

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580087

研究課題名（和文） ファージDNAが介在する細胞分化に伴う遺伝子再構築

研究課題名（英文） Developmentally regulated gene reconstitution mediated by a phage DNA

研究代表者

佐藤 勉 (SATO TSUTOMU)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：70215812

研究成果の概要（和文）：*Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 の細胞分化特異的遺伝子のひとつであるジピコリン酸合成酵素をコードする *spoVFB* は、プロファージ DNA 様因子により分断されている。この *spoVFB* は、孢子形成期に部位特異的組換えにより 5' -*spoVFB* と 3' -*spoVFB* と名付けられた分断された遺伝子が融合されたものであることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The developmentally regulated gene *spoVFB* which encodes a dipicolinic acid synthetase was interrupted by a phage-like DNA in *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4. We showed that the *spoVFB* gene is a composite of two truncated genes named 5' -*spoVFB* and 3' -*spoVFB*, which are brought together by site-specific recombination during sporulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

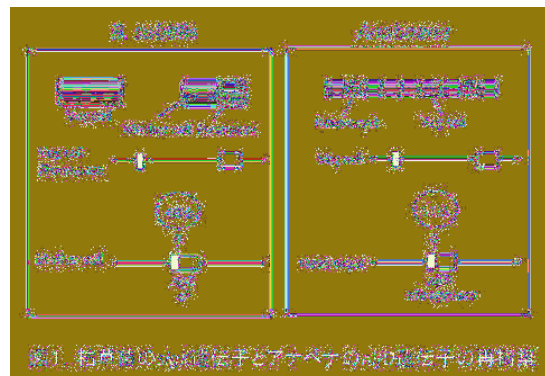
研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：細菌・ファージ・DNA再編成・細胞分化・枯草菌・遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

(1) 枯草菌の孢子形成は、栄養細胞が将来孢子となるフォアスポアとそれを外側から構築する母細胞に分化し、それぞれの細胞で異なるシグマ因子が機能発現することにより進行する。我々は、母細胞で働くσ因子をコードする *sigK* 遺伝子が、部位特異的組換え酵素 SpoIVCA により再編成されることを明らかにした (Sato *J Bacteriol* 1990)。この *spoIVCA* は、母細胞でσ<sup>F</sup> が働く前に機能するσ<sup>F</sup> により認識されることが示され (Sato *J Bacteriol* 1994)、母細胞においてのみ *sigK*



構築がおこる機構が明らかになった (図 1 左)。母細胞は孢子が成熟すると細胞死をおこすため、再編された DNA が子孫に受け継がれることはない。また、栄養細胞の *sigK* 遺伝子には、*skin* (*sigK* intervening) element と呼ばれる 48kb の DNA が介在し、我々が塩基配列を決定した結果、この領域にはファージ関連遺伝子が多く含まれることが明らかになり、*skin* element はファージが起源であることが示唆された (Takemaru *Microbiology* 1996)。ただし、*skin* element はファージ粒子とはならず、欠損ファージ因子と定義された。その後、*skin* element 内にはヒ素耐性遺伝子が存在し、宿主細胞へヒ素耐性を付与していることが判った (Sato *J Bacteriol* 1998)。一方、*spoIVCA* のサプレッサー取得の試みの過程で、*skin* element が無く、予め *sigK* が構築された (*skin*-less) 株が得られた (Sato *J Bacteriol* 1996)。*skin*-less 株の孢子形成は正常でありこの株は、進化の過程で、*sigK* にファージ DNA (*skin*) が挿入される前段階の形態であることが予想された。

(2) *skin* element 内の  $\lambda$  ファージのイムニティーレプレッサー (CI) に相当する *sknR* 遺伝子がないと枯草菌は致死性を示すことを見出した。*sknR* により制御される遺伝子を解析するため、48kb の *skin* element ゲノムを広域に渡り欠失させ、致死性を示す遺伝子を探索した。その結果、複製開始タンパク質 DnaA と相互作用する YqaH、ヘリカーゼローダーと相溶性のある YqaM が SknR による抑制解除により宿主複製を阻害していることが示された。この結果、*skin* element は、イムニティーレプレッサー (SknR) により調節されるプロファージとしての機能の一部を有していることが示された。しかし、SknR は、一般にファージの誘導に用いられるマイトマイシン C や他のストレスに全く応答しないことが明らかとなった。

