

LitR を介した一般細菌の光応答：その分子メカニズムと潜在する多様性に関する研究

高野 英晃

(日本大学 生物資源科学部)

研究の目的

光合成を行わないバクテリア群が示す光応答現象は、真核生物や光合成細菌に比較すると多様性に乏しいものの、光照射で生じた活性酸素を除去する作用を持つカロテノイド生産の光誘導が広く認められる⁽¹⁾。その制御メカニズムについては、主にグラム陰性の粘液細菌を対象に調べられてきたが、未だに光受容体の同定には至っていない。そのような状況下、我々は抗生物質を生産することで知られるグラム陽性の放線菌群におけるカロテノイド生産の光誘導現象を見出し、MerR 型の転写調節因子 LitR (Light Inducible Transcriptional Regulator) がその光誘導の中心的な役割を担うことを明らかにしてきた⁽³⁾。LitR はビタミン B12 をアンテナとし、既知の光センサーに類似性を持たない全く新規なタイプの光受容体であることが推測されている⁽²⁾。ゲノム情報の拡大に伴って、*litR* に相同な遺伝子がグラム陽性・陰性を問わず多種多様な一般細菌に保存されていることが明らかになりつつあり、LitR の役割が多岐に渡ることが示唆されている⁽²⁾。本研究の目的は、高度好熱菌 *T. thermophilus* における LitR ホモログの機能と役割を解明することに加えて、これまで一般細菌の研究で見過ごされてきた光応答性微生物のスクリーニングを通じて、新しい微生物機能を発掘することである。

方法

T. thermophilus の LitR 蛋白および TTP55 蛋白は、大腸菌 BL21(DE3)を宿主として GST 融合蛋白として発現・精製後、HRV 3C プロテアーゼで GST タグを除去することで調製した。LitR 蛋白が結合する DNA 配列の決定は、精製した LitR 蛋白を用いた DNaseI footprint 法を用いて行った。LitR 蛋白および TTP55 蛋白の機能評価は、*in vitro* ランオフ転写アッセイ法を用いて行った。また、光誘導性遺伝子群を特定するために、明条件および暗条件下で培養した菌体から分離したトータル RNA を用いた DNA マイクロアレイ (Affimetrix 社) 解析を行った。

土壌をスクリーニング源として、約 2,300 株のバクテリアを単離した。それぞれの菌群を illuminating incubator (タイテック社)を用いて明条件および暗条件下で培養し、色素・コロニー形態などを指標として差異が認められた菌群を選抜した。選択された菌株種の推定を目的として、16S rDNA 配列を決定した。

結果

1. 高度好熱菌 *T. thermophilus* における光応答の分子機構の解明

T. thermophilus が示す光誘導性カロテノイド生産は、LitR と cAMP レセプター(CRP)様の TTP55 によって制御され、それぞれの機能はリプレッサーとアクチベーターであ

ることが予想されている (図 1)。カロテノイド生合成遺伝子(*crtB*)のプロモーターを鋳型として、LitR、TTP55、RNA ポリメラーゼホロ酵素を用いた *in vitro* 転写実験を行った。*crtB* プロモーターの転写は、RNA ポリメラーゼホロ酵素と TTP55 の共存時のみに検出された。ここで認められた TTP55 のアクチベーター活性には *crtB* 転写開始点より-56 領域までが必要であった。この結果は大腸菌 CRP の知見と良く一致していた。続いて、RNA ポリメラーゼホロ酵素と TTP55 による転写誘導に対する LitR の影響を調べたところ、LitR 添加は TTP55 による転写誘導を顕著に阻害した。また、DNase I footprint 法は、LitR のプロモーター結合配列が *crtB* プロモーターにおける-55 から-89 領域であることを明らかにした。これらの結果は、LitR と TTP55 の機能がそれぞれリプレッサーとアクチベーターであることを明確に示している。次に、新規な光誘導性遺伝子群の同定を目的としたトランスクリプトーム解析を行った。明条件下において転写上昇または *litR* 破壊株において転写上昇を示した遺伝子群は、*litR* 遺伝子の近傍に位置する *TTHB89-91*、*TTHB94-97*、*TTHB112-113* を含む総計 23 遺伝子であった。これらには既知ドメインを持たない機能未知蛋白をコードする遺伝子が多く含まれていた。

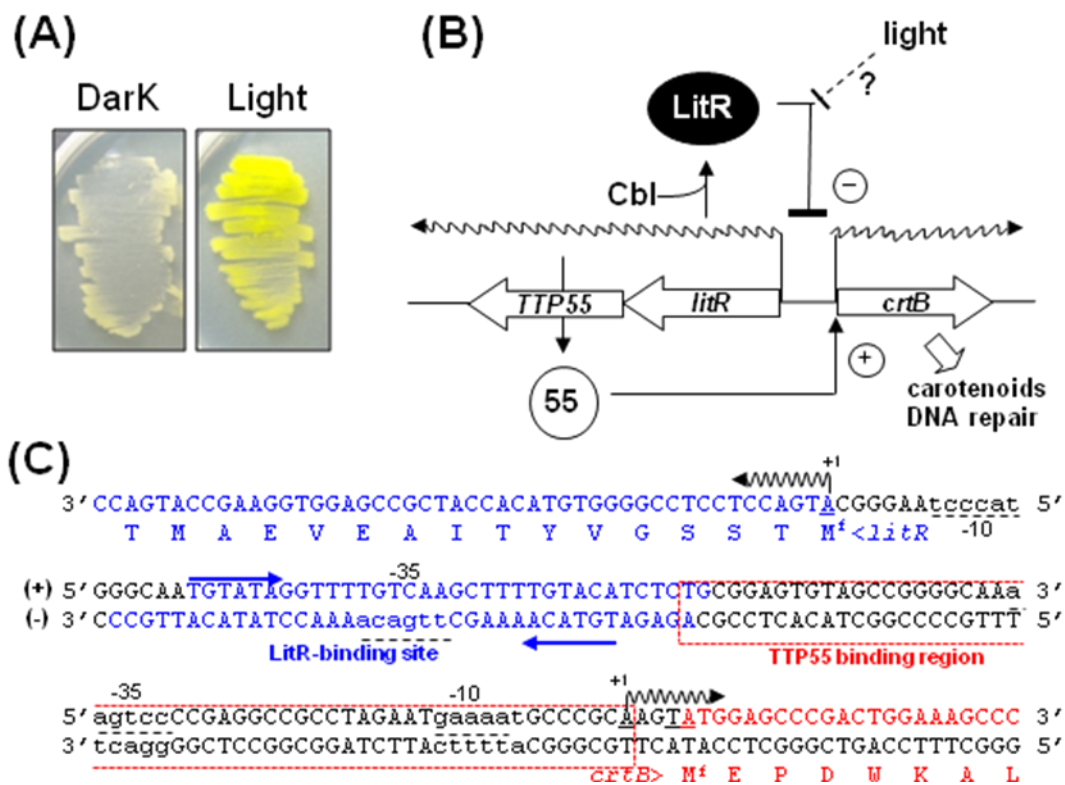


図 1 *T. thermophilus* の光誘導性カロテノイド生産 (A) とその制御メカニズム (B)

LitR 蛋白は、暗条件下では *crtB* プロモーター (C) に結合し、その転写を抑制している。青色光を吸収した LitR-Cbl (コバラミン) 複合体は、蛋白の構造変化に伴う LitR 自身の不活化を引き起こし、cAMP レセプター様蛋白である TTP55 による *crtB* の転写促進を許可することが予想されている。

2. 光に依存する微生物と機能の探索

カロテノイドと予想される黄色色素が光によって誘発される 80 株の細菌を土壌より単離および取得した。これら光応答性細菌について、近縁種ゲノム情報をもとに *litR* および既知光受容体ホモログ遺伝子の分布を調べた。その結果、*litR*・光受容体遺伝子をゲノムにコードしているグループ 1 (*Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Staphylococcus*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*) とそれらのホモログ遺伝子を有さないグループ 2 (*Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacteria*) に分類された。グループ 2 に属する放線菌群は既知の光受容体を有さないことから、新規なタイプの光受容体をコードしている可能性が示唆された。ここで見つかった細菌群はこれまでに研究対象として解析されてきたにも関わらず、光応答性に関する報告は皆無であった。

結論

LitR は、放線菌とは全く異なる性質を示す *T. thermophilus* の光誘導性カロテノイド生産においても、その中心的な制御蛋白であった。このことは、LitR が一般細菌における光誘導性カロテノイド生産の普遍的な転写調節因子であることを意味している。また、LitR のリプレッサーとしての機能は、LitR がアクチベーターとして働く TTP55 に光依存性を賦与することによって、光誘導的な Crt 物質生産を誘発していることを示唆している。一方、光応答性細菌の生態的分布調査は、光誘発性細菌およびその機能が自然界において潜在的に多様であることを示していた。

文献

1. Purcell, E., and S. Crosson. 2008. Photoregulation in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* **11**:168-178.
2. Takano, H., T. Beppu, and K. Ueda. 2006. The CarA/LitR-family transcriptional regulator: Its possible role as a photosensor and wide distribution in non-phototrophic bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**:2320-2324.
3. Takano, H., S. Obitsu, T. Beppu, and K. Ueda. 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.