

論文の内容の要旨

Analysis of oxidative stress-mediated gene regulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803

(*Synechocystis* sp. PCC 6803 の酸化ストレス応答機構の解析)

小林真理

呼吸や光合成を営むすべての生物にとって、酸化ストレスは避けることのできない重大な問題である。呼吸鎖では NADH 脱水素酵素により電子が酸素に渡されることで活性酸素が生じる。光合成の電子伝達系では、光化学系 I の還元側で酸素自体が Hill 酸化剤として働くメーラー反応による活性酸素の生成や、光化学系 II ではクロロフィルからの余剰な励起エネルギーの酸素への移行による一重項酸素の生成が知られている。これに対し生物は効率のよい活性酸素防御システムを構築してきた。まず、直接的な活性酸素の消去システムとしてスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やカタラーゼ、ペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素と、それらと共役して働くグルタチオンやチオレドキシシンなどの還元力を供給するタンパク質、また、鉄イオンの安定化に寄与しているフェリチンなどがある。また、二次的な防御システムとして、障害を受けた DNA やタンパク質に対する修復酵素系がある。これらのシステムが常に複合的に機能することで、生物は酸化ストレスから身を守ることができる。

近年、数多くのゲノム解析の進行やマイクロアレイ技術の発展によって、遺伝子発現の網羅的な解析が可能となり、ストレス応答機構の分子レベルでの解明に大きな成果をあげている。すでに大腸菌や酵母では、活性酸素のセンサーとして働く OxyR や

SoxRS などの転写因子が知られており、その制御下の遺伝子や発現調節のしくみについても数多くの知見がある。これに対し、さらに酸化ストレス応答機構が発達していると考えられる光合成生物では、活性酸素センサーに関する知見は皆無であり、活性酸素防御機構についても不明な点が多い。原核光合成生物であるシアノバクテリアにおいては、植物の葉緑体で主要な抗酸化酵素として働くアスコルビン酸ペルオキシダーゼが存在せず、活性酸素防御の中心的な役割を担う抗酸化タンパク質についてほとんどわかっていない。

私は、シアノバクテリアの中でも遺伝子操作が容易で全ゲノム情報がすでに決定され、ポストゲノム解析が進んでいる *Synechocystis* sp. PCC 6803 に注目し、活性酸素の応答機構の分子レベルでの解明を目指した。

1. 酸化ストレスに応答する遺伝子発現の網羅的解析

Synechocystis sp. PCC 6803 において活性酸素が遺伝子発現にもたらす影響を、マイクロアレイを用いて網羅的に調べた。異なる活性酸素種による遺伝子発現の特異性、または共通項を明らかにするために、メチルビオロゲンと、過酸化水素による処理を野生株に施し、それぞれについて未処理株と比較した。メチルビオロゲンは光化学系 I の電子受容体として働き、受け取った電子を酸素に渡すためにスーパーオキシドが産生されることが知られている。

マイクロアレイの結果、メチルビオロゲン処理株で野生株に比べて発現が 2 倍以上に誘導された遺伝子は 27 個あり、その中でも *sll1621* の発現が 26 倍と著しく誘導されていた。*sll1621* は他の生物で知られている抗酸化酵素ペルオキシレドキシシンと相同性があり、ゲノム上 *sll1621* の上流には推定転写因子 *slr1738* が逆向きに位置していた。

slr1738 遺伝子の発現もまたメチルピオロゲンによって誘導されており、Slr1738 タンパク質が *sll1621* の発現調節に関与する可能性が考えられた。また、有意に誘導された *slr0074* と *slr0075* 遺伝子はゲノム上で同一方向に隣接して並んでおり、そのすぐ上流には転写因子 *sll0088* が逆向きに存在した。*slr0074* と *slr0075* は大腸菌の *suf* オペロンに相同性があり、大腸菌の過酸化水素処理株においてもまた *suf* オペロンの発現が高く誘導されることが報告されている。*sll0088* は誘導された遺伝子リストには含まれないが、Sll0088 タンパク質が *slr0074*, *slr0075* 遺伝子の発現調節に関与する可能性が考えられた。一方、メチルピオロゲン処理によって SOD やカタラーゼなどの既知の抗酸化タンパク質は誘導されなかった。

過酸化水素処理株では、メチルピオロゲン処理株よりもさらに多い 35 個の遺伝子が、野生株に比べて 2 倍以上に誘導された。その中には、メチルピオロゲン処理でも誘導された *sll1621* や *slr0074*, *slr0075* を含む 7 つの遺伝子が共通していた。この遺伝子リストの中にも SOD やカタラーゼなどは含まれなかったが、近年バクテリアで報告されている新規抗酸化タンパク質 (Bcp) と相同性のある *sll1159* が見出された。*sll1159* の下流にある *sll1160* もまた過酸化水素により誘導され、ゲノム上これらの遺伝子の上流には転写因子 *slr1245* が逆向きに位置していた。また、隣り合って存在する *sll1404*, *sll1406*, *slr1484*, *slr1485* は過酸化水素処理によって有意に誘導されており、これらの近隣にある転写因子 *sll1408* もまた、発現が誘導されていた。*sll1159* と *sll1160*, *sll1404* とその近隣遺伝子の発現はメチルピオロゲン処理株では誘導されないため、これらの遺伝子は過酸化水素により特異的に誘導される遺伝子であるといえる。

2. 酸化ストレスに応答するレギュロンの解析

Slr1738 が *sll1621* を調節している可能性を検証するために、*slr1738* 破壊株を作製し、マイクロアレイによって通常条件下における遺伝子発現を野生株と比較した。その結果、*slr1738* 破壊株では *sll1621* の発現が最も高く誘導されていた。また、メチルビオロゲン処理により誘導された遺伝子リストと比較すると、*sll1621* の他に *sll1620* も共通していた。このことから、Slr1738 は通常条件下ではリプレッサーとして機能することが示唆された。次に、Slr1738 のターゲットを同定するため、Slr1738 をヒスチジンタグ融合タンパク質として大腸菌内で発現・精製した。*slr1738* と *sll1621* の間の領域を DNA プローブとして gel mobility shift assay を行った結果、Slr1738 はこの領域に特異的に結合した。さらに、Slr1738 の DNA への親和性は、ジチオスレイトールを添加した還元的環境で特に促進され、過酸化水素を添加した酸化的環境では結合が阻害された。このことから、Slr1738 は還元的環境で *Sll1621* の発現を抑制し、酸化ストレスに応答して抑制を解除するリプレッサーであることが強く示唆された。同様に *sll1620* と *slr0589* の上流配列をそれぞれプローブにした gel mobility shift assay を行ったところ、ジチオスレイトール存在下において Slr1738 の特異的な結合が観察された。

Slr1738 の制御下にある3つの遺伝子はすべて機能未知の遺伝子であったため、それらの生体内での役割を調べるために *sll1621* と *sll1620* のそれぞれの破壊株を作製しその表現型を調べた。興味深いことに、*sll1621* 破壊株は嫌気条件下でのみ野生型遺伝子が薬剤耐性カセットに完全に置換された。また、*sll1621* 破壊株はプレート上弱光下ですでに増殖の阻害が観察され、液体培養でも中光下で増殖の阻害がみられた。さらに、強光下や酸化ストレス条件下では完全に増殖が阻害された。以上のことから、*Sll1621* は *Synechocystis* の新規の抗酸化タンパク質であることが強く示唆された。*sll1620* 破壊株は、通常条件下では野生株に比べて増殖に違いはみられなかったが、

2.5 μ Mのメチルピオロゲン存在下では若干増殖が阻害された。*sII1620*のホモログは植物やシアノバクテリアで広く存在していたが、他のバクテリアなどには見当たらなかった。これらのことから、SII1620 は新規の抗酸化タンパク質の可能性もあるが、その役割は*sII1621*よりも補助的なものだと考えられる。

SII0088 についても同様に、そのターゲット遺伝子の同定を試みた。*sII0088*、*slr0074* に関してはすでに破壊株が作製できない必須遺伝子であることが報告されている。本研究では SII0088 をヒスチジンタグ融合タンパク質として大腸菌内で発現・精製し、gel mobility shift assay を行った。*sII0088*と*slr0074*の間の領域を DNA プローブとしたところ、SII0088 はこの領域に特異的に結合した。Slr1738と同様、SII0088 の DNA への親和性は、ジチオスレイトールを添加した還元的環境で促進された。このことから、SII0088 は還元的環境で*slr0074*の発現を抑制するリプレッサーであることが強く示唆された。

以上の結果から、酸化ストレス環境でのマイクロアレイのプロファイリングをもとに、4 つの酸化ストレス応答レギュロンの候補を抽出し、そのうち2つに関しては実験によりその可能性を強く示唆する結果が得られた。これは、光合成生物において酸化ストレスに応答する転写因子とそのターゲットを同定した最初の報告である。本研究で見出された酸化ストレスで誘導される抗酸化酵素 (SII1621、SII1159) や Slr0074、Slr0075、SII1620、Slr058 タンパク質は植物にも保存されている。これらの遺伝子の機能や酸化ストレス応答性を植物で調べることによって、光合成生物共通の応答、防御機構を理解できると考えている。