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的構築の基本原理とその多様化の機構を明らかにすること目指す。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。

＜ 2008 年度の研究の当初計画＞

1) タイリングアレイによる転写制御ネットワーク・核様体構造の解明：枯草菌・大腸菌について、富栄養培地（LB）及び最少培地（MM）における、遺伝子発現プロファイルを経時的に解析する。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・機能している遺伝子とそれらのプロモーターとオペロン構造を同定する。グローバルな転写制御因子について、順次、ChIP-chip 解析を行い、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。また、核様体構造の変換を介した転写制御を検討する。
2) 大腸菌の一次代謝系システムの動態のモデル化：中心代謝系の酵素量の変動を、単一の生細胞において測定をするために、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。
3) 枯草菌・大腸菌のメタボロームの動態の解析：二つのモデル細菌で、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。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。
4) 枯草菌における細胞周期の制御システムの解析：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。

＜ 2008 年度の成果＞

● 大腸菌 Affymetryx 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 は、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基本機能であると考えられることを明らかにした（論文 6）。そのホモログである StpA についても解析を行い、野生株では H-NS と StpA の分布は一致していること、そうした H-NS の分布は *stpA* 欠失株でも変化しないのに対し、StpA の結合部位は *hns* 遺伝子の欠失により、約 1/3 に減少することを見出し、StpA は H-NS との相互作用を介して、転写のサイレンシングや核様体構造の維持に補助的な役割を担う能力を持っていることを明らかにした（論文 18）。実際、実験室株 K12 に比べて、大量の外来性遺伝子を獲得している O157 株では、StpA がその病原性に一定の役割を果たしていることが見出されている。また、応用ゲノム・計画研究林班の分担者である、大阪大学・戸邊准教授と、大腸菌 O157 における H-NS による病原性遺伝子のサイレンシング解除の分子機構の解明を進めた（論文 15）。
● 枯草菌には H-NS のホモログは存在しない。しかし、遷移期に発現する遺伝子の転写を対数増殖期に抑制している AbrB の分布が、H-NS と非常によく似ていることを見出した。興味深いことに、AbrB のホモログ、Abh も存在しており、両者の関係も大腸菌における H-NS と StpA の関係に似ていることも示唆された。さらに、細胞分裂位置の制御を行っている Noc、や複製開始タンパク質 DnaA も、核様体タンパク質として、染色体 DNA のドメイン構造の形成に関与している可能性を見出し、そうした視点から解析を進めた。
● 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、約 100 遺伝子の gfp 融合株の作製を行った。Western 解析による大腸菌中心代謝系の 37 酵素に加え、全中心代謝系酵素遺伝子及びホモログなど、同代謝経路に関連する可能性がある遺伝子群及び転写調節遺伝子群を選択し、in vivo 単一細胞での観察を可能にした。現在、融合株を用い、フローサイトメーターを用いた定量を進めており、Western 解析との相関解析を進めている。解糖系及び TCA 回路の酵素において、ほぼ Western 解析と同様の動きを観察している。また、アイソザイムや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。系統的な 2 重欠失株作製の為の新規欠失株及び 2 重化の為の Hfr 作製ツールの開発を終了し、現在は定量化の為のシステム構築を進めている。
● 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てきたが（論文 3, 11, 12）、今まで作用時期が不明で会った YphC につて、Dominant negative な表現型を示す変異タンパク質の作製に成功し、その機能解明が進んだ。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 16）。
● 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, 15）。

＜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マチックなゲノム機能の解析は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。
- 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. Noirot-Gros, M. F., Velten, M., Yoshimura, M., McGovern, S., Morimoto, T., Ehrlich, S. D., Ogasawara, N., Polard, P., and Noirot, 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.（登録番号：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.（登録番号：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.（登録番号：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.（登録番号：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.（登録番号：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.（登録番号：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.（登録番号：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.（登録番号：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.（登録番号：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.（登録番号：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.（登録番号：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.（登録番号：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 15, 25-38, 2008.（登録番号：0901161703）
16. Cho, E., Ogasawara, N.,* and Ishikawa, S. The functional analysis of YabA, which interacts with DnaA and regulates initiation of chromosome replication in *Bacillus subtils*. Gene Genet Sys 83, 111-125, 2008.（登録番号：0901161708）
17. Takahashi H, Kai K, Shinbo Y, Tanaka K, Ohta D, Oshima T, Altaf-Ul-Amin M, Kurokawa K, Ogasawara N, and Kanaya S.* Metabolomics approach for determining growth-specific metabolites based on Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, Anal Bioanal Chem 391, 2769-2782, 2008.（登録番号；0901161712）
18. Uyar, E., Kurokawa, K., Yoshimura, M., Ishikawa, S., Ogasawara, N.,* and Oshima, T. Differential binding profiles of StpA in wild-type and *hns* mutant cells: a comparative analysis of cooperative partners by ChIP-chip analysis. J. Bacteriol in press, 2009