

博士論文（要約）

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

農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 醗酵学研究室

木村 知宏

目次

序 論.....	3
第1章 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> について.....	4
第2章 微生物のべん毛の構造と構成.....	9
第3章 微生物の運動停止に関する研究.....	14
第4章 微生物の IV 型線毛の構造と機能.....	16
第5章 使用した菌株、培地組成、形質転換方法.....	18
A. <i>missouriensis</i> の形質転換法の改良.....	23
本 論.....	30
第1章 べん毛形成に必須なチオレドキシンの機能解析.....	31
1-1. 背景.....	31
1-2. 結果.....	36
1-3. 考察.....	41
1-4. 方法.....	41
第2章 べん毛回転停止に必須なブレーキタンパク質 <i>FtgA</i> の機能解析.....	42
2-1. 背景.....	42
2-2. 結果.....	43
2-3. 考察.....	47
2-4. 方法.....	47
第3章 遊走子の固体表面への付着に必須な線毛の機能解析.....	48
3-1. 背景.....	48
3-2. 結果.....	49
3-3. 考察.....	50
3-4. 方法.....	50
総合討論.....	51
引用文献.....	52

序 論

第1章 希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* について

一般的な放線菌の定義は、高 GC 含量のゲノムを持つ、グラム陽性細菌である。放線菌は原核生物でありながら、8 Mbp の比較的大きなゲノムを持ち、二次代謝産物生産能を持つことと、複雑な形態分化を行うことが特徴として挙げられる。放線菌の持つ多様な二次代謝産物生産能は創薬資源として着目され、20 世紀中葉から 21 世紀の現在に至るまで、世界中の研究者によって精力的に単離、培養、代謝物解析がなされてきた。たとえば、結核治療薬である Streptomycin は *Streptomyces griseus* から見出された。大村智北里大学特別荣誉教授らによる 2015 年度ノーベル医学・生理学賞受賞理由となった抗寄生虫薬 Avermectin は *Streptomyces avermitillis* から見出された。通常、放線菌の単離は、土壌を水溶液に懸濁し、平板培地に希釈する手法によってなされるが、この手法によって単離される放線菌の 90% 程度は *Streptomyces* 属に分類される。一方、*Streptomyces* 属に該当しない放線菌は希少放線菌 (noble actinomycetes) と称される。本研究の題材である希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は、1963 年にアメリカ合衆国ミズーリ州の農家の庭の土壌中から、胞子の持つ走化性を利用して単離された (Couchi, 1963)。図 0-1 に示す、さまざまな属の放線菌の 16S リボソーム系統解析によると、*A. missouriensis* は *Streptomyces* 属放線菌とは系統的に離れた位置に分類される (Tamura *et al.* 1994)。過去に行われた *Actinoplanes* 属放線菌の二次代謝産物研究に注目すると、*A. missouriensis* はグリコペプチド系抗生物質の Actaplanin や抗悪性腫瘍薬の 5'-Azacytidine (Debono *et al.*, 1984)、新規ポリケタイド alkyl-O-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinone、天然ゴムの分解酵素などを生産することが知られている (Awakawa *et al.*, 2011)。また、*Actinoplanes* sp. SE 50/110 や A56 などいくつかの種は 2 型糖尿病治療薬の Acarbose 生産菌として知られており、そのうち *Actinoplanes* sp. SE 50/110 株については、ゲノム解読がなされ、RNA シーケンス解析に基づく生産量向上の試みや、CRISPR Cas-9 システムによる遺伝子操作方法の確立もなされている (Schwientek *et al.*, 2012, 2013)。

このように、*Actinoplanes* 属放線菌は *Streptomyces* 属とは異なる二次代謝産物の供給源として着目することもできる。しかし、*Actinoplanes* 属放線菌と *Streptomyces* 属放線菌の生活環を

比較すると、放線菌のもつ特徴もう 1 つの特徴である、形態分化における大きな差が存在する。図 0-2 と図 0-3 に示すように、孢子形成期では、*Streptomyces* 属放線菌は気中菌糸の先端がいくつもの細胞に分かれた孢子鎖を形成するのに対し、*Actinoplanes* 属放線菌は基底菌糸から孢子囊柄を介して数十個の孢子を内包した孢子囊を形成する。孢子囊内部でどのように孢子が成熟していくのかは不明だが、約 1 週間で成熟する。成熟した孢子囊は水浸すると開裂し、内部からべん毛を持った孢子 (zoospore, 古い文献では motile spore とも、本論文では zoospore / 遊走子と表記する) が泳ぎだしてくる。遊走子は走化性に従って遊走し、生育に適した環境に至ると遊走をやめて発芽し、菌糸成長に移行する。遊走子は直径 0.9 μm 程度の球形で、15 本程度のべん毛を持ち、平均 240 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 、最高 400 $\mu\text{m}/\text{sec}$ で遊走する。運動性をもつ他の細菌と比較すると、*Bacillus subtilis* の約 12 倍、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium の約 4.5 倍という高速である。

A. missouriensis のゲノム解読は醗酵学研究室などの研究グループにより完了しており (Yamamura *et al.*, 2012)、相同組換えによる遺伝子破壊方法、近縁菌のプラスミドを用いたベクター、大腸菌 / 放線菌間のシャトルベクターを用いた遺伝子導入方法が確立された (Jang *et al.*, 2015)。また、孢子囊形成期の遺伝子発現変動を解析した RNA シークエンス解析のデータも利用可能である (Mouri *et al.*, 2017)。

本研究では、修士課程在学時の研究結果と、そこから得られた着想に基づき、他の放線菌と全く異なる生活環を持つ *A. missouriensis* が形成する遊走子の特徴を解析し、天然に存在する微生物の多様性の一端を明らかにする。

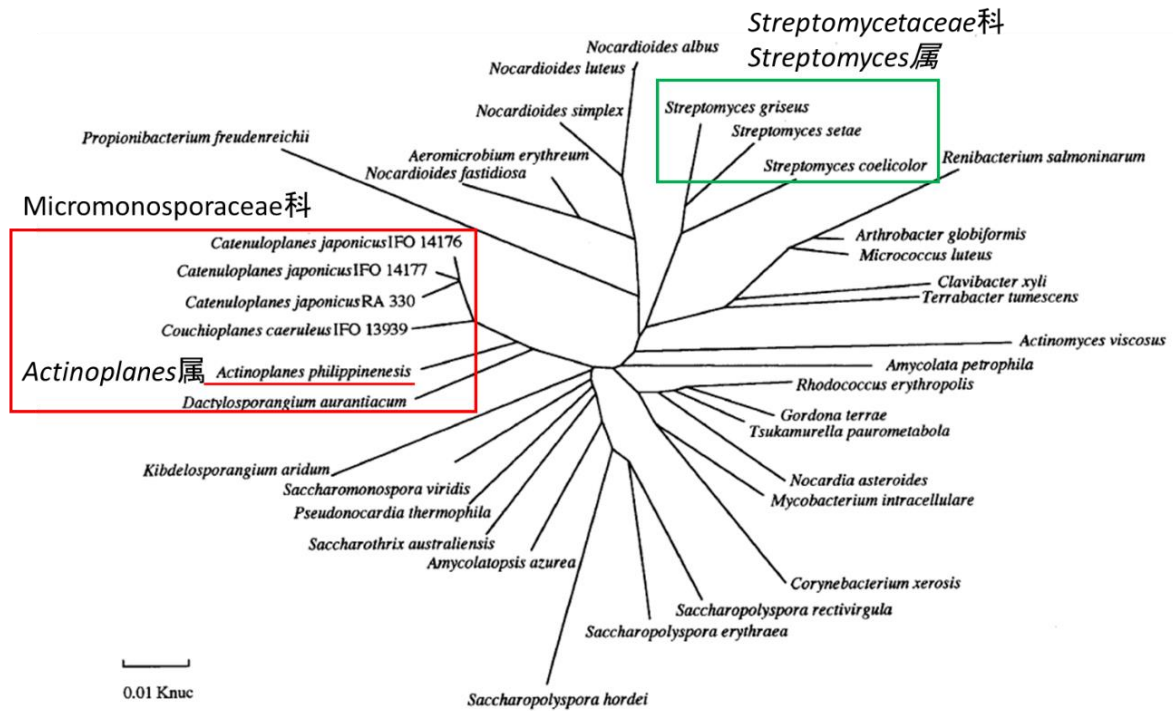


図 0-1. 16S リボソーム RNA 配列に基づく放線菌の系統樹

放線菌の 16S リボソーム RNA 配列に基づいた無根系統樹解析。創薬資源などとして重点的に解析の行われている *Streptomycetaceae* 科と、本研究の題材である *Actinoplanes* 属の分類される *Micromonosporaceae* 科は進化的にかなり遠く離れていることが分かる。Tamura *et al.* (1994) より引用し、一部に加筆。

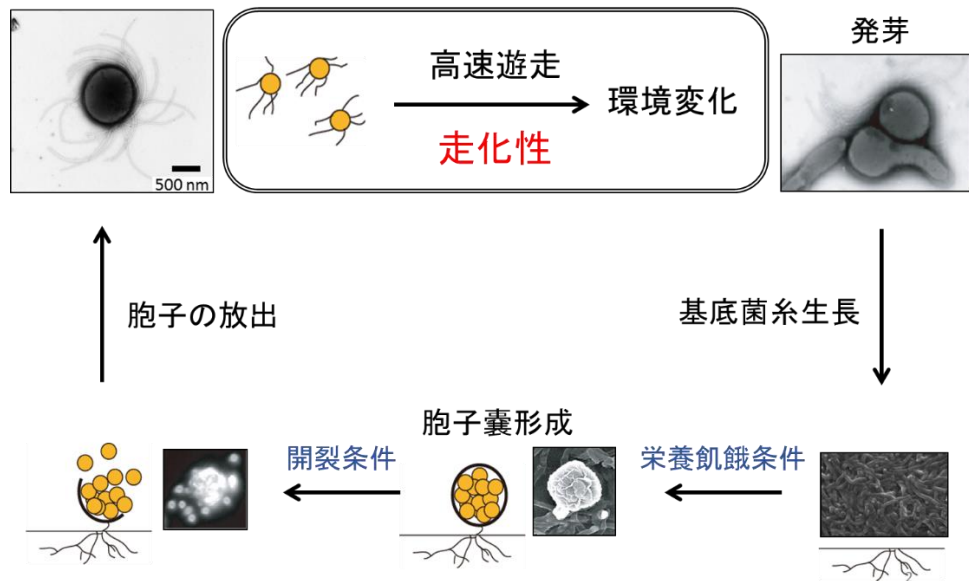


図 0-2. *A. missouriensis* の生活環

本文に記したように、*A. missouriensis* は栄養豊富な条件下では基底菌糸を形成して生育する。栄養飢餓条件に陥ると、基底菌糸から胞子嚢柄を介して胞子嚢を形成する。自然界では、おそらく降雨や河川などからの水の流入によって、実験室条件下では 25 mM NH_4HCO_3 の HAT プレートへの重層によって、胞子嚢の開裂が起き、胞子が放出される。出てきた胞子は高速で遊走し、走化性に従って発芽や菌糸生長に適した場所へ移動すると考えられる。

<<堀之内先生のレビューから生活環を引用する。>>

図 0-3. *S. griseus* の生活環

S. griseus の生活環を例にとり、一般的な放線菌の生活環を示す。基底菌糸での生育が行われ、

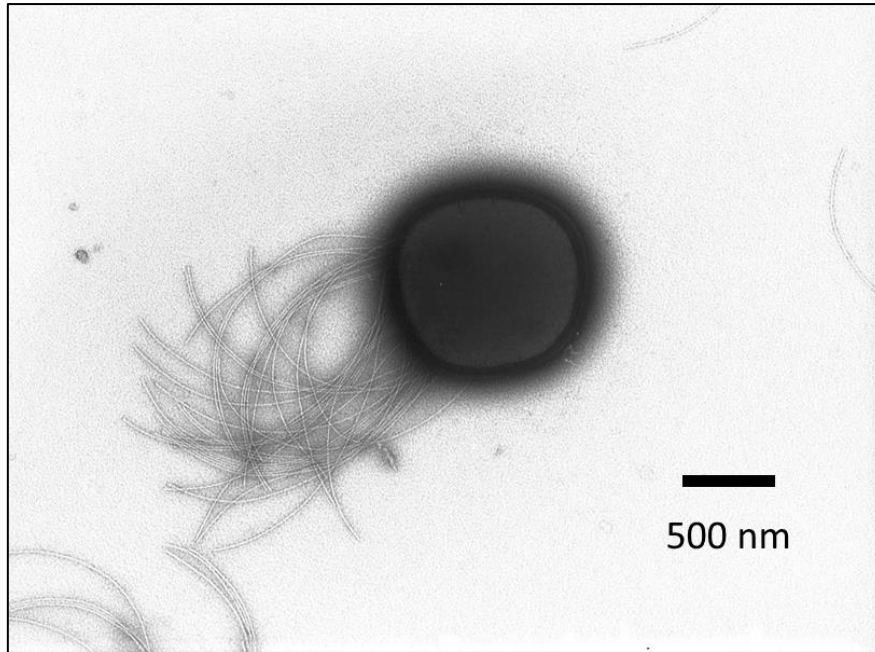


図 0-4. *A. missouriensis* の遊走子 (拡大図)

A. missouriensis の遊走子は直径 0.9 μm 、15 本程度のべん毛を持ち、球形である。透過型電子顕微鏡を用いて観察を行うと、緩やかな曲率のべん毛が生えていることがわかる。このべん毛は観察前のピペッティングなどで比較的容易に脱落するが、脱落后も曲率を保ったままであり、べん毛繊維タンパク質 FliC が孢子嚢内部で重合して形成されていると考えられる。

第2章 微生物のべん毛の構造と構成

球菌または桿菌状の形態を示す細菌の細胞の中には、べん毛を持ち、運動できるものもある。細菌の運動性は、感染性とも関連しており、これまで日本では *Salmonella enterica*、欧米では *E. coli* を主な対象として精力的な研究がなされてきた。べん毛の構造の模式図を図 0-5 に示す。細胞膜表面に固定された MS-ring と、細胞質側に突き出た C-ring、膜内の P-ring と L-ring があり、その中心にロッドおよびシャフトが通り、その先に菌体外へ向かってべん毛本体が突き出している。菌体外からの陽イオンの流入に伴って、MotA/MotB タンパク質が基部に作用し、回転力を生み出している。用いられる陽イオンは、ほぼすべての菌で一価の陽イオンである H^+ または Na^+ だが、ごく一部に Mg^{2+} や Ca^{2+} といった二価の陽イオンを用いるものもある (Imazawa *et al.*, 2016)。また、クライオ電子顕微鏡観察により、べん毛構造体の取る構造の詳細な形状がほぼ解明されている (図 0-6、阪大加藤助教の論文)。

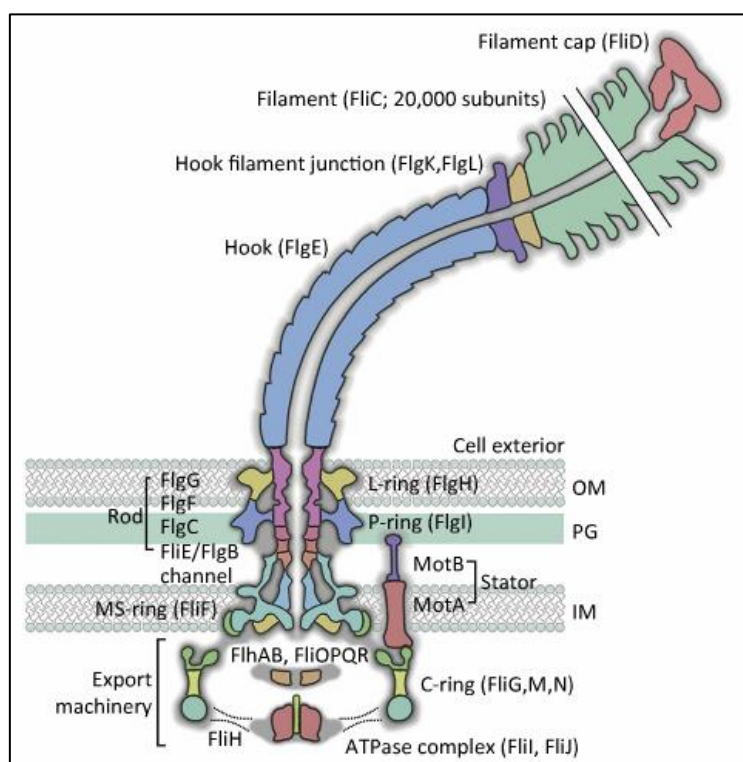


図 0-5. 細菌べん毛の模式図

細菌（グラム陰性菌）のべん毛の模式図を示す。細胞外に見えるのは Hook (FlgE) より先の部分である。MotA / MotB はべん毛を回転させるための固定子 (Stator) と呼ばれる構成因子である。個の模式図中に示されているタンパク質群は、べん毛形成に関与するタンパク質のうち、完成したべん毛構造体に含まれているものだけであり、実際のべん毛形成過程においてはシャペロンや σ 因子などよ

り多くの因子が関与している。図は Lewis D.B. Evans, Colin Hughes, Gillian M. Fraser (2014) より引用した。

<< 阪大加藤助教の論文 >>

べん毛構造は、30 種類程度のタンパク質が秩序立って組み立てられることで完成する。この過程には、転写レベルの制御、翻訳レベルの制御、翻訳後レベルの制御が存在することが知られている。まず、転写レベルの制御では、図 0-7 に示すように、*Salmonella enterica* において、3 段階で転写が進んでいくことが知られている。この秩序立った遺伝子発現制御機構は、主に σ 因子 FliA とそのアンチ σ 因子である FlgM によって制御されている。

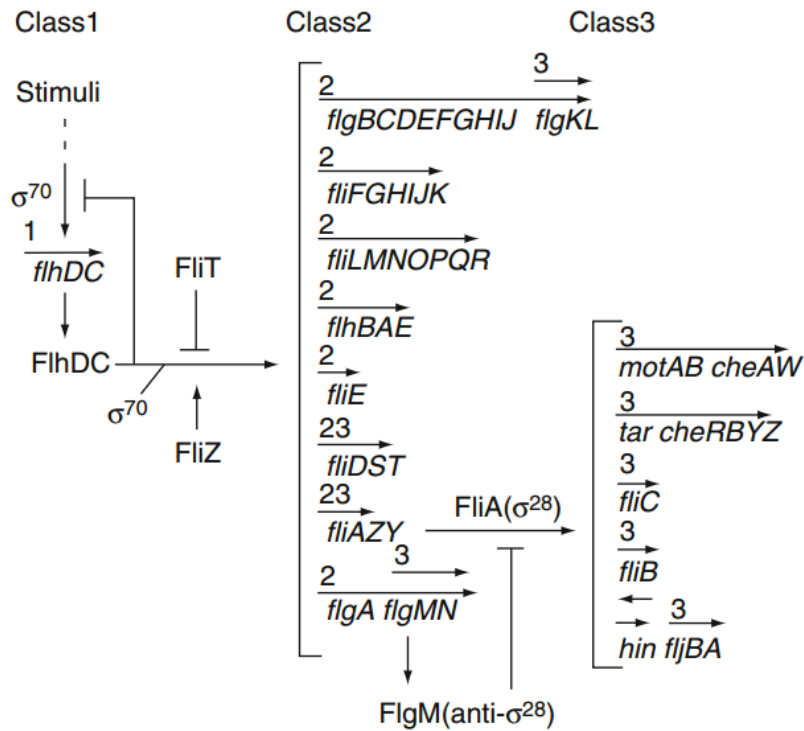


図 0-7. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium におけるべん毛遺伝子群の転写・翻訳の順序

横向きの矢印下に記された遺伝子群が同一の転写単位であり、矢印始点上の数字が転写・翻訳される時期である。クラス II には、クラス III の転写時期にも転写されるものがある。たとえば、*fliG*, *fliL*, また *fliDST* は両時期に転写翻訳される。Terashima *et al.* (2008) より引用。

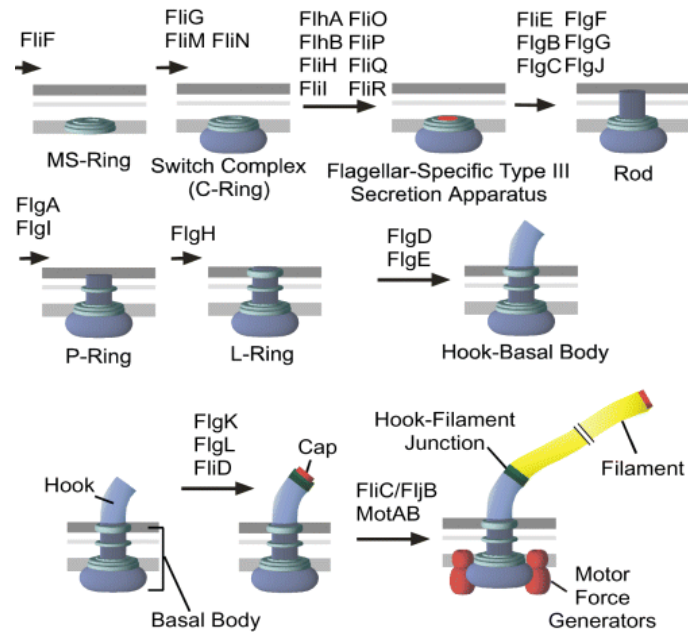


図 0-8. べん毛の組み立ての模式図

図 0-7. で示した遺伝子が発現し、各タンパク質が重合していく順序を模式的に記した。まず、細胞膜に MS リングとべん毛の基部が形成され、続いてⅢ型分泌装置を利用して菌体外にべん毛が伸びていく。Hook の形成が完了すると、べん毛の繊維を構成する FliC が既に形成されたフックやフィラメントの中を通して菌体外に次々と送り出されていくが、FliC の送り出しに関する具体的な方法はまだ確定していない。Terashima *et al.* (2008) より引用。

次に、翻訳レベルの制御では、*Bacillus subtilis* において、RNA 結合性タンパク質の CsrA と FliC 特異的シャペロン FliW の協働により、FliC の翻訳量を調整し、細胞内 FliC の存在量を一定に保つ仕組みが報告されている (Kearns DB, 2014)。この仕組みは CsrA-FliW システムと呼ばれている。この系では、細胞内 FliC 濃度が高い場合、CsrA は FliW だけでなく、FliC をコードする mRNA (*mfliC*) の上流に結合し、過剰な FliC の翻訳を抑制している。逆に、細胞内 FliC 濃度が低下すると、FliC から遊離した、free FliW の存在量が増加する。すると、CsrA は FliW-CsrA 複合体を形成し、*mfliC* から乖離する。これによって FliC の翻訳が開始され、細胞内 FliC 濃度が増加に転じる。

最後に、翻訳後レベルの制御では、*B. subtilis* や *Campylobacter jejuni* において、FliW-FliC 複合体形成による FliC 分泌阻害や、FliC 特異的シャペロンとして働き、べん毛基部の輸送ゲートへ FliC を輸送する FliS による FliC の分泌促進が知られている。いずれの制御も、細胞内の限られた資源を有効利用しつつ運動能を獲得し、かつ、べん毛構造体を正確に組み立て

るために行われていると考えられる。しかし、べん毛を持つすべての細菌にこのシステムが存在しているわけではなく、たとえば *E. coli* のゲノム中には FliW ホモログタンパク質をコードする遺伝子は見いだされず、このシステムは存在しないと予想される。

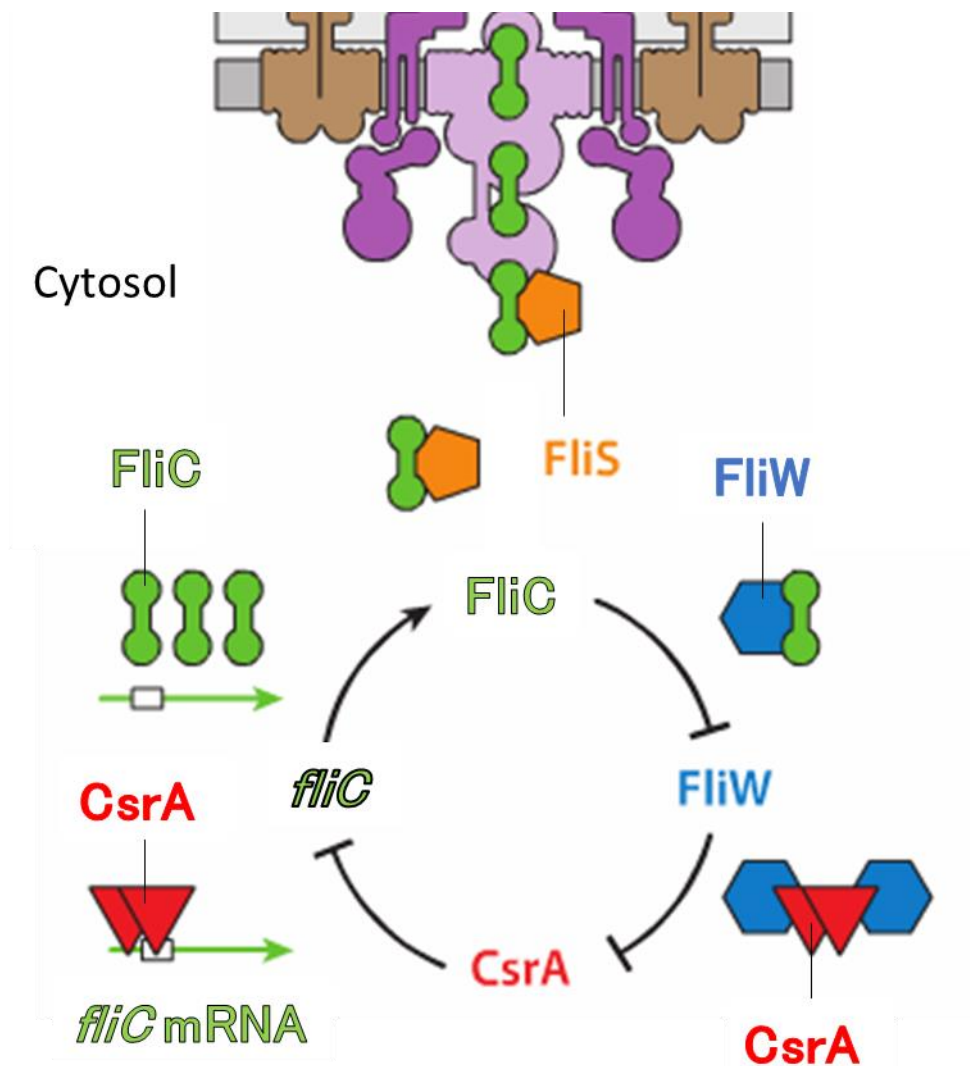


図 0-9. *B. subtilis*における細胞内 FliC 存在量の制御メカニズム

*B. subtilis*において提唱されている、細胞内 FliC 存在量の制御メカニズム。このシステムを構成するタンパク質群は、相互に結合 / 解離を繰り返すことで細胞内の FliC 存在量を一定に保つように機能している。なお、同様のシステムが *C. jejuni*でも保存されている。

ここまでにあげた *S. enterica* や *B. subtilis*、*C. jejuni*、*E. coli* はすべて球菌ないし桿菌であり、細胞分裂を行って増殖する期間と、べん毛を形成して運動する期間を比較的容易に切り替え可能である。一方、*A. missouriensis* の場合、べん毛を形成するのは遊走子の時のみであり、菌糸成長へ移行するまでの4時間程度しかべん毛が機能する時間はない（菌糸成長期はべん毛構造を持っていても、べん毛の回転力による移動はできないため、生存戦略上必要ない）。そのため、べん毛の形成は孢子嚢内部で遊走子が形成されるときに一過的に行われると考えられ、他の細菌とは異なる制御メカニズムの存在が示唆される。

第3章 微生物の運動停止に関する研究

運動性を持つ微生物のうち、積極的に運動を停止するための機構を持つものがある。研究がなされている例は少なく、グラム陰性菌では *E. coli* の YcgR、グラム陽性菌では *B. subtilis* の EpsE が知られている。この2者はホモログ関係にはなく、異なった機構でべん毛回転のブレーキとして機能している。

YcgR は、c-di-GMP 依存的にべん毛回転の停止を行わせる。図 0-10 の模式図に示すように、YcgR は FliM に結合する。そこに、c-di-GMP が存在すると、YcgR に結合し、FliG の細胞膜側に向いている領域に、YcgR が結合する。すると、FliG と MotA/MotB (Stator) の相互作用ができなくなり、べん毛の回転が停止する。

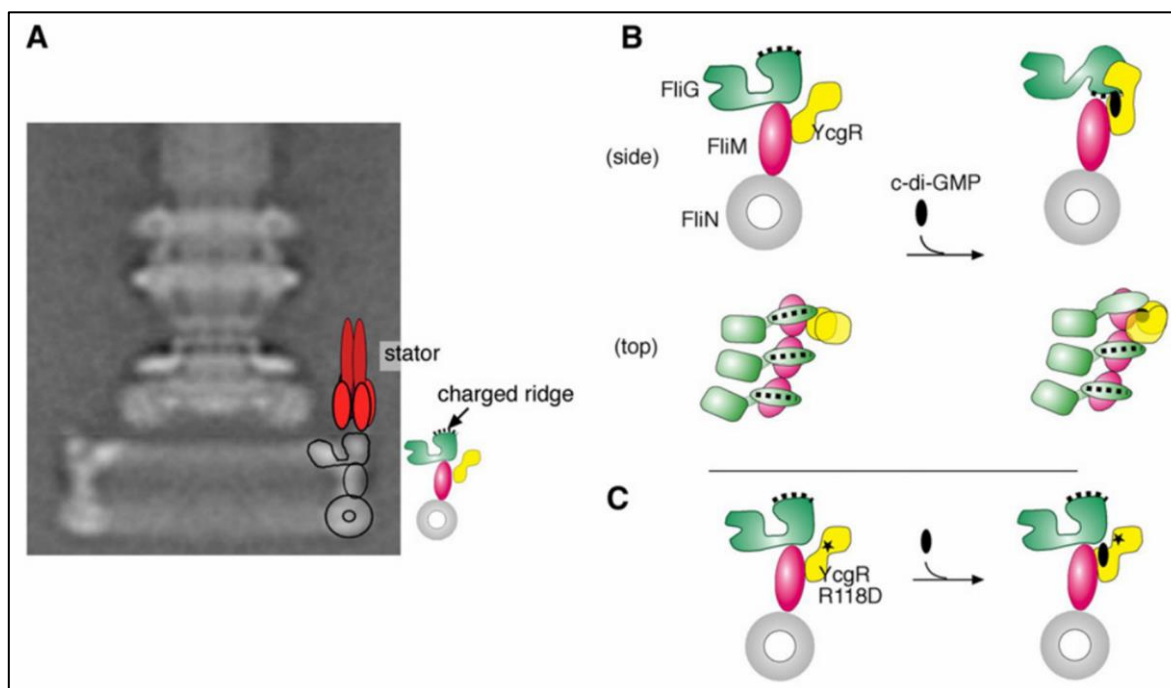


図 0-10. YcgR の作用機序

E. coli の YcgR がべん毛の回転を停止させるメカニズムと、その作用機序の模式図。A はべん毛構造体のクライオ電子顕微鏡写真を基に、C-ring を構成する FliG, FliM, FliN とべん毛に回転力を伝える Stator を書き加えたもの。B と C は、クライオ電子顕微鏡の構造をもとに、YcgR の作用機序をまとめたもの。図は、Koushik Paul *et al.*, 2010 より引用した。

一方で、*B. subtilis* では、EpsE がクラッチ※¹として働くことで、べん毛の回転を制御すると提唱されている。EpsE が細胞内で過剰発現すると、FliG に結合し、MotA と FliG の相互作用を阻害する。これにより、MotA/MotB を通して H⁺が細胞内から流入し、その際に FliG との相互作用によって発生するべん毛の回転力を生成できなくする。これにより、べん毛の回転を停止させる。この機能は c-di-GMP とは無関係である。この現象はバイオフィーム形成時に何が起きているのかを解明する研究から見出されており、DegS-DegU 制御系の下に組み込まれていることが解析されている (Lynne S. Cairns *et al.*, 2013)。

※1 クラッチとは、ヒトの作った機械において、1つの動力軸 (回転している軸状の部品など) から、別の部品への動力の伝達を ON/OFF するために使われる部品のことで、元々の動力を停止させることなく、動力伝達をする / しないを可能にするものである。

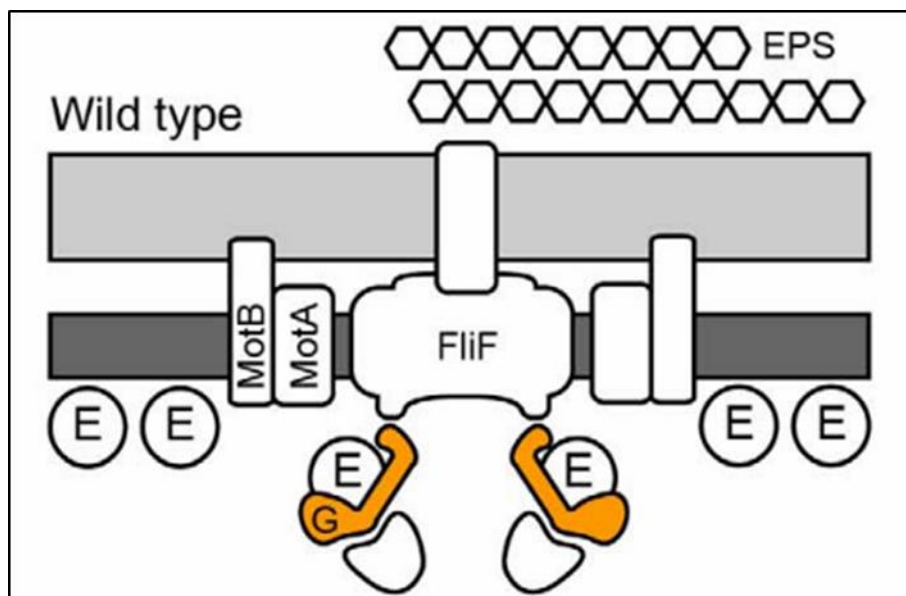


図 0-11. EpsE の作用機序

B. subtilis の EpsE の作用機序の模式図。G は FliG、E は EpsE を示している。図は、Sarah B. Guttenplan *et al.*, 2010 より引用した。

第4章 微生物のIV型線毛の構造と機能

微生物の中には、運動器官としてのべん毛以外に、菌体外に繊維状構造を持つものがあり、線毛と呼ばれている。細菌の線毛には複数の種類があり、I型線毛、IV型線毛、性線毛などが知られている。線毛に関するこれまでの研究は、主にグラム陰性菌で研究が進んでいる(図0-12)。本研究で扱うIV型線毛はII型分泌装置の機構に似た仕組みであり、構成しているタンパク質にも相同性がある(表0-1)。IV型線毛の組み立ては、*pilA*がコードするpre-pilinがPilD(ペプチダーゼ)により成熟型になり、major pilinとなる。内膜に存在するPilB(ATPase)により、major pilinは重合しながらPilQによって作られた穴を通して細胞外へ出て行く(グラム陰性菌の場合)。べん毛合成の場合、繊維(重合したFliC)内部を通してFliCモノマーが輸送され、すでに合成されたべん毛繊維の先端で新たに重合し、伸長していく。一方、IV型線毛の場合は、繊維状構造が基部から形成されつつ細胞外へ伸びていく。そのため、細胞に近い部分が新しく合成された線毛繊維となる。この違いにより、IV型線毛の場合はPilBとは異なる別のATPaseであるPilTにより、一度細胞外に伸長していった繊維を細胞内へ引き戻すことができる。この機構により、細胞外で線毛繊維が何かに付着したあとでPilTを用いることで、基質表面へ細胞を移動させることができる。これにより、後述するIV型線毛の機能の発揮に関与していると考えられる。

IV型線毛は様々な機能を果たすことが知られており、例えば、べん毛を持たない細菌が移動する際に線毛を用いる例(twitching motility, gliding motility)、DNAの取り込み、真核細胞などへの接着、バイオフィルム形成等が知られている。グラム陽性菌の線毛の機能のうちよく調べられているものとしては、*Clostridium perfringens*におけるgliding motilityの研究がある。この菌はべん毛を持たないが、IV線毛を使い、寒天培地上を這うように移動することができる。しかしながら、グラム陽性菌のIV型線毛の解析例は少なく、形態分化を行う細菌の孢子(遊走子)の表面に存在する線毛の解析例は全くなかった。

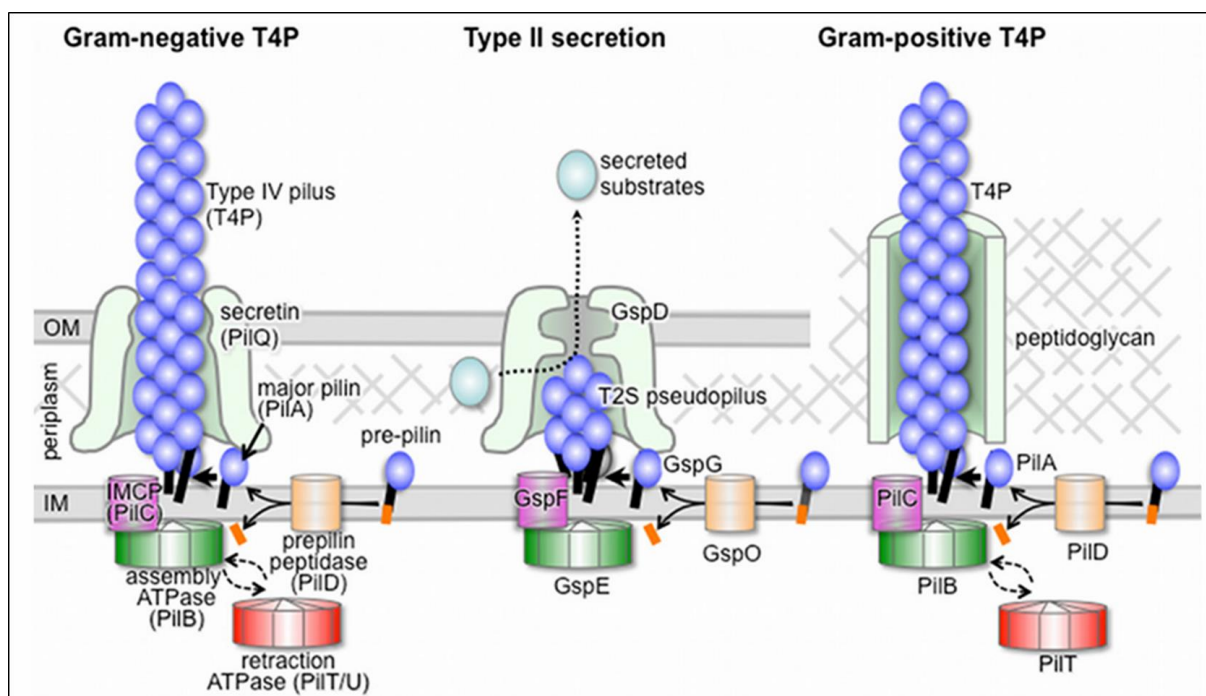


図 0-12. グラム陰性菌、グラム陽性菌の IV 型線毛と II 型分泌装置の模式図

IV 型線毛の構成因子および組み立て様式、II 型分泌装置の模式図。Stephen Melville, Lisa Craig (2013) より引用。

表 0-1. IV 型線毛と II 型分泌装置の構成因子の比較

TABLE 1 Nomenclature for related filament systems in Gram-negative and Gram-positive bacteria

Protein category	Protein(s) in system			
	Gram-negative bacterial systems			
	T4P ^a	T2SS ^b	TAD pili ^c	Gram-positive T4P ^d
Major pilins/pseudopilins	PilA	GspG	FliP	PilA
Minor pilins/pseudopilins	FimU, PilV, PilW, PilX, PilE	GspH, GspI, GspJ, GspK	TadE, TadF, TadG	Various proteins
Assembly ATPase	PilB	GspE	TadA	PilB
Inner membrane core protein	PilC	GspF	TadB, TadC	PilC
Prepilin peptidase	PilD	GspO	TadV	PilD
Outer membrane secretin	PilQ	GspD	RcpA	
Retraction ATPase	PilT, PilU			PilT
Inner membrane accessory protein	PilM, PilN, PilO	GspL, GspM	TadG, TadZ	PilM, PilN, PilO

^a *Pseudomonas aeruginosa* nomenclature.

