

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 27 年度 博士課程 進学
氏名 木村 知宏
指導教員名 大西 康夫

論文題目

希少放線菌の運動性胞子が示す高速遊走運動の分子基盤に関する研究

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は土壌に生息し、栄養豊富な条件下では菌糸を伸ばして生育するが、栄養源が枯渇すると多数の胞子を内包した胞子嚢を形成して休眠状態になる。胞子嚢は水と土壌中の何らかの物質を感知すると開裂し、胞子を放出する。胞子は直径 $0.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$ の球形で、平均 15 本のべん毛を持ち、べん毛を回転させることで平均 $240 \mu\text{m} / \text{sec}$ 程度という高速で水中を遊走する。遊走子は走化性によって生育に適した栄養豊富な環境へ到り、遊走を停止して発芽し、菌糸生長へと移行する。細胞分裂による増殖だけではなく、複雑な形態分化を含む生活環は、本菌最大の特徴といえる。

私は修士課程において、新たな走化性アッセイ系を構築し、3つの走化性遺伝子クラスターのうち、*che* クラスター1 が走化性の発揮に必須だと示した。さらに、遊走軌道の解析を行った。この際、遊走子のガラス表面への付着が度々観察され、基質表面への付着を担うIV型線毛の遺伝子群の機能解析を着想した。また、べん毛形成に関与するチオレドキシシン (AMIS75470、TrxA と命名) を発見した。さらに、前任者により、*che* クラスター1 に存在する *ftgA* 遺伝子の翻訳産物が遊走子のべん毛回転のブレーキの役割を担うことが判明していた。

博士課程では、本菌の特異な生活環を特徴付ける、遊走子が示す高速遊走運動の分子基盤の解明のために、以下の3つの課題に取り組んだ。

第1章 TrxA の機能解析

胞子嚢形成期特異的に転写が増大する遺伝子群を対象とした遺伝子破壊による機能スクリーニングの中で、*trxA* 破壊株 (Δ *trxA* 株) ではべん毛が形成されないことを発見した。 Δ *trxA* 株へ染色体組込み型シャトルベクター-pTYM19 を用いて野生型の *trxA* を導入したところ、相補株の遊走子ではべん毛が正常に形成された。TrxA は他の生物のもつチオレドキシシンと高い相同性を示し、チオレドキシシンモチーフ (CXXC) も保存されている。チオレドキシシンは S-S 結合の架け替えによって標的タンパク質の還元を行うため、当初、30 種類以上のタンパク質の秩序立った組み立てが要求されるべん毛形成の過程において、TrxA が標的タンパク質を還元することでべん毛タンパク質のアセンブリーに寄与していると考えた。そこで、TrxA の CXXC モチーフの Cys を Ser に置換した変異タンパク質をコードする遺伝子を持つプラスミドを Δ *trxA* 株に導入することで、変異タンパク質生産株を作製した。この株は、予想に反してべん毛形成能を有しており、チオレドキシシン活性はべん毛形成に必須ではないことが示された (修士課程時の結果)。

そこで、真の活性残基の特定を試みた。べん毛を持たない放線菌である *Streptomyces griseus* に存在するホモログ (SGR690、相同性 58%) を Δ *trxA* 株へ導入したところ、べん毛形成能が回復しなかったため、べん毛形成能に寄与するアミノ酸残基は TrxA と SGR690 の配列が異なる部分に存在すると考えた。TrxA と SGR690 のキメラタンパク質生産株を計 45 株作製した結果、TrxA の 101 番 Glu~105 番 Gln の 5 アミノ酸 (EKVEQ) がべん毛形成能に重要な機能を担うことが明らかになった。データベース上の放線菌株のゲノムを参照した結果、この 5 アミノ酸は、遊走子を形成する放線菌にのみ保存されていた。

