

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07374

研究課題名(和文) 枯草菌の緊縮転写制御ネットワークの先導的基盤研究とその活用

研究課題名(英文) Pioneer research of transcription network of stringent control in *Bacillus subtilis* and its application

研究代表者

藤田 泰太郎 (FUJITA, Yasutaro)

東海大学・海洋研究所・客員教授

研究者番号：40115506

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)： 枯草菌の胞子形成のトリガー遺伝子kinB(並びにkinA)は緊縮状態に曝されると転写開始点(+1)のアデニンからの転写が活性化される、すなわち正の緊縮転写制御をつける。kinB転写は制御因子SinRの欠失で脱抑制される。また、SinRはkinBの正の緊縮転写制御にも関与していた。lacZ融合とEMSA解析により、kinBの転写抑制に関わるSinRの結合シス配列(-61/-57)を特定した。また、kinBの正の緊縮転写制御の関わるSinRの結合シス配列(-29/-8)をも明らかにした。さらに、SinRは、kinBのみならずkinA、ilvB、pycAの正の緊縮転写制御にも関与していた。

研究成果の概要(英文)： Transcription initiation of sporulation trigger genes of *Bacillus subtilis* (kinB and kinA) from adenine (+1) is activated upon stringent response, that is, under positive stringent transcription control. kinB transcription is repressed by a regulatory factor SinR for biofilm formation. Moreover, SinR was found to be involved in positive stringent transcription control of kinB. The lacZ-fusion and EMSA analyses revealed a SinR-binding site (-61/-57) for SinR repression of kinB and another SinR-binding site (-29/-8) for positive stringent transcription control of kinB. Furthermore, SinR was involved not only in positive stringent transcription control of kinB but also in that of kinA, ilvB, and pycA.

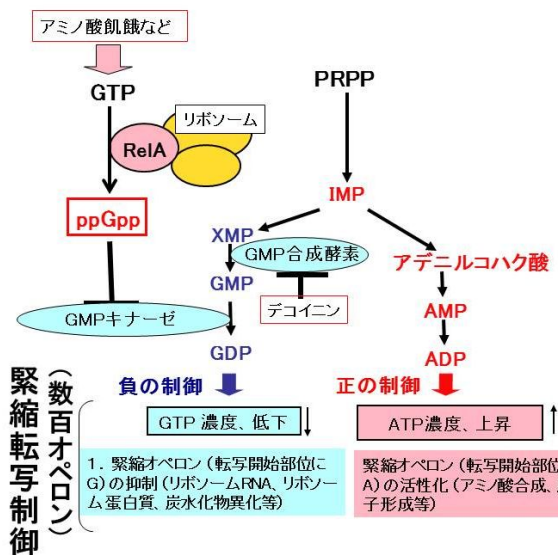
研究分野：農学

キーワード：枯草菌 胞子形成 バイオフィーム 緊縮応答 緊縮転写制御 発現制御 ゲノム プリン代謝制御

1. 研究開始当初の背景

枯草菌には、大腸菌の緊縮転写制御系とは本質的に区別できる緊縮転写制御系が作動している。即ち、枯草菌では、ppGpp が RNA ポリメラーゼと結合することなく、グアニンヌクレオチド合成系の GMP キナーゼを阻害し、生体内のエネルギー状態の指標である GTP の濃度を低下させる。この GTP 濃度の低下により PRPP 合成のフィードバック抑制を解除し AMP 合成を高め、細胞の物質合成能の指標である ATP 濃度を上昇させる。この GTP 濃度の低下および ATP 濃度の上昇が、緊縮遺伝子の転写開始速度に影響し、転写開始部位にグアニンがある負の緊縮制御遺伝子の場合は負に制御され、アデニンがある正の緊縮制御遺伝子の場合には正に制御される (図 1)。この緊縮転写制御のうち、負の制御を受ける緊縮遺伝子群は、リボソーム RNA および蛋白質、炭水化物代謝のキナーゼ遺伝子等で、正の制御を受けるのはアミノ酸合成や孢子形成トリガー遺伝子等で、全体で数 100 種に及ぶと想定される。この緊縮転写制御機構は、生物進化の過程で転写制御因子が現れる前の極めて初期に確立した系である可能性が高く、細菌のみならず広く生物全般に亘って本緊縮制御系が転写制御の基層として現在も作動していると思われる。

枯草菌の緊縮転写制御ネットワーク(図1)



2. 研究の目的

本研究代表者は、孢子形成や代謝制御を含む枯草菌の緊縮転写制御の分子機作の解明に多大な貢献をしてきた。この緊縮転写制御は、転写開始部位のプリン塩基種に依存した転写開始速度の制御を含み、フィルミクテス門細菌の生存環境適応のための包括的制御系と考えられる。本研究は、フィルミクテス門細菌の緊縮転写制御のモデル系として、枯草菌の緊縮転写制御ネットワークの全体像を掴む。また、細胞分化のモデル系と考えられている孢子形成もまた緊縮転写制御の作

動により誘導される。そこで、正の緊縮転写制御下にある孢子形成開始を担うセンサーキナーゼ遺伝子 *kinA* と *kinB* の転写制御の詳細を明らかにする。さらに、この先導的な基礎研究を、アミノ酸の発酵生産の増強、並びにアミラーゼやプロテアーゼなどの有用分泌酵素や抗生物質の生産能向上などの応用研究に展開する。

3. 研究の方法

孢子形成開始に必須で正の緊縮制御を受ける *kinA* と *kinB* 遺伝子の転写制御蛋白質 ($\Delta codY$, $\Delta abrB$, $\Delta spo0A$ など) の結合部位を含む約-300 から+100 (+1 転写開始点) のプロモーター領域を *lacZ* 遺伝子と融合し、野生型、 $\Delta codY$, $\Delta abrB$, $\Delta sigH$ または $\Delta spo0A$ の遺伝的背景で、栄養培地や最小培地を用いた孢子形成の開始前後の *lacZ* の発現を追跡する。これら種々の孢子形成条件での *lacZ* の発現状況を見て、孢子形成の開始には *kinA* と *kinB* の正の転写制御が必須なことを確認する。緊縮転写制御の作動で誘導される *kinA* と *kinB* の発現制御を主として *lacZ* 融合系を用いて枯草菌孢子形成開始機構を分子レベルで解明する。

平成 27 年度の本課題研究により、*kinB* の発現は SinR による転写抑制と SinR の絡む正の緊縮転写制御下にあることが判明した。そこで、*kinB* プロモーター領域の PCR 産物をプローブにし、精製 SinR 蛋白質を用いた EMSA 解析により、転写抑制と正の緊縮転写制御に与る二種類の SinR 結合部位を特定する。

4. 研究成果

(1) 平成 27 年度の研究成果

kinB 遺伝子の転写制御に関わる因子を *kinB* のプロモーターと *lacZ* との融合系を用いて探索したところ、既知の *CodY*, *AbrB* や *Spo0A* の欠損では影響を受けず、SinR の欠失で影響を受けることが分かった。欠失解析により SinR の結合部位を探索すると、*kinB* の転写開始点(+1)の上流域(-65 ~ -55)に存在することが分かり、その部位と-45を中心とする部位に直接反復配列(TAAAGG)があることが分かった。そこで-45GをAに置換したところ SinR での抑制が弱くなった。上流のTAAAGGを含む5塩基欠失と-45AのGへの置換は SinR による転写抑制解除に相加的に働いていた。この孢子形成開始時の SinR による *kinB* の抑制解除は、*kinB* の正の緊縮制御とは独立しているものであるが、孢子形成開始時に SinR が不活性化し *kinB* の転写が上がり、孢子形成を引き起こし易くしていると思われた。

(2) 平成 28 年度の研究成果

昨年度の研究で、*kinB* 遺伝子の転写制御に関わる因子を *kinB* のプロモーターと *lacZ* との融合系を用いて探索したところ、バイオフィルム形成の制御因子である SinR により転

写抑制されていることを明らかにした。また、予期せぬことに SinR が *kinB* の正の緊縮転写制御に関与していることが判明した。

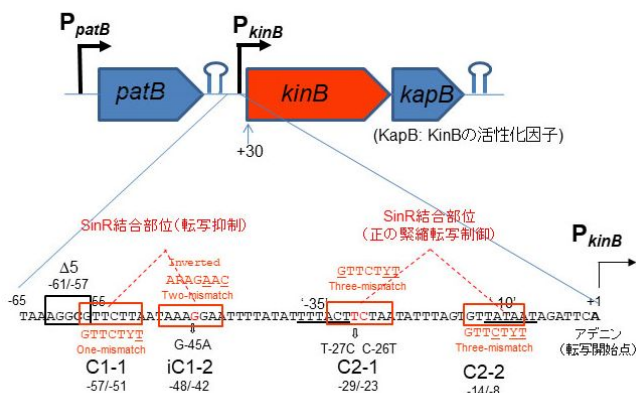
lacZ 融合による欠失・塩基置換解析と精製 SinR を用いた EMSA 解析により、*kinB* のプロモーター上流域 (-64 から -36) に存在する配列タンデムリピートが *kinB* の転写抑制に関わる SinR の結合シス配列であると推定した。さらに、*lacZ* 融合による塩基置換解析と EMSA 解析により、その下流域 (-34 から -8) に *kinB* の正の緊縮転写制御に関わると思われる同様な構成のタンデムリピートを見出した。また、*kinB* の SinR による転写抑制は、SinR のアンタゴニストである SinI の誘導により解除されるが、SinR に依存した *kinB* の正の緊縮転写制御へ SinI の関与は認められなかった。

SinR は、*kinB* のみならず *kinA*、*ilvB*、*pycA* 等の正の緊縮転写制御にも関与していたが、*ptsG*、*pdhA* 等の負の緊縮転写制御には関与していないことが判った。

(3)平成 29 年度の研究成果

昨年度までの研究成果を学術論文としてまとめ、投稿したところ審査員より SinR の結合部位の解析が不十分であるとの指摘を受けた。そこで、*lacZ* 融合による欠失・塩基置換解析及び欠失・塩基置換プローブを用いた EMSA 解析により、*kinB* の転写抑制に関わる SinR の結合シス配列を詳細に解析したところそれは一対の逆転 SinR 結合コンセンサ配列 (-61/-57) から成り立っていることが判明した。また、*kinB* の正の緊縮転写制御の関わる SinR の結合シス配列は、- 対の反復 SinR 結合コンセンサ配列 (-29/-8) から成り立っていた。これらの配列は *kinB* プロモーターの “-35” と “-10” 領域と部分的に重複していた。さらに、EMSA 解析により、*kinB* プロモーター断片、RNA ポリメラーゼおよび SinR は、複合体を形成していることを明らかにした。これらの結果より、枯草菌の孢子形成は対数増殖後期における SinI による SinR の阻害による *kinB* 転写の脱抑制と SinR の関

枯草菌孢子形成トリガー遺伝子 (*kinB*) の SinR による二重制御機構 (図 2)



与する *kinB* の正の緊縮転写制御が共同して効率良い孢子形成を引き起こすと推察された (図 2)。

枯草菌の緊縮転写制御系を応用研究に展開することも当初の研究目的としていた。しかしながら、*kinB* 発現が SinR の制御下にあるという、孢子形成の開始に極めて重要な意義をもつ発見であったので、SinR による *kinB* の発現制御機構の解明に全力を注いだ。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Yasutaro Fujita, Mitsuo Ogura, Satomi Nii, Kazutake Hirooka, Dual Regulation of *Bacillus subtilis kinB* gene encoding a sporulation trigger by SinR through transcription repression and positive stringent transcription control. *Frontiers in Microbiology* 8:2502 (2017). DOI: 10.3389/fmich.2017.02502.

藤田泰太郎, 真正細菌フィルミクテス門に属する枯草菌の代謝制御の分子生物学の過去半世紀の展開. *化学と生物* 54 (9) 657-667 (2016). DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.54.657.

Kazutake Hirooka, Yusuke Kodoi, Takenori Satomura, Yasutaro Fujita, Regulation of the *rhaEWRBMA* operon involved in L-rhamnose catabolism through two transcriptional factors, RhaR and CcpA, in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 198 (5):830-845 (2016). DOI: 10.1128/JB.00856-15.

[学会発表] (計 3 件)

藤田泰太郎, 小倉光雄, 仁井里美, 広岡和丈, 枯草菌のバイオフィルム形成のトリIGGER (SinR) による孢子形成トリガー遺伝子 (*kinB*) の転写制御. 第 39 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜、横浜市) 2016.11.30~2016.12.2

藤田泰太郎, 仁井里美, 広岡和丈, 枯草菌孢子形成のトリIGGER 遺伝子 *kinB* の転写制御. 日本農芸化学会 2016 年大会 (札幌コンベンションセンター、札幌市) 2016.3.28~2016.3.30

藤田泰太郎, 仁井里美, 広岡和丈, 枯草菌孢子形成のトリIGGER 遺伝子である *kinB* の転写制御. 第 38 回日本分子生物学会 (神戸ポートアイランド、神戸市) 2015.12.1~2015.12.4

[その他]

ホームページ等

藤田泰太郎 - 研究者 - researchmap (<http://researchmap.jp/read0035996/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 泰太郎 (FUJITA, Yasutaro)
東海大学・海洋研究所・客員教授
研究者番号：4 0 1 1 5 5 0 6

(2) 研究分担者

小倉 光雄 (OGURA, Mitsuo)
東海大学・海洋研究所・教授
研究者番号：8 0 2 0 4 1 6 8

広岡 和丈 (HIROOKA, Kazutake)
福山大学・生命工学部・准教授
研究者番号：2 0 3 8 9 0 6 8