(3) 今日多くの微生物ゲノム情報が蓄積されているが、これらのゲノムに広く目を向けると多くのファージ・エレメントの細胞分化の過程で極めて重要とされる遺伝子への挿入がみられる。例えば、藻類の一種であるアナベナの場合は、窒素固定を専門に行なうヘテロシストへの分化に伴いニトロゲナーゼをコードする *nifD* 遺伝子の再構築が起こる (図 1 右)。この場合も、過去ファージが *nifD* 遺伝子に挿入されて、遺伝子再構築のシステムを確立させたと予想されている。また、先に述べた、内生孢子をつくる細菌である *Bacillus* 属や *Clostridium* 属などのゲノム内の *sigK* 相当遺伝子の中には、*skin* element 様因子を持つもの、持たず予め *sigK* が構築されたもの、また、*skin* 様因子も *skin* の 1/3 程の大きさしかないもの、挿入位置が異なるものが存在し多様であった。また、ファージの複

製・構造に関わる遺伝子は欠落されていると示唆されたが、イムニティーレプレッサーをコードする遺伝子は有している。これらの塩基配列の決定された微生物のゲノム情報から、我々は①ファージ DNA が過去に上記のシグマ因子やニトロゲナーゼをコードする遺伝子などの細胞分化にとって重要な遺伝子に入り込み、DNA 再編成により遺伝子構築のシステムを築いたこと、また②挿入されたファージゲノムは、誘導されると宿主生育を阻害する遺伝子が変異・欠落し、またイムニティーレプレッサーはストレスにより脱抑制できなくなる様に変異したのではないかと推測した。

## 2. 研究の目的

本研究では、DNA 再編成の主要因となっているファージゲノムを起源とした *skin* element を解析し、*sigK* 遺伝子再構築獲得機構を探る。また、この研究成果を基盤とし、他の細菌の細胞分化に伴う DNA 再編成を検出し、細胞分化におけるファージ DNA が介在する DNA 再編成を広く普遍的な現象として位置づける。

## 3. 研究の方法

(1) *skin* element 内の *yqaFV* オペロン内の YqaH と YqaM が宿主複製に作用し、細胞致死に働くことが示唆されている。本研究ではサザンハイブリダイゼーションにより、YqaH と YqaM の IPTG により誘導される過剰発現株の *ori/ter* 比を求め、複製開始への関与を調べる。

(2) 現在、多くの微生物ゲノム情報が利用可能となっており、有孢子細菌および他細菌の DNA 再編成による遺伝子再構築の可能性を検討するため、下記の手順で解析を行う。①ゲノム配列が公開されている細菌ゲノムの情報を基に、ファージ様因子を検索し、構造遺伝子への挿入の有無を調べる。細菌の特徴、挿入遺伝子の機能から、当該細菌の細胞分化時の再編成について、ハイブリダイゼーション及び定量 PCR 等により解析を試みる。本課題研究により明らかにした *skin* 様ファージゲノムの比較を行い、介在ゲノムの由来を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) *skin* element 内の致死因子

*skin* element の致死因子をコードする遺伝子を解析し、*sknR* の発現抑制は細胞の生育阻害を引き起こすが、*yqaH* と *yqaM* が阻害効果を持ち、強制発現により宿主の DNA 複製が阻害されることが、強制発現株の顕微鏡観察により明らかになった。さらに、複製のどの段階に働くかを明らかにする目的で、これらの強制発現株の染色体上の *ori/ter* 比を調べた。

その結果、*yqaM*過剰発現株 (IPTG+) は、栄養増殖期の *ori/ter*比が 1.0 となり、複製が完結している spore DNA と比が同じであったため、*yqaM*は複製開始を阻害することが示された。*YqaH*については阻害効果が検出されなかった (図 2)。これらの結果の詳細については、Kimura ら *J. Bacteriol.* 2010 の論文に掲載されているのでこの論文を参照されたい。



以後、この報告においては、大きな進展のあった以下の *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 株 (以後、*B. wei*と記す) の DNA 再編成についての研究報告を中心に行う。

