

の発展に寄与できる知見であることは一目瞭然である。

以上から、従来1種4遺伝的集団であると考えられていた本種が、実際には4種からなる複合種群であることが分かり、内2種は未記載種であることが分類学的に整理された。本結果はドイツの学術誌から公表されており、北日本集団は *O. sakaizumii* としてすでに分類され、*O. sp.* も新種として記載する準備中である。本研究の結果から推定された本種群内の類縁関係からも、従来日本に分布していた2種は単系統群であると考えられてきた報告と違い、側系統群である可能性が示唆され、これからの系統分類学的研究の発展に大いに期待できる。

以上から、本論文は分類学上、必要不可欠な形態学的情報を多く蓄積しているだけでなく、メダカ種群の起源を解明するうえで、系統分類学上きわめて重要な知見を含んでいる。このように本論文の内容は、本学大学院農学研究科博士課程の基準を超えることはもとより、学術研究においてもきわめて発展性のある課題と言える。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえで、平成25年2月8日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。

氏名	石井英治
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	農第188号
学位授与の日付	平成25年3月22日
学位授与の要件	学位規程第5条該当
学位論文題目	Studies on the activation mechanism of PhoQ/ PhoP signal transduction by the connector SafA in <i>Escherichia coli</i> (コネクター SafA による PhoQ/PhoP 細菌情報伝 達の活性化機構に関する研究)
論文審査委員（主査）	教授 内海 龍太郎
	（副主査） 教授 深溝 慶
	（副主査） 教授 川崎 努

## 論文内容の要旨

細菌情報ネットワークの分子機構を理解するために、SafAのPhoQ/PhoP系の活性化機構の解明は重要である。本研究において、最初にコネクターSafAによるPhoQ/PhoPの活性化の情報伝達の分子機構の詳細を明らかにするために、大腸菌細胞を用いた*in vivo*解析およびSPR法やNMR法を用いた*in vitro*解析研究を行った。その後、大腸菌細胞膜を用いて*in vitro* PhoQ/PhoP情報伝達システムを構築し、SafAによる活性化機構を明らかにした。

コネクターSafAによるPhoQ/PhoP情報伝達の活性化機構

## 1. SafA(41-65)によるPhoQの活性化(主論文2)

SafAは、内膜一回貫通型のC末端側をペリプラズムに位置する65aaからなる膜タンパク質であり、同じ内膜タンパク質で二成分制御系のHKであるPhoQに作用しPhoQ/PhoP系を活性化している。一方、PhoQは、ペリプラズムに位置するセンサー領域で二価の陽イオンやCAMPsに応答し遺伝子発現制御を行っている。このことから、SafAもそのペリプラズムでこのセンサー領域に作用しPhoQを活性化しているのではないかと考えた。そこで、SafAの細胞質領域、ペリプラズム領域をそれぞれ断片し、SafAがPhoQ/PhoPの活性化にどのような影響を与えるか検討したところ、ペリプラズム領域に位置する領域を欠損させたSafA変異体において、PhoQ/PhoP系の活性化が見られなかった。更に、ペリプラズム領域であるSafA(41-65)を菌体内からペリプラズムへ分泌した時や、SafA(41-65)の合成ペプチドを、外膜透過性を向上させたPhoQ/PhoPのレポーター株の培養液に添加した時、PhoQ/PhoP系の活性化がみられた。これらのことから、SafAがPhoQを活性化する領域はペリプラズムに位置すること、またその活性化はペリプラズムの領域で十分であることが明らかとなった。前述したようにPhoQのペリプラズム部位には、環境シグナルとして複数の因子の報告がある。特に、PhoQを不活性化する二価の陽イオンやそれらと競合して活性化する陽イオン性抗菌ペプチドは、PhoQのペリプラズムに位置する酸性アミノ酸のクラスターに結合し制御を行っていることが報告されている。また、PhoQ/PhoPの負のフィードバック制御因子として膜タンパク質MgrBもまたPhoQのペリプラズムに働いているという報告がなされている。そこで、これまで知られているPhoQのペリプラズム領域におけるリガンドとSafAがPhoQの活性においてどのような競争関係にあるのかを調べた結果、SafAはどのリガンドとも競合せず、独立的にPhoQを活性化していることが明らかになった。さらに、NMR法(nuclear magnetic resonance)を用い、SafA(41-65)ペプチドとMg<sup>2+</sup>によるPhoQ(43-190)の構造変化の違いを異種核二次元<sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H-HSQCスペクトルにより解析し、比較をおこなった。その結果、SafA(41-65)ペプチド添加時では、Mg<sup>2+</sup>添加時で起きたものとは異なるケミカルシフトや新たなピークが見られた。このことは、SafA(41-65)ペプチドが、PhoQ(43-190)に直接的に結合し、構造変化を起こしていることを示し、また、SafA(41-65)ペプチド添加時のピークの出方やケミカルシフトがMg<sup>2+</sup>添加時とは異なることから、SafA(41-65)ペプチドはMg<sup>2+</sup>が結合した時とは異なる構造変化を引き起こしていることが示唆された。

## 2. SafAとPhoQの複合体形成に必須なアミノ酸解析(主論文2)

SafAとPhoQが、相互作用する時にどのアミノ酸が関わり、またそれらのアミノ酸が2分子間の相互作用にどのような役割を担っているかを調べた。まず、SafAペリプラズム領域の極性アミノ酸のアラニン置換体を用いてSafA変異体によるPhoQの活性化が見られなくなる変異体の探索を行った。その結果、53番目のArgを筆頭にいくつかのアミノ酸置換体でSafAによるPhoQ/PhoP系の活性化が低下し、それらのアミノ酸がPhoQの活性化に重要であることが明らかとなった。更に、PhoQの活性化に重要であるPhoQアミノ酸残基の変異体を作成し、SafAによる変異体PhoQの活性化について調べたところ、PhoQのダイマー形成に重要とされるD179の変異体においてSafAによるPhoQ活性化能が低下した。これは、二価の陽イオンや陽イオン性抗菌ペプチドが結合する酸性クラスターとは異なる場所であり、この結果は競合実験の結果を支持した。また、得られたSafA及びPhoQの変異体が、PhoQ-SafA間の相互作用にどのような役割を担っているのかをSPR法(surface plasmon resonance)により調べた。その結果、野生型のPhoQセンサードメイン(41-193)は、SafA(41-65)合成ペプチド添加時に特異的な結合が見られ、その結合は一度結合すると離れにくい結合様式を示した。それに対して、細胞質領域に位置するSafA(1-17)-Cys添加時には結合の反応は見られなかった。更に、SafA変異体、R53Aの合成ペプチドSafA(41-65)R53A添加時において、そのセンサーグラムの形状が箱状となり結合してもすぐに解離する結合様式を示した。同様に、SafAによる活性化が起きにくくなるPhoQ変異体D179Rのセンサー領域(41-193)とSafA(41-65)間での結合様式を測定したところ、野生型のPhoQセンサードメイン(41-193)に比べて解離が起きやすくなっていることが明らかとなった。これらの結果は、SafA(41-65)領域がPhoQのセンサー領域と直接結合していることを示し、また、SafA R53やPhoQ D179残基が、相互作用後のPhoQ(41-193)とSafA(41-65)の複合体の安定性に寄与していることが示唆された。

## 3 PhoQ/PhoP情報伝達の活性化機構の解析(主論文1)

SafAが、PhoQ/PhoP系を活性化し、その制御下の遺伝子発現を増大させていることから、SafAが作用することにより、菌体内におけるリン酸化PhoP量が増大していることが考えられる。そこで、Phos-tag systemを用い、SafA存在時と非存在時の菌体内におけるリン酸化PhoP量の変化を検出し、その比較を行った。その結果、SafA存在時におけるリン酸化PhoPのバンドが確認でき、SafA非存在時よりもリン酸化PhoPの蓄積が確認できた。このようなPhos-tag assayは、大腸菌の他の二成分制御系PhoR/PhoBで同様な実験が行われており、PhoR/PhoBの活性化条件であるリン酸枯渇化において、*in vivo*でのリン酸化PhoBの蓄積が起きていることが報告されている(Berbier Analytic. Biochem. 2008)。このことから、PhoQ/PhoP系においてもSafAによるPhoQ/PhoP系の活性化が菌体内でのリン酸化PhoPの増大に依存していることを示している。

ヒスチジンキナーゼは、(i)自己リン酸化、(ii)リン酸基転移、(iii)RRの脱リン酸化の3つの機能活性をもつことが知られている。PhoQは、ペリプラズムに位置する酸性クラスターにMg<sup>2+</sup>が結合することでPhoQによるPhoPの脱リン酸化活性の促進が起き、PhoQ/PhoP系を不活性化していることが知られている。一方、我々はSafAがMg<sup>2+</sup>と独立的に働き、PhoQ/PhoP系を活性化していることをここまで明らかにしてきたことから、SafAによるPhoQの活性に与える影響もまたMg<sup>2+</sup>と異なるのではないかと考えた。そこで、PhoQもしくはPhoQとSafAを共発現した大腸菌菌膜画分を調製し、放射性同位体[γ-32P]-ATP存在下で、自己リン酸化、PhoPへのリン酸基転移、リン酸化PhoPへの脱リン酸化能の比較を行った。その結果、自己リン酸化において

SafA存在下の膜では、自己リン酸化活性が2倍程度増大していることが認められた。更にリン酸基転移においてもPhoQのリン酸化バンドが強くなり、2倍以上のリン酸化PhoP量の増大が見られた。しかしながら、二つの膜によるリン酸化PhoPの脱リン酸化様式に違いは見られなかった。これらの結果から、SafAがPhoQの自己リン酸化を促進していることが示唆された。また、これまでPhoQにおけるMg<sup>2+</sup>の作用として、PhoQの脱リン酸化能を促進しPhoQ/PhoP系を抑制することが知られていたが、SafAはそれとは異なる作用をしていることが示唆された。

細菌には、ヒトなどの高等生物にはみられない二成分制御系(Two-component signal transduction systems, TCSs)と呼ばれる環境応答機構が存在し、環境からのストレスを感知するヒスチジinkinナーゼ(HK)と遺伝子発現を制御するレスポンスレギュレーター(RR)から構成される。一般的にセンサータンパク質であるHKが、ストレスシグナルを感知し、ATP依存的にHis残基がリン酸化される。リン酸化されたHKは、対となるRRのAsp残基にリン酸基を転移し、リン酸化されたRRは二量体を形成することでその標的遺伝子の転写を制御する。細菌は、これらを複数組持つことで環境からの種々のストレスに応答し、様々な環境での生育が可能となる。近年のゲノムレベルでの網羅的なトランスクリプトーム解析により、これまでの単純なHKからRRへのリン酸基の受け渡しでは説明できない遺伝子発現プロファイルが得られ、実際、二成分制御系間でのクロストークなどを介したより高次の情報伝達が存在している。このようなネットワークの調節タンパク質としてHKやRRに作用することで、情報伝達の出力の強さや方向を変える修飾タンパク質の存在が知られている。修飾タンパク質SafAは、大腸菌二成分制御系 PhoQ(HK)に作用し、PhoQ/PhoP系を活性化する膜タンパク質として見出された(江口らPNAS, 2007)。SafAは、別の二成分制御系であり、酸耐性に関わる二成分制御系EvgS/EvgAにより正に転写制御され、EvgSのシグナルである低pH時に発現し、PhoQ/PhoP系を活性化することで、2種の異なるTCSをつなぎ、大腸菌の酸耐性遺伝子発現ネットワークの要となるコネクターとしても働いている(江口、石井ら、J.Bac. 2011, 関連論文2)。細菌情報ネットワークの分子機構を理解するために、SafAのPhoQ/PhoP系の活性化機構の解明は重要である。本研究において、最初にコネクターSafAによるPhoQ/PhoPの活性化の情報伝達の分子機構の詳細を明らかにするために、大腸菌細胞を用いた*in vivo*解析およびSPR法やNMR法を用いた*in vitro*解析研究を行った。その後、大腸菌細胞膜を用いて*in vitro* PhoQ/PhoP情報伝達システムを構築し、SafAによる活性化機構を明らかにした。その結果は、2種の主論文(第一著者)として報告した。

1. SafAによるPhoQの活性化は、SafAのペリプラズム領域SafA(41-65aa)を必要とし、その作用はPhoQセンサー領域に作用するどのリガンドとも独立的に働く。(主論文2)
2. ペリプラズム領域におけるSafAとPhoQの相互作用は、直接的な結合をしており、その複合体は安定である。また、SafA R53とPhoQ D179はSafA-PhoQ複合体の形成に大きく寄与している。(主論文2)
3. SafAが存在することで、PhoQの自己リン酸化活性が増大し、その結果、リン酸化PhoP量の増大が起きた。この活性の変化は、同じペリプラズムに作用するMg<sup>2+</sup>とは異なる様式であった。(主論文1)

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査に当たっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成25年2月8日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。