

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：35409

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380053

研究課題名(和文) 枯草菌緊縮制御ネットワークの全貌の解明とその応用

研究課題名(英文) Elucidation of transcription network of stringent control in *Bacillus subtilis* and its application

研究代表者

藤田 泰太郎 (FUJITA, Yasutaro)

福山大学・生命工学部・教授

研究者番号：40115506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,100,000円、(間接経費) 2,730,000円

研究成果の概要(和文)： 枯草菌の緊縮応答によりGTP濃度の低下とATP濃度の増加が引き起こされる。その結果、緊縮遺伝子の転写開始部位にGがあれば負の転写制御が、Aがあれば正の転写制御が起こる。正の転写制御を受ける遺伝子のなかに孢子形成を開始させるkinAとkinBが含まれ、ATP濃度の増加を感知した正の緊縮制御の作動が孢子形成開始の前提条件となっていることを明らかにした。

応用面では負の緊縮制御を受けるptsオペロンの転写開始部位のGをAに変換することにより、緊縮制御時のグルコース代謝を高め正の制御を受ける分岐鎖アミノ酸合成オペロン(ilv-leu)によるイソロイシン産生の効率を5倍以上に高めることができた。

研究成果の概要(英文)： In *Bacillus subtilis*, stringent response evokes a GTP decrease and an ATP increase. As a result, positive and negative stringent transcription regulation of stringent operons possessing adenine and guanine in their transcription initiation sites, occur, respectively. Among positive stringent genes are kinA and kinB which are necessary for sporulation initiation. Operation of positive stringent transcription of kinA and kinB was found to be prerequisite for sporulation initiation.

As an approach to the applied field, guanine at the transcription initiation site of the pts operon under negative stringent control was converted to adenine, so that glucose metabolism was enhanced in the stringent conditions to result in more than 5-fold increase of isoleucine production by ilv-leu operon involved in branched-chain amino acid synthesis which is subjected to positive stringent transcription control.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：緊縮応答 枯草菌 発現制御 応用微生物 ゲノム 孢子形成 緊縮転写制御 プリン合成

1. 研究開始当初の背景

総じて劣悪な栄養環境に生育する細菌にとって、アミノ酸飢餓などの栄養状態の飢餓に対応する細胞応答である緊縮制御は、主として大腸菌を研究対象に研究が進められ、ppGpp を介した蛋白質や RNA の高分子物質合成を含む代謝制御系であることが明らかにされていた。通常劣悪な土壌環境に生息する枯草菌においても、その緊縮制御は ppGpp を介した代謝制御系であることが証明されていた。

研究代表者は、枯草菌のポストゲノムシークエンス研究であるゲノム機能解明プロジェクトに参画し、枯草菌の転写制御ネットワークの解明研究を遂行してきた。その結果、枯草菌には、大腸菌の緊縮制御系とは本質的に区別できる緊縮制御系が作動していることを明らかにすることができた。即ち、枯草菌では、ppGpp が RNA ポリメラーゼと結合することなく、GTP 合成系の GMP キナーゼを阻害し、生体内のエネルギー状態の指標である GTP の濃度を低下させ、また逆にこの阻害により AMP 合成を高め、細胞の物質合成能の指標である ATP 濃度を上昇させることにより、緊縮オペロンの転写制御をしている。即ち、この GTP 濃度の低下および ATP 濃度の上昇が、緊縮オペロンの転写開始速度に影響し、転写開始部位にグアニンがありアデニンがない場合は負に制御され、アデニンがありグアニンがない場合は正に制御される。この緊縮制御のうち、負の制御を受ける緊縮オペロン群は、リボソーム RNA および蛋白質、炭水化物代謝のキー酵素等で、正の制御を受けるのはアミノ酸合成や孢子形成初期遺伝子等で、全体で数百種に及ぶ。また、この緊縮制御における GTP の濃度の低下は、GTP をコリプレッサーとする窒素代謝の制御蛋白質 CodY の抑制解除により、100 近くのオペロンの脱抑制を引き起こす。このように、研究代表者の多大な貢献の結果、枯草菌の緊縮制御は壮大なネットワークを形成していることが明らかになっていた。

2. 研究の目的

枯草菌の緊縮制御の基盤として、GTP 濃度の低下と ATP 濃度の上昇が、緊縮オペロンの転写開始部位にグアニンがありアデニンがなければ転写開始が抑制され、アデニンがありグアニンがなければ活性化される制御の分子機作の詳細を明らかにする。

枯草菌は内生孢子を形成するが、この孢子形成の過程は細胞分化のモデルと見なされ、幾多の分子遺伝学的研究がなされ、枯草菌孢子形成が細胞分化系のなかで最も遺伝学的解明が進んだ系となっている。しかしながら、孢子形成開始のトリガーとなる代謝産物は不明のままであった。孢子形成の開始を担うフォスフォリレー系の主たる初発反応を担うのが *kinA* と *kinB* 遺伝子である。極最近、研究代表者らは DNA マイクロアレイ解析に

より *kinA* と *kinB* 遺伝子が緊縮制御で正に制御されることが判り、これらの遺伝子の転写開始部位の塩基種はアデニンであった。このことは、孢子形成の引き金が GTP 合成阻害に起因する、ATP 濃度の上昇による特異的な *kinA* と *kinB* 遺伝子の転写開始反応の活性化が孢子形成のトリガーではないかと思われた。この仮説を証明して、今まで不明であった孢子形成開始の代謝制御機作を解明する。

枯草菌は産業界で頻用され、分泌酵素やアミノ酸や呈味性ヌクレオチドあるいは抗生物質の生産に使われている極めて有用な細菌である。上記の基礎研究に加えて、枯草菌の有用物質の産生系は、概して対数増殖後期の緊縮制御下にある細胞で担われることが多く、有用物質産生系の多くは CodY による抑制あるいは上述の転写開始の緊縮制御を受けている。そこでこのように多くの有用物質産生系を抑制している緊縮制御系から合目的的に脱抑制させ、有用物質の産生を効率化させる。

3. 研究の方法

(1) 緊縮オペロンの抽出とそれらの転写開始点の特定

緊縮制御の DNA マイクロアレイ解析結果から、数百のオペロンがこの種の緊縮制御を受けていると推察できるが、その中で、転写開始点と同定されているものを DBTBS (database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis*) と文献情報を駆使して探索し、それらのオペロンの転写開始点 (+1) とその次 (+2) の塩基種を解析する。さらに、緊縮条件と非緊縮条件下での RNA を用いて cDNA を合成して、次世代シーケンサーを用いて、その塩基配列情報を得る。それを、ゲノム配列に貼り付け、緊縮制御条件で変動するオペロン群を特定すると共に、発現している全オペロンの転写開始点の情報を得る。このようにして、枯草菌の緊縮制御ネットワークを構成しているオペロンとその転写開始塩基を明らかにし、枯草菌の転写開始部位のプリン塩基種に依存した緊縮制御の全貌を明らかにする。

(2) 正の緊縮制御を受ける孢子形成開始機構の解明

アミノ酸飢餓や GMP 合成酵素の阻害剤である抗生物質デコイニンの添加により引き起こされる、生体内の GTP 濃度の低下と ATP 濃度の上昇が緊縮制御ネットワークを作動させ、このことが孢子形成の開始へと導くと推察される。孢子形成の開始は、センサーキナーゼである KinA と KinB のリン酸化が最終的に孢子形成の正の制御因子 Spo0A のリン酸化へと繋がるフォスフォリレーにより担われている。緊縮制御の DNA マイクロアレイ解析結果によるとデコイニンの添加により *kinA* と *kinB* 遺伝子の誘導が観察された。これら *kinA* と *kinB* 遺伝子の転写の開始部位は A で

あるが、*kinA* および *kinB* のプロモーターとレポーター *lacZ* 融合系で A を G に変換し、デコイニン添加での誘導が起こるか否かを検証する。さらに誘導が起こらなかつたらこの A の G への置換を in frame で染色体上の *kinA* と *kinB* 遺伝子の転写開始部位に導入し、緊縮制御で引き起こされる胞子形成の効率を低下させるか否かを検証する。

(3) 負の緊縮オペロンの転写開始抑制解除および *CodY* 抑制解除による有用物質生産菌の育種

アミノ酸飢餓など緊縮制御を引き起こす増殖条件では、GTP 濃度の低下とともに分岐鎖アミノ酸などのアミノ酸合成系オペロンの転写制御因子 *CodY* による抑制が解除され、当該アミノ酸合成が高まる。また、ATP 濃度の増加により、分岐鎖アミノ酸合成などの幾つかのアミノ酸合成の正の緊縮制御が高まる。このことにより、醗酵生産の難しいイソロイシンなどのアミノ酸の生産が高まる。しかしながら、緊縮制御によりグルコースの取り込み系 (*pts*) が負の緊縮制御を受けるため、アミノ酸合成の前駆体の量が低下する。この負の緊縮制御を回避しイソロイシンなどの生産能を向上させるための試みとして、染色体上の *pts* オペロンの転写開始部位 (+1 と +2 が G) を A に変え負の緊縮制御が作動しないようにし、アミノ酸生産能が向上するか検証する。

(4) *CcpA* に依存するカタボライト制御の解析

通常、土壌細菌である枯草菌はグルコースなどの代謝され易い炭素源の枯渇した緊縮状態にあると云える。炭素源の供給を感知するのが HPr 蛋白質であり、代謝され易い炭素源が培地中に存在すると P-Ser-HPr が形成され、*CcpA* と複合体を形成し *cre* に結合しカタボライト制御を引き起こす。この *CcpA* が関与するカタボライト制御系のうち、脂肪酸分解レギュロンと *FadR* とラムノース資化オペロンのカタボライト抑制、および分岐鎖オペロン合成系 (*ilv-leu*) のカタボライト活性化の機作を解析する。

4. 研究成果

(1) DBTBS と文献検索によりシグマ A 依存の転写開始点の明らかなプロモーターを 442 個見出すことが出来た。これらの転写開始部位 (+1, +2) の塩基種と DNA マイクロアレイ解析の結果を合わせたところ、デコイニン添加により 10 倍以上の負の遺伝子発現変動を示すものには、転写開始部位にグアニンがありアデニンがなく、10 倍以上の正の発現変動を示すものにはアデニンがありグアニンがなかった。5 倍以上ではこの法則に従わないものがあつたが、これは他の転写制御因子による転写制御の影響によるものと思われた。

(2) デコイニンで引き起こされる緊縮制御での DNA マイクロアレイ解析で胞子形成の引き金となるリン酸リレー系に關与する *kinA*

と *kinB* の発現の上昇が觀察された。そこで *kinA* と *kinB* の *LacZ* レポーター解析を行い、転写開始点 A(+1) を G あるいは C に変換するとこの緊縮制御による誘導が起こらなくなることを確認した。さらに *kinB* の +1 の A の C への置換では *kinB* のプロモーター活性そのものを低下させた。さらに、染色体上の転写開始点の A を G に変換した菌株を作成したところ胞子形成能に有意に影響した。以上の結果より、生体内の ATP の高濃度を転写開始点の A に依存した *kinA* と *kinB* の転写の活性化で感知することが、胞子形成開始の前提条件であることが示唆された。

さらに本研究の *LacZ* 融合実験において *kinA* と *kinB* 遺伝子のコアプロモーター領域を用いたため胞子形成開始時の本来の発現が追跡することができず、さらに広いプロモーター領域を *lacZ* に融合させ解析した。その結果、*kinB* のプロモーターの -35 領域上流に負の制御部位を見出した。

(3) 負の緊縮転写制御を解除したイソロイシンなどの有用物質生産菌育種のため、染色体上の *pts* オペロンの +2 の G を A に in frame で変えた変異株を分離した。この菌を用いて、緊縮条件下でのイソロイシンなどのアミノ酸合成量をメタボローム解析により解析したところ、この変異株では緊縮制御下でのイソロイシン等のアミノ酸合成が、野生株を用いた場合より 5 倍以上増加していることが判明した。次に *pts* オペロンの転写開始部位の G の A への置換を +1 に導入した変異株の作製を何度も試みたが、この変異株の作成には至らなかった。

(4) 枯草菌は自然界で一般的に栄養的に極めて劣悪な状況におかれる。そのため、枯草菌にとって栄養劣悪時に作動する緊縮制御が常態となり、またカタボライト抑制も解除していると類推できる。この緊縮制御下の代謝ネットワークの動態を把握するため、まず、脂肪酸分解系の *FadR* レギュロンのカタボライト抑制機構を解明した。この *FadR* レギュロンは長鎖脂肪酸分解系の遺伝子群から構成されている。このレギュロンのうち 3 オペロン (*IcfA-fadRB-etfBA*, *IcfB*, *fadNAE*) が、*CcpA* に依存するカタボライト抑制を受けている事を明らかにした。次に、根圏に豊富なラムノースの分解系オペロン (*yuxG-yuBCDE*) のラムノースによる誘導とそのカタボライト抑制機構を解明した。このオペロンのリプレッサーと思われる *YuIB* の DNase I フットプリントで、そのプロモーターの 2 つの不完全なダイレトリピートを含む領域に結合した。また、この制御領域には *CcpA* の認識配列である *cre* が含まれており、この *cre* に *CcpA* と P-Ser-HPr 複合体が結合した。

YuIB は *yuxG-yuBCDE* オペロンのレプレッサーで *DeoR* ファミリーに属する転写因子であり、2 つのダイレトリピートを含む領域に結合する。この結合様式を明らかにするために *YuIB* タンパク質を精製したところ、二

量体を形成することが明らかになった。ラムノース代謝中間体のラムヌロース-1-リン酸が誘導物質として作用していると思われ、YuIBのDNA結合に対する効果の検証に用いるラムヌロース-1-リン酸を調製することを目的に、YuIEおよびYuICタンパク質を精製した。精製YuIEとYuICの酵素活性を測定したところ、YuIEはラムノースを異性化し、YuICは生じたラムヌロースを選択的にリン酸化した。

分岐鎖アミノ酸合成オペロン(*ilv-leu*)もまた正の緊縮転写制御を受ける。このオペロンのカタボライト活性化の機構の解明研究を行った。生体外で*ilv-leu*の転写系を構築して検証したところ、CcpAとP-Ser-HPrのみの添加で転写の活性化が見られた。このことにより*ilv-leu*の異化物活性化はCcpAとP-Ser-HPrの複合体の*cre*への結合による転写活性化であると結論づけた。

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6件)

Masahiro Fujihashi, Taiga Nakatani, Kazutake Hirooka, Hiroshi Matsuoka, Yasutaro Fujita, Kunio Miki, Structural characterization of a ligand-bound form of *Bacillus subtilis* FadR involved in the regulation of fatty acid degradation. *Proteins*, in press (2014). DOI: 10.1002/prot.24496

Shigeo Tojo, Kazutake Hirooka, Yasutaro Fujita, Expression of *kinA* and *kinB* of *Bacillus subtilis*, necessary for sporulation initiation, is under positive stringent transcription control. *Journal of Bacteriology* 195 (8): 1656-1665 (2013). DOI: 10.1128/JB.02131-12

Kazutake Hirooka, Takayoshi Eda, Kosuke Kimura, Yasutaro Fujita, Direct and indirect regulation of the *ycnKJI* operon involved in copper uptake through two transcriptional repressors, YcnK and CsoR, in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 194 (20): 5675-5687 (2012). DOI: 10.1128/JB.00919-12

東條繁郎, 広岡和丈, 藤田泰太郎, 枯草菌 *Bacillus subtilis* の孢子形成トリガーへの正の緊縮転写制御の関与. 福山大学生命工学部研究年報 (11) 1-20 (2012). <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009465203>
査読無

Kazutake Hirooka, Yasutaro Fujita, Identification of aromatic residues critical to the DNA binding and ligand response of the *Bacillus subtilis* QdoR

(YxaF) repressor antagonized by flavonoids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75 (7): 1325-1334 (2011). DOI: 10.1271/bbb.110098

Shigeo Tojo, Takenori Satomura, Hiroshi Matsuoka, Kazutake Hirooka, Yasutaro Fujita, Catabolite repression of the *Bacillus subtilis* FadR regulon, which is involved in fatty acid catabolism. *Journal of Bacteriology* 193 (10): 2388-2395 (2011). DOI: 10.1128/JB.00016-11

[学会発表](計12件)

広岡和丈, 藤田泰太郎, 枯草菌でのラムノース資化に関わる *yuxG-yuBCDE* オペロンにコードされる各タンパク質の機能解析. 日本農芸化学会 2014 年度大会 (明治大学生田キャンパス, 東京都) 2014.3.28

藤田泰太郎, 東條繁郎, 広岡和丈, 枯草菌の炭素代謝と孢子形成開始の緊縮転写制御. 第36回日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド, 神戸市) 2013.12.3

広岡和丈, 藤田泰太郎, 枯草菌におけるラムノース異化に関わる *yuxG-yuBCDE* オペロンの YuIB と CcpA による制御機構. 2013 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議 (筑波山ホテル江戸屋, つくば市) 2013.9.7

Yasutaro Fujita (招待講演), Shigeo Tojo, Kazutake Hirooka, Stringent transcription control of carbon metabolism and sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. 7th International Conference on Gram-Positive Microorganisms, Palazzo dei Congressi, Montecatini Terme, Italy 2013.6.25

広岡和丈, 枝廣貴成, 木村晃輔, 藤田泰太郎. 枯草菌におけるラムノース異化に関わる遺伝子群の発現制御機構の解析. 日本農芸化学会 2013 年度大会 (東北大学, 仙台市) 2013.3.26

東條繁郎, 広岡和丈, 藤田泰太郎, 枯草菌 *Bacillus subtilis* の孢子形成トリガーへの正の緊縮転写制御の関与. 2012 年度グラム陽性菌機能会議 (焼津グランドホテル, 焼津市) 2012.8.31

東條繁郎, 広岡和丈, 藤田泰太郎, 枯草菌の緊縮制御による孢子形成誘導機構の解明. 2012 年度日本農芸化学会大会 (京都女子大学, 京都市) 2012.3.24

東條繁郎, 広岡和丈, 藤田泰太郎, 枯草菌緊縮制御の転写開始点の塩基種に依存した孢子形成誘導機構. 第6回日本ゲノム微生物学会年会 (立教大学池袋キャンパス, 東京都) 2012.3.10

Yasutaro Fujita (招待講演), Construction of the metabolic networks and white biotechnology in the post-genome sequence era of *Bacillus*

subtilis. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan 2011.9.10
Shigeo Tojo, Kazutake Hirooka,
Yasutaro Fujita, Heavy involvement of stringent transcription control dependeing on the adenine, or guanine species of the transcription initiation site in glucose and pyruvate metabolism in *Bacillus subtilis*. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan 2011.9.10

藤田泰太郎 (招待講演), 枯草菌代謝ネットワークのカタボライト制御. 2011年度グラム陽性菌機能会議 (福山大学社会連携研究推進センター, 福山市) 2011.8.26

東條繁郎, 広岡和丈, 藤田泰太郎, 枯草菌の緊縮応答と孢子形成. 2011年度グラム陽性菌ゲノム機能会議 (福山大学社会連携研究推進センター, 福山市) 2011.8.25

〔図書〕(計2件)

Katsutoshi Ara, Kenji Manabe, Shenghao Liu, Yasushi Kageyama, Tadahiro Ozawa, Masatoshi Tohata, Keiji Endo, Kazuhisa Sawada, Nozomu Shibata, Akihito Kawahara, Kazuhiro Saito, Hiroshi Kodama, Yoshiharu Kimura, Katsuya Ozaki, Yoshinori Takema, Hiroshi Kakeshita, Kouji Nakamura, Kunio Yamane, Takeko Kodama, Junichi Sekiguchi, Takuya Morimoto, Ryosuke Kadoya, Shigehiko Kanaya, Yasutaro Fujita, Fujio Kawamura, Naotake Ogasawara. Creation of novel technologies for extracellular protein production toward the development of *Bacillus subtilis* genome factories pp. 3-15 in Microbial Production; From Genome Design to Cell Engineering, 306 pages (H. Anazawa, S. Shimizu, eds), Springer Japan, Tokyo, 2014

Yasutaro Fujita, Shigeo Tojo, Kazutake Hirooka, Stringent transcription control of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, pp.179-196 in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*: The Frontiers of Molecular Biology Revised, 362 pages (Y. Sadaie, K. Matsumoto, eds), Research Signpost, Kerala, India, 2012

〔その他〕

藤田泰太郎-研究者-researchmap
(<http://researchmap.jp/read0035996/>)

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 泰太郎 (FUJITA, Yasutaro)

福山大学・生命工学部・教授
研究者番号：40115506

(2)研究分担者

広岡 和丈 (HIROOKA, Kazutake)
福山大学・生命工学部・准教授
研究者番号：20389068