

5 章 *sspA* 遺伝子破壊株の作製および表現型観察

5.1 序

これまでの研究により SspA の発現条件や細胞内局在は決定した。しかし、この段階では機能の一端を明らかにしたに過ぎない。そこで、*sspA* 遺伝子が欠損することにより、*R. sphaeroides* の生体内でどのような変化が起こるかを明らかにするべく、*sspA* 遺伝子破壊株の作製を試みることにした。

R. sphaeroides における遺伝子破壊法としては、大腸菌の形質転換でも用いられるエレクトロポレーション (Electroporation) 法と接合伝達 (Conjugation) 法が知られている (Scolnik and Marrs, 1987)。このうち、機器も不要で遺伝子導入確率の高い接合伝達法を採用することにした。簡単に概要を述べると、*E. coli* (S17-1) 株が *R. sphaeroides* の繊毛を通じてプラスミド DNA を運び入れる性質を利用することにより相同組み換えを起こして、一重交叉株と二重交叉株を作製、このうち二重交叉株を薬剤耐性遺伝子の活用によりスクリーニングして欠損株を作製する手法である。

作製した破壊株がどのような表現型を示すかを明らかにするべく、野生株と比較解析することにより、*sspA* 遺伝子が欠損した影響を観察する事を目的とした。具体的には下記の 6 項目に注目して表現型観察を行なった。

(1) 生育の変化 (5.3.2 参照)

菌体を多様な条件下で培養することにより、どのような生育変化が起こるかを液体培養とプレート培養で観察した。このうち、塩ストレスを中心としたストレス環境に対する影響に注目して比較解析を行なった。

(2) 光学顕微鏡による菌体形状観察 (5.3.3 参照)

(3) 電子顕微鏡による菌体形状観察 (5.3.5 参照)

NaCl ストレス条件下の菌体の変化に注目して顕微鏡観察を行なった。光学顕微鏡により菌体の大まかな構造と動態を観察し、電子顕微鏡により膜構造を中心とした詳細な菌体構造変化を観察した。

(4) 野生株と SSPA1 のフローサイトメータ (FCM) による解析 (5.3.4 参照)

フローサイトメータは、細胞の散乱光と蛍光を検出することにより、細胞の相対的な大きさ、内部構造などの情報を得ることが可能な装置である。このうち、前方散乱光

(FSC: Forward Scattered Light) は散乱光の中でもレーザービームの光軸に対して前方に検出される光で、細胞の表面積または大きさにほぼ比例する。一方、側方散乱光 (SSC: Side Scattered Light) はレーザービームの光軸に対して 90° の角度で検出される光で、その大部分が細胞内の物質に光が当たって散乱したものであることから、細胞の顆粒性状、内部構造にほぼ比例することが知られている (Fig. 5-1)。フローサイトメータの解析により、*sspA* 遺伝子が破壊された際に、どのような細胞構造変化が起こったかを類推することが可能である。

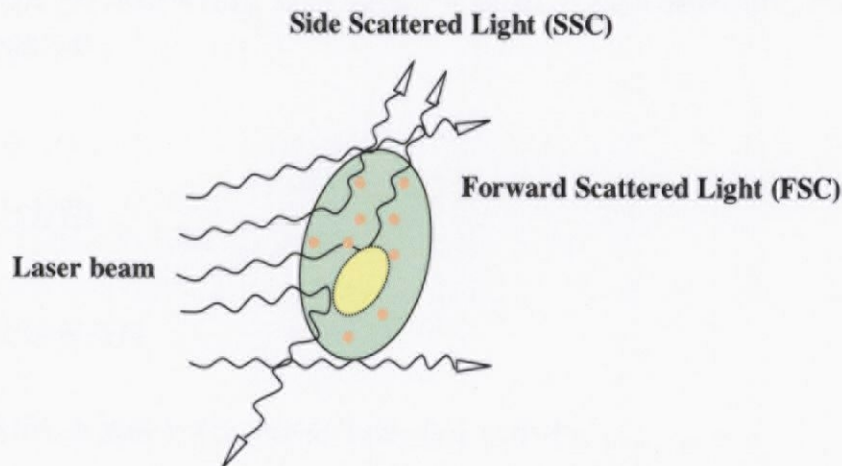


Fig. 5-1 Difference between FSC and SSC (image figure).

(5) 野生株と SSPA1 のタンパク質レベルでの比較解析 (5.3.6 参照)

sspA 遺伝子が欠損したときに、SspA が存在する外膜、さらには細胞質やペリプラズムでどのような変化が起こっているかを解析することにより、SspA の機能が明らかになる可能性が挙げられる。そのため、タンパク質発現レベルで網羅的な解析が可能である二次元電気泳動 (Two-dimensional electrophoresis) (O'Farrel *et al.*, 1975) を用いて、野生株と SSPA1 の発現量変化を捉えようと考えた。手法としては、菌体破碎液のうち、水溶性画分と外膜画分を分離・分画し、それぞれを分けて泳動することにより比較解析することにした。

二次元電気泳動は、タンパク質の示す二種類の性質をもとにした二段階の分離操作を行なって、タンパク質を分離する手法である。一次元目の泳動では等電点電気泳動 (Isoelectric focusing: IEF) では、タンパク質を等電点 (pI) によって分離する。二次元目の泳動である SDS-PAGE ではタンパク質の分子量によって分離する。現在その改良法が次々に考案されており、数千種類のタンパク質を分離することも可能である。そのため、質量分析計とともに近年のプロテオミクス研究の基本技術として細胞分化の解析、疾病マーカーの検出、新薬開発など多方面で応用されている効率的な手法である。

(6) 野生株と SSPA1 の適合溶質トレハロースの定量 (5.3.8 参照)

塩ストレス時における最も顕著かつ重要な応答に適合溶質の蓄積が挙げられる。そのため、*sspA* 遺伝子の欠損によって適合溶質の蓄積にどのような変化が生じるかを知ることがきわめて重要であると考え、破壊株における適合溶質蓄積量を調べることにした。*R. sphaeroides* は NaCl ストレス条件下で、二糖類であるトレハロースを主要な適合溶質として蓄積することにより耐塩応答していることが確認されている (Xu *et al.*, 1998)。そのため、本研究では *sspA* 遺伝子を破壊したときの菌体内トレハロース蓄積量の解析を試みた。

5.2 材料と方法

5.2.1 菌株と培養条件

本章で使用した菌株とプラスミドを Table 5-1 に示す。

Table 5-1 Bacteria and plasmids used in this chapter

Strain or plasmid	Characteristic(s)	Source or reference
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80<i>lacZ</i>ΔM15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 λ^-</i></i>	Jessee, 1986
JM109	<i>endA1 recA1 gyrA96 <i>hsdR17 supE44 λ^- Δ (lac-proAB) /F' [traD36 proAB⁺ lacZ</i>ΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
JM109 λ pir	JM109 lysogenized with λ pir bacteriophage	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
S17-1 λ pir	Tp ^r Sm ^r <i>hsdR pro recA λpir</i> RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 in chromosome	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>R. sphaeroides</i>		
f. sp. <i>denitrificans</i> IL106	Wild-type	Satoh <i>et al.</i> , 1976
SSPA1	IL106 Δ <i>sspA</i> :: Ω Sm ^r /Sp ^r	this study
Plasmids		
pT7Bluescript II	Ap ^r ; cloning vector	Stratagene
pJP5603	Km ^r ; R6K-based suicide vector	Penfold <i>et al.</i> , 1992

Table 5-1 Continued

pTK106	Ap ^r Sm ^r /Sp ^c ^r ; source of Sm ^r /Sp ^c ^r gene (Ω cassette)	Prentki <i>et al.</i> , 1984
pRSSP001	pJP5603 with PCR fragment containing upstream of <i>sspA</i>	this study
pRSSP002	pJP5603 with PCR fragment containing upstream and downstream of <i>sspA</i>	this study

5.2.2 *sspA* 遺伝子破壊株の作製

5.2.2.1 破壊株作製用プラスミドの調製

本章における遺伝子工学的手法は2章と同様に行なった。

R. sphaeroides のゲノム DNA を鋳型として、forward primer (SSPAKS-f: 5'-ATAGTCGACGCCTGAGACCCCATGTTGGCGGC-3') と reverse primer (SSPAKS-r: 5'-ATTCCCGGGTCCGGTCCTCGATCTGCCGCGTC-3') を用いることにより *sspA* 遺伝子の上流 0.8 kbp の DNA 断片を PCR により伸長させた。DNA 断片をプラスミドにライゲーションするために、*Sal*I と *Sma*I の制限酵素認識部位 (下線) をプライマーに付加した。電気泳動により精製後、同じく *Sal*I-*Sma*I で制限酵素処理した Km^r-suicide vector pJP5603 (Penfold *et al.*, 1996) にライゲーションして pRSSP001 を取得した。

一方、*sspA* 遺伝子の下流 1.6 kbp の DNA 断片を、同じく鋳型として *R. sphaeroides* のゲノム DNA と forward primer (SSPAKS2-f: 5'-TAACCCGGGTAACGAGAGCCGCGGATCCGCA-3') および reverse primer (SSPAKS2-r: 5'-TGTGAATTCTTGTGGATCTGGGGGTCCCCCGT-3') を用いて PCR により伸長させた。DNA 断片をプラスミドにライゲーションするために、*Sma*I と *Eco*R I の制限酵素認識部位 (下線) をプライマーに付加した。電気泳動で精製後、同じく *Sma*I と *Eco*R I で制限酵素処理した pRSSP001 にライゲーションして pRSSP002 を取得した。

最後に薬剤耐性を有する Ω Sm^r/Sp^c^r cassette を pRSSP002 および cassette 共に *Sma*I で制限酵素処理した後、ライゲーションすることによって組み換え用プラスミドである pRSSP002 Ω を取得した (Fig. 5-2)。ここまでのプラスミド調製は全て *E. coli* JM109 lysogenized with λ *pir* 株を使用して行なった。

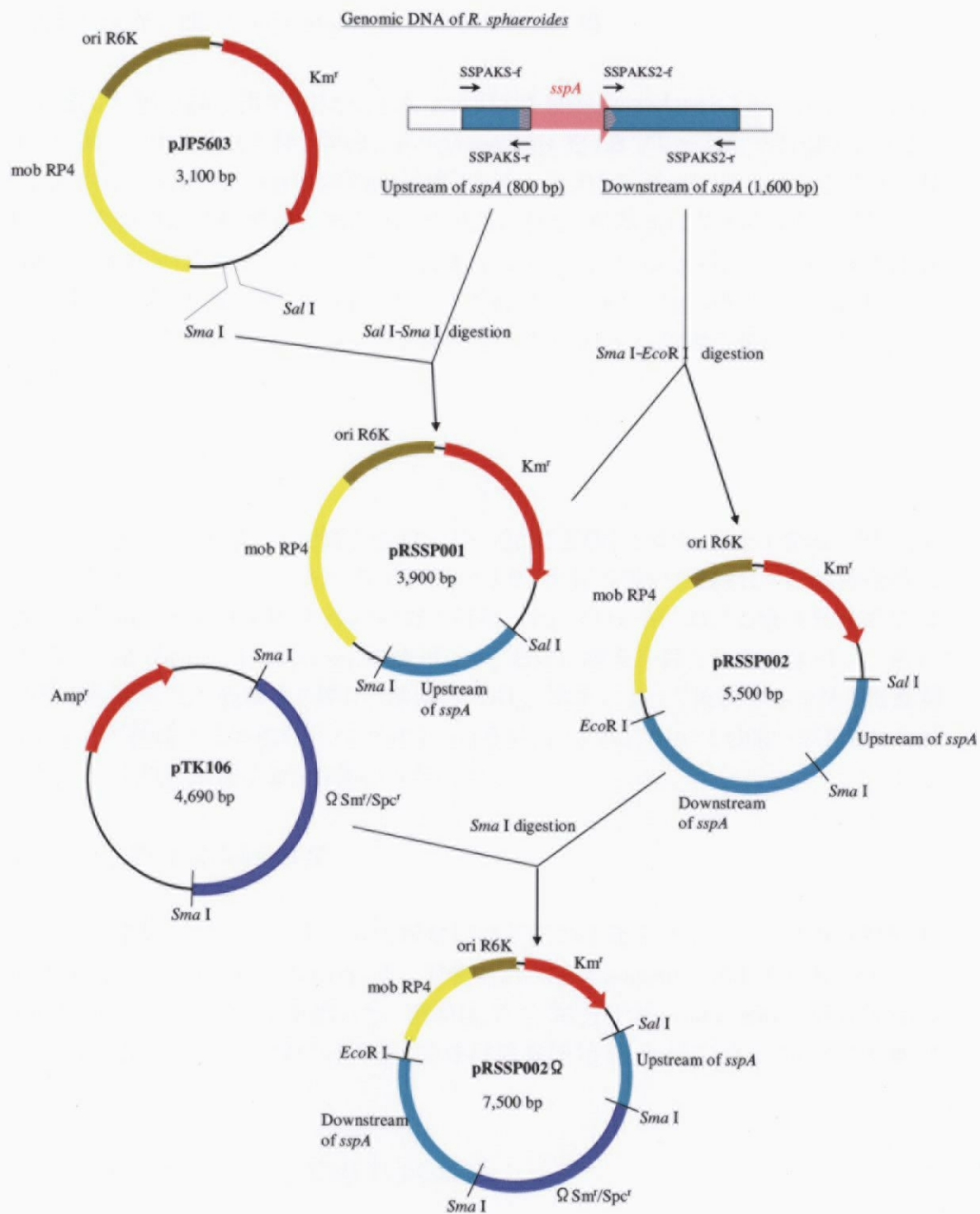


Fig. 5-2 Construction scheme of pRSSP002 Ω , which is transferred into *R. sphaeroides* cells.

5.2.2.2 接合伝達 (Conjugation) 法による相同組み換え

作製した組み換え用プラスミドは *E. coli* S17-1 lysogenized with λ_{pir} (De Lorenzo *et al.*, 1990) に保持させた後、同株と *R. sphaeroides* を LB プレート上で固相接合させることにより、*R. sphaeroides* の細胞内に導入した。このうち、 Spc^r , Km^s である二重交叉株が目的の遺伝子破壊株である可能性が高いため、単離後にゲノム DNA を抽出し、ORF の周辺を DNA シーケンサによる配列を読むことにより *sspA* 遺伝子の欠損を確認した。同時に野生株と同株を NaCl ストレス条件下で培養し、菌体破碎後、SspA 抗体によるウェスタン解析を行ない、タンパク質レベルでも SspA は誘導合成していないことを確認した。

5.2.3 菌体の培養

sspA 遺伝子が欠損した影響を確認するべく、野生株と SSPA1 (*sspA* 遺伝子破壊株) を液体培養、およびプレート培養することにより、生育の違いを観察した。培養条件は嫌気光合成条件と好気暗条件の両方で行なった。プレートにおける嫌気光合成培養は Gas-Pak (Becton Dickinson) を使用して、完全に嫌気が保たれる状態とした。液体培養で生育変化を観察する際に、菌体の OD_{660} 測定によって確認する方法と重量測定によって確認する方法の二つが考えられるが、いずれにおいても違いが見られなかったため、 OD_{660} 測定による結果のみを示す。

5.2.4 光学顕微鏡による観察

光学顕微鏡を用いた菌体の形状観察には下記の装置を使用した。光学顕微鏡として Olympus BX52 (OLYMPUS) を、対物レンズは UplanApo 100 x objective lens (OLYMPUS) を使用して観察した。画像は全て 微分干渉 (differential interference contrast; DIC) モードで取り込んだ。菌体は培養開始 96 h 後の静止期のものを観察した。

5.2.5 フローサイトメータ (FCM) による解析

FACSCalibur (Becton Dickinson) を用いて解析した。菌体は塩ストレス (4% NaCl) を誘導して静止期まで培養させたものを、前処理等を行わずそのまま測定した。FSC における電圧は信号を 10 倍にして出力する E01 で行い、細胞数は 5,000 で解析した。データの収集、解析には CellQuest を使用した。

5.2.6 電子顕微鏡による観察

5.2.6.1 菌体サンプルの固定

電子顕微鏡による観察は塩ストレスをかけたもののみ解析した。NaCl ストレス (培地 NaCl 濃度 2%) 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。

菌体サンプルをグルタルアルデヒド溶液 (3% グルタルアルデヒド 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グルタルアルデヒドを除去した。溶液を捨てて、PB で洗浄後、新たな PB 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、1% OsO₄ 溶液を加えて 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、10% sucrose in PB で洗浄後、室温、3 min 計 3 回振とうした。膜の染色を向上させるために、溶液をデカンテーションにより除いた後、3% 飽和酢酸ウラン溶液を加えて室温、30 min 振とうした。

5.2.6.2 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 振とうした (計 2 回)。

5.2.6.3 菌体サンプルの樹脂への包埋

サンプルと樹脂をなじませるために、プロピレンオキシドを 1 サンプルあたり 2 ml ずつ加え、室温、5 min 計 2 回振とうした。デカンテーションにより菌体のみ回収して Quetol-812 (エポン樹脂; 日新 EM) 19.4 ml、DDSA (硬化剤; 日新 EM) 9.6 ml、MNA (硬化剤; 日新 EM) 11 ml、DMP-30 (加速剤; 日新 EM) 0.6 ml を混合したエポン樹脂混合液を加えて、スターラーでよく攪拌した。エポン樹脂混合液とプロピレンオキシドを 1:1 となるように希釈した溶液を作製し、1 サンプルあたり 2 ml ずつ加えて室温、一

晩静置した。エポキシ樹脂混合液を 1 サンプルあたり 2 ml ずつ加えて室温、1 h 静置した。

サンプルを樹脂固定用容器に移し、45°C、12 h 静置した後、60°C、24 h、さらには 45°C、12 h 静置することにより樹脂を完全に硬化した。

この後の超薄切片の調製・電子顕微鏡観察の操作は 3 章で述べた方法と同様に行なった。

5.2.7 二次元電気泳動による解析

5.2.7.1 サンプル調製

二次元電気泳動による解析には塩ストレスをかけた菌体サンプルのみを使用した。NaCl ストレス（培地 NaCl 濃度 2%）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。外膜画分は、4 章で行なったショ糖密度勾配法により調製した。超遠心後の溶液のうち、外膜タンパク質を主に含んでいる下層の 2 ml を 2-D Clean-Up kit (Amersham Biosciences) を用いて濃縮した後、Rehydration solution [7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% w/v CHAPS, 0.5% IPG Buffer pH 4-7 (Amersham Biosciences), 40 mM Dithiothreitol] 100 μ l を加えて完全に可溶化して、電気泳動サンプルとした。

水溶性画分については、4 章で分画した水溶性画分約 10 ml アセトン沈殿の操作により濃縮した。操作としては、画分に 3 倍量 (30 ml) の冷アセトン (-20°C に冷却後に使用) を添加して、軽く攪拌後、-20°C で 2 h 放置した。これを 2,680 x *g*、4°C、5 min 遠心した後、沈殿を室温で風乾した。沈殿が完全に乾燥する前に Rehydration solution 500 μ l を加えて完全に可溶化して、電気泳動用サンプルとした。

5.2.7.2 一次元目等電点電気泳動

一次元目の分離システムとして IPGphor (Amersham Biosciences) を使用した。IPG ストリップホルダー、及び Immobiline DryStrip gel (pH 4-7) は 11 cm のものを使用した。ゲルの pH レンジが pH 3-10 のものも検討したが (data not shown)、分離が不十分であったこと、酸性側にタンパク質が集中していたことにより、レンジは常に pH 4-7 のものを使用した。サンプルは Bradford 法によりタンパク質濃度測定を行ない、銀染色する場合には総タンパク量が 40 μ g、クマシー染色する場合は 500 μ g となるように調製して添加した。泳動条件は、ゲル膨潤を 20°C、12 h 行なった後、500 V を 1 h、

1,000 V を 1 h、8,000 V を 1 h 50 min で行なった。電気泳動後のゲルは二次元目 SDS-PAGE を行なうまで -80°C に保存した。

5.2.7.3 二次元目 SDS-PAGE

-80°C に保存していたゲルに SDS 平衡化用バッファー 10 ml [50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6 M Urea, 30% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS, a trace amount of Bromophenol blue] を加えて室温で 15 min 振とうして平衡化した。

平衡化したゲルを二次元目ゲル (14.5%, 13 cm x 13 cm) の上面に置いて、アガロース溶液 (0.5% agarose, a trace amount of Bromophenol blue) で封入固定した後、ゲル 1 枚当たり定電流 40 mA で泳動した。電気泳動装置は 4 連式冷却型スラブゲル電気泳動装置 NA1119 (Nihon Eido) を使用した。

5.2.7.4 ゲル・メンブレンの染色

銀染色は 2D-銀染色試薬・II 「第一」 (Daiichikagaku) を用いて染色した。クマシー染色は、泳動の後のゲルを Semidry blotting system NA-1512 (Nihon Eido) (LeGendre *et al.*, 1988) により、Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore) に転写したものを染色した。各サンプルは最低 5 連で比較解析を行ない、目視して顕著に差異が認められたスポットのみ、シーケンサにより同定を行なった。

5.2.7.5 タンパク質の同定

誘導合成量の増減が見られたタンパク質は、クマシー染色した Membrane を切り取り、Edmann 分解法を原理とした気相シーケンサ Procise cLC (Applied Biosystems) により N 末端を決定した。各スポットの同定・解析は、得られた N 末端配列を元に、ゲノム情報が公開されている *R. sphaeroides* 2.4.1 の推定アミノ酸配列 (<http://mmg.uth.tmc.edu/sphaeroides/>)、BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) によるアミノ酸配列の相同性、SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>) によるシグナル配列解析を利用することによる、全アミノ酸配列、細胞内局在、機能を推測した。

5.2.8 菌体内トレハロース量測定

本実験における *R. sphaeroides* の培養条件に関しては、*sspA* 遺伝子を破壊しても NaCl に対する生育変化が見られなかった嫌気光合成条件では培地 NaCl 濃度を 4%

(0.68 M)、NaCl ストレスにより生育が大きく阻害された好気暗条件では培地 NaCl 濃度を 2% (0.34 M) として、菌体が十分な量回収できる条件でストレスを誘導した。

また、通常の培養の際に添加している Yeast extract は成分中にトレハロースを含有している。そのため、*R. sphaeroides* は培地成分に含まれるトレハロースを生体内に取り込んで適合溶質として利用することも可能である。本実験では生体内で生合成したトレハロース量の違いを確認することを目的としているため、今回測定した菌体サンプルは全て培地中に Yeast extract を添加せずに培養した。

