

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6月3日現在

機関番号：35409

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780306

 研究課題名（和文） 枯草菌における植物由来芳香族化合物に応答した
複合的遺伝子発現制御の解析

 研究課題名（英文） Multiple transcriptional regulatory systems of *Bacillus subtilis*,
in response to plant-derived aromatic compounds

研究代表者

広岡 和丈 (HIROOKA KAZUTAKE)

福山大学・生命工学部・准教授

研究者番号：20389068

研究成果の概要（和文）：植物由来芳香族化合物であるフラボノイドまたはインドール-3-酢酸（IAA）に応答する転写制御系を枯草菌から見出し、解析した。鉄イオン応答性転写抑制因子として知られる Fur が、鉄飢餓だけでなくフィセチン等にも応答し、標的遺伝子群を部分的に脱抑制することを示した。また、フラボノイド応答性が既知の LmrA/QdoR 制御系についてもその作動機構と生理的機能を解析した。YhbI 制御系が IAA 応答性であることを示し、特性解析を行った。

研究成果の概要（英文）：We investigated transcriptional regulatory systems of *Bacillus subtilis* that respond to plant-derived aromatic compounds, flavonoids and indole-3-acetic acid (IAA). While Fur is known as a transcriptional repressor that derepresses its target genes on iron starvation, our study demonstrated that Fur also responds to specific flavonoids such as fisetin, resulting in the partial derepression of its target genes. We also analyzed the functional mechanism and the physiological role of the flavonoid-responsive LmrA/QdoR regulatory system, which had been identified in our previous study. Moreover, we identified the YhbI regulatory system as an IAA-responsive one and performed its characterization.

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：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：発現制御、枯草菌、フラボノイド、インドール-3-酢酸、土壤環境、根圏

1. 研究開始当初の背景

根圏に生息する枯草菌は、バイオフィルムを形成することで他の病原菌の繁殖を抑制し、また土壌の pH を下げるあるいはシデロフォアを生産することで植物の鉄イオンの取り込みを助けており、直接共生関係にない

が植物の生育促進に作用する有用根圏微生物であるといえる。根圏土壌には栄養分とともにフラボノイドやリグニン等の芳香族化合物が植物から滲出している。根粒菌はマメ科植物が放出するフラボノイドに応答して根粒形成のための遺伝子群の発現を誘導す

るという知見をもとに、枯草菌も根圏環境を認識するためのシグナル分子としてフラボノイドを利用すると考え、枯草菌でのフラボノイド応答性転写制御系を探索し、研究開始時点で2つの制御系を見出していた。

1つは LmrA/QdoR 制御系で、これがバシラス属で初めて見出されたフラボノイド応答性転写制御系となった。互いにパラログ的な LmrA と QdoR は、自身を含めて5つから成る標的遺伝子群の各制御領域内にある同じ配列を認識・結合して発現を抑制し、ケルセチン等の特定のフラボノイド存在下で脱抑制する。標的遺伝子群のうち *lmrB* は薬剤排出ポンプを、*qdoI* はケルセチン 2,3-ジオキシゲナーゼをコードしており、枯草菌は栄養豊富である一方で抗菌性のフラボノイドや他の微生物が産生する抗生物質が存在する根圏環境をフラボノイドを介して感知し、それらに対処すべくフラボノイド分解と薬剤耐性を強化すると考えられた。

次いで、YetL 制御系がもう1つのフラボノイド応答性転写制御系として見出された。この標的遺伝子群は、自身の遺伝子と推定モノオキシゲナーゼをコードする *yetM* で構成され、近接して逆向きに存在する各制御領域に YetL が結合して発現を抑制し、LmrA/YxaF とは全く異なるフラボノイド応答特異性で脱抑制することがわかった。

これらの転写制御系に加え、DNA マイクロアレイ解析を用いてフラボノイド添加で誘導される遺伝子群の探索を行ったところ、鉄イオン応答性転写抑制因子として知られる Fur の標的遺伝子群が候補として見出された。Fur は通常、シデロフォア合成系遺伝子群や鉄イオン輸送体等の鉄イオン取り込みに関与する 40 余りの遺伝子群の発現を抑制し、鉄飢餓に応答して脱抑制するが、本来のエフェクターである鉄イオンだけでなく、特定のフラボノイドに対しても応答し、標的遺伝子群を脱抑制することが示唆された。

インドール-3-酢酸 (IAA) は植物が生産する芳香族化合物の1つである。IAA は植物ホルモンであるオーキシンとして作用し、根端等の細胞分裂が盛んな組織に多く存在する。したがって、根端周辺で栄養分ともに IAA も浸潤し、枯草菌が IAA をシグナル分子として認識すると予想した。これを検証するために、DNA マイクロアレイ解析を用いて IAA 添加で誘導される遺伝子群を探索した結果、ゲノム上で同方向で連続して存在する *yhbI*、*yhbJ*、*yhcA*、および *yhcB* 遺伝子が候補として見出された。これらのうち *yhbI* が転写因子をコードすると推定され、*yhcB* にコードされるタンパク質は、大腸菌においてトリプトファン代謝系の制御を司る TrpR 転写因子と複合体を形成する WrbA と相同性をもつことがわかり、*yhbI*、*yhbJ*、*yhcA*、および *yhcB* がオペ

ロンを成し、YhbI が YhcB とともに IAA (あるいはその代謝産物) を誘導物質として自身を含めたこれらの遺伝子群の発現を制御すると予想された。

2. 研究の目的

根圏に生息する枯草菌が植物から根圏土壌に分泌される種々の芳香族化合物を如何にして感知してそれらに応答した遺伝子発現制御を行うかを解析することで、芳香族化合物をシグナル分子とした枯草菌と植物間の、更には根圏周辺に生息する様々な生物間での情報伝達機構の解明を目指した。枯草菌は植物の生育促進に有用な根圏微生物としても知られており、本研究で得られた知見が枯草菌を利用した新たな植物栽培技術の開発につながると期待された。

3. 研究の方法

上述の研究背景と DNA マイクロアレイ解析での予備的な知見を踏まえ、以下の事項について解析を進めた。

(1) Fur に関して、標的遺伝子群の抑制が各種フラボノイドによって脱抑制されるかを *in vitro* と *in vivo* の系で検証し、更に Fur のフラボノイド応答特異性を LmrA/YxaF と YetL のものと比較し、これらのフラボノイド認識・応答の作動機序の解明を試みた。

(2) QdoR に関して、そのフラボノイド認識応答に重要なアミノ酸残基を立体構造をもとに予想し、それらをアラニンに置換した変異体を作製して、各変異体の DNA 結合能とフラボノイド応答性を *in vitro* と *in vivo* の系で検証した。また、LmrA/QdoR の標的遺伝子の1つである *qdoI* に関して、両制御因子を不活化して *qdoI* 発現が恒常的となった枯草菌株が野生株と比べてケルセチンに対して著しい感受性を示すことがわかり、その原因について解析を行った。

(3) YhbI に関して、*in vitro* での DNA 結合実験によって結合部位を決定した。次いで YhbI の抑制が IAA あるいはその関連化合物によって脱抑制されるかを *in vitro* と *in vivo* の系で検証し、その作動機序の解明を試みた。また、*in vitro* の系で YhbI の DNA 結合に YhcB が及ぼす影響についても検証した。

4. 研究成果

(1) Fur のフラボノイド応答機構に関する解析

LmrA/QdoR および YetL に加え、鉄イオン取り込み系を司る Fur が枯草菌におけるフラボノイド応答性転写因子の新たな候補として見出された。組換え Fur タンパク質と標的遺伝子の 1 つである *dhbA* オペロンの制御領域に対応する DNA プローブを用いてゲルシフト解析を行い、各種フラボノイドが Fur の DNA 結合を解除する効果を評価した。当初用いた結合反応溶液中には EDTA が含まれていたが、EDTA には Fur の DNA 結合を阻害する効果が認められ、また系に FeCl_2 を添加することでその阻害効果が減殺されたことから、EDTA との錯形成によって Fur から鉄イオンが脱離し、DNA 親和性の低下につながったと考えられた。そこで、EDTA を除いた系を用いて再度フラボノイドの効果を検証した。その結果、フィセチン添加によって Fur の DNA 結合の阻害が認められたが、 FeCl_2 添加でその阻害効果は減殺されず、フィセチンは鉄イオンとは独立して作用することが推測された (図 1)。

dhbA オペロンの制御領域と *lacZ* とを連結した構築を有する枯草菌株を用いたレポーター解析では、通常鉄イオンを含む合成培地で培養し、フィセチンを添加することでレポーター活性の誘導が検出された。このフィセチンの誘導効果は培地に FeCl_3 を過剰に添加した場合でも損なわれることはなく、*in vitro* 系での結果を支持するものとなった。

各種フラボノイドを添加した条件で同様のゲルシフト解析とレポーター解析を行った結果、フィセチン等のフラボノールに加え、ルテオリン等のフラボンにも Fur による *dhbA* オペロンの抑制を解除する効果が同程度あることがわかったが、LmrA/QdoR や YetL と比較すると Fur のフラボノイド応答性は鋭敏ではなく、*dhbA* オペロンの発現は完全に脱抑制されなかった。構造活性相関から、フラボン骨格の平面構造と、B 環 4 位の水酸基が Fur に対する脱抑制効果に必要であり、C 環 3 位に水酸基があると効果が弱まること示唆された。

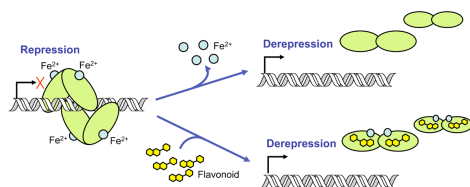


図 1 Fur のフラボノイドに対する応答機構モデル

(2) LmrA/QdoR 制御系を構成するタンパク質の機能解析

QdoR に関して、その立体構造に基づきフラボノイド応答に重要なアミノ酸残基を予想し、これを確かめるために各残基をアラニンに置換した 8 種類の QdoR 変異体タンパク質を調製し、これらの DNA 結合能とフラボノイド応答性をゲルシフト解析にて評価した。その結果、Phe87 または Trp131 を置換した変異体において DNA 結合親和性の著しい低下がみられ、また Phe87、Trp131、または Phe135 を置換した変異体が野生型とは異なるフラボノイド応答特性を示すことがわかり、これら 3 つの残基が DNA 結合とフラボノイド応答に重要であることが示された。これらの残基は QdoR タンパク質内でクラスターを形成しており、フラボノイドを収容するための疎水性ポケットの一部であると示唆された。Trp131 の重要性は、QdoR 変異体を発現させた枯草菌株を用いたレポーター解析によっても確かめることができた (図 2)。

LmrA/QdoR の標的遺伝子の 1 つである *qdoI* は、ケルセチンの C 環開裂反応を触媒するケルセチン 2,3-ジオキシゲナーゼ (QdoI) をコードする。両転写因子遺伝子を破壊してこの発現が恒常的となった枯草菌では、ケルセチンに対する感受性が著しく高まるという現象がみられた。種々のフラボノイドを用いた生育阻害実験や QdoI の基質特異性を調べた結果から、恒常発現した QdoI 活性によってケルセチンが急速に分解され、それによって生じたプロトカテク酸が菌体内に蓄積することが細胞毒性の要因であると示唆された。すなわち、LmrA/QdoR の二重制御は *qdoI* 発現が致死レベルにならないよう厳密に調節するためであると考えられた (図 3)。

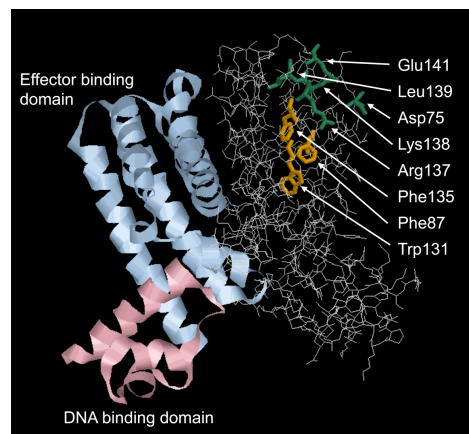


図 2 QdoR タンパク質の立体構造

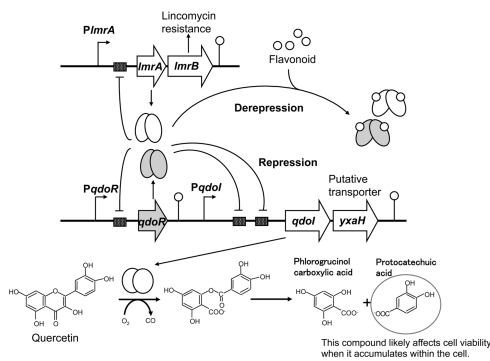


図3 LmrA/QdoR 制御系の構成

(3) IAA 応答性を示す YhbI 制御系の解析

DNA マイクロアレイ解析によって、*yhbI*、*yhbJ*、*yhcA*、および *yhcB* の転写量が IAA 添加で上昇することが示された。後に、他の研究グループより *yhbIJ-yhcABCDEFGH* がオペロンを構成することが報告された (Lehnik-Habrink M., *et al.* 2011)。この *yhbI* オペロンのメンバーである *yhbI* と *yhcF* はそれぞれ MarR と GntR ファミリーに属する転写因子をコードすると推定され、これらがオペロンを抑制し、IAA (あるいはその代謝中間体) に応答して脱抑制すると予想された。各組換えタンパク質と *yhbI* オペロン上流制御領域に対応する DNA プロブを用いたゲルシフト解析により、YhbI がこの領域に特異的に結合するが YhcF は結合しないことが示された。次いで、IAA、その誘導体、あるいは IAA 代謝中間体を添加した条件でゲルシフト解析を行ったが、いずれの化合物によっても YhbI の DNA 結合は阻害されなかった。更に、大腸菌ホモログでの報告をもとに YhcB が YhbI または YhcF の DNA 結合に影響を及ぼすと予想し、YhcB 存在下での YhbI と YhcF の制御領域への結合能と、それらの IAA 関連化合物に対する応答性をゲルシフト解析で評価したが、影響は認められなかった。また、DNase I フットプリント解析で制御領域内の YhbI 結合領域を決定し、その中に YhbI の特異的結合に重要であると考えられる不完全なパルンドロームを見出した。

一方、*yhbI* オペロン制御領域と *lacZ* とを連結した構築を導入した枯草菌株を用いてレポーター解析を行い、IAA 関連化合物による誘導効果を調べた結果、ゲルシフト解析では効果が認められなかった化合物の幾つか (IAA、アントラニル酸等) にレポーター活性の誘導能があることがわかり、IAA が直接 YhbI に作用してその DNA 結合を解除するのではないことが示唆された。

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 5 件)

- ① Tojo, S., Hirooka, K., and Fujita, Y. Expression of *kinA* and *kinB* of *Bacillus subtilis*, necessary for sporulation initiation, is under positive stringent transcription control. *Journal of Bacteriology* **195**, 1656-1665 (2013) (doi: 10.1128/JB.02131-12) (査読有).
- ② Hirooka, K., Edahiro, T., Kimura, K., and Fujita, Y. Direct and indirect regulation of the *ycnKJI* operon involved in copper uptake through two transcriptional repressors, YcnK and CsoR, in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **194**, 5675-5687 (2012) (doi: 10.1128/JB.00919-12) (査読有).
- ③ Hirooka, K., and Fujita, Y. Identification of aromatic residues critical to the DNA binding and ligand response of the *Bacillus subtilis* QdoR (YxaF) repressor antagonized by flavonoids. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **75**, 1325-1334 (2011) (doi: 10.1271/bbb.110098) (査読有).
- ④ Tojo, S., Satomura, T., Matsuoka, H., Hirooka, K., and Fujita, Y. Catabolite repression of the *Bacillus subtilis* FadR regulon, which is involved in fatty acid catabolism. *Journal of Bacteriology* **193**, 2388-2395 (2011) (doi: 10.1128/JB.00016-11) (査読有).
- ⑤ Hirooka, K., and Fujita, Y. Excess production of *Bacillus subtilis* quercetin 2,3-dioxygenase affects cell viability in the presence of quercetin. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **74**, 1030-1038 (2010) (doi: 10.1271/bbb.90928) (査読有).

[学会発表] (計 17 件)

- ① 広岡和丈、枝廣貴成、木村晃輔、藤田泰太郎 枯草菌におけるラムノース異化に関わる遺伝子群の発現制御機構の解析 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013 年 3 月 26 日 東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市)
- ② 広岡和丈 植物の生育促進への利用に資する、枯草菌の転写応答機構の研究 日本農芸化学会 2013 年度農芸化学奨励賞受賞講演 2013 年 3 月 24 日 電力ホール (宮城県仙台市)
- ③ 広岡和丈、枝廣貴成、木村晃輔、藤田泰

- 太郎 枯草菌の銅イオン取り込みに関与する *ycnKJI* オペロンを直接制御する YcnK 転写因子の構造と機能 第7回日本ゲノム微生物学会年会 2013年3月10日 長浜バイオ大学 (滋賀県長浜市)
- ④ 広岡和丈、枝廣貴成、木村晃輔、藤田泰太郎 枯草菌での銅イオンホメオスタシスに関わる2つの転写制御因子 YcnK と CsoR の様々な金属イオンに対する応答性 日本農芸化学会中四国支部大会 (第34回講演会) 2012年9月22日 山口大学工学部 (山口県宇部市)
- ⑤ 東條繁郎、広岡和丈、藤田泰太郎 枯草菌 *Bacillus subtilis* の孢子形成トリガーへの正の緊縮転写制御の関与 平成24年度 (2012年度) グラム陽性菌ゲノム機能会議 2012年8月31日 焼津グランドホテル (静岡県焼津市)
- ⑥ 広岡和丈、枝廣貴成、木村晃輔、藤田泰太郎 枯草菌の銅イオン取り込みに関与する *ycnKJI* オペロンの2つの転写制御因子 YcnK と CsoR による直接的および間接的な制御機構 2012年8月31日 焼津グランドホテル (静岡県焼津市)
- ⑦ 広岡和丈、藤田泰太郎 枯草菌のフラボノイド応答性転写制御系の生理的役割と分子認識 日本農芸化学会中四国支部第33回講演会 (例会) (B. B. B. 論文賞受賞講演) 2012年6月2日 愛媛大学農学部 (愛媛県松山市)
- ⑧ 広岡和丈、枝廣貴成、木村晃輔、藤田泰太郎 枯草菌において銅イオンに応答する YcnK および CsoR 制御因子による *ycnKJI* オペロンおよび *ycnL* 遺伝子の発現制御機構の解析 日本農芸化学会2012年度大会 2012年3月24日 京都女子大学 (京都府京都市)
- ⑨ Hirooka, K. and Fujita, Y. Transcriptional regulatory networks involving the flavonoid-responsive regulators in *Bacillus subtilis*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011), XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology 2011年9月10日 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ⑩ Tojo, S., Hirooka, K., and Fujita, Y. Heavy involvement of stringent transcription control depending on the adenine or guanine species of the transcription initiation site in glucose and pyruvate metabolism in *Bacillus subtilis*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011), XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology 2011年9月10日 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ⑪ 広岡和丈、枝廣貴成、木村晃輔、藤田泰太郎 枯草菌において鉄イオン取り込み系を司る Fur 転写制御因子のフラボノイド応答の分子機構 平成23年度 (2011年度) グラム陽性菌ゲノム機能会議 2011年8月25日 福山大学社会連携研究推進センター (広島県福山市)
- ⑫ 東條繁郎、広岡和丈、藤田泰太郎 枯草菌の緊縮応答と孢子形成 平成23年度 (2011年度) グラム陽性菌ゲノム機能会議 2011年8月25日 福山大学社会連携研究推進センター (広島県福山市)
- ⑬ 広岡和丈、枝廣貴成、木村晃輔、藤田泰太郎 枯草菌における YcnK および CsoR を介した銅イオン取り込み系を含む遺伝子群の発現制御機構 平成23年度 (2011年度) グラム陽性菌ゲノム機能会議 2011年8月25日 福山大学社会連携研究推進センター (広島県福山市)
- ⑭ 広岡和丈、枝廣貴成、木村晃輔、藤田泰太郎 枯草菌において銅イオン取り込みに関わる *ycnKJI* オペロンの機能解析 日本農芸化学会2011年度大会 2011年3月27日 京都女子大学 (京都府京都市)
- ⑮ 広岡和丈、藤田泰太郎 枯草菌におけるフラボノイドに応答した転写制御機構と標的遺伝子群の生理的機能 2010年度日本農芸化学会中四国支部大会 (第28回講演会) 2010年9月25日 香川大学農学部 (香川県木田郡三木町)
- ⑯ 東條繁郎、広岡和丈、藤田泰太郎 枯草菌の緊縮応答と孢子形成 平成22年度 (2010年度) グラム陽性菌ゲノム機能会議 2010年9月3日 ホテル木曾路 (長野県木曾郡南木曾町)
- ⑰ 広岡和丈、藤田泰太郎 枯草菌におけるフラボノイド応答性転写制御因子の機能と生理的意義についての研究 平成22年度 (2010年度) グラム陽性菌ゲノム機能会議 2010年9月2日 ホテル木曾路 (長野県木曾郡南木曾町)

[図書] (計1件)

- ① Fujita, Y., Tojo, S., and Hirooka, K. Stringent transcription control of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* In *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*: The Frontiers of Molecular Microbiology Revisited (eds: Sadaie, Y. and Matsumoto, K.) 179-196 (2012) Research Signpost, Kerala, India

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広岡 和丈 (HIROOKA KAZUTAKE)

福山大学・生命工学部・准教授

研究者番号：20389068