

シアノバクテリアの推定 Cl⁻輸送体をコードする *slr0753* 遺伝子変異体に関する研究

下城 彩 (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)

【背景及び目的】

Synechocystis sp. PCC 6803 (以下 *Synechocystis* と省略) は淡水性のシアノバクテリアであり、全ゲノム情報が利用可能であることや相同組換えによる遺伝子改変が容易であることなどから光合成研究のモデル生物として広く利用されている。

酸素発生型光合成において、塩化物イオン (Cl⁻) は光化学系 II の水分解反応や、イオン恒常性に関わる不可欠な無機イオンの一つである。*Synechocystis* の必須遺伝子である *hik2* は Cl⁻濃度変化を検知するヒスチジンキナーゼであることが報告されており、本種においても Cl⁻恒常性の維持が重要な課題であると考えられるが、シアノバクテリアにおける Cl⁻の代謝制御機構について研究はあまり進んでいない。

Synechocystis の光化学系 II 表在タンパク質シクロコム c550 をコードする *psbV* 遺伝子破壊株は、光独立栄養生長において Cl⁻要求性を示す。この表現型を回復する欠失変異の原因遺伝子として報告された *slr0753* は、その構造及び相同性検索の結果から Cl⁻輸送体として推測されている。またトランスクリプトーム解析より *slr0753* は塩ストレスなどとの関連が示唆されてきた。

本研究の先行研究では Cl⁻欠乏培地で培養した *Synechocystis* のトランスクリプトーム解析を行い、*slr0753* の発現が Cl⁻欠乏条件下で継続的に著しく上昇していることを発見した (Ooi *et al.*, 2016 未発表)。これを受けて本研究では、シアノバクテリアの Cl⁻代謝制御における *slr0753* の生理学的役割を明らかにするため、Cl⁻欠乏条件下での *slr0753* 発現上昇の確認及び *slr0753* 遺伝子欠失変異体の作成とその表現型の解析を行った。

【材料と方法】

Synechocystis sp. PCC 6803 のグルコース耐性株を野生型株 (WT) として使用し、BG-11 で培養した。通気培養条件は 1% CO₂ 混合気、34°C、70 μmol photons m⁻² s⁻¹ の連続光照射とした。

今回 Cl⁻欠乏条件の検討にあたり、通常組成の BG-11 に含まれる CaCl₂ を Ca(NO₃)₂、MnCl₂ を MnSO₄ にそれぞれ置換した BG-11 と、CaCl₂ のみを Ca(NO₃)₂ に置換した BG-11 を作成し、前者を Cl⁻欠乏培地、後者を Cl⁻準欠乏培地と呼ぶことにした。

・ *slr0753* の発現量定量

初期濁度 OD₇₃₀ = 0.2 となるよう植菌し、BG-11、Cl⁻欠乏培地でそれぞれ通気培養した WT を培養開始後 0、6、12、24 時間の時点で回収した。これらのサンプルから total RNA を抽出し、逆転写後 real time-qPCR により *slr0753* の mRNA 定量を行った。

・ *slr0753* 欠失変異体の作成

slr0753 の ORF 中にカナマイシン耐性遺伝子カセットを相同組換えにより挿入し、*slr0753* 欠失変異体 (Δ*slr0753*) を作成した。Δ*slr0753* の培養にはカナマイシン 25 μg ml⁻¹ を添加した。

・ Cl⁻欠乏条件下での細胞の生育

BG-11 で通気培養した細胞を、実験によってもう一度 BG-11 あるいは Cl⁻欠乏培地で通気培養し前培養とした。前培養の細胞を遠心回収後 Cl⁻欠乏培地で 3 回洗浄し、本培養の培地へ植菌した。通気培養を 4 日間行い、細胞濁度とクロロフィル濃度の推移を測定した。

【結果】

slr0753 の発現量は BG-11 で培養した場合 24 時間後まで徐々に低下したのに対し、Cl⁻欠乏培地では 24 時間後まで発現量はほぼ維持された。このことから *slr0753* は Cl⁻欠乏条件下に応答し発現が上昇することが示唆された。

BG-11 で培養した場合、WT と Δ*slr0753* で生育に明らかな差はみられなかった。

前培養を BG-11 で行い本培養を Cl⁻準欠乏培地で行ったところ、Δ*slr0753* のみダブリングタイムがやや遅延し、この差は Cl⁻欠乏培地でさらに大きくなった。一方前培養を Cl⁻欠乏培地で行った場合 Δ*slr0753* の本培養でのダブリングタイムは、Cl⁻準欠乏培地では WT と同程度であったのに対し、Cl⁻欠乏培地では明らかに遅延し、さらに細胞濁度の低下もみられた (図)。以上より *Synechocystis* は微量の Cl⁻ を効率的に利用することができ、*slr0753* がこの代謝機構に関与していると考えられた。

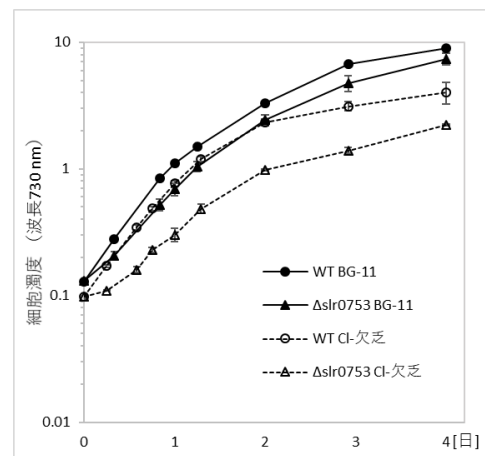


図. Cl⁻欠乏培地で前培養した細胞の生育。

【今後の展望】

シアノバクテリアには *slr0753* 以外にも複数の推定 Cl⁻輸送体遺伝子があり、現在それらの遺伝子欠損株を作成中である。今後これらの変異体で *slr0753* の発現に影響がみられるかどうかを調べたい。また *slr0753* が Cl⁻の輸送体であることをより直接的に確認するため、放射性同位体を用いて Δ*slr0753* の Cl⁻取込み能を評価したいと考えている。

【参考文献】

- Kotajima, T. *et al.* *FEMS Microbiol Lett.* 2014.
Kobayashi, M. *et al.* *Plant cell Physiol.* 2006.
Hagemann, M. *FEMS Microbiol Rev.* 2010.