

令和元年5月31日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06922

研究課題名(和文) バクテリア縮小ゲノムシステムを利用した増殖、生存機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of growth and survival mechanism using bacterial reduced genome system

研究代表者

加藤 潤一 (Kato, Jun-ichi)

首都大学東京・理学研究科・教授

研究者番号：10194820

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)：大腸菌をモデルとして生命システムの増殖、生存に重要な基本的なメカニズムを解明することを目的に、残された機能未知必須遺伝子の解析および野生株では研究が難しい潜在的必須遺伝子の解析をゲノム縮小株および染色体広域欠失変異株を利用して行った。機能未知必須遺伝子yqgFの解析を行なった結果、16S rRNAのプロセシングに働いていることが明らかになり、16S rRNAのプロセシングがリボソームの形成過程の最後に不活性型から活性型に変換するスイッチとして機能する可能性を示した。またDNA修復、酸化ストレス耐性に関して新規遺伝子の同定に成功し増殖、生存に重要な新規システムを同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年大腸菌などのモデル生物を用いて必須遺伝子、最小必須遺伝子群の同定が進み、それらの機能については、本研究により最後の機能未知必須遺伝子の機能が解明され、大腸菌の全必須遺伝子の機能が明らかになった。また潜在的な必須遺伝子群の同定については、本研究によりゲノム縮小株などを利用することで新規遺伝子群を同定することができることが示された。大腸菌の研究が発端となって発見されたバクテリアの免疫機構であるCRISPRが高等生物のゲノム編集に応用されたように、大腸菌など一つの生物を徹底的に調べることにより生命システムの理解が進み、また新規システムの発見、応用面への発展につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate basic mechanisms for growth and survival of life systems, using *E. coli* as a model system, we carried out functional analyses of uncharacterized essential genes and cryptic essential genes, which are difficult to identify with wild-type strains, using reduced genome strains and large scale deletion mutations. Analysis of the uncharacterized essential gene yqgF revealed that it is essential for 16S rRNA processing, and it functions as a switch that converts inactive-form of ribosome to active-form at the end of the ribosome assembly. In addition, we succeeded in identifying novel genes for DNA repair and oxidative stress resistance and then new systems important for proliferation and survival.

研究分野：微生物遺伝学

キーワード：16S rRNAプロセシング 必須遺伝子 ゲノム縮小株

4. 研究成果

(1) 最後の機能未知必須遺伝子 *yqgF* の機能解析

機能未知必須遺伝子 *yqgF* の機能については、*yqgF* 温度感受性変異株 (*yqgFts* 株) を作製して調べることにより、転写終結に欠損があることを明らかにしていた (文献6)。転写終結には翻訳、特にリボソームが重要であることから、リボソームに注目して解析を進めた結果、*yqgFts* 株では非許容温度でリボソーム RNA (rRNA) の 16S rRNA の前駆体 (pre-16S rRNA) が蓄積することがわかり、リボソーム RNA のプロセッシングに関与することが明らかになった。大腸菌の rRNA (16S、23S、5S) は一つの rRNA 前駆体から種々のプロセッシングを経て作られるが、*yqgFts* 株で蓄積した pre-16S rRNA には 16S rRNA の 5' 末端側がプロセッシングされていないものであることが RACE 法により示された。また *yqgFts* 株から精製した pre-16S rRNA を含むリボソームを基質にした時に、精製した YqgF タンパク質 (YqgF) によるプロセッシングが *in vitro* で見られたことから、*yqgF* は 16S rRNA の 5' 末端側のプロセッシングを行なっていることがわかった。

プロセッシングされる位置と量を詳細に調べるため、primer extension 法により定量的な解析を行った。その結果、YqgF は pre-16S rRNA の 5' 末端側のほぼ 16S rRNA の末端にあたる部分をプロセッシングすることが明らかとなった。

また他の RNase との関係性を明らかにするために、16S rRNA の 5' 側は 3 種の RNase (RNase III, RNase G, RNase E) によって段階的にプロセッシングされるとの報告が既にあったので、これらの RNase との関係性について調べた結果、生育に必須な RNase E を除く、RNase III, RNase G の欠失変異によっては YqgF によるプロセッシングや *yqgFts* 株の生育には影響が見られず、YqgF はこれらの RNase 非依存的に機能することが明らかになった (文献7)。

さらに RNA のみを基質にした活性を調べたところ、Mn²⁺イオン依存的な RNase 活性が同定され、YqgF が RNase であることが明らかになった。

YqgF の生物学的機能を明らかにするために *yqgFts* 株のプロテオーム解析を行い、コード領域中に SD 様配列を持つ遺伝子から作られるタンパク質の量が少ない傾向にあることを見出した。また *yqgFts* 株のリボソームについてプロテオーム解析を行ったところ、S1 サブユニットが減少していることが明らかになった (文献8)。

以上の結果から、YqgF はリボソーム形成において pre-16S rRNA の 5' 末端側をプロセッシングすることにより、リボソームを活性型へ変換することに働いていると考えられた (図3)。

(2) 潜在的な必須遺伝子群の同定、解析

ゲノム縮小株を利用して合成致死遺伝子群を同定するために、野生株には導入できるが染色体大規模欠失株には導入できない染色体広域欠失変異の解析を進め、DNA 修復に関与する DNase をコードする *nfo*, *xthA*, *uvrCY* 遺伝子の欠損と一つの染色体広域欠失変異の4つが組合わさることによって引き起こされる合成致死を同定した。さらに *nfo* または *xthA* 遺伝子をクローニングした複製が高温感受性のミニ F プラスミドの存在下で、合成致死を引き起こす4つの欠失変異を導入した生育が高温感受性の変異株を作成し、この株に染色体ライブラリーを導入して、高温でも生育できる株を単離することで、関連遺伝子の探索を行なった。その結果、DNA polymerase III の χ サブユニットをコードする *ho1C* 遺伝子と機能未知遺伝子 *yoaA* が多コピーサプレッサーとして同定した (図4)。

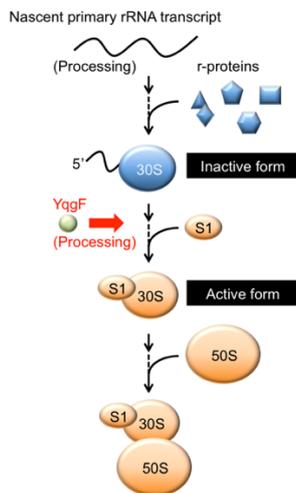


図3 YqgF タンパク質によるリボソームの活性化

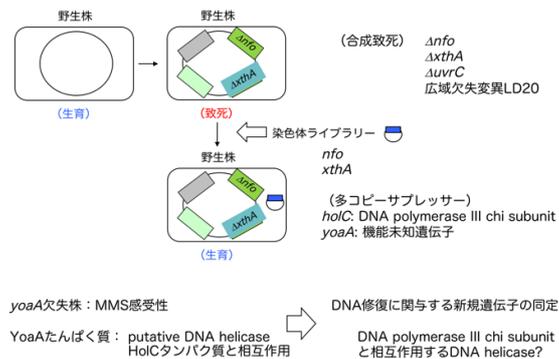


図4 新規 DNA 修復関連遺伝子 *yoaA* の同定

DNA修復に関する新規遺伝子の同定
DNA polymerase III chi subunit と相互作用するDNA helicase?

yoaA 遺伝子の機能を明らかにするために、*yoaA* 遺伝子の欠失変異を作製して調べたところ、*xthA* 欠失変異株と *xthA, yoaA* 二重欠失変異株を比較した時に、*xthA, yoaA* 二重欠失変異株の方が、DNA に損傷を与えるメチルメタンスルホン酸(MMS)に対してより感受性になっていることがわかり、*yoaA* 遺伝子は DNA 修復に働いていることが明らかになった。*yoaA* 遺伝子がコードするタンパク質は、アミノ酸配列から DNA helicase として機能することが推測されており、また DNA polymerase III の χ サブユニットと相互作用することがわかっているため、DNA polymerase III の χ サブユニットが、単独で YoaA タンパク質と複合体を形成し、DNA helicase として DNA 複製に働いている可能性が考えられた (文献 9)。

(3) 酸化ストレス耐性に関与する遺伝子群の同定、解析

定常期のリン酸飢餓における生存は、酸化ストレス耐性と関連することが示唆されていたが具体的な機構については明らかになっていなかった。そこでリン酸飢餓により発現が誘導される遺伝子群の中で、酸化ストレスによって発現が著しく誘導される機能未知遺伝子 *ytfK* に注目し、その破壊株を作製して調べたところ、硝酸存在下で過酸化水素に感受性になり、またリン酸飢餓における生存にも関与することが分かった。細胞の過酸化水素分解活性を調べたところ、*ytfK* はカタラーゼ G による過酸化水素の除去に関与することがわかった。そこでカタラーゼ G の発現を調べる系を作製して調べたところ、*ytfK* はカタラーゼ G の転写調節に関与する因子であることが分かった。大腸菌ではリン酸飢餓によって酸化ストレスが発生することが知られており、*ytfK* はリン酸飢餓の時に働く酸化ストレス耐性機構の一つとして働くことが明らかになった (文献 10)。

定常期における酸化ストレス耐性機構に関与する遺伝子を網羅的に探索するために、数十 kb から数百 kb にわたる染色体の広域欠失変異を組み合わせて作製されたゲノム縮小株を用いた探索を行った。ゲノム縮小株群の活性酸素種を産生する Redox-cycling drug の一つであるメナジオンに対する感受性を調べることによって、メナジオン耐性に関わる染色体領域をいくつか同定し、その一つの染色体領域の解析から、セレノシステインの合成に必要な遺伝子である *selAB* が定常期におけるメナジオン耐性に関与することを明らかにした。そこで大腸菌で唯一セレノシステインを利用するギ酸脱水素酵素の遺伝子群について調べたところ、ギ酸脱水素酵素がメナジオン耐性に関与することが分かった。ギ酸脱水素酵素はグルコース代謝に関わる酵素群の中で唯一モリブデンコファクターを持ち、モリブデンコファクターの酵素への挿入には FdhD シャペロンが必須である。ところがギ酸脱水素酵素についての研究から、微好気条件では FdhD シャペロンを欠損した株でもギ酸脱水素酵素がメナジオン耐性に関与することがわかった。FdhD シャペロンを欠損した株ではギ酸脱水素酵素が検出されないこと、またギ酸脱水素酵素活性に必要なサブユニットの欠損株でもメナジオン耐性になることなどから、ギ酸脱水素活性とは別に、グルコースから生ずる還元力を処理することで活性酸素種の発生を抑えることによって酸化ストレス耐性に働くことが示唆された (図 5、文献 11)。

またゲノム縮小株の解析で同定されたもう一つの染色体領域から、メナジオン耐性に関与する遺伝子として機能未知の *aegA* を同定した。*aegA* とそのパラログの *ygfT* の遺伝子発現を調べたところ、両者とも好気条件下で発現量が低下することが分かった。*ygfT* 遺伝子は尿酸のトランスポーターの遺伝子の隣に位置することから、尿酸への応答を調べたところ *ygfT* 遺伝子は尿酸によって発現量が高くなることも分かった。そこで尿酸を培地に加えて定常期まで培養した時について調べたところ、*ygfT* 破壊株は Redox-cycling drug に感受性になることが分かった。そこで *aegA, ygfT* 変異株について、尿酸を単一窒素源とした時の生育について調べたところ、*aegA ygfT* 二重欠損株では尿酸依存的な増殖が見られず、またその時の培地中の尿酸の減少も認められないことがわかり、*aegA, ygfT* が尿酸分解に関与することがわかった。さらに機能的に関連する遺伝子群についての解析から、*aegA* および *ygfT* が関わる尿酸の分解には、ギ酸およびギ酸脱水素酵素 H が関与することも明らかになった (図 6、文献 12)。

