

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292047

研究課題名(和文)放線菌の接合伝達機構解明と人為的高速ゲノム進化への応用

研究課題名(英文) Study of Streptomyces conjugation mechanism and the application for artificial genome evolution

研究代表者

片岡 正和 (KATAOKA, Masakazu)

信州大学・学術研究院工学系・准教授

研究者番号：90332676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：TraBタンパク質のドメイン構造は欠失解析により、膜局在ドメイン、ATPaseドメイン、DNA結合ドメインに3分割できた。膜局在ドメインはTraBのN末端に、ATPase活性を有するモータードメインは中央部に、DNA結合ドメインはC末端領域に位置していた。線状プラスミドの伝達関連遺伝子群の機能を遺伝学的に明らかにした。また線状プラスミド、環状プラスミドの各々の伝達関連遺伝子群を形態の異なるプラスミドに移植した。pSN22の遺伝子発現制御領域を含む接合必須遺伝子を放線菌*S. lividans*のゲノム上に組み込み、ゲノムの組換えを検出する系を用いて高効率ゲノム移動を確認した。

研究成果の概要(英文)：ATPase activity on the FtsK domain of TraB was essential for the conjugative transfer. All mutations within Walker type domains except T277S abolished the ATPase activity and conjugation. TraB showed specific binding to TraA. Disorder of TraB expression led the decreasing of transfer efficiency. Chromosomal Mobilization Activity (CMA) between *S. lividans* strains was extremely enhanced by genomic insertion of the pSN22 tra genes. Deletion of traB or clt (cis-acting locus of transfer) abolished the CMA activity, and deletion of traA decreased the CMA efficiency. Genomic insertion of clt and trans supplying of the tra gene products also enhanced the CMA. Genome insertion of the tra genes also enhanced hetero genomic recombination suggesting that this phenomena would be useful for the next generation genome engineering.

研究分野：応用微生物学、システム生物学

キーワード：放線菌 接合伝達 ATPase ゲノム移行 TraB DNAチャネル 進化

1. 研究開始当初の背景

細菌界における接合伝達の重要性と現在の知見 接合伝達は、性を持たない細菌が突然変異に起因する比較的緩やかな進化過程を経ずに、自然界から構造遺伝子群を取得できる遺伝子水平移動機構の主演として細菌の多様化に重要と考えられている。我々は、放線菌においてもゲノムの進化に接合因子が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた(*J. Bacteriol.*, 1999)。遺伝子水平移動機構の解明は、薬剤耐性菌の拡散を発端とする R 因子など、グラム陰性菌を中心に展開されてきた。しかし、関連遺伝子数が数十と多く、巨大分子である DNA が細胞膜を介して輸送される DNA チャンネルの解明には至っていない。

放線菌の接合伝達機構と TraB タンパク質

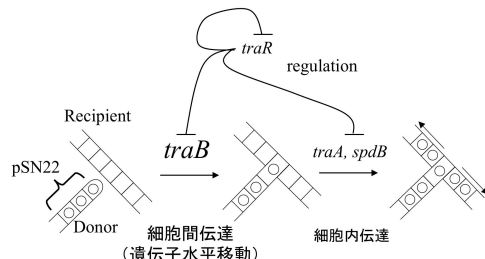


図1. 放線菌の接合伝達機構モデル

研究代表者は、放線菌での接合伝達が3種の遺伝子群に依存していること、遺伝子水平移動点であるゲノム DNA の細胞間移動が pSN22 上の *traB* 遺伝子座にコードされる TraB タンパク質 (TraB) のみによって支配されていること(図 1)、および TraB の膜局在や一次構造上の特徴を明らかにした(*J. Bacteriol* 1991, *Mol. Microbiol.*, 1996 ほか)。

接合伝達とゲノム移行 pSN22 の接合伝達が宿主ゲノムの移行を伴うことは、一般に知られている(*J. Bacteriol* 1991 ほか)。申請者は、放線菌のゲノムに pSN22 の接合伝達ユニットを組み込むことで、プラスミドの接合の場合と比較して、遙かに高頻度で宿主ゲノムが可動化することを見いだしたこの系の応用は、産業微生物である放線菌で大規模な高速ゲノム進化をおこしうる系として、ゲノム育

種手法にパラダイムシフトをおこすことが期待できる。

2. 研究の目的

上述の背景と過去の研究成果を基礎とし、放線菌接合伝達の中心分子 TraB の機能・構造を決定、形態の異なる線状プラスミドの接合伝達機構の解明、さらに応用展開としてゲノム可動化システムを構築する。

- TraB のドメインを機能分割し、膜局在、ATPase、DNA 結合に関与する各機能ドメインを決定し、TraB の分子特性を発現、局在、DNA 輸送のエネルギーの各観点から解明する。
- TraB 結合タンパク質を分離、同定して DNA チャンネル複合体の全貌を解明する。
- X 線結晶構造解析や核磁気共鳴(NMR)法を用いて、TraB の構造を決定する。
- 放線菌線状プラスミドの接合伝達機構を接合関連遺伝子群に着目して、環状プラスミド pSN22 のケースと比較することによって解明し、関与する遺伝子を同定する。
- 高頻度ゲノム移行を異種放線菌間で引き起こし、ゲノム水平移動現象の特徴を明らかにし、選択マーカーを有する変異株作製など実験室内高速進化の容易な手法を整備する。

3. 研究の方法

DNA チャンネル TraB の分子生物学

接合伝達における膜を介した DNA の輸送機構を pSN22 システムの DNA チャンネル、TraB の生化学・分子生物学的な解析で明らかにしていく。タンパク質ホールディングの観点からドメイン構造を決定し、構造上のドメインを決定する。それを元に機能的・生化学的性状を決定し、最終的に立体構造を決定することで TraB の機能構造を明らかにする。

【TraB タンパク質の構造ドメイン構成】

生化学性状の解明と、TraB タンパク質の立体

構造決定のため、TraB タンパク質のドメイン構造を理論的、実験的に決定する。TraB タンパク質は 669 アミノ酸残基からなる膜タンパク質で、立体構造の情報はない。大腸菌や枯草菌の細胞分裂時の DNA チャンネル FtsK/SpoIIIE など類似機能を持つタンパク質との一次構造比較によりドメインを推定し、TraB のトリプシン限定分解によりドメイン構造を決定する。

【膜局在機能ドメインの決定】

TraB の膜局在に関与する機能ドメインを決定する。様々な欠失変異を持つ TraB と GFP の融合タンパク質の膜局在を、蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡で検出する。さらに細胞分画した後、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロットで局在を確認し、TraB の膜局在に必要なドメインを決定する。

【TraB タンパク質の ATP 結合モーター機能ドメインの決定】

TraB タンパク質の *in vitro* での ATPase 活性と DNA 輸送との関連を決定する。TraB タンパク質は、ATP 結合ドメインをもち、そのドメイン内の変異によって pSN22 は伝達能を失う(*Mol. Microbiol.*, 1996)。しかし、接合能と ATPase 活性の関連など、ATP 結合ドメインの詳細な生化学的解析はまだ進んでいない。ATP 結合ドメインに部位特異的変異を導入し、変異の DNA 輸送への影響を調べるとともに、*in vitro* での ATPase 活性を判定する。またこのドメインは、大腸菌細胞分裂時の DNA モーター (FtsK) のモータードメインとの機能類似性が高い。TraB のモータードメイン発現系を構築し、ATPase 活性を測定し、上記の各変異の ATPase 活性と DNA 輸送活性の関係を明らかにし、DNA 輸送に影響する ATPase 活性の閾値を決定する。

【TraB タンパク質の DNA 結合機能ドメインの決定】

TraB の特異的 DNA 結合性について調べる。我々は、pSN22 の接合伝達に必要な DNA 側

の因子として、プラスミド上の *clt*(*cis*-acting locus of transfer)と名付けた DNA 領域を同定した。この領域は、TraB によって特異的に認識される可能性が高いため、*clt* 領域と TraB の結合特異性を決定する。加えて HTH モチーフ内の DNA 結合に関与すると予想されるアミノ酸残基に変異を導入し、接合伝達への影響を調べる。

放線菌線状プラスミドの接合伝達機構

放線菌には、本研究課題で分子解析する環状プラスミドの他、接合伝達可能な線状プラスミドが存在する。しかしその接合伝達機構は、ほとんどわかっていない。連携研究者の池田らによって全ゲノム配列が解読された *Streptomyces avermitilis* 由来の大型線状プラスミド SAP1 に、pSN22 の接合伝達遺伝子 *traA* や *traB* と相同な遺伝子が見ついている。SAP1 の接合伝達機構について、pSN22 と比較しながら解析を進める。SAP1 プラスミド上の *traA* や *traB* 相同遺伝子を破壊し、SAP1 の接合伝達におけるこれら伝達関連遺伝子群の機能を調べる。

tra 遺伝子を利用した高効率ゲノム可動化

高頻度ゲノム可動化システムを開発する。放線菌の遺伝的育種において、英国などでプロトプラスト融合によるゲノム組換えを利用したハイブリッド抗生物質の作製などが試みられた。しかし実験手法としての樹立には至っておらず、ゲノムを放線菌の種間で高頻度に行き来させる手法は未だ確立されていない。研究代表者は、pSN22 の接合機構の研究過程で、ゲノムに pSN22 の伝達関連遺伝子群を挿入することで、現在まで報告されることがない非常に高い頻度(10^{-1})でゲノム移動に伴う染色体組換えが引き起こされることを発見した。この現象をうまく利用すれば、接合伝達の一般性から鑑みて、全ての放線菌をゲノムレベルで操作できる系の樹立に繋がる。

【TraB タンパク質を含む DNA チャンネル複合体

の解明】

TraB 結合因子を探索・分離し、対象遺伝子を破壊することで DNA チャネル複合体の正体を明らかにする。

TraB タンパク質発現の時空間制御の解明

TraB の放線菌コロニー内での発現をリアルタイム可視化解析手法で明らかにし、TraB 発現の時空間を決定する。放線菌は、気中菌糸の形成など高度な分化を示す。どの分化段階で接合が起こるのかは、重要な情報である。TraB 発現の時空間制御を知るとは、放線菌の接合の時空間制御を知ることにつながる。TraB を GFP ラベルし、その時系列発現を蛍光顕微鏡と抗 GFP 抗体によるウエスタンブロットで追跡する。また、コロニー内部のどこで発現しているかを、共焦点顕微鏡を用いて3次元的に発現解析し、時系列に並べることで4次元の発現マップを作成する。

4. 研究成果

DNA チャネル TraB の分子生物学

TraB タンパク質のドメイン構造の分割を行った。ドメイン構造は欠失解析により、膜局在ドメイン、ATPase ドメイン、DNA 結合ドメインに3分割できた。膜局在ドメインは TraB の N 末端に、ATPase 活性を有するモータードメインは中央部に、DNA 結合ドメインは C 末端領域に位置していた。膜局在ドメインの決定には GFP による可視化解析と Western blot による生化学解析を用いた。膜局在ドメインには典型的な膜貫通ドメインは見られないこと、レポータータンパク質の C 末端に本ドメインを付加しても膜局在が観察できることより、膜貫通型以外の機構によって TraB を細胞膜に繫留していると考えられた。ATPase ドメインの解析では、生化学的に活性を明らかにし、変異解析を行った。大腸菌で発現した TraB タンパク質の ATPase 活性を測定し、その必要ドメインの最小化を行って FtsK 様ドメインとした。このドメインにはモ

ーター活性が存在するはずである。ドメイン内には NTP 結合ドメインである Walker Type sequence A と B が存在しており、この配列内に部位特異的変異を 20 カ所導入し、それぞれの ATPase 活性を測定した。一カ所の Thr Ser 変異(T277S)以外の変異は全て ATPase 活性を半分以下に減じ、伝達活性を喪失した。これらの結果より 50%以上の ATPase 活性の低下によって接合伝達活性が喪失することを明らかにできた。

