

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07359

研究課題名(和文) 枯草菌における細胞の繊維状化システムの解明

研究課題名(英文) Study of the filamentation mechanism of *Bacillus subtilis* cells

研究代表者

石川 周 (Ishikawa, Shu)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・准教授

研究者番号：30359872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：LytF/LytE/CwlS 3重欠損株は栄養、グルタミン酸などの使用しやすい窒素源の存在下では著しく繊維状化するが、アンモニアが窒素源の最少培地では解除される。トランスクリプトーム解析から、原因が細胞分化と関連することを突き止め、細胞分化抑制変異の導入とその抑制変異の解析から、増殖に必要な2成分制御系WalRKにより制御されるYocHがその原因の一つであることを見出した。YocH-4重欠損株でも完全な繊維状化は見られない。その抑制変異がWalRKの活性を制御するWallに見られたことから、WalRK制御下の第5の細胞壁溶解酵素が最少培地における繊維状化解除の原因の最後の因子であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The LytF/LytE/CwlS triple mutant forms tremendous filamentous morphology in the presence of easily-metabolized nitrogen sources such as a glutamate, whereas it is canceled in minimum medium if ammonium is sole nitrogen source. Based on transcriptome analysis, we found that this changes were related to the cell differentiation. Introduction of mutations to suppress the cell differentiation and analysis of suppressor mutant of the autolysis phenotype revealed existence of the fourth cell wall hydrolase YocH, which expression is regulated by the essential two component system WalRK. Although the quadruple mutant didn't show complete filamentous phenotype, suppressor mutation of the autolysis phenotype was seen in Wall, a negative regulator for WalRK, suggesting that the last factor to cancel the filamentation phenotype in minimum medium might be the fifth cell wall hydrolase, which expression is regulated by WalRK as well.

研究分野：ゲノム微生物学

キーワード：繊維状化 細胞壁溶解酵素 WalRK YocH LytF LytE CwlS

1. 研究開始当初の背景

(1) 枯草菌の繊維状化のメカニズム：細胞分化の観点から研究されてきた。栄養増殖期には、細胞分裂ごとに細胞が分離して短い運動性を持った細胞（運動細胞）となるが、細胞密度が高くなり、栄養状態が悪くなると、細胞は一時的に繊維状化する（繊維状細胞）（図1）。運動細胞になるか、繊維状細胞になるかの運命は、細胞分裂に伴い形成される隔壁を分解する細胞壁溶解酵素、および、運動性を付与する鞭毛遺伝子の発現に依存する。つまり、運動細胞では、細胞壁溶解酵素と鞭毛遺伝子の両方が発現しているが、繊維状細胞では両方の遺伝子が抑制されている。これらは、異なる2つシステムによる転写制御システムによって説明されている。一つは、隔壁特異的な細胞壁溶解酵素遺伝子 (*lytE*) や鞭毛遺伝子などを転写する RNA ポリメラーゼのシグマ因子、SigD 量の増加（運動細胞化）と低下（繊維状細胞化）である（図1上）。

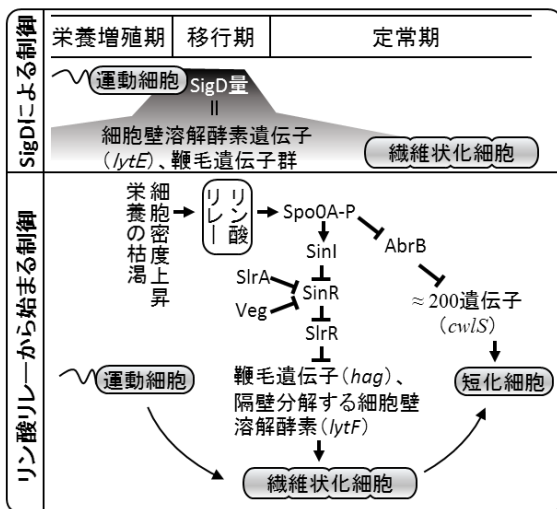


図1 「↓」は活性化、「⊥」を示

もう一つのシステムは、細胞密度および栄養の枯渇により活性化される、リン酸リレーと呼ばれるシグナル伝達系から始まる。その結果、Spo0A がリン酸化され、複数の制御因子を介し、転写抑制因子 SlrR の発現を誘導する。SlrR は隔壁特異的な細胞壁溶解酵素遺伝子 (*lytF*) および鞭毛遺伝子 (*hag*) の転写を抑制し、細胞を繊維状化させる（図1下）。さらに申請者らは、このシステムが制御因子である SlrA と Veg も関わる複雑なものであることを明らかにしてきた。一方、Spo0A-P は、栄養増殖期に 200 以上の遺伝子を抑制しているサイレンサー、AbrB の転写も抑制し、その結果、AbrB の抑制から解放された遺伝子群が誘導されると、細胞壁溶解酵素遺伝子 *cwIS* も誘導され、細胞は再び短くなるということもわかってきた。

(2) 細胞壁溶解酵素遺伝子破壊による繊維状化：申請者らは、1999 年には、LytF、LytE という 2 つの細胞壁溶解酵素が隔壁の分解を特異的に行うこと、その遺伝子欠損株が繊維状化することを世界に先駆けて発見した。現

在では、この 2 つに加え、CwlS も隔壁特異的な細胞壁溶解酵素であること、*lytF/lytE/cwIS* の 3 重欠損だけで繊維状化すると報告されており、追試により肉眼で確認できるほど繊維状化することを確認している（図2）。

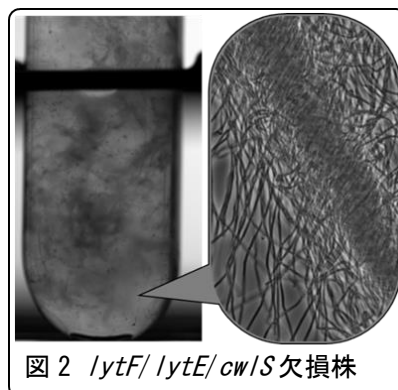


図2 *lytF/lytE/cwIS* 欠損株

しかし申請者らは、この 3 重欠損株はアンモニアを唯一の窒素源とした場合には繊維状化できず、繊維状化にはグルタミン酸などの利用しやすい窒素源が必要であることを発見した。さらに、3 重欠損により繊維状化した細胞も、グルタミン酸の枯渇により、再び短い細胞へと分離することも判明した。これらの結果から、安定した細胞の繊維状化を実現するためには、3 つの隔壁特異的な細胞壁溶解酵素遺伝子の抑制だけでなく、窒素源依存的な転写制御システムも鍵であることが判明した。

(3) 繊維状化と細胞分裂の関係：細胞壁溶解酵素による隔壁の分解は、隔壁以外の細胞壁を分解してしまうと、露出した細胞膜が浸透圧により破裂し致死となるために、高度に特異的である必要がある。申請者は、細胞分裂を阻害したときの細胞を観察した結果、「細胞分裂を阻害すると、本来分解すべき隔壁を失った細胞壁溶解酵素が隔壁以外の細胞壁を分解するため」に細胞分裂が増殖に必須であるという仮説にたどり着いた。逆に、隔壁特異的な細胞壁溶解酵素活性を抑制し、浸透圧による破裂が起こらないが考えられる。枯草菌においては、浸透圧を調整した特殊な条件では細胞分裂装置は増殖に必須ではないことが、研究協力者である川合博士らによる L-フォームの研究から明らかにされている。さらに、繊維状に増殖する放線菌では細胞分裂は増殖には必須ではないという事実からも（文献3）、この仮説の可能性は高く、その検証は学術的にも重要である。

(4) 繊維状細胞の有効性：繊維状化した細胞は、多孔質のマトリックスに固定化し、培地から速やかに分離・繰り返し利用できるため、有用物質の生産・回収・精製を行うバイオプロセスの過程では極めて有効であり、繊維状の形態をとるカビではすでに実証されている（文献4）。枯草菌は、酵素生産、有用物質生産などに用いられる有用微生物でもあるので、安定した繊維状細胞を作ることが

できれば、枯草菌のバイオプロセスにも有効だと考えられる。

2. 研究の目的

未知の窒素源依存的な繊維状化メカニズムを明らかにし、枯草菌細胞の繊維状化システムを解明することを第一の目的とする。それをもとに高度に繊維状化する細胞を創生し、細胞の繊維状化と細胞分裂の必須性の関係性を解明することを第二の目的とする。

3. 研究の方法

枯草菌において、隔壁特異的な細胞壁溶解酵素の3重欠損株は、唯一の窒素源がグルタミン酸の場合は繊維状化するが、アンモニアの場合には繊維状化しない。つまり、唯一の窒素源をアンモニアをとした培養では、3つの細胞壁溶解酵素に加えて、窒素源の違いにより制御される因子が、細胞の繊維状化の鍵となっている。最初に、この因子を制御する転写因子を、トランスクリプトーム解析・遺伝学的解析により特定する。さらに、特定した転写因子の全ゲノム上の結合部位を改良型 ChIP-chip (GeF-seq) 法により決定し、繊維状化に直接関わる遺伝子の候補を抽出する。遺伝学的解析により原因遺伝子を特定し、細胞の繊維状化システムを解明する。この情報をもとに、細胞の繊維状化を自在にコントロールできる細胞を作成し、それを利用して、細胞の繊維状化と細胞分裂の必須性の関係性を詳細に調べる。

4. 研究成果

(1) トランスクリプトーム解析: ジャーファーマンターで培養液の pH を中性にコントロールした条件で、グルタミン酸を含む、あるいは、含まない最少培地において培養し、転写プロファイルをトランスクリプトーム解析により比較した。グルタミン酸を含む培養では細胞分化に関わる遺伝子群 (AbrB レギュロン、Spo0A レギュロン、SigH レギュロン等)、および、おおくの細胞壁溶解酵素の転写に違いが見られた。

(2) 細胞分化抑制変異の導入: *lytF/lytE/cwlS* の3重欠損株に、細胞分化を抑制する変異を導入したところ、最少培地での培養での溶菌が観察された。その抑制変異株は、*lytE*、*yocH* といった細胞壁溶解酵素遺伝子を制御する2成分制御系 WalRK のセンサーに変異が見られ (図3)、WalRK の活性が劇的に上昇していた (図4)。3重欠損株は最少培地において繊維状化の解除に伴い螺旋状の細胞形態を示すが、WalRK 活性の上昇に伴い、細胞形態は野生型に回復していた。*YocH* の過剰生産による効果だと考えられる。

(3) *yocH* 欠損の導入: *lytF/lytE/cwlS* の3重欠損株に、*yocH* 欠損を導入したが、最少培

地において繊維状化は観察されなかった。

一方、この株でも最少培地での培養での溶菌が観察された。その抑制変異株は、WalRK の活性を負に制御する *WalI* に変異がみられた (図3)。この株では最少培地においても部分的な繊維状化が観察された。これらの結果は、WalRK の制御下に *YocH* 以外の第5の細胞壁溶解酵素が最少培地における繊維状化に関与していること、WalRK の活性低下により部分的に繊維状化が可能であることを示唆している。

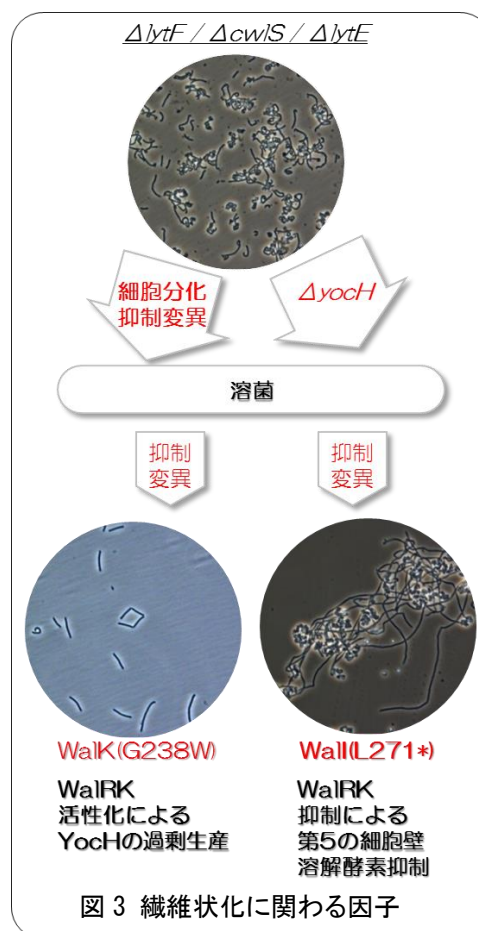


図3 繊維状化に関わる因子

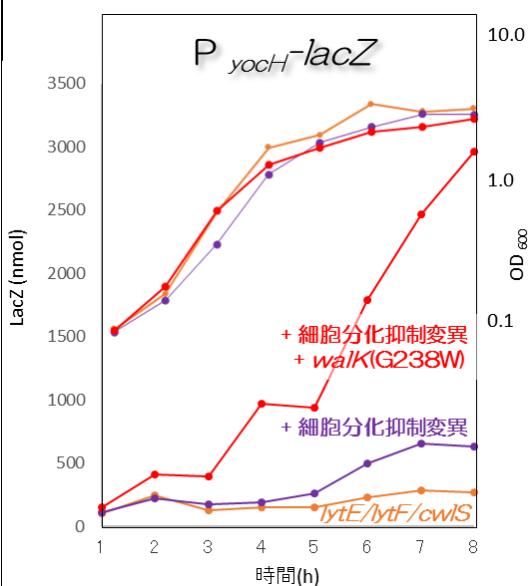


図4 WalRK の転写活性

(4) GeF-seq 解析 : ChIP-chip 解析の解像度を 1-bp レベルまで上げるために GeF-seq を開発したが、DNA 結合蛋白質と共精製された DNA 断片を大きさにより選別するとバイアスがかかるという問題点が発覚した。小さいサイズの DNA 断片のみを選択することにより、超高解像度を実現できたが、逆に、DNA 断片の選別はせずに全て次世代シーケンサーで配列を決定した後、ソフト上で選別することにより、バイアスの無い高解像度の結合領域を決定することに成功した。

(5) 結論と今後の展望: 最少培地では LytF、LytE、CwlS に加えて、YocH が関与することを明らかにした。さらに WalRK 制御下の別の細胞壁溶解酵素が関与することがわかった。ChIP-chip 解析の結果から、WalR の結合は既知の細胞壁溶解酵素遺伝子以外の領域には見られなかった。この結果を考慮すると、第 5 の細胞壁溶解酵素は Cw10 である可能性が高い。Cw10 は LytE、YocH と同様に WalRK により制御される細胞壁溶解酵素である。

枯草菌では、細胞側方の細胞膜上に螺旋状に局在する MreB 複合体に、LytE・Cw10、および、細胞壁合成酵素が局在する。細胞壁の成長は、ペプチドグリカンの架橋を LytE・Cw10 が切断し、新たに合成されたペプチドグリカンが挿入・架橋されることにより細胞壁の成長がすすむために、LytE と Cw10 の欠損株では細胞壁の成長が停止し、細胞壁溶解酵素による自己溶解により細胞が溶けて致死となる。そのために、本研究では Cw10 を含めた 5 重欠損株の検証をすることはできなかった。それゆえ「繊維状化した細胞では細胞分裂をしなくても繊維状に増殖できる可能性」を検証することはできなかった。細胞側方に局在する LytE は、隔壁分解にも関与することが知られているが、Cw10 も最少培地においては隔壁分解を行っている可能性が高い。Cw10 の細胞壁への局在を厳密にし、隔壁を分解しない変異体を得ることができれば、最少培地においても、完全な繊維状化細胞が実現できるかもしれない。

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 2 件)

- ① Chumsakul O, Anantsri DP, Quirke T, Oshima T, Nakamura K, Ishikawa S, Nakano MM. 2017. Genome-Wide Analysis of ResD, NsrR, and Fur Binding in *Bacillus subtilis* during Anaerobic Fermentative Growth by In Vivo Footprinting. J Bacteriol 査読あり、199:e00086-00017.
- ② Murayama S, Ishikawa S, Chumsakul O, Ogasawara N, Oshima T. 2015. The Role of α -CTD in the Genome-Wide Transcriptional Regulation of the

Bacillus subtilis Cells. PLoS One 査読あり 10:e0131588.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 石川周、GeF-seq は DNA 結合蛋白質の結合状態を超解像度に検出する、第 91 回 日本細菌学会、2018. 3. 29、福岡国際会議場 (福岡県)
- ② S. Murayama, S. Ishikawa, O. Chumsakul, N. Ogasawara, T. Oshima, The role of C-terminal domain of RNA polymerase α -subunit in the genome-wide transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* cells, 8th International Conference on Gram-positive Microorganism (18th International Conference on Bacilli), 2015 年 6 月 23 日、モンテカティーニ(イタリア)
- ③ 石川周、細胞内のタンパク質-タンパク質及びタンパク質-DNA 相互作用の高精度解析法の開発、第 6 回合成生物学工学シンポジウム、2016 年 7 月 28 日、神戸大学 (兵庫県)

[図書] (計 1 件)

Onuma Chumsakul, Kensuke Nakamura, Shu Ishikawa, and Taku Oshima、GeF-seq: A Simple Procedure for Base Pair Resolution ChIP-seq, Methods Molecular Biology Vol.1837 Bacterial Chromatin (Methods and Protocols), ISBN 978-1-4939-8674-3

[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://researchmap.jp/shu/>

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-applmic/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 周 (Ishikawa, Shu)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・准教授

研究者番号 : 30359872

(4) 研究協力者

川合 良和 (Yoshikazu, Kawai)

ニューキャッスル大学・主任研究員