

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450113

研究課題名(和文)バクテリア光受容体の多様性とその機能解明

研究課題名(英文)Elucidation of diversity and function of bacterial photosensor

研究代表者

高野 英晃 (TAKANO, Hideaki)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：50385994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：LitRは光合成能をもたない細菌群の多くが有している光センサーである。ビタミンB12をアンテナ分子として利用するClass I LitRタンパク質の光感知ドメインの立体構造を決定することに成功した。また、Class II LitRは青色光受容体LOVタンパク質を光センサーとして利用することが判明した。さらに、LitRとは別のファミリーに属するTetR型およびMarR型レギュレーターが光応答性転写調節タンパク質として機能することを遺伝学的に証明した。本研究の進展により、非光合成細菌が有する新たな光感知メカニズムの分子機構およびその多様性の一端が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：LitR family serves as a transcriptional regulator with photosensor function in a diverged non-phototrophic bacteria. We determined a three dimensional structure of the photosensor domain of Class I LitR. We also demonstrated the biochemical properties of Class II LitR serving as a light-dependent repressor. We also revealed that TetR and MerR type regulator are involved in the light-dependent regulation in non-phototrophic bacteria. Our studies showed the novel molecular mechanism of photo-sensing mechanisms and the diversity in non-phototrophic bacteria.

研究分野：応用微生物学

キーワード：光センサー LitR カロテノイド 非光合成細菌

1. 研究開始当初の背景

環境中に豊富な刺激である光に応答する制御システムの存在は、植物や真核微生物などではよく研究されている一方、光合成を行わない一般細菌が光に応答する現象やその分子機構に関する知見は乏しいのが現状であった。我々はグラム陽性細菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)とグラム陰性細菌 *Thermus thermophilus* のカロテノイド生産が光によって誘発される現象に着目して遺伝学的な解析を進め、カロテノイド生合成遺伝子クラスターに隣接してコードされる MerR 型転写調節タンパク質 LitR が転写の光誘導に中心的な役割を果たすことを明らかにしてきた。LitR 相同遺伝子の分布は多様な環境に生息する細菌に認められたことから、細菌にも光応答メカニズムが広く備わっていることが予想された。

LitR の光センサー機能は、*Thermus thermophilus* や *Bacillus megaterium* が保有する LitR をモデルとして取り上げて詳細な分析をすすめ、これまでに、LitR にリガンドとして結合するビタミン B₁₂ (コバラミン) が光アンテナとして機能すること、それが青色光を吸収すると暗条件でリプレッサーとして機能していた LitR の四量体構造に変化が誘起され対象遺伝子の転写が誘導されることを明らかにした。類似の機構は、粘液細菌 *Myxococcus xanthus* を研究対象とするグループによっても報告されており、光との関係性があまり知られていなかった一般細菌の多くにも、LitR を介した光センシング機構が備わっていることが明らかになった。

ごく最近、我々は新たな光受容体の候補遺伝子を見出した。すなわち、MarR 型レギュレーターがアミノ酸生産菌 *C. glutamicum* が示すカロテノイド生合成遺伝子の光誘導に関与すること、TetR 型レギュレーターがグラム陰性細菌 *Chromobacterium violaceum* の *Pseudomonas* で見つかった光誘導性遺伝子群のオルソログの光応答の中心的なレギュレーターであることが示唆されている。両ファミリーの転写調節活性はそれに作用する低分子化合物に依存することが知られており、未同定の光アンテナ分子がその機能を担うことが予想されている。

我々独自の研究は、一般細菌に普遍的な新しい細胞応答メカニズムの存在をあきらかにし、普遍的な環境因子である“光”によって誘導される機能が細菌全般に広く潜在していることを示している。

2. 研究の目的

以下の4つの計画を実施し、光シグナルを転写レベルに変換する分子メカニズムの解明を主な目的とした。

(1) ビタミン B₁₂ を光アンテナに利用する Class I LitR の立体構造決定 *T. thermophilus* 由来の LitR を対象に Dark state と Light state の X 線結晶構造解析を実施し、バクテリアにユニークな光センサーの構造と機能の相関を明らかにする。

(2) *Pseudomonas* 属細菌に存在する Class II LitR を介した新しい光センシング機構の解明 Class II LitR と LOV 型光受容体を介した新しい光受容メカニズムを生化学実験により証明する。

(3) TetR 型および MarR 型レギュレーターを介した光応答メカニズム TetR や MarR タイプの光センサーにおいて光受容機能を司る低分子化合物の同定および解析を通じて、新規な光センサーとしての証明をする。

(4) 光によって誘発される新規な微生物機能の探索 光が誘発する非光合成細菌の機能は十分に研究されていない。ゲノム情報を利用した調査および自然分離株の表現型を指標とした探索を実施し、ユニークな微生物現象・機能の発見をする。

3. 研究の方法

計画(1)~(3)については、大腸菌で調製した組み換えタンパク質を用いた機能評価を行った。用いた手法は DNA 結合タンパク質の解析で一般的に用いられるゲルシフトアッセイ、ピアコア解析、RT-PCR による遺伝子発現解析、相同組み換えを利用した遺伝子破壊などである。一方、計画(4)においては、自然分離株や公的機関分譲株を明・暗条件下において培養し、その表現型を観察した。また、DNA マクロアレイ解析を実施し、光誘導性遺伝子を抽出した。

4. 研究成果

(1) ビタミン B₁₂ を光アンテナに利用する Class I LitR の立体構造決定 LitR の光感知ドメインとヒドロキシ B₁₂ 複合体の立体構造の決定に成功した(PDB: 3WHP)。立体構造より B₁₂ は His177 および His132 と相互作用することが予想された。変異解析を行ったところ、His177 と His132 はどちらも B₁₂ との相互作用に関与することが明らかになった。また、His132 変異は LitR タンパク質に DNA 結合能に光耐性を付与し、それは *in vivo* 変異においても支持された。このことから His132 は LitR の機能に関与する新しい His 残基であることが判明した(論文執筆中)。

また、*T. thermophilus* における LitR レギュロンを明らかにするために、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、*litR* の周辺領域にコードされている遺伝子群の多くが LitR 依存的な光誘導性遺伝子であることが判明した。さらに、CRP ファミリーの LdrP がマスターレギュレーターとして働くことを生化学的に証明した(発表論文5)。

(2) *Pseudomonas* 属細菌に存在する Class II LitR を介した新しい光センシング機構の解明 Class II LitR と LOV の相互作用を介した光制御機構の存在が遺伝学的な解析結果より予想されている(論文執筆中)。そこで、Class II LitR と LOV の組み換えタンパク質を調製し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより相互作用解析を実施した。それぞれ単独の場合には多量体と予想される位置に溶出された。次に、両者を混合し、ゲルろ過クロマトグラフィーに供した結果、暗条件では複合体は検出されなかった。その一方で、明条件下において複合体が検出された。本結果より、Class II LitR と LOV は光依存的に相互作用することが予想された。現在、相互作用に関する詳細なデータを取得している(論文執筆中)。

(3) TetR 型および MarR 型レギュレーを介した光応答メカニズム 紫色素生産菌 *C. violaceum* において見出した光誘導性遺伝子オペロンに隣接してコードされている TetR 型レギュレーターの遺伝子破壊株を作製し、周辺遺伝子の発現レベルを調べた。その結果、光誘導性遺伝子オペロンの転写が暗条件でも誘導されていた。つまり野生株における光誘導性転写は、本レギュレーター破壊によって構成的な転写となった。このことより、本レギュレーターの基本機能は暗条件において働くりプレッサーであり、その機能は光照射によって抑制されることが予想された。そこで、大腸菌で大量発現させ、精製した組み換えタンパク質を用いたゲルシフトアッセイを行った。予想通り標的プロモーターに特異的に結合したが、光依存的な結合は確認されなかった。このことから、未同定のアンテナ分子を要求することが予想された。

アミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* のカロテノイド生産の光誘導に関わる LimR は、MarR ファミリーのレギュレーターである。これまでに遺伝子破壊実験によりリプレッサーとして機能することが推測されている。しかし、これまでにアンテナ分子の同定には至っていない。そこで、組み換え LimR タンパク質と既知アンテナ分子の相互作用をカロリメトリーで測定したが、相互作用は確認されなかった。このことから、LimR が要求するアンテナ分子はあたらしいタイプの分子であることが予想された。

(4) 光によって誘発される新規な微生物機能の探索 光依存的な色素生産を示す細菌を探索した結果、酢酸菌 *Acidomonas* が細胞内に生産する黄色色素が光照射によって顕著に誘導されることを見出した。吸収スペクトル解析よりカロテノイドであることが示唆された。また、酢酸菌の増殖が光照射によって著しく阻害される現象を見出した。増殖阻害の原因は溶原性ファージの誘発であるという仮説のもと、透過型電子顕微鏡観察を実際したところ、実際にファージ様粒子が検出さ

れた。現在、溶原性ファージのゲノム領域の同定を進めている。

ゴム分解細菌 *Gordonia isoprenivorans* のカロテノイド生産が光で誘導されるという過去の報告に基づいて、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、カロテノイド合成遺伝子や光回復酵素遺伝子の転写が著しく光照射によって誘導されることを見出した。また、RNA ポリメラーゼシグマ因子の一種が光によって顕著に誘導され、中心的なレギュレーターであることが予想された。現在遺伝子破壊による機能と役割の解析を進めている。

土壌細菌 *Pseudomonas putida* において、液体培養時に特異的に認められる増殖期依存的なマイクロコロニー形成現象を見出した。本現象は対数増殖期の初期に特異的に観察され、また青色光照射によってその形成は抑制された。マイクロコロニー形成と離散を誘導する因子の探索したところ、培養液上清中にマイクロコロニー離散因子の活性を見出した。本因子は熱に不安定であったことから、タンパク質であると予想された。そこで、離散活性を指標とした離散因子の精製を実施したところ、鞭毛タンパク質の一種 FliC であることが判明した。fliC 遺伝子破壊株では解離活性が検出されなかったことから、また遺伝学的相補株が野生株と同等の離散活性を有していたことから、FliC がマイクロコロニー離散因子であることが判明した。

サーコスポリンに代表される光トキシンは光照射によって活性酸素を生じることで細胞毒性を示す化合物である。光トキシンの一種である赤色色素ローズベンガルを用いて、グラム陽性・陰性細菌の光トキシシン耐性を調査したところ、*Erwinia* と *Pseudomonas* 属細菌など植物共生細菌が耐性を示すことが判明した。また、*Erwinia* 属に類縁な大腸菌モデル株も耐性能を有していた。大腸菌の遺伝子破壊株コレクションである Keio ライブラリーを用いたスクリーニングによって、大腸菌の光トキシシン耐性に関与する候補遺伝子を 4 つ見出すことに成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1) H. Takano, The regulatory mechanism underlying light-inducible production of carotenoids in nonphototrophic bacteria, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2016, DOI:10.1080/09168451.2016.1156478, 査読有

2) H. Takano, T. Nishiyama, S. Amano, T. Beppu, M. Kobayashi, K. Ueda, *Streptomyces* metabolites in divergent microbial interactions, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43/2-3,

143-148, 2016, DOI:10.1007/s10295-015-1680-z, 査読有

3) H. Takano, K. Mise, K. Hagiwara, N. Hirata, S. Watanabe, M. Toriyabe, H. Shiratori-Takano, K. Ueda, Role and Function of LitR, an Adenosyl B12-Bound Light-Sensitive Regulator of *Bacillus megaterium* QM B1551, in Regulation of Carotenoid Production, *Journal of Bacteriology* 197/ 14, 2301-2315, 2015, DOI:10.1128/JB.02528-14, 査読有

4) H. Takano, K. Hagiwara, and K. Ueda, Fundamental role of cobalamin biosynthesis in the developmental growth of *Streptomyces coelicolor* A3(2) *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99/ 5, 2329-2337, 2015/03, DOI:10.1007/s00253-014-6325-z, 査読有

5) H. Takano, Y. Agari, K. Hagiwara, R. Watanabe, R. Yamazaki, T. Beppu, A. Shinkai, and K. Ueda, LdrP, a CRP/FNR family transcriptional regulator serves as a positive regulator for the light-inducible gene cluster in a megaplasmid of *Thermus thermophilus*, *Microbiology*, 160/ 12, 2650-2660, 2014, DOI:10.1099/mic.0.082263-0, 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

1) 土田 大暁、鈴木 誉士、上田 賢志、高野 英晃、*Pseudomonas* 属細菌の細胞離散に関与する因子の同定、日本農芸化学会 2016 年度大会 (2016/3/29、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市))

2) 角 悟、上田 賢志、高野 英晃、Class III LitR を有する *Burkholderia* 属細菌の光応答制御メカニズムの解析、第 10 回日本ゲノム微生物学会年会 (2016/3/4、東京工業大学・大岡山 (東京都・目黒区))

3) 高野英晃、(受賞講演) 一般細菌が示す多様な環境応答の分子メカニズムに関する研究、2015 年度第 2 回日本農芸化学会関東支部例会 (2015/12/12、東京大学 (東京都・文京区))

4) 見世 光、丸山 貴史、萩原 健太、上田 賢志、高野 英晃、光センサー型転写調節蛋白質 LitR の機能に関するアミノ酸残基の同定、第 38 回日本分子生物学会年会 (2015/12/1、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市))

5) 高野 英晃、(受賞講演) 微生物機能を誘発する環境因子群とその作用機構に関する研究、第 14 回日本農学進歩賞受賞講演会 (2015/11/27、東京大学 (東京都・文京区))

6) 小林暢、上田賢志、高野英晃、*Pseudomonas* 属細菌における青色光感知メカニズムの解析、第 14 回微生物研究会 (2015/10/31、明治大学生田キャンパス (神奈川県・川崎市))

7) H. Takano, K. Mise, K. Hagiwara, N. Hirata, and K. Ueda, LitR, a MarR-family transcriptional regulator of *Bacillus megaterium*: its role and function in the light-inducible carotenoid production, ASM2015(115th General Meeting of the American Society for Microbiology) (2015/06/01, New Orleans Ernest N. Morial Co-vention Center (米国・ルイジアナ州・ニューオリンズ))

8) 角 悟、上田賢志、高野英晃、*Burkholderia multivorans* における光誘導的な遺伝子発現に関わる ECF 型シグマ因子の役割、2015 年度日本農芸化学会大会 (2015/03/27、岡山大学津島キャンパス (岡山県・岡山市))

9) 見世 光、丸山貴史、萩原健太、上田賢志、高野英晃、光センサー型転写調節蛋白質 LitR の機能に関するアミノ酸残基の同定とその立体構造の決定、2015 年度日本農芸化学会大会 (2015/03/27、岡山大学津島キャンパス (岡山県・岡山市))

10) 高野英晃、(受賞講演) 一般細菌が示す多様な環境応答の分子メカニズムに関する研究、2015 年度日本農芸化学会大会 (2015/03/26、岡山大学津島キャンパス (岡山県・岡山市))

11) 松木哲郎、伊藤優佑、渡邊恵利花、上田賢志、高野英晃、アミノ酸生産菌から見出した MarR 型光応答性転写調節蛋白質、第 9 回日本ゲノム微生物学会年会 (2015/03/07、神戸大学神大会館 (兵庫県・神戸市))

12) H. Takano, T. Matsuki, K. Mise, T. Kawamura, Y. Ito, E. Watanabe, S. Watanabe, T. Beppu, and K. Ueda, LimR, a MarR-family transcriptional regulator of *Corynebacterium glutamicum*: its role and function in the light-inducible carotenoid production, XVII. International symposium on the Biology of Actinomycetes (2014/10/09, Pine Bay Holiday Resort (トルコ・クシャダス))

13)松木哲郎、伊藤優佑、渡邊恵利花、上田賢志、高野英晃、*Corynebacterium glutamicum* から見出した新規な光応答性転写調節タンパク質の解析、2014年度日本農芸化学会大会(2014/03/28、明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市))

14)角悟、上田賢志、高野英晃、グラム陰性細菌が有する新規な光応答転写調節タンパク質の探索とその解析、2014年度日本農芸化学会大会(2014/03/28、明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市))

15)見世光、萩原健太、平田直哉、上田賢志、高野英晃、*Bacillus megaterium* QM B1551株の光誘導性カロテノイド生産機構の解明、2014年度日本農芸化学会大会(2014/03/28、明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市))

16)高野英晃、見世光、上田賢志、*B. megaterium* の光誘導性カロテノイド生産機構の解明、第8回日本ゲノム微生物学会年会(2014/03/09、東京農業大学世田谷キャンパス(東京都・世田谷区))

17)H. Takano, K. Mise, K. Hagiwara, N. Hirata, K. Ueda、LitR/CarH family, a light-sensitive AdoB12-photoreceptor widely distributed in non-photosynthetic bacteria、第36回日本分子生物学会年会(2013/12/03、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市))

18)高野英晃、松木哲郎、伊藤優佑、渡邊恵利花、上田賢志、*Corynebacterium glutamicum* の光依存的なカロテノイド生産制御機構の解析、第28回日本放線菌学会大会(2013/09/06、メルパルク広島(広島県・広島市))

〔その他〕

(1)ホームページ

日本大学教員プロフィール

<http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/65/0006452/profile.html>

日本大学生物資源科学部応用生物科学科生命工学研究室

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~ueda/lab/>

(2)受賞歴

2016年3月日本大学生物資源科学部学部長賞

2015年11月農学会 日本農学進歩賞

2015年3月日本農芸化学会 農芸化学奨励賞

6. 研究組織

(1)研究代表者

高野 英晃 (TAKANO, Hideaki)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：50385994

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし