

枯草菌炭素代謝制御ネットワークの物質産生系への有効活用

●藤田 泰太郎 ◆広岡 和丈

福山大学生命工学部

<研究の目的と進め方>

本課題研究に先行する特定領域研究で、枯草菌細胞内のシグナル分子（分岐鎖アミノ酸、グルタミン、GTP、フルクトース-二リン酸等）の細胞内濃度を感知する幾つかのグローバルな転写制御因子が、分岐鎖アミノ酸合成オペロン等のいくつかの基軸オペロンの発現制御を通じて、転写制御ネットワークの基盤となる代謝制御ネットワークを形成している事が明白になった。さらに、代謝ネットワークを構成する基軸代謝制御の一つとみなされる、細胞内のエネルギー状態の指標である ATP と GTP の濃度を感知し、転写のプロモーターを活性化あるいは阻害する、転写開始点の塩基配列のみに依存する緊縮制御の存在も明らかになった。本研究では、この緊縮制御の分子機作を解明し、原核生物の転写制御系解明の新たな一ページを開く。さらに、この転写制御因子の関与しない緊縮制御による炭素代謝制御および炭素代謝のグローバルな制御因子である CcpA と細胞のエネルギー状況とアミノ酸の供給状況を感知する CodY が織りなす、炭素代謝ネットワークを効率的に改変して有用物質の産生に向かわせる。すなわち、グルコースなどの糖質の細胞内への透過を促し、糖質から解糖系で生成されたピルビン酸を如何に効率よく有用物質に変換させるかに着目して研究を進める。

<2008 年度の研究の当初計画>

枯草菌の野生株と *codY* 欠損株を用いたトランスクリプトームとメタボローム解析により、アミノ酸飢餓やデコイニン添加による緊縮制御により引き起こされた ATP 濃度の上昇と GTP 濃度の低下とが、広範囲なオペロンの転写開始を調節していることを明白にした。これら細胞内の ATP や GTP 濃度の上昇や低下により正または負に応答する標的遺伝子群をオペロン単位に整理する。これらオペロン毎に転写開始点を同定し、この制御が実際転写制御因子の関与しないプロモーター活性の変動であることを欠失解析で確認する。このように本制御下にあると確認できたオペロンの転写開始点極近傍の塩基配列を比較し、正あるいは負の緊縮制御に与る配列を特定する。

緊縮制御（あるいはデコイニン添加）で引き起こされた生体内の ATP 濃度の上昇や GTP の濃度の低下が引き起こす転写開始調節系が、*pts* オペロンでは負に作動する。転写開始点の 2 番目の塩基 G を A に変えればこの負の制御が解除されることをレポーターアッセイと生体外転写系で確認した。この置換を本来の *pts* オペロンに導入し、*pts* オペロンが緊縮制御下でも効率よく発現され活発なグルコースの取り込み活性を示すか検討する。また、この状態で解糖系や *ilv-leu* オペロンのカタボライト活性化が起こるかどうかが検証する。さらに、細胞外排出物質であるアセトイン、酢酸および乳酸の合成系を遮断し、ピルビン酸が効率よく分岐鎖アミノ酸合成に向かうかどうか検証する。

<2008 年度の成果>

枯草菌の野生株と *codY* 欠損株を用いたトランスクリプトームとメタボローム解析により、緊縮条件により引き起こされた ATP 濃度の上昇や GTP 濃度の低下が広範囲なオペロンの転写開始を調節しているを明白にした（デコイニン添加の場合のトランスクリプトームやメタボロームの変動は図 1 参照）。グルコースからピルビン酸に至りさらにピルビン酸を代謝する経路に関しては、*Pts* 系によるグルコースの取り込み系 (*ptsG*) とピルビン酸からアセチル-CoA の合成が負に制御され、逆にピルビン酸からの分岐鎖アミノ酸合成 (*ilv-leu*)、アセトイン合成系 (*als*)、およびスレオニンやリジン合成系に入らせるピルビン酸カルボキシラーゼ (*pycA*) 遺伝子群の発現が正に制御される。この緊縮制御には、転写開始点から 2 番目の塩基の種類が重要であるという事を、生体内のレポーター実験および生体外転写系を用いた実験で明らかにしている。分岐鎖アミノ酸合成に関わる *ilv-leu* オペロンのアミノ酸飢餓による正の制御は、GTP 濃度の低下による *CodY* による負の制御の解除と ATP 濃度の上昇によるこのオペロンの転写開始点近傍に存在する塩基配列を介した正の制御である事を明らかにした。後者の制御の塩基配列を特定するため、転写開始点近傍 (-2) TTCA(+2) に塩基置換を導入し、正の緊縮制御への影響を見たところ、(+1) への G の置換がやや、(+2) の G への置換が大きく影響し、とくに後者の置換は負の制御にまで転換した。*ilv-leu* オペロンの *in vitro* の転写系を組み、RNA ポリメラーゼの基質である GTP と ATP の量を変動させ run-off 転写産物の量を測定したところ、(+2) の G への置換が GTP の濃度の低下に極めて感受性が高くなる事が判った。*ptsG* の転写開始点の塩基配列は、(-2) TTGG(+2) であり、最初の G が転写開始点で、その次の G を A に変えたときこの負の緊縮制御が見られなくなった。この知見は (+2) の G が負の緊縮制御に関与することを示し、*ptsG* の負の緊縮制御を回避する方策が見つかった事を意味する。さらに負の制御を受ける *pdh* オペロンと正の制御を受ける *pycA* 遺伝子の転写の開始点はプライマー伸長法で決定したところ、それぞれ、(-2) ATGT(+2) と (-2) TTAT(+2) であり、(+1) の G と A が負と正の制御関連していることが強く示唆された。そこで、*pdh* オペロンの転写開始点の G を A に置換したところ、負の制御が正の制御に転換した。さらに、正の制御を受ける *hom-thrCB* と *alsSD* オペロンの転写開始点は、それぞれ (-2) TGTA(+2) と (-2) TTAT(+2) であることが判明した。これらの知見は転写開始点あるいはその次の塩基が G か A で、緊縮制御が正の制御か負の制御かが決定される事が推察された。従って、緊縮制御を受けるプロモーターでは、RNA ポリメラーゼによる転写開始の頻度が、基質の GTP と ATP の濃度に強く依存し、負の制御の場合は GTP 濃度の減少が正の制御の場合は ATP 濃度の増加がこの緊縮応答の重要な要因であると推定された。

<国内外での成果の位置づけ>

大腸菌の緊縮制御でRNAポリメラーゼの基質としてのGTP濃度の低下が、転写開始点がGの場合、リボソームRNA合成の負の制御を引き起こすことが知られている。枯草菌の緊縮制御では、リボソームRNA合成のみならず、炭素代謝制御に深く関与遺伝子の発現制御が、転写開始点近傍の塩基がGかAかによって制御されているという、極めて新規な発見は、真正細菌の転写制御機構研究に国際的な大きなインパクトを与えるものである。また、有用なグラム陽性菌の緊縮制御の物質産生の効率化に向けた改変の試みは、国際的に先導的な役割を担うものである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

緊縮制御がかかるとイソロイシン等の分岐鎖アミノ酸合成が高まる(図1参照)。しかしながら、グルコースの取り込み活性が極度に低下する。そこで緊縮制御を受ける、グルコースの取り込み活性に関与する*ptsG*の転写開始点の次(+2)のGをAに変え負の制御を解除しようとした。しかし、この置換の導入に、原因が不明であるがうまく成功していない。

また、緊縮制御がかかると生体内のATPの濃度が増加する。これが*ilv-leu*オペロン等で見られる、転写開始点の塩基配列に依存する正の緊縮制御の主原因と考えられる。そこで*in vitro*の転写系でこの正の緊縮制御を再現しようとしたが、ATP濃度を生体内濃度まで上げると原因は不明であるがRNAポリメラーゼの転写活性を阻害したため*in vitro*でのこの正の制御の再現がよく行かなかった。

<今後の課題>

枯草菌の1,000種以上のオペロンがあり、多くのオペロンの転

写開始点がAまたはGであるが、転写開始点極近傍の塩基(AまたはG)に依存する緊縮制御を受けないので、この塩基種だけに依存して、この緊縮制御が引き起こされるとは考えられない。そこで、正の制御を受ける*ilv-leu*や負の制御を受ける*ptsG*オペロンの転写開始点近傍にさらなるGのAへの置換あるいはAのGへの置換を導入して、この緊縮制御を受けるか否かを検証して、この緊縮制御の作動に必要な塩基をさらに特定する。

新規な緊縮制御系が密接に絡む炭素代謝制御ネットワークを、*ptsG*と*pdh*オペロンの負の緊縮制御を解除するかあるいはアセトインや酢酸の細胞外排出活性を抑えることにより、有用物質の代表であるイソロイシン等の産生が増加するか検証する。

<成果公表リスト>

1)論文
 1. 0806161124
 Yoshida, K., Yamaguchi, M., Morinaga, T., Kinehara, M., Ikeuchi, M., Ashida, H., and Fujita, Y.: *myo*-Inositol catabolism in *Bacillus subtilis*, *J. Biol. Chem.*, 283(16), 10415-10424 (2008).
 2. 0901071213
 Tojo, S., Satomura, T., Kumamoto, K., Hirooka, K., and Fujita, Y.: Molecular mechanisms underlying the positive stringent response of the *Bacillus subtilis ilv-leu* operon, involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids, *J. Bacteriol.*, 190(18), 6134-6147 (2008).
 3. 0901071256
 Ujiie, H., Matsutani, T., Tomatsu, H., Fujihara, A., Ushida, C., Miwa, Y., Fujita, Y., Himeno, H., and Muto, A.: *Trans*-translation is involved in the CcpA-dependent tagging and degradation of TreP in *Bacillus subtilis*, *J. Biochem.*, 145(1), 59-66 (2009).

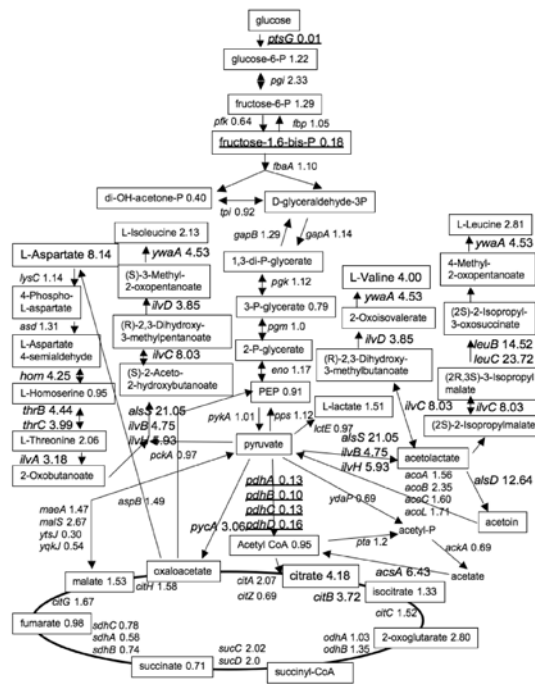


図1. 枯草菌の緊縮制御時による炭素代謝制御ネットワークの変動のトランスクリプトームとメタボローム解析。緊縮制御はデコイニン添加により引き起こした。炭素代謝制御ネットワークに関わる代謝産物は四角で囲い、遺伝子はイタリックで示している。代謝産物濃度や遺伝子発現のデコイニン添加15分後の変動比が示しており、3倍以上の変動が見られたものはフォントを大きくしてある。下線のあるものは、代謝産物濃度や遺伝子発現量が減少したものである。