

7 章 DNA マイクロアレイを用いた網羅的発現解析

7.1 序

前章までの研究により、*SspA* が生理的に重要な役割を果たすことが示された。そのため、その機能、および耐塩性における位置付けを、DNA マイクロアレイを利用した遺伝子発現解析的手法により解析した。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数例行なわれている *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 株を用いて塩ストレスに対する解析を試みた。2.4.1 株には *sspA* 遺伝子やトレハロース合成遺伝子をコードする配列もゲノムの中に確認されており、PCR やクローニングの結果からこれらは *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* 株の塩基配列と差異が少ないことも確認している。そのため、これまで得られた知見を発現解析に反映できる株であると判断した。

これまでに塩ストレス応答遺伝子の網羅的発現解析を行なった例は、*Escherichia coli* (*E. coli*) (Weber *et al.*, 2002)、*Bacillus subtilis* (*B. subtilis*)、(Petersohn *et al.*, 2001)、*Synechocystis* sp. PCC6803 (*Synechocystis*) (Marin *et al.*, 2004)、*Shinorhizobium meliloti* (*S. meliloti*) (Rüberg *et al.*, 2003) で報告がなされている。その結果、いくつかの発現制御遺伝子や適合溶質関連遺伝子の発現誘導が明らかになっているが、シグナル伝達経路のセンサーとして機能している遺伝子や塩ストレス特異的に誘導される遺伝子もわずかしこ同定されていない。その要因として、ゲノム情報の注釈が十分に進んでいない事と、生物の塩ストレス応答機構自体の複雑さが挙げられる。そのため、遺伝子発現量の増減は明らかになっても、それらの機能が分からなかったり、仮に既知の遺伝子であっても他の遺伝子との相関関係が捉えられていないのが現状である。

先章でも述べた通り、*R. sphaeroides* は酸素の有無に関わらず生育可能であり、また同時に光合成によりエネルギーを得る事が可能な興味深い菌株である (Van Niel, 1944; Woese *et al.*, 1984; Jackson, 1998)。これらの生育特性と塩ストレスによる応答を組み合わせることにより、生物全般において普遍的な塩ストレス応答機構を解明できる手がかりが得られるのではないかと考えた。また、*sspA* の発現量が他の遺伝子と比べてどの程度変化し、その制御因子等を同時に同定する事を本章の目的とした。生育条件に関しては、本章ではまず嫌気光合成条件で解析を行なった。

マイクロアレイを用いた解析では、その条件設定が重要であり、今回の実験ではストレス強度とストレス誘導時間に注目した。十分にストレスがかかり、かつ目的とする遺伝子群の絞込みが可能な条件を設定することを目標とした。これまでに、塩ストレス強度

を変化させることにより、遺伝子発現解析を行なった例はなく、強度の違いによりどのような差異が生じるかにも着目した。一方、ストレス誘導時間については、ストレスを感知した情報を最初に伝える一連の信号伝達に関与する遺伝子群と、ストレスに適応するための遺伝子群を捉えることを目標に誘導時間を変化させた。

7.2 材料と方法

7.2.1 菌株と培養条件

本章における実験では *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 株を使用した。生育培地は succinate を炭素源とする Sistrom minimal medium (Sistrom, 1962) (Table 7-1) を用いて、30°Cで培養を行なった。

菌体培養は 60 ml ガラスチューブを使用して、常時 95% N₂、5% CO₂ の混合ガスを送りこむ事により嫌気状態を維持して行なった。また、光合成条件を維持するために、10 W/m² (6,831 lux) の光を均等に照射した (Fig. 7-1A)。塩ストレスは 5 M NaCl 溶液を添加することにより行なった。NaCl 溶液は予め 95% N₂、5% CO₂ の混合ガスで酸素を完全に除いた後、シリンジを用いて嫌気状態を維持したまま、各ストレス強度に応じて添加した (Fig. 7-1B)。その結果、ストレス強度については、培地 NaCl 添加時の生育曲線 (Fig. 7-2) を参考に、通常 Na イオン濃度の 28 倍となる 1.5% NaCl ストレス (Strong-salt stress) と 5 倍となる 0.25% NaCl ストレス (Mild-salt stress) を併せて採用した。集菌時間は、ストレスを誘導しないもの、ストレス誘導後 7 min と 45 min の 2 点で集菌した。ストレス誘導後 7 min において、ストレスを感知した情報を最初に伝える一連の信号伝達に関与する遺伝子群を、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ることを目標に誘導時間を設定した。この際に、菌体を集菌した時点で、600 nm で測定した菌体濁度 (OD₆₀₀) が 0.4 になるように調整した。

Table 7-1 Sistrom's medium for *R. sphaeroides* 2.4.1

1 L of 10 x medium	
K ₂ HPO ₄	34.8 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
Succinic acid	40 g
NaCl	5 g
Nitrilotriacetic acid	2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.334 g
FeCl ₂ ·4H ₂ O	0.014 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.2 ml
Trace element* ¹	1 ml
Vitamin solution* ²	1 ml
Bring the total volume of one with distilled H ₂ O (pH will be 4.5-4.9) and store frozen.	
*1 Trace element solution	
EDTA(4H)	1.765 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10.95 g
FeCl ₂ ·4H ₂ O	3.58 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	1.54 g
CuCl ₂	0.392 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.248 g
H ₃ BO ₄	0.114 g
Add distilled water up to 100 ml of solution	
Add H ₂ SO ₄ dropwise until solution clears.	
*2 Vitamin solution	
Nicotinic acid	1 g
Thiamine·HCl	0.5 g
Biotin	0.01 g
Add distilled water up to 100 ml of solution per 100 ml of solution	
To prepare 1 L of 'normal' (1x) growth medium dilute 1:10 by distilled H ₂ O	
and adjust to pH7.0 with 10 N KOH	

