

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450092

研究課題名(和文)バクテリオファージによる不稔感染機構の分子機序

研究課題名(英文)Molecular mechanism of abortive infection Bacillus subtilis

研究代表者

中村 幸治 (NAKAMURA, Kouji)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：40212097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：枯草菌Marburg168株のSP10ファージ耐性遺伝子として、nonAとnonBという二つの遺伝子が同定されていた。nonAは蛋白質(72アミノ酸)として機能していた。nonA遺伝子の発現には、SP10ファージ感染時に発現されるSP10ファージ由来のシグマ因子が関与していた。nonAを持つ株ではSP10ファージ感染後、ファージ遺伝子の初期産物の転写は正常に見られたが、キャプシド蛋白質などの感染後期で発現するファージ蛋白質の蓄積が阻害されていた。ファージ非感染細胞でNonAの発現を誘導すると呼吸活性が低下し、増殖が停止した。これらの結果から、枯草菌の増殖能の阻害により、不稔感染させていた。

研究成果の概要(英文)：The phage resistance gene nonA is located on the SP10 prophage region of the Bacillus subtilis Marburg strain genome. The nonA transcript was detected after the induction of the sigma factor. Thus, the SP10 sigma factor is an activator of a set of SP10 genes and nonA. The nonA gene encodes a 72-amino-acid protein with a transmembrane motif. NonA overexpression halted cell growth. These results indicate that NonA is a novel protein that can abort SP10 infection, and its transcription was regulated by SP10 sigma factor.

研究分野：ゲノム微生物学

キーワード：枯草菌 バクテリオファージ 不稔感染 転写制御

1. 研究開始当初の背景

(1) 細菌における防護機構

細菌において、ファージやプラスミドの侵入を阻止する機構として、近年、CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats) と呼ばれる DNA 領域が同定され、獲得免疫機構として機能していることが判明した。一方、枯草菌 Marburg 株は、SP10 ファージの感染に対して耐性であるが、宿主染色体上 2 つの部位に変異を生じると、ファージの感染に対して感受性になることを分担者は見出し、解析の結果、枯草菌プロファージ SP 10 にある領域からの転写産物 (RNA) が、特異的にファージの増殖を阻害していることが示唆された (Yee LM, (他 3 名) Asai K. Inhibitory effect of prophage SP8 fragments on phage SP10 ribonucleotide reductase function and its multiplication in *Bacillus subtilis*. *Genes & Genetic Systems* 86: 7-18 (2011))。

(2) 新奇遺伝子発現抑制機構の存在の解明

一方、微生物においても多くの新奇な遺伝子発現制御機構が存在し、特異的な遺伝子発現制御ネットワークを構成していることが明らかとなってきた。申請者は、特に、グラム陽性細菌において、非翻訳型の RNA が、毒素遺伝子の mRNA との相互作用による遺伝子の発現制御の機構を明らかにした (Obana N, (他 2 名) Nakamura K. Stabilization of *Clostridium perfringens* collagenase mRNA by VR-RNA-dependent cleavage in 5' leader sequence. *Molecular Microbiology* 77: 1416-1428 (2010))。さらに、枯草菌の非翻訳型 RNA 結合タンパク質 Hfq (YmaH) の RNA 相互作用の分子パターンを明らかにした (Someya, T., (他 4 名) Nakamura K. Crystal structure of Hfq from *Bacillus subtilis* in complex with SELEX-derived RNA aptamer. insight into RNA-binding properties of bacterial Hfq. *Nucleic Acids Research*, 40, 1856-1867. (2012))。このように、トランスから発現される遺伝子産物が逆さの遺伝子発現を制御する機構が存在するという認識に至った。

2. 研究の目的

「溶原化したバクテリオファージは如何にして他の侵入を阻止しうるか」を検証する。具体的には、すでに、ゲノム上に溶原化した枯草菌プロファージが、病原性ファージ SP10 の侵入に対し、サイレンシング機能を有するかを実証し、その防御機構を分子レベルで明らかにする。現在までに、SP10 ファージ感染時に、SP 10 遺伝子領域から特異的な発現が観察されている。この遺伝子を他の領域へ移動させても SP10 の感染防御は行われることから、この遺伝子自身が、サイレンス機構に関与していることを突き止めた。この遺伝子の方向は、すでに、同定されている遺

伝子とはトランスであることから、センサーアンチセンス対の形成による遺伝子発現阻害であることが予想された。しかし、転写物内の配列には、リボソーム結合配列を有する短いタンパク質翻訳領域 (ORF) が存在することが明らかとなっている。この転写物の ORF が産物そのものなのかを機能解析を行う。ファージの不稔感染では、宿主細胞が持つ制限修飾系が重要な役割を持つことが知られているが、1種類の制限系に対し、その配列を持たないファージにはどのように対処しているのか。期間中に枯草菌に感染能を有するファージライブラリーを作成し、制限サイトを有しないファージに対してはどのような防御機構の獲得されているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

プロファージ SP 10 *bnrdE-bnrdF* 遺伝子間領域からの転写の検証

現在、プロファージ SP 10 *bnrdE-bnrdF* 遺伝子間領域からアンチセンス RNA が転写されていることは確かめられていない。そこで、以下の解析を行い、アンチセンス RNA の存在とその転写機構の詳細について明らかにする。

(1) アンチセンス RNA 転写時期の検証

枯草菌を SP10 ファージに感染させた後、経時的に菌体をサンプリングし、RNA を抽出し、RNA プローブを用いたノーザンブロットにより、*bnrdE-bnrdF* 遺伝子間領域から転写されている RNA の長さ、向き、転写時期、プロセッシング等の転写後調節の有無を明らかにする。また、SP10 ファージ非感染時の発現を確かめるために、枯草菌を各生育段階でサンプリング、RNA を抽出し、同様にノーザンブロットを行い、生育段階における、*bnrdE-bnrdF* 遺伝子間領域からの転写を明らかとする。

(2) 転写産物の転写領域の解析

明らかとなった、転写産物の情報を基に 5' RACE 及び 3' RACE を行い、アンチセンス RNA の 5' 末端及び 3' 末端を決定する。特に、5' RACE には RLM-RACE 法を用い、5' 末端がプライマリーなもののか、プロセッシングを受けたものであるかを決定する。以上の結果を基にアンチセンス RNA の転写領域を決定する。

(3) ORF の解析

明らかとなった転写領域内に SD 配列を持つ ORF が存在するか配列情報から調べる。ORF が認められた場合、レポーター遺伝子を翻訳融合させ、レポーター解析により ORF が翻訳されているか確認する。ORF が翻訳されていた場合、BLAST 検索やモチーフからその機能を推定する。

(4) トランスにコードされた RNA による SP10 ファージ防御機構の解析

25年度では24年度で明らかにしたアンチセンス RNA による SP10 ファージ防御機構を分子レベルで明らかにする。

アンチセンス RNA による *nrd* 遺伝子の発現制御機構の解析

SP10 ファージ感染後の *xnrd* 遺伝子の発現が、アンチセンス RNA の有無によりどのように変化するかをノーザンプロットや RT-PCR、ウェスタンプロット、レポーター解析等の手法を用いて、RNA レベル、蛋白質レベルで明らかにする。また、アンチセンス RNA がファージにコードされている *xnrd* 遺伝子を特異的に制御しているのか、枯草菌にコードされている *nrd* 遺伝子も同様に制御しているのかについても明らかにする。さらに、この遺伝子発現制御における Hfq の関与についても明らかにする。

SP10 ファージの DNA 合成に関する解析

SP10 ファージ感染後の SP10 ファージの DNA 合成や nucleotide 及び deoxynucleotide の代謝が、アンチセンス RNA の有無によりどのように変化するか測定する。また、各 *nrd* 遺伝子の過剰発現により以上の変化が相補されるか検証する。

各 Nrd 酵素の生化学的特徴の解析

枯草菌、SP、SP10 ファージにそれぞれコードされている Nrd 遺伝子を精製し、*in vitro* で生化学的な特長を測定、比較する。

(5) SP 類縁ファージによる SP10 ファージ防御機構の解析

枯草菌 Marburg 株に溶原化している SP だけではなく、環境中から単離された枯草菌株に溶原化している SP 類縁ファージにも同様の SP10 ファージ防御機構が存在するか検証し、この防御機構が一般的なものかを明らかにする。

以上の研究項目から得られる結果を統合し、当該事象のモデルを構築する。

4. 研究成果

(1) nonA の遺伝子領域の同定と発現解析

nonA 遺伝子は SP 枯草菌ゲノム中のプロファージ SP 領域の *bndE-bndF* 遺伝子間領域に存在することが示唆されていたが、実際にその領域から *nonA* が転写され、機能しているかは明らかではなかった。RNA プローブを用いたノーザンプロット解析及び 5' -3' RACE 法により、nonA は *bndE-bndF* 遺伝子間領域から *bndEF* 遺伝子とは逆向きに 370 nt の RNA として転写されていることを明らかとした。*nonA* の転写はファージ非感染時には見られないが、SP10 ファージ感染後、ファージ感染後期に転写されるファージ遺伝子と同時期に転写されていた。さらに、SP10 ファージの遺伝子発現を制御する各因子をプラスミドに組み込み、枯草菌内で発現させ

たところ、後期遺伝子の発現を制御する因子により *nonA* 遺伝子の転写が活性化されていることが明らかとなった。このような、感染したファージのシグマ因子を利用し、宿主が自身の遺伝子の発現を制御する機構は初めての発見である。ファージは宿主因子を利用し増殖しているが、宿主もまたファージ因子を巧みに利用し、ファージに抵抗していることが明らかになった。

(2) nonA 産物の同定と枯草菌における発現が生育に及ぼす影響

nonA の転写領域内に 72 アミノ酸の ORF が予測された。この ORF の RBS 又は開始コドンに変異を導入すると SP10 ファージに対する抵抗性が失われたことから NonA はこの 72 アミノ酸の蛋白質として機能していることが明らかとなった。NonA には膜貫通領域が予測されたことから、分画により局在を確認したところ、膜画分に検出されたことから、NonA は膜蛋白質であることが示された。NonA には膜貫通領域以外の既知のドメインやモチーフは予測されず、BLAST 検索によっても相同な蛋白質も見つからなかったことから、NonA は新奇の蛋白質であると考えられる。NonA の発現を IPTG 誘導出来る株を作成し、対数増殖期中期に NonA を発現させると、生育が著しく阻害された。この細胞を死菌（細胞膜が損傷した細胞）のみを染める PI で染色したところ、染色されなかったが、呼吸活性のある細胞を染める CTC（でも染色されなかった。このことから、NonA は膜損傷を生じさせないが、呼吸活性を低下させることが示された。*nonA* を持つ株では SP10 ファージ感染後期においてもファージ粒子が観察されず、シースやキャプシドといったファージ粒子蛋白質の蓄積も見られなかった。このことから、枯草菌は SP10 ファージ感染後に NonA を発現することで自身の呼吸活性を低下させ、ファージの増殖を阻害し、集団内にファージが拡散することを防いでいることが示唆された。

(3) 他のファージに対する影響

nonA を持つ枯草菌は SP10 ファージに対して抵抗性を持つが、29 や SP01、SPP1 といった枯草菌ファージに対しては抵抗性を持たないということが知られていたが、なぜ *nonA* はこれらのファージに対する抵抗性を枯草菌に付与しないかは明らかではなかった。29、SP01、SPP1 ファージをそれぞれ、枯草菌に感染させ、*nonA* の転写を調べてたところ、SP10 ファージを感染させたときは異なり、*nonA* の転写は見られなかった。これらのファージは *nonA* の転写に必要な因子を持たないことから、*nonA* の転写が起きなかったと考えられる。従って、*nonA* によるファージ防御機構は制限修飾系や CRISPR のような汎用的な防御機構ではなく、

SP10 ファージに対する特異的な機構であると考えられる。

(4) nonA*の発現に対する耐性の株の解析

NonA の発現を誘導しても NonA による生育阻害を受けない、NonA 発現許容株を取得した。この NonA 発現許容株は NonA 依存的な SP10 ファージに対する抵抗性を失っていたことから、NonA による生育阻害がファージ抵抗性に関与していることが示唆された。次世代シーケンサーを用いて NonA 発現許容株の変異部位の同定を行ったところ、細胞骨格蛋白質である *mreB* 遺伝子に変異が見られた。MreB を欠損株では、NonA によるファージ抵抗性及び生育阻害が見られなかったことから、NonA の機能には MreB が必要であることが示された。*nonA* はプロファージ SP 領域に存在することから、枯草菌にとっては外来遺伝子である。*nonA* の転写には外部から感染した SP10 ファージの因子が必要であるが、外来遺伝子である *nonA* が機能するには宿主因子である MreB が必要となっている。このような NonA による不稔感染機構は宿主である枯草菌、溶原ファージである SP、そして病原ファージである SP10 の共進化によって生じたのではないかと考えられる。以上の結果は、宿主とウイルスのみならず、ウイルス間での競争的な進化の理解に寄与するものとして重要である。

(5) バイオフィームに対するファージ産物の解析

細菌の多くは環境中ではバイオフィームという細胞外マトリックスに覆われた構造を形成して集団で生息している。このような細胞外マトリックスに覆われたバイオフィーム中の細菌に対するファージの感染については不明な点が多い。複数の枯草菌ファージライセートを枯草菌バイオフィームに添加したところ、SP10 ファージライセートを添加したときにバイオフィームの著しい分解がみられた。Proteinase K 処理によりこのバイオフィーム分解活性が低下したことから、バイオフィーム分解因子は蛋白質であることが示唆された。バイオフィームを分解する SP10 ファージライセートと分解しない SP01 ファージライセートとの蛋白質を比較し、SP10 ファージライセート特異的な蛋白質を MALDI-TOF MS で同定した。同定された蛋白質は SP10 ファージにゲノム中にコードされており、大腸菌で発現、精製した蛋白質を加えてもバイオフィームの分解が見られた。SP10 ファージはこのようなバイオフィーム分解蛋白質を用いることで、菌体をペリクルから遊離させ、菌体に付着しやすくしている可能性が考えられる。バイオフィームは多くの産業において微生物汚染源として知られているが、その除去は困難である。そのため、このようなバイオフィーム分解蛋白質により効果的なバイオフィーム除去の可能性が期

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 1件)

Tatsuya Yamamoto, Nozomu Obana, Lii Mien Yee, Kei Asai, Nobuhiko Nomura and Kouji Nakamura. SP10 infectivity is aborted after bacteriophage SP10 infection induces *nonA* transcription on the prophage SP region of the *Bacillus subtilis* genome. Journal of Bacteriology, American Society for Microbiology, 196(3), 693-706, 2014 (査読有)

[学会発表](計 13件)

山本達也、野村暢彦、中村幸治「枯草菌バイオフィームを分解するファージタンパク質の解析」2015年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、滋賀県大津市、里湯昔話 雄山荘 2015年8月27-28日

山本達也、尾花望、野村暢彦、中村幸治、「枯草菌 NonA によるファージ不稔感染に関与する遺伝子の探索と解析」、第9回日本ゲノム微生物学会年会、兵庫県神戸市、神戸大学、2015年3月6-8日

山本達也、中村幸治、野村暢彦、「枯草菌バイオフィームを分解するファージタンパク質の同定と解析」、日本農芸化学会2015年度大会、岡山県岡山市、岡山大学、2015年3月26-29日

Tatsuya Yamamoto, Nozomu Obana, Nobuhiko Nomura, Kouji Nakamura, 「CHARACTERIZATION OF* BACILLUS SUBTILIS* PROPHAGE SP GENE FOR PHAGE ABORTIVE INFECTION」、Bacteriophages 2015, イギリス(ロンドン)、2015年1月27-29日

山本達也、尾花望、野村暢彦、中村幸治、「枯草菌 *nonA* 遺伝子による不稔感染機構の解析」、日本農芸化学会関東支部 2014年度支部大会、埼玉県さいたま市、埼玉大学、2014年10月18日

山本達也、尾花望、野村暢彦、中村幸治、「枯草菌のファージ不稔感染遺伝子 *nonA* の機能解析」、第8回日本ゲノム微生物学会若手の会研究会、静岡県駿東郡小山町、ろうきん研修所富士センター、2014年9月28-29日

山本達也、尾花望、野村暢彦、中村幸治、「枯草菌の SP10 ファージ不稔感染遺伝子 *nonA* の機能解析」、第5回ファージ研究会、

三重県津市、三重大学、2014年9月4-5日

Tatsuya Yamamoto, Nozomu Obana, Nobuhiko Nomura, Kouji Nakamura,
「 Bacillus Phage SP10 Infectivity Is Aborted after SP10 Induces *nonA* Transcription on the *Bacillus subtilis* Genome 」、asm2014 114th General Meeting、アメリカ(ボストン)2014年5月17-20日

山本達也、尾花望、Yee Lii Mien、朝井計、野村暢彦、中村幸治、「枯草菌の不稔感染遺伝子 nonA が SP10 ファージ増殖に与える影響」、日本農芸化学会2014年度大会、神奈川県川崎市、明治大学、2014年3月27-30日

山本達也、尾花望、Yee Lii Mien、朝井計、野村暢彦、中村幸治、「枯草菌プロファージ SP の *nonA* 遺伝子が SP10 ファージ増殖に与える影響」、第8回日本ゲノム微生物学会年会、東京都世田谷区、東京農業大学、2014年3月7-9日

山本達也、尾花望、Yee Lii Mien、朝井計、野村暢彦、中村幸治、「枯草菌ゲノム SP 領域内の *nonA* 遺伝子による SP10 ファージ不稔感染機構」、第7回日本ゲノム微生物学会若手の会研究会、静岡県駿東郡小山町、ろうきん研修所富士センター、2013年9月19日20日

山本達也、尾花望、Yee Lii Mien、朝井計、野村暢彦、中村幸治、「SP10 ファージは枯草菌ゲノム SP 領域内の nonA 遺伝子により不稔感染となる」、2013年度GRAM陽性菌ゲノム機能会議、茨城県つくば市、筑波山江戸屋、2013年9月7-8日

Tatsuya Yamamoto, Lii Mien Yee, Kei Asai, Kouji Nakamura, Transcription of nonA gene on the SP prophage region of Bacillus subtilis genome is activated by infection with virulent SP10 phages, FEMS2013 5TH CONGRESS OF EUROPEAN MICROBIOLOGISTS、ドイツ(ライプツィヒ)、2013年6月21-25日

〔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
<http://nc.bsyt.tsukuba.ac.jp/nakamura>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 幸治 (NAKAMURA, Kouji)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号：40212097

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：