

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380052

研究課題名(和文)細胞における生長環境感知と生存戦略決定機構

研究課題名(英文)Sensing mechanism of growing environment and survival strategy in bacterial cells.

研究代表者

吉川 博文(Yoshikawa, Hirofumi)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：50175676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：細菌細胞は栄養増殖期から定常期へ移行するにあたり、さまざまな環境の変化を感知し、適切に対応するメカニズムを擁しているが、資質合成系の必須因子PlsXとTCA回路のOdhBという2つの鍵酵素の解析から、この2者がいくつかの細胞機構のネットワーク同士をつなぎ合わせるグローバル制御因子であることを明らかにした。そして、脂質合成・細胞分裂・緊縮応答のサブネットワーク同士の関連について分子機構を明らかにし、エネルギー生産、胞子形成との関連も示唆した。

研究成果の概要(英文)：Bacterial cells possess sensing mechanism of environmental changes at the end of logarithmic growth phase. We focused on two key enzymes, PlsX and OdhB, and found that these are global regulatory factors connecting several cellular functional networks. Most important finding is that PlsX, an essential lipid synthetic enzyme, has crucial role in cell division machinery and regulating the localization of FtsZ that is a critical protein of division septa. Moreover, PlsX also has functions on stringent control through RelA, an enzyme for ppGpp synthesis and degradation. Alternatively, a TCA cycle enzyme, OdhB, has most significant function in energy production and this aspect has fundamental function on sporulation in *Bacillus subtilis*. These results demonstrate cooperative networks of bacterial cells responding and dealing with the environmental changes.

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：遺伝子発現 機能ネットワーク 微生物 細胞分裂 細胞分化 脂質合成 定常期 生長戦略

## 1. 研究開始当初の背景

枯草菌などの原核細胞は、古くから『酵素袋』と呼ばれ、真核細胞と比べその構造は組織立ったものでないと考えられてきたが、高分子密度は大腸菌において 340g/l と非常に高く、各タンパク質が無秩序に発現・局在するだけでは効率的に作用することが困難であり、秩序だったネットワークが必要である。近年の分子生物学的手法の発達により、構成成分や細胞機能の詳細な分子機構が数多く明らかとされてきた。しかし、細胞の全体像から個々の様々な現象を俯瞰し、互いの現象がどのようなネットワークを持って機能し合っているかという視点においては、未だ不明の点が多い。こうした視点から、網羅的なタンパク質間相互作用解析をポストゲノム解析の一貫として行ってきた。その結果、多くの新規相互作用を見出したが、その中から、細胞が対数増殖後期から栄養源枯渇等のシグナルを感知し、定常期へ向かう際にどのような戦略を取るのかという生長戦略に的を絞り、解析することとした。

## 2. 研究の目的

(1) 原核生物の細胞分裂機構は、チューブリン様タンパク質である FtsZ が重合することにより Z-ring と呼ばれる細胞分裂装置の足場として働くことが見出されて以降、現在まで精力的に研究されてきた。一方で細胞分裂(隔壁形成)には Z-ring の形成と同時に細胞質膜の合成が必要であるのは容易に想像できるが、その両者を共役させる機構は不明である。

当研究室において、両者を繋ぐ機能的なネットワークの解明を目指し、Y2H 法を用いた 1 対 1 のマトリックス解析を行った。その結果、枯草菌において、脂肪酸・リン脂質合成の両方に必須な鍵酵素である PlsX が細胞分裂に必須な FtsZ のアンカー因子である FtsA など複数の細胞分裂関連タンパク質と相互作用することを見出した。そこで本研究では、脂質合成酵素 PlsX に着目し、脂質代謝と細胞分裂を共役させるネットワークの解明を本研究の第 1 の目的とした。

(2) 一方、枯草菌は生育に適した環境下では細胞分裂を繰り返し、指数関数的に増殖するが、栄養飢餓やなどのストレスを感知すると細胞分裂を停止し、胞子を形成する。そのため、枯草菌の胞子形成は細胞分化の単純なモデルとして詳細な研究が行われてきた。しかし、細胞分裂から胞子形成に移行する詳細

