

平成21年3月31日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19810025

研究課題名（和文）コネクターを介する細菌病原性調節ネットワークの全容解明

研究課題名（英文）Elucidation of connector-mediated regulatory networks controlling bacterial virulence.

研究代表者 加藤明宣（KATO AKINORI）

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：00454645

## 研究成果の概要：

二成分制御系は、多くの感染性細菌において病原性調節に深く関わっている。最近、二成分制御系間の高度調節様式として、ネットワーク調節機構の存在が明らかとなって来た。本研究では、二成分制御系を繋ぐ因子コネクターの同定とその役割についての解析が行われた。これまでに、サルモネラにおいて、コネクター様因子のCacA、PacAが単離され、その機能解析が進行中である。また、コネクターPmrDを含む分子ネットワークデザインの進化的定量解析に関する研究成果、及び、大腸菌の新規膜コネクターB1500の同定と機能解析の研究成果をそれぞれ、米国科学アカデミー紀要（計2報）に発表した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：ネットワーク、シグナル伝達、ゲノム、細菌、感染症、two-component system、connector、ペプチドドラッグ

## 1. 研究開始当初の背景

細菌情報伝達機構の二成分制御系は、多くの感染性細菌において、病原性調節に深く関わっている。二成分制御系は細胞外刺激に応答するセンサーとDNA結合因子のレギュレーターから成り、センサーが刺激を受けると、レギュレーターがリン酸化され、ターゲット遺伝子を活性化する。二成分制御系の研究はこれまで、個別の調節系において詳細な解析が行われて来たが、病原性調節研究や、最近のゲノムレベルでの網羅的トランスクリプトーム解析は、二成分制御系のより高度な調節様式として、ネットワーク調節機構の存在を浮かび上がらせている。二成分制御系間のネットワーク調節に関わるスモール・タンパク質、コネクターの同定、機能解析は世界的に注目され、細菌情報伝達研究の最重要課題の一つであるにもかかわらず、研究代表者らが同定したPmrD (図1) を含め、その分子機

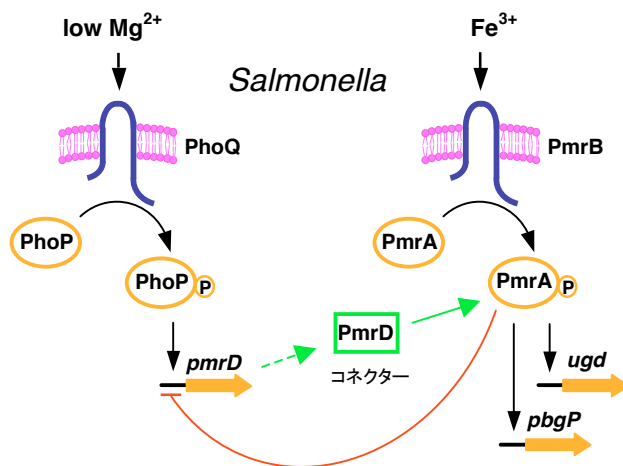


図1 サルモネラにおけるポリミキシンB 抵抗性遺伝子調節の情報伝達ネットワーク

構が明らかとなっているものは当初2例に過ぎなかった。更なるコネクターの同定とその機能解析は、情報伝達ネットワークの全容や病原性細菌の生理調節機構を明らかとするだけでなく、二成分制御系を標的にした新規薬剤開発に新たな方法論（コネクター由来のペプチドドラッグ開発、コネクター様アンタゴニストの開発）を齎すものと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、動物、植物における病原性細菌、サルモネラ (*Salmonella typhimurium*) と、軟腐病菌 (*Erwinia carotovora*) において、細菌の情報伝達ネットワークの全容解明に向け、スモール・タンパク質因子 (コネクター) の同定を網羅的に行う。コネクターは細菌の情報伝達ネットワークにおける構成単位の二成分制御系間を繋ぐ因子として注目を集めているが、タンパク質の塩基配列からコネクターを予測することが難しく、その分子機構が明らかとなっているものも数少ない。これらの病原性細菌において、全二成分制御系に対応したコネクターを網羅的に同定し、その作用機構解明、コネクター由来病原性調整ペプチドの開発に役立てる。

## 3. 研究の方法

### (1) 二成分制御系を活性化させる未知コネクター因子のスクリーニング系の構築

二成分制御系が調節する各ターゲット遺伝子の下流にレポーター遺伝子の *lacZ* 遺伝子を融合させたレポーター株を構築することで、系のON/OFF状態を簡単にプレート上で判別でレポーター株を作成する。

### (2) 複数の新規コネクターの同定

上記のレポーター株に、染色体DNA断片をランダムにクローニングした高コピープラスミドライブラリーを形質転換させることで、極端に *lacZ* 発現が上昇するようになった、クローンを単利し、コネクターを同定する。

### (3) コネクター由来病原性調整ペプチドの開発をめざして

コネクターを細胞外から添加し、標的の二成分制御系に作用させるために適切なタグを検討する。

## 4. 研究成果

サルモネラにおいて、雛形となる遺伝学的操作手法を確立し、個々の二成分制御系 (約30対) の潜在的コネクターに対応したレポーター株 (*lacZ* 融合株) の概ね90%を構築した。また、これらの株を用いて、染色体ライブラリーからコネクターを濃縮し、同定する

操作法を確立した。このシステムティックなスクリーニングにより、サルモネラから複数のコネクター様因子が単離され、それらの機能解析を行っている。また、コネクターの系統的機能解析を行うため、サルモネラゲノムにコードされる二成分制御系のレスポンスレギュレーターの概ね90%について欠損株の作成を行った。

上記のスクリーニングから、二成分制御系CpxA/CpxRを活性化する新規調節因子CacAを含むpWN1が単離され(図2)、CpxR依存的cpxP遺伝子の活性化が確認された(図3)。さらに、二成分制御系PhoP/PhoQを活性化する新規調節因子PacAが単離され、PhoP依存的mgfA遺伝子の活性化が確認されている。これらの研究成果は、近く公表される。

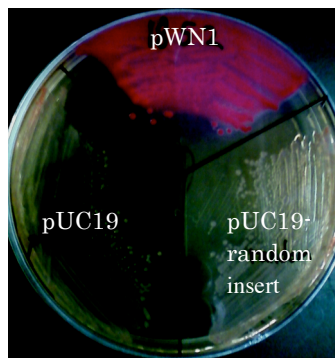


図2. cpxP遺伝子を活性化するpWN1の単離

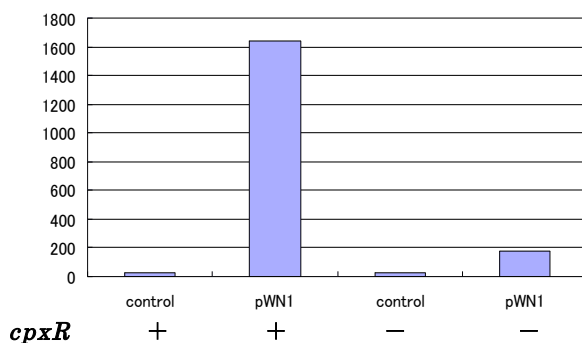


図3. pWN1によるcpxP遺伝子の活性化  
( $\beta$ -galactosidase activity)

つぎに、コネクターPmrDを含む分子ネットワークデザインの進化的定量解析に関する研究成果を米国科学アカデミー紀要(PNAS)に発表した。サルモネラにおいて、二成分制御

系PhoP/PhoQによって発現誘導されたPmrDは二成分制御系PmrA/PmrBを活性化し、抗菌ペプチドに抵抗性を示す。近縁種に見つかったコネクターを含まないネットワークデザインを、サルモネラにおいて実験的に再構築・比較定量することで、コネクターを介するデザインの生物学的特徴を見いだした。

また、共同研究の成果として、大腸菌において二成分制御系EvgA/EvgSと二成分制御系PhoP/PhoQ間で働く新規膜コネクターB1500の同定と機能解析を行った。EvgA/EvgSの活性化で発現したB1500は、センサーPhoQと膜上で相互作用し、PhoPを活性化することが明らかとなった。この成果は、米国科学アカデミー紀要(PNAS)に発表された。このコネクター因子はサルモネラの病原性マスターレギュレーターPhoP/PhoQの制御に利用できることから、今後の詳細な解析が期待される。

さらに、コネクターを利用した融合型ペプチドドラッグの開発に向けて基礎的データを得た。細菌細胞内で発現させて溶菌を誘導する融合コネクターペプチドPmrD-Mを得た。また、これをリードペプチドとして高機能誘導体に磨き上げる課程として、進化工学的最適化技術の開発が行われた。(PmrD-M融合体発現プラスミド/野生型PmrD発現プラスミド)混合ライブラリーから進化工学的サイクルを3サイクル繰り返した結果、PmrD-M融合体発現プラスミドが顕著に(600倍以上)濃縮された。これらの研究成果は、近く公表される。

## 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)

1. Kato A, Mitrophanov AV, Groisman EA. A connector of two-component regulatory system promotes signal amplification and persistence of expression.

*Proc Natl Acad Sci U S A*.

104:12063-12068, (2007). 査読有り

2. Eguchi Y, Ito J, Yamane M, Demizu R, Yamato F, Okada A, Mori H, Kato A, Utsumi R.

B1500, a small membrane protein, connecting EvgA/EvgS and PhoP/PhoQ two-component systems of *Escherichia coli*. ***Proc Natl Acad Sci U S A.*** 104:18712-18717, (2007). 査読有り

〔学会発表〕(計 5件)

1. 加藤明宣、Groisman EA  
分子ネットワークデザインの進化的定量解析  
日本分子生物学会 2007年12月11日 横浜

2. 加藤明宣、Groisman EA  
ゲノムネットワークデザインの進化的比較  
定量解析  
日本ゲノム微生物学会 2008年3月8日 大阪

3. 加藤明宣、Groisman EA  
ゲノムネットワークデザインの進化的定量  
解析  
日本農芸化学会 2008年3月27日 名古屋

4. 江口陽子、山根昌丈、加藤明宣、内海龍太郎  
大腸菌二成分制御系間をつなぐ small protein,  
B1500 の機能解析  
日本農芸化学会 2008年3月28日 名古屋

5. 渡邊崇史、五十嵐雅之、加藤明宣、内海龍太郎  
軟腐病菌MAFF301393 株由来二成分制御系の  
単離とその情報伝達阻害剤の探索  
日本分子生物学学会 2008年12月9日  
神戸

〔図書〕(計 1件)

1. Kato A, Groisman EA.  
The PhoQ/PhoP regulatory network of  
*Salmonella enterica*. “Bacterial signal  
transduction: networks and drug targets.”  
Adv Exp Med Biol. 631:7-21, (2008).

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
加藤明宣 (KATO AKINORI)  
近畿大学・農学部・講師  
研究者番号 : 00454645

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者