

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05781

研究課題名(和文) 希少放線菌が形成する孢子嚢の開裂メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanisms for sporangium dehiscence in *Actinoplanes missouriensis*

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* が形成する孢子嚢を材料として、孢子が休眠耐久状態へと移行する過程、および休眠細胞が外部環境からの刺激を感知して覚醒し発芽に至る過程の分子機構の解明を目標とした。特に、孢子嚢の形成と開裂に必須の Chaperonin-linked protease (Clp) 複合体を構成する ATPase サブユニットをコードする遺伝子 *clpX* の発現制御機構の解明するとともに、孢子嚢の形成と開裂の過程で ClpX と複合体を形成するペプチダーゼサブユニットの同定、および孢子嚢開裂の過程で Clp 複合体の基質となるタンパク質の同定を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原核生物の中には休眠耐久細胞として孢子を形成するものが知られており、これは貧栄養な環境が大半を占めると予想される自然界において重要な生存戦略である。本研究では、希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* を材料として、孢子が包まれた袋状の構造物である孢子嚢が形成される過程、および孢子嚢が外部環境の変化を感知して開裂し、孢子を放出する過程を制御する分子機構の解明を目的とし、孢子嚢の形成と開裂に必須である Chaperonin-linked protease (Clp) 複合体の機能解析を行った。

研究成果の概要(英文)：The object of this research project is to clarify the molecular mechanisms for the transfer from vegetative mycelia to spores and for the activation of the dormant cells to germinate in an actinomycete *Actinoplanes missouriensis*. The specific targets of the research are follows: (i) regulatory mechanism for the transcription of *clpX*, which encodes an ATPase subunit of the chaperonin-linked protease (Clp) complex essential for the formation and dehiscence of sporangia, (ii) Identification of the peptidase subunits in complex with ClpX during sporangium formation and dehiscence, and (iii) identification of the target proteins of degradation by the Clp complex during sporangium dehiscence.

研究分野：応用微生物学

キーワード：孢子 孢子嚢 休眠 Clp複合体 希少放線菌 peptidase ATPase

1. 研究開始当初の背景

原核生物の中には休眠耐久状態の細胞として孢子を形成するものが知られている。孢子の形成は貧栄養な環境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界において非常に重要な生存戦略である。原核生物における孢子形成機構については、モデル生物である枯草菌 *Bacillus subtilis* や放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 等を材料として多くの先行研究が行われてきた。一方で、休眠耐久状態にある細胞が外部環境の変化を感知して覚醒し、発芽を経て栄養増殖へと移行する分子機構については未解明な部分が多く残されていた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* を材料として、栄養細胞が休眠耐久状態である孢子へと移行する過程、および孢子が外部環境からの刺激を感知して覚醒し、発芽を開始する過程の詳細な分子メカニズムの解明を目的とする。*A. missouriensis* は固体培養を行うと培地表面および培地中に分岐した基底菌糸を伸長して栄養増殖を行うが、培地中の栄養源が枯渇すると短い孢子嚢柄に支えられた孢子嚢を空中に多数形成して休眠状態となる。1つの孢子嚢は 100-200 程度の運動性孢子を内包しており、基底菌糸と比較して高温や乾燥条件に対して高い耐性を示す。孢子嚢は乾燥条件から湿潤条件へと外部環境が変化するとそれを感知して開裂し、内部の孢子を外界へ放出する。放出された孢子はべん毛による運動性を示す遊走子となる。遊走子の運動は数時間程度持続可能であるが、栄養条件の適した環境に至ると運動を停止し、発芽して栄養増殖を開始する (図1)。長時間の乾燥条件に晒されても適切な湿潤環境に置かれれば孢子嚢が開裂して孢子が放出され遊走子として運動を開始することから、孢子嚢は孢子のストレス耐性と運動性の維持に不可欠の構造体である。栄養条件の不適切な環境中で孢子嚢が開裂すると、放出される孢子が発芽して栄養増殖へと移行することは困難であり、孢子嚢による外部環境のセンサー機構は *A. missouriensis* の生存戦略に不可欠のメカニズムである。

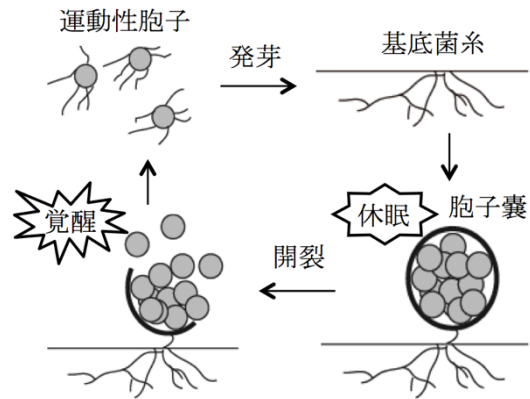


図1. *A. missouriensis* の生活環

(2) これまで、研究代表者が研究を進めるグループでは *A. missouriensis* の孢子嚢について解析を行い、セリンプロテアーゼ阻害剤が孢子嚢開裂を阻害することを見出していた。したがって、孢子嚢開裂には何らかのセリンプロテアーゼが必須であると考えられる。孢子嚢を開裂誘導条件におくと孢子嚢外膜の構造変化と孢子嚢の膨張を経て、約30分ほどで開裂し、内部の孢子を外環境中に放出する。そこで、開裂誘導条件において0、15、120分後の孢子嚢からRNAを抽出して比較トランスクリプトーム解析を行い、開裂の誘導開始0分後と比較して15分後に有意に転写量が増大し、かつ開始15分後と比較して120分後に転写量が有意に減少するセリンプロテアーゼまたはその関連因子をコードする遺伝子を7つ見出した。これらの遺伝子を野生株のゲノム上から個々に欠失させた遺伝子破壊株を作製して表現型を観察した結果、Chaperonin-linked protease (Clp) と呼ばれるタンパク質分解酵素複合体を構成する ATPase サブユニットをコードする *clpX* 破壊株において孢子嚢の形成・開裂を異常が観察された。これより、孢子嚢の形成・開裂過程において Clp 複合体が重要な役割を担うことが判明した。Clp 複合体は ATPase サブユニットとペプチダーゼサブユニットから構成され、ATPase サブユニットは基質となるタンパク質を認識してアンフォールドさせる一方、ペプチダーゼサブユニットは ATPase サブユニットから送り込まれる基質を分解する。そこで、Clp 複合体のペプチダーゼサブユニットをコードすると予想される遺伝子をゲノム上から探索したところ、4つの候補遺伝子 (*clpP1*, *clpP2*, *clpP3*, *clpP4*) が見出された。これらの遺伝子を個々に欠失させた破壊株を作製して表現型を観察した結果、*clpP3* 破壊株において孢子嚢開裂が進行しなかったことから、ClpP3 をペプチダーゼサブユニットとする Clp 複合体が孢子嚢の解列に必須であることが判明した。これらの結果は、*A. missouriensis* の孢子嚢における孢子の休眠と覚醒を分子レベルで解明するための重要な糸口と考えられた。

3. 研究の方法

(1) 本研究開始時までの研究により、*clpX* 遺伝子は少なくとも2つのプロモーター配列を有することが判明していた。これらのプロモーター配列の *in silico* 解析により、1つは主要シグマ因子により認識され、もう一方は孢子嚢形成と開裂をグローバルに制御する置換型シグマ因子 FliA によって認識されると予想された。これら2つのプロモーターのうち、どちらか一方を

欠損すると孢子嚢開裂が阻害され、両者を欠損すると孢子嚢が正常に形成されなくなったことから、*c1pX* の転写制御は孢子嚢形成・開裂において非常に重要な機構であると考えられた。そこで、野生株と *fliA* 破壊株における *c1pX* 遺伝子の経時的な転写解析を行い、*c1pX* の2つのプロモーター配列がそれぞれ異なる制御因子により転写活性化されていることを示した。

(2) 遺伝子破壊株の表現型観察の結果から、ClpX は孢子嚢開裂時には ClpP3 と複合体を形成する一方、孢子嚢形成時には他のペプチダーゼサブユニットと複合体を形成する可能性が高いと予想された。そこで、Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D-DIGE) 法を用い、開裂誘導条件においた野生株と *c1pP3* 破壊株の孢子嚢間の比較プロテオーム解析を行い、*c1pP3* 破壊株特異的に存在量が増加する基質タンパク質を探索した。

(3) 大腸菌を宿主として、ClpX と ClpP3 の組換えタンパク質の発現・精製を行い、 β -カゼインを基質として *in vitro* で Clp 複合体によるタンパク質分解アッセイを実施した。

4. 研究成果

(1) *A. missouriensis* は FliA ファミリーのシグマ因子をコードする遺伝子を4つ (*fliA1*、*fliA2*、*fliA3*、*fliA4*) 持っている。野生株と *fliA1-A3* 破壊株 (*fliA1*、*fliA2*、*fliA3* の多重破壊株) を孢子嚢形成条件にて培養し、経時的に RNA を抽出して *c1pX* 遺伝子の転写解析を行った。その結果、*fliA1-A3* 破壊株では、*c1pX* の2つのプロモーターのうち下流に位置するプロモーターからの転写産物が全く検出されなかった。したがって、この下流のプロモーターは FliA ファミリーのシグマ因子が認識すると考えられる。

(2) 野生株と *c1pP3* 破壊株を孢子嚢形成条件で培養し、これら2株の孢子嚢から抽出したタンパク質を用いて 2D-DIGE 法による比較プロテオーム解析を行った結果、少なくとも4つタンパク質が *c1pP3* 破壊株において野生株よりも存在量が増加していた。これらのタンパク質がいずれの遺伝子産物であるのかについては未同定である。

(3) ClpX、ClpP1、ClpP2、ClpP3、ClpP4 の5つのタンパク質を大腸菌にて発現・精製し、市販の β -カゼインを基質として *in vitro* でプロテアーゼ活性試験を行った結果、ClpX、ClpP1、ClpP4 の3つのタンパク質を混合した場合に基質タンパク質の分解が見られた。

(4) Clp 複合体のペプチダーゼサブユニットの活性部位はセリン、ヒスチジン、アスパラギン酸の3つの残基で構成されることが知られている。ClpP1、ClpP2、ClpP3、ClpP4 タンパク質の詳細な *in silico* 解析を行ったところ、ClpP3 にはこれら3つの活性残基がまったく保存されておらず、ペプチダーゼ活性を有しない可能性が高いことが示唆された。また、ATPase サブユニットとの相互作用に必須の疎水性ポケットにはチロシン残基が含まれていることが多いことが知られているが、ClpP3 にはこのチロシン残基も保存されていないことから、ATPase サブユニットとの相互作用にも直接関与しない可能性が示唆された。

(5) 本研究開始時点では *c1pP2* 遺伝子破壊株は取得できておらず、*c1pP2* は生育に必須な遺伝子であることが示唆されていた。そこで、活性残基の1つである 113番目のセリン残基をアラニン残基に置換した *c1pP2* (S113A) 変異株の作製を試みたところ、本変異株が取得できたことから、*c1pP2* 遺伝子は必須遺伝子ではないと考えられた。また、取得した *c1pP2* (S113A) 変異株による孢子嚢形成、開裂、遊走子の運動能などに異常は観察されなかったことから、ClpP2 のペプチダーゼ活性は孢子嚢形成・開裂に必須ではないことが判明した。

(6) 大腸菌を宿主とする Bacterial two-hybrid assay により ClpX と4つの ClpP タンパク質との相互作用を解析した結果、ClpP1 が ClpX と相互作用することが判明した。また、ClpP タンパク質間の相互作用を同様に解析した結果、ClpP1 は他の3つの ClpP タンパク質いずれとも相互作用すること、ClpP2 が ClpP3 および ClpP4 と相互作用することが判明した。

(7) 以上の結果をふまえ、*A. missouriensis* の孢子嚢形成・開裂時において Clp 複合体を形成する構成因子、およびその機能について考察を行った。ClpX は ClpP1 と特異的に相互作用し、Clp 複合体を形成すると予想される。ClpP2 は孢子嚢形成・開裂には必要ないが、Clp 複合体の構成因子としては必須であると考えられる。一方、ClpP3 はペプチダーゼ活性も ATPase サブユニットとの相互作用能もないと予想されるが、孢子嚢開裂を何らかの形で補助していると予想される。ClpP4 は ClpP1 と相互作用することで Clp 複合体を形成し、基質タンパク質の分解を担っていると考えられる。

(8) 『2. 研究の目的』に記載した通り、*A. missouriensis* の孢子には休眠状態から栄養増殖を開始するまでに多段階の過程(孢子嚢開裂による外界への放出、べん毛運動による遊走と走化性の発揮、運動の停止と発芽)が存在している。これらの過程では、外部環境の変化を感知し、

その情報を細胞内へ伝達し応答する機構がそれぞれ存在するはずであり、その分子機構の解明は、細胞の休眠と開裂という生命の根本的現象の理解につながる重要な知見である。本研究では、特に孢子嚢開裂による外界への孢子の放出過程に焦点を当て、その解明を目指した。

(9) 細胞分裂により増殖する単細胞形態の生物種が多く知られる原核生物において、*A. missouriensis* は非常に複雑な生活環を有する極めて特異な存在である。特に、多数の孢子が1つの構造体に内包されているという意味で“多細胞状態”ともいえる孢子嚢の形成とその開裂は、多細胞生物の進化の側面からも学術機に非常に興味深い研究対象である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Tezuka Takeaki, Ohnishi Yasuo	4. 巻 86
2. 論文標題 Surface structure and nanomechanical properties of <i>Actinoplanes missouriensis</i> sporangia analyzed via atomic force microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 552 ~ 556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac002	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 Hashiguchi Yuichiro, Tezuka Takeaki, Ohnishi Yasuo	4. 巻 113
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 1170 ~ 1188
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 Hashiguchi Yuichiro, Tezuka Takeaki, Mouri Yoshihiro, Konishi Kenji, Fujita Azusa, Hirata Aiko, Ohnishi Yasuo	4. 巻 202
2. 論文標題 Regulation of Sporangium Formation, Spore Dormancy, and Sporangium Dehiscence by a Hybrid Sensor Histidine Kinase in <i>Actinoplanes missouriensis</i> : Relationship with the Global Transcriptional Regulator TcrA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00228-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00228-20	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9件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shixuan Hu, Satoshi Maeda, Takeaki Tezuka, Yasuo Ohnishi
2. 発表標題 Search for the acyltransferase required for the formation of triacylglycerol-containing sporangium membrane in <i>Actinoplanes missouriensis</i>
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 譚 鏘文、手塚 武揚、大西 康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> における孢子嚢胞子の成熟に関わる細胞壁分解酵素AsmA の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 玲実、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> の遊走子べん毛形成に必須な2 つの遺伝子 (<i>trxA</i> , AMIS1780) に対するサプレッサー変異株の取得と解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 手塚 武揚、大西 康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> が形成する孢子嚢の休眠と覚醒を制御する新規なシグマ-アンチシグマ因子制御系
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高井 亮太郎、手塚 武揚、石田 翼、大西 康夫、曾和 義幸
2. 発表標題 放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> の極べん毛モーター回転計測
3. 学会等名 2021年度べん毛研究交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 玲実, 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> の遊走子べん毛形成に必須な2つの遺伝子 (<i>trxA</i> , <i>AMIS1780</i>) に対するサプレッサー変異株の取得と解析
3. 学会等名 2021年度日本放線菌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shixuan Hu, Satoshi Maeda, Takeaki Tezuka, Yasuo Ohnishi
2. 発表標題 Search for the acyltransferase required for the formation of triacylglycerol-containing sporangium membrane in <i>Actinoplanes missouriensis</i>
3. 学会等名 2021年度日本放線菌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 譚 鏘文, 手塚 武揚, 大西 康夫
2. 発表標題 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> における孢子成熟に関わる細胞壁分解酵素遺伝子 <i>asmA</i> の機能解析
3. 学会等名 2021年度日本放線菌学会大会
4. 発表年 2021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 プロテアーゼは孢子嚢開裂を制御する
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------