

細菌における細胞システムの構築原理の研究

●小笠原 直毅¹⁾ ◆森 浩禎²⁾ ◆金谷 重彦¹⁾ ◆大島 拓¹⁾ ◆石川 周¹⁾

1) 奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科 2) 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

<研究の目的と進め方>

細菌の細胞機能は、1) 約 300 の必須遺伝子を中核とした、遺伝子の発現と細胞という構造を作るための基本システム、2) 様々な物質を分解し、エネルギーの獲得と生体高分子合成のための素材合成のための代謝システム、3) 胞子形成という高度に分化したシステムを含む、諸ストレスに対応するためのシステムに大きく区分できる。そして、各システムは、例えば複製、細胞分裂、アミノ酸合成というような種々のプロセスに分解できる。本研究では、細菌の諸生命プロセスの動きの協調的制御システムについて、枯草菌と大腸菌で比較研究を行い、細菌細胞のシステムの構築の基本原則とその多様化の機構を明らかにすることを目指す。具体的には、以下の3つの視点からの研究を統合的に行う。

- 1) 遺伝子発現制御ネットワーク、タンパク質相互作用ネットワーク等の情報を統合し、枯草菌及び大腸菌の細胞機能をモデル化し、普遍的要素と両細菌に特有の要素を明らかにする。
- 2) そうしたモデルに基づき、様々な細胞環境下で、各プロセスがどのように関連しながら動いているかを明らかにし、諸プロセスの協調システムの実体の解明を目指す。
- 3) こうした細胞機能が実現されている基盤として、細菌においてもタンパク質・ゲノムが細胞で特異的な空間的配置を取っていることを示す報告が最近注目されている。この問題にも迫る。

<2007年度の研究の当初計画>

転写制御ネットワークの解明：大腸菌・枯草菌について、対数増殖初期から定常期への転写プロファイルの経時的な変化のタイリングチップを用いた解析を継続すると共に、RNAポリメラーゼ、核様体タンパク質、グローバルな転写制御因子のChIP-chip解析も系統的に進め、対数増殖期から定常期へと増殖期の変化に伴う転写制御ネットワークの動態を明らかにする。また、大腸菌において、単一細胞における *in vivo* 遺伝子発現動態解析の系の開発を行い、一次代謝系システムの動態をモデル化する。

必須遺伝子産物間の機能ネットワーク解析：最小培地での増殖のための必須遺伝子を含め、枯草菌・大腸菌の必須遺伝子セットの実験的・情報学的解析を進める。必須タンパク質を出発点として、免疫沈降法によるコンプレックスの同定等を進め、各種細胞機能の協調に関与するタンパク質相互作用の同定を目指す。

細菌細胞システムのモデル化：枯草菌・大腸菌について、メタボロームの動態のデータ収集を行い、転写プロファイルとの統合的理解を目指す。その上で、細菌細胞の代謝と増殖を支える遺伝子とタンパク質の機能ネットワークのモデル化に挑戦する。

<2007年度の成果>

- 大腸菌 Affymetrix 社高密度タイリングチップを用いた ChIP-chip 解析により、大腸菌核様体タンパク質 H-NS のゲノム上での分布、転写制御因子としての機能解析を行い、それがゲノム上の約 250 箇所に特異的に結合し、基本的にその部位での転写を抑制していることを明らかにした。さらに、そうした H-NS が結合している配列の多くは、最近大腸菌ゲノムに獲得されたものであり、外来性遺伝子の発現を通常の増殖条件では抑制することが H-NS の基本機能であると考えられることが明らかになり、細菌ゲノムの進化を考える上で重要な知見を得た (論文 6)。2007 年度は、増殖条件の変化に伴う、H-NS の分布の変化を解析し、浸透圧ストレスにより H-NS がゲノムから解離し、一群の遺伝子発現が活性化することを明らかにした。また、H-NS のホモログである StpA が、H-NS と複合体を形成してゲノム上に分布していることを明らかにし、その機能の解明を進めた。核様体タンパク質と考えられ

ている Lrp についても解析を行い、それは、実際にはアミノ酸代謝に関わる遺伝子の転写調節因子であることを明らかにした。なお、応用ゲノム・計画研究林班の分担者である、大阪大学・戸辺助教授と、大腸菌 O157 における H-NS 等の分布・機能に関する共同研究を進めている。(論文 15)

- 枯草菌については、転写産物及び RNA ポリメラーゼ σ サブユニットと β サブユニット、さらに転写伸長因子 NusA の結合部位のマッピングを行い、RNA ポリメラーゼの細胞内動態を明らかにした。その結果、大腸菌と異なり、枯草菌では、基本的に転写開始複合体は速やかに転写伸長複合体へ移行し、それに伴い σ 因子と NusA の交換が起こることが明らかとなった (投稿準備中)。また、転写伸長因子 GreA についても解析を行い、それが、正しい位置での転写の停止に寄与していることを、細胞内で明らかにした。DNA 結合タンパク質については、複製開始因子 DnaA のマッピングを行い、転写制御因子としての DnaA の機能及びゲノム複製開始の制御機構に関して、新たなメカニズムを示唆する結果を得た (論文 13)。また、グローバルな転写制御因子 PhoP は、既知の結合部位 10 箇所を含む、27 箇所には結合しているという結果を得た。こうした ChIP-chip 解析に加えて、富栄養培地および最少培地での増殖に伴う転写プロファイルの経時変化の解析を行い、両培地での通常培養時に発現する遺伝子の全貌を把握できた。こうした遺伝子セットは細胞増殖のための基本セットであると考えられる。
- 代謝ネットワークのモデル化及びシミュレーションを目的として、大腸菌中心代謝系の 37 酵素について、MOPS glucose の条件で、Western 解析及び qRT-PCR 法による細胞内酵素量及び酵素遺伝子の発現量の取得を終え、さらに中間代謝産物の定量を慶應大学・富田教授と共同で進めた。その結果、解糖系酵素については、量的な違いは存在するものの、対数増殖期及び静止期において同様のプロファイルが観察された。一方、解糖系の酵素群が静止期においても一定量が安定に存在するのに対して、TCA 回路については、対数増殖期に増加し、静止期においてその量が減少することが観察された。Real Time PCR による mRNA の定量と Western 解析による酵素量の変動の関係を解析した結果、解糖系、TCA 回路のグリオキシル酸経路への分岐までの酵素と、その後の経路の酵素群とでプロファイルの違いが存在する可能性が示唆された (論文 9, 10)。また、アイソザイム、代替経路の同定を目的に、2 重欠失株の系統的な解析の系を開発した。
- タンパク質の機能ネットワークに関しては、必須 GTP 結合タンパク質ファミリーに属する YlqF は、50S リボゾームサブユニットの形成に関与していることを明らかにした (論文 3, 11)。同様に、YqeH は 30S リボゾームサブユニットの形成に関与することも明らかにした (論文 12)。また、ゲノム複製開始因子 DnaA と相互作用する YabA について、DnaA との相互作用様式を詳細に解析することにより、それが、DnaA と必須開始因子 DnaD との相互作用を、競合的に阻害することにより、複製開始を負に制御しているという機構を提唱した (論文投稿中)。
- 細胞システムのモデル化に向けて、蓄積した枯草菌アレイデータを用いて、各遺伝子の発現プロファイルの相関解析によりオペロン構造を推定し、さらに、転写因子欠失株での発現変動とプロモーター領域の配列解析を統合することにより、諸シグマおよび転写調節因子のレギュロンを推定する、情報処

理技術の高度化を進めた(論文7)。また、枯草菌及び大腸菌のメタボロームの動態をFT-質量分析装置を用いて解析することを目指して、培養細胞からの代謝物抽出法、質量分析装置による代謝物検出法、情報学的データ解析について、基盤要素技術の開発を進め、時系列に従って細胞の状態の動的変化を細胞全体の発現遺伝子ならびに代謝物により特徴づけることに成功した(論文14)。

<国内外での成果の位置づけ>

2つのモデル細菌、枯草菌と大腸菌のシステムチックなゲノム機能の解析は、同定は世界を先導するものである。特に、タイリングチップを用いた細菌のゲノム機能研究は、ごく最近になって、世界のいくつかの研究室からの報告が出始めているが、結果の精度等については、我々が開発した手法が、他の報告を凌駕しており、世界の先頭を走っている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

細胞システムのモデル化への研究の展開が遅れている。枯草菌・大腸菌が、富栄養培地及び最少培地で、対数増殖期から定常期へ、どのような遺伝子が、どのような制御システムにより発現して、基本代謝と細胞増殖を維持してくのかという点に焦点を当て、タイリングアレイによる転写プロファイルの解析、ChIP-chip法によるRNAポリメラーゼ、核様体タンパク質、転写制御タンパク質等のゲノム上での動態の解析、さらに、細胞内代謝経路の動的ネットワークの定量、メタボローム解析を系統的に進める。そして、それらの結果と、必須遺伝子の情報も統合して細菌細胞のモデル化を目指す。

<今後の課題>

- 枯草菌・大腸菌について、富栄養培地及び最少培地における、対数増殖期・遷移期・定常期での遺伝子発現プロファイルを経時的に解析する。さらに、この条件で機能するシグマ因子についてChIP-chip解析を行い、通常の培養条件で発現・機能していると考えられる遺伝子とそれらのプロモーターとオペロン構造をほぼ完全に同定する。
- グローバルな転写制御因子についても、順次、ChIP-chip解析を行う。こうした結果と、プロモーター・オペロン解析の結果を統合することにより、枯草菌・大腸菌の基本的な転写制御ネットワークを明らかにする。
- 大腸菌の中心代謝系の酵素量の変動を、抗体を用いたWestern解析により定量してきたが、さらに単一の生細胞において測定を可能にするために、各酵素遺伝子のC末端側にGFP遺伝子の融合株を作製する。これにより、フローサイトメーターを用いて、酵素タンパク質の発現量をreal timeに一細胞レベルで解析を可能にする。また、細胞ごとの発現の揺らぎについても解析する。
- 二つのモデル細菌、枯草菌と大腸菌、の代謝特異性ならびに共通性という視点で、細胞全体の代謝の動態の解明を目指す。また、培養条件特異的な代謝の特異性を特徴づける、細胞全体の代謝物を要素とした数理モデルの開発を行う。さらに、ゲノム情報と動的代謝情報を統合してデータベース化し、発現遺伝子と細胞に蓄積される代謝物により細胞の状態を特徴づける。
- 染色体の複製・分配、細胞分裂に関わるタンパク質群の解析を継続し、細胞周期の諸プロセスを協調させているシステムの解明を目指す。また、それらの細胞内局在機構の解明も試みる。さらに、リボゾーム粒子の形成に関与している必須GTP結合タンパク質が、諸細胞プロセスの同調に関与する可能性を、その枯渇による増殖停止を抑制する変異の単離等により検討する。

<成果公表リスト>

1. Noiro-Gros, M. F., Velten, M., Yoshimura, M., McGovern, S., Morimoto, T., Ehrlich, S. D., Ogasawara, N., Polard, P., and Noiro, P.* Functional dissection of YabA, a negative regulator of DNA replication initiation in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 2368-2373, 2006. (受付番号: 0602231610)
2. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H.* Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Mol Sys Biol 2, 2006 0008, 2006. (受付番号: 0702141317)
3. Matsuo, Y., Morimoto, T., Kuwano, M., Loh, P. C., Oshima, T., and Ogasawara, N.* The GTP-binding Protein YlqF Participates in the Late Step of 50 S Ribosomal Subunit Assembly in *Bacillus subtilis*. J Biol Chem 281, 8110-8117, 2006. (受付番号: 0606191724)
4. Kawai, Y., and Ogasawara, N.* *Bacillus subtilis* EzrA and FtsL synergistically regulate FtsZ ring dynamics during cell division. Microbiology 152, 1129-1141, 2006. (受付番号: 0606191719)
5. Ishikawa, S., Kawai, Y., Hiramatsu, K., Kuwano, M., and Ogasawara, N.* A new FtsZ-interacting protein, YlmF, complements the activity of FtsA during progression of cell division in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 60, 1364-1380, 2006. (受付番号: 0608032021)
6. Oshima, T., Ishikawa, S., Kurokawa, K., Aiba, H., and Ogasawara, N.* *Escherichia coli* histone-like protein H-NS preferentially binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase, DNA Res 13, 141-153, 2006. (受付番号: 0702141312)
7. Kobayashi, H., Akitomi, J., Fujii, N., Kobayashi, K., Altaf-Ul-Amin, M., Kurokawa, K., Ogasawara, N., and Kanaya, S.* The entire organization of transcription units on the *Bacillus subtilis* genome, BMC Genomics 8, 197, 2007. (受付番号: 0801270930)
8. Yoshimura, M., Oshima, T., and Ogasawara, N.* Involvement of the YneS/YgiH and PlsX proteins in phospholipid biosynthesis in both *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. BMC Microbiol 7, 69, 2007. (受付番号: 0801270935)
9. Ishii, N., Nakahigashi, K., Baba, T., Robert, M., Soga, T., Kanai, A., Hirasawa, T., Naba, M., Hirai, K., Hoque, A., Ho, P.Y., Kakazu, Y., Sugawara, K., Igarashi, S., Harada, S., Masuda, T., Sugiyama, N., Togashi, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Yugi, K., Arakawa, K., Iwata, N., Toya, Y., Nakayama, Y., Nishioka, T., Shimizu, K., Mori, H. and Tomita, M.* Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations, Science, 316, 593-597, 2007. (受付番号: 0708071713)
10. Ishii, N., Suga, Y., Hagiya, A., Watanabe, H., Mori, H., Yoshino, M. and Tomita, M.* Dynamic simulation of an in vitro multi-enzyme system, FEBS Lett 581, 413-420, 2007. (受付番号: 0705021212)
11. Matsuo, Y., Oshima, T., Loh, P.C., Morimoto, T., and Ogasawara, N.* Isolation and characterization of a dominant negative mutant of *Bacillus subtilis* GTP-binding protein, YlqF, essential for biogenesis and maintenance of the 50S ribosomal subunit, J Biol Chem 282, 25270-25277, 2007. (受付番号: 0801270939)
12. Loh, P.C., Morimoto, T., Matsuo, Y., Oshima, T., and Ogasawara, N.* The GTP-binding protein YqeH participates in biogenesis of the 30S ribosome subunit in *Bacillus subtilis*, Gene Genet Sys 82, 281-289, 2007. (受付番号: 0801270943)
13. Ishikawa, S., Ogura, Y., Yoshimura, M., Okumura, H., Cho, E., Kawai, Y., Kurokawa, K., Oshima, T., and Ogasawara, N.* Distribution of stable DnaA-binding sites on the *Bacillus subtilis* genome detected using a modified ChIP-chip method. DNA Res 14, 155-168, 2007. (受付番号: 0801270948)
14. Morioka, R., Kanaya, S., Hirai, M., Yano, M., Ogasawara, N., and Saito, K.* Predicting state transitions in the transcriptome and metabolome using a linear dynamic system model, BMC Bioinformatics, 8, 343, 2007. (受付番号: 0801270954)
15. Abe, H., Miyahara, A., Oshima, T., Tashiro, K., Ogura, Y., Kuhara, S., Ogasawara, N., Hayashi, T., and Tobe, T.* Global regulation by horizontally transferred regulators establishes the pathogenicity of *Escherichia coli*. DNA Res, in press.