

令和元年6月5日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18670

研究課題名(和文)ラン藻のバイオフィーム形成誘導におけるシグナル分子生合成制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of signaling molecules synthesis in biofilm formation in *Synechocystis*

研究代表者

解良 康太 (Kera, Kota)

東北大学・工学研究科・助教

研究者番号：30644546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラン藻の塩ストレス誘導性バイオフィーム形成に関わるシグナル分子としてc-di-GMPとポリアミンに着目して、生合成酵素の解析を行った。ポリアミン合成酵素の解析では、合成経路の最初の段階のAdc1、Adc2、およびその次の段階のAuh1、Auh2を解析し、ラン藻のバイオフィーム形成にポリアミンが関与することを解明した。c-di-GMP合成酵素として二成分制御系を構成するHik12-Rre2 及びHik14-Rre8がペアで機能していることを明かにし、リン酸化を介した生合成制御機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラン藻は光合成によって大気中の二酸化炭素を固定し、物質を作り出すことができるため、低炭素社会の実現に向けた工学的応用展開をする上で活用が期待される生物種である。本研究成果は、ラン藻が有する優れた環境適応機構に関して、シグナル分子の機能を酵素と合わせて解明した点で重要である。酵素の機能と合わせて、作用機構を解明することで、応用展開する際に、人為的にシグナル分子を制御し、ラン藻の生活環を物質生産に最適化させる技術の基盤となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused the signal molecules, c-di-GMP and polyamine, which regulate salt stress inducible biofilm formation in *Synechocystis*. Arginine decarboxylases (Adc) and putrescine synthases (Auh) were characterized as polyamine synthase. We reports reduction of polyamine increases the biofilm formation. Rre2 and Rre8 are identified as c-di-GMP synthase. Rre2 and Rre8 form a pair with Hik12 and Hik14, respectively. These two-component system controls biofilm formation via c-di-GMP synthesis.

研究分野：生化学

キーワード：バイオフィーム ポリアミン c-di-GMP ラン藻

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

### 1. 研究開始当初の背景

光合成細菌(ラン藻、*Synechocystis* sp. PCC6803)は、ゲノム解読された光合成生物のモデル生物であり、環境の変化に伴い様々なストレス応答機構を有していることが推測されていた。我々のグループでは、これまでにラン藻の塩ストレス耐性機構を解析する過程で、塩ストレス下でバイオフィーム形成が誘導されていることを明らかにしている。一般に、細菌は環境の悪化に伴いバイオフィームを形成し外部環境と菌体を隔離することで自身を保護していることが知られており、その形成誘導に關する細胞内シグナル分子として、c-di-GMP とポリアミンに着目した。c-di-GMP は細菌のバイオフィーム形成を誘導する役割が知られており、ラン藻においても外来遺伝子を発現させ、人為的にc-di-GMP 濃度を上昇させることで、バイオフィーム形成が誘導されることが報告されている (Agostini *et al.* 2015)。ポリアミンは、哺乳類から細菌まで幅広い生物種で生合成されるシグナル分子であり、細胞増殖など細胞生理に重要な役割を果たすことが知られている。我々の先行研究により、塩ストレス環境下でラン藻を培養することで、細胞内ポリアミン量が低下することが観察されていた(図1)。これらの背景から、ラン藻の塩ストレス誘導性バイオフィーム形成における上記シグナル分子の制御機構について、生合成酵素の機能解析による生化学的な観点から解析を進める着想に至った。

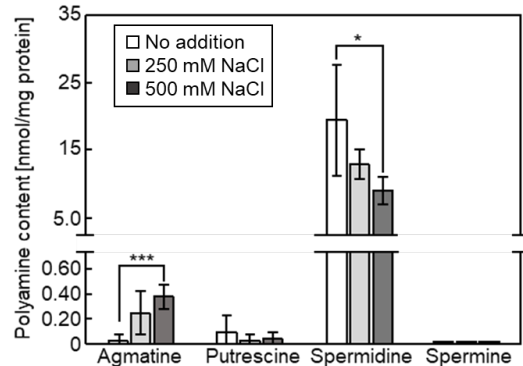


図1 塩ストレス下におけるラン藻のポリアミン量の変動 (Kera *et al.* 2018より一部改変)

### 2. 研究の目的

#### (1) ポリアミンが関与するバイオフィーム形成制御機構

塩ストレス条件下でラン藻がバイオフィーム形成をおこない、また、細胞内でポリアミンが減少している(図1)ことから、ポリアミンによってバイオフィーム形成が制御されていることが示唆された。しかし、ラン藻のポリアミン生合成酵素の機能同定は不十分であったことから、ポリアミンとバイオフィーム形成の関係性を解明することを目的とする。また、ポリアミンがバイオフィーム形成を制御する機構として、ポリアミン受容体(PotD)とc-di-GMP 生合成酵素(MbaA)の關連がコレラ菌で提唱されている (Karatan *et al.* 2005)。そこで、ラン藻のゲノム上に存在するこれらの相同遺伝子についても酵素機能を明らかにすることを目的とする。

#### (2) 二成分制御系による c-di-GMP の生合成制御

ラン藻では、高塩ストレスに曝された場合、センサータンパク質であるヒスチジンキナーゼ (Histidine kinase: Hik) と Hik からのリン酸化シグナルを下流に伝えるレスポンスレギュレーター (Response regulator: Rre) から構成される二成分制御系が機能していることが報告されている (Shoumskaya *et al.*, 2005)。また、ラン藻において cyclic di-GMP の生合成に関する保存ドメイン (GGDEF ドメイン) を有する Rre2、Rre8 の各変異体が、高塩ストレス下においてバイオフィーム形成誘導の減少を示したことを我々の先行研究で確認している。そこで、Rre2、Rre8 の酵素機能を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ポリアミンが関与するバイオフィーム形成制御機構

ラン藻のポリアミン生合成経路の第一段階を触媒するアルギニン脱炭酸酵素 (Adc1、Adc2) および、その次のプトレシン生合成酵素 (Auh1、Auh2) について、ラン藻ゲノムからクローニングを行い、大腸菌により His-tag 融合タンパク質として異種発現させた。また、MbaA についても同様に大腸菌を用いた異種発現に加え、昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質発現を行った。各異種発現タンパク質は、アフィニティー精製後、*in vitro*で Assay を行い、HPLC により生成物を解析した。欠損株を用いたバイオフィーム形成解析では、マルチタイタープレートを用いたクリスタルバイオレット染色により測定した。

#### (2) 二成分制御系による c-di-GMP の生合成制御

ゲノム配列情報から、Hik12-Rre2、Hik14-Rre8 がペアを構築していることが示唆された。そこで、Bacterial Two-hybrid 法 (BACTH) によって各タンパク質の相互作用を解析した。Rre2、Rre8 の酵素機能を明らかにするために、ラン藻ゲノムからクローニングを行い、大腸菌により His-tag 融合タンパク質として異種発現させた。また、リン酸化部位に変異導入を行い、疑似リン酸化タンパク質、疑似脱リン酸化タンパク質も作製した。上述と同様にアフィニティー精製後、*in vitro*で Assay を行い、HPLC により生成物を解析した。Hik12-Rre2、Hik14-Rre8 のリン酸基リレーを解析では、精製タンパク質について、放射標識(<sup>32</sup>P)された ATP と反応させ、SDS-PAGE による分離後、放射活性を検出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) MbaA の機能解析

ラン藻のポリアミン受容体と推定される PotD、c-di-GMP 合成及び分解酵素と推定される MbaA について欠損株のバイオフィーム形成能解析及び酵素機能解析を行った。塩ストレスに曝した場合、mbaA 欠損株はバイオフィーム形成量が少し低下した。このことから MbaA は塩ストレス誘導性バイオフィーム形成機構に参与するものの、寄与が限定的であることが示唆された。また、bacterial two-hybrid 法により PotD-MbaA の相互作用解析を行ったが、相互作用は観察されなかった。MbaA は c-di-GMP 合成ドメインと分解ドメインの両方を有するハイブリッドタイプの膜タンパク質であるため、MbaA の全長、MbaA の親水性領域、c-di-GMP 合成ドメイン、c-di-GMP 分解ドメインのそれぞれについて大腸菌を用いて異種発現させ酵素精製を行った。MBP を融合させた場合全長 MbaA は発現しなかった。一方、各ドメインの精製に成功したが、酵素活性は検出されなかった。昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いて全長 MbaA の発現に成功したが、酵素活性については検出できなかった。

##### (2) ポリアミン合成酵素の機能解析

Adc1、Adc2 の活性測定を行ったところ、Adc1 に比べて Adc2 が高い比活性を示した。どちらのタンパク質とも中性から弱酸性領域 (pH 8.0) で最大活性を示した (図2)。興味深いことに、Assay 系に NaCl を添加したところ、NaCl 濃度依存的に活性が上昇した。Adc の次の段階を触媒する Auh 1、Auh2 について活性測定を行った結果、Auh1 が主要なプトレシン合成酵素であることを明らかにした。プトレシン合成反応は脱尿素反応である。Auh2 のプトレシン合成活性が低かったことから、本来の基質が異なることが予想された。そこで Auh1、Auh2 について、アルギニンを経験として酵素活性を測定したところ、Auh2 のみアルギニンを基質とした。従って、Auh2 はポリアミン合成ではなく、アルギニンの代謝で機能していることが示唆された。Auh1 と Auh2 の欠損株を作製し、バイオフィーム形成を測定したところ、野生株とほとんど変化が観察されなかった。これらのことから、ラン藻では、アグマチンがバイオフィーム形成に重要であることが示唆された。

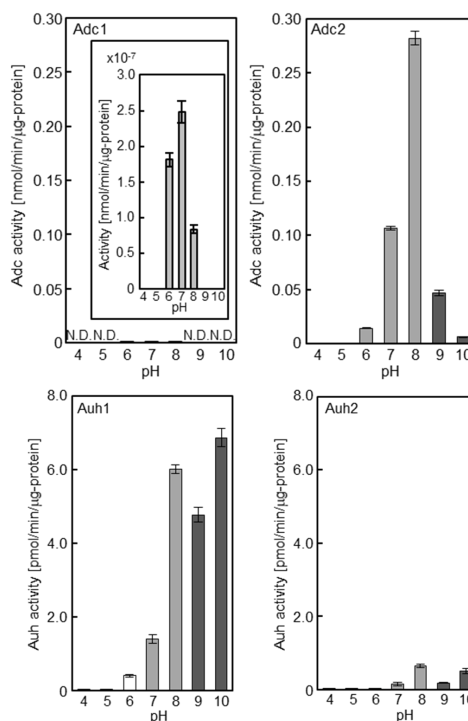


図2 AdcおよびAuhの活性 (Kera et al. 2018より一部改変)

##### (3) Rre2、Rre8 の機能解析

異種発現させた Rre2 は c-di-GMP 合成活性を示し、疑似リン酸化 (D59E) によって活性の上昇、疑似脱リン酸化 (D59N) によって活性の減少を示した。また、活性中心に変異導入を行った場合 (GGAAF)、活性を失った。一方、異種発現させた Rre8 はそのままでは c-di-GMP 合成活性を示さず、疑似リン酸化変異を導入した場合のみ活性を示した (図3)。このことから、Rre2 はリン酸化による活性制御が比較的緩やかであるのに対し、Rre8 はリン酸化によって活性が厳密に制御されていることが示唆された。BACTH では、Hik12-Rre2、Hik14-Rre8 で相互作用

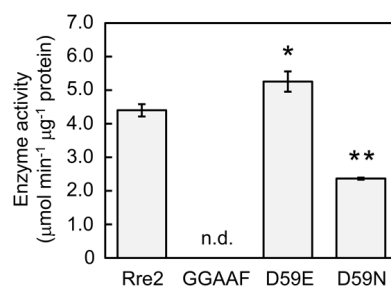


図3 Rre2リン酸化変異体の活性測定

が観察された。Hik12-Rre8、Hik14-Rre2 の組み合わせについても同様の解析を行ったが、相互作用は観察されなかった。このことから、Hik12-Rre2、Hik14-Rre8 のペアは特異的であることが明らかになった。リン酸基リレー解析のために、Hik12、Hik14 の異種発現を行ったところ、Hik12 のみ異種発現に成功した。そこで、Hik12-Rre2 のリン酸基リレー解析を行った (図4)。Hik12 の自己リン酸化反応の後、Rre2 を反応系に添加すると Hik12 のリン酸化レベルが減少した。このとき、Rre2 のリン酸化レベルが上昇することを予想したが、リン酸化が極めて不安定なために検出できなかった。そこで、Rre2 のリン参加部位を変異導入により破壊したタンパク質を作製し、同様のリン酸化リレー解析をおこなったところ、Hik12 のリン酸化レベルは減少しなかった。このことから、Hik12 - Rre2 のリン酸化リレーが起きていることを明らかにした。

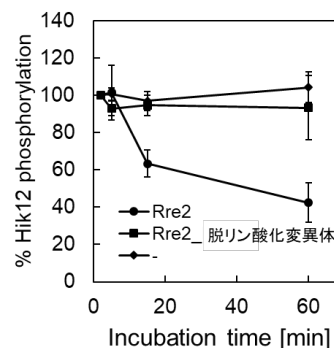


図4 リン酸基リレー解析

## <引用文献>

- Agostoni, M., Waters, C. M., Montgomery, B. L., Regulation of biofilm formation and cellular buoyancy through modulating intracellular cyclic di-GMP levels in engineered, *Biotechnology and Bioengineering*, 113, 2016, 311-9
- Karatan, E., Duncan, T. R., Watnick, P. I., NspS, a predicted polyamine sensor, mediates activation of *Vibrio cholerae* biofilm formation by norspermidine, *Journal of Bacteriology*, 187, 2005, 7434-43
- Shoumskaya, M. A., Paithoonrangsarid, K., Kanesaki, Y., Los, D. A., Zinchenko, V. V., Tanticharoen, M., Suzuki, I., Murata, N., Identical Hik-Rre systems are involved in perception and transduction of salt signals and hyperosmotic signals but regulate the expression of individual genes to different extents in *Synechocystis*, *Journal of Biological Chemistry*, 280, 2005, 21531-8

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計2件)

- Kota Kera, Tatsuya Nagayama, Kei Nanatani, Chika Saeki-Yamoto, Akira Tominaga, Satoshi Souma, Nozomi Miura, Kota Takeda, Syunsuke Kayamori, Eiji Ando, Kyohei Higashi, Kazuei Igarashi and Nobuyuki Uozumi, Reduction of Spermidine Content Resulting from Inactivation of Two Arginine Decarboxylases Increases Biofilm Formation in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Journal of Bacteriology*, 9, 2018, 664-706【査読有】  
DOI: 10.1128/JB.00664-17
- Di Chang, Shinya Sakuma, Kota Kera, Nobuyuki Uozumi, Fumihito Arai, Measurement of the mechanical properties of single *Synechocystis* sp. strain PCC6803 cells in different osmotic concentrations using a robot-integrated microfluidic chip, *Lab on a Chip*, 8, 2018, 1241-1249【査読有】 DOI: 10.1039/C7LC01245D

### 〔学会発表〕(計5件)

- 解良康太、永山達也、七谷圭、佐伯-矢本千香、富永昴、相馬聡、三浦のぞみ、武田幸太、茅森俊介、安藤英司、東恭平、木花将、五十嵐一衛、魚住信之、シアノバクテリアのバイオフィーム形成に関するポリアミン合成酵素の解析、第60回植物生理学会年会、2019年 石川航、中鉢千尋、牧野恒平、渥美駿、兵頭守、早川芳宏、解良康太、魚住信之、*Synechocystis* sp. PCC6803 の塩ストレス誘導性バイオフィーム形成を促進する c-di-GMP 合成酵素 Hik17 の機能解析、日本農芸化学会 2018、2018 年
- 解良康太、牧野恒平、永山達也、吉澤優一朗、中村謙介、重原武浩、七谷圭、鈴木石根、魚住信之、塩ストレス誘導性バイオフィーム形成制御における二成分制御系の解析、藍藻の分子生物学 2017、2017 年
- 狩野文香、解良康太、辻井雅、魚住信之、シヨ糖密度勾配遠心分離法による N+/H+ アンチポーターの細胞内局在解析、藍藻の分子生物学 2017、2017 年
- 吉澤優一朗、解良康太、永山達也、七谷圭、鈴木石根、魚住信之、*Synechocystis* sp. PCC 6803 におけるバイオフィーム形成に関する二成分制御系の機能解析、第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年

### 〔図書〕(計0件)

### 〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

### 〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

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

研究協力者氏名：鈴木石根

ローマ字氏名：SUZUKI, iwane

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。