

シアノバクテリアにおける  
炭素／窒素代謝バランス調節機構の解析

農学生命科学研究科  
応用生命工学専攻  
平成16年度博士課程進学  
氏名 小山内 崇  
指導教員 田中 寛

## 目次

第1章 序論.....	1
第1節 シアノバクテリア.....	2
第2節 シグマ因子.....	3
第3節 C/N バランスセンサーPII.....	6
第4節 シアノバクテリアの窒素代謝と窒素関連転写因子 NtcA.....	10
第2章 グループ 2 シグマ因子 SigE は糖異化遺伝子群の発現を正に制御する。	
第1節 序.....	15
第2節 材料と方法.....	15
(1) 材料と生育条件.....	15
(2) マイクロアレイ解析.....	16
(3) ノーザンブロット解析.....	17
(4) 酵素活性測定 (G6PD と 6PGD).....	18
(5) グルコース取り込み活性の測定.....	19
(6) グリコーゲン定量.....	19
(7) ウェスタンブロット解析.....	20
第3節 結果.....	21
(1) マイクロアレイによる SigE レギュロンの探索.....	21
(2) SigE 欠損による解糖系、酸化的ペントースリン酸経路遺伝子群の mRNA 量、酵素活性の減少.....	24
(3) SigE 欠損によるグルコース取り込み速度の低下.....	25
(4) SigE 欠損によるグリコーゲン異化遺伝子群の発現低下とグリコーゲンの過剰蓄積.....	25
(5) SigE 欠損株における従属栄養条件での増殖不全.....	29
(6) SigE と Hik8 の関係.....	33
第4節 考察.....	33
(1) 暗条件下 (従属栄養条件下) における糖異化の役割.....	34
(2) <i>Synechocystis</i> における糖異化酵素の重複性について.....	38
(3) SigE と糖異化遺伝子群のサーカディアンリズム.....	39
(4) SigE の糖異化遺伝子以外のターゲット Cph1.....	40

### 第3章 新規 PII 結合タンパク量 PamA の同定と機能解析

第1節 序.....	43
第2節 材料と方法.....	43
(1) 材料と生育条件.....	43
(2) 酵母ツーハイブリッドスクリーニング.....	45
(3) GST-PamA(475-680)と CBD-PII のアフィニティークロマトグラフィーによる精製.....	45
(4) GST-pulldown 解析.....	47
(5) フェーウエスタンプロット.....	47
(6) ノーザンブロット解析.....	48
(7) ウエスタンプロット解析.....	49
第3節 結果.....	49
(1) 酵母ツーハイブリッドスクリーニングによる PII 結合タンパク質の同定.....	49
(2) <i>In vitro</i> における PII と PamA のタンパク質間相互作用.....	52
(3) PamA 欠損株の作製と PamA 欠損による窒素関連遺伝子群の発現低下.....	53
(4) PamA 欠損による <i>sigE</i> と糖異化遺伝子群の発現低下.....	57
(5) PamA 相補株の作製と PamA 欠損による表現型の遺伝学的解析.....	57
(6) PamA 欠損株の表現型の探索とグルコース感受性.....	63
(7) PamA 欠損株における PII タンパク質量とリン酸化状態.....	63
第4節 考察.....	63
(1) 細胞内における PII と PamA の相互作用および PamA の機能予測.....	63
(2) PamA 欠損による窒素関連遺伝子群の発現低下について.....	67
(3) PamA 欠損株のグルコース感受性の原因.....	69

### 第4章 糖異化遺伝子群は窒素欠乏時に NtcA 依存的に発現誘導を受ける。

第1節 序.....	71
第2節 材料と方法.....	71
(1) 材料と生育条件.....	71
(2) マイクロアレイ解析.....	73

(3) ノーザンブロット解析.....	73
(4) 酵素活性測定 (G6PD と 6PGD).....	73
(5) グリコーゲン定量.....	73
(6) ウェスタンブロット解析.....	73
第3節 結果.....	74
(1) GT株の窒素欠乏下における mRNA プロファイル変化.....	74
(2) 解糖系、OPP 経路遺伝子群の窒素欠乏による発現誘導.....	74
(3) 窒素欠乏下でのグリコーゲン異化遺伝子群の発現誘導とグリコーゲンの蓄積.....	75
(4) SigE 相補株の作製と SigE 欠損による表現型の遺伝学的確認.....	78
(5) 糖異化遺伝子群の窒素欠乏下における発現誘導は NtcA 依存的である。 .....	78
(6) 窒素欠乏時の糖異化遺伝子の発現誘導に Hik8 は関与していない。...	83
第4節 考察.....	92
(1) 窒素欠乏時の糖代謝.....	92
(2) 窒素欠乏時の CO <sub>2</sub> 固定と C/N バランス.....	93
(3) 窒素欠乏下での糖異化遺伝子発現誘導の意義.....	93
(4) 糖異化遺伝子群の転写に関与する未知因子について.....	95
第5章 Mg-キラターゼ H サブユニット (ChlH) およびグルタミシンセターゼ (GS) の、SigE 結合タンパク質としての同定と機能解析	
第1節 序.....	98
第2節 材料と方法.....	98
(1) 材料と生育条件.....	98
(2) 酵母ツーハイブリッドスクリーニング.....	98
(3) GST-ChlH、GST-GS、His-SigE のアフィニティークロマトグラフィーによる精製.....	98
(4) GST-pulldown 解析.....	100
(5) ノーザンブロット解析.....	101
(6) ウェスタンブロット解析.....	101
第3節 結果.....	101
(1) 酵母ツーハイブリッドスクリーニングによる SigE 結合タンパク質の	

同定.....	101
(2) <i>In vitro</i> における SigE と ChlH のタンパク質間相互作用.....	102
(3) 暗条件下および SigE 欠損による ChlH タンパク質の減少.....	110
(4) GS と SigE の <i>in vitro</i> における相互作用.....	110
第 4 節 考察.....	114
第 6 章 総合討論.....	122
(1) 糖異化遺伝子群の多重発現制御機構.....	123
(2) 窒素欠乏下における時間的発現制御カスケード.....	124
(3) SigE および SigE レギュロンの共進化について.....	129
(4) 終わりに.....	133
参考文献.....	134

略語表

ADP	adenosine diphosphate
ATP	adenosine triphosphate
C／N	carbon and nitrogen
EDTA	di-sodium dihydrogen ethylenediamine tetraacetate dehydrate
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase
GT	glucose tolerant
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-piperazineethane-sulfonic acid
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
LAHG	light-activated heterotrophic growth
2-OG	2-oxoglutarate
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
6PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase
SDS	sodium dodecyl sulfate
Tris	N-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycine

## 第 1 章

### 序論

## 炭素／窒素代謝バランスと研究目標

炭素・窒素は細胞を構成する上で必須の元素であり、その代謝制御機構については古くから研究が進められてきた。しかし、炭素／窒素の各代謝については詳細な解析が行われてきたにもかかわらず、両代謝間に存在する「代謝間相互作用」機構については未知な点が多く残されている。本研究では光合成生物のモデル生物である淡水性、単細胞性シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて、炭素・窒素代謝（C／N）バランス調節機構の解明を目標とした。

### 第1節 シアノバクテリア

シアノバクテリアは酸素発生型光合成を行う原核生物である。シアノバクテリアは土壌、淡水、海洋をはじめ、あらゆる生態環境に存在し、その炭素固定は海洋の一次生産において大きな割合を占めるとされる(Li et al., 1994)。

*Synechocystis* sp. PCC 6803（以下 *Synechocystis*）は直径約 2.5  $\mu\text{m}$  の単細胞性球菌であり、淡水性、非窒素固定型原核生物である（Fig. 1-1）。

*Synechocystis* は細胞内に光合成電子伝達、呼吸鎖タンパク質群を含むチラコイド膜、炭素同化を行う複合体であるカルボキシソーム、またはアミノ酸や炭素源の貯蔵源であるシアノフィシン、グリコーゲン粒といった構造を有する（Fig. 1-2）。*Synechocystis* は同一ゲノムを約 10 コピー持ち、世代時間が最適培養条件下で約 8-12 時間である（Labarre et al., 1989）。*Synechocystis* の野生型菌株はグルコース感受性であるが、グルコース存在下で従属栄養的に生育のできる Glucose-tolerant (GT) 株が単離されており（Williams, 1988）、この株は暗条

件下でもグルコース添加および青色光を 1 日 5 分以上照射することにより増殖することができる (Light-activated heterotrophic growth, LAHG)。またこの株を用いることにより、光合成遺伝子の破壊による機能解析も可能となった (Anderson and McIntosh, 1991)。 *Synechocystis* は相同組換えによる遺伝子破壊が可能であること (Williams and Szalay, 1983)、全ゲノム配列が 1996 年に解読され (Kaneko et al., 1996)、他のシアノバクテリア種と合わせてゲノム情報が簡便に得られること (CyanoBase: <http://www.kazusa.or.jp/cyano/>)、簡便で高精度なマイクロアレイが利用できること (CyanoChip, タカラバイオ) など、研究上の利点が多い。また、シアノバクテリアはサーカディアンリズムを刻む唯一の原核生物であるといった特徴も有する (Kondo and Ishiura, 2000)。

## 第2節 シグマ因子

シグマ因子は RNA ポリメラーゼのサブユニットであり、遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写を開始するために必要なタンパク質である (Fig 1-3)。シグマ因子のタンパク質配列は 4 つの領域 (Region) に大別され、N 末端側の Region1 は、比較的多様性に富み、シグマ因子の DNA への結合を阻害していると言われている (Paget and Helmann, 2003)。Region 2 は、3 つの  $\alpha$ ヘリックスからなり、2 番目の  $\alpha$ ヘリックスが RNA ポリメラーゼ  $\beta$ サブユニットとの、3 番目の  $\alpha$ ヘリックスがプロモーターDNA の -10 領域 (後述) との相互作用部位であることが判っている (Campbell et al., 2002; Malhotra et al., 1996)。Region 3 は、比較的保存性が低く、3 つのヘリックスからなり、1 番目のヘリックスが伸長した -10 領域と相互作用する (Campbell et al., 2002)。Region 4 は、

