

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18670

研究課題名(和文)細菌バイオフィーム形成阻害に関わる分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms involved in bacterial biofilm inhibition

研究代表者

小笠原 寛(OGASAWARA, Hiroshi)

信州大学・学術研究院総合人間科学系・助教

研究者番号：30535232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌のバイオフィーム形成において、アミロイド線維とセルロースは細胞集合と表面付着に関わる主要な構成因子である。本研究で、我々は精製転写因子コレクションおよび、転写因子高発現プラスミドコレクションを用いた網羅的な解析によりcsgBAプロモーターに特異的に結合し、遺伝子発現を制御する転写因子を複数種同定した。またCsgD制御下の遺伝子群のうち、CsgAからなるアミロイド線維の形成阻害に関わるペリプラズムタンパク質YccTを見出し、csgBA発現抑制に関わる機能的役割についても明らかにした。本研究の成果を軸に、細菌バイオフィーム形成阻害の分子機構の解明を目指す。

研究成果の概要(英文)：In biofilm formation of *Escherichia coli*, amyloid fimbriae and cellulose are the major component involved in cell assembly and surface attachment. In this study, we clarified that the expression of *E. coli* biofilm master regulator CsgD, and the amyloid fimbriae subunits CsgA are negatively regulated by YehT/YehU two component regulatory system. In addition, comprehensive analysis using the collection of the purified transcription factors (TFs) and a set of plasmid collection for overproduction of TFs, we identified some species of TFs that specifically bind to the csgBA promoter and regulates its expression. We also found the novel periplasmic protein YccT which regulated by CsgD involved in the inhibition of amyloid fiber composed of CsgA, and we also clarified the roles involved in the inhibition of csgBA expression. Based on the results of this research, we aim to elucidate the molecular mechanism of inhibition of bacterial biofilm formation.

研究分野：分子生物学、ゲノム微生物学

キーワード：Biofilm formation CsgA CsgD *Escherichia coli* Amyloid fimbriae Biofilm inhibition Transcription factor Periplasm

1. 研究開始当初の背景

自然環境中に存在する多くの細菌種は、貧栄養の過酷な環境下において、主に多糖から成るバイオフィームで覆われた細菌集落を形成し、外部環境からの様々な物理的および化学的ストレスに対して抵抗性を高めている。遊走性の単細胞形態からバイオフィーム形成に至る生存形態の移行過程で発現するゲノム遺伝子セットは大きく変化し、それぞれの経路に関わる多数の遺伝子群の転写の包括的制御には、中核転写因子が関わっている。大腸菌のバイオフィーム形成にはアミロイド線維蛋白 CsgA からなる Curli 線毛形成とセルロース合成が主要な役割を果たしており、csgA の発現制御には中核転写因子 CsgD が必須である。CsgD の発現は外部からの多種多様な環境要因に応じて変動することから多数の転写因子により複雑に制御されていることが予想されていたが断片的知識しかなかった (Pesavento *et al.*, *Gene Dev.*, 2008, 22, 2434-2446)。

我々はこれまでに、CsgD の新規支配下遺伝子群の同定や、csgD プロモーター制御に関わる転写因子の同定を試み、csgD の転写は、機能未知転写因子を含む 10 種以上の転写因子によって協調的に制御されること (Ogasawara *et al.*, *J. Bacteriol.*, 2007, 189, 4791-4799, Ogasawara *et al.*, *Microbiology*, 2010, 156, 2470-2483, Ogasawara *et al.*, *FEMS microbial. lett.*, 2010, 312: 160-168, Ogasawara *et al.*, *Microbiology*, 2012, 158, 1482-1492, Shimada *et al.*, *Microbiology-open*, 2012, 158, 381-394)、転写因子として CsgD は、バイオフィーム形成遺伝子群以外にも多数の遺伝子の転写を制御すること (Ogasawara *et al.*, *J. Bacteriol.*, 2011, 193, 2587-2597)、CsgD が遊走性に関わる一部の遺伝子発現を抑制することなどを明らかにした (Dudin *et al.*, *J. Bacteriol.*, 2014, 196, 707-715)。

その後、研究代表者らは大腸菌の全転写因子の約 75%にあたる約 202 種類の精製された転写因子を用いた PS-TF (Promoter specific- Transcription factor) スクリーニング (Shimada, K. *et al.*, *Microbiology*, 2013, 159, 2501-2512) により、csgD プロモーター特異的に結合する複数の転写因子を新規に見出しことに成功し (小笠原、石浜ら、未発表)、それら転写因子のうち、機能未知転写因子の一つである YehT の過剰発現株で Curli 線毛形成の顕著な減少が確認された。

一方、定常期の大腸菌細胞において CsgD 発現促進により、Curli 線毛形成が誘導されバイオフィーム形成が促進されるが、我々は大腸菌細胞内で CsgD を過剰発現させると、csgBA 発現誘導が起こるにも関わ

らず、Curli 線毛形成が阻害されることを見出した。またその際に、CsgD 発現抑制に関わる表層ストレス応答機構は働いていないことから、CsgD 制御下遺伝子中に Curli 線毛形成阻害機能が含まれている可能性を示唆した。

2. 研究の目的

本研究では Curli 線毛の形成阻害に関わる分子機構の全容解明を目指し、1)CsgA 発現抑制に関わる転写因子の探索とその転写抑制の分子機構の解明、2)新規 Curli 線毛形成抑制転写因子 YehT の機能解明、3)CsgD によって制御される Curli 線毛形成阻害機構の探索と解明の 3 つの計画について研究を実施した。1)では csgBA プロモーター制御因子を同定し、それらのうち、強い Curli 線毛形成抑制効果を示す転写因子について機能解明を行った。2)では我々が csgD 制御因子として新たに同定し、著しい Curli 線毛形成抑制効果を示した機能未知転写因子 YehT の活性化シグナル分子の探索と Curli 発現制御機構の全容解明、3)では CsgD 過剰発現により活性化される Curli 線毛形成阻害機構に関わる遺伝子の同定と機能解明を目指した。

3. 研究の方法

1)CsgA 発現抑制に関わる転写因子の探索とその転写制御の分子機構の解明

1)-1. PS-TF スクリーニングによる csgBA プロモーター結合転写因子の同定

csgBA プロモーターに結合する転写因子を同定するために、PS-TF スクリーニングを実施した。PS-TF screening により csgBA 結合が確認された転写因子については DNase-I footprinting 法により csgBA プロモーターにおける結合部位の同定を行った。

1)-2. *in vivo* レポーター系による csgBA プロモーター制御転写因子の探索

csgBA プロモーターへの特異的な結合が確認できた転写因子について、csgBA プロモーター-*lacZ* レポーター株に、それら転写因子高発現プラスミドを導入後、csgBA プロモーター活性に与える影響を調べた。

1)-3. Curli 線毛形成抑制に関わる転写因子の探索

csgBA プロモーターに結合することが明らかになった転写因子について、転写因子過剰発現条件下における Curli 線毛形成への影響をコンゴレッドプレートアッセイにより確認した。

1)-4. 新規 csgBA プロモーター直接制御転写因子の機能解明

新規に csgBA 発現制御に関わるものが確認された転写因子のうち、機能未知転写因子について、Genomic SELEX 法を用いた標的

遺伝子の探索を行い、活性化シグナル分子の予測、および標的遺伝子発現への影響を調べた。

2)新規 Curli 線毛形成抑制転写因子 YehT の機能解明

2)-1. 機能未知転写因子 YehT による *csgD* 発現制御機構の解明

YehT の *csgD* プロモーター上における結合部位を同定するために、DNase-I footprinting アッセイを行った。さらに、*csgD-lacZ* レポーター株を用いて *yehT* 欠損株、YehT 過剰発現株における *csgD* 発現への影響を調べた。

2)-2. 機能未知転写因子 YehT の Curli 形成抑制に至る分子機構の解明

YehT の Curli 線毛形成抑制に至る分子機構の解明を目指し、*yehT* 欠損株、および *yehT* 過剰発現株を用いた *csgBA* 発現解析、コンゴレッドプレートアッセイ、およびバイオフィルムアッセイを行った。

2)-3. 機能未知転写因子 YehT の標的遺伝子の同定と活性化シグナル分子の探索

YehT の更なる機能解明を目指し、Genomic SELEX 法による標的遺伝子の探索を行い、標的遺伝子機能から YehT を活性化するシグナル分子の予測を試みた。

3) *CsgD* によって制御される Curli 線毛形成阻害機構の探索と解明

3)-1. *CsgD* 過剰発現株における Curli 線毛形成阻害因子の同定

csgD 制御下の Curli 形成阻害に関わる因子(タンパク質)を同定するために、これまでに明らかとされている *CsgD* 標的遺伝子の欠損株において *CsgD* の過剰発現を行い、コンゴレッドプレートアッセイによる Curli 線毛形成への影響を調べた。

Curli 線毛形成への影響が確認された因子をコードする遺伝子について、過剰発現プラスミドを構築し、Curli 線毛形成への影響、*csgBA* 発現への影響、および大腸菌表面ストレス応答機構の活性化への関与の有無について検討を行った。

3)-2. *CsgD* に制御される Curli 線毛形成阻害因子の機能解明

CsgD 制御下の Curli 線毛形成阻害因子 YccT について、細胞内における発現量の確認やアフィニティー精製、質量分析による細胞内相互作用タンパク質の同定を目的に、アラビノースプロモーター制御下で C 末端に 3xFLAG タグを付加させた形で発現可能なプラスミド、および大腸菌ゲノム上において 3xFLAG タグを付加した大腸菌株を構築した。さらに *yccT* 欠損株、および *yccT* 高生産株より total RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて RNA-seq 解析を実施した。さらに C

末端に His-tag を付加した YccT および *CsgA* を Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、*CsgA* によるアミロイド線維形成に対する YccT の効果について調べた。

4. 研究成果

1) *CsgA* 発現抑制に関わる転写因子の探索とその転写抑制の分子機構の解明

csgBA プロモーター断片と *lacZ* プロモーター断片を用いて、精製された 198 種類の転写因子を用いて PS-TF スクリーニングを実施した結果、31 種類の転写因子について、*csgBA* プロモーター特異的な結合が確認された。*csgBA* プロモーター-*lacZ* レポーター株において、これら転写因子を高発現させたところ、大腸菌の嫌気センサー ArcB と対をなすレスポンスレギュレーター ArcA および機能未知転写因子の一つ(TF-U:Unknown)については野生株に比べ 0.5 倍以下にまで発現が著しく抑制され、一方、既知転写因子の一つ(TF-K:Known)については約 3.5 倍の活性化が確認された。このうち、TF-U については Genomic SELEX 法を用いた標的遺伝子の探索を行い、*csgD-csgB* 間の領域を含む、複数のプロモーターに結合することが確認されたことから、今後、これらの遺伝子発現に対する影響について引き続き調べていく予定である。また、TF-K については、*csgBA* 発現活性化に関わる分子機構の解明を目指し、研究を継続している。

2) 新規 Curli 線毛形成抑制転写因子 YehT の機能解明

csgD プロモーターにおける YehT 結合部位を同定するために、まず精製 YehT を用いたゲルシフトアッセイを行った。*csgD* および *csgD* と分岐する *csgBA* のそれぞれのプロモーターを含む DNA 断片、およびポジティブコントロールとして YehT の既知標的遺伝子として報告されている *yjiY*、さらにネガティブコントロールとして *lacZ* プロモーターを含む DNA 断片を用いたゲルシフトアッセイを行った。その結果、4 つのプロモーター-DNA 断片のうち、*csgD*、*csgBA*、*yjiY* プロモーターにおいて YehT の結合が確認された。DNase-I footprinting アッセイにより、*csgD* および *csgBA* プロモーターにおける結合部位の同定を試みたが、明瞭な結合部位の同定には至らなかった。しかし、これら YehT の特異的な結合が確認された 3 つのプロモーターを含む DNA 断片の塩基配列を比較したところ *yjiY* プロモーターにおいて既に YehT 結合部位として同定されている領域に含まれる 11 塩基の共通配列が *csgD* および *csgBA* の転写開始点の下流に見出されたことからこ

の配列が YehT 結合共通配列であることが示唆された。さらに、*lacZ* レポーター株を用いて *yehT* 欠損株、YehT 過剰発現株におけるこれら遺伝子発現への影響を調べた結果、*yjiY* 発現は *yehT* 欠損株において著しく減少し、YehT 過剰発現株においては著しい増加が観察されたが、*csgBA* 発現は *yehT* 欠損株において著しい増加が確認され、YehT 過剰発現株においては *csgD*、*csgBA* 発現共に減少が確認された。特に YehT 過剰発現株における *csgBA* 発現抑制効果は顕著であり、コンゴレッドプレートアッセイにおいて、特に著しい Curli 形成抑制が見出された。さらにバイオフィームアッセイを行ったところ、*yehT* 欠損株においてバイオフィーム形成促進、および *yehT* 過剰発現株において著しいバイオフィーム形成量の減少が確認された。

