

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の Mg²⁺輸送体ホモログの機能解析

白吉 瑞綺 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 鈴木 石根 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

マグネシウムイオンは生物にとって必須なイオンのひとつであり、酵素反応の触媒や細胞内の構造的な役割を果たす他、ATP などの生体内で生じるアニオンの対イオンとしても機能する。シアノバクテリア等の光合成生物では、集光性色素のクロロフィルが光エネルギーを捕捉して光合成を行う。クロロフィルの中心にはマグネシウムが金属イオンとして配位している。したがって、シアノバクテリアにおいては、マグネシウムイオンは特に重要であり、多くのマグネシウムイオンを取り込む必要がある。しかし、シアノバクテリアではこのマグネシウムイオンの輸送機構はほとんど解明されていない(1)。また、マグネシウムイオンの輸送は光合成におけるチラコイド膜を通じた電気ポテンシャルの制御にも影響を与える可能性があるが、その仕組みも不明である。そのため、このメカニズムを明らかにすることは光合成機能のより詳細な理解に貢献できる。

一般的なバクテリアではマグネシウムイオン輸送体として CorA・MgtE・MgtA/B の3種が知られている(2)。CorA と MgtE は複数のマグネシウムイオン結合部位を有しており、これらの部位へのマグネシウムイオン結合により輸送活性が低下することによって、細胞内のマグネシウムイオン濃度が制御されていると考えられている。シアノバクテリアのゲノムにもこれらのホモログが存在するが、その局在性・機能は不明である。そこで、モデルシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いてマグネシウムイオンの輸送に関わると推定される CorA ホモログの遺伝子 (*sll0671*, *sll0507*)、MgtE ホモログの遺伝子 (*slr1216*)、MgtA/B の遺伝子 (*sll0672*, *slr0822*, *sll1614*) を単独または複合でノックアウトした破壊株を作製し、それらの株におけるマグネシウムの要求性の変化を調査することを目指した。

【材料・方法】

マグネシウムイオン輸送体候補遺伝子 *slr1216*, *sll0671*, *sll0507*, *sll0672*, *slr0822*, *sll1614* の単独破壊株の作出

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の染色体上の、*slr1216*, *sll1614* 遺伝子にはカナマイシン耐性遺伝子、*sll0671*, *sll0672* 遺伝子にはクロラムフェニコール耐性遺伝子、*sll0507* 遺伝子にはエリスロマイシン耐性遺伝子、*slr0822* 遺伝子にはゲンタマイシン耐性遺伝子を、それぞれ二重相同組み換えにより挿入することで変異株を作出した。それぞれの標的遺伝子のコード領域とその周辺を含む約 2~3 kbp の DNA 断片を PCR で増幅し、pMD19 ベクターにクローニングした。得られたプラスミドを鋳型に、標的遺伝子のコード領域の大部分を欠損するように逆向きに PCR を行い、得られた線状化ベクターと各耐性遺伝子を In-Fusion 反応により結合し、大腸菌で増幅したのち精製することで、耐性遺伝子を目的遺伝子上流および下流の相同領域の間にもつプラスミド DNA を得た。得られたプラスミド DNA を用いて *Synechocystis* 細胞への形質転換を行った。

【結果・考察】

$\Delta slr1216$ 株、 $\Delta sll0671$ 株、 $\Delta sll0507$ 株、 $\Delta sll0672$ 株は、それぞれの薬剤に耐性があるコロニーを複数得ることに成功し、作出した株由来の DNA を鋳型に耐性遺伝子を含む領域を増幅するプライマーで PCR することで、目的の位置に薬剤耐性遺伝子が挿入されていることを確認した。

通常の BG-11 培地は、0.3 mM の MgSO₄ を含む。MgSO₄ を 0.3 mM Na₂SO₄ と様々な濃度の MgCl₂ に置き換えた培地を作製し、野生型の細胞を培養したところ、0.1 mM 以下の MgCl₂ を含む培地で生育が抑制されることがわかった。これまでに作製した 4 種の遺伝子欠損株について、0.1 mM MgCl₂ を含む培地で培養したところ、3 種の候補遺伝子の変異株は野生株と同様かそれ以上に生育したが、CorA ホモログをコードする *sll0507* の欠損株で生育が低下することがわかった (図)。

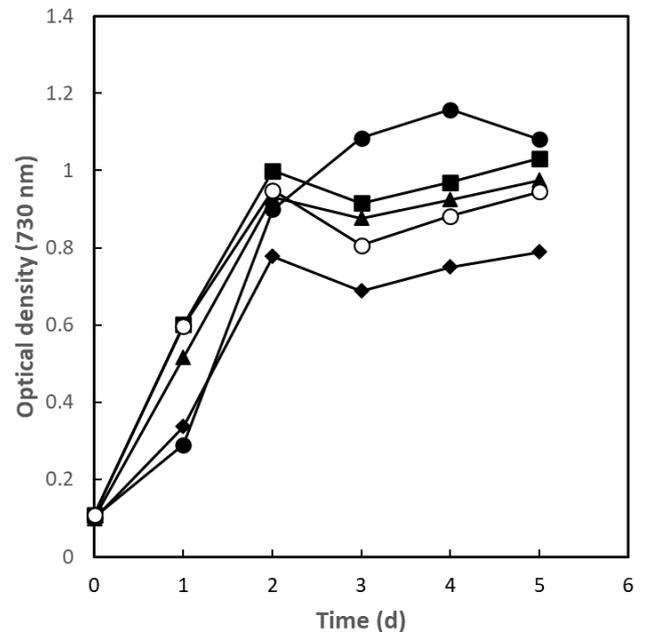


図. Mg²⁺制限条件下での細胞の増殖 0.1 mM Mg²⁺を含む培地での $\Delta slr1216$ (●), $\Delta sll0671$ (▲), $\Delta sll0507$ (◆), $\Delta sll0672$ (■) 遺伝子破壊株および野生型(○)の増殖曲線。培養液の 730 nm における光学密度(OD730)の変化を図示した。

【今後の展開】

作製の終わっていない *slr0822* と *sll1614* 遺伝子の欠損株を作製する。 $\Delta sll0507$ 株でその他の候補遺伝子の破壊を導入する。

【参考文献】

1. Pohland AC & Schneider D, *Biol. Chem.* 400, 1289-1301 (2019)
2. Maguire ME, *Front Biosci.* 11, 3149-3163 (2006)