

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26252010

研究課題名(和文) 希少放線菌の複雑な形態分化を支える分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of the complex morphogenesis of a rare actinomycete

研究代表者

大西 康夫(Ohnishi, Yasuo)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：90292789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,900,000円

研究成果の概要(和文)：希少放線菌の一種であるアクチノプラネスは、菌糸状に生育したのち運動性胞子を多数内包する孢子嚢を形成するという複雑な形態分化を行うバクテリアである。孢子嚢は湿潤した環境下で開裂し、飛び出した胞子は好ましい環境まで遊走したのち発芽する。本研究では、本菌の複雑な形態分化を支える分子基盤を多方面から解析し、「細胞の休眠と覚醒」や「細胞運動の制御」という生命現象の根源的な課題に新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis* shows complex morphological differentiation. *A. missouriensis* is a filamentous bacterium and produces terminal sporangia that include hundreds of flagellated spores. Upon contact with water, the spores are released from the sporangia by dehiscence and swim rapidly for a short period of time until they find niches for germination. In this research project, I studied the molecular basis of its complex morphogenesis by several approaches and obtained new knowledge of the fundamental issues of cell biology, such as “sleeping and awakening of cells” and “regulation of cell motility”.

研究分野：応用微生物学

キーワード：放線菌 希少放線菌 形態分化 遺伝子発現制御 孢子嚢 べん毛 転写因子 菌糸

1. 研究開始当初の背景

いうまでもなく生命の最小単位は細胞である。多細胞生物では、細胞はさまざまに分化して組織・器官が形成され一個体がかたち作られている。単細胞生物はその名の通り細胞そのものが「個体」であるが、この細胞も周辺環境の変化に応じて、多かれ少なかれ、その形態を分化させることが知られている。細胞の形態分化の仕組みを明らかにすることは、根源的な生命現象の謎の1つを解き明かすことにほかならず、古くから数多くの研究がなされてきた。

単細胞生物は多細胞生物と比べて単純で扱いやすいため、形態分化研究の材料として有用である。細胞性粘菌に見られる子実体形成や、酵母やバクテリアに見られる孢子形成は、単細胞生物の形態分化の代表例であり、多くの研究が行われてきた。また、休眠細胞である孢子からの発芽も形態分化の一例と考えることができるが、枯草菌孢子の発芽に関しては、「覚醒」に必要なシグナル分子や発芽の分子機構が研究されてきた。一方、研究代表者の所属研究室では30年以上にわたって、ストレプトマイシン生産放線菌 *Streptomyces griseus* の形態分化（および二次代謝）の制御機構に関する研究が行われてきた。この研究はモデル放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)を用いた研究と双璧をなすものとして高く評価されている。研究代表者は約20年前に本研究に参画して以来、研究グループにおいて中心的な役割を果たしてきたが、希少放線菌と呼ばれる一群の放線菌が一般的な *Streptomyces* 属放線菌よりもさらに複雑な形態分化能を有することを知ることになった。その後、希少放線菌の形態分化に興味をもち続けていたが、約10年前によく機が熟し研究を開始した。

2. 研究の目的

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は、菌糸状に生育したのち運動性孢子を多数内包する孢子嚢を形成するという形態分化を行うバクテリアである。湿潤した環境下、孢子嚢の開裂によって放出された孢子はべん毛の回転により超高速で遊泳し、走化性によって菌糸生長に適した環境に辿り着くと、べん毛の回転を停止し、発芽する。本研究の目的は、その複雑な生活環に見られる形態分化を支える分子基盤を解明することであり、(1)孢子嚢・孢子形成に関わる遺伝子群の同定とその発現制御機構の解明、(2)孢子嚢マトリックスの分子実体の解明とその機能および生産制御機構の解明、(3)孢子嚢開裂の分子メカニズムの解明、(4)運動性孢子的運動性・走化性および運動停止の分子メカニズムの解明、に取り組む。「細胞の休眠と覚醒」や「細胞運動の制御」という生命現象の根源的な課題

について、希少放線菌というユニークな研究材料と最新の研究手法を用いて取り組むことで、「微生物学」の新たな研究領域を切り拓くことが最終的な目標である。

3. 研究の方法

研究開始時での研究計画の概略は以下の通りであった（研究の進捗により、当初とは違う方向に展開した内容については、次項において述べる）。

前項の小課題(1)から(3)における共通の基盤情報の取得のため、孢子嚢形成前、孢子嚢形成初期、孢子嚢成熟期の各菌体および休眠状態にある孢子嚢から mRNA を調製し、シーケンス解析を行う (mRNAseq)。各小課題の主要なアプローチは次の通りであった。小課題(1):すでに取得している形態分化の鍵制御因子 TcrA および BldD の細胞内での結合部位を網羅的に解析し、標的遺伝子の機能解析を遺伝子破壊等により行う。小課題(2):孢子嚢マトリックスを大量調製し、プロテオーム解析、LC-MS 解析等を行い、孢子嚢に特異的な生体成分を同定する。小課題(3):休眠状態にある孢子嚢に存在する mRNA や孢子嚢形成初期や成熟期に発現するプロテアーゼをはじめとする高分子分解酵素について遺伝子破壊によりその機能を解析する。小課題(4):トラッキング顕微鏡を用いた孢子運動・走化性の解析を行うとともに、ブレーキタンパク質の機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) 孢子嚢・孢子形成に関わる遺伝子群の同定とその発現制御機構の解明

①遺伝子発現ベクターの開発 (発表論文3)

本研究開始以前に行っていた研究にデータを追加し、*A. missouriensis* と大腸菌のシャトルベクターを開発した。このベクターは本研究プロジェクトにおいても、遺伝子の高発現に利用した。

②べん毛遺伝子群の転写制御 (発表論文2)

mRNAseq の結果、*A. missouriensis* では、すべてのべん毛遺伝子の転写が孢子嚢形成時期に一斉に開始されることが示された。これは通常の細菌では、べん毛遺伝子群の転写がべん毛のアセンブリー順序に対応して段階的に制御されていることと対照的であり、興味深い。研究開始以前に行っていた遺伝子破壊によるべん毛遺伝子の機能解析の結果と合わせて、論文発表した。

③不適切なタイミングでの孢子嚢形成を抑制する多機能性転写抑制因子 BldD (発表論文1)

染色体 DNA 上での BldD 結合部位を ChIP-seq 解析により網羅的に解析し、BldD が 19 塩基からなる回文配列を含む 346 箇所結合することを示した。このうち、27 遺伝子について転写解析を行い、12 遺伝子が実際

に BldD によって転写が抑制されていることを明らかにした。*A. missouriensis* における BldD レギュロンは、形態分化に必要な遺伝子など、一部分は *Streptomyces* 属放線菌の BldD レギュロンと重複しているものの、大部分は異なっていることが明らかになった。④胞子嚢内の胞子成熟に関わる多機能性転写活性化因子 TcrA

染色体 DNA 上での TcrA 結合部位を ChAP-seq 解析により網羅的に同定することを試みたが、TcrA の DNA 結合能がそれほど強くないためか、良好な結果を得ることができなかった。そこで、結合部位をバイオインフォマティクスの手法により絞り込み、競合的ゲルシフトアッセイにより確認するという手法で、計 42 箇所の TcrA 結合部位を同定した。また、TcrA の結合コンセンサス配列を決定するとともに、mRNAseq の結果から予想される転写開始点と TcrA 結合位置の関係を明らかにし、多くの場合、典型的な転写活性化因子が結合するプロモーター上流に TcrA が結合することを示した。また、TcrA の標的遺伝子の多くは、シグマ因子 FliA によって認識されるプロモーター配列を有することが示され、FliA と胞子嚢形成の関連が示唆された。なお、ゲノム中に 4 つある *fliA* 遺伝子のうち、2 つは TcrA によって直接制御されることが強く示唆された。なお、*tcrA* は BldD によって制御されていることも示唆された。

一方、TcrA およびそのリン酸化に関わると考えられる His キナーゼ HhkA に関して、両遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析と胞子嚢形成時および胞子嚢開裂期の経時的トランスクリプトーム解析の結果を総合的に解析し、TcrA がリン酸化を受けないでも活性化する標的遺伝子群とリン酸化を受けたのちに活性化する遺伝子群が存在することを示すなど、TcrA による遺伝子発現制御の全体像を明らかにした。

⑤胞子嚢形成に必須な新規遺伝子

胞子嚢形成期に転写が活性化される遺伝子に着目し、遺伝子破壊によって、その機能を解析していったところ、2 つの遺伝子が胞子嚢形成に必須であることを見出した。SsgB は *A. missouriensis* で唯一の SALP (SsgA-like protein) であるが、その遺伝子破壊により、胞子嚢が形成されなくなることが示された。一方、AsfR は二成分制御系レスポンスレギュレーターの応答ドメインだけからなるタンパク質であり、その遺伝子破壊により、正常な形の胞子嚢の形成率が極端に低下すること、この胞子嚢は開裂が起こらないことが示された。さらに興味深いことに、SsgB と AsfR が相互作用することが示唆された。さらに、AsfR をリン酸化するキナーゼ AsfK を見出し、胞子嚢形成に関わるシグナル伝達経路の一端を明らかにした。なお、*ssgB* は、4-(1)-③で同定された BldD の標的遺伝子の一つであった。

(2) 胞子嚢マトリックスの分子実体の解明とその機能および生産制御機構の解明

胞子嚢マトリックスの大量調製に難航したため、本小課題は期待通りの進展が叶わず、課題は残されたままである(研究期間終了後、特に胞子嚢壁に着目して、本課題に別角度から再挑戦している)。なお、胞子嚢のプロテオーム解析により、新たに 1 つ胞子嚢マトリックスタンパク質を同定したが、遺伝子破壊株の表現型に野生株との差異を見出すことはできなかった。

(3) 胞子嚢開裂の分子メカニズムの解明

胞子嚢開裂時のトランスクリプトームを経時的に解析し胞子嚢開裂に重要だと考えられる因子を見出すとともに、胞子嚢特異的に発現しているプロテアーゼについて遺伝子破壊によりその機能解析を進めたが、一遺伝子の破壊では開裂異常には至らなかった。トランスクリプトーム解析としては、さらに胞子嚢開裂時の dRNAseq 解析を行い、胞子嚢開裂時に発現する遺伝子のプロモーター配列を明らかにした。これらの遺伝子の多くは、胞子嚢形成時と同様、シグマ因子 FliA によって認識されるプロモーター配列を有することが判明し、FliA と胞子嚢開裂の関連、さらには、胞子嚢形成期および胞子嚢開裂期の遺伝子発現の関連が示唆された。

一方、胞子嚢内の胞子は、開裂により胞子嚢から放出された胞子より耐熱性が高いことを利用し、胞子嚢開裂に異常がある変異株を取得する系を開発し、そのような変異株を複数取得することに成功した。これらの変異株のゲノムリシーケンスを行い、変異遺伝子に対して、胞子嚢開裂異常の原因遺伝子であるかどうかを遺伝子相補実験により検討していったところ、胞子嚢の開裂に重要な新規遺伝子を 1 つ同定することに成功した。

(4) 運動性胞子の運動性・走化性および運動停止の分子メカニズムの解明

①運動の解析

トラッキング顕微鏡を用いて運動の詳細な解析を行った。一方、テザーリング細胞観察系を立ちあげ、プレリミナリーなデータを取得したが、十分な精度での解析には至らなかった(研究期間終了後、光ピンセットを用いた系により、本課題に再挑戦している)。

②べん毛の回転停止に必要なタンパク質 FtgA

キャピラリーを用いた走化性アッセイ系は定量性に問題があったため、マイクロチャンバーを利用した走化性アッセイ系を新たに構築した。この系を用いて、以前同定していた胞子べん毛の回転停止に必要なタンパク質 FtgA が、走化性の発揮にも必要であることを示した。また、FtgA がべん

毛基部の構成因子と相互作用することを示唆する結果を得た。

③べん毛繊維のアセンブリーに必要なチオレドキシリン TrxA

べん毛繊維のアセンブリーに必要なタンパク質として同定していたチオレドキシリン TrxA が FliW と相互作用することを示唆する結果を得た。FliW と FliC の相互作用も確認され、TrxA は FliW-FliC 複合体形成を阻害することで、FliC の細胞表層への分泌・べん毛繊維のアセンブリーを促進すると考えられた。一方、TrxA のべん毛合成に関する機能には、チオレドキシリン活性は必要ではなく、C 末側領域に存在する 5 アミノ酸からなる保存配列が重要であることが示された。この配列は *Actinoplanes* 属では保存されているが、*Streptomyces* 属のホモログでは保存されておらず、今後、TrxA の機能を考えるうえで重要な手がかりとなると思われる。

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 3 件、すべて査読あり)

- (1) Yoshihiro Mouri, Kenji Konishi, Azusa Fujita, Takeaki Tezuka, Yasuo Ohnishi. “Regulation of sporangium formation by BldD in the rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis*” *J. Bacteriol.*, 199 in press (2017) doi: 10.1128/JB.00840-16
- (2) Moon-Sun Jang, Yoshihiro Mouri, Kaoru Uchida, Shin-Ichi Aizawa, Masayuki Hayakawa, Nobuyuki Fujita, Takeaki Tezuka and Yasuo Ohnishi. “Genetic and transcriptional analyses of the flagellar gene cluster in *Actinoplanes missouriensis*” *J. Bacteriol.*, 198, 2219-2227. (2016) doi: 10.1128/JB.00306-16
- (3) Moon-Sun Jang, Azusa Fujita, Satomi Ikawa, Keitaro Hanawa, Hideki Yamamura, Tomohiko Tamura, Masayuki Hayakawa, Takeaki Tezuka, Yasuo Ohnishi. “Isolation of a novel plasmid from *Couchioplanes caeruleus* and construction of two plasmid vectors for gene expression in *Actinoplanes missouriensis*” *Plasmid*, 77, 32-38. (2015) doi: 10.1016/j.plasmid.2014.12.001

[学会発表] (計 23 件、以下に記載の 3 件はすべて招待講演)

- (1) Yasuo Ohnishi. “Involvement of the sole SsgA-like protein (SsgB-Am) in the sporangium formation in *Actinoplanes missouriensis*” 13th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, 18th Oct 2016, Wuhan (China)
- (2) 大西康夫 “希少放線菌の「休眠と覚醒」

に関する遺伝子発現制御” 日本農芸化学会 2015 年度大会シンポジウム 2015 年 3 月 29 日 岡山大学 (岡山県・岡山市)

- (3) Yasuo Ohnishi. “Morphological development of the rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis*” 17th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, 9th Oct 2014, Kusadasi-Aydin (Turkey)

[その他]

研究室ホームページ

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/hakko/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大西 康夫 (Yasuo Ohnishi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：90292789

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

手塚 武揚 (Takeaki Tezuka)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号：80646414