

助成番号 9942

塩ストレス・センサの同定と機能解析

助成研究者：三上 浩司(岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所)

共同研究者：鈴木 石根(岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所)

生物の高塩濃度ストレスへの適応には、特定の塩ストレス誘導性遺伝子の発現が必須である。しかしながら、塩ストレスへの適応過程で最も重要である塩ストレスの検知機構については、大腸菌や酵母以外の生物においては十分な解析はなされていない。我々はシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 を用いて塩ストレスセンサーの同定とその機能の解析を試みているが、本研究では塩ストレスの持つイオン効果と浸透圧効果のうち後者に焦点を当て、浸透圧センサーに関する解析をおこなった。まず、RNA ヘリカーゼ、RNA 結合タンパク質、シャペロンタンパク質の遺伝子の発現が高浸透圧ストレス下で誘導されることを見いだした。これらの浸透圧誘導性遺伝子の発現をこれまでに我々が作成した *Synechocystis* の41種のヒスチジinkinナーゼの変異株で調べ、発現誘導に異常が見られるものを選別した。その結果、2つの膜結合型ヒスチジinkinナーゼ、Hik16とHik33の変異株において、浸透圧ストレス誘導性遺伝子の発現が野生株に比べて有為に低下していることを突き止めた。Hik16とHik33はいずれもN末端側に膜貫通領域をもち、C末端にヒスチジinkinナーゼに共通のキナーゼドメインを持っていた。構造解析の結果、Hik16は膜貫通領域を7つ持ち、それに続いてGAF(cGMP-specific and stimulated phosphodiesterase, *Anabaena* adenylate cyclase, *E. coli* FhlA)ドメインを持っていた。一方Hik33は2つの膜貫通領域を持ち、Type P-linker, ロイシンジッパー、PAS(Per, Armt, Sim and phytochromes)ドメインを有していた。これらの構造は、Hik16とHik33の機能発現に重要だと考えられる。Hik16とHik33の変異により影響を受ける浸透圧ストレス誘導性遺伝子には違いが見られ、さらにそれら変異株の浸透圧ストレス下での細胞増殖への影響にも違いが見られた。これらのことは、Hik16とHik33がそれぞれ異なるシグナル伝達系路に属していることを示唆している。また、以前の我々の結果では、Hik33は低温シグナルの検知にも関わっていることが示されているが、Hik16は低温誘導性遺伝子の発現には無関係である。さらに興味深いことに、いずれのヒスチジinkinナーゼの変異によっても全く影響を受けない塩誘導性遺伝子が存在することも明らかになった。以上の結果から、*Synechocystis*の浸透圧ストレスによる遺伝子発現の誘導はきわめて複雑な系により制御されていると考えられる。

助成番号 9942

塩ストレス・センサの同定と機能解析

助成研究者：三上 浩司 (岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所)

共同研究者：鈴木 石根 (岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所)

①研究目的

生物が、高塩濃度環境などの高浸透圧ストレス条件下にさらされると細胞質から水分が流出し、細胞質の溶質の濃度が上昇するとともに細胞膜にかかる膨圧が減少して細胞質の体積が減少する。その結果、細胞膜の構造のみならずタンパク質や核酸分子の機能に重大な損傷を引き起こす[1]。このような影響を最小限にするため生物は新たなタンパク質の発現を誘導し、膜タンパク質の組成を変化させたり、細胞質にベタインやプロリンなどの適合溶質を蓄積して浸透圧ストレスに適応する機能を有している[1]。しかしながら、浸透圧ストレスへの適応過程で最も重要であると考えられるストレスの検知機構については、あまり多くの知見がえられていない。大腸菌や酵母などでは浸透圧の上昇により活性の変化するヒスチジinkinナーゼをセンサーとし、ヒスチジン残基とアスパラギン酸残基を介したリン酸基転移反応によってシグナルを伝達する、いわゆる2成分情報伝達系がシグナルの検知とその伝達に重要な役割を担っていることが明らかにされている[2,3]。しかしながらそれら以外の生物においては十分な解析はなされていない。我々はシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 を用いて塩ストレスセンサーの同定とその機能の解析を試みているが、本研究では塩ストレスの持つイオン効果と浸透圧効果のうち特に後者に焦点を当て、浸透圧センサーに関する解析をおこなった。

②研究方法

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 のグルコース耐性株[4]を野生株として実験に供した。*Synechocystis* は 20 mM HEPES-NaOH で緩衝した BG-11 培地中[5]で 1% CO₂ を含む空気を通気し、白熱灯による連続光照射下で、温度を 34℃ に保持して培養した[6]。以前に我々が作成した 41 種のヒスチジinkinナーゼの変異株[7]は、野生株と同じ条件に 20 μg/ml スペクチノマイシンを添加して前培養し、実験にはスペクチノマイシンを含まない培地で培養した。細胞に塩ストレス、浸透圧ストレスをあたえるためには、それぞれ NaCl、ソルビトールを培地に添加した。

野生株と変異株の細胞からの全 RNA の抽出、ノーザン解析は Los et al. (1997)[8]の方法に従った。PCR 法により増幅したプローブ DNA 断片は AlkPhos Direct Kit (Amersham Pharmacia, Sweden) でラベルし、電気泳動後ナイロン膜に転写したそれぞれの RNA にハイブリダイズしたプローブのシグナル強度は Lumino-Image Analyzer (LAS-1000, Fuji Photo Film, Japan) を用いて定量化した。

③研究結果

1. 浸透圧ストレスによる RNA ヘリカーゼ遺伝子、低分子ヒートショックタンパク質遺伝子の発現誘導

Synechocystis の全ゲノム配列 [9] から RNA ヘリカーゼ遺伝子 (*crh*, cyanobacterial RNA helicase) は単一の遺伝子によってコードされていることが予想され、その発現は高塩濃度環境下で誘導されることが Vinnemeir and Hagemann (1999) [10] により既に報告されていた。そこで我々は、まず高塩濃度の影響のうち浸透圧による効果と高イオン強度の効果のいずれが *crh* の発現誘導を引き起こすのかを調べた。その結果図 1 A に示すように、*crh* の mRNA の蓄積量は塩処理、浸透圧処理いずれの場合にも増加した。塩処理の場合は誘導の開始に時間がかかったが、蓄積の速度はほぼ同じであった。以上の結果から、*crh* の mRNA レベルの塩による発現誘導は非イオン性の高浸透圧ストレスによるも

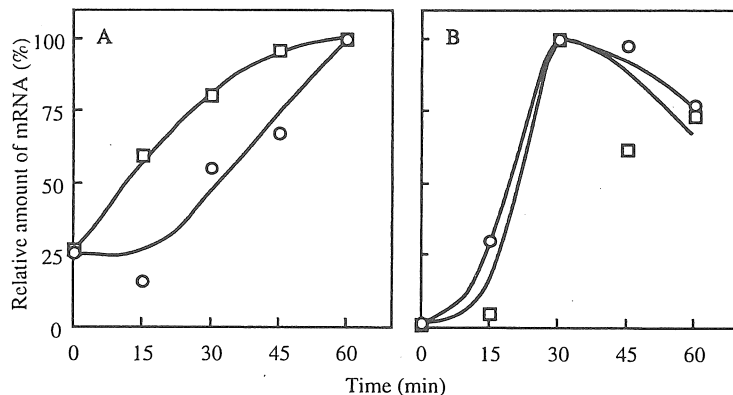


図 1. 浸透圧ストレスによる *crh* mRNA、*hspA* mRNA の誘導。(A)は *crh* mRNA を(B)は *hspA* mRNA の蓄積量をノーザン解析により測定し、相対値で示した。○、0.5 M NaCl；□、0.5M ソルビトールによる処理。

のであると結論した。

crh 遺伝子の場合と同様に、低分子ヒートショックタンパク質遺伝子 *hspA* 遺伝子もゲノム上に1コピー存在し [9]、他のヒートショックタンパク質遺伝子と同様に熱ショックにより発現が誘導される。ヒートショックタンパク質遺伝子は様々なストレスによりその発現が誘導されることが知られているので、浸透圧ストレスにより *hspA* 遺伝子の発現が誘導されるかどうかを調べることにした。図 1B に示すように、*hspA* 遺伝子も浸透圧ストレスにより発現が誘導された。*hspA* と *crh* 遺伝子の発現誘導のパターンの違いは浸透圧ストレスのシグナルの検知あるいは伝達の経路に相違があるためであろうと推測された。

2. *crh* 遺伝子、*hspA* 遺伝子の浸透圧ストレスによる発現誘導に関わるヒスチジンキナーゼの同定

これまでに我々は *Synechocystis* のゲノム配列から推定されている 43 種のヒスチジンキナーゼの遺伝子[9,11]のうち 41 種についてその遺伝子破壊株を作成している [7]。その中に、浸透圧ストレスによる *crh* あるいは *hspA* 遺伝子の発現誘導に異常をきたす株があるかどうか、ノーザンブロット解析によりスクリーニングをおこなった。その結果、ほとんどの変異株では *crh* 遺伝子と *hspA* 遺伝子の浸透圧ストレスによる誘導性は野生株と

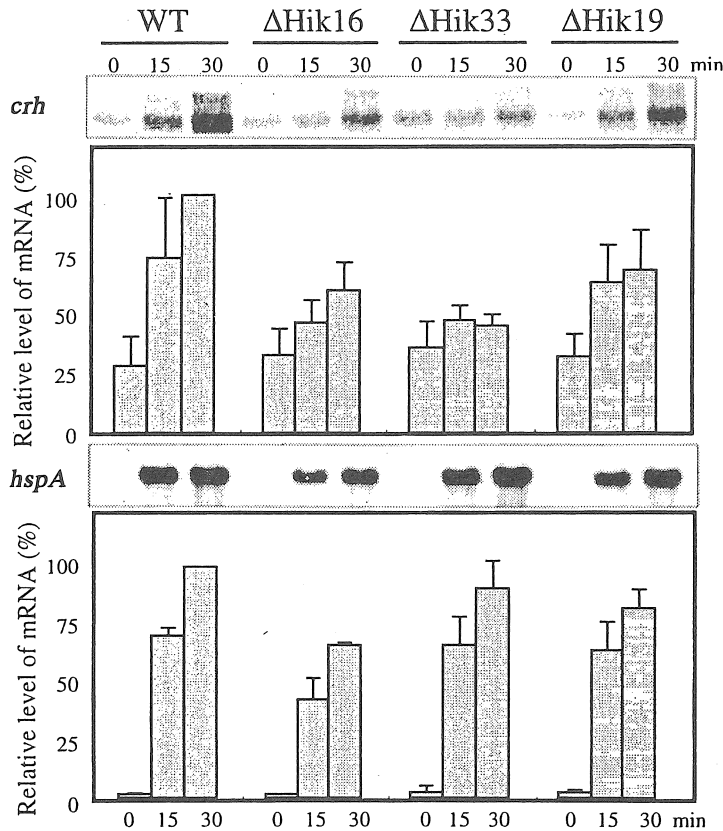


図2. 野生株と Hik16, Hik33, Hik19 の変異株での浸透圧ストレスによる *crh*, *hspA* 遺伝子の発現誘導。0.5 M ソルビトールを培地に加え、以後経時的に全 RNA を抽出して *crh*, *hspA* の DNA 断片をプローブとしてノーザン解析を行った。野生株の 30 分の値を 100 として相対値で示した。

同等であった (図2)。しかしながら、変異株の中で、Hik16, Hik19, Hik33 と名づけたヒスチジンキナーゼの変異株においては、*crh* 遺伝子の発現誘導が低下していた (図2)。興味深いことに、Hik33 と Hik19 は ω 3 脂肪酸不飽和化酵素の低温誘導に関わるとして同定されてきたヒスチジンキナーゼで、*crh* 遺伝子の低温誘導の検知とシグナル伝達にも

関わっていることがわかっているものである [7]。この結果は、*crh* 遺伝子の浸透圧ストレスによる誘導と低温ストレスによる誘導のシグナル伝達系がある部分では重複することを意味するものである。また、Hik16 変異株では *hspA* 遺伝子の発現誘導も低下が見られたが、Hik19, Hik33 の変異株では影響が認められなかった (図2)。これらの結果は、Hik16 はほかのヒスチジンキナーゼの関わりなく単独で *hspA* 遺伝子の発現誘導に関わるとともに、Hik16 と Hik33 は異なるシグナル伝達系路に属することを示唆するものであった。

3. Hik16, Hik33 のその他の浸透圧ストレス誘導遺伝子におよぼす影響

熱ショックタンパク質の *groEL* 遺伝子は高塩濃度でその発現が誘導されることが既に報告されていたので [10]、我々は熱ショックまたは低温ストレスによって誘導される遺

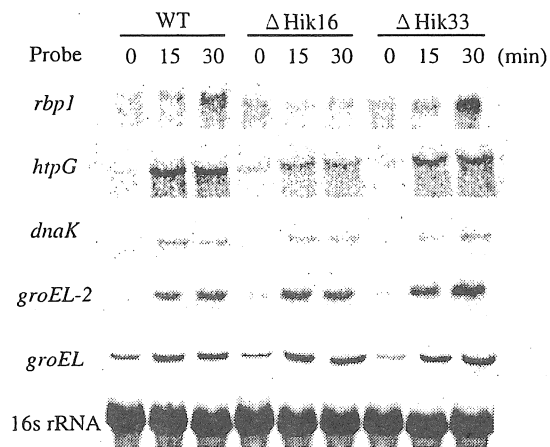


図3. ストレスタンパク質の浸透圧ストレスによる発現におよぼす Hik16, Hik33 遺伝子の破壊の影響。それぞれの培養液に 0.5 M ソルビトールを加え経時的に RNA を抽出し、ノーザン解析により発現量を調べた。

伝子の浸透圧ストレスによる発現誘導性を検討した。図3に示すように、低温誘導性として知られる *rbp1* (RNA-binding protein 1) 遺伝子 [12], 熱ショックタンパク質のホモログをコードする *groEL*, *groEL-2*, *dnaK*, *htrA*, *htpG*, *grpE* の遺伝子の発現が浸透圧ストレスにより誘導されることが明らかになった。さらにそれら遺伝子の浸透圧ストレスによる誘導におよぼす Hik16, Hik33 遺伝子の破壊の影響をノーザン解析により調べた。図3に示すように、Hik16 の欠損により *rbp1*, *htpG*, *grpE*, *htrA* 遺伝子の発現が減少した。一方、Hik33 の欠損によっては *htrA* 遺伝子の発現が低下した。これらの結果は Hik16 と Hik33 がそれら遺伝子の浸透圧による発現誘導に重要な役割を果たしていることを示している。また、Hik16 と Hik33 の変異によっては、*dnaK* や *groEL* の遺伝子は浸透圧ス

トレスによる誘導性に変化が見られなかった。これは *Synechocystis* には、Hik16 と Hik33 を介さない別の浸透圧情報伝達系路が存在することを示唆する結果である。

4. Hik16 と Hik33 の変異による細胞増殖への影響

野生株と Hik16 と Hik33 のそれぞれの変異株で、通常の条件下と 0.5 M ソルビトールによる浸透圧ストレス下での細胞増殖の様子を観察した (図 4)。通常の培養条件下では

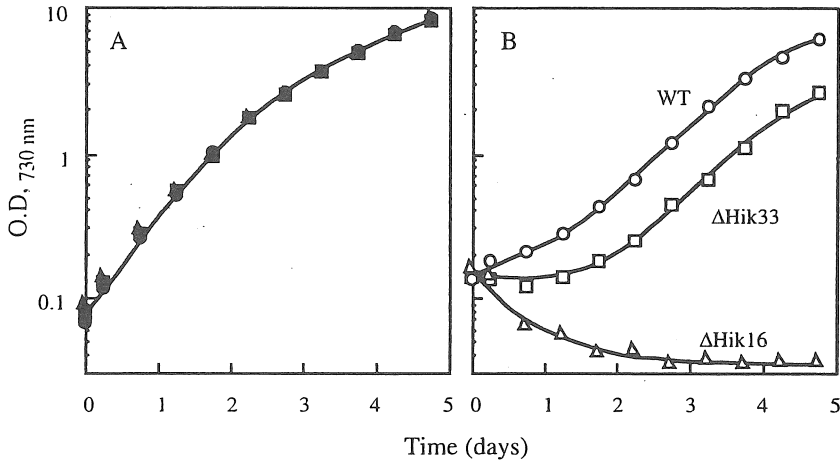


図 4. 野生株と Hik16 と Hik33 の変異株の増殖。通常の BG-11 培地で培養した細胞を 730 nm での O.D. が 0.1 となるように BG-11 培地 (A) と 0.5 M ソルビトールを含む BG-11 培地 (B) に植菌し、その後の細胞の生育を 730 nm での濁度で測定した。

3つの株の間に増殖速度に差は見られなかったが、浸透圧ストレス条件下においては Hik16 と Hik33 の変異株では増殖速度が抑制された (図 4)。特に Hik16 でその影響は顕著で、Hik16 の変異株の方がより多くの浸透圧ストレス誘導性遺伝子の発現が影響を受けていた結果と対応し、Hik16 が浸透圧ストレス応答により重要な機能を担っていると考えられた。

④考察

Synechocystis は、高浸透圧条件下でいくつかの分子シャペロンタンパク質の遺伝子の発現を誘導することが明らかになった。また、RNA ヘリカーゼや RNA 結合タンパク質等のいわゆる RNA シャペロンタンパク質遺伝子も誘導が見られた。これらの遺伝子は熱ショックや低温ストレスによって発現が誘導されるものとして知られているものでもある [12, 13]。これらの結果は、細胞の高浸透圧ストレスへの適応に生体高分子の構造の維持が重要な役割を担っていることを示唆すると同時に、様々なストレスによってこれら遺伝子の発現を制御する機構が存在することを意味する。しかしながら、これまでその発現制

御の機構は十分理解されているわけではない。以前の我々の研究により Hik33 と Hik19 は低温ストレスによる脂肪酸不飽和化酵素と *crh* の遺伝子の誘導に関わっていることが示されている [7]。今回この経路は浸透圧ストレス誘導性遺伝子の発現にも関わっていることが明らかにされた。一方 Hik16 は、低温ストレス応答には関わっていないが、浸透圧ストレス下での生育への影響が大きいことなどから、浸透圧ストレス誘導に主要な役割を担っていると考えられる。

大腸菌では浸透圧ストレスによる遺伝子発現の制御機構として、外膜のチャンネルタンパク質 OmpC/OmpF の組成を変化する 2 成分情報伝達系 EnvZ-OmpR [14] と、適合溶質のベタインやプロリンの取り込みに関わる proP 遺伝子の発現誘導を制御する cAMP 受容タンパク質が知られている [15]。また、熱ショックタンパク質の発現に関わる σ^{32} が高浸透圧条件下においても機能して、シャペロンタンパク質遺伝子の発現を誘導する事例が報告されている [16]。このように複数の経路が総合的に機能して細胞の浸透圧耐性の獲得に寄与している。我々は *Synechocystis* においても少なくとも 3 つの伝達系路が存在する可能性を示した。このように浸透圧ストレスの検知と情報伝達系路は複数存在することが、細胞には重要なかもしれない。

浸透圧センサーがどのように浸透圧の変化を検知しシグナルを伝えるかに関しては、全くわかってはいない。これまでの報告では、大腸菌の EnvZ と酵母の Sln1 の異なる浸透圧検知ヒスチジンキナーゼにおいて、1 つめの膜貫通領域とペリプラズム側の領域が浸透圧ストレスの受容に必要であることが示されている [17,18]。しかしながら、両者のその領域に相同性は全く見られない。Hik33 と Hik16 はいずれも N 末端側に膜貫通領域を持ち、C 末端側にヒスチジンキナーゼに共通するモチーフを持っている。Hik33 と Hik16 も、大腸菌の EnvZ と酵母の Sln1 と膜貫通領域とペリプラズム側の領域にアミノ酸配列の相同性は見られないけれども、この領域が浸透圧を検知する上で重要な機能を有して

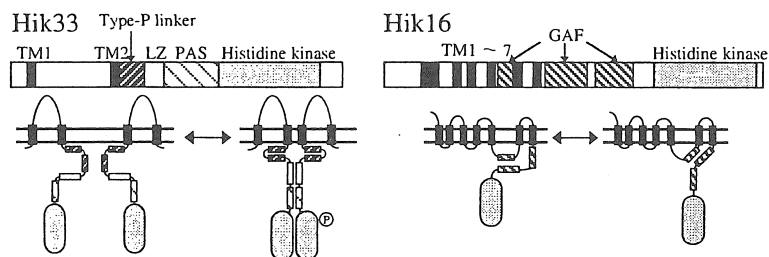


図5. Hik33 と Hik16 のドメイン構造と推定した 2 つの構造のモデル。それぞれ、Type-P linker, GAF ドメインでの相互作用の違いにより 2 つの構造を取りうると考えられる。

いる可能性が考えられる。また、Hik16は7回膜貫通領域を持ち GAF (cGMP-specific and stimulated phosphodiesterase, *Anabaena* adenylate cyclase, *E. coli* FhlA) ドメイン [19] を、一方、Hik33は2つの膜貫通領域を持ち、Type P-linker [20], ロイシンジッパー、PAS (Per, Arnt, Sim and phytochromes) ドメイン [21] を有していた。Hik16のGAFドメインの前半部分は(アミノ酸残基226-257)は後の2つの膜貫通領域と隔てられ、GAFドメインの後半(321-407、423-498)はタンデムに重複していた。おそらくHik16は浸透圧の変化によってGAFドメインの組み合わせを変化させることで2つの構造を取り、このことが浸透圧シグナルの検知に寄与するものと想像される。一方、Hik33のもつType P-linkerは並列のヘリックス構造からなり、細胞外のシグナルにより2つのヘリックス間の相互作用に変化させて、シグナルを細胞内へ伝達する機能を有すると推定されている。この変化がロイシンジッパーやPASドメイン間の相互作用に影響を与え、1量体から2量体へと変換することによりシグナルの検知がおこると想像している。

⑤今後の課題

Hik33とHik16がどのように浸透圧ストレスを検知するのか、推定した機能ドメインが実際に働くのかを、部位特異的変異などを導入したHik33とHik16を作成し、検証することにより、浸透検知のメカニズムを解明しなければならない。また、塩ストレスのイオン強度による影響を検知する機構は、イオン排出のメカニズムとともに今後解明されなければならない。

⑥文献

1. Kempf, B. and Bremer, E. (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress response to high-osmolarity environments. *Arch. Microbiol.* 170, 319-330.
2. Perraud, A.-L., Weiss, V. and Gross, R. (1999) Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trens Microbiol.* 7, 115-120.
3. Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2000) Two-component systems in plant signal transduction. *Trens Plant Sci.* 5, 67-74.
4. Williams, J.G.K. (1988) Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. In Packer, L., and Glazer, A.M. (eds.), *Methods Enzymol. vol. 167 Cyanobacteria.* Academic Press, San Diego, CA, pp. 766-778.

5. Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M. and Cohen-Bazire, G. (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriol. Rev.* 35, 171-205.
6. Wada, H. and Murata, N. (1989) *Synechocystis* PCC 6893 mutants defective in desaturation of fatty acids. *Plant Cell physiol.* 30, 971-978.
7. Suzuki, I., Los, D.A., Kanesaki, Y., Mikami, K. and Murata, N. (2000) The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis*. *EMBO J.* 19, 1327-1334.
8. Los, D.A., Ray, M.K. and Murata, N. (1997) Differences in the control of the temperature-dependent expression of four genes for desaturases in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* 25, 1167-1175.
9. Kaneko, T. et al. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3, 109-136.
10. Vinnermeier, J. and Hagemann, M. (1999) Identification of salt-regulated genes in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by subtractive RNA hybridization. *Arch. Microbiol.* 172, 377-386.
11. Mizuno, T., Kaneko, T. and Tabata, S. (1996) Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *DNA Res.* 3, 407-414.
12. Sato, N. (1995) A family of cold-regulated RNA-binding protein genes in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* M3. *Nucleic Acids Res.* 23, 2161-2167.
13. Chamot, D., Magee, W.C., Yu, E. and Owttrim, G.W. (1999) A cold shock-induced cyanobacterial RNA helicase. *J. Bacteriol.* 181, 1728-1732.

14. Mizuno, T., Wurtzel, E.T. and Inouye, M. (1982) Cloning of the regulatory genes (ompR and envZ) for the matrix proteins of the *Escherichia coli* outer membrane. J. Bacteriol. 150, 1462-1466.
15. Landis, L., Xu, J. and Johnson R.C. (1999) The cAMP receptor protein CRP can function as an osmoregulator of transcription in *Escherichia coli*. Genes Dev. 13, 3081-3091.
16. Bianchi, A.A. and Baneyx, F. (1999) Hyperosmotic shock induces the sima32 and sigmaE stress regulons of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 34, 1029-1038.
17. Tokishita, S., Kojima, A. and Mizuno, T. (1992) Transmembrane signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*: Functional importance of the transmembrane regions of membrane-located protein kinase, EnvZ. J. Biochem. 111, 707-713.
19. Aravino, L. and Ponting, C.P. (1997) The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. Trends Biochem. Sci. 22, 458-459.
20. Williams, S.B. and Stewart, V. (1999) Functional similarities among two-component sensors and methyl-accepting chemotaxis proteins suggest a role for linker region amphipathic helices in transmembrane signal transduction. Mol Microbiol. 33:1093-1102.
21. Taylor, B.L. and Zhulin, I.B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63, 479-506.

**Identification and Characterization of Salt Stress-sensors in
Cyanobacterium Synechocysts sp. PCC6803.**

Koji Mikami and Iwane Suzuki

Department of Cellular Regulation, National Institute for Basic
Biology

Summary

Activation of the expression of particular genes is necessary to cellular adaptation to high salinity. As details of the mechanisms by which salt stress-dependent gene expression is regulated are missing in cyanobacteria, we have investigated sensory components involved in salt signal transduction pathways in *Synechocystis* sp. PCC6803. In the present study, we focused in the non-ionic effects of salt stress. By screening of histidine kinase mutants of *Synechocystis* by monitoring the expression of genes for RNA helicase, RNA-binding proteins and protein chaperons under osmotic stress conditions, we identified two membrane-bound histidine kinases as putative osmo-sensors. Histidine kinase 16 (Hik16) has seven transmembrane regions and an unusual GAF (cGMP-specific and stimulated phosphodiesterase, *Anabaena* adenylate cyclase, *E. coli* FhlA) domain, whereas Histidine kinase 33 (Hik33) contains two transmembrane regions, type P linker, leucine zipper and PAS (Per, Arnt, Sim and phytochromes) domain. Due to the differences in target genes and effects on cell growth, it was speculated that Hik16 and Hik33 belong to different signaling pathways. In addition, together with our previous data, Hik33 is proposed to sense osmotic stress and low-temperature stress, although Hik16 seems to be specific to osmotic stress. Furthermore, expressions of some osmotic stress-inducible genes were not regulated by Hik16 and Hik33. These findings indicate that multiple and complex pathways regulate osmostress-dependent gene expression in *Synechocystis*.