C 末端領域に構造上トリプシンや大腸菌内プロテアーゼに感受性の高い領域を同定し、その領域によって分割されるペプチドの同定 (TraB_C)、発現系の構築、同位体標識を行い、NMR スペクトルを取得した。構造上は Winged HTH と呼ばれる典型的な DNA 結合構造を取っており、Mg⁺⁺イオンの結合残基も決定できた。これらより予想される DNA 結合に必要な残基に変異を導入し、構造と機能の相関性の最終チェックを行っている。なお、ゲルシフトやケミカルシフトによる *clt* と名付けた DNA 側のシス領域に対する結合性は、多くの実験を実施したが未だに検出できないことより、非常に弱い結語であることが予想される。

放線菌線状プラスミドの接合伝達機構

放線菌線状プラスミドの接合伝達システムを解析し、知見が蓄積している環状プラスミドのシステムと比較することで、放線菌の接合伝達の分子メカニズムを解明・一般化する原理究明をめざした。線状プラスミドの伝達関連遺伝子群を遺伝子破壊し、予想していた各遺伝子の機能を遺伝学的に明らかにした。また線状プラスミド、環状プラスミドの各々の伝達関連遺伝子群を形態の異なるプラスミドに移植した。移植した結果、型複製プラスミドでも pSN22 由来の接合伝達は有効でそのメカニズムも同様であった。線状プラスミド SAP1 由来の接合伝達機構に関しては、シス領域を必要とせず (*tra* 遺伝子内部に存

在する可能性は残っているが)、環状プラスミドでは型複製プラスミドでも RCR 型複製プラスミドでも伝達可能であった。線状プラスミドに対しては、SAP1 由来の伝達システムは *ttrA* と呼ばれるヘリカーゼの要求性を強く示した。pSN22 由来のシステムは線状プラスミドの伝達も可能であったが、効率は低下し、*ttrA* の要求性も示さなかった。これらの結果は多くの新しい知見を含んでおり、もう少しメカニズム的に詰めた形で発表する予定である。

tra 遺伝子を利用した高効率ゲノム可動化
高効率ゲノム可動化を行うゲノム操作応用；我々が研究してきた環状プラスミド pSN22 の遺伝子発現制御領域を含む接合必須遺伝子を放線菌 *S. lividans* のゲノム上に組み込み、ゲノムの組換えを検出する系を用いて高効率ゲノム移動を確認した。ちなみにその効率は想像を絶する高効率であり、近い将来のゲノム操作への応用を期待させる結果であった。染色体可動化メカニズムのゲノム育種への応用性を異種菌間による交雑の効率化の観点から調べた。異種菌間の場合の効率は同種菌の場合と比較して 10 から 100 倍低下したが、応用可能範囲内の効率で有り、さらに研究を進めている。また、この効率低下はゲノムの相同性に起因することを明らかにした。

TraB タンパク質を含む DNA チャネル複合体の解明

Tra オペロン内に存在する *traA* 遺伝子産物の TraA が TraB と直接結合すること、その結合に必要な TraB, TraA 双方の領域を決定した。また、プルダウンに必要な TraB の量を稼ぐために大腸菌発現に最適化した *traB* 人工遺伝子を合成し、発現の改良を行った。

TraB タンパク質発現の時空間制御の解明

traB 遺伝子内に翻訳時期制御機構である *blbA* による制御を受ける TTA コドンを埋め込み、その効果を調べて、適切な TraB の発現

が効率的な接合伝達に必要なことを明らかにした。

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)

[学会発表](計 20 件)

村端広介、金眞熙、宮武徹、片岡正和 放線菌接合伝達遺伝子によるゲノム移行
2016 年年会 2016 3/28-30 札幌

小林美貴、淡路健雄、片岡正和 リアルタイム細胞内 pH センサーによる大腸菌長期定常期の解明
2016 年年会 2016 3/28-30 札幌

丸山直也、池田治生、片岡正和 線状プラスミドにおける接合伝達機構の解析
日本農芸化学会 2016 年年会 2016 3/28-30 札幌

矢野嵩紘、宮武徹、片岡正和 放線菌プラスミド pSN22 の接合伝達における必須タンパク質 TraB の機能解析
日本農芸化学会 2016 年年会 2016 3/28-30 札幌

Masakazu Kataoka Conjugation in modern microbiology 異分野融合ワークショップ 微生物生命システムと合成生物学の融合
2016 3/16-17 奈良先端大学院大学

矢野嵩紘、宮武徹、片岡正和 放線菌プラスミド pSN22 の接合伝達における必須タンパク質 TraB の膜局在及び ATPase 活性に関する解析
日本ゲノム微生物学会 2016 3/3-4 神戸

村端広介、金眞熙、宮武徹、片岡正和 放線菌接合伝達遺伝子による染色体移行手法の開発
グラム陽性菌ゲノム機能会議 2015 8/27-28 雄琴温泉

Masakazu Kataoka, Tetsu Miyatake, Mai Kobe Functional analysis of DNA channel protein, TraB, for *Streptomyces* conjugation.
ASM meeting 2015 5/30-6/3 Ner Orleans, USA

Takahiro Yokoi, Mitsuhiro Itaya, Hitrotada Mori, Masakazu Kataoka Optimization of Gene Transfer by the RK2 between Cross-species. ASM meeting 2015 5/30-6/3 Ner Orleans, USA

村端広介, Jin Hee Kim, 宮武徹, 横井崇紘, 片岡正和 放線菌プラスミド pSN22 由来接合伝達遺伝子による染色体移行の解析
日本農芸化学会 2015 年年会 2015 3/26-29 岡山市

遠藤翔太、池田治生、片岡正和 放線菌接合伝達性線状プラスミド SAP1 の解析
日本ゲノム微生物学会 2015 3/6-8 神戸

片岡正和 いまどきの遺伝子操作：巨大な DNA の扱いと接合伝達の復権極限環

境生物学会 2014 11/1-11/3 沖縄県今
帰仁村

Masakazu Kataoka Old is New? : New
horizon of conjugation in the generation of
synthetic biology. Cold Spring Harbor
Laboratory meeting, Plasmids: History &
Biology, 2014 9/21 – 9/23, Cold Spring
Harbor USA

Masakazu Kataoka, Tetsu Miyatake
Localization and interaction of TraA and
TraB, the essential factor for the
conjugative transfer of Streptomyces
plasmid pSN22. ISBA 17 2014 10/8-10/12
Audin Turkey

遠藤翔太、池田治生、片岡正和 放線菌
プラスミド SAP1 をモデルとした線状プ
ラスミドにおける接合伝達機構の解明
第8回 2014 9/8-9 日本ゲノム微生物
学会若手の会 静岡県駿東郡

片岡正和 Old is New? : 合成生物学時
代における接合伝達 グラム陽性菌ゲ
ノム機能会議 2014 9/3-5 鶴岡

神戸麻依、宮武徹、片岡正和 放線菌伝
達性プラスミド pSN22 上の伝達関連タ
ンパク質 TraB の解析 日本分子生物学
会第36回大会 2013 12/3-6 神戸・ポ
ートアイランド

片岡正和 招待 生合成系操作におけ
る接合伝達システムの応用可能性 日
本遺伝学会85回大会 2013 9/19-21 横
浜・慶應大日吉

藤森友真、池田治生、片岡正和 放線菌
線状プラスミド SAP1 を用いた遺伝子ク
ラスタ-輸送システム グラム陽性菌
ゲノム機能会議 2013 9/7-8 つくば・筑
波山ホテル

藤森友真、池田治生、片岡正和 線状プ
ラスミド SAP1 を用いた遺伝子クラスタ
-輸送システムの構築 日本放線菌学
会 2013 年度大会 2013 9/5-6 広島・メ
ルパルク広島 査読無

(3)連携研究者

池田 治生 (IKEDA, Haruo)
北里大学・感染制御科学府・教授
研究者番号 : 90159632

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kankyo.shinshu-u.ac.jp/~kataokalab/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

片岡 正和 (KATAOKA, Masakazu)
信州大学・学術研究院工学系・准教授
研究者番号 : 90332676

(2)研究分担者

三島 正規 (MISHIMA, Masaki)
首都大学東京・理工学研究科・准教授
研究者番号 : 70346310