

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008 ～ 2012

課題番号：20248012

研究課題名（和文） 細菌情報伝達ネットワークの分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of bacterial signal transduction

 研究代表者 内海 龍太郎 (UTSUMI RYUTARO)
 近畿大学 農学部 教授

研究者番号：20151912

研究成果の概要（和文）：細菌は環境変化を迅速に感知する多様な膜センサーを介して、環境適応に必要な遺伝子の発現を制御し、多様な環境変化に迅速に適応するシステム(TCS, two component signal transduction)を有している。細菌細胞は、1細胞に何十というTCS回路を持っていることが知られている。さらに、各TCS回路は互いに連結して、さらに複雑な遺伝子発現制御ネットワークを形成している。本研究では、世界で初めて、大腸菌K-12のTCS EvgS/EvgAとPhoQ/PhoPに着目して、それらの2種のTCS間をつなぐ、コネクターの働きを明らかにし、環境変化に迅速に適応できる細菌の情報伝達ネットワークの分子機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Bacteria have evolved two-component signal transduction systems (TCS), which are comprised of sensor histidine kinases (HK) and their cognate response regulators (RR, transcriptional factor). Bacterial cells have a number of TCSs to respond to various environmental stresses. Comprehensive transcriptome studies of these TCSs suggest that they interact with each other by means of a signal transduction network. In *Escherichia coli* cells, we have clarified the molecular mechanism of how EvgS/EvgA TCS connects to PhoQ/PhoP TCS via a connector SafA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2012年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
総計	36,000,000	10,800,000	46,800,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 応用生物化学

キーワード：two-component system, SafA, EvgS/EvgA, PhoQ/PhoP, connector

1. 研究開始当初の背景

細菌情報伝達の主要な分子機構として、2成分情報伝達機構（Two-component signal transduction, TCS）が知られていた。研究代表者は、2007年、大腸菌の2種のTCS, EvgS/EvgAとPhoQ/PhoP間を連結するコネクターとして、SafAを見出し、PNAS誌

に公表した。このようなコネクター分子の発見は、細菌細胞にも高等動植物細胞と同様に、情報伝達ネットワークが存在していることを示唆した。このような大腸菌をモデル細胞に用いた細菌情報伝達制御機構の解明により、細菌細胞を用いた分子生物学研究の新しいパラダイムが展開することが期待された。

2. 研究の目的

大腸菌情報伝達、EvgS/EvgA と PhoQ/PhoP 間ネットワークの分子機構を制御するコネクタ分子 SafA の機能解析と新規なコネクタ分子の存在と機能を明らかにするために、次のような研究目標を掲げ、研究を行った。

(1) EvgS/EvgA→SafA→PhoQ/PhoP の分子機構

- ① EvgS/EvgA→SafA の情報伝達制御機構
- ② SafA による PhoQ/PhoP 情報伝達制御機構
- ③ EvgS/EvgA→SafA→PhoQ/PhoP 情報伝達ネットワーク

(2) 新規なコネクタ分子の探索と機能解析

3. 研究の方法

(1) EvgS/EvgA→SafA の情報伝達制御機構

- ① EvgS の活性化機構
センサー EvgS の活性化シグナルを特定後、シグナル感知領域の解析のために EvgS と PhoQ の各ドメインを交換したキメラセンサーを発現する大腸菌を作成し、EvgS/EvgA 制御下の遺伝子 *ydeP* の発現を指標に検討する。
- ② EvgS/EvgA によって制御される遺伝子群の転写カスケード解析
EvgA によって、制御される標的遺伝子群の転写制御様式を明らかにするために、S1 ヌクレアーゼアッセイやフットプリンティング実験を行う。

(2) SafA による PhoQ/PhoP 情報伝達活性化機構

- ① SafA と PhoQ の結合作用の解析
SafA と PhoQ の直接結合を Biacore を用い、SPR 解析を行う。
- ② PhoQ のマルチセンシング機能に及ぼす SafA の効果を調べるために NMR を用いて、 ^1H - ^{15}N HSQC 解析を行う。
- ③ SafA-PhoQ *in vitro* 細胞膜構成系を用いて、SafA による PhoQ 活性化に及ぼす影響を調べる。
- ④ Phos-Tag アクリルアミドゲル電気泳動による細胞内のリン酸化 PhoP の測定。

