

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570046

研究課題名(和文)キメラセンサーを用いたヒスチジンキナーゼの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of histidine kinases by expression of chimeric sensors

研究代表者

鈴木 石根 (SUZUKI, Iwane)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：10290909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：細菌の環境シグナルの検知には、ヒスチジンキナーゼと呼ばれるセンサーキナーゼが使われている。ヒスチジンキナーゼはシグナル検知ドメインとキナーゼドメインからなり、キナーゼドメインは保存性が高いが、シグナル検知ドメインは多様性に富んでいる。

ラン藻 *Synechocystis* の内在性のリン酸欠乏応答センサー SphS のシグナル検知ドメインを、機能未同定のセンサーのシグナル検知ドメインと交換したキメラ型センサーを発現することで、*in vivo* で機能解析を行った。必須遺伝子で遺伝子破壊ができなかった Hik2 の解析により、Hik2 が塩化物イオンを検知する塩ストレスセンサーであることを初めて見出した。

研究成果の概要(英文)：Most of bacteria utilize histidine kinases as signal sensors for perception of changes in environmental conditions. Generally histidine kinase consists of signal-input domain and kinase domain. The former is diverse and the latter is well-conserved.

We expressed chimeric sensors which contain signal-input domain from uncharacterised histidine kinase and the kinase domain from SphS, a phosphate-deficient sensor from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. We identified that a chimeric sensor of Hik2, one of the essential histidine kinase, specifically responded to salt stress by sensing Chloride ion concentration. It was the first finding that the salt sensor perceives chloride ion.

研究分野：植物代謝生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理

キーワード：二成分制御系 ヒスチジンキナーゼ キメラタンパク質 遺伝子発現 環境応答

## 1. 研究開始当初の背景

ヒスチジンキナーゼ (Hik) は、高等な動物以外の生物 (細菌・古細菌・カビ・植物・原生生物) に保存されたセンサーキナーゼで、細胞内外の様々な刺激を受容しキナーゼ活性を調節する。それぞれの Hik はペアとなる特定の転写因子、レスポンスレギュレーター (Rre) をリン酸化し、そのリン酸化状態により特定の遺伝子発現を制御している。一般に Hik は N 末側の配列の多様性に富んだシグナル検知ドメインと C 末側の保存性の高いキナーゼドメインからなる。ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 ゲノムには、47 種のヒスチジンキナーゼ (Hik) があり、これまで配列の類似性や変異体の機能解析により、そのうちの 18 種については機能が推定されている [Murata & Suzuki, (2006), J. Exp. Bot. 57: 253]。センサーの網羅的機能解析は、その生物がどのような環境適応・馴化能を有するかを知る上でたいへん重要であり、ある生物がいかにしてその環境に生育するのか、その条件をニッチとして生育する意義を知ることも可能となる。また、センサーのシグナル検知の分子機構の解析は、環境耐性を賦与した生物や生物機能の産業利用にも応用可能で、その意義は大きいといえるが、これまで解析が十分進んでいるとはいえない。シグナル検知ドメインの機能がセンサーとしてのアイデンティティを決めているが、配列だけから機能を推定することは困難である。そこで機能解析が必要となるが、多くの Hik は特定の環境条件でのみアクティブであるため、変異体を作製しても、通常の培養条件では表現型も遺伝子発現レベルも野生株と明確な差が見られず、機能解明に繋がらないことが往々にしてある。

我々はこれまでの解析の過程で、ラン藻のリン酸欠乏のセンサーである Hik、SphS のキナーゼドメインに機能未解析の Hik のシグナル検知ドメインを融合したキメラセン

サーの遺伝子の作成し、ラン藻細胞内で発現することにより、機能未知の Hik がシグナルを検知し活性化される条件で、キメラセンサーの SphS のキナーゼドメインが活性化され、下流の転写因子 SphR をリン酸化する。その結果、本来リン酸欠乏条件で発現が誘導される、アルカリホスファターゼやリン酸の高親和性輸送体遺伝子群が誘導されることがわかった。アルカリホスファターゼは、ラン藻細胞と人工的な基質 (*p*-nitrophenyl phosphate) を用いて容易に活性の測定が可能であり、内在性のレポーター遺伝子として利用できる利点がある。

## 2. 研究の目的

ヒスチジンキナーゼ (Hik) は、細菌・カビ・植物に保存されたセンサーキナーゼである。Hik は一般に N 末側の配列の多様性に富んだシグナル検知ドメインと C 末側の保存性の高いキナーゼドメインからなる。本研究ではラン藻のリン酸応答性 Hik、SphS のキナーゼドメインに機能未知の Hik のシグナル検知ドメインを融合したキメラセンサーを細胞内で発現させ、センサーがアクティブであれば、SphS の制御下にあるアルカリホスファターゼ活性が発現することを利用して、機能未知の Hik の機能とシグナル検知の関わるドメインの同定を目指すものである。

## 3. 研究の方法

### ラン藻の機能未同定 Hik の解析 (Hik が受け取るシグナルの同定とシグナル検知ドメインの解析)

*Synechocystis* ゲノムには 47 種の Hik があり、これまでにそのうち 18 種の Hik の機能は、我々や他の研究グループによって明らかにされているが、残りは未解明である。本計画の研究では *Synechocystis* に固有の Hik は除き、全てのラン藻ゲノムに共通に保存された 5 種の Hik と、淡水性及び陸棲のラン藻に

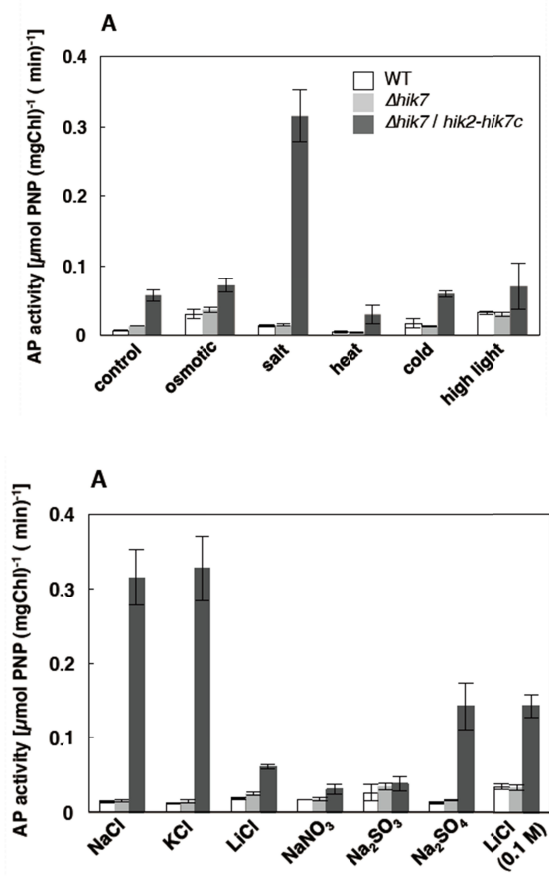
広く保存された 15 種の Hik について、シグナル検知ドメインと SphS のキナーゼドメインを融合し、どのような培養条件で SphS の制御下にあるアルカリフォスファターゼ活性が発現するか調べ、機能未同定の Hik が応答する条件を見出す。また、遺伝子群の特徴を参考に解析する環境条件を検討する。機能する条件が特定できたら、シグナル検知の機構を解析するため、シグナル検知ドメインに欠失・置換等の改変を施し、内在性のレポーターであるアルカリフォスファターゼの活性を測定し、シグナル検知に重要なサブドメイン、アミノ酸残基を明らかにする。サブドメインが明らかとなったら、耐熱性のラン藻のホモログのそのサブドメインに対応する領域を過剰発現・精製したタンパク質構造を解析する。構造解析には海外連携研究者のイギリス、シェフィールド大学の J.B. Rafferty 博士と共同で行う。

#### 4. 研究成果

生物は環境の変化を検知し、その環境に合わせて自身の代謝を調節する。バクテリア・カビ・植物・原生生物においては、細胞内外の環境変化を検知する機構として、ヒスチジンキナーゼと呼ばれるセンサータンパク質が使われている。ヒスチジンキナーゼは、バクテリアに起源を有する、古典的なセンサータンパク質で多様な環境変化を認識するためアミノ酸配列の多様性に富んだ、シグナル検知ドメインと、下流にシグナルを伝達するために ATP からリン酸基を転移する配列の保存性の高いキナーゼドメインから構成される。個々のヒスチジンキナーゼの機能解析から、どのような刺激でどのような遺伝子群の発現を制御するかについての情報は、これまでにかなり蓄積してきたが、これらのセンサー分子が環境変化を検知する分子機構については、まだ十分理解されているとは言えない。本研究で、これまでに比較的詳細に機能とシ

グナル検知のメカニズムを解明できているラン藻のリン酸欠乏センサー SphS のキナーゼドメインに機能未同定のヒスチジンキナーゼのシグナル検知ドメインを融合したキメラ型のセンサーを合成し、SphS を欠失したラン藻の細胞で発現した。キメラ型センサーが活性型であれば、SphS が本来発現を制御するアルカリフォスファターゼの活性が発現し、不活性型となればアルカリフォスファターゼの活性は発現しない。この仕組みを活用して、キメラ型センサーのシグナル検知ドメインに様々な変異を導入することで、シグナル検知に不可欠な部位を解析できる。

ラン藻の機能未同定のヒスチジンキナーゼのひとつである Hik2 のシグナル検知ドメインを結合した SphS のキメラセンサーは、塩ストレス条件下でのみアルカリフォスファターゼの活性を発現した。さらに様々な塩に対する影響を調べたところ、Cl<sup>-</sup>(塩化物イオン)を含む塩でのみ、アルカリフォスファターゼの活性の発現が見られたことから、



Hik2 は塩化物イオンを検知するタイプの新規な塩ストレスセンサーでることがわかった。Hik2のシグナル検知ドメインにはGAFと呼ばれる構造が見られ、このGAFドメインにアミノ酸置換変異を導入すると、Hik2-SphSキメラセンサーの機能が欠損することから、GAFドメインが塩化物イオンの検知に重要な働きをすることが示された。

解析の過程で、アルカリフォスファターゼの活性の発現がマンガンイオンの欠乏により著しく高まることが見出された。この仕組みはまだ明らかではないが、アルカリフォスファターゼ発現の新規な制御系の存在を示す結果であり、たいへん興味を持たれる。

また、植物ホルモンエチレンのセンサーは、ヒスチジンキナーゼ様の構造を有することがわかっているため、シロイヌナズナのエチレンセンサーのシグナル検知ドメインを融合したキメラを5種作製したところ、常に活性型と常に不活性型とに区分された。これまでのところエチレンに応答するキメラセンサーは得られていないが、キメラ型のセンサーが作動するのに必要なドメインを明らかにすることができている。今後、さらに詳細な解析を行って、論文として発表する予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Kotajima T., Shiraiwa Y., Suzuki I.  
Functional analysis of the N-terminal region of an essential histidine kinase, Hik2, in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, FEMS Microbiol. Let.(2014) 351, 88-94.

[学会発表](計 3 件)

鈴木石根 ラン藻のヒスチジンキナーゼのキメラセンサーを用いた機能解析とその利用、ラン藻の分子生物学、かずさアカデミア、2013年11月23日、かずさ

川口美咲、白岩善博、鈴木石根 ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803におけるエチレンセンサー作出の試み、ユークレナ研究会、2013年11月9日、筑波

川口美咲、白岩善博、鈴木石根 植物のエチレンセンサーを利用したエチレン応答性ラン藻作出の試み、第77回日本植物学会年会、2013年9月12~15日、札幌

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 石根 (SUZUKI, Iwane)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：10290909