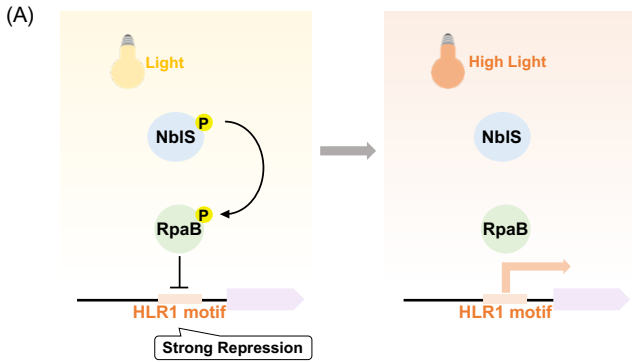


研究背景と目的

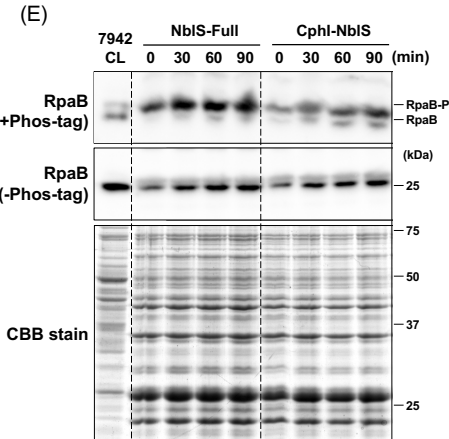
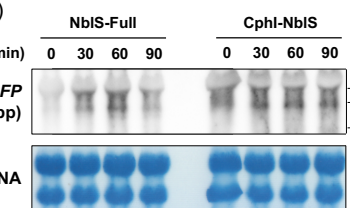
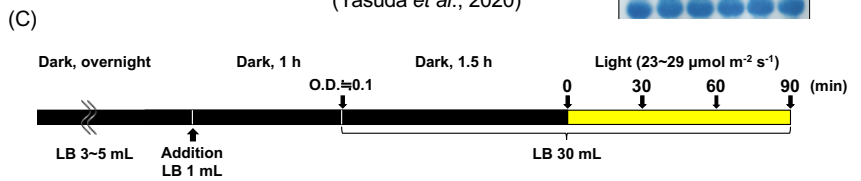
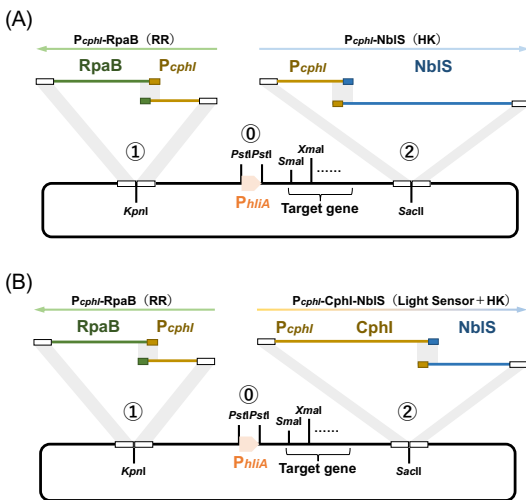
大腸菌を用いた組換えタンパク質の大量発現系は、現在も広く利用され多くの実績がある。しかし、この技術の基盤となる転写誘導系については、今のところバリエーションは少なく、薬剤処理などによる従来法に加え、簡便で発現効率の高い新たな技術の創出が期待される。本研究では、光合成微生物であるシアノバクテリアの光応答転写制御機構をさらに明らかにするとともに、その知見を利用して大腸菌における組換えタンパク質の発現を光で誘導することができる「光発現システム」の開発を目的とした。

シアノバクテリアのNblS-RpaB二成分制御系



本研究では、光依存的な発現調節に関わる転写因子として、シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 のレスポンスレギュレーターRpaBに着目した。これまでの研究で、RpaBは強光ストレス応答に関わることが示されている (A)。通常条件下ではRpaBはリン酸化され、*hliA* など標的遺伝子上流のHLR1領域に結合し転写を抑制するが、強光条件下では速やかに脱リン酸化され転写が開始することから、遺伝子発現誘導系における優れたリプレッサーとしての利用が期待された。しかし、RpaBが活性酸素など光ストレスに応答するのか、あるいは光自身に応答するのかは不明であったため、多様な光強度変化に際した転写制御を詳細に検討した (B-D)。*S. elongatus* を様々な光強度で培養した後、より強い光条件にシフトした際のRpaBのリン酸化状態の変化 (Phos-tagを用いたSDS-PAGE: 右) と遺伝子発現パターン (ノザン解析: 左) をそれぞれ調べた。その結果、強光のみならず、暗→明や弱光→通常光など他の光条件においても *hliA* などの発現が誘導され、それに伴ってRpaBが脱リン酸化されることが示されたため、RpaBによる転写制御系は、強光ストレスに限らず多様な光環境変化に幅広く関与することが示唆された。

RpaBを利用した光発現誘導系の構築



RpaBの解析も踏まえ、大腸菌における光発現誘導系の構築を試みた。RpaBに対するセンサーキナーゼはNblSであることが示されているため、NblS及びRpaBを恒常的に発現させるとともに、RpaBに認識される *hliA* プロモーターの下流に目的遺伝子 (本研究ではGFP) が連結されるようなプラスミドを作出した (A)。一方、NblSは強光に伴って生じる酸化ストレスや光合成レドックスの変化により調節される可能性も指摘されているため、光環境を直接認識する別のセンサーキナーゼCph1にも着目し、N末端の光認識ドメインはCph1、C末端のキナーゼドメインはNblSというキメラセンサーを発現させるプラスミド (B) も作出し、大腸菌に導入した。暗→明による光条件 (C) で培養したところ、双方の系で照射による目的遺伝子の発現誘導が一定のレベルで検出され (D)、RpaBの発現とリン酸化状態の変化も確認できた (E)。しかし、暗条件での抑制が不十分であったり、誘導率も高くなかったことから、照射条件や誘導のタイミング、プロモーター配列の改変など、条件のさらなる最適化が必要であると考えられた。