

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 志 ^し 村 ^{むら} 遥 ^{よう} 平 ^{へい} (長野県) |
| 学位の種類 | 博士(理学) |
| 学位記番号 | 博甲第6311号 |
| 学位授与年月日 | 平成24年7月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 審査研究科 | 生命環境科学研究科 |
| 学位論文題目 | Roles of Signal-input Domain of a Histidine Kinase, Hik33, in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 のヒスチジンキナーゼ Hik33 のシグナル検知ドメインの機能に関する研究) |
| 主査 | 筑波大学教授 博士(農学) 鈴木石根 |
| 副査 | 筑波大学教授 理学博士 白岩善博 |
| 副査 | 筑波大学教授 理学博士 中村幸治 |
| 副査 | 筑波大学准教授 博士(工学) 野村暢彦 |

論文の内容の要旨

シアノバクテリアは主要なシグナル伝達経路である二成分制御系によって、細胞内外の環境変化を検知し順化する。二成分制御系は、一般にヒスチジンキナーゼ (Hik) とレスポンスレギュレーター (Rre) の2種類のタンパク質から構成され、Hik は特定のシグナルに応じて特定の Rre をリン酸化する。一般に Rre は転写因子で、リン酸化の状態により環境条件応答性の遺伝子群の発現を調節する。シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の Hik33 は、低温、酸化、強光、高塩濃度、高浸透圧の各ストレスに応答し、複数の光化学系関連遺伝子群の発現を調節することが知られている。しかし、Hik33 がどのようにして複数のストレスに応答するのか、その分子機構はわかっていない。Hik は一般的に配列の多様性に富んだ N 末端側のシグナル検知ドメインで、特異的なシグナルを検知し、保存性の非常に高い C 末端側のヒスチジンキナーゼドメインで自己と対応する Rre を認識、リン酸化すると考えられている。Hik33 はシグナル検知ドメインに複数のサブドメインを有している。本研究では Hik33 の自己リン酸化活性調節機構に関する知見を得るために、Hik33 のシグナル検知ドメインに含まれるサブドメインの機能について、キメラ型の Hik を *Synechocystis* 細胞内で発現し解析した。

Hik33 は2つの膜貫通ドメイン、膜貫通ドメインに挟まれたループ領域、HAMP ドメイン (HAMP)、PAS ドメイン (PAS) をシグナル検知ドメインにもつ。Hik33 のシグナル検知ドメインと、*Synechocystis* の Hik でリン酸欠乏センサーとして働く、SphS のヒスチジンキナーゼドメインを繋げたキメラ型の Hik (Hik33n-SphSc) を *Synechocystis* で発現させ、この株を用いて、Hik33 のシグナル検知ドメインについて *in vivo* での機能解析を試みた。SphS は本来リン酸欠乏条件下で、アルカリフォスファターゼ (AP) 遺伝子 *phoA* の発現を誘導するので、これを指標にキメラ型 Hik の機能を評価した。

Synechocystis 染色体上の *sphS* 遺伝子を相同組換えによりキメラセンサー *hik33n-sphSc* を発現させた。Hik33n-SphSc を発現する株は、通常培養条件下で *phoA* 遺伝子を発現し、その発現は高塩濃度または低温条件下で抑制された。Hik33n-SphSc は Hik33 と遺伝子発現の制御の方向は逆であったが、それは下流の Rre の違

いによるもので、高塩濃度と低温のいずれの条件でも *phoA* の発現を制御したことから、Hik33n-SphSc は Hik33 と同様にシグナルに応答することが確かめられた。

一般的に低温ストレスは、膜貫通ドメインが膜流動性の低下を検知することによってセンサータンパク質に認識されるとする説がある。そこで、Hik33 における膜貫通ドメインの機能を調べるために、Hik33n-SphSc の膜貫通ドメインを欠損または置換した。膜貫通ドメインを欠損させた Hik33n-SphSc を導入した株は AP 活性を全く発現しなかった。一方、Hik33n-SphSc の膜貫通ドメインを、リン酸センサーの SphS・Ni²⁺ センサーの NrsS の膜貫通ドメインに置換したキメラセンサーは活性をもち、高塩濃度および低温ストレスに対しても正常に応答した。このことから、Hik33 がリン酸化活性を発揮し、ストレスに対して応答するためには、膜貫通ドメインをもち膜に局在する必要があるが、膜貫通ドメインの機能は配列依存的ではないことが示された。つまり、Hik33 の低温ストレス応答は、細胞膜を介さないか、膜を介してはいるが膜貫通ドメインの配列には依存しないと考えられた。

高塩濃度ストレスは、細胞内外のイオン濃度変化として検知されると考えられている。そこで、Hik33n-SphSc のペリプラズム領域、細胞質領域に存在する HAMP、PAS ドメインを順次欠損させ、AP 活性の発現におよぼす影響を解析した。ペリプラズム領域を欠損させた Hik33n-SphSc を発現する細胞は完全長の Hik33n-SphSc を発現する細胞と同様に機能し、高塩濃度および低温ストレスに応答性を示したため、ペリプラズム領域は Hik33 の機能に必須でないことが示された。一方で、HAMP あるいは PAS を欠損させた Hik33n-SphSc を導入した細胞は、通常条件での AP 活性が約 2 倍に上昇したことから、HAMP と PAS は Hik33 の通常条件での活性を抑制する事が示唆された。HAMP と PAS はホモ二量体を形成するとともに、互いに他者の二量体形成を阻害していると考えられた。また、HAMP と PAS 両方を欠損させると活性が完全に失われたことから、HAMP と PAS のどちらか一方でも存在することが、Hik33 の活性には必要であることが示された。興味深いことに、HAMP または PAS を欠損させた Hik33n-SphSc を発現する細胞は、高塩濃度および低温ストレスに対しても正常に応答したことから、Hik33 には HAMP または PAS のどちらか一方で十分であることが示された。次に、Hik33 の PAS に着目し、その機能に重要な役割を持つと考えられるアミノ酸残基の同定を試みた。その結果、D300A, W318A, R415E のアミノ酸残基置換は、PAS 間の二量体形成に影響し、二量体形成能を失わせるか、二量体の形態変化を引き起こすと考えられる。これらのアミノ酸残基は Hik33 のシグナル検知に伴う活性調節に重要な役割を担うことが推測された。

審査の結果の要旨

生物は刻々と変化する細胞内外の環境変化を検知し、細胞の代謝を最適に制御することによりその環境に順化する。生物の環境応答に関して、細胞の代謝の変化や環境ストレスで発現量が制御される遺伝子群については多くの情報が蓄積されているが、細胞の環境変化の検知の分子機構についてはほとんどわかっていない。本研究では、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 のマルチストレスセンサーの Hik33 のシグナル検知の機構を解析するため、ラン藻細胞内でキメラ型のセンサーキナーゼタンパク質を発現する系を新たに確立し、そのキメラ型センサーのシグナル検知ドメインに変異を導入することにより、Hik33 の膜貫通ドメイン、HAMP ドメイン、PAS ドメインの働きを明らかにした。本研究で開発したキメラセンサー系は、機能未知のヒスチジンキナーゼの機能を *in vivo* で解析できる有用なツールになると同時に、バクテリアの細胞内の遺伝子発現を人為的に発現制御する系の構築のためにも応用が可能な系であり、当該分野の発展に重要な貢献をしたと高く評価できる。

平成 24 年 5 月 25 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員

によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。