

第3章

新規 PII 結合タンパク質 PamA の同定と機能解析

第1節 序

シアノバクテリアにおいて PII が同定された後、長い間、PII の相互作用因子が発見されなかったが、2004 年に 2 つの別のグループにより、*Synechococcus* PII 制御下にある結合タンパク質として、アルギニン合成酵素 *N*-アセチルグルタミン酸キナーゼ (NAGK) が同定された (Burillo et al., 2004; Heinrich, et al., 2004)。生化学的な解析により、PII はタンパク質間相互作用により NAGK の活性を上昇させ、また NAGK と PII の相互作用は ATP と 2-OG の存在下で阻害されることが判った (Maheswaran et al., 2005)。この結果は窒素充足時に PII との相互作用により NAGK の活性が上昇し、窒素欠乏時には PII が解離することにより、その活性が低下することを示唆する。実際、NAGK の活性は、窒素欠乏時に比べ、窒素充足時に高いことが判っている (Heinrich, et al., 2004)。

このように、PII がアルギニン合成酵素を直接制御することが明らかになったが、PII の役割は窒素間連遺伝子群の転写制御など、多岐に渡ると考えられている。本章では *Synechocystis* における新規 PII 結合タンパク質 PamA (Sll0985) の同定とその機能解析について言及する。

第2節 材料と方法

(1) 材料と生育条件

菌株 : *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT 株 (GT)、PamA 欠損株 (GN10)、
PamA 相補株

生育条件 : 第2章第2節 材料と方法参照。PamA 欠損株は 50 µg/ml カナマイシン、PamA 相補株は固体培養の際は 3 µg/ml ゲンタマイシン、液体培養の

際は 0.5 µg/ml ゲンタマイシンをそれぞれ添加した。窒素欠乏実験は、modified BG-11（窒素源アンモニア）で培養した細胞を、ニトロセルロース膜（MF-Membrane filters, ミリポア）上にバキュームで集め、窒素源を含まない BG-11（BG-11₀）液体培地に懸濁することにより行った。

PamA 欠損株の作製：PamA 欠損株作製用プラスミドの作製は田中寛博士により行われた。*Synechocystis* コスミドクローン cs0120 より (Shestopalov et al., 1994)、5.5 kbp の *HpaI* 断片を切り出し、これを *HincII*（タカラバイオ）で切断した pTZ18R（アマシャムバイオサイエンス）にクローニングした（*pamA* の方向は *lacZ* と同方向）。作製したプラスミドを p0985 と名付け、*SmaI* と *XhoI* で切断し、DNA blunting kit（タカラバイオ）で平滑末端にし、セルフライゲーションにより、ポリリンカー領域の *BamHI* サイトを削除した。このプラスミドを *BamHI* で切断し、*pamA* コード領域+165 bp から下流の *sll0986*（トランスポゼース）までの約 2.4 kbp の断片を欠失させた。この領域に pKRP11 (Reece and Phillips, 1995) より *BamHI* で切り出されたカナマイシン耐性カセットを導入し、これを p0985B と名付けた。この p0985B を約 1~2 µg 分を 1 ml *Synechocystis* GT 株培養液に混ぜ、一晚培養し、約 100 µl 分の培養液を 5 µg/ml カナマイシン（シグマ）を含む BG-11 プレートに塗布し、得られたコロニーを 50 µg/ml カナマイシンを含む BG-11 プレートで培養し、植え継ぐことにより PamA 破壊株を得た。*pamA* の欠損は PCR（巻末付録参照）により確認された (Fig. 3-4A 参照)。

PamA 相補株の作製：p0985 プラスミドから *pamA* を含む 3.3 kbp の領域を *SacII* と *EcoRV*（タカラバイオ）で切り出し、得られた断片を DNA blunting kit

で平滑化した。次に得られた断片を、シアノバクテリア用自立複製型プラスミド pVZ322 (Zinchenko et al., 1999) を *Sma*I (タカラバイオ) で切断し、ライゲーションした。得られた相補用プラスミドを pVZ322:pamA と名付け、PamA 欠損株 (GN10) にコンジュゲーションで導入した。コンジュゲーションは PamA 欠損株 2 ml 分、pVZ322:pamA を持った大腸菌 DH5α 500 μl 分、コンジュゲーション用ヘルパー大腸菌 RK2013 100 μl 分の細胞を 1 つのエッペンドルフチューブに遠心で集め、BG-11 液体培地 100 μl に懸濁し、30°C で一晩インキュベートした。この細胞を、シアノバクテリアのみが増殖するように、20 μg/ml トリメトプリム (シグマ) と、pVZ322 のマーカーであるゲンタマイシンを 3 μg/ml 添加した BG-11 固体培地に蒔いた。

(2) 酵母ツーハイブリッドスクリーニング

酵母ツーハイブリッドスクリーニングは、佐藤修正博士、田畑哲之博士の研究室 (かずさ DNA 研究所) により行われた。また、ベイト用ベクターの作製は田中寛博士、大橋幸男氏により行われた。PII の全長 (*glnB*, *ssl0707*) を特定のプライマーを用いた PCR により増幅し (巻末付録参照)、*Asc*I (ニューイングランドバイオラブ) で切断後、pAS2-1-*Asc*I (Sato et al, in preparation) を *Asc*I と *Sma*I で切断した部位に導入した。

(3) GST-PamA (475-680) と CBD-PII のアフィニティークロマトグラフィーによる精製

Synechocystis ゲノム DNA を鋳型として、PamA の C 末端領域 (475~680

アミノ酸残基)を含む部分を、特定のプライマーを用いて *PfuI* (プロメガ) により増幅し (巻末付録参照)、*ScaI* と *XhoI* (タカラバイオ) により切断した。この断片を、*SmaI* と *XhoI* で切断した pGEX5X-1 (アマシャムバイオサイエンス) に導入した (GST-tag 付き)。PII の発現用コンストラクトは、*glnB* 全長部位を特定のプライマーを用いて PCR により増幅し (巻末付録参照)、*StuI* と *SacI* (タカラバイオ) で切断した後、pET35b (ノバジェン) の *ScaI*-*SacI* 部位に導入した (CBD-tag 付き)。完成したプラスミドはシークエンシングにより確認した。GST-PamA(475-680)と CBD-PII をコードするプラスミドをタンパク質発現用大腸菌 BL21 codon plus (ノバジェン) に形質転換した。BL21 codon plus を、27°C で LB 液体培地 1 L で培養し、OD₆₀₀ = ~0.5 で 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (和光純薬) を加え、一晚培養した。細胞を遠心で回収し、30 ml Lysis buffer (40 mM Tris-HCl, pH8.0, 5% glycerol, 5 mM EDTA, 4.5% TritonX-100) に懸濁し、超音波破碎した後、20 分間 17,400 x *g* で遠心し、封入体を集めた。得られた封入体を滅菌水で洗浄し、封入体の 1/2 量の Urea 溶液 (8 M urea, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM dithiothreitol) に懸濁し、37°C で 1 時間インキュベートした。封入体より可溶化された GST-PamA(475-680)と CBD-PII タンパク質をそれぞれ PBS (1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 81 mM Na₂HPO₄, 15 mM KH₂PO₄) または CBinD buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl) に透析で置換し、glutathione-Sepharose 4B (アマシャムバイオサイエンス) または CBinD レジン (ノバジェン) を加えて精製した。タンパク質の定量を Bio-Rad protein assay (バイオラッド) を用いて行い、GST-PamA(475-680)と CBD-PII をそれぞれ~4 mg または~3.5 mg

ずつ得た。

PII、PamA に対する抗血清は、精製した GST-PamA(475-680)と CBD-PII を 2 mg ずつ用いて、Qiagen 社に外注して作製した。

(4) GST-pulldown 解析

精製した GST または GST-PamA(475-680)を 2.5 μ g 分ずつ 30 μ l glutathione-Sepharose 4B に加え、binding buffer (50 mM Hepes-KOH, pH7.9, 2 mM $MgCl_2$, 10% glycerol, 0.1% TritonX-100) で全量を 400 μ l にした。室温で 30 分間インキュベートした後、精製した CBD-PII 3.0 μ g ずつ加え、binding buffer で全量を 1 ml にし、4°C で一晩混合した。次にレジンを 300 μ l の binding buffer で 3 回洗浄し、50 μ l の SDS-Sample buffer (0.25 M Tris-HCl, pH 6.8, 20% 2-mercaptoethanol, 8% SDS, 20% sucrose, 0.008% bromophenol blue) を加え、95°C で 5 分間熱した。レジンから解離したタンパク質を 12% SDS-PAGE ゲルで電気泳動し、抗 CBD-tag 抗体 (Novagen) を用いたウエスタンブロットで CBD-PII タンパク質を検出した。

(5) ファーウエスタンブロット

精製した GST または GST-PamA(475-680)を 3.0 μ g 分ずつ 12% SDS-PAGE ゲルで電気泳動し、Immobilon-P transfer membrane にブロットした。非リン酸化型またはリン酸化型 PII タンパク質を含む細胞抽出液を、それぞれ窒素充足時 (アンモニア培養) または窒素欠乏後 4 時間の *Synechocystis* 細胞を超音波破碎することにより得た。PII の量は窒素欠乏 4 時間後に窒素充足時の約 2.1

倍になり (Fig. 3-8 参照)、PII の量を合わせるため、窒素充足時の細胞からの全タンパク質 100 μg 分、窒素欠乏時の細胞から全タンパク質 48 μg 分の細胞抽出液をメンブレンと混合し、冷 PBS-T で全量を 10 ml にして 4°C で 3 時間インキュベートした。その後、PBS-T でメンブレンを 10 分間 x 5 回洗浄し、タンパク質間を架橋するため、0.5%ホルムアルデヒドを含む PBS-T で、30 分間振盪した。次に架橋反応を終了させるため、2% グリシンを含む PBS-T で 10 分間インキュベートし、PBS-T で 10 分間 x 2 回洗浄した。このメンブレンを 3% bovine serum albumin (和光純薬) でブロッキングし、抗 PII 抗血清または抗 GST 抗体 (Molecular Probe) で検出した。

内在性の PamA と精製した CBD-PII の結合を調べる実験は、まず CBD-PII を 3.0 μg 分ずつ 12% SDS-PAGE ゲルで電気泳動し、Immobilon-P transfer membrane にブロットした。*Synechocystis* 細胞から PamA タンパク質を抽出するために、細胞を超音波破碎し、1% Triton-X100 を含む PBS で、90 分間、4°C で振盪した。17,400 x g で 10 分間遠心して、未破碎細胞を除き、全タンパク質量 1.6 mg 分の細胞抽出液をメンブレンと混合し、1% Triton-X100 を含む冷 PBS で全量を 10 ml にして 4°C で 3 時間インキュベートした。その後、PBS-T でメンブレンを 10 分間 x 3 回洗浄し、上記と同様の操作を行い、PII に結合した PamA タンパク質を抗 PamA 抗血清で検出した。

(6) ノーザンブロット解析

RNA の抽出およびノーザンブロットは第 2 章第 2 節 (3) と同様に行った。

(7) ウエスタンブロット解析

ウエスタンブロット解析は第2章第2節(7)と同様に実験を行った。PIIのリン酸化状態の測定は、12% SDS-PAGE ゲルによる電気泳動の代わりに 10% Native-PAGE ゲルによる電気泳動を行い、リン酸化状態の異なる PII を分離した後、抗 PII 抗血清でシグナルを検出した。

第3節 結果

(1) 酵母ツーハイブリッドスクリーニングによる PII 結合タンパク質の同定

Synechocystis PII をベイトとし、*Synechocystis* ゲノムライブラリー 3.8×10^6 クローンに対して酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行った結果、4つのポジティブクローンを得た。そのうちの1つは PII 自身であり、これは PII が三量体を作るという事実と一致する。残りの3つのクローンはすべて未知タンパク質 Sll0985 の C 末端領域であった。sll0985 は 680 アミノ酸からなるタンパク質と予想され、SOSUI プログラムを用いた解析から7回膜貫通ドメインを持つと考えられた (Hirokawa et al, 1998) (Fig. 3-1A)。また、BLAST サーチの結果、MscS ファミリーに属するタンパク質であることがわかった (Fig. 3-1A) (第4節考察参照)。酵母ツーハイブリッドスクリーニングの結果、Sll0985 の C 末端領域 (571~680 アミノ酸) の部分が PII と相互作用することが示唆され (Fig. 3-1A)、また、この領域は他のシアノバクテリアにおいても比較的保存性の高い領域であることが判った (Fig. 3-1B)。この Sll0985 を PamA (PII-associated membrane protein A) と名付け、以下の解析を行った。

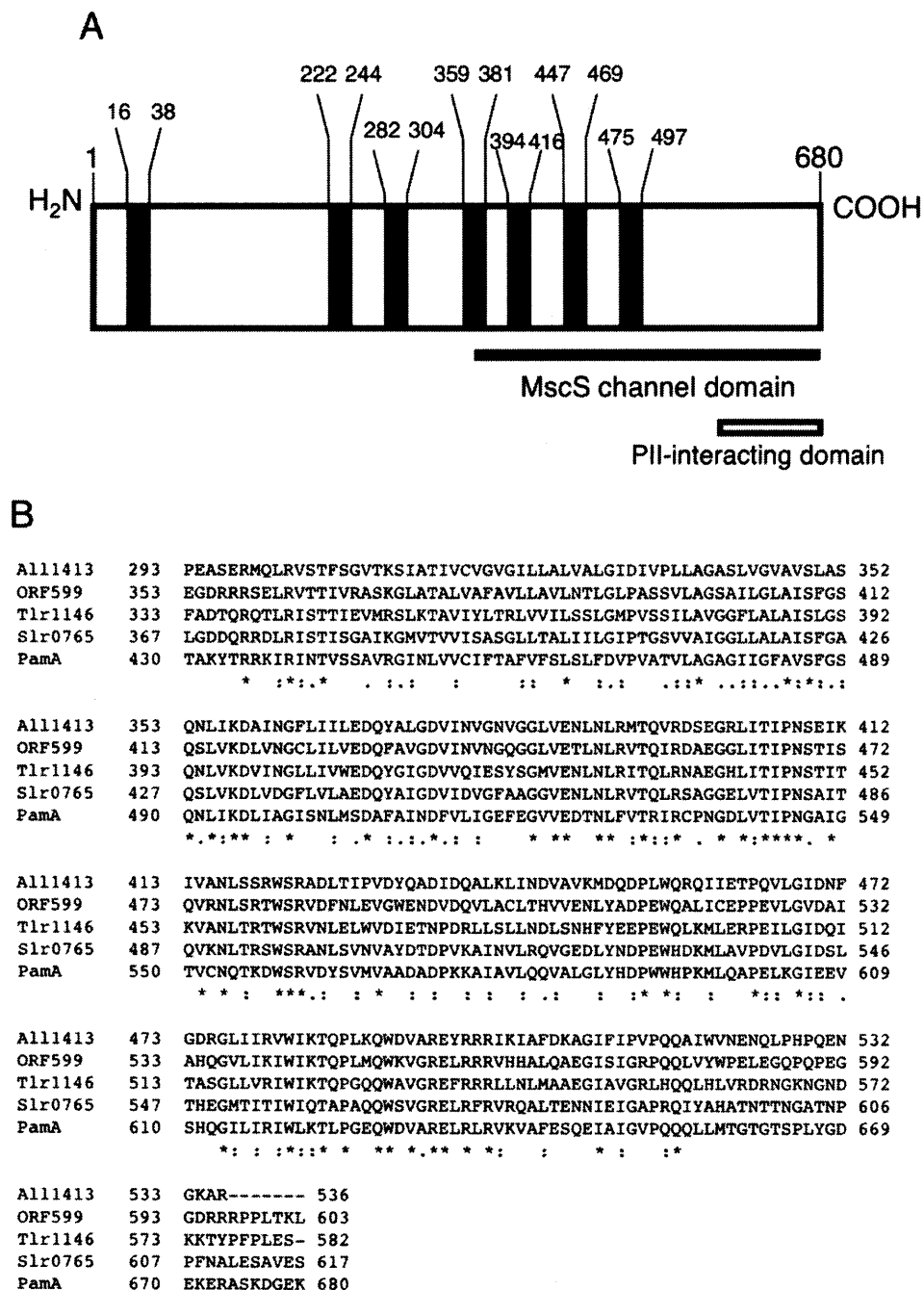


Fig. 3-1 *Synechocystis* PII 結合タンパク質 PamA (Slr0985) の同定

A. *sll0985* にコードされた PamA タンパク質の模式図。PamA タンパク質は 680 アミノ

ノ酸からなり、7回膜貫通ドメインを持つと予想される (Closed Bar で図示)。膜貫通ドメインの最初と最後のアミノ酸の位置が示されている。黒棒は NCBI ドメインサーチにより得られた MscS ドメイン (COG0668)、白棒は酵母ツーハイブリッド解析により予想された PII 結合ドメイン。B. *Synechocystis* PamA C 末端のアライメント。アライメントは ClustalW ソフトウェア Ver. 1.8 により行われた。アステリスクは、すべての配列に保存されたアミノ酸を示す。コロンは、以下に示す “Strong group” 内で保存されたアミノ酸を示す (STA, NEQK, NHQK, NDEQ, QHRK, MILV, MILF, HY, or FYW)。ドットは以下に示す “Weak group” 内で保存されたアミノ酸を示す (CSA, ATV, SAG, STNK, STPA, SGND, SNDEQK, NDEQHK, NEQHRK, FVLIM, or HFY)。All1412, *Anabaena* sp. PCC 7120; ORF599, *Synechococcus* sp. PCC 7942; Tlr1146, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1; Slr0765 and PamA, *Synechocystis* sp. PCC 6803。GenBank accession number はそれぞれ、BAB73370, AAK40245, BAC08698, BAA10769, BAA17174。

(2) *In vitro*における PII と PamA のタンパク質間相互作用

酵母ツーハイブリッドスクリーニングで見られた PII と PamA の相互作用を確認するために、*in vitro* での結合実験を行った。まず始めに PII を CBD (Cellulose binding domain) -tag との、PamA の C 末端領域 475-680 アミノ酸部位を GST-tag との融合タンパク質として大腸菌で発現させ、アフィニティークロマトグラフィーで精製した (精製タンパク質をそれぞれ CBD-PII、GST-PamA(475-680)とした) (Fig. 3-2A)。次に GST-PamA(475-680)または GST のみを、CBD-PII および glutathione-Sepharose 4B レジンと混合し、遠心により結合タンパク質を沈降させたところ、GST-PamA(475-680)と CBD-PII は共沈降したが、GST のみの場合は CBD-PII が得られなかった (Fig. 3-2B)。さらに、補因子が相互作用に与える影響を調べたところ、ATP または 2-OG 単独では相互作用に影響を与えなかったのに対し、1 mM ATP と 1 mM 2-OG を同時に添加すると、PII と PamA の結合が阻害されることが判った (Fig. 3-2B)。

In vitro での相互作用をさらに確認するためにファウエスタンプロットを行った。まず精製した GST または GST-PamA(475-680)を 12% SDS-PAGE ゲルで電気泳動し、メンブレン上にブロットした。次に PII のリン酸化状態の、PamA との相互作用に与える影響を調べるため、PII を窒素充足細胞 (非リン酸化型 PII) または窒素欠乏細胞 (リン酸化型 PII) から抽出し、メンブレンと混合し、最後に抗 PII 抗血清でシグナルを検出した。その結果、PII は GST のみの場合に比べ、GST-PamA(475-680)と強い相互作用を示し、また、リン酸化型、非リン酸化型 PII の間で結合強度の差は見られなかった (Fig. 3-3A)。次に、これまで PamA が C 末端のみのタンパク質を用いたが、内在性の全長 PamA も

PII と結合できるか否かを検討した。精製した CBD-PII を 12% SDS-PAGE ゲルで電気泳動後、メンブレンに転写し、*Synechocystis* 細胞から 1% TritonX-100 で可溶化した PamA を含む細胞抽出液を混合し、最後に抗 PamA 抗血清で結合した PamA タンパク質のシグナルを検出した。その結果、細胞抽出液なし、または抗 SigE 抗体で検出した場合に比べ、細胞抽出液を加え、抗 PamA 抗体で検出した時により強いシグナルが得られた (Fig. 3-3B)。

(3) PamA 欠損株の作製と PamA 欠損による窒素間連遺伝子群の発現低下

PamA の機能を調べるために、GT 株で *pamA* を破壊した株を作製し、これを GN10 と名付けた (Fig. 3-4A)。遺伝子破壊は PCR により確認した (Fig. 3-4A)。GN10 株は、野生株と同等の増殖速度を示したが、ノーザンブロットによる解析の結果、窒素関連遺伝子のうち、*nblA* (NblA, 窒素欠乏時の集光装置フィコビリソームの分解に必須なタンパク質)、*nrtABCD*、*ureG* (UreG, ウレアーゼアクセサリータンパク質) の発現が窒素充足時および窒素欠乏時に減少していることがわかった (Fig. 3-4B)。一方、他の窒素間連遺伝子 *glnA*、*glnB*、*amt1*、*glnN* については、GT 株と GN10 株における mRNA 量の差は少なかった (Fig. 3-4B)。

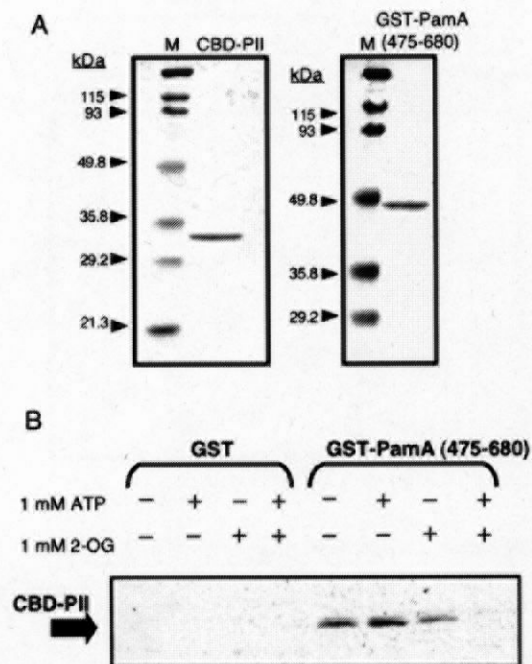


Fig. 3-2 GSTpull-down による PII と PamA C 末端の相互作用

A. CBD-PilI と GST-PamA(475-680)の精製。大腸菌で過剰発現した CBD-PilI と GST-PamA(475-680)をアフィニティークロマトグラフィーで精製し、12% SDS-PAGE ゲルで泳動し、クマシーブリリアントブルーにより染色した。M は分子量マーカーを示す。B. GSTpull-down 解析。精製した GST または GST-PamA(475-680) 2.5 μ g を glutathione-Sepharose 4B レジンに結合させ、CBD-PilI 3.0 μ g を、1 mM ATP または 1 mM 2-OG 存在下、非存在下に加え、ベイトタンパク質と共沈降した CBD-PilI を CBD-tag 抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。

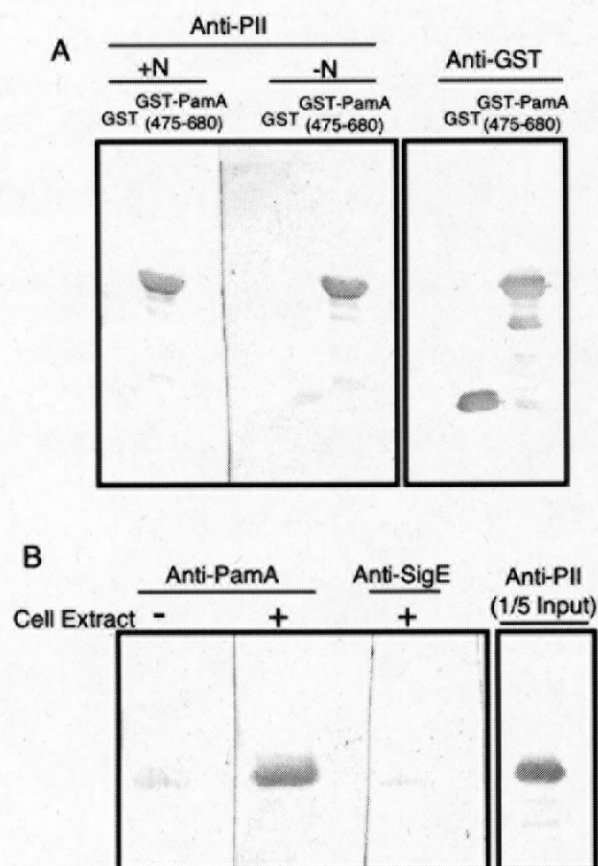


Fig. 3-3 ファーウェスタンブロットによる PII と PamA の相互作用

A. 3.0 μg の精製した GST または GST-PamA(475-680)を 12% SDS-PAGE ゲルで泳動し、Immobilon-P メンブレンにブロットした。非リン酸化型またはリン酸化型 PII を含む GT 株細胞抽出液 (全タンパク質量それぞれ 100 または 48 μg 分) をメンブレンと混合し、結合した PII タンパク質を抗 PII 抗血清で検出した。インプットコントロールとして 1.5 μg の精製した GST または GST-PamA(475-680)を 12% SDS-PAGE ゲルで泳動し、抗 GST 抗体(Molecular

Probe) によるウエスタンブロットを行った。B.内在性 PamA を用いたファールウエスタンブロット。3.0 μg の精製した CBD-PII を 12% SDS-PAGE ゲルで泳動し、Immobilon-P メンブレンにブロットした。PamA を含む GT 株細胞抽出液 (全タンパク質量 1.8 μg 分) をメンブレンと混合し、結合した PamA タンパク質を抗 PamA 抗血清で検出した。ネガティブコントロールとして抗 SigE 抗血清を用いた。インプットコントロールとして 0.6 μg の精製した CBD-PII を 12% SDS-PAGE ゲルで泳動し、抗 PII 抗血清によるウエスタンブロットを行った。

(4) PamA 欠損による *sigE* と糖異化遺伝子群の発現低下

次に NtcA レギュロンの 1 つである SigE の発現を調べたところ、GN10 株において、窒素充足時および窒素欠乏時に *sigE* mRNA 量の低下が見られた (Fig. 3-5A)。一方、窒素欠乏時の mRNA 量の増加は GN10 株においても観察された (Fig. 3-5A)。次に SigE のタンパク質レベルを調べたところ、mRNA 量と同様に、PamA 欠損により減少することが判った (Fig. 3-5B)。第 2 章の結果より、SigE は糖異化遺伝子発現の正の制御因子であることが判ったため、GN10 における糖異化遺伝子群の発現を調べたところ、*gap1*、*zwf*、*gnd* の mRNA 量が GT 株に比べ減少していることが明らかになった (Fig. 3-5C)。

(5) PamA 相補株作製と PamA 欠損による表現型の遺伝学的確認

GN10 株における表現型が PamA の欠損によることを遺伝学的に確認するため、野生型 *pamA* を pVZ322 ベクターで導入した (Fig. 3-6A)。プラスミドの導入は PCR による *pamA* 遺伝子の増幅により確認した (Fig. 3-6B および巻末付録参照)。ノーザンブロットの結果、GN10 株に野生型 *pamA* を導入することにより、*gap1* mRNA の量が回復することが明らかになった (Fig. 3-6C)。

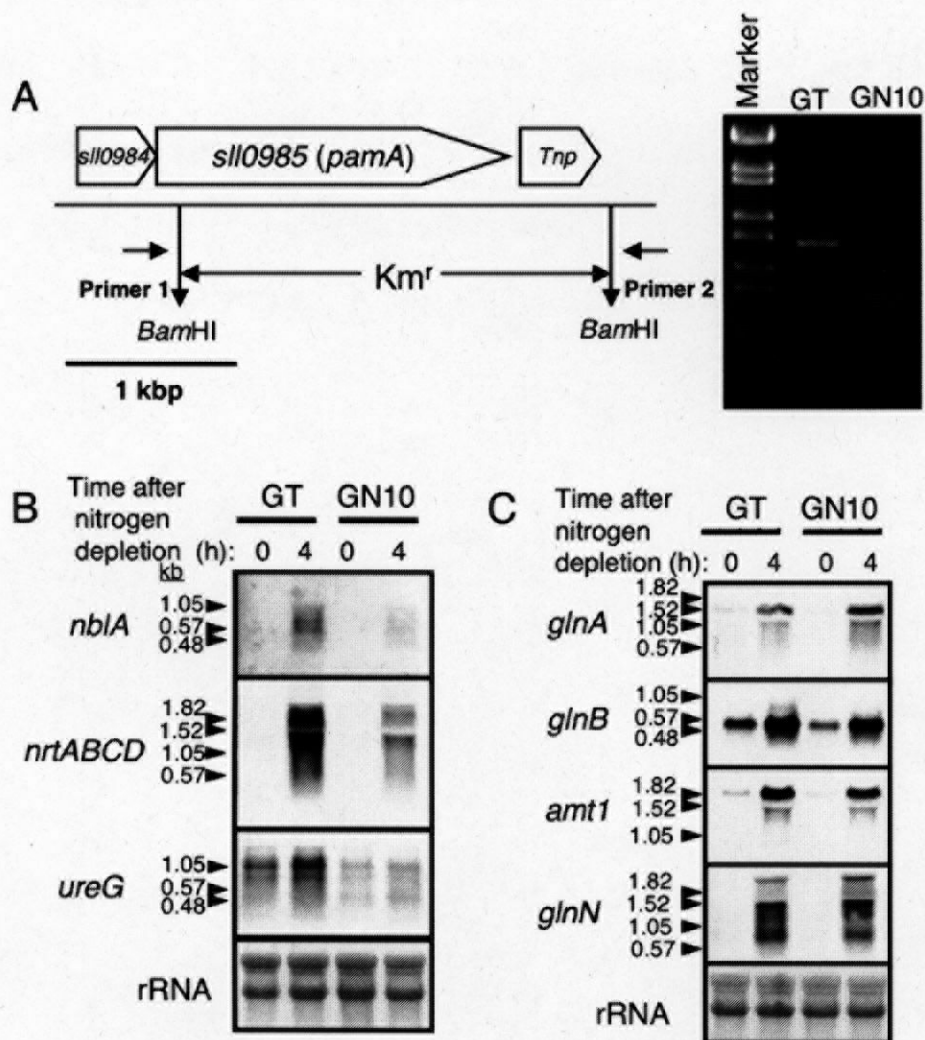


Fig. 3-4 A. PamA 欠損株の作製。2.4 kbp の *pamA* および下流のトランスポゾンを含む領域を *Bam*HI により切除し、1.2 kbp のカナマイシン耐性カセットに置き換えた。*pamA* 遺伝子の欠損は、図示されたプライマーを用いて、PCR に

より確認された。B.&C. GT 株および GN10 株における窒素間連遺伝子のノーザンブロット。Modified BG-11 で培養した GT 株または GN10 株を、BG-11₀ 培地に移し、0 または 4 時間で回収し、RNA を抽出した。各レーン全 RNA (8.0 μ g) ずつ泳動し、遺伝子特異的プローブを用いてノーザンブロット解析を行った。分子量サイズマーカーの位置は矢頭で示した。ローディングコントロールとしてメチレンブルーで染色した rRNA を下パネルに図示した。

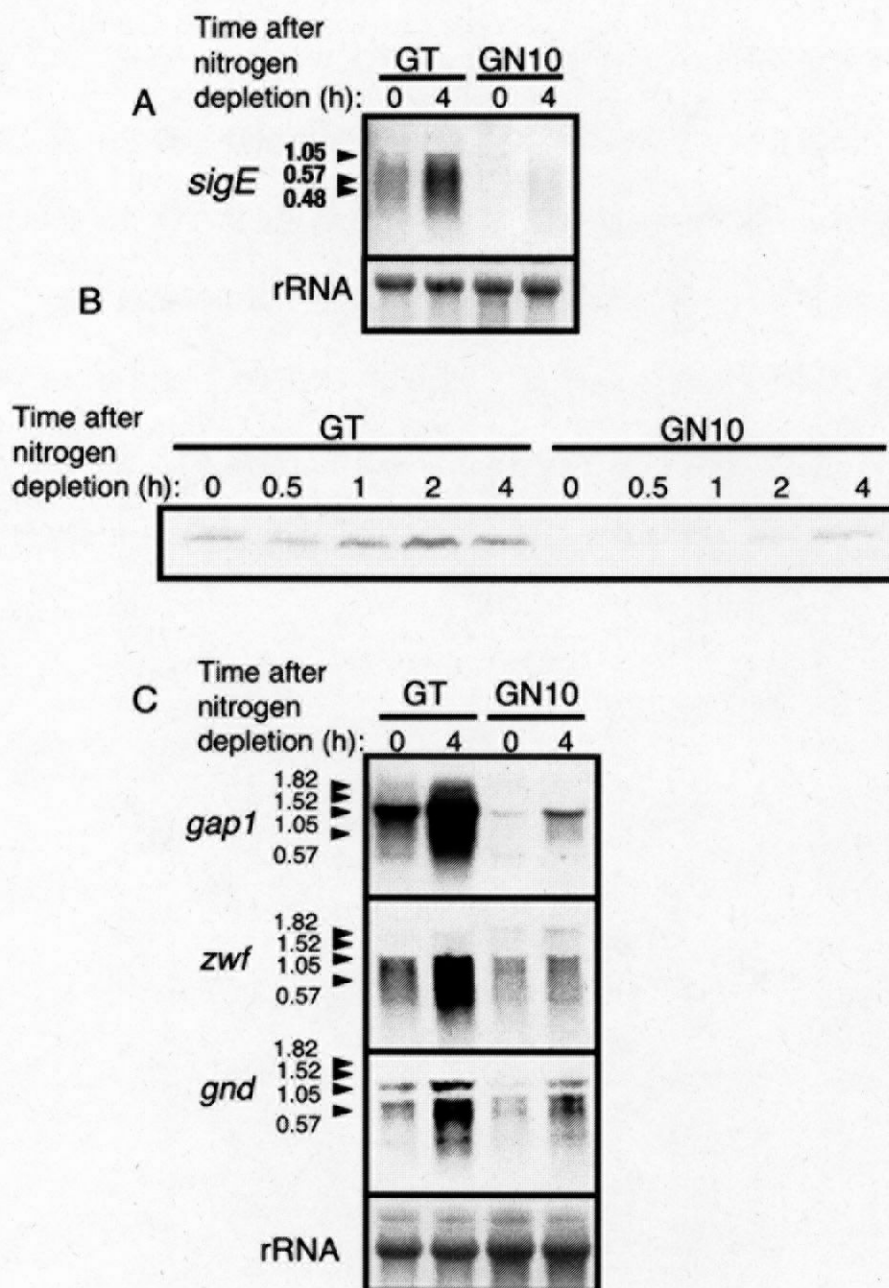


Fig. 3-5 PamA 欠損株における SigE および SigE-レギュロンの発現解析。

A. *sigE* プローブを用いたノーザンブロット。Modified BG-11 で培養した GT 株または GN10 株を、BG-11₀ 培地に移し、0 または 4 時間で回収し、RNA を抽出した。各レーン全 RNA (8.0 μg) ずつ泳動し、*sigE* プローブを用いてノー

ザンブロット解析を行った。分子量サイズマーカーの位置は矢頭で示した。ローディングコントロールとしてメチレンブルーで染色した rRNA を下パネルに図示した。B. GT 株と GN10 株における細胞内 SigE タンパク質量。Modified BG-11 で培養した GT 株または GN10 株を、BG-11₀ 培地に移し、経時的に細胞を回収し、超音波破碎によりタンパク質を抽出した。各レーン全タンパク質量 7.5 µg ずつ 12% SDS-PAGE ゲルに泳動し、抗 SigE 抗血清を用いたウエスタンブロットを行った。C. 糖異化遺伝子 (*gap1*, *zwf*, and *gnd*) のノーザンブロット。A. と同様に RNA を抽出し、*gap1*, *zwf*, *gnd* プローブを用いてノーザンブロット解析を行った。

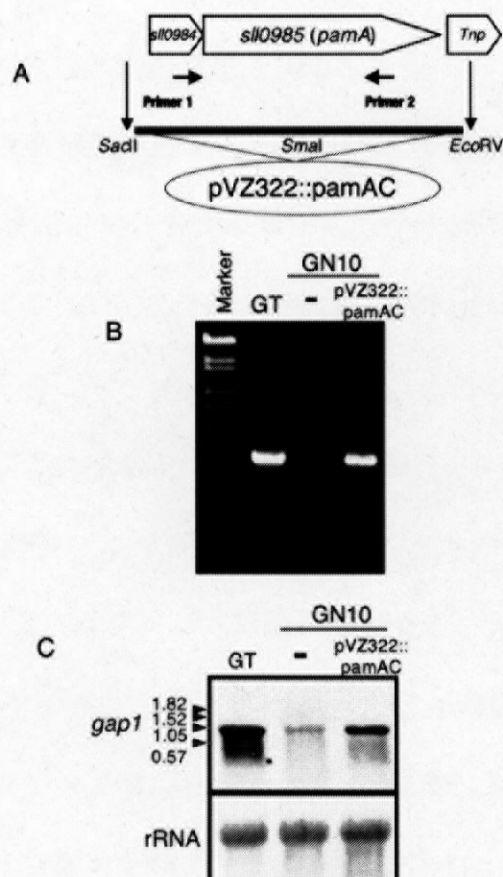


Fig. 3-6 PamA 欠損株の相補実験

A. PamA 相補用ベクターの模式図。 *pamA* と上流の *sll0984* を含む領域を pVZ322 ベクターに挿入し、GN10 株に形質転換した。B. GN10 内の pVZ322:*pamA* ベクターの保持は、A.に示された位置のプライマーを用いた PCR により確認された。C. *gap1* プローブを用いたノーザンブロット。Modified BG-11 培地で培養した GT 株、GN10 株および PamA 相補株から RNA を抽出し、各レーン 10 μ g ずつ用いてノーザンブロットを行った。分子量サイズマーカーの位置は矢頭で示した。ローディングコントロールとしてメチレンブルーで染色した rRNA を下パネルに図示した。

(6) PamA 欠損株の生理学的表現型の探索とグルコース感受性

PamA 欠損による生理学的表現型を探索したところ、GN10 株は 5 mM グルコースを含む固体培地（光混合栄養増殖条件）で増殖できないことを発見した（Fig. 3-7A）。GN10 株におけるグルコース感受性は液体培養においても検出され、PamA 欠損により 10 mM グルコース添加時に増殖が著しく阻害された。

(7) PamA 欠損株における PII タンパク質量とリン酸化状態

PamA の相互作用タンパク質である PII のタンパク質量を調べたところ、PamA 欠損により PII のタンパク質量が減少することが明らかになった（Fig. 3-8A）。GT 株では PII タンパク質が窒素欠乏後 4 時間で約 2 倍に増加したが、窒素欠乏時の PII タンパク質量の増加は GN10 株においても観察された（Fig. 3-8A）。一方、PII は窒素欠乏時にリン酸化を受けることが知られているが、PII のリン酸化状態には、PamA 欠損による影響はなかった（Fig. 3-8B）。

第4節 考察

酵母ツーハイブリッドスクリーニングおよび *in vitro* での結合解析により、新規 PII 結合タンパク質 PamA を同定した。また、PamA 欠損株において、一部の窒素間連遺伝子や、*sigE* および糖異化遺伝子群の発現が減少することから、PamA は遺伝学的に、炭素、窒素代謝遺伝子群の発現を正に制御することが明らかになった（Fig. 3-9）。

(1) 細胞内における PII と PamA の相互作用および PamA の機能予測

GST-pulldown 解析の結果、PII と PamA の相互作用が ATP と 2-OG の存在下で阻害されることが判った (Fig. 3-2B)。第一章で述べた通り、2-OG はシアノバクテリアにおける窒素欠乏のシグナル分子であり、PII に結合することが判っているが、その結合には ATP が必須である (Forchhammer and Hedler, 1997)。この結果は、PamA と PII が窒素充足時に結合し、窒素欠乏時に PII が PamA から解離することを示唆する。実際、通常培養条件において、PII は細胞質膜に結合することが知られているが (Huang et al., 2006)、これは PamA との結合による可能性がある。一方、PII リン酸化状態は、PII と PamA の相互作用に影響がなかった (Fig. 3-3A)。窒素欠乏後、2-OG は約 15 分で 2 倍に上昇するのに対し (Muro-Pastor et al., 2001)、PII のリン酸化は約 1 時間かかる (Fig. 3-8)。これらのことから、PII は PamA から 2-OG をシグナルとして解離するため、時間のかかる PII のリン酸化は相互作用に影響を与えないと考えられる。

In silico 解析の結果、PamA は MscS (Mechansensitive channel S) ファミリーに属することがわかった。MscS は、バクテリアに広く保存されるタンパク質で、浸透圧の低下の際に、溶質を排出することにより浸透圧の調節を行うイオンチャネルである (Pivetti et al, 2003)。Synechocystis を含むシアノバクテリアは MscS のオルソログを持つため、PamA の機能は MscS とは異なると考えられる。PamA の機能については明らかでないが、腸内細菌において、PII パラログである GlnK がアンモニアトランスポーターと直接相互作用し、その活性を制御しているという例が知られているため、PamA も PII との相互作用によってその活性が制御されるイオンチャネルであることが予想される。

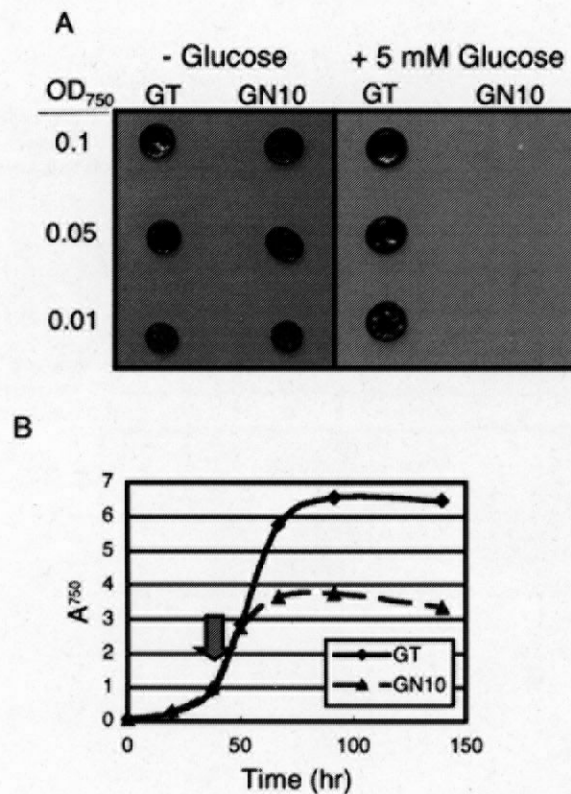


Fig. 3-7 PamA 欠損株のグルコース感受性

A. GT 株および GN10 株を 5 mM グルコースを含む、または含まない modified BG-11₀ 固体培地上で培養した。各スポットは、OD₇₅₀ = 0.1、0.05、または 0.01 の培養液を各 1 μ l ずつ滴下した。プレートの写真は、培養開始後 5 日目に撮られた。B. GT 株および GN10 株を modified BG-11 液体培地で培養し、矢印の時点（培養開始 48 時間後）で 10 mM グルコースを添加した。細胞の増殖と濃度は OD₇₅₀ の値を分光光度計（Beckman model DU640）による測定で求めた。

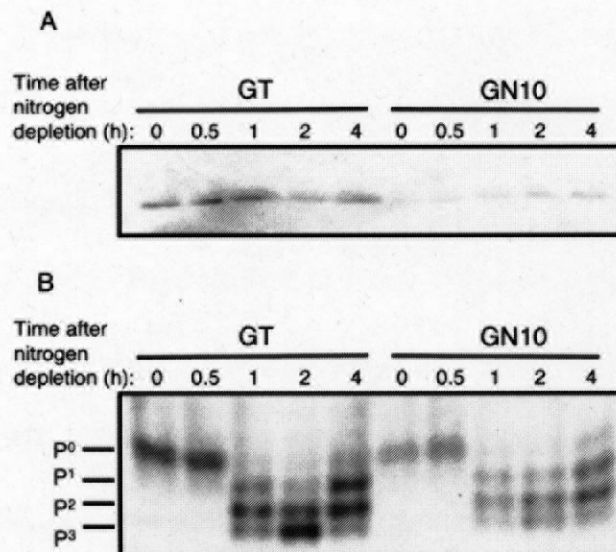


Fig. 3-8 抗 PII 抗血清を用いたウエスタンブロット。

A. GT 株と GN10 株における細胞内 SigE タンパク質量。Modified BG-11 で培養した GT 株または GN10 株を、BG-11₀ 培地に移し、経時的に細胞を回収し、超音波破碎によりタンパク質を抽出した。各レーン全タンパク質量 7.0 μg ずつ 15% SDS-PAGE ゲルに泳動し、抗 PII 抗血清を用いたウエスタンブロットを行った。B. PII リン酸化状態の測定。各レーン全タンパク質量 5.0 μg ずつ 10% Native-PAGE ゲルに泳動し、抗 PII 抗血清を用いたウエスタンブロットを行った。P⁰ は非リン酸化型 PII 三量体、P¹、P²、P³ はそれぞれ 1、2、3 サブユニットずつリン酸化された PII 三量体を示す。

(2) PamA 欠損による窒素関連遺伝子群の発現低下について

PamA 欠損により、*nblA*, *nrtABCD*, *ureG*, *sigE* などの窒素関連遺伝子群の発現が低下した (Fig. 3-4B and 3-5A)。PamA は膜タンパク質であるため、直接転写に関与していることは考えにくい。ウエスタンブロットの結果より PII タンパク質量が PamA 欠損株で減少していることが明らかになった (Fig. 3-8A)。*Synechococcus* における PII 欠損株では NtcA レギュロンの発現が減少することが知られている (Aldehni et al., 2003; Paz-Yepes et al., 2003)。近年、*Synechococcus* PII の結合タンパク質として PipX (PII interacting protein X) が同定された (Espinosa et al., 2006)。PipX は *Synechococcus*, *Synechocystis* をはじめシアノバクテリアにのみ保存されるタンパク質で、*Synechococcus* では PII に加え、NtcA とも相互作用することから、PII のシグナルが PipX を介して NtcA に伝達され、窒素関連遺伝子群の転写を制御していると考えられる (Espinosa et al., 2006)。*Synechocystis* における PipX の役割、PipX と PII または NtcA との相互作用は未知であるが、PamA 欠損株における窒素関連遺伝子群の発現低下は PII タンパク質量の低下に起因すると考えられる。

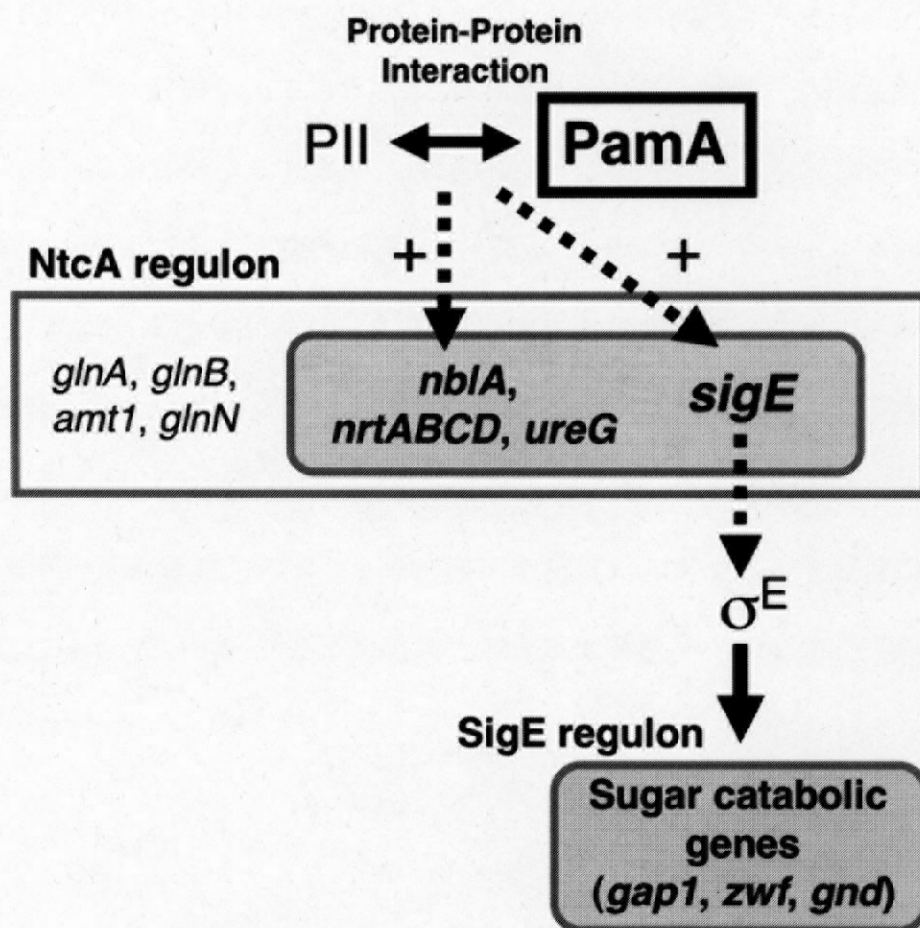


Fig. 3-9 PamA 機能のモデル図

PamA は PII と直接相互作用し、遺伝学的に、*nblA*、*nrtABCD*、*ureG*、*sigE* などの NtcA レギュロンの一部の発現を活性化する。SigE は、続いて、糖異化遺伝子群の発現を上昇させる。

(3) PamA 欠損株のグルコース感受性の原因

PamA 欠損による生理学的表現型を探索したところ、グルコース感受性を示すことが判った。*Synechocystis* において、Gap1 欠損株が同様にグルコース感受性を示すことが知られている (Koksharova et al., 1998)。PamA 欠損により *gap1* mRNA 量が減少したため、Gap1 活性の低下が PamA 欠損株のグルコース感受性の原因である可能性が考えられる。また近年、別のグループの報告により、グルコースからグルコース-6-リン酸を生成する解糖系酵素グルコキナーゼの欠損により、グルコース感受性になることが判ったため (Kahlon et al., 2006)、グルコースそのものが細胞増殖の阻害に働いている可能性がある。今後は PamA 欠損株細胞内のグルコース濃度を測定し、グルコース感受性の原因を調べると共に、PamA 欠損が糖代謝に与える影響をメタボローム解析などにより明らかにしたいと考える。