

シアノバクテリアおよび化学合成細菌における二酸化炭素利用の分子機構

Molecular mechanism of carbon dioxide utilization in cyanobacteria and chemolithotrophic bacteria

代表研究者 茨城大学理学部生物学教室助手 鈴木英治
Res. Assoc., Dept. of Biology, Faculty of Science, Ibaraki Univ.
Eiji Suzuki

Carbonic anhydrase (CA) is essential to inorganic carbon fixation in cyanobacteria. Two experimental approaches have been employed in this study to investigate mechanisms of biosynthesis of CA and assembly of carboxysome where CA is postulated to be localized: 1) Overexpression of *icfA* gene encoding CA in a cyanobacterium, *Synechococcus* PCC7972, by introducing *tac* promoter, and 2) Search for genes of ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) and CA in a chemolithotrophic bacterium, *Thiobacillus neapolitanus* ATCC23641.

tac promoter was inserted 67 base pairs upstream of the coding region of *icfA* and the transformants obtained was designated as HD::KT. Although growth rate constant was higher in HD::KT strain than in the wild type strain by 7-9%, the photosynthetic affinity for dissolved inorganic carbon and CA activity were indistinguishable between these strains. The results suggested that in the cyanobacterium, *tac* promoter was not as efficient as in *Escherichia coli* and that the regulatory sequence responsive to change in CO₂ concentration was localized within approximately 70 base pairs 5' to the coding region of *icfA* gene. When the *tac* promoter was inserted in close proximity of the putative initiation codon of *icfA*, the transformant, designated as ΔSP::KT, showed high CO₂-requiring phenotype.

Total DNA of *T. neapolitanus* was subjected to Southern hybridization with cyanobacterial RuBisCO and CA genes as probes. A specific hybridization was observed with the RuBisCO gene as the probe, while no such hybridization occurred with *icfA*. Oligonucleotide primers were designed based on the conserved sequences found in *Synechococcus* and *E. coli* CA genes and used for polymerase chain reaction to amplify the possible counterpart in *T. neapolitanus*.

研究目的

微細藻類およびシアノバクテリア（藍藻）の光合成の炭酸固定能は、低濃度の二酸化炭素存在下においても、極めて高いことが知られており、その要因としてこれらの微生物には能動的な無機炭素 (CO₂+HCO₃⁻) 輸送機構が存在していると考えられている。さらにこれら微生物での無機炭素輸送、固定能は、低CO₂濃度条件で増大し、高CO₂濃度条件で抑制されることから、発現調節機構の存在が示唆されており、環境条件に対する適応現象の一環として考えられている。特にシアノバクテリアにおいては、形質転換可能な種を用いた研

究を中心として次のことが明らかになってきている。

1. 能動的二酸化炭素輸送系には細胞内への取り込みのステップと細胞内に蓄積した二酸化炭素（重炭酸イオン）プールの固定を促進するステップの少なくとも二つが存在すること。

2. カルボキシゾームと呼ばれる細胞内の蛋白質複合体が炭酸固定酵素（リブローズビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ、RuBisCO）を主成分とし、固定の促進に関与していること。

これまでの研究において、高等植物葉緑体のカーボニックアンヒドラーゼ (CA) と一次構造の

類似した遺伝子がシアノバクテリアの光合成における CO₂ の固定促進に必須であることが明らかになった。シアノバクテリアにおいて、CA はカルボキシゾームに局在していると考えられているが、活性が極めて低いためにその役割に関しては未解明の点が多い。

一方、藻類やシアノバクテリアと同様の CO₂ 固定回路をもつ微生物として化学合成細菌が知られており、これらにも能動的 CO₂ 輸送能が存在することが報告されている。しかしその詳細は明らかではない。

そこで本研究は、1) シアノバクテリア (*Synechococcus*) を用いて細胞内の炭酸固定を促進する因子と考えられる CA の発現調節機構を分子レベルで解析し、2) 独立栄養微生物における能動的二酸化炭素輸送機構の普遍性を検討するために、化学合成細菌 (*Thiobacillus*) を用いてその二酸化炭素利用機構を生理学的、分子生物学的アプローチにより解析することを目的とした。

研究経過

シアノバクテリア *Synechococcus* PCC7942 株の CA をコードする遺伝子、*icfA* の発現調節機構を調べるため、この遺伝子の発現量を人為的にコントロール (大量発現) できる系の開発を試みた。すなわち、発現量の改変を転写レベルで行うため、シアノバクテリア内で機能する高発現プロモーター (*tac* プロモーター) を *icfA* 遺伝子の上流域へ導入することを計画した。*tac* プロモーターは、pKK223-3 由来の 269 bp *Bam* HI 断片を用いた。また、選択マーカーとして、カナマイシン耐性遺伝子 (アミノグリコシド 3'-フォスフォトランスフェラーゼ遺伝子) を pUC4K から 1,240 bp *Pst* I 断片として切り出した。これら両断片を BluescriptIIKS+ にサブクローニングすることによりプラスミド pBSKmtac を構築し、*tac* プロモーターとカナマイシン耐性遺伝子を *Eco* RI により単一の断片として容易に切り出すことができるようにした。この遺伝子カセットを、プラスミド上で *icfA* 遺伝子上流の *Hin*-dIII 部位あるいは *Sph* I 部位に挿入し、これらのプラスミドを用いて *Synechococcus* PCC7942 株

の形質転換を行った。シアノバクテリアの形質転換は常法に従って行い 10 µg/ml カナマイシン存在下で形質転換株を選択した。

Synechococcus の BG11 液体培地における生育速度は、750 nm の吸光度に基づき測定した。また、光合成の酸素発生活性はクラーク型酸素電極により測定した。CA の酵素活性は ¹³C¹⁸O₂ を基質とした際の、交換反応による ¹⁸O の希釈速度を質量分析計で測定することにより算出した。

化学合成細菌 *Thiobacillus neapolitanus* においても、微細藻類と類似した無機炭素輸送機構の存在を示す報告がなされており、カルボキシゾームが細胞内無機炭素プールの固定促進の役割を担っていると予測された。そこで、無機炭素固定機構の普遍性を検証するため、シアノバクテリアの遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションによる *T. neapolitanus* ATCC23641 株の CA および RuBisCO 遺伝子の検索を行った。CA 遺伝子については、シアノバクテリアと大腸菌において保存されている配列に基づく合成プライマーを用いた PCR 法による検索も行った。なお、*T. neapolitanus* の培養は、Holthuijzen らの改変培地を用いて空気通気条件で行い、また、DNA の調製は、常法に従った。

研究成果

tac プロモーターおよびカナマイシン耐性遺伝子を含むカセットを *icfA* 遺伝子の開始コドンの 67 bp 上流の *Hin* dIII 部位に挿入した。カナマイシン耐性シアノバクテリア形質転換株を単離し、これを HD::KT 株と命名した。野生株 (WT) および HD::KT 株から全 DNA を調製し、*icfA* 遺伝子を含む断片をプローブに用いて、形質転換株での遺伝子組換えの確認を行った。野生株において認められる、*icfA* を含む 1.1 kb *Hin* cII-*Bgl* II 断片は、HD::KT 株においては消失し、代わりに挿入したカセット長 (1.5 kb) だけ長い 2.6 kb の断片が検出された。したがって *tac* プロモーターを含むカセットは、シアノバクテリアの染色体上で期待どおりの部位に挿入されたことが確認された。*tac* プロモーターの挿入の結果 *icfA* 由来の 1.0 kb RNA が大腸菌 *E. coli* JM109 においては

200 μ M IPTG (イソプロピル- β -チオガラクトシド) の添加に依存して検出された。したがって *tac* プロモーター制御下で CA 遺伝子が発現されることが確認された。しかしながら、HD::KT 株においては、*icfA* mRNA は未だ検出されておらず、その転写活性は十分に高いものではないことが示唆された。

形質転換株の生理学的性質を明らかにするため、まず液体培養における生育速度を測定した。対数増殖期における増殖速度定数は、通常の空気および 3% CO₂ 通気のいずれの条件においても HD::KT 株では 0.0578~0.0588, WT 株では 0.0538~0.0539 であり、形質転換株で 7~9% 高い値を示した。したがって *tac* プロモーターを CA 遺伝子の upstream に挿入することにより、生育が促進されることが示唆された。しかしながら、酸素電極法により、光合成の溶解無機炭素濃度に対する親和性を測定したところ、HD::KT 株と WT 株の間で顕著な差異は認められなかった。CA の酵素活性は、シアノバクテリアにおいては極めて低く、従来の pH 法による測定では検出できないことから、より感度の高い質量分析計による測定法を試みた。その結果、5% CO₂ および通常の空気条件で培養した HD::KT 株ではそれぞれ 21.5 および 35.0 U/mg Chl, 同じく WT 株では 23.6 および 35.6 U/mg Chl の活性が検出された。すなわち、HD::KT 株における活性は WT 株のものと比較して顕著に増大していることはなく、しかも培養時の CO₂ 濃度に依存して変化することが明らかとなった。したがって *icfA* の発現制御は、コード領域 upstream のたかだか 70 bp の範囲内で行われている可能性が示された。HD::KT 株においては *tac* プロモーターと *icfA* コード領域との距離が長すぎる可能性も考えられたので、遺伝子のより近傍、すなわち翻訳開始点を含む *SphI* 部位への遺伝子カセットの挿入を行った。得られた形質転換株 (Δ SP::KT 株) は、寒天培地上では高 CO₂ 濃度要求性の表現型を示した。

T. neapolitanus の全 DNA について、シアノバクテリアの *icfA* および RuBisCO の構造遺伝子 (*rbcLS*) をプローブとしたサザンハイブリダイ

ゼーションを行った。*rbcLS* をプローブに用いた場合、これと特異的にハイブリダイズするバンドが認められ、ゲノム当たり 1 コピーの RuBisCO 遺伝子の存在が示唆された。これに対し *icfA* をプローブとした場合には明瞭なバンドは検出されず、CA 遺伝子は仮に存在するとしてもシアノバクテリアとの塩基配列の相同性は低いことが予測された。そこで、保存配列にもとづく合成プライマーを用いた PCR 法による遺伝子の増幅を試みた。その結果、アニーリング温度を 60°C として反応を行った場合にも特異的なバンドの増幅が認められた。

今後の課題と発展

本研究の過程で、*tac* プロモーターによる発現効率には、大腸菌とシアノバクテリアの間で顕著な差異が認められた。すなわち、*Synechococcus* においては、遺伝子コード領域の極めて近傍にプロモーターを置かない限り、転写活性は低いことが示唆された。 Δ SP::KT 株の表現型は WT 株のものとは顕著に異なることから、遺伝子の大量発現が起きている可能性がある。今後は、さらに *lac* リプレッサー遺伝子の導入により発現量を自由にコントロールできる系を開発する計画である。

シアノバクテリアと化学合成細菌の間で CA の遺伝子構造には大きな差異があることが示唆された。PCR 産物の構造決定は早急に行うべき課題である。また、将来的にはシアノバクテリアの CA および RuBisCO 遺伝子を *Thiobacillus* のものにより置換してその影響を調べることにより、カルボキシゾーム会合の調節機構について解析する計画である。

なお、質量分析計による測定に際し、京都大学食糧科学研究所の浅田教授に御協力いただいた。発表論文リスト

- 1) E. Suzuki (1992): Analysis of a gene *icfA* encoding carbonic anhydrase in the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7942. In Research in Photosynthesis, Vol. III, pp. 795-798, ed. by N. Murata. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.