

## 論文内容の要旨

論文題目 Analysis of a Novel cAMP Receptor Protein SYCRP1  
in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803

(ラン藻*Synechocystis* sp. PCC6803におけるcAMP受容タンパク質SYCRP1の機能解析)

氏名 吉村英尚

### 序論

cAMPは原核生物から真核生物に至るまで幅広く存在する情報伝達物質であり、様々な遺伝子の発現や酵素活性の調節に関与している。動物ではよく研究がなされており、骨格筋細胞におけるグリコーゲン分解の調節などcAMPの生理的役割が広く知られている。しかし、光合成生物ではcAMPの研究がほとんどなされていない。緑藻のクラミドモナスにおいてcAMPが接合に関与していることが知られているが、アデニル酸シクラーゼやcAMP受容タンパク質は見つかっておらず、cAMPの情報伝達系はほとんど明らかにされていない。

ラン藻は酸素発生型の光合成を行う独立栄養型のバクテリアである。ラン藻は光やpH、窒素源の有無などによる環境変化に応答して細胞内のcAMPレベルが増減することが知られており、これまでに5種類のアデニル酸シクラーゼが単離、同定されている。しかし、cAMPが情報を伝達していく機構については全く不明である。本研究では、cAMP receptor protein (CRP)をコードする遺伝子を同定し、大腸菌を用いた組み換え型タンパク質によるラン藻のCRPの生化学的な特徴を明らかにするとともに、その機能を解析した。

### 結果と考察

#### 1. cAMP受容タンパク質の同定と生化学的解析

材料は*Synechocystis* sp. PCC6803を用いた。このラン藻は全ゲノムシーケンスデータがcazusa DNA研究所によって公開されている。大腸菌などの原核生物においては、cAMPはCRPと結合することによって情報を伝達し、その複合体は特定の遺伝子の転写を制御することが知られている。ラン藻は原核生物なので大腸菌のCRPの配列をもとに、それに相当する遺伝子が存在するかどうか全ゲノムシーケンスデータを用いて検索した。*Synechocystis* sp. PCC6803の全遺伝子3,168個の中から18個の遺伝子を候補として検討し、最終的に3つの遺伝子に絞り、それぞれを*sycrp1*、*sycrp2*、*sypk*と名付けた(図1)。星印で示してあるものが大腸菌のCRPにおいて実際にcAMP結合に関わるアミノ酸で、7つのうちの5つをSYCRP1とSYPKは持っている。SYCRP2にはこれらのアミノ酸が2つしかないが、ゲノムの中でSYCRP1に最も高い相同性を示した。

