

TOPICS

LysR 型転写因子 CmpR の機能から探るラン藻の
CO₂ 欠乏応答メカニズム

名古屋大学 大学院生命農学研究科

西村崇史

1. はじめに

ラン藻は原核生物でありながら植物と共通の光合成機構を持ち、葉緑体の進化的起源と考えられている生物である。安定な培養系、及び形質転換法が確立されているため、ラン藻は光合成研究のモデル生物として広く用いられている。ただし、ラン藻と植物では炭酸固定の基質である CO₂ を環境中から獲得する機構が大きく異なっている。ラン藻には植物には存在しない独特の無機炭素 (CO₂ または HCO₃⁻) の濃縮機構 (Carbon-Concentrating Mechanism; CCM) が備わっており、効率的な光合成に必要な細胞内無機炭素濃度を維持しているのである¹⁾。ラン藻の CCM は大別すると①輸送体による外界から細胞質への無機炭素の取り込み、②カルボキシゾーム内部における CO₂ 固定、の二段階から成る (図 1)。①の段階では、細胞膜に存在する BCT1、SbtA、BicA といった HCO₃⁻ 輸送体が細胞質に HCO₃⁻ を能動的に輸送している。また、NDH-I 複合体が細胞質の CO₂ を HCO₃⁻ に変換することで細胞質

における高い HCO₃⁻ 濃度を維持するとともに、外界から細胞内への CO₂ の浸透速度を高めている²⁾。②では細胞質に蓄積した HCO₃⁻ は、まずカルボキシゾームと呼ばれるタンパク質性の多面構造体内に入り、内部に局在するカーボニックアンヒドラーゼ (CA) により CO₂ に変換された後、同じく内部に局在するルビスコ (Rubisco) により固定される。ラン藻の Rubisco は植物のものにくらべて O₂ に対する CO₂ の選択性が低いけれども、CCM により Rubisco 周囲の CO₂ 濃度を高めることにより高い CO₂ 固定活性を維持している。カルボキシゾームや CA、Rubisco は外界の CO₂ 濃度が高い条件下でもある程度発現しているが、BCT1、SbtA、NDH-I₃ は CO₂ 充足環境では発現しておらず、CO₂ 欠乏環境にさらすことで速やかに発現が誘導される³⁾。この CO₂ 欠乏ストレス応答は遺伝子発現段階での厳密な転写制御によるものであり、我々はこの転写制御機構の解明を目的に研究を進めている。

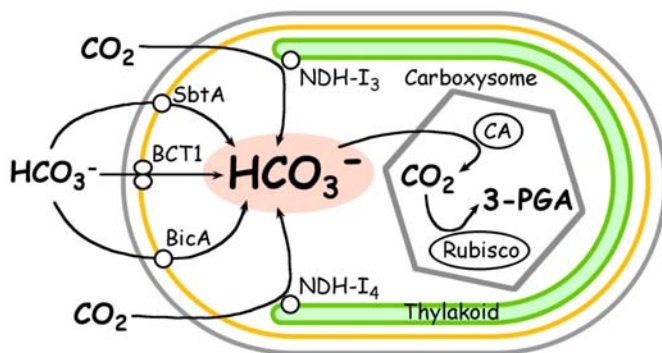


図1 ラン藻の無機炭素濃縮機構のモデル図

ラン藻は外界の無機炭素を複数の機構を使って細胞内に HCO₃⁻ の形で取り込む。細胞質に蓄積した HCO₃⁻ は Carboxysome 内の Carbonic anhydrase (CA) により CO₂ に変換され、Rubisco により固定される。BCT1、SbtA は高親和性 HCO₃⁻ トランスポーター、NDH-I₃ は高親和性 CO₂ 取り込み機構で、いずれも CO₂ 欠乏時に発現する。BicA は低親和性 HCO₃⁻ トランスポーター、NDH-I₄ は低親和性 CO₂ 取り込み機構で、これらは構成的に発現している。

2. *cmpABCD* オペロンの転写制御機構

ABC型の炭酸水素イオントランスポーターBCT1をコードする*cmpABCD*オペロン(以下*cmp*オペロンと略す)は、CO₂欠乏環境で転写量が著しく増加する⁴⁾。この転写制御に関わる因子として、以前にLysR型タンパク質のCmpRが同定されている⁵⁾。CmpRは光合成細菌・化学合成細菌におけるカルビンサイクル関連遺伝子群の転写制御因子であるCbbRのホモログで、CbbRとアミノ酸配列レベルで約30%の類似性を持つ。ラン藻においてCmpRを欠損させると*cmp*オペロンのCO₂欠乏応答性が著しく低下するが⁵⁾、一方でカルビンサイクル遺伝子群の発現には影響しない。したがって、CmpRによる*cmp*オペロンの転写制御機構はラン藻におけるCO₂応答機構を研究する際のよいモデルとなる。

ラン藻 *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942 (以降7942と略す)の*cmpA*の上流領域は約0.9kbと比較的長く、CbbRのDNA結合認識配列のコア配列である「TNA-N_{7,8}-TNA」(CbbRモチーフ⁶⁾)を含む推定上のCmpR結合部位が複数存在する(図2、*cmpI*~*cmpVI*)。このことから、*cmp*オペロンのCO₂応答性はCmpRと*cmpA*上流領域の相互作用によるものと推定された。*luxAB*遺伝子をレポーターとしたプロモーター活性の

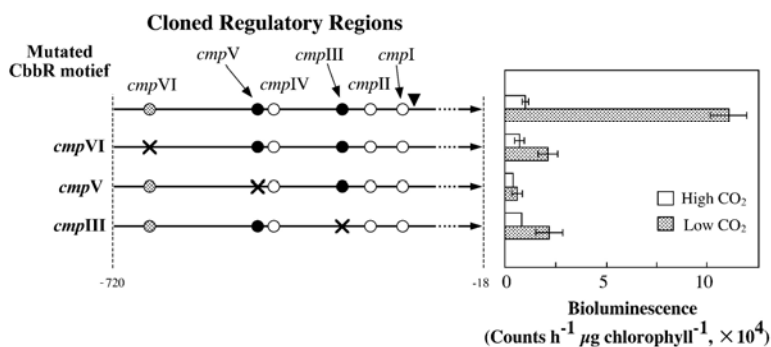


図2 *cmpA*上流領域におけるCO₂欠乏応答性領域の特定を目的としたレポーターアッセイ
*cmpA*上流領域に*luxAB*を繋いだ配列をラン藻 *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942のゲノム中に組み込み、高CO₂条件(白)および低CO₂条件(灰)におけるプロモーター活性を生物発光により測定した。*cmpA*上流領域図中の数値は開始コドンのAからの距離、黒の逆三角は転写開始点の位置を表している。丸のシンボルはCbbRモチーフを表す(白;TNA-N₇-TNA、黒;TNA-N₇-TNA-N₇-TNA、灰;TNT-N₇-TNA-N₇-ANA)。塩基置換を導入したCbbRモチーフは×で示した。

測定で、上流側から推定CmpR結合部位を順次欠失させたところ、*cmpI*~*cmpVI*のうち、2つのCbbRモチーフが重複した構造(TNA-N₇-TNA-N₇-TNA)となっている*cmpIII*と*cmpV*、および重複したCbbRモチーフに似た配列*cmpVI*(TNT-N₇-TNA-N₇-ANA)が低CO₂応答に関与する可能性が示された。これらの部位に個別に塩基置換を導入したところ、いずれの場合も低CO₂応答性が著しく低下した(図2)。これらのことから、*cmp*オペロンの低CO₂応答には*cmpIII*、*cmpV*、*cmpVI*のすべてが必要であることが明らかとなった。次に、*cmpA*上流領域とCmpRの相互作用の有無を検証するため、大腸菌で発現させたCmpRタンパク質と*cmpA*上流領域のDNA断片を用いてゲルシフト解析を行った(図3)。CmpRタンパク質を発現させた大腸菌粗抽出液と*cmpA*上流DNA断片を混合すると、DNA-タンパク質複合体由来のシフトバンドが観察されたことから(図3B)、*cmpA*上流領域にCmpRが特異的に結合することが示された。これにより前述の「*cmp*オペロンのCO₂応答性はCmpRと*cmpA*上流領域の相互作用により形づくられる」という推論がより確かなものとなった。おそらく、CmpRは*cmpIII*、*cmpV*、*cmpVI*の各モチーフに結合しDNAを複雑にベンディングさせることで転写誘導に貢献していると考えられる。

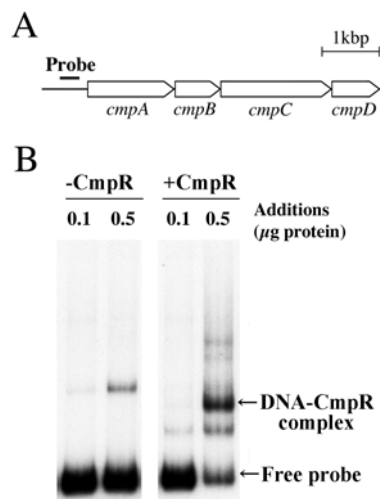


図3 *cmpA*上流領域とCmpRの相互作用の検証
A. *cmp*オペロンの構造。ゲルシフト解析に用いたProbeを傍線で示した。
B. ゲルシフト解析。タンパク質は発現ベクターpTrc99A (-CmpR)およびpTrc99A/*cmpR* (+CmpR)を導入した大腸菌の粗抽出画分を用いた。

3. ラン藻における CO₂ 欠乏シグナルとは？

CCM 関連遺伝子群の CO₂ 応答の第一段階は CO₂ 欠乏ストレスを感受することである。ラン藻が外界の無機炭素濃度の変化を直接感知しているのか、それとも CO₂ 欠乏により細胞内で起こる 2 次的な変化を感知しているのかは長らく不明であった。現在までのところ、環境ストレスシグナル伝達系として一般的な二成分制御系を介した CCM 関連遺伝子群の転写制御機構は知られておらず、CCM 関連遺伝子群の転写に直接関わるものが確定しているのは CbbR ホモログ (CmpR、NdhR) のみである (NdhR については後述)。CbbR を含む LysR 型転写因子の特徴として、DNA との結合に影響を与える co-inducer が存在することが挙げられる⁷⁾。co-inducer の多くは代謝中間体分子であり、光合成細菌と化学合成細菌の CbbR では実際に何種かの化合物が同定されている^{8,9,10)}。ラン藻の CbbR ホモログでも co-inducer を介した標的遺伝子上流領域への結合調節が CO₂ 欠乏ストレス感受機構の実体である可能性が考えられたので、CO₂ 欠乏によって細胞内濃度が変化すると予想されるいくつかの代謝中間体分子を選び、各分子が *cmpA* オペロン上流領域と CmpR の結合に与える影響を調べた。NADH、NADPH、cAMP、3-phosphoglycerate (3-PGA)、2-oxoglutarate (2-OG) は添加による影響がみられなかったが、Ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) と 2-phosphoglycolate (2-PG) は添加により顕著な結合促進効果が見られた (図 4A)。RuBP が 1mM 以上の高濃度でのみ効果を示したのに対し、2-PG は 10 μ M 付近の低濃度の狭い範囲で顕著な影

響を示した点で特に注目された (図 4B)。RuBP は Rubisco の触媒する 2 つの反応 (カルボキシラーゼ反応; C 反応、オキシゲナーゼ反応; O 反応) の基質であるのに対し、2-PG は O 反応によってのみ生成する分子である。O 反応は Rubisco 周囲の CO₂ 分圧が低下した時 (相対的に O₂ 分圧が上昇) に起こるため、2-PG の細胞内濃度は CO₂ 欠乏によって上昇すると推定され、実際にラン藻を CO₂ 制限環境に置いた後に細胞内 2-PG 濃度が一過的に上昇する現象が Marcus らによって報告されている¹¹⁾。また、Woodger らは *cmp* オペロンを含む CCM 関連遺伝子群の迅速な CO₂ 欠乏ストレス応答には空気レベルの O₂ の存在、すなわち O 反応が必要であることを報告している¹²⁾。以上の結果を総合すると、ラン藻細胞内では、O 反応によって引き起こされる 2-PG 濃度の上昇が CO₂ 欠乏シグナルとなり、CmpR と *cmpA* 上流領域の結合を促進していると推察される。2-PG と CmpR がどのような相互作用を示すのか、また 2-PG と RuBP 以外に co-inducer となる分子が存在するのか現段階では不明であるが、今回の結果から推察される「2-PG による細胞内 CO₂ 濃度感受機構」は、現時点では最も単純かつ合理的なものと思われる。

4. CCM 関連遺伝子群の転写制御における CmpR の機能とは？

SbtA、NDH-I₃ をそれぞれコードする *sbtA* と *ndhF3D3chpY* (*ndhF3* オペロン) は、*cmp* オペロンと同様に CO₂ 欠乏により転写が著しく誘導される¹³⁾。

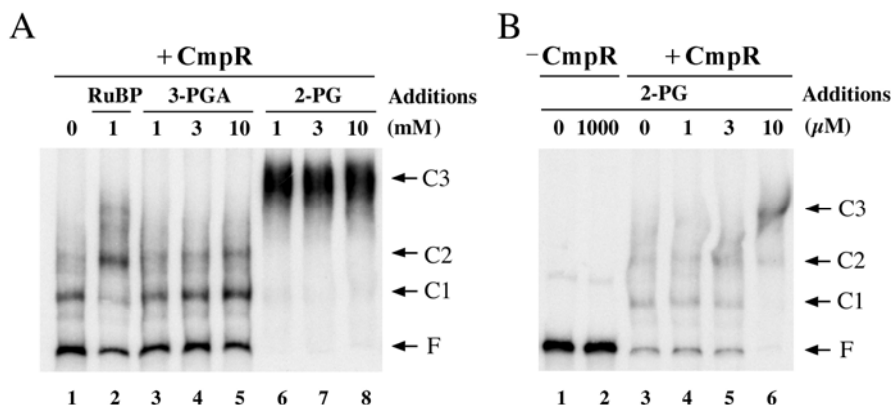


図4 RuBPと2-PGがCmpRのDNA結合活性を高める
 A. 図3の泳動サンプルにRuBP、3-PGA、2-PGを添加した時のシフトバンドの変化。
 B. 2-PGを各終濃度で添加した時のシフトバンドの変化
 FはFree probe、C1-C3はDNA-タンパク質複合体を示す。

CmpR 欠損株でもこれらの転写誘導が起こったことから、CmpR はこれらの転写に必須ではないことがわかったが、詳しく見てみるとやはり CmpR が *sbtA*、*ndhF3D3chpY* の発現調節に関与することを示唆する結果が得られた。図 5 は CO₂ 濃度の異なる条件における *sbtA* と *ndhF3* の発現パターンを半定量的 RT-PCR によって調べたものである。CmpR 欠損株において、*sbtA* は低 CO₂ 条件における発現誘導率が低下し、*ndhF3* は高 CO₂ 条件ですでに一定の発現を示した。どちらの遺伝子についても、CmpR の欠損による発現量の変化は結果的には CO₂ 欠乏ストレス応答性の低下を表しているため、CmpR はラン藻の CCM 関連遺伝子群のグローバルな転写制御因子である可能性が考えられる。*sbtA* と *ndhF3* の各上流領域への CmpR の結合はゲルシフトアッセイにより確かめられた (data not shown)。興味深いことに、*ndhF3* に関しては 2-PG 非存在下でも CmpR が転写開始点付近に結合することがわかった。転写開始点付近への CmpR の結合は転写開始を阻害する効果をもたらすと推察される。実際、図 5 の CmpR 欠損株における *ndhF3* の発現パターンは、CmpR が CO₂ 十分条件下 (つまり 2-PG 非存在下) でリプレッサーとして機能していることを支持している。そうすると次に、2-PG は CmpR の *ndhF3* に対する抑制効果をどうやって解除するのか、という疑問が生じてくる。現在、2-PG、CmpR、*ndhF3* 上流領域の相互作用を調べており、最近になって 2-PG 依存的な CmpR 結合サイトが *ndhF3* 上流に存在することを示唆する結果を得た。化学合成細菌では co-inducer が CbbR の結合部位を移動させるという現象が報告されているので^{10, 14)}、ラン

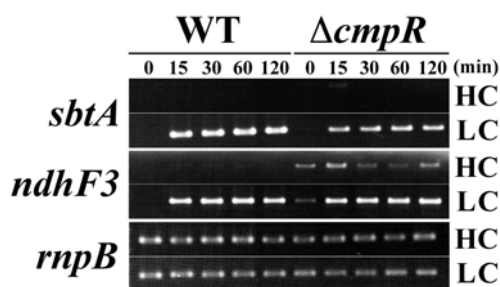


図5 *sbtA*、*ndhF3*の半定量的RT-PCR解析
2%CO₂を含む空气中で培養したラン藻 7942 株の野生株 (WT) と CmpR 欠損株 (Δ *cmpR*) をそれぞれ 2 つに分け、一方は引き続き 2%CO₂を含む空气中で培養し (HC) もう一方は CO₂を除いた空气中で培養した (LC)。CO₂濃度を変えて培養を再開した時点をも 0min とし、経時的に回収したラン藻細胞から RNA を抽出した。*rnpB* は構成的発現の指標である。

藻にも同様に co-inducer による結合部位のスライド機構が存在するのかもしれない。これらの解明にはさらなる研究が必要であるが、CmpR には 2-PG 依存性の異なる二種類の結合配列があり、これらが使い分けられていることは確実のようである。

5. 今後の展望

ラン藻の CbbR ホモログは、現在までに 3 つ同定されている。1 つは CmpR であり BCT1 をもつラン藻が持つ。2 つ目は CmpR とよく似た NdhR であり、NDH-I₃ をもつ数種のラン藻で同定されているが^{13, 15, 16)}、例外として 7942 は NdhR を持っていない。3 つ目は Rubisco をコードする *rbcLS* の転写因子と推定されている RbcR である。CmpR と NdhR については転写制御のターゲットがほぼ明らかになりつつある。上述のように、CmpR はラン藻 7942 では *cmp* オペロンと、おそらく *sbtA*、*ndhF3D3chpY* の転写を制御している。一方、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以降 6803 と略す) では CmpR は *cmp* オペロンの活性化にのみ特化しており⁵⁾、NdhR が *sbtA*、*ndhF3D3chpY* の転写因子として作用している^{13, 16)}。マイクロアレイ解析と半定量的 RT-PCR 解析から、*sbtA* と *ndhF3* の CO₂ 欠乏応答性は CmpR または NdhR を破壊しても完全には失われないことが明らかとなっており (図 5 参照)、このことは、ラン藻 7942 と 6803 の CCM 関連遺伝子群の転写誘導因子は CmpR と NdhR だけではないことを示している。RbcR はこの未同定の転写因子として有力な候補だが、RbcR の完全な欠損株を作ることができず、大腸菌における大量発現も成功していないため、*in vitro* 系の生化学的解析もされていない。今後、アンチセンス法による *rbcR* の不活性化等の研究を行ってこの遺伝子の機能を解明する必要がある。また、最近になって CO₂ 欠乏ストレスによって発現量が増加する non-coding RNA が見つかったため、その機能解析も急務である。これらの機能が明らかになり、それが CCM 関連遺伝子群の転写制御に関わるものであれば、ラン藻の CO₂ 欠乏応答機構の全容解明が大きく近づくであろう。ラン藻 CCM 研究の究極的な目標は植物への CCM の導入による CO₂ 固定能力の向上である。本研究をさらに推し進めることで、ラン藻の環境適応機構の知見を深めるとともに、前述の目標達成への一助としたい。

参考文献

1. Price, G. D., Badger, M. R., Woodger, F. J., and Long, B. M. (2008) Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants, *J. Exp. Bot.* 59, 1441-1461.
2. Kaplan, A., and Reinhold, L. (1999) CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 539-570.
3. Price, G. D., Sültemeyer, D., Klughammer, B., Ludwig, M., and Badger, M. R. (1998) The functioning of the CO₂ concentrating mechanism in several cyanobacterial strains: a review of general physiological characteristics, genes, proteins and recent advances, *Canadian Journal of Botany* 76, 973-1002.
4. Omata, T., Price, G. D., Badger, M. R., Okamura, M., Gohta, S., and Ogawa, T. (1999) Identification of an ATP-binding cassette transporter involved in bicarbonate uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13571-13576.
5. Omata, T., Gohta, S., Takahashi, Y., Harano, Y., and Maeda, S. (2001) Involvement of a CbbR homolog in low CO₂-induced activation of the bicarbonate transporter operon in cyanobacteria, *J. Bacteriol.* 183, 1891-1898.
6. Shively, J. M., van Keulen, G., and Meijer, W. G. (1998) Something from almost nothing: carbon dioxide fixation in chemoautotrophs, *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 191-230.
7. Shell, M. A. (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators, *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 597-626.
8. van Keulen, G., Girbal, L., van den Bergh, E. R. E., Dijkhuizen, B. L., and Meijer, W. G. (1998) The LysR-type transcriptional regulator CbbR controlling autotrophic CO₂ fixation by *Xanthobacter flavus* is an NADPH sensor, *J. Bacteriol.* 180, 1411-1417.
9. Terazono, K., Hayashi, N. R., and Igarashi, Y. (2001) CbbR, a LysR-type transcriptional regulator from *Hydrogenophilus thermoluteolus*, binds two cbb promoter regions, *FEMS Microbiol. Lett.* 198, 151-157.
10. Dubbs, P., Dubbs, J. M., and Tabita, F. R. (2004) Effector-mediated interaction of CbbR_I and CbbR_{II} regulators with target sequences in *Rhodobacter capsulatus*, *J. Bacteriol.* 186, 8026-8035.
11. Marcus, Y., Harel, E., and Kaplan, A. (1983) Adaptation of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* to low CO₂ concentration in their environment, *Plant Physiol.* 71, 208-210.
12. Woodger, F. J., Badger, M. R., and Price, G. D. (2005) Sensing of inorganic carbon limitation in *Synechococcus* PCC 7942 is correlated with the size of the internal inorganic carbon pool and involves oxygen, *Plant Physiol.* 139, 1959-1969.
13. Wang, H. L., Postier, B. L., and Burnap, R. L. (2004) Alterations in global patterns of gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to inorganic carbon limitation and the inactivation of *ndhR*, a LysR family regulator, *J. Biol. Chem.* 279, 5739-5751.
14. van Keulen, G., Ridder, A. N., Dijkhuizen, L., and Meijer, W. G. (2003) Analysis of DNA binding and transcriptional activation by the LysR-type transcriptional regulator CbbR of *Xanthobacter flavus*, *J. Bacteriol.* 185, 1245-1252.
15. Figge, R. M., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., and Cerff, R. (2001) Characterization and analysis of an NAD(P)H dehydrogenase transcriptional regulator critical for the survival of cyanobacteria facing inorganic carbon starvation and osmotic stress, *Mol. Microbiol.* 39, 455-468.
16. Woodger, F. J., Bryant, D. A., and Price, G. D. (2007) Transcriptional regulation of the CO₂-concentrating mechanism in a euryhaline, coastal marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. strain PCC 7002: role of NdhR/CcmR, *J. Bacteriol.* 189, 3335-3347.