

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05781

研究課題名（和文）バクテリア光センサーの多様性理解と光による細胞制御技術の開発

研究課題名（英文）Understanding the diversity of bacterial photosensors and developing light-based cell regulation technology

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ゲノム情報などより独自に見出した光センサー候補の遺伝学的な解析を実施した。放線菌 *Streptomyces griseus* の SigK-RskA システムがこれまでに報告例のない新規な光誘導系であり、RskA が SigK に対するアンチシグマ因子として機能することを明らかにした。酢酸菌群の一部が LOV-HTH 型光センサーを有し、*Gluconacetobacter* において光回復酵素遺伝子の発現を青色光特異的に誘導することを明らかにした。*Corynebacterium* より見出した光センサー候補 CrtR がグラム陰性 *Shingobacterium* 属細菌においてもカロテノイドの光誘導に関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光センサータンパク質は動物・植物・微生物における革新的な細胞制御技術「光遺伝学」におけるツールとして注目されている。本研究で得られた基礎知見は、今後の研究の進展によって、新規な光遺伝学ツールとなりうる。とくに、低コストかつ短時間で高い物質生産能を有する微生物においては、これまでの環境負荷の高い低分子化合物から再利用可能な LED 光源を利用した遺伝子発現誘導へと移行することで、環境にやさしい組換えタンパク質や物質生産系の構築につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Genetic analysis of candidate photosensors originally identified from genome information was conducted. The SigK-RskA system of the actinomycete *Streptomyces griseus* is a novel light induction system that has never been reported before, and RskA functions as an anti-sigma factor against SigK. A part of the acetic acid bacteria group possesses a LOV-HTH type photosensor. LOV-HTH induced blue light-specific expression of photolyase genes in *Gluconacetobacter*. We found that CrtR homolog of *Shingobacterium* sp. is also involved in light induction of carotenoids.

研究分野：応用微生物

キーワード：光センサー 放線菌 酢酸菌 バクテロイデテス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々はビタミン B12 をクロモフォアに利用する新しい光センサー LitR が放線菌、バチルス、サーマス、シュードモナス属細菌などの有用微生物群で機能していることを明らかにしてきた。このことは、光合成能をもたない非光合成細菌にも広く光感知能が備わっていることを示しているとともに、LitR とは異なる新しい光センサーの存在を想起させた。我々が独自に行った光応答性微生物株の探索・網羅的な遺伝子発現解析・ゲノム比較解析を含む多角的なスクリーニングによって、新規な光センサー候補を複数見出すことに成功し、非光合成細菌群の新しい光感知機構の存在が予想されていた。近年、光によって細胞機能を非侵襲的に制御する技術「光遺伝学」が動物・植物・微生物分野で注目されている。また、ゲノム編集技術との併用によって時空間的制御可能なゲノム改変・制御が可能になりつつある。したがって、本研究で得られる知見は光遺伝学の新しいツールの提供を通じて、その発展に寄与することが見込まれる。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでの多角的スクリーニングによって新しい光センサー・システム候補として見出した放線菌 *Streptomyces griseus* の SigK-RskA システム、アミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* の CrtR 転写調節タンパク質の遺伝生化学的な解析を実施した。また、重要な発酵工業細菌である酢酸菌群より植物青色光センサー“フォトリロピン”のホモログ LOV の存在をゲノム情報より見出した。これらの3株は工業微生物であることから、光による物質生産制御の応用を見据えて、光感知機構の基礎的な理解を目的とした。

### 3. 研究の方法

研究対象とした *Streptomyces griseus* NBRC13350、*Gluconacetobacter liquefaciens* NBRC 12388、*Komagataeibacter europaeus* JCM 16935、*Shingobacterium mizutaii* NBRC 14946 は公的分譲機関より取寄せた。遺伝子発現解析はセミ定量 RT-PCR 法、定量 RT-PCR 法、 $\beta$ -グルクロニダーゼをレポーター酵素とする転写活性測定法を用いた。接合伝達宿主大腸菌 S17-1 pir 株、広宿主域プラスミド pCM130 は、それぞれ国立遺伝学研究所と米国 Addgene より取寄せた。ゲノムワイドな転写開始点決定はダナフォーム社の改良型 CAGE 法によって行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 放線菌 *Streptomyces griseus* NBRC13350 の光誘導制御系 SigK-RskA

