

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22770034

研究課題名（和文）

ラン藻の窒素輸送体の活性化を制御する細胞内ネットワークの分子生物学的研究

研究課題名（英文）

Molecular mechanisms of the activation of the nitrogen transporter in cyanobacteria

研究代表者

前田 真一 (MAEDA SHIN-ICHI)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：70335016

研究成果の概要（和文）：

ラン藻の3種類の窒素輸送体 (LtnT, CynABD, FocA) の活性制御機構を解析し、LtnT 輸送体の活性化に新規タンパク質 (LtnE) が関わっていること、様々な窒素同化の活性制御因子である PII タンパク質が CynABD 輸送体の活性化にも関わっていること、および FocA 輸送体の C 末端領域が自身の活性を負に制御しており、FocA 輸送体は培地中にアンモニアが存在する時には活性が抑制されている可能性が高いことを明らかにした。また海洋性ラン藻の培養法を確立し、海洋性ラン藻には未知の亜硝酸イオン輸送機構があることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the molecular mechanisms of the regulatory systems of three kinds of nitrogen transporters (LtnT, CynABD, FocA) in cyanobacteria. We identified a novel protein (LtnE) that is involved in the activation of the LtnT transporter in a freshwater cyanobacterium. We clarified that the PII protein, which was a regulatory protein of various nitrogen assimilation proteins, was involved in the regulation of the activity of the CynABD transporter. We clarified that the C-terminal region of the FocA transporter inhibited the transport activity of the transporter and the FocA transport activity could be inactivated in the presence of ammonium in the medium. In addition, we established the culture method of a marine cyanobacterium and clarified that there was an unknown nitrite transport mechanism in the marine cyanobacterium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生理学

キーワード：ラン藻、輸送体、活性制御

1. 研究開始当初の背景

原核光合成生物であるラン藻は炭素窒素比が5:1であり、植物(20~30:1)に比べ窒素同化の割合が高い。このようなラン藻の高い窒素同化能は、効率の良い窒素吸収機構によって支えられている。これまでに報告者は、ラン藻より3種類の窒素吸収に関わる輸送体(LtnT, CynA, B, D, FocA)を同定してきた。これらの輸送体は輸送活性が制御されているが、その制御機構は輸送体ごとに異なっている。

淡水性ラン藻 *Synechococcus elongatus* の硫酸イオン輸送体様輸送体(LtnT)は、硝酸イオンを輸送し、その輸送活性はHis-Aspリン酸基リレー型情報伝達系(LtnB→LtnA→LtnC)によって制御されている。LtnT輸送体は12回膜貫通領域を持つタンパク質であり、そのC末端に輸送活性を阻害するドメインが存在する。LtnBは、シグナル受容ドメイン、リン酸基受容ドメイン、自己リン酸化ドメイン、及び2つのレシーバードメインを持つハイブリッドヒスチジンキナーゼであり、自己リン酸化能がある。自己リン酸化したLtnBは、レシーバードメインだけからなるLtnAにリン酸基を転移する。リン酸化したLtnAは、リン酸基受容ドメイン、レシーバードメイン、及び機能未知なドメインからなるLtnCにリン酸基を転移し、リン酸化したLtnCは多量体を形成する。そしてLtnCのC末端の機能未知ドメインのみをラン藻細胞内で多量体化させて発現させるとLtnT輸送体が活性化されることから、LtnCのC末端ドメインがLtnB→LtnA→LtnCからなるHis-Aspリン酸基リレー型情報伝達系のシグナルのアウトプットを行う作用ドメインであると推定している。しかし、LtnBがどのようなシグナルを受容しているのか、LtnCのC末端作用ドメインの多量体化とLtnT輸送体の活性化がどのように生化学的に繋がっているのかは不明である。

淡水性ラン藻 *Synechococcus elongatus* のCynABD輸送体は、ATP-Binding Cassette輸送体であり、シアン酸イオンと亜硝酸イオンを輸送する。CynABD輸送体の活性は、培地中にアンモニアが存在すると活性が抑制される。このように培地中にアンモニアが存在すると活性が抑制される窒素同化タンパク質は、他に硝酸イオン/亜硝酸イオン輸送体や硝酸還元酵素が知られており、これらのタンパク質の活性制御にはPIIタンパク質が関わっていることが知られている。そこで、CynABD輸送体の活性にもPIIタンパク質が関わっているかどうかについて興味を持たれている。

近年海洋性ラン藻を含む様々なラン藻の全ゲノム配列が決定され、多くの海洋性ラン

藻のゲノムには、ギ酸イオン輸送体(FocA)と相同なタンパク質をコードしている遺伝子が存在することが明らかとなってきた。この遺伝子(*focA*)は、多くの海洋性ラン藻のゲノムにおいて亜硝酸還元酵素遺伝子の下流に存在することから亜硝酸イオン輸送体をコードしていると推定されているが、淡水性ラン藻には存在せず、実験的に解析された例は報告されていない。

また、海洋性ラン藻(特に α タイプのRuBisCOを持つ海洋性ラン藻)は、海洋の生態系に置いて非常に重要な役割を果たしていることが明らかにされているにもかかわらず、実験室での培養が難しく形質転換技術も確立していないために、分子生物学研究はほとんど行われていない。

2. 研究の目的

ラン藻より同定した3種類の窒素吸収に関わる輸送体(LtnT, CynABD, FocA)の活性制御機構を分子レベルで詳細に解析し、ラン藻の窒素吸収過程における制御機構の生理学的意義について考察していく。また、海洋性ラン藻の実験系を立ち上げ、解析の進んでいない海洋性ラン藻の窒素同化の解析を進める。

3. 研究の方法

ラン藻の窒素吸収に関わる輸送体の活性制御機構について、活性制御タンパク質遺伝子の変異株の解析、タンパク質間の相互作用の解析について研究を行った。

淡水性のラン藻 *Synechococcus elongatus* は、形質転換が容易に行える株であり、様々な変異株、シャトルベクターを用いた発現ライブラリーおよび相同組み替えを利用した遺伝子破壊ライブラリーを既に取得しており、これらを利用して、輸送活性に影響の出る変異株をスクリーニングした。

タンパク質間の相互作用の解析は、酵母Two-hybridシステムを用いて解析した。膜タンパク質の相互作用の解析には、Split-ubiquiti法を用いた酵母Two-hybridシステムも用いた。

また、海洋性のラン藻は、培養するのも困難で、形質転換技術も確立していないため、まず培養系の確立を行った。また、今後形質転換に使用するために寒天培地上でもよく生育する変異株の取得を行った。

4. 研究成果

(1) LtnT輸送体の活性制御機構の解析

淡水性ラン藻 *Synechococcus elongatus* の *ltnB* 遺伝子に変異しているためにLtnT輸送体が恒常的に活性化している変異株にラン

ムに変異を導入し、LtnT輸送体の輸送活性が出ずに硝酸イオンを取り込めなくなった株をスクリーニングした結果、新規遺伝子 (*ltnE*) が破壊されると硝酸イオンを取り込めなくなることが明らかとなった。遺伝学的解析の結果、LtnEは、His-Aspリン酸基リレー型情報伝達系 (LtnB→LtnA→LtnC) のシグナルのアウトプットに関わるLtnCとLtnTの間のシグナル伝達に関わっていることが示された。また酵母Two-hybridシステムにより、LtnEは、LtnCのC末端領域と相互作用することが明らかとなった。LtnCはN末端領域でリン酸基を受け取り多量体化することが分かっており、LtnCのC末端領域がLtnEと相互作用することは、シグナルがLtnEを介してさらに下流に流れていることを示している。またLtnDは、N末端領域にcNMP結合ドメインを持ち、C末端領域にLtnCのC末端領域と相同な領域が存在するが、LtnEはLtnDのC末端領域とも相互作用することが酵母Two-hybridシステムにより示された。これらのことから、LtnBおよびLtnDが受容したシグナルがLtnEで集約されると推定された。LtnTの活性制御ドメインとLtnEとの相互作用もTwo-hybridシステムにより検証したが、相互作用するという結果は得られず、LtnEとLtnT輸送体の間のシグナル伝達には別のタンパク質が介している可能性が考えられた。そこで、LtnEやLtnT輸送体と相互作用する因子をTwo-hybridシステムにより探索したが候補因子は得られなかった。

(2) CynABD輸送体の活性制御機構の解析

Synechococcus elongatus のPII欠損株のCynABD輸送体の活性は、培地中にアンモニアを添加した時に部分的にしか阻害されなくなったことから、CynABD輸送体の活性制御にPIIタンパク質も関わっていることが明らかになった。

(3) FocA輸送体の活性制御機構の解析

海洋性ラン藻の*focA*遺伝子を解析するにあたり、淡水性ラン藻の二重変異株 ($\Delta nrtABCD \Delta cynABD$) を用いた。この二重変異株は、硝酸イオン/亜硝酸イオン輸送体遺伝子 (*nrtABCD*) とシアン酸イオン/亜硝酸イオン輸送体遺伝子 (*cynABD*) の両方を欠損しており、亜硝酸イオンを能動的に取り込めない。この株に5種類の海洋性ラン藻の*focA*遺伝子を導入した結果、淡水性ラン藻細胞内で輸送活性を示すものと示さないものに分けられ、輸送活性を示さないFocAにはそのC末端に保存された延長領域が存在した。このC末

端領域を削ったFocAは、淡水性ラン藻細胞内で亜硝酸イオン輸送活性を示すことが明らかとなり、このC末端領域が輸送体の活性を負に制御していることが示唆された。このC末端領域と相互作用する因子をTwo-hybridシステムにより探索したが候補因子は得られなかった。

(4) 海洋性ラン藻の亜硝酸イオン輸送機構の解析

海洋性ラン藻の亜硝酸イオン輸送活性を生理学的に解析するため、全ゲノム配列が決定されている様々な海洋性ラン藻を入手し、培養系を確立することを試みた結果、*Synechococcus* sp. RS9916を人工海水で培養することに成功した。*Synechococcus* sp. RS9916はC末端に活性制御領域をもつstrainであり、この株を様々な窒素栄養状態で生育させ亜硝酸イオン輸送活性を測定したところ、輸送特性の異なる少なくとも3種類の亜硝酸イオン輸送活性を示すことが明らかとなった。*Synechococcus* sp. RS9916には、亜硝酸イオン輸送活性を示すと推測される*focA*遺伝子および*nrtP*遺伝子が存在するが、これら以外にまだ未知の亜硝酸イオン輸送体をコードする遺伝子が存在することが明らかとなった。また、*Synechococcus* sp. RS9916の示す亜硝酸イオン輸送活性のうちの1つは、培地にアンモニアが存在する時に可逆的に阻害されることが明らかとなった。この活性制御を受ける輸送体がFocAだとすれば、亜硝酸イオンよりも、効率的に同化できるアンモニアが存在する時にアンモニアの同化を優先するために、FocA輸送体のC末端制御領域は、自身の活性を抑制していることが示唆された。

また、淡水性ラン藻の二重変異株 ($\Delta nrtABCD \Delta cynABD$) を用いて、*Synechococcus* sp. RS9916の新規亜硝酸イオン輸送体遺伝子をクローニングすることを試みたが、未だ新規遺伝子の同定には至っていない。

(5) その他

Synechococcus sp. RS9916を経代培養してしていく中で、寒天培地上でもよく生育できる株の入手に成功した。この変異株を用いて形質転換を試みたが未だ形質転換株は得られていない。

また予期せず、淡水性ラン藻より、亜硝酸イオン輸送活性を示す新規膜タンパク質を同定した。

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1件)

① Regulation of nitrate assimilation in cyanobacteria.

Ohashi Y, Shi W, Takatani N, Aichi M, Maeda S, Watanabe S, Yoshikawa H, Omata T
Journal of Experimental Botany (2011) 62: 1411-1424 (査読有)

[学会発表] (計5件)

① 海洋性ラン藻の亜硝酸イオン輸送体の構造と機能の解析

前田真一、村上明男、伊藤寿、田中歩、小俣達男

第52回日本植物生理学会年会 2011年3月20日 (学会中止のため要旨集に掲載)

② Regulation of the *CynABD* cyanate/nitrite transporter in a PII-deficiency mutant of *Synechococcus elongatus* PCC 7942

Yajun Chang, Nobuyuki Takatani, Makiko Aichi, Shin-ichi Maeda, Tatsuo Omata
第53回日本植物生理学会年会 2012年3月16日 京都

③ Nitrite transport activity of the ABC-type cyanate transporter of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942

Shin-ichi Maeda and Tatsuo Omata
14th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes 2012年08月08日 Porto, Portugal

④ Effects of PII deficiency on growth of *Synechococcus elongatus* PCC 7942

Yajun Chang, Nobuyuki Takatani, Makiko Aichi, Shin-ichi Maeda, Tatsuo Omata
第54回日本植物生理学会年会 2013年03月22日 岡山

⑤ 海洋性ラン藻の亜硝酸イオン輸送体の機能解析

前田真一、村上明男、伊藤寿、田中歩、小俣達男

第54回日本植物生理学会年会 2013年03月23日 岡山

[図書] (計0件)

[産業財産権]
○出願状況 (計0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0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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 真一 (MAEDA SHIN-ICHI)

名古屋大学大学院・生命農学研究科・助教
研究者番号：70335016

(2) 研究分担者

研究分担者なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者

連携研究者なし
()

研究者番号：