

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657089

研究課題名（和文） 光照射による新規な遺伝子発現制御系の開発

研究課題名（英文） Development of a novel light-regulated gene expression system

研究代表者

増井 良治 (MASUI RYOJI)

大阪大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：40252580

研究成果の概要(和文):高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 の転写調節タンパク質 LitR は、カロテノイド合成系遺伝子上流に結合するリプレッサーとして働き、青色光に依存して抑制を解除することが知られている。そこで、この発現調節系を利用した遺伝子の発現の制御システムの構築を行った。まず litR 遺伝子と LitR 結合領域を含む DNA 断片をクローニングし、レポーター遺伝子を含む大腸菌の発現ベクターのプロモーター領域に組み込み、青色光照射に対する発現応答を調べた。さらに、LitR 結合領域の長さを変えたり、レポーター遺伝子のプロモーターと LitR 結合領域の距離を変えることにより、発現レベルの改善を試みた。次に、高度好熱菌の薬剤耐性マーカーの上流に同様に DNA 断片を組み込み、光応答性の発現が見られるかどうかを調べた。得られた結果から、LitR を利用した光発現カセットによる光発現制御システムの構築は可能であることが分かった。

研究成果の概要(英文): A transcriptional regulator LitR of *Thermus thermophilus* HB8 acts as a repressor which binds to upstream region of carotenoid biosynthesis genes and releases repression depending on blue light. This regulatory system was used for constructing a light-dependent gene expression system. A DNA fragment containing the litR gene and LitR-binding region was inserted into an expression vector containing a reporter gene in *E. coli* and *T. thermophilus*. The results of gene expression response to blue light irradiation suggested the feasibility of the light-dependent gene expression system using LitR.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：遺伝子の情報発現と複製

1. 研究開始当初の背景

(1) 新しい遺伝子発現制御法の必要性

細胞内に導入した目的遺伝子の発現を制御することは、基礎から応用までの幅広いライフサイエンス分野において欠かすことのできない手法の1つである。しかし、遺伝子

を導入する手法に比べて、発現制御系の開発は遅れており、実際、発現制御が可能な系は大腸菌や酵母など少数のモデル生物に限られている。さらに、それらのモデル生物で使われている方法の多くは薬剤や熱処理を加えることによって発現を誘導するため、物理

的ストレスや薬剤による二次的影響を排除することができない。そのような影響は細胞全体を対象とするプロテオーム解析やトランスクリプトーム解析などの障害となる。また、細胞内の特定の場所でのみ発現を誘導すること（空間的な発現制御）もできない。

(2) 「光」を用いた発現制御法

上記に挙げた問題点を解決する方法の1つとして、「光」によって遺伝子の発現を制御するシステムが提唱されている。具体的には、光情報を特異的に受け取る光受容蛋白質と、光受容蛋白質からシグナルを受けとって遺伝子の発現調節を行う転写調節タンパク質を細胞に導入し、その調節タンパク質の結合配列を上流に組み込んだ目的遺伝子の発現を光照射によって制御しようというものである。光照射は細胞に与える影響がほとんどなく、また照射する領域を限定すれば、空間的な発現制御もできる。しかし、光受容体、転写因子、結合配列の3つが揃ったシステムを構築することが難しいためもあって、現在までのところ、実用レベルに達したものはない。

(3) 光受容能をもつ転写因子の利用

そこで申請者は、光受容能をもつ転写因子を使えば上記の問題の多くが克服できると考えた。申請者が長年研究している高度好熱菌 *Thermus thermophilus* では、カロテノイド生産が青色光の照射によって誘導されるが、その光誘導性を担う因子として見つかったのが LitR である。LitR はカロテノイド合成系遺伝子上流のプロモーター領域に結合し、その転写を抑制するリプレッサーとして働く。LitR の N 末端領域には DNA 結合部位があるが、興味深いことに、その C 末端領域にはビタミン B₁₂ 結合部位がある。ビタミン B₁₂ の生合成を阻害すると、カロテノイド生産の光誘導性が失われたことなどから、LitR に結合したビタミン B₁₂ そのものが光センサーであり、LitR のリプレッサー機能に必須だと考えられている。つまり、LitR は光受容体であると同時に転写因子でもあるというユニークなタンパク質といえる。この LitR が司る発現制御系では、光受容体、転写因子、転写因子結合配列のすべてが分かっている。以上のことから、LitR とその結合配列を利用した光発現制御システムを構築すれば、ビタミン B₁₂ を含むどのような細胞にも適用できるはずだと考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、光に依存して遺伝子発現を誘導する高度好熱菌由来の転写調節タンパク質 LitR を利用して、LitR 結合配列を遺伝子上流に組み込むことにより、光照射によって目的遺伝子の発現を制御できるシステムの基礎を確立することを目的とする。

(1) LitR 結合配列を高度好熱菌ゲノムの目的遺伝子上流に導入し、光照射によって発現を制御する。

(2) LitR 構造遺伝子ならびにその結合配列を含む「光発現カセット」を作製し、それを組み込んだ大腸菌で光照射による発現制御を実現する。

(3) 確立した方法を用いて、発現誘導系をもたない生物種でのタンパク質の大量発現、アンチセンス鎖発現による必須遺伝子の発現抑制などの実験を行い、従来法では困難だった機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) LitR による発現制御をうけるカロチノイド合成系遺伝子の1つ *crtB* 遺伝子において、そのプロモーター領域 (-10, -35 領域) のさらに上流に LitR 結合領域が同定されている (図1)。

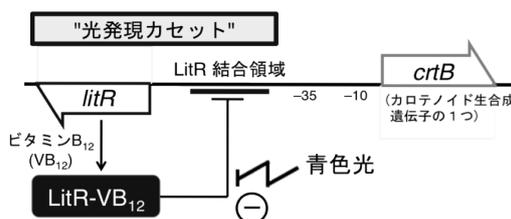


図1 高度好熱菌 LitR による *crtB* 遺伝子の光発現制御メカニズム

そこで、レポーター遺伝子となる耐熱性薬剤耐性因子などのプロモーター上流に LitR 結合領域の DNA 断片を導入したプラスミドを作製し、それを導入した高度好熱菌について、青色光による発現を薬剤入りプレートでの生育やコロニーの発色によって確認する。さらに、LitR 結合領域の長さを変えたプラスミドも構築し、LitR 結合に必要な最小限の塩基配列を決定する。

(2) 大腸菌用の発現ベクターのプロモーター領域に「光発現カセット」を導入し、高度好熱菌と同じく、薬剤耐性などを指標にして、光応答性の発現が見られるかどうかを調べる。

(3) 発現誘導系をもたない高度好熱菌にお

いて、アンチセンス鎖発現による発現抑制実験を行う目的で、薬剤耐性因子を用いた相同組換えによる遺伝子破壊実験をいくつかの遺伝子について行い、必須遺伝子の探索を行う。また、青色光照射による高度好熱菌でのタンパク質発現の変動を把握するために、質量分析法を用いたプロテオーム解析を行う。

4. 研究成果

(1) *litR* 遺伝子と LitR 結合領域を含む DNA 断片をクローニングし、レポーター遺伝子を含む大腸菌の発現ベクターのプロモーター領域に組み込み、青色光照射に対する発現応答を調べた。さらに、LitR 結合領域の長さを変えたり、レポーター遺伝子のプロモーターと LitR 結合領域の距離を変えることにより、発現レベルの改善を試みた。次に、高度好熱菌の薬剤耐性マーカーの上流に同様に DNA 断片を組み込み、光応答性の発現が見られるかどうかを調べた。得られた結果から、LitR を利用した光発現カセットによる光発現制御システムの構築は可能であることが分かった。

(2) 耐熱性薬剤マーカーを利用した相同組換え法による遺伝子破壊実験の結果から、高度好熱菌のリボヌクレアーゼ RNase P と nanoRNase, さらに核様体タンパク質 HU が必須遺伝子であることが強く示唆された。一方、他種では必須遺伝子である RNase Y がこの菌では必須ではないことも分かった。

(3) 高度好熱菌の細胞破砕液に含まれるタンパク質を二次元電気泳動で分離し、MALDI-TOF MS および nanoLC-Q-TOF-MS により、306 スポットから 258 個のタンパク質を同定した。

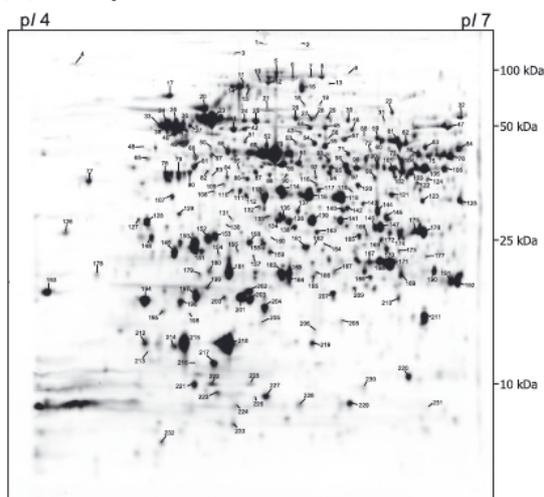


図 2 高度好熱菌タンパク質の二次元電気泳動による分離 (pH 4-7)

検出されたタンパク質としては、代謝系や遺伝子情報発現に関わるものが多かった。

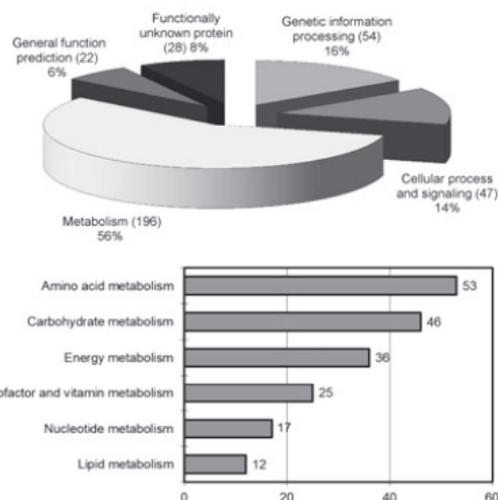


図 3 プロテオーム解析で同定した高度好熱菌タンパク質の機能カテゴリーによる分類

(4) 高度好熱菌タンパク質のプロテオーム解析の過程で、Ser/Thr/Tyr がリン酸化されているタンパク質の存在が明らかになった。そこで、酸化チタンによるリン酸化ペプチドの選択的濃縮と nanoLC-Q-TOF-MS によるタンデム MS 解析により、48 個のリン酸化タンパク質と 46 箇所のリン酸化部位を同定した。同定したリン酸化タンパク質は様々な機能カテゴリーに属していたことから、バクテリアにおいてもタンパク質のリン酸化が主要な翻訳後修飾の 1 つであることが示された。さらに、立体構造上にリン酸化部位をマッピングしたところ、リガンド結合あるいはその近傍に存在する残基が多いことが分かった。

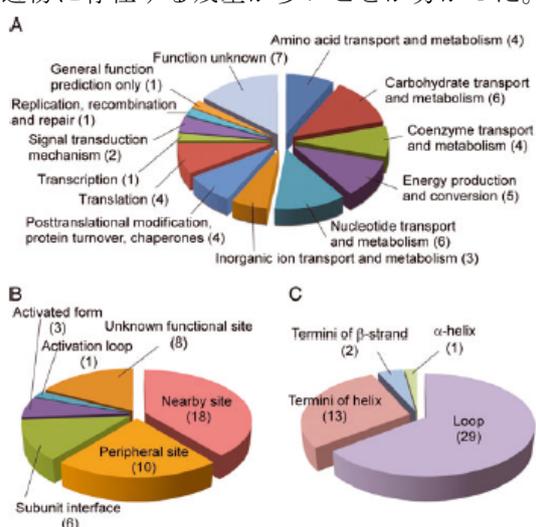


図 4 高度好熱菌で同定したリン酸化タンパク質の機能カテゴリーによる分類 (A), 立体構造上の位置 (B), 二次構造上の位置 (C)

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2件)

(1) Kim, K., Okanishi, H., Masui, R., Harada, A., Ueyama, N., Kuramitsu, S. Whole-cell proteome reference maps of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. *Proteomics*, **12**(19-20), 3063-3068, 2012 doi/10.1002/pmic.201100375/full

(2) Takahata, Y., Inoue, M., Kim, K., Iio, Y., Miyamoto, M., Masui, R., Ishihama, Y., Kuramitsu, S. Close proximity of phosphorylation sites to ligand in the phosphoproteome of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB8. *Proteomics*, **12**(9), 1414-1430, 2012

[学会発表] (計9件)

①高畑良雄, 井上真男, 金光, 石濱 泰, 増井良治, 倉光成紀
原核生物における Ser/Thr/Tyr リン酸化タンパク質の網羅的解析
第58回日本生化学会近畿支部会例会 関西医科大学滝井キャンパス 2011年5月21日

②Hiromasa Ohyama, Yoshihiro Agari, Kenji Fukui, Noriko Nakagawa, Akeo Shinkai, Seiki Kuramitsu, Ryoji Masui
Transcriptome analysis of RNase gene disruptants in *Thermus thermophilus* HB8
第34回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 2011年12月16日

③飯尾洋太、高畑良雄、井上真男、金光、福井健二、上利佳弘、新海暁男、増井良治、倉光成紀
高度好熱菌由来 Ser/Thr protein kinase TTHA0138 の機能解析
第59回日本生化学会近畿支部会例会 京都大学宇治キャンパス おうぼくプラザ 2012年5月19日

④高畑良雄、井上真男、飯尾洋太、妻鹿良亮、高橋裕佳、友池史明、中川紀子、金光、宮本昌明、石濱 泰、増井良治、倉光成紀
高度好熱菌のリン酸化プロテオーム解析: 立体構造に基づくリン酸化部位のマッピング
第12回日本蛋白質科学会年会 名古屋国際会議場 2012年6月22日

⑤増井良治、上利佳弘、新海暁男、飯尾洋太、岡西広樹、金光、大山礼雅、福井健二、倉光成紀
極限微生物を利用した基本的生命現象の発見
第13回極限環境生物学会年会 日本大学文理学部 2012年12月2日

⑥飯尾洋太、高畑良雄、井上真男、金光、福井健二、上利佳弘、新海暁男、増井良治、倉光成紀
高度好熱菌丸ごと一匹解析: リン酸化による翻訳後修飾
第85回日本生化学会大会 福岡国際会議場 2012年12月15日

⑦Hiromasa Ohyama, Yoshihiro Agari, Kenji Fukui, Noriko Nakagawa, Akeo Shinkai, Ryoji Masui, Seiki Kuramitsu
Whole cell analysis of *Thermus thermophilus* HB8: The regulation of mRNA decay by RNases
第85回日本生化学会大会 福岡国際会議場 2012年12月15日

⑧植村有里, 若松泰介, 中川紀子, 増井良治, 倉光成紀
短鎖 DNA/RNA 特異的エキソヌクレアーゼの基質認識機構の解明
第85回日本生化学会大会 福岡国際会議場 2012年12月15日

⑨増井良治、上利佳弘、新海暁男、飯尾洋太、岡西広樹、Kwang Kim、大山礼雅、西田優也、福井健二、倉光成紀
モデル生物 *Thermus thermophilus* HB8 の蛋白質の翻訳後修飾
第7回日本ゲノム微生物学会年会 長浜バイオ大学 2013年3月10日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増井 良治 (RYOJI MASUI)

大阪大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号: 40252580