

機関番号：32644

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008-2010

課題番号：20580084

研究課題名 (和文) 枯草菌の転写因子 DegU によるポリグルタミン酸の生産制御に関する研究

研究課題名 (英文) Studies on regulation of poly-glutamic acid production by *Bacillus subtilis* transcription factor DegU.

研究代表者

小倉 光雄 (OGURA MITSUO)

東海大学・海洋研究所・教授

研究者番号：80204163

研究成果の概要 (和文)：

γ ポリグルタミン酸は、枯草菌の近縁種である納豆菌のつくる粘りを持つ物質の本体であり、その合成酵素は *pgsB* 遺伝子にコードされている。この遺伝子の発現制御に多機能性転写因子 DegU が関わっていると予想し、その詳細の解明を目指した。DegU はリン酸化されて転写を活性化するが、DegU-P の *pgsB* 制御領域への結合部位を塩基レベルで解明した。また、*pgsB* を正に制御するには DegU-P の細胞内濃度が非常に高くなる事が必要と分かった。さらに、DegU-P を特異的に分解するプロテアーゼとして ClpCP 複合体を同定し、試験管内で、ClpCP が DegU-P を分解する事を示した。

研究成果の概要 (英文)：

Bacillus natto is a *B. subtilis*-related bacteria and produces sticky material, which is gamma polyglutamic acid (PGA). PGA is synthesized by PGA synthetase encoded by the *pgsB* gene. The regulation of *pgsB* involves the global-type transcription factor DegU. DegU is activated by phosphorylation. We determined the binding sites of DegU-P on the *pgsB*-control region. It was found that positive regulation of *pgsB* requires higher cellular concentration of DegU-P. Furthermore, ClpCP was indentified as a specific protease for DegU-P degradation. We confirmed that ClpCP degraded DegU-P in vitro.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成21年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4030,000

研究分野：微生物遺伝学

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、PGA、転写制御、能動的タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

(1) PGA 合成酵素遺伝子 *pgsB* は、すでに同定されており、その制御因子として SwrA と DegU

の2つが必要である事は判明していた。しかし、それらの作用メカニズムは全く不明であった。SwrA は swarming motility の制御因子として同定されていたが、その作用機構は現

在でも未解明である。DegQ はおそらく DegU の何らかの機能を亢進させる因子であると想像されていたが、現在では DegU のリン酸化を亢進させる事が判明している。枯草菌の持つ2成分制御系のレスポンスレギュレーター-DegU は、枯草菌の motility、外来 DNA 取り込み能、分泌性プロテアーゼ生産、バイオフィーム形成、ポリグルタミン酸合成などを制御するグローバルな制御因子である。報告者は、それらの背景から、DegU-P が *pgsB* に直接結合し、その発現を正に制御しているのではないかと予想し、それを確認するための実験を行う事とした。遺伝子発現の制御メカニズム解明から、PGA 生産性の向上を目指すためである。それまで、PGA の生産性改良はランダム変異をかけ高生産株を選択する、あるいは培地条件、培養条件を改良するなどの伝統的方法によるものしかなかった。

(2) 細胞内における能動的な、すなわち、ATP のエネルギーを使ったタンパク質分解は、原核生物と真核生物の双方において重要な制御機構であるとの認識が一般化していた。その中でも転写因子の能動的分解は転写制御の重要な局面である。グラム陽性菌では、そのような ATP 依存性細胞内プロテアーゼは、ClpCP, ClpXP, ClpEP などが知られていた。ClpXP が転写因子 Spx を、ClpCP が転写因子 ComK を分解する事が明らかにされていた。

2. 研究の目的

PGA の生産をコントロールするために、その制御メカニズムの詳細を明らかにする事は重要である。*pgsB* 遺伝子発現制御に直接働くのは DegU-P であり、DegU-P の高い細胞内濃度を実現するために、更なる制御因子が必要であると考えられる。そのため、DegU-P の *pgsB* 制御領域への結合の詳細を明らかにし、さらに、DegU-P の細胞内濃度を高めるためのメカニズムについて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) DegU を大腸菌を用いて高発現させ、親和性クロマトグラフィーにより精製し、DNase I footprint 実験や EMSA などの DNA 結合性タンパク質の性質を解明する実験に用いた。

(2) *lacZ* fusion に点突然変異等を導入するには、オリゴヌクレオチドを用いた PCR を駆使した。

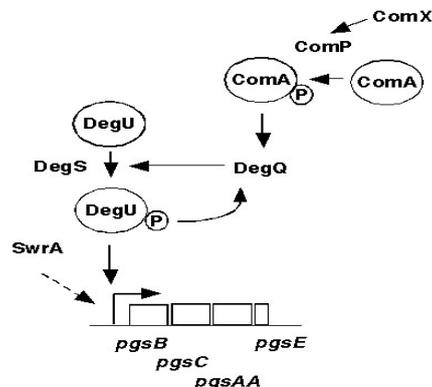
(3) PGA の定量は、培養液から粗精製した試料を電気泳動し、標品と比較して行った。

(4) DegU の ClpCP による in vitro タンパク

分解実験は、以下のように行った。各構成タンパク質を精製した後に混合、ATP を加えて加温し、一定時間ごとに試料を採取し、SDS-PAGE にて定量した。

4. 研究成果

(1) γ ポリグルタミン酸合成酵素をコードする *pgsB* の Campbell 型 *lacZ* fusion を作製して実験室菌株に導入したが、実験室株では *swrA* と *degQ* に変異があるので、*pgsB* は発現しなかった。*degQ* と *swrA* を実験室菌株に導入すると、PGA 生産が起きることが既に知られている。そこで、多コピー *degQ* と野生型 *swrA* を導入した実験室株を作製、*pgsB-lacZ* を導入してその発現を確認したところ、*pgsB-lacZ* 転写は 1000 ミラー単位を超えた。この株をグルタミン酸を含む PGA 生産培地で培養し、PGA 生産を確かめたところ、6 g/L 程度生産した。そこで、DegU のリン酸化を亢進させる変異として知られている *degU32* と *swrA* あるいは *degU32* 単独で *pgsB-lacZ* 発現と PGA 生産がどの程度起きるかを検討した。この実験の狙いは、*pgsB* 遺伝子発現と PGA 生産が比例して増大しているかどうかを調べる事であった。その結果、転写自体は *degU32* 単独で起きたが (およそ 100 ミラー単位)、検出可能な水準の PGA は生産されなかった。PGA の生産制御：



タンパク質と遺伝子の相互作用

degU32 と *swrA* が共存した場合、*pgsB* 転写は *degU32* 単独の場合に比べて3倍程度になり、PGA も 5g/L 程度生産した。従って、PGA 生産には、*swrA* が *pgsB* 転写以外の何らかの理由で必須である事が分かった。

(2) *pgsB* が発現する条件で、プライマー伸張法により、転写開始点を決定した。その上流の塩基配列を調べたところ、主要 σ 因子によって転写されるタイプのプロモーターである事が判明した。His タグ DegU を用いた DNA 結合実験で、DegU は *pgsB* プロモーターの-35 領域のすぐ上流に特異的に結合した。転写開

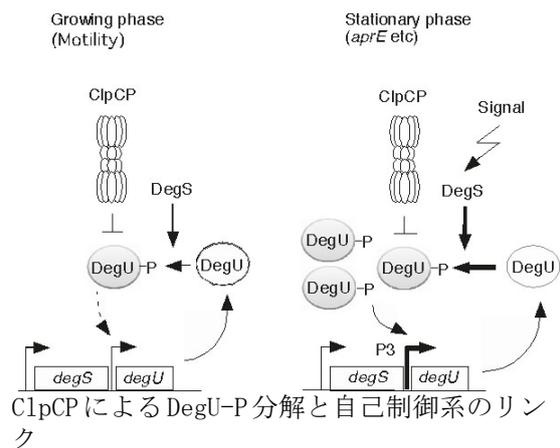
始点より上流-44から-39塩基を取り除くと、DegUの *pgsB* への結合と *pgsB-lacZ* 発現がなくなったので、DegUは *pgsB* の直接の活性化因子である事が判明した。

従って、*pgsB* 発現の制御機構を理解するためには、DegU自身の発現制御を理解する事が重要である。DegUはDegU-Pで活性化されることが最近明らかにされているので、まず、*degU* 制御領域のどこにDegU-Pが結合するのかを調べる事にした。

(3) footprint 実験と点変異プロモーターを持つ *lacZ* fusion を用いて、DegU-Pの *degU* 遺伝子自身に対する結合部位を明らかにした。Footprint解析で、DegU-Pのみが転写開始点上流-106から-75塩基に強く、-72から+7領域に強く結合した。前者も後者も、DegU標的配列GNCATTTAのdirect repeat、それぞれDR1とDR2と定義、を含んでいた。EMSA分析で、これらの領域のDegU-Pに対する結合親和性を測定したところ、DR1はDegU-Pに対する親和性が弱く、DR2は高かった事は、footprint実験の結果と良く一致した。次に、各種の点変異や欠失を持つ *degU-lacZ* を染色体 *amyE* 部位に導入した菌株を作製した。これらを用いて、野生型 *degU* とリン酸化が亢進する変異型タンパク質をコードする *degU32* 変異の2種の遺伝的背景でLacZ解析を行った。その結果、DR1は野生型DegUのもとでは *degU* 転写に貢献せず、DegU32にのみ応答した。この事はDR1のDegU-Pに対する親和性が低い事と良く一致した。DR2は双方の遺伝的背景で *degU* 転写に重要だった。また、DR2に点変異を持つように染色体上の *degU* プロモーター領域を改変した菌株を作製し、*degU* 転写を測定したところ、ほとんど発現していなかった。この事はDR2の *degU* 転写における重要性を示している。

(4) *degU-lacZ* の発現解析と抗DegU抗体を用いたタンパク量の測定から、DegU-Pが選択的に分解されている可能性が示唆された。DegU-P分解に関わるプロテアーゼを特定するため、各種の内因性プロテアーゼ遺伝子破壊株におけるDegUタンパク質量を測定し、ClpCPをその候補として見いだした。培養液にクロラムフェニコールを添加する事により、細胞内のタンパク合成を停止させると、DegUタンパク質は1時間でほぼ分解されたが、*c1pP*、*c1pC*破壊株では安定であった。さらに、DegUのリン酸化部位を別のアミノ酸に置換した株では、DegUタンパクは安定化されたので、DegU-Pが選択的に分解されていることが強く示唆された。ところで、DegUは自己自身による制御系のループの中にある。つまり、DegU-P分解は自己制御系の修飾メカニズムとして働いている事になる。この点を図に

示した。



次に、DegU分解のメカニズムについて解析した。DegUをIPTG依存的に発現させる系を用いて、N末端側のアミノ酸とC末端側のアミノ酸あわせて10残基をそれぞれ側鎖の短いアラニン残基に置換した変異型DegUを枯草菌に発現させた。この系で発現した変異DegUの中から、ClpCPプロテアーゼに抵抗性のDegUをWestern解析にて検索した。その結果、N末端側のアミノ酸変異(V4AとN5A)によりタンパク安定性が増大した。この変異型DegUを持つ菌株はDegUが制御する形質の一つである運動性(swimming motility)が増大していた。

(5) ClpC, ClpP及びアダプタータンパク質MecAを含むin vitro系にDegSによりリン酸化したDegUを加えたところ、経時的に分解されて行く事を見いだした。リン酸化されていないDegUは、殆ど分解されなかった。

(6) 上記の成果は、PGA生産制御に関しては論文3に、DegU遺伝子自体の自己制御系とClpCPによる分解については論文2に発表した。

①PGA生産の培地条件検討による生産性制御に関する研究は、いろいろの菌株を用いて行われ、その結果が報告されているが、それらの結果を制御系全体の観点から解釈できる基盤を明らかにした事は意義が大きい。また、PGA生産には、SwrAが必要で、この因子の性質は依然未解明であるが、DegUとの関連性を示す状況証拠が蓄積しつつある。その観点では、SwrA制御遺伝子の一つである *pgsB* に直接DegU-Pが結合する事を示した意義は大きい。

②特に転写因子DegUがリン酸化されたときに選択的に分解される事の発見は、それまで知られていなかったタイプの制御であり、大

きなインパクトをこの分野に与えたと考えられる。そのため、微生物を用いた分子生物学分野の top journal に発表する事ができた。今後、このような選択的タンパク分解による遺伝子発現制御の例が発見されてくる事が期待される。

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 5 件)

1. Ogura, M., Tsukahara, K., and Tanaka, T. (2010) Identification of the sequences recognized by the Bacillus subtilis response regulator YclJ. Arch. Microbiol, 192, 569-580. 査読有り

2. Ogura, M., and Tsukahara, K. (2010) Autoregulation of the Bacillus subtilis response regulator gene degU is coupled with the proteolysis of DegU-P by ClpCP. Mol. Microbiol, 75, 1244-1259 査読有り

3. Ohsawa, T., Tsukahara, K., and Ogura, M. (2009) Bacillus subtilis response regulator DegU is a direct activator of pgsB transcription involved in g-poly-glutamic acid synthesis. Biosci. Biotech. Biochem. 73, 2096-2102. 査読有り

4. Ogura, M., and Tanaka, T. (2009) Bacillus subtilis late competence operon comE is transcriptionally regulated by yutB and under post-transcription initiation control of comN (yrzD). J. Bacteriol., 191, 949-958. 査読有り

5. Tsukahara, K., and Ogura, M. (2008) Characterization of DegU-dependent expression of bpr in Bacillus subtilis. FEMS Microbiol. Lett., 290, 8-13. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

1. 小倉 光雄 枯草菌のswarming motilityに必要なDegU依存性遺伝子ycdA. 第5回日本ゲノム微生物学会 2011. 3. 15 東北学院大学・仙台

2. 小倉 光雄 枯草菌転写因子DegUによるmotilityの制御 第4回日本ゲノム微生物学会 2010. 3. 7 九州大学百年記念講堂

3. 小倉 光雄 Bacillus subtilis swarming motility: ycdA and yukE are regulated by DegU-P and SwrA. 第33回日本分子生物学会 2010. 12. 7 神戸国際会議場

4. 小倉 光雄 枯草菌の後期competenceオペロンcomEのYutBとComNによる制御 平成20年度日本農芸化学学会年会 2009. 3. 27 福岡国際会議場

5. 小倉 光雄 Phosphorylated form of Bacillus subtilis response regulator DegU is degraded by ClpCP protease. 第32回日本分子生物学会 2009. 12. 10 パシフィコ横浜

6. 小倉 光雄 枯草菌DegU自己制御系とその負の制御因子ClpCPプロテアーゼ. 第31回日本分子生物学会 2008. 12. 10 神戸国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小倉 光雄 (OGURA MITSUO)
東海大学・海洋研究所・教授
研究者番号: 80204163