

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18669

研究課題名(和文) 希少放線菌が形成する孢子嚢の休眠と開裂メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on the mechanism of dormancy and dehiscence in *Actinoplanes missouriensis* sporangia

研究代表者

手塚 武揚 (Tezuka, Takeaki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：80646414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は細菌の1種である希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* が形成する孢子嚢を材料として、細胞が休眠耐久状態に入る分子機構、およびそこから覚醒して栄養増殖を開始する分子機構の解明を目指した。その結果、二成分制御系を構成すると予想される2つのタンパク質が孢子嚢の形成と開裂に必須であることを示し、これら2つのタンパク質により発現が制御される遺伝子群を決定した。本研究により細胞の休眠と覚醒について新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the molecular mechanism that regulates sporangium formation and dehiscence of the rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis*. We successfully identified two proteins that are required for the sporangium formation and dehiscence. These two proteins are suggested to function as components of the novel two component regulatory system. We determined the genes that are regulated by this two component regulatory system. The results obtained in this study are useful for the research of cellular dormancy and activation.

研究分野：応用微生物学

キーワード：希少放線菌 孢子嚢 休眠 開裂 二成分制御系 環境応答 形態分化 遊走子

1. 研究開始当初の背景

(1) 原核生物の中には休眠耐久状態の細胞として孢子を形成するものがあり、多様な微生物が共存し栄養の乏しい状態が時間的にも空間的にも大部分を占めると考えられている自然環境において、孢子形成は原核生物の重要な生存戦略である。原核生物の孢子形成機構についてはモデル生物である枯草菌 *Bacillus subtilis* を材料として多くの先行研究が行われて来たが、孢子が休眠耐久状態を維持する一方で外界からの刺激を感知して覚醒し、発芽・増殖に至る過程については大部分が未解明なままで現在に至っている。

(2) 研究代表者が研究を進めている研究室では、希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* を材料として実験を行っている。本菌は培地中に基底菌糸を張り巡らせて栄養増殖を行うが、栄養源が枯渇した条件になると短い孢子嚢柄に支えられた孢子嚢を空中に形成して休眠状態となる。孢子嚢の内部には多数の運動性孢子が形成されており、菌糸と比較して孢子嚢は高温や乾燥に高い耐性を示す。孢子嚢は外部環境が湿潤条件に変化すると開裂し、内部から多数の孢子を放出する。放出された孢子はべん毛による運動性を持ち、走化性を示す。孢子の運動は最長で数時間続くものの、栄養状態の適した環境に至ると運動を停止して発芽し、栄養増殖を開始する。高温条件や乾燥条件に晒されても適切な湿潤環境に置かれれば孢子嚢が開裂して孢子が放出され運動性を示すことから、孢子嚢は内包する孢子のストレス耐性と運動性の維持に不可欠の構造体である。孢子嚢に土壌抽出物を含む水溶液をかけると孢子嚢が開裂して孢子が放出される一方、蒸留水をかけた場合には孢子嚢が開裂しないことから、孢子嚢には土壌中に含まれる何らかの開裂誘導因子を感知して開裂を開始するセンサー機構があると予想される。栄養状態の不適切な環境において孢子嚢が開裂すると孢子が発芽して栄養増殖を開始することは困難であり、孢子嚢が持つと予想される開裂誘導因子の感知機構は適切な環境中で開裂して孢子を放出するために不可欠のメカニズムである。

(3) これまでの研究により *A. missouriensis* の孢子嚢の休眠と覚醒に関わる因子として二成分制御系のレスポンスレギュレーターと相同性を示すタンパク質 TcrA と、二成分制御系のハイブリッド型センサーヒスチジンキナーゼと相同性を示すタンパク質 HhkA の2つのタンパク質を見いだしている。二成分制御系はセンサーヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレーターからなり、外界からの何らかのシグナルを感知したセンサーキナーゼが自己リン酸化反応により活性化し、続いてレスポンスレギュレーターへとリン酸基が転移されることで情報が伝達され

る。リン酸化されることで活性化されたレスポンスレギュレーターは、標的遺伝子の転写制御を行うか、または標的タンパク質との相互作用を介して環境変化に対する応答を担う。*tcrA* 遺伝子破壊株と *hhkA* 遺伝子破壊株はともに、孢子嚢に土壌抽出物を含む水溶液をかけても開裂しない、孢子嚢内部で孢子の発芽が開始されている、野生株と比較して多数の重複した遺伝子の転写量が減少している、という非常に類似した表現型の変化や遺伝子発現レベルの変化を示したことから、これら2つのタンパク質が孢子嚢の休眠状態の維持と開裂を担う一連の二成分制御系情報伝達経路を形成する因子である可能性が強く示唆された。また、*A. missouriensis* は孢子嚢形成培地で培養すると培養3日目に孢子嚢形成を開始し、培養6日目に開裂誘導条件下で孢子の放出が可能な孢子嚢が形成され、その後さらに培養を続けると孢子嚢の形成と休眠が促進されることから、孢子嚢形成培地で培養1、3、6、40日目の細胞を用いてトランスクリプトーム比較解析を行った。その結果、培養1日目と比較して培養3日目に転写産物量が100倍以上増大し、かつ近縁の *Actinoplanes* 属放線菌で高度に保存された15の遺伝子を見いだした。これらは、*A. missouriensis* の孢子嚢形成に関与する可能性の高い遺伝子群である。

2. 研究の目的

希少放線菌 *A. missouriensis* が形成する孢子嚢を材料として、細胞が休眠耐久状態となった後、外界からの刺激を感知して覚醒し、発芽に至る分子メカニズムの全容解明を研究の目的とした。具体的には、孢子嚢内部で孢子が成熟して休眠状態に入る過程と、孢子嚢が開裂して運動性孢子が放出される過程で鍵となる二成分制御系タンパク質 TcrA と HhkA による情報伝達機構の解析と標的遺伝子の同定、孢子嚢形成開始時に発現が活性化される遺伝子群の解析による、孢子嚢形成に必須の遺伝子の同定と機能解析、の2点を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 組換え TcrA タンパク質を調製し、*in vitro* で TcrA 結合配列を決定した。また、TcrA 結合配列とトランスクリプトーム解析の結果を用いて、TcrA レギュロンを同定した。

(2) HhkA から TcrA へのリン酸基転移を媒介すると予想されるタンパク質 Hpt をコードすると予想される遺伝子の破壊株を作製し、その表現型を解析した。

(3) トランスクリプトーム解析のデータを用いて TcrA と HhkA の制御下にある遺伝子群

を同定し、両遺伝子群の相関解析を行った。

(4) 胞子嚢形成時に転写産物量が増大し、かつ近縁の *Actinoplanes* 属で高く保存されている遺伝子群の破壊株を作製して機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) Hpt ドメインを有すると予想される 4 タンパク質のうち、2 タンパク質をコードする遺伝子の破壊株を作製し表現型を解析したが、いずれも野生株との間に差異は観察されなかったことから、これらの遺伝子は胞子嚢の形成と開裂には関与していないことが示された。残る 2 遺伝子については、現在も取得を進めている。

(2) 組換え TcrA タンパク質を抗原として抗 TcrA ポリクローナル抗体を作製した。ウエスタンブロット解析により、TcrA が胞子嚢形成期に強く発現していることを示した。TcrA が強く発現している時期の細胞を回収して抗 TcrA 抗体による ChIP-seq 解析を行ったが、回収できた DNA 量が極めて微量であったため、解析可能なシーケンスデータを得るには至らなかった。そのため、組換え TcrA タンパク質を用いたゲルシフトアッセイにより TcrA 結合領域を複数同定し、TcrA 結合配列を決定した。得られた TcrA 結合配列を基に、*in silico* 解析により TcrA 標的遺伝子の候補を選抜した。これら候補遺伝子の上流領域に対して、競合ゲルシフトアッセイにより TcrA の結合の有無を解析した。さらに、野生株と *tcrA* 破壊株の RNA-seq 解析の結果を比較することで、TcrA 標的遺伝子群を決定した。

