

博士論文（要約）

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

農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 醗酵学研究室

毛利佳弘

目次

序論

第一章 放線菌の形態分化について	4
第二章 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> について	5
第三章 <i>A. missouriensis</i> の解析の歴史	7
第四章 本研究の目的および本論文の構成	16
第五章 使用菌株、ベクター及び培地組成	17

本論

第一章 胞子嚢形成を制御する転写制御因子AmBldDの機能解析およびターゲット遺伝子の探索	21
第二章 <i>A. missouriensis</i> におけるべん毛遺伝子の転写解析	22
2.1 背景.....	22
2.2 結果.....	22
2.2.1 胞子嚢形成培地培養した細胞の RNA-seq 解析によるべん毛遺伝子の転写解析.....	22
2.3 考察.....	24
2.4 方法.....	26
第三章 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研究 ..	28
第四章 胞子嚢の休眠・覚醒を制御する転写制御因子TcrAの直接のターゲット遺伝子の同定	29
第五章 AmBldDによる <i>tcrA</i> と <i>fliA</i> の転写制御	30
総括	30
引用文献	30

序論

第一章 放線菌の形態分化について

土壌細菌である放線菌は、抗生物質を初めとした多様な二次代謝産物を生産することで知られるグラム陽性細菌である一方で、原核生物でありながらカビにも似た複雑な形態分化を行い、形態学的にも非常に興味を持たれる細菌である。例えば、その中でも特に研究されている放線菌である*Streptomyces*属放線菌は高度に分岐した基底菌糸を形成した後、空中に向かって気中菌糸を伸ばす。気中菌糸形成が終了すると、気中菌糸に隔壁が入り、1細胞につき1つのゲノムを持った孢子を形成する。*Streptomyces*属放線菌は土壌に生息する放線菌の大半を占めることから、それ以外の放線菌は総称して希少放線菌と呼ばれている。～年16S rRNA分類法により放線菌の分類がなされて以来、*Streptomyces*属放線菌のように形態分化を示さない細菌も放線菌に分類されている。例えば、結核の原因菌として知られる結核菌*Mycobacterium tuberculosis*は、一般的な細菌と同様に細胞分裂により増殖する。グルタミン酸生産菌として知られる*Corynebacterium glutamicum*やジフテリアの病原菌*Corynebacterium diphtheriae*を含む*Corynebacterium*属放線菌は、先端成長型の桿菌であり、しばしば菌体の両端または片端が膨れた、棍棒状の形態を示す。一方で、*Streptomyces*属放線菌とは異なる形態分化を示す放線菌も多数存在する。*Streptosporangiaceae*科の*Streptosporangiaceae*属や*Planobispora*属、*Thermomonosporaceae*科の*Spirillospora*属、*Frankiaceae*科の*Frankia*属、*Micromonosporaceae*科の*Actinoplanes*属や*Dactylosporangium*属は孢子嚢を形成することが知られている (Fig. 0-1)。*Frankia*属放線菌は植物共生菌であり、窒素欠乏条件下でベシクルと呼ばれる球状の細胞を分化させ、窒素固定反応を行う点で他の放線菌と比べて特殊である (Fig. 0-1)。また、放線菌の中にはべん毛と呼ばれる細胞小器官を形成して運動性を示すものも存在する。*Micromonosporaceae*科の*Actinoplanes*属と*Coutinoplanes*属放線菌、*Kineosporiaceae*科の*Kineococcus*属、*Pseudonocardiaceae*科の*Actinokineospora*属がこれに該当する。

以上のように、放線菌は属レベルで多様な形態分化を示すことが知られている。その分子機構の解析は*Streptomyces*属放線菌において良く研究されており、明らかにされていることが数多くある。*Streptomyces*属放線菌の形態分化の分子制御機構については後述の章で詳しく述べる。以上のようなことが報告されているが、希少放線菌の形態分化の分子制御機構はほとんど明らかにされていない。

Fig. 0-1. 放線菌が形成する様々なタイプの孢子鎖の模式図 (Barka et al., 2015を参照)。

第二章 希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* について

前章で述べたように、放線菌は属レベルで多様な形態分化を示す。その分子制御機構の研究は形態学的・進化学的に非常に興味深い。その中でも *Micromonosporaceae* 科に属する放線菌は多様な形態分化を示し、孢子囊の有無、孢子形成の仕方や個数、運動性の有無に *Micromonosporaceae* 科の中でも違いが見られる。私が研究対象とした希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は、この *Micromonosporaceae* 科に属しており、栄養豊富な環境下では基底菌糸を形成し、栄養の少ない環境では短い孢子囊柄を介した多数の孢子囊を形成して休眠する (Fig. 0-2)。その孢子囊は数百の遊走子を内包しており、水に溶けた土壌中の何らかのシグナルを感知すると開裂し、多数の運動性孢子を放出する。孢子は初め薄皮に包まれており、薄皮から飛び出して 15 ± 9 本のべん毛で運動する ()。運動を開始した遊走子は、走化性を示し、新たな栄養源へとたどり着くと運動を停止して再び発芽を開始する。 *Dactylosporangium* 属は孢子囊中に運動性孢子を作るという点で *Actinoplanes* 属と似ているが、 *Actinoplanes* 属は球形の孢子囊中に大量の孢子を作る一方で、 *Dactylosporangium* 属は縦長な孢子囊に3つないし4つの孢子を作る (Thiemann *et al.*, 1967) (Fig. 0-1)。また *Catenuloplanes* 属、 *Couchioplanes* 属は運動性孢子を形成するが、孢子囊を形成せず、気中菌糸が隔壁形成を起こして孢子鎖を形成する。 *Catellatospora* 属も気中菌糸が隔壁形成した孢子鎖を形成するが、孢子に運動性はない (Fig. 0-1)。 *Micromonospora* 属は孢子囊を形成せず、孢子に運動性はない (Fig. 0-1)。このように、放線菌における孢子の形成の仕方や孢子の形状は属レベルで様々である (Koch *et al.*, 1996)。

本研究の研究対象である *Actinoplanes missouriensis* NBRC13243 は1963年、Couchi のpollen-baiting techniqueによってアメリカのミズーリ州の農家の庭の土壌より単離された (Couchi, 1963)。 *A. missouriensis* (ATCC23342) は糖質変換に利用されるキシロースイソメラーゼを生産するほか (Anheuser-Busch, 1974)、フラボノイド (Rose and Fetzner, 2005)、天然ゴム (Jendrosseck *et al.*, 1997) などに対して高い分解活性を持つ。また、 *A. missouriensis* はActaplanin (Debono *et al.*, 1984) や5-azacytidin (Toyo Brewing, 1978) など抗生物質生産を行うことも知られている。さらに同種の株はType III polyketide synthaseなど二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを有しており、様々な二次代謝産物生産能を潜在的に有している (Awakawa *et al.*, 2011)。このように二次代謝産物や酵素については解析が進んでいるものの、形態分化に関する研究は顕微鏡観察が主であり、分子生物学的な解析はほとんどなされていなかった。

形態分化の特徴から *A. missouriensis* は環境中で以下のような生存戦略をとっていることが1つの仮説として考えられる。初め水上に浮遊した植物体に孢子が付着し、植物体を栄養源として発芽および栄養生長する。乾燥状態になると耐熱性、耐乾燥性の孢子囊を形成し、雨が降るなどして水に土壌物質が溶け出すとこれに含まれる何らかの物質を感知して、孢子囊が開裂する。孢子囊の開裂により泳ぎだした数百の孢子は、走化性に従い新たな栄養源 (植物体等) へと泳ぎ、付

着して、再び発芽し、栄養生長を開始する。以上のような生存戦略をとっている可能性を考慮すると *A. missouriensis* の形態分化は生存戦略の観点からも非常に興味深い。そこで *A. missouriensis* の形態分化、走化性や運動性の制御機構を明らかにすることを目的として、私の所属する研究室である醗酵学研究室では全ゲノム解析をはじめとして、研究が進められた。

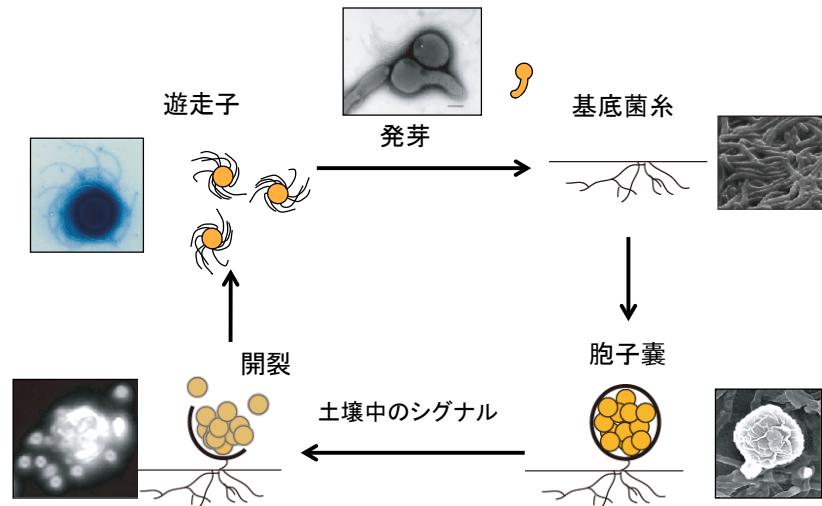


Fig. 0-2. *A. missouriensis* の生活環。遊走子は栄養豊富な環境下で発芽して、菌糸生長し、貧栄養下で胞子嚢を形成する。胞子嚢は水に溶けた土壌中のなんらかのシグナルを感知すると開裂し、遊走子を放出する。遊走子は水中を高速で泳ぎ、新たな栄養物質を感知すると運動を停止し、再び発芽を開始する。

第三章 *A. missouriensis* の解析の歴史

A. *A. missouriensis*に関する研究の背景

前章で述べたように、*A. missouriensis*は複雑な生活環を持ち、その形態分化の制御メカニズムには非常に興味を持たれるが、顕微鏡による観察しかなされていなかった。そこで*A. missouriensis*の孢子嚢形成、休眠・覚醒、運動性の制御機構を明らかにする手がかりを得るべく、醗酵学研究室は他の研究機関と共同で*A. missouriensis* NBRC13423の全ゲノム配列を明らかにした(Yamamura *et al.*, 2012)。その結果、*A. missouriensis*は8.8 Mbpの環状ゲノムであり、8125個のORFを持つことが判明した。張氏により、接合による遺伝子導入法が確立され、pK19mobsacB () を改変したベクターを用いた遺伝子破壊法が確立されたことで、*A. missouriensis*の分子遺伝学的研究が可能となった。また藤田氏と張氏により、*A. missouriensis*の近縁種である*Couchioplanes caeruleus* subsp. *azureus*由来の環状プラスミドpCAZ1より、大腸菌とのシャトルベクターpCAM1とpCAM2が構築された(藤田, 2010, Fujita, 2015)。pCAM1とpCAM2は、*A. missouriensis*の菌糸内において1染色体あたりそれぞれ1コピー、4コピーのコピー数で存在する。放線菌においてよく使用されるゲノム組み込み型のベクターであるpTYM19 (Onaka *et al.*, 2009) にアブラマイシン耐性遺伝子を挿入したベクターpTYM19-Apr^rが張氏により作製されており、安定的に*A. missouriensis*のゲノムにDNAを導入することが可能となった。以上のように、形質転換効率は悪いものの、様々な角度からの*A. missouriensis*の分子遺伝学的研究が可能となっている。また、藤田氏により*A. missouriensis*の遊走子を効率的に回収する方法も開発された。それまでは、土壌からアルカリで抽出した土壌抽出液に孢子嚢を懸濁することで孢子嚢を開裂させ遊走子を回収していたが、ニトロフミン酸を含む培地である孢子嚢形成培地で孢子嚢を形成させ、このプレートに直接25 mM NH₄HCO₃を重ねることで孢子嚢が開裂することが発見され、重層液を回収することでそれまでの手法より多くの遊走子を回収することが可能になった(藤田, 2010)。また、種村氏により25 mM ヒスチジンに孢子嚢を懸濁することでも孢子嚢が開裂することが発見された(種村, 2013)。

*A. missouriensis*の分子遺伝学的研究は、べん毛遺伝子の研究に端を発する遊走子の運動性の研究と、孢子嚢・遊走子・発芽細胞のプロテオーム解析による各細胞状態特異的なタンパク質の同定という主に2つの研究から始まった。

B. *A. missouriensis*のべん毛による運動性に関する研究

B-1. バクテリアのべん毛構造およびべん毛遺伝子の制御機構に関する予備知識

B-1-1. べん毛構造に関する基礎知識

漠手苅のべん毛は複雑な分子機械であり、その構成は厳密に制御されている。これまで研究されている全てのバクテリアにおいて、べん毛構造は大きく分けて基部体 (basal body)、フック、

フィラメントの3つに分かれる。基部体は回転モーターとして働き、ジョイントであるフックを介して、フィラメントを回すことで、バクテリアは液体中を泳ぐことが可能となる。既知のべん毛の基部体は全て、Cリング (cytoplasmic ring)、MSリング (membrane and supramembrane ring)、ロッドを有している。これに加えて、グラム陰性細菌は基部体にPリング (peptidoglycan ring) とLリング (lipopolysaccharide ring) を有している。基部体にはIII型分泌装置が含まれており、この装置によりロッド、フック、フィラメントの生合成に必要なタンパク質を分泌することで、細胞外にそれらの構造を構成することが可能となる (Fig. 0-3)。

Fig. 0-3. べん毛構造の模式図 (日本生物物理学会 (<http://www.biophys.jp/highschool/A-13.html>) を参照)。

B-1-2. べん毛遺伝子の転写制御に関する基礎知識

べん毛合成を行うべん毛遺伝子群は転写レベルで厳密に制御されており、既知のバクテリアのべん毛遺伝子群の転写は全て階層的に制御されている。すなわち、べん毛遺伝子が順番に転写されることで最終的なべん毛構造におけるタンパク質のアセンブリが制御されることが知られている。遺伝学的解析により、サルモネラ菌においてべん毛遺伝子のオペロンは3つの階層 (class) で構成される制御カスケードで制御されることが明らかにされている。Class 1遺伝子である*flhC*と*flhD*は転写制御因子FlhDCをコードしており、class 2遺伝子を制御している。Class 2遺伝子はフックと基部体を構成するタンパク質とclass 3遺伝子を制御する転写制御因子をコードしており、class 3遺伝子はフィラメントタンパク質と走化性に関わるタンパク質をコードしている。フックと基部体が構成されるまではclass 3遺伝子が転写されないというチェックポイント機構も存在することが報告されている (Kutsukake et al., 1990)。その機構を担っているのが、class 2遺伝子がコードする転写制御因子であるシグマ因子FliAとアンチシグマ因子FlgMである (Kutsukake et al., 1994, Chadsey et al., 1998)。FlgMはFliAに対するアンチシグマ因子であり、FliAに結合することでFliAの活性を抑制する。FlgMが基部体から排出されることで、FlgMによるFliAの抑制が解除される。FlgMによる抑制が解除されたFliAはRNAポリメラーゼと相互作用して、class 3遺伝子の転写を直接活性化する (Fig. 0-4)。つまり、基部体が完成してFlgMが排出されて初めてclass 3遺伝子の転写がFliAにより開始される。一方で、*Caulobacter crescentus*のべん毛遺伝子の転写制御は4つの階層構造に分かれている。Class 1遺伝子である*ctrA*はグローバルな転写制御因子CtrAをコードしており、CtrAはMS-ringやflagellar switch、type III分泌装置をコードするclass 2遺伝子の転写を活性化する。Class 3およびclass 4の遺伝子の転写には $\sigma 54$ (FliAホモログ) とclass 2遺伝子に含まれる遺伝子*flbD*にコードされるFlbDが必要である。*Bacillus subtilis*においても似たような制御カスケードが存在し、*fla-che*オペロンより活性化された*sigD* (FliAホモログ) が、フィラメントタンパク質Hagやフックタンパク質FlgKLをコードする遺伝子を含む後期のべん毛遺伝子の転写を制

御している。*C. crescentus*と*B. subtilis*においてもフックやフィラメントは基部体ができた後、転写されるようである。

Fig. 0-4. サルモネラ菌のべん毛遺伝子の階層的転写制御

B-2. *A. missouriensis*におけるべん毛の研究

*A. missouriensis*の遊走子は直径 $0.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$ の球状の細胞であり、15本前後のべん毛を有し、135 $\mu\text{m}/\text{sec}$ の速度で遊泳する。この速度は、*Bacillus subtilis*の約12倍、*Salmonella enterica* serovar Typhimuriumの約4.5倍という高速である。また、*A. missouriensis*の遊走子はアミノ酸、芳香族化合物、糖、無機イオンに対する走化性も有している (Palleroni, 1976、Hayakawa et al., 1991)。*Actinoplanes*属放線菌の遊走子は高速で運動し、走化性を持つ点において興味深い、その研究は顕微鏡観察にとどまっており、分子生物学的な研究はなされていない。また、放線菌の中でも運動性を示すものは一部しか存在しておらず、放線菌におけるべん毛研究に関する分子生物学的知見はほとんどない。そこで、醗酵学研究室では*A. missouriensis*の運動性に関する知見を得るべく、分子生物学的研究が行われた。

B-3. *A. missouriensis*のべん毛に関する遺伝学的研究

前述したとおり、べん毛合成を行う遺伝子群は他の多くの菌で研究されており、細菌において広く保存されている。全ゲノム配列の決定の結果、*A. missouriensis*においてもべん毛遺伝子群が保存されていた (Yamamura et al., 2012)。*A. missouriensis*のゲノム上には33遺伝子からなるべん毛遺伝子クラスター (AMIS_76150-AMIS_76470) が存在していた (Table 0-1、Fig. 0-5)。また、輸送装置の1つであるFliQと予想されるタンパク質をコードする遺伝子AMIS_2110がべん毛遺伝子クラスターとはゲノム上において離れた位置に発見された。発見されたべん毛遺伝子群のうち*fliQ*、*fliC*、*fliK*遺伝子が破壊されており、他のバクテリアのそれらの遺伝子と同様の機能を有していることが張氏により明らかにされている (張, 2010、Jang et al., 2016)。また、べん毛遺伝子クラスター内に存在する遺伝子*lytA*はlytic transglycosylaseをコードしており、既知のべん毛遺伝子と高い相同性を有するものは存在しないが、破壊するとその遊走子はべん毛を合成しない。したがって*lytA*もべん毛合成に必要な遺伝子であることが示された (張, 2010、Jang et al., 2016)。以上のことから、34遺伝子から構成されるべん毛遺伝子群のうち既知のべん毛遺伝子と相同性のあるものはそれらと似たような機能有していることが示唆され、機能未知の遺伝子もべん毛合成に関与する可能性が高いことが予想される。

Table 0-1. *A. missouriensis* におけるべん毛遺伝子 (Jang et al., 2016 を参照)

Fig. 0-5. *A. missouriensis*のべん毛遺伝子の構成 (Jang et al., 2016を参照)。33遺伝子で構成されるべん毛遺伝子クラスターと、それらとは離れた位置に存在するべん毛遺伝子*fliQ* (青矢印) により構成される。

B-4. べん毛遺伝子の転写解析

べん毛遺伝子はいくつかの転写単位に分かれていることが予想されたことから、遺伝子間領域を増幅する半定量RT-PCR、S1ヌクレアーゼマッピング解析、5'-RACEにより9つの転写単位とそれぞれの転写開始点が決定された (Fig. 0-6) (張, 2010)。決定された転写開始点の情報をもとに、プロモーター領域のDNA配列のアラインメントが取られた結果、GCTCAG-N₁₆₋₁₈-CCGAAGからなるプロモーター配列が*fliD*から始まる転写単位以外の8つの転写単位から発見された。9つの転写単位について半定量RT-PCRによる転写解析が行われた結果、べん毛遺伝子は栄養液体培地で培養された菌糸では発現せず、孢子嚢で発現していることが示された。

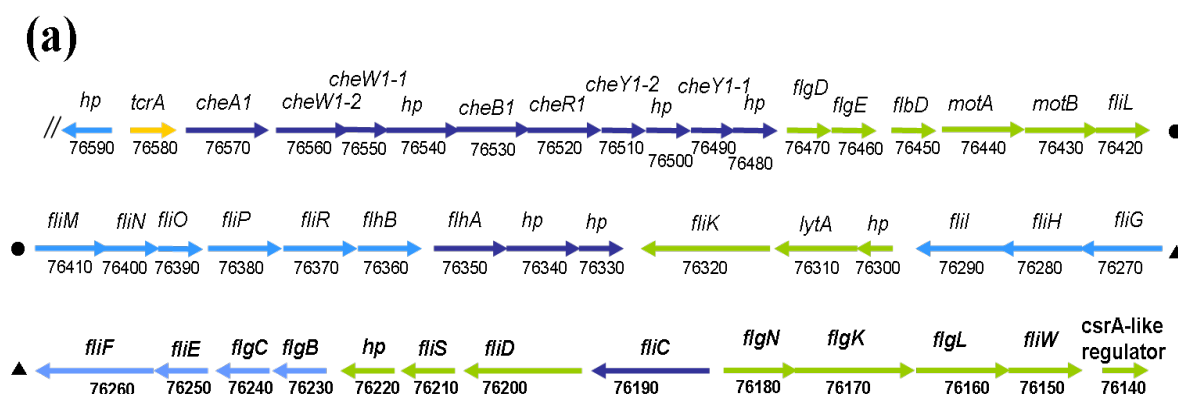


Fig. 0-6. べん毛遺伝子クラスター内の8つの転写単位 (張, 2010より一部改変)。色によって転写単位が区別されている。*cheA1*遺伝子から始まるオペロンは走化性遺伝子クラスターである。その隣にはべん毛遺伝子クラスターの周辺に唯一存在するDNA結合性の転写制御因子をコードする遺伝子*tcrA*が存在している。

B-5. べん毛遺伝子の転写制御に関する解析

B-1-2で述べたように、大腸菌やサルモネラ菌において、class 2のべん毛遺伝子の転写はclass 1遺伝子FlhDCによって開始される (Macnab, 2003)。 *C. crescentus*においても、class 1遺伝子CtrAがclass 2のべん毛遺伝子の転写を活性化する (Reisenauer et al 1999)。 *A. missouriensis*においてもこのようなclass 1遺伝子に相当するような転写制御因子をコードする遺伝子の存在が予想された。べん毛遺伝子クラスターにゲノム上隣接する走化性遺伝子クラスターの隣にtwo-component system response regulatorという転写制御因子をコードする遺伝子*AMIS_76580* (*tcrA*) が発見されたことから、これがべん毛遺伝子群の転写を制御しているのではないかと考えられた。そこで*tcrA*遺伝子の破壊株が取得され、Cz培地での培養時のべん毛遺伝子の転写が野生株のものと比較された (張,

2010)。その結果、*AMIS_76300*遺伝子について野生株と比較して*tcrA*破壊株で顕著に転写が減少していた (Fig. 0-7)。他のべん毛遺伝子の転写も*TcrA*により制御されていることが考えられたことから、Cz培地より孢子嚢形成効率の良い培地であるHAT培地から回収した細胞を用いて、より定量性のある解析手法である定量RT-PCRにより*AMIS_76300*を含む9つの転写単位の9つの遺伝子 (*fliQ*, *fliL*, *AMIS_76300*, *fliI*, *flhA*, *flhB*, *fliC*, *flgN*) について転写量を調べたところ、いずれの遺伝子の転写量も野生株と比較して10倍以上減少していた (毛利, 2014)。また、野生株と*tcrA*破壊株のRNA-seq解析においてもべん毛遺伝子全体の転写が*tcrA*破壊株で減少していた (毛利, 2014)。以上の結果は*tcrA*破壊株においてべん毛遺伝子の転写が大きく減少していることを示唆していた。しかしながら、*tcrA*破壊株の遊走子の観察はなされていない。なぜならば、*tcrA*破壊株の孢子嚢は、野生株の孢子嚢が開裂する条件においても開裂しないためである。*TcrA*に関する更なる研究に関しては序論第三章Eで後述する。

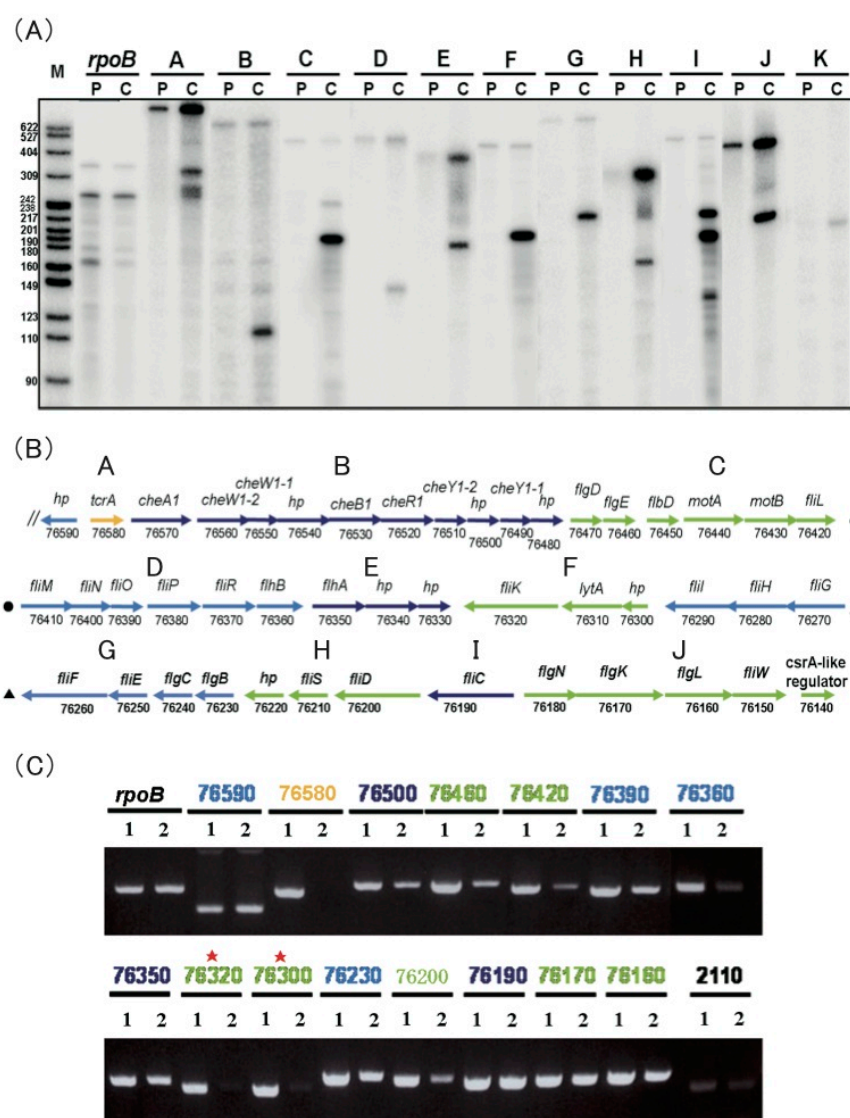


Fig. 0-7. 野生株と*tcrA*破壊株におけるべん毛遺伝子の転写解析 (張, 2010より一部改変)。(A) 低解像度S1マッピングによる、*tcrA* ((A) (B) のA)、走化性遺伝子 ((A) (B) のB)、べん毛遺伝

子の転写開始点の決定。野生株を使用。P : PYM栄養培地で培養した菌糸から抽出したRNAを用いたS1マッピング。C : Cz孢子嚢形成培地から回収した孢子嚢や孢子から抽出したRNAを用いたS1マッピング。*tcrA*の転写開始点は3つ存在する。(B) 決定されたべん毛遺伝子クラスターの転写単位。(C) 半定量RT-PCRによる野生株 (1) と*tcrA*破壊株 (2) におけるそれぞれの転写単位の転写量の比較。赤の★は野生株と*tcrA*破壊株で転写量に顕著な変化があった遺伝子を示している。

C. *A. missouriensis*の孢子嚢・遊走子・発芽細胞のプロテオーム解析

毛利佳弘の博士論文の全文をインターネット公表できない「やむを得ない理由」のため除外。

D. *A. missouensis*の形態分化を制御する転写制御因子AmBldDの解析

D-1. 放線菌における形態分化の分子制御機構に関する予備知識

序論第一章で述べたとおり、放線菌の多くは多様な形態分化を示す。最もよく研究されている放線菌である*Streptomyces*属放線菌は高度に分岐した基底菌糸を形成した後、基底菌糸から上空へと気中菌糸を形成する。気中菌糸形成が終わると、気中菌糸の同調的に隔壁が形成され、1細胞に1ゲノムの孢子が形成される。この気中菌糸形成と孢子形成は多くの形態分化関連遺伝子により厳密に制御されている (Chandra and Chater, 2014、Bush et al., 2015)。形態分化関連遺伝子は**bld**遺伝子と**whi**遺伝子の2つに大別される。**bld**遺伝子は気中菌糸形成に必要な遺伝子であり、**bld**遺伝子の変異株は気中菌糸が形成できなくなり、**bald** (はげ) の表現型を示す。一方で、**whi**遺伝子は孢子形成に必要な遺伝子であり、その変異株は気中菌糸を形成するものの、孢子形成しない。*Streptomyces*属放線菌の気中菌糸は白色であり、孢子形成に伴い茶色色素が生産されるため、**whi**変異株のように気中菌糸形成するが孢子形成しない場合そのような株のコロニーは白色 (white) のままである。

bld遺伝子の1つである**bldD**はDNA結合タンパク質BldDをコードしており、BldDは*Streptomyces*属放線菌の形態分化の制御カスケードにおいて他の気中菌糸形成や孢子形成に必要な遺伝子の転写を抑制している (Fig. 0-10)。BldDは既知の孢子形成する放線菌でアミノ酸配列相同性77-99%と高く保存されており (Tschowri et al., 2014)、*S. coelicolor* A3(2)のBldD (ScBldD) と*Streptomyces venezuelae*のBldD (SvBldD) は特に良く研究されている。ScBldDは少なくとも167遺伝子を直接制御しており、その25% (42遺伝子) はDNA結合性の転写制御因子をコードしている (den Hengst et al., 2010)。ScBldD結合領域の80%以上の領域には、ScBldDが結合する15-bpからなる回文配列 5'-nTnACnC(A/T)GnGTnAn-3' (ScBldD box) が保存されている。ScBldDレギュロンは、*ScbldD*自身を含む**adpA** (**bldH**), **bldA**, **bldC**, **bldM**, **bldN**, **ssgR**, **ssgA**, **ssgB**, **whiB**, **whiD**, **whiG**, **ftsZ**, **smeA-sffA**といった多くの形態分化関連遺伝子を含んでいる。**bldH**, **bldA**, **bldC**, **bldM**, **bldN**は**bld**遺伝子、**whiB**, **whiD**, **whiG**は**whi**遺伝子である。WhiGは大腸菌やサルモネラ菌のべん毛合成を制御するシグマ因子とFliAと40%程度の相同性を持ちながら、孢子形成や孢子成熟に関わる遺伝子を活性化する (Mendez et al., 1987、Chater et al., 1989)。べん毛を持たない細菌であるにもかかわらずFliAファミリーシグマ因子がべん毛転写制御以外の重要な機能を示す興味深い例である。SsgAとSsgBは、孢子形成時に孢子隔壁に局在してZリングという構造を形成するタンパク質であるFtsZのアセンブリに関与する (Noens et al., 2015、Willemse et al., 2011)。SsgRは転写制御因子であり、**ssgA**の転写を制御する (Traag et al., 2004)。**smeA-sffA**は孢子形成時の染色体凝集に関与している (Ausmees et al., 2007)。

また近年、3',5'-cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) がSvBldDのエフェクターであり、c-di-GMP四量体によりSvBldDが二量体化することでBldD boxに特異的に結合することが可能となることが報告されている (Tschowri et al., 2014)。すなわち、c-di-GMPが十分に存在する栄養成長時は、c-di-GMP四量体がSvBldDを二量体化し、形態分化関連遺伝子の転写を抑制しており、c-di-GMPの濃度が低下すると、SvBldDの二量体化が解除され、形態分化関連遺伝子の転写抑制が解除されることで胞子化へと移行する。*Streptomyces*属放線菌以外の放線菌におけるBldDオルソログの分子生物学的研究は*Saccharopolyspora erythraea*でのみ行われており、*S. erythraea*のBldDオルソログはエリスロマイシンの合成と形態分化を制御している (Chng et al., 2008)。

Fig. 0-10. *Streptomyces* 属放線菌の形態分化のマスターレギュレーターBldDによる形態分化関連遺伝子の制御機構 (Bush et al., 2015 を参照)。転写制御因子 AdpA (BldH) は *oriC* を阻害して DNA の複製を阻害する。BldA は *S. coelicolor* A3(2)において TTA コドン翻訳することができる唯一の tRNA であり、AdpA とともに AmfR の発現を制御する。AmfR は転写制御因子であり、気中菌糸形成に必要な surfactant peptide である SapB をコードする遺伝子の転写を制御する。同様に気中菌糸形成には気中菌糸を覆う疎水性タンパク質ロドリッ・チャップリンが必要であり、これらをそれぞれコードする遺伝子 *rod*、*chp* の転写は、BldD に転写制御されるシグマ因子 BldN により制御されている。BldM はホモダイマー形成時と WhiI とのヘテロダイマー形成時とで異なる遺伝子の転写を制御する興味深い転写制御因子 response regulator であり、ホモダイマー形成時は *ssgR* や *ssgB*、*whiB* の転写を活性化し、WhiI とのヘテロダイマー形成時は *smeA-sffA* と *whiE* の転写を活性化する。BldM ホモダイマーと BldD により制御される WhiB は WhiA のパートナーであり、WhiA が胞子形成に必要な遺伝子 *filP*、*ftsZ*、*ftsK*、*whiG* の転写を活性化する。

毛利佳弘の博士論文の全文をインターネット公表できない「やむを得ない理由」のため以下要約。

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胞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。

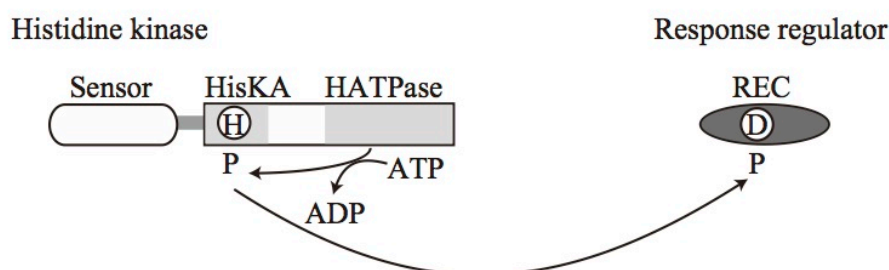
E. *A. missouriensis*の遊走子のべん毛合成や休眠に必要な二成分制御系タンパク質TcrA・HhkAの解析

E-1. 二成分制御系に関する予備知識

二成分制御系 (two-component system ; TCS) は植物、カビ、細菌、古細菌に広く分布するシグナル伝達機構である (Zschiedrich et al., 2016)。最も典型的なTCSはresponse regulator (RR) と histidine

kinase (HK) の2つの因子により構成されている (Fig. 0-14A)。HKはN末端側のシグナルを受容するドメイン (Sensorドメイン) とC末端側のヒスチジinkinaseドメイン (HKドメイン) からなる。HKドメインはHisKAモチーフとHATPaseモチーフを有しており、Sensorドメインが外界からの刺激を感知するとHKドメインのHATPaseモチーフがATPと結合し、HisKAモチーフに存在する保存されたヒスチジン残基を自己リン酸化する。Sensorドメインは外界の多様な刺激に対応するため多様性があるが、HKドメインは高く保存されている。RRは多くの場合N末端側のresponse regulator receiver domain (REC) とC末端側のエフェクタードメインからなる。自己リン酸化したHKがRRのRECの高く保存されたアスパラギン酸残基へとリン酸基を受け渡すことでシグナルが伝達される (Fig. 0-14A)。RECのアミノ酸配列は様々なRRで高く保存されているが、エフェクタードメインはDNA結合ドメインを初めとして多様性がある。エフェクタードメインが存在しない場合もあり、この場合単にリン酸基を仲介している場合やリン酸化RRが他のタンパク質と相互作用している場合がある。ここまでで述べたTCSは最も単純なタイプであり、HKとRRのRECが一体化したhybrid histidine kinase (HHK) も存在する (Fig. 0-14B)。HHKはシグナルを感知して自己リン酸化し、そのリン酸基は自身のRECへと転移される。HHKのRECのリン酸基は、histidine phosphotransferase (HPT) タンパク質のヒスチジン残基へと転移され、別のRRのアスパラギン酸残基へと転移され、シグナルが伝達される。HHKとHPTが一体化したものも報告されている。

