

博士論文

論文題目 プラスミド由来の核様体タンパク質が
 宿主の機能を調節する分子機構の解明

氏 名 鈴木 千穂

目次

第 1 章	序論	1
1-1	細菌における核様体タンパク質	1
1-2	H-NS family proteins	1
1-2-1	H-NS	2
1-2-2	MvaT	6
1-3	本研究の背景と目的	8
	第 1 章の図	10
第 2 章	Pmr のホモ多量体形成機構の解明	22
2-1	緒言	22
2-2	材料と方法	23
2-3	結果	36
2-3-1	Pmr が溶液中でホモ多量体を形成することの確認	36
2-3-2	Pmr の二量体／多量体化ドメインの同定	37
2-3-3	Pmr _{nt61} のホモ多量体化に重要な残基の予想	38
2-3-4	Pmr _{nt61} アミノ酸置換体のホモ多量体形成能の評価	39
2-3-5	Pmr _{nt61} C 末端側のホモ多量体形成への寄与の評価	40
2-3-6	Flexible linker のホモ多量体形成への寄与の評価	41
2-4	考察	44
	第 2 章の図	46
第 3 章	Pmr のヘテロ多量体形成機構の解析	61
3-1	緒言	61
3-2	材料と方法	62
3-3	結果	67
3-3-1	Pmr と TurA-E とのヘテロ多量体形成能の確認	67
3-3-2	TurA, TurB が溶液中でホモ多量体を形成することの確認	68
3-3-3	Pmr のホモ・ヘテロ多量体形成時の結合比の定量	69
3-3-4	TurB-Pmr 間の結合比が TurA-Pmr, Pmr-Pmr 間の結合比より小さくなる原因の探索	71
3-4	考察	73
	第 3 章の図	75
第 4 章	Pmr の DNA 結合能の解析	86
4-1	緒言	86
4-2	材料と方法	87
4-3	結果	99
4-3-1	Pmr の DNA 結合能の評価	99
4-3-2	Pmr の DNA 結合ドメインの同定	99
4-3-3	原子間力顕微鏡による Pmr-DNA 複合体の観察	100

4-3-4	Genomic-SELEX 法による Pmr _{ct} の高親和性塩基配列同定の試み	100
4-3-5	SELEX 法による Pmr, TurA, TurB の DNA 結合ドメインの高親和性塩基配列の探索	102
4-4	考察	105
	第 4 章の図	106
第 5 章	Pmr 及び Pmr-R8A の結晶化条件のスクリーニング	120
5-1	緒言	120
5-2	材料と方法	121
5-3	結果	124
5-3-1	Pmr の結晶化条件のスクリーニング	124
5-3-2	Pmr-R8A の結晶化用バッファの検討	124
5-3-3	Pmr-R8A の結晶化条件のスクリーニング	125
5-4	考察	129
	第 5 章の図	130
第 6 章	総括と展望	134
補章	Pnd, Phu のタンパク質間相互作用の解析と両遺伝子の転写開始点の決定	138
補-1	緒言	138
補-2	材料と方法	139
補-3	結果	142
補-3-1	Pmr, Pnd, Phu 間の相互作用の解析	142
補-3-2	<i>pnd, phu</i> の転写開始点の決定	142
補-4	考察	145
	補章の図	146
参考文献		152

略語表

AFM	atomic force microscopy
Ap	ampicillin
APS	ammonium persulfate
BSA	bovine serum albumin
ChAP-chip	chromatin affinity purification coupled with high density tiling chip
ChIP	chromatin immunoprecipitation
CTAB	hexadecyltrimethyl ammonium bromide
DIG	digoxigenin
DMS	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	ethidium bromide
HRP	horseradish peroxidase
Inc	incompatibility
IPTG	isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
Km	kanamycin
OD	optical density
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
poly[d(I-C)]	poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid
R_{eq}	equilibrium binding response
RU	resonance unit
SDS	sodium dodecyl sulfate
SELEX	systematic evolution of ligands by exponential enrichment
SPR	surface plasmon resonance
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylethylenediamine
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

第 1 章

序論

1-1. 細菌における核様体タンパク質

生物の DNA は真核生物, 原核生物の違いを問わず小さく折り畳まれて細胞内に存在する. 例えばヒトの DNA は計算上約 2 m, 体積にして約 $3 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ にもなるが, 実際には約 $200 \mu\text{m}^3$ の細胞核に収まっており, 大腸菌の DNA は計算上約 2 mm, 体積にして約 $200 \mu\text{m}^3$ であるが, 細胞内では約 $0.5 \mu\text{m}^3$ の空間に収まっている [Luijsterburg *et al.*, 2008]. このような DNA の折り畳み機構については, DNA の超らせん化や高分子クラウディング (高分子が高濃度で存在することにより各高分子の占有体積が縮小する現象), DNA の構造を支えるタンパク質が重要であると考えられているが, 中でも後者は真核生物のヒストンの例に見られるように, DNA を折り畳むだけでなく時には緩めることで転写制御にも関与することから特に重要視されてきた [Luijsterburg *et al.*, 2006; Luijsterburg *et al.*, 2008]. 細菌においてこの役割を果たすのが核様体タンパク質 (nucleoid-associated proteins) である. 核様体タンパク質には大きく分けて DNA を曲げるもの, 巻くもの, 架橋するものが存在し, 種類により大きさ, 会合度, 標的塩基配列が大きく異なり, 通常一つの細胞内に複数種類の核様体タンパク質が存在することが知られている [Dillon and Dorman, 2010]. かつてはその役割の類似性から「細菌のヒストン様因子」と呼ばれていたが, 分子メカニズム研究が進むにつれてヒストンとは異なる性質が数多く報告されたため, 現在ではいくつかの核様体タンパク質の名称の中に「histone-like」という呼称が残るのみで, ヒストンと核様体タンパク質とは全く異なる因子という認識が定着している.

1-2. H-NS family proteins

核様体タンパク質の中でも最も精力的に研究されてきたのが「H-NS ファミリータンパク質 (H-NS family proteins)」である. このタンパク質群には腸内細菌で古くから研究されてきた H-NS と, *Pseudomonas* 属細菌や *Mycobacterium* 属細菌等が持つ「H-NS の機能的ホモログ」(アミノ酸配列の保存性は無いものの同様の機能を持つと考えられるタンパク質) が含まれる [Tendeng and Bertin, 2003; Ali *et al.*, 2012]. 本項では特に研究が進んでいる大腸菌・サルモネラ属細菌の H-NS と *Pseudomonas* 属細菌の MvaT について, 今日までに明らかになっていることを概説する.

1-2-1. H-NS

H-NS は 1970 年代初めに RNA ポリメラーゼの転写を *in vitro* で活性化する耐熱性因子として発見され、その後 1970 年代後半～1980 年代にかけて「細菌のヒストン様因子」としての再発見を経て、現在に至るまで生理的機能や分子機構が精力的に研究されてきた核様体タンパク質である [Navarre, 2010]. 大腸菌やサルモネラ属細菌が持つ小さなタンパク質であり (15.5 kDa, 137 残基)、大腸菌の場合一細胞あたり 20,000 分子と見積もられるなど、細胞内濃度の最も高いタンパク質の一種である [Falconi *et al.*, 1988]. H-NS は 2 つのドメインを持ち、N 末端側の二量体/多量体化ドメインと C 末端側の DNA 結合ドメインが決まった形を持たないリンカー領域 (flexible linker) で繋がれた構造を持つ [Rimsky, 2004]. クロマチン免疫沈降法とマイクロアレイを用いたゲノム上結合箇所の網羅的同定 (ChIP-chip) により、H-NS はゲノム上の GC 含量の低い領域、すなわち外来遺伝子領域に多く結合が見られることが明らかとなっている [Grainger *et al.*, 2006; Lucchini *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2006; Oshima *et al.*, 2006]. H-NS はまずこれらの領域に含まれる高親和性配列を DNA 結合ドメインで認識して結合し、その分子を「足場」として他の分子が DNA-タンパク質間相互作用と「足場」とのタンパク質-タンパク質間相互作用により周辺 DNA 領域に結合することで、DNA 上の幅広い領域でタンパク質-DNA 複合体を形成し、時には距離が離れた DNA をも架橋すると考えられている [Bouffartiges *et al.*, 2007; Lang *et al.*, 2007] (Fig. 1-1). この複合体が RNA ポリメラーゼの開鎖複合体の形成を阻害する、あるいは形成された開鎖複合体中の RNA ポリメラーゼの進行を妨害することにより多くの遺伝子の転写が抑制されると考えられているが [Dorman, 2004; Fang and Rimsky, 2008], H-NS による転写抑制が起こる分子機構については現在も不明な点が多い. しかしホモ多量体形成能を失った H-NS は転写抑制能も失うこと [Ueguchi *et al.*, 1996] を考慮すると、H-NS の機能発現に重要な分子機構を解明するためには、DNA 結合能とホモ多量体形成能の両方の解析が重要であると考えられる.

(1) H-NS の N 末端側の構造とホモ多量体形成機構

H-NS のホモ多量体化は N 末端側の二量体/多量体化ドメインにより行われる. Shindo らは *Escherichia coli* 由来 H-NS の C 末端側の構造解析を進める過程で、H-NS₉₁₋₁₃₇ (H-NS の N 末端側から数えて 91~137 番目までの残基から成るタンパク質を表す、以下同様) が単量体で存在することを発見した [Shindo *et al.*, 1995; Shindo *et al.*, 1999]. また、Smyth らは *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. enterica* Typhimurium) 由来の H-NS₁₋₉₀ が溶液中で多量体を形成することを報告した [Smyth *et al.*, 2000]. さらに Esposito らは *S. enterica* Typhimurium 由来 H-NS の N 末端側の構造解析を進める過程で H-NS₁₋₅₇ が二量体で存在することを発見し [Esposito *et al.*, 2002], Bloch らは *E. coli* 由来 H-NS の N 末端側の構造解析を進める過程で H-NS₁₋₄₆ が二量体を形成することを発見した [Bloch *et al.*, 2003]. その後 Leonard らがサイズ排除クロマトグラフィーを用いて *S. enterica* Typhimurium 由来の H-NS₁₋₇₄,

H-NS₁₋₇₇, H-NS₁₋₈₃ の会合度を調べたところ, H-NS₁₋₇₄ は二量体を, H-NS₁₋₇₇, H-NS₁₋₈₃ はいずれも多量体を形成していることが明らかとなった [Leonard *et al.*, 2009]. 以上から, H-NS の 75~83 番目の残基が多量体化に重要な役割を果たすことが示唆されていた.

最も初期の N 末端側の構造については, ほぼ同時期に 2 つの異なる構造が報告されている. Esposito らが報告した *S. enterica* Typhimurium 由来の H-NS₁₋₅₇ の溶液構造では, N 末端側から数えて 3 番目のヘリックスが parallel に並ぶ coiled-coil 構造をとっていた (Fig. 1-2, 左) [Esposito *et al.*, 2002]. 一方, Bloch らが報告した *E. coli* 由来の H-NS₁₋₄₆ の溶液構造では, 同ヘリックスが anti-parallel に並ぶ coiled-coil 構造をとっていた (Fig. 1-2, 中央) [Bloch *et al.*, 2003]. Fig. 1-3 に示したように, *E. coli* と *S. enterica* Typhimurium の H-NS のアミノ酸は 137 残基のうち 93% が同一であり, 構造解析に用いた N 末端側 57 残基に至っては 1 残基を除いて完全に一致する. なお, この残基は本来システインであったものが *S. enterica* Typhimurium において自然にセリンに置換してしまったものだが, 両タンパク質間で CD スペクトルの変化が無いこと, DNA 結合能に変化が無いことが確認されている [Smyth *et al.*, 2000]. 一方, 後に取得された *Vibrio cholerae* の H-NS ホモログ VicH の 2~49 番目のアミノ酸残基を持つタンパク質 (VicH_Nt) の結晶構造 (Fig. 1-2, 右) や, 後述する H-NS の N 末端側のホモ多量体形成時の結晶構造では, この領域はいずれも anti-parallel な構造をとっていたことから, 現状では H-NS の当該領域は anti-parallel な構造をとりやすいと認識されている. Anti-parallel な H-NS₁₋₄₆ の構造では, 複数の疎水性アミノ酸残基が二量体形成において重要な役割を果たしており (Fig. 1-4), 加えて 2 つの塩橋と 2 組の水素結合が二量体の安定化に寄与していた [Rimsky, 2004]. またこれらの疎水コア, 塩橋, 水素結合に関わるアミノ酸残基は H-NS ファミリータンパク質で保存されている (Fig. 1-5) [Rimsky, 2004]. 一方, H-NS の多量体化に重要な 75~83 番目の残基は NMR の解析により決まった二次構造をとらないと判断されたため [Shindo *et al.*, 1999], これらの残基は二量体/多量体化ドメインと DNA 結合ドメインを繋ぐ flexible linker に含まれると考えられていた [Dorman, 2004].

2010 年になるとホモ多量体を形成した *S. enterica* Typhimurium 由来 H-NS₁₋₈₃ の結晶構造が報告され, この構造中では H-NS 分子がらせん状に積み重なっていることが明らかとなった (Fig. 1-6) [Arold *et al.*, 2010]. この構造により, N 末端側から数えて 3 番目のヘリックスが過去に報告されていたよりも長く 68 番目の残基まで続くこと, 72~83 番目の残基が第 4 のヘリックスを構成することが明らかとなった. またこの構造では 1 番目と 2 番目のヘリックス (H1, H2) は過去の報告と同様に anti-parallel にホモ二量体を形成し (Fig. 1-7, Site 1), 3 番目と 4 番目のヘリックス (H3, H4) は隣り合うホモ二量体と anti-parallel に二量体を形成する (Fig. 1-7, Site 2) ことでホモ多量体を形成していた. この結果は H-NS の 75~83 番目の残基が多量体化に重要であることを指摘した Leonard らの報告 [Leonard *et al.*, 2009] と矛盾しないことはもちろん, H-NS₁₂₋₈₉ がホモ多量体を形成せずホモ二量体で存在することを示した Esposito らの報告 [Esposito *et al.*, 2002] とも矛盾しないものであった. なお H3 の C 末端側と H4 の存在については, 最近 NMR により取得された *E. coli* 由来 H-NS の全長構造におい

でも示唆されている [Renault *et al.*, 2013].

(2) H-NS の C 末端側の構造と DNA 認識機構

H-NS は長らく、DNA の特定の配列を認識して結合するというよりは DNA の構造（特に湾曲した DNA）を認識して結合すると考えられてきた [Dorman, 2004]. しかし 2007 年以降 H-NS-DNA 間相互作用の解析が進むにつれて、H-NS にも高親和性塩基配列が存在し、その配列が DNA 上で多量体を形成する「足場」の最初のターゲットになるという認識が定着している. Bouffartigues らは、H-NS が結合しない DNA 断片に TCGATATATT という配列を挿入したところ、挿入配列周辺で H-NS の結合が見られるようになったことを報告し [Bouffartigues *et al.*, 2007], Lang らは、フットプリント法の結果から 10 bp のコンセンサス配列 tCGATAAATT を提唱した [Lang *et al.*, 2007]. また Sette らは、H-NS の C 末端側のみからなるタンパク質 (H-NS_{ctd}) とコンセンサス配列を含む DNA 断片を用いた NMR 解析から、これらを混合すると、H-NS の E101, T109, Q111, R113, T114, A116 と DNA 断片の 5 つの塩基のシグナルが変化することを明らかにした [Sette *et al.*, 2009]. 変化が現れた H-NS の 6 つの残基について Shindo らにより報告された H-NS₉₁₋₁₃₇ の溶液構造 [Shindo *et al.*, 1995] で分布を調べたところ、E101 以外の 5 つの残基は正電荷を持つ分子表面に突出したループを形成しており (Fig. 1-8), また DNA 上で変化が現れた 5 つの塩基は DNA の minor groove を形成していると予想されたことから (Fig. 1-9), H-NS の正電荷を持つループが DNA の minor groove と相互作用していると考えられた [Sette *et al.*, 2009].

2011 年には protein binding microarray により H-NS の高親和性塩基配列の同定が試みられた [Gordon *et al.*, 2011]. Protein binding microarray は、人工的に合成したランダムな二本鎖 DNA を敷き詰めたアレイチップに対して目的のタンパク質を結合させ、そのタンパク質が持つエピトープタグに結合する標識抗体を用いることで、ランダムな配列の中から目的のタンパク質が特異的に認識する配列を探索する手法である [Berger and Bulyk, 2009]. この解析により、H-NS は A や T が連続した AAAA, TTTT のような配列 (A-tract) よりも、A と T が交互に並ぶ ATAT のような配列 (T-A step) の方により結合しやすいことが明らかとなり、DNA の minor groove の幅が A-tract > T-A step > GC-rich sequencesであることを考慮すると、H-NS の配列特異性は DNA の minor groove の幅に依存すると考えられた [Gordon *et al.*, 2011]. また Shindo らの報告した *E. coli* 由来 H-NS₉₁₋₁₃₇ の構造 [Shindo *et al.*, 1995] よりもさらに高分解能で取得した *S. enterica* Typhimurium 由来 H-NS₉₁₋₁₃₇ の溶液構造と、構造が明らかになっている二本鎖 DNA (CGCATATATGCG) とのドッキングシミュレーションから、Q112, G113, R114 (Sette *et al.*, 2009 の Q111, G112, R113 に相当) が形成するループが DNA の minor groove に結合すると予測され (Fig. 1-10), 実際 Q112 と R114 をアラニンに置換すると DNA への結合能が失われたことから、H-NS はこの 3 残基が形成するループを DNA の minor groove に差し込むことで DNA に結合していると考えられた [Gordon *et al.*, 2011]. また同時期には H-NS の DNA 結合ドメインとアミノ酸配列の保存性が比較的高い Ler の DNA 結合

ドメイン (36% identity) と DNA との複合体の溶液構造が NMR により取得された [Cordeiro *et al.*, 2011]. Ler は病原性大腸菌の pathogenicity island の一種 locus of enterocyte effacement (LEE) のマスターレギュレーターであり, 通常は H-NS の結合によって転写が抑制されている LEE に対してアンタゴニストとして機能する [Mellies *et al.*, 2007]. この複合体の構造 (Fig. 1-11) では, 先述した H-NS の Q112, G113, R114 に相当する残基で形成されるループが T-A step を持つ DNA の minor groove と相互作用していたものの, 特定の塩基との特異的な相互作用は見られず, Ler は配列特異的に DNA 結合するというよりは T-A step が形成する minor groove の形状を認識して結合していると考えられ, 先述の Gordon らの報告 [Gordon *et al.*, 2011] と矛盾しない結果となった.

(3) 同一細胞内に存在する複数の H-NS ホモログの機能

大腸菌やサルモネラ属細菌の染色体には H-NS とアミノ酸配列の保存性が高い StpA (57% identity) がコードされている. StpA は H-NS の標的遺伝子を同様に転写抑制することから H-NS の「バックアップ」の機能を持つと考えられてきた [Shi and Bennett, 1994; Sonden and Uhlin, 1996; Zhang *et al.*, 1996]. しかし最近の研究からは StpA が H-NS とは異なる性質を示すことも明らかになりつつある. 例えば DNA への結合様式については, H-NS も StpA も DNA 上で多量体化し, 時には DNA を架橋して大きなタンパク質-DNA 複合体を形成することが報告されているが [Dame *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2012], StpA-DNA 複合体は H-NS-DNA 複合体に比べて塩濃度や温度の変化に対して安定であると報告されている [Liu *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2012]. また *hns* の転写量が浸透圧や温度の変化に影響を受けないのに対し [Hulton *et al.*, 1990; Hinton *et al.*, 1992], *stpA* の転写量は高温の方が増加することが知られている [Free and Dorman, 1997; Müller *et al.*, 2010]. *stpA* 破壊株のトランスクリプトーム解析からは StpA が転写制御する遺伝子の 90% が H-NS によっても制御されることが [Lucchini *et al.*, 2009], H-NS と StpA の ChIP-chip 解析からは両者の結合箇所が一致することが報告されているが [Uyar *et al.*, 2009; Lucchini *et al.*, 2009], *hns* 破壊株における StpA の結合箇所は減少することが知られている [Uyar *et al.*, 2009].

一方, 病原性大腸菌には H-NS, StpA に加えて genomic island にコードされる第 3 の H-NS ホモログ Hfp (H-NS とのアミノ酸配列の保存性は 58% identity) が存在する [Müller *et al.*, 2010]. Hfp は *hns* 破壊により低下した細胞の運動性を相補でき, H-NS と同様の転写抑制能を持つ一方で, 45°C では *hns* と *stpA* の二重破壊株で, 25°C では *hns* と *hfp* の二重破壊株で生育阻害が見られることから, 病原性大腸菌における Hfp と StpA は H-NS の単なる「バックアップ」ではなく, 温度などの環境が変化した際に細胞内で発現し H-NS と共に機能することで細菌が多様な環境に適応するのを補助していると考えられている [Müller *et al.*, 2010].

また H-NS ホモログの中にはプラスミドにコードされるものも存在する. *Shigella flexneri* 2a strain 2457T が持つ不和合性 (incompatibility; Inc) HI1 群プラスミド pSfr27 には, H-NS ホ

モログ Sfh (H-NS とのアミノ酸配列の保存性は 59% identity) がコードされており, Sfh は H-NS の標的遺伝子の転写を同様に抑制する [Beloin *et al.*, 2003]. *S. enterica* Typhimurium に pSfR27 を保持させた時と, *sfh* を破壊した pSfR27Δ*sfh* を保持させた時のトランスクリプトームの比較から, pSfR27Δ*sfh* を保持させると pSfR27 を保持させた時と比べてはるかに多くの染色体上の遺伝子の転写が変動することが明らかとなった [Doyle *et al.*, 2007]. この結果から, Sfh の役割はプラスミド (一般的に宿主染色体よりも GC 含量が低い) を宿主が保持した際に, 宿主染色体に結合していた H-NS がプラスミドに奪われ宿主に負荷をかけるのを防ぐことであると提唱された [Doyle *et al.*, 2007]. この説を裏付けるように, *S. enterica* Typhimurium を宿主とした Sfh の ChIP-chip 解析では, Sfh の結合箇所は全て H-NS の結合箇所に含まれており, *hns* 破壊株では野生型株で H-NS が結合していた箇所にも Sfh が結合するようになることが示され, Sfh の機能が H-NS の「バックアップ」であることが強く示唆された [Dillon *et al.*, 2010]. 一方, pSfR27 と塩基配列が 99.7% 一致するプラスミド R27 の H-NS ホモログ H-NS_{R27} (Sfh とのアミノ酸配列の保存性は 98% identity) の研究においては, 宿主染色体由来の H-NS と H-NS_{R27} では異なる性質を持つことが示唆されている. 当初は Sfh と同様に, 大腸菌 *hns* 破壊株の生育遅延や R27 の接合伝達頻度の低下が H-NS_{R27} で相補できることから, H-NS_{R27} は H-NS の「バックアップ」であると認識されていた [Forns *et al.*, 2005]. しかし *S. enterica* Typhimurium を宿主として, 野生型株と宿主染色体の *hns* 破壊株に R27 を保持させた際のトランスクリプトームを比較したところ, *hns* 破壊株で転写変動した遺伝子の全てが H-NS_{R27} で相補できたわけではなく, H-NS_{R27} はハウスキーピング遺伝子よりも外来遺伝子の転写制御に関わることを示唆された [Baños *et al.*, 2009]. 最近になり, H-NS と H-NS_{R27} のこのような性質の違いは flexible linker の柔軟性に起因するのではないかという仮説が提唱されている [Fernández-de-Alba *et al.*, 2013]. ただし先述の Sfh の ChIP-chip 解析では, Sfh の結合はハウスキーピング遺伝子が含まれる領域と外来遺伝子領域で違いが見られなかったことには注意が必要である [Dillon *et al.*, 2010].

1-2-2. MvaT

MvaT は *P. mevalonii* においてメバロン酸代謝オペロン *mvaAB* の転写制御因子として単離され, その後バイオフィーム形成やべん毛合成など病原性に関与する遺伝子の転写を制御する global regulator であることが示されている [Rosenthal and Rodwell, 1998; Diggle *et al.*, 2002; Vallet *et al.*, 2004]. アミノ酸配列は大腸菌の H-NS と比較してほとんど保存されていないものの (*P. aeruginosa* PAO1 株の MvaT の場合 18% identity), 大腸菌の *hns* 破壊株が示すセリン感受性を相補したことから H-NS の「機能的ホモログ」であると認識されている [Tendeng *et al.*, 2003]. MvaT は *Pseudomonas* 属細菌に広く保存されており, 2014 年 3 月現在までに全塩基配列が決定されている 14 種の *Pseudomonas* 属細菌のうち, *P. mendocina* を除く全ての種が 2 つ以上の MvaT ホモログを, *P. mendocina* は 1 つの MvaT ホモログを染色体

にコードしている [Pseudomonas Genome Database, <http://www.pseudomonas.com>].

染色体由来の MvaT ホモログの中で最も研究が進んでいるのは *P. aeruginosa* PAO1 株の MvaT と、MvaT とアミノ酸配列の保存性が高い MvaU (46% identity) である。両者は *E. coli* を用いた bacterial two-hybrid assay からヘテロ多量体（またはヘテロ二量体）を形成することが示されている [Vallet-Gely *et al.*, 2005]. MvaT, MvaU の ChIP-chip 解析の結果からは、MvaT の結合が見られたゲノム上の 111 箇所、MvaU の結合が見られたゲノム上の 102 箇所のうち、99 箇所が共通していたことが明らかとなっており (Fig. 1-12 に一例を示した), 2 つの因子はゲノム上のほとんど同じ位置に結合し協調的に機能すると考えられた [Castang *et al.*, 2008]. 一方トランスクリプトーム解析については *mvaT* 破壊株で行われているものの [Vallet *et al.*, 2004; Westfall *et al.*, 2006], *mvaU* 破壊株について行われた例はなく、両遺伝子の破壊が転写に及ぼす影響の網羅的な比較は行われていない。また *mvaT* 破壊株では MvaU の、*mvaU* 破壊株では MvaT のタンパク質量が増加すること [Vallet-Gely *et al.*, 2005], これら遺伝子の二重破壊株が取得できず、各単独破壊株はもう一方の因子を細胞内でプロテアーゼ消化してしまうと生育できなくなることから、MvaT と MvaU は重複した機能を持つと考えられてきた [Castang *et al.*, 2008]. これらの報告以来 *mvaT/mvaU* 二重破壊株は取得できないと認識されていたが、2009 年に別の研究グループから二重破壊株を取得したという報告が成された後 [Li *et al.*, 2009], 最近になって「単独破壊株においても一方の因子を細胞内でプロテアーゼ消化しても生育できる株」の取得と、その取得が可能になる分子機構が報告された [Castang and Dove, 2012]. この報告によれば、取得された株ではプロファージ領域の転写量が顕著に増加しており、この領域に変異が入るか、ファージが標的とする type IV pili をコードする遺伝子に変異が入るとこのような株の取得が可能になるとのことであった [Castang and Dove, 2012]. 事実、Li らが取得した二重破壊株でも同じプロファージ領域の転写量の増加が認められていたが、Li らはゲノム上の *mvaT/mvaU* 以外の領域の変異までは確認していなかった [Li *et al.*, 2009].

一方で MvaT ホモログのタンパク質としての性質については知見が少なく、H-NS とその「機能的ホモログ」である MvaT の間で機能発現に重要な分子機構が共通なのか異なるのかは不明である。2014 年 3 月現在もなお MvaT ホモログの構造情報は得られていないが、N 末端側 2~62 番目までの残基のみで全長と同様の多量体形成能を示すこと [Castang and Dove, 2010], C 末端側の領域が大腸菌の H-NS の DNA 結合ドメインとよく似た三次構造をとると予測されることから [Tendeng *et al.*, 2003], MvaT は H-NS と同様のドメイン構造を持つと考えられている。また MvaT のホモ多量体形成を担う領域については bacterial two-hybrid assay による絞り込みが行われており、N 末端側 2~35, 2~45, 2~55 番目の残基のみを持つタンパク質は多量体を形成できないが 2~62 番目の残基から成るタンパク質は全長同様に多量体を形成すること、MvaT(F36S)及び MvaT(R41P)の 2 つのアミノ酸置換体はホモ多量体形成能が失われホモ二量体で存在することが示されている [Castang and Dove, 2010].

1-3. 本研究の背景と目的

1993 年、石油やコールタールに含まれる環境汚染物質の一つであるカルバゾールを唯一の炭素源・窒素源として生育できる *P. resinovorans* CA10 株が単離され [Ouchiyama *et al.*, 1993], その後 *P. resinovorans* CA10 株のカルバゾール分解能はプラスミド pCAR1 (Fig. 1-13) が有する *car* 遺伝子群に由来することが明らかとなった [Nojiri *et al.*, 2001]. pCAR1 は全塩基配列が決定され [Maeda *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2009a], IncP-7 群に属することが明らかとなっている [Shintani *et al.*, 2006]. 当研究室ではこれまでに pCAR1 と宿主である *Pseudomonas* 属細菌をモデルとして、プラスミド-宿主染色体間相互作用について精力的に研究が進められてきた。プラスミド上の遺伝子が宿主染色体由来の因子の制御を受けることについてはトルエン・キシレン分解プラスミド pWW0 の例に見られるように以前から知られている [Ramos *et al.*, 1997]. これは同一のプラスミドでも宿主により異なる染色体由来因子の制御を受けることにより異なる遺伝子発現を示すことを示唆しているが、事実、当研究室で行われた 6 種の *Pseudomonas* 属細菌における pCAR1 のトランスクリプトーム解析では、pCAR1 の分配や接合伝達に重要な遺伝子の転写量が宿主によって異なっていた [Shintani *et al.*, 2011]. 一方、最近の研究からは宿主染色体上の遺伝子もまたプラスミド由来の因子の影響を受けることが明らかになりつつある。例えば pACR1 を保持した *P. putida* KT2440 株, *P. aeruginosa* PAO1 株, *P. fluorescens* Pf0-1 株の宿主染色体のトランスクリプトームの比較解析からは、鉄吸収に関する遺伝子群や排出ポンプをコードする *mexEF-oprN* オペロンの転写量が宿主によって異なることが明らかとなっている [Shintani *et al.*, 2010]. またこれら 3 宿主は pCAR1 保持に伴い、非保持株と比べて fitness や運動性、浸透圧ストレスに対する耐性が低下することも示されている [Takahashi and Shintani *et al.*, submitted]. 以上の研究から、宿主染色体とプラスミドは両ゲノム由来の因子が互いの遺伝子の転写制御を協調的に行い、その結果としてプラスミドを保持した宿主の表現型が決まると考えられた。

本研究ではこのようなプラスミド-宿主染色体間相互作用の鍵因子として、pCAR1 と染色体の両方にコードされている核様体タンパク質に着目した。pCAR1 には MvaT ホモログ Pmr (ORF70, plasmid-encoded MvaT-like regulator), NdpA ホモログ Pnd (ORF93, plasmid-encoded NdpA-like protein), HU ホモログ Phu (ORF95a, plasmid-encoded HU-like protein) の 3 種類の核様体タンパク質がコードされている [Takeda *et al.*, 2011; 武田, 2011]. 当研究室ではこれまでに *P. putida* KT2440 株をモデル宿主とした研究から、各遺伝子の単独破壊株と $\Delta pnd\Delta phu$ の二重破壊株では顕著な表現型は見られないものの、 $\Delta pmr\Delta pnd$ と $\Delta pmr\Delta phu$ の 2 つの二重破壊株では pCAR1 の安定性が低下すること [武田, 2011], 及び pCAR1 の接合伝達頻度が低下すること [松井, 2014] が明らかとなっている。本研究では表現型が変化した 2 つの二重破壊株に *pmr* が共通していたことから、Pmr の細胞内における転写制御機構に着目した。

当研究室で以前行われた *P. putida* KT2440(pCAR1)株とその *pmr* 破壊株のトランスクリプ

トーム比較では、*pmr* 破壊に伴い pCAR1 上と宿主染色体上併せて 200 以上の遺伝子の転写が変動していた (Fig. 1-14). この転写変動のパターンから、① pCAR1 保持に伴い転写変動する遺伝子が *pmr* を破壊すると転写変動しなくなる、すなわち Pmr は pCAR1 が宿主にもたらす特異的な形質の発現に関与すること (Fig. 1-14 のグループ E, F の場合)、② pCAR1 を保持しても転写変動しなかった遺伝子が *pmr* を破壊すると転写変動する、すなわち Pmr は pCAR1 保持に伴う宿主への負荷を軽減する作用を持つこと (Fig. 1-14 のグループ G, H の場合)、が明らかとなった [Yun and Suzuki *et al.*, 2010]. 一方 *P. putida* KT2440 株染色体には 5 つの MvaT ホモログ TurA-E がコードされており、*turA* が対数増殖期に、*turB* が定常期に多く転写される一方で、*turC*, *turD*, *turE* は *turA*, *turB* に比べて転写量が少ないこと、この傾向は pCAR1 保持株でも *pmr* 破壊株でも変わらないことが明らかとなっている [Yuste *et al.*, 2006; Yun and Suzuki *et al.*, 2010] (Fig. 1-15). また *P. putida* KT2440(pCAR1)株において、*pmr* は対数増殖期に多く転写される一方で、Pmr タンパク質の発現量は定常期に多くなることが示されている [Yun and Suzuki *et al.*, 2010] (Fig. 1-15). 以上より、現在までに調べられていない条件下で TurC, TurD, TurE が多く発現する可能性は否定できないものの、*P. putida* KT2440(pCAR1)株で機能している主要な MvaT ホモログは Pmr, TurA, TurB であり、これらの因子が協調的に（あるいは拮抗的に）プラスミドと宿主染色体の転写制御を行うと考えられた。そこで各因子の機能を調べるために、当研究室において *pmr*, *turA*, *turB* 単独破壊株のトランスクリプトーム比較が行われた結果、Pmr のレギュロンの多くは TurA, TurB のレギュロンと重複しないこと、TurA と TurB のレギュロンも互いに半分程度しか重複しないことが明らかとなった [尹ら, 未発表データ] (Fig. 1-16). この結果から、Pmr, TurA, TurB は DNA 上の異なる位置に結合することで異なる遺伝子を制御すると予想されたため、*P. putida* KT2440(pCAR1)株において改変クロマチン免疫沈降法とタイリングアレイを用いたゲノム上結合箇所の網羅的同定 (chromatin affinity purification coupled with high density tiling chip; ChAP-chip) が行われたが、予想とは異なり、検出された結合箇所は Pmr, TurA, TurB 間ではほとんど一致していた [Yun and Suzuki *et al.*, 2010; 尹ら, 未発表データ] (Fig. 1-17).

Pmr, TurA, TurB が H-NS ファミリータンパク質であることを考慮すれば、これらの因子も H-NS と同様に DNA 上の高親和性配列に結合し、最初に結合した分子を「足場」として DNA 上でホモ多量体を形成すると予想される。また H-NS が StpA や Sfh と、MvaT が MvaU とヘテロ多量体を形成すること [Deighan *et al.*, 2003; Vallet-Gely *et al.*, 2005] を考慮すれば、Pmr, TurA, TurB も DNA 上でヘテロ多量体を形成すると考えられる。以上から、Pmr の転写制御機構を明らかにするためには、Pmr のホモ・ヘテロ多量体形成機構と DNA 認識機構の解析、及びそれらの TurA, TurB との比較が重要であると考えられた。しかし本研究開始当初は Pmr のタンパク質としての性質の解析は行われておらず、そもそも Pmr が H-NS と同様にホモ・ヘテロ多量体形成や DNA への結合を行うのかさえ不明であった。そこで本研究では Pmr の多量体形成様式と DNA との結合様式について、① Pmr と H-NS との比較、② Pmr, TurA, TurB 間の比較、を行うことで、Pmr が転写制御を行う分子機構の解明を目的とした。

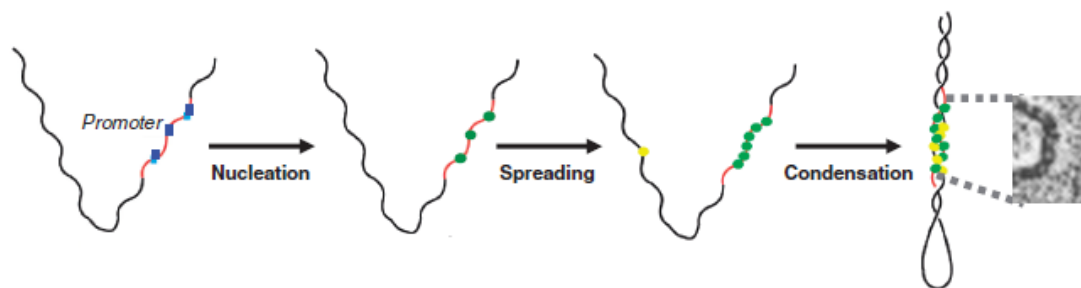


Fig. 1-1. H-NSによるDNA折り畳み機構の模式図.

Proposed mechanism of silencing over extended regions. Initial nucleation of H-NS binding at high-affinity sites is followed by spreading and condensation of H-NS on supercoiled DNA to generate a silenced fiber. Spreading and condensation of H-NS could be either consecutive or concomitant. Blue squares represent high-affinity H-NS binding sequences (nucleating sites) and green and yellow circles represent bound H-NS on nominal distal and proximal sides, respectively, of a promoter. [Lang *et al.*, 2007のFigure 4を引用]

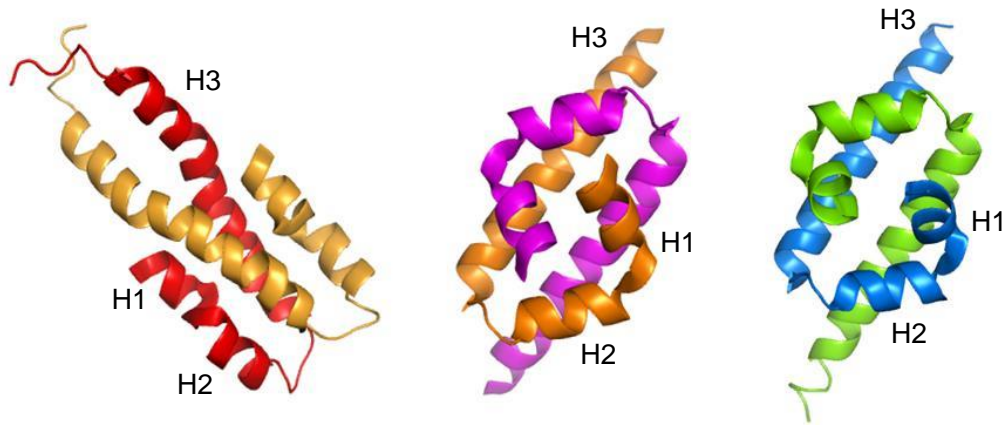


Fig. 1-2. H-NS及びH-NSホモログVicHのN末端側の構造.

ホモ二量体の一方の単量体について、3つのヘリックスをN末端側から順にH1, H2, H3と表記した。(左) *S. enterica* Typhimurium由来H-NS₁₋₅₇の構造 [Esposito *et al.*, 2002]. H3がparallelに並んでいる。(中央) *E. coli*由来H-NS₁₋₄₆の構造 [Bloch *et al.*, 2003]. H3がanti-parallelに並んでいる。(右) *V. cholerae*由来VicH_{Nt} (VicH₂₋₄₉) の構造 [Cerdan *et al.*, 2003]. H-NS₁₋₄₆と同様に、H3はanti-parallelに並んでいる。



Fig. 1-3. H-NSとVicHのアミノ酸配列のアラインメント.

H-NS_ecoliは*E. coli* K-12 MG1655株のH-NSを, H-NS_saltyは*S. enterica* Typhimurium CH1701株のH-NSを, VicHは*V. cholerae* Ogawa O395株のVicHを表す. 背後が黒いものは2つ以上のタンパク質間で一致するアミノ酸を, 背後が灰色のものは疎水性や電荷がよく似たアミノ酸を表している. 本文中で議論したシステインからセリンへの置換があった残基を赤矢印で示した.

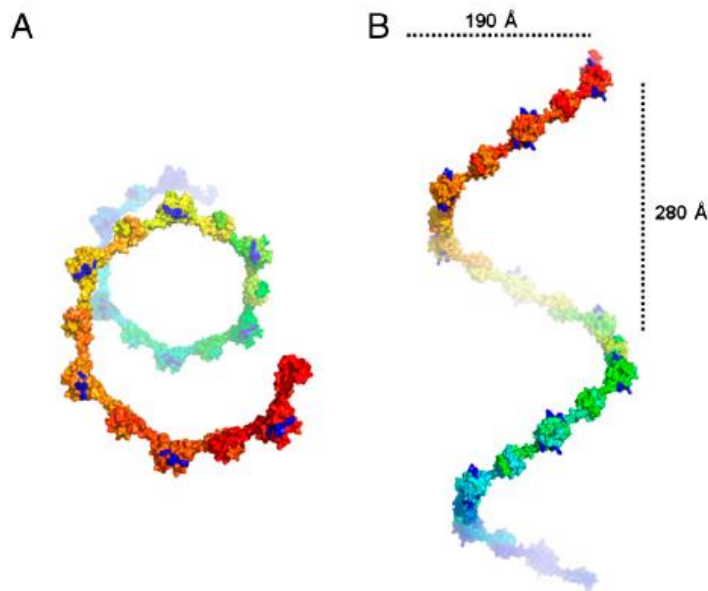


Fig. 1-6. H-NS₁₋₈₃の結晶構造解析から示された多量体形成機構.

Superhelical structure of H-NS in crystal lattice. A and B, 90° views of the superhelix formed by a chain of head-to-head and tail-to-tail linked H-NS molecules. Orientation of the molecules is taken from the crystal lattice. R15, R19, and K32 forming the positively charged, DNA-repelling surface are shown in blue. [Arold *et al.*, 2010のFigure 2を引用]

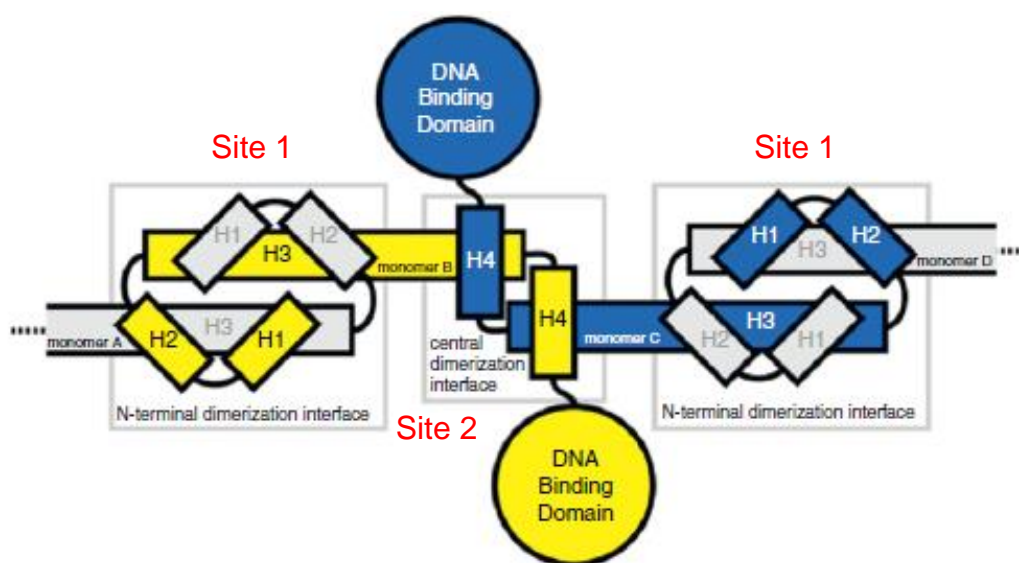


Fig. 1-7. H-NSの二量体形成 (Site 1) と多量体形成 (Site 2) に重要な領域の模式図.

Schematic diagram of H-NS monomers arranged in their multimerized state via a 'head-to-head/tail-to-tail' mechanism. Helices H1, H2 and H3 form the N-terminal dimerization interface. The central dimerization domain is formed by a helix-turn-helix motif formed between the C-terminal end of H3 and H4, which is shown between the yellow and blue H-NS monomers. [Ali *et al.*, 2012のFigure 2を改変して引用]

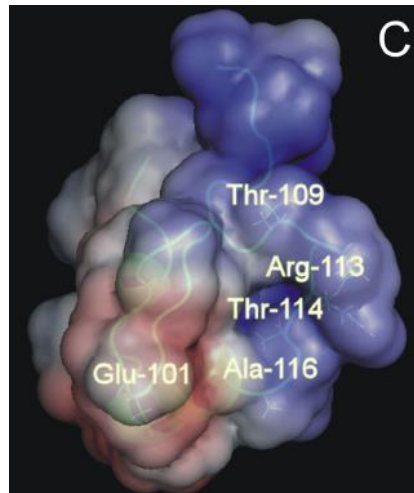


Fig. 1-8. H-NSのC末端側においてDNAと相互作用する残基の分布.

Localization of the most affected residues within the three-dimensional structure of H-NS. The structure of H-NS ctd is taken from Shindo *et al.* (1999). The electrostatic surface of the molecule is also shown with negative and positive potentials in *red* and *blue*, respectively. [Sette *et al.*, 2009のFigure 4を改変して引用]

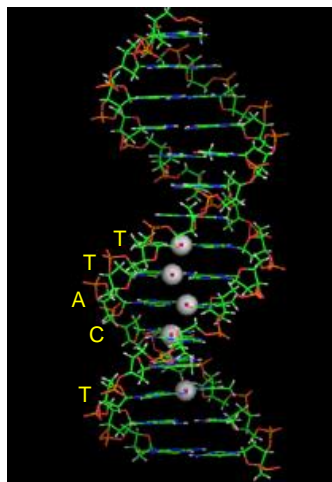


Fig. 1-9. H-NSのC末端側と相互作用した塩基はminor grooveを形成していた.

Model of the 15-bp DNA fragment. The spheres represent the imino protons that show the largest chemical shift differences upon addition of H-NS ctd . [Sette *et al.*, 2009のFigure 6を改変して引用] H-NS ctd と混合した際にNMRでシグナルの変化が見られた塩基を図中に示した.

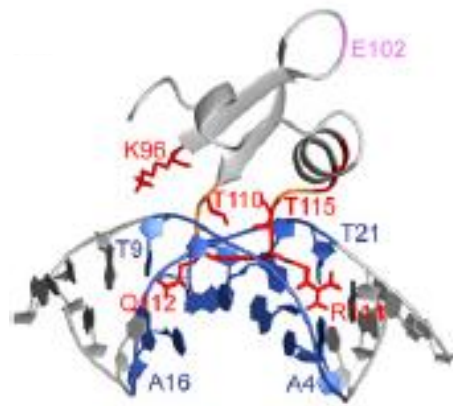


Fig. 1-10. H-NS₉₁₋₁₃₇ (H-NS_{Ctd}) とDNAとの複合体のモデル構造.

Ribbon representation of H-NS_{Ctd}/DNA docking models. Protein backbone and side chains that are involved in DNA-binding are labeled in red. Residues without NH signals but may be involved in DNA-binding are labeled in orange. The binding interface of DNA is shown in blue. Residue E102 that showed chemical-shift changes but is not involved in DNA binding is labeled in purple. [Gordon *et al.*, 2011のFigure 4を改変して引用]

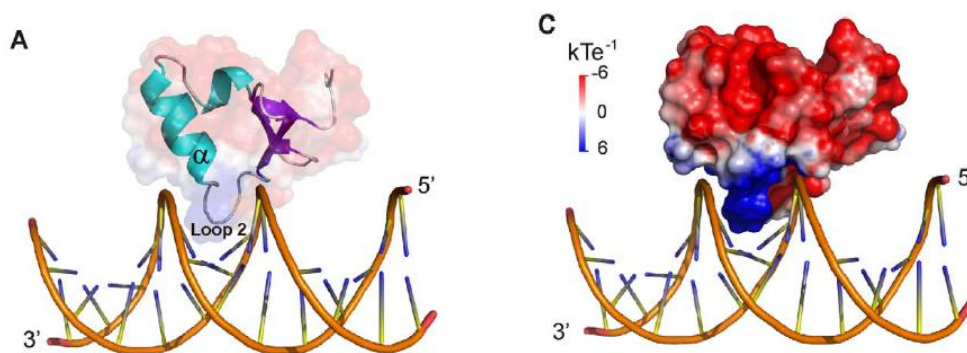


Fig. 1-11. LerのDNA結合ドメイン (CT-Ler) とDNA (LeeH) との複合体の溶液構造.

(A) Structure of CT-Ler/LeeH complex. CT-Ler is shown as a ribbon diagram and transparent surface representation. Interactions involve the DNA minor groove and Loop2 and the α -helix of CT-Ler. (C) Electrostatic potential of CT-Ler. The orientation of the complex is the same as in A. [Cordeiro *et al.*, 2011のFigure 4を改変して引用]

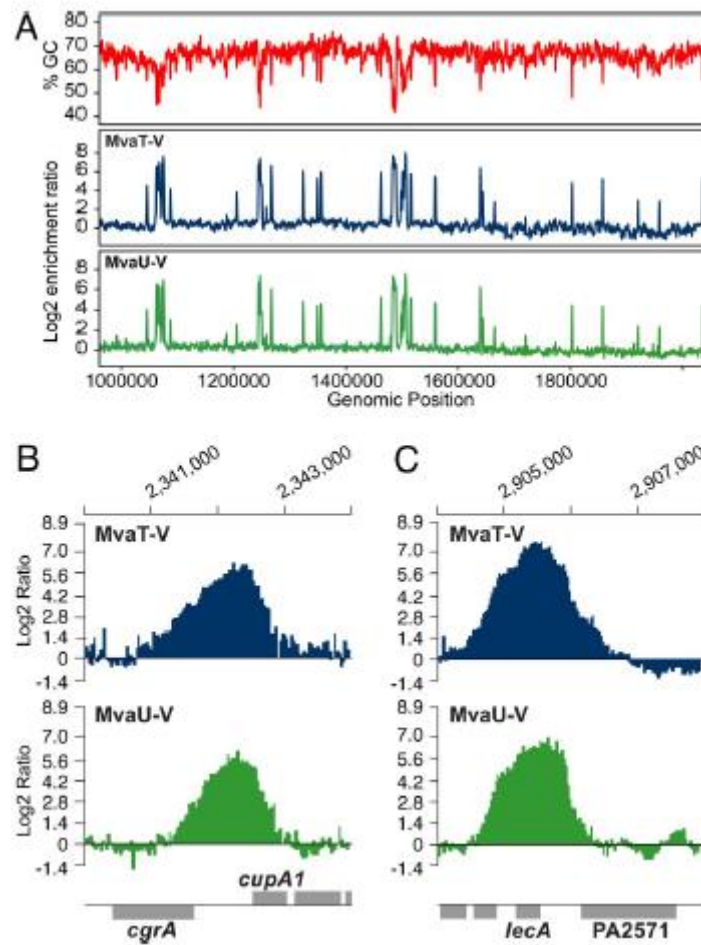
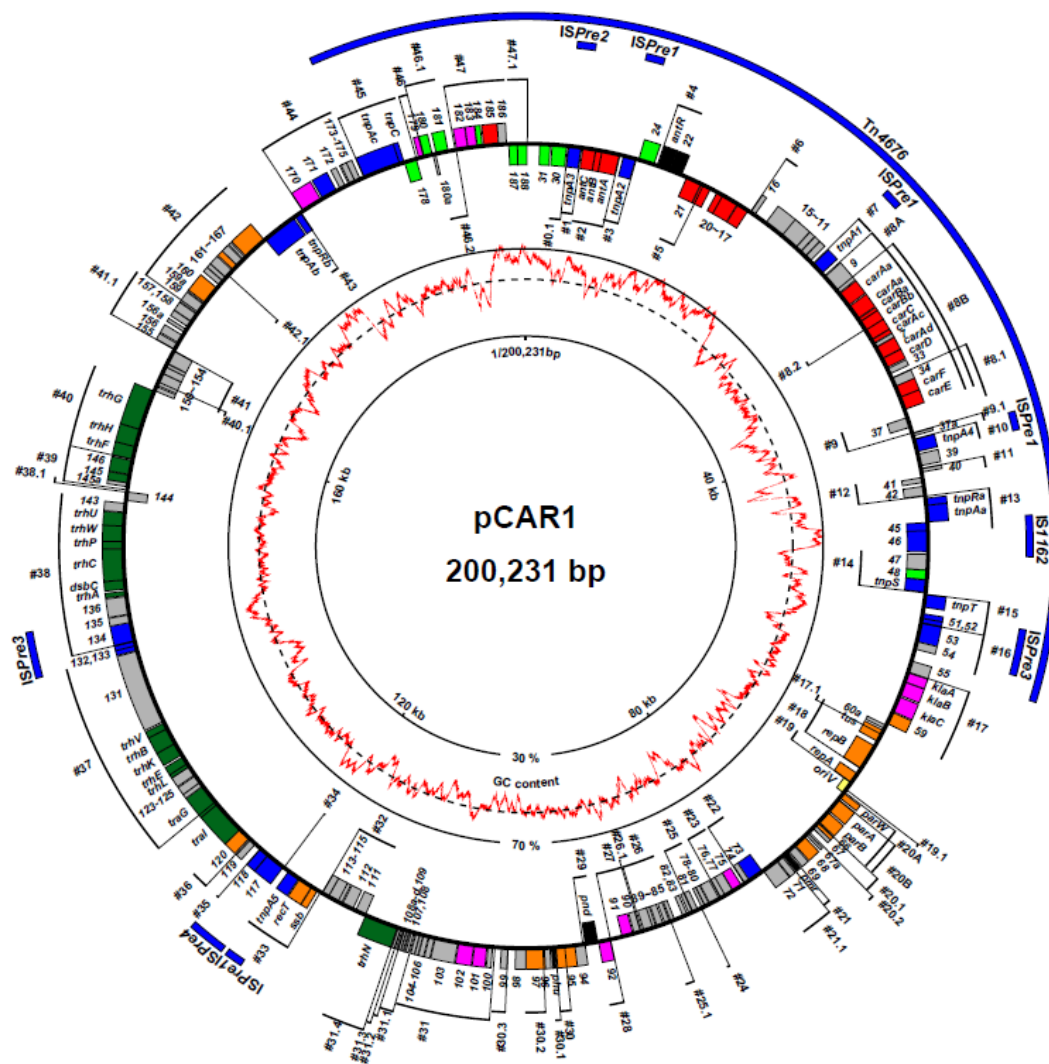


Fig. 1-12. MvaTとMvaUのChIP-chip解析における結合箇所の一例.

(A) The percent GC content for 1 Mb of the PAO1 chromosome (in windows of 1000 bp across the genome with a window step size of 500 bp) is plotted (in red) against the locations of MvaT-V (plotted as log2 ratios in blue) and MvaU-V (plotted as log2 ratios in green) as determined by ChIP-on-chip. Association of MvaT-V and MvaU-V with the *cgrA*-*cupA1* intergenic region (B), and with the *lecA* promoter and coding region (C). Log2 ratio values were normalized and averaged across three replicate arrays. [Castang *et al.*, 2008のFigure 1を引用] “MvaT-V”と“MvaU-V”はMvaTとMvaUのC末端側にvesicular stomatitis virus glycoprotein epitope tagを付加していることを示している。



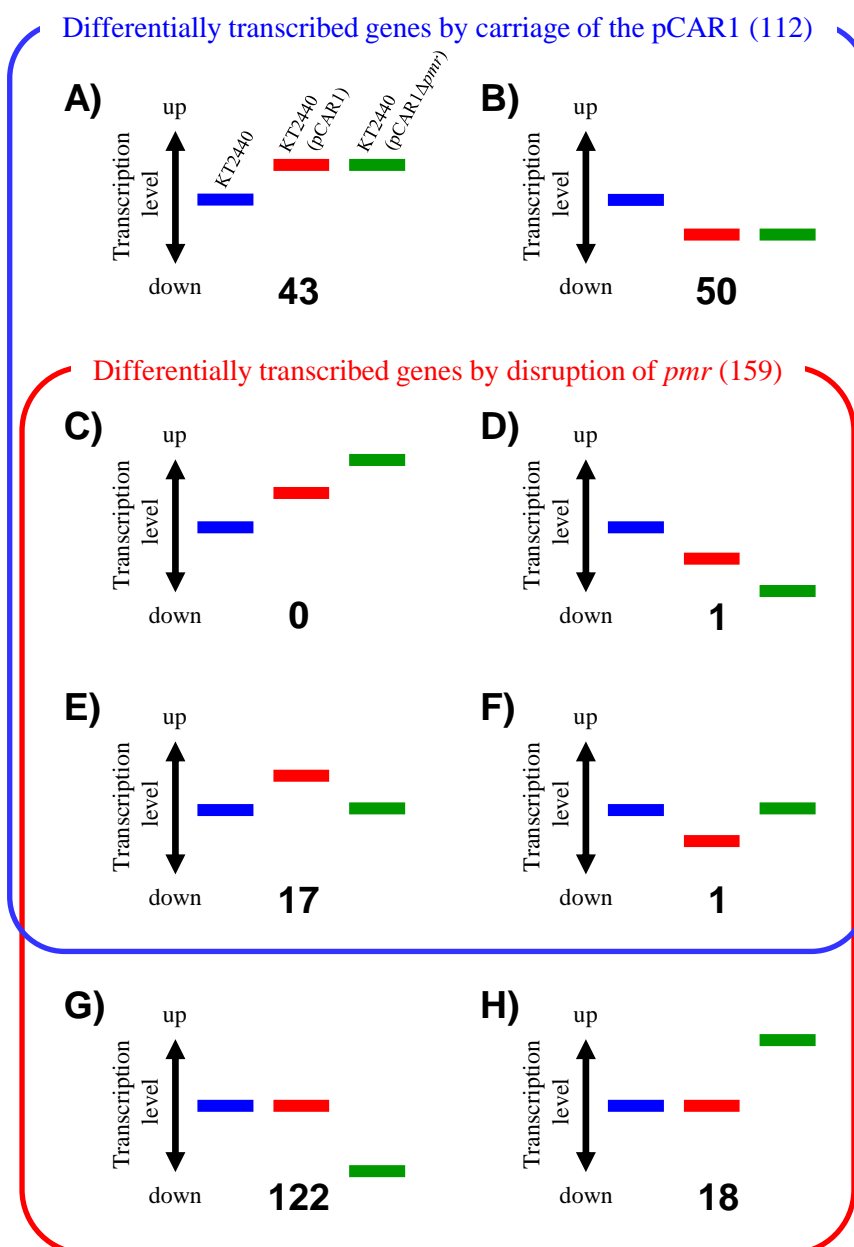


Fig. 1-14. *P. putida* KT2440株におけるpCAR1保持と*pmr*破壊の影響.

Classification of the differentially transcribed genes by pCAR1 carriage and/or *pmr* disruption. Blue, red, and green bars indicate the relative transcription levels in KT2440, KT2440(pCAR1), and KT2440(pCAR1Δ*pmr*), respectively. [Yun and Suzuki *et al.*, 2010の Figure 3を引用] 図中のA~Hは転写変動パターンの分類を示している.

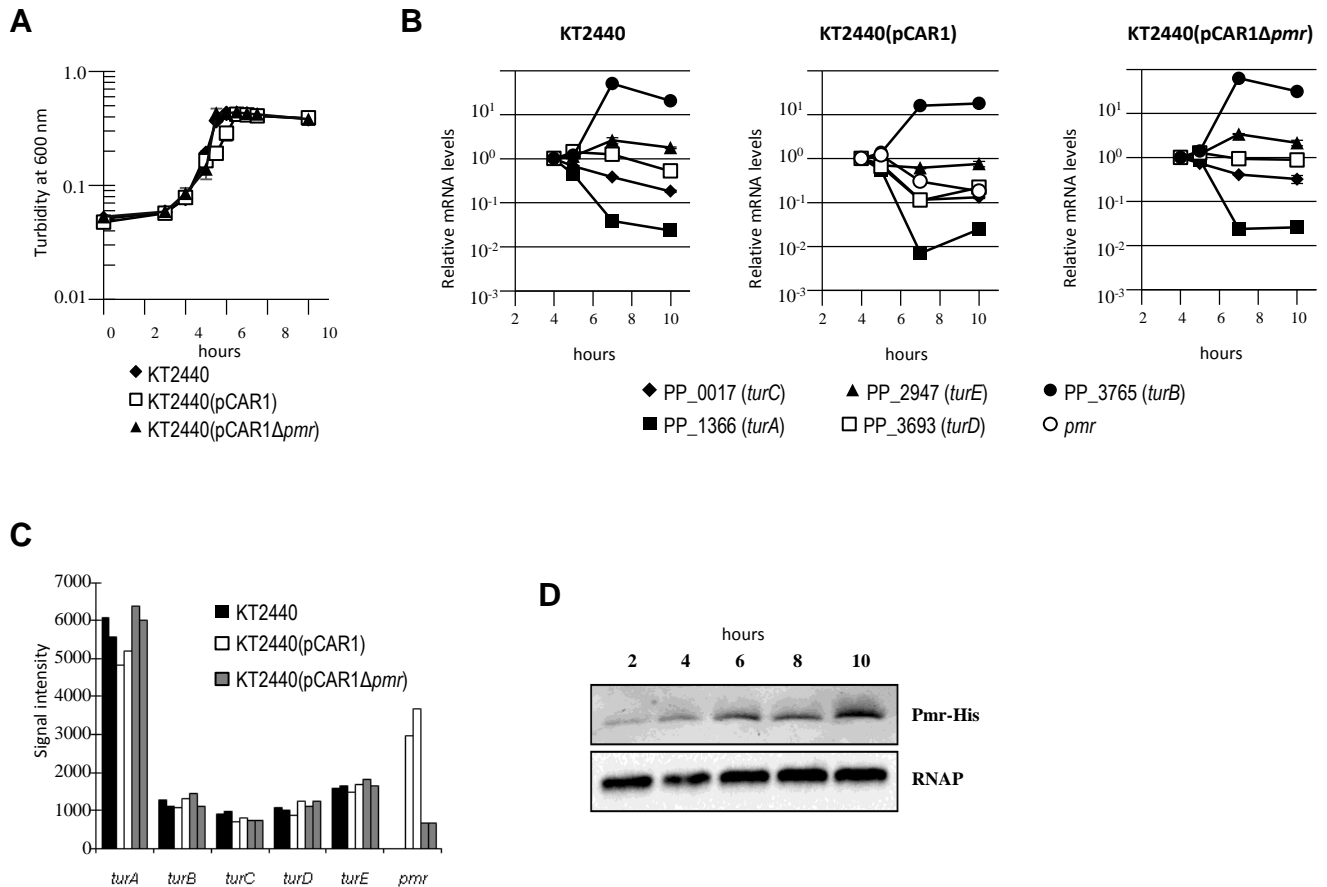
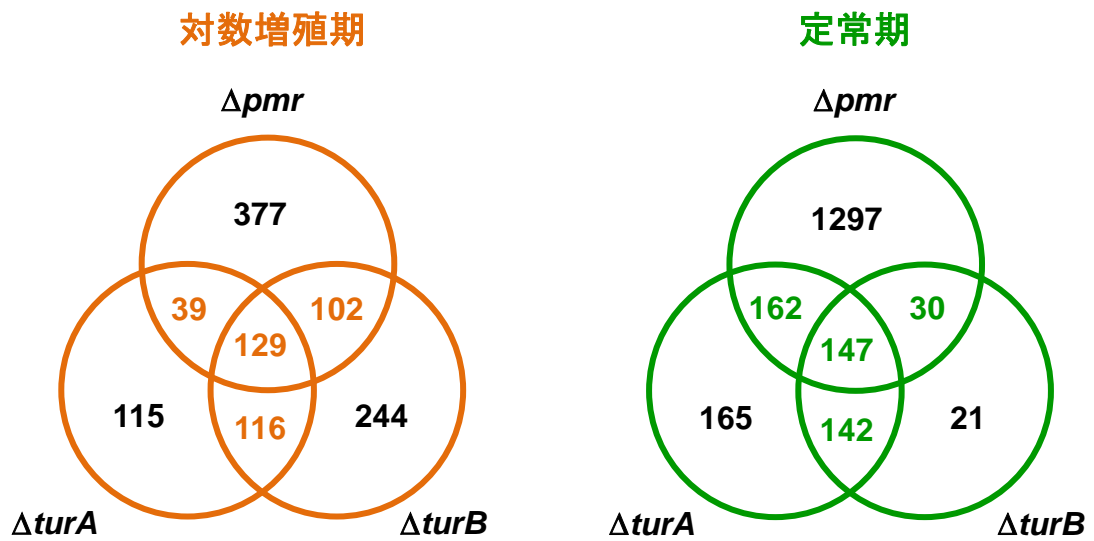


Fig. 1-15. KT2440株及びそのpCAR1保持株における*turA-E*, *pmr*の転写量とPmrの翻訳量. Transcriptional profiles of the genes encoding H-NS family proteins and translational profiles of Pmr. (A) Growth curves of KT2440 (diamond), KT2440(pCAR1) (square), and KT2440(pCAR1Δ*pmr*) (triangle). The turbidity of each cell culture was measured at 600 nm. (B) The mRNA levels of the genes encoding H-NS family proteins (Pmr, PP_0017 [TurC], PP_1366 [TurA], PP_2947 [TurE], PP_3693 [TurD], PP_3765 [TurB]) measured by qRT-PCR. Means and standard deviations (error bars) of triplicate data are shown. (C) Signal intensities of genes encoding H-NS family proteins in tiling array analyses with KT2440 (black), KT2440(pCAR1) (white), and KT2440(pCAR1Δ*pmr*) (gray). Biologically duplicated data are shown. (D) The amount of Pmr-His protein was monitored at different points in the growth curve of KT2440(pCAR1). Results of Western blot analysis using anti-His are shown in the upper panel, and those with use of an anti-RNA polymerase α subunit as a control for sample loading are shown in the lower panel. [Yun and Suzuki *et al.*, 2010のFigure 1を引用]

A



B

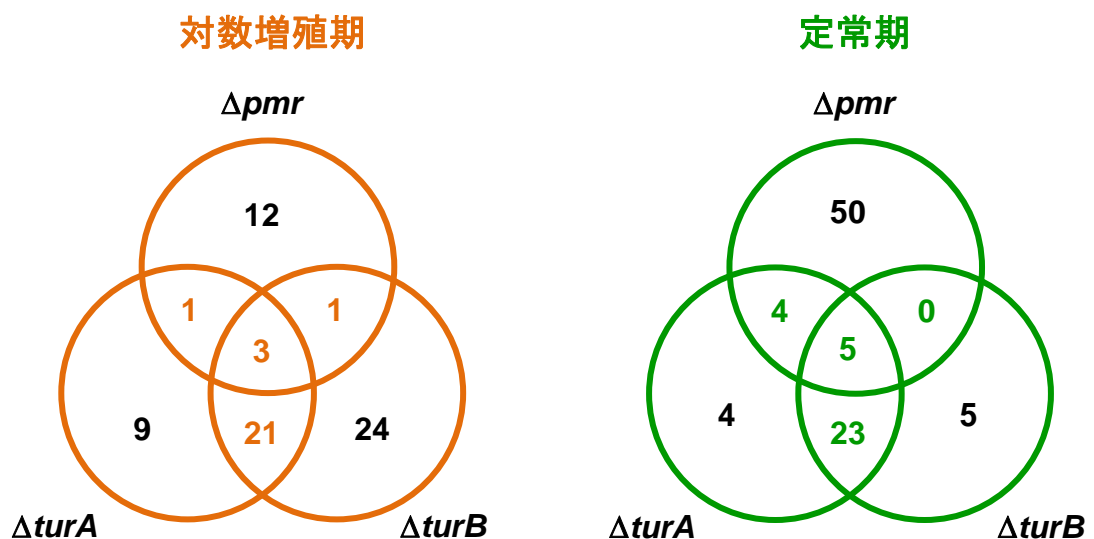


Fig. 1-16. *P. putida* KT2440(pCAR1)株におけるPmr, TurA, TurBのレギュロンの重なり. KT2440株染色体上 (A) 及びpCAR1上 (B) の遺伝子について, *pmr*, *turA*, *turB*破壊株において転写が変動した遺伝子の数と重なりを対数増殖期と定常期に分けてベン図で示した. [尹ら, 未発表データ]

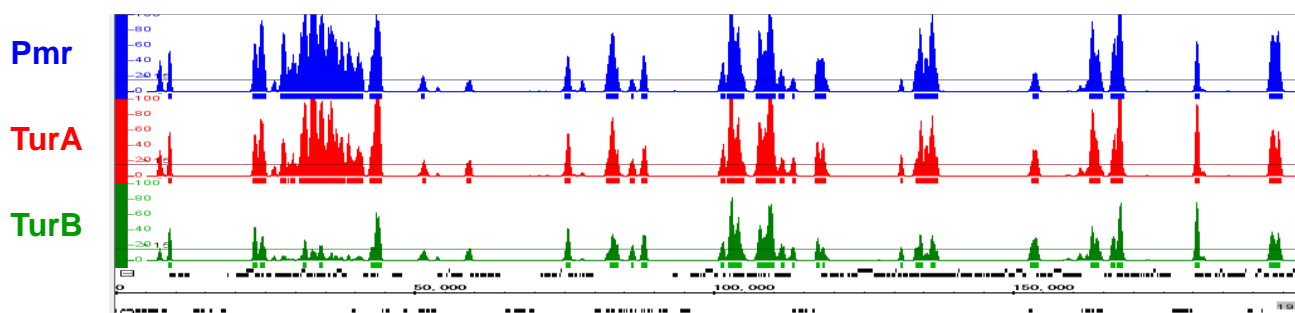


Fig. 1-17. ChAP-chip解析におけるPmr, TurA, TurBの結合位置の分布.

P. putida KT2440(pCAR1)株におけるPmr, TurA, TurBのChAP-chip解析結果(pCAR1上全体)を示した. 横軸はpCAR1上の位置を, 横軸下方の黒色の四角は各ORFを示している. 縦軸は $-\log_{10}(p\text{-value})$ で表してあるため, この図で大きな値を示している領域ほど $p\text{-value}$ が小さい(当該領域にPmr, TurA, TurBが存在する確率が高い)ことを示している. [高橋ら, 未発表データ]

第 2 章

Pmr のホモ多量体形成機構の解明

2-1 緒言

序論でも述べたように，H-NS による転写制御にはホモ多量体形成が重要であることが知られている [Ueguchi *et al.*, 1996]. しかし本研究開始当初，腸内細菌の H-NS の多量体形成機構が精力的に研究されていた一方で，MvaT ホモログの多量体形成機構についてはほとんど知見が無かった．そこで本章では，異種発現・精製した Pmr が溶液中でホモ多量体を形成することの確認を行うと共に，Pmr の二量体／多量体化ドメインの同定及びホモ多量体化に重要な残基・領域の同定を行うことで，Pmr と腸内細菌の H-NS のホモ多量体形成機構を比較することを目的とした．

2-2 材料と方法

2-2-1 使用した菌株, プラスミド, 及び培養条件

本章ではタンパク質発現用プラスミド構築のために *E. coli* DH5 α 株 (Toyobo) を, タンパク質発現のために *E. coli* BL21(DE3)株 (Novagen) を使用した. 本章で使用したプラスミドは Table 2-1 に示した. *E. coli* DH5 α 株は 37°C で, *E. coli* BL21(DE3)株は 25°C または 30°C で培養した. 培地は LB 培地 (Bacto tryptone 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 10 g, per liter) [Sambrook and Russell, 2001]を用い, 培地のスケールが 5 mL の場合は 300 strokes/min で, 100 mL の場合は 120 rpm で培養した. 選択培地に ampicillin (Ap), kanamycin (Km)を使用する場合には, それぞれ終濃度 50 μ g/ml となるように添加した. X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) を使用する場合には終濃度 20 μ g/ml となるように添加した. プレート作製時には細菌培地用の寒天を終濃度 1.6% (w/v)となるように添加した.

2-2-2 酵素

本章で使用した制限酵素はタカラバイオ株式会社 (Takara Bio) のものを添付のプロトコールの指示に従って用いた. また, DNA 断片の連結には Ligation high または Ligation high Ver. 2 (Toyobo)を添付のプロトコールに従って用いた.

2-2-3 PCR

PCR は *Ex Taq* (Takara Bio)を DNA polymerase として用い, 添付のプロトコールに従って行った. サーマルサイクラーには PCR Thermal Cycler Dice (Takara Bio)を用いた. 本研究で使用したプライマー (シグマアルドリッチジャパン及びライフテクロロジーズジャパンに合成を依頼した) は Table 2-2 に示した.

Table 2-1. 本章で使したプラスミド.