一方、菌体湿重量 1 g あたりに添加する抽出溶媒量 (80% アセトニトリル) を一定にして菌体内トレハロースを抽出した。二糖類であるトレハロースは特徴的な紫外吸収波長を持たないため、HPLC による検出には光学示差屈折計を使用した。以上の培養、測定条件を考慮した実験条件は下記の通りである。

NaCl ストレス条件下で培養した静止期の菌体を 4°C、18,500 x g、5 min 遠心して集菌した後、菌体 1 g あたり 80% アセトニトリル 5 ml を加えて懸濁した。Ultrasonicator (IKA) で 60 W、30 s 超音波破碎して、100°C、5 min 加熱した後、4°C、18,500 x g、20 min 遠心してタンパク質を除去した。上清を 0.20 μ m フィルター (Minisart-RC4; Sartorius) にかけたものを HPLC 測定用サンプルとした。HPLC による測定は糖分析用カラム Shodex SUGAR SZ5532 カラム (6 mm x 150 mm)、ガードカラム SZ-G (4.6 mm x 10 mm) を直列に連結して、溶媒の 80% アセトニトリルを流速 1 ml/min で分析した。サンプル量は常に 10 μ l を注入し、検出は示差屈折計 RI 830 refractive index monitor (JASCO) を使用した。

実サンプルを測定する前に、市販のトレハロース二水和物 (Wako) を MilliQ 水に溶解させたものを用いて、1 mM~50 mM の範囲でトレハロース測定用検量線を作成した。

5.3 結果

5.3.1 *sspA* 遺伝子破壊株の作製

SspA はアミノ酸配列中のどの部位に機能を有しているのか分からないので、*sspA* 遺伝子を完全に抜いた後、 Ω Sm^r/Spc^r cassette (Penfold *et al.*, 1996) で組み換えた形の破壊株を作製した (Fig. 5-3)。

作製した組み換え用プラスミドは *E. coli* S17-1 lysogenized with λ pir (De Lorenzo *et al.*, 1990) に保持させた後、同株と *R. sphaeroides* を LB プレート上で固相接合させることにより、*R. sphaeroides* の細胞内に導入した。このうち、Spc^r、Km^s である二重交叉株が、目的である遺伝子破壊株である可能性が高いため、単離後にゲノム DNA を抽

出し、ORF の周辺を DNA シーケンサによる配列を読むことにより *sspA* 遺伝子の欠損を確認した。同時に野生株と同株を NaCl ストレス条件下で培養し、菌体破碎後、SspA 抗体によるウェスタン解析の結果、野生株には SspA のバンドが検出されたものの、欠損株ではバンドが検出されなかったため、遺伝子レベルだけでなく、タンパク質レベルでも SspA は誘導合成していないことが確認された (Fig. 5-4)。この株を SSPA1 株とした。

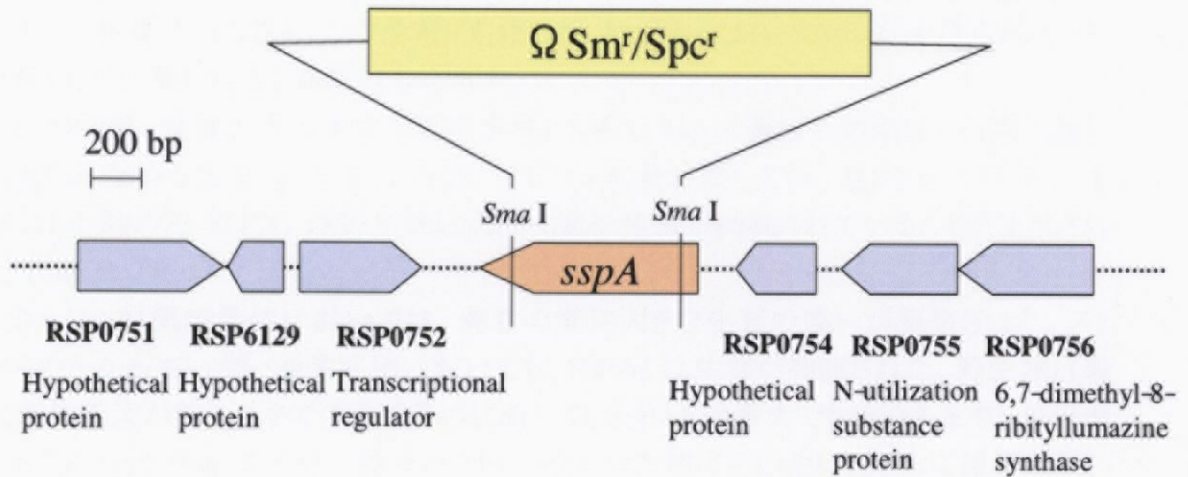


Fig. 5-3 Physical and genetic map of *R. sphaeroides sspA* regions. Insertion of Ω Sm^r/Spc^r cartridge is indicated.

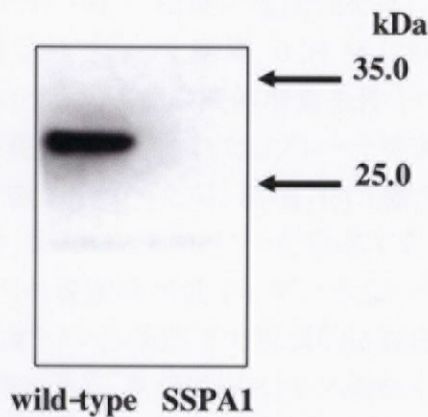


Fig. 5-4 Western blot analysis of cell lysates from wild type and *sspA*-deleted SSPA1 strains. Cells were cultured anaerobic condition in the NaCl-containing media, sonicated in NP-lysis buffer, and separated by SDS-PAGE. The same amount of protein (10 μ g) was loaded into each lane.

5.3.2 野生株と SSPA1 の生育の比較解析

sspA 遺伝子が欠損した影響を明らかにするべく、野生株と SSPA1 (*sspA* 遺伝子破壊株) を液体培養、およびプレート培養することにより、生育の違いを観察した。培養条件は嫌気光合成条件と好気暗条件で行なった。プレートにおける嫌気光合成培養は Gas-Pak (Becton Dickinson) を使用して、完全に嫌気が保たれる状態とした。液体培養で生育変化を観察する際に、菌体の OD 測定によって確認する方法と重量測定によって確認する方法の二つが考えられるが、いずれにおいても違いが見られなかったため、OD 測定による結果のみを示す。

その結果、嫌気光合成条件では野生株と SSPA1 (*sspA* 遺伝子破壊株) の間に違いは見られなかった (Fig. 5-5)。一方、プレート培養に関しては、塩ストレス (NaCl) を添加した時のみ SSPA1 は野生株に比べて若干生育が抑制されていることが見出された (Fig. 5-7A)。

さらに、好気暗条件においては、両者の間に大きな生育の違いが観察された。ストレスのかかっていない通常培地においても、SSPA1 は生育が抑制された。野生株は最大菌体濁度が約 1.0 まで到達するのに対して、SSPA1 は最大でも約 0.7 までしか到達できなかった (Fig. 5-6A)。様々なストレスをかけた時にその違いはさらに顕著に現われた (Fig. 5-6)。Sorbitol を用いた浸透圧ストレス (Fig. 5-6B)、pH を 6.0 条件で培養した酸性ストレス (data not shown) においては、SSPA1 は生育がしばらく抑制された後生育を開始して、最終的に野生株と同じ最大菌体濁度に到達する現象が観察された。さらに、決定的な違いは塩ストレス条件下で生育させた時に現われた。SSPA1 は NaCl や KCl を 0.68 M (4%) 添加した培地では全く生育することができなくなった (Fig. 5-6C, D)。そのため、SSPA1 がどの程度の塩耐性を有しているのかを明らかにするべく、培地 NaCl 濃度を低下させていった結果、0.34 M (2%) になって初めて生育が可能になった。また、好気におけるすべての液体培養条件下で、培養開始 6 h 程度から肉眼でも観察できる菌体の凝集が観察された。プレート培養においては野生株、SSPA1 共に液体培養よりも塩耐能が低かったが、培地 NaCl 濃度が 0.34 M (2%) において野生株は生育できたものの、SSPA1 はコロニーを形成することができなかった。このことから、プレート培養においても塩耐性が低下していることが明らかになった (Fig. 5-7B)。3章において、SspA は塩ストレス条件下で特異的に誘導合成されることを明らかにした。この結果を合わせて考えると、本菌は塩ストレス耐性を高めるために SspA を誘導合成し、それによって耐塩性を獲得していると考えられる。

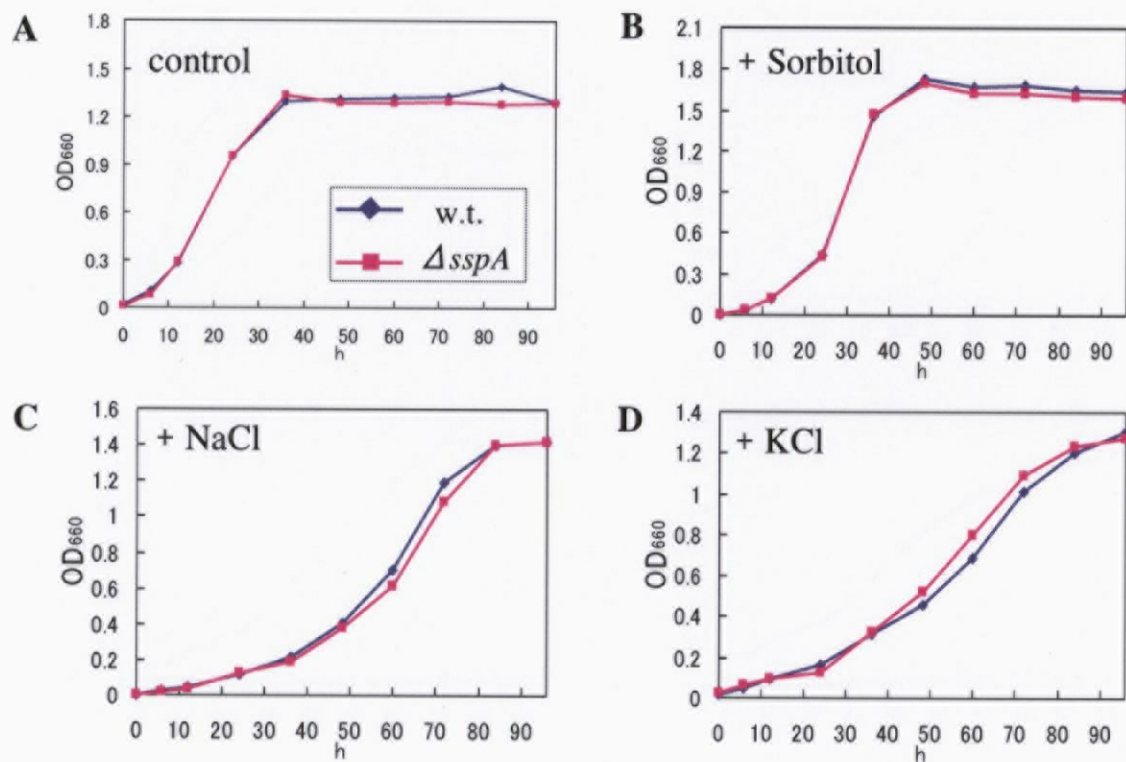


Fig. 5-5 Growth profiles of wild-type and *sspA*-deleted SSPA1 under anaerobic photosynthesis conditions. Wild-type and SSPA1 in the control condition (A), in the sorbitol-containing media (B), in the NaCl-containing media (C), wild-type in the KCl-containing media (D).

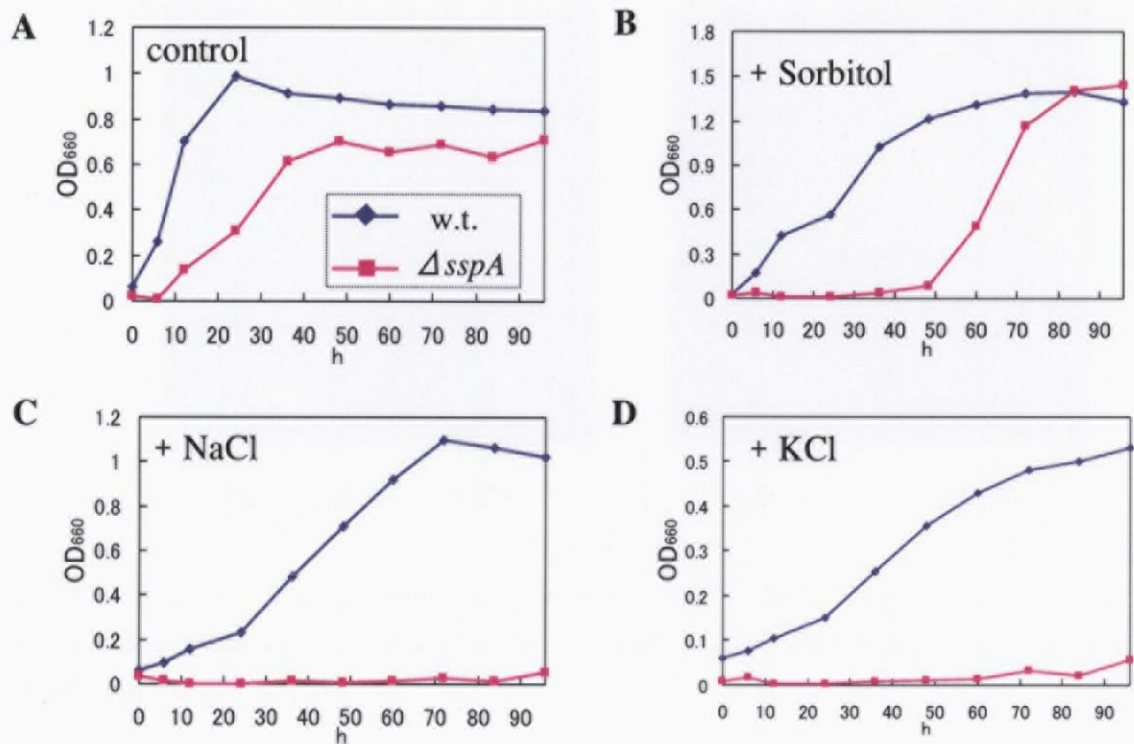
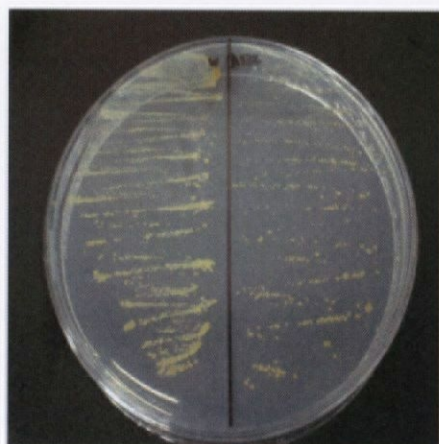
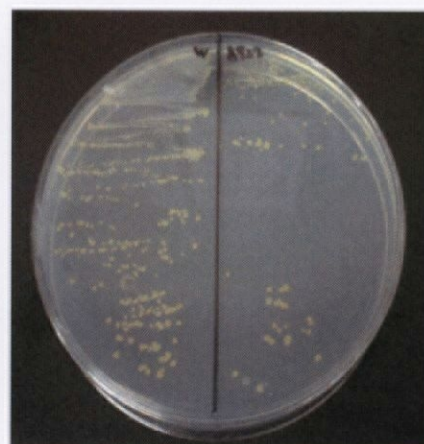


Fig. 5-6 Growth profiles of wild-type and *sspA*-deleted SSPA1 under aerobic dark conditions. Wild-type and SSPA1 in the control condition (A), in the sorbitol-containing media (B), in the NaCl-containing media (C), wild-type in the KCl-containing media (D).

A

wild-type

SSPA1

B

wild-type

SSPA1

Fig. 5-7 Phenotypic change of the *R. sphaeroides* SSPA1 strain on plate culture under salt-stressed (with addition of 2% NaCl) anaerobic photosynthesis condition (A), and aerobic dark condition (B).

5.3.3 野生株と SSPA1 の光学顕微鏡による観察

好気条件における生育の比較解析の結果、SSPA1 はいずれの条件においても、野生株に比べて菌体が集まって浮遊している様子が肉眼でも観察できた。特に NaCl ストレス条件下では、凝集がより顕著になり沈殿する菌体も観察された (Fig. 5-8A)。これは菌体に何らかの形状変化が起こっているのではないかと考え、まずは光学顕微鏡で形状変化を観察することにした。

その結果、野生株では通常条件でも、塩ストレス条件下でも菌体の凝集体は観察されなかった (Fig. 5-8B)。一方、SSPA1 株は嫌気光合成条件においても (data not shown)、好気暗条件においても (Fig. 5-8B)、10-20 程度の菌体が凝集体を形成している様子が観察された。さらに菌体の生育が大きく抑制された好気塩ストレス条件 (0.68 M NaCl 添加) では、無数の菌体が凝集体を形成している現象が観察された (Fig. 5-8B)。形成された凝集体を通常培地に戻すと、速やかに破壊株を通常培地に培養した時と同レベルの OD_{600} が 0.7 程度まで上昇した。また、凝集体の外側の菌体をはじめ多数の菌体は動いていたため、菌体が完全に死ぬことによって形成された凝集ではないことが推測された。培養試験管の形状や振とう角度 (垂直・水平)、振とう速度を変化させても同様の現象が観察された。この凝集は手やボルテックスミキサーによる振とうで容易に拡散し、しばらく培養を継続すると再度凝集を生じるレベルの弱い結びつきによるものであった。

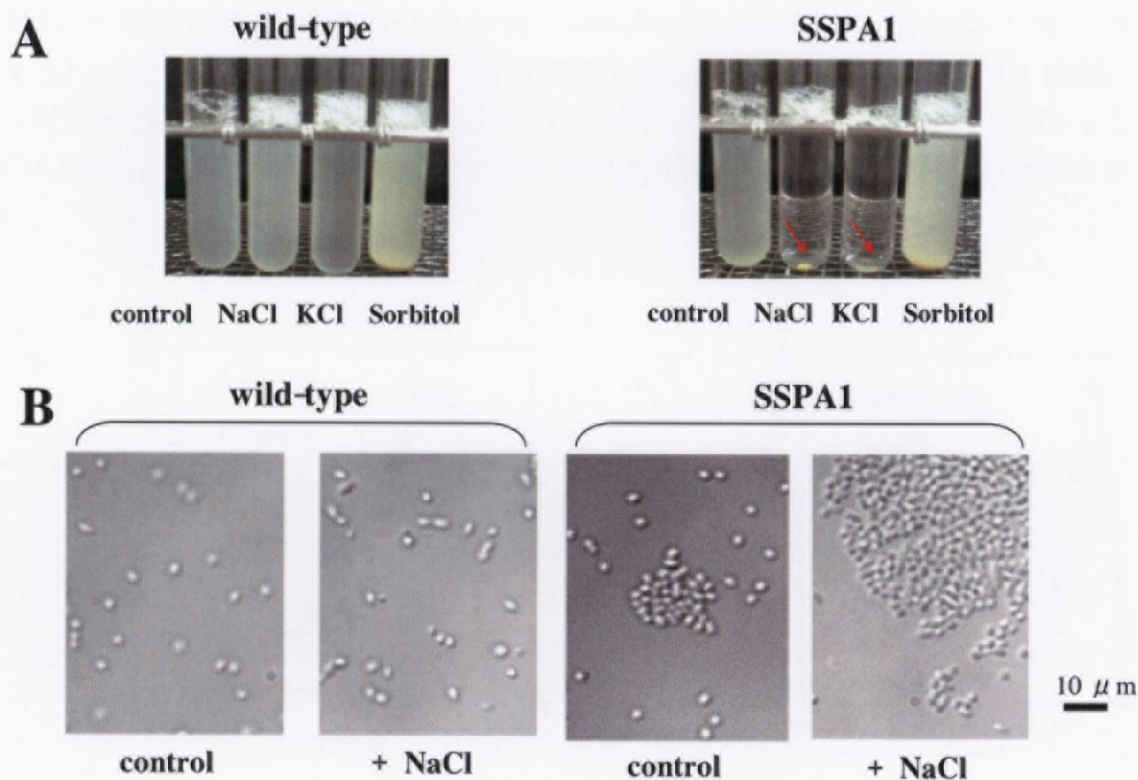


Fig. 5-8 Wild-type and SSPA1 strains cultured under aerobic dark conditions. (A) A stationary-phase culture of wild type and SSPA1 under indicated conditions. (B) Wild type and SSPA1 strains were grown under aerobic condition in the normal (left) and NaCl-containing media (right). Cells were observed at an early-exponential phase. Red arrows indicate cell's precipitation formed by their cohesion. Bars, 10 μ m.

5.3.4 野生株と SSPA1 のフローサイトメータ (FCM) による解析

SSPA1 が形成する凝集体は菌体の形状変化によるものではないかと考え、フローサイトメータによって嫌気光合成、好気暗条件の両条件下で、菌体形状の変化を観察した。

解析の結果、嫌気光合成条件下では塩ストレスの有無に関わらず、野生株と SSPA1 の間に変化は見られなかった (data not shown)。一方、好気暗条件のサンプルに関しては、塩ストレスの有無にかかわらず、野生株と SSPA1 の間で細胞の表面積または

大きさにほぼ比例する前方散乱光 (FSC) の形状に変化は見られなかった (Fig. 5-9 A, B)。一方、細胞の顆粒性状、内部構造にほぼ比例する側方散乱光 (SSC) に関して野生株と比べて、SSPA1で減少していることが明らかになった (Fig. 5-9 C, D)。このことから、SSPA1 は野生株に比べて内部構造が希薄になっていることが示唆された。