(3) 野生株、*tcrA* 破壊株、*hbkA* 破壊株を用いて得られた RNA-seq 解析の結果を精査し、TcrA と HbkA によって転写制御を受ける遺伝子群をそれぞれ同定した。また、両遺伝子群を構成する遺伝子に高い相関関係が見られることを示した。

(4) 野生株を用いて経時的に解析を行った RNA-seq 解析の結果より、胞子嚢形成時に転写産物量が大幅に増大し、かつ近縁の *Actinoplanes* 属放線菌で塩基配列が高度に保存されている遺伝子群を同定した。これらの遺伝子の機能解析を進め、*asfR* と *ssgB* の 2 遺伝子が胞子嚢形成に必須であることを示した。

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)

Yoshihiro Mouri, Kenji Konishi, Azusa Fujita, Takeaki Tezuka, Yasuo Ohnishi. Regulation of sporangium formation by BldD in the rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis*. Journal of Bacteriology(査読あり)、in press (2017). DOI: 10.1128/JB.00840-16

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*. Journal of Bacteriology (査読あり)、198 (2016)、2219-2227. DOI: 10.1128/JB.00306-16

[学会発表](計 12 件)

Tomohiro Kimura, Takeaki Tezuka, Shin-Ichi Aizawa, Yasuo Ohnishi. AMIS75470 is Essential for Flagellar Assembly in the Rare Actinomycete *Actinoplanes missouriensis*. The OIST International Workshop on Bacterial Flagella, Injectisomes and Type III Secretion Systems. 2017年3月1-5日、沖縄科学技術大学院大学(沖縄県・国頭郡)

木村知宏、手塚武揚、大西康夫、希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* のべん毛形成に必須なチオレドキシン AMIS75470 の機能部位および標的タンパク質の同定、日本農芸化学会大会、2017年3月19日、京都子大学(京都府・東山区)

手塚武揚、小山達樹、安久都卓哉、大西康夫、希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢形成に関与する AMIS76070 と相互作用するタンパク質の探索、日本農芸化学会

大会、2017年3月19日、京都女子大学（京都府・東山区）

Tomohiro kimura, Takeaki Tezuka, Yasuo Ohnishi. Analysis of an essential gene for flagella synthesis in *Actinoplanes missouriensis*. The 13th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. 2016年10月16-20日、Wuhan (China)

毛利佳弘、小西健司、手塚武揚、大西康夫、希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の形態分化を制御する転写制御因子 BldD の機能解析、グラム陽性菌ゲノム機能会議、2016年8月29-30日、KKRホテル熱海（静岡県・熱海市）

木村知宏ら、希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の遊走子の走化性に必須な *che* クラスターの機能解析、べん毛研究交流会、2016年3月8日、天童温泉滝の湯（山形県・天童市）

木村知宏、種村裕幸、手塚武揚、大西康夫、希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の遊走子べん毛回転停止に必須な遺伝子 *ftgA* の機能解析、日本農芸化学会大会、2016年3月30日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

安田理沙、手塚武揚、大西康夫、dRNA シーケンスによる希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* 孢子嚢の開裂過程に働く遺伝子のプロモーター領域の解析、日本農芸化学会大会、2016年3月30日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

毛利佳弘、手塚武揚、大西康夫、希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の休眠を制御

する転写制御因子 TcrA のレギュロンの網羅的同定、日本農芸化学会大会、2016年3月30日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

安久都卓哉、平田愛子、手塚武揚、大西康夫、希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* における孢子嚢形成の制御遺伝子 *AMIS_76070* の機能解析、日本農芸化学会大会、2016年3月30日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

手塚武揚、泳ぐ希少放線菌の分子遺伝学、細菌細胞の増殖と代謝研究会、2015年11月6-7日、国立遺伝学研究所（静岡県・三島市）

木村知宏ら、希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の運動性孢子が示す走化性応答のハイスピードトラッキング顕微鏡観察、べん毛研究交流会、2015年3月1-3日、合歡の郷（三重県・志摩市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者
手塚 武揚 (TEZUKA TAKEAKI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号：80646414

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし