

名古屋大学 大学院生命農学研究科 生物機構・機能科学専攻  
分子細胞機構学講座 植物分子生理学研究分野  
平出 優人

## 論文題目

### **Adaptation mechanisms for dark and low-oxygen environments in cyanobacteria**

(シアノバクテリアにおける暗所および低酸素環境への適応機構)

#### 博士論文要約

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。生命進化の黎明期において、還元力として水を利用する光合成能を創出したことで祖先シアノバクテリアは水と光が得られる多様な環境に適応して、地球上のあらゆる環境に進出し、地球環境を酸素に富む環境へと変革した。現在の地球環境においても、シアノバクテリアは、河川や湖、水田などの淡水環境、沿岸や遠洋などの海洋環境はもとより、温泉などに見られる微生物マット、陸上や水田などの人工環境にもよく適応しており、さらにシダや植物との共生関係を構築している種も多く見られる。そのような多様な環境の中で最も重要な因子が光である。シアノバクテリアをはじめ、光合成生物は基本的にエネルギー源を光に依存している。環境において光は、強光から弱光や暗所、波長の変化など多様に変動する。このため、光合成生物は、環境の光の状態を、光受容センサータンパク質や光合成の電子伝達鎖によって感知するような精巧な機構を発達させ、刻々と変化する光環境に適応して生育している。さらに、地球の自転により昼夜の変化があり、日周によって一日の中で大きく光環境は変化する。その中で光の強弱にあわせて、光合成生物は光合成を最適化させるための様々な機構を持っている。一方、夜間になると光合成生物は他の生物と同様に従属栄養的な代謝によってエネルギーを獲得しなければならない。つまり、解糖系や TCA 回路、酸化性的ペントースリン酸経路によって、ATP や NADPH などのエネルギーや還元力を提供しなくてはならない。シアノバクテリアの中には従属栄養能が高く外部環境中の糖などの有機物を取り込んで暗所で生育可能な種も存在する。*Nostoc punctiforme* ATCC 29133、*Anabaena variabilis* ATCC 29413 や *Leptolyngbya boryana* は完全に暗所でも生育可能とされ、また *Synechocystis*

sp. PCC 6803 (*Synechocystis* 6803) において完全暗所ではないが、一日に短時間の光シグナルがあれば従属栄養的に生育できること（光活性化従属栄養的生育 Light-activated heterotrophic growth; LAHG）が知られている。このように、シアノバクテリアは光および環境中の有機物の有無などによって、暗所での代謝を調節して生育する必要がある。しかし、シアノバクテリアにおける従属栄養的代謝がどのように制御されているのかほとんど分かっていない。

光の変動に加えて、シアノバクテリアが生育する環境では、酸素レベルも大きく変動し代謝に大きな影響を与える。シアノバクテリアや真核藻類などの酸素発生型光合成生物は、昼間は光合成によって酸素を発生し環境を好気状態とするが、夜間は逆に呼吸によって酸素を消費する。また、特に微生物マットなど従属栄養性のバクテリアと共存している環境では夜間になると呼吸によって劇的に環境中の酸素レベルが低下することが知られている。従って、夜間や光が限られた環境ではたとえ光合成生物でも細胞内は酸素レベルがきわめて低い微好気から嫌気状態となりうる。しかしながら、シアノバクテリアにおける低酸素環境への適応についての知見は非常に限られている。

第一章では、私は、シアノバクテリアにおいて従属栄養の制御に関わる因子を探るために *L. boryana* を材料として研究を行った。*L. boryana* は、完全に暗所でも従属栄養的に生育可能という特徴を有するが、その野生株の暗所での従属栄養的な生育は世代時間が数日に及び必ずしも良好とは言えない。そこで、これまで研究室で用いてきた暗所従属栄養生育能が向上している自然変異株 *dg5* に着目した。まず私は、次世代シーケンサーを用いて *L. boryana* の野生株 (WT) の全ゲノム配列を決定した。*L. boryana* ゲノムはクロモソーム (6,176,364 塩基対)、1つの環状プラスミド pLBA (77,739 塩基対)、さらに2つの線状プラスミド pLBX (504,942 塩基対)、pLBY (44,369 塩基対) で構成されていた。これにより *L. boryana* ゲノム情報の基盤を整え、さらに並行して *dg5* に生じた自然変異の同定のため *dg5* ゲノムのリシーケンスを行った。その結果、*dg5* には WT と比較して3つの変異があることが明らかとなった。それらの変異を個別に WT に導入した変異株を単離し、暗所従属栄養生育能を検討したところ、3つの変異のうちシトクロム *c<sub>M</sub>* をコードする遺伝子 *cytM* への一塩基挿入変異の導入のみが、*dg5* 形質をもたらした。従って、この変異が原因の変異であると結論づけた。また、上記のように得られた *cytM* 欠損株は WT と比較して有意に高い呼吸活性（約 1.7 倍）を示した。*cytM* 欠損による従

属栄養能向上が *L. boryan* に特異的なものかを検証するため、別のシアノバクテリア *Synechocystis* 6803 においても *cytM* 欠損株を単離し、従属栄養生育能を調査した。その結果、混合栄養条件、LAHG 条件での生育が有意に促進された上、WT が本来生育できない完全暗所でも *cytM* 欠損株は生育できることが確認された。さらに、呼吸活性も約 2 倍に高まっていた。すなわち、*Synechocystis* 6803 においても *L. boryana* とほぼ同様の結果を得られた。シトクロム *c<sub>M</sub>* は、ほぼ全てのシアノバクテリアに保存されているが、その生理学的機能については全く不明であった。本研究により、シトクロム *c<sub>M</sub>* はシアノバクテリアの従属栄養的な代謝の制御に関わっていることが示唆された。

