

博士論文

光合成細菌の塩ストレス応答に関する研究

応用生命化学専攻

平成 14 年度博士課程 入学

氏 名 都築 稔

指導教員名 安保 充

目次

1 章	緒言	1
1.1	序	1
1.2	細菌における塩ストレス応答	2
1.3	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> における塩ストレス応答	7
1.4	本研究の目的	9
2 章	SspA の大量発現、およびポリクローナル抗体の取得	10
2.1	序	10
2.2	材料と方法	10
2.3	結果	15
2.4	考察	18
3 章	SspA のタンパク質レベルでの発現解析	20
3.1	序	20
3.2	材料と方法	21
3.3	結果	22
3.4	考察	26
4 章	SspA の細胞内局在解析	27
4.1	序	27
4.2	材料と方法	27
4.3	結果	30
4.4	考察	33
5 章	<i>sspA</i> 遺伝子破壊株の作製、および表現型観察	35
5.1	序	35
5.2	材料と方法	37
5.3	結果	44
5.4	考察	63

6 章 SspA と関連する因子の探索	66
6.1 序	66
6.2 材料と方法	69
6.3 結果	74
6.4 考察	80
7 章 DNAマイクロアレイを用いた網羅的発現解析	81
7.1 序	81
7.2 材料と方法	82
7.3 結果	88
7.4 考察	100
8 章 総合考察	127
参考文献	133
謝辞	143

1 章 緒言

1.1 序

地球上の自然環境は極めて多様であり、生命が生きていくには過酷とも思える環境においても適応可能な細菌が存在する。細菌はそのような厳しい自然環境下でも外的環境の変化に速やかに応答し、その環境に適応して生存している。多数存在するストレスのうち、塩ストレスは細菌が普遍的に受けるストレスの一種である。塩ストレス下で細菌が生育するためには、細胞内の溶質濃度が外界の濃度に適合するように浸透圧調節が必要である。このような調節は、好塩細菌に限らず増殖に塩を必要としない非好塩細菌においても必要とされる。そのため、細菌の塩ストレス応答機構を解明することは、環境保全、環境再生というアプローチのみならず、塩ストレス適応機構の全容を解明するモデルとしての役割が期待されている。

生物の塩ストレス応答を解析する意義は大きく分けて二つが挙げられる。第一に将来直面する食糧問題に対する解決策として、塩類土壌などの厳しい生育環境でも対応できる耐塩性植物の作出を目指す応用的研究としての意義が挙げられる。これまでも、塩ストレスに関与する遺伝子の導入によって成果を挙げている例もいくつか報告されている (Kasuga *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2003)。第二に、複雑な塩ストレス応答機構の全容を解明する基礎生命科学研究としての意義が挙げられる。高塩環境という厳しい環境に応答して生存するために、細菌から高等植物に至るまで、生物はいくつかの恒常的かつ誘導的な適応機構を有している。そのため、それらを解明することは大変意義深いテーマである。これまでに、浸透圧変化により発現する遺伝子やタンパク質が多数同定されている。しかし、これらの遺伝子の誘導、あるいは抑制を含めたシグナル伝達機構の大部分は解明されていない。本研究では基礎生命科学研究としての立場から、細菌を用いて塩ストレスに対する応答機構に興味を持って研究を行なった。

本章では、研究の背景として、これまでに報告されている細菌における塩ストレス応答、および *Rhodobacter sphaeroides* における塩ストレス応答に関する知見を概説し、本研究の目的を記す。

1.2 細菌における塩ストレス応答

1.2.1 塩ストレスに対する物質応答

グラム陰性細菌のモデルとして、*Escherichia coli* (*E. coli*) や *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*)、さらにはシアノバクテリアの一種である *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 (*Synechocystis*) において塩ストレス応答機構解明に向けた研究が進められている。一方、グラム陽性細菌のモデルとして *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) や *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*)、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) などでも塩ストレス応答に関する研究が進められている (Kempf and Bremer, 1998; Sleator and Hill, 2001)。ここでは、グラム陰性細菌では *E. coli* を、グラム陽性細菌では *B. subtilis* に関する知見を中心に概説する (Fig. 1-1, 1-2)。

塩ストレスに対する初期段階の応答として、細胞膜の膨圧に応答する輸送システムを介した大量の K^+ の取り込みが挙げられる。同時に、陽イオンの急激な上昇に対する対イオンとして、浸透圧上昇後 1 分以内にグルタミン酸の生合成が行なわれる。このグルタミン酸合成は取り込まれた K^+ の量に依存して行なわれることが知られている (McLaggan *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1996)。 K^+ の取り込みのために、*E. coli* には Kup、Trk、Kdp の計 3 種の輸送システムが存在する (Csonka and Epstein, 1996; Stumpe *et al.*, 1996)。このうち Kup による輸送システムは持続的で外界の浸透圧上昇に影響されない小型の K^+ 輸送システムである。一方、Trk と Kdp は外界の浸透圧上昇により誘導され、細胞の膨圧がこれらの活性に寄与していることが示されている。現在は、 K^+ とグルタミン酸の蓄積量の変化が、塩ストレス応答の第二段階である適合溶質の蓄積に影響しているのではないかと考えられている。

適合溶質は生体内での合成あるいは外界からの取り込みによって高濃度に蓄積される (Galinski and Trüper, 1994; Csonka and Epstein, 1996; Miller and Wood, 1996)。糖、及び糖の誘導体、第四級アンモニウム化合物のベタイン類、アミノ酸、アミンの誘導体などいくつかに分類され、原核生物のみならず、高等植物でも蓄積されることが確認されている。これらの適合溶質は代謝されにくく、かつ他の代謝に影響を及ぼさないため、高塩環境下の浸透圧調節に適している (Yancey *et al.*, 1982)。また、外界からの取り込みと生体内での合成の両面から蓄積されることが知られている (Galinski and Trüper, 1994)。

外界に存在する適合溶質は、外膜に存在する OmpC と OmpF による受動的な拡散輸送により細胞内に取り込まれる (Fig. 1-1)。引き続き、グラム陰性細菌の *E. coli* においては、ProP と ProU と呼ばれる二つの細胞質膜貫通型輸送システムにより細胞質内部に取り込まれることが報告されている (Barron and Villarejo, 1987; Haardt *et al.*,

1995) (Fig. 1-1)。このうち ProP は一分子からなる輸送システムであり、プロリンやグリシンベタイン、さらにはエクトインなど多様な基質輸送を仲介している。一方 ProU は ProVWX の 3 分子からなる ATP-binding cassette (ABC) type transporter であり、ProP と同様に多様な基質を輸送するものの、ベタイン類に対する親和性が非常に高く、これらを積極的輸送しているのではないかと考えられている。ProP はベタイン類に対して比較的 low 親和性の輸送系で、浸透圧が低い時にはプロリンを輸送する。しかし、浸透圧ストレスの状態ではプロリンよりむしろベタイン類に対して選択的となる。一方 ProU はベタイン類に対して高親和性の輸送系で、高浸透圧下で細胞内の K^+ が十分蓄積された時点ではじめて誘導合成される。このように、ベタイン蓄積が必要な状況で ProP が誘導され、Kdp と ProU の誘導調節が *E. coli* の浸透圧調節の要となっている (Csonka and Epstein, 1996)。これに対して、グラム陽性細菌の *B. subtilis* では初期応答としての K^+ の取り込みに引き続いて、プロリンが大量に蓄積されることが知られている (Whatmore *et al.*, 1990; Whatmore and Reed, 1990) (Fig. 1-2)。外界のプロリンを取り込むために、*B. subtilis* はプロリンに対する親和性の高い輸送システムである OpuE を使用する。また、*B. subtilis* は他にも OpuA、OpuC、OpuD という 3 種の効率的な適合溶質輸送システムを有しており、基質に対する親和性の違いにより使い分けを行なっている (Kempf and Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996)。 *B. subtilis* の OpuA と OpuC、およびグラム陰性細菌の *E. coli* との ProU は構造的にも互いによく似た輸送システムであることが知られている。

一方、外界に適合溶質となりうる成分が存在しないときには、生体内で適合溶質の合成が行なわれる。*E. coli* は OtsAB からなる経路 (Kassen *et al.*, 1992) でトレハロースを、BetAB からなる経路でグリシンベタイン (Lamark *et al.*, 1991) を生合成することが可能である (一部の株は生合成できない)。グリシンベタインの生合成に必要なコリンは、BetT と呼ばれるコリンと親和性の高い輸送システムを介して輸送される。一方、*B. subtilis* は外界にコリンが存在すれば、コリンに対する基質特異性の高い OpuB、または OpuC により生体内に取り込み、GbsAB 経路によりグリシンベタインを生合成することが知られている (Boch *et al.*, 1994)。また、ProABC または ProHJ からなる経路によりプロリンを生合成することも可能である (Bremer *et al.*, 2000)。このように、細菌は基質の輸送や生合成により塩ストレスに適応する機構を広く有していることが明らかになっている。

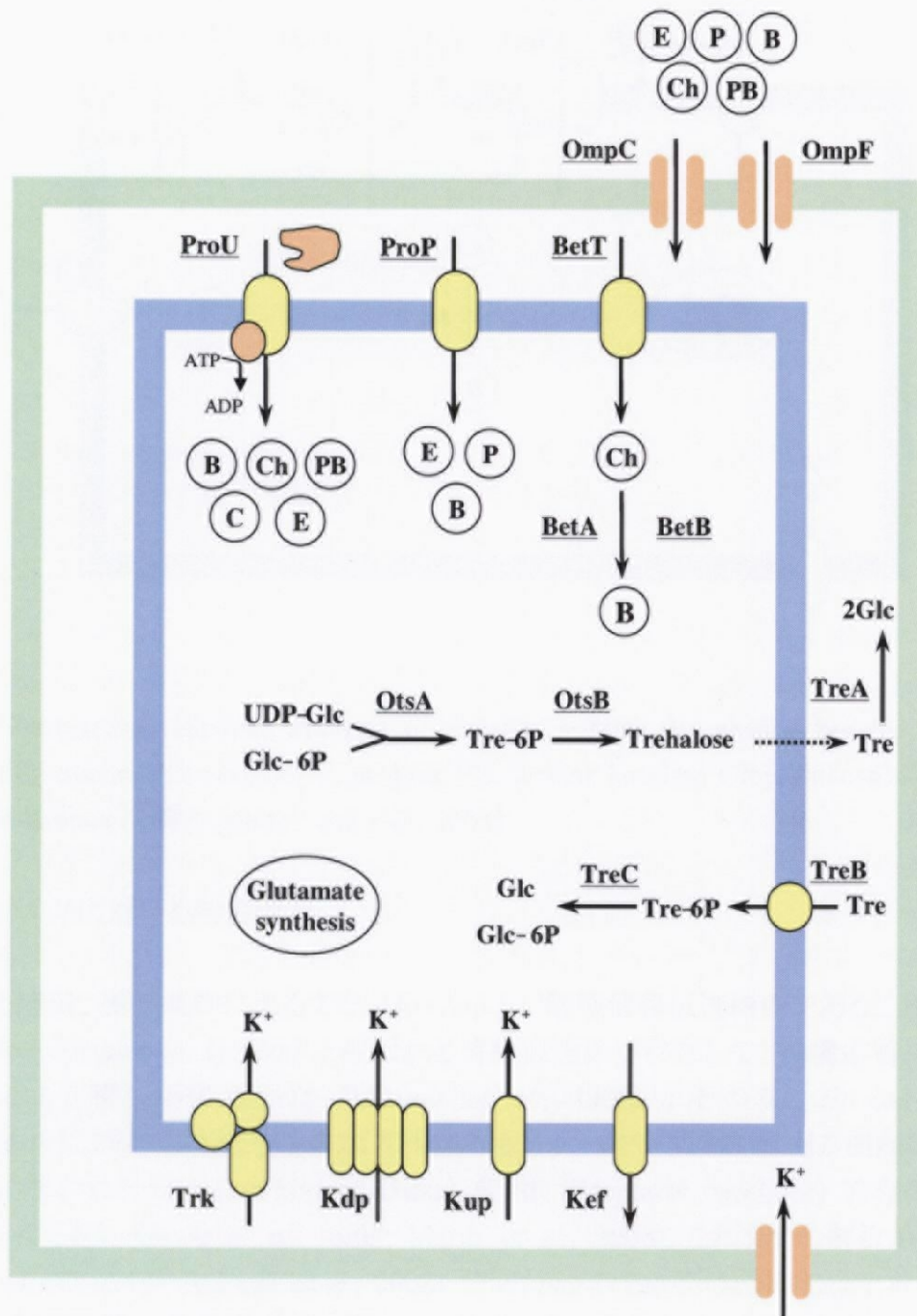


Fig. 1-1 Osmostress response systems of *Escherichia coli*. (B; glycine betaine, C; carnitine, Ch; choline, E; ectoine, P; proline, PB; proline betaine, Glc; Glucose) (Kempf and Bremer, 1998; Sleator and Hill, 2001)

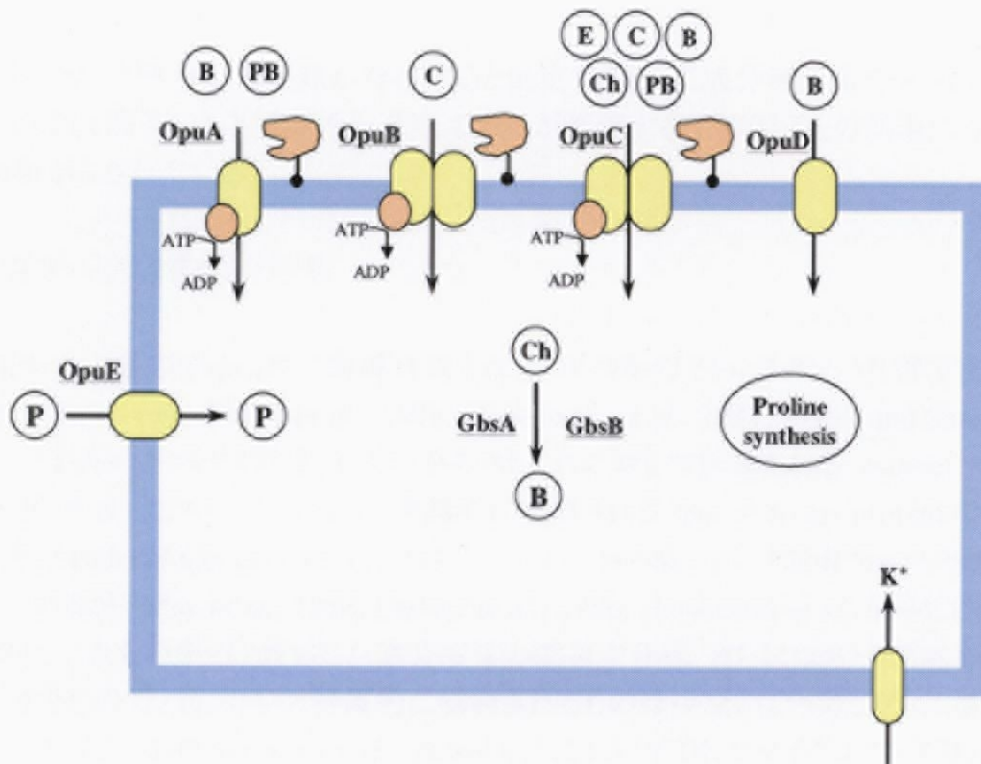


Fig. 1-2 Osmostress response systems of *Bacillus subtilis* (B; glycine betaine, C; carnitine, Ch; choline, E; ectoine, P; proline, PB; proline betaine, Glc; Glucose) (Kempf and Bremer, 1998; Sleator and Hill, 2001)

1.2.2 塩ストレスに対する制御因子

細菌から酵母、高等植物に至るまで、His-Asp リン酸型情報伝達機構である二成分構成系 (two-component system) と呼ばれる情報伝達系が存在して、環境応答に関与していることが明らかになった (Mizuno *et al.*, 1990)。その後、*E. coli* や *Synechocystis* において、いくつかの塩ストレスのセンサーやシグナル伝達の機能を果たしていると思われる Histidine kinases (Hiks) や RR (Response regulator) の存在が明らかになってきた (Zhou *et al.*, 2003; Marin *et al.*, 2003)。これまでの解析から、*Synechocystis* の Hik33 (Mikami *et al.*, 2002) や *E. coli* の EnvZ-OmpR (Egger *et al.*, 1997) を介した経路が浸透圧応答に関与していることが報告されているが、見出された数も少なく、未だに不明な点が多い。

一方、塩ストレス条件下で多数の遺伝子の制御をしていると考えられている σ 因子 (sigma factor) も塩ストレス応答において重要な役割を果たしていることが示唆されている (Wösten, 1998)。*E. coli* の RpoS (Hengge-Aronis, 1996; Conter *et al.*, 1997)、*B. subtilis* の SigB (Hecker *et al.*, 1996) が代表的なものとして知られており、それらが制御する遺伝子群も徐々に同定されつつある。

塩ストレスシグナル伝達経路が存在すると仮定すると、二成分構成系や σ 因子はシグナルの上流因子である可能性が高く、これらが制御する下流因子との関連について現在解析がなされている。

1.2.3 塩ストレス応答タンパク質

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は、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 種類に大別される (Hagemann *et al.*, 1991)。いくつかの塩ストレス誘導タンパク質が同定されているが (May *et al.*, 1986; Barron *et al.*, 1986; Hagemann *et al.*, 1994; Obis *et al.*, 1999)、これらの多くは前述した適合溶質の輸送や合成、さらにはストレス応答全般に関与するもので、塩ストレス特異的に誘導されるものは少ない。一方、ゲノム情報の解読により、*E. coli* や *Synechocystis*, *B. subtilis* において DNA マイクロアレイ等による遺伝子発現レベルでの網羅的解析が行なわれている (Weber *et al.*, 2002; Marin *et al.*, 2004; Steil *et al.*, 2003)。さらに、プロテオミクス技術の進展により、*Synechocystis* や *Listeria monocytogens* (*L. monocytogens*) においてタンパク質発現レベルの網羅的解析がなされている (Fulda *et al.*, 2000; Duche *et al.*, 2002)。しかし、塩ストレス特異的に発現する遺伝子やタンパク質の存在はそれほど明らかになっていない。その主な要因として、現段階ではゲノム情報の注釈が充分なされておらず、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否定できない。しかし、現段階ではそれらの遺伝子の破壊株を作製して塩ストレス条件下での表現型を解析する手法や、破壊株が塩ストレスに対して感受性を示す遺伝子から解析を進める手法などアプローチが限られており、地道な解析が要求される (Cánovas *et al.*, 1997; Hagemann *et al.*, 1997a, b; Ferjani *et al.*, 2003)。

以上のように、これまで得られた知見からは塩ストレスに対する感知や制御といった上流因子から、下流の塩ストレス誘導タンパク質の解析に至るまで、適応機構全般に関しても未だに解明されていないことが多い。そのため、塩ストレスに関与する遺伝子、タンパク質、そして細胞応答に関して詳細に解析を進めることが求められている。

1.3 *Rhodobacter sphaeroides* における塩ストレス応答

Rhodobacter sphaeroides (*R. sphaeroides*) は光合成細菌のうち α -3subdivision に属するグラム陰性細菌であり、極めて多様な環境で生育できることが知られている。同じく光合成を行なうシアノバクテリアの *Synechocystis* が好気条件下でしか生育できないのに対して、*R. sphaeroides* は好気条件下では酸素呼吸により、嫌気条件下では光合成をエネルギーとして生育することが可能である (Van Niel, 1944; Woese *et al.*, 1984; Jackson, 1998)。また、形質転換などの遺伝子操作が比較的容易であり、機能解析が進めやすいという利点も挙げられる。

R. sphaeroides は淡水より単離されたものの、塩ストレスへの耐性として培地 NaCl 濃度が 4% (0.68 M) まで生育することが可能である (Xu *et al.*, 1998)。海洋環境が約 0.5 M の NaCl を含んでいるため、いわゆる海洋細菌と同レベルの塩耐性を有していると言える。塩ストレスへの初期応答として、*R. sphaeroides* は他の細菌と同様に K^+ を蓄積することが知られている (Xu *et al.*, 1998)。また、塩ストレスに応答した適合溶質としてトレハロースを細胞内に蓄積することが NMR により同定されている。トレハロースの蓄積量は培地 NaCl 濃度に依存して上昇することから、本菌の塩ストレス応答における重要な役割が示唆されている (Xu *et al.*, 1998)。現在、当研究室においてトレハロースの生合成経路の探索を進めている。本菌の非常に興味深い特徴として、トレハロースは一部の菌株を除き通常は一つの生合成経路で合成されるものの、本菌ではトレハロースの合成・分解に三つの経路が関与していることが示唆されている (Makihara *et al.*, submitted)。

一方、プロテオミクス解析により、嫌気塩ストレス条件下において、いくつかのストレス応答タンパク質と共に、機能未知タンパク質 SspA が顕著に発現されることが確認されており、塩ストレスに対する何らかの細胞応答に関与していることが期待されている (Xu *et al.*, 1998)。二次元電気泳動により分離した SspA をトリプシン等のプロテアーゼで酵素処理することにより、アミノ酸断片の配列情報を解析した (Xu *et al.*, 2001a)。その結果を元に *sspA* 遺伝子の全長をクローニングした (Xu *et al.*, 2001b)。しかし、データベース解析の結果、高い相同性を有する遺伝子はなく、特徴的なドメインやモチーフも確認されなかった。このことから、SspA は塩ストレスに関与する新規タンパク質である可能性が示唆された (Xu *et al.*, 2001b)。さらに、分画やアミノ酸配列を元にしたデータベースによる局在予測により、外膜に局在する水溶性タンパク質であることが示唆された。

R. sphaeroides を含めたグラム陰性細菌には外膜 (Outer Membrane; OM)、内膜 (Inner Membrane; IM)、及びそれらを分けているペリプラズム空間が存在する。内膜がリン脂質二重膜であるのに対して、外膜はリン脂質とリポ多糖 (LPS) の複合体からな

っている。さらに、内膜タンパク質の多くが α -helix 構造を取っているのに対して、外膜のタンパク質の多くは β -barrel 構造を取っているなど構造的に差異があることが知られている (Koebnik *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2002)。 *R. sphaeroides* が酸素の有無に依らず生育可能な理由は、それぞれの条件における膜構造の変化に由来するのではないかという観点で古くから研究が行なわれてきた (Cohen-Brazie *et al.*, 1957)。酸素が存在する環境下では、他のプロテオバクテリアと同様の生育を示すが、生育環境中に酸素の量が少なくなると、内膜の内側に光合成活性中心 (Reaction center; RC) と二つの光捕集複合体 (Light-harvesting complex; LH) からなる細胞質内膜 (Intracytoplasmic membrane; ICM) を形成することが報告されている (Chory *et al.*, 1984; Zeilstra-ryalls *et al.*, 1998)。そのため、 *R. sphaeroides* は周囲の環境変化によってダイナミックな生体膜構造変化を行なっていると言える。そのため、生育環境の変動に伴って、どのような膜構造変化が起きているかを解析することは大変興味深いテーマであると言える。

本研究では、当研究室で塩ストレス応答の解析が進められてきた *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* 株とゲノムプロジェクトが完了している *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 株の両株を使用した。このうち *denitrificans* 株は脱窒能を有することが確認されている (Sato *et al.*, 1976)。一方、2.4.1 株は Kaplan らによってゲノム情報の解読が完了し (Mackenzie *et al.*, 2001)、現在遺伝子情報の注釈がなされている (<http://mmg.uth.tmc.edu/sphaeroides/>)。その結果、2.4.1 株のゲノムは chromosome I (CI; 3.0 Mbp)、chromosome II (CII; 0.9 Mbp) という2種の環状 chromosome と5つの replicon からなっていることが明らかになった。このうち、CI は約 3,106、CII は約 874 の open reading frame (ORF) を含んでいると考えられている。*denitrificans* 株と 2.4.1 株間の塩基配列を比較すると、当研究室で解析されてきた遺伝子に関しては、ORF のサイズも同一であり、塩基配列の相同性が極めて高いことが確認されている。また、塩ストレス耐性や蓄積される適合溶質の種類も同等であることが確認されている (Makihara *et al.*, submitted)。そのため、研究の大部分は *denitrificans* 株を用いて解析を進めたものの、一部 2.4.1 株のゲノム情報を活用して遺伝子工学的操作を行なった。また、7章で述べる DNA マイクロアレイを用いた解析は全て 2.4.1 株を使用して行なった。そのためここで紹介する塩ストレス応答に関する知見は *denitrificans* 株に関するものである。使用菌株は各章の巻頭に記載するが、以下 *R. sphaeroides* と統一して表記する。

1.4 本研究の目的

これまで述べたように、塩ストレス応答機構の上流因子から下流因子に至るまで、適応機構全般に関して未だに解明されていないことが多い。そのため、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可能性が考えられる。

また、タンパク質レベルで顕著に発現している SspA が塩ストレスに対して特異的に誘導されるのか、どの部位に局在するのか、さらには塩ストレスシグナル伝達経路におけるどの段階で誘導されるタンパク質なのかという、ストレス応答機構全体における役割からも大変興味深い対象である。

そこで、本研究では、まず誘導条件や細胞内局在を明らかにすることにより SspA の生体内機能を明らかにすることができないかと考えた。そのため、それらを決定する手段の一つとして、SspA のポリクローナル抗体の作製を行なった (2 章)。作製した抗体を用いて、各種ストレス条件下で培養した後、菌体抽出液をウェスタン解析することにより誘導条件の決定を試みた (3 章)。さらに、シヨ糖密度勾配法とウェスタン解析、さらに免疫電顕を用いることにより、細胞内局在決定を試みた (4 章)。

次に、詳細な機能解析を行なうべく *sspA* 遺伝子破壊株を作製して、その表現型を各種方法論を用いて野生株と比較解析した (5 章)。一方、他の遺伝子やタンパク質との相互作用解析 (6 章)、および DNA マイクロアレイを用いた解析 (7 章) により、塩ストレス応答機構全体における SspA の役割を明らかにしようと試みた。

2 章 SspA の大量発現、およびポリクローナル抗体の取得

2.1 序

SspA は配列中に特定の機能ドメインやモチーフを持っていない。さらには酵素活性や他の因子との相互作用に関する報告もなされていない。そのため、生体内での役割を解明するためには、局在、発現条件、相互作用タンパク質の解析などの基本情報を一つずつ決定していく必要がある。そこで機能を探る一つの手段として、SspA のポリクローナル抗体の作製を試みた。具体的には抗体を用いることにより、ウェスタン解析や免疫染色により発現解析や局在解析を行なうことを想定した。抗原タンパク質の選択として、*sspA* 遺伝子を発現ベクターに組み込んだ後、大腸菌を宿主に発現させることにより組み換えタンパク質を得ることを考えた。精製方法は、目的タンパク質である SspA の N 末端側に His タグを発現させ、Ni カラムによるアフィニティ精製を行なうことにした。

2.2 材料と方法

2.2.1 菌株と培養条件

Rhodobacter sphaeroides f. sp. *denitrificans* (*R. sphaeroides*) (Satoh *et al.*, 1976) は、リンゴ酸を炭素源とする Malate-Basal salt (MBS) 培地 (Sawada *et al.*, 1978) (Table 2-1) で培養した。嫌気光合成条件に関しては、スクルーキャップ付試験管を用いて嫌気状態を保ち、白熱電球を用いて照射する光強度が 10 W/m^2 (5,382 lux) となるように調整した。この際に培地中に dimethyl sulfoxide (DMSO) を添加することにより DMSO 呼吸が可能な条件で静置培養した。一方、好気暗条件に関しては、30 ml 試験管にシリコ栓を用いて好気状態を保ち、DMSO は添加せずに暗室で振とう培養した。培養温度は共に $25\text{-}30^\circ\text{C}$ とした。*R. sphaeroides* の生育は 660 nm における菌体濁度 (OD_{660}) を Photometer mini photo 518R (TAITEC) で測定することにより観察した。

Escherichia coli (*E. coli*) は Luria-Bertani (LB) 培地で培養し、必要に応じて終濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ のアンピシリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、または終濃度 $25 \mu\text{g/ml}$ のスペクチノマイシンを添加した。本章で使用した菌株とプラスミドを Table 2-2 に示す。なお、DMSO は Wako Chemicals より、アンピシリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシンは Sigma-Aldrich より購入した。

Table 2-1 MBS medium for *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*

1 L of 1 x medium		
Basal salt solution* ¹	100 ml	
Malate (Sodium salt)	3 g	
Vitamin solution* ²	1 ml	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g	
Phosphate solution* ³	15 ml	
(Yeast extract)	0.1 g	(not added on determining intracellular trehalose)
(DMSO)	2 g	(not added under aerobic dark growth condition)
Add distilled water up to 1 L		
*1 Basal salt solution		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 g	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.75 g	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	118 mg	
EDTA (4H)	400 mg	
Trace element solution* ⁴	10 ml	
*2 Vitamin solution		
Niacine (Nicotinic acid)	0.1 g	
Thiamine HCl salt	0.1 g	
Biotin	4 mg	
Add distilled water up to 100 ml		
*3 Phosphate solution		
KH ₂ PO ₄	40 g	
K ₂ HPO ₄	60 g	
Add distilled water up to 1 L		
*4 Trace element solution		
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.1 g	
H ₃ BO ₃	2.8 g	
Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	40 mg	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	240 mg	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	750 mg	
Co(NO ₃) ₂ ·7H ₂ O	248 mg	
Add distilled water up to 1 L		

Table 2-2 Bacteria and plasmids used in this chapter

Strain or plasmid	Characteristic (s)	Source or reference
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>hsdR17 recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> λ^-	Jessee, 1986
BL21	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> ($r_B^- m_B^-$)	Novagen
<i>R. sphaeroides</i>		
f. sp. <i>denitrificans</i> IL106	wild-type	Satoh <i>et al.</i> , 1976
Plasmids		
pT7Bluescript II	Ap ^r ; cloning vector	Stratagene
pRSET	Ap ^r ; cloning vector	Invitrogen
pRSSPA	pRSET with PCR fragment containing <i>sspA</i>	Invitrogen

2.2.2 遺伝子工学的手法

プラスミド抽出、*E. coli* の形質転換、ライゲーションと制限酵素処理は定法に従って行なった (Sambrook *et al.*, 1989)。PCR 産物とプラスミドのアガロースゲルからの抽出には QIAquick gel extraction kit (Qiagen) を使用した。また、プラスミド DNA の抽出には QIAprep Spin Mini kit (Qiagen) を使用した。DNA 配列は ABI PRISM 310NT genetic analyzer (Applied Biosystems) を使用して決定した。

制限酵素とライゲースは TAKARA BIO の製品を使用した。

2.2.3 *sspA* 遺伝子のクローニング

当研究室 Xu らによって、*sspA* の遺伝子全配列決定がなされている (Xu *et al.*, 2001)。しかし、今回大腸菌によってタンパク発現を試みている際に、遺伝子の 3' 側に PCR 反応における DNA ポリメラーゼ由来と思われる変異が確認されたため、ゲノム全配列が公開されている *R. sphaeroides* 2.4.1 の配列を元に、再度 *sspA* 遺伝子 ORF 及び周辺配列のクローニングを試みた。

sspA 遺伝子ならびに周辺配列を含むように設計したプライマーを使用し、ゲノム DNA を template に PCR により伸長させた。PCR 産物を pT7BluescriptII (Stratagene) にライゲーションし、*E. coli* DH5 α 株を使用して形質転換、プラスミド抽出をした後、DNA シーケンサにより配列を決定した。PCR は 3 連で行ない、すべて違いがないことを確認した。

2.2.4 SspA の大量発現と Ni カラムによる精製

SspA は遺伝子やアミノ酸の配列からは機能が類推できないため、その手がかりを得るべく、まずは抗体作製を目指して大腸菌を宿主に大量発現を試みた。発現の手順として、SspA の N 末端に hexahistidine (His₆) -tag が付加されるようなプラスミドを設計し、これを大腸菌内で融合タンパク質として発現させた。融合タンパク質は N 末端に 6 残基のヒスチジンを含む His タグが付加されるため、Ni カラムを使用すれば、ヒスチジンとニッケルとの配位結合を利用した簡便な精製が可能である。

2.2.4.1 発現用プラスミドの作製

発現用プラスミドとして pRSET (Invitrogen) を使用した。挿入 DNA 断片として、5' 側は *sspA* 遺伝子の open reading frame (ORF) のうちシグナルペプチドの一部である 4 アミノ酸が欠損した部位より下流、3' 側は *sspA* 遺伝子の終止コドンから 30 bp 下流までを含む DNA 断片を PCR により伸長させた。PCR 反応は *R. sphaeroides* のゲノム DNA を鋳型として、forward primer (SSPA1-f: 5'-AAAAGATCTCATCGGCACCACCGCCGTT-3') と reverse primer (SSPA1-r: 5'-TTTGAATTCGGGCCCAAGGGCCTACTG-3') を使用した。プライマーは *R. sphaeroides* 2.4.1 株の配列を用いて設計し、*Bgl* II と *Eco* R I の制限酵素認識部位 (下線) をライゲーションのために付加した。PCR 産物 (870 bp) を電気泳動で精製した後、pRSET と同様に *Bgl* II と *Eco* R I で制限酵素処理し、ライゲーションにより pRSSPA を構築した (Fig. 2-1)。PCR 反応は 3 連で行ない、正しく挿入されていることは DNA シーケンサにより確認した。

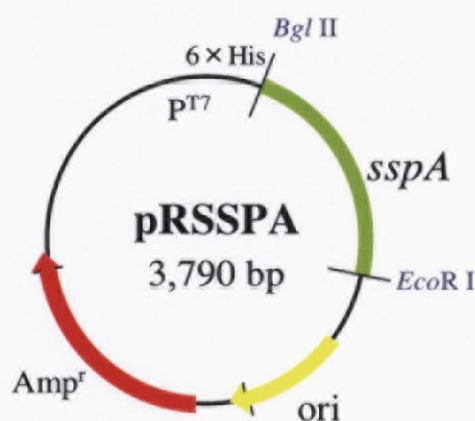


Fig. 2-1 Expression plasmid, pRSSPA, constructed for preparing the anti-SspA antibodies.

2.2.4.2 大腸菌を宿主とした発現

作製した pRSSPA (Amp^r) を保持した *E. coli* BL21 株 (Jessee, 1986) をアンピシリン添加した 10 ml LB 培地にて 600 nm における菌体濁度 (OD₆₀₀) が 0.3 になるまで培養した。培養容器は 30 ml 試験管を使用した。融合 SspA の発現は終濃度 0.4 mM となるように IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) (Wako) を添加してさらに 30°C、6 h 培養をすることにより行なった。菌体は 4°C、17,500 x g、5 min 遠心して集菌後、プロテインインヒビターとして 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Wako) を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) を 1 ml 添加して Ultrasonicator (IKA) により氷上で 50 W、10 s (計 2 回) 破砕した。破砕菌体を 4°C、17,500 x g、5 min 遠心して上清 (水溶性画分) と沈殿 (inclusion body; 不溶性画分) を分離した。両画分に 2% (v/v) SDS sample buffer 20 μl [50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 10% glycerol, 2% SDS, a trace amount of bromophenol blue] を加えて加熱し、SDS-PAGE により分離した。

2.2.4.3 Ni カラムによる精製・ポリクローナル抗体の作製

破砕後の inclusion body を、0.2% Triton-X 100 (Nacalai Tesque) を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) でよく洗浄した後、変性剤として Guanidine-HCl lysis buffer (6 M guanidine hydrochloride in 40 mM phosphate buffer, pH 7.5) を添加した。室温で 10 min 振とうした後、Ultrasonicator (IKA) を 60 W、1 min かけて凝集を解くことにより、ほぼすべての inclusion body を可溶化した。可溶化した溶液は Hi Trap chelating (Ni²⁺) column (bed volume 1 ml; Amersham Biosciences) を用いて精製することにした。融合タンパク質を溶出するために、Binding buffer (8 M urea in 40 mM phosphate buffer, pH 7.8) で平衡化したカラムに可溶化溶液を加え、Elution buffer (8 M urea in 40 mM phosphate buffer adjusted to pH 6.0, 5.3, 4.0) を用いて順次溶出した。

なお、ポリクローナル抗体の作製は日本バイオテスト (Hachioji, Japan) に依頼した。

2.3 結果

2.3.1 *sspA* 遺伝子のクローニング

シーケンスの結果、以前の報告では 894 bp だった配列 (Xu *et al.*, 2001b) が、実際は 870 bp (290 amino-acids) からなる ORF であることが明らかになった。この配列は DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に accession number AB022117 で再登録した。

取得した *sspA* 遺伝子の塩基配列を元に、*R. sphaeroides* の使用コドンから SspA の全アミノ酸配列を決定した (Fig. 2-2)。新たに決定した配列を元に、PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite>) や ProDom (<http://protein.toulouse.inra.fr/prodom.html>) を用いて機能ドメインやモチーフを検索したものの、特徴的なものは見出されなかった。さらに、遺伝子配列やタンパク質のアミノ酸配列としての相同性を BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) や FASTA (<http://fasta.bioch.virginia.edu/>) で検索したところ、機能未知タンパク質である *E. coli* protein YdiY (252 amino-acids) と 23%の相同性が見出された (Fig. 2-2)。遺伝子配列では hypothetical ORF を除いて相同性の高いものは見出されなかった。また、アミノ酸配列をシグナルペプチド予測サイトである SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>) で解析した結果、24 アミノ酸からなる内膜透過シグナルペプチドを有している可能性が示唆された (Fig. 2-2)。一方、タンパク質の膜貫通部位や局在予測を行なう SOSUI program (Hirokawa *et al.*, 1998) で解析した。その結果、24 アミノ酸のシグナルペプチドが切断された後の成熟 SspA (推定分子質量が 30.6 kDa) は膜貫通領域を持たず、外膜に局在する水溶性タンパク質であることが予測された。

SspA	<u>MKDNFRIAGLTAFALLIGTTAVHAQVGTLSGTRQIEDRIEDIEDDVQDDLEEAE</u> DPSPRFG	60
YdiY	-----MKLLKTPAIVMLAGGMFASLNAAAD---DSVFTVMDDPASAKP-----	42
	* . : * * : : . * * * ** . * : *	
SspA	NPEFRPGFSGSASLGYSGSDGNTEEQNLTIGARLRHAQGPYVQNLGVVLDYAETDGN	120
YdiY	-----FEGNLNAGYLAQSGNTKSSSLTADT--TMTWYGQTTAWSLWGNASNTSS	93
	* . * . ** . . . *** : . . ** : : : : : : * . * . : :	
SspA	EDIFMVYEGNYYFNDQFYGFVLGRAEFNGLADDADAKREIADVPLAERVKTDGFI	180
YdiY	SSEKYAAGGRSRFNLTDYDYLFGQASWLTDRYNGYRERDVLTA-----GYG	139
	. . . * . ** * : : * : * : : : : : : : : : * * *	
SspA	YRVINRADMAWRVQAGVGLSYLEFGDDRDESEVGYIASSRFFYRINENVFLTND	240
YdiY	RQFLNGPVHSFRFEFGPGVRYDKYTDNASETQPLGYASGAYAWQLTDNAKFTQ	198
	: : * . : : * : * * : * : * : : * : * : : : * . : : : : * . : * : . . * : .	
SspA	DEALRVNDFGVNFKMTDAFSTRVSYLTDYN----ESRAIRTDNKLGVSLVYGF	290
YdiY	AEDTTLNSESALNVAINEHFGLKVAYNVTWNSEPPESAPEHTDRRTTSLGYSM	252

Fig. 2-2 Comparison of amino acid sequences between *R. sphaeroides* SspA and *E. coli* YdiY. Probable signal peptides (24 amino acids) are underlined.

2.3.2 融合タンパク質の発現と Ni カラムによる精製

融合タンパク質を *E. coli* 株で高発現させるために、SspA の N 末端に His-Tag が付加するように設計されたプラスミド (pRSSPA) を作製した (Fig. 2-1)。

融合タンパク質の発現は IPTG を添加してさらに 30°C、6 h 培養をすることにより行なった。菌体を破碎・遠心により水溶性と不溶性に分離し、SDS-PAGE で検出した結果、融合タンパク質は不溶性画分に多量検出されることが明らかになった (Fig. 2-3, lane4)。培養温度、IPTG 添加後の誘導時間等、条件を多数検討したが、融合タンパク質を水溶性画分に検出することはできなかった。しかし、本実験における大量発現の目的は、ポリクローナル抗体の作製であるため、不溶性画分に存在する融合タンパク質を変性させた後、Ni カラムによって精製することにした。

不溶性に存在する融合タンパク質の inclusion body は Guanidine-HCl lysis buffer を用いることにより、ほぼすべて可溶化した。可溶化した溶液は Hi Trap chelating (Ni²⁺) column を用いて精製した。その結果、融合 SspA は Elution buffer の pH が 4.0

の条件で約 31 kDa のほぼシングルバンドになるまで精製が成功した (Fig. 2-3, lane 5)。発現ベクターにクローニングした遺伝子配列はシグナル配列の一部を切断して設計している。SspA はシグナルペプチドを除くと 266 アミノ酸をコードしており、推定分子質量は 28.7 kDa である。これに His-Tag を加えると翻訳される SspA は 30.5 kDa であると推定される。最終的には 10 ml の培養菌体から 2.5 mg という大量の融合タンパク質が精製できたので、これを抗原タンパク質とした。ウサギ (2.0 kg, 雌, 1 羽) を用いて、抗原タンパク質とフロイント・コンプリート・アジュバンドと等量混合することにより乳化して免疫した。ELISA 法により抗体価測定を行ない、抗体価が 4,000 倍を示した免疫後 8 週目で全採し、約 60 ml の抗血清を得た。

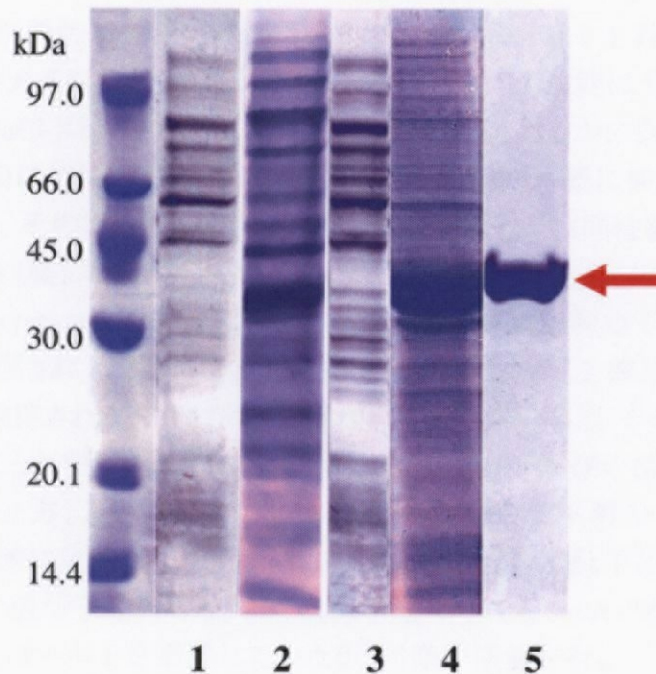


Fig. 2-3 Induction and purification of His₆-SspA. Lanes 1-4, soluble (lanes 1 and 3) and insoluble (lanes 2 and 4) fractions from the *E. coli* BL21 strains harboring the vector control (lanes 1 and 2) or pRSSPA (lanes 3 and 4). Lane 5, purified His₆-SspA obtained from nickel chelate affinity chromatography eluted by 40 mM phosphate buffer containing 8 M urea (pH 4.0). The approximate size of bands in kDa is indicated on the left.

2.4 考察

当研究室でクローニングした *spsA* の塩基配列のうち、3' 側に誤りがあったため、*spsA* 遺伝子全長を再度クローニングした。取得した *spsA* 遺伝子の塩基配列を元に、*R. sphaeroides* の使用コドンから SspA の全アミノ酸配列を決定した。その配列を元に相同性検索を行なった結果、機能未知タンパク質である *E. coli* YdiY との間に 23% の低い相同性が確認された。YdiY は、培地 pH が 6.0 の時に検出され、通常 pH ではほとんど検出されないタンパク質であることが二次元電気泳動により明らかになっている (Stancik *et al.*, 2002)。他の遺伝子とオペロンを形成していたり、他のタンパク質との相互作用があるような報告はなされていない。しかし、若干の pH 上昇によりタンパクとしての誘導が確認される以外は、遺伝子レベルも含めて全く機能は分かっておらず、その誘導レベルも NaCl ストレス条件下の SspA と比較するとはるかに低いレベルと言える。さらに、両者の間に相同性のある保存配列はないため、一概に機能が近いものであると言い切れない。そのため、他の遺伝子やタンパク質との相同性を元に、SspA の機能を類推することは難しいことが判明した。

SspA は *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* 株にて初めて同定されたのだが、ゲノム情報が公開されている *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 株にも同じ遺伝子と思われる配列が確認され (RSP0753)、周辺の配列も含めると、その相同性は 99% 以上と非常に高いことが明らかになった。そのため生体内で同様の機能を有していることが示唆された。一方、*spsA* のすぐ上流の遺伝子は機能不明の Transcriptional regulator であり、下流に見出された ORF も *spsA* 同様、他の遺伝子との相同性からは機能が類推できない遺伝子であった。また遺伝子座の中でも *spsA* の配列から数百 bp 離れていることから、オペロンを形成していたり、同様の機能を有している可能性は低いのではないかと考察した。以上より SspA 自体の遺伝子配列、さらには周辺の遺伝子からも生体内機能を推定するのは難しいことが予想された。一方、同じく紅色非硫黄細菌である *Rhodobacter capsulatus* をはじめ、系統分類上近い株においても相同性が高いものが見出されていない。

そのため、SspA の生体内機能解析を始める第一歩として、ポリクローナル抗体作製を試みることにした。大腸菌を宿主とした大量発現に関しては、培養容器 (30 ml 試験管、L 字型試験管、坂口フラスコ)、IPTG 濃度 (0.1 mM~0.4 mM)、IPTG 添加後の培養温度 (25°C~37°C)、誘導時間 (1 h~12 h) と様々に検討を重ねたものの、融合タンパク質を水溶性に精製することができなかった。この結果が実際の SspA の性質と関連するかは分からないが、今回の大量発現の目的が構造解析など生理活性を保持しておく必要がある用途ではないため、不溶性画分に出てきた inclusion body をそのま

ま変性させて抗体の作製に用いることにした。結果として、10 ml の培養菌体から 2.5 mg という大量の融合タンパク質を取得することに成功した。それに伴い、良好な抗原性を有するポリクローナル抗体を作製することに成功した。次章以降で、この抗体を利用した研究について述べていく。

3 章 SspA のタンパク質レベルでの発現解析

3.1 序

これまでに Heat-shock protein をはじめ、いくつかのストレス応答タンパク質の構造や機能が明らかにされている (Gething *et al.*, 1997)。一方、塩ストレス応答タンパク質の解析はいくつか報告はあるものの (Dartois *et al.*, 1998; Fulda *et al.*, 2000; Duchè *et al.*, 2002)、それらのタンパク質がどのような条件で誘導されるのか、あるいは生育のどの段階で誘導されるのかといった報告例は多くない。誘導条件や時期が分かれば、そのタンパク質の生体内での役割を推定する上で重要な情報が得られることも考えられる。

SspA に関しては、嫌気塩ストレス条件下で誘導されることが分かっているだけで、詳細な解析はなされていない。そこで、前章で作製した SspA 抗体を利用して詳細な解析を試みることにした。具体的には以下の二種の解析を行なった。

第一に、SspA がどのようなストレス条件下で誘導されるのかを解析した (誘導条件解析)。 *R. sphaeorides* は嫌気光合成条件下でも、好気暗条件下でも生育可能な生育特性がある (Van Niel, 1944; Woese *et al.*, 1984; Jackson, 1998)。そこで、本解析では、菌体に両条件下で各種ストレス (NaCl, KCl, Sorbitol, Heat shock, Cold shock) をかけた後、集菌した菌体抽出液を定量ウェスタン解析した。これにより、どのようなストレス環境因子の下で SspA が誘導されるのか決定することを試みた。

第二に、菌体を塩ストレス条件で培養させたときに、生育のどの段階で誘導されるのかを経時的に解析した (誘導時期解析)。多数のストレス応答タンパク質のうち、ストレスの初期段階で誘導されるセンサータンパク質や制御因子、それらの誘導に伴って発現する機能タンパク質の存在が明らかにされている。すなわち、同じストレスに対しても、各種タンパク質の応答時間に違いが見られるということである。そこで、本解析では、菌体を NaCl 添加培地で培養を開始し、生育の各段階で経時的に集菌し、その菌体抽出液をそれぞれ定量ウェスタン解析した。これにより、SspA がどの段階で誘導されるかを決定することを試みた。

3.2 材料と方法

3.2.1 *R. sphaeroides* の培養条件

R. sphaeroides の嫌気光合成条件、好気暗条件における培養は 2 章と同様の条件で行なった。

誘導条件解析の菌体サンプルは下記の通り培養を行なって調製した。塩ストレス (NaCl または KCl)、浸透圧ストレス (Sorbitol) はそれぞれ試薬の終濃度が 0.68 M となるように培地に添加することにより誘導した。酸性ストレスは生育培地の pH を 6.0 にして培養することによりストレス誘導した。その際の酸性培地は 100 mM 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) を培地に添加した後、pH を 6.0 に調整した。上記の 4 種のストレス、及びコントロールとなる通常培養の菌体は培養静止期に集菌して定量ウェスタン解析のサンプルとした。高温、低温ストレスは、通常培地で培養した対数増殖期の菌体にそれぞれ 42°C または 0°C の条件で 2 h 培養した後で集菌することにより定量ウェスタン解析のサンプルとした。

誘導時期解析の菌体サンプルは下記の通り培養を行なって調製した。菌体を NaCl ストレス条件下で培養を開始して静止期に至るまでの 0-96 h の菌体 (0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96 h) をそれぞれ経時的に集菌して定量ウェスタン解析のサンプルとした。

MES は Wako Chemicals より、NaCl、KCl は Kokusan Kagaku、Sorbitol は Nacalai Tesque より購入した。

3.2.2 定量ウェスタン解析

各種ストレス条件下、あるいは経時的に培養した菌体を集菌後、NP-lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40] を添加して、Ultrasonicator (IKA) により氷上で 50 W、30 s (計 2 回) 破碎した。その後、各レーンで総タンパク質量が一定 (10 μ g) になるようにして、2% (v/v) SDS sample buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 10% glycerol, 2% SDS, a trace amount of bromophenol blue] を添加、加熱後、SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。電気泳動の後、ゲルをセミドライブロットティング装置 (Nihon Eido) (LeGendre *et al.*, 1988) により、Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore) に転写した。転写後のメンブレンは、ただちに Tris-buffered saline-Tween 20 (TBST) [20 mM Tris, 1M NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20] plus 2% enhanced chemiluminescence (ECL) Advance Blocking Agent (Amersham Biosciences) によりブロッキングした。その後 anti-SspA antiserum (1:10,000 dilution in TBST plus 2% ECL Advance Blocking Agent) で一次抗体反応を、Peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG

(H+L) (Vector Laboratories) (1:50,000 dilution in TBST plus 2% ECL Advance Blocking Agent) で二次抗体反応を行なうことにより、抗体反応を施した。抗体反応が終了したメンブレンは、ECL Advance kit (Amersham Biosciences) により発光させ、Phosphoimager (LAS-1000; Fujifilm) によりシグナルを SspA の誘導合成量として数値化した。なお Nonidet P-40、Tween 20 は Nacalai Tesque より購入した。

3.3 結果

3.3.1 SspA の誘導条件解析

SspA の誘導条件解析は抗 SspA 抗体を用いた定量ウェスタン解析により行なった。各種ストレスは塩ストレス 2 種 (NaCl または KCl)、浸透圧ストレス (Sorbitol を培地)、低温ストレス (0°C、2 h)、高温ストレス (42°C、2 h)、酸性ストレス (pH 6.0) の計 6 種のストレス条件下で培養を行なった。酸性ストレスに関しては、SspA とアミノ酸配列に低い相同性が見出された YdiY が pH 6.0 の培地で培養したときにタンパク質レベルで誘導が確認されたため、SspA に関しても pH 6.0 培地で培養させて誘導条件解析を行なうことにした。

ウェスタン解析の結果、作製した抗体の SspA に対する特異性は非常に高く、菌体を破砕した抽出液を解析した結果、推定分子質量のサイズに近い 31 kDa 付近に濃いバンドが観察された他はほとんど非特異的なバンドは観察されなかった。

誘導条件解析の結果、嫌気条件と好気条件の間に大きな合成量の差異は見出されなかった (Fig. 3-1)。各種ストレス条件については、塩ストレス条件 (NaCl、KCl) で培養したときに最も顕著に誘導されていることが観察された (Fig. 3-1A, lane 2, 3, 9 and 10)。一方、浸透圧ストレス条件 (Sorbitol) (Lane 4 and 11) や酸性ストレス条件 (pH 6.0) (Lane 5 and 12) では若干の誘導が見出され、低温ストレスや高温ストレスでは逆に誘導合成量が減少していることが明らかになった (Lane 6, 7, 13 and 14)。

以上の結果より、SspA は嫌気条件においても好気条件においても、塩ストレス条件下で特異的に誘導合成されているタンパク質であることが明らかになった。また、通常条件でも誘導されていることから、SspA は恒常的に存在するものの、塩ストレスに伴って誘導合成量が上昇するタンパク質であることが明らかになった。

3.3.2 SspA の誘導時期解析

誘導条件解析と同様に、誘導時期解析も抗 SspA 抗体による定量ウェスタン解析により行なった。菌体サンプルは、NaCl ストレス条件下で培養を開始して、静止期に至る

までの 0-96 h の菌体 (0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96 h) を経時間に集菌して破碎したものを使用し、定量ウェスタン解析の手順はすべて誘導条件解析と同様に行なった。また、嫌気光合成培養と好気暗条件培養の培養条件は 2 章と同様に行なった。

その結果、SspA は嫌気条件においても好気条件においても、NaCl ストレス条件で培養を開始して 6 h という培養初期段階で誘導されていることが明らかになった。また、その合成量が培養開始後 96 h という静止期においても変化が見られないため、長時間の塩に対して安定性を有しているタンパク質であることも示唆された (Fig. 3-2)。

ここで示す定量ウェスタン解析の結果は SDS-PAGE における各レーンの総タンパク量を一定にした際のデータである。そのため、全タンパク質中の SspA の存在量比と考えられる。しかし、各種ストレスや生育期の変化により総タンパク量が大きく変動すると、実際の SspA の誘導合成量を反映しないことも想定される。そのため、菌体乾重量を一定にした条件でも同様に、等量の NP-lysis buffer を添加して破碎した後、ウェスタン解析を行なった。しかし、総タンパク量を一定にした際と同様の結果が観察された (data not shown)。以上より、ここでは総タンパク量を一定にした解析結果のみ示す。

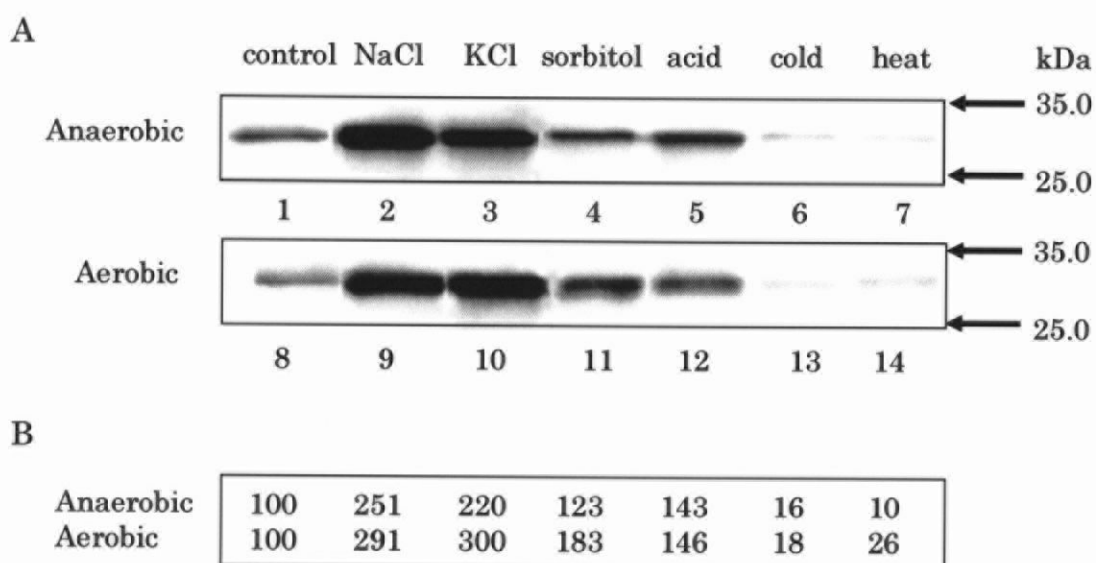


Fig. 3-1 Western blot analysis using anti-SspA antiserum. (A) Expression analysis of SspA under various growth conditions. Upper and lower panels show results in anaerobic and aerobic growth conditions, respectively. Lane 1 and 8, control; lane 2 and 9, +NaCl; lane 3 and 10, +KCl; lane 4 and 11, +Sorbitol; lane 5 and 12, pH 6.0; lane 6 and 13, cold shock; lane 7 and 14, heat shock. Cold (0°C) and heat (42°C) treatments for 2 h were applied to cells at exponential phase. Otherwise, cells were harvested at stationary phase. After stress treatment, cells were sonicated in NP-lysis buffer, and separated by SDS-PAGE. Same amounts of proteins (10 µg per one lane) were analyzed. The approximate band sizes in kDa are indicated on the right.

(B) Quantification of SspA levels by Western blotting. Expression of SspA in the standard, unstressed condition was set at 100, and the relative expression levels in various stress conditions are shown in numbers.

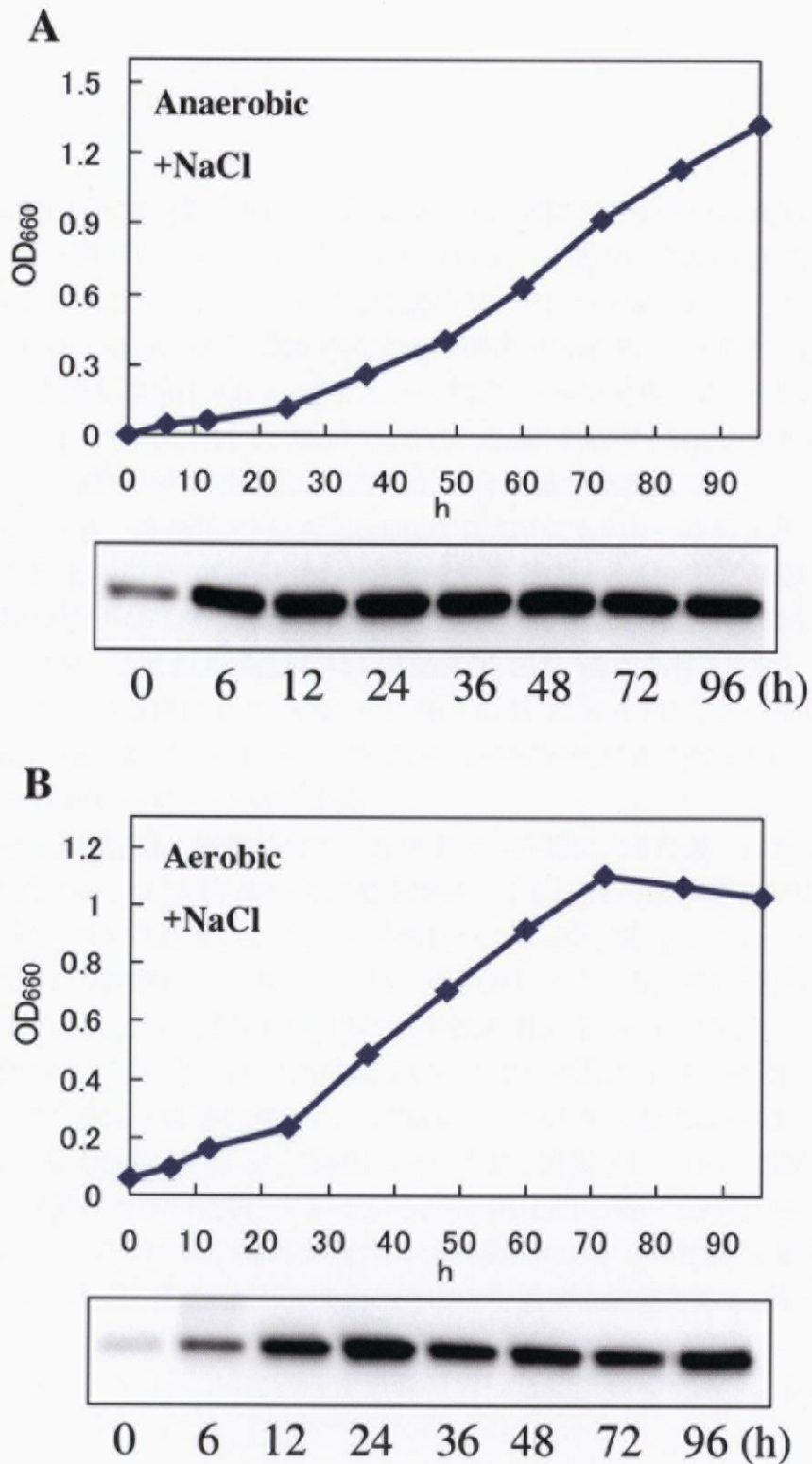


Fig. 3-2 Growth profiles and time course synthesis analysis of SspA under anaerobic photosynthesis condition (A) and aerobic dark condition (B) with addition of 0.68 M NaCl (4%) in growth medium. Upper panels are growth profiles, and lower panels are Western blot analysis by using anti-SspA antiserum.

3.4 考察

誘導条件解析の結果、嫌気条件でも好気条件との間に大きな違いは観察されなかった。各種ストレス源を変化させた結果、SspA は嫌気、好気のいずれの条件においても、NaClとKClという塩ストレス条件下で合成量の高いタンパク質であることが明らかになった (Fig. 3-1)。SspA とアミノ酸配列で低い相同性のあるタンパク質である *E. coli* の YdiY は、生育培地が pH 6.0 のときにタンパク質レベルで発現することが二次元電気泳動のスポットとして確認されているが (Stancik *et al.*, 2002)、SspA は同条件下では、ストレスのない通常条件と比較して若干量しか合成量が上昇していなかった (Fig. 3-1, lane 5 and 12)。浸透圧ストレス (Sorbitol) においても同レベルの上昇しか観察されなかった。以上の結果から、SspA は培養液の浸透圧上昇に応じて誘導されるのではなく、塩類などのイオン性の物質の濃度が上昇することに応答して誘導されるものと考えられる。一方、高温および低温ストレス条件下では、通常条件と比較してバンドが薄くなっていることが観察された (Fig. 3-1, lane 6, 7, 13 and 14)。この現象は遺伝子発現の変化に伴う違いなのか、タンパク質としての安定性に由来するものなのか不明であるが、今後解析していく必要がある。

