

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580100

研究課題名(和文)シアノバクテリアのバイオフィルム形成と新規塩耐性獲得メカニズムの解明

研究課題名(英文)Study of biofilm induction mechanism of cyanobacteria under salt stress condition

研究代表者

七谷 圭(NANATANI, Kei)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00547333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803は、塩ストレス環境下でバイオフィルムを形成する。本研究では、*Synechocystis* の塩ストレスによるバイオフィルム形成誘導メカニズムの解明を目指し、遺伝学的手法、生化学的手法による解析を行った。結果、*Synechocystis* のバイオフィルム形成誘導には、二成分性シグナル伝達が関与していることを明らかにし、シグナル伝達経路の一部を解明した。さらに、c-di-GMPの合成制御によりバイオフィルム形成を制御している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)： *Synechocystis* sp. PCC6803 forms biofilm under salt stress condition. The genetic and biochemical analyses were performed to reveal the mechanism of biofilm formation induced by salt stress. As consequences, we revealed the contribution of the two-component system in *Synechocystis* biofilm formation and one of the signal transduction pathway. Moreover, the possibility of biofilm regulation by c-di-GMP synthesis was also suggested.

研究分野：応用微生物学

キーワード：シアノバクテリア 塩ストレス バイオフィルム形成 二成分性シグナル伝達 c-di-GMP

### 1. 研究開始当初の背景

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 は、多様なストレス環境下で生育することが可能である。研究代表者は、これまでの研究で *Synechocystis* が塩ストレス環境下で、バイオフィルムを形成することを明らかにした。バイオフィルムは、微生物が細胞外に分泌生産した多糖、核酸などの物質の複合体で、フィルム状の構造体である。微生物は、細胞外環境と菌体間にバイオフィルムを形成することにより、環境変化やストレスから自身を保護していると考えられている。シアノバクテリアにおいて、これまでにバイオフィルム形成に関する報告は少なく、塩ストレスによるバイオフィルム形成誘導メカニズムは不明な点が多く残されている。

### 2. 研究の目的

微生物において、バイオフィルムの形成誘導には、二成分性シグナル伝達やシグナル伝達因子である核酸やポリアミンなどが関与しているとの報告がある。二成分性シグナル伝達は、微生物が様々な環境変化を感知し、適切に応答するシステムとして知られている。そこで、本研究ではこれらのシグナル伝達に着目して、生化学的手法、遺伝学手法を組み合わせ、シアノバクテリアのバイオフィルム形成誘導メカニズムの解明と塩ストレス耐性獲得メカニズムの解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) *Synechocystis* 遺伝子破壊株のバイオフィルム形成解析

*Synechocystis* 野生株(WT)および各種遺伝子破壊株を OD730 が 0.5-1.0 になるまで BG11 で前培養を行った。前培養液を BG11、BG11 に NaCl を 500mM 添加した培地を用いて、OD730 が 0.05 になるように希釈した。96 ウェルマルチディッシュに、各希釈液を 100  $\mu$ l ずつ植菌し、3 日間通気振盪培養した。培養後、菌液を捨て、水で 2 回洗浄した。0.1% クリスタルバイオレット (CV) 染色液を 1 ウェル当たり 300  $\mu$ l 添加し 15 分間染色した。マルチディッシュを水で 3 回洗浄し、一晚乾燥させた後、70% エタノールを 1 ウェル当たり 300  $\mu$ l 添加し、室温で 15 分間静置し、CV 色素抽出した。抽出液 100  $\mu$ l を新たな 96 穴プレートに移し、吸光マイクロプレートリーダーを用いて 590 nm の吸収を測定した。

#### (2) バクテリアルツーハイブリット法による Hik-Rre の相互作用解析

Hik-Rre の相互作用解析には、Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Kit (EUROMEDEX) を使用した。はじめに、相互作用を解析する Rre と Hik をそれぞれ pUT18C、pKNT25 ベクターにクローニングした。シーケンス反応によって塩基配列に変異無いことを確認した後、これらのプラスミドを用いて、*E. coli* BTH101 株の形質転換を行った。選択

培地として 100  $\mu$ g/ml ampicillin、50 $\mu$ g/ml kanamycin を添加した LB 培地を使用した。2 種類のプラスミドが形質転換された *E. coli* BTH101 株のコロニーを、3ml LB 液体培地に植菌し、30 で一晚振盪培養した。翌日 OD600=0.005 となるよう希釈し、100  $\mu$ g/ml ampicillin、50 $\mu$ g/ml kanamycin、IPTG および X-gal を添加した LB 培地に 5  $\mu$ l ずつスポットした。30 で 48h 培養した。

#### (3) cyclic di-GMP 合成活性の解析

大腸菌を宿主とした、Hik の発現には低温誘導性ベクター-pCold II (Takara)を用いた。*Synechocystis* ゲノムを鋳型にした PCR により、Hik 遺伝子を増幅し、pColdII にクローニングした。Hik の塩基配列に変異の無いことをシーケンスにより確認した。作製したプラスミドを用いて *E. coli* C43 pLysS 株を形質転換した。形質転換株の培養は、100  $\mu$ g/ml ampicillin および 100  $\mu$ g/ml chloramphenicol を添加した LB 培地で行った。形質転換した *E. coli* C43 pLysS 株を 37 で一晚振盪培養した。この培養液 5 ml を 500 ml の LB 培地に添加し、OD600 = 0.4-0.5 となるまで 37 で 160 rpm で振盪培養した。15 で 30 分静置した後、培養液に 0.2 mM の IPTG を添加し、Hik の発現を誘導した。IPTG 添加後、15 で 24h 培養を継続した。24h 後、培養液を 8,000 rpm, 15 min 遠心して集菌し、菌体を buffer A [50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF] で 2 回洗浄した。菌体を 10 ml の buffer A に懸濁し、高圧細胞破砕機 (AVESTIN EmulsiFlex-B15, 12,000 psi  $\times$ 3) を用いて菌体を破砕した。次に、超遠心 (Beckman Coulter, L-90K Ultracentrifuge, ローター 70.1Ti, 45,000 rpm, 30 min) し、未破砕菌体を除去した。超遠心後の上清を平衡化した TALON<sup>®</sup> Metal Affinity Resin (Clontech) と混合し、ローテーターを用いて 4 , 4h 攪拌した。4h 後、100 $\times$ g, 3min 遠心し、上清を除去した。Resin に 10 ml の bufferA を添加し、ローテーターで 10 min, 4 攪拌した後、100 $\times$ g, 3min 遠心し、上清を除去した。同様の洗浄操作を 2 回行った。次に、Resin に Buffer A を 1 ml 添加、懸濁し、空のカラム (Biorad Poly-Plep Chromatography column) に移した。Resin に 0.3 ml の elution buffer [50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM DTT, 300 mM Imidazole, 1 mM PMSF] を添加し、よくピペティングし 15 min 静置した。カラムを 50 $\times$ g, 1 min 遠心し、カラム内の elution buffer を回収した。同様の操作を 2 回行った。

次に、精製画分について c-di-GMP 合成活性を測定した。40 mM Tris-HCl (pH7.6), 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 40  $\mu$ M EDTA, 40 mM NaCl, 15  $\mu$ M GTP を混合し、30、6h 反応を行った後、100 で 3 分加熱し酵素を失活させた。室温で 15,000 rpm, 2 min 遠心後、上清をフィルタ

ー (Ultrafree-MCGV, millipore) 濾過し、HPLC 分析サンプルとした。HPLC の分析カラムには、Kaseisorb ODS-SAX super (東京化成) を用いた。移動相には A 液 (アセトニトリル : 水 = 20 : 80) と B 液 (アセトニトリル : リン酸バッファー (pH6.5) = 20 : 80) を用いた。分析開始から 15 分の間は A 液 : B 液 = 85 : 15 の混合液を移動相とし、20 分から 45 分の間は B 液のみを移動相とした。50 分から 65 分 (測定終了時) の間は A 液 : B 液 = 85 : 15 の混合液を移動相とした。移動相の流速は、0.7 ml/min とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) ポリアミンによる *Synechocystis* のバイオフィーム形成誘導制御メカニズムの解析

*Synechocystis* のポリアミン合成・分解に関連する酵素蛋白質をコードした遺伝子の欠損株を作成し、これらの遺伝子の塩ストレス下におけるバイオフィーム形成への関与を検討した。slr0401 は細胞外のポリアミンを検知する PotD をコードする遺伝子、slr2077 は PotD と結合し cyclic-di-GMP 合成を行う MbaA をコードする遺伝子の欠損株でバイオフィーム形成量が減少した。これらの遺伝子が *Synechocystis* におけるバイオフィーム形成において、ポリアミンを介したシグナリングが重要な役割を担っていることが推察された。

##### (2) 二成分性シグナル伝達 *Synechocystis* のバイオフィーム形成誘導制御メカニズムの解析

二成分性シグナル伝達は、ヒスチジンキナーゼ(Hik)とレスポンスレギュレーター(Rre)によって構成される。本研究では、*Synechocystis* のバイオフィーム形成誘導メカニズムを明らかにするため、はじめに塩ストレスを感知しバイオフィーム形成を誘導するヒスチジンキナーゼの探索を行った。*Synechocystis* は *hik1* から *hik44* までの 44 種類のヒスチジンキナーゼ遺伝子を有する。各 *hik* のバイオフィーム形成への関与を検討するため、それぞれの欠損株における NaCl 添加時のバイオフィーム形成を観察した。NaCl の添加によるバイオフィーム形成量の増加に着目した結果、野生株のバイオフィーム形成量は NaCl の添加により 5.5 倍増加した。一方、44 種類のヒスチジンキナーゼ欠損株の中には、増加率が 2 倍より小さい株が複数存在した。これらの株が欠損している Hik は、塩ストレス条件下でのバイオフィーム形成誘導に関与している可能性が示唆された。一方で、過去の報告で塩ストレス応答への関与が報告されている Hik の欠損株でありながらもバイオフィーム形成量が変化しないものも存在した。これらの結果から、塩ストレスを感知する Hik の中でも限られた Hik がバイオフィーム形成誘導に関与することが示唆された。

塩ストレス条件下でのバイオフィーム形成量の増加率が 2 を下回った株において欠損しているヒスチジンキナーゼについて、機能ドメイン構造、および周辺に位置している遺伝子を調べた。その結果、核酸の一種でシグナル伝達因子の一つである c-di-GMP の合成または分解ドメインをもつ、または同様のドメインをもつレスポンスレギュレーターが近傍に存在しているヒスチジンキナーゼがいくつか存在していた。c-di-GMP は他の微生物においてバイオフィーム形成を制御することがよく知られているセカンドメッセンジャーである。そこで、Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System を用いて、バイオフィーム形成誘導に関与すると示唆されるヒスチジンキナーゼについて、二成分制御系においてペアとなるレスポンスレギュレーターを探索した。

塩ストレスによるバイオフィーム形成試験の結果、ヒスチジンキナーゼ *hik12* 欠損株でバイオフィーム形成の増加率が減少した。*hik12* は、リン酸基受容部位である HisKA ドメイン、ATP 結合部位である HATPase ドメイン、および receiver ドメインを有する。レスポンスレギュレーター *rre2* は、*Synechocystis* のゲノム上で *hik12* のすぐ下流に存在し、Response regulator receiver ドメイン、PAS ドメイン、および c-di-GMP 合成ドメインである GGDEF ドメインを有している。Response regulator receiver ドメインは、転写因子として機能すると考えられている。以上の調査結果より、Hik12 が塩ストレスを感知すると Hik12 のリン酸基受容ドメインが自己リン酸化し、さらに Rre2 ヘリン酸基の転移反応が起きて、Rre2 の c-di-GMP 合成活性が制御されている可能性がある。そこで、この推論を検証するため Hik12-Rre2 の相互作用を BATCH 法を用いてその検証した。

BATCH 法による相互作用解析の結果、*E. coli* BTH101 株を宿主として Hik12 全長を発現させた場合は、Hik12-Rre2 の相互作用を検出できなかった。これは、膜貫通領域を持ったタンパク質は異種発現しにくいことが知られ、膜タンパク質である Hik12 においてもその可能性があるかと推測した。そこで新たに Hik12 細胞質領域のみを発現させたところ、Rre2 との相互作用を検出することに成功した。これにより、Hik12 と Rre2 は、*Synechocystis* において二成分性シグナル伝達経路を構成していることが示唆された。

##### (3) cyclic di-GMP 合成制御メカニズムの解析

次に、Rre2 の cyclic di-GMP 合成活性(DGC 活性)制御メカニズムを解析するため、Rre2 と Rre2 の GGDEF ドメイン変異体を精製し DGC 活性を HPLC および LC/MS/MS を用いて検出した。その結果、Rre2 が DGC 活性を持ち、さらに GGDEF ドメイン変異体

への変異により活性が失われた事から GGDEF ドメインが DGC 活性に重要であることを明らかにした。

さらに、Rre2 の DGC 活性は Hik12 によるリン酸化によって制御されていると考えられ、Rre2 のアミノ酸配列の情報から 59 番目のアスパラギン酸がリン酸基受容残基であると推定された。一般に、リン酸基受容タンパク質に置いて、リン酸基を受容するアスパラギン酸残基のグルタミン酸への置換は、構造的、機能的にリン酸基を受容したタンパク質の状態を再現することが知られている。そこで、Rre2 の 59 番目のアスパラギン酸をグルタミン酸に置換した変異体 (Rre2 D59E) を作製し、DGC 活性を測定した。その結果、Rre2 D59N の DGC 活性は野生型 Rre2 と比較してわずかに上昇した。一方、59 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換し脱リン酸化状態を模倣した変異体 (Rre2 D59N) は、DGC 活性が著しく減少した。以上の結果は、Rre2 の DGC 活性はレシーバードメインに存在するアスパラギン酸残基のリン酸化によって制御されていることを示した。

以上の結果から、Rre2 と Hik12 は *Synechocystis* の塩ストレス誘導性バイオフィーム形成に関与する二成分情報伝達系を構成し、c-di-GMP 合成を介して、バイオフィーム形成を制御している可能性が示唆された。また、これらの解析は、*Synechocystis* における塩ストレス誘導性のバイオフィーム形成においてもシグナル伝達因子 c-di-GMP が重要な役割を担っていることを証明した。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

吉澤優一郎、永山達也、解良康太、七谷圭、鈴木石根、魚住信之、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の高塩ストレス誘導型バイオフィーム形成におけるヒスチジンキナーゼ hik43 の解析、*藍藻の分子生物学* 2015、2015 年 11 月 16-17 日、かずさアカデミアホール(千葉県木更津市)

西坂敦、解良康太、七谷圭、佐伯千香、Nur Illany binti Mohd Siran、牧野恒平、魚住信之、シアノバクテリアのポリアミンを介したバイオフィーム誘導機構の解明、*藍藻の分子生物学* 2015、2015 年 11 月 16-17 日、かずさアカデミアホール(千葉県木更津市)

永山達也、久米井智裕、牧野恒平、井田智章、赤池孝章、鈴木石根、七谷圭、魚住信之、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の塩ストレス誘導性バイオフィーム形成に必要なヒスチジンキナーゼの同定、日本

農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28-30 日、岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)  
牧野恒平、七谷圭、井田智章、澤智裕、佐伯千香、鈴木石根、兵藤守、早川芳宏、赤池孝章、魚住信之、ラン藻の塩誘導性バイオフィーム形成に関与する二成分系 c-di-GMP 合成酵素の同定、第 37 回日本分子生物学会年回、2014 年 11 月 25-27 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

牧野恒平、富永昂、堀籠智子、三浦のぞみ、七谷圭、相馬聡、茅森俊介、佐伯千香、鈴木石根、魚住信之、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の塩ストレスによるバイオフィーム形成誘導メカニズムの解析、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)

魚住信之、七谷圭、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の糖生産とバイオフィーム形成、*ラン藻の分子生物学* 2013 (招待講演)、2013 年 11 月 22-23 日、かずさアカデミアホール(千葉県木更津市)

七谷圭、佐伯千香、富永昂、茅森俊介、東恭平、五十嵐一衛、古川壮一、森永康、魚住信之、塩ストレスによる *Synechocystis* sp. PCC 6803 のバイオフィーム形成誘導、*ラン藻の分子生物学* 2013、2013 年 11 月 22-23 日、かずさアカデミアホール(千葉県木更津市)

富永昂、三浦のぞみ、佐伯千香、七谷圭、魚住信之、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の細胞外多糖生産を調節する機構解析、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日、東北大学川内キャンパス(宮城県仙台市)

〔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

七谷 圭 (NANATANI, Kei )  
東北大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号 : 00547333

(2)研究分担者

魚住 信之 (UOZUMI, Nobuyuki )  
東北大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号 : 40223515

(3)連携研究者

( )

研究者番号 :