

環境細菌での鉄環境変動に伴うゲノム情報発現制御の包括的研究

津田 雅孝

東北大学大学院 生命科学研究科

研究の目的

鉄は細菌の基本的代謝を含む様々な生物機能の発揮に必要な補因子という点で生存・増殖に必須な金属である。しかし、細菌がその棲息環境で利用可能な鉄は極めて低濃度であるため、細菌は環境からの遊離鉄や鉄含有化合物の積極的獲得系を有する。その一方で、細胞内での過剰な遊離鉄は強力な細胞毒性を有する様々な活性酸素種(ROS)/活性窒素種(RNS)を生成することから、細菌は細胞内遊離鉄濃度を一定に維持する数々の機構を備えている。我々は、多種多様な芳香族化合物の分解能を持つことから汚染環境浄化に有用であるとともに産業上で有用な酵素を産生する土壌細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株¹⁾の鉄獲得系遺伝子群の統括的転写制御因子で細胞内遊離鉄濃度を感知する Fur の欠失突然変異 Δfur 株の解析で、Fur 機能は、遊離鉄獲得系発現制御のみならず、ROS/RNS 除去や芳香族化合物を含む多様な有機化合物の資化能発揮、抗生物質耐性能発揮、そして、土壌での生育に関与することを示してきた(図 1)^{2,3)}。しかし、本菌 Fur が上記の多様な現象/代謝に如何なる階層的な作用機序を介して鉄情報を伝達する全容は不明である。我々は、 Δfur 株の RNS 高感受性または炭素源資化能の不全を抑圧するサプレッサー変異株を複数単離・解析し、全サプレッサー変異株は、 Δfur 株が示した他の多面的表現型も抑圧されてほぼ野生型の表現型を示すことを見出したが、ひとつのサプレッサー変異は ROS/RNS 除去系レギュロンの転写制御因子遺伝子 *oxyR* に存在していた(表)⁴⁾。そして、 Δfur 株では過剰になった細胞内遊離鉄が ROS/RNS 量を上昇させるために ROS/RNS 感受性を示したが、サプレッサー変異株では更なる *oxyR* 変異が ROS/RNS 除去酵素遺伝子群の発現を増大させて ROS/RNS の効率的除去の可能性に至ったことを明らかにし、Fur と OxyR の遺伝学的関連性を示した。このように *fur* 変異株の多面的表現型/機能欠損を抑圧するサプレッサー変異の取得・解析は鉄情報伝達系の中段階で働く分子や制御遺伝子、そして最終的な適応応答に関わる酵素等の同定や機能提示に有効なことを示してきた。そこで本研究では、*oxyR* 以外にサプレッサー変異がある遺伝子を同定するとともに、当該同定遺伝子の機能解析を行い、Fur 機能の更なる多面性提示を目的とした。

方法

種々の分子遺伝学的解析は我々自身が構築した解析を用い、分子生物学的解析や菌株の培養は常法に従った²⁻⁴⁾。サプレッサー変異株ゲノムの re-sequencing と Δfur 株のゲノ

ムレベルでの転写開始点(TSS)解析には Illumina 社製シーケンサーを用いた。DNA やタンパク質の相同検索・解析は NCBI データベースを用い、必要に応じて我々グループ開発のコンピュータープログラム (<http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/labhome/tool.html>)を用いた。

結果

oxyR 以外にサプレッサー変異を有する 5 株は共通して 81 アミノ酸残基をコードする遺伝子に点突然変異が存在していた。本遺伝子は *Yersinia enterocolitica* のへム取り込み・利用に関与する *hemPRSTUW* オペロン⁵⁾の最初に位置する機能未知遺伝子 *hemP* とアミノ酸レベルで 53%の相同性を示したことから、ATCC 17616 株の対応遺伝子を *hemP* と命名した(図 2)。そして、 Δfur 株に *hemP* 欠失変異を導入した誘導体株は、上記の Δfur 株の点突然変異サプレッサー株と同様の表現型を示すことを確認した。ATCC 17616 株第 1 染色体支配の *hemP* は、やはりへム取り込み・利用に関与すると想定されて第 2 染色体支配の *hemRSRUW* オペロンとはかけ離れて存在した。野生型株での *hemP* 転写は培地の遊離鉄過剰条件での抑制と欠乏条件での誘導の様式を示した。一方、 Δfur 株での *hemP* 転写は遊離鉄濃度に関係なく高レベルで、TSS 解析での *hemP* 転写量はゲノムレベルでトップ 20 内に位置付けられた。*hemP* プロモーター上流領域には Fur との特異的結合塩基配列である推定 Fur box が存在し、遺伝学的解析で本 box と Fur の結合が実際に認められたことから、*hemP* の転写は活性型の Fur-Fe²⁺複合体による直接的抑制制御支配下にあると結論した。また、*hemP* はへム存在下で転写誘導された。次に *hemP* 欠失変異株を作製・解析したところ、本株の生育は Fe³⁺含有培地で正常だったが、へムを単一鉄源とした培地(へム培地)での生育に極めて大きな支障が認められ、へム培地生育での HemP の重要性が判明した。また、HemP の生化学的解析で、本タンパク質はへムとの結合能を有するとともに細胞質での局在も判明した。

へム取り込み特異的な外膜レセプターをコードすると推定された *hemR* はそのプロモーター直上流にやはり Fur Box を持ち、*hemR* 転写は、(i)遊離鉄存在下で Fur-Fe²⁺複合体により直接的に抑制されるとともに、(ii)へム存在下で誘導されるが、本誘導には HemP が必要なことを示した。また、*hemR* 欠失変異体はへム培地での生育速度がたいへん遅く、ATCC 17616 株のへム利用に HemR 機能の重要性が判明した。

結論

本研究により、*B. multivorans* ATCC 17616 株はへムを唯一鉄源として利用可能であること、そして、へム利用には HemP と HemR が少なくとも関与し、HemP は *hemR* の転写に必要であることを示した。両遺伝子転写様式の解析から、培地に多量の遊離鉄が存在する際には両遺伝子とも活性 Fur-Fe²⁺複合体により直接転写阻害されるとともに、本株はへムよりも遊離鉄を選択的に利用することが判明した。そして、へム存在下で *hemP* が転写誘導されることで生成された HemP が *hemR* の転写を直接または間接的に誘導す

るというモデルが想定できた。ヘムと結合した HemP が未知の特定塩基配列の結合能を有して直接的に *hemR* の転写を制御するのか、或いは、他の未知タンパク質との相互作用や当該タンパク質遺伝子の転写促進などを介して *hemP* 自身や *hemR* の転写誘導をするのか、さらには、HemP または未知タンパク質と Fur が *hemR* 領域への結合に競合性を示すのか、に関しては現時点では不明である。これら問題点は、HemP を用いた SELEX 解析や *hemP* 欠失変異株を用いた RNA-seq 解析などにより解明の手がかりが得られよう。このような解析を通じて、 Δfur 株にさらに *hemP* 変異が導入された際に Δfur 株の示す多面的表現型が野生型株のそれに回復する分子機構の解明に取り組み、細菌の鉄情報伝達の全容提示を進めたい。

文献

- 1) Ohtsubo, Y., Nishiyama, E., Ishibashi, Y., Nagata, Y., and Tsuda, M. (2014) Strategies to reveal genomic function in natural soil systems. *In: Nojiri, H., Tsuda, M., Fukuda, M., and Kamagata, Y. (ed), Biodegradative Bacteria: How Bacteria Degrade, Survive, Adapt, and Evolve.* pp 279-291. Springer-Verlag, Tokyo.
- 2) Yuhara, S., Komatsu, H., Goto, H., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., and Tsuda, M. (2008) Pleiotropic roles of iron-responsive transcriptional regulator Fur in *Burkholderia multivorans*. *Microbiology* **154**: 1763-1774.
- 3) Nagata, Y., Senbongi, J., Ishibashi, Y., Sudo, R., Miyakoshi, M., Ohtsubo, Y., and Tsuda, M. (2014) Identification of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 genetic determinants for fitness in soil by using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* **160**: 883-891.
- 4) Kimura, A., Yuhara, S., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., and Tsuda, M. (2012) Suppression of pleiotropic phenotypes of a *Burkholderia multivorans fur* mutant by *oxyR* mutation. *Microbiology* **158**: 1284-1293.
- 5) Stojiljkovic, I., and Hantke, K. (1992) Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in gram-negative bacteria. *EMBO J.* **11**: 4359-4367.

表 *B. multivorans* ATCC 17616 野生型株とその誘導体株が示す表現型

表現型	野生型株	<i>Δfur</i> 変異体	サプレッサー変異株	
			<i>ΔfurΔoxyR</i>	<i>Δfur + hemP</i> 突然変異
ROS 感受性	正常	増大	正常	正常
RNS 感受性	正常	増大	正常	正常
Fe ³⁺ 取り込み系	正常	増大	増大	増大
細胞内遊離鉄濃度	正常	増大	正常	正常
クエン酸資化能	正常	減少	正常	正常
コハク酸資化能	正常	減少	正常	正常

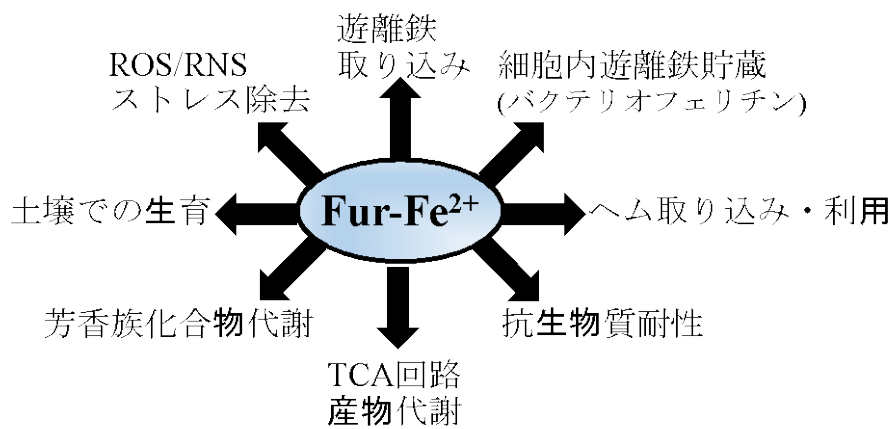


図 1. *B. multivorans* ATCC 17616 株の Fur タンパク質の機能的多面性

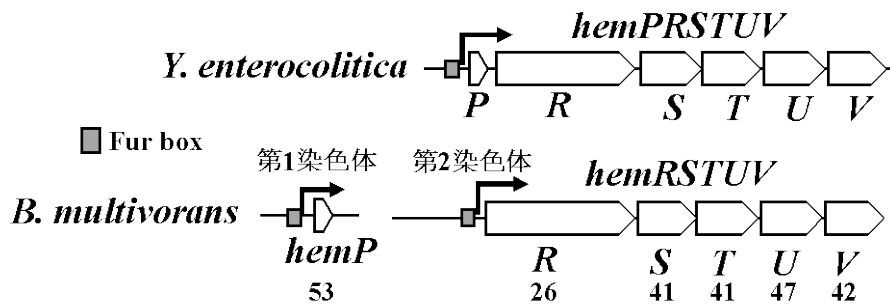


図 2. ヘム取り込み・利用系遺伝子群の構造。矢印は転写開始点と転写方向。数値は各遺伝子産物の *Y. enterocolitica* 当該遺伝子産物との%相同性。*Y. enterocolitica* の遺伝子機能: P, unknown; R, outer-membrane heme receptor; S, heme monooxygenase; T, U, and V, ABC transporter.