

シアノバクテリアにおけるシャペロンタンパク質遺伝子群 (*hsp* 遺伝子群) の発現制御

田中 寛

東京工業大学 科学技術創成研究院

研究の目的

シアノバクテリアは地球史上、酸素発生型光合成により地球環境を劇的に変化させ、現在に至る生物進化を方向づける役割を果たしたとされるバクテリアの大分類群である。また、植物の光合成機能もシアノバクテリアの共生に由来している。光合成明反応は光に駆動される電子伝達系であり、本来的に外環境の変化には脆弱であるが、シアノバクテリアは強力なストレス応答能力を進化させ、極めて多様な環境で繁栄してきたと考えられる。しかし、その制御機構の実体には未解明の点が多く、本研究ではこのようなシアノバクテリアのストレス耐性を支えるシャペロン遺伝子群 (*hsp* 遺伝子群) の発現調節機構の解明を目的とした。光合成の仕組みや装置はシアノバクテリアから植物まで共通であり、様々なストレスの作用にも普遍性がある。シアノバクテリアにおける制御系の解明は光合成を守る仕組みの解明につながり、光合成機能の諸応用や地球環境の維持への基盤情報を提供することが期待される。

バクテリアにおけるシャペロンタンパク質群の発現制御については、大腸菌の熱ショック応答での熱ショックシグマ因子 (σ^H) による転写活性化が最も詳細に解析されている。一方で、枯草菌に σ^H は存在せず、その代わりにプロモーターに結合する抑制因子の解除による熱ショック応答が明らかにされている。シアノバクテリアでも当初は枯草菌型の脱抑制による熱ショック応答機構が見出されたが、これは少数の遺伝子の応答にしか作用せず、本来の熱ショック応答の分子機構には不明な点が多く残されていた。このような状況で、私たちはモデルシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 株において、シアノバクテリアに普遍的に保存される二成分制御系 Hik2-Rre1 が熱ショック応答に直接関与することを見出した。即ち、レスポンスレギュレーターRre1 が熱ショック時にセンサーキナーゼ Hik2 によりリン酸化され、多くのシャペロンタンパク質遺伝子群のプロモーター領域に結合して転写を活性化していた^{文献1)}。さらに、温度の情報は Hik2 キナーゼに直接認識されるのではなく、Hik2 は熱ショックにより変化する光合成明反応系の状態、特にプラストキノンの還元状態が関わることも明らかにした^{文献2)}。本研究では、この Hik2-Rre1 に依存した熱ショック応答の理解を進めるとともに、および新しく見出された Hik2-Rre1 に依存しないシャペロン遺伝子群の転写活性化機構について解析した。

方法

解析に用いる制御標的としては、小型のシャペロンタンパク質をコードする *hspA*

遺伝子のプロモーターを主に用いた。レスポンスレギュレーターRre1 のリン酸化状態の検出はホスタグゲル電気泳動法により、DNA 結合タンパク質とプロモーターの相互作用はクロマチン免疫沈降法（ChIP）により解析した。

結果

本研究により得られた結果は以下の通りである。

1) 熱ショック応答によるシャペロン遺伝子群の発現誘導は、典型的には 30 分程度で収束して発現が基底レベルに収束する。この際、熱ショック時にクロラムフェニコール等のタンパク合成阻害剤を培地中に添加しておくこと、熱ショック誘導後の収束は起こらず誘導が持続した。これは熱ショック後に合成される何らかのタンパク質が応答を負に制御することを意味している。本研究ではこれまでの他生物での知見を参考に、Hsp70 型のシャペロン DnaK2 が負の制御因子と仮説を立てて検証実験を行った。DnaK2 を強制的に過剰発現させることのできる株を構築し、DnaK2 を過剰に発現させた状態で熱ショックを加えた場合、Rre1 のリン酸化、プロモーター領域への結合、下流 *hspA* 遺伝子発現がともに抑制された。また、AlphaFold2 による *in silico* 解析により Hik2 と DnaK2 の相互作用が示唆されることから、熱ショック誘導により蓄積した DnaK2 がセンサーキナーゼ Hik2 活性を抑制する制御モデルを構築した^{文献3)}。

2) 明反応系の光化学系 II の阻害剤 (DCMU) により、電子伝達系プラストキノンの過酸化が誘導される。この際にもシャペロン遺伝子群の転写活性化が観察されるが、ここでも Hik2-Rre1 が関与するかは不明であった。本研究でこの際の Rre1 リン酸化状態、プロモーターへの結合を解析した結果、Rre1 のリン酸化や DNA 結合は観察されないことが判明した。これはプラストキノン過酸化状態への応答には、Hik2-Rre1 と異なるシグナル伝達系が関わることを示唆する結果といえる（投稿準備中）。

3) 熱ショック応答系の解析過程で未知の温度感受性変異株を取得した。全ゲノム配列を解析した結果、*leu-tRNA* をコードする遺伝子の点突然変異を特定した。温度感受性をサプレスする変異が特定の RNA 分解酵素遺伝子にマップされたことから、高温ではこの tRNA の立体構造が変化することで分解を受け、細胞増殖が温度感受性となっていたと結論された^{文献4)}。

結論

熱ショック応答は生育環境の高温シフトに伴う一過的な応答である。これまでの研究で、我々はシアノバクテリアの熱ショック応答の誘導機構を明らかにしてきたが、本研究で熱ショック応答の収束機構が見えてきたことで、Hik2-Rre1 に依存した熱ショック応答の全体像が明らかとなった。また、二成分制御系 Hik2-Rre1 とは独立してシャペロン遺伝子群の発現誘導にはさらに別の活性化経路が示唆された。これ

らを要するに、シアノバクテリアでは様々なストレスが主に光合成明反応系の変化として認識され、複数のシグナル伝達系を介してシャペロン遺伝子群を誘導する全体像が提示された。

文献

- 1) Kobayashi, I., Watanabe, S., Kanesaki, Y., Shimada, T., Yoshikawa, H., and *Tanaka, K. (2017) Conserved two-component Hik34-Rre1 module directly activates heat-stress inducible transcription of major chaperone and other genes in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Mol. Microbiol.* **104**: 260-277.
- 2) Bairagi, N., *Tanaka, K. et al. (2022) Conserved two-component Hik2-Rre1 signaling is activated under high temperature upshift and plastoquinone-reducing conditions in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* **63**:176-188.
- 3) Hasegawa, H., Kobayashi, I., Bairagi, N., Watanabe, S., and *Tanaka, K. (2023) DnaK2 Mediates a Negative Feedback Regulation of the Heat Shock Responsive Hik2-Rre1 Two-component System in the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* **65**:120-127. (doi: 10.1093/pcp/pcad129).
- 4) Hasegawa, H., Kanesaki, Y., Watanabe, S., and *Tanaka, K. (2023) A high-temperature sensitivity of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 due to a tRNA-Leu mutation. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **69**:167-174. (doi: 10.2323/jgam.2023.03.001).
- 5) Luo, Y., Imamitsu, H., Tsurumaki, T., and *Tanaka, K. (2024) Structure of the SigF1-dependent *pilA1* gene promoter and the light activation mechanism in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. (Submitted for publication).

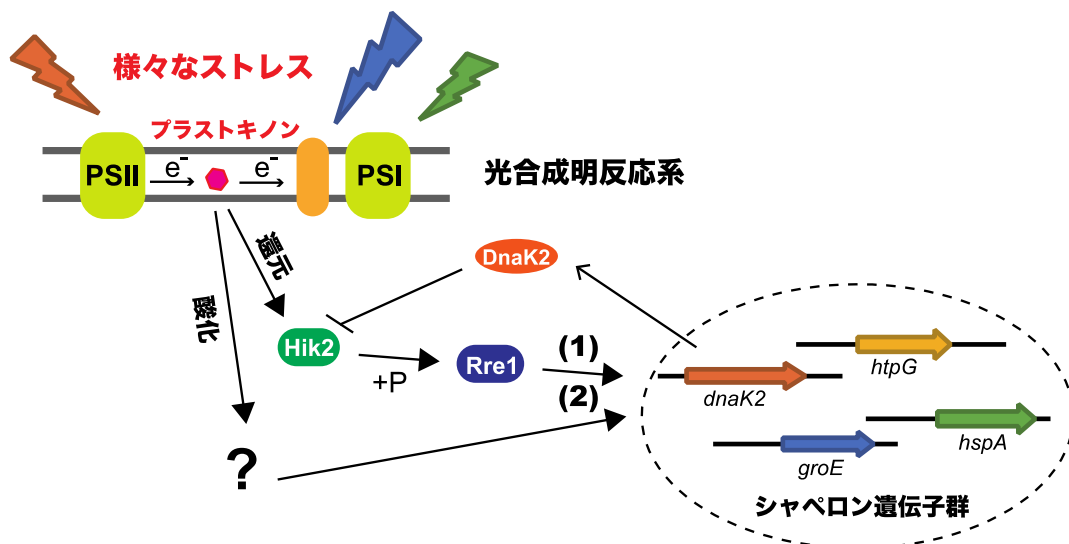


図1 様々なストレスは明反応系における電子状態の変化として認識され、少なくとも2種独立したシグナル伝達系を介してシャペロン遺伝子群の発現を調節している。