

## 枯草菌においてファージ不稔感染経路に関与する NonA の解析

細山田 舜 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 中村 幸治 (筑波大学 生命環境系)

## (背景・目的)

バクテリアはファージ感染に抵抗する機構として、制限修飾系、CRISPR/Cas システム、不稔感染機構などを持つことが知られている。制限修飾系や CRISPR/Cas システムは、ファージ感染直後に、ファージゲノムを切断することで、ファージの増殖を開始されるのを防いでいる。一方、ファージが感染し、ファージの増殖サイクルが開始されるにも関わらず、ファージの増殖・拡散を抑制している機構が不稔感染機構である。不稔感染機構では、ファージの増殖サイクルにおける複製、転写、翻訳における特定のサイクルを阻害するタンパク質の発現により、菌体内におけるファージの増殖を抑えたり、菌体に対し毒性を持つタンパク質が発現することで、感染細胞の細胞死を引き起こし、溶菌によるファージの拡散を抑制したりしている。本研究においては、枯草菌の不稔感染に関与する NonA の研究を行った。

枯草菌 Marburg 株は SP10 ファージに対し、抵抗性を持つ。(Saito *et al*, Mol Gen Genet, 1979)。Marburg 株に抵抗性をもたらす遺伝子として、SP  $\beta$  プロファージ領域に存在する *nonA* 遺伝子がある。また *nonA* 遺伝子の転写に際し、SP10 ファージのシグマ因子が *nonA* 遺伝子の転写に必要であるため、SP10 ファージ感染時のみ NonA の発現が起きる。(Yamamoto *et al*, J Bacteriol, in press)

SPP1 ファージ及び  $\phi$ 29 ファージは、SP10 ファージの  $\sigma$  因子のホモログを持たないため、これらのファージの感染により NonA は発現しない。また、SPO1 ファージは、SP10 ファージの  $\sigma$  因子のホモログを持つが、相同性が低く、同様に NonA を発現しない。また、ファージ非感染時に IPTG 誘導により、NonA の発現を誘導すると、枯草菌の生育を阻害し、呼吸活性が低下することが明らかとなっている。この点から、1つの仮説として、SP10 ファージ感染時に NonA が発現し、枯草菌の増殖を阻害することにより、SP10 ファージの増殖を抑制しているのではないかということが考えられる。そこで、NonA の発現により、SP10 ファージの増殖を抑制できるのか検証した。

## (方法・結果)

*nonA* 遺伝子は SP10 ファージ感染時しか発現しないため、SPO1、SPP1、 $\phi$ 29 ファージが感染した際に NonA の発現により、どのような影響が生じるかを観察することはできない。そこで、*nonA* 遺伝子の ORF 上流に存在するプロモーター部位を、感染後期に発現するファージ遺伝子のプロモーター部位に置き換えた株を作成することにより、SP10 ファージ以外のファージが感染した際にも、NonA の発現が可能になると考えた。これまでに推定されている SPO1、SPP1 の感染時に発現するプロモーター(Stewart *et al*, J Mol Biol, 2009, Juan C. Alonso *et al*, Gene, 2004)の下流に His タグ付き *nonA* 遺伝子を連結した。その断片を SP  $\beta$  プロファージ領域と制限修飾系を欠損させた枯草菌 ASK3002 株の *amyE* 遺伝子座に導入した。また、 $\phi$ 29 ファージに関しては、すでに以前  $\phi$ 29 プロモーターと *nonA* 遺伝子を連結した断片を挿入した株の作成が行われているため、今回は行

わなかった。プロモーターと *nonA* 遺伝子の DNA 配列をシーケンシングした結果、ファージプロモーター推定部位や *nonA* の ORF、His タグ部分にいずれも、点変異やアミノ酸のフレームシフト変異が生じた。*nonA* 遺伝子は枯草菌にとって毒性を持つことから、ファージ非感染時においても、このプロモーターが機能することにより、変異が生じている可能性が考えられた。そこで、SP10 ファージを SPO1 ファージと同時に感染させることにより、NonA が SP10 ファージだけでなく、SPO1 ファージの増殖も阻害するのか検証した。

対数増殖期中期まで培養した ASK3002 株の *amyE* 遺伝子座に *nonA* 遺伝子を導入した TAY3210 株に対し、SP10 ファージ及び SPO1 ファージを異なる混合比で、同時に感染させた。感染後 5 時間までの OD<sub>600</sub> を、それぞれ計測した。SP10 ファージのみを感染させた場合には、枯草菌の溶菌は起きなかった。一方、ファージ感染後 30 分と 90 分の OD<sub>600</sub> の変化を比較すると、SP10 ファージと SPO1 ファージを多重感染させた場合には、感染後 21 %の減少が見られたのに対し、SPO1 ファージのみを感染させた場合、89 %の減少が見られた。この結果より、SP10 と SPO1 を多重感染させた時には、SPO1 のみ感染させた時に比べ、枯草菌の溶菌率が減少したことから、SP10 ファージ感染時に発現する NonA により、SP10 ファージだけでなく、SPO1 ファージの増殖を阻害し得ることが示唆された。この結果に関し、現在、再現性を得るために実験を続けている。

## (展望)

今後、ファージの多重感染実験においては、SPO1 ファージと SP10 ファージが実際に多重感染しているのかという点を検討する必要があり、また、ファージ多重感染時における OD<sub>600</sub> の変化が NonA の発現によることを明らかにするため、NonA 非発現株を用い、同様の実験を行いたいと考えている。SPO1 と SP10 の同時感染では、溶菌率での違いが見られたが、SPP1、 $\phi$ 29 といった別のファージを用いた際に、どのような変化が見られるか、今後検討する予定である。それに続き、OD<sub>600</sub> の変化に関し、ファージ遺伝子の mRNA やタンパク質の発現量の変化を確認し、ファージ多重感染により、遺伝子発現レベルでどのような変化が生じているのかについて解析していきたいと考えている。また、今回行った多重感染実験は、2種のファージを同時感染させたが、ファージ間の感染時期に差を与える実験により、生じる変化についても解析していきたいと考えている。