

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07721

研究課題名（和文）多細胞体形成により誘導されるPaenibacillus sp. 株の運動能の解析

研究課題名（英文）Genetic analysis of colony motility in Paenibacillus sp.

研究代表者

小林 和夫（Kobayashi, Kazuo）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：70324978

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：Paenibacillus sp. NAIST15-1株は、動くコロニーを形成し、他の微生物が運動能を発揮できない高濃度の寒天培地でも高い運動能を示す。この運動能を発揮するために、Paenibacillus sp. NAIST15-1株は、鞭毛と寒天培地表面との接触で生じる鞭毛回転への負荷を感知して、転写制御因子を活性化し、鞭毛遺伝子の発現を誘導することが明らかになった。また、鞭毛遺伝子の発現誘導には、鞭毛に加えて、細胞の表層構造が重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Paenibacillus sp. NAIST15-1株を含むいくつかのPaenibacillus菌は動くコロニーを形成するという特異な運動能を示す。そのメカニズムは非常に興味深い、これまで全く不明であった。本研究では、そのメカニズムの一端として表面感知を介した鞭毛の転写誘導システムが存在することを明らかにした。また、Paenibacillus sp. NAIST15-1株の遺伝学的解析手法を確立したことも成果である。Paenibacillus属細菌は、バイオコントロール菌（微生物農薬）としても注目されており、その高い運動能の理解は、環境中での微生物の拡散を考えるうえでも重要である。

研究成果の概要（英文）：Paenibacillus sp. NAIST15-1 exhibits strong swarming motility ability by forming moving colonies and can move on 1.5% agar medium. In this study, we showed that Paenibacillus sp. NAIST15-1 induces transcription of flagellar genes in response to heavy loads on flagellar rotation. Moreover, cell surface structures are likely to play an important role in inducing flagellar gene transcription.

研究分野：微生物学

キーワード：surface sensing flagella motility two-component system S-layer

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物は、集団化することで新たな機能を発揮する。これまで、微生物の集団形成は、微生物が環境へ定着するために行われると考えられてきた。しかし、我々が新たに単離した *Paenibacillus* sp. NAIST15-1 株は、集団化して「動くコロニー」を形成し、他の微生物ではみられない非常に高い運動能を発揮する。我々は、この特異な運動能がどのように発揮されるのかに興味をもった。また、この過程には、動く集合体の形成だけでなく、その構成細胞の統率、自発的な娘コロニーの形成など、これまでの微生物学の知識とは大きく異なる現象が含まれる。そのため、その機構を明らかにすることで、微生物学の新たな概念を明らかにすることが期待された。

2. 研究の目的

Paenibacillus sp NAIST15-1 株の運動能は鞭毛に依存するが、鞭毛遺伝子がどのようなメカニズムで誘導されるのかは不明である。そこで、*Paenibacillus* sp NAIST15-1 株における鞭毛誘導システムを明らかにする。また、運動能にかかわる因子を同定することで、*Paenibacillus* sp NAIST15-1 株の特異な運動メカニズムを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) *Paenibacillus* sp NAIST15-1 株の鞭毛遺伝子の発現は、ノーザン法またはプロモーター-*gfp* レポーターを用いて解析した。運動能は、0.3%から 1.5%の寒天を添加した 2xYT プレート培地の中央に菌株を接種し、30 度で 18 時間培養後のコロニーの広がりを指標に解析した。トランスポゾンライブラリーの作製には、挿入部位の特異性が異なる 2 種類のトランスポゾンを用いた。

(2) 枯草菌のバイオフィーム形成の解析は、静置培養時に形成されるペリクルバイオフィームを観察することで行った。

4. 研究成果

(1) *Paenibacillus* sp NAIST15-1 株の鞭毛遺伝子は固形培地で誘導される。鞭毛遺伝子の構成は、枯草菌と同様に、鞭毛基部形成タンパク質、Che タンパク質、シグマ因子^Dなどをコードする *flgB* オペロンと^Dによって転写される鞭毛後期遺伝子群からなる。転写解析の結果、固形培地では、*flgB* プロモーターが活性化し、鞭毛遺伝子の転写が誘導されることが明らかになった。枯草菌の *flgB* プロモーターは、2 成分制御系 DegS-DegU のレスポンスレギュレーター DegU により誘導されるが、*Paenibacillus* sp NAIST15-1 の *flgB* プロモーターの活性化も DegS-DegU に依存していた。

(2) *Paenibacillus* sp NAIST15-1 株の鞭毛遺伝子の転写レベルは、固形培地に比べ、液体培地では非常に低い。液体培地にフィコールを添加し、培地の粘度を増加させると、液体培地でも固体培地と同レベルの鞭毛遺伝子の転写誘導が見られた。また、DegS-DegU を過剰発現した場合、液体培地、固体培地で同レベルの鞭毛遺伝子の転写誘導が見られた。さらに、鞭毛の回転を担うモータータンパク質をコードする *motAB* 遺伝子の破壊株では、液体培地、固体培地で同レベルの鞭毛遺伝子の転写誘導が見られた。これらのことから、*Paenibacillus* sp NAIST15-1 株は、鞭毛回転の抵抗を固形培地表面との接触シグナルとして鞭毛モータータンパク質が感知し、DegS-DegU を活性化して、鞭毛遺伝子の転写が誘導されるということが示唆された。

(3) *Paenibacillus* sp NAIST15-1 株の運動能を低下させる変異株をトランスポゾン挿入ライブラリーよりスクリーニングした結果、鞭毛遺伝子へのトランスポゾンの挿入変異株に加え、*degS*、細胞表層を覆う S-layer タンパク質の糖鎖修飾にかかわる *wapP*、メチル化酵素遺伝子などへのトランスポゾンの挿入変異株が単離された(表)。

Target gene	Gene length (bp)	Insertion sites of mini-Tn10 (bp from start)	No. of mini-Tn10 insertions	Motility (0.5% agar)	Motility (1.5% agar)	Gene annotation
<i>flgC</i>	453	216	1	Defective	Defective	Flagellar basal-body rod protein FlgC
<i>fliG</i>	1,008	995	4	Defective	Defective	Flagellar motor switch protein FliG
<i>fliJ</i>	447	335	3	Defective	Defective	Flagellar export protein FliJ
<i>ylzI</i>	225	53	2	Defective	Defective	Putative flagellar protein YlzI
<i>ylxF</i>	918	289	10	Defective	Defective	<i>flaA</i> locus 22.9-kDa protein
<i>fliM</i>	999	428	3	Defective	Defective	Flagellar motor switch protein FliM
<i>fliY</i>	1,266	844	1	Defective	Defective	Flagellar motor switch phosphatase FliY
<i>sigD</i>	786	347	2	Defective	Defective	RNA polymerase sigma factor SigD
PBN151_1926	1,407	409	2	Defective	Defective	Hypothetical protein (gene downstream of <i>sigD</i>)
PBN151_0898	987	965	8	Defective	Defective	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA/MsrB
<i>wsfP</i>	1,407	591	4	Defective	Defective	S-layer glycan biosynthesis initiation enzyme WsfP
<i>fliB</i>	1,263	270	6	WT	Defective	Lysine-N-methylase FliB
<i>degS</i>	1,161	268	1	Defective	Defective	Sensor protein DegS
PBN151_2619	600	464	2	Defective	Defective	Type 11 methyltransferase
PBN151_3232	2,034	141	4	Defective	Defective	Hypothetical protein
PBN151_3459	3,120	2,011	1	WT	Defective	Hypothetical extracellular protein
PBN151_4027	744	4	4	WT	Defective	ThiF family protein
PBN151_4312	1,086	768	4	WT	Defective	Capsular polysaccharide biosynthesis proteins

(4) *flgB* プロモーター活性を低下させる変異株をトランスポゾン挿入ライブラリーよりスクリーニングした結果、鞭毛の基部の M リングをコードする *fliF* へのトランスポゾンの挿入が *flgB* プロモーター活性を低下させることが明らかになった。このことは、DegS-DegU の活性化に鞭毛基部が関係する可能性を示唆している。また、細胞の表層を覆う S-layer に付加される糖鎖の合成遺伝子へのトランスポゾンの挿入が、*flgB* オペロンの転写を低下させた。また、糖鎖合成遺伝子を破壊すると、鞭毛遺伝子の発現が大きく低下し、運動能が完全に失われた。DegS-DegU の活性化における、S-layer タンパク質の役割は不明であるが、これらの結果は、細胞表面にある S-layer タンパク質が表面感知に重要な役割を果たしている可能性を示唆していると考えられた。

(5) *Paenibacillus* sp NAIST15-1 株は、集団化することで運動能を発揮するが、集団化のもう一つの代表例であるバイオフィーム形成能は示さない。*Paenibacillus* sp NAIST15-1 株のゲノム配列を調べたところ、*Paenibacillus* sp NAIST15-1 株システイン合成に必要な sulfite reductase をコードする *cysI* が欠損していた。我々は、以前に枯草菌の *cyIJ* 欠損株がバイオフィーム形成の低下を示すことを報告している (Kobayashi, 2007, J Bacteriol. 189:4920-4931)。この共通点に興味を持ち、解析を進めた結果、枯草菌の sulfite reductase 欠損株では、ジスルフィドストレスがおり、それによって誘導される RNA ポリメラーゼの活性を制御する Spx がバイオフィーム形成を抑制することを見出した。*Paenibacillus* sp NAIST15-1 株がバイオフィーム形成も同様の機構で抑制されていることが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kazuo Kobayashi	4. 巻 201
2. 論文標題 Inactivation of <i>cysL</i> Inhibits Biofilm Formation by Activating the Disulfide Stress Regulator Spx in <i>Bacillus subtilis</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00712-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00712-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi K, Kanesaki Y, Yoshikawa	4. 巻 83
2. 論文標題 Surface Sensing for <i>Paenibacillus</i> sp. NAIST15-1 Flagellar Gene Expression on Solid Medium.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Applied Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e00585-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.00585-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura T, Kobayashi K	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of Glutamate Synthase in Biofilm Formation by <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of bacteriology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00120-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----