

## 6 章 SspA と関連する因子の探索

### 6.1 序

局在解析や発現条件解析、さらには破壊株の表現観察により SspA の機能が徐々に明らかになってきた。これまでの章で述べてきたのは、野生株における SspA の役割、*sspA* 遺伝子破壊株の表現型観察など、実験手法としては直接的に SspA の機能を解明するという方向性で研究を進めてきた。本章では、研究の視点を変えて関連因子の探索、言い換えれば他の遺伝子やタンパク質に着目することにより、その関連性から SspA の機能を明らかにすることを試みた。手法としては以下の三種を選択した。

#### (1) 免疫沈降法による SspA と相互作用を持つタンパク質の解析 (6.3.1 参照)

SspA と細胞内で親和性の高いタンパク質を見出すべく、免疫沈降法を用いて解析を試みた。生体内で物理的に近い位置に存在するタンパク質や、塩ストレス応答の中で同じ機能を有しているタンパク質が同定できることを期待して解析を行なった。免疫沈降法は、抗体 (IgG) が抗原 (標的タンパク質、ここでは SspA) と特異的に結合することを利用する手法である。この方法によって SspA および、その SspA に結合する物質を菌体内から選択的に回収することにより SspA と相互作用を持つタンパク質を同定し、その情報から SspA の生理的機能を推定することを目的とした。SspA とごく微量に結合している成分も含め多種類のタンパク質を確実に分離検出することを目指して、二次元電気泳動を使用した。一方、SspA 以外のタンパク質と非特異的に吸着するタンパク質の存在も想定して、*sspA* 遺伝子破壊株 (SSPA1) においても同様の操作を行なって、検出されるタンパク質を野生株と比較解析した。

#### (2) SspA のシグナル応答上流因子の探索 (6.3.2 参照)

塩ストレスに応答したシグナル伝達における SspA の上流因子の探索を試みた。塩ストレス応答に関する研究は、ゲノム配列が解読された *Escherichia coli* (*E. coli*) や、*Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) *Synechocystis* sp. PCC6803 (*Synechocystis*) でも行なわれている (Marin *et al.*, 2003)。このうち、原核生物のみならず、植物や原生動物でも見つかっている環境応答シグナル伝達因子が Histidine kinases (Hiks) である。Hiks は浸透圧変化をはじめ、あらゆる環境因子の変化に伴ってセンサーとして機能していることが知られている (Nixon *et al.*, 1986; Hoch, 2000)。しかし、一つの生物中に多種類存在してファミリーを形成していること、種間での相同性がかなり低いことから、配列のみから同じ機能を持つセンサーを一つに推定することは難しい。また、*R.*

*sphaeroides* における Hiks については、その機能探索はほとんど進んでいないため、塩濃度センサーは分かっていない。Hiks はストレスを感知すると、Hik ドメインに存在するヒスチジン残基を自己リン酸化する。このリン酸基は response regulator に移行され、それに引き続き多数の遺伝子の発現が制御されることが知られている (Koretke *et al.*, 2000)。浸透圧変化に対する応答因子としては、*E. coli* の EnvZ-OmpR (Egger *et al.*, 1997)、KdpD-KdpE (Walderhaug *et al.*, 1992) や *Yeast* における Sln1p-Ssk1p (Maeda *et al.*, 1994) などが知られている。また、網羅的な Hiks 関連遺伝子破壊株作製および表現型観察研究により、塩ストレスに関する詳細な解析が進められている。このうち、*E. coli* における *rscC-yojN-rscB* (Takeda *et al.*, 2001)、*Synechocystis* の Hik16、Hik41、Hik33、Hik34 (Marin *et al.*, 2003) が塩ストレス応答における何らかのセンサーとして機能していることが推定されている。*rscC-yojN-rscB* は *E. coli* の夾膜におけるリポ多糖の生合成に関与する *cps* 遺伝子、細胞分裂に関与する *ftsAZ* 遺伝子、浸透圧応答遺伝子 *osmC* 遺伝子の発現を制御している (Davalos-Garcia *et al.*, 2001)。*rscC-yojN-rscB* のうち、*rscB* あるいは *yojN* 単独、または 3 遺伝子全てを破壊すると NaCl に対して高い感受性を示すことが確認されている (Zhou *et al.*, 2003)。*E. coli* 中に、NaCl に対して高い感受性を示す Hiks 遺伝子破壊株は他になく、他の遺伝子の制御も含め塩ストレスに対して重要な役割を果たしている可能性が考えられる。一方、*Synechocystis* の Hiks は上記のどの遺伝子を破壊しても NaCl に対して感受性を示さないものの、破壊時にいくつかの塩ストレス応答遺伝子の発現抑制が見られることから、塩ストレスのセンサー遺伝子の一部であると考えられている (Marin *et al.*, 2003)。

*R. sphaeroides* には 41 個の Hiks が存在することが、ゲノム情報の annotation から示唆されている。このうち、SspA の上流因子の候補として *E. coli* の *rscC-yojN-rscB* や *Synechocystis* の Hiks と配列の相同性の高い遺伝子 RSP3219、RSP3240、RSP2407、RSP2880 に着目することにした。*R. sphaeroides* もこれらの遺伝子は塩ストレス応答 Hiks と Table 6-1 に示したような遺伝子としての相同性を示す。Hiks は種間で約 20-50%、平均で 25%程度の相同性を示すことが知られている。これら 2 種の遺伝子を破壊することにより、破壊株が NaCl に対して感受性を示さないか (=塩ストレスのセンサーとして機能していないか)、あるいは *sspA* 遺伝子の発現が抑制されることはないか (=シグナル伝達における *sspA* の上流因子として働いていないか) を探索することにした。

Table 6-1 Histidine kinases (Hiks) in *R. sphaeroides* and their similarity to salt-stress associated gene sequences from database.

Mutant strain	Target ORF ID	Close similarity (% identity/% similarity)	E-value
RSPHik1	RSP3219	<i>Synechocystis</i> Hik16 (26/48)	9.00E-18
		<i>Synechocystis</i> Hik33 (30/52)	2.00E-21
		<i>Synechocystis</i> Hik34 (23/44)	0.003
		<i>E. coli rscC</i> (29/49)	7.00E-19
RSPHik2	RSP3240	<i>Synechocystis</i> Hik41 (26/44)	4.00E-31
		<i>E. coli rscC</i> (26/46)	2.00E-11
		<i>E. coli envZ</i> (24/44)	6.00E-16
	RSP2407	<i>Synechocystis</i> Hik16 (26/44)	7.00E-15
		<i>E. coli rscC</i> (35/49)	4.00E-26
		<i>E. coli yojN</i> (29/50)	3.00E-04
	RSP2880	<i>Synechocystis</i> Hik33 (31/49)	8.00E-23
		<i>E. coli rscC</i> (23/44)	4.00E-13

### (3) トレハロース合成遺伝子破壊株における SspA 発現量測定 (6.3.3 参照)

塩ストレスに応答して蓄積される適合溶質の合成系と SspA の間に何らかの関連性がないかを解析した。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などの特徴を持つため、細胞内に高濃度に蓄積されて、浸透圧調節に利用されている。また、タンパク質に対する保護作用があり、塩によるタンパク質の構造変化や活性部位の変化を抑制することが知られている (Diamant *et al.*, 2001)。*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)。

細菌のトレハロース合成経路として以下の三種の経路が知られている (Fig. 6-1)。第一が glucose-6-phosphate と UDP-glucose からトレハロースを合成する OtsA-OtsB 経路である。この経路は *E. coli* をはじめ原核生物で広く確認されており、*R. sphaeroides* においても主要経路であることが示唆されている (Makihara *et al.*, submitted)。第二が glycogen を最初の基質として利用する TreY-TreZ 経路である。この経路は *Arthrobacter* や *Rhizobium* spp. で確認されており、*R. sphaeroides* においても一部利用されていることが示唆されている (Makihara *et al.*, submitted)。最後が *Pimelobacter* sp. など確認されている TreS 経路である。*R. sphaeroides* のゲノム配列にはこの経路と相同性のある配列も確認されているが、TreS はトレハロース合成および分解の両方の活性を有していることが *in vitro* で報告されており、本菌においては合

成ではなく分解経路の一部である可能性も考えられている (Makihara *et al.*, submitted)。これらの遺伝子群のうち当研究室において *otsA*, *treS*, *treY* をクローニングして、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の accession no. AB189461 (*otsA*) , AB189462 (*treS*) , and AB189463 (*treY*) で登録している。

塩ストレス下での耐性獲得に大きく貢献しているトレハロースを蓄積できない株では SspA の果たす役割が大きくなるなどの変化が生じる可能性があるため、発現量が変化する可能性がある。そこで、本実験においてトレハロース合成ができない株 (トレハロース合成遺伝子破壊株) では、SspA の発現量変化が起こりうるのかを検討した。手法としては、ウェスタン解析により SspA の発現量変化を観察することにより、野生株とトレハロース合成遺伝子破壊株を比較解析した。これにより、前章6項に引き続き、SspA と適合溶質トレハロースとの関連性を評価した。

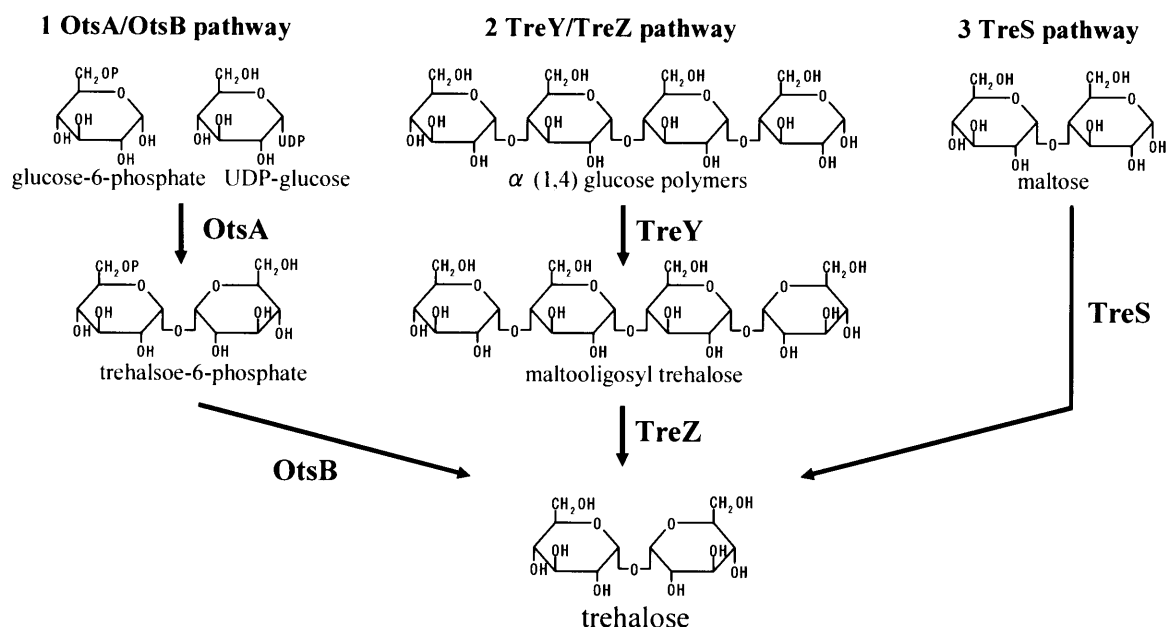


Fig. 6-1 Trehalose biosynthesis pathways identified in bacteria

## 6.2 材料と方法

### 6.2.1 菌株とプラスミド

本章で使用した菌株とプラスミドを Table 6-2 に示す。培養条件や培地成分は2章と同様の条件で行なった。

トレハロース合成遺伝子破壊株は、*otsA*, *treS*, *treY* の三重遺伝子破壊株を使用し

た。この株は NaCl ストレス条件下で培養しても菌体内からトレハロースが検出されないことが確認されている (Makihara *et al.*, submitted) 。トレハロース合成遺伝子破壊株は+3% NaCl, -Yeast extract の塩ストレス条件下で生育が阻害される (Makihara *et al.*, submitted) ものの、ウェスタン解析のために集菌して回収するには十分な菌体量が確保できるため、嫌気光合成条件、好気暗条件共に、培地 NaCl 濃度を 3% (0.68 M) としてストレスを誘導した。前項と同様に培地中に Yeast extract を除いた条件で行なった。

Table 6-2 Bacteria and plasmids used in this chapter

Strain or plasmid	Characteristic(s)	Source or reference
<i>E. coli</i>		
JM109 $\lambda$ pir	<i>endA1 recA1 gyrA96 hsdR17 supE44 <math>\lambda^-</math></i> $\Delta(lac-proAB)/F'$ [ <i>traD36 proAB' lacZ <math>\Delta</math> MI5</i> ] lysogenized with $\lambda$ pir bacteriophage	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
S17-1 $\lambda$ pir	Tp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> hsdR <i>pro recA</i> $\lambda$ pir 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
RSPHik1	IL106 $\Delta$ RSP3219:: $\Omega$ Sm <sup>r</sup> /Spc <sup>r</sup>	this study
RSPHik2	IL106 $\Delta$ RSP3240:: $\Omega$ Sm <sup>r</sup> /Spc <sup>r</sup>	this study
$\Delta$ <i>otsA</i> $\Delta$ <i>treY</i> $\Delta$ <i>treS</i>	$\Delta$ <i>otsA</i> :: $\Omega$ Sm <sup>r</sup> /Spc <sup>r</sup> / $\Delta$ <i>treY</i> / $\Delta$ <i>treS</i> : IL106 with deletion in the <i>otsA</i> , <i>treY</i> and <i>treS</i> ORFs and insertion of $\Omega$ Sm <sup>r</sup> /Spc <sup>r</sup> in the <i>otsA</i> ORF	Makihara <i>et al.</i> , submitted
Plasmids		
pT7Bluescript II	Ap <sup>r</sup> ; cloning vector	Stratagene
pJP5603	Km <sup>r</sup> ; R6K-based suicide vector	Penfold <i>et al.</i> , 1992
pHP45 $\Omega$	Ap <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> /Spc <sup>r</sup> ; source of Sm <sup>r</sup> /Spc <sup>r</sup> gene( $\Omega$ cassette)	Prentki <i>et al.</i> , 1984
pHIK101	pJP5603 with PCR fragment containing upstream of RSP3219	this study
pHIK102	pJP5603 with PCR fragment containing upstream and downstream of RSP3219	this study
pHIK201	pJP5603 with PCR fragment containing upstream of RSP3240	this study
pHIK202	pJP5603 with PCR fragment containing upstream and downstream of RSP3240	this study

## 6.2.2 免疫沈降法による相互作用を持つタンパク質の解析

### 6.2.2.1 サンプルの調製

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 18,500 x g、5 min 遠心することにより集菌した。これをリン酸バッファー (PB) で洗浄して培地成分を完全に除いたものをサンプルとした。サンプルは使用するまで -80°C に保存した。

-80°C に保存していた菌体 (約 1 g) に Homogenize solution (HS) [20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% (w/w) NonidetP-40, 4% (w/w) Protease inhibitor cocktail for bacterial use (Sigma-Aldrich)] 10 ml を加え、氷上で懸濁した。Ultrasonicator (IKA) を用いて、60 W、1 min 計 3 回超音波破碎し、4°C、18,500 x g、5 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。

### 6.2.2.2 ProteinA-Sepharose への吸収 (非特異的吸着成分の除去)

ProteinA-Sepharose (Sigma-Aldrich) 0.125 g に 1 ml HS を加えた後、4°C、18,500 x g、5 min 遠心してビーズを洗浄した。洗浄した ProteinA-Sepharose に 1 mg/ml BSA 含有 HS (BSA-HS) 200  $\mu$ l を加えて、ローテーターで 4°C、5 min 振とうした。その後 4°C、18,500 x g、1 min 遠心して、上清を除いた (計 3 回)。

破碎した菌体の上清 250  $\mu$ l を加え、ローテーターで 4°C、一晩振とうして、ProteinA や Sepharose Beads に非特異的に吸着する菌体成分を除去した。その後、4°C、18,500 x g、1 min 遠心して、上清を免疫沈降用サンプルとした。

### 6.2.2.3 ProteinA-Sepharose への SspA 抗体の吸着

ProteinA-Sepharose 0.025 g に BSA-HS 200  $\mu$ l を加えた後、ローテーターで 4°C、5 min 振とうした。その後 4°C、18,500 x g、1 min 遠心して、上清を除いた (計 2 回)。洗浄した ProteinA-Sepharose に BSA-HS 500  $\mu$ l、anti-SspA antiserum 5  $\mu$ l を加えて、ローテーターで 4°C、2 h 振とうした。4°C、18,500 x g、10 s 遠心して、抗体が吸着した ProteinA-Sepharose を回収した。ProteinA-Sepharose に BSA-HS 200  $\mu$ l を加えて、ローテーターで 4°C、5 min 振とうした。その後 4°C、18,500 x g、1 min 遠心して、上清を除いた (計 4 回)。

回収した ProteinA-Sepharose に BSA-HS 500  $\mu$ l を加えて免疫沈降に用いた。

#### 6.2.2.4 免疫沈降

6.2.2.2 で調製した菌体サンプルと、6.2.2.3 で作製した SspA 抗体結合 ProteinA-Sepharose を混合して、ローテーターで 4°C、1 h 振とうした。その後 4°C、18,500 x g、1 min 遠心して、上清を除いた。

沈降物に BSA-HS 200  $\mu$ l を加えて、ローテーターで 4°C、5 min 振とうした。その後 4°C、18,500 x g、1 min 遠心して、上清を除いた (計 2 回)。この沈降物に HS 200  $\mu$ l を加えて、ローテーターで 4°C、5 min 振とうした。その後 4°C、18,500 x g、1 min 遠心して、上清を除いた (計 2 回)。タンパク質を変性するべく、2% (v/v) SDS sample buffer 100  $\mu$ l を加えて、ボルテックスした後、100°C、5 min 加熱して免疫沈降物を溶解した。その後 4°C、18,500 x g、5 min 遠心後、上清を回収して電気泳動のサンプルとした。

#### 6.2.2.5 二次元電気泳動による検出

二次元電気泳動による分離、銀染色による検出の操作は 5 章と同様に行なった。

#### 6.2.3 RSP<sub>hik1</sub> (RSP3219 破壊株) の作製

*R. sphaeroides* のゲノム DNA を鋳型として、forward primer (HIK0101-f: 5'-GACGTCGACGTCTTCCTGCTCCGCATCCCGC-3') と reverse primer (HIK0102-r: 5'-ATACCCGGGCGACCGTCTGCGCGGTGCAGAA-3') を用いることにより *hik1* 遺伝子上流 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<sup>r</sup>-suicide vector pJP5603 (Penfold, 1996) にライゲーションして pHIK101 を取得した。

一方、*sspA* 遺伝子下流 0.8 kbp の DNA 断片を、同じく鋳型として *R. sphaeroides* のゲノム DNA と forward primer (HIK0102-f: 5'-TATCCCGGGGCGGTCTGGACCGATGCCTAT-3') および reverse primer (HIK0102-r: 5'-CGCGAATTCGGTCGAGCTTGTCGCCCATGGT-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 pHIK101 にライゲーションして pHIK102 を取得した。

最後に薬剤耐性を有する  $\Omega$ Sm<sup>r</sup>/Sp<sup>c</sup> cassette を pHIK102 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 pHIK102Ω を取得した。ここまでのプラスミド調製は全て *E. coli* JM109 lysogenized with  $\lambda$ pir 株を使用して行なった。Conjugation 法による相同組み換えは 5 章と同様に行ない、破壊株の確認は ORF の周辺を DNA シーケンサによる配列を読むことにより行なった。

#### 6.2.4 RSPhik2 (RSP3240 破壊株) の作製

*R. sphaeroides* のゲノム DNA を鋳型として、forward primer (HIK0201-f: 5'-GCAGTCGACGGCTGCCGGTCGGAGAGTGAGA-3') と reverse primer (HIK0201-r: 5'-TATCCCGGGGATCGACCGCCGAGCGAGGAA-3') を用いることにより *hik2* 遺伝子上流 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<sup>r</sup>-suicide vector pJP5603 (Penfold, 1996) にライゲーションして pHIK201 を取得した。

一方、*sspA* 遺伝子下流 0.8 kbp の DNA 断片を、同じく鋳型として *R. sphaeroides* のゲノム DNA と forward primer (HIK0202-f: 5'-ATACCCGGGTCCTGCTTGCCGAGGACGACCG-3') および reverse primer (HIK0202-r: 5'-GCTGAGCTCAGGAGCCGGACAGGCGCGAGAT-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 *Sac*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 *Sac*I で制限酵素処理した pHIK201 にライゲーションして pHIK202 を取得した。

最後に薬剤耐性を有する ΩSm<sup>r</sup>/Spc<sup>r</sup> cassette を pHIK202 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 pHIK202Ω を取得した。ここまでのプラスミド調製は全て *E. coli* JM109 lysogenized with  $\lambda$ pir 株を使用して行なった。Conjugation 法による相同組み換えは 5 章と同様に行ない、破壊株の確認は ORF の周辺を DNA シーケンサによる配列を読むことにより行なった。

#### 6.2.5 ウェスタン解析による SspA の検出

SspA の定量ウェスタン解析は 2 章と同様の方法で行なった。



## 6.3 結果

### 6.3.1 免疫沈降法による SspA と相互作用するタンパク質の探索

生体内で SspA と相互作用する可能性のあるタンパク質を探索するべく、SspA 抗体を用いた免疫沈降法を試みた。今回の実験では、以下の二点に注意して解析を行なった。第一に、ごく微量に結合している成分も含め多種類のタンパク質を分離、検出することを目指し、通常行なわれている SDS-PAGE のみによる検出ではなく、分離能の高い二次元電気泳動と検出感度の高い銀染色を用いて解析を行なった。第二に、固相に非特異的に吸着するタンパク質の存在も想定して、*sspA* 遺伝子破壊株 (SSPA1) でも同様の操作を行なって、野生株との比較解析を行なった。嫌気光合成条件でも、好気暗条件でも同様の結果が見出されたため、ここでは嫌気光合成条件のみデータとして示す。

その結果、野生株においては SspA、さらには抗体の Heavy-chain (H 鎖; 約 55 kDa) に由来するタンパク質群と Light-chain (L 鎖; 約 27 kDa) に由来すると思われるタンパク質群が主に検出された (Fig. 6-2)。また、いくつかの微量に検出されるスポットも観察されたが、抗体に由来するものなのか、SspA に結合するものかはこの段階では判別できなかった。一方、SSPA1 においては、主に H 鎖と L 鎖に由来すると思われるタンパク質のみが検出された (Fig. 6-3)。野生株と同様に、いくつかの微量に検出されるスポットが観察された。銀染色には定量性がないため、単純にスポットの濃淡からデータの比較はできないものの、SspA 結合タンパク質と考えられる、破壊株には存在せず、野生株のみで顕著に観察されるスポットは見出されなかった。一方、検出感度は銀染色より 50~100 倍低いものの、定量性を有するクマシーブリリアントブルー (CBB) 染色を用いたときには、銀染色で検出された微量なスポットは検出されなかった (data not shown)。そのため、本手法により SspA と相互作用を持つタンパク質を同定することはできなかった。

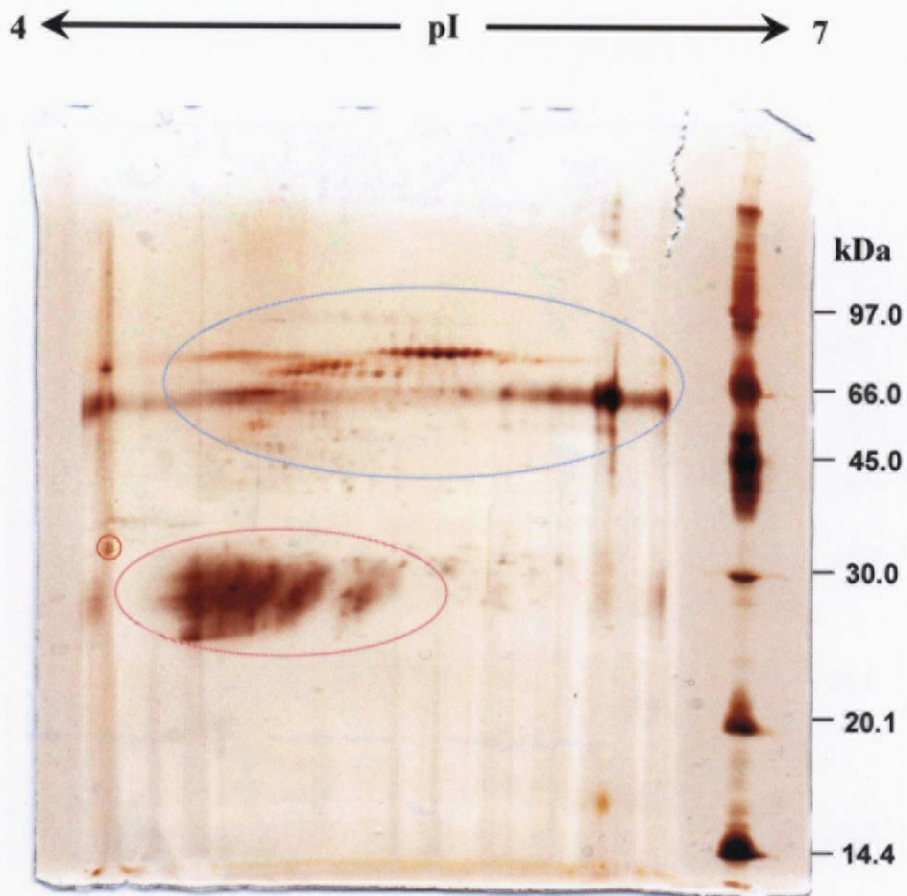


Fig. 6-2 Immunoprecipitation of wild-type strain by using anti-SspA antibodies. Red circle indicates SspA spot, blue circle indicates probable heavy-chain proteins of antibodies, and pink circle indicates probable light-chain proteins of antibodies. The gel was separated on pI 4-7 from left to right, stained by silver. The approximate size of bands in kDa is indicated on the right.

