

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 19 年度博士課程 進学  
氏名 金 昭吟  
指導教員名 大西 康夫

### 論文題目

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の走化性センサーに関する研究

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は、多数の胞子を内包した胞子嚢を、短い胞子嚢柄を介して基底菌糸上に形成する。湿潤した環境におかれると胞子嚢外皮が破れ、べん毛をもった運動性胞子が泳ぎ出す。運動性胞子は生育に適した場所まで移動した後、出芽して菌糸状の生育を始めるが、この際、運動性胞子が示す走化性が重要な役割を果たしている。*A. missouriensis* の運動性胞子は、アミノ酸や糖だけでなく、vanillin や  $\gamma$ -collidine といった芳香族化合物にも走化性を示すことが報告されているが、走化性に関わるタンパク質に関してはこれまで研究が行われてこなかった。近年、*A. missouriensis* の全ゲノム配列が明らかになったことにより、*A. missouriensis* にも、一般の細菌と同様の走化性システムが存在することが示唆され、研究が開始された。*A. missouriensis* は走化性に必要なタンパク質 (CheA, CheB, CheR, CheW, CheY) をコードする走化性遺伝子クラスター (*che* クラスター) を 3 つもっており、そのうちの 2 つが運動性胞子の走化性に関与していることが遺伝子破壊実験により示された。一方、化学物質を感知するセンサータンパク質 (methyl-accepting chemotaxis protein (MCP)、chemoreceptor と呼ばれる) はゲノム上に 21 個コードされているが、その機能については解析されていなかった。本研究においては、運動性胞子という特殊な微生物細胞の MCP について解析を行うことで、一般の細菌での走化性研究では見えてこなかった走化性の分子機構を明らかにすることができるので

はないかと考えた。近年、細胞膜上の MCP が桿菌細胞の極に局在化（クラスタリング）することが示され、これが MCP の機能に重要であることが明らかにされているが、球状の *A. missouriensis* 運動性孢子細胞における MCP の局在には特に興味もたれた。運動性孢子はやがて出芽するが、出芽時も含めて、孢子細胞に極性があるかどうかは全く不明であったからである。また、運動性孢子が出芽し菌糸状の生育をしている時にも、何らかの形で MCP が機能している可能性も考えられ、これまでに知られていなかった MCP の機能を明らかにできるかもしれないと期待した。

#### MCP のアミノ酸配列の *in silico* 解析

21 種の MCP のアミノ酸配列について *in silico* 解析を行った。MCP の細胞質にあるシグナル伝達に関与するドメインは細菌において種を超えて高度に保存されており、7 種類の異なる配列パターンがあることが報告されている。*A. missouriensis* の MCP 遺伝子の配列パターンを解析した結果、すべて 38H に分類される配列であった。この種類の MCP を持っている細菌としては、アクチノバクテリアである *Kineococcus radiotolerans* やシアノバクテリアである *Trichodesmium erythraeum* が知られている。また、21 種の MCP のアミノ酸配列の膜貫通ドメインについて、膜貫通ドメイン解析ソフト (Phobius, TMHMM2.0, HMMTOP3) を用いて解析したところ、MCP4 だけは 1 つの膜貫通ドメインを持ち、残りの 20 個は 2 つの膜貫通ドメインを持つことが分かった。また、膜貫通ドメインと細胞質領域を除いた保存性の低い領域が、細胞外で誘因物質（あるいは忌避物質）と結合するセンシングドメインである。センシングドメインについて、Blast 検索を行った結果、MCP2 と MCP3 には、センサータンパク質によく見られる PAS ドメインと相同性のある配列が見出されたが、残りの 19 種の MCP では機能が示されている配列との相同性は見られず、アミノ酸配列からだけでは、*A. missouriensis* の MCP の機能（感知する化合物）についての情報は得られないことがわかった。また、センシングドメイン間の類似性について系統樹を作製し、MCP の多重遺伝子破壊株作製において参考にした。

#### *A. missouriensis* の MCP 遺伝子の転写解析

21 種の MCP 遺伝子が *A. missouriensis* の生活環上、どの時期で転写されているかについて調べた。(i) 運動中の孢子、(ii) 孢子嚢形成固体培地で培養し孢子嚢を形成している菌体（基底菌糸および孢子嚢中の孢子が含まれる）、(iii) 液体培養した菌糸、の 3 つの菌体から RNA を抽出し、半定量 RT-PCR を行った結果、21 個の MCP 遺伝子のうち 17 個 (*mcp4*, *mcp5*, *mcp6*, *mcp13* 以外) が運動中の孢子で発現していることが示された。また、孢子嚢形成固体培地で培養し孢子嚢を形成している菌体では、*mcp10* の以外のすべての MCP 遺伝子の転写が確認された。両者の転写量の比較により、運動性孢子でより強く転写が見られるも

