

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32686

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15440

研究課題名（和文）溶原性ファージにとってインテグラーゼは必要か？

研究課題名（英文）Analysis of the Lysogenization Mechanism of Bacillus Phage SPbeta through Homologous Recombination

研究代表者

鈴木 祥太（Suzuki, Shota）

立教大学・理学部・助教

研究者番号：00792714

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）：枯草菌ファージSPは宿主に感染すると自らのゲノムにコードされる部位特異的組換え機構（SSR）により宿主ゲノムへ組み込まれる。一方、宿主ゲノムの組込み部位を欠失するとSPゲノムに存在する相同領域を介して組み込まれることが示された。本研究はSPの相同組換えが生じる相同領域の選好性、SPゲノムに潜在する相同組換えに関与する因子の探索、および相同領域のSPにおける機能の解析により、ファージの組込み機構として利用される相同組換えの特性を示す。また組換え頻度の高い相同領域が接合伝達因子ICEBs1による不稔感染機構に関与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年バクテリオファージは、宿主特異的感染や短時間で膨大な数の増殖が可能である特徴を利用してファージセラピーやゲノム合成など医学や合成生物学の分野に応用され注目されている。SPファージの溶原化機構における相同組換えの利用およびその特性を示し、可能性遺伝因子（ICE）による不稔感染に相同領域が関与する可能性を見出した本研究成果は、ファージの研究分野および外来因子間における宿主感染戦略の理解に新しい知見として貢献できるものであり学術的に意義があると考えられる。またpSSベクターを利用した有益な形質の一時的な導入と任意の時期に形質を戻せる可逆的形質転換系は枯草菌の育種や工業的な応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Upon infection, Bacillus phage SP is incorporated into the host genome through its site-specific recombination mechanism (SSR), which is encoded within its own genome. Whereas, it has been demonstrated that in the absence of the integration site in the host genome, SP integrates through homologous regions present in the SP genome. This study reveals the characteristics of homologous recombination utilized as a phage integration mechanism by investigating the preference of specific homologous regions for SP-mediated recombination, exploring factors involved in homologous recombination within the SP genome, and analyzing the function of homologous regions in SP with respect to integration. Additionally, the potential involvement of highly frequent homologous recombination regions in the abortive infection mechanism mediated by the integrative conjugative element ICEBs1 is suggested.

研究分野：分子生物学

キーワード：溶原性ファージ 相同組換え 溶原化 部位特異的組換え 枯草菌

1. 研究開始当初の背景

DNA の組換え機構の代表的なものに、相同組換えと部位特異的組換えが挙げられる。相同組換えは、細菌細胞内の RecA タンパク質によって行われ、細胞内に存在する一本鎖 DNA に RecA が結合して活性化すると、細菌ゲノム上に存在する一本鎖 DNA と相同な配列領域まで RecA が運搬し、相同配列間で組み換える。相同組換えは、細菌における DNA 損傷の修復や、一部の細菌が有する自然形質転換における外来 DNA の取り込みに利用されることから、相同組換えは細菌の生存や進化において重要な機構である。一方、部位特異的組換えは、細菌感染性のウィルス(ファージ)の中でも、宿主細菌ゲノムへ組み込まれるタイプの溶原性ファージによって利用される。この部位特異的組換えは、ファージゲノムにコードされる部位特異的組換え酵素 (Int) によって、ファージゲノムの標的部位 (*attP*) と宿主ゲノムの標的部位 (*attB*) の間で組み換えられ、宿主ゲノム上に *attL* と *attR* を生じながら内部へ組み込まれて溶原化する (図 1 右)。一方、紫外線などによるゲノム損傷が宿主細菌に生じると、ファージゲノムにコードされる切出し因子 (RDF) が発現して Int に作用して逆の組換え反応が促進される。これによりファージゲノムが宿主ゲノム上の *attL/attR* 間で切出され、ファージ粒子を纏って細胞外へ放出される。したがって、部位特異的組換え機構はファージの宿主細菌への溶原化に最も重要である。またファージが持つ部位特異的組換えが宿主細菌(枯草菌)の細胞分化のプロセスにおける遺伝子制御に重要な働きを持つことが示されている (Abe et al., 2014, PLoS Genet.; Abe, et al., 2017, Nucleic Acids Res.)。つまり、溶原性ファージが持つ部位特異的組換えシステムは、ファージ固有のものではなく宿主細胞の生存戦略にも用いられることが示された。そうであるならば、宿主の生存と進化に必要な相同組換えも逆にファージの溶原化への利用の可能性が推測される。即ち、相同組換えを利用して溶原化できるファージが存在する可能性を考えた。近年、Staphylococcus において、細菌ゲノムへ組み込まないタイプの溶菌性ファージが細菌防御システム領域 (CRISPR) の一部を相同組換えにより取り込み、ファージ粒子内に載せて CRISPR を水平伝播させることが報告された (Varble et al., 2019, Nat. Microbiol.)。これはファージゲノムと細菌ゲノムの間で相同組換えが起きることを示しているが、その詳細なメカニズムは不明であり、溶原化に関する報告はされていない。グラム陽性菌のモデル生物である枯草菌に CRISPR は存在しないが、枯草菌の溶原性ファージ SP のゲノム上には枯草菌ゲノムと相同性が 90%以上の領域を有している。SP の *attB* を欠損した宿主細菌に感染すると、本来の *attB* 以外の領域に Int を利用して組み込まれる一方、相同組換えにより宿主ゲノムへ組み込まれるもの存在した。したがって、相同組換えは部位特異的組換えに代わり、SP の溶原化機構として機能することが示唆された。

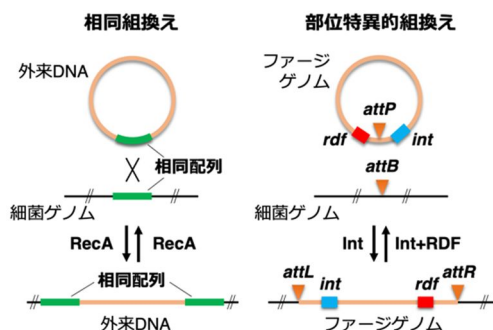


図 1. 相同組換えと部位特異的組換えのメカニズム

2. 研究の目的

本研究は、枯草菌ファージ SP の部位特異的組換えに代わる相同組換えによるファージの溶原化と溶原菌の誘発機構を解明するため、ファージの相同組換えに関わる因子の探索と解析を行うとともに、相同組換えを生じるファージゲノム領域の機能解析を調べることにより、相同組換え機構を保持する生物学的意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) SP ゲノムおよび宿主ゲノムにおける相同組換え領域の選好性の解析

SP の部位特異的組換え酵素 (Int) を欠失させることにより、相同組換え機構に特化した SP Int を作製し、宿主菌へ感染させる。薬剤耐性マーカーを導入した SP を感染させる。形成された溶菌斑の内部から薬剤耐性を示す溶原菌を取得し組み込み位置を調べ、組み込まれやすい相同領域の選好性について明らかにする。

(2) SP ゲノムに潜在する相同組換え機構に関わる因子の探索

SP ゲノム上には Int 以外に DNA の組換えに関わる可能性がある 3 種の DNA 組換えドメインを有するタンパク質をコードする遺伝子および 3 種のヌクレアーゼが存在する。これらの遺伝子欠損体を SP Int で作製し、相同組換えによる組み込みやファージ粒子形成への影響を調べる。

(3) SP における相同領域の機能解析

相同組換えに利用される SP ゲノムの相同領域の欠損体を作製し、ファージ粒子形成および宿主への感染条件を調べることにより、SP における相同領域の役割とこれらの領域を保有する意義について検討する。

(4) SP の部位特異的組換え機構を利用したベクターによる可逆的形質転換系の検討

SP の部位特異的組換え機構を導入することで宿主ゲノム上の組込み・切出しを人為的に制御できる pSS ベクターを構築している。そこで、pSS と枯草菌の自然形質転換の誘導因子 *comK-comS* を組み合わせたベクターを作製し、一時的に枯草菌の形質転換能を人為的に誘導でき、その後の切出し誘導による pSS の除去によってゲノムの復元が可能な系について検討する。これにより枯草菌の遺伝子操作技術へ応用させる。

4. 研究成果

(1) SP の相同組換えによる宿主ゲノムの組込み領域の選好性の解析

枯草菌 SP は組込み部位 (*attB_{SP}*) を欠損した宿主に感染すると *attB_{SP}* に類似した配列への組込みに加え、SP ゲノム上に存在する領域を利用した相同組換えにより組み込まれることが示されていた。枯草菌 SP のゲノムには宿主である枯草菌 168 株のゲノムと相同な領域が 13 カ所存在しており、その中でも 1 kb 以上で 90%以上の相同性をもつ領域が 3 カ所存在する。それぞれの領域は、宿主ゲノムの *yzdM-yddT* 領域と 96%の相同性を持つ 1.3 kb 領域 (*youB-yomL*)、*rttL-yobM* 領域と 92%の相同性を持つ 2.0 kb 領域 (*yokI-yokH*)、そして *yobHx-yobHm-yozL-yozM* 領域と 91%の相同性を持つ 1.9 kb 領域 (*uvrD-yoID-yoIC*) である。また、これらの宿主ゲノム領域は外来因子のゲノム領域に位置しており、*youB-yomL* は接合伝達遺伝因子 ICEBs1 領域に、*rttL-yobM* と *yobHx-yobHm-yozL-yozM* は欠陥プロファージ *pro6* 領域にある。これらの領域に対する組込みの頻度を調べるため、部位特異的組換え酵素 (Int) をコードする *sprA* 遺伝子の欠損を宿主細菌の形質転換能を利用して行い、相同組換えに特化した SP Int を作製した。また *sprA* は宿主ゲノムからの切出しにも必要であるため *aprE* 領域にて異所発現させた。ファージ誘発剤マイトマイシン C (MMC) を利用して SP Int の誘発を行い宿主細菌に感染した際に形成される溶菌斑の数の計測によりファージ産生量を調べたところ、野生型 SP と同等数の感染力を保持するファージ溶液を調製することが確認された。続いて宿主への感染実験を行ったところ SP Int が感染して溶原化したとみられる半透明な溶菌斑の形成がみられた。SP Int にはカナマイシン薬剤耐性遺伝子がコードされているため、溶菌斑の内部からカナマイシン薬剤耐性菌を選択し、SP Int が宿主ゲノムへ組み込まれた溶原菌を取得した。これらの菌体より染色体 DNA を調製し、SP Int が組み込まれた領域を PCR 増幅にて調べた結果、*yzdM-yddT* 領域に 30%、*rttL-yobM* 領域に 15%、*yobHx-yobHm-yozL-yozM* 領域に 15%、の割合で組み込まれていた。またこれらの領域からファージ粒子の誘発を行ったところ、*yzdM-yddT* に組み込まれたファージ産生量は約 1/50 程度の低下がみられたが、その他 2 領域では野生型 SP と同等数が産生された。このことより、*yzdM-yddT* 領域は他の 2 領域に比べて領域は小さい一方、宿主ゲノムと高い相同性を有していることから、相同性の高い領域に組み込まれやすいことが示唆され、領域によりファージ産生量に違いは見られるものの相同組換えにより溶原化を確立できることが示された。

(2) 相同組換え機構に関わる因子の探索

SP Int の相同組換えによる宿主ゲノムへの組込みが相同組換え因子 RecA に依存して生じている可能性が考えられたため、RecA 欠損の宿主細菌に対して SP Int の感染を行い溶原菌の取得を試みた。その結果、RecA 欠損体に比べておよそ 1/10 程度まで溶原化頻度が低下するものの相同組換えによる組込みが確認された。したがって、SP のゲノムに相同組換えに関わる因子が存在する可能性が考えられた。SP ゲノムには機能未知遺伝子が多く残されている一方、アミノ酸配列による機能予測によって DNA 組換え (Int) に関与すると推察される遺伝子 3 種 (*yomM*, *yopP*, *yopR*)、および一本鎖 DNA の露出させるために必要である DNA ヌクレアーゼ (Exo) とみられる遺伝子 3 種 (*yomG*, *yorkK*, *nukF*) が存在する。これらの遺伝子が相同組換えに関与する可能性を考え、SP Int 上で遺伝子欠損体の作製を試みた。その結果、*yopR* を除く遺伝子について薬剤耐性遺伝子との置換により欠損体を作製することができた。*yopR* は研究期間中に他のグループによって SP の溶原化に必須な抑制因子であることが示され (Brady et al., Curr Biol., 2021)、*yopR* 欠損株が取得できない本研究結果と一致する。得られた欠損変異体について、MMC によるファージの誘発を行い感染力について調べた結果、*yomM* (Int) は SP Int と同等の形成率を示したが、*nukF* (Exo) 欠損により約 1/10 倍、*yorkK* (Exo) 欠損により約 1/100 倍の低下がみられ、*yopP* (Int) と *yomG* (Exo) 欠損ではファージ感染による溶菌斑の形成がみられなかった (図 2)。このことにより、*yopP* と *yomG* は SP のファージ粒子形成に必須な因子であることが示された。*yomM*, *nukF*, *yorkK* について溶原菌の取得を試みた結果、*yomM* および *nukF* 欠損は親型である SP Int と同等数の溶原菌が得られ、*yorkK* 欠損でも溶原菌は単離されたがファージ形成能の低下により溶原菌の出現数は親型の 0.5%まで低下していた。続いて、*recA* の依存性を調べるため RecA 欠損株に対して感染させた結果、*yomM*, *nukF*, *yorkK* 欠損体の溶原菌は同等数の出現が確認

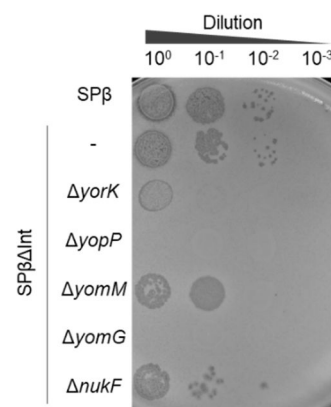


図 2. SP Int 変異体のファージ産生

されたが、RecA 欠損体の生育が不安定であること、溶原菌の出現頻度が安定しないことから詳細な頻度について調べられず、今後安定した実験系の検討が必要である。このことから、相同組換えに關する因子の同定には至らなかったが、本研究により機能未知であった *yopP* と *yomG* が SP のファージ粒子形成に必須であることが見出された。

(3) SP ファージにおける相同領域の機能解析

SP の相同組換えに利用される領域において、YokI が Toxin タンパク質 (*yokI-yokH*)、UvrD が UV 損傷修復タンパク質 (*uvrD-yoID-yoIC*) をコードしていることから SP のファージとしての機能に重要な役割をもつと考えられる一方、その他の遺伝子は機能未知である。これらの相同領域に対して薬剤耐性遺伝子 (エリスロマイシン) を利用して欠損変異体を作製し、MMC によるファージ誘発を行い、ファージ粒子の産生量を調べた。その結果、*yokI-yokH*、*uvrD-yoID-yoIC* 領域の欠損株は野生型 SP と同数のファージ産生がみられた一方、*yomL-yoUB* 領域の欠損では野生型 SP と比較してファージ産生量に約 100 倍の増加がみられた。続いて、それぞれの相同領域を欠損したファージについて感染条件の違いを調べていたところ、SP の不稔感染を引き起こす ICEBs1 が存在する宿主菌に対して *yomL-yoUB* 領域を欠損したファージは溶菌斑を形成することが明らかになった (図 3)。ICEBs1 による不稔感染は SpbK が SP の YonE と協調して細胞死を引き起こすことが示されているが (Johnson et al., PLoS genet., 2022) 本実験によりこの機構が *yomL-yoUB* 領域の欠損により無効になることから、これらの領域が不稔感染機構に關与する可能性が示唆される。一方、*yokI-yokH* と *uvrD-yoID-yoIC* 領域の欠損はファージ粒子形成による影響は見られなかったが、*yokH* は上流の endotoxin タンパク質とオペロンを形成することから *yokI-yokH* は宿主細菌内における SP の維持に關与する可能性があり、*yoID* は UV 損傷修復タンパク質である *uvrD* と同じオペロンに位置することから *uvrD-yoID-yoIC* はストレス環境下において機能する可能性が考えられる。また *yomL-yoUB* 領域は相同組換えの頻度が高い領域である一方、欠損するとファージ産生量が増加したことから、ファージ機能が低下するリスクがあっても

yomL-yoUB 領域を保持する利点があり、その一つに相同組換えの必要な場合に備えている可能性が考えられた。

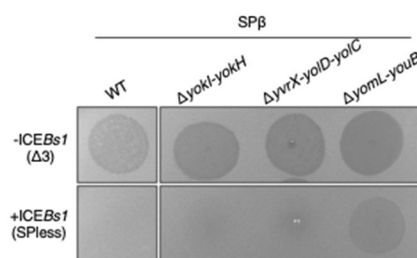


図 3. ICEBs1 の有無によるブランク形成

(4) SPβ の部位特異的組換え機構を保有するベクターによる可逆的形質転換系の検討

これまでに SP の部位特異的組換え酵素 (Int) と切出し因子 (RDF) を利用し、宿主ゲノム上の特異的部位 (*attB_{sp}*) における組込みと、人為的な切出し誘導による DNA 除去が可能で可能な pSS ベクターが作製されていた。また pSS は RDF を人為的に発現することが可能であるため、SP 溶原菌の形質転換に利用することで宿主ゲノムから SP ゲノムを除去した SP 株することが可能である。本研究期間では、pSS を利用して LB 培地における枯草菌の形質転換能誘導系の検討を行った。一般的に枯草菌の自然形質転換には栄養最少培地が用いられ、形質転換能が誘導される対数増殖期の後期まで培養する必要があった。一方、形質転換能の誘導に關与する *comK-comS* 遺伝子を対数増殖期に誘導することにより LB 培地でも DNA 取り込み能を誘導できることが報告されていた (Rahmer et al., Front. Microbiol., 2015)。そこで、マンニトールで転写誘導可能なプロモーター (PmtIA) と *comK-comS* 遺伝子 (*comKS*) を融合したユニットを pSS ヘクローニングして pSS -*comKS* を作製した。SP 株の自然形質転換に pSS -*comKS* を利用し、pSS のクロラムフェニコール薬剤耐性を利用して選択した結果、*attB_{sp}* 部位に pSS -*comKS* が組み込まれた形質転換体を得た。この形質転換体を LB 培地で培養してマンニトール添加による *comKS* の発現誘導を行い、約 11 kb 領域がスペクチノマイシン遺伝子 (*spc*) で置換された染色体を添加して *spc* 耐性菌を選択した。その結果、 1.6×10^3 /ml の形質転換体を得ることができ、*comKS* を誘導しない場合の約 100 倍の効率で LB 培地で形質転換できることが確かめられた。また、pSS -*comKS* はキシロース処理による RDF の発現誘導によりゲノム DNA 上から除去できることも確認された。したがって、pSS の利用によって人為的誘導可能な形質転換能などの有益な形質を一時的に導入し、任意のタイミングで形質を戻すことが可能であることから、枯草菌の育種や工業的な応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Shota, Osada Sachie, Imamura Daisuke, Sato Tsutomu	4. 巻 -
2. 論文標題 New Bacillus subtilis vector, pSS , as genetic tool for site-specific integration and excision of cloned DNA, and prophage elimination	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 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2323/jgam.2021.10.004	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 祥太、宮内 翼、末次 正幸
2. 発表標題 進化分子工学的手法を利用したoriC の改良
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 祥太、宮内 翼、末次 正幸
2. 発表標題 複製開始起点oriCの進化分子工学的手法による改良
3. 学会等名 第17回 ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 祥太、末次 正幸
2. 発表標題 進化分子工学的手法による複製開始起点oriC の改変
3. 学会等名 2022年度 グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 祥太、末次 正幸
2. 発表標題 進化分子工学的手法によるoriC の改良
3. 学会等名 第18回 21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅野 貴史, 茶谷 朋哉, 鈴木 祥太, 細谷 茂生, 今村 大輔, 佐藤 勉
2. 発表標題 枯草菌ファージの相同組換えによる溶原化と誘発
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 菅野 貴史, 茶谷 朋哉, 鈴木 祥太, 細谷 茂生, 佐藤 勉
2. 発表標題 枯草菌ファージSP と 3Tの相同組換えによる溶原化
3. 学会等名 第15回 日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------	---------