(A)



(B)

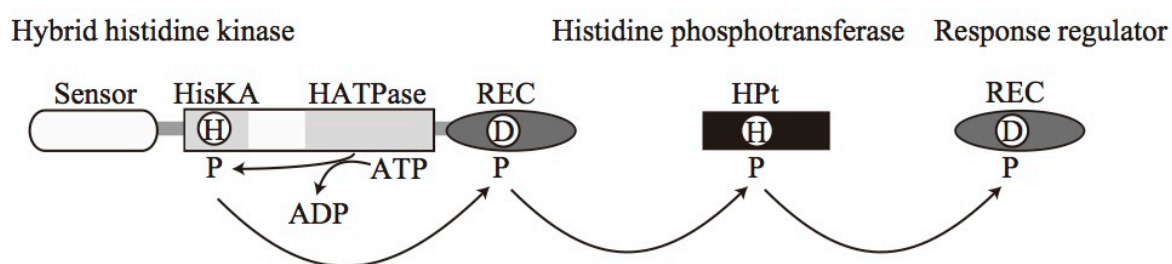


Fig. 0-14. 二成分制御系 (TCS) のモデル図。(A) 基本的なTCSにおけるリン酸基転移。HATPaseモチーフはATPと結合してHKドメインのHisKAのヒスチジン残基をリン酸化する (自己リン酸化)。リン酸基はパートナーとなるRRのアスパラギン酸残基へと転移される。(B) Hybrid型のHK (HHK) によるリン酸リレー。(A) と同様にHHKのヒスチジン残基は自己リン酸化される。リン酸基はHHK自身のRECのアスパラギン酸残基へと転移され、HPTを介してRRのRECへと転移される。

以下、単行本もしくは雑誌掲載等の形で刊行される予定であるため除外。

E-2. TcrAとHhkAの遺伝学的解析

E-3. TcrA の機能解析

E-4. *tcrA*破壊株と*hhkA*破壊株のRNA-seq解析

F. その他のRNA-seq解析

第四章 本研究の目的および本論文の構成

第五章 使用菌株、ベクター及び培地組成

使用菌株

大腸菌

- *Escherichia coli* JM109

recA1、*endA1*、*gyrA96*、*thi*、*hsdR17*($rK^- mK^+$)、*e14* (*mcrA*⁻)
supE44、*relA1*、*D(lac-proAB)/F'* [*traD36*、*proAB*⁺、*lac I*^q、*lacZDM15*]
組換えDNA実験に使用した。

- *Escherichia coli* BLR(DE3)

fhuA2 [*lon*] *ompT gal* (λ DE3) [*dcm*] Δ *hsdS*

λ DE3 = λ *sBamHIo* Δ *EcoRI-B int::*(*lacI::PlacUV5::T7 gene1*) *i21* Δ *nin5*
組換えタンパク質の発現に使用した。

- *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002

dam-13::Tn9、*dcm-6*

hsdM/pUZ8002 [*tra*、*neo*、RP4]

放線菌

- *Actinoplanes missouriensis* NBRC102363

本研究室で使用している野生株。

- *Actinoplanes missouriensis* NBRC102363 Δ *tcrA*

張氏により取得された*tcrA*遺伝子破壊株

- *Actinoplanes missouriensis* NBRC102363 Δ *hhkA*

小西氏により取得された*hhkA*遺伝子破壊株

- *Actinoplanes missouriensis* NBRC102363 Δ *bldD*

小西氏により取得された*bldD*遺伝子破壊株

ベクター

大腸菌用ベクター

- pUC19

アンピシリン耐性遺伝子を持ち、マルチクローニングサイトには*lacZ*の向きに対して HindIII - SphI - PstI - SalI/HincII - XbaI - BamHI - SmaI - KpnI - SacI - EcoRI配列が並ぶ。

- pTYM19-Apr^r

アンピシリン耐性遺伝子、チオストレプトン耐性遺伝子、FC31由来の*int*、RK2由来の*oriT*を持つ接合伝達性のベクターであるpTYM19 (Onaka et al., 2009) のEcoRVサイトにアブラマイシン耐性遺伝子が張氏により組み込まれたベクター (張, 2010)。大腸菌においてはプラスミドとして複製し、*A. missouriensis*では*int*により染色体上の*attB*サイトへ1コピーで組み込まれる。マルチクローニングサイトには*lacZ*の向きに対してEcoRI - SacI - KpnI - BamHI - XbaI - PstI - SphI - HindIII配列が並ぶ。

- pK19*mobsacB*-Apr^r

本研究室の張氏がpK19*mobsacB* (Schäfer et al., 1994) のNcoIサイトにアブラマイシン耐性遺伝子を組み込み作製した。カナマイシン耐性遺伝子、アブラマイシン耐性遺伝子、*oriT*、*sacB*を持つ接合伝達性のベクター。大腸菌においてはプラスミドとして複製し、*A. missouriensis*内では複製できないため、相同組換えを行う際に用いた。また*sacB*を有するためこのプラスミドを組み込んだ菌はsucrose感受性となる。マルチクローニングサイトには*lacZ*の向きに対してEcoRI - SmaI - BamHI - XbaI - SalI - PstI - SphI - HindIII配列が並ぶ。

- pColdI

アンピシリン耐性遺伝子を持ち、マルチクローニングサイトには*lac operator*の向きに対してNdeI - SacI - KpnI - XhoI - BanHI - EcoRI - HindIII - SalI - PstI - XbaI配列が並ぶ。*lac operator*上流に*cspA*プロモーター、NdeIサイトの上流にHis-Tag、FactorXa切断領域を持つ。

- pJET1.2-Km^r

サブクローニング用のベクターである。アンピシリン耐性遺伝子を持ち、致死遺伝子中にマルチクローニングサイト (致死遺伝子の向きと逆向きの順にNotI - BglIII - Kpn2I - XhoI - EcoRV - Eco32I - XbaI - BglIII - NcoI - Bsu15I) が存在し、マルチクローニングサイトのEcoRVサイトにカナマイシン耐性遺伝子が挿入されている。クローニングに用いる際はEcoRV処理によりカナマイシン耐性遺伝子を除去して使用する。

培地組成

- DifcoTMLB培地

BD社製。必要に応じ、アンピシリン、アプラマイシン、カナマイシン、クロラムフェニコールを終濃度50 mg/mlで加えたものを使用した。以下LB培地と略す。

・ HAT 培地

孢子嚢形成培地。1 g Sucrose、0.1 g Casamino acid、0.5 g K₂HPO₄、20 ml 腐植酸保存溶液^{*}、10 ml Trace element^{**}を脱イオン水に溶解し、濃塩酸にてpH を7.5 にして1 lにFill-upし20 g agarを加え、オートクレーブ滅菌したもの。必要に応じ、アプラマイシン、スペクチノマイシンを終濃度50 mg/mlで加えたものを使用した。*A. missouriensis*における孢子嚢形成培地である。

^{*}Humic acid(東京化成社製)10 g を100 ml 0.8% NaOHに溶解し、オートクレーブ滅菌したもの。

^{**}40 mg ZnCl₂、200 mg FeCl₃·6H₂O、10 mg CuCl₂·2H₂O、10 mg MnCl₂·4H₂O、10 mg Na₂B₄O₇·10H₂O、10 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂Oを脱イオン水に溶解し1 lにFill-upしてオートクレーブ滅菌したもの。

・ YBNM培地

1 g BactoTM yeast extract (BD社製)、0.7 g エルリッヒカツオエキス(キョクトー社製)、0.376 g 粉末肉エキス(キョクトー社製)、2 g NZ Amine Type A、10 g Maltoseを脱イオン水に溶解し、pH を7.3 にして1 lにFill-upし20 g agarを加え、オートクレーブ滅菌したもの。必要に応じ、アプラマイシン、スペクチノマイシンを終濃度50 mg/mlで加えたものを使用した。*A. missouriensis*における栄養増殖を行う固体培地である。

・ PYM培地

5 g BactoTM peptone (BD社製)、3 g BactoTM yeast extract (BD社製)、1 g MgSO₄·7H₂Oを脱イオン水に溶解し、pH を7 にして1 lにFill-upし、オートクレーブ滅菌したもの。必要に応じ、アプラマイシンを終濃度50 mg/mlで加えたものを使用した。*A. missouriensis*における栄養増殖を行う液体培地である。

・ DifcoTMCzapek-Dox培地

BD社製。最少培地であり、*A. missouriensis*がわずかながら孢子嚢形成を行う培地である。Cz培地と略す。

・ GYMC培地

4 g glucose、4 g BactoTM yeast extract (BD社製)、10 g BactoTM malt extract (BD社製)、2 g CaCO₃、12 g agarを脱イオン水に溶解し、pHを7.2にしたものを1 lにfill-upし、オートクレーブ滅菌したもの。菌糸を用いた*A. missouriensis*の接合による形質転換を行う際に用いる培地である。

本論

第一章 孢子嚢形成を制御する転写制御因子 AmBldD の機能解析およびターゲット遺伝子の探索

単行本もしくは雑誌掲載等の形で刊行される予定であるため以下要約

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*AmblldD*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、*AmblldD*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*AmblldD*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*AmblldD*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*AmblldD*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。

第二章 *A. missouriensis* におけるべん毛遺伝子の転写解析

2.1 背景

放線菌の多くは一般的に菌糸生長し、運動性は持たない。しかしながら、*Actinoplanes*, *Catenuloplanes*, *Kineosporia*, *Spirillaspora*といった放線菌はべん毛を有しており、べん毛による運動性を示す。この運動性を持つ細胞は遊走子と呼ばれ、生息域の拡大のための機能と考えられている。この形態でいる期間は大変短く、孢子囊の開裂により放出された孢子がsheathから出て運動を開始することから始まり、4-6時間で運動を停止して発芽を開始する。この遊走子の生物学は形態学的、進化学的に興味深く、生存戦略の観点からも興味深い題材である。そこで張氏により *A. missouriensis* のべん毛遺伝子の遺伝学的解析および転写解析が行われていた。

序論で述べたとおり、RT-PCRによる転写解析によりべん毛遺伝子は孢子囊において転写されていることが張氏により明らかにされた。さらにべん毛遺伝子クラスターが少なくとも9つの転写単位に分けられることが確かめられており、その転写開始点も同定された。一方で張氏の転写解析は、Cz培地というHAT培地と比べて孢子囊の形成効率が非常に悪く、菌糸の割合が多くなるような培地で培養された細胞が用いられており、べん毛の転写を調べるのに十分な条件とは言えなかった。序論で述べたとおり、HAT培地で培養した孢子囊の割合が多い細胞を用いたRNA-seq解析が私や今井氏、安田氏、手塚氏により行われていたため、この情報をもとにべん毛遺伝子の孢子囊形成時期における転写プロファイル調べた。

2.2 結果

2.2.1 孢子囊形成培地培養した細胞の RNA-seq 解析によるべん毛遺伝子の転写解析

HAT培地で1, 3, 6, 40日培養した細胞を用いたRNA-seq解析における、それぞれのべん毛遺伝子の転写プロファイルをFig. 2-1に示す。いずれのべん毛遺伝子の転写も1日目では全く検出されなかったが、3日目において強く観察された。この転写プロファイルから、*fliW* (*AMIS_76150*) と *flbD* (*AMIS_76450*) の上流領域に新たに転写開始点が予測された。5'-RACEによりこの2つの転写開始点を決定した。また、張氏によって決定された *fliD* (*AMIS_76200*) の転写開始点とは別に、FlhAファミリーシグマ因子により開始される転写開始点の存在が示唆されていたため、この転写開始点を改めて決定し直した。最終的にべん毛遺伝子クラスターは11の転写単位 (A-K) に分けられることが判明した。これらの転写単位のプロモーター領域のDNA配列を比較したところ、5'-CTCA-(N₁₅₋₁₇)-GCCGAA-3'からなるプロモーター配列が保存されていることが改めて明らかとなった (Fig. 2-2)。

次にRNA-seq解析の転写プロファイルに従い、11の転写単位を4つのグループに分類した (Fig. 2-1の遺伝子を示す矢印の色分け)。(a) *fliD*-, *flgB*-, *AMIS_76300*-, *flbD*-から始まる4つのオペロンと

*fliQ*の発現量は、3日目と比べて6日目で高くなっており、40日目でも高いまま維持されていた (Fig. 2-1赤矢印)。(b) 2つめのグループは*flhA*-, *fliM*-から始まるオペロンと*fliW*であり、このグループの発現量は3日目と6日目で高く、40日目でやや減少していた (Fig. 2-1緑矢印)。(c) 3つめのグループは*flgN*-から始まるオペロンと*fliC*であり、このグループは3, 6, 40日目で同等に発現していた (Fig. 2-1青矢印)。(d) 最後に、*flgD*から始まるオペロンは3日目で強く発現し、日を経つにつれて発現量が減少していた (Fig. 2-1黒矢印)。これらの転写プロファイルは、べん毛の構成要素が胞子の成熟プロセスにおいて胞子嚢の中で生産され、アセンブリされており、これにより胞子嚢から遊走子が放出されたあと速やかに泳ぎ出すことができることを示唆している。

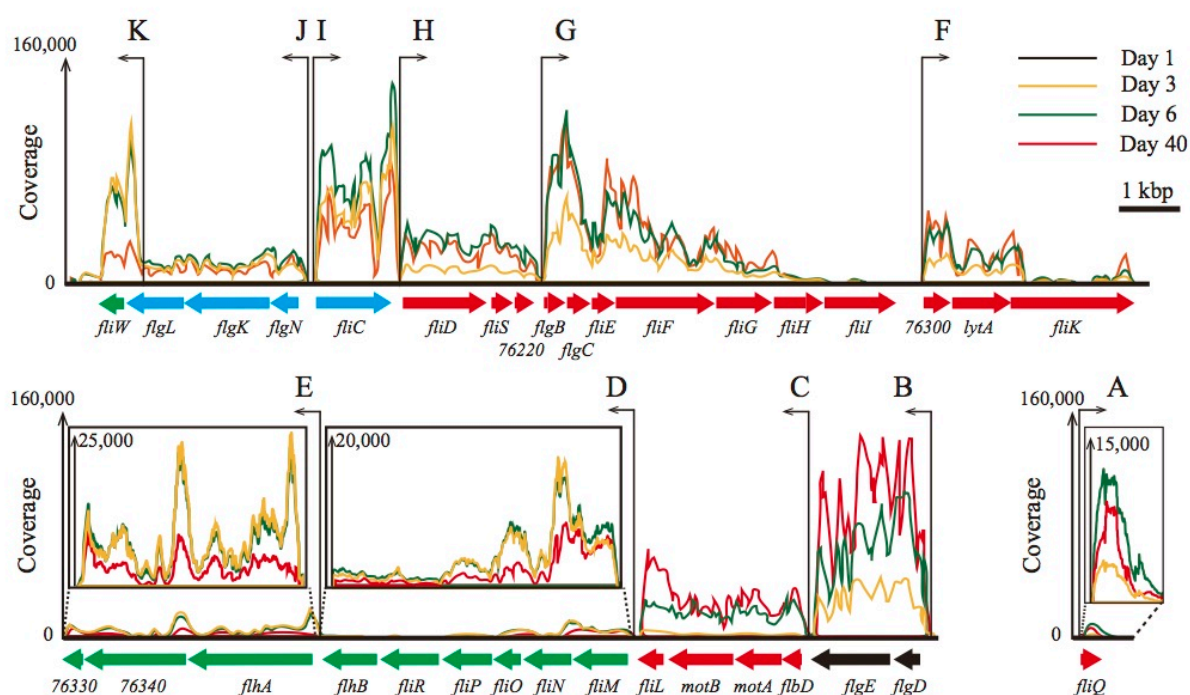


Fig. 2-1. べん毛遺伝子の転写プロファイル。色つきの矢印は遺伝子を示しており、転写変動に従って色で分類されている (赤 : group (a)、緑 : group (b)、青 : group (c)、黒 : group (d))。遺伝子上部の線はRNA-seq解析で得られたリードのマッピングデータを示しており、それぞれの培養条件の結果が色で区別されている (黒 : 1日目、黄 : 3日目、緑 : 6日目、赤 : 40日目)。縦軸はマッピングされたリード数 (総リード数7000万リードとしたとき) を示している。またA-Kで示された矢印は転写開始点を示しており、それぞれの転写単位にA-KのIDを振った。



Fig. 2-2. べん毛遺伝子のプロモーター領域。全てのべん毛遺伝子にプロモーター配列 5'-CTCA-(N₁₅₋₁₇)-GAAGAA-3'が保存されていた。

2.3 考察

張氏の研究によりこれまでべん毛遺伝子が少なくとも9つの転写単位で構成されていることが示されていたが、RNA-seq解析および5'-RACEにより新たに2つの転写単位を発見し、それらの転写開始点を決定して、べん毛遺伝子が11の転写単位で構成されていることを示した。既知の転写開始点のうち*fliD*から始まる転写単位の転写開始点を改めて決め直した。これにより、全てのべん毛遺伝子においてプロモーター配列5'-CTCA-(N₁₅₋₁₇)-GCCGAA-3'が保存されていることを改めて示した。この結果は全てのべん毛遺伝子の転写を制御するシグマ因子が存在していることを示している。このシグマ因子を同定することは*A. missouriensis*のべん毛合成制御を理解する上で非常に重要であると考えられる。この保存配列は、サルモネラ菌や大腸菌のclass 3遺伝子の転写を制御するシグマ因子FliAや枯草菌において同様の機能を持つシグマ因子SigBが認識するプロモーター配列 (5'-TAAAGTTT-N₁₁-GCCGATAA-3'と5'-TAAA-N₁₃₋₁₆-GCCGATAT-3') とやや似ていた。FliA ファミリーシグマ因子は*A. missouriensis*のゲノム上に4つ存在しており (*AMIS_41310*, *AMIS_62620*, *AMIS_64240*, *AMIS_64280*)、そのうち3つは孢子嚢において強く発現している。これらのいずれかまたは複数がべん毛遺伝子の転写に関与している可能性が高いと考えている。

