

平成 21 年 5 月 15 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：19880011

研究課題名（和文） GGDEF/EAL 蛋白質によるバイオフィーム制御機構

研究課題名（英文） Regulation of biofilm formation by GGDEF/EAL proteins

研究代表者

氏 名：鈴木 一史（SUZUKI KAZUSHI）

所 属：新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：00444183

研究成果の概要：自然環境中の固体表面に細菌が付着し形成する「バイオフィーム」の形成制御メカニズムを解明するため、small RNA の安定性を制御する GGDEF/EAL 蛋白質 CsrD と細胞内のシグナル物質 c-di-GMP の代謝に関わる GGDEF/EAL 蛋白質に関する研究を行った。CsrD の機能に重要と思われるアミノ酸残基をアラニン残基に置換した変異型 CsrD の解析の結果、CsrD の活性に重要な領域が明らかとなった。また、GGDEF/EAL 蛋白質は多糖である PGA の産生を調節することでバイオフィームを制御していることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,340,000	0	1,340,000
2008年度	1,180,000	354,000	1,534,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,520,000	354,000	2,874,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：大腸菌、バイオフィーム、GGDEF ドメイン、EAL ドメイン、c-di-GMP、Csr システム、small RNA

1. 研究開始当初の背景

細菌が形成するバイオフィームが医療や工業などの様々な分野で近年問題となっている。消毒薬や抗菌薬に抵抗性を示すバイオフィームによる医療器具の汚染やバイオフィーム感染症、バイオフィームによる金属腐食やパイプの詰まり、食品加工時の汚染などが原因で生じる損失はアメリカにおいて年間数十億ドルにのぼるとされている。従って、

バイオフィームのコントロールが重要な課題となってきている。本研究の究極的な目標はバイオフィーム形成メカニズムの研究から“バイオフィームの形成抑制や除去に有効な方法”を見いだすことである。そこで、バイオフィーム形成に関わる細菌のシステムを明らかにすることとし、近年、バイオフィーム形成制御に関わることが明らかとなった新しい情報伝達蛋白質「GGDEF/EAL 蛋白

質」に着目することとした。

GGDEF/EAL 蛋白質はバイオフィーム形成を促進する新規セカンドメッセンジャー bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP (c-di-GMP)の代謝酵素であり、微生物学領域において近年最も注目されている研究の一つである。c-di-GMP と GGDEF/EAL 蛋白質の研究は欧米で大変注目され論文も多く発表されているが、日本での報告は少ない。c-di-GMP は 2つの GMP がリン酸結合し環状化したヌクレオチド化合物であり、*Acetobacter* におけるセルロース合成活性化因子として 1987 年に初めて報告された¹⁾。それ以降、2004 年頃になるまで、ほとんど注目されることはなかった。細菌のゲノムが次々と明らかになる中、数多く存在していた機能不明な蛋白質ドメイン (Domain of Unknown Function, DUF) の 1 番目と 2 番目、DUF1, DUF2 は、それぞれ、GGDEF モチーフをもつ GGDEF ドメイン、EAL モチーフをもつ EAL ドメインであることが明らかとなった。2004 年以降、これら機能不明の 2つのドメインが c-di-GMP 代謝酵素であることが証明された²⁾。その後急速に研究が進展し、微生物学で最も注目される研究分野となった。GGDEF/EAL 蛋白質は GGDEF ドメイン単独、EAL ドメイン単独、もしくは GGDEF と EAL の 2つのドメインがタンデムに結合した構造で構成されている。GGDEF ドメインは c-di-GMP 合成酵素活性を示し、EAL ドメインは c-di-GMP 開環酵素活性を示す。これまでの研究から c-di-GMP はバイオフィーム形成、細菌の運動性、病原性、菌体外多糖生成などを制御する新規セカンドメッセンジャーであることが明らかとなってきた²⁾。ほとんどの GGDEF/EAL 蛋白質は二成分制御系のヒスチジンキナーゼと類似した膜貫通型の蛋白質であり、外界や細胞内からシグナルを受け取り c-di-GMP 代謝を調節していると考えられる²⁾。細菌ゲノム解析の結果から、GGDEF と EAL の 2つのドメインは細菌に広く分布しており、最も大きな蛋白質ファミリーの一つであることが分かっている。また、細菌は複数の GGDEF/EAL 蛋白質をもっており、大腸菌においては GGDEF ドメインを含む蛋白質が 19、EAL ドメインを含む蛋白質が 17 存在している。これらのことから、複数存在する GGDEF/EAL 蛋白質によるシグナルの感知とセカンドメッセンジャー c-di-GMP の合成及び分解の制御、それに伴う c-di-GMP によるバイオフィームや病原性などの制御という、全く新しい情報伝達機構が細菌に存在することが分かってきた。

申請者は、大腸菌の mRNA 結合蛋白質「CsrA」と 2つの small RNA「CsrB 及び CsrC (CsrB/C)」からなる転写後の遺伝子発現調節システム「Csr システム」の研究を行

ってきた³⁾。Csr システムはバイオフィーム生成、運動性、病原性、グリコーゲン合成、糖代謝など、数多くの制御を行っている重要なシステムである⁴⁾。CsrA はターゲットとなる mRNA に結合することにより mRNA の安定性を制御し、翻訳を調節する⁴⁾。CsrB/C RNA は近年注目されている非翻訳型 small RNA の一種であり、CsrA に結合し複合体を形成することで細胞内の CsrA 活性を抑制する。Csr システムを制御する遺伝子のスクリーニングの結果、CsrB/C RNA の安定性を制御する膜貫通型 GGDEF/EAL 蛋白質「CsrD」を発見した⁵⁾。CsrD は CsrB/C RNA の安定性を変えることによって、細胞内での CsrA の活性を調節していることが分かった。しかし、CsrD は RNA 分解活性を示さず、c-di-GMP 代謝活性も示さなかった⁵⁾。CsrD は c-di-GMP 活性を持たない GGDEF/EAL 蛋白質として初めて報告された蛋白質であり、RNA の分解に関わるという今までの報告からは全く想像できなかった新たな機能を持っていた。

そこで、GGDEF/EAL 蛋白質の今までの知見と、我々が発見した c-di-GMP 非代謝型 CsrD の研究結果を踏まえ、“c-di-GMP 非代謝型と代謝型の複数の GGDEF/EAL 蛋白質がバイオフィームをどのようなメカニズムで制御しているのか”という疑問を解明する本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

申請者らは、GGDEF/EAL 蛋白質が c-di-GMP 代謝酵素であることが明らかとなり注目されている中、c-di-GMP 代謝活性のない GGDEF/EAL 蛋白質を初めて報告した (Genes & Dev.に発表)⁵⁾。しかも、CsrD は c-di-GMP 代謝活性がないにもかかわらず、バイオフィームを制御していた。GGDEF/EAL 蛋白質は細菌に広く分布し、多くの場合、数十もの GGDEF/EAL 蛋白質が 1つの細菌に存在している²⁾。申請者らの CsrD の発見により、GGDEF/EAL 蛋白質が c-di-GMP 代謝以外の異なる機能を有する蛋白質を含む一群であることが考えられる。複数の c-di-GMP 代謝型及び非代謝型 GGDEF/EAL 蛋白質がどのように細胞内で機能しているのか非常に興味深い。本研究ではバイオフィーム形成制御メカニズムの解明を目的に c-di-GMP 代謝型及び非代謝型 GGDEF/EAL 蛋白質の研究を行った。

(1) c-di-GMP 非代謝型 GGDEF/EAL 蛋白質 CsrD の small RNA 安定性制御メカニズムの解明

Csr システムの RNA 結合蛋白質 CsrA はバイオフィームの成分である多糖

-1,6-GlcNAc ポリマー・PGA の合成酵素遺伝子の mRNA に結合し翻訳を制御することでバイオフィルムをコントロールしている⁶⁾。c-di-GMP 非代謝型 CsrD は CsrA に結合し CsrA の活性を抑制する 2 つの small RNA である CsrB・CsrC の分解を促進する。すなわち、CsrD は Csr システム内の small RNA の安定性を制御することで Csr システムを制御し、バイオフィルムの形成を調節している⁵⁾。Small RNA である CsrB・CsrC の分解には RNA 分解酵素 RNase E が必須であることが明らかとなっているものの CsrD がどのように small RNA の分解に関わっているのかは明らかとなっていない。CsrD は GGDEF/EAL ドメインから構成されているが、c-di-GMP 代謝活性を示さない。しかし、RNA への親和性が高いことが明らかとなっている。GGDEF/EAL 蛋白質が c-di-GMP 代謝活性を示すことで注目され、研究が進んでいる中で、CsrD は GGDEF/EAL 蛋白質でありながら c-di-GMP 代謝活性を持たず、small RNA の安定性を制御するという全く新しい機能を有する蛋白質として非常に興味深い。CsrD のアミノ酸配列を c-di-GMP 代謝活性を示すことが証明されている GGDEF/EAL 蛋白質と比較したところ、c-di-GMP 代謝型 GGDEF/EAL 蛋白質に高く保存されているアミノ酸残基・領域が、CsrD とそのホモログには保存されていなかった。これらのアミノ酸残基は CsrD 活性には必要ではないと考えられる。このことから、CsrD の研究は GGDEF/EAL 蛋白質の新たな機能解明に繋がると考えられる。よって、CsrD の small RNA 安定性制御メカニズムの解明を目的として研究を行った。また、CsrD は膜貫通型の情報伝達蛋白質であり、シグナルを感知して活性が変化すると考えられる。外界からのシグナルによって small RNA の安定性が変化すると報告はなく、これが明らかとなれば画期的なことである。よって、シグナル伝達に参与するペリプラズム領域や HAMP-like ドメインの解析を行い、シグナルによる small RNA 安定性制御の有無を明らかにすることを目的とした。

(2) c-di-GMP 代謝型 AdrA 及び YhjH のバイオフィルム制御メカニズムの解明

AdrA 及び YhjH は c-di-GMP の代謝を通じて大腸菌 K-12 株のバイオフィルムを制御するが、そのターゲットは不明である。サルモネラや病原性大腸菌の場合は c-di-GMP がバイオフィルムの主要な多糖成分であるセルロースの合成制御を行っている⁷⁾。しかし、大腸菌 K-12 株はセルロースを生産せず、バイオフィルムの多糖成分は -1,6-GlcNAc ポリマー・PGA である。したがって、c-di-GMP は多糖 -1,6-GlcNAc ポリマー・PGA の生産を制御している可能性が高い。そこで、AdrA

及び YhjH の PGA 生産及び PGA 合成酵素遺伝子の発現に与える影響を明らかにする。また、細菌には c-di-GMP 合成酵素と分解酵素がほぼ同数存在している。さらに、c-di-GMP の合成・分解は細胞内の局所で行われていると考えられている。このことから、GGDEF 蛋白質と EAL 蛋白質との関連性を調べることを目的として研究を行った。

1) P. Ross et al., Nature **325**:279-281 (1987)

2) U. Römling et al., Mol. Microbiol. **57**:629-639 (2005)

3) K. Suzuki et al., J. Bacteriol. **184**:5130-5140 (2002)

4) T. Romeo, Mol. Microbiol. **29**:1321-1330 (1998)

5) K. Suzuki et al., Genes & Dev. **20**:2605-2617 (2006)

6) X. Wang et al., Mol. Microbiol. **56**:1648-1663 (2005)

3. 研究の方法

(1) c-di-GMP 非代謝型 CsrD の small RNA 安定性制御メカニズムの解明

CsrD 活性に重要な GGDEF/EAL ドメインのアミノ酸残基の特定

GGDEF と EAL 両方のドメインは CsrD の活性に必須であるが、CsrD は c-di-GMP 代謝活性がなく、c-di-GMP 代謝に必須なアミノ酸は重要でない。また、CsrD は RNA への高い親和性を示すことが明らかとなっている。GGDEF/EAL ドメインでありながら異なる機能をもつことから、CsrD 活性に重要な領域・アミノ酸残基は異なると考えられる。そこで、CsrD 活性に重要な領域・アミノ酸残基を特定するため、CsrD ホモログに保存されているアミノ酸残基を中心に選択し、部位特異的変異によってアラニン残基に置換した。変異を導入したプライマーを用い、野生型 *csrD* 遺伝子が挿入されたプラスミドを鋳型に PCR を行い、得られた変異を含む PCR 産物を野生型 *csrD* 遺伝子の相当する部分と置き換えることで変異型 *csrD* 遺伝子を含むプラスミドを作製した。得られた各種変異を含むプラスミドで *csrD* 欠損株を形質転換した。それぞれのプラスミド上の野生型及び変異型 *csrD* 遺伝子が発現することによって現れた表現型を解析することで各々の CsrD 変異体の活性を比較した。CsrD の活性は比較的測定が容易なバイオフィルム、*csrB* 遺伝子の発現、グリコーゲン合成を指標とした。*lacZ* をレポーター遺伝子とした *csrB-lacZ* の β -ガラクトシダーゼ活性を測定することで *csrB* の発現量を測定した。また、発現した野生型及び変異型

CsrDにはC末端にHis₆-tagが付加されているため、それぞれのCsrDの発現はHis₆-tagに対する抗体を用いたウエスタンブロッティングにより確認した。

HAMP-like ドメインの解析

HAMP-like ドメインはHAMPドメインの構造8)との類似性から、膜貫通領域からの情報を細胞質内のドメインに伝えるシグナル伝達ドメインであると予測している。CsrDのホモログ間ではHAMP-likeドメインが最もよく保存されていることから、CsrDの活性に重要な領域であると考えられる。そこで、上記に示した方法によって部位特異的変異を導入し、得られた変異型CsrD活性を野生型CsrDと比較した。また、CsrDのアミノ酸配列のホモロジー検索及び立体構造予測をHHpredによって行った。

(2) c-di-GMP代謝型AdrA及びYhjHのバイオフィーム制御メカニズムの解明

AdrA及びYhjHによるバイオフィーム制御へのセルロース及びPGAの関与

大腸菌K-12株のバイオフィーム生産がGGDEF/EAL蛋白質・c-di-GMPによって制御されるが、そのターゲットが-1,6-GlcNAcポリマー・PGAであるのか、それともセルロースであるのかを確認するため、セルロース合成酵素遺伝子やPGA合成酵素遺伝子の欠失変異株をGGDEF蛋白質AdrA及びEAL蛋白質YhjHの遺伝子を挿入したプラスミドで形質転換し、バイオフィーム生産性を測定した。96穴マイクロタイタープレートで24時間静置培養した後、培養液を除き、形成されたバイオフィームをクリスタルバイオレットで染色し、酢酸溶液を添加した後、吸光度を測定した。

AdrA及びYhjHによるPGA合成遺伝子の転写制御

AdrA及びYhjHがPGA合成酵素遺伝子の発現に与える影響を調べるため、レポーター遺伝子として*lacZ*を用い、PGAオペロンの転写調節領域との転写融合遺伝子を大腸菌の染色体に導入した。得られた菌株を*adrA*及び*yhjH*遺伝子の発現プラスミドで形質転換し、-ガラクトシダーゼの活性を測定した。

AdrA及びYhjHによるPGA合成制御(研究協力者)

AdrAとYhjHのPGA生産に及ぼす影響を調べるため、PGA合成酵素遺伝子欠失変異株や*adrA*及び*yhjH*遺伝子の発現プラスミドで形質転換した株のPGA生産性をPGA抗体を用いて測定した。

AdrA及びYhjHの活性測定法の確立、c-di-GMP及びl-di-GMP(pGpG)の調製

GGDEF/EAL蛋白質の活性測定法の確立や基質となるc-di-GMP及びl-di-GMP(pGpG)の調製を行うため、pETシステムやpColdを用い、AdrA及びYhjH蛋白質の発現系を構築し

