



希少放線菌の形態分化に関する分子遺伝学的研究

東京大学大学院農学生命科学研究科 手塚 武揚

はじめに

放線菌はグラム陽性細菌に分類される高GC含量の土壌微生物であり、原核生物としては非常に複雑な形態分化を行う菌群が含まれる。自然界からの分離頻度が最も高いのは *Streptomyces* 属放線菌であり他の分離頻度が低い放線菌は希少放線菌と呼ばれるが、希少放線菌の中には特に複雑な形態分化を行うものが知られている。筆者は希少放線菌がどのような分子機構により複雑な形態分化を行っているのかという点に興味を持ち、希少放線菌の一種 *Actinoplanes missouriensis* を対象として研究を行ってきた。 *A. missouriensis* を適切な条件で固体培養すると、基底菌糸の伸長による増殖の後、孢子囊柄を経てその先端に多数の孢子囊を形成する。個々の孢子囊内部には数百の孢子が形成され、成熟して休眠細胞となる。孢子囊は水をかけると覚醒し、最外層である孢子囊膜が破れて孢子を水中へ放出する。孢子はべん毛を持ち、遊走子として水中を高速移動するが、発芽に適した環境では運動を停止して発芽し、菌糸生長を開始する(図1)。筆者らは、このような生活環の中でも特に孢子成熟を含む孢子囊形成、および孢子囊開裂に注目して研究を進めてきた。以下に成果の概要を紹介する。

1. 効率的な遺伝子操作法の確立

筆者が *A. missouriensis* の研究を開始した当時、大腸菌との接合伝達を利用した形質転換、および相同組換えによる遺伝子破壊株の取得が行われていたものの、形質転換体や破壊株の取得効率の低さが研究の律速となっていた。そこで、接合伝達の際に使用する細胞の調製法や培地組成の検討、および *sacB* 遺伝子を利用するカウンターセクション法の条件検討等により形質転換体や遺伝子破壊株の効率的な取得法を確立した。これにより、着目した遺伝子の過剰発現株や破壊株、相補株等の迅速な作製による機能解析を可能にした。

2. 形態分化に関わる遺伝子群の転写制御機構の解析

*A. missouriensis* が示す複雑な形態分化の過程では、それぞれ

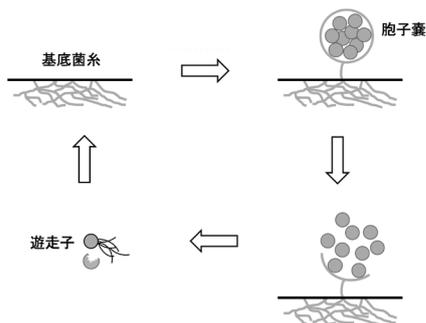


図1. *A. missouriensis* の生活環

の生命現象に関わる多数の遺伝子が時期特異的に発現し、その機能を発揮していると考えられることから、筆者らは、形態分化に関わる遺伝子の発現制御機構に関心をもって研究に取り組んできた。筆者が研究を開始した時点では、形態分化に関わる2つの転写制御因子 BldD と TcrA が同定されており、 *bldD* 破壊株では栄養増殖時に無秩序な孢子囊形成が観察されること、 *tcrA* 破壊株では孢子囊が形成されるものの孢子囊内部で一部の孢子が発芽しており、水中でも孢子囊が開裂しないことが判明していた。そこで、遺伝子破壊株の詳細な表現型解析や RNA-Seq 解析、ChIP-Seq 解析、組換えタンパク質を用いた *in vitro* での機能解析等を行い、BldD が栄養増殖時に孢子囊形成の開始を抑制する鍵転写因子として機能すること、TcrA が遊走子のべん毛・線毛の合成や走化性に関わる遺伝子群を含む200を超える遺伝子の転写を活性化するグローバルな転写制御因子であることを示した。 *tcrA* は BldD により転写が抑制される遺伝子の1つであり、形態分化の開始時には BldD による転写抑制が解除されることで孢子囊形成や孢子成熟に関わる遺伝子の転写が活性化される。また、孢子囊を水に懸濁すると孢子囊開裂、遊走子の運動等に関わる遺伝子の発現が順次活性化される。また、このような TcrA による多数の遺伝子の発現制御ネットワークにおいて、TcrA をリン酸化すると考えられるキナーゼ HhkA や3つの FliA ファミリーのシグマ因子、および転写制御因子 BldC が重要な役割を果たしていることを明らかにした(図2)。

放線菌の形態分化については数種の *Streptomyces* 属放線菌を対象として精力的な研究が行われ、形態分化に関わる遺伝子の発現制御機構について解析が進められてきた。BldD や BldC は *Streptomyces* 属放線菌において形態分化の制御因子として同定されていたタンパク質であり *A. missouriensis* においても利用されていることから、放線菌において形態分化に関わる遺伝子の制御因子として広く保存されていると考えられる。

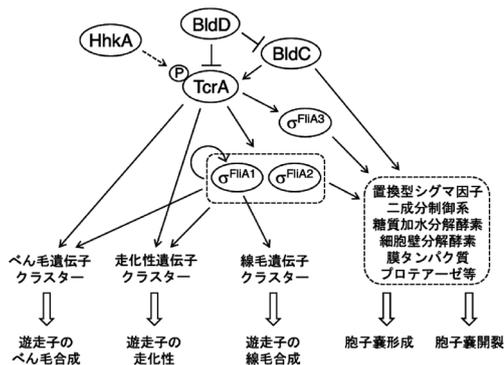


図2. *A. missouriensis* の形態分化に関与する遺伝子の発現制御ネットワーク

一方、二成分制御系のセンサーキナーゼと応答制御因子である HhkA と TcrA は、*Actinoplanes* 属とその近縁の希少放線菌において高度に保存された制御因子である。また、FliA ファミリーのシグマ因子はべん毛遺伝子の発現制御因子として知られているが、*A. missouriensis* では複数の FliA ファミリーのシグマ因子がべん毛遺伝子に加えて形態分化に関わる多数の遺伝子の発現を制御していることが明らかになった。以上の結果から、*Streptomyces* 属放線菌と *Actinoplanes* 属放線菌の形態分化では最上流に位置する転写制御因子は共通しているものの、下流の制御ネットワークはまったく異なることを示すことができた。

### 3. 形態分化に関わる遺伝子の同定と機能解析

*A. missouriensis* の形態分化に関わる遺伝子を同定するため、野生株を用いて RNA-Seq 法によるトランスクリプトーム解析や二次元電気泳動法によるプロテオーム解析を行い、胞子嚢の形成や開裂、遊走子の運動時における遺伝子発現量の変化を網羅的に解析した。このうち、胞子嚢形成時に発現が活性化される遺伝子に注目して機能解析を行い、二成分制御系の応答制御因子 AsfR や酸性タンパク質 SsgB、および Clp プロテアーゼ構成因子が胞子嚢形成に関わることを、細胞壁分解酵素 GsmA が胞子嚢内部における胞子成熟に関わることを、チオレドキシシン TrxA が遊走子のべん毛合成に関わることを示した。また、胞子嚢開裂時に発現が活性化される遺伝子に注目して機能解析を行い、2つの糖質加水分解酵素 GimA と GimB が胞子嚢開裂に関わることを示した。

また、胞子嚢表層で検出される自家蛍光を利用して胞子嚢膜の精製を行い、その構成因子を解析することで、胞子嚢膜に局在する複数の膜タンパク質を同定した。これらの膜タンパク質の機能解析を行い、このうち1つが胞子嚢膜の形成に必須であることを示した。

一方、*Streptomyces* 属放線菌の胞子には見られない生理機能である遊走子の運動能に注目して解析を行い、べん毛遺伝子クラスターの発現制御機構が他の運動性細菌における制御機構とは異なることを示した。さらに、遊走子に線毛が形成されることを見出し、これが遊走子の固体表面への吸着に使われることを明らかにした。

### 4. 胞子嚢開裂を制御するシグマ-アンチシグマ因子制御系の解析

休眠状態の胞子を内包する *A. missouriensis* の胞子嚢を水中に懸濁すると、時間の経過とともに胞子嚢表層に構造変化が起こり透明になって内部の胞子が見えるようになる。その後、胞子嚢は吸水して膨張し、胞子嚢膜が破れて胞子が放出される。筆者らは、胞子の覚醒がこのようにダイナミックな胞子嚢形態の変化を伴って進行する点に着目し、その分子機構を解明すべく研究を進めてきた。

胞子嚢内部の胞子と比較すると、胞子嚢から放出された遊走子では耐熱性が大幅に低下する。そこで、両者の耐熱性の違い、および胞子嚢と遊走子の大きさの違いを利用したスクリー

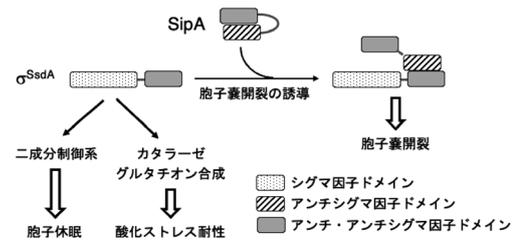


図3. 胞子嚢開裂を制御する  $\sigma^{SsdA}$ /SipA 制御系

ニング法を考案し、水中において胞子嚢開裂がほとんど進行しない変異株、およびそのサプレッサー変異株を取得した。ゲノム解析と遺伝子相補実験等により原因遺伝子を特定したところ、隣接した遺伝子座にコードされるシグマ因子  $\sigma^{SsdA}$  とアンチシグマ因子 SipA が胞子嚢開裂を制御していることを見出した。詳細な機能解析の結果、SipA は  $\sigma^{SsdA}$  に結合してそのシグマ因子活性を阻害すること、*sipA* 破壊株や *ssdA* 過剰発現株では水中でも胞子嚢開裂が進行しないことを示した。したがって、 $\sigma^{SsdA}$  が胞子嚢開裂を抑制して休眠状態を維持する一方、SipA が  $\sigma^{SsdA}$  の機能を抑制することで休眠状態を解除し、胞子嚢開裂を促進すると考えられ、SipA と  $\sigma^{SsdA}$  からなるシグマ-アンチシグマ因子制御系はシグマ因子である  $\sigma^{SsdA}$  が胞子嚢開裂を抑制するという予期しない機能を有していることを示すことができた(図3)。

### おわりに

希少放線菌 *A. missouriensis* の形態分化に焦点をあてて研究を行い、胞子嚢の形成や開裂、遊走子の運動等に関わる遺伝子を同定し、その機能を解析した。また、これらの遺伝子が時期特異的に発現する制御機構を明らかにした。これらの成果から、*A. missouriensis* が示す複雑な形態分化の分子基盤の一端を明らかにすることができたと考えている。これらの研究の過程では、RNA-Seq 解析等の網羅的な遺伝子発現の解析データに加え、形質転換法の改良や変異株スクリーニング法の考案が研究の進展に大きく貢献した。これらはいずれも地道で古典的な実験であるが、特に *A. missouriensis* のような非モデル生物を対象とする研究では、非常に重要な役割を果たすものと感じている。今後は同定した遺伝子の機能解析と新たな因子の特定を包括的に進め、希少放線菌が示す複雑な形態分化と生存戦略の全容に迫っていきたい。

**謝辞** 本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻醗酵学研究室で行われたものです。研究の機会をいただき、ご指導ご鞭撻を賜りました大西康夫先生に心よりお礼申し上げます。研究の遂行にあたり多くのご助言を賜りました同研究室・勝山陽平先生、ともに研究に取り組んでいただいた研究室メンバーの皆様にも心より感謝申し上げます。また、本研究の成果は多くの共同研究により達成されたものであり、ご協力をいただいた共同研究者の方々に深く感謝申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦いただきました日本農芸化学会関東支部長・松島芳隆先生に深謝いたします。