

枯草菌のリンゴ酸利用に関わる
2 成分制御系 YufL-YufM の機能解析

田中耕生
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞遺伝学講座
(小笠原直毅 教授)

目次

第 1 章	2 成分制御系 YufL-YufM による転写調節機構の解析	
I	序論	3
II	材料と方法	13
III	結果	26
IV	考察	45
第 2 章	センサー蛋白質 YufL のリンゴ酸認識機構の解明	
I	序論	50
II	材料と方法	54
III	結果	63
IV	考察	77
参考文献		83

第1章

2 成分制御系 YufL-YufM による転写調節機構の解析

I 序論

2 成分制御系の基本概念

現在するすべての生物は絶えず変化する環境の中で、それに対応しながら生存している。バクテリアの様な単細胞生物も決して環境の変化に消極的に身を任せて生きているわけではない。むしろ、刻々と変化する環境要因を感知して能動的に生きていこうとしている。その環境応答システムの一つが2成分制御系であり、その基本的なシステムは、外界あるいは細胞内のシグナルを受け取るセンサー蛋白質(Sensor Kinase)と転写の調節を行う調節蛋白質(Response Regulator)で構成されている(図1)。また、対を成すセンサー蛋白質と調節蛋白質をコードする遺伝子は通常、同一の転写単位から成ることが知られている。

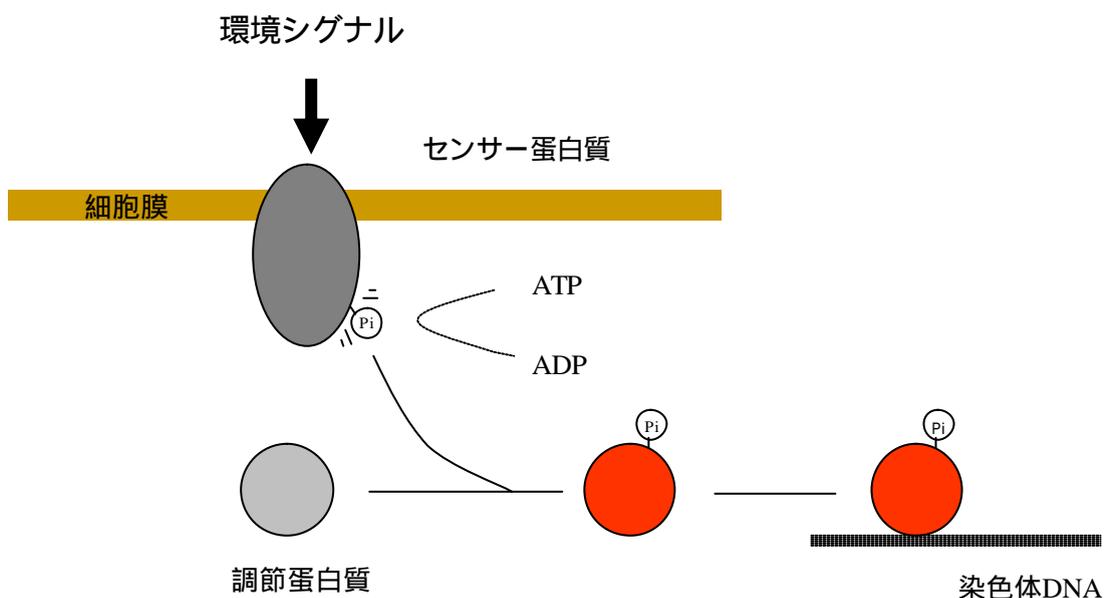


図1 2成分制御系の反応機構

2 成分制御系の研究の展開

2成分制御系の研究は1980年代に始まった。大腸菌で発見された、浸透圧の変化に対応しポリリン蛋白質の発現制御を行うEnvZ-OmpR(Mizuno *et al.*, 1982)を皮切りに、リン酸飢餓状態でアルカリフォスファターゼの発現を誘導する大腸

菌の PhoB-PhoR, 細胞内の窒素源の状態をモニターし、遺伝子発現をコントロールする *Klebsiella pneumoniae* の NtrB-NtrC(Nixon *et al.*, 1986) などが 2 成分制御系として同定された。その後の EnvZ-OmpR の解析により、センサー蛋白質から調節蛋白質へのリン酸リレーが 2 成分制御系のシグナル伝達機構であることが明らかとなった。また、これはセンサー蛋白質のヒスチジン残基から調節蛋白質のアスパラギン酸残基への、ATP を基質としたリン酸基の転移であることも明らかとなった(Aiba *et al.*, 1989; Kanamura *et al.*, 1990)。現在では、この反応は 2 成分制御系で共通であり、センサー蛋白質、調節蛋白質には構造的にも共通点が存在することが知られている。調節蛋白質は、一般に N 末端側にセンサー蛋白質からリン酸基を受け取るアスパラギン酸残基が存在する。アスパラギン酸周辺の領域はレシーバードメインと呼ばれ、調節蛋白質間で相同性が高い領域である。一方 C 末端側には DNA 結合領域がある事が多く、この領域が DNA に結合して転写の調節を行うことから、アウトプットドメインと呼ばれている。センサー蛋白質は、ほとんどが N 末端に、疎水性アミノ酸に富む、細胞膜を貫通すると考えられる領域を持つ。この領域がシグナルを感知する領域で、インプットドメインと呼ばれ、センサー蛋白質間の相同性は低い。一方 C 末端側は細胞質内に露出し、ここに調節蛋白質とのリン酸リレーを行うヒスチジン残基が存在しており、トランスミッタードメインと呼ばれている(図 2)。またトランスミッタードメインはセンサー蛋白質間の相同性が高いことが知られている。アミノ酸の相同性から見いだされた 2 成分制御系の中には、*Agrobacterium*

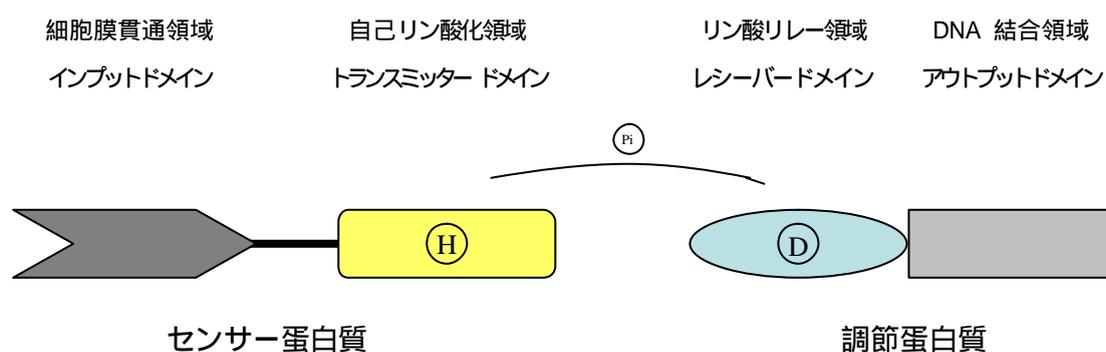


図2 センサー蛋白質と調節蛋白質の構造

センサー蛋白質と調節蛋白質の構造を図に示した。センサー蛋白質には N 末端側からインプットドメインとトランスミッタードメインが配座されている。調節蛋白質には N 末端側から、レシーバードメインとアウトプットドメインが配座されている。リン酸リレーは、センサー蛋白質のトランスミッタードメインに存在するヒスチジン残基と、調節蛋白質のレシーバードメインに存在するアスパラギン酸残基との間で起こる。

tumefaciens の植物への病原性に関わる VirA-VirG も含まれていた(Nixon *et al.*, 1986)。以前の解析でこれらの遺伝子 *virA*, *virG* が病原性に必須であることが示されていたことから、2成分制御系への注目が高まった(Klee *et al.*, 1983; Okker *et al.*, 1984; Stachel *et al.*, 1986)。その後、ヒトの病原性細菌である *Bordetella pertussis* (百日咳菌) でも病原性に関わる2成分制御系 BvgS-BvgA が発見された(Stibitz *et al.*, 1989)。また BvgS-BvgA は、類縁種である *Bordetella parapertussis* (パラ百日咳菌; ヒトに感染) や *Bordetella bronchiseptica* (気管支敗血症菌; 哺乳類全般に感染) でも見いだされたことから、広く保存された病原性に関わる2成分制御系として知られるようになった(Heininger *et al.*, 2002)。それだけでなく、*Salmonella typhimurium* の PhoQ-PhoP や *Streptococcus pyogenes* の CsrS-CsrR など、その他多くの2成分制御系が病原性に関わるということが報告されたことから、その分子機構の解明のため、2成分制御系のより深い知見が求められている(Miller *et al.*, 1989; Heath *et al.*, 1999;)。

これらのセンサータンパク質のうちVirA とBvgS は先に示した構造とは異なることが報告されている。VirA はインプットドメインとトランスミッタードメインのC末端側に調節蛋白質のレシーバードメインを持つハイブリッドセンサーである(Chang *et al.*, 1996; Beier *et al.*, 1996)。BvgS は、VirAの構造のC末端側に、更にセンサー蛋白質のトランスミッタードメインを持つ(図3)。これらと同じ構造を持つセンサー蛋白質は大腸菌でも存在する。大腸菌のRcsC センサー蛋

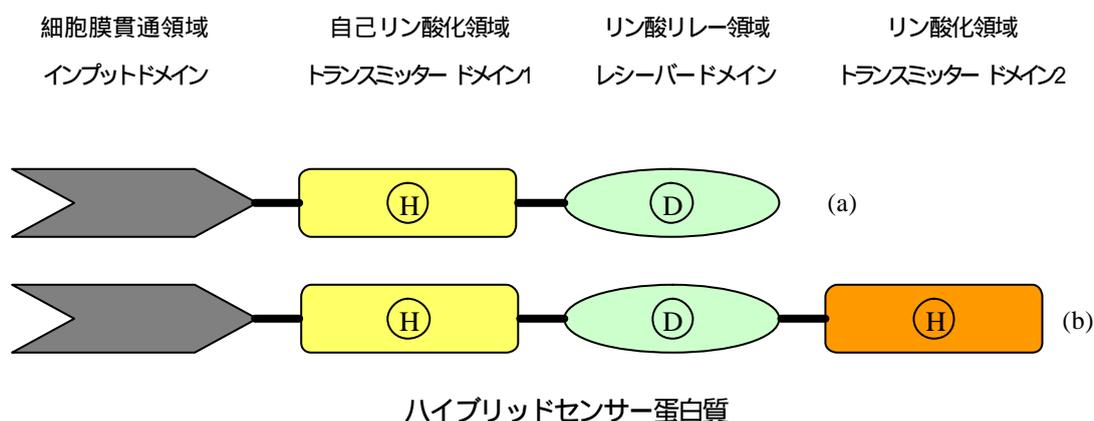


図3 ハイブリッドセンサー蛋白質の構造

ハイブリッドセンサー蛋白質の構造を示した。ハイブリッドセンサー蛋白質は一般的なセンサー蛋白質の構造のC末端側に調節蛋白質のレシーバードメインを持つ(a)タイプと、この構造の更にC末端側にトランスミッタードメインを持つ(b)タイプが見つかっている。

白質はVirA 蛋白質と同様の構造を示し、細胞膜外多糖成分の合成および分泌に関わることが報告されている(Clarke *et al.*, 2002)。また、ArcB センサー蛋白質はBvgS 蛋白質と同様の構造を示し、嫌気・好気状態を感知することが報告されている。特にArcB は大腸菌のハイブリッドセンサー蛋白質としてよく研究されており、このセンサー蛋白質は、トランスミッタードメインとレシーバードメイン間で、実際にヒスチジン-アスパラギン酸-ヒスチジンの多段階リン酸リレーが行われることが報告されている(Mizuno, 1997; Georgellis *et al.*, 1997)。また、この多段階リン酸リレーはリン酸基伝達の過程で、その活性を制御する因子の存在が知られており、こうした付加的な制御機構を持つことでハイブリッドセンサーは、幾つもの状況に、より厳密に応じることができる高度な情報伝達を可能にすると考えられている(Georgellis *et al.*, 1999)。このことから、同様の構造を持つVirA やBvgS も様々な状況に対応した活性化機構をもつと考えられている。

現在では、2成分制御系は酵母やシロイナズナなどの真核生物にも存在することが報告されており、出芽酵母ではセンサー蛋白質 SLN1 が浸透圧応答と関連した情報伝達系で機能していることが初めに報告された(Ota *et al.*, 1993)。このセンサー蛋白質も図 3(a) タイプのハイブリッド型に分類された。その後の解析で調節蛋白質である SSK1 が同定され、また SLN1 センサー蛋白質と SSK1 調節蛋白質との間のリン酸リレーを橋渡しする HPt 因子(Histidine-containing phosphotransfer)である YPD1 も同定された(Pasas *et al.*, 1996)。HPt とはハイブリッドセンサーのレシーバードメインからリン酸基を受容し、調節蛋白質のレシーバードメインに受け渡す働きをする蛋白質であり、その反応に使われる残基がヒスチジンである。これら SLN1-YPD1-SSK1 のリン酸リレーが大腸菌の ArcB で知られる多段階リン酸リレーに当てはまることから、2成分制御系は普遍的なシグナル伝達機構として認識されるようになった。また調節蛋白質 SSK1 は転写因子ではなく、MAP(mitogen-activated protein) キナーゼの一つである HOG1 へのキナーゼカスケードの上流でエフェクターとして働くことから、2成分制御系のリン酸リレーを介した MAP キナーゼカスケードとして新たな環境応答システムが成立した。

また、シロイナズナではセンサー蛋白質 ETR1 が植物ホルモンの一種であるエチレンの応答情報伝達系において機能していることが初めに報告された(Chang *et al.*, 1993)。その後シロイナズナの全ゲノム配列が決定されたことから、リン酸リレー関連遺伝子を検索したところ 11 種のセンサー蛋白質、5 種の HPt 因子および 22 種の調節蛋白質が見いだされた(Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Hwang *et al.*, 2002)。明らかとなった全 11 種のセンサー蛋白質のうち 9 種がハイブリッド型であったことから、大腸菌の ArcB 様の多段階リン酸リレーは 2成分制御系のより進化した形であると考えられるようになった。実際、植物ホ

ルモン的一种であるサイトカイニンのレセプターである AHK2, AHK3, AHK4 ではサイトカイニンと結合し、多段階のリン酸リレーが行われることが報告されている(Inoue *et al.*, 2001)。

また、ハイブリッドセンサー蛋白質のリン酸リレーとは異なり、独立した蛋白質間での多段階リン酸リレーが枯草菌で報告されている(Burbulys *et al.*, 1991)。枯草菌は孢子を形成する細菌であり、その開始は厳密にコントロールされている。ここにホスフォリレー系と呼ばれる多段階のリン酸リレーが存在している。このシグナル伝達では孢子形成開始シグナルを受けて自己リン酸化した 3 種のセンサー蛋白質 KinA, KinB, KinC から Spo0F-Spo0B-Spo0A の順にリン酸基が転移され、リン酸化された Spo0A が孢子形成遺伝子群の発現誘導を行うことが報告されている。またこのリン酸リレーは、脱リン酸化活性を持つ蛋白質によってシグナル伝達の制御が行われている。Spo0A は Spo0E によって、Spo0F は RapA(response regulator aspartate phosphatase) によって脱リン酸化される(Ohlsen *et al.*, 1994; Perego, 1997)。これは孢子形成という生き延びる上で必須であるが、不可逆である現象をできる限り厳密に制御するための機構であると考えられている。

ゲノム配列の決定と 2 成分制御系の研究

現在では全塩基配列が決定した、ゲノム解析のモデル細菌である大腸菌や枯草菌で、発現制御ネットワークの解析が進められている。特に 2 成分制御系は環境応答の発現制御ネットワークであり、細菌がよりよく生き抜くための重要なシステムである。したがって、これらのシステムを解明することは、生命の基本単位である細胞がどのような発現制御ネットワークを駆使し、機能するかを知る上で重要であると考えられている。そこでマイクロアレイを用いて、大腸菌や枯草菌の 2 成分制御系による発現制御ネットワークの解析が進められた。2 成分制御系調節蛋白質は欠失や過剰発現により、制御遺伝子の転写が変化することが知られている(Ogura *et al.*, 2001)。また、マイクロアレイ解析では、ひとつの生物の全遺伝子の転写が測定できることから、この解析方法を用いて、大腸菌では野生株と調節蛋白質の欠失株において、枯草菌では野生株と調節蛋白質の過剰発現株において転写が比較された。その結果、転写レベルに変化が観察された遺伝子群が同定され、これらの遺伝子群が 2 成分制御系による制御遺伝子の候補とされた。同定された遺伝子群の機能から多くの 2 成分制御系の機能が推定され、その機能解析が進められている(Oshima *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2001)。現在までに大腸菌のセンサー蛋白質と調節蛋白質は、それぞれ全体の 83 % (24/29) と 79 % (27/34) について、枯草菌では、それぞれ全体の 50 % (18/36) と 47 % (16/34) について、その機能が報告されている。

この他に、マイクロアレイによる解析では、様々な培養条件における野生株の転写の測定が行われている。枯草菌の形質転換や孢子形成は、2成分制御系を介した遺伝子の転写誘導により行われることが知られており(Piazza *et al.*, 1999; Predich *et al.*, 1992)、形質転換や孢子形成を誘発する培養条件では、実際に制御下の遺伝子が誘導されることがマイクロアレイ解析でも確認されている。この様な、実際のシグナルを受けた細胞内での2成分制御系による転写調節を解析することも重要である。というのも、2成分制御系のシグナル伝達は、センサー蛋白質から調節蛋白質へのリン酸基の転移であり、シグナル伝達に用いられる領域は、センサー蛋白質間、調節蛋白質間でよく保存されている。このことから、クロストーク(cross-talk)と呼ばれる、対を成さないセンサー蛋白質と調節蛋白質との間でのリン酸基の転移が起こることが報告されているからである。実際、大腸菌のセンサー蛋白質と調節蛋白質との全組み合わせによる *in vitro* でのリン酸リレー解析から、全体の約3%でクロストークが起こることが証明された(Utsumi *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 2005)。この反応の細胞内での解析、換言すると、対を成す2成分制御系が、シグナルを感知して行う転写制御と、対を成さない蛋白質間でのリン酸リレーによる、転写への影響の解析が、細胞内で実際に起こるリン酸リレーに基づいた、2成分制御系の発現制御ネットワークの解析と言える。この様に、個々の遺伝子の機能解析と、様々な培養条件での野生株の遺伝子発現の解析により、実際の細胞内で起こる発現制御ネットワークを明らかにする試みがなされている。

現在、100種を超えるバクテリアで全塩基配列が決定され、アミノ酸配列の相同性から多くの2成分制御系が見いだされている。その中で、個々の2成分制御系の解析が最も行われている生物は枯草菌と大腸菌であり、マイクロアレイ単独の結果を含めると、ほぼ全ての2成分制御系に関して解析が行われている。これらの次に2成分制御系の解析が進められているのは病原性細菌である。特に結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、黄色ブドウ状球菌(*Staphyrococcus aureus*)、肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)における2成分制御系について、その機能が報告されている。しかし、これらの生物における2成分制御系の解析は病原性の分子機構を明らかにするためであり、その他についてはほとんど解析が行われていない。また、解析された遺伝子数はそれぞれ、結核菌(センサー蛋白質 7/13, 調節蛋白質 7/17)、黄色ブドウ状球菌(センサー蛋白質 6/16, 調節蛋白質 6/17)、肺炎連鎖球菌(センサー蛋白質 5/13, 調節蛋白質 6/14)であり、大腸菌や枯草菌と比べて少数である。今後ゲノム解析のモデル生物で2成分制御系の機能が明らかにされることにより、他の生物の2成分制御系の機能の推測が容易になると考えられる。

枯草菌の CitA-CitB ファミリーに属する 2 成分制御系

枯草菌の機能未知 2 成分制御系の解析は、全ゲノム配列決定後、本格的に開始された。アミノ酸配列の相同性から見いだされた 2 成分制御系遺伝子の合計は 70 であり、36 のセンサー蛋白質遺伝子と 34 の調節蛋白質遺伝子が存在することが明らかとなった。しかし、その 8 割(センサー遺伝子: 30/36, 調節蛋白質遺伝子: 26/34) は実験的解析がなされておらず機能未知であった(Kunst *et al.*, 1997; Fabret *et al.*, 1999)。そこでこれらの機能を予測する第一段階として枯草菌の全センサー蛋白質をトランスミッター領域に存在するヒスチジン残基周辺領域の相同性でグループ分けした。大腸菌ではすでにこの手法で 2 成分制御系のグループ分けがなされており、機能の予測が行われている(Mizuno, 1997)。その結果、センサー蛋白質は 5 つのファミリーに分けられた(Fabret *et al.*, 1999)。その一つに大腸菌の CitA ファミリーに該当する CitS, YdbF, YufL のグループ(図 4)が見いだされた。大腸菌の CitA ファミリーとは CitA, DcuS センサー蛋白質が属するグループであり、CitA は CitB 調節蛋白質と対を成す 2 成分制御系で、クエン酸発酵を行う遺伝子群の発現を誘導することが報告されている(Ingmer *et al.*, 1998)。一方、DcuS は DcuR 調節蛋白質を介して、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸などの C₄-ジカルボン酸トランスポーター遺伝子の発現を誘導することが報告されている(Zientz *et al.*, 1998)。このファミリーと枯草菌の CitS, YdbF, YufL ファミリーが高い相同性を示した。その後の解析により、枯草菌の CitS は CitT 調節蛋白質を介して、クエン酸トランスポーターの発現を誘導することが明らかとなった(Yamamoto *et al.*, 2000)。

	332	338	347		47	54	62
YufL 533aa	ALRAQ	SHEFMNKLHVI		YufM 235aa	HIDLILL	DIYMPGKNG	
	330	336	345		43	58	66
DctS 535aa	ALRVQN	HEHMNKLHTI		DctR 226aa	QPDLVIL	DVYMPKKDG	
	333	339	348		47	54	62
CitS 542aa	DLRAQT	HEFSNKLYAI		CitT 226aa	KADLLLL	DIYMPDELG	

CitA ファミリー
センサー蛋白質

CitB ファミリー
調節蛋白質

図4 枯草菌 CitA-CitB ファミリーのアミノ酸配列の比較

リン酸化するアミノ酸周辺の配列を同じファミリー内で比較した。

リン酸化するアミノ酸を緑、3 つに共通するアミノ酸を濃い灰色、

2 つに共通するアミノ酸を薄い灰色で示した。アミノ酸配列の上の数字はそれぞれの N 末端からの位置を示している。

また、YdbF(DctS に改名) は細胞膜外蛋白質である YdbE(DctB に改名) を必要とするが、YdbG (DctR に改名) 調節蛋白質を介して C₄-ジカルボン酸トランスポーター遺伝子の発現を誘導することが明らかとなった(Asai *et al.*, 2000)。しかし、その基質と成りえるのはコハク酸とフマル酸だけであり、リンゴ酸存在下ではトランスポーター遺伝子の発現誘導は起こらなかった。リンゴ酸はクエン酸、コハク酸及びフマル酸と同じくクエン酸サイクルの中間生成物である。また、化学構造式においても炭素鎖の両端にそれぞれ 1 つずつカルボン酸基を持つという共通点がある。このことから、同じ CitA ファミリーに属し、機能未知である YufL センサー蛋白質が YufM 調節蛋白質を介してリンゴ酸トランスポーター遺伝子を誘導すると考えられた。

枯草菌のリンゴ酸トランスポーター遺伝子

枯草菌のゲノム中にはリンゴ酸トランスポーター遺伝子と考えられる *yufR*, *yxkJ*, *yqkI*, *yflS* 遺伝子が存在する(図 5)。

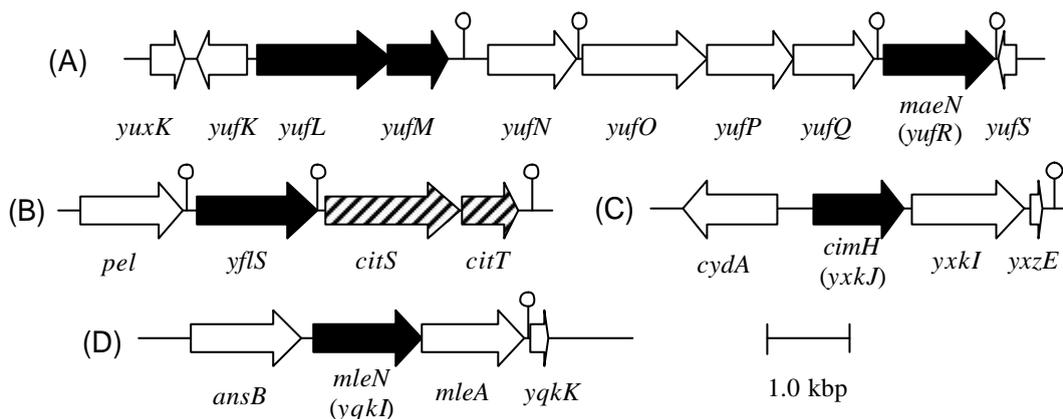


図5 枯草菌のリンゴ酸トランスポーター遺伝子とその周辺の遺伝子構造

本研究で扱った遺伝子を黒矢印で、その周辺の遺伝子を白矢印で示した。また、染色体上のDNA 配列から予測できる転写のターミネーターをステムループ構造で示した((A), (B), (C), (D))。また、*citS*, *citT* 遺伝子の矢印を斜線で示した。

yufR(*maeN* に改名) 遺伝子は、*Streptococcus bovis* のリンゴ酸トランスポーター遺伝子である *maeP* の相同遺伝子である(Kawai *et al.*, 1997)。実際の MaeN 蛋白質を大腸菌で発現させると、Na⁺ と結合したリンゴ酸が取り込まれることが示された。また、*maeN* 遺伝子のパラログとして *yxkJ* (*cimH* に改名) 遺伝子も存在する。この蛋白質も、大腸菌で発現させることにより、リンゴ酸の取り込み能が示された。しかし枯草菌での、これらのトランスポーターの機能解析は行わ

れていない(Wei *et al.*, 2000; Krom *et al.*, 2001)。これらとは別に、 Na^+ - H^+ アンチポーターである YqkI (MleN に改名) は、 H^+ と結合したリンゴ酸と、 Na^+ と結合した乳酸の対向輸送により、リンゴ酸の取り込みを行うことが示された(Wei *et al.*, 2000)。YflS 蛋白質は *Spinach* の葉緑体にあるリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルのリンゴ酸/2-オキソグルタル酸キャリアーと高い相同性を示す(Weber *et al.*, 1995)。我々は、これらのリンゴ酸トランスポーターを本研究での解析の候補とした。

本研究の目的

2成分制御系の発現制御ネットワークの解明には、個々の遺伝子の機能解析が必須である。そこで我々は、機能未知であり、リンゴ酸の利用に関わると考えられる、枯草菌の2成分制御系 YufL-YufM を解析の対象とした。また、リンゴ酸トランスポーターの発現が YufL-YufM により制御されると考え、以下の解析を行った。

まず、リンゴ酸を炭素源とする最少培地において、野生株とリンゴ酸の利用に関わると考えられる遺伝子群の、各破壊株との増殖を比較した。この解析により、リンゴ酸の利用に関わる遺伝子群を同定した。次に、培地中へのリンゴ酸添加により、転写が誘導される遺伝子群を、ノーザンハイブリダイゼーションにより同定した。最後に、DNase I フットプリント解析により調節蛋白質 YufM は、誘導される遺伝子群の上流に結合することを明らかにした。また、誘導される遺伝子群の転写は、調節蛋白質 YufM により制御されることも明らかにした。

これらの結果から明らかとなった、枯草菌の2成分制御系を介したリンゴ酸利用の分子機構について考察する。

II 材料と方法

菌株

本研究に用いた枯草菌株および大腸菌株を表 1 に示した。

使用したプラスミド

本研究に用いたプラスミドを表 2 に示した。また、プラスミドに組み込む DNA 断片の増幅に用いた合成 DNA プライマーの配列を表 3 に示した。

プラスミド pMutinT3(Moriya *et al.*, 1998) は枯草菌の遺伝子破壊株作製に用いた。このプラスミドは LacI 結合配列を付加した *spac* プロモーターと、それを制御するための *lacI*、枯草菌での選択マーカーであるエリスロマイシン耐性遺伝子を持つ。pMutinT3 のマルチクローニングサイトに挿入された DNA 断片と枯草菌染色体が、相同組み換えにより、枯草菌染色体へ一重交差で挿入することができる(図 6(a))。

プラスミド pDLd は、目的遺伝子のプロモーター活性を測定するためのレポーター遺伝子として耐熱性バチルス(*Bacillus stearothermophilis*) 由来の β -ガラクトシダーゼをコードする *bgaB* 遺伝子を持っており、枯草菌染色体上の *amyE* 遺伝子に、二重交差で組み込むための配列である、*amyE* 遺伝子の 5' 側と 3' 側の配列を持つ(図 6(b))。

プラスミド pDLT3 は目的遺伝子を *spac* プロモーター制御下に置いた形で枯草菌染色体上の *amyE* 遺伝子に、二重交差で組み込むために用いた。このプラスミドは、*spac* プロモーター、*lacI*、枯草菌で選択するためのクロラムフェニコール耐性遺伝子とこれらをはさむ形で *amyE* 遺伝子の 5' 側と 3' 側の配列を持つ(図 6(c))。

yufM 遺伝子の転写に影響を及ぼさない *yufL* 遺伝子の破壊用プラスミド pIFDLC の構築方法と構造を図 7 に示した。このプラスミドが枯草菌の染色体に 2 重交差で組み込まれると、YufL センサー蛋白質は 12 残基のポリペプチドとして発現する。

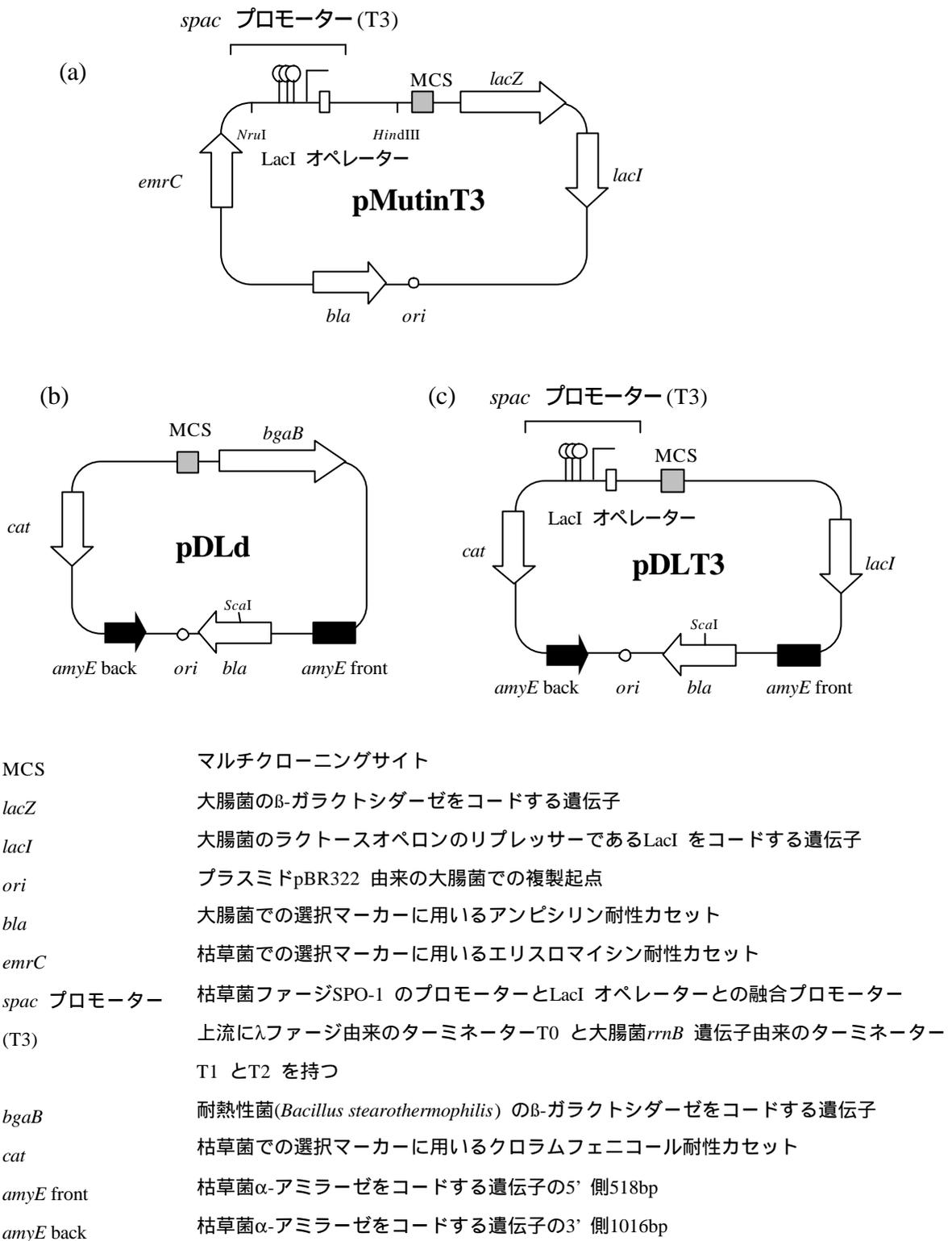


図6 本研究に用いたプラスミドの構造

(a) pMutinT3, (b) pDLd, (c) pDLT3 の構造を図に示した。

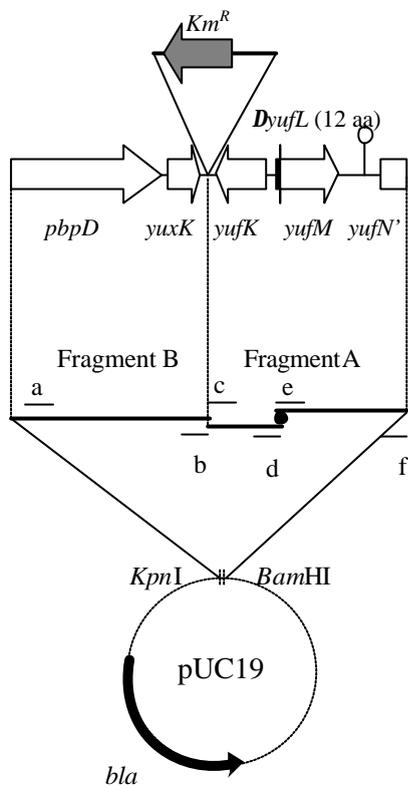


図7 プラスミドpIFDLC の構造と構築方法

小さい矢印は各断片を増幅したときに用いたプライマーを示した(a, IFDL-FF; b, IFDL-FR; c, IFDL-BFF; d, IFDL-BFR; e, IFDL-BRF; f, IFDL-BRR)。黒点はPCR ライゲーションにより結合した部位を示す。組み込んだカナマイシン耐性遺伝子の位置を遺伝子地図の上部に示した。まずPCR ライゲーションによってFragment A を作製した。この断片はyufL 遺伝子の内部(6-526 aa) が欠失しており YufL 蛋白質は12 残基のポリペプチドとなる。これをUC19 プラスミドに組み込んだ。次にFragment B をその上流に組み込んだ。最後にカナマイシン耐性カセットを図に示した向きで挿入し、枯草菌染色体に2 重交差で組み込んだ。

表 1 本研究で用いた菌株

株の名前	遺伝子型	作成方法
<i>B.subtilis</i>		
168	<i>trpC2</i>	S.D.Ehrlich
NT101	<i>trpC2 yufL::pMutinT3</i>	pMUFL→168
NT102	<i>trpC2 yufM::pMutinT3</i>	pMUFM→168
NT103	<i>trpC2 maeN::pMutinT3</i>	pMUFMR→168
NT104	<i>trpC2 yfIS::pMutinT3</i>	pMFLS→168
NT105	<i>trpC2 yqkI::pMutinT3</i>	Laboratory stock
NT106	<i>trpC2 yxkJ::pMutinT3</i>	Laboratory stock
NT201	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a</i>	pMUFRR→168
NT202	<i>trpC2 ΔyufL</i>	pIFDLC→168
NT203	<i>trpC2 amyE::(Pspac-yufL cat)</i>	pDLYufl→168
NT204	<i>trpC2 amyE::(Pspac-dctS^o(1-212 aa)-yufL'(212-533 aa) cat)</i>	pDLDSYL→168
NT205	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL</i>	NT201→NT202
NT206	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::(Pspac-yufL cat)</i>	NT203→NT205
NT207	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::(Pspac-dctS^o-yufL' cat)</i>	NT204→NT205
NT301	<i>trpC2 amyE::(PmaeN(-381 to +230)^b-bgaB cat)</i>	pDR381→168
NT302	<i>trpC2 amyE::(PmaeN(-381 to +230)^b-bgaB cat) yufM::pMutinT3</i>	pMUFM→NT401
NT303	<i>trpC2 amyE::(PmaeN(-267 to +230)^b-bgaB cat)</i>	pDR267→168
NT304	<i>trpC2 amyE::(PmaeN(-98 to +230)^b-bgaB cat)</i>	pDR98→168
NT305	<i>trpC2 amyE::(PmaeN(-92 to +230)^b-bgaB cat)</i>	pDR92→168
NT306	<i>trpC2 amyE::(PmaeN(-89 to +230)^b-bgaB cat)</i>	pDR89→168
NT307	<i>trpC2 amyE::(PmaeN(-85 to +230)^b-bgaB cat)</i>	pDR85→168
NT401	<i>trpC2 amyE::(PyfIS(-339 to +196)^c-bgaB cat)</i>	pDS339→168
NT402	<i>trpC2 amyE::(PyfIS(-339 to +196)^c-bgaB cat) yufM::pMutinT3</i>	pMUFM→NT501
NT403	<i>trpC2 amyE::(PyfIS(-162 to +196)^c-bgaB cat)</i>	pDS162→168
NT404	<i>trpC2 amyE::(PyfIS(-98 to +196)^c-bgaB cat)</i>	pDS98→168
NT405	<i>trpC2 amyE::(PyfIS(-92 to +196)^c-bgaB cat)</i>	pDS92→168
NT406	<i>trpC2 amyE::(PyfIS(-85 to +196)^c-bgaB cat)</i>	pDS85→168
NT407	<i>trpC2 amyE::(PyfIS(-73 to +196)^c-bgaB cat)</i>	pDS73→168
NT501	<i>trpC2 Δpta(pta::Cm^r(クロラムフェニコール耐性カセット))</i>	Laboratory stock
NT502	<i>trpC2 ΔackA(ackA::Sp^r(スペクチノマイシン耐性カセット))</i>	Laboratory stock
NT503	<i>trpC2 Δpta ΔackA maeN::pMutinT3^a</i>	NT501, NT502 →NT201
NT601	<i>trpC2 yufL::pMutinT3 amyE::(PmaeN(-381 to +230)^b-bgaB cat)</i>	NT301→NT101
<i>E.coli</i>		
C600	<i>supE44 hsdR17 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21</i>	Laboratory stock
DH5α	<i>supE44 ΔlacZ U169(φ80lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 glrA96 thi-1 relA1</i>	TaKaRa
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdSB (rB mB) gal dcm Δ(srl-recA)306::Tn10(DE3) pLysS</i>	Novagen

a. pMutinT3 に存在する *spac* プロモーターを含む 367 bp(*Hind*III-*Nru*I) の領域が削除されたプラスミドを示す。

b. *maeN* 遺伝子の開始コドンからの塩基数を示す。

c. *yfIS* 遺伝子の開始コドンからの塩基数を示す。

表 2 本研究で使用および作製したプラスミド

プラスミド名	用いたプラスミド	説明	用いたプライマー
pMutinT3		枯草菌の遺伝子変異株作成用プラスミド ^a	
pMUFL	pMutinT3	<i>yufL</i> 遺伝子の内部配列 272 bp (18 ~ 290) ^b を組み込んだプラスミド	UFL-F, UFL-R
pMUFM	pMutinT3	<i>yufM</i> 遺伝子の内部配列 252 bp (18 ~ 270) ^b を組み込んだプラスミド	UFM-F, UFM-R
pMUFR	pMutinT3	<i>maeN</i> 遺伝子の内部配列 200 bp (29 ~ 229) ^b を組み込んだプラスミド	UFR-F, UFR-R
pMFLS	pMutinT3	<i>yflS</i> 遺伝子の内部配列 315 bp (213 ~ 528) ^b を組み込んだプラスミド	FLS-F, FLS-R
pMUFRd	pMutinT3 ^a	<i>maeN</i> 遺伝子の内部配列 200 bp (29 ~ 229) ^b を組み込んだプラスミド	UFR-F, UFR-R
pIFDLC	pUC19	<i>pbpD</i> 遺伝子から欠損 <i>yufL</i> 遺伝子を含む <i>yufN</i> 遺伝子までをカバーする 6046 bp と、その間にカナマイシン耐性遺伝子を組み込んだプラスミド (図 7 を参照)	IFDL-FF, IFDL-FR IFDL-BFF, IFDL-BFR, IFDL-BRF, IFDL-BRR,
pDLT3		目的遺伝子を <i>spac</i> プロモーター制御下に置いた形で枯草菌染色体の <i>amyE</i> 遺伝子に組み込むために <i>amyE</i> 遺伝子の 5' 側および 3' 側の配列の一部を組み込んだプラスミド	
pDLYufl	pDLT3	<i>yufL</i> 遺伝子全長を組み込んだプラスミド	UFLF-F, UFLF-R
pDLDSYL	pDLT3	<i>dctS</i> 遺伝子の開始コドンから 212 番目までのアミノ酸と <i>yufL</i> 遺伝子の 212 から 533 番目までのアミノ酸に相当する DNA を結合させて組み込んだプラスミド	SLF-FF, SLF-FR, SLF-MF, SLF-MR SLF-BF, SLF-BR,
pDLd		pBR322 に <i>Bacillus stearothermophilus</i> 由来の耐熱性 <i>lacZ</i> をコードする <i>bgaB</i> 遺伝子と枯草菌の <i>amyE</i> 遺伝子の 5' 側および 3' 側の配列の一部を組み込んだプラスミド	
pDR381	pDLd	<i>maeN</i> 遺伝子のプロモーター領域(-381 to 230) ^c を組み込んだプラスミド	EUFR-F1, UFR-R
pDR267	pDLd	<i>maeN</i> 遺伝子のプロモーター領域(-267 to 230) ^c を組み込んだプラスミド	EUFR-F2, UFR-R
pDR98	pDLd	<i>maeN</i> 遺伝子のプロモーター領域(-98 to 230) ^c を組み込んだプラスミド	EUFR-F3, UFR-R
pDR92	pDLd	<i>maeN</i> 遺伝子のプロモーター領域(-92 to 230) ^c を組み込んだプラスミド	EUFR-F4, UFR-R
pDR89	pDLd	<i>maeN</i> 遺伝子のプロモーター領域(-89 to 230) ^c を組み込んだプラスミド	EUFR-F5, UFR-R
pDR85	pDLd	<i>maeN</i> 遺伝子のプロモーター領域(-85 to 230) ^c を組み込んだプラスミド	EUFR-F6, UFR-R
pDS339	pDLd	<i>yflS</i> 遺伝子のプロモーター領域(-339 to 196) ^d を組み込んだプラスミド	EFLS-F1, EFLS-R
pDS162	pDLd	<i>yflS</i> 遺伝子のプロモーター領域(-162 to 196) ^d を組み込んだプラスミド	EFLS-F2, EFLS-R
pDS98	pDLd	<i>yflS</i> 遺伝子のプロモーター領域(-98 to 196) ^d を組み込んだプラスミド	EFLS-F3, EFLS-R
pDS92	pDLd	<i>yflS</i> 遺伝子のプロモーター領域(-92 to 196) ^d を組み込んだプラスミド	EFLS-F4, EFLS-R
pDS85	pDLd	<i>yflS</i> 遺伝子のプロモーター領域(-85 to 196) ^d を組み込んだプラスミド	EFLS-F5, EFLS-R
pDS73	pDLd	<i>yflS</i> 遺伝子のプロモーター領域(-73 to 196) ^d を組み込んだプラスミド	EFLS-F6, EFLS-R
pET15b		大腸菌細胞内での蛋白質過剰発現用プラスミド	
pETYuflM	pET15b	<i>yufM</i> 遺伝子全長を組み込んだプラスミド	UFMF-F, UFMF-R

a. *spac* プロモーターを含む 367 bp (*Hind*III-*Nru*I) の領域が削除されたプラスミドを示す。

b. 各遺伝子の開始コドンからの塩基数を示す。

c. *maeN* 遺伝子の開始コドンからの塩基数を示す。

d. *yflS* 遺伝子の開始コドンからの塩基数を示す。

表3 本研究で使用したプライマー

プライマー	配列(5'-3')	制限酵素
UFL-F	AAGA <u>AGCTT</u> CTGCAAACCACTCACC	<i>Hind</i> III
UFL-R	GGA <u>GGATCC</u> GCGGATACCGTTCATATCC	<i>Bam</i> HI
UFM-F	AAGA <u>AGCTT</u> GTTGAAGATGACCCCATGG	<i>Hind</i> III
UFM-R	GGA <u>GGATCCT</u> GATCAGTCAAGCTCGC	<i>Bam</i> HI
UFR-F	AAGA <u>AGCTT</u> TTTACCTGAGCAAAAAGAC	<i>Hind</i> III
UFR-R	GGA <u>GGATCC</u> CCTATGTCTCCGAGAAAC	<i>Bam</i> HI
FLS-F	AAGA <u>AGCTT</u> GTTACTGCACTAACTAAGTGG	<i>Hind</i> III
FLS-R	GGA <u>GGATCCT</u> TCTCTGTTCCATTTGCC	<i>Bam</i> HI
IFDL-FF	GGT <u>GGTACC</u> AGAGTGACCATGTTACGAAAAATAATC	<i>Kpn</i> I
IFDL-FR	CT <u>CCTCGAG</u> TCCTAGCCATTTTTTATTTACGG	<i>Xho</i> I
IFDL-BFF	GGT <u>GGTACC</u> ATGCT <u>CCTCGAG</u> CAAATCTGACCACCAAACGC	<i>Kpn</i> I, <i>Xho</i> I
IFDL-BFR	cttcggttctgttttttCATATAAAACTTCCTTACGTTT	
IFDL-BRF	aaaaaacagaaccgaagGAGGAAAATCATG	
IFDL-BRR	GGA <u>GGATCC</u> GTCAAAAATCTCACGCGCC	<i>Bam</i> HI
UFLF-F	GGA <u>GGATCC</u> TTAATCATGATTTTCCTCCTTCG	<i>Bam</i> HI
UFLF-R	GGA <u>GGATCC</u> GTAAGGAAGTTTTATGAAAAAAC	<i>Bam</i> HI
SLF-FF	CT <u>CCTCGAG</u> CGCAGGAATCATAAACGTAAGGAAGTTTTATATGAACA AAAAGAAGCTCTCAATCC	<i>Xho</i> I
SLF-FR	agcatcgctcctcttcaTACATTCGGACAATCTCATGG	
SLF-MF	ccatgagattgccgaatgaTGAAGAACGAGCGCGATGCT	
SLF-MR	ATAG <u>GTACCT</u> CATTAACACAAGCTCC	<i>Kpn</i> I
SLF-BF	GGA <u>GGATCC</u> CTCGAGTGA <u>GGTACCT</u> ATCCAGCTGAAAGG	<i>Bam</i> HI, <i>Xho</i> I, <i>Kpn</i> I
SLF-BR	GGA <u>GGATCC</u> TTAATCATGATTTTCCTCCTTCGG	<i>Bam</i> HI
EUFR-F1	GAAGAAT <u>TCGT</u> ATTTCGGAAAATGGCATCCG	<i>Eco</i> RI
EUFR-F2	GAAGAAT <u>TCGT</u> GTATATGCTGATGGCTCCTTATATC	<i>Eco</i> RI
EUFR-F3	GAAGAAT <u>TCCT</u> TAAATTTAATGTTTATTAGTTTTTT	<i>Eco</i> RI
EUFR-F4	GAAGAAT <u>TCCT</u> TAAATGTTTATTAGTTTTTTAACTT	<i>Eco</i> RI
EUFR-F5	GAAGAAT <u>TC</u> CAATGTTTATTAGTTTTTTAACTTAA	<i>Eco</i> RI
EUFR-F6	GAAGAAT <u>TCGT</u> TTATTAGTTTTTTAACTTAAAAAATATG	<i>Eco</i> RI
EFLS-F1	GAAGAAT <u>TCCT</u> GTGCTGCTGCTAAAACGATC	<i>Eco</i> RI
EFLS-F2	GAAGAAT <u>TCGT</u> TATAAATCAAGCGGGTGC	<i>Eco</i> RI
EFLS-F3	GAAGAAT <u>TC</u> TTGTGTTTTTTAATTAATTAATTAATGTTTATTAAGTTAG	<i>Eco</i> RI
EFLS-F4	GAAGAAT <u>TCGT</u> TTTTTAATTAATTAATTAATGTTTATTAAGTTAGTTAAG	<i>Eco</i> RI
EFLS-F5	GAAGAAT <u>TC</u> CAATTAATTAATTAATGTTTATTAAGTTAGTTAAGGAG	<i>Eco</i> RI
EFLS-F6	GAAGAAT <u>TCGT</u> TTATTAAGTTAGTTAAGGAGTAGAATGG	<i>Eco</i> RI
EFLS-R	GGA <u>GGATCC</u> GCAATTCACCCATTGGC	<i>Bam</i> HI
EX-R	CAAGACCAAATTTTTGAAACAGG	
EX-S	GGGAATAAACAGATGATTAGTCCC	
UFMF-F	CATCATCATCAT <u>CATATG</u> ATTAATGTACTAATAGTTGAAGATG	<i>Nde</i> I
UFMF-R	GGA <u>GGATCC</u> TTATAGATATTGCTTTATTCCGTTAATG	<i>Bam</i> HI
RFOOT-F	GAAGAAT <u>TCGG</u> CGTGCCTTATATTAAGGAAAAAG	<i>Eco</i> RI
RFOOT-R	GGA <u>GGATCC</u> TTGGAATTGCTCCCATGTC	<i>Bam</i> HI
SFOOT-R	GGA <u>GGATCC</u> GGAACAAGCTTTACTGCTGACTG	<i>Bam</i> HI
T3F	TTTATCTACAAGGTGTGG	
T3RT7	CAGGAAACAGCTATGACCTAATACGACTACTATAGGGCGAAGTGTAT CAACAAGCTGG	

下線は制限酵素の認識配列を示す。小文字は PCR ライゲーションの為に付加した配列を示す。

使用培地

実験に使用した培地を下記に示した。また、高圧蒸気滅菌（121 °C、15 分）後の培地に必要に応じてアンピシリン 50 µg/ml、エリスロマイシン 0.5 µg/ml、カナマイシン 5 µg/ml、クロラムフェニコール 10 µg/ml、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactopyranoside) 120 µg/ml あるいは 1 mM IPTG(isopropyl 1-thio-β-D-galactoside) を添加して実験に用いた。

・ LB 培地

10 g/l Bacto Tryptone(Difco)
5 g/l Bacto Yeast Extract(Difco)
5 g/l NaCl

・ CI 培地

20 mg/ml (NH₄)₂SO₄
140 mg/ml K₂HPO₄·3H₂O
60 mg/ml KH₂PO₄
10 mg/ml sodium citrate·2H₂O
5 mM MgSO₄
0.5 % glucose
0.1 % casein hydrolysate
50 µg/ml L-Tryptophan

・ CII 培地

20 mg/ml (NH₄)₂SO₄
140 mg/ml K₂HPO₄·3H₂O
60 mg/ml KH₂PO₄
10 mg/ml sodium citrate·2H₂O
5 mM MgSO₄
0.5 % glucose
0.03 % casein hydrolysate
10 µg/ml L-Tryptophan

・ グルコース-グルタミン最少培地(GGM 培地) (1 L あたり)

100 ml 10 x Minimal salt solution 1(autoclaved)
8 ml 50 % glucose(autoclaved)
5 ml 1 % L-tryptophan(filtration)

50 ml 4% L-glutamine(filtration)
2 ml FeCl₃ 2 mg/ml(autoclaved)
2 ml MnSO₄(autoclaved)
10 ml 100 x Trace element(autoclaved)
0.8 ml 1 M MgSO₄

・ リンゴ酸最少培地(SMM 培地) (1 L あたり)

100 ml 10 x Minimal salt solution 2(autoclaved)
5 ml 1% L-tryptophan(filtration)
2 ml FeCl₃ 2 mg/ml(autoclaved)
2 ml MnSO₄(autoclaved)
10 ml 100 x Trace element(autoclaved)
0.8 ml 1 M MgSO₄
0.5 % malic acid

・ NYE 培地 (1 L あたり)

100 ml 10 x Minimal salt solution 2(autoclaved)
5 ml 1 % L-tryptophan(filtration)
2 ml FeCl₃ 2 mg/ml(autoclaved)
2 ml MnSO₄(autoclaved)
10 ml 100 x Trace element(autoclaved)
0.8 ml 1 M MgSO₄
5 ml 10 % yeast extract(filtration)

・ 10 x Minimal salt solution 1

19.87 g/l K₂SO₄
108 g/l K₂HPO₄
60 g/l KH₂PO₄
10 g/l sodium citrate·2H₂O

・ 10 x Minimal salt solution 2

140 g/l K₂HPO₄
60 g/l KH₂PO₄
10 g/l sodium citrate·2H₂O
20 g/l (NH₄)₂SO₄

- 100 x Trace element
- 0.55 g/l CaCl_2
- 0.17 g/l ZnCl_2
- 0.043 g/l $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0.06 g/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 0.06 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

大腸菌の形質転換およびプラスミド DNA の調整

プラスミド DNA は電気穿孔法により、大腸菌 C600、DH5 α 、あるいは BL21(DE3)pLysS 株に導入した。形質転換体は、アンピシリン(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、カナマイシン(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) あるいはクロラムフェニコール(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む寒天平板上で選択した。組換え体プラスミド DNA はアルカリ溶菌方法(Sambrook *et al.*, 1989) で抽出した。

塩基配列の決定

プラスミド中の挿入 DNA に変異がないことを確認するために、塩基配列の決定を行った。まず、プラスミドに挿入された DNA 断片を PCR により増幅し、PEG 沈殿により精製した。得られた DNA 断片を鋳型として、ABI PRISM Dye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction Kit を用いて Cycle sequencing 反応を行い、ABI3100 型シーケンサーで塩基配列を決定した。

枯草菌の形質転換

枯草菌の形質転換は Anagnostopoulos らの方法に従って行った (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961)。形質転換には、1 μg のプラスミド DNA あるいは 100 ng の枯草菌染色体 DNA を用いた。形質転換体は、抗生物質を添加した LB プレートで選択した。

- 枯草菌の形質転換は以下の手順で行った。

枯草菌株を LB プレート上で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、一晩前培養を行う。

5 ml CI 培地に細胞を懸濁し、定常期まで 37 $^{\circ}\text{C}$ で振とう培養する。

集菌後、2 倍量の CII 培地に懸濁し、30 分振とう培養する。

培養液 200 μl に、プラスミド DNA 1 μg または染色体 DNA 100 ng を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間振とう培養を行う。

適当な抗生物質を含む LB プレートにて一晩培養を行う。

抗生物質は以下の濃度で使用した。

エリスロマイシン 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

クロラムフェニコール 5 µg/ml

カナマイシン 5 µg/ml

また、必要な場合には 1 mM の IPTG もしくは 120 µg/ml の X-gal を添加した。

枯草菌の染色体 DNA の調整

Marmur の方法に従い、枯草菌細胞から染色体 DNA を抽出した(Marmur *et al.*, 1961)。枯草菌を LB 培地にて 37 °C で振とう培養し、O.D.₆₀₀ が 1.0 の時点で集菌した。得られた菌体を溶菌バッファー(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 100 mM KCl, 1 mg/ml リゾチーム(lysozyme)) で 37 °C、20 分間の加温を行い、フェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール(25:24:1) 抽出を行った。染色体 DNA を含む水層にエタノールを加え、界面に析出した染色体 DNA をガラス棒に巻きつけて回収した。回収した DNA は 70 %エタノールで洗浄後、TE 緩衝溶液(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) に溶解し、DyNAQuant 200(Amersham Bioscience)を用いて DNA 濃度を測定した。

β-ガラクトシダーゼ活性の測定

Yangman らの方法に従い、細胞内の β-ガラクトシダーゼ活性の測定を行った (Yangman *et al.*, 1985)。

・酵素反応

MUG (4-methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside) を β-ガラクトシダーゼの活性測定の基質として用いた。MUG は β-ガラクトシダーゼにより加水分解され、4 MU(4-methylumbelliferone) を生産する。凍結保存した細胞を、10 µg/ml DNase I および 100 µg/ml リゾチームを含む 0.2 ml の Z buffer(0.06 M Na₂HPO₄, 0.04 M NaH₂PO₄, 0.01 M KCl, 0.001M MgSO₄ 1 mM DTT (*threo*-1,4-dimercapto-2,3-butanediol)) に懸濁した後、37 °C、20 分間の加温を行い溶菌した。遠心分離(14000 rpm, 5 分間) を行い、得られた上清 50 µl に 10 µl, 0.4 mg/ml MUG を加え攪拌した後、28 °C で 15-30 分間反応させた。反応の停止は 90 °C、5 分間の加温により行った。4 MU の濃度は Labsystems Fluoroscan II(大日本製薬株式会社) を用いて測定した。菌体蛋白量 1 mg を用いたとき 1 分間で 1 pmol の MUG を加水分解する β-ガラクトシダーゼの酵素活性を 1 Unit(単位) とした。蛋白質濃度の測定には Protein Assay Reagent (Bio Rad) を用いた。標準蛋白質として牛アルブミン蛋白質(albumin, bovine) を用いた。

耐熱性 β-ガラクトシダーゼ(BgaB) 活性の測定は、酵素反応温度 65 °C、反応停止温度 0 °C(氷上) の条件で行った。

ノーザンハイブリダイゼーション

・ RNA の抽出

枯草菌株を GMM 培地で O.D.₆₀₀ が 0.01 から培養し、0.35 に達した時点で集菌し-80 °C で保存した。得られた枯草菌細胞から、Igo & Losick の方法に従い全 RNA を抽出した(Igo & Losick, 1986)。凍結した菌体に 0.55 ml の LETS buffer(0.1 M LiCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 % SDS(sodium lauryl sulfate))、0.5 ml のガラスビーズ(井内盛栄堂) および 0.5 ml の水飽和フェノールを加え、懸濁・攪拌した。遠心後、上層 0.4 ml に、0.4 ml のフェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール(25:24:1) を加えて攪拌し、遠心して水層を回収した。この溶液に 1/20 量の 4 M LiCl と 2.5 倍量のエタノールを加えて核酸を沈殿させ、遠心により回収した。沈殿は 70 % エタノールで洗浄し、風乾した。その後 300 μ l の蒸留水に溶解し、3 倍量の 4 M 酢酸ナトリウム(pH 6.0) を加え、-20 °C で 1 時間放置した。この溶液を遠心して、RNA を回収し、風乾後、TE 緩衝液に溶解した。RNA の濃度は 260 nm の吸光度を測定することにより求めた。

・ ジゴキシゲニン標識 RNA プロープの作製

ジゴキシゲニン標識 RNA プロープおよびシグナル検出は DIG Labeling Kit(Roche) のマニュアルに従った。目的遺伝子内部の配列を組み込んだ pMutinT3 プラスミドを鋳型として、T3F-T3T7R プライマーで PCR 反応を行い、得られた PCR 産物を鋳型として T7RNA ポリメラーゼを用いてジゴキシゲニン標識 RNA プロープの作製を行った。

・ 電気泳動およびメンブレンへのプロット

1 % ホルムアルデヒド、1 % アガロースゲルを用いて 1 μ g の全 RNA を電気泳動により分離した。分離した RNA は、10 x SSC 溶液(1.5 M NaCl, 0.3 M クエン酸ナトリウム, pH 7.0) 中でナイロンメンブレン Hybond N+(Amersham Bioscience) にプロットした。その後メンブレンをクロスリンカー(UV Stratalinker 1800(STRATAGENE)) を用いてメンブレンに RNA を UV 固定した。

・ ハイブリダイゼーションとシグナルの検出

ハイブリダイゼーションおよびシグナルの検出は、DIG 化学発光検出キット(Roche) に付属のマニュアルに従い行った。ハイブリダイゼーション溶液(5 x SSC, 0.1 % *N*-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム(sodium *N*-lauroyl sarcosinate), 0.02 % SDS, 2 % Blocking solution(Roche), 50 % ホルムアミド) 中、65 °C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。シグナルの検出には DIG 発光検出キット

(Roche) を用いた。

PET system (Novagen) による YufM 蛋白質の精製

目的蛋白質の N 末端側にヒスチジンタグを融合できるプラスミド pET15b (Novagen) に *yufM* 遺伝子全長をクローニングしたプラスミド pETYufM を作製した。このプラスミドを BL21(DE3)pLysS 株に導入し、アンピシリン(50 µg/ml) を含む LB 培地 100 ml 中で 30 °C、280 rpm の条件で培養した。O.D.₆₀₀ が 0.6 に達した時点で終濃度 1 mM になるよう IPTG を添加した後、3 時間後に集菌した。PET system(Novagen) のマニュアルに従い、得られた細胞から His₆-YufM 蛋白質を精製した。まず、細胞を binding buffer(0.5 M NaCl, 5 mM imidazole, 20 mM Tris-HCl pH 7.9) で洗浄した後、10 ml binding buffer に懸濁し、氷上で超音波による細胞破碎を行った。得られた細胞破碎液を 4 °C、39000 g、20 分間遠心し、その上清から His-Bind resin(Novagen) を充填したカラムにより、His₆-YufM 蛋白質の精製を行った。カラムを 10 ml binding buffer で洗浄した後、0.1–1.0 M imidazole を含む binding buffer で目的蛋白質を溶出した。得られた精製蛋白質を含む画分は、終濃度 10 % になるようグリセロールを加え、-80 °C で保存した。試料中の蛋白質濃度の測定は、Protein Assay reagent(Bio Rad) を用いて行った。

DNase I フットプリント解析

- ・ T4 polynucleotide kinase による合成プライマーの ³²P 標識

YufM 制御遺伝子上流の制御領域の前後に作製したフォワード、リバースプライマー 10 pmol について、1 x Phosphorylation buffer(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT) 中で、T4 polynucleotide kinase 1 µl(TaKaRa) により 5' 末端を標識した。基質として[γ-³²P]ATP (222 TBq, 6000 Ci/mmol, 0.37 MBq/µl) 5 µl を加え、10 µl の反応液中で、37 °C、30 分間反応を行った。その後、90 °C で 2 分間の加熱により反応を停止した。

- ・ PCR 反応によるプローブ DNA の作製

5' 末端 ³²P 標識プライマーと非標識のプライマーのペアを用いて PCR 反応を行い、その産物を NICK Spin Columns(Amersham Bioscience) により精製した後、DNase I フットプリント解析のプローブとして用いた。

- ・ サイクルシーケンス反応によるシーケンスラダーの作製

5' 末端 ³²P 標識プライマー 1 pmol を用いて、非標識の PCR 産物をテンプレートとしてサイクルシーケンス反応を行い、シーケンスラダーを作製した。

サイクルシーケンス反応には、TaKaRa Taq™ Cycle Sequence Kit(TaKaRa) を用いた。

・ YufM 蛋白質と DNA の結合反応および DNase I 処理

YufM 蛋白質とプローブ DNA の結合反応は 50 μ l の反応液中で行った。200,000 cpm, 100 fmol のプローブ DNA、0.5 μ g Poly(dI-dC)、50 mM PIPES(pH 6.2)、200 mM NaCl、4 mM MgCl₂、4 mM DTT、0.5 % Tween-20 および 10 % グリセロールの混合液に 0-70 pmol の精製 YufM 蛋白質を加え、25 °C で 30 分間加温した。反応終了後、0.6 U の DNase I(TaKaRa) を加え、25 °C で 1 分間加温した後、100 μ l の 20 mM EDTA を加え、DNase I を失活させた。さらに、フェノールクロロフォルム・イソアミルアルコール抽出を行い、エタノール沈殿によりプローブ DNA を回収した。

・ 電気泳動とゲルイメージの検出

反応産物を 5 μ l ホルムアミド色素液(95 % ホルムアミド, 20 mM EDTA, 0.05 % BPB(bromophenol blue), 0.05 % キシレンシアノール FF(xylene cyanol FF)) に溶解した後、8 M Urea, 6 % ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。電気泳動は 2500 V, 25 mA, 45 W の条件で 2 時間行った。泳動終了後、ゲルを 3 M 濾紙上に置き、ゲルドライヤーで乾燥させた後、BAS-2500 Imaging Plate(富士フィルム) に一晩感光させた。翌日、バイオイメージングアナライザー-BAS-2500(富士フィルム) によるゲルイメージの検出を行った。

Primer 伸長法

RNA 10 μ g と 5' 末端を標識したプライマー-0.5 pmol を、バッファー(250 mM KCl, Tris-HCl pH 7.4, EDTA 1 mM, 1.25 mM each dNTPs)に混合し、65 °C で 60 分間加温した。その後、徐々に室温まで冷却し、バッファー(最終濃度 Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT) と逆転写酵素 M-MLV(TaKaRa) を加えて、42 °C で 120 分間加温した。逆転写によって合成された cDNA は 5 μ l ホルムアミド色素液(95 % ホルムアミド, 20 mM EDTA, 0.05 % BPB, 0.05 % キシレンシアノール FF) に溶解した後、8 M Urea, 6% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。電気泳動は、2500 V, 25 mA, 45 W の条件で 2 時間行った。泳動終了後、ゲルを 3 M 濾紙上に置き、ゲルドライヤーで乾燥させた後、BAS-2500 Imaging Plate(富士フィルム) に一晩感光させた。翌日、バイオイメージングアナライザー-BAS-2500(富士フィルム) によりゲルイメージの検出を行った。

III 結果

YufL, YufM の遺伝子破壊株のリンゴ酸利用能

2成分制御系 YufL-YufM が、リンゴ酸の利用に関わるかを明らかにするために、*yufL*, *yufM* 各遺伝子に pMutinT3 を挿入した破壊株(NT101, NT102) を作製した。まず、*yufL*, *yufM* 各遺伝子の内部領域をプラスミド pMutinT3 にクローニングし、遺伝子破壊用プラスミド pMUFL, pMUFM を作製した。次に、これらのプラスミドを枯草菌に形質転換し、*yufL*, *yufM* 各遺伝子の破壊株を得た(図 8)。

