

令和元年8月30日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08798

研究課題名(和文) クリプティックな二成分制御系ヒスチジンキナーゼを介したシグナル伝達ネットワーク

研究課題名(英文) Non-canonical signaling networks mediated by an orphan two-component system histidine kinase in *Vibrio cholerae*

研究代表者

山本 章治 (Shouji, Yamamoto)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：80469957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、コレラ菌のキチン応答性二成分制御系ヒスチジンキナーゼChiSを介した非典型的なシグナルネットワークの形成機構を解明するために行い、特に、糖の取り込みに関わる細胞内シグナル伝達系PTSのChiSに対する干渉作用について遺伝学的に解析した。その結果、1) 脱リン酸化型のPTS酵素EIIAGlcがChiSのシグナル伝達を阻害すること、2) EIIAGlcによる阻害は、細胞内cAMPレベルの低下によって引き起こされる古典的なカタボライト抑制とは別の機構によって行われることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、キチンの応答に関わる二成分制御系と一般的な糖の取り込みに関わるPTS制御系という異なるタイプのシグナル伝達系が相互作用し、PTS側が二成分制御系側に干渉することを明らかにした。この成果は、細菌におけるシグナル伝達ネットワークの形成様式について新しい知見を提供するとともに、コレラ菌の感染を制御する技術の発展にも繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：This study was done to understand how phosphoenolpyruvate:phosphotransferase system (PTS) interferes with chitin-activated signaling pathways initiated by the orphan two-component system histidine kinase ChiS in *Vibrio cholerae*. The results indicated that: 1) dephosphorylated EIIAGlc of the PTS inhibits ChiS-mediated signaling, 2) this inhibition is independent of classical catabolite repression that is caused by lowered levels of cyclic AMP.

研究分野：細菌学

キーワード：二成分制御系、オルファンヒスチジンキナーゼ、非二成分制御系、PTS、シグナル伝達ネットワーク、コレラ菌、キチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

二成分制御系はヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレーターから成るリン酸基転移を介したシグナル伝達系の一種であり、細菌が外部環境を認識して遺伝子発現を制御する上で主要な役割を担う。特定の外部刺激を感知したヒスチジンキナーゼは自己リン酸化し、そのリン酸基をレスポンスレギュレーターに受け渡す。リン酸化されたレスポンスレギュレーターは標的遺伝子のプロモーターに結合し、その転写を活性化する。コレラ菌のキチン応答性ヒスチジンキナーゼである ChiS は、キチンの取り込み・代謝を担う遺伝子群と DNA コンピテンスに関わる遺伝子群を含む 40 個以上の遺伝子の発現を支配しているものの、対応するレスポンスレギュレーターが同定されていない所謂“オルファン型”に属する。研究代表者らのこれまでの研究により、ChiS を介したシグナル伝達は、従来までのドグマから逸脱していることが判明している。例えば、ChiS はレスポンスレギュレーターではなく非二成分制御系の転写制御因子 TfoS を介して働いており、その過程でヒスチジンキナーゼ間で保存されたリン酸基転移に関わるアミノ酸残基を必要としない。また、ChiS のシグナル伝達は、糖の取り込みに関わるリン酸基転移系 PTS を介して細胞内から調節されていることも明らかになりつつある。

2. 研究の目的

本研究は、1) ChiS による TfoS の制御機構、2) ChiS のリン酸基転移活性に依存したシグナル経路、および 3) PTS の ChiS に対する干渉機構を明らかにし、二成分制御系ヒスチジンキナーゼのシグナルネットワーク形成能について新しい知見を得ることを目的として行われた。

3. 研究の方法

1) ChiS による TfoS の制御機構

ChiS は TfoS の活性を調節することが遺伝学的な解析から示唆されていたものの、両者の直接的な相互作用については実証されていない。そこで ChiS と TfoS の *in vivo* での相互作用について two-hybrid 系とプルダウン法を用いて解析した。

2) ChiS のリン酸基転移活性に依存したシグナル経路

ChiS (1129 残基) の N 末端側 37-356 残基はペリプラズム側に露出しており、センサードメインを有する。一方、C 末端側 375-1129 残基は細胞質側を向いており、ヒスチジンキナーゼドメイン (457-523 残基)、ATPase ドメイン (578-680 残基) およびリン酸基受容ドメイン (725-839 残基) が含まれる。このうち、リン酸基の転移に関わるヒスチジンキナーゼ間で保存されたアミノ酸残基 His469 と Asp772 は、少なくともキチンの取り込み・代謝を担う遺伝子群と DNA コンピテンスに関わる遺伝子群の発現には影響を与えない。主要ドメインのシグナル伝達における役割を詳細に把握するために、キチン存在下で培養した野生株、*chiS* 欠失株、*chiS*^{G617A, G619A, G647A, G649A} 株 (ATP 結合部位の変異) および *chiS*^{H469A, D772A} 株 (リン酸基転移部位の変異) から抽出した RNA を用いて RNA-seq を行なった。

3) PTS の ChiS に対する干渉機構

E^{A^{61c}} は PTS を構成する酵素の 1 つであり、グルコースの取り込みを担うだけでなく、リン酸化の状態に依存して様々なプロセスを制御している。例えば、リン酸化型 E^{A^{61c}} はアデニル酸シクラーゼに作用して cAMP の合成を促進する。cAMP は転写制御因子 CRP と複合体を形成し、多数の遺伝子の発現を活性化する。PTS がグルコースを取り込む過程で生成される脱リン酸化型 E^{A^{61c}} は、アデニル酸シクラーゼの活性化能を持たない。そのためグルコース存在下では、cAMP-CRP レギュロンが抑制される現象、所謂“カタボライト抑制”が起こる。研究代表者は、脱リン酸化型 E^{A^{61c}} が ChiS のシグナル伝達を阻害することを既に見出ししており、本研究ではグルコースがその現象の引き金になっている可能性について発現レポーター系を用いて検討した。

4. 研究成果

1) ChiS による TfoS の制御機構

ChiS と TfoS の *in vivo* での相互作用について two-hybrid 系とプルダウン法を用いて解析したところ、いずれの実験系においても ChiS と TfoS の相互作用を検出することはできなかった。

2) ChiS のリン酸基転移活性に依存したシグナル経路

RNA-seq 解析を行い、*chiS*^{H469A, D772A} 株は野生株と変わらない遺伝子発現プロファイルを示し、二成分制御系に典型的な His-Asp リン酸基転移は ChiS によるシグナル伝達には関与しないことを確認した。これに対して、*chiS*^{G617A, G619A, G647A, G649A} 株は、*chiS* 欠失株と同様なプロファイルを示したことから、少なくとも自己リン酸化に関わる ATP 結合部位は ChiS のシグナル伝達に必要なとされることがわかった。シグナリングのメカニズムを理解するためには、さらに多くの変異体を用いて実験を行うとともに、精製蛋白質を用いた *in vitro*

での解析を行う必要があるだろう。

3) PTS の ChiS に対する干渉機構

グルコースが存在すると ChiS レギュロンの発現レベルが半分程度まで低下し、E^{A61c} 欠損下ではその阻害効果が抑圧された。なお、グルコース/E^{A61c}による ChiS レギュロンの発現阻害は、過剰量の cAMP を添加しても抑圧されなかったことから、細胞内 cAMP レベルの低下によって引き起こされる古典的なカタボライト抑制とは別の機構によって行われることが示唆された。以上のことから、グルコースの取り込み E^{A61c}の脱リン酸化 ChiS 活性の阻害という一連のカスケードが提案される。今後はこの仮説を証明するために、E^{A61c}と ChiS の相互作用を調べる必要がある。

本研究は、PTS が二成分制御系に対して干渉作用を示すことを初めて明らかにしたものであり、細菌におけるシグナルネットワークの形成機構について新しい知見をもたらした。本研究を機に、病原細菌におけるシグナルネットワークの相互作用に着目した基礎研究のさらなる推進とともに、その成果を利用した応用研究へ展開が期待される。

なお、本研究に関連して、実験に使用したコレラ菌株 V060002 の完全長ゲノム配列を決定した。この株では2本の染色体の間で相同組換えが起こり、1本の染色体を形成していた。このことから、コレラ菌の染色体数は必ずしも2本と決まっておらず、変動している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Ogawa M, Matsuda R, Takada N, Tomokiyo M, Yamamoto S, Shizukusihi S, Yamaji T, Yoshikawa Y, Yoshida M, Tanida I, Koike M, Murai M, Morita H, Takeyama H, Ryo A, Guan JL, Yamamoto M, Inoue JI, Yanagawa T, Fukuda M, Kawabe H, Ohnishi M. Molecular mechanisms of *Streptococcus pneumoniae*-targeted autophagy via pneumolysin, Golgi-resident Rab41, and Nedd4-1-mediated K63-linked ubiquitination. *Cellular Microbiology* 20(8) e12846 2018年8月
2. Yamamoto S, Lee KI, Morita M, Arakawa E, Izumiya H, Ohnishi M. Single Circular Chromosome Identified from the Genome Sequence of the *Vibrio cholerae* O1 bv. El Tor Ogawa Strain V060002. *Genome Announcements* 6(25) 2018年6月
3. Yamamoto S, Ohnishi M. Glucose-Specific Enzyme IIA of the Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System Modulates Chitin Signaling Pathways in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* 199(18) 2017年9月

〔学会発表〕(計 1 件)

山本章治 Regulation of natural competence by PTS in *Vibrio cholerae*. 第90回日本細菌学会総会, 2017年3月, 仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

Vibrio cholerae V060002 DNA, complete genome
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AP018677.1>): 1本の染色体を持つコレラ菌株
V060002の完全長ゲノム配列をGenBankに登録した。

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。