

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780070

研究課題名(和文)細菌の細胞間交信・細胞集合における環境シグナル感知伝達機構の解明

研究課題名(英文)Characterization of the environmental signal transduction system in bacterial cell-cell communication and cell aggregation

研究代表者

小笠原 寛(OGASAWARA, Hiroshi)

信州大学・ヒト環境科学研究支援センター・助教

研究者番号：30535232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：自然環境中に存在する細菌は多様で複雑なストレスに曝されているが、そのような環境下では多くの細菌種がバイオフィームと呼ばれる多糖からなる膜で覆われた細胞集団を形成し、外部環境から受ける様々な物理的および化学的ストレスに対する抵抗性を高めている。本研究では大腸菌のバイオフィーム形成過程において中心的役割を担う転写因子CsgDの発現制御に関わる環境シグナル応答機構の全容解明を目標に、応答シグナルとCsgD制御因子の探索を行い、幾つかの新規機構を明らかにした。本研究での成果を軸に、細菌が環境変化に応じてバイオフィームを形成する過程のゲノム発現パターンの転換応答について更なる分子機構の解明を目指す。

研究成果の概要(英文)：In the natural environments, the many bacterial species exposed to much complicated stress forms biofilm and raises resistance for physical and chemical factors received from such external environment. In this study, we performed the systematic analysis to clarify expression control of CsgD protein playing a central role of the biofilm formation of Escherichia coli, and searched for received signals and the regulatory factors for the csgD expression and clarified some new mechanism. We hope to promote this study to understand the molecular switching mechanism of response to environmental change of the bacterial genome expression pattern in the biofilm formation.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：Biofilm csgD curli Escherichia coli Transcription signal transduction

1. 研究開始当初の背景

自然環境中に存在する細菌は、多様で複雑な環境ストレスに曝されているが、このような環境では多くの細菌種がバイオフィームと呼ばれる多糖から成る膜で覆われた細胞集団を形成することで、外部環境から受ける様々な物理的および化学的ストレスに対する抵抗性を高めている。グラム陰性菌のモデル生物である大腸菌は、バイオフィーム形成の際に細胞外多糖を含め、細胞表面構造の形成に関わる数多くの遺伝子を発現させる。特に大腸菌が作り出すアミロイド様線維蛋白 CsgA からなる Curli と呼ばれる線毛は、セルロースと共に、大腸菌のバイオフィーム形成過程で細菌の固体表面や細胞同士の接着因子としての機能を担っている。アミロイド線維蛋白は、ヒトではプリオン病やアルツハイマー病といった脳に重篤な疾患を引き起こす原因とされていることから注目される研究対象であり、細菌では大腸菌以外に緑膿菌や枯草菌などで相次いで見つかってきており、細菌全般のバイオフィーム形成に広く利用されていることが伺える。大腸菌における Curli とセルロースの発現誘導は、転写因子 CsgD に依存しており、この転写因子が *csgA* とセルロース生合成遺伝子の発現誘導に関わるグアニレートシクラーゼをコードする *adrA* 発現を直接活性化している(図 1)。

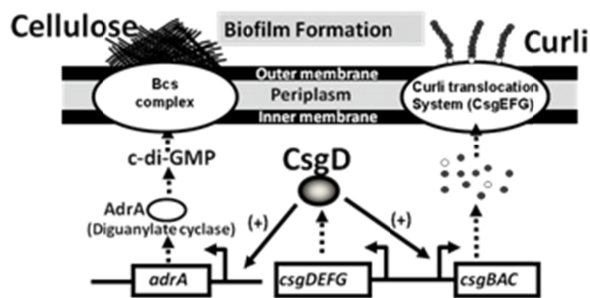


図1. バイオフィーム形成過程における転写因子 CsgD による Curli 線毛とセルロース生合成の誘導機構

このように CsgD は Curli やセルロース生合成に関わることでバイオフィーム形成において細胞間連結の主要な役割を果たしているが、これま

で、その制御機構の全体像は殆ど明らかとされていなかった。しかし、最近申請者らは CsgD 抗体を用いた ChIP(Chromatin immunoprecipitation)- on chip 解析により、大腸菌ゲノム上の CsgD 標的部位を 20 箇所特定することに成功し、その内、遺伝子間領域に存在する 7 箇所について、周辺遺伝子の発現を調べた結果、べん毛の基部体形成に関わる蛋白をコードする遺伝子発現を負に制御することが明らかになったことから、この転写因子がバイオフィーム形成を促進する一方で運動性を抑制することが示唆された。また、CsgD 標的候補遺伝子には機能未知遺伝子が多数含まれ、Curli 発現と同調して発現が誘導される遺伝子も見つかり、これら遺伝子群はバイオフィーム形成過程の細胞機能において重要な役割を担っていることが示唆された(図 2)。

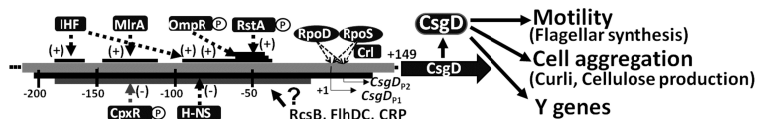


図2 複数転写因子による複合的な *csgD* 発現制御と CsgD 支配下遺伝子機能

そこでこれら研究成果を元に、本研究計画を提案した。

2. 研究の目的

本研究では、大腸菌細胞がバイオフィームを形成するまでの過程で、周辺環境から受けるどのようなシグナルを感知することで、ゲノム発現パターンの転換応答を行っているのかについて分子レベルで解明を目指した。そのモデルケースとして、大腸菌のバイオフィーム形成の中心的役割を果たす転写因子 CsgD の発現制御とそれに関わる遺伝子発現ネットワークの全容解明に向けて、(1)CsgD 発現に関わる環境シグナル応答機構の解明 (2)バイオフィーム形成過程の細胞における CsgD 支配下遺伝子群の発現制御の解明、(3)CsgD 支配下機能未知蛋白のバイオフィーム形成細胞における機能解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) SELEX 法による CsgD 制御転写因子の同定: 精製された大腸菌転写因子コレクションを用いてゲノム DNA 断片混合液から複合体を単離し、DNA chip を用いて標的遺伝子探索を行い、*csgD* プロモーター結合転写因子の探索を行った。
- (2) *csgD* プロモーター制御の物理的及び化学的シグナル検出のためのレポーターシステムの構築: *csgD* 発現や CsgD 支配下遺伝子発現を確認するための *lacZ* レポーター株の作製を行い、*csgD* 発現制御に関わるシグナル感知に関与するペリプラズム・リポ蛋白の探索に用いた。また、これらレポーター株と BIOLOG 社の Phenotype array を用いて異なる培養条件に対するこれらプロモーター活性の変化を経時的にモニターするシステムを構築した。
- (3) DNase-I footprinting による転写因子結合部位の同定: これまでに *csgD* 遺伝子発現を制御することが示唆されていた転写因子 RcsB、CRP が *csgD* プロモーターに直接結合するかについて確かめるために DNase-I footprinting を実施した。
- (4) 大腸菌遺伝子欠損株を用いたバイオフィーム形成実験: CsgD 支配下遺伝子欠損株について、バイオフィーム形成への影響を確かめるために、24 ウェルプレートを用いたバイオフィームアッセイを実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) CsgD 発現に関わる細胞の物理的及び化学的シグナル応答機構の解明

Genomic SELEX 法を用いた網羅的な解析から、二成分制御系のレギュレーター蛋白である BasR が新たに *csgD* 制御に関わることを明らかにした。また、BIOLOG 社の Phenotype array を用いた CsgD 標的遺伝子の経時的なプロモーター活性

測定の結果、幾つかの化合物で著しい発現抑制効果を示す結果が得られた。今後、これら解析結果を元に、選択された化合物のバイオフィーム形成に対する効果も含めて個別に調べていく予定である。また、*csgD* 発現制御に関わるシグナル感知に関与するペリプラズムリポ蛋白を新たに同定するために LB 培地で培養した大腸菌体内でそれら蛋白を過剰発現させ、*csgD* 発現への影響を *lacZ* レポーター株を用いて調べたが、顕著な *csgD* 発現誘導を引き起こすものは現在までに確認されていない。今後、ペリプラズム・リポ蛋白以外のペリプラズム領域に存在する蛋白にも範囲を広げ、そのような蛋白が明らかになった際には、*csgD* 発現制御に関わる二成分制御系センサー蛋白との相互作用の有無などストレス応答機構との関連性についても明らかにしていく予定である。

#### (2) 転写因子 CsgD 発現制御に関わる転写制御機構の全容解明

これまでの報告で *csgD* 発現制御への関与が示唆されている転写因子のうち、莢膜合成制御に関わる RcsB が *csgD* プロモーターに直接結合することを明らかにした。CRP (cAMP 結合蛋白質) については *csgD* プロモーターへの結合は見出すことが出来なかったが、公開されている CRP の SELEX-chip assay のデータを解析したところ、*csgD* 制御に関わる転写因子をコードする遺伝子とその支配下にあることを見出し、実際にそのプロモーター領域に CRP が結合することを発見した。現在、その遺伝子発現における CRP の効果について研究を進めている。

#### (3) バイオフィーム形成過程の細胞における CsgD 支配下遺伝子群の発現制御の解明

CsgD 抗体を用いた ChIP-chip 解析のデータを元に、CsgD 標的候補の機能未知遺伝子群の発現制御について各遺伝子プロモーターの *lacZ* レポーターを用いて調べ、新たに 2 種類の機能未知遺伝子が CsgD の制御下にあることを明ら

かにした。

#### (4) CsgD 支配下機能未知蛋白のバイオフィルム形成細胞における機能解明

CsgD 依存的な遺伝子発現の変化が確認された機能未知遺伝子群の欠損株についてバイオフィルム形成能を調べ、野生株と比較したところ *csgD* 欠損株のような顕著なバイオフィルムの減少は確認されなかった。そのうち、CsgD 依存的な発現誘導が確認された YhbU 蛋白は、そのアミノ酸配列のホモロジー検索からコラゲナーゼと推定されたが、YhbU 発現条件下の大腸菌培養上清および大腸菌破砕液からコラーゲンに対する分解活性を見出すことが出来なかったことから、その他の機能的役割があると考えられた。その他 CsgD 支配下機能未知蛋白についても引き続き機能解析を進めていく予定である。

#### (5) Curli 発現を認識する表層ストレス応答機構の解明

CsgA 過剰発現株において 23 種類の二成分制御系標的遺伝子発現の観察を行ったところ、大腸菌の表層ストレス応答機構の一つとして知られる二成分制御系 CpxR/CpxA 系の標的遺伝子以外に、二成分制御系 BarA/UvrY によって制御される *csrB* 発現が抑制されることが明らかとなった。更にその発現抑制は、CpxA/CpxR 系の欠損株においても同様に効果が観察されたことから、CpxR/CpxA 系とは独立した新規 Curli 発現応答機構であることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1) Shimada, K., Ogasawara, H., Yamada, K., Shimura, M., Kori, A., Shimada, T., Yamanaka, Y., Yamamoto, K., Ishihama, A., "Screening of promoter-specific transcription factors: multiple regulators for the *sdiA* gene involved in cell division control and quorum sensing." *Microbiology*, 159, 2501-2512, (2013), 査読有

2) Kurata, T., Katayama, A., Hiramatsu, M.,

Kiguchi, Y., Takeuchi, M., Watanabe, T., Ogasawara, H., Ishihama, A., Yamamoto, K., "Identification of the set of genes, including non-annotated *morA*, under the direct control of ModE in *Escherichia coli*." *J. Bacteriol.*, 195, 4496-4505, (2013), 査読有

3) Shimada, T., Katayama, Y., Kawakita, S., Ogasawara, H., Nakano, M., Yamamoto, K., Ishihama, A., "A novel regulator RcdA of the *csgD* gene encoding the master regulator of biofilm formation in *Escherichia coli*." *Microbiologyopen*, 1, 381-394, (2012), 査読有

4) Ogasawara, H., Shinohara, S., Yamamoto, K., Ishihama, A., "Novel regulation targets of the metal-response BasS-BasR two-component system of *Escherichia coli*." *Microbiology*, 158, 1482-1492, (2012), 査読有

(学会発表) (計 9 件)

1) 小笠原寛, 石塚俊行, 石浜明  
大腸菌バイオフィルム形成統括制御因子 CsgD の新規発現調節機構の探索と機能解析  
第 8 回日本ゲノム微生物学会年会 2014 年 3 月 7 日 ~ 9 日, 東京農業大学世田谷キャンパス

2) 加藤佑輝, 石浜明, 小笠原寛  
細菌細胞によるアミロイド様線維蛋白応答機構の解明  
第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日 ~ 6 日, 神戸ポートアイランド

3) 石浜明, 島田佳織, 小笠原寛, 島田友裕, 山田佳代子, 郡彩子, 山本兼由, 川岸郁郎  
ひとつのプロモーターを制御するすべての転写因子の PS-TF 法による探索: 大腸菌細胞分裂分化制御因子 SdiA 遺伝子プロモーター  
第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日 ~ 6 日, 神戸ポートアイランド

4) 小笠原寛, 石塚俊行, 石浜明  
PS-TF screening による大腸菌バイオフィルム統括制御因子 *csgD* プロモーター特異的転写因子の探索  
第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日 ~ 6 日, 神戸ポートアイランド

5) 小笠原寛  
細菌のふたつの生存形態間バランスの多因子による制御機構  
遺伝研研究集会「細菌細胞の増殖と代謝研究会(スイッチング制御)」2013 年 11 月 29 日 ~ 30 日, 国立遺伝学研究所(三島市)

6) 小笠原寛  
PS-TF (promoter-specific TF) screening system による大腸菌多因子プロモーター解析  
遺伝研研究集会「大腸菌ゲノム転写研究全体像の分析と転写データベース構築」2013 年 10

月 24 日 ~ 25 日, 国立遺伝学研究所(三島市)

7) 島田佳織、志村美樹、山田佳代子、郡彩子、小笠原寛、島田友裕、山本兼由、石浜明

プロモーター特異的転写因子(PS-TF)探索法の開発と大腸菌細胞分裂制御因子 SdiA 遺伝子調節転写因子の探索

第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日 ~ 14 日, 福岡国際会議場、マリンメッセ福岡

8) 小口卓也、島田友裕、石浜明、小笠原寛

高グルコース環境下におけるバイオフィルム形成統括因子 CsgD の発現制御機構の解明

第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日 ~ 14 日, 福岡国際会議場、マリンメッセ福岡

9) 小笠原寛、山本 兼由、石浜 明

亜鉛による大腸菌バイオフィルム形成統括因子 CsgD の発現抑制機構

第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日 ~ 14 日, 福岡国際会議場、マリンメッセ福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小笠原 寛 (OGASAWARA, Hiroshi)

信州大学・ヒト環境科学研究支援センター・助教

研究者番号: 30535232