

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780072

研究課題名(和文) 枯草菌における窒素同化の動的数理モデルによる理解

研究課題名(英文) Understanding the nitrogen assimilation by the mathematical model in *Bacillus subtilis*

研究代表者

高橋 弘喜 (Takahashi, Hiroki)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号：60548460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：野生株とゲノム縮小型株MGB874を対象に、培地中の窒素濃度に応じた細胞増殖、遺伝子発現を検討したが、MGB874の窒素源に対する応答は野生株と変わらなかった。また、主要シグマ因子であるsigAのゲノム上での結合領域を比較解析したところ、グルタミン酸生合成遺伝子を含む13のsigA結合領域がMGB874に特異的に存在することが明らかとなった。MGB874でのsigAの新たな結合が、グルタミン酸蓄積に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed the monitoring of the growth rate of *Bacillus subtilis* WT and MGB874 strains after adding the nitrogen source. As the results, there were not significant difference between the responses to nitrogen in WT and those in MGB874. Moreover, GeF-Seq analysis for sigA was conducted. We revealed 13 sigA binding sites only in MGB874 strain. Interestingly, sigA was bound to the upper region of σ^{InR} , suggesting that the accumulation of glutamic acid in MGB874 would be affected by alternation of sigA profile.

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：枯草菌 窒素同化

1. 研究開始当初の背景

枯草菌(ゲノムサイズ:4.2Mb)において世界最小のゲノムサイズを有するゲノム縮小型株 MGB874 (874kb 縮小)は、正常に生育し、転写制御等も野生株とほぼ同様でありながら、外来タンパク質合成が増進されるという、物質生産に極めて有利な特徴を有している。これまでの解析から、MGB874 ではグルタミン酸の顕著な蓄積が観察されており、グルタミン酸の関わる窒素同化こそが、MGB874 の外来タンパク質合成の増進に繋がっていると考えられている。

大腸菌を含む多くの微生物には3つの窒素同化反応が存在している。

(反応1) グルタミン酸 + NH₃ + ATP → グルタミン + ADP + Pi

(反応2) グルタミン + 2-ケトグルタル酸 + NADPH → 2 グルタミン酸 + NADP⁺

(反応3) 2-ケトグルタル酸 + NADPH + NH₃ → グルタミン酸 + NADP⁺

反応1はグルタミン合成酵素、反応2はグルタミン酸合成酵素、反応3はグルタミン酸脱水素酵素によってそれぞれ触媒される。大腸菌では、2-ケトグルタル酸とグルタミンの量比が様々な培地条件でも変化せず、窒素同化がシステムとして冗長で、恒常的であることが知られている。そこで、MGB874 でグルタミン酸の蓄積が見られることに着目して、その原因を明らかにできれば、窒素同化の制御機構の一端を明らかに出来るのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、MGB874 のグルタミン酸に関わる制御機構を遺伝子発現データから検証し、文献情報と統合することで、窒素同化に関わる数理モデルの構築並びにその挙動解析による機構の理解を目的とした。また、MGB874 の高い物質生産性を支える転写機構を検証することで、物質生産とグルタミン酸との関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培地中の窒素濃度の細胞への影響

MGB874 ではグルタミン酸の蓄積が見られることから、培地中の窒素源に対する細胞増殖の影響を検討した。窒素源としては、(NH₄)₂SO₄を用いることとした。また培養条件としては、数時間全培養後、栄養飢餓状態になってから、窒素源を加えることとした。

条件検討後にグルタミン酸合成に関わる遺伝子発現を Real-time PCR で検討することにした。

(2) sigA の恒常性の解明

MGB874 における転写制御機構の恒常性を検討するために、転写において重要な役割を担う sigA の結合箇所の比較解析を行った。そのための手法として、ChIP-Seq 法の改良法である、GeF-Seq 法(Chumsakul et al. 2013)

による sigA 結合領域の検出を採用した。GeF-Seq 法においては、DNase I の濃度が結果に大きく影響すると考えられることから、詳細な検討を行った。

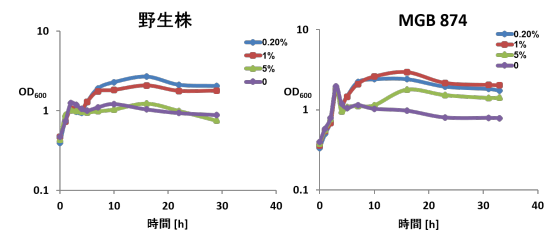
まず、枯草菌 168 及び MGB874 を対象に、sigA 遺伝子の C 末端に 12×His が融合した SigA-His 株を作製した。

