

令和元年6月12日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07096

研究課題名(和文)チオレドキシンを介した光合成電子伝達依存的な転写制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of photosynthetic electron transport-dependent transcriptional regulation mediated by thioredoxin

研究代表者

日原 由香子(Hihara, Yukako)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：60323375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シアノバクテリア*Synechocystis* sp. PCC 6803において、調節タンパク質チオレドキシンの相互作用が検出され、光合成活性に依存して働くと考えられる転写因子のうち、RpaBとSll1961について個別解析を行った。RpaBについては全ゲノムレベルで標的遺伝子を同定し、および光合成電子伝達鎖のレドックス状態がRpaBのDNA結合活性に及ぼす影響を明らかにした。Sll1961については、システイン残基のレドックス状態変化とチオレドキシンの相互作用機構、およびRNA-seq解析結果を用いての標的遺伝子の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、チオレドキシンの相互作用により、光合成に依存して働くと考えられる2つの転写因子RpaBとSll1961について、その標的遺伝子および活性制御機構の一端を明らかにした。光合成に依存した遺伝子発現制御のメカニズムは、シアノバクテリアのみならず、他の光合成生物においても未解明な部分が多く、本研究で得られた成果は、転写レベルで環境応答を調節する応用技術につながるなど、植物科学全体の発展に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：We performed biochemical and physiological characterization of two transcription factors in *Synechocystis* sp. PCC 6803, RpaB and Sll1961, which were previously identified as interacting partners of thioredoxin. As for RpaB, we performed genome-wide search of its target genes and analysis of regulatory mechanism of its DNA binding activity dependent on redox state of photosynthetic electron transport chain. As for Sll1961, we identified changes in its thiol-redox state upon interaction with thioredoxin. Moreover, we successfully identified target genes of Sll1961 from the results of RNA-seq analysis.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：転写制御 レドックス制御 シアノバクテリア 光合成 チオレドキシンの環境応答 転写因子 シグナル伝達

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

光合成生物が環境順化応答を行う上での主要な調節メカニズムの1つとして、光合成電子伝達鎖のレドックス変化をセンシングして行われる転写制御が知られている。研究代表者はこれまでに、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803(以下 S.6803)において、強光照射時に、転写因子 PedR が調節タンパク質チオレドキシニン(Trx)と相互作用し、光合成電子伝達鎖からの還元力を受けて一過的に不活化されることで、一群の遺伝子の発現変動が起きることを見出した (Nakamura and Hihara 2006, Horiuchi et al. 2010)。しかし PedR の制御下にある遺伝子の数は、S.6803 ゲノム中でレドックス依存的な転写制御を受ける遺伝子の総数に比べるとごく僅かであった。そこで、PedR の他にも、Trx と相互作用する転写因子が存在するのではないかと考え、大腸菌共発現系を用いて、S.6803 においてシステイン残基が高保存されている転写因子と Trx との相互作用を検出するスクリーニングを行った。その結果、RpaB (Slr0947)、Sll1961、RpaA (Slr0115)、SufR (Sll0088)、ManR (Slr1837)の5種の転写因子を新規 Trx 標的候補として同定した。

## 2. 研究の目的

本研究では、Trx の相互作用因子として同定された5種の転写因子のうち、多くの光合成関連遺伝子の強光応答に関与することが示されている RpaB (Riediger et al. 2018)、および長期間の強光下で光化学系 I 量の抑制、窒素欠乏条件でフィコビリソームの分解に関与することが示されている Sll1961 (Fujimori et al. 2005, Sato et al. 2008) に着目し、Trx との相互作用によってそのシステイン残基がどのように状態変化するのか、また実際に S.6803 細胞内で Trx と相互作用して環境応答に関与するのかどうか、個別解析を行うことにより、光合成電子伝達鎖のレドックス変化が Trx を介して転写因子に伝えられ、標的遺伝子の転写制御が行われるまでの調節メカニズムの解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) RpaB に関してはゲノムワイドな標的遺伝子の探索を行った。バイオインフォマティクス解析により S.6803 ゲノム中より、RpaB 認識配列である HLR1 を適切な位置に持つ遺伝子を検出することで、RpaB により正の調節を受ける標的、および負の調節を受ける標的候補約 300 個をリストアップした。いくつかの新規標的候補遺伝子についてノーザン解析、クロマチン免疫沈降解析、ゲルシフト解析等により、HLR1 配列への RpaB の結合と遺伝子発現レベルの変化の関係を調べ、RpaB 標的遺伝子であることを実験的に示した。