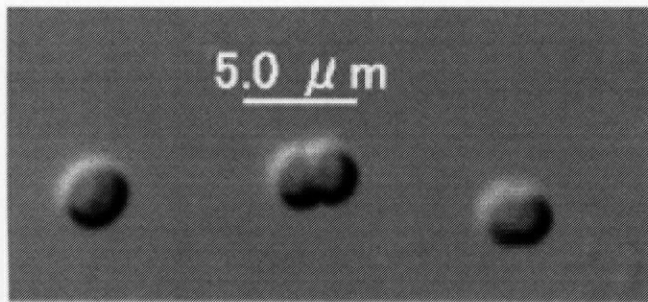


Fig. 1-1 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の光学顕微鏡写真

*Synechocystis* 細胞の直径は約 2.5 μm で、等分裂により増殖する。

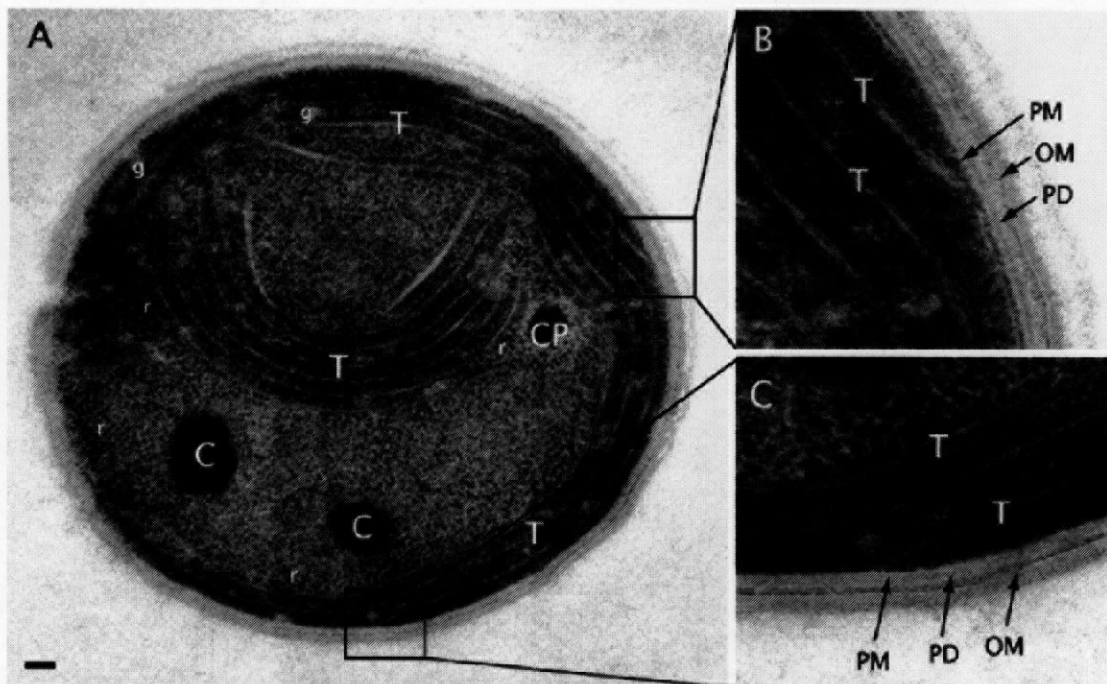


Fig. 1-2 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の電子顕微鏡写真 (Liberton et al., 2006 より転載)

A. *Synechocystis* 細胞の電子顕微鏡写真。B, C は Box 部分の拡大図。

T, チラコイド膜、C, カルボキシソーム、CP, シアノフィシン、G, グリコーゲン塊、PM, 細胞質膜、OM, 外膜、PD, ペプチドグリカン層 (Bar は 100 nm)

2つの $\alpha$ ヘリックスから構成され、プロモーターDNAの-35領域（後述）と結合する（Campbell et al., 2002）。

多くのバクテリアは複数のシグマ因子を有し、環境変動や分化に伴ってRNAポリメラーゼに結合するシグマ因子を切り替えることにより、遺伝子発現プロファイルを変化させる（Wösten, 1998）。シグマ因子は $\sigma^{70}$ ファミリーと $\sigma^{54}$ ファミリーに分けられ、両タンパク質ファミリー間の相同性はほとんどみられない（Merrick et al., 1987）。 $\sigma^{70}$ ファミリーはさらにグループ 1, 2, 3に分けられる（Lonetto et al., 1992）。グループ 1 は主要シグマ因子と呼ばれ、これまで知られているすべてのバクテリアは、グループ 1 シグマ因子を 1 つずつ有する（Gruber and Bryant, 1997）。グループ 1 シグマ因子は対数増殖期におけるほとんどの遺伝子の転写開始を担い、細胞の生存に必須なタンパク質である。グループ 1 シグマ因子によって認識される典型的なプロモーターは、転写開始点から約-35、-10 上流の領域にそれぞれ TTGACA、TATAAT の 6 塩基ずつのコンセンサス配列を有する（Wösten, 1998）。グループ 2 シグマ因子は、グループ 1 シグマ因子と同様のプロモーター配列を認識するが、生存に必須でないシグマ因子である（Lonetto et al., 1992）。グループ 2 シグマ因子は、腸内細菌などに保存される定常期型シグマ因子（RpoS）、シアノバクテリア型シグマ因子、GC 含量の高いグラム陽性細菌型シグマ因子の 3 つのサブグループに大別される（Wösten, 1998）。グループ 3 シグマ因子は、グループ 1, 2 に含まれない $\sigma^{70}$ ファミリーの総称であり、外部環境や分化段階において、それぞれのシグマ因子に特異的なレギュロンの転写を担う（Helmann and Chamberlin, 1988）。

シアノバクテリアにおけるシグマ因子の特徴として、複数のグループ 2 シグ

マ因子を持つこと、また、 $\sigma^{54}$  型シグマ因子を持たないことが知られている (Fig. 1-4) (Gruber and Bryant, 1997)。 *Synechocystis* ゲノムには 9 つのシグマ因子の遺伝子 *sigA~I* がコードされており、これら遺伝子がコードするシグマ因子について、SigA はグループ 1、SigB~E はグループ 2、SigF~I はグループ 3 に分類される (Kaneko et al., 1996)。シアノバクテリアのグループ 2 シグマ因子は、腸内細菌同様に、グループ 1 シグマ因子とよく似たプロモーター認識特異性を持つことが *in vitro* で示されている (Goto-Seki et al., 1999)。 *Synechocystis* における 9 つのシグマ因子のうち、本研究では SigE について研究を行った (第 2、5 章)。

### 第 3 節 C/N バランスセンサーPII

PII (遺伝子名 *glnB*) はバクテリア、古細菌、植物に保存されるタンパク質で、腸内細菌、シアノバクテリアにおいて、細胞内窒素栄養状態をセンシングすることが知られている (Arcondeguy et al., 2001)。また、窒素栄養状態に加え、PII は炭素と窒素のバランス (C/N バランス) もセンシングされている。シアノバクテリアにおける PII は、腸内細菌同様、ホモ三量体を形成し、ATP と 2-OG が結合する (Forchhammer, 2004)。ATP と 2-OG の結合は相互依存的であり、2-OG が結合すると PII に窒素欠乏のシグナルが伝達されと考えられている (Forchhammer and Hedler, 1997)。ATP と 2-OG の結合に加え、*Synechocystis* と *Synechococcus* の PII は 49 番目のセリン残基 (Ser-49) が窒素欠乏時にリン酸化される (Forchhammer and Tandeau de Marsac, 1994)。また外部の CO<sub>2</sub> 濃度が上昇すると PII がリン酸化され、反対に炭素同化の阻害

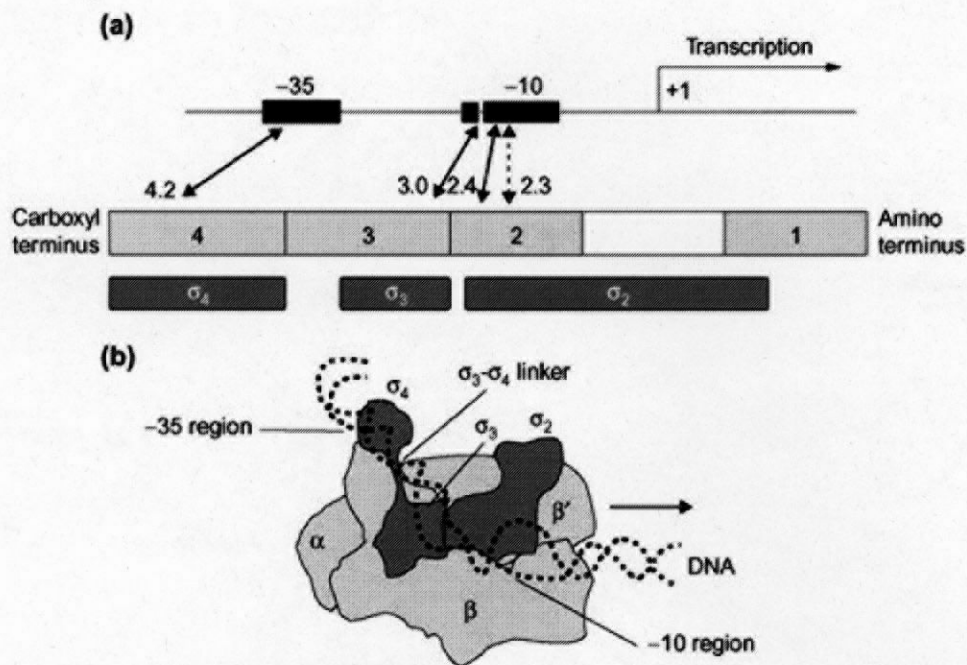


Fig. 1-3 シグマ因子の構造 (大腸菌 $\sigma^{70}$ )

(a) タンパク質配列は4つのRegionに分けられ、C末端側のRegion 4はヘリックスターンヘリックスを形成し、-35領域と相互作用する。Region 3のN末端側とRegion 2はそれぞれ-10領域付近と相互作用する。(b) RNAポリメラーゼホロ酵素 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\sigma$ サブユニット) とDNAとの相互作用モデル。 $\sigma$ サブユニットは黒、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ サブユニットは灰色で示されている。



により脱リン酸化されることが判っている (Forchhammer and Tandeau de Marsac, 1995a)。このように、PII は窒素と炭素の栄養状態によりリン酸化が制御されているため、C/N バランスセンサーであると考えられている。

*Synechococcus* PII 欠損株 (MP2) において、硝酸／亜硝酸トランスポーターの制御異常が知られている。単細胞性シアノバクテリアの野生株は、アンモニア存在下では硝酸または亜硝酸を取り込まないが、MP2 ではアンモニアによる硝酸／亜硝酸トランスポーターの活性抑制が起こらないという表現型を示す (Lee et al., 1998)。PII の Ser-49 をアラニンに置換し、PII を非リン酸化型に固定した変異株では、窒素源に依らず、硝酸／亜硝酸トランスポーターの活性がなくなることから、非リン酸化型の PII が硝酸／亜硝酸トランスポーターの活性を抑制し、リン酸化されると硝酸／亜硝酸トランスポーターが脱抑制されるというモデルが提唱されている (Lee et al., 2000)。硝酸／亜硝酸トランスポーターの ATP 結合サブユニット NrtC の C 末端側のドメインを除去すると MP2 と同様の表現型が観察されることから、PII がこの領域に直接結合し、硝酸／亜硝酸トランスポーターの活性を制御することが示唆されているが (Kobayashi et al., 2005)、直接の相互作用の証拠は今のところ見つかっていない。また硝酸／亜硝酸トランスポーターに加え、*Synechocystis* PII 欠損株では、高炭素濃度条件下における高親和性無機炭素トランスポーターの抑制が起こらないことから、炭素源のトランスポーターの制御も行っている可能性がある (Hisbergues et al., 1999)。

シアノバクテリアにおける PII の相互作用因子として、PII の脱リン酸化酵素 PphA (Sll1771) が *Synechocystis* において発見された (Irmer and

Forchhammer et al., 2001)。PphA は PP2C タイプのセリンスレオニンホスファターゼで、その活性に  $Mg^{2+}$  または  $Mn^{2+}$  を必要とする。精製したリン酸化 PII、PphA タンパク質を用いた *in vitro* の生化学的解析により、PphA による脱リン酸化活性は ATP と 2-OG の存在下で阻害されることがわかった (Ruppert et al., 2002)。この結果は、PII が窒素充足時に脱リン酸化され、窒素欠乏時にリン酸化される事実と一致する。一方、PII のリン酸化酵素については、その活性が 2-OG によって上昇すること、アンモニアを窒素源としたときに低下すること、NtcA 欠損株 (第 4 節参照) で消失することが *Synechococcus* において知られているが、現在までのところ同定されていない (Lee et al., 1999, Kloft et al., 2005)。本研究では *Synechocystis* 新規 PII 結合タンパク質 PamA の同定とその機能解析を行った (第 3 章)

#### 第 4 節 シアノバクテリアの窒素代謝と窒素関連転写因子 NtcA

シアノバクテリアは他のバクテリア同様、窒素源を主にアンモニアの形で、グルタミンシンセターゼ (GS) -グルタミン酸シンターゼ (GOGAT) サイクル (GS-GOGAT cycle) により同化する (Fig. 1-5)。*Synechocystis* の GS は *glnA* 遺伝子にコードされた 52 kDa のタンパク質で、12 量体を形成し、ADP によりその酵素活性が阻害される (Merida et al., 1990)。また、*in vivo* での GS 活性は、窒素源を硝酸からアンモニアに移すと約 1/5 に減少することが知られていたが (Merida et al., 1990)、この活性抑制は IF7 と IF17 というタンパク質が結合することにより起こることが示された (Garcia-Dominguez et al., 1999)。活性レベルに加え、GS は転写レベルでも制御を受け、*glnA* mRNA 量は窒素源が

ない場合に最も多く、硝酸培養、アンモニア培養の順に mRNA 量が減少していくことが知られている (Reyes et al., 1997)。この *glnA* の転写活性化にはシアノバクテリアにおけるグローバルな転写因子である NtcA が関わっている。NtcA は *Synechococcus* sp. PCC 7942 (以下 *Synechococcus*) において、硝酸を窒素源として増殖することができない変異株の中から単離された (Vega-Palas et al., 1990)。NtcA は CRP (Catabolite repression protein) ファミリーに属し、C 末端側にヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフを持つ 2 量体タンパク質である (Vega-Palas et al., 1992)。NtcA は *Synechococcus* および *Synechocystis* *glnA* をはじめとする窒素間連遺伝子群のプロモーター領域にある GTAN<sub>8</sub>TACN<sub>22</sub>TAN<sub>3</sub>T という配列に結合する (Luque et al., 1994; Reyes et al., 1999)。シアノバクテリアの細胞内では、窒素欠乏時に 2-オキシグルタル酸 (2-OG) が蓄積し、窒素欠乏のシグナル伝達因子となることが知られているが (Muro-Pastor et al., 2001)、2-OG は直接 NtcA のプロモーター DNA への結合を促進し、その転写活性を上昇させることが明らかになっている (Vazquez-Bermudez et al., 2002; Tanigawa et al., 2002)。 *Synechocystis* において、NtcA の制御下には *glnA* の他に、*glnB* (PII タンパク質)、*amt1* (アンモニアトランスポーター)、*nrtABCD* (硝酸/亜硝酸トランスポーター)、*sigE* などが含まれることが知られている (Fig. 1-6) (Herrero et al., 2001)。本研究では、マイクロアレイを用いた窒素欠乏下でのグローバルな mRNA プロファイル解析を基に、NtcA と糖異化遺伝子群の関係について解析を行った (第 4 章)。

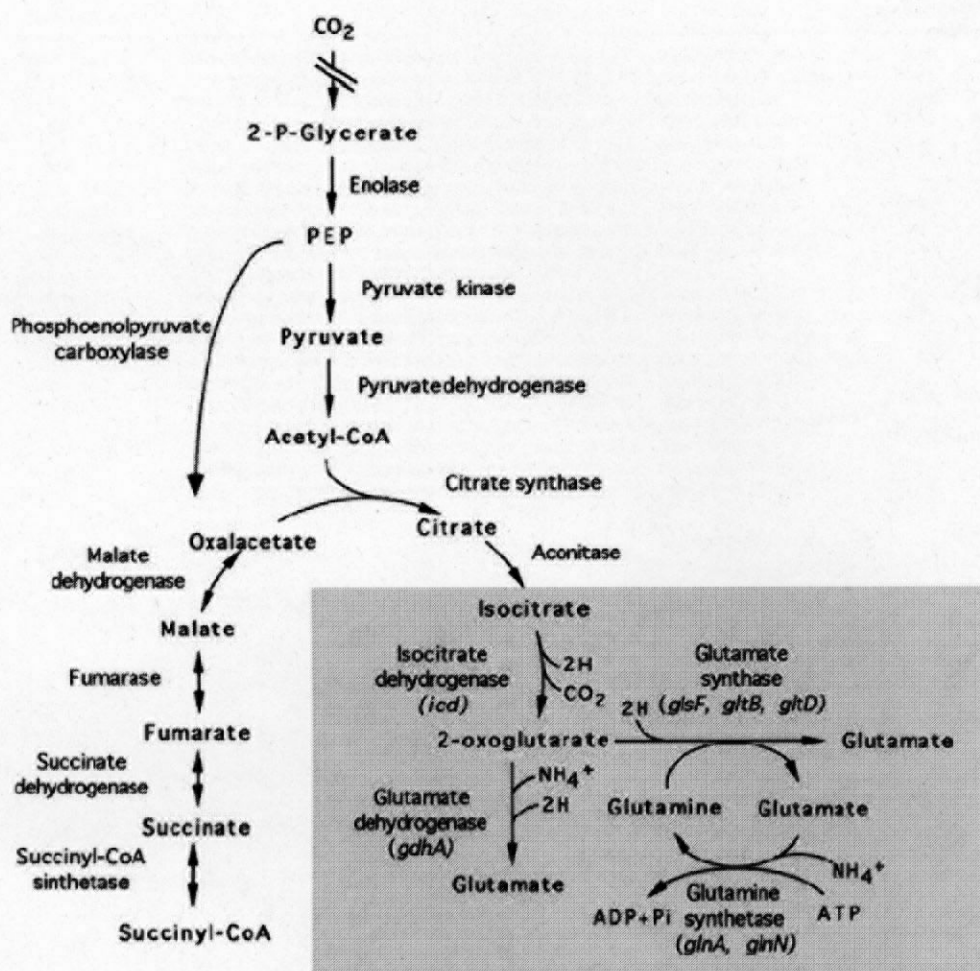


Fig. 1-5 シアノバクテリアにおける窒素同化と炭素、窒素代謝相互作用経路図

(Muro-Pastor et al., 2005 より転載)

典型的な 2-OG デヒドロゲナーゼを持たないため、“開いた” TCA サイクルになっている。2-OG とグルタミンはグルタミン酸シンターゼ (GOGAT) により 2 分子のグルタミン酸に変換される。グルタミンシンセターゼは、ATP のエネルギーを用いて、グルタミン酸とアンモニアからグルタミンを生成する。

Strain	gene/operon	Promoter sequence	tsp location
PCC 7942	<i>nir</i> operon	AAAGTTGTAGTTTCTGT <b>TACCA</b> ATTGCGAATCGAGAACTGCC.. <b>TAATCTG</b> CCGAg	-32
	<i>nirB-ntcB</i>	TTTTTAGTAGCAATTGCT <b>TACA</b> AGCCTTGACTCTGAAGCCCGC.. <b>TTAGGTGGAG</b> CCATTa	-30
	<i>ntcA</i>	GAAAAAGTAGCAGTTGCT <b>TACA</b> AGCAGCAGCTAGGCTAGGCCG.. <b>TACGGTA</b> ACGa	-109
	<i>glnB</i>	TTGCTGTAGCAGTA <b>ACTACA</b> ACTGTGGTCTAGTCAGCGGTGT.. <b>TACCA</b> AGAGTc	-53
	<i>glnA</i>	TTTTATGTATCAGCTGT <b>TACAAA</b> AGTGCCGTTTCGGGCTACC.. <b>TAGGATG</b> AAAGc	-147
PCC 7120	<i>amt1</i>	CGAACTGTACATCGATT <b>TACAAA</b> ACAACCTTGAGTCTCGCTG.. <b>AATGCTT</b> ACAGAGa	-103
	<i>glnA</i> (RNAI)	CGTTCTGT <b>TACAAA</b> AGACT <b>TACAAA</b> ACTGTCTAATGTTTAGAATC.. <b>TACGATATT</b> TCa	-92
	<i>nir</i> operon	AATTTTGTAGCTACTTAT <b>TACT</b> ATTTTACCTGAGATCCCGACA.. <b>TAACCTT</b> AGAAGt	-460
	<i>urt</i> operon	AATTTAGTATCAAAAAT <b>ACA</b> AATTCATGGTTAAATATCAAA <b>C</b> .. <b>TAATATC</b> ACAAT	-67
	<i>ntcB</i>	AAAGCTGT <b>TACAAA</b> ATCT <b>TACAAA</b> ATTGGGAGCAAAATCAGC.. <b>TAACCTA</b> ATTGAa	-31
PCC 6803	<i>hetC</i>	AAATCTGT <b>TAC</b> ATGAGAT <b>TACACA</b> ATAGCATTATTTGCTT.. <b>TAGTATC</b> TCTCt	-571
	<i>devBCA</i>	TCATTTGTACAGTCTGT <b>TAC</b> CTTTACCTGAAACAGATGAATG.. <b>TAGAATT</b> TATa	-704
	<i>amt1</i>	TGAAAAGTAGTAAATC <b>TAC</b> AGAAAACAATCATGTAAAA.. <b>TTGAAT</b> ACTCTaa	-142
	<i>glnA</i>	AAAAATGGTAGCGAAAAAT <b>TACA</b> TTTTCTAACTACTTGACTCTT.. <b>TACGATG</b> GATAGTcg	-48
	<i>glnB</i>	CAAAACGGTACTGATTTT <b>TACAAA</b> AAACTTTTGGAGAACATGT.. <b>TAAAAGT</b> GTCTcg	-54
PCC 7601	<i>icd</i>	AATTTCT <b>TAC</b> AGCCAAATGCAATCAGAGCCTCCAGAAAGGAT.. <b>TATGATC</b> TGCTCCg	-27
	<i>rpoD2-V</i>	AAGTTTGTATCAGGAAT <b>TACA</b> CTGCCGTGAAAATTTAACGA.. <b>TATTTG</b> GACAg	-264
	<i>glnA</i> (P1)	GAATCTGT <b>TACAAA</b> AGACT <b>TACAAA</b> AATTCCTTAATGTCTATCCT.. <b>TAGGATAT</b> TCCAGgt	-88
	<i>glnN</i>	TTTTTTGTGCGCGTTT <b>TACCA</b> ATCAAGTGCGATCTAATCGG.. <b>TATCTT</b> TTTATc	-61
	<i>nrtP</i>	TAAAGAGTATCAGCGGT <b>TACGA</b> ATTTAGCGAAGAAAGATGTGATTCCTTATCACA	-226
WH 7803	<i>ntcA</i>	GGAACCGTGTGCGTTGCT <b>TACAGG</b> TGGGAATCGATCGCTCCT.. <b>TAATTC</b> CTTGAa	-75

Fig. 1-6 NtcA により活性化されるプロモーターの比較 (Herrero et al., 2001 より転載)

転写開始点が決定された遺伝子のみ記載。図右に翻訳開始点からの転写開始点距離 (tsp location) を示す。NtcA 結合配列は太字、転写開始点は小文字で示す。 *nir*, nitrite reductase; *ntcB*, a transcription factor responding nitrate/nitrite condition; *urtA*, urea transporter; *hetC*, heterocyst differentiation protein; *devBCA*, heterocyst-specific ABC transporter; *icd*, isocitrate dehydrogenase; *rpoD2-V*, SigE; *nrtP*, nitrate/nitrite permease.

## 第 2 章

*Synechocystis* グループ 2 シグマ因子 SigE は糖異化遺伝子群の発現  
を正に制御する。

## 第1節 序

グループ 2 シグマ因子 SigE (Sll1689) は、*Synechocystis* ゲノムに保持される 9 つのシグマ因子のうちの 1 つであり、窒素欠乏時に mRNA 量が増加することが知られていた (Muro-Pastor et al., 2001)。SigE はそのプロモーター領域に NtcA 結合領域を持ち、窒素代謝に関与することが予想されたが、*glnA*, *glnB*, *amt1* といった窒素関連遺伝子の発現は SigE 欠損株と野生株で同等であり、*glnN* (グルタミンシンセターゼホモログ) の窒素欠乏による誘導が 30%程度低下するのみであった (Muro-Pastor et al., 2001)。このように、SigE の制御下にある遺伝子群は未同定であった。本章ではマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析により、SigE が、解糖系、酸化的ペントースリン酸 (OPP) 経路、グリコーゲン異化などの糖異化遺伝子群の発現を正に制御することを示した。

## 第2節 材料と方法

### (1) 材料と生育条件

菌株 : *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT 株 (GT) および SigE 欠損株 (G50)

生育条件 : BG-11 培地 (巻末参照)、30°C、2% (vol/vol) CO<sub>2</sub> in Air、白色光 50~70  $\mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。窒素源として硝酸の代わりに 5 mM NH<sub>4</sub>Cl を用いた培地を modified BG-11 と名付けた。固体培地には 1.5% アガロース (関東化学) と 1 mM チオ硫酸ナトリウム (日水製薬) を添加した。固体培地の窒素源は、特記しない限り 17.5 mM NaNO<sub>3</sub> を用いた。暗条件培養の際はアルミホイルで培養用綿ろ管を包装した。また LAHG は、窒素源を 10 mM NH<sub>4</sub>Cl とし

た上で、培地に 5 mM グルコースを添加し、1 日 15 分の白色光を当て、残りの時間についてすべて暗条件で培養した。細胞培養液の濁度は OD<sub>750</sub> を分光光度計 Beckman model DU640 により測定した。

**SigE 欠損株の作製** : SigE 欠損株用プラスミドの作製は当研究室の高橋洋之氏により行われた（高橋洋之 修士論文、1998）。GT 株への形質転換は、中野貴之氏により行われた（中野貴之 修士論文、1998）。*sigE* の破壊は PCR (Fig. 2-1B) と抗 SigE 抗血清によるウエスタンブロットにより確認された (Fig. 2-1)。ウサギ抗 SigE 抗血清は当研究室の高橋洋之氏によって作製された（高橋洋之 修士論文、1998）。Hik8 欠損株は鈴木石根博士（基礎生物学研究所、現筑波大学）より供与して頂いた（Suzuki et al., 2001）。

## （2）マイクロアレイ解析

RNA の抽出はホットフェノール法を用いて行った。OD<sub>750</sub> = 0.5~0.7 の培養液 20 ml を 6,600 x *g* で 5 分間遠心し、細胞を 1.5 ml エッペンドルフチューブに移した。細胞を 500 µl TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) + 0.5% SDS 溶液に懸濁し、等量の酸性フェノールを加えて 65°C で 10 分間インキュベートした。次に 17,400 x *g* で 5 分間遠心し、上清を新しいエッペンドルフチューブに移し、等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1、和光純薬) を加え、混合した後、17,400 x *g* で 5 分間遠心し、上清を新しいエッペンドルフチューブに移した。同様の操作を中間層に夾雑物が見えなくなるまで繰り返し、エタノール沈殿を行い、滅菌水に懸濁した。マイクロアレイ解析には RNA に DNase I (プロメガ) および Proteinase K (プロメガ) 処理を

行い、2 回のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出、エタノール沈殿後、滅菌水に懸濁したものをを用いた。

マイクロアレイ解析は CyanoChip version 1.6 (タカラバイオ) を用いた。CyanoChip は全長または C 末端領域 1 kbp の PCR 産物がスライドガラス上に載っており、操作は RNA fluorescence labeling kit version 2.0 (タカラバイオ) と Cy3-dUTP、Cy5-dUTP (アマシャムバイオサイエンス) を用いて cDNA の合成、ラベリング、精製を行った。ラベルされた cDNA を 95°C で 2 分間熱変性された後、スライドガラス上にスポットし、カバーガラス (TaKaRa Spaced Cover Glass, タカラバイオ) を掛け、ハイブリチャンバー内に入れ密封し、65°C で一晩保温した。次にスライドガラスを 2 x SSC (巻末付録参照) 溶液および 0.2 x SSC, 0.1% SDS 溶液でそれぞれ 2 回ずつ 60°C において洗浄し、室温で 0.2 x SSC 溶液で 2 分間 x 2 回振盪した後、超純水でリンスし、最後に水分をエアスプレーにより飛ばした。シグナルの検出はアレイスキャナー (GMS418、アフィメトリックス)、定量と解析は ImaGene version 4.0 software (BioDiscovery) を用いて行った。

### (3) ノーザンブロット解析

RNA の抽出は、マイクロアレイと同様にホットフェノール法を用いた。ノーザンブロットの場合は DNase I 処理と Proteinase K 処理を行わなかった。ノーザンブロットは RNA 溶液を変性アガロースゲル [MOPS buffer (巻末付録参照) with 3% ホルムアルデヒド、1.5% アガロース] で、各レーン 10 µg の RNA を泳動し、ゲルを超純水で 10 分間 x 2 回洗浄した後、バイオラッドモデル 785 バ

キュームブロッター（バイオラッド）を用いて、バイオダインプラスメンブレン（Pall）に転写した。メンブレンを乾燥、UV でクロスリンクした後、メチレンブルー溶液（0.04%メチレンブルー、0.5 M 酢酸ナトリウム）で染色し、rRNA のパターンをスキャナで検出してコントロールとした。次にメンブレンをタッパー内のハイブリダイゼーションゼーションバッファー（巻末付録参照）で 48°C x 1 時間振盪した。プローブは、遺伝子特異的プライマー（巻末付録参照）によって増幅した PCR 断片を鋳型にし、DNA labeling mix（ロシュ）を用いて DIG ラベルされたプローブを作製した。ハイブリダイゼーションバッファー内のメンブレンにプローブを滴下し、48°C で一晩振盪した。メンブレンを 2 x SSC、0.1% SDS 溶液で 48°C x 10 分間 x 2 回、0.1 x SSC、0.1% SDS 溶液で 68°C x 10 分間 x 2 回、洗浄バッファー（巻末参照）により室温で 5 分間洗浄し、バッファー2（巻末参照）で 1 時間、室温で振盪した。次に 10,000 希釈の Anti-DIG antibody（ロシュ）を加えて 1 時間、室温で振盪し、洗浄バッファーで 10 分間 x 2 回洗浄し、バッファー 3（100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>）で平衡化した。シグナルは CDP-Star Ready-to-use（ロシュ）を滴下し、5 分間暗条件下で反応させ（室温）、LAS-3000（富士フイルム）で検出した。

（4）酵素活性測定（グルコース・6・リン酸デヒドロゲナーゼ G6PD と 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ 6PGD）

G6PD と 6PGD の活性は NADPH 濃度の上昇を A<sub>430</sub> でモニターすることにより行った。G6PD の活性測定には、まず 35 ml (OD<sub>750</sub> = 0.5~0.7) 分の細胞を 1 ml の Buffer A (55 mM Tris-HCl, pH 8.0, 3.4 mM MgCl<sub>2</sub>, )に懸濁し、超音波に

より破碎した。17,400 x *g* で 5 分間遠心し、その上清を酵素反応に用いた。酵素反応は、反応溶液は BufferA 600  $\mu$ l に 50  $\mu$ l の 20 mM NADP<sup>+</sup>, 細胞破碎液 200  $\mu$ l を混合し、100 mM グルコース-6-リン酸（ナカライテスク）溶液を 100  $\mu$ l を加え、25°C で 2 分間吸光度を測定した。6PGD の活性測定は、オリエンタル酵母社のプロトコールに従った。まず細胞を 1 ml の 100 mM Hepes-KOH (pH 7.5) に懸濁し、超音波により破碎した。17,400 x *g* で 5 分間遠心し、その上清を酵素反応に用いた。酵素反応は、反応溶液は 100 mM Hepes-KOH (pH 7.5) 700  $\mu$ l、20 mM NADP<sup>+</sup> 50  $\mu$ l, 細胞破碎液 100  $\mu$ l を混合し、100 mM 6-ホスホグルコン酸（オリエンタル酵母）溶液を 50  $\mu$ l を加え、25°C で 1 分間吸光度を測定した。

#### （５）グルコース取り込み活性の測定

OD<sub>750</sub> = 0.5~0.7 の細胞を遠心（17,400 x *g*、1 分間）でエッペンドルフチューブに集め、1 ml modified BG-11 に、2 mM グルコースを加えた液体培地に OD<sub>750</sub>=1 となるように懸濁した。グルコースの取り込み活性は、培地中のグルコース濃度を Glucose CII kit（和光純薬）を用いて測定した。100  $\mu$ l の培養液を 17,400 x *g* で 1 分間遠心して細胞を除き、上清グルコース濃度を 2 時間ごとに測定した。

#### （６）グリコーゲン定量

グリコーゲンの定量は Forchhammer and Tandeau de Marsac の方法に変更を加えて行った（Forchhammer and Tandeau de Marsac, 1995a）。細胞を~6 x

10<sup>8</sup>個ずつエッペンドルフチューブに集め、100  $\mu$ l の 3.5% 硫酸で 40 分間煮沸した。この操作により、グリコーゲンが酸加水分解によりグルコースとなり、このグルコースをシグマ社のプロトコールに従って定量した。上記のサンプル 100  $\mu$ l に 8% TCA (シグマ) 450  $\mu$ l を加え、混合後、室温で 5 分間静置した。17,400 x *g* で 5 分間遠心した後、上清 150  $\mu$ l に *o*-toluidine reagent (シグマ) 750  $\mu$ l を加えた。10 分間煮沸し、室温の水に 3 分間浸けて冷却し、OD<sub>653</sub> の値を測定した。

#### (7) ウェスタンブロット解析

OD<sub>750</sub> = 0.5~0.7 の培養液 10 ml 分の細胞をエッペンドルフチューブに遠心 (8,400 x *g*, 3 分間) で集め、200  $\mu$ l 冷 PBS-T で洗浄、遠心した後、再度 500  $\mu$ l 冷 PBS-T に懸濁した。細胞を超音波破碎した後、17,400 x *g* で 10 分間遠心し、上清のタンパク質濃度を BCA protein assay kit (PIERCE) で定量した。SigE のウェスタンブロットには、各レーン 5  $\mu$ g ずつのタンパク質溶液を、12% SDS-PAGE ゲルで泳動した。泳動後、タンパク質を Immobilon-P トランスファーメンブレン (ミリポア) に、セミドライトランスファー装置 BE-330 (バイオクラフト) を用いてブロットした。3% BSA (和光純薬) を含む PBS-T で室温 1 時間以上振盪し、SigE 抗血清を 12,000 倍希釈して加え、室温で 1 時間以上振盪した。PBS-T で 5~10 min x 3 回洗浄した後、二次抗体として Anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (Molecular Probe) 溶液を 12,000 倍希釈で加え室温で 1 時間振盪した。PBS-T で 5~10 分間 x 3 回洗浄した後、APase buffer (100 mM Tris-HCl, pH9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) で平衡化し、

nitro-blue tetrazolium chloride ( NBT ) ( 終 濃 度 0.33 mg/ml) と 5-bromo-4-Chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt (BCIP) (終濃度 0.17 mg/ml) (シグマ) を加えて発色させた。

### 第3節 結果

#### (1) マイクロアレイによる SigE レギュロンの探索

本研究では SigE の制御下にある遺伝子群を同定するため、SigE 欠損株 G50 を用いて解析を行った。G50 株については、当研究室の中野により既に作製されていたものを用いた (中野貴之 修士論文、1998) (第2節 (1) 材料と生育条件参照) (Fig. 2-1A)。まず、PCR と抗 SigE 抗血清を用いたウエスタンブロットにより、SigE の欠損を確認した (Fig. 2-1B, C)。G50 の増殖速度は親株である GT と同等であった。SigE レギュロンを同定するために、通常培養条件 (modified BG-11) で培養した GT と G50 から RNA を抽出し、マイクロアレイによる mRNA プロファイルの比較を行った。その結果、GT 株に比べて G50 株では、アレイ上にある 3,076 遺伝子のうち、67 遺伝子の発現強度比が 1/2 以下に減少していた (Fig. 2-1D)。この中で、SigE 欠損により、解糖系、酸化的ペントースリン酸 (OPP) 経路、グリコーゲン異化などの糖異化酵素の遺伝子群の発現が顕著に減少していた (Table 2-1)。

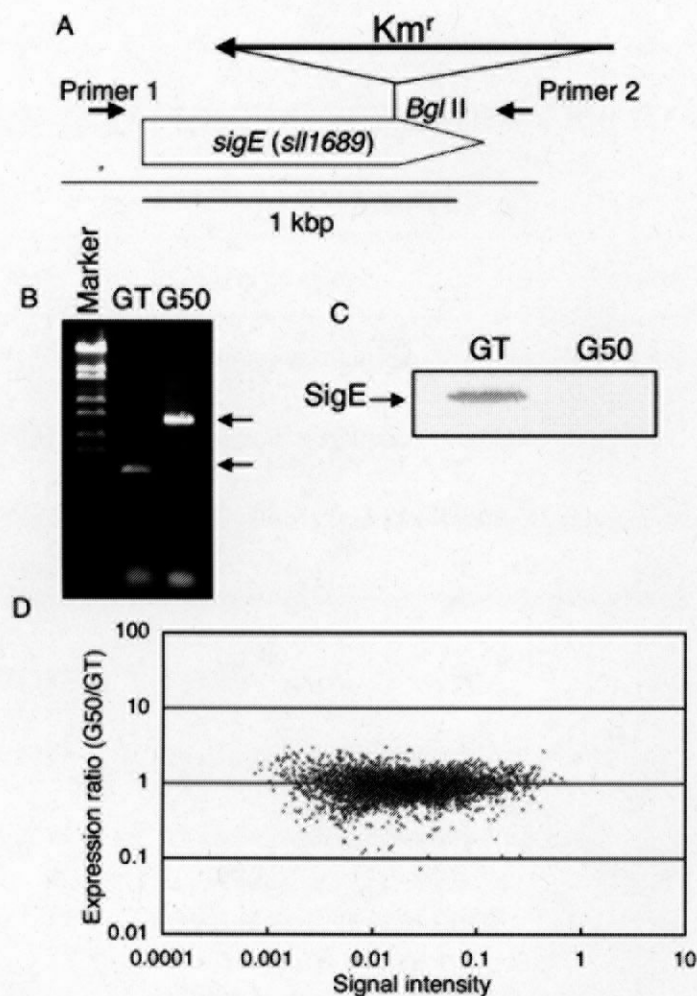


Fig. 2-1 SigE 欠損株の作製とマイクロアレイ解析

A. *sigE* 遺伝子の *Bgl*III サイトにカナマイシン耐性カセットを導入し、*sigE* 欠損株の作製を行った。カナマイシン耐性カセットは *sigE* と反対方向である。

B.&C. *sigE* 欠損株を G50 と名付け、PCR と抗 SigE 抗血清によるウエスタンブロットにより、カナマイシン耐性カセットの導入と SigE の欠損を確認した。

D. マイクロアレイ解析による GT 株と G50 株の mRNA プロファイルの比較。それぞれの点は G50/GT の発現強度比を表し、シグナルの強度が横軸にプロットされている。実験は独立に 3 回行い、そのうちの 1 回分の図を示した。

Table 2-1 SigE 欠損による糖異化遺伝子群の発現変化（マイクロアレイ解析）

データは、G50 株（SigE 欠損株）の GT 株（対応する野生株）に対する発現強度の比を表す（ $n = 3\sim6$ 、ただし *pyk1* は  $n = 2$ ）。

Gene	ORF	Gene product	Expression ratio (G50/GT)
<i>pfkA</i>	<i>sll1196</i>	Phosphofructokinase	$0.43 \pm 0.23$
<i>pfkA</i>	<i>sll0745</i>	Phosphofructokinase	$0.90 \pm 0.38$
<i>gap1</i>	<i>slr0884</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	$0.64 \pm 0.11$
<i>gap2</i>	<i>sll1342</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	$1.20 \pm 0.11$
<i>pyk1</i>	<i>sll0587</i>	Pyruvate kinase	0.32
<i>pyk2</i>	<i>sll1275</i>	Pyruvate kinase	$1.18 \pm 0.09$
<i>zwf</i>	<i>slr1843</i>	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	$0.82 \pm 0.11$
<i>opcA</i>	<i>slr1734</i>	Allosteric activator of G6PD	$0.28 \pm 0.12$
<i>gnd</i>	<i>sll0329</i>	6-Phosphogluconate dehydrogenase	$0.21 \pm 0.03$
<i>tal</i>	<i>slr1793</i>	Transaldolase	$0.15 \pm 0.03$
<i>glgX</i>	<i>slr1857</i>	Glycogen isoamylase	$1.38 \pm 0.28$
<i>glgX</i>	<i>slr0237</i>	Glycogen isoamylase	$0.65 \pm 0.14$
<i>glgP</i>	<i>slr1367</i>	Glycogen phosphorylase	$1.07 \pm 0.14$
<i>glgP</i>	<i>sll1356</i>	Glycogen phosphorylase	$0.75 \pm 0.07$

## (2) SigE 欠損による解糖系、酸化的ペントースリン酸経路遺伝子群の mRNA 量、酵素活性の減少

マイクロアレイの結果、解糖系の遺伝子ではホスホフルクトキナーゼ (*pfkA* (*sll1196*))、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (*gap1*)、ピルビン酸キナーゼ (*pyk1*) 遺伝子、OPP 経路の遺伝子では、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (酵素名 G6PD、遺伝子名 *zwf*)、G6PD の活性化因子 OpcA、6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (酵素名 6PGD、遺伝子名 *gnd*)、トランスアルドラーゼ (*tal*) 遺伝子の発現が SigE 欠損により減少していた (Table 2-1)。次に、これらの糖異化遺伝子群の mRNA レベルをノーザンブロット解析により、明条件、暗条件 1、4 時間後で調べた。解糖系の酵素の 3 つの遺伝子は、GT 株において、*pyk1* のみが明条件から暗条件に移すことにより、その発現がやや上昇するが、*gap1* と *pfkA* では増加が見られなかった (Fig. 2-2A)。一方、G50 株においては、*pyk1* mRNA の暗条件下での増加はやや見られ、また、*gap1* と *pfkA* の発現は暗条件下でより GT 株との差が大きくなることが判った (Fig. 2-2A)。OPP 経路の 4 つの遺伝子の発現は GT 株において明条件から暗条件に移すことによって増加した (Fig. 2-2B)。しかし、SigE 欠損によりこれらの増加がほとんどみられないことが明らかとなった (Fig. 2-2B)。mRNA レベルに加え、酵素活性レベルへの SigE 欠損の影響を調べるため、GT 株と G50 株の G6PD および 6PGD の酵素活性を調べた。その結果、通常培養条件 (明条件) における G50 の G6PD、6PGD の酵素活性は、それぞれ GT 株の約 45%、38% に低下していることが判った (Fig. 2-2C, D)。また、GT 株において、G6PD、6PGD の酵素活性は暗条件移行後 4 時間で、それぞれ 1.3 倍、1.1 倍に増加した

が、G50 株においては、G6PD は約 1.2 倍に増加するものの、6PGD は逆に低下することが明らかになった (Fig. 2-2C, D)。

### (3) SigE 欠損によるグルコース取り込み速度の低下

SigE 欠損により、解糖系、OPP 経路の mRNA、酵素活性レベルが減少することが判ったため、G50 株においてグルコース異化が抑制されている可能性が考えられた。そこで、外部のグルコース取り込み能を調べたところ、GT 株に比べ、G50 株ではグルコース取り込み能が約 20~30%減少していることが明らかになった (Fig. 2-3)。

### (4) SigE 欠損によるグリコーゲン異化酵素遺伝子群の発現低下とグリコーゲンの過剰蓄積

マイクロアレイ解析により、解糖系、OPP 経路の遺伝子群に加え、グリコーゲン異化酵素グリコーゲンイソアミラーゼ *glgX* (*slr0237*)、グリコーゲンホスホリラーゼ *glgP*(*sll1356*) 遺伝子の mRNA の低下が G50 株において見られた。真正細菌において、グリコーゲンは主にグリコーゲンホスホリラーゼにより分解され、分岐鎖の部分がグリコーゲンイソアミラーゼにより切断されることが知られている (Ball and Morell, 2003)。 *Synechocystis* のゲノムには *glgX* (*slr1857*, *slr0237*) と *glgP* (*slr1367*, *sll1356*) がそれぞれ 2 つずつコードされているが、ノーザンブロットの結果、*glgX* (*slr0237*) と *glgP* (*sll1356*) の mRNA 量は、通常培養条件下で G50 において、GT 株より減少が見られたのに対し、他の 2 つの遺伝子は GT と G50 間に差が見られなかった (Fig. 2-4A)。

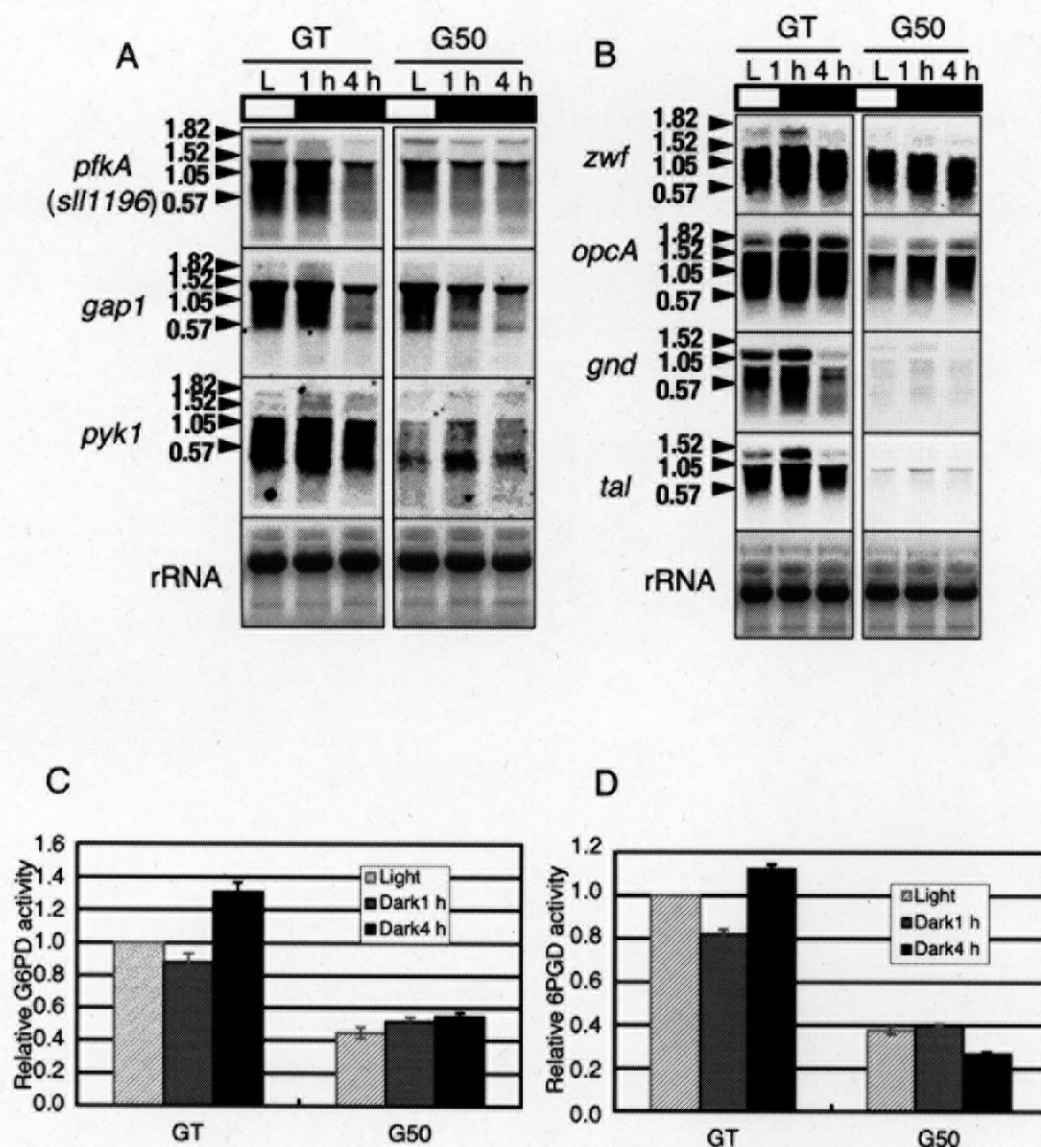


Fig. 2-2 SigE 欠損による解糖系、OPP 経路遺伝子の発現低下

A.&B. 解糖系 (*pfkA* (*sll11196*), *gap1*, *pyk1*)、OPP 経路 (*zwf*, *opcA*, *gnd*, *tal*) 遺伝子群のノーザンブロット解析。Modified BG-11 で培養した GT 株または G50 株を暗条件前 (L) または暗条件後 1 時間 (1 h)、4 時間 (4 h) で回収し、

RNA を抽出した。各レーン全 RNA (各 10  $\mu$ g) ずつ泳動し、遺伝子特異的プローブを用いてノーザンブロット解析を行った。分子量サイズマーカーの位置は矢頭で示した。ローディングコントロールとしてメチレンブルーで染色した rRNA を下パネルに図示した。C.&D. G6PD と 6PGD の酵素活性。Modified BG-11 で培養した GT 株または G50 株を暗条件前 (L) または暗条件後 1 時間 (1 h)、4 時間 (4 h) で回収し、G6PD と 6PGD の酵素活性を測定した。データはそれぞれ 3 回の独立した実験の平均値を GT 株の L の値を 1 とした相対値で表した。標準偏差は、それぞれ細線で表した。

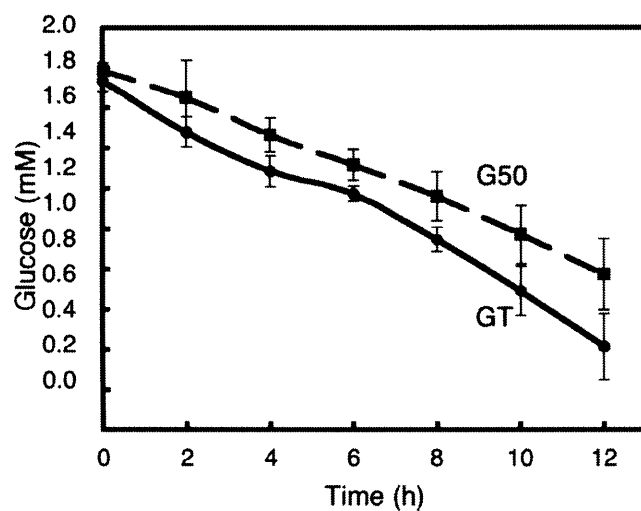


Fig. 2-3 グルコース取り込み活性の測定

OD<sub>750</sub>=0.5~0.7 の GT 株または G50 株を、OD<sub>750</sub>=1.0 となるように BG-11<sub>0</sub> に 10 mM NH<sub>4</sub>Cl と 2 mM グルコースを添加した培地に懸濁し、培地中のグルコースの減少を経時的に測定した。データの平均と標準偏差は 3 回の独立した実験より得られた。

しかし、*glgP* (*slr1367*) に関しては暗条件下において、SigE 欠損による mRNA の低下が見られた (Fig. 2-4A)。

次に SigE 欠損によるグリコーゲン量への影響を調べたところ、通常培養条件において、G50 株のグリコーゲン量が GT 株の約 1.6 倍に増加していることが明らかになった (Fig. 2-4B)。さらに、明条件から暗条件に移行した際のグリコーゲン量を測定したところ、GT 株では 6 時間後に明条件の 42%まで減少したのに対し、G50 株では 65%であり、SigE 欠損によるグリコーゲン異化活性の低下が見られた。

#### (5) SigE 欠損株における従属栄養条件での増殖不全

上記の研究により、SigE が糖異化遺伝子群の発現を正に制御していることが示唆されたため、SigE 欠損株の従属栄養条件下での増殖を調べた。GT 株と G50 株を LAHG 条件 (第2節 (1) 材料と生育条件参照) で培養したところ、G50 株は同条件で増殖できないことが明らかになった (Fig. 2-5A)。また暗条件に対する感受性を検討するため、5 mM グルコースを添加した modified BG-11 培地で 4 日間暗黒下において培養し、その後明条件下で培養した。その結果、G50 株では GT 株に比べ、生存率が低下することが判った (Fig. 2-5B)。

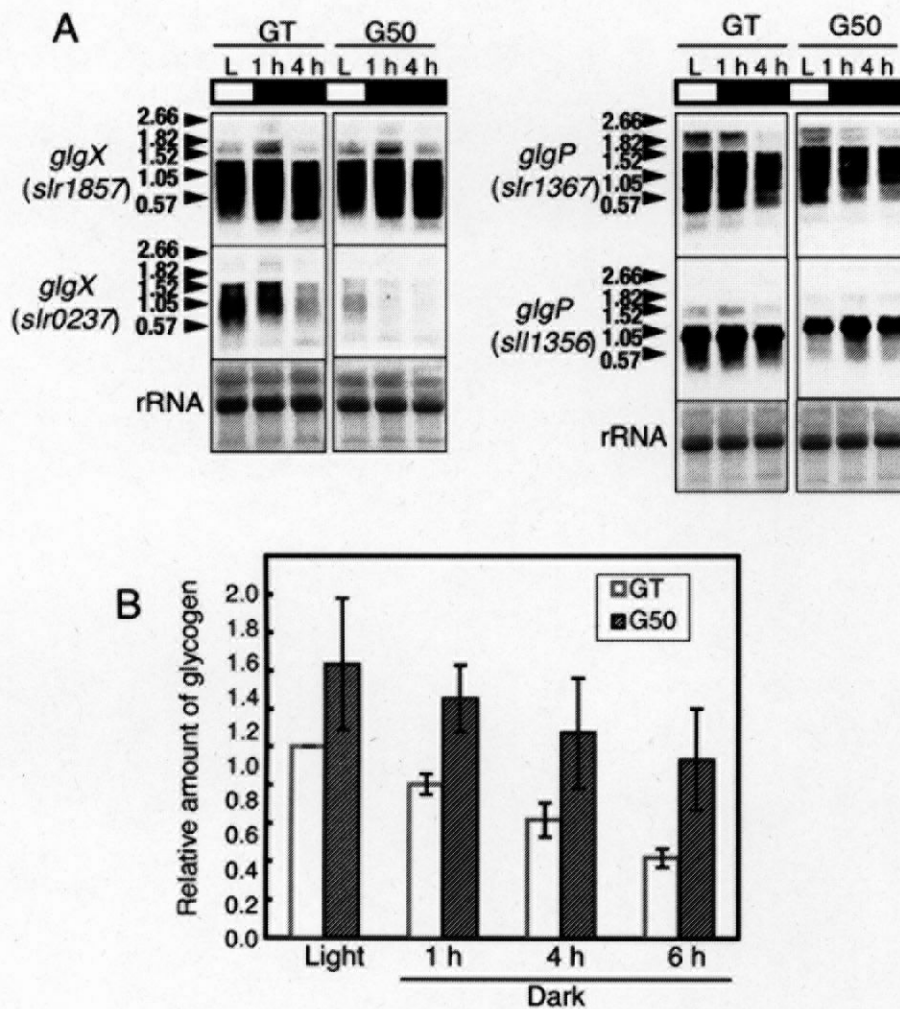


Fig. 2-4 グリコーゲン異化遺伝子群の発現とグリコーゲン量

A. グリコーゲン異化遺伝子群のノーザンブロット解析。Modified BG-11 で培養した GT 株または G50 株を暗条件前 (L) または暗条件後 1 時間 (1 h)、4 時間 (4 h) で回収し、RNA を抽出した。各レーン全 RNA (各 10  $\mu$ g) ずつ泳動し、遺伝子特異的プローブを用いてノーザンブロット解析を行った。分子量サ

イズマーカ-の位置は矢頭で示した。ローディングコントロールとしてメチレンブルーで染色した rRNA を下パネルに図示した。B. 細胞内グリコーゲン量の測定。暗条件前または暗条件後 1、4、6 時間のグリコーゲン量を測定した。データの値はそれぞれ 3 回の独立した実験の平均値を GT 株の L の値を 1 とした相対値で表した。標準偏差は細線で表した。

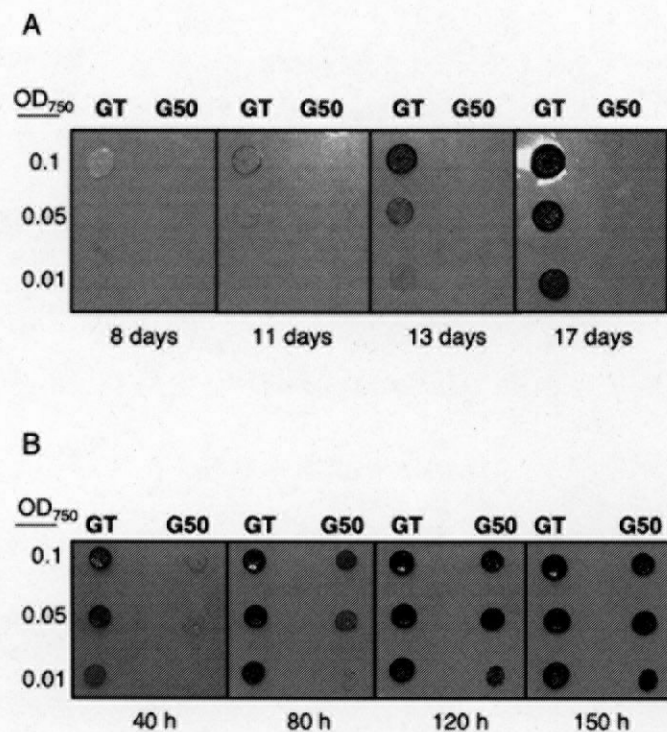


Fig. 2-5 SigE 欠損による表現型解析

A. Modified BG-11 で培養した対数増殖期中期の GT 株および G50 株を 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  と 5 mM グルコースを含む BG-11<sub>0</sub> 固体培地に滴下した。滴下は示された OD<sub>750</sub> の値の培養液を各 1  $\mu\text{l}$  ずつ用いた。プレートは、1 日 15 分間明条件で培養し、その他の時間は暗条件で培養した。プレートの写真は滴下後、示された時間ごとに撮影した。B. A と同様に滴下したプレートを連続 4 日間暗条件で培養し、その後、明条件で培養した。プレートの写真は明条件に移行後、示された時間ごとに撮影した。

## (6) SigE と Hik8 の関係

他のグループの研究により、二成分制御系ヒスチジinkinase Hik8 (Sll0750) が糖代謝遺伝子群の発現を正に制御することが明らかになった (Singh and Sherman, 2005)。Hik8 は *Synechococcus* SasA タンパク質のオルソログである。SasA はシアノバクテリアにおけるサーカディアンリズムの形成を行う KaiABC 複合体と相互作用する (Iwasaki et al., 2000)。また、Hik8 欠損株ではシアノバクテリア型フィトクロム遺伝子 (*cph1*) とその下流でオペロンを形成するレスポンスレギュレーター遺伝子 (*rcp1*) の mRNA 量も減少することがわかっている (Singh and Sherman, 2005)。マイクロアレイの結果より、*cph1* の G50/GT 発現強度の比は 0.322 であり、SigE 欠損により *cph1/rcp1* mRNA が減少することが示唆された。この結果を確認するため、ノーザンブロットを行ったところ、明/暗量条件下において、SigE 欠損による *cph1/rcp1* mRNA の減少が観察された (Fig. 2-6A)。通常培養条件下における *hik8* mRNA の G50/GT 発現強度比は 0.976 であり、従って、SigE 欠損は *hik8* mRNA レベルに影響しない。一方、Hik8 欠損株の SigE タンパク質量を調べたところ、GT 株と差が見られなかった (Fig. 2-6B)。しかし、SigE/Hik8 二重欠損株は、糖異化遺伝子群の mRNA の減少が相加的にならないため (第 4 章参照)、遺伝学的にはこれら因子が同一の調節経路に関わることが予想された。

## 第 4 節 考察

マイクロアレイ、ノーザンブロットによるトランスクリプトーム解析により、*Synechocystis* SigE 欠損株において、解糖系、OPP 経路、グリコーゲン異化遺

伝子群の発現が低下することが明らかになった。これらの結果より SigE は糖異化経路の正の制御因子であることが判った (Fig. 2-7)。

#### (1) 暗条件下 (従属栄養条件下) における糖異化の役割

本研究により、糖異化遺伝子群のうち、特に OPP 経路の mRNA 量が、明条件から暗条件に移行することにより、増加することが判った (Fig. 2-2B)。また、糖異化遺伝子群の発現が減少する SigE 欠損株において、LAHG 条件で増殖できず、さらに暗条件下における生存率が低下することがわかった (Fig. 2-5)。

これまでに、窒素固定型シアノバクテリア *Nostoc* sp. ATCC29133 の *zwf*破壊株が暗条件下における従属栄養増殖ができないことや (Summers et al., 1995)、*Synechococcus* の *zwf*破壊株は暗条件下で生存率が下がることなど (Scanlan et al., 1995)、糖異化が暗条件下、従属栄養条件下で必須なことが示されている。また、*Synechococcus* の *OpcA* 欠損株では、夜に還元力プールが減少することが知られている (Min and Golden, 2000)。メタボローム解析によって、従属栄養条件における *Synechocystis* 細胞は主に OPP 経路を使ってグルコースを分解することが判っているが (Yang et al., 2002)、この知見は上記の遺伝学的な解析結果と矛盾しない。OPP 経路に加え、*Synechocystis* では *Gap1* 欠損株も従属栄養条件で増殖できないことが知られている (Koksharova et al., 1998)。これらの結果は、本研究による SigE 欠損株の LAHG 条件における増殖不全が、OPP 経路を主とした糖異化活性の低下に起因することを示唆する。

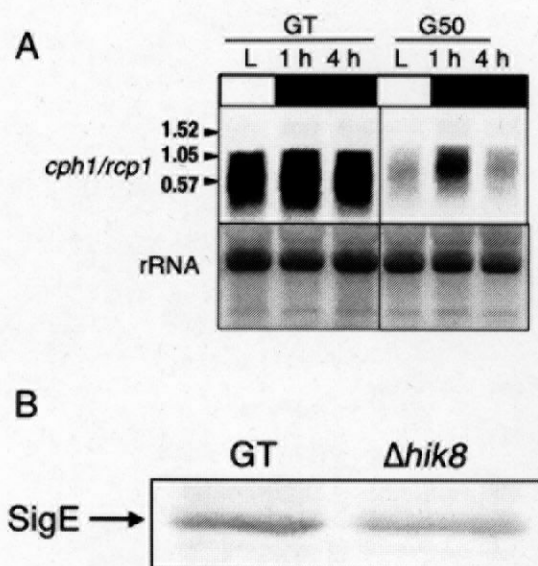


Fig. 2-6 A. *cph1/rcp1* プロブを用いたノーザンブロット。Modified BG-11 で培養した GT 株または G50 株を暗条件前 (L) または暗条件後 1 時間 (1 h)、4 時間 (4 h) で回収し、RNA を抽出した。各レーン全 RNA (各 10  $\mu$ g) ずつ泳動し、*cph1* 特異的プロブを用いてノーザンブロット解析を行った。分子量サイズマーカーの位置は矢頭で示した。ローディングコントロールとしてメチレンブルーで染色した rRNA を下パネルに図示した。B. 抗 SigE 抗血清を用いたウエスタンブロット。Modified BG-11 で培養した GT 株または Hik8 欠損株 ( $\Delta hik8$ ) を集め、超音波により細胞の破碎を行った。各レーン全タンパク質量 5.0  $\mu$ g ずつ 12% SDS-PAGE ゲルで泳動し、抗 SigE 抗血清を用いてウエスタンブロットを行った。



下と予想される代謝経路を示す。G1P, glucose-1-phosphate; G6P, glucose-6-phosphate; 6PGL, 6-phosphogluconolactone; 6PG, 6-phosphogluconate; F6P, fructose-6-phosphate; F1,6P<sub>2</sub>, fructose-1,6-bisphosphate; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; G1,3P<sub>2</sub>, 1,3-bisphosphoglycerate; G3P, 3-phosphoglycerate; G3P, 2-phosphoglycerate; PEP, phosphoenolpyruvate; PYK, pyruvate, RU5P, ribulose-5-phosphate; R5P, ribose-5-phosphate, S7P, sedoheptulose-7-phosphate; X5P, xylulose-5-phosphate; E4P, erythrose-4-phosphate.

## (2) *Synechocystis* における糖異化酵素の重複性について

*Synechocystis* ゲノムには、ホスホフルクトキナーゼ *pfkA* (*sll1196*, *sll0745*)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ *gap1* (*slr0884*)、*gap2* (*sll1342*)、ピルビン酸キナーゼ *pyk1* (*sll0587*)、*pyk2* (*sll1275*) をコードする遺伝子がそれぞれ2つずつ存在する (Fig. 2-7)。本研究により、*pfkA* (*sll1196*)、*gap1*、*pyk1* のみが SigE 制御下にあることが判った (Table 2-1)。このうち、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼについては、Gap1 が異化反応、Gap2 が同化反応を触媒することが知られているが (Koksharova et al., 1998)、その他の酵素についてはその使い分けが明らかになっていない。本研究により、*gap1* のみが SigE の制御下にあり、*gap2* は SigE 制御下でないという結果が得られたが、これは、SigE は糖異化遺伝子群の発現を正に制御するが、炭素同化、糖新生遺伝子群の発現には関与しないという本章の結果と一致する (Table 2-1)、ホスホフルクトキナーゼとピルビン酸キナーゼの使い分けについてはこれまでのところわかっていないが、本研究により、2つずつ存在するホスホフルクトキナーゼとピルビン酸キナーゼの、それぞれ一方のみが SigE 依存であることから、異なる制御系を有し、特定の条件下で酵素を使い分けている可能性が示唆された。実際、*pyk1* は窒素欠乏時に誘導されるが、*pyk2* は逆にその発現が抑制されることが判った (第4章参照)。今後は、両酵素の生化学的解析を通し、その酵素活性、性質を明らかにすることにより、解糖系酵素の使い分けの意義が明らかになるものと思われる。

*Synechocystis* ゲノムにはグリコーゲンイソアミラーゼ *glgX* (*slr1857*、

*slr0237*) とグリコーゲンホスホリラーゼ *glgP* (*slr1367*, *sll1356*) がそれぞれ 2 遺伝子ずつコードされている。グリコーゲンホスホリラーゼについて、GlgP (Sll1356) は独立栄養条件下および高温条件下における、暗条件下でのグリコーゲンの異化に主としてはたらく (Fu and Xu, 2006)。一方、GlgP (Slr1367) は、グルコース取り込み、炭酸同化が同時に阻害された条件で、重要な役割を担う (Fu and Xu, 2006)。SigE 欠損により、通常培養条件においてグリコーゲンの過剰蓄積が見られたが (Fig. 2-4B)、これは SigE 欠損による GlgP (Sll1356) の発現低下に起因すると考えられる。また、通常培養条件下において、SigE 欠損により、*glgP* (*sll1356*) と *glgX* (*slr0237*) の発現のみが減少することから、パラログ間で独立した転写制御機構が存在することが示唆された。

### (3) SigE と糖異化遺伝子群のサーカディアンリズム

近年、サーカディアンリズムによる mRNA 量変化を網羅的に調べた研究報告が、*Synechocystis* においてなされた (Kucho et al, 2005)。その結果、*sigE* と糖異化遺伝子群の mRNA レベルはサーカディアンリズムを刻み、そのピークが *sigE* は“昼の終わり (夕方)” (Circadian Time 8 h)、糖異化遺伝子群は“夜の初め” (Circadian Time 10-14 h) であることが判った (Kucho et al, 2005)。これらの結果は、SigE により糖異化が夜に促進されることを示唆し、本研究から明らかになった、SigE と糖異化酵素は暗条件下での生存に必須であるという事実と一致する。*sigE* の発現がサーカディアンリズムを刻む機構については、SigE と Hik8 との相互関係も含め、今後の研究が必要である。

#### (4) SigE の糖異化遺伝子以外のターゲット Cph1

糖異化遺伝子群に加え、シアノバクテリアフィトクロム遺伝子のオペロン *cph1/rcp1* の mRNA 量が、SigE 欠損により減少した (Fig. 2-6)。Cph1 は、高等植物の光受容体であるフィトクロムと相同性を持ち、また、C 末端にヒスチジンキナーゼドメインを有する (Vierstra and Davis, 2000)。Synechocystis における Cph1 は、遠赤外光から赤外光に移行した際に、クロロフィル合成遺伝子などの発現誘導に関与することが知られているが、その詳しい機能は明らかになっていない (Hübschmann et al., 2005)。Synechocystis における *cph1/rcp1* の発現は、明条件下から暗条件下に移行することで増加することが知られており (Garcia-Dominguez et al., 2000a)、この増加はグルコース存在下で消失することから、*cph1/rcp1* の発現誘導には光シグナルではなく、細胞内のレドックス状態など別のシグナルが関与していることが示唆されている。本研究により、SigE が *cph1/rcp1* の発現を正に制御することが明らかになったため、SigE は糖異化遺伝子群だけでなく、レドックス状態などをシグナルとして、Cph1 などの暗条件下で発現が増加する遺伝子群を網羅的に制御する可能性がある。今後は暗条件下でのトランスクリプトーム解析が必要であると考えられる。

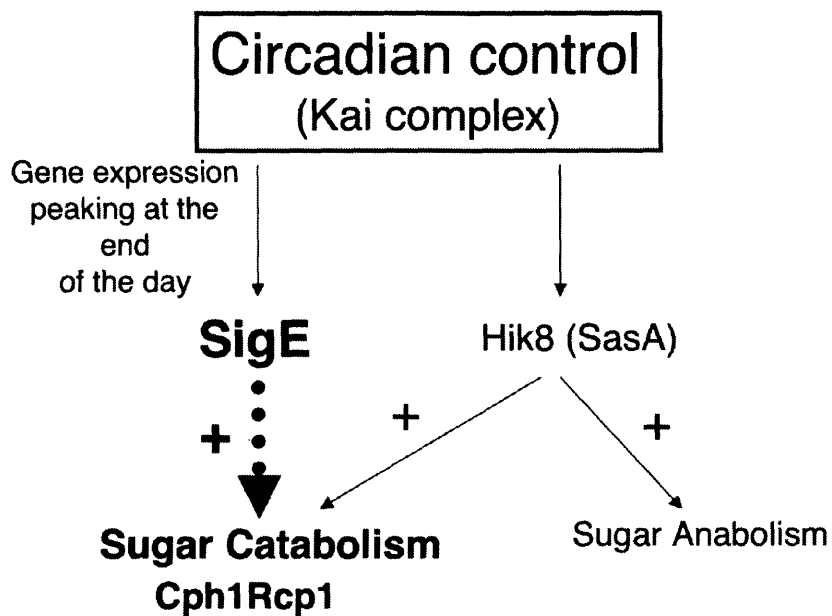


Fig. 2-8 SigE 機能の制御モデル

SigE と Hik8 はサーカディアンリズムの制御下であり、それぞれ糖異化遺伝子群および *cph1/rcp1* の発現を正に制御する。SigE は糖の同化には関与しないが、Hik8 は糖同化遺伝子群の発現を正に制御する。