

平成 21 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19580094  
 研究課題名 (和文) 枯草菌アルカリプロテアーゼ遺伝子 *aprE* におけるグローバルな発現制御  
 研究課題名 (英文) Global Regulation of expression of the *Bacillus subtilis aprE* gene encoding the extracellular alkaline protease  
 研究代表者  
 田中 暉夫  
 東海大学・海洋研究所・教授  
 研究者番号：10236606

## 研究成果の概要：

土壌や根圏に生息する微生物である枯草菌は細胞外に多量の蛋白質分解酵素であるプロテアーゼを分泌する。プロテアーゼの役割は、細胞の周辺にたまたま存在する動植物の破片やその細胞内容物に含まれるタンパク質をアミノ酸またはペプチドにまで分解し、細胞に取り込まれる形にするものと考えられる。しかし、枯草菌は必要な時にだけ、すなわち、栄養が不足した時にだけプロテアーゼを分泌する。本研究は、このような制御のメカニズム解明を試みた。その結果、グルタミン合成酵素が細胞内の栄養（窒素源）状態を感知し、その制御下にある種々の転写制御因子をコントロールしてプロテアーゼの産生を制御しているという結論を得た。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：枯草菌、アルカリプロテアーゼ、*aprE* 遺伝子、*scoC* 遺伝子、*glnA* 遺伝子、*tnrA* 遺伝子、*degR* 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

枯草菌は菌体外に複数個のプロテアーゼを産生するが、主要なものは中性 (*nprE* 遺伝子産物) およびアルカリプロテアーゼ (*aprE* 遺伝子産物) である。その内、研究の歴史が古く、より遺伝子発現レベルで研究が進んでいるのがアルカリプロテアーゼである。*aprE* は、培地の栄養状態が良く対数的に増殖している時にはほとんど発現しないが、枯渇して細胞増殖が停滞する静止期に入ると発現する

ようになる。すなわち、細胞内の栄養の枯渇を反映して *aprE* の発現がコントロールされているように思われる。このことは *aprE* 発現が正にも負にも制御されているという過去の研究からも類推される。制御因子として *aprE* の転写開始点付近に結合し、その発現を直接制御しているのが負の因子として *ScoC*, *SinR*, *AbrB* があり、正の因子として *DegU* がある。増殖期には *AbrB* が働き、また、増殖期と静止期の中間を境に *ScoC* と *SinR* 細胞内

レベルが下がる。一方、DegUは増殖期の終わりから増え始める。このような現象から *aprE* の発現調節は説明されるが、何が原因でそれぞれの制御因子が働き始めるのかは不明であった。

## 2. 研究の目的

枯草菌は高分子タンパク質を取り込むことは出来ないが、アミノ酸またはオリゴペプチドまでに分解されれば取り込むことが出来る。枯草菌がプロテアーゼを産生する目的は、細胞内の窒素源が不足し菌体外に存在するであろうタンパク質を分解し利用しようとする手段ではないかと考えられる。この仮説が正しいか否かを検証するために、*aprE* を研究対象にし詳細な検討を行った。上記のように *aprE* 発現を、DNA に結合し直接制御しているのが ScoC, SinR, DegU および AbrB である。これらの因子が何をきっかけに作用するのか、また、どのようなメカニズムでなされるのかを解明するために本研究を行った。その結果、*aprE* の発現をコントロールしているのは細胞内で窒素源のセンサーとして働くと考えられているグルタミン合成酵素であろうという結論が得られた。

## 3. 研究の方法

本研究で使用した各種の方法は次の通りである。

### (1) 遺伝子発現量の測定方法

当該遺伝子の Open Reading Frame (ORF) またはその上流に *lacZ* 遺伝子を融合し、遺伝子の発現量を  $\beta$ -galactosidase の活性の多少で定量した。

### (2) 遺伝子の破壊

遺伝子破壊は当該遺伝子とその近隣の DNA を鋳型にし、PCR によって N 末と C 末領域の二つの DNA 断片を得た。また、挿入すべき薬剤耐性遺伝子を PCR で作製した。これら 3 本の DNA を両末端のプライマーを用いて再び PCR によって増幅し、真中に薬剤耐性遺伝子が入った DNA 断片を得た。調製した DNA 断片を宿主に導入し、遺伝子の破壊を行った。

### (3) promoter 領域の解析

調べる DNA 領域を PCR で増幅し *lacZ* 遺伝子に繋いで *amyE* 領域に挿入した。遺伝子の発現量は  $\beta$ -galactosidase 活性を測定することによって行った。また、直接 RNA 量を Northern 法でも解析した。

### (4) 転写開始点

primer extension 分析により行った。

## 4. 研究成果

### (1) *degU* 発現への窒素制御の関与

① *glnA* 破壊による *degU* と *comK* の発現上昇  
枯草菌の *degU* 遺伝子はその上流にある *degS* とともに 2 成分制御系を構成する。

DegU は DegS によりリン酸化されると *aprE* をはじめとする protease 産生に関与する遺伝子の転写を活性化する。また、非リン酸化型 DegU は、枯草菌が示す性質の一つで細胞外の DNA を取り込む competence という現象を促進する。これは competence の獲得に中心的な役割を司る *comK* という遺伝子の発現を促進することに起因する。上記の如く *aprE* は細胞外のタンパク質を分解して窒素源を獲得する手段と考えられるが、competence も同様に生息域に存在する DNA を取り込み分解して窒素源にすると考えてもおかしくない。

### ② *degU* 発現の窒素源による制御

*glnA* を blasticidin 耐性マーカー ( $Bs^r$ ) で破壊し *degU-lacZ* の発現を測定したところ著しく上昇していることが分った。同時に *comK-lacZ* の発現も上昇することから、*glnA* は Competence にも関与していることが立証された。*degU* の転写に関しては、*degS* 上流の promoter からの read through と *degU* 上流の未知 Promoter からの転写が知られていた。*degS-lacZ* の発現量から、*degS* 上流の promoter は影響を受けないことが分った。*degU* 上流の promoter に関しては、primer extension 法によって検討したところ、*degU* の上流には promoter が 2 つ存在し、この内上流側の promoter が *glnA* 破壊によって上昇することが判明した。*degS* 上流の promoter を P1、*degU* 上流の promoter を 5' 側からそれぞれ P2、P3 と命名した。*glnA* 破壊で転写レベルが上昇するのは P2 であることは、さらに種々の実験により確かめた。

P2 promoter は *glnA* を破壊すると活性が上昇するため窒素源に反応する promoter であることが予測された。そこで、培地に窒素源として有効な塩化アンモニウムを添加した場合と効率の悪いグルタミン酸を加えた場合の P2-*lacZ* の活性値を比較した。その結果、窒素源がグルタミン酸のみの乏しい条件下では P2-*lacZ* 発現が上昇することが証明され、本 promoter は窒素源の多少に反応する promoter であることが判明した。

### ③ P2 promoter 発現の非 DegU 依存性

*degU* の発現は DegU による autoregulation を受けることが知られている。P2-*lacZ* 発現について、*degU* 破壊の影響を検討したが破壊の影響は見られなかった。すなわち P2 は DegU の支配を受けないことが分った。

### ④ P3 promoter の DegU 依存性

*degU* を破壊すると P3-*lacZ* 発現の阻害が観察された。また、*glnA* 破壊による *degU* の発現上昇は *degS* を破壊した場合にも見られなかった。この事実は *glnA* 破壊に起因する *degU* 発現の上昇には DegS の存在、す

なわちリン酸化された DegU が必要であることを示している。

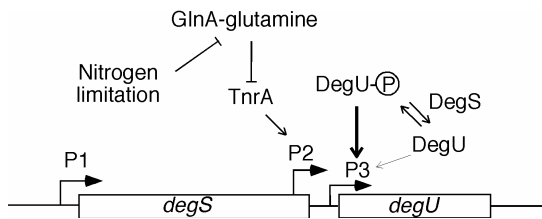
#### ⑤ *glnA*破壊による *degU*発現上昇の TnrA 依存性

窒素源が豊富な時に合成されるグルタミン (Gln) は GlnA と複合体を作り、さらに global な転写因子である TnrA と複合体を作って TnrA の機能を阻害することが知られている。したがって、*glnA* 破壊による *degU* 発現の上昇の場合にも、TnrA を介した制御が行われていると考えられる。事実、*tnrA* 遺伝子をあらかじめ破壊しておいた菌株での実験では、*glnA* 破壊による *degU* 発現の上昇は見られず、*degU* 発現は TnrA を介してなされることが明らかになった。

P2 promoter の上流には TnrA が作用すると考えられる塩基配列が存在する。この配列を変更すると *glnA* の破壊による *degU* 発現の上昇が観察されないことが判明し、この塩基配列に TnrA が結合し転写を制御していることが強く示唆された。

上記の結果を総合して図 1 のスキームに表される制御ネットワークが明らかになった。

図 1.



#### (2) Glutamine synthetase 遺伝子 (*glnA*) による *aprE* 発現の制御

*glnA* 遺伝子が *aprE* の発現を制御するか否かを調べるために、*aprE-lacZ* をもつ菌株に *glnA::Bs<sup>r</sup>* を挿入した。その結果、*aprE-lacZ* 発現が上昇することが分った。*glnA* を破壊した状態は図 1 から分かるように、GlnA-glutamine 複合体が極端に減少した状態、すなわち窒素飢餓が著しく進んだ状態と同等である。換言すれば窒素飢餓が *aprE* の発現を上昇させることになり、細胞内の窒素源の状態が protease の産生をコントロールしていることになる。

次に *glnA* 遺伝子がどのようなメカニズムで *aprE* の発現をコントロールしているのか詳細に検討した。(1) で述べたように *glnA* 破壊によって *degU* の発現が上昇することは判明しているので、他の DNA 結合制御因子の遺伝子発現への影響を調べた。その結果、*glnA* 破壊は *scoC* 発現を著しく減少させるが、*abrB* と *sinR* 発現には影響を与えないことが判明した。ここまでの結果を総合すると *glnA* 破壊は正の制御因子である *degU* の発現を上げ、負の制御因子である *scoC* の発現を下げ

ることによって *aprE* の発現を上げると考えられた。

#### ① *scoC* 発現への影響

図 1 の *degU* 発現への *glnA* 破壊の影響に見られるように、*glnA* の影響は TnrA という制御因子を通してターゲットに影響が及ぶ。このような GlnA と TnrA の関係は他の例でも知られている。本研究において、*scoC* への影響の場合も *tnrA* を破壊すると *glnA* の影響が無くなるので TnrA を介して *glnA* 破壊の影響が出ることを確認した。一方、*scoC* の発現制御を調べる上で転写開始点を知ることが必須であり、これを primer extension 法で決定した。その結果、-35 と -10 領域の塩基配列から *scoC* の転写は  $\sigma^{54}$  型の RNA polymerase で読まれることが分った。*scoC* promoter 領域のどの辺に GlnA を介した TnrA が作用するのかを調べるために、*scoC* 上流に種々の長さの欠失を導入し *scoC-lacZ* 発現を測定した。その結果、転写開始点の上流 -167 から -144 塩基の間にターゲットがあることが分った。この間の塩基配列には TnrA のターゲットと類似した配列が認められたため、これらの塩基に変異を導入したところ *glnA* 破壊の影響が見られなくなった。これらのことから GlnA は TnrA を介してそのターゲットに結合し、*scoC* 発現を抑制すると結論される。

#### ② *degU* 発現への影響

*glnA* 破壊の影響が *scoC* と *degU* を通じてなされるならば、*scoC* 破壊単独よりも *scoC glnA* 破壊株中の *degU* 発現量が多いので *aprE* 発現量が多いはずである。しかし、予期に反して後者の方がはるかに (1/2-1/3) 発現量は低かった。すなわち *scoC* 破壊株中では *glnA* 破壊によって *degU* の発現量が多いにもかかわらず *aprE* の発現量が低いことになる。この事実は DegU が細胞内に産生されても機能しないことを意味する。そこで、DegU の機能または作用に影響を与えることが考えられる 6 種の遺伝子 (*prob*, *degQ*, *degR*, *relA*, *tenA*, *rapG*; 図 2) の *lacZ* fusion を作製し、その発現を *glnA* 破壊株中で検討した。その結果、*degR-lacZ* の発現だけが著しく減少した。DegR はリン酸化 DegU からリン酸がはずれるのを阻害する作用を持つ、すなわち *aprE* の正の制御因子である。また、*degR* 破壊株中では *aprE* の発現が阻害されることは筆者らの研究から明らかになっている。従って、*glnA* 破壊株中では *scoC* 発現の減少によって *aprE* 発現は上がるが、DegU の脱リン酸化によって *aprE* の発現は下がることになる。前者の影響の方が強い場合全体では *aprE* の発現は上昇することになるであろう。この仮説が正しいことは、*scoC degR* 破壊株中では *glnA* 破壊の影響はもはや観

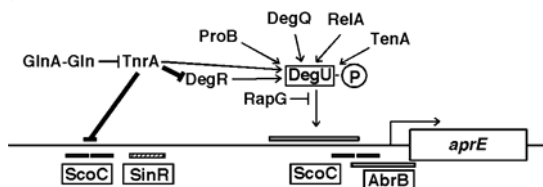
察されないことから明らかである。

③ *glnA* 破壊による *sigD* 遺伝子発現阻害  
*degR* は  $s^D$  型 RNA polymerase によって転写される。 $s^D$  は *sigD* 遺伝子産物である。そこで *sigD-lacZ* 発現への影響を *glnA* 破壊株中で調べたところ、強く阻害されることが判明した。すなわち、*glnA* 破壊株中では  $s^D$  の発現量が少なく、その結果 *degR* の発現量が低くなりリン酸化型 DegU の減少につながったと結論される。

$s^D$  型 RNA polymerase で転写される遺伝子に、鞭毛の構成タンパク質の遺伝子である *hag* がある。*hag-lacZ* 発現も予期した通り *glnA* 破壊により強く阻害された。

細胞内の窒素源が乏しくなった状態を *glnA* 破壊という環境下で再現した一連の研究結果から、貧窒素状態では ScoC の減少により protease が多く産生されるが鞭毛ができないという状態が想定される。これは protease を菌体外に出してタンパク質を分解している時は、その場を離れると栄養が取れないので鞭毛を作らないと考えれば説明がつく。一方、*glnA* 破壊によって DegU レベルが細胞内で上昇するが、DegR ができないためこれらの DegU は非リン酸化型 DegU であると思われる。非リン酸化型 DegU は competence に必要であるが、competence は細胞外にある DNA を取り込み分解して窒素源にする手段と考えれば目的性が理解できる。事実、*glnA* 破壊株中の *comK* 発現は上昇しており、形質転換頻度も上昇していることを観察している。

図 2



(3) グルコースによる *aprE* 発現へのカタボライト抑制

*aprE* の発現はグルコースを培地に加えると抑制される (catabolite repression) ことが知られている。この現象を *glnA* 破壊の *aprE* 発現への影響の項で述べたのと同様の方法で 4 つの転写因子について調べたところ、*scoC* と *degU* 発現の上昇が観察された。*scoC* 発現の上昇によって *aprE* 発現の減少がもたらされることは明らかである。

しかしながら、*degU* 発現の上昇は何をもたらすのであろうか。competence 能の獲得には *comK* の発現が必須であり、その発現には非リン酸化型 DegU が必要である。グルコースの存在下で *degU* 発現は上昇するが、上がって

も *aprE* 発現は減少するので、ここで産生される DegU は非リン酸化型であると考えられる。*degSU* オペロンの 3 つの Promoter についてグルコースによる発現上昇を調べたところ、P1 またはそれよりも上流からの転写が上昇し、P3 からの転写は減少、P2 の転写には変化がなかった。*aprE* 発現の増加には P3 からの転写が必要であることから、その減少が *aprE* 発現の減少につながったものと考えられる。また、グルコースによって P1 からの read through による転写で DegU レベルが上がっても、増産された DegS がグルコースの存在下ではリン酸化 DegU の脱リン酸酵素として働き、結果として *aprE* の発現レベルが下がるのかも知れない。

## 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 5 件)

1. Abe, S., Yasumura, A., and Tanaka, T. Regulation of *Bacillus subtilis aprE* expression by *glnA* through inhibition of *scoC* and  $s^D$ -dependent *degR* expression. J. Bacteriol. 191:3050-3058 (2009). 査読有
2. Ogura, M. and Tanaka, T. *Bacillus subtilis* late competence operon *comE* is transcriptionally regulated by *yutB* and under post-transcription initiation control by *comV* (*yrzD*). J. Bacteriol. 191:949-958 (2009). 査読有
3. Yasumura, A., Abe, S. and Tanaka, T. Involvement of nitrogen regulation in *Bacillus subtilis degU* expression. J. Bacteriol. 190:5162-5171 (2008). 査読有
4. Ogura, M., Ohsawa, T. and Tanaka, T. Identification of the sequences recognized by the *Bacillus subtilis* response regulator YrkP. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72:186-196 (2008). 査読有
5. Ogura, M., Tsukahara, K., Hayashi, K. and Tanaka, T. 2007. The NatK-NatR two-component system regulates expression of *nataB* operon encoding an ABC transporter for sodium ion extrusion. Microbiology 153:667-675 (2007). 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 安村彩子、阿部定信、田中暉夫、枯草菌グルタミン合成酵素遺伝子 *glnA* による *degU* 転写制御への *degR* の関与. 日本農芸化学会 2009 年度大会. 2009 年 3 月. 福岡.

2. 小倉光雄、田中暉夫．枯草菌の後期competenceオペロン*comE*のYutBとComNによる制御．日本農芸化学会2009年度大会．2009年3月．福岡．
3. 安村彩子、阿部定信、田中暉夫．枯草菌グルタミン合成酵素遺伝子による*degU*の転写制御．日本農芸化学会．2008年3月．名古屋．
4. Ogura, M., Tsukahara, K., Hayashi, K., and Tanaka, T. The NatK-NatR two-component system regulates expression of the *natAB* operon encoding an ABC transporter for sodium ion extrusion. 4th Conference on Functional Genomics of Gram-positive Microorganisms, 2007年6月 Pisa, Italy.

[図書] (計 1 件)

Tanaka, T. Regulation of the *Bacillus subtilis* alkaline protease gene, *aprE*, by many regulatory factors. p. 155-170. In Y. Fujita (ed.), Global regulatory networks in *Bacillus subtilis*. Transworld Research Network, Keraia, India (2007).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 暉夫 (TANAKA TERUO)  
東海大学・海洋研究所・教授  
研究者番号：10236606

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし