

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580090

研究課題名（和文） 放線菌遺伝子水平移動機構の解明

研究課題名（英文） Clarification of horizontal gene transfer mechanism in *Streptomyces*

研究代表者

片岡正和（KATAOKA MASAKAZU）

信州大学・工学部・准教授

研究者番号：90332676

研究成果の概要（和文）：放線菌の主たる遺伝子水平機構である接合伝達機構について分子生物学的解析を行った。放線菌プラスミド pSN22 はその接合接合伝達にともない、ゲノムレベルの遺伝子水平移動を引き起こす。その膜を介した DNA 輸送には TraB と名付けたタンパク質が DNA チャネルとして主たる役割を担っており、伝達のエネルギーは ATP の分解によって行われていることを実験的に証明した。伝達に必要なシス因子を明らかにし、その特徴的な配列と、構造必要性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The conjugative transfer of the small plasmid takes a main role in horizontal gene transfer in *Streptomyces*. The small cryptic plasmid, pSN22, from *Streptomyces nigrifaciens* can mobilize the host chromosome along with the plasmid transfer. We identified both the TraB protein is essential for the plasmid and genome transfer through cytoplasmic membrane and the ATP activity is essential for the DNA channel function. In addition the elements acted *in trans*, we also identified cis element essential for the plasmid transfer and determined the distinctive structure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：微生物遺伝、ゲノム進化、放線菌、接合伝達、TraB、局在、発現

1. 研究開始当初の背景

接合伝達は、性を持たない細菌が複製ミスに起因するゆっくりとした進化過程を経ずに、自然界から構造遺伝子群を取得できる遺伝子水平移動機構の主役として細菌の多様化に重要だと考えられている。申請者らは、放線菌においてもゲノムの進化に接合因子が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきている(*J. Bacteriol*, 1999)。遺伝子

水平移動機構の解明は、薬剤耐性菌の拡散を発端とする R 因子の解析など、グラム陰性菌を中心に展開されてきた。しかし関連する遺伝子数が数十と多く、巨大分子である DNA が細胞膜を介して輸送される DNA チャネルの解明には至っていない。

申請者は、放線菌の接合因子 pSN22 の研究を通し、世界に先んじて放線菌での接合伝達が 3 種の遺伝子群に依存し、遺伝子水平移

動点であるゲノム DNA の細胞間移動が pSN22 上の *traB* 遺伝子座にコードされる TraB タンパク質 (TraB) のみによって支配されていることを明らかにし (*J. Bacteriol* 1991)、さらに TraB の膜局在や構造的特徴を明らかにした (*Mol. Microbiol*, 1996 ほか)。しかし、TraB が細胞毒性を持ち、非常に少量しか発現していない膜タンパク質であることに起因する実験の困難性により、世界的に放線菌接合伝達の分子機構解明は進んでいない。

申請者は、近年研究フィールドを脳神経科学分野に拡大し、膜タンパク質の生化学や蛍光顕微鏡を用いたイメージング技術を駆使した解析を行ってきた (*EMBO.J* 1997 *J. Neurochem* 2000 *J. Neurochem in press* ほか)。神経科学分野で用いた膜タンパク質に対する操作や生物物理学的手法を、TraB の分子解析や TraB による DNA 移行の解析に用いることで、現在の停滞した状況を打破し、DNA チャネルの正体解明に繋がれると考えた。

2. 研究の目的

申請者らは、TraB が DNA チャネルであることを提唱し、米英仏独の 5 グループから相次いで同様の提唱がなされた (*Mol. Microbiol.Rev.* 2002)。一方、グラム陰性菌の DNA チャネルは、1 本鎖 DNA 特異的で、Type IV secretase に分類されるが (*Science* 2004)、放線菌では 2 本鎖 DNA (dsDNA) 特異的であると示唆するデータが我々 (*Mol. Microbiol* 1996) や仏 (*Mol. Microbiol.* 2004) から発表され、注目を集めている (*Nat. Rev. Microbiol.* 2004) が、まだ仮説の段階である。また、TraB の分子性状に関する知見は前述の分子の取り扱いにくさにより極めて少ない。本研究はこれら不明点が多く残されている DNA チャネルの分子性状や DNA 輸送メカニズムを現在までの技術的蓄積と最新技術で解決しようとするものである。

放線菌は、気中菌糸の形成など高度な分化を示す。TraB が分化していく放線菌コロニー内でいつ、どこで発現しているのかをリアルタイム解析手法で明らかにし、TraB 発現の時空間制御を解明する。

- (1) TraB は膜に局在していることは、その機能からも我々の結果 (*Mol. Microbiol.* 1996) からも明確であるが、膜局在に必要なドメインは、見つかっていない。TraB の機能構造を明らかにするため、膜局在ドメインを決定する。
- (2) TraB タンパク質は ATP 結合ドメイン以外の典型的な機能ドメインを持たないが、ATP 結合ドメインの生化学的な機能は不明のままである。DNA 輸送の際のエネルギー供給を明らかにするた

