

## 論文の内容の要旨

論文題目 Molecular studies on phototactic motility in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

(シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の走光性機構の分子生物学的解析)

氏名 吉原 静恵

### <序論>

シアノバクテリアは、変動する光環境に適応するために光に応答した運動性を示すものが知られており、100年以上前から研究されてきた。しかし、生理学的な知見がほとんどであり、光受容や運動のメカニズム、これらの調節機構について分子レベルでの報告は非常に少ない。本研究では、シアノバクテリアの走光性と運動のメカニズムを分子生物学的に解明することを目指した。そのために、全ゲノム情報が決定されている単細胞性シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 をもちいて多数の遺伝子破壊株を作成し、表現型を解析することによって以下に分類する遺伝子を同定した。1章：運動機構（線毛）の構成遺伝子、2章：線毛の形成調節にかかわる遺伝子クラスター、3章：正の走光性の調節にかかわる光受容体とシグナル伝達因子をコードする遺伝子クラスター。4章で、本研究で同定した走光性の光受容体タンパク質（PixJ1）を単離し、その分光学的特性について述べる。

### 1章：運動機構である線毛を構成する遺伝子

*Synechocystis* のゲノムには、IV型線毛と呼ばれる線毛の形成遺伝子に似た、複数の遺伝子が存在する。IV型線毛とは、グラム陰性菌に広く見られる一群の線毛構造で、細胞運動や形質転換、病原性細菌では宿主への感染などに関与することが知られている。そこで、遺伝子の破壊株を作成し、運動性を調べた結果、*sll1694* (*pilA1*)、*slr0063* (*pilB1*)、*slr1294* (*pilM*)、*slr1295* (*pilN*)、*slr1296* (*pilO*)、*slr1297* (*pilQ*)などの遺伝子が、*Synechocystis* の細胞運動に関与していることを明らかにした。電子顕微鏡観察によって、野生株は形態が異なる2種類の太い線毛と細い線毛をもち、上記の遺伝子破壊株では太い線毛だけが失われていることを確かめた (Fig. 1)。さらに、これらの遺伝子破壊株は形質転換能も完全に失ったことから、太い線毛は運動と形質転換の両機能に関与する構造であることが強く示唆された。一方、*slr0197* (*comA*)破壊株は運動性を保持しているが、形質転換能を完全に失うことから、運動性に関与せず形質転換に特異的にかかわる遺伝子であることを見いだした。これらの結果から、*Synechocystis* の運動と形質転換には共通の機構として線毛がかかわっているが、形質転換にかかわる特異的な機構も存在することが明らかになった。

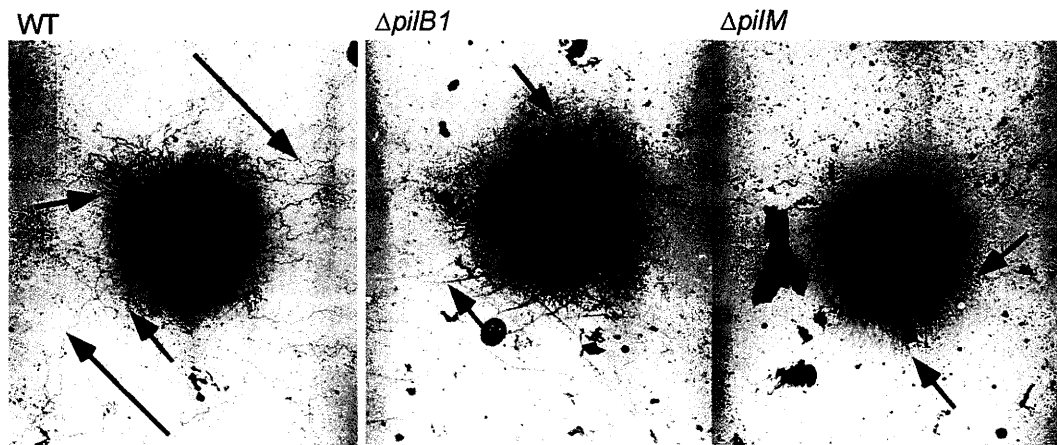


Fig. 1 運動性の野生株と、非運動性の*pilB1*、*pilM*破壊株の線毛  
長い矢印は太い線毛（直径約5 nm）、短い矢印は細い線毛（直径約3 nm）を示す。

## 2章：線毛の形成調節にかかわる遺伝子クラスター

*Synechocystis* のゲノムには、べん毛運動の調節因子（CheY、CheW、MCP、CheA）に相同性を示す遺伝子などから構成される遺伝子クラスターが3種存在する（Fig. 2）。また、これらの遺伝子の並び方は、*Pseudomonas aeruginosa* においてIV型線毛の形成と運動性にかかわる *pilGHILJKL* 遺伝子クラスターに相同性を示す（Fig. 2）。しかし、*P.aeruginosa* に見られる *cheR* 様の遺伝子（*pilK*）は、*Synechocystis* のゲノムに存在しない。*Synechocystis* の運動性への関与を調べるために、これらの遺伝子の破壊株を作成し、表現型を調べた。

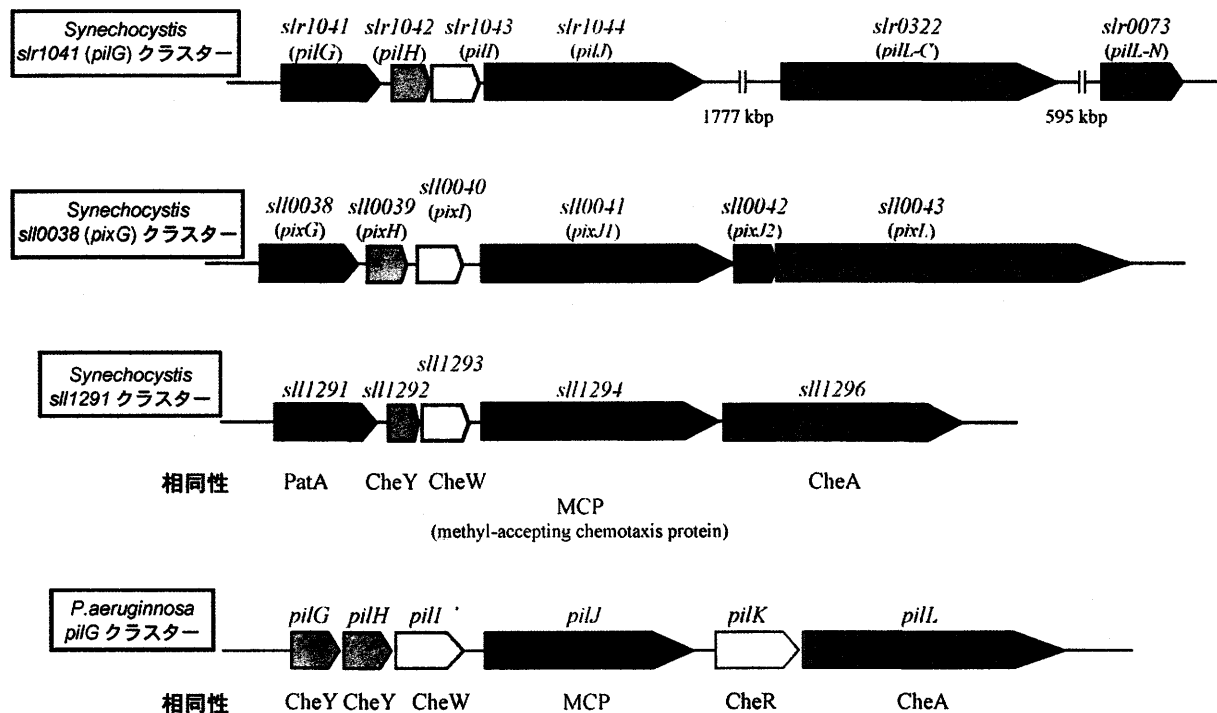


Fig. 2 *Synechocystis* のゲノムには、シグナル伝達因子をコードする遺伝子クラスターが3種存在する：*slr1041* (*pilG*) 遺伝子クラスター、*sll0038* (*pixG*) クラスター、*sll1291* クラスター。これらの遺伝子群はまた、*Pseudomonas aeruginosa* のIV型線毛の形成にかかわる *pilGHILJKL* クラスターに相同性を示す。同じシグナル伝達因子に相同性を示すものを同色で示し、因子名を *sll1291* クラスター、*pilG* クラスター [*P.aeruginosa*] の下に示した。遺伝子の矢印は転写の方向を示す。

その結果、*slr1041*、*slr1042*、*slr1043*、*slr1044* 遺伝子クラスターが、太い線毛の形成、運動、形質転換にかかわることを明らかにした（Table 1）。しかし、*slr1042* 破壊株は野生株よりも多い線毛を保持するが運動

性を失っていた。また、*slr1043* 破壊株は線毛を少数保持しているが運動性を失った。また、*slr1044* 破壊株と *slr0322* 破壊株は線毛を失ったが、わずかに形質転換能を保持していた。これらは、1 章で述べた線毛の形成遺伝子の破壊株の結果（線毛形成、運動性、形質転換能を完全に失う）と異なった。これらの違いは、*slr1041* 遺伝子クラスターが線毛本体の形成因子ではなく、線毛形成の調節にかかわっているためであると考えられる。そのため、破壊株の線毛形成と形質転換効率は、破壊株が保持する線毛の機能を表していると考えられる。一方、*slr1041* 遺伝子クラスター内には CheA 型遺伝子がみられない。全ゲノムに対して *cheA* 型遺伝子を検索した結果、2 つの ORF (*slr0073* と *slr0322*) に分断され、それぞれが *slr1041* 遺伝子クラスターから離れて存在していることを見いだした。遺伝子破壊株の解析から、両遺伝子ともに運動と形質転換に必要な線毛の形成に関与することがわかった。*slr1041*、*slr1042*、*slr1043*、*slr1044*、*slr0073*、*slr0322* を、*pilG*、*pilH*、*pilI*、*pilJ*、*pilL-N*、*pilL-C* と命名した。

Table. 1 *slr1041* 遺伝子群、*slr0073*、*slr0322* は線毛形成、運動性、形質転換にかかわる

ORF No. (遺伝子名)	予想産物が示す 相同性	野生株と破壊株の表現型			
		太い線毛の形成	運動性	形質転換効率 (%)	
		WT	++	+	100
<i>slr1041</i> ( <i>pilG</i> )	PatA	++	+		97.6
<i>slr1042</i> ( <i>pilI</i> )	CheY	+++**	-		28.6
<i>slr1043</i> ( <i>pilJ</i> )	CheW	+	-		not determined
<i>slr1044</i> ( <i>pilH</i> )	MCP*	-	-		1.5
<i>slr0073</i> ( <i>pilL-N</i> )	N-terminal of CheA	+++	-		not determined
<i>slr0322</i> ( <i>pilL-C</i> )	C-terminal of CheA	-	-		1.5

\* MCP: methyl-accepting chemotaxis protein

\*\* +++: hyperpiliation

### 3 章：正の走光性の調節にかかわる光受容体とシグナル伝達因子をコードする遺伝子クラスター

走光性にかかわる遺伝子を同定するために、*Synechocystis* の野生株の中から、白色蛍光灯下で常に正の走光性を示す株 (PCC-P 株) と、常に負の走光性を示す株 (PCC-N 株) を単離し、以後の遺伝子破壊の親株としてもちいた。光受容体などの候補遺伝子の破壊株の表現型を調べた結果、PCC-P 株を親株とした *slI0041* と周辺の遺伝子の破壊株が、負の走光性を示すことを見出した (Fig. 3)。*slI0038*、*slI0039*、*slI0040*、*slI0041*、*slI0042*、*slI0043* を、正の走光性 (positive phototaxis) にかかわる遺伝子として、*pixG*、*pixH*、*pixI*、*pixJ1*、*pixJ2*、*pixL* と命名した。

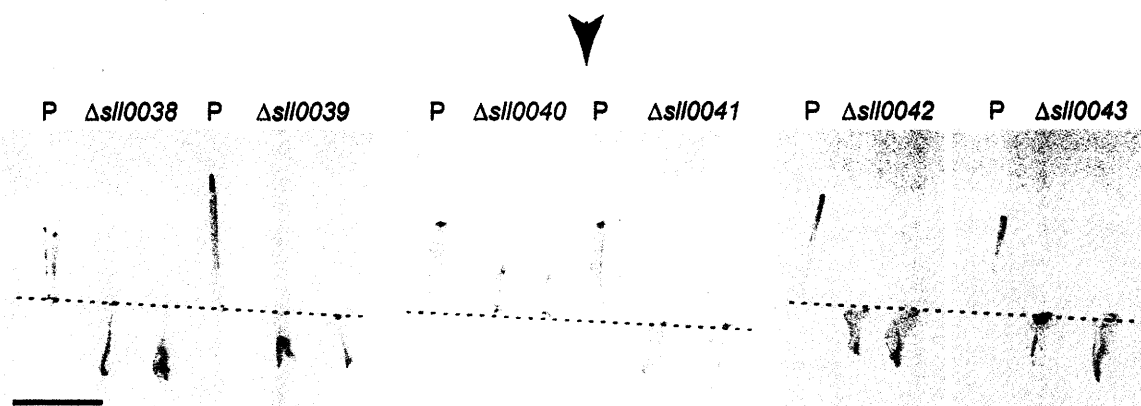


Fig. 3 PCC-P株と*slI0038*クラスターの破壊株の走光性

白色光の照射方向を矢頭で示した。*slI0038*、*slI0039*、*slI0041*、*slI0042*、*slI0043*の破壊株は正の走光性を失い、負の走光性を示した。点線は光照射前に各株を植えた位置を示す。P: PCC-P。スケールバー: 10 mm。

この遺伝子クラスターは、2 章で述べた *pilG* 遺伝子クラスターと同様に、シグナル伝達因子をコードすると考えられる。さらに、*pixJ1* の予想産物は、植物の光受容体であるフィトクロム様の色素結合領域と走化性

の受容体 MCP (methyl-accepting chemotaxis protein)のシグナル領域をあわせもつ。これらの結果から、*Synechocystis* の正の走光性の調節系には、フィトクロム様の光受容体と、べん毛運動を調節する Che タンパク質による調節経路に似た機構がかかわっていることが強く示唆された。

一方、PCC-P 株と *pixJ1* 破壊株について、基礎生物学研究所の大型スペクトログラフを利用し、走光性の作用スペクトルを得た (Fig. 4)。その結果、*Synechocystis* の走光性は少なくとも 3 つの調節機構が関与する複雑な機構であることが示唆された。

- (1) 紫外領域の光に対する負の走光性
- (2) 可視領域の光に対する正の走光性
- (3) 可視領域の光に対する負の走光性

*pixJ1* は (1)と(2)の機構の調節にかかわることが示唆された。

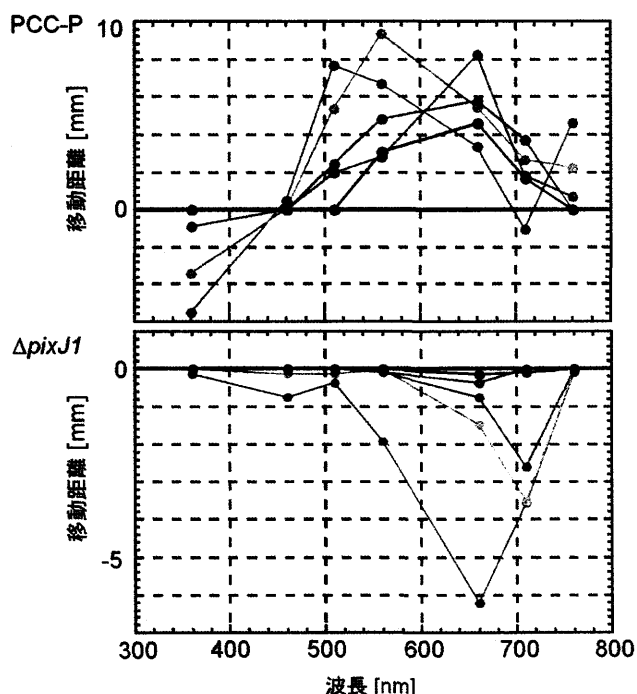


Fig. 4 PCC-P株と*pixJ1*破壊株の走光性の波長依存性  
縦軸は、単色光照射後のコロニーの移動距離を示す  
(+: 正の走光性、-: 負の走光性)。光強度: 20  
(赤)、7 (オレンジ)、2 (緑)、0.7 (青)、0.2  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$   
(黒)。

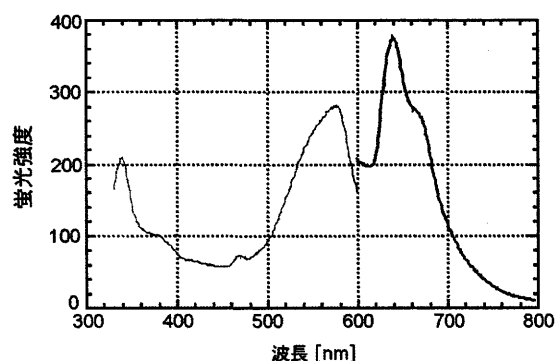


Fig. 5 His-PixJ1タンパク質の蛍光スペクトルと蛍光励起スペクトル  
蛍光スペクトル(励起波長=580 nm: 黒線)と蛍光励起スペクトル(蛍光波長=630 nm: 赤線)。

#### 4章: 正の走光性の光受容体 PixJ1 のスペクトル解析

PixJ1 タンパク質の分光学的特徴を調べるために、ヒスチジンタグとの融合タンパク質として *Synechocystis* で発現させ、精製した。SDS-PAGE 後に Zn イオン処理すると His-PixJ1 から蛍光が生じたことから、開環テトラピロールが共有結合していることを確認した。さらに、蛍光スペクトルの測定から、最大蛍光波長が 640 nm、最大励起波長が 580 nm であることが分かった (Fig. 5)。

シアノバクテリアのフィトクロム Cph1 は、生体内で開環テトラピロールの 1 つであるフィコシアノピリンを結合しており、その最大吸収波長は 656-658 nm である。PixJ1 は、蛍光励起スペクトルから 580 nm 付近に吸収ピークをもつと予想される。PixJ1 に結合する色素として、開環テトラピロールの 1 つであるフィコエリスロピリンが考えられるが、フィコエリスロピリンの合成にかかわる既知の遺伝子のホモログは *Synechocystis* のゲノムに見られない。可能性としては、既知の経路とは異なるフィコエリスロピリン合成系が存在する、または、PixJ1 には未知の色素が結合している、と示唆される。フィコエリスロピリンを結合する、または 600 nm より短波長側に吸収ピークをもつフィトクロムの例はない。今後、PixJ1 の吸収スペクトルの決定と色素の同定が期待される。