

平成 22 年 4 月 8 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19580081

研究課題名（和文） 蛋白質間相互作用と機能ネットワークの観点からの転写制御機構群の研究

研究課題名（英文） Study of transcriptional regulators about protein-protein interaction and functional network

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

研究成果の概要(和文): 細菌の転写制御 因子の活性を制御する抗 膜蛋白質について解析した。機能未知の膜蛋白質をコードする遺伝子が、 因子の活性に影響を与えることを新たに見出した。抗 蛋白質は 因子の全長とではなく、C 末端側 200 アミノ酸程度と相互作用していることが分かった。

研究成果の概要(英文): Regulation mechanisms of anti-sigma membrane protein which regulates the activity of sigma factors in Bacteria was studied. The membrane protein of unknown function was newly found to regulate the activity of a sigma factor. It was found that the anti-sigma membrane protein can interact with only the C-terminal portion of the sigma factor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：枯草菌 因子 膜蛋白質 リン脂質

1. 研究開始当初の背景

細菌の環境応答や細胞間コミュニケーション、真核細胞内のオルガネラ間の情報伝達など、細胞膜を超えて信号を外から内へ伝達し転写を変化させることは、生物にとって重要である。そのしくみの一つとして、シグナル受容体膜蛋白質を介して、リン酸基やアルキル基などで化学的に転写因子蛋白質を修飾することでその活性を変化させる信号伝達

系がよく知られている。一方、近年「Regulated intramembrane proteolysis (RIP)」と呼ばれる、細菌からヒトまで多くの生物種に普遍的に存在する制御系が注目を集めている (Brown et al.(2000) Cell 100:391-408)。膜外のシグナルを受けて、膜に局在しているプロテアーゼが、転写因子の前駆体や、転写因子を負に制御している抗転写因子蛋白質を物理的に切断して、転写を活

性化する機構である。

細菌では、ECF (英語の細胞質外機能の略称) サブファミリーに分類されている因子が、不活性状態では膜結合型の抗膜蛋白質と直接結合し拘束しているが、膜局在プロテアーゼによって抗膜蛋白質が切断されることで、自由になり、転写因子としての機能を発揮するというRIP機構が広く知られている (Alba and Gross (2004) Mol Microbiol 52:613-619)。因子とは、転写装置の本体であるRNA合成酵素の主要な構成成分であり、全ての細菌および、植物のオルガネラで見出される普遍的な転写制御因子である。また、ECF因子による制御機構は、細菌の病原性や共生関係などの興味深い現象も包括した様々な環境応答現象に、深く関わっていることが示されている。

グラム陽性の土壌細菌である *Bacillus subtilis* (枯草菌) は1996年に全ゲノム塩基配列が決定されており、ポストゲノム解析のモデル生物として、広く研究されている。4100程の遺伝子からなる枯草菌ゲノム上に17の因子遺伝子があり7つがECF因子である。ゲノム配列決定後の1997年には7つ全てがほぼ機能未解析であったが、申請者らにより、枯草菌 ECF 因子システムの働きが徐々に判明してきた (図1参照)。7つの ECF 因子のうち6つに対してはそれぞれ抗膜蛋白質を同定した。ECF 因子と抗膜蛋白質の相互作用の組み合わせは厳密(特異的)で、異なる因子、抗膜蛋白質同士は結合しない。抗膜蛋白質同士にアミノ酸配列の類似性はなく、また一つの因子に関わる抗膜蛋白質は1つとは限らないなど、システムの制御様式は多様である。それぞれの因子-抗膜蛋白質システムは独立して直線的に機能するのではなく、複数のシステムが互いに協調して働き、機能ネットワークを形成している。すなわち一つのスイッチ(環境シグナル)で様々な組み合わせの複数のシステムが同時にオンになる。

2. 研究の目的

枯草菌の7種類の因子-抗膜蛋白質システムの一つは、RIP機構によって制御されている (Schöbelet al. (2004) Mol Microbiol 52:1091-1105) が、それ以外についての制御機構は未だ不明であるので、本研究ではこれを明らかにする。また、因子-抗膜蛋白質の間の多様な相互作用と、相互作用の特異性が生じるメカニズムを分子レベルで解剖する。その上で、本研究は、一つの生物種の「抗膜蛋白質を介した転写因子の制御系群」の全てを、網羅的に解析することで、単に個別に新たな分子機構を明らかにするという、それはそれで興味ある結果を導き出すだけでなく、生物がシステムとして有して

