

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する NAD キナーゼの生理機能

埼玉大学理工学研究科 理工学専攻
指導教員 川合真紀

石川優真
2019 年 9 月

目次	
略称-----	1
第1章 序論-----	2
1.1 はじめに-----	3
1.2 本論文の目的と意義-----	5
1.3 本論文の構成-----	6
第2章 光従属栄養条件における <i>sll1415</i> の機能解析-----	10
2.1 概要-----	10
2.2 実験方法-----	10
2.3 結果-----	11
2.4 考察-----	15
2.5 結論-----	17
第3章 <i>slr0400</i> の機能解析-----	30
3.1 概要-----	30
3.2 実験方法-----	30
3.3 結果-----	31
3.4 考察-----	33
第4章 シアノバクテリアが有する NADK の高発現株について-----	50
4.1 概要-----	50
4.2 実験方法-----	50
4.3 結果-----	51
4.4 考察-----	53
第5章 <i>slr0400</i> は NADK なのか？-----	66
5.1 概要-----	66
5.2 実験方法-----	66
5.3 結果-----	66
5.4 考察-----	67
第6章 系統解析と考察-----	70
6.1 概要-----	70
6.2 実験方法-----	70
6.3 結果-----	70
6.4 考察-----	70
第7章 まとめと今後の展望-----	74
参考文献-----	76
謝辞-----	81

略称	
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADK	NAD kinase
DCMU	3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea
G6PDH	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
6 PGDH	6-phosphogluconate dehydrogenase
PCR	Polymerase chain reaction
WT	Wild type
$\Delta 1415$	<i>sll1415</i> 破壊株
$\Delta 0400$	<i>slr0400</i> 破壊株
TEM	Transmission electron microscope
CE-MS	Capillary electrophoresis mass spectrometry
G6P	Glucose-6-phosphate
6PG	6-phosphogluconate
Ru5P	Ribulose 5-phosphate
GDH	Glucose dehydrogenase
ED 経路	Entner-Doudoroff pathway
DHAP	Dihydroxyacetone phosphate
PEP	Phosphoenolpyruvic acid
3PGA	Glycerate-3-phosphate
GST	Glutathione S-transferase

第1章 序論

1.1 はじめに

NAD(P)(H) は生体内酸化還元反応を司る電子伝達運搬体である。細胞内において、NAD(P)(H)には酸化型の NAD^+ と還元型の NADH に加え、それぞれがリン酸化された NADP^+ と NADPH が存在し、様々な代謝反応に関与する。 NAD(P)(H) は発見以来、その単離や構造決定が行われ、代謝反応の補酵素としての認識が広まっていった。1950 年には酵母から初めて NAD を NADP へとリン酸化する、 NAD キナーゼ (NADK) が単離され (Kornberg et al., 1950)、様々な生物で NADK が同定されてきた (Apps 1975, Tseng et al., 1979, Bulygina et al., 1980, Butler et al., 1982)。近年では、ヒトの細胞質局在型とミトコンドリア局在型の NADK が発見され (Lerner et al., 2001, Ohashi et al., 2012)、がん治療のターゲットとしてその阻害機構についての研究が展開されている (Imai et al., 2014)。さらに老化の観点からも NAD(P)(H) は着目されており、老化と NAD^+ 量の低下に密接な関連性があることが報告されている (Tsang et al., 2016)。このように動物を用いた研究では、 NAD(P)(H) の利用が応用展開されている事例もあり、近年は NAD(P)(H) の可視化技術の発展とともに、生理応答への時空間情報が理解されつつある (Tao et al., 2017)。

一方、植物においてもタバコで NADK が同定され、 NAD(P)(H) 合成経路、および 3 種類報告されているそれぞれの NADK の局在や生化学的性質が明らかにされてきた (Yamamoto., 1966, Katoh et al., 2006, Waller et al., 2010)。近年は、 NAD(P)(H) 量が改変された植物が多く作出され、逆遺伝学的に、その表現型解析や原因特定のための分子生物学的解析が行われ、 NAD(P)(H) の生理応答への議論がおこなわれている (Dutilleul et al., 2005, Schippers et al., 2008, Takahashi et al., 2009, Sienkiewicz-Porzucek et al., 2010, Takahara et al., 2010, Bernhardt et al., 2012, Petriacq et al., 2012, Maruta et al., 2016, Petriacq et al., 2016)。光合成生物の場合は、最終的な研究目標として、バイオマスの増産や有用物質生産が挙げられる。しかしながら、それらの応用に向けて、 NAD(P)(H) 代謝をどのように改変すればよいのか、という道筋は明確ではない。その為、 NAD(P)(H) バランスが環境条件で細胞区画ごとにどのように制御され、どの代謝に影響を与えているのか、また何が NAD(P)(H) の調節に関与しているのか等、ブレークスルーを求めたさらなる基礎研究が必要な状況である。

シアノバクテリア (図 1A) において NAD(P)(H) 合成に関与する酵素は、既知の植物や動物の NAD(P)(H) 合成に関連する遺伝子の情報を基に同定されている (Gerdes et al., 2006) (図 1B)。特に、 NAD(P)(H) 合成に関連する酵素のうち、Slr1916 (NaMNAT)、Slr1691 (NADS/GAT)、Slr0787 (NMPRT)、Slr0788 (NMNAT)は生化学的な性質が報告されている (Raffaelli et al., 1999, Gerdes et al., 2006)。これまでに知られている NAD 合成系は以下の通りである。まず *de novo* 合成されるアスパラギン酸が初発で供給される。アスパラギン酸からニコチンアミドモノヌクレオチド (NaMN) への変換は Slr0631 (NadB) から Slr0622 (NadA)、Slr0936 (NadC)によって変換される。 NaMN は Slr1916 (NaMNAT)によ

って NaAD に変換され、NaAD がアミド化され NAD⁺になる。シアノバクテリアでは NaAD から NAD⁺へは Slr1961 (NADS/GAT)によって変換され、NADS/GAT は ATP の消費を伴ったアミド化のためにグルタミンが必要である (Raffaelli et al., 1999)。このように NAD⁺合成経路は、調べられたすべてのシアノバクテリアとシロイヌナズナで共通であることが報告されている (Gerdes et al., 2006)。その一方で、シロイヌナズナではニコチンアミドから NaMN がサルベージ経路によってリサイクルされることが知られている (Kato et al., 2006, Wang and Pichersky., 2007)。シアノバクテリアでは、種によって NAD⁺のリサイクリング及びサルベージ経路が多様であるといわれている (Gerdes et al., 2006)。*Synechocystis* sp. PCC 6803 の NAD⁺のリサイクリング経路としては、Slr0787 (nicotinamide mononucleotide (NMN)-specific adenylyltransferase)と *slr0788* (NMPRT)が知られている。Slr0787 は二機能性酵素であると考えられており、N 末端側には NMN と ATP から NAD⁺を合成する触媒ドメインがあり、C 末端側には Nudix 加水分解酵素活性のドメインがある。Nudix 加水分解酵素はヌクレオチド二リン酸類縁体に対して加水分解活性を持つタンパク質ファミリーの総称であり、細胞内の代謝物や毒性の化合物量の調節に関与していると考えられている (Bessman et al., 1996)。しかしながら、*slr0787*の遺伝子破壊株は通常の条件では特に WT と異なる表現型を示さないことが報告されており (Gerdes et al., 2006)、今後培養条件依存的な重要性が見出されることが期待される。さらに Slr0788 (NMPRT) はニコチンアミドを NMN に変換すると考えられている。その為、*Synechocystis* sp. PCC 6803 ではニコチンアミドから NMN を経て NAD⁺を合成できると考えられる。その一方で、*Synechocystis* sp. PCC 6803 では NAD⁺や NADP⁺の分解経路が未知であり、ニコチンアミドも細胞外から取り込むことはできないとされている (Gerdes et al., 2006)。その為、NAD(P)(H)の量的調節機構をより深く理解するためには NAD(P)の分解経路が明らかにすることが求められる。

NADP⁺は細胞内で必要不可欠な物質であり、NAD⁺がリン酸化することで合成される。光合成生物では特に、NADP⁺は光合成電子伝達鎖の電子の最終的な受容体として知られ、NADPH に変換されることでカルビンベンソンサイクルに還元力を提供すると考えられている (Hurley et al. 2002)。NADP⁺は一般的には同化の代謝反応に関わると考えられているが、一次代謝においては酸化的ペントースリン酸経路やシアノバクテリアでは TCA 回路のような異化代謝にも関与している (Muro-Pastor et al., 1992)。酸化的ペントースリン酸経路では、G6P から、6PG、Ru5P へと変換されていく際、NADP⁺が補因子として必要であり、G6PDH を欠損させた変異体では光従属栄養条件や LAHG 条件でブリーチングすることが報告されている (Jansen et al., 2010)。さらに、イソクエン酸を 2OG に変換する代謝反応においても NADP⁺が必要であり、その代謝反応を担うイソクエン酸デヒドロゲナーゼ (ICD) の欠損を試みると *Synechocystis* sp. PCC 6803 は致死になることが報告されている (Muro-Pator et al., 1996)。このように NADP⁺は葉緑体で知られているように同化反応に関与するだけでなく、シアノバクテリアの炭素代謝においては、異化反応にも必須である

と考えられる。

NAD⁺のリン酸化は NAD キナーゼ (NADK) によって担われており、NADK はすべての生物に存在する。シロイヌナズナの葉緑体内では NAD⁺のリン酸化は葉緑体局在性 NADK2 によって担われている。葉緑体局在性 NADK2 の変異体は Pale-green になることが報告されており、酸化ストレスなどの環境ストレスに感受性になることが報告されている (Chai et al., 2005, Takahashi et al., 2006)。葉緑体局在性 NADK2 は N 末端側に葉緑体移行シグナルとカルモジュリンが結合する配列があることが報告されており (Turner et al., 2004)、酵素活性の制御領域であると考えられている。さらに、多くの植物では N 末端側にシロイヌナズナの葉緑体局在性 NADK2 と同様の配列が付加されており、植物では未知の活性制御メカニズムによって NADP⁺合成が環境依存的に調節されていると考えられ、今後葉緑体局在性 NADK2 の酵素活性の制御システムの解明が望まれる。一方で、シロイヌナズナではペルオキシソーム、もしくはミトコンドリア局在の NADK3 を有しており、NADK3 は NADK2 とは異なり、C 末端側に NADK ドメインとは違う未知の配列が付加されている (Waller et al., 2010)。しかしながら、NADK3 の C 末端側に関してはこれまで全く報告がなく、その機能解析が求められる。

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 は NADK として *sll1415* と *slr0400* の二つの NADK を有している。さらに、多くのシアノバクテリアは細胞区画がないのにも関わらず、二つの NADK を有していることが報告されている (Gao and Xu., 2012, Ishikawa et al., 2019 b)。これまで二つの NADK の二重破壊は致死になることから (Gao and Xu., 2012, Ishikawa et al., 2016) NADK はシアノバクテリアにとって必要不可欠で重要な酵素であると考えられる。NADK として保存されているモチーフとして Conserved motif と NAD 結合モチーフ、ATP 結合モチーフの三つが報告されている (Liu et al., 2005)。この 3 つのモチーフは *Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する二つの NADK でも保存されており (図 2B)、さらに *sll1415* と *slr0400* は一次構造上で N 末端側にも C 末端側にもシロイヌナズナの NADK2 や NADK3 で見られる酵素活性の制御領域と考えられる配列がない (図 2A)。その為、葉緑体内では酵素活性制御によって調節される NADP⁺合成が、シアノバクテリアの場合は一つの細胞内でシンプルな二つの NADK を使いこなすことによって NADP⁺/NAD⁺を適切に調節していると推察される。このことから、シアノバクテリアには細胞区画がシンプルであることによる独自の NAD(P)(H)調節機構が存在すると考えられ、本研究では、二つの NADK による NAD(P)量の調節がどのように行われているのか、さらに二つの NADK の存在にどのような生理的意義があるのか、という疑問に迫った。

1.2 本論文の目的と意義

本研究は、シアノバクテリアが培養環境依存的に二つの NADK を使い分けることで、代謝を調節し、様々な環境ストレスに順応していると予測した。その為、二つの NADK のそれぞれの機能の違いを明らかにすることを目的として研究を行った。研究の結果、それぞれ

の NADK 破壊株の表現型解析から、*sll1415* は光従属栄養条件で必須であることが分かった。一方で、*slr0400* は従属栄養条件におけるシアノバクテリアの増殖を抑制していることがわかり、従属栄養条件でそれぞれの NADK は増殖速度を正、又は負に調節するための異なる機能的な役割を有していることを示した。

シアノバクテリアは細胞区画が基本的にはないと考えられている為、シアノバクテリアが有する二つの NADK には一見役割分担がないと考えられてきた。しかし本研究によりそれらが代謝において異なる機能を有していることが示された (Ishikawa et al., 2016)。二つの NADK が影響を及ぼす代謝反応には違いがあると考えられ、シアノバクテリアというシンプルな細胞でさえ NADP プールと代謝制御の間には予想以上に緻密なクロストークが存在し、二つの NADK がそれを担っている可能性がある。今後の解析により、二つの NADK の役割分担が明らかになった暁には、シアノバクテリアの代謝における NADP⁺供給の戦略を利用した独自の代謝制御技術の構築につながると考えている。本研究により NAD(P)(H)の量的制御法を用いた代謝改変技術が確立されれば、シアノバクテリアの一次代謝を中心とする基礎生産性の底上げが可能であると考えられ、それを用いた多角的な応用が見込まれる。将来的には、化石燃料の代替エネルギー生産を担い得る意義がある。例えば、油脂を蓄積する実用的な藻類での代謝改変により、一次代謝の亢進による油脂の蓄積量の増加などに結び付くことも期待される。

1.3 本論文の構成

第1章では、着目した NAD(P)(H)についてのこれまでの研究の流れと本研究の位置づけをはじめに述べた。NAD(P)(H)は生体内酸化還元反応を司る電子伝達物質であり、細胞内では酸化型の NAD⁺と NADP⁺、還元型の NADH と NADPH として存在する。酸化還元電位がほぼ同じであるのにもかかわらず、なぜリン酸化された酸化型もしくは還元型の NADP(H)が生物に普遍的に存在するのか、という疑問を出発点として、そのリン酸化を担う NAD キナーゼ (NADK) に着目した。さらに、細胞構造がシンプルであるのにも関わらず、シアノバクテリアが2種類の NADK 遺伝子 (*sll1415*, *slr0400*) を持っている点について、それぞれの NADK にどのような生理的役割があるのか、という疑問を提起した。そこで、本研究では、シアノバクテリアが培養環境依存的に二つの NADK を使い分けることで、一次代謝を調節し、様々な環境ストレスに順応していると予測し、二つの NADK の機能の違いを明らかにすることを目的として研究を行った。

第2章では二つの NADK のうちの *sll1415* の破壊株が光従属栄養条件で増殖阻害を示し、酸化的ペントースリン酸経路への NADP⁺供給の不足が原因であることを示した。さらに、NAD(P)(H)量の明暗周期での変動結果を基に時計遺伝子 *kaiABC* との関連性を考察した。

第3章では、二つの NADK のうちの *slr0400* 破壊株は強光条件で黄化することを示し、*slr0400* の遺伝子破壊により、光化学系 II が直接影響を受けていることを示した。さらに、*slr0400* 破壊株は Light-activated heterotrophic condition や明暗条件でグルコースを添加し

た条件で WT よりも増殖が早くなることを示した。また、*slr0400*破壊株では通常光条件でも NAD^+ が WT に比べて蓄積しており、その際の代謝変化及び ROS 発生量、暗呼吸活性を示し、強光条件での黄化の原因を考察した。

第 4 章ではそれぞれの NADK の基質特異性を調べるため、それぞれの NADK の高発現株の NADK 活性、NAD(P)(H)量の測定結果を示した。さらに、NADK 高発現株の表現型を示し、その原因を代謝データに基づいて考察した。

第 5 章では、特に *slr0400* における NADK 活性の有無についてシロイヌナズナ *nadk2* 変異体を用いて解析を行った。シアノバクテリアの二つの NADK のいずれかをシロイヌナズナ *nadk2* 変異体に高発現させても、*nadk2* の表現型が回復することを示し、これにより、*slr0400* も葉緑体局在性 *AtNADK2* を相補できる能力を有している可能性が示唆された。

第 6 章ではデータベース解析によりシアノバクテリア類が *sll1415* と *slr0400* のいずれのクレードの NADK 分子種を持っているのかに着目して、系統解析を行った。多くのものは 2 種類の NADK を有していた。一方で *sll1415* のクレードに属する NADK は有するが、*slr0400* のクレードに属する NADK は有していないシアノバクテリアとして *Atelocyanobacterium thalassa* が見出された。*Atelocyanobacterium thalassa* はルビスコや光化学系 II が遺伝子レベルで喪失し、光合成をしない代わりに、他の酸素発生型光合成シアノバクテリアに付着して炭素源を略奪することが報告されている。そこで、*slr0400* 破壊株を、培地にグルコースを添加し完全暗所条件で培養すると、WT は全く増えないが、*slr0400* 破壊株は増殖することが分かった。このことから、*slr0400* は藻類の進化の過程で光合成能力の有無と関連している可能性が考えられ、光合成シアノバクテリアの光合成能の獲得、もしくは非光合成シアノバクテリアの完全従属栄養性の獲得というイベントの中で重要な因子であると考えられた。

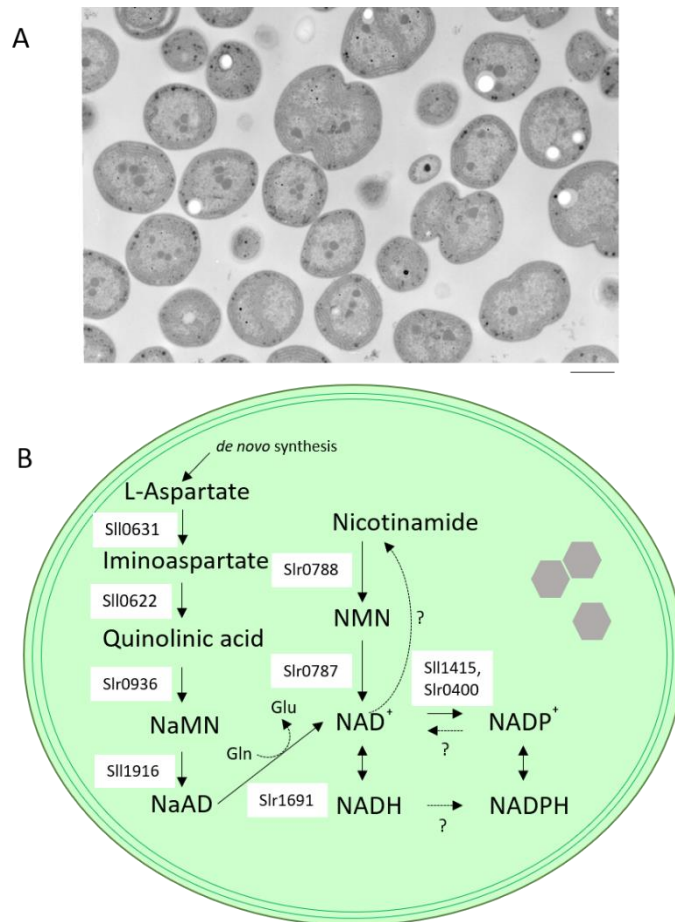


図 1 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の NAD(P)(H)合成系

A, *Synechocystis* sp. PCC 6803 の透過型電子顕微鏡写真。スケールバーは 1 μm 。B, *Synechocystis* sp. PCC 6803 の NAD (P)(H) 合成系。NAD⁺が合成されるまでそれぞれの反応を触媒する酵素は一つの遺伝子によってコードされ、NADP⁺合成のみが二つの NADK によって触媒されている。NaMN; nicotinate mononucleotide, NaAD; nicotinate adenine dinucleotide, NMN; nicotinamide mononucleotide; Sll0631; L-aspartate oxidase, Sll0622; quinolinate synthetase, Slr0936; quinolinate phosphoribosyl transferase, Sll1916; nicotinate nucleotide adenylyl transferase, Slr1691; NAD synthase, Slr0787; nicotinamide nucleotide adenylyl transferase, Slr0788; nicotinamide phosphoribosyl transferase.

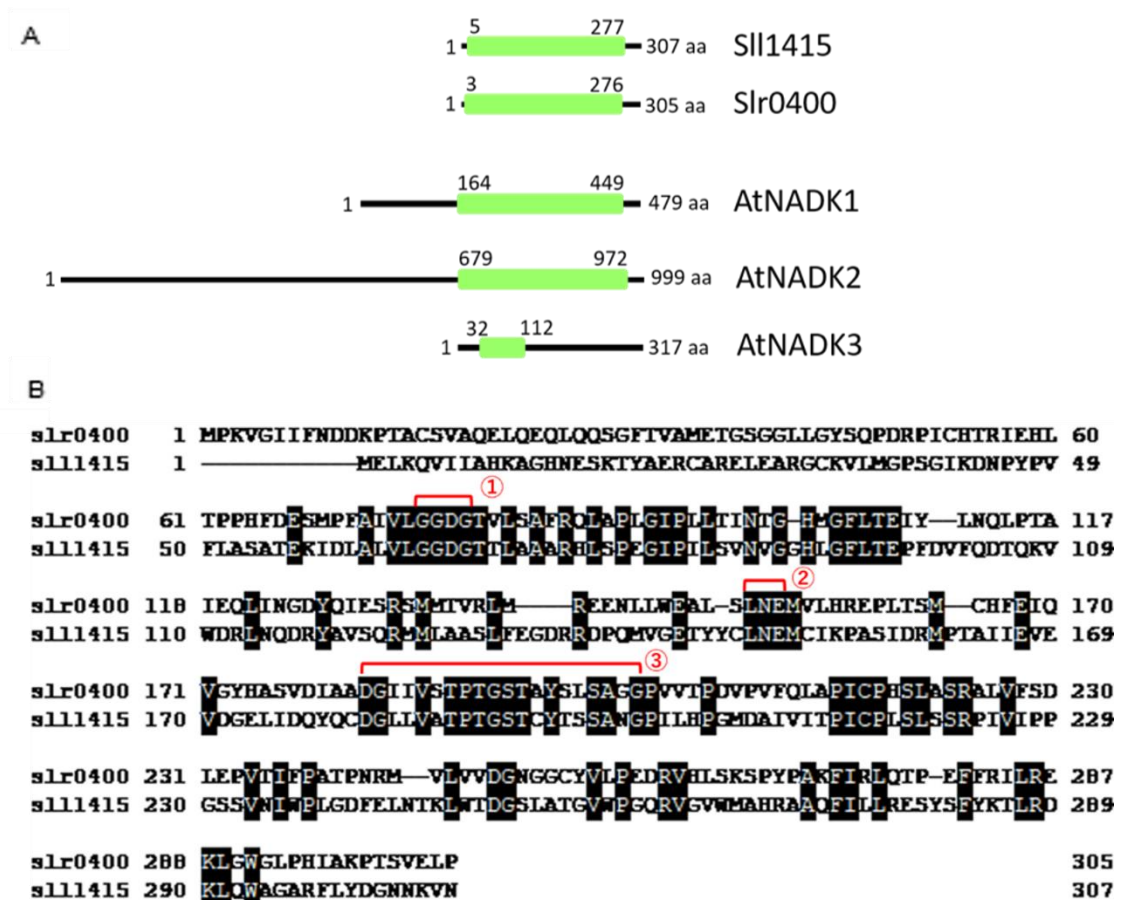


図 2 NADK (シロイヌナズナ、シアノバクテリア) の一次構造の比較

A, シアノバクテリアの NADK (Sll1415、Slr0400) では NADK モチーフが配列の全体にわたって存在する。シロイヌナズナの NADK (AtNADK1、AtNADK2) では N 末端側に機能未知の配列が付加されている。一方、AtNADK3 は C 末端側に機能未知の配列が付加されている。AtNADK1, At3G21070; AtNADK2, At1G21640; AtNADK3, At1G78590.

B, *slr0400* と *sll1415* がコードするアミノ酸配列の比較。①; GGDG motif, ②; NE/D motif, ③; Conserved region II。

第2章 光従属栄養条件における *sll1415* の機能解析

2.1 概要

Synechocystis sp. PCC 6803 は *sll1415* と *slr0400* の二つの NADK 遺伝子を有している。二つの NADK のうち、*sll1415* 破壊株は、培地にグルコースと光合成阻害剤の DCMU を添加した光従属栄養条件で増殖阻害を示すことが報告されていた (Gao and Xu., 2012)。また、*sll1415* 破壊株はメチルビローゲン存在下で増殖阻害が起こること、グルコースのみを添加する混合栄養条件で NADP(H)量が野生型 (WT) よりも減少していることが報告されていた (Gao and Xu., 2012)。しかしながら、*sll1415* 破壊株で増殖阻害が起こる原因や分子メカニズムは解明されていなかった。そこで、第2章では *sll1415* 破壊株を作出し、代謝解析や分子生物学的手法を用いて増殖阻害の分子機構を明らかにした。さらに、NAD(P)(H)量の明暗周期における変動結果を基に、時計遺伝子 *kaiABC* との関連性を考察した。

2.2 実験方法

・培養条件の設定と遺伝子クローニング

本研究で WT として用いた株は、埼玉大学理工学研究科 日原教授から分譲していた *Synechocystis* sp. PCC 6803 (GT 株) である。培養は、光量 30 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 、30°C、100 rpm を通常光条件とした。培地は、BG-11 を用いた。光従属栄養条件は、BG-11 に DCMU (10 μM) 及びグルコース (5 mM) を添加した。光従属栄養条件では、前培養は OD₇₃₀ を 0.0075 に合わせ、96 時間培養し、それを光従属栄養条件用の培地 20 ml に 2 ml 添加した後の経時変化を調べた。

Kai 遺伝子破壊株は Dorrich et al., (2014) と同様のものを GeneArt®Seamless Cloning & Assembly (Thermo Fisher) を用いて作成した。

・NAD(P)(H)量の測定

サンプリングした細胞に、HCl (0.2 M) もしくは NaOH (0.2 M) を添加し、超音波破碎機で約 5 秒間細胞を再懸濁し、95°C で 1 分間ボイルした。以下は Ishikawa et al., (2019 a) を参照。

・NADK 活性測定

粗タンパク質は、乳鉢及び乳棒を用いて抽出した。以下は (Ishikawa et al., 2019 a) を参照。

・遺伝子発現解析

細胞は 10 秒×2 で超音波破碎した。RNeasy Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した後、DNase (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を分解した。ゲノム残留の有無は PCR により確認した。他は (Ishikawa et al., 2019 a) を参照。

・酵素活性測定

粗タンパク質は、乳鉢及び乳棒を用いて抽出した。以下は (Ishikawa et al., 2019 a) を参照。

・代謝解析

代謝物はメタノールで抽出した。以下は (Ishikawa et al., 2019 a) を参照。

2.3 結果

2.3.1 光従属栄養条件における *sll1415*破壊株の増殖曲線

Synechocystis における二つそれぞれの NADK 遺伝子破壊株は、通常光条件では WT と増殖に差がない (Ishikawa et al., 2016)。一方で、光従属栄養条件においては *sll1415*破壊株が増殖阻害を示す。そこでその原因を明らかにするため、詳細な解析を行った。光従属栄養条件で増殖曲線を描くと、WT は、継代から 3 日後から 4 日目にかけて増殖速度が上昇することが分かった (図 3)。一方で、*sll1415*破壊株は 2 日目以降、増殖速度が低下し、細胞が肥大していた (図 3 C, D)。*sll1415*破壊株では細胞分裂が抑制され、細胞一つ辺りの体積が大きくなっていると考えられた。

2.3.2 光従属栄養条件における *sll1415*破壊株の増殖阻害の相補実験

*sll1415*破壊株に *psbA2* プロモーターに連結した *sll1415* を発現させ、光従属栄養条件における *sll1415*破壊株の増殖阻害が緩和されるかどうかを調べた (図 4)。その結果、光従属栄養条件における *sll1415*破壊株の増殖阻害は *sll1415* によって相補されたため、*sll1415*破壊株の光従属栄養条件における増殖阻害は *sll1415* の遺伝子破壊が原因であった。一方で、*psbA2* プロモーターに *slr0400* を連結し、*sll1415* 破壊株に導入した場合は、光従属栄養条件における *sll1415* 破壊株の増殖阻害が全く緩和されなかった。このことは、*slr0400* が光従属栄養条件における *sll1415* の機能を補うことができないことを示しており、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する二つの NADK は異なる機能的役割を有していることが示された。

2.3.3 シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する二つの NADK の光従属栄養条件における遺伝子発現変化

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する二つの NADK の遺伝子発現変化を光従属栄養条件に継代してから 48 時間後と 96 時間後で調べた (図 5A)。その結果、*sll1415* は独立栄養条件に比べて、光従属栄養条件に継代してから 48 時間後から 96 時間後で遺伝子発現が上昇していた。一方で、増殖速度が速くなる 96 時間後のタイミングで *slr0400* は遺伝子発現量が減少していた。このことから、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する二つの NADK が培養条件依存的に異なる働きを有している可能性が示唆された。

2.3.4 光従属栄養条件におけるシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の NAD(P)(H) 量変化

遺伝子発現量の変化に伴って、光従属栄養条件下で NAD(P)(H) 量がどのように経時変化しているのか調べた (図 5B)。その結果、WT において NADP⁺ 及び NADPH は光従属栄養条件に継代してから 96 時間後に独立栄養条件に比べて増加していた。その一方で、

sll1415 破壊株では NADP^+ 量が光従属栄養条件に継代してから 48 時間後と 96 時間後に WT に比べて減少していた。さらに、光従属栄養条件に継代してから 96 時間後には、*sll1415* 破壊株で NADPH が WT に比べて減少していた。*sll1415* の遺伝子発現は光従属栄養条件に継代してから 48 時間後にはすでに独立栄養条件より上昇していることを示した (図 5D)。一方で、*slr0400* の遺伝子発現は光従属栄養条件に移してから 96 時間後に減少する。その為、*sll1415* 破壊株では 48 時間後に糖代謝に必要な *sll1415* 由来の NADP^+ 供給が不足し、96 時間後では WT は NADP^+ を NADPH に変換する代謝を駆動させていると考えられる一方で、*sll1415* 破壊株では、光従属栄養条件に継代してから 96 時間後に NADP^+ を NADPH に変換するための代謝反応が正常に駆動されていない可能性が考えられた。

一方で、*slr0400* 破壊株では、通常光条件で WT と比較して NAD^+ が蓄積しており、光従属栄養条件に継代してからは NADH が蓄積してくることがわかった。このことから *slr0400* 破壊株では何らかの要因で NAD^+ が蓄積し、蓄積した NAD^+ が NADH に変換される未同定の代謝反応が亢進している可能性が予測された。

2.3.5 光従属栄養条件における *sll1415* 破壊株の形態観察とグリコーゲン量の変動パターン

さらに、光学顕微鏡で *sll1415* 破壊株の様子を観察すると、光従属栄養条件下で細胞が肥大し、分裂途中の細胞が WT に比べて多くみられた。そこでより詳細に細胞構造を観察するため、透過型電子顕微鏡 (TEM) で *sll1415* 破壊株の観察を行った。その結果、*sll1415* 破壊株は細胞が肥大しているだけでなく、細胞内にグリコーゲン顆粒が多く蓄積していることがわかった (図 6)。そこで、図 3 の増殖曲線において経時的にグリコーゲン量がどのように変動しているのかを調べた (図 7 A)。その結果、WT では光従属栄養条件に継代して 48 時間後にグリコーゲンが蓄積しており、その後 96 時間後にはその量が減少するようなパターンになっていることがわかった。一方で、*sll1415* 破壊株でも光従属栄養条件に継代してから 48 時間後では WT と同様にグリコーゲンが蓄積するのに対して、光従属栄養条件に継代してから 48 時間後から 96 時間後にかけて、48 時間後よりもグリコーゲンは減少するものの、WT よりもグリコーゲン量が高蓄積していることが分かった。その為、WT は 48 時間で一過的に蓄積するグリコーゲンを 48 時間後から 96 時間後にかけて炭素源として消費する一方で、*sll1415* 破壊株では炭素代謝に異常が生じ、48 時間後から 96 時間後にグリコーゲンが消費できずに蓄積していると考えられた。一方で、通常光条件において *slr0400* 破壊株では、グリコーゲンが WT よりも減少していた (図 7)。

2.3.6 シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 が有するグリコーゲン関連遺伝子の光従属栄養条件における遺伝子発現変化

光従属栄養条件に継代してから 48 時間後と 96 時間後でグリコーゲン合成関連遺伝子の発現パターンを調べた。グリコーゲンは図 7 C の示す経路で合成され、G1P から ADP-グルコースを合成する *agp* (*ADP-glucose pyrophosphorylase*; *slr1176*) と ADP-グルコースか

らグリコーゲンを合成する *gs-1,2* (*glycogen synthase1, 2*; *sll0945, sll1393*)、グリコーゲン分岐酵素の *gbe* (*glycogen branching enzyme*; *sll0158*) (図 7C) の遺伝子発現を解析した。その結果、WT ではグリコーゲン量の変動パターンと同様にグリコーゲン合成遺伝子の発現量は、48 時間で独立栄養条件に比べて上昇し、96 時間後に減少した (図 7B)。*sll1415* 破壊株も、グリコーゲン合成に関連する遺伝子が 48 時間では WT と同様に上昇し、96 時間では 48 時間に比べて遺伝子発現量は減少していた。しかしながら、*sll1415* 破壊株では光従属栄養条件に継代してから 96 時間後に WT よりもグリコーゲン合成遺伝子の発現量が高くなっていた (図 7B)。このことから、*sll1415* 破壊株ではグリコーゲンが消費できていないだけでなく、代謝不全によって蓄積したグリコーゲン合成のための基質が貯まることでグリコーゲン合成方向の代謝が WT に比べて活性化されていると予測された。

一方で、グリコーゲン合成遺伝子に関連する遺伝子発現が *slr0400* 破壊株では WT に比べて減少していた (図 7B)。

2.3.7 光従属栄養条件における糖代謝に関与する酵素活性測定

光従属栄養条件は培地にグルコースと、光合成電子伝達阻害剤の DCMU を添加する条件である。DCMU は光化学系 II の Q_A から Q_B への電子伝達を阻害するため、光合成電子伝達により NADPH が生産できない。その為、光従属栄養条件では酸化的ペントースリン酸経路において G6P を 6 PG に変換する G6PDH (*glucose-6-phosphate dehydrogenase*)、6 PG (6-phosphate dehydrogenase) を Ru5P に変換する 6 PGDH によって $NADP^+$ を NADPH に変換する。その為、糖代謝に関連する酵素活性の比較を行った (図 8)。その結果、光従属栄養条件に移してから 96 時間後に、*sll1415* 破壊株では G6PDH と 6 PGDH の酵素活性が WT よりも低下していた。また、グルコースの代謝経路として解糖系と酸化的ペントースリン酸経路に加えて、Entner-Doudoroff (ED) 経路が同定されている (Chen et al., 2016) ため、GDH (*glucose dehydrogenase*) の酵素活性を測定した。その結果、*sll1415* 破壊株では GDH の酵素活性が WT よりも上昇していた (図 8)。さらに、グリコーゲンが蓄積していた理由としてグリコーゲンの分解が影響を受けている可能性を検討するために、グリコーゲン分解酵素の Glycogen phosphorylase の酵素活性を測定した。その結果、*sll1415* 破壊株では WT よりもむしろ Glycogen phosphorylase の酵素活性が上昇していた (図 8)。その為、*sll1415* 破壊株では蓄積したグリコーゲンが分解されつつも何らかの要因によって WT よりも *sll1415* 破壊株の方がグリコーゲン合成方向への代謝が活性化していると考えられた。

2.3.8 光従属栄養条件における代謝解析

sll1415 破壊株の代謝不全の原因を明らかにするために、光従属栄養条件に継代してから 96 時間後における主要一次代謝を CE-MS で解析した。その結果、WT とそれぞれの NADK 破壊株の代謝パターンは異なることが分かり (図 9A, B)、光従属栄養条件においてもそれぞれの NADK は異なる機能を有していることが支持された。さらに、*sll1415* 破壊株では

WT に比べて G6P と 6 PG が蓄積していた一方で、その代謝反応以降の有機酸やアミノ酸が WT に比べて減少していた (図 9C, D)。 *Synechocystis* sp. PCC 6803 は光従属栄養条件でグルコースを酸化的ペントースリン酸経路で代謝することで、光合成で合成できない NADPH を合成していると考えられている (Nakajima et al., 2014)。酸化的ペントースリン酸経路において、G6P から 6 PG、6 PG から Ru5P への変換には NADP⁺が補因子として必要である。その為、*sll1415* 破壊株では NADP⁺供給が不足することで酸化的ペントースリン酸経路が滞り、糖代謝の不全を引き起こすことで増殖阻害が引き起こされていると考えた。

一方で、*slr0400* 破壊株は、通常光条件で糖リン酸系の代謝物が WT よりも減少していることが分かっていた (Ishikawa et al., 2016)。さらに、光従属栄養条件においても、*slr0400* 破壊株では糖リン酸が WT に比べて減少していた (図 9、10)。これらのことから、*slr0400* 破壊株では未知のメカニズムによって糖代謝が亢進し、炭素飢餓になっていることが示唆された。

2.3.9 光従属栄養条件において *sll1415* の遺伝子発現を規定する因子の探索

sll1415 は独立栄養条件に比べて、光従属栄養条件に継代してから 48 時間後から 96 時間後までで遺伝子発現が上昇していた。その一方で、*slr0400* は独立栄養条件や光従属栄養条件に継代してから 96 時間後に遺伝子発現量が減少していた。このことから、二つの NADK は培養条件ごとに遺伝子発現を制御されることで適切に使い分けられている可能性が考えられた。

光従属栄養条件における *sll1415* の遺伝子発現量を規定する因子を探索するために、*sll1415* のように従属的な栄養条件で増殖阻害を引き起こす変異体を文献調査した。その結果、明暗条件でグルコースを添加する条件で時計遺伝子の *kaiABC* 遺伝子の破壊株が増殖阻害を引き起こすことが報告されていた (Dorrich et al., 2014)。そこで、WT を用いて明暗条件下で NAD(P)(H)量を測定すると、NADPH と NADH は明所で増加し、暗所で減少していた (図 12)。その一方で、NADP⁺は暗所から明所に移してから約 6 時間後、明所から暗所に移してから約 3 時間後に増加していた。そこで、時計遺伝子 *kaiABC* の遺伝子破壊株を作出し (図 13A,B)、明暗条件 (12 h Light/12 h Dark) でグルコースを添加する培養条件での増殖度を調べた。その結果、*kaiABC* 遺伝子破壊株も *sll1415* 破壊株も、明暗下でグルコースを添加する条件では増殖阻害を引き起こした (図 13)。そこで、明暗条件下の WT で見られた一過的な NADP⁺の増加が *kaiABC* 遺伝子破壊株と *sll1415* 遺伝子破壊株でどのように影響を受けているのか調べた。すると、WT で暗所から明条件に移してから 6 時間後に見られる NADP⁺の増加は *kaiABC* 遺伝子破壊株と *sll1415* 遺伝子破壊株で見られなかった (図 14)。このことから、従属栄養条件における *sll1415* の遺伝子発現が *kaiABC* 遺伝子に規定されている可能性が示唆された。

2.4 考察

第 2 章「*sll1415* の機能解析」では光独立栄養条件から光従属栄養条件に移した際の、*Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する二つの NADK (Sll1415、Sllr0400) の機能を、それぞれの NADK 破壊株を用いることで調べた。光独立栄養条件から光従属栄養条件に移した後の 96 時間後、WT では NADP⁺ と NADPH が増加しており、結果として NADP(H)/NAD(H) が上昇していた (図 5)。近年、シロイヌナズナでは葉緑体局在性 NADK2 を高発現させ NADP(H)/NAD(H) を増加させた際、炭素代謝や窒素代謝が亢進していることが報告されている (Takahashi et al., 2009)。その為、光従属栄養条件においても NADP(H)/NAD(H) が上昇するタイミングで炭素・窒素代謝が亢進、もしくは代謝経路の切り替えのようなダイナミックな代謝変化が起こっている可能性が考えられる。

sll1415 破壊株が光従属栄養条件で増殖阻害を引き起こすことはすでに、報告されていた (Gao and Xu., 2012)。しかしながら、その詳細な増殖阻害の原因に関しては知見が乏しく、第 2 章では、詳細に *sll1415* 破壊株の解析を行った。さらに、光従属栄養条件のみならず、Light-activated heterotrophic condition (LAHG) でも *sll1415* 破壊株が増殖阻害を引き起こすことを見出し、*sll1415* はグルコース代謝に重要であることが明らかになった。

sll1415 破壊株を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察すると細胞内にグリコーゲン顆粒が高蓄積していることがわかった (図 6)。さらに、グリコーゲンが光従属栄養条件に移してから 48 時間後には蓄積しており、グリコーゲン合成が活性化され、96 時間後には蓄積したグリコーゲンが消費されていた (図 7)。また、培地中のグルコース量を定量すると、光従属栄養条件に移してから 96 時間後には WT は培地中のグルコースを消費しきっていた。このことから、光従属栄養条件に移してから 96 時間後には一度蓄積したグリコーゲンをグルコースの代替の炭素源として消費していると考えた。また、グルコースは光が照射されると酸化されたグルコースがシアノバクテリアにとって毒になることが報告されている (Narainsamy et al., 2013)。その為、光従属栄養条件に移してから 48 時間後にグリコーゲンが細胞内で蓄積しているのは細胞内にグルコースを蓄積しないように、グリコーゲンとして貯蔵している可能性がある。その一方で、*sll1415* 破壊株ではグリコーゲンが光従属栄養条件に移してから WT に比べて蓄積しており、培地中のグルコースも消費されていなかった。このことから、*sll1415* 破壊株ではグルコースが正常に消費されないことで、副次的に細胞内にグリコーゲンが蓄積していると考えられた。

Synechocystis sp. PCC 6803 はグルコースを主に酸化的ペントースリン酸経路で代謝することが知られている (Nakajima et al., 2014)。酸化的ペントースリン酸経路は G6P から 6 PG、6 PG から Ru5P への代謝に NADP⁺ が補因子として必要であり、光従属栄養条件では光合成電子伝達で合成できない NADPH を合成するために、解糖系に加えて酸化的ペントースリン酸経路が駆動していると考えられている (Nakajima et al., 2014)。*sll1415* 破壊株では光従属栄養条件に移してから 96 時間後に WT に比べて G6PDH と 6 PGDH の酵素活性が低下していた (図 8)。また、代謝解析では G6P と 6 PG が WT に比べて蓄積し、他の代

謝物が減少しており、*sll1415* 破壊株では、光従属栄養条件で駆動すべき酸化のペントースリン酸経路が代謝不全を引き起こしていると考えられる。近年、*Synechocystis* sp. PCC 6803 では解糖系と酸化のペントースリン酸経路に加えて、Entner-Doudoroff (ED) 経路が同定されている (Chen et al., 2016)。ED 経路は、混合栄養条件や明暗条件での生育に必要であることが示されており、*sll1415* 破壊株では ED 経路によるグルコースから 6 PG の合成が活性化されていると予測した。そこで、ED 経路の GDH の酵素活性を測定すると *sll1415* 破壊株では GDH の酵素活性が上昇していた (図 8)。このことから、*sll1415* 破壊株が光従属栄養条件で酸化のペントースリン酸経路が滞っているにもかかわらず、完全に細胞が死なず、増殖がわずかに増えるのは GDH が活性化し、ED 経路によるグルコース代謝が補われている可能性がある。

これらの結果より、第 2 章で明らかにした WT と *sll1415* 破壊株の代謝の状態をモデルとして図 11 に表した。WT では炭素源を酸化のペントースリン酸経路により代謝する。その一方で *sll1415* 破壊株では NADP⁺ 供給が不足することで酸化のペントースリン酸経路が滞る。加えて、グリコーゲン合成方向の代謝が *sll1415* 破壊株では維持されたままになっており、細胞内にグリコーゲンが高蓄積していると考えられた。

通常光の培養条件では WT とそれぞれの NADK 破壊株の増殖に差はない (Ishikawa et al., 2016)。しかしながら、*slr0400* 破壊株は WT および *sll1415* 破壊株と代謝パターンが異なり、*slr0400* は *sll1415* とは異なる役割を持っていると予測された。第 2 章では *sll1415* が光従属栄養条件における糖代謝に重要であることを示したが、その一方で *slr0400* はグリコーゲンの蓄積やグリコーゲン合成に関与する遺伝子発現、炭素代謝に重要であることもわかった。

slr0400 破壊株を通常光条件で培養した場合、WT よりもグリコーゲン量が減少していた (図 7)。さらにグリコーゲン合成に関連する *agp* 遺伝子の発現量が WT よりも減少していた (図 7)。また、*slr0400* 破壊株では光従属栄養条件においても WT や *sll1415* 破壊株と代謝パターンが異なり、F6P、G6P、fumarate、G3P、G1P が WT に比べて減少していた (図 9)。そのため、*slr0400* はグリコーゲンを代謝するうえでカルビンベンソン回路か解糖系の代謝反応に影響を与えている可能性が示唆された。

さらに、*slr0400* 破壊株では通常光条件で NAD⁺/NADH が WT に比べて増加し、NADPH が減少していた (図 5)。その為、*slr0400* 破壊株は通常光条件であるのにも関わらず、従属栄養性の代謝になっている可能性が考えられた。実際、*slr0400* 破壊株は光従属栄養条件に移してから NADH が増加するため、NAD⁺ から NADH への変換が起こるような糖代謝が活性化している可能性が予測された。

それぞれの NADK 破壊株の代謝パターンが異なっていたことから、それぞれの NADK は機能が異なると考えられる。さらに、*sll1415* は光従属栄養条件に移してから遺伝子発現が増加するが、*slr0400* は減少する。その為、それぞれの NADK を上流で制御する因子が NAD(P) をモニターし、適切にそれぞれの NADK を転写制御することで代謝の要求性、方

向性に合わせて NAD(P)量を調節していると考えられる。時計遺伝子 *Kai* が従属的な栄養条件で増殖阻害を起こすことに着目したのと同時に、明暗下で NADP^+ が一過的に変動することを見出したことで、時計遺伝子 *Kai*と *sll1415*には何らかの関連性があることが示唆された。現時点では、明暗下における NAD(P)(H)の変動の意義や、分子的な時計遺伝子との関連性は不明であり、今後さらなる詳細な解析が求められる。

2.5 結論

シアノバクテリアは基本的には多くの代謝反応が混在し、細胞区画が単一であるのに関わらず、多くのシアノバクテリアは二つの NADK を有する。第 2 章「*sll1415*の機能解析」では *Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する二つの NADK のうちの *sll1415*が光従属栄養条件における酸化のペントースリン酸経路を介した糖代謝に必須であることを示した。その一方で、*slr0400*に関しても、*sll1415*とは異なる機能を有していることが示唆され、糖代謝の抑制因子として働いている可能性が示唆された。

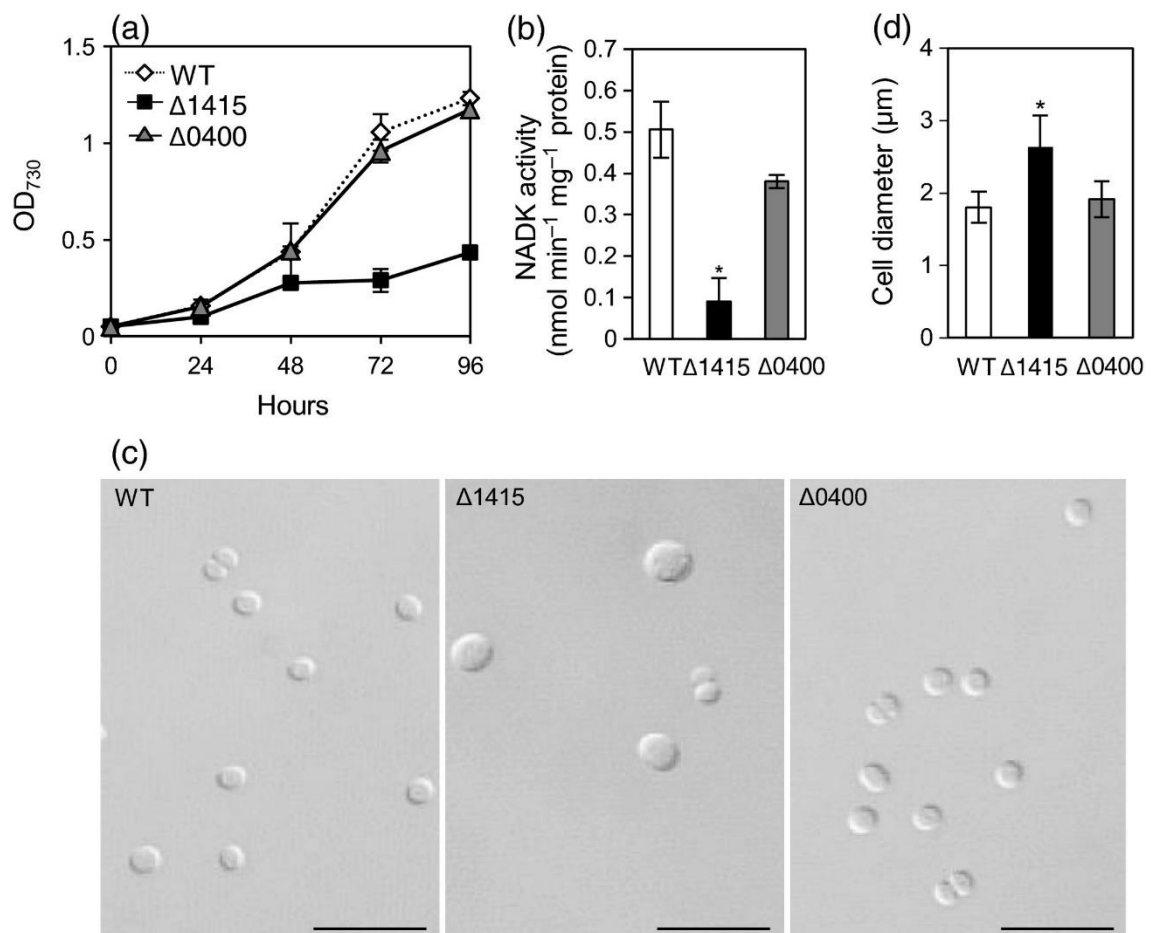


図3 光従属栄養条件における WT と *NADK* 変異体の増殖の比較
A, 光従属栄養条件における WT と *NADK* 変異体の増殖曲線 (n=3)。B, NADK 活性 (n=3, * $P<0.05$)。C, 培養4日目の細胞の光学顕微鏡による形態観察、スケールバーは 10 μ m。D, 細胞の直径の比較 (n=50, * $P<0.01$)。

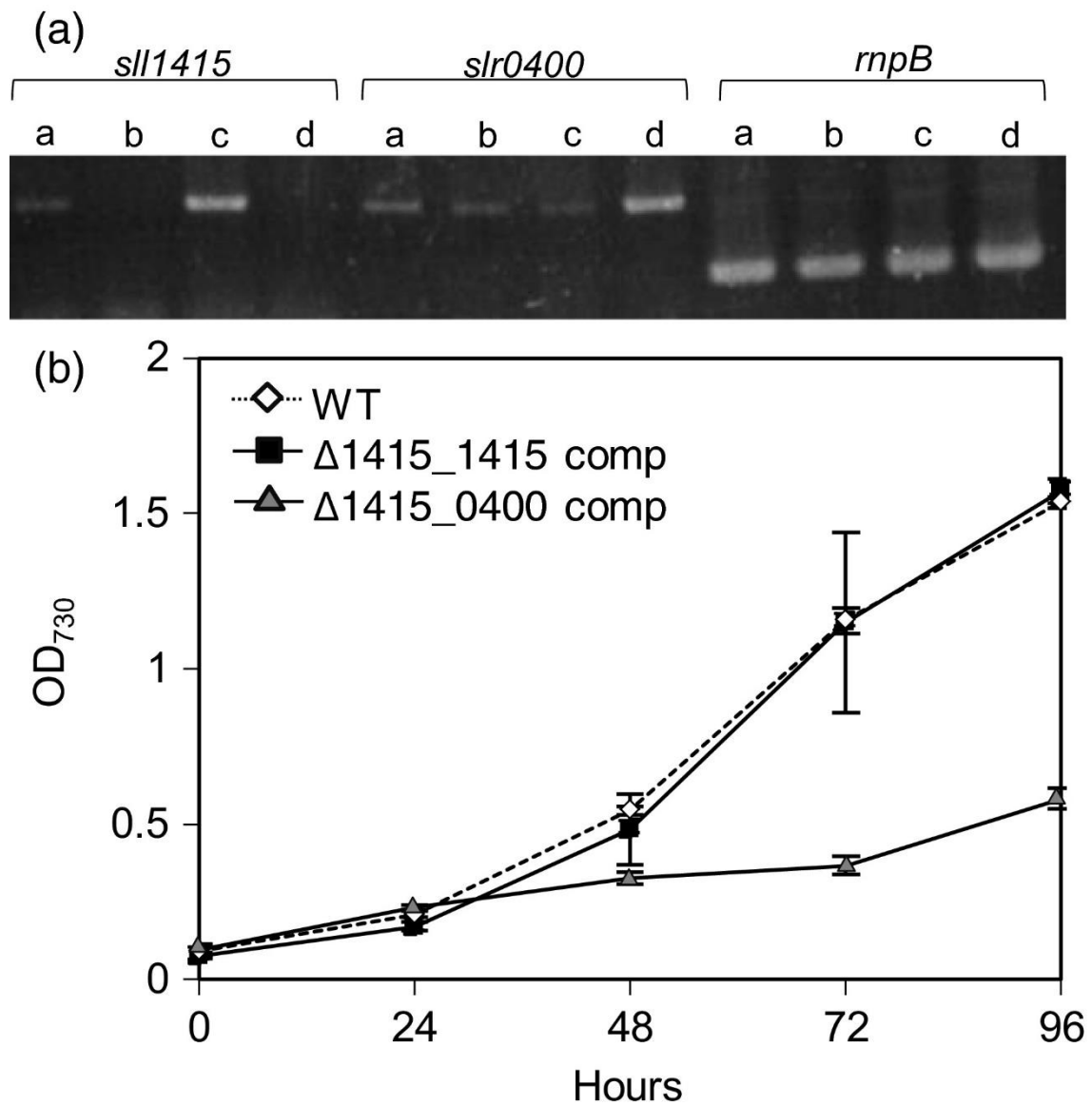


図4 光従属栄養条件における *NADK* 変異体の相補試験

A, RT-PCR による *sll1415*、*slr0400* の発現解析。独立栄養条件で培養4日目の細胞からRNAを抽出し、RT-PCRを行った。a, WT、b, *sll1415*破壊株、c, *sll1415*破壊株に*sll1415*を高発現させた株、d, *sll1415*破壊株に*slr0400*を高発現させた株。B, 光従属栄養条件におけるWTと*sll1415*又は*slr0400*を発現させた*NADK*変異体の増殖曲線(n=3)。

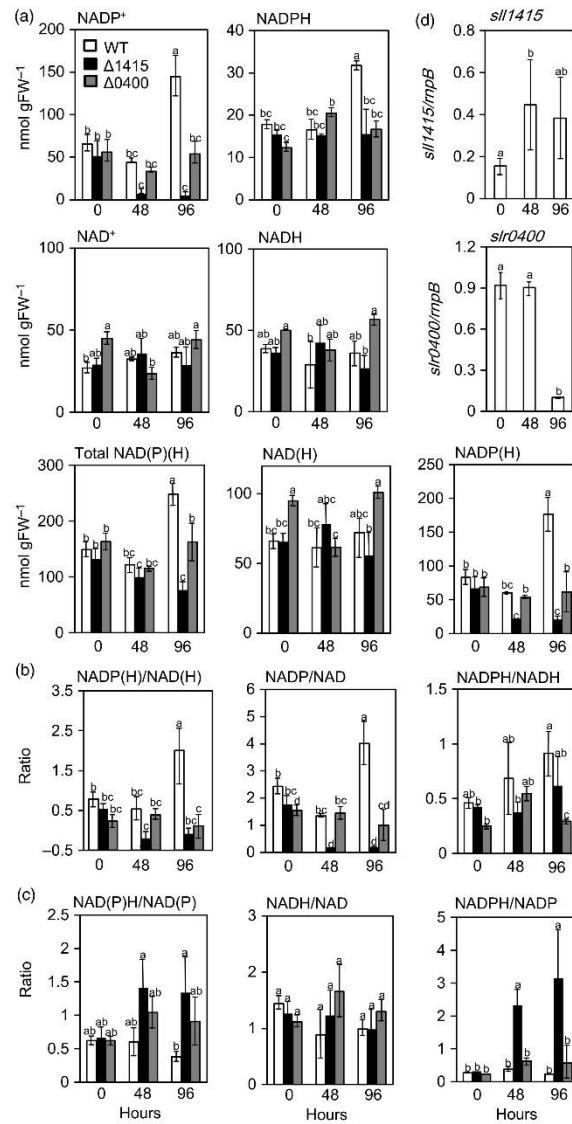


図 5 光従属栄養条件における WT と *NADK* 変異体の NAD(P)(H)定量 (a-c)、WT の光従属栄養条件におけるそれぞれの *NADK* の遺伝子発現解析 (d)。

a, 通常光条件から光従属栄養条件に移してから 48 時間後と 96 時間後における NAD(P)(H)量の変化。b, 通常光条件から光従属栄養条件に移してから 48 時間後と 96 時間後の NADP(H)/NAD(H)の変化。c, 通常光条件から光従属栄養条件に移してから 48 時間後と 96 時間後の NAD(P)H/NAD(P)の変化。d, WT を通常光条件から光従属栄養条件に移してから 48 時間後と 96 時間後のそれぞれの *NADK* の遺伝子発現変化 (n=3, $P<0.05$, Tukey's test)。

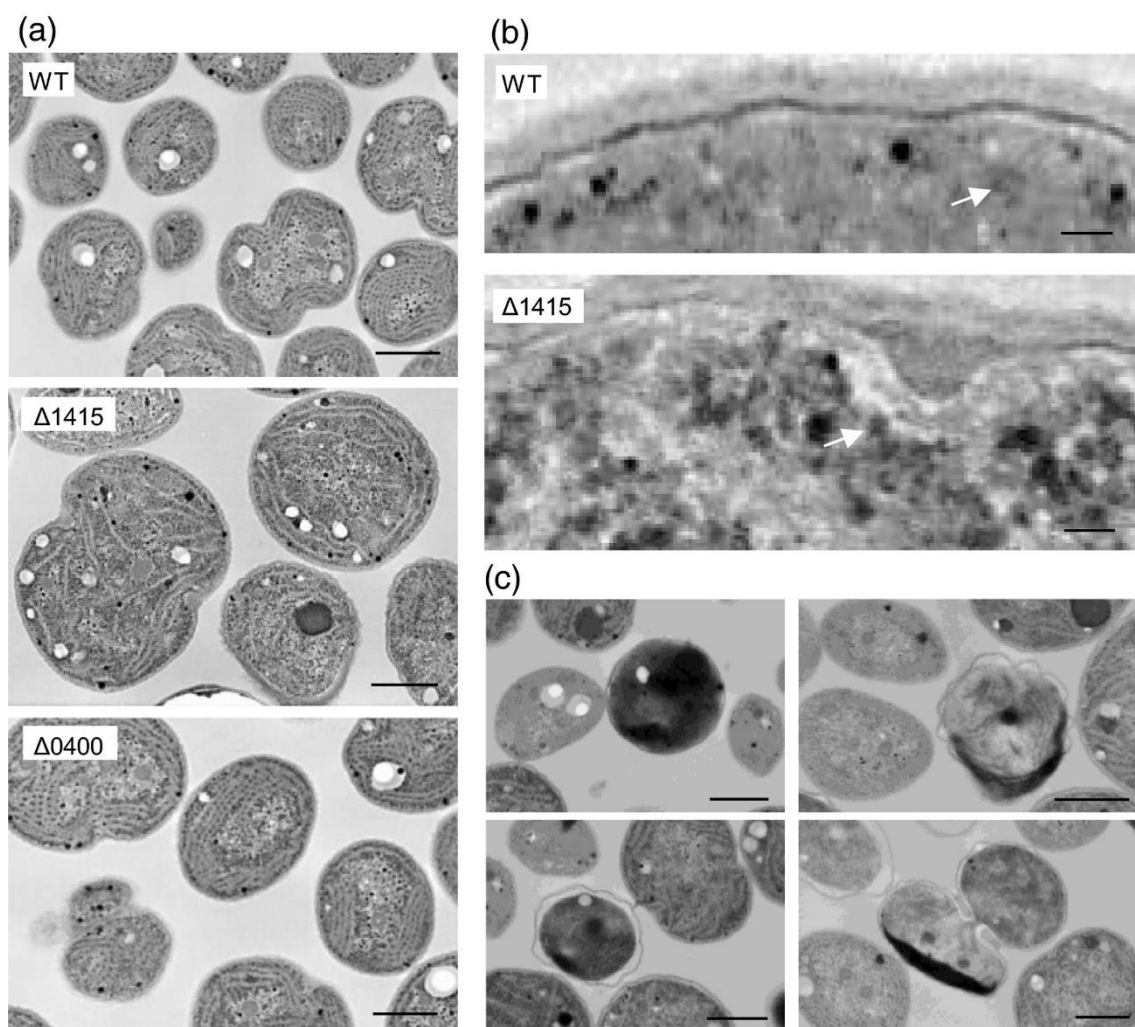


図6 光従属栄養条件における WT と *NADK* 変異体の形態観察
A, 通常光条件から光従属栄養条件に移してから 96 時間後の WT と *NADK*破壊株の形態観察。スケールバーは 1 μm を示す。B, 白い矢印はグリコーゲン顆粒を示す。C, *sll1415*破壊株で特徴的な細胞を示す。

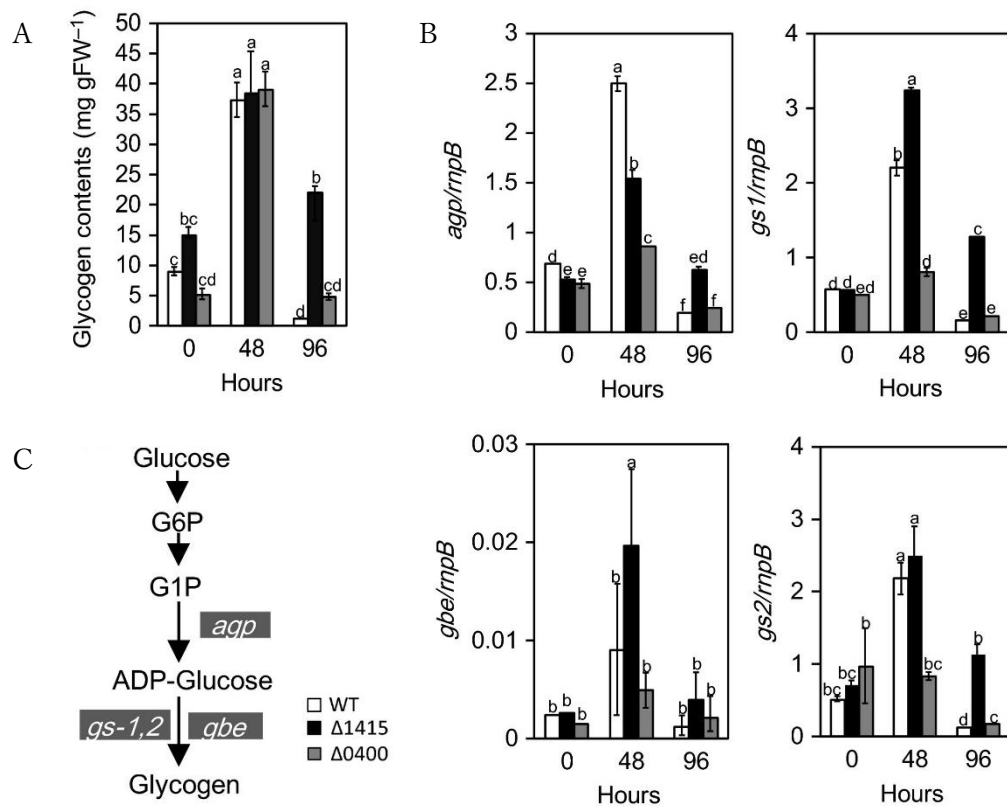


図7 光従属栄養条件における WT と *NADK* 変異体のグリコーゲン合成に関連する遺伝子発現解析

A, 光従属栄養条件における WT と *NADK* 変異体のグリコーゲン量の定量 ($n=3$, $P<0.05$, Tukey's test). B, 通常光条件から光従属栄養条件に移してから 48 時間、96 時間後の WT と *NADK* 破壊株のグリコーゲン合成の遺伝子発現解析 (*agp*, *gs1*, *gbe*, *gs2*). それぞれの値は *rnpB* で補正している ($n=3$, $P<0.05$, Tukey's test). C, グリコーゲン合成に関連する遺伝子。 *agp*: ADP-glucose pyrophosphorylase (*slr1176*); *gs-1*: glycogen synthase 1 (*sll0945*); *gs-2*: glycogen synthase 2 (*sll1393*); and *gbe*: glycogen branching enzyme (*sll0158*).

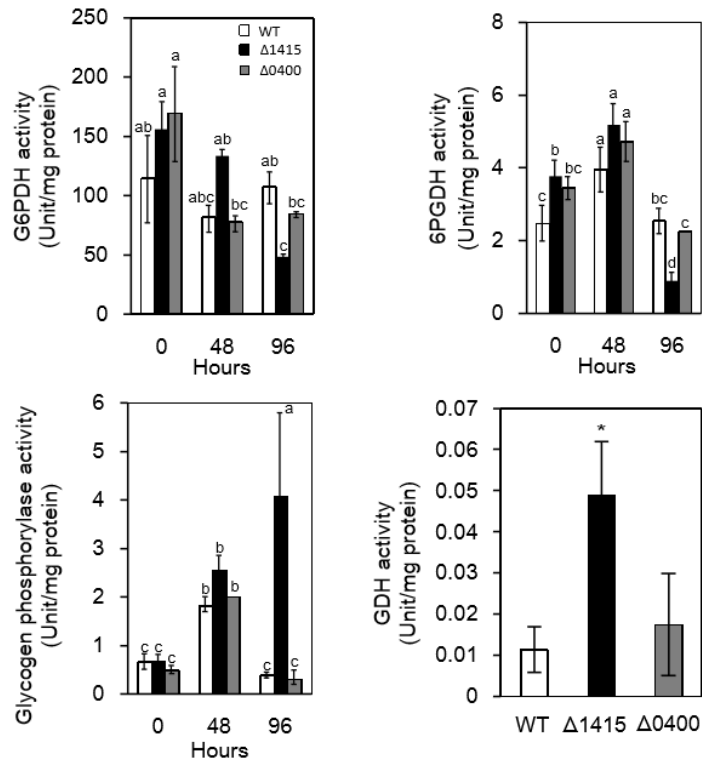


図 8 光従属栄養条件における WT と *NADK* 変異体の糖代謝に関連する酵素活性測定 A, 通常光条件から光従属栄養条件に移してから 48 時間、96 時間後の WT と *NADK* 破壊株の酵素活性測定 (G6PDH, 6PGDH, Glycogen phosphorylase activity, GDH) (n=3、 $P<0.05$ 、Tukey's test)。G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; 6PGDH, 6-phosphate dehydrogenase; GDH, glucose dehydrogenase.

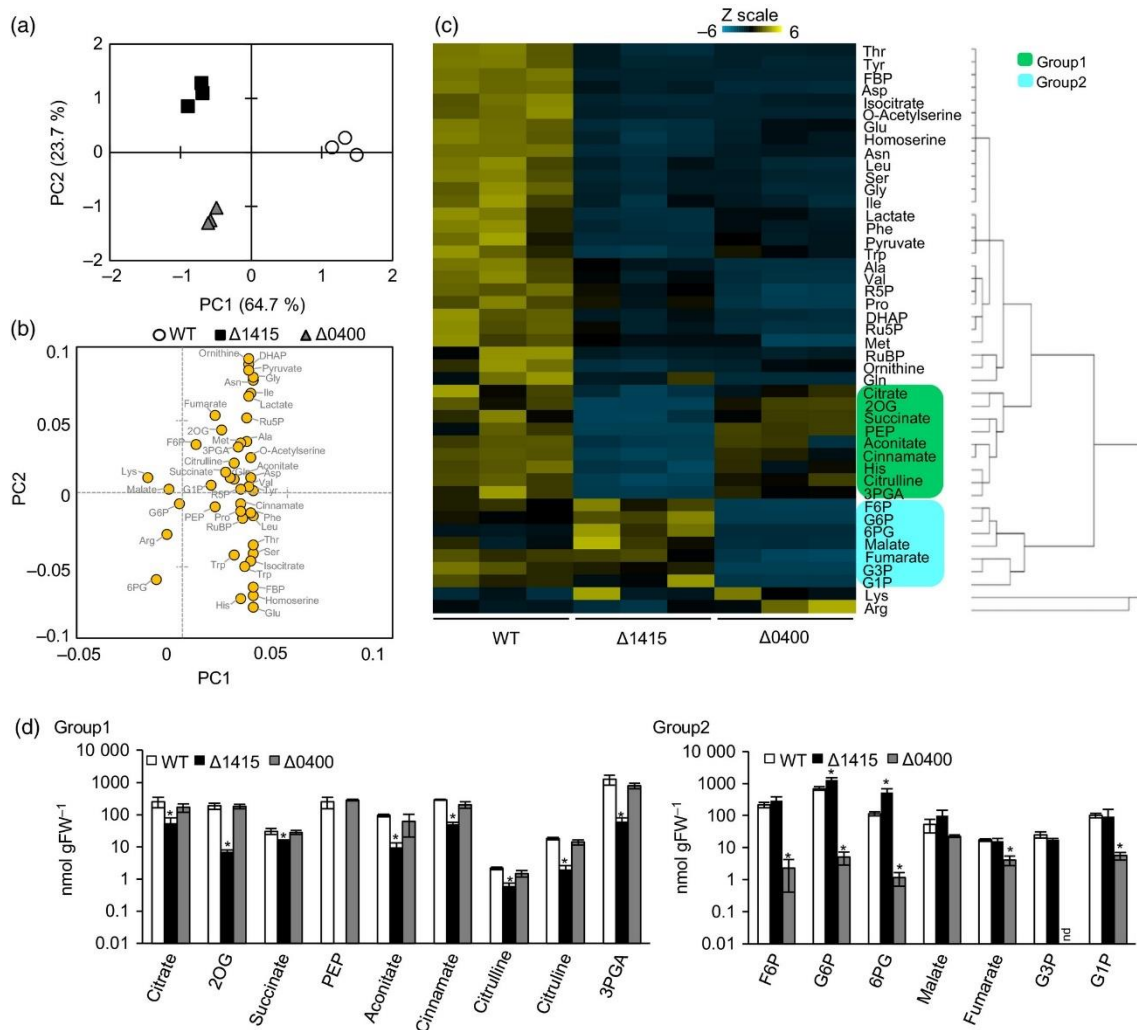


図9 光従属栄養条件における WT と *NADK* 変異体の代謝解析

A, 代謝物データを用いた主成分分析。B, 代謝物の Loading score。C, 代謝物のクラスター解析及びヒートマップ。Z 得点に正規化した値を WT との比をとり、WT よりも多ければ黄色くなり、少なくなれば青くなるように色付けしている。D, WT と *slr0415* 破壊株もしくは *slr0400* 破壊株の値が有意に異なる代謝物をグラフにした ($n=3$, $*P<0.05$)。DHAP, Dihydroxyacetone phosphate; FBP, Fructose-1,6-bisphosphate; F6P, Fructose-6-phosphate; G1P, Glucose-1-phosphate; G3P, Glucose-3-phosphate; G6P, Glucose-6-phosphate; PEP, Phosphoenolpyruvate; RuBP, Ribulose-1,5-bisphosphate; Ru5P, Ribulose-5-phosphate; R5P, Ribose-5-phosphate; 2OG, 2-oxoglutarate; 3PGA, 3-phosphoglycerate; 6PG, 6-phosphogluconate, Ala, Alanine; Arg, Arginine; Asn, Asparagine; Asp, Aspartic acid; Gln, Glutamine; Glu, Glutamic acid; Gly, Glycine; His, Histidine; Ile, Isoleucine; Leu, Leucine; Lys, Lysine; Met, Methionine; Phe, Phenylalanine; Pro, Proline; Ser, Serine; Thr, Threonine; Trp, Tryptophan; Tyr, Tyrosine; Val, Valine.

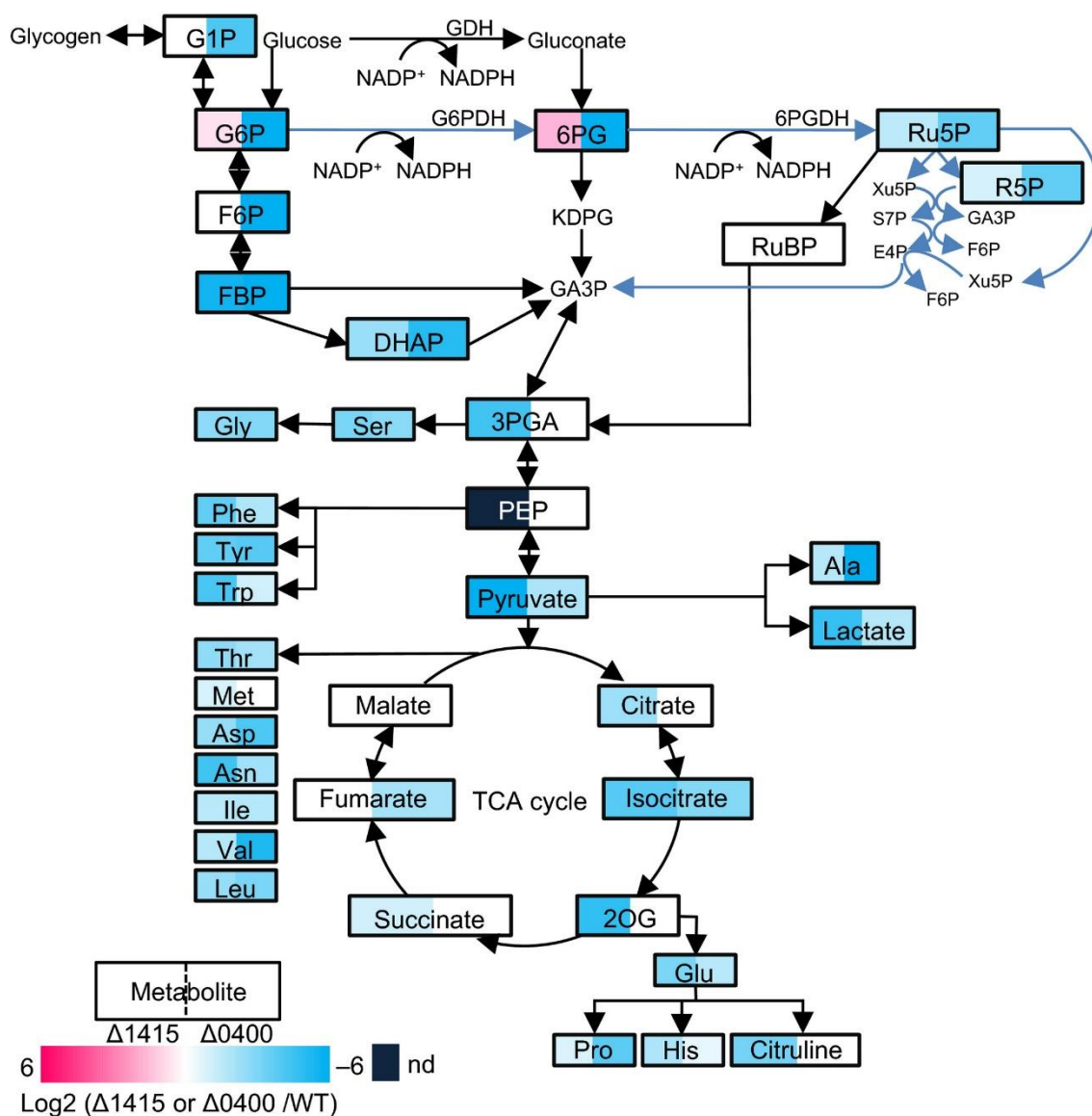


図 10 *NADK*変異体における代謝変化

得られた代謝データを WT に対する比をとり、代謝経路上に示した。赤くなるほど WT に対して増加していることを表し、青くなるほど WT よりも減少していることを示している。KDPG, 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate; Xu5P, xylulose-5-phosphate; S7P, sedoheptulose-7-phosphate; E4P, erythrose-4-phosphate; GA3P, glyceraldehyde-3-phosphate。

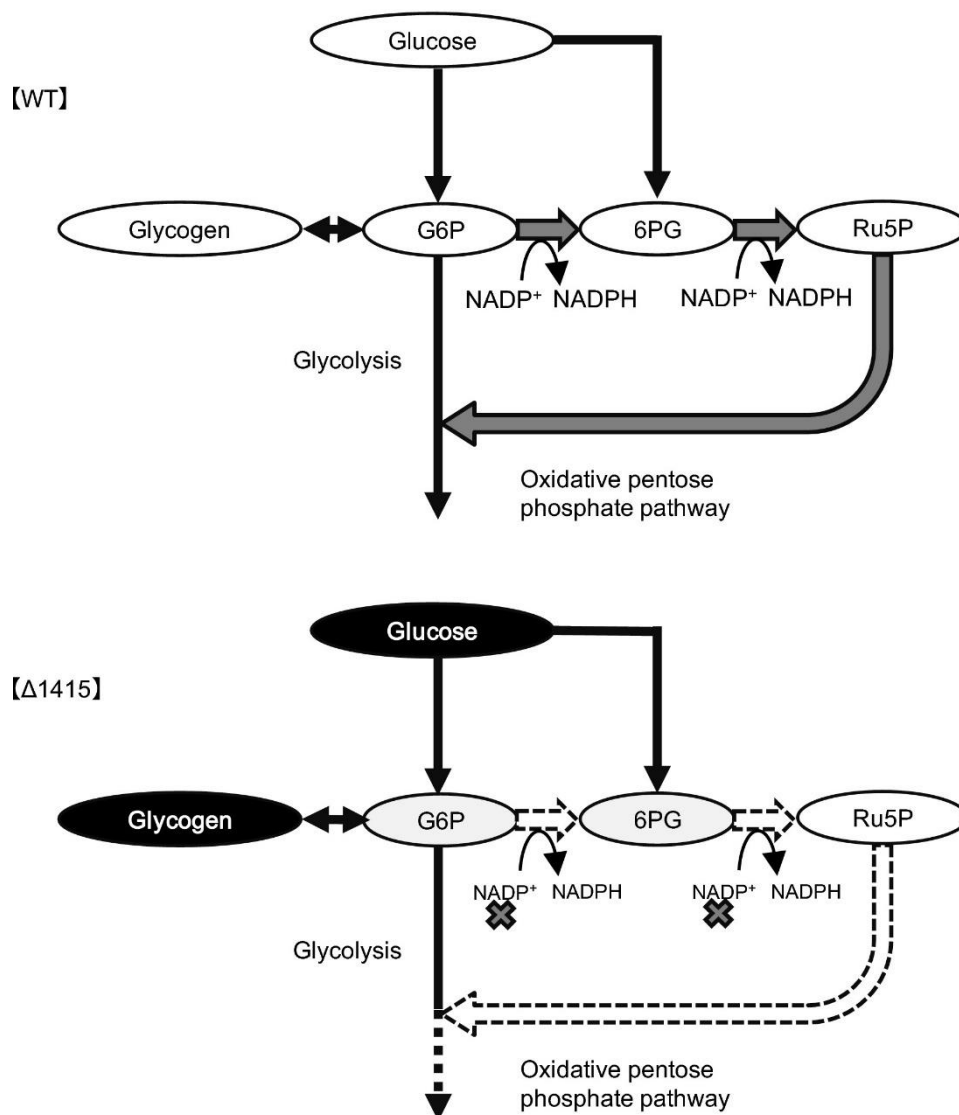


図 11 光従属栄養条件における WT と *sll1415*破壊株における糖代謝のモデル
 WT では酸化のペントースリン酸経路でグルコースを代謝する。*sll1415* 破壊株では酸化のペントースリン酸経路が滞り、グリコーゲンが蓄積していると考えられる。

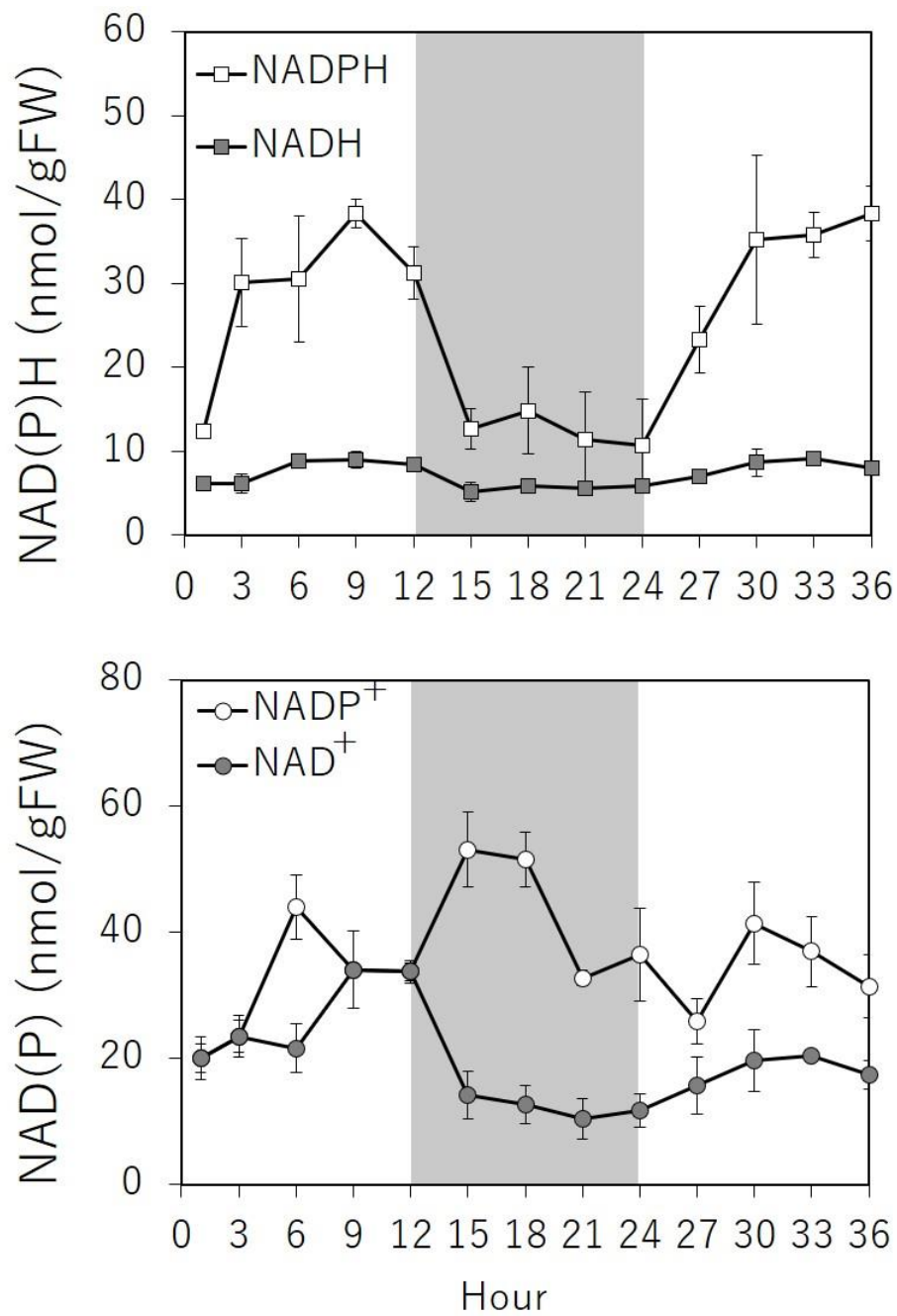


図 12 明暗条件下 (12 h Light/12 h dark) における WT の NAD(P)(H)量の変化
4 日間連続光条件で培養した後の明所→暗所→明所でサンプリングし、定量した (n=3)。

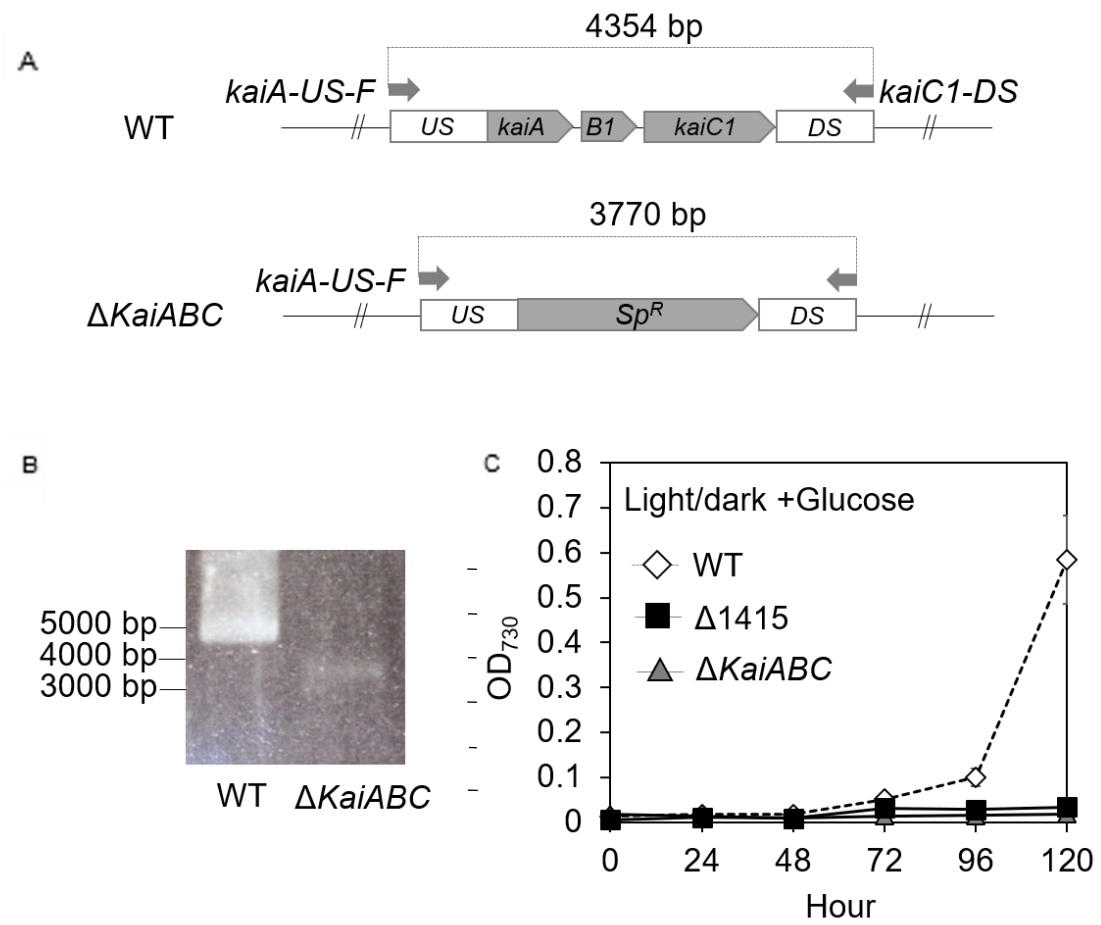


図 13 時計遺伝子 (*Kai*) 破壊株の作出

A, *kaiABIC1* をスペクチノマイシン抗生物質耐性遺伝子で置き換えた。B, ゲノム PCR。C, 明暗条件 (12 h Light/ 12 h Dark) にグルコースを添加した条件における増殖比較 (n=3)

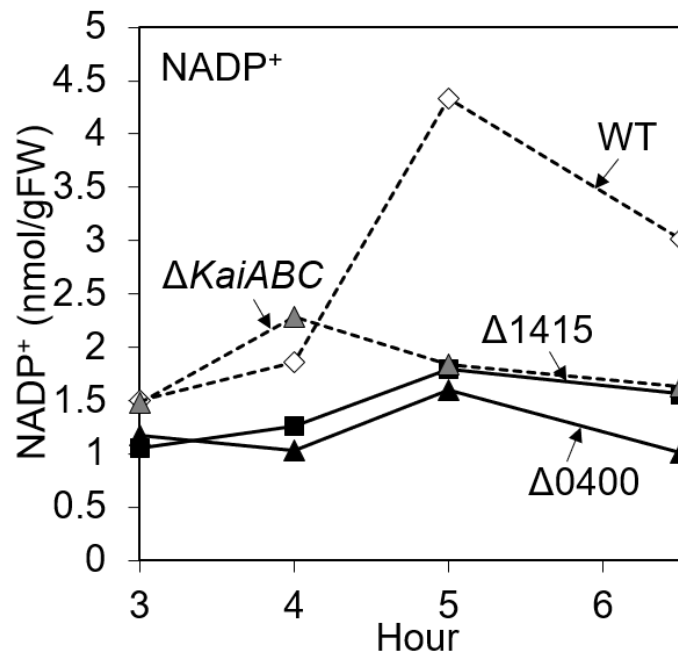


図 14 暗所から明所に細胞を移した後の、WT と時計遺伝子 (*Kai*) 破壊株、*NADK* 破壊株の $NADP^+$ 定量
 図 12 と同じ条件で $NADP^+$ の変動を計測した (n=3)。

第3章 *slr0400* の機能解析

3.1 概要

Synechocystis sp. PCC 6803 が有する二つの NADK を同時に破壊したダブルノックアウト株が、致死になることを報告した (Ishikawa et al., 2016)。また、ゲノムが報告されているシアノバクテリアは多くが 2 種類の NADK を有していることが報告されている (Gao and Xu., 2012)。さらに、第 2 章で *slr1415* 破壊株と併せて *slr0400* 破壊株の解析を行い、*slr0400* は従属栄養性に関連している可能性が示唆された。しかしながら、これまで *slr0400* の生理機能に関しては全く知見がなく、その生理機能の解明は、シアノバクテリアが二つの NADK を用いてどのように NAD(P)(H)量を調節しているのか、という問いに迫る上で必要な情報である。そこで、本研究では、*slr0400* 破壊株を様々な培養条件で培養し、表現型を探索した。

3.2 実験方法

・培養条件

強光条件は、光量 $150 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 、 30°C 、100 rpm で培養した。培地は、BG-11 である。Light-activated heterotrophic condition (LAHG) は BG-11 培地にグルコース (5 mM) を添加し、暗所で培養し、一日に一度、同じ時間に $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の光を 15 分照射した。明暗条件は $30 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 、 30°C 、100 rpm で培養しつつ、明期 (12 時間) と暗期 (12 時間) を設けた。グルコースを添加した際は終濃度 5 mM のグルコースを添加した。

その他、解析の際は、前培養は OD_{730} を 0.0075 に合わせ、96 時間、通常光で培地は BG-11 で培養した。光合成関連の解析の際は早稲田大学園池研究室まで 50 ml ファルコンチューブにスポンジを滅菌して取り付け、アルミホイルで遮光しつつ、サンプルに光が当たらないように運搬した。NAD(P)(H)定量、代謝解析の際は前培養後のサンプルにグルコース (5 mM) を添加した後の経時変化を測定した。

・クロロフィル定量

OD_{730} をサンプル間で同じになるように希釈したサンプル 1 ml を、14000 rpm、10 min で遠心し、上清を除いた。ペレットに 100 % MeOH を 1 ml 添加し、ボルテックスで破碎した。10000 rpm、10 min 遠心し、上清を回収した。上清の OD_{665} を測定し、13.4 を掛けた値を $\mu\text{gChl}/\text{ml}$ として算出した。

・Water-PAM によるクロロフィル蛍光測定

クロロフィル蛍光測定は、Water-PAM (Waltz) を用いた。サンプルは、 OD_{730} を 0.2 になるように希釈した後、 F_0 、 F_s 、 F_m' 、 F_m は以下の式で算出した。 F_m は 10 μM の DCMU を添加して測定した。

$qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$ 、 $qN = 1 - (F_m' - F_0') / (F_m - F_0)$ (Van kooten and Snel., 1990), $\phi_{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$ (Bilger et al., 1995, Genty et al., 1989), $\phi_{NPQ} = F_s / F_m' - F_s / F_m$, $F_0' = F_0 / \{F_v / F_m\} + (F_0 / F_m')$ (Oxborongh and Baker., 1997).

- ・ Q_A の再酸化率の測定

Q_A の再酸化率は二重変調蛍光光度計 (FL200PS, Photon Systems Instruments) で測定した。サンプルは OD_{730} を 0.2 に希釈し、5 分間暗処理後、測定した。30 μ s の短い閃光による蛍光を 60 s モニターした。

- ・ Daul PAM を用いた NADPH 測定

弱光条件 (5 μ E/m²/s) で 9 日間培養した細胞をサンプルとして用いた。測定は、Dual PAM (Walz 社) を用いた。

- ・ ROS 定量

OD_{730} を 0.5 に合わせ、20 mM NaN₂ と 10 μ M Carboxy-H₂DCFDA (Invitrogen) を添加し、30 分暗所に静置した。1×PBS で Wash 後、蛍光を測定した。

- ・ 暗呼吸活性

暗黒下で、呼吸活性を測定した後、1 mM KCN を添加して同じタイムスケールで再度測定した。最終的な値は、最初に測定した呼吸活性の値から KCN で測定した値を引いたものである。

3.3 結果

強光条件で、WT と *slr1415* 破壊株は同様の表現型であった一方で、*slr0400* 破壊株は強光条件で黄化することが分かった (図 15)。このことから、*Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する Slr0400 は、強光条件で NADP⁺供給を担っていることが示唆された。光合成のリニア電子伝達における還元力は最終的に NADP⁺に受け渡され、NADPH に変換されることで炭酸固定の駆動力となる。しかし、強光環境におけるエネルギー供給過剰は、供給が需要を超え続けると、還元力の最終受容体 NADP⁺が枯渇し、余剰の還元力がストレスになる。そこで Slr0400 が強光条件で枯渇する NADP⁺供給を担っていると考え、光合成電子伝達の状態を Water-PAM で評価した。サンプルは、30 μ E/m²/s で 4 日間培養した細胞と、1 日強光 (150 μ E/m²/s) を照射した細胞を用いた。その結果、WT と *slr1415* 破壊株のデータに大きな違いは見られなかったが、*slr0400* 破壊株では Fv/Fm の値が強光下では大きく減少しているのに加え、通常光でさえも Fv/Fm の値が低下していた (図 16)。また、光化学系 II の実効量子収率を示す ϕ PSII が *slr0400* 破壊株では低下していたが、励起光照射下で還元していない Q_A の割合を示す qP の値に有意な差が見られず、*slr0400* 破壊株は光化学系 II 自体に問題が生じている可能性が考えられた。光化学系 II が異常になる原因としてはクロロフィル蛍光の非光化学的消光を示す NPQ の上昇が関与している可能性が考えられたが、むしろ ϕ NPQ の値は減少していたことから、*slr0400* 破壊株では光化学系 II の反応中心自体に問題が発生している可能性が考えられた。

二重変調蛍光光度計により、 Q_A の再酸化率を測定し、光化学系 II の反応中心における Q_A から Q_B への電子伝達速度を評価した。すると WT と *slr1415* 破壊株には差が見られなかったが、*slr0400* 破壊株ではクロロフィル蛍光の減衰が遅く、 Q_A から Q_B への電子伝達速度が

遅くなっていることが分かった (図 17)。このことから *slr0400* を破壊すると、強光条件のみならず通常培養条件でさえも光化学系 II にストレスがかかっていることが分かった。さらに、酸素発生型光合成の光化学系 II 反応中心を構成する D1 タンパク質の量を調べた結果、通常光培養条件 ($30 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ で 4 日間培養) では WT と *slr0400* 破壊株の D1 タンパク質量に大きな違いがみられなかったが、強光条件 ($150 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) に移してから 1 日、および 3 日後には D1 タンパク質の量が WT に比べて *slr0400* 破壊株で減少していた (図 18)。これらの結果から、*slr0400* の破壊は何らかのメカニズムにより D1 タンパク質のターンオーバーにも影響を与え、強光になると D1 タンパク質量を維持できないことが黄化へつながったと考えられた。

NADP^+ は光合成電子伝達において電子の最終的な受容体として働くことが知られ、酸化還元電位を考慮すると、光化学系 II と光化学系 I 間の他のコンポーネントから NADP^+ が電子を受け取ることができるとは考えづらい。酸化還元電位としては、光化学系 II から直接 NADP^+ が電子を受け取っている可能性はあるが、これまでそのような報告はなく、実際に *slr0400* 破壊株は NADP^+ 量が WT に比べて減少しておらず、 NADPH のみが WT よりも減少していた (図 19)。その為、光が照射された際に必要な NADP^+ プールが不足し、 NADPH が減少している、というよりもむしろ、光化学系 II がストレスを受けて正常に電子を流すことができず、 NADP^+ を NADPH へ還元できていない可能性が高いと考えた。そこで、弱光で培養した株を暗所に移し、光照射時の一過的な NADPH の生成量を Dual-PAM で測定した (図 19)。その結果、*slr0400* 破壊株の NADPH 量は WT に比べて変わらず、光照射時の NADPH 生成に *slr0400* は必要ではなく、むしろ *slr0400* 破壊株が黄化する直接的な要因は他にあると考えられた。しかしながら、具体的に *slr0400* の破壊がどの代謝に影響を与えた結果、光化学系 II が影響を受けているのかは不明であった。

強光条件において *slr0400* が必須である一方で、これまでの光従属栄養条件における解析から *slr0400* は従属栄養性にも関与している可能性が示唆されていた為、詳細に解析を行った。従属的な栄養条件として、Light-activated heterotrophic condition (LAHG) 条件で増殖特性を調べた。その結果、グルコース代謝が異常になっている *sll1415* 破壊株では増殖阻害がみられた一方 (Ishikawa et al., 2019 a)、*slr0400* 破壊株は WT よりも増殖速度が速いことが分かった (図 20、21)。さらに、12 時間明所/12 時間暗所の明暗条件では WT 及びそれぞれの *NADK* 破壊株の増殖速度に違いは見られなかったものの (Ishikawa et al., 2019 a)、明暗条件で培地にグルコースを添加すると、*sll1415* 破壊株は増殖阻害を引き起こす一方で (Ishikawa et al., 2019 a)、*slr0400* 破壊株は WT よりも増殖が早くなっており、その増殖の亢進は *slr0400* の高発現によって相補された (図 22)。その為、*slr0400* 破壊株では WT よりも糖代謝が亢進し、増殖が早くなっていると考えられた。明暗条件下において、*Synechocystis* sp. PCC 6803 は明所で増殖し、暗所では増殖が抑制される。これは、光が当たるまでは増殖を抑制することで、細胞内・外の栄養源の消費を抑えていると考えられる。また、*slr0400* 破壊株は WT に比べて早く定常期に達した (図 22)。このことから *slr0400* は

増殖期間を長く維持するための増殖の抑制因子としての働きを有していると考えられ、何らかの形で糖代謝を調節することで増殖を負に制御している可能性が考えられた。さらに、LAHG 条件は一日に一度光を照射しなければならず、グルコースを培地に添加していても、完全暗所では WT は増殖することができない。そこで、培地にグルコースを添加しておき、光を照射せずに *slr0400* 破壊株が増殖するかどうかを調べた。その結果、12 日ほどで OD₇₃₀ が約 0.1 まで増加することがわかった (図 22)。このことから、*slr0400* が破壊されると、糖代謝が亢進することで増殖度が上昇するだけでなく、完全暗所でも増殖する完全従属栄養性を獲得することが明らかとなった。

slr0400 破壊株が従属栄養性を獲得する原因を調べるため、細胞内の NAD(P)(H)量を定量した。通常光で 4 日間培養した細胞と、グルコースを添加して 3 時間、6 時間後の NAD(P)(H)量を調べた。その結果、WT では NADP⁺量はグルコース添加後に減少していたが、*slr0400* 破壊株も同様に NADP⁺がグルコース添加後に減少していき、WT とは差がなかった (図 23)。その一方で、WT において NAD⁺はグルコース添加後、増加したが、*slr0400*破壊株ではグルコース添加後一定であった。また、NADH はグルコース添加前では WT と *slr0400*破壊株に差はなかったものの、グルコース添加後 3 時間では *slr0400*破壊株で WT よりも蓄積していた。その一方で、グルコース添加後 6 時間後では *slr0400* 破壊株における NADH の蓄積は解消されていた。このことから、*slr0400* 破壊株では未知のメカニズムで NAD⁺が蓄積しており、グルコース添加後、本来 WT では、適切に増加していくべき NAD⁺により、NAD⁺が必要とされる糖異化反応が活性化され、NADH が生成されていると考えられる。しかしながら、*slr0400*破壊株では調節されるべき NAD⁺量よりも NAD⁺が蓄積することで、NAD⁺が NADH へと変換される糖代謝が活性化していると予測された。また、グルコース添加後 3 時間後から 6 時間後までには蓄積した NADH が呼吸電子伝達に用いられ、ATP を生産している可能性が考えられた。その為、通常光条件で培養した細胞を用いて、暗呼吸活性を測定した。その結果、グルコースを添加していない通常光条件では、WT に比べて、*slr0400*破壊株の暗呼吸活性は低下していた (図 24)。その一方で、通常光条件でグルコースを添加すると、WT に比べて *slr0400*破壊株の暗呼吸活性は高くなっていた (図 24)。

グルコース添加後の代謝パターンを WT と *slr0400* 破壊株で比較した。グルコースを添加してから 3 時間、6 時間後にサンプリングした細胞の代謝物を CE-MS で定量した。その結果、グルコース添加後、WT と *slr0400*破壊株において PEP、3PGA、6PG 以外の代謝物は増加していた (図 25)。その一方で、PEP、3PGA、6PG はグルコース添加後、グルコース添加前よりも減少しており、グルコース添加後、WT ではピルビン酸デヒドロゲナーゼが活性化している可能性が示唆された。同時に、*slr0400* 破壊株でも、WT と同様に PEP や 3PGA が減少していたものの、WT よりも減少していた (図 25)。これらの結果から、*slr0400* 破壊株では、WT でグルコース添加後引き起こされている代謝変化がさらに大きく起こっていると考えられ、NAD⁺が蓄積することで、ピルビン酸デヒドロゲナーゼが活性化され、

NADH が合成されていると考えられた。

3.4 考察

シアノバクテリアが、なぜ二つの NADK (*sll1415*, *slr0400*) を有するのか、という疑問に答えるためには、それぞれの NADK 破壊株のみが表現型を示す培養条件を見出すことが、最も明確に機能の違いを示す情報に為ると考えた。第 3 章「*slr0400* の機能解析」では、*sll1415* 破壊株は WT と同様の表現型を示しつつ、*slr0400* 破壊株のみが表現型を示す培養条件を探索したところ、強光条件で WT と *sll1415* 破壊株は全く同じ表現型である一方で、*slr0400* 破壊株は黄化することを見出した (図 15)。これを受け、*slr0400* は強光下における光合成電子伝達の電子の最終受容体である NADP⁺ 供給を担う働きをしていると考え、光合成関連の解析を行ったが、予想外に、*slr0400* 破壊株では光合成電子伝達の下流は詰まっておらず、むしろ光化学系 II が直接ダメージを受けており、D1 タンパク質が強光条件で減少してしまうことを示した。その為、別の代謝への影響の副次的な効果として光化学系 II が損傷している可能性、もしくは NADP⁺ が光化学系 II から電子を受け取っている可能性が考えられた。さらに、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 では Flv2 と Flv4 がコンプレックスを作り、タンパク質自体が光化学系 II からのエレクトロンシンクとして機能する、という報告もある (Pengpeng et al., 2009)。その為、NADK 同士が複合体を作り、光化学系 II 付近に移動してエレクトロンシンクとして働いている可能性も考えられた。しかしながら、*slr0400* に関しては、生理機能のみならず、生化学的な情報は全く報告されていないのと同時に、NADP⁺ が光化学系 II から電子を授受していることもこれまで報告されていない。さらに、第 2 章の解析から、*slr0400* が従属栄養性に関与している可能性が示唆された。その為、第 3 章では、*slr0400* 破壊株で光化学系 II が損傷していたのは、従属栄養性が変化したことによる副次的な影響を見ていると考え、これまでシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 が増殖可能であることが報告されている従属的な培養条件で表現型を調べた。

slr0400 破壊株は LAHG 条件や、明暗条件でグルコースを添加する条件、完全暗所でグルコースを添加する条件で WT よりも増殖が早くなることを見出した (図 21)。さらに、*slr0400* 破壊株では通常光培養条件でも NAD⁺ が蓄積しており、グルコースを添加してから 3 時間後には NADH が蓄積することが分かった (図 23)。このため、*slr0400* は細胞内の NAD⁺ 量を調節することで、細胞の従属栄養性を適切に抑制し、増殖速度を規定していると考えられた。すなわち、シアノバクテリアにとって NAD(P) の量的調節は、独立栄養的代謝と従属栄養的代謝を切り替える重要な要因であり、増殖期間を長く維持するための還元的基質の持続的な利用に重要であると考えられる。

代謝解析により、*slr0400* 破壊株ではグルコース添加後起こる代謝変化がより大きく、顕著に起こっていた (図 25)。その為、*slr0400* 破壊株のように、NAD⁺ が適切に調節されず、蓄積してしまうと、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの代謝反応に影響が及ぶことが示唆され、

解糖系がオーバーフローになると考えられる。解糖系がオーバーフローになる典型的な例は、細胞の癌化である。これはワークブルク効果と呼ばれており、ATP 供給を補うために糖代謝を活性化する現象で、乳酸を蓄積し、呼吸や TCA 回路が低下することが知られている (Warbug., 1965)。実際に、*slr0400* 破壊株では通常光条件で糖リン酸系の代謝物が WT よりも減少し (Ishikawa et al., 2016)、乳酸が WT よりも高蓄積している。さらに、細胞内の呼吸の基質が減少することで暗呼吸活性が減少していた (図 24)。その一方で、グルコースを添加し、呼吸基質が増えると暗呼吸活性が高くなっていた。その為、*slr0400* 破壊株では、呼吸活性が上昇はしているものの、通常光条件では呼吸活性を維持するために必要な基質が不足していると予測され、*slr0400* が破壊されると NAD^+ を適切に調節できず、糖異化が活性化してしまうことがわかり、培地中の栄養源の枯渇に伴い、増殖期間を長期間維持できないような細胞になっていると考えられる。

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 は解糖系から、メチルグリオキサールを合成する (Knoop et al., 2010)。メチルグリオキサールは植物ではストレス環境下で合成され、細胞分裂を一時停止させることで劣悪な環境下における無駄なエネルギー消費の抑制に貢献していると考えられる。また、植物ではメチルグリオキサールの合成・分解酵素によって量的に調節されているが、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 ではメチルグリオキサールの分解酵素がなく、合成酵素として *sll0036* にコードされた、メチルグリオキサール合成酵素が存在する。興味深いことに、メチルグリオキサール合成酵素 (*sll0036*) は二機能性酵素であることが一次配列から予測され、N 末端側にはメチルグリオキサール合成酵素のドメイン、C 末端側には NADK の GGDG モチーフが保存されている。GGDG モチーフは NADK では ATP、もしくは NAD^+ の結合モチーフとして知られている。さらに、細菌においては NAD^+/NADH が二量体の間隙に入り込み、その比を構造レベルで感知して呼吸関連遺伝子の遺伝子発現を調節する転写因子が知られている (Sickmier et al., 2005)。加えて、 NAD^+ は転写レベルを直接制御する、という報告もある (Bird et al., 2016) ことから、*sll0036* は C 末端側で ATP もしくは NAD^+ の量を構造レベル、もしくは転写レベルで感知することで解糖系の下流にそのまま代謝物を流すか、メチルグリオキサール合成に糖代謝物を迂回させ、細胞分裂を抑制することで解糖系のオーバーフローを防いでいると予測される。メチルグリオキサールは解糖系において DHAP から合成されるが、*slr0400* 破壊株では NAD^+ が蓄積することで PEP や 3 PGA が減少し、下流に糖代謝がオーバーフローになっていると考えられる。すなわち、*slr0400* が NAD^+ を適切に調節できず蓄積すると、メチルグリオキサールを合成できず、糖代謝と細胞分裂が活性化してしまい、増殖を抑制することができないと予測される。*slr0400* 破壊株ではピルビン酸キナーゼが活性化していると考えられるが、 NAD^+ 量によってどのようにメチルグリオキサール合成とピルビン酸キナーゼが活性化、もしくは抑制のバランスを調節しているのか、メチルグリオキサールがどのように NAD^+ 量を感知し、制御されているのか、今後の研究が望まれ、糖代謝の調節を介した、増殖速度のチューニングを可能にする基礎知見を得られる可能性も期待できる。実際に、

*slr0036*破壊株は明暗下でグルコースを添加する条件やグルコースを添加した暗所で WT よりも *slr0400*破壊株のように増殖が早くなることを明らかにしている（未発表）。

*slr0400*破壊株では糖代謝が亢進していることが明らかとなった。透過型電子顕微鏡で通常光条件で培養した *slr0400*破壊株を観察すると、WT と比べてチラコイド膜の電子密度が薄く見える（図 26）。さらに、通常光条件で培養した *slr0400*破壊株は、WT よりも ROS の発生量が多い（図 27）。これまで、チラコイド膜成分が減少すると、光化学系 II が損傷することが報告されており（Nakajima et al., 2018）、光合成にとって、光化学系 II の足場が十分に光環境下で用意されていることは、適切な光捕集に重要であると考えられる。今のところ、*slr0400*破壊株が強光条件下で黄化する原因は不明であるが、*slr0400*では従属栄養性が亢進する反面、光に対する適切な代謝調節に異常が生じていると考えられ、呼吸が上昇することで ROS が発生し、D1 タンパク質に影響が生じているか、膜自体が糖代謝の亢進により影響を受け、D1 タンパク質の合成・もしくは分解に影響を与え、ROS が増えている点を可能性として予測している。

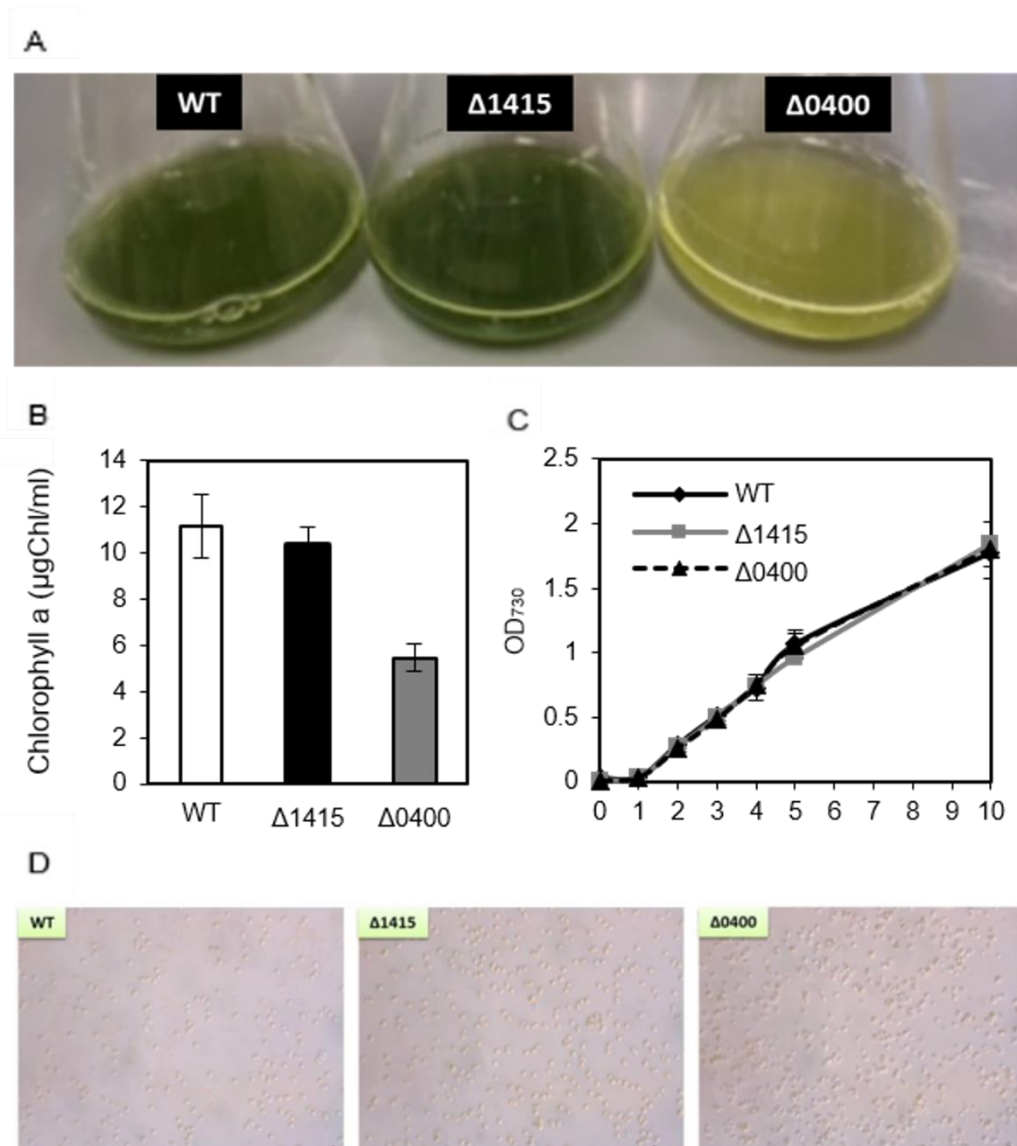


図 15 強光条件下における WT と *NADK*破壊株の表現型

A, 強光条件で 13 日後の WT、*slr1415*破壊株、*slr0400*破壊株の様子。B, 培養 10 日目のクロロフィル定量 (n=3)。C, 強光条件下における増殖曲線 (n=3)。D, 光学顕微鏡による形態観察。スケールバーは 1 μ m を示す。

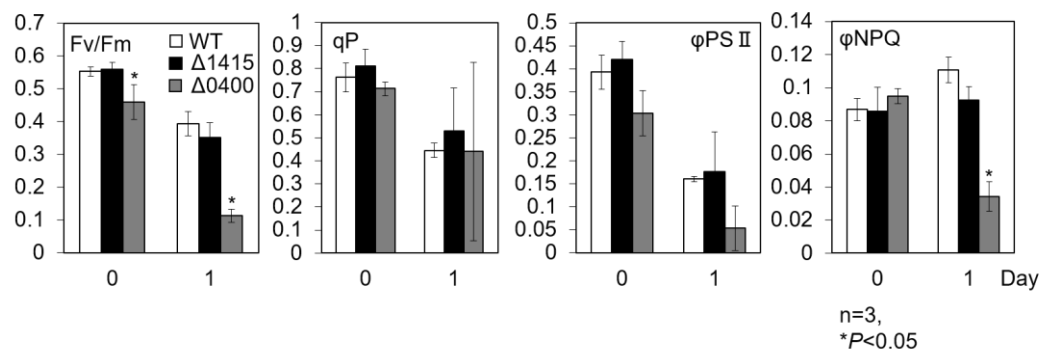


図 16 Water-PAM を用いたクロロフィル蛍光測定
通常光条件で 4 日間培養した細胞 (0 day) とそれに一日 150 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ を照射した細胞 (1 day) を用いた (n=3, * $P < 0.05$)。

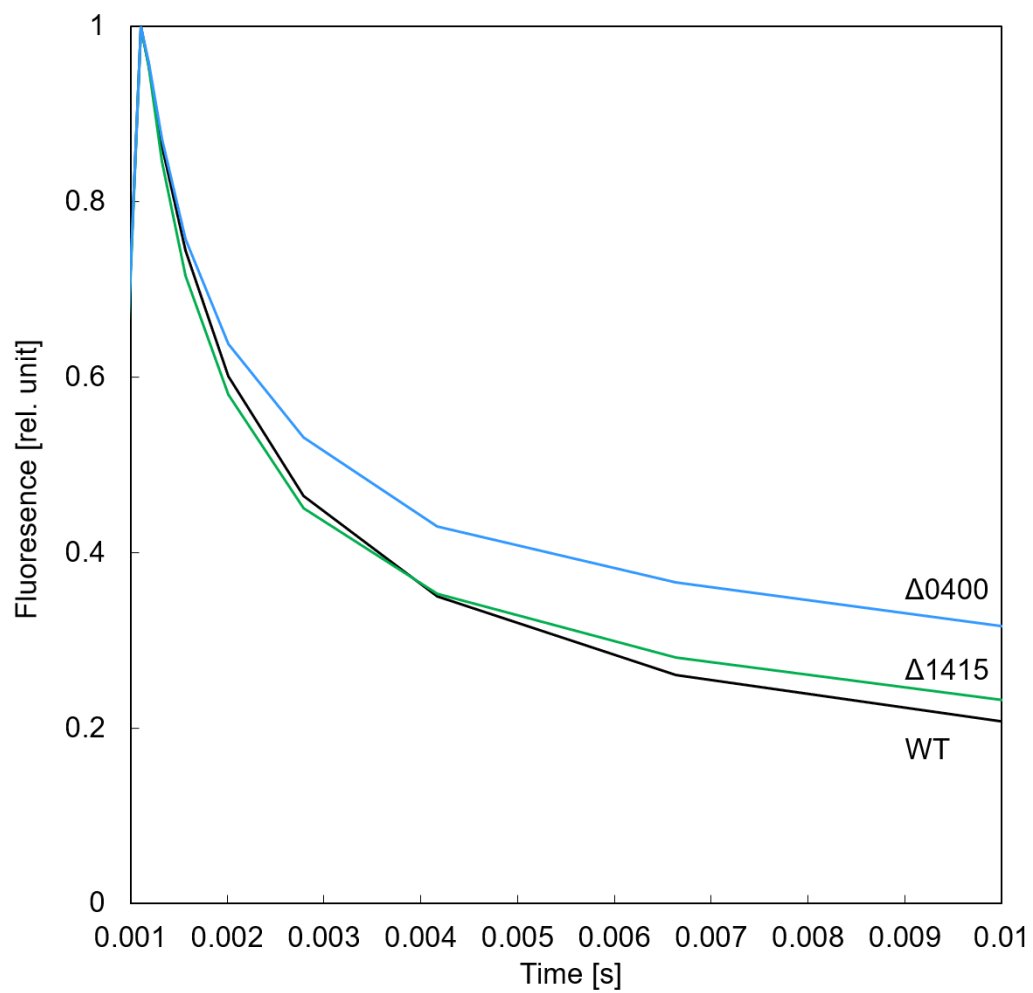


図 17 Q_A から Q_B への電子伝達速度の測定
 通常光条件で 4 日間培養した WT と *NADK* 破壊株にサブミリオーダーで励起光を照射し、減衰する蛍光を測定した。

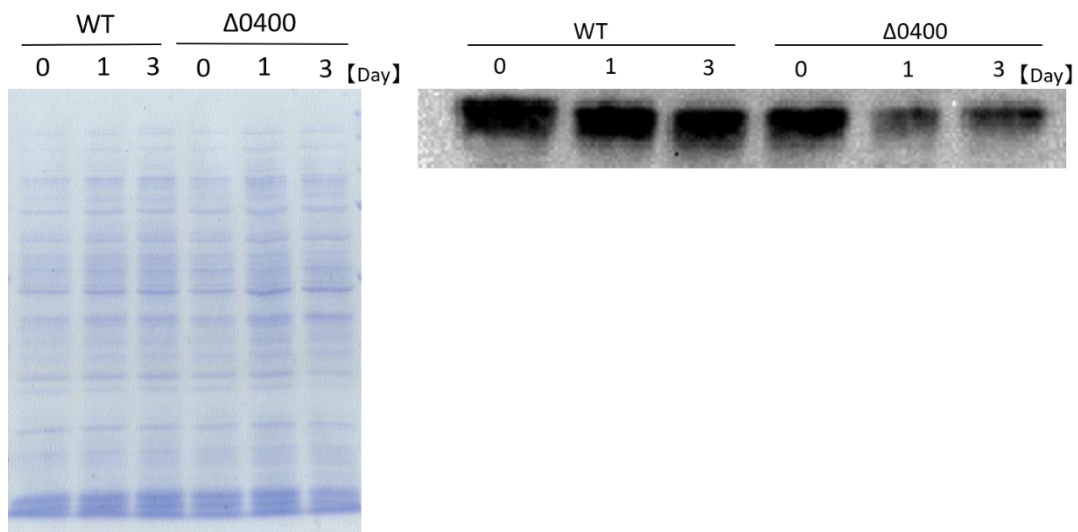


図 18 WT と *NADK*破壊株における D1 タンパク質量の比較

通常光条件で 4 日間培養した WT と *NADK*破壊株に強光 ($150 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) を 1 日、あるいは 3 日照射した細胞からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット解析により、D1 タンパク質量の比較を行った。

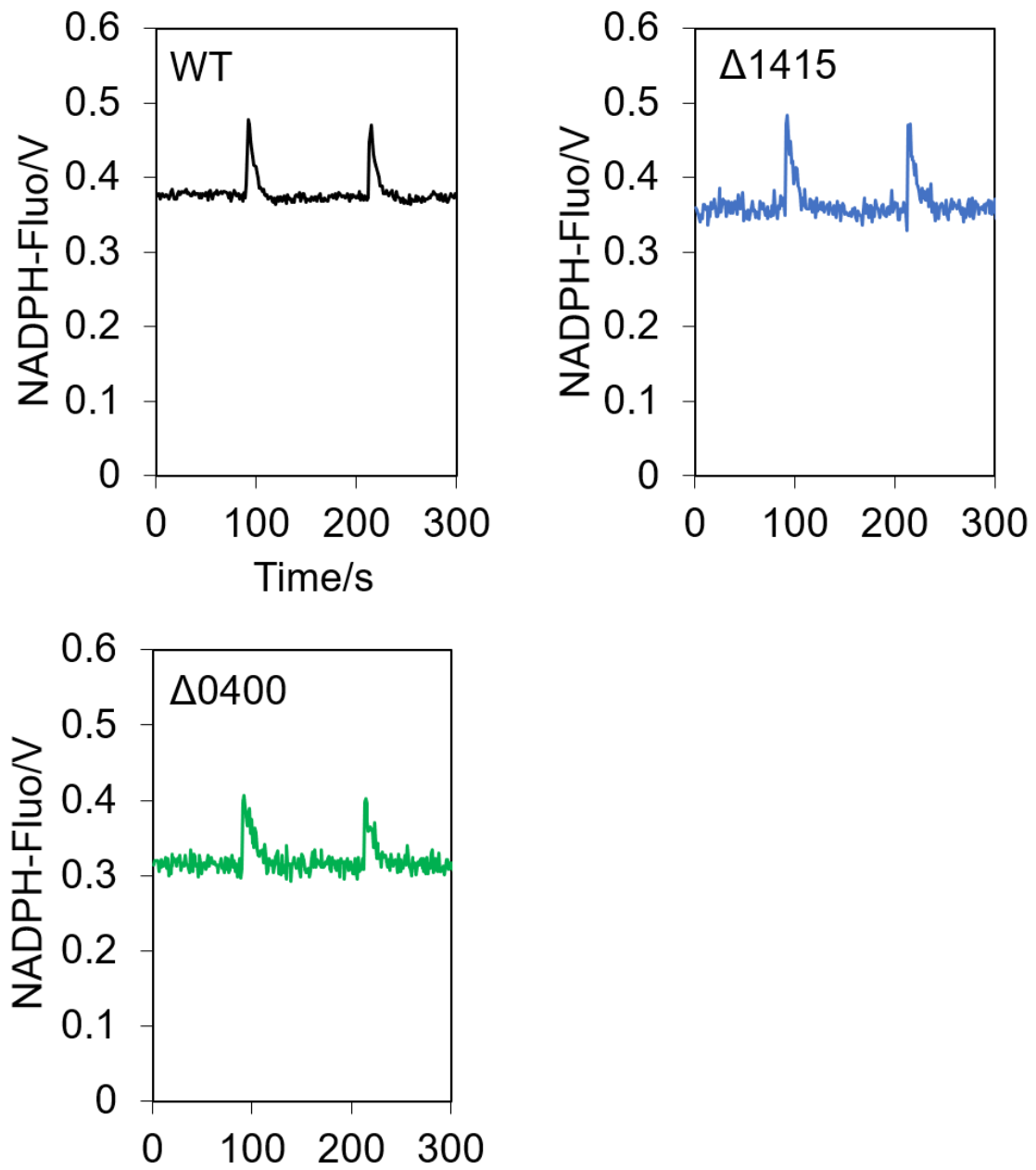


図 19 Dual-PAM による NADP^+ から NADPH への還元量の比較
 弱光条件 ($5 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) で 9 日間培養した WT と *NADK* 破壊株における NADPH 量の比較

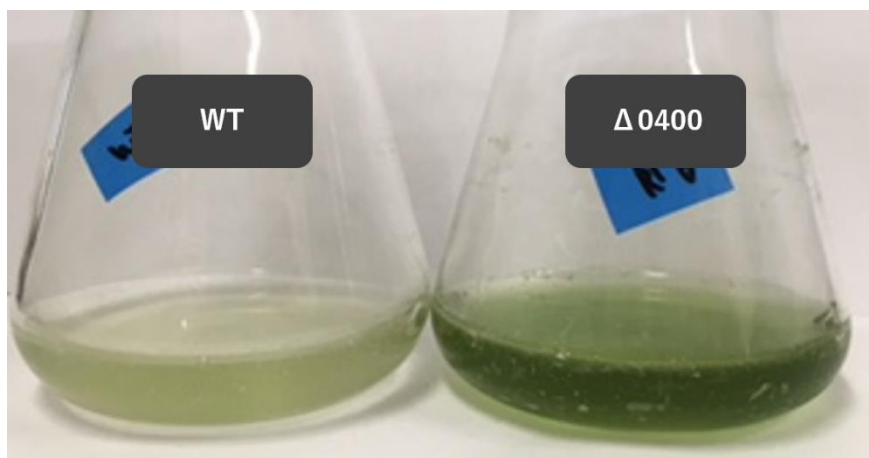


図 20 Light-activated heterotrophic condition における WT と *slr0400*破壊株の表現型
培養 4 日目の様子を示す。

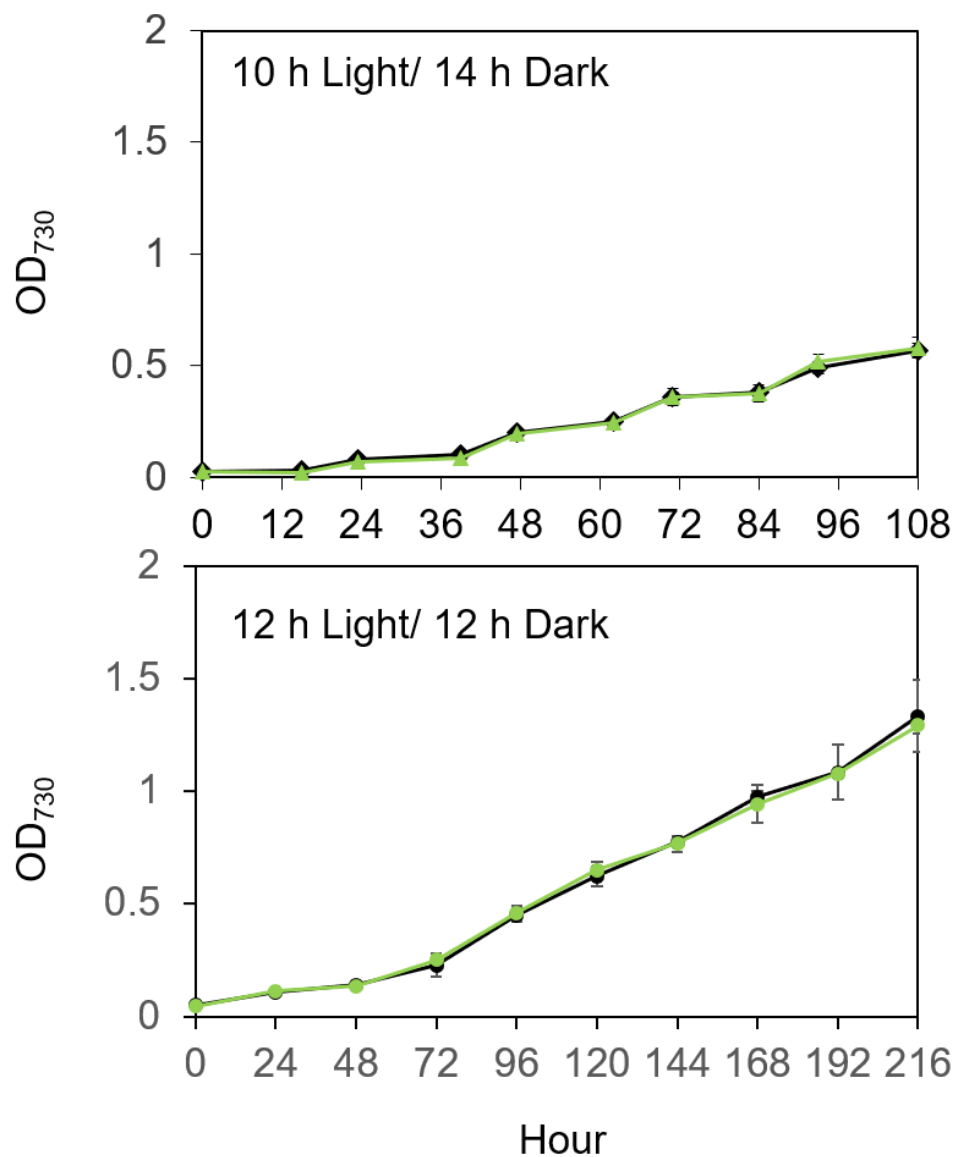


図 21 明暗条件下における WT と *slr0400* 破壊株の増殖速度の比較
 黒い線が WT で、緑の線が *slr0400* 破壊株を示している (n=3)。

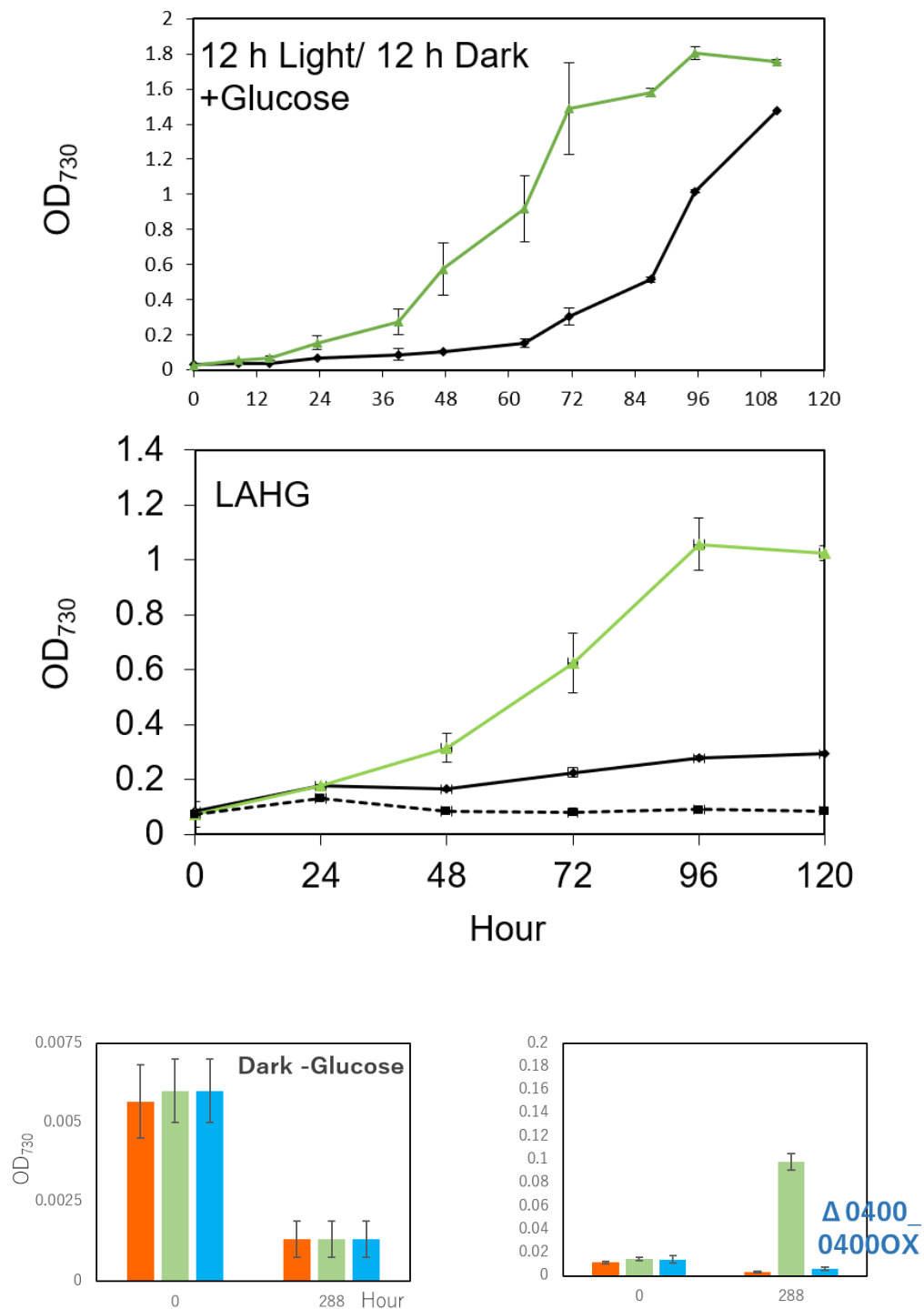


図 22 明暗条件下もしくは暗条件でグルコースを添加した条件における WT と *slr0400* 破壊株の増殖速度の比較
 黒い線が WT で、緑の線が *slr0400* 破壊株、黒の点線は *slr0400* 破壊株に *slr0400* を高発現させた株を示している (n=3)。

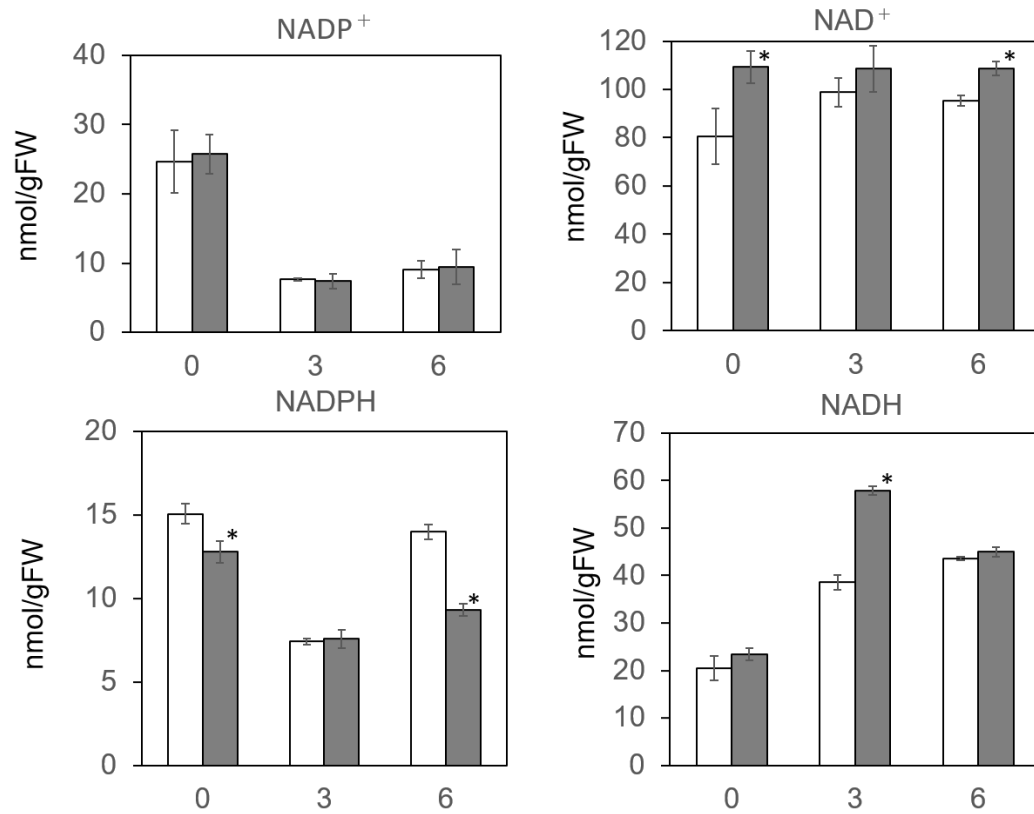


図 23 明条件下 (30 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) でグルコースを添加した際の WT (白)と *slr0400*破壊株 (灰)の NAD(P)(H)量の比較
横軸は明条件で 4 日間培養した後、グルコースを添加してから時間変化を示す(n=3)。

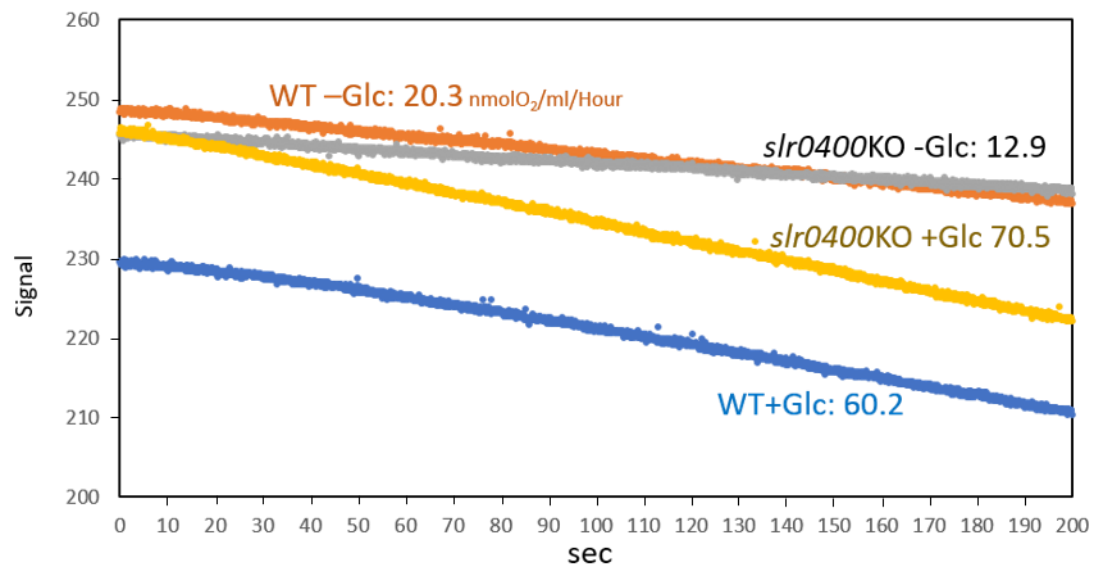


図 24 WT と *slr0400* 破壊株の暗呼吸活性の比較
通常光 (30 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) で 4 日間培養した細胞を、酸素電極を用いて酸素発生量を測定した。値は KCN 添加後のバックグラウンドを補正したものである。

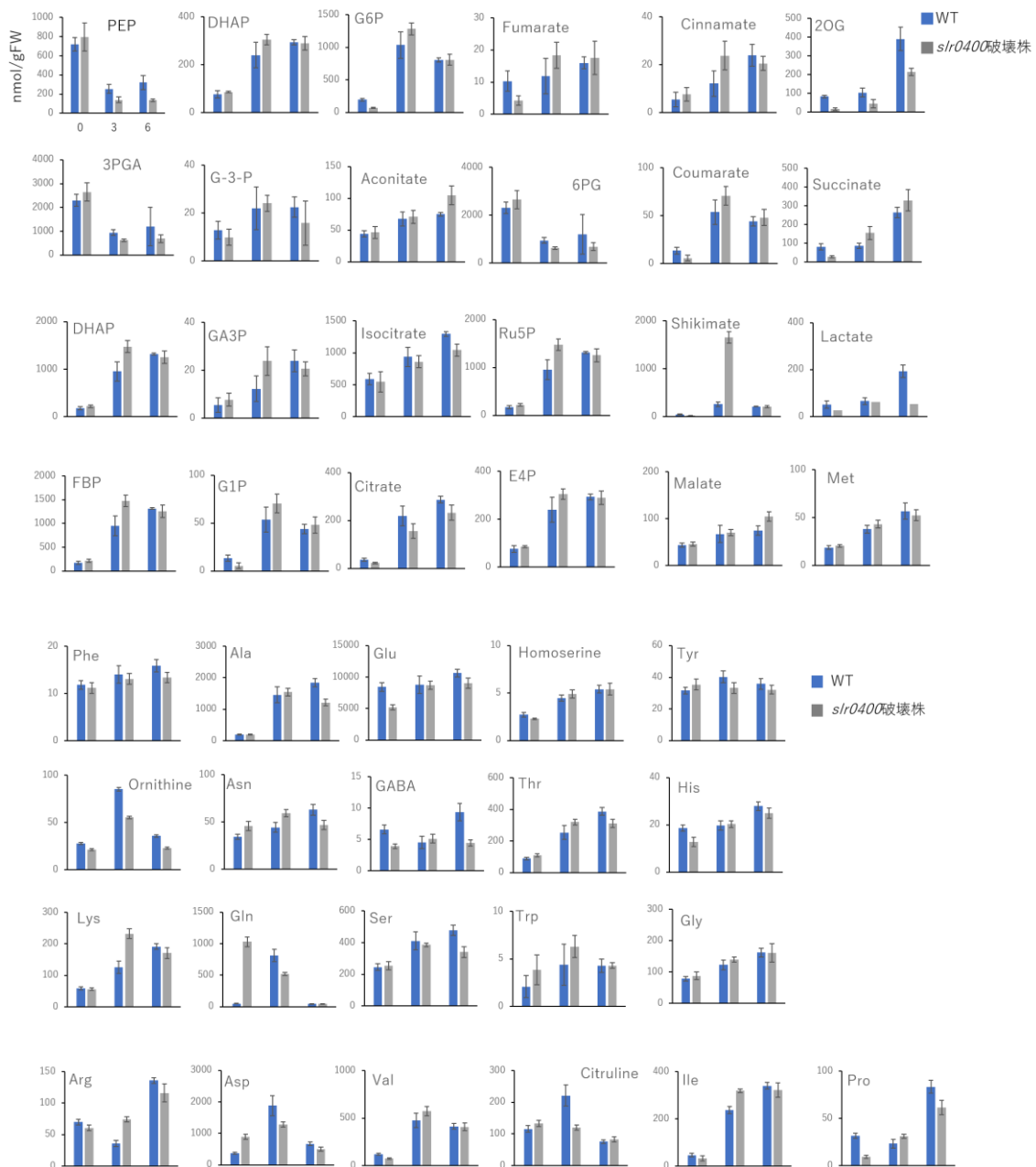
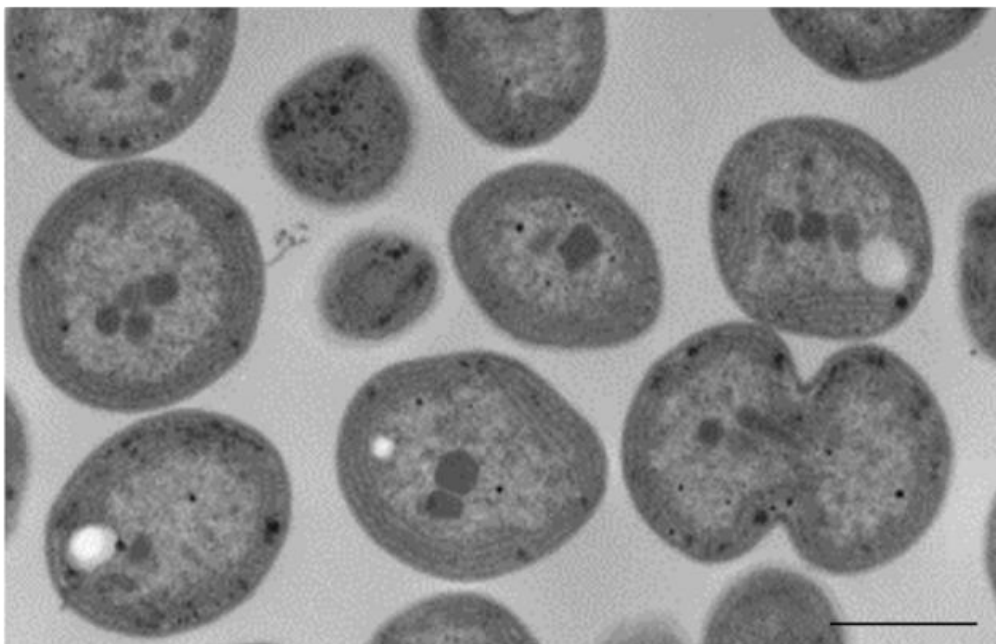


図 25 WT と *slr0400* 破壊株の代謝解析

通常光 (30 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) で 4 日間培養した細胞 (0) に、グルコースを添加して 3 時間後 (3)、6 時間後 (6) にサンプリングを行い、代謝抽出をした (n=3)。

WT



*slr0400*破壊株

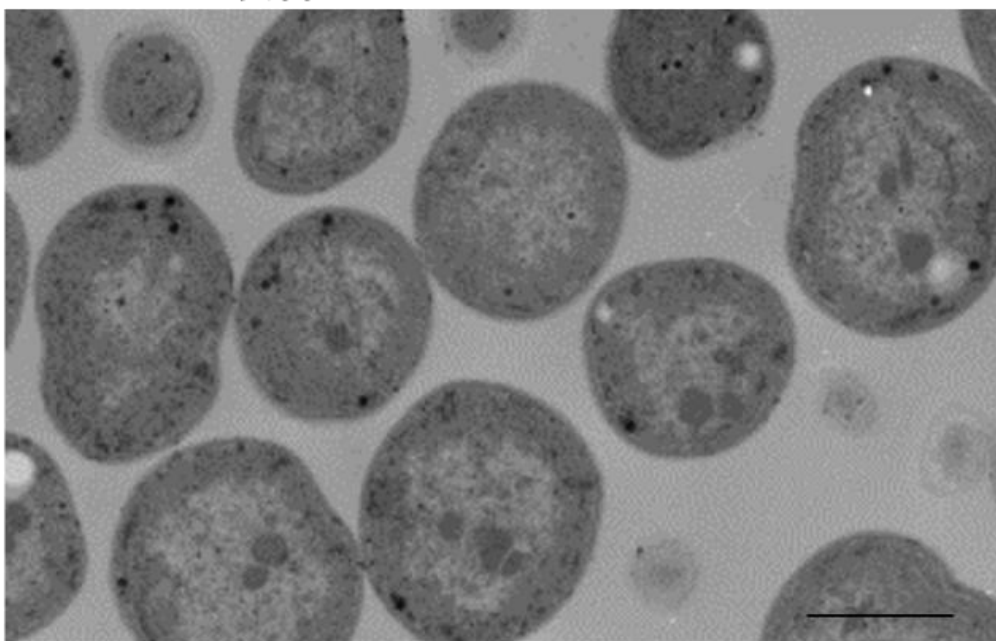


図 26 通常光 ($30 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) で 4 日間培養した WT と *slr0400*破壊株の TEM 観察、スケールバーは $2 \mu\text{m}$ を示す。

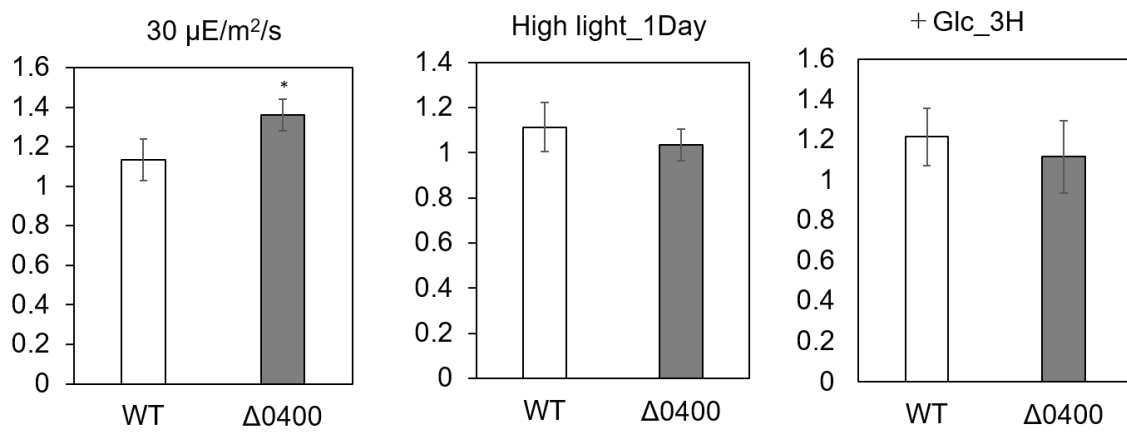


図 27 WT と *slr0400*破壊株の ROS 測定

Carboxy-H₂DCFDA (Invitrogen)を用いて測定した (n=3、**P*<0.05)。左から、通常光 (30 μE/m²/s) で 4 日間培養した細胞、強光 (150 μE/m²/s) を 1 日間照射した細胞、通常光 (30 μE/m²/s) でグルコース添加後 3 時間後の細胞を示している。

第4章 シアノバクテリアが有する NADK の高発現株の解析

4.1 概要

Synechocystis sp. PCC 6803 が有する二つの NADK (Sll1415、Slr0400) それぞれの遺伝子破壊株は異なる培養条件で固有の表現型を示した。その為、*Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する二つの NADK は、培養条件依存的に遺伝子発現もしくは酵素活性が適切に制御されつつ、それぞれの生化学的特性を発揮することで、細胞内の NAD(P)(H)量を調節していると考えられる。これまで NADK はその活性に必要なモチーフとして NAD⁺結合配列 (GGDG) (Raffaelli et al., 2004; Mori et al., 2005)、ATP 結合配列 (NE/D) (Liu et al., 2005) が含まれることが報告されている。また、シロイヌナズナなどの植物では、NADK モチーフのほかに N 末端側に酵素活性を調節すると考えられている配列が存在している。近年、動物で、類似の一次構造を示す NADK ではこの配列が酵素活性の抑制を担っていることが報告されている (Hoxhaj et al., 2019)。一方で、*Synechocystis* sp. PCC 6803 をはじめとしたシアノバクテリアでは、植物や動物の NADK の N 末端側に存在する酵素活性の制御領域と考えられる配列がなく、NADK モチーフのみの単純な一次構造である。また、*Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する *sll1415* と *slr0400* は類似性が 75% であり、どちらの NADK にも NADK モチーフは保存されている (図 2B)。これらのことから、*Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する二つの NADK は NADK としての酵素活性を有しつつ、遺伝子発現レベルで培養条件特異的にそれぞれの NADK の使い分けが規定されていると考えられる。しかしながら、*Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する二つの NADK に関しての生化学的な情報はこれまで全く報告されていない。これまでリコンビナントタンパク質を大腸菌に発現させ、精製するため、*pcoldI*、*pcold GST*、*pDEST17*、*pDEST15* にそれぞれの NADK をクローニングし、精製を試みた。いずれのベクターでもタンパク質は大量に発現誘導された。しかしながら、His タグを付加するベクターでは可溶画分にタンパク質が全く溶解せず、GST タグを用いた場合はわずかに可溶化した。そこで、*pDEST15* ベクターを用いて大量の大腸菌からタンパク質の精製を試みた。しかしながら、精製したタンパク質を用いても、GST を切断しても、NADK 活性はどちらのリコンビナント NADK から検出できず、精製の過程で活性が失われているか、大腸菌内で不活化されている可能性が考えられた。このように、現時点では *in vitro* で NADK の活性を測定することが困難であったため、そこで、第4章では、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する NADK の生化学的性質の差異を調べるために、それぞれの NADK をシアノバクテリアで高発現させ、その酵素活性及び NAD(P)(H)量を行った。さらに、シアノバクテリアにおいて NAD(H)及び NADP(H)量の改変が生理的にどのような意義をもつのかを表現型解析に基づいて考察した。

4.2 実験方法

- ・ 遺伝子クローニングと培養条件

本章で用いた高発現用のベクターは埼玉大学理工学研究科 日原教授から分譲していた pTCP、pTKP ベクターである。これらのプロモーターは *psbA2* であり、本研究では *psbA2* とそれぞれの NADK を予めオーバーラップ PCR で連結し、*AadI* と *AflI* を用いてクローニングした。また、クローニングの際、大腸菌内にベクターが入ると必ず塩基欠損・置換が起こったため、塩基置換が起きたベクターを後に PCR で正しい塩基配列に修復し、そのフラグメントを DNA シーケンスで確認してから、その DNA フラグメントをシアノバクテリアの形質転換に用いた。さらに、遺伝子導入後、ゲノム抽出を行い、PCR で導入したフラグメントを増幅し、その NADK の配列も DNA シーケンスで確認した。

高栄養培養条件は、光量 30 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 、30°C、100 rpm で培養した。培地は、グルコース (5 mM) と NaNO_3 を 4 倍量添加した BG-11 を使用した。高栄養培養条件では、前培養は OD₇₃₀ を 0.0075 に合わせ、96 時間、通常光、BG-11 培地で培養し、それを高栄養培養条件 (グルコース (5 mM) と NaNO_3 を 4 倍量添加)用の培地に再度 OD₇₃₀ を 0.0075 になるように継代した。

・遺伝子発現解析、NAD(P)(H)定量、酵素活性測定、代謝解析

本章で行った上記の解析手法は第 1 章と同じである。培養はすべて上記のように継代した。光呼吸関連の遺伝子発現は以下のプライマーを用いて行った。 *sll1981*

(CCCACTGGAGATTTGCCCAT; GAGTGGGTTTACCTTGGCGA)、 *sll0171*

(AGTGGGCTTGGAGATGTTGG; GGTAGGAGAAAGGGTGCCAC)

・ルビスコ活性測定

抽出バッファー (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA-NaOH (pH 7.0), 5 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 1% triton-100, 1 mM PMSF) で粗タンパク質を抽出した。ルビスコ活性は NADH の吸光度を 25°C で測定した (Nakano et al., 2000)。反応液は 50 mM HEPES-KOH (pH 8.0), 10 mM NaHCO_3 , 0.2 mM NADH, 2.5 mM ATP, 10 mM KCl, 1 mM EDTA-NaOH (pH 7.0), 20 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 5 mM phosphocreatine, 6 units PGK (3-phosphoglyceric phosphokinase), 6 units GAPDH (NAD-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), 20 units PCK (pyruvate kinase), 200 μM 3PGA, であり、1 mM RuBP を添加して測定を開始した。

4.3 結果

Synechocystis sp. PCC 6803 が有する NADK をそれぞれ *psbA2* プロモーターに連結し、高発現させた (図 28A,B)。その結果、どちらの NADK を高発現させた株もベクターコントロール株に比べてそれぞれの遺伝子発現量が上昇していた (図 28C)。さらに、*sll1415* 高発現株ではベクターコントロール株に比べて NADK 活性が上昇していた (図 29A)。一方で、*slr0400* 高発現株では遺伝子発現量はベクターコントロール株に比べて上昇していたが、NADK 活性の有意な上昇は見られなかった。これまで酵母やシロイヌナズナでは、 NAD^+

を基質にして NADP^+ を合成する NADK 活性に対して、 NADH を基質に NADPH を合成する NADHK を有する NADK が存在することが報告されている。その為、*Synechocystis* sp. PCC 6803 のそれぞれの NADK 高発現株の NADHK を測定したところ、*sll1415* 高発現株では NADH を基質にした場合も高い酵素活性が検出された (図 29B)。一方で、*slr0400* 高発現株では NADHK 活性もベクターコントロール株に比べて差がなかった (図 29B)。これらの結果から、*sll1415* は NADK 活性のみならず NADH 活性も有していることが示唆された。

Synechocystis sp. PCC 6803 のそれぞれの NADK 高発現株の NAD(P)(H) 量を比色法で測定した。その結果、*sll1415* 高発現株では基質と考えられる NAD(H) が減少していた一方で、生成物と考えられる NADP(H) がベクターコントロール株と比較して増加していた (図 30)。一方で *slr0400* 高発現株では NAD(H) 活性の有意な上昇がベクターコントロール株と比較して見られなかったにも関わらず、 NADP^+ 量はベクターコントロール株と比較して上昇していた。*slr0400* 高発現株の NAD^+ 量はベクターコントロール株と比較して減少していなかったが、*slr0400* には NADP^+ を合成する能力があることが示唆され、*slr0400* の持つ酵素活性を検出するには、現在の酵素活性の測定条件もしくは粗タンパク質の抽出条件が適していないと考えられ、*slr0400* には未知の生化学的性質がある可能性が考えられた。

シロイヌナズナでは葉緑体局在性 NADK を高発現させると、 $\text{NADP(H)}/\text{NAD(H)}$ が上昇し、炭素・窒素代謝に広く影響が及ぶことが報告されている (Takahashi et al., 2009)。しかしながら、シアノバクテリアでは $\text{NADP(H)}/\text{NAD(H)}$ の上昇が表現型や代謝にどのように影響を及ぼすのかは明らかになっていない。*sll1415* 高発現株では、コントロール株に比べて $\text{NADP(H)}/\text{NAD(H)}$ が上昇していた為 (図 30)、 $\text{NADP(H)}/\text{NAD(H)}$ の改変により、表現型にどのような影響が及ぶのか調べた。その結果、*sll1415* 高発現株は通常光条件 (図 31A)、光従属栄養条件 (図 31B)、混合栄養条件 (図 31C) ではベクターコントロール株と増殖速度が変わらなかった。しかしながら、強光条件で *sll1415* 高発現株は凝集すること、メチルビオローゲンを添加すると全く増えなくなること、通常光条件で長期培養すると早くブリーチすることが分かった (図 31)。その為、*sll1415* 高発現株は、光ストレスに感受性になっていることや栄養源を早く取り込むことで長期培養において培地の栄養源が枯渇している可能性が示唆された。シアノバクテリアにおいて NAD^+ は Asp を前駆物質として複数の代謝反応を経た後、合成される (Gerdes et al., 2006)。その為、 NADP^+ 合成量が上昇している *sll1415* 高発現株ではより多くの窒素を必要としていると予測した。また、光合成生物において、炭素と窒素の比が適切に維持されることは代謝を適切に駆動するうえで重要な一つの要因である。その為、培地中の窒素源である NaNO_3 (硝酸ナトリウム) を通常の BG-11 よりも多く (2×) 添加した培地と、炭素源としてグルコースを添加した培地で *sll1415* 高発現株の増殖を調べた。その結果、窒素源として NaNO_3 (硝酸ナトリウム) を通常の BG-11 よりも多く (2×) 添加した培地でも、そこに炭素源としてグルコースを添加した培地 (高栄養条件) でも *sll1415* 高発現株の増殖はベクターコントロール株と差異がみら

れなかった (図 32)。その一方で、光学顕微鏡で細胞を観察すると、*sll1415* 高発現株は通常光条件ではコントロール株と形態に顕著な差異が見当たらなかった一方で、高栄養の培養条件 ($4 \times \text{NaNO}_3 + \text{グルコース}$) では、ベクターコントロール株に比べて *sll1415* 高発現株が肥大し、細胞同士が接着していた (図 33)。このことから、*sll1415* 高発現株における、NADP(H)/NAD(H)の上昇が炭素・窒素代謝に影響を与え、細胞構造に変化が生じ、細胞同士が接着している可能性が考えられた。これまで、シアノバクテリアではセルロースの合成が細胞接着や凝集に重要であることが報告されている (Kawano et al., 2011)。そこで、*sll1415* 高発現株でセルロース量にどのような変化が生じているのか調べるため、高栄養条件で培養した細胞をセルロースの染色試薬であるカルコフローで染色した。その結果、*sll1415* 高発現株では、ベクターコントロール株に比べてカルコフローの染色による蛍光が弱かった (図 33)。このことから、*sll1415* 高発現株ではセルロース合成が低下し、細胞壁で露出している糖の質が変化したことが細胞凝集や接着の原因になっていると考えられた。

高栄養条件 ($4 \times \text{NaNO}_3 + \text{グルコース}$) における *sll1415* 高発現株の表現型より、NADP(H)/NAD(H)の上昇による影響が通常の培養条件よりも高栄養条件でさらに大きく出ていると予測し、通常光で培養した細胞と高栄養条件の細胞の代謝物を CE-MS で定量した。その結果、*sll1415* 高発現株ではカルビンベンソン回路の 6 PG、Ala、Asp、Citrate、2 OG、Gln、Glu、GABA が、通常光条件で、コントロール株に比べて減少していた (図 35)。さらに *sll1415* 高発現株では、Asp、Gln、Citrate が、高栄養条件 ($4 \times \text{NaNO}_3 + \text{グルコース}$) では増加しており、*sll1415* 高発現株では窒素の要求性が高くなっていると考えられた。一方で、*sll1415* 高発現株では RuBP (リブローズ-1,5-ビスリン酸) と 3PGA は通常光条件と高栄養条件の両方で減少し、多くのアミノ酸 (Gly, Ser, Phe, Trp, Thr, Met, Asn, Lys, Leu, Val, Pro, Arg) が増加していた。これらのことから、*sll1415* 高発現株では、RuBP の減少が糖異化の亢進による基質の不足か、光呼吸の亢進によるものである可能性を考え、ルビスコ活性と、光呼吸に関連する遺伝子発現を調べた。その結果、*sll1415* 高発現株ではコントロール株の 84.9% のルビスコ活性を示し、光呼吸に関連する遺伝子発現量もコントロール株に比べて低下していた (図 36)。このことから、*sll1415* 高発現株では、炭素制限により、カルビンベンソン回路への基質としての炭素が不足した結果、RuBP が減少していると考えられる。

sll1415 高発現株は高栄養培養条件でベクターコントロール株よりもわずかに OD_{730} が高くなり、細胞数は変らなかったが、細胞の沈降速度が速くなっていた。さらに、高栄養培養条件で乾重量が *sll1415* 高発現株ではコントロール株に比べて重くなっていることがわかり (図 34)、*sll1415* 高発現株では培地中の栄養源を早く取り込むような代謝亢進が起こっていることが示唆された。

4.4 考察

Synechocystis sp. PCC 6803 が有する二つの NADK の酵素活性と生化学的性質を調べる

ために、それぞれの NADK の高発現株を作出した。*sll1415* 高発現株は NADK 活性及び NADHK 活性がベクターコントロール株に比べて上昇していた (図 29)。さらに、NAD(H) が減少し、NADP(H)が増加していたことから、*Sll1415* は細胞内の NADP(H)/NAD(H)を上昇させる活性を有していることが示唆された。すなわち、*Sll1415* は NADP(H)量の要求量が大きくなった際に NAD(H)から NADP(H)を合成する重要な因子であると考えられる。

第 6 章で述べるように、*Synechococcus* sp. UTEX 2973 は多くのシアノバクテリアと同じように二つの NADK を有していたが、図 40 の分子系統樹上でどちらの NADK も *sll1415* のクレードに分類された。*Synechococcus* sp. UTEX 2973 は他のシアノバクテリアよりも増殖速度が早く、近年、シアノバクテリアを用いた物質生産のプラットフォームとして期待されている有用株である (Yu et al., 2015)。その為、当初は *sll1415* を高発現させることにより増殖速度が上がることを期待していた。しかしながら、*sll1415* 高発現株は通常光条件で増殖速度はベクターコントロール株と変わらず、混合栄養条件や光従属栄養条件、高栄養培養条件でもベクターコントロール株よりも増殖速度が亢進することはなかった。さらに、強光条件では *sll1415* 高発現株は細胞が凝集したり、メチルビオローゲンのような酸化ストレスに感受性になっていた (図 31)。これらの結果から、シアノバクテリアの有用物質生産を見据えた増殖速度の亢進を目指すためには、NADK のみの改変では不十分であることが示され、その他、*Synechococcus* sp. UTEX 2973 で多型として検出されている遺伝子に由来する機能が NAD(P)(H)量と適切に関連することが増殖速度の向上に重要であると考えられる。

近年、有用物質生産としてシアノバクテリアに水素や PHB、油脂を合成させる研究が盛んにおこなわれている。その中でも NADPH を細胞内の還元力として蓄積させ、高分子を合成させる試みが複数行われている (Hauf et al., 2013, Wang et al., 2016, Zhou et al., 2016)。多くの場合、遺伝子改変の結果、増殖速度に差はなく、ターゲットとした物質合成が活性化している結果が得られている (Shabestary et al., 2016)。*sll1415* 高発現株も、NADPH が蓄積し、高栄養培養条件では、乾重量が重くなりつつ、増殖もコントロール株と変わらない上、測定した代謝物の総量が増加するような代謝亢進が起こっていた (図 34)。その反面、光ストレスや酸化ストレスには感受性になっており、これは NADPH を蓄積させる代謝改変の際の課題であると考えられる。これらの結果から、NADPH などの還元力の貯蔵は、物質生産には有効な反面、培養環境の緻密な検討が必要であると考えられ、特に野外などで培養する際は、増殖の不安定性が顕著な問題になると考えられる。

通常光条件で長期間培養すると、コントロール株に比べて *sll1415* 高発現株は、早くグリーンチングした。この結果を受けて、*sll1415* 高発現株では、培地中の栄養源が早く枯渇するような代謝改変が起こっていると予測した。また、*sll1415* 高発現株は、通常光条件で、NAD⁺量が減少していた (図 30)。NAD⁺は、シアノバクテリアにおいても Asp から複数の酵素反応を経て、合成される (Gerdes et al., 2006)。その為、*sll1415* 高発現株では NAD⁺から NADP⁺への合成の活性化によって、アスパラギン酸の要求性が上がり、窒素代謝が亢進し

ていると予測した。そこで、窒素代謝を含め、代謝に *sll1415* の高発現がどのような影響を与えているのかを明らかにするために、CE-MS を用いて代謝解析を行った。その結果、*sll1415* 高発現株では通常光条件で Asp の量が減少していた一方で、高栄養条件では Asp が増加していた (図 35)。*sll1415* 高発現株では、 NAD^+ が通常光条件で減少しているだけではなく、その前駆体の Asp も減少しており、窒素を添加すると Asp の量が増えることから Asp の要求性が *sll1415* 高発現に伴って上昇していると考えられた。

sll1415 高発現株では、通常光条件で 2OG が減少していた (図 35)。2OG は、解糖系から炭素骨格を提供し、GS-GOGAT サイクルの初発の代謝物であることから、炭素と窒素代謝の一つのマーカーとして考えられており、例えば 2OG が減少した場合は、窒素量に対して炭素制限が引き起こされていると考えられている (Zhang et al., 2018)。

PII タンパク質は多くの生物に保存されているシグナル伝達に関与することで知られる因子である (Forchhammer et al., 2004)。*Synechocystis* では、PII は炭素・窒素代謝をモニターする役割を担っていることが報告されており (Watzer et al., 2015)、PII 遺伝子破壊株 (*glnB*) は炭素飢餓になることが知られている。代謝変化としては、PII 遺伝子破壊株 (*glnB*) は、Isocitrate、Arg、Ornithine、Malate が蓄積する一方で、2OG が WT に比べて減少することが報告されている (Schwarz et al., 2014)。2OG が減少する原因としては、イソクエン酸が蓄積していることから、イソクエン酸デヒドロゲナーゼの酵素活性が抑制されていると考えられている。さらに、*glnB* では、Gln や Glu が減少している一方で、Malate が蓄積している。その為、*glnB* では、窒素がさらに過剰になるのを防ぐために、余剰の炭素骨格を Malate に流していると考えられている。興味深いことに、これらの *glnB* における代謝変化は、通常光条件における *sll1415* 高発現株の代謝変化と非常によく似ている (図 35)。その為、*sll1415* でも *glnB* と同様に、窒素量に対して炭素制限になっていると考えられる。

第 2 章において、*sll1415* は酸化的ペントースリン酸経路を介した糖代謝に必須であることを示した。*sll1415* 高発現株は高栄養条件下 ($4\times\text{NaNO}_3$ + グルコース) で G6P、6PG、Ru5P、F6P、FBP、DHAP がコントロール株に比べて増加していた (図 35)。さらに、*sll1415* 高発現株は、通常光条件で、コントロール株に比べてグリコーゲン量が減少していた (図 37)。これらの結果より、*sll1415* 高発現株では、糖異化が亢進していると考えられた。

sll1415 高発現株では、RuBP が減少していた (図 35)。RuBP が減少していた原因を理解するため、ルビスコ活性と光呼吸関連の遺伝子発現を調べると、*sll1415* 高発現株では、ルビスコ活性も光呼吸の遺伝子発現もコントロール株に比べて減少していた (図 36)。その為、*sll1415* 高発現株は、糖異化の亢進によって基質としての炭素源がカルビンベンソンサイクルではなく、Malate や他のアミノ酸に異化されてしまうことが原因として考えられた。

これらの結果から、*sll1415* の高発現による $\text{NADP(H)}/\text{NAD(H)}$ の上昇は、炭素・窒素代謝に影響を与え、強光に感受性になりつつ、高栄養条件では細胞形態にも影響が及ぶことが分かった。

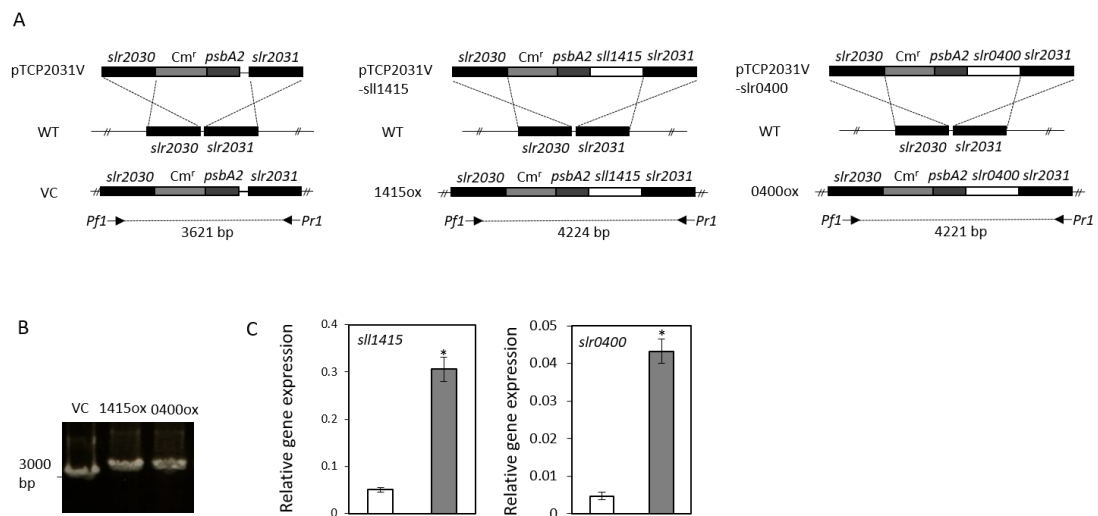


図 28 *NADK* 高発現株の作出

A, 遺伝子挿入の概略。B, セグレーションチェック。C, リアルタイム PCR による *slr1415*、*slr0400* の発現解析 (n=3、* $P<0.05$)。白がベクターコントロール、灰色がそれぞれの *NADK* 高発現株。

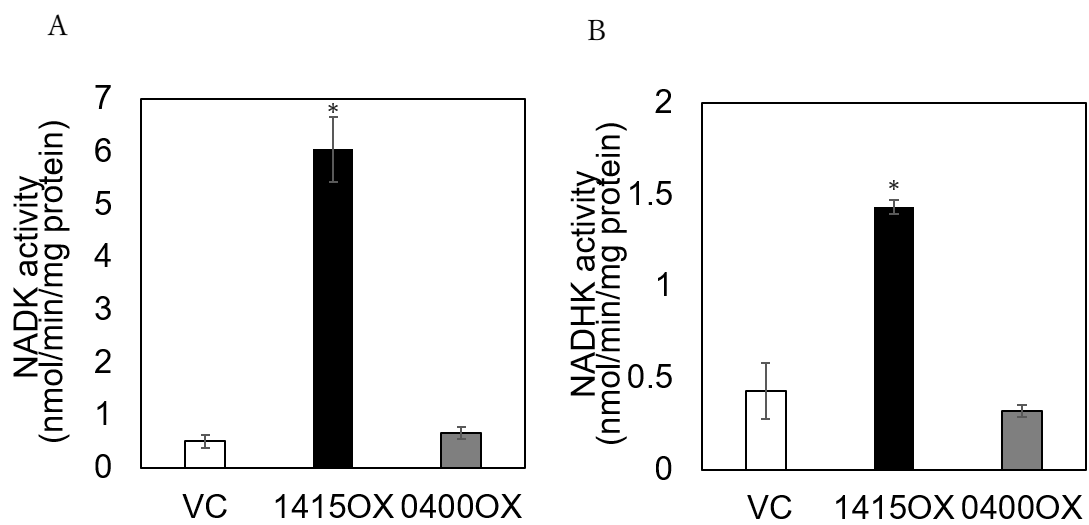


図 29 明条件下で 4 日間培養した *NADK* 高発現株における NAD(H) K 活性測定
A, NADK 活性。B, NADHK 活性 (n=3、* $P<0.05$)。

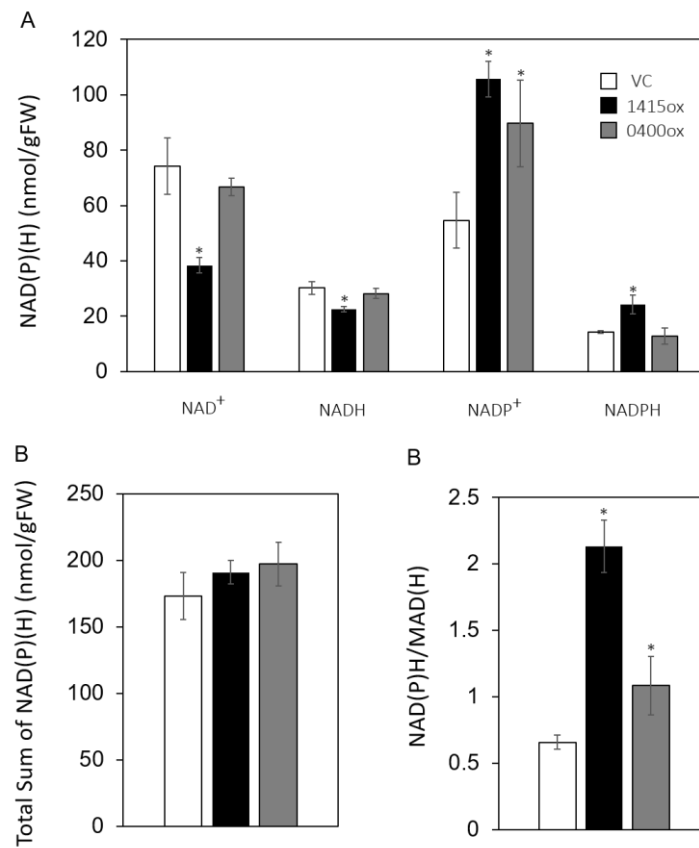


図 30 明条件下 ($30 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) で 4 日間培養した *NADK* 高発現株の NAD(P)(H) 定量 ($n=3$, * $P<0.05$)。

