

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20780064  
 研究課題名（和文） 枯草菌におけるオートインデューサー「ネオトレハロサジアミン」の機能解明  
 研究課題名（英文） Investigation of the role of an autoinducer neotrehalosadiamine in *Bacillus subtilis*.  
 研究代表者  
 稲岡 隆史 (INAOKA TAKASHI)  
 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・主任研究員  
 研究者番号：40391205

研究成果の概要（和文）：網羅的転写解析により *glcP* 遺伝子の破壊が引き起こす効果を調査した結果、*glcP* 遺伝子破壊により 13 遺伝子の発現に著しい変化が観察された。この現象は NTD を合成できない変異株では起こらないことから、*glcP* 遺伝子破壊によって起こる遺伝子発現の変化は NTD 合成経路の活性化に依存して起こることを示している。これらの知見は、GlcP が NTD 合成遺伝子を抑制することにより、これら 13 遺伝子の発現調節に関与していることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：*Bacillus subtilis* GlcP negatively regulates a neotrehalosadiamine (NTD) biosynthesis operon. Here, we investigated, by use of transcriptome, the effect of *glcP* disruption on gene expression. As the result, the *glcP* disruption was found to cause significant differences in the expression of 13 genes. This effect was, however, completely negated in a mutant lacking the ability to synthesize NTD, indicating that GlcP-promoted regulation was exerted depending on *de novo* NTD synthesis. Our findings suggest that GlcP participates in regulation of certain genes by repressing the NTD biosynthesis operon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：オートインデューサー、グルコーストランスポーター、二次代謝、遺伝子発現、メタボローム、枯草菌

## 1. 研究開始当初の背景

NTD は、枯草菌野生株では極微量（～1 µg/mL）生産しているにすぎないが、我々の

提唱する微生物の潜在機能開発手法によって RNA ポリメラーゼに変異を導入した結果、その生産性が劇的に向上（500 µg/mL）し

た抗生物質であり、NTD 自身がその生合成遺伝子の発現を活性化するオートインデューサーとして機能している。二次代謝経路は通常、生産菌の生育には必須ではなく、それら遺伝子はゲノム中で最も不安定な領域であるが、NTD 生産能は枯草菌だけでなく納豆菌や *B. circulans*, *B. pumilus* においても確認されており、二次代謝産物としては極めて異例である。これらの事実を鑑みれば、NTD が重要な生理機能を担う菌体外シグナルとして作用していることは容易に想像できる。提案者は、そのような着想の基に研究を推進した結果、グルコーストランスポーターGlcPをコードする遺伝子がNTD 生合成遺伝子と共に発現しており、GlcPによるグルコース取り込み系がNTD 生合成遺伝子の発現を負に制御している事実を発見するに至った。現在、様々な微生物のオートインデューサーが知られているが、グルコース取り込み能を直接制御するオートインデューサーは例が無く、本研究は正に微生物の代謝制御へ向けた実用化研究のブレークスルーとなりうる。なぜなら、微生物の代謝経路は解糖系を中心に据えており、グルコースの取り込みを人為的に制御することは代謝経路のボトルネックを開放することに繋がるからである。

## 2. 研究の目的

本研究では、2年間でNTDにより制御されるグルコース取り込み系 GlcP とそれに付随する遺伝子群を同定して、NTD が関与する遺伝子発現制御機構の全体像を明らかにするとともに、既知のカタボライト制御機構との関連性を明確にする。また、分子生物学的解析を駆使してNTD 生合成遺伝子の発現制御機構解明にも取り組む。更に、これら基礎的知見を統合し、NTD を活用した人為的代謝制御の基盤技術を整備する。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用菌株

本研究に使用した菌株は表1に示した。グルコーストランスポーターGlcPをコードする *glcP* 遺伝子破壊株 TI214 ( $\Delta glcP::spc$ ) は、*glcP* 遺伝子のORF内にスペクチノマイシン耐性遺伝子 (*spc*) を挿入して作製した。*glcP* 誘導株 TI168 (*ntdABC*-pMutinT3-*glcP*) は、*glcP* 遺伝子にpMutinT3を挿入することにより作製した。この株では、*glcP* 遺伝子の発現はIPTGの添加によって誘導することができる。また、このTI168株のNTD生合成遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*) で破壊した TI172 株 (*ntdABC::cat*-pMutinT3-*glcP*) も作製した。*lacZ* レポーター株の作製の為、*alsS* 及び *licB*, *yyaH* 各遺伝子の上流領域 (それぞれ 495 bp, 487 bp, 217 bp) をPCRで増幅し *amyE*