次に、TrxA はタンパク質間相互作用によってべん毛形成過程に関与していると仮定し、べん毛構成タンパク質のうち 23 種類を対象として選択した。これらの候補タンパク質と TrxA の相互作用を、大腸菌内でタンパク質間相互作用を検出するバクテリアルツーハイブリッド (BACTH) 法により調べた。その結果、FliW と TrxA の間に相互作用が検出された。

FliW は、RNA 結合性レギュレーター CsrA または FliC (べん毛繊維タンパク質) と結合することにより、細胞内の FliC タンパク質存在量を一定レベルに維持することが *Bacillus subtilis* や *Campylobacter jejuni* で報告されている (CsrA-FliW システムと呼ぶ)。この系では、細胞内 FliC が過剰である時、FliW は FliC と結合し、CsrA が FliW から遊離する。すると、CsrA は *fliC* mRNA の上流に結合し、FliC の翻訳を停止させる。逆に、細胞内 FliC 量が不足した場合、FliW は FliC だけでなく CsrA と結合し、その結果、CsrA は *fliC* mRNA から乖離する。すると、FliC の翻訳が進行し、細胞内 FliC 量が増加に転じる。

BACTH 法による実験により、FliW-CsrA、および FliW-FliC 間の相互作用も検出されたことから、*A. missouriensis* においても CsrA-FliW システムが保存されていると強く示唆された。そこで、FliW、CsrA の単独遺伝子破壊株および TrxA との二重遺伝子破壊株を作製し、種々の実験によりべん毛形成の有無や細胞内 FliC 量を調べた。その結果、TrxA は FliC から FliW を乖離させ、

FliC を菌体外へ輸送可能な状態にしていると強く示唆された。この結果は、BACTH 法に第 3 のプラスミドを導入して構築したスリーハイブリッド法の実験からも示唆された。

以上の結果から、*A. missouriensis* の TrxA は、他の細菌では細胞内 FliC 濃度を一定に保つ役割を果たす CsrA-FliW システムに関与し、孢子嚢形成期においてのみ FliC の翻訳・分泌を強力に推進する仕組みの鍵因子であると考えられる。*in vitro* 実験により、TrxA はチオレドキシニン活性を有すると示されたため、本研究の成果は全生物において普遍的な機能を持つタンパク質が個々の生物において特殊な機能を獲得した例として興味深い。

第 2 章 FtgA の機能解析

che クラスター 1 中の 4 番目に存在する機能道遺伝子 *AMIS76540* を欠損した株の遊走子は発芽開始後もべん毛の回転を停止しない。この遺伝子は *ftgA* (flagella rotation terminator in germination) と命名された。さらに、野生株へ 1 コピーの *ftgA* を追加で導入して作製した *ftgA* 過剰発現株の遊走子は、孢子嚢からの放出直後から遊走を停止する。FtgA は機能既知タンパク質との相同性がなく、保存されたドメインも存在しない。そこで、FtgA の作用機序解明を目指した。

まず、FtgA の作用対象の特定を目標として、*ftgA* 過剰発現株を親株として UV 照射によるランダム変異導入を行い、*ftgA* 遺伝子座には変異がないが発芽後も遊走をやめない株を複数取得した。これらの株のうち 7 株のゲノムをリシーケンスし、変異点を特定することで FtgA 作用対象の特定を試みた。しかし、リシーケンスの結果からは有望な遺伝子を見いだせず、また、変異点の全てを対象に原因遺伝子かどうかを検証していくことは現実的でなかったため、この手法での FtgA 作用対象遺伝子の特定は差し当たり断念した。

次に、BACTH 法により、べん毛基部およびべん毛の回転方向を制御するとされる走化性関連遺伝子産物と FtgA 間の相互作用を調べた。その結果、べん毛基部の細胞質側に存在する C リングを形成する FliN と FliG、べん毛の回転軸の直下に存在する ATPase である FliI が、それぞれ FtgA と相互作用すると示された。また、FtgA 同士の相互作用も検出された。これらのタンパク質と FtgA の相互作用を *in vitro* で解析するために組換えタンパク質の調製を試みたが、すべてのタンパク質の生産性、可溶化度ともに悪く、また、FtgA が作用する際は FliN, FliG は環状の多量体を形成すると予想されるため、*in vitro* 実験は困難だった。

最後に、FtgA がブレーキとして機能する際に、*che* クラスターの中にコードされる他の因子と共働しているのか調べた。3 つの *che* クラスター全てを破壊した株に 1 コピーの *ftgA* を導入した株を作製したところ、この株の遊走子は、遊走開始時は野生株と同様の運動性を持ち、また、栄養培地と孢子液を混合し、30°C で 1 時間静置後も、野生株同様に遊走を停止した。この結果から、FtgA のブレーキとしての機能には *che* クラスター内の他の因子は関係しないと示された。

以上の結果から、FtgA は *che* クラスター内の他の因子とは独立し、FtgA 重合体を形成しながら FliN, FliG, FliI に作用してべん毛回転のブレーキとして機能していることが強く示唆された。

べん毛回転のブレーキとしては、大腸菌の YcgR や枯草菌の EpsE などが知られているが、FtgA はこれらとは起源を全く異にする新規なブレーキタンパク質であり、その作用機序も未知のものであった。

第3章 線毛遺伝子群の機能解析

野生株の遊走子を透過型電子顕微鏡観察によって、べん毛とは明らかに異なる、直径 2 nm 程度で直鎖状の構造体を見だし、これが線毛の実体だと考えた。*A. missouriensis* のゲノム中に IV 型線毛の遺伝子クラスターが 1 組存在しており、クラスター全長の破壊株と、線毛繊維をコードする *pilA* 単独の破壊株を相同組み換えによってそれぞれ作製した。これらの破壊株の遊走子を光学顕微鏡観察すると、どちらの破壊株でも、野生株と比較してよりスムーズに遊走していた。さらに、栄養培地を孢子液に添加して 1 時間静置すると、野生株は顕微鏡下で数十個の遊走子の塊が見られたのに対し、線毛破壊株の遊走子は目視で観察可能な 4 mm 程度の凝集細胞塊を形成した。この実験をプラスチックチューブ内で行うと、野生株はチューブ表面に菌体が付着したのに対し、破壊株では付着はほぼ観察されなかった。*pilA* 単独破壊株にゲノム組込み型ベクターを用いて *pilA* を導入した遺伝子相補株では、野生株と同様の表現型を示した。

以上の結果から、*A. missouriensis* の線毛は、遊走終了時に菌体同士の接触を回避しつつ、発芽、菌糸生長に移行する際に足場となる基質表面へ付着する機能を持つと考えられた。

総合討論

放線菌でありながら、高速で遊走する遊走子を形成する *A. missouriensis* において、TrxA は他の細菌から水平伝播してきたと考えられるべん毛関連遺伝子の制御系である FliW-CsrA システムに関与し、遊走子でのべん毛形成を成立させる。また、FtgA は、遊走子が菌糸成長に適した条件下で速やかに遊走を停止し、発芽へ移行するために *che* クラスターとは独立に機能し、べん毛回転にブレーキをかけると考えられる。さらに、遊走子表面に存在する線毛は、栄養存在下での遊走子の不用意な凝集の回避と、発芽後に“根を張る”のに適した基質表面への付着に関与していることが示唆された。普遍的に存在するタンパク質が新規機能を獲得した TrxA と、遊走子形成能を持つ放線菌にのみホモログが存在する、極めて特殊な FtgA という 2 つの因子に加え、全く解析例のなかったグラム陽性菌の遊走子の線毛を題材とした本研究により、微生物が他の細菌の持つシステムを取り込み、適宜改変し、自身の生活環に組み入れることで進化を遂げ、特徴的なニッチに適応していく具体例の一つを解明できたと考えている。