法政大学学術機関リポジトリ
HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

PDF issue: 2024-06-16

プロファージによる遺伝子再構築機構の解明と応用

佐藤, 勉 / SATO, Tsutomu

(開始ページ / Start Page)
1
(終了ページ / End Page)
5
(発行年 / Year)
2018-06-04

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　６　月　　４　日現在

機関番号：　３２６７５
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2015～2017
課題番号：　１５Ｋ０７３７１

研究課題名（和文）プロファージによる遺伝子再構築機構の解明と応用

研究課題名（英文）Analysis and application of prophage-mediated gene reconstitution

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）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：枯草菌のSPβプロファージは、胞子形成期にspsM遺伝子を再構築するために宿主染色体から切り出される。我々はin vitro組換え実験により5'-ACAGATAA / AGCTGTAT-3 'の中心のAAの位置でインテグレースであるSprAにより部位特異的組換えが起こることを明らかにした。また、SprAと基質DNAとの間のシナプス複合体形成には、RDFであるSprBが欠失反応においては必要であるが、挿入反応においては逆に阻害することを示した。さらに我々は、枯草菌母細胞からの脱分化細胞の検出系およびSPβ組換え機能に基づく新しいゲノム改変ツールを開発した。

研究成果の概要（英文）：Bacillus subtilis SPβ prophage is excised from the host chromosome in a process of sporulation to reconstitute a composite spsM. As results of in vitro recombination experiments, we revealed that the site-specific recombination occurred at the position of AA in the center of recombination site “5'-ACAGATAA /AGCTGTAT-3 '” catalyzed by an integrase SprA. Furthermore, we showed that a recombination directionality factor (RDF) SprB is necessary for synaptic complex formation between SprA and substrate DNA during excision while SprB inhibits the formation during integration. We also developed a detection system for B. subtilis dedifferentiated cells from mother cells and new genome modifying tool based on the SPβ recombination function.

研究分野：　ゲノム微生物

キーワード：　DNA組換え　胞子形成　細菌　部位特異的組換え　遺伝子再構築

１．研究開始当初の背景

プロファージは宿主ゲノム内に溶原化したファージDNAであるが、これが遺伝子内に挿入されると、その遺伝子は分断され機能を失う。しかし、その遺伝子が必要とされる時期に欠失することで、その影響を回避することができる。この一つの例として、枯草菌の欠陥プロファージである*skin* element による胞子形成シグマ因子σ^Kをコードする*sigK* 遺伝子の分断が挙げられる。*sigK*は*skin* element により機能を失っていると考えられるが、胞子形成期に*skin* 欠失により再構築される（Stragier et al. Science 1989, Sato et al. J. Bacteriol. 1990）。我々はプロファージにより分断されている遺伝子を公共ゲノムデータベースを用いて探索し、有胞子細菌の*sigK* 以外にも他の胞子形成に関わる遺伝子にファージ様配列が挿入されていることを見出だし、*B.weiphenstephanensis* および一部の*Geobacillus* 属においては、胞子耐熱性に関与するそれぞれ*spoVFB* および*spoVR*に挿入されたファージ様配列が胞子形成期に欠失することにより、遺伝子再構築を行っていることを明らかにした(Abe et al. Mol. Microbiol. 2013)。さらに、枯草菌に感染するSPβ(134 kb)が機能未知遺伝子(後に*spsM* と命名)を分断していることを見出し、分断された遺伝子は*yodU* と*ypqP* として命名されていたが、これらは胞子形成期のSPβの切り出しにより、UDP-sugar epimerase をコードする遺伝子となることを明らかにした。この遺伝子再構築には部位特異的組換え酵素(SprA)と

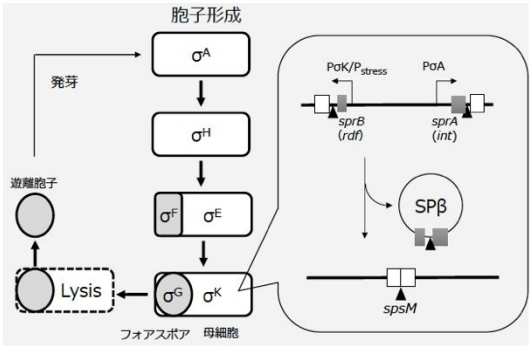

図1　枯草菌母細胞における*spsM*遺伝子の再編成

RDF(Recombination directionality factor)と推定されるSprBが必要であり、ファージの誘導および遺伝子再構築のタイミングは*sprB*の発現調節により制御されていることが示された（図 1）。枯草菌の胞子形成細胞は、将来胞子となるフォアスポアとそれを外側から構築するのに必要な母細胞からなるが、*sprB*はストレス誘導型と母細胞特異的な２つのプロモータから転写される。母細胞は胞子の成熟とともに消失し、遺伝子再構築は将来胞子となるフォアスポア側ではおこらないため、SPβ欠失は子孫に受け継がれることはない。これらの研究結果は、ウイルスDNA により分断された遺伝子が、それが必要とされるタイミングで再構築されることを示した初めての例である(Abe et al. PLoS Genet. 2014）。

２．研究の目的

本研究では、研究対象であるSPβファージによる枯草菌胞子形成期の遺伝子再構築における標的配列選択機構を、（１）部位特異的組換え酵素 SprA および RDF SprB を用いて*in vitro* レベルで詳細に解明する。（２）また、これまでに得られたSPβの組換え機能の知見を基に、SPβの欠失を判別できる実験系の開発、および新たなゲノム改変ツールの開発（合成生物学への応用）の応用研究へ発展させることを目的とする。本研究では、組換え機構の基礎的解析とともに応用研究をも展望する。

３．研究の方法

（１）SPβプロファージによる*spsM*再構築機構の*in vitro* レベルでの解明

まず、DNA 組換えに必要な SprA と SprB を精製し、*in vitro* 組換え系を構築する。次に、挿入・欠失に必要な DNA 領域を決定する。さらに SprA・SprB・基質 DNA の相互作用領域をゲルシフト法で解析する。また、この複合体を原子間力顕微鏡(AFM)を用いて解析する。最後に、母細胞特異的な遺伝子再構築系の調節機構を解明するため、*sprB* の発現調節に着目した転写解析を行う。

（２）SPβの組換え機構の応用

枯草菌母細胞からの脱分化を判別するために DNA 再編成機構を応用した枯草菌母細胞の脱分化検出系を枯草菌ゲノム上に構築する。一方、我々が研究対象としている SPβファージは、ゲノム大規模改変と遺伝子改変の重要なツールとなるため、SPβの組換えシステム加工した組換え系を用い、宿主ゲノムの任意の位置に *att* 部位を導入することにより、ゲノムからの切り離しによる影響を調べる系を構築する。

４．研究成果

（１）SPβプロファージによる*spsM*再構築のメカニズムの*in vitro*レベルでの解明

SprA（545 aa)およびRDFと推定されるSprB(58 aa)の大腸菌発現ベクターを構築し、大腸菌内での大量発現、カラムクロマトグラフィー等により酵素の精製を行った。また、精製したこれらの酵素と基質となる*attP*（ファージ側DNA）および*attB*（宿主側DNA）を持つDNAを用いた組換え反応を行った。その結果、*attB*と*attP*をそれぞれ含むDNA断片を用いた挿入については、SprAのみで起こり、*attL*と*attR*を含む断片を生じること、また、この反応はSprBにより阻害されることが明らかとなった。一方、SPβファージが宿主ゲノムに溶原化したその両端の*attL*と*attR*をそれぞれ持つDNA断片を基質とし、組換え反応を行った結果、SprAを含む反応溶液にSprBを加えた場合のみ欠失を示す*attP*と*attB*が生じた。従って、欠失にはSprAおよびSprBが必要であることが明らかとなった。また、この反応はSprAの22番目のSerをAraに置換($SprA_{S22A}$)により、挿入・欠失反応が生じないことから、SprAはセリンタイプの部位特異的組換え酵素であることが示された。また、小分子タンパク質であるSprBは、組換えの方向性を挿入から欠失に変換するRDFであることが確認された。

次に、*attP*と*attB*を含む断片を基質に用い、30%のエチレングリコールと5%のグリセロールを含む溶液で組換え反応を行い、切断断片を回収しその断片の塩基配列を決定した。その結果、組換えの中心は、5’-ACAGATAA/AGCTGTAT-3’であり、このうちAAが突出する形で切り出しと再結合がおこることが明らかとなった。さらに、*attP*、*attB*、*attL*、*attR*として必要な部位を決定した結果、最小サイズはそれぞれ52、44、48、48 bpであることが示された。いずれも対称性を持つ16 bpのコア配列5’-ACAGATAA/AGCTGTAT-3’が存在することから、この配列の対称性がSprAによる組換え反応に重要であることが示唆された。また、基質DNAとこれらの組換えに関わるSprA、SprBとの高次構造であるシナプス複合体の形成をゲルシフトアッセイにより調べた。その結果、*attP*と*attB*を基質にした場合、SprAのみでシナプス複合体形成が確認されたのに対し、*attL*と*attR*を基質とした場合、シナプス複合体が形成にはSprAに加えてSprBも必要であることが明らかとなった。一方、このシナプス複合体を視覚化するために、AFMによる一分子観察を行った。組換え反応が途中停止する$SprA_{S22A}$を用いて視覚化したところ、SprBの添加により、*attL*と*attR*を持つ基質から内部のDNAのループアウトが確認された（図２）。この結果は、部位特異的組換え

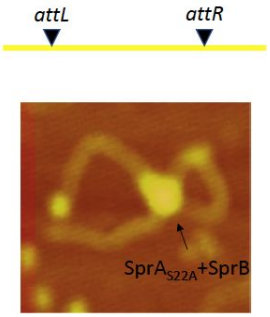

図2. AFMによるシナプス複合体の視覚化

酵素による反応過程を一分子レベルで視覚化した最初の例である。

我々は、挿入により産物である*attL*と*attR*がSprBの濃度依存的に消失することを見出した。我々の以前の研究により、*sprB*は胞子形成期母細胞で機能するシグマ因子σ^Eとσ^Kの２つのプロモーターを有し、SPβの欠失後も発現が継続していることが確認されている。このためSprBは、胞子形成期中に生じたSPβ環状DNAが再び*attB*に挿入されることを抑制しているのではないかと考えた。そのため*sprB*のプロモーターをσ^Eで認識されるプロモーターのみに変更したところ、*sprB*の発現が一過的となり、*sprB*の発現がほぼ消失した段階でSPβDNAの再挿入が起こり、*spsM*のSPβによる再分断が確認された。この株の胞子は、*spsM*が分断されているため、胞子表層にポリサッカライドができない。従って、*sprB*の発現が胞子形成の最終段階まで継続しない場合、胞子ポリサッカライドが形成できない重大な欠陥をもたらすことが示された。以上の結果より、*sprB*の発現のタイミングと継続が、胞子形成期中のSPβの欠失状態を維持するために重要であることが明らかとなった。

（２）SPβの組換え機構の応用

枯草菌の胞子形成は単細胞レベルの細胞分化のモデル系として知られており、母細胞は最終分化細胞として捉えられている。一方、本研究室では母細胞からの脱分化誘導系の確立を目指している。有胞子細菌を用いる場合、脱分化した細胞が胞子または脱分化細胞由来かの判別は、それぞれに同一のゲノムが存在するため、困難であった。このためSPβの組換えシステムを利用した検出系を開発した。キシロース誘導性のプロモーターの下流に*attB*とその下流にβ-ガラクトシダーゼをコードする*lacZ*また緑色蛍光タンパク質をコードする*gfp*を配置した枯草菌株をそれぞれ作製した。SPβ上の*sprB*は$\sigma^{E/K}$プロモーターを有するため、胞子形成期母細胞で発現すると、欠失が起こる。この系を用いて、欠失完了後

の胞子形成開始6時間後の母細胞を脱分化誘導し、培地をEnrichment（栄養培地に移行）後キシロースで*sprB*を誘導し、レポーターを発現させた。その結果、一部の細胞でGFP蛍光が観察され、また一部のコロニーでβ-ガラクトシダーゼの生産が確認された。従って、欠失を確認するための実験系は完成した。しかし、一方で脱分化誘導後、SPβの再挿入が確認された。これは*sprB*のプロモーターが$\sigma^{E/K}$で制御されるため、脱分化誘導後の細胞ではSprBの細胞内濃度が低下するためと考えられた。今後は、再挿入が起こらない検出系を構築する必要がある。

また、もう一つの応用例として、組換えシステムを用いて、ゲノムの大規模欠失を試みた。SPβの欠失のタイミングは *sprB* の発現により調節されている。*sprB* を IPTG 誘導可能な P*spac* プロモーターの制御下に置き、*attL* と *attR* をゲノム上の任意の位置に配置するとその間の領域を培養液に IPTG 添加することにより、除去することが可能と考えた。そこでまず、ゲノム上の *spo0A-bmrU* 間の 25 kb 欠失誘導株を作製し、IPTG 添加により、この領域の長距離欠失を確認した。次に最長欠失距離を調べるために、82、150、250、350、700 kb 欠失誘導株を作製した。これらの欠失の有無を PCR により調べた結果、82、150、250、350 kb 欠失が確認できたが、700 kb 欠失誘導確認できなかった。したがって、このSprA・SprB 切り出しシステムを用いると 350 kb以下のDNA領域の欠失は可能であることが示された。一方、この系を用いて長距離欠失を行うと、一部欠失が生じていない細胞が出現するという問題が生じた。また、*sigK*を再構築する *skin* element 組換えシステム SpoIVCA(部位特異的組換え酵素)および Skr（RDF）を用いて、長距離欠失誘導を行ったが、同様に完全な欠失が確認できるのは25 kbまでの断片であった。この理由として、①組換えシステムに関わる遺伝子(*sprA*、*sprB*)の発現が十分ではない。②欠失させる領域に生育に必要な遺伝子が含まれるため、組換えシステムの遺伝子に変異が生じた細胞が顕在化するなどが考えられた。しかしながら、本研究に開発した部位特異的組換えにより、少なくとも 25 kb の任意のゲノム領域を欠失されることが可能であることが確認された。

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 3 件）

① Kimihiro Abe, Shin-ya Shimizu, Shuhei Tsuda, Tsutomu Sato. A novel non prophage(-like) gene-intervening element within *gerE* that is reconstituted during sporulation in *Bacillus cereus* ATCC10987. Sci. Rep.7(1):11426 doi: 10.1038/s41598-017-11796-8 (2017). 査読有

② Kimihiro Abe, Takuo Takamatsu, Tsutomu Sato. Mechanism of bacterial gene rearrangement: SprA-catalyzed precise DNA recombination and its directionality control by SprB ensure the gene rearrangement and stable expression of *spsM* during sporulation in *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res. 45(11):6669-6683. doi: 10.1093/nar/gkx466. (2017). 査読有

③ Mario Arrieta-Ortiz, Christoph Hafemeister, Ashley Rose Bate, Timothy Chu, Alex Greenfield, Bentley Shuster, Samantha Barry, Matthew Gallitto, Brian Liu, Thadeous Kacmarczyk, Francis Santoriello, Jie Chen, Christopher Rodrigues, Tsutomu Sato, David Rudner, Adam Driks, Richard Bonneau, Patrick Eichenberger. An experimentally supported model of the *Bacillus subtilis* global transcriptional regulatory network. Mol. Syst. Biol. 11(11):839. doi: 10.15252/msb.20156236. (2015). 査読有

〔学会発表〕（計 14 件）

① 安部公博，高橋匠，清水慎哉，高松拓夫，津田嵩平，佐藤勉，グラム陽性細菌における胞子形成特異的な遺伝子再編成の普遍性と分子メカニズム，日本ゲノム微生物学会，京都大学桂キャンパス，2018 年 3 月 7 日.

② Tsutomu Sato, Takuo Takamatsu, Kimihiro Abe, *Bacillus subtilis* SPβ phage integrase-mediated site-specific recombination during sporulation, 19th International conference Bacilli & Gram-Positive Bacteria, Germany, 2017 年 6 月 12 日.

③ Shota Suzuki, Hayate Suzuki, Kimihiro

Abe, Tsutomu Sato, Construction of chimeric lysogenic phages integrated at distinct target (*attB*) sites in *Bacillus subtilis*. 19th International conference Bacilli & Gram-Positive Bacteria, Germany, 2017年6月12日.

④ 鈴木祥太, 鈴木颯, 安部公博, 佐藤勉, 異なる *attB* を認識する新規ファージの構築, 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会, 慶応大学・湘南藤沢キャンパス, 2016年 3月2日.

⑤ 住吉泰樹, 鈴木祥太, 安部公博, 佐藤勉, 枯草菌胞子形成母細胞の栄養細胞への脱分化, 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2016年 12月1日.

⑥ 橋口優一朗, 鈴木祥太, 安部公博, 佐藤勉, 枯草菌胞子形成期における *sigK* 遺伝子再構築の調節機構, 第 39 回日本分子生物学会年会・パシフィコ横浜, 2016年 12月1日.

⑦ 橋口優一朗, 平島翔太, 安部公博, 佐藤勉, 枯草菌胞子形成期における *sigK* 再構築に関与する *skr* 遺伝子, 日本ゲノム微生物学会, 東京工業大学・大岡山, 2016年3月4日.

⑧ 津田嵩平, 北村友美, 安部公博, 佐藤勉, セレウス菌の胞子形成期における *gerE* 遺伝子の再構築, 日本ゲノム微生物学会, 東京工業大学・大岡山, 2016年3月4日.

⑨ 高松拓夫, 安部公博, 佐藤勉, 枯草菌 SPβ の Integration/Excision 機構および site-specific recombinase の機能解析, 日本ゲノム微生物学会, 東京工業大学・大岡山, 2016年3月4日.

⑩ 安部公博, 岩本敬人, 小林優生, 井之口紫苑, 佐藤勉, 枯草菌胞子ポリサッカライド層の解析, 日本ゲノム微生物学会, 東京工業大学・大岡山, 2016 年 3月4日.

⑪ 佐藤勉, 安部公博, プロファージによる遺伝子再構築, 第 38 回日本分子生物学会・第88回日本生化学会合同大会, 神戸ポートピアアイランドホテル, 2015年12月1日.

⑫ Kimihiro Abe, Yuta Kawano, Keito Iwamoto, Kenji Arai, Yuki Maruyama, Takuo Takamatsu, Patrick Eichenberger, Tsutomu Sato. SPβ prophage-mediated DNA rearrangement is required for spore envelope polysaccharide synthesis in *Bacillus subtilis*, Molecular Genetics of Bacteria and Phages Meeting, University of Wisconsin-Madison USA, 2015年8月6日.

⑬ Kimihiro Abe, Shuhei Tsuda, Keito Iwamoto, Takuo Takamatsu, Yuta Kawano, Patrick Eichenberger, Tsutomu Sato, Developmentally-regulated prophage excisions reconstitute genes required for sporulation in spore-forming bacteria, 8th International Conference on Gram-Positive Microorganisms, Italy, 2015年6月23日.

⑭ Kimihiro Abe, Takuo Takamatsu, Yuta Kawano, Keito Iwamoto, Patrick Eichenberger, Tsutomu Sato, Rearrangement of *spsM*, a spore polysaccharide synthesis gene in *Bacillus subtilis*, is mediated by the SPβ site-specific recombination factors, SprA and SprB, 8th International Conference on Gram-Positive Microorganisms, Italy, 2015年6月22日.

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