RNA-seq 解析によって、本菌の光誘導的に発現量が増加する遺伝子群を複数見出した。その中で、再現性良く光誘導的な転写を示したのは、RNA ポリメラーゼシグマ因子 *sigK* とその活性を阻害するとアンチシグマ因子 *rskA* 遺伝子であった。また、その近傍には、本菌から 1949 年に生物で初めて見出された DNA 修復現象である光回復現象に関与する酵素 Deoxyribodipyrimidine photolyase (Phr) が並んでコードされていた。*sigK* プロモーター配列は、結核菌 SigK 認識配列とよく類似しており、*sigK-rskA-phr* の 3 遺伝子はオペロンを成すことが予想された。さらに、*sigK* 近傍には光酸化ストレス応答に関与するシクロプロパン環脂肪酸合成酵素遺伝子 *cfa* が存在し、*cfa* とオペロンを形成する *SGR\_5877* プロモーター配列も SigK 認識配列の存在が認められた。なお、転写開始点はダナフォーム社の改良型 CAGE 法によって網羅的に決定した。*sigK* クラ

スターは類縁菌でも保存されていることから、*phr* と *cfa* の発現が SigK-RskA により光依存的に行われることが予想された。また、SigK-RskA は結核菌内のレドックス状態に応答して病原性遺伝子の発現制御を調節することが明らかになっている。その一方で、光との関係性や *Streptomyces* 属細菌における SigK-RskA の役割は不明である。

SigK と RskA の役割および両者の関連性を調査するために、各遺伝子のマーカーレス破壊株を作製し、転写解析を行なった。その結果、野生株における *sigK* クラスターに含まれるすべての遺伝子の転写レベルが光照射によって 3~54 倍に増加し、RNA-seq 解析結果と一致していた。また、*rskA* 破壊株の転写量は野生株と比較し、暗条件で *phr* は 10 倍、*sigK* は 34 倍に上昇しており、明条件と同等の値を示していた。このことから、*phr* と *sigK* の発現は RskA により負に制御され、それが光によって解除されることが示唆された。*sigK* 破壊株ではプロモーター領域に SigK の推定認識配列の存在が認められる *SGR\_5877* の転写量は野生株に比べ低下していた。

シグマ因子 SigK はアンチシグマ因子 RskA と結合して阻害され、その阻害が光によって解除されることが予想されている。そこで、大腸菌を宿主とした Two-hybrid 法を用いて、SigK と RskA のタンパク質間相互作用と光の関係を  $\beta$ -galactosidase 活性を指標として確認した。その結果、SigK と RskA の相互作用が確認され、本タンパク質同士は大腸菌内で相互作用していることが示された。一方で、明暗で活性の差は見られず、光によって RskA の SigK 阻害が解除されるといった現象は認められなかった。これは、RskA が膜タンパク質であり、宿主であるレポーター大腸菌内では本来の立体構造通りにフォールディングされず、光を感知して SigK との相互作用を解除する機構が再現できなかったためだと考えられる。本研究で行なった遺伝学的な転写解析と *in vivo* での SigK-RskA タンパク質間相互作用解析により、SigK-RskA 制御系モデルが示唆される。暗条件では *sigK* と *rskA* は一定量転写されているが、RskA が SigK を阻害し、光誘導性遺伝子の発現を抑制している。明条件になるとその抑制は解除され、光誘導的に転写量が増加する。SigK-RskA の相互作用が光を感知し、RskA の阻害から SigK が活性化する機構には、大腸菌内では再現できていないと考えられる膜タンパク質 RskA の膜貫通領域や膜外の領域が関与しているのではないかと予想される。

## (2) グラム陰性 *Shingobacterium mizutaii* NBRC 14946 の光センサー候補 CrtR

グラム陽性 *Corynebacterium* 属細菌より見出した光センサー候補 CrtR がグラム陰性細菌のバクテロイデス門に属する細菌ゲノムに広く分布していた。その中で、グラム陰性細菌 *S. mizutaii* NBRC 14946 株のカロテノイド生産が光によって誘導されることを見出した。本菌はカロテノイド合成遺伝子クラスターを 2 つ有し、その合成遺伝子上流には共通して *crtR* 相同遺伝子 (*crtR1*、*crtR2*) がコードされていた。*crtR* とカロテノイド合成遺伝子はオペロンを形成していると予想され、2 クラスターの構成遺伝子群は互いに極めて高い相同性を有していたことから、*crtR* が本菌の光誘導に関与することが予想された。

まず本菌の DNA 導入・遺伝子破壊系を確立した。トランスポゾンベクター pHimarEm1 を保有する大腸菌 S17-1 pir 株から接合伝達によって、本菌への効率的な外来 DNA の導入に成功したと同時に、ランダムトランスポゾン系の確立に成功した。そこで、*S. mizutaii* 株の野生株、*crtR1* 破壊株、*crtR2* 破壊株、*crtR1*・2 二重破壊株、その遺伝学的相補株を作製し、LB 固体培地で青色光照射下と暗条件下にて培養した。その結果、*crtR1*・2 二重破壊株においてのみ、光誘導が失われたことによる構成的なカロテノイド生産が認められた。ここで観察されたカロテノイド生産に対する影響は、セミ定量 RT-PCR 法による転写解析によっても確認された。このことから *crtR1* と *crtR2* がカロテノイド生産の光誘導に対して負に作用し、互いにバックアップする関係

性にあることが考えられた。CrtR ホモログがゲノム上に 2 セットコードされている例はこれまでに見つからない。

### (3) グラム陰性酢酸菌の光センサーLOV-HTH の解析

酢酸菌は好氣的酸化により酢酸や機能性分子を生産する有用微生物であり、果実や花といった植物性炭水化物が多く含まれる環境から分離される。しかし、酢酸菌における光応答に関する知見は見つからない。我々のゲノム情報に基づく調査によって、酢酸菌の一部は、青色光センサー(LOV)と DNA 結合ドメイン(HTH)が融合した LOV-HTH タンパク質、それとは別にヒスチジンキナーゼ(HK)とレスポンスレギュレーター(RR)が融合した LOV-HK-RR タンパク質のホモログを保有することが示唆され、クロモフォアであるフラビンとの相互作用に必須なアミノ酸残基が保存されていたことから、青色光センサーとして働くことが強く示唆された。本研究では、LOV 保有酢酸菌を対象とした遺伝子発現解析によって、光感知能力を持った酢酸菌の同定とその LOV 遺伝子の機能解明を目的とした。

ドイツの酢酸発酵槽より分離された *K. europaeus* JCM16935 株、国内の干し柿から分離された *G. liquefaciens* NBRC 12388 を明・暗条件において培養し、セミ RT-PCR 法による遺伝子発現解析を行った。その結果、LOV-HTH の発現は構成的であったが、隣接する DNA 修復酵素遺伝子 *phr* の発現は青色光によって顕著に誘導された。このことから、LOV-HTH が *phr* の発現に対してポジティブに作用するアクチベーターとして機能することが予想された。一方、LOV-HK-RR および近傍のカロテノイド合成遺伝子の発現は、暗条件に比べて明条件においてわずかに転写レベルの増加が確認された。

次に光誘導が確認された *G. liquefaciens* NBRC 12388 の DNA 導入系を確立した。RK2 ori とテトラサイクリン耐性遺伝子を有する pCM130 プラスミドが、酢酸菌群に一般的なエレクトロポレーションおよび接合伝達によって効率的に本菌に導入可能であることが判明した。また、レポーターアッセイベクターとして pCM130 に大腸菌  $\beta$ -グルクロニダーゼ(GUS)を導入した pCM130GUS を構築し、*G. liquefaciens* における転写レベルの光誘導を解析した。その結果、*phr* プロモーターは光によって顕著に上昇した。また、同プラスミド上への LOV-HTH 遺伝子の導入は転写上昇を引き起こし、その転写強度は生育必須遺伝子 *rpoD* プロモーターの 50%程度であった。このことは LOV-HTH がアクチベーターであることを強く示している。また、本系を用いたプロモーターサブクローニング実験によって、LOV-HTH 結合領域は *phr* 開始コドンから上流-40 から -50bp 付近であることが示唆された。転写開始点はダナフォーム社の改良型 CAGE 法によるゲノム全体の網羅的な決定によって、*phr* 遺伝子開始コドン(ATG)の A であることを明らかにした。

ゲノム比較解析より *G. liquefaciens* の LOV-HTH 近傍には光酸化ストレスセンサー-ChrR のホモログがコードされていることが判明した。つまり、2 種類の光感知システム、1 つは光を直接感知する LOV-HTH、もう一方は細胞内光増感物質(ヘムなど)の光受容に伴って発生する活性酸素種を感知する ChrR の存在を示している。同様の光感知遺伝子のクラスター化は *G. dulcium* LMG 1728 と *G. diazotrophicus* NBRC 110704 にも見られる。果実・花などに棲息する酢酸菌群の光応答はこれまで報告例が見つからないことから、本成果は酢酸菌の生態に新たな知見をもたらすとともに、光によって遺伝子オンオフを可逆的かつ非侵襲的に制御する技術(オプトジェネティクス; 光遺伝学)への応用利用が見込まれる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sumi Satoru, Suzuki Yuto, Matsuki Tetsuro, Yamamoto Takahiro, Tsuruta Yudai, Mise Kou, Kawamura Takuya, Ito Yusuke, Shimada Yuka, Watanabe Erika, Watanabe Shoko, Toriyabe Minami, Takano (Shiratori) Hatsumi, Ueda Kenji, Takano Hideaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Light-inducible carotenoid production controlled by a MarR-type regulator in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-49384-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satoru Sumi, Naotaka Mutaguchi, Teppei Ebuchi, Hiroaki Tsuchida, Takahiro Yamamoto, Maki Suzuki, Chihiro Natsuka, Hatsumi Shiratori-Takano, Masaki Shintani, Hideaki Nojiri, Kenji Ueda, Hideaki Takano	4. 巻 202/20
2. 論文標題 Light-response of <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 mediated by class II LitR, a photosensor homolog	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00146-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高野英晃	4. 巻 58
2. 論文標題 ビタミンB12を利用する光センサータンパク質～細菌カロテノイド研究からの発見～	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 89/96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高野英晃	4. 巻 52
2. 論文標題 ビタミンB12を利用する光受容タンパク質LitRファミリー	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 55/58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koki Omata, Naruhiro Hibi, Shigeru Nakano, Shuji Komoto, Kazuki Sato, Kei Nunokawa, Shoichi Amano, Kenji Ueda, and Hideaki Takano	4. 巻 11
2. 論文標題 Distribution and genome structures of temperate phages in acetic acid bacteria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-00998-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 長束千尋, Salvatore Cosentino, 按田瑞恵, 角悟, 後藤恭宏, 中村佳司, 林哲也, 岩崎涉, 上田賢志, 高野英晃
2. 発表標題 Streptomyces griseus における SigK-RskA 制御系を介した光誘導機構の解析
3. 学会等名 2019年度(第34回)日本放線菌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 真紀, 兼崎 友, 吉川 博文, 上田 賢志, 高野 英晃
2. 発表標題 ミヤコグサ根粒菌 Mesorhizobium japonicum における光誘導性遺伝子の解析
3. 学会等名 第18回微生物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長束千尋, Salvatore Cosentino, 按田瑞恵, 角悟, 後藤恭宏, 中村佳司, 林哲也, 岩崎涉, 上田賢志, 高野英晃
2. 発表標題 放線菌 Streptomyces griseus における SigK-RskA 制御系を介した光誘導機構
3. 学会等名 第18回微生物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高根大, 上田賢志, 高野英晃
2. 発表標題 B12リボスイッチによって制御される放線菌二次代謝合成遺伝子の解析
3. 学会等名 第18回微生物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関根勇人, 上田賢志, 高野英晃
2. 発表標題 CrtRファミリーによるカロテノイド生産の光制御
3. 学会等名 第18回微生物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野英晃
2. 発表標題 細菌カロテノイド生産の光制御～あらたな光センサー候補 CrtR ファミリー～
3. 学会等名 2019 年度遺伝研研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野英晃
2. 発表標題 ビタミンB <sub>12</sub> を利用する光センサータンパク質とその光遺伝学への応用
3. 学会等名 京大大学生存圏研究所・第252回オープンセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 真紀, 兼崎 友, 吉川 博文, 上田 賢志, 高野 英晃
2. 発表標題 ミヤコグサ根粒菌 <i>Mesorhizobium japonicum</i> における光誘導性遺伝子の制御と機能
3. 学会等名 2020年度日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田島 侑, 榮山 新, 上田 賢志, 高野 英晃
2. 発表標題 ゴム分解性細菌 <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> VH2のシグマ因子が制御する光応答メカニズムの解析
3. 学会等名 2020年度日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://www.abs-brs.com/research/lab-bt/">https://www.abs-brs.com/research/lab-bt/</a>
---

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
---------	---------