

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32675

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18675

研究課題名(和文) 枯草菌胞子を用いた有用多糖類合成系の確立に向けての基礎研究

研究課題名(英文) Study of the formation process of the *Bacillus subtilis* spore polysaccharide layer for potential applications.

研究代表者

安部 公博 (ABE, Kimihiro)

法政大学・マイクロ・ナノテクノロジー研究センター・研究員

研究者番号：10748940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：枯草菌の胞子は、多糖類を主成分とした外層に包まれている。胞子表層の性質は外環境との相互作用において重要な因子である。本研究は、この多糖類層の形成過程の解明を目指した。本研究により、胞子多糖類層の形成に関与する遺伝子として、spsM、spsABCDEFGHIJKL、cgeAB、cgeCDE、cotVWXYZと、これらの遺伝子の発現に必要な転写因子をコードするgerEを同定した。Sps及びCgeタンパク質群が多糖類合成を担い、胞子タンパク質の内、特にCotW、CotXとCotZは多糖類成分の胞子表層への付着に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Bacillus subtilis spore is surrounded by a polysaccharide layer. This study was aimed for understanding of the morphological process of formation of the polysaccharide layer. Here, we uncovered the molecular mechanism of activation of spsM, which was identified as an essential gene for the generation of the polysaccharide layer. In search for the other members that are required for the polysaccharide layer production, we identified spsABCDEFGHIJKL, cgeAB, cgeCDE, cotVWXYZ, and gerE which encodes the transcriptional factor for their expression. Based on the amino-acids sequences, Sps and Cge proteins are considered to synthesize and elongate the polysaccharides. Furthermore, we revealed that spore coat proteins, CotW, CotX, and CotZ, play the important role in the attachment of the polysaccharides on the spore surface.

研究分野：農芸化学

キーワード：枯草菌 胞子 多糖類合成 遺伝子再編成 部位特異的DNA組換え ファージ

### 1. 研究開始当初の背景

枯草菌をはじめとする有孢子細菌は、外界の栄養環境が悪化すると、熱や化学薬品に耐性をもつ内生孢子を形成し、環境が好転するまで休眠状態で過ごす。枯草菌は栄養増殖細胞から孢子形成期に入ると、母細胞と呼ばれる大きな細胞と将来孢子となる小さな細胞に不等分裂する。各々の細胞に特異的な孢子形成関連遺伝子群が発現し、母細胞は孢子の外側から、前孢子細胞は内側から、化学的に成分の異なる多重の層構造から成る成熟孢子を作り上げる(図1)。枯草菌の成熟孢子は内側から、DNAとタンパク質の凝集体から成るコア、主にペプチドグリカンからなるコレテックス層、70種類以上のスポアコートタンパク質を含むスポアコート層から構成される。スポアコート層はそのタンパク質成分からインナーコート層、アウターコート層に分類され、さらに近年、アウターコート層の外側にはさらにクラスト層があることが報告されている(図1)。

これまでに我々は、枯草菌孢子の最外層はガラクトースとラムノースを主成分とする多糖類層であり、この多糖類層の形成には *spsM* 遺伝子が必須であることを明らかとした。また、枯草菌 168 株の *spsM* は SPβ プロファージの挿入によって分断されているが、孢子形成期になるとプロファージが染色体 DNA から切り離されて *spsM* を再構築することを見出した(図1)。

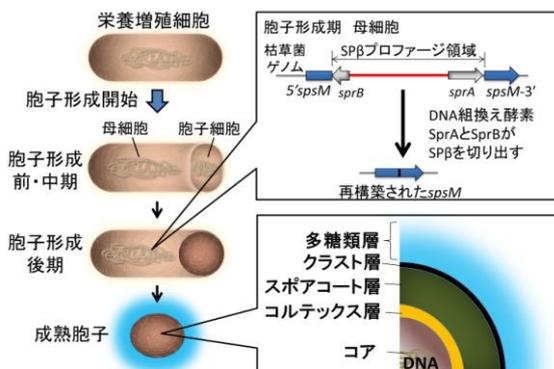


図1. 枯草菌の孢子形成と *spsM* 遺伝子の再編成

### 2. 研究の目的

枯草菌孢子の多糖類層の合成過程を解明し、有用微生物が生産する機能性多糖類の大量合成に枯草菌を利用できるかを検討する。

### 3. 研究の方法

(1) *spsM* 再構築の分子メカニズムの解析。大腸菌より精製した組換え SprA と SprB を用いて、*in vitro* における DNA 組換え実験や SprA と SprB の複合体形成の解析を行った。

(2) *spsM* の転写制御機構の解析。枯草菌孢子形成期特異的  $\sigma$  因子及び転写因子欠損株における *spsM* の転写活性を  $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイにより調べ、*spsM* がどのような転写制御を受けるかを解析した。

(3) 孢子多糖類合成に関わる *spsM* 以外の遺伝子の検索。*spsM* と同様の転写制御を受ける遺伝子の変異株における孢子多糖類合成能を墨汁で染色した孢子を顕微鏡観察により調べた。

(4) 孢子表層タンパク質をコードする *cotVWXYZ* が孢子多糖類層の形成に果たす役割の解明。孢子多糖類層の形成に関与するタンパク質に GFP を融合し、*cotVWXYZ* 遺伝子の欠損時における GFP 融合タンパク質の局在を蛍光顕微鏡で観察した。

### 4. 研究成果

(1) *spsM* 再構築の分子メカニズムの解析。枯草菌孢子最外層多糖類合成に関与する *spsM* は SPβ プロファージの挿入により 2 つに分断されている。我々は、以前の研究で SPβ プロファージ上の *sprA* と *sprB* が、プロファージの切り出しと *spsM* の再編成に必要であることを見出している。本研究では、SprA と SprB を過剰発現させた大腸菌から、これらのタンパク質を精製し、*in vitro* における DNA 組換え系を構築した。その結果、SprA は SPβ プロファージと *spsM* 内の特定の塩基配列 (*attP* お

よび *attB*) を認識し、部位特異的 DNA 組換え反応を触媒した。SprA は単独では SP  $\beta$  フェージ DNA の *spsM* 内への挿入反応を触媒するが、切り出し反応(すなわち *spsM* 再編成)には、SprA と SprB の両方を必要とした (図 2)。

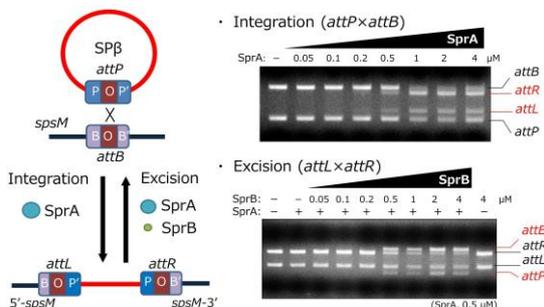


図2. *in vitro*におけるSprAとSprBによるDNA組換え反応

SprB は SprA の C 末端に結合することが、未変性タンパク質電気泳動による SprA-SprB 複合体解析の結果から明らかとなった。SprB と結合した SprA は SP  $\beta$  フェージ DNA の切り出し活性を有する一方、挿入反応を触媒しないことが示された。SP  $\beta$  溶原菌において、SprA は対数増殖期に最も発現し、孢子形成が進むと発現が減少するが、SprB は孢子形成期中期から終期に至るまで発現する。したがって、孢子形成期では SprB が過剰量存在することになり、切り出された SP  $\beta$  フェージ DNA の *spsM* への再挿入が阻害されるため、十分な量の SpsM が発現されることが示された。

このような遺伝子発現様式は、枯草菌 *spsM* だけでなく、セレウス菌 (*Bacillus cereus* ATCC10987 株)、*gerE* 遺伝子においても見られることが明らかとなった。セレウス菌の *gerE* を分断する介在配列 Gin (*gerE*-intervening element) は、SprA に相当する部位特異的 DNA 組換え酵素 GirC と SprB に相当する補助因子 GirX をコードし、*spsM* と同様の機構で孢子形成期特異的にセレウス菌の *gerE* の再構築が行われることが証明された。この結果は、孢子形成関連遺伝子の再編成が有孢子細菌に見られる普遍的な現象であることを示唆している。

(2) *spsM* の転写制御機構の解析。枯草菌孢子形成期特異的  $\sigma$  因子及び転写因子欠損株を用いて *spsM* の転写活性を調べた結果、*spsM* は孢子形成期母細胞特異的な  $\sigma$  因子  $\sigma^K$  と転写因子 GerE によって正に転写が制御されることが明らかとなった (図 3)。

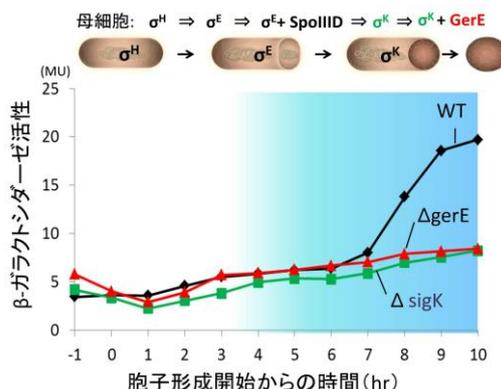


図3. *spsM* 遺伝子のプロモーター活性

(3) 孢子多糖類合成に関わる *spsM* 以外の遺伝子の検索。*spsM* と同様に  $\sigma^K$  と GerE によって正に制御される遺伝子群の破壊株における孢子多糖類合成能を調べた。その結果、*spsM* の他に、*spsABCDEFGHIJKL*、*cgeAB*、及び *cgeCDE* オペロンが孢子最外層多糖類合成に関与することが明らかとなった (図 4)。

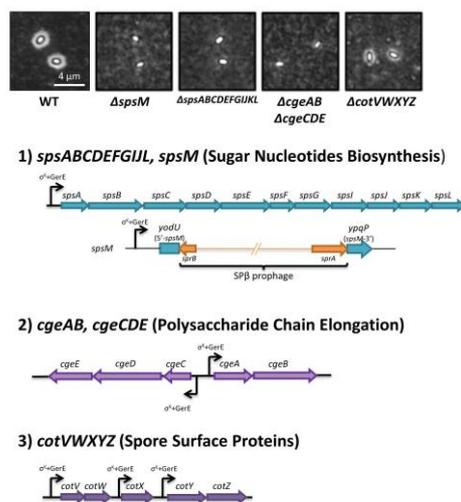


図4. 孢子多糖類層の形成に関わる遺伝子群

各遺伝子にコードされるアミノ酸配列情報から、*spsA*, *spsB*, *cgeB*, *cgeD*が多糖鎖を合成するための糖転移酵素をコードし、その他の遺伝子は、多糖類の基質の合成や修飾に関与することが推測された。*CgeA* は *Bacillus* 属細菌でのみ見られるユニークなタンパク質であり、その役割は不明であるが、孢子多糖類層の形成に必須となる因子であった。一方、*cgeCDE*は多糖類合成には必須ではないが、*cgeD*変異体で多糖鎖が異常に長くなったことから、*CgeD*は多糖鎖長の制御を行っている可能性が示唆された。

(4) 孢子表面タンパク質をコードする *cotVWXYZ* が孢子多糖類層の形成に果たす役割の解明。*cotVWXYZ* 遺伝子欠損株を用いた解析から、これらの遺伝子にコードされるタンパク質が多糖類層の形成に関与することが示された(図5)。特に *CotZ* 欠損孢子において、孢子表面から多糖類層が剥離する様子が観察された(図5,  $\Delta cotZ$ )。 *CotZ* は孢子アウターコートタンパク質 *CotE* と相互作用することが報告されている。そこで、*CotE* 欠損孢子の形態観察を行ったところ、*CotZ* 欠損と同様に多糖類層の剥離が見られた(図5, *cotEd*)。このことから、*CotE*-*CotZ* 間の結合が多糖類層と孢子本体を結びつけていると考えられた。

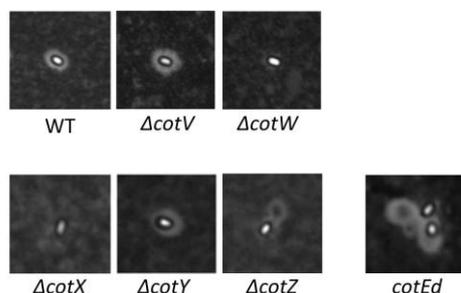


図5. 孢子タンパク質欠損による多糖類層形成への影響

*CotX* 欠損孢子では、多糖類層の消失がみられた。*GFP* を融合した *CgeA* タンパク質は、*CotX* 依存的に母細胞内に形成された内生孢子表面に局在したことから(図6)、*CotX* の役割は、

多糖類層の合成に必須な *CgeA* を孢子表面へ局在化させることだと推測された。

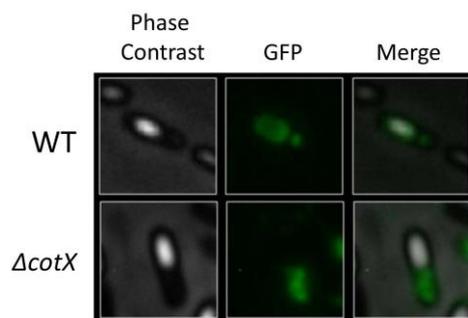


図6. *CotX*依存的な孢子タンパク質の孢子表面への局在

*CotY* は多糖類層形成には必須でなかったが(図5,  $\Delta cotY$ )、*GFP* 融合させた *CotX* や *CotZ* の孢子表面への定着を促進した。

*CotX*、*CotY* 及び *CotZ* は孢子表面のタンパク質層(クラスト層)の主要な構成成分であることが報告されているが、*CotV* と *CotW* については、孢子表面での正確な局在場所や機能は明らかとなっていなかった。*CotV* の欠損は、孢子表面多糖類層の形成に影響が見られなかったため、その機能はいまだ不明である。もしかしたら、多糖類層形成とは異なる役割があるのかもしれない。一方、*CotW* を欠損させると、孢子から多糖類層がほぼ完全に消失したことから、孢子表面への多糖類の付着に極めて重要であることがわかった。今回の結果から、*CotW* それ自身か、あるいは *CotW* と直接相互作用する因子が孢子表面多糖類のアンカーとなっている可能性が考えられた。

多糖類は、細胞間の相互作用、細胞分化や、免疫応答などに関わる重要な生体分子であり、核酸やタンパク質に次ぐ第3の鎖状生体高分子として注目を集めている。また、ヨーグルトに含まれるビフィズス菌や乳酸菌などに代表される微生物が産生する多糖類は、ヒトの免疫機能を高めたり、整腸効果があることが知られている。今回同定した枯草菌ゲノム上の孢子多糖類合成遺伝子群を別菌種の有用多糖類合成遺伝子と置換すれば、枯草菌を宿主として有用多糖類を生産できる可

能性があると考えられる。今後さらに、胞子多糖類がどのように CotW(あるいは未同定の多糖類アンカー)に付加させるかが解明されれば、枯草菌胞子を有用多糖類合成の足場として利用できるかと期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kimihiko Abe, Shin-ya Shimizu, Shuhei Tsuda, and Tsutomu Sato. (2017) A novel non prophage(-like) gene-intervening element within *gerE* that is reconstituted during sporulation in *Bacillus cereus* ATCC10987. Scientific Reports, Vol. 7, No. 1, Article number 11426. Doi: 10.1038/s41598-017-11796-8 (査読有)
- ② Kimihiko Abe, Takuo Takamatsu, and Tsutomu Sato. (2017) Mechanism of bacterial gene rearrangement: SprA-catalyzed precise DNA recombination and its directionality control by SprB ensure the gene rearrangement and stable expression of *spsM* during sporulation in *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Research Vol. 45, No. 11, pp. 6669-6683. Doi: 10.1093/nar/gkx466 (査読有)

[学会発表] (計 37 件)

- ① 安部公博, 高橋匠, 清水慎哉, 高松拓夫, 津田嵩平, 佐藤勉 (2018) グラム陽性細菌における胞子形成期特異的な遺伝子再編成の普遍性と分子メカニズム 第 12 回日本ゲノム微生物学会年会
- ② 中谷優星, 安部公博, 岩本敬人, 佐藤勉 (2018) 枯草菌胞子最外層の解析 第 12 回日本ゲノム微生物学会年会
- ③ 清水慎哉, 津田嵩平, 安部公博, 佐藤勉

(2017) *Bacillus cereus* ATCC10987 における可動性因子 *gin* を介した *gerE* 遺伝子再編成 2017 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議

- ④ Kimihiko Abe, Takuo Takamatsu, Tsutomu Sato (2017) Mechanism of bacteria gene rearrangement during sporulation Molecular Genetics of Bacteria and Phages Meeting
- ⑤ 安部公博, 岩本敬人, 井之口紫苑, 小林優生, 佐藤勉 (2016) 枯草菌胞子ポリサッカライド層の解析 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

安部 公博 (ABE, Kimihiko)  
法政大学・マイクロ・ナノテクノロジー研究センター・研究員  
研究者番号: 10748940