

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660171

研究課題名(和文)次世代発酵技術の確立に向けたファージの宿主乗っ取り機構の解明

研究課題名(英文)Studies on mechanisms of viral takeover of its cyanobacterial host for application platform of a next generation fermentation system

研究代表者

吉田 天士 (Yoshida, Takashi)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80305490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シアノファージMa-LMM01感染時のマイクロキスティスの転写動態解析をおこなった。その結果、ファージ遺伝子は既知海洋性シアノファージ同様大きく初期・中期・後期遺伝子の3つの転写時期を示した。また初期遺伝子10個に宿主乗っ取りに関与する遺伝子が含まれると示唆された。一方、宿主遺伝子の99%は感染全体で有意な発現変動を示さなかった。またファージ遺伝子プロモーターを探索した結果、初期・中期・後期遺伝子の各上流に細菌主要 70因子認識プロモーターが見出された。以上よりMa-LMM01は宿主プロモーター活性を変えず、光合成を維持しながら自身を複製すると示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined transcriptional dynamics of genes of cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and its phage during infection through RNA-seq and in silico analysis. Phage gene dynamics showed three expression classes like other lytic dsDNA phages including marine cyanophages; early (host-takeover), middle (replication) and late genes (virion morphogenesis). The early genes are concentrated in a single ~5.8 kb window on the phage genome spanning 10 open-reading frames. Almost all host genes (99%) did not show significant change in expression throughout infection. Bacterial RNA polymerase (σ_{70})-recognition sequences were also found in the upstream region of middle and late genes, but not the phage-specific motifs. Our findings suggested that Ma-LMM01 phage archived sequential three expression patterns with no change in host promoter activity unlike known T4-like phages.

研究分野：水圏微生物学

キーワード：シアノファージ ラン藻 ミクロキスティス トランスクリプトーム 光発酵

1. 研究開始当初の背景

再生可能エネルギーの利用効率の向上は、省エネルギー社会化などと合わせ、2050年までに世界の温室効果ガスの排出を半減させるというわが国の目標に向けた必須課題の一つである。そのため、植物により生成された糖をエタノールへ変換するバイオエタノール、緑藻など真核藻類によって生成される炭化水素を直接燃料に用いるバイオディーゼルといった光合成を利用したエネルギー生産に関する研究が進められてきた。最近、ラン藻の遺伝子操作性の高さから、発酵・脂質代謝に関わる外来の遺伝子を導入し、合成されたピルビン酸を起点として様々な有用産物を効率的に合成する組換えラン藻が作出されつつある。バイオエタノールを第一世代、バイオディーゼルを第二世代とし、このようなラン藻を用いた光発酵系ともいふべき技術が第三世代として注目されるようになってきている。しかしながら、ラン藻における異種遺伝子の効率的な高発現系の構築はまだ発展段階にある。

2. 研究の目的

世界に先駆け淡水性ラン藻ミクロキスティスに感染するシアノファージの分離に成功した。本研究では、本ファージをはじめ宿主ラン藻の複製・代謝系を乗っ取り、自らのコピーを大量に作り出すための巧妙な分子メカニズムを解明し、有用遺伝子資源を網羅的に開発する。そこで、(1) 本ファージ遺伝子の宿主内トランスクリプトーム解析による宿主乗っ取り遺伝子の同定、(2) ファージ遺伝子の宿主内発現による乗っ取り機構の解明、(3) (2) の手法による、ウイルスメタゲノムからの新規乗っ取り遺伝子の網羅的解析を行う。これによりファージが有する「天然に備わる光合成利用装置」の分子メカニズムを応用した、極めて効率的な有用物質生産系、すなわち脱石油型の次世代光発酵技術の確立基盤を構築する。

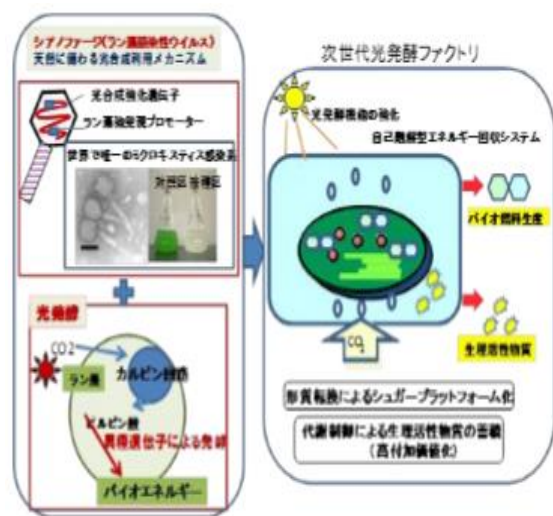


Fig. 1 本研究の全体構想

3. 研究の方法

対数増殖期のミクロキスティス NIES-298 株を暗期 36 h で同調化処理した。その後、本種感染性ファージ Ma-LMM01 を接種した。接種後、経時的に細菌画分とウイルス画分を採取して直接計数法により細胞数とファージ粒子数を測定した。また感染区および非感染区のサンプルを経時的に適宜採取し、全 RNA を抽出した。rRNA を除去した後、cDNA を合成した。また、宿主ミクロキスティス NIES-298 株から DNA を抽出した。得られた cDNA と本種ゲノム DNA を MiSeq によるシーケンス解析に供した。得られたシーケンスリードのうち、宿主ゲノム DNA 由来のものは SPAdes でアセンブリし、GeneMarkS でアノテーションをおこなった。cDNA から得られたシーケンスリードは Bowtie2 で宿主・ウイルスゲノム両方に対してマッピングした。得られた発現データは遺伝子長に基づき補正したのち、DESeq で統計処理をおこなった。また Ma-LMM01 の各遺伝子上流 300 bp を対象として BPROM による主要 σ^{70} 認識プロモーター配列の探索をおこなった。

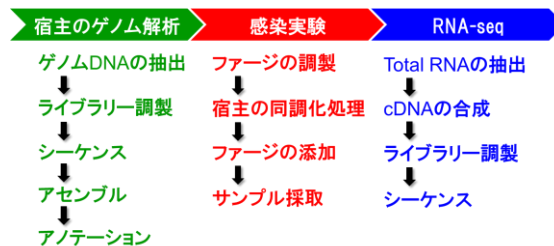


Fig. 2 RNA-seq 実験手法の概要

4. 研究成果

(1) トランスクリプトーム解析による宿主乗っ取り遺伝子の同定

海洋性シアノファージは光合成活性中心 II (PSII) の主要タンパク質の遺伝子をはじめ、宿主から獲得したと推定される遺伝子を数多く有する。これにより感染時に宿主の光合成を維持し、カーボンフラックスをカルビン回路からペントースリン酸経路に切り替えることが知られている (Fig. 3)。

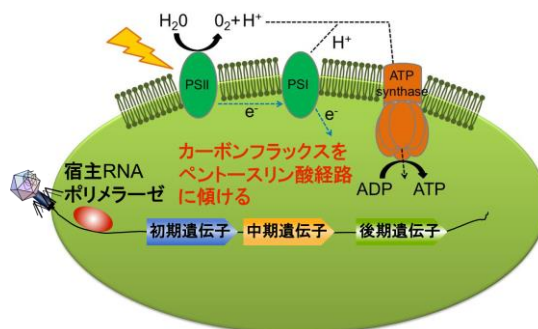


Fig. 3 シアノファージの感染戦略

そこで先行研究では Ma-LMM01 感染時の PSII、炭素代謝に関与する宿主遺伝子、そしてファージ遺伝子に着目し、転写動態を RT-qPCR で

調べた。また、ミクロキスティスはゲノム上にファージ耐性遺伝子を多く保有していることから、ストレス応答系の転写動態も同様に調べた。その結果、ファージ遺伝子が転写され感染が成立している条件下でも、宿主遺伝子の構成的転写は維持された。一方、ストレス応答遺伝子の転写は非感染時と比較して増加した (Fig. 4)。

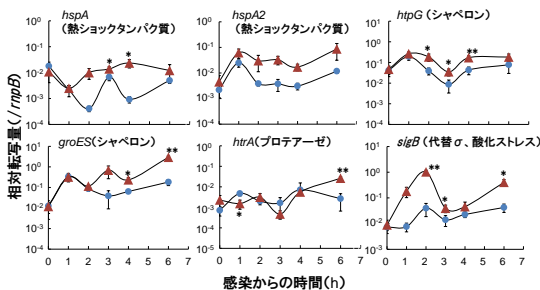


Fig. 4 ファージ被感染時のミクロキスティスの光合成保護に関わるストレス応答遺伝子 (*hspA*, *hspA2*, *htpG*, *groES*, *htrA*) と代替 σ 因子 *sigB* の転写動態。
●: 非感染区、▲: 感染区

これらのストレス応答系遺伝子は PSII の保護に関与し、特有のプロモーターを認識する転写因子 (代替 σ 因子) によって誘導される。ラン藻のモデル生物であるシネコキスティスでは *hspA* と酸化ストレス応答に関与する代替 σ 因子 *sigB* の転写がファージ感染後顕著に誘導される。従って、ミクロキスティスも同様にファージ感染時に *sigB* によって誘導される PSII 保護系を有することが示唆された。

本研究ではまず、この先行研究と同じサンプルのうち感染後 0 時間と 6 時間から得た cDNA を RNA-seq に供した。その結果、感染 6 時間ではファージの粒子形成に関与する遺伝子が発現しており、すでに感染後期に突入していることが明らかになった。一方、宿主全遺伝子のうち 95% は有意な発現変動を示さなかった。次に宿主乗取りに関与するファージ遺伝子を同定し、感染過程全体に渡って宿主全遺伝子の転写動態を明らかにする

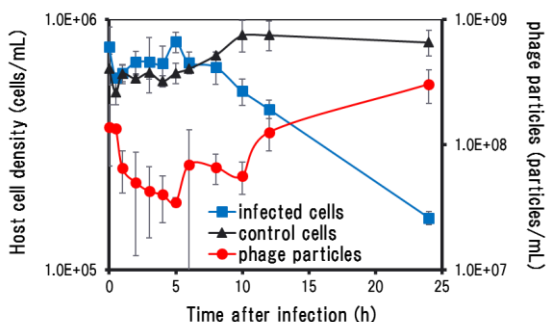
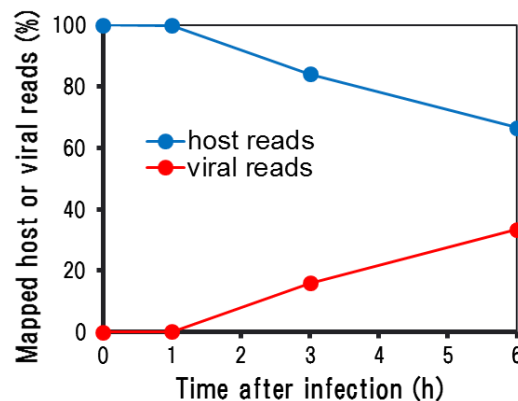


Fig. 5 Ma-LMM01 感染時の宿主細胞数およびファージ粒子数の経時的変動

ために RNA-seq をおこなった。感染実験では Ma-LMM01 接種後 8 時間で宿主細胞の溶菌が始まり、それと同調する形でウイルス粒子の増加が観測された (Fig. 5)。感染 24 時間後の宿主細胞数との比較から最終的に全宿主細胞の 79% がファージ感染を受けたことが明らかになった。

溶菌開始前の感染 0, 1, 3, 6 時間後の感染区および非感染区のサンプルから得られたシーケンスリードを宿主・ファージゲノム



に対してそれぞれマッピングした。ファージ由来リードは感染 1 時間後に全リードの

Fig. 6 Ma-LMM01 感染時の宿主およびファージ由来リードの経時的変動

0.13% に増加し、その後感染後 3 時間で 16%、6 時間で 33% まで増加した (Fig. 6)。

一方で、海洋性シアノファージでは感染直後に宿主遺伝子転写の大規模な下方制御が起こることが知られているが、Ma-LMM01 感染時には感染全体を通じて 60% 以上の宿主由来リードが維持された。このことから Ma-LMM01 は既知の海洋性シアノファージとは異なる感染戦略を有する可能性が示唆された。

また Ma-LMM01 が有する 184 個の遺伝子のうち、CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) 配列と予測された 2 個を除いた 182 個の遺伝子に関して、発現時期に基づく階層クラスタリ

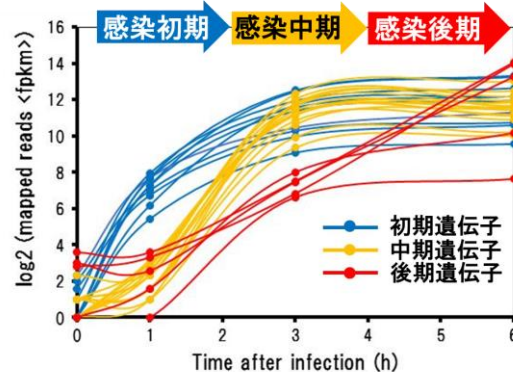


Fig. 7 Ma-LMM01 遺伝子の発現時期に基づく転写プロファイル

ングをおこなった。その結果、各遺伝子は大きく3つのクラスターに分類された (Fig. 7)。

本解析結果はファージが感染過程を進行させて自己複製をおこなう上で、大きく3つの転写プロファイルが切り替わることを示している。特に感染初期 (1 h) で発現量が急増する遺伝子群 (初期遺伝子) は Ma-LMM01 のゲノム上に集中して存在し、遺伝子クラスターを形成することが示唆された (Fig. 8)。

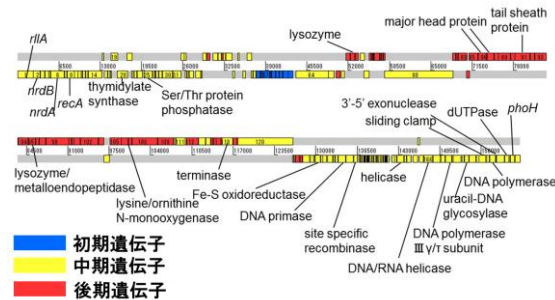


Fig. 8 Ma-LMM01 初期・中期・後期遺伝子のゲノム上の位置

同様の傾向はシネココッカス感染性ファージ Syn9 をはじめとし、環境ゲノムから見出されている。これに加え、感染初期には一般的に宿主乗取りが起こることを踏まえると、10 個の初期遺伝子 (gp054~gp063) のいずれかに本研究の目的とする遺伝子が存在すると考えられる。また初期遺伝子の次に転写量が増加する遺伝子群 (中期遺伝子) にはファージ DNA の複製に関与する遺伝子が含まれた。さらにその後転写量が増加する遺伝子群 (後期遺伝子) にはファージ粒子を形成する遺伝子が含まれた。

上記の結果からファージ感染は問題なく進行したと判断できたので、宿主全遺伝子の転写動態解析をおこなった。感染1時間での宿主遺伝子に着目すると、有意に転写量が増加した遺伝子が7個、減少した遺伝子が1個存在したが、99%の遺伝子はファージ感染による影響を示さなかった (Fig. 9)。

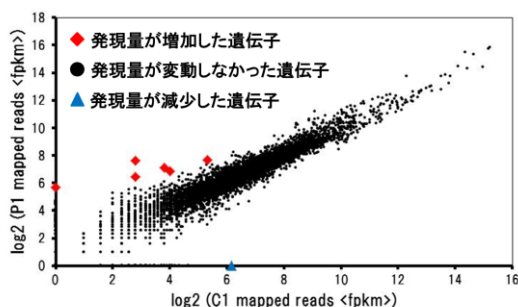


Fig. 9 感染1hにおける宿主遺伝子の転写動態変化

同様に感染3時間で35個、感染6時間で32個の宿主遺伝子が有意な発現変動を示した。これらの宿主遺伝子はいずれもゲノム上に

散在したもので、機能的な関連性が示唆される遺伝子や遺伝子クラスターの形成が示唆される遺伝子は含まれていなかった。

ファージは自身の代謝系を有していないため、一般的に宿主の RNA ポリメラーゼを利用して自身の遺伝子を発現させ、遺伝子産物で修飾することで感染時期に応じた遺伝子を発現させる。このことから初期・中期・後期各遺伝子群それぞれの上流、すなわち転写調節領域にファージ遺伝子特有のコンセンサス配列が存在するかを調べた。まず中期・後期遺伝子の各上流を MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) を用いて調べたが、コンセンサス配列は見出されなかった。次に初期遺伝子の発現には未修飾の宿主 RNA ポリメラーゼが関与すると考えられることから、主要 σ^{70} 因子の認識プロモーター配列を探索した。その結果、初期遺伝子に加えて中期・後期遺伝子の上流にも主要 σ^{70} 因子認識プロモーター配列が見出された。T4 ファージでは宿主 RNA ポリメラーゼの中期プロモーターや後期プロモーターの認識にそれぞれ AsiA/MotA、と gp55 が必要であることが知られている (Fig. 10)。

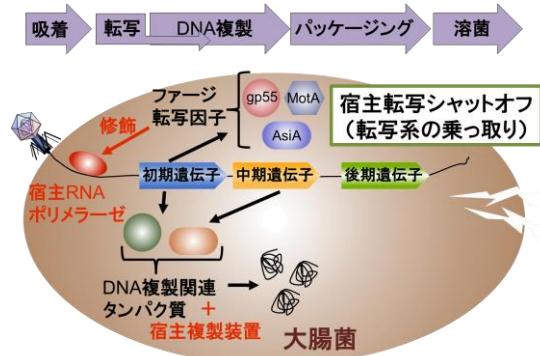


Fig. 10 T4 ファージの遺伝子産物による宿主 RNA ポリメラーゼの修飾

Ma-LMM01 のゲノム上にはこれらのホモログが存在しないという事実は、本ファージが感染時に宿主代謝系を転写レベルで変化させない、また主要 σ^{70} 因子認識プロモーター配列が初期・中期・後期遺伝子群のいずれにも見いだされるというような本研究結果とも符号する。また、本ファージのゲノム上には海洋性シアノファージの感染戦略 (Fig. 3) を行使する際に必要な遺伝子 (補助代謝遺伝子) を欠いている。補助代謝遺伝子は感染時に宿主代謝系を大きく下方制御した際、感染に支障をきたさず効率的に複製をおこなうために要求されるものである。そのため、光合成を含め宿主代謝系に影響を与えない感染動態を示す Ma-LMM01 ゲノム上にそれらが見出されないのは合理的であると考えられる。

本研究成果により、ファージが有する「天然に備わる光合成利用装置」の分子メカニズムを光発酵技術へ応用していく上で重要な

宿主乗っ取りに関与する遺伝子候補を 10 個に絞ることができた。また、Ma-LMM01 感染時の宿主・ファージ遺伝子の転写動態およびプロモーター配列は、本ファージが宿主のプロモーター活性を変えずに自身の複製を達成することを示唆している。今後光発酵技術による物質生産へ応用していく上で、このような性質は既存ファージのように宿主に致死作用をもたらさないため有用であると考えられる。

(2) ファージ遺伝子の宿主内発現系の確立

(1) で宿主乗っ取りに関与するファージ遺伝子を 10 個に絞ることができたので、次にファージ遺伝子の宿主内発現系の確立を目指した。ミクロキスティス K-81 株のゲノム上の MAE_09560 を相同組換えのための標的領域とした。次にクロラムフェニコール耐性遺伝子と目的遺伝子を挿入したベクター (Fig. 11) をミクロキスティス NIES-91, 98, 101 株に対しエレクトロポレーションで導入した。

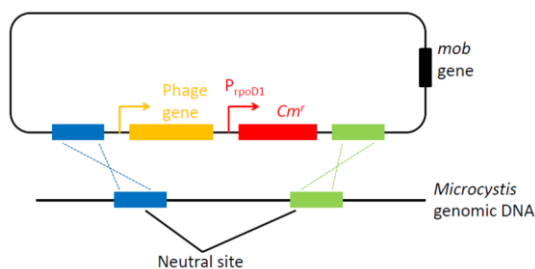


Fig. 11 ファージ遺伝子導入ベクターのモデル図

その結果、NIES-101 株では生育が見られず、NIES-91 および 98 株では生育が確認できたものの細胞密度が大きくコロニーピックが困難であった。

そこで先行研究で構築済みのベクター pDXS7 を基盤とし (Nishizawa et al. 2011)、大腸菌 S-17 株を介したコンジュゲーションによる二重交差相同組換えを想定したプラスミドを立案した。ミクロキスティス内にマルチコピーで存在する *psbA* 遺伝子を相同組換えの標的配列候補とし、形質転換体の判別はこれまで同様クロラムフェニコール耐性の有無ですることとした。また、宿主乗っ取りに関与する遺伝子はその機能からミクロキスティスに対して生育阻害 (あるいは致死) 作用を及ぼすと想定された。今後は従来の IPTG のようなインデューサーによる発現制御ではなく、転写産物の立体構造変化により翻訳レベルでの制御をおこなうリボスイッチでより厳格な制御を試みることを予定している。

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)

Honda T, Takahashi H, Sako Y and Yoshida T. Gene expression of *Microcystis aeruginosa* during infection of cyanomyovirus Ma-LMM01. (2014) *Fish Sci.* 80: 83-91

[学会発表] (計 4 件)

- ① 本田貴史、左子芳彦、吉田天士「ファージ Ma-LMM01 感染過程における *Microcystis aeruginosa* の遺伝子転写解析」環境微生物系学会合同大会 2014、P16-10、アクトシティ浜松、2014 年 10 月 22 日 (ポスター発表)
- ② 森本大地、本田貴史、左子芳彦、吉田天士「Transcriptome analysis of *Microcystis aeruginosa* during Ma-LMM01 infection」日本微生物生態学会第 30 回大会、PI-128、土浦亀城プラザ、2015 年 10 月 19 日 (ポスター発表)
- ③ 森本大地、本田貴史、左子芳彦、吉田天士「アオコ原因ラン藻 *Microcystis aeruginosa* におけるファージ感染による転写動態変化の網羅的解析」平成 28 年度日本水産学会春季大会、724、東京海洋大学 (品川キャンパス)、2016 年 3 月 28 日 (口頭発表)
- ④ 森本大地、本田貴史、中田舞、左子芳彦、吉田天士「アオコ原因ラン藻 *Microcystis aeruginosa* におけるファージ感染時の網羅的転写動態解析」平成 29 年度日本水産学会春季大会、722、東京海洋大学 (品川キャンパス)、2017 年 3 月 27 日 (口頭発表)

[その他]

ホームページ等

<http://www.microbiology.marine.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 天士 (YOSHIDA, Takashi)
京都大学・農学研究科・准教授
研究者番号：80305490

(2) 研究分担者

- ① 左子 芳彦 (SAKO, Yoshihiko)
京都大学・農学研究科・教授
研究者番号：60153970
- ② 澤山 茂樹 (SAWAYAMA, Shigeki)
京都大学・農学研究科・教授
研究者番号：80357178