

Regulatory mechanism of the CO₂ concentrating mechanism (CCM)-related genes
in *Synechococcus elongatus* strain PCC7942

(*Synechococcus elongatus* strain PCC7942 における CO₂ 濃縮機構関連遺伝子群の
制御機構)

ラン藻（シアノバクテリア）は、酸素発生型の光合成を行う原核生物であるが、CO₂ を細胞内に HCO₃⁻ の形で濃縮し、CO₂ 固定酵素である Rubisco 周辺で局所的に CO₂ に変換することにより、きわめて効率的な光合成を行うことが知られている。このようなラン藻の「CO₂ 濃縮機構 (CCM)」の構成成分の多くは、転写レベルで発現制御されており、CO₂ 欠乏条件下で転写レベルが大きく上昇する。近年、LTR 型転写因子のうち、CbbR サブファミリーに属する転写因子が、CCM 関連遺伝子の制御に関与することがわかってきたが、制御機構の全体像は未解明である。本学位論文は単細胞性のラン藻である *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を材料として、CCM の制御に関わる CbbR ホモログである CcmR の作用機構について、プロモーター近傍の作用部位、および CcmR の発現を制御する転写因子と制御シグナルを解析したものであり、以下の 3 つの内容から構成されている。

1. CO₂ に応答する最小プロモーターにおける CcmR の役割の解析

S. elongatus PCC7942 は CbbR ホモログとして CcmR のみをもつが、2 つの CbbR ホモログをもつ *Synechocystis* sp. PCC6803 では、それらのうちの 1 つ (CmpR) が低 CO₂ 条件下で転写活性化因子として作用するのに対し、他方 (CcmR) は高 CO₂ 条件下で自身の遺伝子 (*ccmR*) を含め複数の遺伝子を抑制している。*S. elongatus* PCC7942 では CcmR が転写活性化因子としても抑制因子としても作用すると推定されるが、自身の遺伝子に対する制御は不明であった。そこで、*ccmR* 遺伝子のプロモーターをレポーター遺伝子 *luxAB* に連結した融合遺伝子を、野生株と *ccmR* 欠損株とに導入して発現レベルを比較することにより、1) *ccmR* プロモーターが低 CO₂ 条件で活性化されること、2) CcmR が *ccmR* を抑制していること、および 3) 低 CO₂ 条件下で *ccmR* を活性化する未知因子 (X) が存在することを明らかにした。*ccmR* の CO₂ 応答に必要な制御領域の長さは、様々な低 CO₂ 誘導性の遺伝子の中でももっとも短く、この領域内に CcmR の結合配列と推定される不完全なパルンドローム配列が 2 組存在している。そこで、これら 2 つの推定 CcmR 結合配列のそれぞれに変異を導入した実験により、それぞれの役割を解析した。

2. *ccmR* の発現制御における RbcR の機能の解析

上記 1. で明らかにした CO₂ 応答性の最小プロモーターに作用する未知の活性化因子

Xが CcmR と結合配列を共有することが推定されたため、その候補として CcmR と近縁の RbcR に注目してその機能解析を行った。RbcR はラン藻の代表的 LTR で全ラン藻に保存されているため、Rubisco 遺伝子との関連が予測されていたが、遺伝子破壊ができず、逆遺伝学的解析が困難な上、生化学な取り扱いも困難で十分な機能解析が行われていなかった。本研究では、*ccmR* プロモーターと *luxAB* の融合遺伝子を保有する株に *rbcR* を含むプラスミドを導入した上で、クロモソーム上の *rbcR* を破壊し、IPTG によって *rbcR* の発現をコントロールする系を構築して低 CO₂ 条件への応答過程を解析し、RbcR が CO₂ 欠乏による *ccmR* の誘導に関与するか否かを検証した。

3. *ccmR* の発現制御に関わる未知因子の遺伝学的探索

上記 1. において CcmR 欠損株背景で *PccmR::luxAB* 株がきわめて強い生物発光を示すことが明らかとなったので、この株を親株とし、UV-C 照射によって突然変異を誘発した細胞集団のコロニーの中から、生物発光のレベルに異常のある株をリアルタイム生物発光分析システムを用いて単離した。当初、発光レベルが低い変異株の単離を目指したが、親株よりもさらに高い発光レベルを示す株も数株得られた。これらの変異株のゲノム配列の再解析によって原因遺伝子の同定を試みたところ、ほとんどの株に数カ所以上の変異があつて原因遺伝子の特定に至らなかったが、親株より強い発光を示した 2 株 (E3、E11) で *cpcE* 遺伝子の欠損が見つかった。*cpcE* は光捕集タンパク質フィコシアニンの発色団であるフィコシアノビルリンをタンパク質に結合させるリアーゼのサブユニットのひとつをコードしている。2 株の変異株はフィコシアニンの含量が低く、きわめて生育速度が遅かったが、*cpcE* をプラスミドを用いて変異株に戻したところ、フィコビルリン含量は部分的にしか回復しなかったものの、生物発光の強度と *luxA* の発現レベルはいずれも親株レベルに低下し、増殖速度も回復した。以上の結果から、光エネルギーが不足して光合成生産が制限された条件下で生じる何らかの代謝的な変化が、RbcR あるいはさらに未知の因子を介して CCM の基本制御因子である CcmR の発現を抑制しているものと推定した。