

論文内容の要旨

Biochemical and physiological analysis of cyanobacterial chromatic acclimation sensors.

(シアノバクテリアの補色順化を制御する光受容体の生化学・生理学的解析)

東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻

広瀬 侑

フィトクロムは、植物や菌類・細菌・シアノバクテリアなどに広く存在する光受容タンパク質であり、赤色光吸収型 (Pr) と遠赤色光吸収型 (Pfr) の間を可逆的に光変換する (図1)。フィトクロムの GAF ドメインには開環テトラピロールが結合し、その C-D 環の回転 (C15-Z ⇌ C15-E の異性化) が、吸収型の変換を引き起こす (図2)。一方、近年のゲノム解析の進歩により、シアノバクテリアからフィトクロム様の GAF ドメインを持つ光受容体の一群が見つかった (図3)。これらはフィトクロムと同様に開環テトラピロールを結合するが、赤色光/遠赤色光以外の様々な色を感知することが明らかとなり、「シアノバクテリオクロム」と呼ばれている (Ikeuchi 2008 *Photochem Photobiol Sci*)。これまでに、この光受容体はシアノバクテリアにしか見つかっておらず、光合成によって独立栄養を営むシアノバクテリアが独自の光環境応答機構を進化させてきたことを示唆している。

図1、フィトクロムの吸収スペクトル

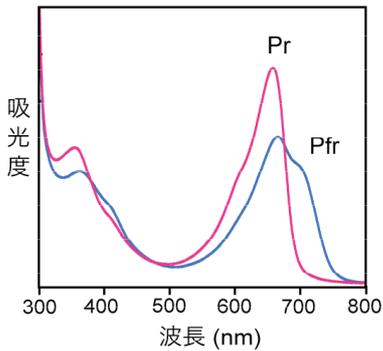


図2、開環テトラピロールの構造変化

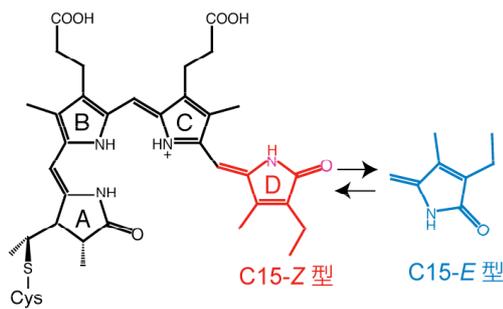
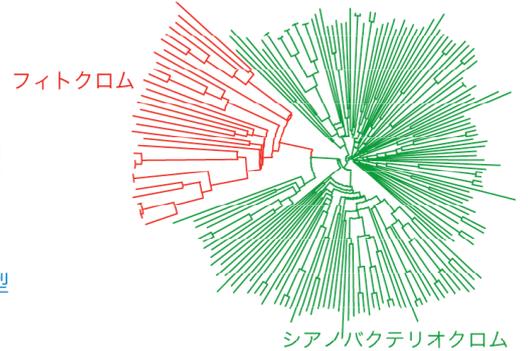


図3、開環テトラピロール結合 GAF ドメインの系統樹



シアノバクテリアは、光合成の集光装置として、フィコビリソームと呼ばれる集光タンパク質複合体を持つ。フィコビリソームはロッドとコアから構成され (図4)、ロッドによって吸収された光エネルギーはコアを介して光化学系の反応中心へと伝達される。一部の種では、ロッドの集光タンパク質は、緑色光を吸収する「フィコエリスリン (PE)」と、赤色光を吸収する「フィコシアニン (PC)」から構成される。これらの種の多くが、周囲の緑色光と赤色光の量によって PE と PC の量を変化させる現象は100年以上前から知られており、「補色順化」と呼ばれている (Gaiducov 1902 *Abh. Preuss. Akad. Wiss*)。しかし、その緑色光と赤色光の感知機構の実態は長らく不明であった。また、補色順化には、緑色光の下で PE を蓄積するタイプ (2型) と、緑色光下で PE を蓄積し、逆に赤色光下で PC を蓄積するタイプ (3型) に分けられると考えられてきた (図5) (TD Marsac 1977 *J Bacteriol*)。

