

令和元年6月1日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07676

研究課題名(和文) バクテリアの多様な光応答を支える光スイッチ群に関する研究

研究課題名(英文) Study on diverse photo-sensing switches in non-phototrophic bacteria

研究代表者

高野 英晃 (TAKANO, Hideaki)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：50385994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：クラスII LitR蛋白質とLOV複合体の結晶化条件を約5,800通りスクリーニングしたが、複合体の結晶化には至らなかった。Burkholderia multivoransのクラスIII LitRの遺伝生化学的な解析によって350nm付近に吸収を示すUV-Aセンサーとして働き、葉酸の発現制御に関わることを明らかにした。また、納豆菌において細胞外粘性物質の生産量が光照射により抑制される現象を見出し、 γ -ポリグルタミン酸合成に関わる酵素活性に光照射が影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グラム陰性細菌Burkholderia multivoransのクラスIII LitRが、一次代謝の葉酸合成遺伝子の光依存的な発現に関与することを示した最初の例である。また、クラスIII LitRは転写調節とUV-Aセンサーの2機能を合わせもったバクテリアからの初めての例と予想されることから、学術的に高い意義を有する。納豆菌において見出したユニークな現象およびその研究成果は、光による γ -ポリグルタミンの精密な生産制御技術の基盤となることが見込まれる。

研究成果の概要(英文)：We screened conditions for crystallization of class II LitR-LOV protein complex, but we were unable to identify the proper condition among 5,800 conditions. We showed that class III LitR serves as UV-A sensor, and controls the expression of folate biosynthesis gene. We also found that γ -PGA production in Bacillus subtilis natto is repressed in a photo-dependent manner.

研究分野：微生物遺伝学

キーワード：光センサー LitR/CarHファミリー ビタミンB12 カロテノイド Burkholderia属細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

LitR/CarH ファミリーの多様な光感知機構は、ビタミン B12 をアンテナ分子に利用することで青色～緑色光を感知する MerR 型転写調節タンパク質である。2015 年に LitR/CarH の光依存的なタンパク質構造変化が解明され、バクテリアに特異的に分布する新規な光センサーとして注目されている (Nature(2015)526:536)。LitR の特徴はホモログ遺伝子が 3 割のゲノム解読株に見つかることであり、光感知ドメインの分子系統解析に基づいて少なくとも 5 クラスに分類されることが予想されている。我々はクラス I LitR が B12 タイプであること、クラス II は青色光センサー-LOV タンパク質のエフェクターとして機能することを明らかにしてきた。他のクラス群についても遺伝子発現が光で誘導されることから、それぞれにユニークな光感知メカニズムの存在が予想され、これまでに考えられてこなかった非光合成細菌における光センサーの多様性を示唆している。また、LitR 近傍には光受容遺伝子としてプロテオロドプシン、LOV、BLUF および PYP、光ストレス防御遺伝子として光回復酵素遺伝子、カロテノイド合成遺伝子、細胞膜フラン脂肪酸合成遺伝子、葉酸合成遺伝子などが多くのバクテリアにおいて見つかる。したがって、LitR ファミリーの機能と役割に関する研究は、新規な光センサーや光関連遺伝子の発見につながるが大いに期待される。

上記の細菌ゲノムにおける光センサーの分布に基づいて行った微生物スクリーニングによってアミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* のカロテノイド生産が光照射によって著しく促進されることを見出し、LitR とは異なるファミリーに属する MarR 型転写調節タンパク質 LimR がカロテノイド合成遺伝子群の光依存的な発現に関与することを明らかにしてきた。これら発見は我々独自の研究にもとづく知見、ゲノム情報、遺伝子発現変動データを用いた複合的な解析によって生み出されたものである。また、これら光センサー候補は既知のアンテナ分子を利用しないことから、新規なタイプの光センサーである可能性が極めて高く、今後インパクトの大きな研究へと進展すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では我々がこれまでに積み重ねてきた研究成果をベースに多様な光センサーの分子特性ならびにユニークな光応答現象の探索・解析を通じて、一般細菌の光応答の多様性と普遍的なメカニズムを解明し、光に関わる新しい共通概念を提示する。これにより細菌の環境適応機構の新たな領域に光を当てるとともに微生物利用性を拡大する。本研究で得られる知見は、光スイッチを利用した有用物質生産制御などの微生物機能を利用したオプトジェネティクス分野の新しい基礎となることが高く見込まれる。

(1) クラス II LitR 蛋白質と LOV 複合体の立体構造解明 本蛋白質複合体の立体構造を明らかにすることで、機能と構造の相関関係を明確にし、新しい光感知機構の全容を解明することを目的とした。

(2) クラス III LitR 蛋白質を介した光応答機構 *Burkholderia multivorans* 由来の光センサー候補蛋白質クラス III LitR のアンテナ分子として働く低分子化合物の同定を通じて、新規な光センサー機能の解明を目的とした。

(3) アミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* が有する 2 つの光応答システム 本研究では、トランスクリプトーム解析によるゲノムワイドな光応答遺伝子の同定および LimR の DNA 結合特性に関する生化学的な解析を通じて、本菌における光応答系の包括的理解とその分子機構の解明を目的とした。

(4) 納豆菌 *Bacillus subtilis natto* の粘性物質生産の光抑制機構 我々は納豆菌における細胞外粘性物質の生産が光照射により抑制される現象を見出した。本研究では粘性物質生産の光抑制メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

上記の課題において、大腸菌で大量発現させた組換えタンパク質を高純度に精製し、各種分子生物学的解析に供することで機能を評価した。遺伝子機能はノックアウト株における転写解析によって評価した。また、必要に応じて DNA マイクロアレイもしくは RNAseq 解析によるトランスクリプトーム解析を実施した。カロテノイドや γ -ポリグルタミン酸の定量は定法に従った。

4. 研究成果

(1) クラス II LitR 蛋白質と LOV 複合体の立体構造解明 クラス II LitR と LOV の相互作用に関する詳細なデータを収集し、新たな構造と機能の相関を明らかにすることを目的として X 線結晶構造解析法を用いた立体構造解析を試みた。結晶化に用いる蛋白質溶液は高純度かつ高濃度であることが要求されるため、精製ステップを増やし、高純度の蛋白質溶液を得た。複数のスクリーニングキットを用いてハンギングドロップ法により結晶化条件の検討を行った。LitR と LOV の結合を維持するために光照射をしながらインキュベーションを行い、蛋白質のものと思われる結晶を得た。解析に十分な大きさの結晶を得るため、結晶が確認された条件の沈殿剤の濃度や緩衝液の pH、塩の種類について条件の最適化を行った。その結果得られた比較的大きな結晶を用いて X 線照射により回折像を取得した。しかし、得られた回折斑は非常に少なく、中心から離れた位置にのみ見られた。これにより得られていた結晶は塩類のものである可能性も考えられた。再度蛋白質の結晶を得るために結晶化条件のスクリーニングを行い、約 5,800 通りの条件を検討したが、蛋白質の結晶化には至らなかった。

(2) クラス III LitR 蛋白質を介した光応答機構 我々は土壌細菌 *Burkholderia multivorans* のクラス III LitR の遺伝生化学的な解析を実施し、クラス III LitR が 350nm 付近に吸収を示す UV-A センサーとして働くことを明らかにした。具体的には、大腸菌から精製した組み換え LitR タンパク質は UV-A 付近帯に特徴的な吸収を示し、UV-A 照射によって吸光度の低下が見られ、暗条件におけるインキュベーションで回復する光サイクルが確認された。また、UV-A 照射によって DNA 結合能の低下が認められ、これらの性質より、クラス III LitR は UV-A センサーとして機能することが予想された。また、*litR* 遺伝子の近傍には葉酸合成遺伝子が存在し、*litR* 破壊株においては転写レベルに加えて、葉酸の合成量が増加していた。葉酸は LitR 制御下にある光回復酵素の補酵素としての役割を担うことが予想されている。実体が明らかになっていないアンテナ分子の同定を通じて新規なタイプの光センサーの機能証明を今後進めていく。

(3) アミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* が有する 2 つの光応答システム トランスクリプトーム解析の結果、これまでの観察と一致してカロテノイド合成遺伝子オペロンの光による強い転写誘導が確認された。また、セミ定量 RT-PCR 解析によって、LimR は *crt* 遺伝子の発現を暗条件で抑制するリプレッサーとして機能し、明条件においてはその機能が不活性化することが予想された。ゲルシフトアッセイによる LimR タンパク質とプロモーター領域の相互作用解析を行い、LimR はカロテノイド合成遺伝子プロモーター領域に特異的に結合することを確認した。また、LimR の機能調節を司るリガンドとして予想された既知クロモフォアとの相互作用が確認されなかったことから、従来型とは異なる光応答制御機構の存在が示唆された。

トランスクリプトーム解析はまた、鉄取り込みトランスポーター遺伝子群の転写レベルが暗

条件と比べて明条件下において顕著に上昇していることを明らかにした。これらの遺伝子群は鉄センサー型転写抑制タンパク質 DtxR の直接的な制御下にあり、鉄欠乏時に発現が誘導されることが知られている。そこで、*dtxR* 破壊株における転写レベルを解析した結果、各遺伝子群とも明暗の両条件下において構成的な発現を示すことが判明した。一方、*limR* 破壊株では光依存的な転写誘導が認められた。以上の結果より、*C. glutamicum* には LimR を介したカロテノイド合成遺伝子群に加えて、それとは独立に働く DtxR を介した鉄取り込みトランスポーター遺伝子群の光誘導システムが存在することが明らかになった。カロテノイドは光照射によって生じる活性酸素のクエンチング活性を有することが知られているが、光照射時における鉄取り込みトランスポーターの役割は全く調べられておらず、新規な光応答システムであることが予想される。

(4) 納豆菌の粘性物質生産の光抑制機構 納豆菌が生産する粘性物質は、グルタミン酸の重合体である γ -ポリグルタミン酸(γ -PGA)とフルクトースの重合体であるレバンから構成される。納豆菌を明・暗条件下で液体培養した菌体から γ -PGA とレバンを抽出し、それぞれを定量した。その結果、明暗による増殖の違いとレバンの生産量に顕著な違いは認められなかったが、 γ -PGA 生産量は青色光の照射により強く抑制されていることが判明した。また、固体培地を用いた実験においても同様の結果が認められた。このことから、光照射は γ -PGA 生産を特異的に抑制すると考えられた。次に、光の波長帯と強度の γ -PGA 生産に対する影響を調べた結果、緑色や赤色光の照射によっても γ -PGA 生産の抑制が認められた。また、強度が $9.60 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ sec per } \mu\text{A}$ の青色光によって γ -PGA 生産の光抑制が認められた。これらのことから、光照射によって生じる酸化ストレスが γ -PGA の生産抑制に関与している可能性が考えられた。

納豆菌による γ -PGA 合成は、*ywsC-ywtABCD* 遺伝子群にコードされる酵素群によって進行する。そこで、本合成酵素群の活性に対する光の影響を調査するために、大腸菌を宿主として納豆菌由来の γ -PGA 合成遺伝子群を発現させ、 γ -PGA 生産量を測定した。ベクターのみ導入した大腸菌株では γ -PGA 量はわずかにしか検出されなかった。一方、T7 プロモーターの下流に γ -PGA 合成遺伝子群を導入した株では、暗条件で γ -PGA の生産が認められ、光照射下でその生産は低下した。この大腸菌株の増殖は光照射に影響されなかった。T7 プロモーターの活性は明暗で影響を受けないことから、観察された光抑制には転写後の調節機構が関与していることが強く示唆された。次に、実際の納豆製造における光の影響を調査することを目的として、大豆の発酵に対する光照射の影響を調査した。発酵後、攪拌前の見た目では光の影響は観察されなかったが、攪拌すると光照射下で調製した納豆では粘性が顕著に低下していることが認められた。このことから、納豆の発酵過程において光による粘性物質の生産抑制が起きることが判明した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- 1) S. Sumi, H. Shiratori-Takano, K. Ueda, H. Takano, Role and Function of Class III LitR, a Photosensor Homolog from *Burkholderia multivorans*, *Journal of Bacteriology*, 査読有, 200/14, 1-18, 2018, DOI: 10.1128/JB.00285-18.
- 2) 高野英晃, バクテリアから見つかった光センサータンパク質: LitR/CarH ファミリーの多様な光感知機構とその役割, アグリバイオ, 査読無, 2/ 13, 41-46, 2018.
- 3) H. Takano, K. Mise, T. Maruyama, K. Hagiwara, K. Ueda, Role of the semi-conserved histidine residue in the light-sensing domain of LitR, a MerR-type photosensory

transcriptional regulator, *Microbiology*, 査読有, 162/8, 1500-1509, 2016, DOI: 10.1099/mic.0.000321.

〔学会発表〕(計 20 件)

- 1) 丸山貴史, 小林暢, 角悟, 高野(白鳥)初美, 兼崎友, 吉川博文, 上田賢志, 高野英晃, *Pseudomonas* 属細菌のクラス II LitR を介した光応答メカニズム, 日本農芸化学会大会 2019 年度東京大会(2019/3/26, 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区))
- 2) 秋山るしあ, 岡添孝章, 見世光, 相澤朋子, 浦井誠, 上田賢志, 高野英晃, 納豆菌における -ポリグルタミン酸生産の光抑制メカニズムの解析, 日本農芸化学会大会 2019 年度東京大会(2019/3/26, 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区))
- 3) 角悟, 兼崎友, 吉川博文, 上田賢志, 高野英晃, 有用微生物群の光環境応答メカニズムに関する研究, 東京農業大学生物資源ゲノム解析拠点研究報告会(2019/2/15, 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区))
- 4) 角悟, 按田瑞恵, Salvatore Cosentino, 岩崎渉, 上田賢志, 高野英晃, オプトジェネティクスに資する微生物光センサーの探索, 新学術領域「先進ゲノム支援」2018 年度拡大班会議(2018/12/21, 九州大学医学部百年講堂(福岡県福岡市))
- 5) 角悟, 高野(白鳥)初美, 上田賢志, 高野英晃, 光センサークラス III LitR を保有する *Burkholderia multivorans* の光依存的な転写調節に関する解析, 日本農芸化学会関東支部 2018 年度大会(2018/10/13, 東京理科大学野田キャンパス(千葉県野田市))
- 6) 鈴木勇人, 安井瑞稀, 角悟, 上田賢志, 高野英晃, *Corynebacterium glutamicum* が有する 2 つの光誘導システムの解析, 2018 年度日本放線菌学会大会(2018/10/10, 武蔵野大学(東京都江東区))
- 7) 田島侑, 柴山新, 荒木知珠, 角悟, 高野(白鳥)初美, 上田賢志, 高野英晃, ゴム分解性細菌 *Gordonia polyisoprenivorans* VH2 におけるカロテノイド生産の光誘導メカニズムの解析, 2018 年度日本放線菌学会大会(2018/10/10, 武蔵野大学(東京都江東区))
- 8) 高野英晃, RNAseq によるバクテリア光応答の横断的解析, 平成 30 年度(2018 年度) 遺伝研研究会(2018/8/21, 国立遺伝学研究所(静岡県三島市))
- 9) S. Sumi, K. Ueda, H. Takano, Light-Dependent Transcriptional Regulation in *Burkholderia multivorans*, ASM Microbe 2018(2018/6/8, Georgia World Congress Center(米国アトランタ))
- 10) 柴山新, 田島侑, 荒木知珠, 角悟, 高野(白鳥)初美, 上田賢志, 高野英晃, *Gordonia* 属細菌の光依存的なカロテノイド生産メカニズムの解析, 日本農芸化学会 2018 年度大会(2018/3/16, 名城大学(愛知県名古屋市))
- 11) 角悟, 高野(白鳥)初美, 上田賢志, 高野英晃, 細菌型光センサー Class III LitR の光受容に関わるシステイン残基の解析, 日本農芸化学会 2018 年度大会(2018/3/16, 名城大学(愛知県名古屋市))
- 12) 角悟, 高野(白鳥)初美, 上田賢志, 高野英晃, Class III LitR の光感知におけるシステイン残基の役割, 第 12 回日本ゲノム微生物学会年会(2018/3/7, 京都大学桂キャンパス(京都府京都市))
- 13) 丸山貴史, 小林暢, 角悟, 高野(白鳥)初美, 兼崎友, 吉川博文, 上田賢志, 高野英晃, *Pseudomonas* 属細菌のクラス II LitR を介した光応答メカニズム, 第 12 回日本ゲノム微生物学会年会(2018/3/7, 京都大学桂キャンパス(京都府京都市))

- 14) 高野英晃, バクテリアの多様な光応答を支える光スイッチ群に関する研究, 新学術領域「先進ゲノム支援」拡大会議(2018/1/11, マロウドインターナショナルホテル成田(千葉県成田市))
- 15) 角悟, 高野(白鳥)初美, 上田賢志, 高野英晃, 新たな光センサー型転写調節蛋白質 LitR, 第 32 回日本放線菌学会大会(2017/9/8, 若里市民文化ホール(長野県長野市))
- 16) 柴山新, 田島侑, 荒木知珠, 角悟, 高野(白鳥)初美, 上田賢志, 高野英晃, *Gordonia* 属細菌におけるカロテノイド生産の光誘導メカニズムの解析, 第 32 回日本放線菌学会大会(2017/9/8, 若里市民文化ホール(長野県長野市))
- 17) 高野英晃, 見世光, 萩原健太, 平田直哉, 渡辺祥子, 高野(白鳥)初美, 上田賢志, *Bacillus* 属細菌の光応答: LitR ファミリーを介した光依存的なカロテノイド生産, 環境微生物系学会合同大会 2017(2017/8/30, 東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市))
- 18) H. Takano, LitR, a MerR-family transcriptional regulator of *Bacillus megaterium*: its role and function in light-inducible carotenoid production, FEMS2017(2017/7/12, Feria Valencia-Convention & Exhibition Centre(Spain, Valencia))
- 19) 小林暢, 丸山貴史, 上田賢志, 高野英晃, *Pseudomonas* 属細菌における Class II LitR を介した光応答メカニズムの解明, 日本農芸化学会(2017/3/19, 京都女子大学(京都府京都市))
- 20) 角悟, 高野(白鳥)初美, 上田賢志, 高野英晃, *Burkholderia multivorans* における葉酸合成の光誘導メカニズムの解析, 第 11 回日本ゲノム微生物学会(2017/3/3, 慶応大学湘南キャンパス(神奈川県藤沢市))

〔その他〕

ホームページ等

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

<https://www.abs-brs.com/research/lab-bt/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。