

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570047

研究課題名(和文) 光合成電子伝達のセンシングによる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

研究代表者

日原 由香子 (HIHARA, Yukako)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：60323375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：光合成生物は、環境の変化を光合成電子伝達鎖のレドックス変化としてセンシングし、転写制御を行うことが知られている。しかし、その過程で働く転写制御因子に関する知見は極めて乏しい。そこで本研究では、光合成電子伝達鎖のレドックス状態を伝える調節タンパク質チオレドキシソキシソと転写制御因子の相互作用を検出するスクリーニング系を開発し、この系を用いて、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 ゲノムから、チオレドキシソの標的となり得る転写制御因子 5 種を新たに同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Photosynthetic organisms are known to perceive environmental changes as changes in redox state of photosynthetic electron transport chain to start transcriptional regulation. However, information on transcriptional regulators working on the process has been very limited. In this study, we established the new screening system to detect interaction between a transcriptional regulator and the redox-dependent regulatory protein, thioredoxin. We successfully identified five transcriptional regulators as new targets of thioredoxin using this screening system. By characterizing these regulators, the mechanism of photosynthetic electron transport-dependent transcriptional regulation will be elucidated.

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：レドックス制御 光合成 シアノバクテリア 転写制御 チオレドキシソ

1. 研究開始当初の背景

生物は細胞内外に備わったセンサーで生育環境の変動を検知し、遺伝子発現を柔軟に調節することにより、新しい環境へ適応するための順化応答を開始する。環境変動の検知の方法は種々多様であるが、光合成生物では、光合成電子伝達鎖のレドックス状態変化が、順化応答開始のシグナルとして重要であることが、以前より指摘されてきた。申請者はシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下 S.6803) において全ゲノム DNA マイクロアレイ解析の系を確立し、光強度変化に際しての遺伝子発現変動とその後に関察される細胞レベルでの順化応答との間に密接な関連があること、プラストキノンプールより下流の光合成電子伝達鎖のレドックス状態が、これらの遺伝子の発現レベルに大きな影響を与えることを明らかにした。また他グループの解析結果から、これらの強光・レドックス応答遺伝子群が、温度、CO₂濃度など、他の様々な環境要因の変動に対しても応答性を示すことが分かってきた。これらの知見から、シアノバクテリアの順化応答の初期段階において、環境変動を光合成電子伝達鎖のレドックス変化として検知し、遺伝子発現を調節するシグナル伝達系が重要な役割を果たしていることが示唆されたが、その過程に関わる調節因子の知見は乏しく、シグナル伝達の実態は不明であった。

生物間に普遍的に存在する調節タンパク質チオレドキシニン (以下 Trx) は、システイン残基のチオール・ジスルフィド変換という酸化還元反応を介して、標的タンパク質の活性を制御するが、光合成生物においては、光合成電子伝達鎖からの還元力を標的タンパク質に伝え、光合成と細胞内代謝をリンクさせる重要な役割を担っている。これまでに、Trx アフィニティークロマトグラフィーにより、葉緑体、およびシアノバクテリア細胞内に存在する Trx 標的タンパク質の網羅的な単離同定が行われ、その結果、各種の代謝経路のみならず、DNA 複製、翻訳、色素体分裂等、多岐にわたる細胞内プロセスが、Trx を介して光合成電子伝達依存的に制御されていることが明らかになってきた。しかし、細胞内存在量が少ないためか、同定された推定 Trx 標的タンパク質のリストに転写制御因子は含まれておらず、光合成電子伝達と遺伝子発現との間に働くシグナル伝達系の解明にはつながっていなかった。

申請者はこれまでに、S.6803 を材料として、シアノバクテリア間で広く保存されている転写制御因子の欠損株の表現型解析を行ってきた。その過程で、LuxR 型の低分子量転写因子 Ssl0564 が、光合成電子伝達依存的な転写制御に働くことを見出し、これを PedR と名づけた。プルダウン法にて PedR と相互作用するタンパク質の探索を行ったところ、S.6803 の主要 Trx である TrxM が単離された。さらに Trx 還元酵素の欠損株では、PedR

の光合成電子伝達依存的な活性制御が行われないことを見出した。これは、Trx との相互作用によって活性制御を受ける転写制御因子の、光合成生物における初の報告例となった。しかし PedR の支配下にある遺伝子の数は限られており、S.6803 細胞内で光合成によるレドックス制御を受けていると推定される総遺伝子数からすると、Trx と相互作用して働く転写制御因子は他にも複数存在することが予想された。

2. 研究の目的

光合成生物の順化応答において、光合成電子伝達鎖のレドックス変化をセンシングし、遺伝子発現を調節するシグナル伝達系が重要な役割を担っている。しかし、その過程で働く転写制御因子に関する知見は、細胞内存在量が少なく単離同定が困難なこともあって、極めて乏しい。そこで本研究では、まずレドックス調節タンパク質である Trx と転写制御因子を大腸菌内で共発現させ、両者の相互作用を検出するスクリーニング系の開発を行う。次に S.6803 のゲノム情報をもとに、DNA 結合領域、および高度に保存されたシステイン残基を併せ持つという条件で、Trx の標的となり得る転写制御因子候補を選択し、このスクリーニング系を用いて Trx との相互作用を検証する。Trx 標的転写制御因子の同定に成功した場合には、その支配下にある遺伝子群を網羅的に同定し、最終的には光合成電子伝達依存的な転写制御機構の全貌を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌内で共発現させた Trx と標的候補の転写制御因子の相互作用の検出系の確立

S.6803 の主要 Trx である TrxM (Slr0623) の活性部位を構成するシステインの 1 つをセリンに置き換え、標的タンパク質を捕捉できるように改変した C35S Trx を S-タグ付きで、Trx 標的候補転写因子を His-タグ付きで大腸菌内で共発現させた。発現ホストとしては、Trx 還元酵素とグルタチオン還元酵素の破壊株であり、ジスルフィド結合を有するタンパク質の発現に適した Origami2 株を用いた。この大腸菌に IPTG を添加して転写因子と C35S TrxM を誘導後に集菌・破砕し、可溶性画分を非還元 SDS-PAGE に供した。His-tag 抗体、および S-tag を認識する S-protein を用いたウェスタン解析により、転写因子、C35S TrxM をそれぞれ検出した。この系により実際に Trx と標的転写因子との相互作用を検出可能かどうか、まず既知の Trx 標的である PedR を用いて評価を行った。

(2) 大腸菌共発現系を用いての Trx 標的候補転写制御因子のスクリーニング

(1) で確立した大腸菌共発現系を用いて、実際にスクリーニングを行った。S.6803 ゲノ

ムから、DNA 結合に関わるとされるドメイン、およびシアノバクテリアのオルソログ間で高度に保存されたシステイン残基を持つタンパク質をコードする ORF を選択した。S.6803 の転写制御因子の多くは DNA 結合モチーフとしてヘリックス・ターン・ヘリックスを持つが、他の DNA 結合モチーフを持つ場合も本スクリーニングの対象とした。保存されたシステイン残基が、明らかに酵素の活性中心を形成しているような場合は、これを除外した。こうして選択した候補タンパク質は約 40 個であるが、この中から転写制御因子であることが明らかであり、システイン残基の保存性も高いものを最優先としてスクリーニングを開始した。

(3) Trx と標的候補転写制御因子の相互作用の *in vitro* における検証

(2) の系において単離された Trx 標的候補転写制御因子を大腸菌より精製し、精製 Trx との相互作用を、両タンパク質の量比を変えて *in vitro* で検証した。また、チオール基の修飾剤 PEG-maleimide を用いて、Trx と相互作用する前後における標的転写制御因子のチオール基の存在状態を調べた。

(4) Trx と標的候補転写制御因子の相互作用の *in vivo* における検証

チオレドキシシンとスクリーニングの結果得られた候補転写制御因子の相互作用を、S.6803 細胞内にて *in vivo* で検証するため、C35STrx を条件誘導可能な株を作製した。この株において条件誘導後に、C35STrx と候補転写制御因子の相互作用が検出できるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) 大腸菌内で共発現させた Trx と標的候補転写制御因子の相互作用の検出系の確立

PedR を単独で発現する大腸菌 (PedR 株) と PedR と C35S Trx を共発現する大腸菌 (Trx-PedR 株) について、IPTG による発現誘導の有無での PedR と Trx 両タンパク質の発現レベルを調べ、さらに PedR-Trx 複合体が形成されるかを非還元 SDS-PAGE、CBB 染色により確認した。その結果、PedR 株で確認された PedR 単量体 (12 kDa) および二量体 (24 kDa) のバンドに加えて IPTG 誘導後の Trx-PedR 株では、30 kDa の位置に PedR 株では見られないバンドが検出された。このバンドは His-tag 抗体、S-protein の両方で検出されたこと、DTT を添加しての還元処理により消失し、新たに PedR、Trx の単量体の位置にバンドが現れたことから、大腸菌内で PedR-Trx 複合体が形成されており、それが 30 kDa バンドとして検出されたことが示された。

PedR の C 末端には 3 つのシステイン残基 C73、C79、C80 が存在するが、このうち Trx の標的として働くシステイン残基がどれで

あるかは未解明である。そこで、これら 3 つのシステインのそれぞれをセリンに置き換えた PedR を大腸菌内で C35STrx と共発現させて同様な実験を行ったところ、野生型 PedR に比べ、これらのセリン置換 PedR では PedR-Trx 複合体が形成されにくいことを見出した。中では C80SPedR が最も Trx と相互作用しにくく、C80 が Trx の標的である可能性が示された。以上の実験結果から、Trx と転写制御因子との相互作用を検出するのに適した実験系を確立できたと考えられる。

(2) 大腸菌共発現系を用いての、Trx 標的候補転写制御因子のスクリーニング

シアノバクテリア内でシステイン残基の保存性が高い 30 種の転写制御因子を選び、(1) で確立した実験系を用いて C35STrx との相互作用を調べたところ、保持するシステイン残基の数によらず、C35STrx と複合体を形成する転写制御因子と形成しない転写制御因子が存在することが明らかになった。このことから大腸菌共発現系を用いてのスクリーニング系が実際に Trx 標的因子の探索方法として機能し得ることが示された。以下に相互作用が検出されなかった例、された例を一例ずつ挙げる。

相互作用が検出されなかった例：LysR 型転写因子 Slr1871

Slr1871 は、アミノ酸配列中に 5 つのシステイン残基を持つ。Slr1871 と C35STrx の単独発現株および共発現株の可溶性画分を非還元 SDS-PAGE、ウェスタン解析に供した結果を図 1 に示す。His-tag 抗体によって Slr1871 を検出したところ、Slr1871 単独発現株と Trx と Slr1871 の共発現株のバンドパターンには特に違いがなかった。また、S-protein によって Trx を検出しても、特に Slr1871-Trx 複合体と考えられるバンドは検出されなかった。これらの結果から Slr1871 は複数のシステイン残基を持つものの、大腸菌内で Trx と相互作用していないと考えられる。

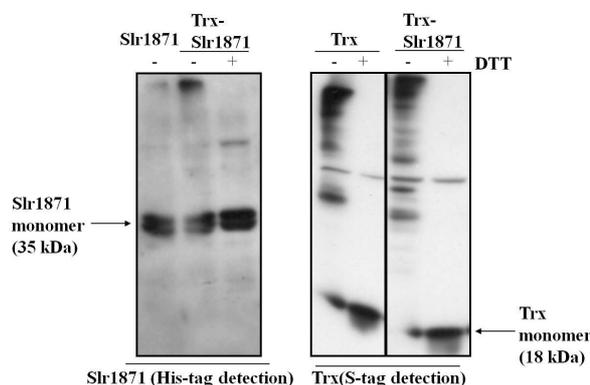


図 1. Trx と Slr1871 の相互作用の検出

相互作用が検出された例 : GntR 型転写因子 Sll1961

Sll1961 は、アミノ酸配列中に 3 つのシステイン残基を持つ。Sll1961 と C35STrx の単独発現株および共発現株可溶性画分を非還元 SDS-PAGE、ウェスタン解析に供した結果を図 2 に示す。His-tag 抗体によって Sll1961 を検出したところ、共発現株では 45 kDa の Sll1961 単量体に加え、64 kDa のバンドが検出された。また、S-protein によって Trx を検出すると、共発現株では 18 kDa の Trx 単量体に加え、64 kDa のバンドが検出された。DTT を添加すると 64 kDa のバンドが消失し、Sll1961 と C35STrx 単量体バンドが増加したことから、64 kDa バンドは Sll1961-Trx 複合体であると考えられる。

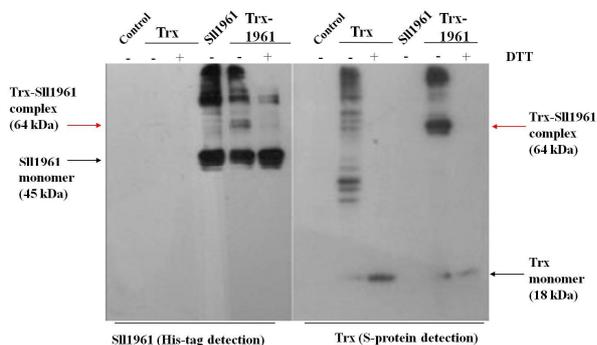


図 2. Trx と Sll1961 の相互作用の検出

Sll1961 は S.6803 において強光条件下での光化学系量比の調節や、窒素欠乏条件下でのアンテナ色素タンパク質複合体フィコビリソームの量の制御に関与することが知られている。Sll1961 の活性制御が Trx を介して光合成電子伝達活性依存的に行われているのかどうか、現在 S.6803 を用いての解析を進めている。

本研究では、大腸菌共発現系において、Sll1961 を含めた 5 種の転写制御因子について C35STrx との複合体を検出することができた。これらについてタンパク質を精製し、チオール基の修飾剤 PEG-maleimide を用いて個別に精製 Trx との相互作用を検証した。その結果いずれの転写制御因子においても Trx との相互作用が確認されたため、今後は S.6803 内での Trx との相互作用とその生理的意義について研究を進めていきたい。

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 3 件)

Kaniya Y, Kizawa A, Miyagi A, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Kaneko Y,

Nishiyama Y, Hihara Y. (2013) Deletion of the transcriptional regulator cyAbrB2 deregulates primary carbon metabolism in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* 162 (2):1153-1163. 査読有

Muramatsu M, Hihara Y. (2012) Acclimation to high-light conditions in cyanobacteria: from gene expression to physiological responses. *J Plant Res.* 125 (1):11-39. 査読有

Yamauchi Y, Kaniya Y, Kaneko Y, Hihara Y. (2011) Physiological roles of the cyAbrB transcriptional regulator pair Sll0822 and Sll0359 in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol.* 193 (15):3702-3709. 査読有

[学会発表](計 7 件)

門脇 太郎、原 怜、野亦 次郎、久堀 徹、日原 由香子 「シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 におけるチオレドキシンと相互作用する転写因子の探索」第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 17 日、富山

門脇 太郎、原 怜、野亦 次郎、久堀 徹、日原 由香子 「シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 におけるチオレドキシンと相互作用する転写因子の探索」ラン藻の分子生物学 2013、2013 年 11 月 22 日、千葉

Taro Kadowaki, Satoshi Hara, Jiro Nomata, Toru Hisabori, Yukako Hihara “A screen for transcription factors that interact with thioredoxin in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803” 第 16 回国際光合成会議、2013 年 8 月 12 日、米国セントルイス

門脇 太郎、原 怜、野亦 次郎、久堀 徹、日原 由香子 「シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 におけるチオレドキシンと相互作用する転写因子の探索」第 4 回日本光合成学会、2013 年 5 月 31 日、名古屋

門脇 太郎、原 怜、野亦 次郎、久堀 徹、日原 由香子 「シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 におけるチオレドキシンと相互作用する転写因子の探索」第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 22 日、岡山

Taro Kadowaki, Toru Hisabori, Yukako Hihara “Elucidation of mechanisms of transcriptional regulation dependent on

thioredoxin in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803” 第14回国際原核光合成生物会議、2012年8月9日、ポルトガル、ポルト

門脇 太郎、堀内 真由美、中村 絹、小島 幸治、西山 佳孝、原 怜、畠山 和佳子、野 亦 次郎、久堀 徹、日原 由香子
「*Synechocystis* sp. PCC 6803 における転写因子 PedR のチオレドキシンの標的システム残基の同定」日本植物学会第75回大会、2011年9月17日、東京

〔図書〕(計1件)

Hihara Y., Sonoike, K. (2013) Organization and Assembly of Photosystem I. in *Plastid Development in Leaves during Growth and Senescence*, pp.101-116, 全 685 頁 (B. Biswal, K. Krupinska, U. Biswal eds.), Springer, Dordrecht.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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