

機関番号 : 15501

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20580080

研究課題名 (和文) 大腸菌における sRNA を介したシグマ E 依存性プログラム死経路の解明

研究課題名 (英文) Analysis of sigma E-dependent programmed cell death pathway via sRNA in *Escherichia coli*

研究代表者

山田 守 (YAMADA MAMORU)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 30174741

研究成果の概要 (和文) :

大腸菌集団の多くの細胞は、増殖定常期初期に VBNC (生きているがコロニー形成ができない) 細胞となり、その大部分はシグマ E 発現増加によって溶菌する。本研究ではその引き金 (シグナル) およびプログラム死経路 (PCD カスケード) を解明することを目的とした。解析の結果、活性酸素種の蓄積がシグナルとして働き、PCD カスケードはシグマ E 発現増加 ⇨ sRNA (*micA*, *rybB*) 発現増加 ⇨ Omp (*ompA*, *ompC*, *ompW*) 発現低下とすすみ、最終的に膜構造が弱くなり膜破壊に至ると推測された。

研究成果の概要 (英文) :

A large number of *Escherichia coli* cells become viable but non-culturable (VBNC) at early stationary phase, most of which are directed to lyses in cells with an enhanced active sigma E level, eliminating VBNC cells. The lysis process, however, has not been elucidated except for the evidence of reduction of outer membrane proteins, OmpA, OmpC and OmpW. Recently, it was discovered that *micA* and *rybB* encoding sRNA, which are involved in the negative regulation of OmpA, OmpC, and OmpW, are regulated by sigma E. The aim of this study is to decipher the cascade of the sigma E-dependent programmed cell death on the assumption that *micA* and *rybB* as a small RNA are involved in the cascade. Especially, we focused on the trigger as a signal to induce the lysis process and the cascade from repression of *omp* expression to lysis.

The defective strain of *katE*, encoding catalase, exhibited a sigma E-dependent cell lysis phenotype at early stationary phase. The level of intracellular reactive oxygen species (ROS) became maximal at the transition period from exponential to stationary phases, and VBNC cells gradually increased after that period. In the wild-type strain, both *sodA*, encoding superoxide dismutase, and *katE* plasmid clones almost completely suppressed cell lysis, largely reduced ROS, and substantially increased culturable cells. These results suggest that oxidative stress is a major factor responsible for VBNC cell formation and cell lysis at the early stationary phase. Therefore, these results suggest that oxidative stress (intracellular ROS) is a signal to give rise to VBNC cells, which are in turn lysed by a sigma E-dependent process. Experiments with mutants or plasmid clones of *micA*, *rybB*, *ompA*, *ompC* and *ompW* and effect of Mg²⁺ suggest that the cell lysis proceeds in the cascade of sigma E → expression of *micA* and *rybB* → reduction of Omp proteins → disintegration of the outer membrane. These results with others presented reveal a novel function of sRNA to control the cell lysis. Significant characteristics of cell lysis, accompanied by a severe reduction in the levels of periplasmic OMP-folding factor (PpiD), were observed in a mutant of *rseA* encoding anti-sigma E. The cell-lysis phenotype of the mutant was suppressed by either *rseA* or *ppiD* plasmids. Thus, increase in the ratio of free σE in *rseA* mutants with a concomitant reduction in PpiD levels can account for sigma E-dependent lysis in concert with a potential role of small RNAs on the lysis process.

Altogether, intracellular ROS is accumulated at the beginning of stationary phase and VBNC cells increase to cause cell lysis, sigma E-dependent PCD. In the cascade of the sigma E-dependent PCD, the accumulation of active sigma E molecules up-regulates sRNA of *micA* and *rybB* to repress the expression of Omp genes (*ompA*, *ompC* and *ompW*) and somehow decreases PpiD. Their both negative effects decrease OmpA, OmpC, OmpW, which weaken outer membrane structure to cause cell lysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：微生物分子生物学

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、シグマ E、sRNA、溶菌、プログラム細胞死、Omp

1. 研究開始当初の背景

微生物におけるプログラム細胞死(PCD)は、枯草菌の孢子形成母細胞の死などで一部知られるが、その生理的意義を含めて詳細な分子機構はほとんど明らかでない。大腸菌などでは、トキシンとアンチトキシンのセットが複数存在し、栄養枯渇などが引き金となってPCDを起こすことが知られているが、溶菌までには至らない。一方、大腸菌のシグマ E (RNA ポリメラーゼのサブユニットであるシグマ因子) 依存性 PCD は、溶菌を引き起こす。シグマ因子が関与することからその下流の遺伝子発現に繋がっており、プログラムされていることは間違いない。大腸菌を栄養豊富な培地で生育させると定常期初期にVBNC (生きているがコロニー形成ができない) 細胞となり、その大部分はシグマ E の発現を抗シグマ E 遺伝子破壊などによって増加させると溶菌する。しかしながら、その溶菌の分子機構やカスケードはほとんど未解明のままであった。

2. 研究の目的

本課題では、「シグマ E 依存性 PCD」のカスケード解明を目的とした。この現象は、申請者らが見出したものであるが、長らくその分子機構は不明であった。最近の本課題代表者らの研究によって、シグマ E 依存性 PCD に small RNA (sRNA) の *micA* や *rybB* が関与し、それらが Omp の発現を抑制し、溶菌に至る可能性が示された。そこで、本課題研究では、そのカスケードの開始と最終段階に焦点を

当てた。すなわち、「カスケードを誘導するシグナル」と「Omp の発現抑制から溶菌まで」を解析した。この機構の解明は、発酵細菌の細胞死や溶菌の抑制あるいは病原菌の繁殖抑制などの技術として発酵産業や衛生等に活かされると期待される。

3. 研究の方法

大腸菌 W3110 を一般的な栄養豊富な LB 培地に植菌し、100 rpm の振とう培養条件で培養した。経時的にサンプリングし、増殖、溶菌等を調べた。「カスケードを誘導するシグナル」の解析では、以前の解析からストレス対応のシグマ S の変異やシグマ S レギュロンの KatE 遺伝子変異によって溶菌が強まるのが分かっていたので、細胞内酸化ストレスすなわち活性酸素種 (ROS) に着目した。ROS の定量や VBNC を測定し、溶菌が起るタイミングと比較した。溶菌は、培養液を低速で遠心し、その上清に 5%TCA を加えてタンパクを沈殿として回収し、SDS 電気泳動によってタンパクバンドの濃さを比較することによって調べた。また、ROS 除去に働く KatE や SodA 遺伝子破壊株を用いて、ROS を増加させ、その影響を調べた。「Omp の発現抑制から溶菌まで」の解析では、いくつかの関連遺伝子の破壊株およびいくつかの関連遺伝子クローンの導入株における溶菌の度合いを調べた。溶菌は、SDS 電気泳動による検討だけでなく、電子顕微鏡を用いて観察した。Mg²⁺の影響は培地に 20 mM 添加してその影響を検討した。

4. 研究成果

カスケードを誘導するシグナルの検討

対数増殖期から定常期への移行期付近からシグマ S が定常期の生育に必要な遺伝子を発現するようになる。また、シグマ S はストレス対応のシグマと呼ばれることから、定常期のストレスに耐えうる遺伝子発現を行っているかと推測される。これまでの研究によってシグマ S の変異やシグマ S レギュロンの KatE 遺伝子変異によって溶菌が強まること示された。そこで、細胞内の活性酸素種 (ROS) 量の変動を調べることにした。同時に全細胞数、VBNC 細胞数、生菌数 (コロニー形成細胞数) を測定し、溶菌が起るタイミングと比較した。その結果、定常期初期に、まず、ROS が一過的に蓄積し、その後、VBNC 細胞が増加し、続いて、溶菌が観察された。また、ROS 生産を抑制するスーパーオキシドディスムターゼやカタラーゼの遺伝子 (*sodA* と *katE*) 変異株について野生株と溶菌を比較したところ、*sodA* と *katE* 変異株は野生株よりはるかに強い ROS 蓄積と溶菌を示した。同時に、*sodA* と *katE* 変異株では sigma E の発現が高まっていた。さらに、*sodA* と *katE* プラスミドクローンを野生株に導入したところ、ROS 蓄積量が下がり溶菌も弱まった。これらの結果から、ROS がシグマ E 依存性 PCD のシグナルであることが示唆された。従って、シグナルは外部ストレスではなく、内在性ストレスであることが示唆された。おそらく、ROS が細胞内の高分子などを酸化することによって VBNC 細胞とし、その障害が sigma E を発現させて溶菌へと導いていると思われる。

Omp の発現抑制から溶菌までの経路の解析

mica や *rybB* 変異株では溶菌が抑制され、*mica* や *rybB* のプラスミドクローンの導入や *ompA*, *ompC*, *ompW* の破壊によって溶菌が観察された。従って、Omp (*ompA*, *ompC*, *ompW*) の発現抑制が溶菌に繋がることから、溶菌に至るカスケードにおいて Omp が減少し、外膜の構造が不安定になることが原因であると予測された。これを裏付けるために、外から外膜を安定化する Mg²⁺ を 20 mM の濃度になるように培地に添加したところ、溶菌が抑制された。また、この抑制は EDTA 処理によって解除され迅速に溶菌へ導かれた。これらの結果と合わせて考えると、カスケードはシグマ E 発現増加 ⇨ sRNA (*mica*, *rybB*) 発現増加 ⇨ Omp (*ompA*, *ompC*, *ompW*) 発現低下とすすみ、最終的に膜構造が弱くなり膜破壊がおこるものと推測される。

さらに、ペリプラズムのタンパク質フォールディングに関わる PpiD が関与していることが示唆された。特に、コロニー形成不能細

胞において、PpiD の発現が減少し、これが、sRNA による Omp 遺伝子の発現抑制に加えて Omp タンパク質の発現低下を加速させ、外膜の不安定化そして溶菌に繋がると推測される。

溶菌が進む時期が死滅期と一致することから、これまで不明であった定常期から死滅期の進行の 1 つがシグマ E 依存性 PCD によって進められることが示唆された。sRNA の変異株を作製しその変異の影響を検討したところ、シグマ E 依存性 PCD が抑制され、長期定常期での生存率が大きく低下した。これらの結果から、死滅期から長期定常期への移行において、シグマ E 依存性 PCD が重要な役割を演じていることが示唆された。

シグマ E 依存性 PCD の調節機構

シグマ E 依存性 PCD の調節を検討するために、それに関与すると予測される遺伝子 (*rseA*, *rseB*) の変異株について、溶菌の度合いを野生株と比較した。RseA (抗シグマ E) 遺伝子変異は強く溶菌を引き起こし、RseB (共抗シグマ E) 遺伝子変異はかなりの溶菌を引き起こした。これは両遺伝子変異株の *rpoE* の発現量の度合いと一致した。また、RseA 遺伝子変異株では膜結合性 RpoE に対する可溶性 RpoE の割合を高めており、これが *rpoE* やそのレギュロンの発現を高め、溶菌を誘導していると予測された。

関連した研究成果

高温になれば細胞内 ROS が増加し、シグマ E 依存性 PCD も顕著になった。そこで、大腸菌のゲノムワイドスクリーニングによって 47 °C での生育に不可欠な遺伝子 (耐熱性遺伝子) 群を同定した。同時に、生育限界温度ショックによって発現変動する遺伝子群を同定した。予想に反して、前者は *dnaJ* と *dnaK* を除いて後者と重複しておらず、生育限界温度では特殊な非熱ショック応答遺伝子セットが要求されることが示された。耐熱性遺伝子変異株の半分以上が 30 °C で過酸化水素に感受性であることが判明し、耐熱性機構は部分的に酸化ストレス耐性機構と重複していることが示唆された。耐熱性遺伝子は、外膜の形成、DNA 二本鎖切断修復、tRNA 修飾、タンパク質品質管理、転写調節、細胞分裂に関係していた。必須遺伝子の内、多くのリボソームタンパク質遺伝子が生育限界温度で発現抑制されることが示された。生物情報学的解析とゲノム情報比較によって、大腸菌が生育限界温度での生存のためにいくつかのシステムをもつことが示唆された。特に、リボ多糖の生合成系と tRNA 修飾のための硫黄リレー系が水平伝播によって獲得されてきたと推測された。

