

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07351

研究課題名(和文)好気性酸素非発現型光合成細菌における脱窒遺伝子発現制御機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of the regulatory mechanism of the denitrification genes in an aerobic anoxygenic photosynthetic bacterium

研究代表者

新井 博之 (Arai, Hiroyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：70291052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* OCh114 の嫌氣的生育に関わる脱窒遺伝子の発現には、2つのDNRタイプの転写調節因子(DNR1とDNR2)が関与している。各種転写調節因子の欠損株を用いた遺伝子発現解析の結果、DNR1がDNR2の発現を制御し、DNR2が脱窒酵素遺伝子の発現を誘導するカスケード制御系が明らかになった。また、酸素を感知するFnrLは、ヘム生合成系の発現を制御することにより、間接的にDNRの活性化に必要であり、光合成遺伝子発現を制御しているLOV-HKが光に応答した脱窒遺伝子発現制御に関与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：An aerobic anoxygenic photosynthetic bacterium *Roseobacter denitrificans* OCh114 requires two DNR-type transcriptional regulators, DNR1 and DNR2, for anaerobic growth by denitrification. Gene expression analyses using the mutant strains of some regulatory genes revealed that DNR1, DNR2, and the denitrification genes constitute a cascade regulatory system. DNR1 regulates the expression of DNR2 and DNR2 directly regulates the expression of the denitrification genes in the system. An oxygen-responsive regulator FnrL was indirectly involved in the expression of the denitrification genes via regulation of the biosynthesis of heme, which is required for the activity of DNR. LOV-HK, which is involved in the regulation of the photosynthetic genes, was predicted to be involved in the light-responsive regulation of the denitrification genes in OCh114.

研究分野：応用微生物学

キーワード：脱窒 光合成 一酸化窒素 微生物

1. 研究開始当初の背景

酸素非発生型の光合成を行う原核光合成細菌は、酸素発生型光合成を行うシアノバクテリアや藻類に比べて比較的単純な光合成装置を有しており、光エネルギーを利用したバイオエネルギー生産、有用物質生産への利用が期待できる。通常、酸素非発生型光合成細菌は好氣的に光合成を行うことはできない。なぜなら、光により励起されたバクテリオクロフィル a と酸素が反応すると、強力な活性酸素種である一重項酸素(1O_2)が生成し、光酸化ストレスを生じて生育や種々の生理機能が阻害されるためである。一方、好気性酸素非発生型光合成細菌は、嫌気性光合成細菌と類似の光合成系を有しているが、光合成装置が好気条件で発現・機能している点に特徴がある。好気性光合成細菌は近年の分子生態学的研究から、海洋表層において 5~20% を占める最優占種であり、地球上の物質循環に重要な役割を担っていると考えられている。好気性光合成細菌は好気光合成を可能にするために特異なエネルギー代謝調節系と強い酸化ストレス防御機構を有していると考えられ、これらの特徴は光合成機能をバイオエネルギー生産などに応用する上で有利な性質であると期待される。

本研究で用いる *Roseobacter denitrificans* OCh114 株は好気性光合成細菌のモデル生物の一つであり、光合成、好気呼吸、嫌気呼吸の 3 つのエネルギー獲得系を有している。本菌は光合成だけでなく嫌気呼吸の脱窒系も好気条件で発現し、さらに光照射により脱窒活性が上昇するという興味深い特徴を有している。脱窒とは、微生物の作用により可溶性の硝酸が、ガス状の分子状窒素 (N_2) として大気中に放出される現象であり、結合型窒素を N_2 に戻す重要な生物反応として、地球上の窒素循環の一翼を担っている。このため、海洋環境での優占種である好気性光合成細菌の脱窒反応の制御機構を理解することは、生態学的にも重要である。また、脱窒反応は富栄養排水の処理などで環境浄化に利用されており、OCh114 株の脱窒反応が好気条件でも発現することは、環境浄化に利用する上で有利な性質と考えられる。好気性光合成細菌におけるエネルギー代謝変換には、細胞内の酸化還元バランスを維持するための複雑な制御系が働いていると予想される。この制御系を解明することは、好気性光合成細菌の利活用のために必要であり、さらには、これらの細菌の環境優占化の理由を理解することにもつながると考えられる。

2. 研究の目的

OCh114 株は脱窒において硝酸を亜硝酸、一酸化窒素(NO)、亜酸化窒素を経て N_2 にまで還元する一連の反応を触媒する還元酵素の遺伝子をすべて有している。これらの脱窒関連遺伝子は、嫌気条件だけでなく光照射によっても発現誘導が起こるといった特徴があ

る。脱窒関連遺伝子は、多くの細菌において DNR などの NO に応答する転写調節因子によって制御されることが知られている。先行研究により、OCh114 株は DNR タイプの転写調節因子をコードする遺伝子を 2 個 (*dnr1* と *dnr2*) 持っており、両方が脱窒による嫌氣的生育に必要とされることを明らかにしている。*Pseudomonas aeruginosa* の研究では、DNR はヘムを補因子として NO を感知することが知られているが、OCh114 株は 2 種の DNR (DNR1 と DNR2) を必要とするため、それらの機能上の違いに興味を持たれた。本研究では、OCh114 株のエネルギー代謝制御機構の全容を解明する一環として、脱窒遺伝子発現制御機能の詳細な解析と、2 種の DNR の機能分担を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脱窒遺伝子発現様式の解析

OCh114 株の脱窒系の発現制御は、酵素活性の測定により調べられていたが、実際に脱窒関連遺伝子の発現量変化を正確に測定した例はなかった。そこで、酸素濃度、NO の有無、光の強度と波長を変化させた種々の生育条件での脱窒遺伝子の発現様式の解析を行った。解析手法としては、網羅的トラスクリプトーム解析にはマイクロアレイ、個々の遺伝子の詳細な発現量変化の解析には *lacZ* レポーターアッセイを用いた。

(2) 脱窒遺伝子発現制御に関わる転写制御因子の解析

dnr1 と *dnr2* の単独または二重破壊株を用い、*lacZ* レポーターアッセイにより、*dnr1*、*dnr2*、および、脱窒関連遺伝子の転写活性を測定した。また、OCh114 株において、酸素、および、光を感知してエネルギー代謝制御を行っていると思われる FnrN と LOV-HK についても、それらの欠損株を用いて、脱窒関連遺伝子発現への寄与を調べた。

(4) DNR の異種発現

P. aeruginosa の DNR はヘムを補因子として NO を感知することが報告されているが、他の菌の DNR の機能解析が行われたことはなかったため、OCh114 株の DNR1 と DNR2 が同様な機能を有しているかは不明であった。DNR1 と DNR2 の機能や性質の違いを明らかにするため、OCh114 株と類縁の嫌気性光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides*、および、*P. aeruginosa* の *dnr* ホモログの遺伝子欠損株を宿主として DNR1 と DNR2 の異種発現を試みた。

4. 研究成果

(1) 脱窒遺伝子発現様式の解析

微好気-暗及び嫌気脱窒-暗条件における脱窒関連の硝酸還元酵素(NAR)、亜硝酸還元酵素 NIR、一酸化窒素還元酵素(NOR)、亜酸化窒素還元酵素(N_2 OR)をコードする遺伝子の発現パターンを比較したところ、嫌気脱窒

条件において NAR, NIR, NOR, N₂OR すべての構造遺伝子が高レベルで発現していた。また、それらの中でも NIR 遺伝子が最も高レベルで発現していた。なお、微好気条件下においても各構造遺伝子は、好気条件と比較して約 2~5 倍の発現上昇を示した。

好気/微好気/嫌気脱窒の各条件において光照射の影響を見るために、各培養条件における明/暗条件の発現レベルを比較したところ、微好気/嫌気脱窒条件においては、光照射による各遺伝子発現レベルの変化は見られなかったが、好気条件では光照射により NIR, NOR, N₂OR の遺伝子発現レベルが上がっていたが、NAR 遺伝子の発現に変化は見られなかった。

(2) 2 種の DNR の役割分担

dnr1 と *dnr2* の単独破壊株、二重破壊株、および、それらの相補株を用いて、各遺伝子の発現解析を行った結果、DNR1 が DNR2 の発現を正に制御し、DNR2 が脱窒に関わる亜硝酸還元酵素と NO 還元酵素の発現を直接誘導するという、カスケード制御系を構成していることが明らかになった。