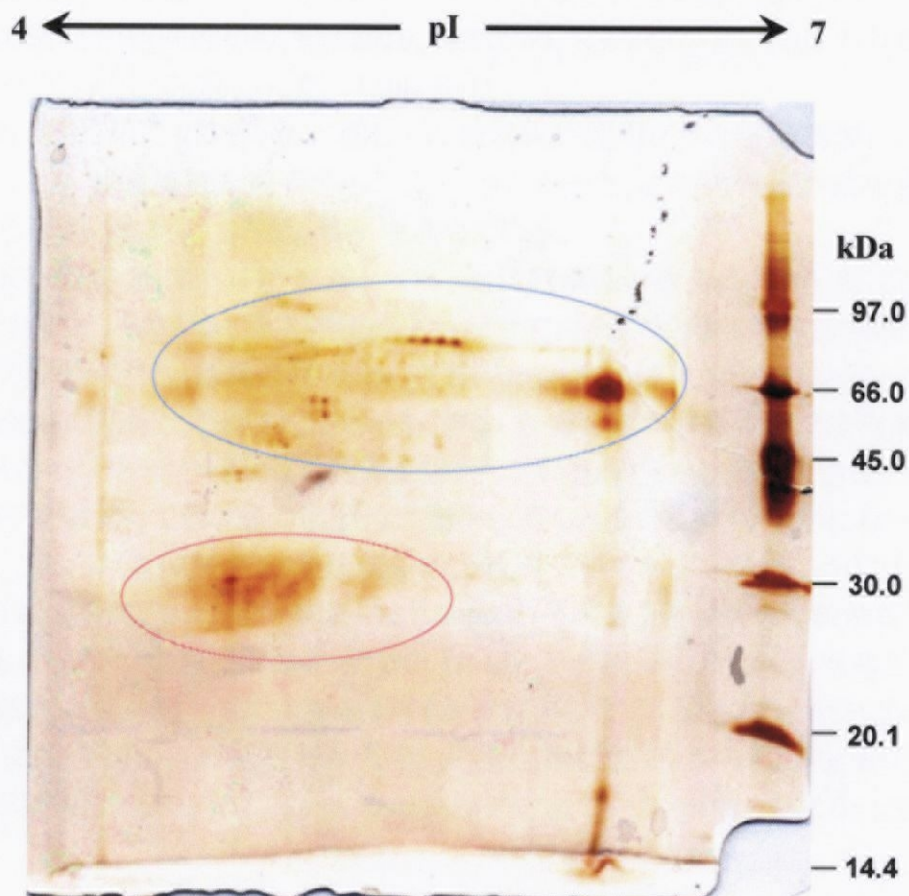


Fig. 6-3 Immunoprecipitation of SSPA1 strain by using anti-SspA antibodies. Blue circle indicates probable heavy-chain proteins of antibodies, and pink circle indicates probable light-chain proteins of antibodies. The gel was separated on pI 4-7 from left to right, stained by silver. The approximate size of bands in kDa is indicated on the right. The gel was separated on pI 4-7 from left to right, stained by silver. The approximate size of bands in kDa is indicated on the right.

### 6.3.2 SspA のシグナル伝達上流因子の探索

他の菌株における塩ストレスのセンサータンパク質と *R. sphaeroides* のゲノム配列に含まれる ORF との相同性から、RSP3219、RSP3240、RSP2407、RSP2880 の計 4 種の遺伝子をターゲットとして絞り込んだ (Table 6-1)。

このうち RSP2407、RSP2880 に関しては破壊株作製用プラスミドの調製には成功したものの、目的の破壊株を取得することができなかった。この遺伝子が致死遺伝子となっている可能性もあり、さらなる解析を進めている。

一方、RSP3219 と RSP3240 に関しては、共に破壊株の取得に成功した (Fig. 6-4, 6-5)。それぞれ、RSPHik1 と RSPHik2 と名付けて、野生株と生育を比較解析した。その結果、ストレスのない通常条件においても、NaCl を培地に加えた塩ストレス条件においても生育の変化は観察されなかった (Fig. 6-6)。この結果のみでは両遺伝子が塩ストレスのセンサープロテインの役割を果たしているかどうかは判断できないが、これらの遺伝子を破壊しても本菌の塩耐性に変化は見られないことが明らかになった。

さらに、これらの遺伝子が *sspA* 遺伝子上流遺伝子であることを明らかにするべく、NaCl 条件において、ウェスタン解析により SspA の発現量を野生株と比較解析した。解析の結果、SspA の発現量が抑制されていれば、上流因子の可能性も考察された。しかし、嫌気光合成条件においても好気暗条件においても、野生株と RSPHik1、及び RSPHik2 における SspA の発現量に明確な差異は観察されなかった (Fig. 6-7)。そのため、RSP3219 と RSP3240 は SspA の上流因子ではないことが明らかになった。

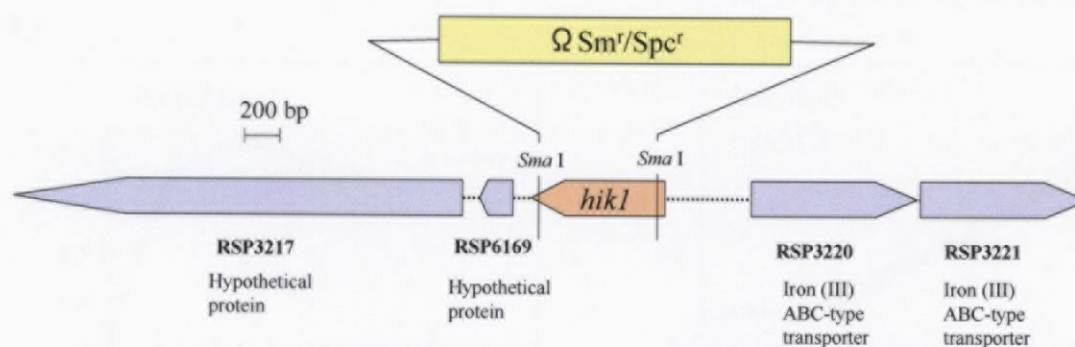


Fig. 6-4 Physical and genetic map of *R. sphaeroides* *hik1* regions. Insertion of  $\Omega$  Sm<sup>r</sup>/Spc<sup>r</sup> cartridge is indicated.



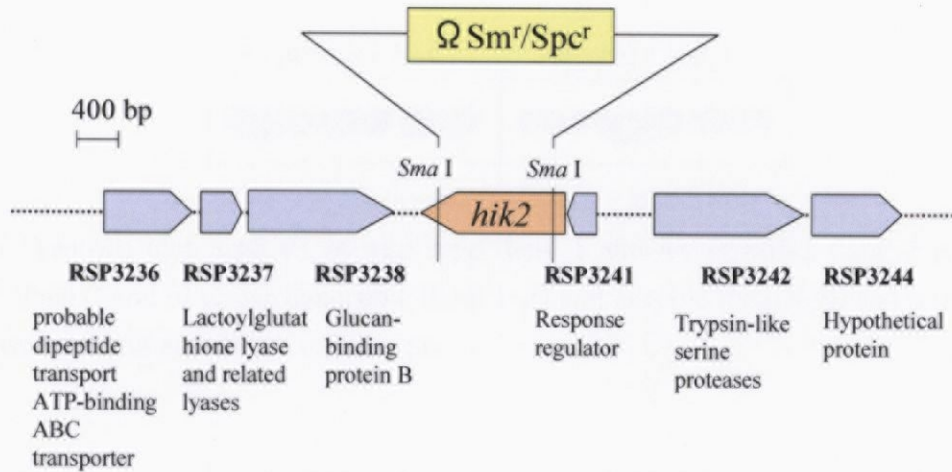


Fig. 6-5 Physical and genetic map of *R. sphaeroides hik2* regions. Insertion of  $\Omega$  Sm<sup>r</sup>/Spc<sup>r</sup> cartridge is indicated.

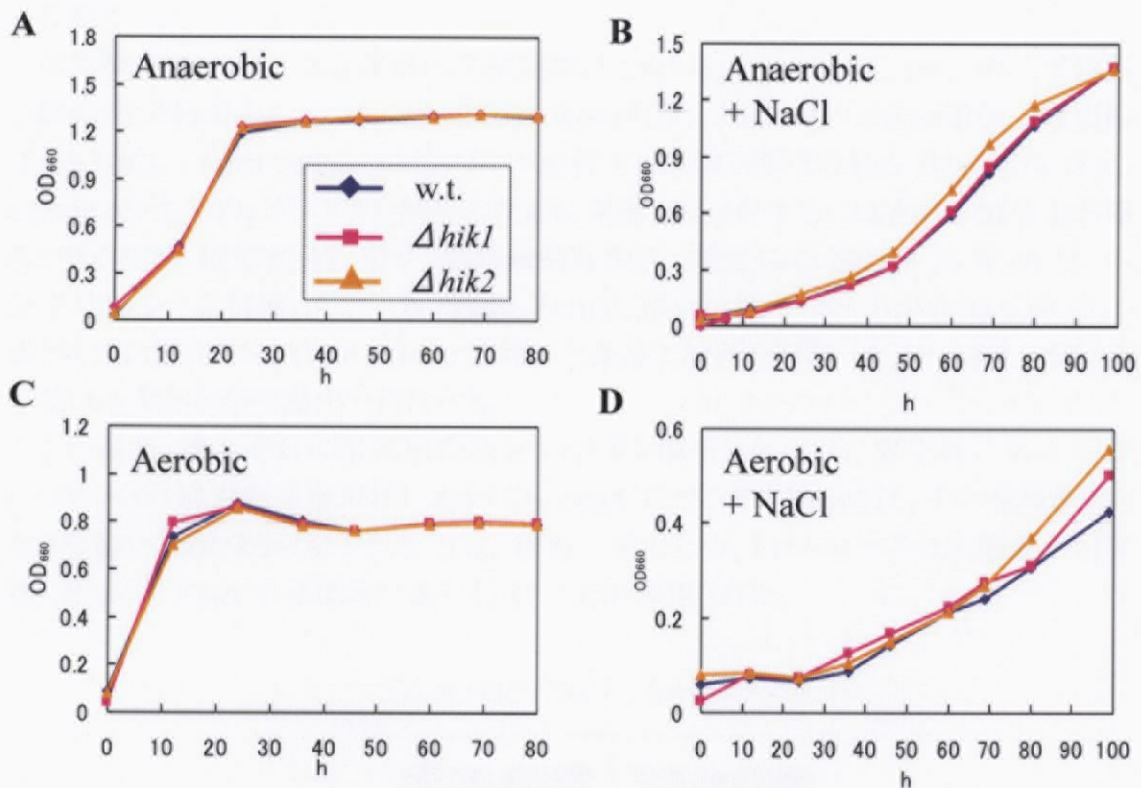


Fig. 6-6 Growth profile of wild-type (blue line) and *hik1*-deleted RSPHik1 (pink line) and *hik2*-deleted RSPHik2 (orange line) under anaerobic (A), anaerobic salt-stressed (B), aerobic (C), and aerobic salt-stressed (D) conditions.

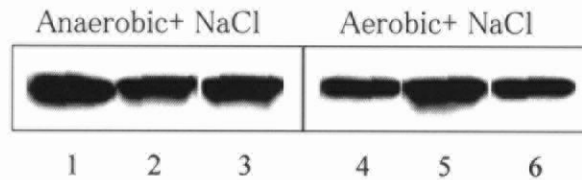


Fig. 6-7 Western blot analysis of wild type (lane 1 and 4), RSPhik1 (lane 2 and 5), RSPhik2 (lane 3 and 6) under anaerobic (lane 1-3) and aerobic (lane 4-6) salt-stressed conditions by using anti-SspA antiserum.

### 6.3.3 野生株とトレハロース合成遺伝子破壊株の SspA 発現量測定

トレハロース合成ができない株 (トレハロース合成遺伝子破壊株) において SspA の発現量に変化が起こりうるのかを比較検討した。手法としては、SspA 抗体を用いたウェスタン解析により、野生株とトレハロース合成遺伝子破壊株における SspA の発現量を比較解析した。

本実験のトレハロース合成遺伝子破壊株はこのうち、*otsA*, *treS*, *treY* の三重遺伝子破壊株 (Makihara *et al.*, submitted) を使用した。トレハロース合成遺伝子破壊株は+3% NaCl, -Yeast extract の塩ストレス条件下で生育が阻害される (Makihara *et al.*, submitted) もの、ウェスタン解析のために集菌して回収するには十分な菌体量が確保できるため、嫌気光合成条件、好気暗条件共に、培地 NaCl 濃度を 3% (0.68 M) の条件でストレスを誘導した。一方、Yeast extract 中にはトレハロースが含まれるため、5章と同様に培地中に Yeast extract を除いた条件で検討を行なった。ウェスタン解析の手順は 3 章と同様の操作で行なった。

その結果、それぞれの菌体破砕液をウェスタン解析したところ、野生株においてもトレハロース合成遺伝子破壊株においても SspA のバンドが検出され、その発現量にも大きな違いは観察されなかった (Fig. 6-8)。そのため、トレハロース合成遺伝子の有無に依って、SspA の発現量は変化しないことが確認された。

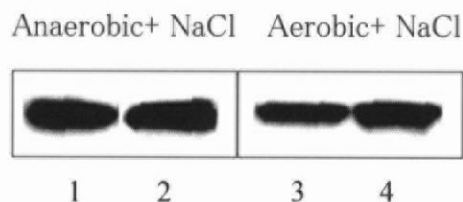


Fig. 6-8 Western blot analysis of wild type (lane 1 and 3) and  $\Delta otsA/\Delta treY/\Delta treS$  mutant strain (lane 2 and 4) under anaerobic photosynthesis (lane 1 and 2) and aerobic dark (lane 3 and 4) conditions by using anti-SspA antiserum.

## 6.4 考察

1 章でも述べたとおり、SspA は配列から機能の類推することができないタンパク質である。そのため、他の因子との関連性を調べることにより、SspA の生体内機能を探索しようと考えた。本章において、三種の手法を用いて SspA と関連する因子を探索した。

第一に免疫沈降法を用いて、SspA と相互作用する可能性のあるタンパク質を探索した。しかし、抗体由来のタンパク質以外は結合タンパク質と思われるスポットは検出されなかった。また、銀染色のみで観察された微量に検出されるスポットは、抗体のみを電気泳動すれば、このスポットが抗体由来なのか、結合タンパク質由来であるか決定することが可能である。しかし、SspA 結合タンパク質と考えられる、破壊株には存在せず、野生株のみで顕著に観察されるスポットは見出されなかった。この結果から、SspA と相互するタンパク質は存在しないか、本法で同定できない非常に弱い相互作用しか有していないのではないかと考察された。

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遺伝子の配列を元に、相同性から SspA の上流因子の探索を試みた。これまでに、塩ストレスのシグナル応答経路を探索した研究がいくつか行なわれている (Hengee-Arronis, 2000; Hecker *et al.*, 1996; Marin *et al.*, 2003)。しかし、上流のセンサーと下流の発現タンパク質への一連の流れを網羅的に解明している例は報告されていない。今回は、ターゲットとした 4 種のうち 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ず、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。また、これらの遺伝子を破壊しても菌株の塩耐性が変化することは見出されなかった。そのため、SspA は今回探索した経路以外のシグナルを経由して誘導されることが示唆された。

最後に、5 章に引き続き塩ストレス応答における重要な役割が知られている適合溶質トレハロースとの関連性を探索した。本章では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、トレハロースの蓄積に関わらず SspA の発現量に変化は見られないことが明らかになった。5 章では *sspA* 遺伝子破壊株 (SSPA1) におけるトレハロース蓄積量を測定した。この際にも、野生株と比べて蓄積トレハロース量に変化は見られなかった。以上の解析により、適合溶質トレハロースと SspA の間の相関関係は非常に低いのではないかと考察した。

本章で行なったアプローチでは、SspA と他の因子との相関関係を示すことにより、SspA の機能を明らかにしようと試みたものの、結果としてはネガティブなものとなった。そのため、より網羅的に解析を進めるべく、次章において DNA マイクロアレイを用いた網羅的発現解析により全遺伝子の中の *sspA* の位置付けを探索することにした。