(2) ファージ DNA により分断された遺伝子

① ファージ DNA により分断された遺伝子の構造

ファージ DNA が *sigK* 以外の孢子形成遺伝子に挿入され、ファージ DNA により分断された孢子形成遺伝子を有している細菌株がないかゲノムデータベースを用いて調べた。その結果、*B. wei* と *B. cereus* G9842 において、*spoVFB* 遺伝子内にファージ DNA 様エレメントの挿入が認められた。*spoVFB* は枯草菌において、孢子耐熱性に関与するジペコリン酸合成酵素の  $\beta$  サブユニットをコードする遺伝子である。分断された *spoVFB* 遺伝子の 5' 側を 5' -*spoVFB*、3' 側を 3' -*spoVFB* とし、これらの遺伝子の構造を調べた。*B. wei* と *B. cereus* G9842 の 5' -*SpoVFB* と 3' -*SpoVFB* の構造は非常に似ている。いずれの細菌も DNA 配列から推定される 5' -*SpoVFB* と 3' -*SpoVFB* の大きさは、それぞれ 146aa と 62aa であった。*B. wei* の 5' -*SpoVFB* は 55 番目のアミノ酸が E であるのに対し、*B. cereus* G9842 の場合は A である点が異なっているが、他の配列は完全に一致していた。*B. wei* の 5' -*SpoVFB*、3' -*SpoVFB* と最も高い相同性を示すのは、*B. cereus* ATCC 14579 の大きさ 199aa の *SpoVFB* である。*B. cereus* ATCC 14579 の *SpoVFB* は 199aa であるが、*B. wei* の 5' -*SpoVFB*、3' -*SpoVFB* を足した値 (146+62=208aa) より 9aa 多い。一方 5' -*SpoVFB* の 5aa (IPTPR) は他の *Bacillus* 属細菌のアミノ酸配列と一致していない。また、

3' -*SpoVFB* の N 末端側の 4aa (GVNL) は、5' -*SpoVFB* の C 末端側から 9-6aa (GVNL) と一致していた。また、このオーバーラップした配列を繋げた *B. wei* の *spoVFB* は、*B. cereus* ATCC 14579 の *SpoVFB* の大きさ 199aa と完全に一致した。

一方、5' -*spoVFB* と 3' -*spoVFB* の間に挿入された DNA (以後、*vfb*in element と呼ぶ) の長さは 42kb であり、52 個の遺伝子を有していた。このうち大部分の遺伝子はファージ DNA 中の遺伝子と類似の DNA であった。一方、*B. cereus* G9842 株の *vfb*in は長さおよび遺伝子は、*B. wei* とほぼ同数であるが、ゲノム構造は異なっていた。また、5' -*spoVFB* 側には、枯草菌の *skin* element の切り出しに関与する部位特異的 DNA 組換え酵素をコードする *spoIVCA* と相同性のある遺伝子が位置していた。従って、これらの菌株においては DNA 再編成により、*spoVFB* 遺伝子が再構築される可能性が示唆された。本研究では、以後 *B. wei* の解析を行った。

② *B. weihenstephanensis* KBAB4 の孢子形成

*B. wei* はフランスのベルサイユ近郊の森から分離された有孢子細菌である。また、好冷菌であり、30°C では生育できるが、37°C では生育できない。一方この菌株は、孢子形成能を有することは報告されているが、その過程についての詳細には調べられていない。そこで我々は、まずこの株の孢子形成過程における形態変化について調べた。MSM 孢子形成培地を用い 30°C で培養した。対数増殖期の終わりを  $T_0$  として、一時間ごとに細胞膜と DNA をそれぞれ FM4-64 および SYTO16 で染色して、蛍光観察と位相差顕微鏡による観察を行った。この結果、 $T_{10}$  より非対称角膜が観察され、 $T_{12}$  にフォアスポア及び未成熟な孢子を示す dark spore、 $T_{18}$  に密度の高い孢子を示す bright spore、 $T_{48}$  に遊離孢子が観察された。30°C で培養するため (枯草菌の場合は 37°C)、孢子形成の進行は枯草菌より遅くなるが形態変化は枯草菌とほぼ同じであった (図 3)。