YehT は機能未知二成分制御系 YehU/YehT のレスポンスレギュレーターであり、センサーキナーゼ YehU の応答シグナルは未知であったことから、YehT の更なる機能解明を目指し、Genomic SELEX 法による標的遺伝子の探索を行い、標的遺伝子機能から YehT を活性化するシグナル分子の予測を試みた。しかし、新たな標的遺伝子の同定には至らず、その間に別グループより YehU のシグナル分子候補としてクエン酸が報告されたため (Behr *et al.*, *Sci Rep.* 2017,7(1):1388, Vilhena *et al.*, *J Bacteriol.* 2017, 200(1), e00536-17)、これら情報も参考に、現在、YehT/YehU 依存的な *csgD* および *csgBA* 発現制御解析を行い、引き続き YehT の新規標的遺伝子の同定を試みている。

3) Curli 線毛形成抑制に関わる転写因子の探索

CsgD 過剰発現株における著しい Curli 形成阻害に関わる因子を同定するために、以前、我々の研究グループにおいて明らかにした CsgD 制御下の標的遺伝子に着目し、特に CsgD の結合親和性の強い上位 10 種の CsgD 標的遺伝子欠損株において CsgD 過剰発現を行い、コンゴレッドプレートを用いて Curli 形成への影響を観察したところ、CsgD 依存的に発現が活性化され、機能未知ペリプラズムタンパク質をコードする *yccT* の欠損株において、Curli 線毛形成の抑制が見られなくなったことから、この機構に YccT が重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、CsgD 過剰発現条件下においては、CsgD によって正に制御される *csgBA* 発現は発現誘導されていることから、YccT は Curli 線毛形成に必要な CsgA の重合、または細胞外への CsgA の輸送を阻害している可能性が示唆された。

そこで、YccT 過剰発現プラスミドを構築

後、コンゴレッドプレートアッセイによる Curli 形成および、*csgBA* 発現への影響について調べた結果、Curli 形成の著しい抑制に加え、転写レベル、および翻訳レベルにおける *csgBA* 発現の減少が確認された。さらに、YccT のシグナルペプチドの削除により Curli 形成が観察され、*csgBA* 発現抑制が殆ど確認されなくなったことから、YccT はペリプラズム領域において Curli 線毛形成および *csgBA* 発現抑制の両方に関与していることが示唆された。*csgBA* 発現抑制に関して、*csgD* 発現を抑制する大腸菌表層ストレス応答機構 CpxA/CpxR および RcsC/RcsD/RcsB の関与が考えられたことから、CpxR および RcsB 欠損株において、YccT 過剰発現を行ったところ、野生株と変わらず *csgBA* 発現抑制が観察されたことから、ペリプラズム領域においてこれら表層ストレス応答機構以外の機構を介して制御が行われていることが示唆された。トランスクリプトーム解析の結果、YccT 過剰発現下において *csgBA* に同調して遺伝子発現が著しく抑制される遺伝子が見出され、これら遺伝子発現を制御するストレス応答機構の関与が示唆されたことから、そのストレス応答機構欠損株における YccT 過剰発現がこれら遺伝子発現へ与える影響について調べた。その結果、*csgD* 発現について YccT 高発現における抑制が著しく緩和されたことから、YccT はペリプラズム領域においてこのストレス応答機構を介して *csgBA* 発現抑制に関与している可能性が示唆された。今後、ペリプラズム領域における EnvZ および YccT の局在解析についても実施する予定である。

また、精製 CsgA によるアミロイド線維形成に対する YccT の効果について調べた結果、YccT 濃度依存的に CsgA の凝集体形成が減少することが確認された。今後、精製 YccT の結晶化条件の検討を行い、X 線結晶構造解析を行う予定である。

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 5 件)

Single-target regulators form a minor group of transcription factors in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.*, 46: 3921-3936, 2018
Shimada T., Ogasawara H., Ishihama A. (査読有)

A structural sketch of RcdA, a transcription factor controlling the master regulator of biofilm formation

FEBS Lett.,591:2019-2031,2017

Sugino H, Usui T, Shimada T, Nakano M, Ogasawara H., Ishihama H, Hirata A. (査読有)

Cross-regulation between two common ancestral response regulators, HprR and CusR, in *Escherichia coli*.

Microbiology,163:243-252, 2017

Urano H, Yoshida M, Ogawa A, Yamamoto K, Ishihama A, Ogasawara H. (査読有)

Cooperative regulation of the common target genes between hydrogen peroxide-response YedVW and copper-response CusSR in *Escherichia coli*.

Microbiology,161:729-738, 2015

Urano H, Umezawa Y, Yamamoto K, Ishihama A, Ogasawara H. (査読有)

Role of transcription factor NimR (YeaM) in sensitivity control of *Escherichia coli* to 2-nitroimidazole.

FEMS Microbiol Lett.,362:1-8 2015

Ogasawara H, Ohe S, Ishihama A. (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

大腸菌アミロイド線維形成に関する新規遺伝子群の同定と機能解明

2017 年度生命科学系学会合同年次大会

井出 有佳里、加藤 佑輝、杉本 真也、小笠原 寛

大腸菌ペリプラズムタンパク質 YccT によるアミロイド線維形成抑制機構の解明

日本農芸化学会 2017 年度大会

佐野晃太郎、加藤佑輝、小笠原寛

大腸菌新規アミロイド線維形成抑制因子 YccT の機能解明

第 39 回日本分子生物学会年会 2016

佐野晃太郎、小笠原寛

大腸菌の遊走性とバイオフィーム形成を制御する新規転写因子の同定と機能解明

第 39 回日本分子生物学会年会 2016

増井祥平、石塚俊行、石浜明、小笠原寛

大腸菌アミロイドファイバー形成制御に関わる新規遺伝子機能の解明

第 39 回日本分子生物学会年会 2016

井出有佳里、加藤佑輝、小笠原寛

大腸菌バイオフィーム形成統括因子 CsgD の新規発現制御機構の解明

第 10 回日本ゲノム微生物学会年会 2016

石塚俊行、太田あず佐、石浜明、小笠原寛

バイオフィーム統括制御因子 CsgD によって制御される新規アミロイド線維形成抑制因子 YccT の機能解明

第 10 回日本ゲノム微生物学会年会 2016

佐野晃太郎、加藤佑輝、小笠原寛

機能未知二成分制御系 YehT/YehU によるバイ

オフィーム形成抑制機構の解明

日本農芸化学会 2015 年度大会 2015

石塚俊行、石浜明、小笠原寛

バイオフィーム統括制御因子 CsgD によって制御される新規 Curli 線毛抑制機構の解明

第 38 回日本分子生物学会年会 2015

佐野晃太郎、小笠原寛

大腸菌バイオフィーム形成統括因子 CsgD の新規転写制御因子の同定と機能解明

第 38 回日本分子生物学会年会 2015

石塚俊行、小笠原寛、石浜明

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小笠原 寛 (OGASAWARA, Hiroshi)

信州大学・学術研究院総合人間科学系・助教

研究者番号：30535232

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

石浜 明 (ISHIHAMA, Akira)

法政大学・マイクロナノテクノロジー研究センター・客員教授

研究者番号：80019869

加藤 佑輝 (KATO, Yuki)

信州大学大学院・応用生物科学科・大学院生
研究者番号：なし

石塚 俊行 (ISHIZUKA, Toshiyuki)

信州大学大学院・応用生物科学科・大学院生
研究者番号：なし

佐野 晃太郎 (SANO, Kotaro)

信州大学大学院・応用生物科学科・大学院生
研究者番号：なし

増井 祥平 (MASHUI, Shohei)

信州大学大学院・応用生物科学科・大学院生
研究者番号：なし

堀田 修平 (HOTTA, Shuhei)

信州大学・繊維学部・大学生
研究者番号：なし

小林 弘明 (KOBAYASHI, Hiroaki)

信州大学・繊維学部・大学生
研究者番号：なし

青木 美千香 (AOKI, Michiko)

信州大学・繊維学部・大学生

研究者番号：なし