

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の強光応答

—順化過程における *sll1961* 遺伝子の役割—

2008年3月修了

先端生命科学専攻 生命応答システム分野

学生証番号: 66534 氏名: 田森 美緒

指導教員: 園池 公毅 准教授

キーワード (シアノバクテリア、強光、ストレス応答)

[序論]

光合成生物にとって過剰な光エネルギーの供給 (強光)は、光合成電子伝達鎖の過還元状態を引き起こし、光合成装置における活性酸素種の生成を誘発する為、非常に危険である。そこで、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 は、光環境の変動に対し、光吸収量の抑制、光合成電子伝達の調節、CO₂ 固定系の調節、活性酸素消去系の誘導等、様々な応答機構を働かせる。このような機構の一つとして、光化学系量比調節機構が知られている。この機構により、強光下で光化学系 I が選択的に抑制され、光化学系 II に対する光化学系 I の量 (系 I/系 II 比) が低下する。光化学系量比調節機構に関与する因子については、推定転写因子 *sll1961* などが知られているが、*sll1961* が光化学系量比調節機構にどう関与するののかは、全く明らかでない。さらには、生育光環境は、光合成系以外にも大きな影響を与えることが予想されるが、これについても実際に得られた知見はほとんどないと言ってよい。そこで、本研究では、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 を材料とし、1. 細胞の形態に対する強光の影響と光化学系量比調節の関係、2. *sll1961* の光化学系量比調節機構における位置、の二点について解析した結果を報告する。

[結果・考察]

1. 細胞の形態に対する強光の影響と光化学系量比調節の関係

強光に際して細胞内の状態は大きく変化する。多くの生物種では、そのような生理状態の変化に伴い細胞形態が変化する例がある。本章では、光化学系量比調節と細胞形態の関わりを検証することとした。

(1) 強光下での細胞形態の変化

弱光 (20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 下で生育した野生株を強光 (200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) に移行し、経時的に位相差顕微鏡で観察し、細胞直径を測定した。その結果、野生株の細胞サイズは、強光移行後大きな変化を示すことがわかった (図 1)。まず、強光移行後 6 時間までは、細胞直径は殆ど変化を示さず、その後 12 時間までに細胞直径は著しく増加し、最大で移行前の 25% 程度大きくなった。その後、48 時間まで細胞直径は緩やかに減少し、48 時間以降はほぼ一定の値を維持した。この強光定常レベルでの細胞直径と弱光培養株の細胞直径は有意に異なっていた。また、強光移行後 12 時間における最大直径も、強光順化後の定常レベルの直径と有意に異なっていた。一方、強光に順化した細胞を弱光に移すと、弱光順化していたもとの大きさまで細胞直径が減少し、この際には一過的な細胞直径の変動は見られなかった。以上の結果から、シアノバクテリアにおいては、細胞のサイズを光環境に合わせて変化させることが示唆された。細胞のサイズを外界の光強度に依存して変化させる意義については、現在のところ明解な答えはない。しかし、細胞のサイズが大きくなると、自らの細胞内で光合成色素同士が被陰効果を示し、効率的な光合成を阻害すると考えられる。その為、光合成が生育の律速段階となる弱光下では、大きな細胞は不利になると考えている。

(2) 光化学系量比調節欠損株の形態変化

強光移行後 12 時間前後に見られる細胞の一過的な巨大化は、何に起因するのだろうか。強光下から弱光下への移行時には一過的な変化は見られなかったことから、強光ストレスが細胞の大きさの変

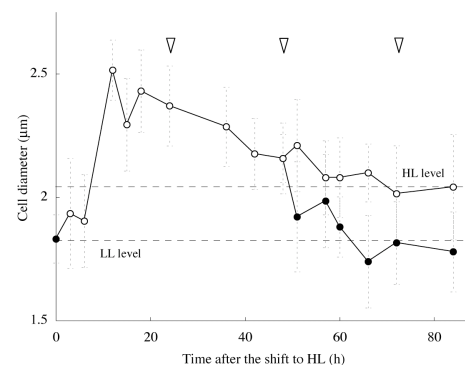


図 1. 強光移行後の細胞直径の変化 弱光生育細胞を黒丸で、強光生育細胞を白丸で表した。

化を引き起こしている可能性が考えられる。そこで、強光下でよりストレスを受けやすくなっていると考えられる強光応答関連遺伝子の欠損株の細胞形態を観察することとした。光化学系量比調節に欠損をもつ遺伝子破壊株、*pmgA* 破壊株、*sll1961* 破壊株、*nblA* 破壊株、*ccmK2* 破壊株、*slr2057* 破壊株、*slr1916* 破壊株、*ctaEI* 破壊株、*ctaCI* 破壊株、*slr0645* 破壊株を強光移行後 12 時間、24 時間において観察し、細胞直径を比較した。強光移行 12 時間後、これらの遺伝子破壊株のうち *pmgA* 破壊株、*sll1961* 破壊株、*nblA* 破壊株、*ccmK2* 破壊株、*slr2057* 破壊株、*slr1916* 破壊株の 6 株 (group A) が野生株よりも有意に大きい細胞直径を示した (図 2)。また、これらの破壊株は、強光移行前の細胞直径に対する強光移行 12 時間後の細胞直径の増加率が野生株より高いこともわかった。これに対し、前述の group A 以外の 3 つの遺伝子破壊株 (group B) は、強光移行 12 時間後においても野生株と同レベルの細胞直径を有していた。では、これら 2 つのグループにおける細胞直径の変化の違いは、何を意味するのだろうか？強光移行 24 時間後において、これら 9 株のクロロフィル含有量を測定した。その結果、以前に報告がある通り、group A に属する 6 株はいずれも、野生株より高いクロロフィル量を示し、これに対し group B に属する 3 株は野生株と同じか、より低いクロロフィル量を示した。シアノバクテリアにおいて、クロロフィル分子の約 90% が系 I に配位している為、group A に属する遺伝子破壊株は系 I を多く有すると言える。以上の結果を併せて考えると、強光下において系 I を多く有することが、細胞の巨大化を引き起こした可能性が高い。過剰な系 I による細胞の巨大化を説明する理由として、酸化ストレスの影響が考えられる。光合成生物において、活性酸素種の主な発生部位が系 I の還元側にある為、group A の破壊株は過剰な酸化ストレス下におかれていると考えられるからである。酸化ストレスがなぜ細胞の巨大化を誘導するのかについては明らかでないが、窒素欠乏時には窒素欠乏応答欠損株 (*nbl* 破壊株) の細胞直径が大きくなることが報告されており、*Synechocystis* sp. PCC 6803 のストレス下における細胞サイズの増加は様々なストレス下で共通に見られる事象である可能性がある。またこれまでの結果から、仮に細胞サイズをストレスの指標としてとらえた場合、強光下のシアノバクテリアにとっては、光化学系量比のバランスを維持することよりも増して、系 I の量を適切に管理することが重要であることを意味していると考えられるだろう。

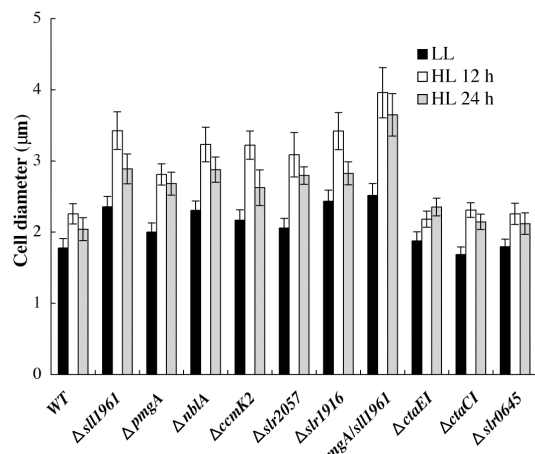


図 2. 強光下における光化学系量比調節欠損株の細胞直径の変化

2. *sll1961* の光化学系量比調節機構における位置

Sll1961 は Herix-turn-herix ドメインをもつことから、*Sll1961* を介した光化学系量比調節が、転写調節を介して行われる可能性が高いと考えた。先行研究で行われた *sll1961* 破壊株での網羅的発現解析の結果から、4 つの遺伝子を *Sll1961* による転写調節の標的候補として取り上げた。標的候補遺伝子破壊株は、強光下での光化学系量比調節に部分的な欠損を示した。そこで、標的候補遺伝子の上流域の DNA 断片と *Sll1961* の組み換えタンパク質を用いてゲルシフトアッセイ (EMSA)を行った。その結果、全種の DNA 断片に対し、高タンパク質濃度条件下で適切なサイズの DNA-タンパク質複合体形成が観察されたが、配列特異性を確認することはできなかった。また、強光生育のシアノバクテリア由来の粗タンパク質液を用いた EMSA では、*slr0364* と *slr2057* に対する DNA 断片において、組み換えタンパク質を用いた EMSA で見られた複合体とほぼ同じサイズのシフトが見られた。*Sll1961* の転写標的遺伝子を特定するには至っていないが、いくつかの条件において、適切なサイズの DNA-タンパク質複合体形成が見られたことから、*Sll1961* が反応条件によって、これらの DNA 断片に対して特異性を示す可能性は残されていると考えている。*Sll1961* が分類される GntR 型転写調節因子は、様々な補因子によって活性調節を受けることが知られており、*Sll1961* の DNA 結合能が低いことは、実験条件における補因子の欠如によるものである可能性が高い。今後の *Sll1961* を介した光化学系量比調節機構の解明のためには、補因子の同定が必要なのではないかと考えている。