

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

日本大学大学院生物資源科学研究科応用生命科学専攻  
博士後期課程

角 悟

2018



# 目次

緒言 .....	1
第 1 章 経緯と目的 .....	3
第 1 節 細菌で発見された真核生物型光センサー .....	3
第 2 節 非光合成細菌に特有の光センサー LitR/CarH .....	7
第 3 節 非 B <sub>12</sub> 型 LitR の光応答 .....	15
第 4 節 <i>Burkholderia</i> 属細菌 .....	19
第 5 節 研究の目的 .....	22
第 2 章 材料と方法 .....	23
第 3 章 結果と考察 .....	52
第 1 節 光応答性転写調節蛋白質の多様性に関する解析 .....	52
第 1 項 光応答性転写調節蛋白質の分子系統解析 .....	52
第 2 項 RNA seq による光応答性細菌のトランスクリプトーム解析 ..	74
第 3 項 小括 .....	131
第 2 節 クラス III LitR における光誘導性遺伝子の役割の検証 .....	132
第 1 項 光誘導性遺伝子の転写解析 .....	132
第 2 項 光誘導性遺伝子のプロモーター構造に関する解析 .....	149

第 3 項	葉酸合成の光促進 .....	162
第 4 項	小括 .....	175
第 3 節	クラス III LitR の機能の検証 .....	176
第 1 項	光サイクル反応の観測 .....	176
第 2 項	光感知ドメインの分子構造 .....	192
第 3 項	小括 .....	220
第 4 章	総括 .....	221
参考文献	.....	224
謝辞	.....	239

## 緒言

光は地球上の生物の生命活動に欠かせない環境因子の一つである。植物をはじめとする光合成生物は光を利用してグルコースなどの生命活動のエネルギー源を産生し、それを動物などの従属栄養生物が栄養分として要求する。また、動物は視覚によって光を情報として処理し、それに準じた運動ができる。このような高等生物の光センシングメカニズムの解析は進められてきた。一方、我々の肉眼では見えないような微生物においても高等生物が有するものに類似する光センサー蛋白質が分布しており、同様に光に応答するシステムを有していることが明らかにされている。例えば、光回復酵素-クリプトクロームファミリーは、はじめバクテリアの光依存的な DNA 修復酵素として発見されたが、動物・植物では概日リズムに関与する時計遺伝子の一部として機能することが明らかになっている。このように、ほとんどの光センサーは生物界に広く分布し、その生命活動に重要な役割を果たしている。さらに、ロドプシンがオプトジェネティクス技術として応用利用されることから、光応答メカニズムの研究は基礎と応用面においても重要である。

LitR/CarH ファミリーは、ビタミン B<sub>12</sub> をクロモフォアとするバクテリアに特有の光センサーである。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、その後の研究で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。興味深いことに、この類似蛋白質は一部の非光合成細菌群にしか分布していない。さらに、その光感知ドメインは多様であり、その領域の推定機能が未知であることから新しい光センシングメカニズムの存在を示唆している。

本研究は、非光合成細菌が保有する光応答性転写調節蛋白質の多様性に関する解析をしたうえで、新規な光応答メカニズムを解明することを目的とした。本論文の第 1 章では細菌における光応答メカニズムに関する知見を中心に概説し、第 3 章第 1 節では LitR ファミリーなどの光センサー蛋白質の分類とそれらを保有する細菌群のトランスクリプトーム解析の結果を記述した。その結果を踏まえ、クラス III LitR を保有するグラム陰性の土壌細菌 *Burkholderia multivorans* を分子生物学的なモデルに選定し、本菌を対象として実施した遺伝生化学的研究の成果と考察を第 3 章第 2 節以降に記述した。

## 第1章 経緯と目的

### 第1節 細菌で発見された真核生物型光センサー

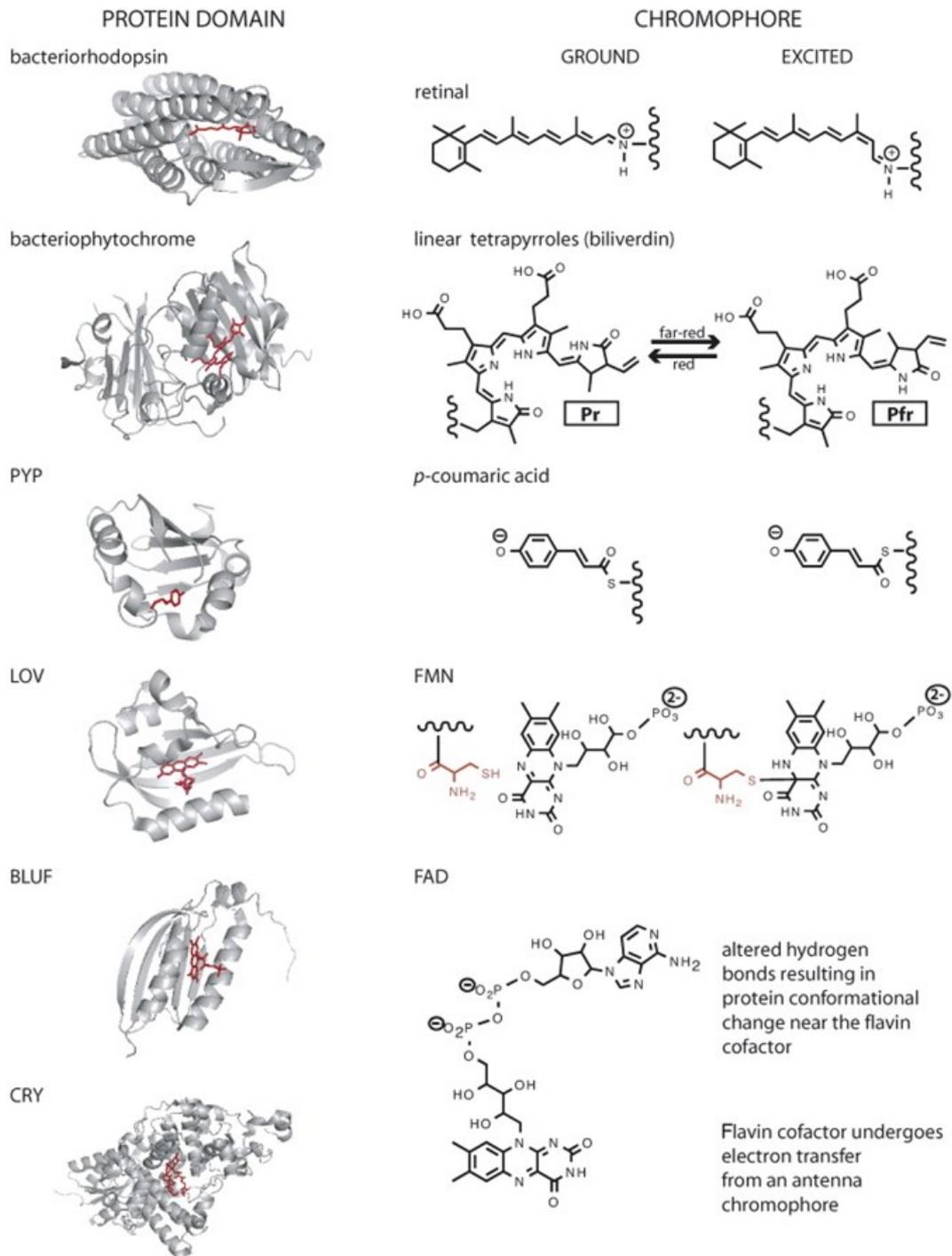
光は、多くの生物の生命活動に重要な役割を果たしている。植物や光合成細菌のような光合成能を持つ生物は光エネルギーを得ることにより生命を維持できる。また、動物は、眼で可視光を受容することにより周囲の情報を得ることができ、それに準じた行動をとることができる。一方、太陽光に含まれる紫外線はピリミジンダイマーを生じさせることによる DNA 損傷を引き起こし、変異した細胞を生じさせる。また、細胞内のフラビンやポルフィリンなどの光増感作用を持つ物質が光照射によって活性酸素の一種である一重項酸素を発生させる<sup>1</sup>。それは、蛋白質や脂質、核酸のような高分子化合物を破壊し、細胞に対してダメージを与える。動物や植物ではメラニンやカロテノイドなど色素を生産してその酸化ストレスに対抗していることが考えられる。

光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分子の解析を中心に進められてきた。植物などが行う光合成にはクロロフィル分子が、動物の視覚にはロドプシンが光受容に重要な役割を果たすことが明らかになっている。光合成を行うバクテリア *Rhodobacter sphaeroides* で

は、LOV (light-oxygen-volatge) 型光センサー PpsR と BLUF (blue-light sensing using flavin) 型光センサー AppA によって光合成に関与する遺伝子群やカロテノイド合成遺伝子群の転写調節を担うことが明らかされてきた<sup>2,3</sup>。また、大腸菌や放線菌などで発見された光回復酵素は光エネルギーを利用して DNA 損傷を修復する機能を持つが、それに類似の蛋白質クリプトクロームは動物や植物などの概日リズムに関与することが知られている<sup>4</sup>。

さらに、一部の細菌は真核生物で発見された光センサーを有しており、それを介した光応答を示すことが明らかになりつつある。これまでにバクテリアで特定された光センサーには 6 つのタイプがある<sup>5</sup> (図 1-1)。バクテリオロドプシンは、海洋性細菌やアーキアで発見された動物の視覚を司るロドプシンに類似な蛋白質であり、光依存的なプロトンポンプとして機能する。赤色光センサー蛋白質フィトクロムや青色光受容体 LOV、BLUF は植物で発見された光センサーであるが、それらは様々なバクテリアの光誘導的な色素生産や形態変化、走光性などに関与することが明らかにされている。多くの光センサー蛋白質は生物ドメインを超えて分布し、それに従った光応答を示すことが明らかになっている。一方、一部の非光合成細菌で見出された光センサー LitR (Light-induced transcription, Regulator) は、光合成細菌や真核生物

に認められない独自のものであることが明らかになりつつある。



Purcell EB and Crosson S, Curr Opin Microbiol.(2008)

図 1-1 バクテリアで発見された光センサー

## 第2節 非光合成細菌に特有の光センサー LitR/CarH

LitR/CarH は、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)<sup>6</sup> や好熱性細菌 *Thermus thermophilus*<sup>7</sup>、グラム陽性の土壌細菌 *Bacillus megaterium*<sup>8</sup>、グラム陰性の粘性細菌 *Myxococcus xanthus*<sup>9</sup> における黄色色素カロテノイド (Crt) 生産の光誘導に関与する MerR 型の転写調節因子である。本蛋白質は N 末端領域に DNA 結合ドメインを、C 末端領域に B<sub>12</sub> 結合ドメインを保有し、光依存的な Crt 生産の調節に重要な役割を担う。その生理学的な意義は、Crt の抗酸化作用による光酸化ストレスへの防御<sup>10,11</sup> と暗条件でその生産を抑制することによるエネルギーの節約であることが考えられる。

生化学的および構造学的な解析により LitR は B<sub>12</sub>(アデノシル B<sub>12</sub>: AdoB<sub>12</sub>) をクロモフォアとする新規な光センサーであることが明らかになった<sup>8,9,12</sup> (図 1-2 および 1-3)。暗条件下では LitR-AdoB<sub>12</sub> 複合体が標的遺伝子のオペレーター上に結合してその転写を抑制する (図 1-4)。緑から青の波長帯の光が照射されることで、ヒドロキシ B<sub>12</sub> (OHB<sub>12</sub>) に光分解されて構造変化を引き起こす。これによって、本複合体の標的プロモーター DNA への親和性が低下し、そこに RNA ポリメラーゼがリクルートされることによって光誘導性遺伝子の転写を開始させる。

*B. megaterium* の遺伝子制御メカニズムは単純であり、LitR-AdoB<sub>12</sub> 複合体と生育に必須な RNA ポリメラーゼシグマ因子  $\sigma^A$  を含む RNA ポリメラーゼのみで光依存的な転写調節スイッチが構成される<sup>9</sup>。一方、*S. coelicolor* や *M. xanthus* ではまず LitR の機能によってそれぞれ  $\sigma^{LitS}$  と  $\sigma^{CarQ}$  の光依存的な発現がおこり、次にそれらを含む RNA ポリメラーゼによって光誘導性遺伝子群の転写が開始される<sup>6,13</sup>。また、*T. thermophilus* では、LitR によって発現誘導される転写活性化因子 LdrP が Crt 合成遺伝子群の転写開始を担うことが明らかになっている<sup>14</sup>。

近年、ゼブラフィッシュ、やヒト細胞、モデル植物シロイヌナズナなどの高等生物で LitR が制御技術に応用されている<sup>15,16</sup>。また、細胞組織培養などに用いられるエアロゾル（成形可能な高分子材料）に LitR が利用されていることも報告されている<sup>17</sup>。

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非光合成細菌種に分布し（図 1-5）、その多くは C 末端領域に B<sub>12</sub> 結合ドメインを有している<sup>18,19</sup>（図 1-6）。一方、一部の LitR のその領域は部分的な B<sub>12</sub> 結合ドメインが推定されている、あるいは、機能既知のドメインと相同性を示さないものが含まれる。これは、LitR ファミリーの光感知ドメインの構造が多様

であることを示唆している。それらの中には、これまでに知られていない光  
感知機構の存在が示唆される。

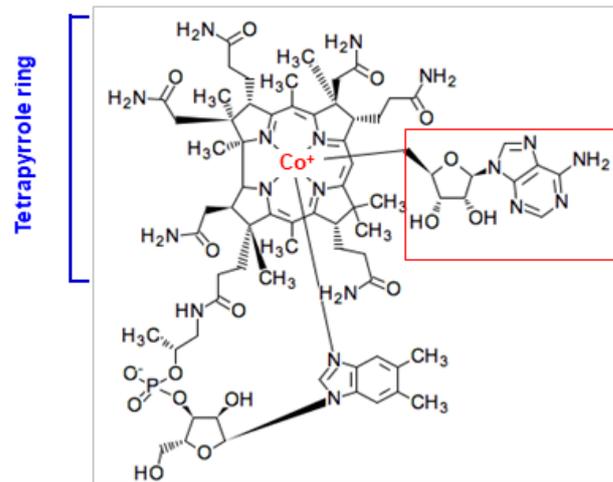


(PDB: 5C8F)

Nature 526:536, 2015

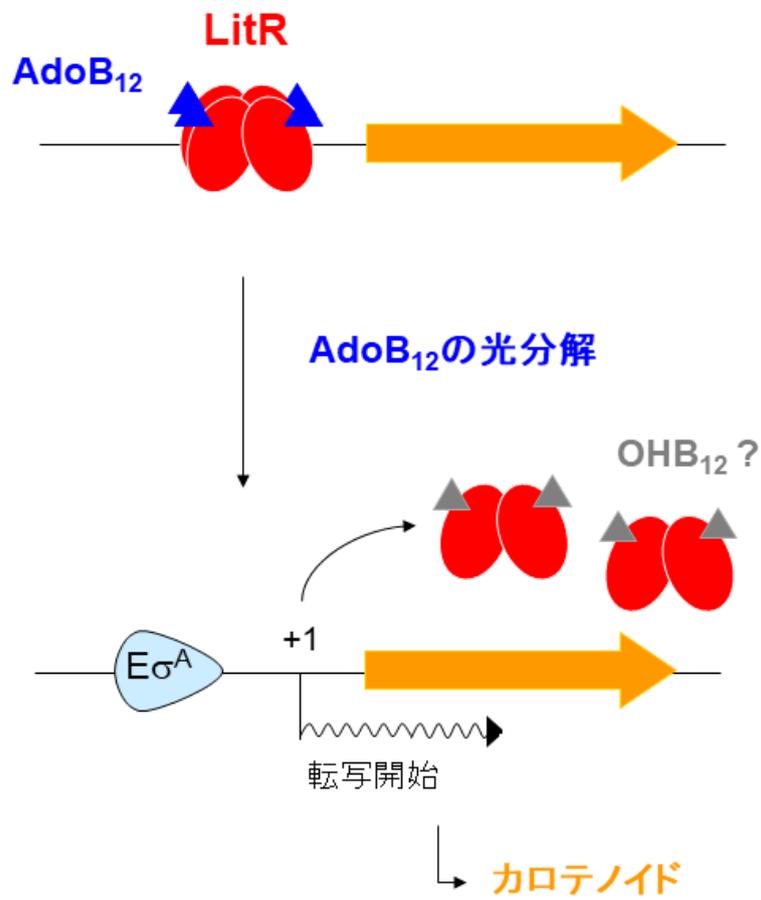
図 1-2 LitR/CarH の立体構造

## Adenosyl B<sub>12</sub> (AdoB<sub>12</sub>)



Co-C bond は光、熱などに感受性

図 1-3 ビタミン B<sub>12</sub> の化学構造



*J Bacteriol.* 197:2301, 2015

図 1-4 LitR の光応答メカニズム

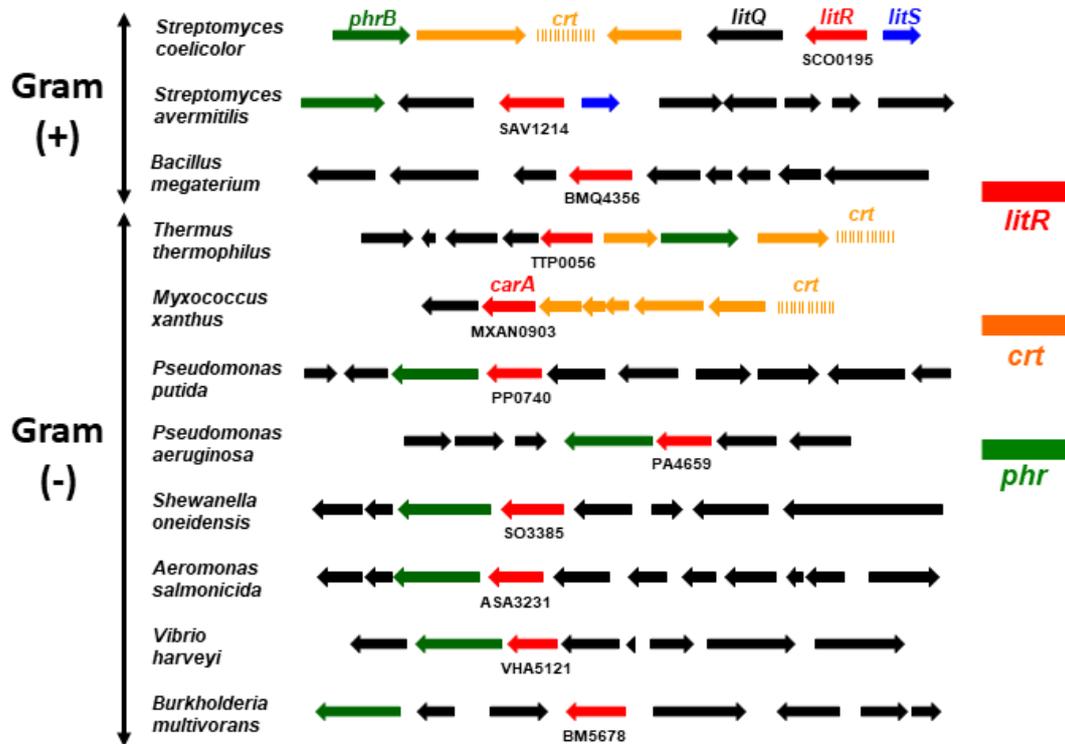
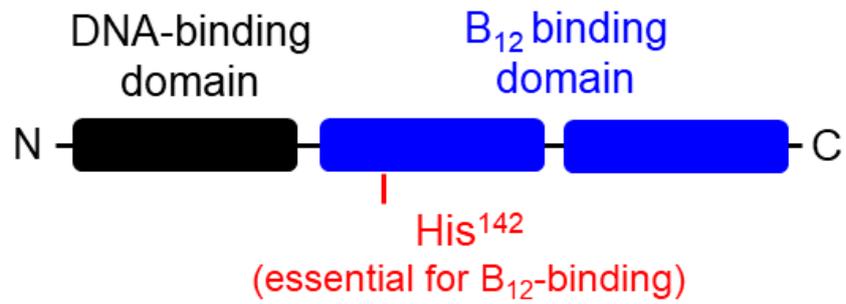


図 1-5 LitR に相同性を示す蛋白質の分布

### 1. B<sub>12</sub>-binding domain



### 2. Partial B<sub>12</sub>-binding domain



### 3. Unknown domain

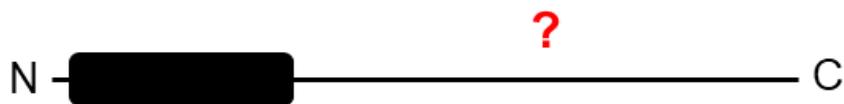


図 1-6 LitR における光感知ドメインの多様性

### 第3節 非 B<sub>12</sub> 型 LitR の光応答

予備調査において、非 B<sub>12</sub> 型 LitR を保有するグラム陰性細菌 *Burkholderia multivorans* LMG17588 (ATCC 17616) が光に応答することが判明した<sup>20</sup>。本菌は LitR 類似蛋白質を保有するが、その C 末端領域は機能既知のドメインと相同性を示さない。また、本菌では光照射による色素生産あるいは形態的な変化が認められない。そこで、DNA マイクロアレイを用いた予備調査を行い（表 1-1）、32 個の遺伝子の転写が光照射によって 2 倍以上上昇し、そのうちの 19 個は LitR 類似蛋白質をコードする BM5678 の周辺にコードされていることを明らかにした。それらの遺伝子群には転写調節に関与する ECF 型シグマ因子遺伝子 *litS* や光回復酵素遺伝子 *phrB*、葉酸合成関連遺伝子 *folE*、シクロプロパン環脂肪酸合成酵素遺伝子 *cfaB* などが含まれていた。半定量 RT-PCR の結果から、青色光は特異的にこれらの遺伝子群の転写を上昇させることが判明した（図 1-7）。さらに、GST タグを融合させた *B. multivorans* の 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<sup>20</sup>（図 1-8）。その吸収スペクトルは B<sub>12</sub> のものとは異なることから、新規な光感知メカニズムを有することが示唆された。

表 1-1 DNA マイクロアレイ解析で特定された *B. multivorans* の光誘導性  
遺伝子

	Gene name	Expression Light/Dark	Direction	Annotation for product
	BMULJ_05674	5.8	+	hypothetical protein
<i>phrB2</i>	BMULJ_05675	12.0	-	deoxyribodipyrimidine photo-lyase
	BMULJ_05676	6.7	-	hypothetical protein
	BMULJ_05677	5.0	+	putative esterase/lipase
<i>litR</i>	BMULJ_05678	2.9	-	MerR family transcriptional regulator
<i>cryB</i>	BMULJ_05679	7.5	+	deoxyribodipyrimidine photolyase- related protein
	BMULJ_05681	4.3	+	putative short-chain alcohol dehydrogenase
	BMULJ_05682	3.4	+	hypothetical protein
<i>litS</i>	BMULJ_05687	12.6	-	ECF subfamily RNA polymerase sigma-70 factor
<i>foIE2</i>	BMULJ_05688	19.1	-	GTP cyclohydrolase I
	BMULJ_05689	10.2	-	hypothetical protein
	BMULJ_05690	3.2	-	hypothetical protein
	BMULJ_05691	18.5	-	hypothetical protein
<i>cfaB1</i>	BMULJ_05692	23.0	-	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase
	BMULJ_05693	22.4	-	hypothetical protein
	BMULJ_05694	21.9	-	predicted NAD/FAD-binding protein
	BMULJ_05695	26.0	-	outer membrane lipocalin-like protein
<i>cfaB2</i>	BMULJ_05696	26.1	-	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase
	BMULJ_05697	12.1	-	predicted membrane protein

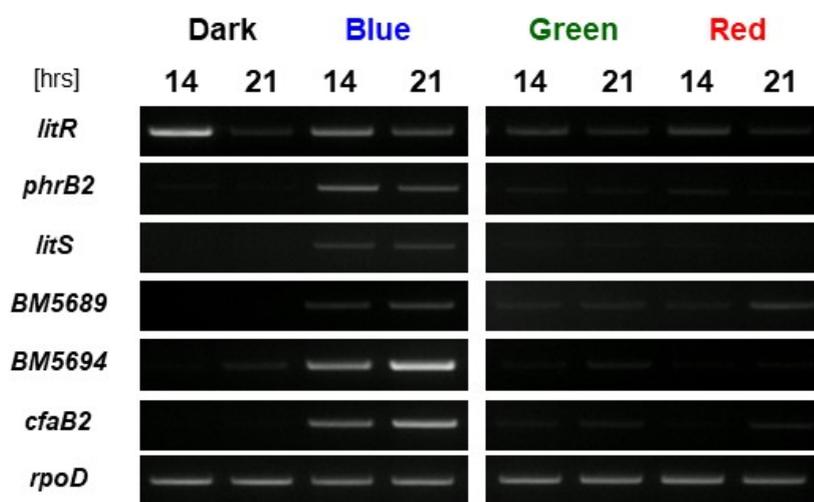


図 1-7 青色光に特異的な光誘導性遺伝子群の転写上昇

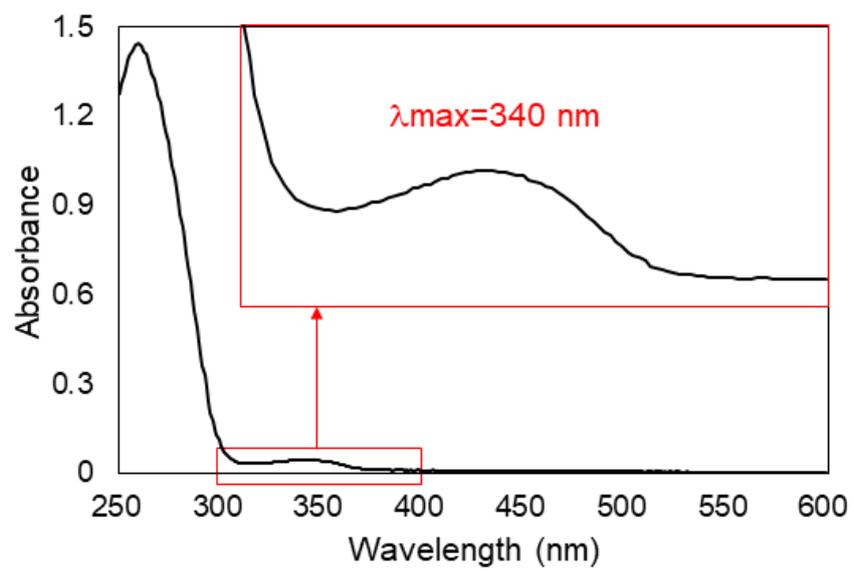


図 1-8 *B. multivorans* 由来の LitR 組換え蛋白質の吸収スペクトル

#### 第4節 *Burkholderia* 属細菌

*B. multivorans* はβ-プロテオバクテリアに属するグラム陰性細菌で、*B. cepacia* や *B. cenocepacia*、*B. vietnamiensis* などが含まれる *Burkholderia cepacia* complex (BCC) に属する<sup>21</sup>。BCC は動物や植物、川、土壌、根圏、化学汚染土壌を含む様々な環境から単離され、それらの環境に適応するために優れた代謝能を有する。

*B. multivorans* LMG17588 (ATCC 17616) は、アントラニル酸を豊富に含んだ土壌から単離され<sup>22</sup>、この細菌の全ゲノム配列は2つのグループによって決定された<sup>23,24</sup>。本菌は3.4Mb、2.4Mb および0.9Mb の3つの環状染色体および1.6Mb のプラスミド pTGL1 を有する。*B. multivorans* のゲノム情報には、サリチル酸塩、安息香酸塩、フタル酸塩、4-ヒドロキシ安息香酸塩、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸塩などの芳香族化合物の炭素代謝および同化に関与する遺伝子を含んでいる<sup>25</sup>。このことから、難分解性の汚染土壌の浄化へ利用されることが期待されている。

一部の *Burkholderia* 属細菌は LitR 類似蛋白質を保有し、その遺伝子の周辺に *B. multivorans* の DNA マイクロアレイ解析で特定された光誘導性遺伝

子群が分布している（図 1-9）ことから、それらの細菌種も *B. multivorans* と同様な光応答を示すことが予想される。

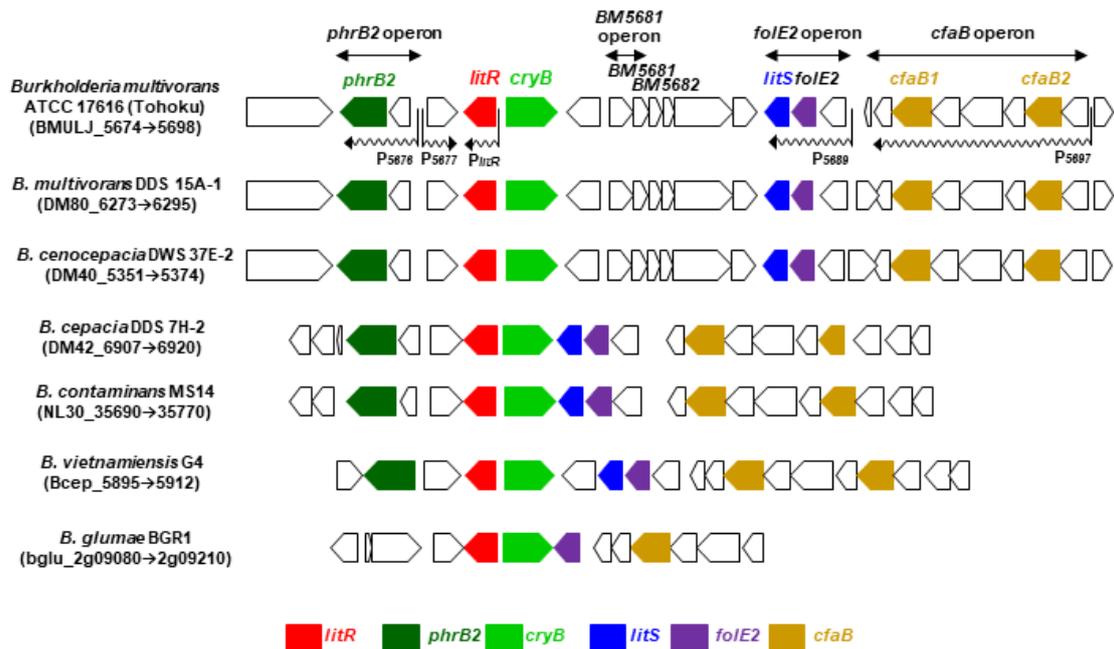


図 1-9 *Burkholderia* 属細菌における *LitR* の分布

## 第5節 研究の目的

本研究は LitR ファミリーの分子系統的な解析を行い、新規な光センサーと予想されるものを見出すことを第一の目的とした。また、予備調査で光応答に関与すると考えられる MarR 型転写調節蛋白質 LimR と TetR 型転写調節蛋白質の分類も行った。次に、新規な光センシング機構を有すると予想された細菌種の光応答をトランスクリプトーム解析によって光応答を確証することを試みた。

さらに、選抜したモデル株の分子生物学的な検証を詳細に行うことで、新規な光応答メカニズムの解明を試みた。これらによって、非光合成細菌の光応答メカニズムの多様性と潜在性を提唱することを目指した。

## 第2章 材料と方法

### 使用菌株

*Burkholderia multivorans* LMG17588 (野生株)

*B. multivorans*  $\Delta litR$

*B. multivorans*  $\Delta litR/litR$

*B. multivorans*  $\Delta litS$

*B. multivorans*  $\Delta litS/litS$

*Escherichia coli* HST08

*E. coli* S17-1  $\lambda$ pir

*E. coli* Rosetta2(DE3)pLysS

*E. coli* Rosetta2(DE3)pLysS/pGEX-6P-2::*litRbmj*-His

*E. coli* XL1-Blue MRF' Kan

*E. coli* BacterioMatch II Validation Reporter

*Enterococcus hirae* NBRC 3181

*Vibrio campbellii* ATCC BAA-1116

*V. campbellii*  $\Delta luxA$

*Chromobacterium violaceum* ATCC 31532

*Erwinia tasmaniensis* ET1/99

*Pseudomonas aeruginosa* PAO1

*Burkholderia plantarii* NBRC 104884T

*Rhodococcus jostii* RHA1

*E. coli* Rosetta2(DE3)pLysS/pGEX-6P-2::*litRvha*-His

#### 使用プラスミドと DNA

*Burkholderia vietnamiensis* G4 由来染色体 DNA (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)

pK18mobsacB

pGEX-6P-2

pGEX-6P-2::*litRbmj*-His

pET26b(+)

pUTmini-Tn5 Cm

pTRG

pROMOTER

## 使用プライマー

表 2-1 プライマーリスト：遺伝子破壊株と遺伝学的相補株の作製

Name	Sequence (5'-3') <sup>a</sup>	Restriction enzyme <sup>b</sup>
DisfolE2F	TGAGCATTGCAGAACGAAGTC	-
DisfolE2R	TGAATCACGCTGTTGGTCATC	-
DisfolE1F	GGTACCCGGGGATCCCTACGACGAAATGATCGTG	-
DisfolE1R	GCCAGTGCCAAGCTTACGTATTCGTGTCAGGTTTAC	-
P5689cmpF	<u>GCGGCCGCT</u> GACTCAAACATGATGCATG	<i>NotI</i>
P5689cmpMR(Bm)	CTCGAGGGATCCGGGGGACTCCTTGGTCGATTC	<i>BamHI</i>
folE2cmpMF	CTCGAGGGATCCATGGGAAATCTGATCGACG	<i>BamHI</i>
folE2cmpR	<u>GCGGCCGCT</u> TATGCATTCTTCCCGGC	<i>NotI</i>

<sup>a</sup>制限酵素サイトを下線に示す。

<sup>b</sup>は制限酵素サイトが存在しないことを示す。

表 2-2 プライマーリスト : 定量 RT-PCR

Name	Sequence (5'-3')
rpoDbmjF(QRT)	CAAAGACGACAGGCGGAAAG
rpoDbmjR(QRT)	TGGCGGAAGAAGCAGACTTG
BM5674F(QRT)	GCACACGGTTCGCATTGTC
BM5674R(QRT)	TCGCAGCTTGCCCAGATAAC
phrB2bmjF(QRT)	CAGGCTCTCGCCGTATCTTC
phrB2bmjR(QRT)	ACACCTGCCGAACCGATATG
BM5677F(QRT)	ACAGATAGCCGCCTTGCTTG
BM5677R(QRT)	AGCGGCAAGAAGTCATACGC
litRbmjF(QRT)	ATTGACGACGCGAGCGAAC
litRbmjR(QRT)	GAGCTGCGACACGACATCTTC
cryBF(QRT)	CGCATCGAGTACCTGCTGTC
cryBR(QRT)	CGCGTCGTGTAGAAATGTCC
BM5680F(QRT)	GGATCGCCCATGACACATC
BM5680R(QRT)	CGCTTCCAGATGAGCCTGAC
BM5681F(QRT)	TTCAACGCTGCTCACTGCAC
BM5681R(QRT)	ACAACGTCTCCGCAAGAACG
BM5682F(QRT)	CGTCGCGTCACGATGTTTAC
BM5682R(QRT)	GAATCACGCTCCACCCGTAG
litSbmjF(QRT)	CCGTTCTGCCTGACGAAGC
litSbmjR(QRT)	CAGCAAGCGGTCGAGTTCC
folE2bmjF(QRT)	CCTCTGTCGCTCATCATTCG
folE2bmjR(QRT)	TGTTGTCGTTGGCATGGAAG
BM5689F(QRT)	AACACGCAATCACGCCATC
BM5689R(QRT)	ACGCCCGATCAATGAAGC
BM5694F(QRT)	GCGGTGCTCCATACCGATAC
BM5694R(QRT)	CCGCTCAGGTAGTTCCATGC
cfaB2bmjF(QRT)	GCTTCTTCGAGGCCCATCTC
cfaB2bmjR(QRT)	CGTTGCCGTTCCGGTAATAG
dnaAbmjF(QRT)	GCGGTTGACGATTTC AAGC
dnaAbmjR(QRT)	CGAACGCGTAGAAGAATTCC

表 2-3 プライマーリスト：半定量 RT-PCR

Name	Sequence (5'-3')
litRbmjF(semi)	CTCCACGAAGATGTCGTGTC
litRbmjR(semi)	ACTCACACTTGACGGTGGTG
phrB2bmjF(semi)	CTCCGAATTGCCGTATGAAT
phrB2bmjR(semi)	GGTGTGCGCTTTTCGAGTAAC
litSbmjF(semi)	CAAGACGTGTTCACGACAGC
litSbmjR(semi)	CGAATCCAGCTCTTCATCGT
folE2bmjF(semi)	GCATTGCAGAACGAAGTC
folE2bmjR(semi)	CGTCCATACTTCGACAGG
cfaB2bmjF(semi)	TGCTGTGCGATCGAGATGTTC
cfaB2bmjR(semi)	CGTAGACGGTGTGCGAAAATG
rpoDbmjF(semi)	AGGAAACCAACCGTCAGATG
rpoDbmjR(semi)	TCGTCTCGATCATGTGAACC
cfaAbmjF(semi)	ACTTCAATCACACGAAGAGC
cfaAbmjR(semi)	GAGATCGACTGTTTCTGC
cfaB1bmjF(semi)	TATACTTCAACACGCTCAGG
cfaB1bmjR(semi)	GCAATAGGCGAGATAGAGC
phrB1bmjF(semi)	TCATCTGCTCTACCACTTCC
phrB1bmjR(semi)	GGTTCTTGGTCAGAAAGCTC
cryBbmjF(semi)	CTACAGCGACTCGATATTCC
cryBbmjR(semi)	GATGAGCAATTACTIONGCAAGG
folE1bmjF(semi)	CTACGACGAAATGATCGTG
folE1bmjR(semi)	GTCATCTTTTCTGGATCTG
folB1bmjF(semi)	CTACGAGGTGCACATCAAC
folB1bmjR(semi)	GTTTCTGCAGATGGATG
folB2bmjF(semi)	GGATCGATTACGACGGCTAC
folB2bmjR(semi)	CGTCCACCGCAGGTAATC
folKbmjF(semi)	GAAGATCGAACATCACTTCG
folKbmjR(semi)	GTCTGCACCTTCTCGATG
folPbmjF(semi)	ACTTGATCAACGACATCTGG
folPbmjR(semi)	CAGCAGCGCATAGTTGTC
folCbmjF(semi)	GGGCTTCTTTCCGTACAC
folCbmjR(semi)	TTCTCGGATGCTCTTTTAG

表 2-3 (続き) プライマーリスト : 半定量 RT-PCR

Name	Sequence (5'-3')
folAbmjF(semi)	GAAACTTCCCGAAGACCTC
folAbmjR(semi)	GTGACGATCAGCTTGTCC

表 2-4 プライマーリスト : One-hybrid システム法

Name	Sequence (5'-3') <sup>a</sup>
litSbmjF(pTGR)	AGAAACCAGAGGCGGCCGGATCC ATGAACCGTTTCGCACGAAT
litSbmjR(pTGR)	GAGCGCCAGCTCAGACTGAATT TACTGCTCCAGATAGATCT
PrpoDbmjF (pROMOTER)	GAAAAAGTGGGGGATCCGAATT TGGACTATGATGAAAACGTC
PrpoDbmjR (pROMOTER)	ATCTTCGACAAGGATCCTCTAG CATCGCGAATCTCGCCTCT
PlitRbmjF (pROMOTER)	GAAAAAGTGGGGGATCCGAATT CATGGGACGCTCCGCCATG
PlitRbmjR (pROMOTER)	ATCTTCGACAAGGATCCTCTAG CATCGTTGTTCTCCTGAAG
P5676F (pROMOTER)	GAAAAAGTGGGGGATCCGAATT CATTCAAATCTCCGTAACG
P5676R (pROMOTER)	ATCTTCGACAAGGATCCTCTAG CATGATCGCGCGGGATGC
P5677F (pROMOTER)	GAAAAAGTGGGGGATCCGAATT GGATGCACGATTGGGAAA
P5677- (pROMOTER)	ATCTTCGACAAGGATCCTCTAG CATTCAAATCTCCGTAACG
P5679F (pROMOTER)	GAAAAAGTGGGGGATCCGAATT CATCGTTGTTCTCCTGAAG
P5679R (pROMOTER)	ATCTTCGACAAGGATCCTCTAG CATGGGACGCTCCGCCAT
P5689F (pROMOTER)	GAAAAAGTGGGGGATCCGAATT TGACTTCGCGTTGACGCA
P5689R (pROMOTER)	ATCTTCGACAAGGATCCTCTAG CACGGGGGACTCCTTGGT
P5697F (pROMOTER/SLic)	GAAAAAGTGGGGGATCCGAATT CATCCCGTTTCATCTCCAC
P5697R (pROMOTER)	ATCTTCGACAAGGATCCTCTAG CATACGGGCTCCGGGGGC



表 2-5 (続き) プライマーリスト：蛋白質発現用ベクター

Name	Sequence (5'-3') <sup>a</sup>	Restriction enzyme <sup>b</sup>
RF267YMR	GTATCGCTCGTACGCACTGAG	-
RF267YMF	CTCAGTGCGTACGAGCGATAC	-
RY271WMR	TCGTCGCTCCATCGCTCGAAC	-
RY271WMF	GTTTCGAGCGATGGAGCGACGA	-
RY271FMR	TCGTCGCTGAATCGCTCGAAC	-
RY271FMF	GTTTCGAGCGATTCAGCGACGA	-

<sup>a</sup> 制限酵素サイトを下線に示す。

<sup>b</sup> は制限酵素サイトが存在しないことを示す。

表 2-6 プライマーリスト：ゲルシフトアッセイ

Name	Sequence (5'-3') <sup>a</sup>	Restriction enzyme <sup>b</sup>
pMD19F(Cy5)	Cy5-TACGCGCGGATCTTCCAGAG	-
pMD19R	TTTGCACGCCTGCCGTTTCGAC	-
PrpoDF	CTCGAGGAATTCTGGACTATGATGAAAACGTC	<i>EcoRI</i>
PrpoDR	CTCGAGGGATCCGTGTGACCTTCTTGGTCGGCTC	<i>BamHI</i>
PlitRF	CTCGAGGAATTCACCATGCTGCACCGGCAGTTG	<i>EcoRI</i>
PlitRR	CTCGAGGGATCCCTCAGCGTGGCTGCTGGCATGC	<i>BamHI</i>
PBM5689F	CTCGAGGAATTCATGCATGATTCAACGTTCTC	<i>EcoRI</i>
PBM5689R	CTCGAGGGATCCGCCCGATCAATGAAGCTG	<i>BamHI</i>
PBM5676F	CTCGAGGAATTCAAACGATACGAAAACCGATC	<i>EcoRI</i>
PBM5676R	CTCGAGGGATCCAGATAAACGTACGTGCGAGC	<i>BamHI</i>
PBM5697F	CTCGAGGAATTC AACGATAAGTCGCTTCATCC	<i>EcoRI</i>
PBM 5697R	CTCGAGGGATCCATCCACACTGCCGTGAAGGAC	<i>BamHI</i>
PlitRR2	CGTTGTTCTCCTGAAGTCGA	-
PlitRR3	GCAGTCTGGATTAAATATG	-
PlitRR4	TTAAATATGAAGCAGGAAGG	-
PlitRR5	AGCAGGAAGGCGATTCAAT	-
PlitRR6	CGATTCAATGTGCGGAAAT	-
PlitRR7	TGCGGAAATGTCGTCCGGG	-
PlitRR8	GTCGTCCGGGAGGTGTTTC	-
PlitRR9	TGTGGCTGGAATGCTGCAC	-

<sup>a</sup> 制限酵素サイトを下線に示す。

<sup>b</sup> は制限酵素サイトが存在しないことを示す。

## 実験手法

### 各細菌株の培養

*B. multivorans* は LMG17588 を野生株として使用し、LB 培地（1.0% BactoTryptone、0.5% BactoYeast Extract、0.5% NaCl）または M9 最少培地（0.6% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O、0.15% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.1% NH<sub>4</sub>Cl、0.05% NaCl、0.1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MgSO<sub>4</sub>、0.001%チアミン、0.2%グルコース）を用いて 28℃ で培養した。各大腸菌株は、LB 培地または M9 最少培地（0.6% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O、0.15% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.1% NH<sub>4</sub>Cl、0.05% NaCl、0.1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MgSO<sub>4</sub>、0.001%チアミン、0.2%グルコース、20 μM アデニン、1 μM ZnSO<sub>4</sub>、20 μM ウラシル、0.077% -His DO Supplement、0.0076% L-ヒスチジン）で 37℃あるいは 28℃で培養した。RNA seq 解析で用いた *B. plantarii* と *E. tasmaniensis*、*C. violaceum*、*R. jostii* は LB 培地によって 28℃で培養した。*P. aeruginosa* は LB 培地に37℃で培養した。*V. hraveyi* は LM 培地（1.0% BactoTryptone、0.5% BactoYeast Extract、2% NaCl、pH 7.8）で 28℃で培養した。抗生物質は 20 μg/ml のカナマイシンおよび 20 μg/ml のクロラムフェニコール、50 μg/ml のアンピシリン 10 μg/ml テトラサイクリンの終濃度で使用した。全ての試薬は、特記しない限り、和光純薬工業株式会社（大阪、

日本) から購入した。

## 分子系統解析

LitR および LimR、TetR の系統樹は次のように作成した。アミノ酸配列は KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)から入手し、LitR と TetR の系統解析では、Pfam によって推定された N 末端側の HTH ドメインを除外して残された C 末端領域のアミノ酸配列を使用した。それらのアミノ酸配列を CLUSTAL W<sup>26</sup> と MEGA 5<sup>27</sup> によって解析した後、分子系統樹は近隣結合法<sup>28</sup> によって再構築した。距離行列は Kimura 2 パラメーターモデル<sup>29</sup> を用いて算出した。

## 菌体と蛋白質への光照射

細菌株を培養する際は、光照射型インキュベータ (BR-180LF、タイテック、埼玉、日本) と白、青、緑、赤色蛍光ランプ (20W; Toshiba, Tokyo, Japan) を用いた。蛋白質への光照射には、LED ランプと UV-A ( $\lambda_{\max} = 365 \text{ nm}$ )、青色光 ( $\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$ )、緑色光 ( $\lambda_{\max} = 530 \text{ nm}$ )、赤色光 ( $\lambda_{\max} = 660 \text{ nm}$ ) (Optocode corp., Tokyo, Japan) を用いた。光度は、Model Li-250A Light Meter (LI-COR Inc., Lincoln, NE) を用いて測定した。

## RNA 抽出と cDNA 合成

*B. multivorans* の野生株や変異株は、LB 液体培地で明暗条件下で 28℃ 振盪培養した。0.7~1 ml の培養液を 14 時間と 21 時間に回収した。10,000xg で遠心した後、精製中の RNA 分解を防ぐため沈殿を 1 ml の RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) で固定し、そこから RNeasy Mini Kit を用いて総 RNA を精製した。また、ゲノム DNA を除去するために、DNase I (Takara Bio) 処理を行った。RNA 濃度は NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) で測定した。cDNA は、2 µg の総 RNA を用いて SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) によって合成した。

## RNA seq によるトランスクリプトーム解析

解析対象株を青色光照射下 ( $18.55 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) で液体培養し、1~2 ml を回収した。その菌体を RNAprotect Bacteria Reagent による固定後、RNeasy Mini Kit と DNase I を用いて総 RNA を精製した。その RNA を適当なプライマーを用いて PCR し、ゲノム DNA がほとんど検出されないことを確認した。精製した RNA は、東京農業大学ゲノム解析センターにて HisSeq2500 を使

用して解析された。得られた各遺伝子のリード数から転写レベルを割り出し、光照射によって上昇した転写量の倍率変化を算出した。

## DNA シーケンス解析

本研究でクローン化した DNA 断片は、Eurofins Genomics K.K の配列決定サービス（東京、日本）、または ABI 3100 Genetic analyzer（Thermo Fisher Scientific）によってシーケンス解析をした。

## 遺伝子破壊株の作製

*foIE1* と *foIE2* を破壊するため、pK18msfoIE1 と pK18msfoIE2 を構築した。

DisfoIE1F/DisfoIE1R (*foIE1*) と DisfoIE2F/DisfoIE2R (*foIE2*) のプライマー

（表 2-1）の組合せと PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara Bio) で PCR

を行い、それぞれの内側の領域を増幅した。得られた PCR 断片を pUC118

にクローニングした。シーケンス解析で配列確定したクローンを *EcoRI* と

*HindIII* で消化し、pK18mobsacB の同じサイトに挿入して pK18msfoIE1 と

pK18msfoIE2 を完成させた。構築した 2 つのプラスミドは *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir

を用いた接合伝達法によって *B. multivorans* に導入した<sup>24,25</sup>。具体的には、

1 ml の *B. multivorans* 培養液と 0.5 ml の *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir 培養液を混合して LB 液体培地で 2 回洗浄後、細胞を 100  $\mu$ l の LB 液体培地で懸濁して 0.22 mm フィルターが載せられた LB 固体培地に塗布した。それを 28°C で 6 時間培養し、フィルター上の細胞を LB 液体培地で回収した。その液体を 200  $\gamma$  カナマイシンと 50  $\gamma$  アンピシリンを含んだ LB 固体培地に塗布して 28°C で 2~3 日間培養した。得られたカナマイシン耐性コロニーを適切なプライマーで PCR し、適性の組換え体を選別した。

### 相補ベクターの作成

*foIE2*破壊株の遺伝学的な相補株を作製するため、ミニトランスポゾンとクロラムフェニコール耐性遺伝子を搭載したトランスポゾン pUT-miniTn5 Cm (Funakoshi, Tokyo, Japan)を基にした染色体組込み型ベクターを使用した。

*foIE2*をプライマーセット *foIE2cmpMF/foIE2cmpR*によって、BM5689のプロモーター領域をプライマーセット P5689cmpF/P5689cmpMR(Bm) (表2-1) によって増幅後、それらの PCR断片を *Bam*HI 消化してライゲーションし、pUC118にクローニングした。次に、pUT-miniTn5 Cmの *Not*I サイトに挿入し、p*foIE2*を取得した。これを上述の接合伝達法によって *B. multivorans foIE2*破壊

壊株に導入し、得られたクロラムフェニコール耐性コロニーを適正なプライマーを用いたPCR法によって確認した。

### 転写開始点 (TSS) の決定

TSSはDNAFORM (Yokohama, Japan)の受託解析サービス Modified 5'RACEによって決定した。使用したRNAは、光照射した菌体から抽出した。方法を簡潔に述べる。RNAのクオリティをバイオアナライザー (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)で解析してRIN値 (RNA integrity number)が7.0以上とA260/280とA260/230比率が1.7以上であることを確認した。ライブラリー作製は次のプロトコルに従った。1 µgのRNAからrRNAを除去するためにRibo-Zero rRNA Removal Kit を使用した。次に、cDNAをSuperscript III (Thermo Fisher Scientific)で合成し、RNAをRNase Hによって分化して一本鎖cDNAを精製した。次に、Illuminaプラットフォームに対するプライミング部位とバーコード配列を含んだアダプターをcDNAの両末端に連結した。そのライブラリーの配列はIllumina NextSeq500を用いて解読した。一連のデータ処理は次の通りに行った。Illumina Real-Time Analysis (RTA)ソフトウェアをベースコールに使用した。BWA (パラメーター変更なし) を使

用して決定した配列を *B. multivorans* ATCC 17616 の全ゲノム配列にマップした。TSS クラスタリングと百万リード数のタグ (TPM) は CAGEr を使用して計算した<sup>30</sup>。

### 定量 RT-PCR

光誘導性遺伝子の転写レベルを解析するため、定量 RT-PCR を行った。合成した cDNA を PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) で反応液を調製して Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher) で解析した。反応液は 20  $\mu$ l スケールとし、cDNA は 50 ng、プライマーは終濃度 0.2  $\mu$ M で使用した。PCR の反応は次のように行った：50  $^{\circ}$ C、120 s- 95  $^{\circ}$ C、120 s、(95  $^{\circ}$ C、15 s-60  $^{\circ}$ C、60 s) x40 サイクル。解析対象とした遺伝子のプライマーは、Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) を使用して設計した (表 2-3)。サンプルの標準化のため、*dnaA* (ハウスキーピング遺伝子) を内在性コントロールとして使用し、解析した遺伝子の相対発現を定量した。遺伝子発現の相対定量は内在標準として *dnaA* シグナルを用いた  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法<sup>31</sup> によって算出した。全ての反応は 3 回実施した。

## 半定量RT-PCR

本解析では、GoTaq Green Master Mix, 2X (Promega Corp., Madison, WI, USA)を PCR 反応に用いた。25  $\mu$ l スケールで反応液を調製し、次の PCR 反応で行った：95 °C、180 s- (95 °C、30 s- 55 °C、30 s-72 °C、45 s) 25 サイクル-72 °C、180 s。使用したプライマーは、表 2-4 に示した。PCR 産物をアガロース電気泳動に供し、バンドの強度を転写レベルとして検出した。

## One-hybrid システム法による DNA-蛋白質間の相互作用解析

One-hybrid システム法は転写調節因子の DNA 結合に対する特異性を決定する手法である<sup>32,33</sup>。本方法で、 $\sigma^{LitS}$  が認識するプロモーター領域を特定することを試みた。光誘導性遺伝子のプロモーター配列（開始コドンから上流に隣接する遺伝子のストップコドンあるいは開始コドン）を適切なプライマーセット（表 2-4）の PCR 法によって増幅し、pROMOTER の XbaI-EcoRI サイトにクローニングした。*litS* は、プライマーセットの PCR 法によって増幅し、pTRG の BamHI-EcoRI にクローニングした。クローニング法は SLIC（One-step sequence- and ligation-independent cloning）法<sup>34</sup>によって行った。具体的には、40 ng の精製した PCR 断片と直鎖状ベクター、0.6 U の T4 DNA

polymerase (NEB)、0.1  $\mu\text{g}$  の BSA、変異を防ぐため 20 ng の RecA を 10  $\mu\text{l}$  の反応系で調製し、室温で 2.5 分の反応後、氷上で 10 分間インキュベートして PCR 断片と直鎖状ベクターをアニーリングさせた。それを *E. coli* XL1-Blue MRF' Kan に形質転換した。シーケンス解析によって配列確定した pPROMOTOR と pTRG のクローンを *E. coli* BacterioMatch II Validation Reporter にエレクトロポレーション法で導入した。次に、 $\sigma^{\text{LitS}}$  とプロモーター配列との相互作用をレポーター遺伝子 HIS3 の活性化を指標に解析した。得られた形質転換体を M9 最少培地で 28°C、2 日間振盪培養し、その培養液 10  $\mu\text{l}$  をスクリーニング培地 (0.6%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.15%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.05%  $\text{NaCl}$ 、0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、1 mM  $\text{MgSO}_4$ 、0.001%チアミン、0.2% グルコース、20  $\mu\text{M}$  アデニン、1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ 、20  $\mu\text{M}$  ウラシル、His dropout amino acid supplement、50  $\mu\text{M}$  IPTG、10  $\mu\text{g/ml}$  テトラサイクリン、20  $\mu\text{g/ml}$  クロラムフェニコール) に 0、1、2.5 mM 3-アミノ-1,2,4-トリアゾール (3-AT) を含んだ固体培地へ滴下し、28°C、2~3 日間培養した。この方法で 3-AT に耐性を示したものを相互作用として検出した。

## 細胞内葉酸の抽出と定量

細胞内の葉酸を定量するため、菌体から熱水抽出して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<sup>35,36</sup>。*B. multivorans* を LB 培地で 28°C で培養し、その菌体を遠心分離で回収後、PBS バッファー(140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)で 2 回洗浄し、再度 PBS バッファーで懸濁した。それを超音波破碎機(Astrason Ultrasonic Processor XL)で破碎し、12,000 g、10 分、4°C で遠心分離してその上清を得た。121°C、15 分の熱水抽出後、12,000 g、15 分、4°C で遠心分離した上清をフィルター濾過した。次に、Difco Folic Acid Assay Medium (Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD) の説明書通りのバイオアッセイ法で葉酸を定量した。指示菌として用いた *Enterococcus hirae* NBRC 3181 は Lactobacilli Broth AOAC (Becton, Dickinson and Co.)で 37°C、16 時間で前培養した。検量線の標準として葉酸(プテロイルグルタミン酸)を用いた。蛋白質濃度は protein assay kit (Bio-Rad Laboratories)を用いたブラッドフォード法で測定した。

## LitR 組換え蛋白質発現ベクターの構築

LitR の N 末端欠失体または C 末端領域欠失体を調製するため、次の要領で発現ベクターを構築した。表 2-5 のプライマーセットで PCR し、各 DNA 断片を pGEX-6P-2 の *Bam*HI サイトにクローニングした。 *B.vietnamiensis* G4 由来の LitRbvi 組換え蛋白質の発現ベクターについては、*litRbvi* をプライマーセット litRbviF (6P2) / litRbviR (6P2) の PCR によって増幅し、その断片を pGEX-6P-2 の *Bam*HI-*Eco*RI 部位に導入した。

また、アミノ残基の役割を明らかにするため、その変異 LitR の発現ベクターを構築した。251 番目と 253 番目、274 番目のシステインをそれぞれアラニンあるいはセリンに置換するため、表 2-5 に記載した適切なプライマーを用いた 2 段階 PCR 法によって DNA 断片を増幅し、pGEX-6P-2 の *Bam*HI 部位にクローニングした。また、228 番目のトリプトファンのアラニンへの置換と 267 番目のフェニルアラニンのアラニンまたはチロシン、トリプトファンへの置換、271 番目のチロシンのアラニンまたはフェニルアラニン、トリプトファンへの置換も上述と同様な手法で発現ベクターを作製した。

これによって発現する各組換え蛋白質は、N 末端領域に GST タグと C 末端領域にポリヒスチジンタグが付加される。配列確定したそれぞれのクロー

ン体は *E. coli* Rosetta2(DE3)/pLysS に導入し、以降の組換え蛋白質の精製に使用した。

### **LitR 組換え蛋白質の精製**

*litR* 発現ベクターを保有する *E. coli* Rosetta2(DE3)/pLysS をクロラムフェニコールとアンピシリンが含まれた LB 液体培地で 16 時間、28°C で前培養した。500-mL バッフル付フラスコ中の 100 ml の LB 液体培地、あるいは、5-L バッフル付フラスコ中の 1 l の LB 液体培地に前培養液を終濃度 1% になるように植菌した。それを 135 rpm、3 時間、28°C で振盪培養した。次に、IPTG を終濃度 0.1 mM になるように添加し、さらに 135 rpm、4 時間、28°C で振盪培養した。この大腸菌細胞を遠心分離によって回収し、その菌体を PBS バッファー (pH 7.5) (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) に懸濁した。PBS バッファーで 2 回洗浄した後、Astrason Ultrasonic Processor XL (Misonix Inc., Farmingdale, NY)、または、APV 1000 Gaulin mechanical cell presser (APV Homogenizers, As, Denmark) で細胞を破碎した。その溶液を遠心分離し、上清をフィルター濾過した。そのサンプルを ÄKTA explorer 10S (GE Healthcare, UK Ltd, Buckinghamshire, England) を用

いて GSTrap HP カラムに供した。溶出ピークを SDS-PAGE によって解析して GST-LitR-His のバンドを確認し、バッファーA (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 200 mM L (+)-アルギニン塩酸塩, and 1 mM EDTA) で 4°C、終夜透析した。2 mg の GST-LitR-His に対して 1 mg の PreScission Protease を添加して 4°C、4 時間インキュベートして GST タグを除去した。次に、LitR-His を 5 ml cOmplete His-Tag Purification Column (Roche, Basel, Switzerland)で精製した。IMAC 結合バッファーには 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) と 200 mM NaCl、200 mM L-アルギニン塩酸塩を使用した。IMAC 溶出バッファーには 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)と 200 mM NaCl、200 mM L-アルギニン塩酸塩、500 mM imidazole を使用した。LitR-His に対応する溶出画分を IMAC 結合バッファーで 4°C、終夜透析した。そのサンプルを 15,000 rpm、15 min 、4°Cで遠心分離し、得られた上清を以降の生化学的な解析に使用した。蛋白質濃度は Bio-rad protein assay kit (Bio-rad, Laboratories, Hercules, CA)を用いて測定し、吸収スペクトルを Multiskan GO spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)で測定した。

## ゲルシフトアッセイによる DNA-蛋白質間の相互作用解析

LitR 蛋白質の DNA 結合能はゲルシフトアッセイによって解析した。プロモーター領域を含んだ DNA 断片は表 2-6 に示したプライマーを用いた PCR 法で増幅した。各々の DNA 断片は pMD19 (Takara Bio) に TA クローニングした。5'末端を Cy-5 標識したプローブ DNA を調製するため、Cy-5 標識プライマー pMD19F(Cy5) と非標識プライマー pMD19R で PCR して増幅した。両プライマーは pMD19 ベクターのクローニングサイトの外側にアニールするように設計した。精製した LitR (0-80 fmol) と DNA プローブ (10 fmol) を 10 mM Tris-HCl (pH 7.2), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% グリセロールと 0.5  $\mu$ g poly(dI-dC) 反応液中で 28°C、30 分間反応させた後、6% 非変性ポリアクリルアミドゲルにアプライした。LitR 蛋白質の光照射は、UV-A 光 ( $\lambda_{\max} = 365$  nm) で 180 秒間行った。泳動したポリアクリルアミドゲルは Typhoon FAL9500 image analyzer (GE Healthcare) でスキャンした。

## 吸収スペクトルの測定

LitR 組換え蛋白質の吸収スペクトルは Cary 60 UV-Vis 分光光度計 (Agilent Technologies) で測定した。光依存的な吸収変化を測定するため、アフィニテ

イークロマトグラフィーで精製した組換え LitR 蛋白質に UV-A ( $\lambda_{\max} = 365$  nm)を照射した。UV-A (光度:  $0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) を 60 秒と 180 秒照射し、その吸収スペクトルを記録した。次に、暗条件下で 60 分と 120 分間室温でインキュベートした吸収スペクトルを測定した。他の波長の光照射は  $0.06$  ( $\lambda_{\max} = 365$  nm)、 $60.41$  (450 nm)、 $14.02$  (470 nm)、 $22.13$  (505 nm)、 $21.76$  (595 nm)、 $75.93$  (630 nm) の光度( $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ )で 180 秒行った。

#### ゲル濾過カラムクロマトグラフィー

LitR 蛋白質の相対分子量(Mr)を算出するため、アフィニティークロマトグラフィーによって精製した各 LitR 蛋白質を ÄKTA explorer 10S system と Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare)で解析した。カラムは 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, and 200 mM L-アルギニン塩酸塩で流速  $0.2 \text{ ml/min}$  で平衡化した。L-アルギニン塩酸塩は LitR の凝集を防ぐために添加した<sup>37</sup>。分子量マーカーとして Gel Filtration Calibration Kit LMW (GE Healthcare. Kit: Ribonuclease A: Mr 13,700 と Carbonic anhydrase: Mr 29,000、Ovalbumin: Mr 43,000、Conalbumin: Mr 75,000)と Gel Filtration Calibration Kit HMW (GE Healthcare. Kit: Aldolase: Mr 158,000、と Ferritin:

Mr 440,000) を使用した。サンプルは Superdex 200 10/300 GL column にアプライする前に 180 秒の UV-A 光 (365 nm、光度：約  $0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) を照射した。LitR の相対分子量は分子量マーカーに基づいて算出した。溶出された蛋白質は SDS-PAGE と銀染色で解析し、LitR のバンドを検出した。

### **LitR 蛋白質からの低分子化合物の単離**

LitR に何らかの低分子化合物が結合していると想定して熱処理によってその抽出を試みた。LitR 蛋白質溶液を  $37^{\circ}\text{C}$  または  $55^{\circ}\text{C}$  で 30 分間、あるいは  $95^{\circ}\text{C}$  で 10 分間加熱し、15,000 rpm、10 分で遠心分離してその上清を得た。また、還元剤である  $\beta$ -メルカプトエタノール ( $\beta$ -ME) と DTT をそれぞれ終濃度 1 mM になるように添加し、同様の加熱処理と遠心分離を行って上清を得た。それらの吸収スペクトルを Cary 60 UV-Vis 分光光度計で測定した。また、LitR と酢酸エチルを 1 : 1 の割合で混合して静置させ、その上清の吸収スペクトルを測定した。

## リフォールディングによるアポ体の調製

LitR 蛋白質を変性させるために、6 M グアニジン塩酸塩溶液（50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、200 mM NaCl）で 2 時間、室温で透析した後、 $\beta$ -ME を添加して室温、終夜インキュベートした。次に、グアニジン塩酸塩の濃度を段階的に薄くして蛋白質の構造の巻き戻しを試みた。具体的には、6 M グアニジン塩酸塩溶液（50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、200 mM NaCl）で 12 時間、4°C で透析し、3 M グアニジン塩酸塩溶液（50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、200 mM NaCl）で 12 時間、4°C で透析した。次に、凝集抑制のため 400 mM L-アルギニン塩酸塩とジスルフィド結合を促進させるために 2 mM システインと 0.2 mM シスチンを含んだ 1 M グアニジン塩酸塩溶液（50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、200 mM NaCl）で 12 時間、4°C で透析した。0.5 M グアニジン塩酸塩溶液（50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、200 mM NaCl、300 mM L-アルギニン塩酸塩）で 12 時間、4°C で透析した後、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、200 mM NaCl、200 mM L-アルギニン塩酸塩を含んだバッファーで 2 時間、4°C の透析を 3 回繰り返した。透析膜から回収した LitR 溶液の吸収スペクトルを測定してアポ体の確認を行った。アポ体とアンテナ候補分子 NADH と葉酸との相互作用解析は透析法によって行った。10 倍のモル量の NADH あるいは葉酸をアポ体と混合して

28℃、30 分間インキュベートした。次に、バッファー（50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、200 mM NaCl、200 mM L-アルギニン塩酸塩）で終夜、4℃で透析した。それらの吸収スペクトルを測定してその結合を評価した。

### **LitR 蛋白質の元素分析**

測定に必要なガラス器具（トーチ）は 0.3 M HCl で一晩浸漬し、超純水で十分にすすいだ後、よく乾燥させた。精製した LitR 蛋白質溶液約 7 ml をバッファー（50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、200 mM NaCl、200 mM L (+)-アルギニン塩酸塩）で透析し、その LitR 蛋白質溶液と透析に用いた外液を測定試料とした。検量線用として ICP 汎用混合試薬を 0.1 M 硝酸水溶液で希釈し、0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 ppm の各濃度溶液を調製した。ICP 測定専用のポリプロピレンチューブに測定試料を入れ、キャップを閉めた。マルチタイプ ICP 発光分光分析装置（ICPE-9000）（島津）を用いて検量線用の標準試料を測定した。検量線の作成と測定波長の校正を行った後に、試料の測定を行った。各試料の測定は 3 回行い、その平均を算出した。さらに、LitR 溶液中の元素のモル濃度から透析液中の値を引いて LitR 蛋白質のモル濃度で割り算し、その元素含量を割り出した。

## 変性実験

光センサー蛋白質の光吸収帯はクロモフォアに由来する。LitR 蛋白質に見られる 340 nm の極大吸収が何らかのリガンド分子に由来する可能性を検証するため、SDS を用いた変性実験を行った。LitR に終濃度 2% の SDS を添加して泡立たないようにピペティングで混合した。また、 $\beta$ -ME は終濃度 6% になるように添加した。室温で 5 分間放置した後、吸収スペクトルを測定した。

また、1 mg/ml のトリプシン (Sigma-Aldrich) を精製した 20  $\mu$ M LitR に添加して室温でインキュベート後、その吸収スペクトルを測定した。

### 第3章 結果と考察

#### 第1節 光応答性転写調節蛋白質の多様性に関する解析

##### 第1項 光応答性転写調節蛋白質の分子系統解析

###### 目的

LitR ファミリー蛋白質の光感知ドメインの多くは、B<sub>12</sub> 結合ドメインが推定される一方、一部の LitR では部分的な B<sub>12</sub> 結合ドメインあるいは機能既知ドメインに相同性を示さないものが含まれる。これは、LitR ファミリーに B<sub>12</sub> によるものとは異なった光感知システムを有するグループが存在することを示唆している。また、*Corynebacterium* 属細菌と青色色素生産菌 *Chromobacterium violaceum* の光応答に関与する MarR 型転写調節蛋白質 LimR と TetR 型転写調節蛋白質は LitR と同様な光センサーとして機能することが考えられるが、その光感知機構は明らかにされていない。そこで、これらの蛋白質の分子系統的な解析によって明確に分類し、新しい光感知機構を持つ光応答性転写調節蛋白質の存在を提示することを目的とした。

## 結果

### LitR ファミリーの分類

はじめに、LitR ファミリー蛋白質を Pfam によって機能既知ドメインを推定し、N 末端領域側の DNA 結合ドメインを削除して光感知ドメインを抽出した (図 3-1-1-1、第 2 章参照)。それらの配列を用いて分子系統解析したところ、少なくとも 5 つのクラスに分類されることが推測された (図 3-1-1-2)。

クラス I はアデノシル B<sub>12</sub> をクロモフォアに利用する光センサー蛋白質であることが複数の研究によって示されている<sup>8,9,12</sup>。本クラスには、放線菌 *Streptomyces* 属や *Bacillus* 属、好熱性細菌 *Thermus-Deinococcus*、粘性細菌 *Myxococcus* 属細菌に分布するものが含まれており、これらの細菌では実際に光照射による黄色色素カロテノイド生産が観察されることが報告されている<sup>6-9</sup>。クラス I LitR は 2 つのドメインから構成される B<sub>12</sub> 結合ドメインを有している (図 1-6)。Rossmann fold domain (Pfam definition, B<sub>12</sub>-binding domain) には、B<sub>12</sub> との結合に重要な His 残基が保存され、B<sub>12</sub> 内のコバルト原子と結合する。4-helix bundle domain (Pfam definition, B<sub>12</sub>-binding\_2 domain) は Rossmann fold domain の N 末端側によく見つかる。一方、*Oceanospirillales* 属細菌のクラス I LitR は Rossmann fold domain 中の His

残基が保存されていないが、 $B_{12}$  と結合することが報告されている<sup>35</sup>。従って、His 残基が保存されているものを **Ia**、されていないものを **Ib** と分類した。

*Oceanospirillales* 属細菌の LitR は **Ib** とした。

クラス II は 4-helix bundle domain しか有していないため、 $B_{12}$  をクロモフォアとするクラス I とは異なることを意味している。これには *Pseudomonas* 属細菌が主に分布しており、青色光受容体 LOV と相互作用することが明らかになっている（未発表データ）。クラス III と IV、V には *Burkholderia* 属と *Vibrio* 属、*Micrococcus* 属細菌が分布しているが、それぞれの C 末端領域中のアミノ酸配列は  $B_{12}$  結合ドメインと相同性を有していない。さらに、機能既知ドメインとも相同性を示さない。このことから、クラス III~V は新しい光センサー蛋白質であることが予想された。一方で、クラス **Ib** とクラス II の間には一部の *Pseudomonas* 目細菌由来のクレードが存在するが、この明確な属性はわからない。また、クラス II から IV の間に位置する *Alteromonas* 目細菌や *Aeromonas* 目細菌、*Enterobacteria* 目細菌とクラス V とクラス III の間の *Chromatia* 目細菌も同様にそのクラス分けは不明である。

予備試験においてクラス III に属する *Burkholderia multivorans* 由来の LitR 組換え蛋白質は 280 nm と 340 nm に 2 つの極大吸収を有しており（図 1-7）、

その吸収スペクトルは  $B_{12}$  をクロモフォアとするクラス I LitR とは異なることから、新規な光応答メカニズムを有することが予想された。そこで、他のクラスの LitR の光吸収を調査するため、クラス IV に属する *Vibrio harveyi* 由来の LitR 組換え蛋白質を精製した。その吸収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（図 3-1-1-3）。

クラス Ia を保有する細菌群では光誘導的なカロテノイド生産が観察され、その合成遺伝子が LitR によって制御されることが明らかにされている。一方、クラス Ib では葉酸とシクロプロパン環脂肪酸の生産量が光によって増加することが報告されている<sup>38</sup>。これらの合成遺伝子はクラス II~V や他のクレードを保有する菌のゲノム上で *litR* の周辺にコードされていることから（図 1-8、図 3-1-1-4 から 3-1-1-7 まで）、それらのバクテリアにおいても同様な現象が起きていると考えられる。以上のことから、LitR ファミリーはその光感知機構だけでなく、制御される遺伝子も複数のグループがあることが推測された。

## TetR 型光応答性転写調節蛋白質の分類

青色色素生産菌 *Chromobacterium violaceum* では、シクロプロパン環脂肪酸合成遺伝子 *cfa* や光回復酵素遺伝子 *phr* などの転写が光で誘導されるが(図 3-1-1-8)、本菌は LitR 類似蛋白質を保有していない。分子遺伝学的な解析からそのオペロンに隣接する TetR(Tetracycline resistance Regulator)型転写調節蛋白質がそれら遺伝子に対して光依存的な転写調節を行うと推測される。

この TetR は、N 末端領域に DNA 結合ドメインを持ち、約 100 アミノ酸程度からなる C 末端領域は機能既知のドメインと相同性を有さない(図 3-1-1-1)。

それに類似の蛋白質は、一部の *Neisseria* 目や *Burkholderia* 目細菌に分布している(図 3-1-1-9)。本研究はそれらの TetR も新しい光センサーであると予想した。

そこで、LitR と同様に N 末端領域側の DNA 結合ドメインを排除した C 末端アミノ酸配列の分子系統解析を行ったところ、3 つのクレードに分類されることが推測された(図 3-1-1-10)。また、その分類が 16S rRNA の系統樹に似ていることから、生物種の進化に従って TetR が分類されることが示唆された。

## LimR (Light induced MarR, Regulator) の分類

当研究室で行われた光応答性細菌のスクリーニングから、*Corynebacteria* 目や *Micrococcus* 目細菌が光照射による黄色色素生産を観察してきたが、これらの細菌群は LitR 類似蛋白質や既知の光センサー遺伝子を保有していない。アミノ酸生産菌 *Corynebacteria glutamicum* をモデルにした分子遺伝学的な解析から MarR(Multi-antibiotic resistance, Regulator)型転写調節蛋白質 LimR が、カロテノイド合成遺伝子の転写制御を介してその光誘導的な生産制御に関与していることが明らかになっている(未発表データ)。それに相同性を示す蛋白質は一部のグラム陰性細菌やアーキアにも分布していることから(図 3-1-1-11)、LimR ファミリーにも多様性があると予想された。

LimR は、LitR とは異なり全アミノ酸配列の中央に DNA 結合ドメインが認められ、その両末端側のアミノ酸配列は機能を有しているかはわからない(図 3-1-1-1)。そのため、本ファミリーの分子系統解析にはアミノ酸配列全長を用いた。その系統解析の結果、5 つのクレードに分類され、大きく分けてグラム陽性細菌 (Actinobacteria) とグラム陰性細菌 (Bacteroides)、アーキアの 3 つのグループで成り立つことが推測された(図 3-1-1-12)。グラム陽性細菌のグループには、黄色色素の光誘導が観察された *Corynebacterium* 属細

菌や *Micrococcus* 目細菌のクレードと *Mycobacterium* 属細菌、*Streptomyces* 属細菌の 3 つのクレードに分類された。*Corynebacterium* 目細菌の LimR では、*Corynebacterium* 属細菌と *Mycobacterium* 属細菌はそれぞれ異なった光応答メカニズムを有していることが示唆された。

## 考察

### (1) 光応答性転写調節蛋白質の分類

本研究では、LitR 類似蛋白質の光感知ドメインを分類し、それらが少なくとも 5 つのクラスに分類されることを見出した。B<sub>12</sub> をクロモフォアとするクラス I はグラム陽性・陰性細菌の両方に広く分布し、LitR の主要な形態であることを示している。一方、クラス II-V の分布は特定の属と目に限定されているようであり、これらは特定の系統または環境への適応に基づいて進化したものであると推測される。また、TetR 型光応答性転写調節蛋白質や LimR の分類についてもそれと同様なことが考えられる。

クラス II-V LitR の光感知ドメインと予想される C 末端領域のアミノ酸配列は、既知の機能のドメインと相同性を示さない。これは、クラス II-V が、既知のものとは異なる光感知メカニズムを有していることを示唆している。この光感知メカニズムの多様性とそれらを保有する細菌群の系統の相関関係は、対応する細菌種の生息環境を反映していると考えられる。

さらに、クラス III LitR はクラス I<sup>8,12</sup> とは異なる吸収スペクトルを示すことから、それとは異なる光感知メカニズムを有していることが予想された。

一方、クラス IV LitR の吸収スペクトルは蛋白質由来のピークのみが認められたことから、これが新規な光応答メカニズムを有しているかは不明である。

## (2) 光誘導性遺伝子

クラス I LitR では光に誘導されたカロテノイドが光照射で生じた酸化ストレスへの防御機構として働くことが考えられる<sup>10,11</sup>。一方、クラス II-V やクラス分けされていないクレードではシクロプロパン環脂肪酸合成遺伝子の転写を光依存的に制御すると予想される。光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* では、それに相同性を示す酵素の遺伝子発現が光酸化ストレス応答システム ChrR-RpoE によって調節され、酸素原子を含んだ 5 環構造をもつフラン脂肪酸の合成に関与することが知られている<sup>39</sup>。その脂肪酸の役割は、光照射で生じる活性酸素を除去することが考えられている。LitR 類似蛋白質を保有する *Shewanella oneidensis* では、フラン脂肪酸の生産が光照射によって 2 倍増加することが報告されている<sup>40</sup>。その合成酵素に相同性を示す遺伝子は *litR* の周辺にコードされることから、それに制御されることが予想される。これらのことから、クラス II-V などを保有する細菌群では脂肪

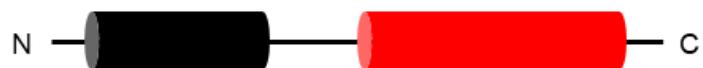
酸の合成を制御し、それがカロテノイドと同様な抗酸化作用を持つことが予想される。

上述の **ChrR-RpoE** は $\alpha$ -プロテオバクテリアと $\gamma$ -プロテオバクテリアに分布し<sup>41</sup>、主に脂肪酸合成遺伝子の転写調節に関与すると考えられる。一方で、***Azospirillum brasilense* Sp7** ではカロテノイドの生産が **ChrR-RpoE** によって制御されることが報告されている<sup>42</sup>。LitR ファミリーも同様にカロテノイドと脂肪酸の 2 つのグループに分けられることから、それらの転写調節因子とそれに制御される遺伝子は進化の過程で何らかの因果関係を持つことが考えられる。

**LitR: MerR型** (Mercury regulator)



**TetR型** (Tetracycline resistance regulator)



**LimR: MarR型** (Multi-antibiotic resistance regulator)



図 3-1-1-1 光応答性転写調節蛋白質のドメイン構成

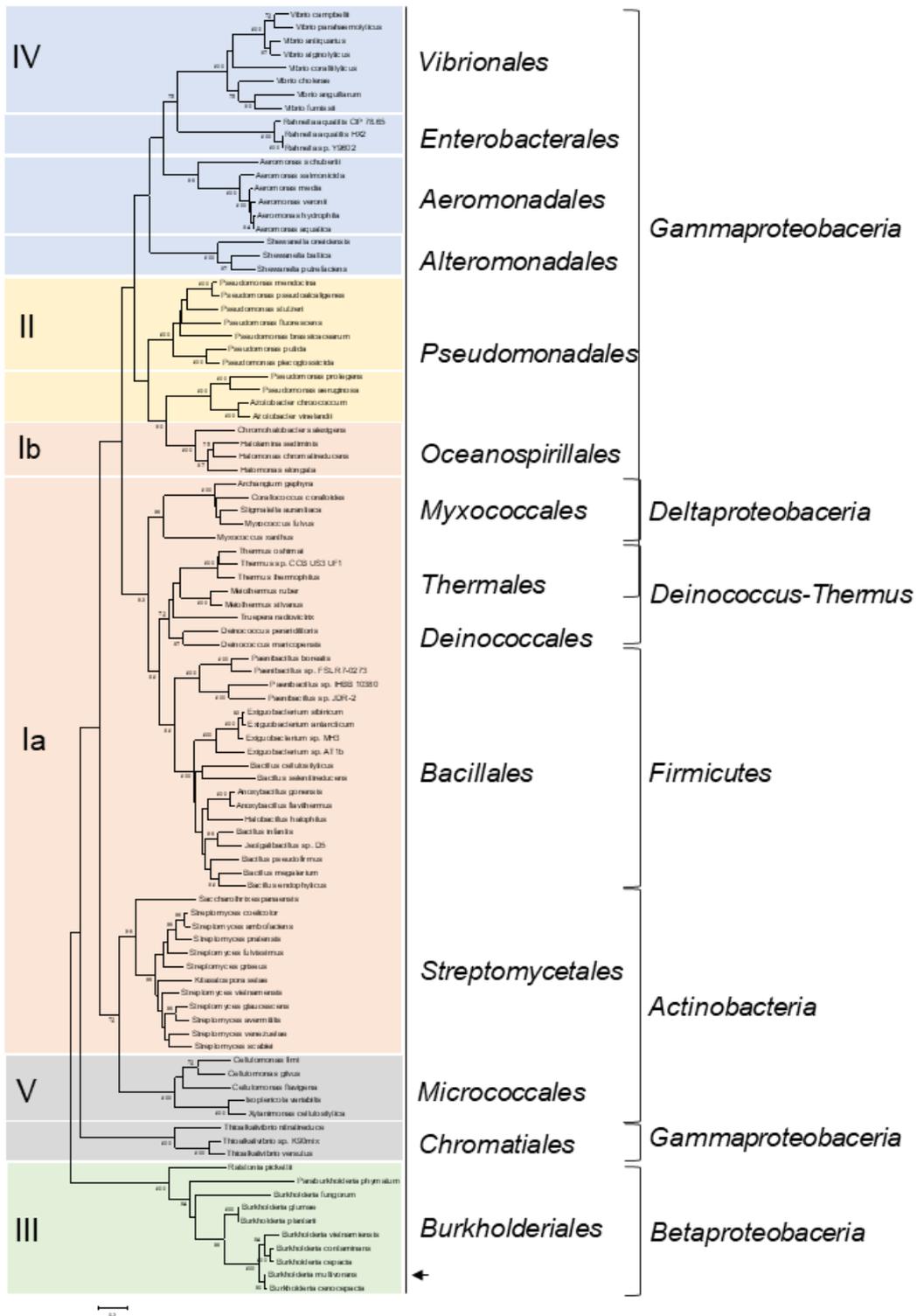


図 3-1-1-2 LitR ファミリーの分子系統樹

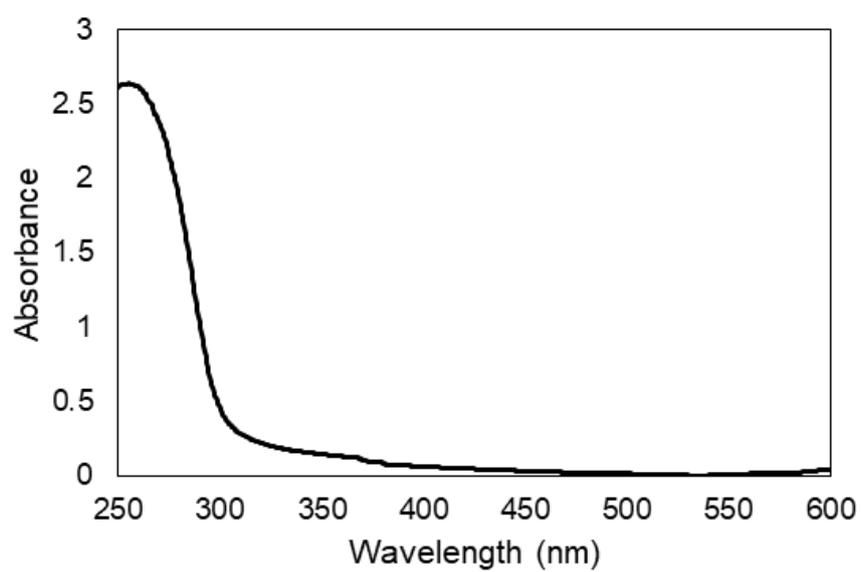


図 3-1-1-3 *V. harveyi* 由来のクラス IV LitR 組換え蛋白質の吸収スペクトル

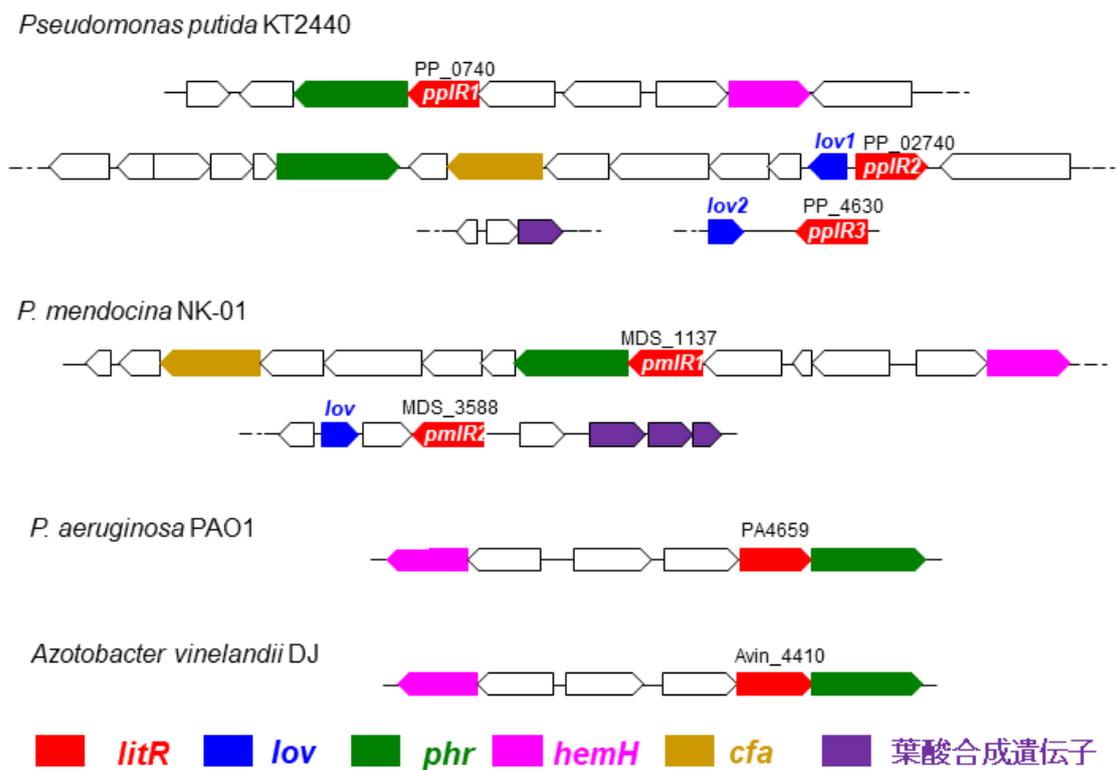


図 3-1-1-4 *Pseudomonas* 属細菌における *litR* 周辺の遺伝子図

### **Alteromonadales**

---

*Shewanella oneidensis* MR-1

SO\_3385



*S. putrefaciens* 200

Sput200\_2852

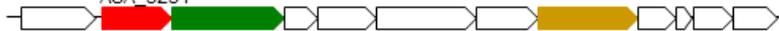


### **Aeromonadales**

---

*Aeromonas hydrophila* ML09-119

ASA\_3231



*A. salmonicida* subsp. *salmonicida* A449

AHML\_05885



### **Enterobacterales**

---

*Rahnella aquatilis* CIP 78.65

Rahaq2\_3062



*Rahnella* sp. Y9602

Rahaq\_3035



 *litR*     *phr*     *cfa*

図 3-1-1-5  $\gamma$ -プロテオバクテリアが有する *litR* 周辺の遺伝子図

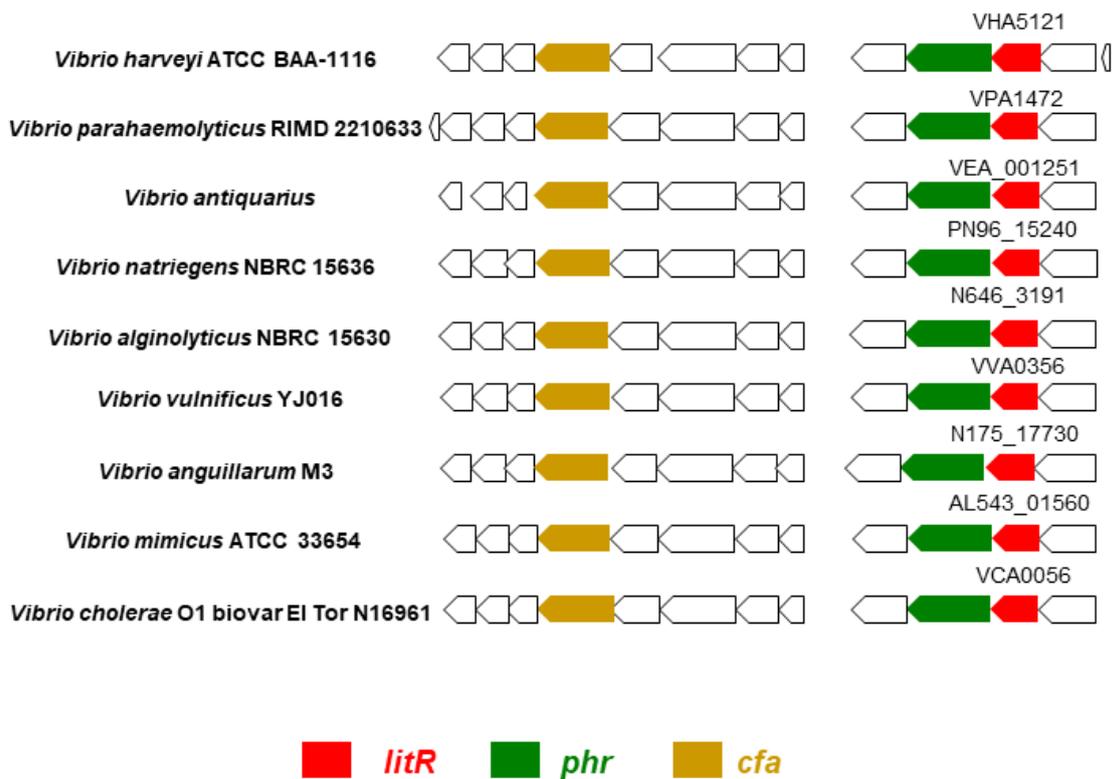


図 3-1-1-6 クラス IV LitR を有する *Vibrio* 属細菌の *litR* 周辺の遺伝子図

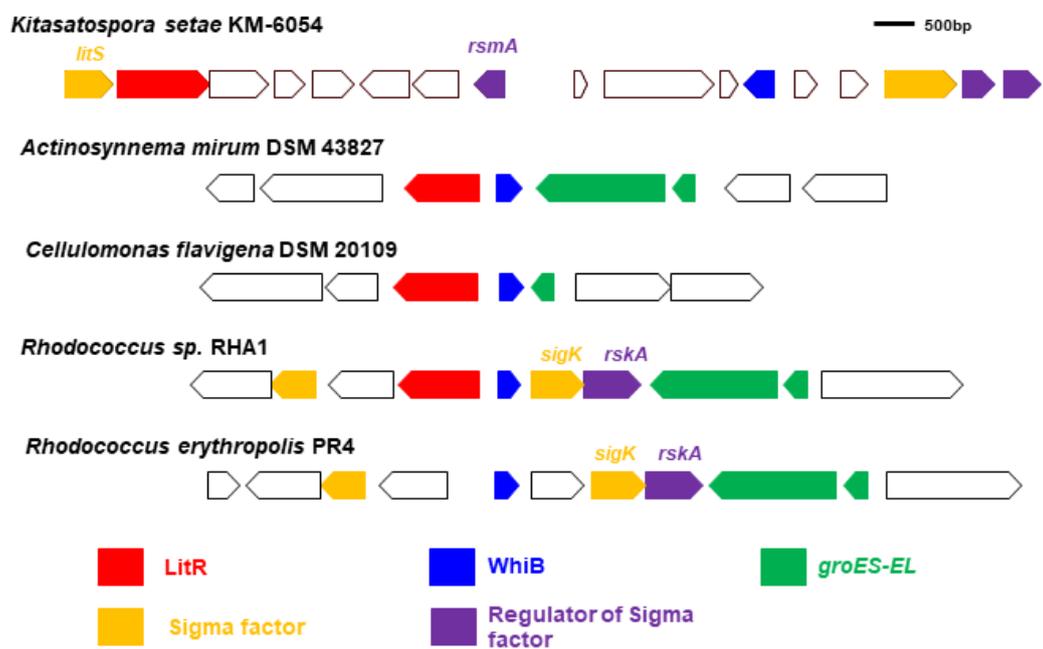
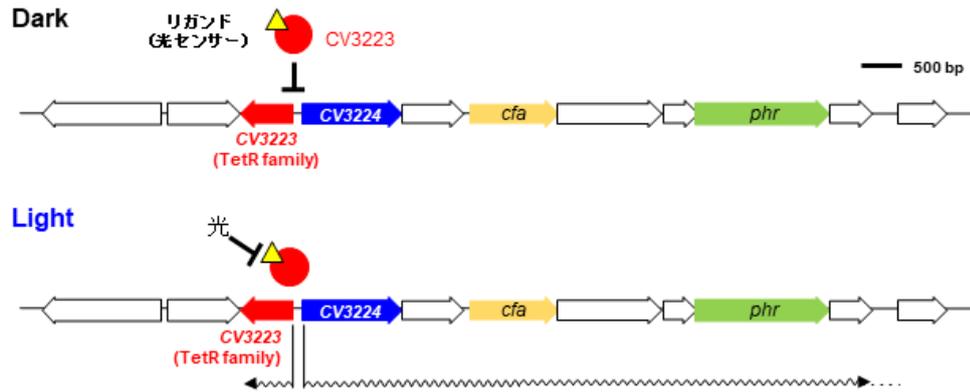


図 3-1-1-7 クラス V LitR 保有細菌における *litR* 周辺の遺伝子図

### A. TetR型光応答性蛋白質を介した転写制御機構



### B. 半定量RT-PCRを用いた転写解析

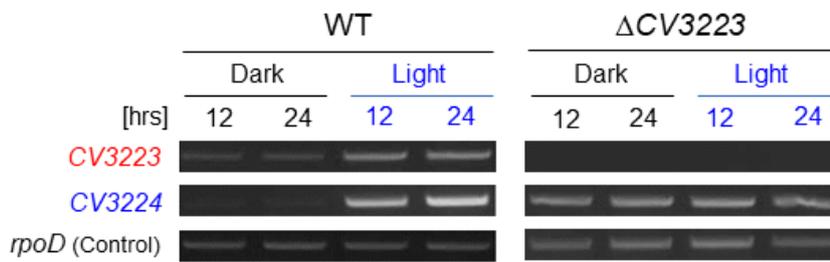


図 3-1-1-8 TetR を介した *C. violaceum* の光応答機構

## Neisseriales

---

*Laribacter hongkongensis* HLHK9



*Chromobacterium violaceum* ATCC 12472



## Burkholderiales

---

*Ralstonia eutropha* JMP134



*Herbaspirillum seropedicae* SmR1



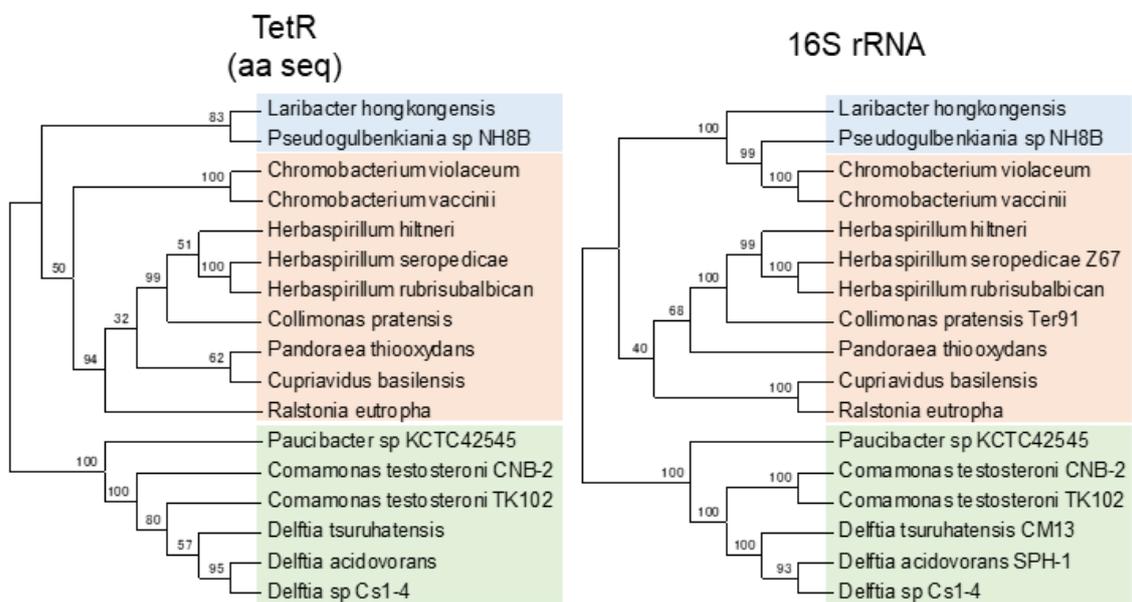
*Delftia acidovorans* SPH-1



*Comamonas testosteroni* CNB-2



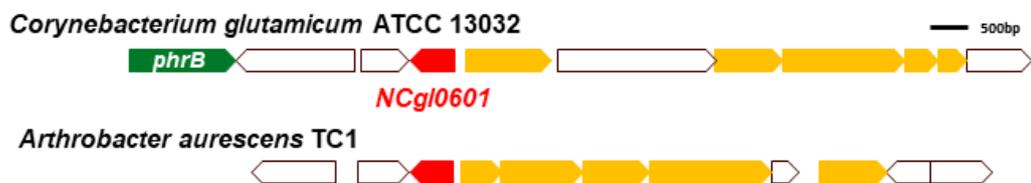
図 3-1-1-9 光応答性 TetR 蛋白質の分布



NJ-Poisson, 17 sequences

図 3-1-1-10 光応答性 TetR 蛋白質と 16S rRNA の系統樹

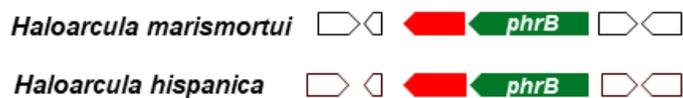
グラム陽性細菌



グラム陰性細菌



アーケア



■ MarR型レギュレーター ■ カロテノイド合成遺伝子群 ■ 光回復酵素(*phrB*)

図 3-1-1-11 LimR 蛋白質の分布

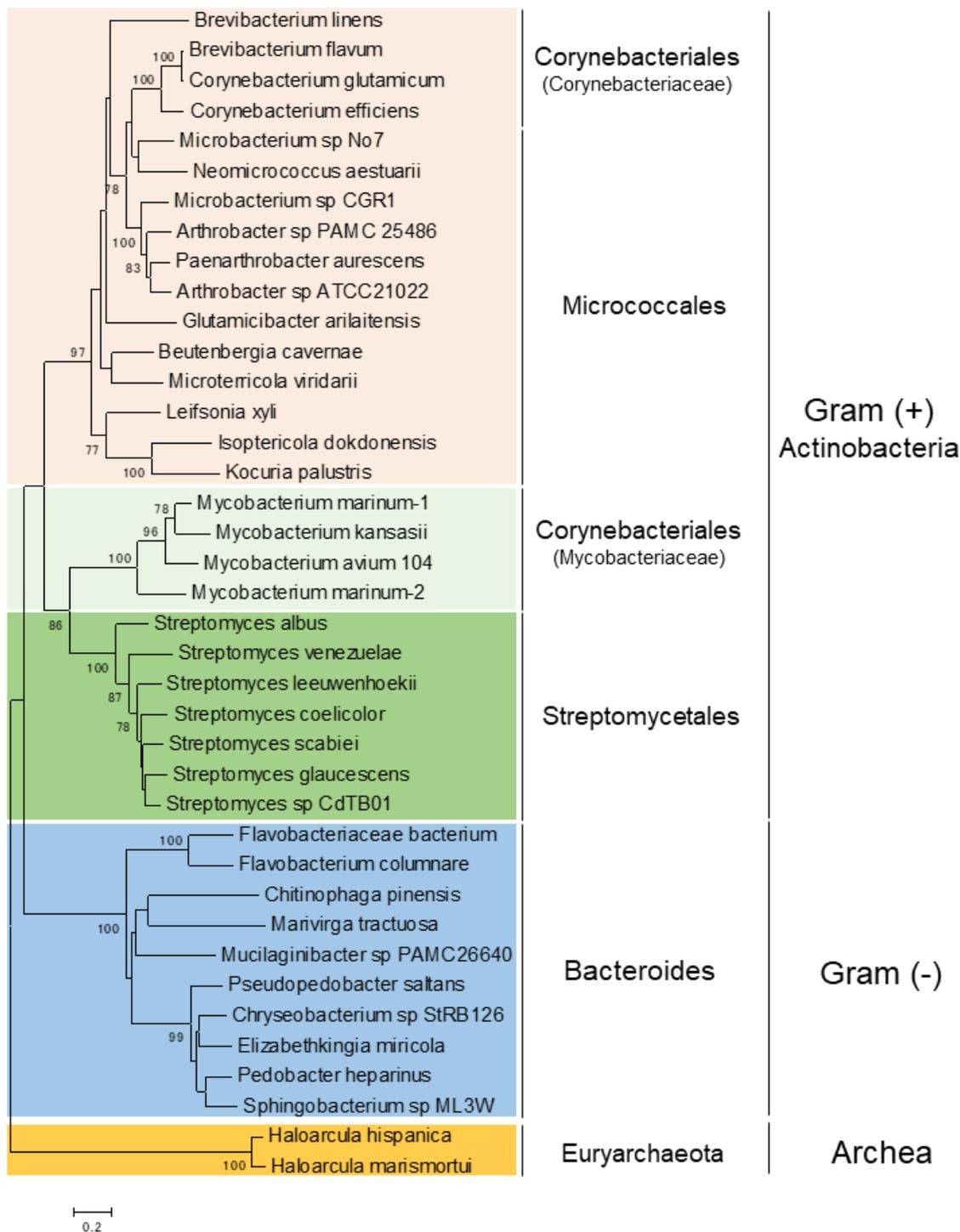


図 3-1-1-12 LimR の分子系統樹

## 第2項 RNA seq による光応答性細菌のトランスクリプトーム解析

### 目的

LitR ファミリーの系統解析から多様な光センシング機構が存在することが示唆された。クラス I や II を保有する細菌群が分子生物学的な解析から光に  
応答することが明らかになっている。一方、他のクラスを保有するバクテリアの光応答は不明である。本章では、LitR 類似蛋白質などを保有する細菌群を用いた RNA seq によるトランスクリプトーム解析を行い、転写レベルでの光応答を見出すこと目的とした。なお、本解析は東京農業大学生物資源ゲノム解析センター（平成 28 年度共同利用・共同研究拠点採択課題）の採択課題として行われた。

## 結果と考察

青色光照射下で培養した計 7 株の細菌から抽出した RNA を RNA seq によって解析した。その結果、7 株とも光による転写上昇を示した遺伝子が確認されたが、全遺伝子中の 5%以上の遺伝子が光誘導を受ける細菌種や 0.5%前後と光誘導性遺伝子が少ないものが存在した。このことから、細菌種によって光誘導を受ける遺伝子数が大きく異なることがわかった。

RNA seq の結果は光によって 2 倍以上に転写上昇した遺伝子を表 3-1-2-1 から 3-1-2-6 にまとめた。本研究では、光誘導性遺伝子群の転写制御や生理学的な意義について考察した。以下に、各細菌種の結果と考察を述べる。

### 海洋性発光細菌 *Vibrio harveyi* ATCC BAA-1116

*V. harveyi* (*Vibrio cambellii*) は、海洋に生息するグラム陰性の $\gamma$ -プロテオバクテリアである。本菌は、バクテリオルシフェラーゼによる青白い発光をすることで知られている。RNA seq では、野生株と非発光性の変異株( $\Delta luxA$ )を光照射下で培養し、それらの転写レベルを比較した。光照射によって 2 倍以上転写上昇した遺伝子数は野生株では 82 個であり、*luxA* 破壊株では 86 個であった (表 3-1-2-1)。これら遺伝子群には、クラス IV LitR をコードする

VHA5121 や光酸化ストレス応答システム **ChrR-RpoE** が含まれていたことから、それらが *V. harveyi* の光依存的な転写調節を担っていることが予想された。ヒト病原菌 *Vibrio cholerae* ではクラス IV LitR と予想される MerR 型転写調節蛋白質と **ChrR-RpoE** が光依存的な転写調節を担っていることが報告されており、光照射で生じる活性酸素が転写を誘導することを明らかにしている<sup>43</sup>。このことから、*V. harveyi* も同様に光酸化ストレスが光誘導性遺伝子の転写を誘導すると考えられる。本菌の光誘導性遺伝子群には、DNA 修復に関与する 4 つの光回復酵素や脂肪酸合成酵素、シトクロームオキシダーゼなどをコードする遺伝子が含まれ、それらが光ストレスへの防御に関係していると考えられる。

### 青色色素生産菌 *Chromobacterium violaceum*

青色色素ピオラセインを生産するグラム陰性細菌 *C. violaceum* は、LitR 保有菌で見られるような *phrB* と *cfaB* の遺伝子群を有し、半定量 RT-PCR による予備試験でそれらの遺伝子発現が光照射によって上昇することが判明している (図 3-1-1-7)。そこで、RNA seq によってさらに光誘導性遺伝子を見出すことを試みたところ、44 遺伝子の転写レベルが 2 倍以上に上昇した (表 3-

1-2-2)。予備試験で光誘導が確認された Cv017\_17815~17855 の転写レベルは 17.0~28.6 倍と顕著に上昇していた。また、アセチル CoA の代謝に関与する遺伝子群の転写レベルが 4 倍までに上昇していた。

*C. violaceum* は LitR などに相同性を示す光センサー蛋白質を保有していない。一方、*phrB-cfaB* クラスター付近に TetR 型の転写調節因子がコードされており、それが光依存的な転写制御を担うことが考えられる。予備調査において、その破壊は暗条件下においても *phrB* や *cfaB* の高い転写レベルを引き起こすことが判明している。この光センシング機構は明らかではないが、*C. violaceum* は TetR 型転写調節蛋白質による新規な光応答メカニズムを有していることが推測される。

#### 植物共生細菌 *Erwinia tasmaniensis* Et1/99

*E. tasmaniensis* は、オーストラリアのリンゴの木から分離されたグラム陰性細菌である。本菌は、大腸菌の光応答に関与する転写調節因子 BluR に相同性を示す蛋白質を保有している<sup>44</sup>。光照射による転写上昇した遺伝子数は全 3,622 遺伝子中 22 個であった (表 3-1-2-3)。BluR 類似蛋白質と思われる光応答は確認されなかったが、硫酸の取込みや資化に関与する遺伝子群やシ

ステインの転写調節に関わる遺伝子の転写が光誘導されていたことが特徴的であった（図 3-1-2-1）。このことから、細胞内のシステイン量が増加することが考えられた。

### 稲苗胴枯病菌 *Burkholderia plantarii* MAFF301723

*B. plantarii* はβ-プロテオバクテリアに属するグラム陰性細菌であり、稲苗胴枯病を引き起こす植物病原菌である。本菌はクラス III LitR を保有することから、それによる光応答を示すことが予想された。なお、本株はゲノム DNA の配列情報が不明であったため、アノテーションには ATCC 43733 のものを使用した。光照射によって転写が誘導された遺伝子数は、全 6,457 遺伝子中 29 個であった（表 3-1-2-4）。その転写倍率は最大で 4 倍と光照射による影響が小さかった。クラス III LitR のレギュロンと予想される遺伝子群の転写倍率は 1.1～2.4 倍であり、光による誘導は低かった。このことから、*B. plantarii* のクラス III LitR は機能しない、あるいは、転写リプレッサー活性が強力であることが考えられた。一方、呼吸鎖に関与するシトクロームオキシダーゼをコードする遺伝子 bpln\_2g03750～2g03780 の転写レベルは 3 倍に上昇し、これが本菌では特徴的であった。

## 緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

*P. aeruginosa* は、環境中に広く分布する $\gamma$ -プロテオバクテリアであり、メジャーな日和見感染菌である。本菌では 204 遺伝子の転写レベルが光照射によって上昇したが、その多くは 2~5 倍の低いレベルの転写誘導であった(表 3-1-2-5)。*P. aeruginosa* は LitR 類似蛋白質を保有し、それを含んだ遺伝子クラスターの転写レベルは光によって 7~14 倍に上昇した。その他に、呼吸鎖に関与する遺伝子 *nuoADEHJK* や *sdhADC*、*ccoP2Q2A2ZN2*、*cyoABCDE* (図 3-1-2-2) やプロファージ領域と予想される遺伝子群 *PA0163~PA0645* の転写が光誘導を受けることが確認された。

## *Rhodococcus jostii* RHA1

*R. jostii* は *Corynebacteria* 目に属するグラム陽性細菌である。本菌は、難分解性物質ポリ塩化ビニフェルの分解能を持つことで知られている。本菌はクラス V LitR を保有しているが、そのレギュロンと予想される遺伝子 *RHA6292-6293* の転写倍率は 0.5~0.9 であったため、それによる光応答は認められなかった。このことから、*R. jostii* のクラス V LitR は光センサーとして機能しない、あるいは、青色光以外に応答することが考えられる。

*R. jostii* の光誘導性遺伝子は 480 個であり、全遺伝子数の 5.2% を占めた (表 3-1-2-6)。ほとんどの遺伝子群は 2~5 倍程度の低い誘導レベルであった。それらには、硫黄代謝やビオチンの取込みと合成、B<sub>12</sub> や葉酸、チアミン、パントテン酸の生合成、解糖系、アミノ酸代謝に関与する酵素の遺伝子群が含まれていた (図 3-1-2-3 から 3-1-2-11 まで)。これらの遺伝子群を低いレベルで発現誘導することで、その関連代謝を微調整して光ストレスに対応すると考えられる。

また、多くのリボソーム蛋白質や蛋白質のフォールディングに関与する *groL12* の遺伝子発現が光によって誘導されていた。*Streptomyces coelicolor* では一部のリボソーム遺伝子の転写が酸化レギュレーター RsrA-SigR に制御されることが知られていることから<sup>45</sup>、*R. jostii* の光誘導性リボソーム遺伝子群は光酸化ストレスに関与すると予想される。

RHA1\_ro02555~02561 の転写倍率が 5.8~7.5 と比較的高く、それに隣接するアンチシグマ因子-シグマ因子 RskA-SigK がその遺伝子群の転写を調節することが予想された。RskA-SigK は、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* のレドックス応答性転写調節因子であり、病原遺伝子や細胞膜を構成するミコール酸合成遺伝子などの遺伝子発現を調節することが明らかになっている

<sup>46,47</sup>。RskA-SigK の転写メカニズムは *M. tuberculosis* のみ報告されているが、光による制御の報告例はない。このことから、*R. jostii* の RskA-SigK メカニズムは *M. tuberculosis* のものとは異なり、光または光酸化に応答すると考えられた。

以上より、RNA seq によるトランスクリプトーム解析をした全ての細菌種で光照射による転写上昇を確認することができた。多くの細菌種で光回復酵素 *phr* やシクロプロパン環脂肪酸合成酵素、呼吸鎖関連酵素遺伝子群が光誘導されることが見出された一方、細菌種によって光誘導性遺伝子が異なるものも多く見つかった。すなわち、これらの結果は光誘導性遺伝子の共通性と多様性を示唆させるものであり、それは細菌種の環境適応と進化に基づいていると予想させる。

また、本解析によって新規な光誘導的な転写制御機構の存在を示唆する結果が得られた。一方、新しい光センサーと予想されたクラス V LitR などの光応答は確認できなかったが、本解析では青色光の条件下であったため、他の波長に反応する可能性が残されている。解析した細菌種の光感知メカニズム

は明らかではないが、今後の研究によってそれらが解明されることを期待する。

表 3-1-2-1 *V. harveyi* の光誘導性遺伝子群

Direction	Gene number	Definition	Fold change (Light/Dark)	
			WT	$\Delta luxA$
+	VIBHAR_00151	superoxide dismutase, Fe-Mn family	3.74	2.28
+	VIBHAR_00286	hypothetical protein	4.17	7.06
+	VIBHAR_00352	membrane protein	6.30	3.18
+	VIBHAR_00353	hypothetical protein	6.08	4.57
+	VIBHAR_00509	spermidine export protein MdtJ	3.65	7.25
+	VIBHAR_00510	spermidine export protein MdtI	3.13	7.11
+	VIBHAR_00796	hypothetical protein	25.92	16.23
+	VIBHAR_01814	transcriptional regulator	2.03	4.17
+	VIBHAR_01815	short-chain dehydrogenase	2.69	4.62
+	VIBHAR_01816	amine oxidase	3.06	3.62
+	VIBHAR_01817	plasmid partition ParA protein	3.30	2.85
+	VIBHAR_01818	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	4.08	4.31
+	VIBHAR_01819	zinc ABC transporter permease	5.45	6.99
+	VIBHAR_01820	putative periplasmic protein	10.36	7.61
+	VIBHAR_01821	lipoprotein	11.09	9.16
-	VIBHAR_01822	adenylosuccinate lyase	3.21	3.14
+	VIBHAR_02160	bacteriorhodopsin	2.63	3.58
-	VIBHAR_02225	glycosyltransferase	1.97	2.28
-	VIBHAR_02226	galactosyltransferase	3.37	2.79
-	VIBHAR_02235	hypothetical protein	2.68	2.22
-	VIBHAR_02393	propionyl-CoA synthetase	1.88	3.42
-	VIBHAR_02394	2-methylaconitate isomerase	1.47	4.98
-	VIBHAR_02395	2-methylcitrate dehydratase	1.71	5.13
-	VIBHAR_02396	2-methylcitrate synthase	2.19	4.38
-	VIBHAR_02397	methylisocitrate lyase	2.29	5.90
-	VIBHAR_02398	GntR family transcriptional regulator	2.00	1.58
-	VIBHAR_02420	aldehyde dehydrogenase	2.45	5.02
-	VIBHAR_02449	serine protease	2.58	2.14
-	VIBHAR_03282	hypothetical protein	8.38	7.23

表 3-1-2-1 *V. harveyi* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	Gene number	Definition	Fold change (Light/Dark)	
			WT	$\Delta luxA$
-	VIBHAR_03283	putative transcriptional regulator (ChrR)	12.16	6.36
-	VIBHAR_03284	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily (RpoE)	10.73	5.84
-	VIBHAR_03285	2-dehydropantoate 2-reductase	4.90	4.58
-	VIBHAR_03286	ATP-dependent protease	21.21	27.32
+	VIBHAR_03583	XTP/dITP diphosphohydrolase	2.16	2.04
+	VIBHAR_03584	HemN family oxidoreductase	2.05	1.85
-	VIBHAR_04755	glyoxalase	8.67	2.32
-	VIBHAR_04781	putative protease	1.81	2.14
-	VIBHAR_04782	hypothetical protein	24.42	19.70
+	VIBHAR_04796	major type 1 subunit fimbrin (pilin)	3.05	3.24
+	VIBHAR_04941	hypothetical protein	6.15	7.06
+	VIBHAR_04942	GTPases - Sulfate adenylate transferase	3.15	2.37
-	VIBHAR_05020	hypothetical protein	4.94	6.70
-	VIBHAR_05022	hypothetical protein (Methylenetetrahydrofolate reductase)	2.63	2.79
+	VIBHAR_05120	hypothetical protein	5.63	2.99
+	VIBHAR_05121	LitR	3.47	3.90
+	VIBHAR_05122	deoxyribodipyrimidine photo-lyase	3.26	4.17
+	VIBHAR_05123	L,D-transpeptidase YcfS	1.77	2.30
-	VIBHAR_05308	hypothetical protein	2.93	2.27
-	VIBHAR_05309	glutathione peroxidase	4.37	3.77
-	VIBHAR_05323	magnesium transporter	2.77	2.19
-	VIBHAR_05324	ubiquinol-cytochrome C reductase	7.06	3.51
-	VIBHAR_05464	cytochrome C	4.94	4.73
-	VIBHAR_05465	cytochrome oxidase	4.70	4.72
-	VIBHAR_05466	cytochrome oxidase subunit I	5.39	6.59
-	VIBHAR_05467	cytochrome C553	7.98	10.18

表 3-1-2-1 *V. harveyi* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	Gene number	Definition	Fold change (Light/Dark)	
			WT	$\Delta luxA$
+	VIBHAR_05528	arginine transport system ATP-binding protein	2.25	5.09
+	VIBHAR_05529	arginine transport system substrate-binding protein	2.32	3.06
+	VIBHAR_05530	arginine transport system permease protein	2.22	2.40
+	VIBHAR_05567	hypothetical protein	2.22	3.20
-	VIBHAR_05568	Putative lipoprotein	1.84	2.65
-	VIBHAR_05569	Putative lipoprotein	2.27	2.24
-	VIBHAR_05665	putative deacylase	2.56	2.61
+	VIBHAR_05687	uroporphyrin-III methyltransferase	2.19	2.14
-	VIBHAR_05688	hypothetical protein	2.17	2.23
+	VIBHAR_05891	hypothetical protein	2.41	2.28
+	VIBHAR_06101	hypothetical protein	5.31	9.28
-	VIBHAR_06102	putative riboflavin deaminase	6.35	11.15
+	VIBHAR_06567	lipoprotein	2.04	2.61
-	VIBHAR_06658	hypothetical protein	5.33	3.40
+	VIBHAR_06659	deoxyribodipyrimidine photo-lyase	4.02	3.17
+	VIBHAR_06660	fasciclin	17.49	27.07
+	VIBHAR_06661	flavin oxidoreductase	5.23	6.27
-	VIBHAR_06662	phospholipase	2.33	2.18
+	VIBHAR_06690	peptide methionine sulfoxide reductase msrA/msrB	7.65	6.64
-	VIBHAR_06691	C factor cell-cell signaling protein	8.07	6.09
-	VIBHAR_06692	deoxyribodipyrimidine photolyase-related protein	5.60	5.24
-	VIBHAR_06693	deoxyribodipyrimidine photo-lyase	10.36	8.33
-	VIBHAR_06712	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit B	18.59	13.09
-	VIBHAR_06863	glycerate 2-kinase	2.11	3.38

表 3-1-2-1 *V. harveyi* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	Gene number	Definition	Fold change (Light/Dark)	
			WT	$\Delta luxA$
-	VIBHAR_06887	hypothetical protein	2.15	2.04
-	VIBHAR_06888	hypothetical protein	6.17	8.44
+	VIBHAR_07021	putative redox protein	21.63	13.26
+	VIBHAR_07022	methyl-accepting chemotaxis protein	2.93	2.01

表 3-1-2-2 *C. violaceum* の光誘導性遺伝子群

Direction	Gene number	Definition	Fold change (Light/Dark)
+	Cv017_00350	methylcrotonoyl-CoA carboxylase	3.30
+	Cv017_00355	enoyl-CoA hydratase	2.58
+	Cv017_00360	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase	2.81
-	Cv017_01790	hypothetical protein	2.37
+	Cv017_01800	protein mbtH	2.29
+	Cv017_02905	ABC transporter permease	2.55
+	Cv017_02910		11.58
-	Cv017_03735	indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase	3.68
+	Cv017_04135	aldehyde dehydrogenase	3.13
+	Cv017_09530	TonB-dependent receptor	3.11
+	Cv017_09535	hemin degrading factor	4.08
+	Cv017_09540	hypothetical protein	3.57
-	Cv017_10400	acetyl-CoA acetyltransferase	3.96
-	Cv017_10405	MerR family transcriptional regulator	2.80
+	Cv017_10410	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	3.22
+	Cv017_10415	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	3.53
+	Cv017_10420	acyl-CoA dehydrogenase	4.12
+	Cv017_10425	enoyl-CoA hydratase	3.25
+	Cv017_10430	enoyl-CoA hydratase	2.96
-	Cv017_11935	C4-dicarboxylate transporter	3.17
-	Cv017_12620	hypothetical protein	4.05
+	Cv017_15080	hypothetical protein	2.45
+	Cv017_17570	hypothetical protein	2.73
-1	Cv017_17810	TetR family transcriptional regulator	3.98
+	Cv017_17815	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit 6	24.18
+	Cv017_17820	cyclopropane fatty acid synthase	17.03
+	Cv017_17825	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	23.83
+	Cv017_17830	hypothetical protein	28.56

表 3-1-2-2 *C. violaceum* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	Gene number	Definition	Fold change (Light/Dark)
+	Cv017_17835	short-chain dehydrogenase	24.20
+	Cv017_17840	isomerase	18.91
+	Cv017_17845	deoxyribodipyrimidine photolyase	21.42
+	Cv017_17850	lipocalin	19.26
+	Cv017_17855	hypothetical protein	26.75
+	Cv017_17860	diguanylate cyclase	2.78
+	Cv017_17940	C4-dicarboxylate ABC transporter	4.00
+	Cv017_17945	C4-dicarboxylate ABC transporter permease	2.30
-	Cv017_18945	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	4.58
+	Cv017_19080	2-methylisocitrate lyase	2.40
+	Cv017_19085	2-methylcitrate synthase	6.21
+	Cv017_19090	hypothetical protein	5.02
+	Cv017_19095	Fe/S-dependent 2-methylisocitrate dehydratase AcnD	3.70
+	Cv017_19100	3-methylitaconate isomerase	3.41
-	Cv017_20470	acyl-CoA dehydrogenase	2.23
-	Cv017_21445	glycerol kinase	3.31

表 3-1-2-3 *E. tasmaniensis* の光誘導性遺伝子群

Direction	Gene name	Definition	Fold change (Light/Dark)
+	ETA_01100	hypothetical protein	2.06
-	ylaC	Putative inner membrane protein YlaC	2.23
+	ETA_04750	Probable ABC transporter, periplasmic-binding protein	2.44
+	gltL	GltL protein	2.74
+	gltJ	GltJ protein	3.48
+	ETA_05380	Potential ORFB-specific chaperone, encodes a homolog of virulence/avirulence effector proteins secreted via the type III pathway	3.06
+	cysP	Thiosulfate-binding protein	3.71
+	cysT	Sulfate ABC transporter permease	2.88
+	cysW	Sulfate transport system permease protein	3.56
+	cysA	Sulfate/thiosulfate import ATP-binding protein	3.18
-	cysK	Cysteine synthase A	2.31
+	cbl	Transcriptional regulator cys regulon	3.73
-	yciW	Conserved hypothetical protein YciW	2.16
+	ydjN	Putative symporter YdjN	3.54
-	cysC	Adenylylsulfate kinase	2.49
-	cysN	Sulfate adenylyltransferase subunit 1	3.08
-	cysD	Sulfate adenylyltransferase subunit 2	6.10
-	cysG	uroporphyrin-III C-methylase, siroheme synthase	9.59
+	ETA_27130	Putative amino-acid transport system permease protein	3.19
+	ETA_27140	Putative amino-acid ABC transporter, ATP-binding protein	2.60
+	ETA_27150	Putative amino-acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein	2.81
-	lysA	Diaminopimelate decarboxylase	2.93

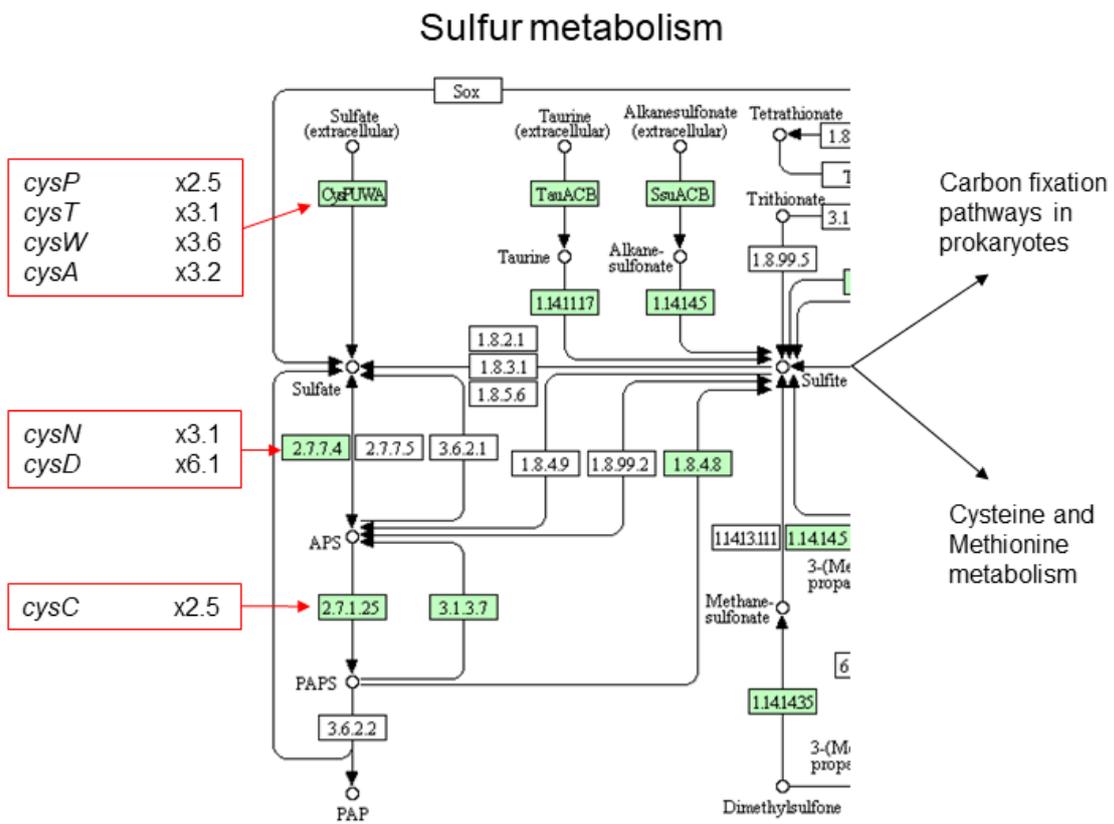


図 3-1-2-1 *E. tasmaniensis* の硫黄代謝関連遺伝子

表 3-1-2-4 *B. plantarii* の光誘導性遺伝子群

Direction	Gene number	Definition	Fold change (Light/Dark)
-	bpln_1g12250	putative superoxide dismutase	2.27
-	bpln_1g15950	collagen triple helix repeat protein	2.49
-	bpln_1g15960	pseudo gene	4.22
+	bpln_1g15970	pseudo gene	2.69
+	bpln_1g15990	Peptidase A24A, prepilin type IV	2.14
+	bpln_1g16000	TadE-like protein	2.31
-	bpln_2g03740	GntR family transcriptional regulator	2.37
+	bpln_2g03750	cytochrome o ubiquinol oxidase, subunit II	3.45
+	bpln_2g03760	cytochrome o ubiquinol oxidase, subunit I	3.33
+	bpln_2g03770	cytochrome o ubiquinol oxidase, subunit III	3.20
+	bpln_2g03780	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV	3.37
+	bpln_2g03940	methylmalonyl-CoA mutase	2.40
-	bpln_2g03950	hypothetical protein	2.76
-	bpln_2g03960	nitrite/sulfite reductase hemoprotein beta subunit	2.65
-	bpln_2g06080	RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT	2.12
-	bpln_2g06140	delta 12 desaturase	2.14
-	bpln_2g06190	pyoverdine synthetase	2.28
+	bpln_2g08560	electron transfer flavoprotein subunit beta	2.42
+	bpln_2g08880	Acyl-CoA dehydrogenase	2.26
+	bpln_2g08890	Acyl-coenzyme A synthetase	2.22
+	bpln_2g08900	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	2.38
+	bpln_2g08910	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	2.29
+	bpln_2g08920	Enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase	2.46
+	bpln_2g08930	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	2.49
+	bpln_2g15500	Alcohol dehydrogenase zinc-binding domain protein	2.90

表 3-1-2-4 *B. plantarii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	Gene number	Definition	Fold change (Light/Dark)
-	bpln_2g17970	hypothetical protein	2.11
-	bpln_2g17980	hypothetical protein	2.38
+	bpln_2g23570	triple helix repeat-containing collagen	2.91
+	bpln_2g24240	Response regulator receiver protein	2.99

表 3-1-2-5 *P. aeruginosa* の光誘導性遺伝子群

Direction	Name	Defintion	Fold change (Light/Dark)
+	plcB	phospholipase C, PlcB	2.00
+	PA0028	hypothetical protein	2.64
+	osmC	osmotically inducible protein OsmC	2.17
-	PA0205	probable permease of ABC transporter	2.10
-	PA0445	probable transposase	2.08
-	glcB	malate synthase G	3.92
-	PA0483	probable acetyltransferase	2.62
+	PA0560	conserved hypothetical protein	2.01
+	prtN	transcriptional regulator PrtN	2.26
+	ptrB	repressor, PtrB	2.56
+	PA0613	hypothetical protein	2.58
+	PA0614	hypothetical protein	4.31
+	PA0615	hypothetical protein	2.46
+	PA0616	hypothetical protein	2.61
+	PA0617	probable bacteriophage protein	3.15
+	PA0618	probable bacteriophage protein	3.32
+	PA0619	probable bacteriophage protein	2.57
+	PA0620	probable bacteriophage protein	2.25
+	PA0622	probable bacteriophage protein	3.31
+	PA0623	probable bacteriophage protein	2.93
+	PA0624	hypothetical protein	2.35
+	PA0625	hypothetical protein	2.68
+	PA0626	hypothetical protein	2.27
+	PA0627	conserved hypothetical protein	2.54
+	PA0628	conserved hypothetical protein	3.18
+	PA0629	conserved hypothetical protein	2.63
+	PA0630	hypothetical protein	2.45
+	PA0631	hypothetical protein	3.03
+	PA0632	hypothetical protein	4.40
+	PA0633	hypothetical protein	3.31
+	PA0634	hypothetical protein	2.82
+	PA0635	hypothetical protein	3.42

表 3-1-2-5 *P. aeruginosa* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	Name	Defintion	Fold change (Light/Dark)
+	PA0636	hypothetical protein	2.97
+	PA0637	conserved hypothetical protein	2.25
+	PA0638	probable bacteriophage protein	2.37
+	PA0639	conserved hypothetical protein	2.23
+	PA0640	probable bacteriophage protein	2.88
+	PA0641	probable bacteriophage protein	2.29
+	PA0642	hypothetical protein	4.33
+	PA0643	hypothetical protein	2.18
+	PA0645	hypothetical protein	2.00
+	PA0713	hypothetical protein	3.22
+	PA0789	probable amino acid permease	2.18
+	acsA	acetyl-coenzyme A synthetase	2.10
-	PA0908	hypothetical protein	3.15
-	PA0909	hypothetical protein	3.27
-	PA0910	hypothetical protein	3.16
-	PA0911	hypothetical protein	2.98
-	PA1123	hypothetical protein	2.66
+	PA1203	hypothetical protein	2.05
+	cyoA	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	4.07
+	cyoB	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	2.76
+	cyoC	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III	2.95
+	cyoD	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV	3.06
+	cyoE	cytochrome o ubiquinol oxidase protein CyoE	2.86
-	PA1333	hypothetical protein	3.44
+	ccmB	heme exporter protein CcmB	2.25
-	PA1540	conserved hypothetical protein	2.01
-	PA1541	probable drug efflux transporter	2.27
+	PA1550	hypothetical protein	2.21
+	PA1551	probable ferredoxin	2.77

表 3-1-2-5 *P. aeruginosa* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	Name	Definition	Fold change (Light/Dark)
-	ccoP2	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoP subunit	2.19
-	ccoQ2	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoQ subunit	2.13
-	ccoO2	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoO subunit	2.31
-	ccoN2	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoN subunit	2.38
+	gltA	citrate synthase	2.04
+	sdhC	succinate dehydrogenase (C subunit)	2.41
+	sdhD	succinate dehydrogenase (D subunit)	2.32
+	sdhA	succinate dehydrogenase (A subunit)	2.26
-	PA1602	probable oxidoreductase	2.39
+	PA1673	(bacteriohemerythrin)	2.09
-	PA1848	probable major facilitator superfamily (MFS)transporter	2.18
-	PA1849	conserved hypothetical protein	2.58
-	PA1850	probable transcriptional regulator	2.57
-	PA1852	hypothetical protein	4.61
-	PA1853	probable transcriptional regulator	2.33
-	PA1854	conserved hypothetical protein	2.04
+	PA1870	hypothetical protein	2.14
	PA1935	hypothetical protein	2.07
+	PA1937	conserved hypothetical protein	2.00
+	pqqF	pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein F	2.79
+	PA1975	hypothetical protein	4.67
+	ercS'	ErcS'	3.13
-	eraS	sensor kinase, EraS	4.06
-	eraR	response regulator EraR	4.20
-	PA1981	hypothetical protein	2.18

表 3-1-2-5 *P. aeruginosa* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	Name	Definition	Fold change (Light/Dark)
+	pqqA	pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein A	2.82
+	pqqB	pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein B	2.76
+	pqqC	pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein C	2.69
+	pqqD	pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein D	2.70
+	pqqE	pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein E	2.75
+	pqqH	PqqH	2.99
-	bdhA	3-hydroxybutyrate dehydrogenase	2.14
-	PA2004	conserved hypothetical protein	2.00
+	PA2134	hypothetical protein	2.11
+	PA2135	probable transporter	2.07
+	PA2136	hypothetical protein	3.17
+	PA2137	hypothetical protein	2.85
+	PA2138	probable ATP-dependent DNA ligase	2.18
-	PA2146	conserved hypothetical protein	3.35
-	PA2148	conserved hypothetical protein	2.19
-	PA2149	hypothetical protein	2.00
-	PA2150	conserved hypothetical protein	2.06
-	PA2151	conserved hypothetical protein	2.01
-	PA2154	conserved hypothetical protein	2.12
+	PA2160	probable glycosyl hydrolase	2.15
+	PA2161	hypothetical protein	2.32
+	PA2162	probable glycosyl hydrolase	2.28
+	PA2163	hypothetical protein	2.02
+	PA2165	probable glycogen synthase	2.13
+	PA2166	hypothetical protein	3.43
+	PA2173	hypothetical protein	2.12
-	PA2184	conserved hypothetical protein	3.49

表 3-1-2-5 *P. aeruginosa* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	Name	Defintion	Fold change (Light/Dark)
+	PA2187	hypothetical protein	2.10
+	PA2190	conserved hypothetical protein	2.39
-	psIN	hypothetical protein	2.01
+	PA2319	probable transposase	2.17
+	PA2381	hypothetical protein	2.25
+	idh	isocitrate dehydrogenase	4.34
+	aceA	isocitrate lyase	2.26
+	nuoA	NADH dehydrogenase I chain A	2.51
+	nuoD	NADH dehydrogenase I chain C,D	2.23
+	nuoE	NADH dehydrogenase I chain E	2.29
+	nuoH	NADH dehydrogenase I chain H	2.11
+	nuoJ	NADH dehydrogenase I chain J	2.01
+	nuoK	NADH dehydrogenase I chain K	2.11
-	PA2679	hypothetical protein	5.82
-	PA2690	probable transposase	2.16
-	PA2745	probable hydrolase	3.25
-	PA2747	hypothetical protein	2.71
+	PA2753	hypothetical protein	2.05
+	PA2880	hypothetical protein	4.40
-	sth	soluble pyridine nucleotide transhydrogenase	3.76
+	PA3174	probable transcriptional regulator	2.95
-	PA3231	hypothetical protein	2.51
-	PA3232	probable nuclease	2.13
-	PA3270	hypothetical protein	2.01
-	PA3271	probable two-component sensor	3.22
+	PA3369	hypothetical protein	2.21
+	PA3370	hypothetical protein	2.21
-	PA3434	probable transposase	2.10
-	rhIA	rhamnosyltransferase chain A	2.04
+	PA3614	hypothetical protein	3.42
+	PA3660	probable sodium/hydrogen antiporter	2.43

表 3-1-2-5 *P. aeruginosa* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	Name	Definition	Fold change (Light/Dark)
-	adk	adenylate kinase	2.29
-	PA3766	probable aromatic amino acid transporter	2.19
-	PA3791	hypothetical protein	2.33
-	PA3928	hypothetical protein	2.37
-	cioB	cyanide insensitive terminal oxidase	2.30
-	cioA	cyanide insensitive terminal oxidase	2.93
-	tesB	acyl-CoA thioesterase II	2.13
+	PA3993	probable transposase	2.08
+	PA4013	conserved hypothetical protein	2.27
+	PA4014	hypothetical protein	2.10
+	oprG	Outer membrane protein OprG precursor	2.07
+	PA4131	probable iron-sulfur protein	2.68
-	PA4171	probable protease	2.08
-	PA4172	probable nuclease	2.16
+	PA4289	probable transporter	2.32
+	PA4290	probable chemotaxis transducer	4.16
+	PA4291	hypothetical protein	2.26
+	xenB	xenobiotic reductase	2.03
-	PA4359	(ferrous iron transporter A)	2.22
-	PA4400	probable pyrophosphohydrolase	2.51
-	PA4438	conserved hypothetical protein	5.08
-	PA4548	probable D-amino acid oxidase	2.51
+	ccpR	cytochrome c551 peroxidase precursor	2.38
-	PA4596	probable transcriptional regulator	2.26
-	PA4620	hypothetical protein	2.09
-	PA4621	probable oxidoreductase	3.00
+	mgoB	malate:quinone oxidoreductase	2.83
-	hemH	ferrochelataase	2.25
-	PA4656	conserved hypothetical protein	2.49
+	PA4658	hypothetical protein	13.52
+	litR	probable transcriptional regulator	14.18
+	phr	deoxyribodipyrimidine photolyase	7.27

表 3-1-2-5 *P. aeruginosa* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	Name	Defintion	Fold change (Light/Dark)
+	pagL	Lipid A 3-O-deacylase	2.30
-	PA4738	conserved hypothetical protein	3.08
-	PA4739	conserved hypothetical protein	2.90
-	PA4797	probable transposase	2.00
+	PA5030	probable major facilitator superfamily (MFS) transporter	2.08
+	PA5085	probable transcriptional regulator	2.01
+	hutG	N-formylglutamate amidohydrolase	2.28
+	hutI	imidazolone-5-propionate hydrolase HutI	2.43
+	PA5093	probable histidine/phenylalanine ammonia-lyase	2.59
+	PA5094	probable ATP-binding component of ABC transporter	3.03
+	PA5095	probable permease of ABC transporter	3.39
+	PA5096	probable binding protein component of ABC transporter	7.56
+	PA5097	probable amino acid permease	14.19
+	hutH	histidine ammonia-lyase	19.46
+	PA5099	probable transporter	16.12
+	hutU	urocanase	31.53
-	PA5104	conserved hypothetical protein	6.62
-	hutC	histidine utilization repressor HutC	9.35
-	PA5106	conserved hypothetical protein	20.86
+	PA5194	hypothetical protein	2.07
-	argA	N-acetylglutamate synthase	2.86
+	poxB	pyruvate dehydrogenase (cytochrome)	2.32
+	PA5395	conserved hypothetical protein	4.30
+	PA5445	probable coenzyme A transferase	7.12
-	PA5475	hypothetical protein	2.05
+	PA5480	hypothetical protein	3.39
+	PA5481	hypothetical protein	2.51
+	PA5482	hypothetical protein	2.50

## Oxidative phosphorylation

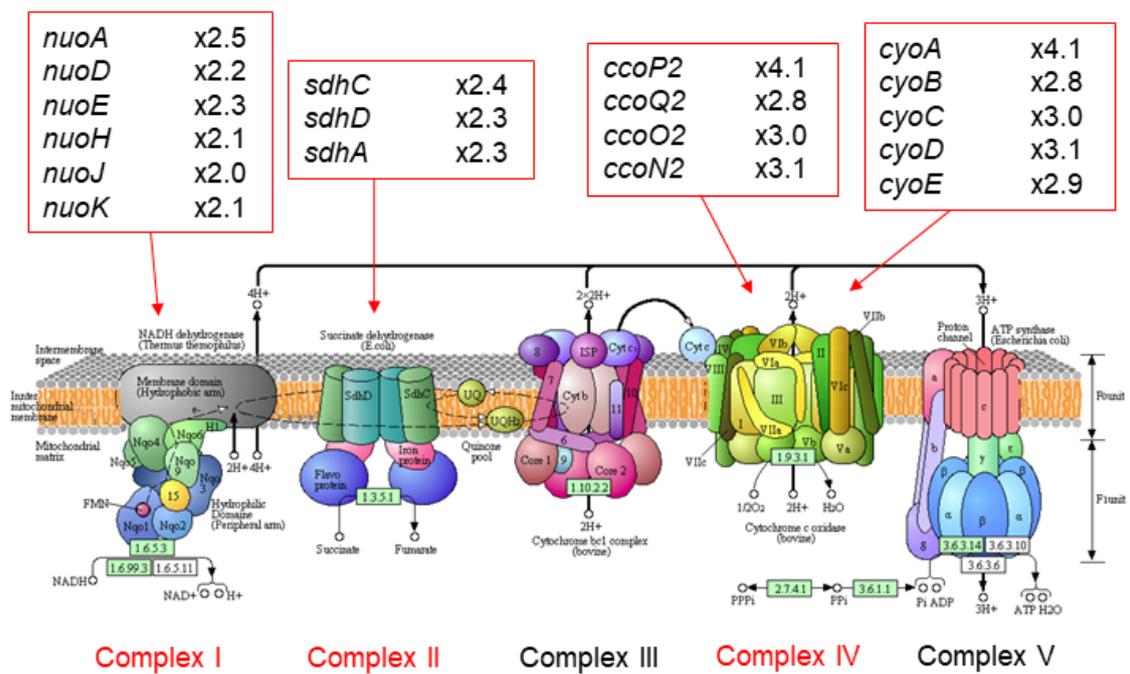


図 3-1-2-2 *P. aeruginosa* の呼吸鎖関連遺伝子

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
+	RHA1_ro00154	conserved hypothetical protein	3.11
-	RHA1_ro00171	cobaltochelataase	2.13
+	groL1	60 kDa chaperonin GroEL	2.08
-	RHA1_ro00572	repressor LexA	2.09
-	RHA1_ro00596	probable transcriptional regulator, GntR family protein	2.17
+	RHA1_ro00607	hypothetical protein	8.69
-	RHA1_ro00608	possible transposase	4.01
+	RHA1_ro00616	probable ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	2.14
+	RHA1_ro00617	conserved hypothetical protein	2.93
-	RHA1_ro00851	probable S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	2.12
-	hisI	phosphoribosyl-ATP diphosphatase	2.33
-	RHA1_ro00857	conserved hypothetical protein	2.07
-	argC	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	2.03
-	RHA1_ro00960	tRNA/rRNA methyltransferase	2.03
-	suhB	inositol-1(or 4)-monophosphatase	2.35
-	RHA1_ro01028	hypothetical protein	2.08
-	nadB	L-aspartate oxidase	2.05
-	RHA1_ro01043	possible biotin synthase, C-terminal	8.06
-	bioD	dethiobiotin synthetase	3.89
-	bioF	8-amino-7-oxononanoate synthase	5.62
+	bioA1	adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	2.03
-	murE1	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase	2.18

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
+	RHA1_ro01100	conserved hypothetical protein	2.09
+	RHA1_ro01101	probable beta-carotene ketolase	2.84
+	RHA1_ro01102	possible carotenoid biosynthesis protein	2.66
-	RHA1_ro01113	conserved hypothetical protein	2.73
-	RHA1_ro01118	arsenite transporting ATPase	2.11
-	RHA1_ro01123	conserved hypothetical protein	2.27
-	RHA1_ro01124	probable protein p60 precursor	2.37
+	cobU	bifunctional adenosylcobinamide kinase/ adenosylcobinamide phosphate guanylyltransferase	2.18
+	cobT	nicotinate-nucleotide-- dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase	2.08
+	aceE1	pyruvate dehydrogenase E1 component	2.05
-	RHA1_ro01215	probable lipase precursor	2.04
-	RHA1_ro01219	conserved hypothetical protein	2.52
-	RHA1_ro01243	hypothetical protein	3.37
-	RHA1_ro01244	possible lipase/esterase	2.44
-	RHA1_ro01245	conserved hypothetical protein	2.11
+	RHA1_ro01251	ferredoxin--nitrite reductase	3.03
+	cysH	phosphoadenylyl-sulfate reductase (thioredoxin)	2.16
+	RHA1_ro01253	sulfate adenylyltransferase small subunit	2.20
+	RHA1_ro01255	conserved hypothetical protein	2.42
-	RHA1_ro01272	ABC sulfate/ thiosulfate porter, permease component	2.69
-	RHA1_ro01273	ABC sulfate/ thiosulfate porter, substrate binding component	2.46
+	RHA1_ro01274	hypothetical protein	2.87
+	rpsT	30S ribosomal protein S20	2.00
-	RHA1_ro01293	conserved hypothetical protein	2.09

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
-	RHA1_ro01294	conserved hypothetical protein	2.21
-	RHA1_ro01295	probable phosphoglycerate mutase	2.01
-	RHA1_ro01296	conserved hypothetical protein	2.23
-	proB	glutamate 5-kinase	2.51
-	RHA1_ro01311	probable GTP-binding protein, GTP1/Obg family protein	2.27
-	rpmA	50S ribosomal protein L27	3.15
-	rplU	50S ribosomal protein L21	3.32
+	RHA1_ro01359	glucokinase	3.25
+	RHA1_ro01360	conserved hypothetical protein	3.72
-	RHA1_ro01361	sugar transporter, MFS superfamily protein	2.62
-	RHA1_ro01378	probable ribose 5-phosphate isomerase	2.02
+	RHA1_ro01390	conserved hypothetical protein	2.02
-	RHA1_ro01406	hypothetical protein	2.67
-	RHA1_ro01425	holo-[acyl-carrier-protein] synthase	2.91
-	RHA1_ro01426	probable fatty-acyl-CoA synthase	3.94
+	RHA1_ro01444	probable ATP-dependent helicase	2.07
+	RHA1_ro01451	probable D-galactonate transporter, MFS superfamily protein	2.14
-	RHA1_ro01485	transcription termination factor Rho	3.22
-	RHA1_ro01538	probable enoyl-CoA hydratase	6.21
-	mmsB1	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	6.29
-	RHA1_ro01540	possible enoyl-CoA hydratase	7.19
-	RHA1_ro01541	probable acyl-CoA dehydrogenase	7.58
-	mmsA2	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (acylating)	6.84
-	RHA1_ro01546	copper homeostasis protein	2.41
-	RHA1_ro01547	glucosamine-6-phosphate deaminase	2.79

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
-	RHA1_ro01548	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	3.36
-	RHA1_ro01549	phosphoenolpyruvate--protein phosphotransferase	3.34
-	RHA1_ro01550	protein-N(pi)-phosphohistidine--sugar phosphotransferase	2.37
+	RHA1_ro01552	protein-N(pi)-phosphohistidine--sugar phosphotransferase	2.12
-	RHA1_ro01554	conserved hypothetical protein	2.23
-	RHA1_ro01563	probable sulfite oxidase	3.63
-	RHA1_ro01572	benzoate membrane transport protein BenE	3.17
+	RHA1_ro01577	pyruvate dehydrogenase	2.52
+	RHA1_ro01578	dihydrolipoyllysine-residue succinyl-transferase	3.23
+	RHA1_ro01597	possible transcriptional activator TenA	2.94
+	RHA1_ro01598	probable ABC transporter, permease component	2.36
+	RHA1_ro01599	ABC transporter, permease component	2.62
+	RHA1_ro01605	possible mucin precursor	2.13
+	RHA1_ro01606	possible PPE family protein	2.11
-	RHA1_ro01671	possible transposase	3.15
-	RHA1_ro01719	conserved hypothetical protein	2.35
+	RHA1_ro01796	probable glutamate synthase large subunit	2.09
+	cysJ	sulfite reductase [NADPH] flavoprotein alpha-component	2.11
+	RHA1_ro01832	conserved hypothetical protein	2.62
+	RHA1_ro01874	cyclohexanone monooxygenase	4.75
-	RHA1_ro01875	acyl-CoA dehydrogenase	5.75
-	RHA1_ro01876	acetyl-CoA C-acetyltransferase	5.36
-	rpsL	30S ribosomal protein S12	2.27

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
+	RHA1_ro01943	probable transcriptional regulator	2.19
-	RHA1_ro01947	transcriptional regulator, MarR family protein	2.29
-	rplL	50S ribosomal protein L7/L12	3.72
-	rplJ	50S ribosomal protein L10	4.94
-	rplA	50S ribosomal protein L1	2.24
-	RHA1_ro01980	transcription antitermination protein	2.04
-	RHA1_ro01981	probable protein translocation complex preprotein translocase subunit	3.06
-	trnW	tRNA-Trp	3.04
-	RHA1_ro01983	possible fatty acid synthase beta subunit	2.45
-	RHA1_ro01984	conserved hypothetical protein	2.71
-	rpmG1	50S ribosomal protein L33 type 2	3.07
-	trnM_2	tRNA-Met	2.99
+	RHA1_ro01999	probable siderophore interacting protein	2.08
-	RHA1_ro02000	conserved hypothetical protein	2.08
+	RHA1_ro02019	transcriptional regulator, IclR family protein	2.60
-	RHA1_ro02025	possible acyltransferase	2.02
-	RHA1_ro02081	possible transcriptional regulator, ROK family protein	2.10
+	RHA1_ro02089	conserved hypothetical protein	2.45
-	dldH1	dihydrolipoyl dehydrogenase	2.99
-	groL2	60 kDa chaperonin GroEL	3.39
+	RHA1_ro02165	probable multisubunit Na <sup>+</sup> :H <sup>+</sup> antiporter MnhB subunit	2.01
+	RHA1_ro02166	probable multisubunit Na <sup>+</sup> :H <sup>+</sup> antiporter MnhC subunit	2.31
-	RHA1_ro02237	O-succinylhomoserine sulfhydrylase	2.09
-	RHA1_ro02238	conserved hypothetical protein	2.28
-	RHA1_ro02239	conserved hypothetical protein	2.37

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Difinition	Fold change (Light/Dark)
+	RHA1_ro02264	transcriptional regulator	2.31
+	RHA1_ro02305	transcriptional regulator, LacI family protein	4.09
-	RHA1_ro02306	possible long-chain-fatty-acid-CoA ligase	3.92
-	RHA1_ro02315	conserved hypothetical protein	2.27
+	RHA1_ro02320	ABC Fe(3+) transporter, substrate binding component	2.08
+	RHA1_ro02333	hypothetical protein	2.39
-	RHA1_ro02365	sugar transporter, MFS superfamily protein	16.92
+	RHA1_ro02450	conserved hypothetical protein	2.84
+	RHA1_ro02451	conserved hypothetical protein	2.30
+	RHA1_ro02453	hypothetical protein	2.00
+	RHA1_ro02456	possible potassium uptake channel	6.16
-	RHA1_ro02457	conserved hypothetical protein	2.13
+	RHA1_ro02503	possible transcriptional regulator, AsnC family protein	2.54
+	catA2	catechol 1,2-dioxygenase	2.06
+	RHA1_ro02516	possible hydrolase	2.30
+	RHA1_ro02526	conserved hypothetical protein	2.25
+	RHA1_ro02549	conserved hypothetical protein	2.25
-	RHA1_ro02554	probable bacterial lipocalin protein	3.42
+	RHA1_ro02555	possible cell surface protein	7.53
+	RHA1_ro02556	conserved hypothetical protein	6.10
+	RHA1_ro02557	possible amine oxidase	5.78
+	RHA1_ro02558	conserved hypothetical protein	5.93
+	RHA1_ro02559	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	6.16
+	RHA1_ro02560	possible cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	5.84
+	RHA1_ro02561	possible membrane protein	6.61
-	pyk2	pyruvate kinase	2.99

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
+	RHA1_ro02617	possible transcriptional regulator, WhiB family protein	2.29
-	RHA1_ro02731	probable NADP-dependent oxidoreductase	2.03
-	RHA1_ro02732	possible ketosteroid isomerase-related protein	2.25
+	nos	nitric oxide synthase oxygenase	2.73
-	RHA1_ro02852	probable amidase	2.32
-	RHA1_ro02868	probable NADH dehydrogenase/NAD(P)H nitroreductase	2.19
+	RHA1_ro03026	4-coumarate--CoA ligase	5.10
+	RHA1_ro03027	acyl-CoA dehydrogenase	2.17
-	RHA1_ro03078	conserved hypothetical protein	2.02
-	RHA1_ro03158	hypothetical protein	2.29
-	RHA1_ro03159	resolvase	2.33
-	RHA1_ro03177	possible tyrosine recombinase	3.00
-	RHA1_ro03178	conserved hypothetical protein	2.62
-	RHA1_ro03232	possible transcriptional regulator, GntR family protein	3.30
+	RHA1_ro03297	transcriptional regulator, LysR family protein	2.35
-	RHA1_ro03317	transposase	2.55
-	dldH3	dihydrolipoyl dehydrogenase	2.02
-	pdhC	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase, E2 component of pyruvate dehydrogenase complex	2.14
-	pdhB1	pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	2.35
-	pdhA2	pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	2.61
+	RHA1_ro03394	conserved hypothetical protein	2.79

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
-	gap1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	2.19
-	rplI	50S ribosomal protein L9	2.03
-	rpsR1	30S ribosomal protein S18	2.01
-	RHA1_ro03431	single-strand binding protein	2.02
-	rpsF	30S ribosomal protein S6	2.74
+	RHA1_ro03439	conserved hypothetical protein	2.23
-	RHA1_ro03440	possible membrane protein	2.23
-	RHA1_ro03441	peptidoglycan glycosyltransferase	2.00
-	RHA1_ro03454	ABC sugar transporter, ATP-binding component	2.31
-	RHA1_ro03493	probable carbohydrate diacid regulator	2.38
+	RHA1_ro03538	conserved hypothetical protein	2.11
+	RHA1_ro03580	conserved hypothetical protein	2.85
-	RHA1_ro03581	conserved hypothetical protein	2.04
+	RHA1_ro03615	transcriptional regulator, TetR family protein	2.11
+	RHA1_ro03616	probable drug/metabolite transporter protein	2.77
+	RHA1_ro03624	conserved hypothetical protein	2.86
-	RHA1_ro03663	conserved hypothetical protein	2.08
-	RHA1_ro03664	ribonuclease P	2.36
+	RHA1_ro03671	possible metal-dependent hydrolase	2.27
+	RHA1_ro03705	hypothetical protein	2.07
-	RHA1_ro03712	conserved hypothetical protein	2.64
-	RHA1_ro03713	possible glycoprotein	2.02
-	RHA1_ro03721	possible transcriptional regulator, TetR family protein	3.54
+	RHA1_ro03847	possible transposase	2.20
+	RHA1_ro03877	transcriptional regulator, AraC family protein	2.14

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
-	RHA1_ro03886	probable inositol 2-dehydrogenase	2.51
+	RHA1_ro03901	conserved hypothetical protein	2.59
-	RHA1_ro03924	hypothetical protein	6.22
+	RHA1_ro03932	ABC oligopeptide transporter, ATP-binding protein	2.03
-	RHA1_ro03947	probable O-succinylbenzoate--CoA ligase	2.64
-	RHA1_ro03948	possible enoyl-CoA hydratase	2.33
-	RHA1_ro03949	probable NADPH:quinone reductase	2.05
+	RHA1_ro03952	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	2.51
+	RHA1_ro03961	probable sugar efflux transporter, MFS superfamily protein	2.65
+	RHA1_ro03997	conserved hypothetical protein	2.27
+	RHA1_ro04025	conserved hypothetical protein	2.04
-	RHA1_ro04046	conserved hypothetical protein	2.31
+	RHA1_ro04048	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	2.35
+	RHA1_ro04057	conserved hypothetical protein	2.03
+	RHA1_ro04059	probable antigen 85 complex protein	2.57
+	RHA1_ro04063	FMN reductase	2.17
-	RHA1_ro04067	conserved hypothetical protein	2.14
-	RHA1_ro04113	possible glycosyl transferases	2.26
+	RHA1_ro04140	probable phosphoglycerate dehydrogenase	2.46
-	tyrA	prephenate dehydrogenase	2.23
-	RHA1_ro04174	possible membrane protein	2.06
-	RHA1_ro04175	possible membrane protein	2.06
-	RHA1_ro04191	hypothetical protein	3.75
+	RHA1_ro04193	conserved hypothetical protein	2.20
+	RHA1_ro04212	probable transcriptional regulator	2.13
-	RHA1_ro04222	probable acetyl/propionyl-CoA carboxylase alpha subunit	6.06

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
+	RHA1_ro04409	dihydropteroate synthase	2.12
+	RHA1_ro04410	dihydroneopterin aldolase	2.13
+	RHA1_ro04411	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridine diphosphokinase	2.37
+	RHA1_ro04412	conserved hypothetical protein	2.10
+	RHA1_ro04418	possible cysteine dioxygenase	2.53
+	RHA1_ro04425	probable transcriptional regulator	2.47
+	RHA1_ro04456	conserved hypothetical protein	2.31
-	radA	possible DNA repair protein RadA: Ion protease	2.67
-	RHA1_ro04458	conserved hypothetical protein	2.11
+	RHA1_ro04461	2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase	2.24
-	RHA1_ro04467	possible transcriptional regulator	2.05
+	RHA1_ro04475	hypothetical protein	2.06
-	RHA1_ro04477	ABC metal ion transporter, permease component	3.41
-	RHA1_ro04478	ABC transporter, ATP-binding component	3.23
+	RHA1_ro04560	probable transporter, MFS superfamily protein	2.18
+	RHA1_ro04598	possible transcriptional regulator	2.39
+	RHA1_ro04599	probable acetyl-CoA C-acetyltransferase	2.15
+	RHA1_ro04613	probable transcriptional regulator, TetR family protein	2.22
+	RHA1_ro04647	conserved hypothetical protein	2.48
+	RHA1_ro04734	hypothetical protein	3.62
-	RHA1_ro04735	hypothetical protein	2.60
+	RHA1_ro04760	conserved hypothetical protein	2.82
+	RHA1_ro04761	conserved hypothetical protein	2.38
-	RHA1_ro04789	conserved hypothetical protein	2.02

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
+	purC	phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase	2.04
-	RHA1_ro04820	regulator relate	2.05
-	RHA1_ro04851	conserved hypothetical protein	2.18
+	pstS	ABC phosphate transporter, substrate-binding component	3.37
+	trnD	tRNA-Asp	2.47
+	RHA1_ro04900	short-chain dehydrogenase	2.08
+	RHA1_ro04901	monooxygenase	2.24
+	RHA1_ro04931	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	2.68
+	RHA1_ro04964	probable cold shock protein	2.05
+	RHA1_ro04969	conserved hypothetical protein	2.08
+	RHA1_ro05029	conserved hypothetical protein	2.21
-	RHA1_ro05056	ABC transporter, ATP-binding component	2.03
-	RHA1_ro05069	O-acetylhomoserine aminocarboxypropyltransferase	2.03
-	RHA1_ro05070	conserved hypothetical protein	2.39
+	RHA1_ro05105	probable Mg(2+) and Co(2+) transporter	2.98
+	RHA1_ro05114	ABC sugar transporter, permease component	3.03
-	RHA1_ro05185	glucokinase	2.41
-	RHA1_ro05186	possible methyltransferase	2.90
-	RHA1_ro05188	conserved membrane protein	2.68
+	RHA1_ro05239	conserved hypothetical protein	4.48
+	RHA1_ro05251	possible oxidoreductase	2.04
+	RHA1_ro05255	conserved hypothetical protein	3.02
+	RHA1_ro05256	synthetase	5.85
+	RHA1_ro05257	probable acetyl-CoA C-acetyltransferase	2.38
+	RHA1_ro05258	ABC cobalt transporter, ATP-binding component	2.32
+	RHA1_ro05259	conserved hypothetical protein	2.66

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Difinition	Fold change (Light/Dark)
+	RHA1_ro05260	probable O-succinylbenzoate--CoA ligase	2.52
-	RHA1_ro05261	conserved hypothetical protein	2.00
+	RHA1_ro05430	non-ribosomal peptide synthetase	3.05
+	RHA1_ro05431	possible antigenic 85 complex protein	2.06
+	RHA1_ro05434	undecaprenyl-phosphate galactose phosphotransferase	2.27
+	RHA1_ro05435	probable mannose-1-phosphate guanylyltransferase	2.11
+	manA1	mannose-6-phosphate isomerase	2.27
-	RHA1_ro05442	probable glycosyltransferase	2.36
-	RHA1_ro05443	possible N- acetylglucosaminyldiphosphoundecaprenol N-acetyl-beta-D-mannosaminyltransferase	2.93
+	RHA1_ro05444	GDP-mannose 4,6-dehydratase	2.17
+	RHA1_ro05445	GDP-L-fucose synthase	2.38
+	RHA1_ro05446	UDP-glucose 6-dehydrogenase	2.16
+	RHA1_ro05447	conserved hypothetical protein	2.09
-	RHA1_ro05450	hypothetical protein	2.14
-	RHA1_ro05451	conserved hypothetical protein	2.12
+	RHA1_ro05452	non-ribosomal peptide synthetase	2.14
+	RHA1_ro05453	probable protein-tyrosine kinase	2.02
-	RHA1_ro05482	possible protease	2.48
+	RHA1_ro05510	probable flavohemoprotein	2.06
+	RHA1_ro05529	conserved hypothetical protein	2.03
+	RHA1_ro05530	probable RNA methyltransferase	2.34
-	RHA1_ro05550	conserved hypothetical protein	2.27
-	RHA1_ro05571	possible lipoprotein	2.19
+	purN	phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2	2.31
-	RHA1_ro05610	conserved hypothetical protein	3.33

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
+	RHA1_ro05626	conserved hypothetical protein	4.10
+	RHA1_ro05627	conserved hypothetical protein	3.41
+	RHA1_ro05666	conserved hypothetical protein	2.00
-	glnQ	glutamine transport ATP-binding protein GlnQ	2.12
-	RHA1_ro05668	probable glutamine transport system permease protein	2.24
+	RHA1_ro05670	conserved hypothetical protein	2.25
+	RHA1_ro05671	probable rRNA dimethyladenosine transferase	2.45
-	RHA1_ro05672	hypothetical protein	3.51
+	RHA1_ro05673	cold shock protein	2.61
-	RHA1_ro05674	hypothetical protein	2.68
+	RHA1_ro05684	4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D- erythritol kinase	2.48
+	RHA1_ro05685	ABC drug resistance transporter, ATP- binding protein	2.19
-	rplY	50S ribosomal protein L25	3.37
-	RHA1_ro05719	cytochrome P450 CYP130	2.00
-	RHA1_ro05720	hypothetical protein	3.01
-	RHA1_ro05721	hypothetical protein	2.56
+	RHA1_ro05755	possible acyl carrier protein	2.27
+	RHA1_ro05758	conserved hypothetical protein	2.09
+	RHA1_ro05759	probable O-glycosyl hydrolase	2.21
-	coaA	pantothenate kinase	2.64
-	RHA1_ro05880	probable multidrug resistance transporter, MFS superfamily protein	2.38
+	RHA1_ro05894	G/U mismatch-specific DNA glycosylase	2.13
+	RHA1_ro05897	conserved hypothetical protein	5.36
+	RHA1_ro05946	possible ferredoxin	2.53
+	RHA1_ro05947	probable aspartate aminotransferase	3.07

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
+	RHA1_ro05948	conserved hypothetical protein	2.06
+	RHA1_ro05953	conserved hypothetical protein	2.59
-	RHA1_ro05982	conserved hypothetical protein	3.29
-	RHA1_ro06011	ABC transporter, ATP-binding component	2.31
+	RHA1_ro06087	metabolite transporter, MFS superfamily protein	2.15
+	rpsJ	30S ribosomal protein S10	3.39
+	rplC	50S ribosomal protein L3	2.72
+	rplD	50S ribosomal protein L4	2.47
+	rplB	50S ribosomal protein L2	2.19
+	rplV	50S ribosomal protein L22	2.05
+	rpsC	30S ribosomal protein S3	2.26
+	rplP	50S ribosomal protein L16	2.31
+	rpmC	50S ribosomal protein L29	2.33
+	rpsQ	30S ribosomal protein S17	2.14
+	rplN	50S ribosomal protein L14	2.81
+	rplX	50S ribosomal protein L24	2.87
+	rplE	50S ribosomal protein L5	2.44
+	rpsN2	30S ribosomal protein S14	2.36
+	rpsH	30S ribosomal protein S8	2.71
+	rplF	50S ribosomal protein L6	3.18
+	rplR	50S ribosomal protein L18	3.09
+	rpsE	30S ribosomal protein S5	3.29
+	rpmD	50S ribosomal protein L30	2.98
+	rplO1	50S ribosomal protein L15	3.00
+	adk1	adenylate kinase	2.25
+	RHA1_ro06155	methionyl aminopeptidase	2.53
-	RHA1_ro06156	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase	3.47
+	infA	translation initiation factor IF1	2.63
+	rpmJ	50S ribosomal protein L36	3.48
+	rpsM	30S ribosomal protein S13	3.76

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
+	rpsK	30S ribosomal protein S11	3.23
+	rpsD	30S ribosomal protein S4	2.92
+	rpoA	DNA-directed RNA polymerase alpha subunit	2.57
+	rplQ	50S ribosomal protein L17	3.48
+	RHA1_ro06164	pseudouridylate synthase	2.36
+	rplM	50S ribosomal protein L13	2.86
+	rpsI	30S ribosomal protein S9	2.83
+	RHA1_ro06172	possible 30S ribosomal subunit	2.49
+	RHA1_ro06175	conserved hypothetical protein	2.99
+	RHA1_ro06189	10 kDa chaperonin	3.50
+	RHA1_ro06190	chaperone protein	3.88
+	RHA1_ro06212	conserved hypothetical protein	2.21
+	RHA1_ro06223	probable ABC iron transporter, substrate-binding component	14.97
+	RHA1_ro06224	ABC iron transporter, permease component	11.69
+	RHA1_ro06225	ABC Fe(3+)-transporter, ATP-binding component	10.50
+	RHA1_ro06226	conserved hypothetical protein	6.34
+	dnaE2	DNA-directed DNA polymerase alpha subunit (DNA polymerase III alpha subunit)	3.51
+	RHA1_ro06238	isocitrate dehydrogenase (NADP+)	3.23
+	rplV	50S ribosomal protein L22	2.05
+	rpsC	30S ribosomal protein S3	2.26
+	rplP	50S ribosomal protein L16	2.31
+	rpmC	50S ribosomal protein L29	2.33
+	rpsQ	30S ribosomal protein S17	2.14
+	rplN	50S ribosomal protein L14	2.81
+	rplX	50S ribosomal protein L24	2.87
+	rplE	50S ribosomal protein L5	2.44

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
+	rpsN2	30S ribosomal protein S14	2.36
+	rpsH	30S ribosomal protein S8	2.71
+	rplF	50S ribosomal protein L6	3.18
+	rplR	50S ribosomal protein L18	3.09
+	rpsE	30S ribosomal protein S5	3.29
+	rpmD	50S ribosomal protein L30	2.98
+	rplO1	50S ribosomal protein L15	3.00
+	adk1	adenylate kinase	2.25
+	RHA1_ro06155	methionyl aminopeptidase	2.53
-	RHA1_ro06156	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase	3.47
+	infA	translation initiation factor IF1	2.63
+	rpmJ	50S ribosomal protein L36	3.48
+	rpsM	30S ribosomal protein S13	3.76
+	rpsK	30S ribosomal protein S11	3.23
+	rpsD	30S ribosomal protein S4	2.92
+	rpoA	DNA-directed RNA polymerase alpha subunit	2.57
+	rplQ	50S ribosomal protein L17	3.48
+	RHA1_ro06164	pseudouridylate synthase	2.36
+	rplM	50S ribosomal protein L13	2.86
+	rpsI	30S ribosomal protein S9	2.83
+	RHA1_ro06172	possible 30S ribosomal subunit	2.49
+	RHA1_ro06175	conserved hypothetical protein	2.99
+	RHA1_ro06189	10 kDa chaperonin	3.50
+	RHA1_ro06190	chaperone protein	3.88
+	RHA1_ro06212	conserved hypothetical protein	2.21
+	RHA1_ro06223	probable ABC iron transporter, substrate-binding component	14.97
+	RHA1_ro06224	ABC iron transporter, permease component	11.69

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
+	RHA1_ro06225	ABC Fe(3+)-transporter, ATP-binding component	10.50
+	RHA1_ro06226	conserved hypothetical protein	6.34
+	dnaE2	DNA-directed DNA polymerase alpha subunit (DNA polymerase III alpha subunit)	3.51
+	RHA1_ro06238	isocitrate dehydrogenase (NADP+)	3.23
+	rpoA	DNA-directed RNA polymerase alpha subunit	2.57
+	rplQ	50S ribosomal protein L17	3.48
+	RHA1_ro06164	pseudouridylate synthase	2.36
+	rplM	50S ribosomal protein L13	2.86
+	rpsI	30S ribosomal protein S9	2.83
+	RHA1_ro06172	possible 30S ribosomal subunit	2.49
+	RHA1_ro06175	conserved hypothetical protein	2.99
+	RHA1_ro06189	10 kDa chaperonin	3.50
+	RHA1_ro06190	chaperone protein	3.88
+	RHA1_ro06212	conserved hypothetical protein	2.21
+	RHA1_ro06223	probable ABC iron transporter, substrate-binding component	14.97
+	RHA1_ro06224	ABC iron transporter, permease component	11.69
+	RHA1_ro06225	ABC Fe(3+)-transporter, ATP-binding component	10.50
+	RHA1_ro06226	conserved hypothetical protein	6.34
+	dnaE2	DNA-directed DNA polymerase alpha subunit (DNA polymerase III alpha subunit)	3.51
+	RHA1_ro06238	isocitrate dehydrogenase (NADP+)	3.23
+	RHA1_ro06289	probable multidrug efflux transport protein	2.10
+	purK	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit	2.11

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
+	purE	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit	2.14
-	RHA1_ro06355	conserved hypothetical protein	2.02
-	RHA1_ro06391	conserved hypothetical protein	2.55
+	RHA1_ro06410	conserved hypothetical protein	2.73
+	RHA1_ro06424	reductase	2.51
-	RHA1_ro06425	ATP-dependent RNA helicase	2.81
+	RHA1_ro06448	conserved hypothetical protein	2.12
-	RHA1_ro06475	conserved hypothetical protein	2.66
-	RHA1_ro06483	cationic amino acid transport protein	3.05
-	RHA1_ro06491	transporter, MFS superfamily protein	5.17
-	RHA1_ro06497	conserved hypothetical protein	5.22
-	RHA1_ro06498	transcriptional regulator	7.24
+	leuC2	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	8.12
+	leuD2	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	7.73
-	RHA1_ro06508	conserved hypothetical protein	2.01
+	thiL	thiamine-phosphate kinase	2.06
-	rpmB2	50S ribosomal protein L28	2.38
+	RHA1_ro06522	ribonuclease III	2.25
+	RHA1_ro06523	DNA-formamidopyrimidine glycosylase	3.12
+	rpsP	30S ribosomal protein S16	2.74
+	RHA1_ro06536	conserved hypothetical protein	3.26
+	RHA1_ro06537	16S rRNA processing protein	3.79
+	trmD	tRNA (guanine-N(1)-)-methyltransferase	5.27
+	rplS	50S ribosomal protein L19	2.39
+	RHA1_ro06565	conserved hypothetical protein	2.41
+	rpsB	30S ribosomal protein S2	2.25
+	RHA1_ro06598	probable acetate--CoA ligase	2.16
+	RHA1_ro06614	magnesium chelatase	2.12

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
+	RHA1_ro06615	cob(I)yrinic acid a,c-diamide adenosyl-transferase	2.93
+	cobB	cobyrinic acid a,c-diamide synthase	3.55
-	RHA1_ro06622	sensory histidine kinase	2.03
-	RHA1_ro06639	conserved hypothetical protein	2.05
-	RHA1_ro06640	conserved hypothetical protein	2.16
+	RHA1_ro06645	conserved hypothetical protein	2.16
+	RHA1_ro06648	probable DNA-damage-inducible protein F (probable multi antimicrobial extrusion protein MatE)	2.29
+	RHA1_ro06651	pseudouridylate synthase	2.02
+	RHA1_ro06779	conserved hypothetical protein	2.96
-	trnC_2	tRNA-Cys	2.01
+	RHA1_ro06876	conserved hypothetical protein	3.09
-	RHA1_ro06889	conserved hypothetical protein	2.23
+	ruvC	crossover junction endonuclease	2.46
+	RHA1_ro07060	conserved hypothetical protein	2.21
-	RHA1_ro07071	probable enoyl-CoA hydratase	2.47
-	RHA1_ro07072	probable enoyl-CoA hydratase	3.23
-	RHA1_ro07073	acyl-CoA dehydrogenase	8.32
-	RHA1_ro07076	probable formyl-CoA transferase	3.83
+	RHA1_ro07088	multidrug resistance transporter, MFS superfamily protein	3.28
+	RHA1_ro07139	conserved hypothetical protein	2.53
+	RHA1_ro07159	probable primosomal protein N	2.47
-	RHA1_ro07193	ABC drug resistance transporter, ATP-binding component	2.13
-	RHA1_ro07221	possible aminotransferase, C-terminal	2.97
-	iunH	purine nucleosidase	2.59
-	RHA1_ro07237	possible redox protein	2.10
-	RHA1_ro07247	possible ATP-dependent RNA helicase	3.21

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
-	RHA1_ro07262	conserved hypothetical protein	3.05
-	RHA1_ro07263	possible branched-chain amino acid transporter	3.05
-	ndh2	NADH dehydrogenase	2.22
-	RHA1_ro08002	conserved hypothetical protein	2.67
+	RHA1_ro08007	conserved hypothetical protein	3.69
+	RHA1_ro08008	possible tetracycline resistance protein	2.87
-	RHA1_ro08014	conserved hypothetical protein	4.63
-	RHA1_ro08015	conserved hypothetical protein	5.93
-	RHA1_ro08016	conserved hypothetical protein	8.10
-	RHA1_ro08026	RNA-directed DNA polymerase (reverse transcriptase)	2.59
-	RHA1_ro08032	conserved hypothetical protein	4.12
-	RHA1_ro08116	conserved hypothetical protein	2.87
+	RHA1_ro08118	possible beta-lactamase	3.27
+	RHA1_ro08198	conserved hypothetical protein	2.94
+	RHA1_ro08199	conserved hypothetical protein	2.51
-	RHA1_ro08406	possible N-formylglutamate aminohydrolase	2.00
-	RHA1_ro08421	probable secretory lipase	2.15
+	RHA1_ro08478	probable transcriptional regulator, lclR family protein	2.54
+	sfuA2	ABC Fe(3+) transporter, substrate binding protein SfuA	2.18
+	sfuC2	Fe(3+)-transporting ATPase protein SfuC	2.12
+	RHA1_ro08546	methyltransferase	2.75
-	RHA1_ro08681	conserved hypothetical protein	2.95
+	RHA1_ro08760	conserved hypothetical protein	3.07
-	RHA1_ro08767	conserved hypothetical protein	2.13
-	RHA1_ro08768	hypothetical protein	3.93
-	RHA1_ro08769	hypothetical protein	5.16

表 3-1-2-6 *R. jostii* の光誘導性遺伝子群 (続き)

Direction	gene	Definition	Fold change (Light/Dark)
-	RHA1_ro08859	hypothetical protein	2.08
-	RHA1_ro09033	hypothetical protein	2.15
+	RHA1_ro09095	conserved hypothetical protein	2.45
+	RHA1_ro09106	conserved hypothetical protein	2.20
+	RHA1_ro09130	conserved hypothetical protein	2.47
-	RHA1_ro10005	conserved hypothetical protein	2.17
-	RHA1_ro10030	hypothetical protein	2.32
-	RHA1_ro10109	conserved hypothetical protein	3.10
+	RHA1_ro10139	possible ketosteroid isomerase-related protein	2.06
-	RHA1_ro10234	conserved hypothetical protein	3.63
+	RHA1_ro10282	hypothetical protein	2.28
+	RHA1_ro10380	conserved hypothetical protein	2.79
-	RHA1_ro11050	conserved hypothetical protein	2.43
-	RHA1_ro11057	conserved hypothetical protein	2.02
+	RHA1_ro11071	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	2.45
-	RHA1_ro11075	conserved hypothetical protein	2.36
-	RHA1_ro11085	hypothetical protein	2.15
-	RHA1_ro11253	conserved hypothetical protein	2.12
-	RHA1_ro11255	conserved hypothetical protein	2.16

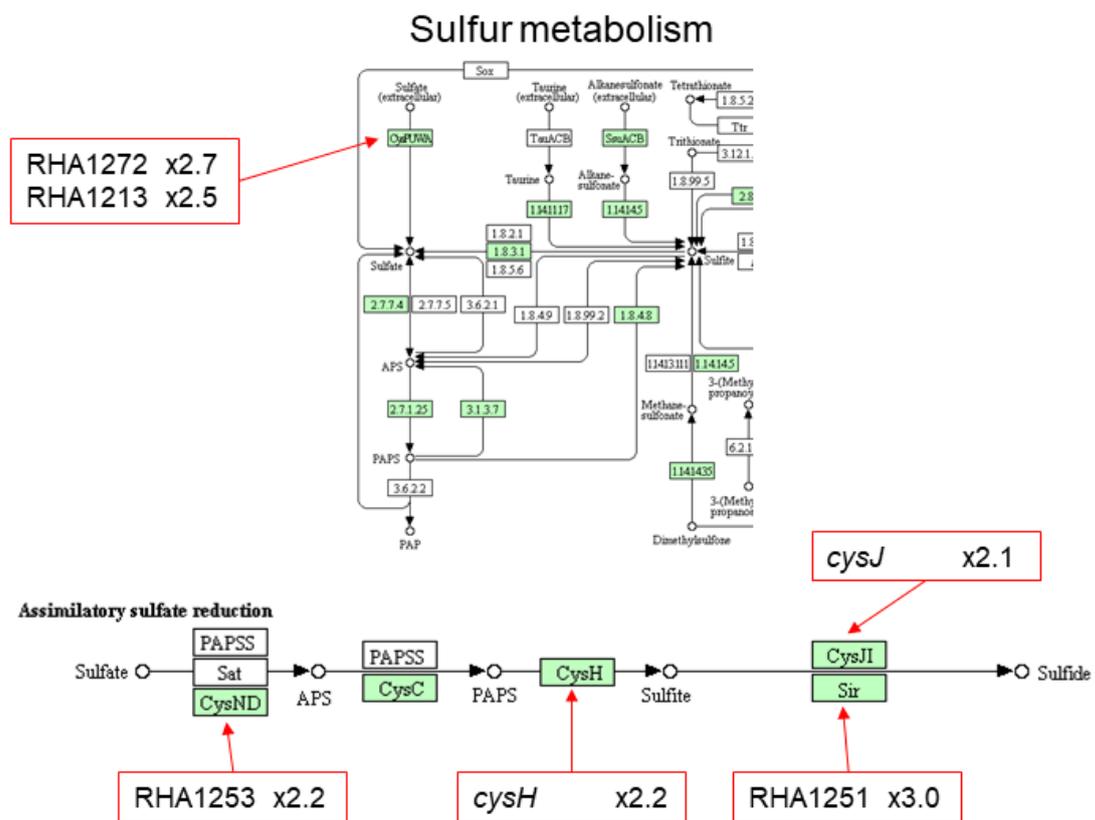


図 3-1-2-3 *R. jostii* の硫黄代謝関連遺伝子

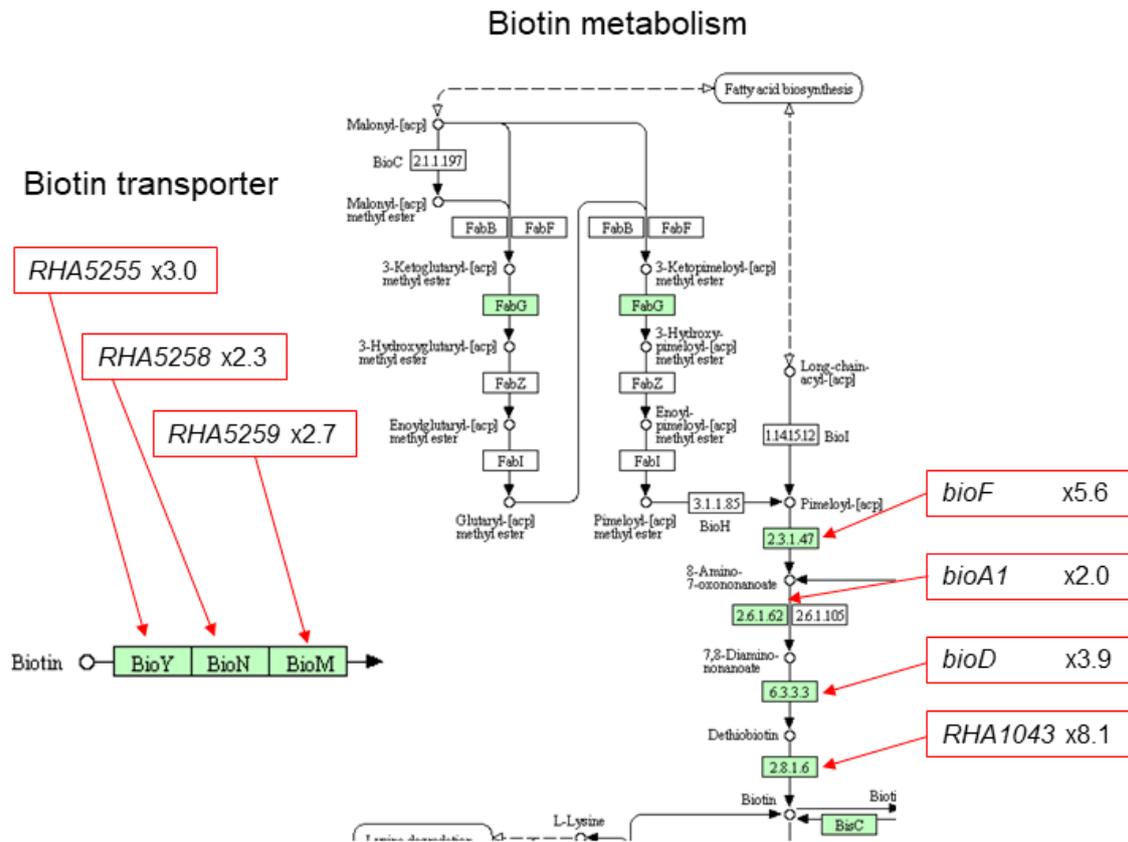


図 3-1-2-4 *R. jostii* のビオチン代謝関連遺伝子

## Cobalamin biosynthesis

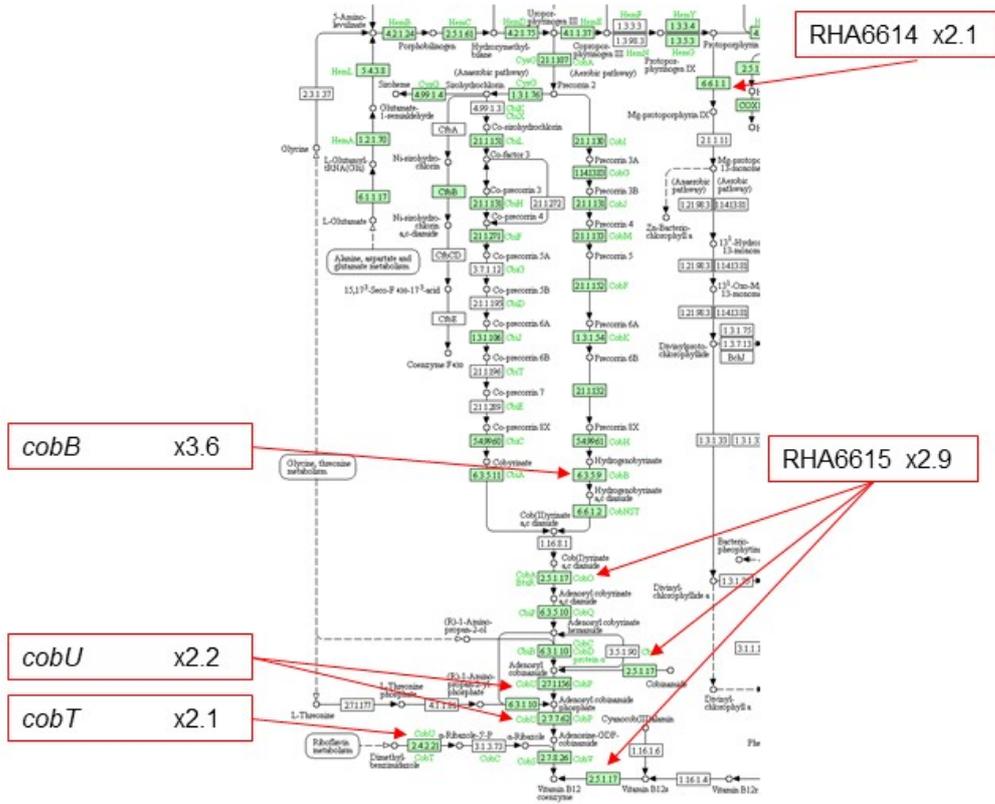


図 3-1-2-5 *R. jostii* のビタミン B<sub>12</sub> 合成関連遺伝子

## Folate biosynthesis

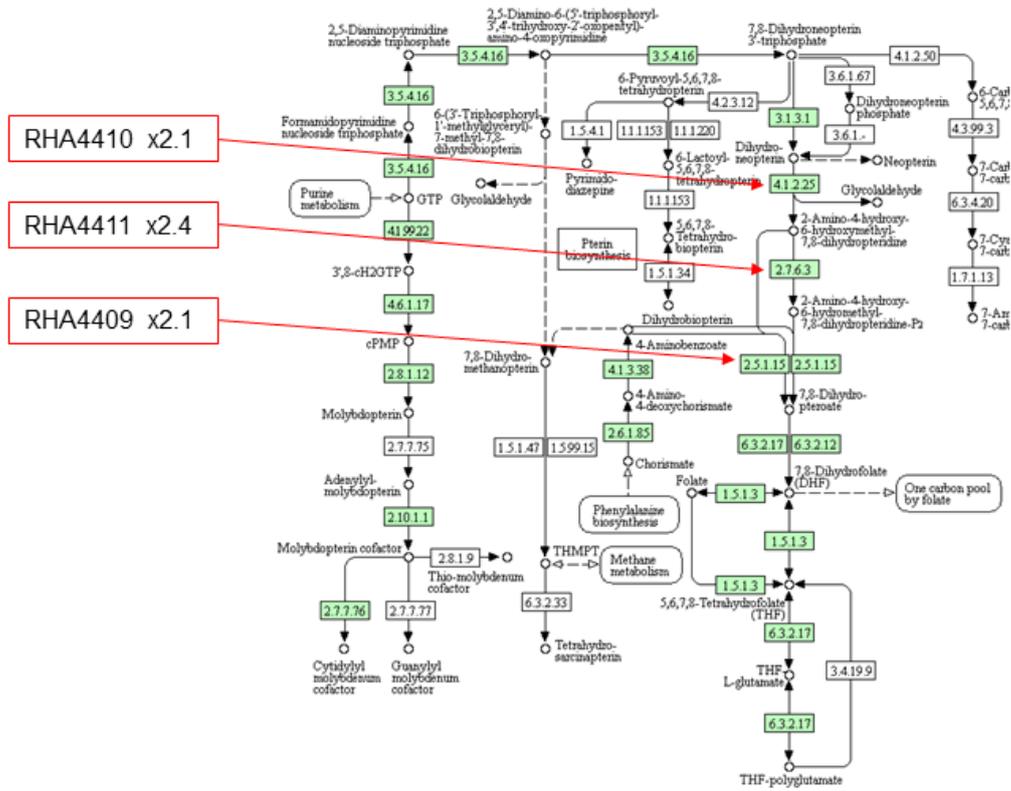


図 3-1-2-6 *R. jostii* の葉酸合成関連遺伝子

## Thiamine metabolism

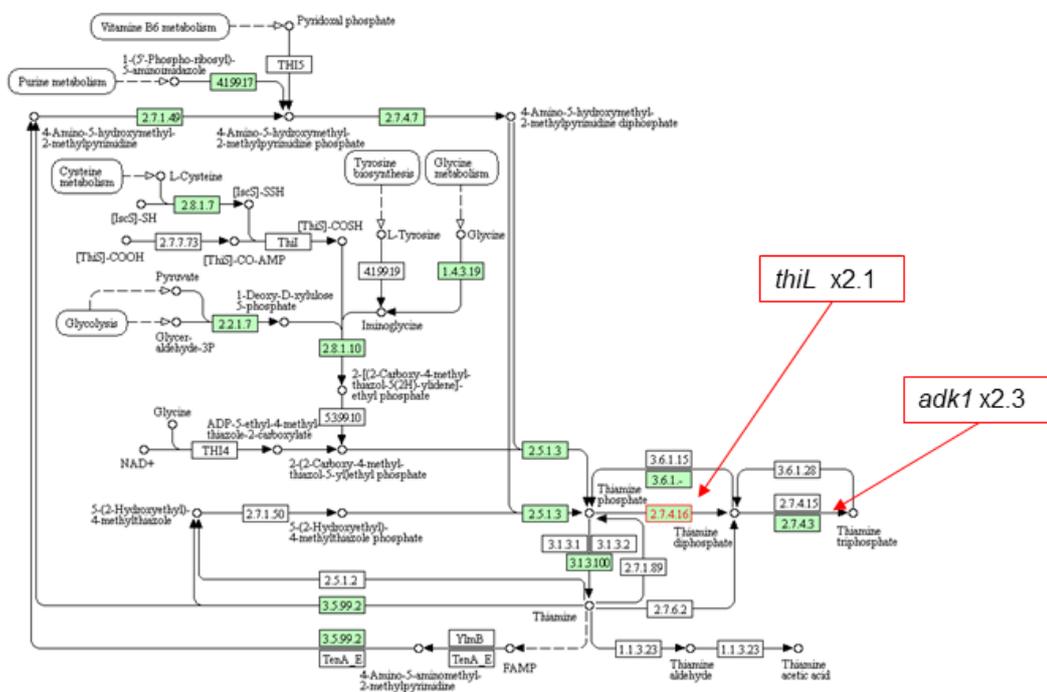


図 3-1-2-7 *R. jostii* のチアミン合成関連遺伝子

## Pantothenate and CoA biosynthesis

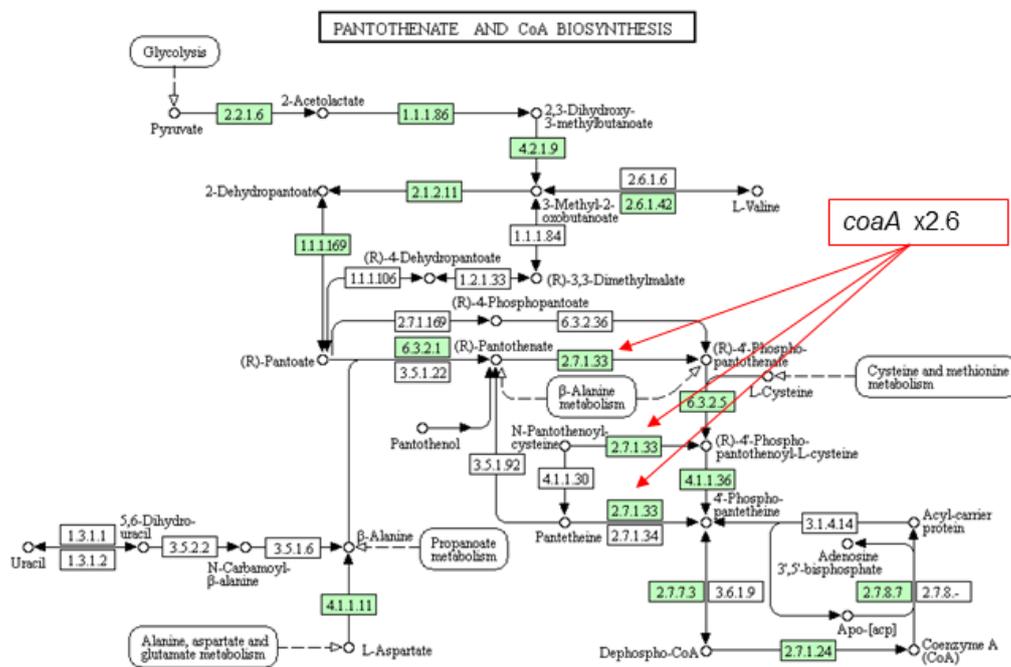


図 3-1-2-8 *R. jostii* のパントテン酸と CoA 関連遺伝子

# Glycolysis

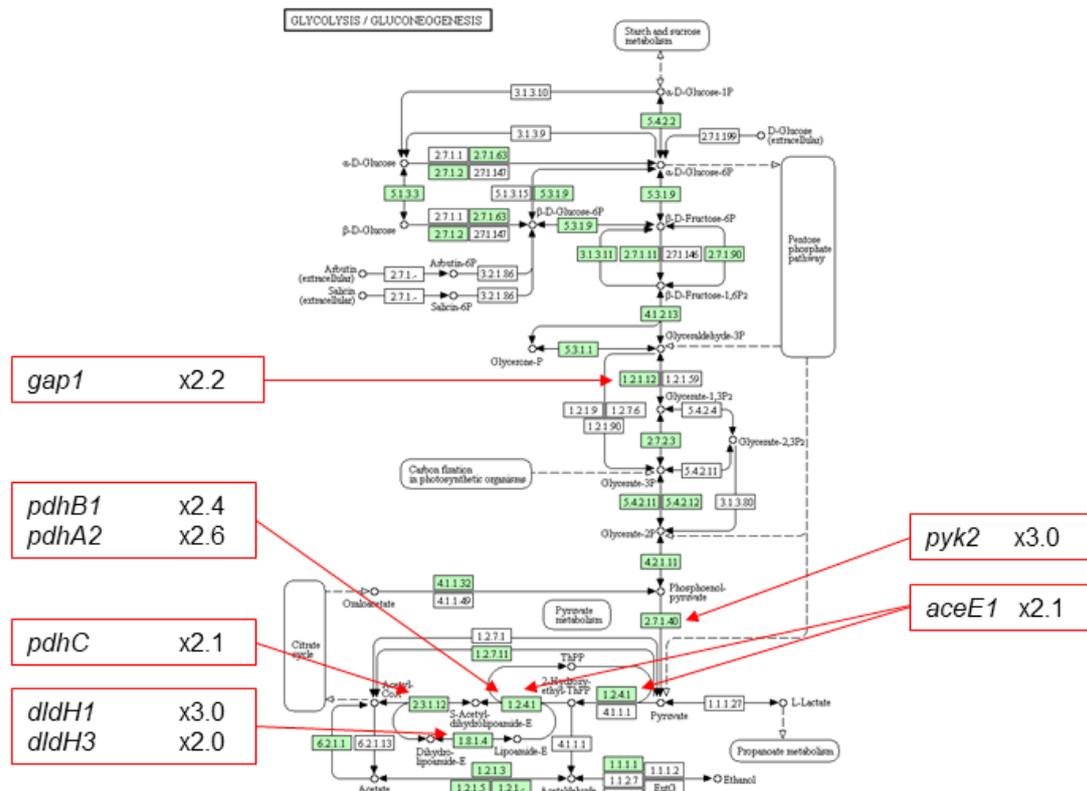


図 3-1-2-9 *R. jostii* の解糖系関連遺伝子

## Biosynthesis of Amino Acid

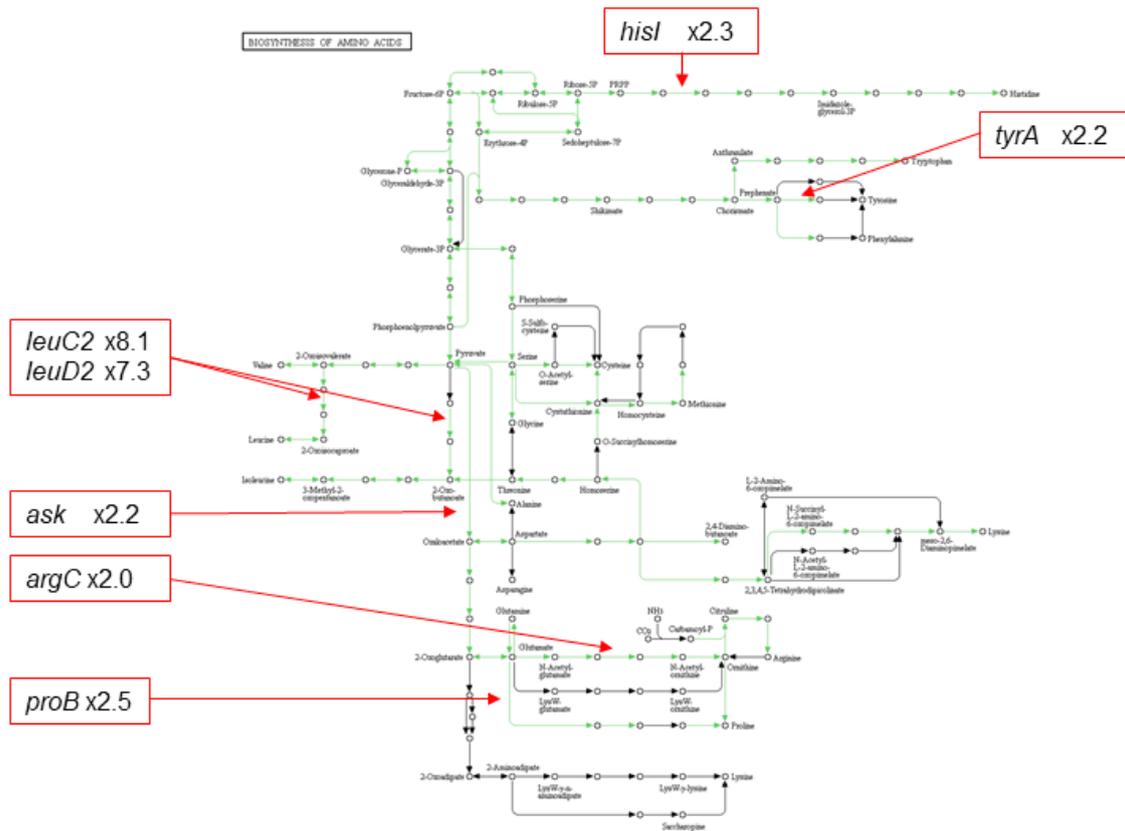


図 3-1-2-10 *R. jostii* のアミノ酸代謝関連遺伝子

# Purine metabolism

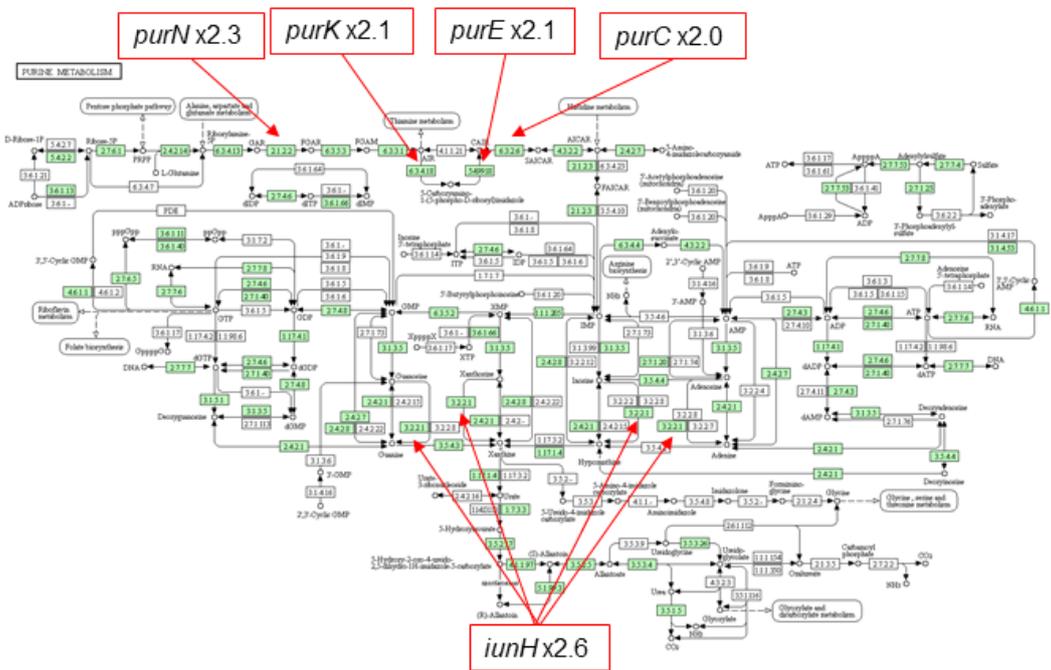


図 3-1-2-11 *R. jostii* のプリン代謝関連遺伝子

### 第3項 小括

LitR ファミリーの分子系統解析を行ったところ、少なくとも 5 つのクラスに分類されることが推測された。そのうちの、クラス III~V とクラス分けがされていないクレードの LitR は新しい光センサーであることが予想される。また、その分岐が属レベルに従っていることから、LitR の多様性は細菌種の進化とその生息環境に適応していることが考えられた。また、TetR や LimR の分類も同様の理由であることが考えられる。

RNA seq による計 7 種のトランスクリプトーム解析によって、新規な光応答メカニズムの存在を示唆する結果が得られた。それらの光感知機構は細菌種で異なることが考えられ、光誘導性遺伝子には共通性と多様性が存在することが考えられた。これらの光感知機構と多くの光誘導性遺伝子の役割は明らかではないが、新規な光応答メカニズムであることが予想された。

## 第2節 クラス III LitR における光誘導性遺伝子の役割の検証

### 第1項 光誘導性遺伝子の転写解析

#### 目的

LitR の分子系統解析や新規な光応答メカニズムを有すると予想した細菌群のトランスクリプトーム解析などの結果から、*B. multivorans* が保有するクラス III LitR を詳細な解析対象として選定した。本菌を用いた DNA マイクロアレイ解析によって、*litR* とその周辺遺伝子を含む 19 遺伝子が青色光照射によって転写誘導されることがわかった（第 1 章第 4 節）。それらの遺伝子群には、MerR 型転写調節蛋白質をコードする *litR* と ECF 型シグマ因子をコードする *litS* が含まれることから、その両者によって光誘導的な転写調節が行われていると予想した。そこで、それらの遺伝子の破壊株および遺伝的相補株を用いた定量 RT-PCR による転写解析を行うことで、2 つの転写調節蛋白質の役割とその転写調節メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 結果

*B. multivorans* の光誘導性遺伝子の転写量を定量 RT-PCR で測定し、その転写量について暗条件下を 1 とした場合の青色光照射下における倍率変化を  $\Delta\Delta C_T$  法によって算出した。 $\Delta\Delta C_T$  法による解析を行うにあたり、解析対象用のプライマーと内在性コントロール用のプライマーのそれぞれについて PCR 効率を確認し、適切であることを確認した (表 3-2-1-1)。本解析には、13 の光誘導性遺伝子 (*BM5674*, *phrB2*, *BM5677*, *litR*, *cryB*, *BM5680*, *BM5681*, *BM5682*, *litS*, *foIE2*, *BM5689*, *BM5694*, *cfaB2*) と生育に必須なシグマ因子 *rpoD* を対象とした。その際、内在性コントロールとして使用した *dnaA* の転写レベルを補正して倍率変化を算出した。

各株における *rpoD* の転写倍率は、0.7~1.9 倍を示し、光照射によって大きな影響を受けないことがわかった。野生株における光誘導性遺伝子の転写レベルは、培養 14 時間目で 2.0 から 26.7 倍、培養 21 時間目で 1.5 から 23.3 倍に光照射によって上昇した (図 3-2-1-1 および 3-2-1-2)。次に、*litR* 破壊株の転写レベルを解析したところ、0.7 から 1.6 倍の転写倍率を示した。また、*litR* 破壊株の転写レベルを野生株のそれと比較したところ、明暗両条件下で顕著に高い値が認められた (図 3-2-1-3 および 3-2-1-4)。一方、*litR* 破壊株の

遺伝的相補株では、野生株と同様に光誘導性遺伝子の光による転写誘導が確認された（図 3-2-1-1 および 3-2-1-2）。これらのことから、LitR が転写抑制能を持ち、それが光依存的に解除されることが推測された。

光誘導性遺伝子の転写が ECF 型シグマ因子をコードする *litS* によって調節されると予想し、その破壊株で転写解析を行った。8 個の光誘導性遺伝子の転写は *litS* の破壊によって影響を受けなかった一方、*BM5677* と *phrB2*、*cryB*、*BM5694*、*cfaB2* の転写レベルは低下していた（図 3-2-1-5 から 3-2-1-8 まで）。*litS* 破壊株の遺伝的相補株では、それら遺伝子に部分的な転写の光誘導が認められた。これらのことから、 $\sigma^{\text{LitS}}$  は一部の光誘導性遺伝子の転写開始を担うことが示唆された。

次に、光照射 ( $\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$ ) から光誘導性遺伝子の転写が開始されるまでの時間を半定量 RT-PCR によって調査した。*litR* と *foIE2* と *BM5689* は 5 分で転写が増大し、*litS* は 10 分で、*phrB2* と *cfaB2* は 20 分で転写が増加した（図 3-2-1-9）。これらのことから、 $\sigma^{\text{RpoD}}$  依存性遺伝子の転写は 5~10 分の間に、 $\sigma^{\text{LitS}}$  依存性遺伝子の転写は 20 分で上昇することがわかった。

光誘導性遺伝子である *phrB* と *foIE*、*cfaB* はそれぞれのパラログ (*phrB1* と *B2*, *cryB* ; *foIE1* と *E2* ; *cfaA* と *B1*, *B2*) が *B. multivorans* のゲノム中に

存在する。このことから、構成型と光誘導型の 2 つが共存していると考えられた。そこで、それらの転写レベルを *B. multivorans* 野生株を用いて半定量 RT-PCR で解析した。構成的な遺伝子発現を示したものは、*phrB1*、*folE1*、*cfaA* であった (図 3-2-1-10)。

## 考察

### (1) 光誘導性遺伝子

DNA マイクアレイ解析で特定された *B. multivorans* の光誘導性遺伝子群 (*BM5674* ~ *5682*, *BM5687* (*litS*) ~ *BM5697*) の遺伝子発現は、定量 RT-PCR による転写解析でも、その光による誘導が確認された。*B. multivorans* では、光回復酵素をコードする *phrB2* や葉酸合成酵素コードする *folE2*、シクロプロパン環脂肪酸合成酵素コードする *cfaB* が光による転写誘導を受けた。クラス Ia LitR では Crt 合成遺伝子を主に制御することから<sup>6-9</sup>、クラス Ia とクラス III ではレギュロンの構成が異なることがわかった。

*folE* と *cfaB* は好塩性細菌 *Halomonas* sp. HL42 の PhrR (クラス Ib) によって光依存的な転写調節を受けることが報告されている<sup>38</sup>。また、両遺伝子は *Caulobacter crescentus* では酸化ストレス応答型センサー ChrR-RpoE によって、放線菌 *Streptomyces coelicolor* では RsrA-SigK によってそれぞれ制御されることから<sup>45,48</sup>、*folE* と *cfaB* は光酸化ストレスに対する防御的な役割を持つことが考えられる。

## (2) LitR と $\sigma^{LitS}$ の役割

*litR* の破壊によって光誘導性遺伝子群は構成的な遺伝子発現を示したことから、暗条件下で LitR は光誘導性遺伝子群に対して転写リプレッサーとして働き、光照射によってその機能が弱くなることが推測された。*T. themophilus* や *B. megaterium* のクラス I LitR では、その破壊によって暗条件下での高いレベルの Crt 生産とその合成遺伝子の構成的な転写を引き起こすことが明らかになっていることから<sup>7,8</sup>、クラス III LitR も同様な光センサー型転写リプレッサー蛋白質であることが示唆された。一方、*litS* の破壊は *litR* や *foIE2* などの転写には影響しなかったが、*phrB2* や *cfaB2* などの転写レベルは野生株よりも低下した。このことから、 $\sigma^{LitS}$  は一部の光誘導性遺伝子の転写開始を担うことが考えられた。これらのことから、*B. multivorans* の光依存的な転写は、LitR と  $\sigma^{LitS}$  の 2 つの転写調節因子によって制御されると推測された。

表 3-2-1-1  $\Delta\Delta Ct$  法に使用するプライマーの効率の確認

標的遺伝子	対数初期濃度と $\Delta Ct$ 値の グラフにおける近似曲線の数式
<i>BM5674</i>	$y = 0.0456x + 1.8757$
<i>phrB2</i>	$y = 0.0939x - 2.0918$
<i>BM5677</i>	$y = 0.0903x - 1.5374$
<i>litR</i>	$y = -0.0272x - 2.7061$
<i>cryB</i>	$y = -0.049x + 2.4$
<i>BM5680</i>	$y = -0.0172x - 0.9381$
<i>BM5681</i>	$y = 0.0547x - 3.6726$
<i>BM5682</i>	$y = -0.4156x + 3.0723$
<i>litS</i>	$y = -0.0461x - 2.5794$
<i>foIE2</i>	$y = 0.0019x - 4.9694$
<i>BM5689</i>	$y = 0.0456x + 1.8757$
<i>BM5694</i>	$y = 0.0362x - 1.5553$
<i>cfaB2</i>	$y = -0.0145x - 3.9806$
<i>rpoD</i>	$y = -0.092x - 1.6865$

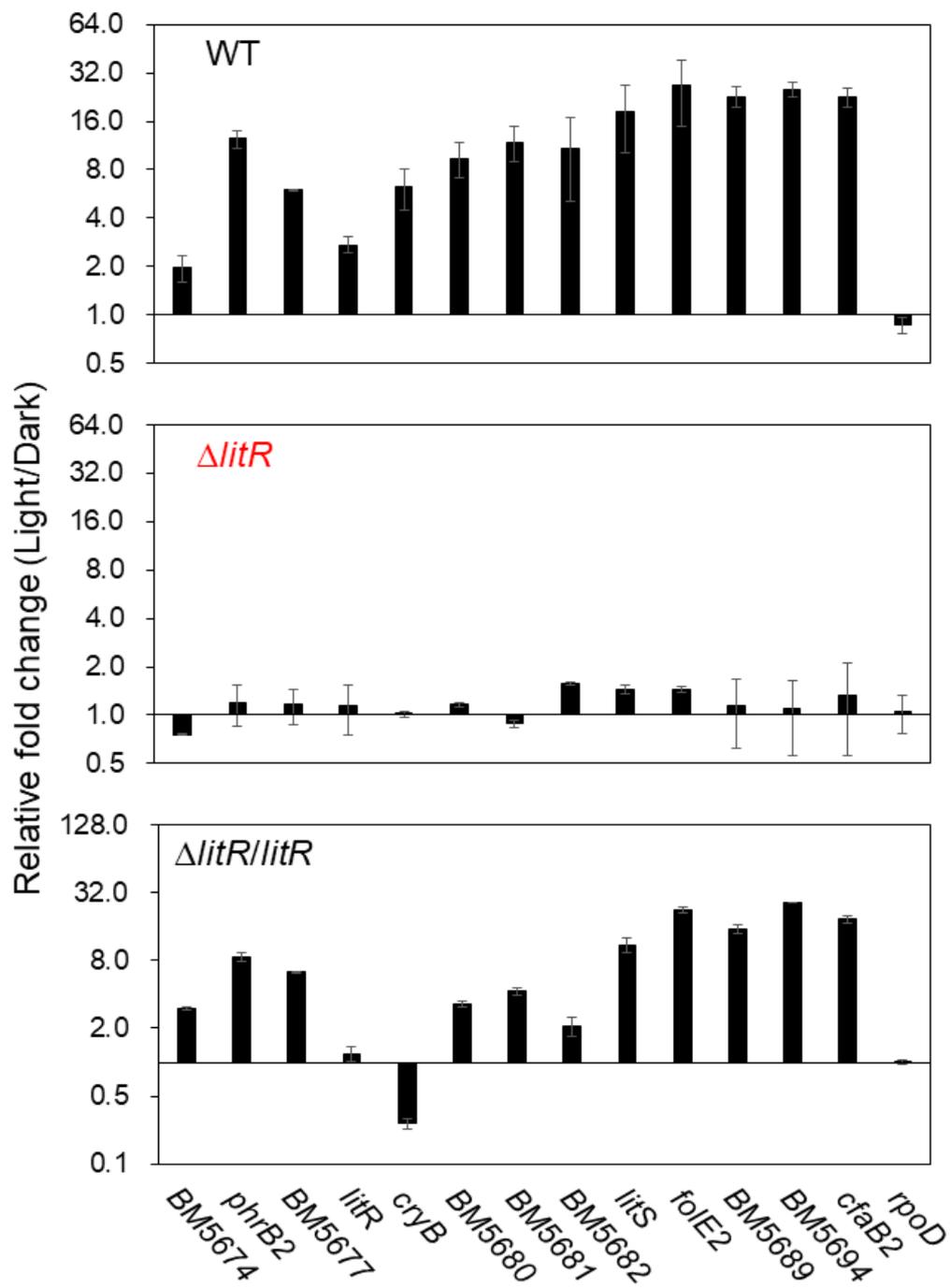


図 3-2-1-1 培養 14 時間目における *litR* 破壊株の転写倍率 (定量 RT-PCR 法)

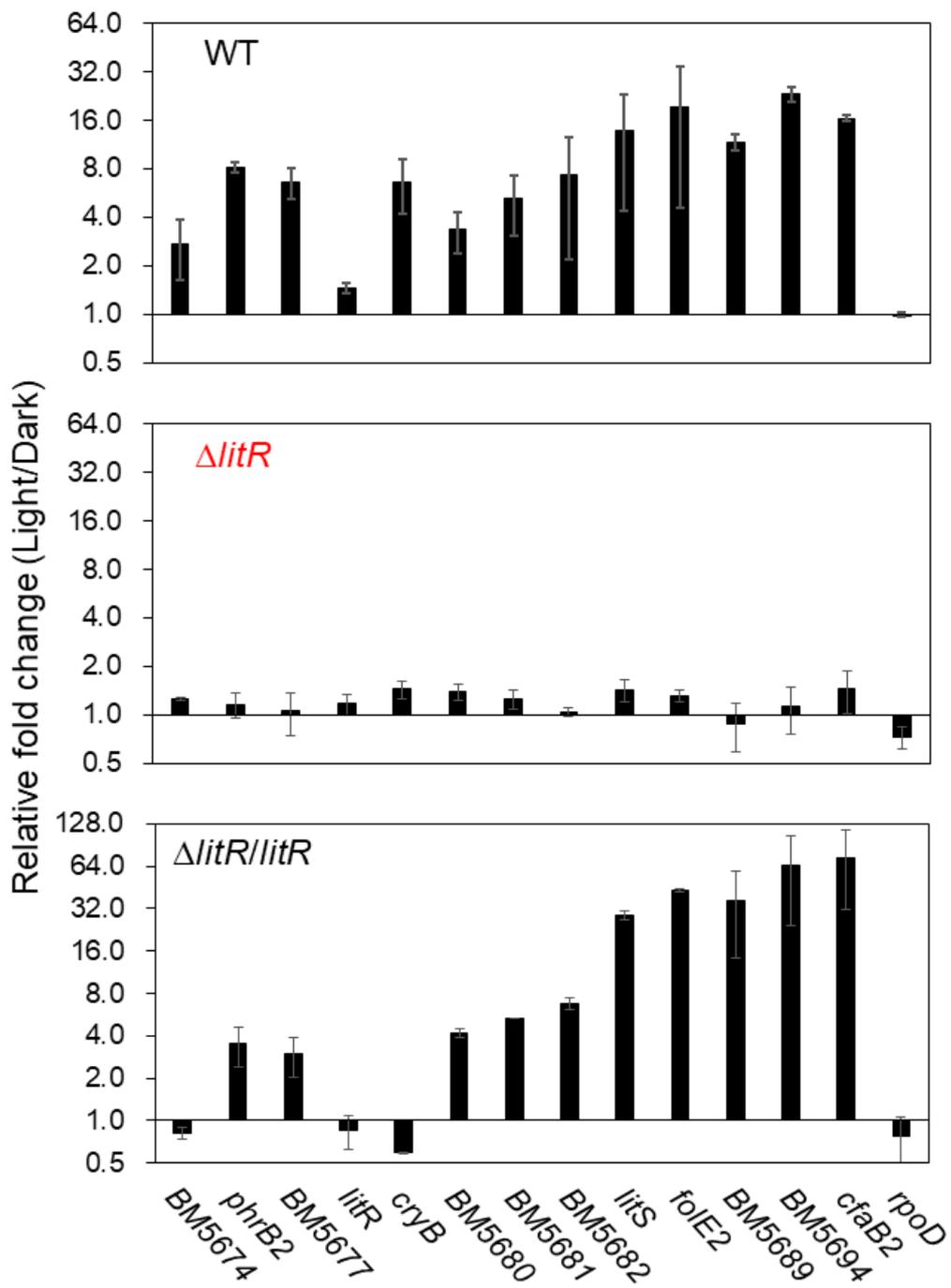


図 3-2-1-2 培養 21 時間目における *litR* 破壊株の転写倍率 (定量 RT-PCR 法)

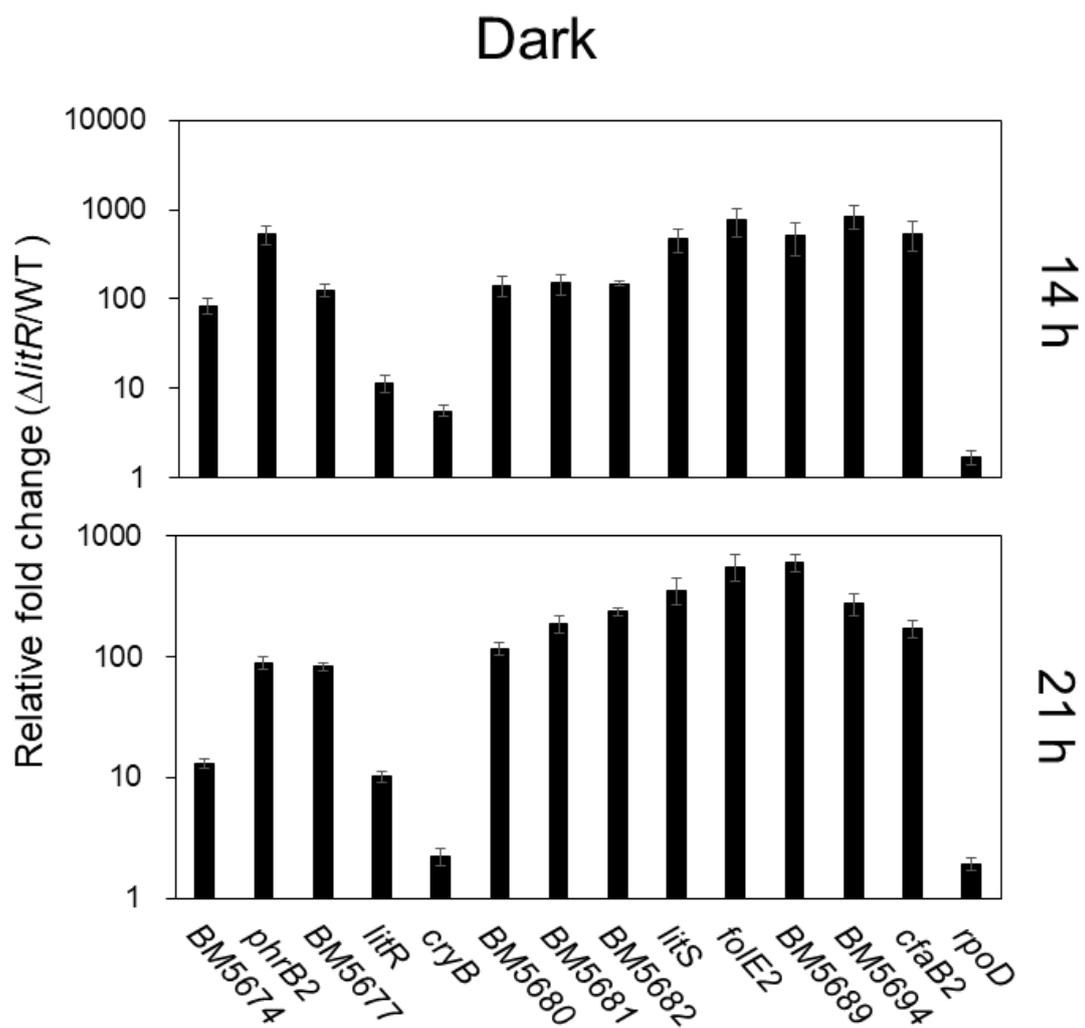


図 3-2-1-3 *litR* の破壊による暗条件下での転写上昇  
(定量 RT-PCR 法)

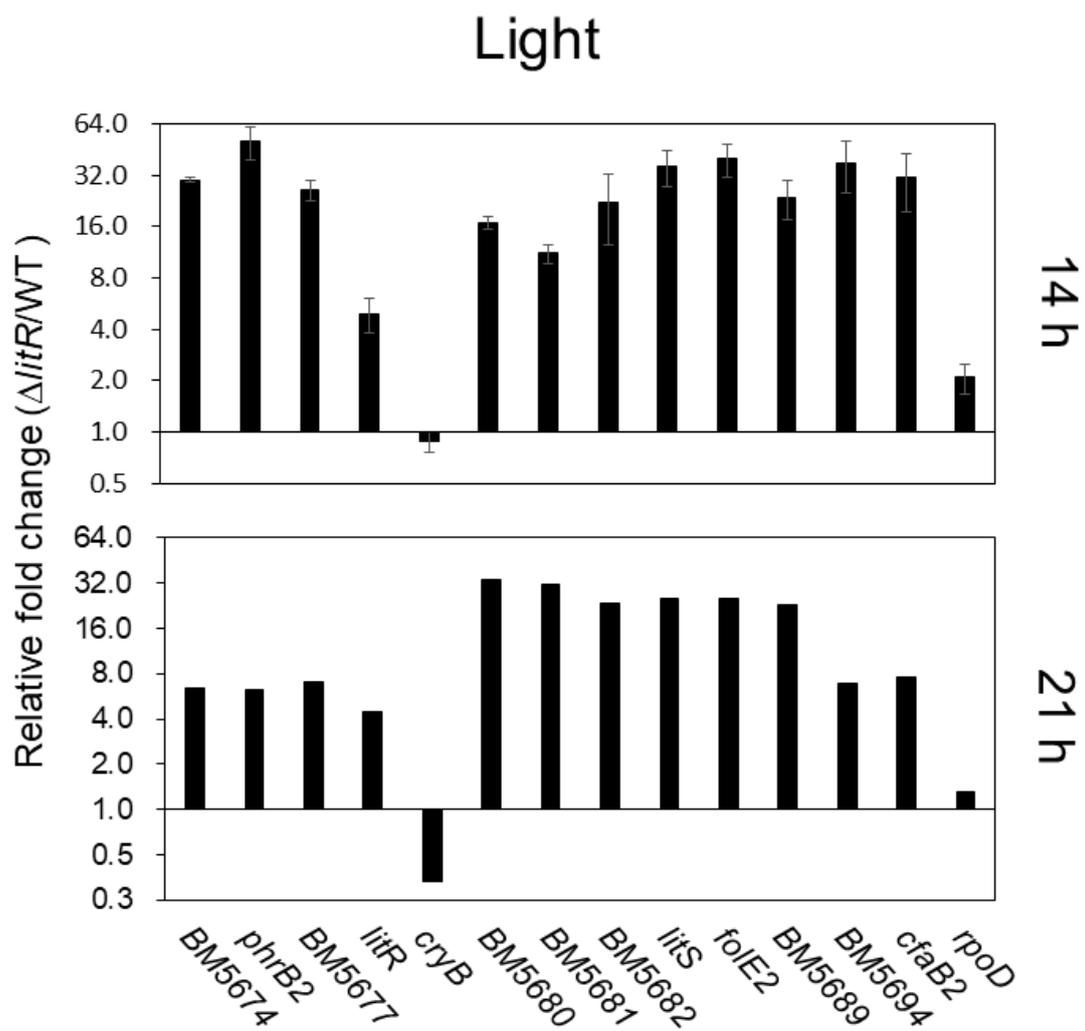


図 3-2-1-4 *litR* の破壊による明条件下での転写上昇 (定量 RT-PCR 法)

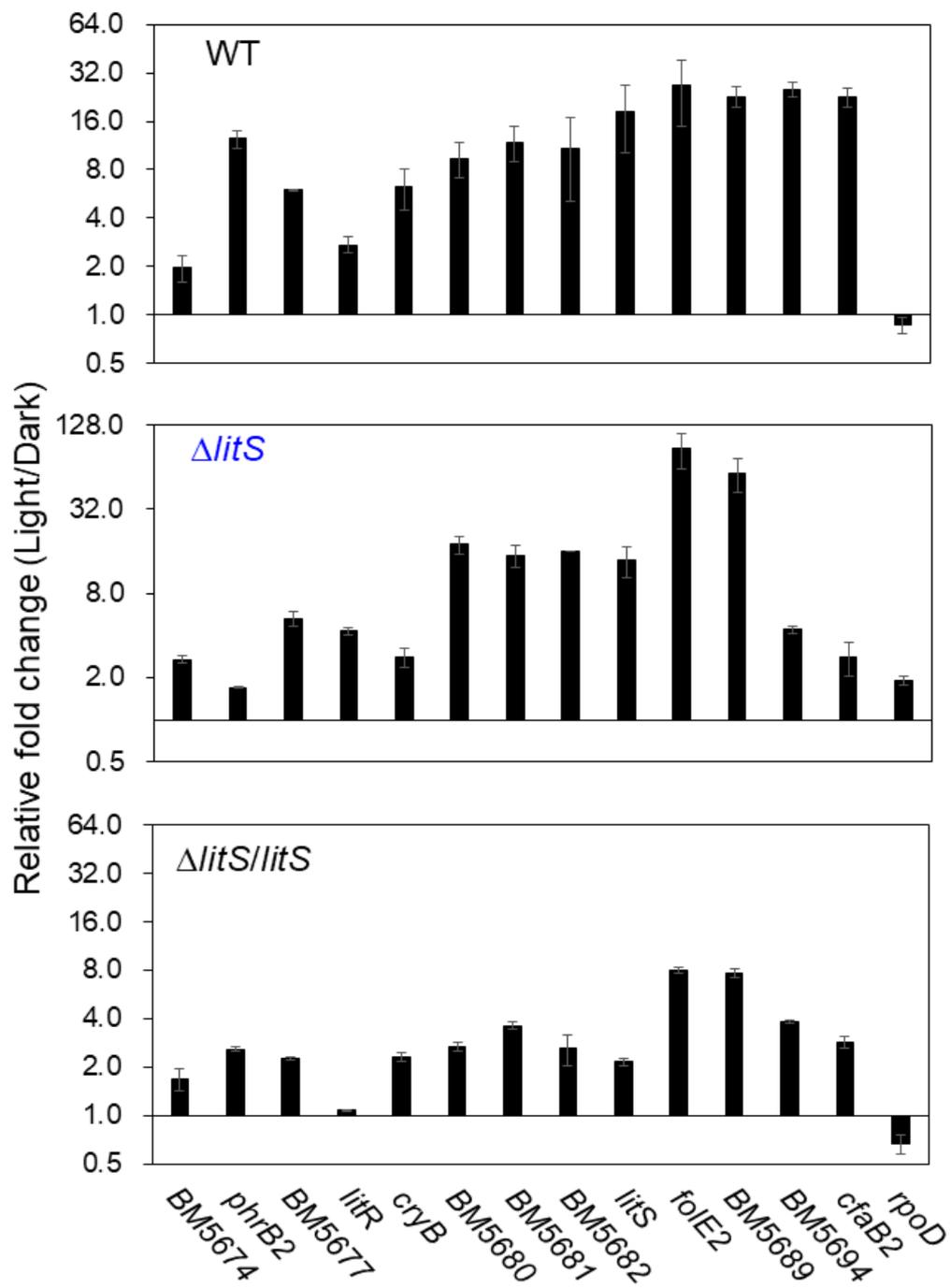


図 3-2-1-5 培養 14 時間目における *litS* 破壊株の転写倍率 (定量 RT-PCR 法)

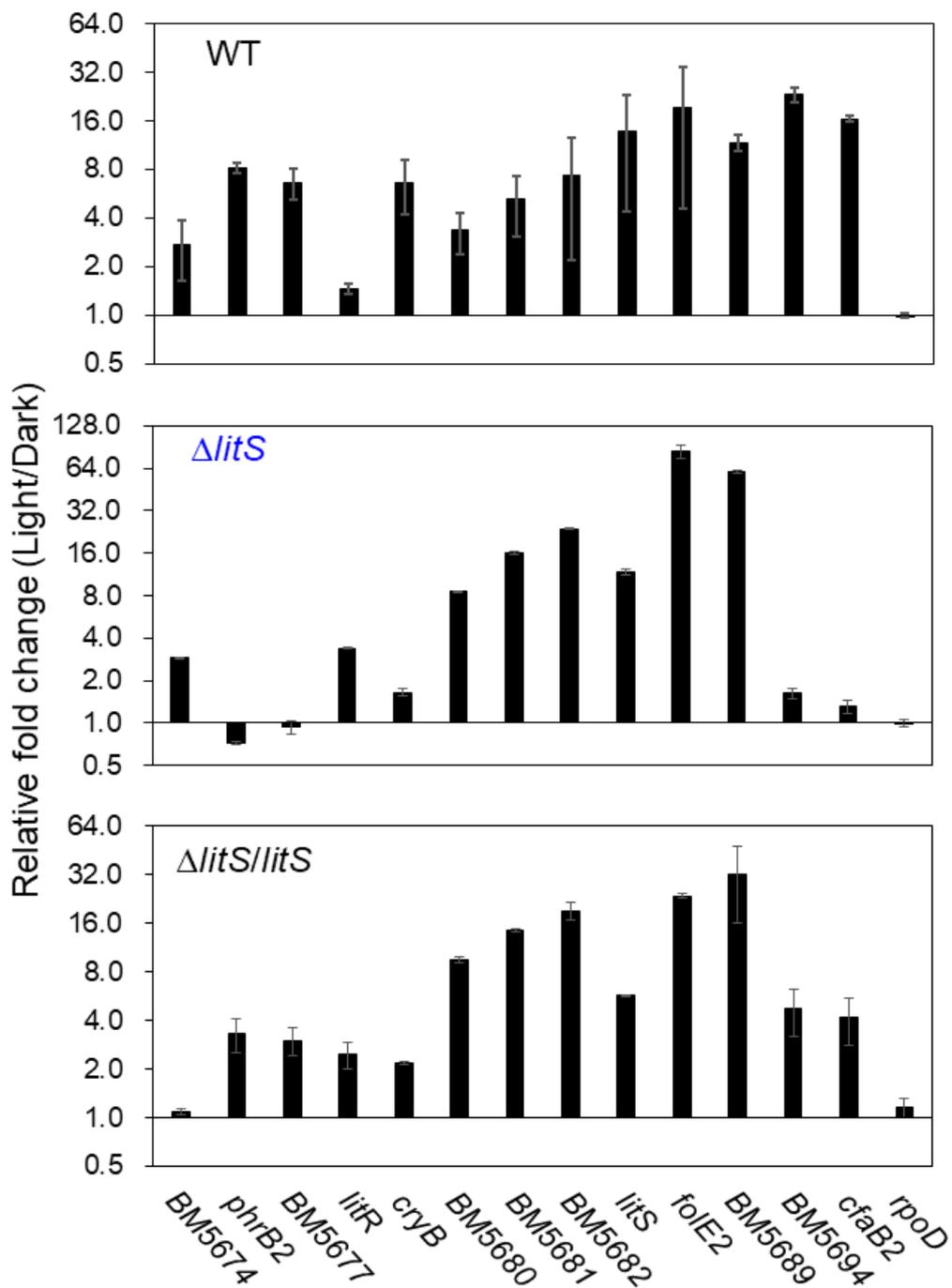


図 3-2-1-6 培養 21 時間目における *litS* 破壊株の転写倍率 (定量 RT-PCR 法)

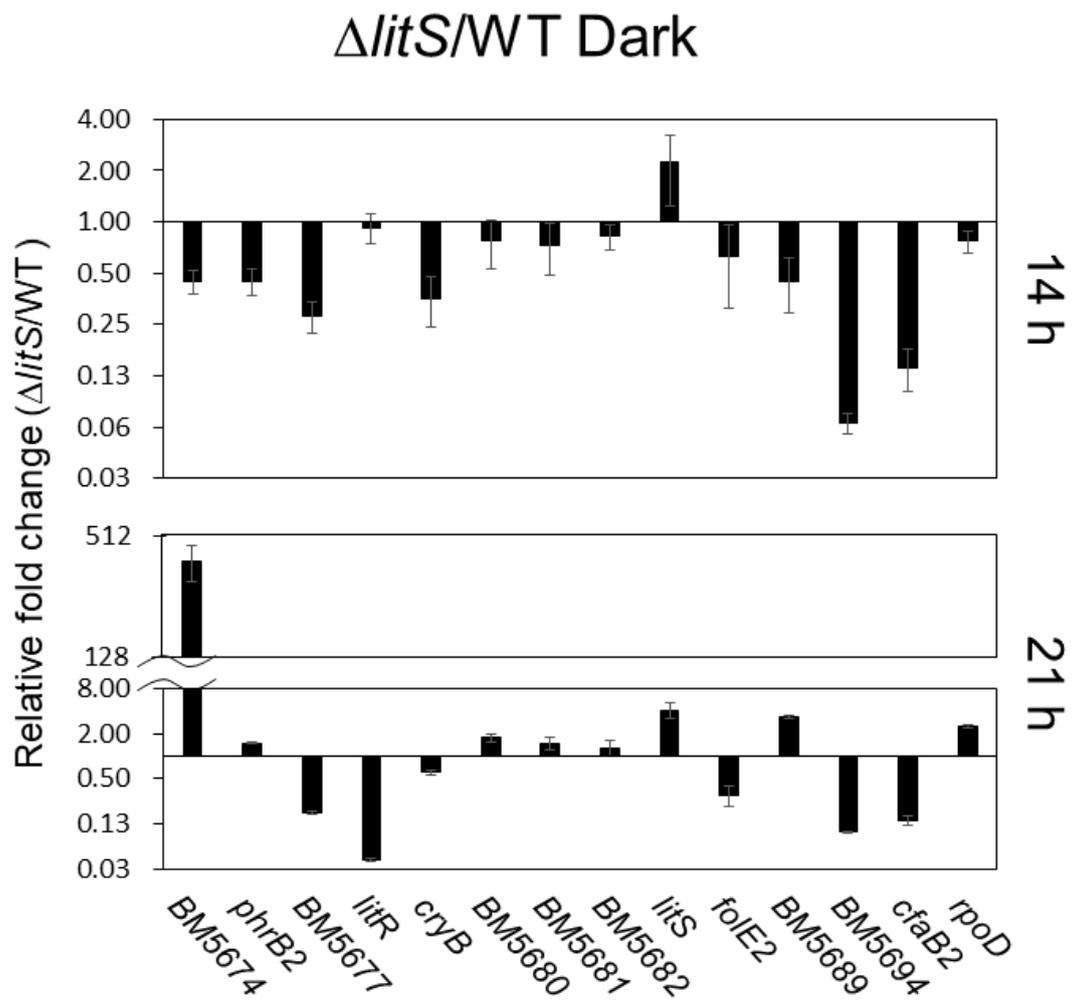


図 3-2-1-7 *litS* の破壊による暗条件下での転写降下 (定量 RT-PCR 法)

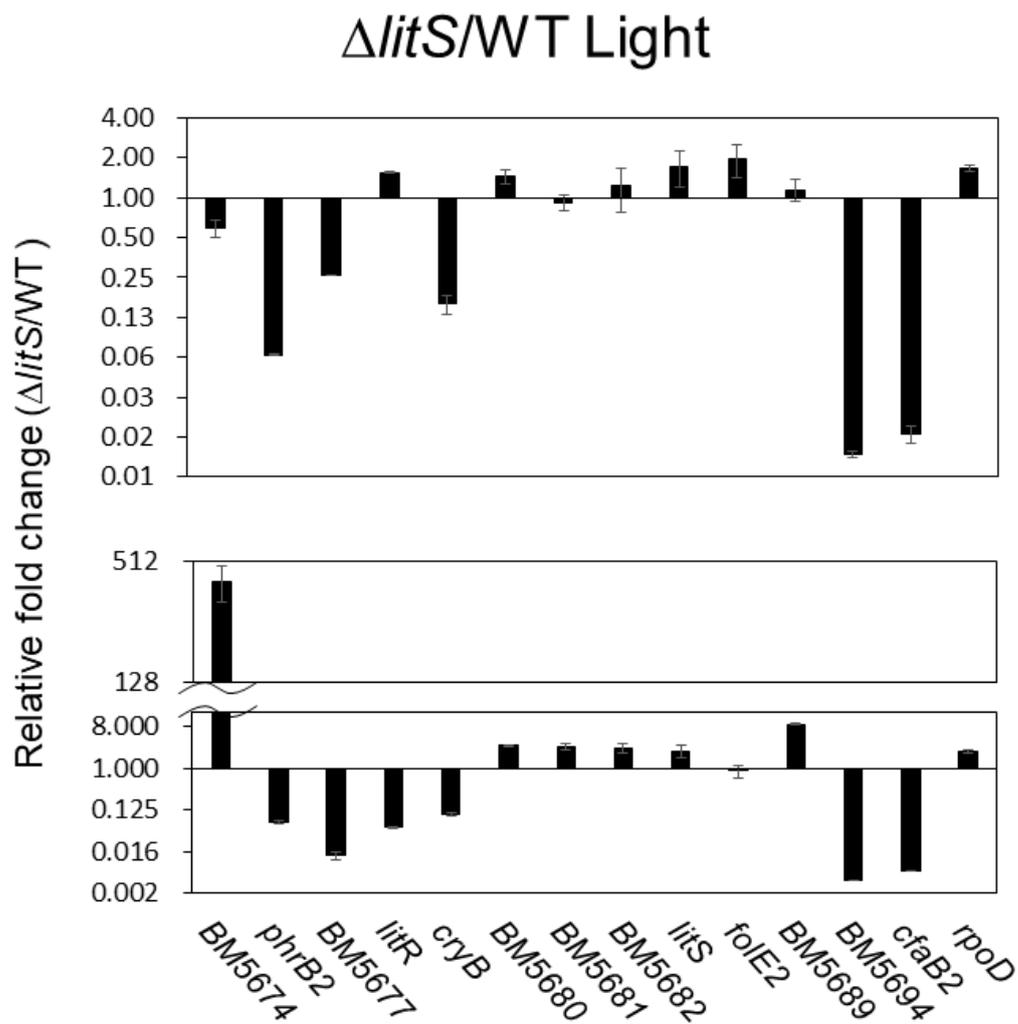


図 3-2-1-8 *litS* の破壊による明条件下での転写降下 (定量 RT-PCR 法)

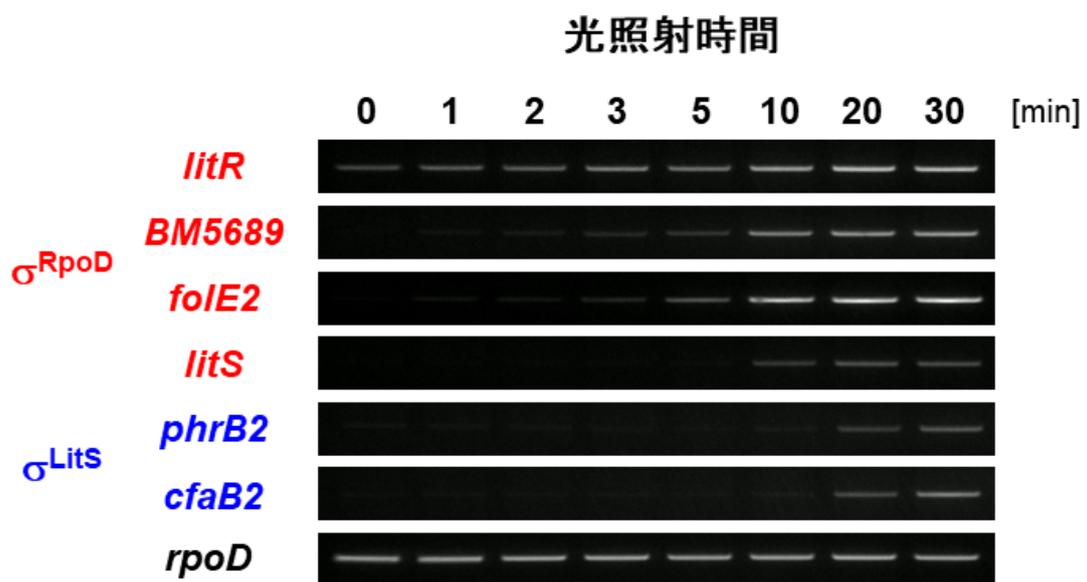


図 3-2-1-9 光照射開始から転写が開始されるまでに要する時間  
(半定量 RT-PCR 法)

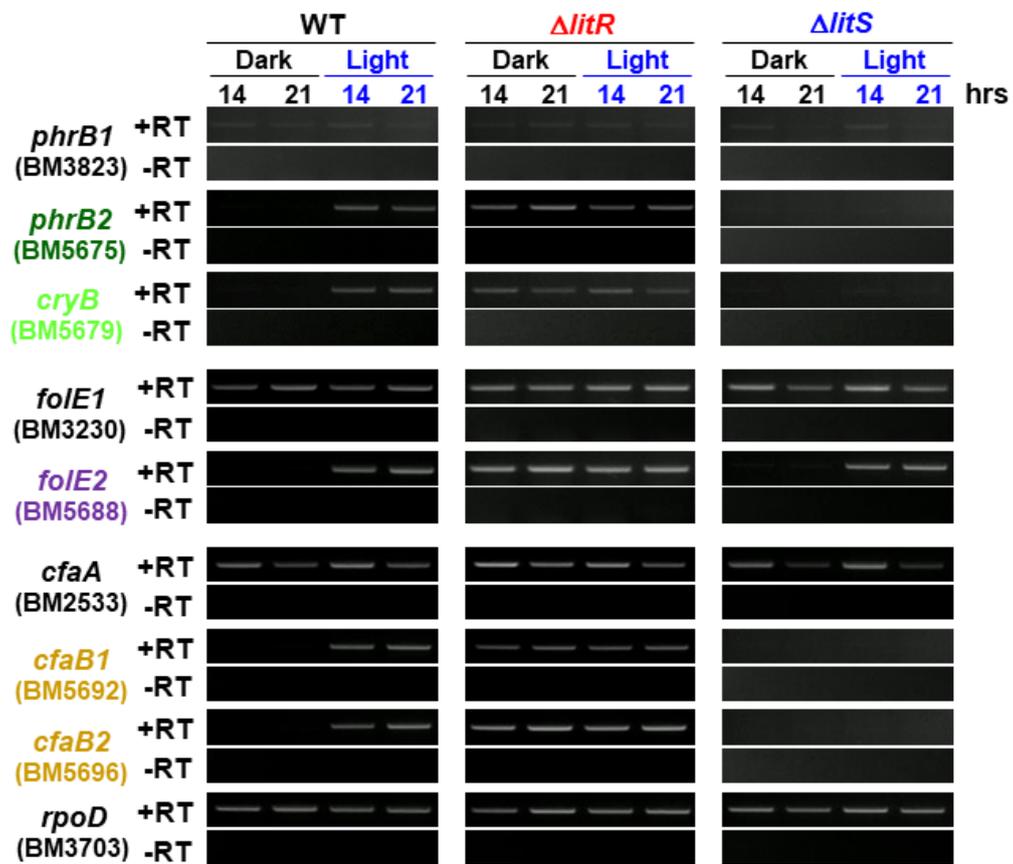


図 3-2-1-10 光誘導型と構成型の遺伝子発現（半定量 RT-PCR 法）

## 第2項 光誘導性遺伝子のプロモーター構造に関する解析

### 目的

転写解析の結果（第3章第2節第1項）から、*B. multivorans* の光誘導性遺伝子は4つのモノシストロニックな遺伝子（BM5674, BM5677, *litR*, *cryB*）と4つのオペロン（*phrB2* オペロン、BM5681-BM5682 オペロン、*foIE2* オペロン、*cfaB2* オペロン）から構成されることが予想された。そこで、それらの転写開始点を決定し、プロモーターの構造を明らかにすることを目的とした。さらに、2つの転写調節因子 LitR と LitS の認識配列を特定することを試みた。

## 結果

光誘導性遺伝子群の転写開始点を決定するために Modified 5'-RACE 法を行った。その結果、*PlitR* は翻訳開始コドンから 31 bp、P5676 は 239 bp、P5677 は 46 bp、P5689 は 30 bp そして P5697 は 20 bp それぞれ上流に転写開始部位が存在することを特定した (図 3-2-2-1)。一方で、P5674 と *PcryB*、P5681 の転写開始点は得られたシグナルが低かったため、決定できなかった。

次に、プロモーター領域間の配列を比較したところ、*PlitR* (TTCATA<sub>N16</sub>TACAAT) と P5689 (TTCACT<sub>N16</sub>TACAAT) の -10 と -35 配列は、大腸菌の生育に必須なシグマ因子  $\sigma^{70}$  の認識配列 (TTGACA<sub>N16-18</sub>TATAAT)<sup>49</sup> に類似していた。このことから、対応するシグマ因子である  $\sigma^{\text{RpoD}}$  に認識されることが推測された。さらに、転写開始点から -30 ~ -50 にインバーテッドリピート配列 TGAA<sub>N12</sub>TTCA が存在し、同配列はクラス III LitR を保有する他の *Burkholderia* 属細菌にも同様な領域で見出された (図 3-2-2-2)。このことから、TGAA<sub>N12</sub>TTCA がクラス III LitR の認識配列であることが予想された。

一方、P5676 と P5677、P5697 の -10 と -35 配列 TGCATCC<sub>N16</sub>CGTA は、大腸菌  $\sigma^{70}$  のコンセンサス配列に似ていなかった (図 3-2-2-1)。これらの遺伝子の転写レベルは *litS* の破壊で低下したことから、 $\sigma^{\text{LitS}}$  によって認識されるこ

とが示唆された。また、他の *Burkholderia* 属細菌に保存されている **BM5676** と **BM5677**、**BM5697** のホモログ遺伝子においても **TGCATCC<sub>N16</sub>CGTA** が対応する領域に見出された (図 3-2-2-3)。

そこで次に、**LitR** と **LitS** のプロモーター配列との相互作用解析を行い、これらの認識配列を特定することを試みた。**LitR** は N 末端領域に **MerR** 型の **Helix-turn-Helix DNA** 結合ドメインが存在することが推定されているため、特定の塩基配列に結合することが考えられた。そこで、各プロモーター領域に対する **DNA** 結合能をゲルシフトアッセイによって解析したところ、**PlitR** と **P5689** で特異的なバンドのシフトが確認された (図 3-2-2-4A)。一方、コントロールとして用いた生育に必須なシグマ因子 **PrpoD** と **P5676**、**P5697** には結合を示さなかった (図 3-2-2-4B)。次に、**PlitR** を上流側に向かって切り詰めたプローブ **DNA** (図 3-2-2-5A) を作製してゲルシフトアッセイを行った。その結果、転写開始点から **-45** より上流の領域を含んだプローブでは相互作用が検出されたが、それ以降の塩基配列には結合が認められなかった (図 3-2-2-5B)。このことから、**TGAA<sub>N12</sub>TTCA** が **LitR** の認識配列であることが推定された。

$\sigma^{LitS}$  の認識配列を特定するため、それと DNA 間の相互作用解析を行った。

LitS と RpoD の組換え蛋白質の精製をアフィニティークロマトグラフィーによって行ったが、精製できなかった。そこで、大腸菌を宿主とした One-Hybrid システム法を行った (図 3-2-2-6)。LitS を pTRG に、解析対象のプロモーター配列 (*PrpoD* と *PlitR*, P5676, P5677, *PcryB*, P5689, P5697) を pPROMOTOR にクローニングした (第 2 章参照)。ネガティブコントロールである、プロモーター配列をクローニングしていない pPROMOTOR と *PrpoD* では 3-AT に感受性を示したことから、それらとの相互作用は認められなかった (図 3-2-2-7)。また、*PlitR* と *PcryB* も同様に相互作用は検出されなかった。一方、P5676 と P5677、P5689、P5697 では 3-AT に耐性を示したことから、それらと結合することが推測された。

## 考察

### (1) LitR の認識配列

ゲルシフトアッセイによって LitR の結合配列が  $TGAA_{N12}TTCA$  であることが示唆された。クラス I LitR の認識配列は  $TGTACA_{N16-18}TGTACA$  であることが特定されている<sup>8,12,19</sup>。それは DNA 結合ドメインに存在する RXWERRY のモチーフが TnnACA を認識することが明らかになっている<sup>12,19</sup>。本モチーフは LitR ファミリーの DNA 結合ドメインに保存されており、多くのクラスの LitR において、その推定レギュロンのプロモーターと予想される領域に  $TnnACA_{N16-18}TnnACA$  が見つかる<sup>38</sup>。クラス III LitR も RXWERRY のモチーフを有しているが、ゲルシフトアッセイで特定した配列に TnnACA は見つからない。これらのことから、クラス III LitR の DNA 結合メカニズムはクラス I とは異なったものであることが考えられた。

### (2) $\sigma^{LitS}$ の認識配列

One-Hybrid システム法による相互作用解析から、 $\sigma^{LitS}$  は P5676 と P5677、P5689、P5697 に結合することが考えられた。*litS* 破壊株を用いた転写解析では、*phrB2* と *BM5677*、*BM5694*、*cfaB2* の転写レベルは野生株よりも低下

し、P5676 と P5677、P5697 には共通の-10 と-35 配列 TGCATCC<sub>N16</sub>CGTA が存在することから、それが  $\sigma^{\text{LitS}}$  の認識配列であることが推測された。一方、P5689 に  $\sigma^{\text{LitS}}$  が相互作用する結果になったが、TGCATCC<sub>N16</sub>CGTA は見つからないこと、-10 と-35 は大腸菌の  $\sigma^{70}$  に類似していることから、P5689 は  $\sigma^{\text{LitS}}$  に認識されないと考えられた。また、*cryB* は *litS* 破壊株でその転写レベルが低下したことから、 $\sigma^{\text{LitS}}$  に依存すると考えられた。しかし、One-Hybrid システム法ではそれらの相互作用が認められず、開始コドン上流の領域に  $\sigma^{\text{LitS}}$  の認識配列が存在しないことから、 $\sigma^{\text{LitS}}$  によって調節されないことが考えられた。



### P*litR*

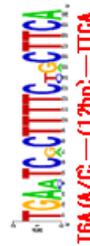
#### Putative LitR-binding site



	-35	-10	+1		
<i>B. multivorans</i>	GGACGACATTTCCGCAGATTGAATCGCCTTCCCTGCTTCA	IA	TTTTAAATCCAGACTGCGTACAA	TTCTGACAAACCTTCGCTCGACTTCAGGAGAACAACGATG	
<i>B. cenocepacia</i>	GGACGACATTTCCGCAGATTGAATCGCCTTCCCTGCTTCA	IA	TTTTAAATCCGAGACTGCGTACAA	TTCTGACAAACCTTCGCTCGACTTCAGGAGAACAACGATG	
<i>B. contaminans</i>	GGACGA-AAATCCGAGGTTGAATCACTTCCCTGCTTCA	IA	TTTTAAATCCGCAACTGCGTACAA	TCTGACAAACCTTCGCTCGACTTCAGGAGAACAACGATG	
<i>B. cepacia</i>	GGACGA-AAATCCGCTTGTGAATCACTTCCCTGCTTCA	IA	TTTTAAATCCGCAAACTGCGTACAA	TCTGACAAACCTTCGCTCGACTTCAGGAGAACAACGATG	
<i>B. vietnamiensis</i>	GACCAA-AAATAGGTACA	TTGAATCACTTCCCTGCTTCA	IA	TTTTAAATCCGCAAACTGCGTACAA	TCTGACAAACCTTCGCTCGACTTCAGGAGAACAACGATG
<i>B. plantarii</i>	TGCGCG-AAATCGACTCGTTGAGTCACTTTCCGCTTCA	CGTTGCGCGAAGTCTGCGTACAA	TTTCCGTTTCAATA	TCGAGT-GAATTCAGGAGATCCAGCATG	
<i>B. glumae</i>	CTGCGC-AAACCGGCAAAATGAGTCACTTTTCTGATCA	TGCTGCTGCTCGA	TTCTGATTCGCTGCGCTCGA	TTTCAATGTCGCTCGAATTCAGGAGAACAACCTCATG	

### P5689

#### Putative LitR-binding site



	-35	-10	+1			
<i>B. multivorans</i>	ACAAAAT---AATTCATGGAATCGCTTTTCTGCTTCA	CTTCCGGA	AAATTTTGAACAATCCAGGCTG	TGACGCGATGAA	TCGACC--AAGGATCCCCC-6T6	
<i>B. cenocepacia</i>	ACAAAAT---AATTCATGGAATCGCTTTTCTGCTTCA	CTTCCGGA	AAATTTTGAACAATCCAGGCTG	TGACGCGATGAA	TCGACC--AAGGATCCCCC-6T6	
<i>B. contaminans</i>	ACAAATTT---ATTTC-A	TGAAATCACTTTCCGCTTCA	CTTTCCGCAAAATTTGCA	TACAATCCGAGGCTG	TGACGCGATGAA	TCGACC--GAGGAGGCC-6T6
<i>B. cepacia</i>	GTAAATTT---ATTTC-A	TGAAATCACTTTCCGCTTCA	CTTTCCGCAAAATTTGCA	TACAATCCGAGGCTG	TGACGCGATGAA	TCGACC--GAGGAGGCC-6T6
<i>B. vietnamiensis</i>	GCATTTTCACAACTC-TGACTCGCTTTTCTGCTTCA	CATTTCCGGA	AAATTTTGAACAATCCAGGCTG	TGACGCGATGAA	TCGACC--AAGGAGGCC-6T6	

図 3-2-2-2 推定される LitR の認識配列の保存性



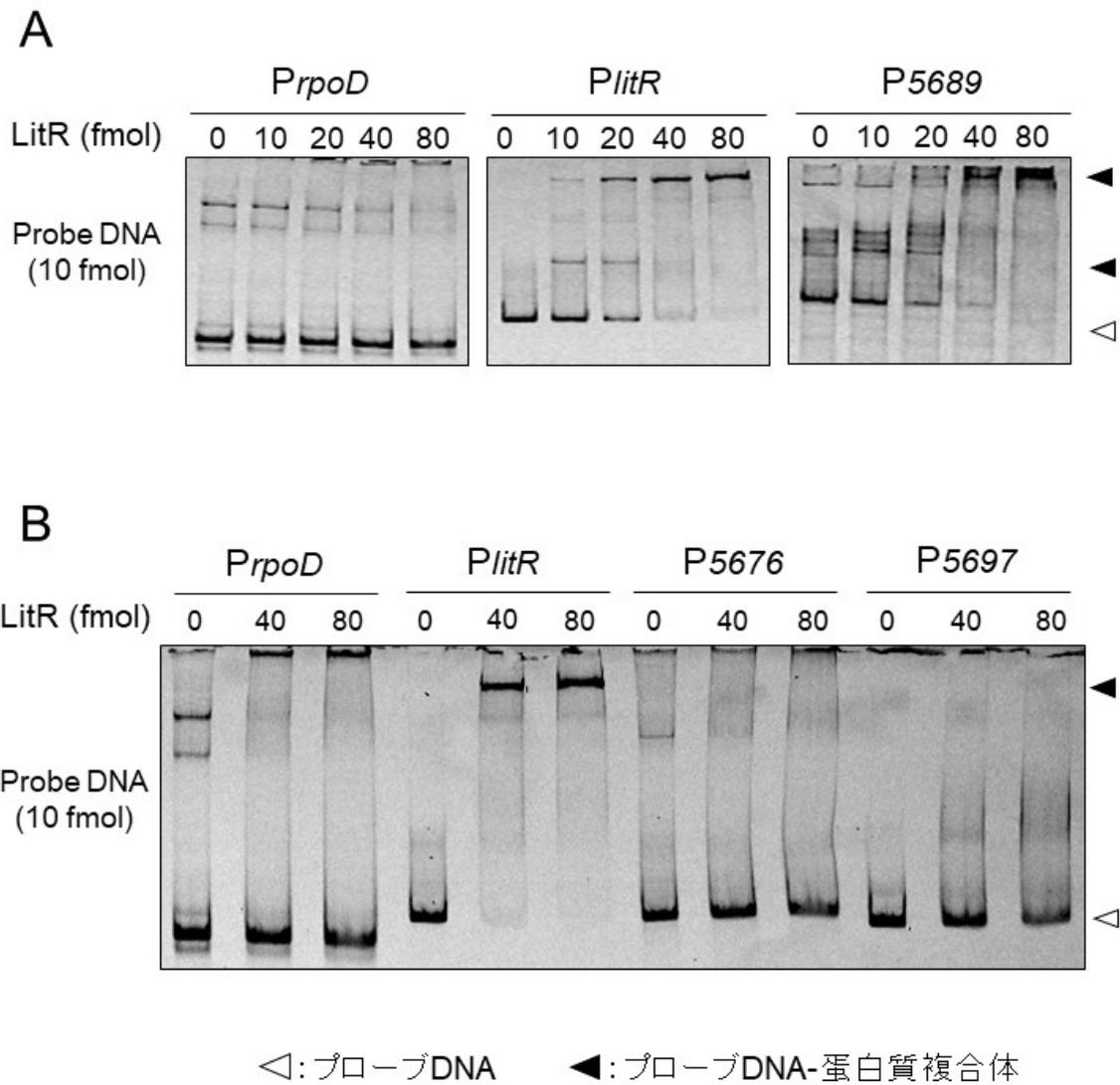


図 3-2-2-4 ゲルシフトアッセイによる LitR のオペレーターの特定

# A

*PlitR* -60 -50 -40 -30 -20 -10 +1 <sup>fMet</sup>

1: 91bp--CCCGGACGACATTTCCGCACAT**TGAAT**OGCCTTCTGCT**TTCA**TATTTAATCCAGACTGCCGTACAATTCTGAGA-30bp-CAACGATG-85bp  
 2: 91bp--CCCGGACGACATTTCCGCACAT**TGAAT**OGCCTTCTGCT**TTCA**TATTTAATCCAGACTGCCGTACAATTCTGAGA-30bp-CAACGATG  
 3: 91bp--CCCGGACGACATTTCCGCACAT**TGAAT**OGCCTTCTGCT**TTCA**TATTTAATCCAGACTGC  
 4: 91bp--CCCGGACGACATTTCCGCACAT**TGAAT**OGCCTTCTGCT**TTCA**TATTTAA  
 5: 91bp--CCCGGACGACATTTCCGCACAT**TGAAT**OGCCTTCTGCT  
 6: 91bp--CCCGGACGACATTTCCGCACAT**TGAAT**OG  
 7: 91bp--CCCGGACGACATTTCCGCA  
 8: 91bp--CCCGGACGAC

予想された結合配列 **TGAA---(12bp)---TTCA**

# B

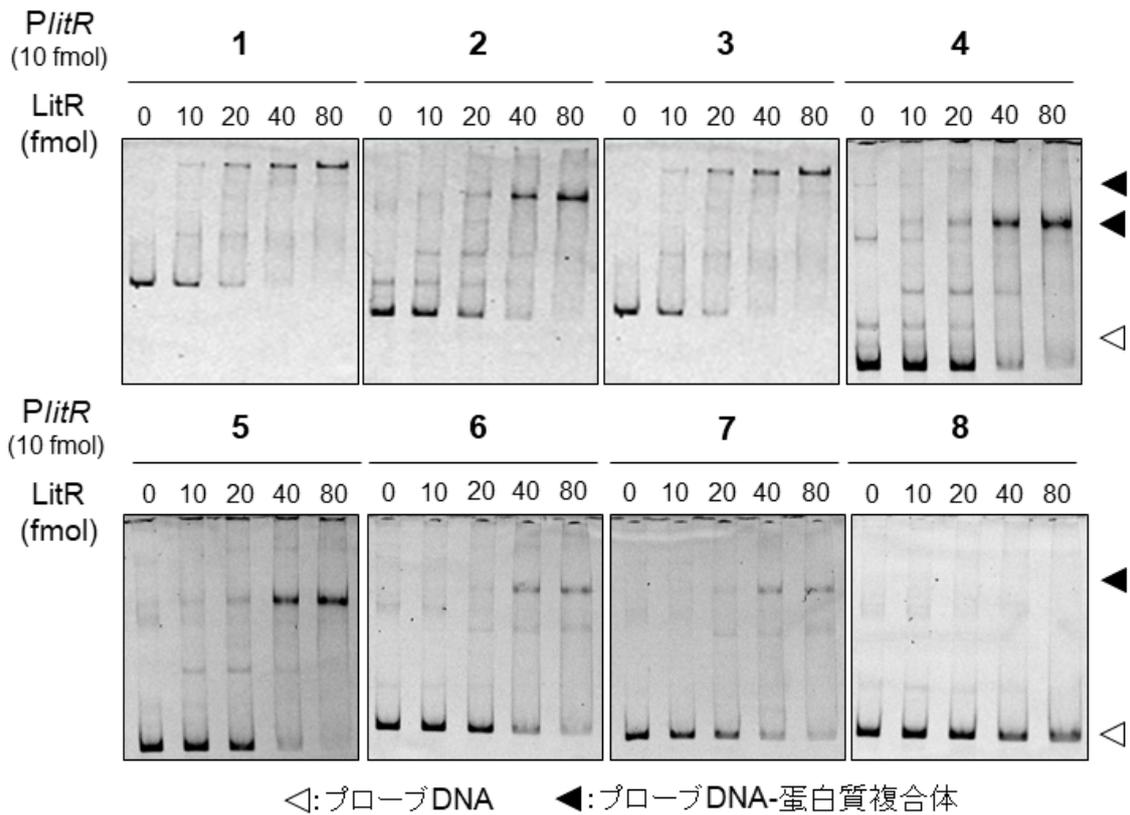


図 3-2-2-5 LitR の結合配列の推定

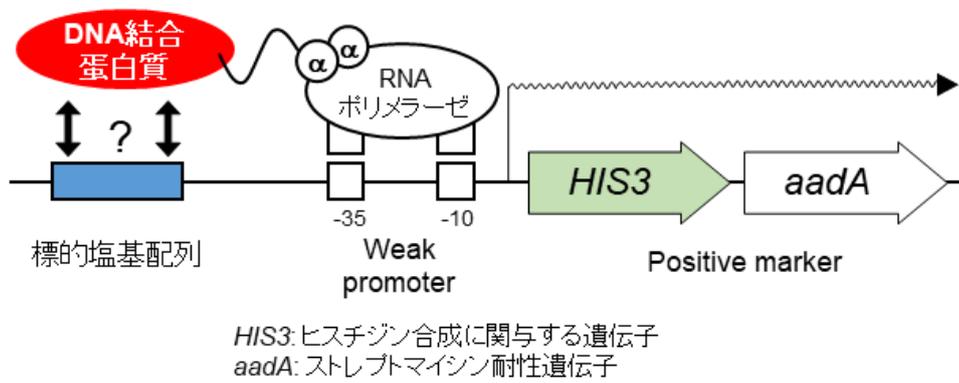


図 3-2-2-6 One-Hybrid システム法の原理

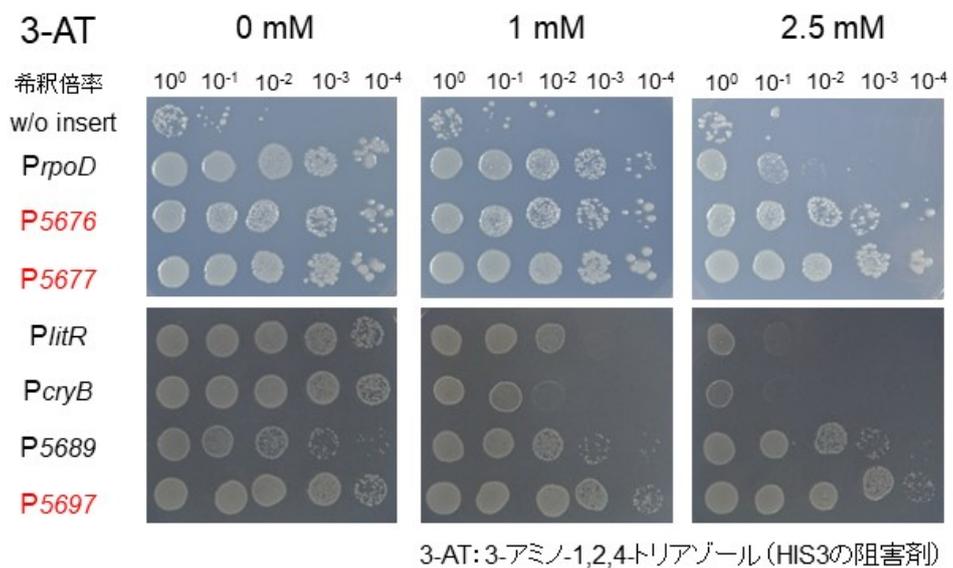


図 3-2-2-7 One-hybrid システム法による $\sigma^{\text{LitS}}$ とプロモーターDNAとの相互作用解析

### 第3項 葉酸合成の光促進

#### 目的

*B. multivorans* は 2 つの GTP cyclohydrolase IA 遺伝子 (*folE1* と *folE2*) を有している。本蛋白質は、GTP を 7,8-ジヒドロネオプテリン 3 リン酸に変換する酵素であり、葉酸やプテリンの合成に関与することが知られている(図 3-2-3-1)。

葉酸は、プテリンと *p*-アミノ安息香酸、L-グルタミン酸から構成される化合物であり、植物や細菌が合成するビタミンの 1 種である。GTP を初発の基質として 7 段階の反応を経て合成され、メチル基やホルミル基などの炭素の受け渡しに利用される。その生理学的な役割は、核酸のチミンやアミノ酸のセリン、グリシン、メチオニンの合成に関与する酵素の補因子としての作用である。

*folE1* は光誘導性遺伝子群に含まれていないが、*folE2* は *litR* の近傍に位置し、光誘導を受ける。このことから、光照射によって *FolE2* が誘導発現することを通じて葉酸合成が促進されることが予想された。そこで、光照射下における細胞内の葉酸量を測定し、*folE2* の役割と *LitR* の影響を明確にすることを目的とした。

## 結果

第 3 章第 2 節第 1 項での転写解析の結果、*foIE1* は光照射と *litR* の破壊に影響されず恒常的に発現し、*foIE2* の転写は光照射によって上昇した（図 3-2-1-1 および 3-2-1-2、3-2-1-10）。また、他の葉酸合成関連遺伝子（*foIA*、*foIB12*、*foIC*、*foIK*、*foIP*）の転写レベルについても半定量 RT-PCR で解析したところ、光照射による転写への影響は認められなかった（図 3-2-3-2）。このことから、光照射による *foIE2* の転写活性化が葉酸合成に影響すると考えられた。

そこで、光照射下で培養した *B. multivorans* から細胞内葉酸を熱水抽出し、葉酸要求性細菌を用いたバイオアッセイ法によって葉酸量を測定した（第 2 章参照）。野生株では暗条件下と比べて青色光照射下で最大で 2.5 倍まで葉酸量が上昇した（図 3-2-3-3）。一方で、緑・赤色光照射下ではその増大は認められなかった。次に、*foIE2* 破壊株の葉酸量を測定したところ、光照射による葉酸量の増大は認められなかった（図 3-2-3-4）。しかし、*foIE1* 破壊株も同様に光照射によって葉酸量は増大しなかった。

さらに、*litR* 破壊株の葉酸量を定量したところ、野生株と比べて最大で 20.1 倍まで増大した（図 3-2-3-5）。一方、その相補株では野生株と同様な量まで

低下した。このことから、LitR が光依存に葉酸合成の促進を制御していることが明らかになった。

次に、葉酸の増大が *B. multivorans* の増殖に及ぼす影響を調査するため、LB 培地あるいは最少培地中での増殖速度を調査した。その結果、野生株と *litR* 破壊株または *foIE2* 破壊株の増殖には差が認められなかった（図 3-2-3-6 および 3-2-3-7）。これらのことから、細胞内の葉酸量の増減が *B. multivorans* の増殖速度に影響しないことがわかった。

## 考察

### (1) 葉酸合成と遺伝子制御

*B. multivorans* の細胞内葉酸量を測定したところ、青色光照射によってその含量は 2.5 倍に増大した一方、緑と赤色光では増加が認められなかった。これは、光誘導性遺伝子群の青色光に特異的な転写上昇の結果と一致する。さらに、*litR* 破壊株における葉酸量が野生株と比べて 20 倍上昇したことは、*foIE2* の著しい転写レベルの上昇によるものであると考えられる。近年、*Halomonas* sp. HL42 が保有する *PhrR* (*LitR* ファミリークラス Ib に属する転写調節蛋白質)は葉酸とユビキノンの合成遺伝子を制御すると報告されており、*phrR* の欠損がテトラヒドロ葉酸量の顕著な増加を起こすことが明らかになっている<sup>38</sup>。さらに、*litR* と *foIE* は多くの細菌ゲノムで見つかっており、それらの細菌で同様な現象が起きると考えられる。

### (2) *foIE1* と *foIE2* の役割

転写解析の結果から、*foIE1* は構成的に働き、*foIE2* は光誘導型であることが考えられた。*foIE2* の破壊は光照射による増大を示さなかったが、構成的な遺伝子発現を示す *foIE1* の破壊株においても同様な結果が得られた。これは、

一つの *folE* が機能しないときにもう一方が補完するように機能する、あるいは、細胞外の葉酸を取り込むことで細胞内の葉酸レベルを一定に保っていることが考えられた。

### (3) *folE2* 活性化の生理的な意義

光照射による *folE2* の転写活性化は、光ストレスに対する防御的な役割を果たすことが考えられる。海洋性シアノバクテリア *Oscillatoria sp.* では、ビオプテリングルコシドが UV-A から細胞を防御することが報告されている<sup>50</sup>。また、葉酸量の増加は、光回復酵素 (PhrB) のクロモフォアとして必要とされる葉酸を明条件下で補給している可能性も考えられる。PhrB は、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) と 5,10-メテニルテトラヒドロ葉酸をクロモフォアまたは光アンテナ分子として利用し、UV 照射で生じたピリミジンダイマーを分解することで DNA 損傷を修復する酵素である<sup>51</sup>。

また、葉酸は、シクロプロパン環脂肪酸の合成に関与することも考えられる。乳酸菌 *Lactobacillus* のシクロプロパン環脂肪酸含量は葉酸の添加によって上昇することが報告されている<sup>52</sup>。シクロプロパン環脂肪酸は、酸や有機溶媒への耐性に関与することが知られ<sup>53,54</sup>、本合成酵素をコードする遺伝子

(*cfaB12*) の転写が光に誘導されることから、本脂肪酸が光ストレスの防御を担うことが予想される。本合成酵素は S-アデノシルメチオニン (SAM) を補酵素として要求するが、葉酸合成の阻害が細胞内 SAM 量を低下させることが報告されている<sup>55</sup>。その反対に葉酸の増加が SAM の合成を促進させることが予想される。これらのことから、光照射による葉酸の増加は、SAM 合成の促進を介してシクロプロパン環脂肪酸量を増やすことが考えられた。

一方で、葉酸は DNA を構成するチミンの合成に関与することから、増殖速度に影響すると考えられた。しかし、*B. multivorans* の増殖速度は、光照射と *litR* や *foIE2* の破壊に影響を及ぼさなかった。このことから、光照射による葉酸の増加は *B. multivorans* の増殖速度と関連しないと考えられる。

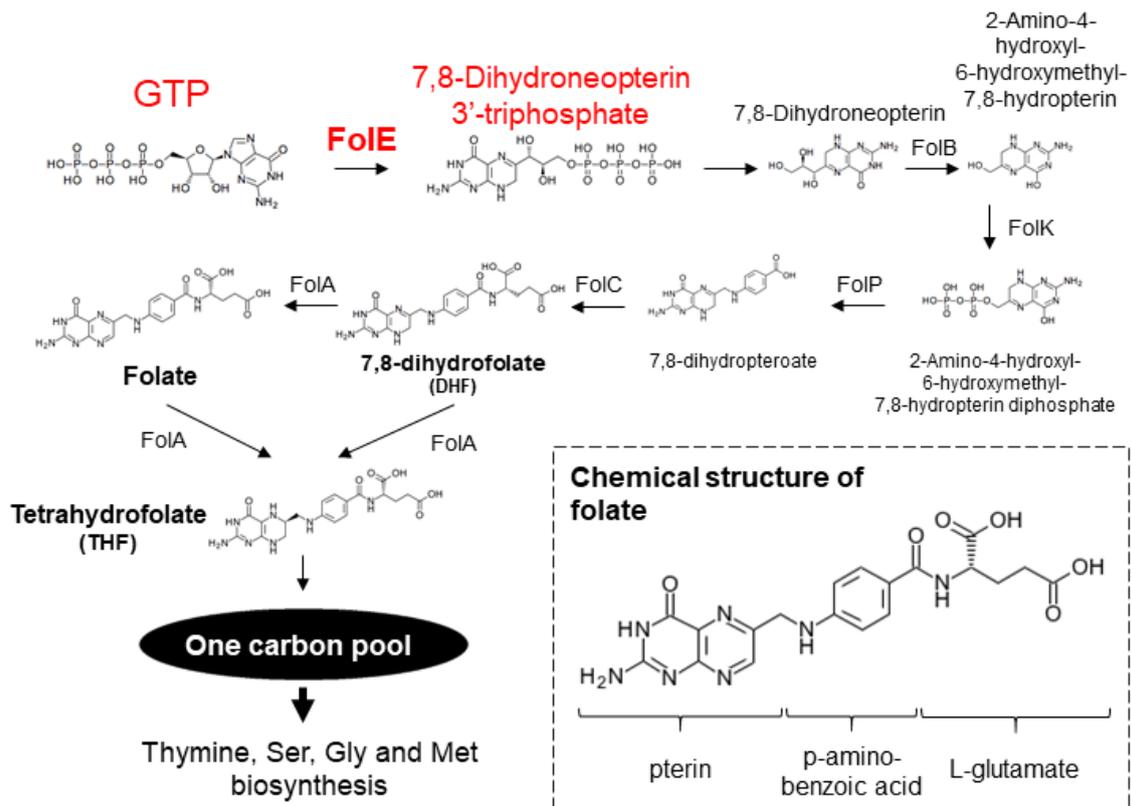


図 3-2-3-1 葉酸の構造と生合成経路

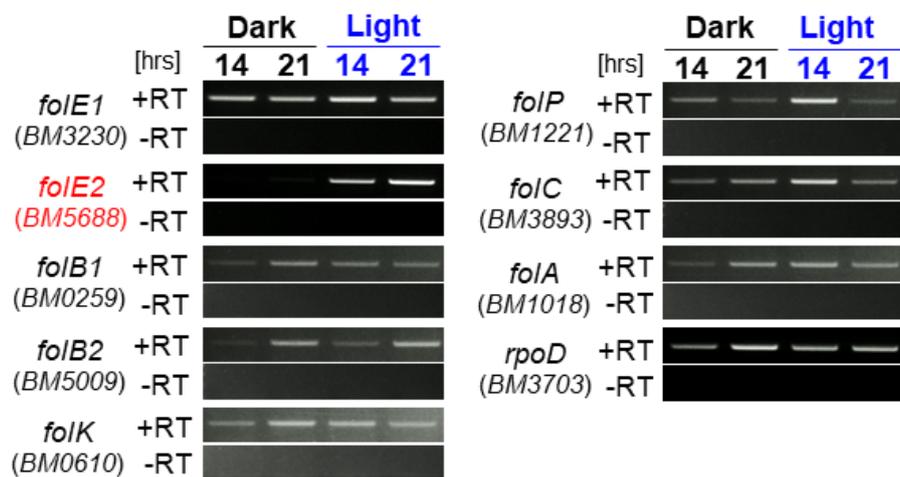


図 3-2-3-2 半定量 RT-PCR による葉酸合成遺伝子の転写解析

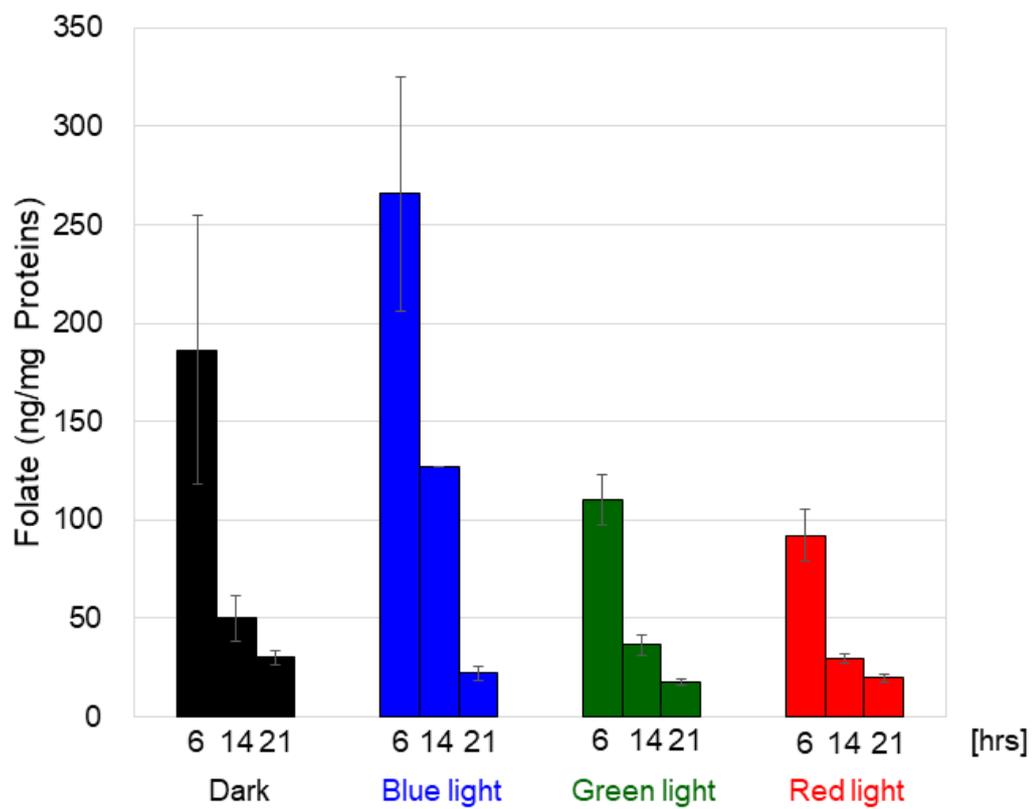


図 3-2-3-3 光照射による細胞内葉酸量への影響

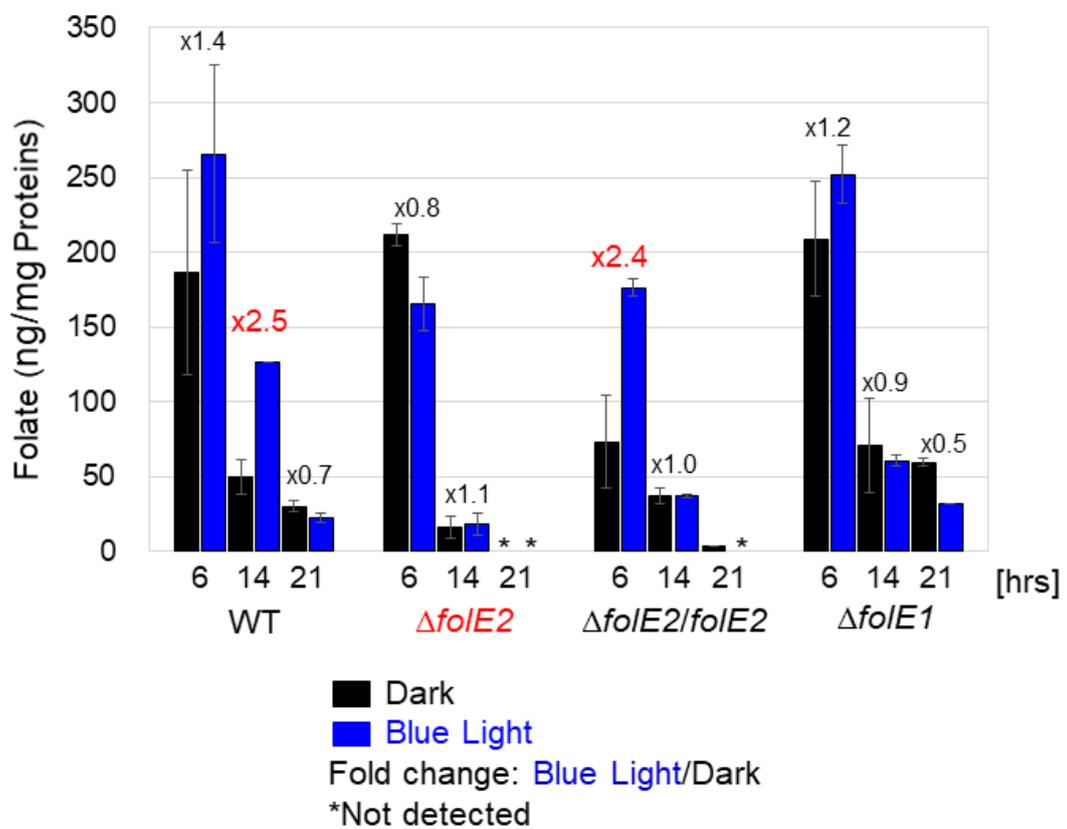


図 3-2-3-4 *foIE* の破壊が細胞内葉酸量に及ぼす効果

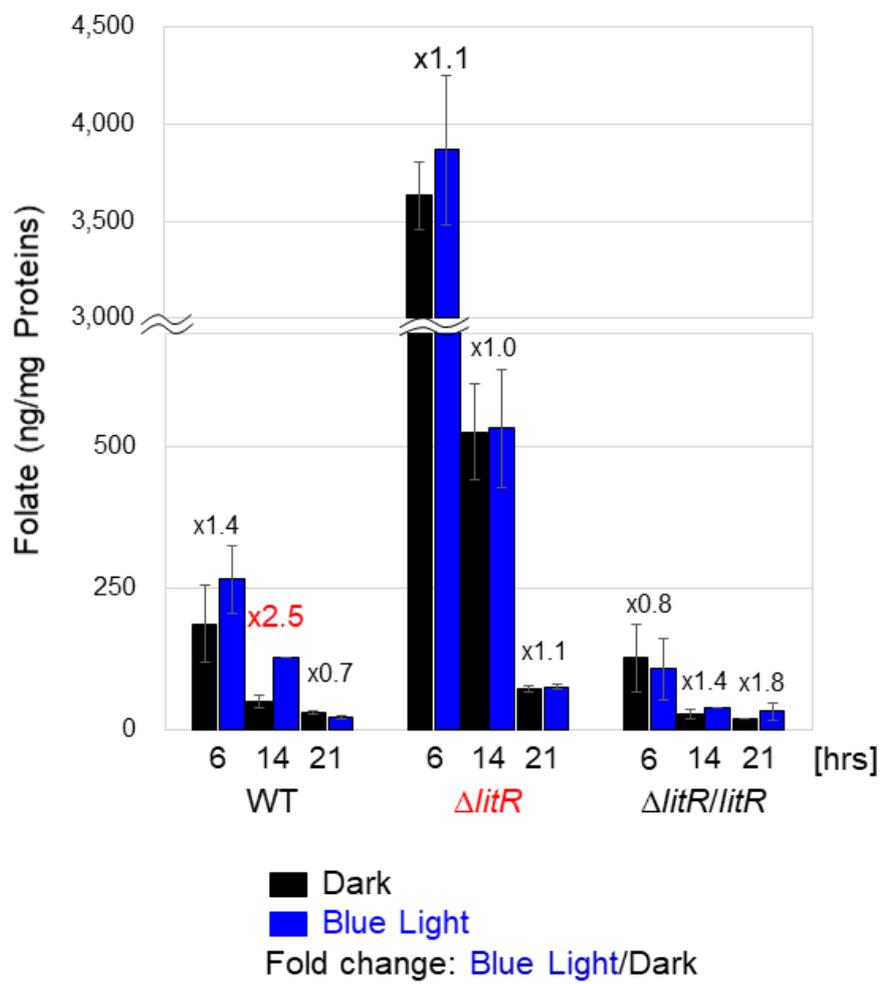


図 3-2-3-5 *litR* の破壊が細胞内葉酸量に及ぼす効果

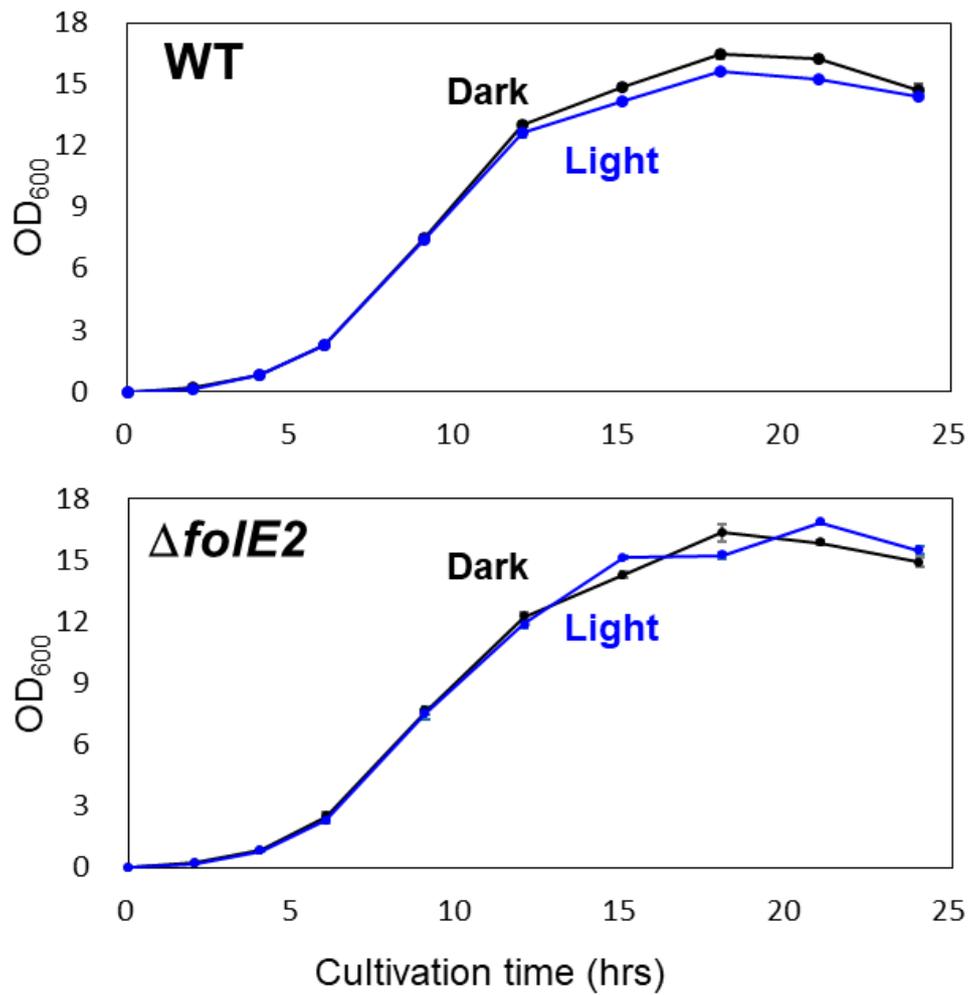


図 3-2-3-6 LB 培地中での *B. multivorans* の増殖速度

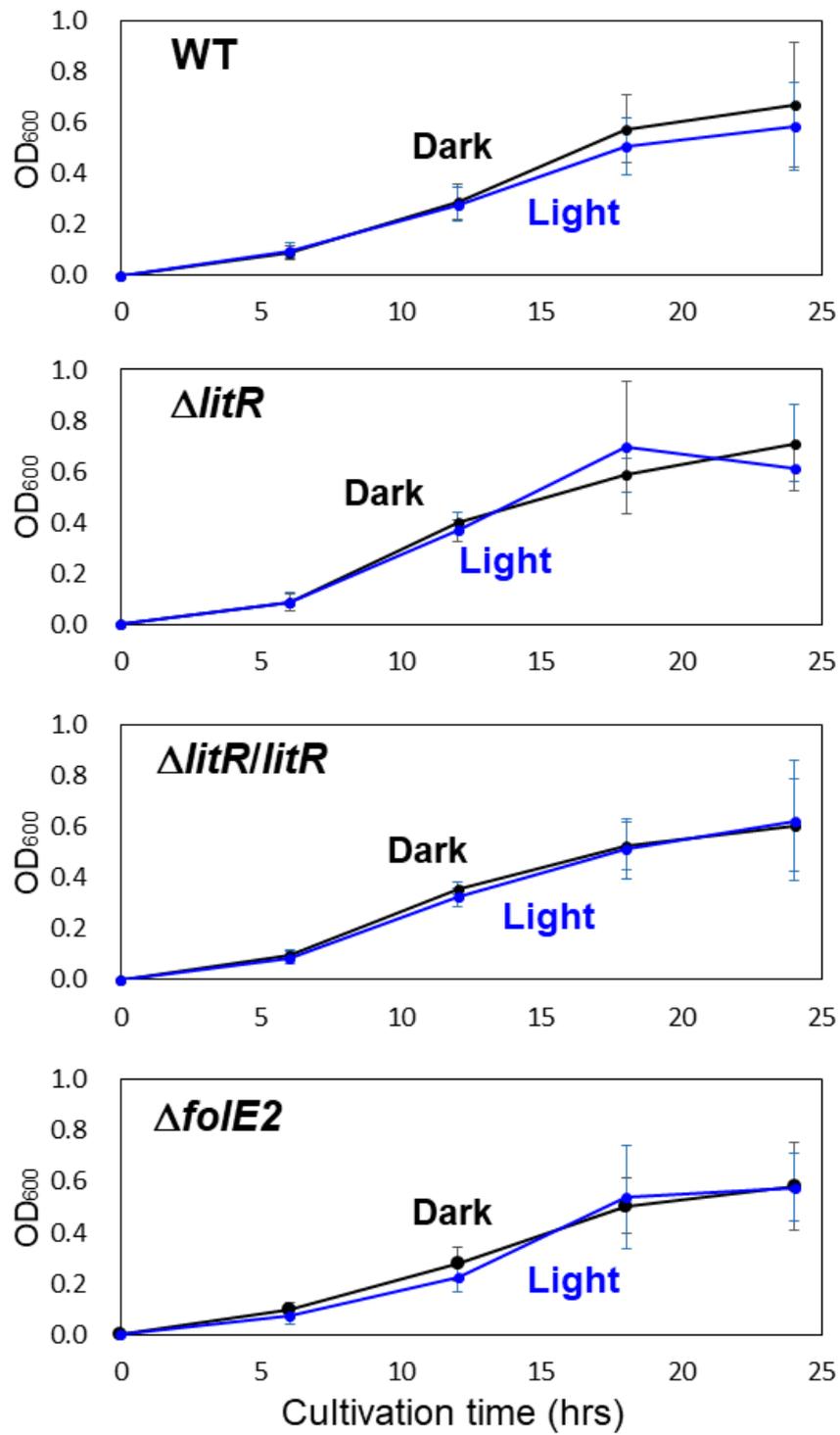


図 3-2-3-7 各破壊株の M9 最少培地中での増殖速度

#### 第4項 小括

遺伝子破壊株を用いた定量 RT-PCR 解析の結果から、*B. multivorans* の光依存的な転写は LitR とそれによって誘導される  $\sigma^{\text{LitS}}$  によって 2 段階的に調節されると推測される。LitR は *litR* と *litS-foIE2* クラスターの転写を光依存的に直接制御し、 $\sigma^{\text{LitS}}$  は *phrB2* や *cfaB* などの一部の光誘導性遺伝子群における転写開始を担うことが推測された。

また、LitR を介した *foIE2* の転写活性化によって細胞内葉酸量を増加させることが強く示唆された。増加した葉酸は、光照射から 2 段階目に発現する光回復酵素 (PhrB) やシクロプロパン環脂肪酸合成酵素 (CfaB) の機能に必要なとされる葉酸を補充する役割を持つことが考えられる。これらの遺伝子は、他のクラスの LitR を保有する細菌群にも認められることから、同様なシステムが備わっていることが予想される。

### 第3節 クラス III LitR の機能の検証

#### 第1項 光サイクル反応の観測

##### 目的

*litR* 破壊株を用いた定量 RT-PCR による解析結果から、LitR が転写抑制能を持ち、光依存的に解除されることが推測された。また、予備試験で観察した LitR 組換え蛋白質の吸収スペクトルには 340 nm の単一の極大吸収が認められたことから、光センサーとして機能することも考えられた。そこで本章は、光センサーとしての性質と DNA 結合特性を解析することで、光依存的な転写調節蛋白質としての機能を明らかにすることを目的とした。

## 結果

予備実験では GST タグが融合した LitR の吸収スペクトルを測定したため、GST タグを除去した LitR 組換え蛋白質の精製を試みた。精製した LitR 溶液が白濁したことから、アグリゲーションを起こしたと考えられた。そこで、蛋白質の凝集抑制効果が認められるアルギニン塩酸塩<sup>37</sup>をバッファー中に添加したところ、可溶化した LitR 蛋白質を精製することに成功した (図 3-3-1-1、左端のレーン)。その吸収スペクトルを測定したところ、GST タグ融合 LitR で検出されたように 340 nm 付近に単一の極大吸収が認められ、かつ、LOV<sup>56</sup> や BLUF<sup>57</sup> などの光センサーに特有な光サイクルを有していることが判明した。すなわち、同標品に 365 nm の光を照射したところ、60 秒で約 5 分の 1 までそのピークが減少し (図 3-3-1-2A)、180 秒で完全に消失した。これを暗所に戻したところ、徐々にそのピークが回復していくことが認められた (図 3-3-1-2B)。本蛋白質は、365 nm の光照射によって 340 nm のピークが消失する一方で、それ以上の波長ではピークの減少はほとんど認められなかった (図 3-3-1-2C)。また、これと同様に各波長の光を野生株の *B. multivorans* に照射してその転写レベルを半定量 RT-PCR で解析したところ、365 nm の光照射が *litR* と *BM5689* の転写を誘導し、それ以上の波長の光で

は効果を示さなかった（図 3-3-1-3）。さらに、*B. multivorans* 由来 LitR に相同性 88%を有する *B. vietnamiensis* 由来の LitR を発現・精製したところ、*B. multivorans* 由来のものと同様に 340 nm の単一の極大吸収が認められ、それが光サイクル反応を示すことがわかった（図 3-3-1-4A および B）。また、UV-A 光を吸収し、青色光以上の波長にほとんど反応を示さなかった（図 3-3-1-4C）。

次に、340 nm の極大吸収が由来するアミノ酸配列の特定を行った。LitR は、ゲノム情報上では N 末端領域に MerR 型の DNA 結合ドメインを有していることが予測されている。そこで、DNA 結合ドメインを含んだ N 末端側の領域を除いた LitR 蛋白質（LitR<sub>81-323</sub>）と C 末端側の 100-323 aa の領域のもの（LitR<sub>100-323</sub>）、200-323 aa 領域のもの（LitR<sub>200-323</sub>）を調製した（図 3-3-1-1）。その結果、両者とも 340 nm の極大吸収を有していた（図 3-3-1-5）。さらに、UV-A を照射したところ、それぞれでピークの消失が認められた。また、N 末端領域の蛋白質を調製してその吸収スペクトルを測定したところ、その極大吸収は認められなかった（図 3-3-1-6）。これらのことから、340 nm の極大吸収は 200-323 aa の領域に由来することがわかった。

次に、光照射による LitR の DNA 結合能への影響を調査するため、ゲルシ

フトアッセイによる DNA-蛋白質の相互作用解析を行った。ネガティブコントロールとして用いた *PrpoD* では、光照射に関係なく LitR との結合を示さなかった (図 3-3-1-7)。次に、*PlitR* と *P5689* では、暗条件で特異的な結合が認められ、UV-A 照射下によってその結合が弱くなった。このことから、LitR の DNA 結合能は光照射によって低下することが推測された。

LitR の相対分子量を求めるため、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行った。暗条件では検量線より大きいピークと 136 kDa と推定されるピークが検出された (図 3-3-1-8)。一方で、UV-A 照射下では単一の 131 kDa のピークが検出された。これらの溶出画分について SDS-PAGE 解析と銀染色を行った結果、LitR のバンドが検出された。また、LitR<sub>C81-323</sub> の GST タグを除去して精製し (図 3-3-1-1 および 3-3-1-9)、それについて同様の解析を行った。その結果、暗条件では検量線の上限を超える大きさのピークと 107 kDa と推定されるピークが検出され、UV-A 照射下では単一の 102 kDa のピークが検出された (図 3-3-1-10)。

## 考察

### (1) 光サイクル反応

*B. multivorans* および *B. vietnamiensis* 由来の LitR 組み換え蛋白質が有する 340 nm の単一の極大吸収が光サイクル反応を示した (図 3-3-1-2 および 3-3-1-4) ことから、それはアンテナ分子に由来することが推測された。その光感知ドメインは、N 末端欠失 LitR と C 末端欠失 LitR の吸収スペクトル測定から、200-323 aa の領域に存在することがわかった。*B. multivorans* の野生株を用いた半定量 RT-PCR の解析で UV-A ( $\lambda_{\max}=365$  nm) が顕著な転写誘導を示したことから、340 nm のピークは、ヒスチジntagの付加などに帰因するアーティファクトではないと考えられた。また、大腸菌を異種宿主にして精製したことから、大腸菌においてもアンテナ分子が合成されることが考えられた。

### (2) DNA 結合能とホモ複合体の解離

LitR の DNA 結合能は UV-A 照射によって著しく低下した (図 3-3-1-7)。このことから、C 末端領域の UV-A 感知による構造変化が N 末端側の DNA 結合ドメインのコンフォメーションに影響することが考えられた。野生型 LitR

と LitR<sub>81-323</sub> を用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる解析では、16 量体と推定されるオリゴマーが UV-A 照射によって 4 量体に解離したことから、UV-A を感知することによって構造変化が起こると考えられる。また、LitR のホモオリゴマーの形成には 81-323 aa の領域のアミノ酸配列が重要であることがわかった。

ゲル濾過カラムクロマトグラフィーで観察された光照射によるホモ複合体の解離は、クラス I LitR でも同様なことが報告されている<sup>12</sup>。検量線外ではあるが推定 16 量体が暗条件下で標的配列に結合することで強い転写抑制能を発揮する一方、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推測される。ただし、暗条件下でのゲル濾過カラムクロマトグラフィーの結果の解釈では、LitR がアグリゲーションを引き起こすことを考慮しなければならない。しかしながら、野生型 LitR と LitR<sub>81-323</sub> の 340 nm における溶出プロファイルでは、4 量体よりもオリゴマーの 340 nm の吸光度が高い数値を示した。これは、オリゴマーが UV-A 感知に重要な構造を形成している可能性を考えさせる。

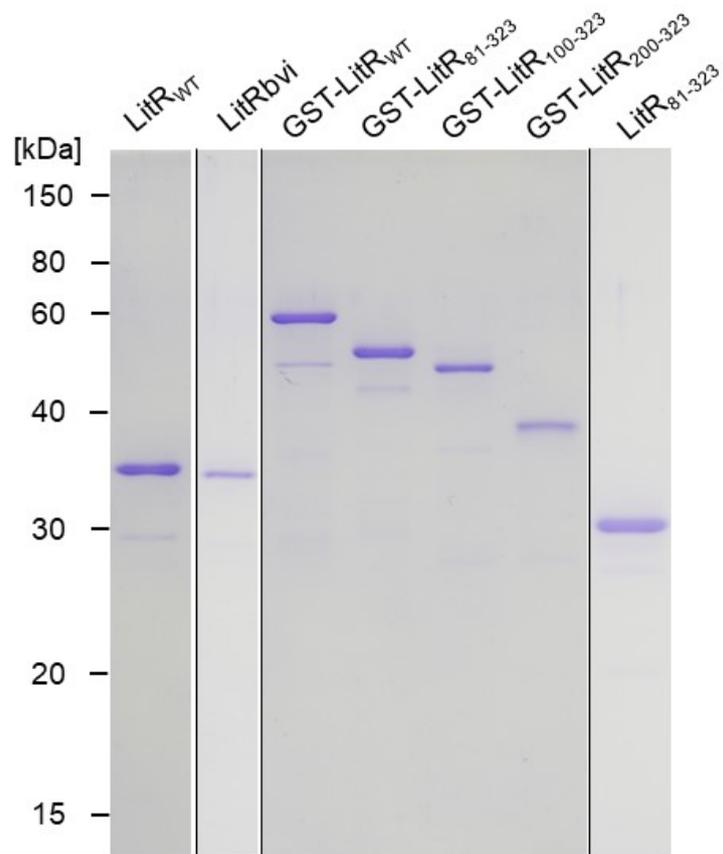


図 3-3-1-1 SDS-PAGE 解析による各 LitR 組換え蛋白質の精製の確認

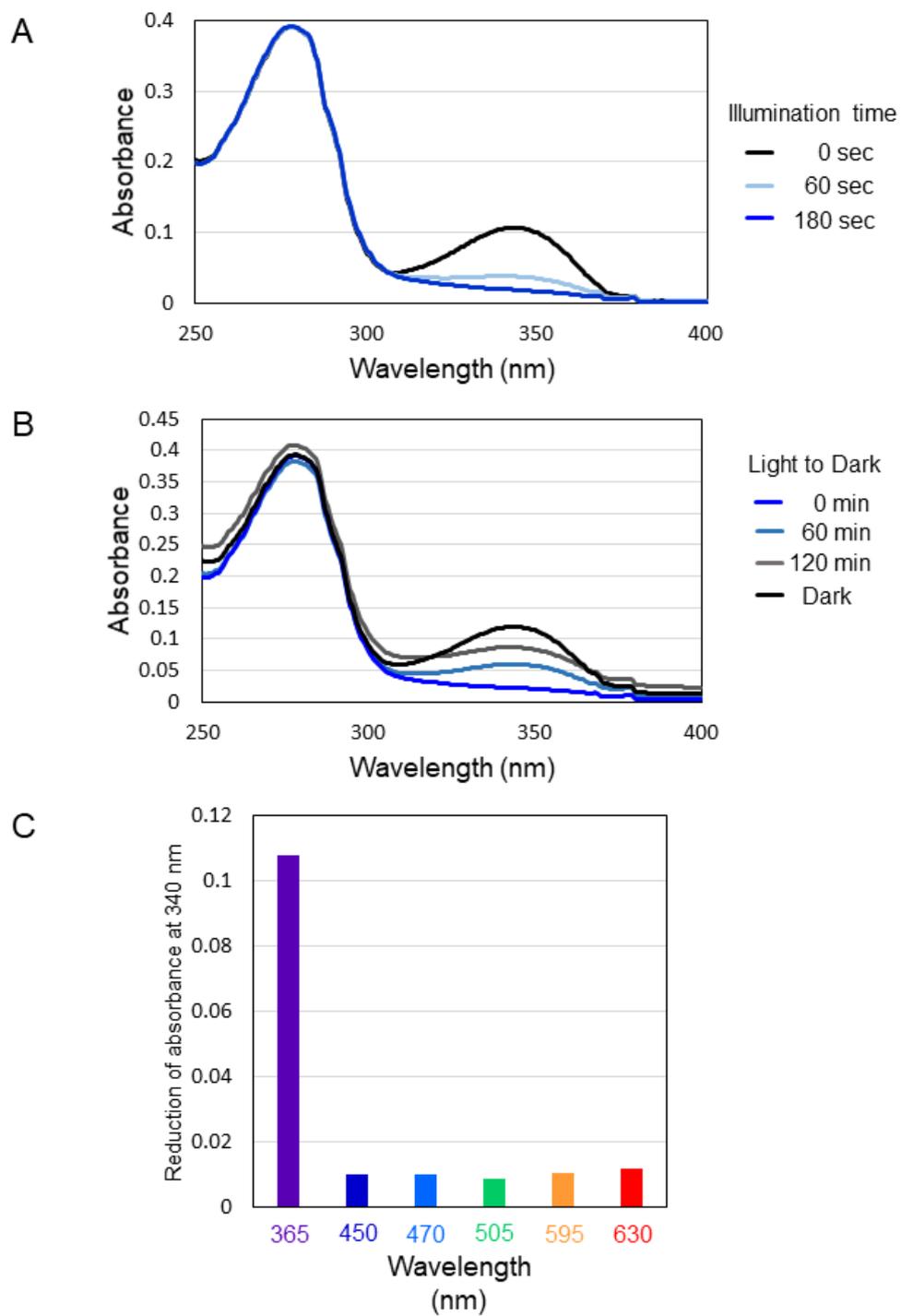


図 3-3-1-2 *B. multivorans* 由来 LitR の光サイクル反応と受光範囲

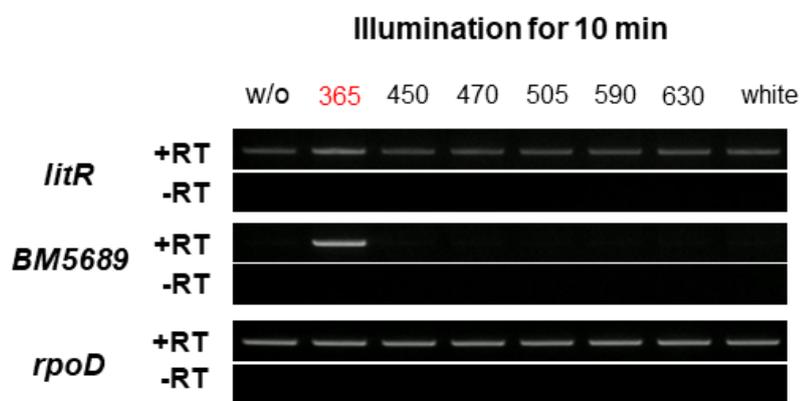


図 3-3-1-3 *B. multivorans* の受光範囲

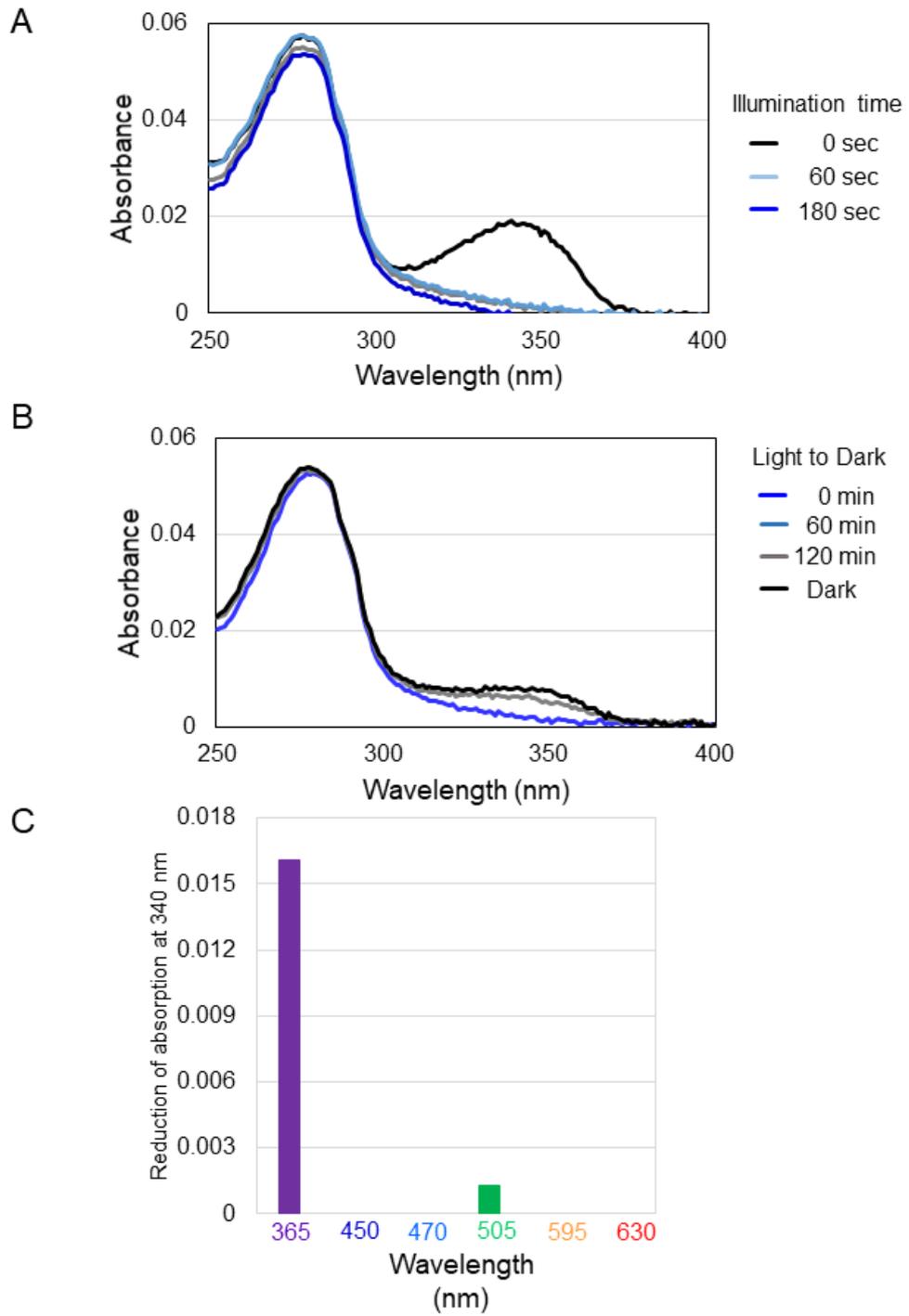


図 3-3-1-4 *B. vietnamiensis* 由来 LitR の光サイクル反応と受光範囲

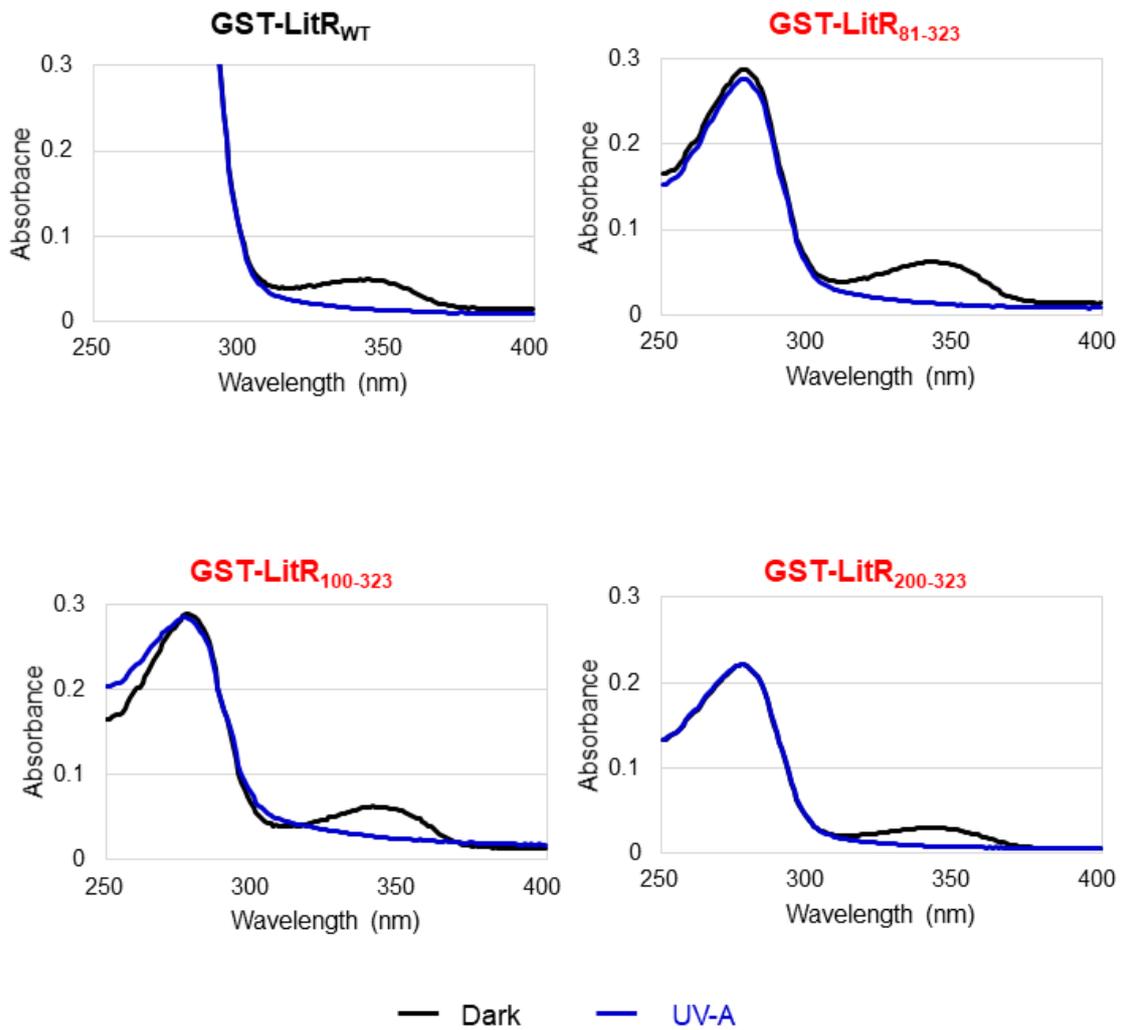


図 3-3-1-5 N 末端欠失 LitR の吸収スペクトル

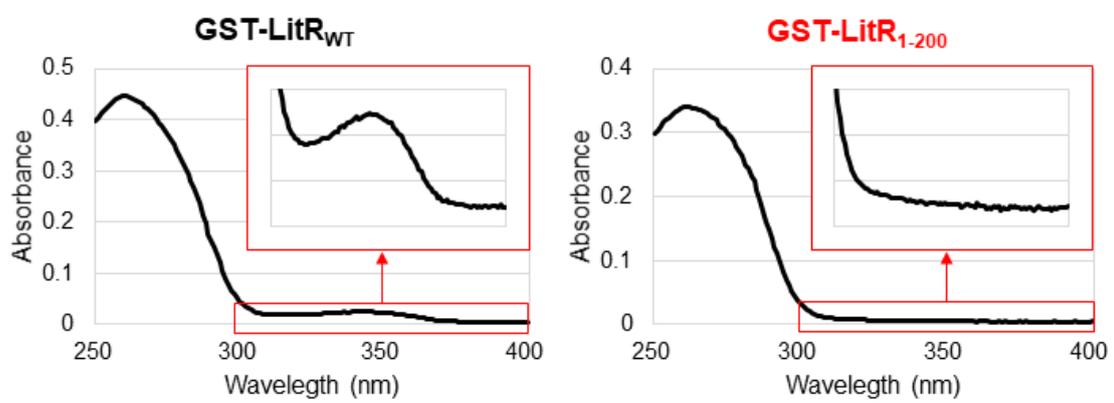


図 3-3-1-6 C 末端欠失 LitR の吸収スペクトル

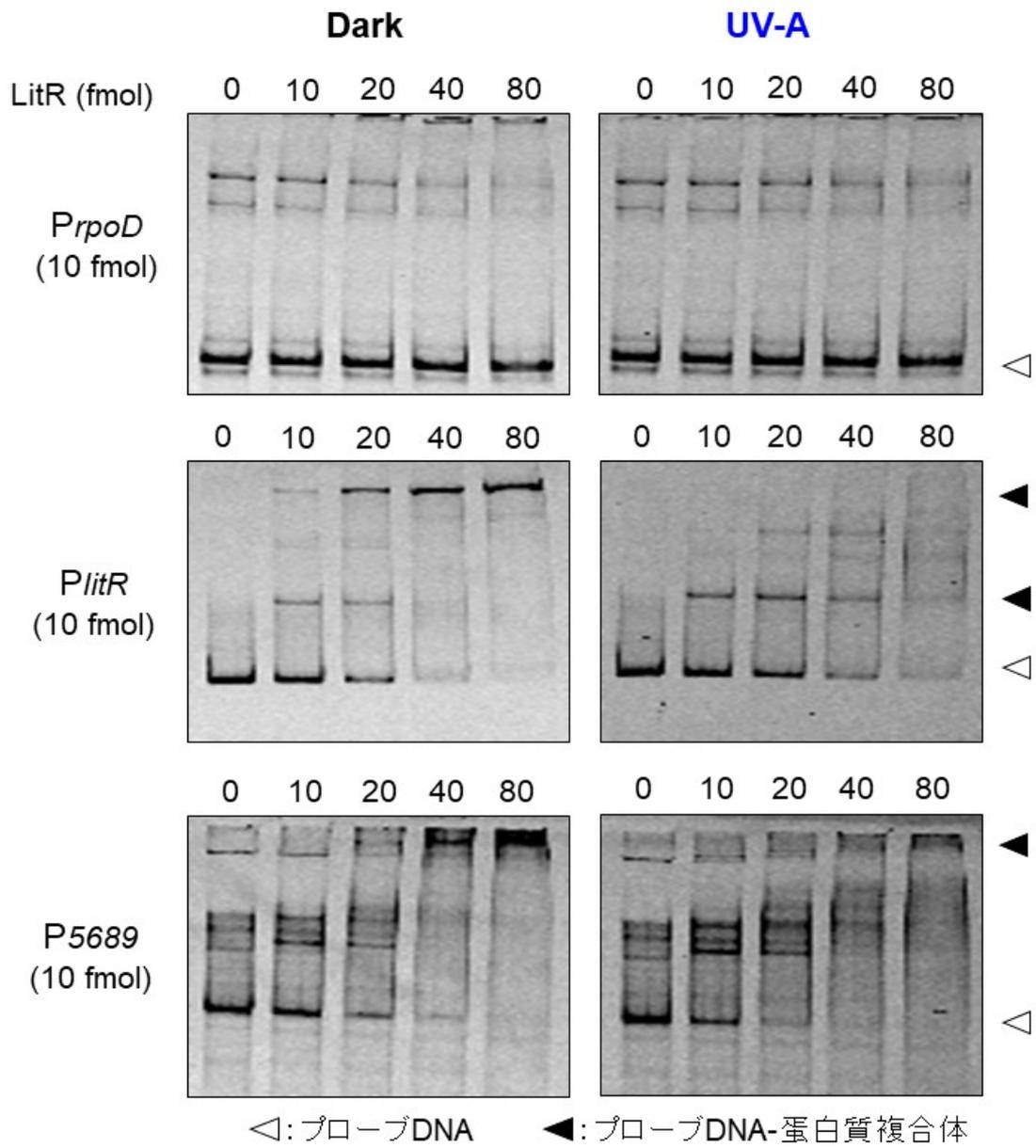


図 3-3-1-7 光照射による DNA 結合能への影響

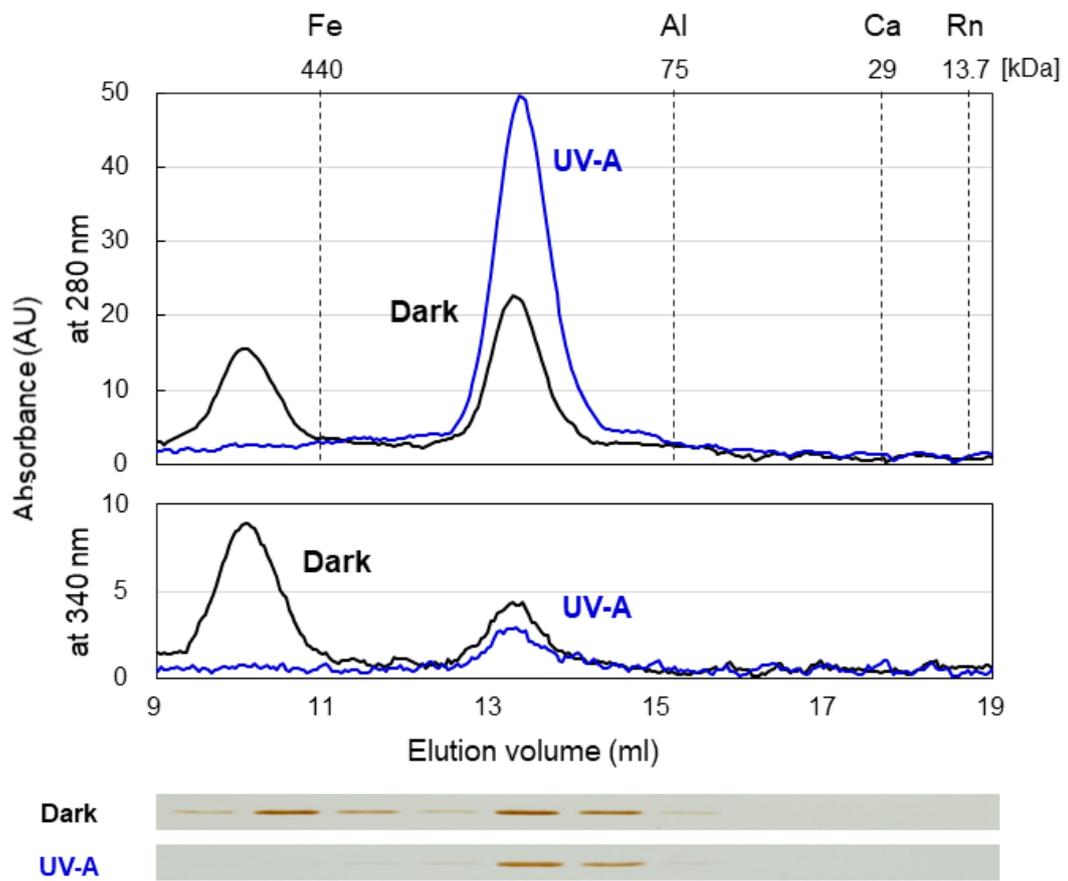


図 3-3-1-8 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いた光照射による LitR<sub>WT</sub> のホモ複合体解離の観察

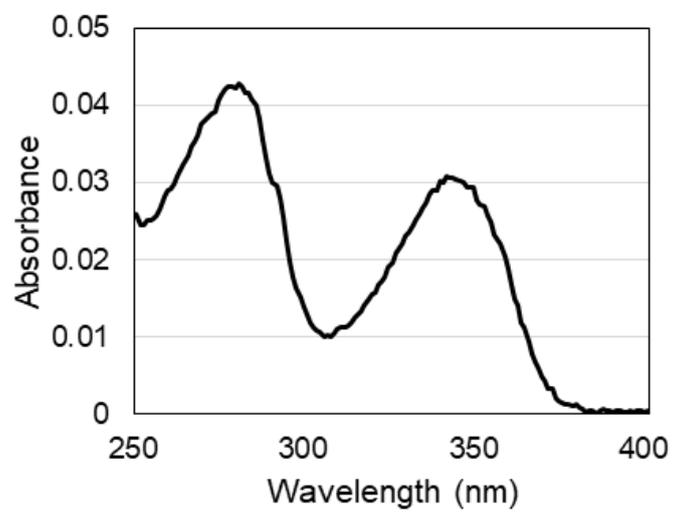


図 3-3-1-9 LitR<sub>81-323</sub> の吸収スペクトル

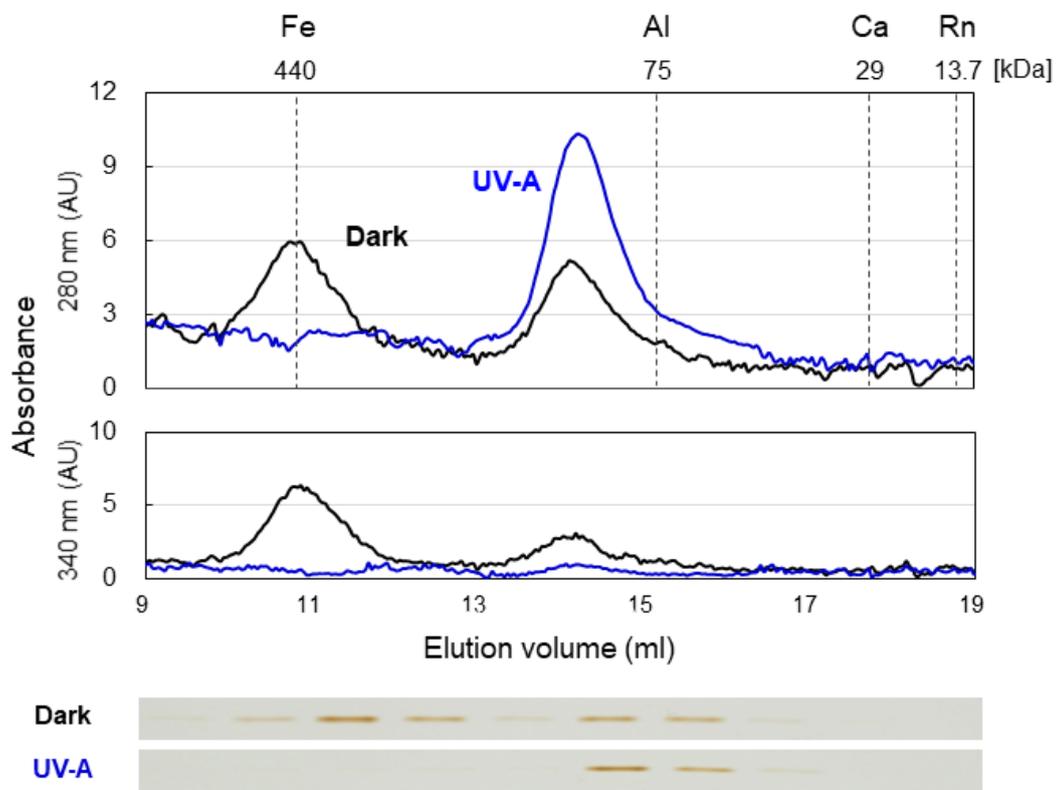


図 3-3-1-10 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いた LitR<sub>81-323</sub> の光依存的なホモ複合体の解離の観察

## 第2項 光感知ドメインの分子構造

### 目的

LitR の吸収スペクトルに見られた 340 nm の単一のピークは光センサーに特有の光サイクル反応を示し、さらにその光依存的な DNA 結合能の変動とオリゴマーの解離が認められた。このことから、340 nm のピークがアンテナ分子に由来することが考えられる。そこで、その分子を単離して構造を明らかにすることで、新規な光センシング機構を明らかにすることを目的とした。さらに、その光感知に関わるアミノ酸残基を特定することで、LitR 蛋白質-アンテナ分子間の相互作用によって成立すると予想される光センサー機能を明確にすることを目指した。

## 結果

340 nm の極大吸収が何らかの低分子化合物に由来すると予想し、まず LitR 蛋白質からの単離を試みた。加熱した LitR 蛋白質を遠心分離してその上清の吸収スペクトルを測定したところ、37°C では LitR がほとんど変性せず、55°C と 95°C では光の吸収を示さなかった (図 3-3-2-1、左端のレーン)。また、 $\beta$ -メルカプトエタノール ( $\beta$ -ME) と DTT を加えて同様の操作をしたが、その効果は認められなかった (図 3-3-2-1、中央および右端のレーン)。さらに、酢酸エチルの添加による抽出を行ったが、その上清の吸収スペクトルには光の吸収が認められなかった (図 3-3-2-2)。次に、LitR 蛋白質を ICP-MS で分析して元素の含有率を調査したところ、ほとんどの元素は 10% を下回った (表 3-3-2-1)。このことから、LitR は金属イオンと結合していないことが考えられた。そこで、LitR 蛋白質をリフォールディングさせることによって 340 nm のピークが消失したアポ体の調製を試みた。 $\beta$ -ME 非添加条件下でリフォールディングを行ったところ、340 nm のピークはほとんど消失していなかった (図 3-3-2-3A および B)。グアニジン塩酸塩溶液中の吸収スペクトルを測定したところ、340 nm のピークが検出された。このことから、SH 基が構造形成に重要な役割を果たしていると考えられた。次に、 $\beta$ -ME を添加して

リフォールディングを行ったところ、グアニジン塩酸塩溶液中では 340 nm のピークは消失し、巻き戻し後のピークは 10 分の 1 程度まで減少した (図 3-3-2-3C)。このことから、不完全なアポ体の調製に成功したと考えられる。次に、アンテナ分子の候補として 340 nm に極大吸収をもつ NADH や 360 nm に極大吸収を示す葉酸を LitR アポ体に添加し、それらとの相互作用の解析を透析法によって行ったが (第 2 章参照)、結合を示す結果は得られなかった (図 3-3-2-4)。

これまでの試験では、LitR 蛋白質から低分子化合物あるいは金属イオンを検出できなかったため、次に SDS を用いた変性が 340 nm に及ぼす影響を調査した。2%の SDS を含んだ緩衝液に溶解した LitR では本ピークが 300 nm 側にシフトした (図 3-3-2-5A)。さらに、熱処理によって本ピークは消失した。また、SDS と  $\beta$ -ME を含んだものにおいても同様に本ピークは認められなかった。これらのことから、本ピークは 340 nm に極大吸収を持つ化合物に由来しないことが示唆された。次に、トリプシンによって LitR を部分消化させてその吸収スペクトルを測定したところ、340 nm の極大吸収が徐々に 300 nm 側に崩れていき、120 min 後には本ピークが検出されなくなった (図 3-3-2-5B)

そこで次に、340 nm の極大吸収の形成に関与するアミノ酸の推定を行った。C 末端領域には 3 つのシステイン (Cys) 残基が高度に保存されており、それらが光受容ドメインの形成に関与することが予想された (図 3-3-2-6)。そこで、3 つの Cys 残基をそれぞれアラニン (Ala) またはセリン (Ser) に置換した変異体を作製し (図 3-3-2-7)、その吸収スペクトルを測定した。その結果、野生型では 340 nm の極大吸収が認められたのに対して、Ala に置換した 3 つの変異体全てで本ピークが検出されなかった (図 3-3-2-8)。また、251 番目の Cys を Ser に置換した LitR では 340 nm のピークが 300 nm 側に傾き、253 番目の Cys の Ser 置換体ではそのピークは消失し、274 番目の Cys の Ser 置換体ではピークが 322 nm にシフトしていた (図 3-3-2-9)。このことから、光受容ドメインの形成に 3 つのシステイン残基が関与していることが明らかになった。次に、ゲルシフトアッセイによって解析したところ、Ala 変異体では顕著に DNA 結合能が低下し、Ser 変異体では野生型よりも弱かった (図 3-3-2-10 および 3-3-2-11)。また、Ala 変異体をゲルろ過カラムクロマトグラフィーに供したところ、野生型では検量線外と 4 量体の 2 つのピークが検出されたのに対し、C251A では 171 kDa、C253A では 158 kDa、C274A では 180 kDa の単一のピークが認められた (図 3-3-2-12 から 3-3-2-

14 まで)。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。

次に、芳香族アミノ酸の変異体を作製した。植物型光センサー UVR8<sup>58,59</sup> や線虫 *C. elegans*<sup>60</sup> の LITE-1 ではトリプトファンが UV 光に対するアンテナ分子として機能することが報告されている。そこで、C 末端領域に保存されている 228 番目の Trp と 267 番目のフェニルアラニン (Phe)、271 番目のチロシン (Tyr) を Ala に置換した変異体を作出した (図 3-3-2-6 および図 3-3-2-15)。その吸収スペクトルを測定したところ、W228A では野生型と同様な 340 nm のピークが検出されたが、F267A と Y271A では 340 nm のピークが 5 分の 1 程度までに低下した (図 3-3-2-16)。このことから、Phe<sup>267</sup> と Tyr<sup>271</sup> が光感知に関与していることが推測された。次に、Phe<sup>267</sup> を Tyr または Trp に、Tyr<sup>271</sup> を Phe または Trp に置換した変異体を作製した。F267W の吸収スペクトルは、F267A と同様に低い 340 nm のピークが検出された一方、F267Y では 340 nm のピーク強度は野生型に近いレベルを示した (図 3-3-2-17)。また、Y271F と Y271W の 340 nm のピークは Y271A よりも高い吸光度を示した (図 3-3-2-18)。

## 考察

### (1) アンテナ分子の特定：低分子化合物の検証

LitR の 340 nm のピークが低分子化合物に由来するものと予想してその単離を行ったが、その取得には至らなかった。また、リフォールディングによって得られた不完全なアポ LitR と NADH あるいは葉酸との相互作用解析を行ったが、それらとの結合も認められなかった。これらのことから、クラス III LitR のアンテナ分子が低分子化合物である証拠を得ることができなかった。

### (2) アンテナ分子の特定：金属イオンが関与する可能性の検証

一部の酸化センサー型転写調節蛋白質では、Cys 残基が金属と結合することが知られている。酸化センサー型アンチシグマ因子 RsrA は、還元状態で 3 つの Cys 残基と 1 つの His 残基が亜鉛と結合してシグマ因子 SigR の機能を抑制し、ジアミドを感知すると亜鉛が遊離して SigR を活性化させる<sup>61</sup>。また、MerR 型転写調節因子 SoxR は 4 つの Cys 残基が 2Fe-2S クラスターを形成し、活性酸素がそれを破壊することで転写活性化因子として機能する<sup>62</sup>。しかし、LitR とそれらとの蛋白質間の相同性は低く、また、Cys 残基の

保存性は認められなかった。さらに、ICPEによる元素分析の結果から、LitRのアンテナ構造に金属イオンが関与する可能性が低いと考えられた。

### (3) Cys 残基の役割

グアニジン塩酸塩または SDS を用いた変性実験結果から、LitR がジスルフィド結合を含んだ構造を形成することが示唆された。一方、非変性条件下で還元剤を添加しても 340 nm の極大吸収に影響がみられなかったことから、ジスルフィド結合は LitR 蛋白質の内側に形成されていることが考えられた。光感知ドメイン中に保存されている 3 つの Cys 残基を Ala に置換させた LitR では、340 nm の極大吸収が検出されなかった。また、LitR<sub>C251S</sub> と LitR<sub>C274S</sub> では UV-A 吸収ピークは 280 nm 側にシフトしたのに対し、LitR<sub>C253S</sub> ではその極大吸収が検出されなかったことから、Cys<sup>253</sup> が光感知ドメインの形成に必須であることが明らかになった。さらに、3 つの Cys 変異体は DNA 結合能の低下と推定 16 量体を形成しないことが認められたことから、Cys 残基が光感知の構造と DNA 結合に必須の役割を担うことが明らかになった。

#### (4) アンテナ分子の特定：ビルトインの検証

クラス III LitR のアンテナ分子が低分子化合物や金属元素である可能性は低いと考えられたことから、自身のアミノ酸残基を利用するビルトイン型であることが考えられた。既知のビルトイン型光センサーである植物の UVR8 や線虫 *C. elegans* の LITE-1 では特定の Trp 残基をアンテナ分子として利用することが報告されている<sup>58-60</sup>。クラス III LitR に保存されている Trp 残基の変異体の吸収スペクトルは野生型と同様に 340 nm の極大吸収を有していたが、保存されている 267 番目の Phe と 271 番目の Tyr を Ala に置換したことでその極大吸収は低いレベルになった。このことから、Phe と Tyr がアンテナ分子であることが示唆された。

構造が明らかになっているビルトイン型補酵素の中で、Tyr と Cys で形成するチロシルチオエーテルが LitR のアンテナ構造として最も考えられる。チロシルチオエーテルはカビのガラクトースオキシダーゼではじめて報告され<sup>63</sup>、ヒトやラット由来のシステインジオキシゲナーゼもその構造を保有することが明らかにされている<sup>64,65</sup>。その役割は活性部位の構造を形成すること、および、酵素活性で生じる活性酸素の発生を防ぐことが考えられている<sup>62</sup>。オキシダーゼは触媒反応の過程で活性酸素を生じることが知られている<sup>1</sup>。

また、光合成色素クロロフィルも光照射によって活性酸素を発生させることが知られており、**B<sub>12</sub>** のポルフィリンやフラビンのような光アンテナ分子も同様なことが考えられる。クラス III LitR のアンテナがビルトイン型と仮定した場合、その役割の一つは光感知で生じる活性酸素発生の抑制であることが予想される。

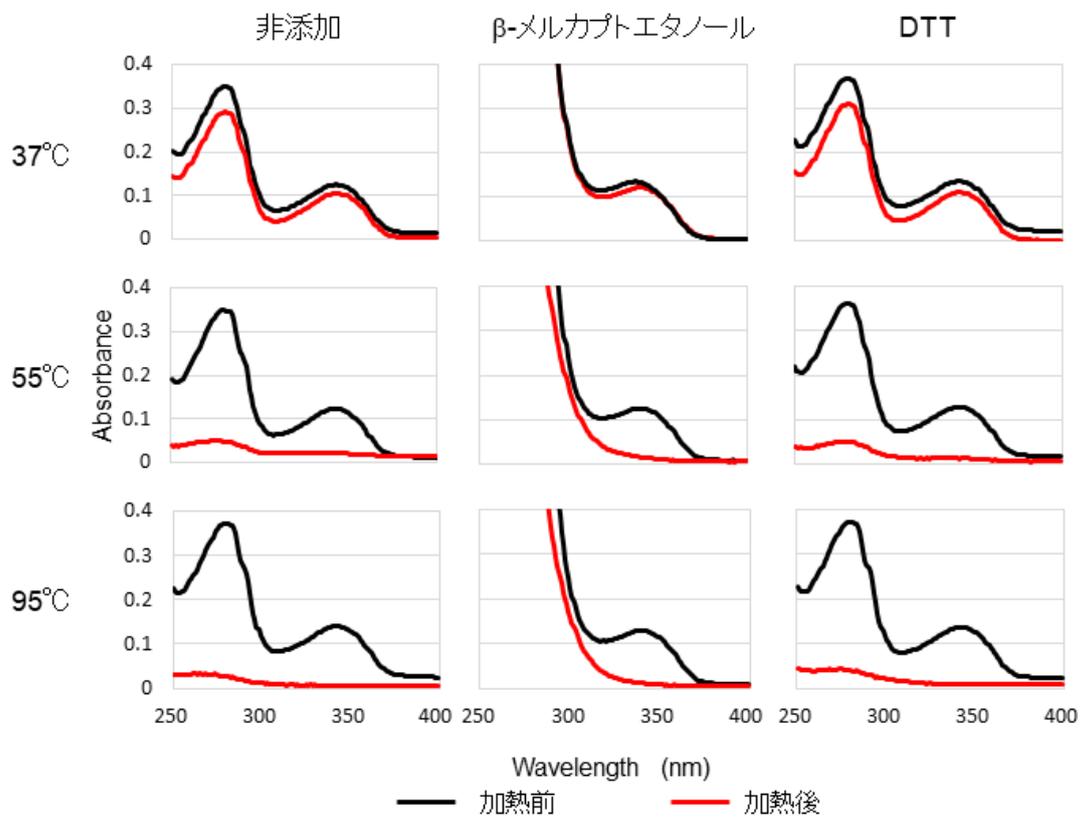


図 3-3-2-1 熱および還元処理が LitR のアンテナ分子に及ぼす影響

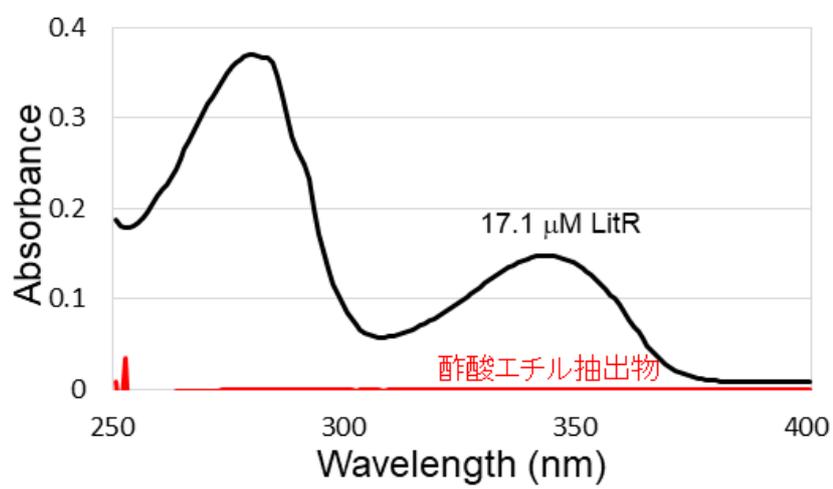


図 3-3-2-2 酢酸エチルによる LitR のアンテナ分子の抽出の試み

表 3-3-2-1 LitR 蛋白質の元素含有率

Li 0%	Be 0%	B 0%	Na 0%	Mg 0.2%
Al -5.3%	Si 0.1%	P 0.5%	S 84.6%	K 6.2%
Ca 2.1%	Sc 0%	Ti 0%	V 0%	Cr 0%
Mn 0%	Fe 0%	Co 0%	Ni 0%	Cu 0.2%
Zn 1.0%	Ga 0%	Ge 0%	As 0%	Se 0%
Rb -33.4%	Sr 0%	Y 0%	Zr 0%	Nb 0%
Mo 0%	Ru 0%	Rh -0.1%	Pd 0%	Ag 0%
Cd 0%	In 0%	Sn 0%	Sb 0%	Te -0.1%
I 0%	Cs 0%	Ba 0%	La 0%	Ce 0%
Pr 0%	Nd 0%	Sm -0.1%	Eu 0%	Gd 0%
Tb 0%	Dy 0%	Ho 0%	Er 0%	Tm 0%
Yb 0%	Lu 0%	Hf 0%	Ta 0.1%	W 0%
Re 0%	Os 0%	Ir -0.1%	Pt 0.1%	Au 0%
Hg 0%	Tl 0%	Pb 0%	Bi 0%	Th 0%
U 0%				

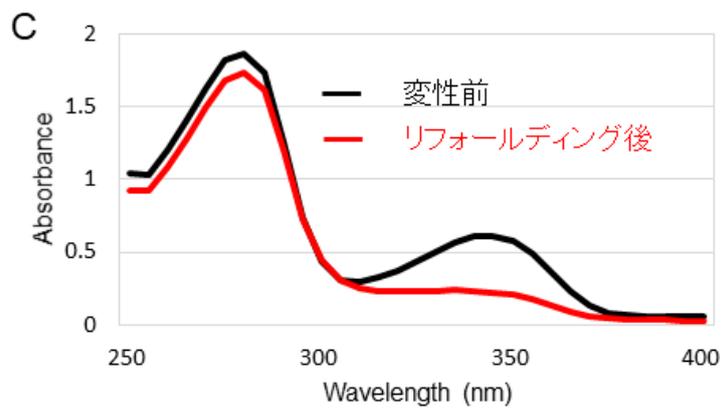
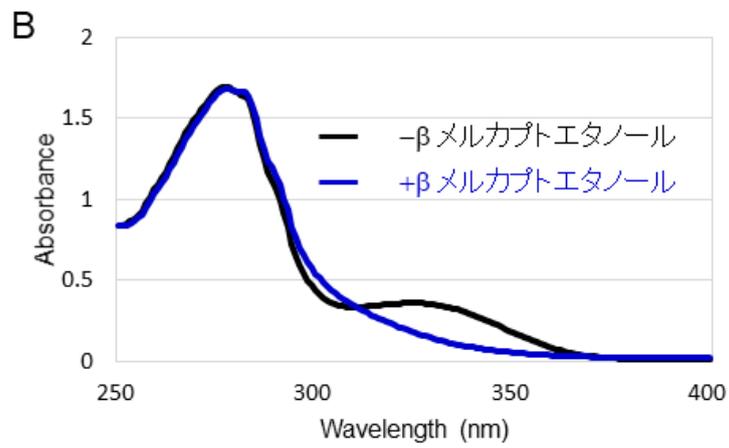
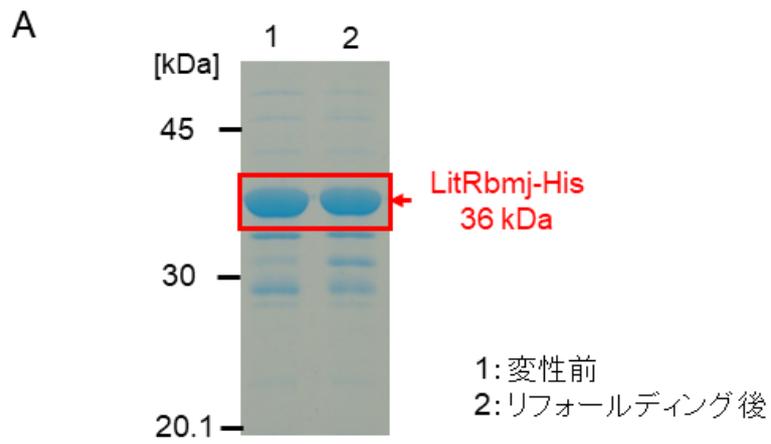


図 3-3-2-3 グアニジン塩酸塩による変性処理とリフォールディング

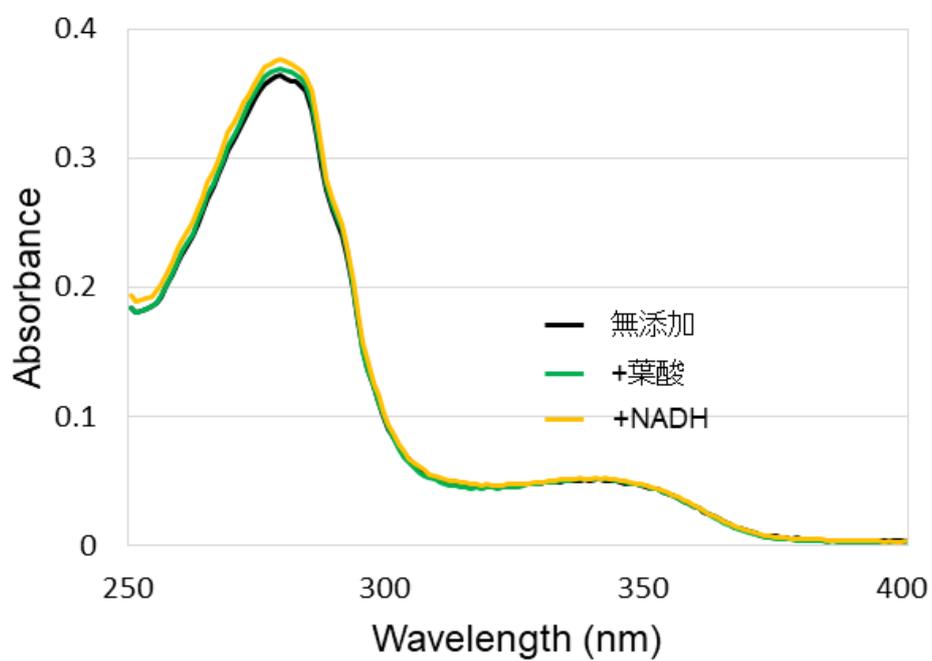


図 3-3-2-4 アポ LitR 蛋白質とアンテナ候補化合物との相互作用解析

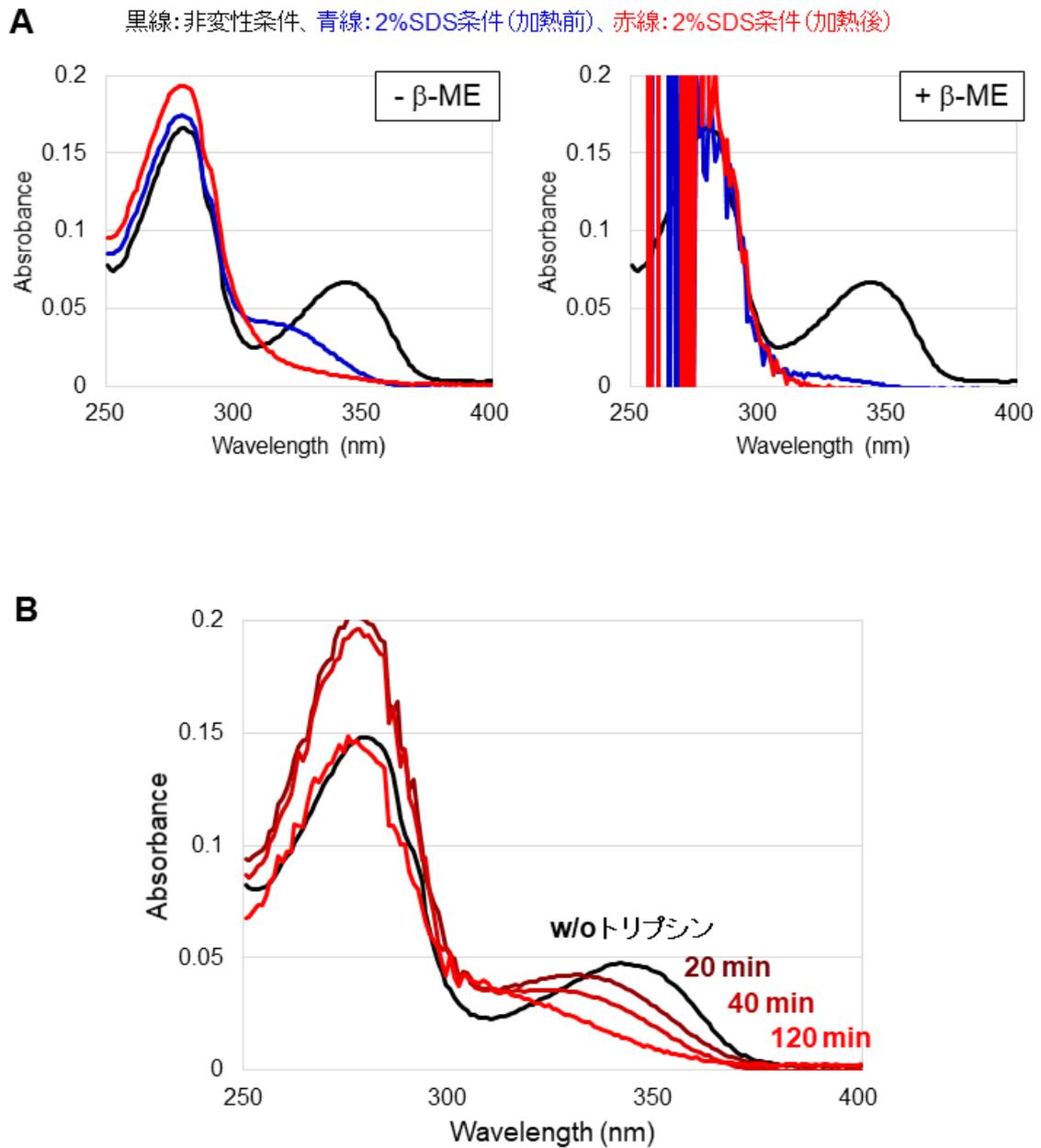


図 3-3-2-5 変性処理による吸収スペクトルの変化



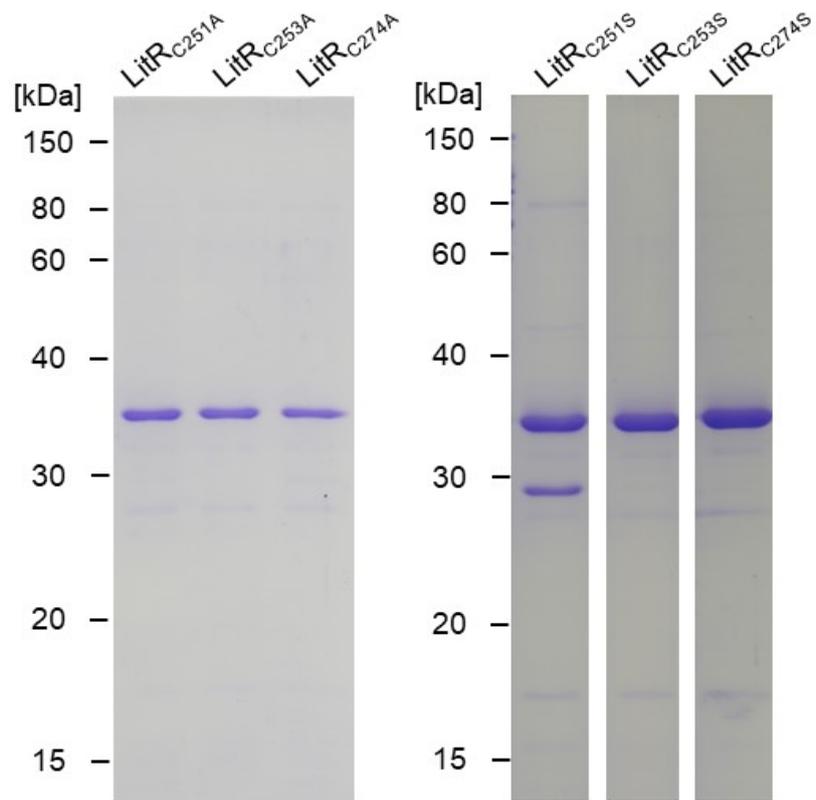


図 3-3-2-7 SDS-PAGE による Cys 変異 LitR 蛋白質の精製の確認

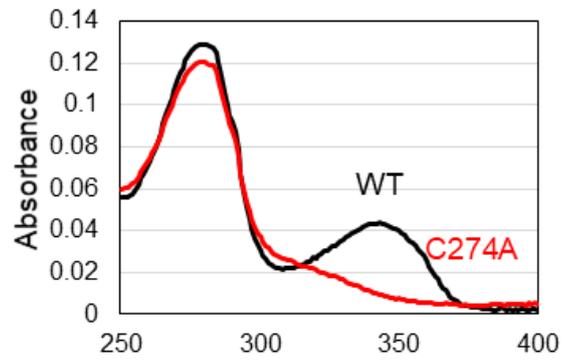
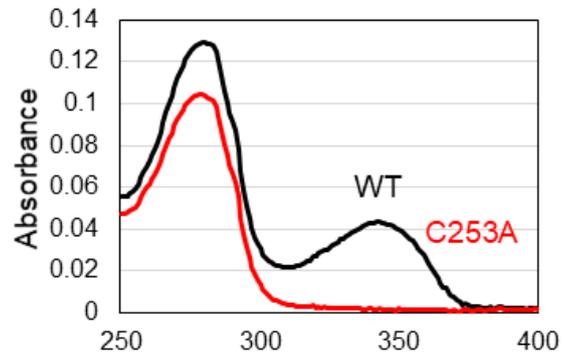
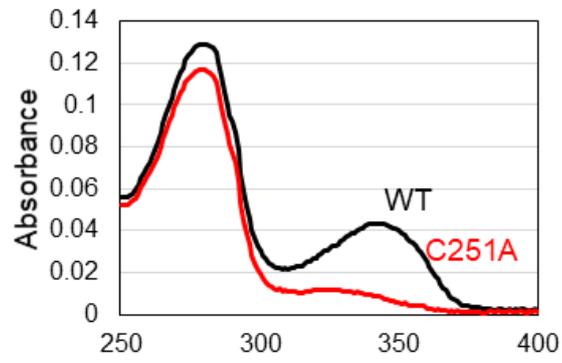


図 3-3-2-8 Cys を Ala に置換した LitR の吸収スペクトル

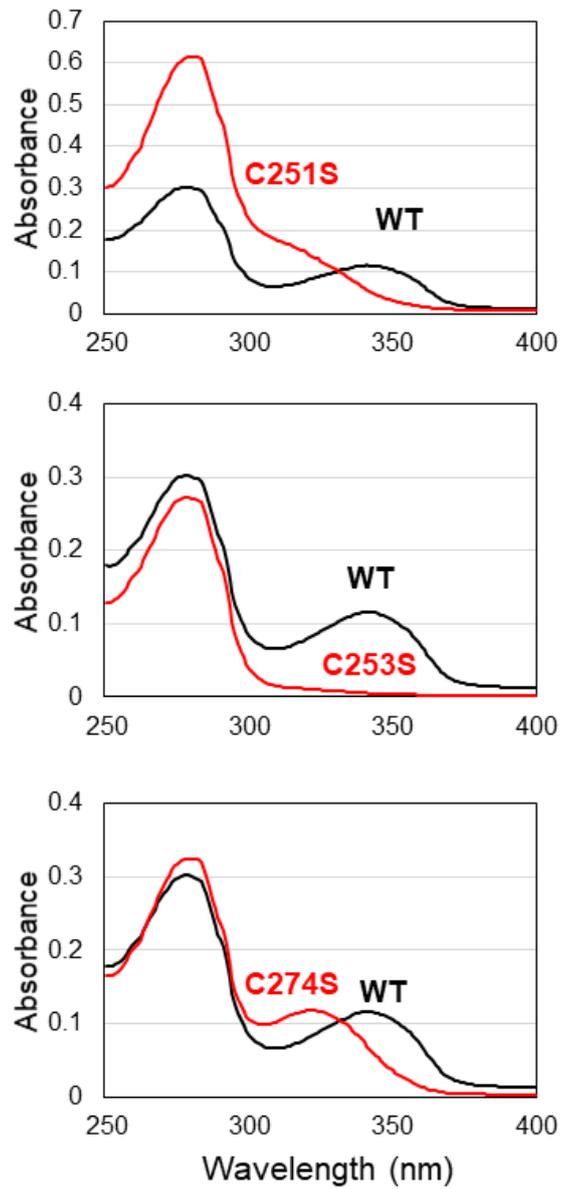


図 3-3-2-9 Cys を Ser に置換した LitR の吸収スペクトル

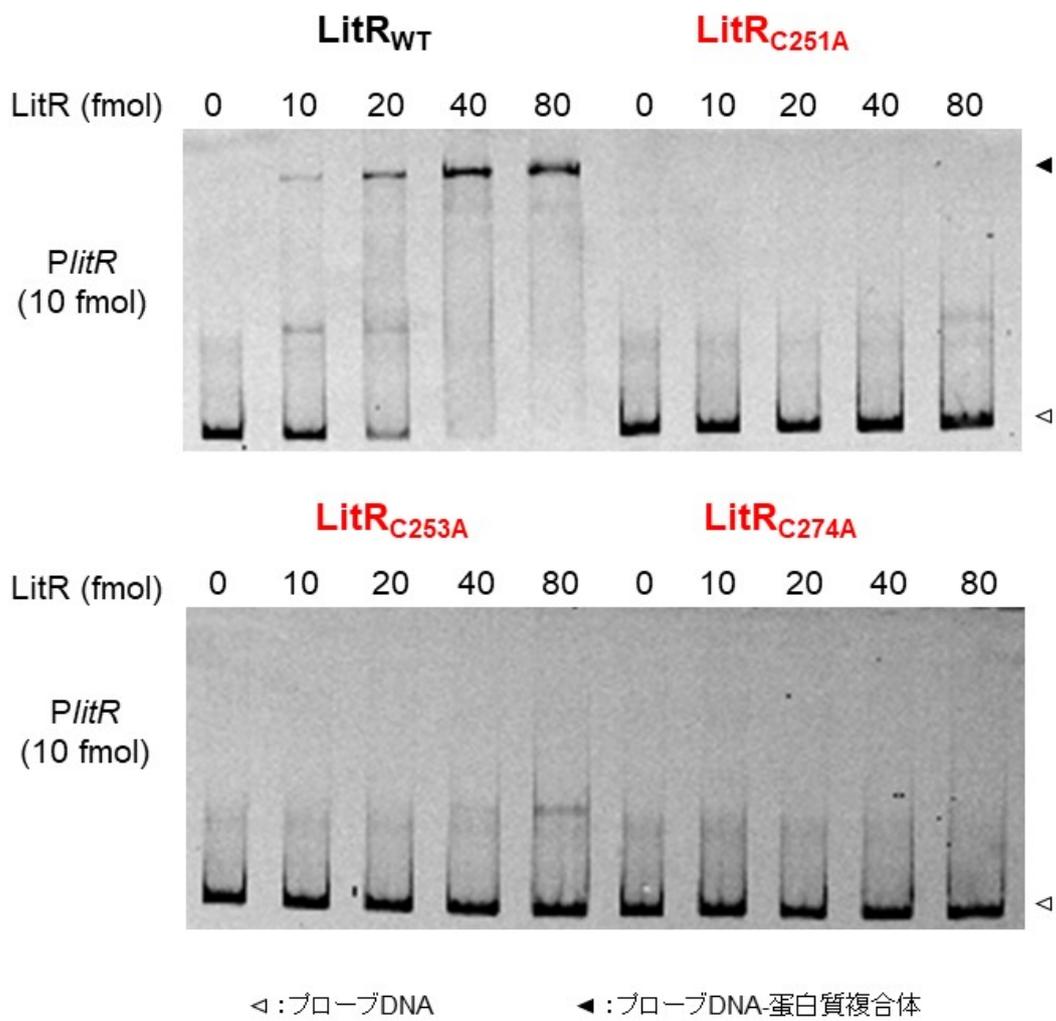


図 3-3-2-10 Cys を Ala に置換した LitR の DNA 結合能の解析

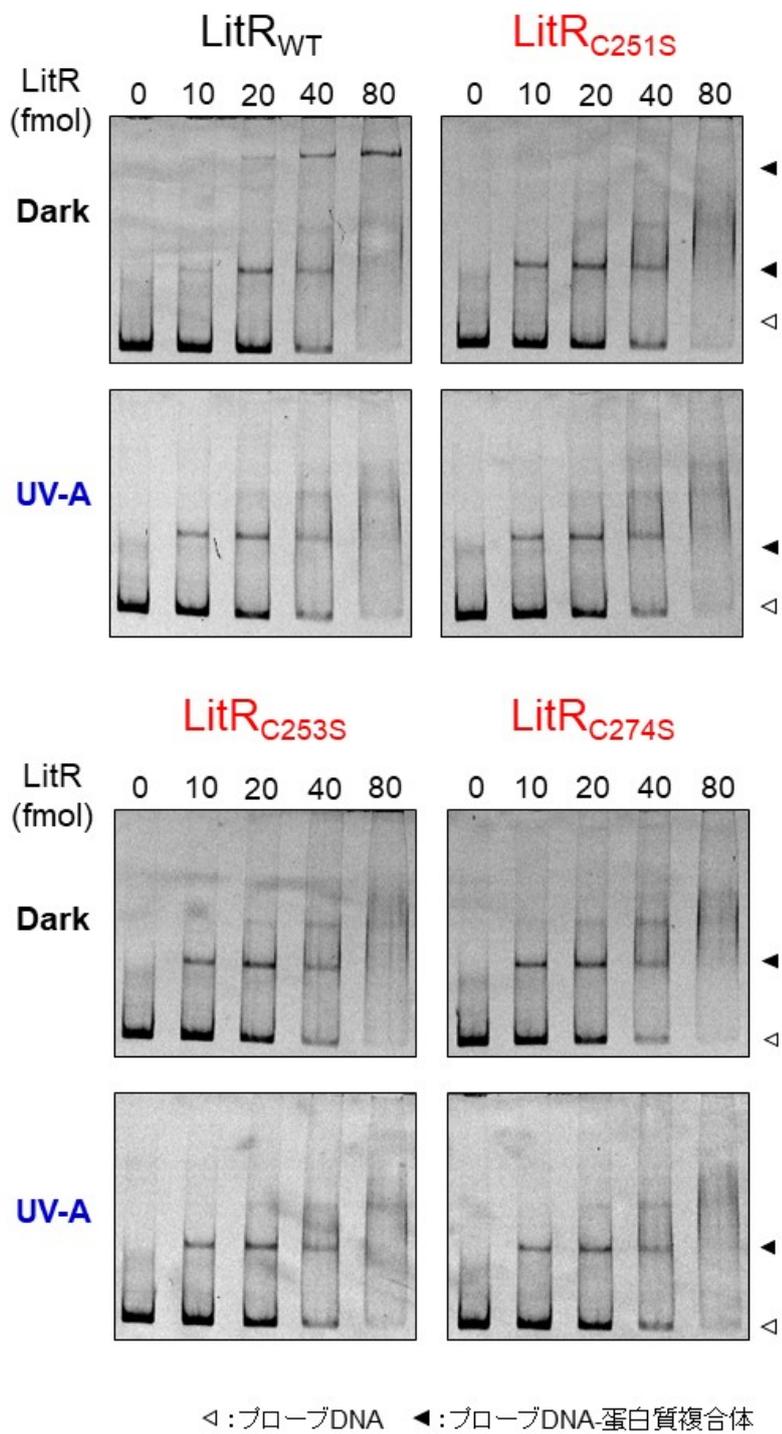


図 3-3-2-11 Cys を Ser に置換した LitR の DNA 結合能の解析

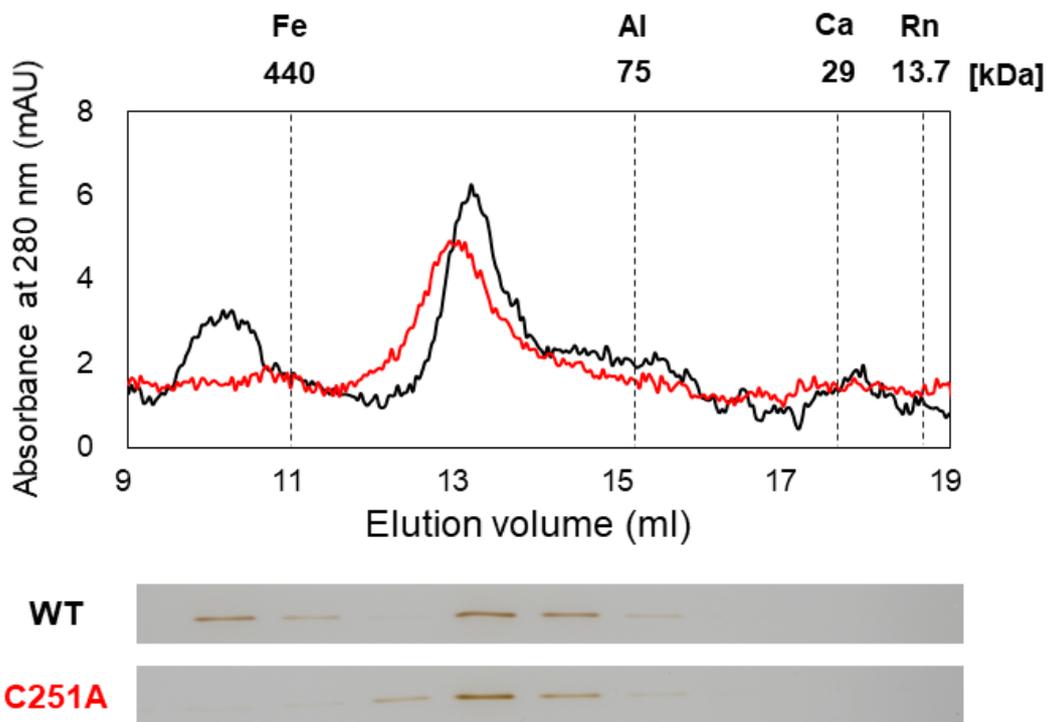


図 3-3-2-12 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる LitR<sub>C251A</sub> の解析

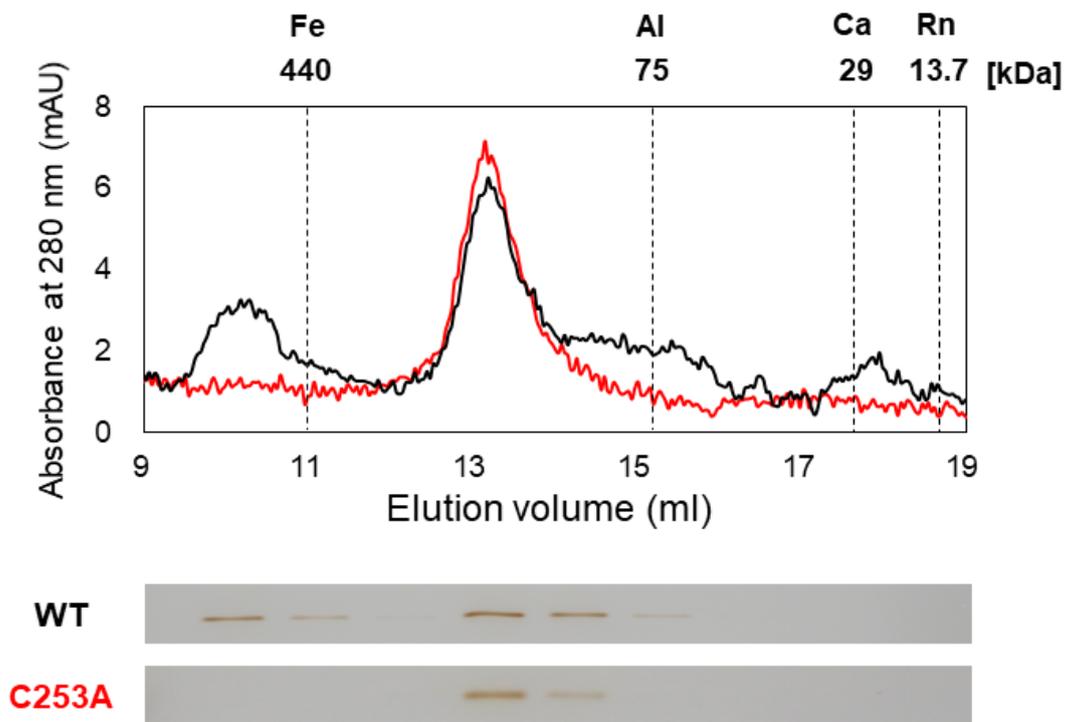


図 3-3-2-13 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる LitR<sub>C253A</sub> の解析

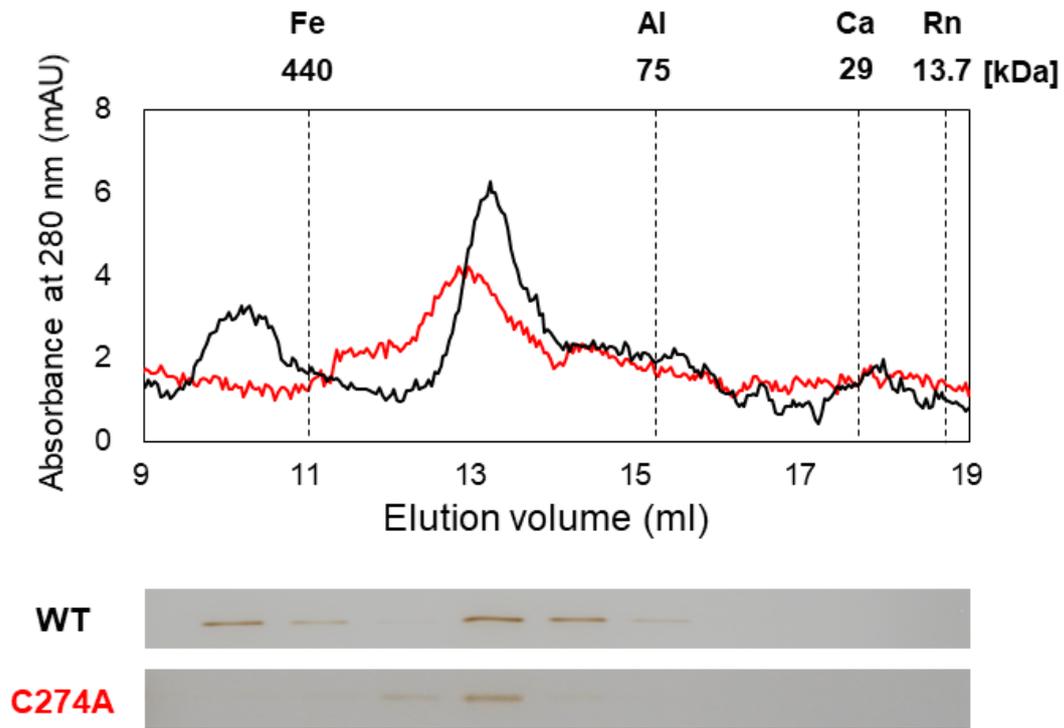


図 3-3-2-14 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる LitR<sub>C274A</sub> の解析

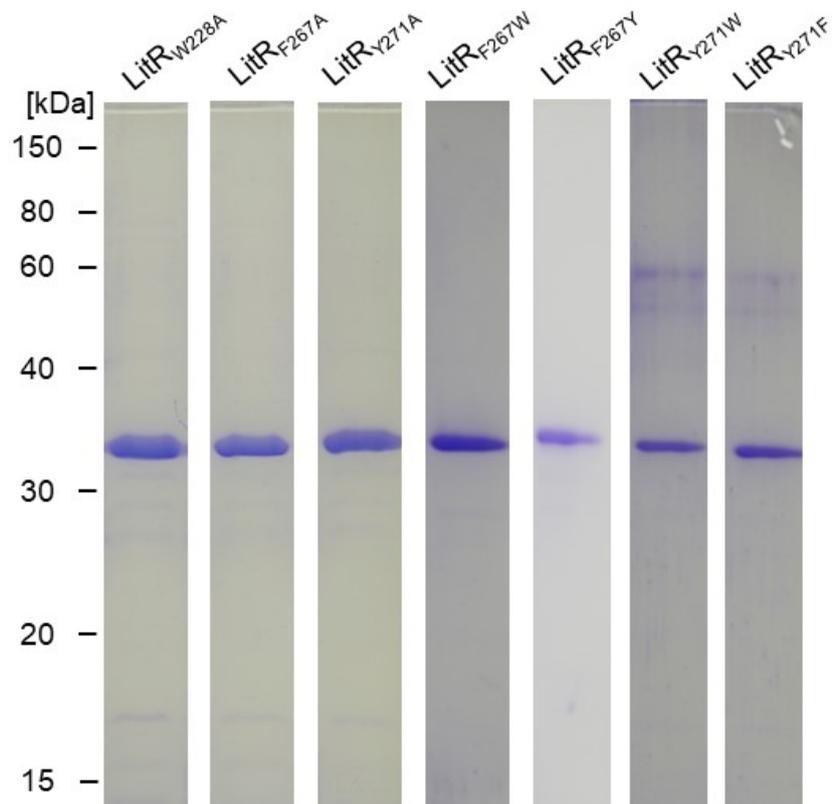


図 3-3-2-15 芳香族アミノ酸変異 LitR の精製の確認

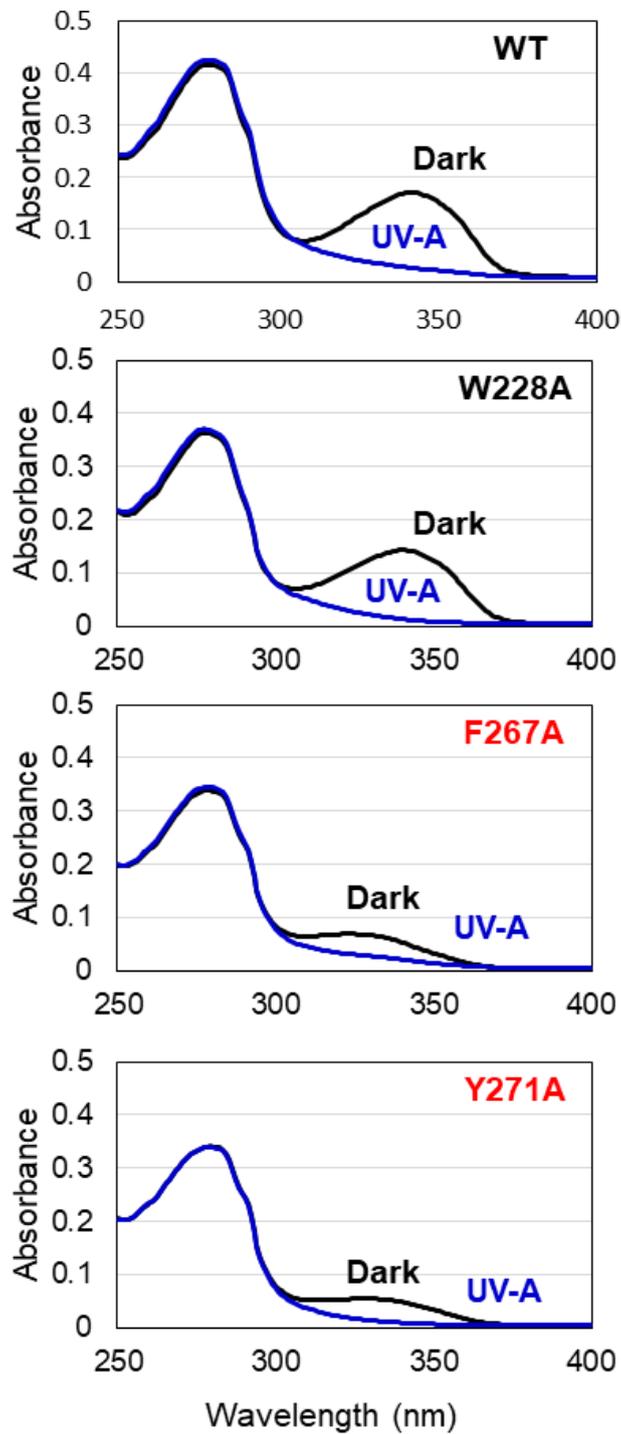


図 3-3-2-16 保存されている芳香族アミノ酸を Ala に置換した LitR の吸収スペクトル

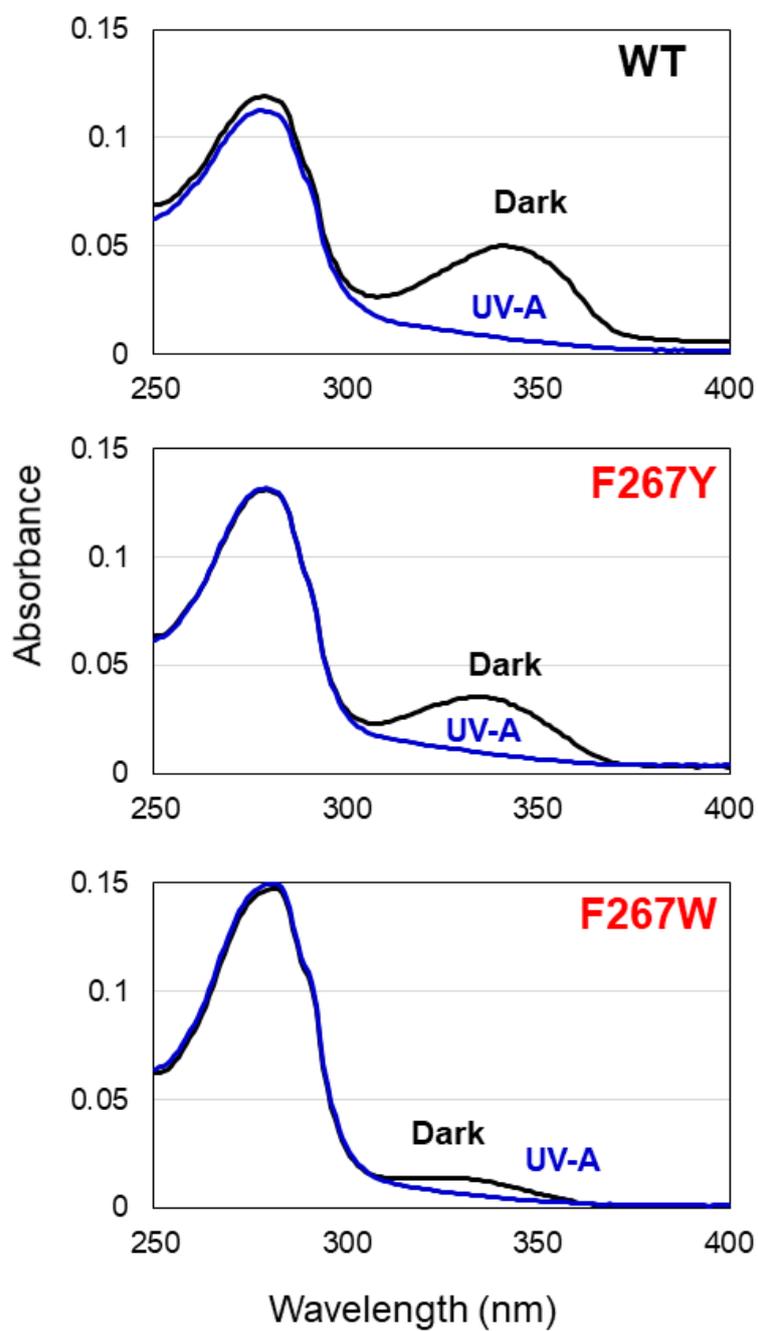


図 3-3-2-17 Phe<sup>267</sup> を別の芳香族アミノ酸に置換した LitR の吸収スペクトル

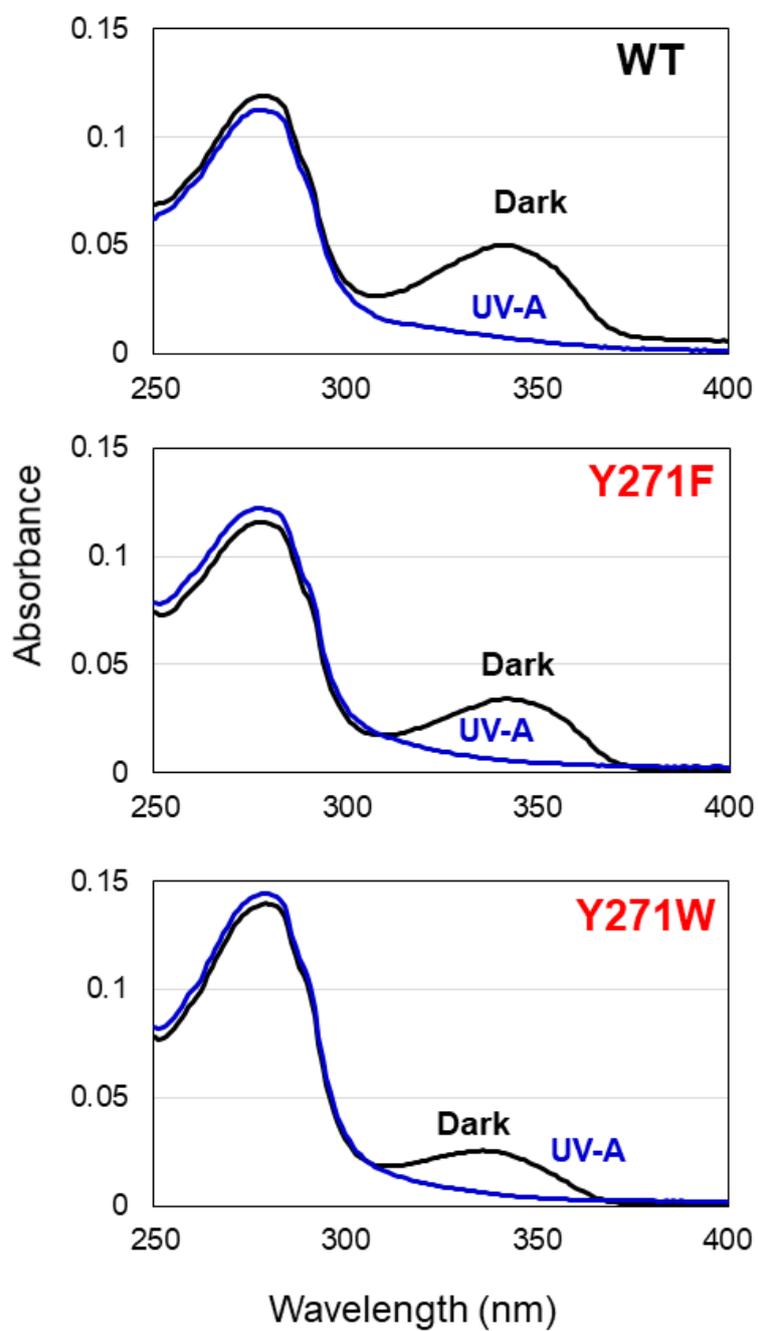


図 3-3-2-18 Tyr<sup>271</sup>を別の芳香族アミノ酸に置換した LitR の吸収スペクトル

### 第3項 小括

クラス III LitR は UV-A を感知し、LOV や BLUF などの光センサーに見られる光サイクル反応と光依存的なホモ複合体の解離を示すことが判明した。

これは B<sub>12</sub> をクロモフォアとするクラス I とは異なった光感知機構であることを推測させる。また、本蛋白質の DNA 結合能は UV-A 照射によって変動することから、UV-A の照射が C 末端側の構造変化に連動して N 末端側の DNA 結合活性に大きく影響すると考えられた。

さらに、UV-A 感知ドメインに保存されている 3 つの Cys 残基が光感知構造の形成に必須の役割を有することが明らかになった。LitR が要求する光アンテナ分子を単離することができなかったことから、一つの可能性としてそのアンテナ構造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ことが考えられる。既知のビルトイン型光センサーである UVR8 や LITE-1 では特定の Trp 残基が UV 感知に利用されることが知られているが、クラス III LitR の UV-A 感知ドメインはそれらとも相同性を有していない。一方、クラス III LitR の芳香族アミノ酸の変異解析によって 267 番目の Phe と 271 番目の Tyr が UV-A 感知に重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 第4章 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  $\sigma^{\text{LitS}}$  によって 2 段階的に調節されると推測される (図 4-1)。暗条件下では LitR の転写抑制活性によって *litR* と *litS-foIE2* クラスターの転写を抑制する。UV-A 照射によって LitR の転写抑制能が低下すると、まず  $\sigma^{\text{RpoD}}$  を含んだ RNA ポリメラーゼが *litR* と *litS-foIE2* クラスターの転写を開始させる。これにより発現誘導される FoIE2 が細胞内の葉酸量を増加させることが明らかになった。次に、 $\sigma^{\text{LitS}}$  を含んだ RNA ポリメラーゼが *phrB2* や *cfaB* クラスターの転写を開始させる。このようにして 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。

特に、*B. multivorans* の光応答は UV 照射による DNA 損傷へ重要な役割を果たすことが考えられる。UV 照射による遺伝子発現メカニズムは SOS 応答が知られている<sup>66</sup>。UV 照射で生じた一本鎖 DNA を RecA が認識することでプロテアーゼ活性を発揮し、LexA を切断する。これが LexA によって転写抑制されていた SOS 応答性遺伝子群の発現を開始し、UV によって損傷した DNA を修復する。一方、*B. multivorans* では、クラス III LitR が UV-A を感知

することで *phrB2* の遺伝子発現を誘導し、光回復酵素活性によって DNA 損傷を修復することが考えられる。

さらに、本研究では、B<sub>12</sub> 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はじめて明らかにした。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 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っていないが、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。また、クラス III LitR は、既知のビルトイン型光センサー UVR8 や LITE-1 との相同性を示さないことから、新規な光センサーであることが強く示唆された。

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。

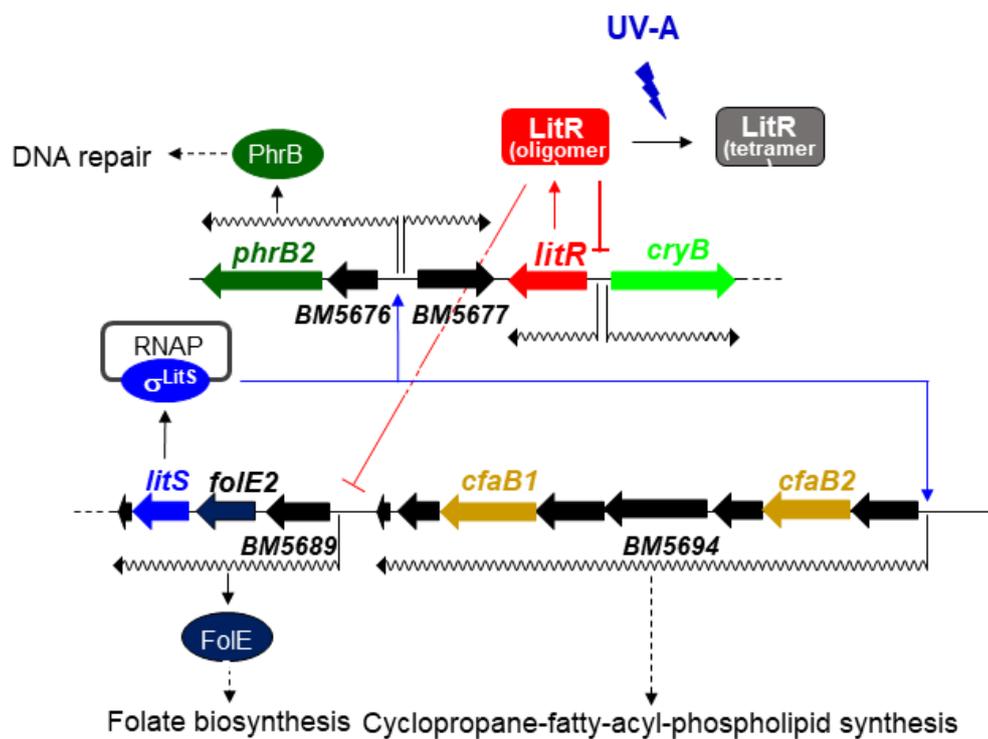


図 4-1 *B. multivorans* における光依存的な転写制御機構

## 参考文献

1. Ziegelhoffer EC, Donohue TJ. 2009. Bacterial responses to photo-oxidative stress. *Nat Rev Microbiol* 7:856-863.
2. Moskvin OV, Gomelsky L, Gomelsky M. 2005. Transcriptome analysis of the *Rhodobacter sphaeroides* PpsR regulon: PpsR as a master regulator of photosystem development. *J Bacteriol.* 187: 2148-2156.
3. Winkler A, Heintz U, Lindner R, Reinstein J, Shoeman RL, Schlichting I. 2013. A ternary AppA-PpsR-DNA complex mediates light regulation of photosynthesis-related gene expression. *Nat Struct Mol Biol.* 20: 859-867.
4. Ozturk N. 2017. Phylogenetic and Functional Classification of the Photolyase/Cryptochrome Family. *Photochem Photobiol.* 93: 104-111.
5. Purcell EB and Crosson S 2008. Photoregulation in prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology.* 11:168-178.

6. Takano H, Obitsu S, Beppu T, Ueda K. 2005. Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): Identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. *J Bacteriol* 187:1825-1832.
7. Takano H, Kondo M, Usui N, Usui T, Ohzeki H, Yamazaki R, Washioka M, Nakamura A, Hoshino T, Hakamata W, Beppu T, Ueda K. 2011. Involvement of CarA/LitR and CRP/FNR family transcriptional regulators in light-induced carotenoid production in *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol* 193:2451-2459.
8. Takano H, Mise K, Hagiwara K, Hirata N, Watanabe S, Toriyabe M, Shiratori-Takano H, Ueda K. 2015. Role and Function of LitR, an Adenosyl B<sub>12</sub>-Bound Light-Sensitive Regulator of *Bacillus megaterium* QM B1551, in Regulation of Carotenoid Production. *J Bacteriol* 197:2301-2315.

9. Ortiz-Guerrero JM, Polanco MC, Murillo FJ, Padmanabhan S, Elías-Arnanz M. 2011. Light-dependent gene regulation by a coenzyme B<sub>12</sub>-based photoreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:7565-7570.
10. Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG. 1997. The carotenoids as antioxidants - A review. *J Photochem Photobiol B Biol* 41:189-200.
11. Armstrong GA. 1997. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: A Colorful Tale. *Annu Rev Microbiol* 51:629-659.
12. Jost M, Fernandez-Zapata J, Polanco MC, Ortiz-Guerrero JM, Chen PY, Kang G, Padmanabhan S, Elias-Arnanz M, Drennan CL. 2015. Structural basis for gene regulation by a B<sub>12</sub>-dependent photoreceptor. *Nature* 526:536-541.
13. Galbis-Martínez M, Padmanabhan S, Murillo FJ, Elías-Arnanz M. 2012. CarF mediates signaling by singlet oxygen, generated via photoexcited protoporphyrin IX, in *Myxococcus xanthus* light-induced carotenogenesis. *J Bacteriol* 194:1427-1436.

14. Takano H, Agari Y, Hagiwara K, Watanabe R, Yamazaki R, Beppu T, Shinkai A, Ueda K. 2014. LdrP, a cAMP receptor protein/FNR family transcriptional regulator, serves as a positive regulator for the light-inducible gene cluster in the megaplasmid of *Thermus thermophilus*. *Microbiology* 160:2650-2660.
15. Kainrath S, Stadler M, Reichhart E, Distel M, Janovjak H. 2017. Green-Light-Induced Inactivation of Receptor Signaling Using Cobalamin-Binding Domains. *Angew Chem Int Ed Engl.* 56:4608-4611.
16. Chatelle C, Ochoa-Fernandez R, Engesser R, Schneider N, Beyer HM, Jones AR, Timmer J, Zurbriggen MD, Weber W 2018. A Green-Light-Responsive System for the Control of Transgene Expression in Mammalian and Plant Cells. *ACS Synth Biol.* 7:1349-1358.
17. Wang R, Yang Z, Luo J, Hsing IM, Sun F 2017. B<sub>12</sub>-dependent photoresponsive protein hydrogels for controlled stem cell/protein release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114:5912-5917.

18. Takano H. 2016. The regulatory mechanism underlying light-inducible production of carotenoids in nonphototrophic bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 8451:1-10.
19. Padmanabhan S, Jost M, Drennan CL, Elías-Arnanz M. 2017. A New Facet of Vitamin B<sub>12</sub>: Gene Regulation by Cobalamin-Based Photoreceptors. *Annu Rev Biochem* 86:485-514.
20. 角 悟 2014. グラム陰性細菌 *Burkholderia multivorans* が有する青色光応答機構に関する研究 修士論文
21. Chiarini L, Bevivino A, Dalmastrri C, Tabacchioni S, Visca P. 2006. *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends Microbiol* 14:277-286.
22. Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M. 1966. The Aerobic Pseudomonads a Taxonomic Study. *J Gen Microbiol* 43:159-271.
23. Komatsu H, Imura Y, Ohori A, Nagata Y, Tsuda M. 2003. Distribution and organization of auxotrophic genes on the multichromosomal genome of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. *J Bacteriol* 185:3333-3343.

24. Yuhara S, Komatsu H, Goto H, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M. 2008. Pleiotropic roles of iron-responsive transcriptional regulator Fur in *Burkholderia multivorans*. *Microbiology* 154:1763-1774.
25. Nishiyama E, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M. 2010. Identification of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 genes induced in soil environment by in vivo expression technology. *Environ Microbiol* 12:2539-2558.
26. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.
27. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.
28. Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.

29. Givens GD, Seidemann MF. 1977. Middle ear measurements in a difficult to test mentally retarded population. *Ment Retard* 15:40-42.
30. Haberle V, Forrest ARR, Hayashizaki Y, Carninci P, Lenhard B. 2015. CAGEr: precise TSS data retrieval and high-resolution promoterome mining for integrative analyses. *Nucleic Acids Res* 43:e51.
31. Livak KJ, Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25:402-408.
32. Guo M, Feng H, Zhang J, Wang W, Wang Y, Li Y, Gao C, Chen H, Feng Y, He ZG. 2009. Dissecting transcription regulatory pathways through a new bacterial one-hybrid reporter system. *Genome Res.* 19:1301-1308.
33. Zeng J, Li Y, Zhang S, He ZG. 2012. A novel high-throughput B1H-ChIP method for efficiently validating and screening specific regulator-target promoter interactions. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93:1257-1269.

34. Jeong JY, Yim HS, Ryu JY, Lee HS, Lee JH, Seen DS, Kang SG. 2012. One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Appl Environ Microbiol.* 78:5440-5443.
35. Masuda M, Ide M, Utsumi H, Niuro T, Shimamura Y, Murata M. 2012. Production potency of folate, vitamin B<sub>12</sub>, and thiamine by lactic acid bacteria isolated from Japanese pickles. *Biosci Biotechnol Biochem* 76:2061-2067.
36. Arcot J, Shrestha A. 2005. Folate: methods of analysis. *Trends Food Sci Technol* 16:253-266.
37. Arakawa T, Ejima D, Tsumoto K, Obeyama N, Tanaka Y, Kita Y, Timasheff SN. 2007. Suppression of protein interactions by arginine: a proposed mechanism of the arginine effects. *Biophys Chem* 127:1-8.

38. Romine MF, Rodionov DA, Maezato Y, Anderson LN, Nandhikonda P, Rodionova IA, Carre A, Li X, Xu C, Clauss TRW, Kim Y-M, Metz TO, Wright AT. 2017. Elucidation of roles for vitamin B<sub>12</sub> in regulation of folate, ubiquinone, and methionine metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E1205-E1214.
39. Lemke RA, Peterson AC, Ziegelhoffer EC, Westphall MS, Tjellström H, Coon JJ, Donohue TJ . 2014. Synthesis and scavenging role of furan fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E3450-E3457.
40. Petit M, Bonin P, Amiraux R, Michotey V, Guasco S, Armitano J, Jourlin-Castelli C, Vaultier F, Méjean V, Rontani JF. 2015. Dynamic of bacterial communities attached to lightened phytodetritus. *Environ Sci Pollut Res Int* 22:13681-13692.
41. Dufour YS, Landick R, Donohue TJ. 2008. Organization and evolution of the biological response to singlet oxygen stress. *J Mol Biol.* 383:713-730.

42. Gupta N1, Kumar S, Mishra MN, Tripathi AK. 2013. A constitutively expressed pair of *rpoE2-chrR2* in *Azospirillum brasilense* Sp7 is required for survival under antibiotic and oxidative stress. *Microbiology* 159:205-218.
43. Tardu M, Bulut S, Kavakli IH. 2017. MerR and ChrR mediate blue light induced photo-oxidative stress response at the transcriptional level in *Vibrio cholerae*. *Sci Rep* 18;7:40817.
44. Natalia Tschowri, Susan Busse, and Regine Hengge 2009. The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Eschericia coli*. *Genes Dev.* 23:522-534.
45. Kim MS, Dufour YS, Yoo JS, Cho YB, Park JH, Nam GB, Kim HM, Lee KL, Donohue TJ, Roe JH. 2012. Conservation of thiol-oxidative stress responses regulated by SigR orthologues in actinomycetes. *Mol Microbiol* 85:326-344.
46. Veyrier F, Saïd-Salim B, Behr MA. 2008. Evolution of the mycobacterial SigK regulon. *J Bacteriol* 190:1891-1899.

47. Shukla J, Gupta R, Thakur KG, Gokhale R, Gopal B. 2014. Structural basis for the redox sensitivity of the *Mycobacterium tuberculosis* SigK-RskA  $\sigma$ -anti- $\sigma$  complex. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 70:1026-1036.
48. Lourenço RF1, Gomes SL. 2009. The transcriptional response to cadmium, organic hydroperoxide, singlet oxygen and UV-A mediated by the sigmaE-ChrR system in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* 72:1159-1170.
49. Shimada T, Yamazaki Y, Tanaka K, Ishihama A. 2014. The whole set of constitutive promoters recognized by RNA polymerase RpoD holoenzyme of *Escherichia coli*. *PLoS One* 9:e90447.
50. Wachi Y, Grant Burgess J, Iwamoto K, Yamada N, Nakamura N, Matsunaga T. 1995. Effect of ultraviolet-A (UV-A) light on growth, photosynthetic activity and production of biopterin glucoside by the marine UV-A resistant cyanobacterium *Oscillatoria* sp. *BBA - Gen Subj* 1244:165-168.

51. Sancar A. 2008. Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50th anniversary. *J Biol Chem* 283:32153-32157.
52. Henderson TO, McNeill JJ, Tove SB. 1965. Folic acid involvement in cyclopropane fatty acid synthesis in lactobacilli. *J Bacteriol.* 90:1283-1287.
53. Ying-Ying Chang and John E. Cronan, Jr. 1999. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Eschericia coli*. *Molecular Microbiology* 33:249-259.
54. Cecilia-Vanesa Pini, Patricia Berbal, Patricia Godoy, Juan-Luis, Ramos and Ana Segura 2009. Cycropropane fatty acids are involved in organic solvent tolerance but not in acid stress resistance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Microbial Biotechnology* 2:253-261.
55. Nixon MR, Saionz KW, Koo MS, Szymonifka MJ, Jung H, Roberts JP, Nandakumar M, Kumar A, Liao R, Rustad T, Sacchettini JC, Rhee KY, Freundlich JS, Sherman DR. 2014. Folate pathway disruption leads to critical disruption of methionine derivatives in *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Biol* 21:819-830.

56. Herrou J, Crosson S. 2011. Function, structure and mechanism of bacterial photosensory LOV proteins. *Nat Rev Microbiol* 9:713-723.
57. Fujisawa T, Masuda S. 2018. Light-induced chromophore and protein responses and mechanical signal transduction of BLUF proteins. *Biophys Rev* 10:327-337.
58. Christie JM, Arvai AS, Baxter KJ, Heilmann M, Pratt AJ, O'Hara A, Kelly SM, Hothorn M, Smith BO, Hitomi K, Jenkins GI, Getzoff ED. 2012. Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges. *Science* 335:1492-1496.
59. Wu D, Hu Q, Yan Z, Chen W, Yan C, Huang X, Zhang J, Yang P, Deng H, Wang J, Deng X, Shi Y. 2012. Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. *Nature* 484:214-219.
60. Gong J, Yuan Y, Ward A, Kang L, Zhang B, Wu Z, Peng J, Feng Z, Liu J, Xu XZS. 2016. The *C. elegans* Taste Receptor Homolog LITE-1 Is a Photoreceptor. *Cell* 167:1252-1263.

61. Rajasekar KV, Zdanowski K, Yan J, Hopper JT, Francis ML, Seepersad C, Sharp C, Pecqueur L, Werner JM, Robinson CV, Mohammed S, Potts JR, Kleanthous C. 2016. The anti-sigma factor RsrA responds to oxidative stress by reburying its hydrophobic core. *Nat Commun* 19;7:12194.
62. Watanabe S, Kita A, Kobayashi K, Miki K. 2008. Crystal structure of the [2Fe-2S] oxidative-stress sensor SoxR bound to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4121-4126.
63. Ito N, Phillips SE, Stevens C, Ogel ZB, McPherson MJ, Keen JN, Yadav KD, Knowles PF. 1991. Novel thioether bond revealed by a 1.7 Å crystal structure of galactose oxidase. *Nature* 350:87-90.
64. Ye S, Wu X, Wei L, Tang D, Sun P, Bartlam M, Rao Z. 2007. An insight into the mechanism of human cysteine dioxygenase. Key roles of the thioether-bonded tyrosine-cysteine cofactor. *J Biol Chem* 282:3391-3402.
65. McCoy JG, Bailey LJ, Bitto E, Bingman CA, Aceti DJ, Fox BG, Phillips GN Jr. 2006. Structure and mechanism of mouse cysteine dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:3084-3089.

66. Kidambi SP, Booth MG, Kokjohn TA, Miller RV. 1996. recA-dependence of the response of *Pseudomonas aeruginosa* to UVA and UVB irradiation. Microbiology. 142:1033-40.

## 謝辞

本研究の遂行および論文の作成にあたりご指導とご助言を賜りました上田賢志教授と高野英晃准教授に心より感謝いたします。青木俊夫教授と砂入道夫教授には副査をご快諾していただき、厚くお礼を申し上げます。RNA seq解析では静岡大学の兼先友博士と東京農業大学の吉川博文教授にご協力いただき深く感謝します。分子系統樹の作成にご指導していただきました高野初美博士と元素分析をしていただきました西山辰也博士、定量 RT-PCR 解析で協力していただきました島村昌幸博士に心より感謝いたします。TetR とクラス IV LitR の研究を共に進めてくれた大田千愛さんと永松瑛梨さんに深く感謝いたします。博士前期課程・学部生で卒業された研究室の皆様には、研究室での生活等で大変お世話になりました。学会発表会や研究会では多くの先生方に研究へのご助言と励ましの言葉をいただきました。研究を進行させるにあたり、大変な活力となりました。皆様のご助言やご厚意、励ましの言葉のおかげで本論文を作り上げることができました。深く感謝申し上げます。最後に、生活面で支えてくれた両親に心より感謝いたします。本当にありがとうございました。