図4、フィコビリソームの構造モデル

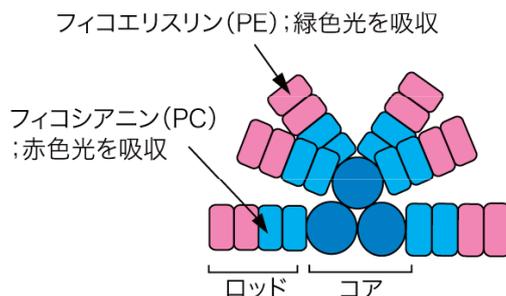
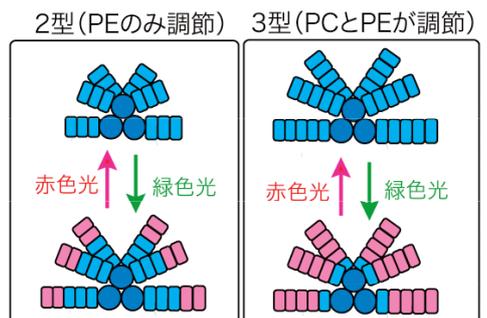


図5、従来の補色順化のモデル



シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*) は、PC を持つが PE を持たず、そのため補色順化をしないと考えられてきた。しかし、先攻研究の、シアノバクテリオクロム破壊株の網羅的な解析によって、シアノバクテリオクロムの1つである CcaS が、転写因子である CcaR を介して、PC の構成遺伝子 (*cpcG2*) の発現を直接制御することが示唆された (Katayama 2006 *Research Signpost*)。そこで、筆者らは、CcaS がどのような光を受容して *cpcG2* の発現を制御するのかを調べるため、CcaS の生化学解析を行った (Hirose 2008 *PNAS*)。CcaS の GAF ドメインは、開環テトラピロールの一種であるフィコシアノビルリン (PCB) を結合し、緑色光吸収型 (Pg) と赤色光吸収型 (Pr) の間を可逆的に光変換した (図 6)。

その  $Pg \rightleftharpoons Pr$  の光変換反応には、フィトクロムと同様に、PCB の C-D 環の回転が起こっていた。また、CcaS のヒスチジinkinナーゼドメインは、転写因子 CcaR のリン酸化活性を緑色光の元で上昇させた (図 7)。つまり CcaS は緑色光のもとで CcaR をリン酸化し、*cpcG2* の発現を誘導することが明らかとなった。

図 6、CcaS の GAF ドメインの吸収スペクトル (左) と写真 (右)

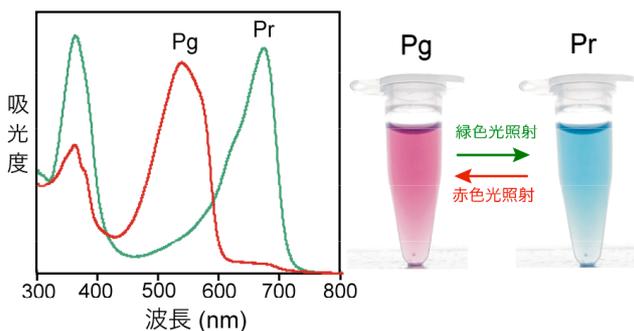
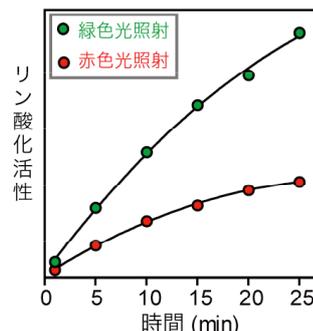


図 7、リン酸化活性



CcaS は、PE と PC を持ち、2 型補色順化を行う *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (*N. punctiforme*) にも存在する。筆者らは *N. punctiforme* において *ccaS* および *ccaR* の破壊株を作製し、補色順化への影響を調べた (Hirose 2010 *PNAS*)。野生株では、緑色光の下で PE が蓄積し (図 8)、同時に *cpeC-cpcG2-cpeR* オペロンの転写が誘導された (図 9)。逆に、赤色光の下では PE が蓄積せず、このオペロンの転写も抑制された。*ccaS* を破壊すると、*cpeC-cpcG2-cpeR* オペロンの緑色光による発現が低下するだけでなく、赤色光による抑制も起こらなかった。*ccaR* を破壊すると、緑色光と赤色光のどちらの下でも *cpeC-cpcG2-cpeR* の発現が停止し、PE 蓄積も起こらなかった。また、CcaR タンパク質は *cpeC-cpcG2-cpeR* オペロンのプロモーター領域に特異的に結合した。これらの結果は、CcaS が緑色光下で CcaR をリン酸化し、リン酸化された CcaR が *cpeC-cpcG2-cpeR* オペロンの発現を誘導し、PE の蓄積が起こること、逆に、CcaS は赤色光下で CcaR を脱リン酸化することでオペロンの発現を抑制し、PE の蓄積を抑制することを強く示唆している。

図 8、*N. punctiforme* の野生株、*ccaS* 破壊株、*ccaR* 破壊株の細胞の吸収スペクトルと培養溶液の写真 (左下)

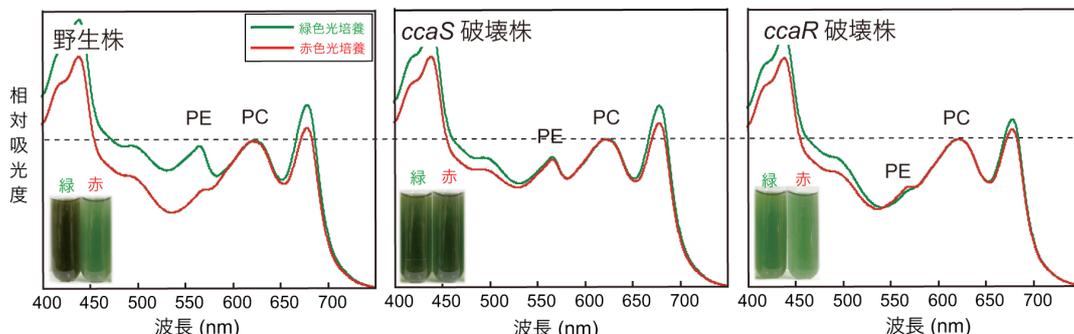
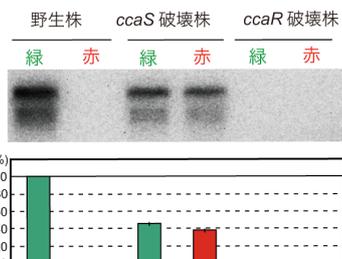


図 9、*cpeC-cpcG2-cpeR* オペロンの転写産物のノーザン解析 (上) と定量 (下)



さらに、3型補色順化の光受容体として同定されていた RcaE 遺伝子の生化学解析を行い、RcaE が CcaS と同様の Pg/Pr 変換を示す事、また自己リン酸化活性が CcaS とは逆に赤色光の下で活性化される事を示した。また、C15-Z, anti 型に固定した PCB を RcaE タンパク質と in vitro で再構成させると、形成された Pg が照射によっても Pr へと変換しなかった。これは、C15-Z/C15-E 変換が Pg/Pr の変換に必要である事を示している。しかし、驚くべき事に、RcaE の Pg と Pr の変換は、pH 変化によっても引き起こされた (図 10)。C15-Z と C15-E のどちらでも、低 pH では Pr が形成され、逆に高 pH では Pg が形成された。この Pg と Pr の吸収ピークの変動はヘンダーソンハッセルベルヒ式  $pH = pK_a + \log(Pg/Pr)$  で非常によくフィッティングされた。これらの点は、PCB が脱プロトン化されると Pg が形成され、逆に PCB がプロトン化されると Pr が形成されることを強く示唆している。C15-Z における PCB の pKa は約 5、C15-E の pKa は約 8 - 8.5 と大きく異なり、この pKa の変化が中性下での Pg/Pr 変換の要因であると考えられた。つまり、RcaE の光変換の機構は、C15-Z/C15-E 変換による PCB の pKa の変化と、それによるプロトン分子の脱着であった。Pr/Pfr 変換を行うフィトクロムでは、C15-Z/C15-E の両方で色素がプロトン化されていることから、RcaE の Pg/Pr 変換機構はフィトクロムとは異なる新しい光変換の機構であることが示された。

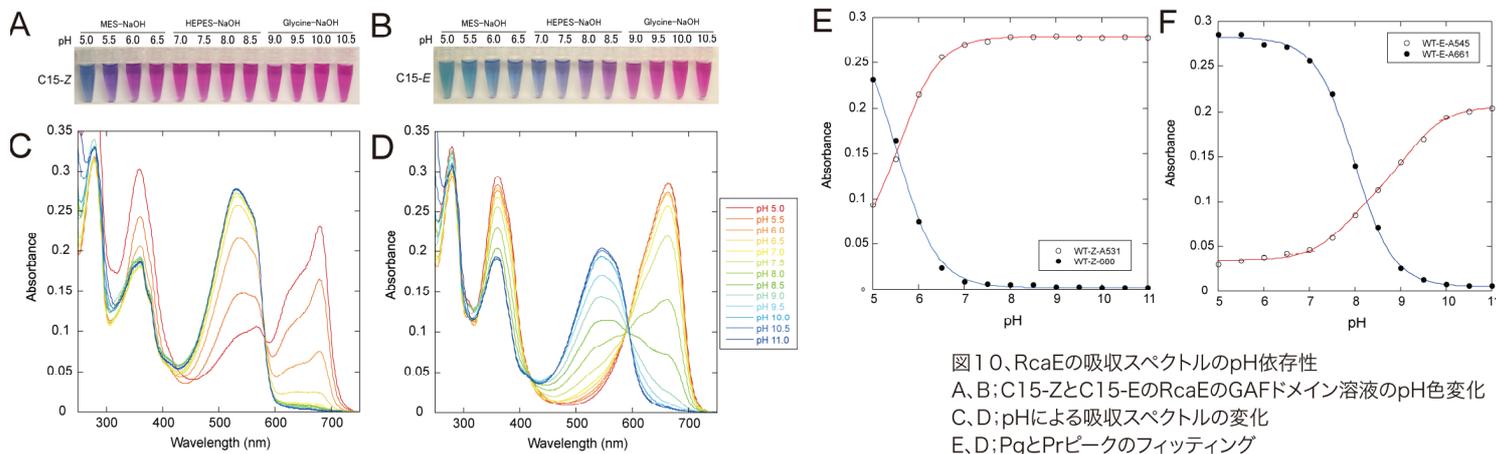


図 10. RcaE の吸収スペクトルの pH 依存性  
A, B: C15-Z と C15-E の RcaE の GAFドメイン溶液の pH 色変化  
C, D: pH による吸収スペクトルの変化  
E, D: Pg と Pr ピークのフィッティング

RcaE に結合した PCB の pKa の変化は、タンパク質を変性すると失われたことから、PCB 近傍のアミノ酸残基が pKa の変換に必要である事が示唆された。そこで、色素近傍の保存された荷電性アミノ酸残基に置換変異を導入したところ、E217 と K261 の変異体は、Pg は形成するが、照射によっても Pr を形成しなかった (図 11)。吸収ピークの pH 依存性と、結晶構造との比較から、K261 がプロトン分子を提供し、E217 がその正電荷を安定化させていることが示唆された。一方、L249 を His に置換した変異体では C15-Z の PCB がプロトン化され、Pr を形成した。これは L249 が C15-Z の PCB の脱プロトン化状態を疎水相互作用によって安定化していることを示唆している。

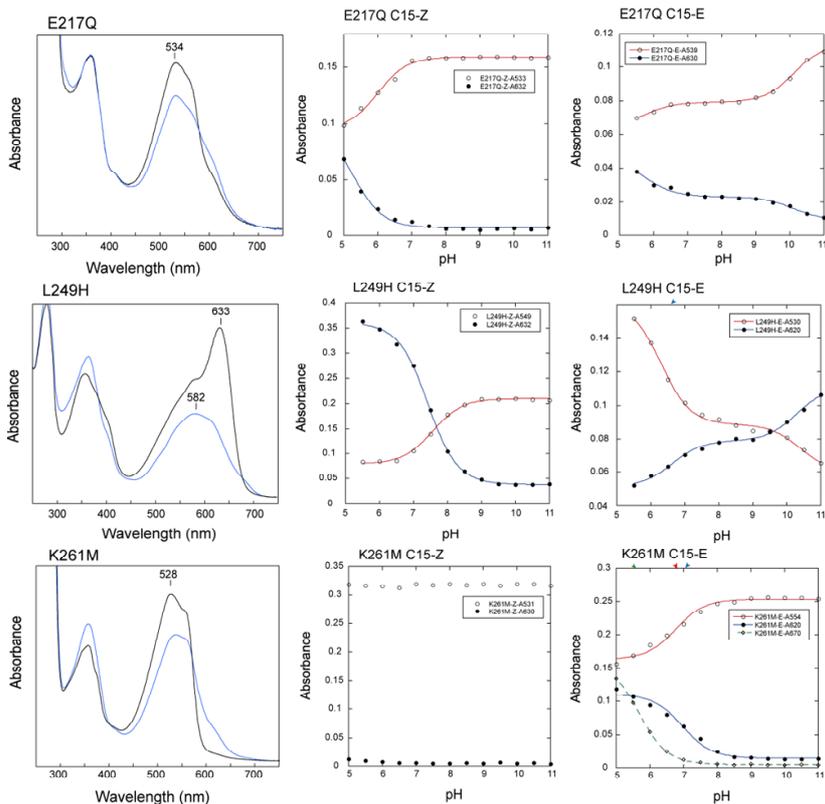


Fig 11 ; RcaE の E217Q, L249H, K261M 変異体の pH7.5 における吸収スペクトル (左列) と、Pg と Pr ピークの pH 依存性のフィッティング (C15-Z ; 中央, C15-E ; 右列)