誘導時期解析の結果も、嫌気条件でも好気条件との間に大きな違いは観察されなかった。両者とも SspA は NaCl 条件で培養を開始して 6 h という培養の初期段階においてタンパク質レベルで発現していることが明らかになった。塩ストレスのシグナル応答経路の中で、この誘導時間が果たして早いのか遅いのかを現段階で判断することはできない。そのため、さらに詳細な発現時間や他の遺伝子との発現時間の差異を確認するべく、DNA マイクロアレイによる遺伝子レベルでの変化を 7 章で検討している。mRNA レベルでの遺伝子の発現量とタンパク質レベルでの発現量には相関がないことが報告されている (Futcher *et al.*, 1999)。そのため、遺伝子レベルでは高発現していても、タンパク質レベルで発現していなかったり、機能的に働いていないという遺伝子は多数存在する。そのため、SspA が塩ストレス特異的にタンパク質として発現しているという知見を明らかにしたことは機能を解明する上で重要な情報であると考えられる。

4 章 SspA の細胞内局在解析

4.1 序

2 章でも述べた通り、SspA の全アミノ酸配列をタンパク質の細胞内局在予測プログラムで解析した結果、24 アミノ酸のシグナルペプチドが切断された後の成熟 SspA は膜貫通領域を持たず、外膜に局在する水溶性タンパク質であることが予測された。

当研究室におけるこれまでの研究においても SspA は外膜に局在していることが示唆されている (Xu *et al.*, 2001a)。しかし、これは *N*-Lauroyl sarcosinate による細胞分画によるもので、他画分からの混入も予測され、正確な同定とは言いがたい。また仮に SspA が外膜に局在すると仮定しても、外膜の外側にあるのか、または内側にあるのかも明らかになっていない。機能未知タンパク質の生体内機能を探るうえで、局在を決定することは必要不可欠である。そのため、本研究では 2 章で作製した SspA 抗体を利用して SspA の局在決定を行なった。具体的には、シヨ糖密度勾配法による分画とウェスタン解析による同定、および免疫電顕によるイメージングの二種の手法を用いて SspA の生体内局在決定を行なった。

4.2 材料と方法

4.2.1 シヨ糖密度勾配法による *R. sphaeroides* の外膜・内膜画分の分画、およびウェスタン解析による SspA の局在決定

膜画分分画法は従来法 (Baumgardner *et al.*, 1980; Shepherd *et al.*, 1981) を一部改変した方法で行なった。詳細は下記の通りである。NaCl ストレス (培地 NaCl 濃度 4%) をかけた状態で、嫌気光合成条件または好気条件で静止期まで培養した菌体を、4°C、18,500 x *g*、5 min 遠心して集菌した菌体を 1/15 M Phosphate Buffer [Phosphate Buffer Powder (Wako) in 1 L MilliQ water] (PB), pH 7.4 で洗浄して、培地成分を完全に除いたものを使用した。菌体は使用するまで -80°C に保存した。

菌体 (約 1 g) に TKE buffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM EDTA) (pH 7.8) 2 ml、および DNase (Sigma-Aldrich) 10 μ g を加えて Ultrasonicator (IKA) を用いて 60 W、1 min (計 3 回) 超音波破碎した。氷上で 30 min 静置した後、4°C、7,267 x *g*、10 min 遠心することにより未破碎細胞とデブリを沈殿させた。このうち上清 (約 3 ml) に TKE buffer 10 ml を加えて 4°C、120,000 x *g*、15 min 遠心して水溶性画分と膜画分

を分離した。沈殿（全膜画分）を回収し、TKE buffer 0.5 ml に懸濁した後、下層から 72% (wt/vol) sucrose in TKE buffer 1.6 ml、49% (wt/vol) sucrose in TKE buffer 5.5 ml、20% (wt/vol) sucrose in TKE buffer 3.9 ml を静かに重層させ、4°C、120,000 x g、18 h 遠心して、難溶性成分を除去した。さらに、沈殿（難溶性成分）を除いた下層 2 ml のみ（外膜・内膜画分）を回収して、20% (wt/vol) sucrose in TKE buffer 10 ml を重層させ 4°C、100,000 x g、6 h 遠心した。このうち上層から各 1 ml ずつ回収して、それぞれ Frac. 1-12 とした。中層の Frac. 6-8 付近が内膜タンパク質を多く含む画分、下層の Frac. 10-12 付近が外膜タンパク質を多く含む画分とした。各フラクションの SDS-PAGE による分離、および SspA 抗体を用いたウェスタン解析は 3 章と同様の方法で行なった。

4.2.2 免疫電顕による SspA の局在決定

4.2.2.1 菌体サンプルの固定

NaCl ストレス（培地 NaCl 濃度 4%）をかけた状態で、嫌気光合成条件または好気条件で静止期まで培養した菌体を、4°C、18,500 x g、5 min 遠心して集菌した菌体を 1/15 M Phosphate Buffer [Phosphate Buffer Powder (Wako) in 1 L MilliQ water] (PB), pH 7.4 で洗浄して、培地成分を完全に除いたものを使用した。菌体は使用するまで -80°C に保存した。

菌体サンプルをパラホルムアルデヒド (PFA) 溶液 (4% PFA in 1/15 M PB) に浸して、4°C、2 h 振とうして初期固定した。溶液をデカンテーションにより除いた後、菌体を PB で洗浄後、再度 PB を加えて 4°C、1 h 振とうすることにより PFA を除去した。溶液をデカンテーションにより除去して、10% sucrose in PB で洗浄後、再度 10% sucrose in PB を加えて菌体サンプルが沈降するまで 4°C、15 min 程度（計 2 回）振とうすることにより、溶液中から完全に PFA を除去した。

4.2.2.2 菌体サンプルの脱水

固定した菌体サンプルの溶液をデカンテーションにより除去して、70% エタノールを 2 ml を加えて 4°C、5 min 振とうした。デカンテーションにより菌体のみ回収して、80% エタノールを 2 ml 加えて 4°C、5 min 振とうした。デカンテーションにより菌体のみ回収して、90% エタノールを 2 ml 加えて 4°C、5 min 振とうした。デカンテーションにより菌体のみ回収して、95% エタノールを 2 ml 加えて 4°C、5 min 振とうした。デカンテーションにより菌体のみ回収して、100% エタノールを 2 ml 加えて 4°C、15 min（計 2 回）振とうした。

4.2.2.3 菌体サンプルの樹脂への包埋

包埋用樹脂は LOWICRYL K4M 樹脂 (Polysciences, Warrington, PA) を使用した。K4M 溶液 (Component A 2.7 g, Component B 17.3 g, Component C 0.1 g をスターラーで攪拌後に使用) と 100% エタノールを 1:1 で希釈した溶液を作製し、このうち一菌体サンプルあたり 2 ml を加えて 4°C、1 h 振とうした。溶液をデカンテーションにより除いた後、新たな K4M 溶液を加えて 4°C、一晩振とうした。溶液をデカンテーションにより除いた後、サンプルを樹脂固定用容器に移し、新たな K4M 溶液を加えて 4°C、一晩紫外線照射することにより、樹脂を硬化した。

4.2.2.4 超薄切片の調製

菌体サンプルを包埋した樹脂をダイヤモンドカッター-DIATOME (LEICA) を用いて超薄切片化し、ニッケル支持膜付メッシュに装着した。PFA の影響を排除するため、0.1 M グリシン溶液の中で室温、10 min 振とうした。さらに、滅菌水で室温、5 min (計 2 回) 洗浄して抗体反応を行なった。

4.2.2.5 抗体反応

菌体サンプルを含む超薄切片を 1% BSA (Sigma-Aldrich) in PB に加えて 4°C、1 h 振とうすることにより、ブロッキング反応を行なった。溶液をデカンテーションにより除いた後、500 倍希釈した一次抗体 (SspA 抗体) を含む 1% BSA in PB を加えて 4°C、一晩振とうして一次抗体反応を行なった。溶液をデカンテーションにより除いた後、PB で 4°C、15 min (計 5 回) 洗浄して、余剰な一次抗体を除去した。さらに、50 倍希釈した二次抗体 [10 nm gold labeled goat anti rabbit IgG (H+L) (British Biocell, Cardiff, UK)] を含む 1% BSA in PB を加えて室温、1 h 振とうして二次抗体反応を行なった。溶液をデカンテーションにより除いた後、PB で 4°C、10 min (計 2 回) 洗浄して、余剰な二次抗体を除去した。さらに滅菌水で 4°C、5 min 洗浄した。ここで樹脂切片上での抗原抗体反応を強固にするために、4% PFA 溶液を加えて室温、5 min 振とうした。3% 飽和酢酸ウラン溶液を加えて室温、30 min 振とうした。その後、滅菌水で 5 min (計 3 回) 洗浄して電子顕微鏡サンプルとした。

4.2.2.6 電子顕微鏡観察

電子顕微鏡観察による観察は JEM-100CX (JEOL, Tokyo, Japan) を使用した。

4.3 結果

4.3.1 ショ糖密度勾配法による *R. sphaeroides* の外膜・内膜画分の分画、およびウェスタン解析による SspA の局在決定

ショ糖密度勾配法を用いた分画および、ウェスタンブロットングにより SspA の局在決定を試みた。菌体を破碎した後、計 3 回の超遠心を用いることにより *R. sphaeroides* の膜画分のうち外膜と内膜を効率的に分離、分画できることが報告されている (Baumgardner *et al.*, 1980; Shepherd *et al.*, 1981)。3 回の超遠心後の 12 フラクシオンを SDS-PAGE で分離した後、作製した SspA 抗体を用いたウェスタン解析した。外膜タンパク質はリポ多糖を含むため、内膜タンパク質より比重が大きいことが報告されており (Shepherd *et al.*, 1981)、中層の Frac. 6-8 付近が内膜タンパク質を多く含む画分、下層の Frac. 10-12 付近が外膜タンパク質を多く含む画分とした。その結果、嫌気塩ストレス条件と好気塩ストレス条件で若干のバンドの偏りはあるものの、いずれの条件においても、SspA は外膜に局在していることが示唆された (Fig. 4-1A, B)。

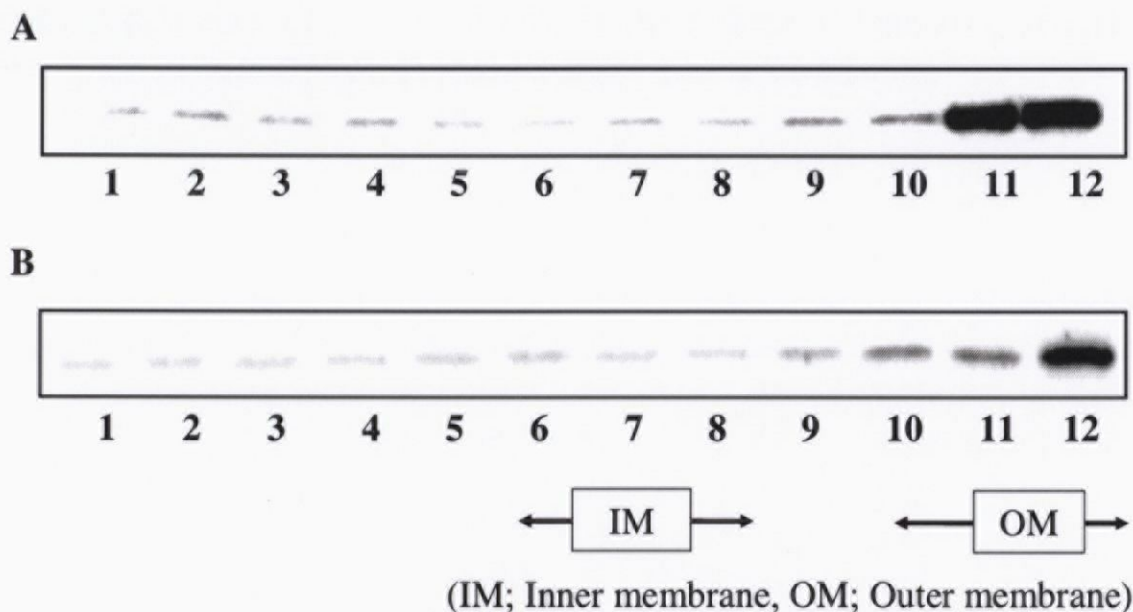


Fig. 4-1 Western blot analysis of total membrane fraction of *R. sphaeroides* under salt-stressed anaerobic photosynthesis condition (A), and under salt-stressed aerobic dark condition (B) by using anti-SspA antibodies. Total membrane fraction was separated by sucrose density centrifugation (20-72%). Fraction numbers are indicated under the blot.

4.3.2 電子顕微鏡を用いた局在決定

さらに詳細に局在解析を進めるべく、SspA 抗体を用いた免疫電顕により SspA の局在決定を試みた。菌体の超薄切片に SspA 抗体を吸着させ、さらに金粒子が結合した二次抗体を吸着させた後に電子顕微鏡で観察すれば、より正確な局在決定ができるのではないかと考えた。

電子顕微鏡の観察において最も検討を要したのは抗原性を維持するための前処理法の検討、抗体の希釈倍率の決定、および樹脂の選択である。前処理法は抗原性が維持されるべく、固定度合いの強いオスミウム酸ではなく、パラホルムアルデヒドを用いて固定を行なった。また、一次・二次抗体の希釈倍率を一次抗体は 500 倍、1,000 倍、5,000 倍、二次抗体は 30 倍、50 倍をそれぞれ比較検討した結果、一次抗体は 1,000 倍、二次抗体は 50 倍が至適条件であることを見出した。一方、包埋用樹脂として、抗原性の保持能の高い LOWICRYL K4M 樹脂を用いて顕微鏡観察した。

顕微鏡観察の結果、SspA の細胞内局在には、嫌気光合成条件においても好気条件においても、外膜に局在していることが明らかになった (Fig. 4-2, A-F)。なお、ここに示した像は撮影倍率を除き、全て同じ条件で前処理、観察を行なった。両条件を比較すると、嫌気光合成条件の方が、SspA の存在を示すドットが数量的にも多く、また外膜の広範囲で検出された。SspA の局在が外膜の内側なのか外側なのか、さらには膜の中に含まれた形で存在しているのかを同定することはできなかった。

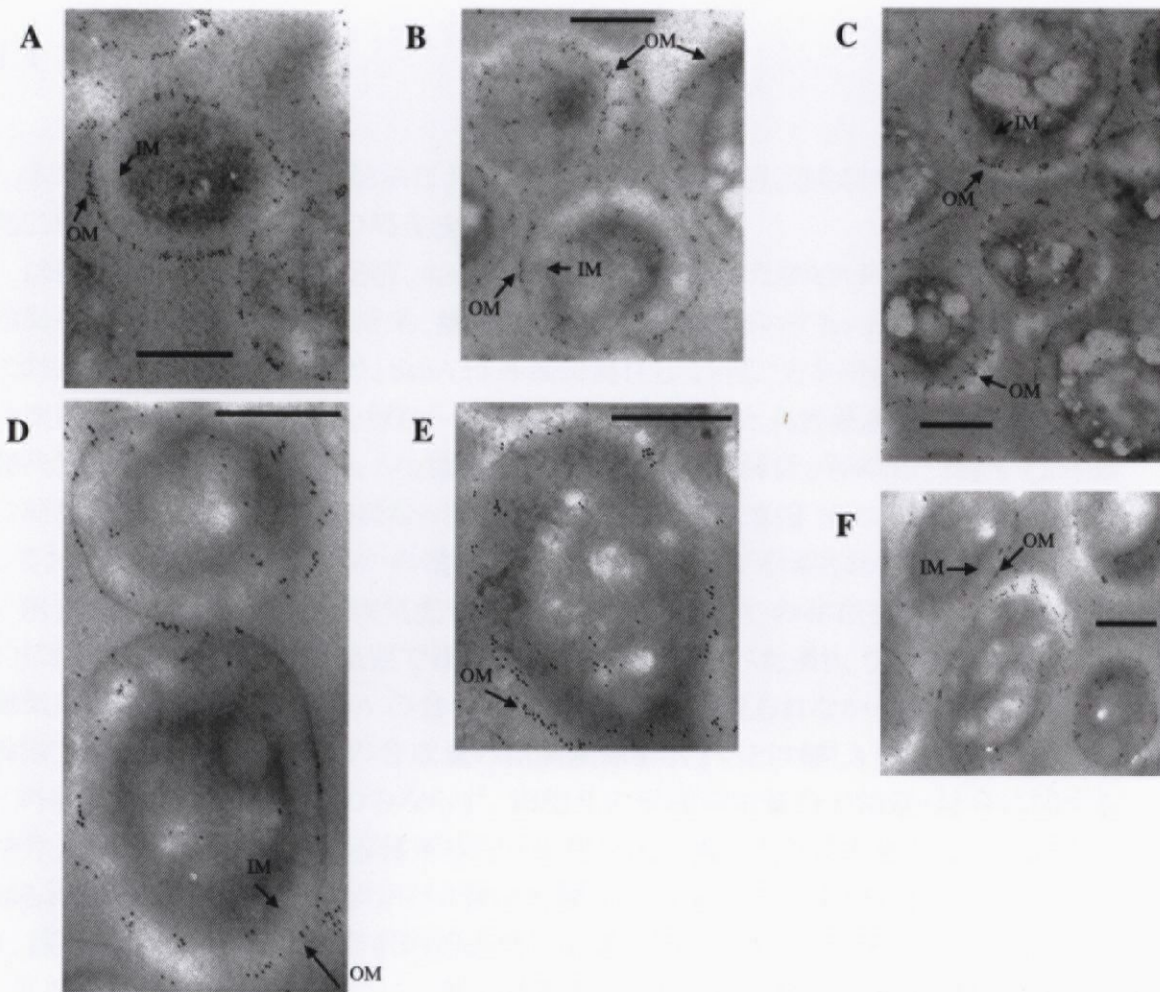


Fig. 4-2 Immunogold electron microscopy of *R. sphaeroides* grown under anaerobic photosynthesis salt-stressed (2% NaCl in culture medium) conditions (A-C), and aerobic dark salt-stressed conditions (D-F). They are labeled with anti-SspA antibodies, showing localization of SspA *in situ*. OM; Outer membrane, IM; Inner membrane. Bars indicates 0.5 μ m.

4.4 考察

本章では、シヨ糖密度勾配法による分画とウェスタン解析、さらには免疫電顕を用いた二種の方法により SspA の局在決定を試みた。

はじめに、シヨ糖密度勾配法、および SspA 抗体を用いたウェスタン解析により SspA の局在決定を試みた。その結果、嫌気塩ストレス条件においても、好気塩ストレス条件においても、当初の予想通り、SspA は外膜に局在していることが示唆された。

次に、さらなる詳細解析を行なうべく SspA 抗体を用いた免疫電顕により SspA の局在決定を試みた。その結果、シヨ糖密度勾配法を用いた解析と同様に、SspA は外膜に局在していることが明らかになった。そのため、SspA は直接 NaCl ストレス環境に接しており、外膜において何らかの役割を果たしていることが示唆された。

培養条件で比較すると、嫌気光合成条件の方が、SspA の存在を示すドットが数量的にも多く、また外膜の広範囲で検出された。3 章で述べた通り、ウェスタン解析では嫌気条件と好気条件で SspA の合成量に大きな差異は見られなかった。そのため、現段階では培養条件と SspA の合成量の相関関係を示すことは難しい。

外膜は細胞構造の維持のみならず、細胞孔の形成や栄養分の輸送・結合に関する仲介、phage や colicin の受容体形成など生化学的に重要な役割を果たしていることが知られている。このうち外膜タンパク質は外膜全構成成分の約半分の質量を占めており、膜の形態維持と物質の選択的透過性に必須の因子である。外膜タンパク質は外界と直接的に作用しているために、周囲の環境因子によって発現が大きく制御されるとい側面を持っている。

塩ストレスと外膜タンパク質との関連についてはいくつかの報告がなされている。一般的に、外膜タンパク質は塩ストレスを受けると、膜の透過性を変化させ、Na⁺を含めた生体に悪影響を与える物質を外に排出する役割を果たすことが知られている (Wood, 1999)。その中で、Porin は外膜に最も多く存在し、かつ塩に対して安定性の高い三量体タンパク質である。複数のタイプの Porin が知られており、様々なイオンや基質を透過させるべく孔のサイズも異なるため、塩ストレスに対して幅広い適応が可能である。*E. coli*においては、塩ストレスに対して OmpF と OmpC という二種類の Porin が関与しているが、OmpCの方が孔径も大きく、より重要な役割を果たしている (Thanassi *et al.*, 1997)。同様の Porin の存在は *Vibrio cholerae*でも確認されており、塩ストレスに必須のタンパク質であることが明らかになっている (Provenzano *et al.*, 2000)。*R. sphaeroides*のゲノム配列には OmpF や OmpC と相同性の高い遺伝子は確認されていないが、いくつかの膜貫通型 Porin が存在し、同様の機構を有していることが示唆される。また、OmpF や OmpC は塩ストレス特異的に発現するタンパク質ではなく、膜貫通ドメインを有して物質の拡散輸送を行なっていることが知られている (Sleator and Hill,

2001)。しかしながら、SspA は膜貫通ドメインを持たないため、同等の機能を有している可能性は低いと考えられる。一方、配列としての相同性のみで比較すると、SspA は *E. coli* YdiY との低い (23%) 相同性のみが見出されている。YdiY はペリプラズムへの局在が予測されており (Stancik *et al.*, 2002)、局在の相違からも機能としての関連性は低いと考察した。

以上、本章で行なったいずれの手法においても、SspA は外膜に局在していることが初めて明らかになった。SspA のように塩ストレスを受けることにより特異的に合成量が増加する外膜タンパク質はこれまでに報告がなく、機能の一面を明らかにするうえでは重要な知見が得られたのではないかと考えている。