(3) EvgS/EvgA→SafA→PhoQ/PhoP 情報伝達ネットワーク解析

EvgS/EvgA→SafA→PhoQ/PhoP による情報伝達ネットワークの生物学的意義を明らかにするために、各遺伝子の欠損株を作成し、酸耐性能を測定する。

(4) 新規なコネクタ分子の探索と機能解析

SafA 以外の TCS 間を調節する新規なコネクタを探索するために、大腸菌における各種コネクタ候補遺伝子と 30 種類の全センサー遺伝子について、大腸菌における two-hybrid 法を用いて、それらの遺伝子がコードするタンパク質の直接相互作用を予測する。その後、コネクタ候補遺伝子欠損株を作成して、標的 TCS に対する制御機構を調べる。

4. 研究成果

(1) EvgS/EvgA→SafA→PhoQ/PhoP の分子機構

- ① EvgS は酸性 pH と 150 mM 以上の Na^+ あるいは K^+ の条件が重なった時に活性化された。PhoQ とのキメラセンサーを解析した結果、 Na^+ や K^+ は EvgS のペリプラズム領域で、酸性 pH は細胞質側のリンカー領域で感知することが示唆された。
- ② センサー EvgS の活性化により、EvgA, YdeO, GadE の 3 種の転写因子を含む転写カスケードによって多数の酸耐性遺伝子および薬剤耐性遺伝子の発現が誘導されることを示した。

(2) SafA による PhoQ/PhoP 情報伝達活性化機構

- ① BiacoreX100 を用いた SPR 解析結果から、SafA の C-末端部位 (41-65aa) と PhoQ のセンサードメイン (41-193aa) の直接結合が示された。また、SafA の R53 ならびに PhoQD179 が SafA による PhoQ 活性化に重要な働きをしていることが明らかになった (図 1)。

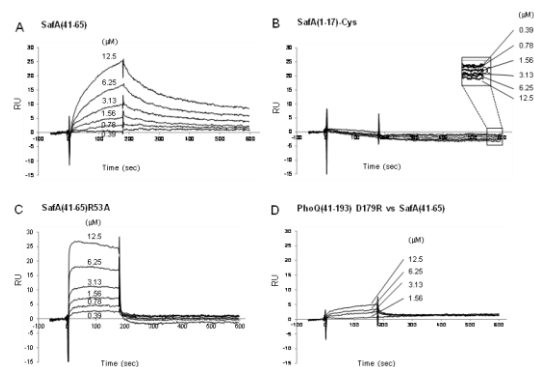


図 1 SafA と PhoQ の SPR 解析

- ② ^{15}N 標識した PhoQ(43-190)を用いて、 Mg^{2+} と SafA (41-65) をそれぞれ、添加、無添加の条件で、 ^1H - ^{15}N HSQC 解析を行った結果、SafA は、 Mg^{2+} とは異なる作用で、PhoQ の活性化制御を行っていることが明らかになった (図 2)。

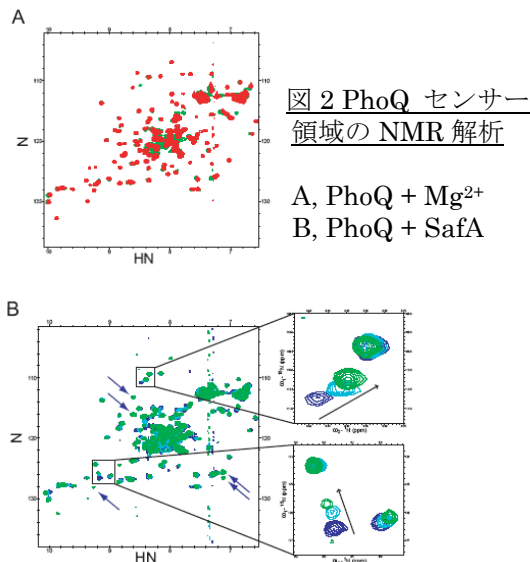


図 2 PhoQ センサー領域の NMR 解析

A, PhoQ + Mg²⁺
B, PhoQ + SafA

③ SafA による PhoQ の制御機構を明らかにするために、SafA-PhoQ 共発現大腸菌の細胞膜を調製して、*in vitro* リン酸化反応に対する SafA の影響を調べた結果、SafA による PhoQ の自己リン酸化反応の促進ならびにリン酸化 PhoP の蓄積効果を示した。

④ Phos-Tag アクリルアミドゲル電気泳動を用いて、SafA-PhoQ 共発現大腸菌細胞と PhoQ 発現大腸菌細胞内でのリン酸化 PhoP の蓄積量を調べた結果、明らかに、SafA-PhoQ 共発現株において、リン酸化 PhoP の蓄積効果が観察され、③の *in vitro* 細胞膜実験結果と一致した。