^b General secretion pathway nomenclature (170).

^c *Pseudomonas aeruginosa* nomenclature.

^d *Clostridium perfringens* nomenclature.

Stephen Melville, Lisa Craig (2013) より引用。

第5章 使用した菌株、培地組成、形質転換方法

菌株

【大腸菌】

- *E. coli* JM109

recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rk⁻ mk⁺), e14- (*mcrA*⁻), *supE44, relA1, Δ(lac-proAB)/F'*[*traD36, proAB*⁺, *lacIq, lacZΔM15*]

遺伝子のクローニング等、大腸菌を用いる実験で特に断りがない場合は全てこの株を使用した。

- *E. coli* ET12567/ pUZ8002

dam-13::Tn9, dcm-6, hsdM

プラスミド pUZ8002 (*tra, neo* RP4) を持つ。 *A. missouriensis* との接合伝達に用いた。

【放線菌】

- *Actinoplanes missouriensis* NBRC102363

醗酵学研究室において使用されている野生株。ゲノム解読済み。

- *Actinoplanes missouriensis Δche* クラスタ1
- *Actinoplanes missouriensis Δche* クラスタ2
- *Actinoplanes missouriensis Δche* クラスタ1 & 2
- *Actinoplanes missouriensis ΔfliC*

上記4つの破壊株は、醗酵学研究室 Jang 氏作製のもの。

- *Actinoplanes missouriensis ΔftgA*

醗酵学研究室種村氏作製のもの。

ベクター

• pUC19

アンピシリン耐性遺伝子を有す。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 (Yanisch, Perron *et al.* 1985)。

• pK19mobsacB

スクロースを資化すると細胞毒性を引き起こし致死となる遺伝子 *sacB* を持つプラスミド。クローニングサイトとして *HindIII*, *SphI*, *PstI*, *SalI*, *XbaI*, *BamHI*, *SmaI*, *EcoRI* をもつ。

• pK19mobsacB Apra^R

オリジナルである pK19mobsacB のカナマイシン耐性領域を *BglIII/NcoI* 処理して 3/4 程度欠失させ、そこにアプラマイシン耐性遺伝子 *aac* (3) IV を挿入した。破壊株作製に使用した。

• pTYM19 ベクター

富山県立大学尾仲宏康博士らによって開発されたシャトルベクターで、大腸菌内ではプラスミドとして複製され、放線菌内ではゲノム中の *attB* サイトに 1 コピー組み込まれる (Onaka *et al.*, 2003)。アンピシリン耐性遺伝子、チオストレプトン耐性遺伝子、ファージ ΦC31 由来の *integrase* 遺伝子, RK2 由来の複製起点 *oriT* を持つ。また、マルチクローニングサイトには *lacZ* の方向に向かって *EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *BamHI*, *XbaI*, *PstI*, *SphI*, *HindIII* が並ぶ。

A. missouriensis への接合伝達には、薬剤耐性マーカーをアプラマイシンに書き換えたものを使用した。

培地

・ Difco™ LB (Luria-Bertani) 培地

BD 社製。大腸菌の培養に用いた。必要に応じて抗生物質を添加した。

・ 2xYT 培地

BD 社製。大腸菌の液体培養に用いた。必要に応じて抗生物質を添加した。

・ BM (Bennett's - Maltose) 培地

1 g Bacto™ 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 または NZ Amine (和光純薬工業社製、Type A は終売)、10 g Maltose (国産化学社製または和光純薬工業社製) を D.W. に溶解し、pH を 7.3 にして 1 L に Fill-up し、20 g の寒天末を加えてオートクレーブした。必要に応じて、抗生物質を添加した。 *A. missouriensis* の栄養成長用固体培地。

・ PYM 培地

5 g Bacto™ peptone (BD 社製)、3 g Bacto™ yeast extract (BD 社製)、1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (国産化学社製) を D.W. に溶解し、pH を 7.0 にして 1 L に Fill-up し、オートクレーブした。 *A. missouriensis* の栄養成長用液体培地。接合伝達の前培養に用いる際は、1 L 当り 50 g の Mannitol を添加した。

・ HAT 培地

1 g Sucrose (和光純薬工業社製)、0.1 g Casamino acid (BD 社製)、0.5 g K_2HPO_4 (国産化学社製)、20 mL 腐食酸保存液^{※1}、10 mL trace element solution^{※2} を D.W. に溶解し、pH を 7.5 にして 1 L に Fill-up し、20 g の寒天末を加えてオートクレーブしたもの。 *A. missouriensis* に孢子形成をさせるための固体培地。

※1 腐食酸保存液 : Nitrohumic acid (東京化成社製) 10 g を 100 mL の 0.8 % NaOH に溶解し、オートクレーブ滅菌したもの。

※2 Trace element solution : 40 mg ZnCl_2 、200 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、10 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、10 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、10 mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、10 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を D.W. に溶解し、1 L に

Fill-up してオートクレーブ滅菌したもの。

- GYMC 培地

4 g glucose (国産化学社製)、4 g Bacto™ yeast extract (BD 社製)、10 g Bacto™ malt extract (BD 社製)、2 g CaCO₃ (和光純薬工業社製) を D.W. に溶解し、pH を 7.2 にして 1 L に Fill-up し、12 g の寒天末を加えてオートクレーブ滅菌したもの。CaCO₃ は溶解度に比べて大過剰に入っているため沈殿する。培地中で均一になるよう、オートクレーブ後は固化するぎりぎりまで待ってから、プレートを作製した。かつて接合伝達に用いていた培地である。

- Cz 培地 (Difco Czapek Dox)

カビ用の合成培地。 *A. missouriensis* は栄養成長と胞子形成の両方を行うことができる。BD 社製 Difco Czapek Dox を 35 g / 1 L D.W. に溶解し、寒天末 20 g を入れて調整した。pK19mobsacB ベクターを用いた破壊株の選抜には、2 % スクロースを添加したものを使用した。

- MS 培地

20 g きなこ、20 g Mannitol、20 g 寒天末を D. W. 1 L に溶解し、オートクレーブしたもの。オートクレーブ後に、別滅菌した MgCl₂ を終濃度 40 mM となるように添加した。きなこは東京大学農学部付近のスーパーマーケットで調達した。

接合伝達用培地の 1 つであり、pTYM シリーズを接合伝達する際に使用した。

- 改変 ISP4 培地

37 g Difco ISP medium 4 (BD 社製) に 0.5 g Yeast extract (BD 社製)、1 g Tryptone (BD 社製) を加え、D. W. 1 L に溶解後、オートクレーブした。オートクレーブ後に、別滅菌した MgCl₂ を終濃度 40 mM となるように添加した。

接合伝達用培地の 1 つであり、pK19mobsacB を接合伝達する際に使用した。

- M63-Maltose 培地

2 g (NH₄)₂SO₄、13.6 g KH₂PO₄、0.5 mg FeSO₄ 7H₂O 15 g 寒天末を D. W. 1L に溶解し、オートクレーブした。オートクレーブ後に、それぞれ別滅菌した 20 % マルトース 10 mL (終

濃度 0.2 %)、1M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mL (終濃度 1 mM)、0.5 % Vitamine B1 200 μL (終濃度 0.0001 %) を加えた。バクテリアルツーハイブリッド法における相互作用検出用培地であり、実際の実験では抗生物質、IPTG を添加して使用した。

A. *missouriensis* の形質転換法の改良

醗酵学研究室において過去に行われてきた *A. missouriensis* の形質転換では、液体培養した *A. missouriensis* と、形質転換に使用するプラスミドを保持させた接合用大腸菌である *E. coli* ET12567/pUZ8002 株をGYMC培地上で混合、塗布し、24時間後に選抜用抗生物質をオーバーレイし、10日程度培養することで形質転換対を取得していた。しかし、この方法では形質転換体の取得効率が低く、放線菌／大腸菌の量比や、オーバーレイまでの時間など各種パラメータを種々変更し、数十枚のGYMC培地を用いて形質転換を行っても、目的の株が取得できないことが多々あった。特に、遺伝子破壊株作成用のpK19mobsacBベクターを用いた場合、破壊株の取得は困難を極めた。そこで、本論文に記す研究を進めながら、より高効率に形質転換可能な培地条件の検討を行った。

1. ゲノム組み込み型ベクターpTYM19シリーズを用いた接合伝達用培地の探索

まず、条件検討開始前において、比較的形質転換体の取得効率が高かったpTYM19シリーズを用いて接合に適した培地の条件検討を行った。文献XXX（韓国のグループの論文、Johninness center）を参考に、以下の組成の培地上で接合伝達を行い、形質転換体が取得できるかどうか確認した。

GYMC media

Glucose	4	g
Yeast Extract	4	g
Malt Extract	10	g
Ca ₂ CO ₃	2	g
Agar	12	g /L

MS(SFM) media

Soy flour	20	g
Mannitol	20	g
Agar	20	g /L

<u>ISP medium 4</u>		* BD
Soluble starch	10 g	
K ₂ HPO ₄	1 g	
MgSO ₄	1 g	
NaCl	1 g	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g	
CaCO ₃	2 g	
Agar	20 g	
FeSO ₄	0.001 g	
MnCl ₂	0.001 g	
ZnSO ₄	0.001 g	/L

<u>ISP medium 2</u>	
Glucose	4 g
Yeast Extract	4 g
Malt Extract	10 g
Agar	20 g

<u>AS-1 medium</u>	
Yeast Extract	1 g
L-alanine	0.2 g
L-arginine	0.2 g
L-asparagine	0.5 g
Soluble starch	5 g
NaCl	2.5 g
Na ₂ SO ₄	10 g
Agar	20 g
pH	7.5

その結果、MS 培地での形質転換効率が最も高かった。

次に、マグネシウムイオン濃度 (MgCl₂ の添加量) の検討を行った。

0 mM、10 mM、20 mM、30 mM、40 mM の MgCl₂ を添加した MS 培地で接合を行い、形質転換体の取得効率を比較した。その結果、40 mM の MgCl₂ を添加した MS 培地が最適で

あると判明し、以降はこの条件を用いることにした。

2. 接合に使用する大腸菌株の検討

醗酵学研究室には、2016年時点で前述の *E. coli* ET12567 / pUZ8002 株と、*E. coli* S17-1 株という 2 種類の接合伝達用大腸菌が存在した。*E. coli* ET12567 / pUZ8002 株よりも *E. coli* S17-1 株は生育が早く、接合伝達に必要な因子をゲノム中に保持しているため、培養が容易になると考えられた。しかし、実際に *E. coli* S17-1 株を用いて形質転換を行ってみると、ゲノム中に持つストレプトマイシン耐性遺伝子のため、スペクチノマイシンのオーバーレイでは *A. missouriensis* と分離することができなかった (*A. missouriensis* はスペクチノマイシンに自然耐性を持つ)。そこで、グラム陽性菌の選択培養に用いられるナリジクス酸による分離を試みた。ところが、*A. missouriensis* はグラム陽性菌であるにもかかわらず、ナリジクス酸に対する耐性がなかった。結果として、*E. coli* S17-1 株を接合伝達に用いることは現実的ではないと判断し、*E. coli* ET12567 / pUZ8002 株を引き続き使用することにした。

3. 遺伝子破壊株作成用ベクター pK19mobsacB 用の接合伝達培地の探索

上記 1. で MS+40 mM MgCl₂ 培地の使用によって容易に形質転換対が取得できるようになったが、遺伝子は会株作製に用いている pK19mobsacB では形質転換がうまくいかなかった。原因を探るため、MS+40 mM MgCl₂ 培地上に pK19mobsacB ベクターを保持した *E. coli* ET12567 / pUZ8002 株を植菌したところ、他のベクターを保持させた場合や、何れのベクターも持たせていない場合と比較して著しく生育が悪化した。これは、MS 培地中のきなこに含まれるスクロースが *sacB* 遺伝子の働きにより代謝され、致死となったためだと考えられた (食品用きなこを使用しているため、正確なスクロース含量は不明)。そこで、*sacB* 遺伝子が働かない炭素源で形質転換可能な培地を再度探索することにした。様々な培地に 40 mM MgCl₂ を添加した条件で接合伝達を行ったところ、改変 ISP4 培地に 40 mM MgCl₂ を添加した場合、最も効率よく形質転換体を取得できた。以後、pK19mobsacB ベクターを用いた破壊株の取得にはこの条件を用いることにした。

4. pK19mobcacB ベクターを用いて作製した 1 組換え体からの破壊株選抜方法の改良

従来、pK19mobcacB ベクターを用いて遺伝子破壊株の 1 回組換え体の作成が完了した場合は、以下の方法をとっていた。まず、一回組換え体を HAT 培地に植菌し、孢子形成させ、回収した孢子を適宜希釈して BM 培地に塗布し、シングルコロニーを取得しする。次に、これらのコロニーを 1 つずつアブラマイシンあり／なしの BM 培地にレプリカし、アブラマイシン感受性になった株を破壊株候補としてコロニー PCR 等を行い、破壊株を選びだしていた。しかし、破壊対象の遺伝子によっては 1,000 個以上のコロニーのレプリカが必要になる場合があり、大きな労力がかかっていた。そこで、*sacB* 遺伝子の機能が利用可能な、野生型復帰株または遺伝子破壊株のみが生育する培地を探索した。その結果、主にカビの培養に用いられる合成培地である Czapek-Dox 培地のスクロース濃度を 5 %に上げた培地 (Czapek-Dox Sucrose Final 5 % media、CzSF5 培地と呼称する) が目的にかなうことが判明した。そこで、pK19mobcacB ベクターを用いて作製した 1 回組換え体の孢子を CzSF5 培地に塗布し、生育してきたコロニーに PCR を行って破壊株の選抜を行うことにした。

