

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790431

研究課題名(和文) コレラ菌のキチン誘導型形質転換におけるシグナル伝達機構

研究課題名(英文) Signal-transducing mechanisms involved in chitin-induced natural transformation in *Vibrio cholerae*

研究代表者

山本 章治 (Shouji, Yamamoto)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：80469957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：GlcNAcのポリマーであるキチンはコレラ菌のDNAコンピテンスを活性化し、形質転換を引き起こす。本研究は、キチンのシグナル伝達における膜貫通型DNA結合蛋白質TfoSの役割を解明する目的で行われた。その結果、1) TfoSはコンピテンスレギュロンの発現に必須なsmall RNA遺伝子(tfoR)の転写を活性化すること、2) TfoSは二成分制御系の蛋白質ではないにも関わらず、その活性はキチン反応型の二成分制御系センサーキナーゼChiSに支配されること、3) ChiSからTfoSへのシグナル伝達は既知のリン酸基転移とは異なる機構で進行することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In *Vibrio cholerae*, chitin, a polymer of GlcNAc, induces natural competence for genetic transformation. This study was done to understand the role of a novel transmembrane DNA-binding protein, named 'TfoS', in chitin-induced competence. The results suggested that: 1) TfoS acts as a transcriptional activator of the tfoR gene, encoding a chitin-induced small RNA essential for competence gene expression, 2) TfoS has no two-component system (TCS) signature domains, but its activity is strictly dependent on the chitin-responsive TCS sensor kinase ChiS, and 3) ChiS regulates the activity of TfoS using mechanisms distinct from classical phosphorelay reactions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学(含真菌学)

キーワード：コレラ菌 キチン 形質転換 シグナル伝達 二成分制御系 センサーキナーゼ 膜貫通型転写因子 small RNA

1. 研究開始当初の背景

コレラ菌はヒトに感染しコレラを引き起こすが、自然環境中では主に汽水域に生息しており、キチン質なプランクトンや甲殻類によく付着している。*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) のポリマーであるキチンは、栄養源として利用されるだけでなく、コレラ菌に対して様々な生理的影響を及ぼす。近年、形質転換の誘導現象が報告されたことを契機にして、キチンはコレラ菌の遺伝的多様性にも寄与していると考えられるようになった。

形質転換の誘導には、キチンの分解産物である (GlcNAc)₂ がシグナルとしてはたらき、DNA 取り込み能 (コンピテンス) に関わる遺伝子群の発現を活性化する。研究代表者はキチン誘導性の形質転換を支配する遺伝子発現制御機構について解析を行い、1) (GlcNAc)₂ はコンピテンスレギュロンのアクティベーター遺伝子 *tfoX* の翻訳を活性化すること、2) *tfoX* の翻訳活性化には、(GlcNAc)₂ 誘導性の small RNA である TfoR が関わること、3) (GlcNAc)₂ による TfoR の発現誘導には、推定上の転写因子 TfoS (VC2080) が必要とされることを明らかにしてきた。しかしながら、(GlcNAc)₂ のシグナル伝達機構については未解明のままであった。TfoS は内膜局在性が予測されるユニークな DNA 結合蛋白質であり、N 末端側にペリプラズムセンサードメイン、C 末端側にヘリックス・ターン・ヘリックス DNA 結合ドメイン、および両者の間に膜貫通ヘリックスをもつ。このような特徴から、TfoS は (GlcNAc)₂ の受容・応答に重要な役割を果たしていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では主に、1) (GlcNAc)₂ の TfoS に対する作用機構、2) TfoS による *tfoR* の転写制御機構について解析し、コレラ菌のキチン誘導型形質転換を支配するシグナル伝達機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) (GlcNAc)₂ が TfoS の発現に及ぼす影響

(GlcNAc)₂ 存在下・非存在下で培養したコレラ菌で産生される TfoS をウエスタンブロットティングで検出した。

2) 大腸菌におけるシグナル伝達系の再構成実験

コレラ菌だけではなく、大腸菌も (GlcNAc)₂ の取り込み能をもつことが知られている。想定されるシグナルカスケード“(GlcNAc)₂ TfoS *tfoR*”を構成する因子間で直接的な相互作用があるならば、この系を大腸菌で再構成できるはずである。*tfoR::lacZ* 転写融合を染色体上に組み込んだ大腸菌を (GlcNAc)₂ 存在下で培養させると同時に、TfoS を発現させた時のレポーター活性を調べた。また、TfoS に加えて、(GlcNAc)₂ 反応型の二成分制御系センサーキナーゼ ChiS (およびリン酸基転移アミノ酸残基をアラニンに置換した変異体) を発現させた場合にもレポーターアッセイを行った。

3) TfoS の局在性の解析

コレラ菌細胞を外膜、ペリプラズム、内膜および細胞質に分画し、TfoS がどの画分で検出されるかをウエスタンブロットティングで調べた。また、TfoS の様々な部位に翻訳融合させた PhoA (および LacZ) の大腸菌での活性を指標にして、蛋白質の膜トポロジーを解析した。

4) TfoS の精製

マルトース結合蛋白質と TfoS の C 末端側 DNA 結合ドメインの融合蛋白質 (MBP::*TfoS*_C) を大腸菌で大量発現させた。大腸菌抽出液中に含まれる MBP::*TfoS*_C をアミロースレジンによりアフィニティー精製した。

5) TfoS の転写活性化能

MBP::*TfoS*_C が *tfoR* の転写に及ぼす影響を調べるために、大腸菌 RNA ポリメラーゼと

*tfoR*のプロモーター領域を含む鋳型 DNA を用いて *in vitro* 転写解析を行った。

6) TfoS の DNA 結合能

MBP::TfoS_c と *tfoR* のプロモーター領域を含む DNA を用いてゲルシフトアッセイを行い、DNA 結合能を調べた。さらに、DNase I フットプリンティングを行い、MBP::TfoS_c の結合部位を解析した。

4. 研究成果

コレラ菌における TfoS の発現は (GlcNAc)₂ の有無に影響されなかった。したがって、(GlcNAc)₂ は TfoS の翻訳後調節に関わることが示唆される。しかしながら、(GlcNAc)₂ 存在下で培養した大腸菌で TfoS を発現させても、染色体上に組み込まれた *tfoR*::*lacZ* の発現は活性化されなかったため、(GlcNAc)₂ の直接的な標的は TfoS 以外の因子であると考えられる。

(GlcNAc)₂ と TfoS の間を介在する因子の候補として、(GlcNAc)₂ 反応型の二成分制御系センサーキナーゼ ChiS が挙げられる。通常 ChiS の活性はペリプラズム局在型 (GlcNAc)₂ 結合蛋白質 CBP によって抑えられているが、(GlcNAc)₂ がペリプラズムに取り込まれて CBP に結合すると ChiS はフリーになり、脱抑制されると考えられている。大腸菌は *cbp* を有しないため、発現させた ChiS は常に活性型となる。*tfoR*::*lacZ* を組み込んだ大腸菌において TfoS と ChiS を共発現させたところ、十分なレポーター活性が得られた。この結果は、通常不活性型の TfoS が ChiS 存在下で活性型に変化し、*tfoR* の転写を活性化することを示唆している。

二成分制御系は、特異的な環境シグナルを認識して自己リン酸化するセンサーキナーゼと、センサーキナーゼからリン酸基を受け取って活性化し、標的遺伝子の転写制御を行うレスポンスレギュレーターから構成される。興味深いことに、TfoS は ChiS に依存

して活性化されるにもかかわらず、レスポンスレギュレーター間で保存されるリン酸基受容ドメインをもたない。ChiS に保存されるリン酸基転移残基をアラニンに置換しても、*tfoR*::*lacZ* の発現誘導には影響を与えなかった。つまり、ChiS によるシグナル伝達は、既知のリン酸基転移とは異なる機構で行われていることになる。

TfoS の局在性を調べるために、コレラ菌細胞を外膜、ペリプラズム、内膜および細胞質に分画し、TfoS を検出した結果、大部分が内膜に存在することがわかった。また、PhoA/LacZ レポーター系を用いた膜トポロジー解析から、ペリプラズムセンサードメインがペリプラズム側に、DNA 結合ドメインが細胞質側に位置していることが確認された。

TfoS の DNA 結合ドメインを含む領域を精製し、*in vitro* での解析を行った。精製した蛋白質は *tfoR* のプロモーターに特異的に結合し、その転写を活性化した。また、DNase I フットプリンティングを行い、精製蛋白質は *tfoR* の -35 領域付近に存在するダイレクトリピート配列に結合することがわかった。

本研究から、1) (GlcNAc)₂ は ChiS を介して TfoS を活性化する、2) 活性化した TfoS は *tfoR* プロモーターに結合し、その転写を活性化する、という一連のシグナルカスケードが提案される。この成果は、コレラ菌の形質転換を支配する環境応答の初期過程を明らかにしただけでなく、二成分制御系蛋白質 (ChiS) と非二成分制御系蛋白質 (TfoS) から構成されるシグナル伝達系の例を初めて示したものであり、細菌におけるシグナル伝達のネットワークを理解する上で極めて重要な知見である (発表論文 1)。今後、ChiS による TfoS の制御機構およびその生理的意義について明らかにする必要がある。

なお本研究課題に関連して、形質転換を高効率で起こすための手法を確立し、III 型分泌装置の遺伝子クラスターがコレラ菌間

で水平伝播されることを示すための解析に貢献した（発表論文2）。

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2件)

1. Yamamoto S, Mitobe J, Ishikawa T, Wai SN, Ohnishi M, Watanabe H, Izumiya H. Regulation of natural competence by the orphan two-component system sensor kinase ChiS involves a non-canonical transmembrane regulator in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*. 2014 Jan;91(2):326-347.

2. Morita M, Yamamoto S, Hiyoshi H, Kodama T, Okura M, Arakawa E, Alam M, Ohnishi M, Izumiya H, Watanabe H. Horizontal gene transfer of a genetic island encoding a type III secretion system distributed in *Vibrio cholerae*. *Microbiol Immunol*. 2013 May;57(5):334-339.

〔学会発表〕(計3件)

1. 山本章治，三戸部治郎，大西真，渡邊治雄，泉谷秀昌．コレラ菌のキチン誘導型コンピテンスを支配する非典型的なシグナル伝達機構．第87回日本細菌学会総会（ワークショップ：細菌の環境シグナル受容体と遺伝子調節ネットワーク），東京，2014年．

2. Yamamoto S. A novel transmembrane regulator controls transcription of the *tfoR* gene, encoding a small RNA activator for the competence regulon in *Vibrio cholerae*. 3rd Conference on Regulating with RNA in Bacteria, Wurzburg, 2013.

3. 山本章治，三戸部治郎，大西真，渡邊治雄，泉谷秀昌．コレラ菌のキチン誘導型コンピテンスに関わる新規転写因子の同定．第86回日本細菌学会総会，幕張，2013年．

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 章治 (YAMAMOTO SHOUJI)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：80469957

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：