

大腸菌二成分制御系転写因子AtoCの2つの部位のリン酸化による活性調節

遠藤, 貴秀 / ENDO, Takahide

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

60

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

3

(発行年 / Year)

2019-03-31

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00022100>

大腸菌二成分制御系転写因子 AtoC の 2つの部位のリン酸化による活性調節

REGULATION OF THE *ESCHERICHIA COLI* TRANSCRIPTION FACTOR ATOC OF THE NTRC
FAMILY
VIA DUAL PHOSPHORYLATION

遠藤貴秀

Takahide ENDO

指導教員 川岸郁朗

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

Two component systems (TCS) endow a cell with the ability to respond to various kinds of stimuli for adapting to ever changing environments. Typically, TCS consists of a histidine kinase that receives extracellular signals and a response regulator that transmits the signal and to regulate gene expressions through phosphorylation. The histidine kinase AtoS senses acetoacetate to activate the response regulator AtoC, which in turn induces the genes for short-chain fatty acid catabolism. AtoC is unique in that it possesses two phosphorylation sites, which can potentially bear complex regulatory features or ultra-sensitivity in responses to stimulus. In this study, I sought to investigate the input-output relationship of AtoSC by utilizing luciferase promoter assay. Acetoacetate promoted the transcription activity of the downstream genes through the phosphate transfer from AtoS to AtoC. The activation occurred only at lower expression levels of AtoSC, suggesting the excess AtoSC negatively regulates the downstream gene expression. Notably, the two phosphorylation sites in AtoC play distinct roles: the canonical Asp-55 residue receives a phosphate group from AtoS, while the noncanonical His-73 residue deprives Asp-55 of the phosphate group to suppress excess gene expression. This study uncovers a novel regulatory mechanism of AtoC through multiple phosphorylation sites for precise control of gene expression.

Key Words : gene expression, histidine kinase, transcription factor, two-component regulatory system

1. 諸言

大腸菌は、巧妙な情報伝達系を備えて多様な環境を生きている。それは、環境の感知と情報を伝達し、応答に必要な遺伝子発現を調節して恒常性を維持する。その仕組みのうち二成分制御系と呼ばれるシグナル伝達系は、ヒスチンキナーゼ (HK) とレスポンスレギュレーター (RR) の2つの蛋白質で構成される。HKは、環境シグナルを感知し、トランスミッタードメインのヒスチジン残基 H が自己リン酸化し、RRにそのリン酸基を転移する。RRのレシーバードメインのアスパラギン酸残基 D がリン酸基を受け取ると、RRは活性化し標的の下流遺伝子の発現を調節する [1]。

大腸菌二成分制御系 HK AtoS, RR AtoC は、短鎖脂肪酸代謝を制御する。AtoSは短鎖脂肪酸であるアセト酢酸のシグナルを感知すると、AtoCにリン酸基を転移する。そして活性化した AtoCは、短鎖脂肪酸代謝遺伝子群 *atoDAEB* オペロンのプロモーターに結合し、転写を誘導する (図 1)

[2]。

典型的な RR は複合体を形成して機能する。OmpR ファミリーは、二量体を形成して下流標的遺伝子を正に制御する。一方、AtoC が属する NtrC ファミリーは、複雑な調節機構をもつ。そのなかでも代表的な NtrC は、七量体を形成すると標的遺伝子を負に制御するが、六量体では標的遺伝子を正に調節する [1]。AtoC の調節機構は未解明だが、複雑な制御機構をもつ可能性が高い。

AtoS が典型的なリン酸化部位 H398 をもつのにに対し、AtoC は、典型的なリン酸化部位 D55 に加えて、もう一つのリン酸化部位 H73 をもつ。後者は、HK のリン酸化部位近傍に典型的な配列 H-box をもつことから見出された。D55, H73 をそれぞれ G, L に置換すると AtoC のリン酸化レベルは低下し、両者を置換すると完全に失われると報告されている [3]。しかし、この2つの部位のリン酸化の生理的意義は不明である。可能性として考えられることは、

上述のような多量体を形成し、サブユニット間リン酸基リレーによって活性を調節する。もしくは、他の因子とのクロストークを起こす可能性も考えられる。そこで、AtoCの2つのリン酸化部位がどのように機能するかを明らかにしたい。そのためには、シグナル入力応答の関係を低濃度から高濃度の広い範囲で明らかにすることが重要である。

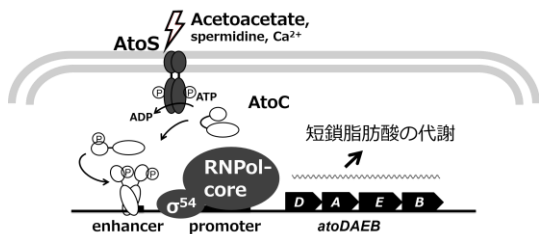


図1 AtoSCのシグナル伝達経路

2. 実験方法

AtoSCのシグナル入力応答の關係に着目した。可能な限り低濃度から高濃度のアセト酢酸のシグナルを与えて、ルシフェラーゼアッセイによりAtoC標的の下流遺伝子atoDAEBのプロモーター活性を解析した。

