

平成21年5月21日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19614011

研究課題名（和文） 新しい光受容体 LitR の機能

研究課題名（英文） Function of LitR, a novel photoreceptor

研究代表者

高野英晃 (TAKANO HIDEAKI)

日本大学・生物資源科学部・助手

研究者番号：50385994

研究成果の概要：

光合成を行わない細菌にも光に応答して遺伝子発現をするシステムが存在することを発見し、そこに中心的に関わる蛋白質 LitR の機能と役割に関する研究を複数のモデル細菌を用いて分子遺伝学的研究を推進した。その結果、高度好熱菌 *Thermus* ならびに環境中で広く重要な役割を果たすグラム陰性菌 *Pseudomonas* においても LitR による光依存的な転写制御が認められ、またそれが多様な遺伝子群をコントロールしていることが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：LitR；光応答；転写制御；コバラミン；MerR ファミリー；*Thermus thermophilus*；*Pseudomonas putida*；*Streptomyces coelicolor*

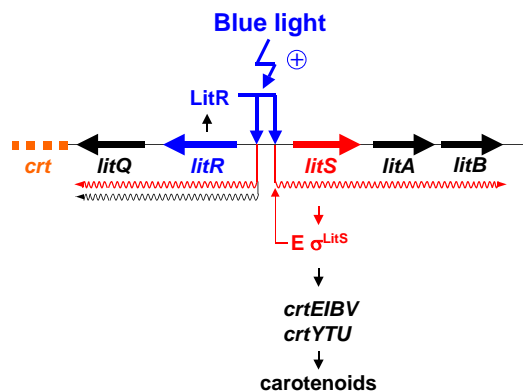
1. 研究開始当初の背景

環境中に豊富な物理刺激である光は、生物機能に深く関与し、特に光受容の分子メカニズムは動物視覚系ならびに光合成生物を材料に詳細な研究がなされている。一方、環境中に普遍的な細菌の光応答は、その実例に乏しく、全くと言っていいほど調べられてこなかった。ところが、最近我々は、光合成を行わない一般細菌にも光に応答して新たな機能発現を誘導する分子機構が存在するという新事実を明らかにした。この発見の発端と

なった放線菌は、土壤に生息し複雑な形態分化と多様な二次代謝産物を生産することでよく知られる産業微生物である。我々は、遺伝的取り扱いのモデル株 *Streptomyces coelicolor* A3(2)において、その二次代謝産物の一つであるカロテノイドの生産が光によって誘導されることを見出した。カロテノイドは微生物から高等植物まで幅広い生物によって生産され、光照射により生じる有害活性酸素分子種の消去剤として機能する。光によるカロテノイド生産の誘導は一般細菌において知られる現象であるが、その分子メ

カニズムはグラム陰性細菌である *Mycococcus xanthus* においてのみ研究されてきた。*M. xanthus* における光応答の分子メカニズムは複雑で、すでに多くの制御遺伝子群が同定されているが、光受容の分子機構は未だ明らかでない。一方我々は、*S. coelicolor* A3(2) における光依存的なカロテノイド生産は、生合成遺伝子クラスター (*crt*) の上流にコードされている転写制御蛋白 LitR によって中心的に制御されていることを明らかにした。LitR は、その C 末端領域に結合するコバラミン分子の青色光吸収に伴ってプロモーター領域への結合様式が変化し、その結果 RNA ポリメラーゼがリクルートされて *litS* の転写を開始に導くと予想される (図)。こうして転写が誘導される *litS* は ECF ファミリーの σ 因子をコードしており、*crt* の特異的な転写を司ることが明らかになっている。

我々はさらに、LitR に相同な蛋白が放線菌以外にも *Thermus* や *Pseudomonas* をはじめとするグラム陰性菌にも広く分布することを見いだした。*Thermus thermophilus* の *litR* 相同遺伝子は、*S. coelicolor* A3(2) と同様に *crt* 及び光回復酵素遺伝子とクラスターをなして存在しており、実際に青色光照射によってこの菌のカロテノイド生産が誘導されることが我々によって確認されている。また、遺伝子学的解析により *litR* 遺伝子が放線菌のシステムと同様に最も重要な光応答性遺伝子であることを明らかにした。組み換え LitR 蛋白を用いた生化学的解析により、LitR 蛋白がリガンドとしてコバラミンを結合することに加え、自身のプロモーターに結合してリプレッサーとして作用することも証明した。これ以外にもグラム陰性菌の *litR* 相



同遺伝子は光回復酵素 (*phrB*) および機能未知の蛋白をコードする遺伝子と一つのオペロンを形成して存在しており、我々は *Pseudomonas putida* の当該オペロンの転写が光によって誘導される現象も予備的に確認している。以上の証拠は、LitR 蛋白が一般細菌に広く分布して光依存的な転写調節を司ることを示しており、光という極めて普遍的な環境因子によって誘導される機能がバクテリア全般に広く潜在していることを暗示

している。これまでに知られているカビや植物から見つかっている青色光受容体の光吸収はフラビンを介して行われることから、LitR はコバラミンを発色団とする新しい型の光受容体である可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では、(1) LitR による光応答転写制御メカニズムを解明することならびに (2) 光に応答する微生物機能の多様性を評価することを目的とする。制御メカニズムの解明については、蛋白質の安定な取り扱いにおいて有利な *Thermus* 由来の LitR 蛋白質を主な材料として用い、そのリガンド相互作用と DNA への結合様式に関する詳細な検証を行う。その際、X線結晶構造解析等による立体構造の解明を通じて作用メカニズムの本質を明らかにすることも視野に入れる。また、*Pseudomonas putida* に3つ存在する LitR 相同蛋白の役割を遺伝学的手法を用いて明らかにする。それぞれの菌で利用可能な光誘導型発現ベクターの構築を最終目標とするが、第一段階として放線菌における光依存的発現ベクターの構築を行う。次に、光に応答する微生物機能の多様性評価については、*litR* 相同遺伝子を有することがこれまでに明らかになっている細菌属を主な対象として、光照射によって影響をうける表現形質の探索を行う。この探索によって光に顕著な依存性を示した株について、プロテオーム解析を実施し、光依存的に発現する蛋白質の多様性を評価する。

本研究は、すべて我々による独自の研究成果に基づくもので、他に例がない独創性の高いものである。本研究によって得られる光応答制御に関する知見は、細菌環境応答のメカニズムに関する基礎分子生物学に新たな知見を与えると同時に、微生物の機能を利用した諸技術の新しい基礎になることが見込まれる。一般細菌における光生物学はほとんど未開拓の研究領域であることから、本研究が分子生物学ならびに生態学に与えるインパクトは大きく、また微生物資源の利用性拡大にも貢献することが期待されることから、社会的にも高い効果を有すると考えられる。

3. 研究の方法

平成19年度

(1) 好熱性細菌 *Thermus thermophilus* HB27 の LitR 蛋白の機能と構造解析

本菌由来の蛋白が熱に安定であるという利点を生かし、LitR 蛋白の機能及び構造解析の相関を明らかにする。LitR 蛋白は N 末端領域に DNA 結合ドメイン、C 末端領域にコバラミン結合ドメインを有している。これまでの我々による詳細な解析により、DNA 結合ドメインの詳細な機能は試験管内実験により明

らかである。その一方で、光吸収機能を有すると推測されるコバラミン結合ドメインに関する解析は現状では不十分である。まず、大腸菌の系を用いて組み換え LitR 蛋白を調製し、試験管内における LitR 蛋白とコバラミンの結合をその特定吸収波長から確認する。この結合が特異的であることをピアコアにより確認する。次に、コバラミン生合成遺伝子クラスターの破壊株を作製する。本破壊株における Crt 生産能を調べ、コバラミンの光誘導での役割を明らかにする。最も興味を持たれるコバラミンを介した光による LitR 蛋白の活性制御メカニズムを生化学的な実験により明らかにする。暗条件下(赤色光下)で精製したコバラミン結合型 LitR 蛋白を調整する。リプレッサーとしての本蛋白活性評価を試験管内転写実験により行い、細胞内で見られた光依存的な LitR 蛋白による転写開始の阻害を再現する。本アッセイ系は市販の本菌由来の RNA ポリメラーゼを用いた予備実験により確立済みである。これらの LitR 蛋白に関する部分的な生化学的なデータを基に、本蛋白の立体構造決定を目指し X 線結晶解析を開始する。

(2) *Pseudomonas putida* KT2440 の LitR

本菌では3つ存在する LitR 相同蛋白の役割解明を目的とする。*litR1* オペロンは *crt* クラスターを含まず、*phrB* や機能不明の蛋白群から構成されていることから、放線菌や *T. thermophilus* とは異なる新しい LitR に関する知見を得ることができるものと考えられる。*litR1* オペロンは4つの遺伝子 (*ORF1*, *litR*, *phrB*, *ORF2*) から構成されるが、*litR1*, *phrB* 以外の *ORF1*・2 は既知蛋白と同一性を有さないため機能は不明である。この *litR1* オペロンはゲノム解読が完了している *Pseudomonas* 属と *Vibrio* 属細菌の全般に加えて、*Shewanella oneidensis* においても同じ遺伝子構成である。このことはオペロン構成蛋白群が機能面で密接な関連性を有することを示唆する。まず、*litR1* 遺伝子欠失体を作成し、LitR1 が *litR1* オペロンの光誘導に直接関わることを明らかにする。次に、大腸菌の発現系で精製した組み換え LitR1 蛋白を用いて、試験管内における LitR1 蛋白と標的プロモーターの相互作用解析をゲルシフトアッセイ法や DNaseI フットプリント法を用いて行う。*phrB* 及び機能不明な *ORF1*・2 についても遺伝子破壊株を取得し、転写の光誘導、PhrB 蛋白の酵素活性に対する影響、紫外線に対する致死率の測定実験から、これら機能未知遺伝子群と光誘導の関わりを明確にする。以上の遺伝子破壊実験から得られた各遺伝子の機能や役割から判断して、学術的に興味を持たれる遺伝子については、さらに大腸菌の系で作出した組み換え蛋白を用い、生化学

的な解析を進める。

(3) 光に依存した表現形質の探索

カビや植物では多くの青色光応答現象が観察されているにも関わらず、光合成を行わない一般的なバクテリアではカロテノイド合成の誘導が知られているのみである。未知の光応答現象の発見を目的として、これまでに *litR* 相同遺伝子の存在が確認されている種々の細菌属ならびに任意の自然界分離株を対象として、光依存的な表現形質を示す菌株をスクリーニングする。土壌に棲息する放線菌群はカビに似た複雑な形態分化を行うことに加えて、8Mbp というカビに近い巨大なゲノムつまり遺伝情報を持つことから最も潜在能力が高い細菌であると言える。この放線菌群を中心として光照射により孢子形成・抗生物質生産が促進される、これまでに報告のない光形態形成を示す菌株を探索する。

平成20年度

(1) 好熱性細菌 *Thermus thermophilus* HB27 の LitR 蛋白の機能と構造解析

LitR 蛋白の光活性制御機構並びに X 線結晶解析を継続的に行う。X 線結晶解析には LitR 蛋白に関する詳細な生化学的なデータと大量かつ高純度の蛋白が必要とされる。LitR 蛋白の生化学的な機能解析では、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより組み換え LitR 蛋白の分子量を決定する。ホモ多量体形成が予想された場合は、大腸菌 Two-Hybrid-System 解析により LitR 蛋白の各ドメイン間の相互を明確にする。次に、LitR 蛋白が結合する DNA のコンセンサス配列を決定するために、部位特異的変異法により種々の変異型プロモーター断片を作製しゲルシフトアッセイを行う。LitR 蛋白精製系の確立では大腸菌発現系でコバラミン非結合型と結合型 LitR 蛋白の大量発現・精製系を確立する。こらら両タイプの蛋白を用いて結晶化の条件検討を行う。これら一連の実験により LitR 蛋白の生化学的機能と立体構造の相関関係の理解を目標とする。

(2) *Pseudomonas putida* KT2440 の LitR

litR1 以外の *litR2*, *litR3* は、いずれにも隣接して植物型光受容体フォトトロピンに相同性な遺伝子 *sbp* (sensory box protein) がコードされている。この SBP1・2 は青色光吸収機能を示す PAS ドメインに顕著な同一性を有し実際に光受容機能を持つ可能性が極めて高い。我々は LitR2,3 と SBP1・2 の各遺伝子の機能・役割の解析に加えて、両蛋白の関係解明に重点をおいて実験を進める。最初に、*litR2*・3, *sbp1*・2 遺伝子破壊株を作製し、これらの変異株の UV 耐性、青色光照射などの各種ストレスに対する耐性度を調べる。また、定量 PCR 法を用いて野生株、各破壊株におけ

る *litR2*・3、*sbp1*・2 の転写量を定量及び比較すると同時に、本菌の既知ストレス応答性プロモーターの転写活性を測定する。これらの実験に加えて既に確立済みである2次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析なども併用し、これら4つの遺伝子の機能解析に焦点を絞って実験を行う。ここで得られた微生物学的な現象を実証する場合には、各組み換え蛋白を用いた生化学的実験により詳細な機能解析を進める。

(3) 光に依存した表現形質の探索

水圏では魚類発光器官などに棲息する発光細菌やそれと共存する細菌群を広く単離し、走光性などの発光応答性細菌群を探索する。発光器官に棲息する細菌群は難培養性であることが知られているが、我々の研究グループは培養困難な共生細菌 *Symbiobacterium* の研究を行っており、その培養技術に精通していると同時に豊富な知識を有している。また DGGE 法や 16sRNA 解析などの分子生態学的手法も併用し、海洋において青色光に反応する細菌種の同定を目指す。その他、ゲノム上に *litR* 相同遺伝子が存在する微生物株並びにその近縁種について、プロテオーム解析などを通じて、光依存的に発現する蛋白質の同定を試みる。上記のような一般細菌における光形態形成や走光性など未発見の光応答現象の探索やその機構解明から、光受容機能を有する細菌の普遍的存在を明確にする。

4. 研究成果

(1) 好熱性細菌 *Thermus thermophilus* HB27 の LitR 蛋白の機能と構造解析

コバラミン生合成遺伝子群破壊株を薬剤マーカーの挿入により作製した。本破壊株は明・暗の両条件下でカロテノイド生産を示し、LitR による転写制御が解除されていることが予想された。これらの結果を支持するように、大腸菌を宿主として調製した組み換え LitR はコバラミンに特徴的な吸収波長を示したが、コバラミン結合ドメインを欠失した LitR 蛋白はこの吸収波長を示さなかった。試験管内転写実験を用いて LitR の機能を調べた結果、LitR 蛋白は RNA ポリメラーゼによる転写開始を阻害するリプレッサーとして機能することが判明した。これらの結果から、LitR 蛋白はコバラミンをリガンドとして必要とし、本蛋白のリプレッサー活性はコバラミンを介して吸収した青色光によって制御されることが示唆された。

(2) *Pseudomonas putida* KT2440 の LitR 青色光によって誘導される遺伝子群の特定を目的とタイリングアレイ (アフイメトリックス社) 解析を行った結果、未知生合成遺伝子クラスター、葉酸生合成遺伝子、走化性の

受容体として機能する MCP 遺伝子、フェニル酢酸分解遺伝子クラスターを含む約 50 の遺伝子群が青色光によって誘導されることが判明した。これら遺伝子群の青色光による誘導はこれまでに報告がなく、本応答は新規な環境応答現象であると考えられた。

タイリングアレイ解析によって同定した青色光によって誘導される遺伝子群について、RT-PCR を主に用いた解析によりその光依存性を確認した。その結果、脂肪酸合成に関連すると推測される機能未知遺伝子クラスター、葉酸生合成遺伝子、フェニル酢酸分解遺伝子クラスターが光によって誘導されることを明確にした。一方、*litRI* 破壊株を取得し、それについても同様の解析を行った結果、いずれの遺伝子についても依然として光誘導性が観察された。このことから、2つのパラログ (*litR2*、*litR3*) が *litRI* の機能を相補していることが示唆された。

(3) 光に依存した表現形質の探索

土壌を単離源とした探索の結果、多数の菌株が光に反応して黄色色素を生産することを見出した。16S rRNA 配列解析からこれまでに光応答性の報告が殆どない *Bacillus* 属、*Arthrobacter* 属及び *Pseudomonas* 属細菌がその大半を占めていた。この中で *Bacillus megaterium* が生産する黄色色素は極めて高極性であり、新規性の高いカロテノイドであると推測された。これらに加えて DGGE 法を用いた分子生態学解析により土壌中には多くの青色光依存的な生育を示す細菌の存在が示唆された。

(4) *Streptomyces coelicolor* のコバラミン生合成遺伝子

LitR のリガンドとして光応答に重要な役割を果たすことが予想されるコバラミン (ビタミン B12) について、その生合成遺伝子を放線菌 *S. coelicolor* A3(2) において破壊した。その結果、光応答性が失われただけでなく、形態分化と抗生物質生産にも負の影響が認められた。このことから、コバラミンは本菌においてグローバルな調節に要求される因子であることが明確になった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1) 上田賢志、高野英晃、白鳥初美、アスカ・ダラル、和辻智郎、別府輝彦 (2008): 見え

ない微生物とその機能を刺激するー普遍的な環境因子との関わりに着目した新しい取り組み BIO INDUSTRY 25 巻 8 号 (査読無)

[学会発表] (計 9 件)

1) 高野英晃、別府輝彦、上田賢志 光応答制御遺伝子に着目した微生物ゲノムの横断、日本農芸化学会 2009 年度大会、(2009.3.29) 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡・博多)

2) 高野英晃、大関博通、臼井利光、袴田航、別府輝彦、上田賢志 *Thermus thermophilus* の光誘導生カカロテノイド生産におけるコバラミンの役割、日本農芸化学会 2009 年度大会、(2009.3.29) 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡・博多)

3) 奨励賞受賞講演 高野英晃 一般細菌における光応答転写制御の普遍性と多様性に関する研究、第 3 回日本ゲノム微生物学会年会 (2009.3.6) 中央大学後楽園キャンパス (東京・文京区)

4) 高野英晃、大関博通、袴田航、別府輝彦、上田賢志 LiR を介した光応答性転写調節におけるコバラミンの役割、第 3 回日本ゲノム微生物学会年会 (2009.3.6) 中央大学後楽園キャンパス (東京・文京区)

5) 招待講演 Takano H The role of cobalamin in *Streptomyces* secondary metabolite、日英ワークショップ：医薬をつくる放線菌のゲノム科学～その示唆と応用、(2008.10.31) 日本大学会館 (東京・市谷)

6) 高野英晃、大関博通、臼井利光、臼井紀好、別府輝彦、上田賢志 一般細菌の光応答性転写調節におけるコバラミンの役割、2008 年度グラム陽性細菌のゲノム生物学研究会、(2008.9.5) 国立オリンピック記念青少年総合センター (東京・代々木)

7) 高野英晃、上田賢志、別府輝彦 放線

菌 *S. coelicolor* においてコバラミン生合成の破壊が光応答性に及ぼす影響、日本農芸化学会 2008 年度大会、(2008.3.28) 名城大学 (愛知・名古屋)

8) 渡辺祥子、高野英晃、上田賢志、別府輝彦 新規光応答性微生物の探索、日本農芸化学会 2008 年度大会、(2008.3.27) 名城大学 (愛知・名古屋)

9) Hideaki Takano, Teruhiko Beppu and Kenji Ueda LitR, a photo-dependent transcriptional regulator of *Streptomyces*: its photosensory function and wide distribution in non-phototrophic bacteria, 14th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, (2007.8.28) The Sage Gateshead & the University of Newcastle (U.K.)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

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・助手
研究者番号：50385994

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

上田賢志
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：00277401

別府輝彦
日本大学・大学院総合科学研究科・教授
研究者番号：80011873