

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05361

研究課題名（和文）LysRタイプ転写調節因子による転写活性化初期機構の解明

研究課題名（英文）Transcriptional activation mechanism by LysR-type transcriptional regulators

研究代表者

小川 直人（Ogawa, Naoto）

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：60354031

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：土壌細菌Burkholderia multivirans ATCC17616株とCupriavidus necator NH9株の3-ヒドロキシ安息香酸(3-HB)分解遺伝子群の転写活性化機構の解析を行い、両株の3-HB分解遺伝子群が、それぞれLysRタイプ転写調節因子MhbRによって、3-HBまたはゲンチジン酸を誘導物質として、転写が活性化されることを明らかにした。さらにMhbR(ATCC17616)の誘導物質認識に關与するアミノ酸を解明するとともに、同因子が、従来LysRタイプ転写調節因子について想定されていたよりも、はるかに柔軟にプロモーター領域の塩基配列を認識することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LysRタイプ転写調節因子は、細菌では最大の転写調節因子のグループを構成しており、アミノ酸生合成、芳香族化合物分解、病原性因子産生、ストレス応答、窒素固定、二酸化炭素固定など、多くの重要な遺伝子群の発現調節を行っている。一方、近年の様々な細菌のゲノム解読により、1つの細菌は、数十種から、菌株によっては200種近くの、LTTRの遺伝子を持つことが判明している。本研究は、1つの細菌で100前後以上の種類があるLTTRがどのように被制御プロモーターを識別して、さらに特定の誘導物質を認識して、転写活性化を行うのか、という根源的な問いに対して、大きな知見を提供するものであり、学術的意義は高いと考える。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of transcriptional activation of 3-hydroxybenzoate (3-HB) degradative genes from Burkholderia multivirans ATCC17616 and Cupriavidus necator NH9 was analyzed. The results showed that the transcription of 3-HB degradative genes of both strains was activated by LysR-type regulator, MhbR, of respective strain with 3-HB and gentisic acid as inducers. Five amino acids involved in inducer recognition by MhbR(ATCC17616) were clarified. MhbR(ATCC17616) was further shown to activate transcription of 3-HB degradative genes from C necator NH9. The comparative analysis using the nucleotide sequences of the promoter regions of 3-HB genes of the two strains revealed that MhbR(ATCC17616) recognizes nucleotide sequence of the promoter regions which are distantly related with those previously known as sequences recognized by the LysR-type regulators. This result indicated that the nucleotide sequences recognized by LysR-type regulators are more diverse than previously known.

研究分野：微生物学

キーワード：転写調節 細菌 LysRタイプ転写調節因子 芳香族化合物分解 Burkholderia Cupriavidus

1. 研究開始当初の背景

細菌の代謝経路の発現調節は多くの場合、転写レベルで行われ、往々にして代謝経路の一連の酵素の遺伝子群がオペロン構造をとって、そのプロモーター領域において、1つの転写調節因子によって発現の制御を受ける。細菌の場合、基本的な転写調節単位では正の制御(転写の活性化)が行われるものが多く、その場合、誘導物質が存在すると、転写調節因子がこれを認識して転写を活性化し一連の酵素群が生産される。細菌の転写調節因子は構造上の特徴からいくつかのグループに分かれるが、LTTRは、アミノ酸合成、芳香族化合物分解、病原性関連因子産生、酸化ストレスへの応答、窒素固定、二酸化炭素固定など、多くの重要な遺伝子群の発現調節を行っており、細菌の転写調節因子としては最大のグループを構成する。近年、様々な細菌のゲノムが明らかになり、1つの細菌は、数十種から、菌株によっては200種近くの、LTTRの遺伝子を持つことが判明している。LTTRは、多くの場合、4量体を形成し、N末側のDNA結合ドメインが被制御遺伝子群のプロモーター領域内の特徴的な逆向き繰り返し配列を認識して結合し、さらに、C末側の制御ドメインが特異的な誘導物質(多くの場合、代謝経路の基質もしくは中間産物)を認識することによって、転写を活性化する(Maddocks, S. E., and Oyston, P. C. F. *Microbiology* 154, 3609-3623 (2008))。しかし、その詳細についてはほとんど明らかになっていない。すなわち、1つの細菌で100前後以上の種類があるLTTRによる被制御プロモーターの識別、ならびに転写活性化に必要な誘導物質の特異的認識がどのような機構で行われているのか?という問いが本研究課題の学術的背景である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者らが立体構造情報を蓄積しているCbnRと、誘導物質を解明しているTfdT、MhbR等を用いて、生化学的・分子生物学的解析により、プロモーターへの結合と誘導物質認識に始まる転写活性化の初期機構を明らかにすることである。

CbnRは、3-クロロ安息香酸分解菌 *Cupriavidus necator* NH9株で、中間産物として生じる3-クロロカテコールを分解する遺伝子群の発現調節を行うLTTRである(図1)。

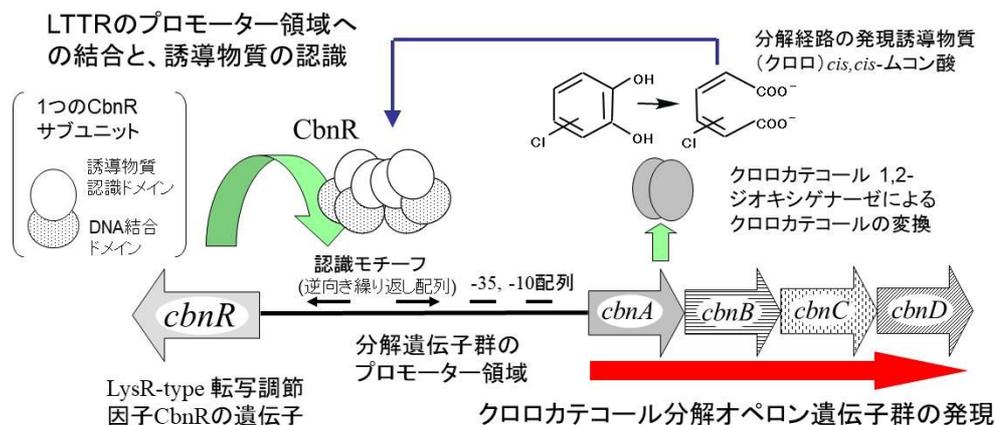


図1. LysR-type 転写調節因子 CbnR による発現調節機構

CbnRについては、全長での結晶構造、及び、そのN末端側のDNA結合ドメイン(DBD、87アミノ酸)と、被制御プロモーター領域中で最初にCbnRが認識、結合すると考えられる逆向き繰り返し配列を含むRecognition Binding Site(RBS)の25bp DNAとの複合体の結晶構造が、それぞれ得られている。本研究では、このCbnRを中心として、その立体構造情報等をもとに、近縁のLTTRであり誘導物質とする芳香族化合物の認識スペクトルが異なるTfdT、MhbRについて比較解析を進めることで、RBSへの結合と誘導物質認識に始まる転写活性化の初期機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 本研究課題以前の研究蓄積があるCbnR、TfdT(ともにクロロカテコール分解遺伝子群のLTTR)に続いて、*Burkholderia multivorans* ATCC17616株の3-ヒドロキシ安息香酸(3-HB)分解遺伝子群の転写活性化を行うLTTRであるMhbRについて、レポーター実験系を構築して、3-ヒドロキシ安息香酸等、誘導物質候補となる各種芳香族化合物の存在下で、プロモーターの転写活性化の有無、程度を調べて、誘導物質スペクトルを明らかにする。また、MhbRの発現系を構築して同タンパク質を発現、精製し、ゲルシフト実験等によりその被制御プロモーター領域との結

合を解析する。

(2) TfdT は、3-クロロ安息香酸分解菌 *Caballeronia* sp. NK8 株のクロロカテコール分解遺伝子群の転写活性化を行う LTTR である (以下、TfdT(NK8))。この TfdT(NK8)については、先にレポーター実験によって、誘導物質スペクトルを明らかにするとともに、誘導物質の 1 つである 3-クロロ安息香酸等の認識に関与するアミノ酸を既に明らかにしている。一方、TfdT は *in vitro* の実験にタンパク質として供試するための発現系を構築できておらず、本課題でこの構築を試みた。

4. 研究成果

(1) レポーター実験により解析した結果、*B. multivorans* ATCC17616 株の MhbR (以下、MhbR(Bm)) の誘導物質が、3-HB およびその分解中間産物であるゲンチジン酸(GA)であることが明らかとなった。また、この MhbR(Bm)の誘導物質認識部位について、LTTR として近縁である TfdT(NK8) の誘導物質認識部位を参考にして、アミノ酸を置換した変異体を作製してレポーター実験で解析した。その結果、Ser233Ala、Leu234Ala の各変異体は、誘導物質に対して、野生型 MhbR(Bm) とは異なる応答パターンを示した (図 2)。一方、Leu135Ala、Pro207Ala、Cys300Ala の 3 つの変異体は、野生型 MhbR(Bm)と比べて、3-HB 存在下での転写活性化能が弱くなった (図 2)。これらの結果から、この 5 か所のアミノ酸は、MhbR の誘導物質認識、もしくは転写活性化能に関与していると考えられた。本研究によって、3-HB の認識に関わる LTTR のアミノ酸が初めて明らかとなった。

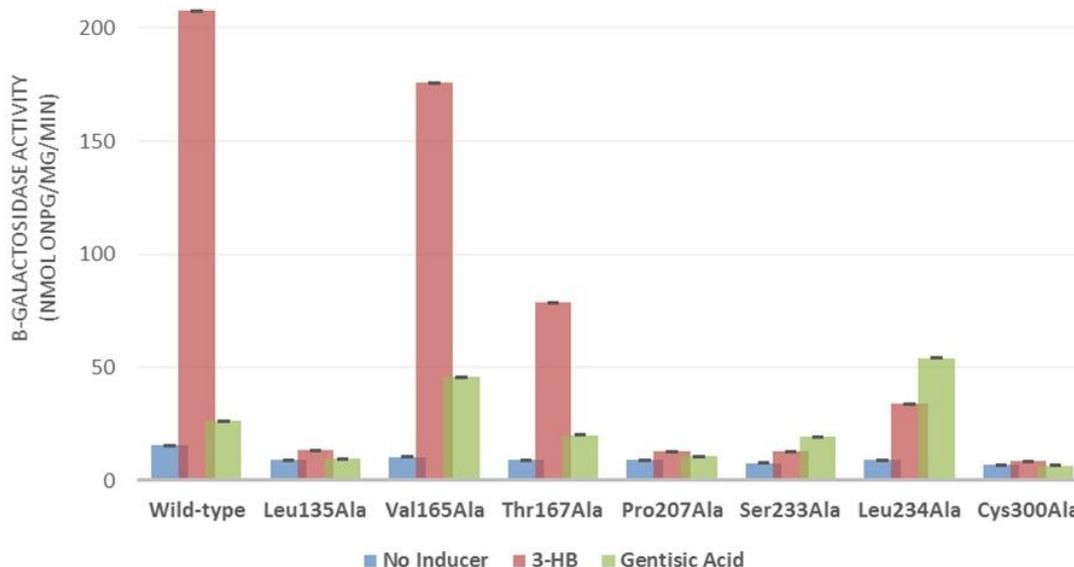


図 2. MhbR(Bm)野生型と同変異体による被制御プロモーターの転写活性化

(2) MhbR(Bm)をゲルシフト実験等の *in vitro* 実験に供試するためのタンパク質の発現、精製法について、大腸菌で発現するためのコドンの最適化や、精製に用いるカラムの検討によって改良し、より精製度を高くすることに成功した (図 3)。精製度を高めた MhbR(Bm)を供試することで、ゲルシフト実験において、対象のプロモーター領域 DNA との結合の微妙な差を検出することが可能となった。

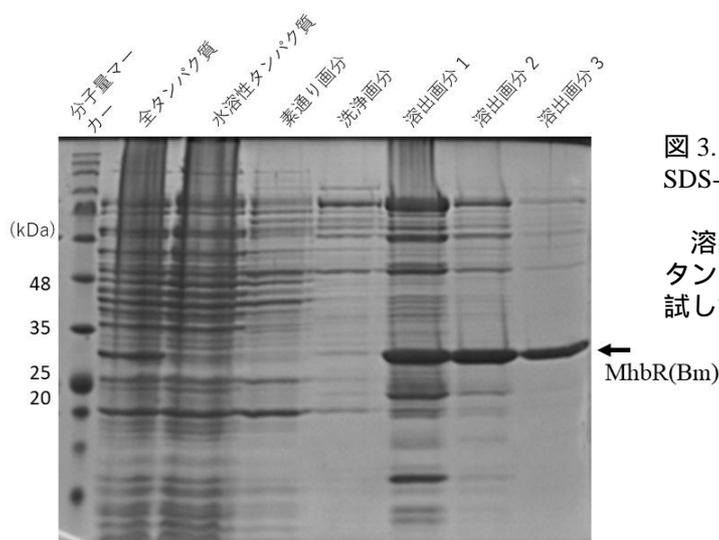


図 3. MhbR(Bm)の精製過程を示す SDS-PAGE プロファイル

溶出画分 3 で得られた MhbR(Bm) タンパク質をゲルシフト実験に供試した。

← MhbR(Bm)

(3) 本研究の進行過程で、CbnR が由来する *C. necator* NH9 株の 3-HB 分解遺伝子群の発現が、*B. multivorans* ATCC17616 株と同様に、LTR である MhbR (以下、MhbR(NH9)) によって制御されることが示唆された (MhbR(Bm)と MhbR(NH9)はアミノ酸レベルで 65%の同一性)。一方、この 2つの細菌の 3-HB 分解遺伝子群のプロモーター領域 (*B. multivorans* ATCC17616 株、*gtdA* プロモーター; *C. necator* NH9 株、*mhbD* プロモーター) においては、LTR が最初に認識するとされる、T-N11-A や G-N11-A といった塩基配列のモチーフ (N は任意の塩基) を含む逆向き繰り返し配列 (inverted repeat) が存在しないことが明らかとなった。このことは、1つの細菌が 100種類前後以上の LTR を持っており、それぞれの被制御プロモーターを特異的に認識することを考えると、その仕組みを探るうえでたいへん興味深い。さらに、MhbR(Bm)は、本来自身が制御する *gtdA* プロモーター以外に、NH9 株の *mhbD* プロモーターも、3-HB を誘導物質として制御することが明らかとなった。そのため、この両細菌の 3-HB 分解遺伝子群のプロモーター領域を用いて、精製度を高めた MhbR(Bm)を用いて、結合の解析をゲルシフト実験によって行った。まず、*gtdA* プロモーターでは、その推定した結合モチーフ (AACCATATGGAT) に変異を導入したところ、MhbR(Bm) の結合において、野生型 *gtdA* プロモーターの場合とは、複合体の立体構造が異なっていることが示唆され (図 4) さらなる解析の結果、結合力が弱くなることが示された。一方、*mhbD* プロモーター領域では、18-35 bp の領域に結合に關する塩基配列が存在することが明らかになった。これらの結果から、両プロモーター領域において、MhbR(Bm)が最初に認識する配列を、ほぼ特定することができ、LTR には典型的な結合モチーフ以外の結合配列が存在することが明らかとなった。この結果は、LTR が認識する塩基配列に、従来考えられていたよりも多様性があることを示すものであり、被制御遺伝子プロモーターを特異的に認識する機構の解明に大きく貢献するものである。

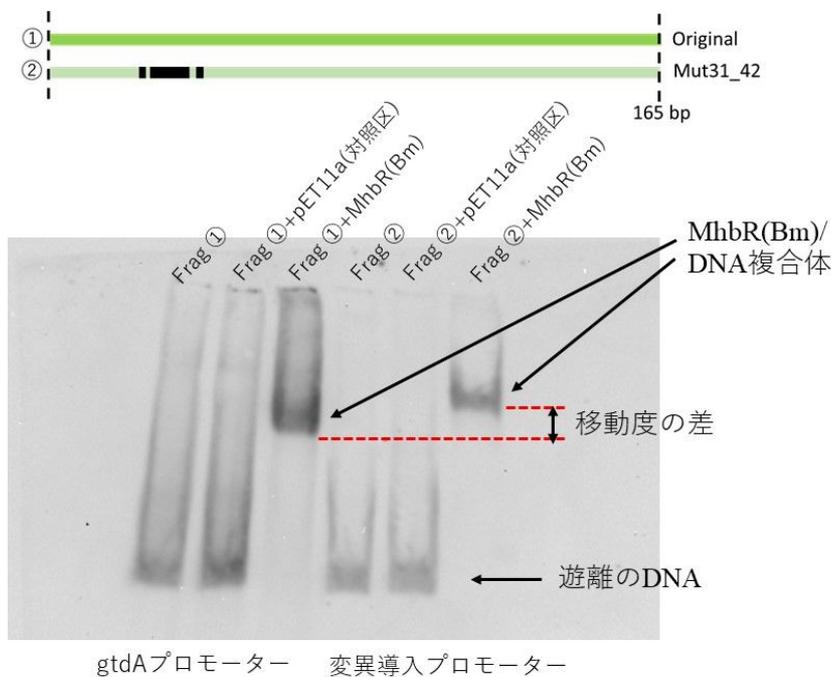


図 4. *gtdA* プロモーターと同変異導入プロモーター(上)と両 DNA 断片への MhbR(Bm)の結合(下)

gtdA プロモーター領域 DNA (165bp、図上) と、同領域に変異を導入したプロモーター DNA (図上、変異導入位置を黒線で示す) への、MhbR(Bm)の結合を解析した結果、変異導入プロモーターでは、MhbR(Bm)と形成する複合体の移動度が、元の配列の場合とは異なることが判明し、複合体の立体構造が異なることが示唆された。

(4) TfdT(NK8)について、大腸菌発現系を構築するために、コドンの最適化を行ったうえで、発現ベクター pET11a にクローニング、大腸菌 BL21(DE3)株に形質転換して、各種条件下での発現を検討した。その結果、従来、大腸菌では全く発現させることができなかった TfdT(NK8)について発現が見られるようになったものの、タンパク質精製の際には不溶性画分に含まれてしまうことが判明した。この不溶性画分から、尿素等を用いる方法により、TfdT(NK8)を水溶性画分として回収することまで成功したものの、被制御プロモーター DNA への結合が見られず、課題終了時まで適用した方法では、タンパク質として正しくリフォールディングされていないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Rhithu Kotoky, Naoto Ogawa, Piyush Pandey	4. 巻 262
2. 論文標題 The structure-function relationship of bacterial transcriptional regulators as a target for enhanced biodegradation of aromatic hydrocarbons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiological Research	6. 最初と最後の頁 127087 ~ 127087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micres.2022.127087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ryota Moriuchi, Hideo Dohra, Yu Kanesaki, Naoto Ogawa	4. 巻 85
2. 論文標題 Transcriptome differences between <i>Cupriavidus necator</i> NH9 grown with 3-chlorobenzoate and that grown with benzoate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1546-1561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kimiko Yamamoto-Tamura, Ryota Moriuchi, Naoto Ogawa	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of <i>Caballeronia</i> sp. Strain NK8 (MAFF311271), a Chlorobenzoate-Degrading Bacterium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00416-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ifat Ara, Ryota Moriuchi, Hideo Dohra, Kazuhide Kimbara, Naoto Ogawa, Masaki Shintani	4. 巻 11
2. 論文標題 Isolation and Genomic Analysis of 3-Chlorobenzoate-Degrading Bacteria from Soil	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms11071684	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣怜奈、Noor Febryani、小川直人
2. 発表標題 環境細菌の3-ヒドロキシ安息香酸分解遺伝子群のLysRタイプ転写調節因子の解析
3. 学会等名 第23回静岡ライフサイエンスシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 良知拓実、長瀬里沙、宮崎剛亜、千田俊哉、小川直人
2. 発表標題 3-クロロ安息香酸分解細菌の分解遺伝子群発現に関わる転写関連タンパク質の精製
3. 学会等名 第23回静岡ライフサイエンスシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 島田結衣、海野聖貴、本多優衣、小川直人
2. 発表標題 3-クロロ安息香酸分解細菌Cupriavidus necator NH9株のRNAポリメラーゼ精製用菌株の作製
3. 学会等名 第23回静岡ライフサイエンスシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Noor Febryani, Naoto Ogawa
2. 発表標題 Transcriptional regulation of the degradation genes of 3-hydroxybenzoate of Burkholderia multivorans ATCC17616
3. 学会等名 日本土壤微生物学会2021年度鹿児島大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣怜奈、Noor Febryani、宮丸真央、小川直人
2. 発表標題 環境細菌の3-ヒドロキシ安息香酸分解遺伝子群のLysR-type転写調節因子MhbRの解析
3. 学会等名 日本土壤微生物学会2023年度千葉大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関