(3) その他の転写制御因子の役割

OCh114 株において酸素を感知する転写調節因子 FnrL の変異株を用いて遺伝子発現解析を行った結果、FnrL は *dnr2* と脱窒関連遺伝子の発現制御に関与していた。これは、FnrL がヘム生合成系の遺伝子発現を制御することにより、間接的に DNR の活性化に必要であるためと考えられた。OCh114 株で新たに見つかった光合成遺伝子発現を制御している因子 LOV-HK の遺伝子破壊株では好気明条件での脱窒遺伝子の発現が上昇しており、LOV-HK が好気条件下での光に应答した脱窒遺伝子発現に関与していることが明らかになった。

(4) DNR の異種発現

R. sphaeroides、および、*P. aeruginosa* の FNR ファミリー転写調節因子の遺伝子欠損株を宿主として、OCh114 株由来の DNR1 と DNR2 を異種発現し、嫌氣的生育の相補、および、典型的 FNR 依存プロモーターの転写活性を指標に、それらの機能上の違いの比較を試みたが、現時点ではどちらの宿主を用いた場合でも DNR1 と DNR2 の機能的発現は認められず、他菌の DNR との互換性が低いことが分かった。

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 5 件)

Raika Yamagiwa, Takuya Kurahashi, Mariko Takeda, Mayuho Adachi, Hiro Nakamura, Hiroyuki Arai, Yoshitsugu Shiro, Hitomi Sawai and Takehiko Tosha, “*Pseudomonas aeruginosa* overexpression system of nitric oxide reductase for *in*

vivo and *in vitro* mutational analyses”, *Biochim. Biophys. Acta*, 1859, 333-341, 2018、査読有

doi: 10.1016/j.bbabi.2018.02.009

Erina Terasaka, Kenta Yamada, Po-Hung Wang, Kanta Hosokawa, Raika Yamagiwa, Kimi Matsumoto, Shoko Ishii, Takaharu Mori, Kiyoshi Yagi, Hitomi Sawai, Hiroyuki Arai, Hiroshi Sugimoto, Yuji Sugita, Yoshitsugu Shiro and Takehiko Tosha, “Dynamics of nitric oxide controlled by protein complex in bacterial system”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114, 9888-9883, 2017、査読有

doi: 10.1073/pnas.1621301114

Masafumi Kameya, Haruna Kanbe, Yasuo Igarashi, Hiroyuki Arai and Masaharu Ishii, “Nitrate reductase in *Hydrogenobacter thermophilus* with evolutionarily ancient features: distinctive localization and electron transfer”, *Mol. Microbiol.*, 106, 129-141, 2017、査読有

doi: 10.1111/mmi.13756

Tatsuya Osamura, Takuro Kawakami, Reiko Kido, Masaharu Ishii and Hiroyuki Arai, “Specific expression and function of the A-type cytochrome c oxidase under starvation conditions in *Pseudomonas aeruginosa*”, *PLoS ONE*, 112, e0177957, 2017、査読有

doi: 10.1371/journal.pone.0177957

Takehiro Hirai, Tatsuya Osamura, Masaharu Ishii and Hiroyuki Arai, “Expression of multiple *cbb*₃ cytochrome c oxidase isoforms by combinations of multiple isosubunits in *Pseudomonas aeruginosa*”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113, 12815-12819, 2016、査読有

doi/10.1073/pnas.1613308113

[学会発表](計 5 件)

山本麻衣子、石井正治、新井博之、「好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* OCh114 における LOV-HK の機能解析」、日本農芸化学会大会、2018

山本麻衣子、石井正治、新井博之、「好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* OCh114 の光合成色素生産における光受容体タンパク質の役割」、日本農芸化学会大会、2017

山本麻衣子、石井正治、新井博之、「好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* OCh114 の光合成色素生産における光受容体タンパク質の役割」、日本生物工学会東日本支部コロキウム、2017

新井博之、「酸素非発生型光合成細菌のエネルギー代謝制御機構」、光合成細菌ワークショップ、2016

天野修、石井正治、新井博之、

「*Rhodobacter sphaeroides*におけるピリ
ドキサルリン酸依存型転写調節因子による
5-アミノレブリン酸合成遺伝子の発現制
御」, 日本農芸化学会大会、2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 博之 (ARAI, Hiroyuki)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
准教授
研究者番号：70291052