

8 章 総合考察

生物がいかに塩ストレスを感知し適応するのかというテーマで、細菌のみならず酵母、高等植物などで古くから広汎な研究がなされてきた。生命科学における研究分野はポストゲノム時代に突入し、DNA マイクロアレイを利用した体系的、網羅的な遺伝子発現研究や二次元電気泳動や質量分析計を利用したプロテオーム研究、さらにはバイオインフォマティクスの進展に至るまで、分子レベルで解析可能な技術開発が活発に行なわれている。しかし、複雑な塩ストレス応答機構の大部分は明らかになっていない。現段階ではゲノム情報の注釈が充分なされていなく、発現量に変動が見られた遺伝子やタンパク質の大部分が hypothetical protein であることが挙げられる。そのため、これらの中に塩ストレス応答において重要な役割を担うタンパク質が存在している可能性も考えられる。

そこで、本研究では、嫌気塩ストレス条件で誘導が見出された *R. sphaeroides* の機能未知タンパク質 SspA の生体内機能を明らかにすることを目的とした。これにより、細菌の塩ストレス応答機構に関する新たな知見が得られるのではないかと考えた。

SspA はアミノ酸配列や遺伝子配列に高い相同性を示すものがなく、配列の中に特徴的な機能ドメインやモチーフを持っていない。そのため、機能推定の一つ的手段として、はじめにポリクローナル抗体の作製を行なった。大腸菌を宿主にして、抗原となる組み換えタンパク質を作製することにより、抗原性の高い抗体を取得することに成功した。

作製したポリクローナル抗体を用いて SspA の誘導条件、および局在情報をウェスタンや電子顕微鏡により解析した。興味深いことに、ウェスタンによる誘導条件解析の結果、SspA は NaCl、KCl というイオン性の塩ストレス条件下で特異的に誘導合成されることが明らかになった。細菌には塩ストレスに適応するために誘導合成されるいくつかのストレスタンパク質の存在が示唆されている (e.g. Fulda *et al.*, 1999; Hagemann *et al.*, 1991; Webb and Sherman, 1994)。これらのタンパク質をいくつかのストレスに対して誘導される general stress protein と、決まったストレスに対して特異的に誘導される special stress protein の 2 種類に大別すると (Hagemann *et al.*, 1991)、SspA は塩ストレス条件下で特異的に誘導される special stress protein である可能性が示唆される。

一方、局在解析に関しては、ショ糖密度勾配法とウェスタンによる解析、および免疫電顕による解析により SspA は外膜に局在していることが明らかになった。つまり、SspA は塩ストレスを直接的に感受する部位に局在して、何らかの働きを担っていることが考えられる。塩ストレスを含めた浸透圧上昇に伴って誘導される膜タンパク質としては、K⁺取り込みに関わる KdpABCD や、適合溶質輸送に関与する ProP、ProU などの内膜タンパク質、外膜タンパク質である OmpC、OmpF が代表的なものとして挙げられる

(Csonka and Epstein, 1996)。しかし、これらは浸透圧上昇に応じて発現されるものの、すべて膜貫通部位や基質認識部位を有していたり、そのうち一部はオペロン形成して機能していることが知られている。OmpC、OmpFに限れば、これらは塩ストレス特異的に合成されるタンパク質ではないことが報告されている (Sleator and Hill, 2001)。SspA は特定の膜貫通ドメインがなく、またオペロンを形成している可能性も極めて低い。そのため SspA はこれまでに報告されたことのない機能を有しているタンパク質である可能性が考えられる。

ゲノム情報の注釈が進んでいる *E. coli* K-12 株のゲノム配列には、他の生物との相同性から外膜に局在すると類推される遺伝子は 62 種類存在し、そのうち 39 種が膜結合・貫通タンパク質であることが予測されている。上記の OmpC、OmpF やリン酸チャンネル形成タンパク質である PhoE、マルトース/マルトデキストリンチャンネル形成タンパク質 LamB などを除いては、機能が分かっていないものが大多数である。同様に、*R. sphaeroides* においても機能が類推できるものは非常に少ない。さらに、配列の相同性から機能の類推できたとしても、実際に発現して生体内で機能しているものがどのくらいあるのかは未だに解析が進んでいない。これは外膜タンパク質を可溶化するのが難しく、分画も含め SDS-PAGE 上でスポットとして検出するのが難しいという点が原因として挙げられる。現在これらを解決するべく、可溶化のための界面活性剤の組成の検討 (Molloy *et al.*, 2000; Nouwens *et al.*, 2002) がプロテオミクス解析の発展に伴って進みつつあり、近い将来外膜タンパク質に関する新たな知見が得られることが期待される。

これらの外膜タンパク質は細胞質で生合成されるのだが、それらの多くは Sec システムを介して内膜を通過する時に必要なシグナル配列を N 末端に有している (Manting *et al.*, 2000)。このシグナル配列は内膜を通過した後に切断され、成熟タンパク質と同じアミノ酸配列の形でペリプラズム空間に放出される。外膜に挿入される前のタンパク質と LPS が作用して、最終的なフォールディングを行なうという知見が *in vitro* でのみ確認されている (Cock and Tommassen, 1996)。しかし、内膜に見られるような外膜タンパク質移行システムは見つかっておらず、この後の外膜への移行、最終的な生合成に関しては未だに不明な点が多い。SspA にも 24 アミノ酸の内膜透過シグナルペプチドの存在が示唆されているが、生合成の過程でどのように輸送されて成熟タンパク質となるかというのも非常に興味深い。

本研究では SspA の詳細な生体内機能を解析するべく、*sspA* 遺伝子破壊株の作製を試みた。接合伝達法により相同組み換えを起こすことにより、目的であった破壊株 SSPA1 の取得に成功した。そこで、作製した破壊株がどのような表現型を示すかを観察するべく、大きく分けて 3 種類の観点から野生株と比較解析した。第一は生育の変化である。嫌気光合成条件においてはストレスの有無に関係なく優位な生育の変化は見られなかった。一方、好気暗条件においてはいくつかの顕著な変化が観察された。最も目立ったのは、破壊株で見られた生育の抑制であった。破壊株はストレスのない

条件下でも野生株と同程度まで生育することができなかつた。加えて、塩ストレス条件下では全く生育することができなかつた。この結果から、SspA は好気条件で、より重要な役割を果たしていることが考えられた。

第二に顕微鏡とフローサイトメータ (FCM) により菌体形状の変化を観察した。その結果、最も大きな変化であったのが、好気暗条件で見られたSSPA1の菌体凝集である。光学顕微鏡で観察したところ、NaCl ストレス条件下で大きな凝集体が観察された。同様の凝集体は KCl による塩ストレスでも観察された。この凝集体は培養開始から数時間という培養の初期段階で形成されることから、*sspA* 遺伝子の欠損が直ちに菌体に重大な影響を与え、その結果生育抑制を引き起こしているのではないかと考えられる。この結果は SspA の発現が塩ストレス誘導後 6 h で起こるというウェスタン知見と一致しており、塩ストレスを誘導直後から SspA が生体内で機能していることを示唆している。さらに、破壊株は FCM による解析により内部構造が変化していることが観察され、電子顕微鏡による観察において内部構造に何らかの変化が起こっていることが示唆された。*R. sphaeroides* は、酸素の存在により光捕集系複合体などの光合成因子の発現を抑制することが知られている。これらの因子はほとんどが内膜に局在し、酸素がない状態では光合成因子の発現誘導が起こり、内膜構造が厚くなる (Chory *et al.*, 1984; Zeilstra-Ryalls *et al.*, 1998)。そのため、好気暗条件では SspA が局在する外膜のみならず膜構造全体が弱くなっている可能性も想定され、SspA の欠損によって大きく生体構造が変化している可能性も考えられる。二次元電気泳動を用いることにより、これらの差異をタンパク質レベルで明らかにできないかと考えて、好気塩ストレス条件の外膜、および水溶性タンパク質を野生株と破壊株で比較解析した。その結果、好気塩ストレス条件における破壊株では糖質代謝や物質輸送に関連するタンパク質の発現量が増加していることが明らかになった。しかし、これらのタンパク質が持っている機能ドメインや酵素活性などを含めると、これらが SspA の代替的な役割を担っているとは考えにくい。そのため、*sspA* 遺伝子の欠損により何らかの細胞内変化が生じたことは見出されたものの、SspA の細胞内機能を特定するのに十分な情報を取得することはできなかつた。二次元電気泳動を用いた手法の欠点として、同手法では検出されないタンパク質の存在が挙げられる。そのため、*sspA* を欠損させてもタンパク質レベルで特徴的な変化が起こらなかつたと断定することはできない。

破壊株が塩ストレスに対して感受性を示したり、塩耐性が大きく低下する遺伝子はいくつか報告がある。このうち、*Synechocystis* の *ggtA* は適合溶質輸送に関与しており (Hagemann *et al.*, 1997)、同じく *Synechocystis* の *ggsS* や *E. coli* の *otsA*, *otsB* は適合溶質そのものの生合成に関与している遺伝子である (Marin *et al.*, 1998; Strøm and Kaasen, 1998)。興味深いものとしては、*R. sphaeroides* と同じくグラム陰性細菌である *Caulobacter crescentus* の *gmhA*, *rfa*, *manA* が挙げられる (Zuleta *et al.*, 2003)。これらの遺伝子はそれぞれ、D-Glycero-D-mannno-heptose 1,7-bisphosphate

phosphatase、Heptosyltransferase、Mannose-6-phosphate isomerase をコードしており、3 遺伝子共に外膜のリポ多糖生合成に関与していると推定されている。そのため、これらの欠損により外膜構造が不安定になり塩耐性が低下すると考察されている。これらの遺伝子と *sspA* の間に相同性はないが、機能は異なっているものの同様に外膜構造の維持に寄与している可能性も考えられる。

本研究では SspA と関連する因子の探索も行なった。第一に免疫沈降法により SspA と直接的に相互作用を持っているタンパク質の探索を試みた。しかし、結合タンパク質に関する情報を得ることはできなかった。第二に、他の菌株で塩ストレスセンサーであると示唆されている Histidine kinase 遺伝子 (Hiks) の配列を元に、相同性から *sspA* の上流因子の探索を試みた。ターゲットとした 4 種の Hiks のうち 2 種については破壊株の取得に成功した。しかし、ウェスタンで解析した結果、これらの遺伝子を破壊しても SspA の発現量に変化は見られなかったことから、共に *sspA* の上流因子である可能性は低いことが考察された。そのため、*sspA* は今回探索したシグナル伝達経路以外の経路で誘導されることが示唆された。第三に、塩ストレス応答における重要な役割が報告されている適合溶質トレハロースとの関連性を探索した。トレハロース合成遺伝子を破壊することにより、トレハロースが細胞内に蓄積されていない状態で SspA の発現量に変化が生じているかどうかをウェスタンにより解析した。その結果、トレハロース蓄積の有無に関わらず SspA の発現量に変化は見られないことが明らかになった。一方、*sspA* 遺伝子破壊株におけるトレハロース蓄積量も測定した。この際にも、野生株と比べて蓄積トレハロース量に変化が見られなかった。以上よりトレハロースと SspA の間に相関関係は低いことが示唆された。

最後に DNA マイクロアレイを用いて、塩ストレスに対する遺伝子発現レベルの変化を網羅的に捉えようと考えた。ここではゲノムプロジェクトが完了して、DNA マイクロアレイの解析も行なわれている *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 株を用いて塩ストレス応答に対する発現解析を行なった。これにより、*sspA* が全遺伝子の中で、どの段階でどの程度発現しているのかを決定しようとした。本実験の最も重要なポイントとして注意したのが、ストレス強度と誘導時間である。ストレス強度は 0.25% (Mild) と 1.5% (Strong) NaCl ストレスという異なる濃度を採用することにより両者を比較解析した。一方、誘導時間に関しては NaCl ストレス誘導後 7 min と 45 min を採用した。これは 7 min において NaCl を感知する遺伝子群を、45 min においてストレスに適応するための遺伝子群を捉えようと考えたからである。今回はまず嫌気光合成条件において実験を行なった。

その結果、Strong/Mild NaCl ストレス添加後 45 min において、適合溶質トランスポーター遺伝子やトレハロース合成遺伝子と共に、*sspA* の顕著な発現上昇が観察された。また、全遺伝子の中でも相対的に *sspA* の発現量比は高いことが明らかになった。本実験で *sspA* と関連する遺伝子や塩ストレスのセンサー遺伝子を捉えることはできな

ったものの、*sspA* が耐塩能を獲得する段階で発現するという情報を得ることに成功した。本実験を利用した情報から、*R. sphaeroides* の塩ストレス応答遺伝子を Fig. 8-1 として示す。

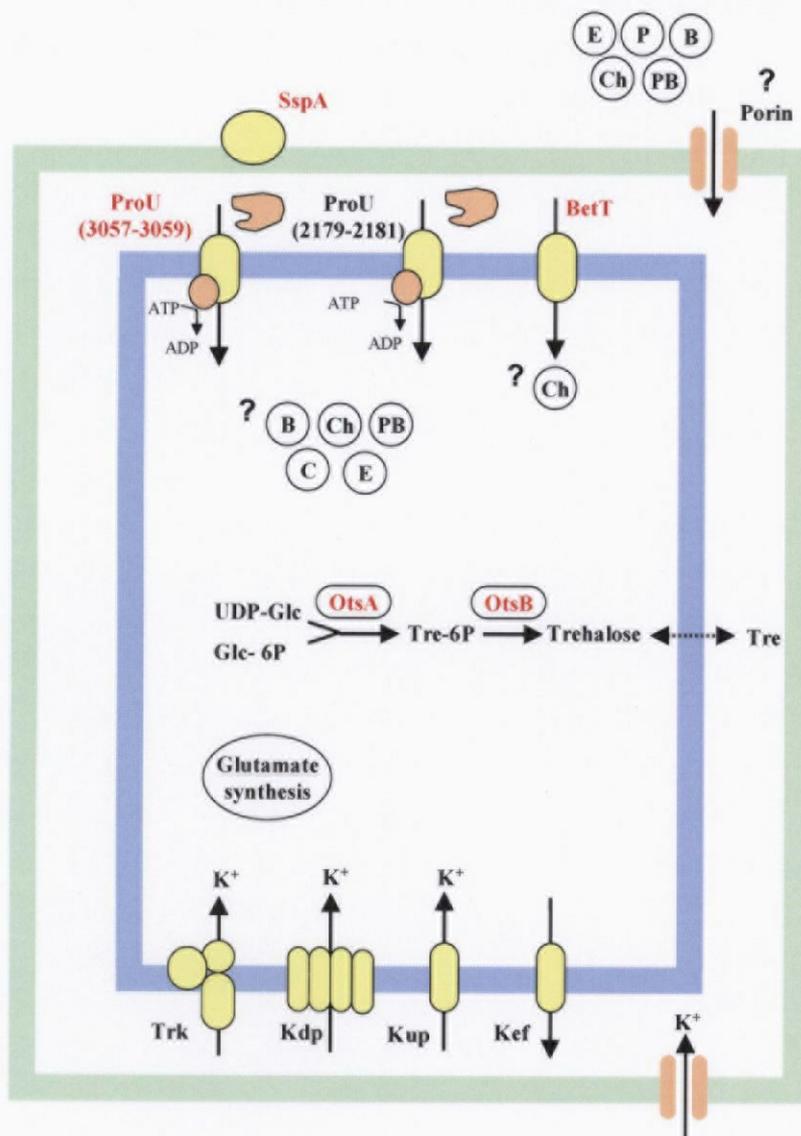


Fig. 8-1 Osmostress response systems of *Rhodobacter sphaeroides*. (B; glycine betaine, C; carnitine, Ch; choline, E; ectoine, P; proline, PB; proline betaine, Glc; Glucose) Genes written in red character is upregulated by Gene chip analysis.

