

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580130

研究課題名(和文) 有孢子細菌のDNA再編成

研究課題名(英文) DNA rearrangement in spore-forming bacteria

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：一般的にプロファージが宿主の遺伝子に挿入すると遺伝子が分断されその機能を失う。我々は、多くの有孢子細菌において、孢子形成期母細胞で機能する遺伝子がファージ(様)因子により分断されていることを見出した。これらの分断された遺伝子は、母細胞で特異的に機能的な遺伝子として再構築される。さらに、枯草菌のSP⁺プロファージは、母細胞で発現するポリサッカライド合成遺伝子であるspsMに挿入されており、その欠失は、ファージの溶菌サイクル時と孢子形成期に機能的なspsM遺伝子をつくる際にそれぞれ必要であることを明らかにした。これらの結果は有孢子細菌の遺伝子再構築システムが一般的な機構であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Integration of prophages into protein-coding sequences of the host chromosome generally results in loss of function of the interrupted gene. We have shown that several phage (-like) elements are inserted into mother cell-specific sporulation genes in many spore-forming bacteria. Remarkably, functional sporulation genes are reconstituted during sporulation by limiting prophage excision to the mother cell genome. We have also reported that an active prophage, SP⁺, is inserted into a polysaccharide synthesis gene, spsM, which is expressed in the mother cell during sporulation in *B. subtilis*. SP⁺ excision can occur either during the phage lytic cycle or during sporulation to reconstitute a functional spsM gene. Our results suggest that this type of gene reconstitution is a common mechanism in spore-forming bacteria.

研究分野：農学

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 *sigK* の再構築

細菌に感染し、宿主ゲノムに組み込まれるタイプのウイルスを溶原性ファージ、また宿主上のファージ領域をプロファージと呼ぶ。一般にこのようなファージ DNA やトランスポゾンなどの可動因子が宿主の遺伝子に挿入されるとその機能を失う。しかし、可動因子により分断された遺伝子が、それが必要なときに再構築されれば、問題は回避できる。このような機構を持つ遺伝子として、枯草菌の孢子形成期母細胞で働く因子、*K* をコードする *sigK* が知られている。*sigK* 遺伝子には、*skin element* と呼ばれるファージ様因子が挿入されているが、孢子形成期母細胞で *skin element* が切り出され、染色体上に機能的な *sigK* 遺伝子が再構築される (Stragier 1989 Science, Sato 1990) (図 1)。しかし、当時

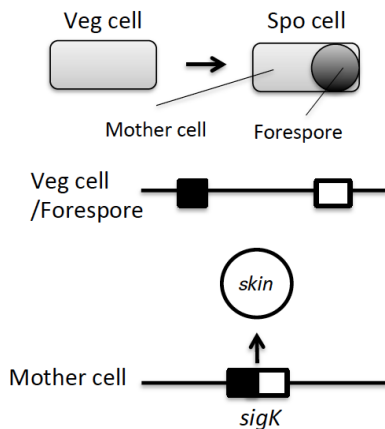


図 1. 枯草菌の孢子形成期における *sigK* 遺伝子の再構築

この機構は極めて特異な例として捕らえられ、近年、我々が解析するまで、他の遺伝子についての報告はなされていなかった。

(2) *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 の *spoVFB* 遺伝子の再構築

我々は、この遺伝子再構築機構が有孢子細菌の *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 株においても起こることを明らかにした。この株の孢子の耐熱性に関与するジピコリン酸合成酵素をコードする *spoVFB* オペロンの *spoVFB* 遺伝子は、42kb のプロファージ様因子 (*vfb*) により分断されている。しかし、孢子形成期母細胞において、部位特異的組み換え酵素 SsrA が機能することで、再構築することを明らかにした。この事例は、有孢子細菌では *sigK* に次ぎ、2 例目であるが、いずれのファージ様因子も感染能を持たず、縮退した不完全なプロファージと考えられた。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究課題ではゲノムデータベースより、有孢子細菌において分断されている遺伝子を検索し、そのメカニズムの詳細と普遍性を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *B. weihenstephanensis* KBAB4 株の *spoVFB* 遺伝子の時期および母細胞特異的転写制御機構の解明

部位特異的組換え酵素をコードする *ssrA* と再構築される *spoVFB* の転写をノーザンプロットと RT-PCR で解析する。また、それらの遺伝子と *gfp* 融合遺伝子を構築し、融合タンパク質の蛍光局在解析を行う。

(2) 有孢子細菌における遺伝子再構築の普遍性

ゲノムデータベースより有孢子細菌における分断遺伝子の検索を網羅的に行う。また、抽出された遺伝子のうち代表的なものについて、サザンプロット等による遺伝子再構築の検出を行う。

(3) 溶原性ファージによる宿主遺伝子を分断・再構築

枯草菌に感染する溶原性ファージの標的遺伝子の分断を調べ、DNA レベルでの変化をサザンプロットおよびシーケンシングにより明らかにする。また、当該遺伝子の発現については、ノーザン、GFP 融合遺伝子作製によるタンパク質局在解析により明らかにする。

4. 研究成果

(1) *B. weihenstephanensis* KBAB4 株の *spoVFB* 遺伝子の時期および母細胞特異的転写制御機構の解明

B. weihenstephanensis KBAB4 株の *spoVFB* 再構築に関わる部位組換え酵素をコードする *ssrA* および再構築される *spoVFB* の発現時期をノーザンプロットおよび RT-PCR により調べた。その結果、いずれの遺伝子も孢子形成期後期特異的な発現が検出された。また、*ssrA* は *spoVFB* よりも早い段階で発現していることが示された。*ssrA* の発現時期と *spoVFB* が再構築される時期が一致していることから、*ssrA* が発現すると直ぐに、その産物である部位特異的組換え酵素が生産され、遺伝子再構築が起こるのではないかと考えられた。さらに、*ssrA* および *spoVFB* と *gfp* との融合遺伝子を作製し、その産物の局在を調べた結果、いずれの遺伝子産物も母細胞に局在していることが示された (図 2)。母細胞は、胞

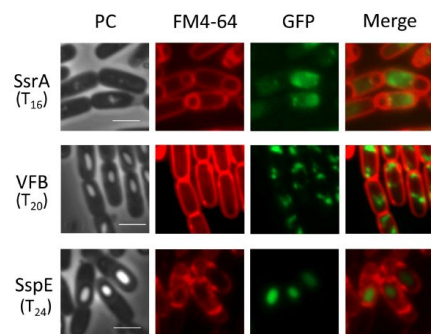


図 2. *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 株の SsrA と SpoVFB の母細胞特異的局在

SsrA; SsrA-GFP, VFB; SpoVFB-GFP, SspE; SspE-GFP (フォアスポア局在; コントロール), 時間 T; 培養後の時間

子の構築をその外側から行う細胞であり、胞子の構築とともに消失する。従って、*spoVFB* に挿入された、42kb のファージ様因子は胞子側では保持され、垂直伝播される。

(2) 有胞子細菌における遺伝子再構築の普遍性

我々は、さらに多くの有胞子細菌の胞子形成遺伝子がファージ様因子により分断され、再構築する機構を有しているのではないかと考え、ゲノムデータベースを用いて、分断されている遺伝子を検索した。その結果、*sigK*、*spoVFB* の他に、枯草菌において母細胞特異的に発現することが示されている *spoVR*、*spoVK*、*cotJC*、*gerE*、*yaah*、*yhbH*、*ytIA* がファージ様因子によって分断されていることが示された。この遺伝子介在配列の大きさは 8.3 kb から 156 kb であり、小さいサイズの介在配列はプロファージが縮退したものと推測された。我々はこのうち、*Geobacillus thermoglucosidasius* C56-YS93 の *spoVR* の DNA 再編成を調べ、前例と同様に、胞子形成期母細胞において遺伝子再構築が起こることを明らかにした。これらの結果から、有胞子細菌においては、母細胞特異的に機能する遺伝子にファージ様因子が挿入し、胞子形成期母細胞で再構築する機構が普遍的であることが示唆された。

(3) 溶原性ファージによる宿主遺伝子を分断・再構築

我々は、さらに感染可能な溶原性ファージが遺伝子を分断し、胞子形成期に再構築する可能性を考え、モデル細菌のひとつである枯草菌 168 株に感染する溶原性ファージに着目した。168 株には、SP ファージが溶原化している。また、外来性のファージとして 105 が 168 株を宿主として溶原化することが知られている。我々はこのうち SP プロファージが機能未知遺伝子を分断する形で溶原化していることを見出した。SP プロファージにより分断されている遺伝子は、*ypqP* および *yodU* と名付けられていたが、これらを融合させると sugar-epimerase をコードすると考えられる遺伝子となることが示された。我々はこれを *spsM* (spore polysaccharide synthesis protein M) と名付け、解析を進めることとした。

まず、SP プロファージがマイトマイシン C (MMC) などの DNA 損傷剤で誘発させ、その際に起こるプロファージの切り出し (Excision) を検出した。一方、胞子形成培地を用いて、胞子形成を誘導させ、DNA 再編成を調べたところ、胞子形成期開始 3 時間後に SP DNA の Excision および染色体上での *spsM* の再構築が確認された (図 3、4)。また、この胞子形成期の DNA 再編成は、他の例と同じく母細胞特異的であり、SP プロファージは垂直伝播されることが分かった。

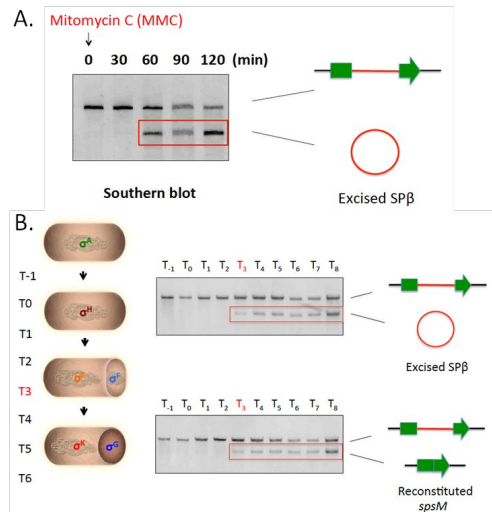


図3. SPβプロファージのMMC添加時と胞子形成期のDNA再編成 (A) MMC添加後のSPβプロファージのExcision。 (B) 胞子形成期におけるExcisionと*spsM*遺伝子再構築。DNA再編成はサザンブロットにより検出

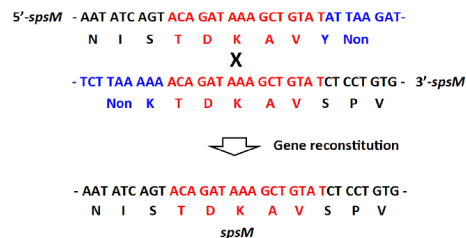


図4. *spsM*再構築の組換え部位のコア塩基配列 赤で示した配列でDNA組換えが起こり、SPβのExcisionにより*spsM*が再構築される

枯草菌の *spsM* が SP プロファージにより分断され、胞子形成期に再構築されることから、類縁細菌の *spsM* にもプロファージが挿入されているのではないかと考えた。*spsM* の分断は、枯草菌の類縁細菌である *B. amyloliquefaciens* の多くの株で見られた。しかし、そのサイズは 4.5 kb ~ 20kb であり、SP (134kb) に比べると著しく縮小していた。また、その領域には SP 関連遺伝子以外の ORF も多く存在しており、SP が縮退したものと考えられた。しかしながら、このうちのひとつである FZB42 株の再編成を調べた結果、MMC による Excision は起こらなかったが、胞子形成期の *spsM* 再構築能は有していた。FZB42 株はファージとしての機能は失っているが、*spsM* 再構築能を保持しているため、宿主ゲノム上に留まることができているのではないかと考えられた。

次に、枯草菌 168 株の SP の DNA 再編成機構について調べた。SP DNA 上にはセリン型の部位特異的組換え酵素をコードする遺伝子が存在する。我々はこの遺伝子を *sprA* (site-specific recombination factor A) と名付けた。また、この酵素は *sigK* に介在する *skin element* 上の *spoIVCA* と *spoVFB* に介在する *vfbin element* 上の *ssrA* がコードする部位特異的組換え酵素と高い相同性を持つ。*spoIVCA* および *ssrA* とともに胞子形成期母細胞で発現する。そこで、*sprA* の転写を

調べてみたところ、予想外に栄養増殖期から発現していることが明らかになった(図5)。栄養増殖期でのSP プロファージの

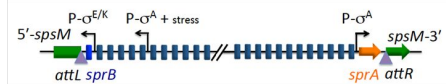


図5. SPβプロファージ上のsprAとsprBのプロモーター
P-σ^A; σ^Aで認識されるプロモーター, P-σ^{E/K}; σ^Eとσ^Kで認識されるプロモーター,
stress; MMCで誘導されるプロモーター

Excisionは検出されないため、他の因子が部位特異的組換えをコントロールしているのではないかと考えた。*B. amyloliquefaciens* FZB42株においてもspsMの再構築が起こることから、*B. amyloliquefaciens*のspsM介在配列とSP DNAに共通して存在する遺伝子を探索した。その結果、attL側の小さな遺伝子yotN(58 aa)がすべてのspsMに介在する因子の同じ位置に配置されていることが示された。SP上のこの遺伝子を破壊したところDNA再編成は起こらず、また、sprA発現下でyotNを誘導するとDNA再編成が誘導された。従って、yotNはDNA再編成をコントロールする因子をコードしていると考えられた。我々はこの遺伝子をsprBと名付けた。さらに、sprBのプロモーターについて解析した結果、sprBはMMC添加時に誘導するプロモーターと孢子形成期母細胞で発現するプロモーター(P^{E/K})を有していることが明らかになった(図5)。恐らく、この因子がSP DNAのSprAによるIntegration機構の方向性を変化させ、SP DNAの宿主DNAへの作用を変更する機能(Integration Excision)を持っていると考えられた。

