

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510204

研究課題名（和文） バクテリアの生育に必須な「外来遺伝子群抑制システム」の解析

研究課題名（英文） Study on the essential “suppression system of foreign genes” in bacteria

研究代表者

加藤 潤一（JUN-ICHI KATO）

首都大学東京・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：10194820

研究成果の概要（和文）：大腸菌の転写終結に必須な Rho は外来遺伝子の発現を抑える働きをしていることが近年明らかにされた。転写終結に関与することを見出した機能未知必須遺伝子 *yqgF* および機能未知必須遺伝子群 *yeaZ*, *ygjD*, *yjeE* を解析した結果、*yqgF* は 16S rRNA のプロセッシングに関与すること、また *yeaZ*, *ygjD*, *yjeE* が転写終結およびゲノムの安定性に関与することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The important function of *Escherichia coli* Rho protein was recently found to be suppression of foreign genes. We analyzed the functions of uncharacterized essential genes, *yqgF*, *yeaZ*, *ygjD*, and *yjeE*. We found that YqgF, which is involved in transcriptional termination, is necessary for 16S rRNA processing and that *yqgF*, *yeaZ*, and *ygjD* are involved in transcriptional termination and genome integrity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：ゲノム機能発現

1. 研究開始当初の背景

大腸菌ゲノムの全塩基配列は 1997 年に決定され、その後約 10 年かかって全ての必須遺伝子が同定された。我々は染色体広域欠失株を系統的、網羅的に作製することにより、シス位で機能する必須なユニークな配列は複製起点だけであることを示し、またトランス位で機能する必須遺伝子は 302 個と同定してそれらの機能解析を進めてきた。この 302 個の必須遺伝子については、今ではほとんどのものの機能が明らかにされているが、研究開始当初は、いくつかの必須遺伝子の機能が明らかにされておらず、これらの機能を明らかにすることが重要な課題となっていた。

この機能がまだ明らかになっていなかった必須遺伝子の一つである *yqgF* 遺伝子の機能について我々は解析を行い、YqgF タンパク質が転写終結に必須な Rho タンパク質の機能と関連することを見出していた。Rho タンパク質依存的転写終結シグナルは染色体上に多く存在するが、遺伝子の上流や遺伝子内にも存在することが知られているが、興味深いことに YqgF タンパク質は、これらの転写終結シグナルを乗り越えて転写を起こさせるのに機能していることがわかってきた。

一方、研究開始直前、Rho タンパク質は外来遺伝子群の発現を抑制するシステムであることが明らかにされ、実際に染色体中のウ

ウイルス由来の領域（プロファージ領域）を欠失させた菌株では、Rho タンパク質の機能を補助する必須遺伝子である *nusA*, *nusG* 遺伝子を欠失させても生育できることが報告された。この報告では *rho* 遺伝子は欠失できていなかったが、Rho タンパク質の阻害剤に対して耐性になることが報告されていた。これらの結果により、外来遺伝子の発現を抑制せずには生育できないという、これまで知られていなかった大腸菌の姿が明らかになってきた。

我々が機能解析を進めていた YqgF タンパク質は、Rho タンパク質による不具合を克服するために必須であるとも考えられるので、もし外来遺伝子の欠失をさらに進めて *rho* 遺伝子を欠失させることができれば、YqgF タンパク質も非必須になるかもしれないと考えられた。もしそうなれば、YqgF タンパク質広い意味では外来遺伝子の発現を抑制するシステムの一つと考えられ、大変興味深い。

また別の機能未知必須遺伝子で我々が解析を進めている *ygjD*, *yeaZ*, *yjeE* 遺伝子についても、外来遺伝子の発現を抑制するシステムとして機能することが示唆されてきた。*ygjD* 遺伝子は、原核生物はもちろん古細菌、真核生物にも広く保存されている遺伝子で、近年酵母においてテロメアの維持や転写制御に関与すること、また古細菌のホモログが脱塩基部位に作用する AP-endonuclease であることが報告され、研究開始当初、非常に注目されてきていた。大腸菌の *ygjD* 遺伝子については、我々の遺伝学的解析などにより、2つの機能未知必須遺伝子 *yeaZ*, *yjeE* 遺伝子が *ygjD* 遺伝子の機能に関与していることがわかっていた。

我々は研究開始当初、これらの *ygjD*, *yeaZ*, *yjeE* 遺伝子が抗転写終結機構の阻害に働くことを示唆する結果を得ていたので、ゲノム中のウイルスゲノムに存在する抗転写終結機構との関連が考えられ、これらも外来遺伝子の発現を抑制するシステムの一つである可能性が考えられた。

2. 研究の目的

バクテリアには、ゲノム中に存在するウイルスゲノムなどの外来遺伝子の発現を抑制するシステムが存在し、それが生育に必須であることが明らかになってきている。本研究では大腸菌を材料にしてこのシステムの全容を明らかにすることを目的とする。具体的には、転写終結に必須な *rho* 遺伝子、また機能未知必須遺伝子 *yqgF*, *ygjD*, *yeaZ*, *yjeE* が外来遺伝子の発現を抑制するシステムであることが示唆されてきたので、我々が作製した染色体大規模欠失株からさらに残っている外来遺伝子群を欠失させた株を作製し、これらの遺伝子が非必須になることを示す

と共に、各々の遺伝子の機能を明らかにする。さらに他の必須遺伝子群の中からも同様なものを探索する。

3. 研究の方法

まず我々が作製した大腸菌染色体大規模欠失株において、まだ残っている外来遺伝子領域を欠失させた菌株を作製し、*rho* 遺伝子さらには *yqgF* 遺伝子、また *ygjD*, *yeaZ*, *yjeE* 遺伝子の欠失を試み、これらが外来遺伝子の発現を抑制するシステムである可能性について調べた。

また *yqgF* 遺伝子については、YqgF タンパク質が転写終結に必須な Rho タンパク質の機能と関連することを見出ししていたので、どのようなメカニズムで転写終結に関与しているかについて調べ、最終的には YqgF タンパク質の生物学的機能、生化学的機能の解明を試みた。

さらに機能未知必須遺伝子 *yqgF*, *ygjD*, *yeaZ* については、これらが抗転写終結機構の阻害に働くことを示唆する結果を得ていたため、そのメカニズムを明らかにし、また他の機能についても調べた。

4. 研究成果

(1) 外来遺伝子領域を欠失させた菌株の作製

我々は研究開始までに染色体広域欠失株の系統的、網羅的作製、および染色体を約 30% 欠失させた染色体大規模欠失株の作製に成功していた。大腸菌染色体にはウイルスゲノム由来の外来遺伝子領域（プロファージ）が 8カ所知られているが、この約 30% 欠失させた染色体大規模欠失株ではすでに 4カ所が欠失しているため、残りの領域などを欠失させ、染色体の約 39% を欠失させた菌株を作製した。

大腸菌染色体大規模欠失株の作製

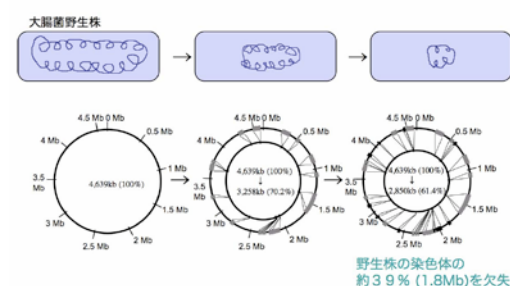


図 1 大腸菌染色体大規模欠失株の作製

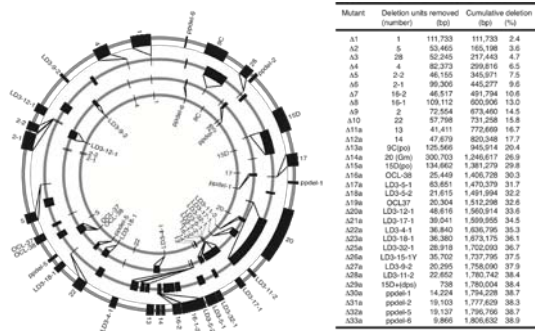


図2 大腸菌染色体大規模欠失株（ゲノム縮小株）
一番外側の円は野生株の染色体を、一番内側の円は約39%欠失させた株の染色体の大きさを表す。

作製した染色体大規模欠失株で *rho*, *yqgF*, *ygjD*, *yeaZ*, *yjeE* 遺伝子を破壊した株の作製を試みたが、いずれについても作製できず、外来遺伝子の発現抑制以外の生育に重要な機能に必須であることが示唆された。

また、本研究で外来遺伝子領域を欠失させて作製した染色体大規模欠失株群については、酸化ストレス耐性を調べたところ、染色体を欠失させていくに従って耐性の低下と回復が見られること、また好氣的、嫌氣的の培養条件によって耐性が変化することなど、興味深い性質がわかり、野生株では潜在的な酸化ストレス耐性機構を調べる手がかりが得られた。

(2) 必須遺伝子 *yqgF* の解析

yqgF 遺伝子の生物学的機能については、遺伝学的解析により Rho タンパク質依存性転写終結配列を遺伝子内や遺伝子上流に持つ *lacZ*, *tna* 遺伝子の発現に YqgF タンパク質が必須であることが明らかになり、Rho タンパク質依存性転写終結配列に対する抗転写終結に関与する事が示唆されていた。

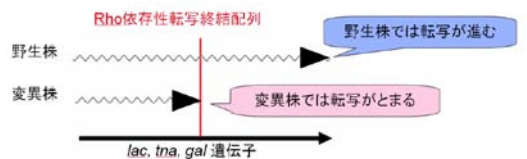


図3 *yqgF* 変異の転写終結に対する影響

YqgF タンパク質の Rho タンパク質依存性転写終結配列に対する抗転写終結への関与のメカニズムを明らかにするために、精製した YqgF タンパク質を用いて転写における R-loop への影響について調べたが、影響は見られなかった。

また転写終結に必須な NusA タンパク質の、DNA 複製と転写の衝突および DNA 修復への関与が報告されたので、YqgF タンパク質のこれ

らへの関与について遺伝学的に調べたが、関与を示す結果は得られなかった。

近年バクテリアにおける翻訳と転写は、より直接的、機能的に関連していることが明らかになってきたことから、YqgF タンパク質が翻訳、さらにはリボソームの機能に関与する可能性を考え、*yqgF* 温度感受性変異株における rRNA について調べたところ、16S rRNA のプロセッシングが不完全な前駆体 (pre-16SrRNA) が蓄積していることがわかった。単離した pre-16S rRNA は精製した YqgF タンパク質により *in vitro* でプロセッシングされなかったが、pre-16S rRNA を含むリボソーム画分を用いるとプロセッシングされることがわかり、YqgF タンパク質は 16S rRNA のプロセッシングに関与する RNase であることが明らかになった。切断部位については 5' RACE, 3' RACE 法により決定したところ、5' 側のこれまで RNase E が切断すると考えられてきた部位であることがわかった。また 16S rRNA がプロセッシングされない場合には、リボソームの S1 タンパク質が減少することもわかった。

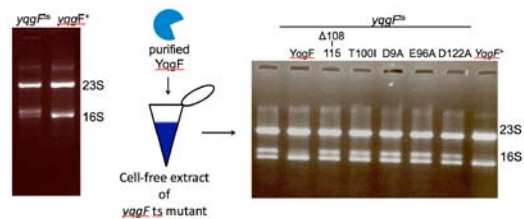


図4 *yqgF* 温度感受性変異株における pre-16SrRNA の蓄積と精製した野生型、変異型 YqgF による pre-16SrRNA 切断反応

また YqgF タンパク質の構造と機能について遺伝学的解析を行った。YqgF タンパク質の構造については、DNA の相同的組換えにおける Holliday 構造を解離させる Resolvase である RuvC タンパク質と、立体構造の相同性が高いことが NMR による解析から知られていた。そこで RuvC の活性部位に対応する YqgF のアミノ酸残基、および RuvC タンパク質と構造的に大きく異なっているドメイン (disordered structure) の変異型 *yqgF* 遺伝子を作製して調べたところ、どちらも生育に必須な機能に重要であることが明らかになった。また作製した変異型 YqgF タンパク質を精製して、*in vitro* で pre-16SrRNA の切断について調べたところ、どの変異型 YqgF タンパク質でもプロセッシング活性が認められなかった。

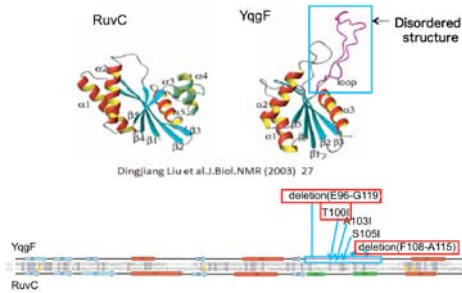


図5 YqgF タンパク質の RuvC タンパク質と相同的な立体構造を持つ部位と非相同的な部位

(3) 必須遺伝子 *ygjD*, *yeaZ*, *yjeE* の解析
 遺伝学的解析から YgJd, YeaZ, YjeE タンパク質が転写、特に抗転写終結に関与することが示唆されたので、*ygjD* 高温感受性変異株についてマイクロアレイを用いた解析を行った結果、*thr*, *ilv* オペロンの発現が増大していることを見出した。そこで *lacZ* 遺伝子をレポーター遺伝子に用いてさらに詳細な解析を行ったところ、これらのオペロンにおける転写減衰が減少することがわかった。

研究を進めている途中の 2011 年 2 月に 2 つの研究グループより、YgJd 関連タンパク質が tRNA の普遍的な修飾の 1 つで、ANN コドンを解読するのに重要な t6A 修飾の生成に直接関与することが明らかになった。*thr*, *ilv* オペロンのリーダーペプチドの Thr, Ile 残基のコドンが ANN であることから、tRNA 修飾に欠損のある *ygjD* 高温感受性変異株では ANN コドン解読に支障があるためリーダーペプチドの翻訳が遅くなり、アテニュエーションが起こりにくくなっていると考えられ、RNA 修飾と遺伝子発現調節機構との関連が示唆された。

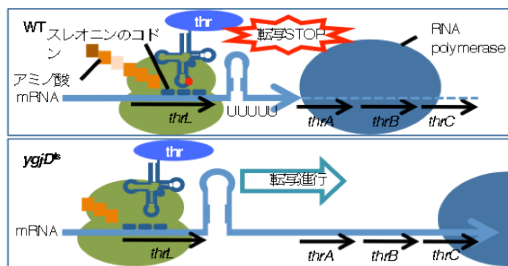


図6 *ygjD* 高温感受性変異株における *thr* オペロンのアテニュエーション異常

また *ygjD* 高温感受性変異株から単離されたサプレッサー変異株のゲノム構造について、全塩基配列を決定して解析した結果、染色体構造が大きく変化していることがわかった。そこで次世代シーケンサーによって全ゲノム配列を解析したところ、約 450kb の染

色体領域が倍加して、他の領域に欠失を伴う逆位の形で挿入されていることがわかった。この染色体構造の変化は複雑であるが、挿入配列 IS1 が関与していることが示唆されたので詳細に調べたところ、*ygjD* 変異により挿入配列 IS1 の転位頻度が上昇すること、さらには挿入配列 IS1 のトランスポゼースは上流の遺伝子のフレームシフトにより翻訳されることが知られているが、そのフレームシフトの頻度が *ygjD* 変異により上昇することが明らかになった。またこの染色体構造の変化により 3 つの *rrn* オペロン (rRNA 遺伝子) の逆位が生じていることから、DNA 複製と転写の衝突に耐性になっていることが示唆された。これらの結果から、RNA 修飾の欠損は翻訳だけでなく、転写調節機構やゲノム構造にも影響することが明らかになった。

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)

① Tachikawa, T., and Kato, J. (2011) Suppression of the temperature-sensitive mutation of the *bamD* gene required for the assembly of outer membrane proteins by multicopy of the *yiaD* gene in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **75**: 162-164.

② Iwadate, Y., Honda, H., Sato, H., Hashimoto, M. and Kato, J. (2011) Oxidative stress sensitivity of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. FEMS Microbiology Letter. **322**: 25-33.

③ Hashimoto, C., Sakaguchi, K., Taniguchi, Y., Honda, H., Oshima, T., Ogasawara, N., and Kato, J. (2011) Effects on transcription of mutations in *ygjD*, *yeaZ*, and *yjeE* genes involved in a universal tRNA modification in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **193**: 6075-6079.

④ Iwamoto, A., Osawa, A., Kawai, M., Honda, H., Yoshida, S., Furuya, N., and Kato, J. (2012) Mutations in the essential *Escherichia coli* gene, *yqgF*, and their effects on transcription. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **22**: 17-23.

[学会発表] (計 13 件)

① 加藤潤一、岩本明、橋本知佳、大澤睦、河井真紀子、本多弘典、吉田早織、成田裕行、古屋伸久、酒井彩 (2010) 大腸菌の機能未知必須遺伝子群の解析. 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会 合同学会 (神戸).

- ② 岩館佑未、加藤潤一 (2011) 大腸菌染色体大規模欠失株を用いた酸化ストレス耐性に関与する遺伝子の解析. 第5回日本ゲノム微生物学会年会 (仙台) .
- ③ 岩館佑未、高木光、岩岡千晶、久保田希、加藤潤一 (2011) 大腸菌染色体大規模欠失株を用いた酸化ストレス耐性に関与する遺伝子の探索. 第34回日本分子生物学会年会 (横浜) .
- ④ 橋本知佳、成田裕行、本多弘典、加藤潤一 (2011) 大腸菌の機能未知必須遺伝子群の解析. 第34回日本分子生物学会年会 (横浜) .
- ⑤ 岩館佑未、加藤潤一 (2011) 大腸菌染色体大規模欠失株を用いた酸化ストレス耐性に関与する遺伝子の解析. ゲノム微生物学会ワークショップ「ゲノムで繋がる微生物研究の新展開」 (仙台) .
- ⑥ 橋本知佳、加藤潤一 (2012) 大腸菌の生育に必要なtRNA修飾酵素遺伝子yggDの遺伝学的解析. 第6回日本ゲノム微生物学会年会 (東京) .
- ⑦ 岩館佑未、加藤潤一 (2012) 大腸菌染色体大規模欠失株を用いた定常期の生存に関与する遺伝子の探索. 第6回日本ゲノム微生物学会年会 (東京) .
- ⑧ 中西忍、橋本昌征、古屋伸久、加藤潤一 (2012) 大腸菌の生育に必要な機能未知遺伝子yqgFの解析. 第34回日本分子生物学会年会 (横浜) .
- ⑨ 高木光、北村麻衣子、加藤潤一 (2012) 大腸菌染色体大規模欠失株を用いた合成致死遺伝子群の解析. 第35回日本分子生物学会年会 (福岡) .
- ⑩ 久保田希、橋本昌征、岩岡千晶、橋本知佳、加藤潤一 (2012) 大腸菌染色体大規模欠失株の作製と利用. 第35回日本分子生物学会年会 (福岡) .
- ⑪ 中西忍、橋本昌征、古屋伸久、加藤潤一 (2013) 大腸菌の生育に必要な機能未知遺伝子yqgFの解析. 第7回日本ゲノム微生物学会年会 (長浜) .
- ⑫ 高木光、久保田希、加藤潤一 (2012) 大腸菌染色体大規模欠失株の解析とその利用. 第7回日本ゲノム微生物学会年会 (長浜) .
- ⑬ 岩館佑未、加藤潤一 (2012) 大腸菌の定常期の生育に関わるユニバーサルストレスプロテインの機能解析. 第7回日本ゲノム微生物学会年会 (長浜) .

[その他]

ホームページ等

<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/lab0.asp?ID=molgen>

<http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/index.jsp>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
加藤 潤一 (JUN-ICHI KATO)
首都大学東京・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：10194820
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし