T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報 Article / Book Information

題目(和文)	室素固定型シアノバクテリアAnabaena sp. PCC 7120のレドックス制 御システム
Title(English)	
著者(和文)	見原翔子
Author(English)	Shoko Mihara
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11081号, 授与年月日:2019年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:久堀 徹,若林 憲一,田中 寛,上田 宏,柘植 丈治,下嶋 美恵,日原 由 香子
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11081号, Conferred date:2019/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	
Category(English)	Doctoral Thesis
 種別(和文)	
Type(English)	Outline

論文要約

窒素固定型シアノバクテリア Anabaena sp. PCC 7120 のレドックス制御システム

見原 翔子 指導教員 久堀 徹 教授

第1章 序論

1-1 シアノバクテリア

シアノバクテリアは酸素発生型の原核光合成生物であり、藻類や陸上植物の 葉緑体の起源と考えられている。細胞形態や分裂様式から、単細胞2分裂、単細 胞多分裂、糸状性細胞、ヘテロシスト(異質細胞)をもつ糸状性細胞、異質細胞 を持ち分岐を伴う糸状性細胞の5つに分類されている。形態、生理、生体の多様 性を有し、海、湖、沼、川、砂漠、高原、南極など広く環境に分布している。ま た、動物や植物と共生する種も存在する。シアノバクテリアの光合成の機構は、 真核光合成生物と原理的にほとんど同じであることから、光合成研究のモデル 生物として広く用いられている。ほとんどのシアノバクテリアは光合成の場で あるチラコイド膜を持っており、このチラコイド膜上に光合成電子伝達を担う 光化学系 I、光化学系 II、Cytochrome bef 複合体が存在する(図 1-1)。また、膜 表面にはフィコビリンと呼ばれる光合成色素を結合したタンパク質の超分子複 合体である Phycobilisome も存在する。Phycobilisome は緑色光、赤色光を吸収し、 集めた光エネルギーを主に光化学系 Ⅱ に伝達する。すべてのシアノバクテリア はカルビン・ベンソン回路で CO2 を固定し、一部のシアノバクテリアは窒素固 定を行なうことができる。窒素固定酵素は酸素により失活するため、一般的に窒 素固定と光合成は時間または空間的に分けて行なわれる。窒素固定を行なう単 細胞シアノバクテリアの場合は、昼間に光合成を行ない、夜間に窒素固定を行な うことで光合成と窒素固定を分けている。一方、糸状性の種ではヘテロシストと 呼ばれる窒素固定に特化した細胞を分化させることで光合成と窒素固定を空間 的に分けている。また、一部のシアノバクテリアはヘテロシストを形成すること なく昼間に窒素固定を行なうが、詳細な機構は明らかになっていない。



Fd : Ferredoxin, FNR : Ferredoxin-NADP⁺ reductase

1-2 窒素固定型・ヘテロシスト形成型シアノバクテリア Anabaena sp. PCC 7120 Anabaena sp. PCC 7120 (Anabaena 7120)は糸状性のシアノバクテリアで、窒素 源が欠乏すると、光合成を行なう栄養細胞から10-20細胞に1細胞の割合でヘテ ロシストという窒素固定に特化した細胞を分化する(図 1-2)。ヘテロシスト分 化は窒素欠乏後およそ 20 時間で完了し、窒素欠乏から 18-24 時間後に窒素固定 酵素をコードする遺伝子の発現が誘導される(Elhai and Wolk 1990; Golden et al. 1991; Kumar et al. 2010)。ヘテロシストでは窒素固定酵素 Nitrogenase によって窒 素分子が還元され、アンモニアが生成される(図 1-3)。アンモニアは Glutamine synthetase によってグルタミン酸に付加され、アミノ酸として隣接する栄養細胞 に供給される。Nitrogenase は酸素により失活するため、ヘテロシストでは酸素 発生に関与する光化学系 II が欠如している(Kumar et al. 2010)。また、ヘテロシ ストは糖脂質及び多糖に覆われており、酸素の浸透を防いでいる(Nicolaisen et al. 2009)。それでも、ヘテロシストにわずかに酸素が浸透するが、ヘテロシスト では呼吸活性が高いため、酸素は積極的に消費される。ヘテロシストでは炭酸固 定能が欠如しているため、隣接する栄養細胞で光合成によって生成された糖が ヘテロシストに輸送される。これが酸化的ペントースリン酸経路で代謝される ことにより、窒素固定に必要な還元力 NADPH が生成される(Kumar et al. 2010; Cumino et al. 2007) $(\boxtimes 1-3)_{\circ}$



図 1-2 窒素固定型・ヘテロシスト形成型シアノバクテリア Anabaena 7120



図 1-3 Anabaena 7120 による窒素固定 G6PDH: Glucose 6-phosphate dehydrogenase

1-3 ヘテロシスト分化

ヘテロシスト分化は、多くの遺伝子の転写が複雑に制御されることで完了する(Golden and Yoon 2003; Kumar et al. 2010; Flores et al. 2018)。これまでの研究で、ヘテロシスト分化では NtcA や HetR などの転写因子が中心的な遺伝子発現制御を行なっていることが明らかになっており、NtcA 破壊株ではヘテロシスト分化が起こらないことが報告されている(Frías et al. 1994; Wei et al. 1994)。NtcA は、シアノバクテリアで広く保存されている転写因子であり、炭素と窒素のバランスに応じて遺伝子の転写を促進または抑制する。シアノバクテリアでは、生体内の炭素と窒素のバランスによって 2-オキソグルタル酸の蓄積量が変化する(図 1-4)。NtcA は 2-オキソグルタル酸の存在下で効率よく DNA に結合するこ

とが明らかになっている(Valladares et al. 2008)。窒素源が欠乏すると、細胞内の 2-オキソグルタル酸の蓄積量が向上し、NtcAが ntcAのプロモーターに結合する ことで ntcA の転写を促進する。また、ヘテロシストパターン形成やヘテロシス ト内の酸素消去、ヘテロシストに特異的な糖脂質層の形成などヘテロシスト分 化に関与するタンパク質をコードする遺伝子の転写を促進し、炭酸固定に関与 する酵素 RuBisCO など一部のタンパク質をコードする遺伝子の転写を抑制する (図 1-5) (Flores et al. 2018)。さらに、NtcA が NrrA という転写因子をコードす る遺伝子 nrrA のプロモーターに結合し、nrrA の転写を促進する(図 1-5)。続い て、NrrA が hetR のプロモーターに結合し、hetR の転写を促進する。HetR はへ テロシストパターン形成、ヘテロシスト特異的な糖脂質層および多糖層の形成 などヘテロシスト分化に必要なタンパク質をコードする遺伝子の転写を促進す る (図 1-5) (Flores et al. 2018)。 窒素固定酵素 Nitrogenase は、ヘテロシスト内の 酸素が十分に消去された後(窒素欠乏から18-24時間後)に発現する。Nitrogenase を構成するために必要なタンパク質をコードする遺伝子はオペロンとなってい る。このオペロンは CnfR という転写因子によって制御されており、また、cnfR の転写は NtcA によって促進される(図 1-5) (Pratte and Thiel 2016、Flores et al. 2018)



図 1-4 シアノバクテリアの炭素と窒素の代謝経路



図 1-5 ヘテロシスト分化における遺伝子の転写制御の一部

1-4 レドックス制御

レドックス制御とは、生体内の酸化還元状態に応じてタンパク質のシステイ ン(Cys)残基の酸化還元(レドックス)状態を変化させることによりタンパク 質の活性を調節する分子機構である。レドックス制御によって、生物は様々な環 境の変化に対して代謝系を適応させることが可能となる。光合成生物のレドッ クス制御については、植物葉緑体を用いた研究が盛んに行なわれており、植物葉 緑体では、光合成電子伝達系から Ferredoxin-thioredoxin reductase (FTR)、 Thioredoxin (Trx)を介して標的へとつながる還元力伝達経路と、NADPH から NADPH-Trx reductase C (NTRC)を介して標的へとつながる還元力伝達経路がレ ドックス制御システムの中枢である(図 1-6)。この2 つの経路が協調的にはた らくことが植物葉緑体の機能の調節に重要であると理解されている (Yoshida and Hisabori 2016)。植物葉緑体では、カルビン・ベンソン回路ではたらく Fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase) や Sedoheptulose 1,7-bisphosphatase (SBPase) をはじ めとした複数の酵素、光条件下での ATP 合成を担う ATP synthase、リンゴ酸バル ブで働く NADP-malate dehydrogenase (NADP-MDH)、酸化的ペントースリン酸 経路で働く Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) がレドックス制御を受 けることが知られている (Buchanan 1980; Mills et al. 1980; Scheibe and Anderson 1981)。これらの酵素は活性部位とは異なる部位にレドックス制御を受ける Cys 残基を持っており、これが Trx により還元されることで活性化または不活性化 する (図 1-7)。多くの酵素は Trx により還元されることで活性化するが、G6PDH は還元されることで不活性化する。Trx は様々な代謝系で働く酵素の活性を調節 する一方で、抗酸化系で働く Peroxiredoxin の還元力供与体としても機能してい る(König et al. 2002; Collin et al. 2003; Dietz 2003; Collin et al. 2004)。Peroxiredoxin は活性部位に Cys 残基を持っており、Trx から受け取った還元力を利用して H2O2 を還元する。

Trx は活性部位に保存されたアミノ酸配列 WCGPC を持ち、ジチオール-ジス ルフィド交換反応を介して標的の Cys 残基を還元する (図 1-7)。これまでに様々 な光合成生物のゲノムが解読され、植物の Trx にはいくつかのサブタイプが存 在することが明らかになってきた (Arabidopsis Genome Initiative 2000)。それら は、Trx-f、Trx-m、Trx-x、Trx-y、Trx-z、Trx-h、Trx-o に分類される (Hisabori et al. 2007) (図 1-8)。これらのうち、Trx-f、Trx-m、Trx-x、Trx-y、Trx-z が植物葉緑体 に存在する。また、シアノバクテリアの Trx も Trx-m、Trx-x、Trx-y、TrxC、に分 類され、系統解析によりシアノバクテリアの Trx も Trx-m、Trx-x、Trx-yをコードして いる遺伝子は植物葉緑体の Trx-m、Trx-x、Trx-yをコードして いる遺伝子は植物葉緑体の Trx-m、Trx-x、Trx-yをコードしている遺伝子のオル ノログであることが示されている (Florencio et al. 2006; Hisabori et al. 2007) (図 1-8)。TrxC はシアノバクテリアに特有であり、典型的でない活性部位 WCGLC を持つ (図 1-8)。植物葉緑体では、各 Trx サブタイプが標的に選択性を示すこと が明らかになっている。これまでの研究で、Trx-*f*は FBPase および SBPase の効 率の良い還元力供与体、Trx-*m*は NADP-MDH の効率の良い還元力供与体、Trx*x*、Trx-*y*、Trx-*z*は Peroxiredoxin Q (PrxQ) など抗酸化系で働く酵素の効率の良い 還元力供与体であることが知られている (Wolosiuk et al. 1979; Schürmann et al. 1981; Collin et al. 2003; Collin et al. 2004、Chibani et al. 2011、Yoshida et al. 2015)。 また、Trx-*z* は葉緑体遺伝子の転写調節に関与していることも報告されている (Arsova et al. 2010)。



図 1-6 植物葉緑体のレドックス制御システム



図 1-7 Trx による標的の還元



図 1-8 植物とシアノバクテリアの Trx の分子系統樹

各 Trx のアミノ酸配列をもとに、近隣結合法により系統樹を作成した。系統樹は ClustalW ver. 2.1 を用いて作成し、Phylip-3.69 により描写した。Trx の活性部位 の配列を口内に示した。Anab: Anabaena 7120, Syn: Synechocystis sp. PCC 6803, At: Arabidopsis thaliana 1-5 Anabaena 7120 のレドックス制御システム

Anabaena 7120 は FTR、8 種の Trx (m1, m2, m3, x, y, C, Alr2205, Asl7641)、NTRC に加え、NADPH-Trx reductase (NTR)をコードする遺伝子を持っている (Florencio et al. 2006)。Alr2205, Asl7641 はどの Trx サブタイプにも属さず、典型的でない 活性部位を持っている(図 1-8)。これらのレドックス関連タンパク質が栄養細 胞とヘテロシストでどのようなレドックス制御システムを構成しているかは明 らかになっていない(図 1-9)。先行研究において、Anabaena 7120の栄養細胞と ヘテロシストについて Trx-m1 の標的の網羅的探索が行なわれ、栄養細胞のみに 発現しているタンパク質、ヘテロシストのみに発現しているタンパク質、両方の 細胞で発現しているタンパク質が標的候補として同定された(Nomata et al. 2015)。 この標的候補のうち、窒素固定に必要な Fe-S クラスター合成のための足場タン パク質である NifU について生化学解析が行なわれ、酸化型の NifU は Trx-m1 に より還元されることが報告されている (Nomata et al. 2015)。ヘテロシストでは、 NifU 以外にも窒素固定に関与する NifH や NifK が標的候補として同定されてい る。さらに、酸化的ペントースリン酸経路の最初の反応を触媒し、窒素固定に必 要な還元力を生成する酵素である G6PDH の活性がレドックス制御により調節 されていることも報告されている(Udvardy et al 1984; Gleason 1996)。



図 1-9 Anabaena 7120 のレドックス制御システムの構成要素

1-6 Glucose-6-phosphate dehydrogenase

G6PDH は酸化的ペントースリン酸経路で働く酵素であり、反応式(1-1)の反応 を触媒する。シアノバクテリアでは、OpcA とよばれる活性化因子の存在下で基 質に対して高い親和性を示す(Hagen and Meeks 2001)。OpcA はシアノバクテリ アと放線菌でのみ保存されている。葉緑体とシアノバクテリアの G6PDH はレド ックス制御を受けることが報告されている。光合成生物の多くの Trx の標的は 光照射下で Trx に還元されることにより活性化するが、G6PDH は不活性化する。 これは、光合成により固定した炭素を放出するのを防ぐためである。Arabidopsis thaliana の葉緑体では、Trx-m と Trx-f が効率よく G6PDH を還元することで G6PDH 活性を抑制することが報告されている(Née et al. 2009)。また、ジャガイ モの葉緑体では G6PDH の Cys¹⁴⁹ と Cys¹⁵⁷がレドックス応答に重要な分子内ジス ルフィド結合を形成することが報告されている(Wenderoth et al. 1997)。しかし、 シアノバクテリアの G6PDH にはこれらの Cys が保存されておらず、これまでレ ドックス制御機構の詳細は明らかになっていなかった。

グルコース 6-リン酸 + NADP⁺ \rightarrow 6-ホスホグルコノラクトン + NADPH (1-1)

1-7 本研究の目的

1-4 節から 1-6 節で述べたように、植物葉緑体やシアノバクテリアの G6PDH はレドックス制御を受けており、光照射下では不活性化される。しかし、光照射 下で窒素固定を行なう Anabaena 7120 では、酸化的ペントースリン酸経路の第一 反応を触媒する G6PDH は、窒素固定に必要な還元力 NADPH を供給するために 光照射下であっても活性化されている必要がある(図 1-3)。Anabaena 7120 は光 合成生物で広く保存された G6PDH の制御システムを持ちながら、上記の矛盾す る点をどのようにして克服したのだろうか。私は Anabaena 7120 では、レドック ス制御システムが光条件の変化だけでなく窒素条件の変化への応答にも関与し ていると考え、Anabaena 7120 のレドックス制御システムの解明を目的として研 究を開始した。

第2章 窒素固定に関与するチオレドキシンの特定

本章の概要

Anabaena 7120 は、レドックス制御システムの構成要素として FTR、8 種の Trx (*m*1, *m*2, *m*3, *x*, *y*, C, Alr2205, Asl7641)、NTRC、 NTR を持っている。本章では、 レドックス制御が窒素固定に関与しているかどうかを明らかにするために、Trx*m*1, *m*2, *m*3, *x*, *y*, C, FTR catalytic subunit (FTR-C), NTR の遺伝子破壊株(それぞれ *ΔtrxM1* 株、*ΔtrxM2* 株、*ΔtrxM3* 株、*ΔtrxX* 株、*ΔtrxY* 株、*ΔtrxC* 株、*ΔftrC* 株、*Δntr* 株)を作製し、表現型解析を行なった。

まず、相同組換えにより $\Delta ftrC$ 株の作製を試みたが、ftrC遺伝子を完全に破壊 することはできなかった。また、硝酸添加条件下および窒素欠乏条件下で野生株 と Trx 破壊株で増殖速度を比較したところ、 $\Delta trxM2$ 株、 $\Delta trxM3$ 株、 $\Delta trxX$ 株、 $\Delta trxY$ 株、 $\Delta trxC$ 株、 Δntr 株は野生株と同様の生育を示した。一方、 $\Delta trxM1$ 株は 硝酸添加条件下では野生株と同様の生育を示したが、窒素欠乏条件下では生育 阻害を示した。以上の結果から、レドックス制御は窒素固定に関与しており、 Trx-m1 が窒素欠乏条件下での生育に重要な役割を果たしているものと結論した。 第3章 チオレドキシンへの還元力伝達経路の解明

本章の概要

第2章で述べたように、ΔtrxM1株は窒素欠乏条件下で生育阻害を示した。これは、Trx が窒素欠乏条件下での生育に重要であることを示している。Anabaena 7120はFTR、8種のTrx (m1, m2, m3, x, y, C, Alr2205, Asl7641)、NTRC に加え、 植物葉緑体には無いNTR を持っている。しかし、これらがどのような還元力伝 達系を構成しているのかは、明らかになっていなかった。FTR は、光合成電子伝 達系で得られた還元力を利用して、光依存的にTrx を還元する。一方、NTR は 代謝系で得られた還元力を利用して、光照射に依存することなくTrx を還元で きる。窒素欠乏条件下の Anabaena 7120 では、窒素固定に必要な還元力 NADPH が盛んに生成されるため、もし NTR がTrx を還元できるならば、光条件だけで なく窒素条件の変化によってもTrx を介したレドックス制御系が応答している と考えられる。そこで、本章ではTrx が光条件以外の変化にも応答するかを明ら かにするために、Trx への還元力伝達経路を調べた。

それぞれの組換え体を作製し、生化学実験によって、FTR、NTR、NTRCから Trx-m1, m2, m3, x, y, Alr2205 へ還元力が伝達するかを調べた。タンパク質のレド ックス状態は、チオール基修飾試薬 4-アセトアミド-4'-マレイミジルスチルベン -2,2'-ジスルホン酸(AMS)(Invitrogen)を用いて分析した。その結果、Alr2205 以外の Trx は FTR により還元されることが明らかになった。また、Alr2205 は NTR または NTRC により還元されることが明らかになった。さらに、細胞内で のタンパク質量を調べたところ、NTR や Alr2205 は検出されなかったことから、 細胞内で Trx は光照射に応答して標的の活性を調節していると結論した。

12

第4章 Glucose 6-phosphate dehydrogenase のレドックス制御機構の解明

4-1 本章の概要

第3章に示したように、Anabaena 7120 では Trx は光依存的に還元され、窒素 条件の変化は Trx のレドックス状態に影響を与えないことが明らかになった。 では、Trx の標的のレドックス状態も光依存的に変化するのだろうか。本章では、 Trx によるレドックス制御を受けると考えられている G6PDH に注目した。 G6PDH は酸化的ペントースリン酸経路で働く酵素である。シアノバクテリアで は OpcA という活性化因子の存在下で基質に対して高い親和性を示す。葉緑体 では G6PDH がレドックス制御を受けており、光条件下(還元条件下)では Trx に還元されることで不活性化する。Anabaena 7120 でも還元条件下で G6PDH 活 性が低下することが報告されている。しかし、光条件下で窒素固定を行なう Anabaena 7120 では、G6PDH は窒素固定に必要な還元力を供給するために、光 条件下であっても活性化されている必要がある。本章では、Anabaena 7120 の G6PDH 活性が光条件と窒素条件の両方に応答してどのように制御されているの かを明らかにするために、G6PDH のレドックス制御の分子機構の解明を目的と して研究を行なった。

生化学解析により、Trx が OpcA を還元することによって G6PDH 活性が抑制 されることが明らかになった。また、OpcA のレドックス制御に重要な Cys 残基 を同定した。さらに、細胞内の OpcA のレドックス状態を調べたところ、窒素欠 乏条件下では光条件下であっても OpcA の一部が酸化されており、G6PDH 活性 が維持されていることが明らかになった。 4-2 実験方法

4-2-1 プラスミドの作製および組換え体タンパク質の精製

制限酵素処理とライゲーションにより、OpcA と G6PDH の発現用プラスミド を作製した。OpcA は C 末端に、G6PDH は N 末端に His タグが融合した状態で 発現するようにプラスミドを設計した。OpcA の発現用プラスミドの作製では pET-23a を、G6PDH の発現用プラスミドの作製では pET-16b をベクターとして 使用した。His タグが融合した OpcA と G6PDH は、Ni-ニトリロ三酢酸(Ni-NTA) アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

(1) 菌体破砕

菌体を各カラム平衡化バッファー60 mL に懸濁し、氷冷しながら超音波破砕 (TOMY UD-201、Output 5、Duty 40、5 分×3)を行なった。超遠心分離(HITACHI P45AT、40,000 rpm(125,000×g)、40 分、4℃)後、上清画分を回収し、これを精 製に用いた。

(2) Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィー

オープンカラムに Ni-NTA 樹脂 10 mL を充填し、10 mM イミダゾールを含む 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) 80 mL で平衡化した。(1) で得られた上清画分をカラム に導入し、35 分間振とうすることで His タグが融合したタンパク質を Ni-NTA 樹 脂に十分に吸着させた。続いて、カラムを 20 mM イミダゾールを含む 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) 30 mL で 3 回洗浄した。タンパク質は 250 mM イミダゾールを含 む 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) を 6.5 mL ずつ添加することで溶出した。目的のタ ンパク質が含まれている画分について透析を行なった。

(3) 透析·濃縮

目的のタンパク質が含まれている画分を回収し、25 mM Tris-HCl (pH 7.5 また は pH 8.0) 3L を用いて 12 時間から 17 時間程度透析を行なった。さらに、翌日 新しいバッファーを用いて 1 時間透析を行なった。透析後のタンパク質溶液を Amicon Ultra-15 (Millipore) を用いて脱塩、濃縮した。濃縮したタンパク質溶 液に終濃度約 20%となるようにグリセリンを添加し、液体窒素で凍結後、-80°C で保存した。タンパク質濃度は BCA プロテインアッセイ (Pierce) またはブラッ ドフォードプロテインアッセイ (Bio-Rad) を用いて測定した。

4-2-2 Trx から OpcA への還元力伝達解析

30 µM OpcA を 50 µM のテトラチオン酸ナトリウム (STT) と混合し、30℃で 1 時間インキュベートすることで OpcA を酸化した。反応溶液を 50 mM NaCl を 含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) で透析することで余剰の STT を除去した。酸化型 の2µM OpcA、Trx の還元剤である 50µM DTT、1µM Trx を混合し、30℃で 10 分間インキュベートした。反応溶液中のタンパク質をトリクロロ酢酸(TCA)を 加えることで沈殿し、続いてアセトンを用いて沈殿を洗浄した。得られた沈殿を AMS を含む SDS サンプルバッファーに溶解した。遮光条件下、室温で 30 分間 振とうすることでチオール基を十分に修飾し、非還元 SDS-PAGE を行なった。

4-2-3 G6PDH 活性測定

G6PDH は反応式(4-1)の反応を触媒する。NADPH に由来する Abs₃₄₀の変化 を測定することで、G6PDH 活性を測定した。キュベットに 5.9 nM G6PDH, 30 nM OpcA, 20 mM グルコース 6-リン酸(G6P), 10 mM MgCl₂, 50 µM DTT, 15 nM Trx、 バッファー(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl)を入れ、30℃で 10 分間 インキュベートした。NADP⁺を添加することで反応を開始し、30℃における Abs₃₄₀の変化を測定した。NADPH の生成量はモル吸光係数 6200 M⁻¹を用いて算 出した。G6PDH 活性のレドックス応答を調べる際には還元剤として 10 mM DTT、 酸化剤として 50 µM STT を用いた。速度論的パラメータを求める際には 0.6 mM から 200 mM の G6P を用いて活性を測定した。

グルコース 6-リン酸 + NADP⁺ \rightarrow 6-ホスホグルコノラクトン + NADPH (4-1)

4-2-4 ゲル内消化-ペプチド抽出

40 µM OpcA と 55 mM ヨードアセトアミドを混合し、30℃で 45 分間インキュ ベートした。透析でヨードアセトアミドを除去し、一部の OpcA について 50 mM DTT を用いた還元処理を行なった。TCA を加えることで OpcA を沈殿し、沈殿 をアセトンで洗浄した。沈殿を AMS を含む SDS サンプルバッファーに溶解し、 非還元 SDS-PAGE を行なった。酸化型の OpcA のバンド部分のゲル切片を切り 出し、2 つに分けた。一方を 10 mM DTT で還元処理後、55 mM ヨードアセトア ミドで処理した。もう一方は何も処理を行なわなかった。これらのゲル切片をそ れぞれマイクロチューブに入れ、50%(v/v)アセトニトリルを含む 50 mM NH4HCO3 400 µL を添加し、室温で 10 分間振とうした。溶液を除去し、上記操 作を 2 回繰り返した。50%(v/v)アセトニトリルを含む 50 mM NH4HCO3 を除去後、 100 mM NH4HCO3 400 µL を添加し、室温で 10 分間振とうした。溶液を除去後、 50%(v/v)アセトニトリルを含む 50 mM NH4HCO3 を除去後、 NH4HCO₃と100 mM NH4HCO₃を交互に添加することで、ゲルを脱色した。十分 に脱色されたところで濃縮遠心機を用いてゲルを乾燥し、20 ng/ µL トリプシン (ブタ膵臓由来、Wako)を含む50 mM NH4HCO₃10 µL で膨潤させることでゲル 内のタンパク質を分解(37℃、12 時間から17 時間程度)した。上清を除去し、 0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸(TFA)を含む50%(v/v)アセトニトリル40 µLを添 加し、15 分間インキュベートした。上清をペプチド溶液として回収した。さら に、0.1%(v/v)TFAを含む75%(v/v)アセトニトリル40 µLを添加し15 分間イン キュベート後、上清をペプチド溶液として回収した。回収したペプチド溶液の体 積が10 µL 程度になるまで濃縮遠心機で濃縮し、-20℃で保存した。ペプチド溶 液はC-Tip(日京テクノス)を用いて脱塩・濃縮し、質量分析に用いた。

4-2-5 質量分析

マトリックスとして α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) を使用した。マ トリックス溶液 (CHCA、0.1% (v/v) TFA、50% (v/v)アセトニトリル) と 4-2-4 節 に従って調製したペプチド溶液をサンプルプレート上で混合し、完全に乾燥し た後、MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics ultraflex TOF/TOF)により分析を行なっ た。得られた測定結果を MASCOT peptide mass fingerprint search engine (Matrix Science)を用いて解析し、ペプチドを帰属した。MASCOT による解析条件を表 4-1 に示す。

	衣中-1 府们木IT	
Database	NCBIprot 20170811	
Taxonomy	Other Bacteria	
Enzyme	Trypsin	
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C)	
Variable modofocations	Oxidation (M)	
Mass values	Monoisotopic	
Peptide Mass Tolerance	±1.2 Da	

表 4-1 解析条件

4-2-6 プラスミドへの変異導入

Prime STAR Max (Takara) を用いてプラスミドに変異を導入し、目的のタンパク質発現用プラスミドを作製した。His タグを融合した OpcA WT の発現用プラスミドをテンプレートとして用い、OpcA C388S 変異体 (388 番目の Cys を Ser に置換した変異体)、C393S 変異体、C399S 変異体、C393/399S 変異体の発現用プラスミドを作製した。

4-2-7 G6PDH と OpcA の相互作用解析

Superdex 200 10/300 GL(GE Healthcare)カラムを使用したゲルろ過クロマト グラフィーにより、G6PDH と OpcA の相互作用を調べた。カラムは 150 mM NaCl を含む 25 mM Tris-HCl(pH 7.5)で平衡化した。1 μ M G6PDH と 1 μ M OpcA を 50 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)バッファーと混合し、30°Cで 10 分 間インキュベートした。Trx-m1 が相互作用に与える影響を調べる際には、Trx の 還元剤である 25 μ L DTT、0.5 μ M Trx-m1 も加えて同様にインキュベートした。 反応溶液を遠心分離(TOMY AR015-24、15,000 rpm(20,400×g)、5 分)し、上 清 500 μ L をカラムに導入した。タンパク質は 150 mM NaCl を含む 25 mM Tris-HCl(pH 7.5)バッファーを 0.4 mL/min で流すことで溶出した。Abs₂₈₀ を測定す ることでタンパク質の溶出を観察した。カラムは Ribonuclease A (13.7 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Conalbumin (75 kDa), Aldolase (158 kDa), Ferritin (440 kDa), Thyroglobulin (669 kDa), Blue Dextran 2000 (GE Healthcare)で校正した。目的タン パク質の分配定数 K_{av} は以下の式(4-2)から求めた。

 $K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o)$ (4-2) V_e: elution volume, V_o: column void volume (V_e for Blue Dextran 2000), V_t: total bed volume

4-2-8 細胞内タンパク質のレドックス状態の解析

対数増殖期の培養液 10 mL を容量 15 mL のコニカルチューブに入れた。光条 件下または遮光条件下で 100%TCA 1 mL を添加し、細胞内のタンパク質のレド ックス状態を維持したまま変性した。氷上で 1 時間静置後、遠心分離(TOMY AR510-04、7,400 rpm (5,000×g)、5 分、0°C)により細胞および変性したタンパ ク質を回収した。上清を除去し、内容物をマイクロチューブに移した。再び遠心 分離(TOMY AR015-24、15,000 rpm (20,400×g)、15 分、0°C)を行ない、上清を 完全に除去した。続いてアセトンを用いて沈殿を洗浄し、得られた沈殿を 4 mM AMS を含む SDS サンプルバッファー100 µL に溶解した。遮光条件下、室温で 1 時間振とうすることでチオール基を十分に修飾後、遮光条件下、37℃で 2 時間 インキュベートした。95℃で 5 分間加熱後、遠心分離(TOMY AR015-24、15,000 rpm (20,400×g)、20 分、20°C)を行ない、得られた上清を回収した。上記操作で 得られたタンパク質を用いてイムノブロッティングを行なうことにより、各タ ンパク質の細胞内のレドックス状態を調べた。

4-3 結果

4-3-1 G6PDH と OpcA のレドックス応答

Anabaena 7120 において、G6PDH 活性が還元条件下で低下することは報告さ れているが、詳細な機構はこれまで明らかにされていなかった(Udvardy et al. 1984, Gleason 1996)。そこで、G6PDH 活性のレドックス制御を分子レベルで明ら かにするために、G6PDH と活性化因子 OpcA のどちらがレドックス応答するか を調べた。G6PDHの分子量は約 59,000 であり、分子内に 4 つの Cys 残基を持っ ている。OpcAの分子量は約51,000であり、9つのCys残基を持っている。G6PDH、 OpcA について、酸化処理または還元処理を行なった後にタンパク質のレドック ス状態を調べた。G6PDH については、酸化剤、還元剤を添加してもレドックス 状態に変化は無かった(図 4-1)。一方、OpcA は何も処理を行なわない条件下で は酸化型と還元型の両方で存在しているが、還元剤である DTT を添加するとす べての OpcA が還元型となり、酸化剤である STT を添加するとすべてが酸化型 となった(図 4-1)。また、酸化剤である CuCl₂ やジアミドを添加した条件下で は、酸化型に相当するバンド以外にも複数のバンドが見られた。CuCl2やジアミ ドにより OpcA が分解された可能性がある。以上の結果から、G6PDH ではなく OpcA がレドックス応答を示すことが明らかになった。また、OpcA は分子内に 1組以上のジスルフィド結合を持っていることが示された。

続いて、Trx から OpcA への還元力伝達を調べた。本実験では、Trx の還元剤 として 50 μ M DTT を使用した。 OpcA についてはあらかじめ STT を用いた酸化 処理を行なった。50 μ M DTT は OpcA のレドックス状態に影響を及ぼさなかっ たが、Trx-m1 または Trx-m2 存在下では OpcA が還元された(図 4-2)。Trx-m3 ま たは Trx-y の存在下でも、OpcA はわずかに還元された(図 4-2)。この結果より、 Trx-m1 と Trx-m2 は OpcA を効率よく還元できることが明らかになった。



図 4-1 G6PDH と OpcA のレドックス応答 Red: 還元型、Ox: 酸化型

2 µM G6PDH または OpcA を還元剤(50 mM DTT)または酸化剤(50 µM CuCl₂, 100 µM ジアミド, 25 µM STT)と混合し、30℃で 30 分間インキュベートした。タンパク質のレドックス状態を固定後、AMS でチオール基を修飾し、 非還元 SDS-PAGE を行なうことでタンパク質のレドックス状態を解析した。



図 4-2 Trx による OpcA の還元 Red: 還元型、Ox: 酸化型

2 µM OpcA、1 µM Trx、50 µM DTT を混合し、30℃で 10 分インキュベートした。OpcA のレドックス状態を固定後、AMS でチオール基を修飾し、非還元 SDS-PAGE を行なうことで OpcA のレドックス状態を解析した。 4-3-2 Trx による OpcA を介した G6PDH 活性のレドックス制御

Trx が G6PDH 活性に与える影響を調べた。Trx を含まない条件での活性をコ ントロールと表記した。還元型の Trx-m1 または Trx-m2 の存在下では、G6PDH 活性が著しく低下した(図 4-3)。これは、4-3-1 節で示した Trx-m1 と Trx-m2 は OpcA を効率よく還元できるという結果と一致している。Trx-m3 の存在下でも G6PDH 活性が低下したが、Trx-m1 または Trx-m2 存在下での活性と比較すると G6PDH 活性が高かった(図 4-3)。また、Trx-x、Trx-y、TrxC は G6PDH 活性に影 響を与えなかった。以上の結果から、Trx-m1 または Trx-m2 が OpcA を還元し、 G6PDH 活性の制御能を持つことが明らかになった。



図 4-3 Trx および OpcA 存在下での G6PDH 活性

5.9 nM G6PDH、30 nM OpcA を 50 mM Tris-HCI (pH 7.5)、50 mM NaCl、10 mM MgCl₂、20 mM G6P、50 µM DTT、15 nM Trx と混合し、30℃で 10 分間イ ンキュベートした。NADP⁺を添加することで反応を開始し、30℃における G6PDH 活性を測定した。平均値と標準偏差(n= 3-5)を示した。

4-3-3 OpcA のレドックス制御に重要な Cys の同定

OpcA は分子内に9 個の Cys を持っている。どの Cys が OpcA のレドックス制 御に重要であるのかを明らかにするために、還元型と酸化型の OpcA をそれぞ れトリプシン消化し、MALDI-TOF MS で分析した。酸化型および還元型 OpcA の MS スペクトル、ペプチドマップ、検出されたペプチドを図 4-4、表 4-2 に示 した。酸化型および還元型の OpcA の Sequence coverage はそれぞれ 38、52%で あった。還元型の OpcA でのみ、特異的なピーク (m/z 2499.131) が見られた(図 4-4 A)。これはトリプシン消化したペプチド Lys³⁷⁹-Arg⁴⁰¹の質量と一致した(図 4-4 B、表 4-2)。このペプチドには 3 つの Cys (Cys³⁸⁸, Cys³⁹³, Cys³⁹⁹)が含まれてい る(図 4-4 B、表 4-2)。これら Cys の内の 2 つがレドックス制御に重要な分子内 ジスルフィド結合を形成するものと予想した。

そこで、これら3つの Cys をそれぞれ Ser に置換した変異体 C388S, C393S, C399S 変異体を作製し、レドックス応答を調べた。C388S 変異体は何も処理を行なわない条件下では酸化型と還元型の両方で存在していたが、還元処理を行なうと WT と同様に還元型となった(図 4-5)。一方、C393S、C399S 変異体は顕著なレドックス応答を示さなかった(図 4-5)。

Cys³⁹³、Cys³⁹⁹の両方を Ser に置換した変異体 C393/399S 変異体を作製し、OpcA 変異体存在下での G6PDH 活性のレドックス応答を調べた。WT または C388S 変 異体の存在下では、酸化処理による活性の上昇、還元処理による活性の低下が観 察された(図 4-6)。一方、C393S、C399S、C393/399S 変異体の存在下では G6PDH 活性はレドックス応答を示さなかった(図 4-6)。以上の結果から、Cys³⁹³ と Cys³⁹⁹ が OpcA のレドックス制御に重要であることが明らかになった。





В

Α

図 4-4 OpcA のペプチドマッピング解析

(A) 還元型または酸化型 OpcA の MALDI-TOF MS スペクトル
 OpcA のチオール基をヨードアセトアミド(IAA)でアルキル化し、一部の
 OpcA について還元処理を行なった。OpcA のレドックス状態を固定後、チオール基を AMS で修飾した。非還元条件下で SDS-PAGE を行ない、酸化型のバンドを切り出した。ゲルを2つに分け、一方は何も処理を行なわず(Ox)、もう一方について還元処理を行なった後、IAA でチオール基を修飾した(Red)。ゲル内のタンパク質をトリプシン消化後、MALDI-TOF MS で分析した。還元型の OpcA のみで得られたペプチド由来のピークを矢印で示した。
 (B) OpcA のペプチドマップ

酸化型および還元型の両方で検出されたペプチドを下線で示した。還元型でのみ検出されたペプチドを赤色で示した。

22

	Peptid	e mass	Pontido fragmont ^c
	Observed ^a	Calculated ^b	replide llagment.
Ox	3473.810	3473.695	¹⁶ DISLNEIEAELNQIWQSYGITGEDGALPAATR ⁴⁷
	1107 075	4407 070	⁴⁸ ATTFTLVVYEPEETQYLLASLGFYNGPIDGIL
	4407.075	4407.279	GPQTETALR ⁸⁸
	3049.472	3048.453	²³⁵ LAAVCNNVIVDSCNFNEPESDLLSLQK ²⁶¹
	1581.837	1581.852	²⁶² LVETGVPLADLNWR ²⁷⁵
	1712.923	1712.936	³¹⁰ GNPAQALLFLGWLASR ³²⁵
	2532.501	2532.391	³⁵⁴ RVEAELAGVPVADVGDIVGDVIALR ³⁷⁸
	2376.250	2376.290	355VEAELAGVPVADVGDIVGDVIALR378
	2239.083	2238.161	439ESLFEESLALIGQVFQLGMK458
Red	3473.952	3473.695	¹⁶ DISLNEIEAELNQIWQSYGITGEDGALPAATR ⁴⁷
4488.060 4		1187 270	⁴⁸ ATTFTLVVYEPEETQYLLASLGFYNGPIDGIL
	4400.000	4407.279	GPQTETALR ⁸⁸
	1598.932	1598.892	¹⁵⁴ IIALFPIVGEDEGVK ¹⁶⁸
	3048.586	3048.453	²³⁵ LAAVCNNVIVDSCNFNEPESDLLSLQK ²⁶¹
	1581.898	1581.852	²⁶² LVETGVPLADLNWR ²⁷⁵
	1934.952	1934.901	277LAAWQELTAEAYDSPDR ²⁹³
	2091.048	2091.002	²⁷⁷ LAAWQELTAEAYDSPDRR ²⁹⁴
	1712.985	1712.936	³¹⁰ GNPAQALLFLGWLASR ³²⁵
	2984.746	2984.602	³¹⁰ GNPAQALLFLGWLASRLQWQPISYQK ³³⁵
	1289.712	1289.677	³²⁶ LQWQPISYQK ³³⁵
	2532.460	2532.391	³⁵⁴ RVEAELAGVPVADVGDIVGDVIALR ³⁷⁸
	2376.351	2376.290	³⁵⁵ VEAELAGVPVADVGDIVGDVIALR ³⁷⁸
	2499.131	2499.061	³⁷⁹ LSSTNPQANCGTVICSETGGCMR ⁴⁰¹
	2238.213	2238.161	439ESLFEESLALIGQVFQLGMK458

表 4-2 酸化型(Ox) または還元型(Red) OpcA の質量分析

a 質量分析により決められた分子量、b ペプチド配列から推定される分子量 還元型でのみ検出されたピークを赤色で示した。c 数字は OpcA のアミノ酸配 列における残基番号を示す。



図 4-5 OpcA Cys 変異体のレドックス応答 Red: 還元型、Ox: 酸化型

2 µM OpcA WT または Cys 変異体を 1 µM Trx-*m*1 および 50 µM DTT と混合 し、30[°]Cで 30 分間インキュベートした。OpcA のレドックス状態を固定後、 AMS でチオール基を修飾し、非還元 SDS-PAGE を行なうことでレドックス状 態を解析した。



図 4-6 OpcA WT または Cys 変異体存在下での G6PDH 活性のレドックス応答 OpcA WT または Cys 変異体の存在下で G6PDH 活性を測定した。何も処理を 行なわない条件下での活性を Control、50 µM STT を添加した条件下での活性 を Oxidized、10 mM DTT を添加した条件下での活性を Reduced と表記した。 測定は 3-5 回行ない、平均値と標準偏差を示した。

4-3-4 G6PDH と OpcA の相互作用

OpcA は G6PDH の活性化因子であるが、G6PDH と OpcA がどのようにして相 互作用しているのか未解明であった。そこで、G6PDH と OpcA が複合体を形成 するかをゲルろ過クロマトグラフィーで調べた。カラムの void volume (Vo)は 8.8 mL であった。G6PDH または OpcA を別々にカラムに導入したところ、単一の ピークが観察された(図 4-7 A)。G6PDH で観察されたピークを I、OpcA で観察 されたピークを II とした。ピーク I は分子量 440,000 – 669,000 の間に相当し、 G6PDH は 8 量体以上の複合体を形成していることが示された(図 4-7 D)。ピー ク II の分子量は約 60,000 に相当し、OpcA は単量体で存在していることが明ら かになった(図 4-7 D)。等モルの G6PDH と OpcA を混合し、室温で 10 分間イ ンキュベートした後にカラムに導入したところ、ピーク I のシグナルの上昇およ びピーク II のシグナルの低下が観察された(図 4-7 A)。溶出画分に含まれるタ ンパク質について SDS-PAGE を行なったところ、画分①についても OpcA に相 当するバンドが検出された(図 4-7 E)。これより、G6PDH と OpcA は分子量 440,000 – 669,000 の複合体を形成することが明らかになった。続いて、OpcA の レドックス状態が複合体の形成に影響を与えるかどうかを調べるために、 C393/399S 変異体およびあらかじめ Trx-m1 で還元処理を行なった OpcA を用い て同様の実験を行なった。Trx-m1 に相当するピークを III とした(図 4-7 C)。 C393S/399S 変異体、還元処理を行なった OpcA の両方が G6PDH と複合体を形 成した(図 4-7 B, C, E)。以上の結果から、OpcA は Cys³⁹³ と Cys³⁹⁹ のレドックス 状態に関係なく G6PDH と複合体を形成することがわかった。



図 4-7 OpcA と G6PDH による複合体の形成

(A)-(C) G6PDH(赤)、OpcA(青)、G6PDHとOpcAの混合物(黒)の 溶出プロファイル、(D) G6PDHとOpcAの分子量の算出に用いた検量線、(E) 溶出画分の電気泳動像。

カラムは、Thyroglobulin (*M*_r = 669,000)、Ferritin (*M*_r = 440,000)、Aldolase (*M*_r = 158,000)、Conalbumin (*M*_r = 75,000)、Ovalbumin (*M*_r = 44,000)、 Ribonuclease A (*M*_r = 13,700)で校正した。 4-3-5 OpcA のレドックス状態と G6PDH の速度論的パラメータの関係

OpcA のレドックス状態が速度論的パラメータに与える影響を調べた。還元条件下では s-v プロットがシグモイド型となったため、Hill の式を用いて速度論的パラメータを算出した(図 4-8)。酸化型の OpcA 存在下では、G6P に対する見かけの $K_m(S_{0.5})$ が 11.2±3.2 mM、還元型の OpcA 存在下では 31.4±2.6 mM であり、酸化型 OpcA の存在下では G6PDH の G6P に対する親和性が還元型の OpcA 存在下と比べて約 3 倍高いことが明らかになった(表 4-3)。一方、 V_{max} 値は OpcA のレドックス状態に影響されなかった(表 4-3)。以上の結果から、酸化型の OpcA のみが正のアロステリック因子として機能することが示された。



図 4-8 酸化型または還元型 OpcA 存在下における G6PDH 活性の G6P 濃度依存性

OpcA および 50 µM STT または 10 mM DTT 存在下で G6PDH 活性を測定し、 G6PDH 活性の G6P に対する濃度依存性を調べた。50 µM STT 添加条件下での 活性を Oxidized、10 mM DTT 添加条件下での活性を Reduced と表記した。測 定は 3 回行ない、平均値と標準偏差を示した。Hill の式にフィッティングする ことで G6PDH の速度論的パラメータを求めた。

表 4-3 酸化型または還元型 OpcA 存在下での G6PDH の速度論的パラメータ So 5: G6P に対する見かけの Km 値、Vmax: 最大反応速度、n: ヒル係数

OpcA のレドックス状態	S _{0.5} (mM)	V _{max} (U/mg-G6PDH)	n (-)
酸化型	11.2±3.2	99.9±8.6	1.5±0.2
還元型	31.4±2.6	103.0±7.0	4.2±1.1

4-3-6 細胞内の OpcA のレドックス状態

生化学解析により Trx-m1 と Trx-m2 が効率よく OpcA を還元することを明ら かにすることができたので、実際に細胞内でこれら Trx から OpcA へ還元力が伝 達しているかを調べた。野生株、ΔtrxM1 株、ΔtrxM2 株を硝酸添加条件下および 窒素欠乏条件下で培養し、培養 1 日目と 3 日目の OpcA のレドックス状態を調 べた。光条件下で細胞内のレドックス状態を固定したままタンパク質を抽出後、 チオール基を AMS で修飾し、Anabaena 7120 の OpcA 組換え体を抗原として作 製した抗体を用いてイムノブロッティングを行なった。硝酸添加条件下、光照射 下で培養した野生株と ΔtrxM2 株では、OpcA のほとんどが還元型で存在してい た (図 4-9, lanes 1, 3)。一方、ΔtrxM1 株では一部が酸化されていた (図 4-9, lane 2)。これより、細胞内では Trx-m1 が主に OpcA を還元していると考えられる。 興味深いことに、窒素欠乏条件下で培養した野生株と ΔtrxM2 株では、光照射下 であるにもかかわらず、OpcA の半分以上が酸化型で存在していた(図 4-9, lanes 4,6,7,9)。したがって、窒素欠乏により細胞内のレドックスバランスが大きく変 化したと考えられる。野生株および ΔtrxM2 株とは対照的に、ΔtrxM1 株では窒素 欠乏条件下であっても OpcA は還元型で存在していた(図 4-9, lanes 5, 8)。



図 4-9 野生株、Δ*trxM1* 株、Δ*trxM2* 株における細胞内の OpcA の レドックス状態

Red: 還元型、Ox: 酸化型

硝酸添加条件下(+N)または窒素欠乏条件下(-N)で培養した細胞から、光条 件下(30 µmol photons m⁻² s⁻¹)でレドックス状態を固定したままタンパク質を 抽出した。タンパク質のチオール基を AMS で修飾後、抗 OpcA 抗体を用いたイ ムノブロッティングを行なった。1 レーンあたりタンパク質 20 µg をロードし た。

4-4 考察

これまでの報告で、窒素固定型、ヘテロシスト形成型シアノバクテリアの G6PDH または OpcA をコードする遺伝子を破壊すると、窒素欠乏条件下で生育 できないことが報告されている(Summers et al. 1995)。したがって、G6PDH に よる還元力の生産は、窒素欠乏条件下での生育に必須であるといえる。先行研究 で Anabaena 7120 の G6PDH がレドックス制御を受けていることが報告された が、詳細な機構は明らかになっていなかった(Udvardy et al. 1984; Gleason 1996)。 本研究では、G6PDH のレドックス制御の分子機構を調べ、Trx-m1 が活性化因子 OpcA のレドックス状態を変えることで G6PDH 活性を調節していることが明ら かになった。また、OpcA のレドックス制御に重要な Cys も同定した。さらに、 細胞内の OpcA のレドックス状態を調べたところ、窒素欠乏条件下では光照射 下であっても OpcA が酸化型で存在していることが明らかになった。

ジャガイモの葉緑体の G6PDH では、Cys¹⁴⁹ と Cys¹⁵⁷ がレドックス制御に重要 な分子内ジスルフィド結合を形成することが報告されている(Wenderoth et al. 1997)。これらの Cys は NADP⁺結合ドメインを含む N 末端に存在する。これら Cys¹⁴⁹ と Cys¹⁵⁷ の間でジスルフィド結合が形成されることにより、G6P が効率よ く結合するようになると考えられている。さらに、ジスルフィド結合の形成によ り G6P 結合ドメインと NADP⁺結合ドメインの距離が変化すると考えられている (Wenderoth et al. 1997)。図 4-10 に示すように、これらの Cys は植物葉緑体の G6PDH には保存されているが、シアノバクテリアには保存されていない (Wendt et al. 1999)。そこで、本研究では植物葉緑体の G6PDH とシアノバクテリアの G6PDH は異なる機構でレドックス制御を受けていると予想した。

本研究により、シアノバクテリア Anabaena 7120 では OpcA のレドックス状態 により G6PDH 活性が調節されていることが明らかになった。Trx-m1 または m2 により OpcA が還元されている条件下では、G6PDH 活性は OpcA 非存在下での 活性と同程度であった (図 4-3)。したがって、還元型の OpcA は活性因子として 機能しないと考えられる。同様の結果は Nostoc punctiforme ATCC 29133 でも報告 されている (Hagen and Meeks. 2001)。さらに、質量分析と OpcA の Cys 変異体 を用いた解析により Cys³⁹³ と Cys³⁹⁹ が OpcA のレドックス応答に重要であるこ とが明らかになった。しかし、C393S、C399S 変異体でもチオール基修飾による わずかなバンドシフトが見られた (図 4-5)。さらに、Trx から OpcA への還元力 伝達を調べたところ、部分的に還元された OpcA が見られた (図 4-2)。以上の結 果から、OpcA は Cys³⁹³ と Cys³⁹⁹ 以外にもレドックス応答を示す Cys を持ってい ると考えられる。

本研究で m型の Trx が OpcA を効率よく還元することが明らかになった。Trxmは Arabidopsis thaliana でも葉緑体型 G6PDH を効率よく還元することが報告さ れている(Nee et al. 2009)。制御機構は異なるが、植物葉緑体とシアノバクテリ アでは Trx-m が酸化的ペントースリン酸経路の光依存的な制御に重要だと考え られる。生化学実験により Trx-m2 は Trx-m1 と同様に OpcA を効率よく還元する ことが示されたが、硝酸添加条件下の $\Delta trxM2$ 株では OpcA のほとんどが還元型 で存在していた(図 4-9 lane 3)。これは、Trx-m1 の細胞内での発現量が Trx-m2 より高く、Trx-m1 が Trx-m2 の欠損を補っているためだと考えられる。trxM2 の 転写は H₂O₂ 処理条件下で上昇することが報告されていることから、Trx-m2 は酸 化ストレス条件下での標的の還元に重要な役割を果たしている可能性がある

(Ehira and Ohmori 2012)_o

これまで native PAGE および共免疫沈降法により、N. punctiforme の G6PDH と OpcA の相互作用が調べられた。N. punctiforme から抽出したタンパク質につい て native PAGE を行なった後、抗 G6PDH 抗体または抗 OpcA 抗体を用いたイム ノブロッティングが行なわれたが、G6PDH と OpcA は別々のバンドとして検出 された (Hagen and Meeks 2001)。さらに、N. punctiforme から抽出したタンパク 質について、抗 G6PDH 抗体または抗 OpcA 抗体を用いた免疫沈降が行なわれた が、これらのタンパク質は共免疫沈降しなかった(Hagen and Meeks 2001)。以上 のように、これまでの実験手法では、G6PDH と OpcA の相互作用は検出されな かった。G6PDH と OpcA の相互作用は非常に弱いために、上記の手法では検出 できなかったものと考えられる。そこで、本研究ではゲルろ過クロマトグラフィ ーにより G6PDH と OpcA が複合体を形成するかどうかを調べた。正確な分子量 や G6PDH と OpcA のモル比を明らかにすることはできなかったが、G6PDH と OpcA はヘテロオリゴマーを形成することが明らかになった(図 4-7 A, E)。さら に、ヘテロオリゴマーの形成は OpcA のレドックス状態に依存しないことが明 らかになった(図 4-7 B, C, E)。OpcA の酸化が G6PDH の構造変化を引き起こし、 G6P に対する親和性が上昇するため G6PDH 活性が上昇すると考えられる。ま た、OpcAの変異体もWTと同様にG6PDHと複合体を形成したことから、OpcA の Cys の Ser への置換はタンパク質の安定性や構造に大きな影響を与えないと 考えられる。今後、G6PDH と OpcA が生体内でもヘテロオリゴマーを形成して いるかどうかを調べるために、細胞からのタンパク質抽出液を用いて同様の実 験を行なう必要がある。また、図 4-7E に示すように、溶出体積 9.6-11.8 mL の 画分において OpcA が検出されたが、これは OpcA がキャリーオーバーしている 可能性がある(図 4-7 E)。今後、OpcA のみを導入した際に溶出体積 9.6 – 11.8 mL の画分において OpcA が検出されるかどうかを確かめる必要がある。また、 複合体における G6PDH と OpcA のモル比や、OpcA のレドックス状態の変化が 複合体の構造に与える影響を明らかにするために、複合体の結晶構造を解明す る必要がある。

Anabaena 7120 とその近縁種である N. punctiforme では、DTT と Trx の存在下 で G6PDH 活性が低下することが報告されている (Udvardy et al. 1984; Gleason 1996; Hagen and Meeks 2001)。これは、光条件下で窒素固定が行なわれているに もかかわらず、G6PDHはNitrogenaseに還元力を供給できていないことを示して いる。しかし、細胞内の OpcA のレドックス状態を調べたところ、窒素欠乏条件 下では光条件下であるにもかかわらず、半分以上の OpcA が酸化型で存在して いた(図 4-9 lanes 4, 7)。これまでの研究で、G6PDHと OpcA をコードする遺伝 子の転写レベルが窒素欠乏条件下で上昇し、G6PDH と OpcA はヘテロシストで 多く発現していることが報告されている (Summers and Meeks 1996; Stensjö et al. 2007; Ow et al. 2008)。本研究で得られた結果と上記の報告から、ヘテロシストで は OpcA が酸化されており、G6PDH が光条件下であっても活性を維持している ものと考えられる (図 4-11)。N. punctiforme では、opcA, G6PDH をコードする zwf の破壊株が窒素欠乏条件下で生育できないことから、G6PDH による還元力の生 産は必須であるといえる(Summers et al. 1995)。本研究で明らかになった光に依 存しない OpcA のレドックス制御が、Anabaena 7120 の光条件下での窒素固定を 可能にしているものと考えられる。

硝酸添加条件下の $\Delta trxM1$ 株では、OpcAの一部が酸化されていた(図 4-9 lane 2)。 $\Delta trxM1$ 株は硝酸添加条件下でもわずかにヘテロシストを形成するため、Trxm1からの還元力不足だけでなく、わずかなヘテロシストの形成もOpcAのレド ックス状態に影響を与えている可能性がある。興味深いことに、窒素欠乏条件下 の野生株と $\Delta trxM2$ 株では半分以上のOpcAが酸化型で存在しているにも関わら ず、 $\Delta trxMI$ 株では還元されていた(図 4-9 lanes 5,8)。したがって、Trx-m1 は窒 素欠乏条件下ではOpcAの酸化にも関与していると考えられる。また、OpcA が 還元されており、G6PDH 活性が低下していることが $\Delta trxM1$ 株が窒素欠乏条件 下で生育阻害を示した理由の1つであると考えられる。

本章では、Trx-m1 が OpcA を還元することで G6PDH 活性を抑制していること が明らかになった。図 4-12 において赤色で示したように、ほとんどのシアノバ クテリアの OpcA で Cys³⁹³、Cys³⁹⁹ が保存されていることから、OpcA を介した G6PDH のレドックス制御はシアノバクテリアで共通の機構であると考えられる。 *N. punctiforme と Synechocystis* sp. PCC 6803 では、OpcA が存在しない条件では G6PDH 活性がレドックス応答を示さなかったという報告が上記の仮説を支持す る (Hagen and Meeks 2001; Guo et al. 2014)。活性化因子 OpcA は、シアノバクテ リアと放線菌にしか存在しない。しかし、アミノ酸配列の相同性は低く、放線菌 の OpcA にはレドックス制御を受ける Cys も保存されていない (図 4-12)。すな わち、本章で明らかにした Trx が OpcA を介して G6PDH 活性を間接的に制御す るというシステムは、シアノバクテリアに特有であると考えられる。また、*in vivo* の解析により硝酸添加条件下と窒素欠乏条件下ではレドックス制御システムが 異なることが明らかになった。硝酸添加条件下と窒素欠乏条件下でのレドック ス制御システムの違いが、光条件下で窒素固定を行なうことに重要であると考 えられる。

MATHSMI IPSPSSSSSLATAASPFKETLPLFSRSLTFPRKSLFSOVRLRFFAEK HSOLDTSNGCATNFASL ODSGDOL TEEHVTKGESTLS ITVVGASGDLAKKKI FPALFALF 115 MGVOLRLNPCSSSSSAATSPSTFHNGTPYFCKKFNFLPFRTOPLNWVSGI YSRI OPRK HFEVFSSNGFPLNAVSVODVOVPL TELGSGDTTVSI TVI GASGDLAKKKI LPALFALF 115 	YEGCL-PODFSVFGYRTKLTHEELRDMISSTLTCRIDGREKCGDKMEOFLKRCFYHSGO YNSEEDFAELNKKLKEKEAGKISNRLYYLSIPPNIFVDVVRCASLRASSENG 226 YEDCL-PENFVVFGYSRTKLSDEELRNMISTTLTCRIDKRENCDAKMEHFLERCFYHSGO YNSEDDFAELDYKLKEKEGCRVSNRLFYLSIPPNIFVDVVRCASLKASSTSG 226 RERRI-PPETTIVGVARREWSHEYFREOMOKGMEEA-HSSVELGELWODFSOGLFYCPGD IDNPESYOKLKNILSELDEKRGTRGNRMFYLSVAPNFFPEAIKOLGGAGMLDDPY 159 RERRL-PPELTVVGFARRDWSHDHFREOMRKGIEEF-STGIGSEDLWNEFAOGLFYCSGN MDDPESYLKLKNFLGELDEKRNTRGNRMFYLAVSPNFFPGIKOLGAAGMLSDPV 159	WTRVIVEKPFGRDSESSGELTRCLKOYLTEE0IFRIDHYLGKELVENLSVLRFSNLVFEPLWSRNYIRNVOLIFSEDFGTEGRGGYFDQYGIIRDIMONHLLQILALFAMETPVSLDAED346 WTRVIVEKPFGRDLESSSELTRSLKKYLTEE0IFRIDHYLGKELVENLSVLRFSNLVFEPLWSRNYIRNVOFIFSEDFGTEGRGGYFDHYGIIRDIMONHLLQILALFAMETPVSLDAED346 KHRLVIEKPFGRDLASAOSLNAVVOKYCKEHOVYRIDHYLGKETVONLLVFRFANAIFEPLWNROFVDHVOITVAETVGVEDRAGYYEKAGALRDMLONHLMOLYCLTAMEAPNSMDADS279 KSRIVIEKPFGRDLSSAOSLNRVVOSVCKENQVYRIDHYLGKETVONLMVFRFANAIFEPLWNROFVDHVOITVAETVGVEERAGYYESAGALRDMLONHLMOLYCLTAMEAPNSMDADS279	IRSEKVKVLRSMKPLR——LEDVVVGOYKGHNKGGKTYPGYTDDPTVPNHSLTPTFAAA AMFINNARWDGVPFLMKAGKALHTRGAEIRVOFRHVPGNLYKKSFATNLDNATNELVIRV 462 IRNEKVKVLRSMRPLQ——LEDVVLGOYKGHSNGAKSYPAYTDDPTVPNGSITPTFSAA ALFIDNARWDGVPFLMKAGKALHTKRAEIRVOFRHVPGNLYKRNFGTDMDKATNELVIRV 462 IRTEKVKVLOATRLADVHNLSRSAIRGOYSAGWMKGOQVPGYRTEPGVDPNSSTTPTFAAL KLNVDNWRWOGVPFYLRTGKRMPKKVSEISIHFRDVPSRMFOS—AAOQRN-ANILAMRI 396 IRNEKVKVLOATRLADVHNLENAGIRGOYKAGWMGGKPVPGYREEPGVDPSSTTPTFAAL KLNVDNWRWOGVPFYLRTGKRMPKKVSEIAIOFROVPLLIFQS—VAHOAN-PNVLSLRI 396	<pre>OPDEGIYLRINNKVPGLGMRLDRSDLNLLYRSRYP-REIPDAYERLLLDAIEGERRLFIR SDELDAAWDLFTPALKELEE—KKIIPELYPYGSRGPVGAHYLASKYN—VRWGDLGEA- 576 OPDEAIYLKINNKVPGLGMRLDRSDLNLLYKAKYR-GEIPDAYERLLLDAIEGERRLFIR SDELDAAWALFTPLLKELEE—KKIAPELYPYGSRGPVGAHYLASKYN—VRWGDLGEA- 576 OPDEAIYLKINNKVPGLGMRLDRSDLNLLYKAKYR-GEIPDAYERLLLDAIEGERRLFIR SDELDAAWALFTPLLKELEE—KKIAPELYPYGSRGPVGAHYLASKYN—VRWGDLSGDD 577 OPDEGISLRFDVKMPGAEFRTRSVDMDFSYG-SFGIEATSDAYDRLFLDCMMGDOTLFTR ADEVEAAWOVTPALSVWDSPADPATIPOYEAGTWEPAEAEFLINODG—RRWRRL 509 OPNEGISLRFEAKMPGSELRTRTVDMDFSYGSSFGVAAA-DAYHRLLLDCMLGDOTLFTR ADEVEEAWRVVTPVLSAWDAPSDPLSMPLYEAGTWEPAEAEWLINKDG—RRWRRL 509 OPNEGISLRFEAKMPGSELRTRTVDMDFSYGSSFGVAAA-DAYHRLLLDCMLGDOTLFTR ADEVEEAWRVVTPVLSAWDAPSDPLSMPLYEAGTWEPAEAEWLINKDG—RRWRRL 509 OPNEGISLRFEAKMPGSELRTRTVDMDFSYGSSFGVAAA-DAYHRLLLDCMLGDOTLFTR ADEVEEAWRVVTPVLSAWDAPSDPLSMPLYEAGTWEPAEAEWLINKDG—RRWRRL 509 OPNEGISLRFEAKMPGSELRTRTVDMDFSYGSSFGVAAA-DAYHRLLLDCMLGDOTLFTR ADEVEEAWRVVTPVLSAWDAPSDPLSMPLYEAGTWEPAEAEWLINKDG—RRWRRL 509</pre>	
Arabidopsis	Arabidopsis	Arabidopsis	Arabidopsis	Arabidopsis	
Potato	Potato	Potato	Petato	Potato	
Anab	Anab	Anab	Anab	Anab	
Syn	Syn	Syn	Syn	Syn	

図 4-10 植物葉緑体とシアノバクテリアの G6PDH のシーケンスアライメント 葉緑体の G6PDH のレドックス応答に重要な Cys を赤で示した。 Anab: Anabaena sp. PCC 7120, Syn: Synechocystis sp. PCC 6803



図 4-11 本章の結果から予想される OpcA のレドックス制御システム OPPP:酸化的ペントースリン酸経路

b	b ATPETIAKLREEFVKROGNSANGDANGSTSYAYSSST-SPRIADEIALRNPCRIIALFPI VGEDEGVKAQVSAYCPIOKOSSSTLICCEYITLSGTATALERIGGMIPALLIGGLF ATOETLTILREEFAKGORGGTGGEHAIAGLNSG-SPRIADEIALRNPCRIIALFPI TGEDEGVKAQVSAYCPIOKOSSSTLICCEYITLSGTAAALERIGGMIPALLIGGLF SSPEFKOALOTAFETAHREGNLLSTAERITKPYSPDLEGSGIADTIAASNPCRIITLCPT AEDDOGVOAQLSAYCPIOKTHONTLICCEYITLRGTSDALERIGGVITELMLPTLF O PDSATFKALROAYOALK	b WKATPDPNNILFKRLAAVCNNVIVDSCNFNEPESDLLSLOKLVETGVPLADLNWRRLAAW QELTAEAYDSPDRRAALGDIDRVTIDYEKGNPAQALLFLGWLASRLOWOPISYOKDS N WKATPDPNNGLFKRLAAICNNVIVDSCNFNEPESDLLRLEELVEAGVPLADLNWRRLASW QELTAEAYDSPKRRAALREIDRVTIDYEKGNPAQALLFLGWLASRLEWOPVSYOKES WKASPEAEYGLFQRLLSHADMIIVDSSIFNNPEQDLLQLAQLVNKPEAIADLNWSRLAPW QELTAEAFDPPERRSAVGEIDQISIDYEKGNHAQALMYLGWVASRLOWTPVSYSYOF O WKATPNPEQLLFQQLANSCNCMIFDSSYFSDPEAEFLRFQDLIDQETYIADLNWHRLAAW QELTAAAFDPPERRSAVGEIDQISIDYEKGNPAQALMYLGWVASRLGWQPVSYRCEG I WPVD-APEVPSKDPLGALAQRRITDLYAVENPLDVLRARVRSYAPGDTDLAWTRLTPW RSMLAAALDQARVEVTSAAVEAEDNPAELLAR-WLEARLGVT	b DITRIHFUNDDØKRVEAELAGVPVADVGDIVGDVIALRLSSTNPQANCGTVICSETGGCM RMETHGGAQAAGLFOQVSSLSEQKAEALLSOQVORWGRESLFEESLALIGQVFOLGM DITRIHFISQDOROVEAELAGVPVADVGDIIGDLIALRLSSTNPQADCGTVICSETGGCM RMETHGGAQSAGLFOQVTSLSEQKAEALLSOQVORWGRESLFEESLGVTANIFKLAN EIHKIOFCAPNORPIEAELAGLPLADTGQVLGDLISLKLGSTNTQAQCGTVLCSGTVGCM RMEAGGGAQNV-RVQQVTALDDQNTEQLLGRQLORWGRESLFEESLGVTANIFKLAN DLR0IEFRTEDDRMVKVELAGIPVGDPGLVLGDLIALRLTSENPDADCGTVLCSGTVGCM RMEAGGGAQNV-RVQQVTALDDQNTEQLLGRQLORWGRESLFEESLAVIAVALRORI DLR0IEFRTEDDRMVKVELAGIPVGDPGLVLGDLIALRLTSENPDADCCTILCSETTGCM RMEAGGGAQSC-RTEQVAPPSNETSESLLAMQMORWGRALYEESLAVIAVALRORI i
Ang	Ang	Ang	Spr
Syr	Syn	Syn	Syn
Sel	Sel	Sel	Sgr
Sgr	Sgr	Sgr	Sgr

Anab: Anabaena sp. PCC 7120, Npun: Nostoc punctiforme ATCC 29133, Syn: Synechocystis sp. PCC 6803, Selo: Synechococcus elongatus PCC 7942, Sgri: Streptomyces griseus IFO 13350 (放線菌) Cys を灰色で示し、本研究で同定したレドックス応答に重要な Cys を赤色で示した。

図 4-12 シアノバクテリアと放線菌の OpcA のシーケンスアライメント

第5章 ヘテロシストにおけるレドックス制御システムの解明

本章の概要

これまでの研究で、栄養細胞とヘテロシストを含めた細胞全体のレドックス 制御システムを調べ、Trx は光照射に応じて還元されることが明らかになった。 しかし、Trx の標的の1つである OpcA は、光照射下であるにもかかわらず、窒 素欠乏条件下では大部分が酸化されていた。OpcA は栄養細胞とヘテロシストの 両方で発現しており、窒素固定を行なうヘテロシストでは G6PDH 活性を維持す るために光照射下であっても OpcA は酸化型で存在していると考えられる。そ こで、本章ではヘテロシストのレドックス制御システムを明らかにすることを 目的として研究を行なった。

栄養細胞とヘテロシストにおける標的のレドックス状態を別々に調べたところ、光条件下、窒素欠乏条件下の栄養細胞では標的が還元されている一方で、ヘテロシストでは一部が酸化されていることが明らかになった。以上の結果から、ヘテロシストでは標的への還元力伝達効率が低下し、OpcAのような標的が一部酸化型で存在していると結論した。すなわち、栄養細胞とヘテロシストのレドックス制御システムの違いにより、光条件下であってもヘテロシストでG6PDH活性を維持することが可能となり、窒素固定に必要な還元力が生産されるため、 Anabaena 7120 は光条件下で窒素固定を行なうことができると考えられる。

第6章 総括・今後の展望

6-1 総括

窒素固定型シアノバクテリア Anabaena 7120 のレドックス制御は、光条件だけではなく窒素条件の変化への応答にも関与していると考え、本研究では Anabaena 7120 のレドックス制御システムの解明を目的として研究を行なった。

まず、レドックス制御が窒素固定に関与しているかどうかを明らかにするために、Trx 破壊株を作製して窒素欠乏条件下での生育に与える影響を調べた。 $\Delta trxMI$ 株、 $\Delta trxM2$ 株、 $\Delta trxM3$ 株、 $\Delta trxX$ 株、 $\Delta trxY$ 株、 $\Delta trxC$ 株、 $\Delta ftrC$ 株、 Δntr 株を 作製し、硝酸添加条件下で培養したところ、野生株と Trx 破壊株の生育に大きな 差異は見られなかった。一方、窒素欠乏条件下では、 $\Delta trxMI$ 株が著しい生育阻 害を示した。以上の結果から、レドックス制御は窒素固定に関与しており、Trxm1 は窒素欠乏条件下での生育に重要な役割を果たしていると結論した。

次に、Trx が光条件以外にも応答するかどうかを明らかにするために、Trx への還元力伝達経路を調べた。Anabaena 7120 は FTR、8 種の Trx に加え、植物葉緑体にはない NTR を持っている。FTR は光依存的に還元された Fd から還元力を受け取り、Trx を還元する。一方、NTR は NADPH を還元力として Trx を還元するため、光照射に依存することなく Trx を還元できる可能性を持っている。そこで、生化学解析によりタンパク質間の還元力伝達を調べたところ、ほとんどの Trx が FTR から還元されることが明らかになった。Alr2205 のみが NTR により還元されたが、Alr2205 と NTR は細胞内でタンパク質として検出されなかった。従って、細胞内で発現している Trx は、すべて FTR により光依存的に還元されていると考えられる。以上の結果から、Anabaena 7120 でも Trx は光依存的に標的を還元していると結論した。

さらに、窒素条件の違いが Trx の標的のレドックス状態に与える影響を調べた。酸化的ペントースリン酸経路において、G6P と NADP⁺から 6-ホスホグルコ ノラクトンと NADPH を生成する反応を触媒する G6PDH に注目し、G6PDH の レドックス制御機構を調べた。G6PDH は、窒素固定に必要な還元力 NADPH の 生成に重要な役割を果たす。これまでの研究で、G6PDH 活性がレドックス制御 されており還元条件下で低下することは報告されていたが、その詳細な機構は 明らかになっていなかった。まず、生化学実験により G6PDH のレドックス制御 機構を調べ、G6PDH 活性は活性化因子である OpcA が Trx-m1 に還元されること で低下することが明らかになった(図 4-1、4-2、4-3)。続いて、細胞内の OpcA のレドックス状態を調べ、光条件下および硝酸添加条件下では OpcA が還元さ れているが、窒素欠乏条件下では光条件下であっても OpcA のほとんどが酸化 されていることが明らかになった(図 4-9)。以上の結果から、Trx の標的のレド ックス状態は、光条件だけでなく窒素条件によっても変化すると結論した。

最後に、ヘテロシストのレドックス制御システムを調べた。Nitrogenase に還 元力を供給するため、ヘテロシストでは光条件下であっても OpcA が酸化型で 存在し、G6PDH が活性を維持していると考えられる。そこで、栄養細胞とヘテ ロシストにおける Trx の標的のレドックス状態を別々に調べたところ、光条件 下、窒素欠乏条件下の栄養細胞では標的が還元されているが、ヘテロシストでは 半分以上が酸化されていることが明らかになった。以上の結果から、ヘテロシス トでは標的への還元力伝達効率が低下するため、光条件下であっても標的は酸 化されていると結論した。

本研究により、Anabaena 7120 では Trx は光照射に応じて標的を還元するが、 窒素条件にも応じて標的のレドックス状態を調節していることが明らかになった。

6-2 今後の展望

6-2-1 標的の探索

本研究により、シアノバクテリアでは、OpcA のような植物葉緑体には存在し ないタンパク質がレドックス制御を受けていることが明らかになった。しかし、 植物葉緑体に比べ、シアノバクテリアで同定されている Trx の標的は少ない。こ れまでの研究で、シアノバクテリアの Trx の標的を同定するために、Trx アフィ ニティークロマトグラフィーやレドックスプロテオームにより標的の網羅的探 索が行なわれている (Lindahl and Florencio 2003; Pérez-Pérez et al. 2006; Pérez-Pérez et al. 2009; Guo et al. 2014; Nomata et al. 2015)。しかし、このような網羅的探索で 同定されたタンパク質の中には、実際には Trx の標的ではないタンパク質も多 く含まれているため、生化学解析によりタンパク質間の還元力伝達を調べる必 要がある。一部について、生化学解析が行なわれているが、生化学解析が行なわ れていない標的候補が多数残されている(Lindahl and Florencio 2003; Tsukamoto et al. 2013; Guo et al. 2014; Nomata et al. 2015)。このため、今後、これらの組換え 体タンパク質を作製し、生化学実験により Trx からの還元力伝達を調べる必要 がある。また、生化学解析で E. coli や他の生物由来の Trx を用いている場合が あるが、生物種や細胞小器官によって Trx のサブタイプや Trx によって制御され ている標的が異なるため、シアノバクテリア由来の Trx と標的タンパク質の組 換え体を用いて検証し直す必要がある。

6-2-2 標的の酸化機構の解明

最近、Arabidopsis thaliana では、暗条件下で Trx-like2 というタンパク質が Trx の標的を酸化していることが明らかになった(Yoshida et al. 2018)。Trx-like2 は Trx に類似した活性部位 WCRKC を持っており、Trx よりも中間酸化還元電位が 高いため、Trx と同程度の中間酸化還元電位を示す標的を酸化することができる。 生化学解析により、Trx-like2 が標的から還元力を受けとり、2-Cys peroxiredoxin を介して H₂O₂ へと還元力を伝達することが明らかになっている (Yoshida et al. 2018)。加えて、Trx-like2 と同様の性質を持つ Atypical cystein histidine-rich Trxs も標的を酸化する可能性が示されている(Eliyahu et al. 2015)。このような Trx に 類似したタンパク質は、陸上植物や緑藻で保存されているが、シアノバクテリア には保存されていない(Chibani et al. 2009)。また、シアノバクテリアにも WCXXC モチーフを持つタンパク質が保存されているが、これは HCF164 のオルソログ であると考えられている(Lennartz et al. 2001)。HCF164 は膜貫通タンパク質で あり、チラコイドルーメン側に活性部位を持っているため、標的の酸化因子では ないと考えられる(Lennartz et al. 2001; Motohashi and Hisabori 2006)。したがっ て、シアノバクテリアではH2O2のような低分子やTrx が標的の酸化を行なって いると予想される。Trx-x は Trx の中で比較的中間酸化還元電位が高く、暗条件 下でも約半分が還元されていたため、標的から還元力を受け取っている可能性 がある(図 3-12)。今後、シアノバクテリアのTrxの標的の中間酸化還元電位や、 標的から H2O2や Trx への還元力伝達を生化学的に調べることにより、シアノバ クテリアにおける標的の酸化機構を明らかにできるものと考えられる。加えて、 暗条件下で野生株と Trx 破壊株で標的の酸化速度を比較し、Trx が標的の酸化に 関わる可能性について調べる必要があるであろう。

6-2-3 レドックス制御システムが光合成電子伝達系に与える影響の解明

Anabaena 7120 の ΔtrxM1 株は、弱光条件下で培養した場合にも、野生株に比 ベてフィコビリンタンパク質量が低く、強光条件下で培養したときと類似した 表現型を示すことが明らかになっている (Deschoenmaeker et al. 2018)。Trx は FTR を介して Fd により還元され、Peroxiredoxin などの酵素へ継続的に還元力を供給 するため、光化学系 I の下流の電子伝達を担っているタンパク質の1つであると いえる。ΔtrxM1 株では、Trx-m1 の欠損により還元力を十分に消去できず、光合 成電子伝達系が還元的となり、強光ストレス応答を引き起こしている可能性が ある。植物葉緑体では、還元力消去機構として、Trx/Peroxiredoxin の経路の他に 抗酸化剤であるアスコルビン酸を介した巧みな還元力消去ネットワークが存在 することが明らかになっている (Asada 2000)。シアノバクテリアでは上記のネ ットワークが存在しないため、Trx が還元力の消去系としても重要な役割を担っ ている可能性がある。Trx 破壊株や過剰発現株について生理学的・分光学的解析 を行ない、シアノバクテリアにおける Trx が光合成電子伝達活性や光合成電子 伝達鎖の酸化還元レベルに与える影響を調べることで、今後、光合成生物の進化 の過程で Trx の役割がどのように変化していったかについて重要な情報が得ら れるものと期待される。

- Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796.
- Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Üstün, Ş., Melzer, M., Petersen, K., Lein, W., and Börnke, F. (2010). Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*, tpc-109.
- Asada, K. (2000). The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. Philos. Trans.R. Soc. Lond. B: *Biol. Sci.*, 355(1402), 1419-1431.
- Buchanan, B. B. (1980). Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31, 341–374.
- Chibani, K., Tarrago, L., Schürmann, P., Jacquot, J. P., and Rouhier, N. (2011). Biochemical properties of poplar thioredoxin *z. FEBS Lett.*, 585(7), 1077-1081.
- Chibani, K., Wingsle, G., Jacquot, J. P., Gelhaye, E., and Rouhier, N. (2009). Comparative genomic study of the thioredoxin family in photosynthetic organisms with emphasis on Populus trichocarpa. *Mol. Plant*, 2(2), 308-322.
- Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Marchand, C., Hirasawa, M., Lancelin, J. M., Knaff, D.
 B., and Miginiac-Maslow, M. (2003). The *Arabidopsis* plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. *J. Biol. Chem.*, 278(26), 23747-23752.
- Collin, V., Lamkemeyer, P., Miginiac-Maslow, M., Hirasawa, M., Knaff, D. B., Dietz, K. J., and Issakidis-Bourguet, E. (2004). Characterization of plastidial thioredoxins from *Arabidopsis* belonging to the new *y*-type. *Plant Physiol.*, 136(4), 4088-4095.
- Cumino, A. C., Marcozzi, C., Barreiro, R., and Salerno, G. L. (2007). Carbon cycling in *Anabaena* sp. PCC 7120. Sucrose synthesis in the heterocysts and possible role in nitrogen fixation. *Plant Physiol.*, 143(3), 1385-1397.
- Deschoenmaeker, F., Mihara, S., Niwa, T., Taguchi, H., Wakabayashi, K. I., and Hisabori, T. (2018). The absence of thioredoxin m1 and thioredoxin C in *Anabaena* sp. PCC 7120 leads to oxidative stress. *Plant Cell Physiol.*, 59(12), 2432-2441.
- Dietz, K. J. (2003). Plant peroxiredoxins. Annu. Rev. Plant Biol., 54(1), 93-107.
- Ehira, S., and Ohmori, M. (2012). The redox-sensing transcriptional regulator RexT controls expression of Thioredoxin A2 in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. J. Biol. Chem., 287(48), 40433-40440.
- Elhai, J., and Wolk, C. P. (1990). Developmental regulation and spatial pattern of

expression of the structural genes for nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena*. *EMBO J.*, 9(10), 3379-3388.

- Eliyahu, E., Rog, I., Inbal, D., and Danon, A. (2015). ACHT4-driven oxidation of APS1 attenuates starch synthesis under low light intensity in *Arabidopsis* plants. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112(41), 12876-12881.
- Florencio F. J., Pérez-Pérez, M. E., López-Maury, L., Mata-Cabana, A. and Lindahl, M. (2006). The diversity and complexity of the cyanobacterial thioredoxin systems. *Photosynth. Res.*, 89(2-3), 157-171.
- Flores, E., Picossi, S., Valladares, A. and Herrero, A. (2018). Transcriptional regulation of development in heterocyst-forming cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, In Press.
- Frías, J. E., Flores, E., and Herrero, A. (1994). Requirement of the regulatory protein NtcA for the expression of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Mol. Microbiol.*, 14(4), 823-832.
- Gleason, F. K. (1996). Glucose-6-phosphate Dehydrogenase from the Cyanobacterium, Anabaena sp. PCC 7120: Purification and Kinetics of Redox Modulation. Arch. Biochem. Biophys., 334(2), 277-283.
- Golden, J. W., and Yoon, H. S. (2003). Heterocyst development in Anabaena. Curr. Opin. Microbiol., 6(6), 557-563.
- Golden, J. W., Whorff, L. L., and Wiest, D. R. (1991). Independent regulation of *nifHDK* operon transcription and DNA rearrangement during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.*, 173(22), 7098-7105.
- Guo, J., Nguyen, A. Y., Dai, Z., Su, D., Gaffrey, M. J., Moore, R. J., Jacobs, J. M., Monroe, M. E., Smith, R. D., Pakrasi, H. B., Qian W. J. (2014). Proteome-wide light/dark modulation of thiol oxidation in cyanobacteria revealed by quantitative site-specific redox proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*, 13(12), 3270-3285.
- Hagen, K. D., and Meeks, J. C. (2001). The unique cyanobacterial protein OpcA is an allosteric effector of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. J. Biol. Chem., 276(15), 11477-11486.
- Hisabori, T., Motohashi, K., Hosoya-Matsuda, N., Ueoka-Nakanishi, H. and Romano, Patrick G. N. (2007). Towards a functional dissection of thioredoxin networks in plant cells. *Photochem. Photobiol.*, 83(1), 145-151.
- König, J., Baier, M., Horling, F., Kahmann, U., Harris, G., Schürmann, P., and Dietz, K. J. (2002). The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99(8), 5738-5743.

- Kumar, K., Mella-Herrera, R. A., and Golden, J. W. (2010). Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2(4), a000315.
- Lennartz, K., Plücken, H., Seidler, A., Westhoff, P., Bechtold, N., and Meierhoff, K. (2001). HCF164 encodes a thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of the cytochrome b6f complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13(11), 2539-2551.
- Lindahl, M., and Florencio, F. J. (2003). Thioredoxin-linked processes in cyanobacteria are as numerous as in chloroplasts, but targets are different. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100(26), 16107-16112.
- Mills, J. D., Mitchell, P., and Schürmann, P. (1980). Modulation of coupling factor ATPase activity in intact chloroplasts. *FEBS Lett.*, 112(2), 173-177.
- Motohashi, K., and Hisabori, T. (2006). HCF164 receives the reducing equivalents from stroma thioredoxin across thylakoid membrane and mediates reduction of target proteins in thylakoid lumen. *J. Biol. Chem.*, 281(46), 35039-35047.
- Née, G., Zaffagnini, M., Trost, P., and Issakidis-Bourguet, E. (2009). Redox regulation of chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase: A new role for *f*-type thioredoxin. *FEBS Lett.*, 583(17), 2827-2832.
- Nicolaisen, K., Hahn, A. and Schleiff, E. (2009). The cell wall in heterocyst formation by *Anabaena* sp. PCC 7120. *J. Basic Microbiol.*, 49(1), 5–24.
- Nomata, J., Maeda, M., Isu, A., Inoue, K. and Hisabori, T. (2015). Involvment of thioredoxin on the scaffold activity of NifU in heterocyst cells of the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Biochem.*, 158(3), 253-261.
- Ow, S. Y., Cardona, T., Taton, A., Magnuson, A., Lindblad, P., Stensjö, K., and Wright, P.
 C. (2008). Quantitative shotgun proteomics of enriched heterocysts from *Nostoc* sp.
 PCC 7120 using 8-plex isobaric peptide tags. *J. Proteome Res.*, 7(4), 1615-1628.
- Pérez-Pérez, M. E., Florencio, F. J., and Lindahl, M. (2006). Selecting thioredoxins for disulphide proteomics: target proteomes of three thioredoxins from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics*, 6(S1), S186-S195.
- Pérez-Pérez, M. E., Mata-Cabana, A., Sánchez-Riego, A. M., Lindahl, M., and Florencio, F. J. (2009). A comprehensive analysis of the peroxiredoxin reduction system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 reveals that all five peroxiredoxins are thioredoxin dependent. *J. Bacteriol.*, 191(24), 7477-7489.
- Pratte, B. S., and Thiel, T. (2016). Homologous regulators, CnfR1 and CnfR2, activate expression of two distinct nitrogenase gene clusters in the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Mol. Microbiol.*, 100(6), 1096-1109.
- Scheibe, R., and Anderson, L. E. (1981). Dark modulation of NADP-dependent malate

dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta*, 636(1), 58-64.

- Schürmann, P., Maeda, K., and Tsugita, A. (1981). Isomers in thioredoxins of spinach chloroplasts. Eur. J. Biochem., 116(1), 37-45.
- Stensjö, K., Ow, S. Y., Barrios-Llerena, M. E., Lindblad, P., and Wright, P. C. (2007). An iTRAQ-based quantitative analysis to elaborate the proteomic response of *Nostoc* sp. PCC 7120 under N₂ fixing conditions. *J. Proteome Res.*, 6(2), 621-635.
- Summers, M. L., and Meeks, J. C. (1996). Transcriptional regulation of *zwf*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, from the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133. *Mol. Microbiol.*, 22(3), 473-480.
- Summers, M. L., Wallis, J. G., Campbell, E. L., and Meeks, J. C. (1995). 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.*, 177(21), 6184-6194.
- Tsukamoto, Y., Fukushima, Y., Hara, S., and Hisabori, T. (2013). Redox control of the activity of phosphoglycerate kinase in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol.*, 54(4), 484-491.
- Udvardy, J., Borbely, G., Juhasz, A. and Farkas, G. L. (1984). Thioredoxins and the redox modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 vegetative cells and heterocysts, *J. Bacteriol.*, 157(2), 681-683.
- Valladares, A., Flores, E., and Herrero, A. (2008). Transcription activation by NtcA and 2-oxoglutarate of three genes involved in heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.*, 190(18), 6126-6133.
- Wei, T. F., Ramasubramanian, T. S., and Golden, J. W. (1994). Anabaena sp. strain PCC 7120 ntcA gene required for growth on nitrate and heterocyst development. J. Bacteriol., 176(15), 4473-4482.
- Wenderoth, I., Scheibe, R., and von Schaewen, A. (1997). Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem., 272(43), 26985-26990.
- Wendt, U. K., Hauschild, R., Lange, C., Pietersma, M., Wenderoth, I., and von Schaewen, A. (1999). Evidence for functional convergence of redox regulation in G6PDH isoforms of cyanobacteria and higher plants. *Plant Mol. Biol.*, 40(3), 487-494.
- Wolosiuk, R. A., Crawford, N. A., Yee, B. C., and Buchanan, B. B. (1979). Isolation of three thioredoxins from spinach leaves. J. Biol. Chem., 254(5), 1627-1632.

Yoshida, K., and Hisabori, T. (2016). Two distinct redox cascades cooperatively regulate

chloroplast functions and sustain plant viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 113(27), E3967-E3976.

- Yoshida, K., Hara, A., Sugiura, K., Fukaya, Y., and Hisabori, T. (2018). Thioredoxinlike2/2-Cys peroxiredoxin redox cascade supports oxidative thiol modulation in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 115(35), E8296-E8304.
- Yoshida, K., Hara, S., and Hisabori, T. (2015). Thioredoxin selectivity for thiol-based redox regulation of target proteins in chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, 290(23), 14278-14288.