

令和元年5月23日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04900

研究課題名(和文) シデロフォアを利用したケイ素取り込み系の実証

研究課題名(英文) Analysis of the possibility of siderophore-mediated silicon uptake

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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：一部の*Bacillus*属細菌はケイ酸を細胞内に取り込み、その重合体であるシリカを孢子殻上に蓄積するが、本菌がケイ酸を取り込む機構は不明であった。一方、微生物が細胞内に鉄を取り込むために分泌するシデロフォアが、鉄の他にケイ素とも錯体を形成することが近年報告された。我々は、*Bacillus*属細菌がケイ酸の取り込みにシデロフォアを利用しているのではないかと予想し、その検証を行った。シデロフォアの合成に必要な遺伝子を破壊したところ、ケイ酸取り込み量が顕著に減少した株が得られた。一方で、培養途中での培地交換実験の結果から、シデロフォアによる輸送がケイ酸取り込みの主要な経路ではないと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シデロフォアを介したケイ酸の取り込みが証明できれば新奇な発見であったが、予想に反してケイ酸の取り込みそのものにはシデロフォアが関与していないことが示された。一方、シデロフォアを合成できない遺伝子破壊株ではケイ酸取り込み量が顕著に減少したことから、取り込まれたケイ酸が重合してシリカが形成されるプロセスのどこかでシデロフォアが何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。シデロフォアの未知の機能の発見につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：*Bacillus cereus* and its close relatives take up soluble silicate from the environment and accumulate it as insoluble silica in and around the spore coat layer. However, the mechanism underlying silicate uptake has not been clarified. Recently, it has been reported that siderophores, natural iron-chelating compounds secreted by microorganisms, can form a complex with silicon. We hypothesized that siderophores might be involved in silicate uptake in *B. cereus*. The disruption of one of the two siderophore biosynthesis operons resulted in significant decrease in silicate uptake. However, medium exchange during cultivation did not affect silicate uptake, suggesting that siderophore-mediated transport is not a major route of silicate uptake.

研究分野：生物学

キーワード：細菌 孢子 ケイ素

1. 研究開始当初の背景

シデロフォア(siderophore)は、微生物が細胞内に鉄を取り込むために分泌する天然の鉄キレート剤である。鉄は地殻中に豊富に存在する元素であるが、その多くは不溶性の酸化物として存在するため、生物は必要量の鉄を確保できないことが多く鉄欠乏状態に陥りやすい。微生物は鉄欠乏にตอบสนองして、低分子有機化合物であるシデロフォアを産生し、三価の鉄を可溶化して細胞内に取り込むことが知られている。ところが最近の研究で、シデロフォアが鉄だけでなくケイ素(Si)とも錯体を形成しうることが報告された(文献 1)。カテコール型の配位子を有するシデロフォアであるエンテロバクチン(別名エンテロケリン)をケイ酸( $\text{Si}[\text{OH}]_4$ )と反応させた場合、通常  $\text{Fe}^{3+}$  に配位する 3 つのカテコール部位が Si に対して安定に配位していることが NMR による構造解析によって確認された。当初の報告は、in vitro で Si との錯体を人工的に形成させたものであったが、後に *Streptomyces* 属細菌の培養液より Si-シデロフォア複合体が単離され、天然にも存在していることが確かめられた(文献 2)。しかし、Si-シデロフォア複合体の生理学的な意義は不明であった。

一方、我々は一部の土壌細菌が環境中のケイ酸を取り込み、細胞内で重合してシリカ( $\text{SiO}_2$ )として蓄積することを発見した(文献 3)。16S rRNA 配列による系統解析の結果、得られたシリカ蓄積細菌は全て孢子(芽胞)形成能を有する *Bacillus* 属に属し、特に *B. cereus* に近縁なものが多く見られた。培地中のケイ酸は孢子形成期に取り込まれ、シリカとして孢子表面上に蓄積されていることが判明した。また、シリカを蓄積した孢子は酸に対する耐性が高まっており、表面に形成されたシリカ層が酸に対する防壁として機能していることが示唆された。酸耐性を高めることで、捕食された際の生存率を高めていると予想された。これは、生存のためにシリカを積極的に利用した新奇の生存戦略だと考えられる。これまで一部の真核生物(珪藻・海綿・イネなど)がシリカを蓄積して、細胞骨格や殻などとして利用していることは広く知られていたが、原核生物では初めての発見であった。シリカ蓄積機構の解析の結果、孢子表面でのシリカの重合には孢子殻タンパク質である CotB1 が関与していることを明らかにしたが(文献 4)、本菌が細胞内にケイ酸を取り込むメカニズムは不明であった。

*Bacillus* 属細菌においてケイ酸の細胞内への取り込みは孢子形成期のみ起こることから、孢子形成中の母細胞が何らかの方法で可溶性のケイ酸を取り込んでいると予想された。また、ケイ酸はおよそ 2 mM を超えると自発的に脱水縮合してシリカとなることが知られているが、取り込まれたケイ酸量から母細胞中のケイ酸濃度を計算すると、数百 mM という非常に高い値となることが分かった。しかし、細胞内においてシリカ重合は孢子表面でのみ起こっており、細胞質中での非特異的なシリカ重合は生じていない。これらのことから、細胞内では自発的な重合が起こらないようになんらかの制御を受けている可能性や、あるいは、単純にケイ酸のまま取り込まれているのではなく、何らかの修飾を受けている可能性が強く示唆された。

これらの知見を合わせて考えると、シリカ蓄積細菌がケイ酸の取り込みやケイ酸の自発的な重合の抑制にシデロフォアを利用しているのではないかと、という仮説が浮かび上がった。つまり、これまで鉄キレート剤としての役割しか知られていなかったシデロフォアが、図 1 のような形で『ケイ酸の取り込み』ならびに『細胞内でのケイ酸の可溶性の維持』にも関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、シリカを蓄積する *Bacillus* 属細菌が、ケイ酸の取り込みや細胞内でのケイ酸の可溶性の維持にシデロフォアを利用しているのではないかと予想し、本仮説を実験的に検証することを目的とした。また、本研究を通して、本菌がケイ酸を細胞内に取り込むメカニズムを解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子破壊株の構築とケイ酸取り込み量の評価

本研究ではモデル生物として、ゲノム配列が決定済みで、遺伝子組換え系も確立されている *B. cereus* ATCC 14579 株を用いた。遺伝子破壊株の構築は文献 5 に基づいて以下に行った。まず、標的となる遺伝子の上流領域・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( $\text{Sp}^R$ )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、目的遺伝子の上流配列- $\text{Sp}^R$  遺伝子-目的遺伝子の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

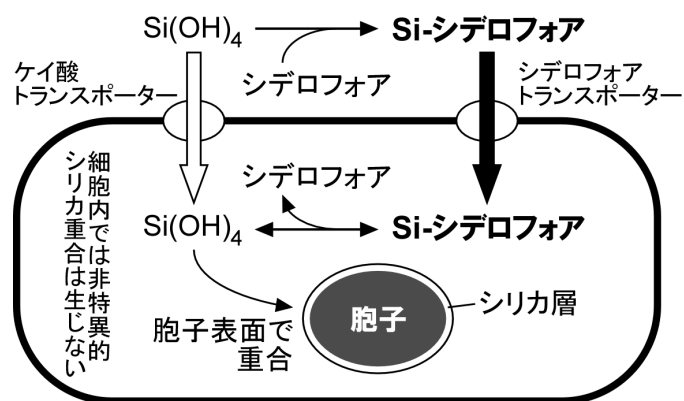


図 1 シデロフォアを利用したケイ酸取り込みの予測モデル

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 5 に従ったが、目的とする遺伝子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  $^{\circ}\text{C}$  で振盪培養を行った。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。

## (2) 培養途中での培地交換実験

100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のケイ酸を含む mR2A 培地に *B. cereus* 野生株を植菌し、28  $^{\circ}\text{C}$  で振盪培養を行った。培養開始後 16 時間の時点で、遠心分離により一旦菌体を回収した。得られた菌体ペレットを新たな同培地に懸濁し、同条件で培養を継続した。この間、経時的に培養液のサンプリングを行い、前項と同様の方法でケイ酸取り込み量を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) シデロフォア合成系の遺伝子破壊株の作製と解析

本研究で用いた *B. cereus* ATCC 14579 株は 2 種類のカテコール型シデロフォア(ペトロバクチンとバシリバクチン)を分泌することが知られている。これらのシデロフォアはそれぞれ *asb* オペロンと *dhb* オペロンによって合成される。これらのシデロフォアがケイ酸の取り込みや細胞内でのケイ酸の可溶性の維持に関与しているかを調べるために、それぞれの合成系オペロンの遺伝子を薬剤耐性遺伝子と置換することで遺伝子破壊株を作製した。作製した遺伝子破壊株を、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のケイ酸を含む mR2A 培地に植菌し、培養液上清のケイ酸濃度を経時的に測定することでケイ酸取り込み

量を評価した。その結果、ペトロバクチンの合成系である *asb* オペロンを破壊するとケイ酸取り込み量が顕著に減少することが判明した(図 2)。一方、バシリバクチンの合成系である *dhb* オペロンを破壊した株では野生株と同程度のケイ酸取り込みが観察された。これらの結果から、本菌が有する 2 種類のシデロフォアのうち、ペトロバクチンがケイ酸の取り込み、あるいは細胞内でのケイ酸の可溶性の維持に寄与していることが強く示唆された。

### (2) シデロフォア輸送系の遺伝子破壊株の作製と解析

鉄の取り込みの場合、分泌されたシデロフォアは細胞外で鉄をキレートした後、トランスポーターによって再び細胞内に取り込まれることで鉄を細胞内に輸送する。シデロフォアがケイ酸の取り込みに関与しているのであれば、シデロフォアトランスポーターの遺伝子を破壊するとケイ酸取り込み量が減少すると予想し、シデロフォアトランスポーター遺伝子の破壊を試みた。なお、本菌のシデロフォア合成系オペロンとシデロフォアトランスポーター遺伝子クラスターは染色体上の別の位置に存在する。ペトロバクチンを輸送するトランスポーターは、*fpuA/fhuB* 遺伝子クラスターや *fatBCD/fhuC* 遺伝子クラスターによってコードされていると報告されているため、それぞれの遺伝子クラスターを薬剤耐性遺伝子と置換することで遺伝子破壊株を作製した。作製した遺伝子破壊株によるケイ酸取り込み量を前項と同様の方法で評価した。その結果、いずれの遺伝子クラスターを破壊しても野生株と同程度のケイ酸が取り込まれることが判明した。この結果から、ペトロバクチンによる輸送がケイ酸の取り込みの主要な経路ではないと考えられた。

### (3) 培養途中での培地交換実験

シデロフォアがケイ酸の取り込みに関与しているのかをさらに検証するために以下の実験を行った。細胞外に分泌されたシデロフォアがケイ酸の取り込みに関与しているのであれば、培養途中で培地を新しいものに交換した場合、培地中に分泌されたシデロフォアが失われることになるため、ケイ酸取り込み量が減少すると予想される。100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のケイ酸を含む mR2A 培地に野生株を植菌し、培地中のケイ酸濃度の減少が始まる培養開始後 16 時間の時点で、培養液中の菌体を一旦回収した。その後、速やかに菌体を新しい培地に懸濁して培養を継続した。ケイ酸取り込み量を経時的に評価したところ、培地を交換した場合でも、培地交換をせずに培養し続けた野生株と同程度のケイ酸の取り込みが見られた。このことから、シデロフォアがケイ酸の取り込みに関与している可能性は低いと考えられた。

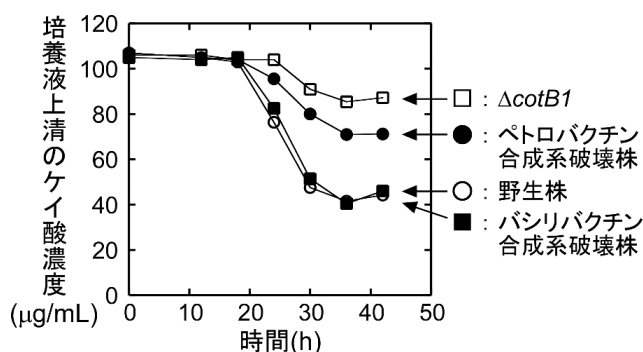


図 2 *B. cereus* のシデロフォア遺伝子破壊株によるケイ酸取り込み

ペトロバクチン合成系の破壊株はケイ酸取り込み量が顕著に減少している。ケイ酸取り込み量が最も少ない *cotB1* はシリカ重合に関わるタンパク質の破壊株(文献 4 参照)。

#### (4) ケイ酸トランスポーターの探索

シデロフォアがケイ酸の取り込みに関与していないのであれば、別のメカニズムにてケイ酸が取り込まれると考えられた。イネなどの高等植物や珪藻では、ケイ酸トランスポーターの存在が報告されており(文献 6-8)、本菌にもケイ酸を直接輸送するトランスポーターが存在する可能性が考えられた。そこで、既知のケイ酸トランスポーターとの相同性を指標に、本菌のケイ酸取り込みに関わるトランスポーターの探索を試みた。比較的相同性の高い候補遺伝子を複数選定し、それぞれについて遺伝子破壊株を作製したものの、ケイ酸取り込み量が顕著に減少した株は認められず、ケイ酸トランスポーターの同定には至らなかった。

#### <引用文献>

- T. Schmiederer, S. Rausch, M. Valdebenito, Y. Mantri, E. Möscher, T. Baramov, K. Stelmaszyk, P. Schmieder, D. Butz, S.I. Müller, K. Schneider, M.-H. Baik, K. Hantke, R.D. Süssmuth. 2011 The *E. coli* siderophores enterobactin and salmochelin form six-coordinate silicon complexes at physiological pH, *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol.50, 4230-4233
- T.J.N. Kenla, M.D.K. Tatong, F.M. Talontsi, B. Dittrich, H. Frauendorf, H. Laatsch, Si-enterobactin from the endophytic *Streptomyces* sp. KT-S1-B5 – a potential silicon transporter in Nature?, *Chem. Commun.*, vol.49, 2013, 7641-7643
- R. Hirota, Y. Hata, T. Ikeda, T. Ishida, A. Kuroda, The silicon layer supports acid resistance of *Bacillus cereus* spores, *J. Bacteriol.*, vol.192, 2010, 111-116
- K. Motomura, T. Ikeda, S. Matsuyama, M.A.A. Abdelhamid, T. Tanaka, T. Ishida, R. Hirota, A. Kuroda, The C-terminal zwitterionic sequence of CotB1 is essential for biosilicification of the *Bacillus cereus* spore coat, *J. Bacteriol.*, vol. 198, 2016, 276-282
- M. Arnaud, A. Chastanet, M. Débarbouille, New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol.70, 2004, 6887-6891
- J.F. Ma, K. Tamai, N. Yamaji, N. Mitani, S. Konishi, M. Katsuhara, M. Ishiguro, Y. Murata, M. Yano, A silicon transporter in rice, *Nature*, vol.440, 2006, 688-691
- J.F. Ma, N. Yamaji, N. Mitani, K. Tamai, S. Konishi, T. Fujiwara, M. Katsuhara, M. Yano, An efflux transporter of silicon in rice, *Nature*, vol.448, 2007, 209-212
- M. Hildebrand, B.E. Volcani, W. Gassmann, J.I. Schroeder, A gene family of silicon transporters. *Nature*, vol.385, 1997, 688-689

#### 5 . 主な発表論文等

##### [学会発表](計 4 件)

- 池田 丈, 廣田 隆一, 黒田 章夫, ケイ素を孢子表面に蓄積する *Bacillus* 属細菌の解析と界面バイオテクノロジーへの応用, 第 70 回日本生物工学会大会, 2018
- T. Ikeda, M. Nakagawa, K. Motomura, R. Hirota, A. Kuroda, Silica biomineralization in the gram-positive, spore-forming bacterium *Bacillus cereus*, BiominXIV/14th International Symposium on Biomineralization, 2017
- 池田 丈, 廣田 隆一, 黒田 章夫, ケイ素(Si)で孢子をコーティングする *Bacillus* 属細菌, 環境微生物系学会合同大会 2017, 2017
- 池田 丈, 本村 圭, 田中 達也, 廣田 隆一, 黒田 章夫, *Bacillus* 属細菌のシリカ蓄積メカニズムの解析, 環境バイオテクノロジー学会 2016 年度大会, 2016

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。