

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590526

研究課題名(和文)バクテロイデスにおける莢膜多糖の多様性と相変異の生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Analysis of physiological significance of the diversity and the phase-variable regulation of the capsular polysaccharides in *Bacteroides*

研究代表者

中山 治之 (NAKAYAMA, HARUYUKI)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80294669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：*Bacteroides fragilis* YCH46株のゲノム上にはMpiと呼ばれる組換え酵素が仲介するプロモーター領域のDNA逆位によってON/OFF制御される計7箇所の莢膜生成遺伝子領域が存在する。本菌の莢膜多糖(PS)の発現メカニズムを解明するために、Mpiタンパク質に結合する13個のタンパク質をin vitro pull-downアッセイによって同定した。また、mpi遺伝子の直下に位置するBF2766組換え酵素遺伝子欠失変異株を用いた解析より、*B. fragilis*におけるPS遺伝子発現は、BF2766によるDNA逆位を介した階層的な制御下にあると推測された。

研究成果の概要(英文)：The human gut microbe *Bacteroides fragilis* can alter the expression of its surface molecules such as capsular polysaccharides (PS) through the reversible DNA inversions. *B. fragilis* strain YCH46 possesses master DNA invertases, Mpi that mediates the on-off switching of seven promoter regions for PS biosynthesis. However the underlying molecular mechanisms to regulate the DNA inversions by Mpi are still unclear. In this study, we identified the thirteen Mpi-binding proteins by in vitro pull-down assay. The mpi gene colocalizes with a tyrosine-type site-specific recombinase gene (BF2766) in a head-to-head manner. By comparing the transcriptomes of BF2766 deletion mutants, we found that BF2766-mediated inversion controlled the expression of Mpi as well, which in turn regulated the expression of PS loci in a hierarchical manner, allowing a coordinate alteration of surface structures.

研究分野：細菌学

キーワード：*Bacteroides fragilis* 莢膜 相変異 DNA逆位

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管には 1,000 種、100 兆個に及ぶ細菌が定着し、常在細菌叢を形成している。これら腸内菌は食物の消化、微量栄養素の供給、免疫賦活や種々の薬物の解毒、さらには外来病原体との競合作用など宿主にとって有益な生理活性を担っている。*Bacteroides* 属は腸内細菌叢の中で最も優勢な菌群のひとつである。我々は、*Bacteroides* 属の中で最も臨床検体からの分離頻度が高く、医学的に重要な日和見感染菌である *B. fragilis* YCH46 株の全ゲノム塩基配列を解読した¹⁾。このゲノム解析の結果、本菌は少なくとも 9 箇所の莢膜多糖合成遺伝子領域を持つことを明らかにした。このうち 7 領域は Mpi と呼ばれる一つの site-specific recombinase が仲介する promoter inversion によって遺伝子発現の ON/OFF 制御を受けている。また我々は、本菌種の多糖利用や環境認知に関わる複数の外膜タンパク質群も DNA inversion による相変異を起こすことを明らかにし、その制御を担う site-specific recombinase を同定した²⁾。このような菌体表層構造の相変異は宿主免疫からの回避機構として本菌の腸管内での長期生存に重要な役割を果たしているだけでなく、安定的な定着・増殖が可能な腸内環境の形成にも寄与していると考えられる。近年のゲノム解析の結果、多様な莢膜多糖 (PS) の産生能や莢膜相変異は *Bacteroides* に普遍的なものであり、他の菌群に類を見ない *Bacteroides* 属の特徴であることが明らかとなっている。しかしながら、なぜ *Bacteroides* が多数の莢膜多糖を産生し、かつ相変異による複雑な発現状態を創り出しているのか、その生理学的意義は明確ではない。

2. 研究の目的

我々は、これまでに Mpi recombinase の欠失変異株を作製し、変異株の ON/OFF パターンを Multiplex PCR 法によって解析した(図 1)。その結果、理論的には $2^7=128$ 通りの genotype が予測されるにもかかわらず、実際にはある一定の genotype への偏り (PS3 のみ ON の genotype が全体の 12% を占めた) が認められた。このような特定の genotype への収束は、

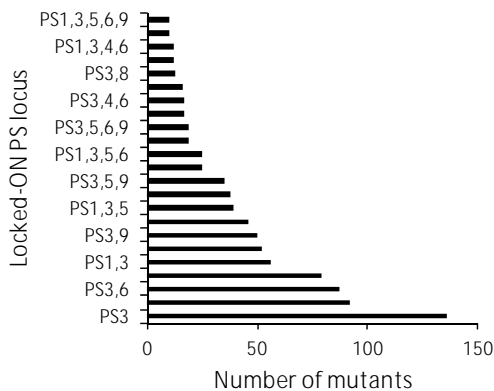


図 1. *mpi* 欠失変異株ライブラリーの内訳の一部

Mpi recombinase 以外に莢膜多糖合成遺伝子の promoter (PS promoter) の向きを調節するアクセサリー分子の存在を示唆している。そこで本研究では、*B. fragilis* の莢膜多糖合成遺伝子領域の promoter 領域に結合する新規の DNA 結合タンパク質を同定するとともに、PS promoter inversion の master recombinase である Mpi タンパク質と直接的・間接的に結合するタンパク質も同定することによって、本菌の莢膜多糖の詳細な発現メカニズムを解明する。また、*mpi* 遺伝子の発現制御に関わると考えられる BF2766 recombinase の遺伝子欠失株を用いて DNA 逆位による階層的な PS 遺伝子発現制御の一端を理解する。

3. 研究の方法

(1) 各莢膜多糖合成遺伝子領域のプロモーターに結合する新規 DNA 結合タンパク質の同定: DNA inversion を起こす 7 つの莢膜多糖合成領域 (PS1, PS3, PS4, PS5, PS6, PS8, および PS9) の promoter に結合する DNA 結合タンパク質を Yeast One-Hybrid System を用いて探索した。試薬キットとして Matchmaker One-Hybrid System (Clontech 社) を使用した。また、Dynabeads M-280 streptavidin (Invitrogen 社) を使った DNA affinity precipitation assay (DNAP assay) によっても同定を試みた。

(2) Mpi recombinase と結合するタンパク質の同定: PS promoter inversion の master recombinase である Mpi タンパク質と直接的・間接的に結合するタンパク質を Yeast Two-Hybrid System を用いて探索した。試薬キットとして Matchmaker Gold Two-Hybrid System (Clontech 社) を使用した。また、*B. fragilis* ゲノム上の *mpi* 遺伝子の下流に 3×FLAG 配列を挿入することで 3×FLAG 融合 Mpi を産生する組換え株 (*B. fragilis* *mpi::3×FLAG*) を用いて *in vivo* pull-down アッセイを行った。さらに、Mpi を GST 融合タンパク質として *E. coli* BL21 株で大量発現し、得られた粗抽出液と *B. fragilis* の粗抽出液を混合した後、glutathione sepharose 4B を用いて *in vitro* pull-down を行った。

(3) DNA 逆位による階層的な PS 遺伝子発現制御: *mpi* 遺伝子の発現制御に関わると考えられるチロシン型部位特異的組換え酵素 (BF2766) の遺伝子欠失株を作製し、*mpi* 遺伝子の発現を定量 PCR 法およびマイクロアレイ解析によって検討した。

4. 研究成果

(1) 各莢膜多糖合成遺伝子領域のプロモーターに結合する新規 DNA 結合タンパク質の同定。DNA inversion を起こす 7 つの莢膜多糖合成領域の promoter に結合する DNA 結合タンパク質を Yeast One-Hybrid System を用いて探索するために条件検討を行った。まず、我々

が既に明らかにしている *B. fragilis* のリン酸飢餓応答二成分制御システム(PhoB/PhoR)をパイロット試験の対象とした³⁾。Matchmaker One-Hybrid System (Clontech 社) を用いてスクリーニングを行った結果、bait 配列 (pho box 配列: cctcaccacagagtagcacagagttccacaagattatt) に結合するタンパク質として高分子多糖体の取り込みに関与する SusD 外膜蛋白質 (BF0947) と σ 54-enhancer binding protein (BF1515) を同定したが、PhoB 制御因子を同定するには至らなかった。捕捉されたタンパク質は bait 配列のコピー数が成否の鍵を握ると考えられたので、bait 配列のリピート回数を 3 回にしたレポータープラスミド pAbAi-3PhoBox を構築し Matchmaker One-Hybrid System を用いてスクリーニングを行った結果、bait 配列に結合するタンパク質として窒素代謝制御に関わる NtrC 制御因子、BF0947 および BF1515 が同定されたが PhoB 制御因子を同定するには至らなかった。次に PS promoter に結合する DNA 結合タンパク質を Dynabeads M-280 streptavidin を使った DNAP assay によって同定を試みた。まず、PS3 莢膜生合成領域の promoter 領域を pUC118 ベクターにクローニングした後、5' ピオチン化 M4 および RV プライマーを用いて PCR を行うことでピオチン化 DNA プロンプを作製した。ピオチン化 DNA プロンプ 1 μ g と *B. fragilis* の粗抽出液を混合し Dynabeads M-280 streptavidin を用いて affinity 回収を行ったが、PS3 プロモーター領域に結合するタンパク質は検出されなかった。今後詳細な条件設定が必要である。

(2) Mpi recombinase と結合するタンパク質の同定。

PS promoter inversion の master recombinase である Mpi タンパク質と直接的に結合するタンパク質を Yeast Two-Hybrid System を用いて探索するために条件検討を行った。前実験として新規に構築した *B. fragilis* YCH46 株 two-hybrid ライブラリーから PhoB と相互作用するタンパク質をスクリーニングしたところ、候補として PhoR を同定できた。以上よりタンパク質-タンパク質相互作用解析では *B. fragilis* において Yeast Two-Hybrid System が適用できることが確認できたので今後詳細に検討する。また Mpi タンパク質と直接的・間接的に結合するタンパク質を *in vivo* pull-down アッセイによって同定するために、*B. fragilis* ゲノム上の *mpi* 遺伝子の下流に 3 \times FLAG 配列を挿入することで 3 \times FLAG 融合 Mpi を産生する組換え株 (*B. fragilis* *mpi*::3 \times FLAG) を構築し *in vivo* pull-down を行ったが、Mpi の発現量の低さから Mpi に結合するタンパク質を同定するには至らなかった。そこで Mpi と直接的・間接的に結合するタンパク質を *in vitro* pull-down アッセイによって同定を試みた。Mpi を GST 融合タンパク質として *E. coli* BL21 株で大量発現し得られた粗抽

出液と *B. fragilis* の粗抽出液を混合し glutathione sepharose 4B を用いて pull-down を行った結果、13 個の Mpi 結合タンパク質が検出された (図 2)。

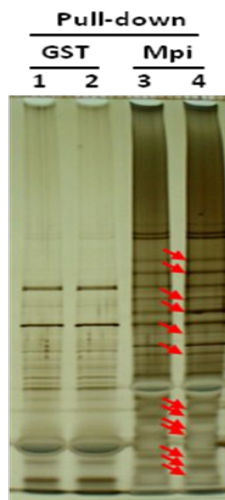


図 2. *In vitro* pull-down アッセイによる Mpi と相互作用するタンパク質の同定。レーン 1 と 2: GST のみ発現大腸菌 BL21 の粗抽出液+*B. fragilis* YCH46 株粗抽出液。レーン 3 と 4: GST-Mpi 融合蛋白質発現大腸菌 BL21 の粗抽出液+ *B. fragilis* YCH46 株粗抽出液。偶数レーンは各粗抽出液を Sepharose CL-6B および Glutathione sepharose 4B で前処理した。赤矢印が推定 Mpi 結合蛋白質。

(3) DNA 逆位による階層的な PS 遺伝子発現制御。

B. fragilis YCH46 株のゲノム上においては、現在までに DNA 逆位を起こす 31 箇所の invertible region が確認されている。これらの invertible region は、DNA 逆位の起点となる inverted repeat 配列の内部モチーフにより 6 種類 (Class I - VI) に分類されており、Class I 領域は Mpi recombinase によって莢膜多糖合成、Class II、V、VI 領域は BF0667 recombinase によって主に菌体外高分子多糖体の取り込みに関与する外膜蛋白質である SusC/SusD 発現、そして Class IV 領域は BF2766 recombinase によって外膜空胞 (OMVs) 形成が制御されている。この Class IV 領域はゲノム上に 2 箇所 (IV-1 および IV-2 領域) 存在しており、Class IV-1 領域の直ぐ上流に BF2766 が位置している。さらに BF2766 の直前に *mpi* 遺伝子が存在している (図 7 参照)。従って、BF2766 による Class IV-1 プロモーター制御によって間接的に *mpi* 遺伝子発現が調節されていると考えられた。そこで、Class IV 領域下流の遺伝子群の発現が共に ON に固定された BF2766 の欠失変異株 (IV-1/IV-2=ON/ON 株) および IV-1/IV-2=OFF/ON 株、OFF/OFF 株、ON/OFF 株を作製し、定量 PCR 法により各欠失株における *mpi* 遺伝子発現を比較した。その結果、Class IV-1 プロモーターの向きに依存して

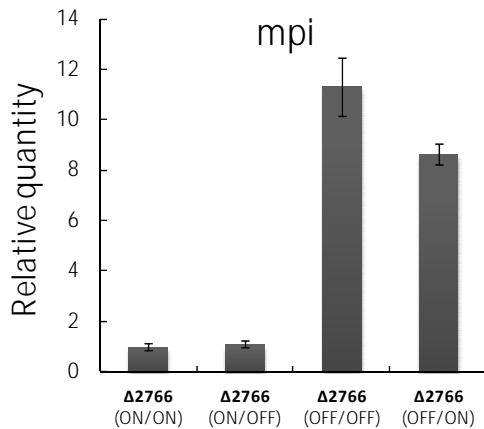


図 3. 各 BF2766 遺伝子欠失株における *mpi* 遺伝子発現。

mpi 遺伝子の発現も増減することが明らかとなった (図 3)。次に、各 BF2766 遺伝子欠失株間の DNA マイクロアレイ解析を行った。各変異株間で 4 倍以上の発現変動が認められた遺伝子を比較したところ、変動が顕著だった遺伝子は莢膜生合成領域の遺伝子群に集中した。そこで、9 箇所の莢膜生合成領域の遺伝子群について階層クラスタリングを行ったところ特に変動が顕著であった領域は、PS3, 4, 5, 7 領域であった。PS3 は、ON/OFF 株、PS4 は OFF/OFF 株、PS5 は ON/ON, OFF/ON 株、PS7 は ON/ON, ON/OFF 株で顕著に発現が高かった (図 4)。

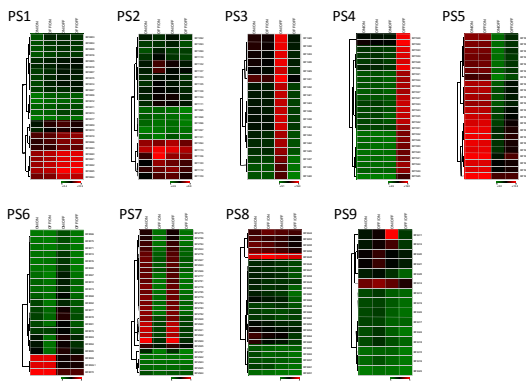


図 4. 各 BF2766 遺伝子欠失株間における 9 箇所の莢膜生合成領域遺伝子発現の階層クラスタリング解析。各カラム横軸は各 BF2766 遺伝子欠失株 (左より、ON/ON, OFF/ON, ON/OFF, OFF/OFF 株) を示す。縦軸は各莢膜生合成領域を構成する遺伝子を示す。

以上より、Class IV 領域の DNA 逆位によって莢膜発現パターンの劇的な変動が生じることからすると、莢膜発現と OMVs 形成がリンクしている可能性が示唆された。*B. fragilis* における OMVs 産生は、BF2766 欠失株 (ON/ON 変異株) において顕著に亢進するが、Class IV-2 領域下の遺伝子である BF3403 (*fimX*) を欠損するだけで OMVs 産生は著しく減少する。そこで、OMVs 産生増強株 (ON/ON 株) と *fimX* を欠損させた ON/ON 株における PS5,

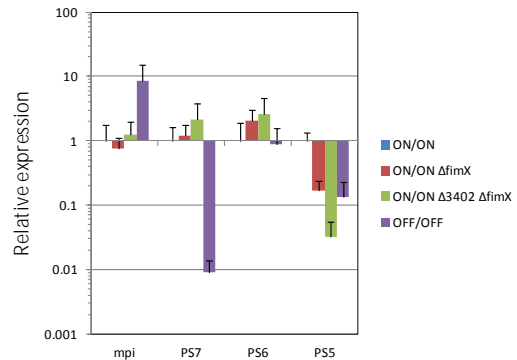


図 5. *fimX*, BF2766 二重欠失株における PS5, PS6, PS7 および *mpi* 遺伝子の発現

PS6, PS7 および *mpi* 遺伝子の発現を定量 PCR 法で解析した (図 5)。その結果、*fimX* 欠失株では PS5 発現の著しい減少が認められたことから OMVs 産生増強株 (ON/ON 株) における OMVs 産生と PS5 莢膜発現との関連性が示唆された。一方 PS6 および PS7 莢膜発現に関しては *fimX* 欠失の影響は認められなかった。さらに ON/ON 株由来 OMVs を精製し Optiprep を用いて密度勾配遠心分画したところ、莢膜様バンドが認められた (図 6)。

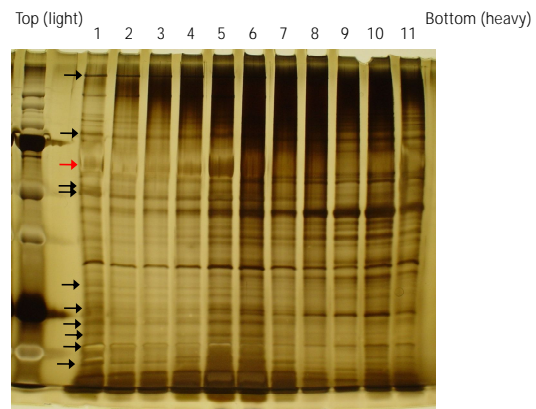


図 6. BF2766 欠失株 (ON/ON 変異株) 由来 OMVs の Optiprep 密度勾配遠心分画。赤矢印が莢膜様バンド。

以上より *B. fragilis* における PS 遺伝子発現制御は、BF2766 による DNA 逆位を受け、より階層的な制御ネットワーク下にあると推測された (図 7)。

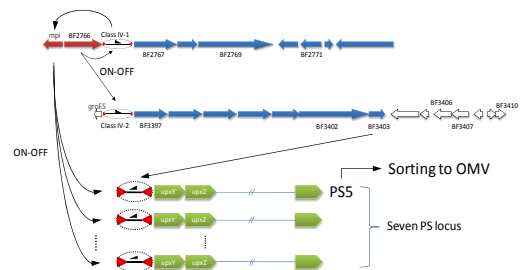


図 7. 莢膜生合成遺伝子発現の DNA 逆位による階層的な制御ネットワーク

<引用文献>

1) Kuwahara, T., Yamashita, A., Hirakawa, H., Nakayama, H., Toh, H., Okada, N., Kuhara, S., Hottori, M., Hayashi, T., Ohnishi, Y. Genomic analysis of *Bacteroides fragilis* reveals extensive DNA inversions regulating cell surface adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101, 14919-14924, 2004.

2) Nakayama-Imaohji H, Hirakawa H, Ichimura M, Wakimoto S, Kuhara S, Hayashi T, Kuwahara T. Identification of the site-specific DNA invertase responsible for the phase variation of SusC/SusD family outer membrane proteins in *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.*, 191, 6003-6011, 2009.

3) Wakimoto S, Nakayama-Imaohji H, Ichimura M, Morita H, Hirakawa H, Hayashi T, Yasutomo K, Kuwahara T. PhoB regulates the survival of *Bacteroides fragilis* in peritoneal abscesses. *PLoS One*, 8, e53829. 2013.

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 12 件)

1. Tagawa J, Inoue T, Naito M, Sato K, Kuwahara T, Nakayama M, Nakayama K, Yamashiro T, Ohara N. Development of a novel plasmid vector pTIO-1 adapted for electrotransformation of *Porphyromonas gingivalis*. *J Microbiol Methods.*, 105, 174-9, 2014. 査読有
DOI: 10.1016/j.mimet.2014.07.032.
2. Utsunomiya H, Ichinose M, Ikeda K, Uozaki M, Morishita J, Kuwahara T, Koyama AH, Yamasaki H. Inhibition by caffeic acid of the influenza A virus multiplication *in vitro*. *Int J Mol Med.*, 34, 1020-4, 2014. 査読有
DOI: 10.3892/ijmm.2014.1859.
3. Ichimura M, Uchida K, Nakayama-Imaohji H, Hirakawa H, Tada T, Morita H, Yasutomo K, Okazaki K, Kuwahara T. Mariner-based transposon mutagenesis for *Bacteroides* species. *J Basic Microbiol.*, 54, 558-67, 2014. 査読有
DOI: 10.1002/jobm.201200763.
4. Tamai E, Yoshida H, Sekiya H, Nariya H, Miyata S, Okabe A, Kuwahara T, Maki J, Kamitori S. X-ray structure of a novel endolysin encoded by episomal phage phiSM101 of *Clostridium perfringens*. *Mol Microbiol.*, 92, 326-37, 2014. 査読有
DOI: 10.1111/mmi.12559.
5. Horiuchi I, Kawata H, Imaohji H, Nagao T, Murakami K, Kino Y, Yamasaki H, Koyama AH, Fujita Y, Goda H, Kuwahara

T. Antimicrobial activity and stability of a novel chlorous-acid-based sanitizer.

Biocontrol Science 20, 43-51, 2015. 査読有
DOI: 10.4265/bio.20.43.

6. Imataki O, Kita N, Nakayama-Imaohji H, Kida JI, Kuwahara T, Uemura M. Bronchiolitis and bacteremia caused by *Burkholderia gladioli* in a non-lung transplantation patient. *New Microbes and New Infections*, 2, 175-176, 2014. 査読有
DOI: 10.1002/nmi2.64.
7. Yoshikawa K, Shimada M, Kuwahara T, Hirakawa H, Kurita N, Sato H, Utsunomiya T, Iwata T, Miyatani T, Higashijima J, Kashihara H, Takasu C, Matsumoto N, Nakayama-Imaohji H. Effect of Kampo medicine "Dai-kenchu-to" on microbiome in the intestine of the rats with fast stress. *J Med Invest.*, 60, 221-7, 2013. 査読有
8. Wakimoto S, Nakayama-Imaohji H, Ichimura M, Morita H, Hirakawa H, Hayashi T, Yasutomo K, Kuwahara T. PhoB regulates the survival of *Bacteroides fragilis* in peritoneal abscesses. *PLoS One*, 8, e53829. 2013. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0053829.
9. Ishibashi H, Kuwahara T, Nakayama-Imaohji H, Ohnishi Y, Mori H, Shimada M. Effects of indole-3-carbinol and phenethyl isothiocyanate on bile and pancreatic juice excretion in rats. *J Med Invest.*, 59, 246-52, 2012. 査読有
10. Nakayama-Imaohji H, Ichimura M, Iwasa T, Okada N, Ohnishi Y, Kuwahara T. Characterization of a gene cluster for sialoglycoconjugate utilization in *Bacteroides fragilis*. *J Med Invest.*, 59, 79-94, 2012. 査読有
11. Nemoto H, Kataoka K, Ishikawa H, Ikata K, Arimochi H, Iwasaki T, Ohnishi Y, Kuwahara T, Yasutomo K. Reduced diversity and imbalance of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. *Dig Dis Sci.*, 57, 2955-64, 2012. 査読有
DOI: 10.1007/s10620-012-2236-y.
12. Takami H, Taniguchi T, Moriya Y, Kuwahara T, Kanehisa M, Goto S. Evaluation method for the potential functionome harbored in the genome and metagenome. *BMC Genomics.* 13, 699, 2012. 査読有
DOI: 10.1186/1471-2164-13-699.

[学会発表](計 6 件)

1. 今大路治之、山本高成、芳池 一、桑原知巳、*Raoultella ornithinolytica* における histidine decarboxylase 遺伝子の発現制御、第 56 回日本細菌学会中国・四国支

部総会、徳島文理大学(徳島県・徳島市)、
2014年10月5日

2. 今大路治之、*Raoultella ornithinolytica* の histamine 産生機構、2014 中国・四国乳酸菌研究会、ホテルグランヴィア岡山(岡山県・岡山市)、2014年5月16日
3. 今大路治之、大岡唯祐、後藤恭宏、成谷宏文、堀内功典、鈴木基生、岡崎勝一郎、林 哲也、桑原知己、*Raoultella ornithinolytica* における histamine 産生は酸素ストレス耐性に関与する、第 87 回日本細菌学会総会、タワーホール船堀(東京都)、2014年3月26日
4. 今大路治之、堀内功典、桑原知己、腸管内常在菌が *Clostridium difficile* の病原性に与える影響、第 83 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)、2013年11月7日
5. 今大路治之、大岡唯介、成谷宏文、鈴木基生、岡崎勝一郎、林 哲也、桑原知己、*Raoultella ornithinolytica* における histamine 産生と酸素ストレス耐性、第 66 回日本細菌学会中国・四国支部総会、広島国際大学呉キャンパス(広島県・呉市)、2013年10月13日
6. 今大路治之、市村 穰、桑原知己、*Bacteroides fragilis* の外膜空胞形成は膜ストレスに応答した DNA 逆位によって制御される。第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)、2012年12月13日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 治之 (NAKAYAMA, Haruyuki)
香川大学・医学部・分子微生物学・助教
研究者番号：80294669

(2) 研究分担者

桑原 知己 (KUWAHARA, Tomomi)
香川大学・医学部・分子微生物学・教授
研究者番号：60263810