

機関番号：12401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20770026

研究課題名（和文） シアノバクテリアの強化順化における転写制御機構の解明

研究課題名（英文） Mechanism of transcriptional regulation in cyanobacteria upon acclimation to high-light conditions

研究代表者

日原 由香子（HIHARA YUKAKO）

埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：60323375

研究成果の概要（和文）：これまでに我々はシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 において、光化学系 I 反応中心サブユニットをコードする *psaAB* 遺伝子のプロモーター解析を行ってきた。一般に、光化学系 I 遺伝子プロモーターは弱光下で活性化され、強光下で抑制されるが、*psaAB* 遺伝子の 2 つのプロモーター P1 と P2 両方が、この応答パターンを示すことが明らかになった。本研究では、レスポンスレギュレーター RpaB が *psaAB* プロモーター領域に複数存在する HLR1 配列に結合することを見出し、さらに、細菌由来ルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーター解析により、これらの HLR1 配列を含むシスエレメントが、2 つのプロモーターの活性に様々な影響を及ぼすことを明らかにした。以上、複数の転写制御機構が働き、*psaAB* 発現レベルの fine-tuning が行われていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Previously, we analyzed the promoter architecture of the *psaAB* genes encoding reaction center subunits of photosystem I (PSI) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. There exist two promoters, P1 and P2, both of which show typical high-light (HL) response of PSI genes; their activities are high under low-light (LL) conditions but rapidly downregulated upon the shift to HL conditions. In this study, it was shown that a response regulator RpaB binds to multiple high-light regulatory 1 (HLR1) sequences in the upstream region of the *psaAB* genes. We explored the regulatory role of cis-elements, including these HLR1 sequences on the individual activity of P1 and P2. Our results suggest that cis-elements, including multiple HLR1 sequences, differently regulate the activities of dual promoters of the *psaAB* genes to achieve the fine-tuning of the gene expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：シグナル伝達、転写制御、シアノバクテリア、光合成、光順化

### 1. 研究開始当初の背景

シアノバクテリアの強光順化における転写制御の重要性は以前より示唆されていたものの、光強度依存的な転写制御がどのように行われているのか、具体的な知見は皆無であった。研究代表者はこれまでに、*Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノム上に分散して存在している光化学系 I 遺伝子群の発現レベルが、光強度に依存した統一的な制御を受けており、弱光下では豊富に蓄積している転写産物が、強光下に移すと1時間以内に完全に消失することを観察していた。その応答は転写活性の厳しい抑制により達成されており、光強度依存的な転写制御を解析する上での理想的なモデル系であると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究においては、シアノバクテリアの強光順化における転写制御機構の解明を目的とする。そのために、すでに光応答領域を決定した *Synechocystis* sp. PCC 6803 の光化学系 I 遺伝子に着目し、この光応答領域に相互作用する調節因子を明らかにする。次にこれらの因子によって、光強度依存的な調節がどのように達成されているのかの解明を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) すでに同定した *Synechocystis* sp. PCC 6803 の光化学系 I 遺伝子群の光応答領域内に、HLR1 配列と呼ばれるモチーフが共通して含まれていることを見出した。この HLR1 配列には、レスポンスレギュレーター RpaB が結合することが報告されている。そこで、光化学系 I 遺伝子群上流域の HLR1 配列に RpaB が結合するかどうかを、精製 His-RpaB タンパク質と光化学系 I 遺伝子群上流域 DNA 断片を用いたゲルシフトアッセイにより調べた。さらに、HLR1 配列に塩基置換を導入した場合の、RpaB 結合能への影響、プロモーター活性への影響を、ゲルシフトアッセイ、およびレポーターアッセイにより調べた。

(2) *Synechocystis* sp. PCC 6803 野生株の *rpaB* 遺伝子にクロラムフェニコール耐性カセットを挿入し、遺伝子破壊株を作製した。この株の増殖速度、色素量、光化学系 I 遺伝

子プロモーター活性等を調べることにより、RpaB の生理的機能の解明を目指した。

(3) 光化学系 I 反応中心サブユニット遺伝子 *psaAB* 上流域に4か所存在する HLR1 配列に RpaB が結合するかどうかを、精製 His-RpaB タンパク質と *psaAB* 上流域 DNA 断片を用いたゲルシフトアッセイにより調べた。さらに、RpaB の結合が確認された HLR1 配列に塩基置換を導入し、*psaAB* プロモーター活性にどのような影響が出るかどうかを、レポーターアッセイ、およびノーザン解析により調べた。

### 4. 研究成果

(1) 精製 His-RpaB は、HLR1 配列を含む光化学系 I 遺伝子群上流域 DNA 断片に結合したが (図 1 A)、それぞれの DNA 断片から HLR1 配列を除いた場合には結合は見られなくなった (図 1 B)。

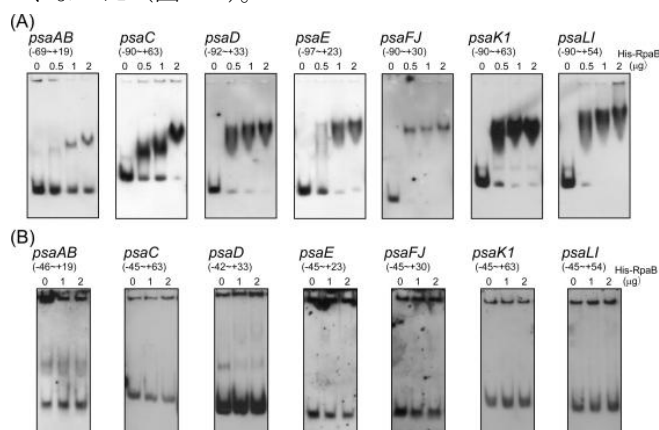


図 1 精製 His-RpaB の光化学系 I 遺伝子群上流域への結合性

また、HLR1 配列に点突然変異を導入した場合にも His-RpaB の結合は見られなくなった。さらにレポーターアッセイにより、この点突然変異の導入によって弱光下での光化学系 I 遺伝子プロモーター活性が著しく減少することが明らかになった。以上の結果より、RpaB が弱光下で、光化学系 I 遺伝子群上流域の HLR1 配列に結合しアクチベーターとして働いていることが強く示唆された。

(2) すべてのゲノムコピーにおいて *rpaB* が挿入破壊された株は得られなかったため、*Synechocystis* sp. PCC 6803 にとって *rpaB*

は必須遺伝子であると考えられる。*rpaB* コピー数を減らしただけでも、弱光下において、増殖速度、クロロフィル含量、フィコシアニン含量、光化学系 I 遺伝子プロモーター活性などの顕著な低下がみられた。これらの結果からも、RpaB は弱光下で、光化学系 I 遺伝子群のアクチベーターとして働いていることが示された。これまで、RpaB は弱光下でのリプレッサーとして報告されており、アクチベーターとしての報告は本研究が初めてである。

(3) 光化学系 I 反応中心サブユニット遺伝子 *psaAB* 上流域に 4 か所存在する HLR1 配列のうち、3 か所に RpaB が結合することを見出し、これらの配列をそれぞれ HLR1A、HLR1B、HLR1C と名付けた。それぞれの HLR1 配列に塩基置換を導入してのレポーターアッセイにより (図 2 A)、これら 3 か所の HLR1 配列が 2 つのプロモーター P1、P2 に対して、正負様々な影響を及ぼすことが明らかになった (図 2 B)。

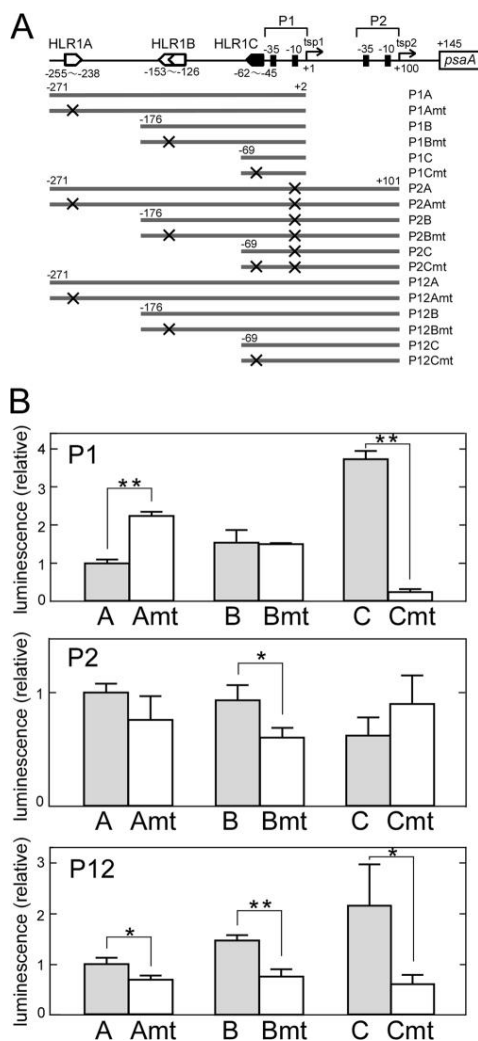


図 2 *psaAB* 上流域の HLR1 配列の機能

弱光下で最も重要な制御領域は HLR1C(転写開始点を+1 としたとき、-62~-45 に存在)であり、P1 の活性化に関わっている。他の HLR1 配列も弱光下でのプロモーター活性に影響している。具体的には、HLR1A(-255~-238)は P1 の抑制に、HLR1B(-153~-126)は P2 の活性化に関与している。強光下では、-271~-177 領域に存在する HNE2 領域の活性が強まり、これは P1、P2 両方の活性抑制に働く。以上のような仕組みで、*psaAB* 発現レベルが弱光下で高く、強光では低く保たれることが明らかになった (図 3)。他の光化学系 I サブユニット遺伝子に比べ、反応中心サブユニット *psaAB* 遺伝子では、転写制御メカニズムが複雑化しているが、これは *psaAB* 遺伝子発現量が、光化学系 I 複合体蓄積の重要な調節ステップの 1 つであり、環境変動に応答しての発現量の fine tuning が必要であるためと考えられる。

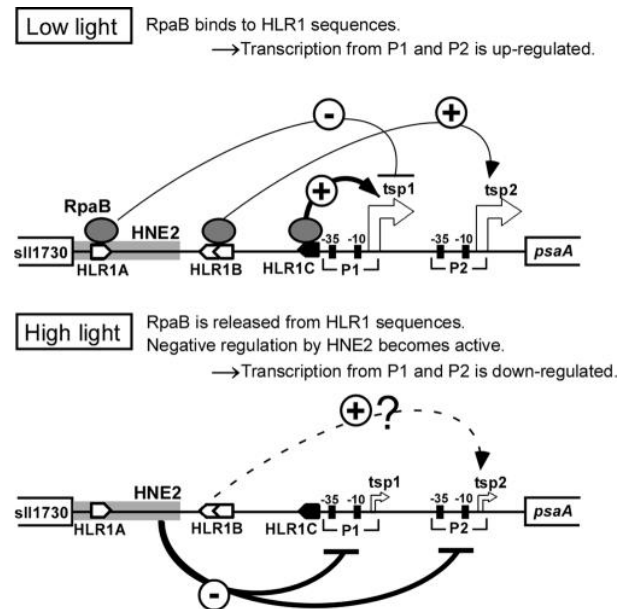


図 3 *psaAB* 遺伝子の異なる光強度下での発現制御メカニズム

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

①Takahashi T, Nakai N, Muramatsu M, Hihara Y (2010) Role of multiple HLR1 sequences in the regulation of the dual promoters of the *psaAB* genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Bacteriology* 192: 4031-4036 査読あり

②Horiuchi M, Nakamura K, Kojima K, Nishiyama Y, Hatakeyama W, Hisabori T, Hihara

Y (2010) The PedR transcriptional regulator interacts with thioredoxin to connect photosynthesis with gene expression in cyanobacteria. *Biochemical Journal* 431: 135-140 査読あり

③Seino Y, Takahashi T, Hihara Y (2009) The response regulator RpaB binds to the upstream element of photosystem I genes to work for positive regulation under low-light conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Bacteriology* 191: 1581-1586 査読あり

④Muramatsu M, Sonoike K, Hihara Y (2009) The mechanism of down-regulation of photosystem I content under high-light conditions in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* 155: 989-996 査読あり

⑤Takahashi H, Uchimiyama H, Hihara Y (2008) Difference in metabolite levels between photoautotrophic and photomixotrophic cultures of *Synechocystis* sp. PCC 6803 examined by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Experimental Botany* 59: 3009-3018 査読あり

⑥Ishii A, Hihara Y (2008) An AbrB-like transcriptional regulator, Sll0822, is essential for the activation of nitrogen-regulated genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiology* 148: 660-670 査読あり

[学会発表] (計 12 件)

①Hihara Y "Physiological role of AbrB-type transcriptional regulators in cyanobacteria" 日本フィンランド二国間セミナー 2011.3.3 岡山

②Hihara Y "Light acclimation and transcriptional regulation in cyanobacteria" スイス日本二国間セミナー 2011.1.11 スイス

③日原由香子「転写因子 CyAbrB と細胞内 C/N バランス制御」ラン藻ゲノム研究交流会 2010.7.24 東京

④山内優輝、日原由香子「シアノバクテリアにおける AbrB 型転写制御因子の機能解析」第4回日本ゲノム微生物学会年会 2010.3.7 博多

⑤日原由香子「*Synechocystis* sp. PCC 6803 の光化学系 I サブユニット遺伝子 *psaAB* プロモーター構造の再検討」かずさ DNA 研究所研究会 ラン藻の分子生物学 2009.12.5 かずさ

⑥日原由香子「シアノバクテリアの環境順化応答の分子生物学的解析 (学会賞受賞講演)」日本植物学会第 73 回大会 2009.9.20 山形

⑦日原由香子「転写因子 cyAbrB」ラン藻ゲノム研究交流会 2009.7.4 東京

⑧Hihara Y "Transcriptional regulators working on environmental responses in Cyanobacteria" 第5回日独二国間セミナー "From Photoreaction to Biomass: Phototrophs in Ecosystems and Biotechnology" 2009.6.5 筑波

⑨高橋朋子、村松昌幸、日原由香子「*Synechocystis* sp. PCC 6803 における光化学系 I 遺伝子 *psaAB* の転写調節への HLR1 配列の寄与」第 50 回日本植物生理学会年会 2009.3.21 名古屋

⑩堀内真由美、中村絹、小島幸治、西山佳孝、島山和佳子、久堀徹、日原由香子「シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における光合成電子伝達に依存的な転写因子 PedR の解析」第 50 回日本植物生理学会年会 2009.3.21 名古屋

⑪日原由香子「シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における光合成電子伝達に依存的な転写因子 PedR の解析」第 3 回日本ゲノム微生物学会 2009.3.6 東京

⑫日原由香子、高橋朋子、佐藤あゆみ、清野友里絵「*Synechocystis* sp. PCC 6803 の光化学系 I 遺伝子群の強光応答におけるレスポンスレギュレーター RpaB の役割」日本植物学会第 72 回大会 2008.9.25 高知

[図書] (計 1 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計◇件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.molbiol.saitama-u.ac.jp/~hihara/top.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

日原 由香子 (HIHARA YUKAKO)  
埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授  
研究者番号：60323375

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：