

## シアノバクテリアの高温適応を制御する遺伝子の網羅的解析

●西山 佳孝

愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター

### 〈研究の目的と進め方〉

光合成は、環境の変化にもっとも敏感に応答する生理活性の一つである。細胞が穏やかな高温を検知すると、光合成の高温耐性が増大し、きたるべき高温ストレスによる損傷を緩和する機構が働く。この光合成の高温適応は、シアノバクテリアから高等植物にまで広くみられる現象であるが、その分子機構は不明である。

本研究では、シアノバクテリアを用いて光合成の高温耐性を制御するタンパク質を同定する。その方法として、チラコイド膜内腔（ルーメン）に局在するタンパク質のプロテオーム解析を行い、高温によって存在量の増えるタンパク質を明らかにする。その中から、目的の高温耐性因子を生化学的手法や分子生物学的手法を用いて同定する。

さらに、高温耐性因子をコードする遺伝子をもとに、穏やかな高温を検知するセンサーとシグナル伝達因子、およびその制御下にある遺伝子群を同定し、高温適応に関与する遺伝子のネットワークを明らかにする。

### 〈研究開始時の研究計画〉

#### 1. プロテオーム解析

シアノバクテリアを用いたこれまでの研究から、光化学系IIの高温耐性を制御するタンパク質が、チラコイド膜のルーメンに存在することがわかっている。イギリス・ダラム大学のToni Slabas教授のグループと共同で、*Synechocystis* sp. PCC 6803のチラコイド膜ルーメンに局在するタンパク質をプロテオミクスの手法で同定する。細胞から単離したチラコイド膜を低濃度のTriton X-100で処理してルーメンに局在するタンパク質を抽出し、2次元電気泳動ゲルに展開してスポットをMALDI-TOF MS法により同定する。この際、穏やかな高温（38℃）に適応した細胞と、25℃で生育させた細胞から得たタンパク質画分を比較し、高温により存在量が増大しているタンパク質に特に着目する。

#### 2. ゲノム情報による候補タンパク質の絞り込み

プロテオーム解析で同定したタンパク質の中から、ゲノム情報とバイオインフォマティクスの手法を用いて、可能性のあるタンパク質の候補を20個以内に絞り込む。

#### 3. 光化学系IIの高温耐性因子の同定

候補にあがったタンパク質の遺伝子をノックアウトした*Synechocystis*の変異株を作製し、その中から光化学系IIの高温耐性が増大しない変異株をスクリーニングする。この作業と平行して、候補タンパク質を大腸菌で発現させて、組み換えタンパク質を作製する。これを単離チラコイド膜に加えて、光化学系IIの高温耐性への影響を調べることによって、目的の高温耐性因子を同定する。

#### 4. DNAマイクロアレイ

穏やかな高温（38℃）により発現が誘導される遺伝子を網羅的に調べる。この結果とプロテオーム解析の結果を照合する。

#### 5. 高温適応のセンサーおよびシグナル伝達体の同定

二成分系（44種のHis kinaseと42種のresponse

regulator）の遺伝子破壊株の中から、高温適応による制御因子の発現誘導が起らないものを選別する。また、これらの遺伝子破壊株についてDNAマイクロアレイ解析を行い、高温適応の発現誘導パターンに異常を示す株を選別する。これにより高温適応のセンサーと情報伝達体を同定する。

### 〈研究期間の成果〉

#### 1. プロテオーム解析

38℃で培養した*Synechocystis*の細胞から得たチラコイド膜ルーメン画分と、25℃で培養した細胞から得たルーメン画分に含まれるタンパク質を2次元電気泳動ゲルに展開して比較した。その結果、存在量の異なる221個のスポットを統計的に確認することができた。このうち38℃の培養により存在量の増えたスポットが118個、存在量の減ったスポットが103個あった。これらのスポットの同定をMALDI-TOF MS法を用いて行った。その結果、現在までに86個のスポットが同定できた。このうち、著しく存在量の増えたタンパク質は、機能未知のタンパク質やNADHデヒドロゲナーゼのサブユニットなどであった。

#### 2. ゲノム情報による候補タンパク質の絞り込み

高温によって存在量が増えたタンパク質のうち、チラコイド膜の外側（サイトゾル側）に存在していると推定されるタンパク質や、明らかに関与していないと考えられるタンパク質を除外し、候補タンパク質を絞り込んだ。その結果、機能未知の3つのタンパク質Slr1852、Slr1106に興味をもたれた。Slr1852はDNA結合モチーフをもっているが、既知のタンパク質と相同性はない。Slr1852は他にまったく相同性を示すものがない。Slr1106はprohibitinと低い相同性を示している。

#### 3. 光化学系IIの高温耐性因子の同定

遺伝子破壊法と生化学的解析により光化学系IIの高温耐性との関連を調べた。Slr1106については遺伝子破壊株を作製することに成功した。Slr1106遺伝子破壊株では、光化学系IIの高温耐性への影響が見られなかった。一方、slr1106遺伝子破壊株では、光化学系IIの熱安定性が少し減少したため、Slr1106が高温耐性と関係していることが示唆された。しかし、高温適応で見られるようなドラスティックな高温耐性の変化と比べるとその効果は小さく、少なくともSlr1106が単独で高温耐性を制御しているとは考えられない。

これら3つのタンパク質を大腸菌で発現させた結果、Slr1106およびSlr1852は封入体を作って不溶化したが、Slr1852は可溶性画分に得られ、精製することができた。精製したSlr1852タンパク質をチラコイド膜と再構成させたが、光化学系IIの熱安定性は変化しなかった。したがって、Slr1852と光化学系IIの高温耐性との関連性は認められていない。

#### 4. DNAマイクロアレイ

25℃で生育させた細胞を38℃に移して経時的にサンプリングを行い、DNAマイクロアレイで遺伝子発現の様子を網羅的に調べた。この穏やかな高温により多くの遺伝

子の発現が誘導されたが、誘導の度合いが大きいものは、その大半が機能未知の遺伝子であった。さらに、これらの遺伝子は通常の熱ショック (42°C) では誘導されなかった。したがって、穏やかな高温による高温適応と熱ショックとは、遺伝子発現の様子が全く異なることが明らかになった。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

光合成の高温適応に関する研究代表者の研究により、これまでに光化学系IIの高温耐性に関与する2種類のタンパク質 (Cyt c550およびPsbU) が明らかになっている。これは生理学的な研究基盤しかないこの分野の現状のなかで先駆的なものである。また、イギリスのグループと共同で進めている高温適応に関するプロテオーム解析も世界に先駆けている。

さらに、高温耐性に関する研究の大半が、致死温度の付近で誘導される熱ショックタンパク質に偏重しており、穏やかな高温で起こる適応現象については、ほとんど分子レベルの研究がされておらず、未解明である。高温適応に関わる遺伝子群を同定する試みは他に例をみない。プロテオーム解析によりいくつかの候補タンパク質を絞り出すことができた。したがってこの手法が、光合成の環境応答に関する未知のタンパク質を探索するのに有効であることがわかった。光合成の高温適応のメカニズムは、分子レベルでまったく未解明であり、その解明は高温耐性植物を作出する上でも不可欠である。本研究により、その分子基盤に新たな知見を提供することができた。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

プロテオーム解析の計画は遂行することができたが、光化学系IIの高温耐性因子の同定までは至らなかった。その理由として、まずプロテオーム解析で高温適応により存在量の増大するタンパク質を統計的に確認するために多くの時間を要したことが挙げられる。

さらに予想外の困難としては、調製したチラコイド膜ルーメン画分に、フィコシアニンやCF1-ATPaseサブユニットなどチラコイド膜のサイトゾル側に位置する表在性タンパク質が多数混在していた。これは細胞破碎の際に一時的に膜構造の壊れたチラコイド膜に外部のタンパク質が混入したものと考えられる。純粋な画分を生化学的に得る困難さに直面した。また、プロテオーム解析では低分子量タンパク質の同定が困難であった。

#### 〈今後の課題〉

今回の研究では、シアノバクテリアのチラコイド膜ルーメン画分を出発材料としたが、上記のように純粋な画分を調製できず、サイトゾルタンパク質の混入を招いたことが最大の問題点があった。この問題を克服するには、もっと対象を絞り込む必要がある。具体的には、ルーメン画分から光化学系IIと結合するタンパク質を生化学的に選別することが必要である。

現在までに、*Synechocystis*から単離した光化学系II複合体を用いて、チラコイド膜ルーメン画分の中から光化学系IIに結合するタンパク質画分を得た。この画分を一次元電気泳動ゲルに展開して、MALDI-TOF MS法によりタンパク質を同定した。その結果、高温適応により誘導され、光化学系IIに結合しうるタンパク質を約10個同定することができた。これらのタンパク質のほとんどは、当初のルーメン画分のプロテオーム解析で現れなかったものである。

現在、これらすべてのタンパク質について組み換えタ

ンパク質を作製し、光化学系II複合体との再構成を行っているところである。また、これらの遺伝子の破壊株も作製しており、その表現型を解析する予定である。

今後、このアプローチにより目的の光化学系IIの高温耐性因子を明らかにする。その遺伝子をもとに、穏やかな高温を検知するセンサーとシグナル伝達因子、およびその制御下にある遺伝子群を同定し、高温適応に関与する遺伝子のネットワークを明らかにする予定である。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

##### 1) 論文

- 0602081951  
Okuda, K., Nishiyama, Y., Morita, E.H., and Hayashi, H., Identification and characterization of NuhA, a novel Nudix hydrolase specific for ADP-ribose in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Biochim. Biophys. Acta*, 1699, 245-252 (2004).
- 0602081955  
Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., Yamamoto, H., Hayashi, H. and Murata, N., Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Biochemistry*, 43, 11321-11330 (2004).
- 0602081959  
Yamauchi, S., Okuyama, H., Nishiyama, Y. and Hayashi, H., Gene structure and transcriptional regulation of *dnaK* and *dnaJ* genes from a psychrophilic bacterium, *Colwellia maris*, *Extremophiles*, 8, 283-290 (2004).
- 0602082003  
Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I. and Murata, N., Inhibition of the repair of photosystem II by oxidative stress in cyanobacteria, *Photosynth. Res.*, 84, 1-7 (2005).
- 0602082011  
Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I. and Murata, N., Regulation by environmental conditions of the repair of photosystem II in cyanobacteria, *Advances in Photosynthesis and Respiration: Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation and Environment*, 193-203 (2005).
- 0602082014  
Allakhverdiev, S.I., Nishiyama, Y., Takahashi, S., Miyairi, S., Suzuki, I. and Murata, N., Systematic analysis of the relation of electron transport and ATP synthesis to the photodamage and repair of photosystem II in *Synechocystis*, *Plant Physiol.*, 137, 263-273 (2005).
- 0602082019  
Ohnishi, N., Allakhverdiev, S.I., Takahashi, S., Higashi, S., Watanabe, M., Nishiyama, Y. and Murata, N., Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center, *Biochemistry*, 44, 8494-8499 (2005).
- 0602082022  
Okuda, K., Hayashi, H. and Nishiyama, Y., Systematic characterization of the ADP-ribose pyrophosphatase family in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *J. Bacteriol.*, 187, 4984-4991 (2005).