

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32686

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18676

研究課題名(和文)鞭毛形成マスターレギュレーターFlhD4C2による代謝制御機構の解明

研究課題名(英文)Study of novel FlhD4C2 regulated mechanism

研究代表者

高田 啓 (TAKADA, Hiraku)

立教大学・理学部・ポスドクトラルフェロー

研究者番号：70747899

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)：大腸菌の鞭毛形成のマスターレギュレーターであるFlhD4C2に着目し、FlhD4C2の新規制御遺伝子の探索および、生長環境に応じたFlhD4C2支配下遺伝子の転写変動を観察した。FlhD4C2のゲノム上での結合領域の同定に成功し、また、栄養源の遷移時に、FlhD4C2が鞭毛形成関連遺伝子だけではなく、複数の代謝酵素遺伝子の発現制御に関与していることを明らかとした。これにより、如何にして細胞内代謝と鞭毛形成を共役させているか、その増殖形態を選択していく過程を明らかした。

研究成果の概要(英文)：The hetero-oligomeric complex of the FlhD and FlhC (FlhD4C2) plays a pivotal role in the transcriptional regulation of flagellar regulon. The flhD operon has been referred to as the “master operon” because it is required for the expression of level II and level III flagellar and chemotaxis genes. In recent years, it has been shown that FlhD4C2 regulates a number of non-flagellar promoters in *E. coli*. However, the detail mechanism remains unclear. We tried to identify the regulatory function of FlhD4C2. After SELEX screening, FlhD4C2 was found to bind to not only the promoters of flagellar regulon but also that of genes involved in central carbon metabolism. These results demonstrate the mechanism how bacteria cooperate flagellar formation with central metabolism responding to the environmental changes.

研究分野：応用微生物

キーワード：代謝と増殖 FlhDC

1. 研究開始当初の背景

環境中の微生物は栄養源の遷移を量・質ともに正確に感知し、それら栄養源に細胞内代謝を最適化することで環境変化に適応している。この適応機構には増殖形態の変化を伴い、その代表的な例として、鞭毛形成・バイオフィーム形成がある。

生育環境中の栄養状態の悪化に伴い、大腸菌などの運動性の細菌は化学的濃度勾配に沿って栄養濃度の高い方へ泳ぐことは、古くから知られていることである。更に生育環境の悪化が進行すると、浮遊状態の細胞は物資表面に接着し、細胞外マトリクスの生産と増殖を伴いながら、バイオフィームを形成し、細胞集団として環境ストレスに対応する。大腸菌において、この鞭毛形成とバイオフィーム形成は2つのマスターレギュレーター転写因子 (FlhD4C2・CsgD) によって制御されていることが知られている。この両者が互いを負に制御していることから、鞭毛形成とバイオフィーム形成は bistable な関係にあり、両者の制御カスケードが同時に活性化することはない。細菌鞭毛は約30種類のタンパク質からなる超分子複合体であり、べん毛の形成には60種以上もの遺伝子産物の秩序だった機能が必要である (Chevance SB, et al., 2008)。Class I, Class II, Class III と呼ばれる遺伝子群が発現制御を受けて、順次翻訳されることによって効率よく構築される。この階層性において Class I に位置するのがヘテロ六量体を形成する FlhD4C2 である。Class II では FlhD4C2 依存的に基部体からフックまでが構築され、このとき同様に、FliA (RpoF) が転写活性因子として働き、Class III の発現に移行する。Class III ではフラジェリンが大量発現され、鞭毛繊維が構築される。つまり、この超分子複合体の形成には多大なエネルギーを必要とすると考えられる。また、*flhDC* オペロンの発現制御には、12種類の転写因子と4種類の ncRNA が直接的に関与していることがわかるが、これまでに同定されている FlhD4C2 の制御遺伝子は鞭毛形成関連の複数種に限られており、多様な環境シグナルを入力源とする意義は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では大腸菌の鞭毛形成マスターレギュレーター FlhD4C2 に着目し、新規 FlhD4C2 制御候補遺伝子群の同定とその解析、さらに栄養源の遷移に伴ったこれら遺伝子群の動態を解析することにより、増殖環境を感知しながら増殖形態を選択していく過程の全体像の把握を目指し、実施したものである。

3. 研究の方法

(1) Genomic SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) 法・Tilling array 解析を組み

合わせた SELEX-Chip 法 (Ishihama A, 2012) により、FlhD4C2 が結合するゲノム DNA 配列の網羅的な同定を行うため、以下のことを行なった。

FlhD4C2 複合体の大量発現および、精製。

精製 FlhD4C2 を用いた SELEX-Chip 法による、新規制御遺伝子の探索。

ゲルシフトアッセイ (EMSA) を用いた、新規制御遺伝子の Promoter 領域への FlhD4C2 の結合活性の検証。

(2) 同定した新規制御遺伝子に対する FlhD4C2 の影響を検証するために、以下のことを行なった。

ノーザン解析による、*flhD* 欠損が与える新規制御遺伝子の転写への影響を検証。*flhD* 欠損が与える生育への影響を、培地成分を変えることで検証。

flhD 欠損が与える遺伝子発現への影響を再検証するため、RNA-seq 解析を用いた網羅的な遺伝子発現解析。

4. 研究成果

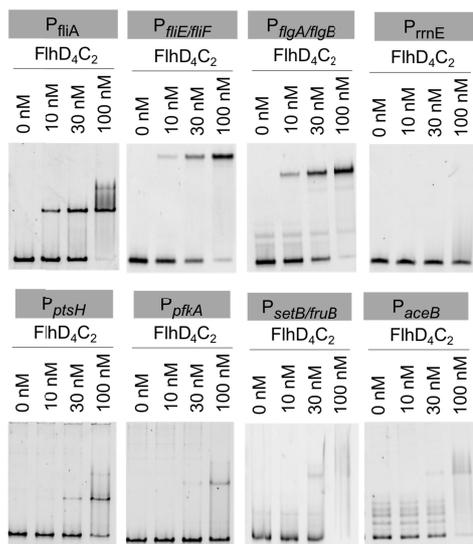
上記の研究計画で、3年間の研究を実施し、以下の成果を得た。

(1) FlhD は FlhC の DNA 結合を制御する調節因子であり、DNA 結合を持たないと推定されている (Wang S et al., 2006)。そこで、*flhD* の N 末端もしくは *flhC* の C 末端に His-tag を付加し、*flhDC* の operon として pET vector から発現誘導。その後、Ni-NTA のレジンをを用いて、FlhD4C2 の複合体を共精製することを目指した。簡易的に発現確認をしたところ、*flhD* の N 末端に His-tag を付加したコンストラクトでは FlhC が不溶化してしまった。一方で、*flhC* の C 末端に His-tag を付加したコンストラクトでは両タンパク質が可溶性画分に確認できたので、こちらのコンストラクトを以降の実験に採用することにした。最初に取り組んだ、Ni-NTA のレジンをを用いたバッチ法においては共精製が可能であったが、精製後の FlhD4C2 が不溶化しやすく、不安であった。この問題に対しては細胞破碎方法の変更および、硫酸沈殿による素精製を行い、AKTA pure25 および HisTrap HP カラムを使用することにより改善することができた。

精製 FlhD4C2 と大腸菌 Genome DNA 断片混合物を利用し、SELEX-Chip 法により FlhD4C2 が認識結合する配列を16カ所同定した。この中には、既に結合が報告されている、*fliA*、*flgA/flgB* および *fliE/F* 領域も含まれており、本解析で得られた新規認識配列が特異性の高いものであることを示している。

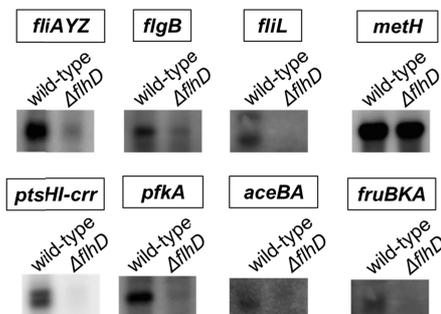
次に、EMSA により、同定した新規 FlhD4C2 制御候補遺伝子の Promoter への FlhD4C2 の結合を検証した。Positive control として、既知の制御遺伝子 *fliA*、*fliE/fliF* および *flgA/flgB* の Promoter 領域を用いた。また、Negative control として、*rrnE*