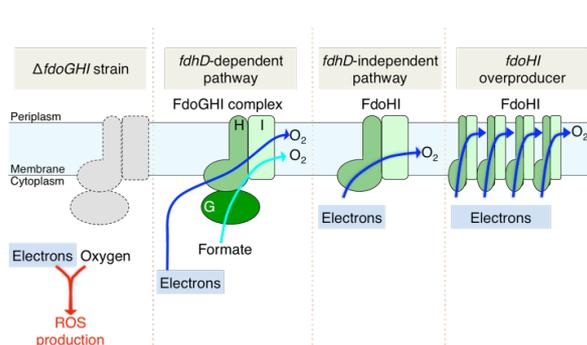


図 5 酸化ストレス耐性に関与するギ酸脱水素酵素

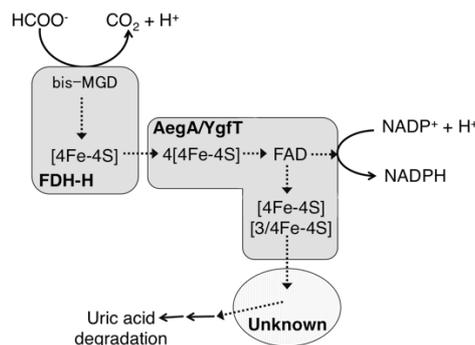


図 6 尿酸分解に関与する *aegA, ygfT*

これらの研究により今までよく知られている活性酸素種の処理に働く新規遺伝子に加えて、これまで解析が進んでいなかった活性酸素種の発生を抑える機構に關与する遺伝子群も同定され、酸化ストレス耐性機構の全体像の解明に向けて手がかりを得ることができた (図7)。

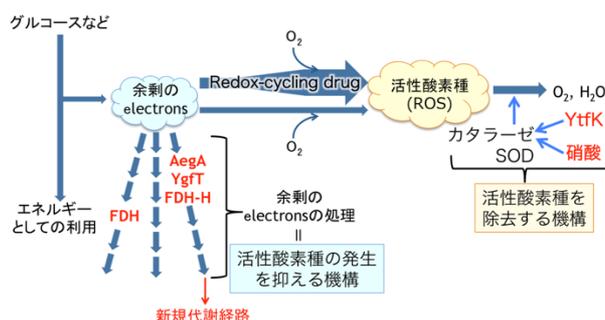


図7 広義の酸化ストレス耐性機構

<引用文献>

1. Kato, J. and Hashimoto, M. (2007) Construction of consecutive deletions of the Escherichia coli chromosome. *Mol. Syst. Biol.* 3: Article number 132
2. Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S., and Suzuki, H. (1990). New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* 63: 393-404.
3. Kato, J. and Katayama, T. (2001) Hda, a novel DnaA-related protein, regulates the replication cycle in *Escherichia coli*. *EMBO Journal* 20: 4253-4262.
4. Hashimoto, M., Ichimura, T., Mizoguchi, H., Tanaka, K., Fujimitsu, K., Keyamura, K., Ote, T., Yamakawa, T., Yamazaki, Y., Mori, H., Katayama, T. and Kato, J. (2005) Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *Mol. Microbiol.* 55: 137-149.
5. Iwadate, Y., Honda, H., Sato, H., Hashimoto, M. and Kato, J. (2011) Oxidative stress sensitivity of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *FEMS Microbiology Letter.* 322: 25-33.
6. Iwamoto, A., Osawa, A., Kawai, M., Honda, H., Yoshida, S., Furuya, N., and Kato, J. (2012) Mutations in the essential *Escherichia coli* gene, *yqgF*, and their effects on transcription. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 22: 17-23.
7. Kurata, T., Nakanishi, S., Hashimoto, M., Taoka, M., Yamazaki, Y., Isobe, T., and Kato, J. (2015) Novel essential gene involved in 16S rRNA processing in *Escherichia coli*. *J Mol. Biol.* 427: 955-965.
8. Kurata, T., Nakanishi, S., Hashimoto, M., Taoka, M., Isobe, T., and Kato, J. (2018) Subunit composition of ribosome in the *yqgF* mutant deficient in pre-16S rRNA processing of *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 28:179-182.
9. Watanabe, K., Tominaga, K., Kitamura, M., and Kato, J. (2016) Systematic identification of synthetic lethal mutations with reduced-genome *Escherichia coli*: synthetic genetic interactions among *yoaA*, *xthA* and *holC* related to survival from MMS exposure. *Genes Genet. Syst.* 91: 183-188.
10. Iwadate, Y., Funabasama, N. and Kato, J. (2017) Involvement of formate dehydrogenases in stationary phase oxidative stress tolerance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letter.* 364(20). doi: 10.1093/femsle/fnx193.
11. Iwadate, Y. and Kato, J. (2017) Involvement of the *ytfK* gene from the *PhoB* regulon in stationary-phase H2O2 stress tolerance in *Escherichia coli*. *Microbiology.* 163: 1912-1923.
12. Iwadate, Y. and Kato, J. (2019) Identification of a Formate-Dependent Uric Acid Degradation Pathway in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 201: e00573-18.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

