

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450087

研究課題名(和文)細菌の芳香族化合物トランスポーターネットワーク

研究課題名(英文)Functional aspects of bacterial multiple transporter genes for aromatic compounds

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：多用な有機化合物を資化するBurkholderia multivorans ATCC17616株の芳香族化合物の取り込みに関与する類縁トランスポーター遺伝子群の発現を解析した結果、benK2の発現は安息香酸、3-クロロ安息香酸(3CB)で誘導され、benK3は構成的に発現していることが判明した。一方、benK4は、3CBで特に強く発現することと、同遺伝子が3CB分解遺伝子群とクラスターを形成していることから、benK4が3CBの取り込みに大きく関与していることが判明した。芳香族化合物トランスポーターの取り込みへの寄与には、その化合物の存在下で効率的に発現されることが重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The analysis of gene expression in Burkholderia multivorans ATCC17616 revealed different expression patterns of related transporter genes of Major Facilitator Super Family (MFS) for aromatic compounds such as benzoate and 3-chlorobenzoate (3CB). While benK2 was induced by benzoate and 3CB, benK3 was expressed constitutively. On the other hand, benK4 was induced by 3CB strongly. This result and the fact that benK4 gene constitutes gene cluster together with 3CB degradation genes suggested strongly that benK4 is involved in uptake of 3CB. Another MFS family member, mhbK constitute gene cluster with 3-hydroxybenzoate (3OH-Ben) degradation genes which seemed to be expressed by 3OH-Ben and was found to be involved in uptake of 3OH-Ben. These results suggested that the efficient expression of transporter gene is critical for the uptake of aromatic compound.

研究分野：微生物学

キーワード：トランスポーター 芳香族化合物 応用微生物 細菌 取り込み MFS family 発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

土壌等の環境中の微生物は様々な有機化合物を取り込んで分解・代謝することにより、物質の循環や植物の生育に不可欠の関与を行っていると考えられている。しかしその実際は未知の部分が多い。なぜなら、微生物の土壌中の有機化合物の利用については、多くのことが微生物の同定のための生育実験や、ゲノム上に分解(代謝)遺伝子を持っていることからの推定だからである。また、根圏では微生物は根の分泌物を利用するとされているが、これも根圏と土壌では菌相や菌数が異なることからの推定である。微生物菌体内への取り込みについては、その制御なども含めてよく研究されている有機化合物はグルコースなどごく限られた種類の物質だけであり、環境中に様々な種類が存在する芳香族化合物については、個別の遺伝子の研究はあるものの、制御機構を含めたその全貌は全く知られていない。地球上の様々な物質の循環において、土壌微生物が菌体内に取り込んで分解、無機化する過程は、有機物分解の最終段階であるにも関わらず、その具体的知見はこのようにたいへん乏しい。

## 2. 研究の目的

多様な有機化合物の資化能を持つ代表的な土壌細菌である *Burkholderia* 属細菌を用いて、芳香族化合物の取り込みを行うトランスポーターを同定し、取り込み機構を明らかにする。さらに、トランスポーター遺伝子群の発現調節機構を明らかにする。

細菌で芳香族化合物の取り込みを行うトランスポーターとして明らかにされているものはいくつかあるが、そのほとんどは Major Facilitator Superfamily (MFS) に属する膜タンパク質である。土壌の細菌は様々な有機化合物を利用するにもかかわらず、既存の研究は全て、特定の菌の特定の芳香族化合物の分解能に着目して行われており、その物質の MFS トランスポーター1つを解析するに留まっている。本研究では、1つの菌株で、各種芳香族化合物を取り込む複数の MFS トランスポーターを網羅的に解明し、その役割分担を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) トランスポーター遺伝子群の発現解析

*B. multivorans* ATCC17616 株の野生株について、クエン酸(対照区)、安息香酸、3-クロロ安息香酸(3CB)をそれぞれ基質として液体培養を行い、*benK2*, *benK3*, *benK4* 各遺伝子の発現を、半定量及び定量 Reverse-Transcription PCR (RT-PCR) により解析した。定量 RT-PCR は、LightCycler RNA Master SYBR Green キット(Roche)と、ライトサイクラー2.0 インストルメント(Roche)を使用して行った。

### (2) トランスポーター遺伝子破壊株の作製と

### 生育の解析

*B. multivorans* ATCC17616 株で安息香酸、3CB の取り込みに関与すると思われる *benK2*, *benK3*, *benK4* 各遺伝子について、単独破壊株、3通りの組み合わせの二重遺伝子破壊株、三重遺伝子破壊株を構築した。ATCC17616 株染色体上の破壊対象遺伝子両側の DNA 断片を pEX18Tc ベクターに組み込んで、同株に接合伝達により導入し、相同組換えにより破壊対象遺伝子を欠失した株を選抜して、マーカーレス遺伝子破壊株を作製した。作製した破壊株と野生株を、クエン酸(対照区)、安息香酸、3CB を基質とする液体培地での生育を比較解析した。

### (3) 転写調節因子の機能の解析

*B. multivorans* ATCC17616 株の 3-ヒドロキシ安息香酸分解遺伝子群の発現を調節すると考えられた LysR タイプ転写調節因子 MhbR (図 1) の、同分解遺伝子群のプロモーター領域への結合を解析した。*mhbR* 遺伝子に His コドン 6 個を付加させたものをタンパク質発現用ベクター pET11a に挿入し、発現用宿主大腸菌 BL21(DE3)pLysS に形質転換した。MhbR を発現させて、回収した菌体から Capturem His-Tagged Purification Miniprep Kit (TaKaRa) を用いて、MhbR タンパク質を部分精製した。分解遺伝子群のプロモーター領域 DNA は DIG でラベルし、部分精製した MhbR タンパク質との結合をゲルシフト実験により解析した。

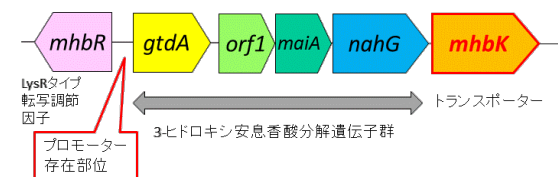


図 1 *Burkholderia multivorans* ATCC17616 株の 3-ヒドロキシ安息香酸分解遺伝子群

## 4. 研究成果

### (1) トランスポーター遺伝子群の発現

半定量及び定量 RT-PCR による解析の結果、*benK2* は 3 種類の基質でそれぞれ発現していたが、安息香酸、3CB により、クエン酸よりも強く発現していたことから、これら 2 種の芳香族化合物により誘導されることが判明した(図 2)。安息香酸による発現は対数増殖期中期に最も強く、3CB による発現は同終期に最も強かった。それに対し、*benK3* は前培養の LB 液体培地及び本培養の 3 種類の基質で発現していたため、構成的に発現していると判断された(図 3)。一方、*benK4* は、3CB で特に強く発現することが明らかとなり、3CB 培養での対数増殖期中期における発現量はクエン酸、安息香酸それぞれの培養の同時期に比べて 150 倍及び 3.5 倍であった(図 4)。以上の結果と、*benK4* 遺伝子が 3CB

分解遺伝子群の近傍に存在してクラスターを形成していることから、3CBの取り込みには少なくとも *benK4* は関わっていることをほぼ確定した。既知の芳香族化合物トランスポーターに対する *benK2*、*benK3*、*benK4* 各遺伝子とのアミノ酸レベルでの相同性も考え併せると、芳香族化合物のトランスポーターがターゲットとする化合物の取り込みに寄与する程度に関しては、アミノ酸レベルでの相同性と強い相関関係があるわけではなく、その化合物が存在するときに発現されることが重要であることが示唆された。

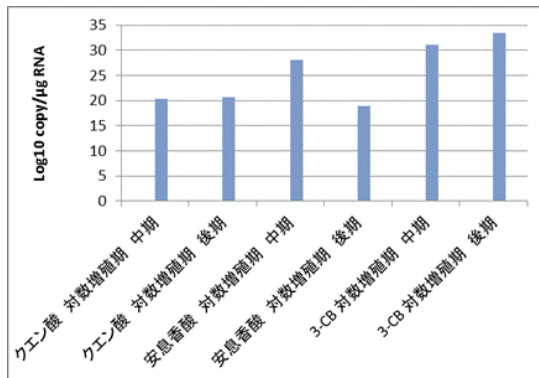


図 2. *benK2* 遺伝子の発現

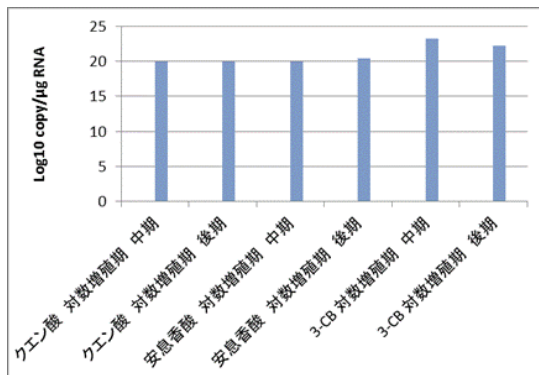


図 3. *benK3* 遺伝子の発現

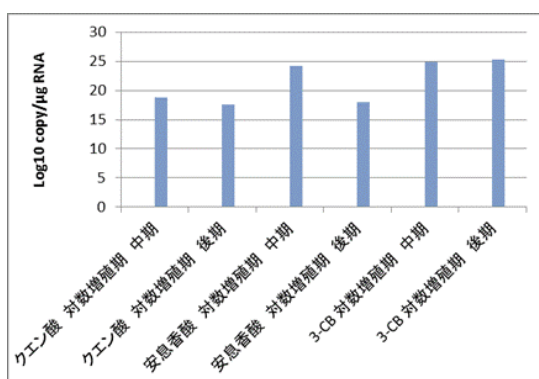


図 4. *benK4* 遺伝子の発現

(2) トランスポーター遺伝子破壊株の生育  
*B. multivorans* ATCC17616 株野生株及び、*benK2*、*benK3*、*benK4* 各遺伝子の単独破壊株、3通りの組み合わせの二重遺伝子破壊株、三重遺伝子破壊株について、安息香酸、3CB

の液体培地での生育試験を行ったが、生育速度に顕著な違いは見られなかった。またアントラニル酸等の他の芳香族化合物での生育にも差は見られなかった。

### (3) 転写調節因子の機能

MhbR 発現実験後の粗タンパク質を SDS-PAGE により確認したところ、IPTG による誘導を行った区にのみ MhbR とみられる約 34 kDa のバンドが見られ、His-tag による精製結果のプロファイルでもこの 34kDa のバンドが現れた (図 5)。従って、MhbR の発現、部分精製方法が確立できた。この部分精製した MhbR タンパク質について、3-ヒドロキシ安息香酸分解遺伝子群のプロモーター領域を含むと考えられる DNA 断片とのゲルシフト実験を行った結果、両者の特異的な結合を示すバンドが見られ (図 6)、MhbR が 3-ヒドロキシ安息香酸分解遺伝子群のプロモーターを制御することが強く示唆された。またこの特異的なシフトバンドは、タンパク質と DNA の非特異的な静電相互作用による結合を防ぐヘパリンの存在下で見られたが、ヘパリン無添加の場合には、ゲル内のシフトバンドとしては見られず、高次の凝集体を形成したと考えられた。このことから、MhbR と被制御プロモーター-DNA の結合は強いことが予想された。

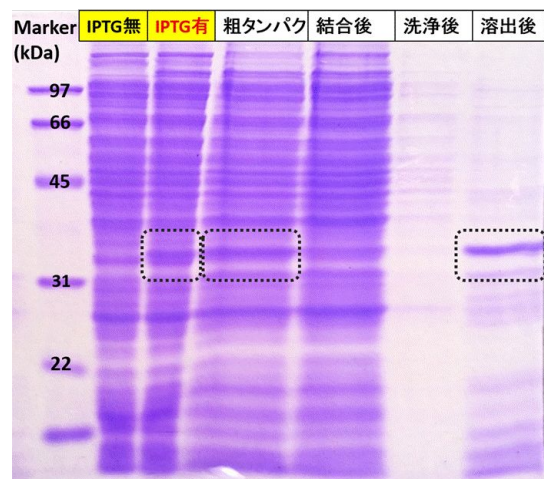


図 5. MhbR の精製プロファイル (点線枠内の太いバンドが MhbR タンパク質を示す。)

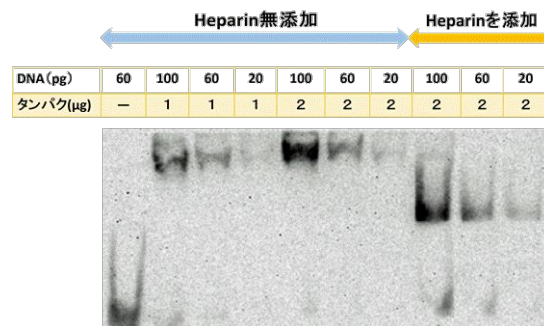


図 6. MhbR とプロモーター-DNA との結合を示すゲルシフト実験

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2件)

小川直人、細菌による芳香族化合物の分解と遺伝子発現調節機構、分離技術、査読無、47巻、2号、2017年、pp. 92-96. Kimiko Yamamoto-Tamura、Ikuro Kawagishi、Naoto Ogawa、Takeshi Fujii、A putative porin gene of *Burkholderia* sp. NK8 involved in chemotaxis toward  $\beta$ -ketoadipate Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 査読有、Vol.79、No.6、2015、pp. 926-936.

〔学会発表〕(計2件)

小川直人、細菌による芳香族化合物の分解と遺伝子発現調節機構、分離技術会 第44回夏季研究討論会(招待講演)、2016年8月26日~27日(8月26日発表)、伊豆山研修センター(静岡県熱海市) 本田悦爾、町田峻太郎、戸倉由貴、津田雅孝、小川直人、*Burkholderia multivorans* ATCC17616株のクロロ安息香酸トランスポーター様遺伝子群の多重遺伝子破壊株の構築と解析、環境微生物系学会合同大会2014、2014年10月21日~24日(10月22日発表)、アクティシティ浜松(静岡県浜松市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

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

無し ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

無し ( )

研究者番号：

(4)研究協力者

無し ( )