のとして、*mcp1*, *mcp2*, *mcp9*, *mcp10*, *mcp12*, *mcp17*, *mcp18*, *mcp19*, *mcp21* の 9 遺伝子があげられる。べん毛遺伝子もすでに孢子嚢形成時に転写が起こっていることが示されているため、多くの MCP は孢子形成の時点ですでに生産されているものと考えられるが、これら 9 種の MCP は運動中にさらにその発現が強化されていると思われる。一方、液体培養した菌糸においても、*mcp8* と *mcp15* だけは転写が見られた。さらに詳しく調べたところ、*mcp8* は静止期で強く発現しているのに対して、*mcp15* はどの培養時期でも発現していた。通常、液体培養では運動性孢子形成は起こらないため、これら 2 つの MCP は運動性孢子的走化性とは異なった機能をもつ可能性がある。なお、*mcp8* 遺伝子破壊株の菌糸生長や孢子嚢および孢子形成には異常は見られなかった。

#### MCP タンパク質の孢子細胞内における局在解析

21 個の MCP 遺伝子すべてについて、C 末端に GFP が融合したタンパク質として発現するように GFP 遺伝子と融合させた。自身のプロモーターを使って転写が起こる形で、*mcp-gfp* 融合遺伝子を、染色体組み込み型ベクターを用いて、染色体上に 1 コピー挿入した。その結果、9 つの *mcp-gfp* 組換え株 (MCP1, MCP2, MCP3, MCP5, MCP9, MCP12, MCP16, MCP17, MCP18 の GFP 融合タンパク質を生産する株) の運動性孢子において、GFP 由来の蛍光シグナルが観察された。MCP-GFP の局在パターンは、いずれの株でも同様であり、2 個から 6 個の蛍光スポットが孢子細胞膜上に観察された。そこで、MCP17-GFP 融合タンパク質および MCP18-RFP 融合タンパク質をコードする遺伝子を同時に染色体に挿入した株を作製し、GFP と RFP の蛍光シグナルを観察した。その結果、両者は同一の部位に共局在することが示された。さらに同様の実験により、MCP18 と 5 つの MCP (MCP1, MCP2, MCP3, MCP5, MCP9) の共局在が示された。以上の結果より、*A. missouriensis* 運動性孢子細胞内では、一般の細菌と同様、複数の MCP がクラスターを形成することで、走化性シグナルの増幅がなされている可能性が示された。

一方、走化性に関与する *che* オペロン 1 と *che* オペロン 2 の単独破壊株および二重破壊株で MCP17-GFP の局在パターンを観察した。*che* オペロン 1 の単独破壊株では、クラスターの形成率が低下した。*che* オペロン 2 の単独破壊株では、この傾向がより顕著であり、ほとんどクラスターが形成されず、膜全体に蛍光シグナルが観察された。一方、二重破壊株では蛍光シグナルが全く観察されなかった。MCP18-GFP を用いて同様の実験を行ったところ、MCP18-GFP は MCP17-GFP より安定性の低下が顕著であり、*che* オペロン 2 の単独破壊株でも蛍光シグナルがほとんど見られなくなった。以上の結果より、走化性に機能をしている *che* オペロンの発現が MCP タンパク質の局在および MCP タンパク質の安定性に寄与しているこ

とが強く示唆された。Che オペロンの破壊株において、MCP がクラスターを形成できなくなるという結果は、*Rhodobacter sphaeroides* や *Azospirillum brasilense* で報告されているが、Che オペロンの発現が MCP の安定性にも大きく寄与していることを示した報告はこれまでになされていない。

#### MCP タンパク質の局在パターンの詳細な解析

MCP の局在について、球菌ではこれまでに報告がないため、MCP18-GFP の局在パターンについて詳細な解析を行った。まず、共焦点顕微鏡で Z 軸に沿って 0.15  $\mu\text{m}$  の厚さで蛍光シグナルを撮影し、画像処理ソフトウェアによって 3 次元に復元した。94 個の孢子について観察した結果、MCP18-GFP の 2-6 個の蛍光スポットが孢子の細胞膜上のランダムな位置に局在していることがわかった。また、蛍光スポットの大きさや輝度が異なって観察されたことから、画像解析ソフト *Image J* を利用してクラスターのサイズや輝度を調べた。その結果、1つの孢子細胞には、サイズの大きい蛍光スポットはほとんどの場合、1つか2つであり、これに加えて小さな蛍光スポットが 0-4 個含まれていることが明らかになった。以上の解析結果より、MCP のクラスター形成には、その部位や数を厳密に制御する機構は存在しないと推測された。

#### MCP 遺伝子の破壊株作製

*A. missouriensis* の運動性孢子の走化性に関わる MCP の機能解析には、MCP 遺伝子破壊株の作製が必須であると考えられたため、各 MCP 遺伝子の破壊を試み、15 種の MCP 遺伝子の単独破壊株を作製した。一般的な細菌では、1つの誘因（忌避）物質を感知する MCP が複数存在することも多いので、さらに多重破壊株の作製を試みた。この際、転写量の多い MCP 遺伝子を同時に破壊することや、センシングドメインの相同性が高い MCP 遺伝子を同時に破壊することにした。その結果、二重破壊株を 5 種類、3 破壊株を 4 種類、4 重破壊株を 4 種類取得できた。さらに多くの遺伝子破壊株を作製する必要があるが、本研究で作製した MCP 遺伝子破壊株ライブラリーは、今後の MCP の機能解析に極めて重要であると考えている。