

細菌の未解析シグマ因子群の解析とその利用

Study and application of unanalyzed sigma factors in bacteria

プロジェクト代表者: 朝井 計

(埼玉大学大学院理工学研究科生命科学部門分子生物学領域・助教授)

Kei Asai

Area of Biochemistry and Molecular Biology,

Division of Life Science,

Graduate School of Science and Engineering,

Saitama University: Associate Professor

1. 目的

細菌の遺伝情報のおよそ10%が転写制御因子である。また、ヒトの全遺伝子数も2万程度と見積もられており、細菌の平均的な遺伝子数 4000 と比べてそれほど多くはない。細菌だけでなくヒトにおいても、細胞が有する全遺伝子のうち非常に多くの部分が転写を制御する蛋白質(転写因子)遺伝子で占められている。このようなことから、生物は、遺伝子の種類を増やして進化したのではなく、少ない種類の遺伝子を、その発現パターン(時期、場所、組み合わせ等)を巧みに制御することで、多様化・複雑化したと考えられている。従って、遺伝子の発現・転写のオンオフ調節機構(転写制御機構)は、その細胞が環境適応・分化などの生命活動を行う上で基本的かつ重要なメカニズムであり、転写制御機構を解析することは、重要な生物研究の課題の一つである。

グラム陽性の土壌細菌である *Bacillus subtilis*(枯草菌)は1996年に早々と全ゲノム塩基配列が決定されており、ポストゲノム解析のモデル生物として、世界的に広く研究されているバクテリアである。枯草菌の全遺伝子約4000のうち1割が転写因子をコードしており、うちシグマ因子という重要なファミリーに属する転写因子が 17 種ある。その17のシグマ因子でさえ、全ゲノム配列が明らかとなっている現在においても、すべての働きが明らかになっているわけではない。本研究は枯草菌のシグマ因子の機能・活性・制御様式を全て明らかにすることを眼前の目的としている。その解析の後には、他の細菌の類似の機能未解析のシグマ因子群の機能を探る横断的な解析と、最終的には一生物の遺伝子発現の全体像を探ろうとする縦断的な解析の両面を目標としている。

2. 結果と考察

本研究は主に3つのステップにわけて行った。

i) 枯草菌の未解析シグマ因子の解析

ii) 枯草菌類縁菌の未解析シグマ因子の解析

iii) 枯草菌を宿主とした、シグマ因子制御系を用いた遺伝子発現制御システムの構築

以下それぞれについて本プロジェクトで明らかとなった結果および現在進行中の解析内容を記述していく。

i) 枯草菌の未解析シグマ因子の解析

枯草菌が保有する17のシグマ因子の中でこれまでに解析のあまり進んでいない8つのシグマ因子(SigI, SigM, SigV, SigW, SigX, SigY, SigZ, YlaC)について、制御している遺伝子群・制御の特異性・シグマ因子活性の制御機構などについて詳細な解析を行った。

YlaC シグマ因子は4つの遺伝子からなるオペロンを形成しており, ylaC 遺伝子は3番目に位置している。このオペロンの転写は YlaC に依存しており, YlaC の転写は酸化ストレスにより誘導され, その活性はオペロン4番目に位置する YlaD タンパク質によって負に制御されていることを明らかにし, 論文発表した(発表論文1)。

SigI は熱ストレスにより誘導され, その破壊により細胞は熱感受性になることが既に海外の研究者により報告されていた。しかし, 今回, 熱ストレスにより転写開始が誘発されるプロモーター部位を明らかにし, SigI が熱により誘導される機構には分子シャペロンである DnaK と YkrI タンパク質が関与していることを新たに明らかにした。これらの成果は学会で発表(学会発表2)し, 投稿論文は印刷中である。

SigW および SigM はアルカリ・高塩・酸化ショック・熱ショックや抗生物質など広範囲の環境ストレスに対して活性化する。SigW は, SigW に直接結合する膜蛋白質によって負の制御を受けることは判明している。この膜蛋白質は SigW が活性化している時には, プロテアーゼにより分解される。さらに詳細な解析を行うために, トランスポゾンによるランダムな挿入突然変異により, SigW および SigM 活性に影響する遺伝子を探索し, 新規因子をいくつか同定している。これらの成果は学会で発表(学会発表1, 3)し, 現在新規同定因子のシグマ因子活性に与える作用の分子機構を解析中である。

ii) 枯草菌類縁菌の未解析シグマ因子の解析

全ゲノム配列の公表されている 7 種 9 株の *Bacillus* 属細菌(*B. subtilis*(枯草菌), *B. anthracis* 2 株(炭疽菌), *B. cereus* 2 株(セレウス菌), *B. licheniformis*, *B. halodurans*, *Oceanobacillus iheyensis*, *Geobacillus kaustophilus*)についてシグマ因子について生物情報学的な解析を行った。それぞれの細菌種は約 20 のシグマ因子を保有し, そのうち約半数は機能の予測がつかないシグマ因子であった。すなわち, 同属の類縁菌であるため, 生育に必須なシグマや, *Bacillus* 属細菌の共通の特徴である孢子形成能に関わるシグマは高く保存されていたが, それ以外のシグマ因子は種に固有のものが多く, その細菌の生活環境により多様化したことが考えられた。

このような機能予測のできないシグマ因子の機能を探り, それら種に固有のシグマ機能と生活環境とに関連性があるかどうか検討することとした。初発解析として, 様々な極限環境条件下で生育可能な枯草菌類縁菌(高温・高アルカリ性・高塩等の極限環境菌)のシグマ因子の

活性を、それぞれの至適条件、あるいは非至適条件で検出する系の創出を目指した。シグマ因子の活性はそのシグマ因子をコードする遺伝子の転写活性を指標として、転写量を定量的 RT-PCR 法に基づき、リアルタイム PCR 装置を使用して測定することで、解析可能であることを見出した。現在、この方法により、個々のシグマ因子の発現を解析中である。

iii) 枯草菌を宿主とした、シグマ因子制御系を用いた遺伝子発現制御システムの構築

表現型の変化を野生株と比較し、シグマ因子群の機能を解析するために、枯草菌シグマ因子遺伝子の破壊株を作製した。単独破壊が可能であったので、複数のシグマ因子遺伝子を同時に破壊した株の作製を試みた。研究によく用いられる一般的な培地を用いた場合、本研究で対象とした8つのシグマ因子を同時に破壊することが可能であることを見出した。この多重破壊株は過剰の NaCl が培地に存在すると細胞の形態異常を起こし、死に至る。また、熱ショックに対する適応応答が著しく減退していた。現在、その他の表現型を詳細に解析中である。それ以外の枯草菌シグマ因子も同時に破壊した最小のシグマ因子セットで生育する枯草菌も作製準備中である。

シグマ因子は、転写開始の段階でプロモーターと呼ばれる DNA 配列を認識する RNA 合成酵素のサブユニットである。転写される遺伝子にはプロモーターが必須なので、異なるプロモーター配列を認識するシグマ因子を多数保有することで、細胞は遺伝子の転写を様々な制御可能である。本研究対象の8つのシグマ因子のうち SigI を除く7つのシグマ因子は、類似のプロモーター配列を認識する。SigI はこれまで知られている細菌のシグマ因子認識プロモーター配列のどれとも類似性がなく、新種の特異性を有するシグマ因子と考えられる。前述の、シグマ因子数を最小限にした細胞を主体とし、シグマ因子のプロモーターの認識能の特異性・類似性を利用して、外来の複数の遺伝子を細やかに制御する系の構築を模索中である。

3. プロジェクトに関連した研究業績

発表論文

1) Matsumoto T, Nakanishi K, Asai K, Sadaie Y. Transcriptional analysis of the *ylaABCD* operon of *Bacillus subtilis* encoding a sigma factor of extracytoplasmic function family. *Genes Genet. Syst.* 2005. 80(6):385-393.

学会発表

日本農芸化学会 2006 年度大会(京都市)2006 年 3 月 25 日～28 日

1) 3C30a07(27 日) 枯草菌シグマ W と M の活性制御ネットワークの解析

朝井 計, 三浦 大典, 上原 拓也, 河合 明日香, 定家 義人

日本遺伝学会第77大会(東京)2005 年 9 月 27 日～29 日

2) 1C06(27 日) 枯草菌 SigI の機能解析

小幡一枝, 大辻崇史, 松本貴嗣, 朝井計, 定家義人

3) 1C07(27 日) 枯草菌 ECF σ^M , σ^W の機能発現制御

上原拓也, 三浦大典, 朝井計