

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580083

研究課題名 (和文) 枯草菌の増殖・分化のエネルギー戦略

研究課題名 (英文) Energy strategy for growth and development in *Bacillus subtilis*

研究代表者

佐藤 勉 (SATO TSUTOMU)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授

研究者番号：70215812

研究成果の概要：枯草菌の細胞分裂と呼吸に関わる遺伝子に着目し、細菌がもつ効率的なエネルギー戦略の解明を行った。機能未知であった転写因子 YofA が細胞分裂に関与し、分裂装置を構成する FtsW の遺伝子の転写を促進することを明らかにした。さらに、この因子は培養液の栄養状態を感知し、細胞分裂を促進させる役割を持つことを示した。一方、増殖・分化に必要な呼吸酵素である NADH 脱水素酵素をコードすると考えられた Ndh, YumB, YutJ の遺伝子を解析し、いずれもこの酵素としての役割を持つことを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分子生物学

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 細胞分裂 細胞分化 呼吸

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞増殖は、細胞内外のエネルギー源の量を感じ、増殖・分裂装置へ伝達することで進行する。このように栄養状態に応じて、細胞分裂を制御するためには、それらの遺伝子発現調節を転写調節因子が行なうと考えられる。しかし、エネルギー源の状態を感じ、細胞分裂調節に関わる転写因子は、細菌においては、ほとんど見出されていない。

(2) 一方、細胞分裂停止後、細胞は、細胞内に蓄積しておいたエネルギー源を糧に細胞分化を行なわなければならない。すなわち、

分化のコミットメントを過ぎると外部からのエネルギー源の摂取なしに分化を進めるため、限られたエネルギー源を効率的に消費することが重要となる。しかし、この細胞内に蓄積されているエネルギー源の実体についての報告は乏しく、またその効率的な利用について呼吸系の遺伝子を対象とした細胞分化時の発現調節機構の報告も極めて少ない。

## 2. 研究の目的

(1) 細胞内のエネルギー状態を感じ細胞

分裂を調節する機構については未解決の部分が多い。新規に当研究室で見出された細胞分裂転写制御因子、特に YofA の解析を行ない、対数増殖期から定常期に至る過程の細胞分裂停止機構を解明する。

(2) 枯草菌は、細胞を分化させ耐久型細胞つくる胞子形成機構を有している。この過程は外部からの栄養源を摂取すること無しに内部に蓄積させたエネルギー源を効率的に消費させ、胞子形成を進行させる。この効率的なエネルギー生産の機構の解明するため、エネルギー生産・呼吸の主要酵素をコードする *ndh*, *yumB*, *yutJ* に焦点をあて、これらの機能解析を行う。一方、このエネルギー源の実体を明らかにするため、細胞内マクロ分子を候補とし、実体の解明を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 分裂装置を構成するタンパク質をコードする遺伝子の発現調節に関与する因子の探索と解析

① 機能未知転写因子をコードする遺伝子の変異株の生育曲線を作製し、対数増殖と定常期において野生株と異なるパターンを示す株を選別する。

② 顕微鏡による観察により、細胞分裂異常が生育曲線に影響を与えているのか否か調べる。

③ 得られた転写調節因子の変異株における FtsA, FtsW, FtsL, DivIB, DivIC, PBP2B など分裂装置を構成するタンパク質をコードする遺伝子の転写活性を調べ、これらの遺伝子の発現が当該転写制御因子により調節されているのか否か調べる。

④ *ftsW* の上流領域の YofA の作用する領域および結合領域を調べる。

⑤ YofA が感知するシグナルを解析する。

(2) 胞子形成細胞におけるエネルギー源の実体の解明とエネルギーの効率的利用についての解析

① エネルギー産生系の入り口にあたる NADH 脱水素酵素をコードする *ndh* (主要酵素, Gyan J. Bacteriol 2006), *yumB*, *yutJ* の発現パターン及び発現量を調べ、各遺伝子の重要性について解析する。また、*yumB*, *yutJ* の NADH 脱水素酵素として機能の有無を調べる。

