

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580100

研究課題名(和文) ビルレントファージを用いた遺伝子発現系の構築とその応用

研究課題名(英文) Construction of gene expression system using virulent phages.

研究代表者

金子 淳 (KANEKO, JUN)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30221188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：納豆菌に感染するバクテリオファージは感染時に自らが保有する外来遺伝子である ポリグルタミン酸分解酵素遺伝子を強く発現させる。本研究は異種タンパク質発現系を構築するため、ファージゲノムを解析し、本遺伝子の発現システムを探るとともに、ファージ宿主域の決定因子を探索した。その結果、外来遺伝子の発現へのDNA上のシス因子および納豆菌が持つトランス因子の関与を見いだした。さらに宿主認識タンパク質を同定した。

研究成果の概要(英文)：Some *Bacillus subtilis* natto phages carry gamma-poly glutamate hydrolase gene on their genome, and this gene is strongly expressed during phage lytic cycle. To apply this system for the foreign gene expression system, we determined complete genome sequence of phage phiNIT1 and analyzed the expression system of gamma-PGA hydrolase gene.

As a result, we found that not only phage encoded elements but also both of cis-elements and trans-elements in the bacterium were required for the gene expression. In addition, we identified phage proteins involving in specific recognition of host cell surface.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：納豆菌 virulent phages 感染補助因子 遺伝子発現 宿主認識

### 1. 研究開始当初の背景

バクテリオファージにはビルレント(溶菌)型とテンプレート(溶原)型が存在する。

ビルレントファージは感染し続けなければ子孫を増やせない。大腸菌の T4 ファージに代表される大型で伸縮型の尾部を持つミオウイルス型ファージでは 100 kbp を越えるゲノムの多くの部分が感染細菌細胞内でのファージの増殖を補助するための遺伝子で占められている。連携研究者の木村らは納豆菌に特異的に感染するミオ型ファージ NIT1 が、納豆菌が産生し、ファージ感染防御に関わる菌体外ポリグルタミン酸(-PGA) を分解する酵素(PghP)の遺伝子をゲノム上に保有し、ファージ感染時に菌体内で発現した PghP を溶菌に伴ってリッターあたり数 mg の濃度で放出することを見いだした。申請者らは木村らと共同で NIT1 のゲノムの解析を進め、*pghP* 遺伝子が増殖には必須でない遺伝子領域に存在していることを見いだした。以上から、申請者は溶菌型ファージ感染を利用したタンパク質生産系を構築できるのではないかと発想した。

一方、外来遺伝子を運び込み染色体上の侵入する溶原性ファージは細菌ゲノムの進化促進の主役である。本申請者は 1997 年に黄色ブドウ球菌の 2 成分性毒素 Pantone-Valentine ロイコシジンを生産する V8 株における PVL 遺伝子の存在形態を追究した結果、PVL の遺伝子が溶原化した新規ファージ PVL のゲノム上に存在していることを世界で初めて発見し、そのゲノムの全塩基配列を黄色ブドウ球菌のファージとしては初めて決定した。以来 PVL の水平伝播に複数の PVL 変換ファージが関わることを証明し、さらにファージ間においても PVL と溶菌関連遺伝子が一つの遺伝子カセットとして水平伝播する可能性を示してきた。さらに SLT の尾部繊維が黄色ブドウ球菌を認識する機構を解明した。溶原性ファージが保有する部位特異的組換えシステムは、効率的な組換えシステムとして用いられており、PVL ファージ群のシステムを用いた NIT1 への有用タンパク質の特異的組換えシステムへの応用を検討する。

本研究の成果は、ファージを用いて標的細菌のバリア等を破壊するタンパク質を発現させ、溶菌と共に放出させることで、夾膜やバイオフィルムを形成する細菌を効率よく殺菌を行うシステムを構築する試みに直結する。本申請者は植物病原菌 *Pectobacterium carotovorum* phage 尾部状バクテリオシン(Ctv)の構造遺伝子の解読に成功し、ファージの尾部繊維の相変異により宿主域が変化することを発見し、現在詳細な解析を進めている。NIT1 の宿主域を変えることが出来れば、その適用範囲がさらに広がることを期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究はビルレントファージを用いて任意のタンパク質を生産するシステムを構築することを目的とする。そのために(1) NIT1 のゲノム解析を通じ感染時に強く発現する *pghP* 以外の感染補助因子を探索・同定する。一方納豆菌に感染できる *Bacillus* のタイピングファージであるミオウイルス SP50 のゲノムを解析し、NIT1 と比較して納豆菌と *Bacillus* への感染に必須な領域を特定するとともに、(2) *pghP* 及びその他の感染補助因子の発現調節機構を解析する。(3) これらの結果を応用しファージ粒子と共に外来遺伝子を発現させ、溶菌に伴って菌体外に放出させる発現系構築の基礎を作る。具体的にはファージ感染で制御される上記プロモーターに接続した任意の遺伝子をプラスミドで有する宿主にファージを感染させるシステム、相同組換えにより任意の遺伝子をファージに導入するシステムを構築する。さらに並行して(4) SLT の *attP*/integrase からなる部位特異的組換え機構を応用した、枯草菌内で部位特異的組換え系の構築を試みる。本ファージはゲノムサイズが 150 kB と大きいと、試験管内でのゲノム再構成及びパッケージングは困難である。そこで本組換え系を応用し病原性ファージの遺伝子組換え体の作製系の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) NIT1 のゲノム解析の完成、及び SP50 を初めとする近縁ファージのゲノム解析

： NIT1 のゲノム解析

NIT1 はおよそ 150 kbp のゲノムを有しているの見積もられている。これまでに決定された contig よりプライマーを作製し、それらの組み合わせによる PCR とウォーキングにより細かいギャップを埋め、NIT1 のゲノム解析を完成する。

： 感染時に発現する *PghP* 以外の感染補助因子の探索

*PghP* 以外の感染補助因子として、納豆の糸のもう一つの成分であるフラクタン分解酵素の遺伝子を有することを見いだした。本酵素産物の組換え体、及びファージ溶菌液における活性の解析を進め、本酵素の発現が糸を引く条件で培養している納豆菌への感染に寄与するかを解析する。さらにゲノムの精密アノテーションを行い、これら以外の感染補助因子の存在を探る。

： SP50 及びその他の NIT1 類似納豆菌ファージのゲノム解析

NIT1 類似ファージ群は納豆菌に特異的に感染し、PGA 分解酵素を生産する NIT1 類似のミオ型ファージである。これらのゲノムを調製し、完成した NIT1 ゲノムをもとにファージ比較のためのプライマー群を設定して PCR スキャニングを行う。増幅断片が得られた場合、適宜塩基配列を決定し NIT1 ゲノムと比較する。さらに *pghP* 遺伝子及びフラ

クタン分解酵素遺伝子とそれらの周囲の配列を比較し、ファージがこれらの遺伝子を取得した機構を探る。SP50は*Bacillus*のタイプファージであるが、納豆菌に感染しPGA分解酵素活性を有する。そこで本ファージのゲノム解析から*pghP*等の感染補助因子の存在を探るとともに、指示菌認識に關与する遺伝子を特定する。

:宿主認識物質の特定

申請者は黄色ブドウ球菌ファージ SLT において宿主リポテイコ酸を認識する尾部繊維タンパク質を見いだしている(文献4)。その手法を応用し、ファージの感染ステップの初期段階を宿主表面認識、吸着、DNA注入の段階に分け、NIT1及びSP50の比較からファージが納豆菌と*Bacillus*を見分ける機構を解明する。具体的には予想されるそれぞれの尾部繊維タンパク質のN-末端にヒスチジンタグを付けた形でクローン化し、発現させた産物がファージ感染を抑制することを確かめる。菌体側因子の解析は研究協力者の協力を得る。

(2) *pghP*及びその他の感染補助因子の発現調節機構の解析

:PghPの発現調節系の解析

これまでに予備的な northern 解析により *pghP* の発現がファージ感染後期に起きると言う結果を得ている。そこで、逆転写リアルタイムPCR法により、ファージの溶菌サイクルにおける *pghP* の発現タイミング及び発現量を解析する。対照としてファージの後期転写産物(キャプシド及び尾部鞘(シース)遺伝子の発現と比較する。

一方 *pghP* のプロモーター領域はこれまでに確立した逆転写PCRを用いる手法で推定し、5' RACE法により決定する。NIT1のcontigのドラフト解析の結果、本ファージはいくつかの独自シグマ因子を有しており、*pghP*がそのシグマ因子の支配下にある可能性がある。

それを確かめるため、*pghP* のプロモーター領域にルシフェラーゼ遺伝子を融合したモニター系を大腸菌-グラム陽性菌のシャトルベクターpHY300上に構築し、NIT1の指示菌である納豆菌NAFM5に導入したモニター指示菌を作出する。ファージ感染時のみに発現が確認された場合にはファージ特有のシグマ因子により発現が調節されている可能性が高い。その場合にファージ感染菌体からライゼートを調製し、*pghP* プロモーター領域によるゲルシフト法によって調節タンパク質(シグマ因子)を特定する。SP50についても同様に解析する。

:フラクタン分解酵素、および感染後期に発現する感染補助因子の発現解析

(1)- において特定した感染補助因子についても(2)-と同様に解析する。

(3)ファージの発現系を応用した外以来遺伝子発現システムの構築

:ファージ感染によるプラスミド上の遺伝子発現系の確立

(2)において構築したモニター系をNAFM5株において高いプロモーター活性が確認された場合、モニター遺伝子を目的遺伝子に置き換えることで発現系として応用することができる。宿主菌には菌体外プロテアーゼ欠損株等を用いる。*Bacillus* 株を宿主として用いる場合には(1)-の結果を基にSP50を使用する。

:ファージに組み込んだ目的遺伝子の発現系

ファージに目的遺伝子を組み込むことができればファージ療法や、ファージを用いた細菌のコントロールシステムに応用できる。その際にはファージ感染サイクルにおける *pghP* と目的遺伝子を相同組換えにより組換えファージを取得する。

(4) SLTの*attP*/integrase からなる部位特異的組換えシステムの構築

(3)-ファージの感染サイクル中の相同組換えを効率的かつ確実にを行うため、SLTの*attP* site /integrase を用いた部位特異的組換え系を構築する。

#### 4. 研究成果

(1) NIT1のゲノム解析と感染補助因子の探索

: NIT1のゲノム解析

NIT1は155,631 bpの末端繰り返しを持つ直鎖状ゲノムを有していた。*orf* は220個、tRNA 遺伝子は4個存在した。76個の*orf* は既知のファージ遺伝子と相同性を示し、うち71個がSP01-related phages由来であった。これらの遺伝子群のうち、*pghP* を含む外来性と思われる遺伝子群は、両端の5,103 bpの反復配列とゲノム中心にあるファージの構築および増殖の關与する遺伝子群(コア領域)に挟まれた領域に配置していた。

:感染時に発現するPghP以外の感染補助因子の探索

アノテーションの結果、本研究のターゲットであるPghP以外の感染補助因子としてフラクタン分解酵素と推定される*orf*(*levP*)を見いだした。他に菌体外構成物の分解などに関わる因子は見いだされなかった。大腸菌で発現させた組換えLevPはレバン分解活性を示すことを確認するとともに、下記で明らかにした*pghP*のみを有し*levP*を保有しないSP50との比較、ならびに大腸菌で発現させた組換えLevPをSP50感染時に作用させる実験から、LevPがファージ感染の増強に寄与することが確認された。LevPによるファージ感染障壁である納豆の系の分解に補助的に働くことが示唆された。*levP*は*pghP*同様ファージの増殖には關与しない遺伝子群からなる領域に、*pghP*とは独立して存在した。こ

これらの遺伝子の発現パターンをノーザン分析で解析したところ、いずれも感染後に発現することを確認した。

： SP50及びその他の NIT1類似納豆菌ファージのゲノム解析

電子顕微鏡観察で NIT1と同様な形態を示し、*pghP* を有する納豆菌ミオウイルス型ファージ9株はいずれも *levP* 遺伝子を保有していた。*levP* 遺伝子の存在する制限酵素断片のサイズが異なるものが見られたが、*levP* および周辺領域の塩基配列はいずれの株でも保存性は高く、周辺の変異が少ないことが明らかになった。従って、(1)- の結果と合わせ、納豆菌ファージ群においてPghP とLevP は納豆の系のバリアを破って感染する際に機能していると考えられた。

一方、枯草菌ファージであり、納豆菌に感染し -PGA分解活性を示すSP50は、形態的にもNIT1と酷似したミオウイルスであった。PCR スキャンおよび増幅断片のシーケンス決定により、SP50ゲノムは両端の繰り返し配列および中央のコア領域は NIT1と極めて近い、同系統のファージであることが明らかになった。しかし NIT1を含む納豆菌ファージ納豆菌ファージ間ゲノムの制限酵素切断パターンの際に比べ、SP50と納豆菌ファージ群では異なる部分が多く見られた。

SP50の *pghP* 遺伝子上流の配列は、小さな挿入がある以外は NIT1の同領域の塩基配列と高い同一性を示した。しかし本ファージは *levP* 遺伝子は保有しておらず、その周辺領域は NIT1の同領域に比べ、欠失や別の遺伝子断片挿入が多発しており、PCR スキャンの結果と合わせ、NIT1 と SP50 とでは取り込んだ外来遺伝子群が異なっていることが示された。

以上の NIT1のゲノム関連の成果は、学会発表(1)で公表した。現在、(2)の成果を含め論文の投稿作業を進めている。

：宿主認識物質の特定

アノテーションの結果、候補となる推定尾部繊維遺伝子を2つ見いだした。このうち2つの候補遺伝子は、他の類縁ファージとの比較ゲノム解析では見いだされ無い一方、SP50及びその他の NIT1類似納豆菌ファージでは保存されていた。

宿主認識は Ctv を応用した宿主認識解析系を新たに構築して検討した。3つの候補遺伝子のうち、*orf1166*をこの系に導入して、Ctv の尾部繊維として組み込むことにより、納豆菌には結合できるが、枯草菌には結合できない改変 Ctv 作成に成功した。さらに本遺伝子をいくつかの領域に分割して検討した結果、宿主認識活性がC-末端領域 1.6 kb に存在することを見いだした。

本システムの構築と納豆菌ファージの宿主近認識解析への応用に関しては、学会発表(2)で公表した。

現在、ファージ尾部繊維タンパク質における宿主細胞レセプター認識部位の特定を進めている。今後は論文(2)におけるブドウ球菌タンパク質と血球膜の相互作用解析の手法を応用し、両者の相互作用の構造化学的解析を行う。

(2) PghP 及びその他の感染補助因子の発現調節機構の解析

：PghP の発現調節系の解析

フラクタン分解酵素、および感染後期に発現する感染補助因子の発現解析

NIT1の *pghP* についてはノーザン解析から遠位と近位のプロモーターの存在が示唆された。このうち、近位プロモーターからの転写開始点を5' RACE により決定した。さらに *levP* の転写開始点も同様に決定した。

プロモーター活性をモニターする系として、当初の予定を変更し、連携研究者が使用実績のある *lacZ* をレポーターとし、宿主納豆菌ゲノムの *amyE* 遺伝子上に組みこむことでコピー数を限定できるプロモーターアッセイ用ベクターを活用することにした。決定した *pghP* の遠位、近位プロモーター、*levP* プロモーター領域を含む 500 bp の断片をそれぞれ *lacZ* と融合させたモニター遺伝子を枯草菌 ISW1214 株、および納豆菌 NAFM73 株に導入したモニター株を構築した。

これらの枯草菌、および納豆菌由来モニター株に、それぞれ SP50 および NIT1を感染させ、ファージ感染に伴うプロモーター活性の変化を調べた。その結果 *pghP* の遠位プロモーターはファージの感染に関わらず、構造的に発現していた。一方で *pghP* の近位プロモーターと *levP* プロモーターは、ファージ感染でも働かなかった。この結果から、プロモーター配列以外にシスに働く因子があると考え、現在さらに上流の解析を進めている。

また、一般に感染後期の発現制御はファージ由来の因子で制御されることから、4つの推定シグマ因子をコードする *orf* のうち、配列の特徴から可能性が高い2つの遺伝子に注目し、それらを *lac* プロモーター下流につないだシグマ因子発現プラスミドを作成した。しかし上記の枯草菌モニター株にこれらを導入したが、やはりプロモーター活性は見られなかった。

そこで、枯草菌、納豆菌ともに感染できる SP50 ファージをそれぞれの宿主に感染させ、PghP 活性を測定したところ、*pghP* は納豆でなければ発現しないことが明らかになった。これは、*pghP* の発現にはファージ上にコードされた遺伝子だけではなく、納豆菌側の因子が関与することを示唆するものである。

これと関連し、論文(1)で納豆菌における -PGA 合成酵素の発現調節に関わる調節因子である DegQ の働き的一端を解明したが、その成果をふまえて納豆菌側の因子の探索を進めている。

なお、(3)ファージの発現系を応用した外以来遺伝子発現システムの構築および(4)SLT の *attP/integrase* からなる部位特異的組換えシステムの構築は、論文(3)で用いた変異株作成システムを応用して進めるはずであった。しかし(2)で発現システムの設定が進行中のため、それを応用するこれらの研究には着手できなかった

#### 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3件)

1) M. Fukuda, S. Yoshida, H. Itoh, Y. Kato, S. Watanabe, Y. Itoh, Y. Kamio, J. Kaneko. AxyR, an AraA family transcriptional activator of the xylanase 3 gene, requires xylo- oligosaccharides as a cofactor for DNA binding in *Paenibacillus* sp. Strain W-61. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読あり, 76:1051 - 1054 (2012). DOI: org/10.1271/bbb.120165

2) K. Yamashita, Y. Kawai, Y. Tanaka, N. Hirano, J. Kaneko, N. Tomita, M. Ohta, Y. Kamio, M. Yao and I. Tanaka. Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin reveals the  $\alpha$ -barrel pore formation mechanism by two components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 査読あり, 108:17314 - 17319 (2011). DOI: 10.1073/pnas.1110402108/-/DCSupplemental

3) T.-H. Do, Y. Suzuki, N. Abe, J. Kaneko, Y. Itoh and K. Kimura. Mutations suppressing the loss of DegQ function in *Bacillus subtilis* (natto) poly-  $\gamma$ -glutamate synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 査読あり, 77: 8249 - 8258 (2011). DOI: 10.1128/AEM.05827-11

[学会発表](計2件)

1) 樋口大祐、鈴木敦斗、木村啓太郎、阿部直樹、金子淳  
ファージ尾部状バクテリオシンを利用したファージ宿主認識の研究  
日本農芸化学会 2014 年度大会  
2014年03月28日～2014年03月30日  
川崎市 明治大学 農学部

2) 鈴木敦斗、尾崎達郎、木村啓太郎、金子淳  
納豆菌ファージにおける菌体外ポリマー分

解酵素遺伝子の存在とその転写制御機構の解析

第4回ファージ研究会

2012年08月19日～2012年09月20日

前橋市 群馬大学 刀城会館

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

金子淳 (KANEKO, JUN)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号: 30221188

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

木村 啓太郎 (KEITARO, KIMURA)  
(独)農業・食品産業技術総合研究機構  
食品総合研究所・主任研究員  
研究者番号: 20353980