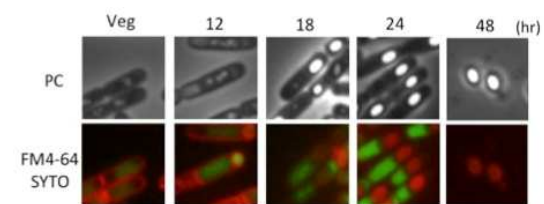


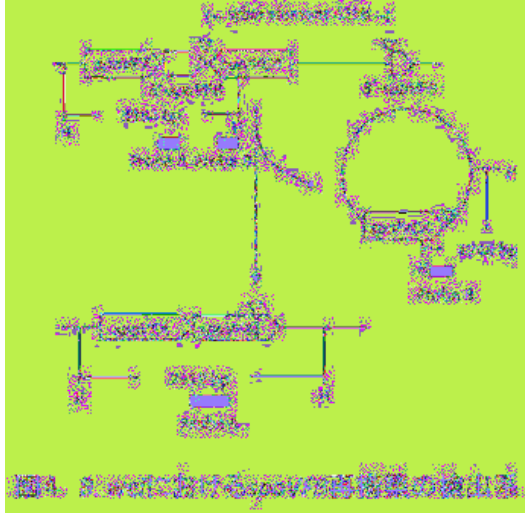
図 3. *B. weihenstephanensis* KBAB4 の孢子形成過程

次に、孢子の熱耐性を調べた。 $T_{24}$  の培養液を 80°C 10min 熱処理し、出現するコロニー数を調べた。この結果、約 60% 以上の細胞が熱耐性の孢子となることが確認された。これも枯草菌の孢子形成能とほぼ同じ値であり、*B. wei* が十分な孢子形成能を有していることが示された。

③ *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 の胞

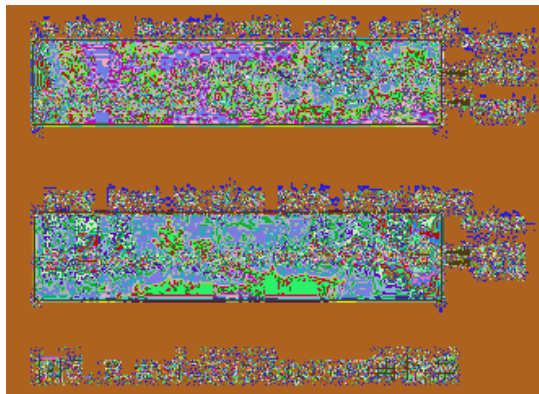
### 子形成期における DNA 再編成

枯草菌の *spoVFB* は、フオアスポア形成後の母細胞で発現することが報告されている。従って、DNA 再編成はこの前におこることが予想された。我々は、*B. wei* の孢子形成期の培養液を経時的にサンプリングし、DNA を抽出し、サザンハイブリダイゼーションにより、組換え DNA の検出を試みた。組換え DNA の検出のためのストラテジーを **図 4** に示す。



**図 4** 子形成期における *spoVFB* の検出のためのストラテジー

5' -*spoIVB* 内のプローブ A と *spoIVCA* 内のプローブ B を用いた。再編成前のゲノム DNA を *Hind*III で切断し、それぞれのプローブでハイブリダイゼーションをおこなうと、いずれも 3.9kb のバンドが生じ、再編成がおけるとゲノム DNA 内の再構築した *spoIVFB* を含む 7.9kb の DNA 断片と *vfbin* element 内の 4.7kb のバンドが生じると予想した。**図 5** にその結



果を示す。プローブ A およびプローブ B を用いた場合、 $T_{16}$ 以降、組換わった DNA を示すそれぞれ 7.9kb と 4.7kb の位置にそれぞれ新たなバンドが検出された。この結果から *B. wei* の孢子形成期に DNA 再編成がおこることが明らかになった。

次に我々は DNA 再編成後の *spoVFB* と *vfbin* の DNA-breakpoint 周辺の DNA 塩基配列を調べた。孢子形成期のゲノムを増幅し、ジェネティックアナライザー ABI によって組換え部位とその周辺の塩基配列を決定した。その塩