さらに、クロマチン免疫沈降法を用いて、試薬添加により光合成電子伝達鎖のレドックス状態を変動させた場合に、RpaB の標的遺伝子上流域への結合活性がどのように変化するかを検討した。

(2) Sll1961 に関しては組換えタンパク質を用いて、その存在状態および Trx との相互作用についての生化学的解析を行った。野生型、および Sll1961 に存在する3つのシステイン残基 C124、C229、C307 をアラニンに置換した変異型タンパク質をそれぞれ大腸菌で大量発現・精製し、チオール基修飾試薬 PEG-maleimide を用いた解析により、精製 TrxM との相互作用の前後における、システイン残基のレドックス状態を調べた。さらに、酸化還元処理を行った Sll1961 タンパク質を TOF-MS 解析、HPLC 解析、CD スペクトル測定等に供して、その存在状態を解析した。

*in vivo* での Sll1961 のシステイン残基のレドックス状態を検出するために、S.6803 野生株を弱光下または強光下で培養し、TCA 添加によりレドックス固定して集菌し、チオール修飾試薬 PEG-maleimide で処理した後に、イムノブロット解析を行い、Sll1961 を検出した。

Sll1961 の標的遺伝子を同定するために、野生株と *sll1961* 破壊株の弱光下・強光下での RNA-seq 解析を実施した。さらに、野生株に比べて破壊株で高発現していた複数の遺伝子について、DNA ゲルシフトアッセイを行うことにより、標的遺伝子候補を絞り込んだ。

## 4. 研究成果

RpaB については全ゲノムレベルで標的遺伝子を同定し、および光合成電子伝達鎖のレドックス状態が RpaB の DNA 結合活性に及ぼす影響を明らかにした。Sll1961 については、システイン残基のレドックス状態変化と Trx との相互作用機構、および RNA-seq 解析結果を用いての標的遺伝子の同定に成功した。以下、その成果について詳述する。

### (1) RpaB :

S.6803 ゲノム上の転写開始点マッピングデータに基づき、転写開始点近傍に RpaB 認識配列である HLR1 配列を持つ遺伝子 (RpaB がリプレッサーとして働くと思われる)、および転写開始点の約 50 bp 上流に HLR1 配列を持つ遺伝子 (RpaB がアクチベーターとして働くと思われる) 150 個ほどをピックアップした。その内、循環的電子伝達に関わる *pgrR*、光呼吸に関わる *gevP*、光化学系 II の修復に関わるプロテアーゼをコードする *ftsH2* については、RpaB が弱光下で HLR1 に結合することで転写抑制され、強光下で解離することにより発現誘導されることを実験的に示した。本成果により、RpaB が従来考えられていた光合成タンパク質複合体のみならず、より広範な細胞機能を制御していることが明らかになった。また、鉄欠乏下で

誘導される *isiA*、窒素欠乏下で誘導される *nirA* など RpaB の支配下にあることを実験的に示したことから、RpaB が窒素代謝のマスター転写因子 NtcA や鉄代謝のマスター転写因子 FurA などとともに複雑な制御ネットワークを構成していることが明らかになった。

