

# 論文の内容の要旨

氏名：角 悟

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題目：非光合成細菌が保有する光応答性転写調節蛋白質に関する研究

## 1. 背景と目的

光は、多くの生物の生命活動に重要な役割を果たしている。その受容に関する分子生物学的検討は、真核生物や光合成細菌の光センサー蛋白質の解析を中心に進められてきた。また、光合成を行わない細菌群にも真核生物型光センサーが存在し、それを介した光応答が起こることが知られている。一方、当研究室では、LitR と命名した特有の光センサーが非光合成細菌群に広く分布することを見出し、その役割と機能に関する研究を進めてきた。

当初、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) の光依存的なカロテノイド (Crt) 生産を制御する蛋白質として同定された LitR は、ビタミン B<sub>12</sub> (B<sub>12</sub>) をクロモフォアとする転写調節因子であり、その後様々な非光合成細菌における Crt 生産の光誘導に関与することが明らかになった。グラム陽性細菌 *Bacillus megaterium* では、暗条件で B<sub>12</sub> と LitR の複合体が Crt 合成遺伝子のオペレーターに結合することでその転写を抑制する。光照射によって B<sub>12</sub> が酸化されると LitR がオペレーターから解離し、Crt 合成遺伝子の転写が促進される。この LitR に相同性を示す蛋白質はグラム陽性・陰性を問わず広範な細菌種に分布するが、そこには B<sub>12</sub> 結合ドメインを有さないものも含まれ、光感知ドメインの構造に多様性が認められた。それらの中には、これまでに知られていない光アンテナ分子を要求する光センサーが含まれる可能性がある。そこで本研究は、アンテナ分子が明らかになっていない LitR 類似蛋白質を解析することで、新規な光センシング機構を解明することを目的とした。

## 2. 結果

### I LitR ファミリーの多様性

LitR 類似蛋白質群の光感知ドメインと予想される C 末端側アミノ酸配列をもとに系統解析を行ったところ、LitR 類似蛋白質は 5 つのクラスに分類されることが推測された (図 1)。これまでの知見から、クラス I は B<sub>12</sub> を光アンテナ分子として利用し、クラス II は青色光受容体 LOV と相互作用することが明らかにされてきた。一方、クラス III~V についてはアンテナ分子が明らかになっておら

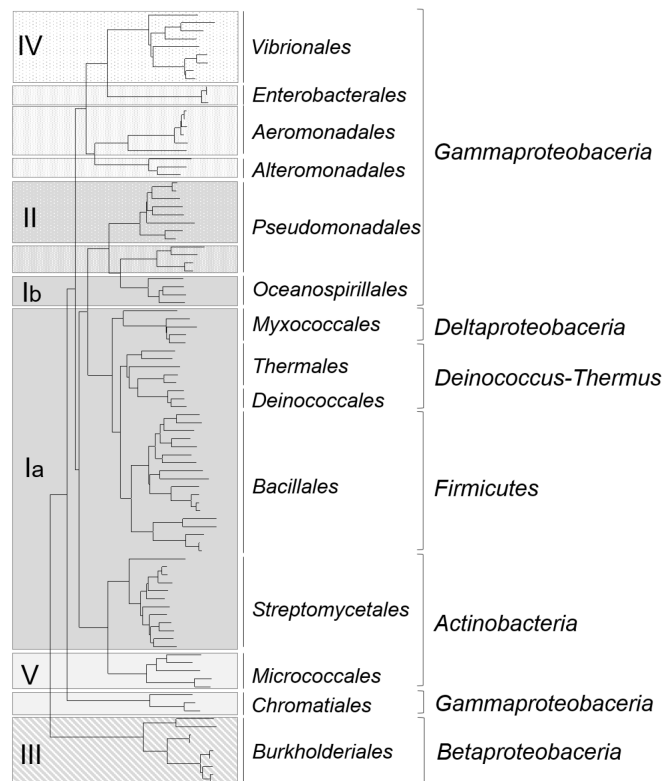


図 1 LitR ファミリーの分類

LitR 類似蛋白質の C 末端領域におけるアミノ酸配列を基に Neighbor-joining 法で解析した系統樹。

ず、それらの光感知ドメインは機能既知ドメインと相同性を有していない。このことから、クラス III ~V は新しい光感知機構を有することが予想された。

DNA マイクロアレイを用いた予備試験において、クラス III LitR を保有するグラム陰性細菌 *Burkholderia multivorans* では *litR* 周辺の遺伝子群の転写が光誘導されること、また、LitR 組換え蛋白質は 280 nm と 340 nm の 2 つの極大吸収を有する特徴的なスペクトルを示すことが観察された。そこで、他のクラスの LitR を保有する細菌群についても RNA seq によるトランスクリプトーム解析を実施した。クラス VI LitR 保有菌 *Vibrio harveyi* では、そのレギュロンと予想される 11 遺伝子群の転写レベルが光照射によって 2~11 倍に上昇した。一方、クラス III LitR 保有菌 *Burkholderia plantarii* とクラス V LitR 保有菌 *Rhodococcus jostii* では、それらの推定レギュロンの光による転写誘導は認められなかった。また、*V. harveyi* 由来の LitR の組換え蛋白質を精製し、その吸光スペクトルを測定したところ、蛋白質由来のピークのみが検出された。これらのことから、詳細な解析の対象として *B. multivorans* が保有するクラス III LitR を選定し、その役割と機能に関する分子生物学的検証を行った。

## II クラス III LitR の役割と機能

### (i) 遺伝子破壊による役割の検証

予備試験において観察された遺伝子群の光誘導的な転写上昇を確認し、かつ、それに対する LitR と LitS の役割を明らかにするため、定量 RT-PCR による転写解析を行った。野生株における当該遺伝子群の転写レベルは、光照射によって 2~27 倍が上昇し、DNA マイクロアレイ解析と同様な結果が得られた (図 2A 左)。次に、*litR* 破壊株で同様の解析を行ったところ、明暗両条件下における転写量の差が認められず (図 2

中央)、また、その転写レベルは野生株の明条件のそれを大きく上回っていた (図 2B)。一方、その遺伝学的相補株では、野生株と同様の光依存性が回復していた。これらのことから、LitR は転写抑制能を有し、それが光照射によって阻害されると推測された。次に、

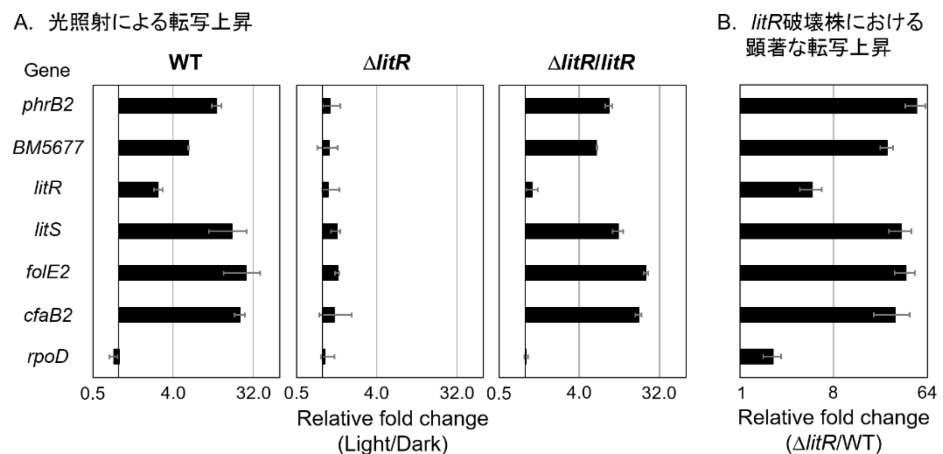


図 2 定量 RT-PCR による転写解析の結果

(A) 棒グラフは、*B. multivorans* 野生株と *litR* 破壊株、その遺伝学的相補株における光誘導性遺伝子の転写レベルを示す。横軸は、暗条件下における転写レベルを 1 とした場合の光照射下の転写倍率を表す。(B) 明条件下における野生株の転写レベルを 1 とした場合の *litR* 破壊株の転写倍率を示す。

に、ECF 型シグマ因子をコードする *litS* の破壊株を解析したところ、3 つの遺伝子の転写レベルは低下し、2 つの遺伝子はわずかに減少した。それらは遺伝学的相補株によって部分的に回復した。このことから、 $\sigma^{LitS}$  が 5 つの遺伝子の転写開始に関与することが示唆された。

光誘導を受ける遺伝子群に葉酸合成に関与する *foIE2* が含まれていたところから、細胞内の葉酸含量が光照射によって上昇すると予想された。そこで、光照射した菌体から抽出した葉酸を、葉酸要求

性細菌を用いたバイオアッセイ法によって定量したところ、野生株では光照射によりその含量が2倍以上増加することが判明した。また、*litR* 破壊株は野生株の21倍の含量を示すことが判明した。このことから、*B. multivorans* では LitR を介した *foIE2* の光誘導による葉酸合成が促進されることが強く示唆された。

## (ii) 生化学試験による機能の検証

### ①光サイクルの観測

前述した通り、組換え LitR 蛋白質は 340 nm 付近に単一の極大吸収を有する吸収スペクトルを示す。本ピークは、同蛋白標品に UV-A を 180 秒照射することで完全に消失し（図 3A）、光照射した標品を暗所へ戻すことで徐々に回復することが観察された（図 3B）。この現象は、光センサーに特徴的な光サイ

クルを反映するものと考えられ、本極大吸収がアンテナ分子の光吸収特性に由来するものであることを強く支持した。この光照射が LitR の DNA 結合能に及ぼす影響をゲルシフトアッセイにより解析したところ、暗条件の LitR は標的 DNA 配

A. UV-A照射による340 nmの極大吸収の消失 B. 暗条件下におけるピークの回復

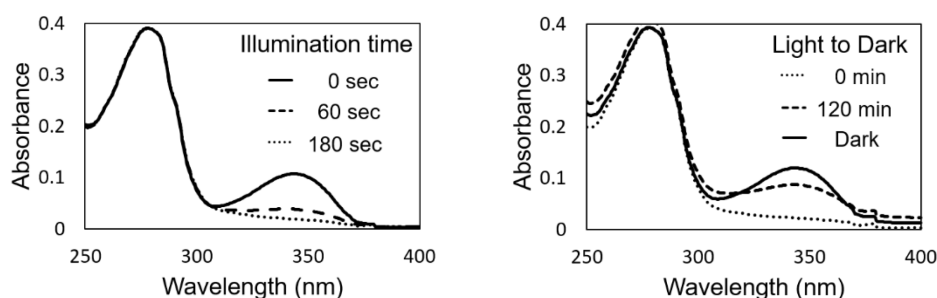


図3 LitRの光サイクル反応

(A) LitR 組換え蛋白質の吸収スペクトル。UV-A 照射後の吸収スペクトルを 60、180 秒後に測定した。(B) 120 分後の暗条件下における吸収スペクトルを測定した。

列への特異的な結合を示した一方、光照射された LitR は DNA 結合能が著しく低下していることが判明した。次に、LitR をゲル濾過クロマトグラフィーに供したところ、暗条件下では検量線の上限を超えるオリゴマーと、4 量体と推定される 2 つのピークが検出された。一方、光照射した LitR では 4 量体のピークのみが認められた。これらのことから、暗条件下ではオリゴマーを形成することで標的 DNA に対して強いリプレッサー活性を発揮する一方、UV-A 照射による 4 量体への解離が DNA 結合能を低下させることが示唆された。

### ②光応答に関与する分子構造の解析

LitR 蛋白質のアンテナ分子が低分子化合物であると予想してその単離を試みたが、その取得には至っていない。また、本標品の元素分析を行ったところ、金属の含有は認められなかった。そこで、変性剤等の効果を調査することで、情報を収集することを試みた。同標品に SDS を添加したところ、340 nm のピークが 300 nm 側にシフトし、さらにメルカプトエタノールを添加するとそのピークは消失した。このことから、光感知ドメインはジスルフィド結合を含んだ立体構造を有すると予想された。そこで次に、C 末端側領域に保存されている 3 つのシステイン (Cys) 残基をアラニンに置換した変異体を作製した。作出した変異体の吸光スペクトルを測定したところ、3 箇所の Cys における変異体全てにおいて 340 nm の極大吸収が消失していた（図 4）。さらに、これらの変異体についてゲルシフトアッセイによる DNA 結合能を解析したところ、いずれもその能力が低下していることが認められた。また、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる解析では各変異体で 4 量体と推定される 1 本のピーク

が検出された。以上のことから、3つの Cys 残基が光受容に中心的役割を果たす構造の形成に必須の役割を有することが示された。

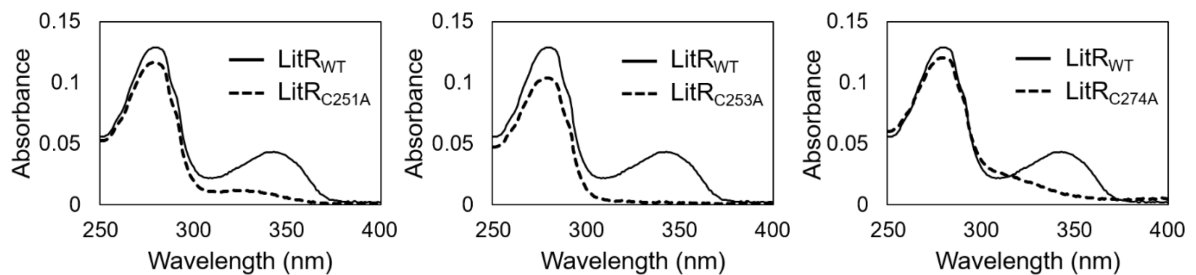


図4 Cys 変異 LitR の吸光スペクトル

暗条件下における各 LitR 蛋白質の吸光スペクトル。実線は野生型、破線は変異型の吸光スペクトルを示す。

### 3. 総括

本研究で得られた分子遺伝学・生化学的な解析結果から、*B. multivorans* の光応答は LitR とそれによって誘導される  $\sigma^{LitS}$  によって 2 段階的に調節されると推測される (図 5)。2 つのグループの遺伝子群を段階的に誘導発現することで光照射ストレスに対する秩序だった防御応答が確立すると考えられる。

さらに、本研究では、 $B_{12}$  結合ドメインを持たないクラス III LitR が光センサー型転写調節蛋白質として機能することを始めて明らかにした。本蛋白質は、UV-A 感知ドメインを保有し、光サイクル反応と光依存的なホモ複合体の解離を示した。これは、クラス I や II のそれとは異なる光応答機構である。アンテナ分子の同定には至らないが、低分子化合物や金属が検出されなかったこと等から、本蛋白質の光アンテナは自身のアミノ酸残基で構成されるビルトイン型である可能性がある。

本研究で得られた成果は、これまでに知られていない光センサーが細菌における光依存的な遺伝子発現を担っていることを具体的に示すもので、分子生物学ならびに生態学に新たな基礎知見をもたらした。また、分子レベルの知見がさらに集積することでオプトジェネティクスなどの応用技術にも貢献することも期待される。

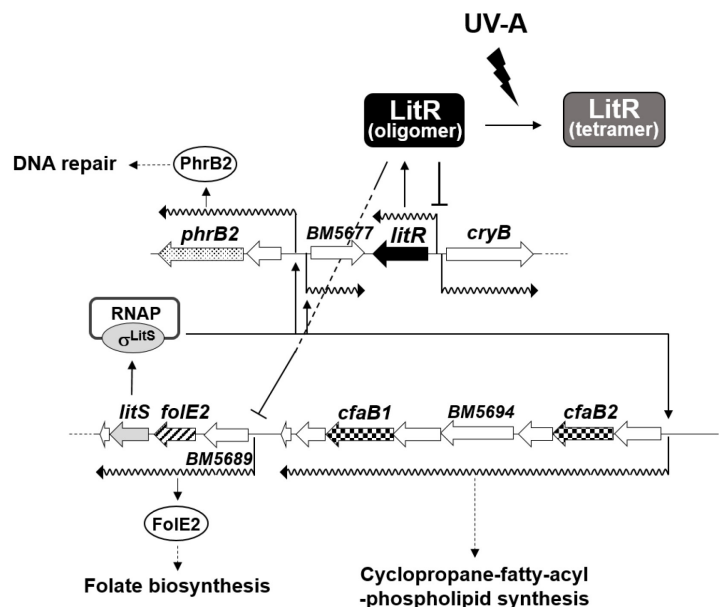


図5 *B. multivorans* の光応答メカニズム

暗条件下では、LitR が *litR* と *foIE2* クラスターのオペレーターに結合し、光誘導性遺伝子群の転写を抑制する。UV-A が照射されると、LitR のリプレッサー活性が低下し、はじめに RNA ポリメラーゼによって *litR* と *foIE2* クラスターの転写が開始される。次に、 $\sigma^{LitS}$  を含んだ RNA ポリメラーゼが *phrB2*、*cfaB* クラスターの転写を開始させる。