

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007-2008

課題番号：19770006

研究課題名（和文） 新奇 ppGpp 合成酵素の発見と機能解明

研究課題名（英文） Identification and functional analysis of novel ppGpp synthetase genes

研究代表者

七宮 英晃（NANAMIYA HIDEAKI）

愛媛大学・無細胞生命科学工学研究センター・助教

研究者番号：50366944

研究成果の概要：ppGpp（グアノシン四リン酸）は、アミノ酸等の栄養源枯渇に伴い合成される異常核酸であり、バクテリアや植物の増殖等を制御することが知られている。本研究では、グラム陽性細菌である枯草菌において、これまでに知られていた ppGpp 合成酵素とは異なる二種の ppGpp 合成酵素（YjbM, YwaC）遺伝子を新たに見出し、これらの遺伝子産物が ppGpp 合成酵素として実際に機能することを証明した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,300,000	360,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	360,000	3,490,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：枯草菌 / 緊縮応答 / グアノシン四リン酸（ppGpp） / RelA-SpoT ホモログ / 遺伝子発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

バクテリアや植物では、アミノ酸等の栄養飢餓条件に陥った際、細胞内にて ppGpp（グアノシン四リン酸）を合成する。合成された ppGpp は、DNA 複製や転写、翻訳に負に作用することにより、最終的に細胞増殖を停止させることが知られている。ppGpp 合成酵素は大腸菌 RelA および SpoT に類似するタンパク質であり、これら生物種にて広く保存されている。枯草菌をはじめとしたグラム陽性細菌では、この RelA-SpoT に相同な Rel タンパク質一種のみが知られていた。この Rel タンパク質は

ppGpp 合成のみならず ppGpp 分解活性も有する SpoT に類似すると考えられており、これ以外の ppGpp 合成酵素の存在は知られていなかった。しかし、枯草菌 *rel* 遺伝子破壊株では、ppGpp 合成能欠失の影響というよりむしろ ppGpp 分解活性不在に起因すると思われる表現型が見出されていた。つまり、*rel* 遺伝子欠失でありながら、ppGpp 合成が行われている可能性が考えられるなど、これまでに知られていない ppGpp 合成酵素の存在が示唆されていた。しかし、その詳細は不明なままであった。

## 2. 研究の目的

以上の背景から、枯草菌ゲノム塩基配列を精査したところ、既知の RelA-SpoT ホモログとは異なり、ppGpp 合成ドメインのみを有する二種の新奇 ppGpp 合成酵素遺伝子、*yjbM*、*ywaC* を見出した。本研究では、これらの遺伝子産物が実際に ppGpp 合成酵素として機能するか否かを調べる一方、その遺伝子破壊株がもたらす影響を解析し、各種ストレスに呼応した ppGpp 合成制御機構を解明することで、これら遺伝子産物の機能解明を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 新たに見出した ppGpp 合成酵素遺伝子、*yjbM* および *ywaC* をクローニングし、大腸菌 *relA* 遺伝子破壊株、もしくは *relA spoT* 二重遺伝子破壊株に導入し、*in vivo* における ppGpp 合成活性を検討した。

(2) YjbM タンパク質、および YwaC タンパク質をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて合成した。合成・精製した酵素を用いて、これらが実際に ppGpp 合成活性を有するか否かを *in vitro* にて検討した。

(3) *yjbM* および *ywaC* に関する遺伝子破壊株を構築する一方、*rel* 遺伝子 (枯草菌では *relA* 遺伝子) 破壊との三重遺伝子破壊株を構築し、増殖や細胞内 ppGpp 合成量、rRNA の転写制御に与える影響等について解析を行った。

(4) *yjbM* および *ywaC* の遺伝子発現制御機構について解析を行い、これまでに知られていないストレス条件下等における ppGpp 合成制御機構について調べた。

## 4. 研究成果

### <研究の主な成果>

(1) *yjbM*、*ywaC* 遺伝子の大腸菌への導入を検討した。その結果、特に *ywaC* 遺伝子については大腸菌 *relA* 遺伝子破壊株でのみ導入可能であった。*yjbM*、*ywaC* 遺伝子とも、大腸菌 *relA* 遺伝子破壊株において発現させると、両遺伝子発現に依存した ppGpp 合成をモニターすることができた。このことから、両遺伝子産物は細胞内にて ppGpp 合成活性を有することが判明した。

(2) YjbM、YwaC ともコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて精製タンパク質として取得することが出来た。ppGpp 合成酵素は

その酵素活性がバクテリア増殖に負に作用することが判明している。そのため、通常のタンパク質精製手法では両タンパク質とも精製困難である。一方、コムギ胚芽無細胞合成系では、タンパク質合成活性が ppGpp によって負に作用されないため、本系を導入することで初めて、これらの精製タンパク質を取得することが出来た。

これら精製タンパク質を用いて、ppGpp 合成活性を *in vitro* にて検討した結果、ppGpp 合成活性の検出に成功した。ただしその活性は YjbM のほうが有意に高く、YwaC は微量のみ合成するにとどまった (図 1)。活性の相違こそあれ、1) および 2) の結果は、今回見出した両遺伝子産物がいずれも ppGpp 合成酵素として機能することを証明する成果であった。

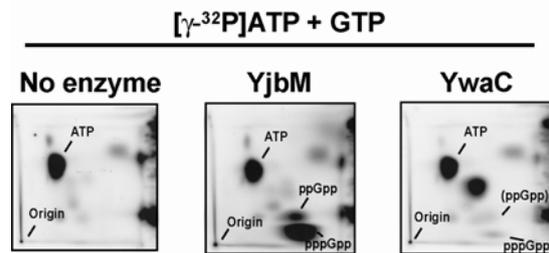


図 1. YjbM および YwaC の *in vitro* における ppGpp 合成活性。

(3) 枯草菌 *relA* 遺伝子破壊株では細胞増殖速度が野生株に比して低下していた。一方、*yjbM*、*ywaC* 遺伝子とも単独で遺伝子破壊可能であり、かつ、*relA yjbM ywaC* 三重遺伝子破壊株の構築も可能であった。さらに、この三重変異株では、*relA* 単独遺伝子破壊株が示す増殖遅延の影響を回復させることが判明した (図 2)。

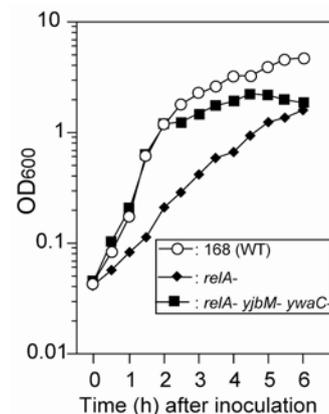


図 2 野生株 (168)、*relA* 遺伝子破壊株および *relA yjbM ywaC* 三重遺伝子破壊株の増殖曲線 (37°C, LB 培地)

*relA* 単独遺伝子破壊株では HPLC 解析で検出可能なレベルでの ppGpp 合成を示さないことから、両遺伝子産物による ppGpp 合成量は微小であることが予想される。しかし、*relA* 単独遺伝子破壊株の増殖遅延は、ppGpp 分解能のみを有する変異型 RelA タンパク質を発現させることでも回復可能であった。そのため、微量であれ *yjbM* および *ywaC* 遺伝子産物は細胞内 ppGpp 合成に寄与しているものと考えられる。

加えて、*relA* 単独遺伝子破壊株では rRNA 遺伝子の転写量も減少していること、および、その転写は *relA yjbM ywaC* 三重遺伝子破壊株にて回復していることが判明した (図 3)。分子遺伝学的解析から、*relA* 遺伝子破壊株より取得されるサプレッサー変異は *yjbM* および *ywaC* に集中して見出されることも判明したことから、細胞内における ppGpp 合成酵素はこれら三種に限定されることも明らかとなった。

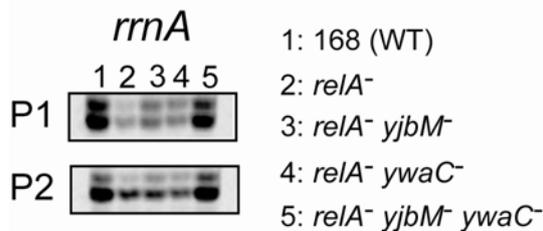


図 3 野生株、および各種 ppGpp 合成酵素遺伝子破壊株における rRNA の転写制御解析。*rrnA* オペロンに見出される二種のプロモーター (P1, P2) に関するプライマー伸長法解析結果を示す。

(4) (3) の結果から、*yjbM* および *ywaC* 遺伝子産物は、これまで提唱されていたアミノ酸飢餓等の影響枯渇条件以外にて機能する可能性が想起された。そこで両遺伝子の転写制御機構について調べたところ、とくに *ywaC* 遺伝子は外部環境変動に呼応して活性化する ECF (Extracytoplasmic Function) シグマ因子、SigM に依存して転写されることが判明した。さらに詳細な解析を行った結果、アルカリショック時に YwaC に依存した ppGpp 合成系が機能することが判明した。

<得られた成果の国内外における位置づけとインパクト>

以上の成果、および他生物種における全ゲノム塩基配列を解析した結果から、特にグラム陽性細菌には、YjbM、YwaC に代表される新奇 ppGpp 合成酵素が存在することが明らかと

なり、微生物学分野のトップジャーナル 2 誌にその成果を報告するに至った。本研究の実施期間中に、アメリカ・フロリダ大の研究グループにより、*S. mutans* を用いた類似研究が報告された (Mol. Microbiology. 2007. 65:1568-1581) が、これら新奇 ppGpp 合成酵素の酵素活性を実証したのは本研究が世界的にもはじめての例である。そのため、本成果である発表論文②は論文紹介機関である Faculty of 1000 にも紹介されるなど、国際的にも高く評価されている。

<今後の展望>

本研究では新奇 ppGpp 合成酵素の存在を明らかにすることが出来たが、これら合成酵素の生理学的意義については不明な点が数多く残されている。加えて、最近では ppGpp は細胞内における「セカンドメッセンジャー」として、バイオフィーム形成や感染菌の毒性等に関与することが多数報告されている。そのため、ppGpp 合成制御機構の全容解明は、グラム陽性細菌における ppGpp 合成制御系に重要な知見をもたらすのみならず、有用物質生産や感染防除といった産業利用分野への応用にも重要な知見をもたらすことが期待される。

#### 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 2 件)

- ① Natori Y, Tagami K, Murakami K, Yoshida S, Tanigawa O, Moh Y, Masuda K, Wada T, Suzuki S, Nanamiya H, Tozawa Y, Kawamura F. Transcription activity of individual *rrn* operons in *Bacillus subtilis* mutants deficient of (p)ppGpp synthetase genes, *relA*, *yjbM* and *ywaC*. *J. Bacteriol.* (2009) *in press*. (doi:10.1128/JB.00263-09) (査読有)
- ② Nanamiya H, Kasai K, Nozawa A, Yun CS, Narisawa T, Murakami K, Natori Y, Kawamura F, Tozawa Y. Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* (2008) 67:291-304. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 田上和美、平岡紘奈、松井直子、増田健太、吉田昌樹、黒岩晴子、黒岩常祥、七宮英晃、劉生浩、影山泰、荒克俊、尾崎克也、

河村富士夫「枯草菌における新奇 ppGpp 合成酵素 YwaC によるダイマーリボソーム形成の解析」、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009/3/27-29、マリンメッセ福岡・福岡市

- ② 田上和美、和田哲也、吉田昌樹、黒岩晴子、黒岩常祥、七宮英晃、戸澤譲、河村富士夫。「枯草菌における新奇 ppGpp 合成酵素 YwaC の機能解析」、日本遺伝学会第 80 回大会、2008/9/3-5、名古屋大学・名古屋市
- ③ Tagami K, Natori Y, Murakami K, Yoshida M, Kuroiwa H, Kuroiwa T, Nanamiya H, Tozawa Y and Kawamura F. Function analysis of (p)ppGpp synthetase genes, *relA*, *yjbM* and *ywaC*, in *Bacillus subtilis*. XX international congress of Genetics 2008, 2008/7/12-17, Berlin, Germany
- ④ 田上和美、名取陽祐、村上佳奈、吉田昌樹、黒岩晴子、黒岩常祥、七宮英晃、戸澤譲、河村富士夫。「枯草菌における新奇 ppGpp 合成遺伝子 *ywaC* の機能解析」、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008/3/26-29、名城大学・名古屋市
- ⑤ 七宮英晃、名取陽祐、河村富士夫、戸澤譲。「枯草菌における二種の新奇 ppGpp 合成酵素 (YjbM, YwaC) の機能解析」、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008/3/26-29、名城大学・名古屋市
- ⑥ 村上佳奈、名取陽祐、田上和美、七宮英晃、戸澤譲、河村富士夫。「枯草菌 *relA*, *yjbM*, *ywaC* 遺伝子が及ぼす rRNA オペロンの転写への影響」、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008/3/26-29、名城大学・名古屋市
- ⑦ 七宮英晃、名取陽祐、河村富士夫、戸澤譲。「枯草菌における二種の新奇 ppGpp 合成酵素 (YjbM, YwaC) の発見と機能解析」、第 30 回日本分子生物学会年会、2007/12/11-15、パシフィコ横浜・横浜市
- ⑧ 村上佳奈、名取陽祐、七宮英晃、戸澤譲、河村富士夫。「枯草菌 *relA*, *yjbM*, *ywaC* 遺伝子による rRNA オペロンの転写制御」、日本遺伝学会第 79 回大会、2007/9/19-21、岡山大学・岡山市

[その他]  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

七宮 英晃 (NANAMIYA HIDEAKI)

愛媛大学・

無細胞生命科学工学研究センター・助教

研究者番号：50366944

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし