

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成26年度博士課程進学
氏名 毛利 佳弘
指導教員名 大西 康夫

論文題目

希少放線菌*Actinoplanes missouriensis*の孢子嚢および休眠孢子形成の
制御機構に関する研究

放線菌は原核生物でありながらその多くは複雑な形態分化を示すことで知られる一群のグラム陽性細菌であるが、中でも希少放線菌*Actinoplanes missouriensis*は特に複雑な形態分化を示す。*A. missouriensis*は栄養豊富な環境下で菌糸生長するが、貧栄養下では数百の孢子を内包した多数の孢子嚢を形成する。孢子嚢は水に溶出した土壤中の何らかのシグナルを感知すると開裂し、遊走子を放出する。遊走子はべん毛回転による運動性を示し、走化性により新たな栄養源へと拡散するが、発芽に適した環境に至ると運動を停止し、菌糸生長を開始する。*A. missouriensis*は孢子嚢を形成して休眠する点、べん毛による運動性を示す点で特徴的な放線菌であり、その形態分化は形態学・進化・生存戦略の観点から興味深い。その制御の分子機構はほとんど研究されていない。本研究においては、*A. missouriensis*の孢子嚢形成および休眠孢子形成の制御機構を解明するため、これらの制御機構において重要な働きをする2つの転写制御因子を中心に研究を行った。

孢子嚢形成を制御する転写制御因子AmBldDの機能解析およびその標的遺伝子の探索

所属研究室における先行研究において、放線菌*Streptomyces coelicolor* A3(2)の形態分化および二次代謝のマスターレギュレーターであるBldD (ScBldD) のオルソログ (AmBldD) の遺伝学的解析、機能解析が進められていた。AmBldDは自身をコードする遺伝子のプロ

モーター領域に存在する回文様配列5'-GTCACGCAGCGTAGC-3'に結合し、遺伝子破壊株の表現型観察から正常な孢子嚢の形成に必須であることが示されていたが、AmBldDの標的遺伝子については未知であった。

まず、抗AmBldD抗体を用いたWestern blottingや定量RT-PCRによる*AmblDD*の発現解析を行い、AmBldDタンパク質が栄養菌糸および発芽細胞に多量に存在する一方で、*AmblDD*遺伝子の転写量は栄養菌糸、孢子嚢、遊走子、発芽細胞のいずれにおいてもほぼ同等であることを示した。このことはAmBldDタンパク質の存在量が翻訳レベルまたは翻訳後のレベルで制御されていることを示唆している。

次に、AmBldDが栄養菌糸で強く発現していたことから、栄養菌糸を用いて抗AmBldD抗体によるChromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq) 解析を行うことで、AmBldDの結合領域を網羅的に調べた。ChIP-seq解析により検出された437個のAmBldD結合領域に対する*in silico*解析により、5'-nn(G/A)TnACn(C/G)n(G/C)nGTnA(C/T)nn-3'からなる19 bpの回文配列を346領域から発見した。346領域のうち3つについては、ゲルシフトアッセイによりAmBldDが結合することを確認した。この配列集団は上述した*AmblDD*のプロモーター領域に存在するAmBldD結合配列を包括していたことから、これら346個の領域に存在する回文配列をAmBldD結合配列 (AmBldD box) とした。RNA-seq解析から予測された転写開始点の上流200塩基から下流50塩基までの領域にこの配列を持つ遺伝子は207個 (AmBldD結合箇所は161個) であり、これら207遺伝子をAmBldD標的遺伝子候補とした。このうち27個の遺伝子に焦点を当て、固体栄養培地で培養した野生株と*AmblDD*破壊株における転写解析を行ったところ、12遺伝子の転写が野生株と比較して*AmblDD*破壊株で増大していた。このうち4つの遺伝子の*S. coelicolor* A3(2)におけるオルソログ (*bldM*, *ssgB*, *whiD*, *wblA*) は形態分化関連遺伝子であり、ScBldDの標的遺伝子であった。このようにAmBldDとScBldDの標的遺伝子群は一部に重複が見られたものの、その数は17個 (8.2%) だけであった。このことは、AmBldDが転写制御する遺伝子群はScBldDが制御する遺伝子群と大きく異なっているが、形態分化において重要な一部の遺伝子群のBldDによる転写制御に関しては、進化上、*S. coelicolor* A3(2)と*A. missouriensis* において保存されてきたことを示唆している。

*A. missouriensis*におけるべん毛遺伝子の転写解析

放線菌の多くは一般的に菌糸生長し、運動性を持たない。しかしながら、*Actinoplanes* 属放線菌をはじめとするいくつかの放線菌の孢子はべん毛による運動性を有する。所属研究室における先行研究において*A. missouriensis*のべん毛が、9つの転写単位からなる34個の遺伝子によって合成されることが示されており、その転写開始点も決定されていた。本研究において、孢子嚢形成培地での培養1, 3, 6, 40日目のRNA-seq解析により、べん毛遺伝子群の転写単位の数が9ではなく11であることを見出し、新たに発見された2つの転写単位

の転写開始点を同定した。さらに、べん毛遺伝子群の11の転写単位にはプロモーター配列5'-CTCA-(N₁₅₋₁₇)-GCCGAA-3'が保存されていることを改めて発見した。この配列の5'-GCCGAA-3'モチーフは大腸菌やサルモネラ菌においてべん毛遺伝子の転写を活性化するシグマ因子であるFliAの認識配列の-10領域5'-GCCGAT-3'とよく似ていた。このことは*A. missouriensis*においてもFliAファミリーシグマ因子がべん毛遺伝子群の転写を制御することを示唆している。また、RNA-seq解析から発現量を算出し、発現変動パターンの違いによって、べん毛遺伝子群の11の転写単位を4つのグループに分類した。

レスポンスレギュレーターTcrAによるべん毛遺伝子の転写制御の解析

過去のべん毛研究において、べん毛遺伝子群の転写は階層的に制御されていることが示されている。大腸菌やサルモネラ菌ではclass 1遺伝子にコードされる転写制御因子FlhDCがclass 2遺伝子を転写活性化し、class 2遺伝子に含まれる*fliA*がコードするシグマ因子FliAがclass 3遺伝子の転写に要求される。*A. missouriensis*のゲノム上でべん毛遺伝子群近傍に見出された転写制御因子をコードする遺伝子*tcrA*は前述したclass 1遺伝子と予想され、先行研究においてTcrAがべん毛遺伝子全体を転写活性化していることが示されていた。

修士論文研究において、べん毛遺伝子群の11の転写単位のうち3つにおいて、プロモーター上流領域にTcrAが結合することを示し、5'-GCAACCG-N₄-GCAACCG-3'からなる反復配列をTcrA結合配列 (TcrA box) として同定していたが、本研究においてさらに2つについてもTcrAがプロモーター上流領域に結合することを示し、最終的にTcrAが5つの転写単位を直接制御することを示した。発現変動パターンによって4つに分類されたべん毛遺伝子グループのうち、孢子嚢形成3日目から6日目にかけて発現が増大し、40日目においても6日目と同等に発現していたグループはこの5つの転写単位から構成されていたことから、このグループの転写をTcrAが直接制御していることが支持された。一方で、前述したとおり、べん毛遺伝子群がFliAファミリーシグマ因子によって転写制御されることが示唆されている。*A. missouriensis*のゲノムにはFliAファミリーシグマ因子をコードすると予想される遺伝子が4つ (*fliA1-4*) 存在しており、そのうち*fliA1-3*は野生株で強く発現する一方で*tcrA*破壊株ではほとんど発現しないことが野生株と*tcrA*破壊株のRNA-seq解析から示された。さらにTcrAが*fliA1-3*のプロモーター領域に結合することを示し、TcrAが*fliA*の転写を直接制御することを示した。このことから、TcrAによる転写活性化により発現したFliA1-3のいずれかまたは複数が、べん毛遺伝子の転写を活性化していることが示唆された。

TcrAは二成分制御系 (TCS) を構成するレスポンスレギュレーター (RR) と相同性があり、TCSのもう1つの構成因子であるヒスチジンキナーゼによりリン酸化されることでDNA結合活性が増大することが予想された。既知のRRの多くはアセチルリン酸によりリン酸化することが可能であるが、TcrAもアセチルリン酸によりリン酸化されることを

Phos-tag SDS-PAGEにより示した。また、アセチルリン酸によりリン酸化されたTcrAのDNA結合活性が非リン酸化TcrAと比べて増大することを示した。

孢子嚢の休眠・覚醒を制御する転写制御因子TcrAの直接の標的遺伝子の同定

*tcrA*破壊株ではべん毛遺伝子の転写が低下したほか、*tcrA*破壊株の孢子が孢子嚢内で発芽していたことから、TcrAはべん毛合成だけでなく休眠孢子の形成を制御することが示唆されていた。

修士論文研究において、休眠孢子形成を制御する遺伝子の同定を目的とした野生株と*tcrA*破壊株のRNA-seq解析により、TcrAが少なくとも269遺伝子の転写を活性化することを明らかにしたが、TcrAの直接の標的遺伝子および孢子の休眠状態への移行の制御機構は未解明であった。そこで、TcrAによって活性化される269遺伝子が構成する155転写単位のプロモーター領域の*in silico*解析を行った。その結果、130個のプロモーター様配列5'-CTCA(G/A)-n₁₅-GCCGA(T/A) -3'と46個の5'-nnGCA(A/C)CCG-n₄-GCA(A/C)CnGn-3'からなるTcrA box様配列を発見した。前者はFliA認識配列とよく似ていたことから、TcrAによって活性化される遺伝子の多くはFliA1-3を介して活性化されることが示唆された。一方、後者の46個のTcrA box様配列のうち41個の配列に実際にTcrAが結合することを、ゲルシフトアッセイおよび競合ゲルシフトアッセイにより示した。TcrAが結合した41個のTcrA boxのうち35個のTcrA box様配列の40-70塩基下流には、RNA-seq解析から予想された転写開始点が存在していたため、TcrAはこれらの転写単位を直接活性化していると考えられた。

AmBldDによる*tcrA*と*fliA*の転写制御の解析

*In silico*解析によって*A. missouriensis*のゲノムを探索した結果、*tcrA*, *fliA1*, *fliA3*の上流にもAmBldD boxを発見し、ゲルシフトアッセイによりAmBldDが*tcrA*, *fliA1*, *fliA3*のプロモーターを含む領域に結合することを示した。一方、定量RT-PCRによる転写解析の結果、固体栄養培地で培養した野生株では*tcrA*も*fliA1-3*も発現していないが、*AmBldD*破壊株では*tcrA*の転写は野生株と比較して増大し、*fliA1-3*の転写に有意な増大は見られなかった。以上のことから栄養菌糸においてAmBldDが*tcrA*の転写を抑制していることが示唆された。

総括

AmBldDの標的遺伝子を同定し、孢子嚢形成、べん毛合成と休眠孢子形成をそれぞれ制御する遺伝子*ssgB*と*tcrA*をその中に発見した。また、TcrAが直接活性化する41個の転写単位を同定し、TcrAの直接の標的遺伝子に含まれる*fliA1-3*がコードするシグマ因子FliA1-3が130個の転写単位を活性化していることを示唆した。今後AmBldDやTcrAの標的遺伝子から*A. missouriensis*の孢子嚢や休眠孢子の形成に関与する遺伝子が発見されることが期待される。