

ラン藻の環境ストレス検知機構の網羅的な機能解析

●鈴木 石根

自然科学研究機構基礎生物学研究所

＜研究の目的と進め方＞

本研究は、光合成モデル生物のラン藻（シアノバクテリア）を研究材料として、細胞外の環境変化に対する応答のネットワークの全容を解明することを目指して、計画した。ラン藻のなかでも1996年にかずさDNA研究所の田畑らにより全ゲノム配列が決定されている、*Synechocystis* sp. strain PCC 6803株を用いた。この株は細胞外のDNA断片を自発的に細胞内に取り込み、自身の染色体上の相同配列と高頻度に組み替えを起こす性質を持つ、いわゆるナチュラル・コンピテントな生物で、この性質を利用して容易に遺伝子破壊および、遺伝子改変をすることができる。本研究ではまずゲノム配列情報に基づき、環境応答ネットワークの上流でネットワーク全体の制御に関わる環境センサーとその下流で機能すると予想される転写因子の遺伝子、およびそれらのホモログ遺伝子をピックアップし、それら遺伝子を網羅的に破壊した変異株ライブラリーを作製する。そして、それら変異株の遺伝子発現レベルの環境応答をDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析し、遺伝子改変の影響を調べることにより、[1.環境ストレスのセンサー] → [2.転写因子] までの経路を明らかにする（図1）。ラン藻のゲノム解析により、①ラン藻のゲノム上には他のモデル微生物の大腸菌や枯草菌に比べてゲノムサイズあたり多くの二成分制御系の遺伝子が存在すること（表1）、②ヒスチジンキナーゼ遺伝子とレスポンスレギュレーター遺伝子が染色体上に隣接していることがまれであること、③それらの因子のドメイン構造が極めて複雑化していることなど、他のバクテリアには見られない特徴を有することがわかっていたので、特に二成分制御系に着目することにした。環境センサーとしてのヒスチジンキナーゼ、転写因子としてのレスポンスレギュレーター遺伝子の破壊株、それぞれ47種・45種を作製した。対象とする環境ストレスは、低温、高温、高塩濃度、高浸透圧、酸化ストレス、強光の各条件とした。野生株の網羅的遺伝子発現解析により、[1.環境ストレスのセンサー] → [2.転写因子] により発現制御を受ける [3.ストレス応答性遺伝子] を明らかにし、プロテオーム解析によりそれら [4. ストレス応答性タンパク質] の発現レベルを解析し、それらタンパク質の機能を詳細に解析することにより [5.環境への適応] の分子機構を解明することを考えていた。

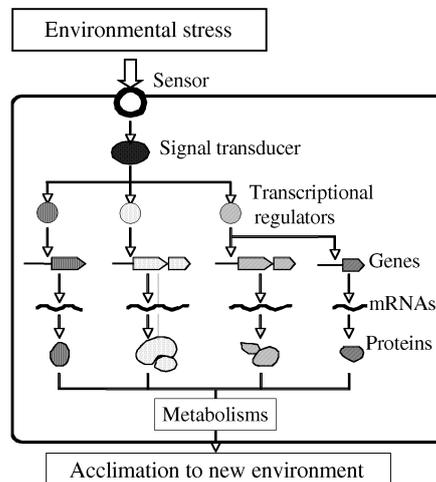


図1. ラン藻の環境応答ネットワークの概念図。

Organism	Genome size (Mbp)	Histidine kinase/Response regulator	Transcriptional factor
<i>Escherichia coli</i>	4.64	30/32	120
<i>Bacillus subtilis</i>	4.21	35/34	140
<i>Synechocystis PCC6803</i>	3.94	47/45	33
<i>Anabaena PCC 7120</i>	7.21	128/78	99