② *ndh*, *yumB*, *yutJ* の破壊 (2重、3重も含む) および大量発現により、胞子形成期に必要なとされる NADH 脱水素酵素を明らかにする

③ エネルギー蓄積に必要と考えられる遺伝子 (*glgBCDAP* 等) 破壊を行ない、胞子形成への関与を調べる。

### 4. 研究成果

(1) 分裂装置を構成するタンパク質をコー

ドする遺伝子の発現調節に関与する因子の探索と解析

① 機能未知転写因子をコードする遺伝子の変異株の生育曲線を作製し、対数増殖と定常期において野生株と異なるパターンを示す株を選別した。この結果、*yofA* 変異株が定常期において濁度 (OD<sub>600</sub>) が低下する表現型をもつことが示された (図 1)。 *yofA* 破壊株の

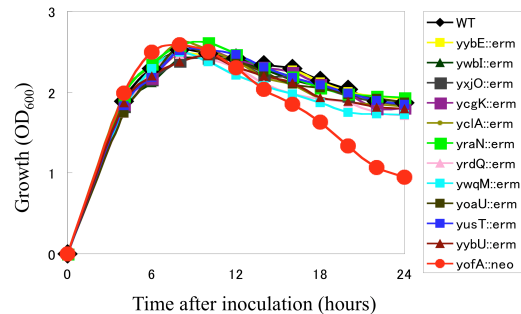


図1 機能未知LysR-type転写調節因子欠損株の生育曲線

*thrC* 領域に *yofA* 遺伝子を導入し相補実験をおこなったところ、野生株と同レベルに定常期の生育が回復した。さらに、*yofA* を *Pspac* プロモーター下に置いた株を作製し、この株の *yofA* を誘導したところ野生株レベルに回復した。したがって、*yofA* 変異株は定常期において、生育状態が悪くなる表現型を示すことが確認された。

② 定常期の細胞膜を蛍光基質により染色し、蛍光顕微鏡で細胞の分裂面を調べたところ、野生株は、ほぼ分裂が終了しているが、*yofA* 破壊株では、非常に多くの分裂途中の細胞が観察された (図 2)。また、野生株と *yofA* 破

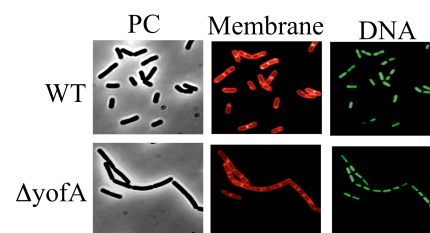


図2 *yofA*破壊株の定常期における細胞形態

壊株の分裂途中の細胞数の推移を調べたところ、野生株は、定常期が進むと、分裂中の細胞の割合が低くなるが、*yofA* 破壊株では、その減少が野生株ほど顕著ではなかった。したがって、*yofA* 変異株は、定常期初期の最後の細胞分裂能が欠損していることが示唆された。

③ YofA は、細胞分裂または細胞伸長に関わる遺伝子の発現に関与することが示唆されたことから、細胞分裂に関わる5つの遺伝子 (オペロン) の転写と細胞伸長に関与する *rodA* の転写を調べた。この結果、*ftsW* においてのみ *yofA* 変異導入による著しい発現低

下がみられた (図3)。さらに、野生株と *yofA* 変異株、そして *yofA* 過剰発現株の *ftsW* の転

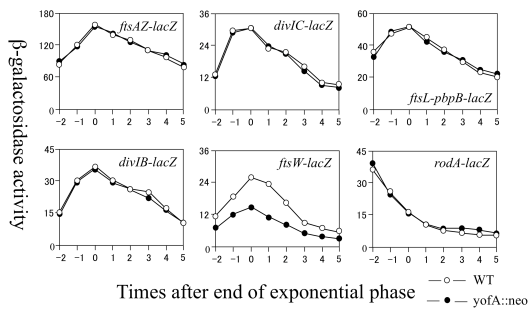
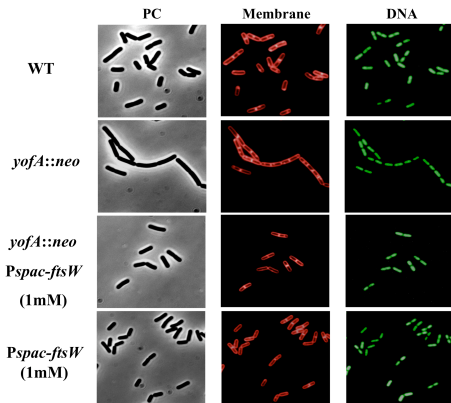


図3 細胞分裂および細胞伸長遺伝子の発現とYofA転写制御因子

写について調べた結果、*yofA* 破壊株で発現量が低下し、過剰発現株で増加が認められた。この結果、少なくとも YofA が *ftsW* の転写に関与することが明らかになった。

④ 次に、細胞増殖の FtsW 依存性を調べる目的で、*Pspac-ftsW* を作製した。発現誘導実験の結果、*ftsW* は細胞分裂に必須であることが示された。次に、この株に *yofA* 変異を導入し、*ftsW* の発現誘導を行った。この結果、*ftsW* の強制発現は *yofA* 変異による定常期初期の細胞分裂阻害を回復することが示された (図



定常期T9の細胞

図4 FtsW発現によるyofA変異 (細胞分裂阻害) の抑圧

4)。さらに、*yofA* と *ftsW* の発現時期を調べた結果、*yofA* の転写量は、定常期初期に最大となり、*ftsW* の転写量が最大となる時期と一致した。この結果、*ftsW* の転写は、*yofA* に依存することが明らかになった。

⑤ 次に、YofA による *ftsW* 転写活性化の培地依存性を調べた。LB では野生株と *yofA* 変異株で大きな違いがみられるのに対して、DSM (胞子形成培地) では差が小さく、MM では差がみられなかった。しかし MM に Glucose を添加した場合、LB 同様に、野生株で *ftsW* の転写レベルは大きく上昇するのに対し、*yofA* 変異株では、*ftsW* の転写レベル上昇はおこらなかった (図5)。この結果から、YofA は、栄養源が豊富で、早い生育がおこなわれる時に、活性化し *ftsW* の転写を促進させることが示された。

⑥ 最後に *ftsW* 上流の YofA による転写活性

### *ftsW-lacZ*

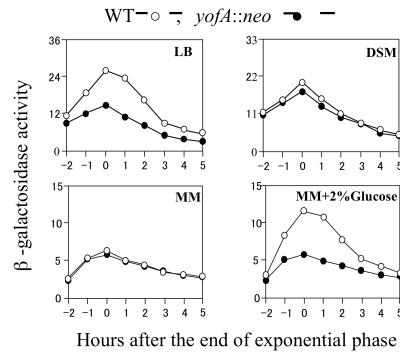


図5 YofAによるftsW転写活性化の培地依存性

化領域について解析した。*ftsW* 上流領域を段階的に欠失させ、発現量を調べた結果、YofA が関与する領域は、*ftsW* の翻訳開始点上流 100~130bp であることが示された。

以上の結果より、新規転写調節因子 YofA は、栄養 (エネルギー) 状態を感知し、細胞分裂装置を構成するタンパク質のひとつである *ftsW* の転写調節を行うことにより、細胞分裂を制御していることが明らかとなった。細胞分裂制御に関わる転写調節因子の報告は少なく、今回の解析により、栄養 (エネルギー) 状態と細胞分裂とを結びつける経路の一端が示された。

(2) 胞子形成細胞におけるエネルギー源の実体の解明とエネルギーの効率的利用についての解析 (NADH 脱水素酵素をコードする遺伝子の解析)

① エネルギー産生系を解析の入り口にあたる NADH 脱水素酵素をコードする *ndh*, *yumB*, *yutJ* の発現を解析した。発現量の違いから *ndh* が主要な酵素をコードしていることを明らかにした。一方、*yumB* と *yutJ* の発現量は非常に低く、各種ストレス下においての発現も認められていなかった。*yumB*, 及び *yutJ* のプロモーターを *ndh* のプロモーターに改変した遺伝子を作製し、*ndh* 欠損変異株に導入したところ、いずれの遺伝子も *ndh* 欠損に見られる機能欠損を全て回復させた。発現量を *ndh* と同レベルにした場合に機能回復がみられたため、*YumB* と *YutJ* は、*Ndh* と同等の機能を有していることが示された。

② *ndh*, *yumB*, *yutJ* の多重破壊株を作製し、細胞増殖・分化に与える影響について調べたが、細胞増殖には *ndh* が必須であり、他の遺伝子については、二重破壊株でも影響は見られなかった。また、*yumB*, *yutJ* の二重変異株の胞子形成への影響は見られなかった。一方、*ndh* を破壊すると胞子形成率は低下した。しかし、この低下については、栄養増殖が阻害されるためと考えられた。

③ エネルギー蓄積に必要と考えられる遺伝子の (*glgBCDAP*等) 破壊を行ない、胞子形成への関与を調べたが、増殖・胞子形成いずれも影響を与えることはなかった。一方、これらの遺伝子を大量発現させる系を構築し、胞子形成へ与える影響を調べたが、この場合においても、増殖・細胞分化とも大きな影響を与えることはなかった。

細胞内エネルギーの効率的利用については、NADH脱水素酵素をコードする遺伝子である *ndh*, *yumB*, *yutJ* についての解析を行うことにより、その解明に迫ったが、*ndh* が細胞増殖と分化において中心的な役割を果たすこと、また *yumB*, *yutJ* は補助的な役割を有していることが示された。エネルギー源の実体については、単一の分子だけではなく多種類のマクロ分子が細胞分化に向かうために貯蔵されていると考えられる。

本研究により、YofA を介した細胞増殖におけるエネルギー戦略の一端が解明された。細胞分化に必要なエネルギー源の実体や備蓄については課題が残され、今後は、メタボローム解析、ゲノム上の遺伝子ネットワークの解明、個々の遺伝子発現量の正確な測定などを行うことにより、消費される分子の特定が進み、細胞増殖と分化におけるエネルギー戦略全体像が明らかになると期待される。

#### 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 Lu Z, Takeuchi M, Sato T., The LysR-type transcriptional regulator YofA controls cell division through the regulation of expression of *ftsW* in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 189, 5642-5615, 2007, 査読有り

② Abe T, Sakaki K, Fujihara A, Ujiie H, Ushida C, Himeno H, Sato T., Muto A. tmRNA-dependent trans-translation is required for sporulation in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 69, 1491-1498, 2008, 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

① 呂作雷、佐藤勉、枯草菌 YofA による細胞分裂制御、グラム陽性細菌のゲノム生物学研究会、2007年9月14日、近江白浜・白浜荘

② 呂作雷、宮本雅史、佐藤勉、The LysR-type transcriptional regulator YofA controls cell division in *Bacillus subtilis*、日本分子生物学会、2007年12月12日、横浜・パシフィコ横浜

③ 牛込智喜、佐藤勉、枯草菌胞子形成特異的シグマ因子、日本農芸化学会、2008年3月28日、名城大学

④ 木村達、佐藤勉、枯草菌 *skin element* の遺伝子発現と細胞致死、グラム陽性細菌のゲノム生物学研究会、2008年9月4日、国立オリンピック記念青少年総合センター

⑤ 佐藤勉、木村達、枯草菌の胞子形成期にDNA再編成により欠失する *skin element* の解析、2008年12月10日、神戸ポートアイランド

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 勉 (SATO TSUTOMU)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授

研究者番号:70215812

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし