

## 第5章

Mg-キラターゼ H サブユニット (ChlH) およびグルタミンシンセターゼ (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

第2章の研究により、糖異化遺伝子群の発現が **SigE** 依存的に、暗条件下において増加することを見出した。しかし、**SigE** タンパク質量は、明条件下から暗条件下に移行しても増加せず、むしろ減少することが知られている (Imamura et al., 2003)。そこで、**SigE** が翻訳後レベルで制御されている可能性が考えられた。本章では **SigE** の **Mg**-キラターゼ **H** サブユニット **ChlH**、グルタミンシンセターゼ **GS** との結合の発見と、**SigE** の活性制御の可能性について言及する。

## 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)、**SigE** 欠損株 (G50)

生育条件：第2章第2節材料と方法参照。マグネシウム欠乏は、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  の代わりに  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  を加えた培地を用いた。

### (2) 酵母ツーハイブリッドスクリーニング

酵母ツーハイブリッドスクリーニングは、佐藤修正博士、田畑哲之博士の研究室（かずさ DNA 研究所）により行われた。また、*sigE*、*glnA* 全長を含んだ酵母ツーハイブリッド用ベクトクターは田中寛博士、大橋幸男氏により作製された。

(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

*Synechocystis* ゲノム DNA を鋳型として、*chlH* 全長を、Forward プライマー 5'-CGGGATCCGGATGTTTACTAACGTCAAGTC-3' と Reverse プライマー 5'-ACTCGAGTTTATTCAACCCCTTCAATG-3' を用いて、KOD DNA ポリメラーゼ（東洋紡）により増幅し、*Bam*HI と *Xho*I（タカラバイオ）により切断した。この断片を、*Bam*HI と *Xho*I で切断した pGEX5X-2（アマシャムバイオサイエンス）に導入した（GST-tag 付き）。*glnA* 全長は、Forward プライマー 5'-CATAGATCTTAATGGCCAGAACCCCCCA-3' と Reverse プライマー 5'-GGCTCGAGCCTTAGCAGTCGTAGTACAAG-3' を用いて、KOD DNA ポリメラーゼ（東洋紡）により増幅し、*Bgl*II と *Xho*I（タカラバイオ）により切断した。この断片を、*Bam*HI と *Xho*I で切断した pGEX5X-2（アマシャムバイオサイエンス）に導入した（GST-tag 付き）。*sigE* 全長は Forward プライマー 5'-CCGCATGCATGAGCGATATGTCTTCC-3' と Reverse プライマー 5'-CCGATATCCTATAACCAACCTTTGAG-3' を用いて、KOD DNA ポリメラーゼ（東洋紡）により増幅し、*Sph*I と *Eco*RV（タカラバイオ）により切断した。この断片を、*Sph*I と *Sma*I で切断した pQE80L（キアゲン）に導入した（His-tag 付き）。完成したプラスミドはシークエンシングにより確認した。GST-*ChlH*、GST-GS、His-*SigE* をコードするプラスミドをタンパク質発現用大腸菌 BL21 codon plus（ノバジェン）に形質転換した。BL21 codon plus を、27°C で LB 液体培地 1 L で培養し、OD<sub>600</sub> = ~0.5 で 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside（和光純薬）を加え、一晚培養した。細胞を遠心で回収し、30 ml PBS-T（1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 81 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 1% Tween-20）に懸濁し、超音波破碎した後、20 分間

17,400 x *g* で遠心し、GST-ChlH と GST-GS は上清(可溶性画分)から、His-SigE は封入体(不溶性画分) からそれぞれ精製した。

GST-ChlH、GST-GS の精製は、上清 30 ml に glutathione-Sepharose 4B (アマシャムバイオサイエンス) 800  $\mu$ l 分を加え、4°C で 1 時間混合した後、1 分間 300 x *g* で遠心し、レジンを回収した。レジンを PBS-T で 5 回洗浄し、GST-elution buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM reduced glutathione) 800  $\mu$ l を加え、結合タンパク質を 3 回溶出した。

His-SigE を含む封入体を滅菌水で洗浄し、封入体の 1/2 量の Urea 溶液 (8 M urea, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM dithiothreitol) に懸濁し、37°C で 1 時間インキュベートした。封入体より可溶化された His-SigE タンパク質をそれぞれ His-binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.1% TritonX-100) に透析で置換し、HIS-Select レジン (シグマ) を 400  $\mu$ l 加えて精製した。タンパク質の定量を Bio-Rad protein assay (バイオラッド) を用いて行った。

ChlH、GS に対する抗血清は、精製した GST-ChlH と GST-GS を 2 mg ずつ用いて、蛋白精製工業社に外注して作製した。

#### (4) GST-pulldown 解析

20  $\mu$ l glutathione-Sepharose 4B と精製した GST、GST-ChlH または GST-GS を等量ずつ (Figure legends 参照)、1.5 ml エッペンドルフチューブに加え、Hepes-binding buffer (50 mM Hepes-KOH, pH8.0, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% glycerol, 0.1% TritonX-100) で全量を 400  $\mu$ l にした。室温で 30 分間インキュベートし



た後、Hepes-binding buffer 150  $\mu$ l で洗浄し、精製した His-SigE を等量ずつ加え (Figure legends 参照)、Hepes-binding buffer で全量を 500  $\mu$ l にし、室温で 1 時間混合した (実験により  $\text{MgCl}_2$  の濃度を変え、また、Proto、Mg-Proto を添加した)。次にレジンを 150  $\mu$ l の Hepes-binding buffer で 2 回洗浄し、50  $\mu$ l の SDS-Sample buffer を加え、100°C で 5 分間熱した。レジンから解離したタンパク質を 12% SDS-PAGE ゲルで電気泳動し、抗 SigE 抗血清を用いたウエスタンブロットによりベイトタンパク質に結合した His-SigE を検出した。

#### (5) 可溶性、膜画分の分画

まず、 $\text{OD}_{750} = 0.5\sim 0.7$  の細胞 (GT 株) 120 ml 分を 15 ml の 50 mM Hepes-KOH (pH 8.0)  $\pm$  10 mM  $\text{MgCl}_2$  に懸濁し、50 ml 遠心管に移した。細胞を超音波破碎後、17,400  $\times g$  で 20 分間遠心した。得られた上清の一部を回収し、全画分 (Whole) とし、残りの上清を超遠心管に移し、XXX  $\times g$  で 1 時間超遠心を行った。上清を可溶性画分 (Sup)、沈殿を 500  $\mu$ l PBS-T +1% TritonX-100 で懸濁したものを膜画分 (Ppt) とした。各画分のタンパク質濃度は BCA protein assay kit (PIERCE) で定量し、ウエスタンブロットにより ChlH と SigE タンパク質を検出した。

#### (6) ノーザンブロット解析

ノーザンブロット解析は、第 2 章第 2 節 (3) と同様に行った。

#### (7) ウエスタンブロット解析

ウェスタンブロット解析は、第2章第2節（7）と同様に実験を行った。

### 第3節 結果

（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  
かずさ DNA 研究所に依頼し、*Synechocystis* SigE をベイトとし、*Synechocystis* ゲノムライブラリー  $3.8 \times 10^6$  クローンに対して酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行った結果、SigE の結合タンパク質の候補として 26 の ORF が得られた。そのうち 4 つの ORF (*ilvC*, *ski2*, *tgt*, *glnA*) については、ポジティブクローンが 2 つ以上得られ、また、1 つの ORF (*chlH*) についてはプレイをベイトとしたスクリーニングによっても SigE との結合が確認された (Table 5-1)。Mg-プロトポルフィリン IX キラターゼ (Mg-キラターゼ) H サブユニット ChlH (Slr1055) は、Mg-キラターゼのサブユニットの 1 つである。Mg-キラターゼはテトラピロール生合成経路の酵素の 1 つで、プロトポルフィリン IX (Proto) に  $Mg^{2+}$  を付加し、Mg-プロトポルフィリン IX (Mg-Proto) を生成する反応を触媒する (Papenbrock and Grimm, 2001)。Mg-キラターゼは ChlI, D, H の 3 つのサブユニットからなり、H サブユニットはポルフィリン結合サブユニットであることが知られている (Reid and Hunter, 2002)。また、高等植物では、Mg-キラターゼは葉緑体に局在し、ChlH は別名 GUN5 (Genomes uncoupled 5) と呼ばれ、プラスチドから核へのシグナル伝達に必須であるなど、代謝以外の機能を有するタンパク質であることが知られている (Mochizuki et al., 2001)。本研究では、ChlH に加え、GS についても *in vitro* での結合解析を行った (第3節 (4) 参照)

## (2) *In vitro*における SigE と ChlH のタンパク質間相互作用

酵母ツーハイブリッドスクリーニングの結果を基に、まず SigE と ChlH の *in vitro* における結合実験を行った。SigE を His-tag との、ChlH を GST-tag との融合タンパク質として大腸菌で発現させ、アフィニティークロマトグラフィーで精製した（精製タンパク質をそれぞれ His-SigE、GST-ChlH とした）(Fig. 5-1A)。次に GST-ChlH または GST のみを、His-SigE および glutathione-Sepharose 4B レジンと混合し、遠心により結合タンパク質を沈降させたところ、GST-ChlH と His-SigE は共沈降したが、GST のみの場合は His-SigE が得られなかった (Fig. 5-1B)。ベイトタンパク質量を段階的に変化させ、GST-pulldown を行ったところ、GST 濃度の増加は共沈降する His-SigE の量に影響がなかったが、GST-ChlH の濃度増加に伴い共沈降する His-SigE タンパク質量の増加が観察されたため、ChlH と SigE との特異的な結合が検出された (Fig. 5-1C)。

次に、補因子が相互作用に与える影響を調べた。ChlH はそのヒスチジン残基に  $Mg^{2+}$  が結合すると予想され (Walker and Willows, 1997)、*in vitro* での生化学的実験により、ChlH は ChlI-ChlD と複合体を形成する前に、 $Mg^{2+}$  を付加することが示唆されている (Jensen et al., 2000)。また、高等植物の葉緑体から ChlH を精製する際に、 $Mg^{2+}$  が高濃度 (5 mM  $MgCl_2$ ) では葉緑体内膜画分に、 $Mg^{2+}$  が低濃度 (1 mM  $MgCl_2$ ) ではストロマ画分に含まれることが示されている (Gibson et al., 1996; Nakayama et al., 1998)。GST-pulldown により、SigE と ChlH との結合における  $Mg^{2+}$  の影響を調べたところ、 $Mg^{2+}$  濃度の上昇に伴い、

GST-ChlH と His-SigE の結合が促進されることが判った (Fig. 5-2)。

次に、Mg-キラターゼの基質である Proto および生成物である Mg-Proto の影響を調べた。Mg-Proto 存在下、非存在下で GST-pulldown を起こったところ、Proto、Mg-Proto により GST-ChlH と His-SigE の結合が阻害されることが判った (Fig. 5-3A)。次に  $Mg^{2+}$ 濃度を固定し、Proto、Mg-Proto の濃度を段階的に変えて、GST-pulldown 解析を行った (Fig. 5-3B)。  $Mg^{2+}$ 濃度を 2 mM に固定した場合、GST-ChlH と His-SigE の結合強度が Mock の 50%に阻害される Proto、Mg-Proto の濃度 ( $I_{50Pro}$  および  $I_{50Mpro}$ ) は、それぞれ 0.50  $\mu M$ 、3.8  $\mu M$  であった (Fig. 5-3B)。

Table 5-1 SigE、ChlH、GS をベイトとした酵母ツーハイブリッドスクリーニングの結果<sup>1</sup>

Bait	ORF	Start from	No. clones
<i>sll1689 (sigE)</i> <sup>2</sup>	<i>sll1363 (ilvC)</i>	+582	1
		+762	1
	<i>slr0451 (ski2)</i>	+1734	1
		+1839	1
	<i>slr0713 (tgt)</i>	+543	1
		+717	1
		+747	1
	<i>slr1055 (chlH)</i>	+1263 bp	1
	<i>slr1756 (glnA)</i>	+921 bp	1
		+1002 bp	2
<i>slr1055 (chlH)</i>	<i>sll1689 (sigE)</i>	+69 bp (to +711bp)	1
	<i>slr0653 (sigA)</i>	+69 bp (to end)	1
<i>slr1756 (glnA)</i>	<i>sll1515 (gifB)</i>	+12	1
		+90	1
		+111	1
		+120	1
	<i>ssl1911 (gifA)</i>	+21	1
	<i>slr0758 (kaiC)</i>	+1272	1

1. 結果は、ORF が in frame で Prey ベクターに含まれているコロニーのみをポジティブとした。

2. *sigE* の結果は、ポジティブクローンが2つ以上の遺伝子、または Prey 側をベイトとしたツーハイブリッドスクリーニングにより、SigE の結合が見られた遺伝子のみを記載した。