1. Watanabe, K., Tominaga, K., Kitamura, M., and Kato, J. (2016) Systematic identification of synthetic lethal mutations with reduced-genome *Escherichia coli*: synthetic genetic interactions among *yoaA*, *xthA* and *holC* related to survival from MMS exposure. *Genes Genet. Syst.* 91: 183-188.
2. Iwadate, Y., Funabasama, N. and Kato, J. (2017) Involvement of formate dehydrogenases in stationary phase oxidative stress tolerance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letter.* 364(20). doi: 10.1093/femsle/fnx193.

3. Iwadate, Y. and Kato, J. (2017) Involvement of the ytfK gene from the PhoB regulon in stationary-phase H2O2 stress tolerance in Escherichia coli. Microbiology. 163: 1912-1923.
4. Kurata, T., Nakanishi, S., Hashimoto, M., Taoka, M., Isobe, T., and Kato, J. (2018) Subunit composition of ribosome in the yqgF mutant deficient in pre-16S rRNA processing of Escherichia coli. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 28:179-182.
5. Iwadate, Y. and Kato, J. (2019) Identification of a Formate-Dependent Uric Acid Degradation Pathway in Escherichia coli. J. Bacteriol. 201: e00573-18.

〔学会発表〕（計10件）

1. 富永賢人、橋本昌之、萩原進、高木光、加藤潤一（2015）大腸菌の酸化ストレス耐性に関する ibs-sib Toxin-Antitoxin システムの解析. 第 38 回日本分子生物学会年会（神戸）.
2. 渡邊圭佑、富永賢人、北村麻衣子、加藤潤一（2015）大腸菌の染色体大規模欠失株を用いた合成致死遺伝子群の解析から同定された DNA 修復に関与する新規機能未知遺伝子の解析. 第 38 回日本分子生物学会年会（神戸）.
3. 倉田竜明、加藤潤一（2016）YqgF による 16S rRNA のプロセシングの生理的意義の解析. 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会（東京）.
4. 岩館佑未、船迫紀之、加藤潤一（2016）大腸菌ゲノム縮小株群を用いた酸化ストレス耐性に関与する遺伝子群の解析. 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会（東京）.
5. 富永賢人、橋本昌之、萩原進、高木光、加藤潤一（2016）大腸菌の酸化ストレス耐性に関する ibs-sib Toxin-Antitoxin システムの解析. 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会（東京）.
6. 渡邊圭佑、富永賢人、北村麻衣子、加藤潤一（2016）大腸菌の染色体大規模欠失株を用いた合成致死遺伝子群の解析から同定された DNA 修復に関与する新規機能未知遺伝子の解析. 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会（東京）.
7. 岩館佑未、植木晃弘、加藤潤一（2017）大腸菌の定常期における過酸化水素耐性に関与する PhoB レギュロンの機能未知遺伝子 ytfK. 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会（神奈川）
8. 岩館佑未、植木晃弘、原田京香、船迫紀之、加藤潤一（2018）大腸菌の定常期における酸化ストレス耐性に関与する遺伝子群の遺伝学的解析. 第 12 回日本ゲノム微生物学会年会（京都）
9. 加藤潤一（2018）大腸菌のゲノム縮小株、染色体広域欠失変異を利用した機能未知遺伝子群の解析. 第 17 回 微生物研究会「微生物分子生物学のフロンティア」（東京）、2018 年 11 月
10. 岩館佑未、加藤潤一（2019）大腸菌におけるギ酸依存的な尿酸分解に関与する遺伝子群の同定. 第 13 回日本ゲノム微生物学会年会（東京）、2019 年 3 月

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/>

<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/lab0.asp?ID=molgen>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。