への挿入用プラスミドpDL2にクローニングし、枯草菌61884株の *amyE* 遺伝子に挿入した。

表1 使用菌株

Strain	Genotype
61884	<i>trpC2 aspB66</i>
62019	$\Delta ilvB$ <i>kauA1 guaA3</i>
QB944	<i>trpC2 purA16 cysA14</i>
TI122	61884 <i>amyE::</i> ( $P_{ntdABC}$ - <i>lacZ cat</i> )
TI168	61884 <i>ntdABC</i> -pMutinT3- <i>glcP</i> ( $P_{spac}$ - <i>glcP</i> )
TI172	61884 <i>ntdABC::cat</i> -pMutinT3- <i>glcP</i> ( $P_{spac}$ - <i>glcP</i> )
TI214	61884 $\Delta glcP::spc$
TI216	61884 <i>amyE::</i> ( $P_{alsS}$ - <i>lacZ cat</i> )
TI217	61884 <i>amyE::</i> ( $P_{licB}$ - <i>lacZ cat</i> )
TI218	61884 <i>amyE::</i> ( $P_{yyaH}$ - <i>lacZ cat</i> )
TI219	61884 $\Delta glcP::spc$ <i>amyE::</i> ( $P_{alsS}$ - <i>lacZ cat</i> )
TI220	61884 $\Delta glcP::spc$ <i>amyE::</i> ( $P_{licB}$ - <i>lacZ cat</i> )
TI221	61884 $\Delta glcP::spc$ <i>amyE::</i> ( $P_{yyaH}$ - <i>lacZ cat</i> )
TI265	<i>trpC2 guaA3 amyE::</i> ( $P_{ntdABC}$ - <i>lacZ cat</i> )
TI266	<i>trpC2 purA16 amyE::</i> ( $P_{ntdABC}$ - <i>lacZ cat</i> )

### (2) グルコース取り込み能の測定

枯草菌を対数増殖期 (OD=0.5) まで培養後、トリス緩衝液 (pH7) で洗浄し、同緩衝液に懸濁した。細胞懸濁液を37°Cで保温し、<sup>14</sup>Cラベルしたグルコースを終濃度0.1mMになるよう添加した。フィルター濾過により菌体を回収し、トリス緩衝液で洗浄後、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。

### (3) 遺伝子発現におけるGlcPの効果

#### ① DNAマイクロアレイによる *glcP* 遺伝子破壊株の網羅的転写解析

*glcP* 破壊株 TI214 ( $\Delta glcP::spc$ ) と野生株 61884 を定常期初期 (OD=1.5) まで培養後、集菌し、Isogen (日本ジーン社) を用いてRNAを調整した。DNAマイクロアレイ及び枯草菌 ORF 特異的プライマーセットはEurogentec社より購入し、逆転写反応はSuperScriptII (Invitrogen社) を用いて行った。マイクロアレイはScanArray 5000 マイクロアレイリーダー (GSI Lumonics社) を用いてスキャン後、各シグナル強度はMicroArray Suite v. 3.5 (Scanalytics) を用いて決定した。データはKEGG EXPRESSION database (<http://www.genome.jp/kegg/expression/>) に登録した。

#### ② DNAマイクロアレイ解析結果の検証

マイクロアレイ解析から推定された候補遺伝子について、定量リアルタイムPCR解析又は *lacZ* レポーター遺伝子を用いてマイクロアレイの結果を検証した。また、*glcP* 誘

導株 TI168 (*ntdABC*-pMutinT3-*glcP*) を用いて、この効果が *glcP* 欠損に伴うものかどうかを確認した。さらに、この *glcP* 誘導株 TI168 の NTD 生合成遺伝子を破壊した TI172 (*ntdABC::cat*-pMutinT3-*glcP*) 株でも同様の条件で比較した。定量リアルタイム PCR 装置はアプライドバイオシステムズ社製 7300 リアルタイム定量 PCR システムを用いた。

(4) NTD 生合成遺伝子の転写制御機構の解析  
NTD 生合成遺伝子プロモーター領域と *lacZ* 遺伝子を連結した  $P_{ntdABC}$ -*lacZ* を *amyE* 領域に持つ TI122 を対数増殖期後期まで培養し、遠心にて集菌後、培地に再懸濁した。再懸濁培地は必要に応じてグルコース濃度を低濃度 (0.01%) に変化させた。細胞を再懸濁すると同時にデコニン (2mM) のみ、又はデコニン及びグアノシン (各 2mM) を添加し、サンプリング後、 $\beta$  ガラクトシダーゼ活性を測定した。また、実際の *ntdABC* の発現を確認する為、同様の実験を行った細胞から RNA を抽出し、*ntdB* 遺伝子をプローブとした RNA ドットプロット法にて発現を確認した。

(5) *glcP* 遺伝子破壊のメタボローム解析

*glcP* 遺伝子破壊株 TI214 及び野生株 61884 を用いて、対数増殖期 (OD<sub>650</sub>=0.5) の細胞内代謝産物を野生株と比較した。代謝産物の一斉解析はヒューマンメタボロームテクノロジー社にて行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) グルコース取り込みにおける *GlcP* の効果

本研究では、まず、グルコーストランスポーター *GlcP* をコードする *glcP* 遺伝子を破壊した TI214 ( $\Delta glcP::spc$ ) を作製した。この株は、当該遺伝子へのトランスポゾン挿入により得られた以前の変異株と同様、過剰な NTD 生産 (800  $\mu$ g/mL) を示した。グルコーストランスポーター *GlcP* の破壊によるグルコース取り込み能への影響を調査したが、野生株 61884 と比較して顕著な取り込み能の低下は観察されなかったことから、*GlcP* の機能はグルコースの取り込みというよりはむしろ、培地中のグルコース濃度に応じて NTD 生合成遺伝子の発現を調節することにあると考えられる。

##### (2) *glcP* 遺伝子破壊に伴う NTD 過剰生産が遺伝子発現に及ぼす影響

*GlcP* 機能欠損に伴う NTD 過剰生産が遺伝子発現に及ぼす影響を調査するため、*glcP* 遺伝子欠損株 TI214 と野生株 61884 を用いて、マイクロアレイによる網羅的転写解析を行っ

た。その結果、*glcP* 遺伝子の破壊により *alsSD* (アセトイン合成遺伝子) 及び *maeN* (リンゴ酸トランスポーター) の発現は低下し、*ntdABC* の他、*licBCAH* (リケナントランスポーター) や機能未知遺伝子 *yyaHmaa* 及び *yyaJ* の発現が増加することが判明した (表 2)。

表 2 *glcP* 遺伝子破壊株における遺伝子発現の変化

Gene (Synonym)	Gene organization	Function	Ratio ( $\Delta glcP$ /wt) in	
			Microarray	RT-qPCR
$\Delta glcP < wt$				
<i>alsD</i>	<i>alsSD</i>	acetolactate synthase	0.246 $\pm$ 0.080	ND <sup>b</sup>
<i>alsS</i>	<i>alsSD</i>	acetolactate decarboxylase	0.190 $\pm$ 0.075	0.277 $\pm$ 0.018
<i>maeN</i> ( <i>yujR</i> )	<i>maeN</i>	Na <sup>+</sup> /malate symporter	0.284 $\pm$ 0.218	0.479 $\pm$ 0.098
$\Delta glcP > wt$				
<i>licA</i>	<i>licBCAH</i>	lichenan-PTS IIA component	3.16 $\pm$ 2.47	ND
<i>licB</i>	<i>licBCAH</i>	lichenan-PTS IIB component	3.27 $\pm$ 0.33	18.5 $\pm$ 4.84
<i>licC</i>	<i>licBCAH</i>	lichenan-PTS IIC component	4.95 $\pm$ 0.73	ND
<i>licH</i>	<i>licBCAH</i>	6-phospho- $\beta$ -glucosidase	7.95 $\pm$ 1.83	ND
<i>ntdA</i> ( <i>yhjL</i> )	<i>ntdABC</i>	NTD biosynthesis	171 $\pm$ 94	347 $\pm$ 126
<i>ntdB</i> ( <i>yhjK</i> )	<i>ntdABC</i>	NTD biosynthesis	93.9 $\pm$ 48.6	ND
<i>ntdC</i> ( <i>yhjJ</i> )	<i>ntdABC</i>	NTD biosynthesis	118 $\pm$ 57	ND
<i>yyaH</i>	<i>yyaH-maa</i>	similar to lactoylglutathione lyase	10.3 $\pm$ 3.3	18.8 $\pm$ 1.7
<i>maa</i> ( <i>yyaI</i> )	<i>yyaH-maa</i>	probable maltose o-acetyltransferase	13.9 $\pm$ 3.0	ND
<i>yyaJ</i>	<i>yyaJ</i>	probable transporter	8.06 $\pm$ 3.60	4.45 $\pm$ 1.55

これら遺伝子発現の変化は、各オペロンの先頭遺伝子について定量リアルタイム PCR 解析を実行することにより確認した (表 2)。さらに、*alsS* 及び *licB*、*yyaH* 遺伝子については各上流領域を *lacZ* 遺伝子に連結したレポーター株を用いた解析でも確認できた (図 1)。

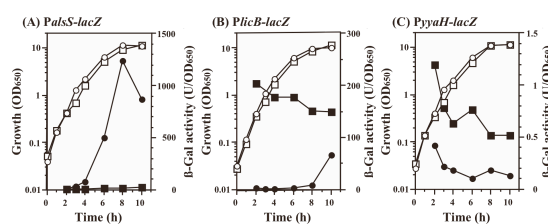


図 1  $P_{alsS}$ -*lacZ*(A) 及び  $P_{licB}$ -*lacZ*(B)、 $P_{yyaH}$ -*lacZ*(C) の発現における *glcP* 遺伝子破壊の影響

●: *glcP*<sup>+</sup> ■:  $\Delta glcP::spc$

さらに、*glcP* 遺伝子の発現を IPTG で誘導することができる TI168 株を作製し、*glcP* 誘導 (IPTG 添加) 又は非誘導 (IPTG 無添加) 条件下で培養した細胞を用いて、定量リアルタイム PCR 解析したところ、*glcP* 非誘導条件下では *glcP* 欠損と同様の効果を観察する事が

できた (表 3)。しかしながら、この *glcP* 誘導株の NTD 生合成遺伝子を欠損させた TI172 株では、TI168 株で観察された遺伝子発現の変化が認められなかった。また、TI172 株に精製した NTD を培地に添加しても *glcP* 誘導・非誘導に伴う遺伝子発現の変化は起こらないことから、*glcP* 欠損によって起こる遺伝子発現の変化は、NTD の過剰生産により引き起こされているものと考えられる。

表 3 *GlcP* に仲介される遺伝子発現制御における NTD 合成の影響

Gene	TI168			TI172 ( <i>ntdABC</i> )		
	-IPTG	+IPTG	Ratio	-IPTG	+IPTG	Ratio
<i>alsS</i>	22 ± 15	500 ± 80	0.04 ± 0.03	560 ± 120	650 ± 150	0.86 ± 0.06
<i>maeN</i>	24 ± 17	100 ± 34	0.22 ± 0.09	180 ± 55	180 ± 58	0.99 ± 0.01
<i>licB</i>	110 ± 28	11 ± 3.4	11 ± 4.0	8.3 ± 1.0	11 ± 1.8	0.76 ± 0.03
<i>ntdA</i>	430 ± 240	2.2 ± 1.6	240 ± 170	<0.01	<0.01	NA <sup>b</sup>
<i>yjaH</i>	280 ± 86	17 ± 2.4	17 ± 6.3	16 ± 4.0	19 ± 3.3	0.84 ± 0.08
<i>yjaJ</i>	34 ± 14	5.5 ± 0.9	6.3 ± 2.5	5.1 ± 1.3	5.9 ± 1.2	0.85 ± 0.05

### (3) NTD 生合成遺伝子の転写制御機構の解析

GTP は細胞内エネルギー状態を反映するシグナルであり、多くの遺伝子発現に関与することが知られている。実際、枯草菌の二次代謝 (バシリシン生産) や胞子形成が細胞内 GTP 濃度の低下により誘発される。そこで、NTD 生合成遺伝子の発現がデコイニン (GMP 合成酵素阻害剤) により誘発されるかどうかを試験した (図 2)。その結果、NTD 生合成遺伝子の発現は、デコイニンのみの添加により誘導され、グアノシンを同時に添加した場合には誘導されないことから、NTD 生産もまた細胞内 GTP 濃度の低下により誘導されることが明らかとなった。意外なことに、グルコースを同時に低下させた場合には、デコイニンの効果は観察されないことから NTD 生合成遺伝子の発現は、グルコース過剰条件下で細胞内 GTP 濃度が急激に低下した時、誘発されることが判明した。

前述の結果は、NTD 生合成遺伝子の発現が細胞内プリン濃度によって制御されていることを強く示唆している。そこで、グアノシン要求株 TI265 (*guaA3*) およびアデノシン要求株 TI266 (*purA16*) を使用して、グアノシン又はアデノシン制限下での NTD 生合成遺伝子のプロモーター活性を比較したところ、グアノシン制限下では NTD 生合成遺伝子の発現が誘導されるのに対して、アデノシン制限下では誘導されないことが判明した (図 3)。これらの結果は、枯草菌の NTD 生合成遺伝子の発現が細胞内のエネルギー状態を反映するこれらプリン濃度に対して正反対の制御 (細胞内

ATP に対して正、GTP に対して負) を受けることを示している。

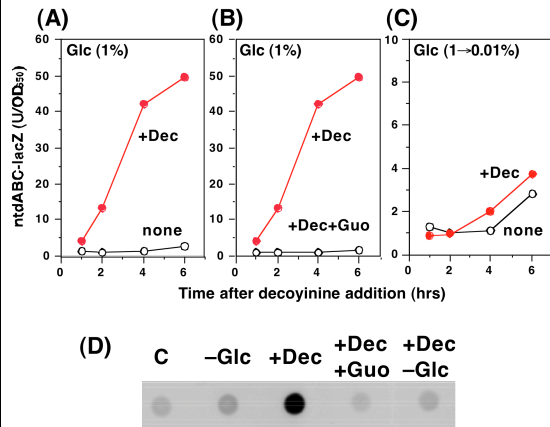


図 2 *ntdABC* の発現におけるデコイニン及びグルコースの効果。TI122 を対数期後期まで培養後、デコイニン (2mM) を含む培地 (A) 又は、デコイニン (Dec; 2mM) 及びグアノシン (Guo; 2mM) を含む培地 (B)、低濃度グルコース下 (0.01%) でデコイニンを含む培地 (C) に懸濁し、 $\beta$  ガラクトシダーゼ活性を測定した。(D) RNA ドットブロッキングによる *ntdABC* の発現。-Glc: グルコース 0.01%、+Dec: デコイニン添加、+Dec+Guo: デコイニン及びグアノシン添加、+Dec-Glc: 低濃度グルコース下 (0.01%) でのデコイニン添加

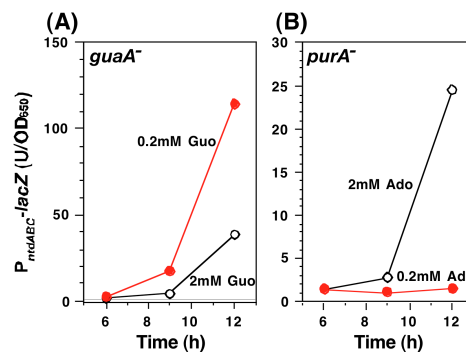


図 3 *ntdABC* の発現におけるグアノシン及びアデノシンの効果。(A) TI265 (*guaA3*) をグアノシン 0.2mM 又は 2mM 存在下で培養し、*ntdABC* プロモーター活性を比較した。(B) TI266 (*purA16*) をアデノシン 0.2mM 又は 2mM 存在下で培養し、*ntdABC* プロモーター活性を比較した。

### (4) *glcP* 遺伝子破壊のメタボローム解析

*glcP* 遺伝子欠損株 TI214 を用いたメタボローム解析により、代謝産物の変化を野生株 61884 と比較した。その結果、グルコサミンやシキミ酸三リン酸、フェニルアラニン等の

代謝産物が野生株と比較して顕著に増加していた。一方、イソロイシン等のアミノ酸やリボース5リン酸、PRPP、ATP、GTPなどは減少していた。枯草菌が生産する抗生物質バシリシンは転写因子 CodY によって抑制されており、細胞内のGTPやイソロイシン等の分枝アミノ酸濃度の低下で誘導されることが判明している。*glcP* 遺伝子欠損株においてバシリシン生産を負に制御する代謝産物の低下が観察されたことから、*glcP* 遺伝子欠損に伴うNTDの過剰生産が別の二次代謝経路であるバシリシン生合成経路を活性化することを示唆している。

#### 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 Inaoka, T., Wang, G., and Ochi, K. ScoC regulates bacilysin production at transcription level in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 191: 7367-7371 (2009) 査読有
- ② Inaoka, T., Satomura, T., Fujita, Y., and Ochi, K. Novel gene regulation mediated by overproduction of secondary metabolite neotrehalosadiamine in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 291: 151-156 (2009) 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① 稲岡隆史  
「枯草菌の二次代謝制御機構に関する研究」日本農芸化学会 東京  
2010年3月27日
- ② 稲岡隆史、王 国君、越智幸三  
「枯草菌の二次代謝制御機構における ScoC の機能解析」日本農芸化学会 博多  
2009年3月29日

#### 6. 研究組織

研究代表者

稲岡 隆史 (INAOKA TAKASHI)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・主任研究員

研究者番号：40391205