

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源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 (Δ LOV-HK) が作製され、その表現型の解析が行われている。 Δ 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、 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、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。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 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 はシュードヒスチジinkinナーゼの一種であり、一般的なヒスチジinkin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、ヒドロキソコバラミンの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。