表1. 大腸菌、枯草菌とラン藻のゲノムサイズと二成分制御系、ヘリックスターン・ヘリックス型転写因子の数。

＜研究開始時の研究計画＞

- ① ラン藻のヒスチジンキナーゼ変異株の解析
ラン藻の47種のヒスチジンキナーゼ変異株を作製し、低温、高温、高塩濃度、高浸透圧、酸化ストレス、強光のストレス条件下での遺伝子発現レベルでの応答をDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析し、野生株の応答と比較することにより、それら環境ストレス条件下で機能するセンサータンパク質と、それにより制御を受けるレギュロンを同定する。
- ② ラン藻のレスポンスレギュレーター変異株の解析
ラン藻の45種のレスポンスレギュレーター変異株を作製し、低温、高温、高塩濃度、高浸透圧、酸化ストレス、強光のストレス条件下での遺伝子発現レベルでの応答をDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析し、野生株の応答と比較することにより、それら環境ストレス条件下で機能するレスポンスレギュレーターを同定することを目指す。ヒスチジンキナーゼ変異株の解析結果と合わせて、ゲノム配列情報からだけではわからなかった二成分制御系を見出す。
- ③ ラン藻の環境ストレス条件下におけるプロテオーム解析

上記のDNAマイクロアレイを用いた解析により、ラン藻の環境応答性遺伝子群が明らかにされることが期待されるが、それら遺伝子発現レベルの変化が実際にタンパ

ク質レベルの発現にどの様に反映されているのかを理解するためにはタンパク質レベルの網羅的な解析が必要である。本研究ではこれまで共同研究を行ってきたイギリス、ダラム大学のスラバス教授を海外共同研究者として加え、スラバス教授のグループと共同でこのテーマに取り組む。

④ ラン藻の転写因子の変異株の解析

ラン藻の転写因子の多くはレスポンスレギュレーターであるが、レスポンスレギュレーターではないタイプの転写因子もラン藻には存在している。ラン藻の転写因子は、代表的なバクテリアのモデル微生物である大腸菌や枯草菌に比べて、ゲノムサイズあたりそれほど多くは保存されていないが(表1)、レスポンスレギュレーターと同様にラン藻の環境応答機構に重要な役割を果たしているはずである。そこで、これらの遺伝子についても変異株を作製し、環境ストレス条件における遺伝子発現解析により、その標識遺伝子を同定することを目指す。

<研究期間の成果>

① ラン藻のヒスチジinkinナーゼ・レスポンスレギュレーター変異株の解析

作製したラン藻*Synechocystis*の、ヒスチジinkinナーゼ・

レスポンスレギュレーター変異株の様々な環境ストレス条件下での遺伝子発現を解析し、低温(3,5)、高温(12,13)、高浸透圧(1,3,10)、高塩濃度(1,7,9,11)、マンガン欠乏(2)、リン酸欠乏(8)、グルコース(15)、酸化ストレス、強光の各条件で機能するセンサー・シグナル伝達系を明らかにした(14, 図2)。遺伝子破壊により通常の培養条件で何らかの遺伝子の発現に影響がみられたのは、熱ショックタンパク質遺伝子を制御するHik34(12,13)と、マンガン輸送体を制御するManS(2)の2つのみで、あとの変異株は通常の培養条件では遺伝子の発現制御に関わっていないことが示された(14)。ラン藻のヒスチジinkinナーゼ・レスポンスレギュレーターの網羅的な機能解析により、従来の二成分制御系には見られなかったユニークな特徴がいくつも示された。低温、高浸透圧、高塩濃度の条件で遺伝子発現を制御するHik33は、以下の点で既知のヒスチジinkinナーゼと異なる性質をもっている。①複数の環境条件に応答しそれぞれの環境条件で一部異なる遺伝子群の発現を制御している、②高浸透圧、高塩濃度の条件ではRre31とともに機能するが、低温条件ではRre26が主な役割を担う、すなわち少なくとも2つのレスポンスレギュレーターにシグナルを分配するポテンシャルを有する、③機能未知のタンパク質と特異的に相互作用し、活性の制御を受ける。

高浸透圧条件と高塩濃度では同一の5つのヒスチジinkinナーゼがセンサーとして機能する。ところがそれら二成分系で制御を受ける遺伝子群は必ずしも同一ではない。また、Hik34とHik2はともにRre1とともに機能する。ところがHik34とHik2により制御を受ける遺伝子群は厳密に区別される。この結果もこれまでの二成分制御系の概念ではうまく説明が出来ないものである。ヒスチジinkinナーゼとレスポンスレギュレーターの破壊株ライブラリーを作製し、ファンクショナルゲノミクスを試みたが、低温、高浸透圧、高塩濃度いずれの条件においても、二成分制御系で制御を受けていない遺伝子群が、相当数存在していた。環境応答のネットワークの全体像を明らかにすることが、本研究の目的のひとつであったので、この点はまだ不十分であったといえる。

② ラン藻の環境ストレス条件下におけるプロテオーム解析

プロテオーム解析はタンパク質含量が著しく変化すると予想された、熱ショック条件を中心に解析を行った。熱ショックタンパク質遺伝子の調節因子であるHik34の変異株は、野生株に比べて耐熱性が上昇する変異株を示すことを見出したので(12)、Hik34変異株と野生株について、DNAマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析と2D-DIGEによるプロテオーム解析を行った(12,13)。Hik34変異株では、熱ショックタンパク質遺伝子の発現レベル、タンパク質蓄積量ともに、野生株より上昇している結果が得られ、Hik34の熱ショック耐性の表現型に関わる直接的原因だと考えられた。熱ショック条件では、熱ショックタンパク質遺伝子の発現に加えて、タンパク質の翻訳に関わる因子の遺伝子の発現が上昇するそれに伴ってタンパク質レベルも増加することが示された。一方、アミノ酸合成系酵素の蓄積量が熱ショックにより増加したが、それらをコードする遺伝子群の発現は変化していなかったことから、細胞の熱ショック応答には遺伝子の発現に加えて、転写後調節によっても制御されていることが示唆され(13)。

③ ラン藻の転写因子の変異株の解析

ラン藻*Synechocystis*のゲノムには、バクテリアのDNA結合タンパク質に普遍的に見られる、ヘリックス・ター

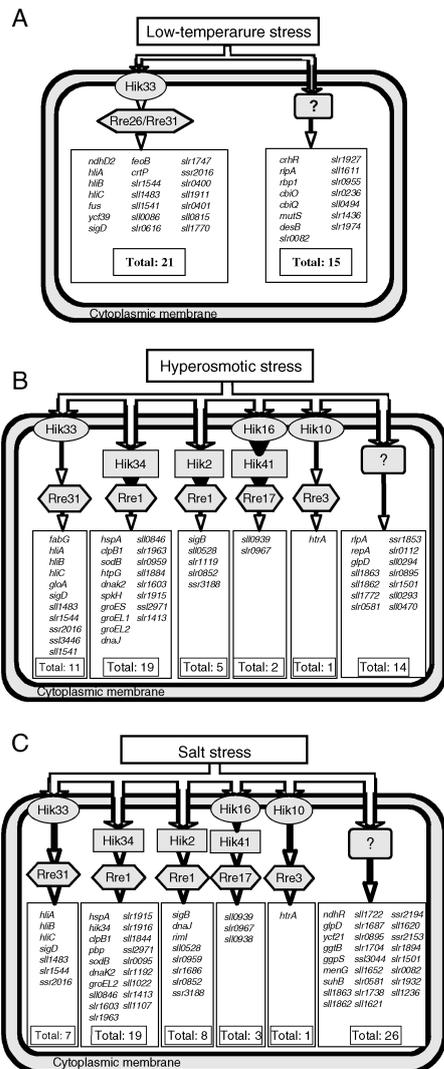


図2. 低温、高浸透圧、高塩濃度における発現制御ネットワークのモデル。一次シグナルは白矢印で、二次シグナルは黒矢印で区別する。膜局在性のHikは楕円で、可溶性のHikは長方形で、レスポンスレギュレーターは六角形で、未同定の制御系は「?」で示す。二成分制

ン・ヘリックスモチーフを持つタンパク質の遺伝子が33個存在する。そのうちこれまでに解析がなされていたものを除いた、12個の遺伝子について遺伝子破壊を行い、様々な環境ストレス条件下における遺伝子発現を調べた。

〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究はラン藻というマイナーなモデル生物を扱ったものではあったが、ポストゲノム解析の先駆的な研究と評価され、また環境センサーの機能ゲノム学的解析としても高く評価された。本研究の過程で作製した、ラン藻のヒスチジンキナーゼおよびレスポンスレギュレーター遺伝子の変異株ライブラリーは、イギリス、ドイツ、韓国、インド、ロシア、イスラエルなど世界各地のラン藻や植物の研究者から譲渡を依頼され、共同研究を行うようになった。また、2001年から2005年の間に国際会議での口頭発表に10回の招待を受け、国内で開催された国際会議も含めると計16回の講演を行った。また、この研究費により支援を受けて行った研究により、2004年9月に日本植物学会奨励賞を「ラン藻の環境ストレスセンサーの研究」というテーマで受賞させて頂いた。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

第一に本研究の目的は、ラン藻の環境適応ネットワーク、すなわち環境検知のセンサー、シグナル伝達機構、ストレス応答性遺伝子の発現、ストレス応答性タンパク質の機能、環境応答の分子機構の全容の解明であったが、網羅的にファンクショナルゲノミクスを行ったにもかかわらず、全てのストレス応答性遺伝子の発現制御機構を明らかにすることができなかった(図2)。その理由は不明だが、一部のストレス応答性遺伝子の発現には複数のシステムが関与している可能性が考えられる。その場合、本研究で試みた単一の遺伝子の機能破壊では、表現型が見られない可能性が考えられる。もう一つの可能性は、ラン藻にはまだ未同定の転写因子が存在する可能性がある。ゲノム上に存在するヘリックス・ターン・ヘリックス型転写因子は、ラン藻*Synechocystis*とほぼ同程度のゲノムサイズを持つ大腸菌や枯草菌が120~140個持っているのに対し、その約1/3程度の33個しか見いだせない(表1)。他のラン藻*Anabaena*のゲノムを見ても同様にバクテリアの主要なDNA結合性タンパク質が保存しているヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフを持つタンパク質はゲノムサイズに比べて少ない。このことは二成分制御系とヘリックス・ターン・ヘリックス型転写因子以外のまだ未知の転写調節因子が環境ストレス条件下で働いている可能性を否定しない。

また、プロテオーム解析は野生株と熱ショックタンパク質の発現を制御するHik34変異株についてしか、十分な解析を行うことができなかった。プロテオーム解析には、様々な条件検討やデータを確実にするために実験の反復が必要で、そのために膨大な時間と努力を払わなければならなかった。幸いこの研究の過程でプロテオーム解析のデータを含む論文を3報(4,12,13)報告することができたのは、海外共同研究者のスラバス教授との共同研究でなければならなかったと思われる。

ストレス応答性遺伝子のうち約半数は機能未同定のもので、その機能の解明なくして細胞の環境適応の機構を理解することはできないのだが、余りにも多数の機能未同定遺伝子の発現がストレスに応答して変動することが分かり、その解析まで手を付けられなかった。現在、これら機能未同定遺伝子のうち他のラン藻のゲノムと植物のゲノムにのみ保存されている約100個の遺伝子を対象を限定

して、遺伝子破壊株を作製し、それらの生物に共通した光合成機能と環境適応との観点から解析を行っている。ラン藻のHik33と相互作用する因子の解析は、本特定の研究期間にはほとんど解析を進められなかった。現在、新しい研究環境でこのテーマに取り組んでいる。たいへん興味深いことに、この因子をHik33の試験管内自己リン酸化の反応系に添加すると、Hik33のリン酸化のレベルが著しく上昇することがわかった。Hik33に取り込まれた標識リン酸のパルスチェース実験より、Hik33のリン酸化がこの因子の存在により活性化されていることが示されている。

〈今後の課題〉

本研究の過程でラン藻の二成分制御系に関して予想もしていなかったようなユニークな性質を垣間見ることができた。今後はこれらの知見をさらに検証していくことが重要な課題となるであろう。特にHik33が複数のシグナルを認識し、少なくとも2つのレスポンスレギュレーターにシグナルを分配する可能性があること、異なる環境ストレス条件で同一の二成分制御系を介していても制御される遺伝子に違いが生じていること、Hik33にはこれまでの二成分制御系では知られていなかった新規な調節因子が見出されていることは緊急に厳密な解析を行う必要がある。また、Hik34とHik2からのシグナルを受け取るRrelは、Hik34からのシグナルとHik2からのシグナルを区別する。Rrelは単一のレシーバドメインしか持たず、Hikからのシグナルがどの様に区別されているかもたいへん興味深い。Hik2にも調節因子が存在するという予備的根拠を得ているので、このあたりから検証していく必要がある。

二成分制御系の網羅的解析にもかかわらず、発現制御機構が不明なストレス応答性遺伝子がかなり存在する(図2)。それら遺伝子については旧来通りの調節領域に結合する因子の探索等地道な解析が必要かもしれない。それにより複数の二成分制御系、あるいは複数の転写制御因子の存在が示される可能性がある。加えて表1に示すように、ラン藻ゲノムには他のバクテリアに比べてコードされている転写因子の数が少ない。このことはまだ未同定のラン藻に特有な形態の転写因子が存在している可能性を想起させる。ゲノム染色体と相互作用している全タンパク質を様々な環境条件から抽出し、それらのプロテオーム解析を行うことにより、新規転写因子の候補を網羅的に解析するプロジェクトを進めている。

機能未知のストレス応答性遺伝子の機能解析は、細胞の環境適応の機構を理解する上で大変重要であるが、その解明は容易ではない。まず、それら機能未知遺伝子のうち他の光合成生物(ラン藻、藻類、植物)のゲノムにのみ保存された遺伝子に着目する。それらは光合成機能の環境的能に関わる可能性が考えられるので、それら遺伝子の破壊株をラン藻で作製し、発現誘導が見られる環境条件での光合成機能について解析を行っている。これまでのところ酸化ストレスで強く発現誘導が見られた機能未知遺伝子から、酸化ストレス条件での光合成活性の維持に必須な遺伝子を同定した。この遺伝子にタグを付加したコンストラクトを細胞に導入し、タグを指標にこの未知タンパク質と細胞内で相互作用しているタンパク質を同定し、それらの機能からこの未知タンパク質の機能を明らかにしていくことを考えている。

Hik33と相互作用する新規因子はHik33の自己リン酸化活性を促進するが、脱リン酸化反応には影響しない。このような二成分制御系の調節因子はこれまで知られてお

らず、その機能にたいへん興味を持たれる。その新規因子のホモログは、全てのラン藻のゲノムとコケ、シロイヌナズナ、イネのゲノムにも見だし、葉緑体移行シグナルを有することから、光合成の機能との関わりを強く示唆する。ラン藻における機能のみならず、他の高等光合成生物における機能についても解明しなければならない課題である。幸いシロイヌナズナT-DNAタグライブラリーからHik33の相互作用因子のホモログのT-DNA挿入破壊株が得られている。これらの破壊株の解析から、高等植物におけるその機能が解明されることが期待される。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文／プロシーディング (査読付きのものに限る)

1. Y. Kanesaki, I. Suzuki, S.I. Allakhverdiev, K. Mikami, N. Murata (2002) Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 339-348.
2. 0303251145
K. Yamaguchi, I. Suzuki, H. Yamamoto, A. Lyukevich, I. Bodrova, D.A. Los, I. Piven, V. Zinchenko, M. Kanehisa, N. Murata (2002) A two-component Mn²⁺-sensing system negatively regulates expression of the *mntCAB* operon in *Synechocystis*. *Plant Cell.* 14: 2901-2913.
3. 030251158
K. Mikami, Y. Kanesaki, I. Suzuki, N. Murata (2002) The histidine kinase Hik33 perceives osmotic stress and cold stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* 46: 905-915.
4. 030251216
W.J. Simon, J.J. Hall, I. Suzuki, N. Murata, A.R. Slabas (2002) Proteomic study of the soluble proteins from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 using automated matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight peptide mass fingerprinting. *Proteomics.* 2: 1735-1742.
5. 404071450
M. Inaba, I. Suzuki, B. Szalontai, Y. Kanesaki, D.A. Los, H. Hayashi, N. Murata (2003) Gene-engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in *Synechocystis*. *J. Biol. Chem.* 278: 12191-12198.
6. 404071454
A. Ferjani, L. Mustardy, R. Sulpice, K. Marin, I. Suzuki, M. Hagemann, N. Murata (2003) Glucosylglycerol, a compatible solute, sustains cell division under salt stress. *Plant Physiol.* 131: 1628-1637.
7. 404071458
K. Marin, I. Suzuki, K. Yamaguchi, K. Ribbeck, H. Yamamoto, Y. Kanesaki, M. Hagemann, N. Murata (2003) Identification of histidine kinases that act as sensors in the perception of salt stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 9061-9066.
8. 404071502
S. Suzuki, A. Ferjani, I. Suzuki, N. Murata (2004) The SphS-SphR two-component system is the exclusive sensor for the induction of gene expression in response to phosphate limitation in *Synechocystis*. *J. Biol. Chem.* 279: 13234-13240.
9. K. Marin, Y. Kanesaki, D.A. Los, N. Murata, I. Suzuki,

M. Hagemann (2004) Gene expression profiling reflects physiological processes in salt acclimation of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol.* 136: 3290-3300.

10. K. Paithoonrangarid, M.A. Shoumskaya, Y. Kanesaki, S. Satoh, S. Tabata, D.A. Los, V.V. Zinchenko, H. Hayashi, M. Tanticharoen, I. Suzuki, N. Murata (2004) Five histidine kinases perceive osmotic stress and regulate distinct sets of genes in *Synechocystis*. *J. Biol. Chem.* 279: 53078-53086.
11. M.A. Shoumskaya, K. Paithoonrangarid, Y. Kanesaki, D. A. Los, V.V. Zinchenko, M. Tanticharoen, I. Suzuki, N. Murata (2005) Identical Hik-Rre systems are involved in perception and transduction of salt signals and hyperosmotic signals but regulate the expression of individual genes to different extents in *Synechocystis*. *J. Biol. Chem.* 280: 21531-21538.
12. I. Suzuki, Y. Kanesaki, H. Hayashi, J.J. Hall, W.J. Simon, A.R. Slabas, N. Murata (2005) The histidine kinase Hik34 is involved in thermotolerance by regulating the expression of heat shock genes in *Synechocystis*. *Plant Physiol.* 138: 1409-1421.
13. A.R. Slabas, I. Suzuki, N. Murata, W.J. Simon, J.J. Hall (2006) Proteomic analysis of the heat shock response in *Synechocystis* PCC6803 and a thermally tolerant knockout mutant in the histidine kinase 34 gene. *Proteomics.* 6: 845-864.
14. N. Murata, I. Suzuki (2006) Exploitation of genomic sequences in a systematic analysis to access how cyanobacteria sense environmental stress. *J. Exp. Bot.* 57: 235-247.
15. S. Kahlon, K. Beerli, H. Ohkawa, Y. Hihara, O. Murik, I. Suzuki, T. Ogawa, A. Kaplan (2006) A putative sensor kinase, Hik31, is involved in the response of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to the presence of glucose. *Microbiol. in press.*