細胞内 ROS の生産には呼吸鎖電子伝達系

が関与している。本課題と関連して呼吸鎖脱水素酵素の構造と機能解析を行った。特に、大腸菌のグルコース脱水素酵素についてはユビキノンはあるいはメナキノンが補因子として働き、活性に不可欠であることを示した。一方、ザイモナス菌において、ROSの1つである過酸化水素の分解に関わるチトクローム *c* ペルオキシダーゼの生理的役割について検討した。

まとめ

大腸菌集団の多くの細胞は、増殖定常期初期に VBNC 細胞となり、その大部分はシグマ E 発現増加によって溶菌する。本研究では2つの sRNA がシグマ E 依存性の溶菌に関与すると仮定し、そのプログラム死経路 (PCD カスケード) を解明することを目的とした。特に、「カスケードを誘導するシグナル」と「Omp の発現抑制から溶菌まで (カスケードの最終段階)」に焦点を当てて解析を実施した。

katE 変異株は増殖定常期初期にその表現系としてシグマ E 依存性の溶菌を示した。一方、細胞内活性酸素種のレベルが対数増殖期から初期定常期への移行期で最大となり、それに続いて VBNC 細胞が増加した。野生株に *sodA* や *katE* を導入すると溶菌が抑制され、細胞内活性酸素種のレベルが減少し、コロニー形成細胞数が増加した。これらの結果は、酸化ストレスが VBNC 細胞形成と溶菌の主な要因であることを示唆する。すなわち、酸化ストレス (内在性の活性酸素種) が「カスケードを誘導するシグナル」であることを示唆する。また、*micA*, *rybB*, *ompA*, *ompC*, *ompW* の変異株やプラスミドクローンを用いた研究や Mg²⁺ を加えた研究などから、シグマ E 依存性のカスケードがシグマ E 発現増加 ⇨ sRNA (*micA*, *rybB*) 発現増加 ⇨ Omp 遺伝子発現低下とすすみ、最終的に膜構造が弱くなり膜破壊に至ると推測された。これらの結果や他の実験結果から、細胞溶菌に関わる sRNA の新規な機能を明らかにした。さらに、抗シグマ E 遺伝子 (*rseA*) の変異株において、溶菌が Omp のフォールディング因子 PpiD の減少を伴うことを見出した。その表現型は *rseA* プラスミドクローンあるいは *ppiD* プラスミドクローンの導入によって回復することが示された。従って、活性型のシグマ E の増加と PpiD の減少がシグマ E 依存性溶菌を引き起こし、そこに sRNA が関与することが示された。

以上のことから、定常期初期、まず、活性酸素種が一過的に細胞内に蓄積し、それに伴ってコロニー形成不能細胞が増加し、その直

後から溶菌が起こり、シグマ E 依存性 PCD がスタートする。PCD カスケードは、活性型のシグマ E の増加によって sRNA (*micA*, *rybB*) が発現し、*ompA*, *ompC*, *ompW* の発現を抑制する。同時に PpiD の減少が起ることから、外膜の OmpA, OmpC, OmpW が不足し、最終的に膜構造が弱くなり膜が破壊され溶菌に至ると推測される。

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 8 件)

- ① M. Murata, H. Fujimoto, K. Nishimura, K. Charoensuk, H. Nagamitsu, S. Raina, T. Kosaka, T. Oshima, N. Ogasawara, and M. Yamada: Molecular strategy for survival at a critical high temperature in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, in press. 査読有り
- ② K. Charoensuk, A. Irie, N. Lertwattanasakul, K. Sootsuwan, P. Thanonkeo and M. Yamada: Physiological importance of cytochrome *c* peroxidase in ethanologenic thermotolerant *Zymomonas mobilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotech.*, 20: 70-82 (2011) 査読有り
- ③ A. A. Talukder, S. Alam, Md Ershaduzzaman, S. K. Bashir and M. Yamada: Structure organization of co-regulated genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriology Research* 1:68-78 (2009) 査読有り
- ④ R. Noor, M. Murata, H. Nagamitsu, G. Klein, S. Raina, and M. Yamada: Dissection of σ E-dependent cell lysis in *Escherichia coli*: Roles of RpoE regulators RseA, RseB and periplasmic folding catalyst PpiD. *Genes to Cells*, 14:885-899 (2009). 査読有り
- ⑤ R. Noor, M. Murata, and M. Yamada: Oxidative stress as a trigger for

growth-phase specific σ E-dependent cell lysis in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotech.*, 17:177-187 (2009) 査読有り

⑥G. Mustafa, C. T. Migita, Y. Ishikawa K. Kobayashi, S. Tagawa, and M. Yamada: Menaquinone as well as ubiquinone as a bound quinone crucial for catalytic activity and intramolecular electron transfer in *Escherichia coli* membrane-bound glucose dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 283:28169-28175 (2008) 査読有り

⑦G. Mustafa, Y. Ishikawa, K. Kobayashi, C. T. Migita, MD Elias, S. Nakamura, S. Tagawa, and M. Yamada: Amino acid residues interacting with both the bound quinone and coenzyme, pyrroloquinoline quinone, in *Escherichia coli* membrane-bound glucose dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 283: 22215-22221 (2008) 査読有り

⑧村田正之、山田守：バクテリアのプログラム死と non-coding small RNA、化学と生物 46:550-556, 2008 査読無し

〔学会発表〕(計 7 件)

①M. Murata, H. Fujimoto, K. Nishimura, K. Charoensuk, H. Nagamitsu, S. Raina, T. Kosaka, T. Oshima, N. Ogasawara, and M. Yamada: Molecular strategy for survival at a critical high temperature in *Escherichia coli*. The 2nd Joint Seminar in Asian Core Program, Khon Kaen, Thailand. 19-21 Nov. 2010. pp. 17.

② M. Yamada: Exploration of thermotolerant useful microbes in tropical environments and their application. The 7th Asian Consortium for the Conservation and Sustainable Use of microbial resources, Tokyo, Japan, 13-14 Oct. 2010.

③Rashed Noor、村田正之、山田守：大腸菌定常期初期におけるシグマ E 依存性プログラム死：PpiD の役割 日本農芸化学会 3 支部合同大会、要旨集, p124, 10 月 30-31 日、2009 沖縄県 琉球大学

④M. Yamada, R. Noor, H. Nagamitsu, and M. Murata: The higher temperature, the more oxidative stress and lysis in *Escherichia coli*. The 3rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, Abstract p63, Khon Kaen, Thailand, 25-26 Aug, 2009

⑤Rashed Noor、村田正之、山田守：大腸菌定常期初期におこる溶菌はシグマ E 依存性である 2009 年度日本農芸化学会大会、講演要旨集、福岡、国際会議場、3 月 27-29 日、2009

⑥村田正之、長光博史、Rashed Noor、山田守：大腸菌定常期初期におこるシグマ E 依存性プログラム死カスケード 2009 年度日本農芸化学会大会、講演要旨集、p251、福岡、国際会議場、3 月 27-29 日、2009

⑦村田正之、長光博史、山田守：大腸菌における sRNA が介在する sigma E 依存性プログラム死カスケード、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講演要旨、p398, 神戸、神戸ポートアイランド、12 月 9-12 日, 2008

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：自己溶菌耐性細胞及びこれを用いた物質生産方法

発明者：山田守

権利者：国立大学法人山口大学

種類：特許

番号：特開 2011-24494

出願年月日：平成 21 年 7 月 27 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://ds22.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~jo-sei08/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 守 (YAMADA MAMORU)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30174741

(2) 研究分担者

村田 正之 (MURATA MASAYUKI)

山口大学・大学院医学系研究科・学術研究員

研究者番号：30452634

(3) 連携研究者

なし