

論文の内容の要旨

論文題目

Analysis of novel sensory PAS domains in filamentous cyanobacterium
Anabaena sp. PCC 7120
(糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 における新奇センサー
PAS ドメインの解析)

氏名

成川 礼

シアノバクテリアは酸素発生型の光合成を行う原核生物であり、植物の葉緑体の祖先と考えられ、モデル生物として広く研究されている。シアノバクテリアは、光合成を効率よく行うために光感知システムを発達させ、光合成による酸化損傷から自分自身を保護するために酸化還元応答システムを発達させていると考えられる。さらに、糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 (*Anabaena* 7120) は、窒素固定を専門的に行うヘテロシストを分化させる複雑な生活環を持ち、より複雑な環境応答システムを構築している。実際、2001年に決定された *Anabaena* 7120 のゲノム配列には、情報伝達タンパク質が多く、中でも PAS ドメインが特に豊富に存在していた。PAS ドメインは、アミノ酸配列は多様だが立体構造は保存されている一群のドメインを包含するスーパーファミリーであり、光、酸化還元状態、酸素、電圧などのセンサー、二量化のリンカーなどの多様な機能を持つといわれている。私は先行研究において、*Anabaena* 7120 から計 140 個の PAS ドメインを検出し、他の生物に比べて非常に多いことを明らかにした。しかし、これらのうち、機能既知サブファミリーに属する PAS ドメインは、3つの推定フラビン結合 PAS ドメイン (flavin-PAS ドメイン) と 1つの推定ヘム結合 PAS ドメイン (heme-PAS ドメイン) のみで、他の PAS ドメインは機能未知であった。PAS ドメインは様々な刺激のセンサーとして機能することが知られているため、*Anabaena* 7120 における多くの機能未知 PAS ドメインの中に、新奇センサー-PAS ドメインが存在することが期待された。本研究では、これらの機能未知 PAS ドメインの中から新奇センサー-PAS ドメインを見出すこと、また、このような機能未知ドメインの機能解析に対する普遍的な戦略の構築を目的とした

(図 1)。

インフォーマティックな解析として、*Anabaena* 7120 の近縁種 *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (*Nostoc punctiforme*) のドラフト配列と併せて、PAS ドメインの網羅的比較解析を行い、推定センサーPAS ドメインを選別した。*Anabaena* 7120 の 140 個の PAS ドメインから作製した HMM (Hidden Markov Model) プロファイルにより、*Anabaena* 7120 から 143 個、*Nostoc punctiforme* から 180 個の PAS ドメインを検出した。これらに関して、4 段階の *in silico* 解析によって、推定センサーPAS ドメインを抽出した。クラスタリング解析により、複数の PAS ドメインを含む計 64 種のサブクラスと 35 個のオーファン PAS ドメインに選別した。クラスタリングした PAS ドメインとともに他のドメインの相同性を基に、両種間の 36 対のオルソログタンパク質を同定した(オルソログ解析)。このうちの 22 対はタンパク質の全長に渡って相同であったのに対し、残りの 14 対は片方、或いは両方において主に PAS ドメインの挿入・重複が見られた。*Anabaena* 7120 や *Nostoc punctiforme* の進化において、これらのドメインが挿入・重複を繰り返したことが推測される。進化において機能が保存されているとすれば、両種間で保存されている PAS ドメインが祖先の機能を受け継いでいると考えられる。この推測に基づき、61 対の保存されたオルソログ PAS ドメインをセンサーPAS ドメインの候補とした。これらの PAS ドメインが転写因子・推定ターゲットと遺伝子配置が保存されているものを、実験的検証の候補とした(シンテニー解析)。既知のセンサーPAS ドメインの立体構造において、リガンド結合に重要なヒスチジン・システイン残基が特定の領域に集中している。この領域に同様の残基が両種で保存されているオルソログ PAS ドメインをリガンド結合センサーPAS ドメインの候補とした(マッピング解析)。以上の解析から、最終的に 25 対の PAS ドメインを実験的に検証するセンサー候補とした。

これら 25 対の PAS ドメインの中には、一次配列から機能予測できる PAS ドメインがいくつか存在した。1 対の推定 heme-PAS ドメインと 2 対の推定 flavin-PAS ドメインである。従って、これらについてまず詳細機能解析を行い、それ以外の 22 対の PAS ドメインについて網羅的生化学的解析を進めた。本研究においては、生化学的解析の対象として *Anabaena* 7120 のタンパク質を用いた。

推定 heme-PAS ドメインを持つオルソログ対 Alr2428 と Npun1874 において、heme-PAS ドメインは唯一の保存されたセンサー様ドメインである。Alr2428 タンパク質は、10 個以上のドメインを持つ複雑な構成をしている。つまり、センサーとしての heme-PAS ドメイン以外に、シグナル伝達のための二成分制御系ドメインを数多く持ち、さらに、転写因子として働くと考えられる DNA 結合ドメインが存在していた。そこで、Alr2428 がシグナル伝達のインプットとアウトプットの両方を担っているかどうかを解析するために、Alr2428 の heme-PAS ドメインと DNA 結合ドメインを大腸菌でヒスタグ融合タンパク質として発現・精製した。この

heme-PAS ドメインには、実際にヘムが結合していた。詳細解析の結果、ヘムは酸素との親和性は低く、酸化型還元型ともに 6 配位型として存在していることを確認し、酸化還元状態に応答しうることを明らかにした。また、この heme-PAS ドメインは、大腸菌の DOS タンパク質の heme-PAS ドメインとは異なるサブファミリーに属するにもかかわらず、その生化学的特徴は非常に似通っていた。進化的収斂によってこの生化学的相似がもたらされたことが推測される。DNA 結合ドメインに関しては、仮想結合配列に対して特異的に結合することが示された。これらのことから、Alr2428 と Npun1874 が酸化還元に応答する転写因子である可能性が示唆された。以上の結果はオルソログ間で保存された PAS ドメインがセンサーとして機能しうることを示唆している。

推定 flavin-PAS ドメインを持つタンパク質は *Anabaena* 7120 に 3 つ存在するが、うち二つは *Nostoc punctiforme* とのオルソログに保存されているが、残り一つは、*Nostoc punctiforme* には保存されていない。これら 3 つについて、ヒスタグ融合タンパク質として大腸菌で発現・精製した。その結果、保存された flavin-PAS ドメインは実際にフラビンを結合していたのに対し、保存されていない PAS ドメインは全くフラビンを結合していなかった。また、フラビンを結合している 2 つの PAS ドメインは、それぞれ青色光に応答してフォトリポピンと同様な光還元反応を示したが、その光応答性は大きく異なっていた。一方は完全に光還元され、暗反転も非常に遅いのにに対し、もう一方はわずかにしか光還元されず、暗反転も非常に早かった。これらのことは、進化的に保存されているドメインであっても、異なる光受容体として働く可能性を示している。また、保存されている flavin-PAS ドメインはフラビンを結合し光応答性を示すのに対し、保存されていない PAS ドメインは全くフラビンを結合しないという結果は、「両種間で保存されている PAS ドメインが祖先の機能を受け継いでいる」という推測を支持する。

上述の結果を受けて、残りの 22 個の機能未知 PAS ドメインについて、大腸菌でヒスタグ融合タンパク質として発現・精製した。その結果、Alr0428-PAS3 のみ発現タンパク質の殆どが不溶性画分に回収されてしまい、可溶性画分からは精製出来なかったが、それ以外の 21 個の PAS ドメインに関しては、精製量に差はあるものの精製できた。これらの精製タンパク質に関して、吸収スペクトルの測定と金属定量を行った。その結果、大腸菌タンパク質由来と考えられるヘムの吸収は検出されたものの、それ以外の特異的な吸収ピークは検出されなかった。また、金属定量からも、測定した金属種に関しては、特異的に結合しているものは検出されなかった。続いて、システインを介した分子内あるいは分子間共有結合が形成されているかどうかを調べたところ、幾つかの PAS ドメインは共有結合を形成しており、酸化還元に応じて可逆的に応答することが分かった。これらの中でも特に、*Nostoc punctiforme* におけるオルソログ PAS ドメインにおいてもシステインが保存されている PAS ドメインは、細胞内における酸化還元状態を感知している可能性が考えられる。最後に、PAS ドメインは、二量体化に関

わるドメインとしても知られているので、ゲル濾過カラムを用いて分子量を決定した。その結果、いくつかの PAS ドメインが特異的に二量化していることが明らかになった。

本研究により、Anabaena 7120 に 143 個存在する機能未知 PAS ドメインの中から、インフォマティックな手法を用いて、25 個の推定センサー-PAS ドメインを抽出した (表 1)。これらのうち、配列相同性から機能が予測できた 1 つの推定ヘム結合 PAS ドメインと 2 つの推定フラビン結合 PAS ドメインの解析から、実際にそれぞれヘム・フラビンを結合するものの、その機能性に関しては、全く新たな知見を得ることに成功した。さらに、近縁種で保存されていない推定フラビン結合 PAS ドメインに関しては、面白いことに全くフラビンが結合せず、本研究のインフォマティックな選別が有効であることが示唆された。また、配列相同性からは全く機能が予測できない 22 個の PAS ドメインに関しては、網羅的生化解析により、幾つかについて、酸化還元応答性が検出された。また、今回精製できた PAS ドメインについて網羅的に構造解析などを今後行うことにより、さらに機能について同定されることが期待できる。今回構築した手法は今後生理学的解析を行うことにより、フィードバック的、包括的に解析を進めることも可能であり、また、異なるドメインの解析などにも適用可能な普遍的な手法たりうるものである。

図1. 本研究の戦略

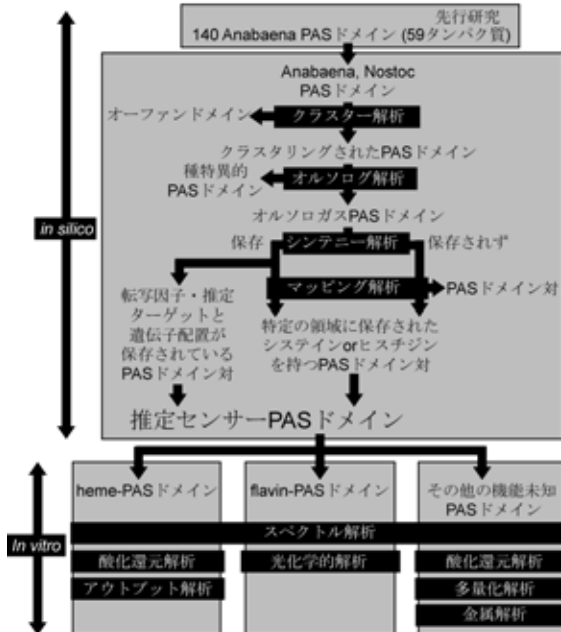


表1. 本研究のまとめ

PAS ID	オルソログ	マッピング	シグネチャー	精製	リガンド	多量化	S-S結合	センシング
AlI0707-1	○	Cys in Fx	X	○	??	ND	ND	??
AlI0824-4	○	His in Fx	X	○	??	O	E	酸化還元?
AlI1219-1	○	His in Fx	X	○	??	D	ND	??
AlI1804-3	○	His in β-seet [#]	X	○	??	D	ND	??
AlI1904-1	○	His in Fx	X	○	??	M	A	酸化還元?
AlI1914-4	○	His in Fx	X	○	??	M	ND	??
AlI2379-5	○	His in Ex	X	○	??	O+M	ND	??
AlI2875-1	○	His in EF loop	X	○	??	M	ND	??
AlI2875-2	○	flavin-PAS	X	○	FMN	nd	nd	青色光?
AlI2875-3	○	His in EF loop	X	○	??	O+M	A	酸化還元?
AlI3447-1	○	Cys in α-helics [#]	○	○	??	O	ND	??
AlI4502-1	○	X	○	○	??	D	A+E	酸化還元?
AlI4897-1	○	Cys in Fx	X	○	??	M	ND	??
Alr0428-1	○	His in Fx	○	○	??	D	ND	??
Alr0428-2	○	Cys in Ex	○	○	??	M	ND	??
Alr0428-3	○	X	○	△	??	ND	ND	??
Alr1966-1	○	X	○	○	??	M	ND	??
Alr1966-2	○	HPDD_E[IFY]R	○	○	??	M	ND	??
Alr1968-1	○	X	○	○	??	D	A	酸化還元?
Alr1968-2	○	X	○	○	??	M	ND	??
Alr2428-3	○	heme-PAS	X	○	Heme	nd	nd	酸化還元?
Alr3170-2	○	flavin-PAS	X	○	FMN	nd	nd	青色光?
Alr3511-1	○	His in Ex	X	○	??	M	E	酸化還元?
Alr4564-1	○	Cys in Fx	X	○	??	O	E	酸化還元?
Alr5272-1	○	Cys and His in Fx	X	○	??	M	ND	??
Alr1229-8	X	flavin-PAS	X	○	??	nd	nd	??

[#] 推定二次構造が既知のPASドメインの構造とは異なる
 ND: 検出されず, nd: 未決定, O: 多量体, D: 二量体, M: 単量体, A: 分子内S-S結合, E: 分子間S-S結合