

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580078

研究課題名（和文） LysRタイプ転写調節因子による遺伝子発現調節機構
と自己認識基盤の解明研究課題名（英文） Gene expression mechanism by LysR-type transcriptional
regulator and basis for self-recognition

研究代表者

小川 直人（OGAWA NAOTO）

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：60354031

研究成果の概要（和文）：細菌の転写調節因子で最大のグループを構成する LysR タイプ転写調節因子について、被制御プロモーターDNA 結合と誘導物質認識に重要なアミノ酸を明らかにして、立体構造との関係から転写活性化機構において重要な役割を果たすと考えられるアミノ酸を同定した。また、この転写因子とプロモーターDNA との共結晶作製のための系を構築、タンパク質精製法を確立することで、共結晶の作製、その立体構造の解明に先鞭をつけた。

研究成果の概要（英文）：The LysR-type transcriptional regulators (LTTRs) comprise one of the largest families of bacterial transcriptional regulators, involved in expression of many genes of diverse roles such as amino acid biosynthesis, degradation of aromatic compounds, and virulence factor synthesis. This study revealed important amino acids for DNA binding and inducer recognition by LTTR in relation to three dimensional structure, and established methods for purifying protein and DNA for co-crystallization of LTTR and the regulated promoter, which together will lead to elucidation of mechanism of transcriptional activation by LTTRs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：遺伝子発現、LysRタイプ転写調節因子、転写、プロモーター

1. 研究開始当初の背景

細菌の代謝経路の発現調節は多くの場合、転写レベルで行われ、往々にして代謝経路の一連の酵素の遺伝子群がオペロン構造をとって、そのプロモーター領域において、1つの転写調節因子によって発現の制御を受ける。細菌の場合、基本的な転写調節単位では正の制御（転写の活性化）が行われるものが

多く、誘導物質が存在する場合には、転写調節因子がこれを認識して転写を活性化し一連の酵素群が生産される。細菌の転写調節因子は構造上の特徴からいくつかのグループに分かれるが、LysRタイプ転写調節因子（LTTR）は、アミノ酸生合成、芳香族化合物分解、病原性関連因子産生、酸化ストレスへの応答、窒素固定、二酸化炭素固定など、多

くの重要な遺伝子群の発現調節を行っており、細菌の転写調節因子としては最大のグループを構成する。近年、様々な細菌のゲノムが明らかになり、1つの細菌は、数十種から、菌株によっては100種以上の、LTRの遺伝子を持っていることが判明している。LTRは被制御遺伝子群のプロモーター領域の特徴的な逆向き繰り返し配列を認識して結合し、さらに、それぞれに特異的な誘導物質（多くの場合、代謝経路の基質もしくは中間産物）を認識することによって転写を活性化する。しかし、1つの細菌で100前後の種類があるLTRが、どのように、それぞれの被制御プロモーターを識別して制御するのかについてはまったく未知である。現在までに、様々な細菌のLTRによる制御機構の生化学的解析が行われ、LTRが被制御遺伝子群プロモーター領域に結合して、さらに誘導物質を認識することで転写を活性化することなど、LTR間で共通する特徴や、個別の誘導物質などが判明してきたが、転写活性化機構の全体像解明につながる情報は得られていない。その最大の理由は、LTR自体及び、LTRとプロモーターDNAとの結合により開始される転写調節機構について立体構造情報が無かったことである。そのため、例えば、個別のLTRについてDNA結合に関与すると見られるアミノ酸が判明しても、その実際的な意味・役割が不明で、転写開始・活性化機構の解明にはつながらなかった。

2. 研究の目的

本研究代表者らは、全長でのLTRとしては初めて、CbnRの立体構造を解明した。CbnRは細菌による芳香族塩素化合物分解に必須なクロロカテコール分解遺伝子群の転写調節因子である。この立体構造によって、LTRが独特の構造の4量体を形成することや、その独特な四次構造により約60bpもの長いプロモーター領域に結合できること、さらに、4量体のDNA結合部のV字型構造によってDNAに大きな湾曲を起こすことができることなどを示し、LTRの機能の全体像解明に向けて大きな知見を提供した。本研究においてさらに、LTRとプロモーター領域DNAの結合機構の詳細や誘導物質認識機構について、立体構造との関係も含めて具体的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

立体構造が明らかになっているCbnRのDNA結合部位と誘導物質認識部位について、部位特異的変異の導入等によりアミノ酸を置換して、その構造と機能の関係を解析する。またCbnRとプロモーター領域DNAとの複合体の立体構造情報を得ることを目的として、共結晶の作製を検討する。さらに類縁の芳香族

化合物分解遺伝子群のLTRや、生化学的知見が得られている他のLTRとの比較解析により、LTRが特定の代謝遺伝子群プロモーターを認識して制御する機構について知見を得る。これらの情報から、CbnR等のLTRについて、DNA結合部位と誘導物質認識部位の構造と機能の関係を、立体構造も含めて明らかにする。

4. 研究成果

(1) CbnRのDNA結合領域の解析

LTRは、全長約300アミノ酸のうちのN末端側の約50アミノ酸がプロモーターDNAへの結合に関与し、それ以外のC末端側の領域が誘導物質認識に関与すると考えられている。CbnRのDNA結合領域に関しては、既に、N末側の12か所のアミノ酸がCbnRのDNA結合等の機能に必須であることを明らかにしている。本研究でさらにCbnRの立体構造から、N末端側の領域でターンを形成してDNA側へ突出している部位のアミノ酸Val27、Ser28、Gln29（図1）がDNAとの結合にとくに重要である可能性が高いと考えられた。これらを他のアミノ酸に置換した変異型CbnRは、いずれもプロモーターDNAへの結合能もしくは転写活性化能を失ったことから、これらアミノ酸がDNAとの結合または転写活性化に必須であることが判明した。このうちGln29は既知の全てのLTRで保存されており、とくに重要であると考えられた。このGln29を他の19種類のアミノ酸に置換した変異型CbnRを解析した結果、これら変異型CbnRはプロモーターDNAへの結合能を失って転写活性化能を有しないか、もしくはDNA結合能がより強くなる場合でも、転写活性化能を失うことが判明した。このことから、この位置がGlnであることがLTRの機能に必須であり、DNAとの適度な結合力がLTRの転写活性化能に必要であることが判明した。

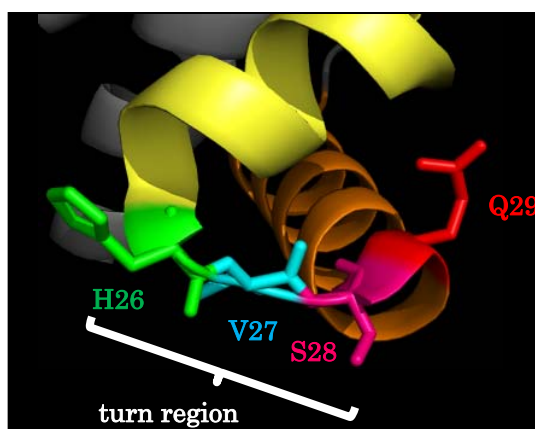


図1. CbnR DNA結合領域のターン形成部位

(2) CbnR等LTRの誘導物質認識部位の解析

CbnRの誘導物質認識部位について類縁LTRとの比較から推定したアミノ酸を置換して解析した結果、Phe98、Thr100、Lys129、Arg199、Phe202、Val246の6か所のアミノ酸が誘導物質認識に関与することが判明した。これらのアミノ酸は、CbnRの制御ドメインのRD-IとRD-IIの間の領域を形成する位置にあり、この領域がCbnRの誘導物質認識部位であると考えられた。これら6か所のアミノ酸のうち、Thr100、Lys129、Phe202はホモロジーモデリングにより、誘導物質の1つであるムコン酸と水素結合を形成できる位置にあると考えられた。このムコン酸結合ポケットにあるアミノ酸のうち、Gly99、Thr100、Arg147、Phe194、Pro195、Phe202は、類縁のLTRで同一もしくは類似アミノ酸として保存されていることから、この6アミノ酸がムコン酸結合ポケットを構成すると考えられた (図2)。

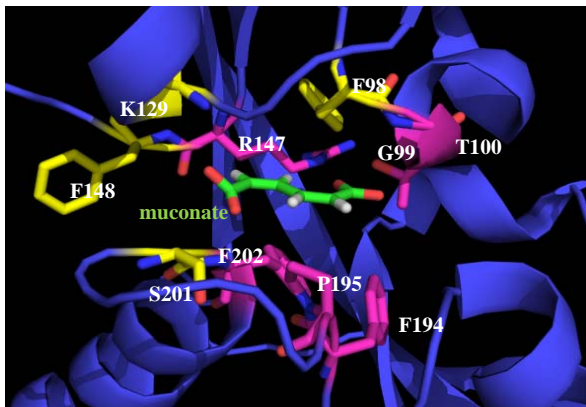
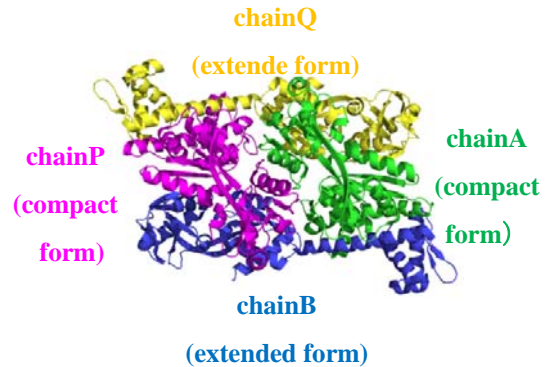


図2. CbnRの誘導物質認識に関与、及び、ムコン酸結合ポケットを構成するアミノ酸

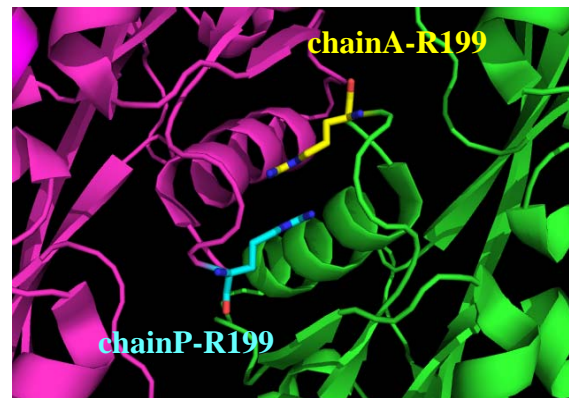
一方、Arg199AlaとVal246Alaの変異はそれぞれ被制御プロモーターの構成的な発現を起こすことが判明した。Arg199とVal246はCbnRの4量体を構成するdimerの境界面に位置することから、Arg199とVal246への変異導入は、サブユニットの会合に影響を与えてCbnRの4量体構造を変化させた可能性が高い (図3)。これらの構造変化は、プロモーターDNAとの複合体の立体構造に影響を及ぼしたことが示唆され、LTRによる転写活性化の機構の解明につながる。

一方、CbnRと類縁のLTRであり、安息香酸分解経路の転写活性化を行うCbeRについて、ランダム変異導入により変異型CbeRを作製して誘導物質認識に関与する部位を同定した。その結果、CbeRで誘導物質の認識に関与すると考えられたArg160とTyr293はCbeRと最も相同性が高いLTRのBenMでは保存されているが、CbnRでは保存されていなかった。これら3

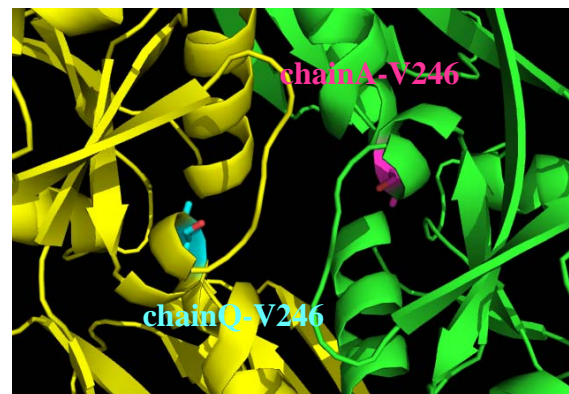
つのLTRがいずれもムコン酸を誘導物質として認識するにも関わらず、認識に関与するアミノ酸が必ずしも同じではないことから、誘導物質の認識に関与するアミノ酸は、LTR内で比較的類縁度が高い因子間でも必ずしも保存されていないことが判明した。



(a) CbnR四量体とサブユニットの関係



(b) サブユニット境界面におけるArg199



(c) サブユニット境界面におけるVal246

図3. CbnR サブユニット境界面におけるArg199とVal246

(3) CbnR及びプロモーターDNA共結晶作製のための大量生産系の構築と精製法の確立

CbnRと被制御プロモーターDNAとの結合の解析を目的とした共結晶の作製を検討する過程で、当初予定していたヒスチジンタグ付きのCbnRでは共結晶の作製条件に適合しないことが判明した。そのため、精製用のタグの無いnativeなCbnRタンパク質の発現系を各種ベクター、宿主大腸菌を用いて検討、構築した。さらに、精製法を検討して、nativeなCbnRタンパク質の大量発現・精製法を確立した。この発現系、精製法により、プロモーターDNAとの共結晶作製にCbnRタンパク質を大量供与することが可能となった。

CbnRと *cbnA* プロモーター断片との共結晶作製に供試するために、野生型の *cbnA* プロモーター断片及び発現パターンが異なる変異型プロモーターM3について、それぞれ長さ63bpまたは70bpのDNA断片を縦列に16個ローニングしたプラスミドを構築した。またこれらのプラスミドの抽出のための大腸菌の培養条件を明らかにし、液体クロマトグラフィーによる精製の条件を確立した。

以上の成果により、既に単独での全長立体構造を明らかにしたCbnRを中心として、LTTRのDNA結合領域および誘導物質認識部位のアミノ酸の機能について、立体構造との関係も含めて、役割の分担など多くの知見を得ることができた。また、nativeなCbnRとその被制御プロモーター領域DNAをそれぞれ大量に精製して供試できるようになったことで、今後、共結晶の作製を検討することが可能となった。今後、共結晶の作製を行って、その立体構造の情報を得ることで、上記の各部位のアミノ酸の機能解析の結果と併せて、転写開始および活性化の動的な機構の解明に向けて大きく前進することができる。

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4件)

- ① Toju Iino, Yong Wang, Keisuke Miyauchi, Daisuke Kasai, Eiji Masai, Takeshi Fujii, Naoto Ogawa, and Masao Fukuda. Specific gene responses of a gram-positive polychlorinated-biphenyl degrader, *Rhodococcus jostii* RHA1 during growth in soil. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 78, p. 6954-6962. (2012年) 査読有
- ② Yong Wang, Sho Morimoto, Naoto Ogawa, and Takeshi Fujii. A survey of the cellular responses in *Pseudomonas putida* KT2440 growing in sterilized

soil by microarray analysis. FEMS Microbiol. Ecol. Vol. 78, p. 220-232.

(2011年) 査読有

- ③ Tsuneo Ohmori, Hirokazu Morita, Megumi Tanaka, Keisuke Miyauchi, Daisuke Kasai, Kensuke Furukawa, Kiyotaka Miyashita, Naoto Ogawa, Eiji Masai, and Masao Fukuda. Development of a strain for efficient degradation of polychlorinated biphenyls by patchwork assembly of degradation pathways. J. Biosci. Bioeng. Vol. 111, p. 437-442. (2011年) 査読有
- ④ 佐伯和利、村上弘治、佐伯雄一、坂本一憲、村瀬潤、鮫島玲子、小川直人、浅川晋. 日本土壤肥科学雑誌進歩総説「土壤生物」. 日本土壤肥科学雑誌 第82巻 p. 479-494. (2011年) 査読無

[学会発表] (計3件)

- ① Naoto Ogawa, Kaori Takada, Masae Takabayashi. Analysis of CbnR, a bacterial LysR-type transcriptional regulator, indicates a conserved aspect of DNA binding and distinctive schemes of inducer recognition. 日本微生物生態学会第28回大会. 2012年9月19~22日 豊橋技術科学大学.
- ② 高田香織、下平潤、黒田直子、秋山絵弥子、千田俊哉、小川直人. *Cupriavidus necator* NH9株のLysRタイプ転写調節因子CbnRのDNA結合領域の解析. 日本農芸化学会. 2011年3月27日 (震災の影響で要旨集の発刊をもって開催に代えた).
- ③ 高林正恵、郎剛華、小川直人. *Cupriavidus necator* NH9株のLysRタイプ発現調節因子CbnRの誘導物質認識部位の解析. 日本農芸化学会. 2011年3月27日 (震災の影響で要旨集の発刊をもって開催に代えた).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 直人 (OGAWA NAOTO)
静岡大学・農学部・教授
研究者番号：60354031

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし