

令和元年5月22日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07350

研究課題名(和文) グラム陽性細菌の定常期の生理状態を制御する分子機構の細胞死誘発物質を用いた解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms controlling physiologic states at stationary phase in Gram-positive bacteria using cell lysis-inducing agents.

研究代表者

朝井 計 (ASAI, KEI)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：70283934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細菌細胞の生活環において、定常期は、対数増殖停止後の、細胞活動を停止した状態と考えられていた。枯草菌の転写開始因子の一つシグマ1タンパク質を破壊すると、増殖に影響しないが、定常期に細胞死を誘発したことから、定常期においても、転写による遺伝子発現を伴う、積極的な細胞維持の機構があることが判明した。

また、植物親油性香気成分中の、ある種のセスキテルペン化合物が、大腸菌には効果が弱いですが、対数増殖期だけでなく定常期においても強く枯草菌細胞を溶菌させる顕著な活性を有することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで細菌細胞では対数増殖に着目した研究が主であったので、定常期の生理状態、増殖、さらにグラム陽性細菌について研究した本課題は、学術的にも意義あるものである。

細菌細胞を用いた物質生産は産業界で徴用されているが、活発に代謝している細胞の増殖に応じて、目的産物を発現させる方法が主である。定常期の代謝状態を利用して物質生産することができれば、増殖に費やすエネルギーを物質生産のみに効率よく転化することが可能である。多くの抗生物質は増殖阻害を標的としているが、定常期の状態で病原性を発揮する細菌もあるので、定常期細胞に特徴的な機構を標的とした抗生物質の開発にも本研究は有効である。

研究成果の概要(英文)：It has been thought that growth and metabolism of bacterial cells are paused at stationary phase after growing at logarithmic phase. Inactivation of one of the transcriptional factor, which regulates the initiation of transcription, SigI, caused cell lysis at stationary phase in *Bacillus subtilis*, while it did not affect logarithmic growth. It was revealed that defined molecular mechanisms including transcriptional gene expression are involved in maintenance of bacterial cells at stationary phase.

It was found that a sesquiterpene in plant-derived lipophilic and aromatic compounds possesses the activity, which induces the lysis of *Bacillus subtilis* cells even at stationary phase as well as at logarithmic phase.

研究分野：ゲノム遺伝学

キーワード：細胞死 定常期 転写開始制御 自己溶菌 細胞膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 極限環境や腸内等生物の体内も含み土壌や海水中など、地球上の細菌の多くは、活発な対数増殖を行えない栄養の少ない環境で、いわゆる「定常期」の細胞の状態にある。定常期とは、対数増殖により栄養源が消耗し、また増殖阻害代謝物が蓄積した結果、集団中に増殖する細胞と死滅する細胞が存在し、従って見かけ上増殖が停止した時期と考えられている。これまでの細菌の解析は実験室で活発に対数増殖を行っている細胞について得られた知見が主で、定常期の細胞の増殖や死滅に関する分子生物学的解析はあまり行われていない。

(2) 細菌のシグマ因子はプロモーターを認識して転写の特異性を担う、RNA 合成酵素の重要なサブユニットである。細菌は複数のシグマ因子を、生育環境に応じて使い分けている。グラム陰性細菌大腸菌の研究で、RpoS シグマ因子は定常期の生存に必須であり、RpoE シグマ因子は定常期の細胞死を制御している。これらの解析はグラム陽性細菌ではほぼ行われていない。

(3) グラム陽性細菌のモデル生物である枯草菌のシグマ I シグマ因子は、最初熱ショック応答に関与するシグマ因子として報告された。研究代表者の解析で、シグマ I の破壊株を、長期に培養すると、定常期において、著しい濁度の低下に呼応して生菌数の減少がみられた。シグマ I が大腸菌の RpoS や RpoE のように細胞の定常期の生存に関与する可能性が示唆された。

(4) 植物の親油性の抽出物には香气成分が含まれ、アロマオイルとして広く利用されている。その多くはテルペン化合物で親油性であることから、増殖中の細胞の細胞膜に作用し抗菌活性を示すと考えられていた。一方、研究代表者は大腸菌にはなく枯草菌に対して、ある植物親油性成分が定常期の細胞の溶菌(細胞死)を誘発することを見出した。

2. 研究の目的

(1) 環境中の細菌の生理状態を理解するためには定常期の細胞の解析が重要である。細菌の定常期の、対数増殖とは異なる細胞増殖と細胞死に関して、大腸菌等のグラム陰性菌を中心に分子機構がわかってきている。研究代表者はグラム陽性菌枯草菌で、シグマ I シグマ因子の破壊株が定常期増殖を維持できず細胞死することから、グラム陽性菌にも増殖と細胞死を制御する大腸菌と異なる分子機構が存在することを新たに見出した。そこで本研究では、細菌界全体の定常期の生理状態の全体像を明らかにするために、グラム陰性細菌と両翼をなす、グラム陽性細菌の定常期の生理状態を制御する分子機構の解明を目的とした。

(2) 一般的に広く使用されている抗生物質は細胞増殖機構を標的としているため、増殖の停滞している定常期の細胞には有効ではない。一方、植物親油性香气成分が増殖中の枯草菌細胞だけでなく、定常期の枯草菌細胞特異的に細胞死を誘発することを研究代表者は見出した。このことは、増殖中とは異なる定常期特有の細胞活動にこの成分が作用していることを示唆している。そこで、枯草菌の定常期の細胞死誘発機構を知る手がかりとして植物親油性成分の溶菌誘発の分子機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 定常期にシグマ I シグマ因子によって転写が制御される遺伝子(レギュロン)をゲノム生物学の手法、いわゆるオミクス解析により網羅的に解明する。シグマ I 破壊株を用いたマイクロアレイ解析によりシグマ I レギュロン候補遺伝子を抽出する。抽出された遺伝子について、ノーザンブロット解析や qRT-PCR 解析により転写産物を直接検出したり、プロモーターの活性を ガラクトシダーゼ等のレポーターにより測定したりすることで、直接シグマ I が転写に関わる遺伝子を絞り込む。選別された遺伝子の機能について、未知の場合はその機能を解析し、シグマ I レギュロンがどのような細胞機能に関与するのか解析することにより、シグマ I による定常期の細胞の維持機構の解明を行う。

(2) 選別された遺伝子の転写開始点を 5' -RACE 法やプライマー伸長法により決定し、プロモーター領域に共通の塩基配列を見出す。共通配列がシグマ I によるプロモーターの認識能に関与しているかを、共通配列に点変異を導入し、プロモーター活性の変化を観察することで、解析する。

(3) 植物由来親油性香气成分を添加した際の、枯草菌細胞への影響を顕微鏡下で観察する。親油性から考えて、細胞膜への影響が考えられる。細胞膜の傷害の有無を見分けるための蛍光プローブが市販され、細胞の生死判定に用いられているので、これらを用いて観察する。

(4) 植物由来親油性香气成分を添加しても、溶菌しないような、あるいは溶菌が緩和されるような、サプレッサー変異株の取得を試みる。取得が困難な場合は、まず香气成分に感受性と

なる株をスクリーニングし、そこからの取得を試みる。サプレッサー変異株の染色体 DNA の全ゲノム配列を次世代シーケンサーにより再決定し、参照株と比較して、塩基変異の部位を同定する。溶菌誘発現象とサプレッサー原因遺伝子の機能の関係を解析し、定常期において細胞死誘発のおこる分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) シグマ I レギュロンとして、いくつかの遺伝子を同定した。興味深いことにそれらは大きく 2 つのタイプに機能分類できた。1 つは細胞表面、特に細胞壁の恒常性を制御する酵素群であった。もう一つは DNA のダメージを修復、合成に参与するタンパク質であった。前者は細胞外からの環境ストレスに常にさらされている細胞表面の維持が、特に定常期に重要であることを示唆している。後者は種の維持に最も重要な遺伝情報を、活発な DNA 複製のおこらない定常期に、安定に保存するためのシステムであると考えられる (図 1)。

これまで細菌細胞では対数増殖に着目した研究が主であったので、定常期の生理状態、増殖、さらにグラム陽性細菌について研究した本課題は、学術的にも意義あるものである。細菌細胞を用いた物質生産は産業界で徴用されているが、活発に代謝している対数増殖期に、細胞の増殖に伴って、目的産物を発現させる方法が主である。本研究課題の成果として、定常期にも一定の代謝が維持されていることが判明し、このような代謝状態を利用して物質生産につなげることができれば、増殖に費やすエネルギーを物質生産のみに転化して効率よく利用することが可能となる。

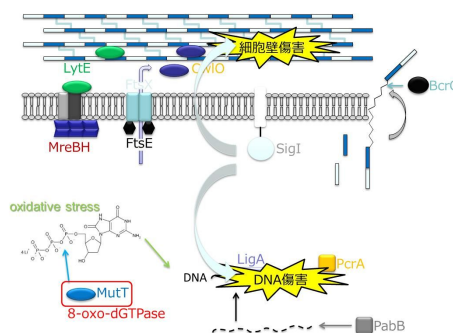


図1 SigI レギュロンによる定常期の細胞維持機構

(2) シグマ I が認識し、転写開始に関わる DNA の配列を調べた結果、これまでに知られている、シグマ因子の認識配列と異なる特徴が見出された。一般的に転写開始点の上流 10 塩基と 35 塩基付近に共通した配列が見られるが、シグマ I の場合、35 塩基よりさらに 5 塩基ほど上流に、転写誘導に直接関わる配列が存在した。

(3) 植物親油性香気成分中の、ある種のセスキテルペン化合物が、大腸菌には効果が弱いですが、対数増殖期だけでなく定常期においても強く枯草菌細胞を溶菌させる顕著な活性を有することを見出した。細胞膜のダメージによる膜透過性の変化により細胞内を蛍光染色する試薬を用いた、細胞の生死判定により、本成分による細胞膜ダメージが細胞死の引き金になっていることが判明した。

(4) 細胞膜に加え、細胞壁のダメージに回答するための遺伝子発現機構の欠損により、植物親油性香気成分の抗細菌作用が増大した。細胞膜へのダメージが細胞壁の代謝に影響し、溶菌を促していることが示唆される。一方、この感受性株から本成分に対して、部分的に耐性となる変異を取得した。得られた変異は、DNA の修復酵素の一種に見られた。定常期における細胞の品質管理の指標として、細胞表面と DNA の状態をモニターしていることが考えられる。定常期において、ある程度のダメージが細胞表面や遺伝情報に蓄積した細胞は、修復をあきらめ溶菌させることで、良質な細胞のみを保存するシステムと考えられる。

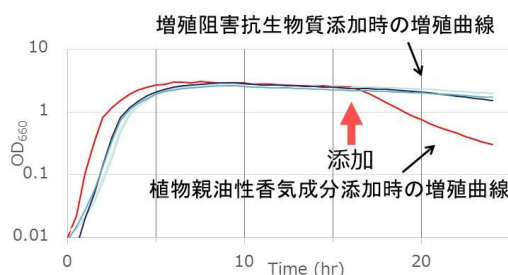


図2 植物親油性香気成分の定常期細胞への作用

多くの抗生物質は増殖阻害を標的としているため、活発な増殖をしていない定常期の細胞には効果が低い(図 2)。定常期の状態で病原性を発揮する細菌も少なからず存在するので、定常期細胞に特徴的な機構を標的とした抗生物質の開発にも本研究成果は有効である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Asai K., Anti-sigma factor-mediated cell surface stress responses in *Bacillus subtilis*, Genes Genet Syst., (査読有) 92(5), 2018, 223-234, doi: 10.1266/ggs.17-00046.

Yokoyama N, Nonaka C, Ohashi Y, Shioda M, Terahata T, Chen W, Sakamoto K, Maruyama C, Saito T, Yuda E, Tanaka N, Fujishiro T, Kuzuyama T, Asai K, Takahashi Y., Distinct roles for U-type proteins in iron-sulfur cluster biosynthesis revealed by genetic analysis of the *Bacillus subtilis* *sufCDSUB* operon., Mol Microbiol. (査読有) 107(6), 2018,

688-703, doi: 10.1111/mmi.13907.

Fujishiro T, Terahata T, Kunichika K, Yokoyama N, Maruyama C, Asai K, Takahashi Y., Zinc-Ligand Swapping Mediated Complex Formation and Sulfur Transfer between SufS and SufU for Iron-Sulfur Cluster Biogenesis in *Bacillus subtilis*, J Am Chem Soc. (査読有) 139(51), 2017, 18464-18467, doi: 10.1021/jacs.7b11307.

