

論文の内容の要旨

論文題目

Signal transduction pathways via eukaryotic-type protein phosphorylation
in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803における
真核生物型タンパク質リン酸化が関与するシグナル伝達経路の解明

池内研究室 亀井 綾子

光合成生物の環境応答において光は重要な要因の1つである。光合成生物は強光による光阻害に対して様々な防御機構を発達させており、一方弱光に対しては光捕集効率を上げるための幅広い応答を示す。しかし、これまでの多くの研究にも関わらず、光シグナル感知機構、遺伝子発現制御やその間をつなぐシグナル伝達についての分子レベルでの知見は非常に少ない。本研究はシアノバクテリアの環境応答のしくみを詳細に明らかにすることを目的とし、ゲノム情報が明らかであり、かつ遺伝子操作が容易な単細胞性の *Synechocystis* sp. PCC 6803 を材料に用いた。 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (PCC株) は、一方向から光を照射してプレート上で培養すると光に向かって運動する正の走光性を示すことが知られている。修士課程において私は *slr2031* 遺伝子破壊株 ($\Delta slr2031$) の表現型の解析結果から、 *slr2031* 遺伝子が強光感受性、運動性、形質転換、色素組成など多機能の調節に関与していることを明らかにした。さらに *slr2031* 遺伝子産物はPP2C型Ser/Thrプロテインフォスファターゼと相同性があった。PP2C型Ser/Thrプロテインフォスファターゼは枯草菌においてストレス応答シグナル伝達経路の調節因子であることや、高等植物においてアブシジン酸依存性のリン酸化シグナル伝達経路の構成成分であることが知られている。これらのことから、シアノバクテリアにおいてタンパク質リン酸化によるシグナル伝達経路が環境応答に関わることが示唆された。本研究では、この仮説を検証するために、Ser/Thrプロテインキナーゼの探索とその解析を行った。

この *slr2031* 遺伝子に対応するSer/Thrプロテインキナーゼ遺伝子を検索する目的でゲノムに存在する候補ORFの全てをそれぞれPCC株で破壊した。その結果、 $\Delta sl1575$ は運動性が失われ、 $\Delta slr2031$ と似た表現型を示した。ゲノムの情報が決定されている非運動性のGT株では、 *sl1575* とすぐ上流の *sl1574* の2つのORFが、ひとつの真核生物型

Ser/Thrプロテインキナーゼ遺伝子に対応していた。そこでこの領域の塩基配列を決定したところ、運動性を示すPCC株ではこれらが単一のORFを形成していた。このORFはよく保存された真核生物型Ser/Thrプロテインキナーゼドメインを持つ521残基の産物をコードしており、*spkA* (*Synechocystis protein kinase*)と命名した。*Synechocystis*の運動性には、線毛構造を必要とすることが報告されている。*spkA*と運動性との関連性を詳細に知るため、線毛のサブユニットをコードする*pilA1*の発現レベル及び線毛の形成を確認したが親株との違いは見られなかった。これは、SpkAは運動や線毛の生合成の必須因子ではないことを示唆している。SpkAはN末端にHis-tagをつけた融合タンパク質として大腸菌での発現を試みた。可溶性画分にわずかに得られたSpkAをNi²⁺アフィニティークロマトグラフィーで精製した。*in vitro*リン酸化実験の結果、自己リン酸化活性と真核生物型Ser/Thrプロテインキナーゼの一般的な基質として知られているカゼイン、ミエリン塩基性タンパク質、ヒストンへのリン酸化が確認された。SpkAの生理的基質を同定するため、*Synechocystis*の細胞抽出液を分画して*in vitro*リン酸化実験に用いた。可溶性画分においてHis-SpkAの添加による新たなリン酸化タンパク質は確認されなかったが、膜画分では30 kDaと90 kDaタンパク質がリン酸化された。これらの結果はSpkAが細胞の運動性に関与した真核生物型プロテインキナーゼであり、*Synechocystis*の細胞膜に存在する運動装置もしくはシグナル伝達経路の成分をリン酸化し、細胞の運動性を活性化していることを示唆している。

Δ *slr1697*は、正の走光性は保持されていたものの運動性が著しく減少した。このORFは*spkA*と同様に、よく保存された真核生物型Ser/Thrプロテインキナーゼドメインをコードしており、その活性を確認できた(後述)ので、*spkB*と命名した。SpkBタンパク質はN末端には保存された4個のCys残基を、C末端側には特徴的なペントペプチドの8回リピート配列を持っている。このSpkBのN末端にHis-tagをつけた融合タンパク質を大腸菌で発現させ、精製した。His-SpkBはHis-SpkAと同様に自己リン酸化活性及び外来基質に対するリン酸化反応を示したが、*Synechocystis*の細胞抽出液には新たなリン酸化タンパク質は確認されなかった。また Δ *spkB*において、*pilA1*の発現レベル及び線毛の形成を確認したが親株との違いは見られなかった。*spkA*と同様に*spkB*もタンパク質のリン酸化による細胞の運動調節に関与していることが示唆された。以上の結果は、*Synechocystis*の運動は少なくとも2つの真核生物型プロテインキナーゼが関与したシグナル伝達経路によって調節されていることを示唆している。

他の候補遺伝子の遺伝子破壊株においては、運動性、増殖速度、細胞内の色素含量、光化学系II/系Iの量比に野生株との違いは見られなかったため、それぞれの遺伝子の生理的機能は現時点では不明である。この5つの遺伝子も、真核生物型Ser/Thrプロテインキナーゼドメインが保存されていたため、それぞれ*spkC* (*slr0599*)、*spkD* (*sll0776*)、*spkE* (*slr1443*)、*spkF* (*slr1225*)、*spkG* (*slr0152*)と命名した。これらの遺伝子を大腸菌に導入し、SpkG以外の発現を確認できた。SpkC、SpkD、SpkFは、未精製ではあるが自己リン酸化活性と基質タンパク質へのリン酸化が確認された。一方SpkEはリン酸化活性を示さなかった。SpkEの配列を詳細に見ていくと、プロテインキナーゼ活性に重要なアミノ酸が多く欠失していた。糸状性シアノバクテリアの*Anabaena* sp. PCC 7120に存在するSpkEのホモログではこれらのアミノ酸は保存されていることから、*Synechocystis*において変異が生じ、偽遺伝子となった可能性が考えられる。以上のことから、*Synechocystis*にはSpkA、SpkB、SpkC、SpkD、SpkFの少なくとも5つの真核生物型プロテインキナーゼが存在することが明らかになった。

細胞の運動調節におけるSpkA及びSpkBの入力系及び出力系を含めたシグナル伝達経路の全貌を明らかにする目的で、SpkA及びSpkBと相互作用する因子及びシグナル

の入出力系の検索を試みた。酵母two-hybridスクリーニングによりSpkA及びSpkBと相互作用する候補が複数得られた。今後、これらの遺伝子産物とSpkAまたはSpkBタンパク質との相互作用の解析から、入出力系が解明できる可能性がある。

プロテインキナーゼによるシグナル伝達経路の下流に転写因子が関与している例が知られている。そこで*Synechocystis*の転写因子の破壊株を作成し、 $\Delta sll1626$ において運動性の欠失を確認した。*sll1626*遺伝子は、大腸菌においてSOS遺伝子群の発現を抑制する転写因子の*lexA*遺伝子と相同性が見られた。*sll1626*遺伝子によって発現に影響を受ける遺伝子を検索するため、DNAマイクロアレイを用いて野生株と $\Delta sll1626$ との比較解析を行った。大腸菌においてLexAによって発現が抑制されるSOS遺伝子群 (*recA*、*umuC*、*sulA*他) のホモログの発現レベルは野生株と比べて有意な差は確認されなかった。一方、*sll1626*遺伝子自身を含む数個の機能未知遺伝子 (*sll1009*、*slr0179*、*sll1765*他) の発現量が $\Delta sll1626$ において7-10倍増加していた。また線毛のサブユニットをコードする*sll1694* (*pilA1*)、*pilA1*と相同性のある*slr2015*、*slr2016*、*slr2017*、*slr2018*や*slr1667*、*slr1668*、などの機能未知遺伝子の発現量が大きく減少していた。*sll1626*、*sll1009*、*pilA1*、*slr2015*の発現量の変化はノーザン解析においても確認できた。*slr2015*、*slr2016*、*slr2017*を別々に破壊したところ、 $\Delta sll1626$ や $\Delta pilA1$ と同様に運動性が失われた。このことは、Sll1626は大腸菌のLexAとは異なり、運動性に関与した線毛様構造体をコードする遺伝子などの発現の調節因子であることを示唆している。Sll1626の生理機能を明らかにするため、N末端にHis-tagをつけた融合タンパク質として大腸菌で大量発現し、精製した。このタンパク質が自身のプロモータに結合することを、ゲルシフトアッセイによって示すことができた。一方、大腸菌のLexAはアルカリ条件で自己切断が起こることが知られているが、Sll1626は自己切断部位が保存されているにもかかわらず自己切断の明確な結果は得られなかった。これらの結果はSll1626が大腸菌とは異なるメカニズムによりその活性が制御されていることを示唆している。

本研究で用いている運動性の*Synechocystis* sp. PCC 6803 (PCC株) と同一起源の非運動性の培養株 (ATCC株、GT株、Kazusa株) が存在する。これらの培養株における遺伝的変異の有無を調べた。本研究で明らかになった*spkA*内の1塩基の挿入は他の3株すべてにみられた。一方、*slr2031*の開始コドンを含む154bpの配列の欠失はGT株とKazusa株で認められた。また、運動に必須な*pilC*の1塩基挿入によるフレームシフト変異がKazusa株だけに生じていることが知られている。また、*spkA*だけに変異がみられたATCC株に正常な*spkA*遺伝子をもどしたが運動性は回復しなかったので、ATCC株ではさらに未知の運動遺伝子にも変異が生じていると考えられる。このことは研究室での長期間の培養により運動機能にかかわる多数の遺伝子に次々と変異が生じたことを示している。このような人工的な培養条件における*Synechocystis*の小進化の方向性は自然界に生育していくためには必要だった運動性や強光感受性など複数の機能が不要もしくは不利となったことを示唆している。