

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14688

研究課題名(和文)バクテリアのコロニー形成を促進する遺伝子群の研究

研究課題名(英文)Study on the genes that promote bacterial colony formation

研究代表者

正木 春彦 (Masaki, Haruhiko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：50134515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌が低温飢餓に曝されると、生存活性はありながらコロニー形成が大きく低下するVBNC状態に陥る。これは自然界で細菌がコロニー形成しにくいモデルとされる。VBNC状態ではコロニー形成に重要な遺伝子機能が減衰していると考え、発現を強化してコロニー形成頻度の低下が抑制される遺伝子を探索してcpdAを見つけ、cAMP-CRPが低温飢餓に対しコロニー形成を積極的に低下させる因子であることを発見した。cAMP-CRPの調節を受けてコロニー形成を支配している遺伝子をRNA-seqで探索したが、cAMP-CRPの影響で発現が変化する遺伝子が非常に多数あるため、現時点で目的の遺伝子は得られていない。

研究成果の概要(英文)：On exposure to cold starvation, Escherichia coli falls into a viable but non-culturable state, where colony formation is lost in spite of retaining signs of viability. We hypothesized that, during cold starvation, specific gene expressions important for colony formation are diminished and that boosting such gene functions would restrain cells from falling into the low-colony state. From the ASKA library containing all E. coli ORFs, we screened such genes restoring the diminished functions. When seven such candidate clones are put in competition in the ability to survive against cold starvation, the winner was cpdA, encoding cAMP phosphodiesterase, suggesting that cAMP is a negative regulator in colony formation. In fact, cyaA or crp mutants kept high colony formation for 30 days in starvation. Assuming that a critical gene determining colony formation is under the control of cAMP-CRP, we are seeking it by RNA-seq, though too many genes change their expressions in response to cAMP-CRP.

研究分野：微生物学、分子生物学

キーワード：cAMP CRP CyaA コロニー RpoS 飢餓ストレス VBNC RNA-seq

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) バクテリアの極めて低いコロニー形成能

R.Koch 以来、バクテリアの研究や利用は、単一のコロニーを分離して始まる(純粋培養法)。しかしバクテリアは、遺伝子から見た生物多様性の最も豊富なドメインでありながら、自然界に生きているうちの極めてわずかしかなコロニーを作れないことが明らかとなり、その多くは分離・培養が難しい。通常それは適切な培養条件が判らないためだと解釈されており、なぜコロニーを作らないかという、遺伝学的あるいは生物学的な研究はほとんどなされてこなかった。

### (2) コロニー形成能を欠く変異からの研究

私は、自然の状態でバクテリアのコロニー形成能が低い現象を、特定の遺伝子に原因のある普遍的な生物現象だと捉え、大腸菌から(液体培養はできるが)コロニー形成できなくなった温度感受性変異株を分離した。変異は脂肪酸合成遺伝子 *fabB* にあり、改めて野生株から  $\Delta fabB$  欠失株を作製してその挙動を調べ、脂肪酸の供給がコロニー形成に関わることを発見した(H24-H27 科研費基盤(B) 課題番号 24380044)。

本研究では、上記のコロニー欠損変異体の分離によってコロニー形成に必要な遺伝子を同定するのは逆のアプローチから、コロニー形成に重要な遺伝子を集積、取得してコロニー形成の遺伝子関与を明らかにしようとしたものである。

## 2. 研究の目的

一般に、バクテリアが生きていることはコロニー形成能で定義されてきた。しかし近年、環境中ではコロニーを作らないバクテリアが大多数であることが認識され、コロニー形成とは、生きている以上のどういう特別な生命現象なのかを明らかにする必要性が生じた。コロニーを作りやすい大腸菌でも、低温飢餓に曝すと、生存活性は保ちながらコロニー形成能の低下した Viable But Non-Culturable な状態に陥る。この VBNC 状態は環境中バクテリアのモデルとみなされている。

本研究では、VBNC 状態をコロニー形成に必要な遺伝子機能が減衰した状態だと捉え、発現強化により VBNC 状態を回避してコロニー形成頻度を高く保つような遺伝子を網羅的に分離して、コロニー形成にとって重要な遺伝子群の働きを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

大腸菌の全 4123 遺伝子をプラスミド上に余分に 1 つずつ持つ ASKA クローンライブラリーを、任意に 8 グループに分割して、各グループの 500 以上のクローンを混合培養し、洗菌後に低温飢餓に曝して VBNC 化させて、寒天培地にまくと経日的にコロニー形成数 cfu が減少していくが、もし余分に発現させ

