

平成 17 年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

ふりがな（ローマ字）		MURATA NORIO				
①研究代表者氏名		村田 紀夫		②所属研究機関・部局・職 基礎生物学研究所・環境適応研究部門・教授		
③研究課題名	和文	低温センサーと低温適応の分子機構の研究				
	英文	Studies on low-temperature sensors and the mechanisms of acclimation to low-temperature				
④研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計
	23,500	23,800	23,800	23,800	0	94,900
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
村田 紀夫	基礎生物学研究所・環境適応研究部門・教授	植物生物学	研究の取りまとめ			
鈴木 石根	筑波大学大学院・生命環境科学研究科・講師	微生物分子生物学	低温センサーの分子機構の解析・低温誘導性遺伝子変異株の解析			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>生物を取り巻く自然環境の中で、低温は高温、乾燥等とともに生物の生存を決定づける特に重要な環境因子の一つである。申請者の研究グループはラン藻を用いて低温センサーの遺伝子をはじめて同定した。本研究では全ゲノム配列が明らかにされているラン藻 <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 を用い、達成目標を以下の4点に置いて研究を進めた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 低温センサーが膜脂質の流動性を検知する仕組みを明らかにする研究：<i>Synechocystis</i> で同定された低温センサーは膜を2回貫通するヒスチジン・キナーゼであり、温度の低下を膜の流動性の低下として検知すると考えられる。本研究では、脂質分子と結合して膜脂質の流動性の変化を検知する検知ドメインを同定する。 2. 低温センサーと低温シグナル伝達体を網羅する研究：DNA ミクロアレイ法を用いて <i>Synechocystis</i> における第2の低温センサーを同定し、それに続く信号伝達系を解明する。研究の結果によっては、第3、第4の低温センサーと信号伝達系を同定する。 3. 低温信号伝達系と浸透圧信号伝達系におけるクロストークの研究：浸透圧もまた膜脂質の構造変化を引き起こす環境ストレスである。本研究では、<i>Synechocystis</i> における浸透圧センサーと浸透圧信号伝達成分を同定し、低温信号伝達系との間で起こるクロストークを解明する。 4. 低温誘導性遺伝子群およびその産物群の低温耐性能獲得における役割を明らかにする研究：<i>Synechocystis</i> を低温にさらすと多数の低温誘導性遺伝子が発現し、低温誘導性タンパク質（酵素）が合成され、その結果、低温耐性能が獲得される。本研究では、低温誘導性遺伝子群とタンパク質群を DNA ミクロアレイ法とプロテオミクスを用いて解析するとともに、これらの遺伝子のシステムティック・ノックアウトにより個々の低温誘導性遺伝子とタンパク質およびそれらの産物の低温耐性能獲得における役割を明らかにする。 						

⑦ 研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)

1. 目標を達成した研究

- (a) ラン藻 *Synechocystis* のゲノムに存在する 44 個のヒスチジンキナーゼ(Hik)のミュータントライブラリーを作成した。このライブラリーをスクリーニングして、Hik の中では Hik33 だけが低温センシングに関わっていることを明らかにした。さらに、*Synechocystis* のゲノムに存在する 42 個のレスポンスレギュレーター(Rre)のミュータントライブラリーを作成した。このライブラリーをスクリーニングして、Hik33 の下流に位置する Rre として Rre26 と Rre31 を同定した。低温で誘導発現する遺伝子により 2 種類の Rre を使い分けていることを明らかにした。
- (b) 浸透圧の検知に関わる 5 種類の Hik とその下流に位置する 4 種類の Rre を同定した。その Hiks のうちの 1 つは Hik33 であった。このことから、Hik33 は低温と共に浸透圧の信号伝達にも関わっていることを明らかにした。さらに、脂肪酸不飽和化酵素の遺伝子を不活化して、膜脂質の流動性を低下させた変異株を用いることにより、Hik33 は温度の低下を膜の流動性の低下として検知していることを明らかにした。
- (c) 10 種類の低温誘導性遺伝子を順次不活化し、10 種類の変異株を作成した。その中の 1 種、RNA helicase (CrhR)を不活化した変異株を詳細に解析し、CrhR は熱ショックタンパク GroES、GroEL1、GroEL2 の発現を促進することによって低温耐性能を付与していることを明らかにした。

2. 目標を達成できなかった研究

- (a) Hik33 の低温検知領域を同定することを目標に研究を行ったが、Hik33 を不活化した変異株を Hik33 遺伝子及びその変異遺伝子の導入によって活性化する系が確立できず、この目標は達成されなかった。

3. 目標以上の成果を挙げた研究

- (a) Hik33 は本研究発足当初には低温センサーとして同定されていた。しかし Hik33 は低温のみならず高浸透圧ストレス、高塩濃度ストレス、光ストレス、酸化ストレスの検知にも関わっていることを明らかにした。
- (b) 脂肪酸不飽和化酵素を不活化して膜脂質の流動性を低下させた変異株においては、低温誘導性でなかった数十種類の遺伝子が低温誘導性になった。しかもこの誘導性を支配する因子は Hik34 であった。Hik34 は膜貫通領域を持たないタンパク質であることから、膜結合型の未知因子が低温による膜の流動性の低下を検知し、Hik34 に伝えている可能性が示唆された。
- (c) 以上の結果を総合すると、Hik-Rre 二成分系は従来考えられていたような単純なものとは異なることがわかった。すなわち、環境変化の検知にかかわる Hik33 はそれ自体は各シグナルに対する特異性を持たない。この事実は、各シグナルに対して特異性を持つ未知因子が存在し、Hik33 と協調してそれぞれの環境ストレスを特異的なシグナルとして検知し、それぞれのシグナルに特異的な遺伝子のセットの発現を制御していることを強く示唆している。
- (d) Hik 及び Rre ミュータントライブラリーをスクリーニングする過程で、マンガンイオン及びリン酸イオンの Hik-Rre の二成分信号伝達系を発見した。
- (e) セリン・スレオニン・キナーゼ(Spk)は真核生物の信号伝達において重要な役割を担っているが、原核生物にも普遍的に存在することが最近のゲノム解析によって明らかになった。*Synechocystis* のゲノムには 12 個の Spk 遺伝子が存在するが、我々はこれら全てを不活化し、低温誘導性遺伝子の発現に対する影響を調べた。その結果、これらのうちの 2 種(SpkD と SpkL)が Hik33 とともに低温シグナルの伝達に関与していることを明らかにした。
- (f) DNA の高次構造(スーパーコILING)の変化は遺伝子の発現を制御することが知られている。我々はスーパーコILINGを促進する酵素 DNA gyrase の阻害剤を用いることによって、低温誘導性遺伝子の発現を制御できることを発見した。この事実から DNA 自体もまた低温センサーであることを明らかにした。

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

1. ヒスチジン・キナーゼ(Hik)、レスポンスレギュレーター(Rre)と共に、セリン/スレオニン・キナーゼ(Spk)も低温の信号伝達に関与していることを明らかにし、原核生物においてもMAPキナーゼカスケードの原始型が存在する可能性を示した。この研究を発展させれば、細胞内信号伝達系の進化の研究に発展する可能性が高い。
2. 原核生物では従来、ヒスチジン・キナーゼ(Hik)とレスポンスレギュレーター(Rre)の二成分系が主要な信号伝達系と考えられ、Hikがシグナルを検知しRreが遺伝子発現を制御すると考えられていた。しかし、Hik33の検知機構の研究から*Synechocystis*における信号伝達系はそのような単純なものではないことがわかった。二成分のHikとRreの他に各シグナルを見分ける(各シグナル特異的な)未知因子が存在し、Hik及びRreと協調してストレス誘導性遺伝子発現を制御していると推定せざるを得ない。これらの因子の同定とその詳細な解析は今後の重要な研究課題である。
3. DNAの高次構造形成を触媒するDNA gyrase や topoisomerase は原核生物のみならず、高等植物のクロロプラストとミトコンドリアにも存在することから、高等植物の低温等の検知においてもクロロプラストやミトコンドリアのDNAの高次構造変化が直接関与し、遺伝子発現を制御している可能性が示唆される。今後の研究が待たれる。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

学術誌に発表した論文

- ①. I. Suzuki, Y. Kanesaki, K. Mikami and N. Murata (2001)
Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis*.
Mol. Microbiol. 40: 235-244.
2. Y. Kanesaki, I. Suzuki, S. I. Allakhverdiev, K. Mikami and N. Murata (2002)
Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 290: 339-348
3. W. J. Simon, J. J. Hall, I. Suzuki, N. Murata and A. R. Slabas (2002)
Proteomic study of the soluble proteins from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 using automated MALDI-tof peptide mass fingerprinting.
Proteomics 2, 1735-1742.
4. K. Mikami, Y. Kanesaki, I. Suzuki and N. Murata (2002)
The histidine kinase Hik33 perceives osmotic stress and cold stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803
Mol. Microbiol. 46: 905-915
5. K. Yamaguchi, I. Suzuki, H. Yamamoto, A. Lyukevich, I. Bodrova, D. A. Los, I. Piven, V. Zinchenko, M. Kanehisa and N. Murata (2002)
A two-component Mn²⁺-sensing system negatively regulates expression of the *mntCAB* operon in *Synechocystis*.
Plant Cell, 14: 2901-2913
- ⑥. M. Inaba, I. Suzuki, B. Szalontai, Y. Kanesaki, D. A. Los, H. Hayashi and N. Murata (2003)
Gene engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in *Synechosystis*.
J. Biol. Chem. 278: 12191-12198
7. K. Marin, I. Suzuki, K. Yamaguchi, H. Yamamoto, K. Ribbeck, Y. Kanesaki, M. Hagemann and N. Murata (2003)
Identification of histidine kinases that act as sensors in the perception of salt stress in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 9061-9066
8. S. Suzuki, A Ferjani, I. Suzuki and N. Murata (2004)
The SphS-SphR two-component system is the exclusive sensor for the induction of gene expression in response to phosphate limitation in *Synechocystis*.
J. Biol. Chem. 279: 13234-13240
9. K. Marin, Y. Kanesaki, D. A. Los, N. Murata, I. Suzuki and M. Hagemann (2004)
Gene expression profiling reflects physiological processes in salt acclimation in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803
Plant Physiol. 136: 3290-3300
- ⑩. K. Paithoonrangsarid, M. Shoumskaya, Y. Kanesaki, S. Satoh, S. Tabata, D.A. Los, V. Zinchenko, M. Tanticharoen, I. Suzuki and N. Murata (2004)
Five histidine kinases perceive osmotic stress and regulate distinct sets of genes in *Synechocystis*.
J. Biol. Chem. 279: 53078-53086

11. D.A. Los and N. Murata (2004)
Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals.
Biochim. Biophys. Acta (Biomembrane) 1666: 142-157
12. A. Shapiguzov, A. A. Lyukevich, S. I. Allakhverdiev, T. V. Sergeyenko, I. Suzuki, N. Murata and D.A. Los (2005)
Osmotic shrinkage of cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803 by water efflux via aquaporins regulates the osmostress-inducible gene expression.
Microbiology 151: 447-455
13. I. Suzuki, Y. Kanesaki, J. J. Hall, A. Slabas and N. Murata (2005)
Histidine kinase Hik34 regulates the expression of heat-shock genes and is involved in thermotolerance in *Synechocystis*
Plant Physiol., in press
14. M. Shoumskaya, K. Paithoonrangsarid, Y. Kanesaki, D. A. Los, V. Zinchenko, I. Suzuki and N. Murata (2005)
Identical Hik-Rre systems perceive and transduce salt signals and hyperosmotic signals but regulate the expression of distinct sets of genes in *Synechocystis*.
J. Biol. Chem., in press

国際会議における発表 (講演)

村田 紀夫

1. **FEBS Advanced Course on Original and Evolution of Mitochondria and Chloroplasts**
Hvar (Croatia). March 31-April 6, 2001.
“Histidine kinases in prokaryotes: sensors and transducers of cold signals”.
N. Murata
2. **Annual Meeting of the Society for Experimental Biology: Plant Cell Biology**
Canterbury (England). April 2-6, 2001.
“Identification of environmental signal sensors in *Synechocystis*-Systematic genomics and DNA microarray approach.”
N. Murata
3. **The 6th International Plant Cold Hardiness Seminar**
Helsinki (Finland). July 1-5, 2001
“Cold sensors identified by systematic genomics and DNA microarray analysis” (Plenary lecture).
N. Murata
4. **The Japan-Germany Binational Seminar: Functional Genomics of Cyanobacteria**
Okazaki (Japan) October 6-11, 2001
“Global analysis of cyanobacterial gene expression with DNA microarrays”
N. Murata
5. **Japan-India Joint Seminar: Fundamental Mechanisms of Stress Response**
Hyderabad (India) November 8-10, 2001
“Analysis of global gene expression in *Synechocystis* with DNA microarray.”
N. Murata
6. **Keystone Symposia: Specificity and Crosstalk in Plant Signal Transduction**
Tahoe City, California (USA) January 22-27, 2002
“Sensors of cold, salt and osmotic stress in *Synechocystis* identified by systematic genomics and DNA microarray” (Plenary lecture)
N. Murata

7. **International Workshop: Redoxy Regulation**
Bielfeld (Germany) July 17-19, 2002
“Environmental sensors in *Synechocystis* identified by systematic genomic and DNA microarray technique”
N. Murata
8. **The 43rd International Conference on the Bioscience of Lipids**
Graz (Austria) September 11-14, 2002
“Regulation of fatty acid desaturation in cyanobacteria; Gene expression and temperature sensors” (Plenary lecture)
N. Murata
9. **Gordon Research Conference: Temperature Stress in Plants**
Ventura, California (USA) January 26-31, 2003
“Cold and heat-sensing His kinases and their unique characteristics”
N. Murata
10. **The Japan-Germany Binational Seminar**
Muenchen (Germany) May 31-June 6, 2003
“Stress-induced gene expression and stress sensors in *Synechocystis* sp. PCC 6803”
N. Murata
11. **The 7th International Congress of Plant Molecular Biology**
Barcelona (Spain) June 23-28, 2003
“Systematic genomics of signal sensors in cyanobacteria” (Plenary lecture)
N. Murata
12. **The 11th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes**
Tokyo (Japan) August 24-29, 2003
“Systematic genomics of environmental signal sensors” (Plenary lecture)
N. Murata
13. **The 16th International Plant Lipid Symposium**
Budapest (Hungary) June 1-4, 2004
“Membrane rigidification and perception of hyperosmotic signals in *Synechocystis*”
N. Murata
14. **The 14th International Congress on Photobiology**
Jeju (Korea) June 10-15, 2004
“Microarray analysis of expression of photosynthesis-related genes under stress conditions”
N. Murata
15. **The Gordon Research Conference “Salt and Water Stress in Plants”**
Hong Kong. June 13-18, 2004
“Osmotic stress sensors and salt stress sensors in cyanobacteria”
N. Murata
16. **The 7th International Plant Cold Hardiness Seminar**
Sapporo (Japan). July 10-15, 2004
“Cold-inducible gene expression and cold sensors in cyanobacteria”
N. Murata

17. **Queenstown Molecular Biology Meeting “Molecular Mechanisms in Cell Biology”**
Queenstown (New Zealand). November 28-December 1, 2004
“Acclimation to abiotic stress in cyanobacteria and plants”
N. Murata
18. **The UK Society of Experimental Biology Conference: “Plant Frontier Meeting-Phenotypic Plasticity and the Changing Environment”**
Sheffield (England). March 21-23, 2005
“Genome information-based systematic analysis to assess how cyanobacteria sense abiotic stress”
N. Murata
- 鈴木 石根
1. **Gordon Research Conference “Temperature Stress in Plants”**
Ventura, CA. (U.S.A.). January 28-February 2, 2001
“Regulation of gene expression at low temperature by histidine kinases.”
I. Suzuki
2. **The VII Cyanobacterial Workshop “The Signaling Events”**
Asilomar, CA. (U.S.A.). July 27-31, 2001
“Involvement of histidine kinases in acclimation to low temperature.”
I. Suzuki
3. **The Japan-Germany Binational Seminar**
Okazaki (Japan). October 6-10, 2001
“Sensors for temperature signals in *Synechocystis*; From systematic genomics of signal sensors”
I. Suzuki
4. **India-Japan Co-operative Program “Fundamental Mechanisms of Stress Response”**
Hyderabad (India). November 8-10, 2001
“Sensors for low-temperature signals in *Synechocystis*. From systematic genomics of signal sensors”
I. Suzuki
5. **The 15th International Symposium on Plant Lipids. “Impact on plant Lipid Research”**
Okazaki (Japan). May 12-17, 2002
“Regulation of unsaturation of membrane lipids by low temperature-sensing histidine kinases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803”
I. Suzuki
6. **Korea-Japan Joint Symposium on Plant Biology “Functional Genomics and Proteomics in Response to Stress”**
Kyoto, (Japan). September 21, 2002
“Functional genomics of sensors for environmental stress in cyanobacteria”
I. Suzuki
7. **U.S.-Japan Binational Seminar “Microbial and Plant Metabolism, Function through Genomes”**
Maui, HI. (U.S.A.). November 22-26, 2002
“Functional genomics of low-temperature sensors in *Synechocystis*”
I. Suzuki
8. **The 2nd German/Japanese Binational Symposium “Functional Genomics in Cyanobacteria --- Beyond Genome Sequences”**
Bavaria (Germany). May 31 - June 5, 2003
“Regulatory mechanisms of gene expression at low temperature and high temperature in *Synechocystis*”
I. Suzuki

9. **Functional Genomics and Breeding Strategies for Cold Tolerance in Plants**
Sapporo (Japan). August 26-27, 2003
“Mechanisms of cold sensing in the cyanobacterium *Synechocystis*”
I. Suzuki
10. **Joint Japanese-Swiss Scientific Seminar “Biogenesis, Function and Acclimation of the Photosynthetic Apparatus.”**
Kurashiki (Japan). September 29 – October 3, 2003
“Regulation of photosynthetic efficiency and genome-wide gene expression under stress conditions in *Synechocystis*”
I. Suzuki
11. **PHOTOSYNTHESIS and POST-GENOMIC ERA: “From Biophysics to Molecular Biology, a Path in the Research of Photosystem II”**
Quebec (Canada). August 25-28, 2004
“From genomics to signal sensors in cyanobacteria”
I. Suzuki
12. **The 13th International Congress of Photosynthesis**
Quebec (Canada). August 29 – September 3, 2004
“Environmental stress-induced expression of photosynthesis-related genes”
I. Suzuki
13. **Gordon Research Conference, “Temperature Stress in Plants”**
Ventura, CA. (U. S. A.). January 30 – February 4, 2005
“Histidine kinases in temperature stress sensing in cyanobacteria”
I. Suzuki