第二章では、シアノバクテリアの低酸素環境への適応の分子機構に着目した。シアノバクテリアは昼夜変動により日常的に低酸素環境にさらされている。クロロフィルやビリル色素やヘムといった光合成と呼吸に必須の色素テトラピロールの生合成系には、そのような低酸素環境への適応機構が見られる。この生合成経路は 20 以上の反応から成っているが、その中で酸素を基質とする反応が少なくとも 3 つあり、それぞれ異なる 2 つの酵素が存在し、酸素レベルに応じ機能分化している。*Synechocystis* 6803 では、構成的に発現している好気型酵素 (ChlA<sub>I</sub>、HO1 および HemF) が好気条件で機能している。しかし、それらとは別に、それぞれ低酸素型酵素 (ChlA<sub>II</sub>、HO2 および HemN) が存在し、これらの酵素は低酸素条件に限って発現誘導され、好気型酵素の行う酸素依存反応をバイパスする。これらの低酸素型酵素をコードする 3 つの遺伝子は一つのオペロン (*chlA<sub>II</sub>-ho1-hemN*) を形成している。私は、このオペロンの発現誘導を担う MarR 型転写制御因子 ChlR の活性化機構に焦点を当てた。ChlR は、酸素レベルの低下を感知して同オペロンの転写を活性化するアクティベーター型の転写制御タンパク質である。以前の研究により、ChlR の 35 番目のアスパラギン酸がヒスチジンとなる変異 (D35H) によって好気条件でも活性化型となり低酸素型酵素遺伝子群を誘導する “スーパーアクティベーター” となることが分かっていた。しかし、ChlR の活性化機構についてはほとんど未解明である。そこで、ChlR の活性化機構を明らかにすることを目的に、多様なスーパーアクティベーターの単離を試みた。好気型酵素 ChlA<sub>I</sub> を欠損した  $\Delta chlA_I$  が好気条件では致死となることを利用し、ChlR へのランダムな変異導入による致死形質からの回復を指標とし合計 282 の独立した  $\Delta chlA_I$  偽復帰変異株を単離した。そのうち 108 株の *chlR* 遺伝子をシーケンスした結果、D35H も含め 8 つの一塩基

アミノ酸変異 (D16A、D32G、D35H、D35A、D36K、L41S、L41V、I104L) が ChlR をスーパーアクティベーターにすることを明らかにした。単離した  $\Delta chlA_I$  偽復帰変異株は好気条件において WT と同様に生育し、 $chlA_{II}$  転写物量は好気条件の転写物量が誘導条件である低酸素条件と同等かそれ以上であった。したがって、これらの変異によって ChlR がスーパーアクティベーターとなったことで  $chlA_{II}$  が構成的に誘導されていることを確認した。さらに、これらのアミノ酸置換を、*Bacillus subtilis* MarR ホモログ BsOhrR の結晶構造をもとに活性化機構を立体構造の視点から考察した。8 つのスーパーアクチベーター変異のうち 7 つの変異 D16A、D32G、D35H、D35A、D36K、L41S、L41V は N 末端側に位置し、BsOhrR の第一ヘリックス領域に対応していた。従って、この領域が ChlR の活性化／不活性化制御に深く関わっていることが示唆された。ChlR ホモログでは N 末端側に二つのシステイン残基が保存され、これが酸素レベルに応じて変換される鉄硫黄クラスターの保持に関与していることが示唆されている。従ってこれらの N 末端側の残基は金属クラスターの状態を感知し、中央の DNA 結合ドメインに伝える役目をしている可能性が示唆される。

第三章では、長期にわたる環境適応を経てゲノムがどのように変化するかという視点で研究を行った。私は暗所でも従属栄養的に生育できる *L. boryana* において、長期 (3~12 年) にわたって暗所従属栄養的に継代培養し続けた変異株 (A5101、E2210、YFCY1、93-1) に着目した。これらの株は、光合成を行えない暗所従属栄養条件に長期間さらされ選抜されてきた結果、変異を蓄積していると推察され、いわゆる研究室内小進化の実例となる。これら 4 株のゲノムをリシーケンスし、その結果 93\_1 では 3 つ、A5101 では 9 つ、E2210 では 10 個、YFCY1 では 14 個の変異を同定した。約 3 年間暗所培養を続けた 93-1 では、光化学系 I のコアタンパク質をコードする *psaA* に 11 塩基の挿入が起こっていた。この遺伝子の欠損は光化学系 I の欠損を意味する。このことから、光合成能の喪失が 3 年という比較的短時間で生じることがわかった。一方、より長期にわたって暗所で継代培養された 3 株 A5101、E2210、YFCY1 では、多くの変異が二成分制御系のヒスチジンキナーゼやレスポンスレギュレーター、クロロフィル生合成の制御に関与する GUN4 などの制御系タンパク質に生じていることが明らかになった。*Synechocystis* 6803 では GUN4 欠損株は光合成的に生育できなくなることが示されている。従って E2210 に生じていた GUN4 遺伝の塩基欠落による欠損がこの株の光合成生育欠落の原因変異であることが強

く示唆される。しかしながら、A5101 や YFCY はそのようなこれまで報告された光合成生育に関わる遺伝子への変異は認められなかった。従ってこれらの変異をさらに詳細に解析することにより、どの変異が光合成能の欠失と従属栄養生育の亢進に寄与しているかが明らかとなり、独立栄養と従属栄養の制御機構についての分子機構が明らかとなることが期待される。自然界では、光合成能を欠落しその主要なエネルギー源を従属栄養に移行した寄生植物が多く存在する。寄生植物の出現は、植物の多くの系統で複数回生じたと推定されている。私が同定した上記の変異は、シアノバクテリアの適応進化のみならず、寄生植物の進化過程においても有用な情報をもたらす。