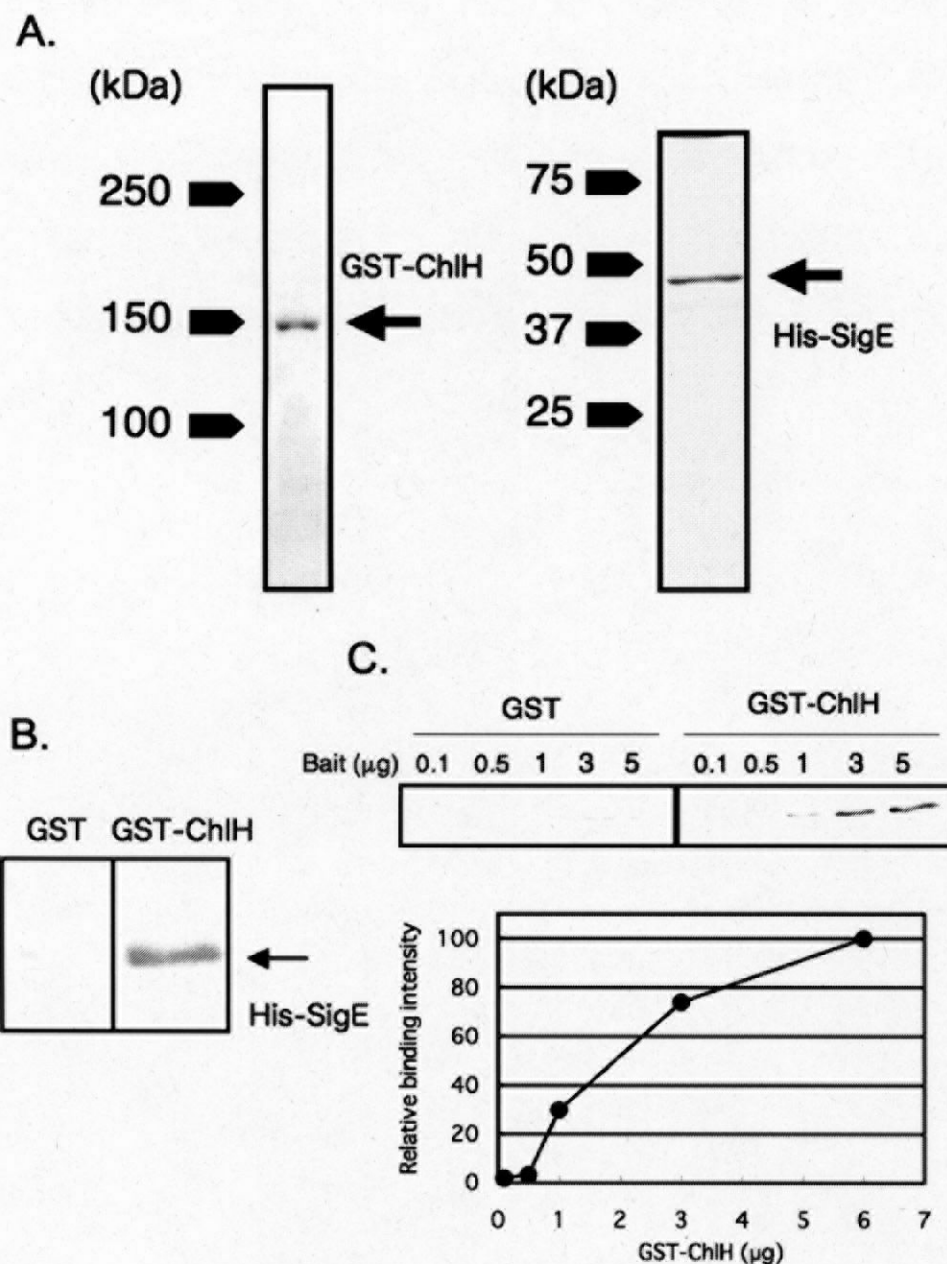


Fig. 5-1 His-SigE と GST-ChlH の精製と GST-pulldown による相互作用解析

A. GST-ChlH (左図) と His-SigE (右図) の精製。GST-ChlH は可溶性画分より、His-SigE は不溶性画分より精製し、それぞれ 6%、12% SDS-PAGE ゲルを用いて泳動し、クマシーブリリアントブルーによって染色した。B, C.

GST-pulldown 解析。精製した GST または GST-ChlH を (B) 2.0  $\mu\text{g}$ 、(C) 0.1, 0.5, 1, 3, 6  $\mu\text{g}$  ずつ glutathione-Sepharose 4B レジンに結合させ、His-SigE 1.0  $\mu\text{g}$  を、2 mM  $\text{MgCl}_2$  存在下で加え、ベイトタンパク質と共沈降した His-SigE を、抗 SigE 抗血清を用いたウエスタンブロットにより検出した。C. は GST-ChlH が 6.0  $\mu\text{g}$  の時の His-SigE の量を 100 とした相対値で表した。

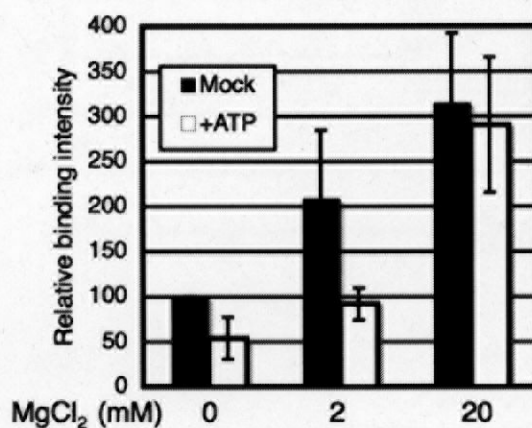
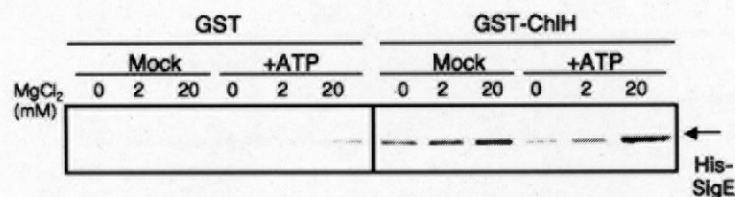
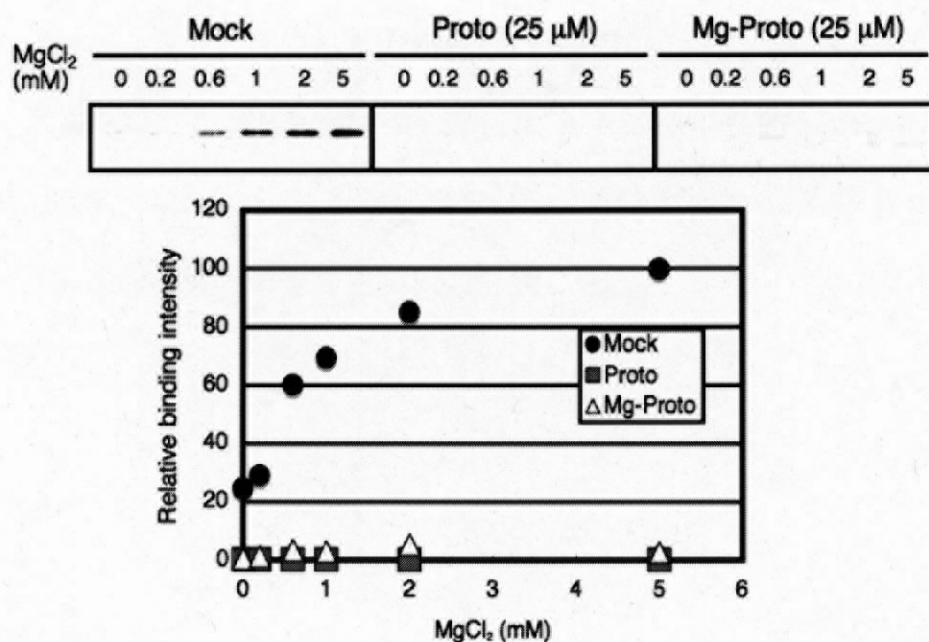


Fig. 5-2 His-SigE と GST-ChlH の結合に対する Mg<sup>2+</sup>と ATP の影響

GST-pulldown 解析。精製した GST または GST-ChlH を 2.0  $\mu$ g ずつ glutathione-Sepharose 4B レジンに結合させ、His-SigE 1.0  $\mu$ g を、それぞれ 0, 2, 20 mM MgCl<sub>2</sub> 存在下および 1 mM ATP 非存在下（黒）または存在下（白）で加え、ベイトタンパク質と共沈降した His-SigE を、抗 SigE 抗血清を用いた ウェスタンブロットにより検出した。下図は、MgCl<sub>2</sub> 0 mM の時の His-SigE の量を 100 とした相対値で表した。実験は独立して 4 回行い、その平均と標準偏差を示した。



A.



B.

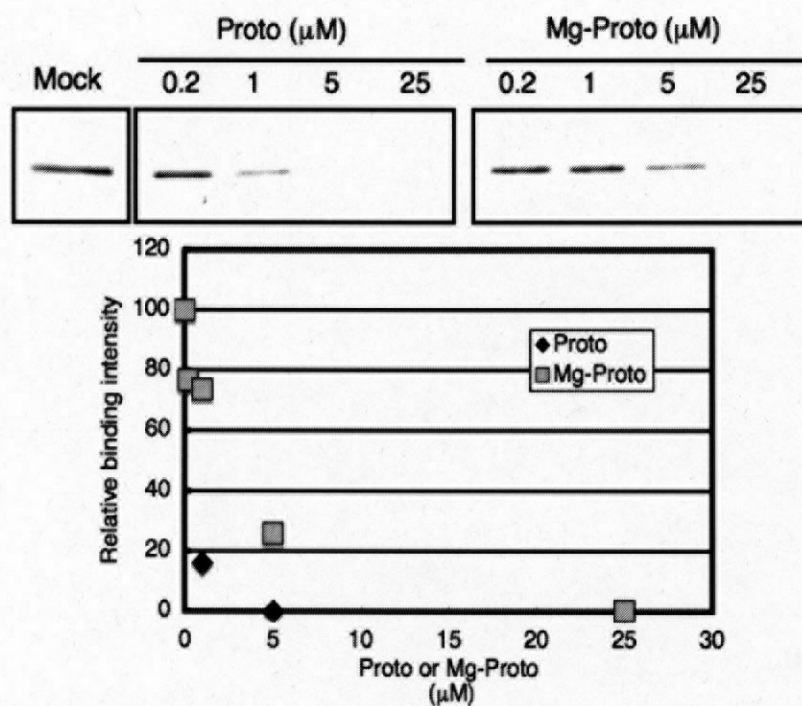


Fig. 5-3 His-SigE と GST-ChlH の結合に対する Proto、Mg-Proto の影響

A. 精製した GST または GST-ChlH を 2.0 μg ずつ glutathione-Sepharose 4B レジンに結合させ、His-SigE 1.0 μg を、それぞれ 0, 0.2, 0.6, 1, 2, 5 mM MgCl<sub>2</sub>

および 25  $\mu$ M Proto、25  $\mu$ M Mg-Proto 存在下で加え (Mock は DMSO 添加)、  
ベイトタンパク質と共沈降した His-SigE を検出した。下図は Mock、MgCl<sub>2</sub> 5  
mM の値と 100 とした相対値で表した。B. A.と同様の GST-pulldown 解析を、  
2 mM MgCl<sub>2</sub> および 0.2, 1, 5, 25  $\mu$ M Proto または Mg-Proto 存在下で行った。  
下図は Mock の値を 100 とした相対値で表した。

(3) ChlH および SigE はマグネシウムイオン濃度依存的に共局在する。

高等植物において、細胞から ChlH を抽出する際に、細胞破碎液中のマグネシウムが高濃度 (5 mM) の場合は膜画分に、低濃度 (1 mM) の場合は可溶性画分にそれぞれ ChlH が検出されることが知られている (Gibson et al., 1996; Nakayama et al., 1998)。そこで、*Synechocystis* 細胞を用いて、10 mM  $Mg^{2+}$  非存在下または存在下における細胞内タンパク質の抽出を行ったところ、高等植物と同様に、ChlH は  $Mg^{2+}$  存在下で膜画分に、 $Mg^{2+}$  非存在下で可溶性画分に多く検出された (Fig. 5-4)。その際の SigE の局在を調べたところ、ChlH と同様に、 $Mg^{2+}$  存在下で膜画分に、 $Mg^{2+}$  非存在下で可溶性画分に多く検出された (Fig. 5-4)。このことから、*Synechocystis* 細胞内において、SigE と ChlH がマグネシウムイオン濃度依存的に共局在している可能性が示唆された。

#### (4) マグネシウム欠乏による SigE レギュロンの発現誘導

腸内細菌を始めとする他のバクテリアのシグマ因子は、アンチシグマ因子などの他のタンパク質により細胞質膜にトラップされ、その転写活性が抑えられることが知られている (Helmann, 1999)。これまでの結果により、SigE と ChlH の結合が  $Mg^{2+}$  により促進され (Fig. 5-2)、その際には細胞質膜またはチラコイド膜に付着している可能性が示された (Fig. 5-3)。このことから SigE は、マグネシウムイオン濃度の低下により、細胞質に放出され、活性化されることが予想された。そこで、マグネシウム欠乏による SigE レギュロンの mRNA 量をノーザンブロットにより調べたところ、マグネシウム欠乏 10 分後に OPP 経路遺伝子の発現が誘導されることが判った (Fig. 5-5A)。発現誘導は 30 分後まで続

き、60 分後ではマグネシウム欠乏前の mRNA 量に戻った (Fig. 5-5A)。この際の SigE および ChlH のタンパク質量を調べたところ、SigE および ChlH はマグネシウム欠乏によってもタンパク質量変化が見られなかったため (Fig. 5-5B)、SigE が翻訳後レベルで脱抑制され、OPP 遺伝子の転写を一過的に促進することが考えられた。

#### (6) 暗条件下および SigE 欠損による ChlH タンパク質の減少

クラミドモナス、高等植物において、*chlH* の発現は暗条件下から明条件下に移すことにより増加することが知られている (Nakayama et al., 1998; Papenbrock et al., 1999; Chekounova et al., 2001)。 *Synechocystis* において、ChlH タンパク質量の明暗条件下での変化を調べたところ、明条件下から暗条件下へ移行することにより、ChlH タンパク質量が減少することが明らかになった (Fig. 5-6)。次に *in vitro* で ChlH との結合が見られた SigE の欠損株 (G50) における ChlH タンパク質量を調べたところ、明条件下において、ChlH タンパク質量が GT 株の 64.5%に減少していることが判った (Fig. 5-6)。また、暗条件下での ChlH タンパク質量の減少は、G50 株においても観察された (Fig. 5-6)。また、SigE 欠損により ChlH タンパク質量が減少したが、G50 株のクロロフィル量は GT 株と同等であった。

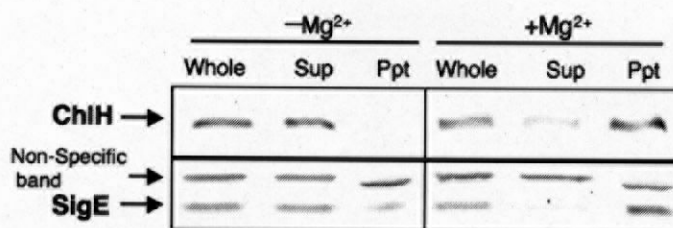


Fig. 5-4. マグネシウムイオン濃度依存的な ChlH および SigE の局在。通常培養条件下で培養した GT 株を、10 mM MgCl<sub>2</sub> 存在下または非存在下で破碎し、遠心後に上清を回収した (Whole)。得られた上清を超遠心にかけて、可溶性画分 (Sup) と膜画分 (Ppt) に分画した。ChlH と SigE タンパク質の検出は、それぞれ 6%、12% SDS-PAGE ゲルに各 5  $\mu$ g ずつ泳動し、抗 ChlH 抗血清または抗 SigE 抗血清で検出した。

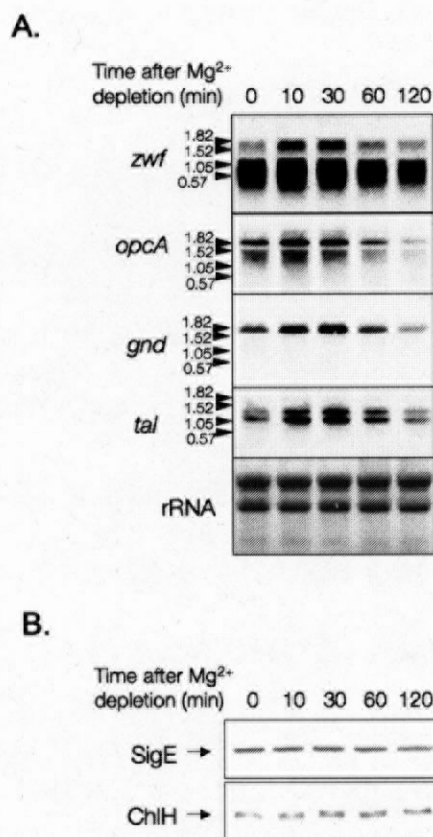


Fig. 5-5 Mg 欠乏による SigE および SigE レギュロンの発現変化

A. Modified BG-11 で培養した GT 株をマグネシウム欠乏後 0、10、30、60、120 分で回収し、RNA を抽出した。各レーン全 RNA (各 5  $\mu$ 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 (kb)。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. ウェスタンブロット解析。A と同様の条件で回収した細胞からタンパク質を抽出し、各レーン 5  $\mu$ g ずつタンパク質を泳動し、抗 SigE 抗血清または抗 ChlH 抗血清を用いて SigE および ChlH タンパク質を検出した。

#### (7) GS と SigE の *in vitro* における相互作用

酵母ツーハイブリッドスクリーニングの結果、ChlH に加え、GS も SigE に結合する可能性が示唆されたため、*in vitro* における結合実験を行った。まず、GS 全長を GST-tag との融合タンパク質として大腸菌で発現させ、アフィニティークロマトグラフィーで精製した（精製タンパク質を GST-GS とした）(Fig. 5-7A)。次に、精製した GST-GS と His-SigE を用いて GST-pulldown 解析を行ったところ、GST-GS と His-SigE が共沈降することが判った (Fig. 5-7B)。一方、SigE 欠損株における GS タンパク質量を調べたところ、明条件下および暗条件下における GT 株との差は見られなかった (Fig. 5-7C)。

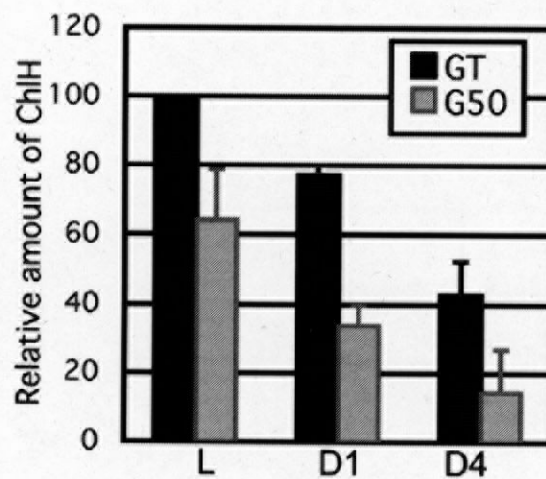
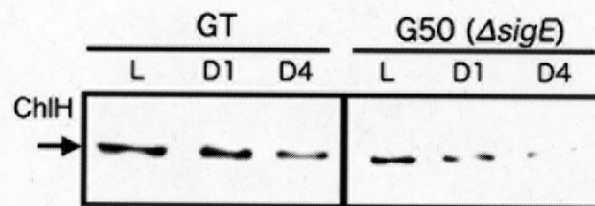


Fig. 5-6 明暗条件下および SigE 欠損株における ChlH タンパク質量測定

GT 株および G50 株における ChlH タンパク質量。Modified BG-11 で培養した GT 株および G50 株を明条件 (L)、暗条件 1 時間 (D1)、暗条件 4 時間 (D4) で細胞を回収し、超音波破碎によりタンパク質を抽出し、各レーン全タンパク質量 6.0  $\mu$ g 分ずつ 6% SDS-PAGE ゲルに泳動し、抗 ChlH 抗血清を用いたウェスタンブロットを行った。下図は GT 株の L の ChlH 量を 100 とした相対値で表した。実験は独立して 3 回行われ、その平均と標準偏差を示した。



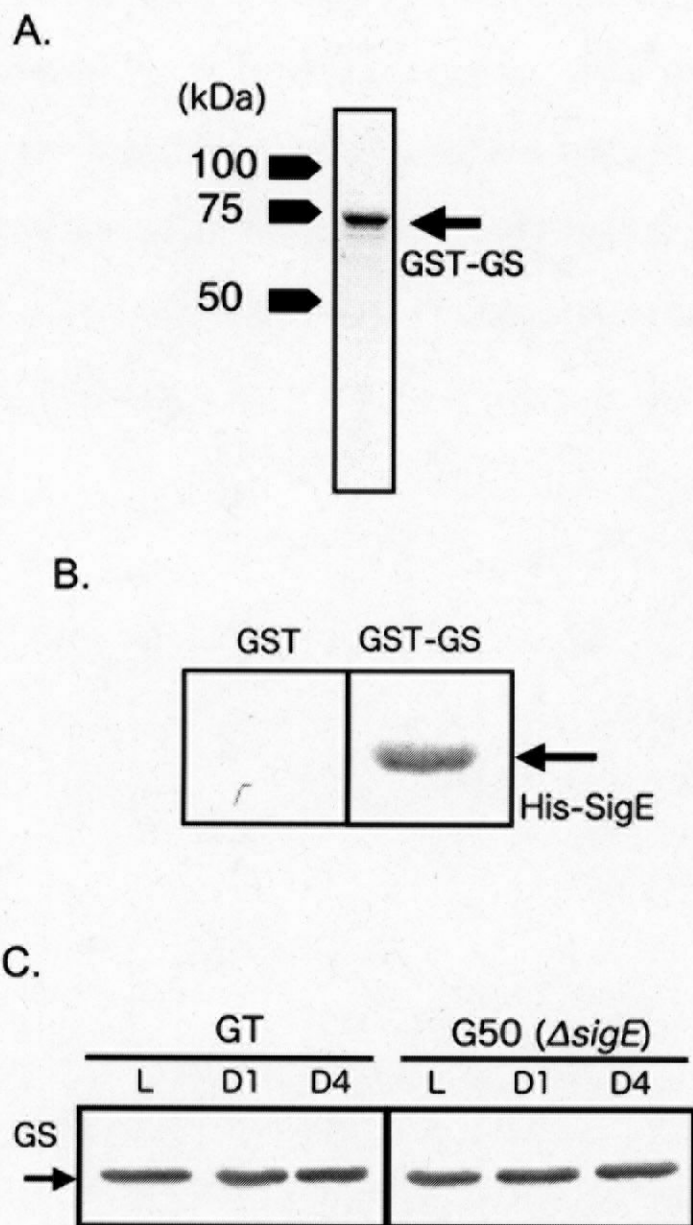


Fig. 5-7 GST-GS の精製と GST-pulldown による His-SigE との相互作用解析

A. GST-GS の精製。GST-GS を大腸菌で大量発現させ、可溶性画分より精製し、12% SDS-PAGE ゲルを用いて泳動し、クマシーブリリアントブルーによって染色した。B. GST-pulldown 解析。精製した GST または GST-ChlH を 3.0  $\mu\text{g}$  ずつ glutathione-Sepharose 4B レジンに結合させ、His-SigE 1.0  $\mu\text{g}$  を加え、べ

イトタンパク質と共沈降した His-SigE を、抗 SigE 抗血清を用いたウエスタンブロットにより検出した。C. GT 株および G50 株における GS タンパク質量。Modified BG-11 で培養した GT 株および G50 株を明条件 (L)、暗条件 1 時間 (D1)、暗条件 4 時間 (D4) で細胞を回収し、超音波破碎によりタンパク質を抽出し、各レーン全タンパク質量 6.0  $\mu$ g 分ずつ 12% SDS-PAGE ゲルで泳動し、抗 GS 抗血清を用いたウエスタンブロットを行った。

#### 第4節 考察

本研究における酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより、SigE の新規結合タンパク質として Mg-キラーターゼ H サブユニット ChlH とグルタミンシンセターゼ GS が得られた (Table 5-1)。近年、代謝酵素が代謝酵素としての機能だけでなく、転写に直接働く事例が数多く報告されている。例として、哺乳類細胞において、解糖系酵素 GAPDH を含む転写複合体がヒストン H2B の転写を S 期特異的に促進すること (Zheng et al., 2003)、酵母ミトコンドリアに局在するアルギニン合成酵素 Arg5,6 が COX1 などの呼吸鎖遺伝子群のプロモーターに結合すること (Hall et al., 2004)、シロイヌナズナ細胞質局在解糖系酵素 HXK1 が核に移行して複合体を形成し、CAB (クロロフィル a 結合タンパク質) の転写を抑制すること (Cho et al., 2006) などが知られている。また、原核生物でも枯草菌 GS が窒素関連転写因子 TnrA と直接相互作用し、TnrA のプロモーター DNA への結合を阻害することが判っている (Wray et al., 2001)。前述の通り、ChlH は、高等植物において、葉緑体から核へのシグナル伝達に必須であり (Mochizuki et al., 2001)、また、アブシジン酸の受容体としても働くなど (Shen et al., 2006)、多様な機能を持つタンパク質である。ChlH および GS と SigE の相互作用の意義は明らかでないが、両代謝酵素が SigE の活性を制御する可能性がある。

酵母ツーハイブリッド解析の結果より、ChlH は SigE の 23~237 アミノ酸残基に結合することが示唆された (Table 5-1)。SigA~D をベイトとした酵母ツーハイブリッドスクリーニングでは、ChlH は結合タンパク質候補として得られなかったため (かずさ DNA 研究所)、SigE 特異的に ChlH が結合すると考えられ

る。*Synechocystis* の SigA~E のアライメントを作成したところ、シグマ因子の N 末端側に比較的保存性の低い領域がある (Fig. 5-6)。特に SigE の 23~54 アミノ酸残基および 86~122 アミノ酸残基領域は他のシグマ因子との相同性がほとんどみられないため、この領域が ChlH との相互作用に働いている可能性が考えられる。

SigE と ChlH 間の相互作用は、 $Mg^{2+}$ 濃度の上昇により促進されることが明らかになった (Fig. 5-2A, B)。 $Mg^{2+}$ 濃度の変動は *Synechocystis* 細胞において不明であるが、高等植物 (ホウレンソウ) の葉緑体において、光照射により  $Mg^{2+}$  がチラコイドからストロマに放出され、ストロマの  $Mg^{2+}$ 濃度が上昇することが知られている (Ishijima et al., 2003)。蛍光プローブを用いた研究により、暗条件下でのストロマの  $Mg^{2+}$ 濃度は約 0.5 mM であり、光照射により約 2 mM に上昇することが判っている (Ishijima et al., 2003)。明条件、暗条件下での  $Mg^{2+}$ 濃度をそれぞれ 2、0.5 mM と仮定すると、Fig. 5-3A より SigE と ChlH の相互作用は、それぞれ最大値の 79.1%、47.3%の結合親和性を示し、 $Mg^{2+}$ の濃度依存的に明暗条件での結合が決定される可能性がある。また、前述の通り、葉緑体の ChlH は高  $Mg^{2+}$ 濃度では葉緑体内膜に、低  $Mg^{2+}$ 濃度ではストロマに局在することが示唆されていることから (Gibson et al., 1996; Nakayama et al., 1998)、*Synechocystis* の ChlH、および SigE も  $Mg^{2+}$ 依存的に明暗条件で局在が変化する可能性がある。今後は *Synechocystis* 細胞内における  $Mg^{2+}$ 濃度の測定とともに、*in vivo* での SigE と ChlH の相互作用を明らかにする必要がある。

一方、Proto または Mg-Proto 添加により SigE と ChlH の結合が阻害されることが判った (Fig. 5-3A)。 $I_{50Pro}$  および  $I_{50Mpro}$  はそれぞれ 0.50  $\mu M$ 、3.8  $\mu M$  で

```

sigA 1 MTQTKEPLTKAESAELEQEIELSQYINTDIDDDIDVEDLEQEVAALEGKEKKVRKIRK
sigB 1 -----MVTVTVILLFIKESFRMPTANLS
sigC 1 -----MTKPSNDEPPLTNVRDLAAMPLLEEDLTADSQDLEYT
sigD 1 -----
sigE 1 -----MSDMSSLSTPNTSAVDQWQALDGLADGQAIANDPFAIEVTLGDGQ-----

sigA 61 DAVKKKPYTEDSIRIYLQEIGRIQLLRAEEIEELAQIADLLELELIRDNLTQLERQPS
sigB 25 SPTSPTFTADMVRSYLLHEIGRVPLLEHEQEIIILGKQVQOMMALLEHKKALAD-----
sigC 39 AVAHRQQFSTDLVRLYLQDIGRIPLLEKDEEVNIAQQVQSYRLVETQNRRAESDAIDQ
sigD 1 ---MTARTSPDQVRAYLLEIGRVPLLEHEEIVYAKIQIQVVSLEIKKSLAE-----
sigE 47 QGSFNKAVSEDAVGAFFKEMARYPLLEAAEEVELARQIRLLVSAEDVRQQETQQLERTPS

sigA 121 ELEWKGQVWKLETAKQRLVGDKKKEPKKKDIDSYLANPDNELSLENENWSQQPNKNFAAFR
sigB 78 -----RLGREPSDP-EWASANDLSVTKLH
sigC 99 YQTAIAVHDQLLV--QLGHRPSYERWAKILGQTVATLKQTLKSGKKRWAEACLTVEELE
sigD 51 -----GKDGEFVSPSEWAKAADLSIRELE
sigE 107 LQEWG-----QALEFPQVRQFE

sigA 181 RRLFLDRRAKDKMVSNNRLRVVSIKKYNNRGLSFODLIQEGSLGLIRAAEKFDHEKGYK
sigB 101 RYLGQGERAKRKMIEANLRLVVAIAKKYQKRNMFFLDLIQEGSLGLERQVEKFDPTKGYK
sigC 157 NIEKQGITAKAMIMANLRLVVSIAKKYQNRGLELDDLQEGSLGLERAQVEKFDPTKGYR
sigD 75 KAIKEGERAKRKMVEANLRLVVSIAKKYQKRNLDDLQEGTIGMORQVEKFDPTKGYR
sigE 124 IWLQOLRAAKRMIRSNLRLRVVSIKKYNNRGLVFFLDLIQEGAIGLNRAAEKFDPKGYK

sigA 241 FSTYATWWIROAITRAIADQSRITIRLPVHLYETISRIKKTLLSQEMRRKPTREEEIAEK
sigB 161 FSTYAYWWIROAITRAIAQQGRTIRLPITHITEKLNKIKKTQRELSQLGRSATPAAEVAKA
sigC 217 FSTYSYWWIROAITRAIATQSRMIRLPVHITEKLNKIKKAQKISQEKGHTPKIDEVAEE
sigD 135 FSTYAYWWIROAITRAIAEKSRTIRLPITHITEKLNKIKKAQROLQSOEKGRAASIAELAEE
sigE 184 FSTYAYWWIROAITRTIANDARTIRLPVHVEKLNKIKKAQNSLQOELKRNENEGELAAA

sigA 301 KEMTIEKLRFIKSAQLPISLETPIGKEEDSRLGDFLEADGETPEDEVSKN--LLREDLE
sigB 221 LEIDPSQIREYLSLSRQPISLDVRVGDNDQDTLSLLEDGVSPDAYITQES--NRQDLQ
sigC 277 LGMTPEQVREVLTQVPRSVSLELVGQDKDTELMDLLEDTQSPEDELMREA--LQNDMQ
sigD 195 LETPKQVREYLEKSRHPLSLDVRVGDNDQDTELGDLLEDGFLPEDFATYAS--LQDLQ
sigE 244 LDTIPAQLRQLQLRQSLSLNHRVCKGDTLVLLDQQLQLPEDLMNESMLAREIVE

sigA 359 NVLDTLSPRRDVLRLRLGLDDGRMKTLEIGQIPNVRRERIRQIEAKALKLRPMNRNS
sigB 279 NLLAELTPQQQAVLTHRFGLNDGQELSLANIGQHLNLSRERVROIEAQAQLKR--RRA
sigC 335 EILLDLTPREQEVIALRFGFDGVANLSEIGRIYLNLSRERVROIEAKALOKLRPRRRD
sigD 253 SLMAELTPQOREVTLRFGLNDGQPLTASIGSMLSRERVROIEREALNKLK--RKS
sigE 304 VLAEVLTREMEVCLRIIGIASHQSYTLEEVGNMPLNSRERVROIQSKAMRKLRLPQVAR

sigA 419 ILNEYIR--
sigB 337 NMAEYIIAS
sigC 395 RIRDYIEN-
sigD 311 MIQEYLAS-
sigE 364 RLKGNL---

```

Fig. 5-8 *Synechocystis* sigA~E の配列比較

CyanoBase (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/>) より得た sigA~E の配列を

ClustalW プログラム (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-j.html>) によりアライメントを作製し、BoxShade3.21 により描画した。保存性の高い残基を黒色、比較的高い残基を灰色で表した。矢頭は、酵母ツーハイブリッド解析より予想された ChlH との結合領域の始点と終点を示す。GenBank accetion No. *sigA*, BAA18672; *sigB*, BAA10020; *sigC*, BAA10419; *sigD*, BAA17711; *sigE*, BAA17757.

あり、Proto による結合阻害の効果が大きかった。Proto および Mg-Proto のアナログである DeuteroporphyrinIX (Deutero) および Mg-DeuteroporphyrinIX (Mg-Deutero) を用いた蛍光測定により、*Synechocystis* の ChlH は、モノマーで Proto および Mg-Proto を結合することが明らかになっている (Karger, et al., 2001)。ChlH に対する Deutero、Mg-Deutero の解離定数は、それぞれ  $K_d = 1.22, 2.43 \mu\text{M}$  であり、ATP、 $\text{MgCl}_2$  の存在下でそれぞれ  $K_d = 4.00, 5.24$  に増加する (Karger, et al., 2001)。これらの結果より、ChlH に対する Proto と Mg-Proto の親和性の差は 2 倍以内であることが判る。従って、Mg-Proto に比べ、Proto による SigE と ChlH の結合阻害の効果が高い理由は、Mg-Proto、Proto の ChlH に対する親和性の差のみではないと考えられる。ゲル濾過クロマトグラフィーを用いた研究から、溶液中の ChlH タンパク質は Proto、 $\text{Mg}^{2+}$ 、ATP 依存的に、モノマー、テトラマー、オリゴマーの割合が変化するため (Karger, et al., 2001)、これらの補因子により ChlH の構造変化が起こることが予想される。これらのことから、Proto 添加により、ChlH に構造変化を引き起こし、その結果 SigE との結合がなくなることが考えられる。今後は Proto、Mg-Proto による ChlH 構造変化を解明する必要がある。

シアノバクテリアにおける Proto、Mg-Proto の細胞内濃度については不明であるが、 $I_{50\text{Proto}}$  および  $I_{50\text{MgProto}}$  ( $0.50 \mu\text{M}$ 、 $3.8 \mu\text{M}$ ) は、細胞内濃度 (nM~pM 単位) よりもはるかに高いと予想されるため、Proto、Mg-Proto は、特別な条件下でのみ SigE と ChlH の相互作用に寄与すると考えられる。高等植物において、ノルフラゾン添加による酸化ストレスにより Mg-Proto が蓄積し、これが葉緑体から核へのシグナルとなって核の転写を制御することが知られている (Strand

et al., 2003)。また、植物細胞において、**diphenyl-ether-type** の除草剤添加による **Proto** の蓄積によって、光依存的な細胞障害が起こることが明らかになっている (Matringe and Scalla, 1988, Witkowski and Halling, 1988)。第 2 章の研究より、**SigE** は **OPP** 経路を正に制御することが明らかになったが、大腸菌において *zwf* の転写は、活性酸素により活性化された **SoxR**、**SoxS** により促進されることが判っている (Pomposiello and Demple, 2001)。また、サルモネラやトリパノソーマなどのバクテリアにおいて、*zwf* の欠損株は酸化ストレスに感受性になることが知られている (Lundberg et al., 1999; Igoillo-Esteve and Cazzulo, 2006)。このように、テトラピロール化合物が蓄積するような酸化ストレス条件下において、**SigE** が **ChlH** から解離することにより、**OPP** 経路をはじめとする糖異化遺伝子群の発現を増加させることが考えられる。

本研究により、**ChlH** に加え、窒素代謝酵素である **GS** と **SigE** が *in vitro* で相互作用することが明らかになった (Fig. 5-5B)。前述のように、**GS** には代謝以外の機能を有する事例があり、枯草菌 **GS** はグルタミンおよび **AMP** 存在下で **TnrA** と相互作用し、**TnrA** の *amtB* (アンモニウムトランスポーター) プロモーターへの結合を阻害する (Wray et al., 2001)。このように、枯草菌において **GS** は、代謝酵素としての機能だけでなく、グルタミンを介した窒素栄養状態のセンサーとしても働く。*Synechocystis* の **SigE** は、窒素欠乏時に **NtcA** により転写が活性され、タンパク質量が増加するシグマ因子であるが (第 2 章、第 4 章参照)、枯草菌のように、翻訳後レベルでも **GS** により活性が制御されている可能性がある。**GS-GOGAT** サイクルの基質の 1 つである **2-OG** は、糖異化により供給されるため、**GS** を介して窒素栄養状態のシグナルを **SigE** 伝達し、糖異



化経路を調節することにより、GS-GOGAT サイクルと糖異化のバランスを調節している可能性がある。

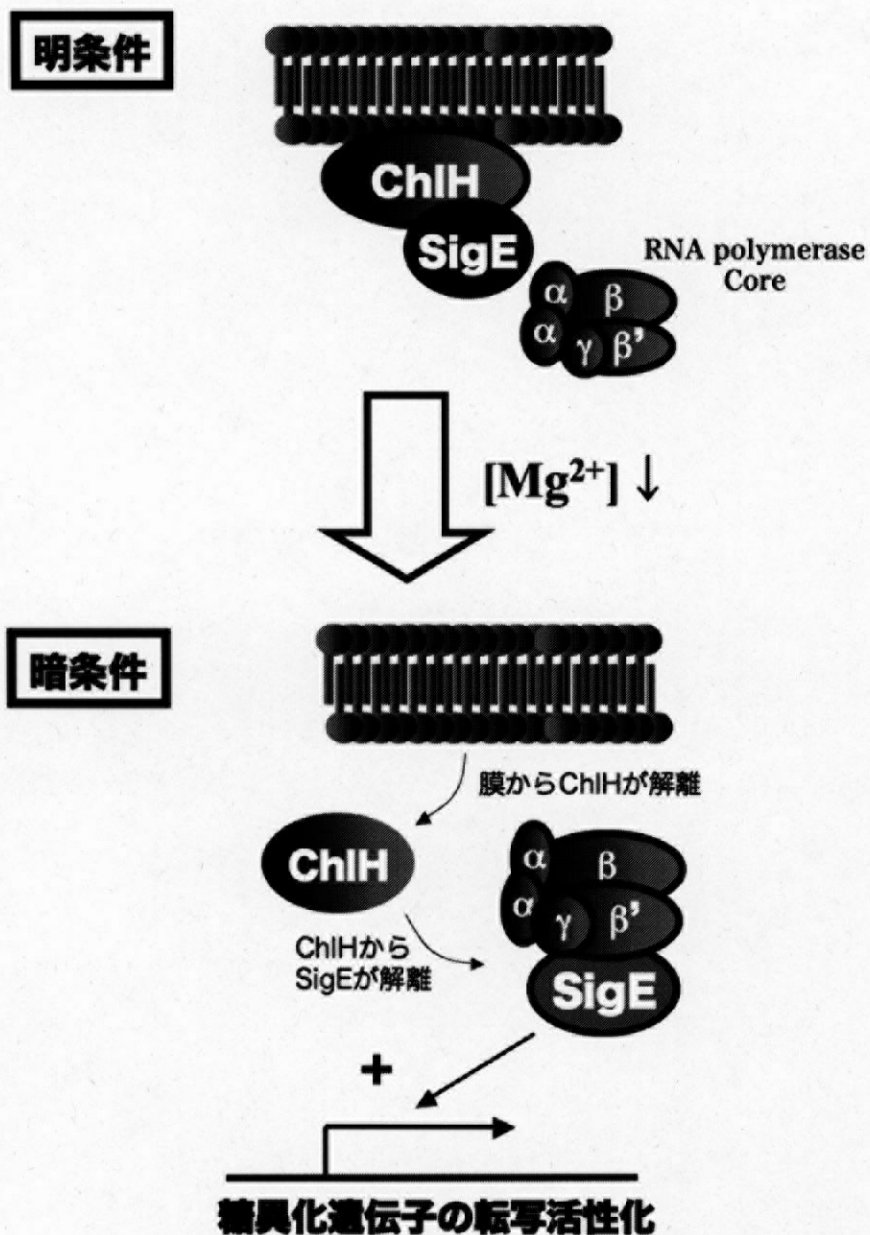


Fig. 5-9 ChlH とのタンパク質間相互作用による SigE 活性制御機構のモデル

SigE は ChlH と相互作用することにより、その転写活性が抑制されているが、 $Mg^{2+}$ 濃度の減少、または Proto（または  $Mg$ -Proto）濃度の上昇により ChlH から解離し、SigE レギュロンである糖異化遺伝子群の転写を促進する。

## 第6章

### 総合討論

本研究により、*Synechocystis* における糖異化が SigE により正に制御され (Osanai et al., 2005a)、また、その上流には PII、PamA、NtcA などのシグナル受容タンパク質群存在し、SigE の発現を正に制御することが判った (Osanai et al., 2005b; Osanai et al., 2006)。さらに SigE 結合タンパク質として ChlH および GS を同定し、代謝酵素による SigE の翻訳後制御の可能性を提示した。このように、本研究では窒素シグナル、C/N バランスシグナルが SigE、PII、PamA、NtcAなどを介して糖異化遺伝子群の発現を制御するという、新しい炭素-窒素代謝間の相互作用経路を提唱することができた。

#### (1) 糖異化遺伝子群の多重発現制御機構

本研究をはじめとするこれまでの解析により、*Synechocystis* の糖異化遺伝子群の転写に関与する因子として、SigE、Hik8、NtcA、PII、PamA など多くのタンパク質が同定された。これらの研究により、糖異化遺伝子を制御するシグナルとして、1. 明暗変化、2. サーカディアンリズム、3. 窒素シグナル、4. C/N バランスが考えられる (Fig. 6-1)。明暗変化については、SigE は暗条件下で活性化すると考えられるが、タンパク質量は増加しないため、翻訳後レベルでの制御が考えられ、SigE の結合タンパク質である ChlH が寄与している可能性がある (第5章参照)。サーカディアンリズムについては、KaiABC 複合体と、KaiC に直接結合する Hik8 (SasA) が必須であると思われる。最近、*Synechococcus* の SasA の下流に存在するレスポンスレギュレーター (RpaA) が同定され (Takai et al., 2006)、*Synechocystis* においても同様にレスポンスレギュレーター (RpaA, Slr0115) を介した Hik8 の糖代謝制御が予想される。本研

究により、SigE と Hik8 は遺伝学的に同一経路にあることが示唆されるので (Fig. 4-8)、Hik8-RpaA による SigE の発現に関与する制御機構についても解析する必要がある。窒素シグナルについては、NtcA 変異株において糖異化遺伝子群の窒素欠乏時の誘導が見られなくなることが判った (第 4 章参照)。また、窒素欠乏 4 時間後の誘導は SigE 欠損株でも観察されたため、窒素欠乏時の糖異化遺伝子群の発現には、SigE のみならず他の転写因子も関与していることが示唆された。第 3 章の研究により、C/N バランスセンサー PII の結合タンパク質 PamA を同定し、遺伝学的に PamA が SigE の発現を正に制御することを明らかにした (第 3 章参照)。PamA が SigE の発現を制御する機構は不明であるが、この結果は糖異化遺伝子群が窒素欠乏シグナルだけでなく、C/N バランスシグナルの下流に存在する可能性を示すものである。今後は、C/N バランスが崩れた条件、特に炭素過剰の条件における糖異化遺伝子群の発現解析を行う必要がある。

## (2) 窒素欠乏下における時間的発現制御カスケード

前述の通り、本研究では窒素欠乏下における糖異化遺伝子群発現制御の多重性を示したが、これまでのモデルは時間概念のない「スナップショット」モデルである。しかし、*Synechocystis* 細胞は、窒素欠乏下で段階的に mRNA およびタンパク質プロファイルを変化させ、休眠型細胞へと分化していくと予想される。従って、糖異化遺伝子発現についても窒素欠乏下で経時的に解析することが必須である。予備的なデータとして、ノーザンブロットにより窒素欠乏下での経時的な mRNA 量変化を調べたところ、*glnA* や *glnB* は窒素欠乏後 1 時間以内で発現量のピークを迎え、その後減少していったが、*sigE* および糖異化遺

伝子群は、窒素欠乏 2 時間後から発現の増加が見られ、少なくとも 8 時間後までは mRNA 量の減少が見られなかった (Fig. 6-2)。この結果から窒素欠乏後 8 時間までの間に少なくとも 3 つの Phase が存在することが予想された (Fig. 6-3)。窒素欠乏後に最も早く発現誘導を受ける遺伝子は、NtcA のみに依存すると思われる (Phase 1)。NtcA には窒素欠乏のシグナル代謝産物である 2-OG が直接結合し、*glnA* などの転写を促進することが知られている (Tanigawa et al., 2002、第 2 章参照)。この Phase 1 では糖異化遺伝子群は発現誘導を受けない (Fig. 6-3)。このモデルは、糖異化遺伝子のプロモーターには NtcA 結合配列がなく、NtcA により間接的に転写が促進されるという結果に基づく (第 4 章参照)。続いて、糖異化遺伝子群の mRNA 量が窒素欠乏後 2 時間以降で増加するが、この増加には NtcA が必須である。しかし、SigE は必須ではないため、NtcA の制御下にある別の転写因子が関与していると思われる (Phase 2) (第 4 章参照)。また、NtcA 依存遺伝子群の中にも、NtcA のプロモーター配列への結合親和性に違いがあることが予想され、それによって発現レベル、タイミングが異なると考えられる (Phase 2)。NtcA の制御下にあるが、SigE の発現誘導は比較的遅いため、窒素欠乏後長時間に渡る高 mRNA レベルの維持に SigE が働く可能性がある (Phase 3)。本研究では窒素欠乏後 4 時間という時点で研究を行ったが、今後はさらに窒素欠乏後の長時間に渡った解析を進めることが重要である。

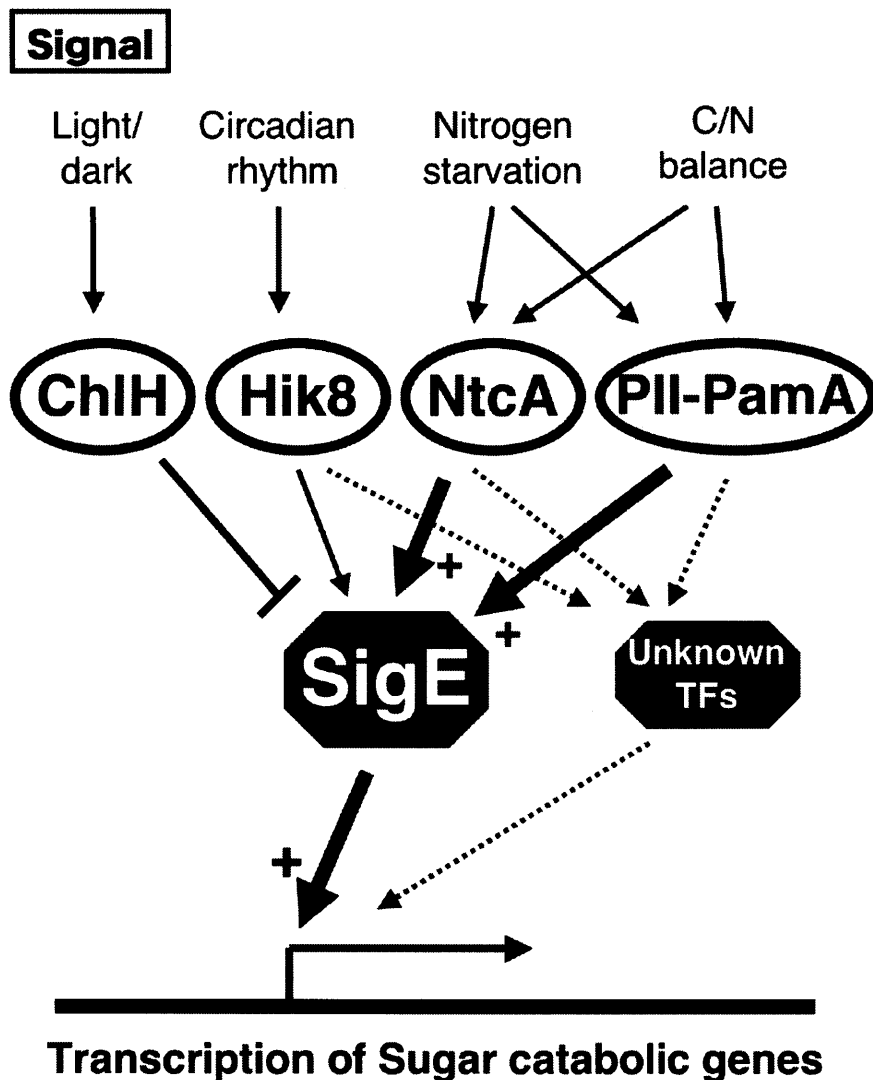


Fig. 6-1 糖異化遺伝子発現の多重制御モデル

これまでの解析により、糖異化遺伝子群の上流シグナルとして、明暗変化、サーカディアンリズム、窒素欠乏、および C/N バランスが存在することが示唆された。さらに、本研究を含む解析により、明暗変化は ChlH、サーカディアンリズムは Hik8、窒素欠乏、C/N バランスは NtcA、PII、PamA を介して SigE および未知転写因子にそのシグナルが伝達され、糖異化遺伝子群の発現が制御されると思われる。

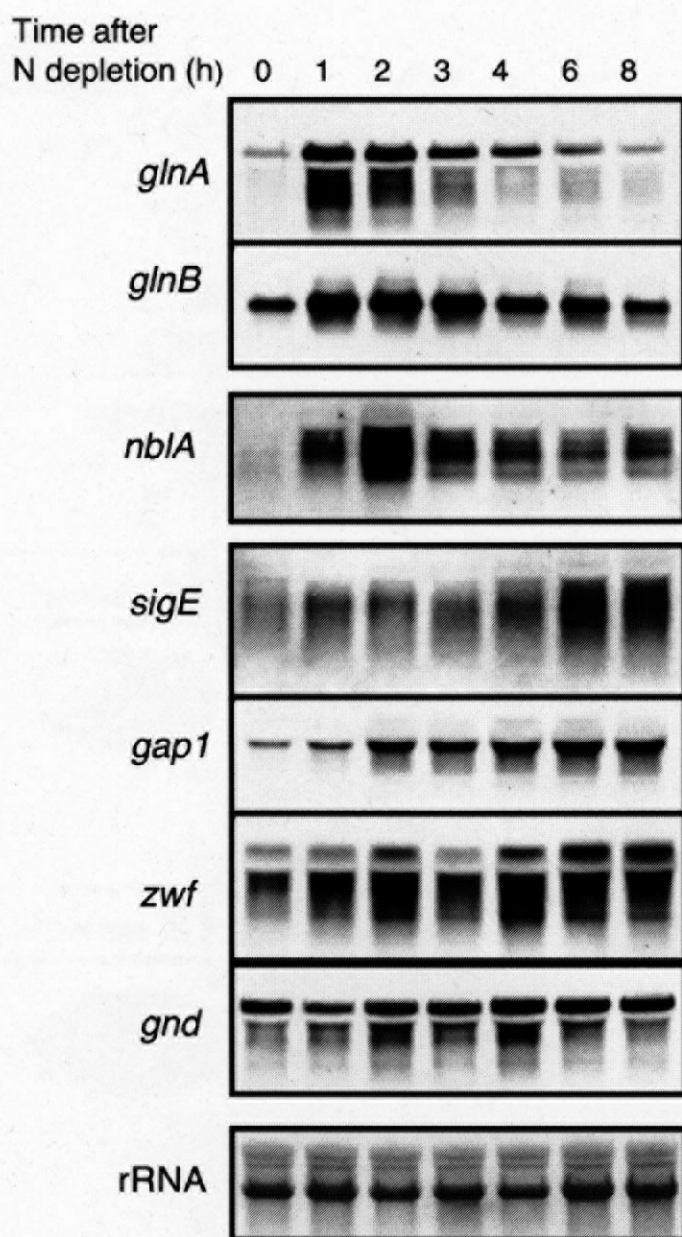


Fig. 6-2 ノーザンブロットによる窒素欠乏後の経時的 mRNA 量変化

Modified BG-11 で培養した GT 株の窒素欠乏後 0、1、2、3、4、6、8 時間で回収し、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。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。



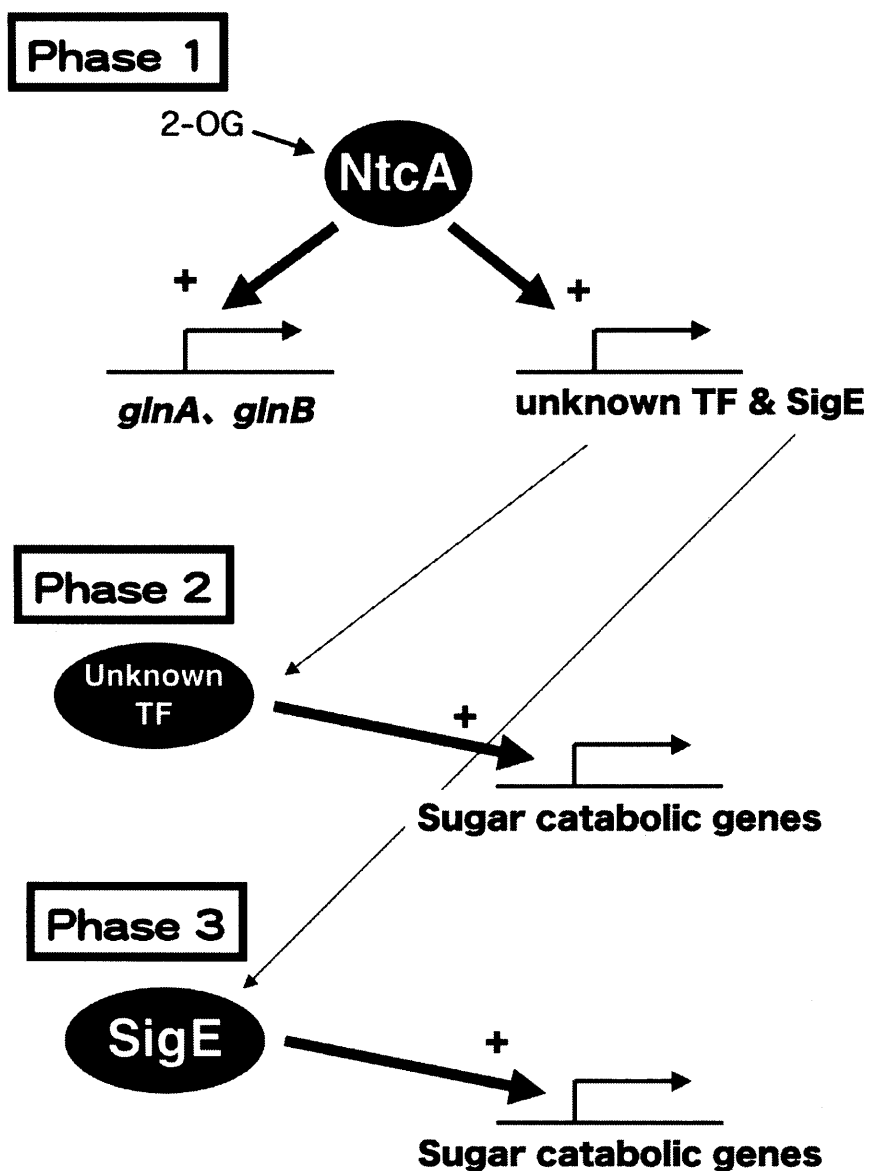


Fig. 6-3 窒素欠乏下における糖異化遺伝子群の経時的発現制御モデル

窒素欠乏時に細胞内の 2-OG が蓄積し、2-OG が NtcA に結合することにより、*glnA*、*glnB* とともに、未同定の転写因子、*sigE* の発現が促進される (Phase 1)。次に NtcA により活性化した未知の転写因子により糖異化遺伝子の発現が増加する (Phase 2)。最後によって、糖異化遺伝子群の発現が高いレベルに保たれると考えられる (Phase 3)。