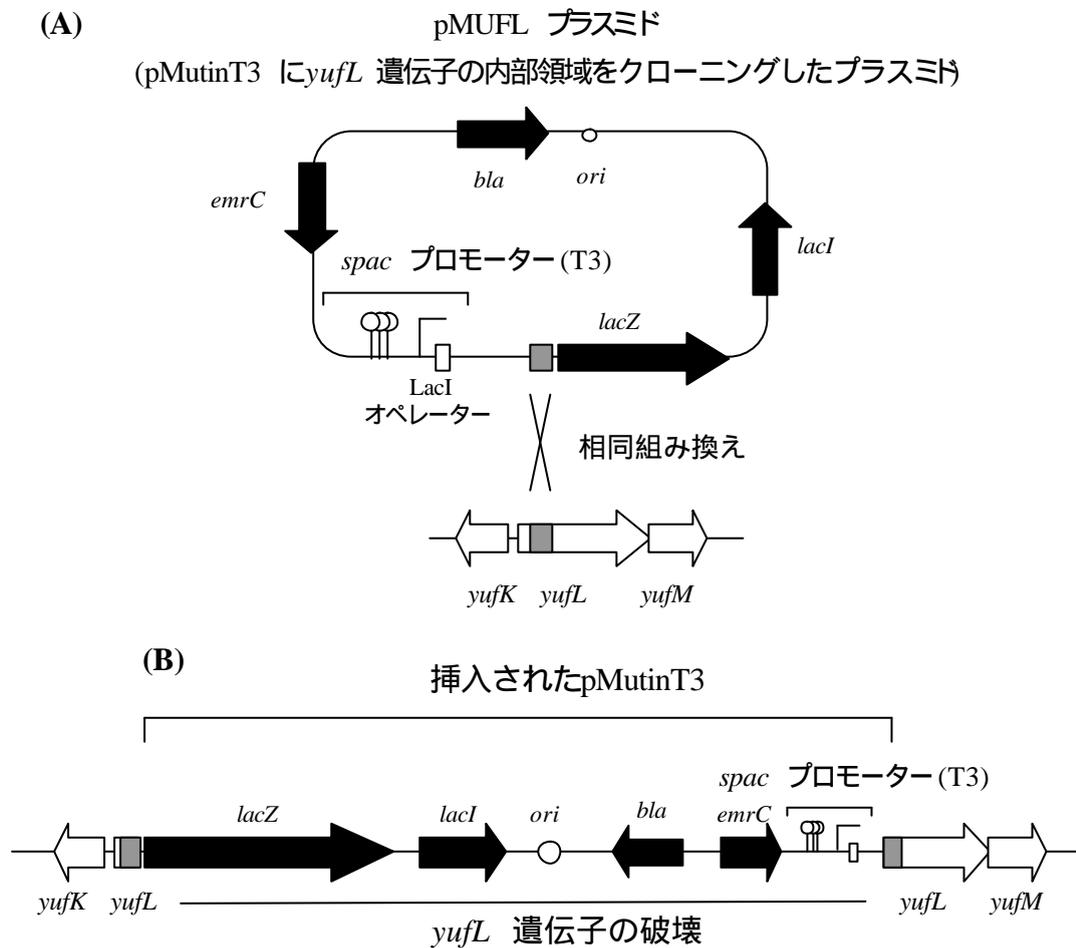


図8 プラスミドpMutinT3 挿入による枯草菌遺伝子の破壊

(A). プラスミドpMutinT3 に *yufL* 遺伝子の内部領域をクローニングした pMUFL プラスミドを図に示した。また、プラスミドに組み込んだDNA断片を灰色で示した。

(B). *yufL* 遺伝子にプラスミドpMutinT3 が組み込まれ、遺伝子が破壊された株の構造を図に示した。また、プラスミドpMutinT3 由来の遺伝子を黒色の矢印で示した。

これらの株を用いて、リンゴ酸を唯一の炭素源とする最少培地(SMM 培地)において増殖を調べた。枯草菌の野生株 168 は SMM 培地で、グルコースを炭素源とする培地と同様の速度で増殖した。一方、*yufL*, *yufM* 遺伝子破壊株は、この培地で増殖することができなかった(図 9)。*yufL* 遺伝子は *yufM* 遺伝子の上流に位置するために、プラスミドの挿入による *yufL* 遺伝子破壊は、下流の *yufM* 遺伝子の転写に影響することが考えられた。そこで *yufM* 遺伝子の転写を確保するために、培地中に IPTG を加えることにより、挿入したプラスミド中に存在する *spac* プロモーターを活性化した(図 8)。このプロモーターは、IPTG 非存在下で LacI 蛋白質がオペレーターに結合し、転写が抑制されるが、IPTG 存在下では LacI 蛋白質が IPTG と結合することにより、オペレーターから解離し、活性化する。すると意外なことに、IPTG 添加により *yufL* 遺伝子破壊株は野生株と同等の増殖を示すようになった。この現象については後で論ずる。

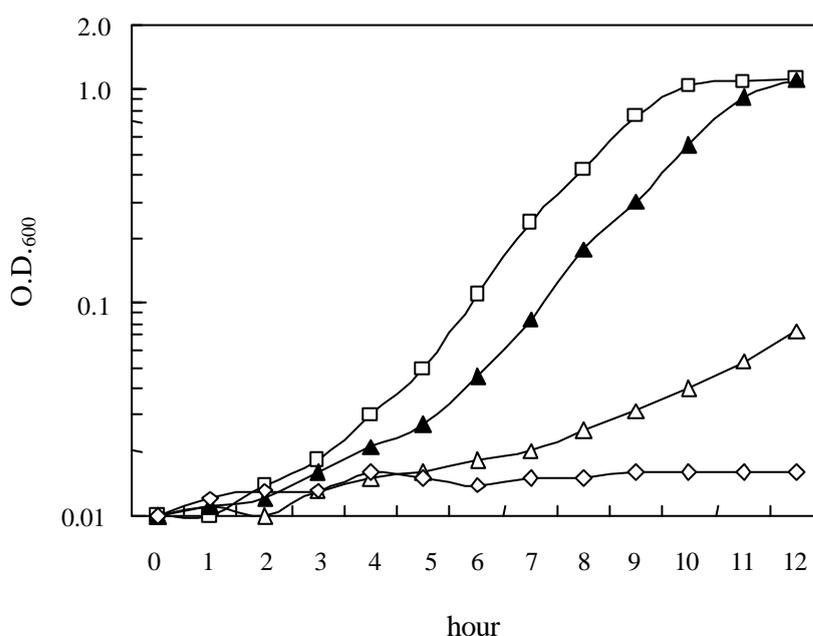


図9 リンゴ酸最少培地(SMM 培地)における野生株と*yufL*, *yufM* 遺伝子破壊株の増殖

は野生株、 は*yufM* 遺伝子破壊株(NT102)、 は*yufL* 遺伝子破壊株(NT101)、 は*yufL* 遺伝子破壊株(NT101) にIPTG を加えた時のそれぞれの増殖曲線を示した。

リンゴ酸の取り込みに関わる遺伝子群の転写解析

枯草菌では、リンゴ酸トランスポーター遺伝子と考えられる 4 つの遺伝子

maeN, *yflS*, *yxkJ(cimH)*, *yqkI(mleN)* が存在する。これらの遺伝子がリンゴ酸の取り込みに関わるのであれば、培地中のリンゴ酸により転写が誘導されると考えられる。そこで各遺伝子にプラスミド pMutinT3 を挿入した破壊株を用いて転写活性を測定した。pMutinT3 はレポーター遺伝子としてプロモーターを持たない *lacZ* を持っており、目的遺伝子へプラスミドが挿入されると、*lacZ* 遺伝子は目的遺伝子のプロモーター領域と転写レベルで融合される(図 8 参照)。この遺伝子構造で目的遺伝子の転写が誘導されると、LacZ 蛋白質の発現が誘導され、LacZ の β -ガラクトシダーゼ活性を指標に、各遺伝子の転写レベルを測定することができる。酵母抽出液を炭素源とする NYE 培地と、NYE 培地に 0.5 % のリンゴ酸を添加した培地で転写レベルを比較したところ、*maeN*, *yflS* 遺伝子の転写が、リンゴ酸を添加した培地で誘導された。*yqkI(mleN)* 遺伝子(NT105) は、どちらの培地でも恒常的に発現しており、*yxkJ(cimH)* 遺伝子(NT106) の転写は低いレベルであった(図 10)。

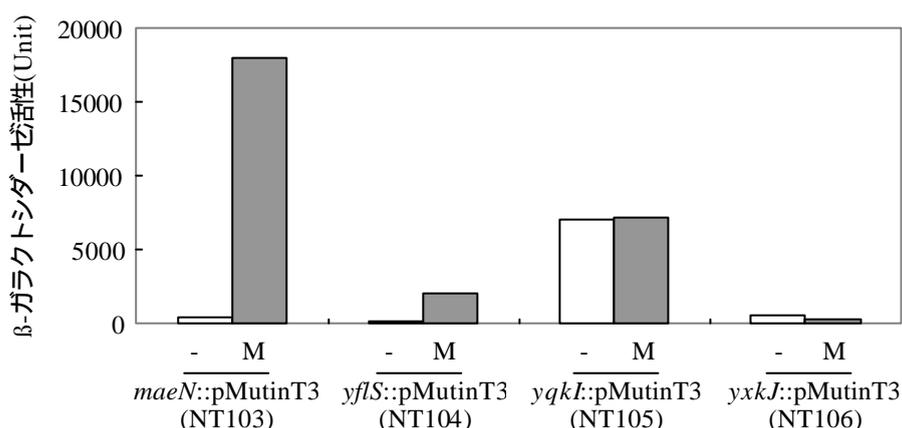


図10 NYE 培地における*maeN*, *yflS*, *yqkI*, *yxkJ* 遺伝子の転写活性

NYE 培地(-) と NYE 培地に 0.5 % のリンゴ酸を添加した培地(M) での *maeN*, *yflS*, *yqkI*, *yxkJ* 遺伝子の転写レベルを示した。

NYE 培地の炭素源は酵母抽出液であり組成が不明であること、また野生株の増殖速度が、NYE 培地と、NYE 培地にリンゴ酸を加えた培地で異なることから、今後の解析には、グルコースを炭素源にした最少培地である GGM 培地と、そこにリンゴ酸、フマル酸、コハク酸の各炭素源をそれぞれ添加した培地を用いることにした。その結果、これらの培地においても *maeN*, *yflS* 遺伝子は、リンゴ酸を添加した培地で転写が誘導され、リンゴ酸と同じ分子数のコハク酸やフマル酸を加えた培地では *maeN*, *yflS* 遺伝子の転写は誘導されなかった(図 11)。この結果から、*maeN*, *yflS* 遺伝子の転写誘導は培地中にリンゴ酸が存在する条件

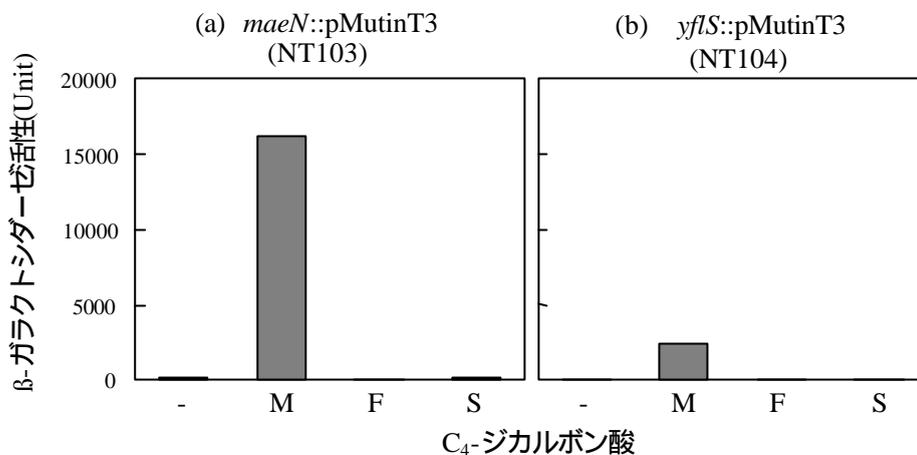


図11 *maeN*, *yfIS* 遺伝子の転写解析

β -ガラクトシダーゼ解析による*maeN*, *yfIS* 遺伝子の転写活性を示した。培地はGGM 培地(-) と GGM 培地にそれぞれ、2 mM リンゴ酸(M)、2 mM フマル酸(F)、2 mM コハク酸(S) を添加した培地を用いた。(a) には*maeN* 遺伝子の転写活性を、(b) には*yfIS* 遺伝子の転写活性を示した。

でのみ起こることが明らかとなった。しかし、 β -ガラクトシダーゼ活性による *maeN*, *yfIS* 遺伝子の転写解析は、各遺伝子の破壊株を用いており、野生株でも培地へのリンゴ酸添加による *maeN*, *yfIS* 遺伝子の転写誘導が起こることを確かめる必要があった。そこで、野生株を用いて *maeN*, *yfIS* 遺伝子のノーザンブロット解析を行った。その結果、 β -ガラクトシダーゼ活性による転写解析の結果と同様に、GGM 培地では *maeN*, *yfIS* 遺伝子の転写は検知できなかったのに対し、GGM 培地にリンゴ酸を添加した培地で、*maeN*, *yfIS* 遺伝子の転写誘導が観察された(図 12A,B)。また、*maeN*, *yfIS* 遺伝子の ORF(open reading frame) のサイズである 1.35kb, 1.45kb のバンドがそれぞれ検出されたことから、これらの遺伝子の転写開始点は開始コドンの近傍にあることが考えられた。そこで、次にプライマー伸長法により転写開始点を同定した。その結果、*maeN* 遺伝子については、開始コドンの 27bp 上流に転写開始点が検出され(図 13)、 $E\sigma^A$ (シグマ A と結合した RNA ポリメラーゼ) による -10 の認識配列と考えられる TGTAGA が見いだされた(図 18)。しかし、明瞭な -35 配列は同定できなかった。このことから *maeN* 遺伝子には $E\sigma^A$ の他に転写を誘導する因子が存在し、その因子が活性化することにより、*maeN* 遺伝子の転写が誘導されると考えられた。一方、*yfIS* 遺伝子は、 β -ガラクトシダーゼ活性による転写解析から、GGM 培地にリンゴ酸を添加した培地での誘導される転写のレベルが低いために、転写開始点を同定することができなかった。

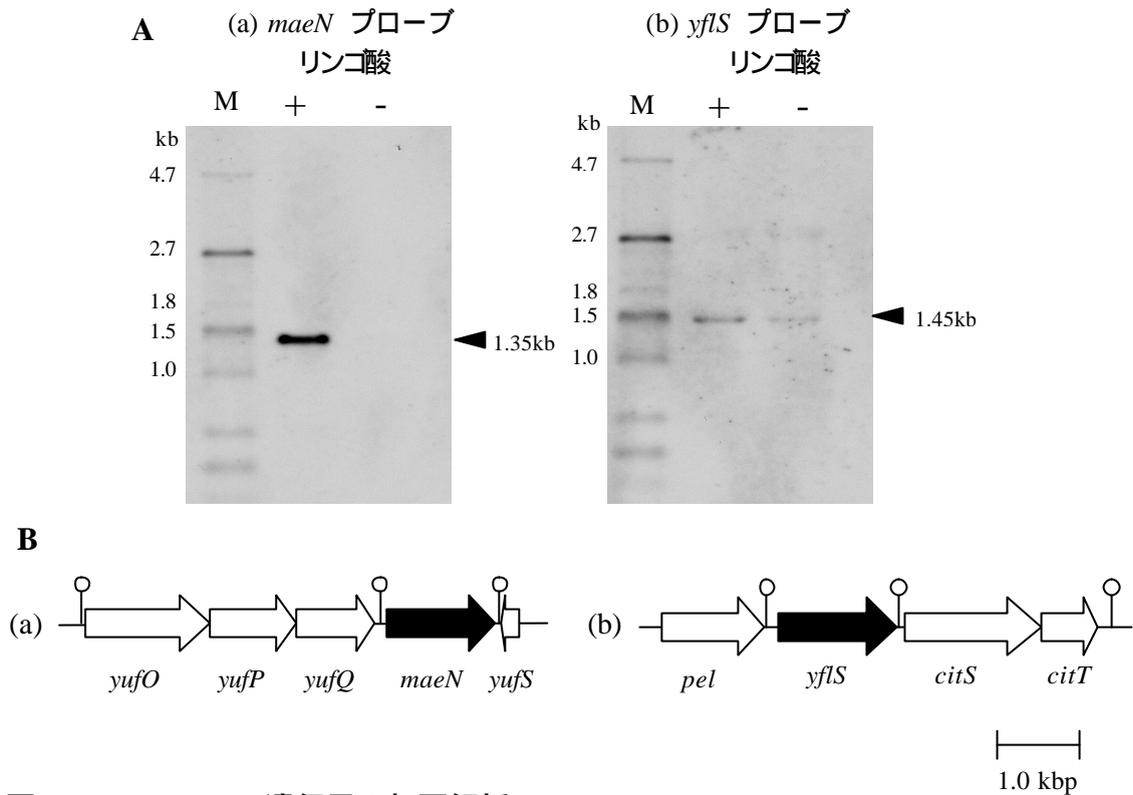


図12 *maeN*, *yflS* 遺伝子の転写解析

A. ノーザンハイブリダイゼーション解析によるリンゴ酸存在下での*maeN*, *yflS* 遺伝子の転写誘導の結果を示した。M は分子量マーカー、(+) がリンゴ酸を加えたGGM 培地、(-) がリンゴ酸を加えないGGM 培地で採取したサンプルを示した。また各図の左側にマーカーサイズを示した。(a) には*maeN* 遺伝子の、(b) には*yflS* 遺伝子の結果を示した。

B. (a) には*maeN* 遺伝子の、(b) には*yflS* 遺伝子の周辺の遺伝子構造を示した。また転写のターミネーターをステムループ構造で示した。

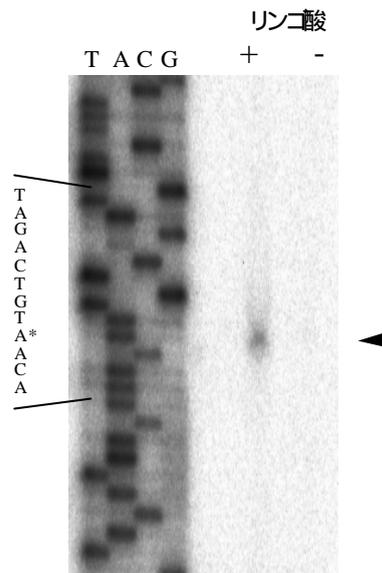


図 13 プライマー伸長法による *maeN* 遺伝子の転写開始点の同定

GGM 培地にリンゴ酸を加えた培地 (+) と加えない培地 (-) で増殖させた菌株から RNA を抽出し、逆転写反応酵素を用いてプライマー伸長法を行った。図の左に TACG のシーケンスラダーを示した。

次に、リンゴ酸トランスポーターと考えられる MaeN, YfiS 蛋白質が、実際にリンゴ酸を取り込むかどうかを確かめるために、リンゴ酸を炭素源とする最少培地(SMM 培地) で野生株と *maeN*, *yfiS* 遺伝子破壊株の増殖を比較した。その結果 *maeN* 遺伝子破壊株(NT103) は増殖しなかったのに対して、*yfiS* 遺伝子破壊株(NT104) は増殖に影響がなかった(図 14)。このことから GGM 培地では、*maeN* 遺伝子がリンゴ酸取り込みにおいて主要な役割を担っていると考えられた。それに対して *yfiS* 遺伝子はリンゴ酸存在下で転写が誘導されるが、この培地ではリンゴ酸の取り込みへの関与を示すことができなかった。

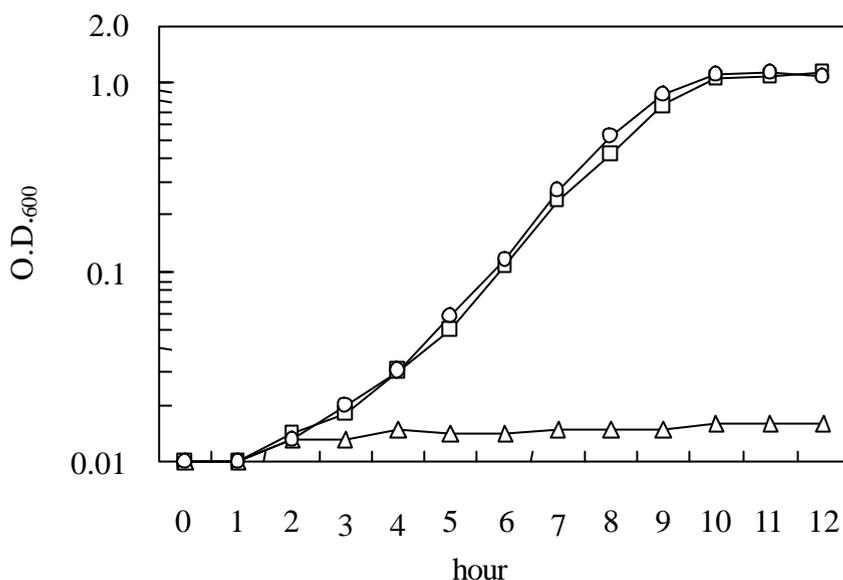


図14 リンゴ酸最少培地(SMM 培地)における野生株と*maeN*, *yfIS* 遺伝子破壊株の増殖

○は野生株、□は*maeN* 遺伝子破壊株(NT103)、△は*yfIS* 遺伝子破壊株(NT104)のそれぞれの増殖曲線を示した。

調節蛋白質 YufM による *maeN*, *yfIS* 遺伝子の転写調節

調節蛋白質 YufM をコードする *yufM* 遺伝子の破壊株が、リンゴ酸を炭素源とする最少培地(SMM 培地)で増殖できなかったこと、リンゴ酸トランスポーターである *maeN* 遺伝子の破壊株も SMM 培地で増殖できなかったことから、YufM 蛋白質は *maeN* 遺伝子の転写調節を行うことが考えられた。そこで、*yufM* 遺伝子破壊株における *maeN* 遺伝子の転写を観察した。また、培地中にリンゴ酸を添加することにより転写が誘導される *yfIS* 遺伝子についても、YufM 蛋白質による転写調節を検討した。

本研究で用いた *yufM* 遺伝子破壊株はプラスミド pMutinT3 の挿入株であり、レポーター遺伝子として *lacZ* を持つ。そのため *maeN*, *yfIS* 遺伝子の転写の測定には異なるレポーター遺伝子を用いる必要がある。そこで耐熱性バチルス (*Bacillus stearothermophilis*) のβ-ガラクトシダーゼである *bgaB* 遺伝子をレポーター遺伝子として、転写の測定に用いた。BgaB は反応至適温度が 62 °C であり、この温度では大腸菌由来の LacZ は β-ガラクトシダーゼ活性を示さないことが報告されている(Yuan *et al.*, 1995)。従って、BgaB のβ-ガラクトシダーゼ活性は LacZ が発現している株でも測定することができる。

まず目的遺伝子のプロモーター領域をプラスミド pDLd 上の MCS(マルチク

ローニングサイト) に組み込むことにより、*bgaB* 遺伝子と転写レベルで融合させた。その後、制限酵素 *ScaI* で消化し、プラスミドを直鎖状にした。プラスミド pDLd は *amyE* 遺伝子へ組み込むための、*amyE* 遺伝子の 5' 側の配列と 3' 側の配列を持つ。これらの配列の相同組み換えにより、二重交差で枯草菌染色体上の *amyE* 遺伝子に組み込んだ(図 15)。

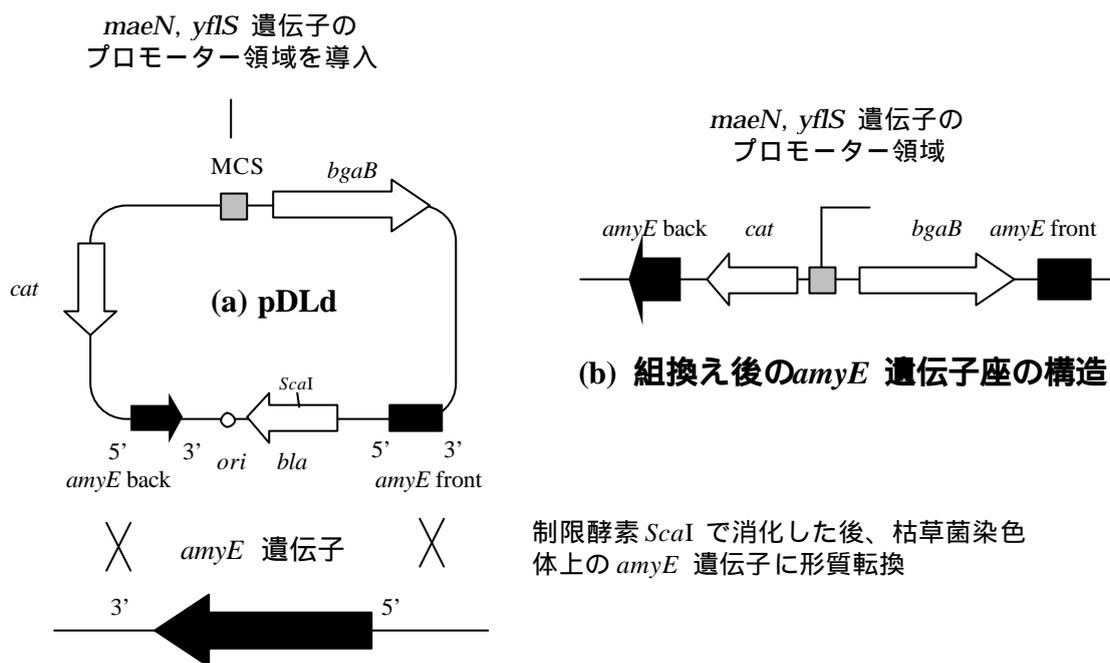


図15 プラスミドpDLd を用いた*bgaB* 遺伝子とプロモーターとの融合と枯草菌染色体上の*amyE* 遺伝子への組み込みの概略図

(a) にプラスミドpDLd を示した。(b) にプロモーターと転写レベルで*bgaB* 遺伝子と融合したpDLd を枯草菌の染色体に組み込んだ株の構造を示した。

これらの株でも *maeN*, *yfIS* 遺伝子ともにリンゴ酸特異的な転写の誘導が観察された。次に、この株の *yufM* 遺伝子をプラスミド pMutinT3 の挿入により破壊したところ、*maeN*, *yfIS* 遺伝子は、培地にリンゴ酸を添加しても転写が誘導されなくなった(図 16)。この結果から、培地中のリンゴ酸存在下で *maeN*, *yfIS* 遺伝子の転写が誘導されるためには調節蛋白質 YufM が必須であることが明らかとなった。

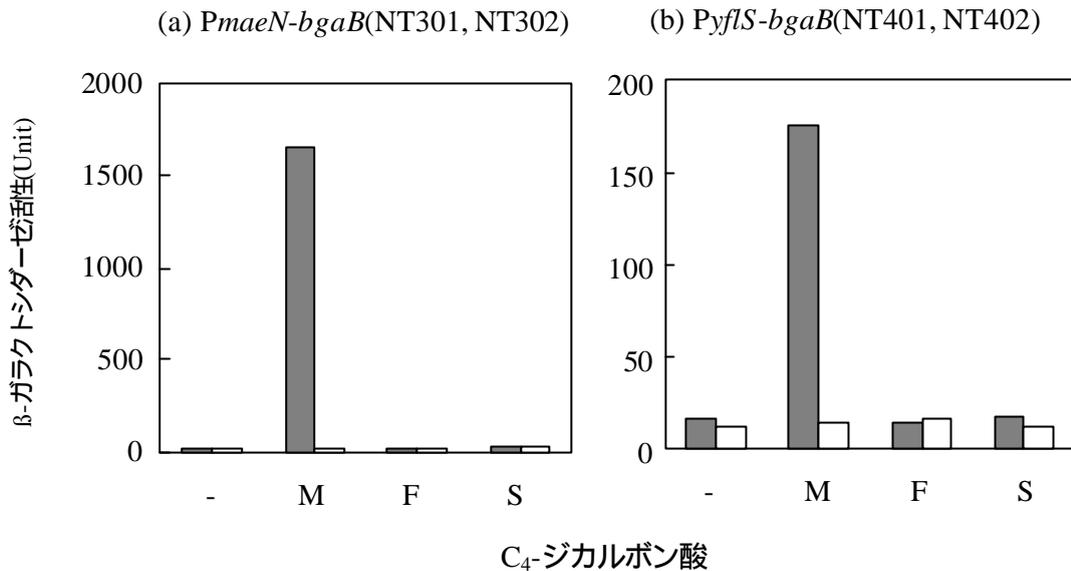


図16 *yufM* 遺伝子破壊による*maeN*, *yflS* 遺伝子のプロモーター活性への影響

GGM 培地(-) と GGM 培地にそれぞれ 2 mM リンゴ酸(M)、2 mM フマル酸(F)、2 mM コハク酸(S) を添加した培地での*maeN*, *yflS* 遺伝子のプロモーター活性を示した。

(a). 灰色のバーは野生株における*maeN* 遺伝子のプロモーター活性(NT301) で、この株の*yufM* 遺伝子破壊株(NT302) を白色のバーで示した。

(b). 灰色のバーは野生株における*yflS* 遺伝子のプロモーター活性(NT401) で、この株の*yufM* 遺伝子破壊株(NT402) を白色のバーで示した。

maeN, *yflS* 遺伝子の転写の誘導に必要な領域の同定

maeN, *yflS* 遺伝子の転写の誘導に必要な領域を同定するために *bgaB* 遺伝子と融合した *maeN*, *yflS* 遺伝子のプロモーター領域を 5' 側から段階的に短くした。この解析により、5' 側が切り取られたプロモーターで転写の誘導が起こらなくなれば、切り取られた領域が *maeN*, *yflS* 遺伝子の転写の誘導に必要な領域だと考えられる。その結果、*maeN* 遺伝子では開始コドンの上流 98 bp までプロモーター領域を欠失した株ではリンゴ酸による転写誘導が行われたが、そこから 6 bp の欠失で転写誘導は 80 % 減少し、更に 3 bp の欠失で転写誘導は完全に起こらなくなった。*yflS* 遺伝子では、開始コドンの上流 92 bp までは転写誘導が行われたが、そこから 6 bp の欠失で転写誘導は完全に起こらなくなった(図 17)。このことから *maeN*, *yflS* 遺伝子の転写の誘導には、少なくとも各遺伝子の開始コドンから 90 - 100 bp 上流を含む領域が必要であることが明らかとなった。

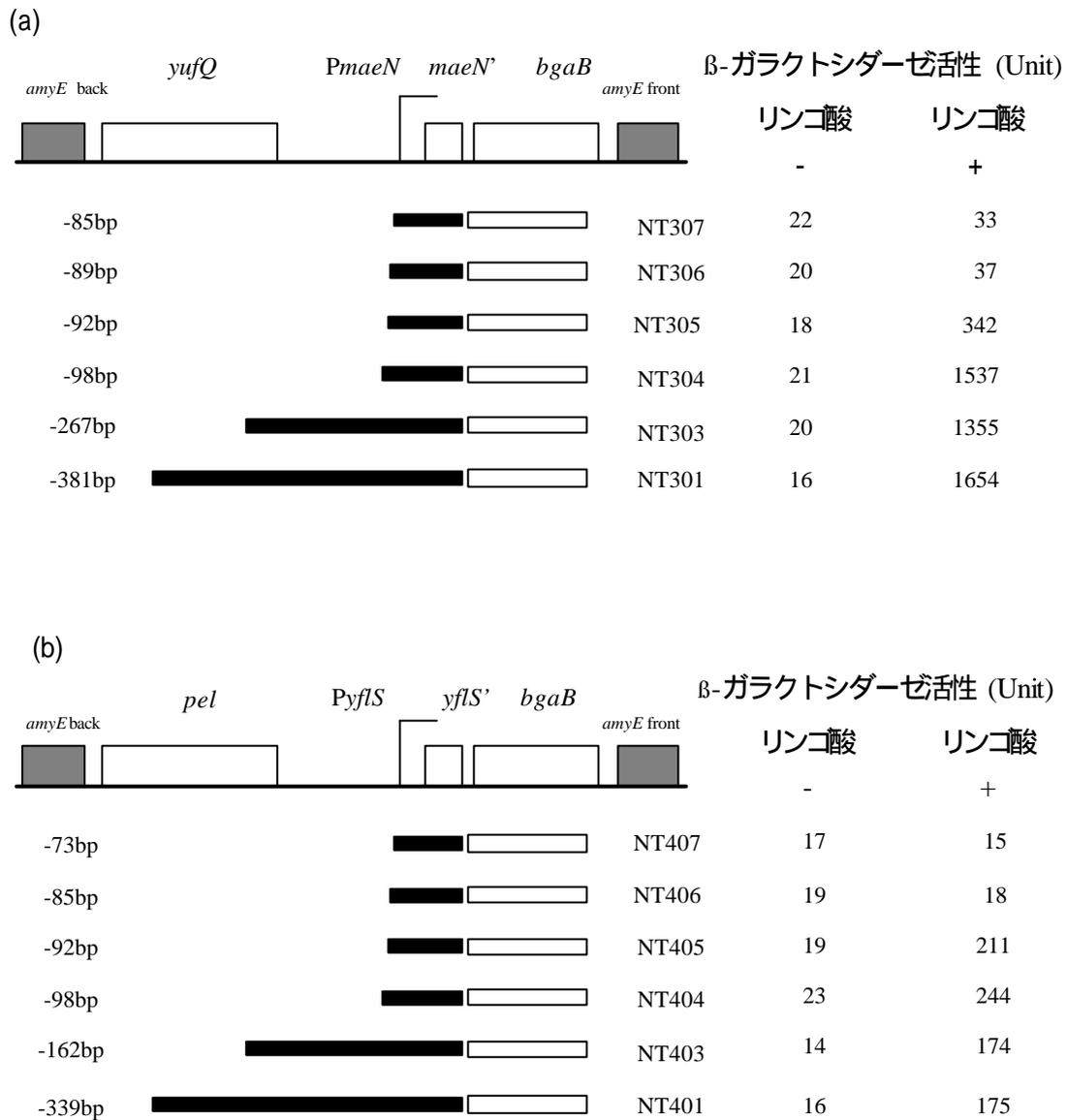


図17 *maeN*, *yflS* 遺伝子の転写誘導に必要な領域の同定

bgaB 遺伝子と融合させた各プロモーター領域を図で示した。また、各々の株におけるプロモーター活性を図の右に示した。図の左の数字は各遺伝子の開始コドンからの塩基対数を示した。(a) は *maeN* 遺伝子について、(b) は *yflS* 遺伝子について、それぞれのプロモーター活性を示した。