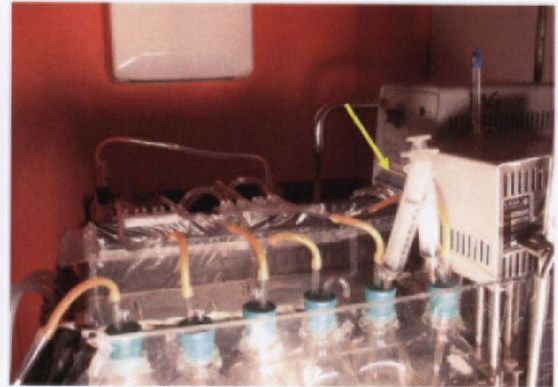
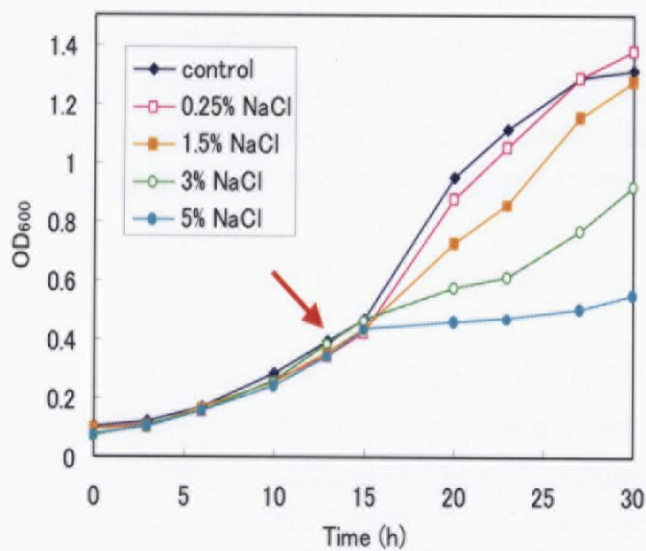
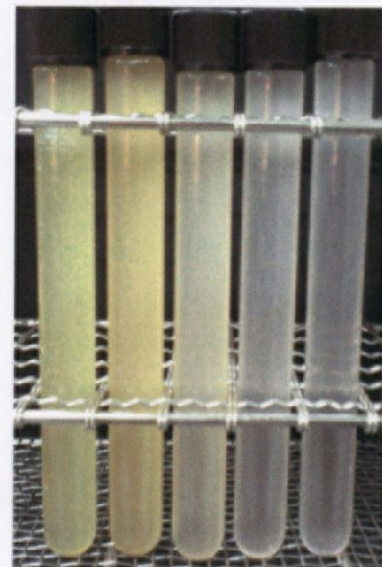
A**B**

Fig. 7-1 Growth condition and induction of salt-stress against *R. sphaeroides* under anaerobic photosynthesis condition (A). NaCl was added to the targeted concentrations by syringe to exclude the oxygen (yellow arrow) (B).

A**B**

Control + 0.25% + 1.5% + 3% + 5%
NaCl NaCl NaCl NaCl

Fig. 7-2 Growth profiles against different strength of salt-stress (A). Arrow indicates the point that added NaCl at optical density of 600 nm (OD_{600}) at 0.4. Growth cultures observed at 30 h (B).

7.2.2 RNA の調製

培養していた菌体に終濃度が 200 $\mu\text{g/ml}$ となるように Rifampicin (Sigma-Aldrich) を添加して RNA の転写を停止させた。菌体は 4°C、18,600 x g 、5 min 集菌後、直ちに破砕するか、-80°C に凍結保存した後、以後の操作に使用した。

RNA 抽出は RNeasy Midi および Mini kit (Qiagen) を用いて行なった。菌体 (30–50 ml) に kit 添付の RLT (β -mercaptoethanol 10 μl を添加) buffer 1 ml を加えてよく懸濁し、破砕用粒径 0.1 mm シリカビーズ (Biospec Products) 2 g の入った 2 ml 筒型チューブに移し、Mini-Bead Beater (Biospec Products) により室温、1 min 破砕した。

抽出した RNA はただちに RNase free DNase (Qiagen) 2 μl に RDD buffer (Qiagen) 30 μl を加えたものを添加して、室温で 20 min 放置することによりゲノム DNA 除去の操作を行なった。この RNA を RNeasy Mini kit をさらに用いることにより精製した。抽出した RNA は Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) による電気泳動、さらには iCycler iQ Real Time PCR Detection System (Bio-Rad) を用いた SYBR Green による定量 PCR を用いてゲノム DNA の混入がないことを確認した。ここで、ゲノム DNA の混入のないものだけこれ以降の操作に使用した。DNA の混入が見られるものは、さらに DNase 処理を繰り返して、その度に同様に確認した。また、タンパク質の混入を確認するべく 260 nm (OD_{260}) と 280 nm (OD_{280}) における吸光度測定し、 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ が 2.0 以上の精製度の高いもののみ、これ以降の操作に用いた。精製した RNA は cDNA 合成の操作を行なうまで -80°C に凍結保存した。

7.2.3 DNA マイクロアレイとデータ解析

cDNA 合成、断片化、末端ビオチン標識化、ハイブリダイゼーションは、Affymetrix 社 GeneChip *Pseudomonas aeruginosa* genome array expression protocol (<http://www.affymetrix.com/support/technical/manuals.affx>) (Affymetrix) に従って行なった。各段階終了時に、サンプルをそれぞれ Agilent 2100 Bioanalyzer により電気泳動して確認操作を行なった。全遺伝子の発現解析には *R. sphaeroides* の全遺伝子を含め 5,355 features (4,292 ORFs, 47 rRNA, 394 intergenic regions) をカバーする高密度オリゴヌクレオチド DNA マイクロアレイである *R. sphaeroides* Gene Chip (Pappas *et al.*, 2004) を使用した。このうち、intergenic regions とは、*R. sphaeroides* の使用コードを元にゲノム情報の注釈修正を行なった結果、ORF が見出されなかったものである。現在さらなる解析が進められており、一部には遺伝子が含まれている可能性もあるため、GeneChip の解析にも使用されている。

GeneChip のデータ解析には Robust Multi-Array Analysis (RMA) with quantile normalization

(<http://www.stat.berkeley.edu/users/bolstad/RMAExpress/RMAExpress.html>)

(Irizarry *et al.*, 2003) と GeneSpring 4.2 software package (Silicon Genetics) を使用した。塩ストレスをかけていないコントロールのデータは Pappas ら (Pappas *et al.*, 2004) のデータ計 3 連も合わせて使用し、計 4 連で行なった。一方、塩ストレスを誘導したデータは各々計 2 連で行なった。

測定結果は、Fold change を用いて発現量比を評価した。Fold change の値は塩ストレスサンプルの蛍光値 (a) がコントロールサンプルの蛍光値 (b) 大きい (塩ストレスにより発現量が増加した) 場合は a/b とし、逆に小さい (塩ストレスにより発現量が減少した) 場合は $-(b/a)$ とする。

さらに、本研究では crt (critical coefficient) を用いて信用性の乏しいデータを排除して評価を行なった。ここで crt の定義、ならびに概要を解説する (Fig. 7-3)。なお、ここでは同じ条件 (ストレス強度、ストレス誘導時間) で行なったサンプルであることを比較の前提とする。crt は、 i 連で行なったサンプルのうち、塩ストレスを誘導していないコントロールサンプルのシグナルの最大値を $(b_i) \max$ 、塩ストレスを誘導したサンプルのシグナルの最小値を $(a_i) \min$ とすると、 $(a_i) \min / (b_i) \max$ (ただし $\overline{a_i} > \overline{b_i}$) で定義される (Fig. 7-3A)。Fig. 7-3B の例にもあるように、crt の値が高ければ高いほどデータの信用性が高くなり、逆に crt の値が 1.0 以下のものは信用性に乏しいと判断することができる係数である。

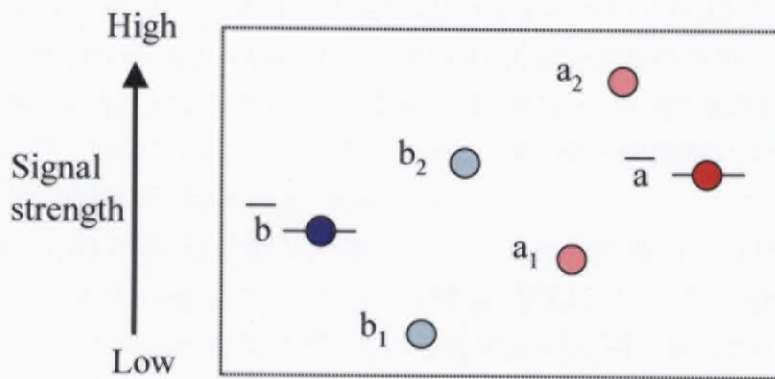
今回は crt が 1.15 以上のもののみを各サンプルの解析データとして採用した。一方、各回の Fold change にも解析のための下限値を設定した。その結果、Mild-salt stress については $crt \geq 1.15$ かつ $Fold\ change \geq 1.5$ 、Strong-salt stress については $crt \geq 1.15$ かつ $Fold\ change \geq 4.0$ という条件に適合する約 100~200 個の遺伝子について解析を行なった。

また、遺伝子の注釈は BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/index.html>)、COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>)、KEGG (<http://www.genome.ad.jp/kegg/>)、および SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) を用いた Oak Ridge National Laboratory の作成した注釈に従って解析した。

A

$$\text{crt} = \frac{(a_i) \text{ min}}{(b_i) \text{ max}} \quad \text{but } \bar{a}_i > \bar{b}_i$$

B

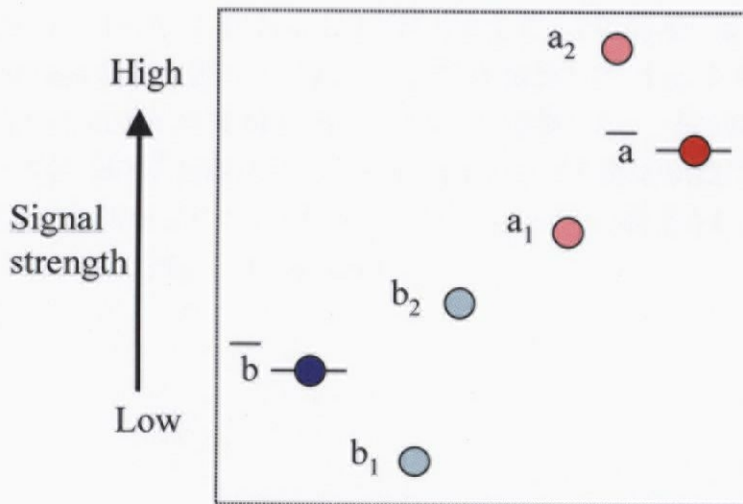


$$\bar{a} > \bar{b}$$

$$\text{crt} = \frac{a_1}{b_2} < 1$$

● ; control ● : salt-stressed

C



$$\bar{a} > \bar{b}$$

$$\text{crt} = \frac{a_1}{b_2} > 1$$

● ; control ● : salt-stressed

Fig.7-3 Definition of crt (critical coefficient). Upper bar means average of the sample data (A). Unreliable case of two replicate data (B). In this case, the average value of a (salt-stressed) is larger than the average value of b (control), but crt of a_1/b_2 is smaller than 1. Reliable case by two replicate data (C). In this case, the average value of a (salt-stressed) is larger than the average value of b (control), and crt of a_1/b_2 is also larger than 1 (C).

7.3 結果

7.3.1 サンプル調製

Strong-salt stress、および Mild-salt stress のサンプル共に同じ手順で調製したため、ここでは Strong-salt stress 7 min、45 min のサンプルのみデータを示す。

RNeasy kit により抽出した RNA は DNase 処理を充分に行ない、電気泳動、RT-PCRによりゲノムDNAの混入がないこと、吸光度測定によりタンパク質の混入がないことを確認した (data not shown)。

抽出した RNA は逆転写酵素を用いて cDNA 合成した。cDNA 溶液は残留 RNA を変性させた後、スピンカラムを用いて精製、回収した。ここで Bioanalyzer による電気泳動により、500 base 前後に検出される残留 RNA (主に 16S, 23S ribosomal RNA に由来する) のバンドがないことを確認した (Fig. 7-4 Blue line)。Bioanalyzer による電気泳動は、横軸が泳動時間を表わし、低分子のものほど先に検出される。縦軸はバンドの濃淡を表わす。

精製した cDNA は DNase により断片化した。その結果、電気泳動により目的とする 50-200 base 程度に断片化されていることを確認した (Fig. 7-4 Orange line)。最後に、断片化した cDNA の末端を Biotin-ddUTP 標識した。一般的には標識化によって、断片サイズが 90%以上増加する。Bioanalyzer による電気泳動により、標識化したものは断片化した cDNA よりサイズが大きくなっていることが確認され、予定通り標識化されていると判断した (Fig. 7-4 Red line)。

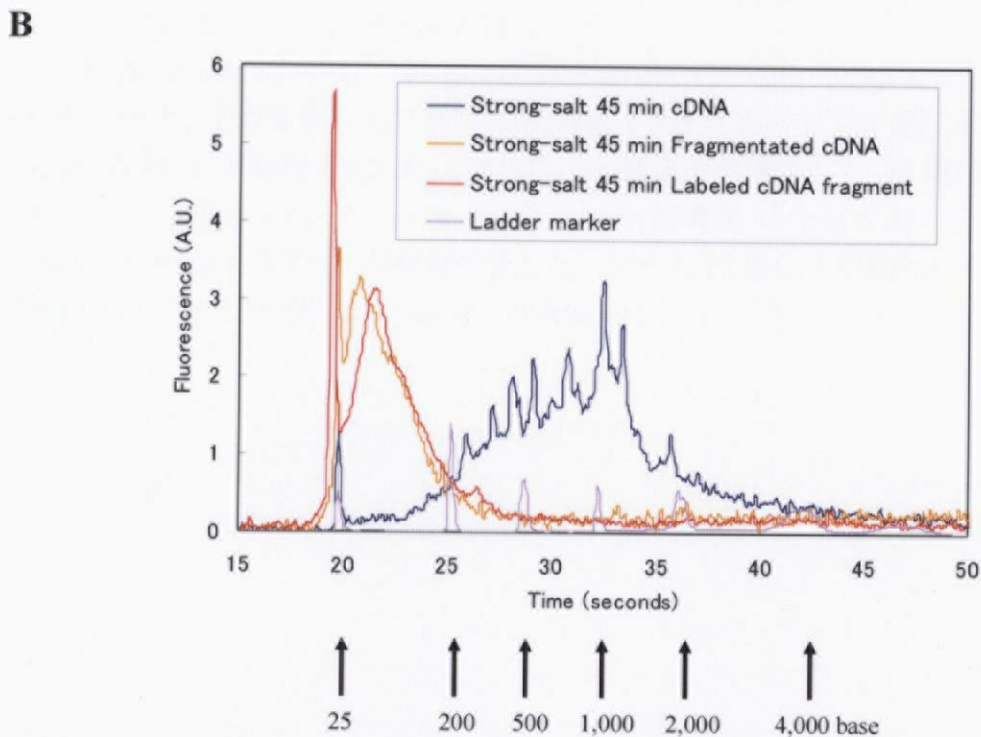
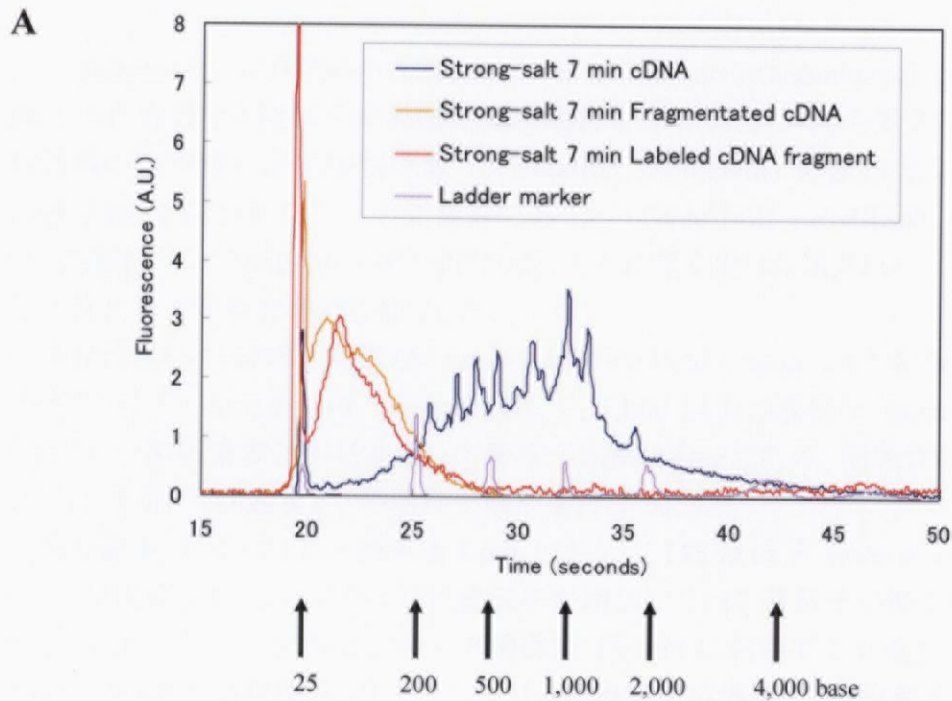


Fig. 7-4 Preparation of microarray sample, synthesized cDNA (Blue line), Fragmentated cDNA (Orange line), and Labelled cDNA fragment (Red line) of Strong-salt stress 7 min (A) and Strong-salt stress 45 min sample (B). Base size determined by Ladder marker (Purple line) is indicated under the panels.

7.3.2 解析結果の概要

*R. sphaeroides*に含まれる 5,355 features (genes and intergenic regions) に関して塩ストレスに応答する遺伝子の網羅的発現解析を行なった。このうち計 2 回のアレイの解析結果の再現性を示す相関係数 (correlation coefficient) の値は完全に一致した時の値である 1.0 にほぼ近く、大変良好であった (Table 7-2)。そのため、一般的にはアレイの解析サンプル数は 3 連で行なうが、この結果を受けて塩ストレスサンプルに関しては計 2 連で解析を進める事にした。

当初はストレス強度に関係なく $crt \geq 1.15$ かつ $Fold\ change \geq 1.5$ の条件で解析する予定だったが、Strong-salt stress に関して、1,000 以上の遺伝子 (intergenic regions を除く) の発現量変化が認められて解析が困難になったため、同条件に関しては $crt \geq 1.15$ 、 $Fold\ change \geq 4.0$ の条件で解析を行なった。

その結果、NaCl ストレス誘導後 7 min において 145 遺伝子 (intergenic regions を除く) が発現変化した。このうち 128 遺伝子が増加して、17 遺伝子が減少していることが明らかになった。一方、NaCl ストレス誘導後 45 min において 140 遺伝子 (intergenic regions を除く) が発現変化した。このうち 61 遺伝子が増加して、79 遺伝子が減少していることが明らかになった (Table 7-2)。

一方、Mild-salt stress については当初の $crt \geq 1.15$ 、 $Fold\ change \geq 1.5$ の条件で解析を行なった。その結果、NaCl ストレス誘導後 7 min において 156 遺伝子 (intergenic regions を除く) が発現変化した。このうち 138 遺伝子が増加して、18 遺伝子が減少していることが明らかになった。一方、NaCl ストレス誘導後 45 min において 122 遺伝子 (intergenic regions を除く) が発現変化した。このうち 72 遺伝子が増加して、50 遺伝子が減少していることが明らかになった (Table 7-2)。

Table 7-2 Correlation coefficient between two replicate, and number of genes that passed under fold change ≥ 1.5 and $crt \geq 1.15$ cut off under Mild-salt stress conditions, and fold change ≥ 4.0 and $crt \geq 1.15$ cut off under Strong-salt stress conditions. Intergenic regions are counted out in this number

Condition	Correlation coefficient	Total no. of genes passed under fixed conditions	No. of genes passed under fixed conditions	
			Increased	Decreased
Mild-salt 7 min	0.995	156	138	18
Mild-salt 45 min	0.996	122	72	50
Strong-salt 7 min	0.984	145	128	17
Strong-salt 45 min	0.983	140	61	79

7.3.3 各条件における解析結果

本項では各サンプルにおいて特徴的な挙動を示した遺伝子群に関して述べる。それらの解釈に関しては次項で詳細に考察する。なお、Table 7-3~7-5 には、解析条件を満たした遺伝子のうち、各条件下で高い発現量変動 (Fold change を指標として) が見出された上位 15 遺伝子の Fold change、 crt の値、および塩基配列を元にした注釈を記す。

また、本解析結果を Supplementary Table 1~4 として章末に添付する。

(1) Mild-salt 7 min (Table 7-3)

UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylase (*pxA*) (RSP2115-2116)、の発現量が最も顕著に増加していることが明らかになった。また、オペロンを形成しているか、相互に機能していると考えられる RSP1941-1944 の遺伝子群の発現量が増加していることが明らかになった。これらの機能が明らかではないものの sulfate transfer に関与していることが示唆される。また、Periplasmic sulfate/thiosulfate binding proteins (RSP3696-3699) や Sulfate/molybdenum transport system (RSP3859-3861) の発現量も上昇しているため、S 化合物の転移や輸送が活発に変動していることが示唆される。一方、sugar transport system (RSP3701-3705) や polyamine/opine transporter (RSP1883-1884, 1886)、spermidine/putrescine-binding peroplasmic protein (RSP0161) の発現量が上昇していることも明らかになった。これらの遺伝子群はストレス誘導後 45 min になると発現量が減少した。一方、発現量が減少した遺伝子は数的にも少なく、45 min でも継続して減少が観察された Sec-dependent protein (RSP3102)

や Ribosomal protein L33 (RSP1887) などが見出されたが、一部代謝に関連する遺伝子の変動以外で特徴的なものは見られなかった。

(2) Mild-salt 45 min (Table 7-4)

代表的な適合溶質の輸送システムである Proline/glycine betaine ABC-type transport systems (RSP3058-3059)、Choline-glycine betaine transporter (RSP3080)、さらには本菌の適合溶質として知られているトレハロース合成遺伝子 (*otsA*, *otsB*) (RSP0948-0949) の発現量上昇が見出された。また、*sspA* の発現量上昇も観察された。これらの遺伝子はストレス誘導後 7 min においても発現量の上昇が見出され、45 min においてさらに発現量が増加していた。さらに、*bchC* (RSP0263)、*crtI* (RSP0271)、*bchG* (RSP0279)、*bchF* (RSP0284) といった光合成関連遺伝子の発現量が増加していた。一方、多数の鞭毛、化学遊走関連遺伝子 (計 45 遺伝子) の発現量が減少していることが観察された。

(3) Strong-salt 7 min (Table 7-5)

本条件で注目すべきものは、多数の Transcriptional regulator の発現量上昇であった (23 種)。一般的にストレスを受けた時に発現量が増加することが知られている phage integrase (RSP0217) や Periplasmic sugar binding protein (RSP0989-0990) の発現量上昇が観察されたが、塩ストレスとの関連性を示すのは難しいと考えた。既知の塩ストレス関連遺伝子では、グルタミン酸の生合成に寄与していると思われる NADPH-dependent glutamate synthase (RSP0189) の発現量上昇が観察された。一方、発現量が減少した遺伝子は、鞭毛関連遺伝子 (RSP0051-0052, 0083)、Ribosomal protein S7 (RSP1709) などが見出されたが、Mild-salt 条件と比較して大きな変化は観察されなかった。

(4) Strong-salt 45 min (Table 7-6)

Mild-salt 45 min で発現量の増加が観察された塩ストレス関連遺伝子 (RSP3057-3059, RSP0948-0949, RSP0753) の発現量がより顕著になることが明らかになった。*sspA* もこの中に含まれていた。これらの遺伝子は Mild-salt 条件と同様に誘導後 7 min においても発現量の増加が見出され、45 min においてさらに発現量が増加していた。一方、Mild-salt 条件で高発現していた光合成関連遺伝子の発現量は上記の遺伝子と比べるとそれほど増加していなかった。一方、Mild-salt 条件と同様に多数の鞭毛/化学遊走関連遺伝子 (計 37 遺伝子) の発現量が減少していた。C4-dicarboxylate transporter (RSP0910-0912) の減少が目立った以外は、Mild-salt 条件と比較して大きな変化は観察されなかった。

Table 7-3 Top 15 genes that affected by Low-salt stress for 7 min

Induced Gene ^a	Function ^b	Low-salt 7 min		Low-salt 45 min		High-salt 7 min		High-salt 45 min	
		Fold	crt	Fold	crt	Fold	crt	Fold	crt
RSP2116	UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylase	3.2	2.5	1.2	1.0	1.8	1.4	3.4	2.5
RSP2115	UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylase	3.1	2.1	1.2	0.9	2.8	2.2	2.8	1.9
RSP3704	Ribitol 2-dehydrogenase	3.0	2.4	-1.1	0.9	1.2	1.0	-1.0	0.8
RSP1942	Sulfite reductase hemoprotein	2.7	2.2	1.1	0.9	-2.9	1.7	-3.0	1.8
RSP2275	Hypothetical protein	2.6	2.1	-1.2	1.0	2.5	1.3	-1.7	1.3
RSP3701	ABC-type xylose transport system	2.6	2.2	-1.3	0.8	11.8	9.3	-2.2	1.6
RSP0635	ATP-independent periplasmic transporter, transmembrane component	2.5	1.9	1.3	1.1	-1.0	0.9	17.1	13.6
RSP2513	Enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase	2.5	2.0	-1.1	0.7	1.2	0.9	4.5	3.2
RSP1943	Hypothetical protein	2.5	2.0	1.2	0.9	-5.1	2.9	-3.7	2.5
RSP1941	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase	2.5	2.0	1.1	0.9	-3.0	1.6	-2.9	1.5
RSP3705	Ribitol kinase	2.4	2.1	-1.1	0.8	-1.1	0.8	1.1	0.9
RSP3697	Periplasmic sulfate/thiosulfate binding proteins	2.3	1.9	1.3	1.1	-2.5	1.8	-2.2	1.6
RSP1944	Uroporphyrin-III C-methyltransferase	2.3	1.7	1.0	0.8	-2.8	1.5	-2.8	1.6
RSP1081	Formate dehydrogenase associated protein	2.2	1.8	-1.1	1.0	1.3	1.0	-1.2	1.1
RSP3698	ABC-type cysteine/molybdate transport systems	2.2	1.6	1.2	0.9	-2.1	1.3	-1.9	1.1
Repressed Gene ^a	Function ^b	Low-salt 7 min		Low-salt 45 min		High-salt 7 min		High-salt 45 min	
Fold	crt	Fold	crt	Fold	crt	Fold	crt	Fold	crt
RSP3102	Component of Sec-independent protein secretion pathway TatA	-3.3	2.6	-3.4	2.7	-3.2	2.4	-4.4	3.3
RSP1887	Ribosomal protein L33	-3.2	1.9	-2.4	1.3	-1.9	1.1	-1.5	0.9
RSP0983	Hypothetical protein	-1.9	1.4	-1.7	1.3	-3.4	2.5	-2.6	1.9
RSP0038	Hypothetical protein	-1.9	1.3	-2.7	1.9	-3.0	2.2	-32.4	22.6
RSP0054	Flagellar motor switch protein FljG	-1.8	1.2	-1.9	1.3	-3.2	2.1	-6.0	4.4
RSP3432	Methyl-accepting chemotaxis protein	-1.8	1.3	-1.6	1.2	-1.7	1.2	-3.6	2.5
RSP3621	Cold shock protein CspA	-1.8	1.4	-1.4	1.1	3.8	2.1	3.7	2.4
RSP0199	Hypothetical protein	-1.8	1.2	-1.6	1.0	-1.7	1.1	-1.4	0.9
RSP1991	Putative Ornithine decarboxylase	-1.7	1.3	-1.4	1.1	-2.0	1.3	-2.9	1.9
RSP0951	Hypothetical protein	-1.7	1.4	-1.5	1.2	-1.5	1.2	1.2	1.0
RSP2636	Acetolactate synthase	-1.6	1.2	-1.3	0.9	1.3	0.9	-1.2	0.8
RSP0513	Putative O-glycosyl hydrolase	-1.6	1.4	-1.3	1.2	-3.8	3.2	-6.8	5.4
RSP1053	Signal recognition particle protein	-1.6	1.4	-1.2	1.1	-2.2	1.7	-2.1	2.0
RSP3270	Fructose biphosphate aldolases	-1.5	1.4	1.1	0.9	-1.7	1.6	-1.1	1.0
RSP1049	Chorismate mutase PheA	-1.5	1.2	-1.1	0.9	-1.9	1.4	-3.2	2.5

^a Sorted according to the *Rhodobacter* genome database. ^b Derived from Oak Ridge National Laboratory genome annotations.

Table 7-4 Top 15 genes that affected by Low-salt stress for 45 min

Induced Gene ^a	Function ^b	Low-salt 7 min		Low-salt 45 min		High-salt 7 min		High-salt 45 min	
		Fold	crt	Fold	crt	Fold	crt	Fold	crt
RSP3059	Proline/glycine betaine ABC-type transport systems	2.1	1.1	2.9	1.5	9.6	4.3	50.1	22.7
RSP4209	Acyltransferase family	1.7	1.0	2.4	1.4	1.4	0.9	7.3	4.1
RSP3058	Proline/glycine betaine ABC-type transport systems	2.0	1.4	2.4	1.7	3.9	2.6	45.3	31.1
RSP0949	OtsB trehalose-phosphatase protein	1.8	1.3	2.0	1.4	6.6	4.5	8.6	6.3
RSP3080	Choline-glycine betaine transporter	1.8	1.3	2.0	1.5	1.1	0.7	4.0	2.9
RSP2692	O-antigen acetylase	1.9	1.5	1.9	1.4	4.6	3.6	2.6	1.8
RSP3075	Hypothetical protein	1.5	1.3	1.9	1.7	-1.1	1.0	3.6	2.9
RSP0948	Trehalose-6-phosphate synthase (OtsA)	1.7	1.3	1.9	1.4	2.3	1.5	11.0	8.1
RSP4203	Thiol-disulfide isomerase and thioredoxins	1.9	1.6	1.8	1.6	1.7	1.5	2.9	2.1
RSP1276	Hypothetical protein	1.4	1.2	1.8	1.5	7.7	6.4	8.9	7.4
RSP0319	Hypothetical protein	1.8	1.6	1.8	1.6	2.8	2.3	2.8	2.3
RSP4204	Rhodanase/sulfotransferase/phosphatase	1.9	1.4	1.8	1.3	1.1	0.8	2.6	1.7
RSP1275	Transcriptional regulator	1.5	1.1	1.8	1.2	2.7	1.9	4.2	3.1
RSP0423	Predicted oxidoreductases (related to aryl-alcohol dehydrogenases)	1.6	1.3	1.7	1.4	1.3	1.0	2.9	2.3
RSP0753	SspA	1.4	1.1	1.7	1.5	1.9	1.5	10.5	8.8
Repressed Gene ^a	Function ^b	Low-salt 7 min		Low-salt 45 min		High-salt 7 min		High-salt 45 min	
RSP3102	Sec-independent protein secretion pathway Tata	-3.3	2.6	-3.4	2.7	-3.2	2.4	-4.4	3.3
RSP0062	Hypothetical protein	-1.5	1.0	-3.0	2.1	-2.7	1.7	-22.0	16.4
RSP0076	Flagellar P-ring protein precursor	-1.5	0.9	-2.9	1.7	-2.3	1.5	-11.2	7.1
RSP0034	Membrane protein involved in flagellum assembly	-1.5	1.1	-2.8	2.1	-2.3	1.8	-8.5	6.1
RSP0038	Hypothetical protein	-1.9	1.3	-2.7	1.9	-3.0	2.2	-32.4	22.6
RSP2663	Periplasmic binding ABC transporter protein	-1.7	0.8	-2.7	1.3	-1.6	0.7	-2.9	1.3
RSP0075	Hypothetical protein	-1.4	1.1	-2.7	1.9	-1.2	0.8	-6.2	4.6
RSP0083	Flagellar basal body protein	-1.6	0.9	-2.6	1.5	-4.3	2.6	-14.5	8.1
RSP1887	Ribosomal protein L33	-3.2	1.9	-2.4	1.3	-1.9	1.1	-1.5	0.9
RSP0032	RNA polymerase sigma factor FliA (flagellar associated)	-1.4	1.1	-2.4	2.0	-2.0	1.5	-5.7	4.8
RSP0082	Flagellar basal body rod protein	-1.4	1.1	-2.3	1.9	-3.2	2.7	-11.1	9.0
RSP0078	Flagellar basal body and hook proteins	-1.3	1.2	-2.3	2.2	-2.7	2.5	-20.3	18.1
RSP0077	Flagellar L-ring protein	-1.4	1.0	-2.3	1.8	-2.7	2.1	-12.1	8.6
RSP0231	Flagellar motor protein MotB	-1.4	1.1	-2.3	1.8	-2.3	1.9	-6.2	4.2
RSP0080	Flagellar basal body and hook proteins	-1.2	0.9	-2.3	1.9	-2.0	1.5	-50.9	41.3

^a Sorted according to the *Rhodobacter* genome database. ^b Derived from Oak Ridge National Laboratory genome annotations.

Table 7-5 Top 15 genes that affected by High-salt stress for 7 min

Induced Gene ^a	Function ^b	Low-salt 7 min		Low-salt 45 min		High-salt 7 min		High-salt 45 min	
		Fold	crt	Fold	crt	Fold	crt	Fold	crt
RSP1435	Transcriptional regulator	1.2	1.1	1.2	1.1	47.7	42.6	4.8	2.9
RSP0217	Phage integrase	1.5	1.1	1.4	1.0	29.6	24.0	6.5	4.6
RSP0640	N-methylhydantoinase A	1.2	1.2	1.1	1.0	21.6	20.8	5.5	4.1
RSP4188	Unknown	1.4	1.2	1.6	1.4	21.5	17.8	8.5	6.3
RSP1434	NADPH, quinone reductase and related Zn-dependent oxidoreductase	1.4	1.1	1.4	1.1	19.6	12.8	5.8	4.0
RSP3634	Hypothetical protein	1.9	1.1	1.5	0.9	19.5	10.7	5.2	2.3
RSP2624	Hypothetical protein	1.9	1.6	1.7	1.1	18.6	13.3	7.2	4.9
RSP2349	Hypothetical protein	1.7	1.1	1.5	1.0	18.2	11.3	4.1	2.3
RSP2801	Transcriptional regulator (ArcR)	1.6	1.3	1.4	1.2	16.9	13.8	4.0	3.2
RSP3633	Hypothetical protein	1.7	1.5	1.7	1.4	16.2	12.4	8.1	6.2
RSP2801	Transcriptional regulator	1.6	1.3	1.4	1.2	16.9	13.8	4.0	3.2
RSP4091	Probable transposase protein	1.3	1.1	1.2	1.2	14.1	11.8	4.6	4.3
RSP2231	Hypothetical protein	1.4	1.2	1.5	1.2	12.0	9.4	5.1	4.3
RSP3701	ABC-type xylose transport system	2.6	2.2	-1.3	0.8	11.8	9.3	-2.2	1.6
RSP2763	Hypothetical protein	1.6	1.0	1.4	0.9	11.4	7.6	7.0	3.7
Repressed Gene^a	Function^b	Low-salt 7 min	crt	Low-salt 45 min	crt	High-salt 7 min	crt	High-salt 45 min	crt
RSP0051	Response regulator (flagellar associated)	-1.5	1.1	-1.9	1.4	-6.6	4.8	-20.9	15.6
RSP3644	dGTP triphosphohydrolase	-1.1	0.8	-1.2	0.9	-5.6	3.2	-2.7	1.9
RSP3642	Probable ATPase	-1.2	0.8	-1.3	0.9	-5.4	3.8	-4.5	2.9
RSP3750	Hypothetical protein	1.0	0.9	1.0	0.8	-5.2	3.6	-1.1	0.9
RSP1943	Hypothetical protein	2.5	2.0	1.2	0.9	-5.1	2.9	-3.7	2.5
RSP4160	Hypothetical protein	1.3	0.9	-1.1	0.5	-5.1	1.9	1.2	0.6
RSP0052	Flagellar hook-basal body protein	-1.3	0.9	-1.5	1.0	-5.0	3.4	-10.4	7.6
RSP1623	Hypothetical protein	-1.1	0.8	1.2	1.0	-5.0	3.6	-1.1	0.8
RSP1709	Ribosomal protein S7	-1.1	1.0	1.0	0.9	-4.9	3.4	-1.8	1.6
RSP3756	ATP-dependent exoDNase (exonuclease V)	1.2	1.0	1.3	1.1	-4.8	3.1	1.4	0.9
RSP3925	Sulfotransferase protein	1.0	0.9	1.2	1.1	-4.8	3.2	-1.4	1.1
RSP3643	Hypothetical protein	-1.1	0.9	-1.1	0.9	-4.7	3.7	-3.1	2.4
RSP2128	Phosphoribosylformylglycinamide (FGAM) synthase	1.1	0.8	1.2	1.0	-4.4	3.2	-1.6	1.4
RSP0083	Flagellar basal body protein	-1.6	0.9	-2.6	1.5	-4.3	2.6	-14.5	8.1
RSP3640	Hypothetical protein	-1.0	0.8	-1.2	0.9	-4.3	3.0	-3.9	3.0












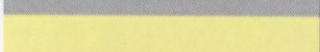



^a Sorted according to the *Rhodobacter* genome database. ^b Derived from Oak Ridge National Laboratory genome annotations.

Table 7-6 Top 15 genes that affected by High-salt stress for 45 min

Induced Gene ^a	Function ^b	Low-salt 7 min		Low-salt 45 min		High-salt 7 min		High-salt 45 min	
		Fold	crt	Fold	crt	Fold	crt	Fold	crt
RSP3059	Proline/glycine betaine ABC-type transport systems	2.1	1.1	2.9	1.5	9.6	4.3	50.1	22.7
RSP3058	Proline/glycine betaine ABC-type transport systems	2.0	1.4	2.4	1.7	3.9	2.6	45.3	31.1
RSP0635	ATP-independent periplasmic transporter, transmembrane component	2.5	1.9	1.3	1.1	-1.0	0.9	17.1	13.6
RSP3057	Proline/glycine betaine ABC-type transport systems	1.2	1.0	1.3	1.0	1.1	0.8	16.4	12.8
RSP3927	Hypothetical protein	-1.1	0.7	1.3	0.9	6.9	2.8	14.4	8.6
RSP0948	Trehalose-6-phosphate synthase (OtsA)	1.7	1.3	1.9	1.4	2.3	1.5	11.0	8.1
RSP0636	Dicarboxylate-binding periplasmic protein	1.7	1.5	1.1	1.0	1.1	1.0	10.5	7.8
RSP0753	SspA	1.4	1.1	1.7	1.5	1.9	1.5	10.5	8.8
RSP2379	Hypothetical protein	1.1	0.8	1.5	1.2	9.6	7.8	10.4	7.7
RSP0018	Transcriptional regulators	1.3	1.1	1.0	0.8	2.8	2.1	9.0	7.3
RSP1276	Hypothetical protein	1.4	1.2	1.8	1.5	7.7	6.4	8.9	7.4
RSP3928	Hypothetical protein	-1.2	1.0	1.0	0.9	4.4	4.0	8.7	6.7
RSP0949	trehalose-phosphatase protein (OtsB)	1.8	1.3	2.0	1.4	6.6	4.5	8.6	6.3
RSP4188	Hypothetical protein	1.4	1.2	1.6	1.4	21.5	17.8	8.5	6.3
RSP0019	Hypothetical protein	1.6	0.8	1.3	0.8	3.5	1.8	8.4	3.6
Repressed Gene ^a	Function ^b	Low-salt 7 min		Low-salt 45 min		High-salt 7 min		High-salt 45 min	
		Fold	crt	Fold	crt	Fold	crt	Fold	crt
RSP0080	Flagellar basal body and hook proteins	-1.2	0.9	-2.3	1.9	-2.0	1.5	-50.9	41.3
RSP0911	C4-dicarboxylate transport protein	-1.3	0.8	-2.0	1.3	-1.6	1.2	-32.4	21.8
RSP0038	Hypothetical protein	-1.9	1.3	-2.7	1.9	-3.0	2.2	-32.4	22.6
RSP0043	Chemotaxis response regulator CheB	1.1	0.8	-1.7	1.4	-1.2	1.0	-24.1	18.1
RSP0233	Flagellar motor component protein Poma	-1.2	0.9	-2.0	1.6	-3.0	2.3	-23.9	19.1
RSP0062	Hypothetical protein	-1.5	1.0	-3.0	2.1	-2.7	1.7	-22.0	16.4
RSP0051	Response regulator (flagellar associated)	-1.5	1.1	-1.9	1.4	-6.6	4.8	-20.9	15.6
RSP0078	Flagellar basal body and hook proteins	-1.3	1.2	-2.3	2.2	-2.7	2.5	-20.3	18.1
RSP0081	Flagellar hook capping protein	-1.2	0.9	-2.0	1.6	-3.3	2.5	-19.6	15.2
RSP0044	Methyl-accepting chemotaxis protein	1.1	0.6	-1.8	1.4	-1.3	0.9	-17.8	11.1
RSP0910	Probable C4-dicarboxylate-binding protein	-1.2	1.0	-1.7	1.3	-1.3	1.1	-17.5	14.9
RSP0912	Probable C4-dicarboxylate transporter	-1.1	0.8	-1.9	1.3	-1.3	1.0	-17.4	12.9
RSP0042	Chemotaxis protein histidine kinase	-1.1	0.6	-2.0	1.1	-1.0	0.5	-15.2	7.7
RSP0083	Flagellar basal body protein	-1.6	0.9	-2.6	1.5	-4.3	2.6	-14.5	8.1
RSP0046	Chemotaxis signal transduction protein CheW	-1.1	0.7	-2.0	1.4	-2.2	1.6	-13.3	7.9

^a Sorted according to the *Rhodobacter* genome database. ^b Derived from Oak ridge National Laboratory genome annotations.

Table. 7-7 Gene classification and its colors displayed in Table 7-3, 7-4, 7-5, 7-6, and Supplementary Table1-4

Colors	Function
	Amino acid metabolism
	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, carriers
	Cell envelope
	Cellular process
	Central intermediary metabolism
	Energy metabolism
	Fatty acid/Phospholipid metabolism
	Nucleotide metabolism
	Regulatory functions (Transcriptional regulators)
	Transport/binding protein
	rRNA
	Operon genes (function unknown)
	Flagellar associated gene
	Genes known to be involved in salt-stress response
	General stress induced gene
	Unknown or not classified genes

7.3.4 NaCl ストレス関連遺伝子 (Table 7-7)

(1) K⁺の取り込みとグルタミン酸合成

塩ストレスに応答してはじめに生体内で見出されるのが、K⁺の外界からの取り込みである。しかし、Mild/Strong-salt 共に発現量変化が観察されなかった。一方、K⁺の対イオンとして体内で合成されることが知られているグルタミン酸の合成遺伝子の発現量変化も観察されなかった。

(2) 適合溶質トランスポーター (Glycine betaine/Proline)

生物は外界に適合溶質とすることができる物質が存在するときは、いくつかのトランスポーターを介してのその輸送を行なっている。今回の解析で発現量が増加していたトランスポーターが Proline/glycine betaine ABC-type transport systems (RSP3057-3059) と Choline-glycine betaine transporter (RSP3080) である。特に、Proline/glycine betaine ABC-type transport systems は Strong-salt 7 min/45 min において、全遺伝子の中で最も発現量が増加していることが見出された。

(3) トレハロース合成遺伝子

本菌はトレハロースを適合溶質として蓄積することにより、塩ストレスに適応していることが知られている。トレハロース合成に関与する遺伝子として、Mild/Strong-salt のいずれにおいても *otsA*、*otsB* 遺伝子の発現量が増加していることが明らかになった。特に、7 min よりも 45 min においてさらに発現量が増加していた。OtsA-OtsB 経路は本菌におけるトレハロースの主要生合成経路として知られている。一方、サブの経路と考えられている TreY-TreZ 経路の遺伝子に関しては、ほとんど発現量が変化していなかった。さらに、トレハロースの合成系および分解系にも働くことが示唆されている TreS 経路の遺伝子は、特に Strong-salt で発現が増加していることが明らかになった。

(4) *sspA* 遺伝子

本論文で解析を進めてきた *sspA* 遺伝子は Mild/Strong salt のいずれにおいても、発現量が増加していることが明らかになった。また、*otsA*、*otsB* と同様に、7 min よりも 45 min においてさらに発現量が増加していた。一方、*sspA* 遺伝子の遺伝子座における周辺遺伝子の発現量はほとんど変化していなかった。さらに、SspA と同じ局在を示す外膜タンパク質の遺伝子に関しても、Mild-salt 7 min において UDP-3-*O*-acyl-*N*-acetylglucosamine deacetylase (*lpxA*) (RSP2115-2116) の発現量が大きく増加している以外は目立った発現量変化は見出されなかった。

Table 7-7 Expression analysis of genes known to be involved in salt-stress response

Gene	Mild-salt 7 min		Mild-salt 45 min		Strong-salt 7 min		Strong-salt 45 min	
	Fold	crt	Fold	crt	Fold	crt	Fold	crt
Genes investigated in our laboratory								
RSP0948	1.7	1.3	1.9	1.4	2.3	1.5	11.0	8.1
OtsA, trehalose-6-phosphate synthase								
RSP0949	1.8	1.3	2.0	1.4	6.6	4.5	8.6	6.3
OtsB, trehalose-phosphatase protein								
RSP2452	-1.0	0.9	1.0	0.9	-1.2	1.0	1.1	1.1
TreY, maltotrioglycosyl trehalose synthase								
RSP2450	1.3	1.1	1.3	1.1	-1.2	1.1	1.4	1.2
TreZ, maltotrioglycosyl trehalose trehalohydrolase protein								
RSP2446	1.3	1.2	1.3	1.2	-1.2	1.0	3.9	3.5
TreS, trehalose synthase								
RSP0753	1.4	1.1	1.7	1.5	1.9	1.5	10.5	8.8
SspA, salt-stress induced outer membrane protein								
RSP3219	-1.4	1.3	-1.3	1.1	-1.5	1.3	-1.5	1.3
RSPhiK1, Histidine kinase								
RSP3240	-1.2	1.0	-1.1	1.0	-1.1	1.0	1.0	1.9
RSPhiK2, Histidine kinase								
Compatible solute transporter								
RSP3057	1.2	1.0	1.3	1.0	1.1	0.8	16.4	12.8
ProU (ProV), Proline/glycine betaine ABC-type transport system								
RSP3058	2.0	1.4	2.4	1.7	3.9	2.6	45.3	31.1
ProU (ProW), Proline/glycine betaine ABC-type transport system								
RSP3059	2.1	1.1	2.9	1.5	9.6	4.3	50.1	22.7
ProU (ProX), Proline/glycine betaine ABC-type transport system								
RSP3080	1.8	1.3	2.0	1.5	1.1	0.7	4.0	2.9
BetT, Choline-glycine betaine transporter								
RSP2179	1.1	1.0	1.1	1.0	-1.4	1.2	1.1	1.0
ProU (ProV), Proline/glycine betaine ABC-type transport system								
RSP2180	1.4	1.2	1.3	1.1	-1.0	0.7	1.2	0.9
ProU (ProW), Proline/glycine betaine ABC-type transport system								
RSP2181	1.3	1.0	1.2	1.0	1.7	1.4	1.3	0.9
ProU (ProX), Proline/glycine betaine ABC-type transport system								
K⁺ uptake system								
RSP1265	-1.0	1.0	-1.0	1.0	-1.0	0.9	-1.0	0.9
KdpA, K ⁺ uptake system								
RSP1266	-1.0	1.0	-1.0	1.0	-1.0	0.9	-1.0	0.9
KdpB, K ⁺ uptake system								
RSP1267	1.0	0.8	-1.0	0.8	-1.1	0.9	1.2	0.9
KdpC, K ⁺ uptake system								
RSP1268	-1.0	0.9	-1.1	0.9	-1.1	0.8	-1.0	0.8
KdpD, K ⁺ uptake sensor kinase								
RSP1269	-1.1	1.0	-1.1	1.0	1.2	1.1	1.0	0.9
KdpE, K ⁺ uptake response regulator								
Glutamate synthesis								
RSP0189	1.2	1.0	-1.1	0.9	10.6	7.0	2.1	1.5
GltD, glutamate synthase								
RSP2643	1.3	0.9	1.2	1.0	1.2	0.8	1.8	1.3
GlnE, glutamate-ammmonia-ligase adenylyltransferase								
RSP1146	-1.3	1.2	-1.1	1.0	1.1	0.9	-3.2	2.8
GltB, glutamate synthase								
RSP1148	-1.2	1.1	-1.1	1.0	-1.6	1.4	-4.4	4.2
GltD, glutamate synthase								

^a Derived from Oak ridge National Laboratory genome annotations.