め ATP 結合ドメインの活性と DNA 輸送との関連を調べる。

- (3) DNA の細胞膜通過は、TraB タンパク質のみで達成されるのではなく、宿主のゲノム由来因子をアクセサリ分子として利用していると予想している。これらの TraB 結合因子を探索・分離し、対象遺伝子を破壊することで DNA チャネル複合体の正体を明らかにする。
- (4) 放線菌型 DNA チャネルの大きな特徴として、大腸菌 F 因子などの DNA チャネルが ssDNA を輸送するのに対して、DNA 鎖開裂を伴わず、dsDNA を輸送していることが示唆されているが、直接的な証拠は得られていない。この輸送機構を明らかにするため *in vitro* で可視化技術を利用して DNA のチャネル通過形態を明らかにする。

3. 研究の方法

- ① TraB を GFP ラベルし、その時系列発現を蛍光顕微鏡と抗 GFP 抗体によるウエスタンブロットで追跡する。また、コロニー内部のどこで発現しているかを、共焦点顕微鏡点顕微鏡を用いて 3 次元的に発現解析し、それを時系列に並べることで 4 次元の発現マップを作成する。
- ② TraB 領域に様々な欠失変異を持つ TraB-GFP 融合タンパク質の膜局在を蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡で検出し、さらに抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロットで確認する。
- ③ ATP 結合ドメインに部位特異的変異を導入し、変異体の DNA 輸送への影響を調べるとともに、ATPase 活性を判定する。
- ④ TraB に結合するタンパク質群を、TraB を標的とした共沈によって放線菌膜面分より分離する。分離したタンパク質をプロテオーム解析し、TraB 会合タンパク質を分離・同定する。
- ⑤ GFP ラベルした TraB を発現する放線菌細胞膜を表面処理したスライドグラス上に固定することで簡易再構成系を構築する。再構成された TraB 膜画分に蛍光ラベルした DNA を加えて DNA の移動状態をタイムラプス観察する。また、DNA のそれぞれの鎖を異なる蛍光色素で標識し、両蛍光プローブ間の FRET (Fluorescent Energy Transfer) を検出することによって dsDNA が輸送されているか、ssDNA として輸送されているのかを判定する。
- ⑥ TraB をはじめとするトランス因子以外にプラスミド上のシス因子が必要か否かを検定し、必要な場合はその位置の決定を行う。さらに当該部位の構造を決定

し、どのような構造が必要かを確定する。

4. 研究成果

- ① 放線菌遺伝子水平移動の中心的役目を持つ TraB のリアルタイム追跡プローブ TraB-GFP を作製し、その局在や発現をリアルタイムで検出する系を構築した。この系を用いて野性型の発現、誘導発現の場合のそれぞれの発現パターンを決定した。また、N 末端、C 末端に GFP をそれぞれ融合させた場合に、N 末端融合体ではタンパク質のプロセッシングを受けやすいことが判明した。
- ② TraB の大腸菌を用いた融合発現系を構築し、精製 TraB を得た。TraB の ATPase 活性を ATP transporter の活性測定法を用いて検出した。
- ③ TraB 領域に様々な欠失変異を持つ TraB-GFP 融合タンパク質発現系を構築し、膜局在に必要な領域が N 末端 100 残基内にあることを明らかにした。
- ④ TraB の ATPase 活性をマカライトグリーンを用いた活性測定法で確認した。多数の点突然変異 TraB を作製し、それらの ATPase 活性を測定し、必要な残基の確定を行った。その結果 Walker type ドメイン内ではほとんどの変異が活性を喪失した。唯一 GSGKT から GSGKS の変異だけが ATPase 活性を保持していた。
- ⑤ 放線菌遺伝子水平移動の中心的役目を持つ TraB のリアルタイム追跡プローブ TraB-GFP を用いて、野性型の TraB の発現と局在を明らかにし、明白な膜局在タンパク質であることを明らかにした。また、その局在の三次元パターンと粒子状クラスターの存在を共焦点顕微鏡をもちいて明らかにした。
- ⑥ TraB と TraA タンパク質の物理的結合と機能相補の時空間的タイミングを明らかにした。またこの相互作用に必要な領域を確定した。
- ⑦ TraB などのタンパク質因子以外に plasmid 上のある領域がシス因子として働いていることを明らかにし、*clt* と名付けた。*clt* 領域は *traB* 遺伝子の下流に存在しており、*clt* が存在しない場合には特異的なプラスミドやゲノムの移行が起こらないことを明らかにした。
- ⑧ *clt* の必要な構造について欠失変異を多数導入し、構造的特徴を決定した。*clt* 部位は 9 回の繰り返し配列と一つの回文配列から構成されていた。

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 2 件)

- ①. 片岡 正和, 合成生物学の潮流と展望, バイオサイエンスとインダストリー, 69, 192-195, 2011, 査読なし
- ②. 片岡 正和, 板谷 光泰, ゲノム合成時代の幕開け, 遺伝, 65, 5-7, 2011, 査読なし

〔学会発表〕(計 20 件)

- ①. 片岡 正和, 放線菌における接合伝達のしくみと合成生物学への応用可能性, 日本農芸化学会 23 年度年会シンポ (招待講演), 2012. 3.25, 京都
- ②. 松田 卓也, 藤森 友真, 池田 治生, 片岡 正和, 線状プラスミド SAPI を用いた遺伝子クラスター輸送システムの構築, 日本農芸化学会 23 年度年会, 2012. 3.24, 京都
- ③. 松田 卓也, 板谷 光泰, 片岡 正和, 枯草菌-放線菌細胞融合による放線菌染色体への遺伝子の導入, 日本農芸化学会 23 年度年会, 2012. 3.23, 京都
- ④. 松田 卓也, 池田 治生, 片岡 正和, 線状プラスミド SAPI を用いた放線菌遺伝子クラスター操作システムの構築, 日本ゲノム微生物学会 23 年度年会, 2012.3.11, 東京
- ⑤. Masakazu Kataoka, Conjugative transfer of *Streptomyces*: the mechanism and application for genome design, JST-BBRC joint UK-Japan Workshop on Microbial Systems Biology. (招待講演), 2011.10.25, Tsuruoka, Yamagata, Japan
- ⑥. 片岡 正和, 実践的ゲノムデザインをめざして, 日本遺伝学会 2011 年度年会 WS (招待講演), 2011.9.22, 京都
- ⑦. Atsushi Suzuki, Takuya Matsuda, Haruo Ikeda, Masakazu Kataoka, Analysis of conjugative transfer of *Streptomyces avermitilis* linear plasmid SAPI, 国際微生物連合会議 (IUMS2011), 2011.9.8, Sapporo
- ⑧. Tetsu Miyatake, Masakazu Kataoka, A novel insight of *Streptomyces* plasmid transfer: *clt* (*cis*-acting locus of plasmid transfer) of pSN22 functions in horizontal transfer of the chromosome and the plasmid. 国際微生物連合会議 (IUMS2011), 2011.9.8, Sapporo
- ⑨. Yukihiro Fuseya, Masakazu Kataoka, The ATPase activity of TraB protein on *Streptomyces* plasmid pSN22 is essential for the conjugative transfer.,

- 国際微生物連合会議 (IUMS2011),
2011.9.8, Sapporo
- ⑩. 鈴木温司, 松田卓也, 池田治生, 片岡正和, 線状プラスミド SAP1 の解析, 日本放線菌学会 23 年度年会, 2011.9.8, 札幌
- ⑪. 宮武徹, 片岡正和, 放線菌接合伝達の新側面: 放線菌プラスミド pSN22 の接合伝達における clt の機能, 日本放線菌学会 23 年度年会, 2011.9.8, 札幌
- ⑫. 伏屋友希弘, 宮武徹, 片岡正和, 伝達性プラスミド pSN22 の接合伝達必須タンパク質 TraB の解析, 日本放線菌学会 23 年度年会, 2011.9.8, 札幌
- ⑬. 宮武徹, 伏屋友希弘, 片岡正和, 放線菌 *Streptomyces nigrifaciens* pSN22 由来の接合伝達因子 TraB の機能解析, 日本農芸化学会 22 年度年会, 2011. 3.25, 仙台
- ⑭. 宮武徹, 伏屋友希弘, 片岡正和, 放線菌伝達性因子 TraB の ATPase 活性とプラスミド伝達機能の解析, 日本分子生物学会 22 年度年会, 2010. 12. 8, 神戸
- ⑮. 片岡正和, 生命の作り方, 日本生物工学会 22 年度年会シンポジウム (招待講演), 2010. 10. 29, 宮崎
- ⑯. 片岡正和, 生命の再設計をめざして, 日本遺伝学会 22 年度年会 ワークショップ (招待講演), 2010. 9. 22, 札幌
- ⑰. 片岡正和, 人類は生命を設計できるか? 分解から組み立てへ, 日本遺伝学会 21 年度年会 ワークショップ (招待講演), 2009. 9. 17, 長野
- ⑱. 松田卓也, 池田治生, 片岡正和, 放線菌線状プラスミドの接合伝達: 基本的性状の解明, 日本放線菌学会 22 年度年会, 2010. 9.2, 東京
- ⑲. 宮武徹, 片岡正和, 放線菌伝達性因子 TraB と cis-acting locus of transfer (clt) の機能解析, 日本放線菌学会 22 年度年会, 2010. 9.2, 東京
- ⑳. 宮武徹, 片岡正和, 放線菌伝達性プラスミド pSN22 の cis-acting locus of transfer (clt) の解析, 日本放線菌学会 21 年度年会, 2009. 7. 16, 秋田

[その他]

ホームページ等

<http://www.kankyo.shinshu-u.ac.jp/~kataokalab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 正和 (KATAOKA MASAKAZU)

信州大学・工学部・准教授

研究者番号: 90332676