これら3つの候補の組み換え型タンパク質を作製した。SYCRP1とSYCRP2はヒスチジンタグとの融合タンパク質として発現させ、SYPKは予測されるORFの全長で発現しないか、或いは不溶化したので、cAMP結合部位を含むと思われる部分のみをGST融合で発現させ、精製した(図2)。

```

1 MELGKISP I I I N L L K T V E N F A L T A F L Q G I L G A S S N A L G A L I A V A W P G R K F L A A V N A F G S G T L N A A I A L E I A S A V Y R S G G V L V L V G G F L S Y P K
98 L G G I L F I S -----
1 N V L - G K P Q T D ----- P T L E W F ----- L S H C H I ----- H K Y H S K S T L I H Q G E K A E T L V E. coli CRP
1 W G T - S P Q N S E F T E R L S Q E I P H F ----- E G L R L E V L Q E A I H V S V ----- R S H H A N Q V I L L E H D W G G S V Y S Y C R P 1
1 W A P - Q K P S T R K L Q L A S E I S R H ----- R S I S K D L L T A N I N Y L S F ----- R N Y H C S Q S I L F O N Y Y G G S I Y S Y C R P 2
98 L S K Y I D E Q G G F L R K P A A S R R Y V V E H K N L E S H E L V D Y L A I S E V N N A L P E Q E R H Q L A G L L T P H A Y P ----- R E V L C R E G D Q G D Y F S Y P K

42 Y I V K G S V A V I K D E E G M E N I - L S Y L N Q G D F Y G E L G L F E E G Q E R S A W R A K T A C E V A E I S Y K F P R Q L I Q V K P D I L N R L S A Q N E. coli CRP
59 F V N D G W V K I R T H N V D G R E V T - L N I V G N G E I V G E N A A T E E A P - R S T M T L T L P A E V C S V P A P E F Y R F L Q T E P M A G I R L A Q I I S Y C R P 1
59 F I A E G W I N V C A I G E S S R N S I - Y T I Y G P D E I V Q A I A A V E E D W N P K E - A V T L T P A K I N S I P T Q F L N L L R E D Y Q A G I O V A I F A S Y C R P 2
179 F I G G E A D I M Y ----- M G T T W N R L T S G D I R G E S L L T G E P - E S A T E V A V I P M E L Y Q L D K E N A N I L S Q S E H L A L A D S R K L S Y P K

122 I A R R I Q V T S E K Y G M L A F I D M T G R I P Q I L I M A I A ----- K Q P D A N T H P D G H Q I K T R Q E I G Q I V G C S R E T V G R I L K M L I D Q N L I S E. coli CRP
138 I A R R I R Q L N R R L - R L R E A E S L T R V A D T L L L A E G R G R D T D K G ----- V I I P N L P H H E L S S I S L A R E T V T R C L I K L E K R Q L I H S Y C R P 1
137 S K R I L R R L N O Y F - R L R E S D S V T K V H I L L R L V - G H G K T I S T K K H R V L I P N L P H R E T A N L S G V R E T V T R I L G L E K K Q L I L S Y C R P 2
253 I A R R I Q S A T D F E A I V P P E D K V S ----- V I E R L I V E G D ----- R Q L A K L A Q S S A P H A I L V G T L F D N I P E A R V I G N N T W Y S Y P K

199 A H G K T I V V Y G T R
214 R E P D F I S V A N L R D L E D L I S
217 R Q G A T I E I L N L D L L Q L V S G N P T S I
320 T P W G G A F L F A V F I S N F P E A L S S S F G H K Q A G I S N R R I L T L W F G A V V A S G L I A N V G Y S I G Q G G T L L L V A V A Q A I A G G G I L A M L

460 A S T N H P E A Y E L G G S S V A Y A T I I G F L A G F L I S A S H F

```

図1. *Synechocystis* sp. PCC 6803のcAMP受容タンパク質候補SYCRP1、SYCRP2、SYPKと*E. coli* CRPにおけるアミノ酸配列のアラインメント  
 アスタリスクは大腸菌CRPがcAMPと複合体形成時にcAMPの近傍に位置するアミノ酸、白い星印は直接cAMP結合に関わるアミノ酸をそれぞれ示している。  
 三角印は4つのアミノ酸配列全てに共通するアミノ酸を示している。  
 3つ以上の配列で一致するアミノ酸を灰色の囲みで示した。

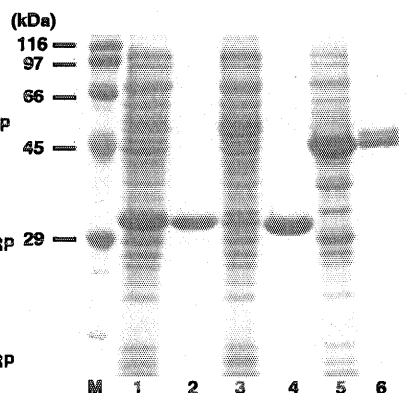


図2. 大腸菌による組み換え型タンパク質の大量発現と精製

12%のSDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、CBB染色した。1 mM IPTGで誘導したヒスタグSYCRP1を含む可溶画分15 μg (レーン1)、ヒスタグSYCRP1精製標品3 μg (レーン2)、1 mM IPTGで誘導したヒスタグSYCRP2を含む可溶画分15 μg (レーン3)、ヒスタグSYCRP2精製標品3 μg (レーン4)、1 mM IPTGで誘導したGST融合の部分的SYPKを含む可溶画分15 μg (レーン5)、GST融合の部分的SYPK精製標品3 μg (レーン6)。Mは分子量マーカー。