た。

4. 研究成果

(1) c-di-GMP非代謝型CsrDのsmall RNA安定性制御メカニズムの解明

CsrDの機能に重要なアミノ酸残基を見いだすため、部位特異的変異によってアミノ酸残基を置換した変異CsrDの解析を行った。CsrDホモログには保存されているが、c-di-GMP代謝活性を示すGGDEF/EAL蛋白質には保存されていないアミノ酸残基を中心に57選択し、アラニン残基に置換した。なお、209番目のアラニン残基はロイシン残基に置換した。変異*csrD*の遺伝子を自身のプロモーターとともにpBR322に組み込み、*csrD*欠損株に導入した。変異CsrDの*csrD*欠損株内での発現はウエスタンブロットにより確認した。変異CsrDで活性が補完された*csrD*欠損株において、バイオフィーム形成、*csrB-lacZ*の発現、グリコーゲン合成を測定してCsrD活性の指標とし、野生型CsrDと比較した。活性が顕著に低下した10種類の変異CsrDが得られ、それらの変異はCsrDホモログ間で特に保存性が高いHAMP-likeドメインとGGDEFドメインのN末端領域に集中していた。CsrDのアミノ酸配列の相同性検索を行い、相同性を示した蛋白質のうち、立体構造が明らかとなっている蛋白質とのアミノ酸配列の比較によって立体構造を予測した。その結果、HAMP-likeドメインはHAMPドメインの構造のように2つのヘリックスがコネクターによって繋がっている構造であると予測された。さらに、CsrD・GGDEFドメインのN末端領域は長いヘリックス構造と予測された。HAMP-likeドメインのC末端側にGGDEFドメインが位置していることから、HAMP-likeドメインの2番目のヘリックスはGGDEFドメインN末端側のヘリックスに連結している可能性が示唆された。置換することによって活性が顕著に低下したアミノ酸残基はHAMP-likeドメインに3残基、GGDEFドメインのN末端領域に5残基存在したことから、HAMP-likeドメインからGGDEFドメインに続くと考えられるヘリックスがCsrDの活性に重要と考えられた。HAMP-likeドメインはHAMPドメインとの類似性から情報伝達ドメインと予測され、膜貫通領域からのシグナルをGGDEF/EALドメインに伝達する役割を担っていると考えられる。CsrDがシグナルを感知することでsmall RNAの分解を制御している可能性が示唆された。また、EALドメイン内の部位特異的変異によって活性が上昇した変異と減少した変異の2種類の変異

