

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05762

研究課題名(和文) in vivoゲノム記録法による微生物集団の解析

研究課題名(英文) Development of "RIGR (Recombinase-mediated In vivo Genomic Recording) system"

研究代表者

安部 公博 (Abe, Kimihiro)

国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター・主任研究官

研究者番号：10748940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多くの細菌は、自然環境中ではバイオフィームと呼ばれる微生物集団を形成して生活しており、集団内の各々の菌体が役割分担(機能分化)をすることが、バイオフィームの形態形成や維持に重要であると考えられている。本研究は、枯草菌をモデルとして、バイオフィーム内の個々の細菌の機能分化状態をより詳しく解析できる手法「in vivo ゲノム記録法」の開発を目的とした。本研究の結果、枯草菌の特徴的な形質である、孢子形成細胞及びDNA受容細胞(自然形質転換細胞)へ分化したことをゲノムDNA上に記録・保持する枯草菌株を樹立できた。今後、本手法がバイオフィームの解析に大きく貢献できると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、バイオフィーム中の個々の細菌の分化状態データを各細菌ゲノムDNAを記録媒体として保存する「in vivo ゲノム記録法(RIGR法)」の技術的基盤を確立することである。本手法を用いることで、自然環境中の細菌の暮らしぶりをよりリアルに知ることができ、ヒトと微生物のより良い共生関係の構築に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)： Many bacteria form communities called biofilms to survive harsh natural environments. It is known that individual bacterial cells play different roles in biofilms. Our research aimed to develop a novel methodology for analysis of bacterial behaviors in a biofilm, designated as "RIGR (Recombinase-mediated In vivo Genomic Recording) system", using *Bacillus subtilis* as the model organism. In this study, we established *B. subtilis* strains that can store a memory of cellular differentiation into sporulating or natural (DNA) competent cells in their genomic DNA. The RIGR system can be expected to contribute to a better understanding of bacterial biofilms in the future.

研究分野：細菌学

キーワード：枯草菌 バイオフィーム セリンリコンビナーゼ DNA組換え 細胞分化

## 1. 研究開始当初の背景

自然環境中の枯草菌は、様々な環境ストレスから身を守るためにバイオフィームと呼ばれる3次元的な微生物集団の塊を作って生活しており、各々の菌体が役割分担をすることで、集団生活を維持していることが、近年わかってきた。これまでによく研究されてきた枯草菌バイオフィームを例にとると、バイオフィーム領域を広げる運動性細胞、バイオフィームの基本骨格となる菌体外マトリクスを生産する細胞、外環境の悪化に耐えうる胞子を作り出す細胞、抗菌ペプチド産生細胞など、多種多様な異なる形質・機能をもつ細胞が群れを成し、1つの微生物集団を形成している(図1)。微生物集団における細胞形質の不均一性の出現は、枯草菌のみならず多くの細菌種で見られる普遍的な現象であり、バイオフィームの形態形成や維持に重要な意味をもつと示唆される。しかしながら、これまで"バイオフィーム形成過程において、いつ・どのように個々の菌体の役割分担が決定されるのか?(細胞機能分化の不均一性の発生・制御メカニズム)、また、その役割分担が時間的に変化することがあるのだろうか?(不均一性のダイナミクス)"といった問題については、いまだ解明されていない。

真正細菌は1細胞のサイズが小さく、機能分化した菌体間の見分けは、外見上困難である。そのため、従来の細菌集団の不均一性の研究では、機能分化細胞特異的に発現する遺伝子のプロモーター下に蛍光タンパク質遺伝子を導入するか、分化細胞を特異的に染色できるような蛍光試薬を用いて、菌が発する蛍光を指標に分化細胞を見分けて、蛍光顕微鏡やセルソーター等で解析する手法が一般的に使われてきた。しかしながら、このような手法によって得られる結果が示すのは、観察を行う時点での"現在の細胞分化状態"であり、バイオフィーム形成過程における1菌体レベルでの機能分化の変遷、つまり各菌体の"過去から現在に至るまでの生きざま"について知ることはできなかった。そのため、バイオフィーム形成過程における細胞形質不均一性のダイナミクスを理解する上で、各細菌の機能分化を時系列的に1菌体レベルで解析できる手法が現在必要とされている。

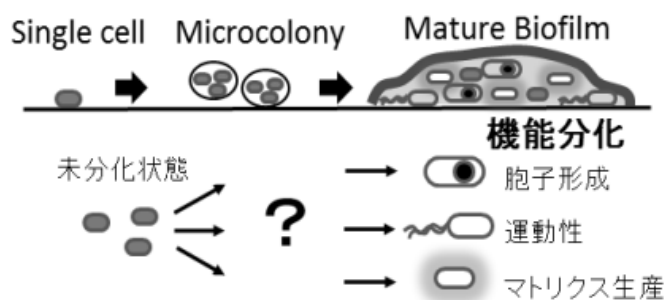


図1. 枯草菌のバイオフィーム形成

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、細菌ゲノム上に細菌の状態変化データを生きた細胞のゲノムDNAにセリンリコンビナーゼを使って書き込む技術" *in vivo* ゲノム記録法(RIGR法)"の技術的基盤を確立し、バイオフィームの形成過程において、個々の菌体の細胞分化が時間的・空間的にどのように制御され、集団形成・維持に寄与しているかを明らかにすることである。本手法が確立されれば、自然環境中の細菌のライフスタイルをより詳細に知ることができ、それにより得られた知見は、ヒトと微生物とのより良い共生関係の構築・維持に有用な情報となると考えられる。

### 3. 研究の方法

- (1) 常発現プロモーターとセリンリコンビナーゼ GirC の標的 DNA 配列 *attP<sub>GirC</sub>* 及び *attB<sub>GirC</sub>* に挟まれた ZsGreen あるいは mScarlet-I 蛍光タンパク質遺伝子(常発現プロモーターと逆向きに設置)からなる記録モジュール DNA を作製し、枯草菌 168 株に導入した。
- (2) 自然形質転換細胞(DNA 受容細胞)特異的プロモーター流にセリンリコンビナーゼ *girC* 遺伝子を連結したりコンビナーゼモジュールを構築し、(1)で得られた枯草菌株に導入した。
- (3) (2)で得られた自然形質転換記録株を自然形質転換誘導培地で 37 °C で 4 時間程度培養して得られた自然形質転換細胞をスペクチノマイシン耐性遺伝子を含む DNA 断片で形質転換を行った。薬剤耐性遺伝子導入後の菌体をスペクチノマイシン含有 LB プレート(あるいはスペクチノマイシンを含まない LB プレート)に塗布し、37 °C で 16 時間培養後生えてきたコロニーを観察した。
- (4) 孢子形成期特異的プロモーター下流にセリンリコンビナーゼ *girC* 遺伝子を連結したりコンビナーゼモジュールを構築し、(1)で得られた枯草菌株に導入した。
- (5) (4)で得られた孢子形成記録株を孢子形成誘導培地で 37 °C で 1 日培養し、80-100 分間の熱処理後(あるいは熱処理無し)、適宜希釈して LB プレートに塗布し、37 °C で 16 時間培養後に生えてきたコロニーを観察した。
- (6) 枯草菌類縁菌 *Paenibacillus polymyxa* における孢子形態形成及び孢子形成期特異的遺伝子発現制御の解析を行い、枯草菌以外の菌でも孢子形成記録株の作製が可能かを調べた。
- (7) 枯草菌において、膜小胞生産細胞が新奇分化細胞候補となり得るかを検証した。

### 4. 研究成果

【方法(1), (2), (4)の結果について】

本研究は、溶原性バクテリオファージのファージインテグラーゼとして働くセリンリコンビナーゼの酵素学的特性に着目した。セリンリコンビナーゼは、バクテリオファージ感染の際に、感染宿主細菌及びバクテリオファージゲノム DNA 上の 40-60 bp の特定の塩基配列をもつ DNA 間(各々 *attP* 及び *attB* と呼ばれる)で、部位特異的な DNA 組換えを引き起こし、バクテリオファージゲノムを宿主細菌染色体に潜り込ませる作用をする。セリンリコンビナーゼによる DNA 組換えは非常に特異性が高く、不可逆的な反応である。また、セリンリコンビナーゼタンパク質の発現は、細菌の生育には影響を及ぼさないため、本酵素を用いれば、細胞が生きたままの状態でも不可逆的にゲノム DNA 配列の改変を行うことが可能である。

今回、孢子形成細胞および自然形質転換細胞特異的プロモーター下流に *girC* セリンリコンビナーゼ 遺伝子を連結したりコンビナーゼモジュール DNA 断片と、常発現プロモーターと GirC 標的 DNA 配列 *attP<sub>GirC</sub>* 及び *attB<sub>GirC</sub>* に挟まれた蛍光タンパク質遺伝子からなる記録モジュール DNA 断片を設計・構築して枯草菌 168 株に導入し、機能分化記録株を樹立した。これらの菌株は、孢子形成もしくは自然形質転換細胞に分化すると、GirC セリンリコンビナーゼが発現し、蛍光タンパク質遺伝子の前後に配置した GirC 標的 DNA 配列間で部位特異的な DNA 組換えを起す。その結果、蛍光タンパク質遺伝子の逆位が起こり、常発現プロモーターからこの蛍光タンパク質遺伝子が転写される。GirC セリンリコンビナーゼによる部位特異的な DNA 組換え反応は不可逆的なため、一度、孢子形成細胞および自然形質転換細胞に分化した細胞が栄養増殖細胞に復帰しても、蛍光タンパク質遺伝子は発現し続ける。

### 【方法(3)の結果について】

作製した自然形質転換記録株をスペクチノマイシン耐性遺伝子を含む外来 DNA 断片を用いて形質転換し、LB プレートおよびスペクチノマイシン含有 LB プレートに塗布した。プレート上に生じたコロニーの mScarlet-I 蛍光を LAS4000 システムで観察したところ、LB プレート上には全体のおよそ 5%のコロニーで蛍光が検出された【図 2 左、黒いコロニー(矢印)】。この結果は、培養液中の全菌体中の 5%程度が自然形質転換能を有していたことを示唆しており、一般的に知られている枯草菌形質転換誘導培地中における実際の形質転換能細胞の出現率とおおむね一致した。一方、スペクチノマイシン耐性遺伝子の獲得により同抗生物質耐性を得た菌体は形質転換能を有していたはずなので、スペクチノマイシンを含む LB プレート上では全てのコロニーが蛍光を示すと予想された。しかしながら、実際には蛍光を発するコロニーは全体の 90%程であった(図 2 右)。これは、GirC リコンビナーゼによる記録効率が 100%に達していない可能性と、形質転換能をもつ菌体が培養液中の死菌由来の機能分化記録前のゲノム DNA を取り込んでしまった可能性が考えられた。

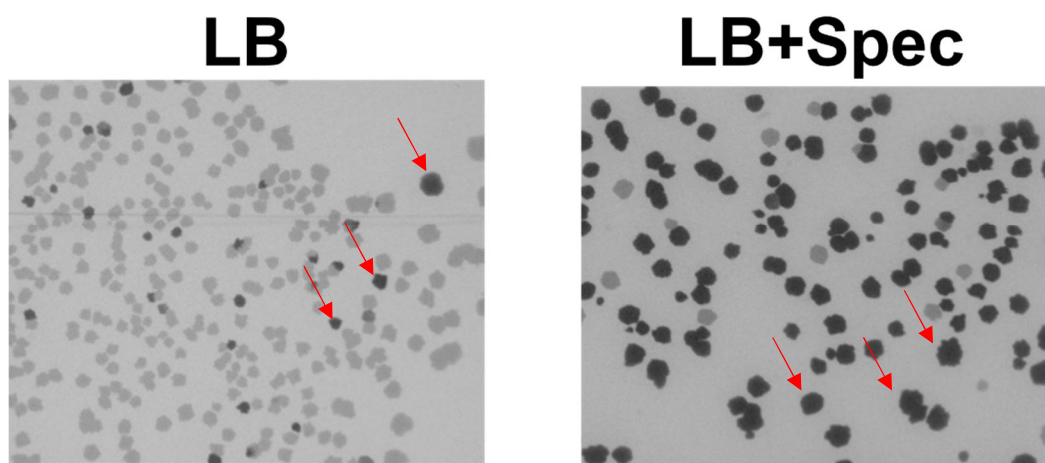


図 2. 自然形質転換細胞への機能分化のレコーディング

### 【方法(5)の結果について】

作製した孢子形成記録株を孢子形成誘導培地(Difco Sporulation Medium; DSM)で 37 ℃、1 日培養し、80 ℃ 10 分間の熱処理有無の後に適宜滅菌水で希釈して、LB プレートに塗布した。熱処理無しの培養液を塗布したプレート上には全体の 40~50%程度のコロニーで ZsGreen 蛍光が検出された。これは培養液中の 40~50%の細胞が孢子形成していたことを示唆しており、孢子形成中の細胞の位相差顕微鏡による形態観察の結果と一致した。一方、熱処理した培養液を塗布した LB プレートではすべてのコロニー( $n=240$ )が ZsGreen 蛍光を発した。熱処理を施すと孢子以外の細胞は死滅するため、今回の結果は、孢子形成細胞への分化の記録が非常に高い効率で起こったことを示している。自然形質転換記録の場合との違いは、孢子形成開始から孢子の成熟までのプロセスは 10 時間以上かかるため、GirC 発現と部位特異的 DNA 組換えのための時間が十分に確保できたためであると考えられる。また、孢子形成期中は、孢子形成特異的シグマ因子の働きによって細胞内の遺伝子発現状態が大きく変化するため、GirC の DNA 組換えを阻害するような因子が少なかった可能性も要因として挙げられる。さらに、孢子形成中には、培養液中に含まれる死菌由来のレコーディング前 DNA の自然形質転換による取り込みも起こりにくいことが推測された。