3つの組み換え型タンパク質とcAMPとの結合親和性は平衡透析法で調べた(図3)。実験は5 μMのcAMPを用いて行った。図の縦軸は結合したcAMP量を表している。cAMPは20 μMのSYCRP1に対して約3 μM、20 μMのSYPKに対して約9 μM結合しており、これら2つの組み換え型タンパク質がcAMPと結合することが示唆された。SYPKについては加えたcAMP量以上のcAMP量が検出されたが、これはSYPKがcAMPを結合したまま精製されたためであろう。次にSYCRP1のcAMPに対する結合解離定数を平衡透析によって求めた(図4)。5 μMのSYCRP1に対して0.5~20 μMの16点のcAMP濃度で平衡透析を行い、その結果をScatchard Plotにした。ほとんどの測定値が直線に乗ったので、この直線の傾きの逆数からKdを算出したところ、20°Cと30°Cでほとんど差がなく、約3 μMという値を得た。この値を大腸菌をはじめとする他のバクテリアと比較すると、他のバクテリアのKdは20 μMから50 μMなので、*Synechocystis* sp. PCC6803のCRPは10倍前後、高い結合親和性を示すことが明らかとなった。またこの図からSYCRP1に対するcAMPの最大結合量を考えると、タンパク質2分子あたりに1分子のcAMPが結合していることになり、このことから他のバクテリアのCRPと同じように、SYCRP1もcAMPと複合体を形成する際、ダイマー構造をとるのではないかと考えられた。そこで、タンパク質架橋剤であるEDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)を用いて架橋実験を行った。cAMPを加えた場合とcAMPを加えない場合では特にダイマー形成に変化は観察されなかった。このことからSYCRP1はダイマーとして存在するがcAMPはダイマー構造の安定性に寄与するのではなく、機能の面で寄与する可能性が考えられた。

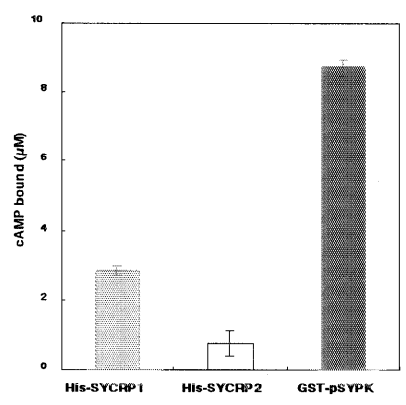


図3. 平衡透析法によるcAMP結合親和性  
 20 μMヒスタグSYCRP1、10 μMヒスタグSYCRP2、20 μMGST融合の部分的SYPKを、それぞれ25°Cで5 μMのcAMPと6時間インキュベートした。cAMPの定量は逆相カラムによるHPLCで行った。

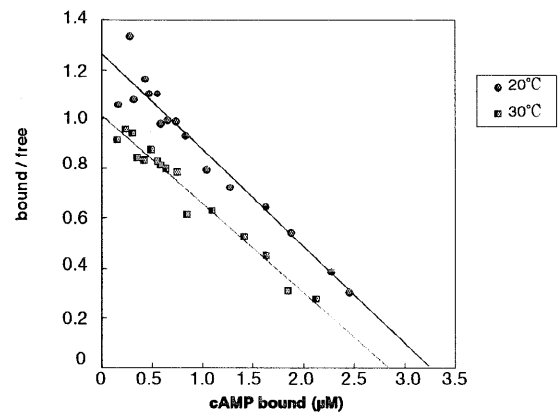


図4. SYCRP1の結合解離定数の決定  
 20°Cと30°CでヒスタグSYCRP1のcAMPに対する結合解離定数を平衡透析法で決定した。5 μMのヒスタグSYCRP1を0.5 μMから20 μMのcAMPで6時間インキュベートした。cAMPの定量は逆相カラムによるHPLCで行った。

大腸菌のCRPはC末端側にDNA結合ドメインとしてhelix-turn-helixモチーフを持っており、SYCRP1のC末端側と比較すると後者のヘリックスが高い相同性を示した(図1)。従ってSYCRP1もcAMPに依存したDNA結合能をもっているのではないかと考えた。そこで大腸菌のCRPが認識し、最もよく結合するコンセンサスDNA配列を合成し、その配列に対するSYCRP1の結合能を調べるためにゲルシフトアッセイを行った(図5)。レーン1はタンパク質の入っていないコントロールである。レーン2と3の結果から明らかなように、SYCRP1の量が増えるに従ってシフトするバンドのシグナルが増大した。レーン4と5は特異性を調べるための競合実験である。レーン5でラベルしていないDNAを加えたことによりシフトしたバンドが明らかに減少していることから、SYCRP1は特異的にコンセンサスDNA配列に結合することが明らかとなった。一方、cAMPを加えない場合にはSYCRP1の濃度を上げてもバンドのシフトは全く検出されなかった(レーン6-9)。以上のことから、SYCRP1はcAMP存在下でのみ特異的な塩基配列を認識し結合すると結論した。

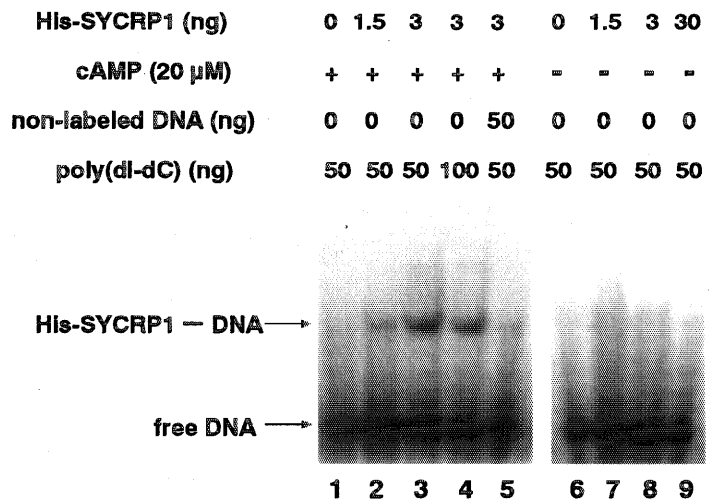


図5.大腸菌CRPのコンセンサスDNA配列(40bp)を用いたゲルシフトアッセイ20 μMのcAMP存在下(レーン1-5)、非存在下(レーン6-9)でヒスタグSYCRP1と大腸菌CRPが最もよく結合するコンセンサスDNA配列でアッセイした。全て<sup>32</sup>Pで標識した1 ngのプロープを用いた。複合体とフリーのプロープは矢印で示した。電気泳動は5%ポリアクリルアミドゲルで行った。

## 2. cAMP受容タンパク質SYCRP1の標的遺伝子の同定

SYCRP1は転写因子であることが示唆されたので、SYCRP1の標的となる遺伝子を、網羅的に遺伝子発現解析できるDNA microarrayを用いてスクリーニングした。SYCRP1が大腸菌のCRPのようにグローバルな転写因子であるなら、*sycrp1*破壊株において発現量の異常が起きている遺伝子が存在するはずである。通常培養した対数増殖期後期の細胞を集菌し、total RNAを抽出して実験を行った。その結果、野性株と*sycrp1*破壊株において遺伝子発現の違いに再現性の得られた遺伝子は18個あった(表1)。これらのなかでシグナル強度が比較的大きく、オペロンになっていると思われる遺伝子群(slr1667~slr1668、slr2015~slr2018)に注目した。この表から、これらの遺伝子発現が*sycrp1*破壊株において、野性株に比べ1/5~1/10程度に抑制されていることが推定された。

ORF	Description	Fold
slr1667	hypothetical protein	0.08
slr1668	hypothetical protein	0.11
slr2015	hypothetical protein	0.14
slr2016	hypothetical protein	0.20
slr2017	hypothetical protein	0.14
slr2018	hypothetical protein	0.20
slr2019	ABC transporter	0.44
slr0444	hypothetical protein	0.25
slr0442	hypothetical protein	0.35
slr1056	hypothetical protein	0.40
slr1009	frpC Iron-regulated protein	0.41
slr1259	hypothetical protein	0.44
slr1003	sensory histidine kinase	0.47
slr0447	hypothetical protein	0.41
slr1401	hypothetical protein	0.31
slr0710	hypothetical protein	0.38
slr0727	hypothetical protein	0.45
slr1241	hypothetical protein	0.37

表1. DNA microarrayによる標的遺伝子のスクリーニング

DNA microarrayを用いて野性株と*sycrp1*破壊株で定性的な遺伝子発現の比較を行った。25~30 μmol/m<sup>2</sup>/sの光量及び1%CO<sub>2</sub>を含む30℃のBG11培地で育成したそれぞれの株の細胞がOD<sub>730</sub> = 1 ± 0.1になった時点で集菌しtotal RNAを抽出した。発現比は野性株の蛍光シグナルに対して破壊株の蛍光シグナルを割った数値で、独立した実験を3回行った平均値を示した。0.5以上2.0未満の比率は有為差がないと判断した。

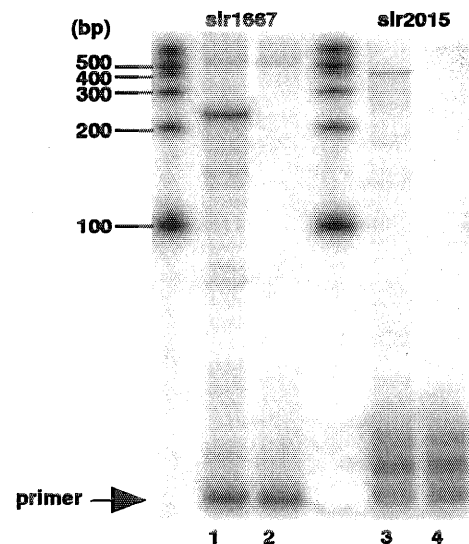


図6. ORF:slr1667、ORF:slr2015の定量的な遺伝子発現量の解析それぞれの遺伝子のORF内部に設定したプライマーでprimer extensionを行った。野性株と*sycrp1*破壊株はDNA microarrayの場合と同じ条件で培養し、それぞれの細胞から抽出したtotal RNA 30 μgを実験に用いた。野性株におけるslr1667の逆転写反応試料(レーン1)、*sycrp1*破壊株におけるslr1667の逆転写反応試料(レーン2)、野性株におけるslr2015の逆転写反応試料(レーン3)、*sycrp1*破壊株におけるslr2015の逆転写反応試料(レーン4)。電気泳動は8Mウレア-8%ポリアクリルアミドゲルで行った。

野性株と *syacr1* 破壊株からそれぞれ total RNA を抽出し、slr1667、slr2015 の ORF 内部に設定した primer で primer extension を行った (図6)。その結果、*syacr1* 破壊株ではほとんど発現が認められず、DNA microarray の結果と一致していた。次にスクリーニングした遺伝子群の先頭の遺伝子について転写開始点の決定、およびプロモーター部位を予測するために primer extension を行った。slr1667 の場合、3 つのバンドが検出され、転写開始点は開始コドンに近い方から T、A、A と 3 つあることが示唆された。slr2015 の場合、転写開始点は T の 1 つであった。それぞれの遺伝子の転写開始点が決まったので、それぞれの遺伝子のプロモーターと考えられる領域を用いてゲルシフトアッセイを行った。SYCRP1 の濃度が増大するとシフトするバンドのシグナルも増大し、標識していないプローブを加えると減少した。また、poly(dI-dC) の量を増やしてもシフトするバンドのシグナルは全く影響を受けなかった。このことから slr1667 の予測した上流領域と SYCRP1 は特異的に結合することが明らかとなった。slr2015 においては予測した上流領域で特異的といえる結合は認められなかった。

slr1667 の上流領域のどの部分に SYCRP1 が結合するのかを特定するために、DNase I フットプリントを行った (図7)。その結果、転写開始点からみて -178 から -127 の領域が SYCRP1 によって保護されることが明らかとなった。保護された領域のなかには大腸菌の CRP が最もよく結合する、コンセンサス DNA 配列のコアとなる塩基配列が確認された。

そこで、SYCRP1 が結合するためのコアと考えられる塩基配列を含むプローブ (野生型) と、その塩基配列を塩基置換したプローブ (変異型) の 2 種類の合成オリゴヌクレオチドを用いて SYCRP1 の結合部位を決定した (図8)。その結果、変異型プローブにおいては SYCRP1 の濃度を増大しても全くバンドのシフトは認められなかった。野生型プローブにおいては SYCRP1 の濃度が増大するとシフトするバンドのシグナルも増大し、標識していない野生型プローブを加えると減少した。また、標識していない変異型プローブを加えてもシフトに全く影響を与えなかった。これらの結果から SYCRP1 は予測した塩基配列に結合すると結論した。

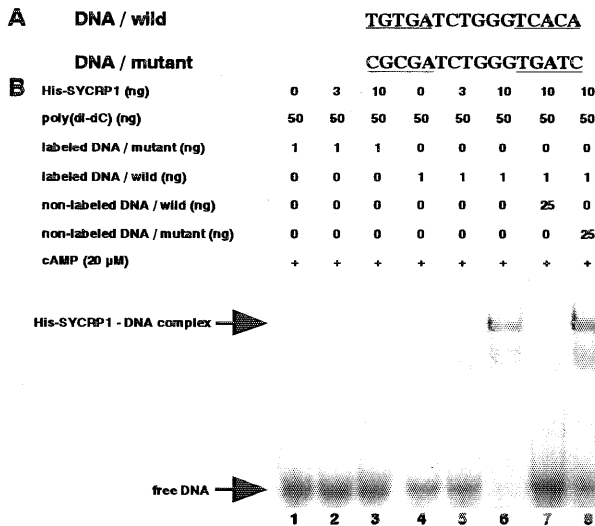


図8. SYCRP1 の結合部位の決定  
 プローブとして SYCRP1 が保護した領域を含む -181 から -122 の領域を用いた。  
 A) 野生型プローブにおいて SYCRP1 が結合するためのコアと考えられる塩基配列 (上段、下線部) とその配列を部分的に変異させた変異型プローブ (下段、下線部、赤字) を示している。  
 B) A の 2 つのプローブを用いてゲルシフトアッセイを行った。20 μM cAMP 存在下で 1 ng の <sup>32</sup>P 標識したプローブ、ヒスタグ SYCRP1、標識していないプローブ及び poly(dI-dC) を用いてアッセイした。複合体とフリーの DNA は矢印で示した。電気泳動は 5% ポリアクリルアミドゲルで行った。

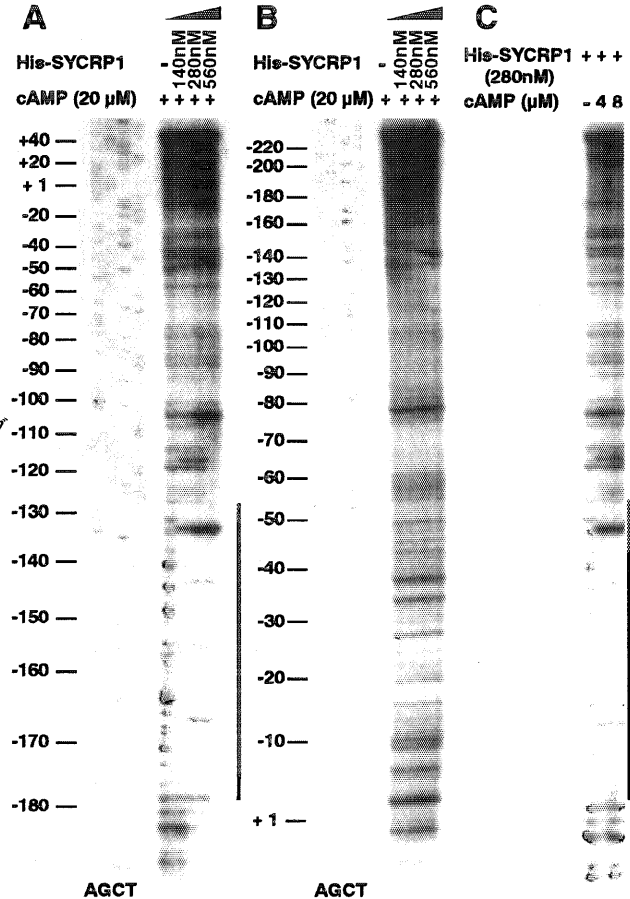


図7. DNase I フットプリントアッセイ  
 A) コーディング鎖を末端標識したプローブと図の上を示した各タンパク質濃度でヒスタグ SYCRP1 を反応させ DNase I 処理した。  
 B) ノンコーディング鎖を末端標識したプローブと図の上を示した各タンパク質濃度でヒスタグ SYCRP1 を反応させ DNase I 処理した。  
 C) cAMP 存在下、非存在下でコーディング鎖を末端標識したプローブと 280nM のヒスタグ SYCRP1 を反応させ DNase I 処理した。SYCRP1 によって保護された領域は直線で示した。- 及び + はヒスタグ SYCRP1 あるいは cAMP の有無を表している。DNA シーケンスラダーはレーン AGCT で示した。プローブとして slr1667 の上流 -233 ~ +44 の領域を用いた。電気泳動は 8 M ウレア - 6% ポリアクリルアミドゲルで行った。

まとめ

- 1) ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 の cAMP 結合タンパク質をコードする 2 つの遺伝子を同定した。
- 2) SYCRP1 は cAMP と結合親和性を持ち、DNA 結合能を持つことを明らかにした。
- 3) DNA microarray によって SYCRP1 の標的遺伝子をスクリーニングした。
- 4) SYCRP1 は標的遺伝子 slr1667 の上流に結合し、その発現を制御していると結論した。