たプラスミド上の遺伝子がコロニー形成能を高く保つのに有効であれば、そのクローンが出現コロニーの中で優占種となっていくはずである。

各グループで、優占的に残った一次候補クローンを分離する。それら候補株を等量混合した上で、VBNC 化させることで改めて生き残りの競争をさせ、生じたコロニー中での優占度に従って、コロニー形成能を高く保つ能力の高い遺伝子群を選び出す。

各遺伝子の発現と、VBNC 化に抗する活性(低温飢餓に曝した時にコロニー形成率が対照よりも高いこと)でみたコロニー形成保持能との関係を確認し、遺伝子産物の生化学的機能との関係を調べて、どういう遺伝子がどういう仕組みでコロニー形成能保持に寄与しているかを明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) VBNC 化に抗する活性のある一次候補

大腸菌の ASKA クローンを 8 グループに分け、それぞれの混合培養液を VBNC 化して、各グループの出現コロニー中で優占種となるクローンを探した。有意に優占種を生じないグループもあったが、各グループ内での優占度を確認して、VBNC 化に抗する能力のある候補を 7 株選んだ。定常期やストレス時の転写を支配する  $\sigma$  因子 RpoS は低温飢餓での生存に必要という既報があるが、今回得られた 7 株には確かに *rpoS* クローンが含まれていたため、当初の目的にかなったクローンが取得されていると思われた。

候補 7 株にベクタープラスミドを持つ対照株を含めた 8 株を、ほぼ等量ずつ混合して培養し、洗菌後、低温飢餓に曝し、経日的にコロニー形成させて、出現コロニー中での 8 株の存在比を PCR で追跡したところ、対照株だけが速やかに集団から脱落した。残り 7 候補株による競争では、*cpdA* を持つクローンが再現性よく最優占となった。

### (2) cAMP-CRP はコロニー形成の負の因子

CpdA は cAMP phosphodiesterase として cAMP を分解するので、cAMP がない方がコロニー頻度は高いのか?そこで野生株から、cAMP 合成酵素子 *CyaA* を欠く変異株と cAMP 受容タンパク質 CRP を欠く変異株を作製して VBNC 化に対する挙動を調べたところ、この 2 種の変異株とも、低温飢餓に曝して 30 日以上 cfu が低下しなかった。さらに cAMP を添加して培養した後に低温飢餓に曝した  $\Delta cyaA$  株は、野生株のように cfu が低下した。即ち cAMP-CRP はコロニー形成能を失わせる因子であった。

### (3) 仮説モデルの変更

想定は: 低温飢餓により「コロニー形成に必要な遺伝子機能が失われていく」時に、その遺伝子発現を補って生き残ったコロニーから当該遺伝子を分離・同定する、であった。

予想通り *rpoS* のようにストレス応答に必要な遺伝子が候補として分離されたが、その一方で、一般に糖利用や生育の可塑性に必要なと思われる cAMP-CRP がコロニー形成を抑制することが判り、それを作る *cyaA* や *crp* という一般に重要だと思われる遺伝子を欠失している方がよく生き延びるといふ逆の結果も得た。これをどう解釈したらよいのか？

新しい仮説として、個々の細胞がコロニーを形成するには一定以上のある種のエネルギーが必要で、低温飢餓でエネルギーがなくなるとコロニーは作れなくなっていくが、その一方で、飢餓に曝されると、最終的な生存を確実にするため積極的にコロニー形成という負荷を遮断する未知の機構が存在していて、cAMP-CRP はそのためのシグナルになっているのではないかと考えられる。ただし、コロニー形成を遮断した細胞が最終的に有利に生き残ることはどこかで証明しなければならない。

(4) cAMP-CRP が制御する、コロニー形成能を支配する遺伝子の探索：

当初の目的から発展して、cAMP-CRP がコロニー形成の負の因子となっているという新発見の具体的な機構を明らかにしたい。cAMP-CRP が転写因子として働くなら、その標的タンパク質は何か？その場合、以下の2つのケースが考えられる：

標的タンパク質 X はコロニー形成頻度を上げる (VBNC 化を抑制する) 分子であり、cAMP-CRP はその遺伝子 X の転写を抑制する。

標的タンパク質 Y はコロニー形成頻度を下げる (VBNC 化を促進する) 分子であり、cAMP-CRP はその遺伝子 Y の転写を促進する。

cAMP に応じて大きく転写を変化させる遺伝子の中から、標的遺伝子 X 或いは Y が何であるかを求めるため、RNA-seq 解析を行った。cAMP の有無で転写量が変化する遺伝子は非常に多い (図 1)。 $\Delta cyaA$  株でも、cAMP を添加培養したのち低温飢餓に曝すと、その VBNC 応答 (コロニー形成頻度の低下) は野生型に似てくるが、それは比較的高濃度の cAMP を添加した時に観察される、という条件で絞り込みをして、X の候補として 15 個、Y の候補として 5 つの遺伝子に注目した。

X, Y が cAMP の下流で働くコロニー形成のマスター遺伝子だとすると、VBNC 処理したため高い cfu を示す  $\Delta crp$  株において、

更に X 遺伝子を欠失させるとその  $\Delta crp \Delta geneX$  株は、 $\Delta crp$  株とは異なり cfu を落とすはず。あるいは

$\Delta crp$  株において、更に Y 遺伝子を過剰発現させるとその  $\Delta crp (+ Y gene)$  株は、 $\Delta crp$  株とは異なり cfu を落とすはず。

しかし、X の候補 15 個と Y の候補 5 つを含め、調べた約 30 個の遺伝子に該当する表

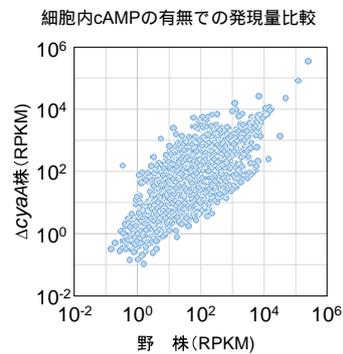


図 1 cAMP 欠失株と野生株での転写量の違い

現型を示したものはなかった。今後、求める遺伝子の候補をさらに幅を広げて、前述の 2 重欠失株から遺伝子 X の、あるいは高発現株から遺伝子 Y の表現型を示すものを探す必要がある。

なお、RNA-seq 実験は、東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの平成 28 年度前期共同研究課題として採用され、行ったものである。

(5) VBNC 応答における cAMP-CRP と *rpoS* との関係：

*rpoS* を過剰発現させた株では VBNC 処理により cfu が対照株より上昇する。ところで、cAMP は *rpoS* の転写を抑制することが知られている。従って  $\Delta cyaA$  株や  $\Delta crp$  株が VBNC 処理で高い cfu を示すのは、cAMP-CRP が機能していないため *rpoS* 発現が上昇したことが原因だという可能性があった。

しかし、 $\Delta crp \Delta rpoS$  二重破壊株を作製してその VBNC 応答を調べたところ、確かに  $\Delta crp$  株よりは cfu が低下したので、上記の *rpoS* 発現レベルの昂進を介する効果はあるものの、二重破壊株でもなお  $\Delta rpoS$  株よりかなり高い cfu を示した (図 2) ので、*rpoS* 発現を介さずに cAMP がコロニー形成能を低下させる未知の仕組みが、別に存在することが示唆された。

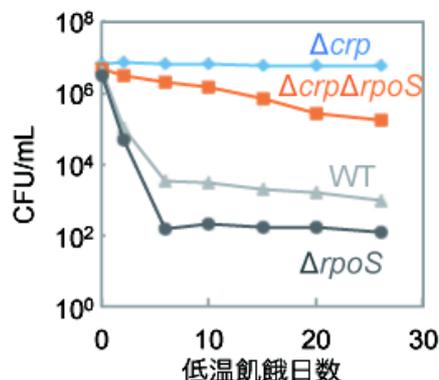


図 2 低温飢餓条件における野生株 WT,  $\Delta crp$  株、 $\Delta rpoS$  株、二重破壊株の示す cfu の比較

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 1件)

Sakai, F., Sugita, R., Chang, J.-W., Ogawa, T., Tumadori, N., Takahashi, K., Hidaka, M., Masaki, H.,  
Transfer-messenger RNA and SmpB mediate bacteriostasis in *Escherichia coli* cells against tRNA cleavage  
Microbiology, 査読あり、161, 2015, 2019-2028  
doi: 10.1099/mic.0.000144

〔学会発表〕(計 3件)

西尾優宏、浅井健宏、小川哲弘、日高真誠、正木春彦「低温飢餓に曝された大腸菌のコロニー形成の制御に関わる遺伝子の解析」日本農芸化学会 2017 年度大会 2017年3月18日「京都女子大学(京都市)」  
福嶋凡子、西尾優宏、高丸玲子、小川哲弘、日高真誠、正木春彦「低温飢餓条件下でのコロニー形成能の低下を抑える大腸菌遺伝子の解析」日本農芸化学会 2016 年度大会 2016年3月30日「札幌コンベンションセンター(札幌市)」  
正木春彦「大腸菌のコロニー形成能における遺伝子関与」日本微生物生態学会第30回土浦大会 2015年10月20日「亀城プラザ(茨城県土浦市)」(招待講演)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

正木 春彦(MASAKI, Haruhiko)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：50134515

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )