

# クエン酸応答二成分制御系を介したクエン酸嫌気呼吸による新規エネルギー産生制御

島田 友裕  
明治大学 農学部

## 研究の目的

本研究は、大腸菌におけるクエン酸の利用および応答機構を理解することを目的として、クエン酸に応答して転写を制御する二成分制御系 CitAB のゲノム転写制御機構およびその生理的役割の解明を目的とした。大腸菌 K-12 株は、クエン酸を単一炭素源として生育することができないが、嫌気条件下において解糖系などの代謝から生じる還元力を消費するために、クエン酸回路の一部を還元的方向に利用する citrate fermentation と呼ばれる代謝の基質として利用することができる。この一連の代謝は、嫌気条件で細胞外のクエン酸に応答する二成分制御系 CitAB (CitA がヒスチジンキナーゼ、CitB がレスポンスレギュレーター) により転写制御されることが報告されている。しかしながら、ゲノム全体における CitAB の役割は不明であったため、CitB の大腸菌ゲノム転写制御ネットワークを同定し、その生理的役割を明らかにすることを目指した。

## 方法

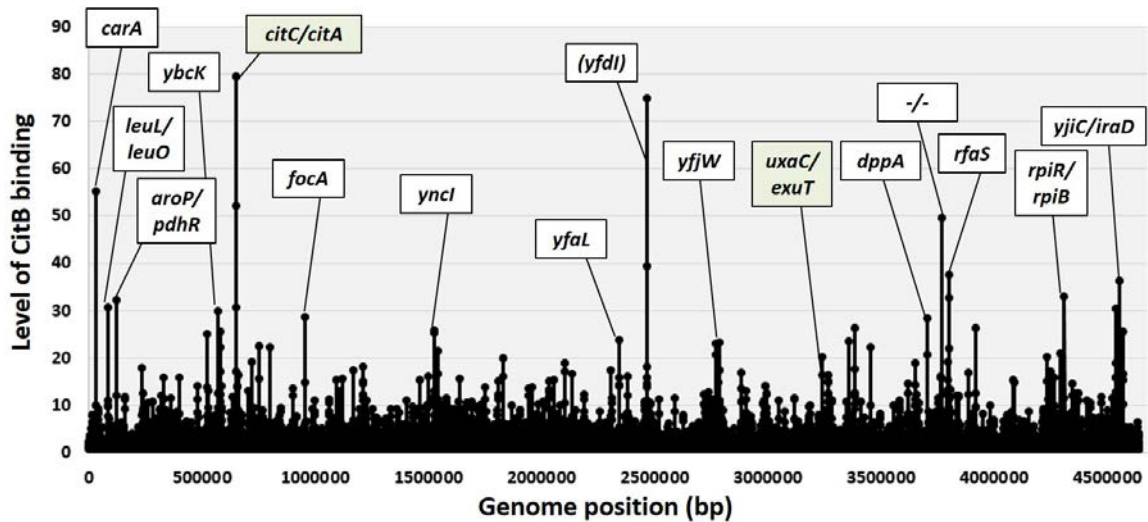
転写制御ネットワークはヒエラルキー構造を形成しているため、転写制御の本質的な制御機構を理解するためには、間接的な影響と区別した直接的な制御標的を同定する必要がある。また、細胞内では他因子が存在するためにゲノム上で競合阻害が生じたり、解析対象の転写因子は常に発現・活性化していなかったり、といった問題点がある。そこで本研究では、研究者らが独自に開発した Genomic SELEX 法 (以下、gSELEX 法) を用いて、CitB のゲノム上結合領域の網羅的な同定を試みた。gSELEX 法は、試験管内において、解析対象とする転写因子を精製した純化タンパク質とゲノム DNA 断片を混合し、形成した複合体の DNA 配列を解析することで、転写因子のゲノム上の直接的な結合配列を網羅的に同定する手法である<sup>1)</sup>。この方法は、細胞内では発現条件や活性化条件が不明な転写因子であっても、ゲノム上の直接的な標的配列を得ることができる。また、細胞内では拮抗因子が存在する場合でもその影響を受けないといった利点がある。今回は、gSELEX 法で得られた CitB 標的配列は、タイリングアレイを用いて分析した。得られた標的配列に対する CitB の結合能は、ゲルシフトアッセイ法を用いて個別に確認した。続いて、CitB 結合領域から推定された支配下遺伝子群への制御を検証するために、大腸菌野生株および *citAB* 欠損株をそれぞれ嫌気条件下におけるグルコース液体培地で培養し、クエン酸 (20 mM) 添加の有無に応じた mRNA レベルを、RT-qPCR 法を用いて比較した。

次に、クエン酸の消費がグルコースの消費に与える影響を観察するために、培養液中のクエン酸濃度およびグルコース濃度について、キットを用いて経時的に測定した。また、エネルギー産生を制御していることを検証するために、ATPase 活性についても測定キットを用いて観察した。さらに、クエン酸の代謝および嫌気呼吸に関連する遺伝子群の各欠損株を用いて、クエン酸を添加した際の生育促進効果に与える影響を検証した。これらの実験結果を総合し、CitAB によるクエン酸を利用した嫌気呼吸について考察した。

## 結果

gSELEX 法により、大腸菌のゲノム上に約 30 カ所の CitB 結合領域を同定することに成功した (図 1)。これまでに報告されていた CitB の標的遺伝子群は全て含まれていた。新規標的遺伝子群は炭素源代謝や呼吸に関わるものが多く含まれており、本研究ではこれらの遺伝子群を解析対象とした。これら新規標的に対する CitB の結合能はゲルシフトアッセイにより検証し、いずれの標的に対しても特異的に結合することが確認された。

続いて CitAB が転写制御に与える影響を検証するために、大腸菌野生株および *citAB* 欠損株において、嫌気条件下のグルコース液体培地を用いて、クエン酸を添加した際の新規標的遺伝子群の発現を比較したところ、いずれの標的遺伝子も野生株においてクエン酸の添加により 2 倍以上、mRNA レベルが上昇することが分かった。



CitB Intensity	center	RegulonDB	Left Function	Left operon	LeftGene	CitB	RightGene	Right operon	Right Function
79.6	651344	Known	citrate lyase synthetase	<i>citCDEFXG</i>	<i>citC</i>	< >	<i>citA</i>	<i>citAB</i>	DpiB sensory histidine kinase
55.3	29360	Newly	DapB	<i>dapB</i>	<i>dapB</i>	> >	<i>carA</i>	<i>carAB</i>	CarA
32.2	121872	Newly	phenylalanine/tyrosine/tryptophan APC transporter	<i>aroP</i>	<i>aroP</i>	< >	<i>pdhR</i>	<i>pdhR-aceEF-lpd</i>	PdhR transcriptional dual regulator
28.6	953940	Newly	FocA formate FNT transporter	<i>focA-pfIB</i>	<i>focA</i>	< <	<i>ycaO</i>	<i>ycaO</i>	conserved protein
26.4	3921034	Newly	Atpl	<i>atpIBEFHAGDC</i>	<i>atpl</i>	< <	<i>rsmG</i>	<i>asnC-mioC-mnmG-rsmG</i>	16S rRNA m7G527 methyltransferase
14.5	4347168	Newly	DcuB dicarboxylate Dcu transporter	<i>dcuB-fumB</i>	<i>dcuB</i>	< <	<i>dcuR</i>	<i>dcuSR</i>	DcuR transcriptional activator
12.4	3382448	Known	Mdh	<i>mdh</i>	<i>mdh</i>	< >	<i>argR</i>	<i>argR</i>	ArgR

図 1 大腸菌ゲノム上のCitB結合領域、および、代表的な標的遺伝子群とその機能  
横軸は大腸菌ゲノムの位置、縦軸はCitB結合強度を示す。緑は既知標的、白は新規標的を示す。

また、同条件下における生育を観察したところ、野生株ではクエン酸を添加することにより生育の促進が観察されたが、*citAB* 欠損株ではその効果が観察されなかった。そして、この際の培地中のクエン酸・コハク酸・グルコースの各濃度を経時的に測定したところ、野生株ではクエン酸の消費に伴い、コハク酸の生産およびグルコースの消費の促進が観察されたが、*citAB* 欠損株ではいずれも見られなかった。これらのことにより、CitAB に依存したクエン酸の利用により、グルコースの消費速度を促進することで、生育速度を上昇させていることが実証された。さらに、新規標的の ATP 合成酵素をコードする遺伝子群の転写が活性化されることが分かったため、同条件において ATP 合成酵素活性を測定したところ、クエン酸および CitAB に依存して活性化されることが分かった。ATP 合成酵素により ATP を産生するためにはプロトンの濃度勾配が必要である。そこで、呼吸関連遺伝子の欠損株を用いて、クエン酸による生育促進効果を観察したところ、フマル酸還元酵素と NADH:キノン酸化還元酵素の欠損株ではその効果がなくなることが分かった。

## 結論

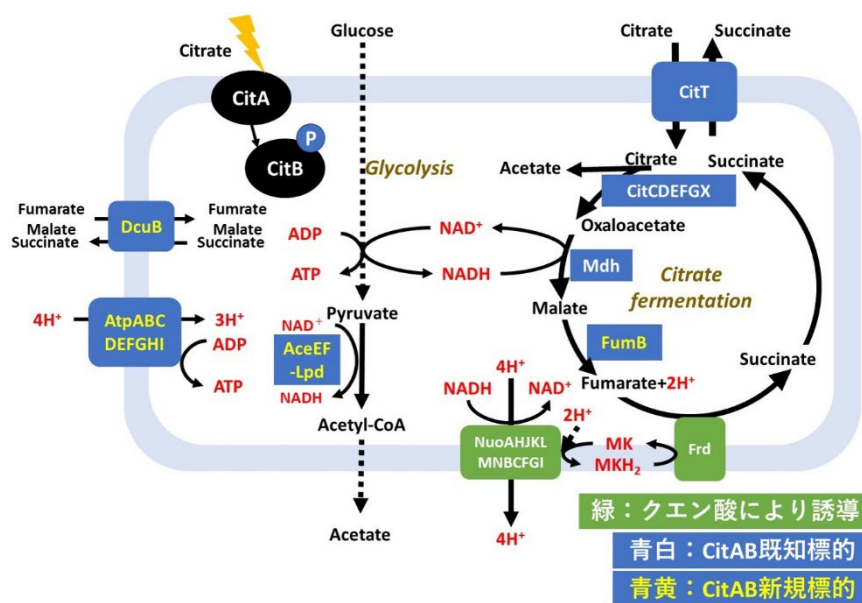


図2 大腸菌におけるクエン酸応答二成分制御系を介したクエン酸嫌気呼吸による新規エネルギー産生制御のモデル図

本研究の成果から、大腸菌のクエン酸応答二成分制御系 CitAB の制御ネットワークの役割は、嫌気条件下においてクエン酸を利用した citrate fermentation による還元力 (NADH) の消費だけではなく、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (AceEF-Lpd) を活性化させることによる解糖系の活性化や、

ATP 合成酵素 (AtpABCDEF GHI) を活性化させプロトン濃度勾配を用いてエネルギーを産生することが示唆された (図2)。

## 文献

- 1) Shimada, T., Ogasawara, H. and Ishihama, A. (2018) Genomic SELEX screening of regulatory targets of *Escherichia coli* transcription factors. *Methods Mol Biol.* **1837**: 49-69