

## 農学研究院若手教員支援事業成果報告書

平成 23 年 2 月 18 日

支援対象研究分野：新農学生命科学

研究課題名：単細胞生物を用いた環境変化応答分子群の解析

支援期間：平成 21 年 11 月～平成 22 年 10 月

所属部門・研究分野：資源生物科学部門・水産生物環境学

研究代表者氏名：島崎洋平

分担者 沖野 望（生命機能科学部門・海洋資源化学）

### 1. 研究の成果，達成度

#### <珪藻>

単細胞藻類である珪藻は水圏生態系の一次生産者として極めて重要であるが、これら生物群に対する化学物質の作用機構に関する知見は極めて少ない。化学物質の作用機構を調べることは多種の化学物質による複合作用を予測する上でも極めて重要である。そこで我々は汎用されている除草剤ベンチオカーブの作用機構を、ゲノムが解読されている珪藻 *Thalassiosira pseudonana* を用いて明らかにすることを目的として研究を行った。

まず、珪藻に 12 時間明：12 時間暗の「明条件下」、または 24 時間暗の「暗条件下」で 5 mg/L のベンチオカーブを 72 時間暴露した。その結果、明条件下のみで珪藻のクロロフィル蛍光値が著しく低下して影響が観察されたため、光合成反応を通じたベンチオカーブの毒性発現機構が推測された。さらに 5 mg/L のベンチオカーブを 24 時間曝露後、プロテオーム解析により珪藻のタンパク質変動を調べた結果、発現量が有意に変動する 24 のタンパク質スポットを検出した。なかでも光合成の電子伝達に關与する cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit のタンパク質量が対照区の約半分と有意に減少しており、ベンチオカーブの光合成系への作用がタンパク質レベルでも支持された。高等植物ではベンチオカーブの光合成系への影響は報告されていない。一方、本物質が藍藻の光合成系へ作用することが近年報告されており、ベンチオカーブによる単細胞藻特異的な光合成阻害作用が推測された。一方、本課題中に同定した光化学系、光化学系 およびカルビン回路関連タンパク質には有意な変動は観察されなかった。さらに継続して変動したタンパク質群の同定を進め、ベンチオカーブの作用機序に関する知見の集積が必要である。

## < 緑膿菌 >

セラミダーゼはセラミドを脂肪酸とスフィンゴシンに加水分解する酵素である。我々は、これまでの研究で緑膿菌のセラミダーゼがスフィンゴ脂質により発現誘導され、溶血性ホスホリパーゼ C (スフィンゴミエリナーゼ、PlcH) 依存性の溶血を増強することを明らかにした (Okino, N. and Ito, M. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 6021-6030)。これまでに多くの細菌が脂質や糖鎖を分解する酵素を生産することが知られているが、その発現メカニズムには不明な点も多い。今回の研究では、緑膿菌セラミダーゼがスフィンゴ脂質によって発現誘導されるメカニズムを解明することを目的として研究を進めた。

まず、緑膿菌セラミダーゼの遺伝子発現を簡便に測定するために、緑膿菌セラミダーゼ遺伝子を大腸菌由来  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子に置換した緑膿菌の変異株を作製した。本変異株は培地にスフィンゴ脂質の一種であるスフィンゴミエリンを加えて培養すると  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が顕著に誘導されるので、セラミダーゼ遺伝子の発現が 96 穴プレートと発色基質 CPRG を使用することで簡便に測定できる。次に、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ置換株のトランスポゾン導入変異体ライブラリーを作製し、スフィンゴミエリン存在下における  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の消失を指標にして、セラミダーゼ誘導能欠損株を探索した。約 2000 株の変異体ライブラリーをスクリーニングしたところ、トランスポゾンが機能未知の転写制御因子に挿入された変異株がスフィンゴミエリンによるセラミダーゼ誘導能を完全に喪失していることを見出した。さらに、その転写制御因子の変異体を新たに作製したところ、スフィンゴミエリン存在下でセラミダーゼの活性が発現誘導されないことが確かめられた。そこで、本転写制御因子をスフィンゴ脂質応答性転写制御因子 (Sphingolipid responsive regulator, SpIR) と名付けた。また、野生株と SpIR 欠損株をスフィンゴミエリン含有培地で培養し、抽出した RNA を用いてリアルタイム PCR を行ったところ、SpIR 欠損株ではセラミダーゼや PlcH の遺伝子発現が顕著に抑制されていた。一方、SpIR 欠損株に SpIR を強制発現させたリバートントでは、スフィンゴミエリンによってセラミダーゼが発現誘導された。

スフィンゴ脂質によって発現誘導される遺伝子はセラミダーゼ以外にも存在すると考えられる。そこで、スフィンゴ脂質によって発現誘導される遺伝子を網羅的に探索するために、スフィンゴミエリンの存在下と非存在下において RNA を抽出し、緑膿菌の DNA マイクロアレイを用いて、スフィンゴ脂質によって起こる遺伝子発現の変化を調べた。その結果、図に示されるように 110 個の遺伝子の発現が有意 (Zscore が 2 以上) に増加し、37 個の遺伝子の発現が低下することが明らかになった。発現が増加した遺伝子の中にはセラミダーゼやスフィ

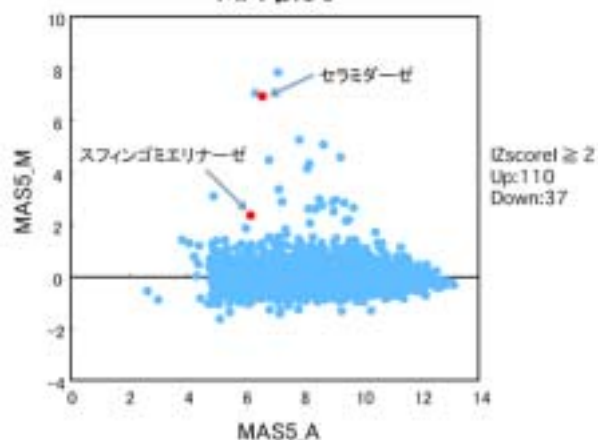
ンゴミエリナーゼも含まれるが、それらの他にも幾つか緑膿菌の病原性に関わると推定される遺伝子が含まれていることが判明した。

今回の一連の研究によって得られた結果は、スフィンゴ脂質が引き金となる緑膿菌セラミダーゼ遺伝子の発現に SpIR が重要な役割を果たしていることを示している。また、DNA マイクロアレイの結果からスフィンゴ脂質の添加によってセラミダーゼ以外にも多くの遺伝子が発現誘導されることも分かった。これ

らのことは、緑膿菌が感染したときに接する宿主のスフィンゴ脂質が緑膿菌の病原因子である PlcH やその働きを増強するセラミダーゼの発現のみならず、その他の病原性に関与する遺伝子の発現にも関与していることを示唆しており、非常に興味深い。

今後はゼブラフィッシュを使用した SpIR 欠損株の病原性の評価や SpIR の高次構造解析を行うことで、SpIR の生理機能をより一層明らかにすることが出来ると考えている。

スフィンゴ脂質で誘導される遺伝子  
~ MA plot ~



## 2. 論文等の研究発表状況

平成23年度日本水産学会春季大会

平成 23 年 3 月 27 日(日) ~ 31 日(木)

東京海洋大学

除草剤ベンチオカーブを曝露した珪藻におけるタンパク質発現量変動と毒性発現機構の解析

島崎 他

第27回内藤コンファレンス 「生体膜ダイナミクスと脂質生物学 [1]」

2010年06月29日(火) ~ 07月02日(金)

シャトレーゼ ガトーキングダム サッポロ(北海道札幌市)

Identification of a transcriptional regulator for ceramidase expression in *Pseudomonas aeruginosa*

Nozomu Okino and Makoto Ito

BMB2010

平成 22 年 12 月 7 日（火）～12 月 10 日（金）

神戸ポートアイランド

緑膿菌セラミダーゼの発現を制御する新規転写因子 SpIR

沖野 望，伊東 信

### 3．研究の波及効果

#### <珪藻>

クラミドモナスなど一部緑藻類を除き、単細胞藻類を用いた分子生物学的研究に関する知見は乏しい。一方で 2004 年に珪藻 *Thalassiosira pseudonana* のゲノム解析に関する論文が Science に掲載されて以来、本種の遺伝子解析に関する研究が多方面で開始されているが、プロテオミクス分野に関する知見は極めて少なかった。珪藻は地球上の生物による炭素固定の 20%を担うと予想され、同時に水圏の食物連鎖を支える。さらに珪藻は地球上の様々な環境に適応しており、一説には 10 万種を越えると考えられている。また、珪藻は多様で精巧なガラス質の外部被殻を持ち、ナノテクノロジーへの応用も期待されている。ゆえに、珪藻類の環境適応性や細胞形性等に関わる分子機構に関する研究を進展させることにより、学術的にも産業的にも重要な貢献ができると予想される。

また、我々は藻類のプロテオミクスをキーワードに対象生物を広げ、有明海などで甚大な漁業被害をもたらした問題となっている有害藻類シャトネラの増殖生理・赤潮消長予測に関するプロテオーム解析に着手した。これまでに本種の増殖期、死滅期、強光下などで発現量が変動するタンパク質群を検出して同定解析を進めるなど、漁業被害軽減に向けた取り組みも行っている。

#### <緑膿菌>

近年、様々な生物においてゲノム解析が行われ、およそ 1000 の微生物ゲノムが明らかにされている。今回の研究で見いだした新規転写制御因子 SpIR は緑膿菌ゲノムの中で推定転写制御因子として登録されており、同様な転写制御因子は緑膿菌ゲノムの中に 300 個近く存在している。興味深いことに、SpIR と同様な転写制御因子は病原細菌ゲノム中に幅広く存在すると共に、SpIR と最も相同性の高いタンパク質が結核菌の病原性に関わる機能未知の転写制御因子であることも判明した。このことは、本研究で見いだしたスフィンゴ脂質に応答する遺伝子発現機構が緑膿菌のみならず結核菌などの重篤な感染症を引き起こす病原細菌にも存在することを容易に想像させる。さらに、緑膿菌の転写制御因子について詳細に検索を行ったところ、その 90%以上は生理機能が不明であることも分かった。転写制御因子は様々なシグナルを転写因子に伝える重要な因子であるが、転写制御因子にシグナルを伝える分子の特定が難しいことから予想以上に研究が進んでいない。今後、SpIR のような機能未知の転写制御因子やそ

れらによって発現制御される遺伝子の解析が進めば、細菌が生産する有用酵素や有用物質の発現量を増大させることや細菌感染症研究の新たなターゲットが発見できるかもしれない。

#### 4．外部資金獲得に向けての取組状況

応募中のもの

平成 23 年度 科学研究費補助金 若手研究（B）

「プロテオミクスを用いたシャトネラ赤潮消長関連タンパク質の探索」

平成 23 年度 科学研究費補助金 基盤研究（C）

「緑膿菌における新規脂質シグナルの解析とその生物機能の解明」

平成 23 年度 長瀬科学技術振興財団 研究助成金

「緑膿菌における新規遺伝子発現機構の解明」

合計 5 ページ以内で作成して下さい。