DNase I フットプリント解析による YufM 調節蛋白質の結合配列の同定

調節蛋白質は DNA に結合して転写の調節を行うことから、YufM 調節蛋白質が *maeN*, *yflS* 遺伝子のプロモーター領域に結合して転写を誘導する可能性が考

えられた。そこで調節蛋白質 YufM が *maeN*, *yflS* 遺伝子のプロモーター領域に結合することを証明するために、また結合するならば、その配列を同定するために、DNase I フットプリント解析を行った。そのために、まず調節蛋白質 YufM を精製した。YufM 調節蛋白質は C 末端側に DNA 結合領域を持つことから、DNA 結合能に影響を及ぼさないよう N 末端側にヒスチジンタグを融合できるプラスミド pET15b に *yufM* 遺伝子全長をクローニングした。このプラスミドを BL21(DE3)pLysE 株に導入し、PET system のマニュアルに従い、His₆-YufM 蛋白質(27 kDa) を精製した(図 18)。

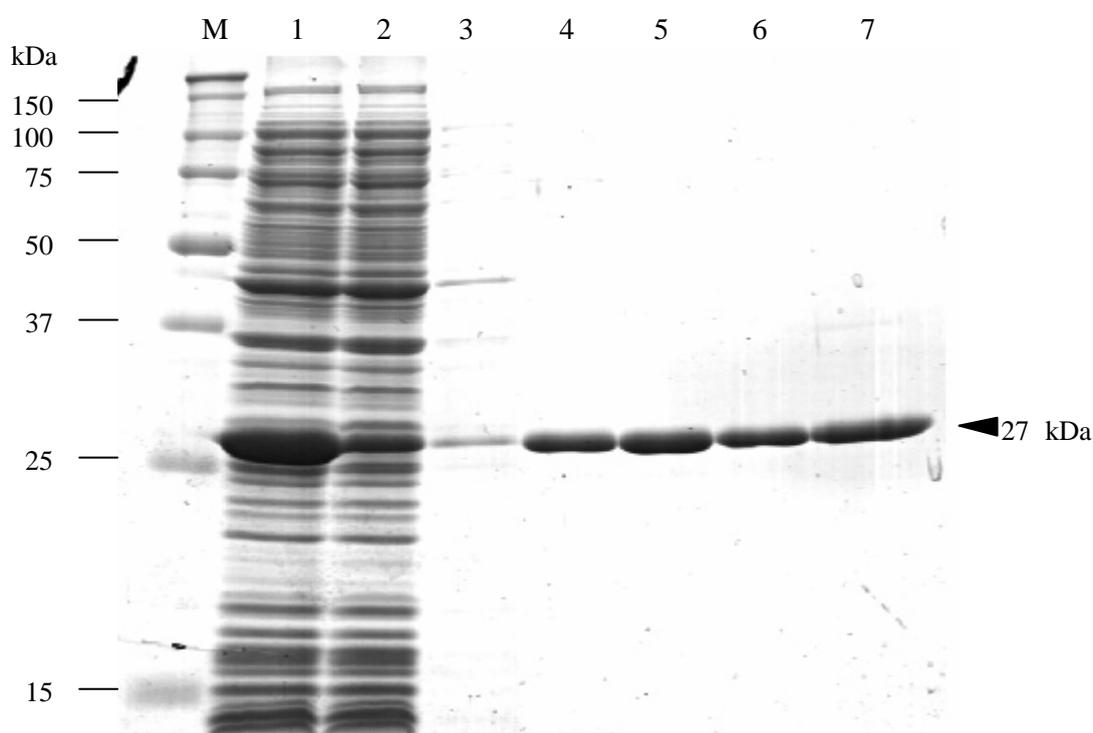
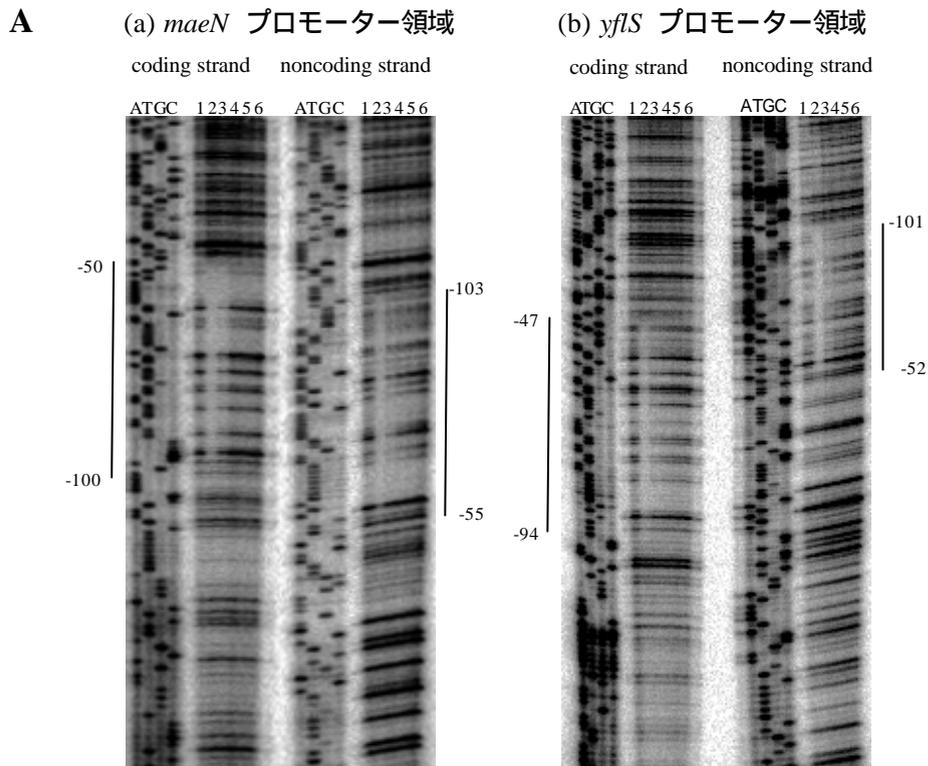


図18 YufM 調節蛋白質の精製

精製したHis₆-YufM 調節蛋白質を図に示した。M. サイズマーカー、1. His₆-YufM 蛋白質の過剰発現を行ったBL21(DE3)pLysS 株の粗抽出物、2. His-Bind resin の非吸着画分、3. 洗浄画分(イミダゾール 5 mM)、4. 溶出画分(イミダゾール 20 mM)、5. 溶出画分(イミダゾール 40 mM)、6. 溶出画分(イミダゾール 60 mM)、7. 溶出画分(イミダゾール 1 M) をそれぞれ示した。

この蛋白質を用いてDNase I フットプリンティング解析を行ったところ *maeN*, *yflS* 遺伝子ともに開始コドンから上流約 50-100 bp の領域に結合することが明らかとなった(図 19A)。また、His₆-YufM 蛋白質が結合する領域と、*maeN*, *yflS* 遺

伝子の転写の誘導に必要な領域が、完全に一致したために、調節蛋白質 YufM が *maeN, yflS* 遺伝子のプロモーター領域へ結合し、転写誘導を起こすことが明らかとなった(図 19B)。ここまでの結果から、2 成分制御系調節蛋白質 YufM が *maeN, yflS* 遺伝子の開始コドンの上流 50-100 bp に結合し、転写の誘導を行うこと、誘導された MaeN, YflS 蛋白質のうち、MaeN リンゴ酸トランスポーターのみが、リンゴ酸を炭素源とする最少培地(SMM 培地)で、リンゴ酸を取り込むことが明らかとなった。また、*yufM* 遺伝子破壊株では *maeN, yflS* 遺伝子の転写誘導が起こらず、リンゴ酸を取り込むことができないことも明らかとなった。



B

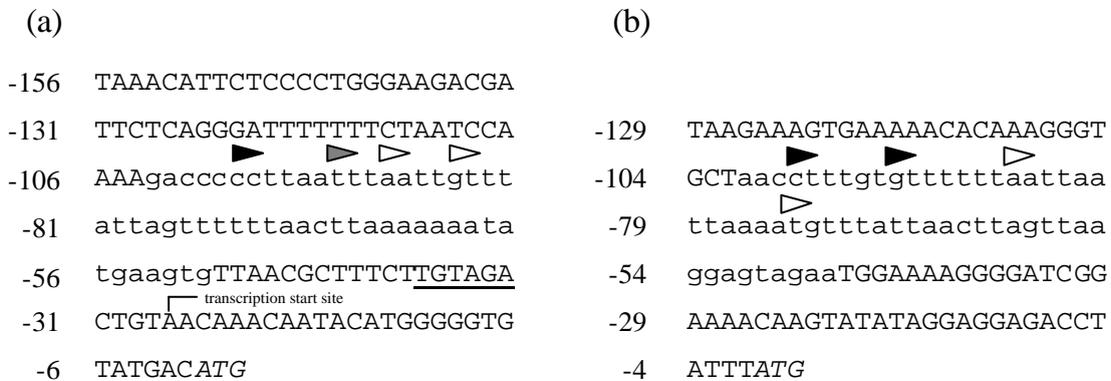


図19 DNase I フットプリント解析によるYufM 調節蛋白質の結合領域の同定

A. His₆-YufM 蛋白質を用いた DNase I フットプリントの結果を示した。(a) は *maeN* 遺伝子のプロモーター領域199bp(-183 ~ +16bp; 開始コドンからの位置) の、(b) は *yflS* 遺伝子のプロモーター領域212bp(-162 ~ +50; 開始コドンからの位置) のDNA 断片を用いた。ATGC はシーケンスラダーを示す。各レーンのDNA は100 fmol 一定である。His₆-YufM 蛋白質は各レーン1-6 に対して0, 70, 35, 18, 8.8, 0 pmol を用いた。

B. プロモーター領域のDNA 配列と、これまでの解析から得られた結果を *maeN* 遺伝子について(a) に、*yflS* 遺伝子について(b) に示した。His₆-YufM により保護された領域を小文字で、開始コドンを斜体で示した。図の左の数字は各遺伝子の開始コドンからの距離を示した。また転写開始点を矢印で、Eσ^A による-10 と予想される配列を下線で示した。黒の三角はリンゴ酸により完全に誘導された領域を、灰色の三角は不完全な誘導が行われた領域を、白の三角は誘導されなかったプロモーター領域を示した。

センサー蛋白質 YufL の機能解析

先に述べたように(図 9)、リンゴ酸最少培地(SMM 培地)において、センサー蛋白質 YufL をコードする *yufL* 遺伝子の破壊株が、野生株と同様の増殖を示したことから、*yufL* 遺伝子の破壊は SMM 培地において、増殖に影響を及ぼさないことが明らかとなった。しかし同じグループに分類されている CitT や DctR では、このような表現型は観察されていない(Yamamoto *et al.*, 2000; Asai *et al.*, 2000)。この現象を解明するために、*yufL* 遺伝子の破壊株における *maeN* 遺伝子の転写を調べた。ここで用いた *yufL* 遺伝子の破壊株も、プラスミド pMutinT3 の挿入株であり、*lacZ* 遺伝子をもつことから、*maeN* 遺伝子の転写の測定には *bgaB* 遺伝子を用いた(図 20(a))。また、*yufM* 遺伝子の転写を確保するために、*yufL* 遺伝子に挿入された pMutinT3 由来の *spac* プロモーターを、培地中に IPTG を加えることにより、活性化した(図 20(b))。その結果、IPTG 非存在下では *maeN* 遺伝子の転写は誘導されなかったのに対し、IPTG 添加により *yufM* 遺伝子の転写が確保された条件では、*maeN* 遺伝子の転写は誘導された。この結果は、*maeN*、*yfLS* 遺伝子の転写誘導には調節蛋白質 YufM が必須であること(図 16) と一致する。

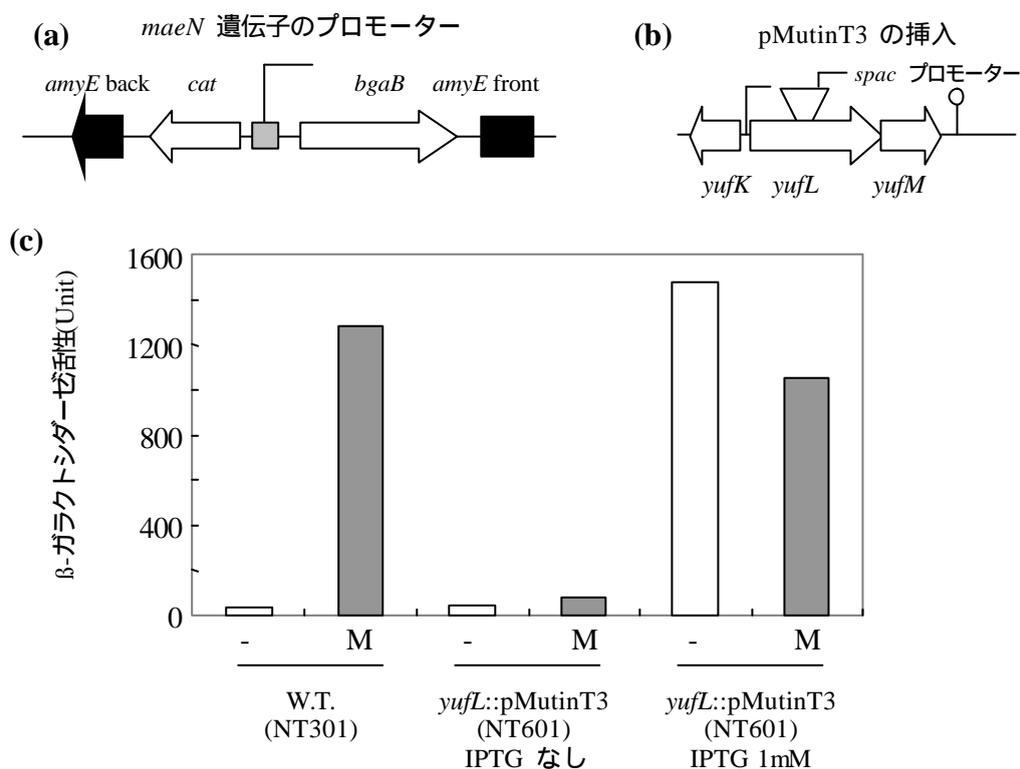


図 20 調節蛋白質 YufM による *maeN* 遺伝子の転写調節

bgaB 遺伝子と転写融合した *maeN* 遺伝子のプロモーターの構造を(a) に、*yufL*::pMutinT3 の遺伝子構造を(b) に、各株における *maeN* 遺伝子の転写活性を(c) に示した。

しかし、*maeN* 遺伝子の転写誘導はリンゴ酸を添加しない培地でも起こることから、これは恒常的な転写であることが明らかとなった (図 20(c))。このことから、*yufL* 遺伝子の破壊株が SMM 培地において、増殖に影響を及ぼさない理由は、センサー蛋白質 YufL 非存在下で、YufM 調節蛋白質が恒常的な *maeN* 遺伝子の転写誘導を起こし、発現した MaeN リンゴ酸トランスポーターがリンゴ酸を取り込むからだと考えられた。調節蛋白質は過剰発現することにより、制御下の遺伝子の転写を変化させることが知られている (Ogura *et al.*, 2001)。図 20 の結果も、YufM の過剰発現が原因である可能性が考えられた。そこで、下流の遺伝子 *yufM* の転写に影響を与えない構造の *yufL* 遺伝子欠損株 (NT202) を作製した (図 21, 材料と方法の図 7 参照)。野生株で *yufL*, *yufM* 遺伝子はオペロンを構成し、そのプロモーターは *yufL* 遺伝子上流に存在すると考えられた。新たに作製した *yufL* 遺伝子欠損株は、YufL 蛋白質の内部領域 (6-526 aa に相当する DNA 配列) が削除された株であり、*yufL* 遺伝子上流に存在するプロモーターにより、野生株と同レベルの *yufM* 遺伝子の転写が確保できると考えられる。また、以降の解析で IPTG を用いることから、*maeN* 遺伝子のプロモーター活性を測定するために、挿入するプラスミド pMutinT3 から、*spac* プロモーターを取り除く必要があった。そこで制限酵素 *NruI* と *HindIII* を用いて、pMutinT3 から *spac* プロモーターを取り除いた (図 22)。

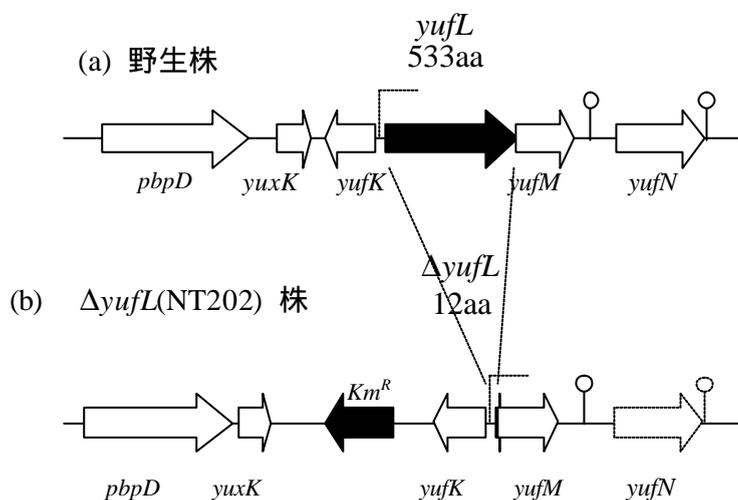


図 21 野生株と $\Delta yufL$ (NT202) 株の遺伝子構造

野生株と $\Delta yufL$ (NT202) 株の遺伝子構造を図に示した。NT202 株は *yufM* 遺伝子の転写に影響を及ぼさない構造での *yufL* 遺伝子の破壊である。(a) に野生株の遺伝子構造を、(b) に NT202 株の遺伝子構造を示した。黒色で示した遺伝子は新たに挿入、もしくは構造が変換された遺伝子を示した。

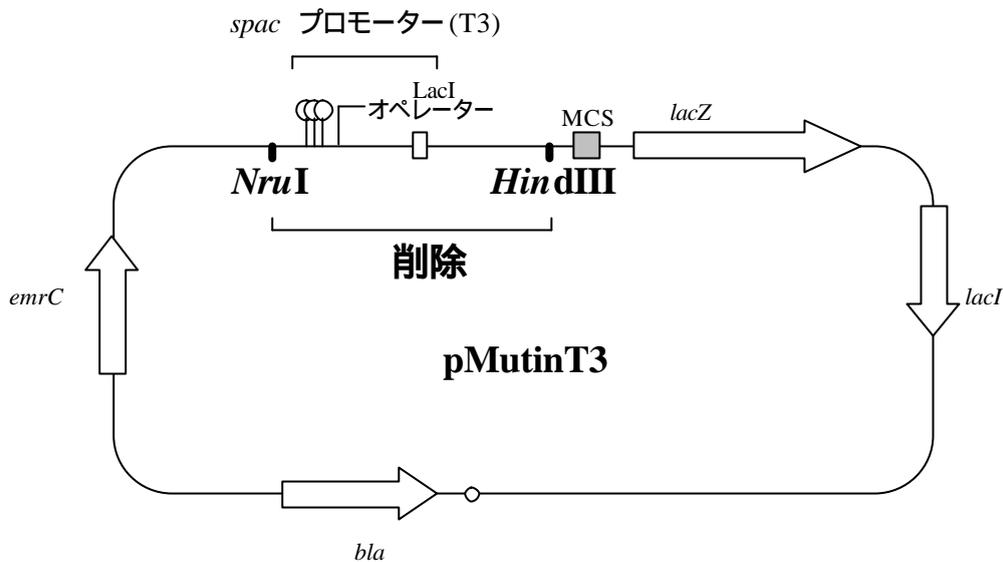


図 22 プラスミド pMutinT3 の改変

プラスミド pMutinT3 の挿入株は *spac* プロモーターを持つ。このプロモーターは IPTG 添加により活性化され、下流の遺伝子の転写が誘導される。この現象を解消するために図に示した制限酵素サイト *NruI* と *HindIII* に挟まれた領域を取り除いたプラスミドを作製した。

このプラスミドは、図 8 で示した方法と同じく、*maeN* 遺伝子の内部領域を MCS(マルチクローニングサイト) へクローニングした後、一重交差により *maeN* 遺伝子へ挿入した。

yufM の転写に影響を与えない構造の *yufL* 遺伝子欠損株($\Delta yufL$ (NT205)) では、*yufL* 遺伝子への pMutinT3 の挿入による破壊株(NT601)と同様(図 20)、恒常的な *maeN* 遺伝子の転写誘導が起こった(図 23A(a))。 $\Delta yufL$ 株では YufM 調節蛋白質の細胞内量は野生株と同様であると考えられることから *maeN* 遺伝子の転写誘導の原因は YufM 調節蛋白質の過剰発現ではない事が明らかとなった。次に、 $\Delta yufL$ 株にセンサー蛋白質 YufL を供給できる株を作製した。この株の作製にはプラスミド pDLT3 を用い、*yufL* 遺伝子を *spac* プロモーター制御下に置いた形で枯草菌染色体上の *amyE* 遺伝子に組み込んだ(図 23B)。その結果、IPTG を加えない培地では *maeN* 遺伝子は恒常的に誘導されるが、IPTG を加えることにより野生株と同様のリンゴ酸特異的な転写誘導が観察された(図 23A(b)(c))。この結果から、染色体上の別の位置から供給した YufL センサー蛋白質は機能しており、その機能とは MaeN リンゴ酸トランスポーターの正しい発現制御であることが明らかとなった。

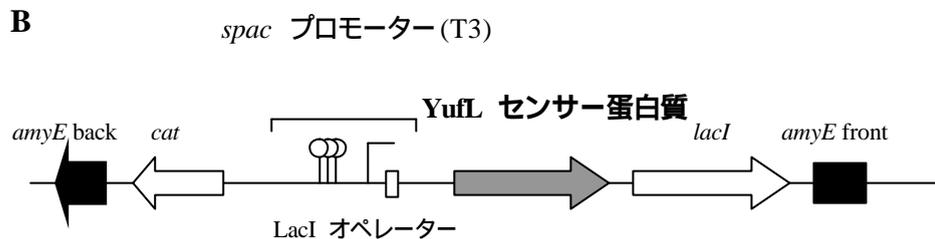
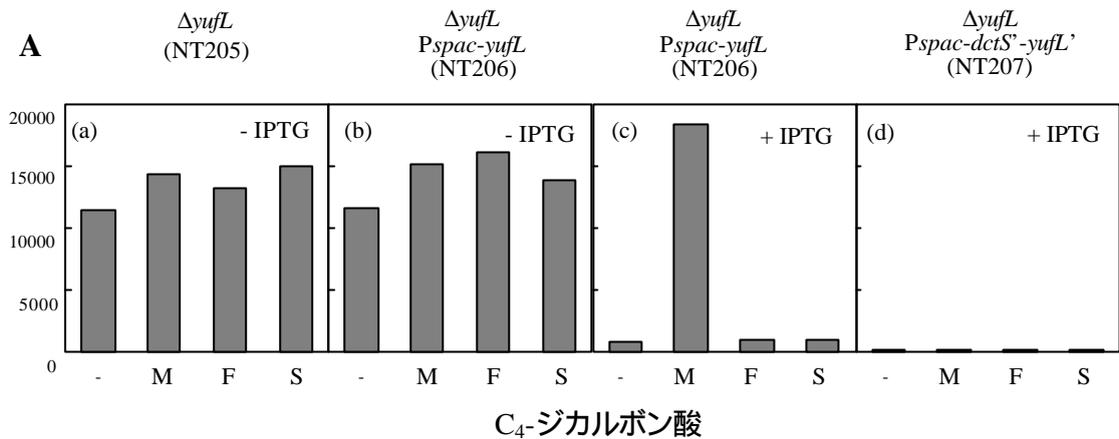


図23 YufL センサー蛋白質の機能解析と

A. GGM 培地(-) と GGM 培地にそれぞれ2 mM リンゴ酸(M)、2 mM フマル酸(F)、2 mM コハク酸(S) を添加した培地での各株の*maeN* 遺伝子のプロモーター活性を示した。

(a). *yufL* 遺伝子の破壊株(NT205)。

(b). NT205 株が土台でYufL 蛋白質が供給できる株 (NT206)。IPTG は添加していない。

(c). NT205 株が土台でYufL 蛋白質が供給できる株 (NT206)。IPTG を添加した。

(d). NT205 株が土台でDctS のN 末端側(1-212aa) とYufL のC 末端側(212-533aa) が融合したキメラセンサー蛋白質が供給できる株。IPTG を添加した。

B. YufL 蛋白質をIPTG 添加により供給できる株の構造を示した。これは*amyE* 遺伝子に組み込まれている。

YufL センサー蛋白質は、CitA ファミリーに属する他の2つのセンサー蛋白質 CitS, DctR と同様、N 末端に2回膜貫通領域と細胞質側に自己リン酸化領域を持つ。これらのセンサー蛋白質は、細胞質側の自己リン酸化領域が対となる調節蛋白質と相互作用することが考えられる。そこで YufL の自己リン酸化領域 (212-533 aa) とコハク酸、フマル酸のセンサー蛋白質である DctS の細胞膜外領域を含む膜貫通領域(1-212 aa) とを融合させた蛋白質を $\Delta yufL$ 株(NT205) に供

給した。すると恒常的な *maeN* 遺伝子の発現は抑制されたが、リンゴ酸存在下でも *maeN* 遺伝子の転写が誘導されることはなかった(図 23A(d))。大腸菌の EnvZ や枯草菌の PhoP センサー蛋白質は、リン酸化した調節蛋白質を脱リン酸化し、不活性化することが報告されている(Hsing *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1999)。これらの結果から YufL センサー蛋白質は YufM 調節蛋白質の不活性化にも重要な役割を果たすことが明らかになった。

アセチルリン酸による YufM 調節蛋白質のリン酸化への影響

大腸菌の PhoB 調節蛋白質や、枯草菌の ComA 調節蛋白質は、センサー蛋白質が欠失しても細胞内のアセチルリン酸によりリン酸化されることが報告されている(Kim *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2001)。アセチルリン酸から調節蛋白質へのリン酸転移が YufM 調節蛋白質でも起こる可能性が考えられた。細胞内のアセチルリン酸はグルコースの代謝経路である解糖系の最終生成物であるピルビン酸を元に生合成される(図 24)。そこでアセチルリン酸合成酵素である *pta*, *ackA* 両遺伝子欠損株で *maeN* 遺伝子の転写を測定したが、*maeN* 遺伝子の恒常的な転写は維持された。このことからアセチルリン酸は、YufM 調節蛋白質による *maeN* 遺伝子の恒常的な転写には無関係であることが明らかとなった(図 25)。

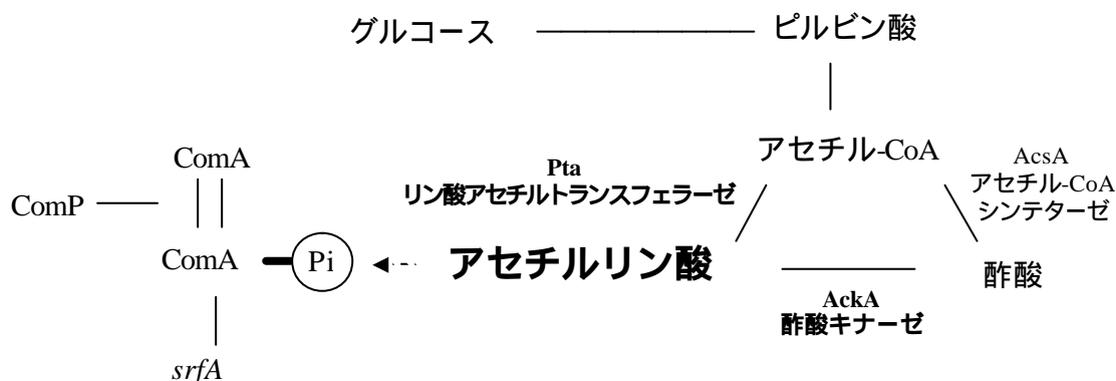


図24 アセチルリン酸の生成経路とComA 調節蛋白質のリン酸化のモデル

アセチルリン酸の生合成経路を図に示した。またアセチルリン酸による調節蛋白質ComAのリン酸化モデルを図に示した。

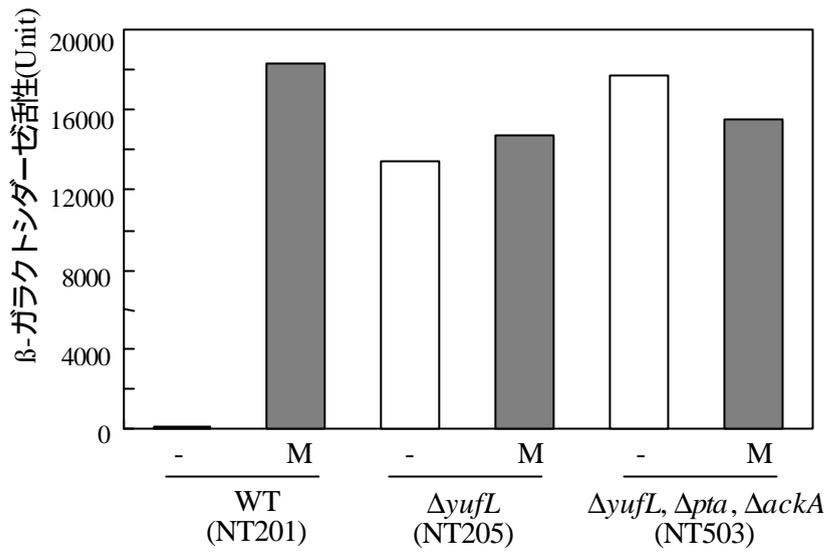


図25 アセチルリン酸によるYufM 調節蛋白質の活性への影響

各株のGGM 培地(-) と GGM 培地に2 mM リンゴ酸(M) を添加した培地での $maeN$ 遺伝子のプロモーター活性を示した。

IV 考察

枯草菌とその類縁種との遺伝子構造の比較

枯草菌の近縁種である *Bacillus halodulance* や *Oceanobacillus iheyensis* では 2 成分制御系の下流の遺伝子は、枯草菌の *ytsJ* 遺伝子(リンゴ酸酸化還元酵素)、リンゴ酸トランスポーター遺伝子の順で配座されていた。一方、*Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* Ames および *Bacillus thuringiensis* では、2 成分制御系の下流に枯草菌のリンゴ酸トランスポーター遺伝子、*ytsJ* 遺伝子の順で配座されていた(図 26)。リンゴ酸酸化還元酵素とはリンゴ酸からピルビン酸を生合成する酵素である。図 26 に示した遺伝子構造から、枯草菌の近縁種では、2 成分制御系がリンゴ酸を認識し、リンゴ酸の代謝酵素であるリンゴ酸酸化還元酵素とリンゴ酸トランスポーターの発現を誘導すると考えられる。一方、枯草菌では 2 成分制

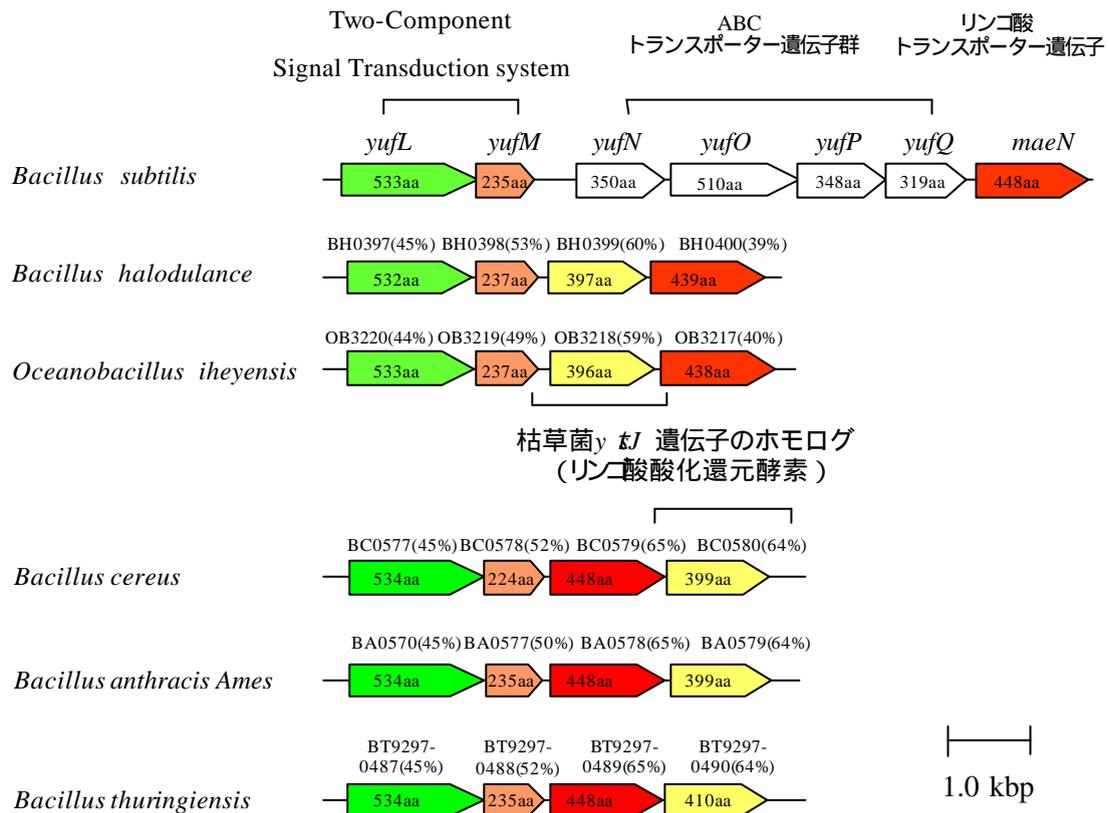


図26 *yufL*, *yufM* 遺伝子周辺の比較

aa は各遺伝子をコードしている蛋白質のアミノ酸の数、% はアミノ酸の相同性を示す

御系とリンゴ酸トランスポーターの間に ABC トランスポーター遺伝子群が配座されている。これらは、酵母抽出液を炭素源とする最少培地(NYE 培地) にリンゴ酸を添加した培地で、転写が誘導されなかったことから、リンゴ酸の取り込みには無関係だと考えられた。また、枯草菌では *ytsJ* 遺伝子は 2 成分制御系 YufL-YufM の近傍には存在せず、培地中にリンゴ酸を加えても発現は誘導されなかったが、*ytsJ* 遺伝子のホモログである *ywkA* 遺伝子(*ytsJ* 遺伝子との相同性は 28 %) が、培地中にリンゴ酸を加えることにより誘導されることが報告されている(Dorn *et al.*, 2003)。このことから、枯草菌とその近縁種は、2 成分制御系を介した同じ機構でリンゴ酸を取り込み、代謝すると考えられる。

枯草菌のリンゴ酸トランスポーター

枯草菌には NYE 培地での増殖において、恒常型と誘導型の少なくとも 2 種のリンゴ酸取り込み経路があることが報告されている(Willecke *et al.*, 1974)。これは、NYE 培地に含まれる未知の物質により誘導されている恒常型のリンゴ酸取り込み経路と、リンゴ酸を添加することにより誘導される誘導型の取り込み経路である。本解析で用いたリンゴ酸最少培地(SMM 培地) では、*maeN* 遺伝子破壊株が増殖できなかったことから、この培地におけるリンゴ酸トランスポーターは MaeN のみであることが明らかとなった。リンゴ酸トランスポーターの候補である、枯草菌の CimH 蛋白質は、大腸菌で発現させるとリンゴ酸を取り込むことが報告されている(Krom *et al.*, 2001)。また、MleN 蛋白質は $\text{Na}^+\text{-H}^+$ の対向輸送と協調してリンゴ酸を取り込むことが報告されている(Wei *et al.*, 2000)。これらの蛋白質は、今回用いた SMM 培地では機能していないことが明らかとなった。他のトランスポーターがどのような条件で作動するのか、また発現誘導されるのかは本研究で明らかにならず、また、リンゴ酸存在下で発現が誘導される YfiS も SMM 培地では機能しておらず、MaeN 蛋白質がリンゴ酸トランスポーターとして主要な働きをしていることが明らかとなった。NYE 培地におけるリンゴ酸取り込み経路の解析には、RI で標識されたリンゴ酸の類似体を用いており、リンゴ酸を添加しない NYE 培地でも類似体により、MaeN 蛋白質の弱い誘導が起こっていたのかもしれない。もしそうであれば、もともと枯草菌でリンゴ酸を取り込むのは MaeN リンゴ酸トランスポーターのみであると考えることができる。

過去のリンゴ酸利用に関わる遺伝子群の解析により、培地中へのリンゴ酸の添加により少なくとも 3 種類の蛋白質、それぞれ 62 kDa, 44 kDa, 33 kDa の発現が誘導されることが報告されている(Fournier *et al.*, 1974)。現在までに、リンゴ酸添加により誘導が確認されている蛋白質の分子量は、リンゴ酸トランスポーター-MaeN が 47.7 kDa, YfiS が 51.4 kDa, リンゴ酸酸化還元酵素 YwkA が 64 kDa

であった。残された未知の 33 kDa の蛋白質もリンゴ酸の利用に関わると考えられるが、現在のところ同定されていない。

調節蛋白 YufM の DNA 結合領域の同定

本研究では *maeN*, *yflS* 遺伝子のプロモーター領域を 5' 側から段階的に短くする、転写の誘導に必要な配列の同定と DNase I フットプリント解析により YufM 調節蛋白質の結合領域を同定した。DctR(Asai *et al.*, 2000), CitT(Yamamoto *et al.*, 2000) について、結合する DNA 配列はそれぞれ AGACCAA の 2 回繰り返し配列と、(A/T)(A/T)CAA の複数繰り返し配列であることが報告されている。しかし *maeN*, *yflS* 遺伝子上流には明瞭な繰り返し配列が見いだされなかった。このことから、YufM 調節蛋白質は、DNA の高次構造を認識して、結合しているのかもしれない。

本研究とは別にリンゴ酸存在下で YufM 調節蛋白質により誘導される新たな遺伝子 *ywkA* が報告された(Dorn *et al.*, 2003)。*ywkA* 遺伝子はリンゴ酸からピルビン酸を合成するリンゴ酸酸化還元酵素をコードする遺伝子である。この遺伝子と *maeN*, *yflS* 遺伝子のプロモーター領域を新たに比較したが YufM の明瞭な結合配列は見いだすことができなかった。

枯草菌のリンゴ酸取り込み機構

本研究の解析により、枯草菌の、2 成分制御系 YufL-YufM を介したリンゴ酸の取り込み機構が明らかとなった。培地中にリンゴ酸が存在する条件では、調節蛋白質 YufM により MaeN リンゴ酸トランスポーターの発現が誘導され、MaeN 蛋白質により、リンゴ酸が取り込まれる。しかし、調節蛋白質 YufM による MaeN 蛋白質の発現誘導は、センサー蛋白質 YufL の欠失株でも起こり、更に、この発現誘導はリンゴ酸が存在しない培地でも起こることから、調節蛋白質 YufM のリン酸化には YufL センサー蛋白質以外の因子に関わることが考えられた。調節蛋白質のリン酸化の原因として、細胞内のアセチルリン酸から直接リン酸基を受け取り、活性化できる調節蛋白質が知られている(Kim *et al.*, 1996)。しかし調節蛋白質 YufM による恒常的な MaeN 蛋白質の発現誘導は、アセチルリン酸合成酵素遺伝子である *pta* や *ackA* を破壊しても観察されたことから、この可能性は否定された。別の要因として、他のセンサー蛋白質からの非特異的なリン酸リレーが考えられた。大腸菌の 2 成分制御系全セットによる *in vitro* リン酸リレー解析により、全体の組み合わせの約 3% でクロストークが起こることから、これは特殊な現象ではないことが示されている(Yamamoto *et al.*, 2005)。このような非特異的なクロストークは野生株でも起きていると考えられるが、野生株ではリンゴ酸存在下でのみ、リンゴ酸トランスポーター-MaeN が発

現誘導されることから、センサー蛋白質 YufL はリンゴ酸のない状態で、調節蛋白質 YufM の脱リン酸化を行うと考えられる。リン酸化した調節蛋白質のセンサー蛋白質による脱リン酸化反応は大腸菌の EnvZ でよく解析されている (Hsing *et al.*, 1998)。EnvZ センサー蛋白質は浸透圧の上昇を感知して自己リン酸化し、対となる OmpR 調節蛋白質へリン酸リレーし、ポリリン蛋白質である OmpC の発現誘導を行う。この発現誘導は OmpR 調節蛋白質のリン酸化レベルにより厳密に制御されており、浸透圧が下がると、センサー蛋白質 EnvZ が OmpR 調節蛋白質から脱リン酸化し、OmpC 蛋白質の発現誘導を抑制する事が知られている。このことから、センサー蛋白質による調節蛋白質の脱リン酸化活性は、厳密な転写調節を行う上で重要な活性であることが知られている。センサー蛋白質 YufL による YufM 調節蛋白質の脱リン酸化も同様に、培地中のリンゴ酸を認識して正しい転写誘導を行うために必要な活性だと考えられた。また、YufL センサー蛋白質による MaeN 蛋白質の正しい発現制御とは、培地中にリンゴ酸が存在しない条件下での、センサー蛋白質 YufL による YufM 調節蛋白質の脱リン酸化であるとも考えられた。その分子機構を図 27 に示した。現在のところ調節蛋白質をリン酸化するであろうセンサー蛋白質は同定されていない。また、センサー蛋白質 YufL がリンゴ酸存在下でのみ、MaeN リンゴ酸トランスポーターの発現を誘導するモデルは、YufL 蛋白質による YufM 調節蛋白質の脱リン酸化活性だけでも成り立つことから、センサー蛋白質 YufL が自己リン酸化し、調節蛋白質にリン酸リレーを行うのかどうかは明らかではない。実際、*in vitro*

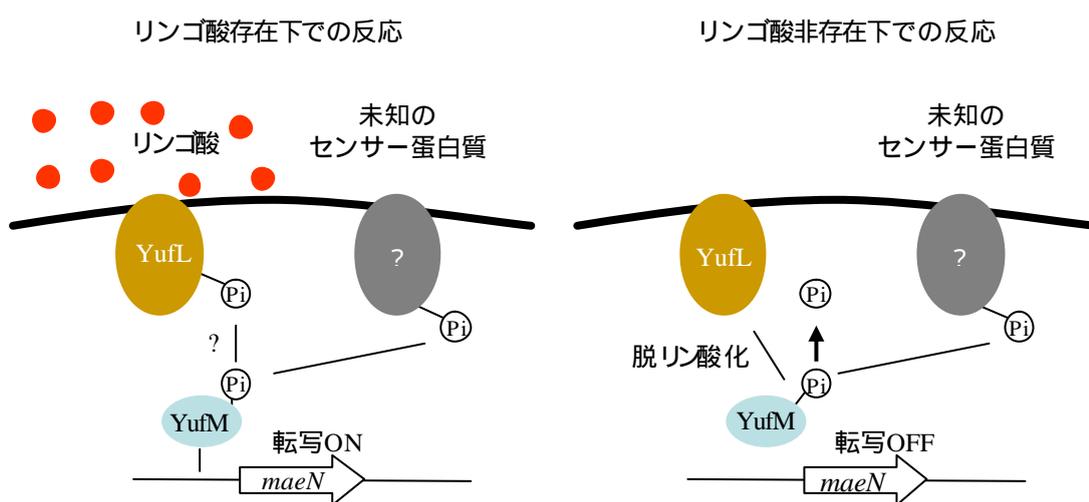


図27 2成分制御系 YufL-YufM による *maeN* 遺伝子の転写制御

培地中にリンゴ酸が存在する条件と存在しない条件での YufL-YufM による *maeN* 遺伝子の転写制御と、その分子機構を示した。

での解析では、センサー蛋白質の自己リン酸化は検出することができなかった。

2 成分制御系 YufL-YufM の機能の解明

本研究では、枯草菌が 2 成分制御系 YufL-YufM を介してリンゴ酸トランスポーター MaeN の発現を誘導する分子機構を明らかにした。培地中に炭素源が存在する条件下でトランスポーターの発現を誘導する機構は、同じファミリーに属するクエン酸利用に関わる CitS-CitT、コハク酸とフマル酸の利用に関わる DctS-DctR 2 成分制御系と共通する結果であった。また、これらの 2 成分制御系も調節蛋白質遺伝子を破壊することによりトランスポーターの発現は誘導されなくなることで共通していた。しかし CitS-CitT, DctS-DctR はセンサー遺伝子の破壊でもトランスポーターの発現は誘導されなくなる点で異なっていた。これは調節蛋白質 YufM が、未知のセンサー蛋白質の非特異的なリン酸リレーによりリン酸化される性質を持つためだと考えられる。逆に、CitT, DctR 調節蛋白質は、対を成すセンサー蛋白質のみによりリン酸化される、厳密なリン酸リレー機構を持つと考えられる。

もう一つの YufL-YufM との相違点として DctS-DctR は基質認識に DctB 蛋白質が必須であることが挙げられる。DctB は細胞膜外の蛋白質で DctS センサー蛋白質が C₄-ジカルボン酸を認識するのに必要であるが、取り込みには関わらないことが知られている(Asai *et al.*, 2000)。枯草菌はコハク酸、フマル酸およびリンゴ酸の中で、特にリンゴ酸に対する取り込み能が高いことが報告されており(Fournier *et al.*, 1972)、DctB は化学構造が類似したこれらの炭素源を、センサー蛋白質が判別するための付加装置でもありと考えられる。大腸菌の C₄-ジカルボン酸を感知するセンサー蛋白質 DcuS は、これら 3 種の炭素源だけでなく他の C₄-ジカルボン酸であるマレイン酸、アスパラギン酸および酒石酸も感知することが報告されている(Zientz *et al.*, 1998)。このことから枯草菌は炭素源として利用できる他の C₄-ジカルボン酸すべてを、DctB が付加した DctS センサー蛋白質が感知するかも知れない。もしそうであれば YufL はリンゴ酸の認識に特化したセンサー蛋白質として役割を分担していると考えられる。

第 2 章

YufL センサー蛋白質のリンゴ酸による活性化機構の解明

I 序論

前章で枯草菌は、培地中に添加されたリンゴ酸により、2 成分制御系 YufL-YufM を介して、リンゴ酸トランスポーター MaeN の発現を誘導することが明らかとなった。また、その発現制御にセンサー蛋白質 YufL が関わっており、培地中のリンゴ酸の有無により、調節蛋白質 YufM による MaeN リンゴ酸トランスポーターの発現誘導を起こす活性を切り替えることが明らかとなった。このような活性の切り替えは、センサー蛋白質 YufL が、培地中のリンゴ酸を認識して立体構造を変化させるために起こると考えられる。実際、*Salmonella typhimurium* のマグネシウムイオンを感知する PhoQ センサー蛋白質は、マグネシウムイオン存在下、非存在下で細胞膜外領域の立体構造が変化することが報告されている。同様の結果が、鉄イオンを感知する PmrA センサー蛋白質でも報告されていることから、センサー蛋白質は細胞膜外の環境変化というシグナルを蛋白質の立体構造の変化に置き換え、細胞質側の自己リン酸化および調節蛋白質へのリン酸リレーへと伝達すると考えられている (Vescovi *et al.*, 1996; Marc *et al.*, 2000)。細胞質側での反応は、浸透圧を感知する大腸菌の EnvZ センサー蛋白質で、よく研究されている。EnvZ センサー蛋白質は細胞膜貫通領域を除いた、細胞質側の領域のみでも自己リン酸化し、この領域で 2 量体を形成することが報告されている。また自己リン酸化できない変異を持つ EnvZ 蛋白質が作製され、大腸菌で発現させて、その機能解析が行われた。その結果、単独で供給しても自己リン酸化できない変異型 EnvZ も、これとは別の、単独では機能しない変異型 EnvZ を供給することで、自己リン酸化の機能を回復することが報告された (Roberts *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1993)。また EnvZ 蛋白質の 2 量体形成に必要な領域と、リン酸化に必要な領域が、センサー蛋白質の異なる領域に配座されていることが明らかとなった (Park *et al.*, 1998)。これらの結果からセンサー蛋白質 EnvZ の自己リン酸化は、まず 2 量体を形成し、対となった一方の蛋白質のリン酸化活性部位が他方のヒスチジン残基をリン酸化することにより起こると考えられるようになった(図 1)。

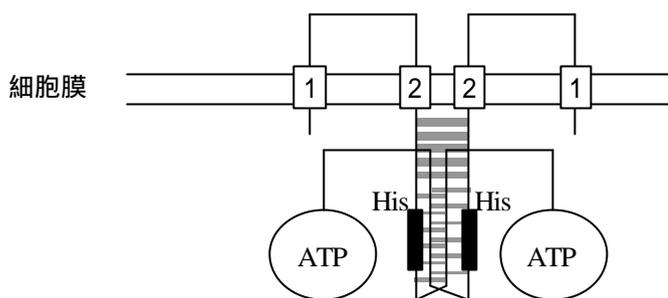


図1 センサー蛋白質EnvZ の自己リン酸化モデル

EnvZ の自己リン酸化モデルを図に示した。1, 2 は細胞膜貫通領域でN 末端からの順番を示した。His は自己リン酸化するヒスチジン残基を示した。ATP はセンサー蛋白質がATP と結合し、反応する領域を示した。灰色のバーは2 量体を形成する領域を示した。EnvZ 蛋白質はホモダイマーを形成し、一方が他方のヒスチジン残基をリン酸化するモデルが示されている。

EnvZ センサー蛋白質は、OmpR 調節蛋白質へのリン酸化と脱リン酸化を行うことが知られており、この2つの活性の変換は、センサー蛋白質が浸透圧の変化を感知することにより起こることも報告されている(Tokishita *et al.*, 1991)。しかし、浸透圧シグナルの実体が不明なため、環境の変化を感知して起こる EnvZ センサー蛋白質の構造変換は明らかになっていない。

Salmonella typhimurium の PhoQ センサー蛋白質は、環境シグナルが解明されており、この蛋白質は Mg^{2+} と結合することが報告されている (Gunn *et al.*, 1996)。しかし、PhoQ センサー蛋白質の自己リン酸化は、培地中の Mg^{2+} が欠乏した条件下で起こることから、蛋白質から基質が解離した条件下で活性化すると考えられる。このことから、蛋白質に変異を導入し、基質との結合能の変化を観察する解析に PhoQ センサー蛋白質は適さない。

センサー蛋白質の基質との結合は *Klebsiella pneumoniae* のクエン酸を感知する CitA 蛋白質でも解析されている。この蛋白質の解析により、センサー蛋白質の細胞膜外領域と基質であるクエン酸が、実際に結合することが明らかにされた(Kaspar *et al.*, 1999)。また、CitA 細胞膜外領域に変異を導入した蛋白質とクエン酸との結合能を測定することにより、どのアミノ酸が基質との結合に重要であるかが報告された。そして、立体構造が決定され、CitA 蛋白質のどの領域にクエン酸が結合するかが明らかとなった(Gerharz *et al.*, 2003; Reinelt *et al.*, 2003)。

しかし、この解析では変異が導入された CitA 蛋白質の生体内での解析がなされ
ておらず、基質との結合と、センサー蛋白質の活性化機構との関係は明らかに
されていない。

本研究ではセンサー蛋白質が基質を認識して、制御下の遺伝子の発現を誘導
する機構の全体像を明らかにすることを目的とした。基質存在下で制御遺伝子
が誘導されないセンサー蛋白質の変異を作製および同定し、その変異により、
制御遺伝子が誘導される機構の、どの段階が遮断されるかを明らかにすること
で、2成分制御系による発現誘導機構の全体像が明らかにできると考えられる。
この解析のセンサー蛋白質には前章で機能が解明された YufL 蛋白質を用いた。
YufL はリンゴ酸を認識するセンサー蛋白質であり、培地中へのリンゴ酸添加に
より MaeN リンゴ酸トランスポーターの発現を誘導することも解明されている。
そこで、MaeN の発現誘導をセンサー蛋白質のリンゴ酸認識の指標とした。

センサー蛋白質 YufL の構造

センサー蛋白質 YufL の構造を図 2 に示した。YufL は 2 回細胞膜貫通蛋白質
であり、その領域は TSEG(prediction tool for Transmembrane SEGment in protein)

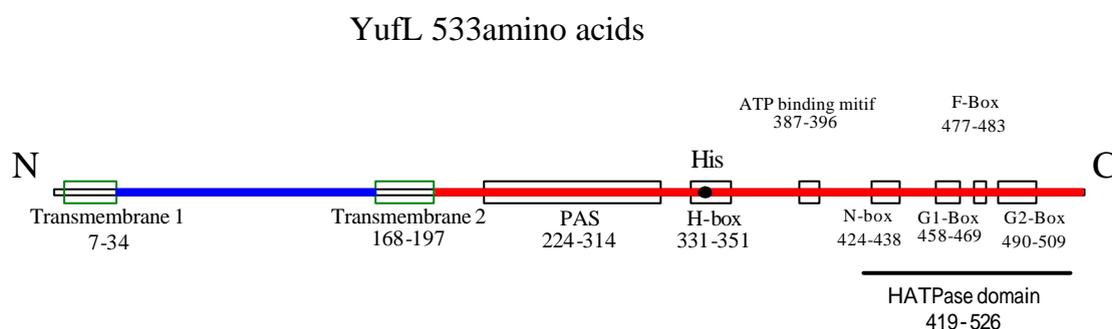


図2 センサー蛋白質YufL の構造的特徴

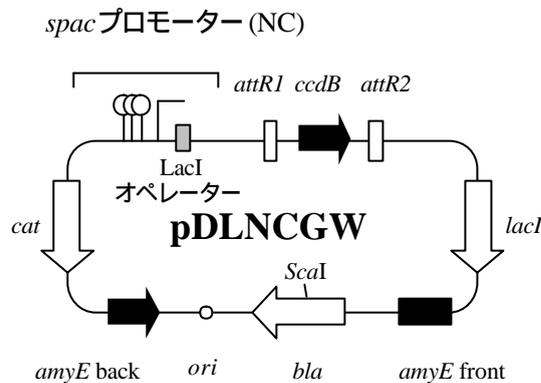
センサー蛋白質の構造的特徴を図に示した。細胞膜外の領域を青色で示した。また、細胞質側の領域を赤色で示した。数字はそれぞれの領域のN 末端側からのアミノ酸数を示す。それぞれの四角で囲まれた領域をそれぞれ下記に記した。Transmembrane 1:膜貫通領域1, Transmembrane 2:膜貫通領域2, PAS: PAS domain, HATPase domain: センサー蛋白質の細胞質側にあるATPase 活性を持つ領域, H-box: ヒスチジン残基周辺の領域, ATP binding motif: リン酸基の基質となるATP が結合する領域, N-box: センサー蛋白質同士よく保存されているアスパラギン残基とその周辺の領域, G1-box: センサー蛋白質同士よく保存されているグリシン残基とその周辺の領域, F-box: センサー蛋白質同士よく保存されているフェニルアラニン残基とその周辺の領域, G2-box: センサー蛋白質同士よく保存されているグリシン残基とその周辺の領域

により 7-34 aa と 168-197 aa と予測された。これらの領域をそれぞれ N 末端側から Transmembrane 1, Transmembrane 2 と名づけた。また、この間の領域は細胞膜外に位置する。逆に Transmembrane2 より C 末端側は細胞質側に位置する。細胞質側の N 末端側の PAS は、様々な細胞内伝達蛋白質に保存されている PAS domain を示し、光、酸化還元電位、酵素、リガンドなどを感知する蛋白質が知られている。また蛋白質同士がホモダイマーやヘテロダイマーを組む領域であることも報告されている(Taylor *et al.*, 1999)。また、C 末端側には HATPase domain と呼ばれるセンサー蛋白質に共通の ATPase 活性を持つ領域が存在する。HATPase domain の N 末端側には ATP binding motif が存在し、センサー蛋白質が自己リン酸化する際に基質として必要な ATP と、この領域で結合すると考えられている。H-box, N-box, G1-box, F-box, G2-box は 2 成分制御系センサー蛋白質によく保存されたアミノ酸配列である。H-box には、自己リン酸化するヒスチジン残基が存在し、この領域はセンサー蛋白質間で特によく保存されている。その他の box は N はアスパラギン残基、G1, G2 はグリシン残基、F はフェニルアラニン残基が存在することを示す。これらの領域に関する活性の報告は、ほとんどない。G2-box に関して、この領域に変異を導入すると、EnvZ センサー蛋白質の、調節蛋白質に対する脱リン酸化活性が失われることが報告されている(Zhu *et al.*, 2002)。

II 材料と方法

本研究で使用した菌株

第2章で使用した菌株リストを表1に、プラスミドを表2に、プライマーを表3に示した。菌株は特に記載が無い場合、第1章の方法に従い培養を行った。プラスミド pDLNCGW では、pDLT3 に用いられている *spac* プロモーターの LacI 結合配列を改変し、LacI に対する親和性が高められている(Morimoto *et al.*, 2002; 図3)。また、Gateway テクノロジーを用いたクローニング(Invitrogen)に必要な DNA 配列、*attR1* と *attR2* が組み込まれている(Gateway テクノロジー後述)。



<i>lacI</i>	大腸菌のラクトースオペロンのリプレッサーであるLacI をコードする遺伝子
<i>ori</i>	プラスミドpBR322 由来の大腸菌での複製起点
<i>bla</i>	大腸菌での選択マーカーに用いるアンピシリン耐性カセット
<i>spac</i> プロモーター (NC)	枯草菌ファージSPO-1 のプロモーターとLacI オペレーターとの融合プロモーター このプラスミドのLacI オペレーターは結合配列が改変され、LacI に対する親和が高められている 上流に入ファージ由来のターミネーター T0 と大腸菌 <i>rrnB</i> 遺伝子由来のターミネーター-T1 とT2 を持つ
<i>cat</i>	枯草菌での選択マーカーに用いるクロラムフェニコール耐性カセット
<i>amyE front</i>	枯草菌a-アミラーゼをコードする遺伝子の5'側518bp
<i>amyE back</i>	枯草菌a-アミラーゼをコードする遺伝子の3'側1016bp

図3 プラスミドpDLNCGW の遺伝子構造

プラスミドpDLNCGW の遺伝子構造を図に示した。また、それぞれの遺伝子の説明を図の下に示した。

Gateway テクノロジー (Invitrogen) と、この技術を用いた *YufL* センサー蛋白質への変異の導入

Gateway テクノロジーはλファージの部位特異的な組み換え (Landy *et al.*, 1989) を利用したクローニング技術である(図 4)。まず、目的遺伝子の 5' 末端と 3' 末端にそれぞれ *attB1* の 3' 末端から 14 塩基、*attB2* の 5' 末端から 8 塩基を加えたプライマーを作製し、枯草菌 168 の染色体を鋳型に、そのプライマーを用いて目的断片を PCR で増幅した。次に増幅された断片を鋳型に *attB1*、*attB2* の配列を持ったプライマーを使用し、PCR で両端に *attB1*、*attB2* の配列を持った目的断片を増幅した。その後、目的断片を BP Clonase Enzyme Mix(Invitrogen) によって donor ベクター(pDnor201) に組み換え、entry クローンを作製した。entry クローンを大腸菌 DH5α 株に導入し増幅後、更に目的遺伝子を LR Clonase Enzyme mix(Invitrogen) を用いて destination ベクター(pDLNCGW) に組み換え、expression クローンを作製した。*yufL* 遺伝子に変異を導入した expression クローンを作成する際には entry クローンを鋳型に pdonr-F, pdonr-R プライマーを使用して *attL1*、*attL2* の配列を持った変異導入断片を PCR により増幅し、得られた断片を destination ベクターに組み換えた。

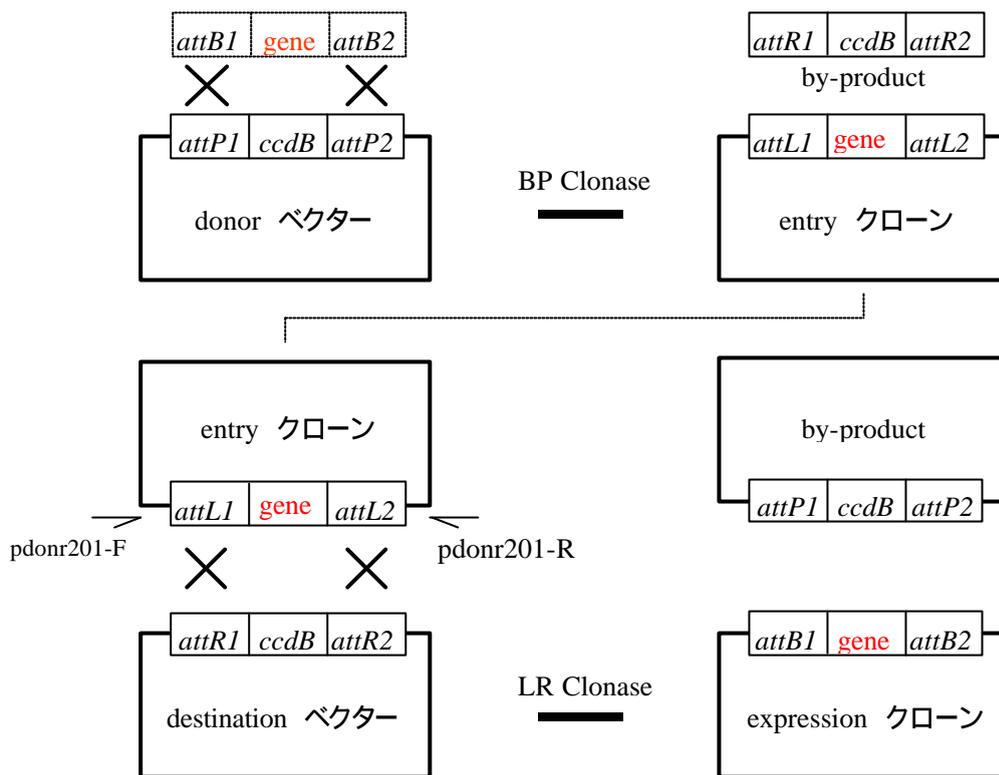


図4 Gateway テクノロジー(Invitrogen) を用いたクローニングの概要

donor ベクターはpDonr201 を示す。entry クローンはpDonr201yufL を示す。destination ベクターはpDLNCGW を示す。expression クローンはpDLNCGWYufL を示す。pDonr201-F および pDonr201-R はentry クローンの*attR1-gene-attR2* 領域をPCR で増幅するためのプライマーを示す。*ccdB* 遺伝子が存在するdonor ベクターもしくは destination ベクターを持つ大腸菌株 (DH5 α) は生育することができない。そのためdonor ベクターと destination ベクターを大腸菌細胞内で増幅するときにはDB3.1株 (*ccdB* 耐性) を宿主細胞として用いた。

表 1 本研究で用いた菌株

株の名前	遺伝子型	作成方法
<i>B.subtilis</i>		
168	<i>trpC2</i>	S.D.Ehrlich
NT201	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a</i>	pMUFrd→168
NT202	<i>trpC2 ΔyufL</i>	pIFDLC→168
NT205	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL</i>	NT201 →NT202
NT601	<i>trpC2 amyE::((GW) P spac-yufL cat)</i>	pDLNCGWmYufL→168
NT602	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL cat)</i>	NT601 →NT205
NT701	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL(Leu24Pro) cat)</i>	pDLNCGWmYufL01 →NT205
NT702	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL(Thr85Met) cat)</i>	pDLNCGWmYufL02 →NT205
NT703	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL(Arg97Ser) cat)</i>	pDLNCGWmYufL03 →NT205
NT704	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL(Glu115Gly) cat)</i>	pDLNCGWmYufL04 →NT205
NT705	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL(Thr127Pro) cat)</i>	pDLNCGWmYufL05 →NT205
NT706	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL(Leu132Pro) cat)</i>	pDLNCGWmYufL06 →NT205
NT707	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL(Gln136Arg) cat)</i>	pDLNCGWmYufL07 →NT205
NT708	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL(Ile166Phe) cat)</i>	pDLNCGWmYufL08 →NT205
NT709	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL(Leu170Ser) cat)</i>	pDLNCGWmYufL09 →NT205
NT710	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL(Tyr174Cys) cat)</i>	pDLNCGWmYufL10 →NT205
NT711	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL(Lys222Glu) cat)</i>	pDLNCGWmYufL11 →NT205
NT712	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL(Leu226Pro) cat)</i>	pDLNCGWmYufL12 →NT205
NT713	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL(Ile297Val) cat)</i>	pDLNCGWmYufL13 →NT205
NT714	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL(Thr309Ala) cat)</i>	pDLNCGWmYufL14 →NT205
NT715	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL(Tyr329Ser) cat)</i>	pDLNCGWmYufL15 →NT205
NT716	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL(Arg334Ser) cat)</i>	pDLNCGWmYufL16 →NT205
NT717	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL(Ser395Pro) cat)</i>	pDLNCGWmYufL17 →NT205
NT718	<i>trpC2 maeN::pMutinT3^a ΔyufL amyE::((GW) P spac-yufL(Gly492Asp) cat)</i>	pDLNCGWmYufL18 →NT205
<i>E.coli</i>		
C600	<i>supE44 hsdR17 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21</i>	Laboratorystock
DH5α	F <i>supE44 Δ(lacZYA-argF)U169 φ80lacZΔM15 hsdR17(rk⁻ mk⁻) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 phoA λ</i>	TaKaRa
BL21(DE3)pLysS	F <i>ompT hsdS_B(rB mB) gal dcm (DE3) pLysS</i>	Novagen
DB3.1	F <i>gyrA462 endA1 Δ(srl-recA) mcrB mrr hsdS20(rB mB) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^r) xyl5 Δleu mutI</i>	Invitrogen

a. pMutinT3 に存在する *spac* プロモーターを含む 367 bp(*Hind*III-*Nru*I) の領域が削除されたプラスミドを示す。

表2 本研究で使用および作製したプラスミド

プラスミド名	用いたプラスミド	説明	用いたプライマー
pMutinT3		枯草菌の遺伝子変異株作成用プラスミド	
pMUFL	pMutinT3	<i>yufL</i> 遺伝子の内部配列 272 bp (18 ~ 290) ^b を組み込んだプラスミド	UFL-F, UFL-R
pMUFRd	pMutinT3 ^a	<i>maeN</i> 遺伝子の内部配列 200 bp (29 ~ 229) ^b を組み込んだプラスミド	UFR-F, UFR-R
pIFDLC	pUC19	<i>pbpD</i> 遺伝子から欠損 <i>yufL</i> 遺伝子を含む <i>yufN</i> 遺伝子までをカバーする 6046 bp と、その間にカナマイシン耐性遺伝子を組み込んだプラスミド	IFDL-FF,IFDL-FR, IFDL-BFF,IFDL-BFR, IFDL-BRF, IFDL-BRR
pDLT3		目的遺伝子を <i>spac</i> プロモーター制御下に置いた形で枯草菌染色体の <i>amyE</i> 遺伝子に組み込むために <i>amyE</i> 遺伝子の 5' 側および 3' 側の配列の一部を組み込んだプラスミド	
pDLNC		pDLT3 の <i>spac</i> プロモーター制御配列である LacI 結合配列が改変されたプラスミド	
pDLNCGW		Gateway テクノロジーを用いたクローニング(Invitrogen)に必要な DNA 配列、 <i>attB1</i> と <i>attB2</i> が pDLNC に組み込まれたプラスミド	
pDonr201		Gateway テクノロジーを用いたクローニング(Invitrogen)に必要な DNA 配列、 <i>attP1</i> と <i>attP2</i> が組み込まれたプラスミド	
pDonr201yufL	pDonr201	<i>yufL</i> 遺伝子全長を Gateway テクノロジーを用いて組み込んだプラスミド	LGWB1-F, LGWB2-R attB1 -F, attB2-R
pDLNCGWYufL	pDLNCGW	<i>yufL</i> 遺伝子全長を Gateway テクノロジーを用いて組み込んだプラスミド	
pDLNCGWmYufL01	pDLNCGW	24 番目の Leu が Pro に変換された <i>yufL</i> 遺伝子全長を持つプラスミド	pdonr-F, pdonr-R
pDLNCGWmYufL02	pDLNCGW	85 番目の Thr が Met に変換された <i>yufL</i> 遺伝子全長を持つプラスミド	pdonr-F, pdonr-R
pDLNCGWmYufL03	pDLNCGW	97 番目の Arg が Ser に変換された <i>yufL</i> 遺伝子全長を持つプラスミド	pdonr-F, pdonr-R
pDLNCGWmYufL04	pDLNCGW	115 番目の Glu が Gly に変換された <i>yufL</i> 遺伝子全長を持つプラスミド	pdonr-F, pdonr-R
pDLNCGWmYufL05	pDLNCGW	127 番目の Thr が Pro に変換された <i>yufL</i> 遺伝子全長を持つプラスミド	pdonr-F, pdonr-R
pDLNCGWmYufL06	pDLNCGW	132 番目の Leu が Pro に変換された <i>yufL</i> 遺伝子全長を持つプラスミド	pdonr-F, pdonr-R
pDLNCGWmYufL07	pDLNCGW	136 番目の Gln が Arg に変換された <i>yufL</i> 遺伝子全長を持つプラスミド	pdonr-F, pdonr-R
pDLNCGWmYufL08	pDLNCGW	166 番目の Ile が Phe に変換された <i>yufL</i> 遺伝子全長を持つプラスミド	pdonr-F, pdonr-R
pDLNCGWmYufL09	pDLNCGW	170 番目の Leu が Ser に変換された <i>yufL</i> 遺伝子全長を持つプラスミド	pdonr-F, pdonr-R
pDLNCGWmYufL10	pDLNCGW	174 番目の Tyr が Cys に変換された <i>yufL</i> 遺伝子全長を持つプラスミド	pdonr-F, pdonr-R
pDLNCGWmYufL11	pDLNCGW	222 番目の Lys が Glu に変換された <i>yufL</i> 遺伝子全長を持つプラスミド	pdonr-F, pdonr-R
pDLNCGWmYufL12	pDLNCGW	226 番目の Leu が Pro に変換された <i>yufL</i> 遺伝子全長を持つプラスミド	pdonr-F, pdonr-R
pDLNCGWmYufL13	pDLNCGW	297 番目の Ile が Val に変換された <i>yufL</i> 遺伝子全長を持つプラスミド	pdonr-F, pdonr-R
pDLNCGWmYufL14	pDLNCGW	309 番目の Thr が Arg に変換された <i>yufL</i> 遺伝子全長を持つプラスミド	pdonr-F, pdonr-R
pDLNCGWmYufL15	pDLNCGW	329 番目の Tyr が Ser に変換された <i>yufL</i> 遺伝子全長を持つプラスミド	pdonr-F, pdonr-R
pDLNCGWmYufL16	pDLNCGW	334 番目の Arg が Ser に変換された <i>yufL</i> 遺伝子全長を持つプラスミド	pdonr-F, pdonr-R
pDLNCGWmYufL17	pDLNCGW	395 番目の Ser が Pro に変換された <i>yufL</i> 遺伝子全長を持つプラスミド	pdonr-F, pdonr-R
pDLNCGWmYufL18	pDLNCGW	492 番目の Gly が Asp に変換された <i>yufL</i> 遺伝子全長を持つプラスミド	pdonr-F, pdonr-R
pET29b		大腸菌細胞内での蛋白質過剰発現用プラスミド	
pETYufLp	pET29b	<i>yufL</i> 遺伝子の細胞膜外領域(34-170aa)を組み込んだプラスミド	UFLBTM1-F, UFLFTM-R1
pETmYufLp1	pET29b	<i>yufL</i> 遺伝子の細胞膜外領域(34-170aa)を組み込んだプラスミド 85 番目の Thr が Met に変換されている	UFLBTM1-F, UFLFTM-R1
pETmYufLp2	pET29b	<i>yufL</i> 遺伝子の細胞膜外領域(34-170aa)を組み込んだプラスミド 97 番目の Arg が Ser に変換されている	UFLBTM1-F, UFLFTM-R1
pETmYufLp3	pET29b	<i>yufL</i> 遺伝子の細胞膜外領域(34-170aa)を組み込んだプラスミド 115 番目の Glu が Gly に変換されている	UFLBTM1-F, UFLFTM-R1
pETmYufLp4	pET29b	<i>yufL</i> 遺伝子の細胞膜外領域(34-170aa)を組み込んだプラスミド 127 番目の Thr が Pro に変換されている	UFLBTM1-F, UFLFTM-R1
pETmYufLp5	pET29b	<i>yufL</i> 遺伝子の細胞膜外領域(34-170aa)を組み込んだプラスミド 132 番目の Leu が Pro に変換されている	UFLBTM1-F, UFLFTM-R1
pETmYufLp6	pET29b	<i>yufL</i> 遺伝子の細胞膜外領域(34-170aa)を組み込んだプラスミド 136 番目の Gln が Arg に変換されている	UFLBTM1-F, UFLFTM-R1
pETmYufLp7	pET29b	<i>yufL</i> 遺伝子の細胞膜外領域(34-170aa)を組み込んだプラスミド 166 番目の Ile が Phe に変換されている	UFLBTM1-F, UFLFTM-R2

a. *spac* プロモーターを含む 367 bp(*HindIII-NruI*)の領域が削除されたプラスミド。

表 3 本研究で使用したプライマー

プライマー	配列(5'-3')	制限酵素
UFL-F	AAGA <u>AAGCTT</u> CTGCAAACCAGACTCACC	<i>Hind</i> III
UFL-R	GGA <u>GGATCC</u> CGGATACCGTTCATATCC	<i>Bam</i> HI
UFM-F	AAGA <u>AAGCTT</u> GTTGAAGATGACCCCATGG	<i>Hind</i> III
UFM-R	GGA <u>GGATCC</u> TGATCACGTCAAGCTCGC	<i>Bam</i> HI
UFR-F	AAGA <u>AAGCTT</u> TTTTCACCTGAGCAAAAAGAC	<i>Hind</i> III
UFR-R	GGA <u>GGATCC</u> CTATGTCTCCGAGAAAC	<i>Bam</i> HI
UFLBTM1-F	CATCAT <u>CATATG</u> ACCACCAAACGAATTAGAGATC	<i>Nde</i> I
UFLFTM-R1	CT <u>CCTCGAG</u> ATGGCTGATCACTTCATCAATTTT	<i>Xho</i> I
UFLFTM-R2	CT <u>CCTCGAG</u> ATGGCTGAACACTTCATCAATTTT	<i>Xho</i> I
attB1 -F	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCG	
attB2 -R	ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	
pdonr-F	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	
pdonr-R	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	
LGWB1-F	aaaaagcaggctcgAAACGTAAGGAAGTTTTATATGAAAAAAC	
LGWB2-R	agaaagctgggtCTTAATCATGATTTTCCTCCTTCGG	
IFDL-FF	GGT <u>GGTACC</u> AGAGTGACCATGTTACGAAAAATAATC	<i>Kpn</i> I
IFDL-FR	CT <u>CCTCGAG</u> TTCTAGCCATTTTTTATTACGG	<i>Xho</i> I
IFDL-BFF	GGT <u>GGTACC</u> CATGCT <u>CCTCGAG</u> CAAATCTGACCACCAAACGC	<i>Kpn</i> I, <i>Xho</i> I
IFDL-BFR	cttcggttctgttttttCATATAAAACTTCCTTACGTTT	
IFDL-BRF	aaaaaacagaaccgaagGAGGAAAATCATG	
IFDL-BRR	GGA <u>GGATCC</u> GTCAAAAATTCTCACGCGCC	<i>Bam</i> HI
UFLF-F	GGA <u>GGATCC</u> TAAATCATGATTTTCTCCTTCG	<i>Bam</i> HI
UFLF-R	GGA <u>GGATCC</u> GTAAGGAAGTTTTATATGAAAAAAC	<i>Bam</i> HI

下線は制限酵素の認識配列を示す。小文字は PCR ライゲーションの為に付加した配列を示す。

PET system (Novagen) による YufL の細胞膜外領域 YufLp-His₆ 蛋白質の精製

C 末端側にヒスチジンタグが融合できる過剰発現系プラスミド pET29b (Novagen) に、*yufL* 遺伝子の細胞膜外領域(34-168 aa に相当する DNA 断片) を組み込み、pETYufLp を作製した。このプラスミドを大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株へ導入し、PET system(Novagen) のマニュアルに従い、YufLp-His₆ 蛋白質を精製した。得られた精製蛋白質を含む画分は、終濃度 10 % になるようグリセロールを加え、-80 °C で保存した。試料中の蛋白質濃度の測定は、Protein Assay reagent(Bio Rad) を用いて行った。

YufLp-His₆ 蛋白質とリンゴ酸との結合解析

200 μ l の反応液中(20 mM Tris-HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 10 % グリセロール) で 50 μ M の YufLp-His₆ 蛋白質と 0- 500 μ M の非 RI 標識のリンゴ酸、20 μ M の L- [1,4(2,3)-¹⁴C] リンゴ酸 (1.48- 2.29GBq/mmol) を混合し、氷上で 15 分間反応を行った。この反応液の 95 μ l を、あらかじめ 2 μ l の D.W. もしくは 2 μ l の 1 M リンゴ酸を分注したチューブにそれぞれ加えた。次に、この反応液 80 μ l を、分子量 3000 Da 以下を分離するフィルターである Microcon-YM3(Millipore) にそれぞれ通した。YufLp-His₆ 蛋白質は約 16 kDa なので、このフィルターを通過できない。1 M のリンゴ酸を加えたサンプルは、YufLp-His₆ と結合した RI 標識リンゴ酸が、新たに加えたリンゴ酸との競合により YufLp-His₆ から分離し、フィルターを通過した画分(FT 画分)に回収される。一方、D.W. を加えたサンプルでは、結合していないリンゴ酸のみが FT 画分に回収される。この FT 画分溶液 10 μ l を 200 μ l の D.W. で希釈し、このうち 100 μ l を液体シンチレーション用溶液であるクリアゾル I 4 ml に溶かし、RI 標識されたリンゴ酸の値を測定した。1 M のリンゴ酸を加えたサンプルと D.W. を加えたサンプルの値の差から、YufLp-His₆ 蛋白質と結合したリンゴ酸の濃度を計算した(図 5)。

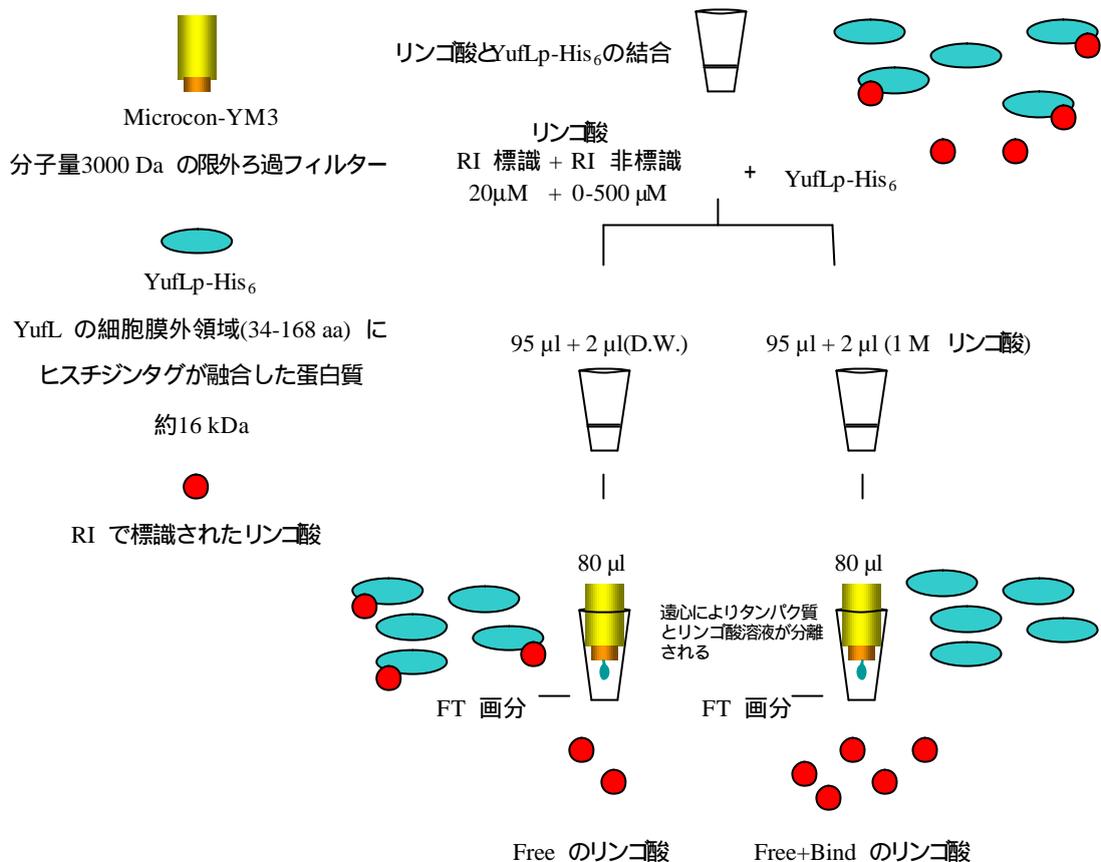


図5 YufLp-His₆ とリンゴ酸との結合解析の概要

YufL センサー蛋白質の細胞膜外領域とヒスチジンタグを融合させたYufLp-His₆ 蛋白質 (約16 kDa) を用いてリンゴ酸との結合解析を行った。解析操作の流れを図に示した。YufLp-His₆ とRI 標識されたリンゴ酸を結合させた後、反応液95 μl に2 μl のD.W. と1 M のリンゴ酸をそれぞれ加えた。それぞれの混合液をMicrocon-YM3(分子量3000 Da 以下を分離するフィルター) に通し、FT 画分の値を測定した。また変異型YufLp-His₆ についても同様の解析を行った。

Superose 12 PC 3.2/30 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる YufLp-His₆ 蛋白質の分画

PET system により精製した YufLp-His₆ 蛋白質溶液を 40,000 rpm (Beckman TLA-100.3 ローター) で 10 分間遠心して不溶性成分を除き、上清を得た。この上清をバッファーで平衡化した Superose 12 PC 3.2/30 カラムに添加し、SMART system(Amersham Bioscience) により分画を行った。分画には 3 種類のバッファーを用いた。それぞれのバッファー組成を以下に示した。リンゴ酸- バッファー (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0), リンゴ酸+ バッファー(0.5 M NaCl, 20 mM

Tri-HCl pH 8.0, 2 mM malate), クエン酸⁺ バッファー (0.5 M NaCl, 20 mM Tri-HCl
pH 8.0, 2 mM citrate)

III 結果

YufL センサー蛋白質への変異の導入

前章で、センサー蛋白質 YufL の欠損株では、リンゴ酸トランスポーターMaeN の恒常的な発現が観察された。また、この株に YufL センサー蛋白質を供給すると、野生株と同様に、リンゴ酸存在下でのみの MaeN リンゴ酸トランスポーターの発現誘導が観察された(第 1 章 図 23)。この現象を利用して、リンゴ酸存在下でも MaeN リンゴ酸トランスポーターの発現を誘導しない YufL センサー蛋白質の変異を単離するために以下の実験を行った。まず Gateway Technology を用いて、*yufL* 遺伝子全長を entry ベクターである pDonr201 にクローニングした。次に、得られた entry クローン pDonr201*yufL* を鋳型にして pdonr-F, pdonr-R プライマーで PCR を行い、DNA 断片を増幅した。増幅された DNA 断片の *yufL* 遺伝子には、PCR によるランダムな変異が導入される。また、DNA 断片の増幅の酵素には Ex taq(TaKaRa) を用いた。得られた DNA 断片を LR reactionにより、destination ベクターである pDLNCGW に導入し、expression クローンを作製した(図 4)。様々な変異が *yufL* 遺伝子に導入された expression クローンを、制限酵素 *ScaI* により直鎖状に消化し、枯草菌の染色体上の遺伝子である *amyE* に導入した(図 6)。

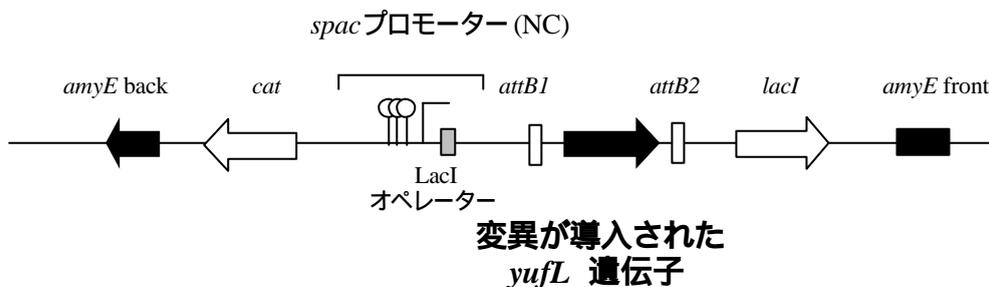


図6 expression クローンが組み込まれた*amyE* 遺伝子

amyE 遺伝子に expression クローンが組み込まれた構造を図に示した。変異が導入された *yufL* 遺伝子は、*spac* プロモーターにより制御される。

また、宿主には NT205 株を用いた。この株はセンサー蛋白質 YufL が欠損しており、*maeN* 遺伝子が恒常的に誘導されている。また、*maeN* 遺伝子の下流には *lacZ* 遺伝子が転写融合されており、この遺伝子の転写が誘導されると β -ガラ

クトシダーゼ活性が上昇し、X-gal を含む寒天プレートでコロニーは青く呈色する。形質転換後の選択培地にはリンゴ酸、X-gal、IPTG およびクロラムフェニコールを含む、グルコース-グルタミン最少培地(GGM 培地) の寒天プレートを用いた。この培地条件では、導入された *yufL* 遺伝子が野生型であれば、培地中に含まれる IPTG によりセンサー蛋白質 YufL が供給され、更に培地中に含まれるリンゴ酸をセンサー蛋白質が認識して MaeN リンゴ酸トランスポーターの発現を誘導し、コロニーは青く呈色する。逆にリンゴ酸存在下でも白いコロニーは、リンゴ酸により MaeN リンゴ酸トランスポーターの発現誘導が起こらないセンサー蛋白質が導入された株だと考えられる(図 7)。

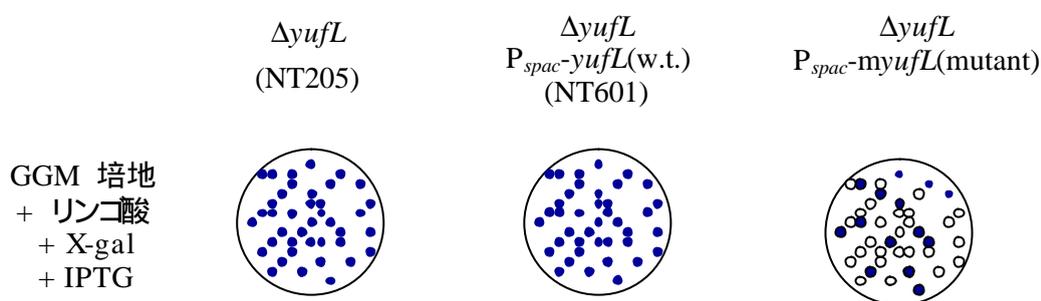


図7 リンゴ酸存在下で活性化できないYufL センサー蛋白質の選択方法

NT205 株ではYufL センサー蛋白質が欠損しており *maeN* 遺伝子の転写が恒常的なために青いコロニーが形成される(左)。この株に野生型の*yufL* 遺伝子が導入されると、培地中のIPTG によりYufL 蛋白質が供給され、この蛋白質がリンゴ酸を認識することにより*maeN* 遺伝子の転写が誘導され、青いコロニーが形成される(中央)。リンゴ酸を認識できないセンサー蛋白質YufL が供給されると*maeN* 遺伝子は誘導されず、白いコロニーが形成される(右)。

この実験により、合計 118 株の白いコロニーを得ることができた。これらの株に導入された *yufL* 遺伝子の塩基配列を決定すると、野生型が 46 株、1 アミノ酸変異が 46 株、2 アミノ酸変異が 22 株、3 アミノ酸変異が 4 株であった。ここで呈色反応の比較対照として野生型の *yufL* 遺伝子を導入した株でも、少数ながら白いコロニーが出現した。これらの株の *maeN* 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を確認したところ、変異は導入されていなかったことから、白いコロニーを形成する原因は、レポーター遺伝子である *lacZ* 遺伝子に変異が導入された可能性が考えられた。同様の現象が、得られた変異株でも生じている可能性が考えられたため、得られた株のうち、1つのアミノ酸変異が導入されている YufL 変異株から染色体 DNA を抽出し、もう一度クローニングしたプラスミ

ドを、NT205 株に導入した。これらの株について β -ガラクトシダーゼ活性を測定したところ、18 株が野生株と異なる転写を示した(図 8)。また、それぞれの変異が YufL センサー蛋白質上のどこに位置するかを図 9 に示した。

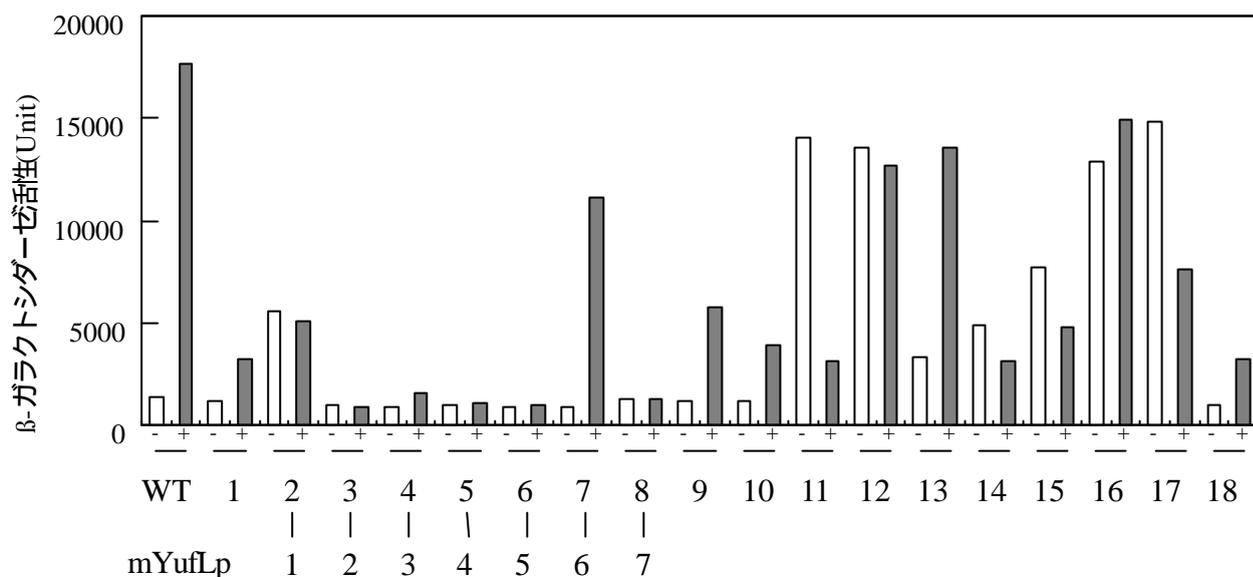


図8 野生型と変異型YufL を発現させたときの $maeN$ 遺伝子の転写活性

GGM 培地(-) と、GGM 培地に2 mM リンゴ酸を添加した培地(+) での各 $yufL$ 遺伝子変異株における $maeN$ 遺伝子の転写活性を示した。また、各株の、変異が導入された位置と変異の種類を図 9 に示した。これらの変異株から作製した、同じアミノ酸変異を持つ細胞膜外領域の蛋白質の名前を、各株の数字の下に示した。

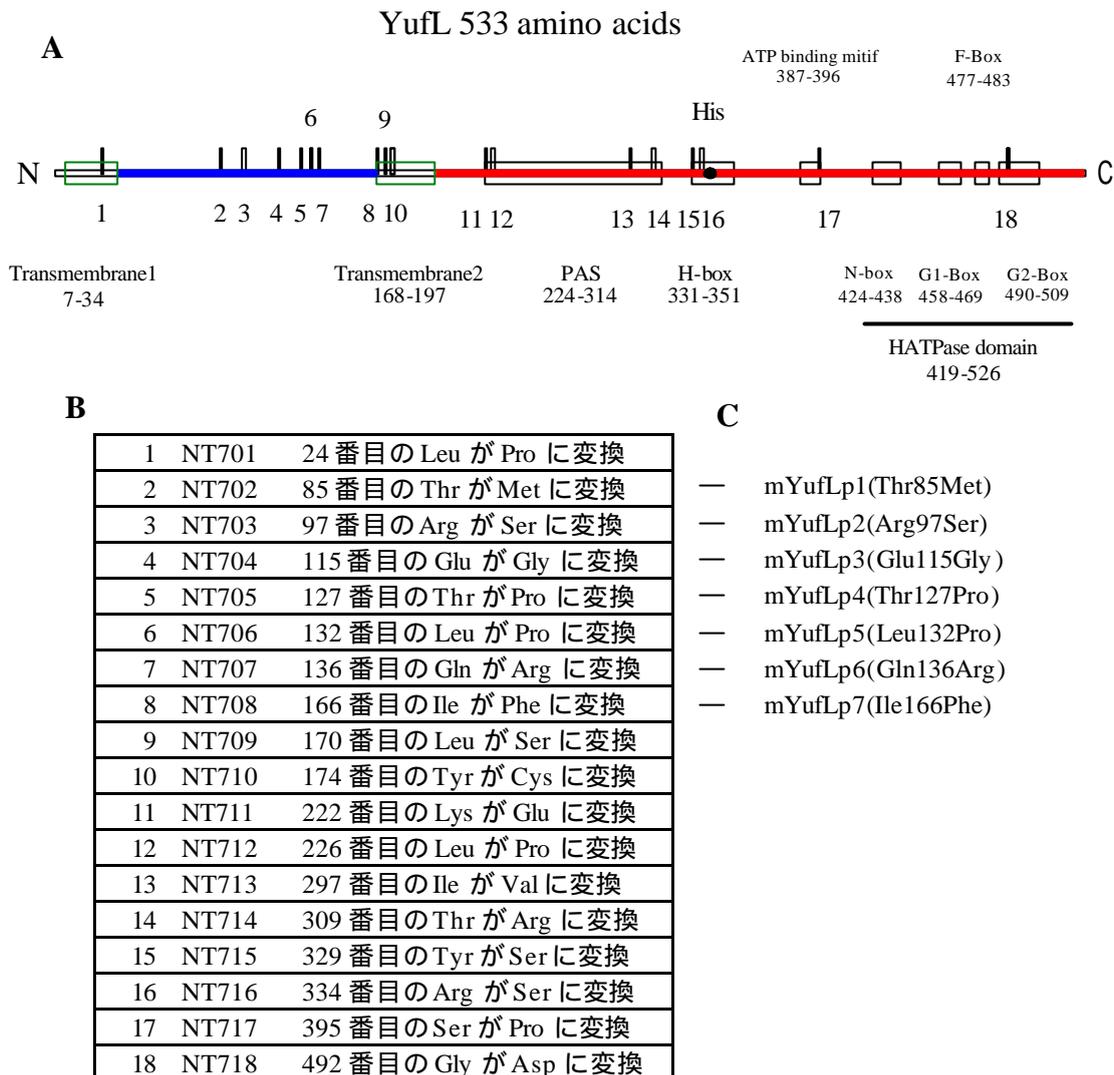


図9 YufL センサー蛋白質の変異のマッピング

導入された、それぞれの変異の位置をセンサー蛋白質YufL の構造図に示した(A)。また、それぞれのアミノ酸変異を(B) に示した。また、この変異株の染色体DNA を用いてプラスミドpET29b にクローニングし、作製した細胞膜外領域の蛋白質の名前を(C) に示した。

得られた18種のYufL変異株は、培地中のリンゴ酸により活性化できない変異だけでなく、恒常的にMaeNが発現している変異が2種(NT712, NT716)、リンゴ酸添加により、野生株と比べて弱いながらも誘導される変異が5種(NT707, NT709, NT710, NT713, NT718)、リンゴ酸添加により抑制される変異が2種(NT711, NT717) 同定された。

YufL センサー蛋白質の細胞膜外領域とリンゴ酸との結合解析

センサー蛋白質は、シグナルの感知と自己リン酸化の、別々の機能を持つことから、それぞれの機能を保持していると考えられる領域を断片化、あるいは別の機能を持つセンサー蛋白質同士を融合して *in vivo* や *in vitro* で活性測定されてきた。特にシグナルの感知に関しては、センサー蛋白質の多くが N 末端側に細胞膜貫通領域を持ち、この領域でシグナルを感知していると考えられていることから、この領域を断片化したセンサー蛋白質を用いて、基質との結合が観察されてきた。その結果、大腸菌の ArcB, *Salmonella typhimurium* の PhoQ や *Klebsiella pneumoniae* の CitA などが、この領域で基質と結合することが報告されている (Georgellis *et al.*, 2001; Vescovi *et al.*, 1997; Kaspar *et al.*, 1999)。特に PhoQ や CitA では細胞膜外領域のアミノ酸配列だけで、基質との結合が観察されている。そこで 2 成分制御系のシグナル伝達の第一歩目である、センサー蛋白質によるシグナルの感知が、どのような機構で行われているかを知るために野生株と変異株を用いて以下の解析を行った。