基配列を **図 6** に示す。*spoVFB* と *vfbin* の塩基

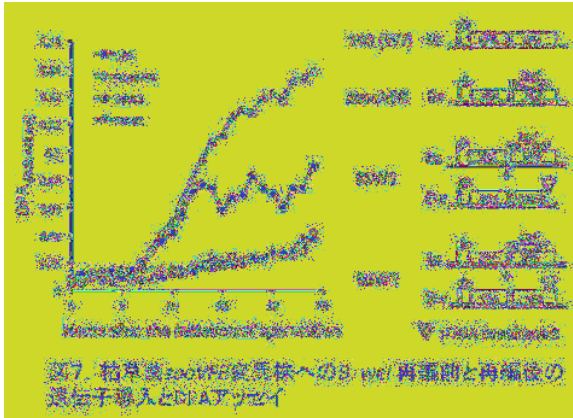


配列を比較すると 5' -CTAAT-3' の配列が一致しており、DNA 組換えはこの配列を介しておこったことが示唆された。このシーケンシング結果から *B. wei* の完全形の SpoVFB の大きさは 199aa であることが示された。また、DNA 再編成により、同時に 42kb の環状 DNA が生じることも示された。さらに、*vfbin* において、この配列を挟んだ、それぞれの鎖上には、5' -GCTTGTCaTCACCcTGTTGGCGT-3' と 5' -GCTTTGTCgTCACCtTGTTGGCGT-3' の、小文字で記した部分の塩基以外は一致する不完全な逆向き反復配列の構造が存在していた。この配列は恐らく組換え酵素が認識する配列と考えられる。組換え酵素の候補は、5' -*spoVFB* に隣接する *spoIVCA* をコードするタンパク質である。

#### ④ 再編後 *spoVFB* の機能

次に *B. wei* の *spoVFB* 遺伝子が、再構築によって完全長になることでジピコリン酸合成酵素  $\beta$  サブユニットをコードしているのか相補実験により調べた。まず、枯草菌の *spoVFB* 遺伝子破壊株 ( $\Delta$  *spoVFB*) を作製し、この株のジピコリン酸合成能及び、胞子の熱耐性が失われていることを確認した。さらにこれらの枯草菌変異株の *thrC* 遺伝子の領域に、*B. wei* の再編成前と再編成後の *spoVFAB* 遺伝子をそれぞれ導入した。その結果、再編成前の *B. wei* の *spoVFAB* 遺伝子を導入した株は相補されなかったが、再編成後の *B. wei* の *spoVFAB* 遺伝子を導入した株では、ジピコリン酸合成及び、熱耐性を持つ胞子の形成が相補された (**図 7**)。従って、再編成後の *B. wei* の *spoVFB* は、枯草菌の *spoVFB* 変異を補完することが示された。即ち、*B. wei* の *spoVFB* 遺伝子は、枯草菌の孢子形成期にゲノム再編成により構築されることで、ジピコリン酸合成酵素の  $\beta$  サブユニットとして機能し、胞子の熱耐性や薬剤耐性を担うジピコリン酸の合成が可能になることが明らかになった。

以上の結果より、*B. wei* の *spoVFB* は、栄養増殖期およびフオアスポアでは、フェージ様ゲノムにより分断されて機能していないが、母細胞において部位特異的組換え酵素 SpoIVCA により DNA 再編成がおこり、DPA 合成酵素をコードする完全形の *spoVFB* が再構



築されることが明らかになった。

有胞子細菌において、*sigK* 遺伝子へのフェージ様 DNA element 挿入例が多く認められるが、今回の解析結果により *sigK* のみにフェージ DNA が挿入される必然性はなく、フェージ DNA が細胞分化に関わる多くの遺伝子に挿入され、細胞分化に関与している可能性が示された。

## 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)

- ① Tatsu Kimura, Yukie Amaya, Kazuo Kobayashi, Naotake Ogasawara, Tsutomu Sato, Repression of *sigK* intervening (*skin*) element gene expression by the cI-like protein SknR and effect of SknR depletion on growth of *Bacillus subtilis* cells, Journal of Bacteriology, 査読有, 192 巻, 2010, 6209-6216

〔学会発表〕 (計 5 件)

- ① 安部公博、青柳隆大、廣田泰伯、佐藤勉、*Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 株の胞子形成期における DNA 再編成、2012 年 3 月 11 日、日本ゲノム微生物学会年会、立教大学 (東京都)
- ② 佐藤勉、青柳隆大、安部公博、有胞子細菌の胞子形成期における DNA 再編成、グラム陽性菌ゲノム機能会議、2011 年 8 月 26 日、福山大学 (広島県)
- ③ 佐藤勉、枯草菌胞子形成期の遺伝子再編成を仲介する *skin* element の構造、微生物研究会、2010 年 6 月 26 日、法政大学 (東京都)
- ④ 木村達、佐藤勉、枯草菌胞子形成期の遺伝子再編成を仲介する *skin* element の構造、日本ゲノム微生物学会年会、2010 年 3 月 8 日、九州大学医学部 (福岡県)
- ⑤ 佐藤勉、枯草菌 *skin* element の遺伝子発現と胞子形成細菌の *skin* の遺伝子構成、グラム陽性菌ゲノム機能会議、2009 年 9 月 5 日、神戸セミナーハウス (神戸市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 勉 (SATO TSUTOMU)  
法政大学・生命科学部・教授  
研究者番号：70215812

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし