

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：34303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14381

研究課題名(和文)葉面細菌Methylobacterium属が有する光応答システムの統合的解析

研究課題名(英文)Analysis on the light responsive regulatory system in the epiphytic bacteria
Methylobacterium sp.

研究代表者

井口 博之 (IGUCHI, Hiroyuki)

京都先端科学大学・バイオ環境学部・講師

研究者番号：30712020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：葉面細菌Methylobacteriumが多種類保有する光応答因子の植物上での生育における役割や、複数保有する意義、それらを介した制御システムを解明しようと研究を行った。光受容体や葉緑素の遺伝子を発現させて機能を調べたところ、いくつかは光吸収の機能を持つことを示し、機能する複数の光応答因子を備えていることが確かめられた。マイクロアレイ解析により、青光に転写応答する遺伝子を見つけることができ、青光に応答する遺伝子と表現型とを結びつけられた。申請者の先行研究で青色光に応答することを見出していた時計遺伝子オルソログについては、Kaiタンパク質間の相互作用の有無を示し、制御機構の一端を明らかにできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Methylobacterium属細菌は、主要な葉面細菌であり植物生長促進作用という有用形質がある一方、水環境においてはバイオフィルムを形成する問題形質がある。本菌の光応答に関する理解は、葉面という光を強く浴びる環境における微生物生態に関する学術的知見を与えると共に、光を用いたMethylobacteriumの良し/悪しの形質を制御する技術開発に資すると考えている。本研究の成果により、Methylobacteriumの光応答に関わる光受容体や遺伝子、表現型が明らかになるなど、着実に上記に関連する理解が進展してきている。

研究成果の概要(英文)：The epiphytic bacteria, Methylobacterium species, possess many light responsive factors such as light receptor and chlorophyll genes. Analysis of gene products revealed that some products had light absorbance properties, showing that Methylobacterium harbors the multiple light responsive abilities. Microarray analysis uncovered the genes that transcriptionally respond to blue light. The genes included the one relative to motility, stress response, and methanol metabolism, which could connect to the light responsive phenotypes revealed in another study. Furthermore, the protein interaction between KaiC, KaiB, and KaiR was studied, and the result provided the new knowledge on the regulatory mechanism via clock proteins.

研究分野：応用微生物学

キーワード：光応答 光受容体 時計遺伝子 葉面細菌

1. 研究開始当初の背景

生物は安定して生育するために、めまぐるしい環境変化への対応を求められる。太陽光は普遍的に存在し、陰/陽の一時的な、また昼/夜の周期的な環境変化を生む。光は微生物にとって、紫外線や熱に代表される傷害作用ばかりでなく、エネルギーやシグナルとしての働きが知られる。そして光量や波長は人為的に操作しやすい要素にも関わらず、実験室培養に光は用いられないため、微生物の光応答はほとんど知られていない。

申請者は、光照射下での細菌の未知能力および葉面細菌の生態・生存戦略を知るため、太陽光の影響を強く受ける植物葉上に生息する主要な細菌、*Methylobacterium* 属の光応答機構を研究してきた。研究の中で、本菌が青色光に応答して、様々な能力(増殖・ストレス耐性・バイオフィーム形成・植物定着)を変化させることを見出し、この応答に光受容体遺伝子と *kaiC* 遺伝子が関与することを明らかにしてきた。

研究で扱う *M. extorquens* は、光応答に関係する多様な遺伝子を保有する。青色光の感知に関わる光受容体(LOVとBLUF)遺伝子は8個も存在するが、複数保有の役割・意義は不明である。一般に光エネルギー利用に関わるバクテリオクロロフィルとH-ポンプ型ロドプシンをコードする遺伝子も保有するが、本菌の細胞内や葉上環境における機能は不明である。時計遺伝子オルソログである *kaiC* 遺伝子は、*kaiB* と *kaiR* 遺伝子と共に各2コピーずつ存在するが、その制御システムは未解明であり、光受容体を介した制御系との関わりが示唆されている。申請者の研究により *Methylobacterium* の光応答機構は部分的に分かってきたが、上述した多数の因子の制御システムにおける関わり合いは分かっておらず、各遺伝子・タンパク質の機能や制御機構を含めた光応答システムの全体的な理解を本研究課題として目指す。

2. 研究の目的

従来の研究では、光受容体をはじめ光関連の遺伝子は個々に解析され、機能や制御機構に関する知見が蓄積されてきた。ところが細菌は複数種の光応答遺伝子を保有するため、1細菌が持つ光応答の制御システムと生育生存に係る役割を知るためには、統合的な解析が必要になる。このため本研究では、光受容体、光エネルギー利用因子、*kai* 遺伝子について相互の関連性に着目した生理・制御機能の解析を行い、さらにゲノム網羅的解析も加えることで、*Methylobacterium* 属細菌の光応答システムの全体的な理解および、葉上での生理生態の理解を深める。

光を用いた微生物制御技術の開発に資する知見を得ることも重要な目的である。光は波長・強度とも容易に調節できる優れたツールである。光照射により本属菌の有益な(植物生長促進)形質を誘導できれば、植物工場などにおいて微生物資材としての利用展開を広げられる。一方、光照射により本菌の増殖やバイオフィーム形成を抑制できれば、水配管中の(水道・冷却水など)障害・清掃に伴う多大な損失や衛生悪化を回避できる産業上有用な技術になる。光に応答する遺伝子・機能発現や制御機構に関する結果から、これら応用可能性について考えていく。

3. 研究の方法

(1)光受容体・ロドプシンの機能解析

光受容体遺伝子とロドプシン遺伝子を発現させ、各タンパク質の機能解析を行うため、遺伝子を発現ベクターに組み込み大腸菌でのタンパク質生産を試みた。ベクターとしては、pET系、pGEX系、pCold系を使用し、大腸菌ホストにはBL21株、Rosetta株を使用した。大腸菌の培養温度は、37と15を検討した。培養した大腸菌は集菌後、ビーズ破砕し、遠心上清を可溶画分として使用した。His-tagを付加して発現したものは、Ni-resinカラムで簡易に精製した。SDS-PAGEによりタンパク質を確認し、分光光度計でタンパク質の吸光スペクトルを分析した。

(2)バクテリオクロロフィル(Bch)の生産条件

Bch遺伝子(オペロン)のプロモーターを、ジオキシゲナーゼ遺伝子 *xyIE* に連結したレポーター系を構築し、*M. extorquens* に導入した。これを各種の培養条件(固体/液体、明/暗、各種炭素源)で培養した。そこから回収した菌体をビーズ破砕、遠心分離して得た上清をカテコールと反応させ、365nmの吸光度変化を経時測定することで遺伝子発現量、すなわちプロモーター活性を求めた。

Bch生産量の測定には、各種の条件で培養した菌体を回収し、メタノール/アセトン溶液で抽出し、遠心分離して得た上清について分光光度計を用いてスペクトル分析した。

(3)光応答の制御機構

青色光の照射と暗の2条件で培養した菌体からRNAを抽出し、マイクロアレイ解析(受託解析)に供した。転写変化が大きく、機能が注目された遺伝子については、相同組み換えにより遺伝子破壊を行うためのプラスミドを作成し、*M. extorquens* に導入して遺伝子破壊株を取得した。

(4)時計遺伝子を介した制御システム

Kaiタンパク質間の相互作用を調べるため、酵母two-hybrid試験を行った。市販のGold Yeast Two-Hybrid Systemを用いた。プラスミドに各 *kai* 遺伝子を導入し、これを用いて酵母を形質転換した。酵母を30あるいは23で培養、回収した菌体をビーズ破砕し、遠心分離して得た上清をウエスタン解析に供した。これにより遺伝子が正常に発現できているか確認した。

酵母 two-hybrid 試験では、2 種のプラスミド (prey と bait) を酵母に導入し、生育したコロニーが His 非要求性かつ Adenine 非要求性かつ Aureobasidin A 耐性になったことを以て相互作用が有ると判断した。

4. 研究成果

下記の項目(1)(2)は光エネルギー利用に関わる因子の機能解明、(1)(3)(4)は光受容体および時計遺伝子を介した光応答制御システムの解明を目指して研究を行った。

(1)光受容体・ロドプシンの機能解析

光受容体遺伝子 (LOV, 6 個; BLUF, 2 個; PYP, 1 個; Phytochrome, 1 個) とロドプシン遺伝子が大腸菌で発現させ、そのタンパク質の性質を調べた。いずれの遺伝子も pET システムを用いたときには、可溶性タンパクとして発現させることはできなかった。そこで pCold システムを使い、低温 (15) で発現誘導を試みた結果、光受容体遺伝子 8 個を可溶性タンパク質として発現でき、融合させた His タグを利用してカラム精製を行った。SDS-PAGE に供した結果、これら 8 個のタンパク質はいずれも正常なサイズであることを確認できた。スペクトル分析を行った結果、1 個の推定 LOV タンパク質と 1 個の推定 BLUF タンパク質について (図 1)、450 nm 付近に極大吸収波長が見られ、青光の吸収特性があることが明らかになった。またこれらの 2 個のタンパク質は、黄色を呈していた。また別の 1 個の推定 BLUF タンパク質も黄色を呈していたが、His-tag カラムでは精製できなかったため、他の担体による精製を検討している。

ロドプシン遺伝子は、pET システム、pCold システム、pGEX システム (GST 融合) を用いて大腸菌での発現を試みたが、発現しない、あるいは発現してもサイズが異常という結果になり、タンパク質を得ることができなかった。今後、別の *Methylobacterium* 株が持つロドプシン遺伝子の発現・機能解析を行おうと考えている。

(2)バクテリオクロロフィル (Bch) の生産条件

古い報告では、1,2-propanediol という特殊な炭素源を用い、明暗サイクル下で培養したときに Bch を生産するとある (FEBS LETTERS 85:207-210, 1978)。この条件、また通常培養に用いられる条件で *M. extorquens* を培養したが Bch 生産は認められなかった。そこで Bch 遺伝子がよく発現する条件を探すために、レポーターアッセイを行うことにした。Bch 遺伝子は数十個ほどあるため、そのうち主要なオペロンのプロモーター 2 個を選び、カテコールジオキシングナーゼ遺伝子 *xyIE* と連結したプラスミドをそれぞれ構築した。各種条件で培養し、活性を測定した結果、炭素源をメタノールとし、連続明としたときに発現量が高いことが分かった。本条件で野生株を培養し、抽出液をスペクトル分析したが、Bch 生産は認められなかった。また Bch の前駆体となるアミノ酸を添加しても Bch を生産しなかった。

そこでゲノム情報を見直したところ、*M. extorquens* では Bch 生合成経路のうち chlorophyllide reductase 遺伝子が欠損していることが分かった。本遺伝子を持ち生合成経路が完全な *Methylobacterium* を検索したところ、*M. phyllosphaerae* が見つかった。この菌株の培養抽出液を分析すると、Bch に相当する光吸収が認められた。培養条件を様々試したところ、明条件よりも暗条件の方が Bch 生産が多く、光による生産阻害あるいは分解が起きていると推察された。今後、*M. phyllosphaerae* において Bch 遺伝子の破壊、または *M. extorquens* において chlorophyllide reductase 遺伝子発現を行い、親株との比較により Bch の機能を明らかにしようと考えている。

(3)光応答の制御機構

M. extorquens は、青色光と赤色光に応答して表現型 (生育速度、バイオフィーム形成、ストレス耐性など) を変えることを以前に報告している。青色光への光受容体が多数存在することから、その制御システムの全体像を明らかにしようとしてマイクロアレイ解析を行った。青色光照射培養と暗所培養とを比較した結果、運動性、ストレス応答、メタノール代謝に関わる遺伝子が転写量変化の大きいものとして抽出された。これら結果より、光応答する遺伝子と表現型を一部結びつけられた。さらに、2 個の光受容体遺伝子の転写が青色光に応答することが判明した。しかし *kaiC* 遺伝子は抽出されず、過去の RT-PCR の実験結果と異なるため、追試が必要と判断した。今後、光受容体遺伝子破壊株を利用して、上記の青色光によって転写制御を受ける遺伝子が、いずれの光受容体の制御下にあるか明らかにしようと考えている。

(4)時計遺伝子を介した制御システム

M. extorquens は、*kaiC1-kaiB2-kaiB1-kaiR1* と *kaiC2-kaiR2* の 2 つのオペロン、6 個の *kai* 遺伝子を保有する。シアノバクテリアの概日時計システムや、本菌のタンパク質ドメインより、これら *kai* 遺伝子産物 (Kai タンパク質) はタンパク質間相互作用を介して制御を行っていることが推測されたため、酵母 two-hybrid を利用してタンパク質間相互作用を調べようとした。プラスミドに *kai* 遺伝子を導入し、宿主酵母でのタンパク質の生産を western 解析により調べたところ、いくつかの遺伝子について正常サイズのタンパク質を認めた。これらについて酵母 two-hybrid 試験を行った結果、KaiC2 と KaiR2 に相互作用があることが明らかになった。今後、タグなどを利用して正常タンパク質生産を達成、残る two-hybrid 試験を行うと共に、*in vitro* 実験により相互作用の詳細を明らかにしていく。

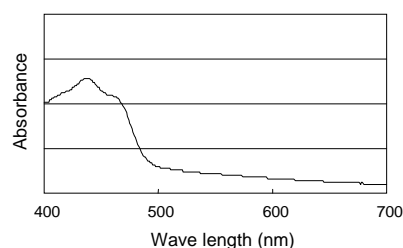


図 1. 大腸菌で生産させ、His-tag 精製した推定 BLUF タンパク質の吸収スペクトル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 井口 博之、金ヶ崎 三千翔、石井 沙弥、田口 和真 |
| 2. 発表標題 光照射により誘導される葉面細菌の色素生産 |
| 3. 学会等名 日本生物工学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|