いる機能ネットワーク構造の総体をも明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 抗膜蛋白質の制御因子の探索
トランスポゾン変異法を用いて、グラム陽性土壌細菌 *Bacillus subtilis* (枯草菌) 168株の7つの抗膜蛋白質の制御因子のスクリーニングを行う。その際、抗膜蛋白質に与える影響を直接観察するのは困難であるので、実験対象の抗膜蛋白質に対応する因子の活性を用いて、間接的に影響をモニタする。因子の活性は因子が転写に関与するプロモーター断片とガラクトシダーゼ遺伝子の融合遺伝子を用い、寒天培地で形成するコロニーのままで測定可能である。候補株のトランスポゾンの挿入部位はPCRとDNAシーケンスにより簡便に同定できる。一方、枯草菌では日欧協力のもとにほぼ全ての遺伝子の破壊株がそろっているため、このソースを利用し抗膜蛋白質の活性に影響を与える変異遺伝子のスクリーニングを行うことも考える。

また、抗膜蛋白質は膜蛋白質であるので、細胞表面の構造変化が立体構造の変化を引き起こす可能性も考えられる。細胞膜リン脂質の組成を変化させることができる、細胞膜構成成分のリン脂質合成遺伝子の変異株や種々の細胞壁合成欠損株を用いて、これらの可能性を検証する。

(2) 因子-抗膜蛋白質の相互作用の分子機構の解明

枯草菌の7種類の因子-抗膜蛋白質の相互作用の特異性を分子レベルで解明する。酵母ツーハイブリッド法を用いて、因子-抗膜蛋白質間の相互作用をモニタする。PCRランダム変異導入法やサイトディレクテッド変異法を用いて、因子・抗膜蛋白質それぞれのアミノ酸配列の一部を改変した、変異ペプチドライブラリーを作製し、酵母ツーハイブリッド法で、アミノ酸変化が相互作用に与える影響をモニタする。その際、対応する因子と抗膜蛋白質同士を用いれば、相互作用に重要なアミノ酸残基を検出でき、異なる因子と抗膜蛋白質同士を入れ子に用いれば、相互作用の特異性に重要なアミノ酸残基を検出できる。この解析には相当数のクローン、サンプル調整が必要であり、かなりの時間を要すると考えらる。また転写の *in vitro* 系を構築し、因子活性の阻害作用を指標として、抗膜蛋白質の活性を直接的に観察する。

4. 研究成果

(1) 抗膜蛋白質の制御因子の探索
トランスポゾン変異法を用いて、グラム陽性

土壌細菌枯草菌の7つの抗膜蛋白質のうち M について重点的に抗膜蛋白質の制御因子のスクリーニングを試みた。その際、因子の活性は因子が転写に關与するプロモーター断片とガラクトシダーゼ遺伝子の融合遺伝子を用い間接的に、寒天培地で形成するコロニーのままで測定した。活性に影響を与える制御因子候補の変異株をいくつか取得した。その制御因子候補株のいくつかのトランスポゾンの挿入部位について PCR と DNA シーケンスにより決定した。その候補遺伝子について、破壊株を取得したところ、トランスポゾン挿入破壊株同様に M 活性に影響を与えた。その遺伝子産物はアミノ酸配列上、複数回細胞膜を貫通する膜蛋白質であることが予測された。従って、同様に膜蛋白質である抗膜蛋白質との相互作用する可能性があったので、解析したが、結果は否定的なものであった、機能詳しく解析中である。

また、抗膜蛋白質は膜蛋白質であるので、細胞表面の構造変化が立体構造の変化を引き起こす可能性も考えられる。細胞膜リン脂質の組成を変化させることができる、細胞膜構成成分のリン脂質合成遺伝子の変異株や種々の細胞壁合成欠損株を用いて、これらの可能性を検証した。本解析に用いている枯草菌に類縁の菌では、ある種のリン脂質合成酵素がもともと染色体上に存在しておらず、従って細胞膜を構成するリン脂質組成が大きく異なっていた。この類縁菌にも枯草菌と同じ因子抗膜蛋白質の組み合わせが存在していたので、この類縁菌の因子抗膜蛋白質を枯草菌内で異種発現させた。しかし、アミノ酸配列上は非常に類似しているにも関わらず、この異種因子抗膜蛋白質は枯草菌では正常に機能しなかった。この原因が膜蛋白質である抗膜因子が、膜組成が異なっていることにより、細胞膜に正常に局在できていないことが原因であることが示唆されており、現在解析中である。

(2) 因子 - 抗膜蛋白質の相互作用の分子機構の解明

枯草菌の7種の因子 - 抗膜蛋白質の相互作用の特異性を分子レベルで解析した。酵母ツーハイブリッド法を用いて、因子 - 抗膜蛋白質間の相互作用をモニタした。W と M について枯草菌と類縁の3種のバクテリアに保存されている相同遺伝子候補とともに、網羅的な解析を行った、その結果、W については相互作用に互換性が見られたが、M については個々の生物種内では相互作用は見られたものの、生物種間では互換性はみられなかった。このことは進化的にこれらの因子ファミリーには、種分化後にも保存されているものや多様化したものの両方

が存在していることを表している。

W の抗膜蛋白質のシステイン残基をサイトディレクテッド変異法を用いてアラニンに置換した。このシステイン残基がジスルフィド結合で結ばれることが、その活性に必要であるかどうか検討したが、結果は否定的であった。抗膜蛋白質は膜貫通領域を挟んで N 末端側で、対応する因子と結合できることが分かっていたが、因子側はどの領域が抗膜蛋白質と結合しているか詳細が不明であるので、これを検討した。因子を断片化し、酵母ツーハイブリッド法で、観察し、その C 末端 200 アミノ酸程が抗膜蛋白質と相互作用していることをつきとめた。

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3件)

Hashimoto M, Takahashi H, Hara Y, Hara H, Asai K, Sadaie Y, Matsumoto K. Induction of extracytoplasmic function sigma factors in *Bacillus subtilis* cells with membranes of reduced phosphatidylglycerol content. *Genes Genet Syst.* 査読有 84 巻 2009 年 191-198 頁.

Kawai Y, Asai K, Errington J. Partial functional redundancy of MreB isoforms, MreB, Mbl and MreBH, in cell morphogenesis of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 査読有 73 巻 2009 年 719-731 頁.

Asai K, Ishiwata K, Matsuzaki K, Sadaie Y. A viable *Bacillus subtilis* strain without functional extracytoplasmic function sigma genes. 査読有 190 巻 2008 年 2633-2636 頁.

[学会発表](計14件)

矢野晃一、*Bacillus* 属細菌における ECF 因子の比較解析、日本遺伝学会、2009 年 9 月 17 日、信州大学理学部

井上広海、枯草菌の ECF 因子を介した環境ストレス応答機構の解析、日本遺伝学会、2009 年 9 月 17 日、信州大学理学部

鈴木大資、枯草菌 M 活性制御因子の探索と作用機構の解明、日本遺伝学会、2009 年 9 月 17 日、信州大学理学部

井上広海、枯草菌 M のアンチ蛋白質による制御機構の解析、日本ゲノム微生物学会、2009 年 3 月 6 日、中央大学理工学

鈴木大資、枯草菌 M 活性制御因子の探索と作用機構の解明、日本ゲノム微生物学会、2009 年 3 月 5 日、中央大学理工学部

矢野晃一、*Bacillus* 属細菌間における ECF

因子の比較解析、日本ゲノム微生物学会、
2009年3月5日、中央大学理工学部

矢野晃一、Bacillus 属細菌における ECF
因子の比較解析、日本遺伝学会、2008年9
月3日、名古屋大学工学部 森宏員、
朝井計

井上広海、枯草菌 ECF 因子 M の活性制
御機構の解明、日本遺伝学会、2008年9月
3日、名古屋大学工学部

朝井 計、枯草菌の複数シグマ因子による
転写制御ネットワーク解明の試み、日本ゲ
ノム微生物学会、2008年3月7日、大阪大
学医学部

矢野 晃一、枯草菌と好熱性細菌
Geobacillus kaustophilus における ECF シ
グマ因子の比較解析、日本ゲノム微生物学
会、2008年3月7日、大阪大学医学部

朝井計、枯草菌シグマ因子群によるネット
ワーク制御機構、日本遺伝学会、2007年9
月21日、岡山大学創立50周年記念館

橋本理尋、膜主要酸性リン脂質欠乏条件
下での枯草菌シグマ因子の活性化、日本遺
伝学会、2007年9月21日、岡山大学創立
50周年記念館

矢野晃一、蛍光標識 RNA による in vitro
transcription system の構築とその適
応例、2007年9月21日、岡山大学創立
50周年記念館

朝井 計、The Sigma-I of *Bacillus*
subtilis; regulation and function.、
International Conference on Functional
Genomics of Gram-Positive
Microorganisms、2007年6月26日、イタ
リア ティレニア州ピサ

〔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

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

()

研究者番号：