(3) EvgS/EvgA→SafA→PhoQ/PhoP 情報伝達ネットワーク解析

EvgS/EvgA 系の活性化によって菌は酸耐性化するが、SafA によって PhoQ/PhoP 系が活性化されることで酸耐性化がさらに強化された。本研究により、EvgS/EvgA→SafA→PhoQ/PhoP→IraM→RssB の 3 種の TCS と 2 種のコネクターを含むネットワークを明らかにした (図 3)。

(4) 新規なコネクター分子の探索と機能解析

新規コネクター候補 70 と大腸菌ヒスチジンキナーゼセンサー 29 個との相互作用を大腸菌 two-hybrid 法で、検討した結果、25 組の組み合わせで、相互作用が認められた。このうち、11 組がセンサー EnvZ との相互作用であった。また、ひとつのコネクター候補が 3 種のセンサーと相互作用を示すことも観察され、より、複雑なネットワークの存在が予想された。そのうち、新規コネクターとして、YigF が

EnvZ を抑制し、YbdJ が活性化した。さらに、YigF の発現は高濃度の NaCl で、誘導されることが判明した。これらの結果を発展させ、新たな情報伝達ネットワークの分子機構が期待される。

(5) まとめ

本研究において、コネクター SafA を介する情報伝達分子機構が大腸菌をモデル生物として明らかにされ (図 3)、その成果は次のようである。

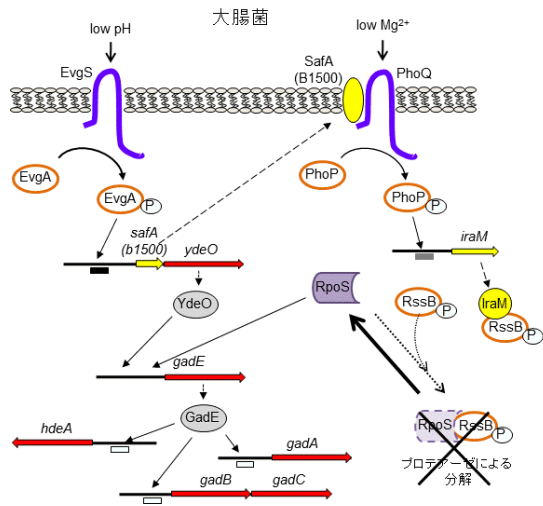


図 3 コネクター SafA を介する情報伝達ネットワーク

- ① Molecular Microbiology (インパクトファクター 6) を含む発表論文 (雑誌論文、①、③、⑤、⑧、⑫) として、公表され、世界的にも高い評価を受け、その成果は 3 誌の国内外の著書 (図書 ① 化学と生物誌、② Horizontal 社、③ Springer 社) として、公表された。
- ② 英国微生物学会からの招待講演はじめ国内外の 11 回の招待講演が行われた。また、日本分子生物学会・生化学会 (2009)、日本農芸化学会 (2009, 2013) においては、シンポジウムを企画運営し、細菌情報伝達ネットワークの国内外の成果をまとめて、報告した。
- ③ 本研究途中で、細菌情報伝達阻害剤が見いだされ、2 件の特許取得と 9 件の特許出願がなされた。細菌情報伝達を標的にした新規抗生物質開発への道を切り開いた。

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 19 件)

- ① Ishii E, Eguchi Y, and Utsumi R. (2013) The activation mechanism of PhoQ/PhoP system by SafA, an auxiliary protein of histidine kinase in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.* in press 査読有 https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/73/4/73_80795/_article
- ② Igarashi M, Watanabe T, Hashida T, Umekita M, Hatano M, Yanagita Y, Kino H, Kimura T, Kinoshita N, Inouye K, Sawa R, Nishimura Y, Utsumi R. and Nomoto A. (2013) Waldiomycin, a novel WalK-histidine kinase inhibitor from *Streptomyces* sp. MK844-mF10. *J Antibiot.* in press 査読有
- ③ Kato A, Hayashi H, Nomura W, Emori H, Hagihara K, and Utsumi R. (2012) A connector-like factor, CacA, links RssB/RpoS and the CpxR/CpxA two-component system in *Salmonella*. *BMC Microbiol.* **12**, 224-235. 査読有 doi: 10.1186/1471-2180-12-224.
- ④ Watanabe T, Igarashi M, Okajima T, Ishii E, Kino H, Hatano, M, Sawa R, Umekita M, Kimura T, Okamoto S, Eguchi Y, Akamatsu Y, and Utsumi R. Isolation and characterization of signermycin B, an antibiotic that targets the dimerization domain of histidine kinase WalK. (2012) *Antimicrob Agents Chemother.* **56**, 3657-3663. 査読有 doi: 10.1128/AAC.06467-11.
- ⑤ Eguchi, Y., Ishii, E., Yamane, M., and Utsumi, R. (2012) The connector SafA interacts with the multi-sensing domain of PhoQ in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **85**: 299-313. 査読有 doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08114.x.
- ⑥ Okamoto S, Yu F, Harada H, Okajima T, Misawa N, and Utsumi R. (2011) A short-chain dehydrogenase involved in terpene metabolism from *Zingiber zerembet*. *FEBS J.* **278**, 2892-2900. 査読有 doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08211.x.
- ⑦ Eguchi Y, Kubo N, Matsunaga H, Igarashi M, and Utsumi R. (2011) Development of an Antivirulence Drug against *Streptococcus mutans*: Repression of Biofilm Formation, Acid Tolerance, and Competence by a Histidine Kinase Inhibitor, Walkmycin C. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 1475-84. 査読有 doi: 10.1128/AAC.01646-10
- ⑧ Eguchi Y, Ishii E, Hata K, and Utsumi R. (2011) Regulation of acid resistance by connectors of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **193**, 1222-8. 査読有 doi: 10.1128/JB.01124-10.
- ⑨ Doi A, Okajima T, Gotoh Y, Tanizawa K, and Utsumi R. (2010) X-ray crystal structure of the DNA-binding domain of response regulator WalR essential to the cell viability of *Staphylococcus aureus* and interaction with target DNA. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**, 1901-7. 査読有 https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/74/9/74_100307/_article
- ⑩ Okada A, Igarashi M, Okajima T, Kinoshita N, Umekita M, Sawa R, Inoue K, Watanabe T, Doi A, Martin A,

- Quinn J, Nishimura Y, and Utsumi R. (2010). Walkmycin B targets Walk (YycG), a histidine kinase essential for bacterial cell growth. *J Antibiot (Tokyo)* **63**, 89-94. 査読有
doi: 10.1038/ja.2009.128.
- ⑪ Gotoh Y, Doi A, Furuta E, Dubrac S, Ishizaki Y, Okada M, Igarashi M, Misawa N, Yoshikawa H, Okajima T, Msadek T, and Utsumi R. (2010). Novel antibacterial compounds specifically targeting the essential WalR response regulator. *J Antibiot (Tokyo)* **63**, 127-134. 査読有
doi: 10.1038/ja.2010.4.
- ⑫ Itou J, Eguchi Y, and Utsumi R. (2009). Molecular mechanism of transcriptional cascade initiated by the EvgS/EvgA system in *Escherichia coli* K-12. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 870-878. 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/73/4/73_80795/_article
- ⑬ Yu F, Okamoto S, Nakasone K, Adachi K, Matsuda S, Harada H, Misawa N, and Utsumi R. (2008). Molecular cloning and functional characterization of α -humulene synthase, a possible key enzyme of zerumbone biosynthesis in shampoo ginger (*Zingiber zerumbet* Smith). *Planta*, 1291-1299 査読有
doi: 10.1007/s00425-008-0700-x.
- ⑭ Yu F, Harada H, Yamasaki K, Okamoto S, Hirase S, Tanaka Y, Misawa N, and Utsumi R. (2008). Isolation and functional characterization of a β -eudesmol synthase, a new sesquiterpene synthase from *Zingiber zerumbet* Smith. *FEBS Lett* **582**, 565-572. 査読有
doi: 10.1016/j.febslet.2008.01.020.
- ⑮ Okajima T, Doi A, Okada A, Gotoh Y, Tanizawa K, and Utsumi R. (2008). Response regulator YycF essential for bacterial growth: X-ray crystal structure of the DNA-binding domain and its PhoB-like DNA recognition motif. *FEBS Lett* **582**, 3434-3438. 査読有
doi: 10.1016/j.febslet.2008.09.007.
- [学会発表] (計 113 件)
- ① 内海龍太郎、”細菌情報伝達阻害型薬剤”、日本農芸化学会シンポジウム、2013、3月27日、東北大学(宮城県)招待講演
- ② Eguchi Y、”The connector SafA interacts with the multi-sensing domain of PhoQ”, Gordon conference on Microbial Stress Response, 2012, June 15-20 Mount Holyoke College (USA)
- ③ 内海龍太郎、細菌情報伝達機構と新規抗菌剤の開発、日本細菌学会シンポジウム、2012、3月27-30日、長崎新聞文化ホール(長崎県)
- ④ Utsumi R, “Antibacterial and antivirulent drugs targeting bacterial signal transduction”, The commemorative International conference for the 20th anniversary of Korean Society of Life Science, 2011, Oct.27-28, Busan (Korea) 招待講演
- ⑤ Utsumi R, “EvgS/EvgA signal transduction: transcriptional cascade and acid resistance”, Society for general microbiology Autumn Meeting, 2010, Sep. 6-9 Nottingham (UK) 招待講演
- ⑥ 内海龍太郎、“細菌情報伝達ネットワークとその阻害剤の開発”、日本乳酸菌学会秋季セミナー、2009、11月27日、東京農業大学(東京都)招待講演
- ⑦ 内海龍太郎、“増殖必須の TCS を標的にした細菌情報伝達阻害剤の開発”日本分子生物学会・生化学会合同大会シンポジウム “細菌情報伝達ネットワークとドラッグターゲット”、2008 12月9-12日、神戸ポートピアアイランド(兵庫県)企画 発表
- ⑧ 江口陽子、“細菌膜小蛋白質による TCS ネットワーク制御機構”、日本分子生物学会・生化学会合同大会シンポジウム

“細菌情報伝達ネットワークとドラッグターゲット”、2008 12 月 9-12 日、神戸ポートピアアイランド（兵庫県）企画 発表

〔図書〕（計 8 件）

- ① 江口陽子、加藤明宣、石井英治、内海龍太郎、“コネクターがつなぐ細菌情報伝達ネットワーク” 化学と生物、日本農芸化学会、51、241-249 (2013)
- ② Eguchi Y, Ishi E, Utsumi R, “Molecular mechanism of bacterial two-component signal transduction networks via connectors” in Two-component System in Bacteria, Horizon Scientific Press, 149-162 (2012)
- ③ 内海龍太郎 五十嵐雅之 (2012) 病原細菌に対する新しい薬剤標的—二成分情報伝達システム *YAKUGAKU ZASSHI* 132: 51-58
- ④ 江口陽子 内海龍太郎 (2010) 細菌情報伝達ネットワークとその阻害剤の開発. *Jap.J.Lactic.acid.Bacteria* (日本乳酸菌学会) 21、36-41
- ⑤ Gotoh Y, Eguchi Y, Watanabe T, Okamoto S, Doi A, and Utsumi R. (2010) . Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* 13, 232-239.
doi: 10.1016/j.mib.2010.01.008.
- ⑥ Utsumi R (編集) “Bacterial Signal transduction: networks and drug targets”, Springer 総ページ 242 (2008)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 9 件）

名称：化合物、その互変異性体、幾何異性体、ないし、それらの塩、及びそれらの製造方法、抗菌剤、並びにその感染症治療薬
発明者：内海龍太郎 他 3 名
権利者：近畿大学 他 3
種類：特許
番号：2012-230270
出願年月日：2012 10 月 17 日
国内外の別：国内

名称：新規化合物、ウオークマイシン、その製造方法、及びその用途
発明者：内海龍太郎 五十嵐雅之

権利者：近畿大学、微生物化学研究会
種類：特許
番号：2009-186724
出願年月日：2009 8 月 11 日
国内外の別：国内

名称：新規化合物、シグナマイシン、その製造方法、及びその用途
発明者：内海龍太郎 五十嵐雅之
権利者：近畿大学 微生物化学研究会
種類：特許
番号：PCT/Jp2008/065196
出願年月日：2008 8 月 26 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 2 件）

名称：セスキテルペンシクターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸
発明者：内海龍太郎
権利者：近畿大学
種類：特許
番号：5219025
取得年月日 2013 3 月 15 日
国内外の別：日本国

名称：Compound signermycin, method for production thereof, and use thereof
発明者：内海龍太郎 五十嵐雅之
権利者：近畿大学
種類：特許
番号：US8058455B2
取得年月日 2011 Nov. 15
国内外の別 米国

〔その他〕

Bio-protocol (実験手法データベース)
Protein-peptide Interaction by Surface Plasmon Resonance (2013)
Eiji Ishii, Yoko Eguchi and Ryutaro Utsumi
<http://www.bio-protocol.org/wenzhang.aspx?id=321>
近畿大学 研究業績データベース
<http://rais.itp.kindai.ac.jp/researchdb>
近畿大学 農学部分子生物学研究室
<http://mbkinki.sakura.ne.jp/index.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
内海龍太郎 (UTSUMI RYUTARO)
近畿大学・農学部・教授
研究者番号：20151912
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者

なし