. Zhang, J. Zhang, K. P. Hoeflich, M. Ikura, G. Qing, M. Inouye (2003) MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Cell,* **12**, 913–923.

20) Y. Zhang, L. Zhu, J. Zhang, M. Inouye (2005) Characterization of ChpBK, an mRNA interferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.,* **280**, 26080-26088.

21) K. Pedersen, A.V. Zavialov, M.Y. Pavlov, J. Elf, M. Ehrenberg (2003) The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell,* **112**, 131-140.

22) Y. Zhang, M. Inouye (2009) The inhibitory mechanism of protein synthesis by YoeB, an *Escherichia coli* toxin. *J. Biol. Chem.,* **284**, 6627-6638.

23) M.H. Prysak, C.J. Mozdzierz, A.M. Cook, L. Zhu, Y. Zhang, M. Inouye, N.A. Woychik (2009) Bacterial toxin YafQ is an endoribonuclease that associates with the ribosome and blocks translation elongation through sequence-specific and frame-dependent mRNA cleavage. *Mol. Microbiol.,* **71**, 1071-1087.

24) G.B. Nair, T. Ramamurthy, S.K. Bhattacharya, B. Dutta, Y. Takeda, D.A. Sack (2007) Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin. Microbiol. Rev.,* **20**, 39-48.

25) Y. Yamaichi, T. Iida, K.S. Park, K. Yamamoto, T. Honda (1999) Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species. *Mol. Microbiol.,* **31**, 1513-1521.

26) A. DePaula, L.H. Hopkins, J.T. Peeler, B. Wentz, L.M. McPhearson (1990) Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U. S. coastal waters and oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**,

2299-2302.

27) M.A.R. Chowdhury, H. Yamanaka, S. Miyoshi, S. Shinoda (1990) Ecology and seasonal distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic environments of a temperate region. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **74**, 1-9.

28) H.C. Wong, P. Wang (2004) Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.,* **96**, 359-366.

29) H.C. Wong, P. Wang, S.Y. Chen, S.W. Chiu (2004) Resuscitation of viable but non-culturable *Vibrio parahaemolyticus* in a minimum salt medium. *FEMS Microbiol. Lett.*, **233**, 269-275.

30) M. Christensen-Dalsgaard, K. Gerdes (2006) Two *higBA* loci in the *Vibrio cholerae* superintegron encode mRNA cleaving enzymes and can stabilize plasmids. *Mol. Microbiol.*, **62**, 397-411.

31) P.P. Budde, B.M. Davis, J. Yuan, M.K. Waldor (2007) Characterization of a *higBA* toxin-antitoxin locus in *Vibrio cholerae. J. Bacteriol.*, **189**, 491-500.

32) J.D. Oliver, L. Nilsson, S. Kjelleberg (1991) Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2640-2644.

33) K. Kondo, A. Takade, K. Amako (1994) Morphology of the viable but nonculturable *Vibrio cholerae* as determined by the freeze fixation technique. *FEMS Microbiol. Lett.*, **123**, 179-184.

34) N. Yamaguchi, M. Nasu (1997) Flow cytometric analysis of bacterial respiratory and enzymatic activity in the natural aquatic environment. *J. Appl. Microbiol.*, **83**, 43-52.

35) S.J. Giovannoni, E.F. DeLong, G.J. Olsen, N.R. Pace (1988) Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.*, **170**,

720-726.

36) E.F. DeLong, G.S. Wickham, N.R. Pace (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, **243**, 1360-1363.

37) G. J. Nuovo (1994) In situ detection of PCR-amplified DNA and cDNA. *J. Histotechnol.*, **17**, 235-246.

38) F. Maruyama, T. Kenzaka, N. Yamaguchi, K. Tani, M. Nasu (2003) Detection of bacteria carrying the stx_2 gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5023-5028.

39) G. Muyzer, E.C. De Waal, A.G. Uitterlinden (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 695-700.

40) S.F. Bloomfield, G.S. Stewart, C.E. Dodd, I.R. Booth, E.G. Power (1998) The viable but non-culturable phenomenon explained? *Microbiology*, **144**, 1-3.

41) R.M. Baker, F.L. Singleton, M.A. Hood (1983) Effects of nutrient deprivation on *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 930-940.

42) 中野宏幸，藤井みか，北口暁子 (2003) 食中毒原因菌の VNC 状態について，月刊海洋，号外 **33**, 112-122.

43) K. Gerdes, S.K. Christensen, A. Lobner-Olesen (2005) Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nature Rev. Microbiol.*, **3**, 371-382.

44) F. Hayes (2003) Toxin-antitoxin: plasmid maintenance, programmed cell death and cell cycle arrest. *Science*, **301**, 1496-1499.

45) Y. Yamaguchi, M. Inouye (2011) Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. *Nature Rev. Microbiol.*, **9**, 779-790.

46) E.W. Sevin, F. Barloy-Hubler (2007) RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying

toxin-antitoxin loci in prokaryotes. *Genome Biol.,* **8**, R155.

47) L. Van Melderen, M. Saavedra De Bast (2009) Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet.*, **5**, e1000437.

48) Y. Shao, E.M. Harrison, D. Bi, C. Tai, X. He, H.Y. Ou, K. Rajakumar, Z. Deng (2011) TADB: a web-based resource for Type 2 toxin–antitoxin loci in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Res.*, **39**, D606-D611.

49) R. Motiejunaite, J. Armalyte, A. Markuckas, E. Suziedeliene (2007) *Escherichia coli dinJ-yafQ* genes act as a toxin–antitoxin module. *FEMS Microbiol. Lett.,* **268**, 112-119.

50) K. Kamada, F. Hanaoka (2005) Conformational change in the catalytic site of the ribonuclease YoeB toxin by YefM antitoxin. *Mol. Cell*, **19**, 497-509.

51) H. Takagi, Y. Kakuta, T. Okada, M. Yao, I. Tanaka, M. Kimura (2005) Crystal structure of archaeal toxin-antitoxin RelE-RelB complex with implications for toxin activity and antitoxin effects. *Nature Struct. Mol. Biol.,* **12**, 327-331.

52) K. Kamada, F. Hanaoka, S.K. Burley (2003) Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. *Mol. Cell*, **11**, 875-884.

53) Y. Zhang, J. Zhang, H. Hara, I. Kato, M. Inouye (2005) Insights into the mRNA cleavage mechanism by MazF, an mRNA interferase. *J. Biol. Chem.,* **280**, 3143-3150.

54) Y. Yamaguchi, J.H. Park, M. Inouye (2009) MqsR, a crucial regulator for quorum sensing and biofilm formation, is a GCU-specific mRNA interferase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **284**, 28746-28753.

55) B.L. Brown, S. Grigoriu, Y. Kim, J.M. Arruda, A. Davenport, T.K. Wood, W. Peti, R. Page (2009) Three dimensional structure of the MqsR:MqsA complex: a novel TA pair comprised of a toxin homologous to RelE and an antitoxin with unique properties. *PLoS Pathog.*, **5**, e1000706.

56) B. Kedzierska, L.Y. Lian, F. Hayes (2007) Toxin–antitoxin regulation: bimodal interaction of YefM–YoeB with paired DNA palindromes exerts transcriptional autorepression. *Nucleic Acids Research*, **35**, 325-339.

57) I. Marianovsky, E. Aizenman, H. Engelberg-Kulka, G. Glaser, (2001) The regulation of the *Escherichia coli* mazEF promoter involves an unusual alternating palindrome. *J. Biol. Chem.*, **276**, 5975-5984.

58) J. Armalyte, M. Jurenaite, G. Beinoraviciute, J. Teiserskas, E. Suziedeliene (2012) Characterization of *Escherichia coli dinJ-yafQ* toxin-antitoxin system using insights from mutagenesis data. *J. Bacteriol.*, **194**, 1523-1532.

59) K. Tagomori, T. Iida, T. Honda (2002) Comparison of genome structures of Vibrios, bacteria possessing two chromosomes. *J. Bacteriol.,* **184**, 4351-4358.

60) G.I. Li, Y. Zang, M. Inouye, M. Ikura (2009) Inhibitory mechanism of *E. coli* RelE/RelB toxin/antitoxin module involves a helix displacement near a mRNA interferase active site. *J. Biol. Chem.*, **284**, 14628-14636.

61) A. Fiebig, C.M.C. Rojas, D. Siegal-Gaskins, S. Crosson (2010) Interaction specificity, toxicity and regulation of a paralogous set of ParE/RelE-family toxin-antitoxin systems. *Mol. Microbiol.*, **77**, 236-251.

62) N. Matsuo (2010) Master thesis, Kyushu University, Japan

63) Y. Jiang, J. Pogliano, D.R. Helinski, I. Konieczny (2002) ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. *Mol. Microbio*l., **44**, 971-979.

64) T. Uchiumi, S. Honma, T. Nomura, E.R. Dabbs, A. Hachimori (2002) Translation elongation by a hybrid ribosome in which protein at the GTPase center of the *Escherichia coli* ribosome are replaced with rat counterparts. *J. Biol. Chem.,* **277**, 3857-3862.

65) Q. Tan, N. Awano, M. Inouye (2011) YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. *Mol. Microbio*l., **79**, 109-118.

66) P. Mary, N.E. Chihib, O. Charafeddine, C. Defives, J.P. Hornez (2002) Starvation survival and viable but nonculturable states in *Aeromonas hydrophila*. *Microbiol. Ecol*., **43**, 250-258.

67) D.R. Pawlowski, D.J. Metzger, A. Raslawsky, A. Howlett, G. Siebert, R.J. Karalus, S. Garrett, C.A. Whitehouse (2011) Entry of *Yersinia pestis* into the viable but nonculturable state in a low-temperature tap water microcosm. *PLos ONE*, **6**, e17585.

68) A Meinhart, J.C. Alonso, N. Strater, W. Saenger (2003) Crystal structure of the plasmid maintenance system epsilon/zata: functional mechanism of toxin zata and inactivation by epsilon 2 zata 2 complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1661-1666.

69) O.I. Demidenok, A.S. Kaprelyants, A.V. Goncharenko (2014) Toxin-antitoxin *vapBC* locus participates in formation of the dormant state in *Mycobacterium smegmatis. FEMS Microbiol. Lett.*, **352**, 69-77.

70) E. Maisonneuve, K. Gerdes (2014) Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell,* **157**, 539-548.

71) S. Helaine, E. Kugelberg (2014) Bacterial persisters: formation, eradication, and experimental systems. *Trends Microbiol*., online available.