

平成 29 年 4 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440006

研究課題名(和文)大腸菌とサルモネラの鞭毛レギュロンにおけるグローバル制御の全体像の解明

研究課題名(英文) Genome-wide screening of the non-flagellar genes involved in regulation of the flagellar biosynthesis and function in Escherichia coli and Salmonella

研究代表者

沓掛 和弘 (KUTSUKAKE, Kazuhiro)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：90143362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、鞭毛レギュロンのグローバル制御の全体像を解明することを目的として行われた。大腸菌のほぼ全遺伝子を対象にし、高発現したときに鞭毛の合成や機能に顕著な影響を与える非鞭毛遺伝子を網羅的に検索した。その結果、鞭毛遺伝子発現に影響を及ぼす遺伝子がゲノムの約10%にものぼることが判明した。その大部分はクラス1鞭毛オペロンの転写制御を介して作用しており、新規に同定された6遺伝子はクラス2鞭毛オペロンに特異的に作用してその発現を阻害することが示された。一方、鞭毛遺伝子の発現には影響を与えずに鞭毛機能を阻害する遺伝子も多数存在することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study was carried out to identify all the E. coli non-flagellar genes which are potentially involved in regulation of flagellar biosynthesis and function. It was found that nearly 10% of the genes have negative or positive effects on flagellar gene expression. Most of them were shown to regulate the expression of the flagellar genes via transcriptional control of the class 1 flagellar operon. Newly identified six genes were shown to encode negative regulators specific for transcription of the class 2 flagellar operons. Interestingly, some genes were found to exert negative effects on flagellar function without significant effects on flagellar gene expression.

研究分野：生物学

キーワード：分子遺伝学 遺伝子発現 鞭毛レギュロン グローバル制御 制御ネットワーク 鞭毛回転 網羅的検索

1. 研究開始当初の背景

(1) 細菌鞭毛の構造と機能

細菌の運動器官である鞭毛は、20種類以上の蛋白質が多数重合してできた高次構造体であり、細胞表層膜中に存在する基体、菌体外に長くのびだした繊維、および両者をつなぐフックの3つの部分構造からなる(文献)。基体は回転モーターとして機能し、その回転はフックを通して繊維に伝達され、繊維のスクリュウ運動により菌体を推進させる。

(2) 鞭毛レギュロン

鞭毛レギュロンは50個以上の遺伝子を含む比較的大きな遺伝子発現制御ネットワークであり、その遺伝子産物は鞭毛の形成と機能を制御している。研究代表者は、これまでサルモネラと大腸菌の鞭毛レギュロンの構造と制御機構について詳細な解析を行ってきており、鞭毛レギュロンの内部構造の全体像をほぼ解明したと考えてよい段階に至った(文献)。鞭毛レギュロンの制御系を要約すると以下のようなものである。すなわち、鞭毛レギュロンは3段階(クラス1, 2, 3)の転写カスケードからなり、各クラスはそれぞれ異なる転写制御を受けるプロモーターから発現される。クラス1は2つの遺伝子(*flhD*, *flhC*)からなる1つのオペロンのみからなり、この転写カスケードの頂点にあることから、マスターオペロンとよばれている。その産物は $FlhD_4C_2$ 複合体を作り、クラス2オペロンのアクティベーターとして機能する。クラス2には約30個の遺伝子を含む8つのオペロンが属しており、主に鞭毛基部構造(基体・フック構造)の形成に関わる遺伝子群が含まれている。クラス2にはクラス3の転写に必要なシグマ28因子の遺伝子(*fliA*)も含まれている。クラス3には、鞭毛形成の最終段階である繊維形成に関わる遺伝子群と、完成した鞭毛の機能制御に関わ

る遺伝子群が含まれている。

転写カスケードの正の制御因子 $FlhD_4C_2$ および *FliA* には、それぞれに対してその活性を負に制御する因子 *FliT* および *FlgM* が同定されており、前者は *anti-FlhD_4C_2* 因子、後者は *anti-シグマ28* 因子として機能している。これらもともに鞭毛レギュロン内の遺伝子の産物であるが、両者の遺伝子ともクラス2型とクラス3型の2つのプロモーターから発現している。鞭毛レギュロンの重要な特徴は、その発現の階層性が鞭毛形態形成過程と密接に共役した制御を受けている点にある。この共役は、鞭毛基部構造の完成時に、*FliA-FlgM* 制御系によりクラス3遺伝子群の発現をONにすると同時に、 $FlhD_4C_2-FliT$ 制御系によりクラス2遺伝子群の発現をOFFにすることにより調節されている。このような調節機構により、多大なエネルギーを消費する鞭毛について、その形成量と形成過程の時間的・空間的制御が行われ、必要なときに必要な数だけ鞭毛が形成されるよう調節されている。

(3) 細胞調節系との相互作用

以上のように、鞭毛レギュロンの内部構造と制御機構はほぼ解明されたが、その一方で、鞭毛レギュロン外の遺伝子(非鞭毛遺伝子)が鞭毛レギュロンの発現や菌体の運動能に影響を与えるとする報告が古くから多数存在し、鞭毛レギュロンと他の細胞調節系の相互作用を示唆する情報が蓄積してきている(文献)。現在までに、80個以上のそのような作用をもつ遺伝子が報告されている。そのなかでサルモネラの *ydiV* 遺伝子の産物は、低栄養条件下で高発現し、 $FlhD_4C_2$ 因子に結合してその機能を阻害する *anti-FlhD_4C_2* 因子であり、クラス2遺伝子群を負に制御している。同様に、非鞭毛遺伝子の産物である *Crp*, *CipXP*, *DnaK* などによる鞭毛レギュロンの制御機構が分子レベルで解明されてきている。

しかし、多くの場合は、様々な細胞調節系の個々の研究の途上で偶然に見つけた現象やトランスクリプトーム解析のデータとして報告されているのみであり、その制御機構が解明されている例はほとんどない。

一方、Inoue ら（文献 ）は大腸菌の変異体コレクション (Keio collection) を用い、Swarm 形成能に関わる遺伝子を網羅的に検索している。Swarm は細菌が固体培地表面を広がって作る集落形態であり、その形成には非常に多くの因子が関わっている。鞭毛もその因子の1つなので、この研究によって同定された遺伝子の中には鞭毛の形成や機能に影響を与えることを介して作用しているものも多数存在していると推定されるが、各遺伝子の機能についてはまったく解析されていない。また、この研究の解析法では正の制御機能をもつ遺伝子しか検索できないため、負の制御機能をもつ遺伝子はまったく同定されていない。

2. 研究の目的

(1) 調節遺伝子の網羅的検索

上で述べたように、鞭毛遺伝子の発現、または、鞭毛形成や機能に影響を与える非鞭毛遺伝子が多数存在することは予想されていたが、その系統だった検索は行われておらず、全体像は未解明であった。そこで本研究では、主に大腸菌のほぼすべての遺伝子を対象とし、高発現させたときに鞭毛の合成や機能に影響を与える非鞭毛遺伝子を網羅的に検索することにした。特に、これまでの研究では主に正の制御機能を示す遺伝子が注目されてきたのに対して、本研究では負の制御機能を示す遺伝子についても検索を行った。

(2) 制御機構の解析

鞭毛レギュロンの内部構造がほぼ完全に解明されていることの強みを生かし、鞭毛遺伝子の発現に影響を与えることが示された

ものについては、そのターゲット（鞭毛レギュロンのどのクラスに作用するのかなど）を特定することにより、その制御機構を解明するための予備的解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 網羅的スクリーニング

当初、本研究では大腸菌とサルモネラの両方を対象として解析することとして計画していたが、既に大腸菌ではほぼ全遺伝子について IPTG で発現誘導が可能なクローン (ASKA クローン) が確立されて広く利用可能になっている（文献 ）ことを考慮し、本研究ではこれを活用し、大腸菌野生株で各遺伝子を高発現させた場合の効果を解析することにした。検出系としては、鞭毛遺伝子の転写量を指標とする方法と、運動性を指標とする方法の2つをとった。

転写量を指標としたスクリーニング

鞭毛レギュロンの最下流であるクラス3に属する *fliC* 遺伝子（繊維構成蛋白質フラジェリンの構造遺伝子）と *lacZ* 遺伝子との転写融合大腸菌株を宿主として用い、ASKA クローンによる形質転換体を作成した。これらについて、IPTG 添加および非添加の X-gal 寒天平板上でのカラーセレクションを行い、LacZ 発現が上昇するもの、および、低下するものを選択した。

運動性を指標としたスクリーニング

大腸菌野生株について ASKA クローンによる形質転換体を作成し、IPTG 添加および非添加の軟寒天平板上で運動性 (Swim 能) を検定した。このスクリーニングでは運動能を阻害する遺伝子のみを選択した。

