

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07711

研究課題名（和文）希少放線菌が形成する遊走子の運動停止メカニズムの解明

研究課題名（英文）Study on the mechanism of migration termination in *Actinoplanes missouriensis* zoospores

研究代表者

手塚 武揚（Tezuka, Takeaki）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：80646414

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* が形成する遊走子を材料として、べん毛の回転運動により水中を高速で移動する細菌細胞が周辺環境の変化を感知して運動を停止する分子機構の解明を目指した。遊走子の運動停止に必須であることが判明していたタンパク質 FtgA がべん毛基部を構成するタンパク質 FliG、FliN、FliI に結合することを示唆した。また、FtgA による運動停止が遊走子が有する走化性の発揮に必要となる可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は細菌が形成する遊走子の運動停止機構を解明することで、微小な細菌細胞が周辺環境の変化に対して応答する分子機構の解明を目指した。べん毛の回転による運動性を示す細菌は多く知られているものの、その運動停止の分子機構が解明された例は非常に少ない。本研究では、希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* が形成する遊走子において FtgA タンパク質がべん毛基部を構成するタンパク質に結合することでべん毛の回転運動を停止させる分子ブレーキとして機能することを示唆した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the molecular mechanism of the migration termination in the rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis* zoospores, which swim in aquatic environments at high speed by means of flagella. We showed that FtgA, which is a protein essential for the migration termination, directly binds to FliG, FliN, and FliI, which are the components of the flagellar basal body. In addition, we suggested that FtgA is required for the chemotactic property of the zoospores.

研究分野：応用微生物学

キーワード：希少放線菌 遊走子 環境応答 べん毛 走化性

1. 研究開始当初の背景

(1) 原核生物の中にはべん毛を利用した運動能を持つものがあり、走化性と併用することで誘引物質や忌避物質の濃度勾配を感知し、生存に適した環境へ能動的に移動することは多様な微生物が共存し栄養の乏しい状態が時間的にも空間的にも大部分を占めると考えられる自然環境において非常に重要な生存戦略である。原核生物のべん毛運動についてはモデル生物であるサルモネラ菌を材料として多くの先行研究が行われて来たが、運動能を持つ細菌細胞が外界の環境変化を感知して能動的にべん毛運動を停止させる機構についてはごく少数の先駆的な研究例が報告されているものの、おおくの運動性細菌において未解明なまま現在に至っている。

(2) 研究代表者が研究を進めている研究室では、希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* を材料として実験を行っている。本菌は培地中に基底菌糸を張り巡らせて栄養増殖を行うが、栄養源が枯渇した条件になると短い孢子嚢柄に支えられた孢子嚢を空中に形成して休眠状態となる。孢子嚢の内部には多数の運動性孢子が形成されており、菌糸と比較して孢子嚢は高温や乾燥に高い耐性を示す。孢子嚢は外部環境が湿潤条件に変化すると開裂し、内部から多数の孢子を放出する。放出された孢子は10~30本程度のごく短いべん毛を持ち、べん毛の回転運動により水中を非常に高速で移動する。また、遊走子は走化性を示し、いくつかの糖類やアミノ酸に対して誘引される。孢子の運動は最長で数時間続くものの、栄養状態の適した環境に至ると運動を停止して発芽し、菌糸生長による栄養増殖を開始することから、周辺環境の変化を感知してべん毛の回転運動を能動的に停止させていると考えられる。

(3) これまでの研究により *A. missouriensis* のゲノム上に存在する走化性遺伝子クラスター中の機能未知遺伝子 *ftgA* を欠損させた変異株では、野生株の遊走子が運動を停止する栄養豊富な環境中において遊走子が運動を停止せず、孢子の発芽開始後もべん毛が回転運動し続けることが明らかになっていた。このことから、FtgA タンパク質は栄養豊富な環境において遊走子のべん毛運動を停止させる機能を有すると予想された。他の運動性細菌における先行研究においてべん毛の回転運動を停止させるタンパク質が複数同定されているが、FtgA はこれらのタンパク質を含めこれまでに機能が解明されたいずれのタンパク質とも有意な配列相同性を示さないことから、新規な作用機構を有するべん毛運動の停止因子であると考えられた。

2. 研究の目的

希少放線菌 *A. missouriensis* が形成する遊走子を材料として、運動能を持つ細菌細胞が外部環境の変化を感知してべん毛の回転運動を停止させる分子メカニズムの全容解明を研究の目的とした。具体的には、FtgA の標的タンパク質の同定と FtgA によるべん毛運動停止メカニズムの解明、FtgA の機能発現制御メカニズムの解明、の2点を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌を宿主として FtgA、FliG、FliN、FliI の組換えタンパク質を調製し、pull-down assay および Biacore を用いた表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析により相互作用解析を行った。

(2) qRT-PCR 法と S1 nuclease mapping 法による転写解析、および抗 FtgA 抗体を作製し、ウエスタンブロット解析により *ftgA* の発現時期を調べた。

4. 研究成果

(1) FtgA、FliG、FliN、FliI の組換えタンパク質を精製し、pull-down assay により FtgA-FliG、FtgA-FliN、FtgA-FliI 間の相互作用を示した。これらのタンパク質間の相互作用は過去に大腸菌を宿主とする two-hybrid assay により示しており、これを支持する結果と得た。

(2) Biacore (GE healthcare) を用いて FtgA-FliG および FtgA-FliN 間の相互作用強度の定量を試みたが再現性のある相互作用は検出されなかった。センサーチップとタンパク質との相互作用、またはタンパク質の安定性の低さが原因と予想しており、現在も解析を続けている。

(3) qRT-PCR 法による転写解析の結果、*ftgA* の転写は孢子嚢形成時および孢子嚢開裂時に活性化されていた。これは *ftgA* を含む走化性遺伝子クラスター全体の転写プロファイルと一致する。また、S1 nuclease mapping 法による転写解析の結果、*ftgA* 遺伝子は周囲の走化性遺伝子群と同一の polycistronic operon として転写され、*ftgA* 上流に独自のプロモーターは有さないことが判明した。

(4) 組換え FtgA タンパク質を抗原とする抗 FtgA 抗体を作製し、栄養菌糸、孢子嚢、遊走子、発芽細胞からそれぞれタンパク質を抽出してウエスタンブロット解析を行ったがいずれのサン

プルにおいても FtgA タンパク質は検出されなかったことから、細胞質において生産される FtgA タンパク質は非常に微量であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshihiro Mouri, Kenji Konishi, Azusa Fujita, Takeaki Tezuka, Yasuo Ohnishi	4. 巻 199
2. 論文標題 Regulation of Sporangium Formation by BldD in the Rare Actinomyces Actinoplanes missouriensis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JB.00840-16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshihiro Mouri, Moon-Sun Jang, Kenji Konishi, Aiko Hirata, Takeaki Tezuka, Yasuo Ohnishi	4. 巻 107
2. 論文標題 Regulation of sporangium formation by the orphan response regulator TcrA in the rare actinomyces Actinoplanes missouriensis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 718-733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mmi.13910	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomohiro Kimura, Takeaki Tezuka, Daisuke Nakane, Takayuki Nishizaka, Shin-Ichi Aizawa, Yasuo Ohnishi	4. 巻 201
2. 論文標題 Characterization of zoospore type IV pili in Actinoplanes missouriensis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of bacteriology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JB.00746-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kyota Mitsuyama, Takeaki Tezuka, Yasuo Ohnishi	4. 巻 201
2. 論文標題 Identification and characterization of a cell wall hydrolase for sporangiospore maturation in Actinoplanes missouriensis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of bacteriology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JB.00519-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuichiro Hashiguchi, Takeaki Tezuka, Yasuo Ohnishi	4. 巻 -
2. 論文標題 Involvement of three FliA-family sigma factors in the sporangium formation, spore dormancy and sporangium dehiscence in <i>Actinoplanes missouriensis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mmi.14485	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeaki Tezuka, Daisuke Nakane, Tomohiro Kimura, Yasuo Ohnishi	4. 巻 9
2. 論文標題 Preparation of <i>Actinoplanes missouriensis</i> zoospores and assay for their adherence to solid surfaces	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bio protocol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3458	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計27件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 前田聡史、手塚武揚、水池彩、福田良一、浜田盛之、田村朋彦、堀内裕之、大西康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> の孢子囊壁の構成成分の同定と孢子囊壁構成タンパク質の機能解析
3. 学会等名 日本放線菌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 光山京太、手塚武揚、大西康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> の孢子囊開裂に関わるグリコシダーゼ
3. 学会等名 日本放線菌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋口優一朗、手塚武揚、大西康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> の孢子嚢形成・開裂期に働く 因子FliA1, FliA2, FliA 3 の機能解析
3. 学会等名 日本放線菌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田聡史、手塚武揚、大西康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> の孢子嚢膜構成タンパク質の同定と機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光山京太、手塚武揚、大西康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> の孢子鎖成熟に関与するグルコサミニダーゼの同定と機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 遼太、手塚 武揚、大西 康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> においてClpプロテアーゼのATPaseサブユニットは孢子嚢の形成と開裂に関与する
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋口優一朗、手塚武揚、大西康夫
2. 発表標題 希少放線菌Actinoplanes missouriensisにおける胞子嚢形成を制御する FliAファミリーのシグマ因子群の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeaki Tezuka, Tatsuki Koyama, Takuya Akutsu, Aiko Hirata, Yasuo Ohnishi
2. 発表標題 Characterization of the Response Regulator Receiver Domain Protein AsfR Required for Sporangium Formation in Actinoplanes missouriensis
3. 学会等名 18th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋口優一朗、手塚武揚、大西康夫
2. 発表標題 希少放線菌Actinoplanes missouriensisの胞子嚢特異的な遺伝子発現を制御する 因子FliAの機能解析
3. 学会等名 2017年度 日本放線菌学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木村 知宏、手塚 武揚、相沢 慎一、大西 康夫
2. 発表標題 希少放線菌Actinoplanes missouriensisの遊走子が持つIV型線毛の機能解析
3. 学会等名 2018年度 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 手塚 武揚、光山 京太、安田 理沙、大西 康夫
2. 発表標題 希少放線菌Actinoplanes missouriensisの孢子囊非開裂株の取得とその原因遺伝子の同定
3. 学会等名 2018年度 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋口 優一郎、手塚 武揚、大西 康夫
2. 発表標題 希少放線菌Actinoplanes missouriensisの孢子囊形成を制御する 因子FliAの機能解析
3. 学会等名 2018年度 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 手塚 武揚、前田 聡史、大西 康夫
2. 発表標題 希少放線菌 Actinoplanes missouriensis のべん毛形成に必須な遺伝子 AMIS1780の同定と機能解析
3. 学会等名 2018年度 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeaki Tezuka
2. 発表標題 Studies on the unique life cycle of the rare actinomycete Actinoplanes missouriensis
3. 学会等名 4th A3 foresight symposium on Chemical & Synthetic Biology of Natural Products (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田聡史、手塚武揚、平田愛子、和泉自泰、馬場健史、大西康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> の胞子囊膜構成成分の同定と機能解析
3. 学会等名 グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光山京太、手塚武揚、大西康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> の胞子囊開裂に関与する シグマファクターの同定と機能解析
3. 学会等名 グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木遼太、手塚武揚、勝山陽平、大西康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> の胞子囊膜に局在する蛍光物質に関する研究
3. 学会等名 グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢田佳子、木村知宏、手塚武揚、大西康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> 遊走子の運動停止に必要なタンパク質FtgAとべん毛構成装置タンパク質の相互作用解析
3. 学会等名 グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 手塚 武揚
2. 発表標題 胞子嚢を形成する希少放線菌の形態分化に関する分子遺伝学的研究
3. 学会等名 日本放線菌学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 遼太, 手塚 武揚, 大西 康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> の胞子嚢の形成と開裂に関する Clpプロテアーゼに関する研究
3. 学会等名 日本放線菌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢田 佳子, 木村 知宏, 手塚 武揚, 大西 康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> 遊走子の運動停止に必要なタンパク質FtgA とべん毛構成装置タンパク質との相互作用解析
3. 学会等名 日本放線菌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田 聡史, 手塚 武揚, 平田 愛子, 和泉 自泰, 馬場 健史, 大西 康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> の胞子嚢膜構成成分の同定と機能解析
3. 学会等名 日本放線菌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光山 京太、手塚 武揚、大西 康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> の孢子嚢開裂に関わるシグマ - アンチシグマファクター制御システムの同定と機能解析
3. 学会等名 日本放線菌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田 聡史、手塚 武揚、和泉 自泰、高橋 政友、馬場 健史、大西 康夫
2. 発表標題 <i>Actinoplanes missouriensis</i> の孢子嚢膜を構成する脂質のリピドーム解析
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 光山 京太、手塚 武揚、大西 康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> の孢子嚢開裂を制御するシグマ - アンチシグマファクター系の同定と機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 遼太、手塚 武揚、大西 康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> の孢子嚢開裂を制御するClpプロテアーゼに関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 手塚 武揚、漆間 功真、大西 康夫
2. 発表標題 希少放線菌Actinoplanes missouriensisの孢子嚢形成・開裂を制御するFliAレギュロンの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 醗酵学研究室 http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/hakko/index.php 注目を集める希少放線菌の不思議に迫る研究 http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2017/20170608-1.html 注目を集める希少放線菌の不思議に迫る研究：遊走子線毛の発見と機能解明 https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20190710-1.html</p>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考