

枯草菌孢子形成初期過程に關与する  
*ispU* 遺伝子の機能解析

河野雄飛

①

枯草菌孢子形成初期過程に関与する *ispU* 遺伝子の機能解析

東京大学大学院農学生命科学研究科

応用生命工学専攻

平成9年度博士課程進学

氏名 河野 雄飛

指導教官名 正木 春彦

## 目次

	Page
第一章 序論	1
第一節 緒言	1
第二節 枯草菌の孢子形成初期過程	1
第三節 <i>ispU</i> 遺伝子の発見と孢子形成との関連	4
第四節 本論文の内容と構成	5
第二章 <i>IspU</i> と孢子形成過程との関連	8
第一節 序	8
第二節 材料及び方法	8
第三節 <i>ispU</i> 遺伝子の発現時期について	11
第四節 <i>ispU</i> 欠損株の示す表現型	11
第五節 まとめ及び考察	13
第三章 <i>IspU</i> の $\sigma^H$ 活性化過程への関与	15
第一節 序	15
第二節 材料及び方法	15
第三節 <i>ispU</i> 欠損株における <i>sigH</i> 遺伝子の 発現及び $\sigma^H$ 蓄積量	18
第四節 <i>IspU</i> と $\sigma^H$ 因子の直接の相互作用	18
第五節 まとめ及び考察	19
第四章 <i>ispU</i> 欠損変異共存下でのみ孢子形成欠損 となる変異株の取得と解析	20
第一節 序	20
第二節 材料及び方法	20
第三節 トランスポゾン変異株の作製	22
第四節 変異株の解析	22
第五節 まとめ及び考察	23

第五章 IspU と相同性を示す蛋白質の欠損株の解析	25
第一節 序	25
第二節 材料及び方法	25
第三節 各欠損株における <i>kinA</i> の発現	27
第四節 まとめ及び考察	28
第六章 IspU と相互作用する蛋白質の同定と解析	31
第一節 序	31
第二節 材料及び方法	31
第三節 IspU と相互作用する蛋白質の存在	36
第四節 IspU と相互作用する蛋白質の精製と同定	37
第五節 Two-hybrid screening による IspU と 相互作用する蛋白質の探索	38
第六節 まとめ及び考察	39
第七章 総括及び今後の展望	41
参考文献	43
謝辞	47



## 第一章 序論

### 第一節 緒言

枯草菌(*Bacillus subtilis*)は好気性で内生孢子を形成することで知られるグラム陽性桿菌である。日本で食品として広く知られている納豆の製造には納豆菌が利用されているが、納豆菌は分類学的には枯草菌であり、世界的に研究に利用されている枯草菌 168 株と遺伝子的にはほぼ同じである。枯草菌 168 株が納豆菌と異なる点はグルタミン酸のポリマーを分泌できず、かわりに形質転換能を示す点である。この形質転換能を有することと、人間に対して無害で培養が容易であることにより、枯草菌 168 株由来の菌株は早くから分子遺伝学的の研究が行われ、グラム陽性菌では最も遺伝的生化学的解析が進んでいる。そしてその研究対象も細胞外分泌、走化性、形質転換能、孢子形成、発酵、各種酵素など多岐にわたっている。1997 年には全ゲノム塩基配列が決定され、枯草菌の研究がさらに容易になり、同じ *Bacillus* 属の研究にも貢献し、それ以外の生物の研究にも大きな影響を与えている。そして現在はゲノム解析のあとに続くプロテオーム解析や機能解析が進行しており、さらなる知見が蓄積されつつある。またそれらの知見を元に *in silico* 上にバーチャル細胞を構築する試みも進んでいる。今後、各研究分野が相互に関連して行き、枯草菌における生命現象のメカニズムの全体像が明らかになるものと思われる。

### 第二節 枯草菌の孢子形成初期過程

生物は外部環境の変化に対応し、それに適応しつつ生きている。枯草菌も同様である<sup>60)</sup>。栄養源の欠乏や温度、浸透圧の変化などのストレスに対して巧みに反応して生き残りを図る。栄養源の欠乏時

には、枯草菌は菌体内に内生胞子を形成して生き残る。枯草菌の成熟した胞子は休眠状態にあり、熱、乾燥、放射線などの物理的な刺激に対しても、有機溶媒、抗生物質、薬剤などの化学的な刺激に対しても強い抵抗性を示す。そして条件さえ整えば半永久的に生存すると言われている。この胞子を形成する過程は細胞分化の基礎的なモデル系として以前から研究が活発に行われており、その骨格は分子レベルで解明されている。以下、枯草菌の胞子形成過程の概要について説明する(図 1-1)。

枯草菌は周囲にある炭素源や窒素源となる物質の濃度、周囲に存在する細胞の密度<sup>16)</sup>、そして自らの細胞の細胞周期を感知して、その後の細胞の運命(栄養増殖を維持するか、胞子形成へと向かうか)を決定する。今のところ細胞の運命を決定する代謝シグナル、環境シグナル、細胞周期シグナルが何であるのかははっきりしていない<sup>1)</sup>が、それを感知して遺伝子発現制御を行うシグナル伝達系は同定されている。胞子形成におけるシグナル伝達系<sup>34)</sup>は、原核生物に普遍的に見られる二成分調節系<sup>21,37,40)</sup>の変形である。普通二成分調節系は自己リン酸化能を有する環境センサー蛋白質と、リン酸基を受け取り遺伝子発現の変化へと導く調節蛋白質の二つからなるが、枯草菌の胞子形成開始における調節系には、環境センサー蛋白質と調節蛋白質の間にリン酸基を転移させる二つの蛋白質があるのが特徴である。このリン酸基転移機構はリン酸リレー系と呼ばれている<sup>3)</sup>。

リン酸リレー系は主に二つのヒスチジンキナーゼ KinA、KinB<sup>4,6)</sup>が何らかのシグナルを感知して自己リン酸化することから始まる。KinA は可溶性の蛋白質<sup>6)</sup>であり、細胞質中にある何らかのシグナルを感知するものと考えられている。一方 KinB は膜結合性の蛋白質<sup>4)</sup>であり、KinA とは異なるシグナルを感知すると考えられている。特に KinB 活性には、それとオペロンをなす膜結合性の KapB が必須である<sup>33)</sup>。これらのキナーゼは Spo0F<sup>38)</sup>にリン酸基を受け渡す<sup>3)</sup>。次に、リン酸化された Spo0F は Spo0B<sup>43)</sup>を介して Spo0A<sup>42,45,47)</sup>にリン酸基を受け渡す。リン酸化された Spo0A は転写因子として機能し<sup>19)</sup>、*abrB* の発現を抑制する<sup>20)</sup>一方、*spo0A*、*spo0F* の発現量を増加させ、胞子形成を次の段階に進ませる<sup>21)</sup>。以上がリン酸リレー系の骨格部分

であるが、各箇所において様々な制御因子が系の finetuning を行う<sup>35)36)</sup>。

KinA 蛋白質にはそのリン酸基転移能を阻害する KipI 蛋白質<sup>7)</sup>が存在しており、これとオベロンをなす KipA 蛋白質がアンチ阻害蛋白質として働くと推定されている。

リン酸化された Spo0F は二つのアスパルチルリン酸ホスファターゼ RapA<sup>8)</sup>、RapB による脱リン酸化によって調節されている<sup>8)</sup>。RapA は、形質転換のための DNA 取込系<sup>39)</sup>に関与する遺伝子発現を制御する ComP/ComA<sup>9)</sup>シグナル伝達系により転写レベルで制御されている<sup>9)10)63)</sup>。また RapA とオベロンをなす PhrA は、SecA<sup>52)</sup>依存的に細胞外に分泌され<sup>11)</sup>、細胞外でプロセッシングされ、オリゴペプチド取込系を介してその C 末端 5 残基 ARNQT として細胞内に取り込まれる<sup>12)13)</sup>。この ARNQT が RapA と相互作用することで RapA を不活性化するものと考えられている<sup>14)</sup>。この PhrA ペプチドは細胞から細胞外への情報伝達経路として機能する調節因子とみなすことができる<sup>14)54)</sup>。

次に、RapB の発現は恒常的に起きているが、Spo0A によって AbrB<sup>46)51)</sup>を介して抑制される<sup>8)</sup>。これとは別に、Rap ファミリーの一種である RapC とオベロンをなす PhrC<sup>15)</sup>は、細胞外に分泌され C 末端の 5 残基 ERGMT がオリゴペプチド取込系により細胞内に取り込まれ<sup>17)</sup>、RapC<sup>64)</sup>活性を阻害する<sup>15)</sup>ことが知られている。この ERGMT が RapB と相互作用することで RapB のリン酸化 Spo0F からの脱リン酸化<sup>32)</sup>を阻害すると考えられている<sup>14)</sup>。

Spo0F、Spo0B、Spo0A 間のリン酸基の受け渡しは可逆的であり、リン酸化 Spo0F が減少すると、それを補うように Spo0A のリン酸基が Spo0B を介して Spo0F に受け渡される<sup>17)</sup>。それゆえ RapA、RapB は間接的に細胞内のリン酸化 Spo0A の量を減少させることになる。

これに加えて、Spo0E<sup>44)</sup>はリン酸化 Spo0A から直接脱リン酸する<sup>18)</sup>が、その活性制御機構の詳細は今のところ不明である。

ところで、リン酸リレー系を構成するこれらの構成要素のうち、kinA の発現と spo0F 及び spo0A の孢子形成期特異的プロモーター (Ps)からの転写は  $\sigma^H$  因子に依存する<sup>23)</sup>(図 1-2 参照)。特に kinA の発現は効率的な孢子形成に必要であり、spo0A の Ps からの転写は孢子

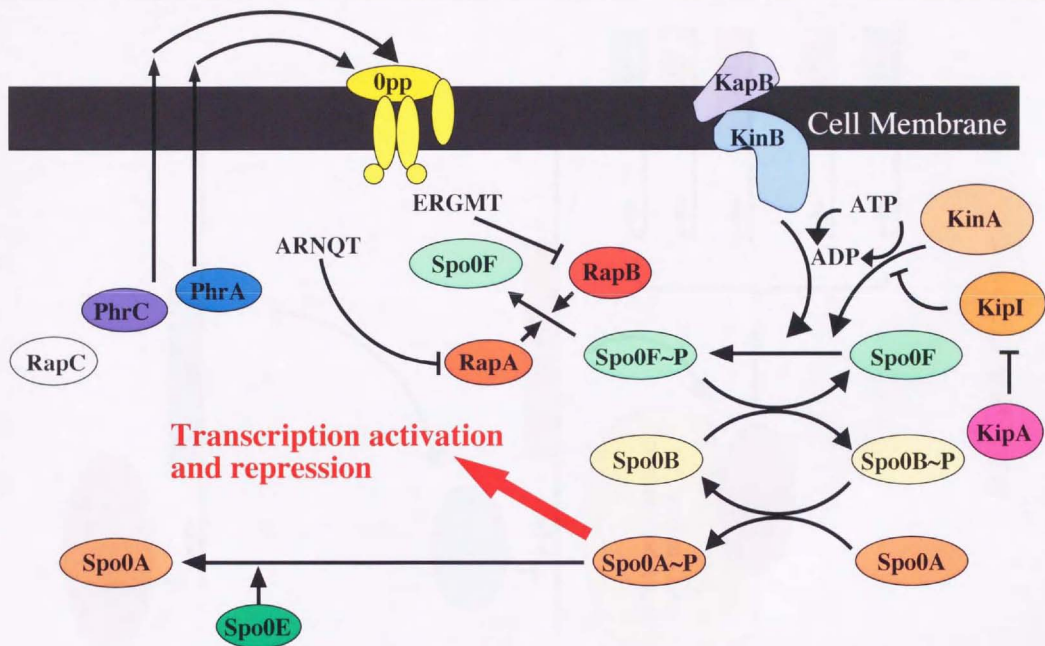


図1-1 リン酸リレー系の概要

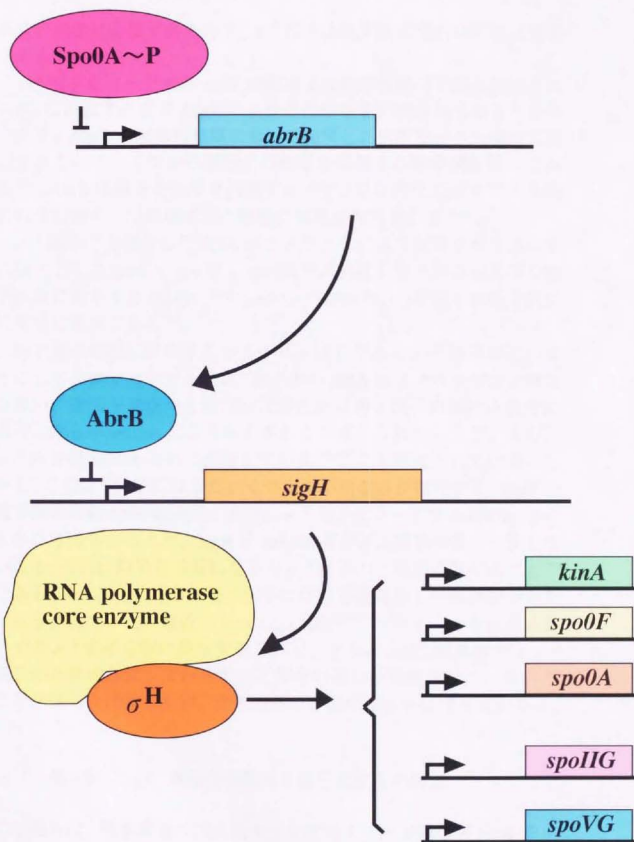


図1-2.  $\sigma^H$  因子について



形成の開始に必須であるので、 $\sigma^H$  因子は胞子形成開始に非常に重要である。

$\sigma^H$  因子をコードする *sigH* の発現は対数増殖期中期に開始されるが、これはそれまで AbrB によりその転写を抑制されている<sup>26)</sup>からである。AbrB は対数増殖期において発現し、プロモーター領域に結合することでいくつかの遺伝子の転写を抑制する転写調節因子である<sup>27)</sup>。AbrB は自身の転写を抑制する<sup>22)</sup>が、リン酸化 Spo0A による抑制の方が強く、対数増殖期の後期に発現が抑制される<sup>20)(41)</sup>。

$\sigma^H$  因子<sup>48)</sup>と結合した RNA ポリメラーゼにより転写される遺伝子には、上記の *kinA*、*spo0F*、*spo0A*<sup>23)</sup>以外にも胞子形成に必須な胞子形成に関与する *spoIIA*<sup>24)</sup>や *spoVG*<sup>25)</sup>があり、 $\sigma^H$  因子は胞子形成に非常に重要である<sup>50)</sup>。

胞子形成初期に存在するマイナー  $\sigma$  因子である  $\sigma^H$  因子がどのようにして主要  $\sigma$  因子である  $\sigma^A$  因子から RNA ポリメラーゼコア酵素を奪い、遺伝子発現へと結びつけるのかは各  $\sigma$  因子の細胞内濃度に依存した competition により決定されると考えられている<sup>30)</sup>。また、 $\sigma^H$  因子が Spo0A と相互作用している<sup>31)</sup>ことも示唆されている。しかし、この  $\sigma^H$  因子にはまだいくつかの不明な点が存在する。*sigH* の転写産物は約 1300 bp あり、実際に  $\sigma^H$  因子をコードする 600 bp よりもかなり大きいこと<sup>28)</sup>。*sigH* の mRNA 量が  $\sigma^H$  因子の量と一致しないこと。それに胞子形成期になると  $\sigma^H$  因子の半減期が伸びること<sup>29)</sup>である。それ故、以前から  $\sigma^H$  因子には転写後調節と分解調節があると推測されていた。最近になって、ClpCP<sup>53)</sup>プロテアーゼが高温条件下での  $\sigma^H$  因子分解に関与する<sup>55)</sup>こと、さらに *clpX* 変異株では  $\sigma^H$  因子が存在するにも関わらず  $\sigma^H$  依存の遺伝子発現が起らない<sup>56)</sup>ことが明らかになったが、調節機構の詳細は明らかになっていない。

### 第三節 *ispU* 遺伝子の発見と胞子形成との関連

小出らは、枯草菌菌体内主要セリンプロテアーゼ遺伝子 *ispA* をクローン化し、その構造を明らかにした<sup>57)</sup>が、その際に上流に *ispA* とは逆向きの 277 アミノ酸から成る機能未知遺伝子 (*ispU*) が存在し



ていた(図 1-3)。nuclease S1 mapping により *ispU* のプロモーター領域を同定した所、-10; -22bp -35; であり、 $\sigma^A$  因子により認識されることが推定された。当時小出が *ispU* 欠損株を作製した所、胞子形成欠損の表現型を示したため、IspU と胞子形成との関連が考えられたが、これは後になって変異株作製の際に *spoIIIA* オペロン<sup>69</sup>内に第2の変異が起ってしまったためであることが当研究室の原によって明らかにされた。

この結果からは IspU と胞子形成との関連は無いものと考えられるが、実際には本論文における研究から関連が明らかになる。

なお、IspU と相同性を示す蛋白質は他に 6 種類存在することが最近の枯草菌ゲノム塩基配列の決定により明らかになった(図 1-4)。これら 6 種類の IspU paralogue のうち、RsbR と RsbS はストレス応答に関与する  $\sigma^B$  因子の蛋白レベルでの制御因子である<sup>80,89</sup>ことが示されているが、他の 4 種類の機能は IspU と同様に不明である。

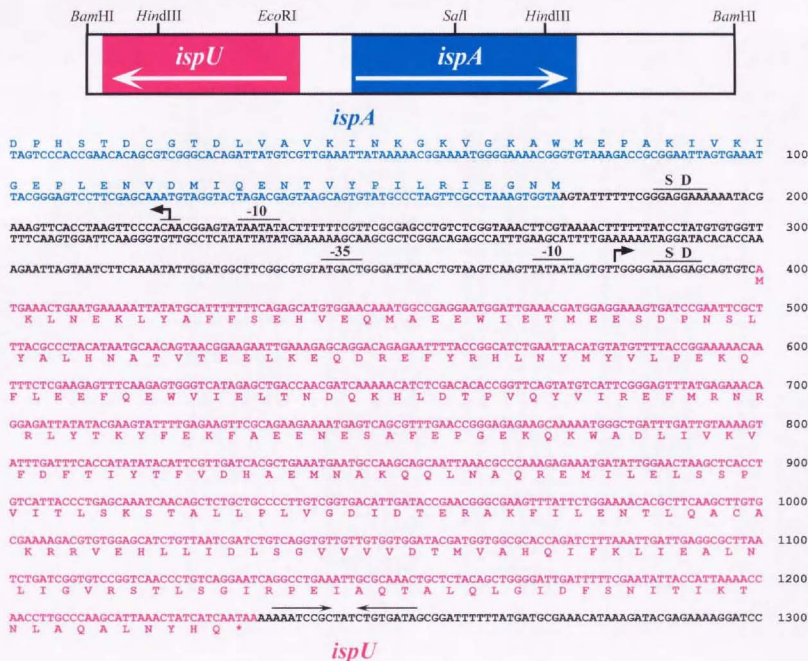
#### 第四節 本論文の内容と構成

本研究は、*ispU* の機能解析を行い、IspU が  $\sigma^B$  因子の活性調節に関与することを明らかにし、さらにその調節機構を明らかにすることを目標に進められた。

*ispU* の発現時期を *ispU-lacZ* 融合遺伝子の発現による  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標に決定し、胞子形成が開始される直前から発現し、胞子形成の開始と同時に発現が減少することが明らかになった。*ispU* 欠損株と野生株の胞子形成率には有意な差は見られなかった。ところが *ispU* 欠損株における胞子形成関連遺伝子の発現について詳細に解析したところ、 $\sigma^B$  依存的な遺伝子発現はすべて野生株と比較して約 30 分遅れていた。また、耐熱性胞子の出現も *ispU* 欠損株では約 30 分遅れることから、*ispU* 欠損株では胞子形成が開始段階から約 30 分遅れて進行することが明らかとなった。以上のことは IspU が  $\sigma^B$  因子の発現調節、あるいは活性調節機構に何らかの形で関与することを示唆する。

$\sigma^B$  因子は上述のように遺伝子発現レベルで AbrB による負の制御

図1-3. *ispU* と *ispA* の塩基配列



IspU: -----\*-----30-----\*-----40-----\*-----60-----\*-----27  
 YojH: -----AKNKKVLEGLQCHAEYSSSTWEELE-----27  
 YqhA: -----LA-----DGLHLLPKKKHLLPQQWVCT-----27  
 RsbR: -----MSNQTVQVLIINQNGLLQWVCTLK-----27  
 RsbS: -----27  
 YtvA: -----LAS-----PQSGLPGQLVKKALDNR-----24  
 YetI: MVQLTKRLLNPVAVLGVSIVFGKEEVPAAHRRSLGWHRQYQGRSRQSLECHRRQCQDRSRQSPQRR-----70

IspU: ESDPNSLHIAHNNANVTEEEKCDREFFYHNYMFLPQKFLBEPQEWELTNDQRHLDPVQVTVIRE-----96  
 YojH: ETDPNLSIASTDPVVIHNNKSNLAFFNYKNRIFDDSDVILPIKKEWAFVTDQDEHLKPIHYIRE-----96  
 YqhA: --SNGSWLSIAKQQRKQQRKQDCH-ELLVTVIAKSRKQD-VEDESNRSLQACARDRAHVETVTVSQFQG-----92  
 RsbR: ELSEQESVLDLQVYENISKEYE---IDIL-LLSDKDAEASQISELARAVQIG-----LSMK-----81  
 RsbS: -----81  
 YtvA: -----VGVVIND-----PAIDENP-----IVYVNGGFIQMTG-YETDELKGNCRFLQGGKHTDPAEVDNIRT-----80  
 YetI: CQCQAMDIQHIIQKQAKAHKNAPQTYKDQHTCDNVLSHCKLIYATAGQGLLVHSFKDMKLECSQRAES-----140

IspU: FTRNRRTYTRFEKKAENESAFEPQKQKWADLVKVSDFTIYTFVDAEMNAKQOQNAQREMLLES-----166  
 YojH: FVRVRDITYSVLKEVHLNQNTVKSEAEEDYHALIKASDLIHIFIEFNTKSLQIAQADMOTLSA-----166  
 YqhA: FNTATRHMFETVHKSEASSQDISQCFYENSRINQNIDEHIEVTFYHQVTMIQNAQREMLLSA-----161  
 RsbR: FIAT-ALAEFKKRLVTKMNDKRLPDQESTETIWDQDRFSPINTEIFNYSISWEKTVSLQNAQREMLSA-----151  
 RsbS: -----RHPKI-----151  
 YtvA: ALONKEPVTVOQNKKDGTMFWNELNIDPTEIEDKTYVGVGLNDITKQK--YEKLEDSLTERTALEST-----148  
 YetI: EDFSLVETFTIPIYHIMKVLILLKRRRTVMNDQLYQVIIDNTADITERKWS-LRCQKGLYSASHSE-----209

IspU: PVVIVSKS--TALLPVLVQDITERAKFLENTIQACAKRVEHLLDLISGVVVDVTVATQI-SKLITPAI-----233  
 YojH: PVVIVFIS--VGLLPIQDIDYAKRNTVQICAKRATVQYIDLGLGAVIDTVATQI-SKLITPAI-----233  
 YqhA: PIMPVITDG--KLLPVLVQDITERAKFISVLEQCSALVYFLLDGIQVPTVTVATQI-SKLIDIST-----228  
 RsbR: LTVNVEIT--LTVNVEITCDITERAKFINLNGVHKSQVLLIDIGVPPVTVTVATQI-TQASEV-----218  
 RsbS: PIIKLYN--CLISVQWEDQDALTALFDLANKIYETGANGVLDLGSADMSLAVVIGVYFMS-----72  
 YtvA: ETVKFRNG--ISALPVGQVTEFNFSVITKNTILSTSDDYLLIDLGACVQETQDQKFSHSL-----215  
 YetI: EITKFLTEQHTFTNITIASAFIDQTDQVIMTKWAKVNAKRNVEQVGVHEVEASNSRSGSDAVAT-----279

p 6 e D6 6 a 6

IspU: NLICVRSITSGIRPE-----LQALALCLGIDFNSITITLQALANYH-Q-----277  
 YojH: RLICVRSITSGIRPE-----LQAVLGLSPPGSLITLQASIASD-LKLLKY-----282  
 YqhA: KLLCETAITSGIRPE-----LQCVTVGLDFNSPQKQSDAKLANKGFGIKEC-----278  
 RsbR: RLVKAKGLASIRPE-----LQCVTVNGLDIDQVITPNTLQGGQTALEMTDRKIVSLGE-----274  
 RsbS: KIMCAKVLITGIGIA-----VIVVILGLGALDEEHALDPLQGGTEIKRELGE-----121  
 YtvA: KTLCTELITITGIRK-----LQMKNDKDAFNSIKIYNSKNDAAKVLPIM-----261  
 YetI: FIKENKGVITVNEADNRNRIVLQKSDLDFSEQYQFPLARLTQSQELISELGCVPISADGIGILPL-----349

6 g 6 g i p 6a f LK 6

IspU: -----360-----  
 YojH: -----  
 YqhA: -----  
 RsbR: -----  
 RsbS: -----  
 YtvA: -----  
 YetI: IGSIDTRRRHSF-----361

を受ける上、遺伝子発現後も蛋白質レベルでの安定化・活性化による制御を受けると考えられている。 $\sigma^H$  因子をコードする *sigH* の発現と、胞子形成開始期における  $\sigma^H$  因子の蓄積に対する *ispU* 欠損株の影響を調べたところ、*ispU* 欠損株における  $\sigma^H$  因子の遺伝子発現及び蓄積は野生株と同様に起こっていた。従って *IspU* は  $\sigma^H$  因子の活性化過程に関与するのではないかと推察した。

次に *IspU* と  $\sigma^H$  因子が直接相互作用するかどうかを酵母の two-hybrid system を用いて解析したが、直接の相互作用を示唆する結果は得られなかった。

*ispU* 欠損株では  $\sigma^H$  因子の活性化は遅れるものの、最終的には野生株と同レベルまで起こる。その原因として枯草菌内に *IspU* と同様の機能を持つ別の蛋白質が存在し、これが *IspU* と平行して  $\sigma^H$  を活性化しているものと考え、*ispU* 欠損変異と共存下でのみ  $\sigma^H$  活性を示さず、胞子形成が欠損となる変異株の取得を目指した。*ispU* 欠損株においてトランスポゾン変異を行い、胞子形成欠損変異株のうち胞子形成の初期過程における変異株の中から、その変異のみでは胞子形成欠損とならないものを探索した。得られた一株はその変異を野生株に移すと胞子形成欠損の表現型を示さなくなったが、トランスポゾンが複数挿入されており、それ以上の解析は不能であった。

*IspU* には他に 6 種類の paralogue が存在するが、これら 6 種類の paralogue の欠損変異が  $\sigma^H$  の活性化に及ぼす影響を調べた。その結果、*yojH* 欠損株のみが *ispU* 欠損株と同様の表現型を示し、さらに *yojH ispU* 二重欠損変異では  $\sigma^H$  依存の遺伝子発現の遅れが約 1 時間となった。

次に *IspU* が、 $\sigma^H$  の活性化に関わる蛋白質の活性を調節する機能を持っているものと考え、*IspU* と相互作用する蛋白質を同定し、その蛋白質の機能解析を行うことにより、 $\sigma^H$  を活性化する蛋白質の同定を試みた。

まず *in vivo* で *IspU* と相互作用する蛋白質の精製を試みた。精製 *IspU* を抗原として抗 *IspU* 抗体を取得し、CNBr-activated Sepharose カラムに固定化した。このカラムに対して  $T_{0.5}$  期枯草菌粗抽出液をかけたところ、分子量約 32 kDa 及び約 30 kDa の二つの蛋白



質が IspU と共精製された。このうち約 30 kDa の蛋白質の N 末端アミノ酸配列は YojH のものと一致した。

もう一つの方法として酵母 two-hybrid screening を用いた IspU と相互作用する蛋白質を同定することを試みた。IspU を bait として GAL4-BD に接続し、超音波によりランダムに破碎した枯草菌ゲノムを用いて作製した GAL4-AD ライブラリーを用いてスクリーニングを行い、いくつかの株を得た。相互作用すると思われる蛋白質の DNA 塩基配列を決定したところ、メチオニル tRNA シンテターゼ、RNA ポリメラーゼ  $\beta$ ' サブユニット、 $\sigma^H$  因子の活性調節蛋白質である RsbT 蛋白質であることが明らかになった。

以上が本文論文の内容であるが、本論文では、本章において枯草菌と孢子形成開始機構についての説明を行い、本論文の内容と構成を述べる。そして第二章において IspU が孢子形成初期過程に関与することを述べ、第三章において IspU と  $\sigma^H$  活性化過程との関連について述べる。第四章では *ispU* 欠損変異との共存下でのみ孢子形成欠損となる変異株の探索と解析について述べる。第五章では IspU と相同性を示す蛋白質の欠損変異が  $\sigma^H$  活性に及ぼす影響について述べる。また第六章ではそれぞれ *in vivo*、あるいは酵母 two-hybrid screening による IspU と相互作用する蛋白質の同定と解析について述べる。そして、最後に第七章において総括及び今後の展望を述べる。

## 第二章 IspU と胞子形成過程との関連

### 第一節 序

ある蛋白質の機能解析を行うに当たって、コードする遺伝子がどの時期に発現するのかを知り、どのような時期、あるいは状況下でその蛋白質が存在するのかを知ることは重要である。

本章では IspU の機能解析の端初として、*ispU* の発現時期及び *ispU* 欠損株の示す表現型について述べる。結果としては *ispU* 欠損変異により  $\sigma^H$  依存の胞子形成初期遺伝子群の発現が約 30 分遅れ、IspU と胞子形成、特に  $\sigma^H$  因子との関連が示唆された。

### 第二節 実験材料および方法

#### 1) 使用菌株ならびに培地、プラスミド

プラスミド DNA の構築には、大腸菌 DH5  $\alpha$  F,  $\phi$  80*lacZ*  $\Delta$  M15,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* ( $r_k^-m_k^+$ ) *phoA*, *supE44*,  $\lambda'$ , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1* を用いた。枯草菌の宿主としては UOT1285 *lys-1*, *trpC2*, *nprR2*, *nprE18*, *aprE* $\Delta$ 3 を用いた。また、UOT1285*kinA-lacZ* 株は、立教大学・河村教授からご供与いただいた。同様に *spo0A* 遺伝子の胞子形成期特異のプロモーター(*Ps*)と *lacZ* 遺伝子との融合遺伝子を含むファージベクター、 $\phi$ CAZ6 も河村教授からいただき、UOT1285 株に導入して UOT1285*spo0A-lacZ* 株を構築した。また、枯草菌 LAB1453 株 (JH642 derivative : *trpC pheA1 pZL207::spc*<sup>67</sup>) は Louisiana State University Medical Center の Peter Zuber 博士が作製した株であり、Sp $\beta$  ファージ上に *spoVG-lacZ* 遺伝子が translational fusion として挿入されている。

大腸菌の培養には L-broth を使い、枯草菌の胞子形成培地としては 2xSG 培地 (Nutrient Broth 1.6%、グルコース 0.1%、KCl 0.2%、2 mM  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、オートクレーブ後、1  $\mu$ M  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、100  $\mu$ M  $MnCl_2$ 、



1 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  を添加)を用いた。

枯草菌の染色体組み込み用のプラスミドには pCP112 を用いた。

## 2) 形質転換

大腸菌の形質転換には、通常の  $\text{CaCl}_2$  を用いる方法を用い、枯草菌の場合には染色体 DNA への組み込みを行う必要上、competence を用いる方法を利用した。

## 3) UOT1285 *ispU-lacZ* 株の作製

プラスミド構築については図 2-1 を参照。最終的に *ispU* 遺伝子の 55 番目のコドンと *lacZ* 遺伝子の 6 番目のコドンが結合した translational fusion を作製した。構築したプラスミド pCP112U-*lacZ* を用いて UOT1285 株を形質転換すると、染色体 DNA 上の *ispU* 遺伝子とプラスミド上の *ispU-lacZ* 遺伝子との間での相長的組換えにより、pCP112U-*lacZ* が染色体上の *ispA* 遺伝子と *ispU* 遺伝子の間に挿入される。本論文では以降、作製したこの株を UOT1285*ispU-lacZ* 株と呼ぶ。

## 4) $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイ

*lacZ* 融合遺伝子を保持する株をクロラムフェニコール 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を添加した LB 寒天培地に植菌し、30  $^{\circ}\text{C}$  で一夜培養する。生えてきた若いコロニーを白金耳で取り、2xSG<sup>(66)</sup> 培地に  $\text{O.D.}_{660}=0.1$  になるように植菌する。培養は 37  $^{\circ}\text{C}$  で行い、 $\text{O.D.}_{660}=0.3\sim 0.4$  になったら再び新鮮な 2xSG 培地に  $\text{O.D.}_{660}=0.01$  になるように接種し、 $\text{O.D.}_{660}=0.1$  から培養液を適宜サンプリングする。各時間ごとにサンプリングした培養液は 250  $\mu\text{l}$  を活性測定用に用いるため遠心チューブに移し、15000 rpm で 7 分遠心して沈殿した菌体を -20  $^{\circ}\text{C}$  で保存する。活性測定は保存しておいた遠心チューブに Z-buffer (60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、10 mM KCl、1 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、50 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) を 500  $\mu\text{l}$ 、Toluene を 20  $\mu\text{l}$  加えて vortex mixer で 10 分間かけて菌体を懸濁する。28  $^{\circ}\text{C}$  のインキュベーターに 5 分置き、ONPG (4 mg/ml o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside in 60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、pH 7.0) を 200  $\mu\text{l}$  加えて反応

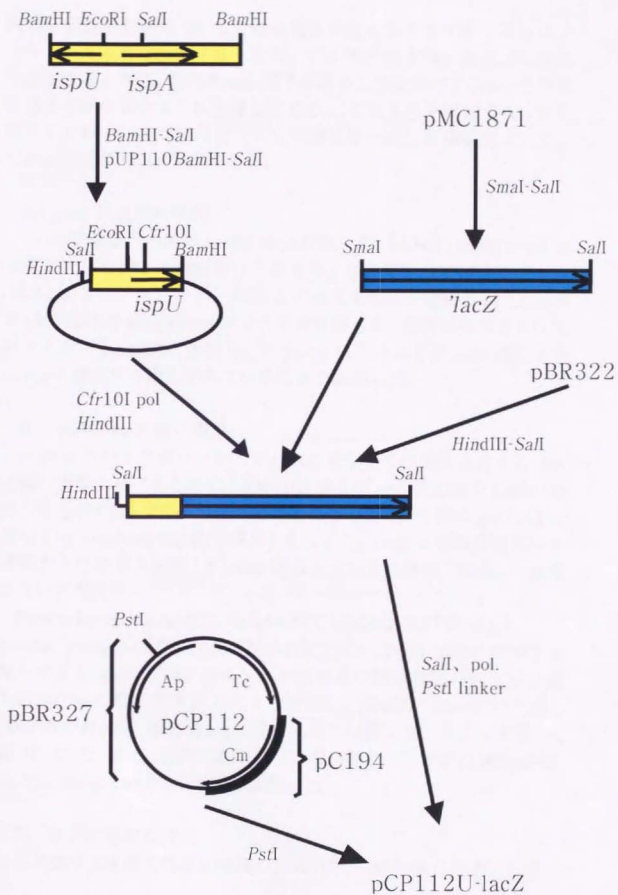


図2-1 pCP112U-lacZの構築

時間を測定しながら 28 °C である程度黄色くなるまでインキュベートする。ある程度黄色くなった後、1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を 500 µl 加えて反応を停止する。次に、15000 rpm で 7 分遠心して上層の Toluene と下層の菌体を取らないように注意して O.D.<sub>420</sub> で吸光度を測定する。測定結果を 1000 倍し、反応時間 (分)、培養液量 (ml)、菌体濃度 (O.D.<sub>660</sub>) で割った値が Miller unit である。

#### 5) *ispU* 欠損株の作製

*ispU* 遺伝子内部の *Eco*RI-*Hind*III 断片を、pAE41 由来の *ermE* 遺伝子を含む *Eco*RI-*Hind*III 断片と置き換える構築を pUC18 上で行った (図 2-2)。このプラスミドを *Nde*I と *Sca*I で消化して直鎖状にし、枯草菌 UOT1285 を competence により形質転換した。形質転換体をエリスロマイシン 1 µg/ml で選択し、サザンブロットにより *ispU* 遺伝子中に *ermE* 遺伝子が挿入されていることを確認した。

#### 6) *spoVG-lacZ* 株の構築

isogenic なバックグラウンドで *spoVG* 遺伝子<sup>6)</sup>の発現に対する *ispU* 欠損の影響を調べるために、UOT1285 株及び *ispU* 欠損株を LAB1453 株の染色体 DNA で形質転換することにより、同株の持つ *spoVG-lacZ* 遺伝子(translational fusion)を導入した。また、*lacZ* との融合遺伝子を構築するためのプラスミド pJM116 はスクリプス研究所の Hoch 教授からいただき、

Forward primer AAAGCTTAAAAACGAGCAGGATTTCAG と  
Reverse primer AAGGATCCCTAATGCTTCAGTGTACCCC のプライマーにより *spoVG* のプロモーター領域及び翻訳領域の約半分を含む約 300 bp の断片を PCR 法により増幅し、*Hind*III、*Bam*HI で消化し、pJM116 の *Hind*III、*Bam*HI site に組み込んで作製したプラスミドを *Pst*I 処理した後、UOT1285 株に導入して UOT1285*spoVG-lacZ*(transcriptional fusion)株を構築した。

#### 7) 胞子形成率の測定

枯草菌を LB 寒天培地に植菌し、30 °C で一晚培養した若いコロニ

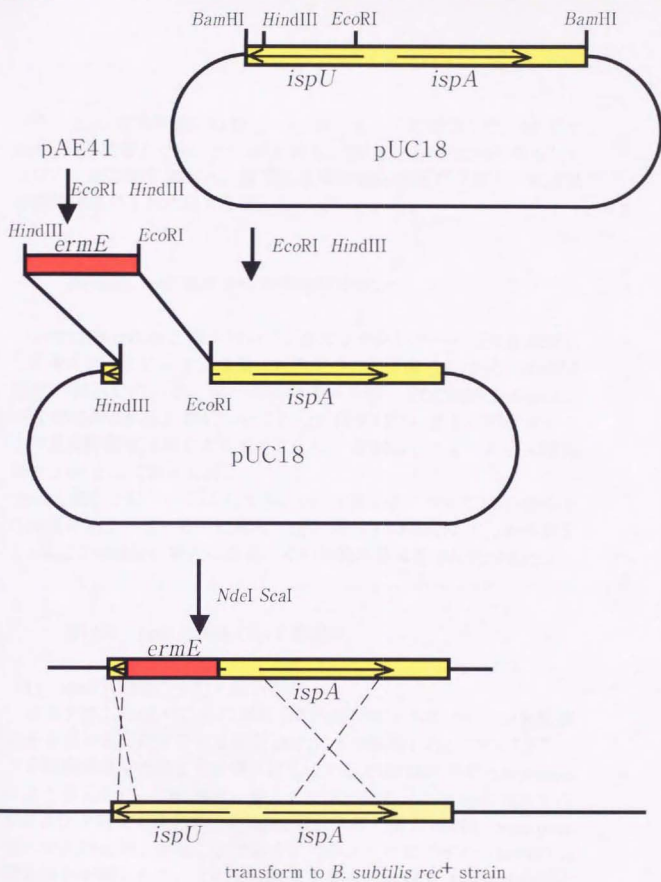


図2-2. *ispU*欠損株の作製

ーを、2xSG 液体培地に  $O.D._{660}=0.1$  になるように懸濁した。37℃で20-24時間培養した後、0.5 mlを取り、75℃、15分間熱処理をしてコロニー形成数を調べた。孢子形成率は熱処理後のコロニー形成数の熱処理前のそれに対する比としてあらわした。

### 第三節 *ispU* 遺伝子の発現時期について

UOT1285*ispU-lacZ* 株を用いて、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した結果を図2-3に示す。横軸は対数増殖の終了時点を  $T_0$  とした相対時間で表示している。同一の実験条件下で、UOT1285*kinA-lacZ*、UOT1285*spo0A-lacZ* 株について行った結果についても同時に示すことで発現時期を比較できるようにした。縦軸はそれぞれの最大活性値を100%として表示した。

*kinA* 遺伝子については  $T_0$  から、*spo0A* 遺伝子については  $T_1$  からその発現が始まっているのに対し、*ispU* 遺伝子の発現は  $T_{1.5}$  から始まり、 $T_{0.5}$  で発現量が最大となり、その後発現量は急速に減少した。

### 第四節 *ispU* 欠損株の示す表現型

#### 1) *ispU* 欠損株の作製と孢子形成

図2-2にしたがって *ispU* 遺伝子の内部にエリスロマイシン耐性遺伝子を組み込んだプラスミドを pUC18 上で構築した。このプラスミドを制限酵素で処理して直鎖状にしてから UOT1285 株に competence により導入した。この場合、導入したプラスミド上の *ispU* 遺伝子の5'および3'断片と染色体上の *ispU* 遺伝子との間で double cross-over 型の相同的組換えが起こった場合にのみエリスロマイシン耐性の形質転換体が得られる。このようにして得られた株を UOT1285 $\Delta$ *ispU* 株と命名した。

*ispU* 欠損の孢子形成にもたらす影響を調べるために、UOT1285*ispU* 欠損株と isogenic な野生株である UOT1285 株の孢子

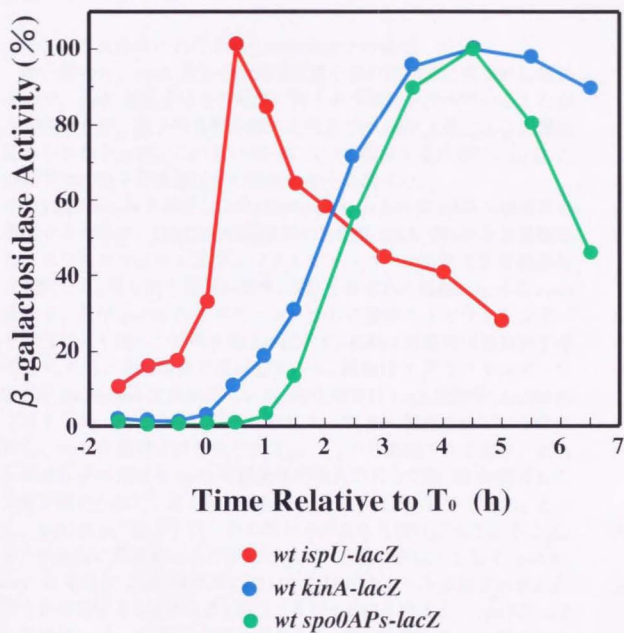


図 2-3. *ispU*、*kinA*、*Ps*からの*spo0A*の発現



形成率について検討した。その結果(表 2-1)、両者の間には明確な差は認められなかった。

## 2) *ispU* 欠損株における胞子形成遺伝子の発現

第三節から、*ispU* 遺伝子の発現は胞子形成開始期に特異的に起こるので、*ispU* 遺伝子はその時期に何らかの機能を持っていることが予想されたが、胞子形成率を調べた限りでは *ispU* 欠損による影響は認められなかった。この食い違いについて検討するために、*ispU* 欠損の下での胞子形成遺伝子の発現の様子を調べた。

UOT1285*kinA-lacZ* 株及び UOT1285*spo0A-lacZ* 株に *ispU* 欠損変異を導入するために、UOT1285 $\Delta$ *ispU* 株の染色体 DNA で両株を形質転換し、エリスロマイシン及びクロラムフェニコール耐性で形質転換体を選択した。得られた形質転換体、及びそれぞれの親株における *kinA* 遺伝子、及び *spo0A* *Ps* プロモーターからの発現を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性により調べた結果を図 2-4 に示す。横軸は対数増殖期の終了時点をもととした相対時間に表示している。縦軸は  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を Miller unit で表示している。野生株では *kinA* 遺伝子、*spo0A* *Ps* プロモーターからの発現はそれぞれ  $T_0$ 、 $T_1$  から開始されているのに対し、*ispU* 欠損株ではそれぞれ  $T_{0.5}$ 、 $T_{1.5}$  から開始されており、どちらの遺伝子の発現も *ispU* 欠損変異の導入によって約 30 分間遅れることが認められた。どちらの遺伝子の発現も  $\sigma^H$  依存性である。よって、*IspU* は  $\sigma^H$  因子と何らかの関わりがある可能性がある。そこで、 $\sigma^H$  依存的に発現することが知られている別の遺伝子として *spoVG-lacZ* の発現が *ispU* 欠損株において先ほどのような現象を示すのかどうか確認することにした。図 2-5 及び 2-6 に示すように *spoVG-lacZ* の発現は *lacZ* との融合の形に関わらず、野生株では  $T_0$  から開始されているのに対し、*ispU* 欠損株では  $T_{0.5}$  から開始されていた。以上より  $\sigma^H$  依存性のプロモーターからの発現が *ispU* 欠損変異の導入によって約 30 分間遅れることが認められた。

## 3) *ispU* 欠損株における熱耐性胞子の出現に関する経時的变化

前項で、胞子形成開始期に機能する *kinA*、*spo0A* 両遺伝子の発現、

strain	Before Heat (colony/ml)	After Heat (colony/ml)	Heat Resistant Fraction(%)
UOT1285	$1.03 \times 10^9$	$8.4 \times 10^8$	81.6
UOT1285 $\Delta$ <i>ispU</i>	$7.1 \times 10^8$	$5.6 \times 10^8$	78.9

表2-1. *ispU*欠損株と野生株の  
胞子形成率の比較

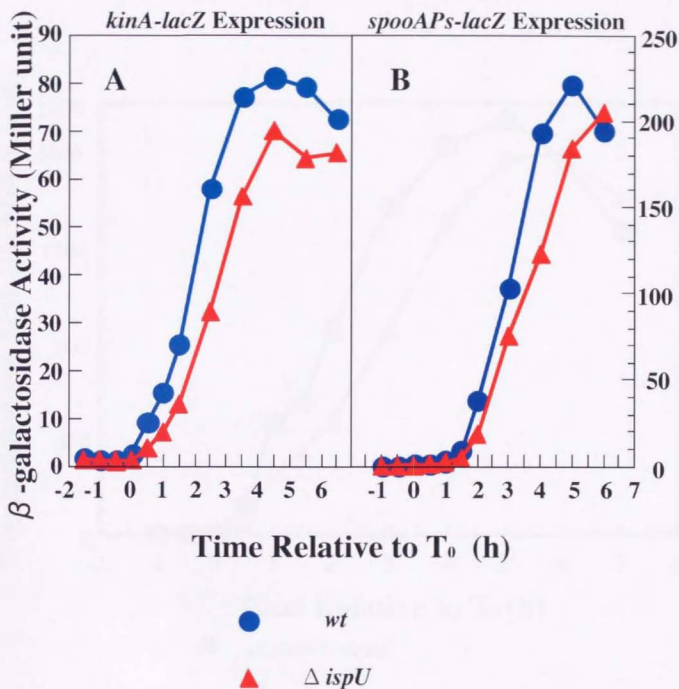


図2-4. *ispU* 欠損変異が*kinA*、*Ps*プロモーターからの*spo0A*の発現に及ぼす影響

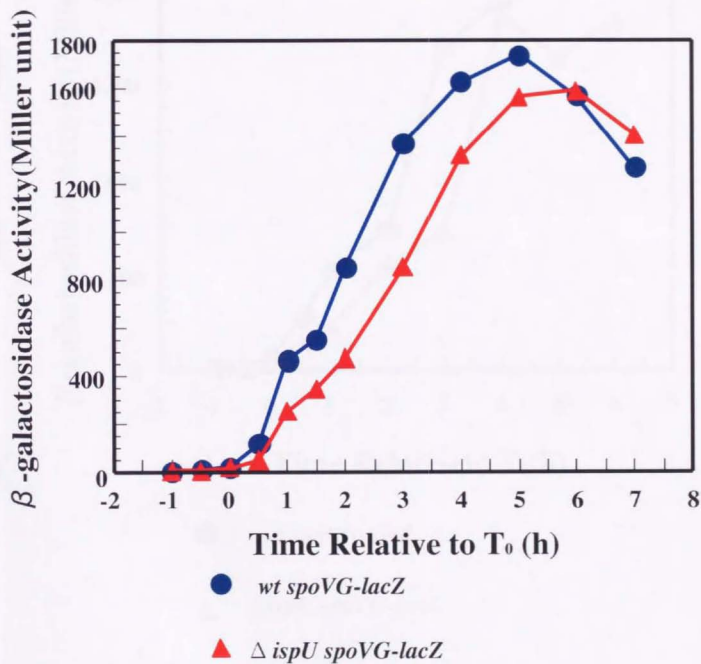


図2-5. *ispU* 欠損変異が *spoVG-lacZ* translational fusion の発現に及ぼす影響

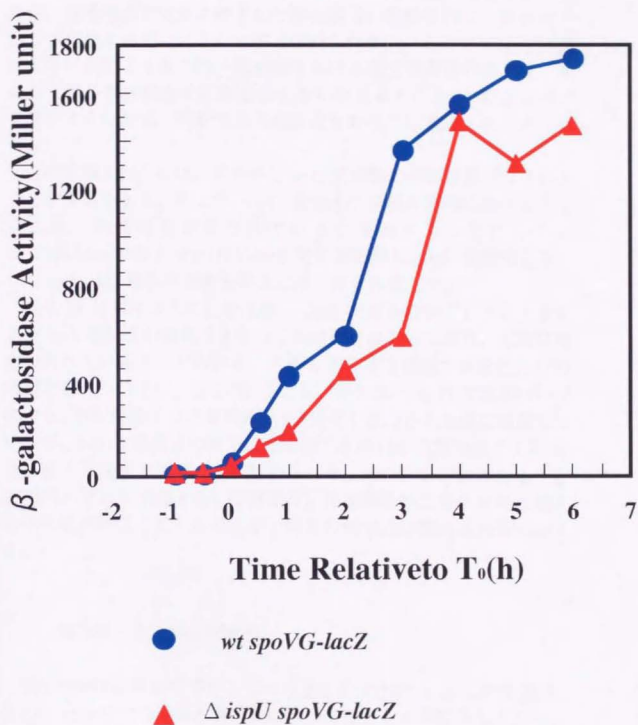


図2-6. *ispU* 欠損変異が *spoVG-lacZ* transcriptional fusion の発現に及ぼす影響

そして *spoVG* の発現も *ispU* 欠損により約 30 分間遅れることを示したが、胞子形成が完全に終了した時点(約 24 時間後)では、野生株と *ispU* 欠損株との間にほとんど差は認められない。それでは *ispU* 欠損により引き起こされる胞子形成期における遺伝子発現の遅れは、最終的な胞子形成に全く影響を与えないのであろうか?この点について解明するために、熱耐性胞子の出現を経時的に追跡することとした。

この実験を行うには、野生株と *ispU* 欠損株の同調培養がなされることが重要である。そこで、*ispU* 遺伝子の発現を同時に調べることにし、同調培養がなされているか確認することにした。UOT1285 $\Delta$ *ispU* 株を pCP112*U-lacZ* で形質転換し、*ispU* 欠損であり、かつ *ispU-lacZ* 遺伝子を染色体上に持つ株を作製した。

図 2-7A に示すように、野生株、*ispU* 欠損株のいずれでも生育および *ispU* 遺伝子の発現はまったく同時期に起こっており、同調培養がなされていることがわかる。そのような培養状態で熱耐性胞子の出現を調べた結果が、図 2-7B である。野生株、*ispU* 欠損株のいずれでも、熱耐性胞子は培養開始後 8.5 時間目( $T_{8.5}$ )から急速に出現しているが、9-10.5 時間目の間では野生株の方が *ispU* 欠損株よりも約 10 倍、胞子形成率が高いことが認められる。また、この差はちょうど 30 分間のずれに相当する。11 時間目以降は胞子形成率が 10% を超え、胞子形成が終了してくるためか、両者の間で差は認められなくなった。

## 第五節 まとめ及び考察

胞子形成開始期に関与する二つの遺伝子、*kinA*<sup>(68)</sup> と *spo0A*<sup>(69)</sup> の発現、それに *spoVG*<sup>(70)</sup> の発現パターンについては以前から知られており、今回著者が行った実験結果と同様の結果が得られている。<sup>(68), (61), (70)</sup> 胞子形成の開始期では、最初に *kinA* 遺伝子の発現が起こって細胞内に *KinA* 蛋白が現れることにより多成分リン酸リレー系が成立し、その結果栄養増殖期特異的なプロモーター(*P<sub>V</sub>*)から合成されていた微



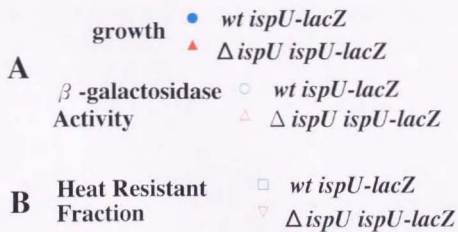
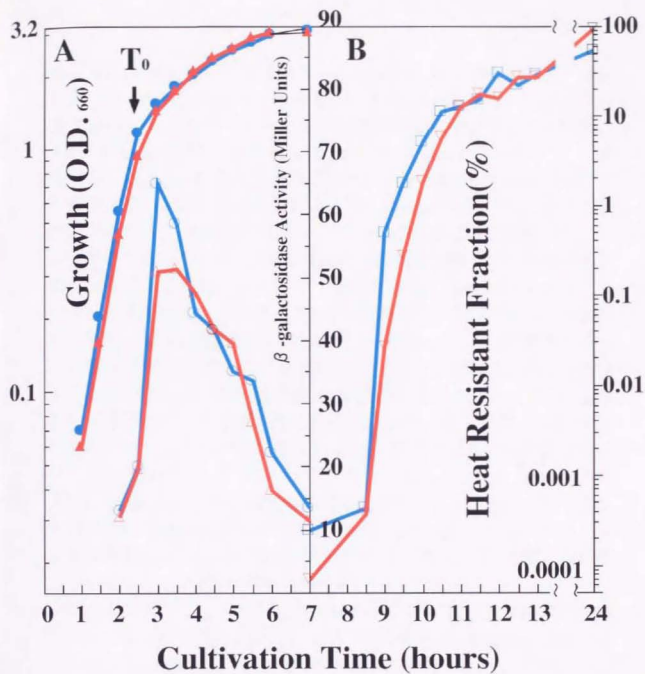


図2-7. 熱耐性胞子出現の経時的変化

量の Spo0A 蛋白がリン酸化される。Spo0A-P は自身の遺伝子の発現を *Pv* から *Ps* へとスイッチさせる。つまり、*kinA* 遺伝子の活性化の後で *spo0A Ps* プロモーターの活性化が起こる。今回得られた結果、すなわち *kinA* 遺伝子は  $T_0$  から、*spo0A Ps* プロモーターは  $T_1$  から発現することは、上記のことと矛盾しない。それに対し、*ispU* 遺伝子の発現はそれ以前に始まっている。 $T_{1.5}$  から始まり、 $T_0$  で最大の発現量を示す *ispU* 遺伝子の発現は、 $T_0$  以前に *ispU* 遺伝子が関与していることを示唆している。実際、 $\Delta ispU$  変異株を作製し、その株の示す表現型について検討したところ、*kinA* 遺伝子、*spo0A Ps* プロモーターからの発現が共に野生株より約 30 分間遅れ、それに応じて熱耐性胞子の出現も 30 分間遅れることが明らかになった。この結果から、*ispU* 遺伝子が *kinA* 遺伝子の発現以前の段階で胞子形成に何らかの関与をしていること、ならびに  $\Delta ispU$  変異が存在しても、一度 *kinA* 遺伝子が発現してしまえば、胞子形成は野生株と全く同様に sequential に進行することから、*ispU* 遺伝子は *kinA* 遺伝子発現以降の胞子形成プロセスには全く関与しないことが考えられる。また、*spoVG* の発現量は *kinA* の発現量と比較してはるかに多く、 $\sigma^{H}$  因子の存在量あるいは活性化状況をモニターするために広く利用されているが、今回得られた *spoVG-lacZ* の結果はまさに *IspU* が  $\sigma^{H}$  因子と何らかの関わりを持つことを示唆している。

現在までのところ、胞子形成に関する研究は  $T_0$  以降の現象に焦点を絞ってなされてきており、 $T_0$  以前、すなわち *kinA* 遺伝子発現以前の段階についてはほとんど明らかになっていない。唯一推察されているのは、*kinA* 遺伝子発現に  $\sigma^{H}$  因子が必要であることから、 $\sigma^{H}$  因子の翻訳後におけるいまだ未知の安定化、活性化機構の存在のみである。そこで、次章では *ispU* 遺伝子と  $\sigma^{H}$  因子の安定化、活性化機構について焦点を当てて論じる。

### 第三章 IspU の $\sigma^H$ 因子活性化過程への関与

#### 第一節 序

本章では、前章の結果から示唆された、*ispU* 遺伝子と胞子形成過程の *kinA* 遺伝子発現以前の段階との関係について解析する。 $\sigma^H$  因子は遺伝子発現レベルで AbrB による負の制御を受ける上、mRNA レベルでの制御も存在し、遺伝子発現後も蛋白質レベルでの安定化・活性化による制御を受けると考えられている。IspU が上記のどの段階に関与するかを明らかにするために、まず野生株と *ispU* 欠損株における  $\sigma^H$  因子をコードする *sigH* の発現を、*sigH-lacZ* の発現を指標に検討した。次に胞子形成開始期の  $\sigma^H$  蓄積に対する *ispU* 欠損株の影響についてウェスタンブロッティングにより検討した。

#### 第二節 材料および方法

##### 1) 使用菌株ならびに培地、プラスミド

枯草菌 UOT1285 株及び前章で作製した derivative を用いた。*sigH-lacZ* 株は立教大学・河村教授からご供与いただいた。酵母 PJ69-4A 株(MATa *trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4 Δ gal80 Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ*)及び pGAD-C1、pGBD-C1 は東京農大・吉川教授からご供与いただいた。枯草菌の胞子形成培地には 2xSG 培地を用いた。酵母の培養には YPD (Bacto pepton 20 g/l, Yeast extract 10 g/l, pH5.8 オートクレーブ後に最終濃度 2%となるように 40%グルコースを加える)と SD (Yeast nitrogen base without amino acids 6.7 g/l, Arg-HCl 20 mg/l, Ile 30 mg/l, Lys-HCl 30 mg/l, Met 20 mg/l, Phe 50 mg/l, Thr 200 mg/l, Tyr 30 mg/l, Val 150 mg/l, uracil 20 mg/l, pH5.8 オートクレーブ後に最終濃度 2%となるように 40%グルコースを加える)を用いた。YPD、SD プレート作製にあたっては 2% agar を加えた。

## 2) 抗 $\sigma^H$ 抗体を用いた細胞内 $\sigma^H$ 蛋白存在量の解析

枯草菌を、 $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイと同様の方法で 2xSG 培地中で培養し、 $O.D._{660}=0.2$  から培養液の量(ml) x  $O.D._{660}=10$  を目安に遠心により集菌した。細胞を 200  $\mu$ l の 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) に懸濁した後、50  $\mu$ l の 50% TCA を加えて氷上に 1 時間以上置き、15000 rpm、10 分の遠心で沈殿物を得、アセトン、エーテルでリンスして完全に TCA を除いた。これに 100  $\mu$ l の 2 x loading buffer (100 mM Tris-HCl (pH 6.8)、200 mM DTT、4% SDS) を加え、ソニケーションにより沈殿物を可溶化した。このようにして調製した溶液中の蛋白質量を BIO RAD の Bio-Rad D<sub>c</sub> Protein Assay kit を用いて測定し、蛋白質量をそろえて 12.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。次に SDS-PAGE により分離された蛋白質を、エレクトロトランスファーにより PVDF 膜に移した。buffer にはエレクトロトランスファーバッファー (25 mM Tris、192 mM glycine、20% methanol) を用いて、50 mA で一晩トランスファーさせた。トランスファー後、PVDF 膜を PBS バッファー (80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、100 mM NaCl) 中に浸して 5% スキムミルクと抗 $\sigma^H$ 抗体 (立教大・河村教授から供与いただいた) を 0.01% 加えて室温で一晩インキュベートした。インキュベート後、0.2% Tween 20 を含む PBS バッファーで 15 分洗浄し、さらに 5 分 x 2 回の洗浄を行った。次に洗浄バッファー中に AP 標識二次抗体を 0.02% 加えて室温で 2 時間インキュベートした後、前述の方法で洗浄を行った。 $\sigma^H$  蛋白質の検出は、ECL Western blotting detection reagents (Amersham pharmacia biotech) により行った。

## 3) 酵母 two-hybrid assay

GAL4-AD に IspU を接続させたプラスミド pGAD-IspU と GAL4-BD に IspU を接続させたプラスミド pGAD-IspU の構築は以下のように行った (図 3-1、図 3-2 参照)。TAKARA Pyrobest<sup>TM</sup> DNA polymerase を使用し、Forward primer GCCATG GAA CTG AAT GAA AAA TTA TAT GC

Reverse primer TTG GAT CCT TGA TGA TAG TTT AAT GCT TGG を用いて熱変性 94 °C 2 分の後、98 °C 5 秒、55 °C 1 分、72 °C 1 分を 1

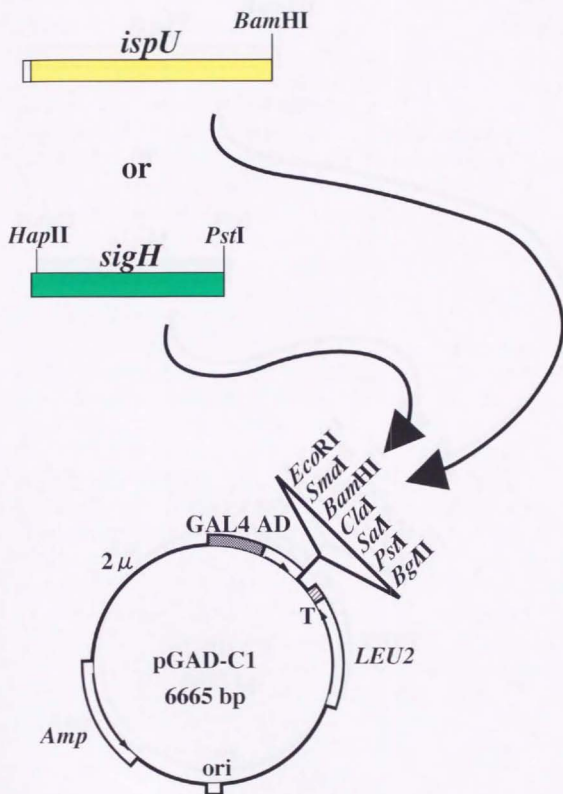


図3-1. pGAD- $\sigma^H$ 、pGAD-IspUの構築

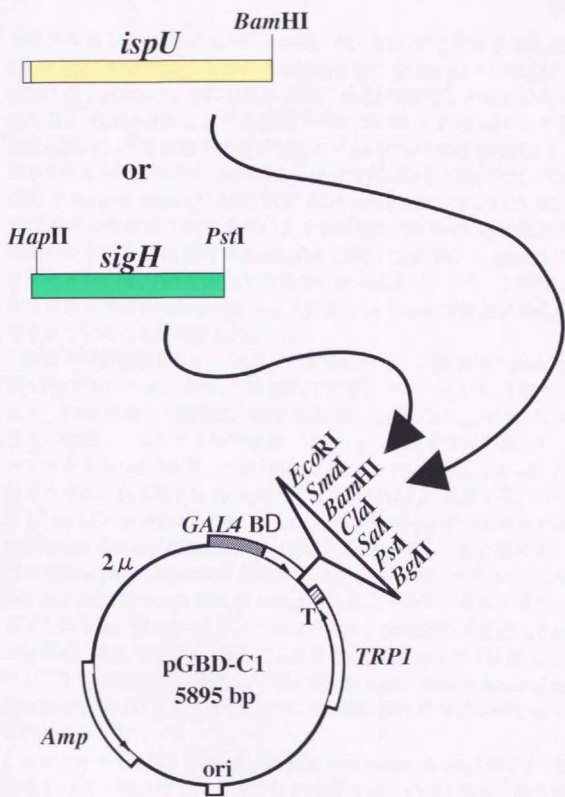


図3-2. pGBD- $\sigma^H$ 、pGBD-IspUの構築



サイクルとして30サイクル行った後、72℃10分で増幅させた842 bp の *ispU* 翻訳領域のみからなる DNA 断片を *Bam*HI で消化し、pGBD-C1、pGAD-C1 それぞれを *Sma*I、*Bgl*II で消化した部分に組み込んだ。GAL4-AD に  $\sigma^H$  を接続させたプラスミド pGAD- $\sigma^H$  と GAL4-BD に  $\sigma^H$  を接続させたプラスミド pGAD- $\sigma^H$  の構築は図3-1、図3-2のように行った。Forward primer TTC TAT CTA CGT GCG CCG と Reverse primer C AGC TGC AGA AAA ATA CTG TCA ATA TAG を用いて前述の PCR 条件により増幅した 726 bp の *sigH* 翻訳領域のみからなる DNA 断片を *Hap*II、*Pst*I で消化し、pGBD-C1、pGAD-C1 それぞれを *Cla*I、*Pst*I で消化した部分に組み込んだ。こうして構築したプラスミドはすべてシーケンスにより in frame で間違いなく構築されていることを確認した。

酵母の形質転換については以下のように行った。酵母 PJ69-4A 株を YPD プレート上に広げ、2日30℃で培養。コロニーを2、3個かきとり、YPD 培地で一晚培養。YPD 培地 300 ml に  $O.D._{600}=0.2$  となるように植菌し、30℃で3時間培養。1000 x g、室温で5分間遠心し、ペレットを 50 ml の滅菌水で洗浄後、1.5 ml の TE/LiOAc (100 mM 酢酸リチウム、10 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM EDTA) に懸濁する。このうち 100  $\mu$ l に pGAD と pGBD の derivative を 0.05  $\mu$ g ずつとキャリア DNA (from Salmon Testes) 100  $\mu$ g 混ぜたものを加えてよく混ぜる。PEG/LiOAc (40% PEG#4000 国産化学、100 mM 酢酸リチウム、10 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM EDTA) 600  $\mu$ l を入れ、ボルテックスミキサーにより懸濁後、30℃で30分インキュベート。DMSO 70  $\mu$ l を加えて静かに混ぜ、42℃で15分、氷上に1分置き、14000 rpm で5秒遠心し、ペレットを TE 500  $\mu$ l に懸濁して His-HCl 20 mg/l、adenine hemisulfate 20 mg/l 加えた SD プレートに広げる。2日後に現れたコロニーを assay に用いた。

コロニーを His-HCl 20 mg/l、adenine hemisulfate 20 mg/l 加えた SD 培地 2 ml で一晚培養し、そのうち 1 ml を 4 ml の YPD 培地に植え継ぎ、30℃で3時間培養後、 $O.D._{600}$  を測定。culture を 1.5 ml 遠心して集菌し、Z buffer ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  21.5 g/l、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  4.86 g/l、KCl 0.75 g/l、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.246 g/l) 100  $\mu$ l に懸濁して液体窒素中に

5分置き、37℃に5分置く。これをもう一度繰り返す。そしてZ bufferを400  $\mu$ l追加し、28℃で5分インキュベートし、0.4% ONPGを200  $\mu$ l加えることにより反応を開始する。ある程度黄色くなってきたところで1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ を500  $\mu$ l加えて反応を停止する。反応時間が2時間になったら、黄色くなくても反応を停止する。各サンプルは15000rpm 7分で遠心することにより菌体を沈殿させ、上清のO.D.<sub>420</sub>を測定する。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性はMiller unitに換算して表示した。

#### 4) その他の方法

枯草菌の形質転換、ならびに $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイは前章で述べた方法を用いた。

### 第三節 *ispU* 欠損株における *sigH* 遺伝子の発現 及び $\sigma^H$ の蓄積量

$\sigma^H$  因子をコードする *sigH* の発現を *ispU* 欠損株と野生株において比較した(図3-3A)。胞子形成開始期の  $T_0$  の前後では両者に違いは見られないが、それ以後になると *ispU* 欠損株の方が発現が減少することが明らかになった。さらに抗 $\sigma^H$ 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行い、 $\sigma^H$  因子の存在量を *ispU* 欠損株と野生株とで比較した(図3-3B)。両株における $\sigma^H$ 蓄積量には *sigH* の発現と同様に大きな差は見られなかった。従って *IspU* は $\sigma^H$  因子の遺伝子発現及び蓄積には関与しないことが明かとなった。*ispU* 欠損変異により $\sigma^H$  依存の遺伝子発現が遅れるのは、*IspU* が $\sigma^H$  因子の活性化過程に関与するものと推察した。

### 第四節 *IspU* と $\sigma^H$ 因子の直接の相互作用

次に *IspU* と $\sigma^H$  因子が直接相互作用するかどうかを酵母の two-hybrid system を用いて解析した(表3-1)。直接の相互作用を示唆する

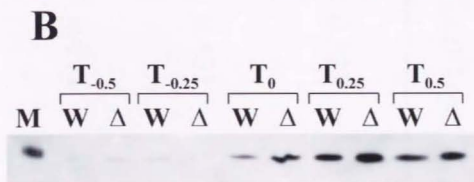
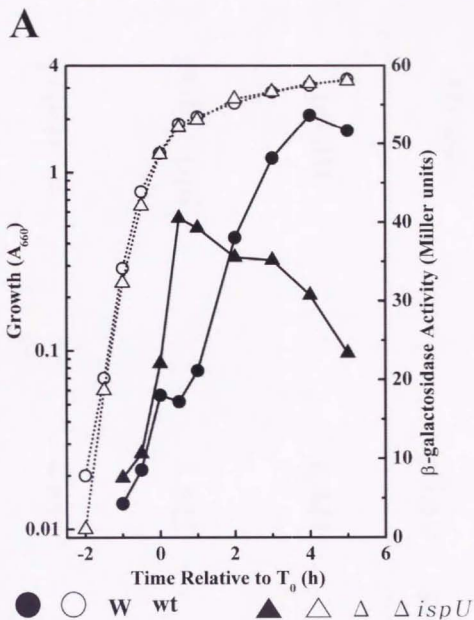


図3-3. *ispU* 欠損株が  $\sigma^H$  の発現と  $\sigma^H$  蓄積量に与える影響

BD-fusion	AD-fusion		
	pGAD	pGAD-IspU	pGAD- $\sigma^H$
pGBD	0.444	0.528	4.378
pGBD-IspU	0.623	0.451	2.294
pGBD- $\sigma^H$	9.878	5.739	18.77

表3-1. IspUと  $\sigma^H$ を用いたtwo-hybrid assay

結果は得られなかった。 $\sigma^H$  因子と IspU との組み合わせ（どちらのドメインと融合させた場合でも）が示す活性はベクターとの組み合わせよりも低かった。従って IspU と  $\sigma^H$  因子は直接には相互作用しないものと考えられる。

#### 第五節 まとめ及び考察

前章において *ispU* 欠損株では  $\sigma^H$  依存性のプロモーターからの発現が約 30 分遅れることが判明した。本章において、*ispU* 欠損株では  $\sigma^H$  をコードする *sigH* の発現は *kinA* の発現が開始する時期の前後において野生株と同様であることが判明した。また、細胞内  $\sigma^H$  の存在量も *ispU* 欠損株と野生株では差が見られなかった。以上より推察されるのは、IspU が  $\sigma^H$  の活性化に関与しているということである。また、Two-hybrid assay により IspU と  $\sigma^H$  が直接相互作用はしないことが示唆された。実際に枯草菌内で IspU と  $\sigma^H$  が相互作用しているかどうかは定かではないが、おそらくは IspU は  $\sigma^H$  の活性化過程に何らかの形で間接的に関与するのではないか。間接的な関与しかないために、*ispU* 欠損変異によっても  $\sigma^H$  の活性化が全く起こらなくなるわけではなく、30 分遅れるという現象になって現れるのではないと思われる。

## 第四章 *ispU* 欠損変異共存下でのみ胞子形成欠損 となる変異株の取得と解析

### 第一節 序

第二章と第三章で *IspU* が  $\sigma^H$  因子の活性化に関与していることが強く示唆された。とはいえ、*ispU* 遺伝子は  $\sigma^H$  因子の活性化に必須ではなく、*ispU* 欠損株の示す表現型も微弱なものである。*ispU* 欠損株において  $\sigma^H$  因子の活性化は遅れるだけで、最終的には野生株と同レベルまで起こる。その原因の一つとしては、細胞内に *IspU* 蛋白と同様の機能を持った別の蛋白質が存在し、これが *IspU* と平行して、あるいは時間的に少し遅れて、もしくはこの蛋白質が必須で *IspU* は補助的に、 $\sigma^H$  を活性化しているものと推察した。そこで、*ispU* 欠損変異と共存下においてのみ  $\sigma^H$  活性を示さず、胞子形成が欠損となる変異株の取得を目指すことにした。*ispU* 欠損株において mini-Tn10 を用いた挿入変異を行い、得られた胞子形成欠損変異株のうち胞子形成の初期過程における変異株を選択し、その中からその変異のみでは胞子形成欠損とならないものを探索した。

### 第二節 材料及び方法

#### 1) 使用菌株ならびに培地、プラスミド

挿入変異株作製のためには、mini-Tn10 を持つプラスミド、pIC333 を使用した。このプラスミドは、mini-Tn10 内にスペクチノマイシン耐性遺伝子と大腸菌内での増幅を可能にする pUCori を持ち、外側に枯草菌内での増幅を可能にする超温度感受性 ori と、エリスロマイシン耐性遺伝子及び挿入部位の特異性を変異により緩和させたトランスポゼース遺伝子を持つ。枯草菌の宿主には、前章までと同様、UOT1285 株の derivative を用いた。枯草菌の培養と、大腸菌の培養には L-broth を使い、枯草菌の胞子形成培地としては 2xSG 寒天培地を



用いた。

## 2) mini-Tn10 を用いた挿入変異株の作製

pIC333 を用いて枯草菌 *ΔispU spo0A-lacZ* 株を形質転換し、スペクチノマイシン 150 μg/ml とエリスロマイシン 1 μg/ml を添加した LB 寒天培地で 28 °C で培養して選択した。得られたコロニーをスペクチノマイシン 150 μg/ml とエリスロマイシン 1 μg/ml を添加した LB 培地に植菌して 28 °C で一晚培養し、スペクチノマイシン 150 μg/ml を添加した新しい LB 培地に 1% 接種した。3 時間 28 °C で培養した後、4 時間 37 °C で培養し、pIC333 の増幅を抑制した。培養液を 1000 倍希釈して、100 μl をスペクチノマイシン 150 μg/ml、クロラムフェニコール 5 μg/ml、X-gal 0.004% を含む孢子形成寒天培地に接種し、37 °C で二日培養した。

## 3) 変異株の選択

孢子形成寒天培地上に形成された強く緑色を呈さない透明なコロニーを選択し、再度スペクチノマイシン 150 μg/ml、クロラムフェニコール 5 μg/ml、X-gal 0.004% を添加した孢子形成寒天培地に画線し、37 °C で二日培養して確認した。こうして取得した二重変異株より染色体 DNA を抽出して、枯草菌 *ΔispU spo0A-lacZ* 株と UOT1285*spo0A-lacZ* 株を形質転換して、両者で孢子形成と *lacZ* 遺伝子の発現に違いが見られるものを選択した。

## 4) mini-Tn10 の挿入部位の塩基配列の決定

変異株の選択の際に取得したプラスミドを template とし、insertion sequence の outside end の内側に設計した二つのプライマー、pIC333primer1 CGA TTC ATT AAT GCA GGG GGA と pIC333primer2 CGG TTT ACC CAC TTA TAA AC を用いて PCR 法によりクローン化した枯草菌染色体断片部分を増幅し、それをテンプレートとして pIC333primer1 と PERKIN ELMER DNA Sequencing Kit Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction を用いて mini-Tn10 が挿入された部分の塩基配列の決定を行った。

#### 6) mini-Tn10 が挿入された遺伝子の同定

mini-Tn10 が挿入された部分の塩基配列を基に、GenomeNet WWW server の Sequence Interpretation Tools 中にある BLAST を用いてホモロジー検索を行い、mini-Tn10 が挿入された遺伝子を同定した。

### 第三節 トランスポゾン変異株の作製

変異株の取得にあたり、X-Gal による発色で  $\sigma^H$  因子の活性をプレート上で検出することを考えた。もっとも適した *lacZ* 融合遺伝子としては、*kinA-lacZ* 遺伝子が考えられるが、発現量が低いいためプレート上での肉眼による識別は困難であった。そこで、本実験では *spo0A-lacZ* 遺伝子を用いることとした。この場合、 $\sigma^H$  因子の活性のみならず、多成分リン酸リレー系の影響も受ける。そこで、*ispU* 欠損株を宿主として得られた変異株のゲノム DNA を抽出し、野生株及び *ispU* 欠損株を再度形質転換することで、トランスポゾンが多成分リン酸リレー系に影響を与える遺伝子中に挿入されたもの、あるいはモニター遺伝子である *spo0A-lacZ* に挿入されたものを排除することにした。

約 14 万株のトランスポゾン挿入株を得、コロニーが青色を呈さず、胞子形成欠損の表現型を示す株、すなわち胞子形成初期過程に異常が見られる胞子形成欠損変異株を 258 株取得した。その 258 株から得られた mini-Tn10 を含む DNA 断片を用いて  $\Delta$ *ispU spo0A-lacZ* 株と UOT1285*spo0A-lacZ* 株を形質転換した。そして野生株中では野生株と同等の青色を呈し、また胞子形成をしていたが、 $\Delta$ *ispU* 変異と共存するとほとんど青色を呈さなくなり、また胞子形成欠損の表現型を示す変異を一つ発見した。

### 第四節 変異株の解析

スクリーニングにおいて得られた変異株はそのゲノム DNA を用

いて *ispU* 欠損株と野生株を形質転換しても、ほとんどのものはどちらも孢子形成が初期の段階で Block されているか、若干 *ispU* 欠損株の方が *spo0A-lacZ* の発現が微弱であり、はっきりした差が見られなかった。ただ一株のみ差が見られる株が得られ、この変異株において *mini-Tn10* の挿入が起こった部位について解析したところ、*mini-Tn10* は複数ゲノム上に挿入されており、これ以上の解析は不可能であった。

## 第五節 まとめ

今回の変異株の取得の試みでは *mini-Tn10* を用いたが、トランスポゾンを用いた変異操作では、挿入位置に偏りが見られたり、欠損変異のみしか取得できないなどの欠点を持っている。しかしながら、今回用いた pIC333 は transposase に変異を導入して挿入部位の特異性を緩和させてある上、挿入断片中に薬剤耐性マーカーと大腸菌内で機能する複製起点を持っており、クローニングが容易であるなどの利点を持っていた。特に、野生株と  $\Delta$ *ispU* 株での挿入変異の比較を行うことが容易であったので、今回の実験では非常に重宝した。

しかし、この変異株取得法にはひとつ厄介な点が存在している。*mini-Tn10* が複数ゲノム上に挿入されたり、*mini-Tn10* の挿入箇所を決定する際にその両側から外側へ向かって塩基配列を解読しようとしても、片方はもう片方と全く別の配列であることがある。なぜこうした現象が見られるのか不明である。今回のスクリーニングでは表現型にはっきりした違いが現れにくかったが、その原因として目的の遺伝子がトランスポゾンが挿入されにくい箇所に存在するか、*ispU* 欠損かつもう一つの遺伝子の欠損では影響が見えにくいのかということが考えられる。この実験を行うきっかけとなった仮説、すなわち *IspU* と同様の機能を持った別の蛋白質が存在するという仮説は、今回の実験では証明することができなかった。それが上述したように目的の蛋白質をコードする遺伝子中にトランスポゾンが挿入されなかったからなのか、目的の蛋白質というのは実は複数存在しており、その内の一つが欠損したところではっきりした表現型の

違いとして現れなかったからなのか、もしくは仮説が間違っていたのか特定することができない。

## 第五章 IspU と相同性のある蛋白質の欠損株の解析

### 第一節 序

IspU のアミノ酸配列は、C 末端側で  $\sigma^B$  因子の蛋白質レベルの制御因子である RsbR、RsbS や、枯草菌ゲノムプロジェクトにより同定された機能未知の YqhA、YtvA、YetI、YojH と高い相同性を示す。これらが IspU と同様の機能をすることも考えられる。そこで、これらの欠損株についても *kinA* 発現に影響があるのかどうか検討した。

### 第二節 材料及び方法

#### 1) 使用菌株ならびに培地、プラスミド

枯草菌は、第二章と同様、UOT1285 株の derivative を用いた。枯草菌の培養と、大腸菌の培養には L-broth を使い、枯草菌の孢子形成培地としては 2xSG 寒天培地を用いた。クローニングには pUC19 を用いた。

#### 2) 欠損株の作製

*rsbRSTU* オペロンのクローニングには、  
GAT GGT ACC CAC GTC GAA ATC GAT G と、  
TAT CTG CAG CGC TTC CTC CTG AGG A をプライマーとして  
TAKARA Pyrobest™ DNA Polymerase を用いて 98℃2 分で熱変性し、  
98℃5 秒、55℃1 分、72℃3 分を 1 サイクルとし、30 サイクル行い、  
72℃10 分により増幅した断片を *KpnI*、*PstI* で消化後クローニング  
した。*rsbR* のフレームシフト変異の作製は以下のようにして行っ  
た。*rsbR* の *MunI* site にカナマイシン耐性遺伝子を組み込んだプラス  
ミドを *SphI* 処理で直鎖状にし、枯草菌を形質転換してカナマイシン  
耐性株を選択し、PCR 法によりゲノム上の *rsbR* 遺伝子にカナマイシ



ン耐性遺伝子が挿入されたことを確認した。再度 *rsbR* の *MunI* site を T4 DNA Polymerase で平滑化したプラスミドを *SphI* 処理で直鎖状にし得られた *rsbR* ::Km 株を形質転換してカナマイシン感受性株を選択した。この株のゲノム DNA から *rsbR* 領域を増幅し、*MunI* で消化されないことを確認した。*rsbS* のフレームシフト変異の作製は基本的に *rsbR* の場合と同様に行った。ただし、カナマイシン耐性遺伝子の挿入は *rsbS* ORF の中央に位置するの *NruI* site に対して行い、replacement 用のプラスミドには、*rsbS* の 5'側を含む *KpnI*-*NruI* 断片 1317 bp と 3'側を含む *Sau3AI*-*PstI* 断片 1129 bp を *Sau3AI* site を平滑化した後に結合して作製したものを用いた。この構築では *Sau3AI*-*NruI* 間 163 bp が重複するが、この長さでは相同的組み換えは起こらないものと考えた。

*yqhA*、*yojH*、*ytvA*、*yetI* のクローニングにはそれぞれ、  
 ATA AGC TTG GCT ATA GCC CAT TGA A 及び  
 TAG CAT GCT TGG AAC CGA TTT ATC A (*yqhA*)  
 TGG ATA TGC TGC AGT TGA CC 及び  
 TGG GCA GAA ATA TGG CGA TC (*yojH*)  
 ACT TTC GTT TTC CCG CGG TA 及び  
 TGT GTC TTT CAG CAT GCT GC (*ytvA*)  
 AAA TCT AGA TTG GGC TCA CCG AGA A 及び  
 TTT CTG CAG CAT CAA AGC GAC AGG (*yetI*) をプライマーとして  
 TAKARA Pyrobest™ DNA Polymerase を用いて 98℃2 分で熱変性後、  
 それぞれ 98℃5 秒、60℃1 分、72℃2 分(*yqhA*)、98℃5 秒、55℃1 分、  
 72℃3 分(*yojH*)、98℃5 秒、55℃1 分、72℃3 分(*ytvA*)、98℃5 秒、55℃  
 1 分、72℃2 分 (*yetI*) を 1 サイクルとして 30 サイクル行い、72℃10  
 分により増幅した断片を *EcoRI* と *SphI* (*yqhA*)、*NruI* と *PstI* (*yojH*)  
 で、*KpnI* と *SphI* (*ytvA*) で、*XbaI* と *PstI* (*yetI*) で消化後 pUC19 に  
 クローニングした。カナマイシン耐性遺伝子の各 ORF への挿入は  
*NcoI*(pol)-*SacI* (*yqhA*)、*Aor5II* (*yojH*)、*EcoRV* (*ytvA*)、*EcoRV* (*yetI*)、  
 を用いた。構築したプラスミドはそれぞれ *SphI* (*yqhA*)、*SacI* (*yojH*)、  
*KpnI* (*ytvA*)、*KpnI* (*yetI*)、で切断して直鎖状にし、枯草菌 UOT1285  
 株を形質転換することにより各遺伝子の欠損株を作製した。各遺伝  
 子内にカナマイシン耐性遺伝子が挿入されていることを、PCR によ



り確認した。

また *ispU yojH* 二重欠損変異株は構築したプラスミドを用いて第二章で示した *ispU* 欠損変異株を形質転換し、カナマイシン耐性株を選択して取得した。

### 第三節 各欠損株における *kinA* の発現

図 5-1 に示すように、*rsbR*、*rsbS* フレームシフト変異株、*yqhA*、*ytvA*、*yetI* 欠損株はいずれも野生株と類似した *kinA* の発現が見られた。*ytvA*、*yetI* 欠損株に関しては  $T_5$  以降で野生株よりも *kinA* の高発現が見られたが、*kinA* の発現開始時期は野生株とほぼ同様であった。これらの変異株における *kinA* の発現は、*ispU* 欠損変異株におけるそれとは明らかに異なるものである。よって、これらの遺伝子は *ispU* と相同性があっても  $\sigma^H$  因子の活性化には関与していないと結論した。また、表 5-1 に示すように、各欠損株の胞子形成率は野生株のそれと有為な差が見られなかった。

ただ一つだけ、*yojH* 欠損株のみは *ispU* 欠損株と類似した *kinA* の発現パターンを示した。*ispU* 欠損株では *kinA* の発現が時間的に遅れることだけではなくその発現量も少なくなるのだが、*yojH* 欠損株もまた同様に発現量が少なくなる。この結果より、*yojH* は  $\sigma^H$  因子の活性化に関与している可能性があると推察される。

そこで *ispU*、*yojH* 二重欠損株における *kinA* の発現状況を調べることにした。

図 5-2 で示すように、*ispU*、*yojH* 二重欠損株では *kinA* の発現は *ispU* 欠損株よりもさらに約 30 分遅れることが認められる。すなわち野生株と比較して約 1 時間遅れて *kinA* の発現が起り、発現量も single mutation の場合よりもさらに少なくなる。従って *ispU*、*yojH* の各変異は加算的に効果を示すようである。

