



微生物の多様な環境応答とその分子機構

名古屋大学大学院生命農学研究科 助教 金丸京子

はじめに

筆者らはこれまでに大腸菌を中心に微生物のさまざまな環境応答を詳細に解析し、その分子機構を明らかにしてきた。センサーレギュレーター間のリン酸転移を介した情報伝達機構は、大腸菌における浸透圧応答や枯草菌における胞子形成開始に機能する重要なメカニズムである。また、微生物が生育とともに菌体外に放出する低分子物質を介して環境中の菌体濃度を認識する Quorum Sensing 機構、深海環境である低温や高圧に対する応答など、微生物の巧みな環境応答機構の解析も行ってきた。本要旨においてはその中でも微生物環境応答の中心である His-Asp リン酸リレー情報伝達機構に焦点をあてた。大腸菌をはじめとする原核微生物から真核微生物の代表である糸状菌にまで研究対象を拡げ、His-Asp リン酸リレー情報伝達機構の理解を深めることに努めたので紹介する。

1. 原核微生物における二成分制御機構

微生物はさまざまな環境に適応して生育している。多細胞の真核生物とは異なり、脂質二重層の膜だけで外界と隔てられている微生物は、環境(変化)に速やかに応答し適応する遺伝子発現調節機構をもつことでどのような環境にも適応することが可能と考えられる。微生物のもつさまざまな環境応答機構の中でも、His-Asp リン酸リレー情報伝達機構は、1980年代に

次々と報告され、微生物に普遍的に存在する環境応答機構である。膜に局在して環境変化をモニターするセンサータンパク質は環境変化(シグナル)を感知すると自身の His 残基を自己リン酸化し、そのリン酸基を転写調節因子であるレスポンスレギュレーターに転移することによってシグナルを伝達する。リン酸基を受け取ったレスポンスレギュレーターは目的遺伝子の転写を活性化する(図1左)。全塩基配列の決定した大腸菌には30種類ほどのセンサー/レギュレーターのペアが存在すると推定されており、すなわち、30種類もの環境変化に応答することができるといえる。

それら His-Asp リン酸リレー情報伝達機構(当時は、センサーとレスポンスレギュレーターの二つの制御因子からなる機構のために二成分制御機構と呼ばれた)の中でも浸透圧センサー EnvZ とレスポンスレギュレーター OmpR の情報伝達メカニズムは、培地浸透圧に応答した大腸菌外膜タンパク質 OmpF, OmpC の発現調節機構として詳細に解析され、His-Asp リン酸転移を介した情報伝達機構のモデルシステムとなった。特に筆者らは、転写因子 OmpR が内膜浸透圧センサー EnvZ により N 末端側ドメインがリン酸化されると中央部領域を介した多量体化が促進され、C 末端側 DNA 結合ドメインの DNA 結合能が上昇することを明らかにした。カリウムイオ

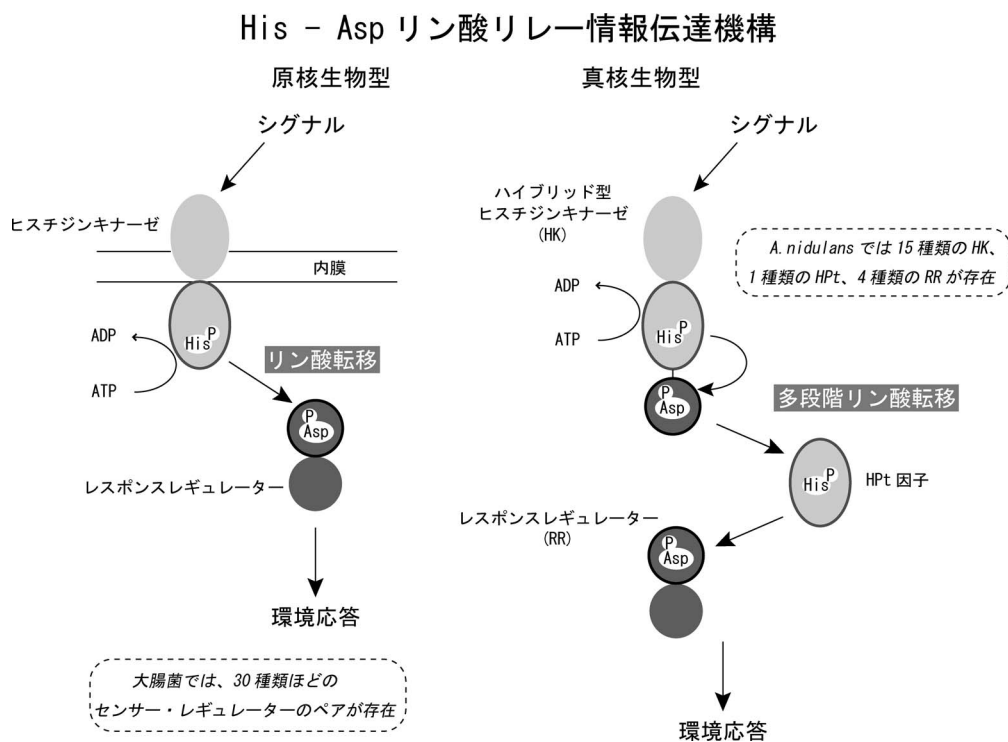


図1 リン酸リレー情報伝達の基本機構

大腸菌をはじめ、原核生物における典型的な二成分間のリン酸リレー系(左)と糸状菌をはじめ、真核生物に見られる多段階リン酸リレー情報伝達系(右)

ン輸送を行う P 型 ATPase (KdpABC 複合体) をコードするオペロンの浸透圧に反応した誘導を担う KdpD-KdpE に関しては、内膜センサー KdpD の環境シグナル受容様式、KdpD と転写因子 KdpE 間のリン酸転移反応、リン酸化依存的な KdpE の活性化を証明した。なかでもリボソームを用いて再構成した KdpD が、*in vitro* で浸透圧に反応して KdpE をリン酸化することを示した結果は、浸透圧という物理的環境シグナルがセンサータンパク質 KdpD の膜領域を介して認識されることを示唆した。

グラム陽性菌である枯草菌の孢子形成は、二成分制御系を基本とする多段階 His-Asp リン酸リレーにより制御されている。栄養源が枯渇すると枯草菌は孢子形成を開始するが、その初期段階で重要なセンサータンパク質 KinA は自身の His 残基の自己リン酸化後、リン酸基を SpoOF (Asp 残基)、SpoOB (His 残基)、SpoOA (Asp 残基) へと伝達し下流遺伝子の発現を制御する。筆者らは特に KinA の部分欠損変異株を作製することにより、シグナル感知に重要な領域の同定など構造的機能解析を行った。また、リン酸化 SpoOF を脱リン酸化する Rap ホスファターゼの活性を抑制するペプチドを特異的に分解するプロテアーゼを新たに同定し、枯草菌孢子形成におけるリン酸転移反応が複数の因子によってより複雑に制御されていることを明らかにした。

2. 真核生物型 His-Asp リン酸リレー機構

原核生物にしか存在しないと考えられていた His-Asp リン酸リレー情報伝達機構も、現在では酵母、カビ、植物などの真核生物に広く存在し、浸透圧応答や酸化ストレス応答、植物ホルモンに対する応答など重要な環境応答に機能していることが明らかになってきた。しかしながら、真核生物における His-Asp リン酸リレーを構成する因子は、原核生物と構造上大きな相違がある (図 1 右)。真核生物型のセンサータンパク質は自己リン酸化するドメインに加え、レスポンスレギュレーターのリニ酸基受容ドメインをその C 末端部分にもつハイブリッド型ヒスチジンキナーゼである。さらにセンサータンパク質と、別に存在するレスポンスレギュレーターの間には、リン酸基転移中間因子として HPt 因子が存在し、結果的に多段階のリニ酸リレーを行うことによって情報が伝達される。

このような真核生物の His-Asp リン酸リレー機構は、これまでに、モデル真核微生物である出芽酵母を中心に研究が進められてきた。出芽酵母では、唯一存在するセンサータンパク質 Sln1 が、浸透圧に反応して下流の HPt 因子 (Ypd1)、レスポンスレギュレーター (Ssk1) へとリン酸基シグナルを伝達し、さらに MAPK カスケードを介して下流遺伝子の発現を調節する。一方、筆者らが研究対象としている糸状菌 *Aspergillus nidulans* においては、ハイブリッド型ヒスチジンキナーゼが 15 種類存在し、His-Asp リン酸リレー系が環境応答のみならず、*A. nidulans* の栄養増殖、無性生殖、有性生殖など生育や分化にも関与することが考えられている。さらに、センサータンパク質とレスポンスレギュレーターがペアで存在している原核生物やセンサー、HPt、レスポンスレギュレーターがそれぞれ複数存在する他の真核生物と異なり、*A. nidulans* には、センサー 15 種類に対して、HPt 因子は 1 種類、レスポンスレギュレーターは 4 種類しかゲノム配列上存在しない。*A. nidulans*

の情報伝達機構では、これらリン酸リレー因子が生育段階特異的、器官特異的に発現し機能することによって数のアンバランスさを補い、その結果複雑なリン酸リレーのネットワークを形成して環境に適応すると考えられる。

そこで、筆者らはそれぞれの因子が生育段階に応じどのような発現 (様式および量) を示すかを Real Time PCR を用いて解析し、また各因子のプロモーターと *gfp* との融合遺伝子を野生株に導入し各因子の発現部位を観察した。その結果、15 種類のヒスチジンキナーゼはそれぞれ発現時期および量においてさまざまであり、異なる環境応答に機能することが示唆された。ゲノム配列上 1 種類しか存在しないリン酸基転移中間因子 HPt はどの生育時期においても十分な発現量を示し、15 種類のヒスチジンキナーゼすべてから情報 (リン酸基シグナル) を受容することが可能であると推定された。四つのレスポンスレギュレーターにおいてもそれぞれ異なる発現時期、量を示し、*A. nidulans* においては、リン酸リレー因子の数のアンバランスさが発現レベルで補われていることが明らかになった。現在、発現に特徴の認められた因子について、その破壊株を作製し機能解析を行うとともに、下流情報伝達経路の解明などを目指している。最も解析の進んでいるヒスチジンキナーゼ HK6 (NikA) については、NikA を介した農薬に対する応答機構や生育への影響に関して理解を深め、NikA の機能的な重要性を明らかにしている。

おわりに

地球上の生物は、細菌やウイルスを除けばすべて真核生物に属し、動物、植物、原生動物、菌類 (カビなど) に分類される。この中でカビ (糸状菌) は、現在知られているだけでも約 7 万種を擁する巨大な微生物群であり、その多くは腐生菌として自然環境中に広く棲息している。カビはあらゆる地球上の環境に適応してさまざまな分解酵素を分泌し、物質循環や環境汚染物質の分解除去にも重要な役割を果たしている。本研究の His-Asp リン酸リレーを介した複雑な環境応答機構を統一的に理解することで、このような糸状菌のもつ無限大とも思える潜在能力を最大限に引き出し、高度利用につなげたいと考えている。

本研究“微生物の多様な環境応答とその分子機構”は、名古屋大学大学院農学研究科において学位取得のために行われた“大腸菌における浸透圧に反応した情報伝達機構”で始まり、海洋科学技術センターにおける“深海環境 (高圧、低温) 応答”、Scripps 研究所での“枯草菌孢子形成における情報伝達機構”、東京大学医科学研究所における“腸管出血性大腸菌 O157:H7 の Quorum Sensing 機構”、および現在所属する名古屋大学大学院生命農学研究科での“糸状菌 *Aspergillus nidulans* における His-Asp リン酸リレー情報伝達機構”へと展開された研究を含む。各研究機関において、研究の機会を与えていただき、ご指導ご鞭撻を賜りました。諸先生ならびに同僚の皆様へ深く感謝いたします。特に、恩師である水野 猛先生には、大学院在籍時から終始絶え間ないご助言、ご助力をいただき、心より御礼申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦いただきました日本農芸化学会中部支部長、前島正義先生の細やかなお心遣いならびに学会の諸先生のご支援に厚くお礼申し上げます。