さて、SP プロファージのExcisionにより宿主染色体上に再構築されるspsMの機能については、この遺伝子がSP DNAにより分断されていることもあり、これまで全く解析されていなかった。我々はspsMがsugar-epimeraseをコードしていると推定されることから、孢子のポリサッカライドの形成に関与している可能性を考えた。しかし、枯草菌孢子のポリサッカライドに関してはこれまでほとんど報告されてこなかった。これは、孢子最外層に関する研究が、電子顕微鏡やAFMを用いたものであり、乾燥状態での観察であるため密度の低いポリサッカライド層を検出しにくいということに起因すると考えた。そこで、枯草菌孢子を墨汁によるネガティブ染色を行い水溶液中で位相差顕微鏡による観察を行った。その結果、孢子最外層を炭素粒子が侵入できない層として視覚化することに成功した(図6)。さらに、

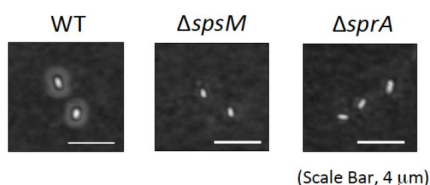


図6. 野生型と変異型孢子のポリサッカライド層
WT; 枯草菌168株の孢子, ΔspsM; spsM変異株孢子, ΔsprA; sprA変異株孢子

この最外層を分離し、成分分析を行った結果、ラムノースとガラクトースを主成分としていることが明らかになった。一方、spsMおよびDNA再編成の起こらないsprA変異株の孢子をこの方法で調べた結果、この最外層(ポリサッカライド層)が形成されていないことがわかった。さらに、この変異孢子は固層表面上に吸着し易い性質を持っていた。また、野生型の孢子は水に拡散するが、変異孢子は拡散しない。従って、孢子ポリサッカライド層は孢子を水流により遠方へ移動させる働きがあることが明らかになった。

本研究課題の以上の解析から、有孢子細菌の溶原性ファージが、母細胞特異的に機能する遺伝子を標的に溶原化し、孢子形成期にその遺伝子を再構築する機構を持ち、これが多くの有孢子細菌において「普遍的」に行われていることであることが示された。また、枯草菌SPファージを用いた解析から、このプロファージのExcisionがファージの溶菌サイクルと孢子形成期の遺伝子再構築に利用されていることが明らかとなった。

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 2 件)

- Kimihiko Abe, Yuta Kawano, Keito Iwamoto, Kenji Arai, Yuki Maruyama, Patrick Eichenberger, Tsutomu Sato, Developmentally-regulated excision of the SPβ prophage reconstitutes a gene required for spore envelope maturation in *Bacillus subtilis*, PLoS Genetics 査読有, 10 巻, 2014 e1004636.
doi: 10.1371/journal.pgen.1004636.
Kimihiko Abe, Akira Yoshinari, Takahiro Aoyagi, Yasunori Hirota, keito Iwamoto, Tsutomu Sato, Regulated DNA rearrangement during sporulation in *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4, Molecular Microbiology. 査読有, 90 巻, 2013 415-427.

[学会発表](計 38 件)

- 安部公博、高松拓夫、河野裕太、佐藤勉、枯草菌SPファージを介したspsM遺伝子再構築機構の解析、2015年3月8日、日本ゲノム微生物学会年会、神戸大学(兵庫県 神戸市)
佐藤勉、安部公博、河野裕太、岩本敬人、細胞分化に伴うプロファージによる遺伝子再構築、2014年11月25日、日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)

河野裕太、新井健司、中村甫、丸山祐輝、
安部公博、佐藤勉、枯草菌SP による遺
伝子再編成の調節機構、2014年3月29日、
日本農芸化学会、明治大学（神奈川県 川
崎市）

Kimihiko Abe, Takahiro Aoyagi,
Yasuhiro Hirota, Keito Iwamoto and
Tsutomu Sato, Regulated DNA
rearrangement during sporulation in
Bacillus weihenstephanensis KBAB4,
2013 年6 月24 日, 7th International
Conference on Gram-Positive
Microorganisms, Montecatini Terme,
(Italy Tuscany)

安部公博、新井健司、岩本敬人、中村甫、
丸山祐輝、佐藤勉、枯草菌孢子形成期に
おけるSP プロファージの切り出しに伴
う孢子形成関連遺伝子 *capD* の再構築、
2013年3月8日、ゲノム微生物学会年会、
長浜バイオ大学（滋賀県 長浜市）

〔その他〕(計1件)

佐藤勉、ウイルス DNA による遺伝子再構
築の発見 - 宿主ゲノムに潜むウイルス
DNA の働き -、2014 年 10 月 10 日、
ニュースリリース、
[http://www.hosei.ac.jp/NEWS/newsrele
ase/141010.html](http://www.hosei.ac.jp/NEWS/newsrelease/141010.html)

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：7 0 2 1 5 8 1 2

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし