

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580123

研究課題名(和文) 転写因子の能動的タンパク質分解による2成分制御系遺伝子の発現制御

研究課題名(英文) Regulation of two-component regulatory system genes by active protein degradation of transcription factor

研究代表者

小倉 光雄(Ogura, Mitsuo)

東海大学・海洋研究所・教授

研究者番号：80204163

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)：枯草菌の2成分制御系DegS-DegUは、様々な生理機能を制御し、その遺伝子はオペロンをなしている。一方、転写因子Spxは多くの機能未知遺伝子とジアミド酸化ストレスに対処するための遺伝子群を制御し、プロテアーゼClpXPの基質である。報告者は、ClpXPの遺伝子破壊がdegSU転写を増大させる事を見だし、この効果のサプレッサー株を4株取得した。これらの株の全ゲノム解析によって、復帰変異はspx遺伝子に起きている事が判明した。このことは、degSUオペロンがSpxの新たな標的である事を示した。また、グルコース添加が、spx発現を誘導し、その結果degSUも誘導される事を見いだした。

研究成果の概要(英文)：The DegS-DegU two-component regulatory system regulates many cellular events in *Bacillus subtilis*. Genes for DegSU are composed of an operon directed by the P1 promoter. Spx regulates diamide-stress regulon in addition to many unknown genes and is a substrate of the ATP-dependent ClpXP protease. We have found that null mutations for clpX and clpP, which encode subunits for ClpXP, enhanced the DegU amount through activation of the P1 promoter. We isolated four suppressors for the clpP-enhancing effect. Whole-genome sequencing of the suppressors revealed that the strains have a point mutation or deletion in spx. The clpP-enhancing effect on degS-lacZ expression was abolished in the spx disruptant. These results showed that the degSU operon is a new target of positive regulation by Spx. Furthermore, we found that the P1 promoter was induced by glucose and that this induction was greatly reduced in the spx mutant. These results suggested that Spx is involved in glucose induction.

研究分野：細菌分子生物学

キーワード：タンパク質分解 ATP依存性プロテアーゼ 遺伝子発現 DNA結合 グルコース誘導

## 1. 研究開始当初の背景

生物は各種の酸化ストレスにさらされて生きている。その中に、タンパク質中のチオール基の酸化で発生するジスルフィド化合物によるストレスがある。生物はこのストレスに対抗する手段を進化の過程で獲得してきたが、枯草菌をはじめとするグラム陽性菌も、対抗手段として転写因子 Spx を持っている。Spx はゲノム中のチオレドキシソキシ遺伝子 *trxA*, *trxB* を含む 250 以上のプロモーター領域に RNA ポリメラーゼに弱く結合したかたちで結合する。*trxA* 遺伝子での詳細な解析によれば、その際プロモーターの -35 配列のすぐ上流に AGCA 配列がある事が重要だとされている。Spx で制御される遺伝子は、酸化ストレスに対応する遺伝子を含むが、機能未知のものも多い。Spx の活性は複数の水準で制御されている。転写段階では、*spx* 遺伝子は主要シグマ因子以外に 4 種類のシグマ因子と結合した RNA ポリメラーゼで転写されていて、さらに、転写因子 PerR と YodB で抑制されている。またプロテアーゼ ClpXP が Spx を常に分解しており、Spx の細胞内濃度を下げている。ジスルフィドストレスが発生すると、ClpXP が不活性化されて、Spx を活性化させ、Spx 自体も酸化還元レベルに対応して活性が変化する。

DegS-DegU は、DegS キナーゼが DegU の Asp 残基をリン酸化し、リン酸化型 DegU が制御下の遺伝子プロモーターに結合して機能を発揮する。DegS リン酸化の直接的なシグナルは不明だが、鞭毛の回転停止、鞭毛基底部分からのフラジェリンの細胞外への輸送、あるいは外部環境でのメチルサリチル酸の存在などとの関連を指摘されている。*degSU* 上流の P1 プロモーターとリン酸化型 DegU で活性化される *degU* のすぐ上流のプロモーターが *degSU* を転写しており、さらに TnrA, CcpA, SinR などの転写因子が結合して転写を調節している事が知られている。また、リン酸化型 DegU のみを特異的に分解する ClpCP プロテアーゼも同定されている。すなわち、ClpCP はリン酸化型 DegU の分解を通じて *degU* 転写を負に制御している。報告者は、さらに、*clpP* 遺伝子破壊が *degSU* の P1 プロモーター活性を上昇させる事を *degS-lacZ* fusion の発現量解析により見いだした。また、この性質は不安定で容易にサプレッサー変異株を得ることができた。

## 2. 研究の目的

*clpP* 遺伝子破壊で *degS-lacZ* の発現量が増大していたので、そのサプレッサー変異株を取得した。サプレッサー変異株の全ゲノム解析により変異点を同定する事で、ClpXP が分解しているであろう *degSU* プロモーター制御に関わる転写因子を同定し、その *degSU* プロモーターでの作用領域を明らかにする事を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 変異 *degS* プロモーターを持つ枯草菌株の作製: *degS* プロモーターをプラスミド pIS284 にクローニングし、大腸菌を宿主にして保持させた。各種 PCR 技法を駆使して変異 *degS* プロモーターを構築した。pIS284 を使うと枯草菌 *amyE* 部に作製した遺伝子カセットを導入できるので、この手法で様々な変異 *degS* プロモーターを持つ枯草菌株を樹立した。これらの株に *clpP* 破壊を導入してその効果を測定し、*clpP* 効果の *degSU* プロモーターでの作用領域を検討した。

(2) サプレッサー変異株取得: *clpP amyE::degS-lacZ* 株を一晩 LB 培地で培養し、X-gal を含む LB 寒天培地に希釈して塗布しコロニーを形成させた。濃青色に呈色したコロニーと淡青色に呈色したコロニーが得られ、後者をサプレッサー株であると見なした。

(3) 全ゲノム解析: *clpP amyE::degS-lacZ* 株とそれに由来した *clpP amyE::degS-lacZ sup* 株の全ゲノム解析は、各株由来の全 DNA をイルミナゲノムアナライザ II で解析できるように前処理して解析を実行した。

(4) ガラクトシダーゼの活性測定: 枯草菌での常法に従って実行した。

## 4. 研究成果

(1) *degS-lacZ* に *clpP* 変異を導入すると、およそ 4 倍程度の発現増大がみられた。この変異株で 5' 側と 3' 側からの欠失を *degS-lacZ* に順次導入した結果、転写開始点 -41 から +1 までの領域が *clpP* 変異の作用点であった。すなわちコアプロモーター領域に作用した。P. Zuber らの研究では、Spx の作用点は RNAP のサブユニットとの接触を可能にする -35 配列の直近上流の AGCA 配列であるとされているが、そのような配列は *degSU* プロモーター領域には存在せず、また、

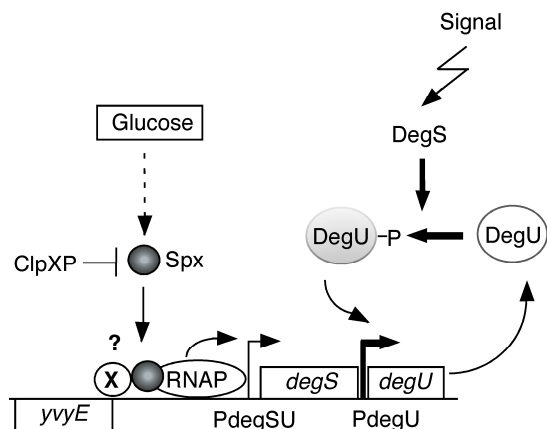


図1 *degSU* オペロンの構造と発現制御  
矢印は活性化、T-bar は抑制を示す。

類似した配列に変異を入れても効果がなく、典型的な例とは作用が異なっている事が予想された。次にサブレッサー変異の本体を全ゲノム解析により決定するため、4株のサブレッサー株を解析した所、2株が *spx* の点変異 (Y5S) 残りの2株は *spx* を含む領域の欠失がみられ、*spx* が共通した変異箇所だった。すなわち、*Spx* 変異がサブレッサー本体である可能性が高く、これを確かめるため、*degS-lacZ* に *clpP* 変異と *spx* 変異を同時に導入し、*lacZ* 活性を測定した所、明らかな発現低下がみられた。つまり、*Spx* が *degS* プロモーターを活性化している一方、*ClpXP* が *Spx* を分解するため、*clpP* 変異導入で *degS-lacZ* の転写活性があがり、また *clpP spx* の2重変異株では活性低下がおこるという事が判明した (図1)。また、*Spx* のC末端にDD残基を付加すると *ClpXP* に抵抗性となる事が知られている。そこで、IPTGにより抵抗型 *spx* 遺伝子を導入、既存の *spx* は破壊しておく、IPTG濃度依存的に *degS-lacZ* 発現が増大する事を観察した。このことも、先のシナリオが妥当である事を示している。ただ、*degSU* プロモーターの *in vitro* 転写実験では、*Spx* の正の効果を確認することはできず、さらに未知の転写因子が必要であるか、あるいは *Spx* のリン酸化、アセチル化などの翻訳後修飾が必要である事が示唆された。

(2) 報告者は、*degSU* プロモーター活性が、培地へのグルコース添加で数倍程度に誘導される事を見いだした。この効果は、グルコース応答のmaster制御因子 *CcpA* には無関係であった。また、この誘導は *spx* 破壊株では顕著に低下した。*Spx* が *degSU* プロモーターのグルコース誘導に必要な事は、*Spx* による遺伝子発現制御として初めて見いだされた形質である。この現象から、*spx* 発現自体が *CcpA* 非依存的にグルコース誘導を受けるのではないかと考え、*spx* オペロンが持つ2つのプロモーターの *lacZ* 融合体をそれぞれ作製し確かめた所、予測が正しい事が確かめられた。*Spx* 遺伝子プロモーターは、ハウスキーピングな *SigA* と ECF シグマ因子である *SigM/X/W* の合わせて4つのシグマ因子で転写されている。このうちのどのシグマ因子がグルコース誘導に責任があるのか調べた所、*SigM* と *SigX* がグルコース誘導に必要なことが判明した。

(3) *degSU* プロモーターがグルコースによる発現誘導を受けている現象の解析過程で、*degU* プロモーターも同じくグルコースによる発現誘導を受けている現象を見だし解析した。その結果、カタボライト制御のmaster regulatorである *CcpA* が直接 *degU* プロモーターに結合して、活性化している事、及び *DegU-P* を分解する *ClpCP* が *CcpA* 依存的にグルコースによる負の制御を受けており、

このことも *degU* プロモーター活性化に寄与している事を明らかにした。これらの成果を論文発表した。

(4) また、申請者は *degSU* オペロンの発現制御自体も従来より追求してきた。その結果、新たにバイオフィーム形成のマスター制御因子 *SinR* による *degU* プロモーターの発現制御を見いだした。*SinR* タンパク質は、*degU* プロモーターへ直接結合し、さらに *SirR* との複合体を形成していた。このプロセスを詳細に解析し論文発表した。

#### 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. Shiwa Y, Yoshikawa H, Tanaka T, Ogura M. (2015). *Bacillus subtilis degSU operon is regulated by the ClpXP-Spx regulated proteolysis system.* **J. Biochem.**, 157:321-330 査読有

2. Ogura M., Yoshikawa H, Chibazakura T. (2014) Regulation of the response regulator gene *degU* through the binding of *SinR/SirR* and exclusion of *SinR/SirR* by *DegU* in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, 196:873-881 査読有

3. Ishii H, Tanaka T, Ogura M. (2013) The *Bacillus subtilis* response regulator gene *degU* is positively regulated by *CcpA* and by catabolite-repressed synthesis of *ClpC*. **J. Bacteriol.**, 195:193-201 査読有

4. Ogura M., Tsukahara K. (2012) *SwrA* regulates assembly of *Bacillus subtilis* *DegU* via its interaction with N-terminal domain of *DegU*. **J. Biochem.**, 151:643-655 査読有

[学会発表](計 8 件)

1. 安部公博、佐藤勉、小倉光雄 Post-transcriptional regulation of *SinI/SinR/SirR* by *DegU* in *Bacillus subtilis*. 第9回日本ゲノム微生物学会年会 2015.3.6 神戸大学百年記念講堂 (兵庫県)

2. 小倉光雄、佐藤勉、安部公博 Post-transcriptional regulation of *SinI/SinR/SirR* biofilm regulation system by *DegU* in *Bacillus subtilis*. 第37回日本分子生物学会 2014.11.26 パシフィコ横浜 (神奈川県)

3. 小倉光雄、田中暉夫、朝井計、志波優、吉川博文 RNAP アセチル化は、RNAP の ECF

シグマ因子選好性を制御する I :  
sigX/M/(I)発現のアンチシグマ非依存的な  
グルコース誘導 平成26年度 グラム陽性  
菌ゲノム機能会議 2014.9.7 庄内いこいの  
村(山形県)

4. 古園さおり、米沢祐大、鈴木祥太、朝井計、  
小倉光雄 RNAPアセチル化は、RNAPのECFシグ  
マ因子選好性を制御するII: アセチル化リジ  
ン変異によるSigXのグルコース誘導消失 平  
成26年度 グラム陽性菌ゲノム機能会議  
2014.9.7 庄内いこいの村(山形県)

5. 小倉光雄、吉川博文、千葉桜拓 枯草菌  
Response regulator DegUの遺伝子発現は、  
SinR/SirR複合体の結合とDegUによる  
SinR/SirRの排除により制御されている 第8  
回日本ゲノム微生物学会年会 2014.3.9 東  
京農業大学(東京)

6. 小倉光雄、石井洋、吉川博文 千葉桜拓、  
枯草菌の転写因子DegUは、エピジェネティッ  
ク複合体の構成因子SirRとタンパク質相互作  
用し、そのコロニー形態を制御している 第  
36回日本分子生物学会 2013.12.4 神戸国  
際会議場(兵庫県)

7. 石井洋、田中暉夫、小倉光雄 枯草菌degU  
遺伝子発現のCcpAによる制御 第35回日本分  
子生物学会 2012.12.13 パシフィコ横浜(神  
奈川県)

8. 石井洋、田中暉夫、小倉光雄 The Bacillus  
subtilis response regulator gene degU is  
regulated by CcpA-binding and catabolite  
repression of clpC 平成24年度 グラム陽  
性菌ゲノム機能会議 2012.8.31 焼津グラ  
ンドホテル(静岡県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.iord.u-tokai.ac.jp/staff/ogura-en.htm>

<http://www.scc.u-tokai.ac.jp/~289077/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小倉光雄(OGURA MITSUO)

東海大学・海洋研究所・教授

研究者番号: 80204163

### (2)研究分担者 なし

### (3)連携研究者 なし