

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780083

研究課題名（和文）細菌に広く分布する光受容体 LitR の作用機作と役割の多様性に関する研究

研究課題名（英文）LitR-mediated photoresponse in non-phototrophic bacteria: studies on its molecular mechanism and potential diversity

研究代表者

高野 英晃（TAKANO HIDEAKI）

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：50385994

研究成果の概要（和文）：

LitRは、グラム陽性およびグラム陰性細菌に広くコードされている光応答性転写調節因子である。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* および土壌細菌 *Pseudomonas putida* に由来する *litR* 遺伝子の解析を進めたところ、*litR*は前者の光依存的なカロテノイド合成遺伝子（*JBacteriol* 2011）、後者の新規な光誘導性遺伝子群の発現制御において中心的な役割を果たすことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The homologous gene of Light-responsive transcriptional regulator (LitR) is distributed in gram positive and gram negative bacteria. In this study, we revealed that LitR homologs of *Thermus thermophilus* and *Pseudomonas putida* are also a central regulator for photo-inducible carotenogenesis and the transcriptional regulation of novel light-inducible genes, respectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：Photo-response ; Transcriptional regulation ; LitR ; MerR family ; Cobalamin ; *Streptomyces coelicolor* ; *Thermus thermophilus* ; *Pseudomonas putida*

## 1. 研究開始当初の背景

環境中に豊富な物理刺激である光は、生物機能に深く関与し、特に光受容の分子メカニズムは動物視覚系ならびに光合成生物を材料に詳細な研究がなされている。一方、環境中に普遍的な微生物の光応答は、その事例に乏しく、全くと言っていいほど調べられてこなかった。ところが、最近我々は、光合成を行わない一般細菌にも光に応答して新たな

機能発現を誘導する分子機構が存在するという新事実を明らかにした。

この発見の発端となった放線菌は、土壌に生息し複雑な形態分化と多様な二次代謝産物を生産することでよく知られる産業微生物である。我々は、遺伝的取り扱いのモデル株 *Streptomyces coelicolor* A3(2)において、その二次代謝産物の一つであるカロテノイドの生産が光によって誘導されることを見出した。

カロテノイドは微生物から高等植物まで幅広い生物によって生産され、光照射により生じる有害活性酸素分子種の消去剤として機能する。光によるカロテノイド生産の誘導は一般細菌において知られる現象であるが、その分子メカニズムはグラム陰性細菌である *Myxococcus xanthus* においてのみ研究されてきた。*M. xanthus* における光応答の分子メカニズムは複雑で、すでに多くの制御遺伝子群が同定されているが、光受容の分子機構は未だ明らかでない。一方我々は、*S. coelicolor* A3(2) における光依存的なカロテノイド生産は、生合成遺伝子クラスター (*crt*) の上流にコードされている転写制御蛋白 LitR によって中心的に制御されていることを明らかにした。LitR は、その C 末端領域に結合するコバラミン分子の青色光吸収に伴ってプロモーター領域への結合様式が変化し、その結果 RNA ポリメラーゼがリクルートされて *litS* の転写を開始に導くと予想される (*J Bacteriol* 2005)。こうして転写が誘導される *litS* は ECF ファミリーの  $\sigma$  因子をコードしており、*crt* の特異的な転写を司ることが明らかになっている。

さらに、LitR に相同な蛋白が放線菌以外にも *Thermus* や *Pseudomonas* をはじめとするグラム陰性菌にも広く分布することを見いだした (*BBB*, 2006)。*Thermus thermophilus* の *litR* 相同遺伝子は、*S. coelicolor* A3(2) と同様に *crt* 及び光回復酵素遺伝子とクラスターをなして存在しており、放線菌のシステムと同様に最も重要な光応答性遺伝子である。

LitR 蛋白が、広範な一般細菌において光依存的な転写調節を司ることは、上記の結果より明らかであり、光という極めて普遍的な環境因子によって誘導される機能がバクテリア全般に広く潜在していることを暗示している。これまでに知られているカビや植物の青色光受容体の光吸収はフラビンを介して行われる。一方、LitR はコバラミンを光センサー分子とことから、新しいタイプの光受容体である可能性が高いことが予想され、学術的にも大変興味を持たれる。

## 2. 研究の目的

(1) LitR による光応答性転写制御メカニズムの詳細

①高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 の LitR 蛋白の機能 *T. thermophilus* が示す光誘導性カロテノイド生産は、LitR と cAMP レセプター (CRP) 様の TTP55 によって制御され、それぞれの機能はリプレッサーとアクチベーターであることが予想されている。まず、LitR と TTP55 を介した転写制御の基礎的なメカニズムを明らかにする。また、コバラミンが LitR のリガンドとして機能するかを、*in vitro* における分子間相互作用解析やコバラ

ミン合成遺伝子の破壊実験により検証する。

② *Pseudomonas putida* KT2440 の LitR

本菌は、カロテノイド合成遺伝子を有さないが、複数の *litR* 相同遺伝子 (*litR1*, *litR2*, *litR3*) をコードしている。また、*litR* に隣接して植物型光受容体のホモログ (*ppSB1-LOV*, *ppSB2-LOV*) が保存されている。これまでに進めたタイリングアレイ解析により 21 個の遺伝子の発現が光によって誘導されることを明らかにした。ここでの目的は、光誘導性遺伝子群の発現制御機構を明らかにすることである。*litR* や *ppSB1-LOV* の機能解析を中心的に進める。本菌から見つかった光誘導性遺伝子群の多くは、放線菌や *T. thermophilus* にはコードされていないことから、本菌を対象とした解析を進めることにより、新しい LitR に関する知見が得られるものと期待される。

(2) 光に応答する微生物機能の多様性評価

カビや植物においては、多くの青色光応答現象が観察されているにも関わらず、光合成を行わない一般的なバクテリアではそのような現象に関する報告がすくない。新しい光応答現象の発見を目的として、*litR* 相同遺伝子の存在が確認されている種々の細菌属ならびに任意の自然界分離株を対象として、光依存的な表現形質を示す菌株をスクリーニングする。ユニークな現象が見つかった場合には、遺伝生化学的な手法を用いて、*litR* 遺伝子の分布やその分子メカニズムを解析する。

## 3. 研究の方法

(1) LitR による光応答性転写制御メカニズムの詳細

①高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 の LitR 蛋白の機能

大腸菌を宿主として LitR と TTP55 の組み換え蛋白を調製する。組み換え蛋白を用いたゲルシフトアッセイ、フットプリント法、*in vitro* 転写実験を進め、2つの蛋白質の基礎的な機能を生化学的に証明する。

次に、光吸収の機能をもつことが推測されるコバラミン結合ドメインを解析する。試験管内における LitR 蛋白とコバラミンの結合をその吸収波長から確認する。また、コバラミン生合成遺伝子クラスターの破壊株を作製し、明・暗条件下におけるカロテノイド生産やその合成遺伝子の転写解析を行う。

② *Pseudomonas putida* KT2440 の LitR

LacZ 活性を指標としたレポーターアッセイを進め、21 個からなる光誘導性遺伝子群の発現制御メカニズムを明らかにする。これらの転写制御において中心的な役割を担うことが予想される *litR1*, *litR2*, *litR3*, *ppSB1-LOV*, *ppSB2-LOV* の遺伝子破壊株を作製

し、各破壊株における光誘導性プロモーターの転写様式を調べる。これにより、各遺伝子が作用するプロモーターを明確にする。その際に、単独破壊株では影響が出ないことも想定にいれ、二重さらには三重破壊株を作製し、解析に供する。さらに、大腸菌の発現系で精製した組み換え LitR 蛋白を用いて、ゲルシフトアッセイ法や DNaseI フットプリント法により LitR 蛋白と標的プロモーターの相互作用を解析する。

#### (2) 光に応答する微生物機能の多様性評価

土壌をスクリーニング源として、2000種のバクテリアを単離する。それぞれの菌群を illuminating incubator (タイテック社) を用いて明条件および暗条件下で培養し、色素・コロニー形態などを指標として差異が認められた菌群を選抜する。選択された菌株種の推定を目的として、16S rDNA 配列を決定する。

### 4. 研究成果

#### (1) LitRによる光応答性転写制御メカニズムの詳細

##### ①高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 の LitR 蛋白の機能

大腸菌を宿主として調製して、LitR と TTP55 の組み換え蛋白の調製に成功したので、これらを用いた *in vitro* 転写実験を行った。*crtB* プロモーターの転写は、RNA ポリメラーゼホロ酵素と TTP55 の共存時のみに検出された。ここで認められた TTP55 のアクチベーター活性には *crtB* 転写開始点より -56 領域までが必要であった。この結果は大腸菌 CRP の知見と良く一致していた。続いて、RNA ポリメラーゼホロ酵素と TTP55 による転写誘導に対する LitR の影響を調べたところ、LitR 添加は TTP55 による転写誘導を顕著に阻害した。また、DNase I footprint 法は、LitR のプロモーター結合配列が *crtB* プロモーターにおける -55 から -89 領域であることを明らかにした。これらの結果は、LitR と TTP55 の機能

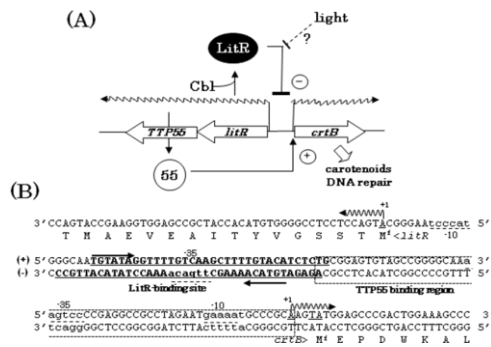


図1 *T. thermophilus* の光誘導性カロテノイド生産の制御モデル

がそれぞれリプレッサーとアクチベーターであることを明確に示している (*J Bacteriol* 2011) (図1)。

LitR 蛋白とコバラミン標品の相互作用を解析したところ、LitR 蛋白はコバラミンに特有な吸収スペクトルを示した。一方、コバラミン結合ドメインを欠損した変異型 LitR は、その吸収スペクトルを示さなかった。このことより、LitR 蛋白は、コバラミンと特異的に相互作用することが明らかになった。また、コバラミン合成遺伝子破壊株を作製し、そのカロテノイド生産を調べた。その結果、コバラミン破壊株は明・暗の両条件下において構成的なカロテノイド生産を示した。以上のことより、コバラミンは、LitR のリプレッサー活性に必須な分子、すなわち“リガンド”であることが強く示唆された (*J Bacteriol* 2011)。

##### ② *Pseudomonas putida* KT2440 の LitR

21個からなる光誘導性遺伝子群について、レポータープラスミドを用いた解析を行った結果、少なくとも7つの光依存的なプロモーターによって制御されることが明らかになった。また、*litR* パラログの各遺伝子破壊株における転写レベルを調べたところ、各 *litR* の単独破壊株では、野生株と同様の光依存的な転写が認められた。一方、*litR* の多重破壊株では光依存性が消失し、構成的な転写を示した。このことから、LitR は光応答の中心的な制御蛋白であり、3つのパラログが互に機能を相補していることが示唆された。

大腸菌における組み換え蛋白の発現・精製に唯一成功した LitR1 蛋白は、7個すべての光誘導性プロモーターに特異的な結合を示した。ここで同定された光応答性遺伝子群が本菌およびその類縁菌にのみ高く保存されていたことは、これら菌群が *litR* を基軸として独自の光応答制御システムを獲得および進化させたことを推測させる。

#### (2) 光に応答する微生物機能の多様性評価

土壌より2300株の細菌を分離し、明・暗条件下で培養したところ、カロテノイドと予想される黄色色素が光によって誘発される80株の細菌を土壌より分離した。これら光応答性細菌について、近縁種ゲノム情報をもとに *litR* および既知の光受容体ホモログ遺伝子の分布を調べた。その結果、*litR*・光受容体遺伝子をゲノムにコードしているグループ1 (*Bacillus*、*Lysinibacillus*、*Staphylococcus*、*Halomonas*、*Pseudomonas*、*Ralstonia*、*Sphingomonas*) とそれらのホモログ遺伝子を有さないグループ2 (*Arthrobacter*、*Brevibacterium*、*Microbacteria*) に分類された。グループ2に属する放線菌群は既知の光受容体を有さないことから、新規なタイプの光受容体をコードしている可能性が示唆された。ここで見

つかった細菌群はこれまでに応用微生物領域において研究対象として解析されてきたにも関わらず、光応答性に関する報告は皆無であった。

#### 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1件)

1) Takano H, Kondo M, Usui N, Usui T, Ohzeki H, Yamazaki R, Washioka M, Nakamura A, Hoshino T, Hakamata W, Beppu T, Ueda K(2011) *Journal of Bacteriology*, 2011, 193:2451-2459, Involvement of CarA/LitR and CRP/FNR family transcriptional regulators in light-induced carotenoid production in *Thermus thermophilus*. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

1) 高野英晃、上利佳弘、山崎竜大、新海暁男、上田賢志、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* における光応答性遺伝子群の網羅的探索とその制御機構の解明。日本農芸化学会(平成23年3月27日、京都)

2) 牟田口 尚敬、高野 英晃、新谷 政己、野尻 秀昭、上田 賢志、*Pseudomonas putida* の光応答：新規な光誘導性遺伝子群とその転写制御機構。日本農芸化学会(平成23年3月27日、京都)

3) 萩原 健太、高野 英晃、上田 賢志、原核生物だけがつくるビタミン、VB12：一部の菌にみられる細胞外蓄積現象。日本農芸化学会(平成23年3月26日、京都)

4) 高野英晃、上利佳弘、山崎竜大、新海暁男、上田賢志、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の巨大プラスミドに集約された光応答性遺伝子群の発現制御メカニズム。日本ゲノム微生物学会(平成23年3月16日、仙台)

5) 高野英晃、山崎竜大、袴田航、中村顕、星野貴行、別府輝彦、上田賢志、*Thermus thermophilus* HB27 の光応答。高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第9会連携研究会(平成22年8月21日、播磨)

6) 山崎竜大、高野英晃、上田賢志、*Thermus thermophilus* の光応答。微生物研究会「微生物分子生物学の新たな挑戦」(平成22年6月26日、東京)

7) 牟田口尚敬、高野英晃、上田賢志、*Pseudomonas putida* の光応答。微生物研究会「微生物分子生物学の新たな挑戦」(平成22年6月26日、東京)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高野 英晃 (TAKANO HIDEAKI)

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：50385994