

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850046

研究課題名(和文) 希少放線菌が形成する孢子嚢胞子の休眠と発芽の分子機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of spore dormancy and germination in a sporangium-forming rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis*

研究代表者

手塚 武揚 (Tezuka, Takeaki)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：80646414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* が形成する孢子嚢の内部で胞子が休眠状態に入る過程に必須であることが判明していた二成分制御系のセンサーキナーゼ HhkA、およびレスポンスレギュレーター TcrA の解析を中心に実験を進めた。両タンパク質をコードする遺伝子の破壊株と野生株を用いたトランスクリプトーム解析により、これらのタンパク質が200を超える遺伝子の発現を制御するグローバルなシグナル伝達経路を担っていることが判明した。TcrA については、孢子嚢に内包される運動性胞子の形成に必須のべん毛遺伝子クラスターの転写を直接活性化することを *in vitro* で示した。

研究成果の概要(英文)：HhkA and TcrA are putative hybrid sensor histidine kinase and response regulator of the two-component regulatory system, respectively, and are essential for spore dormancy in sporangia formed by a rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis*. Using the *hhkA*- and *tcrA*-disrupted strains, their transcriptomes were compared with the wild-type strain by RNA-seq analysis, revealing that both HhkA and TcrA are involved in the transcription of over two hundred genes. Besides, electrophoretic mobility shift assay showed that TcrA directly binds to the upstream regions of the flagellar genes.

研究分野：応用微生物学

キーワード：休眠 覚醒 発芽 希少放線菌 細胞応答 二成分制御系 孢子嚢

1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの細菌は栄養豊富な環境では1つの細胞が2つの細胞に分裂することにより増殖することが知られているが、一部の細菌は栄養源が枯渇したり、増殖に適さない強いストレス環境に置かれると胞子を形成する。胞子は代謝がほぼ停止した状態にある休眠細胞であり、栄養増殖を行っている細胞と比較して様々なストレス条件に対して強い耐性を持つことが知られている。したがって、このような休眠耐久細胞である胞子を形成することは、貧栄養状態に置かれた場合に非常に有効な生存戦略の1つであると考えられる。また、炭疽菌や結核菌といったヒトに対して強い病原性を示す細菌についての最近の知見から、これらの細菌は宿主細胞内で代謝が極端に低下した休眠状態に近い細胞を形成していることが分かっており、これらの休眠状態の細胞が抗生物質をはじめとする薬剤に対して強い抵抗性を示すことが感染症治療を困難なものにしていることが明らかになりつつある。細菌の胞子形成機構については、芽胞と呼ばれる胞子を形成するモデル生物である枯草菌や、菌糸状に生育した後に隔壁の形成により胞子鎖を形成する *Streptomyces* 属の放線菌を実験材料として精力的な研究がなされてきた。一方で、休眠状態の胞子が自身の周辺環境の変化を感知し、増殖に適した条件が整った際に休眠状態を解除して再び栄養増殖を開始するメカニズムについては分子レベルでの知見に乏しい状況であった。

(2) 研究代表者が研究を行っている研究室では、希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* を材料として実験を進めている。本菌は培地中に基底菌糸を張り巡らせて栄養増殖を行うが、増殖に適さない環境条件では空中に胞子嚢を形成して休眠状態となる。胞子嚢の中には多数の胞子が詰まっている。分子実体は未同定であるものの土壤中に含まれる何らかのシグナルと水分を含む湿潤環境に置かれると、胞子嚢はその環境の変化を感知して開裂し、内部の胞子を周囲へ放出する。放出された胞子はべん毛を持っており、水溶液中を高速で運動する遊走子として発芽に適した環境へと走化性により移動する。栄養条件の良い環境に至ると遊走子はべん毛による運動を停止し、発芽して菌糸成長を開始する。このように *A. missouriensis* は非常に複雑な生活環を持つ細菌であり、生活環のそれぞれのステージでは外部環境の変化に応じたダイナミックな細胞形態の変化が起こっている。このような生活環を持つことから、*A. missouriensis* は外部環境を感知し、その情報を細胞内で伝達する機構を備えているはずであり、特に休眠状態の胞子嚢が環境の変化を感知して覚醒し、栄養増殖に至るまでの多段階の過程は細胞の休眠と覚醒メカニ

ムを研究するための格好の材料と言える。

(3) これまでの研究により、*A. missouriensis* の胞子嚢の休眠と覚醒に関わる因子として2つのタンパク質が見いだされていた。二成分制御系のレスポンスレギュレーターと相同性のあるタンパク質 TcrA と、二成分制御系のハイブリッド型センサーヒスチジンキナーゼと相同性のあるタンパク質 HhkA である。二成分制御系はセンサーキナーゼとレスポンスレギュレーターからなり、外界からのシグナルを感知したセンサーキナーゼからレスポンスレギュレーターへとリン酸基が転移されることで情報が伝達され、リン酸化されることで活性化されたレスポンスレギュレーターが標的遺伝子の転写制御を行うことで細胞は環境変化に応答する。*tcrA* 遺伝子破壊株と *hhkA* 遺伝子破壊株はともに、土壌抽出物を含む水溶液中でも胞子嚢が開裂しない、胞子嚢内部で胞子の発芽が開始されている、という非常に類似した表現型を示したことから、これら2つのタンパク質が胞子嚢の休眠状態の維持と開裂を担う一連の二成分制御系情報伝達経路を担う可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

A. missouriensis の胞子嚢が休眠状態に入る一方、環境の変化に応答して開裂し胞子を放出する過程で鍵となるタンパク質 TcrA と HhkA の機能を解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) *A. missouriensis* 野生株、*tcrA* 破壊株、*hhkA* 破壊株から total RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行い、それぞれの株におけるトランスクリプトームの比較解析を行った。

(2) 大腸菌を宿主として組換え TcrA タンパク質を発現させ、精製したタンパク質を用いてべん毛遺伝子クラスターのプロモーター周辺領域への結合を *in vitro* で解析した。

4. 研究成果

(1) *hhkA* 遺伝子、*tcrA* 遺伝子それぞれの欠失により転写量が変動する遺伝子の全容をつかむため、これらの遺伝子破壊株と野生株から RNA を抽出して RNA-seq 解析を行った。転写解析の結果 *hhkA* と *tcrA* はともに胞子嚢形成培地で6日間培養した時に最も転写産物量が增大していたことから、この培養条件の細胞を用いて解析を行った。その結果、*tcrA* 破壊株では野生株と比較して262遺伝子の転写量が有意に減少しており、*hhkA* 破壊株では野生株と比較して279遺伝子の転写量が有意

に減少していた。このうち 135 遺伝子は *tcrA* 破壊株、*hhkA* 破壊株いずれにおいても転写量が減少していたことから、HhkA と TcrA が一連の情報伝達経路を担う可能性が強く示唆された。また、*tcrA* 破壊株において転写量が有意に変動していた遺伝子の大部分は野生株と比較して転写量が減少していたことから、TcrA は転写活性化因子として働くことが示唆された。

(2) 転写制御因子として働くと考えられる TcrA の詳細な機能解析を行うため、大腸菌を宿主としてヒスチジンタグを付加した組換え TcrA タンパク質を発現させ、精製した。*tcrA* 破壊株においては野生株と比較してべん毛クラスターの一部の遺伝子の転写量が減少していることが過去の実験で判明していたため、べん毛遺伝子上流領域に対する TcrA の結合能をゲルシフトアッセイ法により調べた。その結果、べん毛クラスターの 11 の転写単位のうち 3 つの転写単位の転写開始点上流領域に対して TcrA が特異的に結合した。TcrA が結合した 3 つの領域に Direct repeat 配列 CGGNTGCAGNG が共通して存在したことからこの配列を欠く DNA を調製して TcrA の結合能を調べたところ、TcrA の結合は見られなくなった。したがって、この Direct repeat 配列に TcrA が結合すると結論した。また、TcrA はリン酸化により活性化されることが予想されたため、*in vitro* でリン酸基供与体として働くアセチルリン酸を反応系に加えてゲルシフトアッセイを行った。アセチルリン酸を加えた場合には、アセチルリン酸を加えなかった場合には見られなかった新たなシフトバンドが観察されたことから、TcrA の DNA 結合様式がリン酸化により変化する可能性が示唆された。

(3) 野生株と *tcrA* 破壊株から RNA を抽出して定量 RT-PCR 法により転写解析を行ったところ、*tcrA* 破壊株では野生株と比較してべん毛クラスターの全ての遺伝子の転写量が大幅に減少していた。組換え TcrA タンパク質を用いた *in vitro* の解析により、TcrA がべん毛クラスターの 11 の転写単位のうち 3 つの転写単位のの上流領域に結合することは判明したが、残る 8 つの転写単位のの上流領域に対しては TcrA の結合は観察されなかった。そこで、RNA-seq 解析による野生株と *tcrA* 破壊株のトランスクリプトーム比較解析の結果を精査したところ、サルモネラ菌のべん毛遺伝子群の転写に関与することが過去に報告されているシグマ因子 FliA と相同性の高いタンパク質をコードする遺伝子の転写量が *tcrA* 破壊株では野生株と比較して減少していた。したがって、TcrA によるべん毛遺伝子群の転写活性化は、TcrA の結合による直接的な転写の活性化によるものと、TcrA による *fliA* 相同遺伝子の転写活性化を介した間接的な活性化によるものの両者が存在する可

能性が高いことが示唆された。

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 1 件)

Isolation of a novel plasmid from *Couchioplanes caeruleus* and construction of two plasmid vectors for gene expression in *Actinoplanes missouriensis*
Moon-Sun Jang, Azusa Fujita, Satomi Ikawa, Keitaro Hanawa, Hideki Yamamura, Tomohiko Tamura, Masayuki Hayakawa, Takeaki Tezuka, Yasuo Ohnishi
Plasmid (査読あり) 77 (2015)、32-38
DOI: 10.1016/j.plasmid.2014.12.001

[学会発表](計 6 件)

放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の孢子囊開裂に必要な遺伝子の RNA-seq 解析による探索
安田理沙、毛利佳弘、手塚武揚、大西康夫
日本農芸化学会 2015 年度大会
2015 年 3 月 26-29 日
岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)
Functional analysis of the response regulator TcrA involved in the flagellar synthesis and spore dormancy in *Actinoplanes missouriensis*
Yoshihiro Mouri, Moon-Sun Jang, Kenji Konishi, Takeaki Tezuka, Yasuo Ohnishi
17th International Symposium on the Biology of Actinomycetes
2014 年 10 月 8-12 日
Kusadasi-Aydin (Turkey)
希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の孢子囊開裂メカニズムの解析
安田理沙、手塚武揚、大西康夫
日本放線菌学会 2014 年度大会
2014 年 6 月 19-20 日
つくばカピオ(茨城県つくば市)
希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の孢子囊開裂時に翻訳されるタンパク質及び孢子囊構成成分のプロテオーム解析
手塚武揚、安田理沙、大西康夫
日本農芸化学会 2014 年度大会
2014 年 3 月 27-30 日
明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)
希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の二成分制御系レスポンスレギュレーター TcrA のターゲット遺伝子探索
毛利佳弘、手塚武揚、大西康夫
日本農芸化学会 2014 年度大会
2014 年 3 月 27-30 日
明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)

Actinoplanes missouriensis の孢子特異的タンパク質 hybrid histidine kinase HhkA の解析

毛利佳弘、小西健司、藤田梓、手塚武揚、平田愛子、藤田信之、早川正幸、大西康夫

日本放線菌学会 2013 年度大会

2013 年 9 月 5-6 日

メルパルク広島（広島県広島市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

手塚 武揚 (TEZUKA TAKEAKI)

東京大学 大学院農学生命科学研究科 助教

研究者番号：80646414

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし