

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23688013

研究課題名(和文) 近縁病原細菌における情報伝達クロスレギュレーション進化の体系的解析

研究課題名(英文) Systematic analysis of cross-regulatory profiles in two-component signal transduction systems among closely related bacterial pathogens

研究代表者

加藤 明宣 (KATO, Akinori)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：00454645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円

研究成果の概要(和文)：細菌の病原性調節や薬剤耐性遺伝子発現調節等に関わる二成分制御系間のクロスレギュレーションの多様性を解明すべく腸内細菌科に属するサルモネラ菌などにおいて体系的・統計的解析を実施した。各細菌にコードされる全二成分制御系欠損株の構築等を行い、相互ネットワーク解析に使用する遺伝ストックとした。高次ネットワーク形成において二成分制御系間の上下関係をターゲット遺伝子のプロモーター/レポーターシステムを用いた測定により分析することで、各細菌において「クロスレギュレーション・マップ」を作成した。本課題の関連研究成果として、顕著な研究成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Two-component system (TCS) is a predominant mode of signal transduction in bacteria. Recent progresses have been drawing detailed pictures of their regulatory networks and evolutionary traces. Yet, systematic experimental analyses across species and their statistics are quite challenging. Here, we aimed to analyze cross-regulatory profiles in TCSs of *Salmonella enterica* and its closely related bacteria by constructing approximately 30 TCS mutant strains for each species. In order to detect novel cross-regulatory phenomena in a quantitative manner, a representative gene promoter, which is directly regulated by a given TCS, was selected for each TCS and cloned into a promoter-less luciferase (lux) reporter/ broad range conjugation plasmid. By mating and testing epistasis in TCSs, we compare extended “TCSs cross-regulatory profiling maps” across species in details. From a certain aspect of these relating analyses, novel TCS regulatory mechanisms were established lately.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ネットワーク シグナル伝達 進化 細菌 感染症 two-component system connector ゲノム

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 細菌の情報伝達機構の二成分制御系は、病原性調節や薬剤耐性化に関わりが深い。サルモネラ菌において、二成分制御系のPhoP/PhoQを中心とした病原性調節ネットワークが特に発達している。最近、コネクターと呼ばれるクラスの特異的スモールタンパク質(～100 aa以下)が複数の二成分制御系間を繋ぎ、このネットワーク形成に重要な働きを担う事が明らかとなって来た。

(2) 我々はこれまでに、サルモネラにおいて、二成分制御系のPhoP/PhoQ系とPmrA/PmrB系間で働くコネクターPmrDの分子機構を解明した。このような分子機構は、世界で初めての報告である。一方、エルシニア菌においては、サルモネラ菌同様の刺激応答が保持されるものの、PmrDを介さない。我々は、進化的に分岐したネットワークデザインの特徴を調べるため、エルシニア菌型のデザインをサルモネラ菌に再構築し、mRNAの定量解析を行った結果、コネクターPmrDを介するネットワークが、Mg<sup>2+</sup>シグナルを増幅させることを見出した。特定の二成分制御系に作用するコネクターは、ネットワークの進化に重要な役割を示すと考えられるが、未だその統計的解析には至っていない。

### 2. 研究の目的

(1) 感染性微生物の多剤耐性化が進み、それらの多様な適応機構の解明が重要性を増している。細菌の病原性調節や薬剤耐性遺伝子発現調節等に関わる二成分制御系は、環境シグナルを認識するセンサー(HK)とそれを細胞応答に変換するレギュレーター(RR)からなる基本的な情報伝達ユニットより構成される。最近、「コネクター」と呼ばれるクラスのスモールタンパク質がこのユニット間を繋ぐことが明らかとなり、高次ネットワーク形成においてその役割が注目される。本研究では、近縁病原細菌に認められる約30対の二成分制御系間のクロスレギュレーション進化に着目し、その多様性の基本原理を解明すべく体系的解析を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究では、二成分制御系間のクロスレギュレーションの多様性を解明すべく腸内細菌科に属するサルモネラ菌、大腸菌、シトロバクター菌、イネ内穎褐変病菌において体系的・統計的解析を実施する。各細菌にコードされる全二成分制御系RR/HKダブル欠損株の構築等を行い、相互ネットワーク解析に使用する遺伝子ストックとする。

(2) 二成分制御系間の上下関係をRRターゲット遺伝子のプロモーター/ルシフェラーゼ(*lux*)レポーターシステムを用いたアッセイにより分析することで、各細菌において「クロスレギュレーション・マップ」を作成する。

種特異的・種間共通の相互作用が検出された場合、それらを4種類の調節カテゴリーに分類し、調節機構を分子生物学的、生化学的に解析する。

### 4. 研究成果

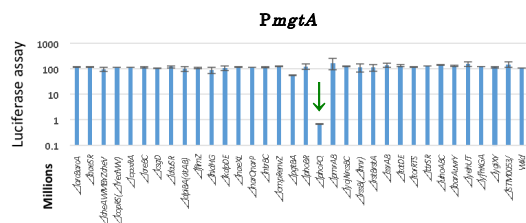
(1) 本研究において、まず、近縁病原細菌における情報伝達クロスレギュレーション進化の体系的解析を進める上で基礎となる二成分制御系(two-component system, TCS) ①～③遺伝子ストックの構築を実施した。

①サルモネラ菌、シトロバクター菌、イネ内穎褐変病菌(パントエア菌)において約30対のレスポンスレギュレーター(RR)/センサー・ヒスチジンキナーゼ(HK)ダブル欠損株の構築が行われ、それらを完成させた。大腸菌においても完成間近となっている。

②腸内細菌科に属する種々の菌株でレポーターアッセイを行う際、共通に使用可能な、ターゲット遺伝子のプロモーター/GFPレポーターシステムの構築(約50)が行われた。検出感度の問題から、*lux*をレポーターとした新しいシステムの構築に変更し、このレポーターシステム(約50)についても完成させた。

③L-アラビノースの添加によりRRを高発現できるプラスミド系列(約50)の遺伝子ストックの構築も完成した。

(2) 上記①欠損株に対し、②のターゲット遺伝子のプロモーター/*lux*レポーター系列を液体培地における接合伝達によりハイスループットに導入する手法も確立した。一方、それに続き、ハイスループット・アッセイを進める過程でサルモネラ菌の接合伝達低効率及び接合伝達後のプラスミド脱落の問題が顕在化した。しかし、液体培地における接合から固形培地上でのクロスストリーク法等に変更することで問題の解決が見られ、体系的なアッセイが進行した。例えば、低Mg<sup>2+</sup>環境下において、Mg<sup>2+</sup>を細胞外から取り込む遺伝子である*mgtA*のプロモーターを用いたサルモネラ菌におけるアッセイの結果を図1に示した。二成分制御系PhoP/PhoQにより直接的に調整されるこのプロモーターが顕著に影響されたのは





④ **Kato A**, Chen HD, Latifi T, and Groisman EA., Reciprocal Control Between a Bacterium's Regulatory System and the Modification Status of its Lipopolysaccharide., *Mol. Cell.* 47:897-908, (2012).  
doi: 10.1016/j.molcel.2012.07.017.  
(Impact Factor: **15.280**) 査読あり

⑤ Yeo WS, Zwir I, Huang HV, Shin D, **Kato A**, and Groisman EA., Intrinsic Negative Feedback Governs Activation Surge in Two-Component Regulatory Systems.  
*Mol. Cell.* 45:409-421, (2012).  
doi: 10.1016/j.molcel.2011.12.027.  
(Impact Factor: **15.280**) 査読あり

〔学会発表〕(計 8 件)

① **加藤 明宣**  
ワークショップ課題：細菌の環境シグナル受容体と遺伝子調節ネットワーク  
“Reciprocal Control between a Bacterium's TCS and the Pyrophosphorylation Status of Its Lipopolysaccharide”  
日本細菌学会、タワーホール船堀、東京、2014年3月

② **加藤 明宣**、深見 知可、萩原 慧、内海 龍太郎、サルモネラ菌の TCS と PTS をつなぐ RcsG、日本農芸化学会、明治大学生田キャンパス、神奈川、2014 年 3 月

③ **加藤 明宣**、深見 知可、萩原 慧、内海 龍太郎、PTS と TCS をつなぐ RcsG の分子遺伝学的解析、日本分子生物学会、神戸コンベンションセンター（神戸国際会議場、神戸国際展示場）兵庫、2013 年 12 月

④ **加藤 明宣**  
セミナー課題：大腸菌ゲノム転写研究全体像の分析と転写データベース構築  
「サルモネラ病原菌の TCS ネットワーク」、国立遺伝学研究所、静岡、2013 年 10 月

⑤ **Akinori Kato**  
**Workshop : GLOBAL CONTROL IN BACTERIA**  
“Reciprocal Control between a Bacterium's Regulatory System and the Modification Status of Its Lipopolysaccharide”  
FEMS Microbiology Congress, Leipziger Messe GmbH Congress Center Leipzig, Leipzig Germany, July 2013

⑥ **加藤 明宣**  
シンポジウム課題：薬剤耐性とその克服へのアプローチ  
「サルモネラ菌の病原性制御と応用展開」  
日本農芸化学会、東北大学、宮城、2013 年 3 月

⑦ **加藤 明宣**、Groisman EA  
Reciprocal Control between a Bacterium's Regulatory System and the Modification Status of Its Lipopolysaccharide  
日本分子生物学会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、福岡、2012 年 12 月

⑧ **加藤 明宣**、Groisman EA  
リボポリサッカライド修飾と二成分系御系の活性化状態を繋ぐ small gene  
日本農芸化学会、京都女子大学、京都、2012 年 3 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://researchmap.jp/read0137572/>  
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/5791>

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
加藤 明宣 (KATO, Akinori)  
近畿大学・大学院農学研究科・講師  
研究者番号：00454645