### (3) SigE および SigE レギュロンの共進化について

シアノバクテリアはグループ 2 シグマ因子を複数持つことが知られているが (第 1 章参照)、田中寛博士により作製されたシアノバクテリアシグマ因子の系統樹より、*Synechocystis*、*Nostoc* をはじめとする SigE を保持する種、*Prochlorococcus*、*Synechococcus* をはじめとする保持しない種に区別ができる (Table 6-1)。第 2 章の結果より、SigE の制御下には糖異化遺伝子群があるが、すべての糖異化遺伝子が SigE の制御下にあるわけではなく、例えばホスホフルクトキナーゼは、Sll1196 は SigE 依存であるが、Sll0745 は SigE 非依存である (第 2 章参照)。これまでに明らかになっているシアノバクテリアの配列情報を用いてホスホフルクトキナーゼの系統解析を行ったところ、(i) 海洋性シアノバクテリアの多くは PfkA を持たないこと、(ii) SigE 非依存の PfkA (Sll0745) は海洋性シアノバクテリアを除いて広く保存されていること (SigE 非依存型クラスター)、(iii) SigE 依存の PfkA (Sll1196) は *Synechocystis*、*Nostoc* など一部のシアノバクテリアにだけ保存されていること (SigE 依存型クラスター) が判った (Fig. 6-4)。これらの結果を合わせ、SigE を持たないシアノバクテリア種は、SigE 依存型クラスターに含まれる PfkA を持たないことが明らかになった (Fig. 6-4)。このように、SigE とその制御下にある糖異化遺伝子群が共進化してきた可能性が考えられる。共進化の結果の表現型については定かではないが、*Synechocystis*、*Nostoc*、*Anabaena* のほとんどの種は、外部の炭素源を用いた従属栄養増殖が可能であるのに対し、海洋性シアノバクテリアの多くは絶対独立栄養増殖型であるため、SigE および SigE レギュロンの保持が従属栄養能の進化に寄与した可能性がある。

Table 6-1 シアノバクテリアにおける SigE の保持と従属栄養能の相関関係

ゲノムに <i>sigE</i> をコードする種	ゲノムに <i>sigE</i> をコードしない種
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	<i>Prochlorococcus</i> MED4
<i>Anabaena</i> <i>variabilis</i>	<i>Prochlorococcus</i> MIT9313
<i>Nostoc</i> <i>punctiforme</i>	<i>Prochlorococcus</i> PCC 7421
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	<i>Prochlorococcus</i> SS120
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942
	<i>Synechococcus</i> sp. WH 8102
	<i>Thermosynechococcus</i>
	<i>elongatus</i> BP-1

赤字は従属栄養能を持つ種、黒字は従属栄養能を持たない種を表す。

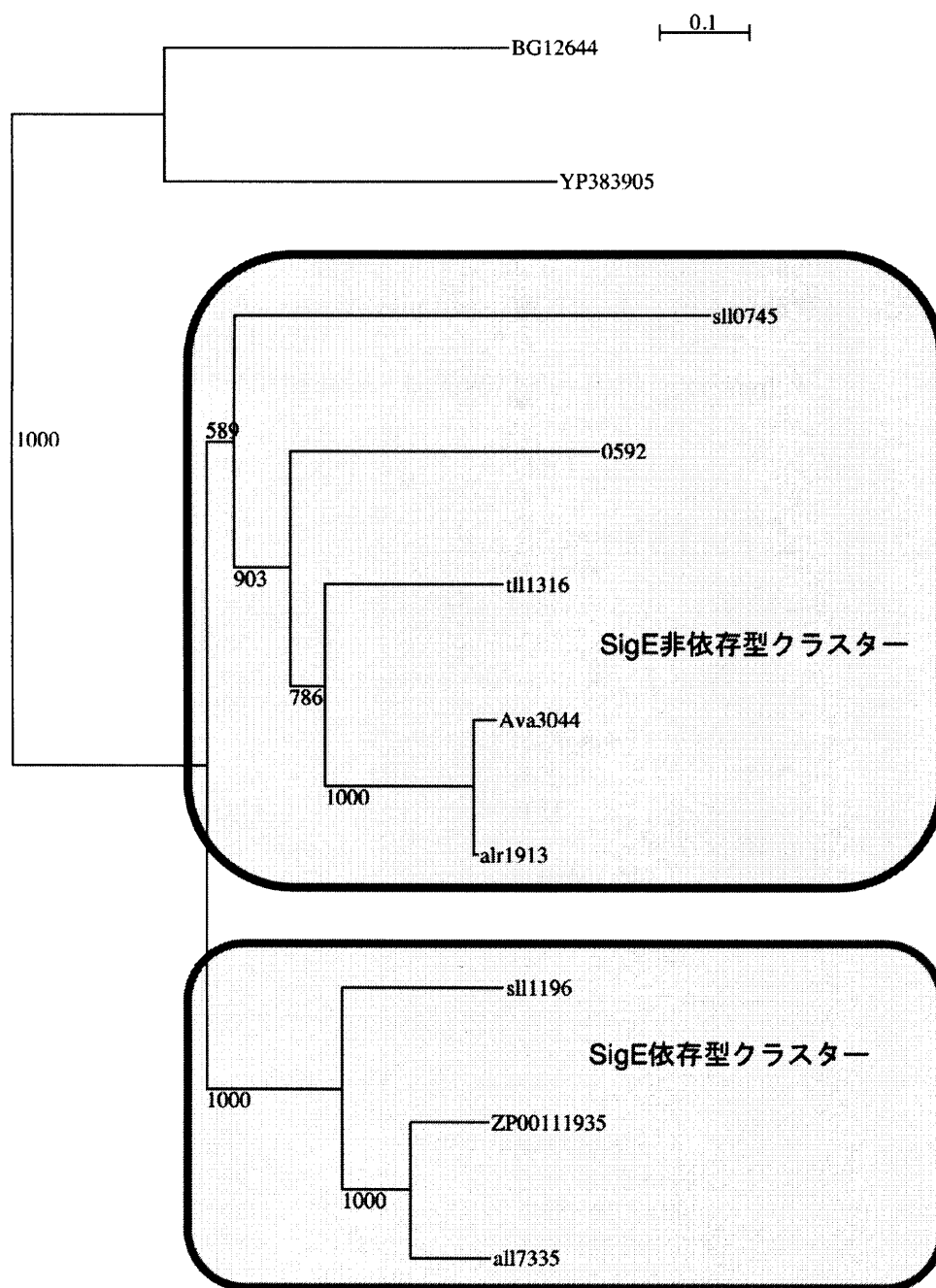


Fig. 6-4 シアノバクテリア Pfk 遺伝子の系統樹

系統樹は、ClustalW (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-j.html>) を用いて作成したアライメントファイルを、MacClade ver. XX によりギャップおよび非相同領域を削除し、再度 ClustalW を用いて作成した (Neighbor-Joining

法)。系統樹は NJplot ソフトにより描画した。*Synechocystis* sp. PCC 6803: sl10745 (BAA10770), sl1196 (BAA16845); *Anabaena* sp. PCC 7120: alr1913 (BAB73612), all7335 (BAB77093); *Nostoc punctiforme* PCC 73102: ZP 00111935, *Thermosynechococcus elongatus*: tll1316 (BAC08868); *Synechococcus* sp. PCC 7942: 0592 (ABB56624); *Bacillus subtilis*: BG12644 (CAB14879); *Geobacter metallireducens* SGS-15: YP 383905. 括弧内は GenBank accession No..

#### (4) 終わりに

本研究は、光合成単細胞生物シアノバクテリアを用いた C/N バランス制御機構の解明を目的とし、その結果、糖異化制御機構について、新規の制御因子およびシグナル伝達経路を同定することができた。代謝バランスは、基礎研究だけでなく、応用研究の上でも重要な分野である。多くの研究者が、細胞増殖の律速となる栄養素（炭素、窒素、硫黄、リン、鉄など）の取り込み活性や同化効率を上昇させ、作物となる植物の生長を促進させる試みを行っている。しかし、ある特定の元素の過剰取り込み、同化は、細胞内におけるホメオスタシスを保つためのフィードバック機構により、ある限界に達すると考えられる。このフィードバック阻害を起こす一因が、代謝バランスの崩れであると思われる。代謝バランスの研究を進めることにより、代謝バランスシグナルのフィードバック阻害を解除しつつ、同化効率を上げるタンパク質、代謝産物プロファイルを探索し、これを利用することにより、植物の生長増進に貢献できるものと考えられる。今後は、最も単純な光合成生物であるシアノバクテリアで研究を進めるとともに、シアノバクテリアで明らかになった事実を高等植物にフィードバックし、その研究を進めることが重要であるだろう。

## 参考文献

M. Aichi, N. Takatani and T. Omata, Role of NtcB in activation of nitrate assimilation genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.*, 2001, **183**, 5840-5847.

M. F. Aldehni, J. Sauer, C. Spielhaupter, R. Schmid and K. Forchhammer, Signal transduction protein PII is required for NtcA-regulated gene expression during nitrogen deprivation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *J. Bacteriol.*, 2003, **185**, 2582-2591.

S. L. Anderson and L. McIntosh, Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: A blue-light-requiring process. *J. Bacteriol.*, 1991, **173**, 2761-2767.

T. Arcondeguy, R. Jack and M. Merrick, PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2001, **65**, 80-105.

S. G. Ball and M. K. Morell, From bacterial glycogen to starch: Understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2003, **54**, 207-233.

S. Bedu, P. Pozuelos, B. Cami and F. Joset, Uptake of inorganic carbon in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: physiological and genetic evidence for a high-affinity uptake system. *Mol. Microbiol.*, 1995, **18**, 559-568.

S. Burillo, I. Luque, I. Fuentes and A. Contreras, Interaction between the nitrogen signal transduction protein PII and *N*-acetyl glutamate kinase in organisms that perform oxygenic photosynthesis. *J. Bacteriol.*, 2004, **186**, 3346-3354.

L. Caldovic and M. Tuchman, *N*-Acetylglutamate and its changing role through evolution. *Biochem. J.*, 2003, **372**, 279-290.

E. A. Campbell, O. Muzzin, M. Chlenov, J. L. Sun, C. A. Olson, O. Weinman, M. L. Trester-Zeditz and S. A. Darst, Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol. Cell*, 2002, **9**, 527-539.

E. Chekounova, V. Voronetskaya, J. Papenbrock, B. Grimm and C. F. Beck, Characterization of *Chlamydomonas* mutants defective in the H subunit of Mg-chelatase. *Mol. Genet. Genomics*, 2001, **266**, 363-373.

Y. M. Chen, T. S. Ferrar, E. Lohmeier-Vogel, N. Morrice, Y. Mizuno, B. Berenger, K. K. S. Ng, D. G. Muench and G. B. G. Moorhead, The PII signal transduction protein of *Arabidopsis thaliana* forms an arginine-regulated complex with plastid N-acetyl glutamate kinase. *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 5726-5733.

Y.-H. Cho, S.-D. Yoo and J. Sheen, Regulatory function of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell*, 2006, **127**, 579-589.

M. D. Edwards, I. R. Booth, and S. Miller, Gating the bacterial mechanosensitive channels: MscS a new paradigm? *Curr. Opin. Microbiol.*, 2004, **7**, 163-167.

J. Espinosa, K. Forchhammer, S. Burillo and A. Contreras, Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA. *Mol. Microbiol.*, 2006, **61**, 457-469.

S. Ferrario-Mery, E. Besin, O. Pichon, C. Meyer and M. Hodges, The regulatory PII protein controls arginine biosynthesis in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.*, 2006, **580**, 2015-2020.

W. M. Fitch and E. Margoliash, Construction of phylogenetic trees. *Science*, 1967, **155**, 279-284.

K. Forchhammer, Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in



cyanobacteria: from signals to targets. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2004, **28**, 319-333.

K. Forchhammer and A. Hedler, Phosphoprotein P<sub>II</sub> from cyanobacteria. Analysis of functional conservation with the P<sub>II</sub> signal-transduction protein from *E.coli*. *Eur. J. Biochem.*, 1997, **244**, 869-875.

K. Forchhammer and N. Tandeau de Marsac, The P<sub>II</sub> protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. *J. Bacteriol.*, 1994, **176**, 84-91.

K. Forchhammer and N. Tandeau de Marsac, Functional analysis of the phosphoprotein P<sub>II</sub> (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. stain PCC 7942. *J. Bacteriol.*, 1995a, **177**, 2033-2040.

K. Forchhammer and N. Tandeau de Marsac, Phosphorylation of the P<sub>II</sub> protein (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: Analysis of *in vitro* kinase activity. *J. Bacteriol.*, 1995b, **177**, 5812-5817.

M. Garcia-Dominguez, J. C. Reyes and F. J. Florencio, Glutamine synthetase inactivation by protein-protein interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, **96**, 7161-7166.

M. Garcia-Dominguez, M. I. Muro-Pastor, J. C. Reyes and F. J. Florencio, Light-dependent regulation of cyanobacterial phytochrome expression. *J. Bacteriol.*, 2000a, **182**, 38-44.

M. Garcia-Dominguez, J. C. Reyes and F. J. Florencio, NtcA represses transcription of *glnA* and *glnB*, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.*, 2000b, **35**, 1192-1201.

L. C. Gibson, J. L. Marrison, R. M. Leech, P. E. Jensen, D. C. Bassham, M. Gibson and C. N. Hunter, A putative Mg chelatase subunit from *Arabidopsis thaliana* cv C24.

Sequence and transcript analysis of the gene, import of the protein into chloroplasts, and *in situ* localization of the transcript and protein. *Plant Physiol.*, 1996, **111**, 61-71.

M. Görl, J. Sauer, T. Baier and K. Forchhammer, Nitrogen-starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942: adaptation to long-term survival. *Microbiology*, 1998, **144**, 2449-2458.

A. Goto-Seki, M. Shirokane, S. Masuda, K. Tanaka and H. Takahashi, Specificity crosstalk among group 1 and group 2 sigma factors in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942: *In vitro* specificity and a phylogenetic analysis. *Mol. Microbiol.*, 1999, **34**, 473-484.

T. M. Gruber and D. A. Bryant, Molecular systematic studies of eubacteria, using  $\sigma^{70}$ -type sigma factors of group 1 and group 2. *J. Bacteriol.*, 1997, **179**, 1734-1747.

D. A. Hall, H. Zhu, X. Zhu, T. Royce, M. Gerstein and M. Snyder, Regulation of gene expression by a metabolic enzyme. *Science*, 2004, **306**, 482-484.

M. A. Harrison, J. N. Keen, J. B. Findlay and J. F. Allen, Modification of a *glnB*-like gene product by photosynthetic electron transport in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. *FEBS Lett.*, 1990, **264**, 25-28.

A. Heinrich, M. Maheswaran, U. Ruppert and K. Forchhammer, The *Synechococcus elongatus* P<sub>II</sub> signal transduction protein controls arginine synthesis by complex formation with *N*-acetyl-L-glutamate kinase. *Mol. Microbiol.*, **52**, 2004, 1303-1314.

J. D. Helmann, Anti-sigma factors. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1999, **2**, 135-141.

J. D. Helmann and M. J. Chamberlin, Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.*, 1988, **57**, 839-872.

- A. Herrero, A. M. Muro-Pastor and E. Flores, Nitrogen control in cyanobacteria. *J. Bacteriol.*, 2001, **183**, 411-425.
- T. Hirokawa, S. Boon-Chen and S. Mitaku, SOSUI: Classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*, 1998, **14**, 378-379.
- M. Hisbergues, R. Jeanjean, F. Joset, N. Tandeau de Marsac and S. Bedu, Protein PII regulates both inorganic carbon and nitrate uptake and is modified by a redox signal in *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS Lett.*, 1999, **463**, 216-220.
- M.-H. Hsieh, H.-M. Lam, F. J. van de Loo and G. Coruzzi, A PII-like protein in *Arabidopsis*: Putative role in nitrogen sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**, 13965-13970.
- F. Huang, S. Fulda, M. Hagemann and B. Norling, Proteomic screening of salt-stress-induced changes in plasma membrane of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Proteomics*, 2006, **6**, 910-920.
- T. Hübschmann, H. Yamamoto, T. Gieler, N. Murata and T. Börner, Red and far-red light alter the transcript profile in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Impact of cyanobacterial phytochromes. *FEBS Lett.*, 2005, **579**, 1613-1618.
- M. Igoillo-Esteve and J. J. Cazzulo, The glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Its role in the defense of the parasite against oxidative stress. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2006, **149**, 170-181.
- S. Imamura, M. Asayama, H. Takahashi, K. Tanaka and M. Shirai, Antagonistic dark/light-induced SigB/SigD, group 2 sigma factors, expression through redox potential and their roles in cyanobacteria. *FEBS Lett.*, 2003, **554**, 357-362.

A. Irmeler and K. Forchhammer, A PP2C-type phosphatases dephosphorylates the PII signaling protein in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**, 12978-12983.

S. Ishijima, A. Uchibori, H. Takagi, R. Maki and M. Ohnishi, Light-induced increase in free  $Mg^{2+}$  concentration in spinach chloroplast: Measurement of free  $Mg^{2+}$  by using a fluorescent probe and necessity of stromal alkalinization. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003, **412**, 126-132.

H. Iwasaki, S. B. Williams, Y. Katayama, M. Ishiura, S. S. Golden and T. Kondo. A KaiC-interacting sensor histidine kinase, SasA, necessary to sustain robust circadian oscillation in cyanobacteria. *Cell*, 2000, **14**, 223-233.

P. E. Jensen, J. D. Reid and C. N. Hunter, Modification of cysteine residues in the ChlI and ChlH subunits of magnesium chelatase results in enzyme inactivation. *Biochem. J.*, 2000, **352**, 435-441.

T. Kaneko, S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirosawa, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuo, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okamura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda and S. Tabata. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.*, 1996, **3**, 109-136.

T. Kaneko, A. Tanaka, S. Sato, H. Kotani, T. Sazuka, N. Miyajima, M. Sugiura and S. Tabata, Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. I. Sequence features in the 1 Mb region from map position 64% to 92% of the genome. *DNA Res.*, 1995, **2**, 153-166.

N. Kloft, G. Rasch and K. Forchhammer, Protein phosphatases PphA from

*Synechocystis* sp. PCC 6803: the physiological framework of P<sub>II</sub>-P dephosphorylation. *Microbiology*, 2005, **151**, 1275-1283.

M. Kobayashi, N. Takatani, M. Tanigawa and T. Omata, Posttranslational regulation of nitrate assimilation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.*, 2005, **187**, 498-506.

O. Koksharova, M. Schubert, S. Shestakov and R. Cerff, Genetic and biochemical evidence for distinct key function of two highly divergent GAPDH genes in catabolic and anabolic carbon flow of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol. Biol.*, 1998, **36**, 183-194.

T. Kondo and M. Ishiura, The circadian clock of cyanobacteria. *Bioessays*, 2000, **22**, 10-15.

J. Labarre, F. Chauvat and Thuriaux, P, Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.*, 1989, **171**, 3449-3457.

H.-M. Lee, E. Flores, A. Herrero, J. Houmard and N. Tandeau de Marsac, A role for the signal transduction protein P<sub>II</sub> in the control of nitrate/nitrite uptake in a cyanobacterium. *FEBS Lett.*, 1998, **427**, 291-295.

H.-M. Lee, M. F. Vazquez-Bermudez and N. Tandeau de Marsac, The global nitrogen regulator NtcA regulates transcription of the signal transducer P<sub>II</sub> (GlnB) and influences its phosphorylation level in response to nitrogen and carbon supplies in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.*, 1999, **181**, 2697-2702.

H.-M. Lee, E. Flores, K. Forchhammer, A. Herrero and N. Tandeau de Marsac, Phosphorylation of the signal transducer P<sub>II</sub> protein and an additional effector are required for the P<sub>II</sub>-mediated regulation of nitrate and nitrite uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**, 591-600.

W. K. W. Li, Primary production of prochlorophytes, cyanobacteria, and eucaryotic ultraphytoplankton: measurements from flow cytometric sorting. *Limnol. Oceanogr.*, 1994, **39**, 169-175.

M. Liberton, R. H. Berg, J. Heuser, R. Roth and H. B. Pakrasi, Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Protoplasma*, 2006, **227**, 129-138.

M. Lonetto, M. Gribskov and C. A. Gross, The s<sup>70</sup> family: Sequence conservation and evolutionary relationships, *J. Bacteriol.*, 1992, **174**, 3843-3849.

B. Lundberg, R. E. Wolf, M. Dinauer, Y. Xu and F. Fang, Glucose-6-phosphate dehydrogenase is required for *Salmonella typhimurium* virulence and resistance to reactive oxygen and nitrogen intermediates. *Infect. Immun.*, 1999, **65**, 5371-5375.

I. Luque, E. Flores and A. Herrero, Molecular mechanism for the operation of nitrogen

control in cyanobacteria. *EMBO J.*, 1994, **13**, 2862-2869.

M. Maheswaran, C. Urbanke and K. Forchhammer, Complex formation and catalytic activation by the P<sub>II</sub> signaling protein of *N*-acetyl-L-glutamate kinase from *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 55202-55210.

A. Malhotra, E. Severinova and S. A. Darst, Crystal structure of a  $\sigma^{70}$  subunit fragment from *E. coli* RNA polymerase. *Cell*, 1996, **87**, 127-136.

M. Matringe and R. Scalla, Studies on the mode of action on acifluorfen-methyl in nonchlorophyllous soybean cells. *Plant Physiol.*, 1988, **86**, 619-622.

A. Merida, L. Leurentop, P. Candau and F. J. Florencio, Purification and properties of glutamine synthetases from the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and *Calothrix* sp. strain PCC 7601. *J. Bacteriol.*, 1990, **172**, 4732-4735.

M. Merrick, J. Gibbins and A. Toukdarian, The nucleotide sequence of the sigma factor gene *ntrA* (*rpoN*) of *Azotobacter vinelandii*: analysis of conserved sequences in NtrA proteins. *Mol. Gen. Genet.*, 1987, **210**, 323-330.

H. Min and S. S. Golden, A new circadian class 2 gene, *opcA*, whose product is important for reductant production at night in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J.*

*Bacteriol.*, 2000, **182**, 6214-6222.

N. Mochizuki, J. A. Brusslan, R. Larkin, A. Nagatani and J. Chory, *Arabidopsis* genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**, 2053-2058.

M. L. Montesinos, A. M. Muro-Pastor, A. Herrero and E. Flores, Ammonium/methylammonium permeases of a cyanobacterium. Identification and analysis of three nitrogen-regulated *amt* genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 31463-31470.

G. B. Moorhead and C. S. Smith, Interpreting the plastid carbon, nitrogen, and energy status. A role for PII? *Plant Physiol.*, 2003, **133**, 492-498.

A. M. Muro-Pastor, A. Herrero and E. Flores, Nitrogen-regulated group 2 sigma factor from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 involved in survival under nitrogen stress. *J. Bacteriol.*, 2001, **183**, 1090-1095.

M. I. Muro-Pastor, J. C. Reyes and F. J. Florencio, Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 38320-38328.



M. I. Muro-Pastor, J. C. Reyes and F. J. Florencio, Ammonium assimilation in cyanobacteria, *Photosynth. Res.*, 2005, **83**, 135-150.

Y. Nakamura, T. Kaneko, S. Sato, M. Mimuro, H. Miyashita, T. Tsuchiya, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Kawashima, Y. Kishida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, N. Nakazaki, S. Shimpo, C. Takeuchi, M. Yamada, and S. Tabata, Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Res.*, 2003, **31**, 137-145.

M. Nakayama, T. Masuda, T. Bando, H. Yamagata, H. Ohta and K. Takamiya, Cloning and expression of the soybean *chlH* gene encoding a subunit of Mg-chelatase and localization of the  $Mg^{2+}$  concentration-dependent ChlH protein within the chloroplast. *Plant Cell Physiol.*, 1998, **39**, 275-284.

A. J. Ninfa and M. R. Atkinson, PII signal transduction proteins, *Trends Microbiol.*, 2000, **8**, 172-179.

A. J. Ninfa and P. Jiang, PII signal transduction proteins: sensors of  $\alpha$ -ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2005, **8**, 168-173.

T. Osanai, S. Imamura, M. Asayama, M. Shirai, I. Suzuki, N. Murata and K. Tanaka,

Nitrogen induction of sugar catabolic gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803.

*DNA Res.*, 2006, **13**, 185-195.

T. Osanai, Y. Kanesaki, T. Nakano, H. Takahashi, M. Asayama, M. Shirai, M. Kanehisa, I. Suzuki, N. Murata and K. Tanaka, Positive regulation of sugar catabolic pathways in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the group 2  $\sigma$  factor SigE. *J. Biol. Chem.*, 2005a, **280**, 30653-30659.

T. Osanai, S. Sato, S. Tabata and K. Tanaka, Identification of PamA as a PII-binding membrane protein important in nitrogen-related and sugar-catabolic gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.*, 2005b, **280**, 34684-34690.

M. S. B. Paget and J. D. Helmann, The  $\sigma^{70}$  family of sigma factors. *Genome Biol.*, 2003, **4**, 203.

J. Papenbrock, H.-P. Mock, E. Kruse and B. Grimm, Expression studies in tetrapyrrole biosynthesis: inverse maxima of magnesium chelatase and ferrochelatase activity during cyclic photoperiods. *Planta*, 1999, **208**, 264-273.

J. Papenbrock and B. Grimm, Regulatory network of tetrapyrrole biosynthesis – studies of intracellular signalling involved in metabolic and developmental control of plastids. *Planta*, 2001, **213**, 667-681.

J. Paz-Yepes, E. Flores and A. Herrero, Transcriptional effects of the signal transduction protein P(II) (*glnB* gene product) on NtcA-dependent genes in *Synechococcus* sp. PCC 7942. *FEBS Lett.*, 2003, **543**, 42-46.

C. D. Pivetti, M.-R. Yen, S. Miller, W. Busch, Y.-H. Tseng, I. R. Booth and M. H. Saier Jr., Two families of mechanosensitive channel proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2003, **67**, 66-85.

P. J. Pomposiello and B. Dimple, Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol.*, 2001, **19**, 109-114.

K. S. Reece and G. J. Phillips, New plasmids carrying antibiotic-resistance cassettes. *Gene (Amst.)*, 1995, **165**, 141-142.

J. D. Reid, and C. N. Hunter, Current understanding of the function of magnesium chelatase, *Biochem. Soc.*, 2002, **30**, 643-645,

J. C. Reyes, M. I. Muro-Pastor and F. J. Florencio, Transcription of glutamine synthetase genes (*glnA* and *glnN*) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is differently regulated in response to nitrogen availability. *J. Bacteriol.*, 1997, **179**, 2678-2689.

U. Ruppert, A. Irmeler, N. Kolft and K. Forchhammer, The novel protein phosphatases PphA from *Synechocystis* PCC 6803 controls dephosphorylation of the signaling protein P<sub>II</sub>. *Mol. Microbiol.*, 2002, **44**, 855-864.

D. J. Scanlan, S. Sundaram, J. Newman, N. H. Mann and N. G. Carr, Characterization of a *zwf* mutant of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.*, 1995, **177**, 2550-2553.

Y.-Y. Shen, X.-F. Wang, F.-Q. Wu, S.-Y. D, Z. Cao, Y. Shang, X.-L. Wang, C.-C. Peng, X.-C. Yu, S.-Y. Zhu, R.-C. Fan, Y.-H. Xu and D.-P. Zhang, The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature*, 2006, **443**, 823-826.

V. I. Shestopalov, O. O. Nashchokina, S. V. Shestakov and N. K. Iankovskii, Construction of the genomic library for cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 using a cosmid. *Genetica*, 1994, **30**, 452-455.

A. Strand, T. Asami, J. Alonso, J. R. Ecker and J. Chory, Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. *Science*, 2003, **421**, 79-83.

Z. Su, V. Olman, F. Mao and Y. Xu, Comparative genomics analysis of NtcA regulons

in cyanobacteria: regulation of nitrogen assimilation and its coupling to photosynthesis.

*Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, 5156-5171.

K. Sugiyama, T. Hayakawa, T. Kudo, T. Ito and T. Yamaya, Interaction of *N*-acetylglutamate kinase with a PII-like protein in rice. *Plant Cell Physiol.*, 2004, **45**, 1768-1778.

M. L. Summers and J. C. Meeks, Transcriptional regulation of *zwf*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, from the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133. *Mol. Microbiol.*, 1996, **22**, 473-480.

M. L. Summers, J. G. Wallis, E. L. Campbell and J. C. Meeks, Genetic evidence of a major role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in nitrogen fixation and dark growth of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain ATCC 29133. *J. Bacteriol.*, 1995, **177**, 6184-6194.

I. Suzuki, Y. Kanesaki, K. Mikami, M. Kanehisa and N. Murata, Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis*. *Mol. Microbiol.*, 2001, **40**, 235-244.

N. Takai, M. Nakajima, T. Oyama, R. Kito, C. Sugita, M. Sugita, T. Kondo, and H. Iwasaki, A KaiC-associated SasA-RpaA two-component regulatory system as a major

circadian timing mediator in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, **103**, 12109-12114.

R. Tanigawa, M. Shirokane, S. Maeda, T. Omata, K. Tanaka and H. Takahashi, Transcriptional activation of NtcA-dependent promoters of *Synechococcus* sp. PCC 7942 by 2-oxoglutarate *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**, 4251-4255.

M. F. Vazquez-Bermudez, A. Herrero and E. Flores, 2-oxoglutarate increases the binding affinity of the NtcA (nitrogen control) transcription factor for the *Synechococcus glnA* promoter. *FEBS Lett.* 2002, **512**, 71-74.

M. A. Vega-Palas, F. Madueno, A. Herrero and E. Flores, Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.*, 1990, **172**, 643-647.

M. A. Vega-Palas, E. Flores, A. Herrero, NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators. *Mol. Microbiol.*, 1992, **6**, 1853-1859.

R. D. Vierstra and S. J. Davis, Bacteriophytochromes: new tools for understanding phytochrome signal transduction, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2000, **11**, 511-521.

C. J. Walker and R. D. Willows, Mechanism and regulation of Mg-chelatase. *Biochem. J.*, 1997, **327**, 321-333.

L. V. Jr. Wray, J. M. Zalieckas and S. H. Fisher, *Bacillus subtilis* glutamine synthetase controls gene expression through a protein-protein interaction with transcription factor TnrA. *Cell*, 2001, **107**, 427-435.

J. G. K. Williams, Construction of specific mutations in Photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol.*, 1988, **167**, 766-778.

J. G. Williams and A. A. Szalay, Stable integration of foreign DNA into the chromosome of the cyanobacterium *Synechococcus* R2. *Gene*, 1983, **24**, 37-51.

F. Winklenbach and C. P. Wolk, Activities of enzymes of the oxidative and the reductive pentose phosphate pathways in heterocysts of a blue-green alga. *Plant Physiol.*, 1973, **52**, 480-483

M. M. S. M. Wösten, Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1998, **22**, 127-150.

C. Yang, Q. Hua and K. Shimizu, Integration of the information from gene expression and metabolic fluxes for the analysis of the regulatory mechanisms in *Synechocystis*.

*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, **58**, 813-822.

L. Zheng, R. G. Roeder and Y. Luo, S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell*, 2003, **114**, 255-266.

V. V. Zinchenko, I. V. Piven, V. A. Melnik and S. V. Shestakov, Vectors for the complementation analysis of cyanobacterial mutants. *Rus. J. Genet.*, 1999, **35**, 228-232.

高橋洋之 修士論文 1998 年 東京大学

中野貴之 修士論文 1998 年 東京大学



## 巻末付録

### 使用培地

#### LB 培地

Trypton-peptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O	up to 1 L

#### BG-11 培地

NaNO <sub>3</sub>	1.5 g (17.65 mM)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.03 g (0.18 mM)
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.075 g (0.30 mM)
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.036 g (0.25 mM)
Citric acid	0.006 g (0.03 mM)
Ferric ammonium citrate	0.006 g (0.03 mM)
EDTA	0.001 g (0.003 mM)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02 g (0.19 mM)
HEPES-KOH (pH 8.0)	4.77 g (20 mM)
Trace metal mix A5 + Co	1 ml
H <sub>2</sub> O	Up to 1 L

BG-11<sub>0</sub> の場合は 17.65 mM NaNO<sub>3</sub> を 17.65 mM NaCl にする。

#### Trace metal mix A5 + Co

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86 g
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.81 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.222 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.390 g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.079 g
Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.049 g
H <sub>2</sub> O	Up to 1 L

## ノーザンブロット用試薬の組成

### MOPS バッファー

0.2 M MOPS, 0.05 M 無水酢酸ナトリウム, 0.01 M EDTA

混合した後、NaOH を用いて pH を 7.0 に合わせる。

### 20 x SSC

NaCl 175.3 g (3 M)

クエン酸三ナトリウム二水和物 88.2 g (0.3 M)

上記の試薬を混合した後、MiliQ を用いて 1 L にメスアップする。

### バッファー 1

0.1 M マレイン酸, 0.15 M NaCl

混合した後、NaOH 用いて pH を 7.5 に合わせる。

### Blocking stock solution

Blocking reagent (ロシュ) を終濃度 10% となるようにバッファー 1 に懸濁した溶液。

### 洗浄バッファー

バッファー 1 に終濃度 0.3% となるように Tween-20 を加えた溶液。

### バッファー 2

Blocking stock solution をバッファー 1 で 1/10 に希釈した溶液。

### ハイブリダイゼーションバッファー (計 500 ml)

20 x SSC 125 ml

ホルムアミド 250 ml

2 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) 12.5 ml

Blocking stock solution 100 ml

10% N-ラウロイルサルコシンナトリウム 5 ml

SDS (w/v) 35 g

Yeast total RNA 25 mg

# プライマー配列

Gene	Purpose*	Forward or reverse	Sequence
<i>ssl0707</i>	YTH	F	5'-GAGGGCGCGCCATGACGGTTTCTGAAGTT-3'
<i>(glnB)</i>	YTH	R	5'-CTCAAAAAGATTAAATAGCTTCGG-3'
	RP, Pr	F	5'-GCAGGCCTTTGAAAAAAGTAGAAGCG-3'
	RP, Pr	R	5'-AAGAGCTCTTAAATAGCTTCGGTATC-3'
<i>pamA</i>	RP	F	5'-TTGTTCGATGTGCCGGTG-3'
	RP	R	5'-ACTCGAGTTCACGCTCAGCCG-3'
	Conf, Cp	F	5'-TCCTTAGTCAACTACCGC-3'
	Conf	R	5'-GCCCATAGCTGTCCATTA-3'
	Cp	R	5'-CACCGCAAAACCGATGAT-3'
<i>sigE</i>	Pr	F	5'-GAGGGCGCGCCATGAGCGATATGTCTTCC-3'
	Pr	R	5'-CGGTATCTATAACCAACCTTTGAG-3'
<i>nblA</i>	Pr	F	5'-GAGGGCGCGCCATGATCAACAACGAAGCC-3'
	Pr	R	5'-GTTGTGCTAGGGGAGGAG-3'
<i>nrtABCD</i>	Pr	F	5'-TGTTAACCAAGGAGTCGG-3'
	Pr	R	5'-AGATAGGCCTGGGGATTT-3'
<i>ureG</i>	Pr	F	5'-ATGGCTCAAACCTCCCCTC-3'
	Pr	R	5'-GCATCCCGATCCATGATT-3'
<i>glnA</i>	Pr	F	5'-GAGGGCGCGCCATGGCCAGAACCCCCCAG-3'
	Pr	R	5'-ATGGACTGGTTTAGCAGTCG3'
<i>amt1</i>	Pr	F	5'-CAGTGTTCTGTTGGTTGG-3'
	Pr	R	5'-CTTGAGGATAGCCCAAAC-3'
<i>glnN</i>	Pr	F	5'-CCTTCACTGGTAACCGTT-3'
	Pr	R	5'-CTATCGGCAATTTCCTCCCT-3'
<i>pfkA</i>	Pr	F	5'-TAGGCACCACCAATAAGG-3'
<i>(sll1196)</i>	Pr	R	5'- TCCTCAATGGGCACACTA-3'
<i>gap1</i>	Pr	F	5'-ACGGGTCTATTTACCACC-3'
	Pr	R	5'-GCGTCGAAAATACTGGAG-3'
<i>pyk1</i>	Pr	F	5'-GAAATCGTGGCAGTTTCC-3'
	Pr	R	5'-GGAATTCCCGCCATGATT-3'
<i>zwf</i>	Pr	F	5'-TTTTGTCTCACCGCCATG-3'

	Pr	R	5'-AGCGACGGCCATCTTTAT-3'
<i>opcA</i>	Pr	F	5'-TACGGAGTTGATGCTACC-3'
	Pr	R	5'-GCAATTGTCGTCCCAGTA-3'
<i>gnd</i>	Pr	F	5'-GTGGAAGACCCCGATAAT-3'
	Pr	R	5'-TTGCGCTTGAGTCAGGTT-3'
<i>tal</i>	Pr	F	5'-TACTATTCGGTCTCCACC-3'
	Pr	R	5'-CGGTCTAGGGCATCAAAA-3'
<i>glgX</i>	Pr	F	5'-TTTGGTGGCCTATAACGG-3'
( <i>slr1857</i> )	Pr	R	5'-GCCAATGAGTAGGGATGA-3'
<i>glgX</i>	Pr	F	5'-CCTGGTTTCCTACAACGA-3'
( <i>slr0237</i> )	Pr	R	5'-GTTTAGAGGGGGCAATTC-3'
<i>glgP</i>	Pr	F	5'-CTCCCTGTTTGATGTGCA-3'
( <i>slr1367</i> )	Pr	R	5'-CCTTGCAGTATTCCCGAA-3'
<i>glgP</i>	Pr	F	5'-ATCTGGATGTTACACCCC-3'
( <i>slr1356</i> )	Pr	R	5'-TACCACGGGTTTGATAGC-3'

---

\*Abbreviations: YTH, yeast two-hybrid screening; RP, recombinant protein production; Pr, probe generation for Northern blot analysis; Conf, confirmation of knockout of *pamA*.; Cp, confirmation of complementation of GN10.

使用菌株

名前	内容	薬剤耐性
野生株		
GT	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 glucose-tolerant 株	なし
欠損株 or 変異株		
G50	SigE 欠損株	Km
GN10	PamA 欠損株	Km
GN20	NtcA 変異株 (NtcA タンパク質量が 50%に減少)	Cm
$\Delta hik8$	Hik8 欠損株	Sp
※親株はすべて GT。		
相補株		
GN10:pVZ:pamA		
	PamA 相補株 (GN10 に野生型 <i>pamA</i> をプラスミドで導入した株)	Km & Gm
G50:pVZ:sigE		
	SigE 相補株 (G50 に野生型 <i>sigE</i> をプラスミドで導入した株)	Km & Gm
GN20Cp		
	NtcA 相補株 (GN20 に野生型 <i>ntcA</i> を相同組換えで導入した株)	Km

薬剤耐性は、Km: カナマイシン、Cm:クロラムフェニコール、Sp: スペクチノマイシン、Gm: ゲンタマイシン耐性をそれぞれ表す。

## 謝辞

本研究は、平成 16 年 4 月から 3 年間、東京大学分子細胞生物學研究所、分子遺傳研究分野において、行ったものである。なお平成 17 年 10 月から平成 19 年 3 月までの 1 年半の期間、奈良先端科学技術大学院大学植物科学推進事業より研究費の補助を受けた。

大学院博士課程への進学を許可して頂き、また、本研究を遂行するにあたり、終始適切な御指導、御鞭撻を賜りました東京大学助教授田中寛先生に心から感謝の意を申し上げます。

研究全般に渡る御助言、御討論を頂きました東京大学助手田村勝徳先生に深く感謝致します。

本研究を進める上で、以下の方々に大変お世話になりました。深く感謝致します。

酵母ツーハイブリッドスクリーニングは、かずさ DNA 研究所佐藤修正博士、田畑哲之博士により行って頂きました。マイクロアレイ解析は、基礎生物學研究所村田紀夫博士、鈴木石根博士（現筑波大学）、京都大学金久實博士に御協力を頂きました。抗 NtcA 抗体は、茨城大学白井誠博士、朝山宗彦博士、今村壮輔博士（現東京大学）から供与して頂きました。Mg-プロトポルフィリン IX は京都大学望月伸悦博士より供与して頂きました。研究を進める上での御助言を、名古屋大学小俣達男博士、東京大学園池公毅博士、東京大学池内昌彦博士、東京大学増田建博士より頂きました。また、奈良先端科学技術大学院大学植物科学推進事業植物タンパク質ネットワークの皆様より多岐に渡る御指導を頂きました。

平素より研究室の環境整備に御尽力頂いている東京大学技官大橋幸男氏、川嶋洋子氏に深く感謝致します。

本研究を進める上で、研究室の先輩・後輩の皆様によくの御助言を頂きました。華岡光正博士、大沼みお博士、今村壮輔博士、兼崎友博士、小林勇氣博士、Poonam Bahatia 博士、Zeng Yu 博士、村山力則博士、永島明知博士、養田歩博士、古賀恵子博士、丸山真一郎博士、中野貴之氏、高橋洋之氏、今清水正彦氏、関麻子氏、東美由紀氏、高帥義幸氏、天谷雪絵氏、川上隆之氏、平澤雄介氏、小沢友希氏、Xiao Jies 氏に深く感謝致します。

最後に、研究生活を支えてくれた家族・友人に心より感謝致します。