

バクテリアの環境応答シグマ因子の研究

Study of bacterial sigma factors responding to environmental change

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・准教授)

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

土壌細菌枯草菌は全ゲノム解析が1997年に終了し、約4,000のORFが同定され、引き続きその3分の1に及ぶ未知機能遺伝子の解析がなされている。そんな中、遺伝子発現制御に関する300もの転写制御因子を網羅的に解析し、転写制御のネットワーク構造を細胞単位で明らかにする試みが行われている。遺伝子の発現・転写のオンオフ調節は、その細胞が環境適応・分化・発生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、転写の制御機構を解析することは、重要な研究課題の一つである。

2. 結果

申請者のグループは転写制御因子の中でも、「シグマ因子」と呼ばれる主要な蛋白質ファミリーについて、とりわけ枯草菌の環境応答に関わる複数のシグマ因子群について、その制御機構の詳細解析を網羅的・包括的に行った。枯草菌では18のシグマ因子のうち、5つが孢子形成、少なくとも9つが環境応答に関わっていると考えられている。

1) 環境応答シグマ因子の活性制御機構の解析：多くの環境応答シグマ因子の活性は、アンチ σ 蛋白質によって負に制御されている。酵母ツーハイブリッド系を用いてアンチシグマ蛋白質制御因子との蛋白質-蛋白質相互作用を解析した。また、トランスポゾンを用いたランダム変異法により、その機構に関わる制御因子を同定、解析した。

2) シグマ因子の多重破壊株の解析：環境応答に関わる9つのシグマ因子全てを同時に欠失した破壊株の作製を試み、成功した。9つのシグマ因子を欠いても枯草菌は増殖可能であることが判明した。一方で種々のストレス環境に感受性を示すようになっていた。

3) *in vitro* 転写系：転写に必要な最低限のタンパク質を再構成し、シグマ因子の転写活性測定系の構築を試みた。特に、多くのシグマ因子に関して、網羅的に解析を行うため、従来法で用いられているラジオアイソトープの使用を避け、ジゴキシゲニンで標識した核酸を用いて、非RI環境での実験系の構築を目指した。実験系は構築することができ、現在 *in vitro* を構成するコンポーネントの精製を行っている。実験系構築の後に、種々の鋳型DNAを用いたプロモーター認識の特異性の検定や、転写反応を制御する因子の検索・解析を予定している。

4) シグマ因子が制御している遺伝子や、認識するプロモーター配列を決定した。制御している遺伝子には、機能未知なものが多いが、概して膜蛋白質・細胞表層構築に関わるものや膜輸送

に関わるものが含まれていた。環境変化に応じて細胞膜や細胞壁の構造を変化させたり、細胞内外からの能動的な物質輸送を行い、細胞内の恒常性を維持する機構を構成するものと思われる。

3. 考察

多くの細菌が、10を超えるシグマ因子発現制御機構を有している。枯草菌のような土壌細菌は、自然環境中に存在する細菌であり、実験室内では再現できないような自然環境・特殊な増殖条件に曝されながら、複数の複雑なシステムを装備・進化させてきたと考えられる。個々のシグマ因子の応答機構は、制御様式やそれに関わる因子が異なっていて、ひとつとして同じものは無い。これら個性的な複数の機構が、ひとつの細胞の中でどのように協調的に働いているのか、そのネットワーク構造はどうなっているのか、これらを知ることはゲノム生物学だけでなく、細胞工学の観点からも興味深い。細胞内の遺伝子発現ネットワークを理解し制御できれば、細菌利用の面で、大きな発展となりうる。一方で同じ蛋白質ファミリーに属するシグマ因子群から、どのようにして様々に個性的な制御機構が生み出されたのか。この問題は生物進化のテーマとしても興味深い。

4. プロジェクトに関連した研究業績

発表論文

- 1) Asai K, Ootsuji T, Obata K, Matsumoto T, Fujita Y, Sadaie Y. Regulatory role of RsgI in *sigI* expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. 2007. 153:92-101.

抄録

- 1) Asai K, Sadaie Y. 2006. Molecular mechanism of activation of SigW, stress responding sigma factor in *Bacillus subtilis*. *Genes Genet. Syst.* 81(6):436.
- 2) Iida M, Asai K, Sadaie Y. 2006. Analysis of ECF sigma factors of *Bacillus* related species. *Genes Genet. Syst.* 81(6):436.
- 3) Matsuzaki K, Asai K, Sadaie Y. 2006. Analysis of stress response genes in *Bacillus subtilis*. *Genes Genet. Syst.* 81(6):436.

学会発表

日本遺伝学会第78大会 2005年9月25日～27日

- 1) 朝井計、定家義人「枯草菌ストレス応答シグマ因子 SigW の活性制御の分子機構」
- 2) 飯田充一、朝井計、定家義人「*Bacillus* 属関連細菌の ECF シグマ因子の解析」
- 3) 松崎邦彦、朝井計、定家義人「枯草菌のストレス応答遺伝子群の解析」

第1回日本微生物ゲノム学会年会 2006年3月1日～3日

- 1) 飯田充一、朝井計、定家義人「*Bacillus* 属細菌の ECF シグマ因子制御系の比較解析」
- 2) 松崎邦彦、朝井計、定家義人「枯草菌のストレス応答シグマ因子の多重欠失株の構築と解析」
- 3) 矢野晃一、朝井計、定家義人「Digoxigenin を用いた non-RI *in vitro* transcription system の構築」

日本農芸化学会 2007年度大会 2007年3月24日～27日

- 1) 朝井計、松崎邦彦、石渡啓介、定家義人「枯草菌の環境応答シグマ因子多重破壊株の解析」