

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06717

研究課題名（和文）シアノバクテリアのパートナースイッチング制御系による環境応答機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of environmental acclimation by the partner switching system in cyanobacteria

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では「パートナースイッチング制御系はいかにして、シアノバクテリアの光合成や代謝を制御しているのか？」の解明を目指した。一般的なパートナースイッチング制御系は、アンチシグマ因子が、因子を捕捉・解放することで遺伝子発現制御を行うが、*Synechocystis* sp. PCC 6803では、アンチシグマ因子がアンタゴニストの蓄積量を制御することで、強光下でのクロロフィルと光化学系 I の蓄積を協調的に制御する独自の系として働いていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質のリン酸化実験、相互作用解析、および変異株の表現型解析を行い、アンチシグマ様因子PmgAがアンタゴニスト様因子Ssr1600の蓄積量を制御することで、強光下での光合成制御に関わること、さらに他のアンタゴニスト様因子との相互作用を通じて炭素代謝制御にも関わる可能性を見出した。本成果は光合成の制御機構、およびパートナースイッチング制御系の基礎研究のみならず、シアノバクテリアの代謝変化による物質生産等の応用研究にも重要な新知見を与えるものである。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate how the partner-switching system regulates photosynthesis and metabolism in cyanobacteria. In the canonical partner-switching systems, gene expression is regulated by the capture and release of sigma factors by anti-sigma factors. We found that the partner switching system in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is a quite unique system in which the anti-sigma factor regulates the amount of the antagonist protein to control the accumulation of chlorophyll and photosystem I in a coordinated manner under high-light conditions.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：パートナースイッチング制御系 シアノバクテリア 光合成 強光順化応答 PmgA

1. 研究開始当初の背景

(1) パートナースイッチング制御系はバクテリア間に広く保存されている調節機構であり、セリンキナーゼドメインをもつアンチシグマ因子、そのリン酸化標的であるアンタゴニスト、**PP2C** 型ホスファターゼの三者からなる [1]。この系において、アンチシグマ因子は RNA ポリメラーゼのサブユニットである 因子を捕捉すると同時に、アンタゴニストをリン酸化する (図1の状態 A)。環境シグナルを受けて活性化されたホスファターゼがアンタゴニストを脱リン酸化すると、アンタゴニストはアンチシグマ因子と相互作用するようになり、因子が放出されることで、結果として転写が活性化される (図1の状態 B)。

このメカニズムにより、枯草菌を始めとしたグラム陽性細菌で、ストレス応答や胞子形成、病原性等が制御されることが報告されている。グラム陰性細菌では、上記の典型的なパートナースイッチング制御系に加え、因子が関与しない非典型的な制御系が報告されている。この場合に、アンチシグマ因子とアンタゴニストの相互作用がどのようなタンパク質の活性制御に働いているのかは解明されていない。

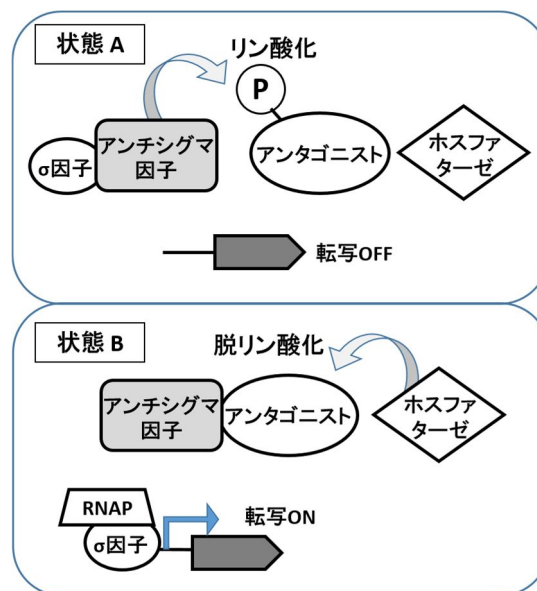


図1 典型的なパートナースイッチング制御系

(2) 研究実施者は、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 (**S.6803**) において、アンチシグマ因子様タンパク質 **PmgA** を欠損すると、光化学系量の調節や、シアノバクテリアでは細胞質中に共存しているカルビン回路と酸化的ペントースリン酸回路の制御に異常をきたし、長期間の強光条件や光混合栄養条件など、特定の環境下で致死となることを見出してきた [2] [3]。これらの表現型から、**PmgA** が関与するパートナースイッチング制御系は、光合成電子伝達系や炭素代謝等、生命活動の根幹をなす細胞機能の調節に関わる重要な分子機構であると予想される。しかし、組換えタンパク質の調製が極めて困難であることから、20 年以上もの間、**PmgA** の解析は変異株の表現型解析に限定され、研究実施者も海外の研究グループも、タンパク質自体の機能解析に踏み込めずにいた。そのような状況下で、コムギ胚芽無細胞翻訳系を用いたことがブレイクスルーとなり、十分量の **PmgA** タンパク質の合成に成功した。そこで、**S.6803** ゲノムにコードされる 4 種のアンタゴニスト様タンパク質 **Ssr1600**、**Slr1912**、**Slr1856**、**Slr1859** を大腸菌内で大量発現・精製し、無細胞翻訳系により **PmgA** を合成した反応液中へ [γ-³²P]-ATP とともに添加し、各アンタゴニスト様タンパク質に対してリン酸基転移が起きるかどうかを評価した。その結果、**Ssr1600** への特異的なリン酸基転移が検出されたが、**PmgA** のキナーゼ活性に必須と推定される 56 番アスパラギン残基を置換した場合には、**Ssr1600** へのリン酸基転移は検出されなかった。以上の結果より、**S.6803** において **PmgA** が **Ssr1600** とともにパートナースイッチング制御系を形成し、光合成電子伝達や炭素代謝を制御する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

PmgA のリン酸化標的として、パートナースイッチング制御系のアンタゴニスト様タンパク質 **Ssr1600** を同定したことから、「パートナースイッチング制御系はいかにして、シアノバクテリアの光合成や代謝を制御しているのか?」の解明を目的として研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) **S.6803** ゲノムにコードされているアンチシグマ因子様タンパク質 **PmgA**、**Slr1861**、およびアンタゴニスト様タンパク質 **Ssr1600**、**Slr1856**、**Slr1859**、**Slr1912** について、バクテリア two-hybrid 法 (**BACTH system**) を用いて、アンチシグマ因子とアンタゴニスト間の相互作用の有無、ホモ二量体・ヘテロ二量体形成の有無、および **Ssr1600** のリン酸化セリン残基を置換した場合の **PmgA** との相互作用への影響を評価した。

(2) **PmgA** および **Ssr1600** の欠損株と過剰発現株を作製し、イムノプロット解析により、各株の細胞内における **Ssr1600** の蓄積量、およびリン酸化状態を調べた。また、これまでに **PmgA** 欠損株で表現型が観察されている強光条件下において表現型解析を行った。

4. 研究成果

(1) [γ - 32 P]-ATP を用いたリン酸化実験では、**PmgA** はアンタゴニスト様タンパク質のうち **Ssr1600** のみを特異的にリン酸化する結果が得られたが、**BACTH system** を用いて **PmgA** との相互作用活性を評価したところ、**Ssr1600**、**Slr1856**、**Slr1859** ではポジティブコントロールの 4 倍以上もの高い活性が、**Slr1912** もポジティブコントロールと同等の活性が検出された。さらに、アンチシグマ因子様タンパク質 **PmgA** と **Slr1861** 間でホモ二量体・ヘテロ二量体を形成し得ること、アンタゴニスト様タンパク質 **Ssr1600** はホモ二量体および **Slr1912** とのヘテロ二量体を形成し得ることが示された。以上の結果より、**S.6803** 細胞内でパートナースイッチング制御系の構成因子がクロストークし、複雑なシグナル伝達経路を構成している可能性が示唆された。

Ssr1600 のリン酸化部位である 59 番目のセリンをアラニンまたはアスパラギン酸に置換することで脱リン酸化状態、リン酸化状態を模倣し、**PmgA** との相互作用を解析したところ、野生型と **S59A** 型がポジティブコントロールより高い活性を示したのに対し、**S59D** 型ではネガティブコントロールと同レベルの活性であったことから、一般的なパートナースイッチング制御系のアンタゴニストと同様、**Ssr1600** は脱リン酸化型のときに **PmgA** と相互作用し、リン酸化されると相互作用が失われると想定された。

(2) **PmgA** 欠損株では **ssr1600** 転写産物は検出されるものの、**Ssr1600** タンパク質は全く細胞内に蓄積していないことが明らかになった。一方、**PmgA** 過剰発現株では、**Ssr1600** 自体を過剰発現させた場合と同様、**Ssr1600** の高蓄積が検出された。また、**Phos-tag PAGE** により、**Ssr1600** のリン酸化状態を検出したところ、いずれの株においても **Ssr1600** はリン酸化型としてのみ検出された。以上の結果より、**Ssr1600** が細胞内に安定的に蓄積するためには、**PmgA** によるリン酸化が必須であることが明らかになった。

これまでに **PmgA** 欠損株では、クロロフィル合成系の前駆体である 5-アミノレブリン酸の合成活性と、光化学系 反応中心サブユニットをコードする **psaAB** 遺伝子転写産物の蓄積量を、長時間の強光下で低く保つことができないことを見出していた[2] [4]。本研究において、**Ssr1600** 欠損株でも同様な表現型が観察されたことから、**PmgA** と **Ssr1600** から成るパートナースイッチング制御系は、アンチシグマ因子と 因子の相互作用をアウトプットとする典型的な系とは異なり、アンチシグマ因子 **PmgA** によって蓄積量が制御されるアンタゴニスト **Ssr1600** をアウトプットとする、新奇性の高い系であることが明らかになった。

(3) 以上の研究結果を、**Plant Physiology** 誌に公表した [7]。本研究により明らかになってきた **S.6803** のパートナースイッチング制御系の分子機構を図 2 にまとめた。**PmgA** はリン酸化により **Ssr1600** の蓄積量を制御することで、

長時間の強光条件下において、光化学系 アポタンパク質とクロロフィルの合成量を協動的に制御していると考えられる。また、**Ssr1600** 以外のアンタゴニスト様タンパク質とも相互作用することで、光合成と炭素代謝の包括的に制御に関与しているかもしれない。アンチシグマ因子様タンパク質 **Slr1861**、アンタゴニスト様タンパク質 **Slr1856** と **Slr1859**、**PP2C** ホスファターゼ **Slr1860** (**IcfG**) は、炭素代謝制御に関わるパートナースイッチングモジュールを構成している可能性が示されている[5] [6]。今後、**PmgA** がこの系にどのように関与しているか、各因子の欠損株、過剰発現株を用いた解析を進めていきたい。

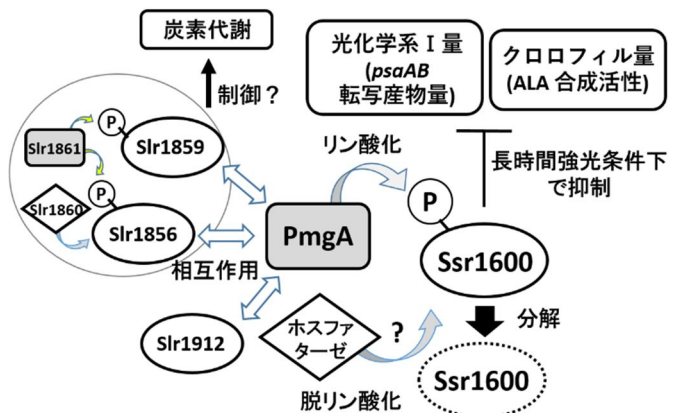


図 2 S.6803のパートナースイッチング制御系

<引用文献>

- [1] Bouillet et al. *Environ Microbiol Rep*, 10, 127-139, 2018
- [2] Hihara et al. *Plant Physiol*, 117, 1205-1216, 1998
- [3] Takahashi et al. *J Exp Bot*, 59, 3009-3018, 2008
- [4] Muramatsu et al. *Microbiology*, 155, 989-996, 2009
- [5] Beuf et al. *Plant Mol Biol*, 25, 855-864, 1994
- [6] Shi et al. *J Bacteriol*, 181, 4761-4767, 1999
- [7] Nakamura et al. *Plant Physiol*, in press, 2024

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kato Naoki, Iwata Kazuki, Kadowaki Taro, Sonoike Kintake, Hihara Yukako	4. 巻 63
2. 論文標題 Dual Redox Regulation of the DNA-Binding Activity of the Response Regulator RpaB in the Cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1078 ~ 1090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka M, Ishikawa T, Tamura S, Saito Y, Kawai-Yamada M, Hihara Y	4. 巻 61
2. 論文標題 Quantitative and qualitative analyses of triacylglycerol production in the wild-type cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 and the strain expressing AtfA from <i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1537-1547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takashima K, Nagao S, Kizawa A, Suzuki T, Dohmae N, Hihara Y	4. 巻 10
2. 論文標題 The role of transcriptional repressor activity of LexA in salt-stress responses of the cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-74534-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Riediger M, Kadowaki T, Nagayama R, Georg J, Hihara Y, Hess WR	4. 巻 15
2. 論文標題 Biocomputational Analyses and Experimental Validation Identify the Regulon Controlled by the Redox-Responsive Transcription Factor RpaB.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 316-331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.04.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishikawa T, Takano S, Tanikawa R, Fujihara T, Atsuzawa K, Kaneko Y, Hihara Y	4. 巻 2
2. 論文標題 Acylated plastoquinone is a novel neutral lipid accumulated in cyanobacteria.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 pgad092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgad092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hishida A, Shirai R, Higo A, Matsutani M, Nimura-Matsune K, Takahashi T, Watanabe S, Ehira S, Hihara Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 CRISPRi knockdown of the cyabrB1 gene induces the divergently transcribed icfG and sll1783 operons related to carbon metabolism in the cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2024.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura R, Takahashi Y, Tachibana S, Terada A, Suzuki K, Kondo K, Tozawa Y, Hihara Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Partner-switching components PmgA and Ssr1600 regulate high-light acclimation in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiae323	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件(うち招待講演 4件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中村陸玖、立花将伍、日原由香子
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 のパートナースイッチング 制御系が強光順化応答に果たす役割
3. 学会等名 第12回日本光合成学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yukako Hihara
2. 発表標題 Dual redox regulation of the DNA-binding activity of the response regulator RpaB in the cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
3. 学会等名 SCyCode FOR 2816 Symposium "The Autotrophy-Heterotrophy Switch in Cyanobacteria" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日原 由香子
2. 発表標題 シアノバクテリアはトリアシルグリセロールを蓄積するか
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩田 和宜、加藤 直喜、門脇 太郎、園池 公毅、日原 由香子
2. 発表標題 光合成電子伝達鎖のレドックス状態に依存した転写因子RpaBのDNA結合活性制御機構の解明
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村陸玖、立花将伍、日原由香子
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 のパートナースイッチング 制御系が強光順化応答に果たす役割
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷川梨瑚、石川寿樹、高野駿也、辻季美江、金子康子、日原由香子
2. 発表標題 シアノバクテリアにおける中性脂質蓄積の解析
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川寿樹、高野駿也、谷川梨瑚、藤原 隆司、厚沢季美江、金子康子、日原由香子
2. 発表標題 シアノバクテリアはアシル化プラストキノンを蓄積する
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 角田 晴南、中村 陸玖、日原 由香子
2. 発表標題 Synechocystis sp. PCC 6803 におけるパートナースイッチングホスファターゼの 解析
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩田 和宜、加藤 直喜、門脇 太郎、園池 公毅、日原 由香子
2. 発表標題 光合成電子伝達鎖のレドックス状態に依存した転写因子 RpaB の DNA 結合活性制御機構の解明
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺田 有沙、高橋 裕二、立花 将伍、鈴木 翔、戸澤 謙、日原 由香子
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 におけるアンチシグマ様因子 PmgA と アンタゴニスト様因子との相互作用
3. 学会等名 第11回日本光合成学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukako Hihara
2. 発表標題 Interaction of PmgA with anti-sigma antagonists reveals partner-switching regulatory network in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
3. 学会等名 日独二国間セミナー（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 立花将伍、高橋裕二、日原由香子
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 におけるアンチシグマ様因子 PmgAとアンタゴニスト様因子 Ssr1600の生理解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 陸玖、立花 将伍、日原 由香子
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803の パートナースイッチング制御系が強光順化応答に果たす役割
3. 学会等名 第12回日本光合成学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺田有沙、高橋裕二、鈴木翔、戸澤謙、日原由香子
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 におけるアンチシグマ様因子PmgAとアンタゴニスト様因子との相互作用
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日原由香子
2. 発表標題 光合成関連遺伝子のレドックス制御機構に迫る
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村陸玖、立花将伍、日原由香子
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 のパートナースイッチング 制御系が強光順化応答に果たす役割
3. 学会等名 第13回日本光合成学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kawahara A, Hihara Y	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Wiley	5. 総ページ数 560
3. 書名 Cyanobacteria Biotechnology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------