

論文内容の要旨

論文題目 Analysis of photosynthetic gene regulation in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

(シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における光化学系遺伝子制御機構の解析)

氏名 緑川 貴文

序論

酸素発生型光合成生物はシトクロム *b₆f* 複合体を介して直列につながった光化学系 II 複合体 (PSII) と光化学系 I 複合体 (PSI) を光環境の変化に応じて調節する必要がある。原核生物シアノバクテリアでは光化学系遺伝子群が遺伝子発現の段階からある程度統一的に制御されるが、具体的な制御因子はあまりわかっていない。光化学系 I 複合体のコアサブユニットをコードする *psaA* はその光応答がよく研究されてきた重要遺伝子のひとつであり、光化学系の調節の際に主要なターゲットとなる。本研究では *psaA* を主として光化学系遺伝子の発現調節機構の解析をおこなった。

1. Rrf2 型転写因子 Slr0846 による *psaA* 発現制御機構の解析

Rrf2 型転写因子 Slr0846 はシアノバクテリアの一部に保存されたタンパク質である。われわれは *slr0846* 遺伝子破壊株においてクロロフィル蓄積量が大きく低下することをみいだした。マイクロアレイ解析により野生株と破壊株の転写産物を比較したところ、破壊株では *psaA* 発現量が顕著に低下していた。大腸菌より Slr0846 を His タグ融合タンパク質として発現させ、ゲルシフト実験をおこなったところ *psaA* 上流配列への結合が確かめられた。以上の結果から Slr0846 は *psaA* 遺伝子の正の制御因子であることが示された (Midorikawa et al. 2009)。

2. *psaA* 低発現株のサプレッサー変異の解析

slr0846 破壊株では *psaA* 発現量が顕著に減少しているため、通常光培養条件において PSI/PSII 比が低く、生育速度が野生株よりも遅くなっている。この破壊株から生育速度が野生株程度に回復する現象がみられたため単離培養したところ、*psaA* 量がある程度回復する疑似復帰変異株が複数得られた。疑似復帰変異株の一部では *psaA* コアプロモーター P1 コンセンサス配列のスペーサー領域に 1塩基欠失がみられた (図 1A)。プライマー伸長法により転写開始点ごとの転写量を比較したところ、プロモーター P1, P2 とともに転写量が増加していたが、特に P1 で

顕著であった (図 1B)。変異したプロモーターをレポーター遺伝子につなげ、野生型プロモーターと比較したところ転写活性が 4 倍以上に増加していた (図 1C)。*psaA* は発現量の非常に高い重要遺伝子であるが、スペーシングの変化によりさらに転写活性が増加することが明らかになった。また、変異はグアニンが 9 塩基連続している領域におきており、同様の変異が異なるクローンの親株から見つかったことから、この領域は変異のホットスポットとなっていると考えられる。

3. Hik8-RpaA による光応答機構

シアノバクテリアは暗所において遺伝子発現の大部分が停止するため、長時間の暗条件下では転写産物のほとんどが分解される。光照射やグルコース添加により遺伝子発現が誘導されるが、これに関わる制御因子はみつかっていない。従属栄養的に生育できない *Synechococcus elongatus* PCC 7942 においては、ヒスチジンキナーゼ (HK) である SasA が概日リズム依存的に OmpR 型レスポンスレギュレーターである RpaA へリン酸化シグナルを渡すことがわかっているが、RpaA が直接制御する遺伝子は不明である。一方、グルコースにより完全従属栄養的な生育が可能な *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*) においては SasA と相溶性の高い HK である Hik8 が従属栄養培養時の解糖系遺伝子群の発現に重要であることが報告されている。これらのことから Hik8-RpaA が *Synechocystis* において光・グルコース添加などに応答してグローバルな遺伝子発現制御をおこなうのではないかと考えた。

rpaA 破壊株・*hik8* 破壊株の光応答

野生株の解析により、暗条件下における培養時間が長くなると光照射による *psaA* 転写活性の回復が遅くなることがわかった (図 2)。また、48 時間以上の暗処理において *rpaA* 破壊株では転写活性の回復が野生株よりも明らかに遅くなっていた。転写活性の低下は *hik8* 破壊株においても同様であった (図 3A)。また、光化学系アンテナタンパク質 *cpcB* や *hik8* 破壊株で影響が報告されている *gap1*, *fbaA*, *fda* といった解糖系の遺伝子発現にも同様の影響がみられた。一方、PSII の D1 タンパク質をコードする *psbA2/psbA3* ではこの差はみられず、野生株・両破壊株共にすみやかに転写が開始された (図 3B)。翻訳阻害剤リンコマイシンを添加し、光照射をおこなったところ *psaA* 転写活性の回復は阻害されたが *psbA2/psbA3* 転写活性には影響がなかった (図 4)。以上の結果から Hik8-RpaA は翻訳を必要とする転写活性化に大きく寄与していることが示された。

rpaA 破壊株・*hik8* 破壊株のグルコース応答

暗条件下においた細胞にグルコースを添加し *psaA* 発現をしらべたところ *rpaA* 破壊株・*hik8* 破壊株では転写活性の回復が光照射条件と同様あまりみられなかった。また遺伝子の発現は一過的であった。シアノバクテリアでは呼吸による還元力もチラコイド膜上にある NDH 複合体を介して PQ へ渡されることが知られている。発現の誘導は *b6f* 複合体の阻害剤である DBMIB を添加することで抑制された。以上の結果からプラストシアニン以降の電子伝達鎖のレドクス状態が Hik8-RpaA を介した転写活性化のシグナルとして機能すると考えられる。

RpaA 結合配列の探索

RpaA が *psaA* 制御に直接関与する可能性を検討するため *psaA* 上流配列に対してゲルシフトアッセイ及び DNaseI フットプリントを行ったところ、RpaA が *psaA* 上流に 3 カ所ある HLR1 (high-light regulatory 1) といわれる配列の 1 カ所のみを認識することが明らかとなった (図 5A, B, C)。HLR1 は RpaA と相溶性の高い強光応答性転写因子 RpaB の結合配列である。しかし、RpaB と比較して結合の特異性が低かった。また HLR1 が上流配列に存在している遺伝子 *sl10528*, *cpcB*, *hliA* についてゲルシフトアッセイを試みたがシフトバンドは検出されなかった。現在、*in vivo* における RpaA と *psaA* 上流の結合領域との関係を明らかにするため、HLR1 配列に変

異を導入したプロモーターを用いて in vivo での影響を検討中である。

考察

本研究により Hik8-RpaA が光照射・グルコース添加によるレドクス変化に応答し、グローバルな遺伝子発現に機能していることが示された。光やグルコースによる電子伝達鎖のレドクス状態の変化が Hik8 自体もしくは何らかの受容体により感知され、Hik8 から RpaA へリン酸化シグナルが渡り、RpaA がなんらかのグローバルレギュレーターの転写をおこなうことで *psaA* や解糖系遺伝子群など多くの遺伝子の転写活性化を行っているのではないかと考えられる (図 6)。また、RpaA の結合が確認された *psaA* では RpaA 自体がアクティベーターとして機能している可能性もある。RpaA の直接的なターゲットとなっているグローバルレギュレーターの候補としては高度に保存されている必須転写因子 RpaB やシグマ因子等が挙げられ、*rpaA* 破壊株におけるこれらの遺伝子発現を現在解析中である。

参考文献

Midorikawa T., Matsumoto K., Narikawa R., Ikeuchi M. (2009) *Plant Physiology* 151:882-892

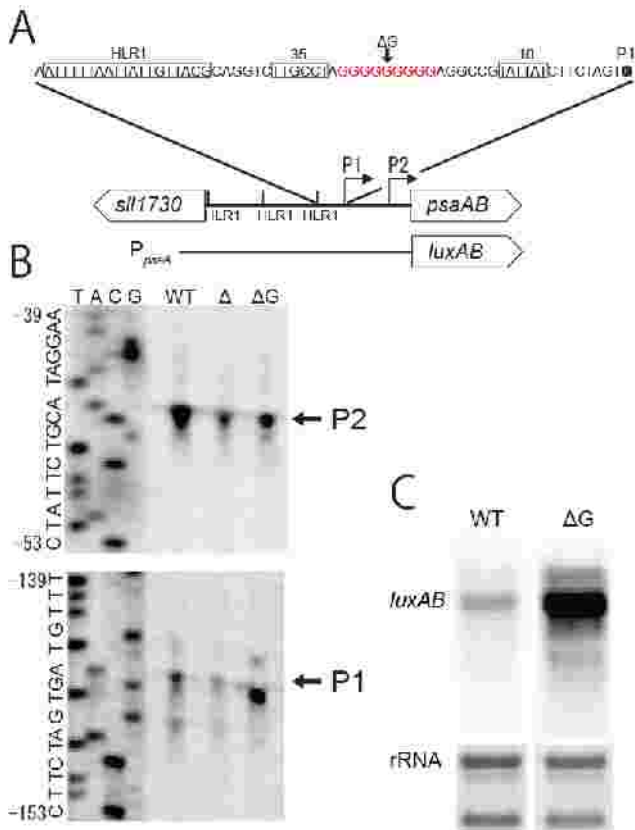


図 1
 A: 変異が見られたプロモーター領域の概略
 赤字で示した領域に一塩基欠失がみられた
 矢印: 転写開始点
 -35, -10: コンセンサス配列
 HLR1: RpaB 結合配列
 B: プライマー伸長法による転写産物の比較
 : *slr0846* 破壊株
 G: 一塩基欠失のみられた疑似復帰変異体
 C: レポーター遺伝子によるプロモーター間の発現比較
 WT: 野生型プロモーター
 G: 一塩基欠失型プロモーター

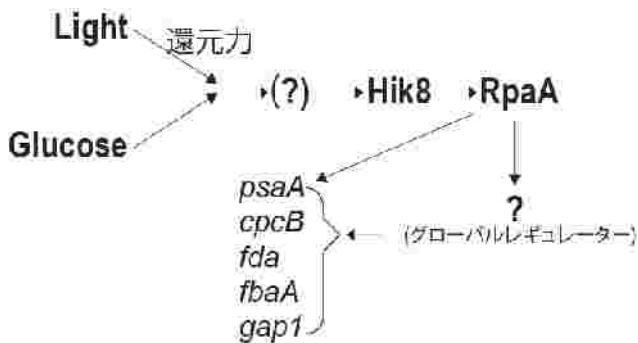


図 6
 予想されるレドクス応答モデル



図 2 暗処理 24, 48 時間後、光照射による *psaA* 発現 (WT: 野生株)

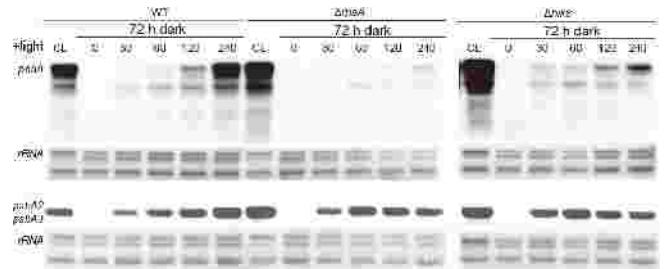


図 3 暗処理 72 時間後光照射による遺伝子発現 (CL: 連続光)

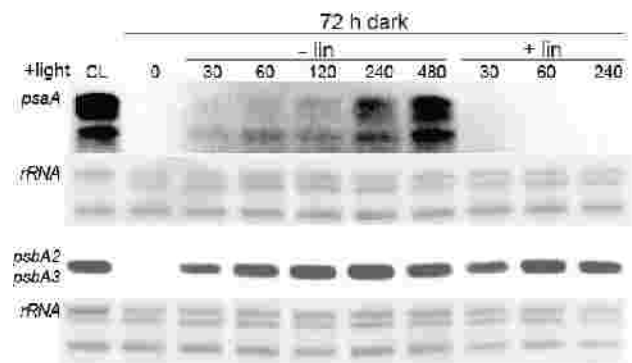


図 4 暗処理 72 時間後光照射による遺伝子発現 (lin: リンコマイシン)

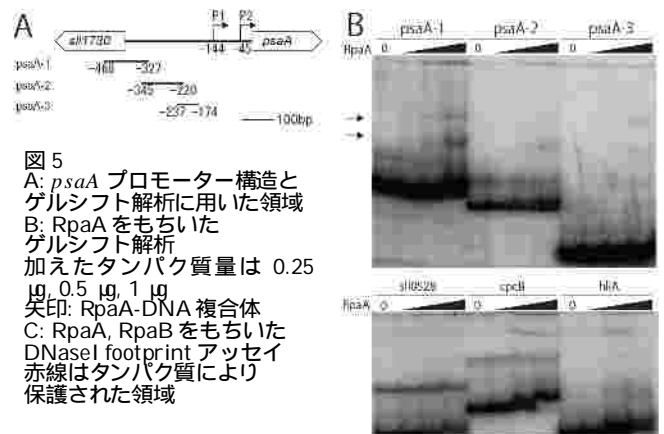


図 5
 A: *psaA* プロモーター構造と
 ゲルシフト解析に用いた領域
 B: RpaA をもちいた
 ゲルシフト解析
 加えたタンパク質量は 0.25
 μg, 0.5 μg, 1 μg
 矢印: RpaA-DNA 複合体
 C: RpaA, RpaB をもちいた
 DNaseI footprint アッセイ
 赤線はタンパク質により
 保護された領域