(2) ターゲットクラスの解析

転写量を指標としたスクリーニングで同定されたクローンについて、*fliC-lacZ* 融合株および *fliA-lacZ* 融合株に形質転換により移入し、上と同様にして LacZ 発現への影響

を解析した。影響が、両者でともに見られないものはクラス3，前者では見られないが後者で見られるものはクラス2，両者でともに見られるものはクラス1が，それぞれの遺伝子産物のターゲットであると判断した。

(3) 遺伝子欠失体の解析

スクリーニングにより同定された遺伝子のうち特に注目されるものについて，その欠失体を Keio collection (文献) より取得し，その鞭毛遺伝子発現や運動性への影響を上と同様の方法で解析した。

4. 研究成果

(1) 主な成果

転写検定で同定された遺伝子

ASKA クローンの組換え体プラスミド (4123 個) のすべてについて，個々にその DNA の精製を行った。それらを大腸菌 *fliC-lacZ* 転写融合株に形質転換によって移入し，個々のクローンの形質転換体を複数個ずつ単離した。それらについて，IPTG 添加および非添加の X-gal 寒天平板上で培養して青色の発色度をデジタルカメラで記録し，正および負の制御因子の候補を選択した。その結果，高発現時に *fliC* 遺伝子の転写に影響を与える遺伝子として 390 個 (一部の鞭毛遺伝子を含む) を同定した。これは解析した全遺伝子の約 1 割にのぼる。このうち，170 個が正の，220 個が負の制御因子であった。これらのうち鞭毛遺伝子を除く多くは，これまで鞭毛形成や機能との関係が報告されたことのないものであり，新規調節因子である可能性が高い。

ターゲットクラス

上で制御因子の候補遺伝子として同定されたものについて，クラス1 (*fliC-lacZ*)，クラス2 (*fliA-lacZ*)，および，クラス3 (*fliC-lacZ*) の発現への影響を解析することにより，それが作用する鞭毛レギュロン内の遺伝子クラスの同定を行った。その結果，

それらの大部分 (375 個) はクラス1を介して作用していることが判明した。これらのうち，165 個が正の，210 個が負の制御因子であった。クラス1はストレス応答系の作用点となっていることから，これらの因子の大部分は蛋白質の高発現による非特異的なストレス応答を介しているものと推定される。

残りの遺伝子のうち8個 (既知の鞭毛遺伝子 *fliT* と既知の非鞭毛遺伝子 *ydiV*，および新規の非鞭毛遺伝子 *htgA*，*metA*，*ttdB*，*yfdL*，*yjeK*，*yraR*) はクラス2に特異的に作用する負の制御因子であることが示された。一方，クラス3に特異的に作用するのは，既知の負の制御因子である鞭毛遺伝子 *flgM* のみであることが明らかになった。

なお，残りの非鞭毛遺伝子 (*essQ*，*rsxG*，*treC*，*ydjX*，*yedA*，*yhfT*) については，新規の制御因子である可能性が残っているものの，増殖への影響や LacZ 活性への二次的な影響が無視できないことなどから，これ以上の解析は行わないことにした。

遺伝子欠損の影響

クラス2に特異的に負の作用をすることが明らかになった非鞭毛遺伝子のうち，その欠損が増殖に影響を与える1つを除いた5遺伝子 (*htgA*，*metA*，*ttdB*，*yfdL*，*yraR*) について，Keio collection から欠失体を取得し，それらの *fliC-lacZ* 発現への影響を解析した。その結果，顕著な影響は検出されなかった。このことから，これらは高発現時にのみ鞭毛遺伝子発現に影響を与える遺伝子であると推定される。ただし，いずれの遺伝子の欠失体でも運動性の上昇が見られることから，通常の細胞でも条件によってはこれらの遺伝子の産物が制御因子として機能する可能性があると考えられる。

運動性検定で同定された遺伝子

ASKA クローンの組換え体プラスミドのすべてについて，形質転換により大腸菌野生株に移入し，IPTG 添加および非添加の軟寒天平

板上で培養して遊走性集落の大きさをデジタルカメラで記録した。その解析の結果、約 150 個のクローンで遊走性集落の形成が著しく阻害されることが判明した。

運動性への阻害効果を示した遺伝子のうち最も顕著なものは、クラス 2 鞭毛遺伝子の負の発現制御因子である *ydiV* であり、他はそれより低い阻害効果を示した。不思議なことに、クラス 1 鞭毛遺伝子の負の制御因子として同定されたものの多くは、運動性への阻害効果を示さないことが判明した。その一方で、鞭毛遺伝子発現には顕著な影響を示さないもののなかに、運動性を著しく阻害するものが 70 個以上存在することが明らかになった。予想通り、このなかには、鞭毛回転の負の制御因子として知られている c-di-GMP 合成酵素の遺伝子群や c-di-GMP 受容体遺伝子 (*cdgR*) など含まれている。それ以外は、非常に多様な遺伝子が含まれており、特定の細胞機能に関わるものに集中する傾向は見られなかった。