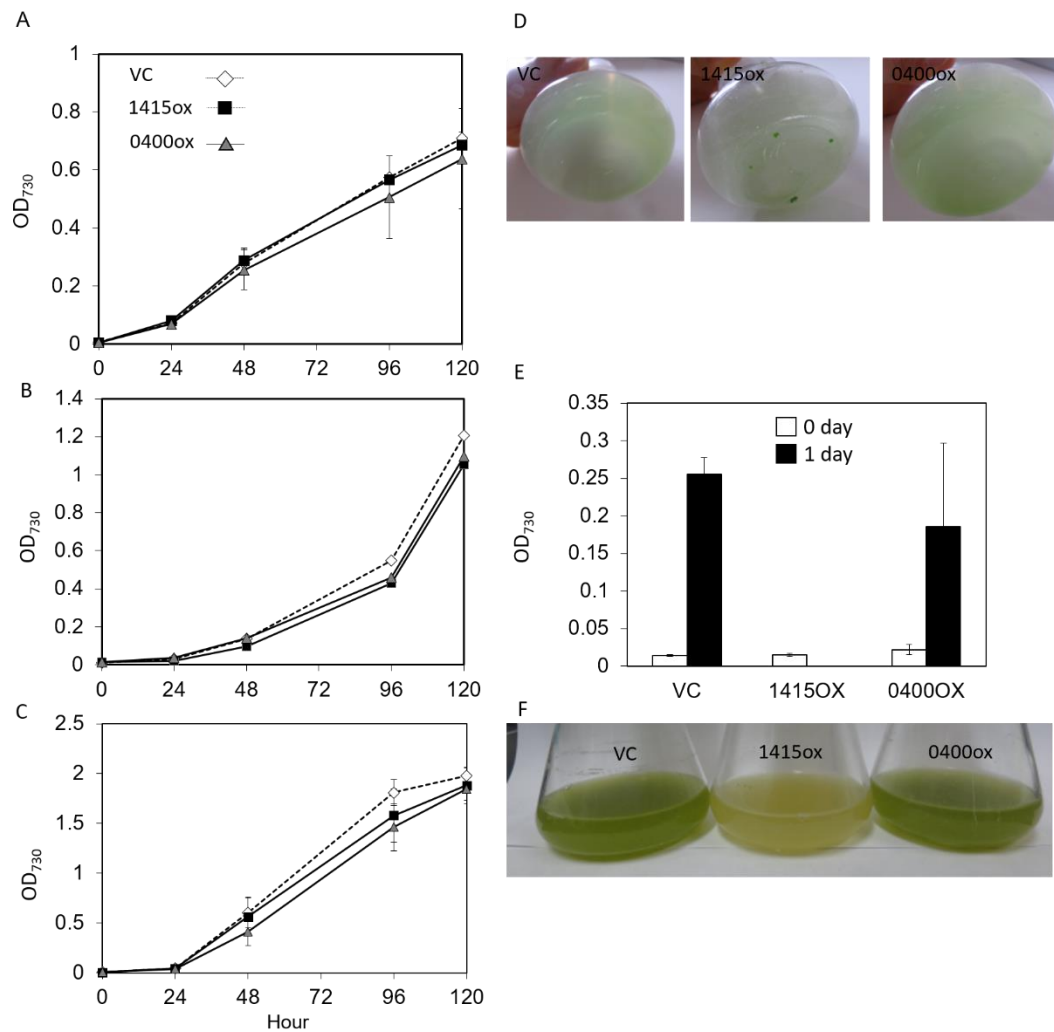


図 31 *NADK* 高発現株の表現型

A, 独立栄養条件における増殖曲線 (n=3)、B, 従属栄養条件における増殖曲線 (n=3)、C, 混合栄養条件における増殖曲線 (n=3)、D, 強光条件 ($150 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 1 日間)における色調、E, メチルビオローゲン添加後の OD₇₃₀ の変化、F, 通常光条件で長期培養 (31 日) した際の色調

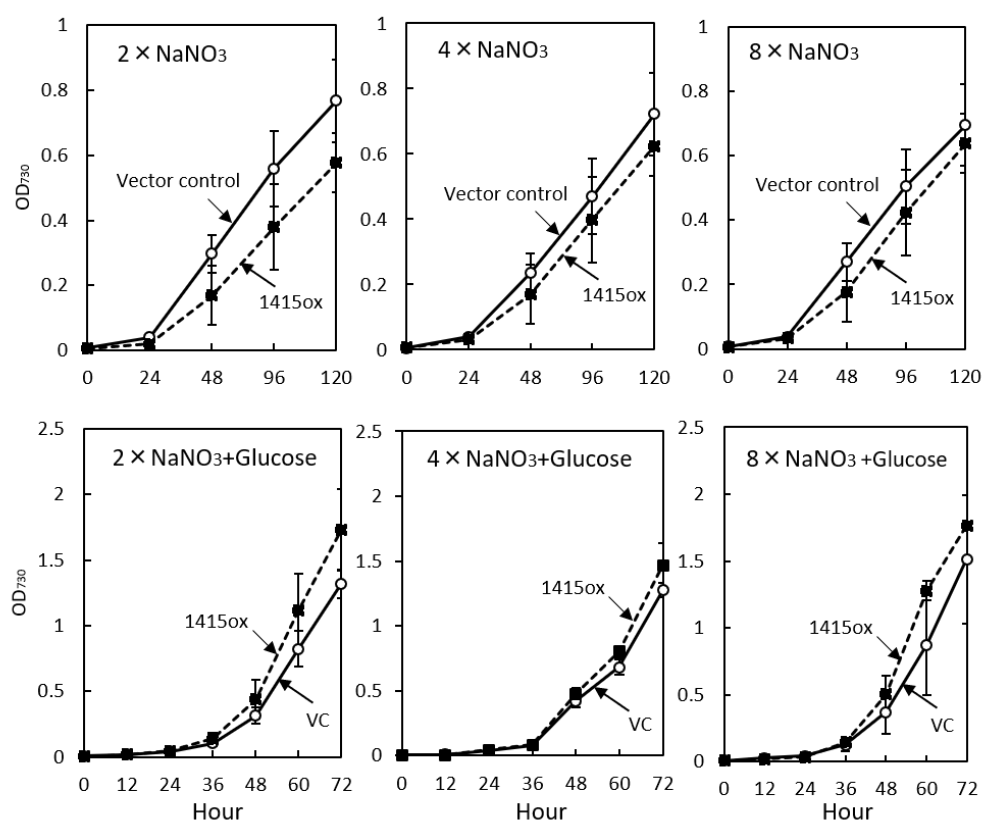
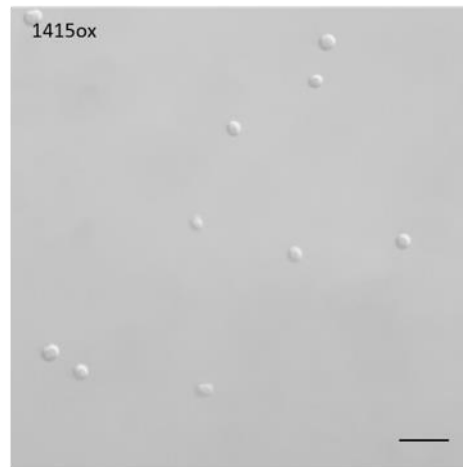
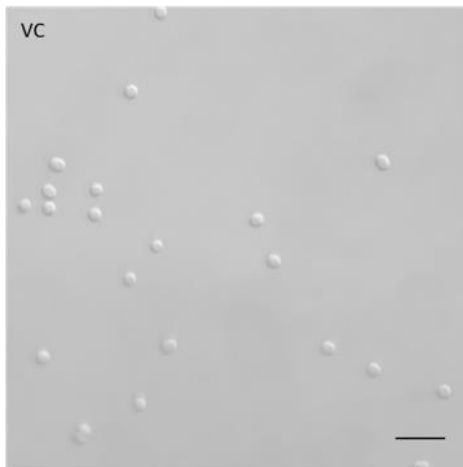


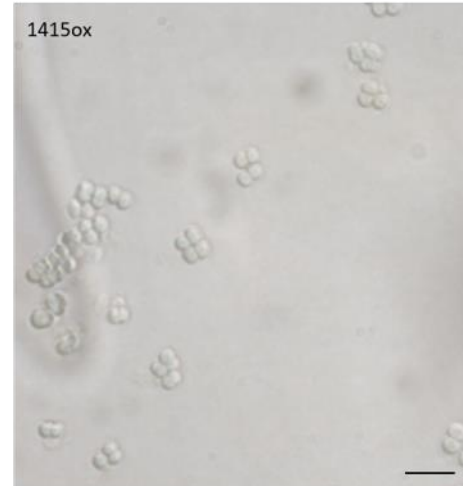
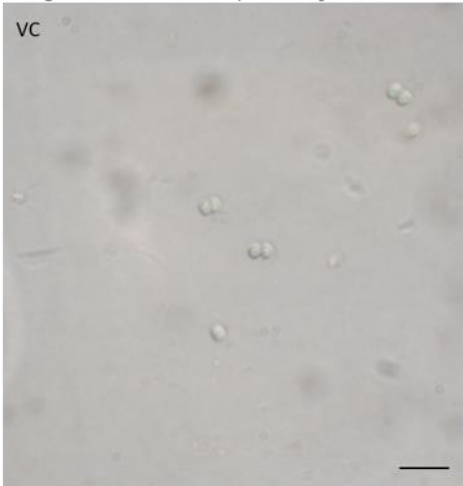
図 32 *NADK*高発現株の高窒素添加条件および高窒素+グルコース添加条件における増殖曲線

A, 高窒素添加条件における増殖曲線 (n=3)、B, 高窒素+グルコース添加条件における増殖曲線 (n=3)

A Photoautotrophic condition



B High nutrient condition (4×NaNO₃+5 mM Glucose)



C

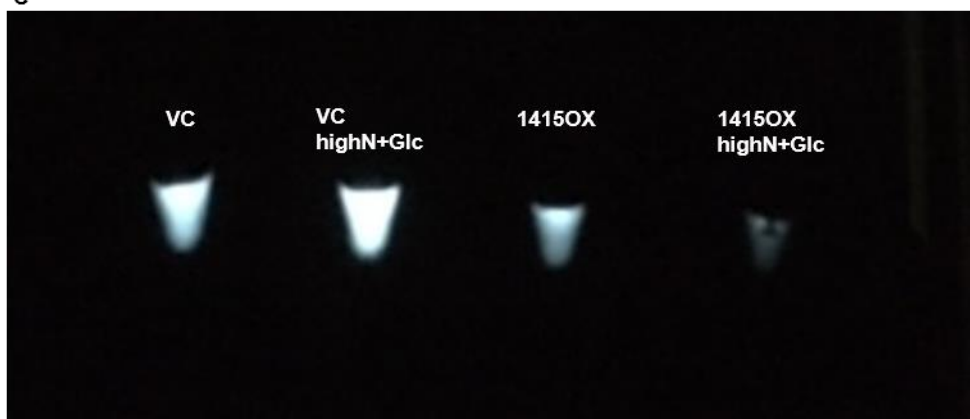


図 33 *NADK* 高発現株の通常光条件および高窒素＋グルコース添加条件における形態観察及びカルコフローによる染色像

A, 通常光条件 (30 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)、B, 高窒素＋グルコース添加条件 (30 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)、C, Calcofluor を用いたセルロースの染色、OD₇₃₀ を合わせ、1.5 ml チューブに細胞を入れ、UV によって励起後、ゲルインディケーターで撮影した。

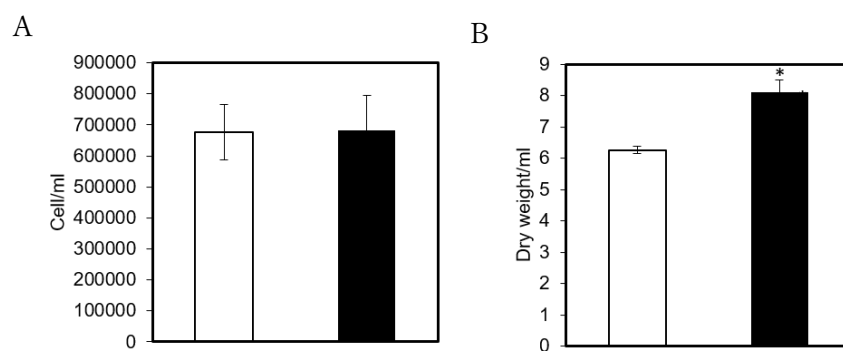


図 34 高栄養培養条件における *NADK* 高発現株の表現型

A, 高栄養培養条件で 4 日間培養したベクターコントロール株と *sll1415* 高発現株の細胞数 (n=3, * $P<0.05$)。B, 高栄養培養条件で 4 日間培養したベクターコントロール株と *sll1415* 高発現株の乾燥重量 (n=3, * $P<0.05$)。

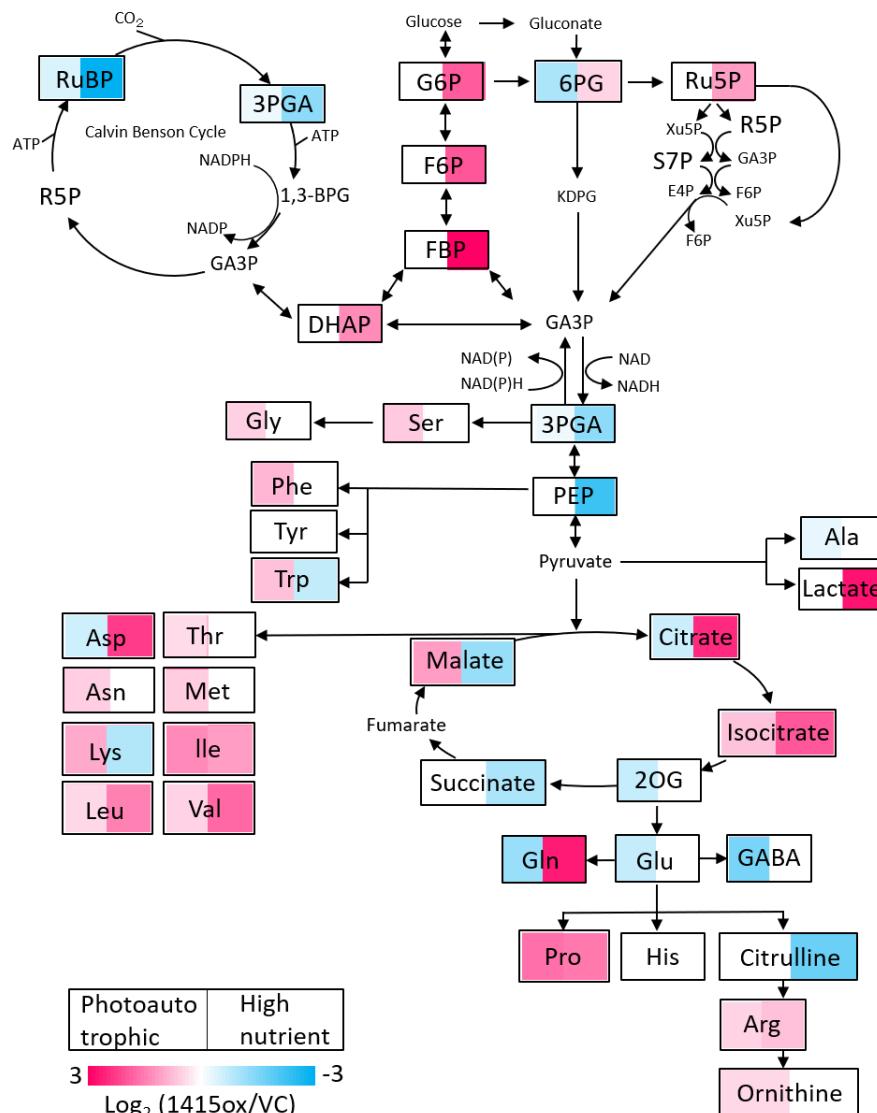


図 35 *NADK* 高発現株の代謝解析

通常光条件および高栄養培養条件で 4 日間培養したベクターコントロール株と *NADK* 高発現株から代謝物を抽出した。ベクターコントロール株よりも多い代謝物ほど赤くなり、少ない代謝物ほど青くなるように色付けした ($n=4$)。それぞれの条件で VC に対して有意な差がある代謝変化のみを色付けした。

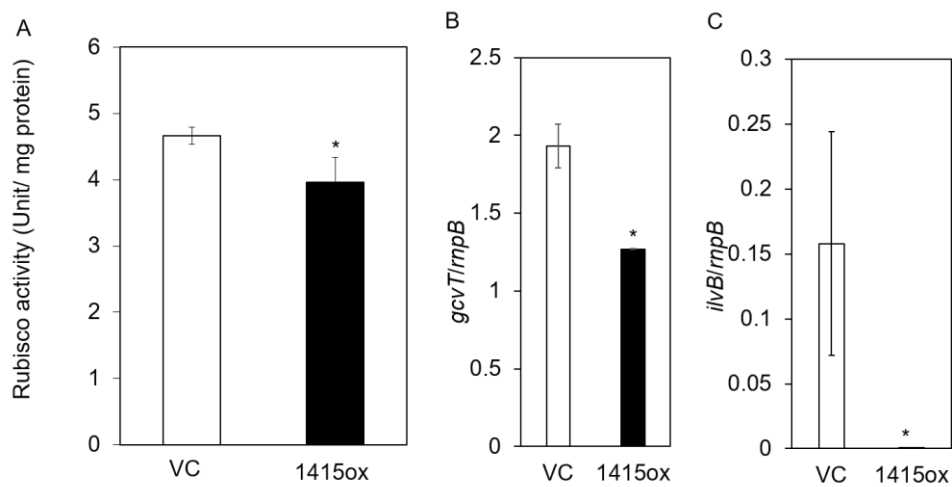


図 36 *NADK* 高発現株のルビスコ活性測定と光呼吸関連遺伝子の発現解析
 A, 通常光条件で 4 日間培養したベクターコントロール株と *NADK* 高発現株のルビスコの活性を測定した (n=3、**P*<0.05)。B, 光呼吸関連遺伝子の遺伝子発現解析 (n=3、**P*<0.05)。サンプルは通常光 (30 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) 条件で培養したものを用いた。

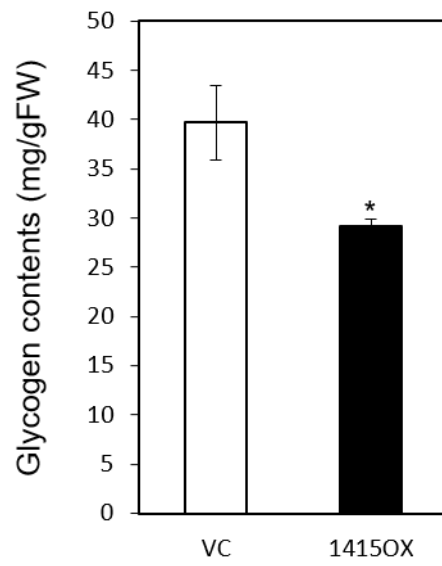


図 37 *NADK* 高発現株のグリコーゲン量の測定 (n=3、* $P<0.05$)。サンプルは通常光 (30 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) 条件で培養したものを用いた。

第5章 *slr0400* は NADK なのか？

5.1 概要

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する 2 系統の NADK (*sll1415*, *slr0400*) 破壊株はそれぞれに固有な表現型を示した。さらに、それぞれの NADK 高発現株を用いた NADK 活性及び NAD(P)(H) 量の測定では、*sll1415* は NAD(H)K 活性を有していることが示唆された。その一方で、*slr0400* は強光条件で必須であり、従属栄養条件での増殖の抑制因子としての役割を有していることが示唆された。しかしながら、*slr0400* 高発現株では NADK 活性の上昇が検出できず、*slr0400* が NADK としての働きを有しているのか検討する必要があった。第 5 章では、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の二つの NADK (*sll1415*, *slr0400*) の N 末端に葉緑体移行シグナルを付加し、シロイヌナズナの *nadk2* 変異体に導入することで、*nadk2* の Pale-green の表現型が回復するのかどうかを観察した。

5.2 実験方法

・遺伝子クローニングと植物系統の確立

シロイヌナズナのルビスコ小サブユニットの葉緑体移行配列をシアノバクテリアのそれぞれの NADK にオーバーラップ PCR で連結した。その際、Gateway 用の配列を付加しておき、*pH2GW7* ベクターに Gateway システムを用いてクローニングした。アグロバクテリウムの GV3101 に形質転換後、シロイヌナズナ *nadk2* 変異体に感染させ、ホモ個体を複数得た。

・NAD(P)(H) 定量

32 日連続光で栽培したシロイヌナズナの葉 1 枚を 1/3 程の大きさに切り、250 μ l の抽出バッファーに入れ、氷上でサンプルが飛び散らないように、葉の残差がなくなるまでホモジェナイズした。以下はシアノバクテリアでの測定方法と同じである。

・NADK 活性測定

液体窒素で凍結乾燥した植物を乳鉢乳棒ですりつぶして、粗タンパク質を抽出した。以下はシアノバクテリアでの測定方法と同じである。

・RT-PCR

RNA 抽出、cDNA 合成を Kit の手順通り行い、Quick Taq で PCR を行った。

5.3 結果

シロイヌナズナの葉緑体局在性 NADK2 の変異体は Pale-green の表現型を示す。そこで、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する二つの NADK が NADK 活性を有しているのかを調べるために、*35S* プロモーター下にそれぞれのシアノバクテリアの NADK 遺伝子を組み込みこんだ。その際、それぞれの N 末端側に葉緑体移行シグナルを付加して高発現させた。ホモ系統を複数得た後、RT-PCR により遺伝子導入の確認を行った (図 38A)。その後、表現型を恒光条件で観察した結果、どちらの NADK を高発現しても、葉緑体局在

性 NADK2 の変異体の Pale-green の表現型は大幅に回復することがわかった (図 38B)。 *sll1415* の相補株はほぼ完全に WT と同様な表現型を示した一方で、 *slr0400* は WT に比べると多少黄緑色であり、葉も少し丸いという特徴を示した。

これまで、葉緑体局在性 NADK2 の変異体では NADP⁺が減少していることが報告されている。そこで、葉緑体局在性 NADK 2 の表現型の相補が、NAD(P)(H)量と NADK 活性レベルでも相補しているのか調べた。その結果、 *sll1415*、 *slr0400* の双方の高発現植物で葉緑体局在性 NADK2 の変異体よりも NADP⁺の量が多くなっており、どちらの NADK も *AtNADK2*の連続光条件での働きを NADP⁺の合成レベルで相補できることがわかった (図 39A)。さらに、NADK 活性を測定すると、双方の NADK 相補株で NADK 活性が葉緑体局在性 NADK2 の変異体よりも高くなっていた (図 39B)。この結果より、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する NADK はどちらもシロイヌナズナにおいて NADK 活性を有していることがわかった。

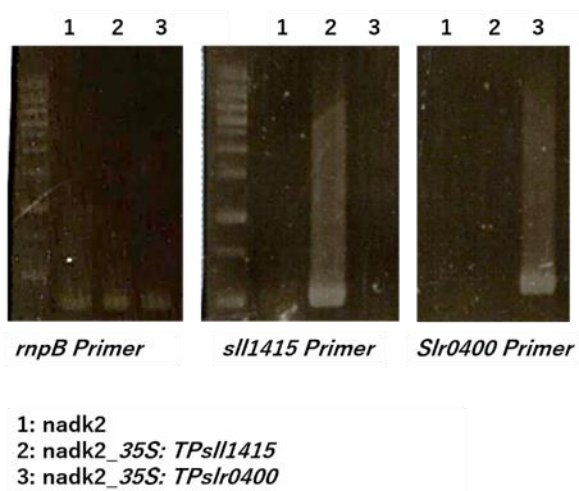
5.4 考察

slr0400 は強光条件下で何らかの役割を果たしており、さらに従属栄養条件で増殖の抑制因子としての役割を有していることが示唆された。しかしながら、 *slr0400* は一次配列上 NADK に保存されている配列を有しているが、高発現株では NADK 活性の上昇が検出できず、 *slr0400* が NADK としての機能を有しているのか検討する必要がある。これまで *slr0400* の高発現株では遺伝子発現量がベクターコントロール株よりも増加しているのにも関わらず、NADK 活性の有意な上昇は検出できていなかった。そこで、第 5 章では、シロイヌナズナ葉緑体局在性 NADK2 の変異体 (*nadk2*) を用いて活性の有無を確認した。

シロイヌナズナは細胞内局在の異なる 3 種類の NADK がこれまで報告されている。NADK1 は細胞質、NADK2 は葉緑体、NADK3 はミトコンドリアかペルオキシソームに局在していると考えられている。いずれの変異体も、環境ストレスに感受性になっているが、特に NADK 2 変異体は連続光条件でも Pale-green の表現型を示し、葉も WT より丸くなっている。そこで、シアノバクテリアの NADK が NADK として活性を有していれば NADK2 変異体の Pale-green の表現型を相補できると考え、それぞれの NADK に葉緑体移行シグナルを付加し、高発現させた。その結果、NADK2 変異体の葉の色はほぼ WT と同様なレベルまで回復した (図 34)。その一方で、葉緑体移行シグナルを付加せずに NADK2 変異体でシアノバクテリアの NADK を高発現させた植物は、形は *nadk2*変異体よりも大きくなるものの、葉の色は回復しなかった。これらの結果から、シロイヌナズナの葉緑体には NADP⁺が容易に通過せず細胞質で NADK を高発現させても葉緑体内の NADP⁺減少による表現型を回復させることができないことが示唆された。今後、NADK の葉緑体への移行を GFP により確認する必要があると考えているが、これらの結果は、シロイヌナズナにおいては NADP⁺量は細胞区画ごとに調節される必要があることを示唆しており、その意義の解明が今後望まれる。さらに、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する二つの NADK は

葉緑体内でシロイヌナズナの葉緑体局在性 NADK2 の活性を相補できる活性を有することがわかり、今後、リコンビナントタンパク質を用いて詳細な生化学的性質が明らかにされることが期待される。

A



B

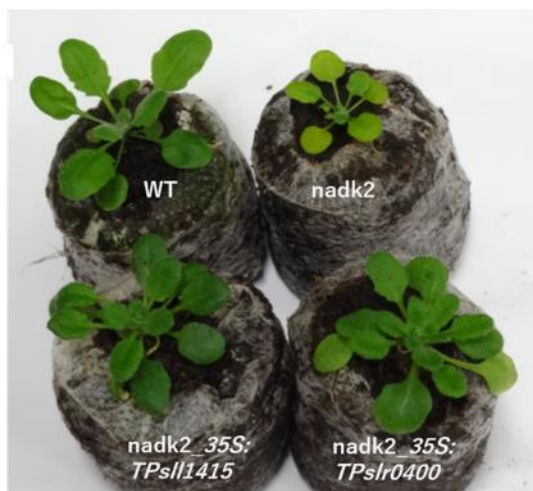


図 38 シアノバクテリアの NADK を発現させた *nadk2* 変異体の観察
 A, RT-PCR、B, 栽培 32 日目の植物の様子

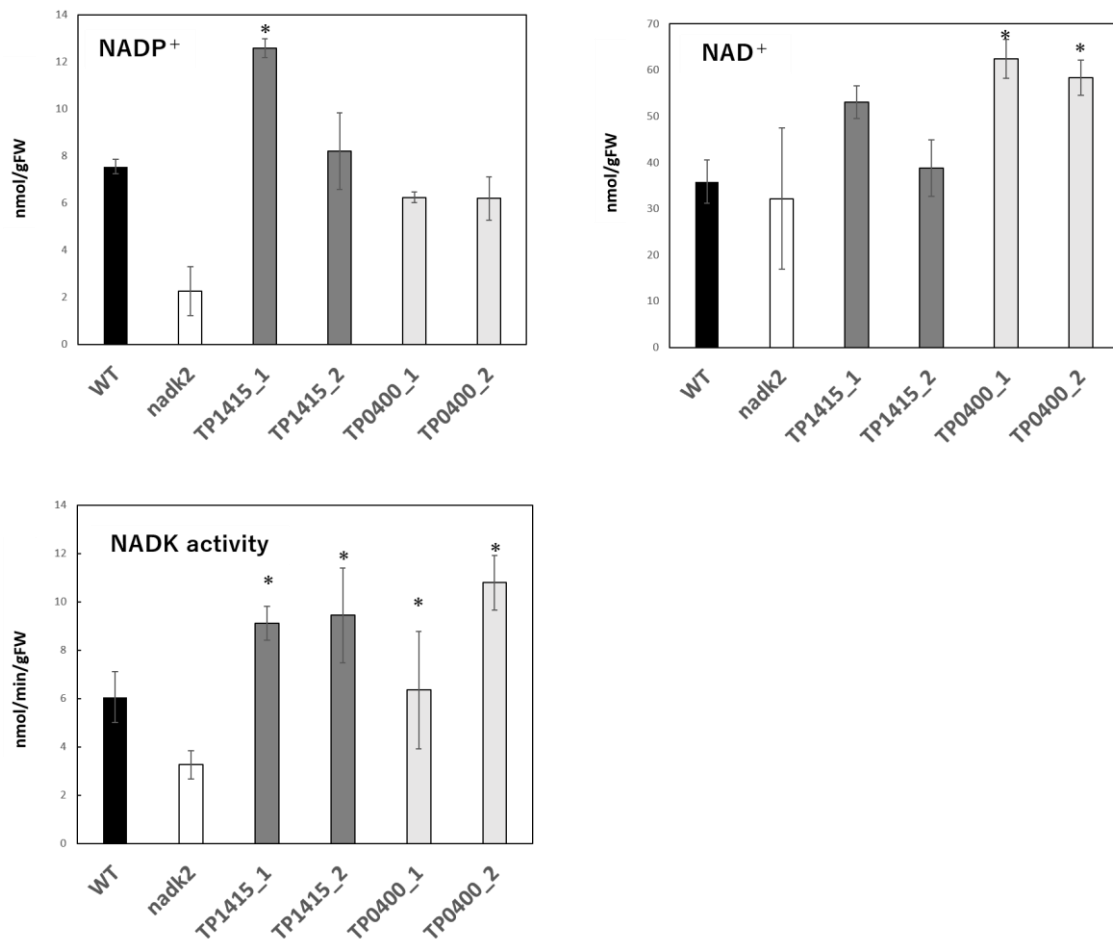


図 39 シアノバクテリアの NADK を発現させた *nadk2*変異体の NAD(P)定量と NADK 活性測定
A, NAD(P)定量 (n=3、* $P<0.05$ 、栽培 28 日目)、B, NADK 活性 (n=3、* $P<0.05$ 、栽培 28 日目)

第6章 系統解析と考察

6.1 概要

WT はグルコースを添加した完全暗所条件では増殖することができないが、*slr0400* 破壊株はグルコースが添加された培養条件で増殖度が上昇し、完全従属栄養性を獲得することを示した。また、それぞれの NADK は異なる培養条件で固有の働きを持っていることが示唆された。そこで、*Synechocystis* sp. PCC 6803 以外のシアノバクテリアは「2 種類の NADK を持つのか」、「その NADK は系統樹上で *sll1415* と *slr0400* のどちらのクレードに属するのか」という点に着目し、Cyanobase (<http://genome.microbedb.jp/CyanoBase>) に登録されている藻類のうち、ゲノム情報が完全に解読されている 72 種のシアノバクテリアのゲノム情報を基に NADK の有無及び数を調べ、分子系統樹を作成した。

6.2 実験方法

分子系統樹は、Cyanobase (<http://genome.microbedb.jp/CyanoBase>) で入手したアミノ酸配列情報を用いた。PHYLIP format を作製し、PhyML 3.0 で BIC を情報量基準とし、ブートストラップ値を 100 回に設定した。外群としてはランダムに原核生物からアミノ酸配列を取得した。

6.3 結果

ゲノム情報に基づいて Blast 検索を行い、NADK の有無を調べた結果、69 種は 2 種類の NADK を有していたが、*Atelocyanobacterium thalassa* と *Epithemia turgida* は NADK を 1 種類のみ有していた。

PhyML を用いて分子系統樹を作製した結果、*sll1415* と *slr0400* はそれぞれが異なるクレードに分類された (図 40)。さらに、65 種の二つの NADK はそれぞれが *sll1415* もしくは *slr0400* が属するそれぞれのクレードに分類された。その一方で、*Atelocyanobacterium thalassa*、*Epithemia turgida* が持つ一つの NADK は *sll1415* が属するクレードに分類され、*slr0400* のクレードに属する NADK を有していないことが分かった (表 1)。興味深いことに、調べた中で唯一、*Synechococcus* sp. UTEX 2973 は二つの NADK を有していたが、図 35 の分子系統樹上でどちらの NADK も *sll1415* のクレードに分類された。

6.4 考察

Synechococcus sp. UTEX 2973 は、近年、他のシアノバクテリアよりも増殖速度が速いことから、バイオマスの新たなプラットフォームとしての利用を見据えた研究が盛んにおこなわれている (Yu et al., 2015)。さらに、*Synechococcus* sp. UTEX 2973 では 55 か所の遺伝子多型が報告されており、その遺伝子多型に増殖速度を早くできる重要な遺伝子があると考えられている。その遺伝子多型の中には NADK が含まれており、さらに、*Synechococcus* PCC 7942 に突然変異を入れて増殖が早くなる変異体が分離されると、NADK に点変異が

入り、結果として NAD^+ の基質特異性が変化し、 NADP(H) を多く合成する株では増殖が早くなることが報告されている (Ungerer et al., 2018)。このことから、*sll1415* は通常光条件でもシアノバクテリアの増殖を調節する一つの重要な因子であると考えられ、今後 *slr0400* との関連性、他の遺伝子多型との関連性、第 4 章の結果を考慮しながら、遺伝子改変をすることで、増殖が早くなる現象の解明が期待される

Synechocystis sp. PCC 6803 が有する *slr0400* の機能についてはこれまで全く報告がない。本研究により、*slr0400* 破壊株は完全従属栄養性を獲得することが分かった。さらに、系統解析により、*slr0400* を持たないシアノバクテリアは、光化学系 II やルビスコを失うなど、光合成能が喪失しており、独立栄養性のシアノバクテリアと相利共生を結ぶことで炭素源を確保している (Thompson et al., 2012)。このことから、一見機能を持たず、なぜ存在するのかよくわからない *slr0400* が、実は光合成と非光合成を切り替える進化の過程で非常に重要な一つの因子であったことが示唆される。今後、具体的に *slr0400* がどのように NAD^+ 量を感知し調節するのか、分子レベルでの解析が求められるとともに、*slr0400* が代謝をどのように調節しているのか、という新たな疑問が生じている。

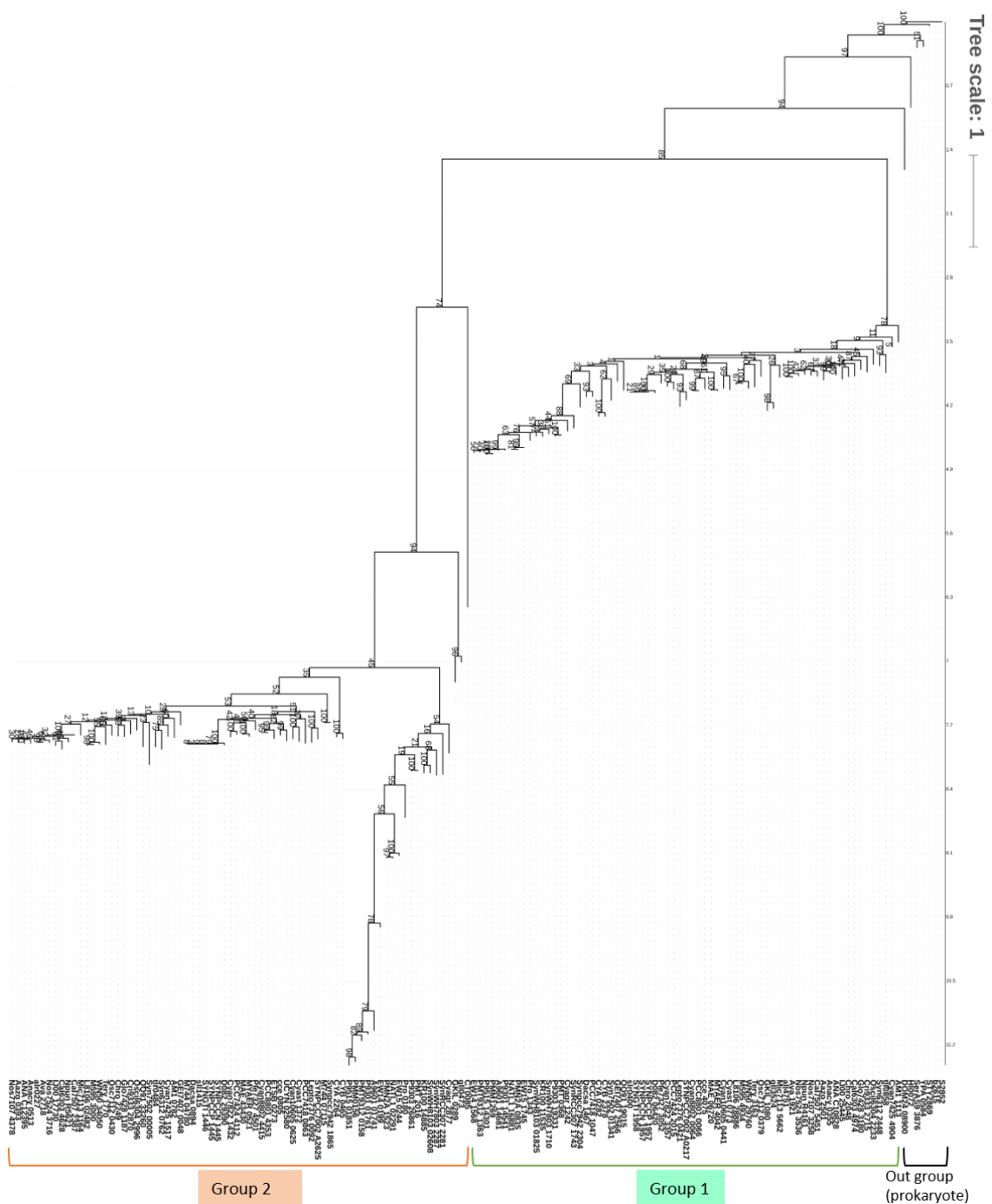


図 40 シアノバクテリアが有する NADK の分子系統樹
 多くのシアノバクテリアは二つの NADK を有しており、それらは *slr0400* が属する Group1 と *sll1415* が属する Group2 の二つのクレードに属する。分子系統樹は PhyML (Guindon et al., 2010) を使い、100 回のブートストラップ及び最尤法で計算した。

表 1 シアノバクテリアが有する NADK

<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	slI1415	slr0400
<i>Anabaena</i> sp. 90	ANA_C12395	ANA_C10828
Candidatus <i>Atelocyanobacterium thalassa</i> isolate ALOHA	UCYN_02580	
<i>Chlorobium tepidum</i> TLS	CT0085	
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8801	PCC8801_4353	PCC8801_0066
<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	gII0473	gII3525
<i>Halothece</i> sp. PCC 7418	PCC7418_0863	PCC7418_1047
<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7376	Lepto7376_0092	Lept7376_0421
<i>Microcoleus</i> sp. PCC 7113	Mic7113_1164	Mic7113_5662
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	alr0227	all4751
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9301	P9301_01761	P9301_14541
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. NATL2A	PMN2A_1523	PMN2A_0835
<i>Synechococcus</i> sp. UTEX 2973	M744_07115	M744_04780
<i>Synechococcus</i> sp. WH7803	SynWH7803_2287	SynWH7803_1710
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 substr. PCC-P	SYNPCCP_1445	SYNPCCP_1957
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	tI0484	tII0858
cyanobacterium endosymbiont of <i>Epithemia</i> <i>turgida</i> isolate EtSB Lake Yunoko	ETSB_0273	

赤が Group 1 で 青が Group 2 を示す。

第7章 まとめと今後の展望

シロイヌナズナの葉緑体とシアノバクテリアにおいて NAD^+ は、*de novo* で合成された Asp から合成される。葉緑体には、NADK が一つ存在し、N 末端側の酵素活性の制御配列が NADK ドメインに付加されている。シアノバクテリアは、NADK ドメインのみからなる、単純な構造の二つの NADK (Sll1415, Slr0400) を有している。本研究では、NADK の数と一次構造から、シアノバクテリアには二つの NADK を用いた未知の NAD(P)(H) の調節機構が存在すると予測した。

二つの NADK のうちの Sll1415 は、光従属栄養条件におけるグルコース代謝に必須であることを示した。Sll1415 が供給する NADP^+ は酸化的ペントースリン酸経路に必要であることを示した。Slr0400 は、強光条件で必須であり、*slr0400* 遺伝子破壊株は黄化し、D1 タンパク質を維持できていないことを示した。従属的な栄養条件では、slr0400 の破壊株が WT よりも早く増殖することが分かり、Slr0400 が従属的な栄養条件における増殖の抑制因子としての働きを有していることを示した。シアノバクテリアは細胞区画が基本的にはないと考えられているため、シアノバクテリアが有する二つの NADK には役割分担がないと考えられてきた。しかし、本研究により、多くのシアノバクテリアが有する二つの NADK には、異なる生理的役割があることが明らかとなった。

Sll1415 と Slr0400 は NAD^+ をリン酸化する、という意味では同じ機能を持つことが、シロイヌナズナの *nadk2* を用いた相補実験によりわかった。しかし、なぜ培養条件依存的に二つの NADK を用いて NAD(P)(H) の量的調節を分業しているのか、という点は明らかになっていない。それぞれの酵素が NAD^+ もしくは NADP^+ をどのようにモニターし、量的調節に貢献しているのかを考えるためには、それぞれの酵素の生化学的特性、細胞内の NAD^+ 及び代謝酵素の濃度勾配もしくは局在と環境条件に合わせた発現タイミングを今後理解していく必要がある。

生化学的性質に関しては、シアノバクテリアの NADK に関してこれまで全く情報がない。本研究により、Sll1415 は NADK 活性のみならず、NADHK 活性をも有していること、Slr0400 も葉緑体 *nadk2* を相補できる NADK としての役割を有していることを示した。それぞれの NADK がどのようなタンパク質と相互作用しているのか、Sll1415 と Slr0400 自体が相互作用していることはないのか、構造的差異はどこにあるのか等、それぞれの NADK が可溶化さえできれば、取り組める実験は数多くある。

近年、 NAD(P)(H) のバイオセンサーが動物で開発され始めている一方で、植物やシアノバクテリアへの応用例はない。今後、 NAD(P)(H) の時空間的動態を理解することで、それが代謝酵素の局在や代謝物の濃度勾配とどのように一致してくるのか、という疑問が今後明らかにされていくことが望まれる。

本研究により、 NAD(P)(H) は明暗周期においてダイナミックに変動していることがわかり、その変動パターンが時計遺伝子の *kaiABC* と関連している可能性が示唆された。さらに、二つの NADK のうち、*sll1415* は光従属栄養条件では遺伝子発現が上昇する一方で、

slr0400 は減少した。この真逆の遺伝子発現パターンがどのような転写因子によって制御され、その因子がなにを感知して、どのように NAD(P)(H) の量的調節の必要性に応じて、それぞれの NADK が発現制御されているのか、今後の展開が期待される。

参考文献

- Apps DK**, Pigeon-liver NAD kinase. The structural and kinetic basis of regulation of NADPH., *Eur. J. Biochem.* **55** (1975) 475-483.
- Bernhardt K, Wilkinson S, Weber AP, Linka N.**, A peroxisomal carrier delivers NAD⁺ and contributes to optimal fatty acid degradation during storage oil mobilization., *Plant J.* **69** (2012) 1-13.
- Bessman MJ, Frick DN, O'Handley SF.**, The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes., *J Biol Chem.* **271** (1996) 25059-25062.
- Bilger W and Bjorkman O.**, Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*., *Photosynth Res.* **25** (1990) 173-185.
- Bird JG, Zhang Y, Tian Y, Panova N, Barvík I, Greene L, Liu M, Buckley B, Krásný L, Lee JK, Kaplan CD, Ebright RH, Nickels BE.**, The mechanism of RNA 5' capping with NAD⁺, NADH and desphospho-CoA., *Nature.* **535** (2016) 444-447.
- Bulygina ER, Telepneva VI.**, Isolation of NAD-kinase from pigeon heart., *Biokhimiia.* **45** (1980) 2019-2027.
- Butler JR, McGuinness ET.**, Candida utilis NAD⁺ kinase: purification, properties and affinity gel studies., *Int J Biochem.* **14** (1982) 839-844.
- Chen, X., Schreiber, K., Appel, J.**, (2016) The Entner-Doudoroff path-way is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. *PNAS*, **113**, 5441–5446.
- Dorrich AK, Mitschke J, Siadat O, Wilde A.**, Deletion of the *Synechocystis* sp. PCC 6803 kaiAB1C1 gene cluster causes impaired cell growth under light-dark conditions., *Microbiology.* **160** (2014) 2538-2550.
- Dutilleul C, Lelarge C, Prioul JL, De Paepe R, Foyer CH, Noctor G.**, Mitochondria-driven changes in leaf NAD status exert a crucial influence on the control of nitrarte assimilation and the integration of carbon and nitrogen metabolism., *Plant Phys.* **139** (2005) 64-78.
- Genty B, Wonders J and Baker NR.**, Non-photochemical quenching of F₀ in leaves is emission wavelength dependent: consequences for quenching analysis and its interpretation., *Photosynth Res.* **26** (1990) 133-139.
- Gerdes SY, Kurnasov OV, Shatalin K, Polanuyer B, Sloutsky R, Vonstein V, Overbeek R, Osterman AL.**, Comparative genomics of NAD biosynthesis in cyanobacteria., *J Bacteriol.* **188** (2006) 3012-3023.
- Gao H, Xu X.**, The cyanobacterial NAD kinase gene sll1415 is required for photoheterotrophic growth and cellular redox homeostasis in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803., *J Bacteriol.* **194** (2012) 218-224

- Hauf W, Schlebusch M, Hüge J, Kopka J, Hagemann M, Forchhammer K.,** Metabolic Changes in *Synechocystis* PCC6803 upon Nitrogen-Starvation: Excess NADPH Sustains Polyhydroxybutyrate Accumulation., *Metabolites*. **3** (2013) 101-118.
- Hashida SN, Itami T, Takahara K, Hirabayashi T, Uchimiya H, Kawai-Yamada M.,** Increased rate of NAD metabolism shortens plant longevity by accelerating developmental senescence in *Arabidopsis*., *Plant Cell Physiol*. **57** (2016) 2427-2439.
- Hurley JK, Morales R, Martínez-Júlvez M, Brodie TB, Medina M, Gómez-Moreno C, Tollin G.,** Structure-function relationships in Anabaena ferredoxin/ferredoxin:NADP(+) reductase electron transfer: insights from site-directed mutagenesis, transient absorption spectroscopy and X-ray crystallography., *Biochim Biophys Acta*. **1554** (2002) 5-21.
- Hashida SN, Miyagi A, Nishiyama M, Yoshida K, Hisabori T, Kawai-Yamada M.,** Ferredoxin/thioredoxin system plays an important role in the chloroplastic NADP status of *Arabidopsis*., *Plant J*. **95** (2018) 947-960.
- Hoxhaj G, Ben-Sahra I, Lockwood SF, Timson RC, Byles V, Henning GT, Gao P, Selfors LM, Asara JM, Manning BD.,** Direct stimulation of NADP⁺ synthesis through Akt-mediated phosphorylation of NAD kinase., *Science*. **363** (2019) 1088-1092.
- Imai S, Guarente L.,** NAD⁺ and sirtuins in aging and disease., *Trends in Cell Biol*. **24** (2014) 464-471.
- Ishikawa Y, Miyagi A, Haishima Y, Ishikawa T, Nagano M, Yamaguchi M, Hihara Y, Kawai-Yamada M.,** Metabolomic analysis of NAD kinase-deficient mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803., *J Plant Physiol*. **205** (2016) 105-112.
- Ishikawa Y, Miyagi A, Ishikawa T, Nagano M, Yamaguchi M, Hihara Y, Kaneko Y, Kawai-Yamada M.,** One of the NAD kinases, *sll1415*, is required for the glucose metabolism of *Synechocystis* sp. PCC 6803., *Plant J*. (2019 a) doi: 10.1111/tpj.14262.
- Ishikawa Y, Kawai-Yamada M.,** Physiological significance of NAD kinases in cyanobacteria., *Front Plant Sci*. (2019 b) **27** 10:847. doi: 10.3389/fpls.2019.00847.
- Jansen MF, Chen QJ, An R, Chen YM, Chen J, Wang XC.,** NADK2, an *Arabidopsis* chloroplastic NAD kinase, plays a vital role in both chlorophyll synthesis and chloroplast protection., *Plant Mol Biol*. **59** (2005) 553-564.
- Jansen T, Kurian D, Raksajit W, York S, Summers ML, Maenpaa P.,** Characterization of trophic changes and a functional oxidative pentose phosphate pathway in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Acta Physiol Plant*. **32** (2010) 511-518.
- Katoh A, Uenohara K, Akita M, Hashimoto T.,** Early steps in the biosynthesis of NAD in *Arabidopsis* start with aspartate and occur in the plastid., *Plant Phys*. **141** (2006) 851-857.

- Kawano Y, Saotome T, Ochiai Y, Katayama M, Narikawa R, Ikeuchi M.**, Cellulose accumulation and a cellulose synthase gene are responsible for cell aggregation in the cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus* RKN., *Plant Cell Physiol.* **52** (2011) 957-966.
- Kooten O and Snel.**, The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology., *Photosynthesis Research.* **25** (1990) 147-150.
- Kornberg A, Pricer WE Jr.**, On the structure of triphosphopyridine nucleotide., *J Biol Chem.* **186** (1950) 557-567.
- Knoop H, Zilliges Y, Lockau W, Steuer R.**, The metabolic network of *Synechocystis* sp. PCC 6803: systemic properties of autotrophic growth., *Plant Phys.* **154** (2010) 410-422.
- Liu J, Lou Y, Yokota H, Adams PD, Kim R, Kim SH.**, Crystal structures of an NAD kinase from *Archaeoglobus fulgidus* in complex with ATP, NAD, or NADP., *J Mol Biol.* **354** (2005) 289-303.
- Ungerer J, Wendt KE, Hendry JI, Maranas CD, Pakrasi HB.**, Comparative genomics reveals the molecular determinants of rapid growth of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973., *Proc Natl Acad Sci USA.* **115** (2018) E11761-E11770.
- Maruta T, Ogawa T, Tsujimura M, Ikemoto K, Yoshida T, Takahashi H, Yoshimura K, Shigeoka S.**, Loss-of-function of an *Arabidopsis* NADPH pyrophosphohydrolase, AtNUDX19, impacts on the pyridine nucleotides status and confers photooxidative stress tolerance., *Sci Rep.* **6** (2016) 37432.
- Mori S, Yamasaki M, Maruyama Y, Momma K, Kawai S, Hashimoto W, Mikami B, Murata K.**, NAD-binding mode and the significance of intersubunit contact revealed by the crystal structure of Mycobacterium tuberculosis NAD kinase-NAD complex., *Biochem Biophys Res Commun.* **327** (2005) 500-508.
- Muro-Pastor MI and Florencio FJ.**, Purification and properties of NADP-isocitrate dehydrogenase from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Eur. J. Biochem.* **203** (1992) 99-105.
- Muro-Pastor M, Reyes J, Florencio F.**, The NADP⁺-isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) is nitrogen regulated in cyanobacteria. , *J Bacteriol.* **178** (1996) 4070-4076.
- Nakano H., Muramatsu S., Makino A. & Mae T.**, (2000) Relationship between the suppression of photosynthesis and starch accumulation in the pod-removed bean., *Australian Journal of Plant Physiology.* **27**, 167-173.
- Shabestary K, Hudson EP.**, Computational metabolic engineering strategies for growth-coupled biofuel production by *Synechocystis*., *Metab Eng Commun.* **3** (2016) 216-226.
- Narainsamy K, Cassier-Chauvat C, Junot C, Chauvat F.**, High performance analysis of the cyanobacterial metabolism via liquid chromatography coupled to a LTQ-Orbitrap mass spectrometer: Evidence that glucose reprograms the whole carbon metabolism and triggers oxidative stress, *Metabolomics.* **9** (2013) 21-32.

- Nakajima T, Kajihata S, Yoshikawa K, Matsuda F, Furusawa C, Hirasawa T, Shimizu H.,** Integrated metabolic flux and omics analysis of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under mixotrophic and photoheterotrophic conditions., *Plant Cell Physiol.* **55** (2014) 1605-1612.
- Ohashi K, Kawai S, Murata K ,** Identification and characterization of a human mitochondrial NAD kinase., *Nat Commun.* **3**(2012) 1248.
- Oxborough K and Baker NR.,** Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components-calculation of qP and F_v'/F_m' without measuring F_0' . *Photosynthesis Research.* **54** (1997) 135-142.
- Nakajima Y, Umena Y, Nagao R, Endo K, Kobayashi K, Akita F, Suga M, Wada H, Noguchi T, Shen JR,** Thylakoid membrane lipid sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) is required for full functioning of photosystem II in *Thermosynechococcus elongatus*., *J Biol Chem.* **293** (2018) 14786-14797.
- Pengpeng Z, Yagut A, Marion E, Aro EM.,** Flavodiiron proteins in oxygenic photosynthetic organisms: photoprotection of photosystem II by Flv2 and Flv4 in *Synechocystis* sp. PCC 6803., *PLoS One.* **4** (2009) e5331.
- Pétriacq P, de Bont L, Hager J, Didierlaurent L, Mauve C, Guérard F, Noctor G, Pelletier S, Pétriacq P, Ton J, Patrit O, Tcherkez G, Gakière B.,** NAD acts as an integral regulator of multiple defense layers., *Plant Phys.* **172** (2016) 1465-1479.
- Schippers JH, Nunes-Nesi A, Apetrei R, Hille J, Fernie AR, Dijkwel PP.,** The *Arabidopsis* onset of leaf death5 mutation of quinolinate synthase affects nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and causes early ageing., *Plant Cell.* **20** (2008) 2909-2925.
- Raffaelli N, Lorenzi T, Amici A, Emanuelli M, Ruggieri S, Magni G.,** *Synechocystis* sp. *slr0787* protein is a novel bifunctional enzyme endowed with both nicotinamide mononucleotide adenyltransferase and 'Nudix' hydrolase activities., *FEBS Lett.* **444** (1999) 222-226.
- Sickmier EA, Brekasis D, Paranawithana S, Bonanno JB, Paget MS, Burley SK, Kielkopf CL.,** X-ray structure of a Rex-family repressor/NADH complex insights into the mechanism of redox sensing., *Structure.* **13** (2005) 43-54.
- Sienkiewicz-Porzucek A, Sulpice R, Osorio S, Krahnert I, Leisse A, Urbanczyk-Wochniak E, Hodges M, Fernie AR, Nunes-Nesi A.,** Mild reductions in mitochondrial NAD-dependent isocitrate dehydrogenase activity result in altered nitrate assimilation and pigmentation but do not impact growth., *Mol Plant.* **3** (2010) 156-173.
- Tao R, Zhao Y, Chu H, Wang A, Zhu J, Chen X, Zou Y, Shi M, Liu R, Su N, Du J, Zhu L, Qian X, Liu H, Loscalzo J, Yang Y.,** Genetically encoded fluorescent sensors reveal dynamic regulation of NADPH metabolism., *Nat Methods.* **14** (2017) 4306.
- Takahara K, Kasajima I, Takahashi H, Hashida SN, Itami T, Onodera H, Toki S, Yanagisawa S, Kawai-Yamada M, Uchimiya H.,** Metabolome and photochemical analysis of rice plants

- overexpressing *Arabidopsis* NAD kinase gene., *Plant Phys.* **152** (2010) 1863-1873.
- Takahashi H, Takahara K, Hashida SN, Hirabayashi T, Fujimori T, Kawai-Yamada M, Yamaya T, Yanagisawa S, Uchimiya H.**, Pleiotropic modulation of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis* plants overexpressing the NAD kinase2 gene., *Plant Phys.* **151** (2009) 100-113.
- Thompson AW, Foster RA, Krupke A, CarterBJ, Musat N, Vaultot D, Kuypers MM, Zehr JP.**, Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga., **501**, *Science*. **337** (2012) 1546-1550.
- Tsang YH, Dogruluk T, Tedeschi PM, Wardwell-Ozgo J, Lu H, Espitia M, Nair N, Minelli R, Chong Z, Chen F, Chang QE, Dennison JB, Dogruluk A, Li M, Ying H, Bertino JR, Gingras MC, Ittmann M, Kerrigan J, Chen K, Creighton CJ, Eterovic K, Mills GB, Scott KL.**, Functional annotation of rare gene aberration drivers of pancreatic cancer., *Nat Commun.* **25** (2016) 10500.
- Turner WL, Waller JC, Vanderbeld B, Snedden WA.**, Cloning and characterization of two NAD kinases from *Arabidopsis*. identification of a calmodulin binding isoform., *Plant Phys.* **135** (2004) 1243-1255
- Tsenq YM, Harris BG, Jacobson MK.**, Isolation and characterization of yeast nicotinamide adenine dinucleotide kinase., *Biochim Biophys Acta.* **568** (1979) 205-214.
- Lerner F, Niere M, Ludwig A, Ziegler M.**, Structural and functional characterization of human NAD kinase., *Biochem Biophys Res Commun.* **288** (2001) 69-74.
- Waller JC, Dhanoa PK, Schumann U, Mullen RT, Snedden WA.**, Subcellular and tissue localization of NAD kinases from *Arabidopsis*: compartmentalization of de novo NADP biosynthesis., *Planta.* **231** (2010) 305-317.
- Warbug O.**, On the origin of cancer cells., *Science* . **123** (1965) 309-314.
- Wang X, Liu W, Xin C, Zheng Y, Cheng Y, Sun S, Li R, ZhuXG, Dai SY, Rentzepis PM, Yuan JS.**, Enhanced limonene production in cyanobacteria reveals photosynthesis limitations., *Proc Natl Acad Sci USA.* **113** (2016) 14225-14230.
- Yamamoto Y.**, NAD Kinase in Higher Plants., *Plant Physiol.* **41** (1966) 523-528.
- Yu J, Liberton M, Cliften PF, Head RD, Jacobs JM, Smith RD, Koppelaar DW, Brand JJ, Pakrasi HB.**, *Synechococcus* elongatus UTEX 2973, a fast-growing cyanobacterial chassis for biosynthesis using light and CO₂., *Sci Rep.* **5** (2015) 8132.
- Zhou J, Zhang F, Meng H, Zhang Y, Li Y.**, Introducing extra NADPH consumption ability significantly increases the photosynthetic efficiency and biomass production of cyanobacteria., *Metab Eng.* **38** (2016) 217-227.

謝辞

電顕の写真撮影は、埼玉大学科学技術支援センターの辻さんと埼玉大学理工学研究科・教育学部の金子先生にご協力いただきました。

D1 の抗体は、埼玉大学理工学研究科西本研の高橋先生に分譲していただきました。また、ROS の定量と暗呼吸活性は湯浅さんにご協力いただきました。

野生株及び高発現用のベクターは埼玉大学理工学研究科の日原先生に分譲していただきました。形質転換法、グリコーゲン定量も日原先生に教えていただきました。

クロロフィル蛍光測定は早稲田大学の園池先生にご協力していただきました。