

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580101

研究課題名(和文)人為的な祖先細胞の造成による環境応答の転写制御ネットワークの全容解明

研究課題名(英文)Elucidation of a whole transcriptional control network concerning environmental response by creation of an artificial ancestor cell

研究代表者

朝井 計 (ASAI, Kei)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：70283934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：細菌のストレス応答転写制御の全体像解明を目指した。枯草菌のストレス応答に関わる全部で19のシグマ因子のうち18のシグマ因子が機能していない株(シグマ因子最少株)を創成し、実質たった1つのシグマ因子のみで増殖可能であることを明らかにした。シグマ因子最少株は野生株と大きく異なり、定常期には完全に死滅してしまうというユニークな表現型を呈した。この定常期死滅を免れる細胞を、数種類取得し、その変異部位の探索を行った。これらの結果から、定常期細胞の生存を担う、転写と翻訳機構が相互に関係した機構の存在を示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We aimed at elucidation of whole transcriptional control mechanism for bacterial stress response. The bacillus cells where 18 sigma factors out of all 19 were inactivated was created (the strain of sigma-A only) and it was revealed that only one essential sigma factor was enough to grow. The vegetative growth of the strain of sigma-A only is identical to that of the wild type strain in a nutritionally rich medium, but interestingly the turbidity of the cells are reduced after the exponential growth phase suggesting that autolysis of the cells is occurred. Suppressor mutants which escaped cell lysis were obtained and their location of mutation was analyzed. Together all this data, it was suggested that novel mechanism for cell survival at stationary phase, in which transcription and translation were closely related.

研究分野：微生物遺伝学

キーワード：転写制御

1. 研究開始当初の背景

(1)地球上のほとんどの生物は外部環境と隔絶して生育することは不可能であるので、刻一刻変化する環境への応答機構の解明はあらゆる生物にとって不可欠の研究課題である。

(2)生物の生育に影響を及ぼす環境要因は多岐にわたり、それに呼応して生物進化の過程で環境応答機構も複雑化し、比較的単純な細菌においても、高度なネットワーク構造を形成している。しかし、種々の網羅的解析可能な現代でも、生物が長い年月をかけて発達させた、ロバストネス(頑丈性・恒常性)を兼ね備えたネットワークの複雑性(リダンダンシー、階層性、クロストーク)が主たる原因で、未だ一生物の環境応答の遺伝子発現制御ネットワークの全容解明はなされていない。

(3)枯草菌(納豆菌の類縁)は、生育が様々な環境要因の影響を受けやすい土壌細菌であり、環境応答機構が高度に発達している。また、高い自然形質転換能を有し、遺伝子組換えが容易である。これらの特徴は本研究課題のモデル生物として最適であると考えた。

(4)細菌の主要な環境応答の転写制御機構として、シグマ因子と2成分制御の2つの系が知られている。1つの細菌にそれぞれ複数の遺伝子が存在し、遺伝子発現制御ネットワークが多様化する。枯草菌約4000遺伝子の内、シグマ因子は19遺伝子、2成分制御系は31セット存在している。

2. 研究の目的

(1)シグマ因子も2成分制御系も進化の間に多重化し、機能的に重複している。従って単独破壊では顕著な表現型の変化を示さない場合が多い。しかし、複数のシグマ因子や2成分制御系を同時に破壊することにより、単独破壊では見つけることのできなかつた表現型と遺伝子発現の新たな変化が検出されることが期待された。

(2)枯草菌の高形質転換能を利用し、枯草菌ゲノム上のシグマ因子や2成分制御系を同時破壊し、環境応答機構を取り去った、いわば人工の祖先細胞を創成する。この細胞を基盤に種々の環境応答機構を解析することにより、一生物の、特に環境応答機構の遺伝子発現制御ネットワークの全容解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)遺伝子多重破壊株の作製を行った。大規模多重破壊には発現すると細胞を死に至らしめるカウンター遺伝子を選択マーカーとして用いたネガティブ選択によるマーカー

レス破壊法を重用した。

(2)枯草菌にはゲノム内に複数のプロファージ領域をもち、そのいくつかはDNA傷害等の要因が引き金となって溶菌を引き起こす原因となる。細胞の濁度低下・溶菌を観察するために、プロファージ領域を欠失させた枯草菌株において、遺伝子多重破壊を行った。

(3)マイクロアレイ法や、次世代シーケンサーを用いた方法により、多重遺伝子破壊株と対照細胞の遺伝子発現プロファイルの差を、継続的に網羅的に定量解析した。

(4)破壊株では定常期において培養液濁度の顕著な低下・死滅がおきた。培養を数日間継続することで、この死滅から回復するサプレッサーと考えられる細胞を取得した。サプレッサー変異を同定し、関与する遺伝子の解析を行うために全ゲノム再シーケンスを行い、変異部位を同定した。

4. 研究成果

(1)マーカーレス破壊法により、枯草菌の19のシグマ因子のうち14シグマ因子遺伝子を同時に破壊し、4つは機能できないように不活化し、実質たった1つのシグマ因子のみで増殖可能である株(シグマ因子最少株)を樹立した。他の細胞に共生や寄生で生きる細菌の中にはシグマ因子を一つしかもたないものもいるが、一般的な培地で独立して増殖可能な複数のシグマ因子を有する細菌としては、本研究で世界で初めて、シグマ因子最少細菌を樹立したことになる。一方2成分制御系については、40ほどの遺伝子セットの8割の同時破壊を行った。

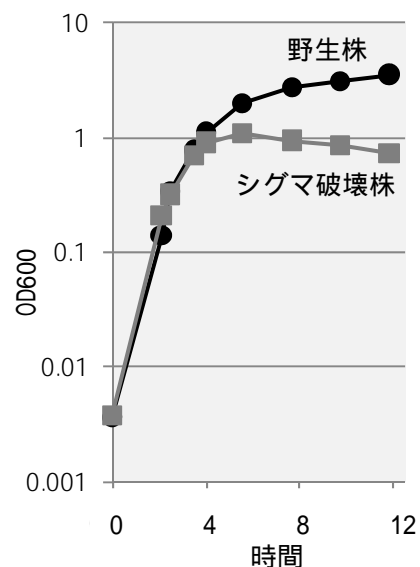


図1 シグマ破壊株は定常期に溶菌する

(2)シグマ因子最少株についてその親株である野生株と比較し、表現型の変化の解析をい

くつが行った。環境ストレスのうち、熱ストレス応答について解析したところ、ストレス応答シグマを複数破壊したにも関わらず、簡便な解析では親株との顕著な感受性の変化は見いだされなかった。シグマ因子の関係しない原始的な未知の熱ショック応答機構の存在が考えられた。一方もっとも大きな変化は対数増殖後の定常期における生存能力の低下であり、数日間培養するとほぼ死滅してしまった(図1)。これはこれまでに報告の無い表現型であった。この表現型は溶菌を引き起こす可能性のあるプロファージ領域を削除しても観察された。

(3) 枯草菌にはシグマ因子最少株でみられた、細胞の溶菌を誘発する機構の存在が新たに示唆された。そこで、その溶菌を誘発するような、すなわち抗生作用を有するような物質の探索を行った。ある種の植物抽出物が、顕著な溶菌作用を示すことが分かった。その作用機構についてさらなる解析を行ったところ、細胞壁の合成機構の一部を阻害することにより、溶菌が誘発されたと考えられた。この機構を解析することで、新たな抗生物質開発につながると考えられる。

(4) シグマ因子最少株について、熱ストレス応答、および対数増殖後の定常期における転写プロファイルの違いを網羅的な手法により解析した。(2)で述べた結果同様、意外にも大きな違いは観察されず、枯草菌は唯一のシグマ因子で、基本的な転写応答が行えることが判明した。これらの知見は原始細胞の能力を、進化した現存の細胞が未だに有していることを実験的に示唆する興味深い知見である。

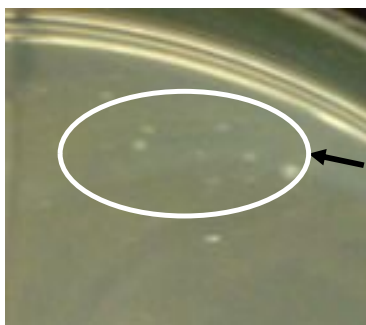


図2 寒天プレート上で溶菌した細胞の上から増殖してきたサブレッサーと思われる細胞

(5) シグマ因子最少株は対数増殖は野生株と同等だが、その後の定常期において培養液濁度の顕著な低下・死滅がおきる。これは生存能力の低下と考えられ、シグマ因子最少株固有の表現型であった。この死滅から回復するサブレッサーと考えられる細胞の単離を試みた(図2)。死滅の回復程度の異なる複数のサブレッサー株を取得し、それぞれ全ゲノムシーケンサーにより変異部位の同定を試みた。一次的な解析では、構造遺伝子内に特徴的な塩基置換は見出せなかった。遺伝子をコードしていない発現調節領域や、全ゲノム

シーケンスで解析できない rRNA オペロンの変異であることが考えられる。

(6) 細菌にはリボソームを不活化して保存しておくための因子が存在するが、シグマ因子最少株ではこの因子を欠失させることができず、その要因は破壊したシグマ因子の一つにあることが判明した。リボソームと転写装置の、定常期細胞の生存における相互の関係を示唆する今後の展開が期待できる興味深い結果である。

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3件)

山本達也、尾花 望、イー リーメン、朝井 計、野村 暢彦、中村 幸治、SP10 infectivity is aborted after bacteriophage SP10 infection induces *nonA* transcription on the prophage SP region of the *Bacillus subtilis* genome, Journal of Bacteriology, 査読有、Vol. 196, No. 3, 2014, pp.693-706, doi: 10.1128/JB.01240-13

井上 広海、鈴木 大資、朝井 計、A putative bactoprenol glycosyltransferase, CsbB, in *Bacillus subtilis* activates SigM in the absence of co-transcribed Yfh0, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有、Vol. 436, No.1, 2013, pp.6-11, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.064

橋本 理尋、関 貴洋、松岡 聡、原 弘志、朝井 計、定家 義人、松本 幸次、Induction of extracytoplasmic function sigma factors in *Bacillus subtilis* cells with defects in lipoteichoic acid synthesis, Microbiology, 査読有、Vol. 159, No.1, 2013, pp.23-35, doi: 10.1099/mic.0.063420-0

[学会発表](計18件)

高松 美沙樹、兼崎 友、朝井 計、吉川 博文、熱耐性と孢子形成に關与する枯草菌 *rpoC* 遺伝子の新規機能解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 03 月 30 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

小澤 良基、新城 優、長谷川 登志夫、朝井 計、Analysis of mechanism of stress response induced with the plant essential oils in *Bacillus subtilis*, The 14th Asian Conference on Transcription, 2015 年 12 月 03 日、Singapore (Singapore)

吉田 早希、植木 典子、朝井 計、枯草菌シグマ因子最少化株の表現型の解析、日本

遺伝学会第 87 回大会、2015 年 09 月 24 日、東北大学川内北キャンパス（宮城県仙台市）

清水 葉子、朝井 計、枯草菌 SigI の定常期における役割、日本遺伝学会第 87 回大会、2015 年 09 月 24 日、東北大学川内北キャンパス（宮城県仙台市）

小澤 良基、新城 優、吉川 博文、長谷川 登志夫、朝井 計、植物香気成分の枯草菌ストレス応答に与える影響の解析、日本遺伝学会第 87 回大会、2015 年 09 月 24 日、東北大学川内北キャンパス（宮城県仙台市）

朝井 計、清水 葉子、吉川 博文、枯草菌の定常期の細胞死における SigI シグマ因子の役割、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 03 月 26 日、岡山大学 津島キャンパス（岡山県岡山市）

⑦小澤 良基、今泉 優、吉川 博文、長谷川 登志夫、朝井 計、ペチパー抽出物の枯草菌のストレス応答機構に与える影響の解析、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 03 月 26 日、岡山大学 津島キャンパス（岡山県岡山市）

小澤 良基、新城 優、長谷川 登志夫、朝井 計、ペチパー抽出物の枯草菌のストレス応答機構に与える影響の解析、日本遺伝学会第 86 回大会、2014 年 09 月 17 日、長浜バイオ大学（滋賀県長浜市）

朝井 計、小穴 秋弓、今泉 優、長谷川 登志夫、香気性の植物抽出物の細菌の増殖に与える影響の解析、日本農芸化学会 2014 大会、2014 年 03 月 28 日、明治大学生田キャンパス（神奈川県川崎市）

朝井 計、ゲノム改造によるバクテリアの RNA ポリメラーゼの多様性と互換性の解析、日本農芸化学会 2014 大会、2014 年 03 月 28 日、明治大学生田キャンパス（神奈川県川崎市）

市島 睦生、小幡 一枝、朝井 計、Alternative Sigma Factor, SigI, responds to Cell Wall and DNA damage in *Bacillus subtilis*, The 13th Asian Conference on Transcription, 2014 年 02 月 19 日、Melbourne(Australia)

植木 典子、三輪 明穂、松本 貴嗣、吉川 博文、朝井 計、Determination of minimum number of the sigma factors required for growth in *Bacillus subtilis*, The 13th Asian Conference on Transcription, 2014 年 02 月 19 日、Melbourne1 (Australia)

朝井 計、枯草菌の転写装置を解剖する試

み、「細胞を創る」研究会 6.0、2013 年 11 月 14 日、慶應義塾大学鶴岡キャンパス（山形県鶴岡市）

朝井 計、枯草菌シグマ因子 SigI の定常期における機能解析、日本遺伝学会第 85 回大会、2013 年 09 月 19 日、慶應義塾大学日吉キャンパス（神奈川県横浜市）

小穴 秋弓、新城 優、長谷川 登志夫、朝井 計、枯草菌の溶菌を誘発する香気性の植物抽出物の解析、日本遺伝学会第 85 回大会、2013 年 09 月 19 日、慶應義塾大学日吉キャンパス（神奈川県横浜市）

朝井 計、市島 睦生、枯草菌 SigI による定常期における細胞維持機構の解析、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 03 月 24 日、東北大学川内北キャンパス（宮城県仙台市）

朝井 計、細菌のシグマ因子の多様性の意義解明への遺伝学的アプローチ、日本遺伝学会第 84 回大会、2012 年 09 月 24 日、九州大学医学部（福岡県福岡市）

朝井 計、Alternative Sigma Factor, SigI, Regulates the Cell Wall Metabolism in Concert with WalRK Two-Component Regulatory System in *Bacillus subtilis*, The 12th Asian Conference on Transcription, 2012 年 06 月 06 日、Jeju Island (Korea)

〔図書〕(計 1 件)

朝井 計、Research Signpost、*Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*: The Frontiers of Molecular Microbiology Revisited, 2012, 362 (9-18)

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.saitama-u.ac.jp/~tougyo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝井 計 (ASAI, Kei)

埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：70283934

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

吉川 博文 (YOSHIKAWA, Hirofumi)
東京農業大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：50175676