本研究により SspA の生体内での役割については明らかにすることができなかったものの、機能未知タンパク質 SspA が塩ストレス条件下で特異的に誘導され、しかも好気塩ストレス下では本菌の耐塩性獲得メカニズムを解析する上で極めて重要かつユニークな足がかりとなったと考えられる。塩ストレス条件下で遺伝子・タンパク質レベルで高発現する外膜タンパク質に関する報告はこれまでになく、本研究が細菌の塩ストレス応答機構を解明する一端を担うことが期待される。

参考文献

- Barron, A. J., and Villarejo, M. (1987) Purification and characterization of a glycine betaine binding protein from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**: 11841-11846.
- Baumgardner, D., Deal, C., and Kaplan, S. (1980) Protein composition of *Rhodospseudomonas sphaeroides* outer membrane. *J. Bacteriol.* **143**: 265-273.
- Belitsky, B. R., Brill, J., Bremer, E., and Sonenshein, A. L. (2001) Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**: 4389-4392.
- Benoit, S., Abaibou, H., and Mandrand-Berthelot, M. A. (1998) Topological analysis of the aerobic membrane bound formate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 6625-6634.
- Berks, B. C., Sargent, F., and Palmer, T. (2000) The Tat protein export pathway. *Mol. Microbiol.* **35**: 260-274.
- Bhagwat, A. A., and Apte, S. K. (1989) Comparative analysis of proteins induced by heat shock, salinity, and osmotic stress in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain L-31. *J. Bacteriol.* **171**: 1393-1399.
- Boch, J., Kempf, B., and Bremer, E. (1994) Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J. Bacteriol.* **176**: 5364-5371.
- Braatsch, S., Moskvina, O. V., Klug, G., and Gomelsky, M. (2004) Responses of the *Rhodobacter sphaeroides* transcriptome to blue light under semiaerobic conditions. *J. Bacteriol.* **186**: 7726-7735.
- Cairney, J., Booth, I. R., and Higgins, C. F. (1985) Osmoregulation of gene expression in *Salmonella typhimurium*: *proU* encodes an osmotically induced betaine transport system. *J. Bacteriol.* **163**: 1224-1232.
- Cànovas, D., Vargas, C., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L. N., Rhodes, D., Ventosa, A., and Nieto, J. J. (1997) Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. *J. Biol. Chem.* **272**: 25794-25801.
- Chory, J., Donohue, T. J., Varga, A. R., Staehelin, L. A., and Kaplan, S. (1984) Induction of the Photosynthetic membranes of *Rhodospseudomonas sphaeroides*: biochemical and morphological studies. *J. Bacteriol.* **159**: 540-554.
- Cock, H., and Tommassen, J. (1996) Lipopolysaccharides and divalent cations are involved in the formation of an assembly-competent intermediate of

- outer-membrane protein PhoE of *E.coli*. *EMBO J.* **15**: 5567-5573.
- Cohen-Bazire, G., Siström, W. R., and Stanier, R. Y. (1957) Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Cell Physiol.* **49**: 25-68.
- Conter, A., Menchon, C., and Gutierrez, C. (1997) Role of DNA supercoiling and Rpos sigma factor in the osmotic and growth phase-dependent induction of the gene *osmE* of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* **273**: 75-83.
- Csonka, L. N., and Epstein, W. (1996) Osmoregulation. *Cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, DC. pp. 1210-1223.
- Davalos-Garcia, M., Conter, A., Toesca, I., Gutierrez, C., and Cam, K. (2001) Regulation of *osmC* gene expression by the two-component system rcsB-rcsC in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: 5870-5876.
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., and Timmis, K. N. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6568-6572.
- Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D., and Goloubinoff, P. (2001) Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses. *J. Biol. Chem.* **276**: 39586-39591.
- Duchè, O., Tremoulet, F, Glaser, P, and Labadie, J. (2002) Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1491-1498.
- Elsen, S., Dischert, W., Colbeau, A., and Bauer, C. E. (2000) Expression of uptake hydrogenase and molybdenum nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is coregulated by the RegB-RegA two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* **182**: 2831-2837.
- Ferjani, A., Mustardy, L., Sulpice, R., Marin, K., Suzuki, I., Hagemann, M., and Murata, N. (2003) Glucosylglycerol, a compatible solute, sustains cell division under salt stress. *Plant Physiol.* **131**: 1628-1637.
- Fraker, P.J., and Kaplan, S. (1971) Isolation and fractionation of the photosynthetic membranous organelles from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **108**: 465-473.
- Fulda, S., Huang, F, Nilsson, F, Hagemann, M, and Norling, B. (2000) Proteomics of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 identification of periplasmic proteins in cells grown at low and high salt concentrations. *Eur. J. Biochem.* **267**: 5900-5907.
- Fulda, S., Huckauf, J., Schoor, A., and Hagemann, M. (1999) Analysis of stress response in the cyanobacterial strains *Synechococcus* sp. PCC 7418, *Synechocystis* sp. PCC 6803, and *Synechococcus* sp. PCC 7418: osmolyte

- accumulation and stress protein synthesis. *J. Plant Physiol.* **154**: 240-249.
- Futcher, B., Latter, G. I., Monardo, P., McLaughlin, C. S., and Garrels, J. I. (1999) A sampling of the Yeast proteome. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 7357-7368.
- Galauert, A. M., and Thornley, M. J. (1969) The topography of the bacterial cell wall. *Annu. Rev. Microbiol.* **23**: 159-198.
- Galinski, E. A., and Truper H. G. (1994) Microbial behavior in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**: 95-108.
- Galinski, E.A., Pfeiffer, H. P., and Truper, H. G. (1985)
1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid, a novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur. J. Biochem.* **149**: 135-139.
- Gething, M. J. (1997) Molecular chaperones: clasping the prize. *Curr Biol.* **6**: 1753-1756.
- Garcia-Horsman, J. A., Berry, E., Shapleigh, J. P., Alben, J. O., and Gennis, R. B. (1994) A novel cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* that lacks CuA. *Biochemistry* **33**: 3113-3119.
- Gjaever, H. M., Styrvold, O. B., Kaasen, I., and Strøm, A. R. (1988) Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 2841-2849.
- Gowrishankar, J. (1985) Identification of osmoreponsive genes in *Escherichia coli*: evidence for participation of potassium and proline transport systems in osmoregulation. *J. Bacteriol.* **164**: 434-445.
- Haardt, M.B., Kempf, B., Faaz, E., and Bremer, E. (1995) The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transport system of ProU of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 783-786.
- Hagemann, M., Fulda, S., and Schubert, H. (1994) DNA, RNA, and protein- synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 adapted to different salt concentrations. *Curr. Microbiol.* **28**: 201-207.
- Hagemann, M., Richter, S., and Mikkat, S. (1997a) The *ggtA* gene encodes a subunit of the transport system for the osmoprotective compound glucosylglycerol in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **179**: 714-720.
- Hagemann, M., Schoor, A., Jeanjean, R., Zuther, E., and Joset, F. (1997b) The *stpA* Gene from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 encodes the glucosylglycerol-phosphate phosphatase involved in cyanobacterial osmotic response to salt shock. *J. Bacteriol.* **179**: 1727-1733.
- Hagemann, M., Techel, D., and Rensing, L. (1991) Comparison of salt- and

- heat-induced alterations of protein synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch. Microbiol.* **155**: 588-592.
- Hamblin, M. J., Shaw, J. G., and Kelly, D. J. (1993) Sequence analysis and interposon mutagenesis of a sensor-kinase (DctS) and response-regulator (DctR) controlling synthesis of the high-affinity C4-dicarboxylate transport system in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.* **237**:215-224.
- Hecker, M., Schumann, W., and Volker, U. (1996) Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **19**: 417-428.
- Hengee-Aronis, R. (1996) Back to log phase: sigma s as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**: 887-893.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng S, and Mitaku S. (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics.* **14**: 378-379.
- Hoch, J. A. (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 165-170.
- Huckauf, J., Nomura, C., Forchhammer, K., and Hagemann, M. (2000) Stress responses of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 mutants impaired in genes encoding putative alternative sigma factors. *Microbiology* **146**: 2877-2889.
- Jackson, J. B. (1988) Bacterial photosynthesis. *Bacterial Energy Transduction. Anthony, London.* pp. 317-376.
- Jessee, J. (1986) New subcloning efficiency competent cells: $>1 \times 10^6$ transformants/ μg . *Focus* **8**: 9.
- Kaasen, I., Falkenberg, P., Styrvold, O. B., and Strom, A. R. (1992) Molecular-cloning and physical mapping of the *otsBA* genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*-evidence that transcription is activated by KATF (APPR). *J. Bacteriol.* **174**: 889-898.
- Kanesaki, Y., Suzuki, I, Allakhverdiev, S. I, Mikami, K., and Murata, N. (2002) Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**: 339-348
- Kappes, R. M., Kempf, B, and Bremer, E. (1996) Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**: 5071-5079.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.* **17**: 287-291.

- Kempf, B., and Bremer, E. (1995) OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **270**: 16701-16713.
- Kempf, B., and Bremer, E. (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**: 319-330.
- Koebnik, K. P., Locher, P., and Gelder, P. V. (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* **37**.
- Koretke, K. K., Lupas, A. N., Warren, P. V., Rosenberg, M., and Brown, J. R. (2000) Evolution of two-component signal transduction. *Mol. Biol. Evol.* **17**: 1956-1970.
- Lamark, T., Kassen, I., Eshoo, M. W., Falkenberg, P., McDougall, J., and Strøm, A. R. (1991) DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**: 1049-1064.
- LeGendre, N., and Matsudaira, P. (1988) Direct protein microsequencing from Immobilon-P transfer membrane. *BioTechniques* **6**: 154-159.
- Lin, J., Huang, S., and Zhang, Q. (2002) Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes and Infection* **4**: 325-331.
- Mackenzie, C., Choudhary, M., Larimer, F. W., Predki, P. F., Stilwagen, S., Armitage, J. P., Barber, R. D., Donohue, T. J., Hosler, J. P., Newman, J. E., Shapleigh, J. P., Sockett, R. E., Zeilstra-Ryalls, J., and Kaplan, S. (2001) The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Photosynthesis Res.* **70**: 19-41.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M., and Saito, H. (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**: 242-245.
- Makihara, F., Tsuzuki, M., Sato, K., Abo, M., Masuda, S., Nagashima, K. V. P., and Okubo, A. (2005) Elucidation of trehalose synthesis pathways in salt tolerance mechanism of *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* IL106. *submitted*.
- Manting, E. H., van Der Does, C., Remigy, H., Engel, and Driessen, A. J. (2000) SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *EMBO J.* **19**: 852-861.
- Marin, K., Huckauf J, Fulda S, and Hagemann M (2002) Salt-dependent expression of glucosylglycerol-phosphate synthesis, involved in osmolyte synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **184**: 2870-2877.

- Marin, K., Kanesaki, Y., Los, D. A., Murata, N., Suzuki, I., and Hagemann, M. (2004) Gene expression profiling reflects physiological processes in salt acclimation of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol.* **136**: 3290-3300.
- Marin, K., Suzuki, I., Yamaguchi, K., Ribbeck, K., Yamamoto, H., Kanesaki, Y., Hagemann M., and Murata, N. (2003) Identification of histidine kinases that act as sensors in the perception of salt stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 9061-9066.
- Marin, K., Zuther E, Kerstan T, Kunert A, and Hagemann M. (1998) The *ggpS* gene *Synechocystis* sp. strain PCC6803 encoding glucosyl-glycerol-phosphate synthase is involved in osmolyte synthesis. *J. Bacteriol.* **180**: 4843-4849.
- May, G., Faaz, M., Villarejo, M., and Bremer, E. (1986) Binding protein dependent transport of glycine betaine and its osmotic regulation in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 225-233.
- McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman E. T., and Epstein, W. (1994) Interdependence of K⁺ and glutamate accumulation during osmotic adaption of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**: 1911-1917.
- Measures, J.C. (1975) Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature* **257**: 398-400.
- Mikkat, S., Hagemann M, and Schoor A (1996) Active transport of glucosylglycerol is involved in salt adaption of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 7942. *Microbiology* **142**: 1725-1732.
- Miller, K. J., and Wood, J. M. (1996) Osmoadaption by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 101-136.
- Mizuno, T., and Mizushima, S. (1990) Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of 2 regulatory components the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol. Microbiol.* **4**: 1077-1082.
- Nixon, B. T., Ronson, C. W., and 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. USA.* **83**: 7850-7854.
- Nouwens, A. S., Willcox, M. D., Walsh, B. J., and Cordwell, S. J. (2002) Proteomic comparison of membrane and extracellular proteins from invasive (PAO1) and cytotoxic (6206) strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics* **2**: 1325-1346.
- Obis, D., Guillot, A., Gripon, J. C., Renault, P., Bolotin, A., and Mistou, M. Y. (1999) Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization

- within bacterial ABC transporters. *J. Bacteriol.* **181**: 6238-6246.
- O'Farrel, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.
- Padan, E., Maisler, N., Taglicht, D., Karpel, R., and Schuldiner, S. (1989) Deletion of *ant* in *Escherichia coli* reveals its function in adaptation to high salinity and an alternative Na⁺/H⁺ antiporter system(s). *J. Biol. Chem.* **264**: 20297-20302.
- Pappas, C. T., Sram, J., Moskvina, O. V., Ivanov, P. S., Mackenzie, R. C., Choudhary, M., Land, M. L., Larimer, F. W., Kaplan, S., and Gomelsky, M. (2004) Construction and validation of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 DNA microarray: transcriptome flexibility at diverse growth modes. *J. Bacteriol.* **186**: 4748-4758.
- Penfold, R. J., and Pemberton, J. M. (1996) An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutation in bacteria. *Gene* **118**.
- Peschek, G. A., Obinger, C., Fromwald, S., and Bergman, B. (1994) Correlation between immuno-gold labels and activities of the cytochrome-*c* oxidase (*aa3*-type) in membranes of salt stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* **124**: 431-438.
- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, Stefan., Hoheisel, J. D., Volker, U., and Hecker, M. (2001) Global Analysis of the General Stress Response of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**: 5617-5631.
- Prentki, P., and Krisch, H. (1984) *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303-313.
- Provenzano, D., and Klose, K. E. (2000) Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 10220-10224.
- Pugsley, A. P. (1993) The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 50-108.
- Rüberg, S., Tian, Z., Krol, E., Linke, B., Meyer, F., Wang, Y., Puhler, A., Weidner, S., and Becker, A. (2003) Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J. Bacteriol.* **106**: 255-268.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.*
- Satoh, T., Hoshino, Y., and Kitamura, H. (1976) *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*, a denitrifying strain as a subspecies of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Arch. Microbiol.* **108**: 265-269.

- Sawada, E., Satoh, T, and Kitamura, H. (1978) Purification and properties of a dissimilatory nitrite reductase of a denitrifying phototrophic bacterium. *Plant Cell Physiol.* **19**: 1339-1351.
- Schulz, G. E. (1993) Bacterial porins: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**: 701-707.
- Scolnik, P., A., and Marrs, B, L. (1987) Genetic reserch with photosynthetic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 703-726.
- Sganga, M. W., and Bauer, C. E. (1992) Regulatory factors controlling photosynthetic reaction center and light harvesting gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Cell* **68**: 945-954.
- Shepherd, W. D., Kaplan, S., and Park, J. T. (1981) Penicillin-binding proteins of *Rhodopseudomonas sphaeroides* and their membrane localization. *J. Bacteriol.* **147**: 354-362.
- Shi, H., Lee, B. H., Wu, S. J., and Zhu, J. K. (2003) Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt torelance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* **2002**: 81-85.
- Sistrom, W. R. (1960) A requirement for sodium in the growth of *Rhodoseudomonas sphaeroides*. *J. Gen. Microbiol.* **22**: 778-785.
- Sleator, D. R., Hill, C. (2001) Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 49-71.
- Stancik, L. M., Stancik, D. M., Schmidt, B., Barnhart, D. M., Yoncheva, Y. N., and Slonczewski, J. L. (2002) pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**: 4246-4258.
- Stanley, N. R., Findlay, K., Berks, B. C., and Palmer, T. (2001) *Escherichia coli* strains blocked in Tat-dependent protein export exhibit pleiotropic defects in the cell envelope. *J. Bacteriol.* **183**.
- Steil, L., Hoffmann, T., Budde, I., Volker, U., and Bremer, E. (2003) Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *J. Bacteriol.* **185**: 6358-6370.
- Strøm, A. R., and Kaasen, I. (1993) Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Mol. Microbiol.* **8**: 205-210.
- Stumpe, S., Schlosser, A., Schleyer, M., and Bakker E. P. (1996) K⁺ circulation across the prokaryotic cell membrane: K⁺-uptake systems. *Transport processes in eukaryotic and prokaryotic organisms. Elsevier, Amsterdam.* pp. 473-499.
- Swem, L. R., Elsen, S., Bird, T. H., Swem, D. L., Koch, H. G., Myllykallio, H., Daldal, F., and Bauer, C. E. (2002) The RegB/RegA two component regulatory system

- controls synthesis of photosynthesis and respiratory electron transfer components in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Mol. Biol.* **309**: 121-138.
- Takeda, S., Fujisawa, Y., Matsubara, M., Aiba, H., and Mizuno, T. (2001) A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC --> YojN --> RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. *Mol. Microbiol.* **40**: 440-450.
- Thanassi, D. G., Cheng, L. W., and Nikaido, H. (1997) Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 2512-2518.
- Tsuzuki, M., Xu, X. Y., Sato, K., Abo, M., Arioka, M., Nakajima, H., Kitamoto, K., and Okubo, A. (2005) SspA, an outer membrane protein, is highly induced under salt-stressed conditions and essential for growth under salt-stressed aerobic conditions in *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*: in press.
- Van Neil, C. B. (1944) The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacterial. Rev.* **8**: 1-118.
- Vichivanives, P., Bird, T. H., Bauer, C. E., and Tabita, R. F. (2000) Multiple regulators and their interactions in vivo and in vitro with the *cbb* regulons of *Rhodobacter capsulatus*. *J. Mol. Biol.* **300**: 1079-1099.
- Walderhaug, M. O., Polarek, J. W., Voelkner, P., Daniel, J. M., Hesse, J. E., Altendorf, K., and Epstein, W. (1992) KdpD and KdpE, proteins that control expression of the *kdpABC* operon, are members of the two-component sensor-effector class of regulators. *J. Bacteriol.* **174**: 2152-2159.
- Webb, R., and Sherman, L. A. (1994) The cyanobacterial heat-shock response and the molecular chaperones. *Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer.: 581-611.
- Weber, A., and Jung, K. (2002) Profiling early osmotic stress-dependent gene expression in *Escherichia coli* using DNA microarrays. *J. Bacteriol.* **184**: 5502-5507.
- Whatmore, A. M., and Reed, R. H. (1990a) Detremination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K⁺ in turgor regulation. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2521-2526.
- Whatmore, A. M., Chudek, J. A., and Reed, R. H. (1990b) The effect of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2527-2535.
- Woese, C. R., Stackebrandt, E., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Madigan, M. T., Fowler, C. R., Hahn, C. M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K. H., and Fox, G. E. (1984) The phylogeny of the purple bacteria: the alfa subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* **5**: 315-326.

- Wood, J. M. (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Mol. Biol. Rev.* **63**: 230-262.
- Wösten, M. M. S. M. (1998) Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev.* **22**: 127-150.
- Xu, X., Abo, M., Okubo, A., and Yamazaki, S. (1998) Treharose as osmoprotectant in *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* IL106. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 334-337.
- Xu, X., Abo, M., Okubo, A., and Yamazaki, S. (2001a) Salt stress responsive membrane proteins in a *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* IL106. *J. Biosci. Bioeng.* **91**: 228-230.
- Xu, X., Kadokura, H., Okubo, A., Kitamoto, K., and Yamazaki, S. (2001b) Cloning and sequencing of a gene encoding a novel salt stress-induced membrane protein from *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 442-447.
- Yan, D., Ikeda, T. P., Shauger, A. E., and Kustu, S. (1996) Glutamate is required to maintain the steady-state potassium pool in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6527-6531.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowls, R. D., and Somero, G. N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Zeilstra-Ryalls, J., Gomelsky, M., Eraso, J. M., Yeliseev, A., O'gara, J., and Kaplan, S. (1998) Control of Photosystem Formation in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **180**: 2801-2809.
- Zhou, L., Lei, X. H., Bochner, B. R., and Wanner, B. L. (2003) Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *J. Bacteriol.* **185**: 4956-4972.
- Zuleta, L. F. G., Italiani, V. C. S., and Marques, M. V. (2003) Isolation and characterization of NaCl-sensitive mutants of *Caulobacter crescentus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3029-3035.
- Zuther, E., Schubert, H., and Hagemann, M. (1998) Mutation of a gene encoding a putative glycoprotease leads to reduced salt tolerance, altered pigmentation, and cyanophycin accumulation in the cyanobacterium *Cynechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **180**: 1715-1722.

謝辞

1996年4月、大学4年生で研究室配属されて当時農学部2号館別館4階にあった研究室の門戸を叩いたときが、私と分析化学研究室との初めての出会いでした。大学4年間運動会庭球部で一心不乱ボールを追いかけていた私はお世辞にも研究熱心とは言えず、何一つ研究成果を出すこともなく、当時の山崎素直教授（現長崎大学環境科学部教授）に迷惑ばかりかけて学部を卒業することになりました。私の学部卒業に際して、「大変ユニークで面白い学生だった」と笑顔でお祝いしていただきましたが、そのときは大変申し訳ない気持ちと感謝の気持ちでいっぱいでした。

以後2年間はサントリー株式会社に就職して一心不乱に酒類販売に没頭する日々でした。在職中は営業という職種が肌に合ったせいもあり、一切の気苦労を感じることもありませんでした。そのため、一生営業一筋の人生を全うする予定でした。しかし、人生何が起こるかわからないもので、結婚と同時に家庭の都合で退社して、将来的に学校経営の仕事に携わることになりました。そのため、長い人生の事も考えて、再度分析化学研究室にお世話になることになりました。

2000年3月、大学院修士課程に入学して以来、学部時代の反省から一心不乱に研究に打ち込みました。営業から研究という異なる世界への転身、仕事と研究の両立、博士課程1年目の秋になってのテーマの変更、大久保先生の急な退官など、研究を進めていく上で大変なことも多々ありました。ただ、そのような時にも心の支えとなったのは恩師、友人、家族の励ましの声があったからだと思います。今振り返ると、本当にたくさんの方々を支えられたことに気付かされ、感謝の気持ちでいっぱいです。

山崎素直元教授には公私共に大変お世話になりました。奥様のひろ子様、御長女の佐和子様も交えて何度も御食事に招いていただき、御退官後も電話でたびたび激励の言葉を頂きました。

大久保明前教授に心よりお礼申し上げます。先生は「おまえの次の人生の糧になれば」と、人生勉強になるような術を多々ご指導頂きました。特に最後の2年間は研究、私生活、その他何でも相談に乗って頂き、私の大きな心の支えとなりました。

安補充講師に御礼申し上げます。安保さんとはたびたび夜通し激論になることもありました。研究室運営も含め、「研究室とは何か」を教えて頂いたように思います。今となっては忘れられない思い出です。

佐藤記一助手に御礼申し上げます。記一さんとは2年間すぐそばの席で、些

細なことから気軽に相談に乗って頂きました。特に研究室環境が大変厳しかった博士課程最後の一年間は記一さんのおかげで無事研究室生活を送れた気がします。夏休み期間中に誰もいない実験室で記一さんと栗林くんと 3 人で過ごした時間は寂しくもあり、実験に没頭できた充実した瞬間でもありました。

応用生命工学専攻 微生物学研究室 北本勝ひこ教授に心より御礼申し上げます。いつも私のことを気にかけていただき、気軽に研究ディスカッションに応じて頂きました。

中島春紫助教授（現明治大学農学部助教授）に御礼申し上げます。先生に分子生物学の基礎を教わることにより私の博士課程は始まりました。

有岡学助手に御礼申し上げます。技術も能力も未熟な私が論文の書き方や研究に対する姿勢を学ぶことができたのは先生の御力であると感謝致しております。

また、博士課程最後の年の教授・助教授不在という緊急事態にご配慮を頂いた生物有機化学研究室 長澤寛道教授、永田晋治助手、生物機能開発化学研究室 阿部啓子教授、工学系研究科 応用化学専攻 北森武彦教授に心より御礼申し上げます。永田助手の温かい激励には何度も助けられました。

光合成細菌の遺伝子工学的手法を初歩から御教授いただいた東京都立大学理学研究科生物学専攻 細胞エネルギー研究室 松浦克美教授、永島賢治助手、理化学研究所 フォトダイナミクス研究センター 増田真二研究員に感謝申し上げます。

電子顕微鏡の操作を丁寧に御教授いただいた日本大学医学部 解剖学研究室 今田正人助教授に感謝致します。

DNA マイクロアレイのためのサンプル調製、解析を御教授いただいた University of Wyoming, Department of Molecular Biology の Dr. Mark Gomelsky、Dr. Oleg Moskvina 両氏に感謝致します。

幸運なことに、私は研究室内外で多くの友人・仲間に恵まれました。分析化学研究室の苦しい時期に共に支え合いながら乗り切った同志である藤井紳一郎氏、徳山孝仁氏に心より感謝致します。

私が在学中に同じく一心不乱に研究を行なった外川直之氏、岸本太郎氏、賀麗頻女史、槇原史大氏、西川優美女史、安田奈美穂女史に感謝致します。同じ志と熱い情熱を持って研究に取り組んだ思い出は一生消えることはないでしょう。また、私の研究の御協力をいただいた久米伸子女史、栗林正晋氏、鶴岡絵里女史に感謝致します。私を筆頭に成果は褒められたものではありませんが、皆様のご協力を持って無事卒業することができました。

研究上で大変お世話になった応用生命工学専攻 微生物学研究室の丸山潤一研究員、Praveen Rao Juvvadi 研究員、海野研二氏、石一智氏、岩崎琢磨氏、

正井久美子女史、正路淳也氏、勢ノ康代女史、今井裕氏、中濱智之氏に感謝致します。皆様のお力添えで順調に研究を進めることができました。

その他、ここでは書き尽くせませんが、当研究室をはじめこの6年間の研究生活でお世話になった皆様は一生忘れることはできない私の財産です。

最後に、私を多方面で支えて頂き、今後も学校経営学の師となる都築総合学園 都築泰壽総長、都築仁子副総長、頑丈な肉体と熱いハートを与えてくれた私の両親に感謝致します。そして、常に食事と健康の配慮をいただき、私などにはもったいない妻慶子と底抜けに元気な子供たち、孝明、泰山に心より感謝致します。

都築 仁