枯草菌 168 及び MGB874 の SigA-His 株は、37°C、200rpm で培養し、吸光光度計で OD₆₀₀ が 0.4 に到達したところで、ホルマリンを最終濃度 1%になるように加え、更に 37°C、200rpm で 30 分間、振盪することにより、タンパク質-DNA 複合体の架橋を行った。GeF-Seq 法を実現するために重要な非特異的に一本鎖及び二本鎖 DNA を分解する DNase I 処理の濃度条件を検討した。DNase I の反応は 37°C、200rpm で 30 分間、1.0、1.25、1.5、2.0 units/ml の各濃度で行い、断片長を 3%アガロースゲルで確認した。

Illumina 用 DNA ライブラリー調製試薬、NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit (NEB) と NEBNext Multiplex Oligo (NEB)を用いて、得られた DNA 断片からライブラリーを作製した。作製したライブラリーは、Illumina のプロトコールに従い、次世代シーケンサー HiSeq 1500 にて 100bp ペアエンド法によるデータ取得を行った。

4. 研究成果

(1) 環境中の窒素濃度に応じた転写量を測定するために、実験条件の検討を行った。OD₆₀₀ が 0.4 になるまで前培養し、(NH₄)₂SO₄ を 0.2%、1%、5%をそれぞれ添加し、細胞増殖を確認した。その結果、MGB874 の細胞増殖は、野生株と遜色ないことが明らかとなった。また、(NH₄)₂SO₄ の 5%添加では、いずれの株においても増殖が悪くなったことから、窒素濃度に対するストレス耐性能は同程度だと考えられる。



0.2%の(NH₄)₂SO₄ 添加後のグルタミン酸合成に関わる複数遺伝子の発現量を Real-time PCR で検討した。その結果、MGB874 では、窒素添加前の栄養飢餓状態で、グルタミンからグルタミン酸への酵素反応を担う gltA、gltC(反応2)の発現量が大きく増加していることが分かった。一方で、グルタミン酸からグルタミンへの酵素反応を担う glnA(反応1)の発現量が大きく減少していたことから、MGB874 では、栄養飢餓状態時に、グルタミン酸を合成する方向に应答していることが示唆された。窒素添加後の应答は、検討した5つの遺伝子(gltA、gltC、glnA、

citB、htrB)に関しては、発現傾向に大きな違いはなかった。しかしながら、野生株では、gltA、gltCを抑制するrocG(反応3)の遺伝子発現が窒素添加後に大きく増加した。一方で、MGB874では発現応答が見られたものの、168ほどの急激な発現上昇は見られなかった。MGB874では、rocGを制御するrocRが欠損しているために、急下名発現応答が観察されなかったと考えられる。しかしながら、MGB874においても僅かなrocGの発現上昇が観察されたことから、rocR以外の制御因子の存在が示唆される結果となった。

以上の結果から、MGB874は窒素源に対する増殖への影響は少ないが、野生株とは異なって栄養飢餓状態時にグルタミン酸を合成する遺伝子発現が大きく上昇しており、グルタミン酸の蓄積が示唆された。今後RNA-Seqによる全転写物の測定を検討している。

(2)タンパク質-DNA結合領域の網羅的検出のために、His-SigAの挿入株を用いて、GeF-Seq法の条件検討を実施した。最適なサイズのDNA断片を得るためにDNaseIの濃度条件の検討を行った。その結果、168では1.5 units/ml、MGB874株では2.0 units/mlのDNaseIの濃度が50bp前後のDNA断片を得るのに最適であることを確認した。株毎にDNaseIの効果が変わるということは、GeF-Seq法を実施する際には、あらゆる条件に対してDNaseIの最適な濃度条件を決定する必要があることを示唆する重要な結果であった。

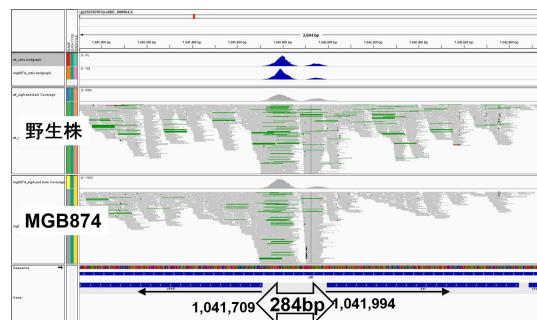
4つのサンプルに対して、合計38,786,312本の配列データを取得した。bowtie2を用いて、得られたデータを枯草菌ゲノム(NC_000964)へマッピングしたところ、97%以上のリードがマッピングされることを確認した。また、マッピングされた総塩基数から、マッピングされたリードの全長100bpのうち、その多くがIlluminaアダプター配列やPCRダイマーを含む人工的な配列に由来すると考えられた。

