

培地中の Mn 欠乏がラン藻のアルカリフォスファターゼの発現に与える影響の解析

西本 謙太郎 (筑波大学 生物学類)

指導教員：鈴木 石根 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

生物は常に外界の環境変化に曝されて生育している。光や温度、栄養塩濃度の変化など様々な環境変化をいち早く検知し、適応することは生物にとって重要な生存戦略である。細菌や真菌、高等植物は、環境シグナルの検知・伝達のため二成分制御系という機構をもつ。二成分制御系は、環境変化を検知するセンサータンパク質のヒスチジンキナーゼ (Hik) と、Hik からリン酸化を受け遺伝子発現の調節を行う転写因子のレスポンスレギュレーター (Rre) の 2 つのタンパク質で構成される。

私は光合成生物の金属の利用機構に興味を持っている。中でも Mn は、光化学系 II の反応中心やスーパーオキシドディスムターゼなどの補因子として働き、それらのタンパク質の活性に必須な金属である。ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 は、Mn 充足条件では Hik の ManS が Rre の ManR をリン酸化し、Mn トランスポーターオペロン (*mntCAB*) の発現を抑制する。一方、Mn 欠乏条件では、脱リン酸化型 ManR が *mntCAB* オペロンを発現する [1]。しかしながら、ManS がどのような分子機構で培地中の Mn イオン濃度を検知しているのかは明らかでなく、細胞内 Mn 濃度の恒常性維持の機構に興味を持ち研究を行った。Hik は N 末端側のシグナル検知ドメインと C 末端側のキナーゼドメインの 2 つのドメインからなり、Hik のシグナル検知ドメインを、別の Hik のものと入れ替えても機能すること [2] から、ManS シグナル検知ドメインを、リン酸欠乏応答性 Hik である SphS のシグナル検知ドメインと置換した ManS-SphS キメラセンサーを *Synechocystis* に発現させた。SphS が本来制御するアルカリフォスファターゼ (AP) 活性をレポーターにして ManS の Mn 応答性を評価することにした。その過程で Mn 存在量が SphS の活性に何らかの影響を及ぼすことを見出したので、その原因について解析することとした。

材料と方法

ManS シグナル検知ドメインと SphS キナーゼドメインを繋げた ManS-SphS キメラセンサー遺伝子を、SphS の ORF と置換する形で *Synechocystis* に導入し、SphS のプロモータから発現させた。ネイティブな ManS は Mn の存在下でシグナル伝達が止まるネガティブセンサーであるため、ManS-SphS を発現する株は通常培養 (Mn 充足) 条件下では AP 活性があり、Mn 欠乏条件に移すと AP 活性が減少すると予想した。通常培養した細胞を、Mn 欠乏培地に移し 24 時間後の AP 活性を計測した。また野生株 (WT) と、 Δ PAS 株と呼ばれる常に AP 活性を有する変異株の 2 株をコントロールとして用いて比較した。

結果・考察

ManS-SphS キメラセンサーを発現する株は、通常培養条件下で高い AP 活性 (1.4 μmol PNP/mg Chl/min) を示した。ManS は Mn 存在下で ManR をリン酸化するため、ManS-SphS は下流の SphR をリン酸化し、AP を発現させたと考えられた。先行

研究で作製された SphS の PAS ドメインを欠損した変異株 (Δ PAS 株) は、構成的に活性型となり、リン酸濃度に関わらず高い AP 活性を示すが、両者の AP 活性は同程度であった。 Δ PAS 株、ManS-SphS 発現株を Mn 欠乏培地で培養した結果、ともに通常培養に比べて約 3~4 倍高い AP 活性が誘導された。それに対して、WT では Mn 濃度に関わらず AP 活性はほとんど観察されなかった。コントロールである Δ PAS 株でも Mn 欠乏下で AP 活性が上昇したことから、Mn 欠乏と AP の関係について何らかの関連が考えられた。その理由を解決するため、いくつかの仮説を立て実験を行った。

酵素反応液中の Mn 濃度を変化させる実験

まず AP 活性の上昇が、細胞のシグナル伝達の結果ではなく、AP 酵素タンパク質そのものが、反応液中の Mn により活性が抑制されているという仮説を立てた。そこで WT、 Δ PAS 株、ManS-SphS 発現株を通常培養条件下で培養し、AP 活性測定時の反応液に含まれる Mn 濃度を 0、0.1、1、5、10 (コントロール)、100 μM と変化させた。その結果、どの Mn 濃度においても AP 活性はほとんど変化しなかったため、この仮説は否定された。

Mn 欠乏時のクロロフィル量の変化

次に Mn 欠乏状態が細胞にとってストレスとなり、細胞あたりの Chl 量が減少してしまったという仮説を立てた。AP 活性の値は Chl 量で補正して求めるため、Chl 量が減ると結果として AP 活性は高く見積られる。そこで通常培地と Mn 欠乏培地で 24 時間培養した細胞の Chl 量と濁度 (OD₇₃₀) を比較した。結果、Mn 欠乏に曝しても細胞の Chl 量と濁度は、通常培養に比べて変化しなかった。

Mn 欠乏とリン酸欠乏による AP 活性の上昇

次に WT のみを用いて実験を行った。WT を Mn 欠乏培地、リン酸欠乏培地、Mn/リン酸欠乏培地の 3 つの条件でそれぞれ培養した後の AP 活性を比較した。その結果、リン酸欠乏、Mn/リン酸欠乏条件の 2 つでのみ AP 活性が観察され、Mn/リン酸欠乏条件での活性は、リン酸欠乏での活性に比べて約 5 倍大きくなった。これらの実験から、Mn 欠乏は、AP 酵素自身ではなく既存の SphS-SphR シグナル伝達経路に影響を与えること、その結果、Mn 欠乏条件では AP 活性の上昇が引き起こされることが示唆された。SphS のシグナル伝達系は通常培養条件下では働かないため、WT では Mn 欠乏のみでは AP 活性は観察されないと考えられる。今後は、AP をコードする遺伝子の mRNA 量の変化を調べるなどして、なぜ Mn 欠乏で AP 活性が上昇するのか、その原因を絞り込みたい。

参考文献

- [1] Yamaguchi et al. (2002) *Plant Cell*, 14: 2901–2913
- [2] Kimura et al. (2009) *Microbiol*, 155: 2256–2264