5. CRISPR/Cas9 system (pCRISPomyces-2) の利用

Actinoplanes sp. SE50/110 株を使用している研究グループから、放線菌用 CRISPR/Cas9 system を使用してメラニン様色素の合成遺伝子を破壊した報告があった (ドイツのグループの論文、2016)。そこで、*A. missouriensis* においても pCRISPomyces-2 が利用可能である可能性を考え、利用可能性を検討した。

gRNA と、相同組換え領域を挿入した pCRISPomyces-2 で *A. missouriensis* 野生株を形質転換した。取得したアブラマイシン耐性のコロニーを植え継ぎ、HAT 培地上で孢子形成させ、生じた孢子をアブラマイシンあり／なしの BM 培地に塗布した。すると、アブラマイシン感受性のコロニーはアブラマイシン耐性のコロニーの約 10,000 倍と圧倒的多数を占めており、薬剤非存在下では pCRISPomyces-2 を安定保持できていない可能性が考えられた。ア

プラマイシン感受性のコロニーのうち数十個に対してコロニーPCRを行ったところ、全て野生株のままであり、pCRISPOmyces-2 ベクターを保持していなかった。これらの結果から、*A. missouriensis* での CRISPR/Cas9 システムによる破壊株作製は現実的ではないと考え、従来通り 2 回の相同組換えを行う方法を継続することにした。

6. 改良後の *A. missouriensis* 形質転換方法

以下の方法が検討を経て確定した形質転換方法である。

A: *Actinoplanes missouriensis* の培養

A1. 形質転換したい *A. missouriensis* のグリセロールストックを BM 培地に起こす。30°C で 2 日程度培養する。

A2. 2 日後、*A. missouriensis* の生えている寒天培地を 1 cm x 1 cm 程度つまようじで切り取り、5% マンにトール入り PYM 100 mL 坂口フラスコに植菌する。30 °C、120 rpm で 40 時間程度振盪培養する。

E: *E. coli* の準備

E1. 形質転換体取得のために構築したプラスミドで *E. coli* ET12567 / pUZ8002 (Km^R) を形質転換する。形質転換に用いたプラスミドの選択マーカーとカナマイシンを加えた LB 培地へ塗布し、37 °C で一晩培養する。

E2. 得られたコロニーを 15 mL の LB + プレートに加えた抗生物質入りの 50 mL 容ファルコンチューブにつまようじで拾って植菌する。37 °C、300 rpm で一晩培養する。この前培養の培養時間が 15 時間を超えないようにする。

E3. 前培養液 1 mL を適切な抗生物質を加えた LB or 2xYT 100 mL 坂口フラスコに 0.2 ~ 1 % 植菌する。pK19mobsacB ベクターを使用する場合は、1 % 植菌するとよい。37 °C、120 rpm で本培養する。

E4. OD₆₀₀ = 0.4 ~ 0.6 (対数増殖期中期まで) で本培養を終了し、接合に用いる。概ね、6 時間

程度の培養で到達するが、ベクターや選択マーカによる違いが生じる。特に、初めて行う条件の時はこまめに OD₆₀₀ を観察する。

C: 接合

(全操作をクリーンベンチ内で行う。また、C1~C9 と C10~C13 を並行して行う。)

C0: 実験開始前に、接合を行うプレートをクリーンベンチ内で風乾するか、37°Cインキュベーターへ入れ、温めるとともによく乾かしておく。

C1: 本培養の終了した *E. coli* の坂口フラスコから培養液 40 mL を 50 mL 遠沈管に移す。3,500 rpm、5 min 遠心する。

C2: 上清を捨て (消毒用エタノールを吹きかけた 1 L 三角フラスコなどでよい)、培養液 40 mL を追加する。3,500 rpm、5 min 遠心する。

C3: 上清を廃液捨てまたは元々の坂口フラスコに捨てる。

C4: 新しいオートクレーブ済み LB 液体培地を 15 mL 程度入れ、P1000 または P5000 で穏やかにピペッティングしてペレットを溶解する。

C5: ペレットが溶解したら、LB で 40 mL まで fill up する。3,500 rpm、5 min 遠心する。

C6: 上清を捨て、C4, C5 の操作をもう一度行う。

C7: 上清を捨て、500 μL ~ 1 mL の LB を加えてピペッティングし、ペレットを溶解する。

C8: *A. missouriensis* を培養中の坂口フラスコを回収する。

C9: 50 mL 容遠沈管へ *A. missouriensis* 培養液 40 mL を移す。3,500 rpm、5 min 遠心する。

C10: 培養液を坂口フラスコに捨て、新しいオートクレーブ済み LB で 40 mL まで満たす。ペレットを溶解し、再度 3,500 rpm、5 min 遠心する。

C11: 上清を捨て、1 mL 程度の LB を加えてピペッティングし、ペレットを溶解する。

(これ以降は *E. coli* と *A. missouriensis* を同時に扱う)

C12: 菌体の量比が *E. coli* : *A. missouriensis* = 1 : 2 ~ 1 : 10 程度になるように、*E. coli* のペレ

ットの入っているチューブに *A. missouriensis* を入れ、穏やかにピペッティングして懸濁する。

C13: 懸濁した菌体液を 200 ~ 400 μL / plate 程度の量で MS + MgCl₂ プレートに塗布する。

C14: 風乾後、30 °Cで培養する。

C15: 培養開始から 15~ 20 時間程度で、スペクチノマイシンと、形質転換したいプラスミドの選択マーカーを各 1 mg / mL で含むフィルター滅菌済み水溶液 1 mL をオーバーレイする。再度風乾後、30 °Cで 1 週間程度培養する。MS プレートの場合は 15~18 時間程度、改変 ISP4 培地の場合は 18~20 時間程度が望ましいと考えられるが、菌体の様子や用いるベクターによって適宜調整する。

C17: 接合から 5 日 ~ 10 日 (MS 培地)、10 ~ 14 日 (ISP4 培地) 程度でコロニーが生じる。適切な抗生物質を含む BM プレートへ植え継ぎ、生育や PCR により目的の株か確認する。

なお、pK19mobsacB ベクター使用時は改変 ISP4 培地を、その他のベクターの使用時は MS 培地で接合が可能である。

本 論

第1章 べん毛形成に必須なチオレドキシンの機能解析

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。

また、結果の図表は削除

本章は、修士論文の第3章、『べん毛形成に必須な遺伝子 AMIS75470 の機能解析』の研究を継続・発展させたものである。修士論文に記載したデータおよび図表は、博士論文においては背景として扱い、該当箇所には修士論文から引用と記す。

1-1. 背景

1-1-1. べん毛形成に必須なチオレドキシンの発見までの経緯

過去に醗酵学研究室藤田氏により過去に行われた二次元電気泳動による網羅的解析から見出されてきた、孢子特異的に発現量が増加するタンパク質の1つにチオレドキシンの機能予測されているものがあった。遺伝子番号は AMIS75470 である。藤田氏による半定量 RT-PCR や、醗酵学研究室において行われた孢子嚢形成期の菌体（栄養生長期の菌糸、孢子嚢形成培地での培養開始3日目、6日目、40日目）から抽出した RNA を用いた RNA シークエンス解析のどちらにおいても孢子嚢形成期に転写量の増大が見られていた（図 1-1）。

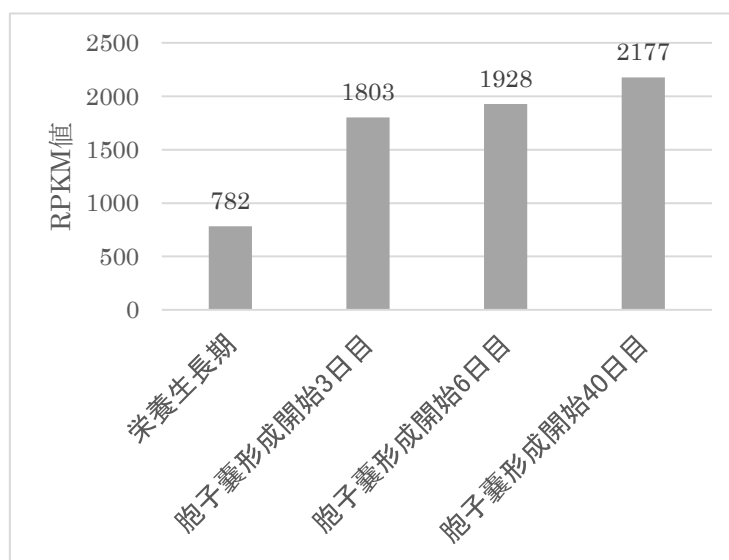


図 1-1. mRNA sequence 解析による AMIS75470 遺伝子の転写量の変化

(修士論文より引用)

AMIS75470 は全長 139 アミノ酸で、Pfam によると保存されているドメインは Thioredoxin-1 であった。Thioredoxin は既知のほぼすべての生物が持つタンパク質で、その機能は CXXC (Cysteine – X – X – Cysteine) のモチーフに含まれる 2 つのシステイン残基によって対象のタンパク質を還元するというものである。AMIS75470 の場合、30 番目と 33 番目のシステイン残基がこの CXXC モチーフに該当した。赤い四角で囲んだ部分が 30 番目と 33 番目のシステイン残基を含む CXXC モチーフである (図 1-2.)。

```
MATVALTAANFDEVTGKDGIVLVDFWASWCGPCVRFAPTYERSSEKHPEITFGKV  
DTEAEQALAAKFDIRSIPTIMAVRDGVVVFAQPGALPESALESLEKVEQLDMDEV  
REQIAAHRKGAHGESATAEPEATAAGRS
```

図 1-2. AMIS75470 のアミノ酸配列

(修士論文より引用)

胞子嚢形成期に、チオレドキシンがどんな役割を果たしているのか解明するため、AMIS75470 の遺伝子破壊株を作製した。破壊の方法は序論第 5 章に示した方法のうち、GYMC 培地と pK19moobsacB ベクターを使用した、2 回の相同組換えによる In-frame deletion である。作製した Δ AMIS75470 株の表現型を確認したところ、野生株と比較して生育の様子には変化はなかった。しかし、HAT 培地上で胞子形成させ、25 mM NH_4HCO_3 の重層により遊走子を泳ぎ出させると、光学顕微鏡観察下では遊走子が運動していなかった。そこで、広島県立大学相沢慎一教授 (当時)、内田薫博士の指導の下、遊走子の透過型電子顕微鏡観察を行った。その結果、 Δ AMIS75470 株の遊走子はべん毛を形成していなかった。また、ゲノム組み込み型ベクター pTYM19 を用い、AMIS75470 の ORF および自身のプロモーターと考えられる領域を破壊株に導入することで遺伝子相補株を作製したところ、べん毛形成能が回復した (図 1-3)。

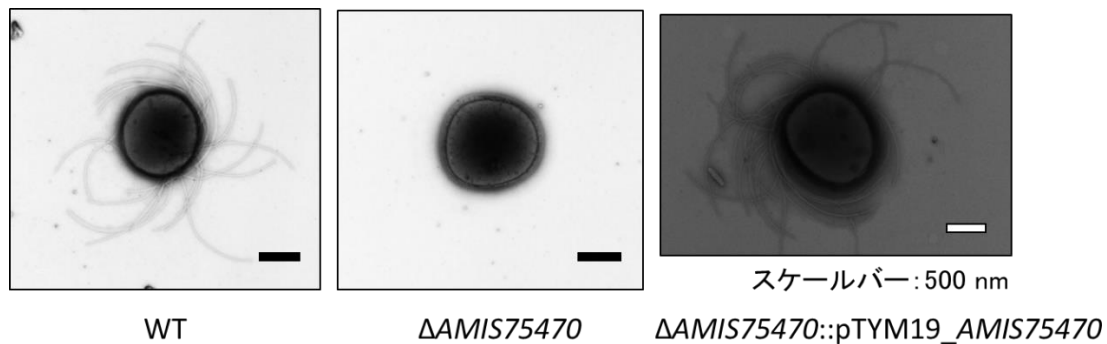


図 1-3. 胞子の透過型電子顕微鏡観察像

(修士論文より引用)

以上の結果から、AMIS75470 の破壊によるべん毛形成能の喪失は、AMIS75470 単独の影響であると判断した。そこで、AMIS75470 はべん毛遺伝子群の転写に影響しているのか、あるいは翻訳に影響しているのかを確認することにした。べん毛遺伝子クラスターに対する半定量 PCR 実験と、野生株および Δ AMIS75470 株の胞子のぬから抽出したタンパク質を用いた 2 次元電気泳動を行った。

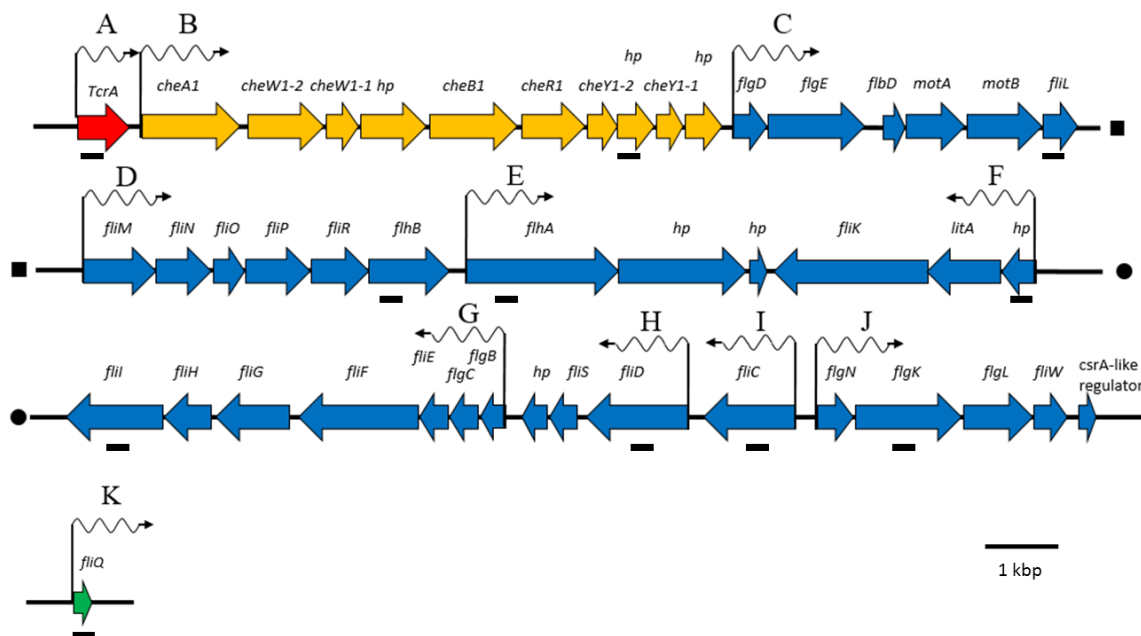


図 1-4. *A. missouriensis* のべん毛遺伝子群

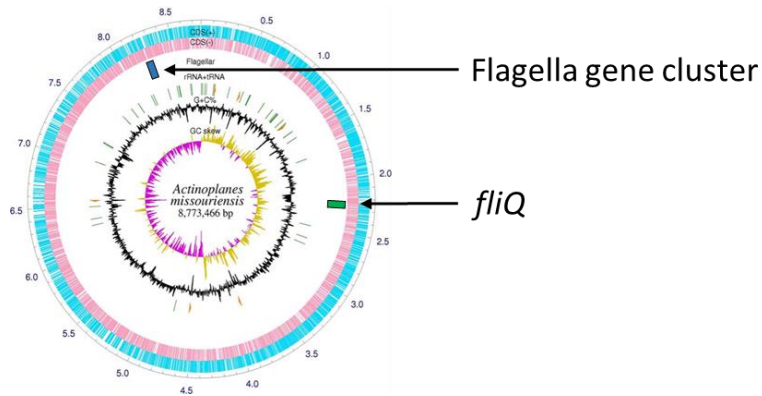


図 1-5. ゲノム中でのべん毛遺伝子群の位置

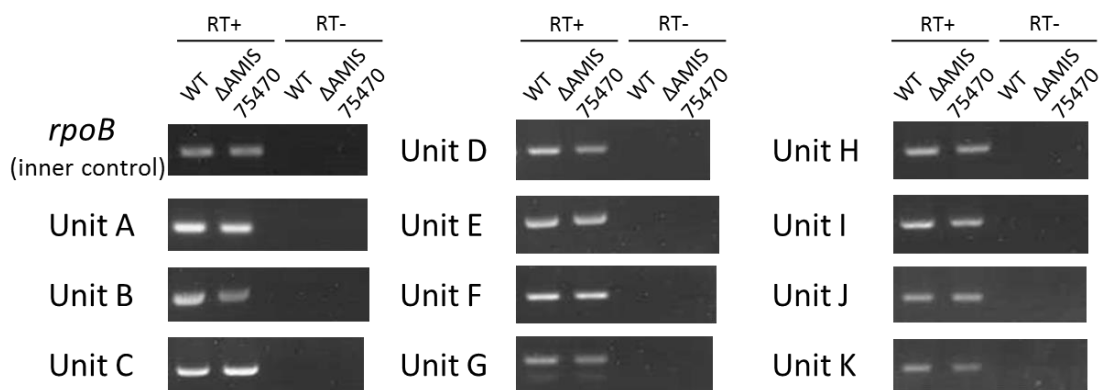


図 1-6. 野生株と $\Delta AMIS75470$ 株におけるべん毛遺伝子の転写量比較

べん毛遺伝子クラスターの上流には、*che* クラスター1 と、その転写因子である *TcrA* が存在している。Unit A は *TcrA* の、Unit B は *che* クラスター1 の転写単位である。また、Unit K はべん毛遺伝子クラスターとは離れた位置に存在するべん毛遺伝子 *fliQ* 遺伝子の転写単位である。

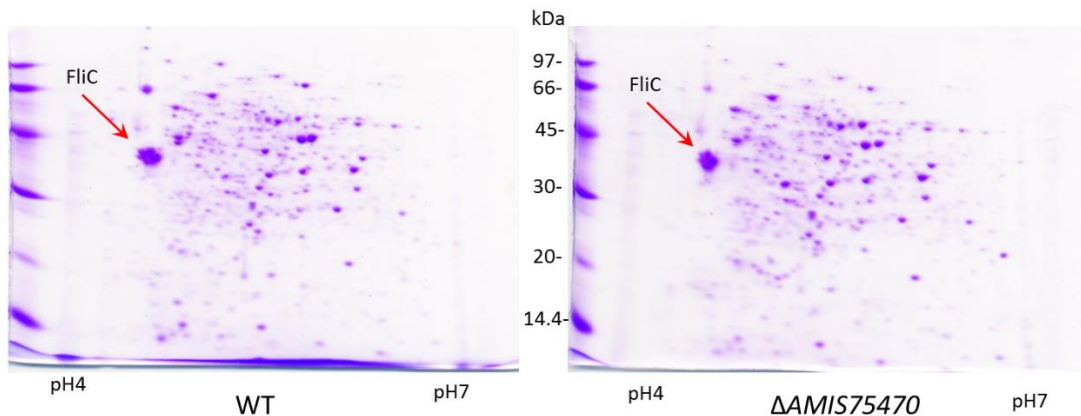


図 1-7. 二次元電気泳動によるべん毛構成タンパク質の翻訳量比較

これらの実験の結果、AMIS75470 はべん毛遺伝子群の転写にも影響せず、また、翻訳にも影響していないと示された。

ここで、AMIS75470 のチオレドキシシン活性がべん毛タンパク質の組み立てに作用していると考え、それを確認するためにシステイン残基をセリン残基に置換した変異 AMIS75470 を発現するプラスミドを Δ AMSI7570 株に導入することで、変異 AMIS75470 発現株を作製し、運動性とべん毛の有無を確認した。C30S は 30 番目の、C33S は 33 番目の、C30S, C33S は 30 番目と 33 番目のシステイン残基をセリン残基に置換した AMSI7570 を発現するコンストラクトである。

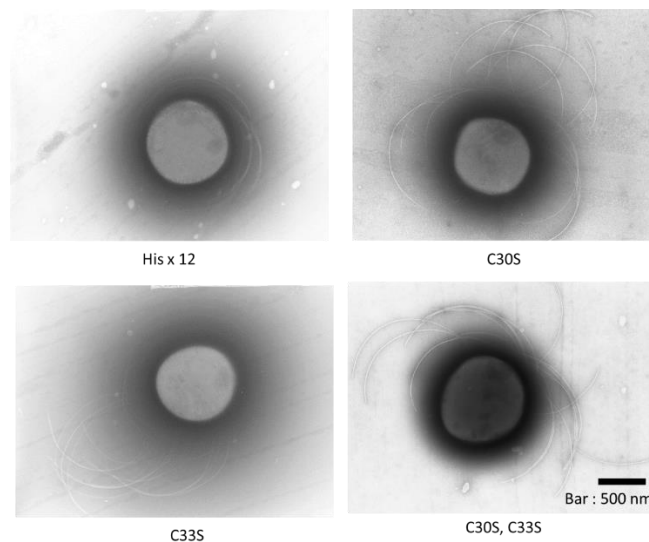


図 1-8. 変異型 AMIS75470 発現株の透過型電子顕微鏡写真

その結果、変異 AMIS75470 発現株においても、野生株同様にべん毛が形成されており、運動性も野生株と差が見られなかった。

修士論文では、以上の結果から、AMIS75470 は確かにべん毛形成に寄与しているものの、べん毛遺伝子群の転写および翻訳には影響せず、べん毛の組み立て過程に関与していること、べん毛の組み立てにはチオレドキシシン活性は不要であることを明らかとしていた。

1-2. 結果

1-2-1. 他の放線菌に存在する AMIS75470 ホモログ遺伝子の探索

修士課程在籍時の結果から、AMIS75470 はチオレドキシシンとしての活性を持つと考えられるが、べん毛形成という機能に関与するのはチオレドキシシンモチーフではないと思われた。そこで、ゲノム情報既知の *Actinoplanes* 属放線菌と、べん毛を持たない放線菌である *Streptomyces* 属放線菌のゲノム中に存在する AMIS75470 ホモログを比較し、有意な差を見出すことができるか検討した。

その結果、検索対象とした菌株全てに AMIS75470 ホモログ (Trx-1) が見いだされた。しかしながら、*Actinoplanes* 属と *Streptomyces* 属のグループ間に、一目で分かる配列上の違いは見いだせなかった。

1-2-2. SGR690 発現株の作製と表現型観察

前節での結果を受けて、AMIS75470 のアミノ酸配列中にべん毛形成に必須な領域が本当に存在するのか確認するために、べん毛を持たない放線菌である *S. griseus* の持つ AMIS75470 ホモログ遺伝子、*sgr690* を Δ AMIS75470 株に導入する実験を試みた。この実験の結果、べん毛形成能が回復すれば、チオレドキシシン様タンパク質の存在がべん毛形成に必須であり、べん毛形成能が回復しなければ、AMIS75470 と SGR690 のアミノ酸配列の間で異なる部分にべん毛形成に必須なアミノ酸残基 (群) が存在すると考えられた。SGR690 の導入は、相補株作製と同様に、AMIS75470 のプロモーター領域と SGR690 の ORF を連結した配列を pTYM19 ベクターで破壊株に導入する方法で行った。

この実験の結果、SGR690 導入株の遊走子はべん毛を形成せず、遊走能も持っていなかった。

1-2-3. チオレドキシシン活性の測定

チオレドキシシン活性とべん毛形成能に関連がないことを示すために、組換えタンパク質を用いたチオレドキシシン活性測定を行った。活性測定に使用する組換えタンパク質は、pColdI ベクターを用いて大腸菌で発現させ、Ni-NTA Spin column で精製した。野生型 TrxA、野生型 SGR690、CXXC モチーフの Cys を Ser に置換した変異 TrxA (C30S, C33S, C30S&C33S) の計 5 種類の組換えタンパク質を調製し、PROTEOSTAT[®] Thioredoxin-1 assay kit (Enzo Life Science 社製) を用いて組換えヒトインシュリンへの還元活性を指標としてチオレドキシシン活性を測定した。

アッセイの結果、野生型の TrxA、SGR690 は有意なチオレドキシシン活性を示したのに対し、CXXC モチーフに変異を導入した TrxA では明らかにチオレドキシシン活性が低下していた。よって、TrxA も SGR690 もチオレドキシシン活性を持っているが、べん毛形成にはその活性は関係しないと示された。

1-2-4. TrxA 内のべん毛形成に必須な部位の特定

前節の結果から、TrxA と SGR690 のアミノ酸配列の間で異なる部分にべん毛形成に必須なアミノ酸残基 (群) が存在すると考えられた。しかし、異なる残基を持つ部分が点在しており、1 カ所ずつアミノ酸残基を交換した変異株を作製していくと膨大な数の株を作製する必要があると容易に予想できた。また、べん毛形成に必須な残基が配列上 1 カ所に集まって存在しているとは限らないと考えられた。こうした理由から、TrxA と SGR690 の ORF を 4 領域に分割し、スワッピングさせた変異株を作製し、領域を絞り込んでいく実験を行うことにした (以降、リージョンスワッピング実験と呼ぶ)。

また、表記の簡略化のため、下図のように *A. missouriensis* の配列由来の領域を“A”、*S. griseus* の配列由来の領域を“S”と表記する (例えば、*A. missouriensis* 野生型は A_A_A_A とする)。

まず、分割した領域のうち 1 カ所を *S. griseus* 由来の配列に置換した株 4 種類のうち、A_A_S_A のみが運動性を持たず、べん毛を形成していなかった。次に、分割した領域のうち、3 カ所を *S. griseus* 由来の配列に置換した株を作製したところ、S_S_A_S のみが運動性を持っていた。これより、3 番目の領域がべん毛形成に必要だと考えた。

そこで、この領域のうちアミノ酸が異なっている 13 カ所を 1 つずつ *S. griseus* 型に点変異させた株を 13 種類作製し、運動性を確認した。ところが、これらの株が形成した遊走子は全て運動性を有していた。

そのため、再度スワッピング実験を行うことにし、3 番目の領域をさらに 2 分割し、スワッピングした株を作製した (A_A_AS_A、A_A_SA_A)。この株のうち、3 番目の領域の後半が *S. griseus* 型の株 (A_A_AS_A) の遊走子は運動性を持っていなかった。

最後に、3 番目の領域のどこがべん毛形成に必須なのか確認するため、以下の配列を持つ株を作成し、運動性を確認した。

遊走子の運動性を確認した結果、最終的に、TrxA の 101 番目のグルタミン酸から 105 番目のグルタミンまでの領域 ("EKVEQ") が *A. missouriensis* 型であれば、べん毛形成が行えることが示された。

この EKVEQ ボックスの保存性を確認したところ、べん毛を形成する放線菌においては、XXXX の形で保存されており、べん毛を持たない放線菌では異なっていることが示された。

さらに、大腸菌の TrxA ホモログをテンプレートとして、モデリングによる立体構造予測を行ったところ、EKVEQ ボックスは表面に露出している部分に位置していた。

1-2-5. TrxA の相互作用対象タンパク質の探索

$\Delta trxA$ 株から抽出したタンパク質の二次元電気泳動結果から、 $\Delta trxA$ 株において、少なくとも FliC は転写・翻訳されているにも関わらず、べん毛が形成できないと示されていた。そのため、TrxA はべん毛タンパク質の組み立てに関与していると仮説を立て、以下の表に示す、べん毛形成時に菌体外に輸送されるタンパク質や、FliC 分泌に関わる既知シャペロンな

どと TrxA の相互作用をバクテリアルツーハイブリッド法（以下、BACTH 法）により検証した。この手法では、相互作用を試験したい 2 種類のタンパク質をコードする遺伝子を、cAMP 合成酵素を 2 分割した断片を持つ別々のベクターに組み込み、IPTG 誘導下でタンパク質を発現させる。試験したタンパク質間に相互作用があれば、cAMP が合成され、 β -Gal アッセイなどで相互作用の強度を定量できる。

大腸菌が相互作用するタンパク質同士の組み合わせのベクターを持っていないと死滅してしまう M63-Maltose 平板培地上でのアッセイの結果、FliW と TrxA の相互作用が検出された。

なお、FliW をコードするプラスミドと、TrxA をコードするプラスミドを形質転換した大腸菌を選択培地に塗布すると、青いコロニーと白いコロニーが出現した。これは、fliW の開始コドンから 10 個目までのコドンに含まれる大腸菌におけるレアコドンの存在により、タンパク質の翻訳量がコロニーごとに異なっているためだと予想できた。そこで、開始コドンから 10 個目までの領域に含まれるレアコドンを PCR により大腸菌内に豊富に存在するコドンに書き換えたプラスミドを用意し、再度同じ実験を行った。その結果、コロニーごとの色の差は減少した。以降の実験では、コドン改変済みのプラスミドを使用して実験を行った。

1-2-6. CsrA-FliW システムの保存性の確認

序論第 2 章に記した通り、FliW は *B. subtilis* や *C. jejuni* において、CsrA と協働して FliC の細胞内の存在量を一定レベルに保つ役割を果たしている。この CsrA-FliW システムが *A. missouriensis* でも保存されているかどうか、BACTH 法を用いて検証を行った。

その結果、FliW-CsrA、FliW-FliC の相互作用が検出できた。これより、*A. missouriensis* の持つ FliW、CsrA、FliC は、*B. subtilis* や *C. jejuni* において提唱されている CsrA-FliW システムと同様の相互作用関係を持つといえた。

1-2-7. CsrA-FliW システム関連の遺伝子破壊株の作製と表現型観察

他の細菌の持つ CsrA-FliW システムは、菌体が移動すべき時にべん毛を形成し、そうでないときはべん毛タンパク質の合成を行わないことで、細胞内の資源の効率的な利用に貢献していると提唱されている (DB Kearns の引用)。しかし、*A. missouriensis* においては菌糸の状態ではべん毛は必要なく、べん毛合成を行うのは孢子嚢形成期のみである。そこで、CsrA-FliW システム関連の遺伝子破壊株を作製し、透過型電子顕微鏡観察と二次元電気泳動により、べん毛形成と FliC 翻訳量に着目した解析を行った。

CsrA 単独破壊株の遊走子のごく一部にべん毛形成が見られたが、CsrA と TrxA の二重破壊株を含むその他の破壊株ではべん毛は形成されなかった。さらに、べん毛を形成していない株のうち、FliW を破壊した株では FliC が生産されず、CsrA 破壊株では FliC は生産されるものの、分泌されていないためにべん毛形成がなされないようだった。

1-2-8. FliW-FliC 複合体に対する AMIS75470 の作用

これまでの結果から、TrxA は FliW-FliC 複合体から FliC を解離させることで菌体外分泌を可能にしていると考えられた。そこでまず、FliW と FliC を用いたプルダウンアッセイを行い、そこに TrxA を添加すると解離が起きなくなることを示す *in vitro* 実験を試みた。しかし、組換え FliC の生産量・可溶化度ともに著しく低く、*in vitro* 実験を満足に行える量のタンパク質を調整できなかった。

次善の策として、BACTH 法に新しいベクターを追加し、3 種類のタンパク質でアッセイを行う方法を構築した。BACTH 法で用いるプラスミドの持つ複製起点は pUCori と P15A の 2 通りであった。研究室所有のプラスミドのうち、これらの複製起点を持つプラスミドと不和合成を起こさない複製起点を持つものとして、pCDF を選択した。なお、オリジナルの pCDF 系ベクターはストレプトマイシン耐性マーカーを持っていたが、アッセイに使用する宿主大腸菌 *E. coli* BTH101 株はゲノム中にストレプトマイシン耐性マーカーを持っていた

ため、pCDF の薬剤耐性をクロラムフェニコール耐性マーカーに入れ替えて使用した。

FliW または FliC を BACTH 法のプラスミドに、TrxA を pCDF にクローニングし、これら 3 種類のプラスミドを E. coli BTH101 株に形質転換した。通常の BACTH 法と同様に培養を行い、M63-Maltose 平板培地上での呈色の変化と、 β -Gal アッセイによる相互作用の強度変化の検出を行った。

その結果、作成可能な 8 つの組み合わせの内、1 つの組み合わせで、コントロールとして用いた pCDF 空ベクターの場合と比較して相互作用の強度が低下したといえた。この結果から、TrxA は FliW-FliC 複合体の結合の乖離に寄与していることが示唆された。

1-3. 考察

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削除

1-4. 方法

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削除

第2章 ベン毛回転停止に必須なブレーキタンパク質 FtgA の機能解析

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。

また、結果の図表は削除

2-1. 背景

2-1-1. FtgA の発見

FtgA は、走化性遺伝子クラスター (chemotaxis gene cluster, 以下 *che* クラスター) の破壊株の観察に由来する。*A. missouriensis* の持つ 3 つの *che* クラスターのうち、どの遺伝子クラスターが走化性に寄与しているのか、あるいは、遺伝子クラスターごとに異なる走化性リガンドの認識やシグナル伝達に関与しているのか興味を持たれていた。そこで、本章の研究の前任者により、*che* クラスター1 または 2 の遺伝子破壊株の観察がなされた。遊走子を回収し、栄養培地である PYM 液体培地と混合し、2 時間静置したのち、光学顕微鏡で観察した。すると、 Δche クラスター1 株の遊走子は発芽を始めながらもベン毛の回転が続いていた。そこで、*che* クラスター1 の遺伝子を破壊していったところ、4 番目の遺伝子である *AMIS76540* のみがベン毛の停止に関与していると示された。

FtgA は、解析例のあるタンパク質との相同性がなく、保存されているドメインも存在しなかった。また、*Actinoplanes* 属をはじめとした、遊走する胞子を形成する希少放線菌にのみホモログ遺伝子が存在する。そこで、修士課程では、構造解析から解析の手がかりを得るべく結晶構造解析を試みたが、大腸菌での組換えタンパク質の生産性、可溶化度、安定性が望ましくなく、結晶の取得には至らなかった。

また、FtgA は序論第 3 章で記した大腸菌のブレーキである YcgR や枯草菌のブレーキである EspE との相同性もなく、作用機序が異なることが示唆された。

2-1-2. $\Delta ftgA$ 株の走化性アッセイ

$\Delta ftgA$ 株を用いて走化性アッセイを行ったところ、 Δche クラスタ1 株と同様に、走化性は見られなくなっていた。

2-2. 結果

2-2-1. UV 照射による遊走子へのランダム変異導入方法の構築

FtgA の作用機序解析の手がかりを得るため、以下のスキームでの FtgA 作用対象の特定を試みた。まず、孢子嚢開裂直後から遊走できない遊走子を形成する、ゲノム組み込み型ベクター pTYM19 を用いて野生株に *ftgA* を 1 コピー追加導入した *ftgA* 過剰発現株を親株として、UV 照射によるランダム変位導入により、FtgA 作用対象に変異が入った株を取得する。実際は、UV 照射後の細胞から、ゲノム中に存在すると予想される、FtgA の作用対象または作用機序においてシグナル伝達などを担う遺伝子をコードすると考えられる遺伝子に変異が入った株をスクリーニングにより選抜する。得られた株のゲノムをリシーケンスし、変異点から FtgA の作用機序に関与する遺伝子の特定を目指す。

実験系の構築に先立って、まず、25 mM NH_4HCO_3 の重層により回収した孢子液に対して UV を照射した時の死滅率を計測した。野生株の孢子液を用い、クリーンベンチ内で UV 照射を行ったところ、150 秒以上の UV 照射により、死滅率 99% 以上となった。これより、以降の実験では 150 秒の UV 照射を行うことにした。

次に、UV 照射後の株から、望ましい変異の入った株をスクリーニングする方法を構築した。望ましい変異点を持つ株は、FtgA の作用対象に変異が入っているため、栄養培地の添加により発芽を誘導した条件下でも遊走を続けると考えられる。そこで、野生株の遊走子と、 $\Delta ftgA$ 株の遊走子を混合した遊走子混合液から、キャピラリーアッセイを用いて遊走可能な株のみを選抜する方法を試みた。

キャピラリーアッセイとは、元々は走化性アッセイのために考案された方法である。

この方法では、遊走可能な株はキャピラリーチューブ内に侵入してくるが、遊走できない株はチャンバー内で沈殿していくため、キャピラリーチューブによる回収はできないと考えられる。実際に、過去に行った野生株と $\Delta fliC$ 株を用いた実験では、回収率に大きな差が出た。この実験では、チャンバーに入れて実験に使用した孢子液の孢子濃度でキャピラリーチューブ内の孢子濃度を除した値を孢子回収率(%)としている。

キャピラリーアッセイが望ましい株の濃縮に利用可能か確認するために、野生株の遊走子と、 $\Delta ftgA$ 株の遊走子を 10000 : 1 の比率で混合した孢子液を用いてキャピラリーアッセイを行い、回収した孢子を BM 平板培地に塗布した。30°C で 2 日培養し、生じたコロニーに対してコロニーPCR を行って遺伝子型を確認することで、濃縮率を計算した。その結果、100 倍程度の濃縮率を担保できていた。

実験系を確立ができたので、以下のスキームで *ftgA* 過剰発現株の遊走子に UV 照射を行い、スクリーニングを開始した。

[1] *ftgA* 過剰発現株の遊走子に 150 秒間の UV 照射を行い、全量を回収した。

[2] 回収した遊走子液を BM 平板培地に塗布し、30°C、2 日間培養した。スクリーニングに供するためのプレートには無希釈の孢子液を、CFU による死滅率確認用のプレートには、UV 照射前後の遊走子液を段階希釈して塗布した。

[3] 死滅率確認用のプレートに生じたコロニーを計数し、UV 照射による死滅率が 99 %程度であることを確認した。

[4] スクリーニングに供するプレートに 10 mL の PYM 液体培地を重層し、ディスポーザブルスプレッダーを用いてプレート上の菌体をできるだけ懸濁した。この菌体懸濁液を 90 mL の PYM 液体培地入りの坂口フラスコへ移し、30 °C、120 rpm で 2 日間培養した。

[5] 坂口フラスコ中の菌体を回収し、0.75 % NaCl 水溶液で洗浄後、HAT 培地に塗布した。30 °C、7 日~14 日程度培養し、十分に孢子嚢形成させた。

[6] 十分に孢子嚢形成した HAT 培地に 25 mM NH_4HCO_3 を 10 mL 重層し、30°C、1 時間

静置し、胞子液を回収した。この遊走子液に対してキャピラリーアッセイを行い、遊走能が回復しているであろう株を選抜した。キャピラリーチューブ内に進入してきた遊走子は BM 平板培地に全量塗布し、30 °C、2 日間培養した。

[7] 十分にコロニーが生育した BM 平板培地に対し、[4]以降の操作をさらに 4 サイクル繰り返した。

[8] 5 サイクル目の[6]で培養した BM 平板培地上のコロニーをシングルアイソレーション氏、PYM 液体培地入り小試験管で 30°C、3 日間培養した。

[9] 小試験管から菌体を回収し、6 穴プレートを用いて作成した BM 平板培地または HAT 培地に植え継いだ。30°C、7 日以上培養した。

[10] HAT 培地に 25 mM NH_4HCO_3 を 3 mL 重層し、30°C、1 時間静置し、胞子液を回収した。これらの遊走子を光学顕微鏡観察し、遊走能が復帰しているものを選抜した。

以上のスキームにより、遊走能回復株を 7 株取得した。

2-2-2. UV 照射による FtgA 相互作用対象タンパク質の探索

前節で取得した遊走能回復株のゲノムのリシーケンスを行った。取得した各株および親株から精製したゲノムをユーロフィンジェノミクス社へ送付し、解析を依頼した。

リシーケンスによって得られたゲノム情報を CLC Genomics work bench を用いて解析し、有望な変異点を探索した。しかしながら、FtgA の作用対象である可能性のあるべん毛基部関連遺伝子や、走化性遺伝子関連遺伝子には変異点が存在しなかった。さらに、各株間で共通する変異点は存在せず、個々の変異点を解析するには莫大な量の変異点が存在していた。

以上の結果を受け、本手法による FtgA 作用対象の特定はさしあたり断念した。

2-2-3. FtgA の相互作用対象タンパク質の探索

FtgA がブレーキとして機能し、べん毛の回転を停止させているという仮説から、その直接の作用対象はべん毛基部のタンパク質や、走化性関連のタンパク質ではないかと考えられた。そこで、TrxA の機能解析同様に、FtgA の作用対象を BACTH 法によりスクリーニングすることにした。以下の 17 遺伝子を対象に実験を行った。

その結果、べん毛基部において C-ring を形成する FliN, FliG、および C-ring 下部において ATPase を形成する FliI と FtgA の相互作用が検出された。また、FtgA 同士の相互作用も検出された。この結果から、FtgA は多量体を形成し、べん毛基部の内側に作用して回転を停止させていることが示唆された。

FliI はべん毛構成因子の送り出しに関与しており、FliG, FliN はべん毛形成の初期に作られる C-ring を構成する、この 3 つの破壊株を作製した場合、べん毛形成ができなくなると予想された。そこで、組換えタンパク質を調整し、*in vitro* での解析を試みた。しかしながら、背景で述べたように、組換え FtgA の調整は困難だった。さらに、FliG, FliN, FliI ともに生産性、可溶化度ともに著しく低く、*in vitro* 実験に供することのできるサンプルは得られなかった (data not shown)。また、*A. missouriensis* の遊走子から各タンパク質を精製することも現実的ではないため、*in vitro* 実験は困難だった。

2-2-4. *che* クラスター内の他の因子と FtgA の関連

FliG, FliN は FliM とともに C-ring を形成する。C-ring は、走化性遺伝子クラスター内に存在する CheY が作用し、べん毛の回転方向の逆転を行う箇所でもある。*ftgA* は他の *che* クラスター 1 内の遺伝子同様に、胞子嚢形成期に転写、翻訳が進行していると考えられるにもかかわらず、ブレーキとしての機能を発揮するのは栄養を感知して発芽を開始するときである。このことから、遊走子が栄養豊富な環境に至ったときに、*che* クラスター内の他の因子と協働して FtgA が C-ring へ作用するのではないかと考え、以下の実験を行った。

まず、3 つある *che* クラスターのうち、これまでに破壊株が取得されていなかった *che* クラスター3 の破壊株を相同組換え法によって作製した。この際、野生株と Δche クラスター1 & 2 株を親株として用い、すべての *che* クラスターを欠失した株 (Δche クラスター1 & 2 & 3 株) も作成した。

次に、以下の表に示す各遺伝子破壊株に、pTYM19 のマルチクローニングサイト内に 1 コピーの *ftgA* をコードするプラスミドを用いて *ftgA* を相補した株を作製した。

今回作成した *ftgA* 相補株と、野生株、 $\Delta ftgA$ 株、 Δche クラスター1 株、 Δche クラスター1 & 2 株、 Δche クラスター1 & 2 & 3 株を HAT 培地で 1 週間以上培養し、25 mM NH_4HCO_3 の重層により遊走子を回収した。回収直後の遊走子と、栄養培地である PYM 液体培地との混合後 1 時間静置した遊走子の運動性を光学顕微鏡で観察した。

その結果、試験したすべての株が孢子嚢開裂直後は遊走可能であり、*ftgA* を持っている株は栄養培地添加後 1 時間で遊走を停止していたのに対し、*ftgA* を持たない株は運動を続けていた。この結果から、FtgA は *che* クラスターの他の因子とは協働することなく、べん毛回転のブレーキとしての役割を果たすことができると示された。

2-3. 考察

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削除

2-4. 方法

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削除

第3章 遊走子の固体表面への付着に必須な線毛の機能解析

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。

また、結果の図表は削除

3-1. 背景

3-1-1. 線毛遺伝子に着目した経緯

私は修士課程において、*A. missouriensis* の持つ特徴の一つである高速遊走運動に対する理解を深めるため、一細胞を追跡できるトラッキング顕微鏡を用い、遊走子の遊走軌道解析を行った。この際、遊走子のガラス表面への付着が度々観察された。遊走軌道解析を行うにあたって、遊走子のガラス表面への付着は好ましくなかったことと、過去に研究例のない、遊走子（孢子）の基質表面への付着という現象にどんな機構が寄与しているのか興味を持った。ゲノム情報を参照すると、基質表面への付着を機能の1つに持つIV型線毛の遺伝子群が1組存在していた。そこで、電子顕微鏡観察と遺伝子破壊により機能解析を試みることにした。

3-1-2. 線毛遺伝子群の転写時期

醗酵学研究室において過去に行われた孢子嚢形成期の遺伝子発現変動に関するRNAシーケンス解析により、*A. missouriensis* 中のIV型線毛遺伝子群は、孢子嚢形成に伴って転写量が増加していくと示された。この結果から、遊走子は線毛を形成していると予想し、以下の実験を行った。

3-2. 結果

3-2-1. 透過型電子顕微鏡による線毛の観察

遊走子表面に存在する線毛についての文献を参照したが、研究開始時点において解析例は見つけられなかった。そこでまず、線毛がどのような構造をとっているのか、電子顕微鏡観察を行い、その実体を確認することにした。

透過型電子顕微鏡で観察を行った結果、線毛の繊維を確認できた。観察条件は方法の節で後述する。この結果、*A. missouriensis* の遊走子の線毛は直径 2 nm 程度の直鎖状であり、べん毛と同程度かそれ以上の長さを持つことがわかった。

3-2-2. 線毛遺伝子破壊株の作製

線毛遺伝子クラスターの構造を以下に示す。機能解析を行うにあたり、線毛遺伝子クラスター全体を破壊した株と、線毛の繊維をコードしている *pilA* 遺伝子単独で破壊した株の 2 種類のコンストラクトの破壊株を作製することにした。さらに、付着性などにおけるべん毛と線毛の影響を区別するために、野生株と $\Delta*fliC*$ 株を親株として破壊株作製を行った。

3-2-3. S1 ヌクレアーゼマッピング法による *pilA* 独自の転写開始点の決定

線毛遺伝子破壊株と野生株の表現型が異なっていた場合、遺伝子相補株の作製が必要となる。しかし、線毛遺伝子クラスターは全長 XX kbp と大きく、ゲノム組込み型ベクターを用いた相補株作製は困難が予想された。そこで、 $\Delta*pilA*$ 株に対して *pilA* を相補する株を作製することにした。醗酵学研究室において行われた RNA シーケンス解析の波形データによると、*pilA* はクラスター先頭の転写開始点とは別に、独自の転写開始点を持つと予想された。そこで、野生株の胞子嚢から抽出した RNA を用いて S1 ヌクレアーゼマッピングを行い、*pilA* 独自の転写開始点を決定することにした。

RNA シーケンス解析から予想される転写開始点を含むように設計したプローブ DNA を用いて実験を行った。その結果、開始コドンの上流 230 bp に転写開始点が見いだされた。

この転写開始点を含む、*pilA* ORF の上流 337 bp を含む領域をゲノム組込み型ベクター pTYM19 へクローニングし、*pilA* 相補株を作製した。

3-2-4. 線毛破壊株の凝集性の評価

線毛破壊株（線毛クラスター全てを破壊した株 または $\Delta pilA$ 株） および野生株、 \DeltafliC 株の遊走子を回収し、PYM 液体培地と混合し、30°C、1 時間静置した。すると、野生株および \DeltafliC 株では、光学顕微鏡観察で確認可能な数十個の遊走子の細胞塊が確認できた。一方で、線毛を破壊した株では、目視で確認可能な 4 mm 程度の巨大な細胞塊が観察された。なお、 $\Delta pilA$ に 1 コピーの *pilA* を導入することで作製した *pilA* 相補株では、野生型と同様の結果となった。また、べん毛の有無による有意な差は認められなかった。このことから、栄養添加時の遊走子の凝集性に関する性質は、線毛によって引き起こされ他ものだといえた。

.

3-2-5. 線毛破壊株の基質への付着性の評価

前節の実験をプラスチックチューブで行ったところ、線毛破壊株では前述の通り大きな細胞塊が形成された。細胞塊の形成されない、線毛を持つ株の遊走子と栄養培地を混合し、1 時間静置したチューブ内の溶液と、栄養培地の代わりに 25 mM NH_4HCO_3 水溶液を混合した遊走子液を光学顕微鏡観察すると、同じ遊走子液を用いているにも関わらず、栄養培地を添加したものは明らかに観察される遊走子数が減少していた。そこで、よくチューブを観察すると、栄養培地を添加したチューブは、内壁に遊走子が付着していた。

これより、*A. missouriensis* の遊走子は、栄養を感知すると線毛を使用し、基質表面への付着を行っているのではないかと考えられた。

3-3. 考察

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削除

3-4. 方法

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削除

総合討論

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削除

引用文献

Awakawa T, Fujita N, Hayakawa M, Ohnishi Y, Horinouchi S. (2011) Characterization of the biosynthesis gene cluster for alkyl-O-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinones in *Actinoplanes missouriensis*. *Chembiochem.* **12**(3):439-48.

Couch, J. N. (1963) Some new genera and species of the *Actinoplanaceae*. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* **79**:53-70

Debono M, Merkel KE, Molloy RM, Barnhart M, Presti E, Hunt AH, Hamill RL. (1984) Actaplanin, new glycopeptide antibiotics produced by *Actinoplanes missouriensis*. The isolation and preliminary chemical characterization of actaplanin. *J Antibiot (Tokyo)* **37**(2):85-95.

Hayakawa M., Tamura T., Nonomura H. (1991) Selective isolation of *Actinoplanes* and *Dactylosporangium* from soil by using γ -collidine as the chemoattractant. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **72**: 426-432

Heras B, Shouldice SR, Totsika M, Scanlon MJ, Schembri MA, Martin JL. (2009) DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* **7**(3):215-25.

Jang M, Fujita A, Ikawa S, Hanawa K, Yamamura H, Tamura T, Hayakawa M, Tezuka T, Ohnishi Y. (2015) Isolation of a novel plasmid from *Couchioplanes caeruleus* and construction of two plasmid vectors for gene expression in *Actinoplanes missouriensis*. *Plasmid.* **77C**:32-38.

Jang M. (2010) 東京大学大学院博士学位論文: 希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の運動性胞子に関する分子遺伝学的研究

Junichi K, Hye-Eun Kim (2007) Chemotaxis in environmental bacteria: review of chemotaxis researches in *Pseudomonas*. *J of Env. Biotech.* **7**(2) 93-98,

Kim S. (2012) 東京大学大学院博士学位論文: 希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の走化性センサーに関する研究

Lechevalier H, Holbert PE. (1965) ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION OF THE SPORANGIAL STRUCTURE OF A STRAIN OF ACTINOPLANES. *J. Bacteriol.* **89**(1) 217-222

Lele PP, Hosu BG, Berg HC. (2013) Dynamics of mechanosensing in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**(29):11839-44.

Matsumoto A, Takahashi Y, Kudo T, Seino A, Iwai Y, Omura S. (2000) *Actinoplanes capillaceus* sp. nov., a new species of the genus *Actinoplanes*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **78**(2):107-15.

Miller LD, Russell MH, Alexandre G. (2009) Diversity in bacterial chemotactic responses and niche adaptation. *Adv Appl Microbiol.* **66**:53-75.

Mitchell J. G. (2002) The Energetics and Scaling of Search Strategies in Bacteria. *Am Nat.* **160**(6) 727-40

Motohashi K, Kondoh A, Stumpp MT, Hisabori T. (2001) Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(20):11224-9.

Mouri Y (2017) 東京大学大学院博士学位論文：希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の孢子囊および休眠孢子形成の制御機構に関する研究

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 (Tokyo).* **56**(11):950-6.

Palleroni N. J. (1980) A chemotactic method for the isolation of *Actinoplanaceae*. *Arch. Microbiol.* **128**: 53-55

Parkinson JS. (1976) *cheA*, *cheB*, and *cheC* genes of *Escherichia coli* and their role in chemotaxis. *J Bacteriol.* **126**(2):758-70.

Porter SL, Wadhams GH, Armitage JP. (2011) Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nat Rev Microbiol.* **9**(3):153-65.

Ratnayake S, Dias IH, Lattman E, Griffiths HR. (2013) Stabilising cysteinyl thiol oxidation and nitrosation for proteomic analysis. *J Proteomics.* **92**:160-70.

Ruan J, Kato T, Santini CL, Miyata T, Kawamoto A, Zhang WJ, Bernadac A, Wu LF, Namba K. (2012) Architecture of a flagellar apparatus in the fast-swimming magnetotactic bacterium MO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**(50):20643-8.

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.

Schwientek P, Wendler S, Neshat A, Eirich C, Rückert C, Klein A, Wehmeier UF, Kalinowski J, Stoye J, Pühler A. (2013) Comparative RNA-sequencing of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110 cultivated in different growth media. J Biotechnol. **167**(2):166-77.

Sowa Y, Rowe AD, Leake MC, Yakushi T, Homma M, Ishijima A, Berry RM. (2005) Direct observation of steps in rotation of the bacterial flagellar motor. Nature. **437**(7060):916-9.

Tamura T, Nakagaito Y, Nishii T, Hasegawa T, Stackebrandt E, Yokota A. (1994) A new genus of the order *Actinomycetales*, *Couchioplanes* gen. nov., with descriptions of *Couchioplanes caeruleus* (Horan and Brodsky 1986) comb. nov. and *Couchioplanes caeruleus* subsp. *azureus* subsp. nov. Int J Syst Bacteriol. **44**(2):193-203.

Terashima H, Kojima S, Homma M. (2008) Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. Int Rev Cell Mol Biol. **2008** 270:39-85.

Torikata A, Enokita R, Okazaki T, Nakajima M, Iwado S, Haneishi T, Arai M. (1983) Mycoplanecins, novel antimycobacterial antibiotics from *Actinoplanes awajinensis* subsp. *mycoplanecinus* subsp. nov. I. Taxonomy of producing organism and fermentation. J Antibiot (Tokyo). **36**(8):957-60.

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**(7):2559-62.

Utada AS, Bennett RR, Fong JC, Gibiansky ML, Yildiz FH, Golestanian R, Wong GC. (2014) *Vibrio cholerae* use pili and flagella synergistically to effect motility switching and conditional surface attachment. Nat Commun. **5**:4913.

Yamamura H, Ohnishi Y, Ishikawa J, Ichikawa N, Ikeda H, Sekine M, Harada T, Horinouchi S, Otoguro 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**(2):294-303.