

モデルラン藻における遺伝子発現制御のための人工センサーの構築

川口 美咲 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 鈴木 石根 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

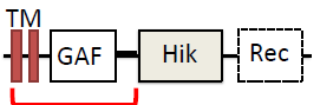
ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 は酸素発生型光合成を行う淡水性の原核生物である。全ゲノム配列が解読済みであること、相同組換えにより遺伝子導入が可能なことなどから、近年、代謝系を改変し、光合成により脂質などの有用物質を生産する研究が盛んに行われている[1]。将来、改変ラン藻を利用した産業的な物質生産を行うためには、導入した遺伝子の人工的な発現制御系が不可欠である。

本研究では、二成分制御系と呼ばれるシグナル伝達経路を利用した、外来の刺激に応答する人工的な遺伝子発現制御システムの構築を試みた。二成分制御系は、刺激を受容するセンサーのヒスチジンキナーゼ(Hik)と、Hikによりリン酸化を受ける転写因子のレスポンスレギュレーター(Rre)から構成される。先行研究から、ある Hik のシグナル受容ドメインを、別種の Hik のそれと入れ替えると、入れ替えた Hik の受容するシグナルにより元々の Hik が制御する遺伝子群の発現を制御できることが分かっている[2]。本研究では、ラン藻がもつ二成分制御系の一つ、SphS-SphR系を基本骨格とし、SphSのシグナル受容ドメインを、*Arabidopsis thaliana*のエチレンセンサーの受容ドメインに置き換えることで、エチレンに応答するキメラセンサーの構築を目的に、研究を行った。

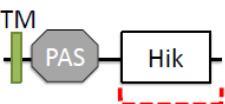
材料と方法

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いた。*Arabidopsis*のエチレンセンサーは ETR1、ETR2、ERS1、ERS2、EIN4 の5つが知られている。これら5つのシグナル受容ドメインと、SphSのキナーゼドメインを繋げたキメラセンサー遺伝子を作製した[Fig.1]。キメラセンサーはSphSのORFを置き換える形でラン藻に導入し、内在性の遺伝子のプロモーターから発現させた。

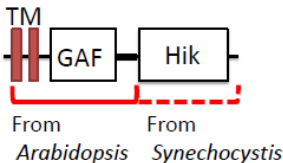
Ethylene sensor



SphS



Chimera sensor



[Figure1:キメラセンサーの構造]
 TM: 膜貫通ドメイン、
 GAF: GAFドメイン、
 PAS: PASドメイン、
 Hik: キナーゼドメイン、
 Rec: レシーバドメインを示す。
 太くなっている部分が
 リンカードメインである。

SphR が制御するアルカリフォスファターゼ(AP)の活性を指標に、キメラセンサーのエチレン応答性を評価した。植物のエチレンセンサーは細胞内でエチレンを受容するとシグナル伝達が抑制されるネガティブセンサーとして働くことから[3]、このキメラセンサーは、エチレン非存在下ではAP活性を発現するが、

エチレン存在下では発現が抑制され AP 活性が減少すると予想した。加水分解によりエチレンを発生する農薬のエテホンを経最終濃度 0.01%(w/v)、あるいは含エチレン水を最終濃度 225 μM とするよう培地に添加し、24 時間後の AP 活性を測定した。

結果と考察

【キメラセンサーを発現する株の AP 活性測定】

キメラセンサーを持つ形質転換体 5 株の AP 活性を、エチレン非存在下、存在下で測定した。その結果、ETR1、ETR2、EIN4 のキメラセンサーをもつ株では、エチレンの有無に関わらず恒常的な AP 活性が観察された。ERS1、ERS2 のキメラセンサーをもつ株はどちらの条件でも AP 活性は検出されなかった。活性が確認された 3 株で AP の mRNA を定量した結果、エチレンの有無に関わらず mRNA の量は一定であり、エチレンの応答性は観察されなかった。

【Cu 添加実験】

エチレンの受容には Cu イオンが必要とされている。Cu イオンの量が不十分なためにエチレンの結合能と応答性が損なわれ正常な制御が観察されなかったのではないかと考え、培地中の Cu イオンを 0.3 μM から 5 μM に増やして同様の実験を行った。しかし、エチレンによる AP 活性の変化は観測されなかった。

【リンカードメインの改変】

2 種の Hik をキメラにすることで構造変化を引き起こし、エチレンと結合できても正常なシグナル伝達ができなかったのではないかと考え、ETR1 のキメラセンサーの、α-ヘリックス構造を持つリンカー部分のアミノ酸 (335 から 341 番目) を一つずつ削っていくことで、シグナル受容ドメインとキナーゼドメインの配位を順次変化させた株を作製した。その結果、いずれの株でもエチレンの応答性は見られなかったが、興味深いことに、リンカーを順次削ると定常状態の AP 活性が周期的に変化した。この変化は欠失により上下のドメインの配位が少しずつ変化することから生じると考えられた。この結果は、リンカー部分の長さを調節することで下流の遺伝子発現の強弱を調節できる可能性を示すとともに、Hik によるシグナルの受容によりキナーゼドメインの配置が変化することで下流に伝達されることを示唆している。

今後の展望

実際に培地に存在したエチレンの定量をガスクロマトグラフにより試みたが、エテホンあるいは含エチレン水を培地に添加後 30 分以内で検出できなくなった。そのため、今後はエチレン 0.01%(v/v)を含む空気を通気して、恒常的にエチレンに曝した条件下で AP 活性を測定する予定である。

参考文献

- [1] Andreas, S. et al. (2010) *Science* 329: 559-562
- [2] Shimura, Y. et al. (2012) *Plant Cell Physiol.* 53: 1255-1266
- [3] Brenda, H. et al. (2007) *J. Plant Growth Regul.* 26: 118-130