

機関番号：32658

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380055

研究課題名（和文） 細胞分裂と分化を制御する機能ネットワークの解析

研究課題名（英文） Analysis of the functional network governing cell division and cell differentiation

研究代表者

吉川 博文（YOSHIKAWA Hirofumi）

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：50175676

研究成果の概要（和文）：栄養増殖期を抜け定常期にある微生物細胞の生命活動の解析は、細胞の持つ新たな生理機能や遺伝的制御機構を解き明かすことに繋がると考える。脂肪酸合成系の必須酵素が細胞分裂装置と相互作用することを見出し、分裂隔壁形成に関与していることを明らかにした。一方、クエン酸回路の一酵素の完全破壊株は正常に栄養増殖するが、孢子形成能を完全に欠いており、細胞のエネルギー状態を感知して分化を進行させる運命決定因子であることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：Analysis of the physiological significance of the stationary phase cells will contribute to the further understanding of cellular functions and genetic control systems in the viewpoint of functional network. We found an essential gene for lipid synthesis interacted with cell divisional machinery and involved in septum formation. While, a gene in the TCA cycle was found to be essential only for sporulation and was suggested to be a critical factor proceeding to the cell differentiation by sensing energy level of the cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：微生物分子遺伝学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：遺伝子発現、細胞分裂、脂質合成、細胞分化、クエン酸回路、機能ネットワーク

## 1. 研究開始当初の背景

個々の生命現象を細胞の全体像から俯瞰したとき、互いの現象がどのような連関（ネ

ットワーク）を持って機能し合っているのかという視点が重要である。

(1) 細胞分裂は、細胞質膜の合成を伴い、脂肪酸の合成系と共役した現象であることが容易に想像できるにもかかわらず、その機能的関連性については全く解析されて来なかった。

(2) 枯草菌の孢子形成は、特徴的な非対称隔膜の形成が認知できる最初の現象であるが、通常の栄養増殖時の分裂装置との相違点も明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

当研究室において行ってきた酵母 2 ハイブリッド系を用いた網羅的タンパク質間相互作用解析から、多くの機能的ネットワークを示唆することが出来た。この相互作用情報を基盤とし、次の2点について集中的にネットワーク解析を行う。

(1) FtsA 等の細胞分裂装置と脂質合成系、特に膜脂質合成系の初期酵素 PlsX(グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素)との相互作用

(2) クエン酸回路の役者の1つ OdhB (2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体の成分)の分裂装置および孢子形成開始因子との相互作用

これらの相互作用を手がかりに、細胞分裂装置と脂質合成系、および分裂装置と孢子形成開始機構とのネットワークを解析し、最終的に細胞がどのような生理状況を感じて、通常の細胞分裂から非対称隔膜形成へと移行していくのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

2つのキー酵素(PlsX, OdhB)について手がかりを得るために、まず細胞内局在性の観察を行う。さらに、両者はいずれも必須遺伝子と報告されており、条件致死変異株の作製とそのサプレッサーを解析する遺伝学的手法、および、結合タンパク質の網羅的同定等の生化学的手法を駆使し、2酵素がこれまで知られていない他の機構へ及ぼす影響について、次の2点を重点的に解析する。

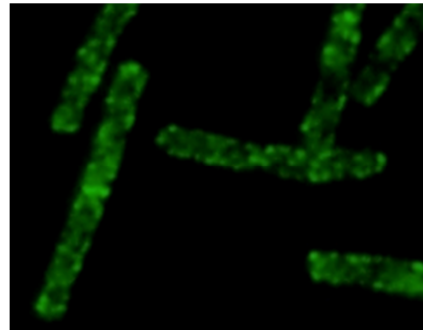
(1) PlsXの細胞分裂装置に及ぼす影響と、その階層性を明らかにする。

(2) OdhBの孢子形成開始機構に及ぼす影響と、その直接的ターゲットを明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) PlsXに関する成果  
細胞内局在性について

PlsXはFtsA等との相互作用を示したが、こうした分裂装置関連のタンパク質同様の局在性を示し、細胞膜に沿ったスパイラル状の局在、および分裂予定域への局在が観察された。注意深く観察すると、スパイラル状の局在ではFtsZとは別の地点で重合しているが、分裂予定域ではFtsZと共局在していることがわかった。



PlsXの免疫蛍光染色

### 変異株の影響

PlsXの温度感受性変異株は制限温度下で分裂装置の欠損株同様、細胞がフィラメント状になり、分裂隔膜の形成が異常になっていた。またIPTG誘導下において発現させると、非誘導時に同様の効果が見られた。このとき、FtsZの局在を観察すると、分裂予定域近くに来ているものの、完全なZ-ringが形成されていないことが明らかとなった。

### 分裂予定域でのヒエラルキー

の結果より、PlsXは相互作用を示したFtsAを介してZ-ringの形成に関与していることを示唆した。PlsX欠損細胞におけるFtsZの局在は、FtsA欠損株におけるFtsZの局在と酷似しており、この仮説を支持した。したがって、PlsXが分裂装置のFtsA等を分裂予定域に局在させる機能を担っているという階層性を明らかにした。

### サプレッサー解析

PlsXの温度感受性変異株からサプレッサーを取得し、次世代シーケンサーによるマッピングを行ったところ、1つは脂肪酸合成酵素遺伝子*fabF*に、もう1つはシャペロン遺伝子発現抑制因子*hrcA*にマップされた。このことから、脂質合成系遺伝子の変異が部分的にPlsX機能を相補するとともに、完全な機能回復にはシャペロンの関与が必要であることが示唆された。

### 機能予測

他のサブレッサー株の解析等から PlsX は必須二成分制御系 WalK/R の機能発現にも関与していることが明らかとなった。こうした結果も合わせて考えると、PlsX は細胞の分裂予定域に分裂関連タンパク質よりも前に局在し、細胞分裂を進行させるかどうかのチェックポイント機構を、WalK/R とともに担っている可能性が示唆された。

## (2) OdhB に関する成果

### 発現時期と局在

OdhB の発現をリポーターアッセイおよびイムノプロットにより確認したところ、対数増殖後期から孢子形成開始期に発現のピークがあった。また細胞内局在性を観察すると、細胞内全体に広がっていた OdhB が対数増殖後期になると細胞膜周辺に集合し、ドット状に局在するという特徴を示した。

### 完全破壊株の取得とその特性

OdhB は必須遺伝子として報告されていたが、変異株作製の過程で完全破壊株が得られることが判明した。この株は、対数増殖後期から急速に死滅することが見いだされ、孢子形成能を完全に失っていた。したがって栄養増殖期しか持たない細胞であることがわかった。

### 孢子形成開始機構への関与

孢子形成開始の様々なシグナルが最終的にマスターレギュレーターの Spo0A に集積して活性化されるが、活性化された Spo0A が転写因子として働く段階に OdhB が必須であることを突き止めた。網羅的結合タンパク質の解析では、RNA ポリメラーゼ サブユニットとの相互作用が見られており、Spo0A 特異的な転写調節因子として働いている可能性を示唆している。

## 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4件)

Nakamura, K., Yoshikawa, H., Kanaya, S. 他 (全13名中5番目) Sequence-specific error profile of Illumina sequencers, *Nucleic Acids Research* 査読有、doi:10.1093/nar/gkr344 (2011)

吉川博文 枯草菌の環境ストレス応答機構 *日本乳酸菌学会誌*、(総説) 査読無、21巻、No. 1、pp16-26 (2010)

Yasuhiro, G., Yoshikawa, H., Msadek, T., and Utsumi, R. (全12名中9番目)、*Novel*

antibacterial compounds specifically targeting the essential WalR response regulator. *J. Antibiotics* 査読有、63, 127-134 (2010)

Yasui, K., Kano, Y., Tanaka, K., Watanabe, K., Shimizu-Kadota, M., Yoshikawa, H., Suzuki, T., Improvement of bacterial transformation efficiency using Plasmid Artificial Modification (PAM). *Nucleic Acids Res.* 査読有、37(1), e3 (2009)

### [学会発表](計9件)

高田啓 枯草菌における脂質代謝と細胞分裂間の新規ネットワーク解析  
日本農芸化学会 2011 年大会  
2011 年 3 月 29 日 京都 (発表は中止)

高田啓 脂質代謝と細胞分裂を共役させるネットワークの解析  
第 5 回日本ゲノム微生物学会年会  
2011 年 3 月 14 日 仙台 (発表は中止)

Yoshikawa, H. Fundamental heat shock response is generated by intrinsic mechanism of transcription initiation. The 11<sup>th</sup> Asian and Oceanian Conference on Transcription.  
2010年7月2日、Nakijin, (Okinawa)

Yoshikawa, H. Genome resequencing and emerging issues in bacteria, rice and cattle. Illumina User symposium (招待講演)  
2010年 4月13日、プーケット (タイ)

横川朋美 細胞分裂から孢子形成開始への移行に関与する新規ネットワークの探索  
日本農芸化学会 2010 年度大会  
2010 年 3 月 28 日 東京

吉川博文 バクテリアゲノムのリシーケンスによる変異解析とその問題点  
第 4 回日本ゲノム微生物学会  
2010 年 3 月 8 日 福岡

Takada, H. Involvement of G3P acyltransferase, PlsX, in the cell division machinery. ASM Conference on Prokaryotic development. 2009 年 7 月 2 日 Cambridge, MA, USA

Yoshikawa, H. Involvement of G3P acyltransferase, PlsX, in the cell division machinery. 5th International Conference on gram-positive Microorganisms. 2009 年 6 月 16 日 San Diego, CA, USA

吉川博文 細胞分裂装置に関わる機能ネットワーク

日本農芸化学会シンポジウム  
2009年3月29日 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 博文 (YOSHIKAWA Hirofumi)  
東京農業大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号: 50175676

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

無