

# 論文内容の要旨

## 論文題目

### The two-phase mechanism of the regulation of photosystem I content under high-light conditions in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

(シアノバクテリアの強光順化応答における光化学系 I 複合体量調節メカニズムの解明)

氏名 村松 昌幸

#### 序論

光合成生物にとって、光はエネルギー源として必要不可欠なものであるが、逆に過剰な光エネルギーは、活性酸素分子種等の有害物質の発生を招く要因ともなりうる。このため、光合成生物は強い光に曝された場合には、自らの光合成系を変えて光阻害による障害を回避する能力を備えている。具体的には、集光性アンテナのサイズを小さくする、活性酸素消去系酵素を誘導する、CO<sub>2</sub>固定能を上昇させる等の調節を行うことが様々な生物種における生理学的研究の蓄積により明らかにされてきた。また、シアノバクテリアにおいては二つの光化学系、特に光化学系 I (以下系 I と略す)複合体量の著しい減少も観察される。強光下で系 I 複合体量調節に欠損のある変異株 (*pmgA* 変異株)が *Synechocystis* sp. PCC 6803 から単離されているが、この変異株は長時間強光培養を続けると致死となることから、系 I 複合体量減少は光阻害回避のための重要な調節であることが分かる。一方、*pmgA* 変異株が単離されたことは、これまで未解明であった、強光下での系 I 複合体量減少の分子メカニズムの解析への突破口が開けたことを意味する。

*Synechocystis* sp. PCC 6803 を弱光から強光へ移すと、ゲノム上に散在している系 I 複合体構

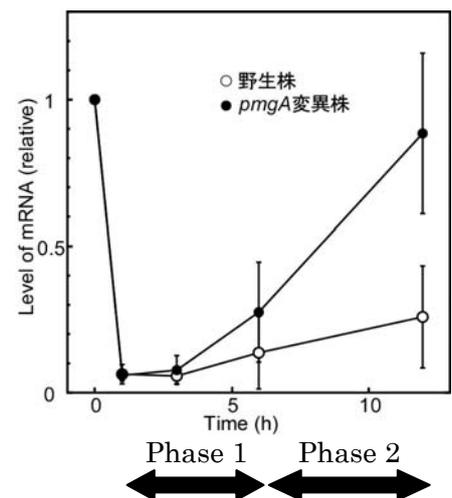


図1 野生株および *pmgA* 破壊株における、弱光から強光へシフト後の *psaAB* 転写産物量の変動

成遺伝子群の発現が1時間以内に統一的に減少する。その後発現は多少増加するものの、弱光に比べると大きく抑制されたままである。*pmgA* 変異株では、強光シフト直後の系 I 遺伝子群の応答は、野生株と変わらないが、強光シフト6時間以降、系 I 反応中心サブユニットをコードする *psaAB* の発現が大きく増加することが分かってきた (図 1)。さらに、PsaAB タンパク質量、およびクロロフィル量においても、野生株では強光シフトにより大きく減少し、その後低く維持されているが、*pmgA* 変異株においては、強光シフト6時間以降からこれらの量も大きく増加してしまうことが分かってきた。したがって、シアノバクテリアの強光下での系 I 複合体量調節は、強光シフト後6時間までの(Phase 1)の PmgA に依存しない調節と、6時間以降の(Phase 2)、PmgA に依存した調節があることが示された。本研究では、Phase 1 における系 I 遺伝子群の統一的な転写抑制メカニズム、さらに Phase 2 における PmgA の機能を探ることにより、強光下での系 I 複合体量調節メカニズムの解明を目指した。

## I Phase 1 における系 I 遺伝子群の転写調節メカニズム

### 強光シフト後の系 I 遺伝子群の統一的な転写抑制メカニズムの解明

まず、*psaAB* および系 I 小サブユニットをコードする *psaD* について、プライマー伸長法、およびレポーターアッセイを行い、プロモーター構造を詳細に調べた。*psaAB* は、2つのプロモーター (P1、P2) を持ち、その両プロモーターが強光下で強く活性を減少させるという光応答性を示すことが分かった。しかし、それらプロモーターの構造は全く異なるものであった。P1 プロモーター活性は、-35 配列直上流の AT リッチな配列(PE1)により、弱光下で高く制御され、強光シフト直後にその調節が不活化されることで抑制されていた。一方 P2 プロモーターは、弱光下ではコア部分のみである程度高い活性を示すものの、強光へシフトすると、コア部分からかなり離れた、5' 上流域に存在するシスエレメント(HNE1)によって、活性が負に調節されていることが分かった。

*psaD* では通常働くプロモーターが一つ存在し、そのプロモーターの活性は強光下で減少していた。そして、この光応答は、*psaAB* の P1 同様、-35 配列上流に存在する AT リッチな配列(PE)で制御されていることがわかった。そこで、他の系 I 遺伝子群 *psaC*, *psaE*, *psaK1*, *psaL1* についても転写開始点を決定しプロモーターの-35 配列上流を比較したところ、やはり AT に富む配列が存在し、さらにこの領域を欠失させると光応答性が失われることが分かった(図 2)。このことから、Phase 1 における系 I 遺伝子群の統一的な転写抑制は、系 I 遺伝子群プロモーターに共通に存在する-35 配列上流の AT リッチな配列により制御されていることが明らかとなった。

## II Phase 2 における PmgA の役割

### PmgA による *psaAB* 転写抑制の意義

Phase 2 において、*pmgA* 変異株では *psaAB* 転写産物量の蓄積が顕著にみられる (図 1)。そこで、*psaAB* のみを強光下で強発現させた場合、*pmgA* 変異株同様、系 I 複合体量が蓄積するの

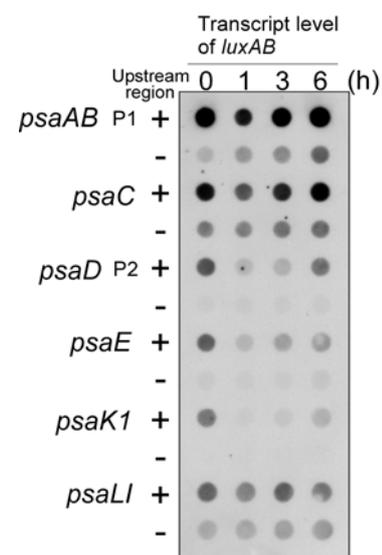


図 2 系 I 遺伝子群プロモーターのレポーターアッセイ。

-35 上流領域を含む (+)、または欠失させたプロモーター(-)をそれぞれ *luxAB* レポーターに連結し、強光シフト後のプロモーター活性を *luxAB* の転写産物量を指標に調べた。

か検証を行なった。*psaAB* を強光下で強発現させた *psaAB-OX* 株の、強光下での表現型を調べたところ、クロロフィル量や系 I 複合体量は野生株同様の減少を示した。この結果は、野生株では *psaAB* 転写産物量のみで強光下での系 I 複合体量が規定されているわけではないことを示しており、その他の要因も系 I 複合体量調節に関係していると考えられる。一方、*psaAB-OX* 株の生育は、弱光下では正常であったが、強光下で大きく阻害されたことから、*psaAB* の転写抑制が強光下での生育に必須であることが示された。

### PmgA によるクロロフィル量調節の意義

Phase 2 において、*pgmA* 変異株ではクロロフィル量を低く維持できないという表現型が観察される。そこで、系 I 複合体量とクロロフィル量との関係について解析することにした。まず、強光下において、クロロフィル合成阻害剤であるレブリン酸を、*pmgA* 変異株に対して 2 mM の濃度で添加したところ、*pmgA* 変異株における強光下での過剰なクロロフィル量の蓄積は野生株程度に抑えられたが、この時、系 I 複合体量も野生株程度まで抑制されていた。すなわち、強光下で系 I 複合体量を減少させるためには、クロロフィル合成量を低く保ち続けることが重要であることが分かった。そこで次に、*pmgA* 破壊株におけるクロロフィル量の抑制維持欠損原因を調べた。クロロフィル合成系における最初の律速段階である、5-アミノレブリン酸(5-ALA)合成の活性を調べたところ (図 3)、野生株においては、弱光下で高く、Phase 1 にて大きく減少し、更なる強光培養(Phase 2)においてもその活性は低く保たれ続けていた。一方 *pmgA* 変異株では、Phase 1 での応答は野生株と同様であったが、Phase 2 では、その活性が再び大きく増加していた。この結果は PmgA が、Phase 2 では *psaAB* 転写産物量の抑制に関与するのに加え、クロロフィル合成経路の初期段階を抑制し、その結果クロロフィル量の低下、ひいては系 I 複合体量の減少を達成させていることを示している。

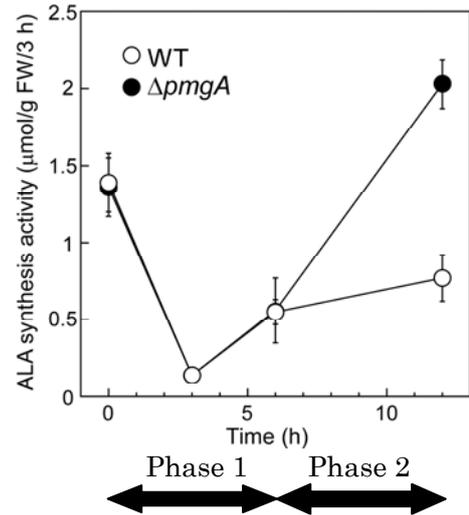


図 3 野生株(WT)と *pmgA* 変異株 ( $\Delta pmgA$ )における強光シフト後の5-アミノレブリン酸合成活性

### 2. PmgA に調節される遺伝子群の探索

PmgA のアミノ酸配列は、枯草菌のアンチシグマ因子である RsbW や SpoIIAB と、弱いながら相同性を持つ。このことから、PmgA は *psaAB* 以外にも多くの遺伝子発現調節に関わるのではないかと考え、DNA マイクロアレイ解析を行なった。その結果、強光シフト後 12 時間において、*pmgA* 変異株では野生株に比べて無機炭素取り込みに関わる遺伝子群 *cmpB*, *sbtA*, *ndhD3* の発現が増加していることが分

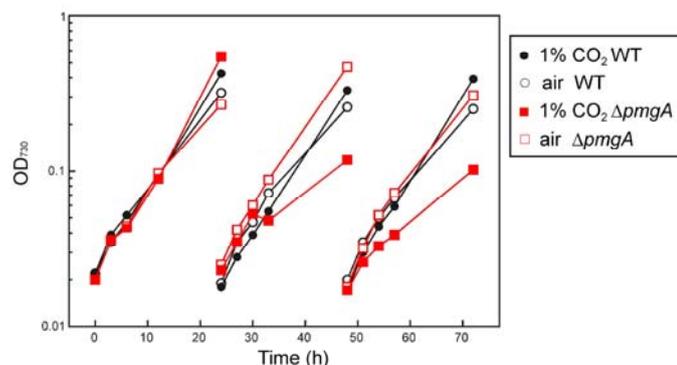


図 4 野生株(WT) および *pmgA* 変異株( $\Delta pmgA$ )を 1%CO<sub>2</sub>または 0.03% CO<sub>2</sub> 存在下で連続強光培養した際の生育曲線

かった。なお、*sbtA* の発現をさらに詳細に調べたところ、*psaAB* の発現と同様、Phase 2 にお

いてはじめて野生株と *pmgA* 変異株間で違いが見られた。次に、*pmgA* 破壊株を高 CO<sub>2</sub>(1%)、あるいは通常 CO<sub>2</sub>(0.03%)下において強光培養し、生育の違いを調べた。野生株では CO<sub>2</sub> 濃度に依存せず生育し続けるが、*pmgA* 変異株では、1%CO<sub>2</sub> 存在下ではこれまでの知見と同様、強光シフト 2 日目から生育阻害を示した。しかしながら、0.03%CO<sub>2</sub> 下で生育させた場合には、2 日目、3 日目でも生育阻害を示さなかった(図)。このことから、*pmgA* 変異株の強光下での致死原因は、おそらく無機炭素を過剰に取り込んでいることにより細胞内が酸性化されることによると考えられる。

## 結論

本研究では、シアノバクテリアにおける、2 つのフェーズを伴った強光下での系 I 複合体量減少メカニズムの解明を目指した。強光シフト後 6 時間までの Phase 1 では、系 I 遺伝子群の統一的な転写抑制が寄与するが、この統一的な転写抑制は、系 I 遺伝子群の-35 配列上流に共通して存在する AT リッチな配列により達成されていることが明らかになった。一方、シフト後 6 時間以降になると(Phase 2)、PmgA による調節が顕著になる。PmgA は、5-アミノレブリン酸合成活性を抑制させることでクロロフィル量の低下を達成させ、ひいては系 I 複合体量の減少を達成させていた。また、*pmgA* 変異株では、Phase 2 において無機炭素取り込み系遺伝子群の発現が増加しており、さらに CO<sub>2</sub> 濃度が高いほど致死性を示した。シアノバクテリアでは光合成電子伝達活性が高いほど無機炭素の取り込み活性が誘導されることが報告されており、これらの事実から、PmgA による強光下での系 I 複合体量減少は、過剰に無機炭素を取り込みすぎ、細胞内が酸性化して致死になってしまうことを避けるための重要な調節であると考えられる。