CsrD が確認され、EAL ドメインの CsrD 活性への関与が示唆された。

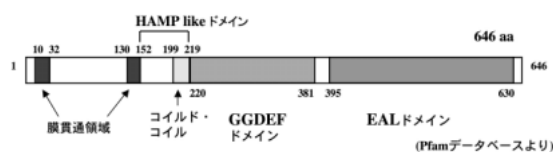


図 1 . CsrD のドメイン構造

(2) c-di-GMP 代謝型 AdrA 及び YhjH のバイオフィーム制御メカニズムの解明

セルロースを生産するサルモネラや病原性大腸菌において、c-di-GMP はセルロース合成酵素の活性をアロステリックに調節することによってバイオフィーム形成に影響を与えていることが分かっている。セルロースを生産しないとされている大腸菌 K-12 株においても、c-di-GMP 代謝活性を示すことが証明されている GGDEF 蛋白質 AdrA 及び EAL 蛋白質 YhjH は、バイオフィームの形成に影響を与えるが、そのメカニズムは明らかとなっていない。大腸菌 K-12 株のゲノム上にはセルロース合成酵素の遺伝子が存在するため、セルロースの関与も否定できない。そこで、セルロース合成酵素遺伝子の破壊株に *adrA* や *yhjH* を発現するプラスミドを導入し、バイオフィームの生産性を測定した。バイオフィーム生産はコントロールと差がなく、セルロース合成酵素欠失の影響は見られなかった。一方、大腸菌 K-12 株が生産する -1,6-GlcNAc ポリマー・PGA 合成酵素遺伝子の破壊株を用いて同様の実験を行ったところ、本来、*adrA* 及び *yhjH* の発現はバイオフィームの生産に影響を与えるが、PGA 合成酵素遺伝子の破壊株では影響が見られなかった。よって、AdrA や YhjH によるバイオフィームの調節には PGA が関与していることが示唆された。次に、AdrA や YhjH が PGA 合成酵素遺伝子の発現に関与しているか否かを確かめるため、PGA オペロンの転写調節領域と *lacZ* との融合遺伝子を染色体に導入した株を用いて PGA 合成酵素遺伝子の発現を測定した。*adrA* や *yhjH* を発現するプラスミドは PGA 合成酵素遺伝子の発現に影響を与えなかった。一方、抗体を用いた PGA の測定によって、*adrA* や *yhjH* の発現は PGA の生産に影響を与えることが確認された。よって、AdrA 及び YhjH は PGA 合成酵素遺伝子の発現以外のメカニズムで PGA の生産を制御していることが示唆された。さらに、GGDEF/EAL 蛋白質の活性測定法の確立や c-di-GMP 及び l-di-GMP の調製のため、pET システムや pCold を用いた AdrA 及び YhjH 蛋白質の発現系を構築した。しかし、可溶性の蛋白質として調製することが出来ず、更なる検討が必要であった。

近年、c-di-GMP 非代謝型 GGDEF/EAL 蛋白質がいくつか報告されるようになり、GGDEF/EAL 蛋白質が c-di-GMP 代謝以外の機能をもつことが認知されるようになってきた。CsrD は c-di-GMP 非代謝型として初めて報告された GGDEF/EAL 蛋白質である。本研究では CsrD の部位特異的変異によって c-di-GMP 代謝型 GGDEF/EAL 蛋白質とは異なる点を明らかにした。今後の研究により外界からのシグナルに応じた small RNA の安定性制御など、更なる機能の解明が期待される。また、大腸菌に複数存在する GGDEF/EAL 蛋白質の役割は十分解明されていない。今後は、c-di-GMP 合成酵素と分解酵素の関係について更なる研究を続けていきたい。

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0件)

[学会発表](計4件)

水野孝彦、Tony Romeo、渡邊剛志、鈴木一史、大腸菌 CsrB/C RNA の安定性を制御する CsrD の解析、第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会・合同大会、平成 20 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド、神戸

Kazushi Suzuki, Yasuhiro Fujii, Takahiko Mizuno, Takeshi Watanabe, and Tony Romeo, Site-Directed Mutagenesis of CsrD, a Specificity Factor for Degradosome-Mediated Decay of CsrB/C RNAs in *Escherichia coli*, American Society for Microbiology 108th General Meeting, 平成 20 年 6 月 5 日、Boston Convention and Exposition Center, ボストン・アメリカ合衆国

Carrlos C. Goller, Archana Pannuri, Yoshikane Itoh, Kazushi Suzuki, and Tony Romeo, PGA Accumulation and Biofilm Formation in *Escherichia coli*: Modulation by c-di-GMP, American Society for Microbiology 108th General Meeting, 平成 20 年 6 月 3 日、Boston Convention and Exposition Center, ボストン・アメリカ合衆国

藤生康宏、水野孝彦、Tony Romeo、渡邊剛志、鈴木一史、大腸菌 small RNA CsrB/C の安定性を制御する CsrD のアラニン置換変異

による解析、日本農芸化学会 2008 年度大会、
平成 20 年 3 月 28 日、名城大学、名古屋

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.agr.niigata-u.ac.jp/profile/
suzuki/index.html](http://www.agr.niigata-u.ac.jp/profile/suzuki/index.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 一史 (SUZUKI, KAZUSHI)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：00444183

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

Tony Romeo

所属 フロリダ大学・微生物・細胞科学・
教授

(2008 年 8 月までエモリー大学)

研究者番号：なし