

研究紹介

シアノバクテリアにおいてチオレドキシンの転写を制御する
レドックス応答性転写因子RexT[§]

¹中央大学 理工学部 生命科学科、²科学技術振興機構 さきがけ
得平 茂樹^{1,2,*}

1. はじめに

チオレドキシシン (Trx) は低分子量の酸化還元タンパク質である。Trxは他のタンパク質のジスルフィド結合を還元、切断することができ、様々な酵素の活性制御や酸化ストレス応答に関わる重要なタンパク質である。葉緑体においては、カルビンサイクルの複数の酵素の活性がTrxにより制御されていることが知られている^{1,2)}。また、シアノバクテリアにおいても様々な生理機能を持つ50を超すタンパク質がTrxと相互作用することが示されている³⁻⁵⁾。このようにTrxは生理的に非常に重要な役割を持っているにも関わらず、シアノバクテリアにおいてはその発現制御機構はほとんど分かっていない。

Anabaena sp. PCC 7120 (以下、*Anabaena*) は、数百に及ぶ細胞が一行につながった糸状性のシアノバクテリアである。*Anabaena*はヘテロシストと呼ばれる分化細胞を形成し、窒素固定を行う^{6,7)}。ヘテロシストは窒素固定に特殊化した細胞であり、光合成活性を失っている。そのため、ヘテロシストでは隣接した栄養細胞から糖を受け取り、その異化により窒素固定に必要な還元力 (NADPH) を獲得している⁸⁾。ヘテロシストにおいては、糖は主に酸化的ペントースリン酸経路で代謝され、その際NADPHが生産される。酸化的ペントースリン酸経路の入口の酵素であるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼは、窒素固定に必須の酵素である⁹⁾。グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼはTrxにより活性制御を受け、還元状態では活性を失い、酸化状態で活性化される^{10,11)}。しかし、ヘテロシストにおいてTrxが実際にどのような役割を果たしているのかは、まだ明らかにされていない。

本研究では、*Anabaena*における*trx*遺伝子の転写制御機構に関して解析を行い、*trxA2*遺伝子の発現を制御するレドックス応答性の転写因子RexTを同定し、その活性制御機構を明らかにした¹²⁾。

2. *Anabaena*における*trx*遺伝子の酸化ストレス応答

*Anabaena*のゲノム中には、Trxをコードする7個の遺伝子 (*alr0052* (*trxA*), *all1866* (*trxA2*), *all2367* (*trxA3*), *all2341* (*trxB*), *alr3955* (*trxC*), *all1893* (*trxQ*), *alr2205* (*trxO*))がある^{13,14)}。植物のTrxを含めた系統解析では、TrxA, TrxA2そしてTrxA3は*m*型、TrxBとTrxQはそれぞれ*x*型、*y*型に分類される¹³⁾。酸化ストレスによる*trx*遺伝子の発現変化を調べたところ、*trxA2*のみがH₂O₂に対して応答を示した (図1)。*trxA2*の転写産物量は、

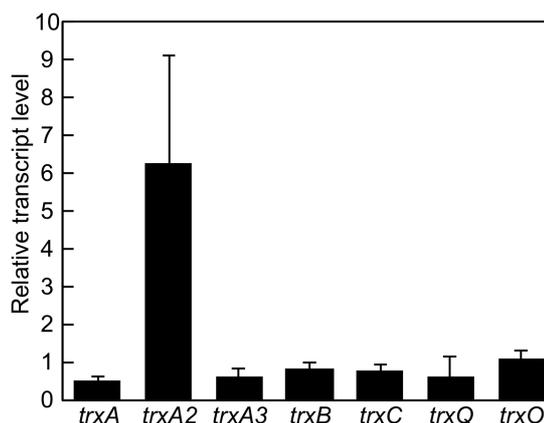


図1 H₂O₂による*trx*遺伝子の発現変化

3 mM H₂O₂添加後10分における各*trx*遺伝子の転写産物レベルを定量RT-PCR法で決定した。各*trx*遺伝子のH₂O₂添加前の転写産物レベルを1としたときの、相対値を示す。

[§] 第3回日本光合成学会シンポジウム ポスター発表賞受賞論文

* 連絡先 E-mail: ehira@kc.chuo-u.ac.jp

3 mM H₂O₂ 処理後 10 分でおよそ6 倍に増加した。*trxA2*以外の*trx*遺伝子は、3 mM H₂O₂ に応答を示さなかった。また、1 mM H₂O₂では、*trxA2*の誘導も見られなかった。

*trxA2*遺伝子上流逆向きには、ArsRファミリーの転写因子をコードする遺伝子*alr1867*がある。この遺伝子の配置は*Anabaena*以外にも、*Anabaena variabilis* ATCC29413、*Nostoc punctiforme* PCC 73102、*Cyanothece* sp. PCC 7425、そして*Acaryochloris marina* MBIC11017で保存されている。このことは、Alr1867タンパク質が*trxA2*遺伝子の転写因子として働くことを示唆している。実際に、*alr1867*遺伝子破壊株における*trxA2*遺伝子の発現量を解析したところ、通常培養条件下で*trxA2*転写産物量は野生株の100倍以上 (122.1 ± 10.9) に増加していた。一方、*trxA2*以外の*trx*遺伝子の発現は、*alr1867*遺伝子の破壊の影響を受けなかった。以上の結果からAlr1867タンパク質が*trxA2*の発現抑制に働くことが示唆され、*alr1867*を*rexT* (redox-sensing transcriptional regulator of thioredoxin A2) と名付けた。

3. RexTによる*trxA2*遺伝子の転写制御機構

RexTによる*trxA2*の発現制御機構を明らかにするため、RexT組換えタンパク質を作製し、*trxA2* プロモーターとの相互作用解析を行った。RexTは*trxA2*のプロモーター領域を含むDNA断片に結合するが、*trxA2*お

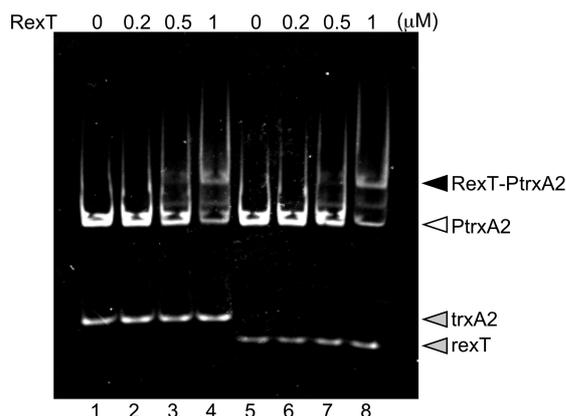


図2 RexT組換えタンパク質と*trxA2*遺伝子プロモーター領域を用いたゲルモビリティシフトアッセイ

RexTタンパク質の濃度が増加するにつれ、*trxA2*遺伝子のプロモーター領域を含むDNA断片 (P*trxA2*) との複合体 (RexT-P*trxA2*) の量が増加した。競合DNAとして、*trxA2*遺伝子 (*trxA2*) と*rexT*遺伝子 (*rexT*) のコード領域内のDNA断片を加えたが、RexTとの相互作用は見られなかった。

よび*rexT*遺伝子のコード領域内のDNA断片には結合しなかった (図2)。さらに、プロモーター領域の一部を欠失させたDNA断片を用いて、RexTが*trxA2*の転写開始点 (開始コドンの 40 nt 上流) のすぐ下流に結合することを明らかにした。また、RexTのDNA結合活性が、レドックスによる可逆的な制御を受けていることが示された。RexTの*trxA2*プロモーターへの結合はH₂O₂の添加により阻害され、逆にH₂O₂により不活性化されたRexTは還元剤 (DTT) により再活性化された (図3)。以上の結果から、RexTは*trxA2*遺伝子のリプレッサーであり、そのDNA結合活性がレドックスにより制御されていることが明らかとなった。

4. レドックスによるRexT活性制御機構

RexTタンパク質には3個のCys残基 (Cys-40、Cys-41、Cys-105) がある。Cys残基は分子間あるいは分子内でジスルフィド結合を形成し、タンパク質のレドックスによる活性制御に関与することが知られている。まず、H₂O₂で酸化したRexTタンパク質を非還元条件下でのSDS-PAGEに供したが、分子間でのジスルフィド結合の形成は観察されなかった。次に、還元状態のCys残基を特異的に修飾する化学修飾試薬である4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid (AMS)を用いてCys残基の状態を調べたところ、酸化型のRexTでは1個のCys残基のみがAMSにより修飾された (図4A)。すなわち、3個のCys残基の内2個が酸化されており、分子内でジスルフィド結合が形成されている可能性が示された。ジスルフィド結合の形成に

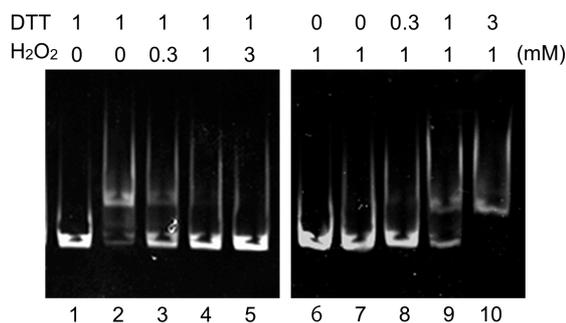


図3 RexTのDNA結合活性のレドックス制御

RexTは1 mM DTT 存在下で、DNA結合活性を示す (レーン2)。還元状態のRexTにH₂O₂を加えると、その濃度が増加するにつれDNA結合活性が失われる (レーン3-5)。反対に、H₂O₂により活性を失ったRexTにDTTを加えると活性が回復する (レーン7-10)。レーン1と6にはRexTタンパク質は加えられていない。

関わるCys残基を同定するため、それぞれのCys残基を Ser に置き換えた 2-Cys RexT 変異タンパク質 (C40S、C41S、C105S) を作製した。しかし、どの2-Cys RexT も H₂O₂ 処理後は AMS による修飾を受けなくなり、分子内でジスルフィド結合を形成していることが示唆された (図4A)。また、レドックス応答性も保持していた (図4B)。一方、1個しかCys残基を持たない 1-Cys RexT 変異タンパク質は、酸化処理後も AMSによる修飾を受け、かつ活性化状態のままだった (図4C)。さらに、MALDI-TOF MSを用いて酸化型RexTタンパク質の質量分析を行い、Cys残基を含む

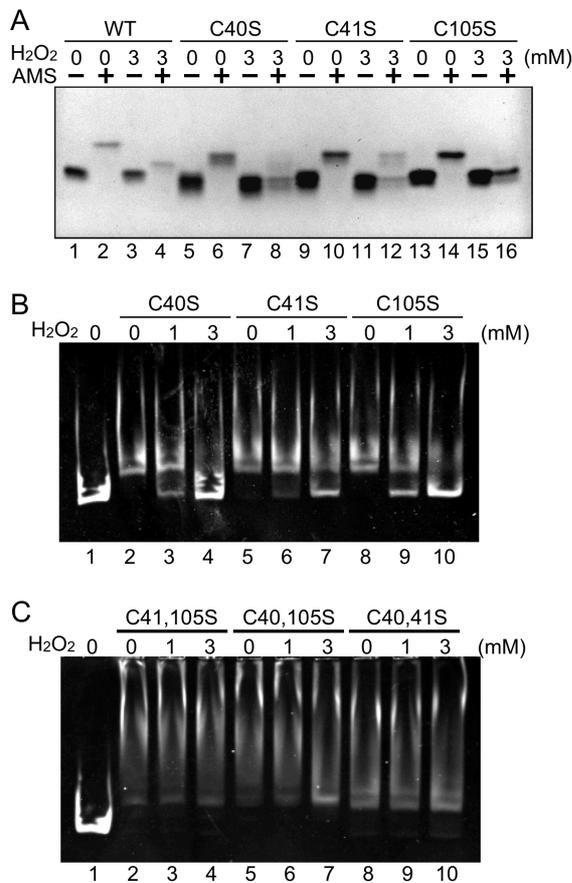


図4 RexTのレドックス応答に対するCys残基置換の影響
 (A) H₂O₂処理によるCys残基の酸化状態の変化。還元状態のCys残基はAMSにより修飾されるため、電気泳動の移動度が低下する。3個のCys残基を持つ野生型のRexTタンパク質は、H₂O₂処理後も1個のCys残基がAMSによる修飾を受けている (レーン4)。一方、1個のCys残基をSerに置換した変異タンパク質 (2-Cys RexT) では、H₂O₂処理によりAMSによる修飾を受けなくなる (レーン8、12、16)。(B、C) Cys置換 RexTタンパク質のレドックス応答。どの2-Cys RexTタンパク質もH₂O₂により、DNA結合活性を失う (B)。一方、Cys残基を1個しか持たない 1-Cys RexT タンパク質は、H₂O₂処理後もDNA結合活性を保持している。レーン1にはRexTタンパク質は加えられていない。

表1 酸化型RexTタンパク質の質量分析

Peptide	Sequence	M _r (Cal) ^a	M _r (Exp) ^b	Intensity
(37-50)	GEQCCAEFDFAIK	1531.66	1529.63	143313
(37-50+98-112)	GEQCCAEFDFAIK +SAQPLLTCQQAIVK	3117.50	3115.48	7974

^a ペプチド配列から推定される分子量
^b 質量分析により決められた分子量

ペプチドを検出した。検出されたペプチドは、推定分子量よりも分子量が水素2個分小さく (表1)。Cys-40とCys-41間と、Cys-105とCys-40あるいはCys-41間でのジスルフィド結合の両方がH₂O₂処理により形成されることが示された。したがって、3個のCys残基の内、どの2個の組合せでもジスルフィド結合が形成され、そして分子内のジスルフィド結合の形成がRexTのレドックス応答には必須であることが明らかとなった。

Trxはタンパク質のジスルフィド結合を切断することで、その活性を制御することが知られている。TrxA2組換えタンパク質を作製し、TrxA2がRexTの活性制御に関与しているのかを調べた。1 mM H₂O₂で不活性化したRexTは、0.5 mM DTTでは再活性化されなかった (図5)。しかし、そこにTrxA2を加えることで、その濃度に応じてRexTの再活性化が見られた (図5)。したがって、TrxA2はRexTの分子内ジスルフィド結合を還元することができることを示された。

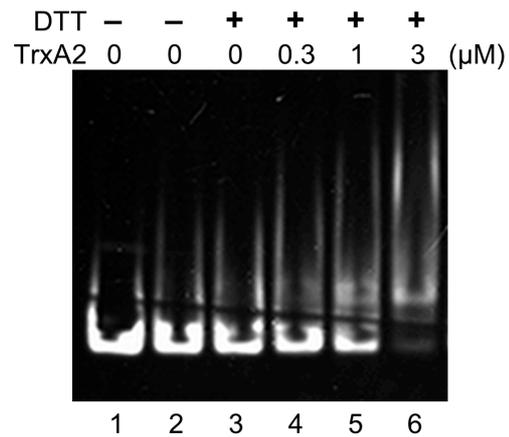


図5 TrxA2によるRexT活性の制御
 1 mM H₂O₂処理により活性を失ったRexTは、0.5 mM DTTの添加では活性を回復しない (レーン2、3)。しかし、そこにTrxA2を加えるとその濃度に応じて、DNA結合活性が回復する (レーン4-6)。レーン1にはRexTタンパク質は加えられていない。

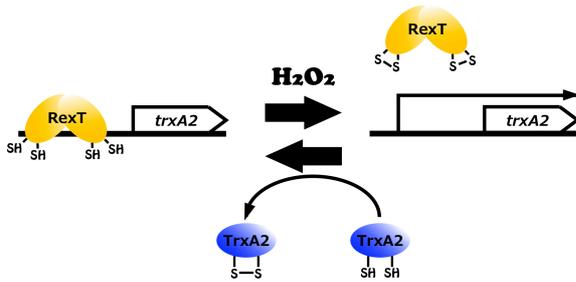


図6 RexTとTrxA2からなるレドックス応答システム

レドックス応答性の転写因子RexTはTrxA2による活性制御を受け、*trxA2*遺伝子の発現を制御している。詳細は本文を参照のこと。

7. おわりに

本研究では、レドックス応答性転写因子RexTが*trxA2*遺伝子のリプレッサーとして働くことを示した(図6)。RexTは、還元状態では*trxA2*のプロモーター領域に結合することでその転写を抑制する。一方、 H_2O_2 などによる酸化ストレス条件下では分子内ジスルフィド結合が形成され、DNA結合活性を失う。その結果として、*trxA2*の発現誘導が起こる。また、TrxA2タンパク質はRexTのジスルフィド結合を還元することができ、そのDNA結合活性を制御していることも明らかとなった。細胞内のレドックス環境に応じて、TrxA2がRexTの活性を制御し、*trxA2*自身の発現を調節している。RexTとTrxA2からなるレドックス応答システムは、シアノバクテリアの酸化ストレス応答において重要な役割を果たしていると考えられる。

これまでシアノバクテリアでは、*Synechocystis* PCC 6803を用いた研究から*trx*遺伝子は酸化ストレスに応答しないと考えられていた^{15,16}。また、バクテリアで*trx*遺伝子の発現を制御するOxyRやSpxなどのレドックス応答性転写因子もゲノム解析から同定されていなかった¹⁷。しかし、本研究により*Anabaena*において、RexTが*trxA2*遺伝子の酸化ストレス応答を制御していることが示された。RexTは*Anabaena*以外にもいくつかのシアノバクテリアで保存されている転写因子である。*Synechocystis* PCC 6803には*m*型Trxは1個しかないが、RexTを持つシアノバクテリアには*m*型Trxが複数個あり、そのゲノム上での配置から*m*型Trxの一つはRexTにより制御されていると推測される。これらのシアノバクテリアでは、新たな*m*型Trxが獲得され、それを酸化ストレス応答に利用していると考えられる。

今後はTrxA2の標的タンパク質の同定を進め、酸化ストレス応答におけるTrxの役割を明らかにしていきたい。

謝辞

本研究を行うにあたり、多くのご助言をいただいた中央大学理工学部大森正之先生に感謝いたします。

Received November 15, 2012, Accepted November 24, 2012, Published December 31, 2012

参考文献

- Montrichard, F., Alkhalfioui, F., Yano, H., Vensel, W. H., Hurkman, W. J. and Buchanan, B. B. (2009) Thioredoxin targets in plants: The first 30 years, *J. Proteomics* 72, 452-474.
- Buchanan, B. B., Holmgren, A., Jacquot, J.-P. and Scheibe, R. (2012) Fifty years in the thioredoxin field and a bountiful harvest, *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 1822-1829.
- Lindahl, M. and Florencio, F. J. (2003) Thioredoxin-linked processes in cyanobacteria are as numerous as in chloroplasts, but targets are different, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 16107-16112.
- Perez-Perez, M. E., Florencio, F. J. and Lindahl, M. (2006) Selecting thioredoxins for disulphide proteomics: target proteomes of three thioredoxins from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Proteomics* 6 Suppl 1, S186-195.
- Pérez-Pérez, M. E., Martín-Figueroa, E. and Florencio, F. J. (2009) Photosynthetic regulation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 thioredoxin system and functional analysis of TrxB (Trx x) and TrxQ (Trx y) thioredoxins, *Mol. Plant.* 2, 270-283.
- Kumar, K., Mella-Herrera, R. A. and Golden, J. W. (2010) Cyanobacterial heterocysts, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000315.
- Flores, E. and Herrero, A. (2010) Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria, *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 39-50.
- Wolk, C. P., Ernst, A. and Elhai, J. (1994) Heterocyst metabolism and development, in *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (Bryant, D. A., Eds.) pp 769-823, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Lechno-Yossef, S., Fan, Q., Wojciuch, E. and Wolk, C. P. (2011) Identification of ten *Anabaena* sp. genes that under aerobic conditions are required for growth on dinitrogen but not for growth on fixed nitrogen, *J. Bacteriol.* 193, 3482-3489.

10. Udvardy, J., Borbely, G., Juhasz, A. and Farkas, G. L. (1984) Thioredoxins and the redox modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 vegetative cells and heterocysts, *J. Bacteriol.* **157**, 681-683.
11. Cossar, J. D., Rowell, P. and Stewart, W. D. P. (1984) Thioredoxin as a Modulator of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase in a N₂-Fixing Cyanobacterium, *J. Gen. Microbiol.* **130**, 991-998.
12. Ehira, S. and Ohmori, M. (2012) The redox-sensing transcriptional regulator RexT controls expression of thioredoxin A2 in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *J. Biol. Chem.* **287**, 40433-40440.
13. Hisabori, T., Motohashi, K., Hosoya-Matsuda, N., Ueoka-Nakanishi, H. and Romano, P. G. (2007) Towards a functional dissection of thioredoxin networks in plant cells, *Photochem. Photobiol.* **83**, 145-151.
14. Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C. P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takazawa, M., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *DNA Res.* **8**, 205-213; 227-253.
15. Kobayashi, M., Ishizuka, T., Katayama, M., Kanehisa, M., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Pakrasi, H. B. and Ikeuchi, M. (2004) Response to oxidative stress involves a novel peroxiredoxin gene in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant Cell Physiol.* **45**, 290-299.
16. Li, H., Singh, A. K., McIntyre, L. M. and Sherman, L. A. (2004) Differential gene expression in response to hydrogen peroxide and the putative PerR regulon of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *J. Bacteriol.* **186**, 3331-3345.
17. Latifi, A., Ruiz, M. and Zhang, C. C. (2009) Oxidative stress in cyanobacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 258-278.

RexT, a redox-sensing transcriptional regulator, regulates
expression of the *trx* gene in cyanobacteria

Shigeki Ehira^{1,2,*}

¹Department of Biological Science, Faculty of Science and Engineering, Chuo University, ²PRESTO, JST