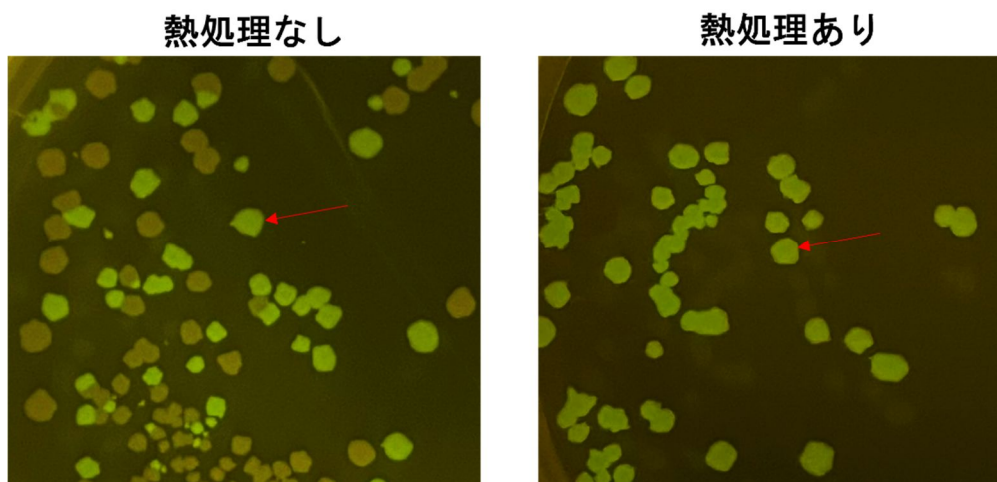


図 3. 孢子形成細胞への機能分化のレコーディング

#### 【方法(6)の結果について】

枯草菌以外の菌でも孢子形成記録株の作製が可能かを調べるために、枯草菌類縁菌 *Paenibacillus polymyxa* における孢子形態形成及び孢子形成期特異的遺伝子発現制御の解析を行った。その結果、*P. polymyxa* は、孢子の形態や孢子コートタンパク質の成分は、枯草菌とは異なったが、Spo0A をはじめとする孢子形成特異的転写因子やシグマ因子およびプロモーター配列は高く保存されていたことから(Abe *et al.*, 2022)、今回枯草菌で行ったような孢子形成記録が行える可能性が高いことが明らかとなった。

#### 【方法(7)の結果について】

近年、細菌間での物質輸送や細菌間コミュニケーションを媒介する因子として、膜小胞が注目されている。枯草菌も膜小胞を分泌することが既に明らかになっている。そこで本研究では、膜小胞生産細胞が枯草菌における新たな機能分化細胞であるか、またその機能分化は記録可能であるかについても検証した。その結果、枯草菌の膜小胞形成は Spo0A や SigD などの転写因子・シグマ因子によって制御されていることが明らかとなった。しかしながら、枯草菌において膜小胞は、菌体の死滅・溶菌に伴って放出されることが示唆されたため(Abe *et al.*, 2021)、膜小胞生産細胞は *in vivo* ゲノム記録法を用いるには適さないと考えられた。

#### 【おわりに】

本研究により、*in vivo* ゲノム記録法(RIGR 法)の基本的技術基盤が確立できた。研究開始当初は、研究代表者がこれまで中心的に研究を進めてきたバクテリオファージ SP にコードされるセリンリコンビナーゼ SprA を用いて、同手法を開発する予定であった。しかしながら、本研究の過程で SprA の DNA 組換え反応制御について新たな知見が得られたものの(Abe *et al.*, 2020)、枯草菌体内で SprA に触媒される部位特異的 DNA 組換えは起こるが蛍光タンパク質の発現が見られない等の予測していなかったトラブルが発生した。そこで、SprA のかわりに GirC セリンリコンビナーゼを使用することでトラブルを解決し、RIGR 法の開発を遂行することができた。

本研究課題期間中は、枯草菌の特徴的な形質である孢子形成と自然形質転換能の 2 点に焦点を絞ったが、今後バイオフィルムマトリクス生産や抗生物質生産についても RIGR 法が適用できるようになれば、枯草菌バイオフィルムの形成メカニズムの解明に大きく貢献できると期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Abe Kimihiro, Kato Hiroko, Hasegawa Yuta, Yamamoto Tatsuya, Nomura Nobuhiko, Obana Nozomu	4. 巻 68(2)
2. 論文標題 Visualization and characterization of spore morphogenesis in <i>Paenibacillus polymyxa</i> ATCC39564	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 79-86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2021.10.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Nobuhide, Abe Kimihiro, Akagi Sachiyo, Kitamura Mayu, Shiraishi Yoshitake, Yamaguchi Aki, Yutani Masahiro, Amatsu Sho, Matsumura Takuhiro, Nomura Nobuhiko, Ozaki Noriyuki, Obana Nozomu, Fujinaga Yukako	4. 巻 13
2. 論文標題 Membrane Vesicles Derived From <i>Clostridium botulinum</i> and Related Clostridial Species Induce Innate Immune Responses via MyD88/TRIF Signaling in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 720308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.720308	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Abe Kimihiro, Toyofuku Masanori, Nomura Nobuhiko, Obana Nozomu	4. 巻 23(5)
2. 論文標題 Autolysis mediated membrane vesicle formation in <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 2632-2647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1462-2920.15502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe Kimihiro, Takahashi Takumi, Sato Tsutomu	4. 巻 115(6)
2. 論文標題 Extreme C terminal element of SprA serine integrase is a potential component of the "molecular toggle switch" which controls the recombination and its directionality	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 1110-1121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mmi.14654	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimihiro Abe, Nobuhiko Nomura, Satoru Suzuki	4. 巻 96(5)
2. 論文標題 Biofilms: Hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Ecology	6. 最初と最後の頁 fiaa031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsec/fiaa031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shota Suzuki, Miki Yoshikawa, Daisuke Imamura, Kimihiro Abe, Patrick Eichenberger, Tsutomu Sato	4. 巻 23(1)
2. 論文標題 Compatibility of site-specific recombination (SSR) units between mobile genetic elements	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.100805	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Bentley Shuster, Mark Khemmani, Yusei Nakaya, Gudrun Holland, Keito Iwamoto, Kimihiro Abe, Daisuke Imamura, Nina Maryn, Adam Driks, Tsutomu Sato, Patrick Eichenberger	4. 巻 201(19)
2. 論文標題 Expansion of the spore surface polysaccharide layer in <i>Bacillus subtilis</i> by deletion of genes encoding glycosyltransferases and glucose modification enzymes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00321-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JB.00321-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mitsuo Ogura, Tsutomu Sato, Kimihiro Abe	4. 巻 10
2. 論文標題 <i>Bacillus subtilis</i> YlxR, which is involved in glucose-responsive metabolic changes, regulates expression of <i>tsaD</i> for protein quality control of pyruvate dehydrogenase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 923
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2019.00923	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Bentley Shuster, Mark Khemmani, Kimihiro Abe, Xiaoyu Huang, Yusei Nakaya, Nina Maryn, Sally Buttar, Adriana Gonzalez, Adam Driks, Tsutomu Sato, Patrick Eichenberger	4. 巻 111(3)
2. 論文標題 Contributions of crust proteins to spore surface properties in <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 825-843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mmi.14194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 安部公博、豊福雅典、野村暢彦、尾花望
2. 発表標題 枯草菌における膜小胞生産機構
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度 京都大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安部公博、豊福雅典、野村暢彦、尾花望
2. 発表標題 枯草菌における膜小胞生産機構
3. 学会等名 JST ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト 終了シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kimihiro Abe, Masanori Toyofuku, Nobuhiko Nomura, Nozomu Obana
2. 発表標題 Spo0A-dependent membrane vesicle production in <i>Bacillus subtilis</i>
3. 学会等名 EMBO Workshop 2021 Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, functions and medical applications (国際学会)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 安部公博、高橋匠、高松拓夫、佐藤勉
2. 発表標題 枯草菌における孢子形成期特異的遺伝子再編成の分子メカニズム
3. 学会等名 第8回 ファージ研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安部公博、加藤寛子、長谷川優太、山本達也、野村暢彦、尾花望
2. 発表標題 Paenibacillus polymyxaの孢子形成
3. 学会等名 2021年度 グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安部公博、豊福雅典、野村暢彦、尾花望
2. 発表標題 枯草菌におけるSpo0A依存的なmembrane vesicle生産
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度 仙台大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安部公博、豊福雅典、野村暢彦、尾花望
2. 発表標題 枯草菌のメンブレンベシクル産生
3. 学会等名 2020年度 グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部公博, 尾花望, 豊福雅典, 野村暢彦
2. 発表標題 枯草菌におけるSPo0Aを介したメンブレンベシクル生産
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部公博, 尾花望, 豊福雅典, 野村暢彦
2. 発表標題 ストレス環境下における枯草菌のmembrane vesicle生産
3. 学会等名 グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kimihiko Abe, Nozomu Obana, Masanori Toyofuku, Nobuhiko Nomura
2. 発表標題 Environmental stress-induced membrane vesicle formation in <i>Bacillus subtilis</i>
3. 学会等名 20th International Conference on Bacilli and Gram-Positive Bacteria (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安部公博, 尾花望, 豊福雅典, 野村暢彦
2. 発表標題 枯草菌におけるメンブレンベシクルの生産機構
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------