次に、sigAの結合箇所を網羅的に検出するために、マッピング後のsamファイルをインプットとしたピーク検出法の実装を行った。具体的には、コントロールサンプルと目的サンプルで得られたタグ数の比を算出し、閾値以上の箇所の検出を行った。図1に示すように、284bpの領域幅においてさえも、2つのピークが検出できたことから、非常に高い分解能でsigAの結合領域を明らかにできたと考えている。

上位1%以上のシグナル値を有する領域をsigA結合領域と仮定してピーク検出を行った結果、野生株では、653箇所、MGB874では、603箇所のsigAの結合サイトを同定した。野生株における63個の結合箇所が、MGB874でのゲノム欠失領域に相当していることを確認した。また、MGB874の13の結合サイトは、野生株では検出されなかったことから、MGB874に特異的な領域として同定できた。一

方で、野生株で見られた3つの結合領域は、MGB874では観測されなかった。このことは、ゲノム縮小によって、sigAの新たな結合サイトが創出されていることを示唆する結果であった。これらの結果は、ゲノム縮小によってSigAの結合プロファイルが僅かながら変化しているという興味深い結果であった。

図1 GeF-Seq法の結果例



284bpの領域にある2つのピークを示す(上段:野生株、下段:MGB874)(IGV 2.3によるデータの可視化)

次に、MGB874に特異的な13のピークのピーク幅を見積もったところ、50bp~85bpという非常に高い分解能でピーク領域の推定に成功した。これは、従来のChIP法の分解能を大きく上回る結果であった。本研究によって、9つの領域がSigA結合領域として新規に同定できた。そのうち、7つの領域では遺伝子の発現制御に関わっているものと考えられる。興味深いことに、glnRの上流にsigAが新たに結合していた。glnRの下流には、glnA(反応1)が存在することから、sigAの結合が栄養飢餓状態時のグルタミン酸の合成に関与していることが示唆された。この結果は、窒素飢餓状態でグルタミン酸合成が進んでいる先の結果と一致していると考えられる。

本研究で得られたsigAの高精度での結合位置情報を使えば、モチーフ配列の厳密な推定が可能となる。さらに、MGB874での新たな結合箇所の生物学的意義の検討は非常に興味深く、現在、モチーフ配列の同定を行っている。

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4件)

Ueda T, Takahashi H, Uyar E, Ishikawa S, Ogasawara N, Oshima T. Functions of the Hha and YdgT Proteins in Transcriptional Silencing by the Nucleoid Proteins, H-NS and StpA, in Escherichia coli. DNA Research. 2013 Jun;20(3):263-71. doi: 10.1093/dnares/dst008. 査読有

Manabe K, Kageyama Y, Morimoto T, Shimizu E, **Takahashi H**, Kanaya S, Ara K, Ozaki K, Ogasawara N. Improved production of secreted heterologous enzyme in Bacillus subtilis strain MGB874 via modification of glutamate metabolism and growth conditions. Microbial Cell Factories. 2013 Feb 18;12:18. doi:

10.1186/1475-2859-12-18. 査読有
高橋弘喜. 数理モデルに触れてみよう. 日本生物工学会. 生物工学会誌 Vol91(2013) 2. 査読無

Wada M, **Takahashi H**, Altaf-UI-Amin M, Nakamura K, Hirai MY, Ohta D, Kanaya S. Prediction of operon-like gene clusters in the Arabidopsis thaliana genome based on co-expression analysis of neighboring genes. Gene. 2012 Jul 15;503(1):56-64. doi: 10.1016/j.gene.2012.04.043. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

高橋弘喜, 大島拓, Clayton Selina R, Hobman Jon L, 戸邊亨, 金谷重彦, 小笠原直毅, Stekel Dov J. 数理モデルアプローチによる大腸菌の亜鉛制御機構の解明. 第36回日本分子生物学会年会. 2013年12月3日-6日 神戸

上田剛士, **高橋弘喜**, 石川周, 小笠原直毅, 大島拓. 大腸菌 Hha,YdgT タンパク質による外来性遺伝子の転写抑制. 第7回日本ゲノム微生物学会 2013年3月8日-10日 滋賀

Clayton, S.R., Patel, M.D., Constantinidou, C., Oshima, T., **Takahashi, H.**, Heurlier, K., Stekel, D.J., Hobman, J.L. The role of zinc uptake regulator, Zur, in pathogenic and non-pathogenic Escherichia coli. Biometals 2012 15-19 July. Brussels, Belgium.

Takahashi H, Oshima T, Clayton SR, Hobman JL, Tobe T, Kanaya S, Ogasawara N, Stekel DJ. Mathematical modelling towards understanding zinc homeostasis in Escherichia coli. Biometals 2012 15-19 July. Brussels, Belgium.

〔その他〕

ホームページ等

<http://bioinfo.pf.chiba-u.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 弘喜 (TAKAHASHI, Hiroki)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授
研究者番号: 60548460