

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25712009

研究課題名(和文) ケイ素を蓄積する新規土壌細菌の分子メカニズムの解析とケイ素循環における役割の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of silica-accumulating soil bacteria and their role in the silicon cycle

研究代表者

池田 丈 (Ikeda, Takeshi)

広島大学・先端物質科学研究科・助教

研究者番号：10505754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに土壌細菌*Bacillus cereus*とその近縁種が孢子形成時にケイ酸を取り込み、生体内で重合反応を起こしてシリカを形成・蓄積する事を発見した。シリカが蓄積される孢子殻は多数のタンパク質で構成されることから、シリカの蓄積(ケイ酸の重合によるシリカ形成)にはタンパク質が関与していると考えられた。本研究では、シリカ形成・蓄積メカニズムの解析を行い、孢子殻タンパク質のひとつであるCotB1が、シリカ形成に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that *Bacillus cereus* and its close relatives accumulate silicon (Si) in and around a spore coat layer. Si is taken up from the environment as soluble silicate ($\text{Si}[\text{OH}]_4$), which is then polymerized and accumulated as insoluble silica (SiO_2). The spore coat is a proteinaceous shell composed of more than 50 proteins. Silica accumulation in and around the spore coat strongly suggests that spore coat proteins play an important role in silica formation. In this study, we found that one of the spore coat proteins, CotB1, mediates the accumulation of silica.

研究分野：生物工学

キーワード：細菌 孢子 ケイ素

1. 研究開始当初の背景

ケイ素(Si, シリコン)は酸素に次いで地殻上に二番目に多く存在する元素であり、産業的にも広く利用されている。一方、ケイ素は生物にとっても重要な役割を担っている。例えば珪藻や一部の海綿は、環境中のケイ酸を取り込み、その重合体であるシリカの骨格を形成して細胞や組織の強度を高めている。また、イネやトクサといった一部の植物がシリカを蓄積し、物理的強度や病気への抵抗性を高めていることが知られている。

また、地球上におけるケイ素の循環は、生物の根幹となる炭素の循環と密接に関連している。なぜなら、シリカ被殻を有する珪藻は海洋における主要な一次生産者であり、地球上の炭酸固定の約 20%を担っていると言われる。珪藻の生育には、被殻の材料となる可溶性のケイ酸($\text{Si}[\text{OH}]_4$)が必須であり、元素比で炭素のおよそ 1/7 にも相当する大量のケイ素が取り込まれる。このように環境中におけるケイ素の循環ならびにそれに関与する生物は非常に重要であるが、これまでは主に水圏生物(珪藻・海綿)・陸圏植物(イネなど)についてのみ研究が進められており、ケイ素循環における陸圏微生物の影響についてはこれまで見過ごされていた。

一方、我々は一部の *Bacillus* 属細菌が孢子形成期に環境中のケイ酸を細胞内に取り込むことを発見した。さらに、取り込まれたケイ酸は細胞内で重合され、シリカとして孢子表面上に蓄積されていることも明らかにした。*Bacillus* 属細菌は土壌中に普遍的に存在することから、本菌によるケイ酸取り込み・シリカ形成は普遍的に起こっている現象である可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

これまで、シリカを蓄積するとして知られていた生物は真核生物ばかりであり、原核生物によるシリカの蓄積についてはほとんど知られていなかった。*Bacillus* 属細菌によるケイ酸取り込み・シリカ形成は、地球規模でのケイ素の循環という観点から興味深いだけでなく、その分子メカニズムにも興味を持たれる。*Bacillus* 属細菌のケイ酸取り込み・シリカ形成に関わるタンパク質・遺伝子を同定できれば、シリカを蓄積する真核生物との進化的関係を明らかにできると期待されるとともに、自然界において原核生物によるシリカ形成がどれだけ広く分布しているかを調べるための分子プローブにもなりうる。そこで本研究では、*Bacillus* 属細菌によるケイ酸取り込み・シリカ蓄積の分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シリカ蓄積に関与する孢子殻タンパク質の探索

B. cereus の孢子殻タンパク質と報告されている 53 種のタンパク質(文献 1)について、

既知のシリカ重合ペプチドとの相同性解析を行った。

(2) 遺伝子破壊株の構築とケイ酸取り込み量の評価

cotB1B2 遺伝子破壊株の構築は文献 2 に基づいて以下のように行った。まず、標的となる *cotB1B2* 遺伝子上流領域・下流領域それぞれ約 1 kb を PCR によって増幅した。また、プラスミド pIC333 上のスペクチノマイシン耐性(Sp^R)遺伝子を PCR によって増幅した。得られた産物を適宜制限酵素で消化した後にライゲーションすることで、*cotB1B2* 上流配列- Sp^R 遺伝子-下流配列の順に並んだ DNA 断片を得た。得られた DNA 断片を温度感受性プラスミド pMAD に挿入することで、遺伝子破壊用プラスミドを構築した。得られたプラスミドをエレクトロポレーションによって、*B. cereus* 野生株に導入した。以降の操作は文献 2 に従ったが、目的とする破壊株の選抜方法は、抗生物質によるスクリーニングではなく、PCR による遺伝子破壊の確認に変更した。

得られた遺伝子破壊株を、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のケイ酸を含む mR2A 培地に植菌し、28 $^{\circ}\text{C}$ で振盪培養した。経時的に培養液のサンプリングを行い、遠心分離によって菌体を除いた培養液上清のケイ酸濃度を測定することで、ケイ酸取り込み量を評価した。

(3) *cotB1*, *cotB2* 遺伝子の相補性試験

cotB1B2 遺伝子ならびにその推定プロモーター領域・ターミネーター領域を含む DNA 断片を PCR により増幅した。得られた断片をプラスミド pHT304 に挿入することで、プラスミド pHT-*cotB1B2* を構築した。pHT-*cotB1B2* を鋳型としたインバース PCR によって、*cotB2* 遺伝子を除いた pHT-*cotB1* と、*cotB1* 遺伝子を除いた pHT-*cotB2* を構築した。構築したプラスミドをエレクトロポレーションによって *cotB1B2* 破壊株に導入し、適当な抗生物質を含む LB 寒天培地上で培養することで形質転換体を得た。得られた形質転換体のケイ酸取り込み量を評価した。

(4) CotB1 タンパク質の発現時期と細胞内における局在の解析

pHT-*cotB1* を鋳型としたインバース PCR によって得られた DNA を βGFP をコードする DNA 断片とライゲーションすることで、 GFP-CotB1 融合タンパク質をコードするプラスミド pHT-gfp-*cotB1* を構築した。構築したプラスミドをエレクトロポレーションによって *B. cereus* 野生株に導入し、適当な抗生物質を含む LB 寒天培地上で培養することで形質転換体を得た。得られた形質転換体を培養し、経時的に蛍光顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

(1) シリカ蓄積に関与する孢子殻タンパク

質の探索

シリカが蓄積される胞子殻は 50 種類以上の多数のタンパク質で構成されていることから(文献 1), ケイ酸の重合ならびにシリカの蓄積には胞子殻タンパク質が関与している可能性が高いと予想された。そこで, 胞子殻タンパク質と珪藻の既知のシリカ重合ペプチドとの配列を比較した。珪藻はシリカの殻をもつ単細胞の藻類であり, シリカの重合に関与するペプチドとして塩基性アミノ酸が豊富な silaffin や酸性アミノ酸が豊富な silacidin が知られている。相同性解析の結果, 胞子殻タンパク質である CotB1 の C 末端領域に珪藻の silacidin に似た領域が存在することが判明した。また, その下流には塩基性アミノ酸であるアルギニン残基が豊富な領域(以下塩基性領域)が存在した。塩基性アミノ酸が多いという特徴は, 珪藻の silaffin と共通しているが, silaffin では塩基性アミノ酸としてアルギニンではなくリジン残基が多いという違いがある。

興味深いことに *cotB1* 遺伝子の 20 bp 下流には *cotB1* に相同な *cotB2* という遺伝子が並んで存在していた。*cotB2* 遺伝子の下流には典型的なプロモーター配列は認められなかったことから, *cotB1B2* 遺伝子はオペロンを形成していることが強く示唆された。CotB1 と CotB2 のアミノ酸配列は互いによく似ているが, CotB1 の方が C 末端が長く, 相同性検索によって発見された silacidin 様領域とその下流の塩基性領域は CotB1 のみに存在していた。

(2) 遺伝子破壊株の構築とケイ酸取り込み量の評価

cotB1B2 遺伝子が胞子殻へのシリカ蓄積に関与しているかを調べるために *cotB1B2* 破壊株を構築した。構築した破壊株の生育速度や胞子形成率は野生株とほぼ同等であり, 細胞分裂や胞子形成に対しては遺伝子破壊による影響はないと考えられた。また, 胞子切片の電子顕微鏡観察を行ったところ, 本遺伝子破壊株においても野生株と同様に胞子殻が形成されていることが示された。100 µg/mL のケイ酸を含む mR2A 培地で培養した際の培養液上清のケイ酸濃度を経時的に測定したところ, 野生株では培養開始から 12 時間を過ぎるとケイ酸濃度が減少する様子が観察され, 細胞内へのケイ酸の取り込みが生じていることが確認された。一方, *cotB1B2* 破壊株では野生株に比べケイ酸取り込み量が顕著に減少していた。これらの結果から, *cotB1B2* 遺伝子の少なくともいずれか一方はシリカ蓄積に関与していることが示唆された。

(3) *cotB1*, *cotB2* 遺伝子の相補性試験

破壊した *cotB1*, *cotB2* 遺伝子のうち, シリカ蓄積に関与している遺伝子を特定するために相補性試験を行った。*cotB1B2* 遺伝子

のプロモーター領域の下流に *cotB1* 遺伝子, *cotB2* 遺伝子, またその両方の遺伝子を組み込んだプラスミド(それぞれ pHT-*cotB1*, pHT-*cotB2*, pHT-*cotB1B2*)を構築し, *cotB1B2* 破壊株に導入した。その結果, pHT-*cotB1* または pHT-*cotB1B2* を *cotB1B2* 破壊株に導入した場合は, ケイ酸の取り込みは野生株と同程度まで回復した。一方, pHT-*cotB2* を *cotB1B2* 破壊株に導入しても, ケイ酸取り込みの回復は見られなかった。これらの結果から CotB1 のみがシリカの蓄積に関与していることが示された。

(4) CotB1 タンパク質の発現時期と細胞内における局在の解析

CotB1 とシリカ蓄積の関係をさらに詳しく調べるために, CotB1 の発現時期と細胞内における局在の解析を以下のように行った。まず, *cotB1B2* 遺伝子の推定プロモーター領域の下流に GFP-CotB1 融合タンパク質をコードする遺伝子を組み込んだプラスミドを構築した。得られたプラスミドを *B. cereus* 野生株に導入した。得られた形質転換体について蛍光顕微鏡観察を行ったところ, 培養開始 12 時間の時点では GFP の蛍光は観察されなかったが, 24 時間以降は形成途中の胞子の周辺部に GFP の蛍光が観察された。この発現時期はケイ酸取り込みのタイミングとよく一致していた。また, アミノ酸配列から予想されたとおり, シリカが蓄積される胞子殻への CotB1 の局在が確認されていることから認められた。これらの結果から, CotB1 がシリカ形成に関与していることが強く支持された。

<引用文献>

1. A.O. Henriques, C.P. Moran Jr, Structure, assembly, and function of the spore surface layers, Annual Review of Microbiology, Vol.61, 2007, pp.555-588

2. M. Arnaud, A. Chastanet, M. Debarbouille, New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria, Applied and Environmental Microbiology, vol.70, 2004, pp.6887-6891

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. Mohamed A. A. Abdelhamid, Takeshi Ikeda, Kei Motomura, Tatsuya Tanaka, Takenori Ishida, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda, Application of volcanic ash particles for protein affinity purification with a minimized silica-binding tag, Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, in

press
DOI:10.1016/j.jbiosc.2016.04.011

2. Kei Motomura, Takeshi Ikeda, Satoshi Matsuyama, Mohamed A. A. Abdelhamid, Tatsuya Tanaka, Takenori Ishida, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda, The C-terminal zwitterionic sequence of CotB1 is essential for biosilicification of the *Bacillus cereus* spore coat, Journal of Bacteriology, 査読有, Vol.198, 2016, pp.276-282
DOI:10.1128/JB.00447-15

3. Mohamed A. A. Abdelhamid, Kei Motomura, Takeshi Ikeda, Takenori Ishida, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda, Affinity purification of recombinant proteins using a novel silica-binding peptide as a fusion tag, Applied Microbiology and Biotechnology, 査読有, Vol.98, 2014, pp.5677-5684
DOI:10.1007/s00253-014-5754-z

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 田中 達也, 本村 圭, 池田 文, 廣田 隆一, 黒田 章夫, *Bacillus* 属細菌における新規ケイ酸トランスポーターの探索, 第 67 回日本生物工学会大会(2015), 2015 年 10 月 27 日, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

2. 池田 文, Mohamed A. A. Abdelhamid, 本村 圭, 廣田 隆一, 黒田 章夫, 新規シリカ結合タグの開発と鹿児島県産シリカ含有鉱物「シラス」を担体とした低コストアフィニティー精製法への応用, 第 67 回日本生物工学会大会(2015), 2015 年 10 月 27 日, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

3. Mohamed A. A. Abdelhamid, Kei Motomura, Takeshi Ikeda, Takenori Ishida, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda, Silica-based affinity purification using silica-binding tags, Cambridge Healthtech Institute's 14th Annual PepTalk: The Protein Science Week (PepTalk 2015), Town and Country Resort & Convention Center, 19-23 January 2015, San Diego, CA, USA

4. 本村 圭, 池田 文, Mohamed A. A. Abdelhamid, 廣田 隆一, 黒田 章夫, *Bacillus cereus* のシリカ蓄積機構における胞子タンパク質 CotB1 の役割, 第 66 回日本生物工学会大会(2014), 2014 年 9 月 11 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

5. 本村 圭, 池田 文, 小西 浩司, Mohamed A. A. Abdelhamid, 廣田 隆一, 黒田 章夫, *Bacillus cereus* のシリカ蓄積機構に関する

る胞子タンパク質の同定, 第 65 回日本生物工学会大会(2013), 2013 年 9 月 19 日, 広島国際会議場(広島県広島市)

6. Mohamed A. A. Abdelhamid, Kei Motomura, Takeshi Ikeda, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda, Affinity purification of recombinant proteins using a novel silica-binding protein, 第 65 回日本生物工学会大会(2013), 2013 年 9 月 18 日, 広島国際会議場(広島県広島市)

〔産業財産権〕
出願状況(計 2 件)

名称: 精製方法, および, 当該精製方法に用いられる酸化ケイ素結合タグ
発明者: 黒田 章夫, 池田 文, 舟橋 久景
権利者: 広島大学
種類: 特許
番号: 特願 2014-215789
出願年月日: 平成 26 年 10 月 22 日
国内外の別: 国内

名称: ペプチドおよびその利用
発明者: 池田 文, 本村 圭, 黒田 章夫
権利者: 広島大学
種類: 特許
番号: 特願 2013-173945
出願年月日: 平成 25 年 8 月 23 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 文 (IKEDA, Takeshi)
広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教
研究者番号: 10505754