

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660077

研究課題名(和文) 遺伝子水平伝播に同調する新規プログラム細胞死の解明

研究課題名(英文) Bacterial programmed cell death synchronized with horizontal gene transfer

研究代表者

宮崎 亮 (Miyazaki, Ryo)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号：80712489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物のプログラム細胞死は、器官形成などの発生過程や偶発的に出現した異常細胞を排除する際に起動し、多細胞生物の機能性・恒常性を維持する上で必要なシステムである。一方、細菌のような原核生物では、プログラム細胞死を利用する意義について様々な説があるものの、実験的に証明された例は少ない。本研究では、細菌の染色体上に存在するICEと呼ばれる外来遺伝子領域に焦点を当て、ICEがコードする新規プログラム細胞死の分子基盤の解析を行った。本研究から、ICEにコードされるParAとShiという二つのタンパク質が細胞内に局在し、染色体等と相互作用することで細胞の成長阻害を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Programmed cell death (PCD) is an elegant system in eukaryotic cells so that eukaryotes can maintain their homeostasis and functionalities. On the other hand, little is known about PCD in prokaryotes that can survive as unicellular organisms, such as bacteria. Here we focus on a PCD system encoded on an Integrative and Conjugative Element (ICE), a mobile DNA element located in the bacterial chromosome, to understand molecular mechanisms underlying the PCD. Using molecular genetics and microscopy techniques, we found that growth inhibition prior to the PCD was induced by two proteins, ParA and Shi, encoded by genes on the ICE. Shi widely distributed in cytoplasm, whereas ParA localized at the middle or polar sites of the cell, suggesting that ParA could interact with chromosomal DNA.

研究分野：微生物学

キーワード：遺伝子水平伝播 細胞死 一細胞解析

1. 研究開始当初の背景

真核生物のアポトーシスに代表されるようなプログラム細胞死は、器官形成などの発生過程や偶発的に出現した異常細胞(がん細胞など)を排除する際に起動し、多細胞生物の機能性・恒常性を維持する上で必要不可欠なシステムである。一方、細菌のような原核生物においては、ファージウイルスに感染したり低栄養条件下におかれた細胞が溶菌するという報告が僅かにあるのみで、単細胞生物として生存可能な細菌がプログラム細胞死を利用する意義については様々な説があるものの、実験的に証明された例は少ない。これまでに我々は、細菌の染色体上に普遍的に存在する ICE (Integrative and Conjugative Element) と呼ばれる外来遺伝子領域の動態を研究してきた。ICE は通常、ホストとなる細菌の染色体に潜伏している二本鎖 DNA であるが、特定の条件下で染色体から切り出され、隣接する他細菌細胞へ特殊な DNA 分泌装置を介して水平伝播される。ICE には様々な形質遺伝子(薬剤耐性、重金属耐性、植物共生など)が含まれているため、微生物の進化・適応を飛躍的に加速させると考えられている。近年、我々が環境細菌 *Pseudomonas knackmussii* B13 株の有機塩素化合物分解を担う ICE の動態を詳細に観察したところ、水平伝播は当該細菌集団全体の僅か 3-5%の活性化細胞においてのみ起こり、同時にその活性化細胞では特殊な遺伝的プログラムが発動し、必ず細胞が死滅することを発見した。我々はこのプログラム細胞死が遺伝子水平伝播の効率を高めることを明らかにし、細胞死の原因となる ICE 上の 2 遺伝子 (*parA* および *shi*) の同定に成功していたが、その細胞死の分子基盤ならびに生物学的意義については不明である。

2. 研究の目的

アミノ酸配列情報から、ParA および Shi は既知のプログラム細胞死とは全く関連性のない新規タンパク質であることが推定された。そこで本研究では、ParA-Shi による新規プログラム細胞死の分子メカニズムの解明、および遺伝子水平伝播とプログラム細胞死が同調して起こる生理・生態学的意義の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *shi* 遺伝子の変異体の作製: PCR プライマーに点変異を導入することで *shi* 遺伝子の開始コドンを Thr 置換 (mut1)、または 7 残基目を終始コドンに置換 (mut2) した変異体を作製した。変異型 *shi* 遺伝子を *parA* と共に IPTG 誘導型ベクターにクローニングし、宿主となる *Pseudomonas putida* に導入して成長試験を行った。

(2) small RNA (sRNA) の *in silico* 推定: *shi* 遺伝子の塩基配列を query とし、CoproRNA

(<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/CopraRNA/Input.jsp>) を用いて *shi* 遺伝子の sRNA としての可能性およびその標的遺伝子を推定・評価した。

(3) *parA* および *shi* 遺伝子の転写開始点の同定: ICEclc を保持する *P. putida* を定常期まで培養して回収した RNA を用いて、5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) を行った。増幅バンドをクローニングし、転写開始点を同定した。

(4) 蛍光タンパク質による ParA および Shi タンパク質の標識: 当研究グループが構築した蛍光タンパク質融合ベクターを用いて (Miyazaki et al. 2012. PLoS Genetics)、ParA および Shi タンパク質を mCherry および GFP でそれぞれラベルした。mCherry は ParA の C 末に融合し、GFP は Shi の N 末または C 末に融合した 2 種類を作製した。各融合タンパク質遺伝子を IPTG 誘導型のベクターにクローニングし、宿主となる *P. putida* に導入して顕微鏡観察に供した。

(5) ParA および Shi タンパク質のライブセルイメージング: 上記 (4) で作製した株を培養し、蛍光顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡を用いて、細胞形態、ParA および Shi タンパク質の発現と細胞内局在を観察した。

4. 研究成果

(1) *shi* 遺伝子の遺伝学的解析: アミノ酸配列情報から、*shi* 遺伝子は既知のタンパク質や機能ドメインと類似性を示さないことがわかった。*shi* 遺伝子は全長 258 bp であるが、上流の *parA* および下流の *parB* 遺伝子とそれぞれ 17 bp および 8 bp オーバーラップしているため、この遺伝子間領域に存在する non-coding sRNA の可能性も考えられる。そこで、*shi* 遺伝子がタンパク質をコードしているかどうかを検証した。まず、*shi* 遺伝子の塩基配列を query として CopraRNA を用いて sRNA としての機能性を予測したところ、統計的に優位な sRNA 構造や標的配列は検出されなかった。次に、数塩基置換により *shi* 遺伝子の翻訳を阻害した変異体を用いて、この変異型 *shi* 遺伝子が野生型同様に細胞の増殖阻害を引き起こすかどうかを実験的に検討した。変異型 *shi* 遺伝子を *parA* 遺伝子と共に誘導発現させた株では、非誘導のコントロールに比べて増殖が若干阻害されたが、野生型 *shi* 遺伝子と *parA* 遺伝子を発現させた場合よりも増殖が回復した (図 1)。このことから、*shi* 遺伝子はタンパク質をコードし、その Shi タンパク質が発現することで細胞増殖阻害が起こり、non-coding sRNA や cis 因子として機能している可能性は低いことが示唆された。ただし、変異型 *shi* 遺伝子の場合でも若干の成長阻害が見られたことに関しては、現在原因を調べている。

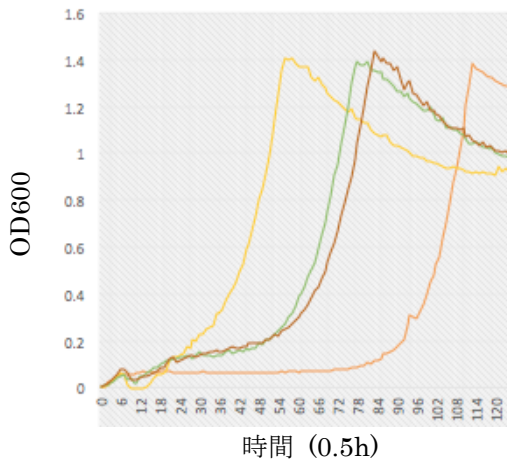


図 1. *shi* 遺伝子の変異体を発現する *P. putida* の成長試験. 黄色, 野生型 *shi* (IPTG-); 緑色, 変異型 *shi* (*mut1*, IPTG+); 茶色, 変異型 *shi* (*mut2*, IPTG+); 橙色, 野生型 *shi* (IPTG+).

(2) *parA-shi* 遺伝子領域の転写開始点の同定: *shi* 遺伝子は *parA* 遺伝子の下流に同一転写方向で位置しているが、仮に sRNA として単独で発現している場合は独自の転写開始点が存在するはずである。そこで、*parA* および *shi* 遺伝子が発現している定常期の細胞から RNA を抽出し、5'RACE 法によって当該領域の転写開始点を調べた。その結果、*parA* および *shi* 遺伝子は *parA* の上流にある *alpA* 遺伝子のプロモーターからポリシストロニックに転写されていることが明らかとなった (図 2)。この結果は、*shi* 遺伝子が sRNA ではなく、一連のオペロン内に存在するタンパク質をコードする遺伝子であることを再度示唆するものであった。

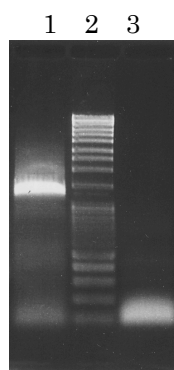


図 2. 5'RACE による *parA-shi* 遺伝子領域の転写開始点の同定. Lane 1, アニーリング 50°C; 2, DNA ladder (MassRuler, Thermo Scientific); 3, アニーリング 55°C. Lane 1 の 1.2 kb 付近に特異的な増幅が見られる。

(3) ParA および Shi タンパク質の可視化と細胞内の動態: 上記 (1) (2) の結果から *shi* 遺伝子がタンパク質をコードしていることが強

く示唆されたため、*parA* および *shi* 遺伝子産物の発現と細胞内の局在を調べるために、両産物を蛍光タンパク質と融合させることで可視化することを試みた。ParA は C 末端に mCherry を連結し (ParA-mCherry)、一方の Shi は N 末端 (GFP-Shi) または C 末端に eGFP を連結 (Shi-GFP) した 2 パターンの融合タンパク質を作製した。ParA-mCherry および GFP-Shi または Shi-GFP をコードする遺伝子を *P. putida* に導入し、IPTG で融合タンパク質の発現を誘導したところ、細胞の増殖は阻害された。このことから、蛍光タンパク質を融合した ParA や Shi は野生型タンパク質と同様に細胞成長阻害の機能を有することが確認された。また、Shi タンパク質においては、N 末端、C 末端いずれの eGFP 融合体であっても機能することが確認できた。

次に、ParA-mCherry および Shi-GFP の発現および細胞内局在を蛍光顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、Shi-GFP は細胞全体に散財して発現しているのに対し、ParA-mCherry は細胞中央部や細胞の極に局在していることが明らかとなった (図 3)。この ParA-mCherry の局在は、染色体の局在に非常に類似していることから、ParA は染色体と直接または間接的に相互作用していることが予想される。また、両融合タンパク質を発現している細胞は、細胞が極端に伸長し、細胞分裂に支障をきたしていることが分かった。以上の結果から、ParA および Shi は上記のような細胞内局在で機能することで、細胞成長阻害を引き起こしていることが分かった。上記 (1) の実験結果で ParA 単独の発現でも若干の成長阻害効果が見られたのは、おそらく ParA が染色体と相互作用しているためであり、さらに Shi タンパクが共発現することで、より強力な阻害効果が発揮されると考えられる。今後、より詳細な解析を進め、ParA と Shi の関係性と細胞成長阻害を引き起こす分子機構を明らかにする予定である。

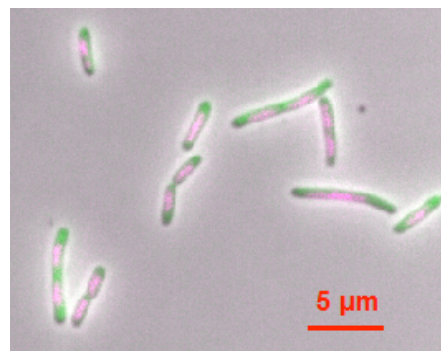


図 3. ParA-mCherry および Shi-GFP を発現した *P. putida* 細胞の顕微鏡像. ParA-mCherry をピンク色、Shi-GFP を緑色で示した。図は位相差像および蛍光像を重ね合わせた。

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)

① 宮崎亮, 細菌クローン集団における個々の細胞が示す表現型のばらつき, バイオサイエンスとインダストリー, 査読無, 74 巻 2 号, 2016, 116-119

[学会発表] (計 2 件)

① 宮崎亮, 遺伝子発現のノイズと表現型のゆらぎ, 第 30 回日本微生物生態学会 (招待講演), 2015 年 10 月 19 日, 亀城プラザ (茨城県・土浦市)

② Ryo Miyazaki, Jan Roelof van der Meer. Fate of cells in horizontal gene transfer of an Integrative and Conjugative Element, ISME 15 (招待講演), 2014.8.25, ソウル (韓国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 亮 (MIYAZAKI, Ryo)

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号 : 80712489