

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 15日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780093

研究課題名（和文） 光が誘発する新規な微生物機能に関する研究

研究課題名（英文） Studies on a microbial function induced by light

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はビタミンB₁₂を光アンテナ分子として利用するバクテリア型転写調節蛋白質であり、その類似遺伝子は細菌種を超えて広範に分布している。我々は温泉に生息する高度好熱菌およびバチルス細菌のLitRホモログを対象としてその機能と役割の解明を進め、LitRが抗酸化活性をもつカロテノイド生産の光スイッチとして機能することを明らかにした。また、生化学的な解析によりLitRタンパク質がアデノシルB₁₂を光アンテナとして利用する光センサーであることを証明した。一方、*Pseudomonas*のLitR様蛋白質を介した光誘導性転写制御にはLOV型光受容体の関与が予想され、新しい光センシング機構の存在が強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

LitR is an adenosyl B₁₂-dependent light-sensitive MerR family transcriptional regulator, and *LitR* homologues are widely distributed among the phylogenetically diverse genera of non-phototrophic bacteria, including gram-positive and gram-negative bacteria. Our study on the function and role of LitR from *Thermus* and *Bacillus* revealed that LitR is a central regulator of the light-inducible carotenoids production in both strains. Furthermore, we showed that LitR protein is an adenosyl B₁₂-dependent light-sensitive regulator *in vivo* experiment. We also revealed that LOV type photoreceptor is involved in the LitR-dependent transcriptional regulation in *Pseudomonas*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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

環境中に豊富な刺激である光に応答する制御システムの存在は、植物や真核微生物などではよく研究されている一方、光合成を行わない一般細菌が光に応答する現象やその分子機構に関する知見は乏しいのが現状であった。そのような中でも粘液細菌や放線菌の生産するカロテノイドが光によって促進さ

れる現象は以前より知られていた。我々はこれまでに放線菌および高度好熱菌におけるその遺伝学的な制御メカニズムに関する研究を進め、カロテノイド合成遺伝子に隣接してコードされる MerR 型転写調節タンパク質 LitR が、光応答性転写制御の中心的なレギュレーターであることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

LitRはアデノシル B_{12} (Ado B_{12})を光アンテナ分子として利用し、光感知機能とDNA結合能をもつ転写調節蛋白質であり、その類似遺伝子は細菌種(主に非光合成細菌)を超えて広範に分布している。我々はこれまでに系統分類学的に異なる細菌種由来のLitRホモログ群を対象としてその機能と役割の解明を進め、主に抗酸化活性をもつカロテノイド生産の光スイッチとして機能することを明らかにしてきた。また、*litR*相同遺伝子は細菌種を超えて広範に分布しており、このことは一般細菌における光センサーの普遍的な存在および光によって誘発される細菌機能の潜在的な多様性を示唆している。本研究ではLitRタンパク質がもつ光センサー機能の解明と新規なタイプの光応答性転写調節蛋白質の探索・解析を進めた。また、微生物の表現型に基づくおよびゲノム情報を利用したスクリーニングを実施し、新規な光応答性調節タンパク質の同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ビタミン B_{12} 結合型光受容体LitRの解析

本研究では主に組み換えタンパク質を用いたLitRの機能解析を実施した。組み換えタンパク質は大腸菌を宿主としてGSTタグ融合タンパク質として大量発現させ、アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した後、プロテアーゼによるGSTタグの切断のステップにより、純度の高い組み換えタンパク質を調製した。

(2) 非ビタミン B_{12} 型光受容体の解析

*Pseudomonas putida*において*litR1*、*litR2*、*litR3*、*shp1*、*shp2*の単独破壊株、二重さらには三重破壊株を作製した。また、LacZ活性を指標としたレポーターアッセイにより遺伝子破壊が光誘導性転写に及ぼす影響を調べた。

(3) 光応答性細菌の探索

ゲノム情報より*litR*ホモログあるいはカロテノイド合成遺伝子を有している細菌を公的分譲機関より購入し、明暗で培養した菌体から抽出したRNAを用いた転写解析を実施し、光応答性遺伝子の探索を行った。

4. 研究成果

(1) ビタミン B_{12} 結合型光受容体LitRの解析

本研究では系統分類学的に全く異なる2つの細菌に由来するLitRを研究対象とした。一つはグラム陰性細菌として温泉より分離された高度好熱菌 *Thermus thermophilus* であり、もう一つはグラム陽性細菌のモデル株として土壌に広く生息する中温性の内生孢子形成細菌 *Bacillus megaterium* である。これらバクテリアの生理学的な性質は全く異なる

にも関わらず、共通してカロテノイド生産が光によって顕著に誘導され、*litR*がカロテノイド合成遺伝子群の光誘導性発現において中心的な役割を果たすことを我々が進めた遺伝学的な解析により明らかになっている。これらのLitRはN末端領域にDNA結合ドメインをもち、C末端領域にビタミン B_{12} 結合ドメインを有している。両細菌でビタミン B_{12} 合成遺伝子を欠損させることにより、カロテノイド生産の光誘導が見られなくなることは、光吸収を示すビタミン B_{12} が光アンテナとして機能することを示唆している。本研究では主に組み換えタンパク質を用いたLitRの機能解析を実施した。

*T. thermophilus*のLitRタンパク質(LitRtth)は、そのアミノ酸配列から予想されていたようにAdo B_{12} と特異的な相互作用を示した。LitRtth-Ado B_{12} の標的プロモーターに対するDNA結合能をゲルシフトアッセイにより評価した結果、暗条件下においては特異的な結合を示した一方、あらかじめ10分間ほど光処理したLitR-Ado B_{12} 複合体はDNAに対する結合能を消失していた。この明・暗間におけるLitR-Ado B_{12} の変化を調べるために、吸収スペクトル解析およびゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量解析を実施した。明条件下におけるLitRはヒドロキソ B_{12} (OH B_{12})と類似のスペクトルを示した。これはAdo B_{12} がCo-C結合が光分解を受けて、OH B_{12} に変換されるという本化合物の性質と良く一致していた。また、ゲル濾過クロマトグラフィーによる解析の結果は、LitRtth-Ado B_{12} 複合体は光受容によりホモ多量体から単量体になり、それに伴ってその転写抑制機能が不活性化することが明らかとなった。

B. megaterium QM B1551のLitRタンパク質(LitRbmq)もAdo B_{12} と複合体を形成し、カロテノイド合成遺伝子のプロモーター領域に光依存的なDNA結合能を示した。LitRbmq-Ado B_{12} 複合体をゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量を解析したところ、予想外なことに明・暗両条件下においてホモ二量体を形成した。以上の結果は、サーマスとバチルス由来のLitRの基本機能はAdo B_{12} と複合体を形成し、光感受性のDNA結合タンパク質であることを示している。しかし、光に応答して起こるタンパク質のコンフォメーションの変化が異なることは、LitRの光依存的な転写調節機構には2つのタイプが存在することを示唆している。また、系統分類学的に全く異なる2つのバクテリア由来のLitRがAdo B_{12} と相互作用し、光依存的なDNA結合能を示したことは、LitRが普遍的な光センサー型転写調節タンパク質であることを示している。

(2) 非ビタミンB₁₂型光受容体の解析

litR は広範なバクテリアに保存されており、1種類のバクテリアが保有するパラログ遺伝子の数およびそれに隣接する遺伝子はバクテリアごとに異なっている。多様な芳香族化合物の分解能力を有することで知られる *Pseudomonas* 属細菌は複数の *litR* ホモログ遺伝子をゲノム上にコードしている。また、上記の *Thermus* や *Bacillus* 属細菌とは異なり、ほとんどの *Pseudomonas* 属細菌のゲノムからはカロテノイド合成遺伝子が見つからない。このことは *Pseudomonas* 属細菌がカロテノイドに代わる別の光応答機構を装備していることを示唆している。そこで、我々はカロテノイド合成遺伝子群をコードしておらず、また最も多い3つ *litR* ホモログ遺伝子 (*litR1-litR3*) をゲノム上にコードしている *Pseudomonas putida* を研究対象に選択した。

我々はこれまでに高精度トランスクリプトーム解析によりゲノム上に散在する21個の遺伝子群(葉酸合成・脂肪酸合成・細胞凝集因子・光回復酵素・ヘム合成など)の発現が光照射によって顕著に誘導されることを明らかにし、本研究では、光誘導性遺伝子群の発現制御における *litR1-litR3* およびそれらに隣接してコードされるSbp群の役割を明らかにすることを目的とした。なお、Sbpは植物の青色光受容体(フォトトロピン)として発見され、フラビンモノヌクレオチドを光アンテナとして利用するタイプの光受容体である。また、近年、Sbpホモログは様々なバクテリアからも類似遺伝子が見つっている。

*litR1-litR3*の役割を調べるために、各単独および多重遺伝子破壊株における光誘導性遺伝子群の転写レベルを解析した。単独破壊株と二重破壊株における転写様式は、野生株と同様であった。その一方で、すべてのLitRを欠失させた三重破壊株では、各遺伝子の転写は明・暗の両条件下において構成的であった。この結果は、LitRホモログ群は転写を負に調節するリプレッサー機能を有し、互いの機能を補完し合っていることを示している。

LitRの光感知は他の細菌と同じくビタミンB₁₂を介して行われることを予想し、ビタミンB₁₂合成欠損株における転写レベルを調べた。その結果、予想外なことビタミンB₁₂合成欠損株においても光依存的な転写誘導が認められ、本菌のLitRによる光センシングにはビタミンB₁₂以外の因子の関与が示唆された。そこで、Sbp蛋白質群が光センサーとしての機能を担うと予想し解析を進めた。各*sbp*遺伝子の単独破壊株は、野生株と同じ程度の光依存的な転写レベルを有していた一方で、*sbp1*・*sbp2*二重遺伝子破壊株においては、

明・暗両条件下で転写がまったく認められなかった。この結果は、2つのSbp蛋白質が互いに補完しあう機能を有すること、そしてSbp蛋白質が光に応答してLitRの負の転写調節機能を解除するアンチリプレッサーとして作用することを想起させる。

同様の機能をもつLitRおよびSbpホモログが一つのゲノムに複数存在することは、本菌における光応答が多様であること、ならびにそれが菌の生理に大きな影響を及ぼす要因になっていることを暗示している。*litR-sbp*の遺伝子セットは*Pseudomonas*属およびその類縁菌に広く分布していることから、新たな光応答メカニズムが広く関連の細菌群において作動しているものと推測される。

(3) 光応答性細菌の探索

litR 相同遺伝子はゲノム配列解読細菌の約3割にコードされており、*litR* 保有菌の生息環境は土壌・海洋・淡水・温泉・植物根圏といった地球上の多岐に渡っている。このことは、光に対する細胞応答システムが一般細菌の普遍的な生物機能として備わっていることを示唆している。そこで、我々はあらたに微生物の表現型およびゲノム情報に基づく探索を実施し、アミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* のカロテノイド生産が光によって顕著に誘導されることを見出した。また、抗菌性紫色色素ピオラセイン生産菌 *Chromobacterium violaceum* において、*Pseudomonas* から見出した光誘導性遺伝子のホモログを含む遺伝子クラスターの転写が光によって誘導されることを見出した。遺伝学的な解析システムが整備されているモデル株を用いた遺伝生化学的な解析により、*C. glutamicum* と *C. violaceum* の光誘導性遺伝子群に隣接してコードされる転写調節タンパク質がその光応答性転写誘導において中心的な役割を担うことが予想された。興味深いことに、両細菌のレギュレーターはLitRが含まれるMerRファミリーには属さず、それぞれMarRファミリーおよびTetRファミリーのレギュレーターであった。一般的に両ファミリーのタンパク質機能(主にDNA結合能)は、低分子化合物(リガンド)の結合による調節を受けることが知られており、光アンテナ機能を有するリガンドの特定が急務であるが、現在のところその同定には至っていない。

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)

[学会発表] (計13件)

1) 見世 光、高野英晃、上田賢志、*Bacillus megaterium* の光応答: カロテノイド生産の光

誘導と細胞外粘性物質生産の光抑制、日本農芸化学会 2013 年度大会 (2013/3/26、東北大学)

2) 丸山貴史、高野英晃、上田賢志、*Pseudomonas* 属細菌における光依存性転写調節因子 LitR の機能に関する研究、第 11 回微生物研究会 (2012/9/22、東京大学)

3) 高野英晃、放線菌が示すストレス応答制御の分子機構に関する研究 2012 年度日本放線菌学会大会浜田賞受賞講演 (2012/9/6、府中の森劇術劇場)

4) 高野英晃、江淵鉄平、牟田口尚敬、新谷政己、野尻秀昭、上田賢志、*Pseudomonas* に存在する新しい光センシング機構、日本農芸化学会 2012 年度大会 (2012/3/24、京都女子大学)

5) 萩原健太、平田直哉、高野英晃、上田賢志、*Bacillus megaterium* における光誘導転写調節機構、日本農芸化学会 2012 年度大会 (2012/3/23、京都女子大学)

6) 高野英晃、萩原健太、平田直哉、上田賢志 *Bacillus megaterium* の光センサー型転写調節タンパク質 LitR の機能解析、第 6 回日本ゲノム微生物学会年会 (2012/3/10、立教大学)

7) H. TAKANO, K. HASHIMOTO, H. WATANABE, H. SHIRATORI-TAKANO, S. AMANO AND K. UEDA Knockout of *cvn1*, a Conserved GPCR-like Regulatory Operon, Causes Fragmentation of the Vegetative Mycelium in *Streptomyces griseus*, 16th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (2011/12/13, プエルトバジャルタ, メキシコ)

8) H. TAKANO, S. AMANO, H. HIRATORI-TAKANO, K. HAGIWARA, H. SAEKI, K. FURIHATA, S. SAKUDA, AND K. UEDA Microbial Community Structuring Based on The Supply of Phores from *Streptomyces*, 16th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (2011/12/13, プエルトバジャルタ, メキシコ)

9) 渡邊廉、高野英晃、上田賢志、光センサー機能をもつ新しいタイプの転写調節因子 LitR の解析、第 10 回微生物研究会 (2011/11/12、千葉大学)

10) 萩原健太、高野英晃、上田賢志、一般細菌におけるビタミン B12 の多様な役割、第 10 回微生物研究会 (2011/11/12、千葉大学)

11) 高野英晃、上利佳弘、新海暁男、上田賢志、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の光応答：新規な光誘導性遺伝子群とその転写制御メカニズム、第 5 回日本ゲノム微生物学会若手の会 (2011/9/30、ろうきん研修所富士センター)

12) 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ワークショップ -ゲノムで繋がる微生物研究の新展開- (2011/8/20、東北大学)

13) Hideaki Takano, Yoshihiro Agari, Ryuta Yamazaki, Teruhiko Beppu, Akeo Shinkai and Kenji Ueda, LdrP, a cAMP-independent CRP/FNR family transcriptional regulator, is a master switch for the light-inducible gene expression in *Thermus thermophilus*, 第 1 回 モデル生物丸ごと一匹学会 (2011/8/19、理化学研究所播磨研究所)

[その他]

[ホームページ]

日本大学教員プロフィール

http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/65/0006452/theses_e.html

日本大学生物資源科学部応用生物科学科生命工学研究室

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~ueda/lab/>

[受賞歴]

2012年9月 日本放線菌学会 浜田賞受賞

2012年4月 長瀬研究振興賞受賞

2012年3月 日本農芸化学会 2012 年度大会トピックス賞

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：