べん毛遺伝子の11の転写単位をRNA-seq解析の転写プロファイルに基づき4つに分類した。分類された4つの遺伝子について予測される機能を詳細に調べたところ、べん毛を構成する機能によって大きく分けることができた。(a) (b) のグループには主に基部体を形成するのに必要な遺伝子が含まれていた。一部、*fliK*や*fliD*のようにフックやフィラメントの形成に必要な遺伝子が含まれていたが、これらは正確にはフックやフィラメントを構成するタンパク質ではなく、FliKはフックやフィラメントを構成するタンパク質に結合して輸送装置内を通過するのを助ける分泌タンパク質、FliDはフックやフィラメントの先端において輸送されてきたフック・フィラメントタ

ンパク質の輸送を止めるタンパク質（CAP）である。(d) のグループはフックを構成するタンパク質をコードしていた。(c) のグループはフックとフィラメントの境界を構成するタンパク質とフィラメントを構成するタンパク質をコードしていた。これらの結果はそれぞれのグループが異なる転写制御を受けていることを示唆している。しかしながら、前述したとおりべん毛遺伝子は保存されたプロモーター配列5'-CTCA-(N₁₅₋₁₇)-GCCGAA-3'を認識するシグマ因子に制御されている可能性が示唆されている。複数のFliAファミリーシグマ因子があることから、それぞれのFliAで微妙に認識配列が異なるためべん毛遺伝子のそれぞれのグループが異なる転写制御を受けている可能性が考えられる。また、序論で述べたとおりべん毛遺伝子の一部の転写がTcrAにより開始されていることが示されており、転写単位Cには転写制御因子をコードする遺伝子*flbD*が存在していることから、シグナル因子FliAとは別の転写制御因子が必要である可能性も考えられる。TcrAによるべん毛遺伝子の転写制御に関しては第章で詳しく説明する。

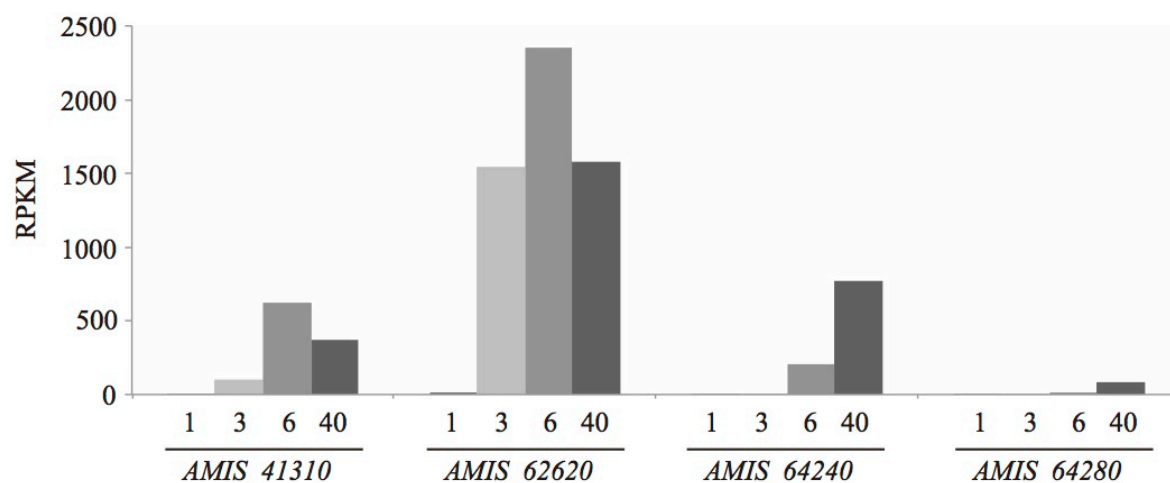


Fig. 2-3. FliAファミリーシグマ因子をコードする4つの遺伝子の発現量。発現量は孢子嚢形成培地1, 3, 6, 40日目の細胞のRNA-seq解析で得られたRPKMを示している。

Table 2-1. ベン毛遺伝子転写単位の分類とそれぞれのタンパク質が構成するベン毛構造。点線で4つに区切られているのは、ベン毛遺伝子の転写プロファイルに従って分類された4つのグループを示している。上から順にgroup (a)、group (b)、group (d)、group (c) である。

Transcription unit	Gene ID	Gene products	Substructure
A	AMIS_2110	FliQ	III型輸送装置
C	AMIS_76450	FlbD	転写制御因子
C	AMIS_76440	MotA	モーター
C	AMIS_76430	MotB	モーター
C	AMIS_76420	FliL	Cリング
F	AMIS_76320	FliK	フック
F	AMIS_76310	LytA	
F	AMIS_76300	FliJ	III型輸送装置
G	AMIS_76290	FliI	III型輸送装置
G	AMIS_76280	FliH	III型輸送装置
G	AMIS_76270	FliG	MSリング
G	AMIS_76250	FliE	ロッド
G	AMIS_76240	FlgC	ロッド
G	AMIS_76230	FlgB	ロッド
H	AMIS_76220	Unknown	
H	AMIS_76210	FliS	シャペロン
H	AMIS_76200	FliD	フック、フィラメント
D	AMIS_76410	FliM	Cリング
D	AMIS_76400	FliN	Cリング
D	AMIS_76390	FliO	III型輸送装置
D	AMIS_76380	FliP	III型輸送装置
D	AMIS_76370	FliR	III型輸送装置
D	AMIS_76360	FlhB	III型輸送装置
E	AMIS_76350	FlhA	III型輸送装置
E	AMIS_76340	Unknown	
E	AMIS_76330	Unknown	
K	AMIS_76150	FliW	シャペロン
B	AMIS_76470	FlgD	フック
B	AMIS_76460	FlgE	フック
I	AMIS_76190	FliC	フィラメント
J	AMIS_76180	FlgN	シャペロン
J	AMIS_76170	FlgK	フック
J	AMIS_76160	FlgL	フック

2.4 方法

2.4.1 5'-RACEによる転写開始点の決定

30°Cで 6日間 HAT培地で培養した野生株の菌糸と胞子嚢の混合物から、1.4.6の方法に従いRNAを抽出した。5'-RACEに用いたprimerは2.4.2のリストに示す。以下任意の遺伝子番号をnumberとし、primer名をnumber.5race.RTといった形で示す。T4 Polynucleotide Kinaseを用いて、number.5race.RTを20 µlの系 (final 50 µM number.5race.RT, 1×Kination Buffer, 250 µM ATP, 12.5%

glycerol, 1 μ l of T4 Polynucleotide Kinase) 37°Cで30分間反応させた。さらに1 μ lのT4 Polynucleotide Kinaseを加え、37°Cで30分間反応することでnumber.5race.RTをリン酸化した。このリン酸化number.5race.RTの2 μ lと1 μ gのRNAを用いて、5'-Full RACE Core Set (Takara) の推奨プロトコルに従い、環化（あるいはコンカテマー化）cDNAを合成した。これを適切な濃度に希釈し、プライマーズセットnumber.1st.S1とnumber.1st.A1を用いて、PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC Bufferの一般的なPCR反応組成（50 μ l）で3 step PCR（98°C 10sec, 60°C 5 sec, 72°C 1 minの30サイクル）により増幅した。このPCR産物を適切な濃度に希釈し、プライマーズセットnumber.1st.S2とnumber.1st.A2を用いて、同じ条件でPCRを行った。T4 ligase (Takara) を用いて、PCR産物をpJET1.2-Km^rのEcoRVサイトへとクローニングした。これらのプラスミドに挿入されたDNA配列をシーケンス解析し、転写開始点を決定した。

2.4.2 5'-RACEに用いたプライマーリスト

Primer name	Sequence (5' to 3')
76450.5race.RT	AGGTCCATCAGCGTTCCTTTC
76450.1st.S1	GTTCGGTGTTTCGCACTGAAC
76450.1st.A1	TCCGTCCTTGGTCTGTCTTG
76450.2nd.S2	GGCACGAAGTACATCATCTC
76450.2nd.A2	TGATGCGGGTTACGAGAATC
76200.5race.RT	TTCACCGACTGGTAGGAG
76200.1st.S1	CAACCAGCTGATGAAGGTTG
76200.1st.A1	AGGTCTGCATTCCACTGAC
76200.2nd.S2	GCAGACCAAACCTCAAGACCA
76200.2nd.A2	AGAGGAGCTCACGGAAAACCT
76150.5race.RT	TCGTTGAGACGCACCAGAAC
76150.1st.S1	TCCAGCAGACCTCGTATCAG
76150.1st.A1	GGAGCTGCAATTCCATGATC
76150.2nd.S2	CATCGATTTCTGAGGTGAC
76150.2nd.A2	ACATCCTCGATATCGGAGAG

第三章 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研究

単行本もしくは雑誌掲載等の形で刊行される予定であるため以下要約。

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胞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、胞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。

第四章 胞子嚢の休眠・覚醒を制御する転写制御因子 TcrA の直接のターゲット遺伝子の同定

単行本もしくは雑誌掲載等の形で刊行される予定であるため以下要約。

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、胞子嚢形成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inkinase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。

第五章 AmBldD による *tcrA* と *fliA* の転写制御

総括

単行本もしくは雑誌掲載等の形で刊行される予定であるため除外。

引用文献

Aizawa S. 2012. Mystery of fliK in length control of the flagellar hook. J. Bacteriol. 194:4798-4800.

Aizawa S. 2014. The flagellar world. Elsevier, Oxford, UK.

Bagwell CE, Bhat S, Hawkins GM, Smith BW, Biswas T, Hoover TR, Saunders E, Han CS, Tsodikov OV, Shimkets LJ. 2008. Survival in nuclear waste, extreme resistance, and potential applications gleaned from the genome sequence of Kineococcus radiotolerans SRS30216. PLoS One. 3:e3878.

Benson AK, Ramakrishnan G, Ohta N, Feng J, Ninfa AJ, Newton A. 1994. The Caulobacter crescentus FlbD protein acts at flr sequence elements both to activate and to repress transcription of cell cycle-regulated flagellar genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4989-4993.

Bibb MJ, Janssen GR, Ward JM. 1985. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (ermE) of Streptomyces erythraeus. Gene 38:215-226.

Blair DF, Berg HC. 1988. Restoration of torque in defective flagellar motors. Science. 242:1678-1681.

Boll JM, Hendrixson DR. 2013. A regulatory checkpoint during flagellar biogenesis in Campylobacter jejuni initiates signal transduction to activate transcription of flagellar genes. Mbio. 3;4(5):e00432-13.

Caramori T, Barilla D, Nessi C, Sacchi L, Galizzi A. 1996. Role of FlgM in sigma D-dependent gene expression in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 178:3113-3118.

Chadsey MS, Karlinsey JE, Hughes KT. 1998. The flagellar anti-sigma factor FlgM actively dissociates Salmonella typhimurium sigma28 RNA polymerase holoenzyme. Genes Dev. 12:3123-3136.

- Chang Y, Tang T, Li JL. 2007. Isolation of a flagellar operon in *Azospirillum brasilense* and functional analysis of FlbD. *Res. Microbiol.* 158:521-528.
- Chevance FF, Takahashi N, Karlinsey JE, Gnerer J, Hirano T, Samudrala R, Aizawa S, Hughes KT. 2007. The mechanism of outer membrane penetration by the eubacterial flagellum and implications for spirochete evolution. *Genes Dev.* 21:2326-2335.
- Chevance FF, Hughes KT. 2008. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:455-465.
- Chilcott GS, Hughes KT. 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:694-708.
- Claret L, Hughes C. 2002. Interaction of the atypical prokaryotic transcription activator FlhD2C2 with early promoters of the flagellar gene hierarchy. *J. Mol. Biol.* 321:185-199.
- Hayakawa M, Tamura T, Nonomura H. 1991. Selective isolation of *Actinoplanes* and *Dactylosporangium* from soil by using γ -collidine as the chemoattractant. *J. Ferment. Bioeng.* 72:426-432.
- Helmann JD, Moran JP Jr. 2002. RNA polymerase and sigma factors. In *Bacillus subtilis and its closest relatives – from genes to cells*. ASM press, Washington DC, 289-312.
- Higgins ML. 1967. Release of sporangiospores by a strain of *Actinoplanes*. *J. Bacteriol.* 94:495-498.
- Hirano T, Minamino T, Macnab RM. 2001. The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase. *J. Mol. Biol.* 312:359-369.
- Hung CC, Haines L, Altier C. 2012. The flagellar regulator fliT represses *Salmonella* pathogenicity island 1 through flhDC and fliZ. *PLoS One.* 7:e34220.
- Ide N, Ikebe T, Kutsukake K. 1999. Reevaluation of the promoter structure of the class 3 flagellar operons of *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Genes Genet. Syst.* 74:113-116.
- Kelemen GH, Brian P, Flårdh K, Chamberlin L, Chater KF, Buttner MJ. 1998. Developmental regulation of transcription of whiE, a locus specifying the polyketide spore pigment in *Streptomyces coelicolor* A3(2).

J. Bacteriol. 180:2515-2521.

Kutsukake K, Iino T. 1994. Role of the FliA-FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 176:3598-3605.

Kutsukake K, Ikebe T, Yamamoto S. 1999. Two novel regulatory genes, *fliT* and *fliZ*, in the flagellar regulon of *Salmonella*. Genes Genet. Syst. 74:287-292.

Kutsukake K, Ohya Y, Iino T. 1990. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 172:741-747.

Liu X, Matsumura P. 1994. The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. J. Bacteriol. 176:7345-7351.

Macnab RM. 2003. How bacteria assemble flagella. Annu. Rev. Microbiol. 57:77-100.

Macnab RM. 2004. Type III flagellar protein export and flagellar assembly. Biochim. Biophys. Acta. 1694:207-217.

Malabarba A, Strazzolini P, Depaoli A, Landi M, Berti M, Cavalleri B. 1984. Teicoplanin, antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. VI. Chemical degradation: physico-chemical and biological properties of acid hydrolysis products. J. Antibiot. 37:988-999.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Minamino T, Macnab RM. 1999. Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. J. Bacteriol. 181:1388-1394.

Minamino T, Macnab RM. 2000. FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. Mol Microbiol. 37:1494-1503.

Mirel DB, Lauer P, Chamberlin MJ. 1994. Identification of flagellar synthesis regulatory and structural genes in a sigma D-dependent operon of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 176:4492-4500.

Mukherjee S, Kearns DB. 2014. The structure and regulation of flagella in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* 48:319-340.

Nambu T, Minamino T, Macnab RM, Kutsukake K. 1999. Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 181:1555-1561.

Ohnishi K, Kutsukake K, Suzuki H, Lino T. 1992. A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an antisigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, sigma F. *Mol. Microbiol.* 6:3149-3157.

Onaka H, Taniguchi S, Ikeda H, Igarashi Y, Furumai T. 2003. pTOYAMAcos, pTYM18, and pTYM19, actinomycete-*Escherichia coli* integrating vectors for heterologous gene expression. *J. Antibiot.* 56:950-956.

Palleroni NJ. 1976. Chemotaxis in Actinoplanes. *Arch. Microbiol.* 110:13-18.

Parenti F, Coronelli C. 1979. Members of the genus Actinoplanes and their antibiotics. *Ann. Rev. Microbiol.* 33:389-411.

Partridge JD, Nieto V, Harshey RM. 2015. A new player at the flagellar motor: FliL controls both motor output and bias. *MBio.* 6:e02367.

Ramakrishnan G, Newton A. 1990. FliB of *Caulobacter crescentus* is a homologue of the NtrC (NRI) protein and activates sigma 54-dependent flagellar gene promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(6):2369-2373.

Reisenauer A, Quon K, Shapiro L. 1999. The CtrA response regulator mediates temporal control of gene expression during the *Caulobacter* cell cycle. *J. Bacteriol.* 181(8):2430-2439.

Roure S, Bonis M, Chaput C, Ecobichon C, Mattox A, Barrière C, Geldmacher N, Guadagnini S, Schmitt C, Prévost MC, Labigne A, Backert S, Ferrero RL, Boneca IG. 2012. Peptidoglycan maturation enzymes affect flagellar functionality in bacteria. *Mol. Microbiol.* 86:845-856.

Rückert C, Szczepanowski R, Albersmeier A, Goesmann A, Fischer N, Steinkämper A, Pühler A, Biener R, Schwartz D, Kalinowski J. 2014. Complete genome sequence of the actinobacterium Actinoplanes

- fruliensis HAG 010964, producer of the lipopeptide antibiotic friulimycin. *J. Biotechnol.* 178:41-42.
- Scheurwater E, Reid CW, Clarke AJ. 2008. Lytic transglycosylases: bacterial space-making autolysins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40:586-591.
- Schmidt DD, Frommer W, Junge B, Müller L, Wingender W, Truscheit E, Schäfer D. 1977. alpha-Glucosidase inhibitors. New complex oligosaccharides of microbial origin. *Naturwissenschaften.* 64:535-536.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods.* 9: 671-675.
- Schwientek P, Szczepanowski R, Rückert C, Kalinowski J, Klein A, Selber K, Wehmeier UF, Stoye J, Pühler A. 2012. The complete genome sequence of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110. *BMC Genomics.* 13:112.
- Serizawa M, Yamamoto H, Yamaguchi H, Fujita Y, Kobayashi K, Ogasawara N, Sekiguchi J. 2004. Systematic analysis of SigD-regulated genes in *Bacillus subtilis* by DNA microarray and Northern blotting analyses. *Gene.* 329:125-136.
- Silverman M, Simon MI. 1977. Bacterial flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 31:397-419.
- Uchida K, Aizawa S. 2014. The flagellar soluble protein FliK determines the minimal length of the hook in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 196:1753-1758.
- Uchida K, Jang MS, Ohnishi Y, Horinouchi S, Hayakawa M, Fujita N, Aizawa S. 2011. Characterization of *Actinoplanes missouriensis* spore flagella. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:2559-2562.
- West JT, Estacio W, Márquez-Magaña L. 2000. Relative roles of the *fla/che* P(A), P(D-3), and P(sigD) promoters in regulating motility and sigD expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 182:4841-4848.
- Xu Z, Dutton RJ, Gober JW. 2011. Direct interaction of FliX and FlbD is required for their regulatory activity in *Caulobacter crescentus*. *BMC Microbiol.* 11:89.
- Yamamura H, Ohnishi Y, Ishikawa J, Ichikawa N, Ikeda H, Sekine M, Harada T, Horinouchi S, Otaguro

M, Tamura T, Suzuki K, Hoshino Y, Arisawa A, Nakagawa Y, Fujita N, Hayakawa M. 2012. Complete genome sequence of the motile actinomycete *Actinoplanes missouriensis* 431(T) (= NBRC 102363(T)). Stand. Genomic Sci. 7:294-303.