

博士論文

好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* OCh114 の
光合成制御に関する研究

山本 麻衣子

目次

第1章 序論

第1節【微生物のエネルギー代謝】	1
第2節【紅色光合成細菌】	1
第3節【好気性光合成細菌と嫌気性光合成細菌】	3
第4節【嫌気性光合成細菌の光合成制御】	5
第5節【好気性光合成細菌の光合成】	7
第5節【OCh114株のエネルギー代謝と光合成関連遺伝子の発現制御】	8
第6節【本研究の目的】	9

第2章 LOV-HKによる光合成制御機構の解明

第1節【背景】	10
第2節【研究材料及び方法】	12
第3節【結果】	
3-1 LOV-HKの光応答性と光合成制御との関係	
3-1-1 LOV-HKの発色団	22
3-1-2 LOV-HKの光照射によるスペクトル変化	23
3-1-3 光応答に必要なシステイン残基の特定	25
3-1-4 野生型 <i>LOV-HK</i> と <i>LOV-HK-C69A</i> 変異体相補株の解析	27
3-1-5 好気条件と嫌気条件での青色光による <i>bchC</i> 転写レベルの変化	31
3-2 LOV-HKのシグナル伝達経路	
3-2-1 自己リン酸化されるヒスチジン残基について	32
3-2-2 Phos-tag SDS-PAGEによるLOV-HKの自己リン酸化の解析	38
3-2-3 <i>LOV-HK-H226A</i> 変異体と <i>LOV-HK-H266A</i> 変異体相補株の解析	40
3-2-4 レスポンスレギュレーター <i>phyR</i> 破壊株の解析	40
第4節【考察】	43

第3章 光合成関連遺伝子の発現抑制解除機構の探索	
第1節【背景】	45
第2節【研究材料及び方法】	46
第3節【結果】	
3-1 PpsRのDNA結合能におけるLOV-HKの影響	53
3-2 <i>RD1-1653</i> と <i>ppaA</i> の解析	
3-2-1 <i>RD1-1653</i> 破壊株の作製と解析	54
3-2-2 <i>ppaA</i> 破壊株の作製と解析	56
3-3 PpsRとPpaAの相互作用解析	
3-3-1 PpaAのコバラミン結合能	58
3-3-2 MBP-PpaA, LOV-HK-His混合条件でのPpsRの ゲルシフトアッセイ	60
3-4 NaN ₃ 及びDNP添加後の光合成関連遺伝子の転写変動	
3-4-1 NaN ₃ の影響	62
3-4-2 DNPの影響	63
第4節【考察】	65
第4章 総括と展望	67
引用文献	72
謝辞	80
論文の内容の要旨	81

第1章 序論

第1節【微生物のエネルギー代謝】

生命の維持には持続的なエネルギー供給が必要であり、生物にとって、いかにして生存に必要なエネルギーを獲得するかは重要な課題である。微生物は地球上の様々な環境に遍在している。温度や pH、酸素濃度、有機物や無機物の組成や濃度が異なる環境で生存するために、微生物はそれぞれがその環境に適したエネルギー代謝を構築してエネルギーを獲得している。微生物の中でも細菌のエネルギー代謝は多様である。エネルギー源として有機物だけでなく無機物や光を用いるものもいる。また、好気呼吸に加えて嫌気呼吸や発酵などを行うものもいる。

細菌は単細胞生物であり、個々が常に様々な環境変化に曝されている。細菌はそのような変化のある環境に適応するために、1つの生物が複数のエネルギー代謝を持つことが多い。環境変化を感知し、エネルギー代謝を含めた様々な代謝を制御することで、直ちにその環境に適応し、生存していると考えられる。そのため、多様なエネルギー代謝を持つことと、それらをどのように制御するかは細菌の生存戦略において重要である。

第2節【紅色光合成細菌】

細菌の中でも酸素非発生型光合成を行うものは光合成細菌と呼ばれる。光合成細菌は 16S rRNA の塩基配列による系統分類において、紅色光合成細菌、緑色硫黄細菌、緑色糸状性細菌、ヘリオバクテリアの4つに大きく分かれ、近年、Acidobacteria 門と Gemmatimonadetes 門でも光合成細菌の存在が確認された(1, 2)。

紅色光合成細菌はプロテオバクテリア門のアルファ、ベータ、ガンマプロテオバクテリア綱に分布する。それぞれの綱で光合成能をもつ菌と持たない菌は混在しており、光合成能を持つものが紅色光合成細菌と呼ばれている。紅色光合成細菌でみられるエネルギー代謝は多様であり、光合成に加えて、好気呼吸、硝酸イオンやトリメチルアミン-N-オキシド (TMAO) やジメチルスルフォキシド (DMSO) を電子受容体とした嫌気呼吸(3-5)、水素の酸化還元や二酸化酸素固定や窒素固定(7)、還元型硫黄化合物の酸化能をもつものなどの報告がある(8-10)。

上述のように紅色光合成細菌はプロテオバクテリア門に散在しており、エネルギー代謝も多様であるが、これらの細菌は共通して光合成に必要な遺伝子がクラスターとなっている光合成遺伝子クラスター (Photosynthesis Gene Cluster, PGC) を持っている(11, 12)。Fig. 1-1 はベータプロテオバクテリア綱の嫌気性光合成細菌である *Rubrivivax gelatinosus* とアルファプロテオバクテリア綱の好気性光合成細菌である *Roseobacter denitrificans* とアルファプロテオバクテリア綱の嫌気性光合成細菌である *Rhodobacter capsulatus* の PGC を示している(13)。PGC には光合成色素であるバクテリオクロフィルやカロテノイドの生合成に必要な遺伝子 (Fig. 1-1 で緑とオレンジ)、集光装置 (puh)、反応中心 (puf) やレギュレーター (Fig. 1-1 で水色) などの遺伝子が含まれており、その長さは約 40 kbp となる。クラスター内の遺伝子の並びに多少の違いは見られるが、クラスターを構成する遺伝子はほぼ同じである。PGC はいくつかの紅色光合成細菌ではプラスミ

ド上においており、水平伝播により様々な菌に移動していることが示唆されている(14)。

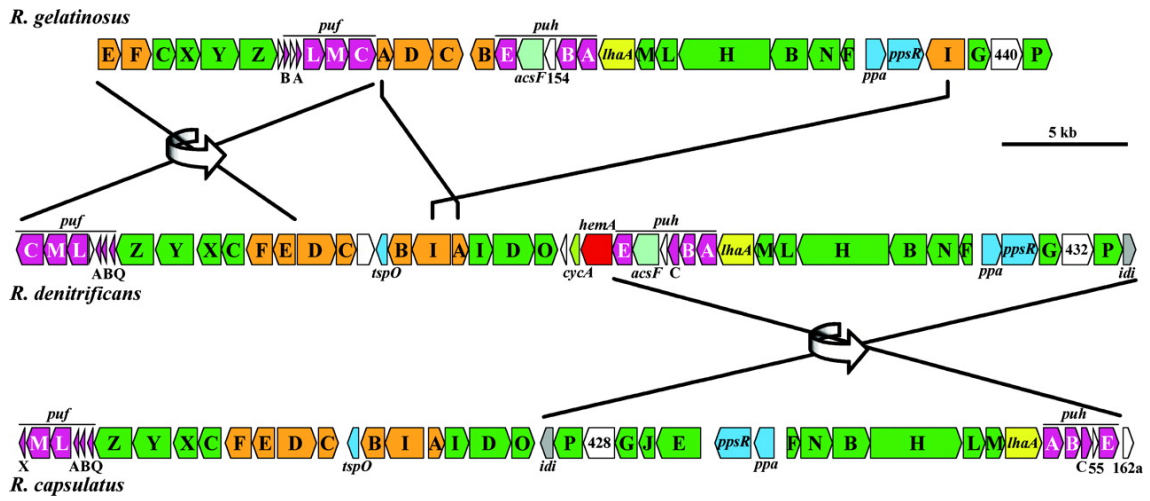


Figure 1-1. Photosynthesis gene cluster arrangement in the purple bacteria *Rubrivivax gelatinosus*, *Roseobacter denitrificans*, and *Rhodobacter capsulatus* (13). Chlorophyll biosynthesis (green), carotenoid biosynthesis (orange), reaction centers and light-harvesting complexes (puf and puh, purple), regulatory proteins (blue), and uncharacterized genes (white).

第3節【好気性光合成細菌と嫌気性光合成細菌】

紅色光合成細菌は共通してPGCを持っているが、光合成の発現条件は菌によって異なり同一ではない。紅色光合成細菌の中には、嫌気条件でのみ光合成を発現する嫌気性光合成細菌と、好気条件でも光合成を発現する好気性光合成細菌が存在する。好気性光合成細菌が発見されるまでは、光合成細菌の光合成は嫌気条件でのみ行われるものだと考えられていた。

好気性光合成細菌は1970年代に芝と原島によって初めて単離された(15)。その後、バクテリオクロフィルの赤外蛍光を指標とした解析により、太平洋の東部の海洋表面と大西洋の北西部の沿岸で好気性光合成細菌が広く分布し、海洋表層の光合成電子伝達系の2-5%を占めることが示唆され(16)、好気性光合成細菌の分布に関する研究が盛んに行われるようになった。現在では、場所によって様々ではあるが、海の貧栄養な場所においては平均的に原核生物の1-7%、沿海や河口では2-15%が好気性光合成細菌であると考えられている(17)。そのため、好気性光合成細菌は海洋の物質循環に寄与する重要な菌群であると考えられる。好気性光合成細菌はアルファ、ベータ、ガンマプロテオバクテリアで存在が確認されている(18-20)。現在知られている好気性光合成細菌は、好気条件で光合成を発現することに加えて、カルビンサイクルを持たず、従属栄養的に生育するという特徴を持つ(12, 13, 21-24)。

嫌気性光合成細菌では、低酸素や嫌気条件でのみ光合成の発現が促進され、好気条件では強く抑制される(25)。さらに、嫌気性光合成細菌は、カルビンサイクルを持ち、嫌気条件で水素を電子供与体、二酸化炭素を炭素源として光エネルギーを利用した光独立栄養的な生育をすることができる。また、光エネルギーに加えて、有機物もエネルギー源や電子供与体として利用する光従属栄養的な生育も行うことができ、光エネルギーがない場合でも、有機物などの他のエネルギー源があれば暗条件でも生育は可能である。

嫌気性光合成細菌は電子供与体として有機物や、水素や還元型硫黄化合物などの無機物を利用することができる(7-10)、好気性光合成細菌は有機物を電子供与体として利用する(18)。無機化合物を電子供与体とした場合は、その酸化によって得られた電子で、シトクロム *c* や細胞膜内のユビキノンを還元される。有機物を電子供与体とした場合は、TCA 回路を経由して有機物が二酸化炭素にまで酸化される過程で NADH ができ、生成された NADH は NADH 脱水素酵素で酸化され、ユビキノンを還元されることで、電子がキノンプールへと入る。

Fig. 1-2 は嫌気性光合成細菌と好気性光合成細菌の光合成を行なっているときの電子の流れを示している。紅色光合成細菌を含む光合成細菌は、植物やシアノバクテリアのようにチラコイド膜を持たず、光合成装置は細胞膜上に存在する。そのため、光合成電子伝達系と呼吸鎖電子伝達系はその成分の多くを共有している。反応中心にあるスペシャルペアのバクテリオクロフィルに光が当たると励起状態となり、電子を放出し、放出された電子はキノンへと渡る。キノンが還元される時、細胞質のプロトンが取り込まれキノールとなることでプロトン勾配が生じる。酸化されたバクテリオクロフィルは *bci* 複合体で還元されたシトクロム *c* から電子を受け取ることにより再度還元される。このように、紅色光合成細菌の光合成電子伝達系は循環型であり、光合成の反応では

電子の数の増減は起こらない。そのため、光合成を行うときの電子伝達系全体のレドックスバランスの調整には他のタンパク質が必要となり、呼吸鎖酵素がその調節に重要な役割を果たしていることが知られている。嫌気性光合成細菌の嫌気・光合成条件での電子伝達系では、NADH 脱水素酵素を介して NAD^+ に電子を渡すこと、または、ヒドロゲナーゼを介した水素生成により還元力が消費される。これにより、キノンプールが過還元状態となることを防ぎ、 NAD^+ に渡された還元力はトランスヒドロゲナーゼにより NADPH 生成に利用され CO_2 固定に用いられる(26)。一方で、好気性光合成細菌はカルビンサイクルやヒドロゲナーゼを持たないため、還元力の消費は好気呼吸の末端酸化酵素での O_2 の還元や、脱窒酵素による硝酸塩の還元依存していると考えられる。

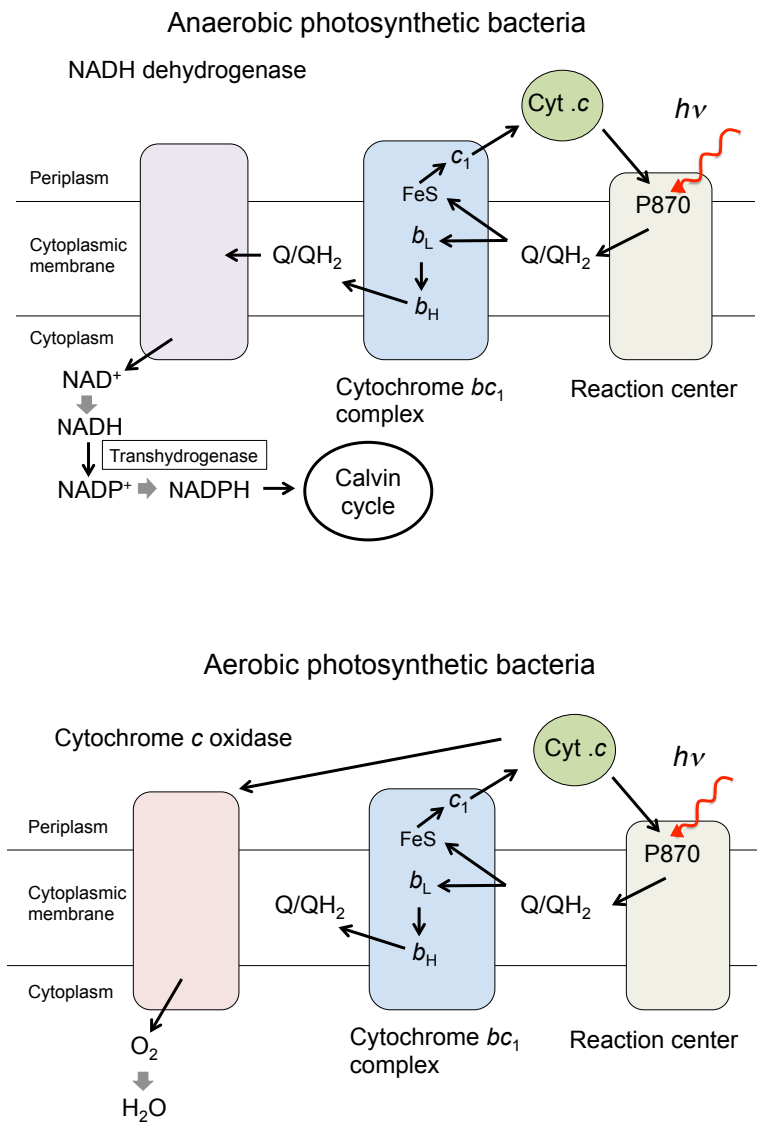


Figure 1-2. Schematic summary of electron transport chains of anaerobic and aerobic photosynthetic bacteria. Q/QH₂; ubiquinone/ubiquinol, P870; special pair, cyt. c; cytochrome c.

第4節【嫌気性光合成細菌の光合成制御】

紅色光合成細菌の光合成制御機構に関する研究は、嫌気性光合成細菌である *Rhodobacter sphaeroides* と *Rhodobacter capsulatus* の2種類の菌で昔からよく行われており、その分子メカニズムに関する知見が多くある。これら2種類の菌では、RegB/RegA、FnrL、PpsRとそのアンチリプレッサーの4つが光合成関連遺伝子の転写制御に関わっていることが知られている。Fig. 1-3は *R. sphaeroides* と *R. capsulatus* の光合成関連遺伝子の発現制御機構を示した図である。RegB/RegAは二成分制御系のセンサーキナーゼとレスポンスレギュレーターであり、嫌気条件下での光合成関連遺伝子の転写促進に関与する(27-29)。RegBは分子内でのジスルフィド結合の形成や酸化型もしくは還元型ユビキノンの結合により自己リン酸化活性が制御されるレドックスセンサーであり、RegAはDNA結合ドメインを持ち、バクテリオクロフィルやカロテノイドの生合成に関わる遺伝子のプロモーター領域に結合することが報告されている(30-32)。

FnrLはFnrファミリーのタンパク質でDNA結合ドメインを持ち、嫌気条件下での光合成関連遺伝子の転写促進に関与すると報告があるが、このFnrLによる光合成関連遺伝子の転写促進は *R. sphaeroides* のみで見られ、*R. capsulatus* では見られない(33, 34)。

PpsRは光合成遺伝子クラスター(Photosynthetic gene cluster, PGC)内にコードされており、現在知られている紅色光合成細菌はみなPGC内に *ppsR* を持つ(35)。PpsR (*R. capsulatus* ではCrtJと呼ばれる)は光合成関連遺伝子のリプレッサーであることが知られており、嫌気性光合成細菌において *ppsR* を破壊すると好気条件下でも光合成関連遺伝子を発現するようになる(36, 37)。また、*regA* 破壊株や *fnrL* 破壊株では光合成関連遺伝子の発現が常に抑制されるが、これらの株で *ppsR* を破壊すると光合成関連遺伝子を発現するようになることが報告がある(34, 38)。さらに、PpsRと相互作用し、PpsRを不活化させるアンチリプレッサーが存在する。*R. sphaeroides* では、AppAと呼ばれるN末端側に青色光センサーであるblue-light using FADドメインとC末端側にヘム結合ドメインを持つタンパク質が、光と酸化還元状態に応答しPpsRのアンチリプレッサーとして機能すること知られている(39-41)。一方、*R. capsulatus* のゲノム上には *appA* と相同な遺伝子は見られない。*R. capsulatus* ではAerR (PpaAホモログ) がPpsRのアンチリプレッサーとして機能し、AerRはコバラミン結合タンパク質で、アデノシルコバラミンが光加水分解したヒドロキソコバラミンと結合することで光を間接的に感知し、PpsRを不活化すると報告がある(42)。また、*aerR* (*ppaA*) は多くのPGC内で *ppsR* の上流に位置している(43)。しかし、*R. capsulatus* では好気条件下において光が存在しても光合成関連遺伝子の転写は抑制されたままで、発現の抑制が解除されるのは嫌気条件のみである(25)。AerRによるPpsRの活性調節は光に応答した調節であり、現時点で、*R. capsulatus* においてPpsRの活性がどのように酸化還元状態に応答して調節されているかは不明である。

Anaerobic condition

Rhodobacter sphaeroides

Rhodobacter capsulatus

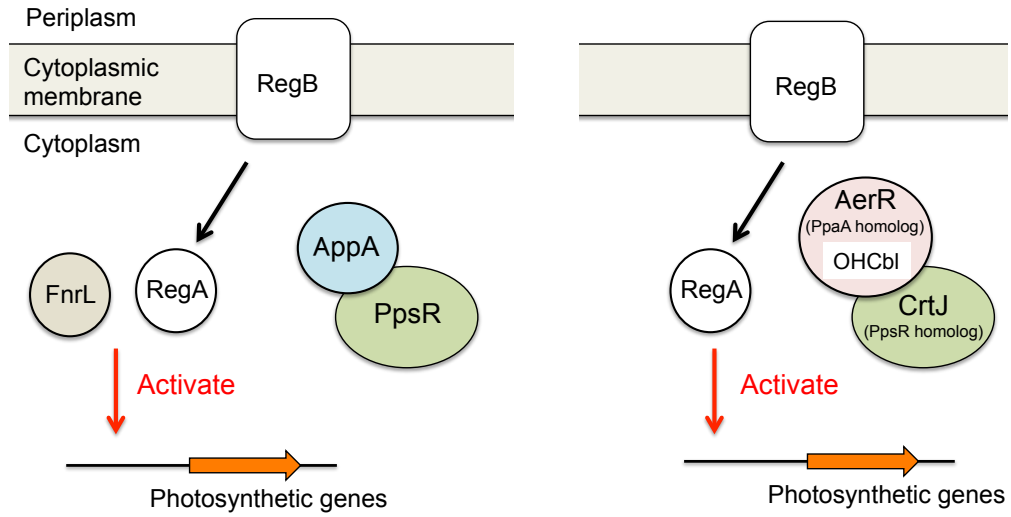


Figure 1-3. Schematic summary of regulation of photosynthetic genes in *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus*. OHCbl; hydroxocobalamin.

第5節【好気性光合成細菌の光合成】

好気性光合成細菌を実験室で培養した時は、光の照射は生育にプラスにもマイナスにも働かず、暗条件と明条件で生育の差は見られない(44)。しかし、好気性光合成細菌の光合成装置を含む膜小胞を用い、光を照射したときのプロトン排出やATP合成を測定すると、光照射に依存したプロトンの排出や、ATP合成が起こることが報告されており、光合成でエネルギー生産できるポテンシャルを持つことは報告されている(45)。また、栄養の無い飢餓条件では光を照射することで生存率が上がることや(44, 46)、光を照射することで最終的なバイオマスが増加することも明らかとなっており(47-50)、光合成を行うことが好気性光合成細菌の生育にプラスに働くことが示唆されている。

一方で、好気性光合成細菌の光合成色素の生産は光によって抑制されるというユニークな制御を受けていることが知られている(51-53)。Table 1-1 は好気性光合成細菌 (*Roseobacter denitrificans* OCh114) と嫌気性光合成細菌 (*Rhodobacter* 属) の光合成の発現条件をまとめたものである。好気性光合成細菌では好気条件の場合、暗条件では光合成を発現するが、近赤外光 (IR) の照射でその発現は抑制され、青色光の照射でより強く抑制される(104)。嫌気条件 (TMAO 呼吸) では青色光照射は好気条件と同様に光合成の発現が強く抑制されるが、IR では抑制されない(54)。嫌気性光合成細菌では好気条件では光合成の発現は強く抑制され(25)、嫌気条件では暗条件でも光合成を発現し青色光やIRの照射によりその発現は促進される(55)。好気性光合成細菌と嫌気性光合成細菌は同じようなPGCを持つにも関わらず、このように光合成の発現条件は大きく異なる。好気条件で光合成装置が発現すると、活性酸素種が生成されることが予想され、好気性光合成細菌で光による抑制が起こるのは、活性酸素種の発生を防ぐためと考えられているが、その詳細な制御機構は不明のままである。

Table 1-1 Expression pattern of photosynthesis in aerobic phototrophic bacteria and anaerobic phototrophic bacteria.

	Aerobic phototrophic bacteria (OCh114)		Anaerobic phototrophic bacteria	
	Aerobic	Anaerobic (TMAO respiration)	Aerobic	Anaerobic
Dark	○	○	×	○
Blue-light	×	×	×	◎
IR	△	○	×	◎

Expression level of photosynthesis: ◎; high, ○; medium, △; low, ×; very low

第 6 節 【OCh114 株のエネルギー代謝と光合成関連遺伝子の発現制御】

Roseobacter denitrificans OCh114 株は好気性光合成細菌で初めて全ゲノムが解読された株である(13)。本菌は光合成、好気呼吸、嫌気呼吸の 3 つのエネルギー生産系を持つ。さらに、好気呼吸では 4 つの末端酸化酵素を持っており、嫌気呼吸では脱窒と TMAO 呼吸を行うことができる。OCh114 株の光合成関連遺伝子の発現条件は Table 1-1 に示した通りで、暗条件では酸素濃度に関係なく光合成関連遺伝子を発現するが、IR や青色光などの光によりその発現は抑制される(102)。また、IR による抑制は嫌気 TMAO 呼吸条件では見られない(54)。

Fig. 1-2 は現在わかっている OCh114 株の光合成制御について示したものである。先行研究で、本菌の *ppsR* 破壊株が作製され、暗条件と近赤色光条件でのトランスクリプトーム解析が行われた(103)。その結果、*ppsR* 破壊株は光合成関連遺伝子を過剰に発現し、近赤外光条件での抑制も見られなくなったことから、本菌でも嫌気性光合成細菌と同様に PpsR が光合成関連遺伝子のリプレッサーであることが示唆された(105)。本菌のゲノム上には *fnrL* と *regAB* ホモログも存在したが、*fnrL* 破壊株と *regA* 破壊株のどちらも、野生株と比較して、光合成関連遺伝子の転写レベルに大きな違いは見られなかった(104)。また、青色光センサードメインを持つと予想された *LOV-HK* 遺伝子 (*RD1-2129*) を破壊したところ、*LOV-HK* 破壊株 ($\Delta LOV-HK$) では暗条件において光合成関連遺伝子の発現が減少した(104)。このことから、*LOV-HK* が光合成関連遺伝子の発現制御に関与することが示されたが、その詳細は明らかとなっていない。また、青色光や近赤外光条件で培養したときの $\Delta LOV-HK$ 株の光合成関連遺伝子の発現レベルは調べられていない。

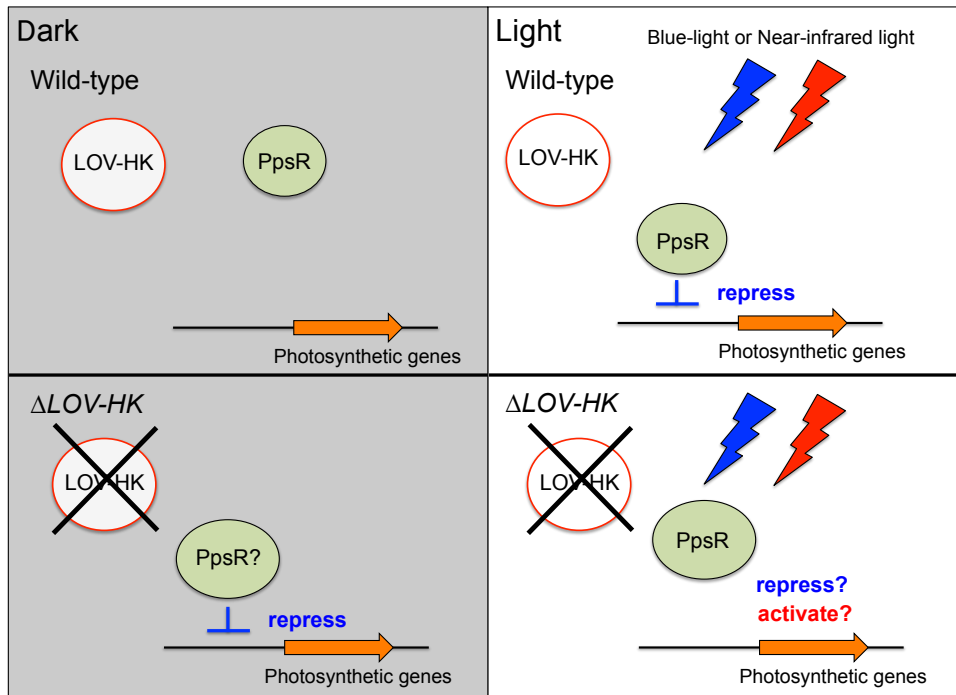


Figure 1-4. Schematic summary of regulation of photosynthetic genes in OCh114 strain.

第 6 節【本研究の目的】

好気性光合成細菌は海洋表層に多く分布していることから、これらの細菌は地球規模の物質循環に関わっていると推測される。海洋表層での優占化において、光合成能をもち、光エネルギーを利用できることは大きな役割をもつと推測される。一方で、好気性光合成細菌は嫌気性光合成細菌と異なり酸素存在下でも光合成を発現するが、その発現は光によって抑制されるという、一見矛盾したユニークな制御機構をもつ。多くの細菌は複数のエネルギー代謝を持ち、それらを環境に応じて使い分けており、その制御機構を知ることはそのエネルギー代謝の役割を明らかにすることに繋がると考えられる。好気性光合成細菌の光合成制御機構を明らかにすることで、好気性光合成細菌がどのようなときに光合成を行い、それがどのようなメリットを生み出すのかといった本菌における光合成の役割が見えてくると考えられる。

そこで本研究では、好気性光合成細菌の光合成制御機構を明らかにすることを目的として、第 2 章では OCh114 株において光合成関連遺伝子発現への関与が示されている LOV-HK について、その光応答性とシグナル伝達方法について調べた結果を述べる。第 3 章では光合成関連遺伝子の抑制解除機構について探索した結果を述べる。これらの結果から、好気性光合成細菌における光合成の制御機構やその役割について考察する。

第2章 LOV-HKによる光合成制御機構の解明

第1節【背景】

LOV (Light, Oxygen, Voltage)ドメインは PER-ARNT-SIM スーパーファミリーの一部であり(56)、その配列は真核生物、アーキア、バクテリアの3つのドメインに存在している(57)。LOVドメインは、植物において青色光照射時にリン酸化されるフォトトロピンというタンパク質で初めて発見された(58)。フォトトロピンは LOV ドメインとセリン/スレオニンキナーゼドメインからなり、植物の青色光によって誘導される葉緑体の運動や気孔の開閉の制御に関与している(59-62)。

LOV タンパク質には FMN, FAD, Riboflavin といったフラビン分子種が発色団として結合し(63-65)、LOV タンパク質に青色光を照射すると、フラビンが青色光を吸収し三重項となり、Fig. 2-1 に示すようにフラビンの C(4a)と LOV ドメイン内のシステイン残基のチオール基との間で共有結合が形成される(66)。形成された共有結合は暗所で自発的に切れ、元に戻るが、このフラビンとシステインの結合の安定性はタンパク質によって様々であり、その半減期が 50 秒や 30 分のもの、2 時間経過しても安定なものも存在する(66, 67)。

LOV タンパク質は一般的に青色光センサーである LOV ドメインと、そのシグナルを伝達するアウトプットドメインからなっている(68)。バクテリアにおいて、アウトプットドメインは多様であるが、約 50%はヒスチジンキナーゼ (HK) をアウトプットドメインとしてもつ LOV-HK であり、約 20%は GGDEF-EAL ドメインをもつ LOV-GGDEF-EAL である。その他にも少数ではあるが、LOV-STAS (sulphate transporter anti-sigma antagonist)、LOV-HTH (helix-turn-helix)や LOV-SpoIIE (sporulation stage II protein E)なども存在する(69)。

LOV-HK は N 末端側に LOV ドメイン、C 末端側に HK ドメインを持つ二成分制御系のヒスチジンキナーゼである。一般的に、ヒスチジンキナーゼは様々な環境の変化を感知しシグナル伝達を行い細胞内外の環境変化のセンサーとして機能すること知られている。現在、いくつかのバクテリアにおいて、光によって誘導される様々な生理機能の変化が LOV-HK によって制御されていることが報告されている。*Caulobacter crescentus* では LOV-HK が光依存的な細胞接着の増強に必要であり、一般的なストレス応答もコントロールしていることが知られている(70, 71)。*Brucella abortus* は人獣共通感染症を引き起こす病原性細菌であるが、この菌では LOV-HK が光に応答して病原性を制御している(67)。*Rhizobium leguminosarum* では光に応答したべん毛タンパク質の生産や細胞外多糖の生産の制御に関わっている(72)。In vitro の実験では、複数の LOV-HK の自己リン酸化活性は光を当てることで上昇することが確認されている(67, 73)。また、*C. crescentus* の LOV-HK は光によって上昇する ATPase 活性が報告されているものの、ATP の添加による自己リン酸化活性は確認されていない(70, 74)。

好気性光合成細菌の光合成は光によって抑制されることに加え、好気性光合成細菌のゲノム上に LOV-HK 遺伝子が比較的保存されていたことから、過去に OCh114 株で LOV-HK 破壊株

($\Delta LOV-HK$ 株) が作製された(102)。 $\Delta LOV-HK$ 株では暗所で培養したときに光合成色素生産が減少し、光合成関連遺伝子の転写レベルも減少していた。このことから $LOV-HK$ が本菌において光合成制御に関わる可能性が示されたが、その詳細な制御機構については不明のままであった(102)。そこで本章では、 $LOV-HK$ による光合成関連遺伝子の発現制御機構を明らかにすることを目的とし、本菌の $LOV-HK$ タンパク質の光応答性と生体での光による光合成抑制との関係性及び $LOV-HK$ のシグナル伝達経路について解析を行なった。

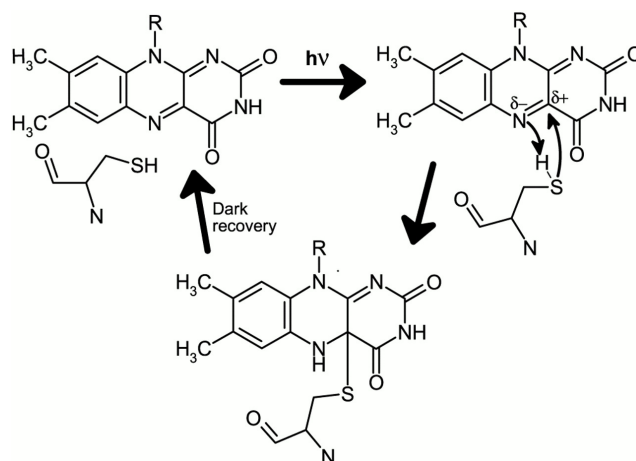


Figure 2-1. Schematic mechanism for cysteine-C(4a) covalent adduct formation in response to light absorption by the LOV domain(75).

第2節【研究材料及び方法】

2-1 用いた細菌と培養条件

使用菌株及びプラスミドは Table 2-3 に示した。大腸菌は LB 培地 (LB 培地, Miller, ナカライテスク) を用いて 37°C で培養した。*R. denitrificans* OCh114 株は 4 mL のグリセロール培地 (Table 2-1) を加えた試験管で 24 から 27 時間培養し、これを前培養液とした。本培養は 100 mL のグリセロール培地が入った 200 mL 容バツフル付き三角フラスコに初期 OD₆₀₀=0.02 となるように前培養液を植菌し、スターラーバーで攪拌しながら好氣的に培養した。暗条件の培養では三角フラスコをアルミホイルで包み遮光した。青色光条件では青色 LED (MIL-B18, SANYO) を 43 W/m² の放射照度で照射した。接合伝達による形質転換では 1.5%寒天を含むグリセロールセレクション培地 (Table 2-2) をセレクションのときに使用した。大腸菌に対して使用した抗生物質は、アンピシリン; 50 µg/ml、カナマイシン; 30 µg/ml、ゲンタマイシン; 15 µg/ml の濃度で使用した。*R. denitrificans* OCh114 株に対しては、寒天培地上で形質転換体のセレクションを行うときは、カナマイシン; 600 µg/ml、ゲンタマイシン; 60 µg/ml、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシン; 25 µg/ml の濃度で使用し、液体培地で培養するときは、カナマイシン; 300 µg/ml、ゲンタマイシン; 30 µg/ml、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシン; 25 µg/ml の濃度で使用した。

Table 2-1. Glycerol medium

NaCl	20 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5 g
KCl	0.5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.5 g
Na ₂ SO ₄	2 g
NaHCO ₃	0.2 g
Ferric citrate	0.1 g
Yeast extract	2 g
Polypeptone	1 g
Casamino acids	1 g
Glycerol	1 g

	Filled up to
Ion Exchange Water	1 L

Adjust pH 7.5 (NaOH)	

Table 2-2. Glycerol-selection medium

NaCl	20 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5 g
KCl	0.5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.5 g
Na ₂ SO ₄	2 g
Na ₂ CO ₃	2.1 g
Ferric citrate	0.1 g
Yeast extract	2 g
Polypeptone	1 g
Casamino acids	1 g
Glycerol	1 g

	Filled up to
Ion Exchange Water	1 L

Adjust pH 9.5 (NaOH)	

Table 2-3. Bacterial strains and plasmids used in the 2nd chapter.

Strain or plasmid	Description or construction	Source or reference
Strains		
<i>R. denitrificans</i>		
OCh114	Wild-type	104
Δ LOV-HK	OCh114 LOV-HK : : Ω Sm/Sp ^r	104
+LOV	Δ LOV-HK/pHRP-LOV	This study
+C69A	Δ LOV-HK/pHRP-C69A	This study
+H226A	Δ LOV-HK/pRK-H226A	This study
+H266A	Δ LOV-HK/pRK-H266A	This study
Δ phyR	OCh114 phyR : : Ω Sm/Sp ^r	This study
<i>E. coli</i>		
JM109	Cloning strain	98
S17-1	For conjugal transfer of plasmids: recA thi pro hasdRM+ RP4:2-Tc:Mu:Km:TnZ	99
BL21 (DE3)	Strain used for heterologous expression	100
Plasmids		
pUC18	Cloning vector, Amp ^r	98
pUCPrpoD1	pUC18 XbaI-BamHI site : : rpoD promoter, Amp ^r	This study
pHRP309	broad host range vector, Gm ^r	101
pRKKM	pRK415 Psp1406I site : : neo gene from pUC119KM, Tc ^r -, Km ^r +	104
pHRP-LOV	pHRP309 : : rpoD promoter LOV-HK fusion	This study
pHRP-C69A	pHRP309 : : rpoD promoter LOV-HK (C69A) fusion	This study
pRK-H226A	pRKKM : : rpoD promoter LOV-HK (H226A) fusion	This study
pRK-H266A	pRKKM : : rpoD promoter LOV-HK (H266A) fusion	This study
pLO1	Mobilizable suicide vector: Km ^r , sucB	102
pPS Ω Smr	pPS854 EcoRI-EcoRV site : : Ω Sm/Sp ^r , Amp ^r	104
pLOphyR	pLO1 containing upstream of phyR, Ω Sm/Sp ^r and downstream of phyR	This study
pMAL-c5X	Heterologous expression plasmid, maltose binding protein tag, Amp ^r	New England Biolabs
pET21a (+)	Heterologous expression plasmid, His6 tag, Amp ^r	Novagen
pMAL-LOV-HK	pMAL-c5x : : LOV-HK	This study
pMAL-C69A	pMAL-c5x : : C69A	This study
pET-LOV-HK	pET21 : : LOV-HK	This study

2-2 野生型 LOV-HK と各 LOV-HK 変異体の異種発現と精製

マルトースバインディングプロテイン(MBP)融合 LOV-HK の異種発現と精製

使用したプライマーの配列は Table 2-4 に示した。LOV-HK 遺伝子は MBP-LOV-HK-L と MBP-LOV-HK-R プライマーを用いて PCR で増幅した。増幅した PCR 産物を pUC18 にクローニングしてシーケンス解析を行なった。エラーが生じていないことを確認した後、NdeI と SacI で処理し、その断片を pET-28a(+)へ挿入した。pET28-LOV-HK プラスミドを *Escherichia coli* BL21(DE3)へ導入し、N 末端に His タグが融合した LOV-HK を発現させたが、LOV-HK は封入体となった。そこで、タンパク質の可溶性を上昇させることが知られている MBP との融合タンパク質として発現させるため、pET28-LOV-HK を NdeI と SalI で処理し、pMAL-c5X 導入し、pMBP-LOV-HK を作製した。C69A 変異体遺伝子は MBP-LOV-HK-L と MBP-LOV-HK-R プライマー及び LOV-C69A-F と LOV-C69A-R を使用して PCR で増幅した。増幅した PCR 産物は pUC18 にクローニングしてシーケンス解析を行ない、目的の塩基が変わっていること及びエラーが生じていないことを確認した。その後、NdeI と SalI で処理し、その断片を pMAL-c5X 導入し、pMBP-C69A を作製した。

E. coli BL21(DE3)に pMBP-LOV-HK または pMBP-C69A を導入し、N 末端に MBP タグが融合したタンパク質を発現させた。*E. coli* BL21 (DE3)/pMBP-LOV-HK または *E. coli* BL21 (DE3)/pMBP-C69A を 50 µg/mL のアンピシリンを添加した LB 培地に植菌し、37°C で OD₆₀₀ が 0.6 から 0.7 になるまで培養した。その後、0.1 mM IPTG を添加して 37°C で 2 時間培養した後菌体を回収し、-80°C で保存した。保存した菌体は 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)バッファーで懸濁し、超音波により破碎した。破碎後、65,000 × g で 5 分遠心することで未破碎菌体を取り除いた。その後、4°C、100,000 × g で 1 時間遠心することで可溶性画分を得た。得られた可溶性画分を吸着バッファー(20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA)で平衡化した 2 mL のアミロースレジンカラムに供した。カラムの 5 倍量の吸着バッファーで洗浄後、カラムの 3 倍量の溶出バッファー(20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM maltose)で溶出した。溶出したサンプルを Vivaspin で濃縮し精製 MBP-LOV-HK または精製 MBP-C69A とした。

His タグ融合 LOV-HK の異種発現と精製

使用したプライマーの配列は Table 2-4 に示した。LOV-HK 遺伝子は MBP-LOV-HK-L と His-LOV-HK-R プライマーを用いて PCR で増幅した。増幅した PCR 産物は pUC18 にクローニングしてシーケンス解析を行なった。エラーが生じていないことを確認した後、NdeI と XhoI で処理し、その断片を pET-21a(+)へ挿入し、pET-LOV-HK を得た。N156H 変異体遺伝子は MBP-LOV-HK-L と His-LOV-HK-R プライマー及び LOV-N156H-F と LOV-H156H-R を使用して PCR で増幅した。増幅した PCR 産物は pUC18 にクローニングしてシーケンス解析を行ない、目的の塩基が変わっていること及びエラーが生じていないことを確認した。その

後、NdeI と XhoI で処理し、その断片を pET-21a(+)導入し、pET-N156H を作製した。

pET21-LOV-HK プラスミドを *E. coli* BL21(DE3)へ導入し、C 末端に His タグが融合した LOV-HK を発現させた。*E. coli* BL21 (DE3)/pET21-LOV-HK を 50 µg/mL のアンピシリンを添加した LB 培地に植菌し、37°C で OD₆₀₀ が 0.6 から 0.7 になるまで培養した。その後、0.1 mM IPTG を添加して 18°C で一晩培養した後、菌体を回収し、-80°C で保存した。保存した菌体は 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)バッファーで懸濁し、超音波により破碎した。破碎後、65,000 × g で 5 分遠心を行うことで未破碎菌体を取り除いた。その後、4°C、100,000 × g で 1 時間遠心を行うことで可溶性画分を得た。得られた可溶性画分を吸着バッファー(20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM イミダゾール, 200 mM NaCl)で平衡化した 2 mL の Ni Sepharose 6 Fast Flow カラムに供した。カラムの 5 倍量の吸着バッファーで洗浄後、カラムの 3 倍量の溶出バッファー(20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM イミダゾール, 200 mM NaCl)で溶出した。溶出したサンプルを Vivaspin で 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)バッファーに置き換え、濃縮し精製 LOV-HK-His とした。

Table 2-4. Primers used in the 2nd chapter.

Name	Sequence 5'→3'
MBP-LOV-HK-L	TACGAATTCCATATGGCAGATACGAATACGAAAAC
MBP-LOV-HK-R	AGTCAGTTGAGCTCAAGTCCTATCCTATTCGGTGA
His-LOV-HK-R	ACTGCTGCAGCTCGAGTTCGGTGACCGACGCGCC
LOV-C69A-F	GGCGTAATGCCCGCTTCCT
LOV-C69A-R	AGGAAGCGGGCATTACGCC
LOV-N156H-F	GAAGTGCAACATCGGGTTCAA
LOV-N156H-R	TTGAACCCGATGTTGCACTTC
exLOV-HK-L	AGTCGGTACCAAGGGCCGCGTAAGGCG
exLOV-HK-R	AGTCGAATTCTCCCAAGGCATAAAAGTCCT
PrpoD2	GATGGATCCTGATGTACCCCTTC
PrpoD3	AGATCTAGAAAAGCTCAGTGCAACC
LOV-H226A-F	GATTGCCGCAACGGAAGG
LOV-H226A-R	CCTTCCGTTGCGGCAATC
LOV-H266A-F	CGTTTCAGGCAGCGTTTGAA
LOV-H266A-R	TTCAAACGCTGCCTGAAACG
QrpoD-R	GTTTCGCCTCTACCATTTCTTCT
QrpoD-L	GCCAATACGTGGGTCTCGAT
QbchC-R	ACAGACCAAAGGCACCGTCA
QbchC-L	CGAGGTGGTTGAGGCTGACA
u2463-F	ACTGAGAGCTCCCTTTTCAGTGATGGCGAGC
u2463-R	ACTGATCTAGAGCGCATAACGGCGAAGATAG
d2463-F	ACTGATCTAGATGAGCCAGGCGATGTTCTTT
d2463-R	AGTCAGTCGACGCTCTTTTCGATGCGGTGTC

2-3 フラビンの抽出と TLC 解析

タンパク質量が 400 μg の精製 MBP-LOV-HK に終濃度 70%になるようにエタノールを加え、100°C で 2 分間加熱した。その後、直ちに氷上で冷却し、濃縮遠心機を用いて遮光、室温条件で液体を蒸発させた。蒸発させた後、20 μL の 35%エタノールに溶解し、これをフラビン抽出液とした。

TLC 解析では標準試料として 100 μM リボフラビン、FMN、FAD をそれぞれ 2 μL と、フラビン抽出液を 1, 2, 4, 8 μL それぞれアプライした。n-butanol/酢酸/dH₂O を 3:1:1 (vol/vol/vol) の割合で混合したものを展開液として利用し、展開後は UV を照射しバンドを検出した。

2-4 吸収スペクトル解析

精製 MBP-LOV-HK を石英キュベットに入れ、室温で白色光 (30 W/m²) を 10 分間照射した。照射後、直ちに HITACHI U-2910 分光光度計で吸収スペクトルを測定した。その後、キュベットは室温・暗所で保存し、10, 30, 60, 120, 150 分後に吸収スペクトルを測定した。光誘導の吸収スペクトル変化の測定では、暗所で 150 分間保存したサンプルに室温で白色光 (30 W/m²) を照射し、1 分ごとに吸収スペクトルを測定した。青色光または近赤外光照射による吸収スペクトルの変化を見るときは精製 MBP-LOV-HK を暗所で 2 時間以上インキュベートした後に各光を照射し吸収スペクトルを測定した。青色光または近赤外光はそれぞれ 45 W/m²、30 W/m² の放射照度で 10 分間照射した。

2-5 恒常発現プラスミドを使用した相補実験

使用したプライマーの配列は Table 2-4 に示した。LOV-HK 遺伝子は exLOV-HK-L と exLOV-HK-R プライマーを用いて PCR で増幅した。C69A の点変異体遺伝子の増幅には、exLOV-HK-L と exLOV-HK-R に加えて、LOV-C69A-F と LOV-C69A-R を用いて PCR を行なった。増幅した PCR 産物は pUC18 にクローニングしてシーケンス解析を行ない、エラーが生じていないこと及び目的の変異が入っていることを確認した。過去のトランスクリプトーム解析の結果から、OCh114 株で恒常発現していた rpoD (RD1-1794) のプロモーター領域 (上流 375 bp 及び内部 124 bp) を恒常発現プロモーターとして利用した。rpoD プロモーターは PrpoD2 と PrpoD3 プライマーを用いて PCR で増幅した。増幅した PCR 産物は pUC18 の XbaI と BamHI サイトにクローニングしてシーケンス解析を行ない、エラーが生じていないことを確認し、このプラスミドを pUCPrpoD1 とした。

クローニングで得られた各プラスミドをそれぞれ EcoRI と KpnI で処理し、LOV-HK または LOV-HK-C69A 遺伝子断片を pUCPrpoD1 プラスミドの rpoD プロモーター下流の EcoRI と KpnI サイトに挿入した。その後、EcoRI と XbaI で処理することで rpoD プロモーターと LOV-HK または LOV-HK-C69A 遺伝子が融合した断片を得て、これを広域宿主プラスミドである pHRP309 へ導入し、pHRP-LOV-HK、pHRP-C69A とした。pHRP-LOV-HK と

pHRP-C69A で *E. coli* S17-1 を形質転換し、その後、接合伝達により $\Delta LOV-HK$ へ導入した。

H226A の点変異体遺伝子の増幅には、exLOV-HK-L と exLOV-HK-R に加えて、LOV-H226A-F と LOV-H226A-R を用いて PCR を行なった。H266A の点変異体遺伝子の増幅には、exLOV-HK-L と exLOV-HK-R に加えて、LOV-H266A-F と LOV-H266A-R を用いて PCR を行なった。増幅した PCR 産物はそれぞれ pUC18 にクローニングしてシーケンス解析を行ない、エラーが生じていないこと及び目的の変異が入っていることを確認した。クローニングで得られたプラスミドを EcoRI と KpnI で処理し、LOV-HK-H226A または LOV-HK-H266A 遺伝子断片を調整し、pUCPrpoD1 ベクターの rpoD プロモーター下流の EcoRI と KpnI サイトに挿入した。その後、EcoRI と XbaI で処理することで rpoD プロモーターと *LOV-HK-H266A* または *LOV-HK-H266A* 遺伝子が融合した断片を得て、これを広域宿主プラスミドである pRKKM へ導入し、pRK-H226A、pRK-H266A とした。pRK-H226A と pRK-H266A で *E. coli* S17-1 を形質転換し、その後、接合伝達により $\Delta LOV-HK$ へ導入した。

2-6 光合成色素の定量

野生株、 $\Delta LOV-HK$ 、野生型 *LOV-HK* 相補株及び *LOV-HK-C69A* 変異体相補株を 100 mL のグリセロール培地で好氣的に対数増殖期後期まで培養した。その後菌体を回収し、アセトン/メタノール法(53)を用いて光合成色素を定量した。各菌体は $6,500 \times g, 5 \text{ min}, 4^\circ\text{C}$ で集菌し、5 mL の 2% NaCl PBS バッファー (2% (w/v) NaCl, 1.5mM KH_2PO_4 , 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , pH7.4) で 2 回洗浄した。洗浄後の菌体 を 2% NaCl PBS バッファーで懸濁し、これを細胞懸濁液とした。細胞懸濁液 1 mL を $13,000 \times g, 1 \text{ min}, 4^\circ\text{C}$ で集菌し 20 μL の脱イオン水で再懸濁した。このサンプルに 1 mL のアセトン/メタノール (7:2) を添加し、良く懸濁した後 $13,000 \times g, 1 \text{ min}, 4^\circ\text{C}$ で遠心し上清を回収した。回収した上清の 400 ~ 800 nm の吸収スペクトルを HITACHI U-2910 分光光度計で測定した。得られた吸収スペクトルを細胞懸濁液タンパク質量でノーマライズし、タンパク質 1mg あたりの値を算出した。

バクテリオクロフィルの定量では OD_{775} の吸光係数=0.457 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) とし(25)、以下の式から算出した。カロテノイドの定量ではバクテリオクロフィル由来の吸収を考慮した corrected OD_{510} と corrected OD_{456} の値を使用して以下の式から算出した。

$$\text{Bacteriochlorophyll } (\mu\text{g}/\text{mL}) = \frac{\text{OD}_{775} \times 10}{0.457}$$

$$\text{Carotenoid } (\mu\text{g}/\text{mL}) = (\text{corrected } \text{OD}_{510} \times 0.692 - \text{corrected } \text{OD}_{456} \times 0.0728) \times 10$$

$$\text{Corrected } \text{OD}_{510} = \text{OD}_{510} - \text{OD}_{775} \times 0.05$$

$$\text{Corrected } \text{OD}_{456} = \text{OD}_{456} - \text{OD}_{775} \times 0.1$$

2-7 RNA 抽出

各株を好気条件で培養し、対数増殖期初期である OD₆₀₀ が 0.4 から 1.5 の間で培養液をサンプリングし、直ちに培養液の 2 倍量の RNA Protect Bacteria Reagent (QIAGEN) を加え、攪拌し RNA の分解を防いだ。攪拌後、5,000 × g、4°C、10 min 遠心をして上澄みを除去し、沈殿を回収した。すぐに RNA を抽出しない場合はその沈殿を -20°C で保存した。沈殿に 5 mg/mL リゾチーム (TE, pH 8.0) を 200 μL 加え室温で 5 分インキュベートした後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA は RNase free - DNase (RQ1DNase, Promega) を加え、37°C で 30 分インキュベート後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を精製し、Total RNA を得た。total RNA 溶液の RNA 濃度は A260 の値から算出した。

2-8 qRT-PCR

逆転写は ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて行ない、180 μg の total RNA をテンプレートとした。ゲノム DNA 除去反応として 37°C で 5 分インキュベートした後、逆転写反応として 37°C で 15 分インキュベートし、さらに 50°C で 5 分インキュベートした。その後、98°C で 5 分インキュベートすることで酵素を失活させた。

qPCR は THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO) を用いてサンプルを調製し、LightCycler 96 (Roche) を用いて行なった。初期変性として 95°C で 30 秒インキュベートした後、95°C で 5 秒、60°C で 20 秒、72°C で 30 秒を 50 サイクルの 3 ステップ PCR を行なった。9 μg の total RNA から逆転写した cDNA をテンプレートとした。

rpoD は QrpoD-R と QrpoD-L、*bchC* は QbchC-R と QbchC-L プライマーをそれぞれ用いた。使用したプライマーの配列は Table 2-4 に示した。*rpoD* (RD1-1794) はハウスキーピング遺伝子として利用した。

2-9 ウェスタンブロット

培養した菌体を対数増殖期で回収し、2%NaCl PBS で 2 回洗浄した。その後、菌体を 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液に懸濁し、超音波で 10 分間処理し破碎した。破碎後、未破碎菌体を除くため 13,000 xg、4°C で 1 分遠心をして上澄みを回収し、これを無細胞抽出液とした。8 または 15 μg のタンパク質を SDS-PAGE により分離し、ゲル中のタンパク質を PVDF 膜に転写した。

一次抗体は大腸菌で異種発現・精製した LOV-HK-His を抗原としてウサギで作製した。二次抗体は Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch 社) を使用した。2%スキムミルク TBST にタンパク質を転写した PVDF 膜を浸し 4°C で一晩静置してブロッキングした。ブロッキング後、TBST で 2 回洗浄後、一次抗体を含む 0.3%スキムミルク (1:200) に膜を浸し室温で浸透しながら 3 時間インキュベートし

た。一次抗体反応後、TBST で 2 回洗浄後、二次抗体反応を行なった。二次抗体 (Jackson ImmunoResearch 社, Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)) を含む 0.3% スキムミルク (1:2000) に膜を浸し室温で浸透しながら 1 時間インキュベートした。TBST で 2 回洗浄後 Tween 20 を含まない TBST で一度洗浄して発色液に浸し H₂O₂ を加え発色させた。

2-10 *phyR* (RD1-2463) 破壊株の作製

使用したプライマーの配列は Table 2-4 に示した。*phyR* 遺伝子上流 1073 bp (u2463 とする) 及び *phyR* 遺伝子下流 1032 bp (d2463 とする) はプライマー u2463-F と u2463-R 及び d2463-F と d2463-R を用いて PCR により増幅した。増幅した PCR 産物は pEX18 にクローニングしてシーケンス解析を行いエラーが生じていないことを確認した。各 DNA 断片をクローニングしたプラスミドを XbaI と SalI で処理し、d2463 断片を pEXu2463 に挿入して pEXud2463 を得た。pEXud2463 と pPSΩSm^r を XbaI で処理し、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性遺伝子を pEXud2463 上の u2463 と d2463 の間に挿入し、pEXud2463Sm を得た。pEXud2463Sm と pLO1 をそれぞれ SacI と SalI で処理し、u2463、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性遺伝子と d2463 を含む断片を pLO1 へ挿入し、pLO1Δ2463Sm を得た。pLO1Δ2463Sm で *E. coli* S17-1 を形質転換し、その後、接合伝達により WT へ導入した。導入後、セレクトションプレートでストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性をもつコロニーを取得し、PCR により *phyR* 遺伝子が破壊されていることを確認し、Δ*phyR* 株を得た。

2-11 自己リン酸化反応

精製 LOV-HK 及び精製 LOV-HK-N156H は暗所で保存し暗状態にした後、自己リン酸化反応に用いた。20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 4 mM ATP に 10 μM 精製 LOV-HK または LOV-HK-N156H を加え、暗所または白色光を照射しながら 40 分間室温でインキュベートした。ATP 非添加のサンプルではその代わりに緩衝液を加えた。その後、3 × SDS-PAGE サンプルバッファー (195 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.01% bromophenol blue, 6% SDS, 30% glycerol, 15% 2-mercaptoethanol) を添加し、反応を停止させた。

2-12 Phos-tag SDS-PAGE

リン酸化タンパク質の検出は Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE により行なった。濃縮ゲル及び分離ゲルの組成は Table 2-5 と Table 2-6 に示した。泳動バッファーには 0.10 M Tris-MOPS (pH7.8), 0.1% SDS, 5 mM NaHSO₃ を用いた。20 μM または 50 μM Phos-tag を含む 8% ゲルを用いて泳動を行なった。リン酸化ヒスチジンは熱に不安定であるため、サンプルは基本的に 3 × SDS-PAGE サンプルバッファーを添加後、熱処理を行わずに直ちに泳動した。熱処理を行う場

合は 100°C で 5 分間加熱した。

Table 2-5. Separating gel of Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE.

	20 μM Phos-tag	50 μM Phos-tag
30% Acrylamide Solution (30% T, 3.3% C)	1.07 mL	1.07 mL
1.4 M Bis-Tris/HCl (pH6.8)	1 mL	1 mL
10 mM ZnCl ₂	16 μL	40 μL
5 mM Phos-tag	16 μL	40 μL
Distilled water	1.864 mL	1.816 mL
TEMED	4.5 μL	4.5 μL
10% Ammonium peroxodisulfate	30 μL	30 μL
Total	4 mL	4 mL

Table 2-6. Stacking gel of Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE.

30% Acrylamide Solution (30% T, 3.3% C)	0.3 mL
1.4 M Bis-Tris/HCl (pH6.8)	0.5 mL
Distilled water	1.19 mL
TEMED	2 μL
10% Ammonium peroxodisulfate	10 μL
Total	2 mL

2-13 好気条件と嫌気条件での青色光照射による *bchC* 転写レベルの変化

野生株は 100 mL グリセロール培地に植菌し、好氣的に暗条件で対数増殖期まで培養した。対数増殖期に入ったらサンプリングをし、これを照射前のサンプルとした。その後、培養液 5mL を気相がアルゴンに置換されたバイアル瓶（嫌気条件）と特に気相を置換していないバイアル瓶（好気条件）にそれぞれ分注した。好気条件のバイアル瓶は蓋をせずに、空気が出入りできる状態とした。バイアル瓶にはスターラーバーを入れておき、スターラーで攪拌させながら 30°C で 30 分間青色光（43 W/m²）を照射し、各サンプルのサンプリングを行った。

第3節【結果】

3-1 LOV-HK の光応答性と光合成制御との関係

3-1-1 LOV-HK の発色団

LOV タンパク質はフラビンを発色団として持ち、LOV ドメイン内に非共有結合的に結合している。OCh114 株の LOV-HK もフラビンを保有しているのか、また、どの種のフラビンを持つのかを明らかにするために、大腸菌で異種発現・精製した MBP-LOV-HK よりフラビンを抽出し TLC 解析を行なった。

フラビン抽出液に加えてリボフラビン、FMN、FAD を標準物質として展開した (Fig. 2-2)。リボフラビン、FMN、FAD の R_f 値はそれぞれ 0.58, 0.21, 0.08 であり、フラビン抽出液でみられたスポットの R_f 値は 0.22 であった。この結果より、本菌の LOV-HK は FMN を発色団として持つことが示された。

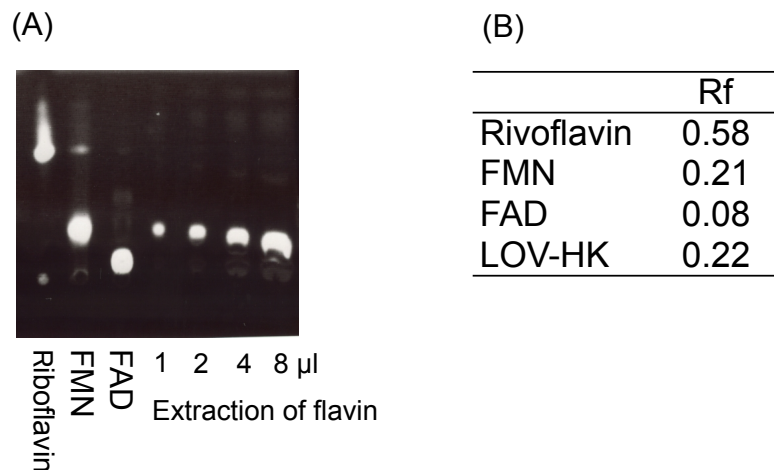


Figure 2-2. Identification of flavin chromophore within purified MBP-LOV-HK by TLC analysis. (A) A picture of TLC plate. Flavin was extracted from purified MBP-LOV-HK and dissolved in 35% ethanol. n-butanol/acetic acid/ water. 3:1:1 was used as solvent. Flavin was detected by irradiation of ultraviolet light. (B) R_f values of flavin standards and flavin extract from MBP-LOV-HK.

3-1-2 LOV-HK の光照射によるスペクトル変化

精製 LOV-HK に白色光を 10 分間照射した後、吸収スペクトルを測定したところ、380 nm 付近に幅広い吸収が見られた (Fig. 2-3A)。この 380 nm の吸収はフラビンの C(4a) の炭素とシステイン残基が共有結合を形成したときに見られる吸収の特徴と一致する。その後、サンプルを暗所でインキュベートし、各時間で吸収スペクトルを測定したところ、370 nm と 450 nm 付近の幅広い吸収が徐々に現れ、約 2 時間で吸収の変化は見られなくなった。Fig. 2-3C と 2-3D

は、精製 LOV-HK の明状態から暗状態へのスペクトルの変化を 450 nm の吸収の変化でみたものである。本菌の LOV-HK の明状態の半減期は約 31 分であり、これは、*Erythrobacter litoralis* の LOV-HK (EL346 と EL368) と同様の性質であった(67)。また、暗状態となった LOV-HK に再度白色光を照射すると 1 分間の照射で 370 nm と 450 nm の吸収は大きく減少し、再び明状態のスペクトルへと変化した (Fig. 2-3B)。これらの結果より、本菌の LOV-HK は可逆的な光応答性を示すタンパク質であることが示された。

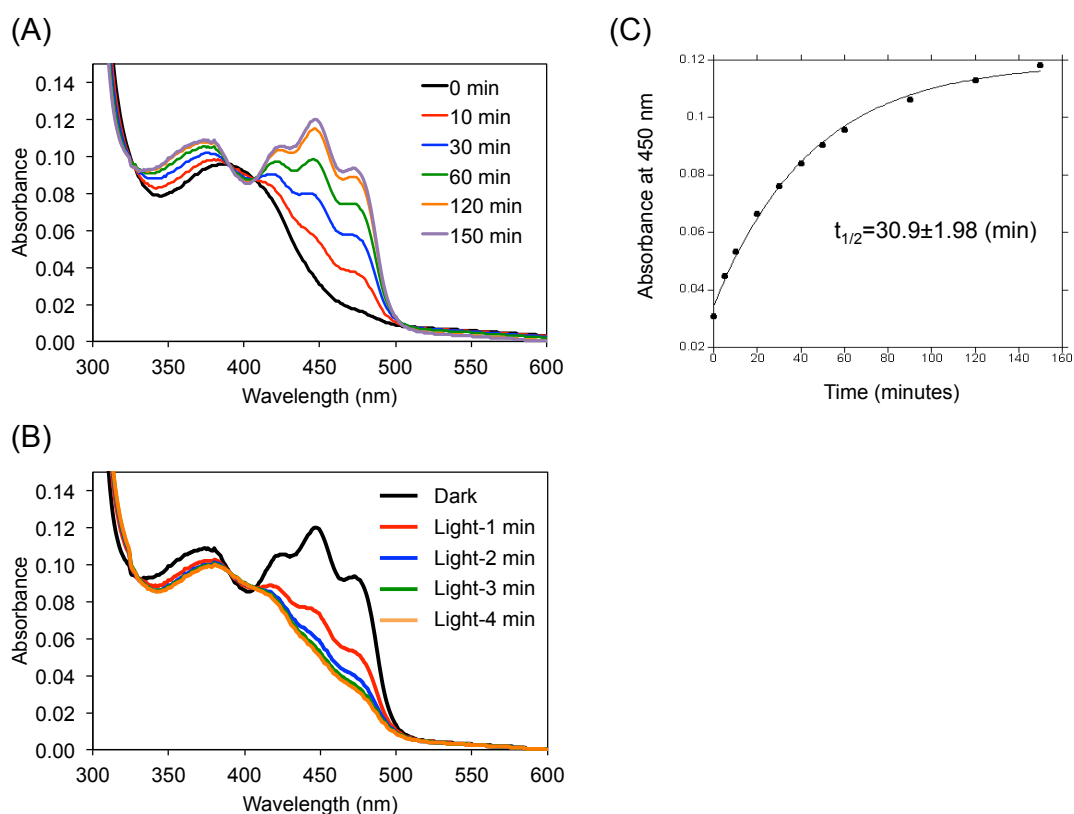


Figure 2-3. Absorption changes of MBP-LOV-HK. (A) Dark recovery of MBP-LOV-HK after light excitation. After light excitation, the sample was incubated in the dark and the spectra were collected at each time points (10, 30, 60, 120 and 150 min).The protein concentration was 2.83 mg/ml. (B) Light-induced absorption change of MBP-LOV-HK. (C) Monitoring the increase of absorbance at 450 nm during the incubation in the dark. The half-life was calculated from the data shown in the panel C.

本菌では、培養時に青色光だけでなく近赤外光（IR）の照射でも光合成関連遺伝子の転写が抑制されることが分かっていたため、IRの照射で青色光と同じような変化がみられるか確認した（Fig. 2-4）。IRの照射では吸収スペクトルは暗状態のままでありシステイン残基とフラビンの共有結合は形成されないことが示唆された。Blue-lightの照射では白色光を照射したときと同様に、380 nm 付近に幅広い吸収がみられシステイン残基とフラビンの間で共有結合が形成されたと考えられる。

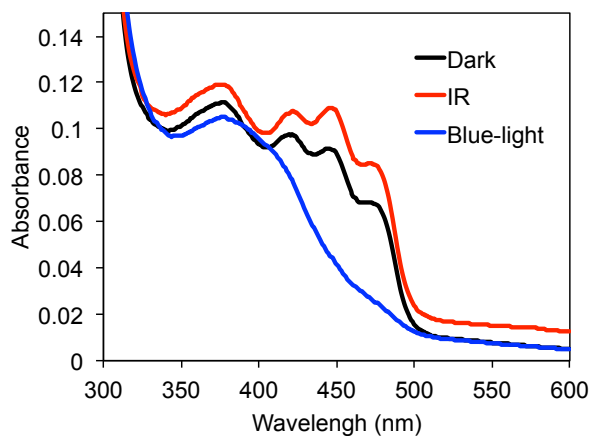


Figure 2-4. Effect of excitation of blue-light and near infrared light. Absorption spectra of MBP-LOV-HK were measured after blue-light or near infrared light excitation.

3-1-3 光応答に必要なシステイン残基の特定

本菌の LOV-HK でも一般的な LOV ドメインと同様の光照射によるフラビンとシステイン残基の共有結合形成が確認された。そこで、共有結合を形成するシステイン残基を特定するために、OCh114 株の LOV-HK と *E. litoralis* (EL346 と EL368)、*B. melitensis* (B. mel)、*R. leguminosarum* (R. leg)、*C. crescentus* (C. cre)、*Xanthomonas axonopodis* (X. axo)、*Pseudomonas syringae* (P. syr) の LOV-HK のアミノ酸配列を用いてアライメントを作製した。Fig. 2-5 は作製したアライメントの LOV ドメインの部分抜粋したものである。光照射によってフラビンと共有結合を形成するシステイン残基 (黄色) は LOV ドメイン内で保存されており、OCh114 株の LOV-HK でも同様に保存されており、Cys69 がその残基であった。このことから、本菌の LOV-HK では Cys69 が光照射によりフラビンと共有結合を形成するシステイン残基であると推測された。

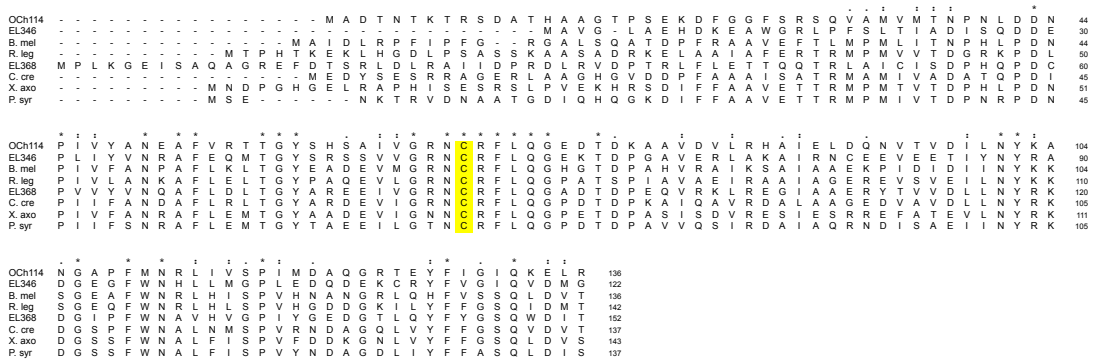


Figure 2-5. Sequence alignment of the LOV domain of LOV-HKs from various organisms. Yellow box denotes conserved cysteine residue.

そこで、Cys69 を Ala に置換した C69A 変異体を異種発現、精製し、光照射による吸収スペクトルの変化を調べた (Fig. 2-6)。C69A 変異体は 350 nm と 450 nm にフラビンに由来すると考えられる吸収が見られ、非共結合的なフラビンの結合は維持されていた。このことから、C69A の変異は非共有的なフラビンの結合には影響を与えていないと考えられる。

C69A 変異体に白色光を 10 分または 30 分間照射したが、野生型 LOV-HK でみられたようなフラビンとシステインの共有結合の形成に由来する吸収スペクトルの変化は見なかった。この結果から、本菌の LOV-HK では Cys69 が光を照射したときにフラビンと共有結合を形成するシステイン残基であることが示された。

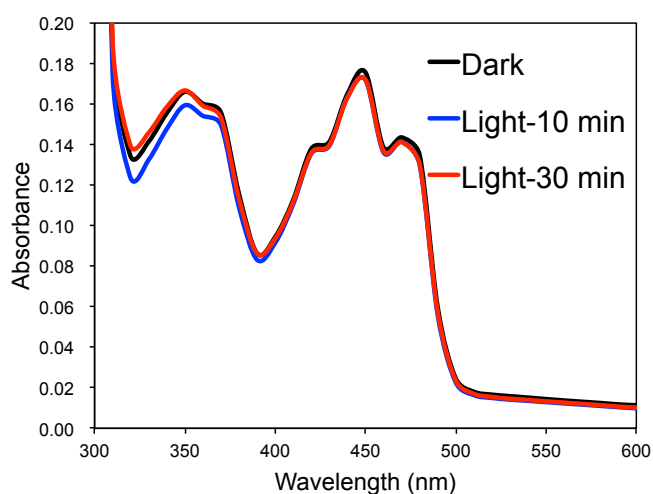


Figure 2-6. Absorption spectra of MBP-LOV-HK-C69A after light excitation. After the sample was exposed to light for 10 or 30 min, the absorption spectra was measured.

3-1-4 野生型 *LOV-HK* と *LOV-HK-C69A* 変異体相補株の解析

本菌の光合成関連遺伝子の転写は青色光照射によって大きく抑制される。この青色光による転写抑制と *LOV-HK* の光応答性との関連を調べるため、 Δ *LOV-HK* 株に野生型 *LOV-HK* または *LOV-HK-C69A* 変異体の相補実験を行なった。これら二つの相補株の間で、青色光条件で培養したときに光合成色素生産及び光合成関連遺伝子の転写レベルに違いが見られるのかを調べた。

Fig. 2-7A は各株を暗条件または青色光条件で培養した細胞から抽出した光合成色素の吸収スペクトルを示している。暗条件で培養した野生株の細胞では、バクテリオクロロフィル (BChl) に由来する 800 nm 付近の吸収とカロテノイド (Crt) に由来する 500 nm 付近の吸収が確認できるが、青色光条件で培養したものでは BChl と Crt のどちらの吸収も確認できなかった。 Δ *LOV-HK* 株を暗条件で培養したときの細胞では、BChl と Crt のどちらの吸収も見られるが、野生株と比べるとその吸収は僅かだった。また、青色光条件で培養した Δ *LOV-HK* 株の細胞では野生株と同様に BChl と Crt のどちらの吸収も確認できなかった。

暗条件で培養した野生型 *LOV-HK* 相補株 (+*LOV-HK* 株) と *LOV-HK-C69A* 変異体相補株 (+*C69A* 株) の細胞では、どちらの株でも BChl の吸収と Crt の吸収が確認でき、*LOV-HK* を破壊することでみられた暗条件での光合成色素の減少は野生型 *LOV-HK* または *LOV-HK-C69A* 変異体を相補することで回復した (Fig. 2-7A)。どちらの相補株も BChl と Crt の量は野生株より少ない傾向にあったが、相補株間では大きな差はみられなかった (Fig. 2-7B)。

もし、野生株において見られた青色光照射による光合成色素生産の抑制が *LOV-HK* によって制御されているとすると、青色光に応答できる野生型 *LOV-HK* の相補株と青色光に応答することができない *LOV-HK-C69A* 変異体の相補株では、青色光条件で光合成色素生産に違いがみられることが予想された。しかし、+*LOV-HK* 株と +*C69A* 株の光合成色素生産は青色光条件で違いは見られず、どちらの株も光合成色素を生産しなかった (Fig. 2-7A)。

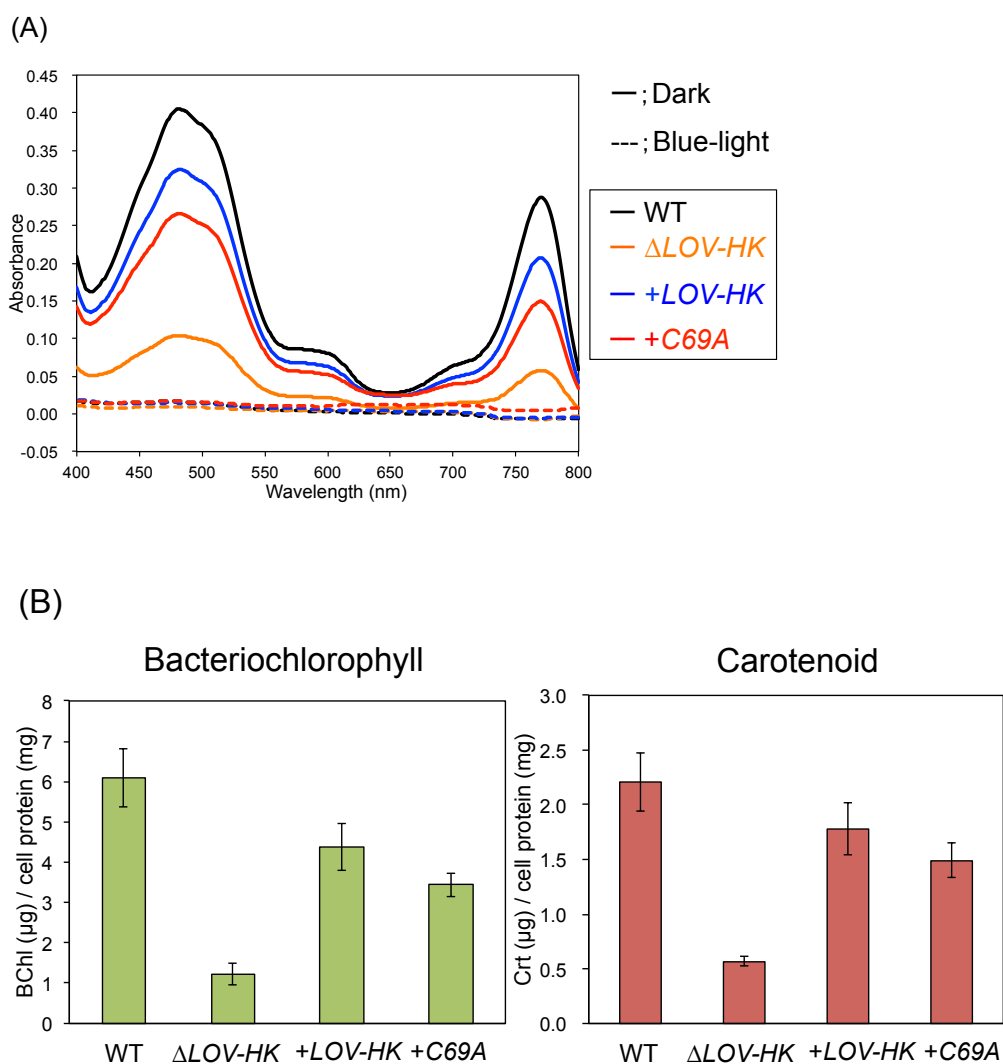


Figure 2-7. Photopigments production in wild-type, Δ LOV-HK, +LOV-HK and +C69A strains. (A) The spectrophotometric determination of the photopigments. The wild-type, Δ LOV-HK, LOV-HK complemented strain and LOV-HK-C69A complemented strain were cultivated aerobically in 100 ml of glycerol medium under dark or blue-light conditions. The cells were collected in late log phase and the pigments were extracted. The absorption spectra of the extracts were measured. Data are means of three independent experiments. (B) Quantitative determination of bacteriochlorophyll and carotenoid contents in the cells grown under dark condition. Bacteriochlorophyll and carotenoid contents were calculated from the absorption coefficients as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments. Error bars indicate standard deviation from the means.

野生株、 $\Delta LOV-HK$ 株、+ $LOV-HK$ 株、+ $C69A$ 株を暗条件と青色光条件で培養し、光合成関連遺伝子の一つであり BChl の生合成に関わる遺伝子である *bchC* の転写レベルを qRT-PCR により測定した (Fig. 2-8)。野生株の *bchC* 転写レベルは光合成色素生産と同様に、暗条件と比べて青色光条件で大きく減少した。暗条件での $\Delta LOV-HK$ 株の *bchC* 転写レベルは野生株の暗条件での転写レベルと比べて 10 分の 1 程度であった。+ $LOV-HK$ 株と + $C69A$ 株は暗条件で野生株と同程度の *bchC* 転写レベルを示し、どちらの相補でも *bchC* 転写レベルは回復した。青色光条件では、+ $LOV-HK$ 株と + $C69A$ 株どちらも野生株と同様に *bchC* 転写レベルは大きく減少した。これらの *bchC* 転写レベルの結果は光合成色素定量の結果と一致していた。

LOV-HK 抗体を用いてウエスタンブロットにより野生株及び各相補株の LOV-HK の発現量を確認した。野生株は暗条件と青色光条件のどちらでも LOV-HK の発現量は変わらず、一定量発現していた (Fig. 2-9A)。+ $LOV-HK$ 株及び + $C69A$ 株では野生株のものより高分子側にバンドがみられた (Fig. 2-9B)。これは *rpoD* プロモーター内の *rpoD* 遺伝子の一部と融合して発現してしまったためと考えられる。しかし、光合成色素生産及び *bchC* 転写レベルが相補により回復したため、融合したことは LOV-HK による光合成制御に大きな影響は及ぼしていないと考えられる。+ $LOV-HK$ 株及び + $C69A$ 株の LOV-HK の発現は暗条件と青色光条件のどちらでも確認でき、青色光条件で多い傾向がみられた。どちらの条件でも + $LOV-HK$ 株と + $C69A$ 株間で LOV-HK の発現量には違いは見られなかった。

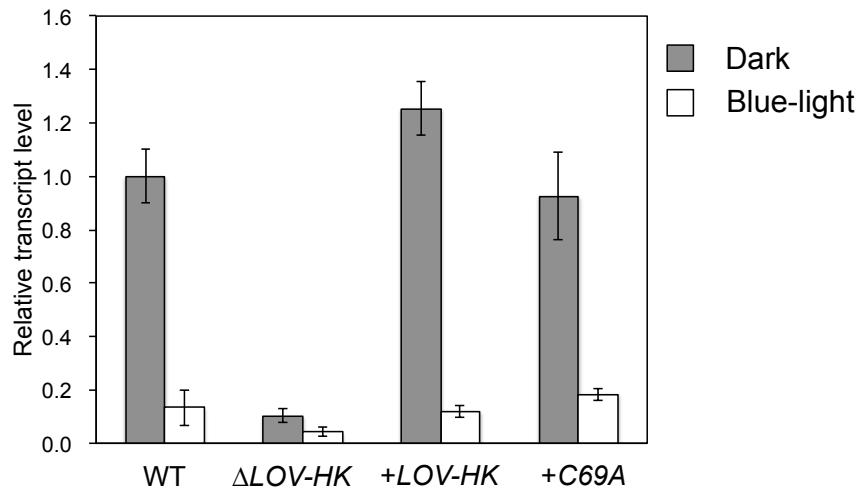


Figure 2-8. Quantitative RT-PCR showing the relative expression level of *bchC* in wild-type, Δ LOV-HK, +LOV-HK and +C69A strains under dark or blue-light conditions. The strains were grown in glycerol medium aerobically. Total RNA of wild-type and Δ LOV-HK strains were extracted from early log phase (OD_{600} =0.5-1.6) cultures. Total RNA of +LOV-HK and +C69A strains were extracted from early log phase (OD_{600} =0.4-1.0) cultures. *rpoD* gene was used as a normalizer. Data are means of three independent experiments. Error bars indicate standard deviation from the means.

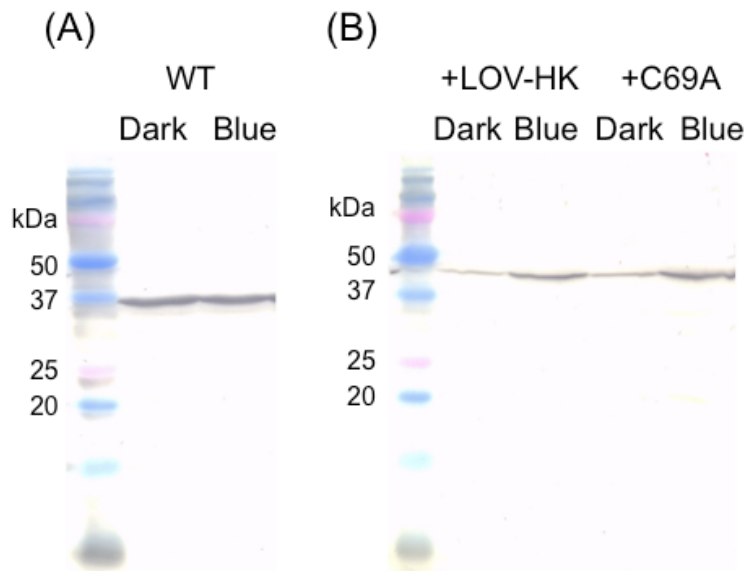


Figure 2-9. Western blot analysis using anti-LOV-HK antibody. (A) Cell free extract of the wild-type strain grown under the dark or blue-light condition. The amounts of protein applied to each lane were 8 μ g. (B) Cell free extract of +LOV-HK and +C69A strains grown under dark or blue-light conditions, respectively. The amounts of protein applied to each lane were 15 μ g.

3-1-5 好気条件と嫌気条件での青色光による *bchC* 転写レベルの変化

LOV-HK-C69A 変異体相補の実験から、*LOV-HK* は生体内では青色光に応答しているのではなく、別のシグナルを感知して光合成関連遺伝子の制御に関わっていることが推測された。本菌の *LOV-HK* は FMN が結合したフラボプロテインであることが 3-1-1 の発色団の分析で明らかとなったが、フラボプロテインの中には酸化還元状態を感知するセンサーとして機能するものが報告されている(76, 77)。また、青色光による光合成関連遺伝子の転写レベルの変化を調べる過程で、試験管での培養と三角フラスコでの培養では青色光照射による *bchC* 転写レベルの低下度合いに違いが見られ、通気条件が転写レベルの変化に大きな影響を与えることが示唆された (data not shown)。そこで、好気条件と嫌気条件という酸化還元状態の異なる条件で青色光を照射し、*bchC* 転写レベルの変化を調べた。Fig. 2-10 は青色光照射前の転写レベルを 1 として、好気条件と嫌気条件でそれぞれ青色光を照射した後の *bchC* の相対転写レベルを示している。好気条件で青色光を照射した時は *bchC* 転写レベルが大きく減少したが、嫌気条件では減少は見られず、照射前と同レベルであった (Fig. 2-10)。好気条件では *bchC* の転写が抑制された、もしくは、*bchC* 特異的な分解系が活性化されて転写が減少したと考えられる。嫌気条件では青色光照射前と比較して変化がなかったことから、*bchC* の転写が継続されている、もしくは、*bchC* 特異的な RNA の分解が起こっていないと考えられる。

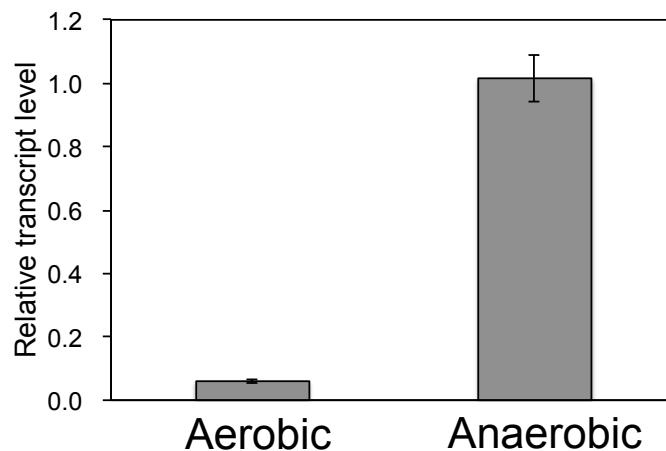


Figure 2-10. Quantitative RT-PCR showing the relative expression level of *bchC*. wild-type strain was grown aerobically under dark condition until log phase. The culture was transferred to vial and incubated aerobically or anaerobically under blue-light condition for 30 min at 30°C. Total RNA were extracted from the cultures. *rpoD* gene was used as a normalizer. Data are means of three independent experiments. Error bars indicate standard deviation from the means.

3-2 LOV-HK のシグナル伝達経路

3-2-1 自己リン酸化されるヒスチジン残基について

一般的にヒスチジンキナーゼは N 末端にセンサードメイン、C 末端側に二量化ドメインと触媒ドメインが存在し、センサードメインによって自己リン酸化活性が制御されている。センサードメインはタンパク質によって様々であるが、二量化ドメインと触媒ドメインはヒスチジンキナーゼ間で相同性がある。

二量化ドメインと触媒ドメインには H-box、D-box、F-box、G-box と呼ばれるいくつかの特徴的な配列を持っている。H-box は二量化ドメイン内に存在し、ATP からリン酸基を受け取るヒスチジン残基があり、このヒスチジン残基はよく保存されている。触媒ドメインにはヌクレオチドの結合の関係する部分や触媒ドメイン部分である D-box、F-box、G-box が存在する(78)。ヒスチジンキナーゼは系統解析により 11 のファミリーに分けられていたが、近年、これに加えてこれまでに知られていた典型的なヒスチジンキナーゼと少し異なるアミノ酸配列の特徴をもつ HWE/HisKA2 ファミリーが見つかっている。このファミリーのアミノ酸配列では、H-box に HRxxN というモチーフがあり、F-box がみられない、ATP lid が短いといった特徴が見られる。(79)。OCh114 株の LOV-HK は Pfam で HisKA2 ファミリーであると予測されている。

Fig. 2-11 は LOV-HK の二量化ドメインと触媒ドメイン部分のアライメントである。

Xanthomonas axonopodis (X. axo)、*Pseudomonas syringae* (P. syr) の LOV-HK はヒスチジンキナーゼの 11 のファミリーの中の HKP₄ クラスのヒスチジンキナーゼであると報告がある(80)。アライメントに含まれるそのほかの LOV-HK は、H-box の配列から HWE/HisKA2 ファミリーのヒスチジンキナーゼであると予想されたが、ヒスチジンキナーゼにおいてよく保存されているリン酸化されるヒスチジン残基が本菌の LOV-HK を含むいくつかの LOV-HK において保存されておらず、別の残基に変わっていた。また、ヒスチジン残基が保存されていない配列では HWE/HisKA2 ファミリーでみられる H-box の HRxxN というモチーフのアスパラギン残基も保存されていなかった。しかし、そのほかの F-box がみられないことや ATP lid が短いという特徴は同じであった。分子系統樹を作製したところ、ヒスチジン残基が保存されていないものは単系統であることが示唆され (Fig. 2-12)、このグループは HWE/HisKA2 ファミリーの中で H-box の保存性が低いグループであると考えられる。

一般的にヒスチジンキナーゼによるシグナル伝達はヒスチジンキナーゼ内のヒスチジン残基のリン酸化から始まり、下流のレスポンスレギュレーターのアスパラギン酸残基へとリン酸基が移る His-Asp のリン酸リレーによって行われる。そのため、ヒスチジンキナーゼとして機能するには自己リン酸化を受けるヒスチジン残基は必須であると考えられる。そこで、ヒスチジン残基が保存されていないグループでよく保存されているヒスチジン残基をアライメントから探索した。その結果、一般的なヒスチジンキナーゼにおいてリン酸化されるヒスチジン残基が存在する二量化ドメイン内には保存されたヒスチジン残基は存在しなかったが、触媒ドメイン内に His226 と His266 の 2 つの比較的保存されたヒスチジン残基があった。

SWISS-MODEL プログラムを利用し *E. litoralis* の EL346 をテンプレートとして OCh114 株の LOV-HK の立体構造を予測し、ATP 結合部位とどのような位置関係にあるかを推測した。モデリングの結果、テンプレートの EL346 と OCh114 株の LOV-HK のアミノ酸配列の相同性は 41.7%を示し、また、モデルの質を現す QMEAN は-1.84 であったため、モデルの精度に問題はないと考えられる。Fig. 2-13 は OCh114 株の LOV-HK の予想された立体構造である。His266 は ATP 結合部位と比較的近い位置に存在した。His226 は ATP 結合部位とはかなり離れた位置に存在し、また、タンパク質の表面付近に位置していた。

EL346 において自己リン酸化反応の触媒塩基として機能すると考えられている Glu246 とそれを補助する Arg143 があり、アミノ酸置換変異体の解析により、これらのアミノ酸残基は自己リン酸化活性に必須であることが明らかとなっている(65)。OCh114 の LOV-HK を含むヒスチジン残基が保存されていないグループでもこれらの自己リン酸化活性に必須のアミノ酸残基は保存されていた (Fig. 2-12 の▼)。また、ヌクレオチドや ATP のリン酸基との結合に関与するアミノ酸残基がある N-box や D-box、G-box において保存されているアスパラギン残基、アスパラギン酸残基、グリシン残基も同様に保存されていた。

OCh114
 Roseobacter_itoralis
 Taleyamaria_omphali
 Aestuaria_vita_boseoensis
 Dinoroseobacter_shibae
 Roseovivax_isoporae
 Roseovivax_marinus
 Marivita_hallyeonenensis
 Janaschia_facicmaris
 Roseobaca_calidilacus
 Roseovarius_sp.
 Oceanoglobus_indicus
 Lokitanea_illorea
 Sulfobacter_sp_AM1-D1
 Aureimonas_sp_AU20
 Aureimonas_sp_N4
 Aurantimonas_manganooxydans
 Stappia_sp.
 EL346
 Pacificimonas_flava
 Janaschia_aquimarinia
 Pseudooceanicola_nanhaiensis
 Maribus_pelagius
 B.mel
 R.leg
 EL368
 C.cre
 X.axo
 Psy

H-box
 ▼
 H R x x N

OCh114
 Roseobacter_itoralis
 Taleyamaria_omphali
 Aestuaria_vita_boseoensis
 Dinoroseobacter_shibae
 Roseovivax_isoporae
 Roseovivax_marinus
 Marivita_hallyeonenensis
 Janaschia_facicmaris
 Roseobaca_calidilacus
 Roseovarius_sp.
 Oceanoglobus_indicus
 Lokitanea_illorea
 Sulfobacter_sp_AM1-D1
 Aureimonas_sp_AU20
 Aureimonas_sp_N4
 Aurantimonas_manganooxydans
 Stappia_sp.
 EL346
 Pacificimonas_flava
 Janaschia_aquimarinia
 Pseudooceanicola_nanhaiensis
 Maribus_pelagius
 B.mel
 R.leg
 EL368
 C.cre
 X.axo
 Psy

His226

OCh114
 Roseobacter_itoralis
 Taleyamaria_omphali
 Aestuaria_vita_boseoensis
 Dinoroseobacter_shibae
 Roseovivax_isoporae
 Roseovivax_marinus
 Marivita_hallyeonenensis
 Janaschia_facicmaris
 Roseobaca_calidilacus
 Roseovarius_sp.
 Oceanoglobus_indicus
 Lokitanea_illorea
 Sulfobacter_sp_AM1-D1
 Aureimonas_sp_AU20
 Aureimonas_sp_N4
 Aurantimonas_manganooxydans
 Stappia_sp.
 EL346
 Pacificimonas_flava
 Janaschia_aquimarinia
 Pseudooceanicola_nanhaiensis
 Maribus_pelagius
 B.mel
 R.leg
 EL368
 C.cre
 X.axo
 Psy

N-box
 ▼
 His266

OCh114
 Roseobacter_itoralis
 Taleyamaria_omphali
 Aestuaria_vita_boseoensis
 Dinoroseobacter_shibae
 Roseovivax_isoporae
 Roseovivax_marinus
 Marivita_hallyeonenensis
 Janaschia_facicmaris
 Roseobaca_calidilacus
 Roseovarius_sp.
 Oceanoglobus_indicus
 Lokitanea_illorea
 Sulfobacter_sp_AM1-D1
 Aureimonas_sp_AU20
 Aureimonas_sp_N4
 Aurantimonas_manganooxydans
 Stappia_sp.
 EL346
 Pacificimonas_flava
 Janaschia_aquimarinia
 Pseudooceanicola_nanhaiensis
 Maribus_pelagius
 B.mel
 R.leg
 EL368
 C.cre
 X.axo
 Psy

Figure 2-12. Amino acid sequence alignment of kinase region of LOV-HKs. Gray boxes denote conserved amino acids in each boxes. Yellow box denotes position of phosphorylated histidine residue. Black box denotes conserved phosphorylated histidine residue. Blue boxes donate amino acids of consensus HRXXN motif in H box. The positions of His226 and His266 are shown in red box. Accession number of LOV-HKs are described in Table 2-7.

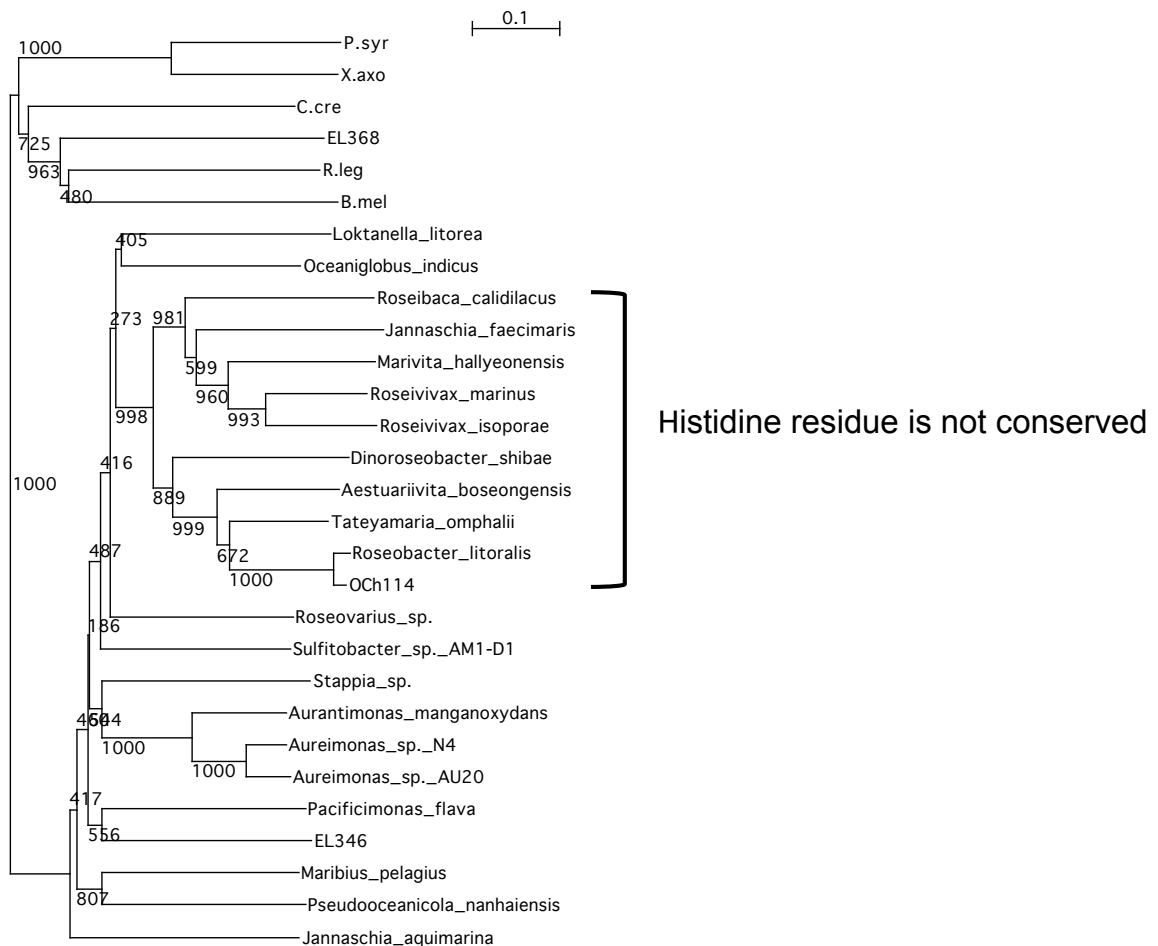


Figure 2-12. Phylogenetic tree of LOV-HKs. The tree was generated by the ClustalX neighbor-joining method.

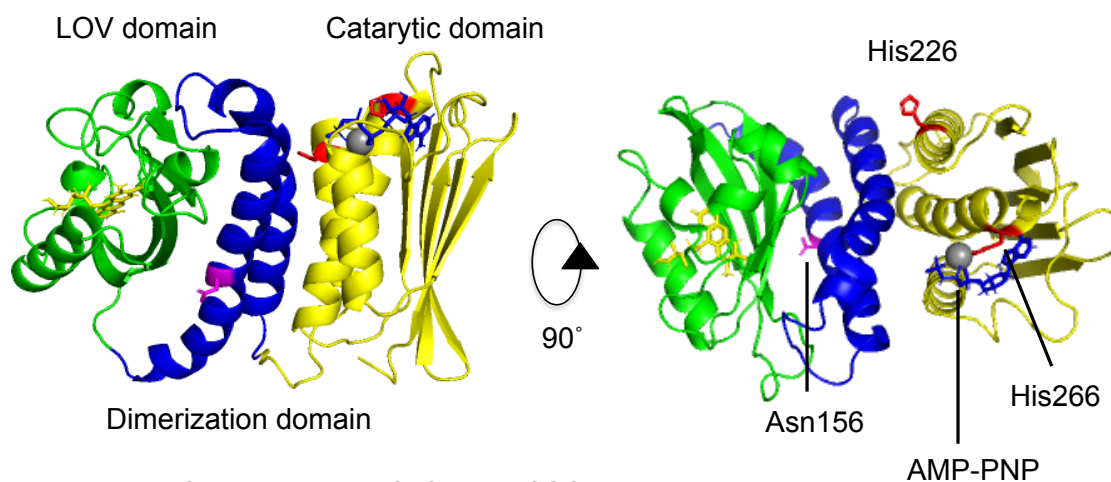


Figure 2-13. Structure model of LOV-HK of OCh114. *Erythrobacter litoralis* EL346

blue-light activated histidine kinase (PDB ID 4R3A) was used as a template. protein modeling was performed by using SWISS-MODEL program.

Table 2-7. Accession number of LOV-HKs.

Name	Accession number
OCh114	ABG31725
X.axo	AAM37406
EL346	Q2NB77
EL368	Q2NCA3
B.mel	AAL53921
P.syr	NP_792694
R.leg	WP_011655064
C.cre	YP_002515662
Roseobacter_litoralis	WP_013961207
Tateyamaia_omphalii	WP_076628099
Aestuariaivita_boseongensis	WP_050929859
Dinoroseobacter_shibae	WP_012177807
Roseivivax_isopora	WP_051491709
Marivita_hallyeonensis	WP_084066268
Roseovarius_sp.	WP_088664637
Roseibaca_calidilacus	WP_072244438
Roseivivax_marinus	WP_092811619
Jannaschia_faecimaris	WP_092642226
Oceaniglobus_indicus	WP_099826863
Loktanella_litorea	WP_090206652
Sulfitobacter_sp._AM1-D1	WP_083545486
Pacificimonas_flava	WP_088713407
Stappia_sp.	WP_083550956
Aurantimonas_manganoxydans	WP_009211252
Aureimonas_sp._AU20	WP_061972692
Aureimonas_sp._N4	WP_062230594
Jannaschia_aquimarina	WP_084629900
Pseudoceanicola_nanhaiensis	WP_028285924
Maribius_pelagius	WP_091843331

3-2-2 Phos-tag SDS-PAGE による LOV-HK の自己リン酸化の解析

本菌の LOV-HK では既知の LOV-HK では保存されているリン酸化されるヒスチジン残基がアスパラギン残基に置き換わっていた。そこで、本菌の LOV-HK が自己リン酸化能を持つのかを Phos-tag SDS-PAGE により解析した。Phos-tag とはリン酸基と相互作用する分子であり、Phos-tag SDS-PAGE はアクリルアミドゲルに Phos-tag を入れることで、リン酸化したタンパク質の移動速度が遅くなり、リン酸化されていないタンパク質と分離することができる手法である(81)。野生型 LOV-HK に加えて、OCh114 株の LOV-HK で既知の LOV-HK でリン酸化されるヒスチジン残基がある位置に存在するアスパラギン残基 (N156) をヒスチジン残基に置換した LOV-HK-N156H 変異体の自己リン酸化活性も調べた。

野生型 LOV-HK または LOV-HK-N156H を含む反応液に ATP を添加し、一定時間インキュベートした後、Phos-tag SDS-PAGE 及び通常の SDS-PAGE により解析した。野生型 LOV-HK または LOV-HK-N156H どちらのサンプルも通常の SDS-PAGE では 1 本のバンドが確認された (Fig. 2-14B)。Phos-tag SDS-PAGE では、移動度はあまり変わらないが、2 本のバンドが全ての条件で見られ、ATP 非添加のサンプルでも 2 本のバンドが見られた (Fig. 2-14A)。

ATP 非添加のサンプルでも 2 本のバンドが見られ、このバンドの分離はタンパク質のリン酸化によって起こったものではないことが考えられた。リン酸化ヒスチジンは化学的に不安定であるため、Phos-tag SDS-PAGE を行うときはサンプルの熱処理を行っていなかったが、未変性のタンパク質があることでバンドが 2 つ見えた可能性が考えられたので、熱処理を行なったサンプルも同時に泳動した。その結果、熱処理を行うことで 2 本見えていたバンドの低分子側のバンドが消失し高分子側のバンドのみとなった (Fig. 2-14C)。熱処理をしたことでリン酸化したタンパク質が増えた可能性は低いので、2 本見えていたバンドは未変性のタンパク質と変性したタンパク質に由来したバンドであったと考えられる。以上の結果より、本菌の LOV-HK は ATP を加えてもリン酸化したタンパク質は検出されず、自己リン酸化活性は持たないことが示唆された。また、LOV-HK-N156H 変異体でも同様に自己リン酸化活性は確認できず、本菌の LOV-HK はヒスチジinkinase としての自己リン酸化能は失われていることが示唆された。

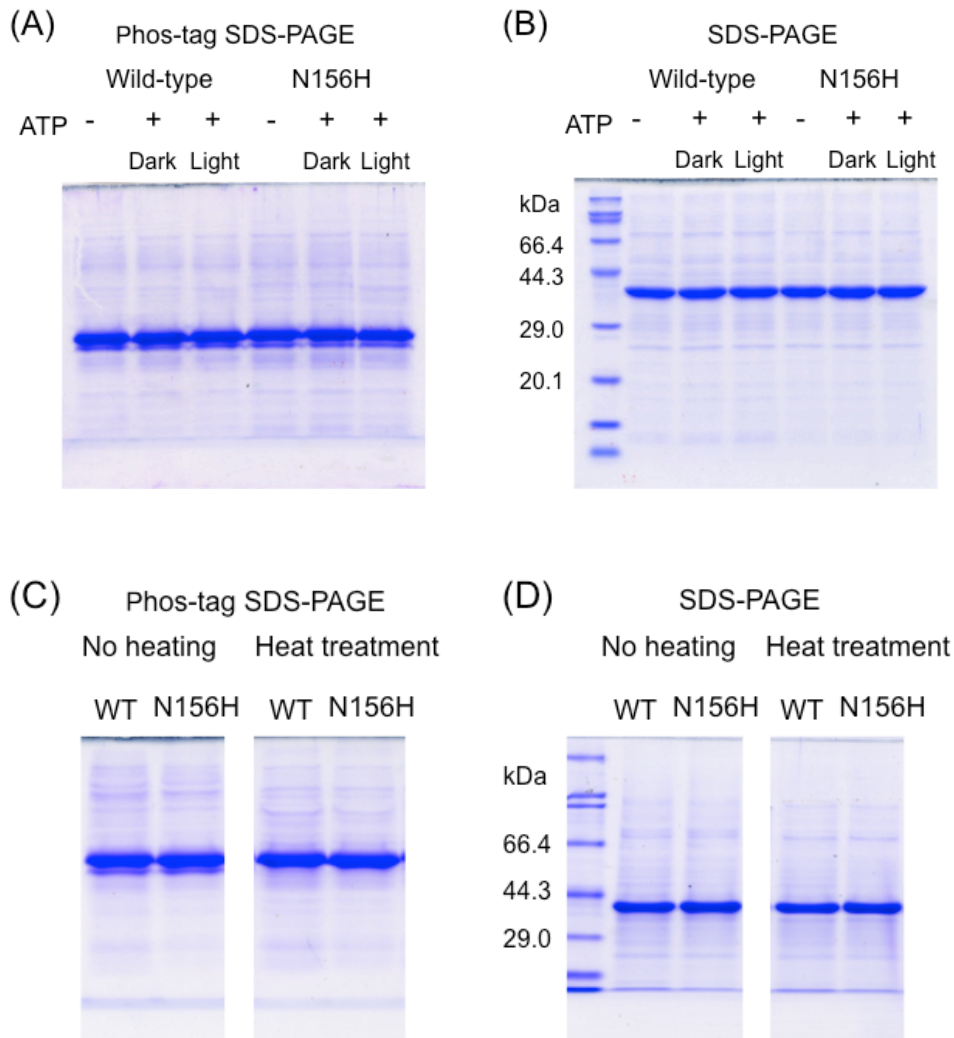


Figure 2-14. Analysis of LOV-HK and LOV-HK-N156H autophosphorylation by using phos-tag SDS-PAGE. (A) Zn^{2+} -Phos-tag acrylamide SDS-PAGE (8% polyacrylamide, $20 \mu M Zn^{2+}$, $20 \mu M$ phos-tag). The amounts of protein applied in each lane were $3.8 \mu g$. (B) SDS-PAGE analysis. The amounts of protein applied in each lane were $3.8 \mu g$. (C) Zn^{2+} -Phos-tag acrylamide SDS-PAGE (8% polyacrylamide, $50 \mu M Zn^{2+}$, $50 \mu M$ phos-tag). The amounts of protein applied in each lane were $3.8 \mu g$. (D) SDS-PAGE analysis. The amounts of protein applied in each lane were $3.8 \mu g$.

3-2-3 LOV-HK-H226A 変異体と LOV-HK-H266A 変異体相補株の解析

Phos-tag SDS-PAGE でリン酸化タンパク質は検出されなかったことから、OCh114 株の LOV-HK が自己リン酸化する可能性は低いと考えられたが、アミノ酸配列のアライメントからリン酸化する残基の候補としてあげられた His226 と His266 がシグナル伝達に関わっているのかを相補実験により調べた。LOV-HK の His226 または His266 を Ala に置換した変異体遺伝子の相補プラスミドを作製し、 Δ LOV-HK 株に相補した。H226A 変異体相補株と H266A 変異体相補株を暗条件で培養し、*bchC* 転写レベルを測定した。H226A 相補株は WT よりも高い *bchC* 転写レベルを示し、H266A 相補株は野生型 LOV-HK 相補と同程度の転写レベルを示した。これら 2 種類の変異体の相補でも *bchC* 転写レベルは回復したことから、LOV-HK の His226 または His266 がリン酸化してシグナル伝達をしている可能性はないと考えられる。

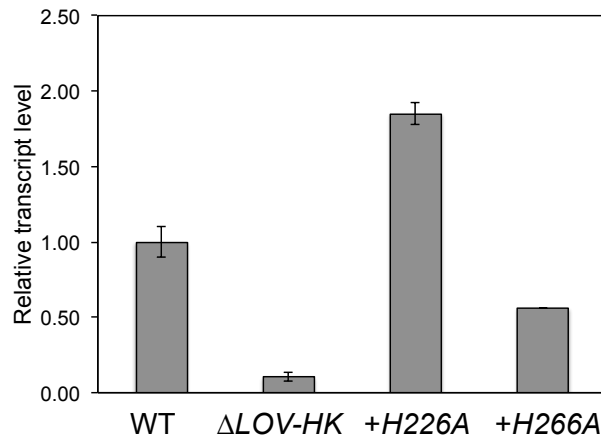


Figure 2-15. Quantitative RT-PCR showing the relative expression level of *bchC* in wild-type strain, Δ LOV-HK strain, H226A-complemented strain and H266A-complemented strain under dark condition. The strains were grown in glycerol medium aerobically. Total RNA were extracted from early log phase (OD600=0.5-1.6) cultures. *rpoD* gene was used as a normalizer. The data of wild-type and Δ LOV-HK are means of three independent experiments. The data of +H226A and +H266A are means of two independent experiments. Error bars indicate standard deviation from the means.

3-2-4 レスポンスレギュレーター *phyR* 破壊株の解析

OCh114 株の LOV-HK のアミノ酸配列は *E. litoralis* の EL346 と 42%の相同性を示し、比較的似たタンパク質であることが示唆された。*E. litoralis* の EL346 では、LovR と PhyR と呼ばれる 2 つのレスポンスレギュレーターが EL346 からリン酸基を受け取ることが *in vitro* の実験において示されている(82)。OCh114 株のゲノム上に *lovR* と相同な遺伝子はなかったが、*phyR* と相同な遺伝子 (*RD1-2463*) が存在していた (46%の相同性)。そのため、PhyR が本菌

においても LOV-HK のシグナル伝達に関与しているのではないかと推測し、破壊株を作製した。相同組換えにより *phyR* の部分が Sm 及び Sp 耐性遺伝子となった破壊株を作製した。*phyR* が破壊されていることは PCR により、*phyR* 破壊プラスミドを作製するときに使用した u2463-F と d2463-R プライマーを用いて確認した。野生株では 2.8 kbp の PCR 産物がみられ、もし、*phyR* が破壊されていれば、そのバンドが 3.8 kbp にシフトするはずである。破壊候補株で PCR を行なって確認したところ、3.8 kbp にバンドが確認できたため、この株を *phyR* 破壊株 ($\Delta phyR$ 株)とした。

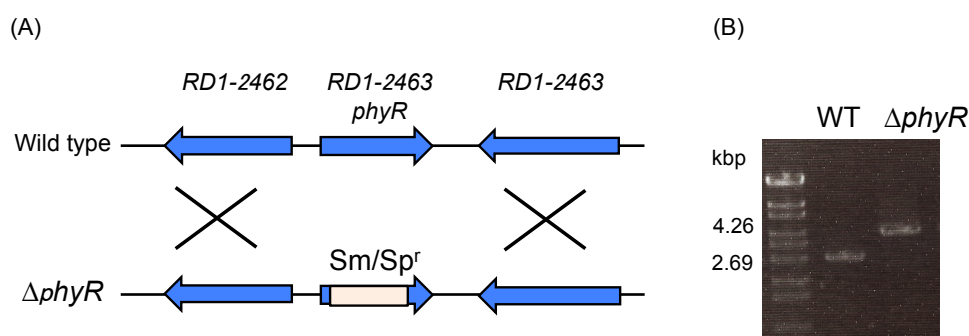


Figure 2-16. Construction of $\Delta phyR$. (A) Diagram showing chromosomal position of *phyR*. (B) Diagnostic PCR of *phyR* deletion.

PhyR が光合成制御のシグナル伝達に関わっているのかを調べるため、 $\Delta phyR$ 株の暗条件と青色光条件での光合成色素生産及び光合成関連遺伝子である *bchC* の転写レベルを測定し、野生株と比較した。

$\Delta phyR$ 株は暗条件で野生株と同程度のバクテリオクロフィルとカロテノイドを生産し、その生産は青色光で抑制された。また、*bchC* 転写レベルも暗条件と青色光条件のどちらでも野生株と同程度であった。これらの結果から、PhyR は本菌では光合成関連遺伝子の制御には関わっておらず、LOV-HK による光合成制御におけるシグナル伝達には関与していないと考えられる。

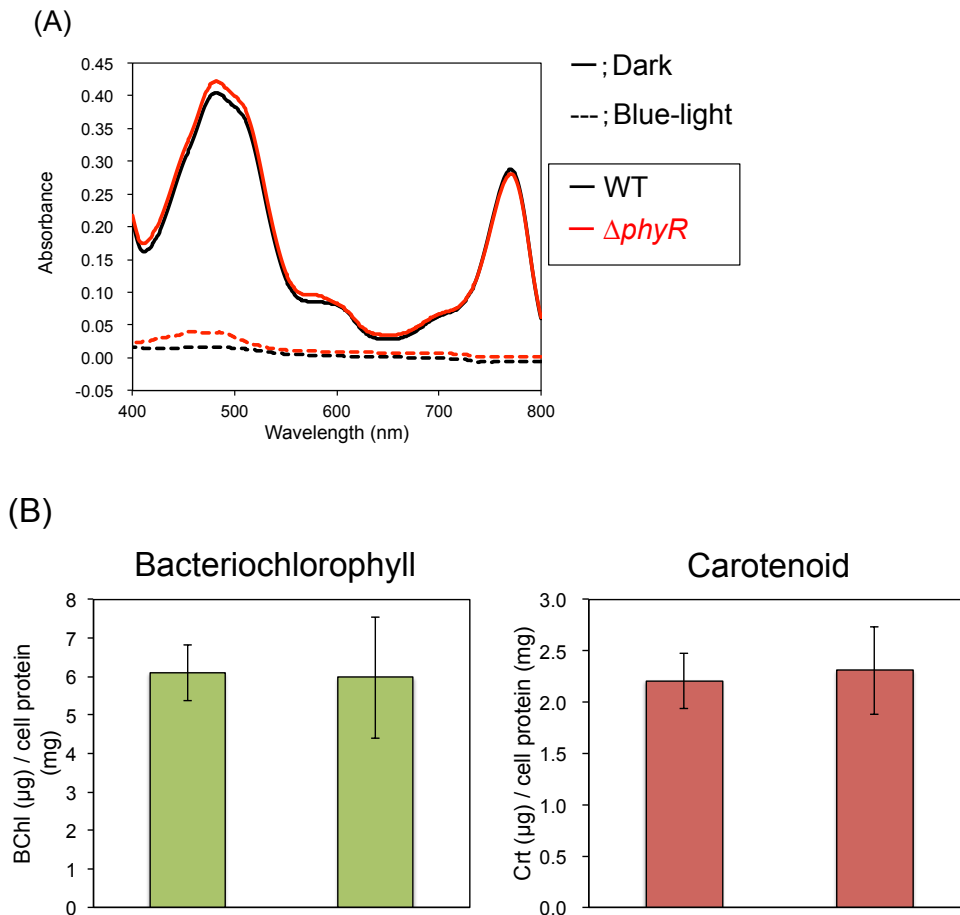


Figure 2-17. Photopigments production in wild-type and $\Delta phyR$ strains. (A) The spectrophotometric determination of the photopigments. The wild-type and $\Delta phyR$ strains were cultivated aerobically in 100 ml of glycerol medium under dark or blue-light conditions. The cells were collected in late log phase and the pigments were extracted. The absorption spectra of the extracts were measured. Data are means of three independent experiments. (B) Quantitative determination of bacteriochlorophyll and carotenoid contents in the cells grown under dark condition. Bacteriochlorophyll and carotenoid contents were calculated from the absorption coefficients as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments. Error bars indicate standard deviation from the means.

第4節【考察】

OCh114株は暗条件で培養したときは光合成関連遺伝子の転写が促進されるのに対し、青色光条件ではその転写は抑制される。背景で述べたように、LOV-HKは様々な菌において青色光に依存した生理機能の変化の制御に関わっている。本菌においても、暗条件と青色光条件での光合成関連遺伝子の発現の違いが、青色光センサーとして機能すると予想されたLOV-HKにより制御されているのではないかという仮説のもと、OCh114株のLOV-HKの光応答性と制御との関係及びシグナル伝達方法について解析を行なった。

OCh114株のLOV-HKタンパク質はFMNを発色団として含み、他のLOVドメインと同様のフラビンとシステイン残基の一時的な共有結合の形成による青色光応答性を示した。このフラビンと共有結合を形成するシステイン残基はLOVドメイン内のCys69であることが明らかとなった。LOV-HKタンパク質で見られた青色光応答性が、OCh114株の暗条件と青色光条件での光合成関連遺伝子の発現の違いに関与しているのかを調べるため、 Δ LOV-HK株に野生型LOV-HKまたは光応答性が失われたLOV-HK-C69A変異体をそれぞれ相補した株を利用して、暗条件と青色光条件での光合成関連遺伝子の発現の違いを調べた。LOV-HK-C69A変異体の相補株は野生型相補株と同様に青色光照射による光合成関連遺伝子の転写抑制がみられ、暗条件と青色光条件での光合成発現の違いの制御にLOV-HKのCys69を介した光応答性は関係しないことが示された。この結果より、OCh114株のLOV-HKは光とは異なるシグナルをセンシングしている可能性が示唆された。フラボプロテインの中にはレドックスセンサーとして機能するものがいくつか知られている。*Azotobacter vinelandii*の窒素固定の制御に関わるNifLや*Escherichia coli*の走気性の制御に関わるAerは、フラビンの酸化還元を介して細胞の酸化還元状態を感知するレドックスセンサーであると報告されている(76, 77)。また、*C. crescentus*のLOV-HK内のフラビンの酸化還元電位が測定され、その値は細胞内で還元されうる値であったと報告もある(83)。これらのことから、OCh114株において、LOV-HKはNifLやAerのようにレドックスセンサーとして機能している可能性が考えられた。C69Aの変異はLOVドメインの非共有的なFMNの結合には影響を及ぼさず、C69A変異体は野生型と同様にFMNは維持されていた。そのため、フラビンを介したレドックスセンシングであればC69A変異体でも可能であると考えられる。

LOV-HKがレドックスレギュレーターであれば、細胞の酸化還元状態の違いは光合成関連遺伝子の発現に影響を与える可能性が考えられたため、野生株を用いて好気条件または嫌気条件と酸化還元状態の異なる条件での青色光照射による光合成関連遺伝子の転写レベルの変化を比較した。青色光による光合成抑制は好気条件でのみ見られ、嫌気条件では全く見られず、細胞の酸化還元状態が光合成制御において重要な因子であることが示唆された。また、この結果は青色光が直接光合成の抑制のシグナルとならないことを示唆し、LOV-HKが青色光以外のシグナルをセンシングしている可能性を支持する結果であると考えられる。しかし、この酸化還元状態の違いがLOV-HKによってセンシングされ、光合成関連遺伝子の発現が制御されているのかは今の段階では不明である。OCh114株のLOV-HKを含め、様々な菌のLOV-HKのアミノ酸配列からのアライメントを作製

した結果、OCh114株を含むいくつかの菌のLOV-HKでは、ヒスチジンキナーゼにおいて保存されているリン酸化されるヒスチジン残基が保存されていないことが明らかとなり、それらは系統解析から単系統であることが示唆された。精製タンパク質を用いて自己リン酸化活性を測定したがリン酸化したタンパク質は検出されなかった。また、ヒスチジン残基の保存されていないLOV-HKにおいて比較的保存されていた2つのヒスチジン残基(His226とHis266)の変異体相補実験も行ったが、どちらもLOV-HKによる光合成関連遺伝子の転写促進には影響を与えなかった。これらの結果から、OCh114株のLOV-HKは自己リン酸化能を持たないことが強く示唆された。

数は少ないが、リン酸化されるヒスチジン残基が保存されていないヒスチジンキナーゼホモログが自己リン酸化を介さずにシグナル伝達に関わるという報告がいくつかある。このようなヒスチジンキナーゼホモログは、シュードヒスチジンキナーゼ(PseudoHK)と呼ばれ、シロイヌナズナでは、サイトカイニンのシグナル伝達にPseudoHKが関与し、PseudoHKは特定のヒスチジンキナーゼのレスポンスレギュレーターへのリン酸基の転移を阻害する作用がある報告がある(84)。*C. crescentus*のDivLというPseudoHKはDivKと呼ばれるレスポンスレギュレーターのリン酸化状態を安定化すると報告がある(85)。OCh114株のLOV-HKも自己リン酸化能を持たずにシグナル伝達に関与していることが強く示唆されたことから、PseudoHKの一種であり、一般的なヒスチジンキナーゼで見られるHis-Aspのリン酸リレーとは異なる、新規なシグナル伝達方法により光合成を制御していることが示唆された。

第3章 光合成関連遺伝子の発現抑制解除機構の探索

第1節 【背景】

PpsR は光合成遺伝子クラスター (Photosynthetic gene cluster, PGC) 内にコードされており、現在知られている紅色光合成細菌はみな PGC 内に PpsR を持ち、多くの紅色光合成細菌で光合成関連遺伝子のリプレッサーとして機能することが知られている(35-37)。OCh114 株でも PpsR が光合成関連遺伝子のリプレッサーであることは破壊株のトランスクリプトーム解析から明らかとなっているが(105)、本菌では PpsR による抑制がどのように解除されているかは不明である。本菌のゲノム上に、嫌気性光合成細菌で PpsR のアンチリプレッサーとして機能しているタンパク質と相同なドメインを持つ遺伝子がいくつかあった。RD1-1653 は AppA に見られる BLUF ドメインを持つと予想された。ppaA (RD1-0142) は aerR のホモログであり、本菌においても ppsR の上流に存在した。それに加えて、 Δ LOV-HK 株は常に光合成の発現が抑制された状態となっており、これは *R. sphaeroides* における appA 破壊株と同じような表現系であり、LOV-HK が PpsR のアンチリプレッサーである可能性が考えられた。そこで、RD1-1653、PpaA、LOV-HK のいずれかが、本菌において PpsR のアンチリプレッサーとして機能しているのはいかと推測し、解析を行なった。

第2章で呼吸鎖電子伝達系と光合成制御に関わりがあることを示唆する結果を得た。そこで、好気呼吸の電子伝達の末端で機能し、酸素を水に還元する末端酸化酵素の阻害剤 (NaN₃) と、電子伝達系で生成されるプロトン勾配を解消する脱共役剤 (2,4-ジニトロフェノール, DNP) が光合成関連遺伝子の転写に及ぼす影響を調べた。

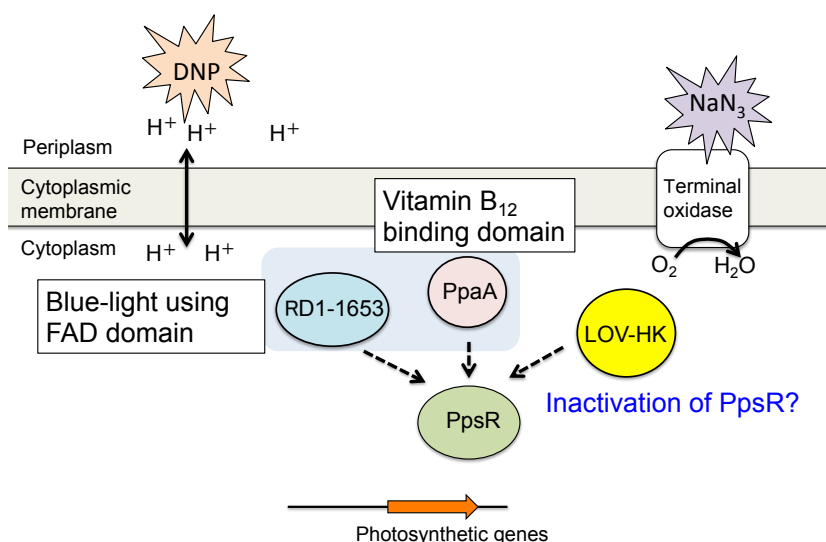


Figure 3-1. Predicted regulation mechanism of photosynthetic genes in OCh114.

DNP; 2,4-dinitrophenol.

第2節【研究材料及び方法】

2-1 用いた細菌と培養条件

用いた細菌は Table3-1 で示した。培養は第2章で記述した条件で行なった。

2-2 His タグ融合 PpsR の異種発現と精製

使用したプライマーの配列は Table 3-2 に示した。 *ppsR* 遺伝子はプライマー ppsR-F と ppsR-R 及び、 nde-del-ppsR-F と nde-del-ppsR-R を用いて PCR で増幅した。 nde-del-ppsR-F と nde-del-ppsR-R は *ppsR* 内に存在した NdeI サイト (cat→ctc) を消去するために用いた。増幅した PCR 産物は pUC18 にクローニングしてシーケンス解析を行なった。エラーが生じていないことを確認した後、NdeI と XhoI で処理し、その断片を pET-21a(+)へ挿入し、pET-ppsR を得た。

pET21-ppsR プラスミドを *Escherichia coli* BL21(DE3)へ導入し、C末端に His タグが融合した PpsR を発現させた。*E. coli* BL21 (DE3)/pET21-ppsR を 50 µg/mL のアンピシリンを添加した LB 培地に植菌し、37°C で OD₆₀₀ が 0.6 から 0.7 になるまで培養した。その後、0.1 mM IPTG を添加して 18°C で一晚培養した後、菌体を回収し、-80°C で保存した。保存した菌体は 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)バッファーで懸濁し、超音波により破碎した。破碎後、65,000 ×g で 5 分遠心することで未破碎菌体を取り除いた。その後、4°C、100,000 ×g で 1 時間遠心することで可溶性画分を得た。得られた可溶性画分を吸着バッファー(20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM イミダゾール, 200 mM NaCl)で平衡化した 2 mL の Ni Sepharose 6 Fast Flow カラムに供した。カラムの 5 倍量の吸着バッファーで洗浄後、カラムの 3 倍量の溶出バッファー(20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM イミダゾール, 200 mM NaCl)で溶出した。溶出したサンプルを Vivaspin で 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)バッファーに置き換え、濃縮し精製 PpsR-His とした。

2-3 マルトースバインディングプロテイン(MBP)融合 PpaA の異種発現と精製

使用したプライマーの配列は Table 3-2 に示した。 *ppaA* 遺伝子はプライマー-MBP-ppaA-F と MBP-ppaA-R を用いて PCR で増幅した。増幅した PCR 産物は pUC18 にクローニングしてシーケンス解析を行なった。エラーが生じていないことを確認した後、NdeI と BamHI で処理し、その断片を pMAL-c5X へ挿入し、pMAL-ppaA を得た。

E. coli BL21(DE3)に pMBP-ppaA を導入し、N末端に MBP タグが融合したタンパク質を発現させた。*E. coli* BL21 (DE3)/pMBP-ppaA を 50 µg/mL のアンピシリンを添加した LB 培地に植菌し、37°C で OD₆₀₀ が 0.6 から 0.7 になるまで培養した。その後、0.1 mM IPTG を添加して 37°C で 2 時間培養した後菌体を回収し、-80°C で保存した。保存した菌体は 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)バッファーで懸濁し、超音波により破碎した。破碎後、65,000 ×g で 5 分遠心することで未破碎菌体を取り除いた。その後、4°C、100,000 ×g で 1 時間遠心することで

可溶性画分を得た。得られた可溶性画分を吸着バッファー(20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA)で平衡化した 2 mL のアミロースレジンカラムに供した。カラムの 5 倍量の吸着バッファーで洗浄後、カラムの 3 倍量の溶出バッファー(20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM maltose)で溶出した。溶出したサンプルを Vivaspin で濃縮し精製 MBP-PpaA とした。

2-4 MBP-PpaA の各種コバラミン結合能

E. coli BL21 (DE3)/pMBP-ppaA の細胞懸濁液にアデノシルコバラミン (Sigma-Aldrich)、メチルコバラミン (東京化成工業)、ヒドロキシコバラミン (東京化成工業) をそれぞれ終濃度 30 μ M になるように加た。そして、各種コバラミンを添加したサンプルをそれぞれ 2-3 で示した MBP-PpaA の精製と同じ手順で細胞破碎・精製し、精製 MBP-PpaA を得た。その後、HITACHI U-2910 分光光度計を用いて各精製 MBP-PpaA の吸収スペクトルを測定し、コバラミン結合能を評価した。各サンプルの吸収スペクトルは、BCA 法により測定したタンパク質濃度を元に 1 mg/mL の吸収スペクトルとなるようにノーマライズした。

2-5 ゲルシフトアッセイ

DNA のラベル化

bchC 上流 298 bp と *bchC* 内部 106bp を含む 404bp の領域を *bchC* プロモーターとして用いた。*bchC* プロモーターは 5'末端をビオチン化した PbchC-F-bio と PbchC-R-bio プライマー (Table3-2) を用いて PCR で増幅し、増幅した DNA 断片をゲル抽出により精製し、これをビオチンラベル化 DNA として利用した。ラベル化していない *bchC* プロモーターはビオチン化されていない PbchC-F と PbchC-R プライマーを用いて PCR で増幅し、増幅した DNA 断片をゲル抽出により精製し利用した。DNA 濃度は A_{260} の値から算出した。

DNA-タンパク質結合反応

反応バッファー(10 mM Tris-HCl pH7.5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10%Glycerol)に 0.4 fmol のビオチンラベル化 DNA を加え、そこに各精製タンパク質を加えた。室温で 30 分インキュベートして DNA とタンパク質を結合させた。明条件で反応させるときは白色光を照射しながらインキュベートし、暗条件では暗所でインキュベートした。競合実験では、非ラベル化 *bchC* プロモーターDNA を 75 fmol 添加し、非特異的な DNA の添加は、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 のゲノム DNA を 20 ng 添加した。

電気泳動と検出

電気泳動には、Table3-3 に示した組成の 5%非変性ポリアクリルアミドゲルを用い、泳動バッファーとして 0.5× TBE バッファー (45 mM Tris, 45 mM borate, 1 mM EDTA) を使用し

た。100 V で 30 分プレランを行なった後、ウェルへサンプルをアプライした。その後、100 V で 50 分泳動し、ナイロンメンブレン(Hybond N+, GE Healthcare)へ転写した。ナイロンメンブレンへの転写は 380 mA で 30 分間行なった。転写後 UV を照射して DNA をクロスリンクさせ、Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Thermo scientific) を使用して、ストレプトアビジン HRP を利用した化学発光法によりビオチンラベル化 DNA を検出した。

Table 3-3. Composition of native polyacrylamide gel for gel mobility shift assay.

30% Acrylamide Solution (30% T, 3.3% C)	1.67 mL
5× TBE buffer	1 mL
80% Glycerol	312 µL
Distilled water	7 mL
TEMED	7.5 µL
10% APS	75 µL
Total	10 mL

2-6 *ppaA* 破壊株の作製

使用したプライマーの配列は Table 3-2 に示した。*ppaA* 遺伝子上流 1417 bp (*uppaA* とする) はプライマー *uppaA-F* と *uppaA-R*、*ppaA* 遺伝子下流 1237 bp (*dppaA* とする) はプライマー *dppaA-F* と *dppaA-R* を用いて PCR により増幅した。増幅した PCR 産物は pEX18Ap にクローニングしてシーケンス解析を行いエラーが生じていないことを確認した。各 DNA 断片をクローニングしたプラスミドを制限酵素処理し、pEX18Ap の KpnI と BamHI サイトに *daapA* 断片が挿入され、BamHI と HindIII サイトに *uppaA* 断片が挿入された pEXudppaA を得た。pEXudppaA と pPSΩSm^r を BamHI で処理し、ストレプトマイシン/スペクチノマイシン耐性遺伝子を pEXudppaA 上の *uppaA* と *dppaA* の間に挿入し、pEXudppaASm を得た。pEXudppaASm で *E. coli* S17-1 を形質転換し、その後、接合伝達により *R. denitrificans* 野生株へ導入した。導入後、セレクションプレートでストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性をもつコロニーを取得し、*cppaA-F* と *cppaA-R* プライマーを用いて PCR により *ppaA* 遺伝子が破壊されていることを確認し、 Δ *ppaA* 株を得た。

2-7 *RD1-1653* 破壊株の作製

使用したプライマーの配列は Table3-2 に示した。*RD1-1653* 遺伝子上流 999 bp (*u1653* とする) 及び *RD1-1653* 遺伝子下流 977 bp (*d1653* とする) はプライマー *u1653-F* と *u1653-R* 及び、*d1653-F* と *d1653-R* をそれぞれ用いて PCR により増幅した。増幅した PCR 産物は pUC18 にクローニングしてシーケンス解析を行いエラーが生じていないことを確認した。各 DNA

断片をクローニングしたプラスミドを *SacI* と *EcoRI* で処理し、u1653 断片を pUCd1653 に挿入して pUCud1653 を得た。pUCud1653 を *EcoRI* と *XbaI* で処理し ud1653 断片を pEX18Ap に挿入し、pEXud1653 を得た。pEXud1653 と pPSΩSm^r を *SacI* で処理し、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性遺伝子を pEXud1653 上の u1653 と d1653 の間に挿入し、pEXud1653Sm を得た。pEXud1653Sm で *E. coli* S17-1 を形質転換し、その後、接合伝達により *R. denitrificans* 野生株へ導入した。導入後、セレクションプレートでストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性をもつコロニーを取得し、c1653-F と c1653-R プライマーを用いて PCR により *RD1-1653* 遺伝子が破壊されていることを確認し、Δ1653 株を得た。

2-8 相補実験

使用したプライマーの配列は Table3-2 に示した。ppsR 遺伝子は ppsR-com-F と ppsR-com-R プライマーを用いて PCR で増幅した。rpoD プロモーターは PrpoD1 と PrpoD2 プライマーを用いて増幅した。PCR 産物は pUC18 にクローニングしてシーケンス解析を行ない、エラーが生じていないことを確認した。クローニングで得られたプラスミドをそれぞれ *BamHI* と *XbaI* で処理し、ppsR 遺伝子断片を pUCPrpoD2 ベクター (pUC18 上の *KpnI* と *BamHI* サイトに rpoD プロモーターが挿入されたプラスミド) の rpoD プロモーター下流の *BamHI* と *XbaI* サイトに挿入した。その後、*KpnI* と *XbaI* で処理することで rpoD プロモーターと ppsR 遺伝子が融合した断片を得て、これを pRKKM へ導入し、pRK-ppsR を得た。pRK-ppsR で *E. coli* S17-1 を形質転換し、その後、接合伝達により *R. denitrificans* ΔppaA 株へ導入した。

ppaA+ppsR 遺伝子の増幅には、ppaA-com-F と ppsR-com-R プライマーを用いて PCR で増幅した。PCR 産物は pUC18 にクローニングしてシーケンス解析を行ない、エラーが生じていないことを確認した。クローニングで得られたプラスミドを *BamHI* と *XbaI* で処理し、ppsR 遺伝子断片を調整し、pUCPrpoD2 ベクターの rpoD プロモーター下流の *BamHI* と *XbaI* サイトに挿入した。その後、*KpnI* と *XbaI* で処理することで rpoD プロモーターと ppsR 遺伝子が融合した断片を得て、これを pRKKM へ導入し、pRK-ppaAppsR を得た。pRK-ppaAppsR で *E. coli* S17-1 を形質転換し、その後、接合伝達により *R. denitrificans* ΔppaA 株へ導入した。

2-9 アザイドと DNP の影響

100 mL のグリセロール培地で野生株と ΔLOV-HK 株を対数増殖期まで暗条件で好氣的に培養した。その後、アザイドまたは DNP を添加し、さらに暗条件で好氣的に 1 時間培養を続けた。1 時間経過したところでサンプリングを行い、RNA を抽出した。アザイドは終濃度 1 mM となるように添加した。2,4-ジニトロフェノール (DNP) はエタノールに溶解させたもの (100 mM DNP) を終濃度 500 μM になるように添加した。エタノールによる影響を確認するために、DNP 添加実験ではエタノールを 500 μL 添加し、同様に 1 時間経過したところでサンプリングを行ったものをコントロールとした。

2-10 光合成色素の定量

第2章に記述した方法と同じ方法で行なった。

2-11 RNA 抽出

第2章に記述した方法と同じ方法で行なった。

2-12 qRT-PCR

第2章に記述した方法と同じ方法で行なった。*rpoD*は QrpoD-R と QrpoD-L、*bchC*は QbchC-R と QbchC-L、*ppsR*は QppsR-R と QppsR-L プライマーをそれぞれ用いた。使用したプライマーの配列は Table 3-2 に示した。*rpoD* (*RD1-1794*) はハウスキーピング遺伝子として利用した。

Table 3-1. Bacterial strains and plasmids used in the 3rd chapter.

Strain or plasmid	Description or construction	Source or reference
Strains		
<i>R. denitrificans</i>		
OCh114	Wild-type	104
Δ LOV-HK	OCh114 LOV-HK : : Ω Sm/Sp ^r	104
Δ ppaA	OCh114 ppaA : : Ω Sm/Sp ^r	This study
Δ 1653	OCh114 1653 : : Ω Sm/Sp ^r	This study
+ppsR	Δ ppaA/pRK-ppaA	This study
+ [ppaA-ppsR]	Δ ppaA/pRK-ppaAppsR	This study
<i>E. coli</i>		
JM109	Cloning strain	98
S17-1	For conjugal transfer of plasmids: recA thi pro hasdRM+ RP4:2-Tc:Mu:Km:TnZ	99
BL21 (DE3)	Strain used for heterologous expression	100
Plasmids		
pUC18	Cloning vector, Amp ^r	98
pUCPrpoD2	pUC18 KpnI-BamHI site : :rpoD promoter, Amp ^r	This study
pRKKM	pRK415 Psp1406I site : :neo gene from pUC119KM, Tc ^r -, Km ^r +	104
pRK-ppsR	pRKKM : :rpoD promoter ppsR fusion	This study
pRK-ppaA+ppsR	pRKKM : :rpoD promoter ppaA and ppsR fusion	This study
pEX18Ap	Mobilizable suicide vector: Amp ^r , sucB	103
pPS Ω Smr	pPS854 EcoRI-EcoRV site : : Ω Sm/Sp ^r , Ap ^r	104
pEXdelppaA	pEX18Ap containing upstream of ppaA, Ω Sm/Sp ^r and downstream of ppaA	This study
pEXdel1653	pEX18Ap containing upstream of 1653, Ω Sm/Sp ^r and downstream of 1653	This study
pMAL-c5X	Heterologous expression plasmid, maltose binding protein tag, Amp ^r	New England Biolabs
pET21a (+)	Heterologous expression plasmid, His6 tag, Amp ^r	Novagen
pMAL-ppaA	pMAL-c5X : :ppaA	This study
pET-ppsR	pET21a (+) : :ppsR	This study

Table 3-2. Primers used in the 3rd chapter.

Name	Sequence 5'→3'
ppsR-F	TACGGTACCCATATGACAACCGGCGGAAATACCTT
ppsR-R	GTAGGATCCCTCGAGACCGTTTTTGTGAGGAGTC
nde-del-ppsR-F	TCGGGTCACATGCGCATCTATGC
nde-del-ppsR-R	TAGATGCGCATGTGACCCGACCG
MBP-ppaA-F	TACGAATTCCATATGTGACGGATGATCAAACAGA
MBP-ppaA-R	CAGTAGGATCCCGTTGTCATGAAGTGCTTG
uppaA-F	GGAAGCTTATTTCTCGGTCATACG
uppaA-R	ATCGGGATCCAAGTGTTCCTTGC
dppaA-F	AGGGATCCCAATACAATACAGGTTG
dppaA-R	TCAGGTACCAGTTTGGTGGCATAG
cppaA-F	GATGTTTTGGCAYCGACAG
cppaA-R	CCACAGCTTCTTCTGCAAC
u1653-F	TAAGTGAATTCGAAAAACACACCGGTCACGC
u1653-R	GATAAGAGCTCCAGCGCCATTGTTGTCCAC
d1653-F	GATAAGAGCTCGCTCATCCGAGGCGTCATAA
d1653-R	TAAGTTCTAGACGAAGGTGTCTACAAGGCGA
c1653-F	AGGATCACATTGAGGGCGG
c1653-R	GGCGACTGCGCGAGATGT
ppsR-com-F	AGTGGATCCTGAAATACGTCAATTCACCAAG
ppsR-com-R	AGTTCTAGAAAGGGCCAGGACTGCGTC
ppaA-com-F	AGTGGATCCAGGTGAAGGGTCGTTAGGAA
PrpoD1	AGAGGTACCAAAGCTCAGTGCAAC
PrpoD2	GATGGATCCTGATGTACCCCTTC
PbchC-F-bio	AGTGTTC AATCTCGACCACAA
PbchC-R-bio	GGGGATGTGTATTTTCGCCTT
QrpoD-R	GTTTCGCCTCTACCATTTCTTCT
QrpoD-L	GCCAATACGTGGGTCTCGAT
QbchC-R	ACAGACCAAAGGCACCGTCA
QbchC-L	CGAGGTGGTTGAGGCTGACA
QppsR-R	GGCCAGCGTTGCATTCATCA
QppsR-L	TCTTGGGCCTGAATGCGGAT

第3節【結果】

3-1 PpsR の DNA 結合能における LOV-HK の影響

第2章で、LOV-HK はリン酸リレーとは異なる様式でシグナル伝達し光合成制御に関わっていることが推測された。可能性の一つとして光合成関連遺伝子のリプレッサーである PpsR と相互作用し、PpsR の DNA 結合能を調節していることが考えられた。そこで、ゲルシフトアッセイにより LOV-HK が PpsR の DNA 結合能に及ぼす影響を調べた。

まず、OCh114 株の PpsR が光合成関連遺伝子のプロモーター領域に結合するのか調べるため、OCh114 株の PpsR を C 末端に His タグを融合させ、大腸菌で異種発現・精製し、光合成関連遺伝子の一つである *bchC* プロモーター領域への結合を調べた。Fig. 3-2A は PpsR の *bchC* プロモーター領域への結合の競合阻害実験を示している。PpsR を添加することでバンドのシフトが確認できた。また、非ラベル化プローブを添加するとシフトしたバンドが減少した。一方、非特異的な DNA である *P. aeruginosa* PAO1 のゲノム DNA を添加してもシフトしたバンドの減少は見られなかった。以上の結果より、OCh114 株の PpsR は *bchC* プロモーター領域に特異的に結合することが示された。

次に、LOV-HK が PpsR の DNA 結合能に影響を与えるのかを調べるため、精製 LOV-HK または LOV-HK-C69A を反応液の中に加え、バンドのシフトに変化が見られるか調べた (Fig. 3-2B)。もし、LOV-HK が PpsR と相互作用し、PpsR の DNA 結合能に影響を与えるのであれば、LOV-HK の添加によりシフトしたバンドの減少といった、PpsR と DNA の複合体のバンドに変化が見られると予想される。PpsR に対して約 2.7 倍、5.3 倍量の LOV-HK を加えたが、暗条件と明条件のどちらでもバンドのシフトに変化は見られず、LOV-HK と PpsR の相互作用は確認できなかった。

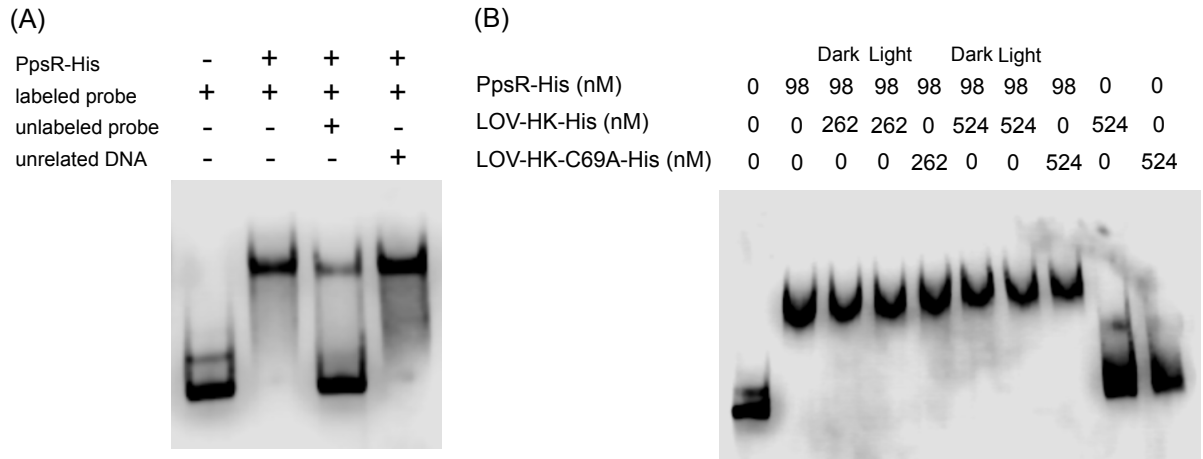


Figure 3-2. Gel mobility shift assay with PpsR-His. (A) A competition experiment was performed. Biotin-labeled *bchC* promoter region was used as probe. Genomic DNA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (unrelated DNA) and unlabeled *bchC* promoter DNA were used as competitors. PpsR-His concentration was 50 nM. (B) LOV-HK and LOV-HK-C69A were added. In light condition, the sample was exposed to light during incubation with DNA probe.

3-2 RD1-1653 と *ppaA* の機能解析

3-2-1 RD1-1653 破壊株の作製と解析

R. sphaeroides の AppA は 450 アミノ酸からなり、N 末端側に BLUF ドメインがあり、C 末端側にはシステインリッチな領域が見られるのに対して、*RD1-1653* は 131 アミノ酸からなる比較的小さいタンパク質をコードする遺伝子であり、BLUF ドメインのみが見られた。

RD1-1653 の破壊は相同組換えにより行い、*RD1-1653* の部分が Sm/Sp 耐性遺伝子となった破壊株を作製した。*RD1-1653* が破壊されていることは PCR により確認した。野生株では 0.5 kbp の PCR 産物がみられ、もし、*RD1-phyR* が破壊されていれば、そのバンドが 2 kbp にシフトするはずである。破壊候補株で PCR を行なって確認したところ、2 kbp にバンドが確認できたため、この株を 1653 破壊株 ($\Delta 1653$ 株)とした (Fig. 3-3)。

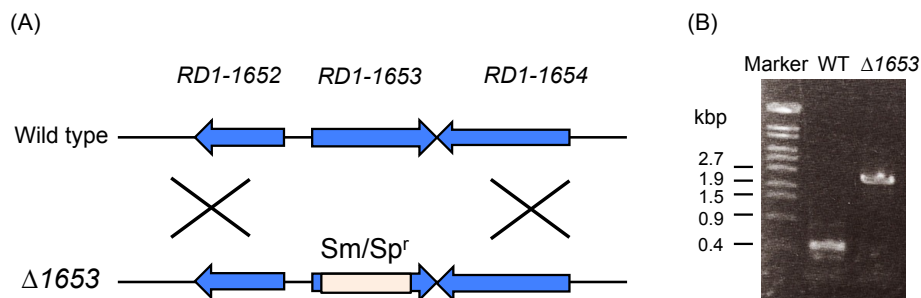


Figure 3-3. Construction of $\Delta 1653$. (A) Diagram showing chromosomal position of RD1-1653. (B) Diagnostic PCR of RD1-1653 deletion.

RD1-1653 が光合成制御のシグナル伝達に関わっているのかを調べるため、 $\Delta 1653$ 株の暗条件と青色光条件で培養したときの光合成色素生産及び光合成関連遺伝子である *bchC* の転写レベルを測定し、野生株と比較した。

$\Delta 1653$ 株は暗条件で野生株と同程度のバクテリオクロフィルとカロテノイドを生産し、その生産は青色光で抑制された (Fig. 3-4)。また、*bchC* 転写レベルも暗条件と青色光条件のどちらでも野生株と同程度であった (Fig. 3-5)。これらの結果から、RD1-1653 は光合成関連遺伝子の制御には関わっていないことが推測された。

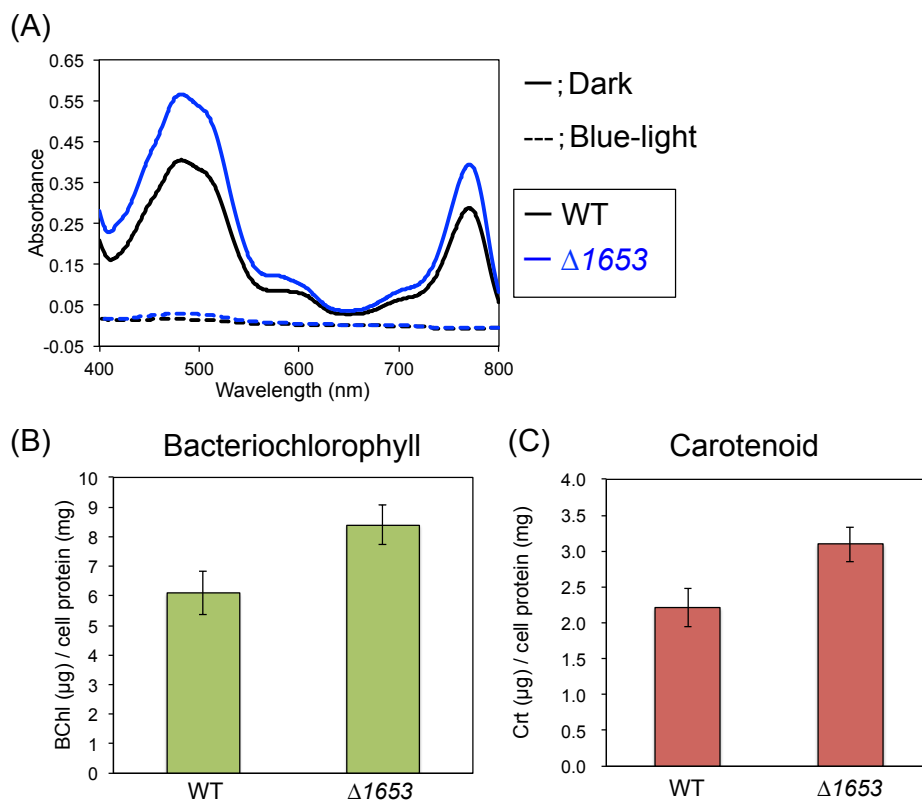


Figure 3-4. Photopigments production in wild-type and $\Delta 1653$ strains. (A) The spectrophotometric determination of the photopigments. The wild-type and $\Delta 1653$ strains were cultivated aerobically in 100 ml of glycerol medium under dark or blue-light conditions. The cells were collected in late log phase and the pigments were extracted. The absorption spectra of the extracts were measured. The curves represent the mean of three independent experiments. (B) Quantitative determination of bacteriochlorophyll and carotenoid contents in the cells grown under dark condition. Bacteriochlorophyll and carotenoid contents were calculated from the absorption coefficients as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments. Error bars indicate standard deviation from the means.

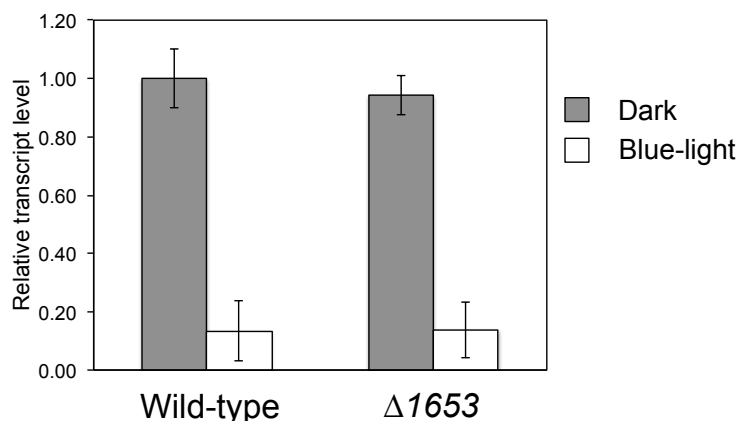


Figure 3-5. Quantitative RT-PCR showing the relative expression level of *bchC* in wild-type strain and $\Delta 1653$ strain under dark or blue-light conditions. The strains were grown in glycerol medium aerobically. Total RNA was extracted from early log phase (OD600=0.6-1.6) cultures. *rpoD* gene was used as a normalizer. Data are means of three independent experiments. Error bars indicate standard deviation from the means.

3-2-2 *ppaA* 破壊株の作製と解析

相同組換えにより *ppaA* の部分が Sm/Sp 耐性遺伝子となった破壊株を作製した。*ppaA* が破壊されていることは PCR により確認した。野生株では 0.7 kbp の PCR 産物がみられ、もし、*ppaA* が破壊されていれば、そのバンドが 2.2 kbp にシフトするはずである。破壊候補株で PCR を行なって確認したところ、2.2 kbp にバンドが確認できたため、この株を *ppaA* 破壊株 ($\Delta ppaA$ 株)とした (Fig. 3-6B)。

ppaA は多くの紅色光合成細菌の PGC 内で *ppsR* の上流に位置している。Fig.3-6A に示すように、OCh114 株でも *ppaA* はリプレッサーである *ppsR* の上流に位置していた。*ppaA* の破壊が *ppsR* の転写に影響を与える可能性があったため、 $\Delta ppaA$ 株の *ppsR* 転写レベルを測定し、野生株と比較した。その結果、 $\Delta ppaA$ 株では *ppsR* の転写レベルが野生株の 20 分の 1 程度まで減少し、*ppaA* の破壊により、*ppsR* の転写レベルに影響がでてしまった (Fig. 3-6C)。*ppaA* 破壊ときに挿入した抗生物質耐性遺伝子には両末端に FRT 配列を挿入していたため、Flp-FRT 組換えシステムにより抗生物質耐性遺伝子の除去を試みた。しかし、FLP 遺伝子を含むプラスミドを $\Delta ppaA$ 株に導入しても、抗生物質耐性遺伝子は除去されず、挿入されたままだった。本菌では FLP による組換えの頻度が低い可能性を考えて、ペニシリンスクリーニングにより、抗生物質耐性遺伝子除去株の取得を試みたが、取得できなかった。また、FLP 遺伝子を含むプラスミドを作製したときに、耐性遺伝子除去後にプラスミドを脱落させるために、レバンスクラーズをコードする *sacB* 遺伝子もそのプラスミド上に導入した。そこで、*sacB* によるスクロー

ス添加によるカウンターセクションができるのかも確認した。その結果、プラスミドを保持している株でもスクロースが添加された培地で生育することが確認され、本菌では *sacB* によるカウンターセクションは行えないことが示唆された。

現段階では、OCh114 株で FLP による抗生物質耐性遺伝子の除去やカウンターセクションができないことから、本菌でマーカース破壊株を作製することは困難であると考えられた。そこで、 $\Delta ppaA$ 株に *ppsR* を相補した株 (+*ppsR* 株) 及び、*ppaA* と *ppsR* を両方相補した株 (+ [*ppaA-ppsR*] 株) を取得し、それらを用いて各株間での *bchC* 転写レベルを比較した (Fig. 3-7)。 $\Delta ppaA$ 株では *bchC* の転写レベルは野生株と比べて高い傾向にあった。この上昇は *ppsR* の転写レベルが減少し抑制がされなくなったことが原因であると考えられる。+*ppsR* 株は $\Delta ppaA$ 株と *bchC* の転写レベルは大きく変わらなかった。一方で、+ [*ppaA-ppsR*] 株では +*ppsR* 株と比べて *bchC* 転写レベルが低い傾向が見られた。これらの結果から、本菌では PpaA は PpsR による光合成関連遺伝子の転写抑制を補助するコリプレッサーとして機能していることが示唆された。

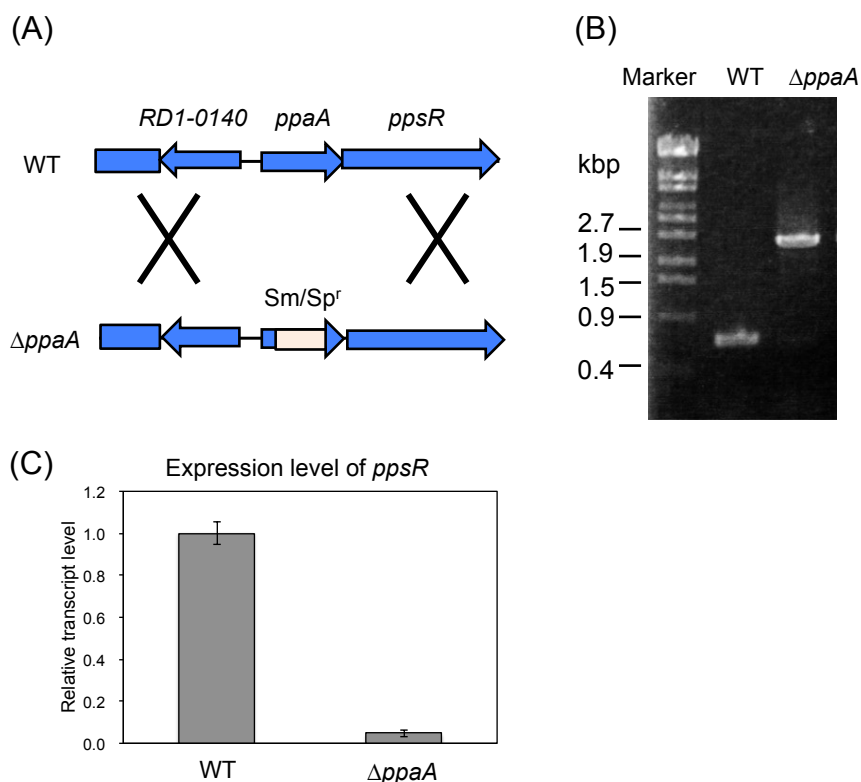


Figure 3-6. Construction of $\Delta ppaA$. (A) Diagram showing chromosomal position of *ppaA*. (B) Diagnostic PCR of *ppaA* deletion. (C) qRT-PCR showing the relative expression level of *ppsR* in wild-type strain and $\Delta ppaA$ strain. Data are means of three independent experiments. Error bars indicate standard deviation from the means.

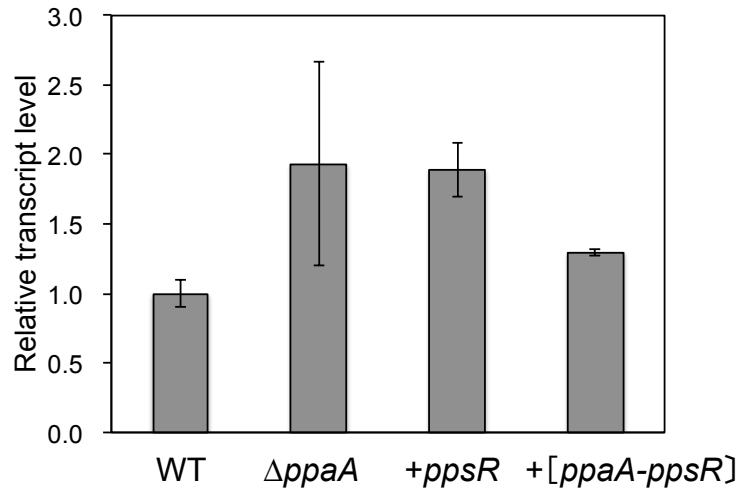


Figure 3-7. Quantitative RT-PCR showing the relative expression level of *bchC* in wild-type strain, $\Delta ppaA$, +*ppsR* and + [*ppaA-ppsR*] strains under the dark condition. The strains were grown in glycerol medium aerobically. Total RNA was extracted from early log phase ($OD_{600}=0.6-1.6$) cultures. *rpoD* gene was used as a normalizer. Data are means of three independent experiments. Error bars indicate standard deviation from the means.

3-3 PpsR と PpaA の相互作用解析

3-3-1 MBP-PpaA のコバラミン結合能

R. capsulatus の AerR (PpaA ホモログ) はアデノシルコバラミンやメチルコバラミンとは結合しないが、アデノシルコバラミンが光加水分解することによって生じるヒドロキシコバラミンと結合し PpsR と相互作用すると報告がある(42)。そこで、OCh114 株の PpaA のアデノシルコバラミン (Ado)、ヒドロキシコバラミン (OH)、メチルコバラミン (Me) に対する結合能を調べた。各種コバラミンを MBP-PpaA を発現させた大腸菌の細胞懸濁液に添加し、精製したタンパク質の吸収スペクトルを測定した (Fig. 3-8B)。非添加条件 (non) では 300-600 nm の間には吸収は見られなかったが、各種コバラミンを添加し、精製したサンプルでは、Ado、OH、Me の全てのサンプルで 350-400 nm と 550 nm 付近にコバラミン由来の吸収がみられた。OCh114 株の PpaA はヒドロキシコバラミンに加えて、アデノシルコバラミンとメチルコバラミンとも結合できることが示された。

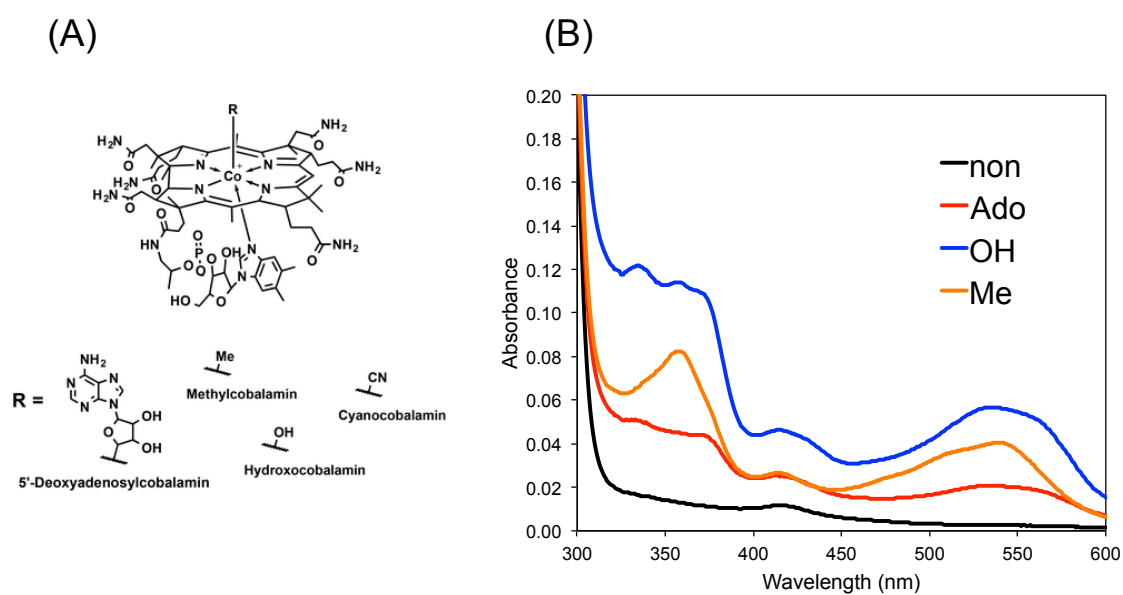


Figure 3-8 (A) Structures of cobalamin derivatives(6).

(B) Absorption spectra of MBP-PpaA treated with various forms of cobalamin.

Different forms of cobalamin were added to *E. coli* cell lysate in which MBP-PpaA was overexpressed, and then MBP-PpaA was purified with amylose resin.

3-3-2 MBP-PpaA, LOV-HK-His 混合条件での PpsR のゲルシフトアッセイ

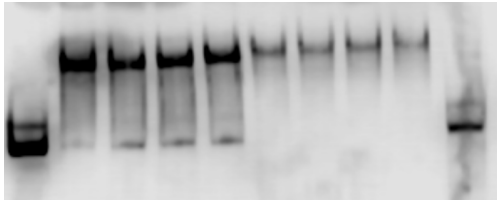
相補実験の結果から、OCh114 株の PpaA は PpsR のコリプレッサーであることが示唆された。一方で、*R. capsulatus* では PpaA は PpsR のアンチリプレッサーであると報告がある、ヒドロキソコバラミンの結合した PpaA が PpsR と相互作用することがプルダウンアッセイにより示され、また、DNaseI フットプリント法による実験により、PpaA が PpsR の DNA 結合に阻害的に働くことが示された(42)。そこで、MBP-PpaA、PpsR-His と様々なコバラミンを添加した条件でゲルシフトアッセイを行い、DNA-タンパク質複合体の解析を行なった。

もし、PpaA が PpsR と相互作用するとしたら、PpaA を添加することで PpsR と PpaA が複合体を形成し移動度の異なるバンドが検出される、もしくは、PpaA が PpsR の DNA 結合能を低下させ遊離の DNA が増加することが予想される。各種コバラミン単体の添加は PpsR の DNA 結合に影響を与えなかった (Fig. 3-9A 左側)。また、MBP-PpaA と各種コバラミンを添加してもシフトしたバンドは PpsR-His のみのときと同様であり、違いは見られなかった (Fig. 3-9A 右側)。PpaA に付与されている MBP タグが PpsR との相互作用を妨げている可能性が考えられたため、MBP-PpaA の MBP を Factor Xa プロテアーゼ処理を行うことで除去し、同様にゲルシフトアッセイを試みた。しかし、MBP タグを除いた PpaA は凝集しやすく、結果を得ることができなかった (data not shown)。以上の結果より、ゲルシフトアッセイでは、OCh114 株の PpaA と PpsR の二者を混合した条件において、PpaA が PpsR と直接相互作用することを示唆する結果は得られなかった。

PpaA と PpsR の二者の混合では、PpsR と DNA の結合能や複合状態に変化は見られなかった。そこで、OCh114 株で光合成制御に関わっている因子の一つである LOV-HK をさらに添加することで、PpsR の DNA 結合能が変化する可能性について検討した。MBP-PpaA と各種コバラミンに加えて、LOV-HK-His を反応液に添加しゲルシフトアッセイ解析を行なった (Fig. 3-9B)。LOV-HK を添加してもバンドのシフトに変化は見られず、PpaA と LOV-HK を混合しても PpsR の DNA 結合能または複合体状態に違いは見られなかった。

(A)

PpsR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PpaA	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Cobalamin	-	-	Ado Me OH			-	Ado Me OH			-



(B)

PpsR	-	+	+	+	+	+	+
PpaA	-	-	+	+	+	+	-
LOV-HK	-	-	+	+	+	+	+
Cobalamin	-	-	-	Ado Me OH			-

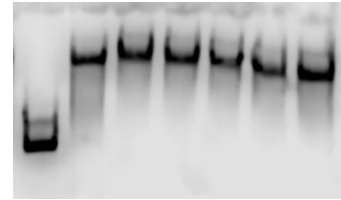


Figure 3-9. Gel mobility shift assay with PpsR-His. (A) MBP-PpaA and various cobalamin derivatives were added to the binding reaction mixtures. Biotin-labeled *bchC* promoter region was used as probe. PpsR-His and MBP-PpaA concentrations were 50 nM and 400 nM, respectively. The concentrations of the cobalamin derivatives concentration were 30 μ M. (B) MBP-PpaA, the cobalamin derivatives and LOV-HK-His were added to the binding reaction mixtures. Biotin-labeled *bchC* promoter region was used as probe. PpsR-His concentration was 50 nM. MBP-PpaA and LOV-HK-His concentration was 200 nM. Various cobalamin derivatives concentration was 30 μ M.

3-4 NaN₃ 及び DNP 添加後の光合成関連遺伝子の転写変動

3-4-1 NaN₃ 添加の影響

第2章の実験で、好気条件で青色光を照射すると光合成関連遺伝子の発現の抑制がみられたが、電子受容体のない嫌気条件では青色光を照射しても抑制が見られないことが観察された。この結果から、光合成関連遺伝子の発現の抑制解除には細胞内の酸化還元状態が大きく影響している可能性が考えられた。そこで、末端酸化酵素阻害剤である NaN₃ の添加、または、電子伝達系は阻害しないが、プロトン勾配を解消する作用を持つ脱共役剤 (2,4-ジニトロフェノール, DNP) の添加による光合成関連遺伝子の転写レベルの変動を qRT-PCR により調べた。

野生株に加えて、光合成関連遺伝子の発現が抑制されている $\Delta LOV-HK$ 株を用い、暗条件下で好氣的に培養し、対数増殖期で NaN₃ を添加し *bchC* 転写レベルの変化を調べた。Table 3-4 は3連分の野生株及び $\Delta LOV-HK$ 株の NaN₃ 添加前と添加して1時間後の *bchC* の相対転写レベルとフォールドチェンジを示している。値にばらつきは見られたため平均値では示さなかった。野生株と $\Delta LOV-HK$ 株のどちらでも NaN₃ を添加することで *bchC* 転写レベルの上昇が見られ、野生株では 1.7-7.5 倍、 $\Delta LOV-HK$ 株では 7.1-81 倍に増加した。また、 $\Delta LOV-HK$ 株の NaN₃ 添加後の相対転写レベルは野生株と同程度であった。

NaN₃ の添加による *bchC* 転写レベルが増加していることから、NaN₃ が PpsR に直接作用し抑制が解除された可能性が考えられた。そこで、ゲルシフトアッセイにより NaN₃ が PpsR の *bchC* プロモーターへの結合を阻害するのか調べた。その結果、NaN₃ を添加しても PpsR の DNA 結合能は変化しないことが示唆された (Fig. 3-10)。

これらの結果より、NaN₃ 添加による光合成関連遺伝子の発現抑制の解除は、NaN₃ を添加したことにより細胞内で起きた二次的な変化に伴って誘導されたと考えられる。また、その抑制解除は $\Delta LOV-HK$ 株でも同様に誘導されている推測される。

Table 3-4. Effect of NaN₃ on expression of *bchC*

	Relative transcript level		Fold-change
	-NaN ₃	+NaN ₃	
WT_1	0.62	2.48	4.0
WT_2	0.64	1.09	1.7
WT_3	0.64	4.78	7.5
$\Delta LOV-HK$ _1	0.07	5.95	81
$\Delta LOV-HK$ _2	0.14	3.12	23
$\Delta LOV-HK$ _3	0.22	1.53	7.1

Relative transcript level shows the values normalized to expression level of *rpoD*.

PpsR-His (nM) - 20 39 98 20 39 98

1 mM NaN₃ - - - - + + +

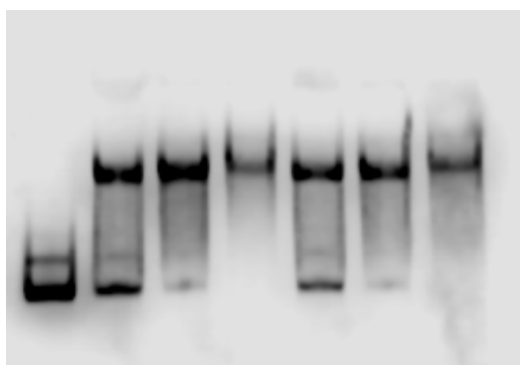


Figure 3-10. Effect of NaN₃ on DNA binding activity of PpsR. Gel mobility shift assay with PpsR-His was performed. 1 mM NaN₃ was added to binding reaction mixtures.

3-4-2 DNP 添加の影響

NaN₃の添加により *bchC* 転写レベルの上昇が見られ、それはリプレッサーに直接作用して起きたものではないことが示唆された。NaN₃の添加により細胞内で起きる変化として、電子伝達系が止まり、プロトン勾配が減少することが考えられ、プロトン勾配の減少が光合成関連遺伝子の発現促進のシグナルとなっている可能性が考えられた。そこで、電子伝達系は阻害せず、プロトン勾配を解消する作用のある脱共役剤を添加したときの *bchC* 転写レベルの変化を調べた。脱共役剤としては DNP を用いた。Fig. 3-11A は野生株の添加前の *bchC* 転写レベルを 1 とした相対転写レベルを示し、Fig. 3-11B は野生株と $\Delta LOV-HK$ 株のそれぞれにおいて、添加前の *bchC* 転写レベルを 1 とした時のフォールドチェンジを示している。野生株では DNP を添加しても *bchC* の転写レベルに変化は見られなかった。一方で、 $\Delta LOV-HK$ 株では DNP を添加することで 2.8 倍上昇した。しかし、その相対転写レベルは野生株と比べると約 5 分の 1 であった。光合成関連遺伝子の発現において、脱共役剤の添加は野生株では影響が見られないが、 $\Delta LOV-HK$ 株では弱く促進することが示唆された。

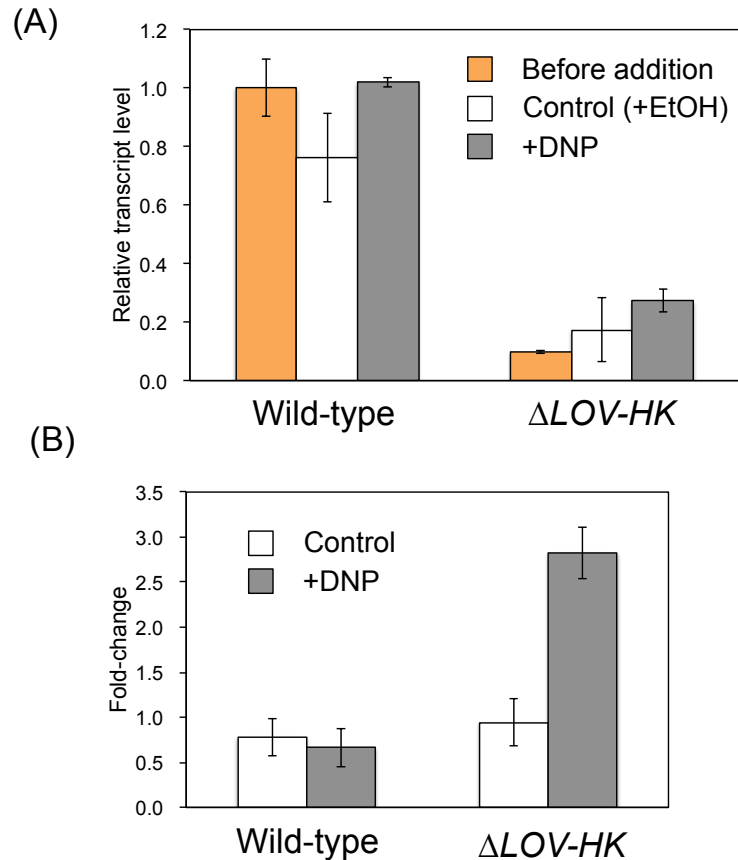


Figure 3-11. Effect of DNP on expression of *bchC*. (A) Relative transcript level of *bchC* in wild-type and $\Delta LOV-HK$ after ethanol or DNP was added. After DNP was added to cultures, the samples were cultivated aerobically under dark condition for 1 hour. In control samples, ethanol was added instead of DNP. Transcription level of *bchC* was analyzed by qRT-PCR. *rpoD* gene was used as a normalizer. Data are means of three independent experiments. Error bars indicate standard deviation from the means.

(B) Fold change in comparison with the transcription level of before addition. Fold-change was calculated from the data of panel A. Data are means of three independent experiments. Error bars indicate standard deviation from the means.

第4節【考察】

本章では OCh114 株の光合成抑制の解除機構の探索を行なった。嫌気性光合成細菌では、PpsR のアンチリプレッサーが存在し、それが PpsR と相互作用することで、PpsR による光合成関連遺伝子の転写抑制を解除する。OCh114 株でも PpsR のアンチリプレッサーとなるタンパク質が存在し抑制解除に関与しているのではないかと考え、LOV-HK、RD1-1653、PpaA の 3 つを PpsR のアンチリプレッサー候補としてあげ、PpsR との相互作用や破壊株を作製し光合成制御との関わりを調べた。

Δ LOV-HK 株では光合成関連遺伝子の発現レベルが好気・暗条件では野生株と比べて低いこと、第2章で述べたように LOV-HK がリン酸リレーとは異なる形で光合成制御に関わっている可能性が高いことから、LOV-HK が PpsR のアンチリプレッサーである可能性が考えられた。そこで、ゲルシフトアッセイにより LOV-HK が PpsR の DNA 結合能に及ぼす影響を調べた。LOV-HK を添加しても PpsR の DNA 結合に変化は見られず、LOV-HK と PpsR の複合体も確認されなかった。また、 Δ LOV-HK 株に NaN_3 を添加することで、野生株と同程度まで *bchC* 転写レベルの上昇が見られ、これは LOV-HK がない状態でも光合成関連遺伝子の発現抑制が解除されることを示している。これらの結果より、LOV-HK が直接 PpsR と相互作用しアンチリプレッサーとして機能する可能性は低いことが強く示唆された。

RD1-1653 は *R. sphaeroides* において PpsR のアンチリプレッサーとして機能する AppA に見られる BLUF ドメインを持つと予想された遺伝子である。 Δ 1653 株は暗条件、青色光条件のどちらも野生株と同等の光合成色素生産が見られ、また、*bchC* 転写レベルも同レベルであったことから、RD1-1653 は光合成制御には関係ないことが示された。AppA は N 末端に BLUF ドメインを持ち、C 末端にシステインリッチな領域を持ち、AppA の PpsR との結合は C 末端側の領域で起こり、BLUF ドメインはその相互作用を調節すると報告がある(86, 87)。RD1-1653 は BLUF ドメインのみからなり、AppA の C 末端と相同な領域は存在しない。そのため、RD1-1653 は PpsR と相互作用する領域を持たないと予想され、破壊しても光合成制御に影響が見られなかった結果は妥当であると考えられる。

本章で OCh114 株の PpaA のコバラミン結合能を調べた結果、嫌気性光合成細菌である *R. capsulatus* や *R. sphaeroides* の AerR または PpaA はヒドロキソコバラミンにとしか結合しないのに対して(42, 43)、OCh114 株の PpaA は、ヒドロキソコバラミンに加えてアデノシルコバラミンやメチルコバラミンとも結合能をもつことが示された。この様々なコバラミンへの結合能は他の好気性光合成細菌の PpaA でも見られている特徴であった(43)。 Δ ppaA 株の相補実験から OCh114 株では PpaA は PpsR のコリプレッサーとして機能し光合成関連遺伝子の発現の抑制に関わることが示唆された。そこで、各種コバラミン存在下での PpaA と PpsR の相互作用をゲルシフトアッセイにより解析したが、各種コバラミン添加条件または非添加条件のどの条件でも PpaA と PpsR の相互作用は確認できなかった。

現在、PpaA または AerR の光合成制御における機能の報告は様々あり、光合成の促進因子と

抑制因子のどちらの機能も報告されている。*R. sphaeroides* と *Rhodospirillum centenum* では、PpaA または AerR の破壊株や過剰発現株の光合成色素生産性や光合成関連遺伝子のプロモーター活性の解析の結果から、PpaA または AerR は好気条件における光合成の発現の促進に関わり、*R. centenum* では嫌気条件においては抑制に関わりと報告された(88, 89)。一方、*R. capsulatus* では、aerR 破壊株の解析から、好気条件では光合成関連遺伝子の発現の抑制に関与することが示唆された(90)。嫌気条件では、破壊株の解析から光合成関連遺伝子の発現促進に関与することが示唆され、*in vitro* の実験で AerR がヒドロキソコバラミンと結合し、CrtJ (PpsR ホモログ) の DNA 結合を阻害することが示された(42, 90)。AerR または PpaA は好気条件か嫌気条件かで、機能が異なる報告が多数されており、レドックスセンサーとしての機能も持つのではないかと考えられる。コバラミンに含まれるコバルトは、+1 価から +3 価までの酸化状態をとることができ、PpaA は細胞内のレドックス状態に応答するポテンシャルをもつと考えられる。本研究では+3 価のコバラミンを添加した実験のみであり、酸化還元状態の異なるコバラミンを用いた実験は行っておらず、PpaA のレドックス状態に焦点を当てた実験は行っていない。また、最近の研究で、*R. capsulatus* の AerR は 2 箇所の翻訳開始点を持ち、生体内では小さい AerR (SAerR) と大きい AerR (LAerR) の 2 つのアイソフォームが存在し、SAerR は光合成を抑制し、LAerR は光合成の促進に関与すると報告された(91)。また、OCh114 株の PpaA は嫌気性光合成細菌の PpaA では見られない、様々なコバラミンとの結合能を示したが、上述した *R. capsulatus* の SAerR と LAerR ではコバラミンに対する結合能も変化し、LAerR はヒドロキソコバラミンとしか結合を示さないのに対して、SAerR はアデノシルコバラミンやメチルコバラミンとも結合を示した(91)。このことから、コバラミン結合能の違いも PpaA の機能において重要な因子ではないかと考えられる。今後は、コバラミン結合能とその酸化還元状態に着目した機能解析を行うことで、PpaA と光合成制御との関わりが明らかになっていくと考えられる。

電子伝達系の末端酸化酵素阻害剤である NaN_3 の添加で光合成関連遺伝子の発現が促進された (Table 3-4)。 NaN_3 の添加によりプロトン勾配の減少が減少し光合成関連遺伝子の発現が促進された可能性が考えられたが、DNP を添加しても違いが見られなかったことから、プロトン勾配の減少は光合成関連遺伝子の発現の促進には関係ないことが示唆された。 NaN_3 を加えることで末端酸化酵素が阻害され、電子伝達系が還元的になったことが促進の要因であると考えられる。嫌気性光合成細菌である *R. sphaeroides* では末端酸化酵素の一つである *cbb₃* 型シトクロム *c* オキシダーゼを破壊した株では好気条件でも光合成関連遺伝子の発現が促進されることが報告され、これは遺伝子破壊で生じた細胞膜の酸化還元状態の変化によるものであると推測されている(92)。OCh114 株でも光合成関連遺伝子の発現は細胞の酸化還元状態で制御されていることが示唆された。嫌気性光合成細菌ではレドックスレギュレーターである RegB/ RegA が光合成制御に関わっている(93)。OCh114 株のゲノム上にも *regB/regA* と相同な遺伝子が存在し、過去に *regA* 破壊株が作製されたが、光合成制御に影響は見られなかった(102)。このことから、OCh114 株には未知の光合成制御に関わるレドックスレギュレーターが存在していることが推測される。

第4章 総括と展望

微生物は多様なエネルギー代謝を持ち、それらを巧みに制御することで様々な環境に適応し生存している。好気性光合成細菌は海洋表層に多く分布し、貧栄養な領域では平均して原核生物の1-7%が、沿海や河口では原核生物の2-15%が好気性光合成細菌であると報告がある(17)。好気性光合成細菌が多く見られる理由の一つとして、多様なエネルギー代謝を持ちこれらを環境の変化に応じて使い分けていることが考えられる。好気性光合成細菌のエネルギー代謝の中でも、光合成は光で抑制されるユニークな制御を受けている。本研究ではこの好気性光合成細菌の持つユニークな光合成制御機構を明らかにすることを目的とし、*Roseobacter denitrificans* OCh114株を用いて、第2章では先行研究で光合成制御に関わることが示されているLOV-HKによる光合成制御機構について、第3章では光合成の発現の脱抑制機構に焦点を当て解析を行った。

OCh114株のLOV-HKはこれまでに報告のある他のLOVタンパク質と同様の光応答性を示し、光を照射することでLOVドメイン内のシステイン残基とフラビンが光照射により一過的に共有結合が形成されることが確認された。さらに、アミノ酸置換変異体の解析から、このフラビンと共有結合を形成するシステイン残基はLOVドメイン内のCys69であることを特定した。また、C69A変異体は光応答性を示さなかったがフラビンは保持されていた。OCh114株は暗条件で培養したときは光合成関連遺伝子の転写が促進されるのに対し、青色光条件ではその転写は抑制される(104)。そこで、LOV-HKタンパク質で見られた光応答性が、OCh114株の暗条件と青色光条件での光合成関連遺伝子の発現制御に関与しているのかを調べるため、 Δ LOV-HK株に野生型LOV-HKまたは光応答性が失われたLOV-HK-C69A変異体を相補した株を利用して、暗条件と青色光条件での光合成関連遺伝子の発現の違いを調べた。LOV-HK-C69A変異体の相補株は野生型相補株と同様に青色光照射による光合成関連遺伝子の転写抑制がみられ、暗条件と青色光条件での光合成発現の制御にLOV-HKのCys69を介した光応答性は関係しないことが示され、OCh114株のLOV-HKは光とは異なるシグナルをセンシングしている可能性が示唆された。また、青色光による光合成関連遺伝子の発現の抑制は好気条件でのみ確認され、嫌気条件では全く抑制がおこらないことが明らかとなり、これは好気性光合成細菌の光合成制御において初の知見である。この結果から、光合成制御において光だけでなく細胞内の酸化還元状態も重要な因子であることが示唆された。フラボプロテインの中にはフラビンの酸化還元を介してレドックスレギュレーターとして機能するものがあることが知られている(76, 77)。LOV-HK-C69A変異体においてもフラビンは保持されており、フラビンを介したレドックスレギュレーターとしては機能できると考えられ、LOV-HKがFMNを補因子とするレドックスセンサーとして機能し、光合成制御に関わっていることが推測された。

ヒスチジinkinナーゼのシグナル伝達はリン酸基転移によって行われる。LOV-HKのアミノ酸配列のアライメントを作製したところ、OCh114株を含むいくつかの生物種のLOV-HKでは、ヒスチジinkinナーゼにおいて保存されているリン酸化されるヒスチジン残基が保存されていないことが明らかとなった。Phos-tag SDS-PAGEを用いて精製LOV-HKの自己リン酸化活性を測定したが、リン

酸化されたタンパク質は検出されなかった。また、他菌由来の LOV-HK で、同様にリン酸化されるヒスチジン残基が保存されていないものの中では、His226 と His266 が比較的保存されていた。しかし、これらヒスチジン残基はヒスチジンキナーゼにおいて一般的にリン酸化される His が存在する二量体ドメインではなく、触媒ドメインに見られた。これらのヒスチジンをアラニンに置換した H226A と H266A 変異体を作製し、それぞれを Δ LOV-HK 株に相補し、これらの変異の影響を調べたところ、それぞれ Δ LOV-HK 株に相補した。各相補株で光合成関連遺伝子の転写レベルの回復が確認でき、どちらの変異も LOV-HK による光合成関連遺伝子の転写促進には影響を与えなかった。これらの結果から、OCh114 株の LOV-HK は自己リン酸化能を持たないことが強く示唆された。本菌の LOV-HK は一般的なヒスチジンキナーゼで見られる His-Asp のリン酸リレーとは異なる、新規なシグナル伝達方法により光合成を制御していることが示唆された。

本菌において LOV-HK による光合成制御には LOV ドメインの光応答は必要ないことが明らかとなり、また、光より細胞内の酸化還元状態が光合成関連遺伝子の発現変化のシグナルとなっていることが示唆された。さらに、本菌の LOV-HK は自己リン酸化能を持たないヒスチジンキナーゼホモログであり、一般的なヒスチジンキナーゼとは異なる方法によりシグナル伝達を行なっている可能性を強く示唆した。しかし、本研究では LOV-HK の光合成制御の具体的なシグナル伝達経路は明らかにすることはできなかった。自己リン酸化能を持たないヒスチジンキナーゼホモログによる制御に関する報告はあるが、その数はまだ少ない。本菌の LOV-HK と同様にリン酸化されるヒスチジン残基が保存されていないヒスチジンキナーゼホモログがシュードヒスチジンキナーゼと呼ばれている。これらは、遺伝子発現制御に関わっている例が報告されており、シュードヒスチジンキナーゼは、自身がリン酸化してシグナル伝達を行うことはないが、二成分制御系の特定のヒスチジンキナーゼのレスポンスレギュレーターへのリン酸基の転移を阻害する作用や、特定のレスポンスレギュレーターと相互作用しリン酸基を安定化する作用が報告されている(84, 85)。これらのことから、本菌の LOV-HK も特定の二成分制御系と関わることで光合成制御に関与している可能性が高いのではないかと考えられる。光合成制御に関わる二成分制御系として、嫌気性光合成細菌で制御に関わっていると報告のある RegB/RegA があげられ(27-29)、RegB/RegA ホモログは OCh114 株のゲノム上にも存在する。しかし、先行研究で RegA を破壊しても、光合成関連遺伝子の発現に変化は見られないことが明らかとなっている(104)。そのため、現時点では LOV-HK が相互作用する二成分制御系の予想は困難である。今後は、OCh114 株のゲノム上に存在するレスポンスレギュレーターやヒスチジンキナーゼと LOV-HK との相互作用を網羅的に解析することで LOV-HK のシグナル伝達経路が明らかになると考えられる。シグナル伝達経路が明らかとなることで、LOV-HK の感知するシグナルの詳細も解明できると考えられる。

多くの紅色光合成細菌において、光合成関連遺伝子は光合成遺伝子クラスター内に存在する PpsR によって抑制され、その抑制の解除は AppA や PpaA といったアンチプレッサーが PpsR と相互作用することにより行われる(36, 37, 40, 42)。先行研究において、OCh114 株でも PpsR が光合

成関連遺伝子のリプレッサーであることが示唆されている(105)。OCh114 株でも PpsR のアンチリプレッサーとなるタンパク質が存在し抑制解除に関与しているのではないかと推測し、LOV-HK、RD1-1653、PpaA の 3 つを PpsR のアンチリプレッサー候補としてあげ、PpsR との相互作用や破壊株を作製し光合成制御との関わりを調べた。ゲルシフトアッセイによる解析から、LOV-HK は PpsR の光合成関連遺伝子プロモーターへの結合を阻害しなかったことから、PpsR に直接作用するアンチリプレッサーではないことが示唆された。RD1-1653 は破壊しても光合成色素生産や光合成関連遺伝子の転写レベルに違いが見られなかったことから、光合成制御には関わっていないことが示された。PpaA は変異株とその相補株の解析から、PpsR のコリプレッサーであることが示唆されたが、ゲルシフトアッセイでは PpsR との相互作用は見られなかった。また、本菌の PpaA はアデノシルコバラミン、メチルコバラミン、ヒドロキシコバラミンの 3 種のコバラミンと結合することが明らかとなった。これは嫌気性光合成細菌の PpaA と異なる点であり、好気条件でも光合成を発現するために重要な要素と予想される。

第 2 章で細胞の酸化還元状態が光合成制御において重要な因子であることを示す結果が得られたため、好気呼吸の末端酸化酵素阻害剤である NaN_3 の添加が光合成関連遺伝子の転写に及ぼす影響を調べた。 NaN_3 を添加することで *bchC* 転写レベルの上昇が見られ、野生株では 1.7-7.5 倍、 $\Delta\text{LOV-HK}$ 株では 7.1-81 倍に増加した。ゲルシフトアッセイにより NaN_3 が PpsR の *bchC* プロモーターへの結合を阻害するのかが調べたところ、 NaN_3 を添加しても PpsR の DNA 結合能は変化しなかった。これらのことから、 NaN_3 の添加による *bchC* 転写レベルの増加は、呼吸阻害による酸化還元状態の変化による可能性が考えられ、また、光合成関連遺伝子の転写促進は必ずしも LOV-HK が必要ではないことが示された。OCh114 株では呼吸の電子受容体がない条件や(第 2 章)、末端酸化酵素が阻害されている条件といった還元力の消費がしばらく条件で光合成関連遺伝子の発現抑制が解除されることが示唆された。PpsR の抑制解除には何らかの酸化還元を受けることができる分子が関与していることが推測される。一般的なレドックス制御に関わる分子としてはチオレドキシシン、グルタチオンなどあり、これらが光合成制御に関与している可能性も考えられる。また、PpaA はコバラミンと結合能を示したが、コバラミンの中心にはコバルトが含まれており、このコバルトは+1 価から +3 価までの酸化状態をとることができる。このことから、PpaA も電子授受が可能であり、酸化還元状態に応答した制御を行うことができることが推測される。これらの電子授受に着目した光合成制御への関与について調べることで、より詳細な抑制解除機構が明らかになると考えられる。

好気性光合成細菌の光合成関連遺伝子の発現は光照射により抑制されるという報告はいくつかあるが(51-53)、酸化還元状態の影響に関しては暗条件において酸素濃度の変化は光合成関連遺伝子の発現に影響を与えないという報告のみで(94)、好気性光合成細菌の光合成制御に関わる因子としては光だけが知られていた。本研究において OCh114 株の光合成関連遺伝子の発現が末端酸化酵素を阻害すると上昇することや、電子受容体のない嫌気条件では青色光を照射しても発現が抑制されないことが明らかとなり、光合成制御に酸化還元状態も関わることを示唆された。

嫌気性光合成細菌の光合成関連遺伝子の発現は酸化還元状態で大きく変化し、好気条件ではリプレッサーである PpsR により発現が抑制されているが、酸素濃度が低下するとその抑制は解除され、光合成関連遺伝子が発現する(36, 37)。嫌気性光合成細菌では PpsR の活性化、不活性化は細胞内の酸化還元状態により調節されていると考えられており、その調節する方法については、アンチリプレッサーの存在(40, 42)、PpsR 自体がレドックスを感知する(95)など、多数報告はあるが未だ不明な部分が多く様々な議論がされている。嫌気性光合成細菌である *Rhodobacter sphaeroides* では、嫌気光独立栄養条件において DMSO などの呼吸鎖の電子受容体を添加すると光合成の発現が減少することや(96)、末端酸化酵素の一つである *cbb₃* 型シトクロム *c* オキシダーゼを破壊することで好気条件でも光合成が発現するようになることが知られている(92)。これらのことから、*R. sphaeroides* では細胞膜のキノンプールの酸化還元状態に応じて PpsR の活性型と不活性型が調節され、光合成制御が行われていることが示唆されている。

本研究でも、OCh114 株において、電子受容体のない条件や末端酸化酵素を阻害した条件などキノンプールが還元的な状態となっていると予想される条件で、光合成関連遺伝子の発現に変化が見られることが明らかとなり、好気性光合成細菌でも嫌気性光合成細菌と同様に呼吸鎖電子伝達系の酸化還元状態に応答した光合成制御が存在していることが示唆された。キノンプールの酸化還元状態を介した光合成制御は好気性、嫌気性を問わず紅色光合成細菌に共通した制御機構ではないかと考えられ、基本的な光合成制御機構は両者で大きな違いはない可能性が示唆された。好気性光合成細菌と嫌気性光合成細菌の間で光合成関連遺伝子の発現条件に違いが見られるのは、酸化還元状態を感知しそれを PpsR へと伝える分子の違いにより起きている可能性が考えられる。一つの可能性として、LOV-HK が好気性光合成細菌に特有の酸化還元状態を感知し PpsR へと伝える分子であり、LOV-HK は比較的酸化的な条件でも還元され、PpsR の不活化に関わっており、そのため、好気条件でも光合成関連遺伝子を発現できることが考えられる。また、光合成関連遺伝子の発現条件に違いが見られる他の要因として、嫌気性光合成細菌と好気性光合成細菌では個々の細胞が保っている酸化還元状態が異なる可能性も考えられる。嫌気性光合成細菌は Calvin サイクルを持つのに対して、好気性光合成細菌は Calvin サイクルを持たないという特徴がある。そのため、好気性光合成細菌は嫌気性光合成細菌と比べて還元力を消費する手段が少ないと予想され、細胞はより還元的な状態で保たれている可能性が考えられ、それが、好気条件でも光合成を発現する原因となっている可能性も考えられる。

好気性光合成細菌において、もし、酸化還元状態による制御が唯一の光合成制御機構だとすると、好気条件で青色光を照射した時には、何らかの電子伝達系の電子フローの変化が起きて光合成が抑制されている可能性が考えられる。今後は、様々な電子伝達系タンパク質の阻害剤が光合成関連遺伝子の発現に及ぼす影響を見ることが、電子伝達系の電子フローが野生株と異なる変異株を作製し、それを用いて光合成関連遺伝子の発現パターンを解析することで好気性光合成細菌の細胞の酸化還元状態に応答した光合成制御機構の詳細が明らかにできると考えられる。

Fig. 4-1 は本研究から示唆された *R. denitrificans* OCh114 株の光合成制御機構を示している。好気性光合成細菌である OCh114 株の光合成関連遺伝子の発現が電子伝達系の還元力の消費が停滞する条件において促進されることを見出した。また、そのような条件では光による光合成発現の抑制がみられないことが明らかとなった。これは好気性光合成細菌が自然環境中で電子受容体が不足するような環境では積極的に光合成を行なっていることを示唆するものである。実際、好気性光合成細菌は貧栄養な環境より富栄養な環境でより多く見られると報告があり(97)、そのような環境では他の生物も比較的多く存在し、酸素や硝酸などの最終電子受容体は不足することが予想される。好気性光合成細菌は、電子受容体が不足し呼吸によるエネルギー生産が低下したときに、光合成により不足するエネルギーを補うことができ、それが海洋表層に多く見られる一因ではないかと考えられる。

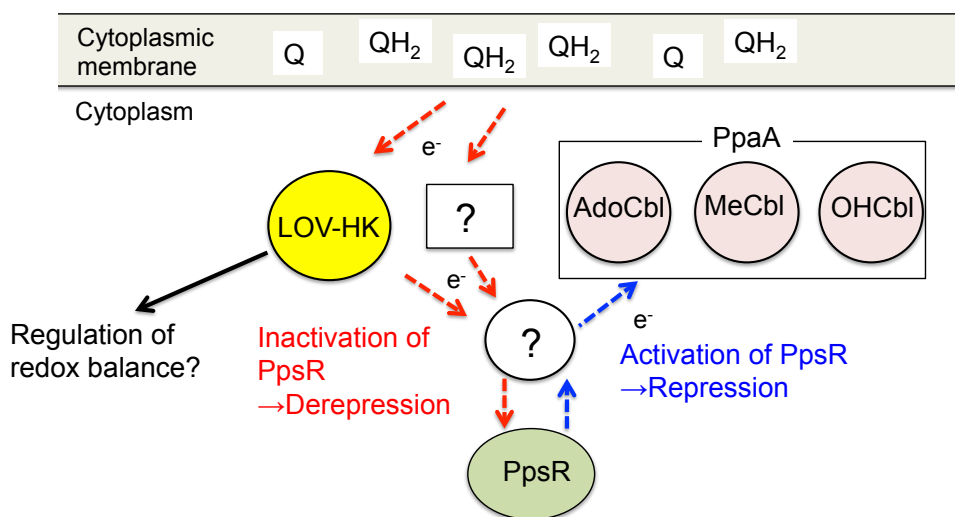


Figure 4-1. Proposed schematic regulation of photosynthetic genes in *R. denitrificans* OCh114. Q; ubiquinone, QH₂; ubiquinol, AdoCbl; adenosylcobalamin, MeCbl; methylcobalamin, OHCbl; hydroxocobalamin.

引用文献

1. Y. Zeng, F. Feng, H. Medová, J. Dean, M. Koblížek, Functional type 2 photosynthetic reaction centers found in the rare bacterial phylum Gemmatimonadetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 7795-7800 (2014).
2. M. Tank, D. A. Bryant, Nutrient requirements and growth physiology of the photoheterotrophic Acidobacterium, *Chloracidobacterium thermophilum*. *Front Microbiol* **6**, 226 (2015).
3. H. Arata, Y. Serikawa, K. Takamiya, Trimethylamine *N*-oxide respiration by aerobic photosynthetic bacterium, erythrobacter sp OCh114. *Journal of Biochemistry* **103**, 1011-1015 (1988).
4. A. G. McEwan, H. G. Wetzstein, S. J. Ferguson, J. B. Jackson, Periplasmic location of the terminal reductase in trimethylamine *n*-oxide and dimethylsulfoxide respiration in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*. *Biochimica Et Biophysica Acta* **806**, 410-417 (1985).
5. A. G. McEwan, Photosynthetic electron-transport and anaerobic metabolism in purple nonsulfur phototrophic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **66**, 151-164 (1994).
6. A. R. Jones, The photochemistry and photobiology of vitamin B₁₂. *Photochem Photobiol Sci* **16**, 820-834 (2017).
7. J. M. Dubbs, F. R. Tabita, Regulators of nonsulfur purple phototrophic bacteria and the interactive control of CO₂ assimilation, nitrogen fixation, hydrogen metabolism and energy generation. *Fems Microbiology Reviews* **28**, 353-376 (2004).
8. T. A. Hansen, H. van Gemerden, Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria. *Arch Mikrobiol* **86**, 49-56 (1972).
9. V. V. Yurkov, E. N. Krasilnikova, V. M. Gorlenko, Thiosulfate metabolism in the aerobic bacteriochlorophyll-*a*-containing bacteria *Erythromicrobium hydrolyticum* and *Roseococcus thiosulfatophilus*. *Microbiology* **63**, 91-94 (1994).
10. A. Zaar, G. Fuchs, J. R. Golecki, J. Overmann, A new purple sulfur bacterium isolated from a littoral microbial mat, *Thiorhodococcus drewsii* sp. nov. *Arch Microbiol* **179**, 174-183 (2003).
11. O. Beja *et al.*, Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature* **415**, 630-633 (2002).
12. B. M. Fuchs *et al.*, Characterization of a marine gammaproteobacterium capable of aerobic anoxygenic photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2891-2896 (2007).
13. W. D. Swingley *et al.*, The complete genome sequence of *Roseobacter denitrificans* reveals a mixotrophic rather than photosynthetic metabolism. *J Bacteriol* **189**, 683-690 (2007).
14. H. Brinkman, M. Goker, M. Koblizek, I. Wagner-Dobler, J. Petersen, Horizontal operon transfer, plasmids, and the evolution of photosynthesis in Rhodobacteraceae. *Isme Journal* **12**, 1994-2010

- (2018).
15. T. Shiba, K. Harashima, Aerobic photosynthetic bacteria. *Microbiol Sci* **3**, 376-378 (1986).
 16. Z. S. Kolber, C. L. Van Dover, R. A. Niederman, P. G. Falkowski, Bacterial photosynthesis in surface waters of the open ocean. *Nature* **407**, 177-179 (2000).
 17. M. Koblížek, Ecology of aerobic anoxygenic phototrophs in aquatic environments. *FEMS Microbiol Rev* **39**, 854-870 (2015).
 18. V. V. Yurkov, J. T. Beatty, Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 695-724 (1998).
 19. T. Suyama *et al.*, Roseateles depolymerans gen. nov., sp. nov., a new bacteriochlorophyll a-containing obligate aerobe belonging to the beta-subclass of the Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**, 449-457 (1999).
 20. B. M. Fuchs *et al.*, Characterization of a marine gammaproteobacterium capable of aerobic anoxygenic photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 2891-2896 (2007).
 21. I. Wagner-Döbler *et al.*, The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae*: a hitchhiker's guide to life in the sea. *ISME J* **4**, 61-77 (2010).
 22. M. Koblížek *et al.*, Genome sequence of the marine photoheterotrophic bacterium *Erythrobacter* sp. strain NAP1. *J Bacteriol* **193**, 5881-5882 (2011).
 23. H. M. Oh, S. J. Giovannoni, S. Ferriera, J. Johnson, J. C. Cho, Complete genome sequence of *Erythrobacter litoralis* HTCC2594. *J Bacteriol* **191**, 2419-2420 (2009).
 24. Q. Zheng, R. Zhang, N. Jiao, Genome sequence of *Citromicrobium* strain JLT1363, isolated from the South China Sea. *J Bacteriol* **193**, 2074-2075 (2011).
 25. G. Cohen-bazire, W. R. Sistrom, R. Y. Stanier, Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J Cell Comp Physiol* **49**, 25-68 (1957).
 26. S. M. Herter, C. M. Kortlüke, G. Drews, Complex I of *Rhodobacter capsulatus* and its role in reverted electron transport. *Arch Microbiol* **169**, 98-105 (1998).
 27. C. S. Mosley, J. Y. Suzuki, C. E. Bauer, Identification and molecular genetic characterization of a sensor kinase responsible for coordinately regulating light harvesting and reaction center gene expression in response to anaerobiosis. *J Bacteriol* **176**, 7566-7573 (1994).
 28. J. M. Eraso, S. Kaplan, prrA, a putative response regulator involved in oxygen regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **176**, 32-43 (1994).
 29. J. M. Eraso, S. Kaplan, Oxygen-insensitive synthesis of the photosynthetic membranes of *Rhodobacter sphaeroides*: a mutant histidine kinase. *J Bacteriol* **177**, 2695-2706 (1995).
 30. L. R. Swem *et al.*, Signal transduction by the global regulator RegB is mediated by a redox-active cysteine. *EMBO J* **22**, 4699-4708 (2003).

31. J. Wu, C. E. Bauer, RegB kinase activity is controlled in part by monitoring the ratio of oxidized to reduced ubiquinones in the ubiquinone pool. *MBio* **1**, (2010).
32. J. Willett, J. L. Smart, C. E. Bauer, RegA control of bacteriochlorophyll and carotenoid synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **189**, 7765-7773 (2007).
33. J. H. Zeilstra-Ryalls, K. Gabbert, N. J. Mouncey, S. Kaplan, R. G. Kranz, Analysis of the *fnrL* gene and its function in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **179**, 7264-7273 (1997).
34. J. H. Zeilstra-Ryalls, S. Kaplan, Role of the *fnrL* gene in photosystem gene expression and photosynthetic growth of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol* **180**, 1496-1503 (1998).
35. S. Elsen, M. Jaubert, D. Pignol, E. Giraud, PpsR: a multifaceted regulator of photosynthesis gene expression in purple bacteria. *Mol Microbiol* **57**, 17-26 (2005).
36. M. Gomelsky, S. Kaplan, Genetic evidence that PpsR from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 functions as a repressor of *puc* and *bchF* expression. *J Bacteriol* **177**, 1634-1637 (1995).
37. S. N. Ponnampalam, J. J. Buggy, C. E. Bauer, Characterization of an aerobic repressor that coordinately regulates bacteriochlorophyll, carotenoid, and light harvesting-II expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **177**, 2990-2997 (1995).
38. O. V. Moskvina, L. Gomelsky, M. Gomelsky, Transcriptome analysis of the *Rhodobacter sphaeroides* PpsR regulon: PpsR as a master regulator of photosystem development. *J Bacteriol* **187**, 2148-2156 (2005).
39. M. Gomelsky, S. Kaplan, *appA*, a novel gene encoding a trans-acting factor involved in the regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol* **177**, 4609-4618 (1995).
40. S. Masuda, C. E. Bauer, AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Cell* **110**, 613-623 (2002).
41. Y. Han, M. H. Meyer, M. Keusgen, G. Klug, A haem cofactor is required for redox and light signalling by the AppA protein of *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **64**, 1090-1104 (2007).
42. Z. Cheng, K. R. Li, L. A. Hammad, J. A. Karty, C. E. Bauer, Vitamin B₁₂ regulates photosystem gene expression via the CrtJ antirepressor AerR in *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular Microbiology* **91**, 649-664 (2014).
43. A. J. Vermeulen, C. E. Bauer, Members of the PpaA/AerR Antirepressor Family Bind Cobalamin. *Journal of Bacteriology* **197**, 2694-2703 (2015).
44. T. Shiba, Utilization of light energy by the strictly aerobic bacterium *Erythrobacter* sp OCh114. *Journal of General and Applied Microbiology* **30**, 239-244 (1984).
45. K. Okamura, F. Mitsumori, O. Ito, K. Takamiya, M. Nishimura, Photophosphorylation and oxidative phosphorylation in intact cells and chromatophores of an aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter* sp. strain OCh114. *J Bacteriol* **168**, 1142-1146 (1986).

46. M. Soora, H. Cypionka, Light enhances survival of *Dinoroseobacter shibae* during long-term starvation. *PLoS One* **8**, e83960 (2013).
47. Y. Shioi, Growth-characteristics and substrate-specificity of aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter* sp (OCh114). *Plant and Cell Physiology* **27**, 567-572 (1986).
48. V. V. Yurkov, H. Vangemerden, Impact of light dark regimen on growth-rate, biomass formation and bacteriochlorophyll synthesis in *Erythromicrobium hydrolyticum*. *Archives of Microbiology* **159**, 84-89 (1993).
49. H. Biebl, I. Wagner-Dobler, Growth and bacteriochlorophyll a formation in taxonomically diverse aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in chemostat culture: Influence of light regimen and starvation. *Process Biochemistry* **41**, 2153-2159 (2006).
50. S. Spring, H. Lunsdorf, B. M. Fuchs, B. J. Tindall, The Photosynthetic Apparatus and Its Regulation in the Aerobic Gammaproteobacterium *Congregibacter litoralis* gen. nov., sp nov. *Plos One* **4**, (2009).
51. T. Shiba, O₂ regulation of bacteriochlorophyll synthesis in the aerobic bacterium *Erythrobacter*. *Plant and Cell Physiology* **28**, 1313-1320 (1987).
52. K. Iba, K. Takamiya, Action spectra for inhibition by light of accumulation of bacteriochlorophyll and carotenoid during aerobic growth of photosynthetic bacteria. *Plant and Cell Physiology* **30**, 471-477 (1989).
53. Y. Shioi, M. Doi, Control of bacteriochlorophyll accumulation by light in an aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter* sp. OCh114. *Arch Biochem Biophys* **266**, 470-477 (1988).
54. K. Takamiya, Y. Shioi, H. Shimada, H. Arata, Inhibition of accumulation of bacteriochlorophyll and carotenoids by blue-light in an aerobic photosynthetic bacterium, *Roseobacter denitrificans*, during anaerobic respiration. *Plant and Cell Physiology* **33**, 1171-1174 (1992).
55. H. N. Happ, S. Braatsch, V. Broschek, L. Osterloh, G. Klug, Light-dependent regulation of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 is coordinately controlled by photosynthetic electron transport via the PrrBA two-component system and the photoreceptor AppA. *Mol Microbiol* **58**, 903-914 (2005).
56. B. L. Taylor, I. B. Zhulin, PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 479-506 (1999).
57. U. Krauss *et al.*, Distribution and phylogeny of light-oxygen-voltage-blue-light-signaling proteins in the three kingdoms of life. *J Bacteriol* **191**, 7234-7242 (2009).
58. E. Huala *et al.*, Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**, 2120-2123 (1997).
59. J. M. Christie *et al.*, Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* **282**, 1698-1701 (1998).

60. T. Kagawa *et al.*, Arabidopsis NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* **291**, 2138-2141 (2001).
61. T. Kinoshita *et al.*, Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**, 656-660 (2001).
62. J. A. Jarillo *et al.*, Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* **410**, 952-954 (2001).
63. M. Salomon, J. M. Christie, E. Knieb, U. Lempert, W. R. Briggs, Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* **39**, 9401-9410 (2000).
64. Q. He *et al.*, White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* **297**, 840-843 (2002).
65. G. Rivera-Cancel, W. H. Ko, D. R. Tomchick, F. Correa, K. H. Gardner, Full-length structure of a monomeric histidine kinase reveals basis for sensory regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 17839-17844 (2014).
66. T. E. Swartz *et al.*, The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *J Biol Chem* **276**, 36493-36500 (2001).
67. T. E. Swartz *et al.*, Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science* **317**, 1090-1093 (2007).
68. S. Crosson, S. Rajagopal, K. Moffat, The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* **42**, 2-10 (2003).
69. J. Herrou, S. Crosson, Function, structure and mechanism of bacterial photosensory LOV proteins. *Nature Reviews Microbiology* **9**, 713-723 (2011).
70. E. B. Purcell, D. Siegal-Gaskins, D. C. Rawling, A. Fiebig, S. Crosson, A photosensory two-component system regulates bacterial cell attachment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18241-18246 (2007).
71. R. Foreman, A. Fiebig, S. Crosson, The LovK-LovR two-component system is a regulator of the general stress pathway in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **194**, 3038-3049 (2012).
72. H. R. Bonomi *et al.*, Light regulates attachment, exopolysaccharide production, and nodulation in *Rhizobium leguminosarum* through a LOV-histidine kinase photoreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 12135-12140 (2012).
73. I. Kraiselburd, A. Gutt, A. Losi, W. Gärtner, E. G. Orellano, Functional Characterization of a LOV-Histidine Kinase Photoreceptor from *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Photochem Photobiol* **91**, 1123-1132 (2015).
74. C. Lori, A. Kaczmarczyk, I. de Jong, U. Jenal, A Single-Domain Response Regulator Functions as an Integrating Hub To Coordinate General Stress Response and Development in Alphaproteobacteria.

- MBio* **9**, (2018).
75. S. Crosson, K. Moffat, Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2995-3000 (2001).
 76. S. Hill, S. Austin, T. Eydmann, T. Jones, R. Dixon, *Azotobacter vinelandii* NIFL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2143-2148 (1996).
 77. A. Repik *et al.*, PAS domain residues involved in signal transduction by the Aer redox sensor of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **36**, 806-816 (2000).
 78. T. W. Grebe, J. B. Stock, The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol* **41**, 139-227 (1999).
 79. B. Karniol, R. D. Vierstra, The HWE histidine kinases, a new family of bacterial two-component sensor kinases with potentially diverse roles in environmental signaling. *J Bacteriol* **186**, 445-453 (2004).
 80. A. Losi, The bacterial counterparts of plant phototropins. *Photochem Photobiol Sci* **3**, 566-574 (2004).
 81. E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike, Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nat Protoc* **4**, 1513-1521 (2009).
 82. F. Correa, W. H. Ko, V. Ocasio, R. A. Bogomolni, K. H. Gardner, Blue Light Regulated Two-Component Systems: Enzymatic and Functional Analyses of Light-Oxygen-Voltage (LOV)-Histidine Kinases and Downstream Response Regulators. *Biochemistry* **52**, 4656-4666 (2013).
 83. E. B. Purcell, C. A. McDonald, B. A. Palfey, S. Crosson, An analysis of the solution structure and signaling mechanism of LovK, a sensor histidine kinase integrating light and redox signals. *Biochemistry* **49**, 6761-6770 (2010).
 84. A. P. Mähönen *et al.*, Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* **311**, 94-98 (2006).
 85. W. S. Childers *et al.*, Cell fate regulation governed by a repurposed bacterial histidine kinase. *PLoS Biol* **12**, e1001979 (2014).
 86. M. Gomelsky, S. Kaplan, AppA, a redox regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, is a flavoprotein. Identification of a novel fad binding domain. *J Biol Chem* **273**, 35319-35325 (1998).
 87. Y. Han, S. Braatsch, L. Osterloh, G. Klug, A eukaryotic BLUF domain mediates light-dependent gene expression in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12306-12311 (2004).
 88. S. Masuda, J. Berleman, B. M. Hasselbring, C. E. Bauer, Regulation of aerobic photosystem

- synthesis in the purple bacterium *Rhodospirillum centenum* by CrtJ and AerR. *Photochem Photobiol Sci* **7**, 1267-1272 (2008).
89. L. Gomelsky *et al.*, Identification and in vivo characterization of PpaA, a regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology* **149**, 377-388 (2003).
 90. C. Dong, S. Elsen, L. R. Swem, C. E. Bauer, AerR, a second aerobic repressor of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **184**, 2805-2814 (2002).
 91. H. Yamamoto, M. Fang, V. Dragnea, C. E. Bauer, Differing isoforms of the cobalamin binding photoreceptor AerR oppositely regulate photosystem expression. *Elife* **7**, (2018).
 92. J. P. O'Gara, S. Kaplan, Evidence for the role of redox carriers in photosynthesis gene expression and carotenoid biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol* **179**, 1951-1961 (1997).
 93. S. Elsen, L. R. Swem, D. L. Swem, C. E. Bauer, RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 263-279 (2004).
 94. K. Nishimura *et al.*, Expression of the *puf* operon in an aerobic photosynthetic bacterium, *Roseobacter denitrificans*. *Plant and Cell Physiology* **37**, 153-159 (1996).
 95. S. Masuda *et al.*, Repression of photosynthesis gene expression by formation of a disulfide bond in CrtJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7078-7083 (2002).
 96. J. I. Oh, S. Kaplan, Generalized approach to the regulation and integration of gene expression. *Molecular Microbiology* **39**, 1116-1123 (2001).
 97. N. Jiao *et al.*, Distinct distribution pattern of abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the global ocean. *Environ Microbiol* **9**, 3091-3099 (2007).
 98. J. Sambrook, D. Russell, *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harb Protoc.
 99. R. Simon, U. Priefer, A. Pühler, A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat. Biotechnol* **1**, 784-791 (1983).
 100. F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, J. W. Dubendorff, Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60-89 (1990).
 101. R. E. Parales, C. S. Harwood, Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for gram- bacteria. *Gene* **133**, 23-30 (1993).
 102. O. Lenz, E. Schwartz, J. Dervedde, M. Eitingner, B. Friedrich, The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation. *J Bacteriol* **176**, 4385-4393 (1994).
 103. T. T. Hoang, R. R. Karkhoff-Schweizer, A. J. Kutchma, H. P. Schweizer, A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**, 77-86 (1998).
 104. 木村真人 好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* のエネルギー代謝調節に関する研究 東京大学

大学院農学生命科学研究科博士論文 (2011)

105. 青山春菜 好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* OCh114 のストレス防御に関する研究 東京大学大学院農学生命科学研究科修士論文 (2013)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方々から御指導、御助言、御支援、激励の言葉をいただき、ここにその感謝の意を表します。

本論文を終えるにあたり、終始有益な御指導、暖かな激励を賜りました、

東京大学教授 石井 正治 博士

に深く感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、実験の御指導、日々のディスカッション、多くの御助言をいただきました、

東京大学准教授 新井 博之 博士

に深く感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、終始親身になって御討論、御助言をいただきました、

東京大学助教授 亀谷 将史 博士

に深く感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、御助言、御討論を頂くと共に様々な面でご協力くださった当研究室の諸先輩、同僚ならびに後輩の方々に深く感謝の意を表します。

本学大学院博士課程での生活を支えて頂きました、家族、友人達に深く感謝いたします。

2018年 12月

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 28 年度博士課程 入学
氏名 山本麻衣子
指導教員 石井正治

論文題目

好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* OCh114 の光合成制御に関する研究

第 1 章 序論

生命の維持には持続的なエネルギー供給が必要であり、生物にとって、いかにして生存に必要なエネルギーを獲得するかは重要な課題である。微生物は地球上の様々な環境に遍在し、個々が常に激しい環境変化に曝されている。そのため、微生物は多様なエネルギー代謝を持ち、それらを巧みに制御することで様々な環境に適応し生存している。

紅色光合成細菌はプロテオバクテリア門に属する酸素非発生型光合成を行う光合成細菌であり、光合成を含め、多様なエネルギー代謝を持つことが知られている。紅色光合成細菌の中には嫌気条件でのみ光合成を発現する嫌気性光合成細菌と、好気条件でも光合成を発現する好気性光合成細菌が存在する。好気性光合成細菌は海洋表層に広く分布し、場所によっては海洋表層微生物の最優占種であることが明らかとなり、地球規模の物質循環に関わる重要な菌群であることが示唆されている。好気性光合成細菌の環境中での優占化の一因として多様なエネルギー代謝を持ち、それらを環境の変化に応じて使い分けることが考えられる。好気性光合成細菌の光合成の発現は光によって抑制されるという、一見矛盾したユニークな制御を受けていることが知られているが、その詳細な制御機構は不明な点が多い。そこで本研究では、好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* OCh114 を材料とし、その光合成制御機構を明らかにすることを目的として、第 2 章では OCh114 株において光合成関連遺伝子発現への関与が示されている LOV-HK の光応答性とシグナル伝達方法について調べ、第 3 章では光合成関連遺伝子の抑制解除機構の探索を行なった。

第 2 章 LOV-HK による光合成制御機構の解明

LOV-HK は一般的に N 末端側に LOV (Light, Oxygen, Voltage) ドメイン、C 末端側にヒスチジンキナーゼドメインを持つ二成分制御系のヒスチジンキナーゼである。LOV ドメインは発色団としてフラビンが結合し青色光センサーとして機能する。LOV-HK は様々な生物種において青色光に依存した生理機能の変化の制御に関わっていることが知られている。先行研究において、OCh114 株の *LOV-HK* 破壊株 ($\Delta LOV-HK$) が作製され、その表現型の解析が行われている。 $\Delta LOV-HK$ 株では暗所で培養したときに光合成色素生産が減少し、光合成関連遺伝子の転写レベルも減少していた。このことから *LOV-HK* が本菌において光合成制御に関わる可能性が示されたが、その詳細な制御機構は不明のままであった。そこで本章では、LOV-HK による光合成関連遺伝子の発現制御機構を明らかにすることを目的とし、本菌の LOV-HK タンパク質の光応答性と生体での光による光合成発現抑制との関係性及び LOV-HK のシグナル伝達経路について解析を行なった。

2-1 LOV-HK の光応答性と光合成制御との関係

OCh114 株の LOV-HK を大腸菌で異種発現・精製したところ、本菌の LOV-HK は FMN を発色団として含み、他の LOV ドメインと同様に光を照射することで、フラビンとシステイン残基との間で一過的な共有結合の形成が確認され、光応答性を示すことが明らかとなった。さらに、アミノ酸置換変異体の解析から、このフラビンと共有結合を形成するシステイン残基は LOV ドメイン内の Cys69 であることを特定した。LOV-HK タンパク質で見られた青色光応答性が、OCh114 株の暗条件と青色光条件での光合成関連遺伝子の発現の違いに関与しているのかを調べるため、 $\Delta LOV-HK$ 株に野生型 LOV-HK または光応答性が失われた LOV-HK-C69A 変異体をそれぞれ相補した株を利用して、暗条件と青色光条件での光合成関連遺伝子の発現の違いを調べた。LOV-HK-C69A 変異体の相補株は野生型相補株と同様に青色光照射による光合成関連遺伝子の転写抑制がみられ、暗条件と青色光条件での光合成発現の違いの制御に LOV-HK の Cys69 を介した光応答性は関係しないことが示され、OCh114 株の LOV-HK は光とは異なるシグナルをセンシングしている可能性が示唆された。

LOV-HK-C69A 変異体においても非共有結合的な FMN の結合は維持されていたため、LOV-HK が FMN を補因子とするレドックスセンサーとして機能していることが予想された。そこで、野生株を用いて好気条件または嫌気条件と酸化還元状態の異なる条件で青色光を照射し光合成関連遺伝子の転写レベルの変化を比較した。その結果、青色光による光合成抑制は好気条件でのみ見られ、嫌気条件では全く見られず、細胞の酸化還元状態が光合成制御において重要な因子であることが示唆された。

2-2 LOV-HK のシグナル伝達

ヒスチジンキナーゼのシグナル伝達はリン酸基転移によって行われる。LOV-HK のアミノ酸配列のアライメントを作製したところ、OCh114 株を含むいくつかの生物種の LOV-HK では、ヒスチジンキナーゼにおいて保存されているリン酸化されるヒスチジン残基が保存されていないことが明らか

かとなった。Phos-tag SDS-PAGE を用いて精製 LOV-HK の自己リン酸化活性を測定したが、リン酸化されたタンパク質は検出されなかった。また、他菌由来の LOV-HK で、同様にリン酸化されるヒスチジン残基が保存されていないものの中では、His226 と His266 が比較的保存されていた。これらがリン酸化するヒスチジン残基である可能性が考えられたため、各ヒスチジンをアラニンに置換した H226A と H266A 変異体を作製し、これらの変異の影響を調べたところ、各相補株で光合成関連遺伝子の転写レベルの回復が確認でき、どちらの変異も LOV-HK より光合成関連遺伝子の転写促進には影響を与えなかった。これらの結果から、OCh114 株の LOV-HK は自己リン酸化能を持たないことが強く示唆された。本菌の LOV-HK はシュードヒスチジンキナーゼの一種であり、一般的なヒスチジンキナーゼで見られる His-Asp のリン酸リレーとは異なる、新規なシグナル伝達方法により光合成を制御していることが示唆された。

第 3 章 光合成関連遺伝子の発現抑制解除機構の探索

多くの紅色光合成細菌において、光合成関連遺伝子は光合成遺伝子クラスター内に存在する PpsR によって抑制されている。PpsR による抑制の解除は AppA や PpaA といったアンチリプレッサーとの相互作用により行われる。先行研究において、OCh114 株でも PpsR が光合成関連遺伝子のリプレッサーであることが示唆されている。OCh114 株でも PpsR のアンチリプレッサーとなるタンパク質が存在し抑制解除に関与しているのではないかと推測し、LOV-HK、RD1-1653、PpaA の 3 つを PpsR のアンチリプレッサー候補としてあげ、PpsR との相互作用の解析や破壊株を作製し光合成制御との関わりを調べた。ゲルシフトアッセイによる解析から、LOV-HK は PpsR の光合成関連遺伝子プロモーターへの結合を阻害しなかったことから、PpsR に直接作用するアンチリプレッサーではないことが示唆された。RD1-1653 は破壊しても光合成関連遺伝子の転写レベルに違いが見られなかったことから、光合成制御には関わっていないことが示された。PpaA は変異株とその相補株の解析から、PpsR のコリプレッサーであることが示唆されたが、ゲルシフトアッセイでは PpsR との相互作用は見られなかった。また、本菌の PpaA はアデノシルコバラミン、メチルコバラミン、ヒドロキシコバラミンの 3 種のコバラミンと結合することが明らかとなった。

第 2 章で細胞の酸化還元状態が光合成制御において重要な因子であることを示す結果が得られたため、好気呼吸の末端酸化酵素阻害剤である NaN_3 の添加が光合成関連遺伝子の転写に及ぼす影響を調べた。 NaN_3 を添加することで *bchC* 転写レベルの上昇が見られ、野生株では 1.7-7.5 倍、 $\Delta\text{LOV-HK}$ 株では 7.1-81 倍に増加した。ゲルシフトアッセイにより NaN_3 が PpsR の *bchC* プロモーターへの結合を阻害するのかが調べたところ、 NaN_3 を添加しても PpsR の DNA 結合能は変化しなかったことから、 NaN_3 の添加による *bchC* 転写レベルの増加は、 NaN_3 が PpsR に直接作用したためではなく、呼吸阻害による酸化還元状態の変化による可能性が考えられた。OCh114 株では呼吸の電子受容体がない条件や (第 2 章)、末端酸化酵素が阻害されている条件といった還元力の消費がしづらい条件で光合成関連遺伝子の発現抑制が解除されるという制御が働くことが示された。

第4章 総括と展望

本研究では好気性光合成細菌である *R. denitrificans* OCh114 株の光合成制御機構を明らかにすることを目的として、LOV-HK の光応答性とシグナル伝達方法、光合成関連遺伝子発現の抑制解除機構の 2 つに着目し解析を行なった。OCh114 株の光合成制御において、LOV-HK の LOV ドメインで見られた青色センサーの機能は光合成の制御には関係がないことを明らかにした。LOV-HK は FMN を介して酸化還元状態の感知をしている可能性が考えられた。さらに、本菌の LOV-HK は自己リン酸化能を持たず、一般的なヒスチジンキナーゼで見られる His-Asp のリン酸リレーとは異なる、新規なシグナル伝達方法により光合成を制御していることが強く示唆された。しかし、本研究では具体的な LOV-HK のシグナル伝達経路を特定するまでには至らなかった。本菌では、電子伝達系の還元力の消費が停滞する条件において光合成の発現が促進されることを見出した。また、そのような条件では光による光合成発現の抑制がみられないという現象を捉えた。これは好気性光合成細菌が自然環境中で電子受容体が不足するような環境では積極的に光合成を行なっていることを示唆するものである。好気性光合成細菌において光合成は、電子受容体が不足し呼吸によるエネルギー生産が低下したときに、不足するエネルギーを補う役割を持つことが推測された。

還元力の消費が停滞するということは細胞内の酸化還元状態が大きく変わっていることが示唆され、光合成の制御にはレドックスセンサーが関与していることが推測される。今後はレドックスセンサーに焦点を当てた解析を行うことで好気性光合成細菌の光合成のより詳細な制御機構が明らかになると考えられる。