の Promoter 領域を用いた。EMSA により、既知の promoter 領域である *fliA*, *fliE/fliF*, *flgA/flgB* への特異的な結合が確認できた。また、既知ものに比べると結合は弱いものの、新規 FlhD4C2 制御候補遺伝子のうち、複数の炭素代謝関連遺伝子(*ptsH*, *pfkA*, *fruB*, *aceB* 等)の promoter 領域への結合が確認できた。FlhD4C2 が *mdh* (マレイン酸脱水素酵素遺伝子)などの好気代謝関連遺伝子群の発現制御に参与しているという報告は過去にあるが(Prüss BM et.al., 2003)、直接的な結合を示すデータはなく、本実験が初めての例である。



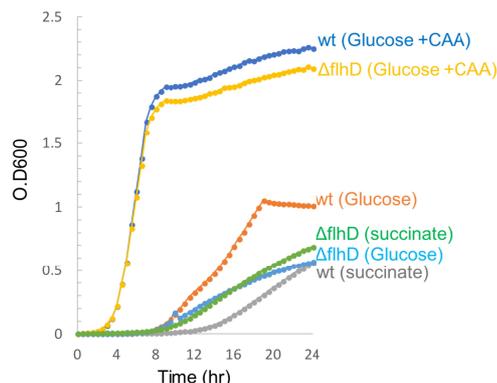
※frag conc. : 10 nM

(2) 上記の結果より、FlhD4C2 が炭素代謝遺伝子の発現制御に参与していることが考えられた。このことは、FlhD4C2 が炭素代謝と鞭毛形成を共役させるグローバルレギュレーターである可能性を示唆している。これまで、FlhD4C2 による転写制御に関する報告では LB などの富栄養培地を用いた解析のみであり、合成培地などを用い、炭素源や窒素源などを変動させた際にどのような挙動を示すかは不明であった。そこで、野生株および *flhD* 破壊株における、既知および新規 FlhD4C2 制御候補遺伝子の転写量をノーザン解析により検証した。



M9 グルコース培地で各発現量を比較したところ、野生株と比較し、*flhD* 破壊株において、優位に各遺伝子の転写量が減少していることが分かった。この結果は、FlhD4C2 が直接これら遺伝子群の転写を制御していることを示している。

上記の実験から、FlhD4C2 が複数の炭素代謝関連遺伝子の転写を直接制御していることが明らかとなった。そこで次に、M9 合成培地において、炭素源および窒素源を変化させた際に、*flhD* 遺伝子破壊が生育に与える影響を検証した。



各培地条件、37 °C で生育を検証したところ、M9 合成培地 (+0.2% Glucose) において、野生株と比較し、顕著に *flhD* 破壊株が生育遅延を示すことがわかった。また、この生育遅延は M9 合成培地 (+0.2% Glucose, 0.2% Casamino acid) においては観察されなかった。このことは、FlhD4C2 がアミノ酸の生合成に影響を与えていることを示すもので会える。

上記の結果から、FlhD4C2 は炭素代謝のみならず、アミノ酸生合成にも関与している可能性が明らかとなってきた。そこで、*flhD* 欠損が与えるゲノムワイドな遺伝子発現への影響を再検証するため、RNA-seq 解析を用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。M9 合成培地 (+0.2% Glucose) および M9 合成培地 (+0.2% Glucose, 0.2% Casamino acid) で生育させた際の、野生株・*flhD* 破壊株間における遺伝子発現量を比較したところ、これまでに明らかとなってきた新規 FlhD4C2 制御遺伝子のほか、複数の ncRNA やその他、様々な代謝に関与する遺伝子の発現に FlhD4C2 が培地成分依存的に関与していることが明らかとなった。現在、詳細な制御機構を検証中である。これらの結果をもとに、論文化を目指しているところである。

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6件) 全て査読あり

Takada H, Yoshikawa H, Essentiality

and function of WalK/WalR two-component system: the past, present, and future of research, *Biosci Biotechnol Biochem.* 2018 Mar 7:1-11. doi: 10.1080/09168451.2018.1444466.

Takada H, Shiwa Y, Takino Y, Osaka N, Ueda S, Watanabe S, Chibazakura T, Su'etsugu M, Utsumi R, Yoshikawa H, Essentiality of WalRK for growth in *Bacillus subtilis* and its role during heat stress, *Microbiology*, 2018 Apr;164(4):670-684. doi: 10.1099/mic.0.000625.

Su'etsugu M, Takada H, Katayama T, Tsujimoto H, Exponential propagation of large circular DNA by reconstitution of a chromosome replication cycle, *Nucleic Acids Res*, 2017 Nov 16;45(20):11525-11534. doi: 10.1093/nar/gkx822.

Kamada K, Su'etsugu M, Takada H, Miyata M, Hirano T, Overall Shapes of the SMC-ScpAB Complex Are Determined by Balance between Constraint and Relaxation of Its Structural Parts, *Structure*, 2017 Apr 4;25(4):603-616.e4. doi: 10.1016/j.str.2017.02.008.

Takada H, Shimada T, Dey D, Quyyum MZ, Nakano M, Ishiguro A, Yoshida H, Yamamoto K, Sen R, Ishihama A, Differential Regulation of rRNA and tRNA Transcription from the rRNA-tRNA Composite Operon in *Escherichia coli*, *PLoS One*. 2016 Dec 22;11(12):e0163057. doi: 10.1371/journal.pone.0163057. eCollection 2016.

Shimada T, Takada H, Yamamoto K, Ishihama A, Expanded roles of two-component response regulator OmpR in *Escherichia coli*: genomic SELEX search for novel regulation targets, *Genes Cells*. 2015 Nov;20(11):915-31. doi: 10.1111/gtc.

[学会発表](計13件)

高田啓、多喜乃雄太、大坂夏木、植田修平、志波優、渡辺智、千葉櫻拓、内海龍太郎、吉川博文、二成分制御系 WalRK の熱ストレス応答と生育必須性に関する解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年

高田啓、辻本寛子、末次正幸、ミニ染色体複製サイクルにおける転写・翻訳の共役と分子進化の試み、第 14 回 21 世紀大腸菌研究会、2017 年

Hiraku Takada, Natsuki Osaka, Masayuki Su'etsugul, Hirofumi Yoshikawa, Essentiality of WalRK for

growth in *Bacillus subtilis* and its role under heat stress, 19th International Conference on Bacilli & Gram-Positive Bacteria.2017

高田啓、志波優、末次正幸、戸澤謙、吉川博文、枯草菌における新規緊縮応答制御機構の解析、2017 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、2017 年

高田啓、辻本寛子、末次正幸、試験管内における転写・翻訳・複製の再構成系の構築、第 11 回日本ゲノム微生物学会若手の会、2017 年

高田啓、辻本寛子、末次正幸、大腸菌ミニ染色体複製サイクルにおける転写・翻訳の共役「細胞を創る」研究会 10.0、2017 年

高田啓、辻本寛子、末次正幸、腸菌ミニ染色体複製サイクル再構成系における転写・翻訳反応の共役、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年

高田啓、多喜乃雄太、大坂夏木、植田修平、志波優、渡辺智、千葉櫻拓、末次正幸、内海龍太郎、吉川博文、二成分制御系 WalRK の熱ストレス応答と生育必須性に関する解析、2016 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、2016 年

高田啓、辻本寛子、末次正幸、大腸菌ミニ染色体複製と転写・翻訳反応の試験管内再構成の試み、第 10 回日本ゲノム微生物学会若手の会、2016 年

高田啓、植田修平、志波優、渡辺智、千葉櫻拓、末次正幸、内海龍太郎、吉川博文、二成分制御系 WalRK の生育必須性の解析、日本農芸化学会関東支部 2016 年度支部大会、2016 年

高田啓、植田修平、志波優、渡辺智、千葉櫻拓、末次正幸、内海龍太郎、吉川博文、二成分制御系 WalRK の生育必須性の解析、第 15 回微生物研究会、2016 年

高田啓、辻本寛子、末次正幸、大腸菌ミニ染色体複製と転写・翻訳反応の試験管内再構成の試み、第 9 回日本ゲノム微生物学会若手の会、2015 年

高田啓、辻本寛子、末次正幸、大腸菌ミニ染色体複製サイクル再構成系における転写・翻訳反応の共役、「細胞を創る」研究会 8.0、2015 年

6. 研究組織

(1)研究代表者

高田 啓 (TAKADA, Hiraku)
立教大学・理学部・ポスドクトラルフェロー
研究者番号：70747899