本研究で得られた変異型 YufL の中に、細胞膜外領域に変異が導入された株が 7 種、同定された (NT702-NT708)。これらの変異株はいずれも、培地中にリンゴ酸を加えても制御遺伝子の発現誘導が起こらないことから、変異により、センサー蛋白質がリンゴ酸と結合できなくなると考えられた。そこでセンサー蛋白質とリンゴ酸との結合を測定するために YufL の細胞膜外領域と予想される 34-168 aa 領域 (YufLp) を精製した。まず、C 末端にヒスチジンタグが融合できる pET29b にセンサー蛋白質 YufL の 34-168 aa に相当する DNA 断片をクローニングし、pETYufLp を作製した。次に、PET system のマニュアルに従い、YufLp-His₆ を精製した。また細胞膜外領域に変異が導入された 7 種についても同様に精製した。これらの蛋白質と RI で標識されたリンゴ酸を用いて、YufLp-His₆ の結合能を調べた (材料と方法、図 5 参照)。まず、YufLp-His₆ と RI で標識されたリンゴ酸を結合させた。次に溶液を 2 つに分注し、一方に RI で標識されていない 1 M のリンゴ酸を、他方に D.W. を加えた。1 M のリンゴ酸を加えた溶液は、蛋白質と結合した RI 標識リンゴ酸が、標識されていないリンゴ酸と競合を起し、蛋白質から分離する。これら 2 種の溶液を Microcon-YM3 (分子量 3000 Da の限外ろ過フィルター) に通過させた。YufLp-His₆ は約 16 kDa であり、このフィルターを通過できない。D.W. を加えたサンプルは、YufLp-His₆ と結合しなかったリンゴ酸のみがフィルターを通過する。一方、1 M のリンゴ酸を加えたサンプルは、RI で標識されたリンゴ酸が YufLp-His₆ から解離しており、その全量がフィルターを通過する。これら 2 つを液体シンチレーションカウンターで測定し、蛋白質のリンゴ酸との結合能を測定した (図 10-1. W.T., 2. mYufLp1(Thr85Met), 3. mYufLp2(Arg97Ser), 4. mYufLp3(Glu115Gly), 5.

mYufLp4(Thr127Pro), 6. mYufLp5(Leu132Pro), 7. mYufLp6(Gln136Arg) , 8. mYufLp7(Ile166Phe))。その結果、野生型と同レベルの結合能を示す変異が 2 種存在した(mYufLp6, mYufLp7)。一方、完全に結合しなくなる変異は 4 種であり(mYufLp2, mYufLp3, mYufLp4, mYufLp5)、1 種は結合能が野生株と比べて低かった(mYufLp1)。センサー蛋白質が細胞膜をまたいで調節蛋白質にシグナルを伝えるには、基質と結合した蛋白質が何らかの変化を起こすと考えられる。今回解析した変異型 YufL はリンゴ酸存在下でも制御遺伝子の発現を誘導できない表現型を持っていることから、少なくとも結合できない変異株はリンゴ酸との結合後の変化が正しく起こらないと考えられた。そこでゲル濾過クロマトグラフィーを用いてリンゴ酸との結合による変化を観察した。その結果、野生型の YufL-His₆ は、リンゴ酸を加えることにより構造変化と考えられるピークのシフトが観察された。一方、クエン酸を加えてもこの変化は観察されなかった。このことから YufL-His₆ は、リンゴ酸と結合することにより何らかの構造変化を起こすと考えられる。同様の解析を変異株で行ったところ、リンゴ酸と結合できない変異蛋白質 4 種(mYufLp2, mYufLp3, mYufLp4, mYufLp5)はリンゴ酸を添加してもピークのシフトが観察されなかった。それに対して、リンゴ酸と結合できる蛋白質はピークのシフトが観察された。

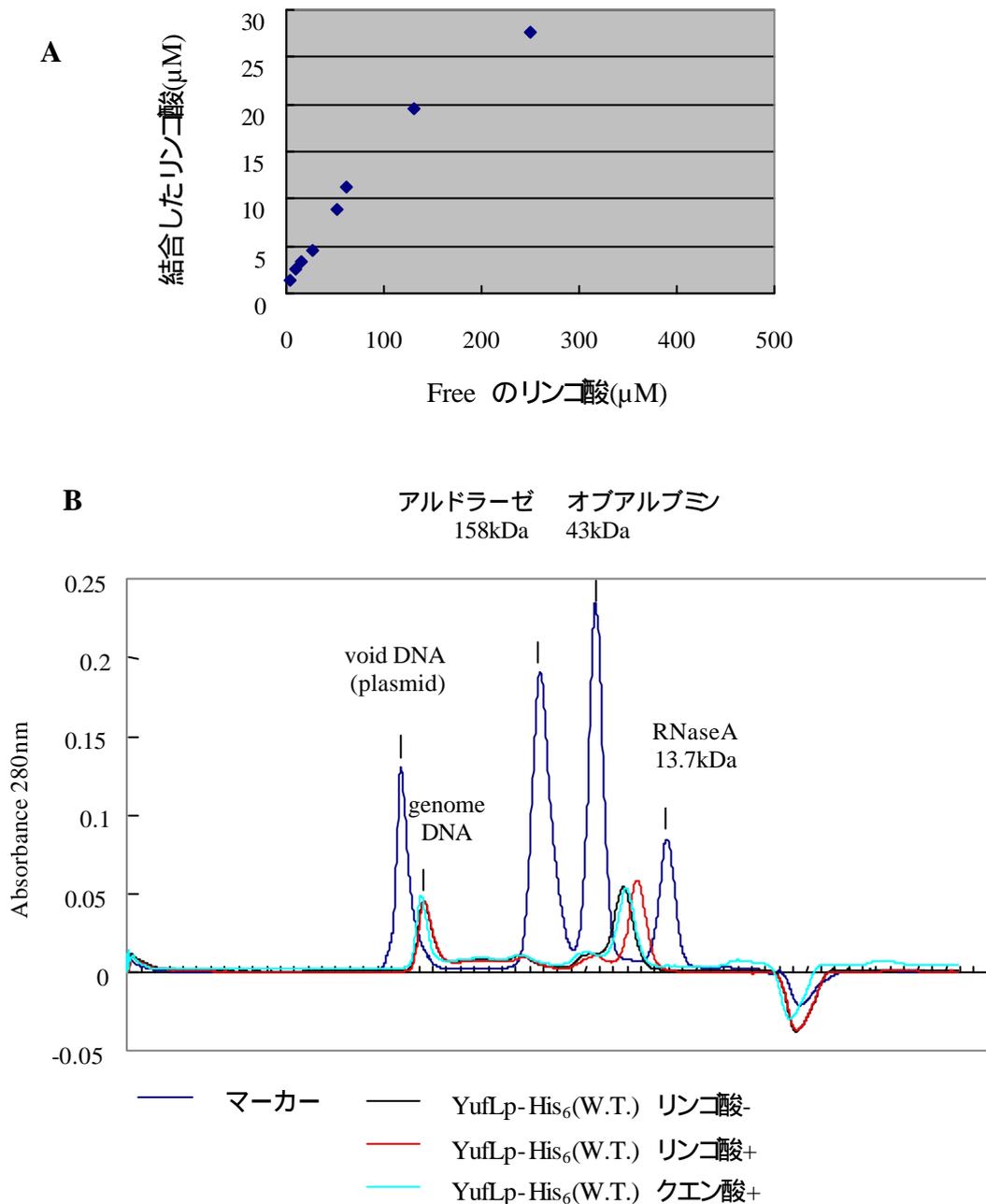


図10-1 野生型YufLp-His₆ のリンゴ酸との結合能とゲル濾過による分画

A. 野生型のYufLp-His₆ とリンゴ酸との結合を示した。縦軸に結合したリンゴ酸濃度、横軸に加えたリンゴ酸の濃度を示した。

B. ゲル濾過によりYufLp-His₆ を分画した。それぞれ、マーカーを青色で示した。また、使用したバッファーにリンゴ酸を加えないサンプルを黒で、リンゴ酸を加えたサンプルを赤で、クエン酸を加えたサンプルを水色で示した。

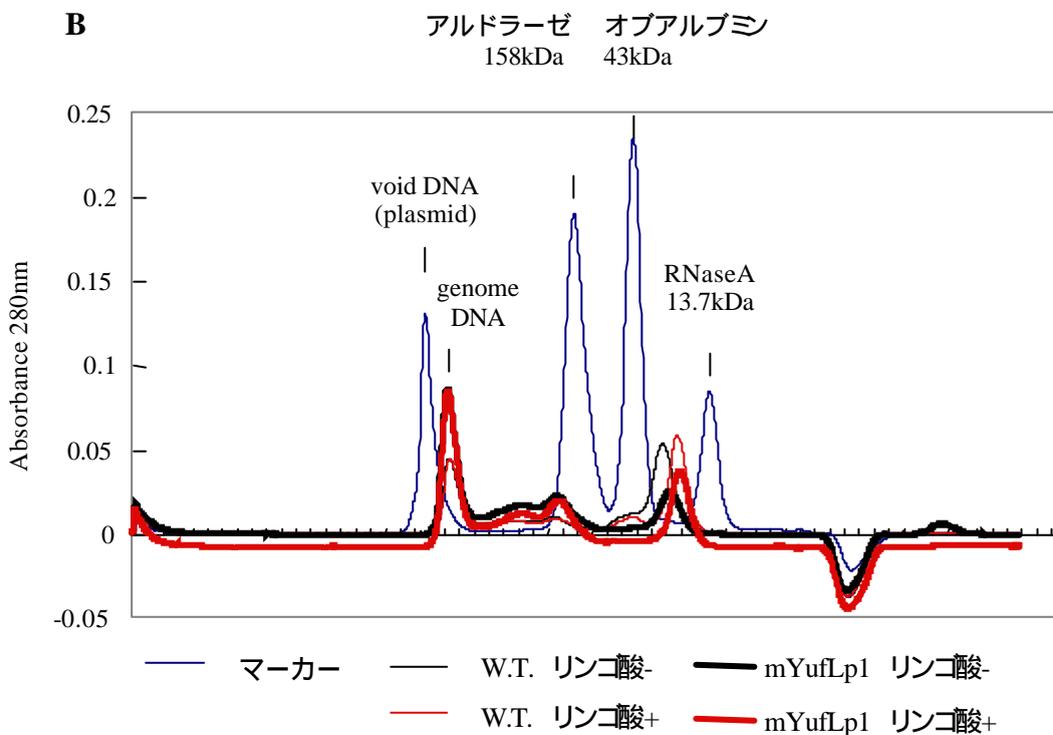
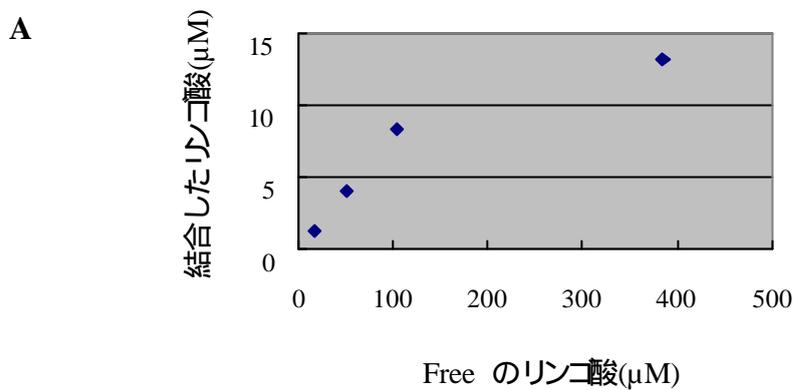


図10-2 mYufLp1 のリンゴ酸との結合能とゲル濾過による分画

mYufLp1 蛋白質のアミノ酸変異は図8 の2 株、図9 のNT702 株に相当する。

A. mYufLp1 とリンゴ酸との結合を示した。縦軸に結合したリンゴ酸濃度、横軸に加えたリンゴ酸の濃度を示した。

B. ゲル濾過により mYufLp1 を分画した。それぞれ、マーカーを青色で示した。また、使用したバッファーにリンゴ酸を加えないサンプルを黒で、リンゴ酸を加えたサンプルを赤で示した。また、比較対照として野生型のYufL-His₆ を示した。

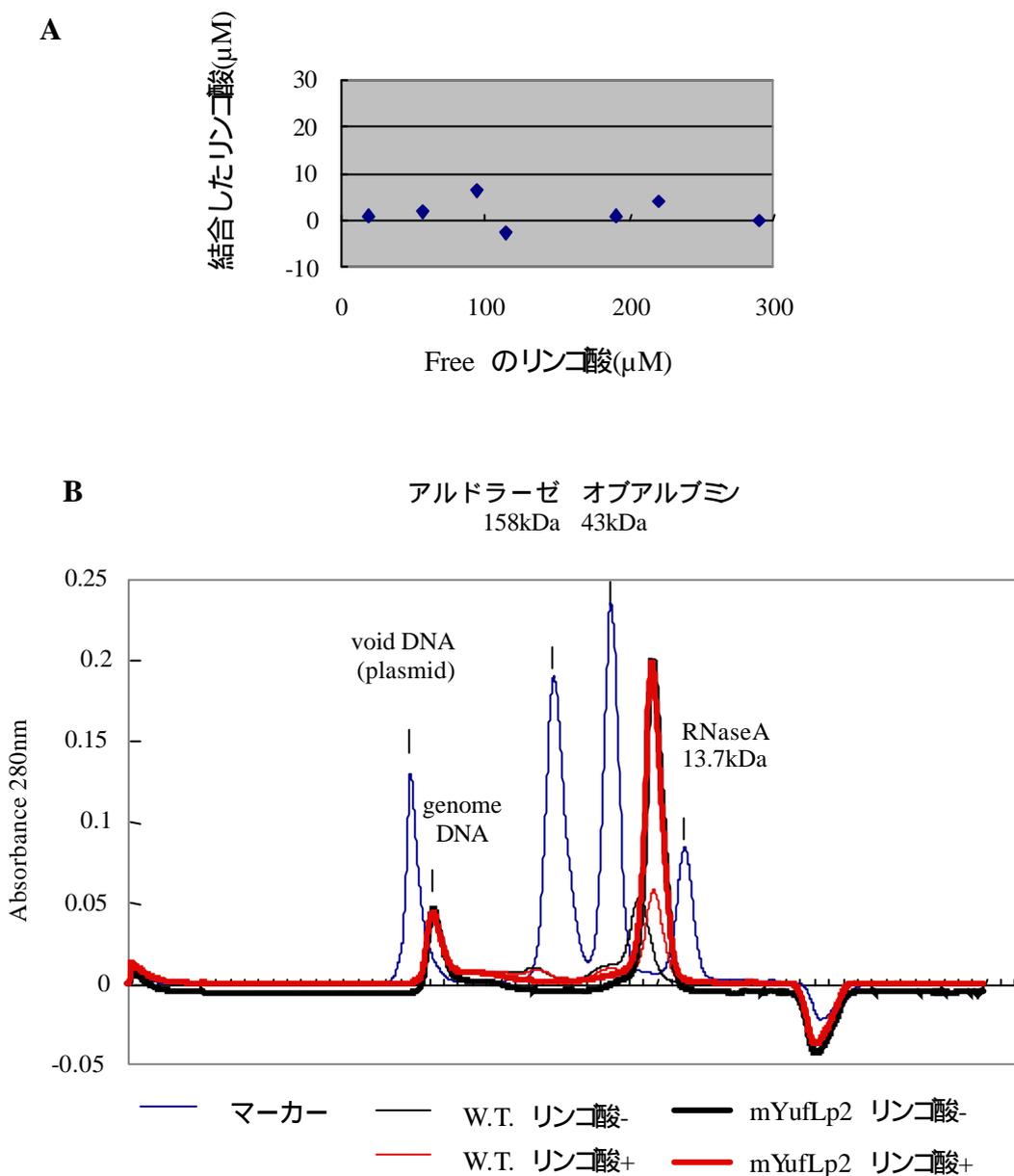


図10-3 mYufLp2 のリンゴ酸との結合能とゲル濾過による分画

mYufLp2 蛋白質のアミノ酸変異は図8 の3 株、図9 のNT703 株に相当する。

A. mYufLp2 とリンゴ酸との結合を示した。縦軸に結合したリンゴ酸濃度、横軸に加えたリンゴ酸の濃度を示した。

B. ゲル濾過により mYufLp2 を分画した。それぞれ、マーカーを青色で示した。また、使用したバッファーにリンゴ酸を加えないサンプルを黒で、リンゴ酸を加えたサンプルを赤で示した。また、比較対照として野生型のYufL-His₆ を示した。

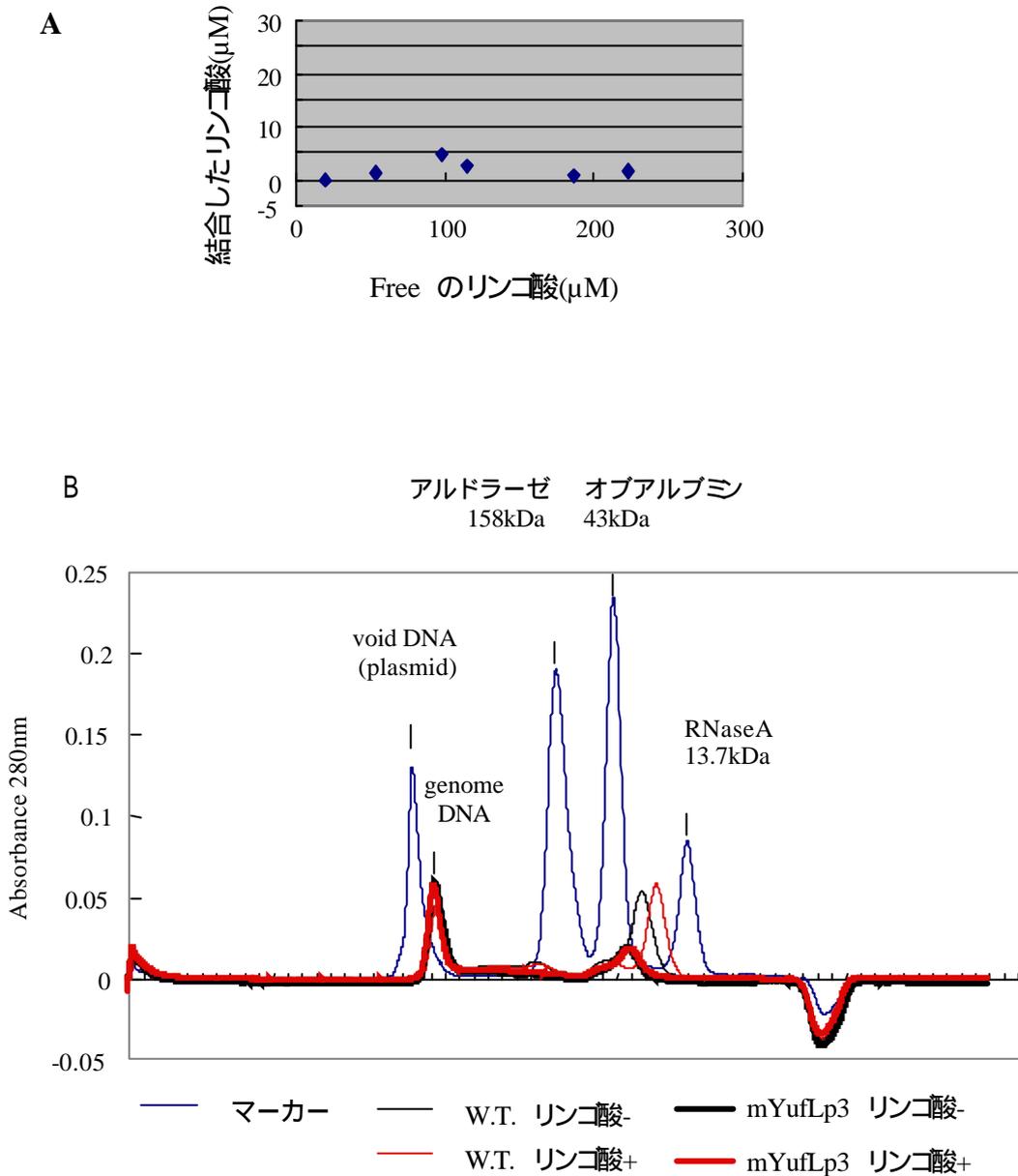


図10-4 mYufLp3 のリンゴ酸との結合能とゲル濾過による分画

mYufLp3 蛋白質のアミノ酸変異は図8 の4 株、図9 のNT704 株に相当する。

A. mYufLp3 とリンゴ酸との結合を示した。縦軸に結合したリンゴ酸濃度、横軸に加えたリンゴ酸の濃度を示した。

B. ゲル濾過により mYufLp3 を分画した。それぞれ、マーカーを青色で示した。また、使用したバッファーにリンゴ酸を加えないサンプルを黒で、リンゴ酸を加えたサンプルを赤で示した。また、比較対照として野生型のYufL-His₆ を示した。

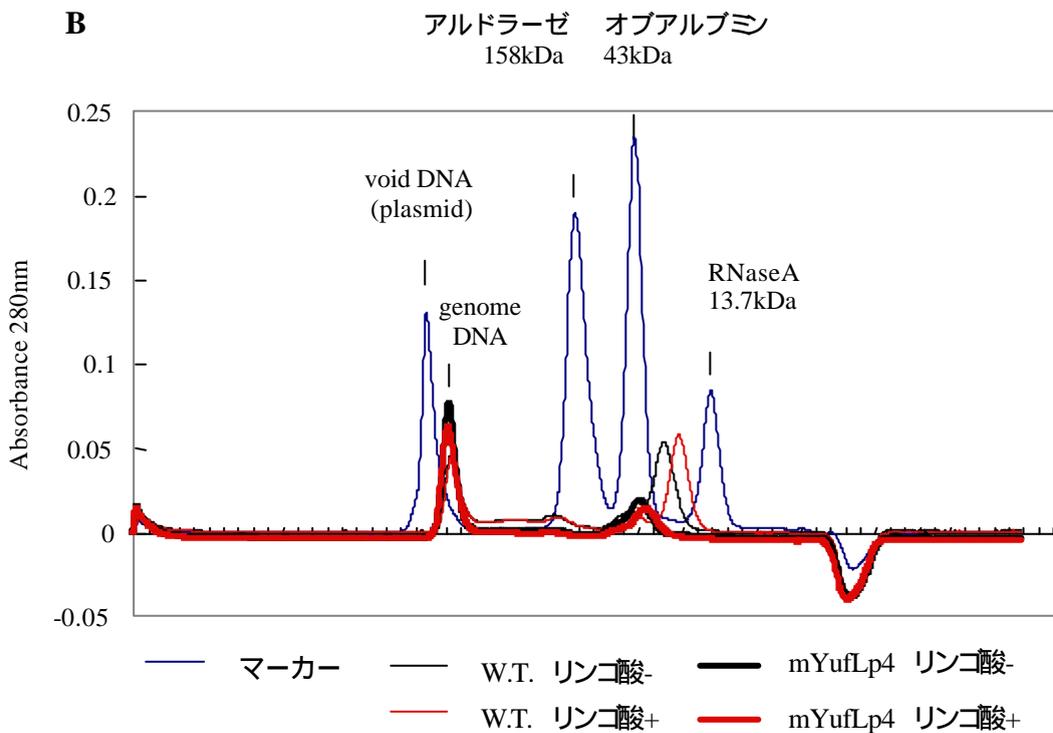
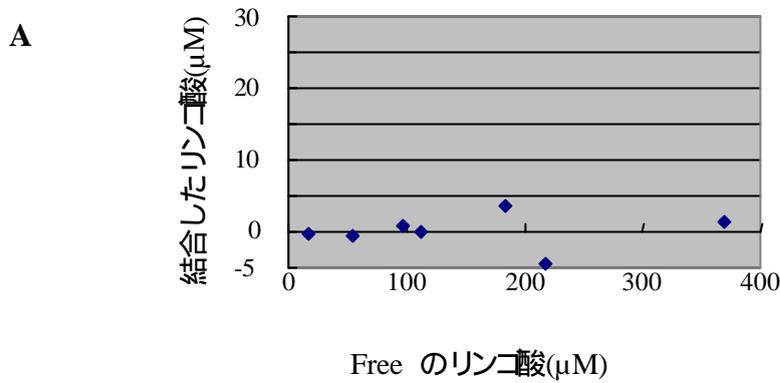


図10-5 mYufLp4 のリンゴ酸との結合能とゲル濾過による分画

mYufLp4 蛋白質のアミノ酸変異は図8 の5 株、図9 のNT705 株に相当する。

A. mYufLp4 とリンゴ酸との結合を示した。縦軸に結合したリンゴ酸濃度、横軸に加えたリンゴ酸の濃度を示した。

B. ゲル濾過により mYufLp4 を分画した。それぞれ、マーカーを青色で示した。また、使用したバッファーにリンゴ酸を加えないサンプルを黒で、リンゴ酸を加えたサンプルを赤で示した。また、比較対照として野生型のYufL-His₆ を示した。

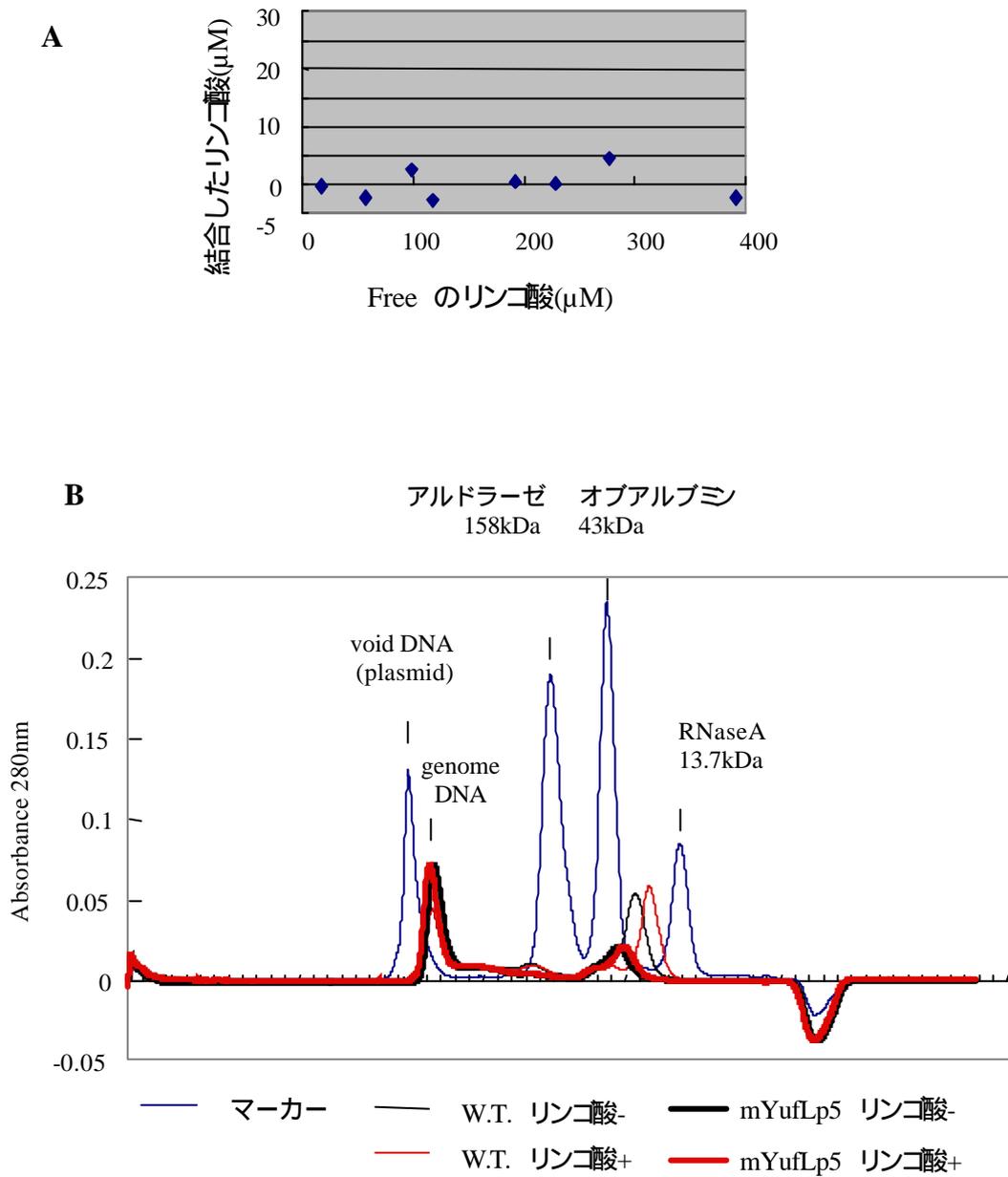


図10-6 mYufLp5 のリノゴ酸との結合能とゲル濾過による分画

mYufLp5 蛋白質のアミノ酸変異は図8 の6 株、図9 のNT706 株に相当する。

A. mYufLp5 とリノゴ酸との結合を示した。縦軸に結合したリノゴ酸濃度、横軸に加えたリノゴ酸の濃度を示した。

B. ゲル濾過により mYufLp5 を分画した。それぞれ、マーカーを青色で示した。また、使用したバッファーにリノゴ酸を加えないサンプルを黒で、リノゴ酸を加えたサンプルを赤で示した。また、比較対照として野生型のYufL-His₆ を示した。

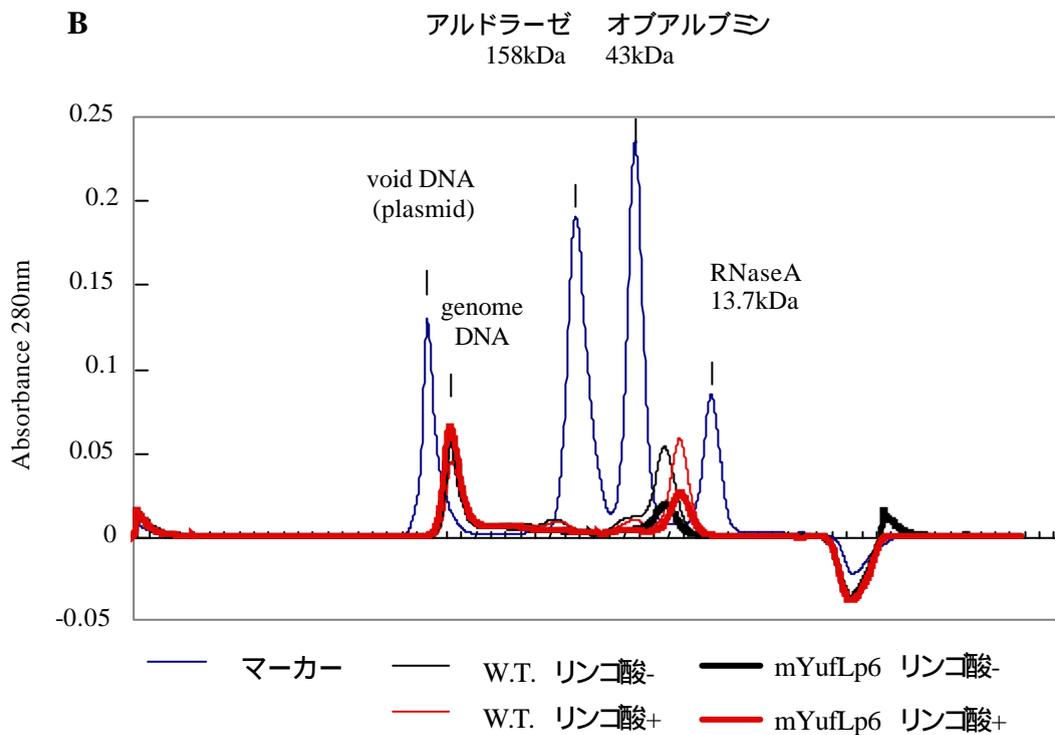
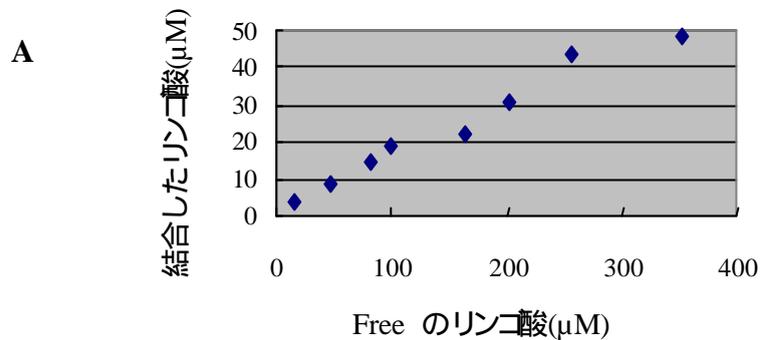


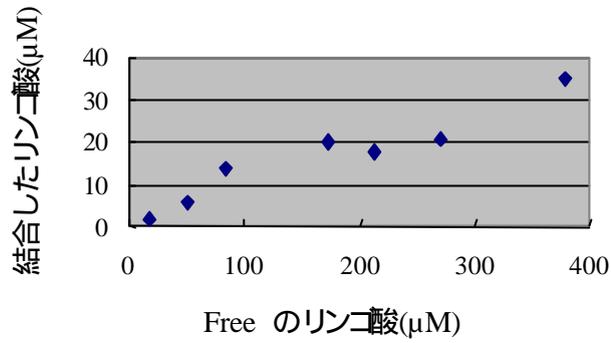
図10-7 mYufLp6 のリンゴ酸との結合能とゲル濾過による分画

mYufLp6 蛋白質のアミノ酸変異は図8 の7 株、図9 のNT707 株に相当する。

A. mYufLp6 とリンゴ酸との結合を示した。縦軸に結合したリンゴ酸濃度、横軸に加えたリンゴ酸の濃度を示した。

B. ゲル濾過により mYufLp6 を分画した。それぞれ、マーカーを青色で示した。また、使用したバッファーにリンゴ酸を加えないサンプルを黒で、リンゴ酸を加えたサンプルを赤で示した。また、比較対照として野生型のYufL-His₆ を示した。

A



B

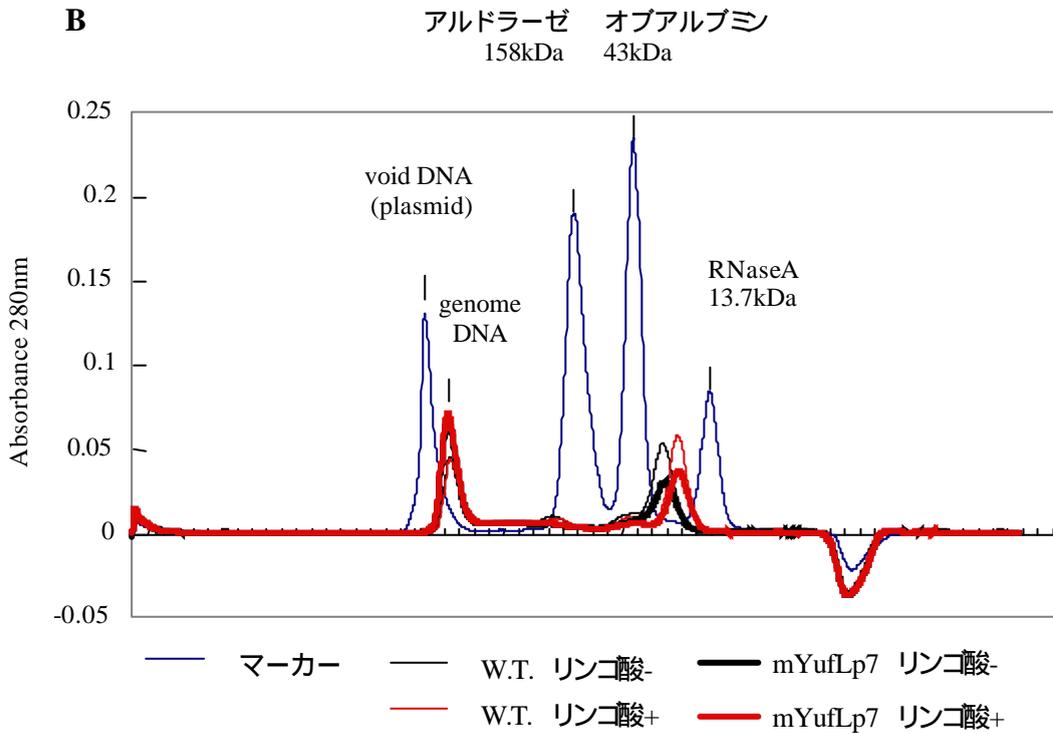


図10-8 mYufLp7 のリンゴ酸との結合能とゲル濾過による分画

mYufLp7 蛋白質のアミノ酸変異は図8 の8 株、図9 のNT708 株に相当する。

A. mYufLp7 とリンゴ酸との結合を示した。縦軸に結合したリンゴ酸濃度、横軸に加えたリンゴ酸の濃度を示した。

B. ゲル濾過により mYufLp7 を分画した。それぞれ、マーカーを青色で示した。また、使用したバッファーにリンゴ酸を加えないサンプルを黒で、リンゴ酸を加えたサンプルを赤で示した。また、比較対照として野生型のYufL-His₆ を示した。

IV 考察

センサー蛋白質 YufL への変異の導入

Gateway テクノロジーと PCR を組み合わせたランダムな変異の導入方法により、リンゴ酸存在下でも制御遺伝子の発現誘導が起こらない YufL センサー蛋白質の変異は全体に分散した。制御遺伝子の発現誘導が起こらない理由として (i) リンゴ酸と結合できない。 (ii) リンゴ酸と結合した後の構造変換が起こらない。 (iii) 構造変換が自己リン酸化に変換されない(ATP との結合領域の変異、ヒスチジン残基の変異など)。 (iv) 調節蛋白質へのリン酸リレー反応がおこらない。 (v) 調節蛋白質に対する脱リン酸化活性の上昇、が考えられる。ただし、(iii)と (iv) はセンサー蛋白質が自己リン酸化し、調節蛋白質 YufM へのリン酸リレーが起こると仮定した場合に限る。今回得られた変異株の表現型はこれらのシグナル伝達のどこかの過程で断ち切られることで起こると考えられる。それぞれの変異を用いてそれぞれの活性を調べることにより、どのプロセスでシグナルが断絶されたかが明らかにされると考えている。またこの解析により、各反応ステップに必要なアミノ酸が同定されると考えている。

YufL の細胞膜外領域とリンゴ酸との結合解析およびゲル濾過クロマトグラフィーによる解析

細胞膜外領域の変異にはリンゴ酸と結合できないタイプと(4 種)、結合はできるが、そのシグナルが伝達されないタイプ(3 種)があることがわかった。また、結合できないタイプはゲル濾過クロマトグラフィーの結果にも顕著に現れており、リンゴ酸を添加しても 4 種(mYufLp2, mYufLp3, mYufLp4, mYufLp5)は、いずれも蛋白質を示すピークに変動が見られなかった。これは、導入された各変異が原因で、野生型が持つ本来の構造を保つことができないためにリンゴ酸と結合できず、構造の変換が起こらなかったと考えられる。また、各々の変異でピークの位置は異なっており、これは各変異がもたらす蛋白質立体構造への影響が、それぞれ異なることを示している。低い結合能を示した mYufLp1 はリンゴ酸が無い状態で野生型と異なる構造を示した。これはリンゴ酸と結合していない状態での構造が、変異により維持できなくなったと考えられる。その結果、リンゴ酸との結合能が下がったと考えられる。強い結合を示した mYufLp6,7 はゲル濾過の結果では、野生株と比較して多少の違いがあるものの、ほぼ同様のシフトが観察された。これらの結果から、リンゴ酸添加によるピークのシフトは蛋白質とリンゴ酸との結合による構造の変化を反映している事が明らかとなった。しかし、今回の結果からはリンゴ酸と結合できる変異蛋白質の、下流へ

のシグナルが遮断される現象の説明までは至らなかった。今後、YufLp-His₆ 蛋白質が回収される画分の分離能が高いカラムを用いることにより、この現象を更に解析する必要があると考えられる。また、リンゴ酸と結合できる変異 mYufLp6,7 に関しては、自己リン酸化、調節蛋白質へのリン酸リレーが起こるならば、その活性を測定することにより、制御遺伝子が誘導されない原因が明らかにされると考えられる。また起こらないならば、センサー蛋白質 YufL による調節蛋白質の脱リン酸化活性を測定することで、その原因が明らかにされると考えられる。

K. pneumoniae の CitA 蛋白質では、細胞膜外領域の立体構造が報告されており(Reinely *et al.*, 2003)、これと高い相同性を示す YufL 蛋白質の細胞膜外領域の立体構造を、細胞構造学講座の福原直志さんをお願いし、予測した(図 11)。また、CitA では、極性を持ったアミノ酸に変異を導入し、クエン酸との結合能を解析している (Gerharz *et al.*, 2003)。その結果も合わせて図 12 に示した。立体構造から、CitA の細胞膜外領域はクエン酸と結合するためのポケットを形作り、そこでクエン酸と結合することが明らかとなった。YufL 蛋白質も同様の構造を示す。図 12 には、立体構造の結果を反映したアミノ酸配列を示している。基質と結合したときに基質と近い位置に存在するアミノ酸を赤字で示した。また変異が導入されたアミノ酸を太字で、その変異により、基質との結合能が変化したアミノ酸を矢印で示した。矢印で示したアミノ酸に着目すると赤色が多いことから、これらは変異により基質と結合できなくなったと解釈できる。

実際、図 11 に示したように、mYufLp2, 3, 4, 5 は基質と結合するポケットの領域のアミノ酸変異である。それとは別の領域の変異である、mYufLp1 は基質との結合能が低下するので、ポケットの形状を維持するのに必要なアミノ酸だと考えられる。mYufL6,7 は基質との結合能に影響がないことから、結合後の立体構造の変化に関わるために必要なアミノ酸であると考えられる。

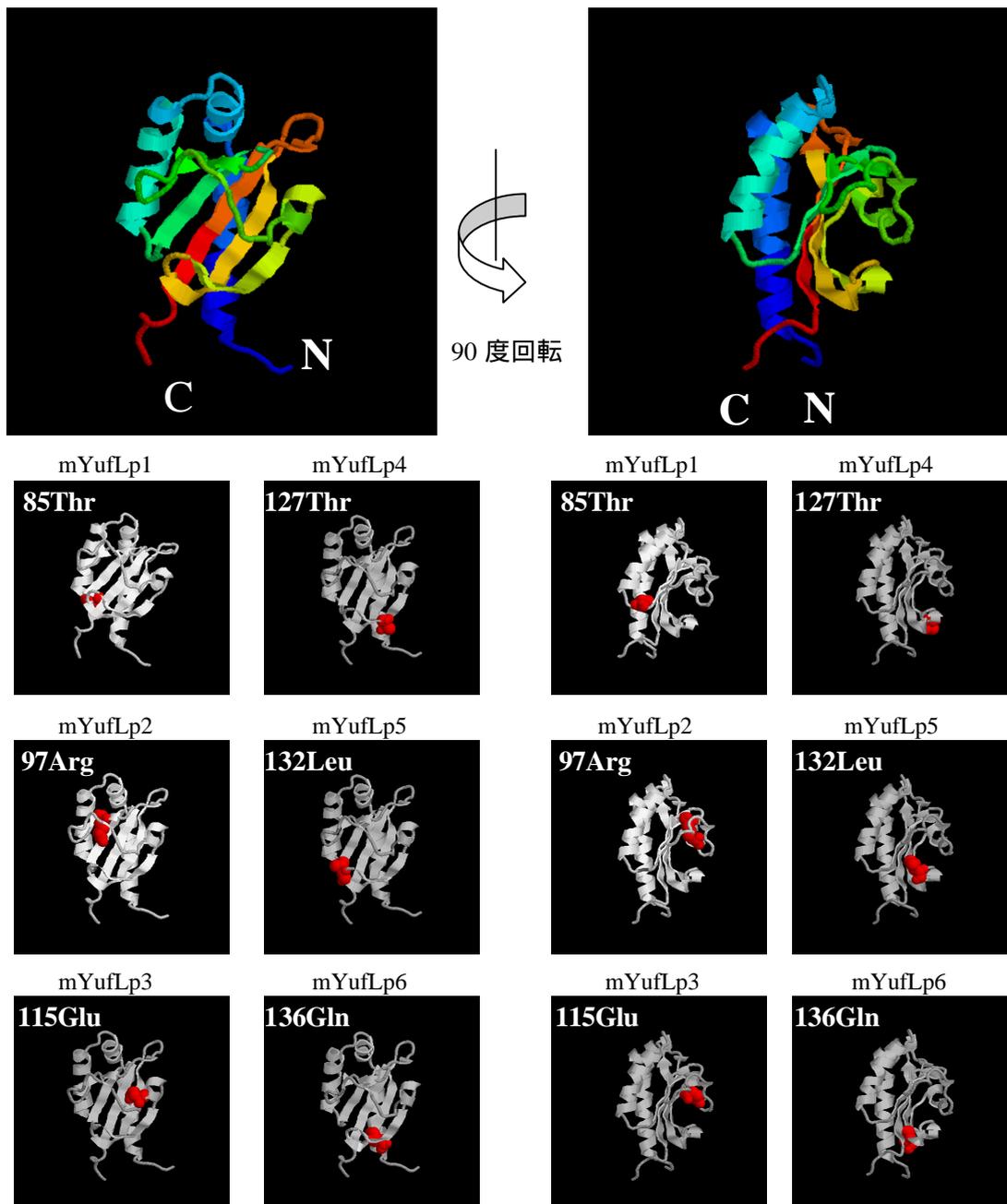


図11 YufL の細胞膜外領域の予測された立体構造

枯草菌 YufL センサー蛋白質の細胞膜外領域を予測した。N は蛋白質の N 末端側を示す。C は蛋白質の C 末端側を示す。また、本研究で得られた細胞膜外領域の変異が生じたアミノ酸の位置をそれぞれ示した。mYufLp7(166Ile) については細胞膜に近いので、予測する領域から除外されている。

Bacillus subtilis; YufLp 32-168 aa

Klebsiella pneumoniae; CitAp 45-180 aa

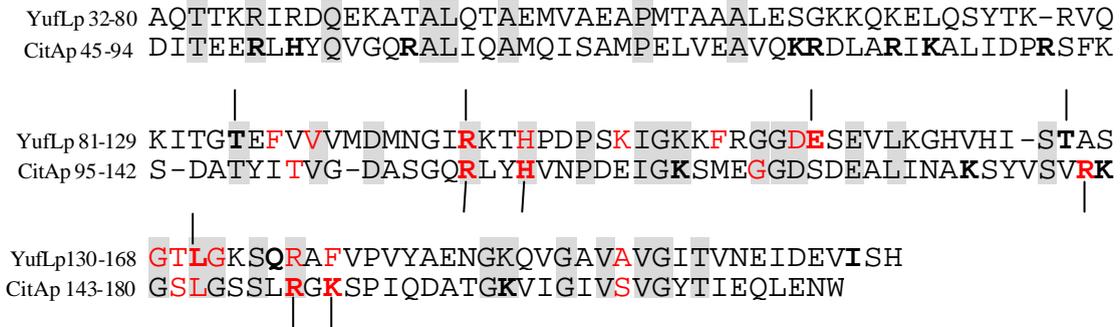


図12 YufL とCitA の細胞膜外領域の比較

枯草菌の YufL と *K. pneumoniae* の CitA の細胞膜外領域のアミノ酸を比較した。双方に保存されているアミノ酸を灰色のバーで示した。また、変異が導入されたアミノ酸を太字で示した。変異が導入されることにより、基質との結合能が変化するアミノ酸を矢印で示した。また、蛋白質が基質と結合したときに基質の近くに位置するアミノ酸を赤字で示した。アミノ酸配列の左側には、開始コドンからのアミノ酸数を示した。

変異がもたらすセンサー蛋白質 YufL の機能の変化

本研究では、培地中にリンゴ酸を添加した条件で、制御遺伝子の発現誘導が起こらない変異型センサー蛋白質を選択する目的で実験を行ったが、野生株と同レベルの発現誘導が起こる株 NT712, NT713, NT716 が得られた。これらの株はリンゴ酸を加えない条件での制御遺伝子の発現誘導が、野生型と比べて高いことから、今後の解析の対象とした。特に NT712, NT716 株は調節蛋白質 YufM に対する脱リン酸化活性が完全に欠損していると考えられる。また、NT711, NT717 に関してはリンゴ酸添加により制御遺伝子の発現誘導が抑制される。これらに関しても今後の解析の対象とした。

本研究で解析に用いた株は細胞膜外領域の変異のみであり、他の領域の変異に関しては解析していない。そこで、現在までに知られている領域別の活性と照らし合わせて、それぞれの株が示す表現型を推測した。また、センサー蛋白質 YufL の自己リン酸化は、実験的な証明が行われていないが、例に出したセンサー蛋白質が自己リン酸化する現象を示した場合は、その現象に従って、機能の推測を行った。まず、NT701, NT709, NT710 は変異の導入された位置が細胞膜貫通領域である。この領域は細胞膜外のシグナルを正しく細胞内に伝える足場となると考えられており、変異によりリンゴ酸存在下での正しいシグナル伝

達が起こらなくなったと考えられる。逆にリンゴ酸非存在下では、センサー蛋白質 YufL の本来の機能である、調節蛋白質の脱リン酸化が起こっており、制御遺伝子の発現誘導は止められている。NT712 と NT716 は表現型から、センサー蛋白質が完全に機能していないと考えられる。特に NT712 は PAS domain の変異である。この領域で大腸菌の ArcB はホモダイマーを形成することが報告されている (Malpica *et al.*, 2004)。この領域の変異により 2 量体が形成されなくなり、センサー蛋白質が全く機能しなくなったと考えられる。一方、NT716 の変異は自己リン酸化するヒスチジン残基に近い。ヒスチジン残基の変異は調節蛋白質の脱リン酸化活性を失うことが大腸菌の EnvZ で報告されている (Kanamaru *et al.*, 1990)。これと同様の現象が起きたのかもしれない。NT713, NT714, NT715 の変異部位は大腸菌のセンサー蛋白質 EnvZ の、細胞膜貫通領域からヒスチジン残基までのリンカー領域にあたる。この領域で EnvZ 蛋白質は形成した 2 量体の構造を変化させ、自己リン酸化、脱リン酸化の活性調節を行うことが報告されている (Cai *et al.*, 2003)。NT713 は、ほぼ正しい転写誘導を示すが、NT714 と NT715 はリンゴ酸存在下でも制御遺伝子は誘導されていない。つまりこれは、活性調節のうちの自己リン酸化への変換が起こらない変異であると考えられる。NT718 の変異が導入された領域は G2-box と呼ばれここに変異が入ると ATP との親和性が低くなり、自己リン酸化できない変異と、調節蛋白質に対する脱リン酸化が起こらなくなる変異が報告されている (Zhu *et al.*, 2002)。この株ではリンゴ酸存在下でも制御遺伝子の転写誘導が起こらないことから、変異によりセンサー蛋白質と ATP との親和性が低くなり、自己リン酸化が起こらなくなったと考えられる。NT711 と NT717 ではリンゴ酸添加によりセンサー蛋白質が不活性化されている。この表現型については過去の報告と比較しての解釈ができなかったために、推測上の解釈を示す。これらのアミノ酸は、センサー蛋白質がリンゴ酸を認識して起こる立体構造の変化、特に調節蛋白質へのリン酸化、脱リン酸化活性の変換のスイッチの役割を果たすのかもしれない。アミノ酸に変異が導入されることにより、スイッチが ON の状態となり、リンゴ酸を認識して起こる立体構造の変化が、スイッチの OFF として情報が伝達されたのかもしれない。

今後の解析

先に示したように、センサー蛋白質の様々なアミノ酸の変異により、リンゴ酸存在下でも制御遺伝子の発現誘導が起こらなくなる。*S. enterica* の PhoQ は細胞膜外領域の 1 アミノ酸変異が自己リン酸化活性、調節蛋白質へのリン酸化リレー活性および調節蛋白質に対する脱リン酸化活性に影響することが報告されており (Sanowar *et al.*, 2003)、これは蛋白質の各々の活性に関わる領域だけを断片化

して解析を行っても、変異による活性の変化が観察されない可能性を示唆している。そこでセンサー蛋白質全長を用いた解析が必要とされる。Castelli ら(2000)がセンサー蛋白質全長を過剰発現させた株の細胞膜画分を用いた解析で、自己リン酸化、調節蛋白質へのリン酸リレー、調節蛋白質からの脱リン酸化が観察できることを報告している。この方法を用いて、本研究で得られた変異から各領域がセンサー蛋白質のどの活性を制御しているのかが明らかになれば、シグナル伝達の全容が明らかになると考えている。

参考文献

- Aiba H., Nakasai F., Mizushima S., Mizuno T. (1989)
Phosphorylation of a bacterial activator protein, OmpR, by a protein kinase, EnvZ, results in stimulation of its DNA-binding ability.
J Biochem (Tokyo). 106:5-7.
- Aiba H., Nakasai F., Mizushima S., Mizuno T. (1989)
Evidence for the physiological importance of the phosphotransfer between the two regulatory components, EnvZ and OmpR, in osmoregulation in *Escherichia coli*.
J Biol Chem. 264:14090-4.
- Angnostopoulos C. and Spizizen J. (1961)
Requirement of transformation in *Bacillus subtilis*.
J Bacteriol. 81:741-6
- Asai K., Baik S.H., Kasahara Y., Moriya S., Ogasawara N. (2000)
Regulation of the transport system for C4-dicarboxylic acids in *Bacillus subtilis*.
Microbiology. 146:263-71.
- Arabidopsis Genome Initiative. (2000)
Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*.
Nature. 408:796-815.
- Beier D, Deppisch H, Gross R. (1996)
Conserved sequence motifs in the unorthodox BvgS two-component sensor protein of *Bordetella pertussis*.
Mol Gen Genet. 252:169-76.
- Burbulys D, Trach KA, Hoch JA. (1991)
Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorylation.
Cell. 64:545-52.
- Castelli M.E., Garcia Vescovi E., Soncini F.C. (2000)
The phosphatase activity is the target for Mg²⁺ regulation of the sensor protein PhoQ in

Salmonella.

J Biol Chem. 275:22948-54.

Chang C., Kwok S.F., Bleecker A.B., Meyerowitz E.M. (1993)

Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators.

Science. 262:539-44.

Chang CH, Zhu J, Winans SC. (1996)

Pleiotropic phenotypes caused by genetic ablation of the receiver module of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein.

J Bacteriol. 178:4710-6.

Clarke DJ, Joyce SA, Toutain CM, Jacq A, Holland IB. (2002)

Genetic analysis of the RcsC sensor kinase from *Escherichia coli* K-12.

J Bacteriol. 184:1204-8.

Fabret C., Feher V.A., Hoch J.A. (1999)

Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world.

J Bacteriol. 181:1975-83.

Fortnagel P., Freese E. (1968)

Inhibition of aconitase by chelation of transition metals causing inhibition of sporulation in *Bacillus subtilis*.

J Biol Chem. 243:5289-95.

Fournier R.E., Pardee A.B. (1974)

Evidence for inducible, L-malate binding proteins in the membrane of *Bacillus subtilis*. Identification of presumptive components of the C₄-dicarboxylate transport systems.

J Biol Chem. 249:5948-54.

Georgellis D., Lynch A.S., Lin E.C. (1997)

In vitro phosphorylation study of the arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*.

J Bacteriol. 179:5429-35.

Ghei O.K., Kay W.W. (1973)

Properties of an inducible C₄-dicarboxylic acid transport system in *Bacillus subtilis*.

J Bacteriol. 114:65-79.

Hagiwara D, Sugiura M, Oshima T, Mori H, Aiba H, Yamashino T, Mizuno T. (2003)

Genome-wide analyses revealing a signaling network of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay system in *Escherichia coli*.

J Bacteriol. 185:5735-46.

Heath A, DiRita VJ, Barg NL, Engleberg NC. (1999)

A two-component regulatory system, CsrR-CsrS, represses expression of three *Streptococcus pyogenes* virulence factors, hyaluronic acid capsule, streptolysin S, and pyrogenic exotoxin B.

Infect Immun. 67:5298-305.

Hsing W, Russo FD, Bernd KK, Silhavy TJ. (1998)

Mutations that alter the kinase and phosphatase activities of the two-component sensor EnvZ.

J Bacteriol. 180:4538-46.

Hwang I, Chen HC, Sheen J. (2002)

Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*.

Plant Physiol. 129:500-15.

Igo M.M., and Loosick R. (1986)

Regulation of a promoter that is utilized by minor forms of RNA polymerase holoenzyme in *Bacillus subtilis*.

J Mol Biol. 191:615-24

Ingmer H., Miller C.A., Cohen S.N. (1998)

Destabilized inheritance of pSC101 and other *Escherichia coli* plasmids by DpiA, a novel two-component system regulator.

Mol Microbiol. 29:49-59.

Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Kakimoto T. (2001)

Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis.

Nature. 409:1060-3.

Jin T., Inouye M. (1994)

Transmembrane signaling. Mutational analysis of the cytoplasmic linker region of Taz1-1, a Tar-EnvZ chimeric receptor in Escherichia coli.

J Mol Biol. 244:477-81.

Kanamaru K., Aiba H., Mizuno T. (1990)

Transmembrane signal transduction and osmoregulation in Escherichia coli: I. Analysis by site-directed mutagenesis of the amino acid residues involved in phosphotransfer between the two regulatory components, EnvZ and OmpR.

J Biochem (Tokyo). 108:483-7.

Kawai S., Suzuki H., Yamamoto K., Kumagai H. (1997)

Characterization of the L-malate permease gene (maeP) of Streptococcus bovis ATCC 15352.

J Bacteriol. 179:4056-60

Kaspar S, Perozzo R, Reinelt S, Meyer M, Pfister K, Scapozza L, Bott M. (1999)

The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor.

Mol Microbiol. 33:858-72.

Kim S.B., Shin B.S., Choi S.K., Kim C.K., Park S.H. (2001)

Involvement of acetyl phosphate in the in vivo activation of the response regulator ComA in Bacillus subtilis.

FEMS Microbiol Lett. 195:179-83.

Kim S.K, Wilmes-Riesenberg M.R., Wanner B.L. (1996)

Involvement of the sensor kinase EnvZ in the in vivo activation of the response-regulator PhoB by acetyl phosphate.

Mol Microbiol. 22:135-47.

Klee H.J., White F.F., Iyer V.N., Gordon M.P., Nester E.W. (1983)
Mutational analysis of the virulence region of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid.
J Bacteriol. 153:878-83.

Kobayashi K, Ogura M, Yamaguchi H, Yoshida K, Ogasawara N, Tanaka T, Fujita Y.
(2001)
Comprehensive DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* two-component regulatory systems.
J Bacteriol. 183:7365-70.

Krom B.P., Aardema R., Lolkema J.S. (2001)
Bacillus subtilis YxkJ is a secondary transporter of the 2-hydroxycarboxylate transporter family that transports L-malate and citrate.
J Bacteriol. 183:5862-9.

Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M.G., Bessieres P., Bolotin A., Borchert S., Borriss R., Boursier L., Brans A., Braun M., Brignell S.C., Bron S., Brouillet S., Bruschi C.V., Caldwell B., Capuano V., Carter N.M., Choi S.K., Codani J.J., Connerton I.F., Danchin A., et al.(1997)
The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*.
Nature. 390:249-56.

Marmur J, Doty P. (1961)
Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids.
J Mol Biol. 3:585-94.

Matsubara M, Kitaoka SI, Takeda SI, Mizuno T. (2000)
Tuning of the porin expression under anaerobic growth conditions by his-to-Asp cross-phosphorelay through both the EnvZ-osmosensor and ArcB-anaerosensor in *Escherichia coli*.
Genes Cells. 5:555-69.

Miller SI, Kukral AM, Mekalanos JJ. (1989)
A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence.
Proc Natl Acad Sci U S A. 86:5054-8.

Mizuno T. (1997)

Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*.

DNA Res. 4:161-8.

Mizuno T., Wurtzel E.T., Inouye M. (1982)

Cloning of the regulatory genes (*ompR* and *envZ*) for the matrix proteins of the *Escherichia coli* outer membrane.

J Bacteriol. 150:1462-6

Morimoto T, Loh PC, Hirai T, Asai K, Kobayashi K, Moriya S, Ogasawara N. (2002)

Six GTP-binding proteins of the Era/Obg family are essential for cell growth in *Bacillus subtilis*.

Microbiology. 148:3539-52.

Moriya S, Imai Y, Hassan AK, Ogasawara N. (1999)

Regulation of initiation of *Bacillus subtilis* chromosome replication.

Plasmid. 41:17-29.

Nixon B.T., Ronson C.W., Ausubel F.M. (1986)

Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntxB* and *ntxC*.

Proc Natl Acad Sci U S A. 83:7850-4.

Ohlsen KL, Grimsley JK, Hoch JA. (1994)

Deactivation of the sporulation transcription factor *Spo0A* by the *Spo0E* protein phosphatase.

Proc Natl Acad Sci U S A. 91:1756-60.

Ogura M, Yamaguchi H, Yoshida Ki, Fujita Y, Tanaka T. (2001)

DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* *DegU*, *ComA* and *PhoP* regulons: an approach to comprehensive analysis of *B.subtilis* two-component regulatory systems.

Nucleic Acids Res. 29:3804-13.

Ogura M, Tanaka T. (2002)

Recent progress in *Bacillus subtilis* two-component regulation.
Front Biosci. 7:1815-24.

Okker R.J., Spaank H., Hille J., van Brussel T.A., Lugtenberg B., Schilperoort R.A. (1984)
Plant-inducible virulence promoter of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid.
Nature. 312:564-6.

Ota I.M., Varshavsky A. (1993)
A yeast protein similar to bacterial two-component regulators.
Science. 262:566-9.

Perego M. (1997)
A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay.
Proc Natl Acad Sci U S A. 94:8612-7.

Perez-Casal J, Caparon MG, Scott JR. (1991)
Mry, a trans-acting positive regulator of the M protein gene of *Streptococcus pyogenes* with similarity to the receptor proteins of two-component regulatory systems.
J Bacteriol. 173:2617-24.

Piazza F, Tortosa P, Dubnau D. (1999)
Mutational analysis and membrane topology of ComP, a quorum-sensing histidine kinase of *Bacillus subtilis* controlling competence development.
J Bacteriol. 181:4540-8.

Posas F, Saito H. (1998)
Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator.
EMBO J. 17:1385-94.

Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H. (1996)
Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor.
Cell. 86:865-75.

- Powell G.K., Hommes N.G., Kuo J., Castle L.A., Morris R.O. (1988)
Inducible expression of cytokinin biosynthesis in *Agrobacterium tumefaciens* by plant phenolics.
Mol Plant Microbe Interact. 1:235-42.
- Predich M, Nair G, Smith I. (1992)
Bacillus subtilis early sporulation genes *kinA*, *spo0F*, and *spo0A* are transcribed by the RNA polymerase containing sigma H.
J Bacteriol. 174:2771-8.
- Raivio TL, Silhavy TJ. (1997)
Transduction of envelope stress in *Escherichia coli* by the Cpx two-component system.
J Bacteriol. 179:7724-33.
- Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T. (1989)
Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Press. Vol.1, 1.21-1.39(a), 1.40-1.41(b), 7.31-7.52(c)
- Sanowar S, Martel A, Moual HL. (2003)
Mutational analysis of the residue at position 48 in the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium PhoQ sensor kinase.
J Bacteriol. 185:1935-41.
- Stachel S.E., Zambryski P.C. (1986)
virA and *virG* control the plant-induced activation of the TDNA transfer process of *A. tumefaciens*.
Cell. 46:325-33.
- Stibitz S., Aaronson W., Monack D., Falkow S. (1989)
Phase variation in *Bordetella pertussis* by frameshift mutation in a gene for a novel two-component system.
Nature. 338:266-9.
- Utsumi R, Katayama S, Ikeda M, Igaki S, Nakagawa H, Miwa A, Taniguchi M, Noda M. (1992)

Cloning and sequence analysis of the *evgAS* genes involved in signal transduction of *Escherichia coli* K-12.

Nucleic Acids Symp Ser. 27:149-50.

Wei Y., Guffanti A.A., Ito M., Krulwich T.A. (2000)

Bacillus subtilis YqkI is a novel malic/Na⁺-lactate antiporter that enhances growth on malate at low protonmotive force.

J Biol Chem. 275:30287-92.

Weber A., Menzlaff E., Arbinger B., Gutensohn M., Eckerskorn C., Flugge U.I. (1995)

The 2-oxoglutarate/malate translocator of chloroplast envelope membranes: molecular cloning of a transporter containing a 12-helix motif and expression of the functional protein in yeast cells.

Biochemistry. 34:2621-7.

Willecke K., Lange R. (1974)

C4-dicarboxylate transport in *Bacillus subtilis* studied with 3-fluoro-L-erythro-malate as a substrate.

J Bacteriol. 117:373-8.

Yamamoto K., Hirao K., Oshima T., Aiba H., Utsumi R., Ishihama A. (2005)

Functional Characterization in Vitro of All Two-component Signal Transduction Systems from *Escherichia coli*.

J Biol Chem. 280:1448-56.

Yamamoto H., Murata M., Sekiguchi J. (2000)

The CitST two-component system regulates the expression of the Mg-citrate transporter in *Bacillus subtilis*.

Mol Microbiol. 37:898-912.

Youngman P., Perkins J.B., Sandman K. (1985)

Use of Tn917-mediated transcriptional gene fusion to *lacZ* and *cat-86* for the identification and study of regulated genes in the *Bacillus subtilis* chromosome. In *Molecular Biology of Microbial Differentiation*, Hoch J.A. and Setlow P., eds. (American Society for Microbiology Washington D.C., pp.47-54)

Yuan G, Wong SL. (1995)

Regulation of groE expression in *Bacillus subtilis*: the involvement of the sigma A-like promoter and the roles of the inverted repeat sequence (CIRCE).

J Bacteriol. 177:5427-33.

Taylor B.L., Zhulin I.B. (1999)

PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light.

Microbiol Mol Biol Rev. 63:479-506.

Zientz E., Bongaerts J., Uden G. (1998)

Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (dcuSR genes) two-component regulatory system.

J Bacteriol. 180:5421-5.

謝辞

本研究を行うにあたり、助言と丁寧にご指導くださった小笠原直毅教授に心より感謝申し上げます。

守家成紀博士、小林和夫博士、大島拓博士、石川周博士、茨城大学笠原康裕助教授、埼玉大学朝井計助教授には有益な御助言、御助力を頂き深く感謝いたします。実験でお世話になった、門屋亨介さん、吉村美香さん、川合良和さん、宮崎大学小椋義俊さん、宮崎大学森本拓也さんに感謝いたします。立体構造を予測していただいた、細胞構造学講座の福原直志さんに感謝します。日々楽しく充実した研究をすることができたのは細胞遺伝学講座の先輩、卒業生、ならびに在校生のおかげです。ありがとうございました。

またこれまで支援していただいた両親と兄弟に心から感謝いたします。

平成 17 年 1 月 31 日 田中耕生