

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の硫酸イオン輸送体 SulP family の機能解析

津留 陽果 (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・目的】

硫黄は生物に不可欠な元素であり、含硫アミノ酸 (システイン・メチオニン)、様々な補因子 (ビオチン、coenzyme A、鉄・硫黄クラスターなど) に含まれる。一般的に、バクテリアは、硫酸塩 (sulfate) を取り込んで、様々な含硫化合物を生合成している。硫酸塩は、様々な硫酸輸送体 (sulfate permeases; SulT (CysPTWA), SulP, Cysp/(Pit), CysZ family) によって取り込まれる(1)。シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 は光合成、窒素・炭素同化や植物色素体の進化について長年研究されてきたモデル生物である。シアノバクテリアの硫酸輸送体は、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 で詳しく調べられている。SulT (CysPTWA) をコードする *sbpA* オペロンの破壊で通常濃度の硫酸濃度条件で生育できなくなる。つまり、7942 株はこの一つの硫酸輸送体をもっている。シアノバクテリアにはこの一種類の硫酸輸送体をもつと考えられていた。しかしながら、私の研究室の先行研究で、*Synechocystis* sp. PCC 6803 は同オペロンを欠失しても通常の硫酸濃度条件で生育できることがわかり(2)、つまり 6803 株には未知の硫酸輸送体が存在すると考えられた。

バクテリアの硫酸輸送体のうち、SulP は 12 個の膜貫通ドメインをもち、生物全般に幅広く存在する陰イオン輸送体である(3)。シアノバクテリアの SulP family について、以下のことがわかっている。*Synechococcus elongatus* の *sync1147* は SulP 様タンパク質をコードし、低親和性の NO₃⁻ 輸送に関連することのみが示唆されているが、本来の基質は明らかにされていない(4)。*Synechococcus* sp. PCC 7002 では、SulP family に属する BicA タンパク質が HCO₃⁻ 輸送体として機能し、CO₂ 濃縮メカニズムの一端を担っている(5)。*Synechocystis* sp. PCC 6803 にも、BicA のオルソログが存在するが、*sync1147* のそれは見つかっていない。それら以外の 3 種の SulP 様タンパク質 (Slr0096, Slr1229, Slr1776) が硫酸塩の輸送に関わる可能性を検討することにした。そこで、それらの遺伝子破壊株を作成し、その表現型についての解明を目指した。

【材料・方法】

slr0096, *slr1229*, *slr1776* 変異株の作出

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の *slr0096*, *slr1229*, *slr1776* 遺伝子中に、それぞれエリスロマイシン、スペクチノマイシン、カナマイシンに耐性を与える遺伝子を二重相同組換えにより挿入することで変異株を作出した (図)。それぞれの標的遺伝子のコード領域とその上流及び下流各 1 kbp を含む約 3 kbp の DNA 断片を PCR で増幅し、pMD19 vector に Cloning した。得られたプラスミドを鋳型に、標的遺伝子のコード領域の大部分を欠損する様に逆向きに PCR を行い、得られた線状化ベクターと各耐性遺伝子を In-Fusion 反応により結合し、大腸菌で増幅したのち精製することで、耐性遺伝子を目的遺伝子の上流及び下流の相同領域によって挟む置列を持つプラスミド DNA を得た。

得られたプラスミド DNA を用いて野生株への形質転換を行い、形質転換株を得た。

【結果・考察】

各株の作出進行状況は以下のとおりである。 Δ *slr0096* 株は、形質転換株ゲノムを耐性遺伝子を増幅するプライマー (Emr_F, Emr_R) 及び遺伝子プライマー (*slr0096_upF*, *slr0096_dnR*) の組み合わせで PCR し、ゲノム情報が目的のものかどうか確認した。その結果、得られた株は目的の Δ *slr0096* 株であると判断した。この株は寒天培地上で生育が抑制されており、遺伝子欠損の影響が見られた。

Δ *slr1229* 株は得られた株の DNA 構造が予測と異なっており、あらためてプラスミド DNA を確認したところ不備が認められたので、infusion クローニングをやり直している。

Δ *slr1776* 株は、得られた変異株の染色体 DNA の構造を確認中である。

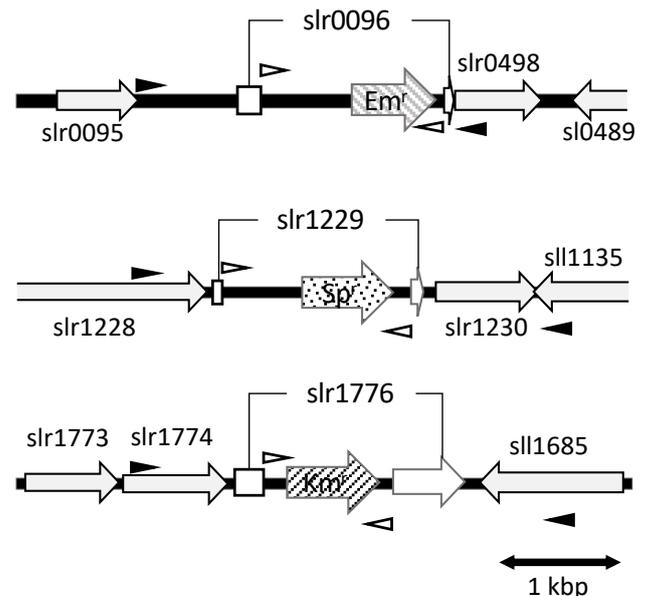


図. *slr0096*, *slr1229*, *slr1776* 遺伝子への薬剤耐性遺伝子挿入の模式図。Emr^r、Sp^r、Km^r は、それぞれエリスロマイシン、スペクチノマイシン、カナマイシン耐性遺伝子を示す。黒三角と白三角は、それぞれの遺伝子領域と薬剤耐性遺伝子を増幅するプライマーの位置を示す。

【参考文献】

1. Aguilar-Barajas et al., *Biomaterials* 24, 687–707 (2011)
2. Lee et al., *Algal Res.* 60, 102530 (2021)
3. Malcom et al., *Physiol. Plant.* 117, 155–163 (2003)
4. Maeda et al., *J. Biol. Chem.* 281, 5869–5876 (2006)
5. Price et al., *PNAS* 101, 18228–18233 (2004)