

枯草菌バイオフィームにおけるファージ不稔感染機構のイメージング解析

北村 あかり (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)
豊福 雅典 (筑波大学 生命環境系)

(背景・目的)

細菌はファージ感染に対して抵抗性をもつ。外来遺伝子の排除機構の例として、ファージゲノムを切断しファージ増殖の開始を防ぐ制限修飾系や CRISPR/Cas システムが知られている。また、ファージ増殖の開始を阻害する機構の他にも、ファージ感染の過程で、ファージ粒子の合成を抑制しファージの増殖・拡散を防ぐ不稔感染機構がある。

不稔感染は、ファージの増殖・拡散を伴わない感染様式であり、様々な要因によって引き起こされる。その例としてプラスミドの安定化に関与する Toxin-antitoxin システム (TA システム) の直接あるいは間接的な関与が考えられている。TA システムは、細胞増殖を阻害する toxin とその inhibitor である antitoxin の遺伝子を 1 つのセットとして、細胞の生育やストレス応答を制御する¹⁾。Toxin/antitoxin がタンパク質/RNA の組み合わせである III 型 TA システムの一つである *P. atrosepticum* の ToxIN 系は、RNase 活性をもつタンパク質 ToxN (toxin) と、36nt の sRNA である ToxI (antitoxin) から構成される。ファージ非感染時では ToxIN が複合体を形成し、同時に ToxI は ToxN によって分解される。しかしファージに感染すると、ToxIN 遺伝子の転写が抑制あるいは ToxIN の相互作用が阻害されることにより、ToxIN 複合体から ToxN が放出され RNase 活性により直接または間接的に不稔感染が引き起こされると考えられる²⁾。

枯草菌 Marburg 株は、SP10 ファージ耐性をもつ。そして TA システムとは異なる方法で不稔感染を引き起こすと考えられている。この株において不稔感染を引き起こす鍵となるのが、SPβ プロファージ領域にある *nonA* 遺伝子である。*nonA* の発現には SP10 ファージの σ 因子が必要である。そのため、SP10 ファージの感染時のみ *nonA* が発現され SP10 ファージに対して抵抗性を示すようになる。また、対数増殖期中期まで振盪培養後 SP10 ファージを感染させた *nonA*⁻ および *nonA*⁺ の枯草菌株を比較すると、感染後 1 時間で *nonA*⁻ 細胞は溶菌し濁度が下がるのに対し *nonA*⁺ 株の濁度は一定の値を維持することが分かっている³⁾。

細菌の多くは実環境中では集団として生活し、バイオフィームと呼ばれる細胞外マトリクスに包まれた集合体を形成する。環境中の枯草菌の多くもバイオフィームを形成する。枯草菌を振盪培養したときのような浮遊菌と SP10 ファージの相互関係は先行研究によって明らかになっているが、実環境に近い枯草菌のバイオフィーム状態と SP10 ファージの相互関係については明らかになっていない。また *nonA* をもつ枯草菌のバイオフィームに SP10 ファージを感染させたときに、SP10 感染がどのようにバイオフィーム中で進行していくのかについても明らかになっていない。そこで仮説として、SP10 ファージ感染が引き起こされてもバイオフィーム表面の細胞で不稔感染が引き起こされ、SP10 ファージの感染が内部の細胞まで進行しないと考えた。*nonA* をもつ枯草菌株バイオフィームにおける SP10 ファージ感

染がどのように進行していくかを解析するため、本研究では枯草菌バイオフィームにおける SP10 感染の不稔感染を可視化することを目的とした。

(方法)

バイオフィームにおけるファージ感染を可視化するための前準備として SP10 ファージ染色の条件検討を行った。ファージの染色に用いた蛍光試薬は、核酸を緑に染める SYTO9 とタンパク質を緑に染める FITC (Fluoresceinisothiocyanate isomer-I) である。ファージの精製は PEG 法またはフィルターを用いて行い、ファージ染色の条件検討に合わせて精製方法についても同様に条件検討を行った。

高栄養培地で SP10 耐性を持たない枯草菌 RM125 株と SP10 耐性をもつ枯草菌 3610 株を静置培養すると気液海面にペリクルバイオフィームを形成する。このペリクルバイオフィームを用いて SP10 感染がバイオフィームに与える影響を観察した。

詳しい方法と結果は、発表会の場で報告する。

(参考文献)

- 1) Page R, Peti W. (2016) Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nature Chemical Biology*.
- 2) Short F.L., Akusobi C., Broadhurst W.R., Salmond G.P.C. (2018) The bacterial type iii toxin-antitoxin system, toxin, is a dynamic protein-rna complex with stability-dependent antiviral abortive infection activity. *Sci. Rep.*
- 3) Yamamoto T, et al. (2014) SP10 infectivity is aborted after bacteriophage SP10 infection induces *nonA* transcription on the prophage SPbeta region of the *Bacillus subtilis* genome. *J. Bacteriol.*