

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780068

研究課題名(和文)ロドコッカス属細菌の芳香族化合物代謝に必須な新規転写制御ネットワークの解明

研究課題名(英文)Characterization of novel regulatory mechanism for the catabolic genes of aromatic compound degradation

研究代表者

笠井 大輔(KASAI, DAISUKE)

長岡技術科学大学・工学部・助教

研究者番号：80452085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：Rhodococcus属放線菌の二成分制御系が関与する芳香族化合物代謝制御ネットワークの解明を目的として、本研究ではR. jostii RHA1株のビフェニル(BP)代謝に関与する二成分制御システムが制御されている転写制御因子(TsdR)の機能解析を行った。TsdRが関与するBP誘導性遺伝子を特定するために、BP生育時におけるtsdR破壊株の遺伝子発現プロファイルを解析した結果、tsdR制御下でBP生育に関与すると考えられる複数の遺伝子を特定した。さらに精製TsdRを用いたin vitroにおける結合解析からTsdRが結合するプロモーター領域を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to identify the regulatory mechanism for the transcription of biphenyl (BP) catabolic pathway genes in Rhodococcus jostii RHA1, an IclR-type transcriptional regulator gene, tsdR, whose transcription is controlled by two-component regulatory system of BP catabolism, was characterized. The results of the transcriptome analysis of tsdR deletion mutant grown with or without BP suggesting that the TsdR-regulated genes are involved in the BP catabolism. Electrophoretic mobility shift assays using purified TsdR and the promoter regions of 2,6-dihydroxybenzoate (26DHB) catabolic genes containing tsdB and tsdT revealed that the TsdR binds to the tsd promoter regions and the bindings are inhibited by the addition of 26DHB. These results indicate that TsdR acts as a repressor for the transcription of tsd genes and 26DHB interacts with TsdR as an effector molecule.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：ビフェニル代謝系 二成分制御系 IclR型転写制御因子 2,6-ジヒドロキシ安息香酸

## 1. 研究開始当初の背景

ビフェニル (BP)、ポリ塩化 BP (PCB)、トルエン等の疎水性芳香族化合物の分解に関与する酵素遺伝子の転写制御は、現在までにグラム陰性細菌で主に研究され、LysR や IclR、AraC/XylS 型転写制御因子等の制御機構が明らかにされている。その一方でグラム陽性細菌の芳香族化合物代謝に関しては、転写制御機構に至るまでの詳細な解析例は殆どなく、その知見は乏しい。さらに芳香族化合物代謝に関与する転写制御因子において二成分制御系が関与する例も殆ど存在しない。以上のことから、*Rhodococcus* 属放線菌の二成分制御系が関与する新規転写制御ネットワークの解明を目指す本研究は、グラム陽性菌において知見の乏しい転写制御機構の解明と、解析例の少ない芳香族化合物代謝に関わる二成分制御機構の新たな機能の解明に大きく貢献するものである。

*R. jostii* RHA1 株は BP/PCB をはじめエチルベンゼン、トルエン等の疎水性芳香族化合物を資化する。我々は、RHA1 株の疎水性芳香族化合物代謝に関わる *bph* 遺伝子群をはじめとした複数の酵素遺伝子群の転写が、センサーキナーゼ (BphS) とレスポンスレギュレーター (BphT) からなる二成分制御系により、多様な芳香族化合物に応答し制御されることを世界に先駆けて明らかにした。さらに、これら遺伝子群の転写が BphST を介したグルコース異化抑制を受けることを示唆する結果を示した。その一方で RHA1 株は、天然由来の芳香族酸である 2,6-ジヒドロキシ安息香酸 (26DHB) の代謝に関与する *tsd* 遺伝子群を保持しており、それらの転写は IclR 型転写制御因子 (TsdR) により負に制御されることを明らかにしている。また *tsdR* の破壊は、GRA 生育能を向上させ、安息香酸やフタル酸での生育には影響しないのに対し、BP での生育能欠損、エチルベンゼンやトルエンでの生育の低下をもたらした。一方、*tsdR* の高発現により BP 生育能が向上することから、*tsdR* は RHA1 株の BP を含む疎水性芳香族化合物での生育に不可欠であることが示された。さらに DNA マイクロアレイ解析及び BphT 抗体を用いた ChIP-chip 解析から、BP 生育時に *tsdR* の転写が誘導されること、BphT が *tsdR* の遺伝子領域近傍に直接結合することを見出した。以上の結果から、*tsdR* の転写は、BP 生育時に BphST により制御されることが示唆された。その一方で BP やエチルベンゼンでの生育における TsdR の役割や、BphST と TsdR による転写制御ネットワークに関する知見は得られていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では *Rhodococcus* 属放線菌の BP 代謝において BphST と TsdR が関与する新規転写制御ネットワークを解明することを目指して、1) BphST の存在下、非存在下における

*tsdR* の転写レベルを評価し、*tsdR* の転写制御への BphST の関与を明らかにすることを目的とした。さらに 2) BP 生育における TsdR の役割を明らかにするために、*tsdR* の存在下、非存在下での遺伝子発現プロファイルを明確にし、TsdR により制御される遺伝子を特定するとともに、TsdR の DNA 結合解析を行い、TsdR の結合コンセンサス配列の推定と TsdR が転写制御に直接関与する遺伝子を特定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

## 遺伝子破壊株の作製

RHA1 株を LBP 培地にて 2 日間培養した。同時に遺伝子破壊用プラスミドを保持する *E. coli* S17-1 株を LB 培地にて一晚培養し、それぞれの寒天培地に 2 ml の LBP 液体培地を加え、菌体を回収し、それぞれを 750  $\mu$ l ずつ混合、集菌した。1 ml の LBP 液体培地で再懸濁後、200  $\mu$ l を LBP 寒天培地に塗布し一晚培養した。コロニーが出現した寒天培地に LBP 液体培地を加え、菌体を回収後、100  $\mu$ l を抗生物質を添加した LBP 寒天培地に塗布し 3 日間培養した。得られたシングルクロスオーバー株をさらにショ糖を含む寒天培地に接種し、生育したショ糖耐性株をダブルクロスオーバー候補株として単離した。

## マイクロアレイ解析

BP の存在下、非存在下で培養した各株の培養菌体から調製した 6  $\mu$ g の RNA に 1.5  $\mu$ g の random 6-mer、6  $\mu$ l の 5 $\times$  RT buffer、4.83  $\mu$ l の dNTP、1.5  $\mu$ l RNase inhibitor、1.5  $\mu$ l ReverTra Ace を添加し cDNA 合成を行った。得られた cDNA を精製後、DMSO に溶解した Cy3 および Cy5 (Amersham) を加え、Aminoallyl 基へのラベリングを行った。ラベルした cDNA プローブを濃縮し、95 $^{\circ}$ C、5 分間の処理により変性させた後、RHA1 株の DNA アレイとのハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後は、GenePix (Axon Instruments) を用いて蛍光強度を測定後、GeneSpring 7.3 を用いた統計処理により遺伝子の発現プロファイルを解析した。

*E. coli* を用いた *tsdR* の発現と精製

5'末端に NdeI 部位を付加した *tsdR* を含む DNA 断片を pET-16b に挿入して、10 $\times$  His タグを付加した *tsdR* 発現プラスミドを作製した。得られたプラスミドを有する *E. coli* BL21(DE3) 株を対数増殖期中期まで培養した後、終濃度 1 mM の isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加してさらに 2 時間培養した。培養液を集菌後、50 mM Tris-HCl (pH 7.5) に懸濁し、フレンチプレスを用いて菌体を破碎した。26,000  $\times$ g、20 分の遠心分離で得た上清をクルード His-Tag 融合 TsdR (ht-TsdR) とした。あらかじめ Buffer A (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 40

mM imidazole, pH 7.5)で平衡化した Ni アフィニティークラムにクルード ht-TsdR を添加し、穏やかに担体と転倒混和した後、素通り画分を溶出させた。その後、Buffer B (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.5)を添加して、溶出画分を 500  $\mu$ l ずつ回収した後、各画分の精製度を SDS-PAGE により分析した。十分に精製された画分を混合した後、限外濾過膜により 1 mg/ml まで濃縮し、ゲルシフト解析に使用した。

#### ゲルシフト解析

ゲルシフト解析は、DIG gel shift kit 2nd generation (Roche)を使用して付属の説明書に従って行った。*tsdB* および *tsdT* の各プロモーター領域を含む DNA 断片 (それぞれ 155 bp および 250 bp) を PCR により増幅した後、3'末端をジゴキシンゲン標識した。得られた 1 nM の DIG 標識 DNA プローブ、50 ng の精製 ht-TsdR、1.0  $\mu$ g の poly[d(I-C)]、0.1  $\mu$ g の poly-L-lysine、1.0 mM EDTA、10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1.0 mM dithiothreitol、0.2% (w/v) Tween 20、30 mM KCl、および 20 mM HEPES (pH 7.6)を含む 20  $\mu$ l の反応系で 20°C にて 20 分反応させた。

反応後のサンプルの分離には非変性ポリアクリルアミドゲル (1 枚あたり 4.5 ml の滅菌水、650  $\mu$ l の 5 $\times$  TBE buffer [445 mM Tris、445 mM ホウ酸、10 mM EDTA]、1.3 ml の Long Ranger 50% gel solution [Lonza, Ltd]、30  $\mu$ l の 10% ammonium peroxodisulfate、5  $\mu$ l の TEMED)を用いた。電気泳動は 0.5 $\times$  TBE buffer を用いて、4°C にて 80 V 定電圧で 180 分を行った。泳動後、DNA をエレクトロブロットング法によりメンブレンへと転写した後、UV 照射によるクロスリンクを行った。シグナルの検出には CSPD を基質として用いて、化学発光検出装置(LumiVision PRO image analyzer)により基質の化学発光を検出した。

#### 4. 研究成果

強力 PCB 分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 株が有する二成分制御タンパク質 BphST が IclR 型転写制御因子をコードする *tsdR* の転写に関与するかを明らかにするために、二成分制御系のレスポンスレギュレーターをコードする *bphT* を相同組換えにより破壊した。また TsdR により制御される遺伝子を特定するために、相同組換えにより *tsdR* 破壊株を構築した。野生株と *tsdR* 破壊株の BP 生育時における遺伝子発現プロファイルの違いを明らかにするために、BP 存在下または非存在下で培養した野生株と *tsdR* 破壊株の total RHA を用いたマイクロアレイ解析を行った。その結果、*tsdR* 破壊株を BP 存在下で生育させた場合、26DHB 代謝に関与する *tsdBACD* 遺伝子群の転写が活性化されることが明らかとなった。その一方で、野生株においては BP 存在下での *tsdBACD* 遺伝子群の転写活性

化は観察されなかった。上記の結果に対して、26DHB で生育させた際には、*tsdR* 破壊株においても *tsdBACD* 遺伝子群の有意な転写活性化は認められなかった。以上の結果から、*tsdR* の非存在下では、BP に応答して *tsdBACD* 遺伝子群の転写活性化に関与する未知の転写制御因子が存在することが示唆された。

また *tsdR* 破壊株では、野生株の BP 生育時において誘導されるいくつかの遺伝子の誘導性欠如が認められた。特に BP の代謝中間体である安息香酸の取り込みに関与する MFS 型トランスポーター遺伝子 (ro02388)や、Fe の取り込みに関与するシデロフォアを合成すると考えられる non-ribosomal peptide synthetase 遺伝子 (ro00141 および ro06664)に関しては、定量的リアルタイム PCR を用いた詳細な転写誘導性評価においても誘導性の明らかな欠如が認められた (表 1)。さらに ro02388 破壊株を作製し、BP での生育能を評価した結果、野生株と比較して生育能が低下することが示された。以上の結果から、*tsdR* 破壊株におけるこれら遺伝子の誘導性欠如が BP やエチルベンゼンでの生育能低下に関与する可能性が考えられた。

表 1. 野生株及び *tsdR* 破壊株での BP 誘導性

	ro02388	ro00141	ro06664
RHA1	4.9 $\pm$ 1.1	4.3 $\pm$ 0.7	3.3 $\pm$ 1.1
$\Delta$ <i>tsdR</i>	0.94 $\pm$ 0.46	0.65 $\pm$ 0.44	0.29 $\pm$ 0.23

BP 非存在下 (コハク酸を炭素源とした場合)の転写量を 1 とした際の相対値を示した。

TsdR の機能解析を行うために、*tsdR* の発現プラスミドを構築し、*E. coli* BL21(DE3)株を用いて T7 プロモーターの制御下で His タグ融合 *tsdR* (ht-TsdR)を発現させた。得られた *E. coli* の細胞抽出液を SDS-PAGE で分析した結果、ht-TsdR のアミノ酸配列から算出される分子量 (31,068 Da)と一致するサイズにタンパク質の生産が確認された。さらに細胞抽出液を Ni アフィニティークロマトグラフィーにより分画した結果、約 31 kDa のタンパク質がほぼ単一に精製されることが示された。以上の結果から、*E. coli* により生産された ht-TsdR の精製タンパク質を得ることに成功したと考えられる。

TsdR により直接制御される遺伝子を見出すため、精製 ht-TsdR と TsdR により制御されることが示唆されている *tsdB* および *tsdT* の各プロモーター領域を用いたゲルシフト解析を行った。その結果、*tsdB* および *tsdT* の各プロモーター領域に TsdR が結合することが明らかとなった (図 1)。さらに各プロモーター領域への TsdR の結合は、基質である 26DHB の存在下で解除されたことから、TsdR は 26DHB 非存在下では各プロモーター領域に結合することで転写を抑制し、26DHB 存在下において、その結合が解除される負の転写制御因子をコードすることが強く示唆され

