

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19510198  
 研究課題名（和文）バクテリア機能未知必須遺伝子群の機能ネットワークの解析  
 研究課題名（英文） Study on the functional network of the bacterial uncharacterized essential genes

研究代表者  
 加藤 潤一（KATO JUN-ICHI）  
 首都大学東京・大学院理工学研究科・准教授  
 研究者番号：10194820

研究成果の概要：大腸菌の機能未知必須遺伝子の機能解析を行い、リポ多糖(LPS)、ペプチドグリカンの基質の輸送に関与すると考えられる遺伝子群、転写に必須と考えられる新規 DNA 分解酵素コードする遺伝子群を同定した。また染色体大規模欠失株を用いて野生株では難しい定常期における生存に関与する遺伝子群の解析を行い、ヌクレオプロテイン複合体を形成し、多くのストレスから DNA を保護している Dps タンパク質が増殖、生存に重要であることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：微生物ゲノム

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 一つのモデル生物について細胞増殖機構の全体像を理解するためには、細胞増殖に必須な全遺伝子を同定し、それらの機能を明らかにする必要がある。我々は大腸菌についてこれまでの研究により 302 個の遺伝子を必須遺伝子と同定した。この 302 個の必須遺伝子の中で、まだ機能が明らかにされていない必須遺伝子の数はそれほど多くはない。これまで多くの研究はそれぞれの現象、過程についてのいわば縦割りの研究が主であり、それだけでは全必須遺伝子群の機能解明には至らないので、やはり必須遺伝子群の Reverse

genetics が必要になる。

(2) また上記の必須遺伝子群だけを持つ大腸菌株が細胞増殖できるとは考えられない。細胞増殖に必須な過程のうち、バイパスのない過程に関与する遺伝子群は必須遺伝子として同定されるが、バイパスのある過程に関与する遺伝子群は野生株の必須遺伝子としては同定されず、破壊しても表現型がわからない非必須遺伝子として見えるからである。全ての必須な過程を理解する時には、後者をどのように解析するかが大きな問題となる、我々は染色体大規模欠失株を利用することが有効であると考えている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、Forward genetics と Reverse genetics の2つの研究の流れをうまく融合させることにより、大腸菌における細胞増殖に必須な全ての遺伝子群の機能および機能的なネットワークを明らかにすることである。大腸菌は大変よく調べられたモデル生物であるが、細胞増殖過程に限ってみてもまだまだ多くの重要な問題が残されている。これらの解明には従来からの研究方法に加えて、ゲノムサイエンス的な研究が欠かせない。本研究の特色はこの両方の研究の流れを融合させていること、特に染色体大規模欠失株を利用することであり、これらにより原核生物のまだ明らかにされていない多くのメカニズムの解明につながると期待される。

## 3. 研究の方法

本研究では大きく分けて、次の2つの方向の研究を進めた。

(ア) 野生株で必須な遺伝子のうち機能がまだよくわかっていない遺伝子の解析

具体的な研究方法としては、すでに単離した高温感受性変異株から抑圧変異株を単離した。抑圧変異株は抑圧遺伝子の同定がしやすいように、高温耐性株の中から低温感受性になったものを選択した。抑圧遺伝子の同定は、大腸菌染色体ライブラリーを得られた抑圧変異株に導入し、低温耐性になった菌株からプラスミドを単離して解析した。この時、抑圧遺伝子だけではなく、多コピー抑圧遺伝子もしばしば同定され、その両方により遺伝学的に相互作用のある遺伝子群が同定され、それらとの機能的な関連が示唆された。これらの結果を基に機能の解明を目指して遺伝学的、生化学的解析を行った。

(イ) 染色体大規模欠失株の解析

我々はこれまでに染色体(約4.6Mb)の約30%を欠失させた大規模欠失株の作製に成功しているが、作製した染色体大規模欠失株について、定常期における生存率が著しく低下すること。また対数増殖期における生菌率が低下していることを見出し、これらの性質が一つの遺伝子の欠損によるものではなく複数の遺伝子の欠損によるものであることを明らかにした。これらの性質について広域欠失変異領域を用いて原因遺伝子群の特定を進めた。

## 4. 研究成果

(ア) 野生株で必須な遺伝子のうち機能がまだよくわかっていない遺伝子の解析

(a) 細胞表層の生合成に必須な遺伝子群の解析：

### (*yfi*遺伝子の解析)

大腸菌の外膜タンパク質は大きく分けると2つのタイプ、 $\beta$ -バレル外膜タンパク質(OMPs)とリポタンパク質、に分けられるが、どちらも親水性と疎水性の性質を合わせ持つタンパク質であり、これらが内膜と外膜の間にある親水性のペリプラズムを通過してどのように外膜に運搬されるかという問題は大変興味深い問題である。これまでにリポタンパク質については運搬に必須なLolタンパク質群が同定され詳細に解析されているが、 $\beta$ -バレル外膜タンパク質についてはようやく運搬に必須なYaeTタンパク質複合体が同定されたものの、メカニズムなどについてはまだよくわかっていなかった。YaeTタンパク質複合体を構成するタンパク質についても、それ自体 $\beta$ -バレル外膜タンパク質であるYaeT以外に、リポタンパク質であるYfiO, YfgL, NlpB, SmpAが主に生化学的解析により同定されているが、これらで機能的に充分かどうかはわかっていなかった。本研究ではこのYaeTタンパク質複合体を構成するタンパク質の一つであるYfiOタンパク質をコードする*yfiO*遺伝子について解析を行った。まず*yfiO*高温感受性変異株の多コピーサプレッサー(抑圧遺伝子)として新規*yiaD*遺伝子を同定した。変異株を高温で培養した時の細胞膜を分画して調べたところ、多コピーの*yiaD*遺伝子を導入することにより*yfiO*変異による外膜画分のパターンの変化がやや抑圧されることがわかり、YiaDタンパク質はYfiOタンパク質の機能に関連する因子であることが示唆された。YiaDタンパク質の構造を調べると、外膜に局在するリポタンパク質であり、また細胞壁ペプチドグリカンとの相互作用に重要であると考えられているOmpAドメインを持つことから、ペプチドグリカンと相互作用するタンパク質であると予想された。このOmpAドメイン内のアミノ酸を置換した変異体群を作製して調べたところ、多コピーの*yiaD*遺伝子による*yfiO*高温感受性変異株の生育の高温感受性の抑圧に変化が見られるものがあり、ペプチドグリカンとの相互作用が機能に重要であることが示唆された。

### (*mviM*遺伝子の解析)

機能未知必須遺伝子*mviM*について、高温感受性変異株を単離して調べたところ、高温で培養すると少し膨らんだ細胞や破裂し細胞質が抜けてしまったゴーストが観察され、細胞壁合成に関与していることが示唆された。そこで東邦大学 藤崎博士と共同研究を行い、細胞壁、ペプチドグリカン合成の中間体について測定したところ、変異株ではリピド中間体が蓄積することが明らかになり、キャリア

リピドに結合した中間体を内膜の細胞質側からペリプラズム側に運搬させるフリッパーゼである可能性が示唆された。

(b) 染色体動態に必須な遺伝子群の解析：

(*yqgF* 遺伝子の解析)

機能未知必須遺伝子 *yqgF* は近年、コードする YqgF タンパク質の立体構造の解析から、一次構造の相同性は高くないものの、立体構造では RNaseH 様の折りたたみ構造を持ち、相同的組換えにおける Holliday 構造の解離に働く RuvC タンパク質と相同性が高いことが明らかになった。この *yqgF* 遺伝子の機能を明らかにすることを目指して生化学的および遺伝学的解析を行った。まず高温感受性変異株から調製したプラスミドでは超らせん構造が変化していることを見出した。また YqgF タンパク質を精製して調べた結果、endonuclease 活性が検出された。*yqgF* 遺伝子の高温感受性株から回収したプラスミドを基質に用いて調べたが特異的な切断は見られず、超らせん構造の変化は *yqgF* 遺伝子の変異の二次的な影響であることが示唆された。RuvC タンパク質が特異的に切断する DNA を基質に用いても調べたが特異的な切断は見られず、RuvC タンパク質とは性質が異なることがわかった。また遺伝学的解析により、転写に関与することが示唆され、DNA の正常な構造を維持することにより転写を正常に進ませる新規なメカニズムの可能性が考えられた。

(*yeaZ*, *ygjD*, *yjeE* 遺伝子の解析)

機能未知必須遺伝子 *ygjD* のホモログは真核生物、真正細菌、古細菌に広く存在することが知られている。1991年に *Pasteurella* 菌の *ygjD* 遺伝子ホモログがエンドペプチダーゼをコードするとの報告があつて以来、YgjD ホモログはエンドペプチダーゼであると考えられてきたが、2006年にパン酵母の *ygjD* 遺伝子ホモログがテロメアの維持や必須遺伝子群の転写に関与すること、また好熱古細菌である *Pyrococcus* 菌の *ygjD* 遺伝子ホモログが DNase (AP エンドヌクレアーゼ) をコードすることが相次いで報告され、近年これらの YgjD ホモログの機能が注目されてきた。大腸菌の *ygjD* 遺伝子については当研究室のこれまでの研究により、他の機能未知必須遺伝子 *yeaZ*, *yjeE* と機能的に関連することが示唆された。本研究ではまず YgjD と YeaZ が複合体を作ることを見出した。また YgjD-YeaZ 複合体を部分精製して調べた結果、種々の DNA を基質にした時に興味深い DNase 活性が検出された。古細菌のホモログについては AP endonuclease であるとの報告があつたが、遺伝学的解析からは支持する結果が得られず、転写に関与することが示唆された。

(イ) 染色体大規模欠失株の解析

自然界で多くのバクテリアは定常期の状態で、増殖期の細胞とは異なる生理状態で生存していると考えられている。定常期における生存機構については、多くの分野から興味を持たれているにもかかわらず、まだほとんど解析が進んでいない。その原因としては、定常期において生存率が低下する変異株がほとんど単離されていないために遺伝学的解析が難しいことが挙げられる。変異株が少ない理由としては、生存機構が複数のシステムによっており、一つの遺伝子の欠損では表現型が見られない可能性が考えられる。実際に我々が作製した染色体の約 30% を欠失させた大腸菌染色体大規模欠失株について、定常期における生存率が低下していることが明らかにになり、その原因が複数の欠失変異の組み合わせによっていることがわかった。しかしその原因遺伝子群はまだ同定されておらず、具体的な生存機構については見知が得られていなかったため、本研究では原因遺伝子群の同定を行った。これまでの研究により原因欠失変異の一つとして LD3-15 (欠失領域：約 135Kb) が同定され、またさらにこの欠失領域内に複数の原因遺伝子が存在することが示唆されていたので、この欠失領域内に部分的な欠失変異を多数系統的に作製することにより原因遺伝子群の同定を試み、*dps*, *ybhN*, *ybhC* 遺伝子を同定した。また増殖期の生菌率が低下していることもわかり、これも複数の遺伝子の欠損によるもので、やはり *dps* 遺伝子の欠損が原因の一つであることがわかった。*dps* 遺伝子についてはコードしている Dps (DNA Protecting protein under Starved conditions) タンパク質が、定常期において DNA と非特異的に結合して安定な「バイオクリスタル」と呼ばれるヌクレオプロテイン複合体を形成し、多くのストレスから DNA を保護していることが知られている。これまで外からのストレスに対する *dps* 遺伝子の機能については報告されていたが、今回 *dps* 遺伝子が直接増殖、生存に重要であることが明らかになった。

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 3 件)

- ① Inoue, A., Murata, Y., Takahashi, H., Tsuji, N., Fujisaki, S., and Kato, J., Involvement of an essential gene, *mviN*, in murein synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**: 7298-7301. 2008 査読有
- ② Mizoguchi, H., Sawano, Y., Kato, J., and Mori, H. Superpositioning of

deletions promotes growth of *Escherichia coli* with a reduced genome. DNA Research **15**: 277-284. 2008 査読有

- ③ Kato, J. and Hashimoto, M. Construction of consecutive deletions of the *Escherichia coli* chromosome, Mol. Syst. Biol. **3**: Article number 132, 2007 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① Kato, J. (2009) Construction of *Escherichia coli* long chromosomal deletion mutants and genome minimization. The 82nd Annual Congress of Japanese Society for Bacteriology (名古屋).
- ② 加藤 潤一、本多 弘典、大森 拓磨、金 景順、蔡 安蓉、橋本 昌征、樽谷 愛理 (2009) 大腸菌染色体大規模欠失株の作製と解析. 第3回日本ゲノム微生物学会年会 (東京).
- ③ 加藤 潤一、本多 弘典、大森 拓磨、金 景順、蔡 安蓉、橋本 昌征、樽谷 愛理 (2008) 大腸菌の染色体大規模欠失変異株の作製とその性質. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (神戸).
- ④ 立川智章、加藤潤一 (2008) 大腸菌の外膜タンパク質の膜局在化に必須な *yfiO* 遺伝子の遺伝学的解析. 第2回日本ゲノム微生物学会年会 (大阪)
- ⑤ 加藤潤一、本多 弘典、馬鳥裕史、橋本昌征、金景順 (2008) 大腸菌の染色体大規模欠失変異株の作製とその性質. 第2回日本ゲノム微生物学会年会 (大阪).
- ⑥ 立川智章、加藤潤一 (2007) 大腸菌の外膜タンパク質の膜局在化に必須な *yfiO* 遺伝子の遺伝学的解析. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 (横浜)
- ⑦ 加藤潤一、本多 弘典、馬鳥裕史、橋本昌征、金景順 (2007) 大腸菌の染色体大規模欠失変異株の作製とその性質. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 (横浜).

[図書] (計 1 件)

Kato, J. and Hashimoto, M. (2008) Construction of long chromosomal deletion mutants of *Escherichia coli* and minimization of the genome. Methods in Molecular Biology (Microbial Gene Essentiality - Protocols and Bioinformatics) **416**: 279-293. (Osterman, A. L. and Gerdes, S. Y. (ed.), Humana Press, Totowa, New Jersey)

[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

<http://dept.biol.metro-u.ac.jp/lab0.asp?ID=molgen>

データベース

<http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/index.jsp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 潤一 (KATO JUN-ICHI)

首都大学東京大学院理工学研究科・准教授  
研究者番号：10194820

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし