

TOPICS

シアノバクテリオクロム CcaS は、フィコビリソームのリンカータンパク質 (CpcG2) の
発現を誘導する緑色光受容体である

東京大学 理学系研究科 池内研究室

広瀬 侑

研究の背景

1. フィトクロムとシアノバクテリオクロム

フィトクロムとは、植物・細菌・シアノバクテリア・菌類などに存在する光受容タンパク質である。フィトクロムは赤色光吸収型 (Pr) と遠赤色光吸収型 (Pfr) の間を可逆的に光変換することで赤色光と遠赤色光を感知し、様々な生理反応に関与する (図1A)。フィトクロムのN末端のPAS, GAF, PHYドメインは、フィトクロムの光変換に必要なものであり、光受容領域 (Photosensory region) と呼ばれている (図1B)。この領域には、4つのピロール環がつながった構造を持つ開環テトラピロールが色素として結合する (図1C)。その種類と結合部位は生物種間で微妙に異なっているが、いず

れのフィトクロムでも、開環テトラピロールが光を受容するとC~D環間のC15-C16の2重結合のZ-E変換が起こり、これがタンパク質全体の構造変化を引き起こすことで、シグナルを伝達すると考えられている。近年、放射線耐性菌と光合成細菌のフィトクロムのPASおよびGAFドメイン (Pr) の結晶構造が報告され、GAFドメインのポケットに埋まっている色素 (ビリベルジン; BV) の詳細な構造が明らかとなった¹⁾。BVと相互作用するGAFドメインのアミノ酸残基は、色素を共有結合するシステイン残基を除き、全てのフィトクロムで高度に保存されていたことから、フィトクロムは共通の赤・遠赤色光受容の分子機構を持つことが示唆された。

近年、「シアノバクテリオクロム」と呼ばれるフィトクロム様

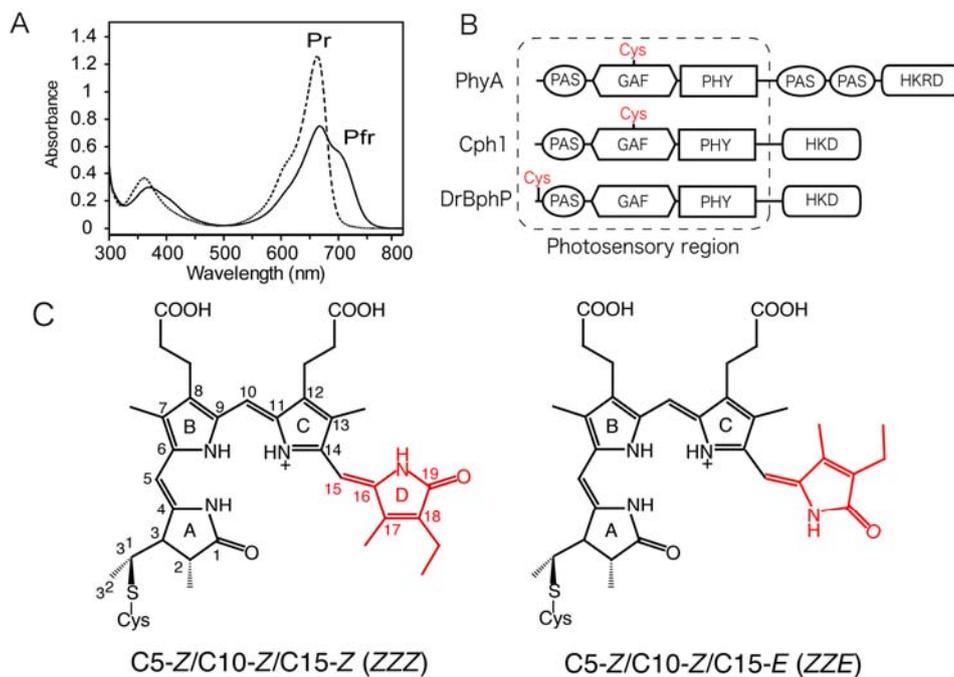


図1 (A) シアノバクテリアのフィトクロム (Cph1) の吸収スペクトル。(B) 代表的なフィトクロムのドメイン構成と色素結合 Cys 残基。(C) 開環テトラピールの1種であるフィコシアノビルリン (PCB)。

の新規光受容体群がシアノバクテリアから見つかった²⁾。シアノバクテリオクロムは、フィトクロムとは明確に異なるグループの色素結合GAFドメインを持ち、フィトクロムとは異なる様々な波長の光を受容する。例えば、単細胞性シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803の正の走光性に関わるSyPixJ1は、青色光吸収型(Pb)と緑色光吸収型(Pg)の間を可逆的に光変換する²⁾。その後、シアノバクテリアの主要な開環テトラピロールであるフィコシアノビルン(PCB)を共発現させた大腸菌から精製したSyPixJ1も、似た光可逆変換を示したことから、SyPixJ1の色素はPCBだと考えられた³⁾。しかし、その後、SyPixJと同じ分光性質を持つオルソログである *Thermosynechococcus elongatus* BP-1のTePixJの変性スペクトルの解析から、結合したPCBがフィコビオロピリン(PVB)へと異性化されている可能性が示された^{4, 5)}。また、近年、Lagariasらのグループが別のTePixJオルソログ(Tlr0924)の解析に参入し、その青/緑光変換機構について新たなモデルを提唱している⁶⁾。また、*Anabaena* PCC 7120から緑色光吸収型(Pg)と赤色光吸収型(Pr)の光変換を示すシアノバクテリオクロムAnPixJが見つかり、結晶構造解析・分光解析が進められている⁷⁾。このように、様々なシアノバクテリオクロムの解析が行なわれているが、その生理的役割は明らかでないものも多く、今後の遺伝学・生理学的解析が期待される。

2. シアノバクテリオクロムによるフィコビリソームの発現制御

シアノバクテリアは、植物と同様に光化学系IIとIを用いて酸素発生型の光合成を行なうが、集光装置として植物のLHCとは異なり、フィコビリソームを用いている。フィコビリソームを構成する集光タンパク質は種間で異なるが、ある種のシアノバクテリアは、緑色光(560nm)を吸収する色素タンパク質であるフィコエリスリン(PE)と、赤色光(620nm)を吸収するフィコシアニン(PC)を持つ。これらのシアノバクテリアが緑色光の下でPEを蓄積し、赤色光の下でPCを蓄積する能力を持つことは100年以上も前から知られ、「補色適応: Complementary chromatic adaptation」と呼ばれている。Tandeu de MarsacらはPEとPCを持つ44種のシアノバクテリアの補色適応を観察し、その応答が以下の3グループに分けられることを見出した⁸⁾。Group I: 緑色光や赤色光の下でPEとPCの組成を変化しない、Group II: 緑色光の下でPEを増やすが、赤色光の下ではPCを増やさない、Group III: 緑色光の下でPEを増やし、赤色光の下でPCを増やす。

その後、GrossmanやKehoeらはGroup IIIの補色適応を示す *Fremyella diplosiphon* (*Calothrix* 又は *Tolypothrix* PCC 7601とも呼ばれる)の補色適応に関わるRcaE、RcaF、RcaC遺伝子を同定した⁹⁾。RcaEはシアノバクテリオクロム型のGAFドメインとヒスチジンキナーゼドメインを持つ。その後の遺伝学的解析によって、RcaEが光を受容し、RcaFを介して転写因子であるRcaCをリン酸化し、赤色光照射下のPC遺伝子群の発現制御に関わることが示唆された¹⁰⁾。しかし、RcaEの色素タンパク質としての分光特性や色素種は未だ明らかになっていない。また、PE遺伝子群は緑色光感知システムによって主に制御されることが報告されているが、その受容体は未だに同定されていない。

Synechocystis sp. PCC6803 (*Synechocystis*) はフィコビリソームを構成する色素タンパク質としてPCを持つがPEを持たない。しかし、フィコビリソームのリンカータンパク質をコードする *cpcG2* は、RcaEと近縁のGAFドメインを持つシアノバクテリオクロムである *ccaS*、また、OmpR型の転写因子である *ccaR* とゲノム上でクラスターを形成している(図2A)。片山らは、(1) *cpcG2* の発現は550-600 nm付近の波長の光によって最も活性化する、(2) *ccaS* および *ccaR* のうち、どちらを破壊しても *cpcG2* の発現は非常に低下する、(3) *CcaR* は *cpcG2* のプロモーター領域に結合する、ことを報告し、*CcaS* が *CcaR* を介して *CpcG2* の発現を波長依存的に制御するモデルを提唱した¹¹⁾ (Katayama M et al., submitted)。本研究では、*CcaS* の生化学解析を行い、その分光特性・色素種と結合部位・活性型を明らかにした¹²⁾。これによって、シアノバクテリオクロムの吸収する光の波長・シグナル伝達経路・標的遺伝子の関係が明らかとなった。

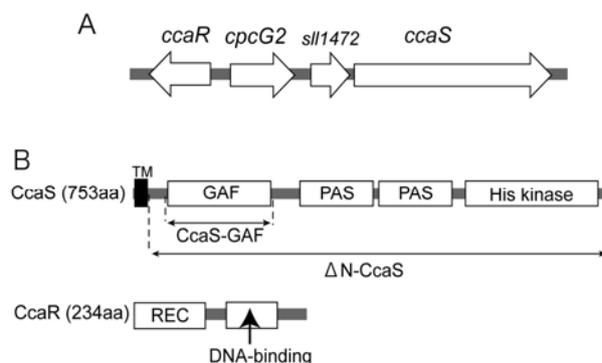


図2 (A) *Synechocystis* における *ccaS* 周辺の遺伝子の配置。(B) CcaS および CcaR のドメイン構成。

結果

1. 色素結合 GAF ドメインの精製・分光解析

CcaSのGAFドメイン(図2B)を、*Synechocystis*から発現・精製した。SDS-PAGEで分離したゲルの、CcaS-GAFの分子量に対応するバンドが、Zn²⁺イオン添加後に強い蛍光を発生し、開環テトラピロールの共有結合を示唆した(図3A)。この精製画分の吸収スペクトルは、緑色光と赤色光照射によって変化した。その差スペクトルは、535nmを吸収極大とする緑色光吸収型(Pg)と672nmを吸収極大とする赤色光吸収型(Pr)の間の光変換を示した(図3B)。次に、同じCcaS-GAFタンパク質を、PCBを産生する大腸菌から発現・精製した。CcaS-GAFのバンドはZn²⁺イオン添加で強い蛍光を発生した(図3A)。精製したCcaS-GAFの吸収スペクトルは、緑色光照射によって672 nmをピークとする赤色光吸収型(Pr)に変換し、逆に、赤色光照射によって535

nmを吸収ピークとする緑色光吸収型 (Pg)に変換した(図3C)。Pr-Pgの差スペクトルは672、370、535 nmのピークを示し、これは*Synechocystis* から単離したものとよく一致した(図3B)。これは、CcaS-GAFがPCBを*in vivo*でも結合することを示唆している。

2. 色素結合ペプチドのMS解析

PCB産生大腸菌から精製したCcaS-GAFをトリプシン消化後、HPLCによって色素が結合したペプチドを精製し、質量分析(MALDI-TOF MS)解析した。精製画分をMS解析すると、脱離した色素(m/z 587.30)、色素が脱離したペプチド(m/z 2151.23)および色素が結合したペプチド(m/z 2736.51)のピークがそれぞれ確認された(図4)。脱離した色素のシグナルはプロトン化したPCB又はその異性体(m/z 587.28)と一致する。さらに、MS/MS解析によって色

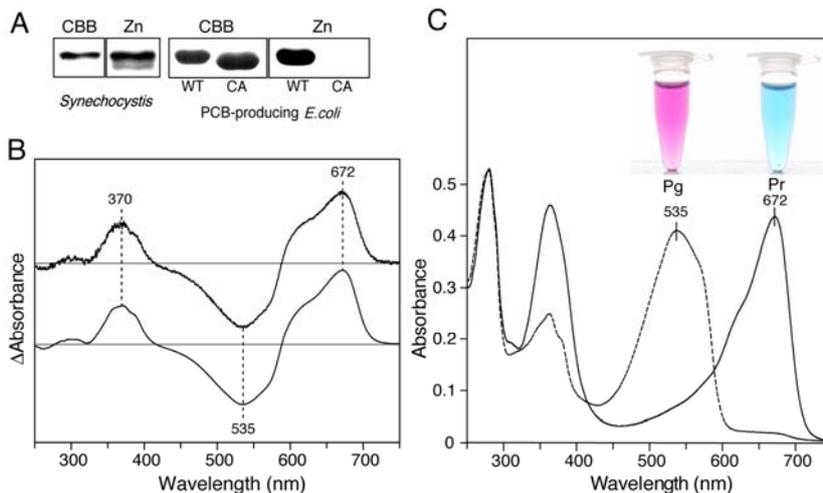


図3 (A) *Synechocystis* と PCB 産生大腸菌から CcaS-GAF を精製し、SDS-PAGE で分離後、CBB 染色 (CBB) と亜鉛蛍光 (Zn) を測定した (WT:野生型、CA : Cys141Ala 変異体)。(B) *Synechocystis*(上)と PCB 産生大腸菌 (下) から精製した CcaS-GAF の吸収差スペクトル。(C) PCB 産生大腸菌から精製した CcaS-GAF の吸収スペクトルと Pg・Pr 溶液の写真。

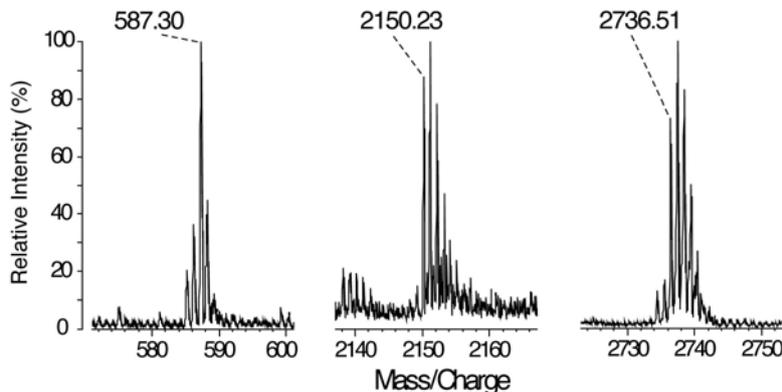


図4 トリプシン処理後に HPLC で精製した色素結合ペプチドの MALDI-TOF-MS 解析

素が脱離したペプチドの配列が AINDIDQDDIEICLADLVK であることがわかった。これは GAFドメイン内の保存されたシステイン残基(Cys141)を含む。ペプチドのカルバミド化処理後にも関わらず遊離システイン残基(m/z 2151.23)のシグナルが得られたことは、MS処理の途中で色素がペプチドから脱離したことを示しており、これはPCBがCys141とチオエーテル結合していることを示唆している。また、このシステイン残基をアラニンに置換した変異体をPCB産生大腸菌から精製しても色素を結合していないことを確認した(図3A)。これらの結果は、PCBまたはその異性体がCys141に共有結合していることを示唆している。

3. 色素種と色素の構造の同定

フィトクロムの色素の Pr および Pfr の構造は C5-Z/C10-Z/C15-Z (ZZZ型) および C5-Z/C10-Z/C15-E (ZZE型) であり(図1C)、酸性尿素(8 M, pH 2.0)で変性させた吸収スペクトルによってこの構造の違いを区別することができる。これを利用し、PCBを色素として結合するフィトクロムであるCph1をコントロールとして、CcaS-GAFのPgおよびPrの色素の構造を調べた。変性させたCcaS-GAFのPgの吸収ピーク(661 nm)は、Cph1のPrの吸収ピーク(661 nm)と一致した(図5A・B)。一方、Cph1は赤色光照射によってPfrを100%にすることができないため、変性させたCcaS-GAFのPrの吸収ピーク(584 nm)は、Cph1のPfrの吸収ピーク(593 nm)と完全には一致しなかった。しかし、2つの吸収型の変性差スペクトルは非常によく一致し、Cph1とCcaS-GAFの色素の光変換成分は同一であることを示していた(図5C)。これらのことから、CcaS-GAFに結合する色素はPCBであり、その構造はPgがZZZ型、PrがZZE型であることが示唆された。

4. 自己リン酸化とリン酸基転移

CcaSはC末端にヒスチジンキナーゼドメインを持つ。N末端の膜貫通領域を除いたCcaS(Δ N-CcaS、図2B)を *Synechocystis* から発現・精製した。 Δ N-CcaSをPgまたはPrに光変換した後、³²PでラベルされたATPと暗所で反応させると、PrがPgよりも約2.5倍高い自己リン酸化活性を示した(図6A・B)。また、自己リン酸化させた Δ N-CcaSを大腸菌から発現・精製したCcaRと混合すると、リン酸基が転移した(図6C)。これらの結果は、CcaSが緑色光によってCcaRをリン酸化することを示している。

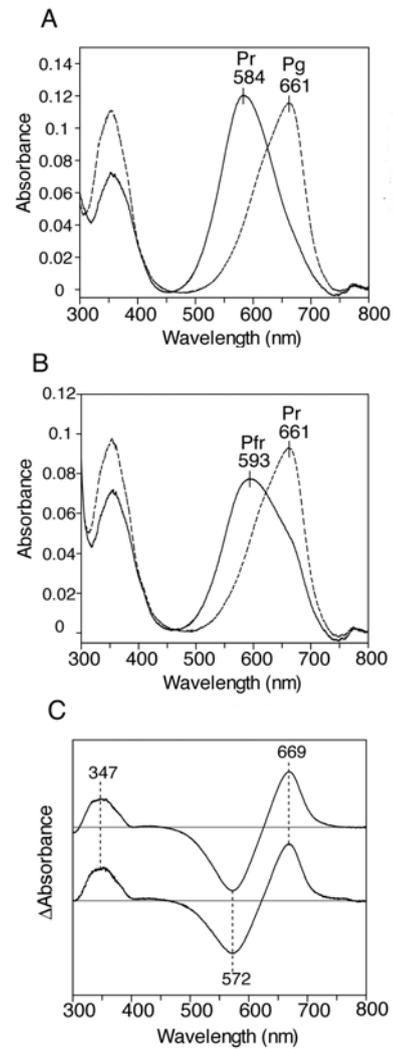


図5 (A) CcaS-GAFのPgとPrの変性スペクトル。(B) フィトクロムCph1のPrとPfrの変性スペクトル。(C) CcaSとCph1の変性差スペクトル。

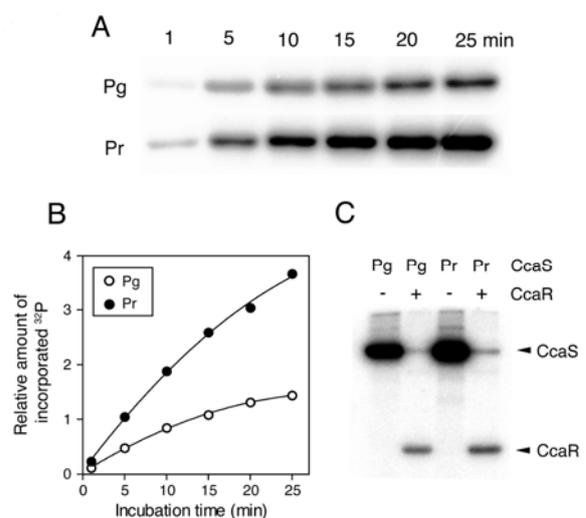


図6 (A) Δ N-CcaSの自己リン酸化活性。(B) Aのバンドを数値化。(C) Δ N-CcaSからCcaRへのリン酸基転移。

考察

1. CcaS-GAF が緑・赤色光を吸収する機構

CcaSは、赤・遠赤色光を吸収するフィトクロムであるCph1と同様にPCBをGAFドメインに結合するが、その吸収波長は大きく異なっている。CcaSおよびその類似GAFドメインをフィトクロムのGAFドメインと比較すると、フィトクロムの結晶構造でZZZ型(Pr)のBVのD環と水素結合を形成しているHis290残基が、CcaS群にも保存されていた(図7, His290)。したがって、CcaSにおいても、このHis残基がZZZ型(Pg)のPCBのD環と水素結合を形成し、D環の配向を決定していると予想される。また、D環近傍の疎水性アミノ酸群もCcaSで保存されており、フィトクロムと同様のD環疎水ポケットを形成することを示唆している。つまり、テトラピロールのD環とGAFドメインとの相互作用は、CcaSのPgとフィトクロムのPrでよく似ていると考えられる。一方、フィトクロムで高度に保存されたAsp207残基と、His260残基が、CcaSでは保存されていない(図7, Asp207 および His260)。これらの残基は、フィトクロムの結晶で特定の水分子(ピロール水分子)を介してA~C環と水素結合ネットワークを形成しており、光変換にも重要な役割を果たしていることが示唆されている¹³⁾。これらのアミノ酸が保存されていないCcaSでは、PCBのA~C環の平面性が歪み、共役二重結合系が短くなることで、CcaSの吸収波長がCph1よりも短波長シフトしているのかもしれない。

2. 緑色光下における *cpcG2* の発現誘導の生理的な意義

△N-CcaSの自己リン酸化活性は緑色光照射によって活

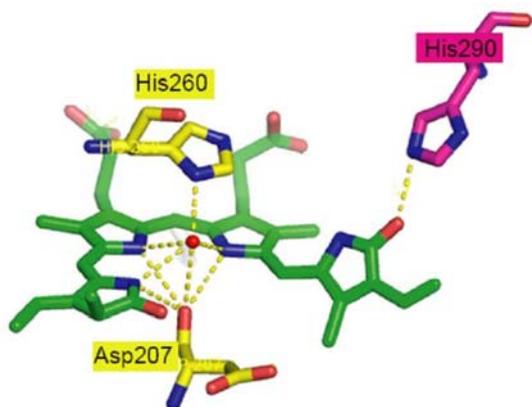


図7 フィトクロム DrBphP (Pr) の結晶構造における色素と相互作用するアミノ酸残基(黄線: 水素結合、赤玉: ピロール水分子)

性化され、CcaRへリン酸基を転移した。片山らの報告と合わせて、CcaSは緑色光によってCcaRをリン酸化し、リン酸化されたCcaRが*cpcG2*のプロモーター領域に結合し、*cpcG2*の発現を誘導するという一連のシグナル伝達経路(緑色光→CcaS→CcaR→*cpcG2*)の存在が明らかとなった。CpcG2はフィコビリソームのロッドコアリンカータンパク質であるCpcG1のパラログであり、ロッドを持つがコアを持たない特異なフィコビリソーム(CpcG2-PBS)を形成する¹⁴⁾。蛍光エネルギー伝達の解析によって、CpcG2-PBSは光化学系Iへエネルギーを特異的に伝達する集光装置である可能性が報告された¹⁵⁾。CcaSのPgの吸収ピーク付近の緑色光は主に光化学系IIを励起することを考えると、緑色光下での*cpcG2*の発現は、光化学系IIがより励起される条件下で光化学系Iのアンテナを増やす応答であると考えられる(図8)。このように、*Synechocystis*はCcaS/CcaRシステムによってCpcG2-PBS量を調節し、光化学系Iと光化学系IIの励起バランスを取っていると考えられる。

3. 補色適応との関わり

*F. diplosiphon*のRcaEのGAFドメインはCcaSと相同性が高いため、CcaSと同様の緑/赤色光変換を示すと考えられる。しかし、CcaSが緑色光でCpcG2の転写を活性化させる「緑色光受容体」であることが示されたのに対し、RcaEは赤色光でPC遺伝子群を活性化させる「赤色光受容体」であることが、遺伝学的解析によって示唆されている。つまり、両者はどちらも緑/赤色光を吸収するにもかかわらず、その活性型・制御するフィコビリソームの遺伝子は異なること

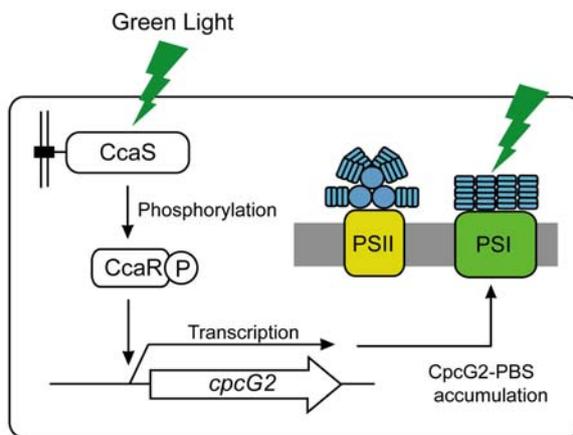


図8 CcaSによるCpcG2-PBSの調節モデル

を示唆している。

Group IIの補色適応を示す*Nostoc punctiforme* PCC 73102 (*N. punctiforme*)にCcaSオルソログ (NpCcaS)が存在し、その遺伝子はccaR, cpcG2らのホモログ遺伝子と遺伝子クラスターを形成している。興味深いことに、その遺伝子クラスターにはPEのロッドリンカータンパク質をコードするcpeC、また、PE遺伝子群の発現の調節因子であるcpeRも含まれている。このことは、NpCcaSが緑色光下でcpeC・cpeRの発現誘導を介してPEの蓄積も調節していることを予想させる。現在、NpCcaSがGroup IIの補色適応におけるPEの緑色光受容体であるという仮説を立てて検証している。今後、*N. punctiforme* と*F. diplosiphon*の解析によって、補色適応の分子機構の全容が明らかになるだろう。

本研究と片山らの研究は、PEを持たない*Synechocystis*のフィコビリソーム遺伝子も波長依存的な発現制御を受けていることを示し、今までPE/PCを持つシアノバクテリアにのみ存在すると考えられてきた発現制御機構が、さらにより多くの種に対しても拡張しうる可能性を示した。今後、シアノバクテリアのゲノム解析がさらに進めば、フィコビリソーム遺伝子群の波長依存的な調節機構は、シアノバクテリオクロムの分光特性・活性型・シグナル伝達経路・標的フィコビリソーム遺伝子の違いによって分類されるようになるだろう。なお、本研究の主要な内容はRef.12として発表した。

参考文献

1. Wagner, J. R., Brunzelle, J. S., Forest, K. T., and Vierstra, R. D. (2005) A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome, *Nature* 438, 325–331.
2. Yoshihara, S., Katayama, M., Geng, X., and Ikeuchi, M. (2004) Cyanobacterial phytochrome-like PixJ1 holoprotein shows novel reversible photoconversion between blue- and green-absorbing forms, *Plant Cell Physiol* 45, 1729–1737.
3. Yoshihara, S., Shimada, T., Matsuoka, D., Zikihara, K., Kohchi, T., and Tokutomi, S. (2006) Reconstitution of blue-green reversible photoconversion of a cyanobacterial photoreceptor, PixJ1, in phycocyanobilin-producing *Escherichia coli*, *Biochemistry* 45, 3775–3784.
4. Ishizuka, T., Shimada, T., Okajima, K., Yoshihara, S., Ochiai, Y., Katayama, M., and Ikeuchi, M. (2006)

Characterization of cyanobacteriochrome TePixJ from a thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* strain BP-1, *Plant Cell Physiol* 47, 1251–1261.

5. Ishizuka, T., Narikawa, R., Kohchi, T., Katayama, M., and Ikeuchi, M. (2007) Cyanobacteriochrome TePixJ of *Thermosynechococcus elongatus* harbors phycoviolobin as a chromophore, *Plant Cell Physiol* 48, 1385–1390.
6. Rockwell, N. C., Njuguna, S. L., Roberts, L., Castillo, E., Parson, V. L., Dwojak, S., Lagarias, J. C., and Spiller, S. C. (2008) A second conserved GAF domain cysteine is required for the blue/green photoreversibility of cyanobacteriochrome Tlr0924 from *Thermosynechococcus elongates*, *Biochemistry* 47, 7304–7316.
7. Narikawa, R., Fukushima, Y., Ishizuka, T., Itoh, S., and Ikeuchi, M. (2008) A novel photoactive GAF domain of cyanobacteriochrome AnPixJ that shows reversible green/red photoconversion, *J. Mol. Biol.* 380, 844–855.
8. Tandeau de Marsac, N. (1977) Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria, *J. Bacteriol.* 130, 82–91.
9. Kehoe, D. M., and Grossman, A. R. (1996) Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors, *Science* 273, 1409–1412.
10. Kehoe, D. M., and Gutu, A. (2006) Responding to color: the regulation of complementary chromatic adaptation, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 127–150.
11. Kayatayama, M., and Ikeuchi, M. (2006) Perception and transduction of light signals by cyanobacteria (Fujiwara, M., Sato, N., and Ishiura, S., Eds.) pp 65-90, Research Signpost, Kerala, India.
12. Hirose, Y., Shimada, T., Narikawa, R., Katayama, M., and Ikeuchi, M. (2008) Cyanobacteriochrome CcaS is the green light receptor that induces the expression of phycobilisome linker protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9528–9533.
13. von Stetten, D., Seibeck, S., Michael, N., Scheerer, P., Mroginski, M. A., Murgida, D. H., Krauss, N., Heyn, M. P., Hildebrandt, P., Borucki, B., et al. (2007) Highly conserved residues Asp-197 and His-250 in Agp1 phytochrome control the proton affinity of the chromophore and Pfr formation, *J. Biol. Chem.* 282,

- 2116–2123.
14. Kondo, K., Geng, X. X., Katayama, M., and Ikeuchi, M. (2005) Distinct roles of CpcG1 and CpcG2 in phycobilisome assembly in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Photosynth. Res.* 84, 269–273.
15. Kondo, K., Ochiai, Y., Katayama, M., and Ikeuchi, M. (2007) The membrane-associated CpcG2-phycobilisome in *Synechocystis*: a new photosystem I antenna, *Plant Physiol.* 144, 1200–1210.