

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2008 ～ 2010
課題番号：	20570006
研究課題名(和文)	網羅的遺伝子発現解析を用いたバクテリアの増殖再開メカニズムの解明
研究課題名(英文)	Transcriptome analysis to understand the mechanisms of the restarting of bacterial growth after the stationary phase.
研究代表者	
牧 泰史	(Maki Yasushi)
大阪医科大学・医学部・講師	
研究者番号：	60401733

研究成果の概要(和文)：バクテリアが増殖停止から増殖再開に至るメカニズムを解明することを目的として、様々な生育状態にある細胞を使った microarray 解析を進めた。研究には大腸菌をモデル生物として使用した。本研究の結果、増殖再開の初期に多くの遺伝子が発現していること、栄養環境の違いによって増殖停止期の適応状態が異なり、増殖再開期の遺伝子発現プロファイルも互いに違っていること、などが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To reveal the mechanisms to restart the proliferation of the bacterial cells from the growth suspending, I have performed the microarray analysis of the cells of various states through the cell cycle, using *Escherichia coli* cells as the model bacteria in this study. The results showed that many genes are transcribed in the early period of the restarting growth after the inoculation of the cells of stationary phase into the fresh medium, and that the physiological states, as well as the profiles of the gene expressions, of the cells of nonproliferation periods are varying according to the nutrient environments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：細菌・マイクロアレイ・増殖

1. 研究開始当初の背景

大腸菌は、対数増殖期から定常期への移行過程(図1①→②)で、様々な生理的変化を示す。DNA様態、RNA合成、タンパク合成など、遺伝子発現に関わる重要な生命システムも、機能構造が大きく変化することが知られている(Nair,S. and Finkel,S.E. (2004) J. Bacteriol., 186, 4192-4198, Somalinga,R.V., et al. (2004) J. Bacteriol., 186, 8499-8507、

Wada,A., et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2657-2661)。

一方、定常期の菌体は、生育環境が改善すると増殖を再開する。しかし実際の増殖開始までには、lag phase と呼ばれる増殖準備期を必要とする(図1②→③)。この期間はゲノムDNAの複製に必要と考えられる時間を大きく超えて、一時間以上を必要とすることが過去の予備実験から明らかとなった。すなわ

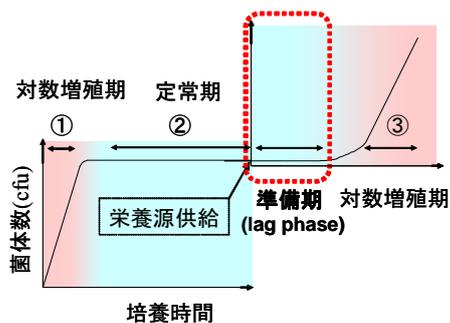


図1 バクテリアの増殖停止と増殖再開の模式図

これは「増殖→増殖停止」の過程（図1①→②）で、増殖に関わる機能構造の一部が失われて増殖できなくなっていること、逆に「増殖停止→増殖再開」の増殖準備期の過程（図1②→③）ではこれらが再構築されて増殖能を再獲得していることを示している。しかし、この時期に注目した研究は少なく、増殖の停止から再開に至る課程で必要とされる遺伝子群についての知見は乏しかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、栄養飢餓環境で増殖を停止した大腸菌が、栄養源供給により増殖を再開するまでの細胞応答を、主に遺伝子発現の観点から、経時的、空間的に追いつき、様々な細胞内機能構造の変化を明らかにすることで、細胞増殖に関わる生命システムの再構築とその機能を解明することである。

3. 研究の方法

研究に用いた大腸菌株は、日本における大腸菌ゲノムプロジェクトの対象となったK-12の野生株W3110を選択した。菌体を異なった栄養条件の培地で培養し、様々な培養時間の菌体をサンプリングした（図2）。得られた菌体からtotal RNAを抽出し、マイクロアレイ用プローブのテンプレートとした。使用したマイクロアレイは、大腸菌ゲノムに含まれる4000以上のORFを網羅してスポットされたスライドガラスを用いた。

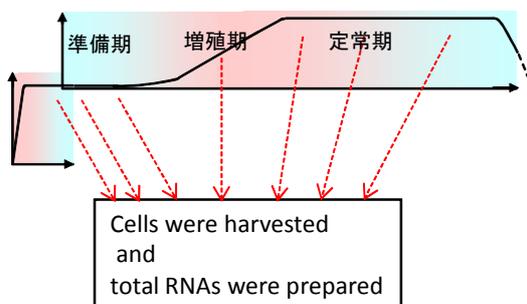


図2 遺伝子発現解析用菌体のサンプリング時期

4. 研究成果

(1) 定常期(Stat)、準備期初期(5min、15min)、対数増殖期(Log)、それぞれの細胞からRNAを抽出してmicroarray解析を行った。その結果、増殖再開の準備期に強く発現する遺伝子群が存在することが明らかとなった（図3）。

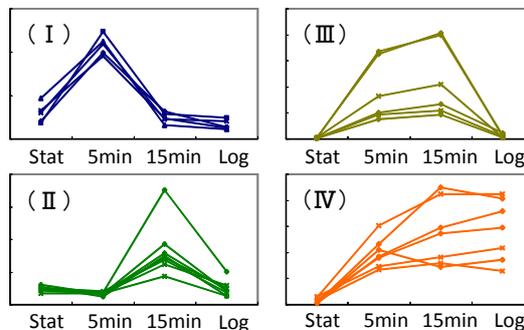


図3 Lag phase 初期に発現する遺伝子群の分類

このようなlag phase 発現遺伝子の欠損株を様々な条件で培養し、その増殖曲線が野生株と比べて有意に遅く、または早くなるものをスクリーニングすることで、増殖再開に重要な役割を果たす遺伝子の探索を続けることが今後必要と考えている。

(2) 大腸菌の持つ遺伝子それぞれについて、いつ必要とされて発現するのか、大腸菌の生活環全体を通して網羅的に解析された例がなかった。そこで、増殖期、定常期初・中・後期、増殖再開初期、といった生活環の全過程の大腸菌をサンプルとしてRNAを抽出し、microarray解析の結果を得た。機能分類したもののうち、遺伝情報の複製と発現に関連する遺伝子群の変動パターンを図4に示す。ここに見られるように、同じ機能分類の中でも発現する時期は異なっていることがわかった。リボソームタンパク遺伝子の発現パターンに注目すると、多くが植え継ぎ後数分で急激に発現量を増しているのに対し、SRAやRMFなど、定常期特異的であることが明らかになっている遺伝子については、定常期にさしかかった頃にピークを迎えており、過去の個別研究データと矛盾しない結果であった。このことは、本研究のデータ処理方法が妥当であることも示している。機能別に見ると、翻訳に関わるリボソームタンパク質の発現時期が総じて早いことから、増殖再開には翻訳装置の再構築が重要であると考えられた。これに対し、RNA polymerase 関連のなかでもσファクターとして機能する遺伝子の場合は、転写産物量のピークを示す時期がまちまちであり、菌体や培地環境の状況変化に応じて、必要とされる因子の種類が変化していく様

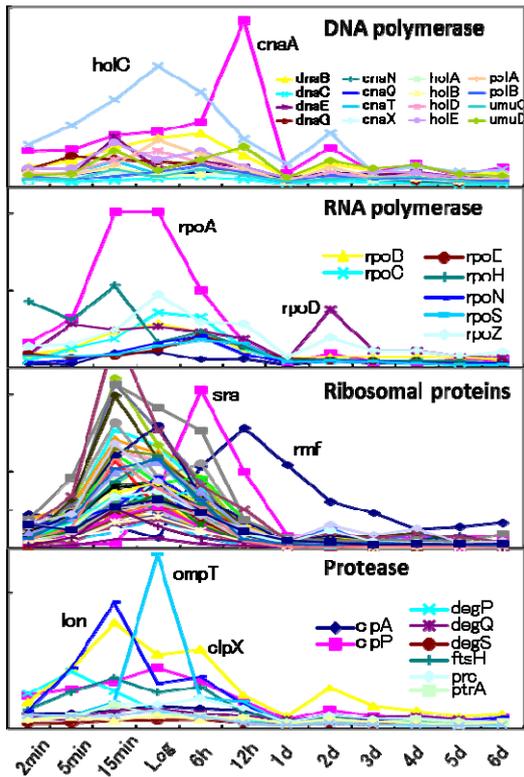


図4 大腸菌の生活環を通じた遺伝子発現解析

子が示された。このように機能で分類する GO 解析や、発現パターンで分類するクラスター解析等によって、増殖再開に関わる遺伝子群のスクリーニングと機能解析を進めることが、今後の課題である。

(3) バクテリアの増殖に必要な栄養素は一つではなく、増殖の停止と再開のメカニズムは不足または再供給される栄養素によって異なっていることが予想される。大腸菌においても、増殖停止の要因となる枯渇栄養素は、培地条件によって異なる。そこで、含まれる栄養素の組成をコントロールすることを目的に、無機塩類とグルコースのみから構成される最少培地を用いて、窒素(N)、リン酸(P)、グルコース(C)を欠乏させた場合の増殖停止

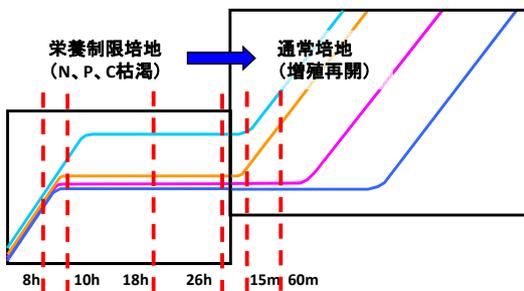


図5 栄養条件の違いによる増殖パターンの模式図と菌体サンプリング時期

期と、再供給したときの増殖再開期の細胞について、遺伝子発現のプロファイルを調べ、各栄養素の違いによるパターンを比較する実験を行った。長期培養の様子から、枯渇栄養素の違いによって増殖停止期の細胞の寿命が異なっていることが明らかとなった。図5に模式的に示すように、栄養源供給後の増殖再開までの時間も培養条件によって異なっており、飢餓環境への適応がそれぞれで違っている可能性が明らかとなった。また遺伝子発現についても、枯渇栄養素が違っていると異なる発現プロファイルとなることが示された。図6に、各培地条件でのリボソームタンパク

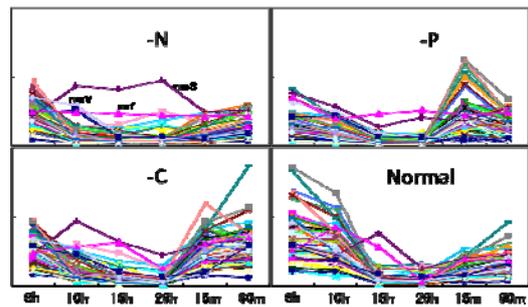


図6 栄養条件ごとのリボソームタンパク質遺伝子の発現プロファイル

質遺伝子の発現プロファイルを例示する。これらの結果は、経験する栄養源枯渇条件ごとに、増殖再開メカニズムも異なっている可能性を示唆していると考えられる。今後は特徴的な発現パターンを示す遺伝子を探索し、遺伝子破壊株の表現型観察やプロテオーム解析、蛍光融合タンパク質による細胞内局在の観察などから、その機能解析を進めていく予定である。

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6件)

- ① Takayuki Kato, Hideji Yoshida, Tomoko Miyata, Yasushi Maki, Akira Wada, Keiichi Namba, 'Structure of the 100S Ribosome in the Hibernation Stage Revealed by Electron Cryomicroscopy.' Structure, 査読有, 2010, vol. 18, p. 719-724.
- ② Akiko Sato, Takumi Watanabe, Yasushi Maki, Masami Ueta, Hideji Yoshida, Yutaka Ito, Akira Wada, Masaki Mishima, 'Solution structure of the E. coli ribosome hibernation promoting factor HPF: Implications for the relationship between structure and function.'

Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, 2009, vol. 389, p. 580-585.

- ③ Masami Ueta, Ryosuke L. Ohniwa, Hideji Yoshida, Yasushi Maki, Chieko Wada and Akira Wada, 'Role of HPF (Hibernation Promoting Factor) in Translational Activity in Escherichia coli.' Journal of Biochemistry, 2008, vol.143, p. 425-433.

[学会発表] (計5件)

- ① 牧 泰史、「大腸菌の栄養環境応答のトランスクリプトーム」第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7-10日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ② Yasushi Maki, 'Transcriptome analysis of the Escherichia coli in the prolonged stationary phase and lag phase.' The 11th Asian and Oceanian Conference on Transcription, 2010.7.1-7.5 Hotel Bel Paraiso (Okinawa, Japan)
- ③ 牧 泰史、「大腸菌の栄養環境応答のトランスクリプトーム解析」第4回日本ゲノム微生物学会年会、2010年3月7-9日、九州大学医学部 (福岡県)

[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

<http://www.osaka-med.ac.jp/~yhide/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧 泰史 (Maki Yasushi)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：60401733