3. 結果と考察

どのようにAtoSCは、アセト酢酸濃度変化のシグナル入力に対して応答するか調べた。はじめに、野生株でアセト酢酸によるatoDAEBプロモーター活性を解析した。その結果、これまでの文献では誘導条件が10 mMの狭い範囲で測定されていたが、文献以上の誘導物質濃度では、急激に活性が上昇する新しいフェーズがみられた(図2)。

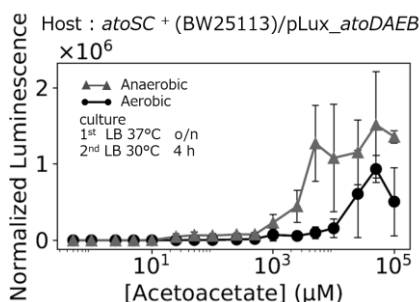


図2 大腸菌野生株におけるシグナル入力応答の關係

この活性上昇にAtoSCの存在量が關係するか、atoSCの発現量とシグナル入力応答の關係を調べた。アラビノースで発現誘導可能なatoSC発現プラスミドをatoSC二重欠株に移入し、アラビノース濃度をふってatoSC発現量を増やした。その結果、AtoSCの量が増加すると、プロモーター活性は低下した(図3)。このことは、AtoSCの細胞内存在量が増加しても、ポジティブフィードバックは起こらず、むしろ阻害的に働くことを示す。つまり、AtoSCは少ない量で機能するのである。

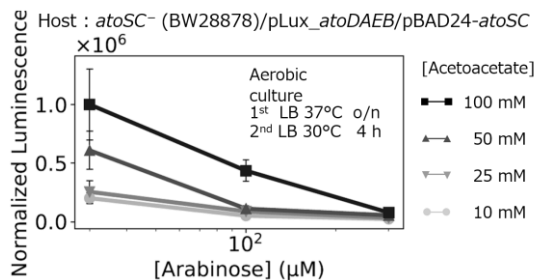


図3 AtoSC存在量変化がシグナル入力応答に与える影響

最後に、活性上昇にAtoCの2つの部位のリン酸化が關連するか調べた。AtoSCそれぞれのリン酸化部位に、点突然変異H398Q, D55N, H73Qを導入した。これらの置換は、先行研究により蛋白質構造に与える影響がマイルドであると推定される。変異型AtoSCをatoSC二重欠株で発現させ、アセト酢酸を与えてatoDAEBプロモーター活性を測定した(図4)。その結果、AtoS-H398Q発現菌では、活性は上昇せず、応答を示さなかった。これは、AtoS以外からのクロストークによってAtoCが活性化しないことを示している。すなわち、AtoSからの直接的なリン酸基転移がAtoCの活性化に必須である。

AtoC-D55N発現菌も、アセト酢酸に全く応答しなかった。これは、D55がリン酸基を受け取り活性化する中心部であることを示している。しかし、AtoC-H73Q発現菌は、高濃度アセト酢酸存在下で野生型よりも高い活性を示した。H73Q変異体は、D55が保存されているため、リン酸化されうるが、脱リン酸化が起こらず、常にD55にリン酸基が結合して構成的活性状態になると推定された。本来のH73は、リン酸基を必要に応じて一時的に貯え活性を負に調節するのではないかと。両変異体を共発現すると野生型に近い表現型を示したことから、D55からH73へのリン酸基転移は、分子間で起こると唆された。この分子間リン酸基転移によって複雑な応答が可能になると考えられる。

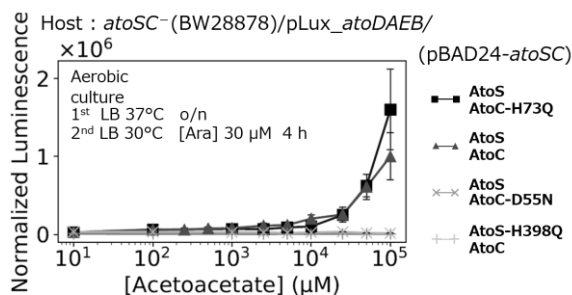


図4 AtoSCリン酸化部位の変異が活性に与える影響

4. 結言

本研究では以下のことを見出した。アセト酢酸によるatoDAEB発現誘導には、AtoSとAtoCのリン酸化転移が必須である。加えて、AtoSCは限定的な量で機能する。AtoCの2つのリン酸化部位のうち、D55が活性化の中心的役割を担い、H73はリン酸基を貯蓄して活性を負に調節する。このリン酸基転移は分子間で起こる。

参考文献

- 1) Gao, R. and Stock, A. M. (2009) *Annu. Rev. Microbiol.*, **63**, 133-154.
- 2) Matta, M. K., Lioliou, E. E., Panagiotidis, C. H., Kyriakidis, D. A. and Panagiotidis, C. A. (2007) *J. Bacteriol.* **189**, 6324-6332.
- 3) Lioliou, E. E., Mimitou E. P., Grigoroudis A. I., Panagiotidis C. H., Panagiotidis C. A. and Kyriakidis D. A. (2005) *Biochim. Biophys. Acta.* **1725**, 257-268.