(2) 研究の位置づけとインパクト

本研究により、大腸菌のほぼ全遺伝子について、鞭毛遺伝子発現への影響と運動性阻害効果の検定が終了し、リスト化が完了した。これは、鞭毛形成と機能のグローバル制御ネットワークの研究史上、重要な一里塚となるものであり、次に行うべき研究の指針を示すものとして、その波及効果は絶大なものとなるであろう。

また、本研究により、鞭毛遺伝子発現には影響を与えることなく鞭毛機能を阻害する遺伝子が多数同定されたことは、特筆に値する。これまでこのタイプの因子として知られていたのは c-di-GMP 関連の遺伝子のみであることから、この新発見のインパクトは大きい。

(3) 今後の展望

本研究により、クラス 1 の転写をターゲットとする非鞭毛遺伝子が非常に多いことが確認された。これらはストレス応答を介して作用している可能性が高いので、そのキーとなる因子を同定すれば、このタイプの遺伝子の産物の作用経路を一挙に解明することができるかと期待される。

本研究により、クラス 2 の転写に特異的に作用する非鞭毛遺伝子が新規に 6 個同定された。これらについては、それぞれの遺伝子産物の作用機構を遺伝学および生化学的手法により、個別に解析していく必要がある。特に、クラス 2 遺伝子の既知の制御因子との相互作用を解析することが重要である。

本研究により、鞭毛機能を特異的に阻害する遺伝子が多数同定された。これらの遺伝子の産物は、細胞の生理活性と鞭毛回転をシヨートタームに共役させる因子として機能しているものと考えられ、鞭毛回転のいわゆる分子ブレーキや分子クラッチとして作用している可能性が高いと考えられる。今後は、テザートセル法等により、ブレーキとして機能するものとクラッチとして機能するものを区別する必要がある。ブレーキの場合は鞭毛回転が固定されるであろうし、クラッチの場合は鞭毛回転がランダムとなると予想される。さらにこれらの遺伝子の産物について、既知の鞭毛モーター蛋白質との相互作用を遺伝学および生化学的手法により個別に解析していくことが重要である。

その一方で、転写量を指標としたスクリーニングで同定された遺伝子のなかに、運動性には顕著な影響が見られないものが多数存在することが判明した。運動性に対して鞭毛遺伝子発現の方が上位にあることから、これはある意味で大変矛盾した結果であり、現時点では論理的説明が不能である。本研究で採用した方法の限界を示しており、今後は実験の閾値等を検討する必要があるだろう。

<引用文献>

Kutsukake K, Nambu T, Recent Research Developments in Microbiology 4(2): 607-615 (2000)

Kutsukake K, Wada T, In *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*: the Frontiers of Molecular Microbiology, Revisited 2012: 219-236 (2012)

Inoue T et al, Journal of Bacteriology 189(3): 950-957 (2007)

Kitagawa M et al, DNA Research 12(5): 291-299 (2005)

Baba T et al, Molecular Systems Biology 2: 2006.0008 (2006)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Hatamoto Y & Kutsukake K, Expression control of the flagellar regulon by SdiA in *Escherichia coli*, Genes & Genetic Systems 89: 330 (3B-06), 2014. (査読無)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/ggs/89/6/89_304/_pdf

〔学会発表〕(計2件)

宮川 暁, 沓掛和弘, 鞭毛レギュロンを制御するグローバルネットワーク, 第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月1日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

幡基友紀, 沓掛和弘, 大腸菌鞭毛レギュロンの SdiA 蛋白質による発現制御, 日本遺伝学会第 86 回大会, 2014 年 9 月 19 日, 長浜バイオ大学(滋賀県長浜市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

沓掛 和弘 (KUTSUKAKE, Kazuhiro)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号: 90143362

(2)研究協力者

宮川 暁 (MIYAGAWA, Akira)

岡山大学・大学院自然科学研究科・大学院生