

光合成活性に応じた転写調節に関わる転写制御因子の解析
—質量分析装置 Autoflex III を用いて—

Mechanism of photosynthetic activity-dependent transcriptional
regulation elucidated by MALDI-TOF MS spectrometry analysis using Autoflex III

大学院理工学研究科生命科学部門 日原 由香子

Department of Biochemistry and Molecular Biology

Yukako HIHARA

Abstract

The redox state of the photosynthetic electron transport chain acts as a critical sensing mechanism by regulating the transcription of key genes involved in the acclimation response to a change in the environment. We have shown that small LuxR-type regulator, PedR, is involved in photosynthetic electron transport-dependent transcriptional regulation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. We report here that thioredoxin (Trx) is identified as an interacting factor of PedR by pull-down assays and subsequent MALDI-TOF MS spectrometry analysis using Autoflex III. Under high-light conditions, it is likely that PedR is transiently inactivated upon reduction by reducing equivalents generated at the acceptor side of photosystem I and mediated by Trx. This is the first report showing the direct interaction between Trx and a transcriptional regulator to connect the redox state of the photosynthetic electron transport chain with changes in gene expression.

シアノバクテリアは植物の葉緑体の祖先生物であると考えられており、光合成研究のモデル生物として広く使われている。私はこのシアノバクテリアの一種である *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下 S.6803 と略記) を用いて、光合成と遺伝子発現制御の関係を調べている。光合成生物は、光・温度・栄養条件などの環境条件の変化に応じて細胞内の遺伝子発現のパターンを大きく変化させ、新しい環境条件になじもうとする。この際、環境条件の変化を細胞内に伝えるセンサーとして、光合成が重要な役割を果たしているのではないかと、ということが以前から提唱されていた。光合成活性は、光が強くなれば増加し、温度が下がれば減少する。このような光合成活性の変化が、遺伝子発現変動の引き金になるのではないかとという考え方である。私自身、S.6803 を弱光から強光条件に移した際に、光合成電子伝達反応を阻害しておく、通常は強光下で見られるはずの遺伝子発現変動の約半数が起きなくなることを観察していた。しかし、光合成活性の変化がどのように遺伝子発現変化に結び付くのか、その間をつなぐシグナル伝達経路については全く分かっていなかった。

こうした状況下で、私たちの研究室は、光合成活性に応じた転写調節に関わる S.6803 の転写制御因子を単離同定し、PedR (Photosynthetic electron transport dependent transcriptional regulator) と命名した (1)。PedR は光合成電子伝達活性の低い弱光条件下では、いくつかの遺伝子の転写活性化、または抑制に関わっているが、強光照射により光合成電子伝達活性が高まると、一過的な構造変化を起こして不活化する。それでは、光合成電子伝達活性の変化は、どのようにして PedR に伝えられているのだろうか？

そこで、プルダウン法という方法を用いて PedR と相互作用するタンパク質の探索を行った。N末端にHisタグを付加した精製 PedR タンパク質 (His-PedR) を S.6803 野生株の粗抽出液に添加し、しばらくインキュベートすることにより、His-PedR と相互作用タンパク質の複合体形成を促す。その後 His タグに親和性を持つ微細粒子(レジン)を加え、His-PedR を結合させてから微細粒子を遠心分離し、洗い操作の後に His-PedR を溶出した。このとき、コントロール実験として His-PedR を添加しない細胞粗抽出液に微細粒子を添加し、同様に洗い・溶出の操作を行った。こうして得られた溶出画分

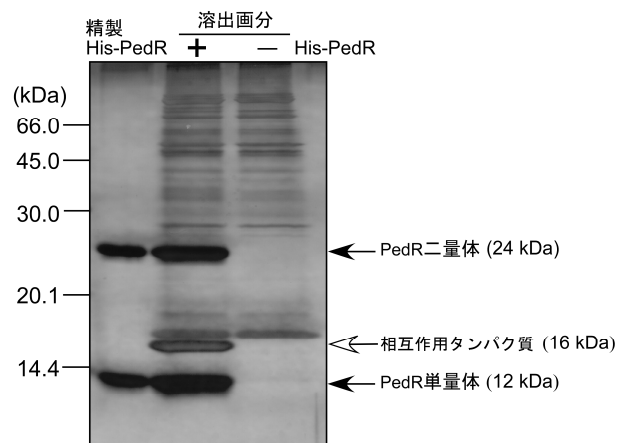


図 1. プルダウン法による PedR の相互作用タンパク質の単離のタンパク質を SDS-PAGE 法により分離し、銀染色によりタンパク質バンドを可視化したところ、His-PedR を添加した溶出画分にも、大きさが 16 kDa 相当のタンパク質が検出され、PedR の相互作用タンパク質であろうと考えられた(図 1)。

このタンパク質が何であるのかを同定するために、タンパク質バンドを切り出してタンパク質分解酵素のトリプシンで消化し、得られた消化断片ペプチド混合物を科学分析支援センターに設置されている質量分析装置、BRUKER 社の Autoflex III にかき、マスペクトル(横軸に検出された質量ピーク m/z、縦軸に検出強度をとったスペクトル)を得た(図 2)。トリプシン等のタンパク質分解酵素は、特定のアミノ酸配列でペプチド鎖を切断するため、得られた質量ピークのリストは、人の指紋(fingerprint)のようにそのタンパク質に固有なパターンを示す。全ゲノム配列が明らかになっている S.6803 のような生き物では、この質量ピークリストを、その生き物が持つ全タンパク質の理論的な質量ピークリストと照合することで、タンパク質の同定を瞬時に行うことができる。この同定方法をペプチドマスマフィンガープリント法と呼ぶ。得られた質量ピークリストを、オンライン上の解析ソフト「Mascot」(<http://www.matrixscience.com/>)にて検索したところ、目的バンドは S.6803 のチオレドキシシン TrxM (Slr0623) であることが明らかになった。また消化断片ペプチドの1つ(m/z = 1792)をタンデム質量分析 (MS/MS) によりさらに解析したところ、その配列が LNTDENPNTASQYGIR であり、TrxM の部分配列であることが確認された(図 3)。

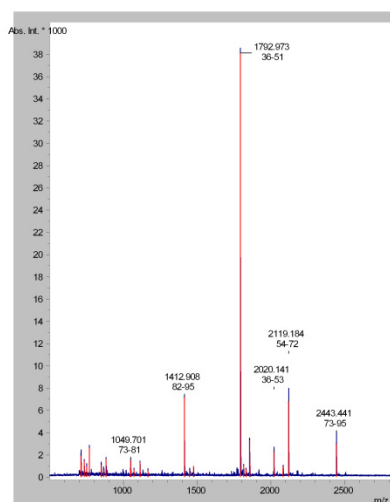


図 2. 相互作用タンパク質のトリプシン消化断片のマスペクトル。データベース検索によりチオレドキシシン TrxM と同定された。

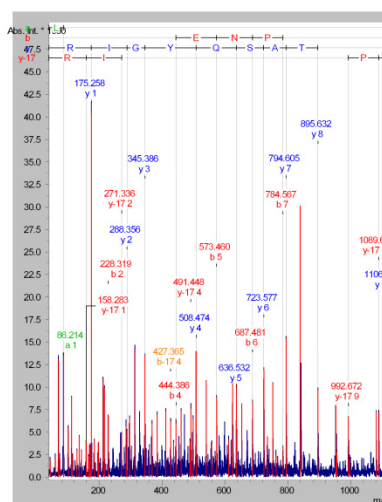


図 3. m/z=1792の消化断片のMS/MS解析結果。アミノ酸配列LNTDENPNTASQYGIR が同定された。

チオレドキシシンは細胞内に多く存在するタンパク質であり、自身が持つチオール基と標的タンパク質のチオール基間でチオール・ジスルフィドの交換反応を起こすことにより、酵素活性の調節などに関与していることが古くから知られている。S.6803 は 4 種類のチオレドキシシンを持つが、今回の実験では、この内最も細胞内での存在量

の多い TrxM が単離されてきた。次には、ブルダウン法で検出された PedR とチオレドキシンの相互作用が実際に起きているのかどうか検討する必要がある。そこで、精製 PedR と精製チオレドキシンを混合した場合に PedR の持つジスルフィド結合がチオレドキシンの還元により還元されることや、チオレドキシン還元酵素の遺伝子破壊株 (TrxM 自体の遺伝子破壊株は致死のため得られない) では、強光下での PedR の構造変化および不活化が起きないことなどを確認した。

以上の実験の結果、光合成電子伝達活性に依存した PedR の活性制御のメカニズムが明らかになった (図 4)。弱光下では PedR は活性型として転写制御を行っているが、強光下で光合成電子伝達活性が高まると、生成した還元力がチオレドキシンを還元、さらにチオレドキシスが PedR を還元し、PedR は一過的な構造変化を起こす。この構造変化の結果、PedR は不活化し、その支配下にある遺伝子群の発現レベルが変化する。このようなメカニズムで光合成電子伝達と遺伝子発現制御がリンクしていることを示すことができた(2)。

光合成生物において、チオレドキシスが光合成電子伝達鎖からの還元力を受けて、光合成活性依存的な制御を行うことは古くから知られていた。最近では、シアノバクテリア細胞や葉緑体の粗抽出液中から、チオレドキシスと相互作用するタンパク質をアフィニティー精製する試みも行われ、多くの新規チオレドキシス標的タンパク質が同定されている。その結果、細胞内の多くの代謝過程が光合成活性依存的な制御を受けていることが明らかになったが、このアフィニティー精製法では、細胞内存在量の少ない転写制御因子を単離同定することはできず、チオレドキシスが遺伝子発現制御に関わっているかどうかは依然として不明であった。本研究が、チオレドキシスと相互作用し、光合成活性依存的に働く転写制御因子の世界初の報告例となる。

質量分析装置を使用するにあたり、科学分析支援センター専門技術員の新美智久さんに大変お世話になった。この場を借りてお礼を申し上げたい。

参考文献

- (1) Nakamura K and Hihara Y (2006) Photon flux density-dependent gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is regulated by a small, redox-responsive, LuxR-type regulator. *Journal of Biological Chemistry* 281: 36758–36766.
- (2) Horiuchi M, Nakamura K, Kojima K, Nishiyama Y, Hatakeyama Y, Hisabori T and Hihara Y (2010) The PedR transcriptional regulator interacts with thioredoxin to connect photosynthesis with gene expression in cyanobacteria. *Biochemical Journal* 431: 135-140.

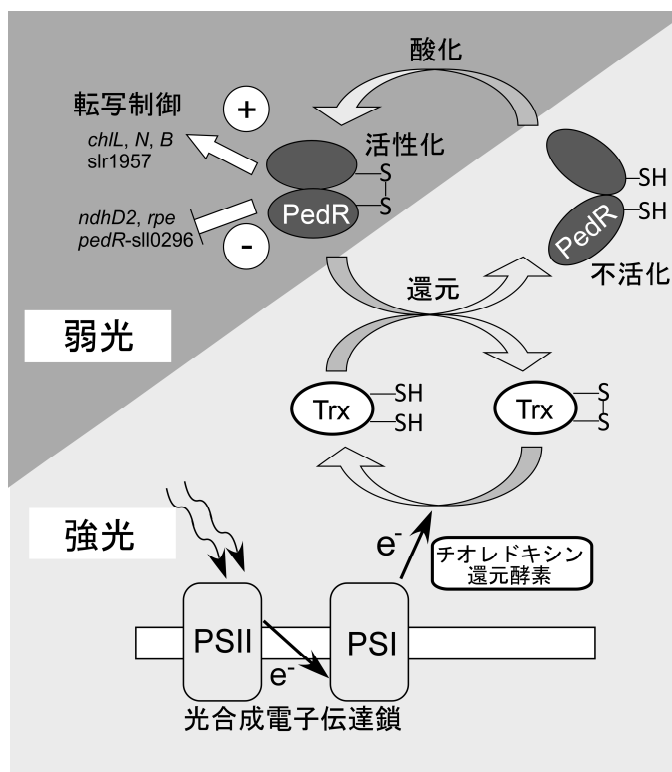


図 4. 光合成電子伝達活性に依存した PedR 活性制御の模式図。光合成電子伝達鎖からの還元力がチオレドキシス (Trx) を還元し、Trx がさらに PedR を還元する。還元型 PedR は構造変化を起こして不活化する。