Ogura M, Asai K, Glucose Induces ECF Sigma Factor Genes, *sigX* and *sigM*, Independent of Cognate Anti-sigma Factors through Acetylation of CshA in *Bacillus subtilis*, Front Microbiol. (査読有) 7, 2016, 1918, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01918/full>

[学会発表](計 24件)

松岡聡、篠原高人、朝井計、戸澤謙、枯草菌糖脂質合成酵素遺伝子 *ugtP* の発現制御機構の解析、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019

蟹谷美有、大坂夏木、朝井計、枯草菌 *rpoA* の非翻訳領域を介する栄養状態に適応した発現制御機構の解析、第 13 回日本ゲノム微生物学会年会、2019

松岡聡、篠原高人、朝井計、戸澤謙、枯草菌糖脂質合成酵素遺伝子 *ugtP* の転写制御機構の解析、日本遺伝学会第 90 回大会、2018

朝井計、林田莉奈、白川文教、枯草菌 RNA ポリメラーゼ サブユニット遺伝子 *rpoA* の発現制御機構の解析、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018

松岡聡、篠原高人、朝井計、戸澤謙、枯草菌糖脂質合成酵素遺伝子 *ugtP* の発現制御機構の解析、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018

朝井計、枯草菌の RNA ポリメラーゼ サブユニット遺伝子 *rpoA* の上流域の解析、日本遺伝学会第 89 回大会、2017

松岡聡、篠原高人、朝井計、戸澤謙、枯草菌糖脂質合成酵素遺伝子 *ugtP* の発現制御解析、日本遺伝学会第 89 回大会、2017

Kei Asai, Analysis of regulation mechanisms of SigM with its cognate anti-sigma factor, YhdL and YhdK, in *Bacillus subtilis*, The 19th International Conference on Bacilli and Gram-Positive Bacteria, 2017

朝井計、清水葉子、廣澤早香、高田啓、吉川博文、SigI と WaIKR による枯草菌の増殖維持の制御ネットワークの解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017

高松美沙樹、兼崎友、朝井計、吉川博文、枯草菌 RNAP コア酵素の変異による耐熱化と高温適応に対するトレードオフ、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017

松岡聡、竹本愛奈、関貴洋、松本幸次、朝井計、原弘志、枯草菌糖脂質合成酵素遺伝子 *ugtP* の発現制御解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017

朝井計、枯草菌におけるシグマ M とその抗シグマ因子 YhdL と YhdK 間の活性制御機構の遺伝学的解析、日本遺伝学会第 88 回大会、2016

吉田早希、吉川博文、朝井計、枯草菌シグマ因子最少化株の顕著な表現型と原因遺伝子の探索、日本遺伝学会第 88 回大会、2016

清水葉子、吉川博文、朝井計、枯草菌 SigI 破壊による溶菌現象解明と SigI の発現解析、日本遺伝学会第 88 回大会、2016

松岡聡、松本幸次、朝井計、原弘志、枯草菌二成分制御系 WaIKR の制御における糖脂質の役割、日本遺伝学会第 88 回大会、2016

松岡聡、松本幸次、朝井計、原弘志、枯草菌二成分制御系 WaIKR の制御における糖脂質の影響、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016

朝井計、佐俣友理、吉本祥子、枯草菌の抗シグマ因子 YhdL と YhdK によるシグマ M の活性制御機構の解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016

朝井計、枯草菌におけるシグマ M とその抗シグマ因子 YhdL と YhdK 間の活性制御機構の遺伝学的解析、日本遺伝学会第 87 回大会、2015

吉田早希、吉川博文、朝井計、枯草菌シグマ因子最少化株の顕著な表現型と原因遺伝子の探索、日本遺伝学会第 87 回大会、2015

清水葉子、吉川博文、朝井計、枯草菌 SigI 破壊による溶菌現象解明と SigI の発現解析、日本遺伝学会第 87 回大会、2015

①松岡聡、松本幸次、朝井計、原弘志、枯草菌二成分制御系 WaIKR の制御における糖脂質の役割、日本遺伝学会第 87 回大会、2015

②朝井計、吉本祥子、Analysis of regulation mechanisms of SigM with its cognate anti-sigma factor, YhdL and YhdK, in *Bacillus subtilis*, The 14th Asian Conference on Transcription, 2015

③小澤良基、小穴秋弓、長谷川登志夫、朝井計、Analysis of mechanism of stress response induced with the plant essential oils in *Bacillus subtilis*, The 14th Asian Conference on Transcription, 2015

④白川文教、池田宗太郎、朝井計、Analysis of expression mechanism and structure of the operon of *Bacillus subtilis*, The 14th Asian Conference on Transcription, 2015

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

https://www.nodai.ac.jp/academics/life_sci/bio/lab/501/

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。