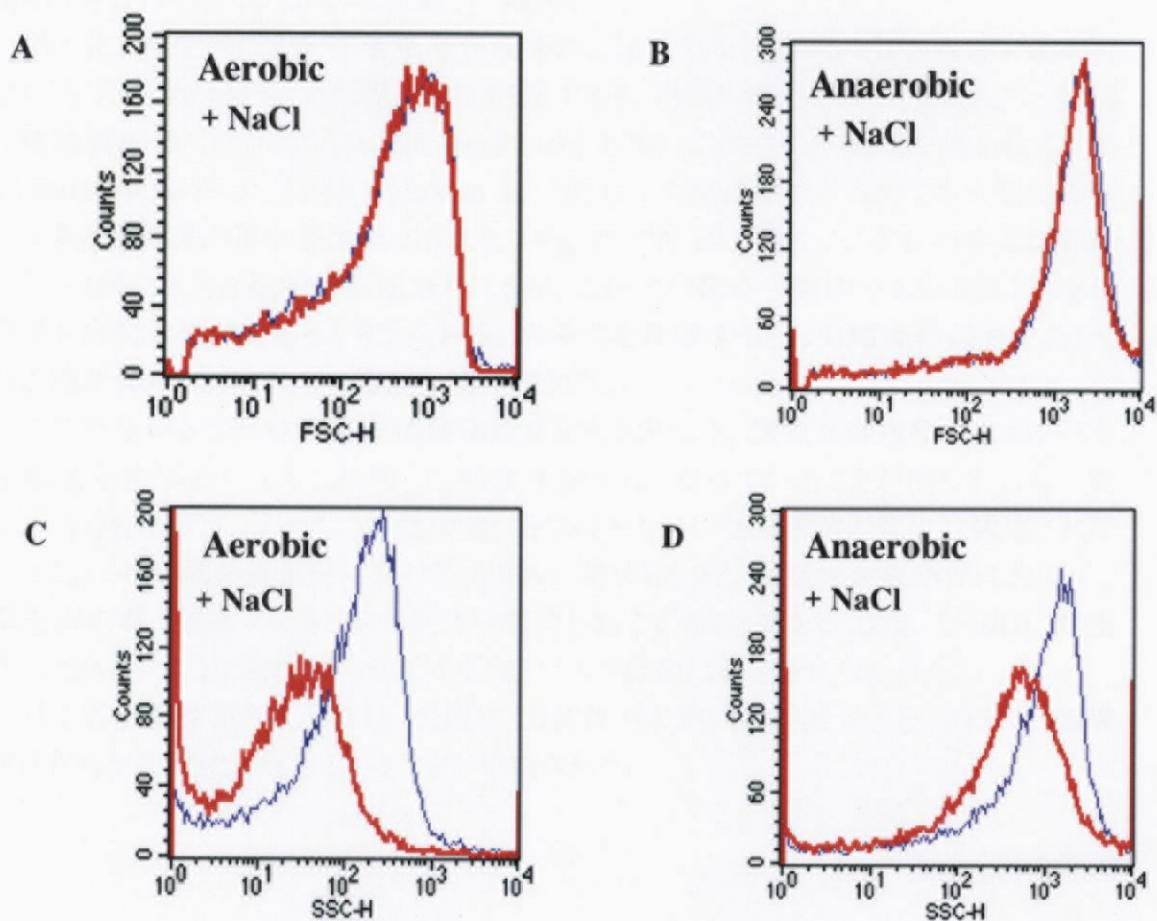


Fig. 5-9 Differential analysis of FSC (proportional to cell size) and SSC (proportional to intracellular compositions) between wild-type (Blue line) and SSPA1 strain (Red line) under salt-stressed (4% NaCl) anaerobic photosynthesis condition (A; FSC, C; SSC) and under salt-stressed (4% NaCl) anaerobic photosynthesis condition (B; FSC, D; SSC) by flow cytometry.

5.3.5 野生株と SSPA1 の電子顕微鏡による観察

光学顕微鏡による観察によって、SSPA1 には何らかの形状・形態変化が起こっていることが予測された。さらに詳細に菌体の形状を観察するべく、電子顕微鏡を用いてその変化を捉えることにした。その際に、SspA が局在している外膜を中心とした膜構造にどのような影響が及んでいくのかを中心に解析した。そのため、膜構造が鮮明に確認できる OsO₄ により菌体を固定して観察した。

第一に、野生株において嫌気光合成条件と好気暗条件の間の菌体構造変化を観察した。*R. sphaeroides* を嫌気条件で培養すると、内膜の構造が大きく変化して、胞状の細胞質内膜 (Intracytoplasmic membrane; ICM) が形成されることが知られている (Zeilstra-ryalls *et al.*, 1998; Chory *et al.*, 1984)。今回の結果においても小型の胞状体である細胞質内膜が多数見出された (Fig. 5-10A, B)。また、いずれの条件においても、一部に大きな胞状体が観察されるが、これは代謝の中間体であるポリヒドロキシ酪酸を含む構造体であると考えられる。両条件を比較すると好気暗条件の方でより大型の胞状体が形成されていることが観察された。

次に野生株と SSPA1 の間の菌体構造変化を比較した。嫌気光合成条件においても、好気暗条件においても、共通して胞状体が少なくなっていることが明らかになった (Fig. 5-10, 5-11)。しかし、細胞構造、特に注目していた膜構造の変化は観察されなかった。一方、両培養条件における SSPA1 間の違いは、嫌気光合成条件において、膜周辺に電子密度の高い部分が複数形成されていることである (Fig. 5-10D)。野生株に見られたような胞状体のサイズ変化といった現象は観察されなかった。

以上の観察結果より、*sspA* の欠損により菌体内の胞状体が減少する、つまり内部構造に何らかの変化が起きていることが示唆された。

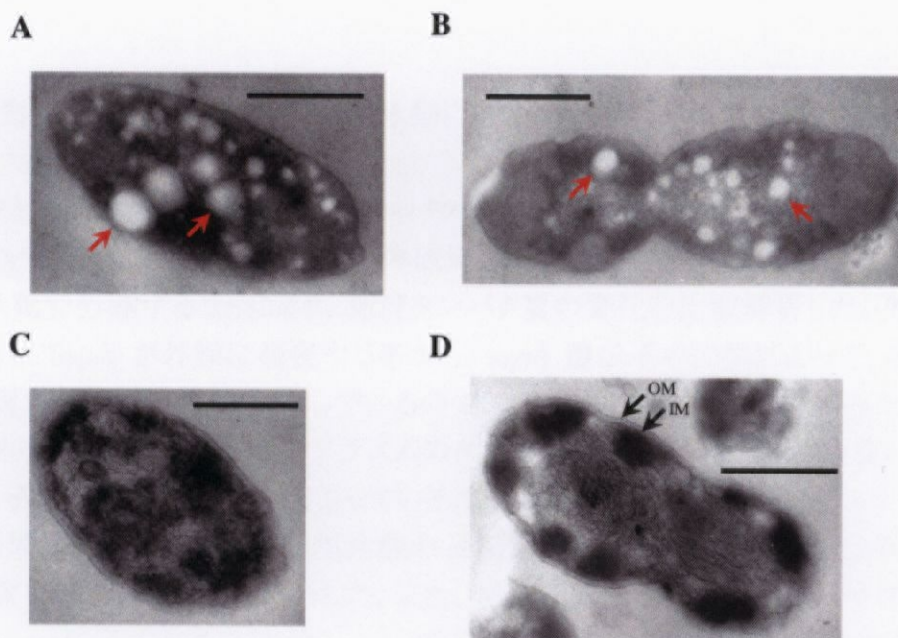


Fig. 5-10 Electron micrographs of a thin section of wild-type (A, B) and SSPA1 (*sspA*-deletion mutant) (C, D) grown under anaerobic photosynthesis salt-stressed (2% NaCl in culture medium) conditions. Red arrow indicate vesicle structures supposed to be poly- β -hydroxybutyrate. Bars indicate 0.5 μ m. OM; Outer membrane, IM; Inner membrane

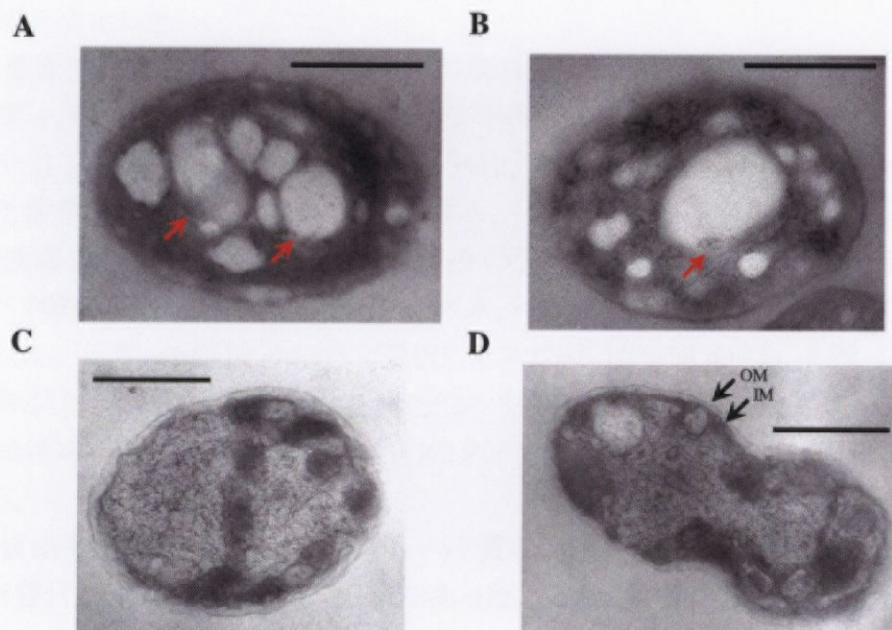


Fig. 5-11 Electron micrographs of a thin section of wild-type (A, B) and SSPA1 (*sspA*-deletion mutant) (C, D) grown under aerobic dark salt-stressed (2% NaCl in culture medium) conditions. Red arrows indicate vesicle structures supposed to be poly- β -hydroxybutyrate. Bars indicate 0.5 μ m. OM; Outer membrane, IM; Inner membrane

5.3.6 野生株と SSPA1 の二次元電気泳動によるタンパク質レベルでの比較解析

野生株と SSPA1 の間において、タンパク質発現レベルでどのような変化が起こっているのかを明らかにしようと考えた。菌体破碎液のうち、外膜画分と水溶性画分を二次元電気泳動で分離することにより、発現タンパク質の変化を比較解析した。外膜画分に関しては、SspA が外膜に局在する事から、*sspA* 遺伝子の欠損によって、他の外膜タンパク質に何らかの影響が及んでいるのではないかと考えて解析を試みた。一方、水溶性画分は主に細胞質とペリプラズムのタンパク質を多く含むため、生育に関連する重要因子の発現量に変化が起こっていることを想定して解析を試みた。

その結果、一次元目等電点電気泳動の pI 範囲を 4-7 に絞り込むことにより、良好にタンパク質を分離することに成功した。また、銀染色する場合には総タンパク量が 40 μ g、クマシー染色する場合は 500 μ g となるように調製してサンプル添加することにより、十分な比較解析ができるような条件とした。

このうち、多数のタンパク質が存在する水溶性画分はクマシー染色により検出し (Fig. 5-12, 5-13)、外膜画分についてはクマシー染色と銀染色の両方で検出した (Fig. 5-14, 5-15, 5-16) とともに野生株と SSPA1 のサンプルを各 5 枚以上泳動して、顕著に変動していることが明らかになったもののみを PVDF 膜に転写してシーケンサにより N 末端を決定した。

発現量変化の顕著であった各スポットの解析は、シーケンサで得られた N 末端配列を元にデータベース情報を活用して、全アミノ酸配列、細胞内局在、機能を推測した (Table 5-2)。なお、ゲルの泳動図 (Fig. 5-12, 5-13, 5-16) で示した番号と Table 5-1 で示した番号は同じタンパク質として表記する。

水溶性画分の中で選択したスポット 1~9 のうち、N 末端の配列から同定可能であったタンパク質の局在は細胞質かペリプラズム、つまり水溶性画分に局在していることが推測された。一方、外膜画分の中で選択したスポット 10~16 のうち、2 種 (スポット 13, 16) のみが外膜への局在が予測されるタンパク質であり、残りは他の部位に局在していることが示唆された。そのため、これらのタンパク質は他の部位から混入したものと考えられる。

細胞質由来で発現量が減少したタンパク質のうち、スポット 2 はアミノ酸代謝、スポット 3 は脂質代謝に関連するタンパク質であった。一方、発現量が増加したタンパク質のうち、スポット 5, 7, 8, 9 は糖質代謝に関連するタンパク質であり、スポット 10, 11, 13, 15 は物質輸送に関連するタンパク質であった。その他、スポット 6 (Ribosomal protein S32)、スポット 12 (alkene monooxygenase)、スポット 14 (Electron transfer protein)、スポット 16 (Probable serine protease) の発現量が増加していることが見出された。スポット 1, 4 に関しては、一部の配列は決定できたものの、ゲノム配列を元にした解析からは同定できなかった。菌株の差異 (*f. sp. denitrificans* と 2.4.1) に由来する可能性が高

いと考察される。

これらの結果から、*spsA* 遺伝子の欠損により、代謝全般や物質輸送に変化が生じている可能性が示唆された。しかし、目的としていた外膜タンパク質や生育に重要な因子の特徴的な変化や傾向を捉えることはできなかった。そのため、本法により *SspA* の機能を特定することは難しいと判断した。

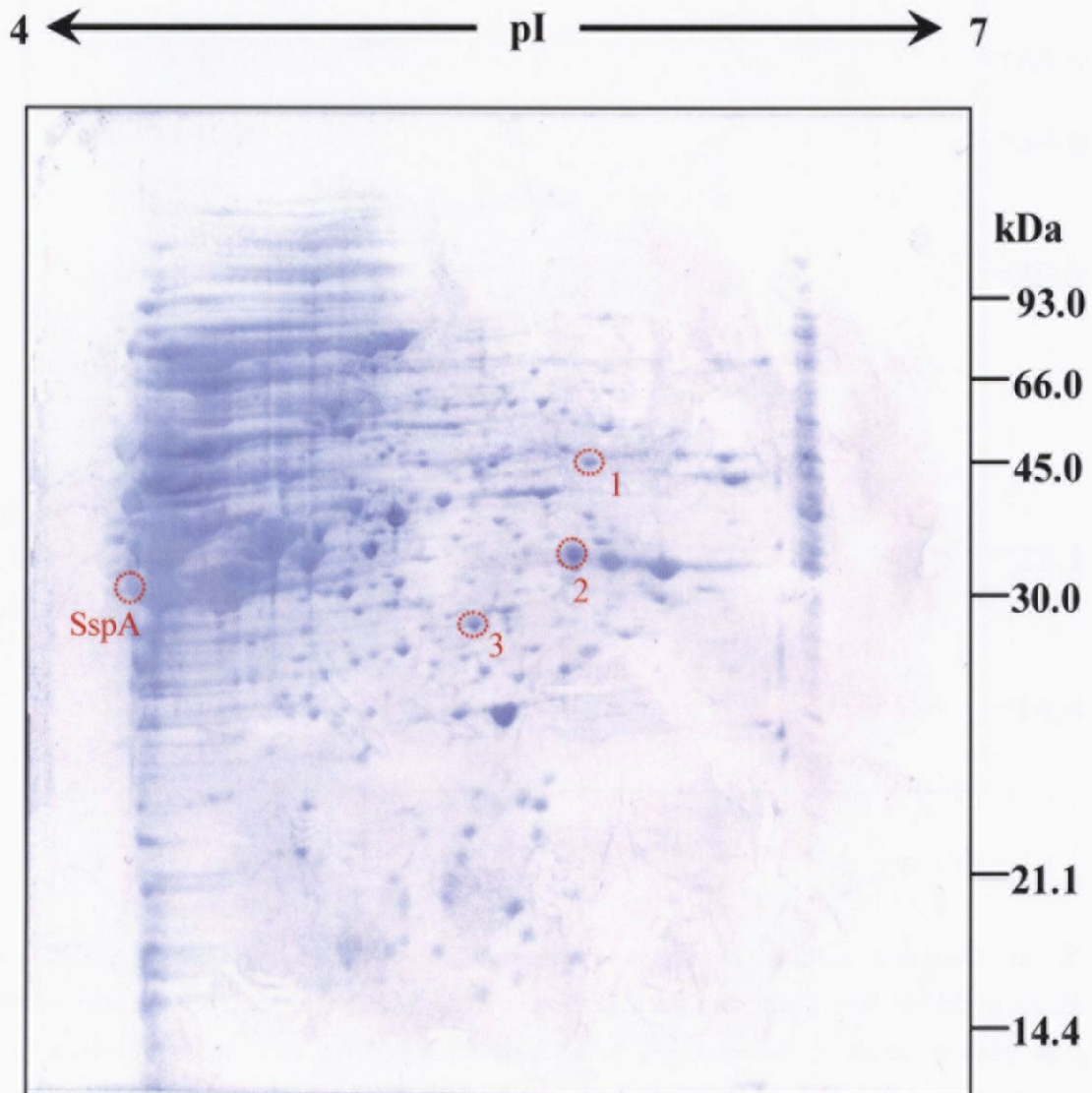


Fig. 5-12 Two-dimensional electrophoresis analysis of soluble fractions of *R. sphaeroides* (wild-type strain) grown under aerobic dark condition with addition of 2% NaCl in the medium. The gel was separated on pI 4-7 from left to right, stained with Coomassie brilliant blue. The approximate size of bands in kDa is indicated on the right. The identities assigned are listed in Table 5-2.

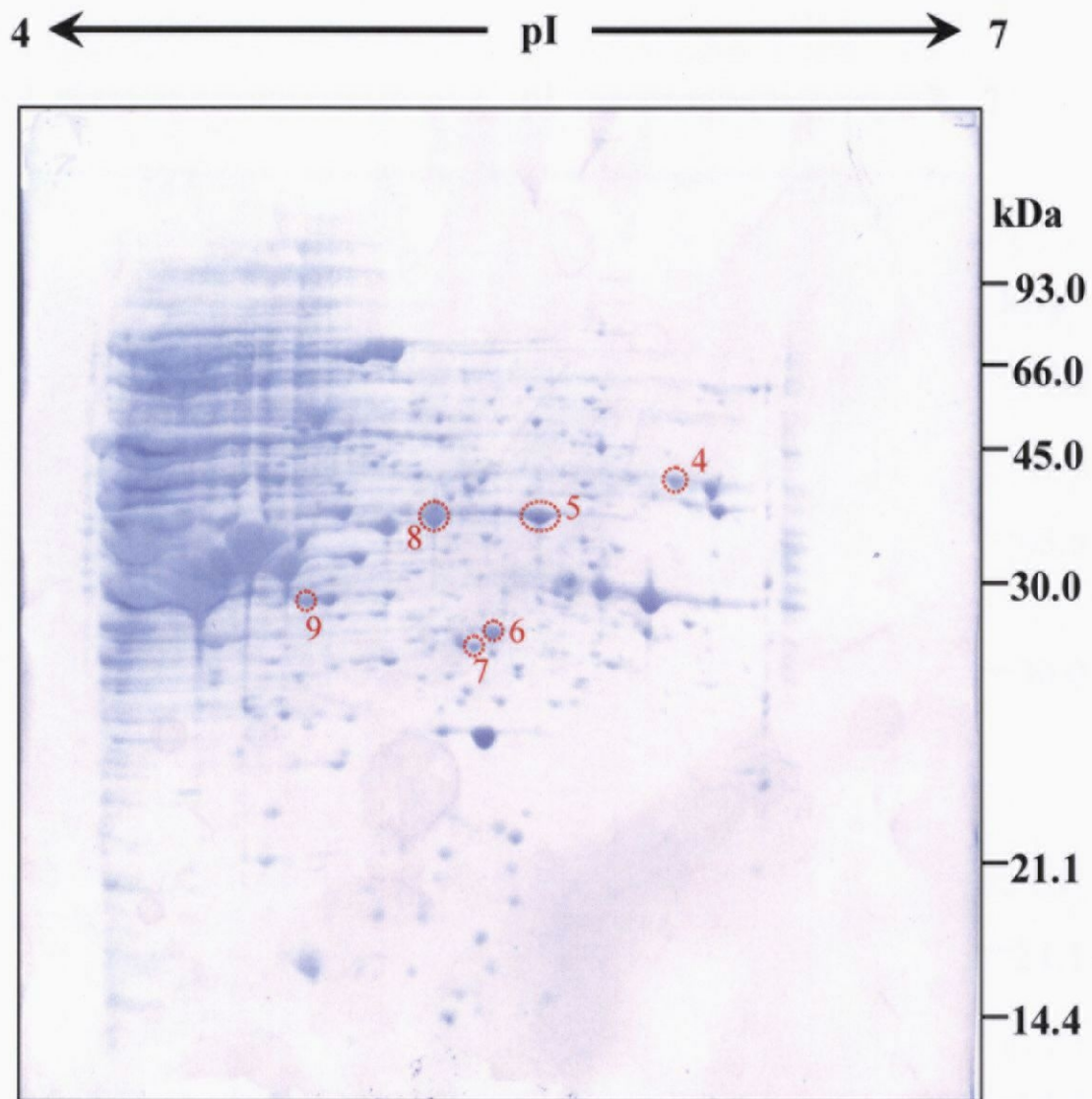


Fig. 5-13 Two-dimensional electrophoresis analysis of soluble fractions of *R. sphaeroides* (SSPA1 strain) grown under aerobic dark condition with addition of 2% NaCl in the medium. The gel was separated on pI 4-7 from left to right, stained with Coomassie brilliant blue. The approximate size of bands in kDa is indicated on the right. The identities assigned are listed in Table 5-2.

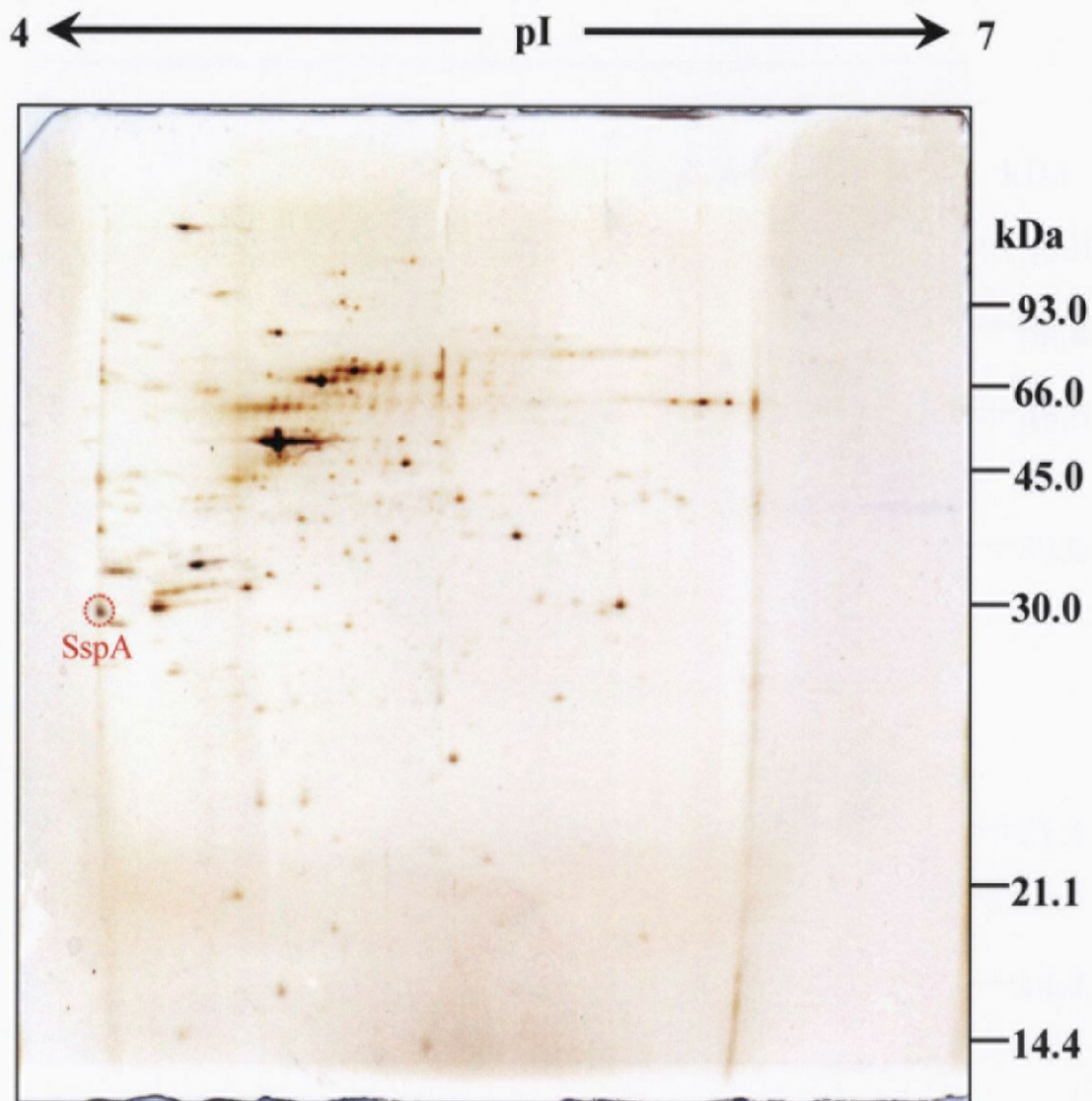


Fig. 5-14 Two-dimensional electrophoresis analysis of outer membrane (OM) protein-enriched fractions of *R. sphaeroides* (wild-type strain) grown under aerobic dark condition with addition of 2% NaCl in the medium. The gel was separated on pI 4-7 from left to right, stained with silver. The approximate size of bands in kDa is indicated on the right.

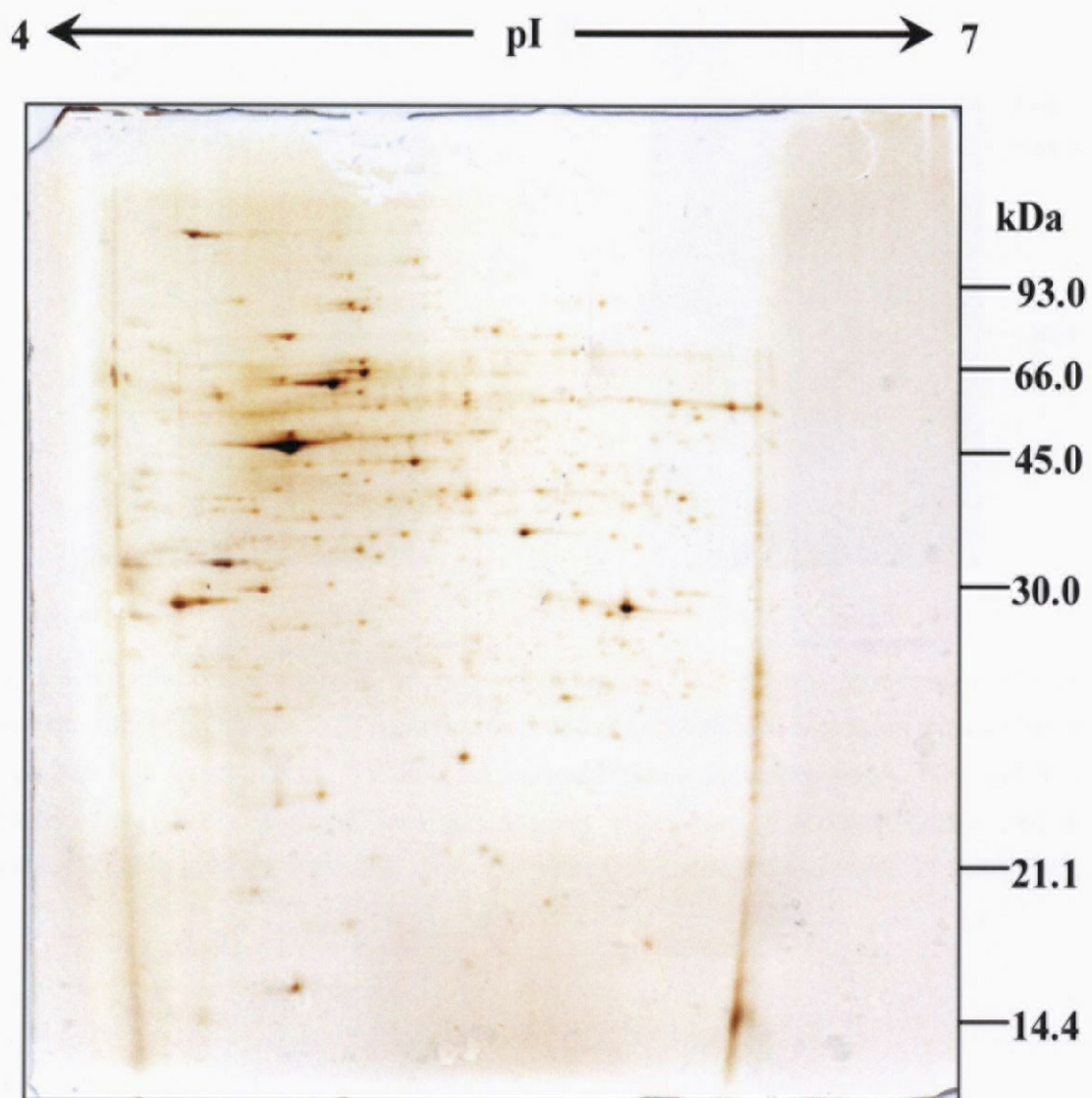


Fig. 5-15 Two-dimensional electrophoresis analysis of outer membrane (OM) protein-enriched fractions of *R. sphaeroides* (SSPA1 strain) grown under aerobic dark condition with addition of 2% NaCl in the medium. The gel was separated on pI 4-7 from left to right, stained with silver. The approximate size of bands in kDa is indicated on the right.

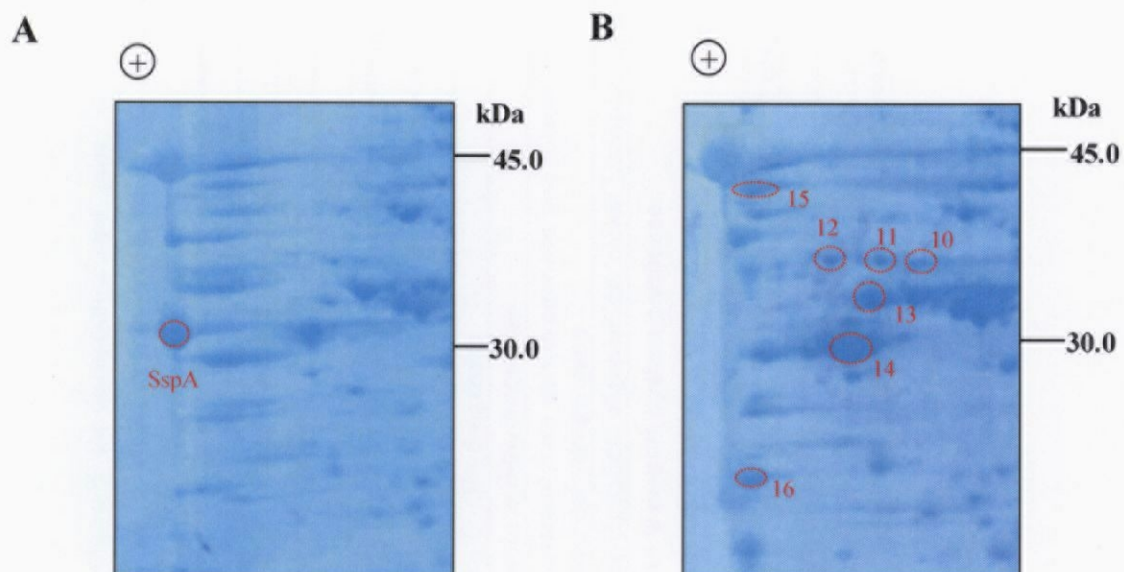


Fig. 5-16 Differential analysis of outer membrane (OM) protein-enriched fractions between wild-type (A) and SSPA1 (B) grown under aerobic dark condition with addition of 2% NaCl in the medium, focused on cationic range including SspA. The gel was separated on pI 4-7 from left to right, stained with silver. The approximate size of bands in kDa is indicated on the right. The identities assigned are listed in Table 5-2.

Table 5-2 N-terminal amino acids sequence and identification of proteins reduced or induced by the disruption of *sspA* gene

Spot No.	Mass obs. (kDa)	pI obs.	N-terminal sequence	% identity/ % similarity	AA length	Location	discription
Reduced protein	1	45	not identified	-			
	2	32	AGYDDRDGKIWMDC	100/100	306	Periplasm	Branched-chain amino acids aminotransferase
	3	32	EDAVKVLFAKLE	75/87	446	Cytoplasm	Acyl-CoA syntetases
	4	43	not identified	-			
Induced protein	5	40	MAERINRDTRGVY	100/100	308	Cytoplasm	Dihydrodipicolinate synthase/ <i>N</i> -acetylneuraminatase lyase
	6	27	MALPEFSVRQLLEA	92/100	253	Cytoplasm	Ribosomal protein S32 (small subunit)
	7	27	MDYRGIRVEEY	83/100	254	Cytoplasm	Gluconate 5-dehydrogenase
	8	40	MARPQIALIGAGT	100/100	320	Cytoplasm	Malate/lactate dehydrogenase
	9	28	MKIAFIGLGN	100/100	290	Cytoplasm	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase and related beta-hydroxyacid dehydrogenases
	10	38	EYYPGEGV	83/100	323	Inner membrane	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system
	11	38	NALEEDALVP	100/100	449	Inner membrane	Phosphate transport system permease ABC transporter protein
	12	38	ELEAALFPYD	75/75	560	Cytoplasm	Probable alkene monooxygenase alpha subunit
	13	38	EVEVNLRYGE	75/75	451	Outer membrane	Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport
	14	32	AVLLKAEVTG	90/90	308	Inner membrane	Electron transfer flavoprotein, alpha subunit
	15	43	EDVKLGI	100/100	254	Inner membrane	Leucine/Isoleucine/Valine-binding protein
	16	28	TMVGATLDFGN	75/100	254	Outer membrane	Probable outer membrane peptidase (Serine protease)

5.3.7 野生株と SSPA1 の適合溶質トレハロースの定量

R. sphaeroides は NaCl ストレス条件下において二糖類であるトレハロースを主要な適合溶質として蓄積することにより耐塩応答していることが確認されている (Xu *et al.*, 1998)。そのため、表現型観察の一環として、*sspA* 遺伝子を破壊したときに菌体内トレハロース蓄積量にどのような変化が起こるのかを検討した。分析手法としては、HPLC の検出に光学示差屈折計を用いる事により菌体内トレハロースを定量した。

5.3.7.1 野生株と SSPA1 の菌体内トレハロース量測定

本実験における *R. sphaeroides* の培養条件に関しては、*sspA* 遺伝子を破壊しても NaCl に対する生育変化が見られなかった嫌気光合成条件では培地 NaCl 濃度を 4% (0.68 M)、NaCl ストレスにより生育が大きく阻害された好気暗条件では培地 NaCl 濃度を 2% (0.34 M) として菌体が十分な量回収できる条件でストレスを誘導した。

実サンプルを測定する前に、市販のトレハロース 2 水和物を MilliQ 水に溶解させたものを用いて、トレハロース測定用検量線を作成した。その結果、トレハロースは約 15 min で溶出され、1 mM~50 mM の範囲で良好な検量線を作成することに成功した (Fig. 5-17)。

この検量線をもとに野生株、及び SSPA1 の菌体内トレハロースを定量した。その結果、NaCl ストレスを誘導していない条件では、嫌気光合成条件、好気暗条件共に、トレハロースは全く検出されなかった (data not shown)。培養条件で蓄積量を比較すると、塩ストレス強度が異なるため、嫌気塩ストレス条件 (4% NaCl) に比べて、塩ストレス条件 (2% NaCl) では 10 分の 1 以下に減少していることが明らかになった (Fig. 5-18)。

一方、野生株と SSPA1 株の菌体内トレハロース量を比較定量したところ、嫌気塩ストレス条件では特に違いは見られなかった (Fig. 5-18A)。また、好気塩ストレス条件でも野生株と SSPA1 株の菌体内トレハロース量には大きな違いは見られなかった (Fig. 5-18B)。そのため、*sspA* 遺伝子の有無に依って、菌体内トレハロースの合成量が変化することはないことが明らかになった。

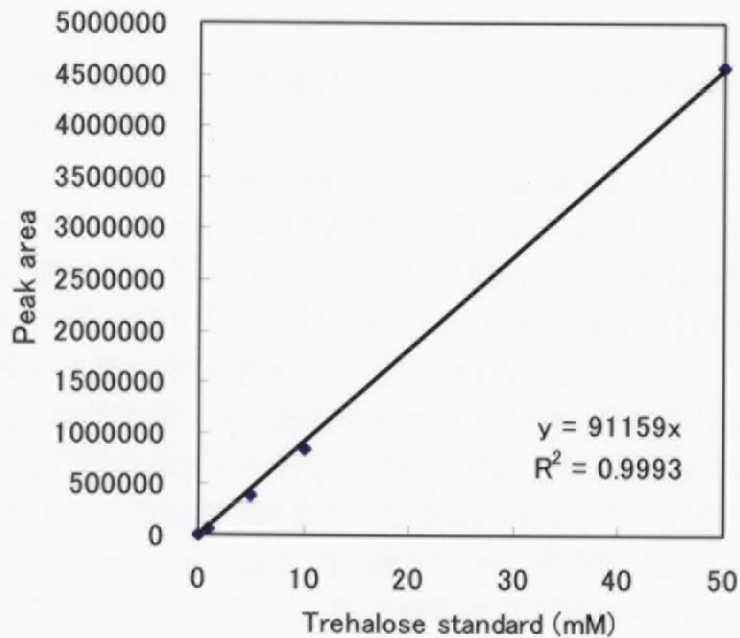


Fig. 5-17 Calibration curve of trehalose standard determined by refractive index monitor.

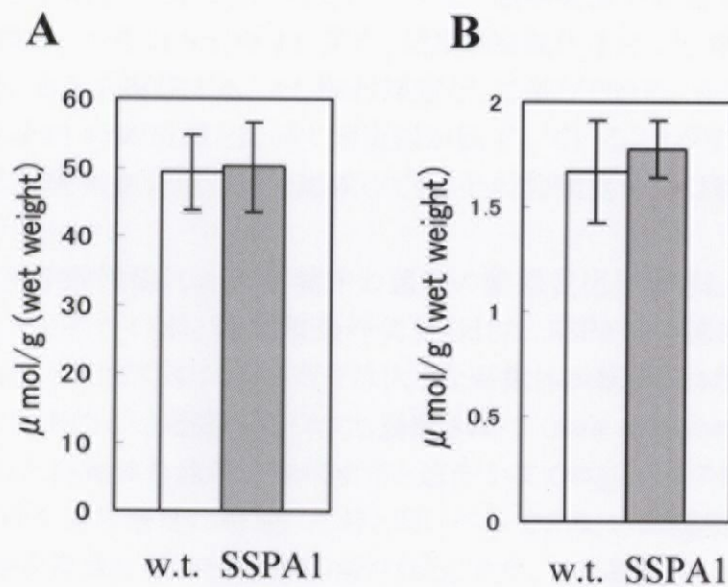


Fig. 5-18 Trehalose level between wild-type and SSPA1 under anaerobic photosynthesis condition (A), and under aerobic dark condition (B).

5.4 考察

SspA の生体内機能を探索するべく、*sspA* 遺伝子破壊株を作製してその表現型を野生株と比較解析した。

はじめに、接合伝達法を用いて *sspA* 遺伝子を完全に抜いた後、 Ω Sm^r/Spc^r cassette で組み換えた形の破壊株の作製を試みた (Fig. 5-3)。その結果取得した SSPA1 は遺伝子レベルだけでなく、タンパク質レベルでも SspA を誘導合成していないことがウェスタンにより明らかになった (Fig. 5-4)。本章では SSPA1 に関して、種々の手法を用いて野生株との表現型の違いを観察した。

第一に、生育の変化を比較解析した。その結果、嫌気光合成条件下では液体培養では変化が見られなかった (Fig. 5-5)。一方、プレート培養では塩ストレスを誘導した条件で若干の生育抑制が観察された (Fig. 5-7)。プレート培養においては、野生株でも塩耐性が培地 NaCl 濃度 2% (通常は 4%) まで低下していた。現段階では要因は明らかになっていない。さらに、好気暗条件下では、いくつかの顕著な変化が観察された。最も大きな変化は、破壊株に見られた生育の抑制である。液体培養で比較した結果、ストレスのない条件でも破壊株は野生株と同レベルの菌体濁度まで生育することができなかった (Fig. 5-6A)。さらに NaCl を培地に添加した塩ストレス条件下では、SSPA1 は生育が大きく抑制された (Fig. 5-6C and D)。塩ストレス以外のストレス条件では、好気条件下で Sorbitol を添加して培養すると、SSPA1 は培養開始からかなり遅れてから生育が始まり、野生株と同等レベルまで菌体濁度が到達する現象が観察された (Fig. 5-6B)。今後は Sorbitol も含め、炭素源を変化させて生育させた時にどのような変化が起こるかを観察することも検討課題として挙げられる。一方、プレート培養においても、SSPA1 は野生株と比べて耐塩能が低下していることが明らかになった (Fig. 5-7B)。また、嫌気光合成条件と比較しても、その抑制度合いは若干高いことが見出された。

第二に、光学顕微鏡により、培養中の菌体の動態変化を観察した。その結果、最も大きな変化であったのが、好気暗条件下で見られた SSPA1 の菌体凝集である (Fig. 5-8B)。特に、NaCl ストレス条件下では大きな凝集体が観察された (Fig. 5-8B)。同様の凝集体は KCl による塩ストレスでも観察された (data not shown)。興味深いことに、形成された凝集体を通常培地に戻すと速やかに OD₆₆₀ が 0.7 程度まで上昇する。これは破壊株を通常培地に培養した時と同レベルであり、この凝集体が細胞死ではなく、生育抑制を意味していることが示唆される。また、この凝集体は培養開始から数時間という生育の初期段階で形成されることから、*sspA* 遺伝子の欠損がただちに菌体に重大な影響を与え、その結果生育抑制が起こっていることが予測される。

三番目として、フローサイトメータを用いて細胞構造の変化について比較解析した。

その結果、SSPA1 は塩ストレス条件下で、菌体の大きさに変化はないものの、内部構造が変化していることが明らかになった (Fig. 5-9)。

四番目として、電子顕微鏡による観察により、膜構造の変化を解析した。その結果、FACS の結果で示された知見と同様に内部構造が変化していることが明らかになった (Fig. 5-10, 5-11)。現段階では代謝変化によるのか、菌体構造の変化によるものなのか判断できないが、*sspA* の欠損により細胞内で何らかの変化が生じている可能性も考えられる。

そのため、五番目として、*sspA* を欠損させたときのタンパク質発現レベルでの差異を解析するべく、二次元電気泳動を用いて野生株と SSPA1 の比較解析を行なった。これまでに得られた知見から、SSPA1 で見られた内部構造変化がタンパク質レベルで評価できないかと考えて分画を行なった後で比較解析する手法を試みた。このうち、SspA を含む外膜画分と代謝全般の特徴的な変化や傾向を捉えることを目標に、外膜画分と水溶性画分に注目して解析を行なった。分離条件に関しては、外膜タンパク質と水溶性タンパク質を主に含む画分に関して、一次元目の泳動条件や添加する総タンパク量を検討することにより、十分に比較解析が可能な分離を得ることに成功した。そのデータを元に野生株と SSPA1 を比較解析した結果、Table 5-2 に示されるように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った。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にくい微量の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ったと断定することはできない。

最後に、*R. sphaeroides* が塩ストレス条件下で適合溶質として生合成するトレハロースの蓄積量を測定した。その結果、塩ストレス条件で蓄積量を比較すると、嫌気光合成条件下に比べて、好気暗条件下では 10 分の 1 以下に減少していることが明らかになった (Fig. 5-18)。塩ストレス強度が異なるため一概には比較できないが、酸素の有無と塩耐性に相関関係があることも予測され、今後の検討課題として挙げられる。一方、野生株と SSPA1 の間のトレハロース蓄積量には大きな変化は観察されなかった (Fig. 5-18)。そのため、SspA の有無とトレハロースの蓄積には関連性が低いことが示唆された。

以上、*sspA* 遺伝子破壊株 (SSPA1) の作製および、その表現型に著しい変化を観察することに成功した。また、いくつかの方法論によりその影響は主に好気暗条件下で観察された。*R. sphaeroides* を含めた光合成細菌は、酸素の有無により多数の光合成因子を含む内膜構造が大きく変化することが知られている (Cohen-Bazire *et al.*,

1957)。酸素が存在すると、bacteriochlorophyll (*bch*)、carotenoid (*crt*)、light harvesting- II (*puc*) などの光合成関連遺伝子の発現が大きく抑制される事が知られており、また、これらの光合成因子が RegA-RegB と呼ばれる regulator に制御されている事も報告されている (Sganga *et al.*, 1992)。RegA-RegB は hydrogen utilization (Elsen *et al.*, 2000)、nitrogen fixation (Elsen *et al.*, 2000)、carbon fixation (Vichivanives *et al.*, 2000)、cytochrome biosynthesis (Swem *et al.*, 2002) といった多様な役割を果たすことが知られている。一方、酸素が存在する条件では、aa₃-type cytochrome c oxidase や一部の NADH-ubiquinone dehydrogenase、さらには catalase (*cat*)、superoxide dismutase (*sox*)、glutathione peroxidase の発現量が増加することが報告されている (Garcia-Horsman *et al.*, 1994; Pappas *et al.*, 2004)。そのため、*sspA* の欠損が、酸素に由来する細胞内構造や代謝系の変化と合わさって、生育変化や菌体の凝集、さらには内部構造の変化を引き起こした可能性も考えられる。しかし、今回解析した方法では SspA の具体的な機能解明には至らなかった。

以後の章では SspA の機能を直接的に解析するのではなく、相互作用している可能性のあるタンパク質、関連している遺伝子やタンパク質を調べることにより SspA の生体内機能を探索することにした。