また、表 5-1 に示すように、*ispU*、*yojH* 二重欠損株でさえも胞子形成率は野生株のそれと有為な差が見られなかった。

# *kinA-lacZ* Expression

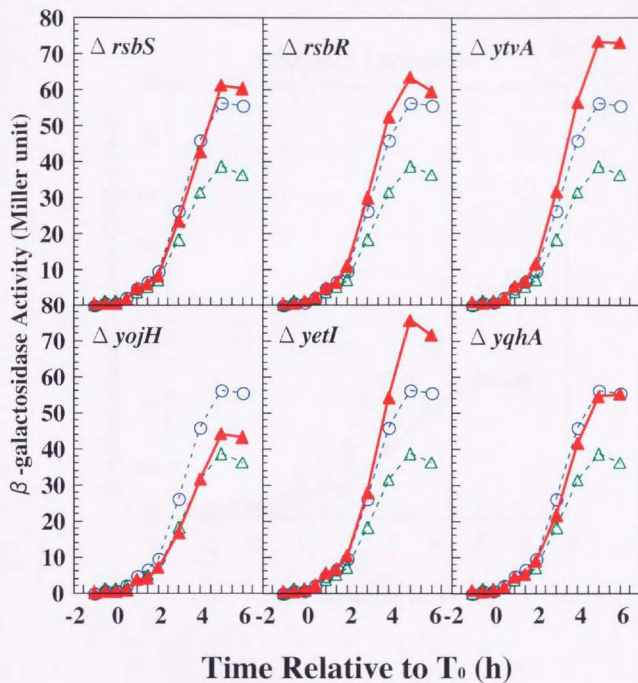


図5-1. *ispU* paralogueの欠損株における *kinA-lacZ* の発現

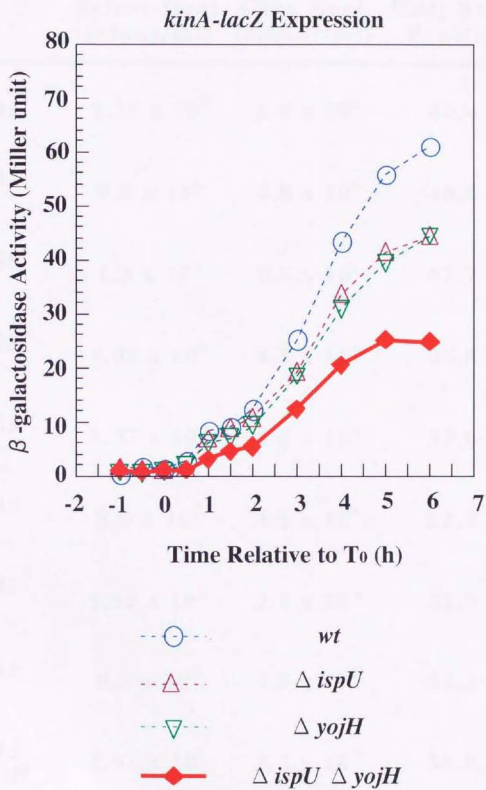


図5-2.  $\Delta ispU \Delta yojH$  二重欠損株が  
*kinA-lacZ* の発現に及ぼす影響

strain	Before Heat (colony/ml)	After Heat (colony/ml)	Heat Resistant Fraction(%)
UOT1285	$1.35 \times 10^9$	$6.0 \times 10^8$	44.4
UOT1285 <i>ΔispU</i>	$9.8 \times 10^8$	$4.0 \times 10^8$	40.8
UOT1285 <i>ΔrsbR</i>	$1.3 \times 10^9$	$8.8 \times 10^8$	67.7
UOT1285 <i>ΔrsbS</i>	$1.05 \times 10^9$	$4.7 \times 10^8$	44.8
UOT1285 <i>ΔytvA</i>	$1.37 \times 10^9$	$4.6 \times 10^8$	33.6
UOT1285 <i>ΔyojH</i>	$8.6 \times 10^8$	$4.5 \times 10^8$	52.3
UOT1285 <i>ΔyetI</i>	$1.55 \times 10^9$	$3.4 \times 10^8$	21.9
UOT1285 <i>ΔyqhA</i>	$8.3 \times 10^8$	$4.5 \times 10^8$	54.2
UOT1285 <i>ΔispUΔyojH</i>	$1.07 \times 10^9$	$3.3 \times 10^8$	30.8

表5-1. *ispU* paralogue 欠損株の孢子形成率

#### 第四節 まとめ及び考察

*rsbR*, *rsbS* フレームシフト変異、*yqhA*, *ytvA*, *yetI* 欠損の各変異はいずれも *kinA* 発現に関しては何ら影響を与えなかった。これはこれらの遺伝子が *kinA* の発現に関与していないこと、さらには  $\sigma^H$  因子の活性化過程に関与していないことを示唆する。*ytvA*, *yetI* 欠損株に関しては  $T_5$  以降で野生株よりも *kinA* が高発現していたが、だからといってこの二つの遺伝子が  $\sigma^H$  因子の活性化過程を負に制御するとは言い切れない。この二つの蛋白質の本来の機能ではなく、間接的に *kinA* 発現に影響を与えている可能性もある。この二つの変異株についてはあまり深く考察することはできない。しかし、*IspU* と同様の形で  $\sigma^H$  因子の活性化過程に関与しているわけではないことは確かである。

*yoyH* 欠損株は *ispU* 欠損株と類似した *kinA* の発現パターンを示したが、 $\sigma^H$  因子の存在量を野生株と比較するまでは  $\sigma^H$  因子の活性化過程に関与しているとは断言できない。しかし、少なくとも  $\sigma^H$  因子の活性化過程とそれ以前の段階に関与しているようである。*ispU yoyH* 二重欠損株では *kinA* 発現は野生株と比較して約1時間遅れた。

ところで、最近  $\sigma^B$  の活性化機構の詳細が次々に解明され、*IspU* paralogue である *RsbR* と *RsbS* の機能についても明らかになりつつある。その概要について図5-3で説明する。 $\sigma^B$  はストレス応答に必要な遺伝子群の発現調節を行う  $\sigma$  因子である。この  $\sigma^B$  には転写後調節機構が存在し、その機構を司る蛋白質は  $\sigma^B$  をコードする遺伝子とオペロンをなしている。 $\sigma^A$  依存性のプロモーターから *RsbR*, *RsbS*, *RsbT*, *RsbU*, *RsbV*, *RsbW*,  $\sigma^B$ , *RsbX* の順に発現し、 $\sigma^B$  はアンチ  $\sigma$  蛋白質である *RsbW* と結合することでその活性が抑制される。*RsbW* はアンチアンチ  $\sigma$  蛋白質である *RsbV* の結合によりそれまで結合していた  $\sigma^B$  を解放するのであるが、通常は *RsbW* が持つ kinase 活性により *RsbV* をリン酸化することでそのアンチアンチ  $\sigma$  因子としての機能を停止させている。しかし、*RsbV* の脱リン酸化が *RsbW* の kinase 活性を上回ると、*RsbV* のアンチアンチ  $\sigma$  因子としての機能が

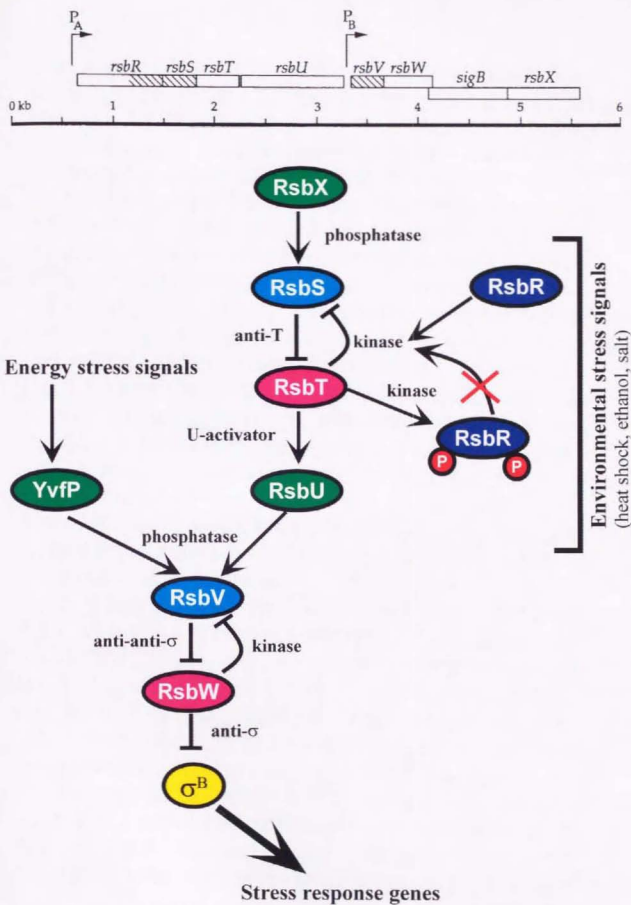


図5-3.  $\sigma^B$  の活性化機構



回復し、RsbV と RsbW 間で結合が起こり、 $\sigma^B$  が解放される。RsbV の脱リン酸を行う蛋白質として RsbU と YvfP が存在するが、RsbU は環境ストレスを感知してそのホスファターゼ活性を示す。また、YvfP はエネルギーストレスを感知してそのホスファターゼ活性を示すのではないかと考えられている。RsbU には、それと結合してその活性化を行う蛋白質 RsbT が存在する。RsbT は RsbS が結合するとその活性を示さないが、環境ストレスに起因する何らかのシグナルが伝達されると RsbT はそのホスファターゼ活性を示し、RsbS をリン酸化することでその RsbT 結合能を失わせる。そして RsbT は RsbU のホスファターゼ活性を高め、結果的に  $\sigma^B$  を解放する。また、 $\sigma^B$  がひとたび解放されると  $\sigma^B$  依存性のプロモーターから RsbV、RsbW、 $\sigma^B$ 、RsbX が発現し、急激な  $\sigma^B$  依存性の遺伝子発現を引き起こす。また、必要以上に  $\sigma^B$  が存在する場合は RsbX による RsbS の脱リン酸化により、RsbT と RsbS の結合が起こり、RsbU 経由のシグナル伝達を弱めると考えられている。また、RsbR は RsbS にも RsbT にも相互作用するが、RsbR によって RsbT の kinase 活性が上昇し、RsbT により二カ所でリン酸化されるとその作用が無くなることから、環境ストレスを感知しているのは RsbR ではないかと考えられている。実際に *rsbR* 欠損変異株では環境ストレス応答における  $\sigma^B$  の活性が約 1/2~1/3 に抑制されることが示されている<sup>58)</sup>。

*ispU* や *yoyH* の欠損株が示す表現型は、対象となる  $\sigma$  因子こそ異なるものの、ある  $\sigma$  因子の活性を調節するという点において、*rsbR* 欠損株と類似している。そのため、 $\sigma^B$  因子にも図 5-3 に示すのと類似した活性化機構が存在するのかもしれない。本章で示した様に、*rsbR* や *rsbS* の欠損株は  $\sigma^B$  活性に何ら影響を与えなかった。また、*ispU* 欠損変異が  $\sigma^B$  活性に与える影響を調べたところ、充分再現性のある結果は得られなかった(data not shown)ことから、図 5-3 に示したシステムそのものが  $\sigma^B$  活性をも調節しているとは考えられない。

IspU-YoyH と RsbR との相同性や RsbR の  $\sigma^B$  活性調節機構における機能、そして第四章の screening で *ispU* 欠損変異との共存化で  $\sigma^B$  の活性化が起こらなくなる変異株を取得できなかったことを考えあわせると、IspU や YoyH が  $\sigma^B$  活性化機構の main pathway に位置してい

るとは考えにくい。むしろ  $\sigma^H$  活性化に必須な蛋白質が別に存在し、その蛋白質の活性を調節すると考えた方が妥当であろう。

## 第六章 IspU と相互作用する蛋白質の同定と解析

### 第一節 序

IspU が  $\sigma^{54}$  の活性化に関わる蛋白質の活性を調節する機能を持っているものと考え、IspU と相互作用する蛋白質を同定し、その蛋白質の機能解析を行うことにより、 $\sigma^{54}$  を活性化する蛋白質の同定を試みた。そのために二つの方法を試みた。

本章ではまずその一つである共精製により *in vivo* で IspU と相互作用する蛋白質の同定と解析について述べる。この方法で同定した蛋白質が IspU と相互作用することは確実であるが、弱い相互作用しかない蛋白質を同定できるのかどうかについては疑問が残る。そこでもう一つの方法として、感度が高いと思われる酵母 two-hybrid screening を用いて IspU と相互作用する蛋白質の同定も同時に行った。

### 第二節 材料及び方法

#### 1) 使用菌株ならびに培地、プラスミド

枯草菌 UOT1285 株 大腸菌 MV1184 *ara*,  $\Delta(lac-proAB)$ , *rpsL*, *thi*( $\phi 80lacZ\Delta M15$ ),  $\Delta(srl-recA)306::Tn10(tet^r)/F'$  [*traD36*, *proAB*<sup>+</sup>, *lacP*, *lacZ\Delta M15*] を用いた。枯草菌の胞子形成培地には 2xSG 培地を用いた。大腸菌の培養には LB 培地を用い、形質転換には塩化カルシウム法を用いた。IspU の C 末端に 6xHis-tag を付加するためのプラスミドには pQE60(QIAGEN)を使用した。

ライブラリーに用いた枯草菌のゲノム DNA には UOT1285 株のものを使用した。酵母には PJ69-4A 株、大腸菌には DH5  $\alpha$  株を使用した。酵母の Two-hybrid system に必要なプラスミド pGAD-C1~C3、pGBD-C1~C3 及び pGAD ライブラリーは東京農大・吉川教授からご供与いただいた。枯草菌及び大腸菌の培養には LB 培地を用いた。酵母の培養には YPD 培地と SD 培地を用いた。YPD、SD プレート作製にあたっては 2% agar を加えた。

## 2) IspU-His 発現プラスミドの構築

TAKARA Pyrobest™ DNA polymerase を使用し、Forward primer  
GCC ATG GAA CTG AAT GAA AAA TTA TAT GC  
Reverse primer TTG GAT CCT TGA TGA TAG TTT AAT GCT TGG  
を用いて熱変性 94 °C 2 分の後、98 °C 5 秒、55 °C 1 分、72 °C 1 分  
を 1 サイクルとして 30 サイクル行った後、72 °C 10 分で増幅させた  
*ispU* を翻訳開始コドンを含む形で *NcoI* site、翻訳停止コドンの代わ  
りに *BamHI* site を付加した 842 bp の DNA 断片を得た。この DNA 断  
片を *NcoI*、*BamHI* で消化し、pQE60 の *NcoI*、*BamHI* で消化した部  
分に組み込んだ(pQE60-IspU)。

## 3) IspU-His の大腸菌における生産と精製

構築した pQE60-IspU を保持する大腸菌 MV1184 をアンピシリン  
50 µg/ml 入りの LB 液体培地で一晚 25 °C で振とう培養し、それを新  
たな LB 培地 1 l に 0.5% 接種した。25 °C で振とう培養し、O.D.<sub>660</sub> が  
0.6 付近に達したとき、IPTG を 2 mM になるように添加した。添加  
後 5 時間後に集菌し、Sonication Buffer (300 mM NaCl 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 8.0) + 50 mM Imidazol にて wash し、再度 80 ml の Sonication  
Buffer に懸濁した。次に Ni-NTA agarose を用いて精製を行った。5 ml  
のカラムに大腸菌菌体破砕液を添加し、Sonication Buffer + 100 mM  
Imidazol 30 ml で wash し、Sonication Buffer + 400 mM Imidazol 25 ml  
で溶出を行った。溶出液は 10 mM Tris pH 8.0 に対して透析し、MonoQ  
を用いて精製した。今回の溶出液には 1 M KCl を使い、推定分子量  
から約 400 mM KCl で溶出する蛋白質を IspU とみなした。この蛋白  
質が IspU であることは N 末端アミノ酸配列を決定することにより確  
認した。

## 4) 抗 IspU 抗体の作製

精製 IspU を脱塩後、凍結乾燥し、蒸留水 1 ml に懸濁し、アジュバ  
ンド 1 ml とよく混ぜ合わせ、ウサギ二羽に 1 ml ずつ注射した。ウサ

ギが抗 IspU 抗体を生産しているかどうかをオクテルロニーテストで確認し、採血した。取得した血清は Ampure™ PA Kit (Amersham LIFE SCIENCE) により精製した。精製した抗 IspU 抗体は 0.02%  $\text{NaN}_3$  を加えて 4 °C で保存した。

#### 5) 枯草菌における IspU-His 発現株の構築

抗 IspU 抗体の作製の際に使用した pQE60-IspU を *Eco*RI, *Xba*I で消化し、*ispU* の翻訳領域の N 末端約 1/8 が欠損し、C 末端に 6xHis が付加された形の断片を得た。これを pUC18Cm の *Eco*RI, *Xba*I で消化した部分に組み込んで pUC18Cm  $\Delta$  *ispU*-His を構築した。このプラスミドを用いて枯草菌 UOT1285 株を形質転換し、クロラムフェニコール耐性株を選択した。その結果、ゲノム上の *ispU* が導入した *ispU*-His と置き換わった株、UOT1285IspU-6xHis 発現株を得た。

#### 6) 抗 IspU 抗体カラムの作製

CNBr-activated Sepharose™ 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) 0.3 g に対し、1 mM HCl 1 ml で 15 回洗浄し、3 ml の 0.1 M リン酸カリウム buffer pH 8.0 で 3 回洗浄。0.1 M リン酸カリウム buffer pH 8.0 に対して透析した抗 IspU 抗体 500  $\mu$ l を用いて室温で 4 時間 coupling を行った。3 ml の 1 M Tris-HCl pH 8.0 を加えて blocking を 3 時間行った後、1 M Tris-HCl pH 8.0、3 ml で 3 回、0.1 M 酢酸ナトリウム buffer pH 4、3 ml で 3 回洗浄、この操作を 3 回繰り返し TSA buffer (0.01 M Tris-HCl pH 8.0、0.14 M NaCl、0.025%  $\text{NaN}_3$ ) 中に保存した。

#### 7) IspU と相互作用する蛋白質の精製

UOT1285IspU-His 株を 2xSG 培地 300 ml で  $T_{0.5}$  まで培養し、6000 rpm 10 分で集菌し、TSA buffer 30 ml に懸濁して再度 6000 rpm 10 分で集菌し、lysozyme 1 mg/ml を含む TSA buffer 30 ml に懸濁して室温に 4 時間放置した。ソニケーションにより破碎した後遠心し、上清を抗 IspU 抗体カラムにかけた。精製方法は、10 ml の TSA buffer でカラムを洗浄後、サンプルをカラムに添加し、10 ml の TSA buffer でカラムを洗浄し、溶出 buffer (50 mM トリエタノールアミン pH 11.5、



0.15 M NaCl) 5 ml で溶出した。次に溶出液から HiTrap chelating column を用いて相互作用蛋白質のみを分離した。あらかじめ HiTrap chelating column は 15 ml の蒸留水で洗浄後、0.1 M  $\text{NiSO}_4$  2.5 ml で Ni をキレートさせ、15 ml の蒸留水で余分な Ni を洗い流し、Start buffer (0.02 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 M NaCl, pH 8.0) 25 ml で平衡化した。一晚 Start buffer に対して透析しておいたサンプルをこのカラムに通した。溶出は 0~500 mM イミダゾールにより行った。さらに溶出サンプルを Resource Q カラムを用いたクロマトグラフィーにより濃縮した。

#### 8) pGBD-IspU の構築

GAL4-BD に IspU を接続させたプラスミド pGAD-IspU の構築は図 3-2 に示した。

#### 9) 酵母の形質転換法

pGBD-IspU で酵母を形質転換する方法はプラスミド DNA が pGBD-IspU のみである点と選択するプレートが Leu 100 mg/l、His-HCl 20 mg/l、adenine hemisulfate 20 mg/l を含む SD プレートである点を除けば第三章で示した方法と同じである。

pGBD-IspU を導入した酵母に pGAD ライブラリーを導入する方法は以下に示すとおりである。pGBD-IspU を導入した酵母を Leu 100 mg/l、His-HCl 20 mg/l、adenine hemisulfate 20 mg/l、を含む SD プレートに広げ、30℃で 2 日培養した。次にコロニーを 2、3 個かきとり、SD (Leu、His、ade 含む) 培地 100 ml で一晚培養した。SD (Leu、His、ade 含む) 培地 300 ml に  $\text{O.D.}_{660}=0.2$  となるように植菌し、30℃で 4 時間培養した。1000 x g、室温で 5 分間遠心し、ペレットを 50 ml の滅菌水で洗浄後、1.5 ml の TE/LiOAc (100 mM 酢酸リチウム、10 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM EDTA) に懸濁した。ここにあらかじめ pGAD ライブラリー 0.5 mg とキャリア DNA (from Salmon Testes) 2 mg を混ぜたものを加えてよく混ぜた。PEG/LiOAc (40 % PEG #4000 国産化学、100 mM 酢酸リチウム、10 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM EDTA) 6 ml を入れ、ボルテックスミキサーにより懸濁後、30℃で 30 分インキュベートした。DMSO 0.7 ml を加えて静かに混ぜ、42℃



で15分、氷上に1分置き、1000 x g 5分遠心し、ペレットをTE 20 mlに懸濁してさらに1000xg 5分遠心し、ペレットをTE 20 mlに懸濁してHis-HCl 20 mg/l加えたSDプレートに広げる。30℃で培養し、10日後までに現れたコロニーをすべて新たなHis-HCl 20 mg/l加えたSDプレートに植菌して30℃で2日培養し、4℃で保存した。

#### 10) $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定

$\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定は第二章で示した方法で行った。

#### 11) 枯草菌からのゲノムDNAの抽出

5 ml LB液体培地に1%グルコースを加えたものに枯草菌 UOT1285 株を植菌して37℃で一晩培養し、200 ml LB培地に1%接種して37℃で4~5時間培養し、8000 rpm 5分遠心により集菌した。pelletを15 mlの50 mM Tris-HCl、20 mM EDTA (pH 8.0)に懸濁した。lysozymeを1 mg/mlになるように加え、37℃で30分インキュベートした。1.5 mlの10% SDSを加えて混ぜた。0.8 mlの3M 酢酸ナトリウムを加えてよく混ぜる。これにPhenol/Chloroformを17 ml加えて100回強く振とうし、12000 rpm 10分の後、上清を別の容器に入れ替えて45 mlの氷冷エタノールを加えて容器のふたを閉め、容器を一度上下逆さまにして、現れたDNAをガラスのパスツールピペットの先に絡ませ、80%エタノール中で洗浄し、真空ポンプを用いて10分間脱気して、エタノールを除いた。DNAは10 mlのTEに溶解させた。

#### 12) 酵母からのDNAの抽出

酵母からプラスミドを回収するために、ゲノムDNAとプラスミドを共に抽出する方法を用いた。プラスミドを導入した酵母をYPD培地100 mlで一晩培養し、6000 rpm 10分で遠心して集菌後、酵母溶解液(2% Triton X-100、1% SDS、100 mM NaCl、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA) 10 mlに懸濁し、Phenol/Chloroformを10 ml加えた。さらに乾熱滅菌したガラスビーズを10 g加えてボルテックスミキサーにより2分間強振した。6000 rpm 10分で遠心して得られる

上清を別の容器に移し、エタノール沈殿して TE 0.1 ml に溶かして保存した。

### 13) Colony-lift Filter Assay

得られた候補株の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の強弱を親株と比較するために Colony-lift Filter Assay を行った。取得した候補株を親株とともに YPD プレートで 1 日培養し、このプレートに濾紙を乗せ、丁寧に押しつけて静かにはがした。コロニーの付着した面を上にして液体窒素に 1 分浸けてから室温に戻した。0.08 % X-gal を含む Z buffer にこの濾紙をコロニーの付着した面を上にして乗せ、発色を確認した。

### 14) pGAD ライブラリーの作製

pGAD ライブラリーは東京農大・吉川教授からいただいたものだけでなく、自らも作製した。まず、枯草菌 UOT1285 株からゲノム DNA を抽出し、1.8 mg/ml のゲノム DNA 溶液を 0.1 ml エッペンドルフ遠心チューブ中で 2 分間超音波破碎した。アガロースゲル電気泳動により約 1500 bp~500 bp の DNA 断片を回収した。この断片は末端が平滑である保証がないので、TAKARA T4 DNA Polymerase により平滑化した。また pGAD-C2 は、あらかじめ EcoRI、ClaI で消化し、TAKARA Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75) で脱リン酸後、TAKARA T4 DNA Polymerase により平滑化しておき、TAKARA T4 DNA Ligase によりこの断片を組み込んだ。こうして作製したプラスミドを用いて大腸菌を形質転換し、3000~100000 コロニーごとに別のライブラリーとしてストックし、11 種類のライブラリーを作製した。いただいたライブラリーを含めて 12 種類のライブラリーを用意した。

## 第三節 IspU と相互作用する蛋白質の存在

まず最初に枯草菌内に IspU と相互作用する蛋白質が存在するかどうかを検討するために、UOT1285ispU-His 株を 2xSG 培地で  $T_{0.5}$  まで

培養して得た抽出液に対して各種クロスリンカーを作用させ、SDS-PAGEにより分離した後、抗 IspU 抗体を用いた western blotting により IspU を検出した。

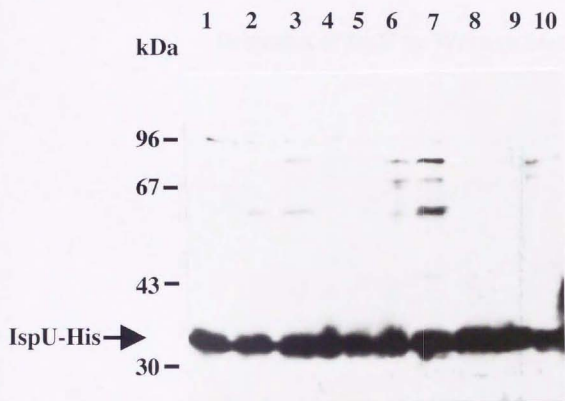
その結果(図 6-1)、クロスリンカーの種類によっては本来の IspU-His の位置(33kDa)以外に複数のバンドが認められた。同様の結果は 0.5%ホルムアルデヒドを枯草菌細胞に作用させた *in vivo* crosslinking でも得られた。(図 6-2)

以上の結果から、IspU と相互作用する蛋白質が枯草菌内に複数存在することが示された。

#### 第四節 IspU と相互作用する蛋白質の精製と同定

次にホルムアルデヒドによる *in vivo* crosslinking により得られた IspU-相互作用蛋白質複合体を精製し、IspU と相互作用する蛋白質を同定することを試みた。当初 IspU の C 末端に付加した 6xHis-tag を用いて  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA カラムにより精製することを試みたが、枯草菌内に  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA カラムと結合するバックグラウンド蛋白質が多種類存在していたため、この方法による精製はできなかった。そこで、抗 IspU 抗体をカラムに固定し、同カラムを用いることで精製を行った。ホルムアルデヒド処理を行った場合と行わなかった場合で抗体カラムを用いて IspU-相互作用蛋白質を精製したところ、どちらの場合にも IspU 以外に約 32 kDa と約 30 kDa の蛋白質が認められた。ところが、UOT1285 $\Delta$ ispU 株抽出液を抗 IspU 抗体カラムに供した場合には、これらの蛋白質が IspU-His 共々精製されない(図 6-3)ことから、この現象はこれらの蛋白質が IspU-His と相互作用し、IspU-His が抗 IspU 抗体カラムに結合したために起こったものであることは明らかである。また、UOT1285ispU-His 株の代わりに野生株を用いた場合にも約 30 kDa の蛋白質については同様の現象が起こることから、この蛋白質と IspU-His との相互作用は、IspU の C 末端に付加した 6xHis-tag によるものではなく、IspU そのものとの相互作用であることも明らかである。一方、約 32 kDa の蛋白質の方は SDS-PAGE 上で IspU とほぼ同じ泳動距離を示すため、IspU そのものとの相互作用であるかどうかは

# Detection of IspU by Western blot



Lane 1: no crosslinker

Lane 6: DSP

Lane 2: BS<sup>3</sup>

Lane 7: DSS

Lane 3: BSOCOES

Lane 8: DTBP

Lane 4: DMA

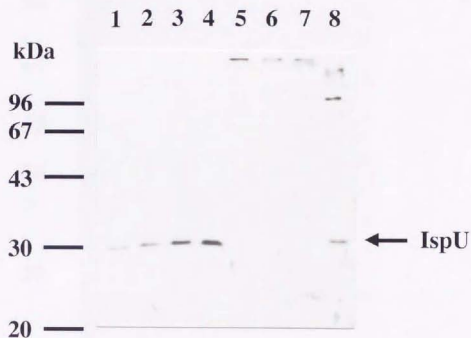
Lane 9: DTSSP

Lane 5: DMS

Lane 10: EEDQ

図6-1. IspUと相互作用する蛋白質が存在することの確認1

# Detection of IspU by Western blot



Lane 1: UOT1285 T-1 Cell

Lane 2: UOT1285 T-0.5 Cell

Lane 3: UOT1285 T<sub>0</sub> Cell

Lane 4: UOT1285 T<sub>0.5</sub> Cell

Lane 5: UOT1285 T-1 Cell *in vivo* crosslink

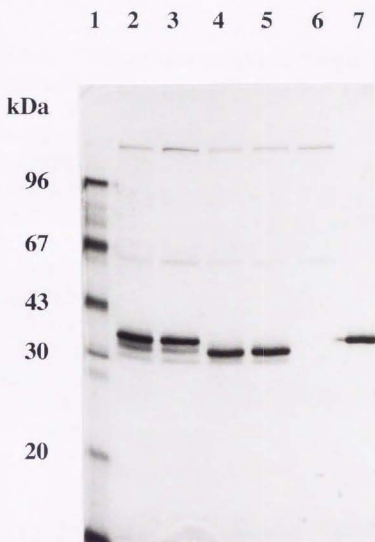
Lane 6: UOT1285 T-0.5 Cell *in vivo* crosslink

Lane 7: UOT1285 T<sub>0</sub> Cell *in vivo* crosslink

Lane 8: UOT1285 T<sub>0.5</sub> Cell *in vivo* crosslink

図6-2. IspUと相互作用する蛋白質が存在することの確認2





Lane 1:molecular mass marker  
Lane 2:UOT1285 IspU-6xHis  
Lane 3:UOT1285 IspU-6xHis crosslink  
Lane 4:UOT1285  
Lane 5:UOT1285 crosslink  
Lane 6:UOT1285  $\Delta$  *ispU*  
Lane 7:Purified IspU-6xHis

図6-3. 抗IspU抗体カラムによる精製

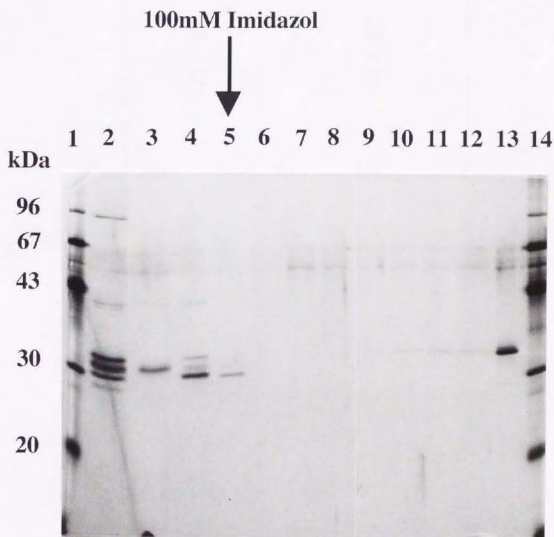


不明である。

次に得られた IspU-相互作用蛋白質複合体から目的の蛋白質を取得するために、Hitrap-chelating column を用いたクロマトグラフィーを行った。その結果、約 32 kDa の蛋白質は flow through フラクシオンに、約 30 kDa の蛋白質はイミダゾール濃度 100 mM 付近のフラクションに溶出された(図 6-4)。最後にそれぞれの蛋白質を ResourceQ クロマトグラフィーにより濃縮し、SDS-PAGE を行った後 PVDF 膜にトランスファーして、気相式アミノ酸シーケンサーにより N 末端アミノ酸配列を決定した(表 6-1 (株)バイオロジカに依頼)。約 32 kDa の蛋白質は SDS-PAGE 上では単一バンドであったが、実際には複数の蛋白質が混在していたためか、各段階で 2 種類のアミノ酸が同定されてしまったため同定することは不可能であった。それに対して約 30 kDa の蛋白質のアミノ酸配列を用いて、Japan Functional Analysis Network for *Bacillus subtilis* (<http://bacillus.tokyo-center.genome.ad.jp/>) を利用してホモロジー検索を行ったところ、YojH の推定アミノ酸配列の 2 残基目から 11 残基目と完全に一致した。よって、IspU と相互作用する蛋白質の一つは YojH であることが判明した。

#### 第五節 Two-hybrid screening による IspU と相互作用する蛋白質の探索

いただいたライブラリーを含めて 12 種類のライブラリーを用いて pGBD-IspU を導入した酵母を形質転換した。ライブラリーの種類により形質転換した細胞数、候補株の数が異なった。この結果を表 6-2 に示す。形質転換した細胞数は 10 万~220 万(総数 1100 万)存在すると見積もられ、Ade<sup>+</sup>の表現型を示す候補株は 30 株得られた。そのうち Colony-lift Filter Assay により pGBD-IspU を導入した酵母よりも  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が高い株を選択し、その株から DNA を抽出した。この DNA を用いて大腸菌を形質転換し、プラスミドを抽出して *EcoRI*、*PstI* で消化し、約 6 kbp の pGBD の断片と約 700 bp の *ispU* の断片が存在するもの以外を探索し、これを pGAD ライブラリー由来のプラスミドとして取得した。得られたプラスミドを用いて組み



Lane 1:molecular mass markers

Lane 2:anti-IspU antigen coupled  
CN-Br-activated Sepharose

Lane 3:HiTrap Chelating flow through

Lane 4~13:HiTrap Chelating

Lane 14:molecular mass markers

図6-4. HiTrap-Chelating column

を用いたクロマトグラフィー

---

**Molecular mass**

**N-terminal Amino acid sequence**

---

**32 kDa**

**S/F-N-Q-T/N-Q/V-T/Y-Q/V-Y/F-A/I-A/I**

**30 kDa**

**A-K-N-K-K-L-F-E-Y-L**

---

表6-1. **IspU-His**と相互作用する  
蛋白質のN末端アミノ酸配列

Library No.	Trp <sup>+</sup> Leu <sup>+</sup> Yeast	pGAD-?
No. 0	2,000,000	<i>yurW</i>
		<i>yurW</i>
		<i>folA</i> out of frame
		<i>opuB</i> out of frame
No. 1	194,000	
No. 2	128,000	
No. 3	2,256,000	<i>metS</i>
No. 4	2,302,000	<i>rsbT</i>
No. 5	400,000	
No. 6	1,530,000	<i>rsbT</i>
No. 7	404,000	<i>yebA</i> complementary
No. 8	450,000	
No. 9	318,000	
No. 10	846,000	<i>rpoC</i>
No. 11	192,000	<i>pksL</i> upstream

表6-2. two-hybrid screeningの結果

込まれた DNA 断片の配列を決定した。これまでに 15 株から目的のプラスミドを取得し、そのうち 10 株については塩基配列の決定を行った。その結果を表 6-2 に示す。塩基配列の決定を行った 10 株のうち、GAL4-AD とフレームのあっているものは 6 株存在し、機能未知の *yurW* であったものが 2 株、 $\sigma^H$  活性化に関与する *rsbT* であったものが 2 株、RNA polymerase  $\beta'$  subunit をコードする *rpoC* であったものが 1 株、methionyl tRNA synthetase をコードする *metS* であったものが 1 株であった。しかし、これらは ONPG を用いた定量的な  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定を行ったところ、はっきりと相互作用しているとは言いがたい結果となった。(表 6-3、6-4、6-5)

#### 第六節 まとめ及び考察

今回の実験において、*in vivo* で IspU と YojH が相互作用していることが明らかとなった。YojH は IspU の paralogue であり、第五章で示したように *yoyH* 欠損株は *ispU* 欠損株と同様の *kinA* の発現パターンを示す。第五章でもふれたが、 $\sigma^H$  の活性化を行う RsbT<sup>59(62/69)</sup> には、それと相互作用することで RsbT 活性を調節する RsbR と RsbS が存在し、RsbR と RsbS はその C 末端で高い相同性を示す。そして、two-hybrid assay の結果<sup>62)</sup>より RsbR と RsbS が相互作用すると考えられている。 $\sigma^H$  の活性化過程にも類似した機構があるとするれば、もし仮に第五章で立てた、IspU と YojH は  $\sigma^H$  活性化蛋白質の活性を調節するという仮説が正しければ、IspU と YojH が相互作用することも納得のいく結果である。RsbT が RsbR と RsbS とともに相互作用するように、

$\sigma^H$  活性化蛋白質も IspU と YojH とともに相互作用しているのかもしれない。今回アミノ酸配列が決定できなかった約 32kDa の蛋白質が  $\sigma^H$  活性化蛋白質であるのかもしれない。

約 32kDa の蛋白質はアミノ酸配列が決定できなかったが、これは SDS-PAGE 上では一つバンドに見えるが、実は SDS-PAGE 上で同じ分子量を示す何種類かの蛋白質を見ていた可能性がある。もしそうなら、2D PAGE で分離してアミノ酸配列を決定したいものである。

Activation domain fusion	Binding domain fusion		
	Vector pGBD	IspU	YurW
Vector pGAD	0.522	0.539	25.79
IspU	0.539	0.451	14.45
YurW	4.976	2.222	28.77

表6-3. 酵母two-hybrid assay による IspUと YurWの相互作用



Activation domain fusion	Binding domain fusion		
	Vector pGBD	IspU	RsbT
Vector pGAD	0.392	0.679	1.537
IspU	0.782	0.812	2.528
RsbT	0.938	1.667	1.268

表6-4. 酵母two-hybrid assay による IspU と RsbT の相互作用

Activation domain fusion	Binding domain fusion	
	Vector pGBD	IspU
Vector pGAD	0.522	0.539
IspU	0.539	0.451
RpoC	0.570	0.950
MetS	0.636	0.596

表6-5. 酵母two-hybrid assay による IspU と RpoC、MetS の相互作用

今回の実験は酵母 two-hybrid system を用いたスクリーニングにより、IspU と相互作用すると思われる蛋白質の探索を目的として行い、いくつかの候補株の取得には成功した。しかし、定量的な  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定を行うと、いずれもはっきりとした相互作用を示す結果を示さなかった。yurW が組み込まれていた候補株については、その株を用いて定量的な  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定を行うと、同じプラスミド構成の株を再構築した株と比較してはるかに高い  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示した。この候補株は形質転換を行ってから 1 週間たって His を含む SD 培地でコロニーを形成し、その後 SD 培地に植え継いで保存した株であり、再構築した株は形質転換を行ってから 2 日たって His と adenine を含む SD 培地でコロニーを形成した株である。この経歴の違いにより候補株は IspU と YurW の微弱な相互作用により菌体内に HIS3、ADE2 を長時間かけて蓄積しなければならず、同時に LacZ も蓄積されており、再構築株は菌体内に HIS3、ADE2 を蓄積する必要がなかったため、LacZ も蓄積されなかったことが推測される。あるいは別の assay 法を使用すれば十分な相互作用をしているという結果を得られた可能性もある。in vivo で IspU と相互作用する YojH については、今回のスクリーニングにおいて取得できなかった。もしかするとまだ塩基配列を決定していない候補株中に存在するのかもしれない。

## 第七章 総括及び今後の展望

本論文は *ispU* の機能解析を行い、 $\sigma^H$  活性化機構に IspU がどのような形で関与するのかを明らかにし、 $\sigma^H$  活性化機構の全体像を明らかにすることを目標に進められた。

まず、*ispU* 欠損株を用いた解析により、*ispU* 欠損株では  $\sigma^H$  依存性プロモーターからの発現が野生株と比較して約 30 分遅れることを明らかにした。さらに *ispU* 欠損変異が、*sigH* の発現及び  $\sigma^H$  の蓄積量に影響を与えないことから、IspU は  $\sigma^H$  活性化機構に何らかの形で関与することが明らかになった。しかしまた IspU が  $\sigma^H$  活性化機構に必須ではないことも事実である。

酵母 two-hybrid assay により IspU と  $\sigma^H$  の直接の相互作用は無いものと考えられる。よって、IspU は間接的に  $\sigma^H$  の活性化機構に関与していることがうかがわれる。

IspU には他に 6 種類の paralogue が存在し、そのうち 4 種類は機能未知である。これらの欠損株を作製し、 $\sigma^H$  依存性の *kinA* の発現パターンを比較することにより、*yoyH* 欠損株が *ispU* 欠損株と類似した発現パターンを示すことを明らかにした。これにより、YojH もまた  $\sigma^H$  活性化機構に何らかの形で関与することが明らかになった。しかし YojH もまた  $\sigma^H$  活性化機構に必須ではない。しかも *yoyH*、*ispU* 二重欠損株でさえ、*kinA* の発現を完全に抑制することはできず、*kinA* の発現が野生株と比較して約 1 時間遅れるのみである。そして最終的な胞子形成率も *yoyH*、*ispU* 二重欠損株は野生株と比較して若干低いものの、胞子形成遺伝子として今まで同定されている遺伝子の欠損株のような有為な差を示さない。これらの事実をふまえ、*yoyH*、*ispU* は直接  $\sigma^H$  を活性化するのではなく、 $\sigma^H$  活性化蛋白質の調節を行うものと推察した。

また、YojH と IspU は相互作用していることが確認できた。これは IspU と YojH による  $\sigma^H$  活性化蛋白質の調節という仮説を証明する上で重要な手がかりとなるものと思われる。そして、残念ながらアミノ酸配列の決定には到らなかったが、IspU と相互作用する蛋白質が

他にも存在することが明らかになった。恐らくこれが $\sigma^H$ 活性化蛋白質ではないかと推測される。

酵母 two-hybrid system を用いたスクリーニングにおいては、はっきりと IspU と相互作用すると思われる蛋白質は取得できなかった。作製したライブラリーはパラエティーに富んでいるはずなので、さらなるスクリーニングを行えば目的の蛋白質が取得できるものと思われる。

今後、IspU と相互作用する $\sigma^H$ 活性化蛋白質を同定し、それらと YojH との関連を明らかにすることによって $\sigma^H$ 活性化の調節機構が解明されるものと思われる。それには、現在明らかになっている $\sigma^B$ 活性化機構をモデルとして実験系を構築することがまず思いつくが、 $\sigma^B$ は他の $\sigma^A$ 、 $\sigma^D$ 、 $\sigma^F$ 、 $\sigma^G$ 、 $\sigma^E$ 、 $\sigma^K$ と相同性を示すのに対し、 $\sigma^H$ は他の $\sigma$ 因子との相同性を示さず、 $\sigma^B$ 活性化機構に類似した活性化機構が $\sigma^H$ 活性化機構に存在するとは限らない。 $\sigma^H$ 活性化機構の解明にはまだ時間がかかるのかもしれない。

### 参考文献

1. Hoch, J.A. (1993) *Annu. Rev. Microbiol.* 47:441-465
2. Albrigh, L. M. Huala, E. and Ausubel, F. M. (1989) *Annu. Rev. Gent.* 23:311-336
3. Burbulys, D., Trach, K.A. and Hoch, J.A. (1991) *Cell* 64:545-552
4. Trach, K.A. and Hoch, J.A. (1993) *Mol. Microbiol.* 8:69-79
5. Perego, M. et al. (1989) *J. Bacteriol.* 171:6187-6196
6. Antoniewski, C., Savelli, B. and Stragier, P. (1990) *J. Bacteriol.* 172:86-93
7. Wang, L. et al. (1997) *Genes Dev.* 11:2569-2579
8. Perego, M. et al. (1994) *Cell* 79:1047-1055
9. Muller, J.P., Bukusoglu, G. and Sonenshein, A.L. (1992) *J. Bacteriol.* 174:4361-4373
10. Dubnau, D. et al. (1994) *Res. Microbiol.* 145: 403-411
11. Tjalsma, H. et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 25983-25992
12. Rudner, D.Z. et al. (1991) *J. Bacteriol.* 173: 1388-1398
13. Perego, M. et al. (1991) *Mol. Microbiol.* 5:173-185
14. Perego, M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 8612-8617
15. Solomon, J.M., Lazazzera, B. A. & Grossman, A. D. (1996) *Genes Dev.* 10:2014-2024
16. Grossmann, A. D. & Losick, R. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:4367-4373
17. Solomon, J. M., Magnuson, R., Srivastava, A., and Grossmann, A. D. (1995) *Genes Dev.* 9:547-558



18. Ohlsen, K.L., Grimsley, J.M. and Hoch, J.A.  
(1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.U. S. A.* 91:1756-1760
19. Perego, M. and Hoch, J.A.(1996) *Trends Genet.* 12:97-101
20. Strauch, M. A., V.Webb, G. B. Spiegelman, and J. A. Hoch. 1990  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U. S. A.* 87:1801-1805
21. Hoch, J. A.1993.American Society for Microbiology, Washington D.C.  
747-755
22. Strauch, M. A., Perego, M. Burbulys, and Hoch, J.A.(1989)  
*Mol. Microbiol.* 3:1203-1209
23. Predich, M., Gopal Nair, and Issar Smith(1992) *J. Bacteriol.*  
174: 9:2771-2778
24. Wu,J.-J.,P. J. Piggot, K. M. Tatti, and C. P.Moran, Jr. (1991) *Gene*  
101:113-116
25. Carter, H. L..3d, and C. P. Moran, Jr. (1986) *Proc.Natl.Acad.Sci.*  
*U. S. A.* 83:9438-9442
26. Weir, J., M. Predich, E. Dubnau, G. Nair, and I Smith. (1991)  
*J. Bacteriol.* 173:521-529
27. Strauch, M. A., G. B. Spiegelman, M. Perego, W. C. Johnson,  
D. Burbulys, and J. A. Hoch. *EMBO J.* 8:1615-1621
28. Weir, J., E. Dubnau, N. Ramakrishna, and I. Smith. (1984)  
157:405-412
29. Healy, J., J. Weir, I. Smith, and R.Losick. (1991) *Mol. Microbiol.*  
5:477-487
30. Hicks, K.A., Grossman, A.D., (1996) *Mol. Microbiol.* 20:201-212
31. Baldus, J.M., Buckner, C.M., Moran Jr., C.P.,(1995) *Mol. Microbiol.*  
17:281-290
32. Tzeng, Y. L. (1998) *Biochemistry* 37:16538-16545
33. Kathleen A. Trach and J. A. Hoch (1993) *Molecular Microbiol.*  
8:69-79
34. Stock, J. B., Ninfa, A. J. & Stock, A. M. (1989) *Microbiol. Rev*  
53:450-490
35. Ireton,K., D. Z. Rudner, K. J. Siranosian, and A. D. Grossman (1993)

Genes Dev 7:283-294

36. Perego, M. (1998) Trends in Microbiol.6:366-371
37. Parkinson, J.S., and Kofoed, E.C. (1992) Annu. Rev Genet 26:71-112
38. Mdhusudan, J. Z. et al. (1998) Biochemistry 37:7725-7732
39. Grossmann, A. D. (1995) Annu. Rev. Gent. 29:477-508
40. Dubnau, D. & R. D. Abelson (1971) J. Mol. Biol. 56:209-221
41. E. Anne Greene and George B. Spiegelman (1996) J. Biol. Chemistry 271:11455-11461
42. Errington, J. (1993) Microbiol Rev 57:1-33
43. Ferrari, F. A., K. Trach, and J. A. Hoch (1995) J. Bacteriol. 161:556-562
44. Kari L. Ohlsen, Janet K. Grimsley, and J.A. Hoch (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:1756-1760
45. Strauch, M. A., Trach, K. A., Day, J. and J.A. Hoch (1992) Biochimie 74:619-626
46. Perego, M., G. B. Spiegelman, and J.A. Hoch (1988) Mol. Microbiol. 2:689-699
47. Piggot, P. J. and Coote, J. G. (1976) Bacterial. Rev. 40:908-962
48. Haldenwang, W. G. (1995) Microbiol. Rev. 59:1-30
49. Nixon, B., Ronson, C. W. and Ausubel, F.M. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:7850-7854
50. Dubnau, E., Weir, J., Nair, G., Carter, III, H.L., Moran, Jr, C.P., and Smith, I. (1988) J. Bacteriol. 170:1054-1062
51. Fisher, S. H., M. A. Strauch, M. R. Atkinson, and L. V. Wray, Jr. (1994) J. Bacteriol. 176:1903-1912
52. Asai, K., F. Kawamura, Y. Sadaie, and H. Takahashi (1997) J. Bacteriol. 179:544-547

53. Dubnau, D., & M. Roggiani. (1990) *J. Bacteriol.* 172:4048-4055
54. Perego, M., and J. A. Hoch (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1549-1553
55. Nanamiya, H., Y. Ohashi., K. Asai., S. Moriya., N. Ogawawara., M. Fujita., Y. Sadaie., and F. Kawamura (1998) *Mol. Microbiol.* 29:505-513
56. Jiajian Liu, W. Mark Cosby and Peter Zuber (1999) *Mol. Microbiol.* 33:415-428
57. Yoshinao Koide, A. Nakamura., T. Uozumi., and T. Beppu (1986) *J. Bacteriol.* 167:110-116
58. Samina Akbar, C. M. Kang, T. A. Gaidenko, and C. W. Price (1997) *Mol. Microbiol.* 24:567-578
59. Xiaofeng Yang, C. M. Kang, M. S. Brody, and C. W. Price (1996) *Genes and Dev.* 10:2265-2275
60. 小林泰夫 (1995) 微生物機能の多様性 437-449
61. Chibazakura, T. et al. (1995) *J. Bacteriol.* 177:4520-4523
62. Voelker, U., Voelker, A., and W. G. Haldenwang (1996) *J. Bacteriol.* 178:7020-7023
63. Magnuson, R., J. M. Solomon, and A. D. Grossmann. (1994) *Cell* 77:207-216
64. Lazazzera, B. A., J. M. Solomon, and A. D. Grossmann (1997) *Cell* 89:917-925
65. Illing N., and J. Errington (1991) *Mol. Microbiol.* 8:1927-1940
66. T. J. Leighton and Roy H. Doi (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 3189-3195
67. Zuber, P., and R. Losick. (1983) *Cell* 35:275-283
68. Asai K., F. Kawamura., H. Yoshikawa., and H. Takahashi. (1995) *J. Bacteriol.* 177:6679-6683
69. Kang, C. M., K. V., and C. W. Price (1998) *Mol. Microbiol.* 30:189-196
70. Frisby D., and P. Zuber (1994) *J. Bacteriol.* 176:2587-2595

## 謝辞

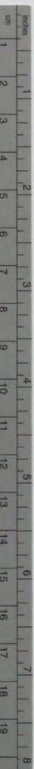
本研究を行うにあたり、テーマを与えてくださると共に終始御懇切なる御指導を頂き、研究に適した環境を整えてくださった明治大学農学部農学科分子微生物学研究室名誉教授魚住武司先生に心から感謝いたします。また、数多くの実験方法とそのコツについて、それに枯草菌に関する数々の知見について直接指導してくださった東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学分子育種学研究室助手中村顕先生に深く感謝いたします。そして、実験方針についていろいろと助言して下さった同研究室教授正木春彦先生、同研究室助教授日高真誠先生にも感謝の意に絶えません。

枯草菌 UOT1285*kinA-lacZ* 株および枯草菌ファージベクター  $\phi$ CAZ-6 を供与して下さった立教大学教授河村富士夫先生、two-hybrid assay に用いる全ての材料をご供与下さった東京農大教授吉川博文先生、枯草菌 LAB1453 を供与して下さった Luisiana State University Medical Center の Peter Zuber 博士、抗  $\sigma^H$  抗体および  $\sigma^H$  精製蛋白を供与して下さった奈良先端科学技術大学院大学助手朝井計先生、PD 小林和夫さん、遺伝研助手藤田昌也先生に感謝いたします。

最後に数々の助言をして下さった先輩の方々、D2 の小川君をはじめとする研究室の方々に心から感謝いたします。







# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue

Cyan

Green

Yellow

Red

Magenta

White

3/Color

Black



## Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