なメカニズムはいまだに不明な点が多い。また、胞子形成にはクエン酸回路の活性化が必須であることが報告されているが、その理由は明らかでない。当研究室における網羅的なタンパク質間相互作用解析から、胞子形成開始因子と細胞分裂因子の両方に、クエン酸回路の 2 オキシグルタル酸脱水素酵素の E2o サブユニットである OdhB が相互作用することがわかった。そこで、OdhB が胞子形成開始のセンサーとして働く可能性を考え、*odhB* の胞子形成への関与を明らかにすること、また破壊した時に LB 培地でみられる溶菌の原因を明らかにすることを本研究の第 2 の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞周期の時系列に従った PlsX の局在制御機構の解析

酵母ツーハイブリッド法によって示唆された PlsX と FtsA の相互作用を検証するため、*in vivo* プルダウンアッセイを行い、さらに蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡による詳細な観測を行った。

(2) PlsX の細胞分裂に対する関与の解析

遺伝学的解析および生化学的解析を合わせ、PlsX が分裂予定域において果たす役割を検証すると共に、DNA 複製と局在との関連も調べ、局在のメカニズムに対しても考察した。

(3) 新規の脂質代謝制御機構の探索と緊縮応答

遺伝学的な解析により、*plsX* の温度感受性変異株から抑圧変異株を取り、マッピングを行うことにより、*plsX* の機能を追跡した。抑圧変異の 1 つが ppGpp 合成/分解酵素をコードする *relA* に落ちたため、緊縮応答制御機構との関連について詳細に検証した。

(4) クエン酸回路因子の破壊株作製と細胞に与える影響の解析

クエン酸回路自体がどのように胞子形成や溶菌に関与しているのか検証するために、各破壊株を作製して影響を解析した。また、OdhB 複合体の大腸菌オルソログとの置換による効果、さらにトランスクリプトームやメタボローム解析により、網羅的な影響についても調べた。

(5) OdhB の胞子形成に及ぼす機能解析

胞子形成開始は Spo0A が中心的な役割を果たしていることが知られているが、OdhB 破壊

株が Spo0A レギュロンにどのような影響を及ぼしているかを、各種レポーターアッセイ等により検証した。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞周期の時系列に従った PlsX の局在制御機構の解析

*in vivo* プルダウンアッセイを行い、質量分析によって PlsX と複合体を形成する因子を網羅的に同定した。この方法によっても FtsA は検出され、PlsX と FtsA の相互作用を確認した。次に、PlsX の N 末端に GFP を融合させた株 (NBS800) を作製し、蛍光顕微鏡を用いて、PlsX の細胞内局在を検証した。蛍光プローブ FM4-64 (細胞膜)・DAPI (核様体) を用いて二重染色を行ったところ、GFP-PlsX は細胞側面や細胞極、そして核様体間に位置する分裂予定域に局在することが分かった (図 1)。

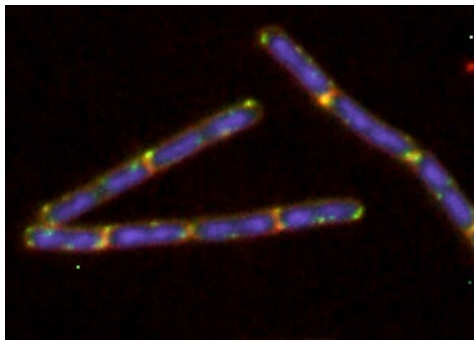


図 1. PlsX の分裂予定域への局在  
GFP-PlsX (緑) は分裂隔膜 (赤) と共局在した。青は DNA。

これらの局在は細胞分裂関連タンパク質のものと同様であったので、FtsA の N 末端に CFP を融合させたコンストラクトを NBS800 に導入し、共局在解析を行ったところ、PlsX は FtsA に先立って分裂予定域に局在し、その後 FtsA と共局在することが分かった。この結果は PlsX と FtsA が相互作用する結果と一致しており、隔壁形成を効率的に進行させることに寄与していると考えられる。一方で、Z-ring が形成できず細胞分裂異常を示す *ftsA* 破壊株においても、GFP-PlsX は分裂予定域に局在することが明らかとなった。この結果は、*ftsZ* 誘導株を用いて FtsZ の発現を制限した場合や、FtsZ の重合阻害因子である MciZ を過剰発現させ Z-ring 形成を阻害させた場合でも同様であり、PlsX は Z-ring 非依存的に分裂予定域に局在すると結論付けた。

また、共焦点顕微鏡 (LSM710 ZEN, ZEISS) を用いて GFP-PlsX の細胞内局在を三次元像

に再構築したところ、野生株においては分裂予定域においてリング状の局在が観察できた。一方で、Z-ring 形成を阻害させた条件においてはドット状の局在のみが観察でき、これらの結果から通常分裂時、Z-ring を形成していく過程で PlsX が Z-ring 上を移動しリング状に局在すると示唆された。以上の結果を基に、(A) Z-ring 形成非依存的に PlsX を分裂予定域に局在させる機構、(B) 隔壁形成が完了するまで PlsX を隔壁形成面に留まらせる機構の存在が想起された。

上記 (A) については核様体の局在との関連を追跡した。DNA 複製は細胞周期において細胞分裂に先立って起きる現象であり、両者は密接に共役している。そこで、DNA 複製と PlsX の局在が共役しているか検証した。SirA は DNA 複製開始のマスターレギュレーターである DnaA に結合し、複製開始を阻害する。SirA 過剰発現時の GFP-FtsA の局在を観察したところ、過去の報告通り、FtsA の分裂予定域への局在が阻害された。一方で、GFP-PlsX の局在を観察したところ、PlsX の分裂予定域への局在も阻害された。これらの結果から、PlsX は Z-ring 形成非依存的に分裂予定域へ局在する一方で、その局在は DNA 複製の進行レベルと連動していることを明らかとした。

(B) の機構に関しては、隔壁形成を遅延させた際の PlsX の局在を検証した。MinC・MinD は Z-ring 依存的に局在し、隔壁形成後期の Z-ring 収縮・崩壊に関与する因子であるため (図 1)、*minCD* 破壊株では隔壁形成が遅延し、野生株に比べ細胞が長くなる。*minCD* 破壊株において GFP-PlsX・CFP-FtsA の局在を観察したところ、ともに次の分裂予定域への局在が阻害されており、合成途中の隔壁や細胞極に共局在していた。これらの結果は、隔壁形成が完了するまで PlsX を隔壁合成面に留まらせる機構の存在を支持するものである。

#### (2) PlsX の細胞分裂に対する関与の解析

PlsX の細胞分裂への関与を検証するため、PCR を用いた人為的変異導入法により、*plsX* 温度感受性変異 (*plsX103*) 株を取得した。制限温度下において *plsX103* 株は分裂異常を示した。また、*plsX* 発現誘導株を用いて解析したところ、*plsX* の発現を抑制した場合においても細胞分裂異常に観察された。この時、FtsA、FtsZ に GFP を融合させ経時的に観察したところ、これらの細胞分裂異常は Z-ring 形成阻害を伴ったものであった (図 2)。

また、Z-ring 形成異常が見られた時、FtsA-GFP の量が著しく低下しており、PlsX

は FtsA の安定性に寄与していることが考えられた。また *plsX103* 株において、DNA 分配と隔壁形成の共役関係が異常な場合に観察できる CUT (Cell Untimely Torn) phenotype が見られ、PlsX が正常な細胞分裂に必要であることを示している。一方で、他の脂質合成酵素である PlsC の温度感受性変異株や、PlsY の発現を制限した場合においては、細胞分裂異常は観察されず、PlsX 特異的な現象であることが示唆された。

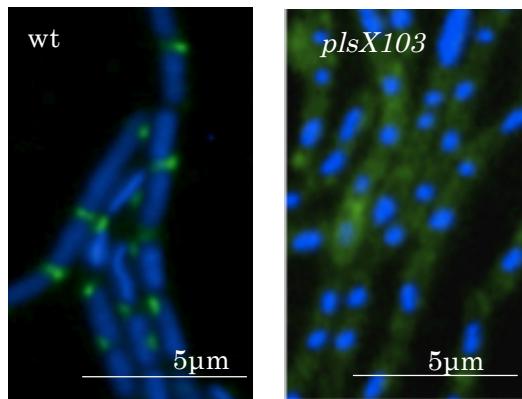


図 2. *plsX* 変異株における Z-ring 形成

*plsX* の温度感受性変異株では制限温度下で Z-ring (緑) の形成異常が見られた。青は DNA。

### (3) 新規の脂質代謝制御機構の探索と緊縮応答

*plsX103* 株より制限温度下で生育を示す温度感受性抑圧変異株を取得し、次世代シーケンサーによるマッピング解析により抑圧変異の同定を試みた。同定した抑圧変異のうち *relA* にマップされた *relA691* に着目した。RelA は環境適応機構の 1 つである緊縮応答に関与しており、この機構の中心物質である (p)ppGpp などを合成・分解する酵素である。枯草菌において (p)ppGpp の細胞内濃度は RelA に加えて、合成のみを行う YwaC、YjbM によって調節されている。GTP や GDP のアナログである (p)ppGpp は細胞の ATP 量の上昇と GTP 量の低下を引き起こし、アミノ酸代謝を促進する一方で、RNA 合成・タンパク質合成・DNA 複製を阻害するため、*relA* を破壊すると (p)ppGpp の蓄積による顕著な生育遅延を示す。*relA691* 株も同等の生育遅延を示すことから、(p)ppGpp の分解活性が低下していることが示唆された。トランスクリプトミクス解析の結果、*relA691* 株は野生株と比較し、アミノ酸代謝系の遺伝子が顕著に誘導されており、メタボロミクス解析よりシステイン・

アスパラギン・アルギニンを除く各種アミノ酸の蓄積が確認できた。一方で、(p)ppGpp の蓄積は見られなかった。そこで HPLC を用いて細胞内ヌクレオチドを詳細に分析したところ、ppGp/pGpp の蓄積が誘導されていることが分かった。枯草菌や大腸菌において (p)ppGpp ではなく ppGp/pGpp が緊縮応答の中心物質であるという学説もあり、今回の結果はこれを支持するものである。*relA691* 変異を *plsX103* 株に導入したところ、温度感受性を抑圧した。*relA691* による抑圧効果は、他の脂質代謝酵素の変異株 (*plsC*・*fabF* 温度感受性変異株) でも同様に確認でき、緊縮応答制御下にこれら酵素が存在していることが伺える。

枯草菌において RelA の活性調節機構の知見は乏しく、生育環境に応じて ppGp/pGpp の合成・分解のバランスを調節する機構は不明である。*relA691V* の変異個所である ACT ドメインは、アミノ酸などの低分子と結合して酵素活性を制御するドメインであることから、RelA の活性調節に寄与していると考えられた。*relA* 破壊株とは異なり、*relA691* 株に *ywaC*、*yjbM* 両破壊カセットを導入しても生育遅延が抑圧されず、*relA691V* は ppGp/pGpp 合成活性を保持していることが示された。変異部位である G691 は二次構造間のリンカー領域に位置し、ACT ドメインとリガンドとの結合に重要な役割をしていることが報告されている点から、*relA691V* はリガンドとの結合性が低下していることが考えられた。実際に、ACT ドメインを欠失した *relAΔACT* 株は分解活性を消失した *relA44Q* 株と同様に *relA691* 株よりさらに顕著な生育遅延を示すことが分かった。

大腸菌において、脂質合成が阻害されるとフリーの ACP (acyl carrier protein) が直接 SpoT に結合し、SpoT の (p)ppGpp 合成活性を促進し、緊縮応答を誘導することが報告されており、両者の関係性が明らかとなりつつある。また、(p)ppGpp が直接脂質合成酵素 PlsB の酵素活性を阻害することも報告されている。PlsX をはじめ、FabF、PlsC が脂質合成を行なう際に利用する Acyl-ACP は脂肪酸合成サイクルにおいて合成されるが、その細胞内濃度は厳密にコントロールされており、Acyl-ACP の蓄積は脂肪酸合成阻害 (フィードバック阻害) を引き起こすことが分かっている。これらの知見から、栄養状態に応じ、緊縮応答制御を介し、各脂質合成酵素の活性が制御され、細胞内の Acyl-ACP が適切な量に保たれている可能性が示唆された。

#### (4) クエン酸回路因子の破壊株作製と細胞に与える影響の解析

*odhB* は当初、必須遺伝子として報告されていたが、破壊株は正常に生育し、対数増殖後期に達すると急激に死滅する、すなわち対数増殖期しか持たないユニークな変異株であることが分かった (図3)。

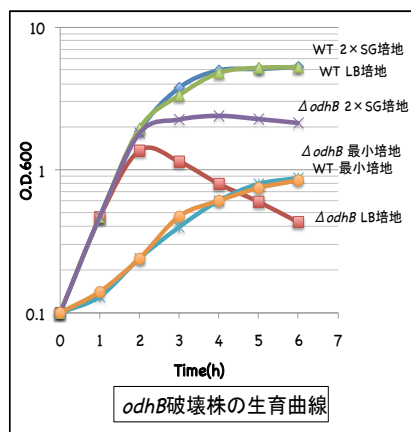


図3. *odhB* 遺伝子破壊株はLB培地では対数増殖後期から急激に溶菌する。

クエン酸回路の各遺伝子破壊株を作製し、孢子形成能および溶菌現象を観察したところ、OdhB複合体以外の因子においては孢子形成に及ぼす影響は部分的であり、溶菌現象も見られなかった。一方、OdhBと複合体を形成し、2-オキソグルタル酸脱水素酵素として働くOdhA、PdhDの遺伝子破壊株の場合は、*odhB*破壊株同様の溶菌、孢子形成欠損が見られた。

また、*odhA*、*odhB*、*pdhD*を破壊した株において細胞内代謝や遺伝子発現がどのように変化しているか調べる為に、メタボローム解析とトランスクリプトーム解析を行った。その結果、*odhA/B*、*pdhD*破壊株では高浸透圧調節物質であるベタインの量が著しく減少し、更に高浸透圧ストレス保護性遺伝子の転写量も減少していた。したがって、OdhB複合体は浸透圧調節機構に重要な役割を持っていることが示唆された。

上記のように、OdhB複合体だけが、溶菌及び孢子形成に特異的な機能を持つことが明らかになったが、その役割は不明である。手がかりを得る手段の1つとして、大腸菌オルソログとの置換実験を行った。その結果、*odhB*と*pdhD*の置換株においては、孢子形成は回復できないが溶菌はかなり抑えることがわかった。したがって、クエン酸回路が回ってエネルギー産生が回復すれば溶菌は防げるのかもしれない。一方で、孢子形成に関しては枯草菌のOdhB複合体が、独特の機能

を持っていることが考えられた。

#### (5) OdhBの孢子形成に及ぼす機能解析

OdhB複合体の欠損株は、*spo0A*変異株同様、孢子形成能を100%欠いており、また抑圧変異株がまったく取得出来ない。したがって、孢子形成のマスターレギュレーターであるSpo0Aに決定的な影響を及ぼしていると考え、Spo0Aレギュロンの*spoIIG*、*spoIIA*、および*spo0A*自身のプロモーター活性について*odhB*破壊による影響を比較した。その結果、*spo0A*の発現が転写レベルで低下していること、そしてレギュロンの発現量も著しく低下していることがわかった。また、リン酸化Spo0Aを擬態し、常に活性化した状態のSpo0A機能を持つSad67変異株を用いて同様のアッセイを行い、Spo0A活性化以降の影響を解析した。その結果、*odhB*破壊株では孢子形成開始点(T=0)に*spo0A*(*sad67*)を誘導発現させても、Spo0Aレギュロンの活性は戻らなかった。更に、同様の実験を*odhA*、*pdhD*、*citC*、*sucCD*破壊株でも行ったところ、これらの破壊株でも*odhB*破壊株同様*spoIIG*のプロモーター活性は低下した。しかし、*odhA*、*pdhD*破壊株では*odhB*破壊株同様、*sad67*を誘導発現しても*spoIIG*のプロモーター活性は戻らないのに対し、*citC*、*sucCD*破壊株では*sad67*を誘導発現させると*spoIIG*のプロモーター活性が回復した。したがって、OdhB複合体だけは他のクエン酸回路因子とは異なり、リン酸化Spo0Aが転写因子として働く段階に特異的な機能を有していることが示唆された。

#### 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21件)

①Hiraku Takada, Masato Morita, Yuh Shiwa, Ryoma Sugimoto, Shota Suzuki, Fujio Kawamura and Hirofumi Yoshikawa. Cell motility and biofilm formation in *Bacillus subtilis* are affected by the ribosomal proteins, S11 and S21. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press (2014, 4/1 accept) (査読有)

②Ogura M, Yoshikawa H, Chibazakura T. Regulation of the response regulator gene *degU* through the binding of SinR/SlrR and exclusion of SinR/SlrR by DegU in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 2014;196(4):873-881. (査読有)

③Hiraku Takada, Sanae Fukushima-Tanaka, Masato Morita, Yasuhiro Kasahara, Satoru Watanabe, Taku Chibazakura, and Hirofumi Yoshikawa. An essential enzyme for phospholipid synthesis has a crucial role in *Bacillus subtilis* cell division. *Mol Microbiol.* 2014 Jan;91(2):242-255. doi: 10.1111/mmi.12457. (査読有)

④Yuh Shiwa, Takashi Matsumoto, and Hirofumi Yoshikawa. Identification of laboratory specific variations of *Bacillus subtilis* strains used in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013; 77(10):2073-2076. (査読有)

[学会発表] (計40件)

①高田啓他「枯草菌における新規緊縮応答制御機構の解析」日本農芸化学会2014年度大会 平成26年3月28日 (神奈川)

②佐藤絢他「転写開始機構に内在する熱ショック応答モデルの提唱」日本ゲノム微生物学会第8回年会 平成26年3月8日 (東京)

③高田啓他「枯草菌における新規緊縮応答機構の解析」日本ゲノム微生物学会第8回年会 平成26年3月7日 (東京)

④Aya Sato 他 Extensive analysis of bacterial novel heat shock response mechanism mediated by the initial nucleotide of transcription. The 13th Asian Conference on Transcription. 平成26年2月20日 メルボルン(オーストラリア)

⑤Aya Sato 他 Analysis of novel heat shock response mechanism mediated by the initial nucleotide of transcription. 7th International Conference on Gram-Positive Microorganisms. 平成25年6月27日 モンテカティーニ・テルメ (イタリア)

⑥高田啓他「枯草菌リボソーム30Sサブユニットタンパク質 RpsK, RpsU の機能解析」日本農芸化学会2013年度大会 平成25年3月26日 (仙台)

⑦山下悠美他「枯草菌の胞子形成に関与するクエン酸回路因子の新規機能解析」日本農芸化学会2013年度大会 平成25年3月26日 (仙台)

⑧大竹俊平他「枯草菌における (p) ppGpp 合成・分解酵素 RelA の新規制御機構の解析」日本農芸化学会2013年度大会 平成25年3月25日 (仙台)

⑨鈴木祥太他「胞子形成欠損を示す枯草菌S10リボソームタンパク質遺伝子, rpsJ, 変異体の単離と解析」日本農芸化学会2013年度大会 平成25年3月25日 (仙台)

⑩吉川博文「次世代シーケンサーが拓く微生物研究の新展開」次世代シーケンシング技術応用研究会(招待講演) 平成25年2月25

日(豊橋)

⑪Aya Sato 他 Efficiency of open complex formation depending on the initial nucleotide of transcription resulted in a heat shock response. The 12th Asian Conference on Transcription. 平成24年6月7日 濟州島(韓国)

⑫清水翔他「枯草菌における緊縮応答と脂質合成の関連性解析」日本農芸化学会2012年度大会 平成24年3月24日(京都)

⑬盛田雅人他 「枯草菌における plsX 温度感受性変異の抑圧因子 S21 の機能解析」日本農芸化学会2012年度大会 平成24年3月24日(京都)

⑭高田啓他 「枯草菌における脂質代謝と細胞分裂間の新規ネットワーク解析」日本農芸化学会2012年度大会 平成24年3月24日(京都)

⑮高田啓他 「脂質代謝と細胞分裂を共役させるネットワークの解析」日本ゲノム微生物学会第6回年会 平成24年3月12日(東京)

⑯山下悠美他「枯草菌の胞子形成に関与するクエン酸回路因子の新規機能解析」グラム陽性菌ゲノム機能会議 平成23年8月25日(福山)

⑰盛田雅人他 「生育必須酵素 PlsX と相互作用する新規因子の探索」グラム陽性菌ゲノム機能会議 平成23年8月25日(福山)

⑱Hiraku Takada 他 Involvement of essential lipid synthetic enzyme, PlsX, in the cell division machinery. International Conference on Gram-positive Microorganisms. (口頭発表) 平成23年6月20日 モンテカティーニ・テルメ (イタリア)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉川 博文 (YOSHIKAWA, Hirofumi)  
東京農業大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号: 50175676