RpaB は弱光下で標的遺伝子上流域に結合し、強光下で解離することをすでに見出している。本研究では、この DNA 結合活性の変化が光合成電子伝達鎖のレドックス変化にตอบสนองして起きているのかどうかを検証するため、試薬添加により光合成電子伝達鎖のレドックス状態を変動させ、クロマチン免疫沈降法を用いて、RpaB の標的遺伝子上流域への結合活性の変化をモニターした。その結果、RpaB の DNA 結合活性が、光合成電子伝達活性からの還元力供給が少ない状況下で高く、還元力供給が多い状況下では低下することを示すことができた。今後、システイン残基の置換株について同様にクロマチン免疫沈降解析を行うこと、また *in vivo* での RpaB のシステイン残基のレドックス変化を検出することにより、システイン残基のレドックス変化と DNA 結合活性の変化の関連を調べることが重要課題である。

## (2) Sll1961:

野生型、および 3 つのシステイン残基 C124、C229、C307 をアラニンに置換した変異型の Sll1961 組換えタンパク質を作製し、精製 Trx M との相互作用を検証した。チオール基修飾試薬 PEG-maleimide を用いて、システイン残基のレドックス状態を調べたところ、酸化条件下では C229 と C307 が分子内ジスルフィド結合を形成すること、Trx との相互作用により可逆的に還元されることを見出した。また、酸化還元処理を行った Sll1961 タンパク質をトリプシン消化し、TOF-MS 解析に供したところ、酸化サンプルにおいて、C229 と C307 の分子内ジスルフィド形成に由来するペプチド鎖が検出された。さらに、酸化還元処理を行った Sll1961 タンパク質を HPLC 解析に供したところ、Sll1961 はレドックス状態によらず、またシステイン残基の置換の有無によらず、二量体として存在していることが明らかになった。CD スペクトル測定とその結果に基づくモデル構築により、C 末側に存在する分子内ジスルフィド結合に Trx が作用することにより、N 末側の DNA 結合領域に構造変化がもたらされる可能性が示唆された。以上の結果より、Sll1961 はシステインを介さず恒常的に二量体を形成しており、酸化条件下では C229 と C307 の分子内ジスルフィド結合形成により構造変化・活性変化が起きる、というスキームが考えられた。

*in vitro* で観察されたシステイン残基のレドックス変化が、*in vivo* でも観察されるか検証するため、S.6803 野生株を弱光下または強光下で培養し、TCA を添加してレドックス状態を固定した後、PEG-maleimide でチオール基を修飾し、イムノブロット解析により Sll1961 を検出した。その結果、3 つのシステイン残基のうち 2 個または 3 個が常に還元状態にあることが明らかになった。この結果は、光強度によらず C229 と C307 は還元状態にあり、レドックス変化しないことを示している。今後、暗所へのシフト、栄養欠乏条件など、別の培養条件下で同様な実験を行い、*in vivo* で Sll1961 のシステイン残基がレドックス変化する条件を探す必要がある。

*in vivo* で Sll1961 の機能解析を行うためには、その標的遺伝子を同定することが必須である。そこで、野生株と sll1961 破壊株の弱光下・強光下での RNA-seq 解析を実施し、遺伝子発現プロファイル比較により、標的遺伝子候補を絞り込んだ。野生株に比べて破壊株で高発現していた複数の遺伝子について、DNA ゲルシフトアッセイを行い、Sll1961 が上流域に直接結合する遺伝子を見出した。Sll1961 はこの遺伝子に対してリプレッサーとして働いている可能性が高い。今後、様々な環境条件下で野生株と sll1961 破壊株のノーザン解析を行い、この遺伝子の発現変動を比較することが、*in vivo* での Sll1961 の機能解明に向けて重要なステップになると考えられる。

以上、本研究では、Trx との相互作用により、光合成に依存して働くと考えられる 2 つの転写因子 RpaB と Sll1961 について、その標的遺伝子および活性制御機構の一端を明らかにした。光合成に依存した遺伝子発現制御のメカニズムは、シアノバクテリアのみならず、他の光合成生物においても未解明な部分が多く、本研究で得られた成果は、転写レベルで環境応答を調節する応用技術につながるなど、植物科学全体の発展に貢献すると期待される。

## <引用文献>

- ① Nakamura K. and Hihara Y. (2006) Photon flux density-dependent gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is regulated by a small, redox responsive, LuxR-type regulator. *Journal of Biological Chemistry* 281: 36758-36766.
- ② Horiuchi M., Nakamura K., Kojima K., Nishiyama Y., Hatakeyama W., Hisabori T. and Hihara Y. (2010) The PedR transcriptional regulator interacts with thioredoxin to connect photosynthesis with gene expression in cyanobacteria. *Biochemical Journal* 431:135-140.
- ③ Riediger M., Hihara Y. and Hess W.R. (2018) From cyanobacteria and algae to land plants: The RpaB/Ycf27 regulatory network in transition. *Perspectives in Phycology* 5: 13-25.

- ④ Fujimori T., Higuchi M., Sato H., Aiba H., Muramatsu M., Hihara Y. and Sonoike K. (2005) The mutant of sll1961, which encodes a putative transcriptional regulator, has a defect in regulation of photosystem stoichiometry in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiology* 139: 408-416
- ⑤ Sato H., Fujimori T. and Sonoike K. (2008) Sll1961 is a novel regulator of phycobilisome degradation during nitrogen starvation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Letters* 582: 1093-1096.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Riediger M., Kadowaki T., Nagayama R., Georg J., Hihara Y. and Hess W.R. (2019) Biocomputational analyses and experimental validation identify the complex regulon controlled by the redox-responsive transcription factor RpaB. *iScience* 15:316-331. doi: 10.1016/j.isci.2019.04.033. 査読有
- ② Kujirai J., Nanba S., Kadowaki T., Oka Y., Nishiyama Y., Hayashi Y., Arai M. and Hihara Y. (2018) Interaction of the GntR-family transcription factor Sll1961 with thioredoxin in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Scientific Reports* 8: 6666. doi: 10.1038/s41598-018-25077-5. 査読有
- ③ Riediger M., Hihara Y. and Hess W.R. (2018) From cyanobacteria and algae to land plants: The RpaB/Ycf27 regulatory network in transition. *Perspectives in Phycology* 5: 13-25. doi: 10.1127/pip/2018/0078. 査読有
- ④ Kadowaki T., Nagayama R., Georg J., Nishiyama Y., Wilde A., Hess W.R. and Hihara Y. (2016) A feed-forward loop consisting of the response regulator RpaB and the small RNA PsrR1 controls light acclimation of photosystem I gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiology* 57:813-823. doi: 10.1093/pcp/pew028. 査読有
- ⑤ Wilde A. and Hihara Y. (2016) Transcriptional and posttranscriptional regulation of cyanobacterial photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1857:296-308. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.11.002. 査読有
- ⑥ Kadowaki T., Nishiyama Y., Hisabori T. and Hihara Y. (2015) Identification of OmpR-family response regulators interacting with thioredoxin in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One* 10: e0119107. doi: 10.1371/journal.pone.0119107. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① 難波理、鯨井純一、岡芳樹、林勇樹、新井宗仁、園池公毅、日原由香子 (埼玉大院・理工、東大院・総合文化、早稲田・教育) シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における GntR 型転写因子 Sll1961 の機能解析、第 13 回日本ゲノム微生物学会年会、東京、2019
- ② 難波理、鯨井純一、門脇太朗、岡芳樹、西山佳孝、林勇樹、新井宗仁、日原由香子 (埼玉大院・理工、東大院・総合文化) シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における GntR 型転写因子 Sll1961 の機能解析、第 17 回微生物研究会「微生物分子生物学のフロンティア」、東京、2018
- ③ Yukako Hihara (Dept. Biochem. Mol. Biol, Saitama Univ.) Identification of transcription factors interacting with thioredoxin in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, CLS, Tokyo Tech. International Forum 2018 "Redox regulation of protein functions, transcription, translation and folding", Tokyo, 2018
- ④ 日原由香子 (埼玉大院・理工) 転写制御因子のレドックス制御 - vitro から vivo への遠い道のり -、藍藻の分子生物学 2017、千葉、2017
- ⑤ 永山竜太、門脇太朗、Matthias Riediger、Wolfgang Hess、日原由香子 (埼玉大院・理工、Univ. Freiburg) シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 ゲノムにおける転写因子 RpaB 標的遺伝子の同定、日本植物生理学会第 58 回大会、鹿児島、2017
- ⑥ Yukako Hihara (Dept. Biochem. Mol. Biol, Saitama Univ.) A feed-forward loop consisting of the response regulator RpaB and the small RNA PsrR1 controls light acclimation of photosystem I gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, 7th International Conference Photosynthesis Research for Sustainability - 2016, Pushchino, Russia, 2016
- ⑦ 門脇太朗、永山竜太、Jens Georg、Annegret Wilde、Wolfgang R.Hess、日原由香子 (埼玉大院・理工、Univ. Freiburg) 転写因子 RpaB と低分子 RNA PsrR1 による光化学系 I 遺伝子の発現制御 -Feed-Forward Loop の形成-、第 7 回日本光合成学会、東京、2016
- ⑧ 永山竜太、門脇太朗、Jens Georg、Annegret Wilde、Wolfgang Hess、日原由香子 (埼

玉大院・理工、Univ. Freiburg) シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における RpaB/PsrR1 システムによる光化学系 I 遺伝子の強光応答の二元的制御、日本植物生理学会第 57 回大会、岩手、2016

- ⑨ 鯨井純一、門脇太朗、新井宗仁、久堀徹、日原由香子 (埼玉大院・理工、東大院・総合文化、東工大・資源研) シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における転写因子 Sll1961 とチオレドキシンの相互作用解析、日本植物生理学会第 57 回大会、岩手、2016
- ⑩ Yukako Hihara (Dept. Biochem. Mol. Biol, Saitama Univ) A feed-forward loop consisting of the response regulator RpaB and the small RNA PsrR1 controls light acclimation of photosystem I gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803、3rd International Workshop of Cyanofactory、東京、2016
- ⑪ 門脇太朗、永山竜太、Jens Georg、Annegret Wilde、Wolfgang Hess、日原由香子 (埼玉大院・理工、Univ. Freiburg) *Synechocystis* sp. PCC 6803 における光化学系 I 遺伝子の強光応答の二元的制御システム、藍藻の分子生物学 2015、千葉、2015
- ⑫ Yukako Hihara (Dept. Biochem. Mol. Biol, Saitama Univ.) Photosynthesis-dependent transcriptional regulation in cyanobacteria, 15th International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes, Tübingen, Germany, 2015
- ⑬ Taro Kadowaki, Yoshitaka Nishiyama, Toru Hisabori, Yukako Hihara (Dept. Biochem. Mol. Biol, Saitama Univ.; Chem. Res. Lab., Tokyo Inst. Tech) Elucidation of mechanisms of transcriptional regulation dependent on thioredoxin in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, 15th International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes, Tübingen, Germany, 2015
- ⑭ 門脇太朗、西山佳孝、久堀徹、日原由香子 (埼玉大院・理工、東工大・資源研) シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 におけるチオレドキシンの相互作用する転写因子の探索、第 6 回日本光合成学会、岡山、2015
- ⑮ 永山竜太、門脇太朗、日原由香子 (埼玉大院・理工) *Synechocystis* sp. PCC 6803 における光化学系 I 遺伝子の強光応答の二元的制御システム、第 6 回日本光合成学会、岡山、2015

[その他]

ホームページ等

<http://park.saitama-u.ac.jp/~idenshi/index.html>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。