Plasmid vectors	Relevant properties ^a	Reference or Source
pT7Blue T-Vector	Ap ^r , <i>lacZ</i> _a , T7 promoter, fl origin, pUC/M13 priming sites	Novagen
pET26b(+)	pBR322 replicon, Km ^r , T7 promoter, <i>lacI</i>	Novagen
pET-C-His-pmr	pET-26b(+), <i>NdeI-XhoI</i> fragment containing <i>pmr</i>	Yun and Suzuki <i>et al.</i> , 2010
pET-C-His-pmr _{nt55}	pET26b(+), <i>NdeI-XhoI</i> fragment containing the gene encoding the N-terminal part of Pmr (residues 1-55)	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-N-His-pmr1-61	pET26b(+), <i>NdeI-XhoI</i> fragment containing the gene encoding the N-terminal part of Pmr (residues 1-61) with 6×His at its N-terminus	This study
pET-C-His-pmr _{nt61}	pET26b(+), <i>NdeI-XhoI</i> fragment containing the gene encoding the N-terminal part of Pmr (residues 1-61)	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt73}	pET26b(+), <i>NdeI-XhoI</i> fragment containing the gene encoding the N-terminal part of Pmr (residues 1-73)	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -E6A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for E6 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -R8A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for R8 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -E12A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for E12 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -K15A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for K15 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -E16A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for E16 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -Q18A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for Q18 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -E19A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for E19 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -R20A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for R20 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -E22A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for E22 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -K23A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for K23 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -S25A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for S25 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -N27A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for N27 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -E28A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for E28 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -K32A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for K32 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -E35A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for E35 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -E37A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for E37 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -K38A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for K38 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -R41A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for R41 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -S45A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for S45 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -K49A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for K49 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -R52A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for R52 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt61} -D53A	pET-C-His-pmr _{nt61} derivative, triplet codon for D53 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr _{nt73} -R8A	pET-C-His-pmr _{nt73} derivative, triplet codon for R8 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pET-C-His-pmr-R8A	pET-C-His-pmr derivative, triplet codon for R8 is replaced with GCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted

^aAp^r and Km^r represent resistance to ampicillin and kanamycin, respectively.

Table 2-2. 本章で使したプライマー.

Primer	Sequence (5' → 3') ^a	Reference
C-FLAG-Pmr-F	<u>CATATG</u> TCCCTCATCACCGA	Yun and Suzuki <i>et al.</i> , 2010
Pmr_nt ₅₅ C-His-R	<u>CTCGAG</u> GATGATGTCGCGCAGGC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr_nt ₆₁ C-His-R	<u>CTCGAG</u> GTCCGGATCAAGAATC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr_nt ₇₃ C-His-R	<u>CTCGAG</u> AGGTTTGCCAGGCTGAT	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
pmr1-61 N-His-F	<u>CATATG</u> CACCACCACCACCACATGTCCCTCATCA CCGAATAC	This study
pmr1-61 N-His-R	<u>CTCGAG</u> TCAGTCCGGATCAAGAATCGC	This study
Pmr E6A-F	GTCCCTCATCACCG CG TACCGAGCCACAG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr E6A-R	CTGTGGCTCGGTAC CG GGTGATGAGGGAC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr R8A-F	CATACCGAATAC CGCG CCACAGAGGAAGC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr R8A-R	GCTTCCTCTGTGGCC CG CTATTTCGGTGATG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr E12A-F	CCGAGCCACAGAG GGCG CCATCAAGGAGC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr E12A-R	GCTCCTTGATGGCC CG CTCTGTGGCTCGG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr K15A-F	GAGGAAGCCAT CGCG GAGCTTCAGGAACG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr K15A-R	CGTTCCTGAAGTCC CG GATGGCTTCCTC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr E16A-F	GGAAGCCATCAAG GGCG TTCAGGAACGAC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr E16A-R	GTCGTTCTGAAG CG CTTGATGGCTTCC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr Q18A-F	CCATCAAGGAGCTT CG GGAACGACTGGAG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr Q18A-R	CTCCAGTCGTTCC G CAAGCTCCTTGATGG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr E19A-F	CAAGGAGCTTCAG GGCG CACTGGAGAAGC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr E19A-R	GCTTCTCCAGTC CGCG CTGAAGCTCCTTG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr R20A-F	GGAGCTTCAGGA AGCG CTGGAGAAGCTGAG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr R20A-R	CTCAGCTTCTCCAG CG CTTCTGAAGCTCC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr E22A-F	CAGGAACGACTGG CG GAAGCTGAGCGG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr E22A-R	CCGCTCAGCTT CG CCAGTCGTTTCCTG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr K23A-F	GGAACGACTGGAG GGCG CTGAGCGGAAATG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr K23A-R	CATTTCCGCTCAG CG CTCCAGTCGTTCC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr S25A-F	GACTGGAGAAGCT GGCG GGAATGAAGCCC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr S25A-R	GGGCTTCATTTCC CG CCAGCTTCTCCAGTC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr N27A-F	GAGAAGCTGAGCGG AGCG GAAAGCCCTTTTG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr N27A-R	CAAAAGGGCTTCC G CTCCGCTCAGCTTCTC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr E28A-F	CTGAGCGGAAATG CG GCCCTTTTGAAAGAG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr E28A-R	CTCTTTCAAAAGGG CG CCATTTCCGCTCAG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr K32A-F	GAAGCCCTTTT GGCG GAGATGGAGTTCGAG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr K32A-R	CTCGAACTCCATCTCC G CCAAAAGGGCTTC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr E35A-F	CTTTTGAAAGAGATGGCGTTCGAGAAAAAG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr E35A-R	CTTTTCTCGAAC CG CCATCTCTTTCAAAAG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr E37A-F	GAGATGGAGTTCGCGAAAAAGCTGCGGGCC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr E37A-R	GGCCCGCAGCTTTT CG CGAACTCCATCTC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr K38A-F	GAGATGGAGTTCGAG GGCG AAGCTGCGGGCC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr K38A-R	GGCCCGCAGCTT CG CCTCGAACTCCATCTC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr R41A-F	GAGAAAAAGCT GGCG GCCTTGATGTCTGAG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr R41A-R	CTCAGACATCAAGGCC CG CAGCTTTTCTC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr S45A-F	CGGGCCTTGATG GGCG GAGTATGGCAAGAGC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr S45A-R	GCTCTTGCCATACTCC G CCATCAAGGCCCG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr K49A-F	GTCTGAGTATGG CG CGAGCCTGCGCGACATC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr K49A-R	GATGTCGCGCAGGCT CGCG CCATACTCAGAC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr R52A-F	GTATGGCAAGAGCCT GGCG GACATCATCGC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr R52A-R	GCGATGATGTCC G CCAGGCTCTTGCCATAC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr D53A-F	GCAAGAGCCTGCG CG GATCATCGCGATTTC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted
Pmr D53A-R	GAATCGCGATGAT CGCG CGCAGGCTCTTGC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , submitted

^a *Nde*I and *Xho*I restriction sites are underlined; mutations are in bold.

2-2-4 アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動は Mupid- α (Advance)を使用して行った。

試薬

- ・ アガロース ME 中電気浸透 (Nacalai Tesque)
- ・ Agarose X (Nippon Gene)
- ・ 50×TAE
242 g Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)
57.1 mL 氷酢酸
100 mL 0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (pH 8.0)
700 mL の dH₂O に上記の順で溶解させ、1000 mL に fill up し、常温で保存した。
使用時は dH₂O で 50 倍に希釈し、1×TAE として用いた。
- ・ 10×Loading Dye (Takara Bio)
- ・ One STEP Marker 6 (Nippon Gene) (DNA 分子量マーカー)
- ・ One STEP Marker 5 (Nippon Gene) (DNA 分子量マーカー)
- ・ Ethidium bromide (EtBr) solution (Nippon Gene) (染色液)
dH₂O で推奨濃度に希釈して使用した。

操作

＜アガロースゲルの作製＞

- ① 泳動する DNA 断片の長さに応じて、2%または 0.9% (w/v) のアガロース ME を 1×TAE に加え、電子レンジで加熱しながら寒天粉末を完全に溶解させた。3% (w/v) で作製する場合には Agarose X を用いた。
- ② ゲルメーカーに静かに流し込み、コームを差して室温で 30~60 分程度静置し、完全に固まってからコームを抜いた。

＜電気泳動と検出＞

電気泳動用のバッファーには 1×TAE を使用した。

- ① サンプルに 10×Loading Dye を加えてゲルにアプライし、100 V で dye がゲルの下端に移動するまで (30~40 分程度) 泳動を行った。
- ② ゲルを EtBr 溶液に浸して 15 分間静置した。その後 FAS (Toyobo)で検出を行った。

2-2-5 DNA 断片の精製

DNA 断片は EZNA gel extraction kit (Omega Bio-Tek) を使用してアガロースゲルから精製した。操作は添付のプロトコールに従った。

2-2-6 アルカリ SDS 法による *E. coli* からのプラスミド抽出

試薬及び酵素

- ・ TEG buffer

2.5 mL 1 M Tris-HCl (pH 8.0)

2 mL 0.5 M EDTA

以上を 85.5 mL の MilliQ 水に溶解させ、オートクレーブ後に 10 mL の 0.5 M グルコース水溶液を加えて 4°C で保存した.

- alkali-SDS

200 μ L 1 M NaOH

100 μ L 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)

以上を 700 μ L の MilliQ 水に使用直前に溶解させた.

- 酢酸-酢酸カリウム水溶液

60 mL 5 M 酢酸カリウム水溶液

11.5 mL 氷酢酸

以上に 28.5 mL の MilliQ 水を加え、4°C で保存した.

- TE buffer

1 mL 1 M Tris-HCl (pH 8.0)

0.2 mL 0.5 M EDTA

以上を 98.8 mL の MilliQ 水に溶解させ、室温で保存した.

- フェノール/クロロホルム

- 100%エタノール

- 70%エタノール

- RNase A (Nippon Gene)

操作

- ① *E. coli* の培養液 2 mL を 2 mL チューブに分注し、15,000 rpm, 4°C で 1 分間遠心を行うことにより集菌した. 遠心後, 上清を除去した.
- ② 100 μ L の TEG buffer を加えて菌体を懸濁した.
- ③ 200 μ L の alkali-SDS を加え, チューブをゆっくりと 5 回転倒させることにより中身を混合させた後, 氷上で 5 分間静置した.
- ④ 150 μ L の 酢酸-酢酸カリウム水溶液を加え, チューブをゆっくりと 5 回転倒させることにより中身を混合させた後, 氷上で 5 分間静置した.
- ⑤ 15,000 rpm, 室温で 5 分間遠心を行った後, 上清を新しい 1.5 mL チューブに移した.
- ⑥ 上清と等量のフェノール/クロロホルムを加えてよく混合した.
- ⑦ 15,000 rpm, 室温で 10 分間遠心を行った後, 上層を新しい 1.5 mL チューブに移した.
- ⑧ 1 mL の 100%エタノールを加えてよく混合し, 氷上で 5 分間静置した.
- ⑨ 15,000 rpm, 4°C で 15 分間遠心を行った後, 上清を除去した.
- ⑩ 400 μ L の 70%エタノールを加え, チューブ壁面を穏やかに洗浄した.
- ⑪ 15,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心を行った後, 上清を除去し, デシケーターで 10 分程度乾燥させた.

- ⑫ 100 μ L の TE buffer を加えて沈殿を溶解させた。
- ⑬ RNase A を終濃度 0.1 mg/mL になるように加え、37°C で 1 時間インキュベートした。その後 -20°C で保存した。

2-2-7 塩基配列の決定

塩基配列の決定はグライナー・ジャパンのワンパス PreMix 解析 (DNA シークエンス受託解析) を利用した。

2-2-8 タンパク質発現用プラスミドの構築

- ① 目的タンパク質の発現用ベクターには pET26b(+)を用いた。目的タンパク質の C 末端側に His-tag を付加する場合には、Table 2-2 のプライマーを用いて目的タンパク質をコードする遺伝子の 5'末端に *Nde*I サイトを、3'末端に *Xho*I サイトを付加した DNA 断片を PCR によって作製した。なおこの場合、His-tag はベクター由来のものを使用した。N 末端側に His-tag を付加する場合には、Table 2-2 のプライマーを用いて目的タンパク質をコードする遺伝子の 5'末端に *Nde*I サイトとヒスチジン残基 6 個をコードする塩基配列を、3'末端に *Xho*I サイトと終止コドン付加した DNA 断片を PCR によって作製した。
- ② アガロースゲル電気泳動により目的の DNA 断片を精製した。
- ③ ②の DNA 断片を pT7Blue T-Vector にクローニングし、PCR 産物の塩基配列が正しいことを確認した。
- ④ ③のプラスミドと pET26b(+)を *Nde*I 及び *Xho*I で処理し、Ligation high または Ligation high Ver. 2 (Toyobo) によりこれらを連結した。

2-2-9 アミノ酸置換体発現用プラスミドの構築

QuikChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用い、Table 2-2 のプライマーを用いて行った。操作は添付のプロトコールに従った。

2-2-10 *E. coli* のコンピテントセルの作製

試薬

- ・ Transformation buffer (TB)

3.0 g PIPES

2.2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

18.6 g KCl

約 950 mL の MilliQ 水に懸濁した後、5N KOH で pH 6.7~6.8 に合わせて溶解させた。 $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を 10.9 g 加え、1000 mL に fill up し、孔径 0.22 μm のフィルターで濾過して滅菌し、4°C で保存した。

- ・ SOB 培地

20 g Bacto Tryptone
5 g Bacto Yeast extract
2 mL 5 M NaCl
1.25 mL 2 M KCl

990 mL の dH₂O に溶解させ、オートクレーブ滅菌した。使用前に孔径 0.22 μm のフィルターで濾過して滅菌した 2 M Mg²⁺溶液 (1 M MgSO₄·7H₂O + 1 M MgCl₂·6H₂O) を 10 mL 加えて使用した。

操作

- ① LB 培地 5 mL で目的の株を一晩前培養した (37°C, 300 strokes/min).
- ② 50 mL の SOB 培地を入れた 500 mL のへそ付き三角フラスコに、前培養液 1 mL を植菌し、18°C, 150 strokes/min で培養した。
- ③ OD₆₀₀ が 0.4~0.8 に達した時点で培養を止め、氷上で 10 分間冷却した。
- ④ 50 mL チューブで 3,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心を行った後、上清を除去した。
- ⑤ 氷冷した TB を 16.7 mL 加えて懸濁し、10 分間氷冷した。
- ⑥ 3,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心を行った後、上清を除去した。
- ⑦ 氷冷した TB を 4 mL 加えて懸濁し、300 μL のジメチルスルホキシドを加え（熱が発生するため少しずつ加えた）、10 分間氷冷した。
- ⑧ 1.5 mL チューブに 50 μL ずつ分注し、速やかに液体窒素で凍結させ、-80°C で保存した。

2-2-11 *E. coli* の形質転換

作製したコンピテントセルにプラスミド溶液またはライゲーション産物を加え、氷上で 30 分間静置した。その後 42°C で 90 秒間インキュベートし、すぐに氷上で 2~3 分程静置した。これに LB 培地 500 μL を加え、選択培地の抗生物質が Ap の場合は 30 分間、Km の場合は 1 時間の回復培養 (37°C, 300 strokes/min) を行い、LB 選択プレートに塗布した後、37°C で 15 時間静置培養を行い、形質転換株を取得した。

2-2-12 SDS-PAGE, Tricine-SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli (1970), Tricine-SDS-PAGE は Schagger (1987, 2006)の方法に従い、Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad)を用いて行った。

SDS-PAGE

SDS-PAGE の Acrylamide/Bis (19:1) 濃度は 12%または 15%で行った。

試薬

- 30% (w/v) Acrylamide/Bis (19:1) (Bio-Rad)
- 4×Tris-HCl/SDS (pH 6.8) (濃縮ゲル buffer)
- 6.05 g Tris

0.4 g SDS

Tris を MilliQ 水 40 mL に溶解後, 1 N HCl で pH 6.8 に調整し 100 mL に fill up した. 孔径 0.22 μ m のフィルターで濾過し, オートクレーブ後に SDS を加えて 4°C で保存した.

- 4×Tris-HCl/SDS (pH 8.8) (分離ゲル buffer)

91 g Tris

2 g SDS

Tris を MilliQ 水 300 mL に溶解後, 1 N HCl で pH 8.8 に調整し 500 mL に fill up した. 孔径 0.22 μ m のフィルターで濾過し, オートクレーブ後に SDS を加えて 4°C で保存した.

- *N, N, N', N'*-Tetramethylethylenediamine (TEMED)

- 10% (w/v) Ammonium persulfate (APS)

- 10×SDS/electrophoresis buffer

30.2 g Tris

144 g Glycine

10 g SDS

dH₂O 1000 mL に溶解させ室温で保存した. 使用時に dH₂O で 10 倍希釈して 1×SDS/electrophoresis buffer として使用した.

- 2×SDS sample buffer

2.5 mL 4×Tris-HCl/SDS (pH 6.8)

2 mL Glycerol

0.4 g SDS

0.3 g Dithiothreitol

0.1 mg Bromophenol blue

MilliQ 水 10 mL に溶解させ, 2 mL ずつ分注して -20°C で保存した.

- XL-Ladder Low (APRO Science) (分子量マーカー)
- Prestained XL-Ladder Broad (APRO Science) (分子量マーカー)
- Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad) (分子量マーカー)
- SeeBlue® Plus2 Pre-stained Standard (Invitrogen) (分子量マーカー)
- SimplyBlue SafeStain (Invitrogen) (染色液)

操作

<ポリアクリルアミドゲルの作製>

(分離ゲルの試薬は 12%ゲル 2 枚分の量を示した. カッコ内が 15%ゲル作製用の試薬の量を示す. 濃縮ゲルの試薬は共通で 2 枚分の量を示した.)

- ① 30% (w/v) Acrylamide/Bis (19:1) 4 mL (5 mL), 分離ゲル buffer 2.5 mL (2.5 mL), MilliQ 水 3.5 mL (2.5 mL), TEMED 10 μ L, 10% APS 50 μ L を穏やかに混合した. ただし TEMED と APS は以下の操作に進む直前に加えた.
- ② 組み立てた Mini-Protean 3 Cell に①の溶液を流し込み, ゲル作成用混合液の水面が平ら

になるよう上から MilliQ 水を適量流し込んだ。ゲルが固まるまで 20~30 分間静置した。

- ③ 30% (w/v) Acrylamide/Bis (19:1) 0.68 mL, 濃縮ゲル buffer 1.24 mL, MilliQ 水 3.08 mL, TEMED 10 μ L, 10% APS 25 μ L を穏やかに混合した。ただし TEMED と APS は以下の操作に進む直前に加えた。

- ④ 分離ゲルの上に加えた MilliQ 水を取り除いて③の溶液を分離ゲルの上に流し込み、コームを差し込んだ。ゲルが固まるまで 20~30 分間静置し、コームを取り除いた。

<サンプルのアプライ、電気泳動、ゲルの染色と脱染色>

- ① サンプルに等量の 2 \times SDS sample buffer を加え、100°C で 5 分間加熱した。
- ② ポリアクリルアミドゲルを泳動槽にセットし、1 \times SDS/electrophoresis buffer を両極に適量満たしてウェルにサンプルをアプライし、100 V で濃縮ゲルの下端まで電気泳動を行った。その後電圧を 200 V に上げ、分離ゲルの下端まで電気泳動を行った。
- ③ 泳動完了後にゲルをゲル板から分離して濃縮ゲルを取り除き、分離ゲルを MilliQ 水に浸して電子レンジで加熱し、約 5 分間振盪した。その後この操作をもう一度繰り返した。
- ④ MilliQ 水を捨て、ゲルを SimplyBlue SafeStain に浸して電子レンジで加熱した。その後染色液が冷めるまで振盪した。
- ⑤ ゲルを MilliQ 水に浸し、電子レンジで加熱した。脱染色を効率的に行うためにペーパータオルを容器に入れ、1~2 時間振盪した。

Tricine-SDS-PAGE

Tricine-SDS-PAGE の Acrylamide/Bis (19:1) 濃度は 14%または 16%で行った。

試薬

ゲルバッファー、泳動バッファー以外は SDS-PAGE と共通である。以下に Tricine-SDS-PAGE にのみ必要な試薬を記載する。

- 3 \times Tris-HCl/SDS (pH 8.45) (Tricine-SDS-PAGE gel buffer)

36.3 g Tris

0.3 g SDS

Tris を MilliQ 水に溶解後、1 N HCl で pH 8.45 に調整し 100 mL に fill up した。孔径 0.22 μ m のフィルターで濾過し、オートクレーブ後に SDS を加えて室温で保存した。

- 5 \times anode buffer

30.3 g Tris を dH₂O に溶解させ、1 N HCl で pH 8.9 に調整し 500 mL に fill up した。使用時に dH₂O で 5 倍希釈し、1 \times anode buffer として使用した。

- 5 \times cathode buffer

30.3 g Tris

44.8 g Tricine

2.5 g SDS

dH₂O に溶解させ、500 mL に fill up した。使用時に dH₂O で 5 倍希釈し、1 \times cathode buffer

として使用した。

操作

＜ポリアクリルアミドゲルの作製＞

(試薬は 16%ゲル 1 枚分の量を示した。14%ゲルを作成する場合は①のみカッコ内の組成に変更した。)

- ① 30% (w/v) Acrylamide/Bis (19:1) 3.2 mL (2.8 mL), gel buffer 2 mL (2 mL), MilliQ 水 0.2 mL (0.6 mL), glycerol 0.6 mL (0.6 mL), TEMED 5 μ L, 10% APS 50 μ L を穏やかに混合した。ただし TEMED と APS は以下の操作に進む直前に加えた。
- ② 組み立てた Mini-Protean 3 Cell に①の溶液を流し込み、ゲル作成用混合液の水面が平らになるよう上から MilliQ 水を適量流し込んだ。ゲルが固まるまで 20～30 分間静置した。
- ③ 30% (w/v) Acrylamide/Bis (19:1) 0.4 mL, gel buffer 0.75 mL, MilliQ 水 1.85 mL, TEMED 5 μ L, 10% APS 40 μ L を穏やかに混合した。ただし TEMED と APS は以下の操作に進む直前に加えた。
- ④ 分離ゲルの上に加えた MilliQ 水を取り除いて③の溶液を分離ゲルの上に流し込み、コームを差し込んだ。ゲルが固まるまで 20～30 分間静置し、コームを取り除いた。

＜サンプルのアプライ、電気泳動、ゲルの染色と脱染色＞

- ① サンプルに等量の 2×SDS sample buffer を加え、100°C で 5 分間加熱した。
- ② ポリアクリルアミドゲルを泳動槽にセットし、1×cathode buffer を上槽に、1×anode buffer を下槽に適量満たしてウェルにサンプルをアプライし、30 V でサンプルが完全にゲルの中に入るまで泳動を行い、続いて 100 V で分離ゲルの中程まで電気泳動を行った。その後電圧を 150～200 V に上げ、分離ゲルの下端まで電気泳動を行った。泳動終了後からゲルの染色、脱染色は SDS-PAGE と同様に行った。

2-2-13 *E. coli* BL21(DE3)株を用いた目的タンパク質の大量発現

LB 培地 5 mL または 100 mL の系で行った。目的の発現プラスミドによって形質転換した *E. coli* BL21(DE3)株を、LB 選択培地 5 mL で一晩前培養を行い(37°C, 300 strokes/min), 本培養に用いる培地の 1/100 量の前培養液を本培養の選択培地に植菌し培養した (5 mL なら 300 strokes/min, 100 mL なら 120 rpm). OD₆₀₀ が 0.4～0.6 になったところで IPTG を目的の濃度で添加し、一晩培養を行った。

5 mL の系で行った場合の操作

培養後の菌体を 2 mL チューブに集菌し、2-2-14 の buffer A で 2 回洗菌後に同 buffer に懸濁した。Sonifier 250D (Branson) を用いて、マイクロチップで強度を 1 に設定して 2 分間超音波破碎し、15,000 rpm, 4°C, 15 分間遠心して細胞抽出液を得た。

100 mL の系で行った場合の操作

培養後の菌体を 50 mL チューブに集菌し、2-2-14 の buffer A で 2 回洗菌後に同 buffer に懸濁した。Sonifier 250D (Branson) を用いて、スタンダードチップで強度を 4 に設定して 10

分間超音波破碎し、25,000×g, 4°C, 1 時間遠心した後に上清を孔径 0.45 μm のフィルターで濾過して細胞抽出液を得た。

2-2-14 His-tag による目的タンパク質のアフィニティー精製

2-2-13 の方法で発現させた His-tag 融合タンパク質を metal chelate affinity chromatography で精製した。カラムは HiTrap Chelating HP (column volume 5 mL; GE Healthcare) を使用し、4°C で ÄKTA FPLC (GE Healthcare) を用いて行った。

試薬

- Buffer A (20 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.5 M NaCl, 10%グリセリン)
- Buffer B (20 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.5 M NaCl, 10%グリセリン, 0.5 M イミダゾール)
- 0.1 M NiSO₄

各々孔径 0.22 μm のフィルターで濾過した後, buffer A, B については脱気してから使用した。

操作

- ① 5 カラム分の MilliQ 水を流速 2 mL/min で流し、カラムを洗浄した。
- ② 0.1 M NiSO₄ を流速 0.12 mL/min で 1.5 mL 流し、カラムに Ni²⁺ をチャージさせた。
- ③ 5 カラム分の MilliQ 水を流速 2 mL/min で流し、カラムを洗浄した。
- ④ Buffer A を流速 2 mL/min で 5 カラム分流し、カラムを平衡化した。
- ⑤ サンプルを 1 mL/min でカラムにアプライした。
- ⑥ 各タンパク質に最適な条件で段階溶出法によるカラムの洗浄と溶出を行い、目的タンパク質が含まれるフラクションを回収した。各フラクションは 5 mL とした。

2-2-15 MagneHis Protein Purification System (Promega) を用いたアフィニティー精製

LB 培地 5 mL の系で目的タンパク質を発現させ、2-2-13 の方法で調製した大腸菌細胞抽出液を用いて添付のプロトコールに従って目的タンパク質を精製した。

2-2-16 ゲルろ過クロマトグラフィー

カラムは HiLoad 16/60 Superdex 200 (column volume 120 mL; GE Healthcare) を、バッファーは 2-2-14 の buffer A または buffer B を使用した。バッファーを流速 0.5 mL/min で 2 時間流しカラムを平衡化した後、精製したサンプルをカラムに供し、流速 0.5 mL/min で溶出させた。各フラクションは 1 mL とした。

2-2-17 ゲルろ過クロマトグラフィーを用いたタンパク質の分子量の推定

分子量マーカーとして、Gel Filtration Calibration Kit LMW (低分子用) 及び HMW (高分子用) (GE Healthcare) を用いてタンパク質の分子量の推定を行った。各タンパク質は付属のマニュアルで推奨される濃度に調製しカラムに供した。Blue dextran は担体と一切相互作用しないと仮定して、blue dextran の溶出に要した体積を排除体積 V_0 とし、カラム内部の体

積（担体の体積と排除体積の合計）を V_t とした．それぞれのタンパク質の溶出に要した体積を V_e とし、各々のマーカー分子の分配係数 K_{av} を次式で算出した．

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

各々のマーカーの分子量 MW の対数値 $\log_{10}MW$ を x 軸に、各タンパク質の K_{av} を y 軸にプロットすることで検量線を作成した．精製した目的タンパク質の K_{av} を同様に求め、検量線上の位置から推定分子量を算出した．

2-2-18 タンパク質の定量

タンパク質の定量は、Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad)を用いて、bovine serum albumin (BSA) を標準タンパク質としてスタンダードアッセイ法により行った [Bradford, 1976]．分光光度計は Beckman Coulter 社製 DU800 を用いた．

操作

- ① 標準試料として、BSA を 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL になるよう調製した．
- ② サンプルを MilliQ 水で希釈して 0.1~0.5 mg/mL の範囲内の濃度になるよう調製した．
- ③ MilliQ 水で 5 倍に希釈した Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent 1 mL に対し標準試料を 20 μ L 加え、よく攪拌した．
- ④ 室温で 5 分以上静置した後、波長 595 nm における標準試料の吸光度を測定して検量線を作成した．
- ⑤ ③~④と同様にサンプルの吸光度も測定し、④で作成した検量線よりタンパク質濃度を算出した．

2-2-19 タンパク質間クロスリンク法

Ueguchi ら (1997) の方法を参考に行った．

試薬

- cross-linking buffer

1 mL 2 M triethanolamine-HCl (pH 8.5)

29 mg NaCl

1.5 mg dithiothreitol

使用直前に MilliQ 水 1 mL に溶解させて使用した．

- dimethyl suberimidate 2HCl (DMS) (Sigma-Aldrich)

使用直前に cross-linking buffer に溶解させて使用した．

操作

- ① 精製タンパク質を目的の濃度となるように cross-linking buffer に溶解させた．
- ② DMS を目的の濃度になるように添加した．
- ③ 室温でインキュベートを行い、等量の 2×SDS sample buffer を加えて 100°C で 5 分間加熱することで反応を停止させた．

④ SDS-PAGE または Tricine-SDS-PAGE によって検出した.

2-2-20 Pmr_nt₆₁ 二量体のモデル構造の作製

V. cholerae の H-NS ホモログ VicH の結晶構造 (PDB ID, 1OV9; Cerdan *et al.*, 2003) を鋳型として作製した. Pmr と VicH はアミノ酸配列の相同性が低く, 代表的なアミノ酸配列のアラインメントツールやフォールド認識プログラムを用いても適切なアラインメントが得られなかったため, VicH の二量体形成に重要な役割を果たしている疎水性残基 L28, L32, L35, V39 を Pmr の 4 つの疎水性残基 F36, L40, L43, Y47 にアラインした (Fig. 2-8B). このアラインメントに基づいて Modeller [Eswar *et al.*, 2006] でモデル構造を作製し, SCWRL [Krivov *et al.*, 2009] で側鎖構造の最適化を行い, Verify 3D [Bowie *et al.*, 1991; Lüthy *et al.*, 1992] でモデル構造の評価を行った. 生成した 10 個の構造のうち, 最も Verify 3D スコアが良かった構造を Pmr_nt₆₁ のモデル構造として採用した.

2-3 結果

2-3-1 Pmr が溶液中でホモ多量体を形成することの確認

(Suzuki *et al.*, 2011, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75:711-717 及び修士論文より改変・引用)

まず Pmr が溶液中でホモ多量体を形成するか確認するために、pET26b(+)ベクターを用いた *E. coli* BL21(DE3)による大量発現系の構築を行った。発現用プラスミドは、目的タンパク質のタンパク質間相互作用を阻害しないように DNA 結合ドメインである C 末端側に His-tag が付加されるように設計された pET-C-His-pmr [Yun and Suzuki *et al.*, 2010] を用いた。発現条件検討は LB 培地 100 mL で 2-2-13 の方法に従って行い、ベクターコントロールにはインサートを持たない pET-26b(+)を保持した *E. coli* BL21 (DE3)を使用した。SDS-PAGE の結果を Fig. 2-1A に示す。この結果から 25°C, IPTG 終濃度 0.1 mM が最適な発現条件であると判断した。そこでこの条件で誘導培養を行った大腸菌から細胞抽出液を取得し、His-tag と Ni^{2+} との親和性を利用した metal chelate affinity chromatography (2-2-14) を用いて、段階溶出法によりイミダゾール濃度を 150 mM から 475 mM に上昇させることで Pmr を精製した。得られた溶出プロファイルと、精製状態を確認するための SDS-PAGE を Fig. 2-1B, C に示す。精製されたタンパク質量を LB 培地 1 L あたりに換算すると約 70 mg であった。

精製された Pmr の会合度を調べるためゲルろ過クロマトグラフィーによる会合度の予測を行った。カラムは HiLoad 16/60 Superdex 200 (column volume 120 ml; GE Healthcare) を、バッファは 2-2-14 の buffer A を使用し、2-2-17 の方法に従って分子量推定のための検量線を作製した (Fig. 2-2A)。Pmr を 120 μM または 20 μM でカラムに供した際の溶出プロファイルを Fig. 2-2B に示す。この結果から、Pmr では void volume である 45 mL から溶出が始まり、60~80 mL まで幅広く溶出されることが明らかとなった。Fig. 2-2A の検量線から計算される void volume の分子質量は Pmr の会合度 70 以上に相当することから、Pmr は 120 μM と 20 μM のいずれの濃度でカラムに供しても会合度 70 以上を示すことが明らかとなった。

さらに、タンパク質間クロスリンク法を用いた Pmr の会合度の確認も行った。架橋剤にはスベリイミド酸ジメチル二塩酸塩 (dimethyl suberimidate 2HCl, DMS) を使用し、2-2-19 の方法で実験を行った。まず最適な DMS の濃度を検討するために、タンパク質濃度を 0.14 mg/mL (9.6 μM) に、架橋剤添加後のインキュベーション時間を 60 分に固定して、DMS の濃度を変化させて実験を行った。SDS-PAGE で検出した結果を Fig. 2-3A に示す。DMS の濃度が 0.7 mg/mL までは濃度依存的に架橋がかかっていない単量体の割合が少なくなり、代わりに二量体 (分子量約 30 k), 四量体 (分子量約 60 k) やさらに大きな分子量を持つ多量体の割合が増加した。DMS 濃度 0.1, 0.3, 0.5 mg/mL のサンプルでは三量体 (分子量約 45 k) も見られるが、それ以上の濃度ではこのバンドは消失していたことから、検出された三量体は四量体が部分的に架橋されたものであると考えられた。一方、DMS の濃度が 1.0 mg/mL, 5.0 mg/mL では SDS-PAGE のバンドパターンは変化しなかった。さらに DMS 濃度を上昇させ

たところ Fig. 2-3B に示すように多量体の割合が減少し、代わりに単量体、三量体の割合が増加した。DMS を 25 mg/mL まで上昇させた際にはタンパク質の凝集体が目視で確認されたことから (データ示さず), DMS の濃度を上昇させ過ぎるとタンパク質が不安定化して凝集することが明らかとなった。そこで DMS の濃度を 1.0 mg/mL に固定し, DMS 添加後のインキュベーション時間を変化させて実験を行った。SDS-PAGE で検出した結果を Fig. 2-3C に示す。DMS の濃度を上昇させた場合と同様に, 架橋剤添加後の時間が長くなるにつれて架橋がかかっていない単量体の割合が少なくなり, 代わりに二量体 (分子量約 30 k), 四量体 (分子量約 60 k) やさらに大きな分子量を持つ多量体の割合が増加した。インキュベーション時間 3~15 分のサンプルでは三量体 (分子量約 45 k) も見られるが, 60 分ではこのバンドが消失していたことから, 検出された三量体は四量体が部分的に架橋されたものであると考えられた。なお Fig. 2-3A, B では DMS 濃度の上昇に伴い単量体のバンドが上にシフトしているが, これは Pmr が持つ 13 個のリジン残基に対して DMS 分子 (分子量 273.20) が濃度依存的に結合しているためと考えられる。以上の結果から, Pmr は二量体を基本構造としたホモ多量体を形成することが明らかとなった。

2-3-2 Pmr の二量体/多量体化ドメインの同定

(Suzuki *et al.*, submitted 及び修士論文より改変・引用)

H-NS は N 末端側に二量体/多量体化ドメインを, C 末端側に DNA 結合ドメインを持ち, その間は flexible linker と呼ばれる決まった形をとらない構造で繋がれていることが知られている [Rimsky, 2004]。Pmr と *P. putida* KT2440 株の MvaT ホモログ TurA 及び TurB, *P. aeruginosa* PAO1 株の MvaT のアミノ酸配列のアラインメントを作製したところ, N 末端側と C 末端側に保存性の高い領域が, その間に保存性の低い領域が見出だされた (Fig. 2-4)。そこで, 特に保存性の高い Pmr の N 末端側 1~61 番目の残基までを二量体/多量体化ドメインと予測し, N 末端側に His-tag を付加したタンパク質 (Pmr₁₋₆₁ N-His) 及び C 末端側に His-tag を付加したタンパク質 (Pmr₁₋₆₁ C-His) を発現するプラスミドを pET26b(+)ベクターを用いて作製した。発現条件検討は LB 培地 5 mL で 2-2-13 の方法に従って行い, ベクターコントロールにはインサートを持たない pET-26b(+)を保持した *E. coli* BL21 (DE3)を使用した。Tricine-SDS-PAGE の結果を Fig. 2-5 に示す。この結果から, Pmr₁₋₆₁ N-His の場合は 25 °C, IPTG 終濃度 0.1 mM が, Pmr₁₋₆₁ C-His の場合は 30°C, IPTG 終濃度 0.1 mM が最適な発現条件であると考えた。そこでこの条件で誘導培養を行った大腸菌から細胞抽出液を取得し, metal chelate affinity chromatography (2-2-14) により目的タンパク質を精製した。Pmr₁₋₆₁ C-His は 100 mM イミダゾールで夾雑タンパク質を洗浄後, 475 mM に上昇させることで溶出させ (Fig. 2-6A), 十分に精製できたことを Tricine-SDS-PAGE によって確認した (Fig. 2-6B)。この方法で精製できたタンパク質を LB 培地 1 L あたりに換算すると約 200 mg であった。また, 同じタンパク質を LB 培地 5 mL で発現させ, MagneHis Protein Purification System (Promega)

(2-2-15) で精製したところ、この方法でも十分に精製することができた (Fig. 2-6C). 一方, Pmr₁₋₆₁ N-His はアフィニティー精製用のカラムにほとんど結合せず, 大半が flow through で検出された (Fig. 2-6D). また精製時の細胞抽出液では分子量 7 k の辺りに目的のバンドと思われるものが 2 本出現しており (Fig. 2-6D), 翻訳が途中で終わったタンパク質が混ざっている可能性も考えられた. 以上より Pmr の N 末端側の解析には Pmr₁₋₆₁ C-His を用いることとし, このタンパク質を Pmr_nt₆₁ と名付け, 以後の解析に使用した.

次に Pmr_nt₆₁ のホモ多量体形成能を調べるため, タンパク質間クロスリンク法による解析を行った. まず架橋剤 DMS の濃度を決定するためにタンパク質濃度を 0.14 mg/mL (18 μ M), 架橋剤添加後のインキュベーション時間を 60 分に固定して, DMS の濃度を変化させて実験を行った. Tricine-SDS-PAGE で検出した結果を Fig. 2-7A に示す. DMS の濃度が 5.0 mg/mL までは濃度依存的に架橋がかかっている単量体の割合が少なくなり, 代わりに二量体 (分子量約 16 k) やさらに大きな分子量を持つ多量体の割合が増加した. 一方, DMS の濃度が 7.5 mg/mL 以上では 5.0 mg/mL の時と比べて Tricine-SDS-PAGE のバンドパターンは変化しなかった. よって, DMS 濃度は 5.0 mg/mL に決定した. 次に, DMS 添加後のインキュベーション時間を変化させて実験を行い, Tricine-SDS-PAGE で検出した結果を Fig. 2-7B に示した. この結果でも, 架橋剤添加後の時間が長くなるにつれて架橋がかかっている単量体の割合が少なくなり, 代わりに二量体やさらに大きな分子量を持つ多量体の割合が増加した. 以上より Pmr_nt₆₁ が Pmr 同様に多量体を形成することが明らかとなり, Pmr_nt₆₁ が Pmr の二量体/多量体化ドメインであることが示された.

2-3-3 Pmr_nt₆₁ のホモ多量体化に重要な残基の予想 (Suzuki *et al.*, submitted 及び修士論文より改変・引用)

Pmr のホモ多量体形成機構を解明するためには, Pmr が多量体を形成するために重要なアミノ酸残基を同定し, その分布から多量体形成に重要な分子表面を明らかにする必要がある. そこで Pmr_nt₆₁ のモデル構造を作製し, ホモ多量体形成に重要な役割を果たすと考えられる残基を予想した. モデル構造を作製した当時, H-NS ホモログで N 末端側の構造が明らかになっていたのは, *S. enterica* Typhimurium の H-NS の溶液構造 (PDB ID, 1LR1; Esposito *et al.*, 2002), *E. coli* の H-NS の溶液構造 (PDB ID, 1NI8; Bloch *et al.*, 2003), *V. cholerae* の H-NS ホモログ VicH の結晶構造 (PDB ID, 1OV9; Cerdan *et al.*, 2003) の 3 つであり, いずれも二量体で構造が解かれていた. また先の 2 つの H-NS の N 末端側については, アミノ酸配列は一残基を除いて完全一致するにも拘わらず (第 1 章 Fig. 1-3), N 末端側から数えて 3 番目のヘリックスの向きが parallel なもの (*S. enterica* Typhimurium) と anti-parallel なもの (*E. coli*) に分かれていたが, VicH ではこのヘリックスは anti-parallel に並んでいた (第 1 章 Fig. 1-2). 以上から, Pmr のモデル構造は最も確からしいと考えられる VicH の構造を鋳型として作製することにした. なおこの判断は, 後に明らかになった *S. enterica* Typhimurium の H-NS₁₋₈₃

の結晶構造 [Arold *et al.*, 2010] において当該ヘリックスの向きが anti-parallel であったことから正しかったと考えられる。

モデル構造を作製するために、まず VicH の N 末端側と Pmr_{nt61} のアミノ酸配列のアライメントを行った。代表的なアラインメントツールである CLUSTAL W やフォールド認識プログラムである FUGUE [Shi *et al.*, 2001] 及び pGenTHREADER [Lobley *et al.*, 2009] を用いて試みたが、Pmr と VicH はアミノ酸配列の相同性が低く、適切なアラインメントを得ることができなかった (CLUSTAL W で得られた結果を Fig. 2-8A に示した)。そこで、VicH や anti-parallel な H-NS の構造において二量体形成に重要な役割を果たしている疎水性残基に着目した。VicH の L28, L32, L35, V39 はロイシンジッパーを形成して二量体形成に重要な役割を果たしており (第 1 章 Fig. 1-4), これらの残基は大腸菌やサルモネラ属細菌のみならず、*Rhodobacter* 属細菌などが持つ H-NS の機能的ホモログにおいても保存されている (第 1 章 Fig. 1-5) [Rimsky, 2004]。これら 4 つの残基を、MvaT ホモログで保存されている Pmr の 4 つの疎水性残基 F36, L40, L43, Y47 にアラインした (Fig. 2-8B)。このアラインメントに基づいて Modeller [Eswar *et al.*, 2006] でモデル構造を作製し、SCWRL [Krivov *et al.*, 2009] で側鎖構造の最適化を行い、Verify 3D [Bowie *et al.*, 1991; Lüthy *et al.*, 1992] でモデル構造の評価を行った。生成した 10 個の構造のうち、最も Verify 3D スコアが良かった構造を Pmr_{nt61} のモデル構造として採用した (Fig. 2-8C)。このモデル構造において、分子表面を形成している荷電性の 22 残基 (E6, R8, E12, K15, E16, Q18, E19, R20, E22, K23, S25, N27, E28, K32, E35, E37, K38, R41, S45, K49, R52, D53, Fig. 2-8C において赤紫色で側鎖を示した) がホモ多量体形成に重要な役割を果たすのではないかと予想した。

2-3-4 Pmr_{nt61} アミノ酸置換体のホモ多量体形成能の評価

(Suzuki *et al.*, submitted 及び修士論文より改変・引用)

2-3-3 でホモ多量体形成に重要な役割を果たすと予想された 22 のアミノ酸残基について、2-2-9 の方法で一つずつアラニン置換体を作製し、Pmr_{nt61}-E6A, -R8A, …, -D53A と名付けた。タンパク質の発現は Pmr_{nt61} と同じく、30°C, IPTG 終濃度 0.1 mM で行った。全てのアラニン置換体のうち、Pmr_{nt61}-E16A は発現したタンパク質の大部分が不溶化してしまったため解析から除外した。一方 Pmr_{nt61}-R20A は不溶性画分に検出される目的タンパク質量の増加が認められたものの、2-2-14 の方法で可用化した目的タンパク質が LB 培地 1 L から約 8 mg 得られたため、解析を行うことにした。その他の 20 種類のアラニン置換体はいずれも Pmr_{nt61} 同様の良好な発現が見られたため、LB 培地 5 mL の系で発現させ、MagneHis Protein Purification System (Promega) (2-2-15) で精製した。以上 21 種類のアラニン置換体について、タンパク質間クロスリンク法 (2-2-19) でホモ多量体形成能の評価を行った。実験条件は Pmr_{nt61} に倣いタンパク質濃度 0.14 mg/mL (18 µM), DMS 濃度 5.0 mg/mL で、架橋剤添加後のインキュベーション時間を変化させて実験を行った。Tricine-SDS-PAGE で検出した結

果の代表的な例を Fig. 2-9 に示した. 各アラニン置換体の多量体形成能を評価するために, 各サンプルの Tricine-SDS-PAGE の泳動図において架橋剤添加後 60 分のレーンの単量体, 二量体, 多量体の割合を画像解析ソフト ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) で定量した. 各サンプル 60 分のレーン全体で見られたバンド強度を 100%として, 単量体, 二量体, それ以上の多量体がそれぞれ何%に相当するかを計算した結果を Fig. 2-10 に示す. Pmr_nt₆₁ については 5 回, アミノ酸置換体についてはそれぞれ 3 回の独立した実験を行い, 各データの平均値と標準偏差を求め, 多量体, 二量体, 単量体の割合についてスチューデントの *t* 検定 ($P < 0.05$) を行った. その結果, Pmr_nt₆₁-E6A, -R8A, -K15A, -Q18A, -R20A, -N27A, -K49A で Pmr_nt₆₁ と比べて多量体の割合が顕著に減少しており, これら 7 つの置換体の二量体と単量体の割合は (Pmr_nt₆₁-N27A の単量体の割合を除いて) Pmr_nt₆₁ より顕著に増加していることが明らかとなった. 以上の結果から, Pmr_nt₆₁ の E6, R8, K15, Q18, R20, N27, K49 がホモ多量体化に重要な役割を果たす残基であると考えられた. なお Pmr_nt₆₁-E12A, -S25A, -E28A, -R41A では Pmr_nt₆₁ と比べて多量体の割合が顕著に増加していたが, これら 4 つのアラニン置換体はクロスリンク後の Tricine-SDS-PAGE におけるバンドパターンが Pmr_nt₆₁ のものと比較的似ていたため (Fig. 2-9), 本研究ではアラニン置換によるバンドパターンの変化が大きかった上述の 7 残基に焦点を当てて解析を進めることにした.

2-3-5 Pmr_nt₆₁C 末端側のホモ多量体形成への寄与の評価 (Suzuki *et al.*, submitted より改変・引用)

2-3-4 で同定された Pmr_nt₆₁ のホモ多量体形成に重要な 7 残基の分布をモデル構造上で確認したところ, 3 つの α -ヘリックスを N 末端側から $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ と名付けた場合, K49 を除く 6 残基が $\alpha 1$, $\alpha 2$ 及び隣接するループ上に存在することが明らかとなった (Fig. 2-11). このことから, Pmr_nt₆₁ は主に N 末端側を用いてホモ多量体を形成することが示唆された. 一方, ホモ多量体を形成した状態で取得された *S. enterica* Typhimurium の H-NS の結晶構造では, H-NS は 2 つの二量体化部位を用いることで多量体を形成することが示されている. すなわち, Fig. 2-8A のヘリックス H1 と H2 を用いて隣の分子と二量体を形成し (この部位は「Site 1」と呼ばれる), H3 の C 末端側と H4 を用いて反対側の分子と二量体を形成する (この部位は「Site 2」と呼ばれる) ことを繰り返して多量体を形成している (第 1 章 Fig. 1-7) [Arold *et al.*, 2010]. もし Pmr と H-NS が同様の多量体形成機構を持つと仮定すると, 上述の K49 を除く 6 残基が $\alpha 1$, $\alpha 2$ 及び隣接するループ上に存在することから, $\alpha 1$, $\alpha 2$ が Pmr の Site 1 を構成すると予想される. しかし Site 2 を構成すると予想される $\alpha 3$ の C 末端側では, 2-3-4 の解析から候補と考えられたのは K49 のみであった. ただ 2-3-4 の解析を行った当時, Pmr_nt₆₁ の C 末端側 6 残基 (N 末端側から数えて 56-61 残基) についてはモデル構造上でヘリックスを形成していなかったため, アラニン置換の対象から除外していたという経緯があった. そこで Pmr の Site 2 がこの領域に存在するか確かめるため, Pmr の N 末端側 55 残

基から成るタンパク質を作成し、ホモ多量体形成能を確認することにした。

Pmr の N 末端側 55 残基を発現するプラスミドは pET26b(+)-ベクターを用いて作製し、2-3-2 の結果を基に C 末端側に His-tag が付加されるように設計した。発現条件検討のため最初を取得したクローンでは、25°C、30°C、IPTG 終濃度 0.1 mM、0.5 mM のいずれの組み合わせでも可溶性画分・不溶性画分共に目的タンパク質の発現が見られなかったため、複数のクローンを取得し、IPTG を終濃度 0.1 mM に固定して、25°C と 30°C で発現を試みた。3 クローンについて細胞抽出液由来のタンパク質を Tricine-SDS-PAGE に供した結果を Fig. 2-12A に示した。この結果から、いずれのクローンでも同様に目的タンパク質が発現していること、30°C、IPTG 終濃度 0.1 mM の方がより発現量が多いことが示された。よってこのタンパク質を Pmr_nt₅₅ と名付け、誘導培養後の大腸菌から 2-2-13 の方法に従って得られた細胞抽出液を用いて metal chelate affinity chromatography (2-2-14) により目的タンパク質を精製した。Pmr_nt₅₅ は 100 mM イミダゾールで夾雑タンパク質を洗浄後、475 mM に上昇させることで溶出させ (Fig. 2-12B)、十分に精製できたことを Tricine-SDS-PAGE によって確認した (Fig. 2-12C)。この方法で精製できたタンパク質を LB 培地 1 L あたりに換算すると約 8 mg であった。そこで Pmr_nt₅₅ のホモ多量体形成能を調べるため、タンパク質間クロスリンク法による解析を行った。架橋剤 DMS の濃度を決定するためにタンパク質濃度を 0.14 mg/mL (22 μM)、架橋剤添加後のインキュベーション時間を 60 分に固定して、DMS の濃度を変化させて実験を行った。Tricine-SDS-PAGE で検出した結果を Fig. 2-13A に示す。DMS の濃度が 5.0 mg/mL までは濃度依存的に架橋がかかっている単量体の割合が少なくなり、代わりに二量体 (分子量約 16 k) やさらに大きな分子量を持つ多量体の割合が増加した。一方、DMS の濃度が 10 mg/mL では 5.0 mg/mL の時と比べて Tricine-SDS-PAGE のバンドパターンは変化しなかった。よって、DMS 濃度は 5.0 mg/mL に決定した。次に、DMS 添加後のインキュベーション時間を変化させて実験を行い、Tricine-SDS-PAGE で検出した結果を Fig. 2-13B に示した。この結果でも、架橋剤添加後の時間が長くなるにつれて架橋がかかっている単量体の割合が少なくなり、代わりに二量体やさらに大きな分子量を持つ多量体の割合が増加した。以上から Pmr_nt₅₅ は多量体を形成することが示され、Pmr の N 末端側から 56-61 残基はホモ多量体形成に関与しないことが明らかとなった。すなわち、Pmr_nt₆₁ の C 末端側が Pmr の Site 2 を構成する可能性は否定された。

2-3-6 Flexible linker のホモ多量体形成への寄与の評価

(Suzuki *et al.*, submitted より改変・引用)

S. enterica Typhimurium の H-NS の Site 2 は H3、H4 の 2 つのヘリックスから成るが、多量体形成時の結晶構造が取得される以前は H3 の C 末端側及び H4 の存在は知られておらず、これらの領域は flexible linker を形成すると考えられていた [Arold *et al.*, 2010]。またこの領域を除いたタンパク質は二量体を形成することから [Esposito *et al.*, 2002; Bloch *et al.*, 2003;

Cerdan *et al.*, 2003; Leonard *et al.*, 2009], かつては flexible linker がホモ多量体形成に重要であるとも言われていた [Dorman, 2004]. Pmr の場合, 推定 flexible linker 領域である 62~73 番目の残基を持たない Pmr_nt₆₁ ホモが多量体を形成することから, flexible linker が多量体形成に重要な役割を果たす可能性は低いと考えられる. しかし, flexible linker が Pmr のホモ多量体形成を補助する可能性を排除するため, 二量体/多量体化ドメインに加えて flexible linker を持つタンパク質において, 2-3-4 で同定したアラニン置換を導入した場合の多量体形成能を確認することにした.

まず Pmr の N 末端側 73 残基 (二量体/多量体化ドメインと推定 flexible linker 領域を含む, Fig. 2-4) を発現するプラスミドを pET26b(+)ベクターを用いて作製した. 2-3-2 の結果を基に C 末端側に His-tag が付加されるように設計した. 発現条件検討は LB 培地 5 mL で 2-2-13 の方法に従って行い, Tricine-SDS-PAGE に細胞抽出液由来のタンパク質を供した (Fig. 2-14A). この結果から 30°C, IPTG 終濃度 0.1 mM が最適な発現条件であると判断し, このタンパク質を Pmr_nt₇₃ と名付けた. 上述の条件で発現させたタンパク質を MagneHis Protein Purification System (Promega) (2-2-15) で精製し, 十分に精製できたことが確認されたため (Fig. 2-14B), Pmr_nt₇₃ のホモ多量体形成能をタンパク質間クロスリンク法で確認した. 架橋剤 DMS の濃度を決定するためにタンパク質濃度を 0.14 mg/mL (16 µM), 架橋剤添加後のインキュベーション時間を 60 分に固定して, DMS の濃度を変化させて実験を行った. Tricine-SDS-PAGE で検出した結果を Fig. 2-15A に示す. DMS の濃度が 1.0 mg/mL までは濃度依存的に架橋がかかっている単量体の割合が少なくなり, 代わりに二量体 (分子量約 17 k) やさらに大きな分子量を持つ多量体の割合が増加した. 一方, DMS の濃度が 5.0 mg/mL 以上では 1.0 mg/mL の時と比べて Tricine-SDS-PAGE のバンドパターンは変化しなかった. よって DMS 濃度を 1.0 mg/mL に固定し, DMS 添加後のインキュベーション時間を変化させて実験を行い, Tricine-SDS-PAGE で検出した結果を Fig. 2-15B に示した. この結果でも, 架橋剤添加後の時間が長くなるにつれて架橋がかかっている単量体の割合が少なくなり, 代わりに二量体やさらに大きな分子量を持つ多量体の割合が増加した. 以上から Pmr_nt₇₃ は予想通り多量体を形成することが示された.

そこで Pmr_nt₇₃ のアラニン置換体を作製することにした. 導入するアラニン置換としては, Pmr_nt₆₁ で最も多量体形成能が低下した R8A (Fig. 2-10) を選択し, このアラニン置換体を Pmr_nt₇₃-R8A と名付けた. タンパク質の発現・精製は Pmr_nt₇₃ と同じ条件で行い, DMS の濃度を 1.0 mg/mL に固定し, インキュベーション時間を変化させてタンパク質間クロスリンク法による解析を行った (Fig. 2-15B). その結果, Pmr_nt₇₃-R8A は Pmr_nt₇₃ と比べて多量体形成能が低下していることが確認できた. しかし Fig. 2-15B と, Pmr_nt₆₁ と Pmr_nt₆₁-R8A の多量体形成能を比較した Fig. 2-9 の最初のゲルの画像を比べると, R8A 導入による多量体形成能の低下の度合いは Pmr_nt₆₁ と Pmr_nt₇₃ とで同程度であった. もし flexible linker が Pmr の多量体形成を補助するのであれば, Pmr_nt₇₃-R8A の方が Pmr_nt₆₁-R8A よりも多量体形成能が回復することを期待しての実験であったが, そのような傾向は見られなかった. 以上よ

り、Pmr の flexible linker はホモ多量体形成に関与しないことが示された。

上述の結果をさらに裏付けるため、Pmr 全長についても同様のアラニン置換を導入し、Pmr-R8A と名付け、多量体形成能の変化を調べることにした。タンパク質の発現・精製は Pmr と同様に 2-3-1 に従い、DMS の濃度を 1.0 mg/mL に固定し、インキュベート時間を変化させてタンパク質間クロスリンク法による解析を行った (Fig. 2-16)。その結果、Pmr-R8A はやはり Pmr に比べて多量体形成能が低下していた。また、これまでの解析は全てタンパク質間クロスリンク法で多量体形成能を評価していたため、別の手法として、ゲルろ過クロマトグラフィーでも Pmr と Pmr-R8A の多量体形成能を比較することにした。カラムは 2-3-1 と同じ物を使用したが、バッファーはアフィニティー精製直後のサンプルのバッファーに近付けるため 2-2-14 の buffer B を使用し、2-2-17 の方法に従って分子量推定のための検量線を新たに作製した (Fig. 2-17A)。Pmr と Pmr-R8A を 140 μ M で 1 mL ずつカラムに供した際の溶出プロファイルを図 2-17B に示す。Pmr では図中に 1~3 で示した 3 つのピークが見られ、各ピークから一定体積を Tricine-SDS-PAGE に供すると、いずれのピークでも Pmr が検出された (Fig. 2-17C)。それぞれの推定分子量は、1 = 760 k (52-mer 相当)、2 = 520 k (35-mer 相当)、3 = 80 k (5-mer 相当) であった。一方 Pmr-R8A では図中に 1, 2 で示した 2 つのピークが見られたが、1 のピークではタンパク質は検出されず (Fig. 2-17C)、さらに高濃度の Pmr-R8A を同条件でカラムに供した場合このピークは大きくならなかった (第 5 章 Fig. 5-1) ことから、1 のピークは Pmr-R8A に由来するものではないと考えられた。一方、Pmr-R8A に由来する 2 のピークの推定分子量は 94 k (6-mer 相当) であったことから、Pmr-R8A はやはり Pmr よりもホモ多量体形成能が低下していると考えられた。以上より、上述のタンパク質間クロスリンク法を用いた解析は「架橋のかかりやすさ」ではなく各アラニン置換体のホモ多量体形成能を反映している可能性が高く、Pmr の flexible linker 及び DNA 結合ドメインはホモ多量体化に関与しないことが強く示唆された。

2-4 考察

H-NS や MvaT において多量体形成能は遺伝子の転写抑制に重要であることが知られている [Ueguchi *et al.*, 1996; Castang and Dove, 2010]. また H-NS と MvaT の両者において、二量体／多量体化ドメインは N 末端側に存在することが明らかとなっている [Ueguchi *et al.*, 1996; Esposito *et al.*, 2002; Leonard *et al.*, 2009; Arold *et al.*, 2010; Castang and Dove, 2010]. 本章ではまず Pmr が H-NS や MvaT と同様にホモ多量体形成能を有すること、N 末端側に二量体／多量体化ドメインを持つことを確認し、Pmr の二量体／多量体化ドメインである Pmr_nt₆₁ を用いてホモ多量体形成に重要な残基の同定を行った。その結果 7 残基 (E6, R8, K15, Q18, R20, N27, K49) が Pmr_nt₆₁ のホモ多量体形成に重要な残基として同定されたが (Fig. 2-10), このうち K49 を除く 6 残基は Pmr のモデル構造上で N 末端側の 2 つのヘリックス ($\alpha 1$ と $\alpha 2$) 及び隣接するループ上に存在していた (Fig. 2-11). さらに Pmr_nt₆₁ の C 末端側を削った Pmr_nt₅₅ のホモ多量体形成能は Pmr_nt₆₁ と変わらず、二量体／多量体化ドメインに加えて推定 flexible linker 領域を持つ Pmr_nt₇₃ や全長の Pmr でも、Pmr_nt₆₁ でホモ多量体形成能が低下したアラニン置換の一つ (R8A) を行うとホモ多量体形成能が低下したことから、Pmr では推定 flexible linker 近傍領域のホモ多量体形成への関与は少なく、二量体／多量体化ドメインの N 末端側がホモ多量体形成に主要な役割を果たすと考えられた (Fig. 2-18). 以上の結果と、*S. enterica* Typhimurium の H-NS では二量体／多量体化ドメインの N 末端側 (Site 1) に加えて flexible linker 近傍の C 末端側 (Site 2) の両方がホモ多量体形成に重要であることを考慮すると、Pmr のホモ多量体形成機構は H-NS とは異なる可能性が高いと考えられる。大腸菌の *hns* 破壊による表現型を相補できる因子として *Pseudomonas* 属細菌の MvaT が注目されて以来、MvaT ホモログはアミノ酸配列こそ H-NS と異なるものの細胞内では基本的に H-NS と同じ機能を果たし、同じ分子機構を持つと信じられてきたが、本章の結果は H-NS と MvaT ホモログが少なくとも多量体形成において異なる分子機構を持つことを示唆する結果と言える。最近ではグラム陰性細菌のみならず、グラム陽性細菌 *Mycobacterium tuberculosis* でも H-NS の機能的ホモログ Lsr2 が発見され精力的に研究が進められており [Gordon *et al.*, 2008; Gordon *et al.*, 2010; Gordon *et al.*, 2011], 腸内細菌の H-NS とその他の細菌が持つ H-NS の機能的ホモログとの共通点と差異に興味を持たれる。

なお本章の一部には *P. aeruginosa* の MvaT で得られている知見と矛盾する結果が含まれている。MvaT は bacterial two-hybrid assay により N 末端側から 2~35 残基が二量体形成に、35~62 残基が多量体形成に寄与すること、N 末端側から 62 残基では多量体を形成するものの、55 残基では多量体を形成しなくなることが示されている [Castang and Dove, 2010]. 一方本章では、Pmr は N 末端側から 55 残基でホモ多量体を形成することが示された (Fig. 2-13). MvaT の場合、本章で Pmr_nt₆₁ の多量体化に重要と同定された 7 残基のうち 6 残基が保存されており、二量体／多量体化ドメイン全体ではアミノ酸配列の 70% が保存されている (Fig. 2-4). 実験手法の違いにより異なる結果が得られた可能性は否定できないものの、2 つのタ

ンパク質間で保存されていない残基が MvaT と Pmr のホモ多量体形成機構に差を生んでいる可能性もある。残念なことに、現時点では MvaT ホモログの構造が一つも報告されていないため、MvaT と Pmr の違いや H-NS と MvaT ホモログの違いを構造レベルで議論することができない。更なる議論のためには MvaT ホモログの構造情報の取得が必須と言えるだろう。

なお本章の内容については以下の原著論文で発表した。

Suzuki C, Yun CS, Umeda T, Terabayashi T, Watanabe K, Yamane H, Nojiri H. 2011. Oligomerization and DNA-binding capacity of Pmr, a histone-like protein H1 (H-NS) family protein encoded on IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**:711-717.

Suzuki C, Kawazuma K, Horita S, Terada T, Tanokura M, Okada K, Yamane H, Nojiri H. Oligomerization mechanisms of an H-NS family protein, Pmr, encoded on the plasmid pCAR1 provide a molecular basis for functions of H-NS family members. *PLoS One* submitted.

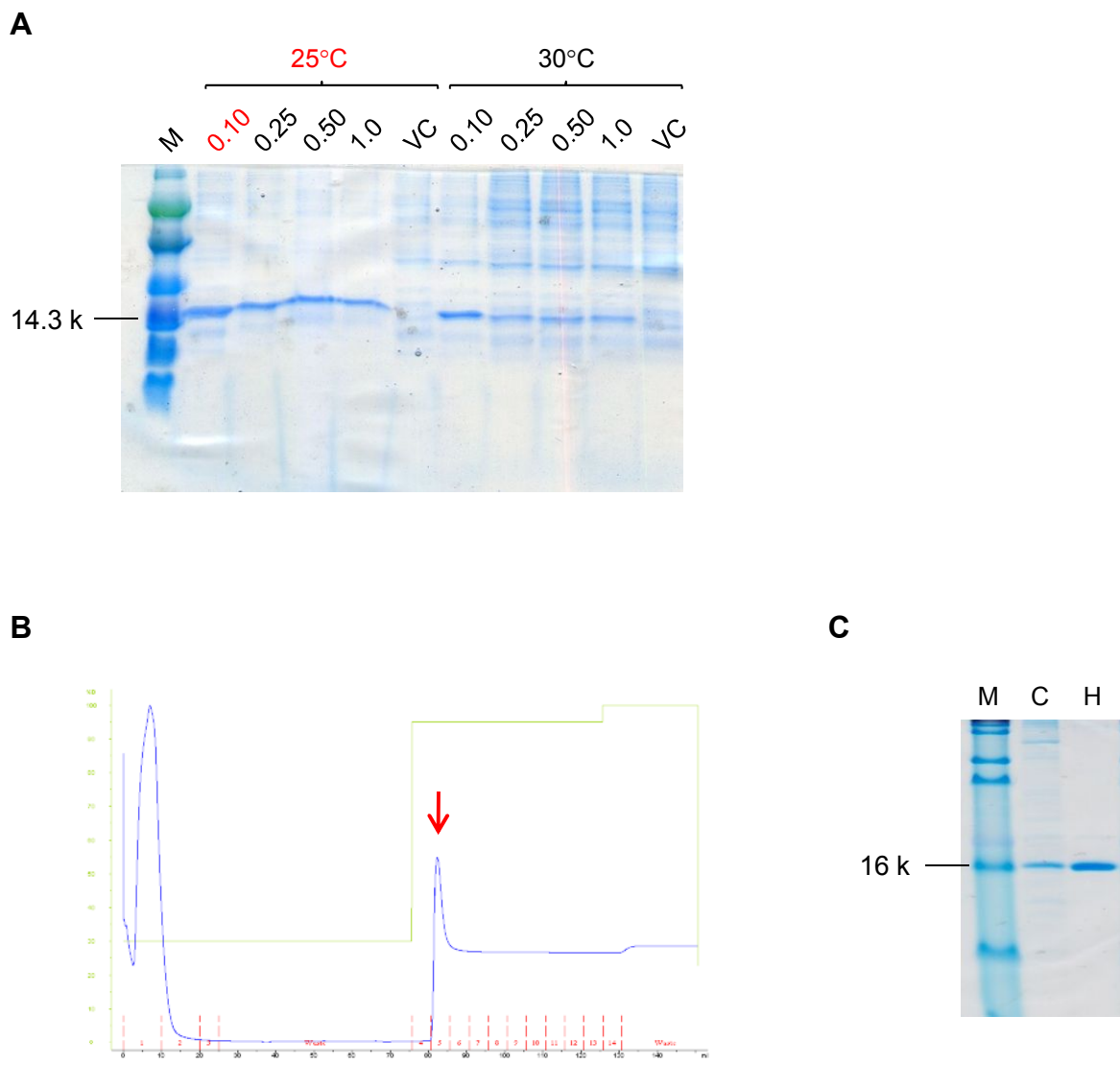


Fig. 2-1. Pmrの大腸菌における発現条件検討とアフィニティー精製.

(A) Pmrの発現条件検討. Mはマーカを, VCはベクターコントロールを, 各レーンの数値はIPTG濃度 (mM) を表す. 細胞抽出液由来のタンパク質を1 μ gずつSDS-PAGEに供した. また最適な発現条件と判断した温度, IPTG濃度を赤字で示した. (B) Metal chelate affinity chromatographyにおける溶出プロファイル. 目的タンパク質のピークを赤い矢印で示した. 青い線はタンパク質由来の波長280 nmの吸光度を, 黄緑色の線はbuffer B (0.5 Mイミダゾールを含む) の割合 (縦軸) を, 赤い線と数字はフラクションを表す. (C) 精製状態の確認. Mはマーカを, Cは細胞抽出液を, Hはアフィニティー精製後のサンプルを表す. 各レーン3 μ gのタンパク質をSDS-PAGEに供した.

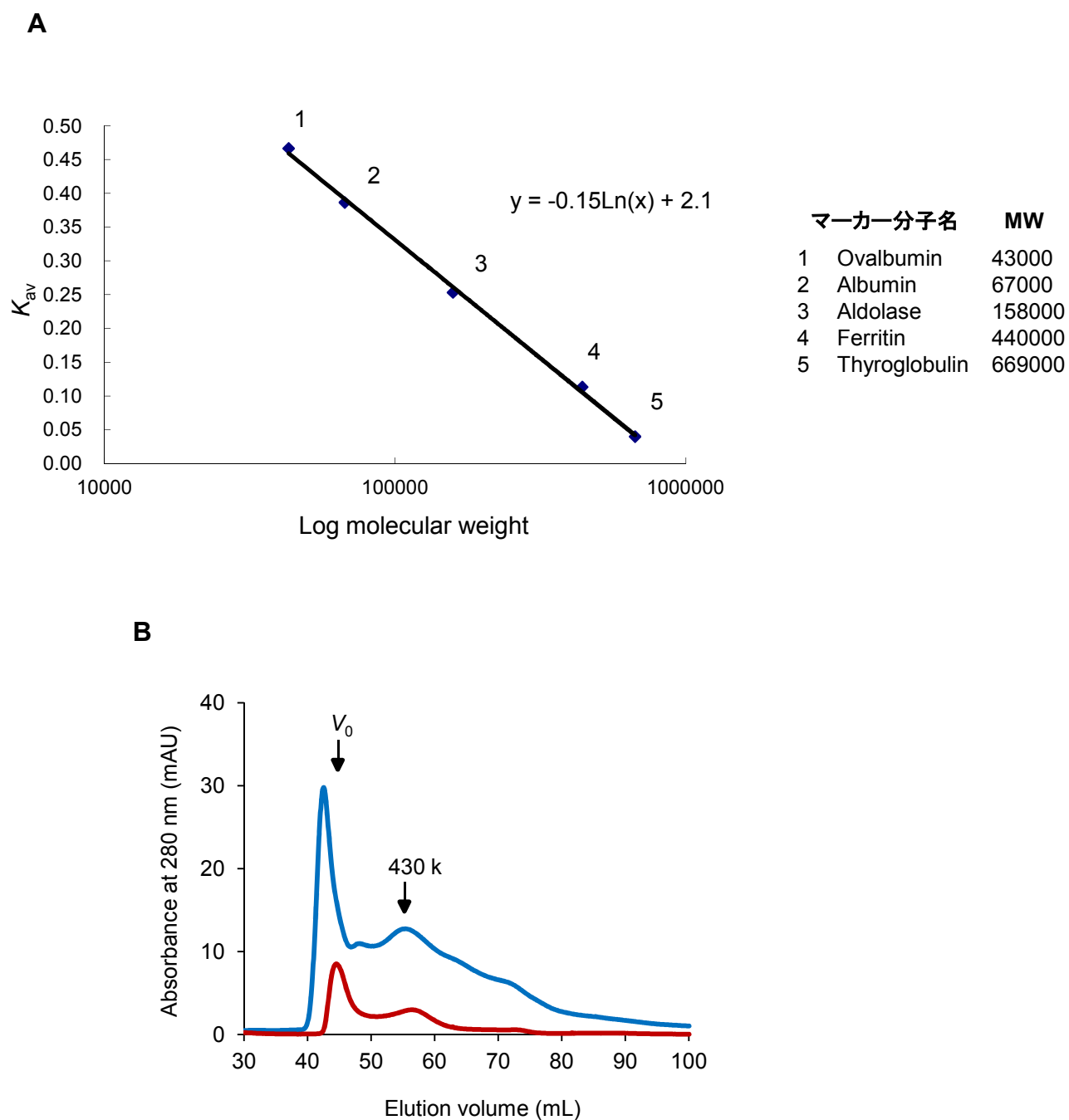


Fig. 2-2. ゲルろ過クロマトグラフィーによるPmrの会合度の確認.

(A) Buffer Aを使用した際の分子量推定のための検量線. 横軸は分子量の対数 ($\log_{10}\text{MW}$) を, 縦軸は分配係数 K_{av} を表す. 検量線作製のために使用した標準タンパク質を図中に示した. (B) Pmrの溶出プロファイル. 縦軸はタンパク質由来の波長280 nmの吸光度を, 横軸は溶出容量を表す. 青色線はPmr 120 μM , 赤色線は20 μM でカラムに供した時の結果を表す. 検量線から推定される分子量とvoid volume ($V_0 = 45 \text{ mL}$) を図中に示した.

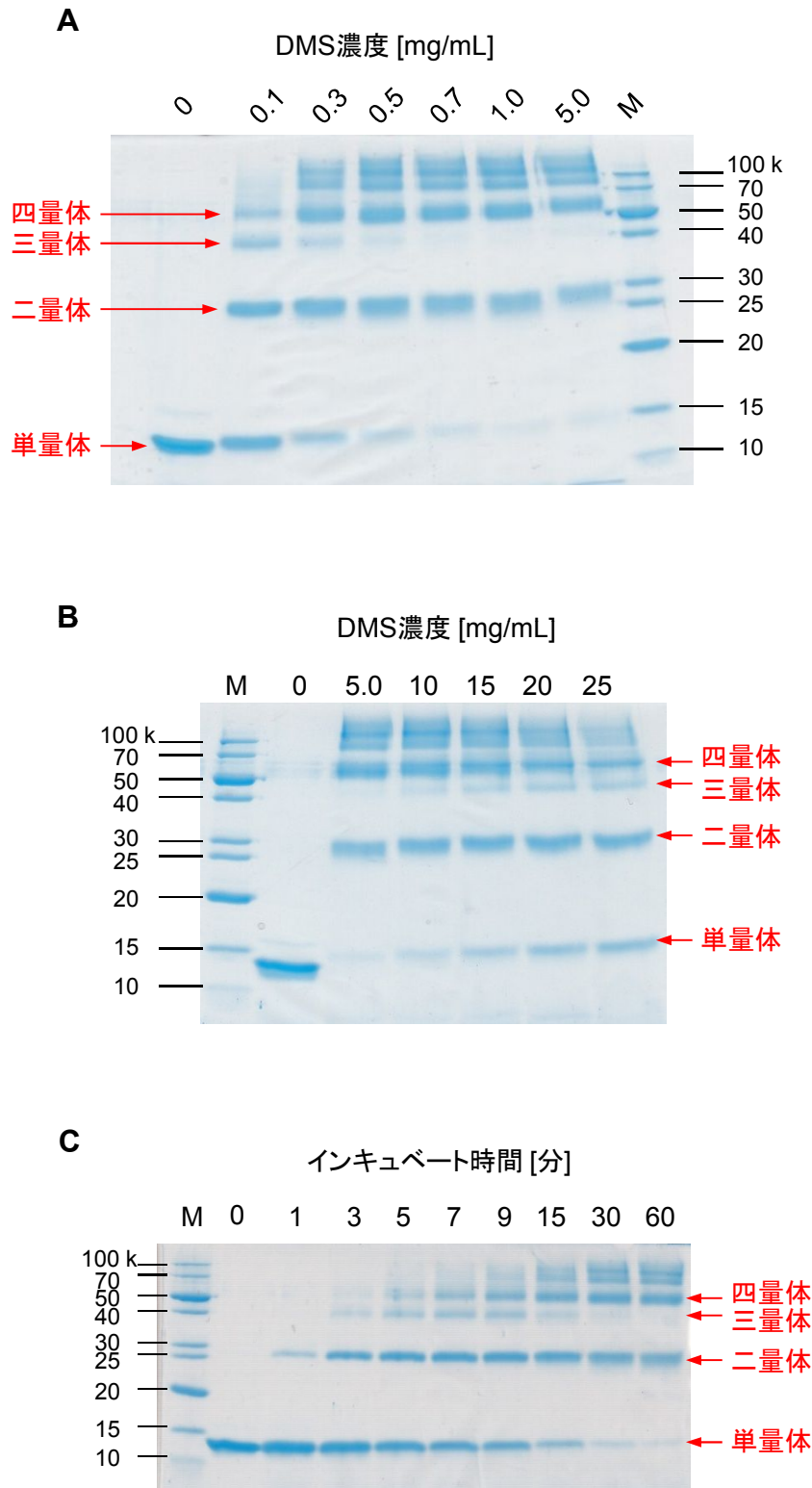


Fig. 2-3. タンパク質間クロスリンク法によるPmrの会合度の確認.

(A), (B) 架橋剤 (DMS) の濃度の検討. Pmrを0.14 mg/mL (9.6 μ M) に調整し, DMS添加後に60分間インキュベートしたサンプルを2 μ gずつ供したSDS-PAGEの結果を示した. Mはマーカを, 各レーンの数値は添加したDMSの濃度 (mg/mL) を表している. (C) 経時的なバンドパターンの変化. Pmrを0.14 mg/mL (9.6 μ M) に調整し, DMSを1.0 mg/mLで添加したサンプルを供したSDS-PAGEの結果を示した. Mはマーカを, 各レーンの数値はDMS添加後のインキュベート時間(分)を表している. 単量体, 二量体, 三量体, 四量体に相当するバンドを図中に示した.



Fig. 2-4. Pmr, MvaT, TurA, TurBのアミノ酸配列のアラインメント.

CLUSTAL W ver. 2.1.を用いて作成した. 2~4種類のタンパク質間で一致した残基については赤色で示した. 本研究で明らかになったPmrの二量体/多量体化ドメイン及びDNA結合ドメインと, 各タンパク質において相当する領域を図中に示した. 本研究で示されたPmrの多量体化に重要な7残基と, 各タンパク質で対応する残基については水色で示した.

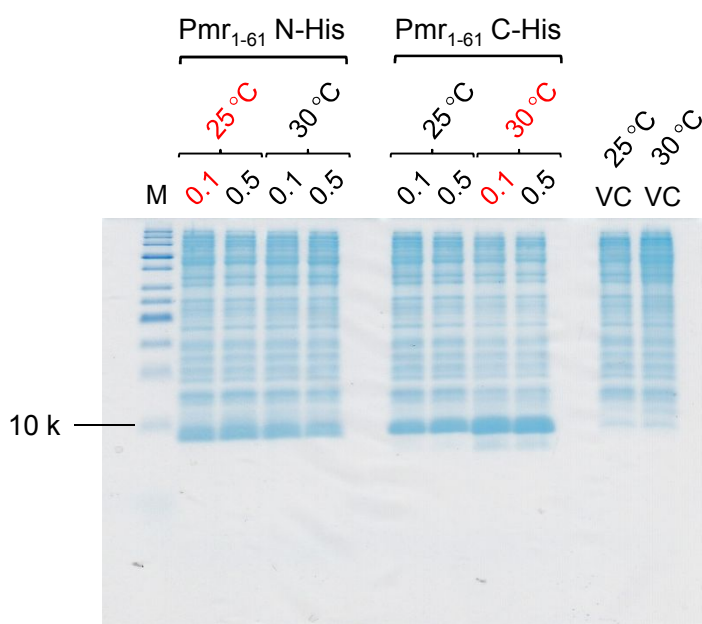


Fig. 2-5. Pmr₁₋₆₁ N-His, C-Hisの大腸菌における発現条件検討.

Mはマーカ―を, VCはベクターコントロールを, 各レーンの数値はIPTG濃度 (mM) を表す. 細胞抽出液由来のタンパク質3 µgをTricine-SDS-PAGEに供した. また最適な発現条件と判断した温度, IPTG濃度を赤字で示した.

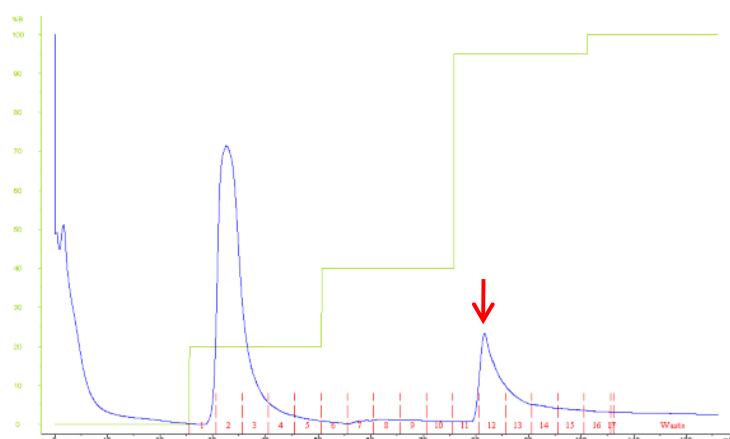
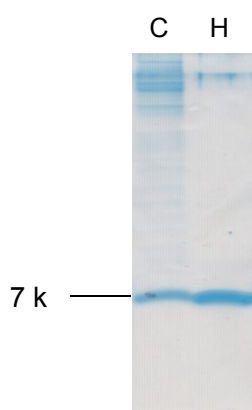
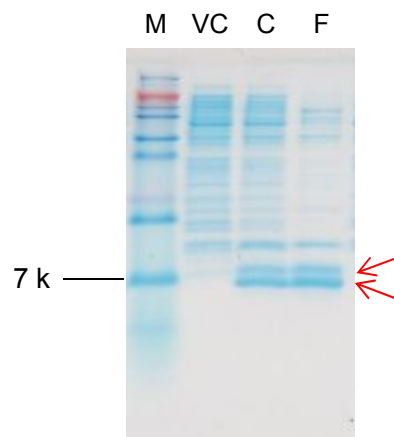
A**B****C****D**

Fig. 2-6. Pmr₁₋₆₁ N-His, C-Hisのアフィニティー精製.

(A) Pmr₁₋₆₁ C-Hisの溶出プロファイル. 目的タンパク質のピークを赤い矢印で示した. 青い線はタンパク質由来の波長280 nmの吸光度を, 黄緑色の線はbuffer B(0.5 Mイミダゾールを含む)の割合(縦軸)を, 赤い線と数字はフラクションを表す. (B) (A)で得られたタンパク質の精製度の確認. Mはマーカを, Cは細胞抽出液を, Hはアフィニティー精製後のサンプルを表す. (C) MagneHis Protein Purification System (Promega) で精製したPmr₁₋₆₁ C-Hisの精製度の確認. Cは細胞抽出液を, Hはアフィニティー精製後のサンプルを表す. (D) Pmr₁₋₆₁ N-Hisがアフィニティー精製用のカラムに結合しないことの確認. Mはマーカを, VCはベクターコントロールを, Cは細胞抽出液を, Fはflow throughのサンプルを表す. ベクターコントロールでは見られないバンドを赤い矢印で示した. なお(B), (C), (D)については各サンプル2 µgをTricine-SDS-PAGEに供した.

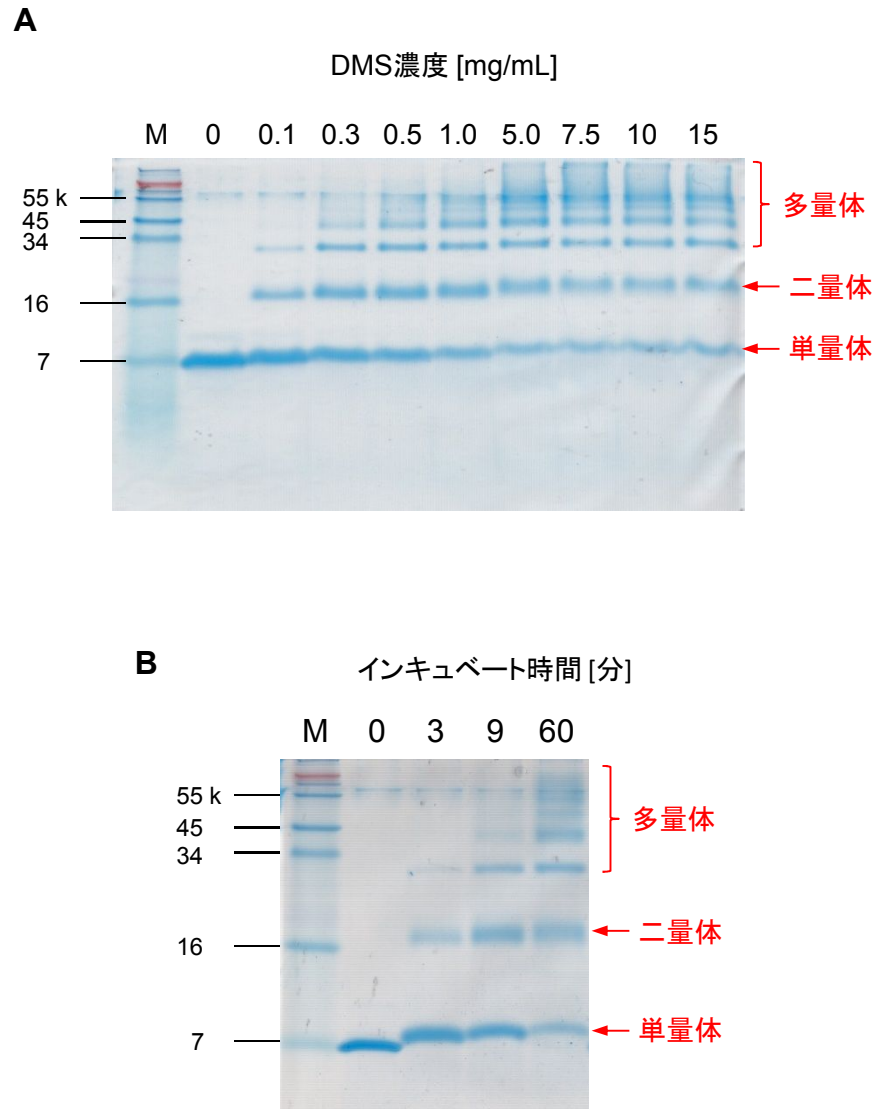


Fig. 2-7. タンパク質間クロスリンク法によるPmr_nt₆₁の会合度の確認.

Pmr_nt₆₁の濃度を0.14 mg/mL (18 μ M) に調整し、架橋反応後のサンプルを2 μ gずつ供したTricine-SDS-PAGEの結果を示した。Mはマーカを、各レーンの数値は(A) DMS濃度、(B) DMS添加後のインキュベート時間を表している。(A)ではDMS添加後60分インキュベートを行い、(B)ではDMSを5.0 mg/mLに固定して実験を行った。単量体、二量体、多量体に相当するバンドを図中に示した。

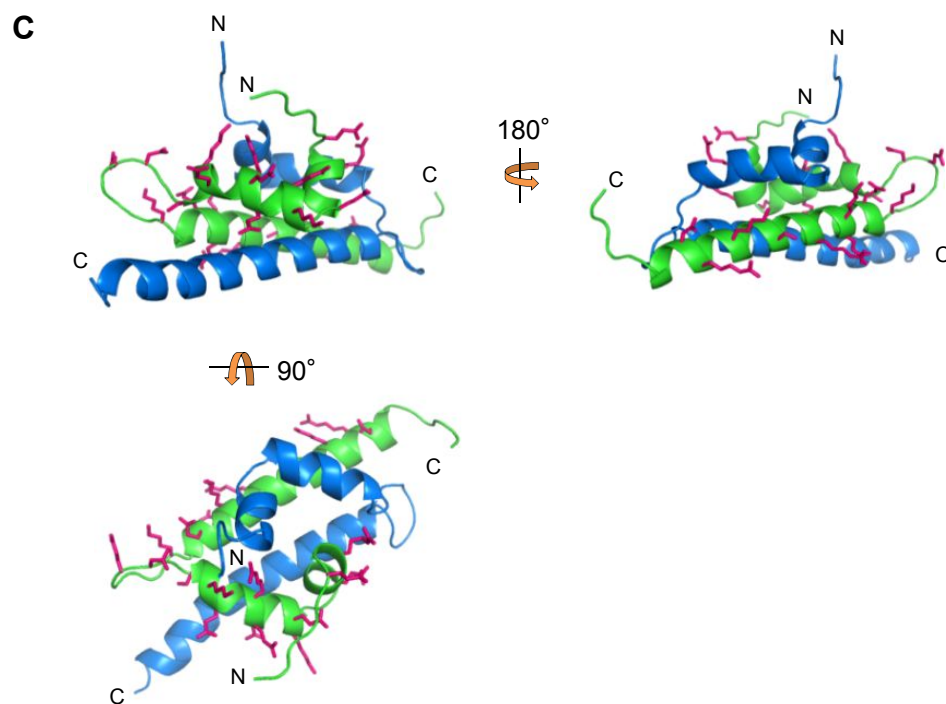
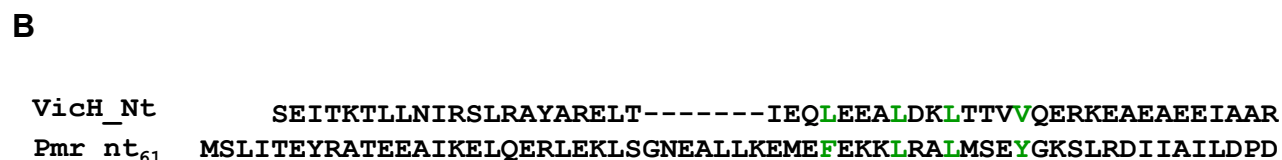
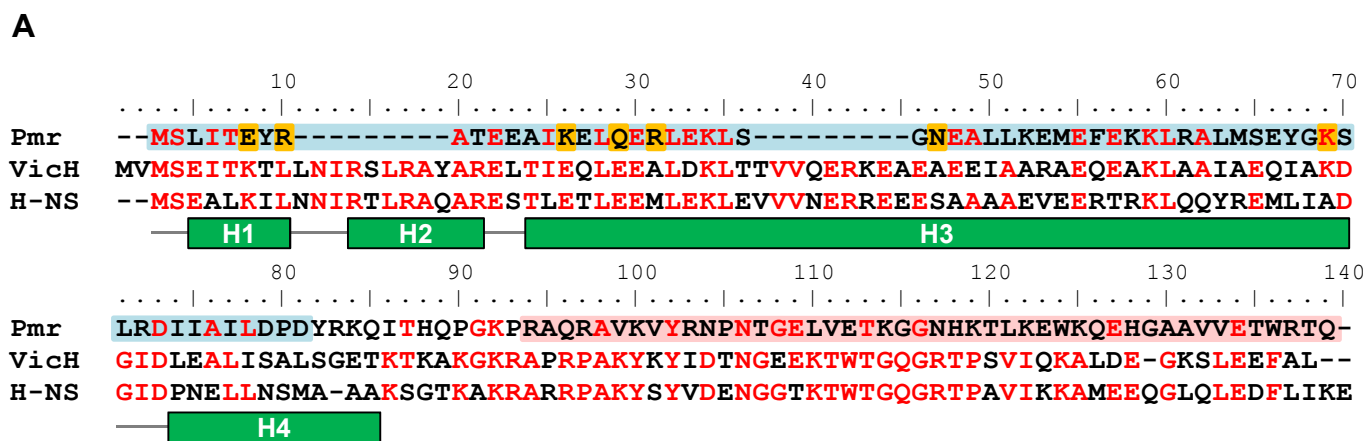


Fig. 2-8. Pmr_nt₆₁のモデル構造の作製.

(A) Pmr, *V. cholerae*のVicH, *S. enterica* TyphimuriumのH-NSのアミノ酸配列のアラインメント. CLUSTAL W ver.2.1.を用いて作成した. 2~3種類のタンパク質間で一致した残基については赤色で示した. 本研究で明らかになったPmrの二量体/多量体化ドメインを水色で, DNA結合ドメインをピンク色で, Pmrのホモ多量体化に重要な7残基をオレンジ色で示した. 図中にAroldらの2010年の報告で明らかとなったH-NSの二次構造を示した. 灰色線は決まった構造をとっていないループを, 緑色の四角はヘリックスを, H1~H4はAroldらの論文で使用された各ヘリックスの名前を表す.

(B) 二量体構造を支える疎水性残基に着目したPmr_nt₆₁とVicH_Nt (VicHの4~53残基) のアラインメント. アラインに主に使用したVicH_NtのL28, L32, L35, V39とPmr_nt₆₁のF36, L40, L43, Y47を緑色で示した.

(C) 本研究で作製したPmr_nt₆₁二量体のモデル構造. 二量体を構成する単量体をそれぞれ緑色, 青色で示し, 緑色の単量体にはホモ多量体形成に関わると予想された22残基の側鎖を赤紫色で示した. 単量体のN, C末端を図中に“N”, “C”で示した.

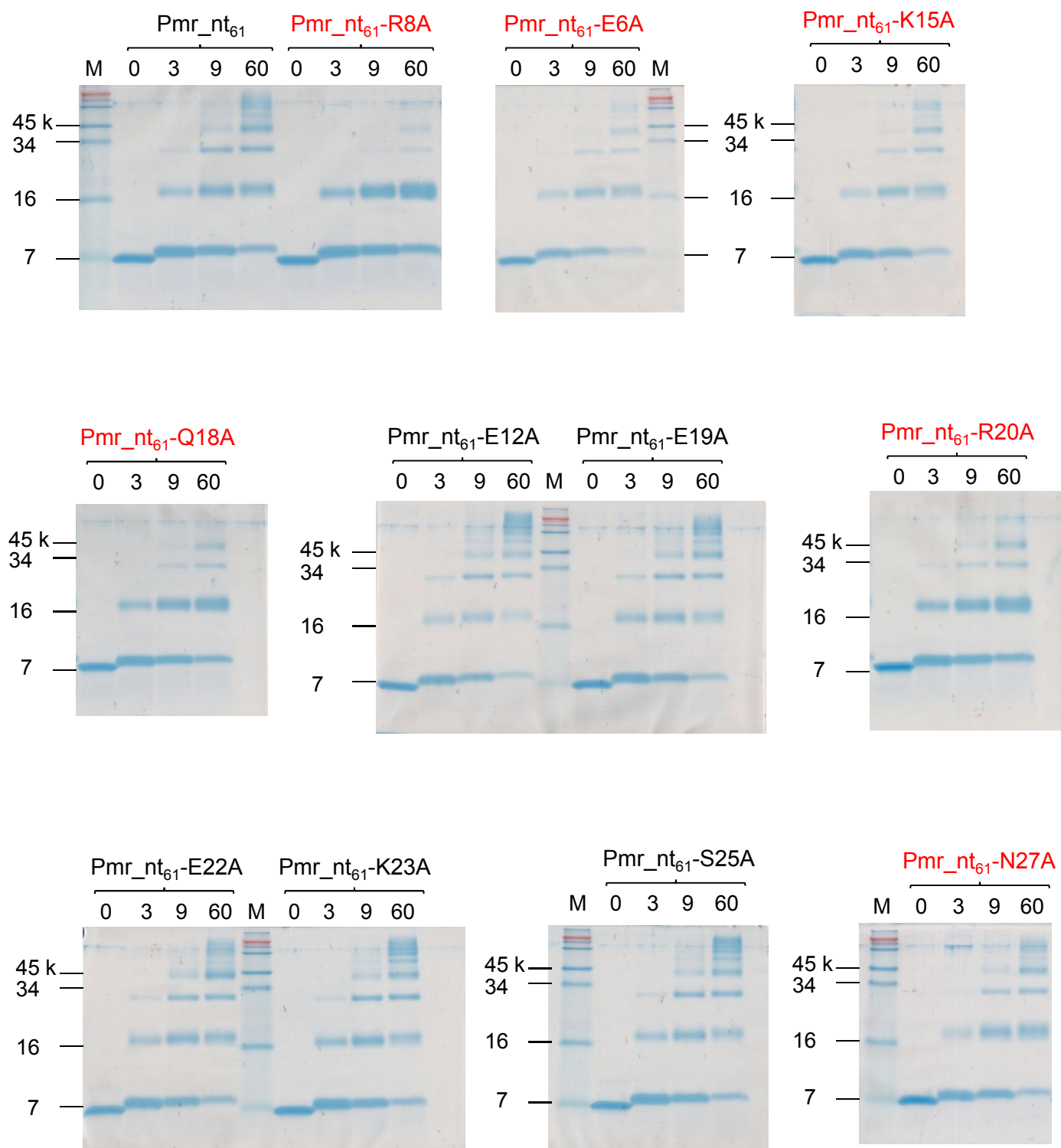


Fig. 2-9. タンパク質間クロスリンク法によるPmr_nt₆₁アラニン置換体の会合度の確認.

各タンパク質の濃度を0.14 mg/mL (18 μ M) に調整し, DMSを5.0 mg/mLで添加した後, 経時的に分取したサンプルを2 μ gずつ供したTricine-SDS-PAGEの結果を示した. Mはマーカーを, 各レーンの数値はDMS添加後のインキュベート時間(分)を表す. 各アラニン置換体のうちPmr_nt₆₁より多量体形成能が低下したと判断されたものは赤字で示した.

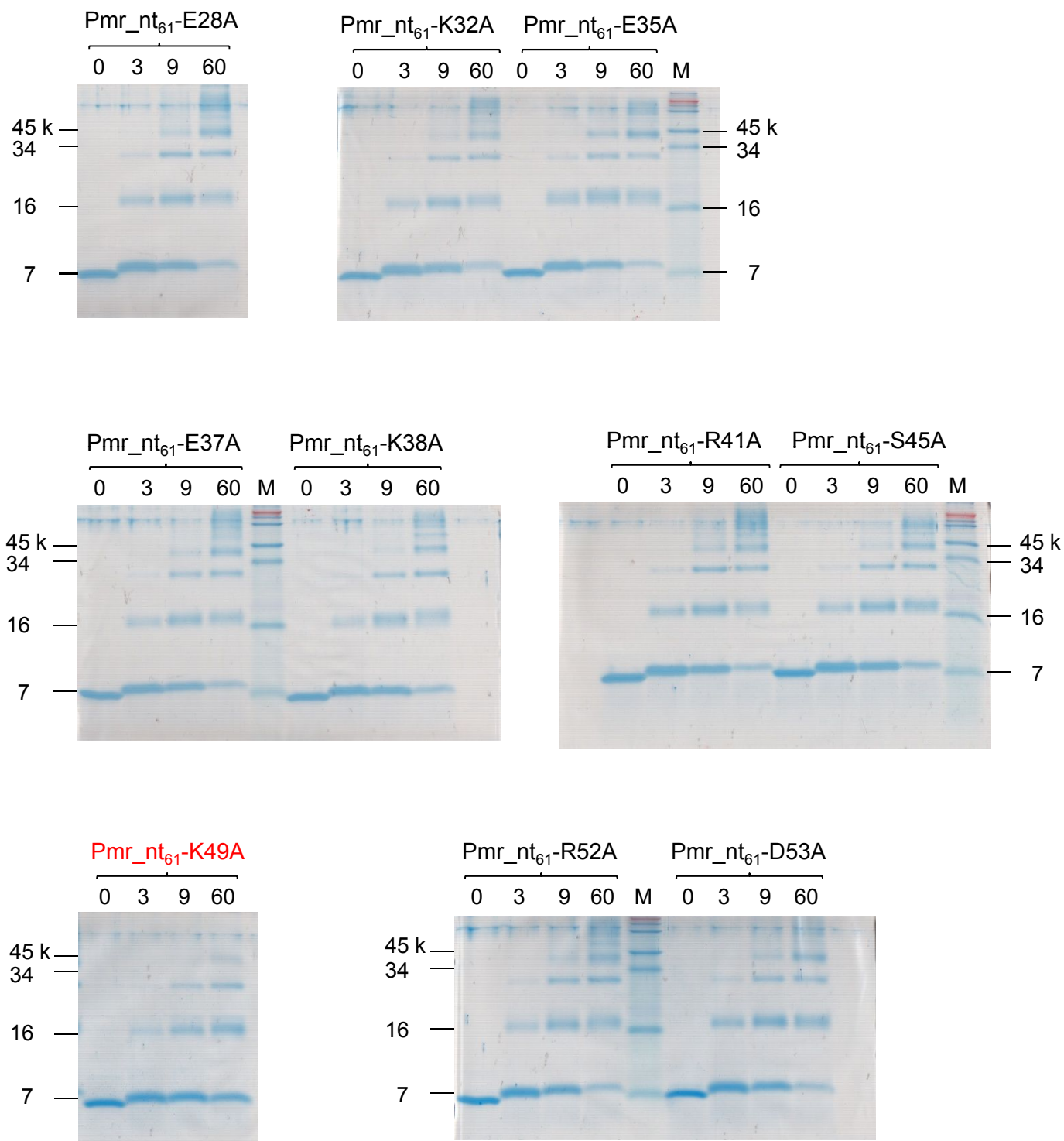


Fig. 2-9. タンパク質間クロスリンク法によるPmr_{nt61}アラニン置換体の会合度の確認(続き).
 各タンパク質の濃度を0.14 mg/mL (18 μ M) に調整し, DMSを5.0 mg/mLで添加した後, 経時的に分取したサンプルをを2 μ gずつ供したTricine-SDS-PAGEの結果を示した. Mはマーカを, 各レーンの数値はDMS添加後のインキュベート時間(分)を表す. 各アラニン置換体のうちPmr_{nt61}より多量体形成能が低下したと判断されたものは赤字で示した.

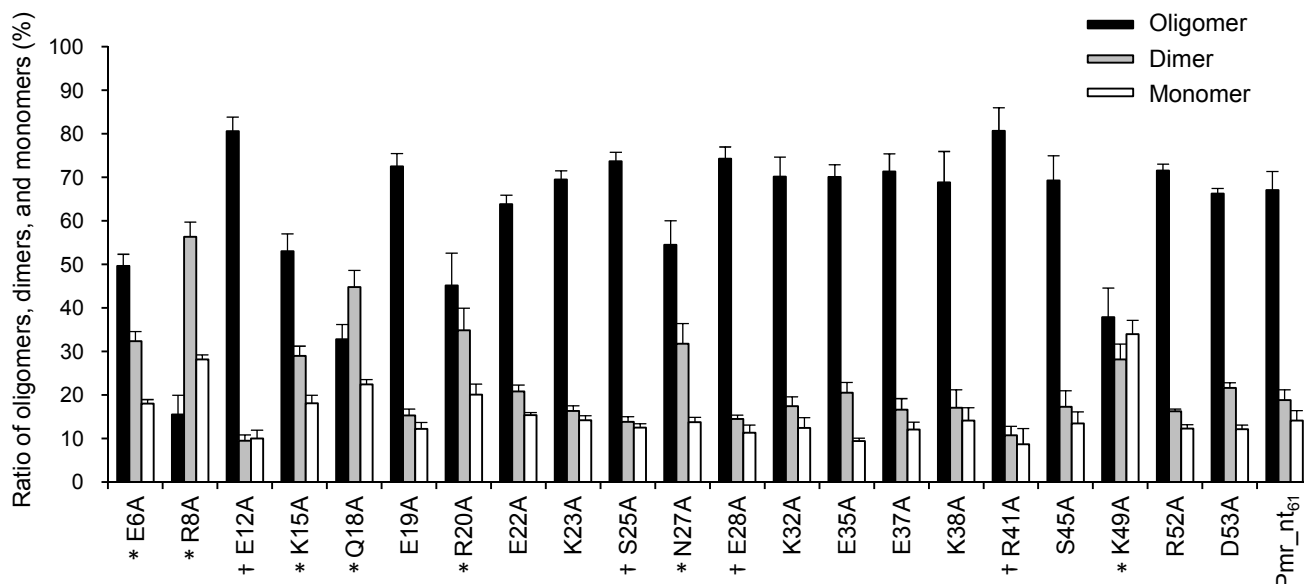


Fig. 2-10. タンパク質間クロスリンク法によるPmr_nt₆₁アラニン置換体の多量体形成能の評価. 各サンプルのTricine-SDS-PAGEの泳動図において、架橋剤添加後60分のレーンの単量体、二量体、多量体の割合を、レーン全体のバンド強度を100%として画像解析ソフトImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) で定量した。黒色が多量体の、灰色が二量体の、白色が単量体の割合を表す。Pmr_nt₆₁のアミノ酸置換体については、Pmr_nt₆₁-E6Aを「E6A」のように表した。Pmr_nt₆₁については独立した5回の実験の平均値と標準偏差を、アミノ酸置換体については独立した3回の実験の平均値と標準偏差を示した。Pmr_nt₆₁が形成した多量体の割合に比べて有意に多量体の割合が減少したアミノ酸置換体は「*」で、有意に増加したアミノ酸置換体は「+」で示した (P < 0.05, two-tailed Student's *t*-test).

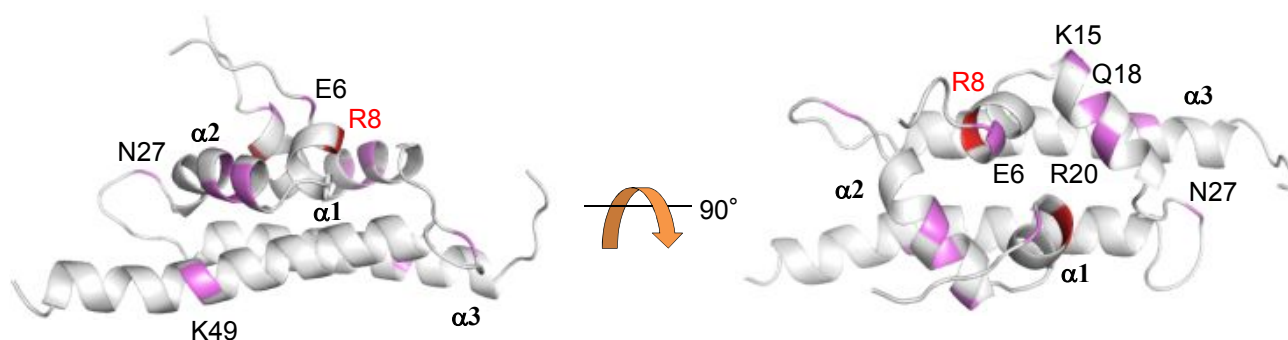


Fig. 2-11. Pmr_nt₆₁のホモ多量体形成に重要な7残基のモデル構造における分布. Pmr_nt₆₁のホモ多量体形成に重要であることが示された7残基を二量体のモデル構造上に示した。7残基のうち多量体形成への寄与が最も高いと予測されたR8については赤色で、他はモデル構造においてピンク色で示した。α1, α2, α3はN末端側から数えたαヘリックスの名前を表す。

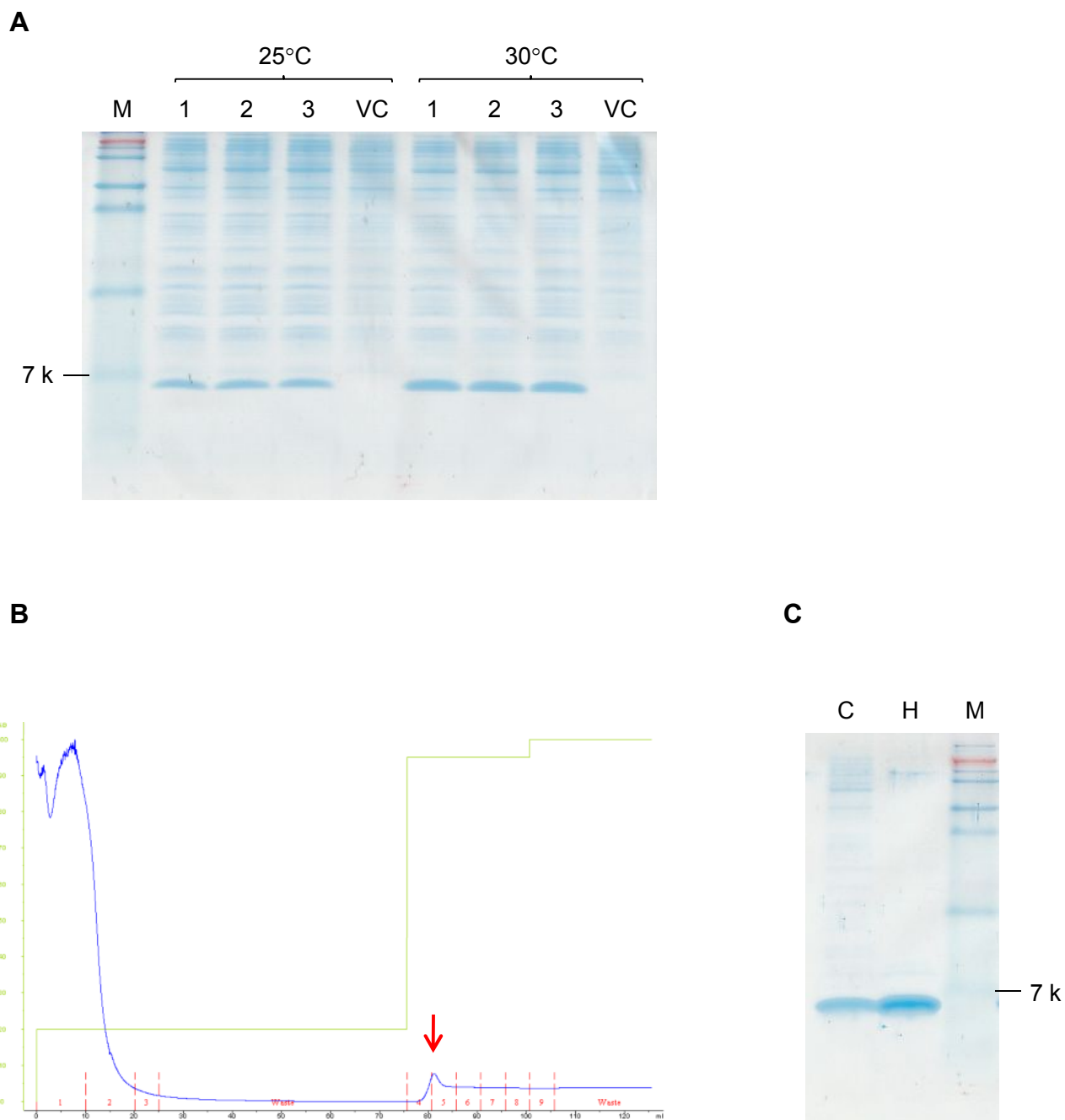


Fig. 2-12. Pmr_{nt55}の大腸菌における発現条件検討とアフィニティー精製.

(A) Pmr_{nt55}の発現条件検討. Mはマーカを, VCはベクターコントロールを, 各レーンの数値はクローンの番号を表す. IPTGは終濃度0.1 mMとなるように添加した. 細胞抽出液由来のタンパク質を2 μ gずつTricine-SDS-PAGEに供した. (B) Metal chelate affinity chromatographyにおける溶出プロファイル. 目的タンパク質のピークを赤い矢印で示した. 青い線はタンパク質由来の波長280 nmの吸光度を, 黄緑色の線はbuffer B (0.5 Mイミダゾールを含む)の割合(縦軸)を, 赤い線と数字はフラクションを表す. (C) 精製状態の確認. Mはマーカを, Cは細胞抽出液を, Hはアフィニティー精製後のサンプルを表す. 各レーン2 μ gのタンパク質をTricine-SDS-PAGEに供した.

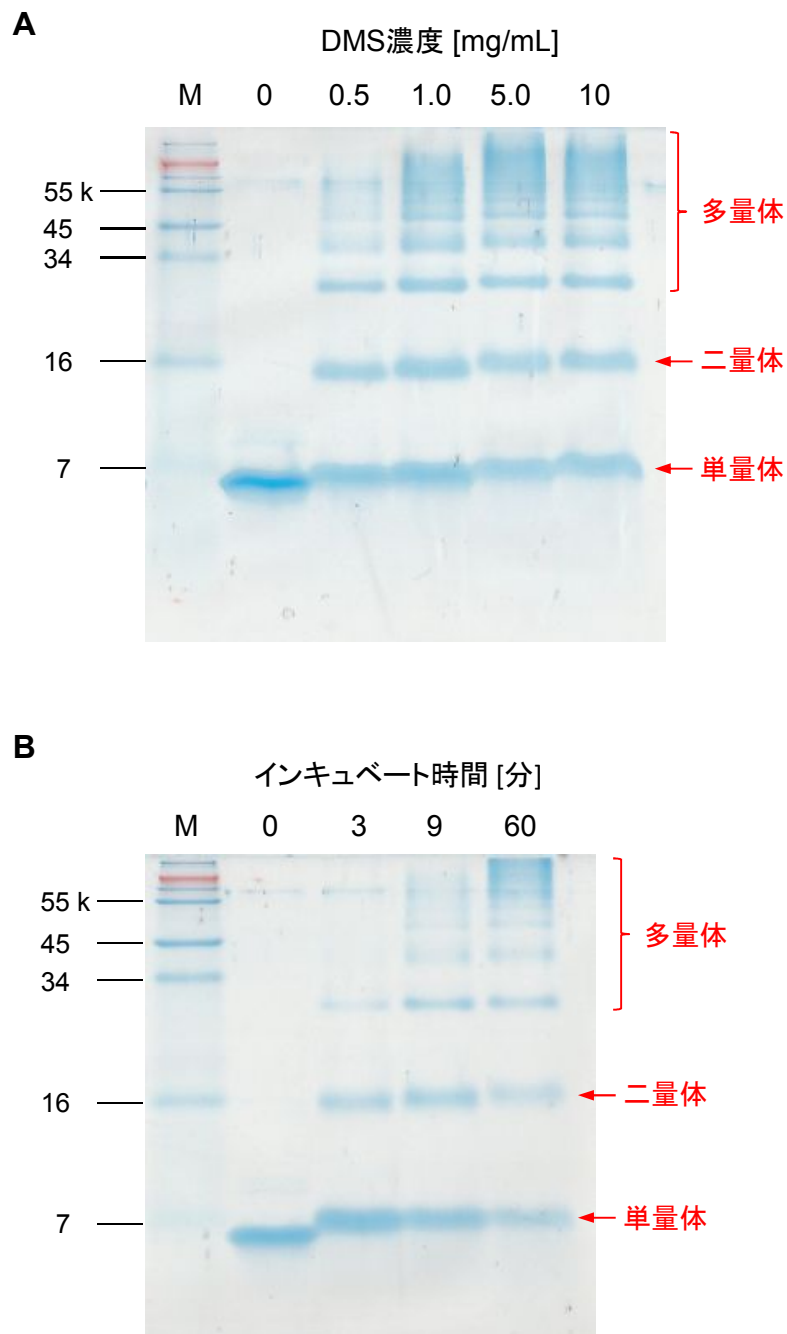


Fig. 2-13. タンパク質間クロスリンク法によるPmr_nt₅₅の会合度の確認.

Pmr_nt₅₅の濃度を0.14 mg/mL (22 μ M) に調整し、架橋反応後のサンプルを2 μ gずつ供したTricine-SDS-PAGEの結果を示した。Mはマーカ―を、各レーンの数値は (A) DMS濃度, (B) DMS添加後のインキュベート時間を表している。 (A)ではDMS添加後60分インキュベートを行い, (B) ではDMSを5.0 mg/mLに固定して実験を行った。単量体, 二量体, 多量体に相当するバンドを図中に示した。

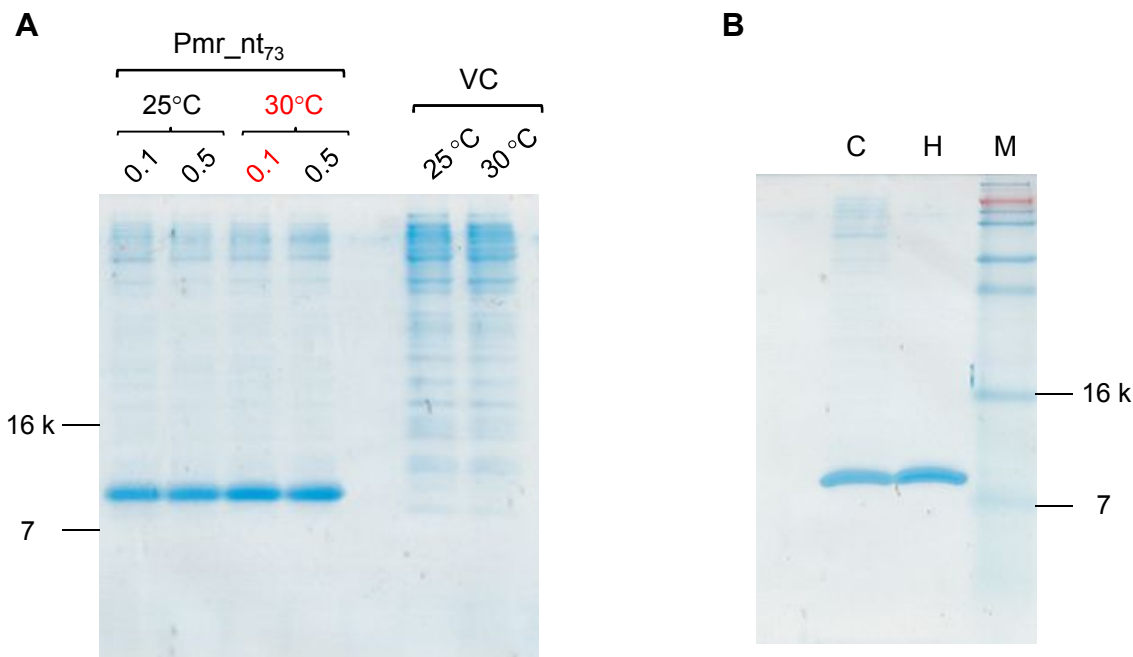


Fig. 2-14. Pmr_nt₇₃の大腸菌における発現条件検討とアフィニティー精製.

(A) Pmr_nt₇₃の発現条件検討. VCはベクターコントロールを, 各レーンの数値はIPTG濃度 (mM) を表す. 細胞抽出液由来のタンパク質を2 μ gずつTricine-SDS-PAGEに供した. (B) MagneHis Protein Purification System (Promega) で精製したPmr_nt₇₃の精製度の確認. Mはマーカーを, Cは細胞抽出液を, Hはアフィニティー精製後のサンプルを表す. 各レーン2 μ gのタンパク質をTricine-SDS-PAGEに供した.

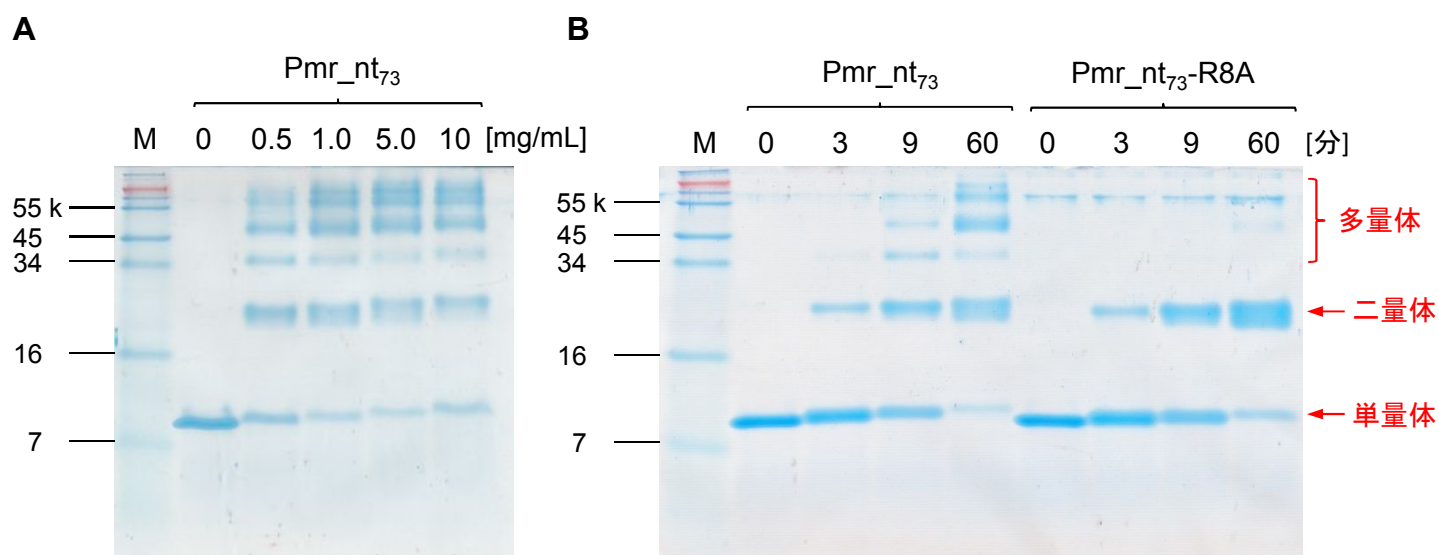


Fig. 2-15. タンパク質間クロスリンク法によるPmr_nt₇₃及びPmr_nt₇₃-R8Aの会合度の確認.

タンパク質の濃度を0.14 mg/mL (16 μ M) に調整し, 架橋反応後のサンプルを2 μ gずつ供したTricine-SDS-PAGEの結果を示した. Mはマーカーを, 各レーンの数値は(A) DMS濃度, (B) DMS添加後のインキュベート時間 (分) を表している. (A)ではDMS添加後60分インキュベートを行い, (B)ではDMSを1.0 mg/mLに固定して実験を行った. (B)には単量体, 二量体, 多量体に相当するバンドを示した.

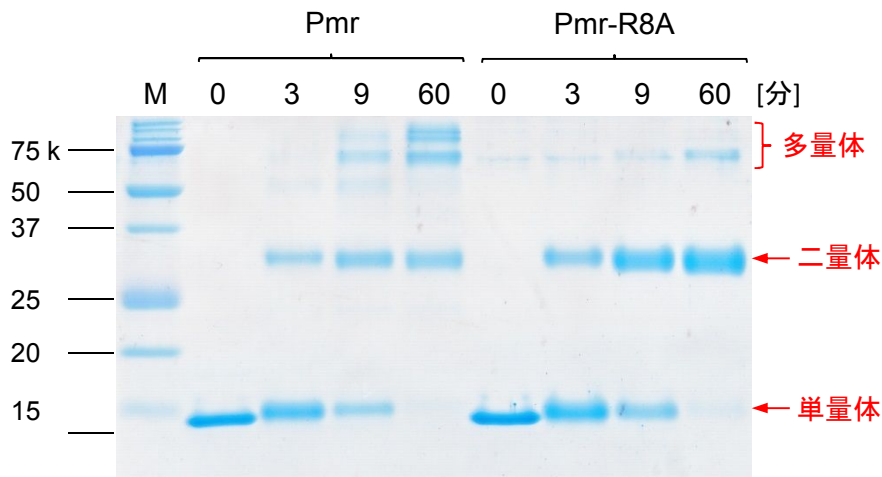


Fig. 2-16. タンパク質間クロスリンク法によるPmr-R8Aの多量体形成能の確認.

タンパク質の濃度を0.14 mg/mL (9.6 μ M) に調整し、架橋反応後のサンプルを2 μ gずつ供したTricine-SDS-PAGEの結果を示した。Mはマーカを、各レーンの数値はDMS添加後のインキュベート時間 (分) を表している。単量体、二量体、多量体に相当するバンドを図中に示した。

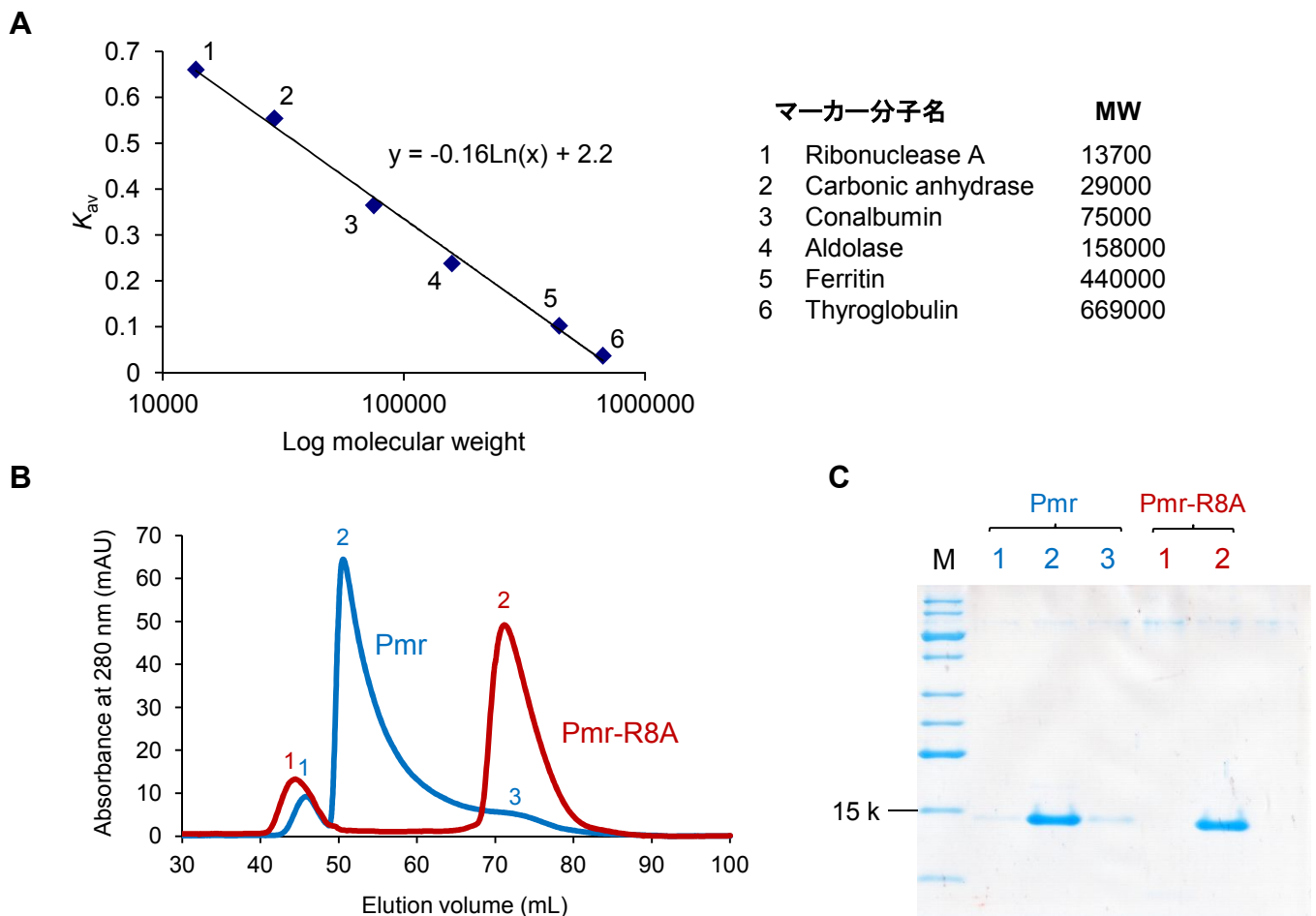


Fig. 2-17. ゲルろ過クロマトグラフィーによるPmr-R8Aの多量体形成能の確認.

(A) Buffer Bを使用した際の分子量推定のための検量線。横軸は分子量の対数 (\log_{10} MW) を、縦軸は分配係数 K_{av} を表す。検量線作製のために使用した標準タンパク質を図中に示した。(B) PmrとPmr-R8Aの溶出プロファイル。縦軸はタンパク質由来の波長280 nmの吸光度を、横軸は溶出容量を表す。140 μ Mのサンプル1 mLをカラムに供した。(C) Tricine-SDS-PAGEによる確認。(B)の溶出プロファイルの該当する番号で得られた溶出液1 mLのうち10 μ Lを供した。Mはマーカを表す。

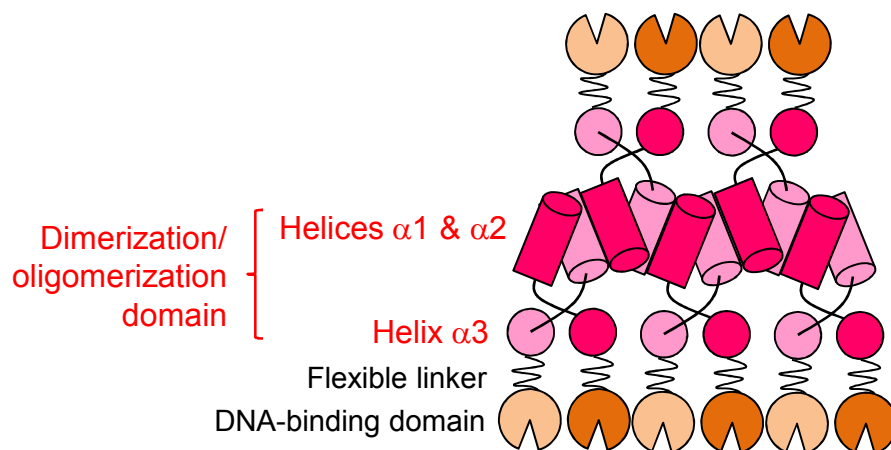


Fig. 2-18. Pmrのホモ多量体形成機構の模式図.

本章の結果からPmrは主にヘリックス $\alpha1$, $\alpha2$ を用いてホモ多量体を形成しており, 二量体／多量体化ドメインの中でもヘリックス $\alpha3$ の寄与は小さいと考えられる. また推定 flexible linker領域やDNA結合ドメインはホモ多量体形成には関与しない.

第3章

Pmr のヘテロ多量体形成機構の解析

3-1 緒言

H-NS ファミリータンパク質はホモ多量体を形成する他，自身のホモログとヘテロ多量体を形成することが知られている [Deighan *et al.*, 2003; Vallet-Gely *et al.*, 2005]. このことから，H-NS の機能的ホモログと考えられる Pmr も *P. putida* KT2440 株染色体由来の MvaT ホモログ TurA-E とヘテロ多量体を形成することが予想された．本章ではまず Pmr が TurA-E とヘテロ多量体を形成するか調べた上で，KT2440 株において遺伝子の転写量の多い TurA, TurB に解析対象を絞り，TurA, TurB も Pmr 同様に溶液中でホモ多量体を形成することを確認した．さらに表面プラズモン共鳴法を用いて Pmr がホモ多量体を形成する時，あるいは TurA, TurB とヘテロ多量体を形成する時の結合比の定量を行うことで，Pmr のホモ・ヘテロ多量体形成機構を比較することを目的とした．

3-2 材料と方法

3-2-1 使用した菌株，プラスミド，及び培養条件

本章ではタンパク質発現用プラスミド構築のために *E. coli* DH5 α 株 (Toyobo) を，タンパク質発現のために *E. coli* BL21(DE3)株 (Novagen) を使用した．本章で使用したプラスミドは Table 3-1 に示した．培養条件は第2章 2-2-1 に従った．

Table 3-1. 本章で使用したプラスミド．

Plasmid vectors	Relevant properties ^a	Reference or source
pET26b(+)	pBR322 replicon, Km ^r , T7 promoter, <i>lacI</i>	Novagen
pET-C-His-pmr	pET-26b(+), <i>NdeI-XhoI</i> fragment containing <i>pmr</i>	Yun and Suzuki <i>et al.</i> , 2010
pET-C-His-turA	pET-26b(+), <i>NdeI-XhoI</i> fragment containing <i>turA</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 2011
pET-C-His-turB	pET-26b(+), <i>NdeI-SalI</i> fragment containing <i>turB</i> which is ligated into <i>NdeI-XhoI</i> site	Suzuki <i>et al.</i> , 2011
pET-C-His-turA ^{K15Q/Q18M/R20Q}	pET-C-His-turA derivative, triplet codon for K15, Q18, and R20 are replaced with CAG, ATG, and CAA, respectively	This study
pFLAG-CTC	Ap ^r , <i>lacI</i> , <i>tac</i> promoter expressing FLAG-tag	Sigma-Aldrich
pFLAG0017	pFLAG-CTC, <i>NdeI-SalI</i> fragment containing <i>turC</i>	Yun and Suzuki <i>et al.</i> , 2010
pFLAG1366	pFLAG-CTC, <i>NdeI-SalI</i> fragment containing <i>turA</i>	Yun and Suzuki <i>et al.</i> , 2010
pFLAG2947	pFLAG-CTC, <i>NdeI-SalI</i> fragment containing <i>turE</i>	Yun and Suzuki <i>et al.</i> , 2010
pFLAG3693	pFLAG-CTC, <i>NdeI-SalI</i> fragment containing <i>turD</i>	Yun and Suzuki <i>et al.</i> , 2010
pFLAG3765	pFLAG-CTC, <i>NdeI-SalI</i> fragment containing <i>turB</i>	Yun and Suzuki <i>et al.</i> , 2010
pFLAGpmr	pFLAG-CTC, <i>NdeI-SalI</i> fragment containing <i>pmr</i>	Yun and Suzuki <i>et al.</i> , 2010

^aAp^r and Km^r represent resistance to ampicillin and kanamycin, respectively.

3-2-2 *E. coli* BL21(DE3)株を用いた目的タンパク質の大量発現

第2章 2-2-13 と同様に行った．

3-2-3 His-tag による目的タンパク質のアフィニティー精製

第2章 2-2-14 と同様に buffer A (20 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.5 M NaCl, 10%グリセリン) 及び buffer B (20 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.5 M NaCl, 10%グリセリン, 0.5 M イミダゾール) を用いて行った．ただし表面プラズモン共鳴法による解析においてアナライトとして流す Pmr の精製についてはグリセリンの濃度を 5%にした buffer A' (20 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.5 M NaCl, 5%グリセリン) 及び buffer B' (20 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.5 M NaCl, 5%グリセリン, 0.5 M イミダゾール) を用いて精製した．

3-2-4 SDS-PAGE, Tricine-SDS-PAGE

第2章 2-2-12 と同様に行った．

3-2-5 ウェスタンブロッティング

試薬

- 10×PBS buffer

80 g NaCl

29 g Na₂HPO₄·12H₂O

2 g KCl

2 g KH₂PO₄

MilliQ 水で 1,000 mL に fill up し，常温で保存した．

- T-PBS buffer

1×PBS buffer 1,000 mL に対して Tween 20 を 1 mL 加え，常温で保存した．

- ブロッキング試薬

T-PBS buffer 10 mL に ECL Blocking Agent (GE Healthcare) 0.5 g を使用直前に懸濁させた．

- Blotting buffer

20 mL 5×cathode buffer

20 mL メタノール

MilliQ 水 60 mL と混合して使用した．

- Anti-His Antibody (GE Healthcare) (一次抗体)
- Monoclonal ANTI-FLAG[®] M2-Peroxidase (HRP) antibody (Sigma-Aldrich) (一次抗体)
- ECL Peroxidase labeled anti-mouse antibody (GE Healthcare) (二次抗体)
- Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (GE Healthcare)
- Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) (発光基質)

操作 (3-3-1 で使用した方法)

- ① Tricine-SDS-PAGE の泳動終了後に分離ゲルを T-PBS buffer に浸して 5 分間ずつ 2 回振盪した．
- ② iBlot Gel Transfer System, iBlot Gel Transfer stacks PVDF Regular (Invitrogen) を用いて，タンパク質をメンブレンへ転写した．操作は添付のプロトコールに従った．プログラムは P4 を使い，6 分間転写を行った．
- ③ メンブレンをすぐにブロッキング試薬に浸して 1 時間振盪した．
- ④ メンブレンを T-PBS buffer に浸して 5 分間振盪した．buffer を交換し，さらにこの操作を 4 回繰り返した．
- ⑤ 一次抗体を T-PBS buffer で 1,000 倍希釈し，メンブレンを浸して 1 時間振盪した．
- ⑥ ④の操作を繰り返した．
- ⑦ 二次抗体を T-PBS buffer で 20,000 倍希釈し，メンブレンを浸して 1 時間振盪した．
- ⑧ ④の操作を繰り返した．
- ⑨ Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate を添付のプロトコールに従って調製し，メンブレンを浸して 5 分間静置した．その後，バイオイメージングアナライザー LAS1000 plus (FUJIFILM) で検出を行った．

操作 (3-3-3 で使用した方法)

- ① メンブレン (Sequi-BlotTM PVDF Membrane, Bio-Rad) を縦 5 cm×横 9cm に切断し、メタノールに浸して活性化させた。
- ② ①のメンブレンと、縦 5 cm×横 9cm に切断した濾紙 6 枚を blotting buffer に浸した。
- ③ Tricine-SDS-PAGE の泳動終了後に分離ゲルを blotting buffer に浸して 20 分間振盪した。
- ④ セミドライ式転写装置に、下から、濾紙 3 枚、メンブレン、ゲル、濾紙 3 枚の順に重ねてローラーで気泡を抜き、20 V で 40 分間ブロッキングした。
- ⑤ メンブレンをすぐにブロッキング試薬に浸して 1 時間振盪した。
- ⑥ メンブレンを T-PBS buffer に浸して 5 分間振盪した。buffer を交換し、さらにこの操作を 4 回繰り返した。
- ⑦ Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate を T-PBS buffer で 1,000 倍希釈し、メンブレンを浸して 1 時間振盪した。
- ⑧ ⑥の操作を繰り返した。
- ⑨ Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate を添付のプロトコールに従って調製し、メンブレンを浸して 5 分間静置した。その後、バイオイメージングアナライザー LAS1000 plus (FUJIFILM) で検出を行った。

3-2-6 プルダウンアッセイ

寺林 (2007) の方法を改変して行った。本項では His-tag 融合 Pmr を His-Pmr, FLAG-tag 融合 Pmr を FLAG-Pmr のように表記する。

- ① LB 培地 5 mL の系で His-Pmr 及び FLAG-Pmr, FLAG-TurA-E を発現させ、3-2-2 の方法で調製した大腸菌細胞抽出液を得た。
- ② His-Pmr を含む大腸菌細胞抽出液由来の粗タンパク質 200 µg に対して、FLAG-Pmr の場合 225 µg, FLAG-TurA の場合 450 µg, FLAG-TurB の場合 225 µg, FLAG-TurC の場合 900 µg, FLAG-TurD の場合 1,350 µg, FLAG-TurE の場合 225 µg の粗タンパク質を混合した。
- ③ MagneHis Protein Purification System (Promega) の Ni-Particles を 30 µL 加え、4°C, 10 rpm で 1 時間インキュベートした。
- ④ MagneHis Protein Purification System (Promega) の推奨プロトコールに従い His-Pmr を溶出した。
- ⑤ 3-2-4 の方法で Tricine-SDS-PAGE を、3-2-5 の方法でウェスタンブロッキングを行い、抗 His-tag 抗体・抗 FLAG-tag 抗体で検出を行った。

3-2-7 ゲルろ過クロマトグラフィーを用いたタンパク質の分子量の推定

第 2 章 2-2-16 及び 2-2-17 と同様に行った。バッファーは 3-2-3 の buffer A を使用した。

3-2-8 タンパク質間クロスリンク法

第2章 2-2-19 と同様に行った。

3-2-9 タンパク質のビオチン化

EZ-Link[®] Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific) をタンパク質のビオチン化試薬として用いた。精製したタンパク質溶液 200 μ L を、タンパク質の 100 倍量（モル比）のビオチン化試薬を使用直前に溶解させた 10 \times PBS buffer 800 μ L と混合し、室温で 30 分間インキュベートした。その後未反応のビオチン化試薬を除くために、MagneHis Protein Purification System (Promega) を用いて目的タンパク質を再精製した。この際、ビーズの洗浄には biotinylation wash buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4 $^{\circ}$ C], 0.5 M NaCl, 10% グリセリン, 0.1 M イミダゾール) を、目的タンパク質の溶出には 3-2-3 の buffer B を使用した。

3-2-10 表面プラズモン共鳴法 (SPR)

Biacore[®] 2000 及び BIACORE 2000 Control Software version 3.2.1 (GE Healthcare) を用いて行った。センサーチップには表面がストレプトアビジンで覆われた Sensor Chip SA (GE Healthcare) を用いた。測定前に Sensor Chip SA wash solution (50 mM NaOH, 1.0 M NaCl) を 10 μ L ずつ 3 回フローセルに流し、センサーチップ上の余分なストレプトアビジンを洗浄した。ビオチン化したタンパク質（リガンド）は 10 μ L/min でフローセルに流し、ベースラインが約 500 RU 上昇するまでセンサーチップ上に固定した。同時に測定する 3 種類のタンパク質については、3 つのフローセルでほぼ同量の固定量 (± 10 RU 程度) となるように調整した。測定は脱気したランニングバッファー (20 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4 $^{\circ}$ C], 0.5 M NaCl, 5% グリセリン, 475 mM イミダゾール) を用いて、4 $^{\circ}$ C、流速 30 μ L/min で行った。3-2-3 の方法で精製した Pmr（アナライト）を 7 分間フローセルに流してリガンドと結合させた後、3 分間ランニングバッファーを流して解離させた。毎測定後のセンサーチップの再生には regeneration buffer (10 mM glycine-HCl [pH 1.5], 0.5 M NaCl, 10% グリセリン, 0.5 M イミダゾール) を用いた。センサーチップの 4 つのフローセルのうち、1 つはコントロールとしてリガンドを固定せずに残しておき、他の 3 つのフローセルと同様にアナライトを流して RU 値の変化を記録した。

解析は BIAevaluation version 4.1.1 (GE Healthcare) を用いて行った。各フローセルで得られた RU 値からコントロール用のフローセルで得られた RU 値を差し引くことで、解析に使用するセンサーグラムを取得した。このセンサーグラムにおいて、反応が平衡に達した時の RU 値 (R_{eq}) を各リガンドの固定量で割ることで、リガンド一分子あたりのアナライトの結合量を計算した。

3-2-11 TurA, TurB の推定二量体／多量体化ドメインのモデル構造の作製

第2章 Fig. 2-4 より、TurA, TurB についても Pmr と同様に N 末端側 61 残基が二量体／多

量体化ドメインであると予想して、これらの二量体のモデル構造を作製した。第2章 2-2-20 で作製した Pmr_nt₆₁ のモデル構造を鋳型として、同様の方法で作製した。

3-2-12 TurA^{K15Q/Q18M/R20Q} 発現用プラスミドの構築

QuikChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用い、TurA151820 F プライマー (CGAAGAAGCCATCCAGGAACTTATGGCCCAACTGGCCAATCTGTC) 及び TurA151820 R プライマー (GACAGATTGGCCAGTTGGGCCATAAGTTCCTGGATGGCTTCTTCG) を用いて行った。操作は添付のプロトコールに従った。

3-3 結果

3-3-1 Pmr と TurA-E とのヘテロ多量体形成能の確認

(Yun and Suzuki *et al.*, 2010, *J. Bacteriol.*, 192:4720-4731 及び修士論文より改変・引用)

Pmr と TurA-E とのタンパク質間相互作用の検出のために、His-tag 融合 Pmr と FLAG-tag 融合 TurA-E, ポジティブコントロールとして His-tag 融合 Pmr と FLAG-tag 融合 Pmr を用いたプルダウンアッセイを行った。本項では His-tag 融合 Pmr を His-Pmr, FLAG-tag 融合 Pmr を FLAG-Pmr のように表記する。いずれもタンパク質間相互作用を阻害しないよう DNA 結合ドメインである C 末端側にエピトープタグを付加した。E. coli BL21(DE3)を用いた His-Pmr と FLAG-Pmr, FLAG-TurA-E の発現は、寺林が採用した発現条件である 25°C, IPTG 終濃度 0.5 mM で行った [寺林, 2007]。まず各タンパク質の発現量を確認するため、LB 培地 5 mL の系で目的タンパク質を発現させ、3-2-2 の方法で得た細胞抽出液由来のタンパク質を SDS-PAGE に一定量ずつ供し、ウェスタンブロッティングで抗 FLAG-tag 抗体を用いて検出した (Fig. 3-1)。この結果から、各タンパク質の発現量の違いはあるものの、いずれのタンパク質も今回の条件で発現することが確認できた。SDS-PAGE やウェスタンブロッティングの結果において FLAG-TurA を含む細胞抽出液由来のタンパク質 5 µg から得られた目的タンパク質のバンド強度を基準とすると、他の FLAG-tag 融合タンパク質の発現量は、FLAG-Pmr, TurB, TurE が FLAG-TurA の 2 倍以上、FLAG-TurC が同程度～やや少ない、FLAG-TurD が 3 分の 1 以下と見積もられた。

プルダウンアッセイは 3-2-6 の手順で行った。本実験では bait タンパク質 (His-Pmr) を含む大腸菌細胞抽出液と、prey タンパク質 (FLAG-Pmr, FLAG-TurA-E) を含む大腸菌細胞抽出液を混合し、MagneHis Protein Purification System (Promega)を用いて His-Pmr を精製した後、ウェスタンブロッティングで FLAG-tag 融合タンパク質を検出した。His-Pmr を含む細胞抽出液由来のタンパク質 200 µg に対して、上述の発現量を考慮して以下に示す量の FLAG-tag 融合タンパク質を含む細胞抽出液由来のタンパク質を反応系に添加した。すなわち、FLAG-Pmr の場合 225 µg, FLAG-TurA の場合 450 µg, FLAG-TurB の場合 225 µg, FLAG-TurC の場合 900 µg, FLAG-TurD の場合 1,350 µg, FLAG-TurE の場合 225 µg の細胞抽出液由来のタンパク質を用いた。Tricine-SDS-PAGE には、FLAG-tag 融合タンパク質を含む細胞抽出液由来のタンパク質を、FLAG-Pmr の場合 2.5 µg, FLAG-TurA の場合 5 µg, FLAG-TurB の場合 2.5 µg, FLAG-TurC の場合 10 µg, FLAG-TurD の場合 15 µg, FLAG-TurE の場合 2.5 µg (以上はプルダウンアッセイに用いたタンパク質量の比と等しくなっている) を、His-Pmr を含む細胞抽出液由来のタンパク質は 5 µg を、プルダウンアッセイ後のタンパク質は 3 µg を供した (Fig. 3-2A)。続いて抗 FLAG-tag 抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出したところ、細胞抽出液由来のタンパク質を供したレーンではいずれのサンプルもバンドが検出されたのに対し、プルダウンアッセイ後のサンプルでは TurA, TurB, TurE, 及びポジティブ

コントロールとして用いた Pmr ではバンドが検出されたものの、TurC, TurD ではバンドが検出されなかった (Fig. 3-2B). また抗 His-tag 抗体を用いたウェスタンブロッティングではプルダウンアッセイ後の全てのレーンで His-Pmr が検出され (Fig. 3-2C), MagneHis Protein Purification System を用いた His-Pmr の精製が出来ていることも確認された. 以上の結果から, Pmr は TurA, TurB, TurE とヘテロ多量体を形成するものの, TurC, TurD との相互作用は弱いことが明らかとなった.

3-3-2 TurA, TurB が溶液中でホモ多量体を形成することの確認

(Suzuki *et al.*, 2011, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75:711-717 及び修士論文より改変・引用)

上述の通り *P. putida* KT2440 株染色体には 5 つの MvaT ホモログがコードされているが, このうち *turC*, *turD*, *turE* の転写量は *turA*, *turB* と比べて少ないことが明らかとなっている [Yuste *et al.*, 2006; Yun *et al.*, 2010]. そこで本研究では, 転写量が多く, 3-3-1 で Pmr とヘテロ多量体を形成することが示された TurA, TurB に焦点を当てて解析を進めることにした. まず TurA, TurB が Pmr と同様にホモ多量体を形成するか確認するために, pET26b(+)ベクターを用いた *E. coli* BL21(DE3)による大量発現系の構築を行った. 発現用プラスミドはタンパク質のC末端側に His-tag が付加されるように設計された pET-C-His-turA 及び pET-C-His-turB [Yun and Suzuki *et al.*, 2010] を用いた. 発現条件検討は LB 培地 5 mL で 3-2-2 の方法に従って行い, ベクターコントロールにはインサートを持たない pET-26b(+)を保持した *E. coli* BL21(DE3)を使用した. 得られた細胞抽出液由来のタンパク質を SDS-PAGE に供した結果を Fig. 3-3 に示した. この結果から, TurA の場合は 25°C, IPTG 終濃度 0.1 mM が, TurB の場合は 30°C, IPTG 終濃度 0.5 mM が最適な発現条件であると考えた. そこでこの条件で誘導培養を行った大腸菌から細胞抽出液を取得し, metal chelate affinity chromatography (3-2-3) を用いて, 段階溶出法によりイミダゾール濃度を 150 mM から 475 mM に上昇させることで TurA 及び TurB を精製した. 得られた溶出プロファイルと, 精製状態を確認するための SDS-PAGE を Fig. 3-4 に示す. 精製されたタンパク質量を LB 培地 1 L あたりに換算すると TurA では 50 mg, TurB では 30 mg であった.

精製された TurA, TurB の会合度を調べるため, 3-2-7 の方法に従いゲルろ過クロマトグラフィーによる会合度の予測を行った. カラムは HiLoad 16/60 Superdex 200 (column volume 120 ml; GE Healthcare) を, バッファーは 3-2-3 の buffer A を使用し, 第 2 章 Fig. 2-2A で作製した分子量推定のための検量線を用いて会合度を予測した. TurA, TurB について 2 種類の濃度でカラムに供した結果を Fig. 3-5 に示す. これらの結果から, TurA はいずれの濃度でも void volume (45 mL) に相当する会合度 70 以上のピークが観察されるものの, 120 μ M では会合度 54 程度 (分子量 810 k), 20 μ M では会合度 29 程度 (分子量 430 k) が最も多くなること, TurB は 130 μ M では会合度 17 程度 (分子量 250 k), 21 μ M では会合度 11 程度 (分子量 160 k) を示すことが明らかとなった. なお TurB の溶出プロファイルでは Pmr (第 2 章 Fig.

2-2B), TurA とは異なり void volume での溶出は見られず, 主要なピークは一種類であった.

さらにタンパク質間クロスリンク法を用いた TurA, TurB の会合度の確認も行った. 架橋剤 DMS の濃度を決定するためにタンパク質濃度を 0.14 mg/mL (TurA 9.3 μ M; TurB 9.7 μ M), 架橋剤添加後のインキュベート時間を 60 分に固定して, DMS の濃度を変化させて実験を行った. Tricine-SDS-PAGE で検出した結果を Fig. 3-6A, B に示す. TurA, TurB いずれの場合も, DMS の濃度が 0.7 mg/mL までは濃度依存的に架橋がかかっている単量体の割合が少なくなり, 代わりに二量体 (分子量約 30 k), 四量体 (分子量約 60 k) やさらに大きな分子量を持つ多量体の割合が増加した. 第 2 章の Pmr の場合 (Fig. 2-3A) と同様に, DMS 濃度 0.1, 0.3, 0.5 mg/mL のサンプルでは三量体 (分子量約 45 k) も見られるが, それ以上の濃度ではこのバンドは消失していたことから, 検出された三量体は四量体が部分的に架橋されたものであると考えられた. 一方, DMS の濃度が 1.0 mg/mL, 5.0 mg/mL では SDS-PAGE のバンドパターンは変化しなかったため, DMS 濃度は 1.0 mg/mL に決定した. 次に, DMS 添加後のインキュベート時間を変化させて実験を行い, Tricine-SDS-PAGE で検出した結果を Fig. 3-6C, D に示した. この実験でも DMS の濃度を变化させた場合と同様の結果が得られた. 以上から, TurA, TurB も Pmr と同様に二量体を基本構造としたホモ多量体を形成することが明らかとなった.

3-3-3 Pmr のホモ・ヘテロ多量体形成時の結合比の定量

(Suzuki *et al.*, submitted より改変・引用)

(1) 相互作用の検出方法

3-3-1 の結果から Pmr が TurA, TurB とヘテロ多量体を形成することが示されたため, Pmr と TurA, Pmr と TurB がヘテロ多量体を形成する際の親和性や結合比を定量しようと考えた. しかし第 2 章及び 3-3-2 の結果からは Pmr, TurA, TurB が二量体を基本構造とするホモ多量体を形成し, 様々な会合度の多量体が溶液中に存在することが明らかとなっている. タンパク質会合時の親和性の定量によく用いられる等温滴定型熱量計や表面プラズモン共鳴法 (surface plasmon resonance, SPR) の通常の測定法では, 相互作用する 2 つのタンパク質の会合度が一定でないと親和性を求めることができない. そこで本章では SPR を応用し, Pmr, TurA, TurB を一定量固定したフローセルに Pmr を流した際の, 各組み合わせにおける結合比を定量した. SPR ではセンサーチップ (サンプルを固定するフローセルを内蔵する) に相互作用を解析する一方のサンプルを固定し, もう一方のサンプルをフローセルに流すことで両者間の相互作用を解析する. これまでの結果から Pmr, TurA, TurB はバッファーやタンパク質濃度によって異なる会合度を示すことが明らかになっているため (第 2 章 Fig. 2-2, 2-17, 本章 Fig. 3-5), これらのタンパク質は溶液中で常に決まった会合度をとっているわけではなく, 最小単位である二量体が結合・解離を繰り返していると考えられる. すなわち, 常に一定の流速でバッファーが流れるフローセル中においてはホモ多量体中の一部のタン

パク質が固定されたとしても残りのタンパク質は解離して流れ去っていく可能性が高く、フローセル中に留まるのは最小単位であるホモ二量体であると考えられる。このことから、例え Pmr の会合度が不明であったとしても、それぞれ等量の Pmr, TurA, TurB が固定された 3 つのフローセルに同じ Pmr 溶液が流れた時に検出される結合比は、その三者間に限って比較できると考えた。機器としては Biacore2000 (GE Healthcare) を、センサーチップにはビオチン化タンパク質をフローセル上のストレプトアビジンを用いて固定する Sensor Chip SA (GE Healthcare) を使用した。なお本項では、フローセルに固定するタンパク質 (リガンド) を ^LPmr, ^LTurA, ^LTurB, フローセルに流す Pmr (アナライト) を ^APmr と表記する。また、本実験においては Pmr と TurA, Pmr と TurB のヘテロ二量体は形成されないと仮定する。これは先述のように ^LPmr, ^LTurA, ^LTurB はいずれもホモ二量体の状態で固定されると予想されることから、ホモ二量体中の 2 つの単量体が両方ともセンサーチップに固定されているとすれば、単量体同士の交換が起こる確率は極めて低いと考えられるためである。

(2) リガンドのビオチン化

リガンドのビオチン化には EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) を用いた。この試薬ではタンパク質の一級アミンと Sulfo-NHS が反応するため、反応バッファーにアミンが含まれていると目的タンパク質のビオチン化が阻害されてしまう。このため反応には PBS バッファーが推奨されているが、Pmr, TurA, TurB は PBS バッファー中では速やかに凝集してしまった (データ示さず)。そこで濃度を 10 倍にした 10 × PBS バッファーを用いたところ、タンパク質の凝集を起こさず反応を行うことができた。反応後のサンプルは MagneHis Protein Purification System (Promega) を用いて未反応のビオチン化試薬を除き、ビオチン化の確認のため Tricine-SDS-PAGE 及び streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (GE Healthcare) を用いたウェスタンブロッティングに供した (Fig. 3-7)。この結果から、反応系に含まれるビオチン化試薬の量が増えるにつれて、ビオチン化されたタンパク質の量が増加することが確認された。よって以降の実験では、Pmr, TurA, TurB のいずれもタンパク質の 100 倍量 (モル比) のビオチン化試薬を用いてリガンドを作製した。

(3) センサーグラムの取得と結合比の計算

Biacore2000 では、センサーチップにリガンドが固定される、センサーチップ上のリガンドに対してアナライトが結合する等の質量変化がセンサーチップ上で起こると、結合した物質の質量に応じてレスポンス (resonance unit, RU) の上昇が見られる。(2)でビオチン化した ^LPmr, ^LTurA, ^LTurB を約 500 RU の上昇が見られるようにセンサーチップの 3 つのフローセルに固定し、様々な濃度の ^APmr を流した時の RU の上昇を記録した (この記録のことをセンサーグラムと呼ぶ)。当初は ^APmr を流す際のランニングバッファーとして 3-2-3 の buffer B を使用する予定だったが、光の屈折率が高いグリセリンを 10% 含んでいたため、ベースラインが検出限界の 40,000 RU を超えてしまい使用することができなかった (Biacore はセ

センサーチップに光を照射し、反射光を用いて RU を計算するため屈折率の高い物質がランニングバッファーに含まれているとベースラインが上昇する)。しかし buffer B からグリセリンを完全に抜いてしまうと、サンプルが不安定化したためかセンサーグラムの大幅な乱れが観察され、測定を行うことができなかった (データ示さず)。そこでグリセリンの濃度を 5% にしたところ、測定値は 40,000 RU 未満に収まり、センサーグラムの乱れも見られなくなった。このランニングバッファーを用いて取得した測定値からリガンドを固定していないフローセルで検出された測定値を差し引いたセンサーグラムを Fig. 3-8 に示した。 ${}^L\text{Pmr}$, ${}^L\text{TurA}$, ${}^L\text{TurB}$ を固定したいいずれのフローセルにおいても、 ${}^A\text{Pmr}$ の添加を開始すると同時に速やかに RU の上昇が見られ、添加が終了すると同時に速やかに RU の減少が見られた。そこで反応が平衡に達した時の RU 値 (R_{eq}) を各リガンドの固定量で割ることで、 ${}^L\text{Pmr}$, ${}^L\text{TurA}$, ${}^L\text{TurB}$ 二量体一分子あたりの ${}^A\text{Pmr}$ の結合量を計算した。高濃度の ${}^A\text{Pmr}$ を使用した場合には、リガンド一分子あたりのアナライトの結合量が上昇を続けるという結果が得られた (Fig. 3-9A)。 ${}^A\text{Pmr}$ 自身がホモ多量体を形成することを考慮すると、 ${}^A\text{Pmr}$ 高濃度側ではリガンド-アナライト間相互作用に加えてアナライト同士の相互作用も検出していると考えられたため、なるべく正確にリガンド-アナライト間相互作用を検出するために低濃度の ${}^A\text{Pmr}$ を用いてデータを取得した (Fig. 3-9B)。この図において、リガンド-アナライト間相互作用が平衡に達した領域での ${}^L\text{TurB}$ に対する ${}^A\text{Pmr}$ の結合量は、 ${}^L\text{Pmr}$, ${}^L\text{TurA}$ に対する ${}^A\text{Pmr}$ の結合量の約半分であった (Fig. 3-9B)。以上より、 ${}^L\text{TurB}$ - ${}^A\text{Pmr}$ 間の結合比は ${}^L\text{TurA}$ - ${}^A\text{Pmr}$, ${}^L\text{Pmr}$ - ${}^A\text{Pmr}$ 間の結合比の約半分であることが示唆された。

3-3-4 TurB-Pmr 間の結合比が TurA-Pmr , Pmr-Pmr 間の結合比より小さくなる原因の探索

3-3-3 において ${}^L\text{TurB}$ - ${}^A\text{Pmr}$ 間の結合比が ${}^L\text{TurA}$ - ${}^A\text{Pmr}$, ${}^L\text{Pmr}$ - ${}^A\text{Pmr}$ 間の結合比の約半分になっていた原因を探索するために、第 2 章で明らかにした Pmr のホモ多量体化に重要な 7 残基の保存性に注目することにした。Fig. 2-4 に示すように、 Pmr のホモ多量体化に重要な 7 残基のうち、 TurA では N 末端側から 27 番目の残基を除く 6 残基が保存されているものの、 TurB では E6, R8, K49 の 3 残基しか保存されていなかった。そこで TurA , TurB の二量体/多量体化ドメインのモデル構造を作製し、保存されている残基のモデル構造中での位置を確認したところ、 TurA では保存されているものの TurB では保存されていなかった 15, 18, 20 番目の残基は、モデル構造の N 末端側から 2 番目のヘリックス $\alpha 2$ に存在することが明らかとなった (Fig. 3-10)。もしホモ多量体形成に重要な残基とヘテロ多量体形成に重要な残基が同じならば、この 3 つの残基が Pmr , TurA と TurB との違いを生む原因かもしれないと考え、 TurA の 15, 18, 20 番目のリジン、グルタミン、アルギニン残基を TurB で対応するグルタミン、メチオニン、グルタミン残基に置換したアミノ酸置換体 ($\text{TurA}^{\text{K15Q/Q18M/R20Q}}$) を作製し、 ${}^L\text{TurA}$ - ${}^A\text{Pmr}$, ${}^L\text{TurB}$ - ${}^A\text{Pmr}$, ${}^L\text{TurA}^{\text{K15Q/Q18M/R20Q}}$ - ${}^A\text{Pmr}$ 間の結合比を測定することにした。もし上述の仮定が正しければ、 ${}^L\text{TurA}^{\text{K15Q/Q18M/R20Q}}$ - ${}^A\text{Pmr}$ 間の結合比はアミノ酸置換前の ${}^L\text{TurA}$ - ${}^A\text{Pmr}$

間の結合比よりも ${}^L\text{TurB-A}^{\text{Pmr}}$ 間の結合比に近づくと予想した。

$\text{TurA}^{\text{K15Q/Q18M/R20Q}}$ の発現用プラスミドは 3-2-12 の方法で作製し、発現・精製の手順は 3-3-2 の TurA の方法に倣った。精製時の溶出プロファイルと精製状態を確認した Tricine-SDS-PAGE を Fig. 3-11 に示す。タンパク質間クロスリンク法により $\text{TurA}^{\text{K15Q/Q18M/R20Q}}$ のホモ多量体の形成能を調べたところ、 TurA と比べて多量体の割合の減少と二量体の割合の増加が観察された (Fig. 3-12)。このことから、 Pmr のホモ多量体化に重要な K15, Q18, R20 は TurA においてもホモ多量体化に重要な役割を果たす可能性が示唆された。そこで SPR を用いて ${}^L\text{TurA-A}^{\text{Pmr}}$, ${}^L\text{TurB-A}^{\text{Pmr}}$, ${}^L\text{TurA}^{\text{K15Q/Q18M/R20Q-A}^{\text{Pmr}}}$ 間の結合比の測定を行ったが、予想に反して ${}^L\text{TurA}^{\text{K15Q/Q18M/R20Q-A}^{\text{Pmr}}}$ 間の結合比は ${}^L\text{TurB-A}^{\text{Pmr}}$ の値よりも ${}^L\text{TurA-A}^{\text{Pmr}}$ の値に近く (Fig. 3-13), 今回着目した残基は TurA-Pmr 間と TurB-Pmr 間の結合比には関与しないことが明らかとなった。以上より、 Pmr のホモ多量体形成とヘテロ多量体形成に重要な残基は異なる可能性が示唆された。

3-4 考察

序論でも述べたように、プラスミドにコードされる H-NS ホモログは染色体由来の H-NS ホモログの「バックアップ」と考えられる一方、染色体由来のホモログとは異なる独自の機能を持つという知見も存在していた [Baños *et al.*, 2009; Lucchini *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2010; Fernández-de-Alba *et al.*, 2013]. 同様に、当研究室で過去に行われたトランスクリプトーム解析では、pCAR1 由来の Pmr と *P. putida* KT2440 株染色体由来の TurA, TurB の 3 つの MvaT ホモログは各々独自のレギュロンを持つと考えられた [尹ら, 未発表データ]. しかし、ChAP-chip 解析で得られた各因子の結合箇所はほぼ一致しており、細胞内の結合箇所の違いからレギュロンの違いを説明することはできなかった [Yun and Suzuki *et al.*, 2010; 尹ら, 未発表データ]. 本章 3-3-1, 3-3-2, 及び第 2 章の結果から Pmr, TurA, TurB はホモ・ヘテロ多量体を形成することが裏付けられたため、過去の ChAP-chip 解析では Pmr, TurA, TurB を含むヘテロ多量体が検出されていたと考えられる. 一方、本章 3-3-3 の結果からは、TurA-Pmr, TurB-Pmr, Pmr-Pmr 間のホモ・ヘテロ多量体形成において TurB-Pmr 間の結合比が TurA-Pmr, Pmr-Pmr 間の結合比の約半分であることが明らかとなった. *P. putida* KT2440(pCAR1)株においては、まず各因子のホモ二量体が各々の高親和性塩基配列を認識して DNA に結合し、その後周辺の DNA に各因子のホモ二量体がタンパク質-タンパク質間とタンパク質-DNA 間の両方の親和性に基づいて結合し、最終的に DNA 上にヘテロ多量体を形成すると予想される. この仮説に基づけば、今回の結果は、DNA 上に Pmr, TurA, TurB のホモ二量体が存在し、そこに Pmr のホモ二量体が結合する時、最初に「足場」となるタンパク質によって次に生じるホモ・ヘテロ多量体の組成が変化することを示唆している (Fig. 3-15). すなわち、TurB が足場となった Pmr とのヘテロ多量体は、Pmr や TurA が足場となったホモ・ヘテロ多量体に比べて、含まれる Pmr 分子の数が約半分になると考えられる. 本章では Pmr, TurA, TurB の足場に Pmr が結合することを想定したが、実際の細胞においては各足場に対して TurA や TurB が各々の組み合わせの結合比をもってヘテロ多量体を形成しており、過去に ChAP-chip 解析で検出されたヘテロ多量体の組成は、最初に足場を形成していた因子によって異なると考えられる. このため、各遺伝子の破壊株では野生型株に比べてヘテロ多量体の組成が変化してしまい、その結果ヘテロ多量体によって覆われる DNA 領域（転写が抑制される領域）が変化して、結果的に *pmr*, *turA*, *turB* 破壊株で各々異なる遺伝子の転写変動が見られたと考えられる. 本章の内容は、同一細胞内に存在する複数の H-NS ファミリータンパク質が異なる機能を示す分子機構をタンパク質間相互作用から説明した最初の報告である.

また本章からは、TurB が Pmr, TurA とは異なる性質を示すことも明らかとなった. TurB は Pmr や TurA と同様にホモ多量体を形成するものの、ゲルろ過クロマトグラフィーから求められた会合度は Pmr, TurA より小さく、分子の主要な会合状態が一種類に近かった (Fig. 3-5). Pmr でホモ多量体形成に重要と同定された残基が TurB で一部しか保存されていないことから、TurB が Pmr, TurA とは異なるホモ多量体形成機構を持つ可能性が高いと考え

られる。また SPR による解析では、上述のように TurB-Pmr 間の結合比が他の 2 つの組み合わせに比べて約半分となっていた。本章ではこの結合比の違いを生み出す原因として 3 つの残基に着目したものの、3-3-4 の結果では着目した残基の結合比への関与は認められなかった。今後 TurB のホモ・ヘテロ多量体形成が Pmr, TurA と異なる原因を解明するためには、TurB のホモ多量体形成に重要な残基の同定や、Pmr, TurA, TurB の構造情報の取得と構造の比較が必須となるだろう。

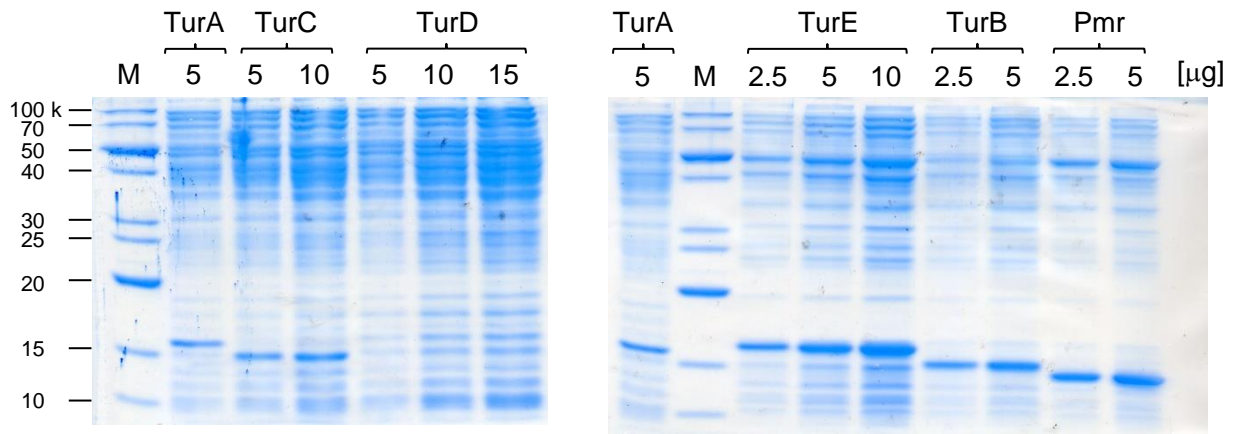
なお、本章の内容については以下の原著論文で発表した。

Yun CS, Suzuki C, Naito K, Takeda T, Takahashi Y, Sai F, Terabayashi T, Miyakoshi M, Shintani M, Nishida H, Yamane H, Nojiri H. 2010. Pmr, a histone-like protein H1 (H-NS) family protein encoded by the IncP-7 plasmid pCAR1, is a key global regulator that alters host function. *J. Bacteriol.* **192**:4720-4731.

Suzuki C, Yun CS, Umeda T, Terabayashi T, Watanabe K, Yamane H, Nojiri H. 2011. Oligomerization and DNA-binding capacity of Pmr, a histone-like protein H1 (H-NS) family protein encoded on IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**:711-717.

Suzuki C, Kawazuma K, Horita S, Terada T, Tanokura M, Okada K, Yamane H, Nojiri H. Oligomerization mechanisms of an H-NS family protein, Pmr, encoded on the plasmid pCAR1 provide a molecular basis for functions of H-NS family members. *PLoS One* submitted.

A



B

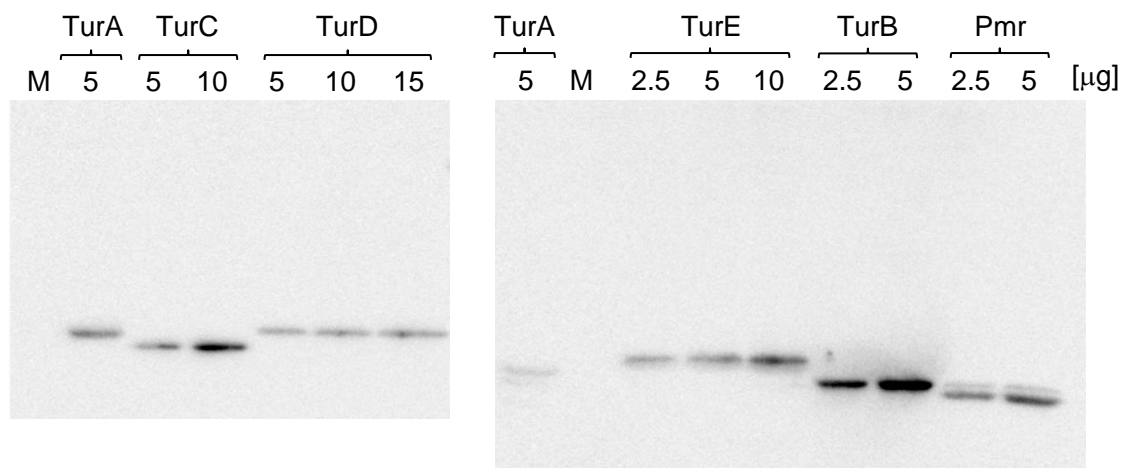


Fig. 3-1. FLAG-tag融合タンパク質の発現量の確認.

FLAG-Pmr, FLAG-TurA-Eを含む細胞抽出液を (A) SDS-PAGE, (B) 抗FLAG-tag抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した. Mはマーカ―を, 各レーンの数値は供したタンパク質量 (μg) を示している.

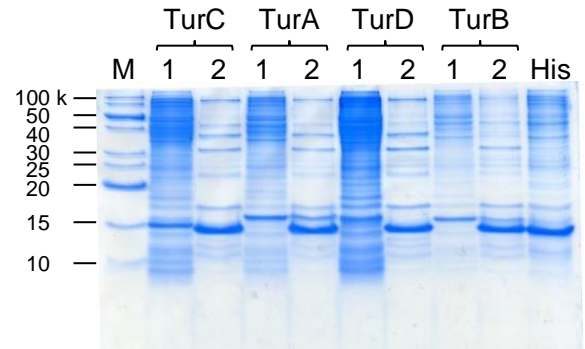
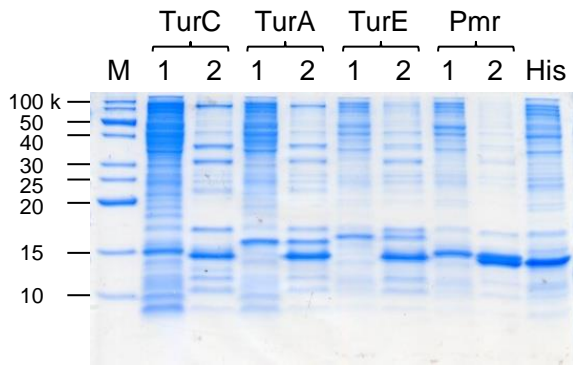
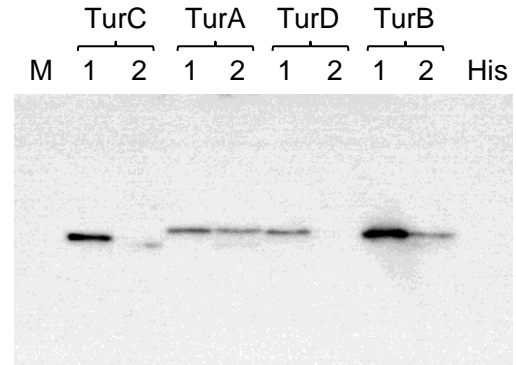
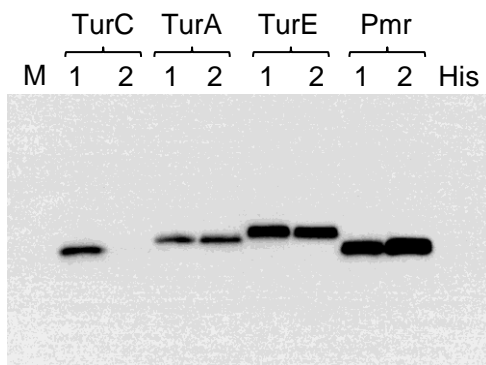
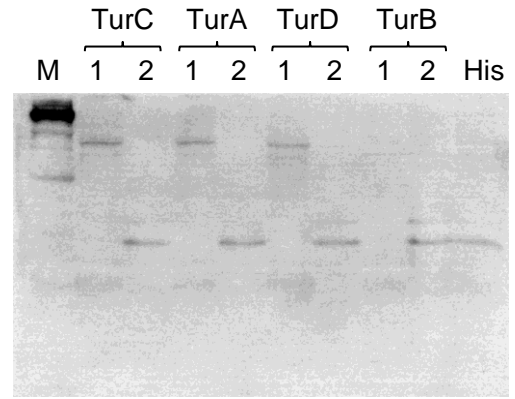
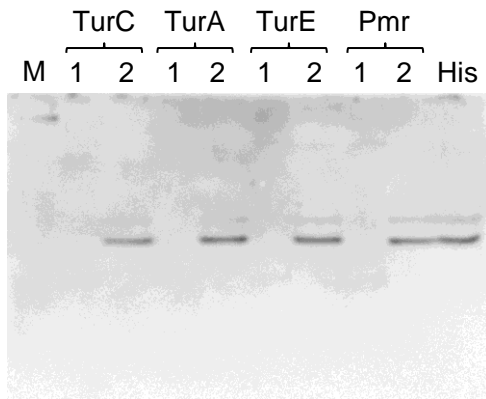
A**B****C**

Fig. 3-2. プルダウンアッセイによるPmrとTurA-E間の相互作用の検出.

His-Pmrを含む細胞抽出液とFLAG-Pmr, FLAG-TurA-Eを含む細胞抽出液を混合し, His-tagとニッケルのアフィニティーによって精製したサンプルを, (A) Tricine-SDS-PAGE, (B) 抗FLAG-tag抗体を用いたウェスタンブロッティング, (C) 抗His-tag抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した. Mはマーカを, “1”はFLAG-tag融合タンパク質を含む大腸菌細胞抽出液を, “2”はプルダウンアッセイ後のサンプルを, “His”はHis-Pmrを含む大腸菌細胞抽出液を泳動したレーンであることを示している.

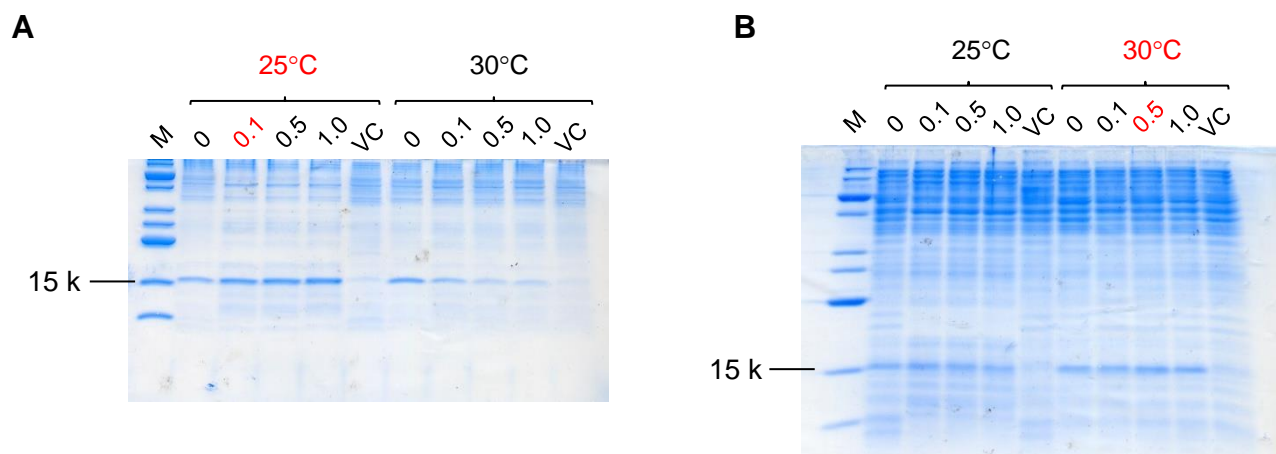


Fig. 3-3. TurA, TurBの大腸菌における発現条件検討.

(A) TurA, (B) TurBの結果を示した. Mはマーカを, VCはベクターコントロールを, 各レーンの数値はIPTG濃度 (mM) を表す. 細胞抽出液由来のタンパク質を(A)では2 μ g, (B)では3 μ gずつSDS-PAGEに供した. また最適な発現条件と判断した温度, IPTG濃度を赤字で示した.

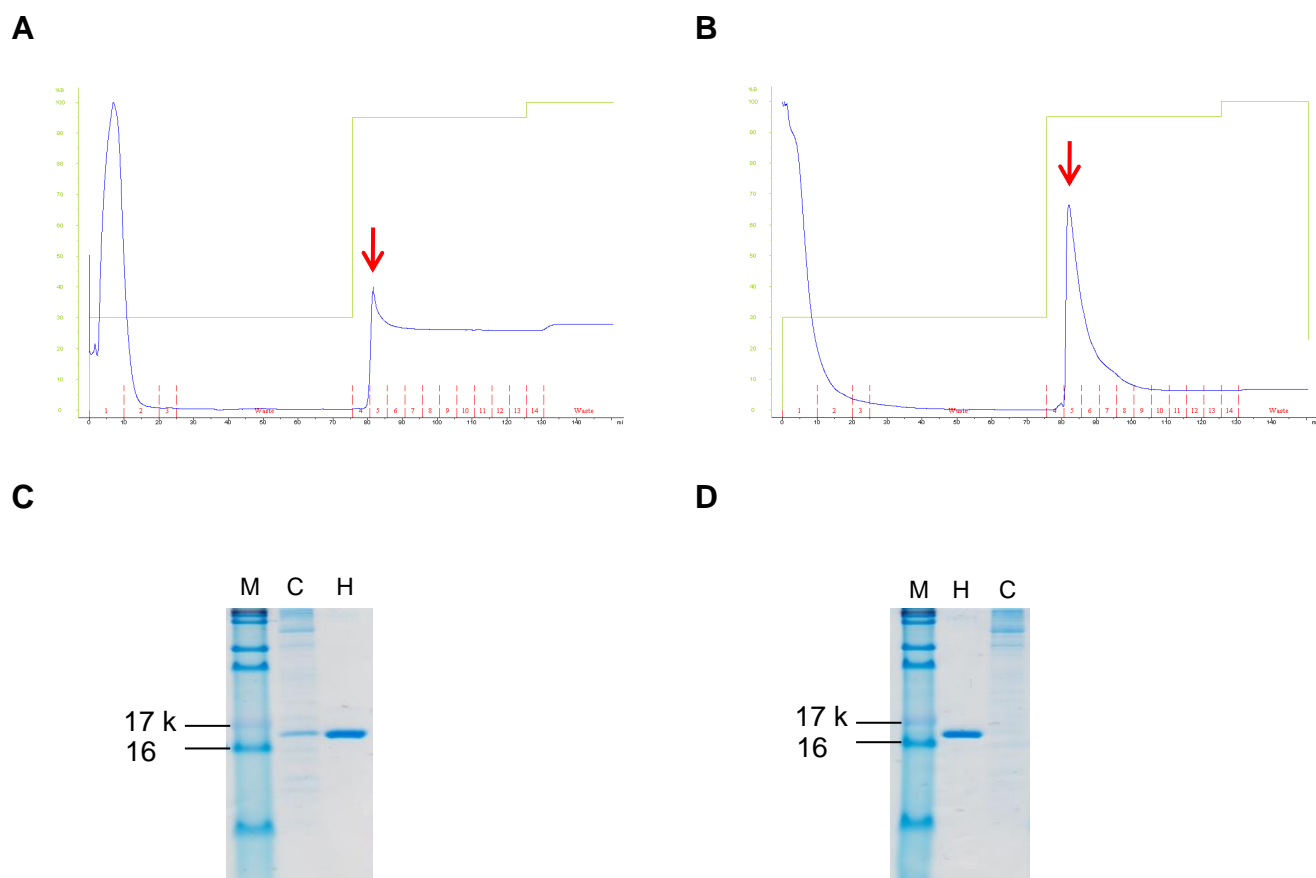


Fig. 3-4. TurA, TurBのアフィニティー精製.

(A) TurA, (B) TurBのmetal chelate affinity chromatographyにおける溶出プロファイル. 目的タンパク質のピークを赤い矢印で示した. 青い線はタンパク質由来の波長280 nmの吸光度を, 黄緑色の線はbuffer B (0.5 Mイミダゾールを含む)の割合(縦軸)を, 赤い線と数字はフラクションを表す. (C) TurA, (D) TurBの精製状態の確認. Mはマーカを, Cは細胞抽出液を, Hはアフィニティー精製後のサンプルを表す. 各レーン3 μ gのタンパク質をSDS-PAGEに供した.

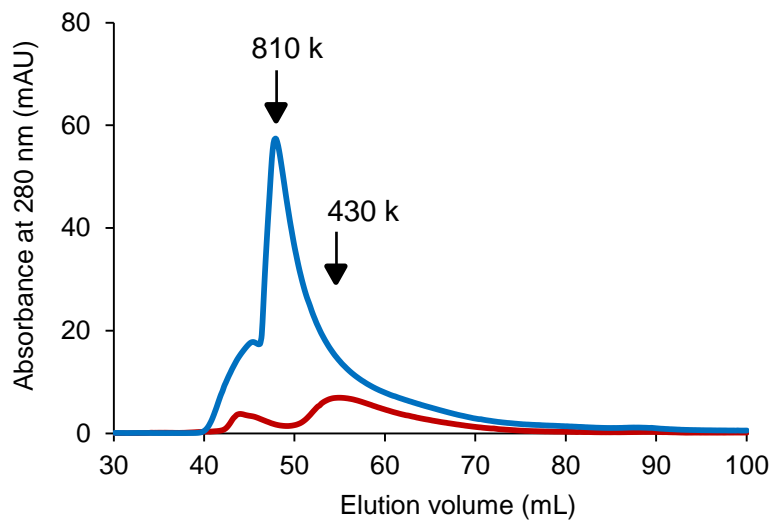
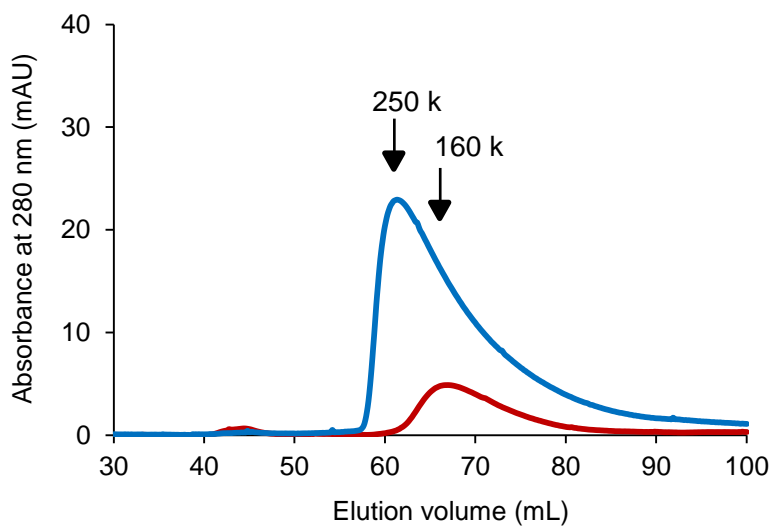
A**B**

Fig. 3-5. ゲルろ過クロマトグラフィーによるTurA, TurBの会合度の確認.

縦軸はタンパク質由来の波長280 nmの吸光度を、横軸は溶出容量を表している. (A) TurAの濃度120 μM (青色線)と20 μM (赤色線)での結果. (B) TurBの濃度130 μM (青色線)と21 μM (赤色線)での結果. 検量線から推定される分子量を図中に示した.

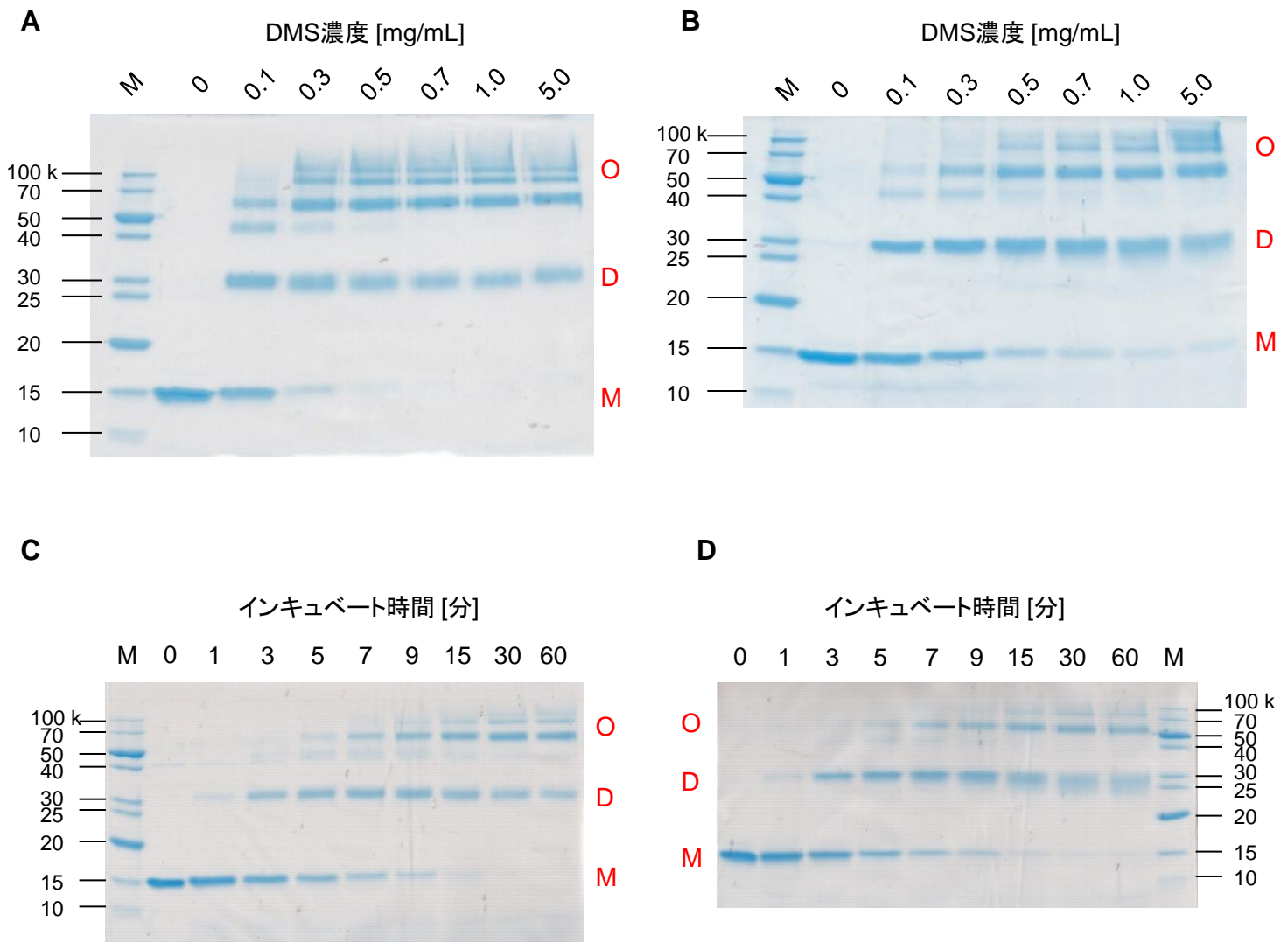


Fig. 3-6. タンパク質間クロスリンク法によるTurA, TurBの会合度の確認.

(A), (B) 架橋剤 (DMS) の濃度の検討. TurA (A) またはTurB (B) を0.14 mg/mL (TurA 9.3 μ M; TurB 9.7 μ M) に調整し, DMS添加後に60分間インキュベートしたサンプルを2 μ gずつ供したSDS-PAGEの結果を示した. Mはマーカを, 各レーンの数値は添加したDMSの濃度 (mg/mL) を表している. (C), (D) 経時的なバンドパターンの変化. TurA (C) またはTurB (D) を0.14 mg/mLに調整し, DMSを1.0 mg/mLで添加したサンプルを2 μ gずつ供したSDS-PAGEの結果を示した. Mはマーカを, 各レーンの数値はDMS添加後のインキュベート時間(分)を表している. 単量体, 二量体, 多量体に相当するバンドをそれぞれ赤字のM, D, Oで示した.

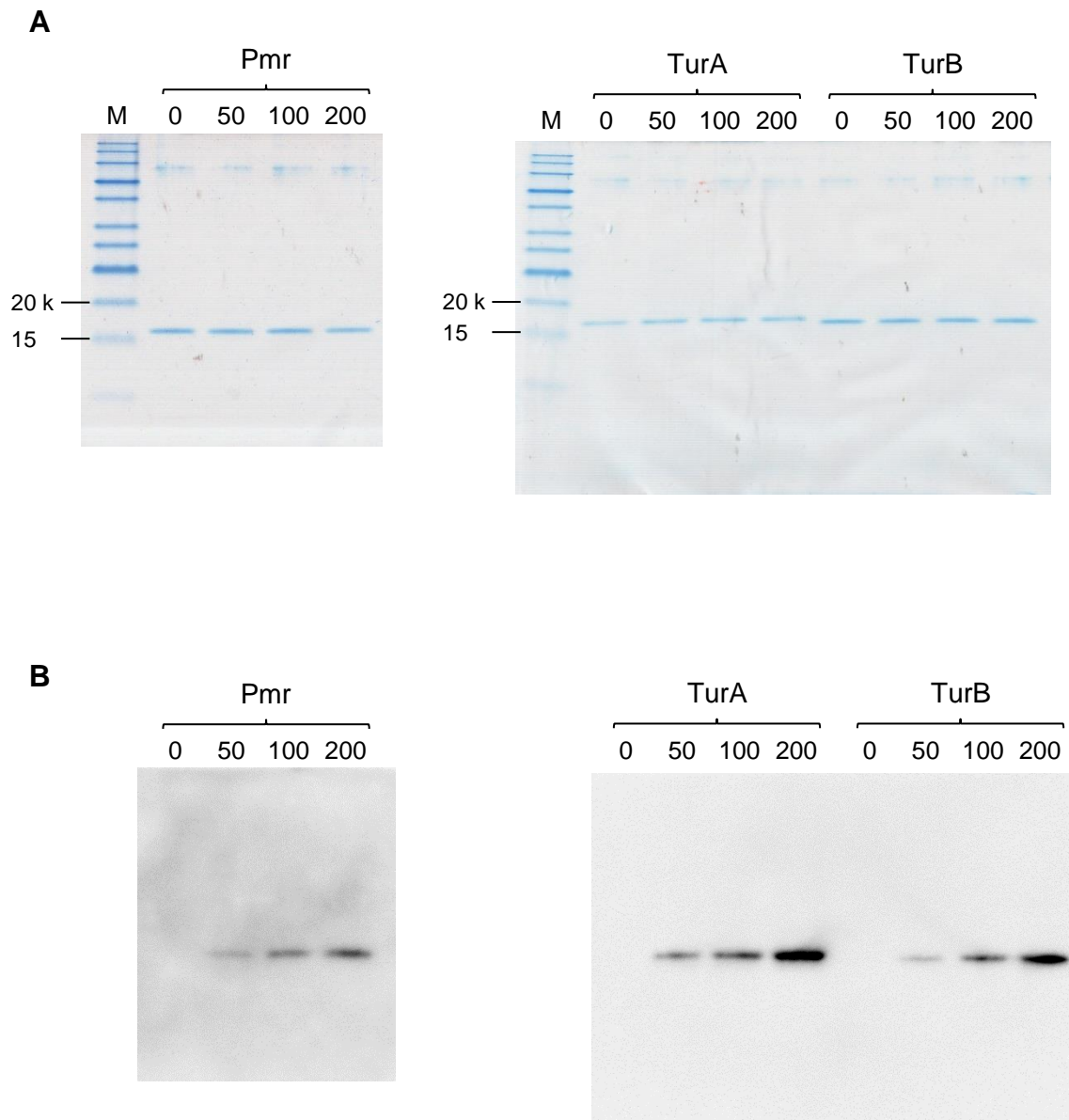


Fig. 3-7. Pmr, TurA, TurBのビオチン化の確認.

EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinでビオチン化したPmr, TurA, TurBを100 ngずつ (A) Tricine-SDS-PAGE, (B) streptavidin-horseradish peroxidase conjugateを用いたウェスタンブロットティングに供した. Mはマーカーを, 各レーンの数値はビオチン化試薬／タンパク質のモル比を示している.

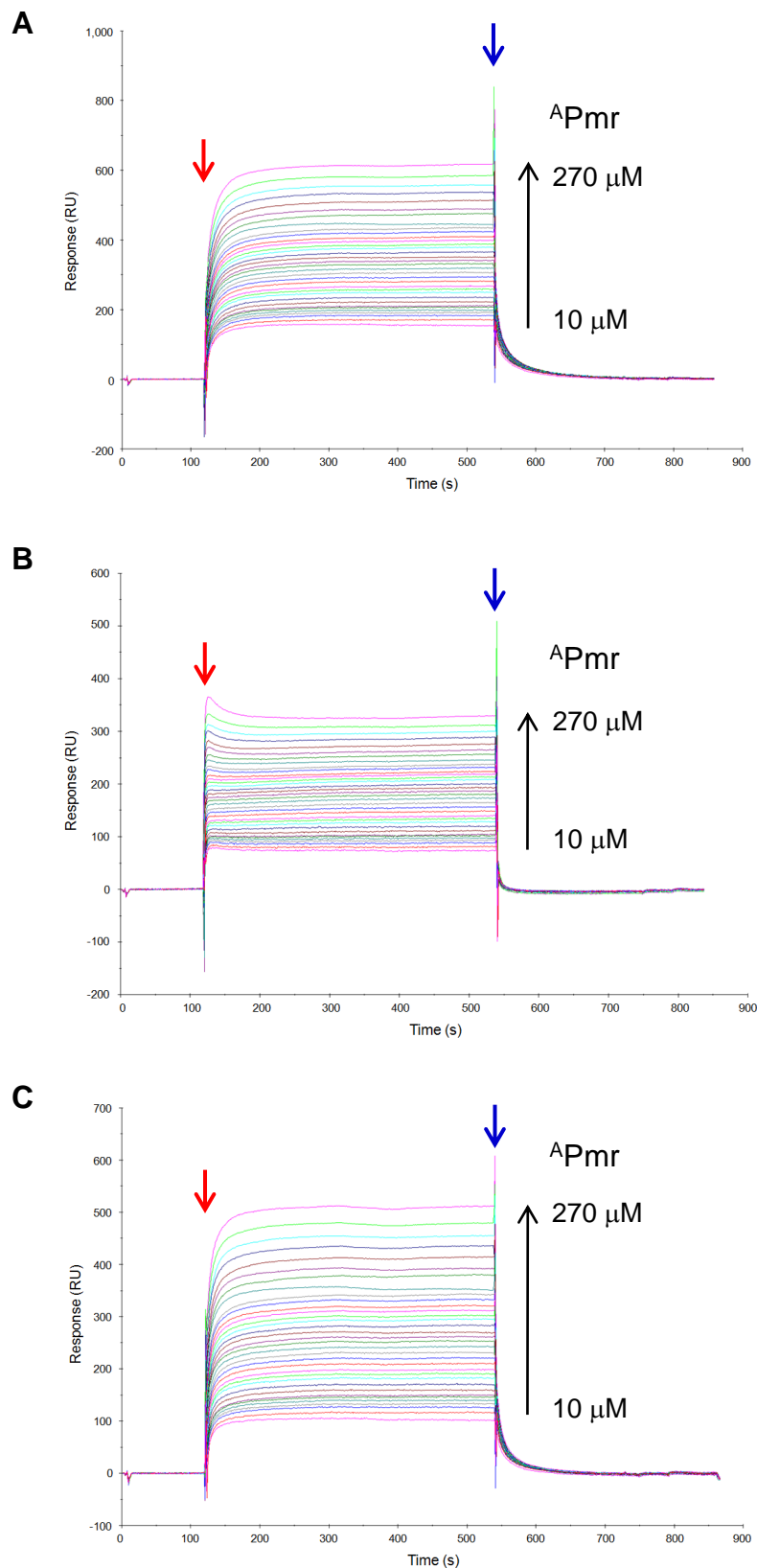


Fig. 3-8. SPRで検出されたセンサーグラム.

リガンドを各フローセルに約500 RUの上昇が見られるように固定し, A^{Pmr} を30 $\mu\text{L}/\text{min}$ で7分間流した際に得られた (A) ${}^L\text{TurA}-A^{Pmr}$, (B) ${}^L\text{TurB}-A^{Pmr}$, (C) ${}^L\text{Pmr}-A^{Pmr}$ 間相互作用のセンサーグラムを示した. 縦軸はresonance unit (RU) を, 横軸は時間(秒)を表す. A^{Pmr} は10~270 μM の濃度でフローセルに流し, 異なる濃度で得られたセンサーグラムを異なる色で重ねて示した. リガンドを固定していないフローセルで検出されたRUを差し引いた値を使用した. A^{Pmr} の添加を開始した点を赤矢印で, 添加を終了した点を青矢印で示した.

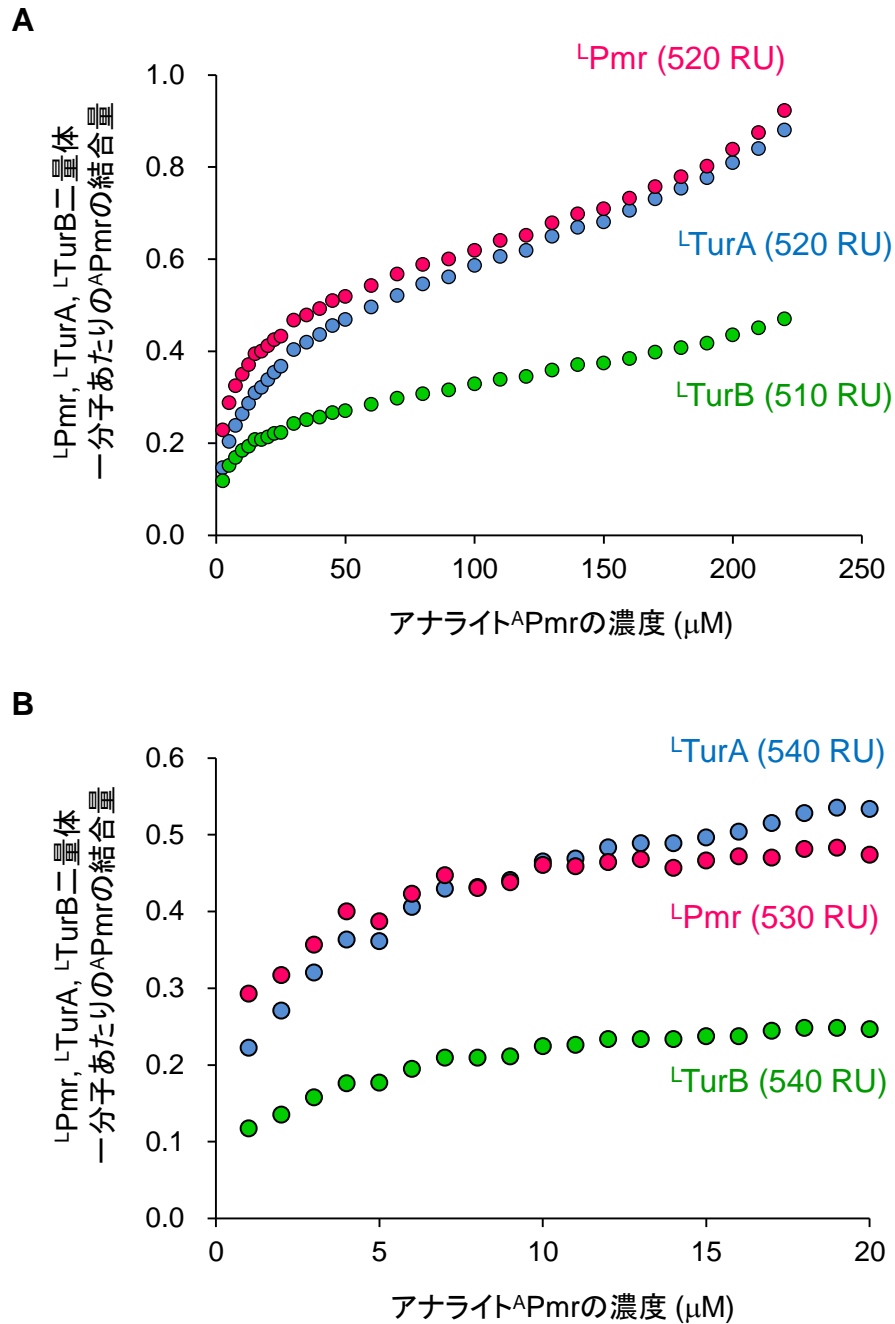


Fig. 3-9. Pmr-Pmr, TurA-Pmr, TurB-Pmr間の結合比.

縦軸はリガンド二量体一分子あたりのアナライトの結合量を、横軸はアナライトの濃度を表している。図中に各リガンドの固定量を示した。リガンド二量体一分子あたりのアナライトの結合量については、反応が平衡に達した時のRU値 (R_{eq}) を各リガンドの固定量で割ることで算出した。 $^{\text{A}}\text{Pmr}$ の濃度が高いサンプルを用いた場合 (A)、濃度が低いサンプルを用いた場合 (B) の結果をそれぞれ示した。

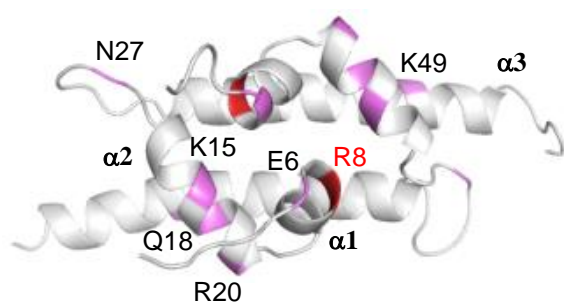
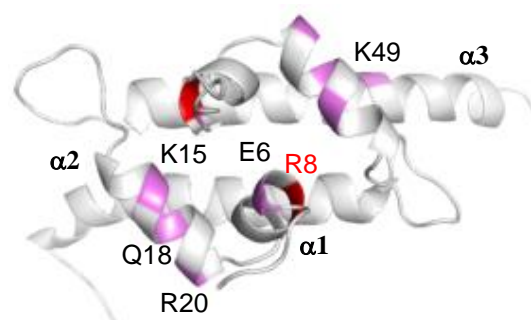
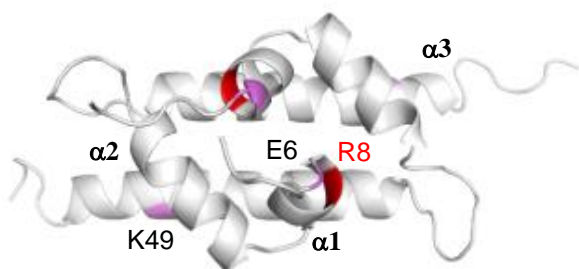
A**B****C**

Fig. 3-10. Pmrのホモ多量体形成に重要な7残基のTurA, TurBにおける保存性.

(A) Pmrのホモ多量体形成に重要な7残基. 第2章で同定された7残基を二量体のモデル構造上に示した. (B) TurAにおける保存性. 上述の7残基のうち, TurAで保存されている6残基を示した. (C) TurBにおける保存性. 上述の7残基のうち, TurBで保存されている3残基を示した. 7残基のうちPmrのホモ多量体形成への寄与が最も高いと予測されたR8については赤色で, 他はモデル構造においてピンク色で示した. $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ はN末端側から数えた α ヘリックスの名前を表す.

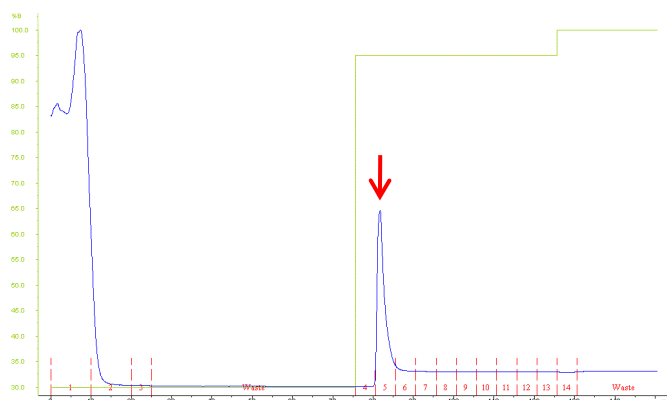
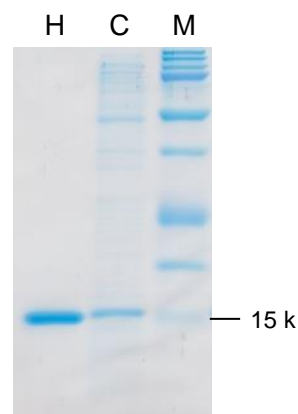
A**B**

Fig. 3-11. TurA^{K15Q/Q18M/R20Q}のアフィニティー精製.

(A) TurA^{K15Q/Q18M/R20Q}のmetal chelate affinity chromatographyにおける溶出プロファイル. 目的タンパク質のピークを赤い矢印で示した. 青い線はタンパク質由来の波長280 nmの吸光度を, 黄緑色の線はbuffer B (0.5 Mイミダゾールを含む)の割合(縦軸)を, 赤い線と数字はフラクションを表す. (B) 精製状態の確認. Mはマーカを, Cは細胞抽出液を, Hはアフィニティー精製後のサンプルを表す. 各レーン2 μ gのタンパク質をTricine-SDS-PAGEに供した.

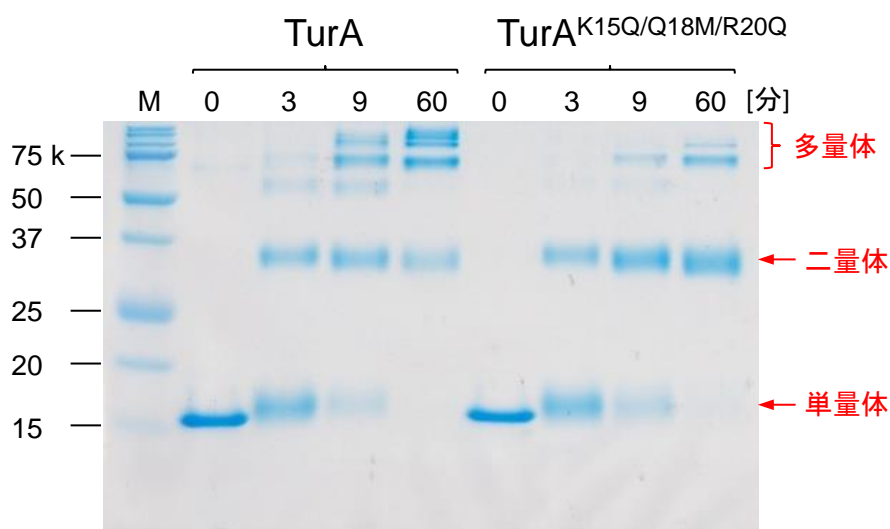


Fig. 3-12. タンパク質間クロスリンク法によるTurA^{K15Q/Q18M/R20Q}の会合度の確認.

タンパク質は0.14 mg/mL (9.3 μ M) に調整し, DMSを1.0 mg/mLで添加したサンプルを2 μ gずつ供したTricine-SDS-PAGEの結果を示した. Mはマーカを, 各レーンの数値はDMS添加後のインキュベート時間(分)を表している. 単量体, 二量体, 多量体に相当するバンドを図中に示した.

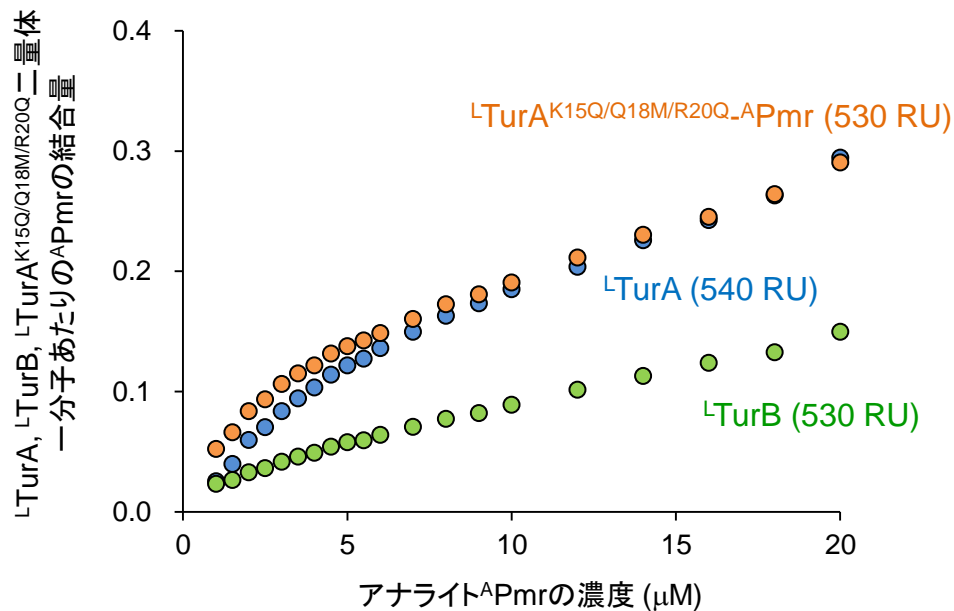


Fig. 3-13. TurA-Pmr, TurB-Pmr, TurA^{K15Q/Q18M/R20Q}-Pmr間の結合比.

縦軸はリガンド二量体一分子あたりのアナライツの結合量を、横軸はアナライツの濃度を表している。図中に各リガンドの固定量を示した。リガンド二量体一分子あたりのアナライツの結合量については、反応が平衡に達した時のRU値 (R_{eq}) を各リガンドの固定量で割ることで算出した。

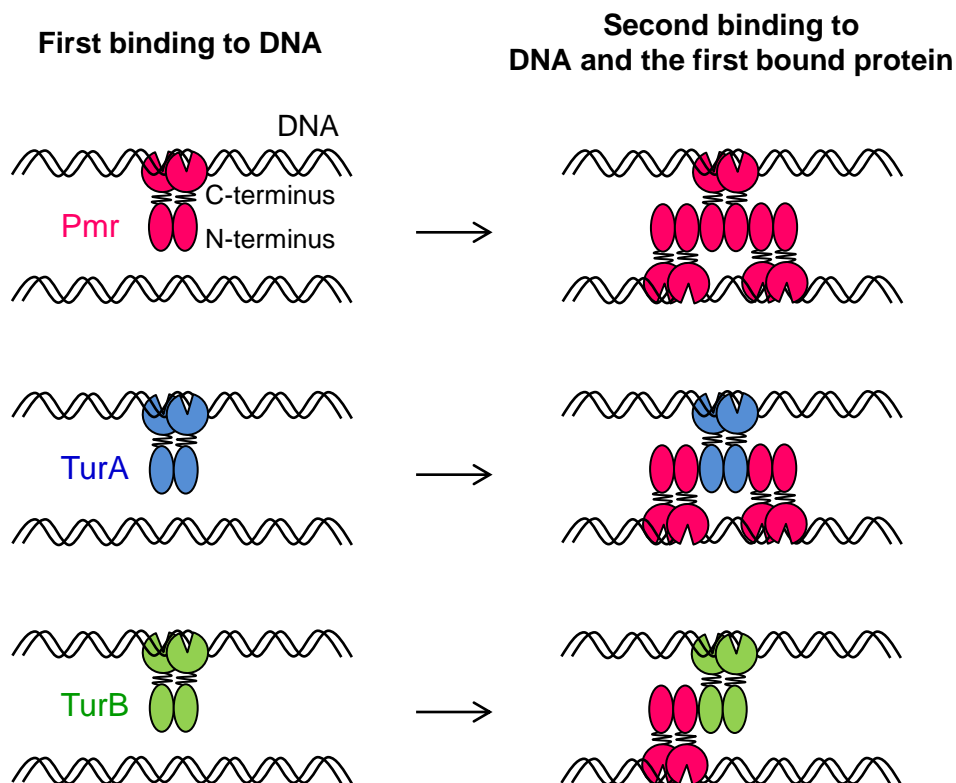


Fig. 3-14. Pmrのホモ・ヘテロ多量体形成機構の模式図.

Pmr, TurA, TurBのホモ二量体がDNA上に「足場」として存在する時、Pmrホモ二量体が結合していく様子を模式的に描いた。本章の結果からTurB-Pmr間の結合比はTurA-Pmr, Pmr-Pmr間の約半分であることが示唆されたため、TurBが足場となる箇所に結合するPmrの分子数はTurA, Pmrが足場となる箇所の約半分になると予想される。

第 4 章

Pmr の DNA 結合能の解析

4-1 緒言

H-NS がまず高親和性塩基配列に結合し、その後 DNA 上で多量体化する [Bouffartigues *et al.*, 2007; Lang *et al.*, 2007] ことを考えると、Pmr にも高親和性の塩基配列が存在すると予想される。しかし、過去に行われた ChAP-chip 解析では Pmr, TurA, TurB のヘテロ多量体が検出されたためか、Pmr, TurA, TurB のいずれでもほとんど同じ領域が結合箇所として検出されてしまい、結合箇所の分布から Pmr に特異的な結合配列を同定することはできなかった [Yun and Suzuki *et al.*, 2010; 尹ら, 未発表データ]. そこで本章では、Pmr が H-NS 同様に DNA に結合することを確認すると共に、Pmr, TurA, TurB の DNA 結合ドメインのみから成るタンパク質を作製し、これらの結合配列を比較することを目的とした。

4-2 材料と方法

4-2-1 使用した菌株, プラスミド, 及び培養条件

本章ではプラスミド構築のために *E. coli* DH5 α 株 (Toyobo) を, タンパク質発現のために *E. coli* BL21(DE3)株 (Novagen) を使用した. 本章で使用したプラスミドは Table 4-1 に示した. 大腸菌の培養条件は第 2 章 2-2-1 に従い, *P. putida* KT2440(pCAR1)株は 30°C で LB 培地を用いて培養した.

4-2-2 タンパク質発現用プラスミドの構築

第 2 章 2-2-8 と同様に Table 4-2 のプライマーを用いて行った.

4-2-3 *E. coli* BL21 (DE3)株を用いた目的タンパク質の大量発現

第 2 章 2-2-13 と同様に行った.

4-2-4 His-tag による目的タンパク質のアフィニティー精製

第 2 章 2-2-14 と同様に buffer A (20 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.5 M NaCl, 10%グリセリン) 及び buffer B (20 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.5 M NaCl, 10%グリセリン, 0.5 M イミダゾール) を用いて行った.

4-2-5 SDS-PAGE, Tricine-SDS-PAGE

第 2 章 2-2-12 と同様に行った.

4-2-6 タンパク質間クロスリンク法

第 2 章 2-2-19 と同様に行った.

Table 4-1. 本章で使したプラスミド.

Plasmid vectors	Relevant properties ^a	Reference or source
pET26b(+)	pBR322 replicon, Km ^r , T7 promoter, <i>lacI</i>	Novagen
pET-C-His-pmr	pET-26b(+), <i>NdeI-XhoI</i> fragment containing <i>pmr</i>	Yun and Suzuki <i>et al.</i> , 2010
pET-N-His-pmr_ct	pET26b(+), <i>NdeI-XhoI</i> fragment containing the gene encoding the C-terminal part of Pmr (residues 74-119) with 6×His at its N-terminus	This study, Suzuki <i>et al.</i> , 2011
pET-N-His-turA_ct	pET26b(+), <i>NdeI-XhoI</i> fragment containing the gene encoding the C-terminal part of TurA (residues 78-125) with 6×His at its N-terminus	This study
pET-N-His-turB_ct	pET26b(+), <i>NdeI-XhoI</i> fragment containing the gene encoding the C-terminal part of TurB (residues 75-119) with 6×His at its N-terminus	This study
pT7Blue T-Vector	Ap ^r , <i>lacZα</i> , T7 promoter, f1 origin, pUC/M13 priming sites	Novagen
pTCAR157-158	pT7Blue T-Vector containing 167,819-168,073 region of pCAR1	This study, Suzuki <i>et al.</i> , 2011
pTCAR20	pT7Blue T-Vector containing 14,934-15,187 region of pCAR1	This study, Suzuki <i>et al.</i> , 2011
pUC19	pMB9 replicon, Ap ^r , <i>lacZα</i>	Sambrook and Russell, 2001
pUC118	pMB9 replicon, Ap ^r , <i>lacZα</i> , M13IG	Takara Bio

^aAp^r and Km^r represent resistance to ampicillin and kanamycin, respectively.

Table 4-2. 本章で使したオリゴヌクレオチド.

Primer	Sequence (5' → 3') ^a	Reference
pmr_ct-N-His-F	<u>CATATGCACCACCACCACCACCACCGTGC</u> GCAACG AGCAGTC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , 2011
pmr_ct-N-His-R	<u>CTCGAGTCACTGGGTTCGCCATGTCTC</u>	This study, Suzuki <i>et al.</i> , 2011
turA_ct-N-His-F	<u>CATATGCACCACCACCACCACCACAAGCGCGCACG</u> CAAGGTCA	This study
turA_ct-N-His-R	<u>CTCGAGTCACTCCAGCAGGGTTGCCC</u>	This study
turB_ct-N-His-F	<u>CATATGCACCACCACCACCACCACCGCCGCCCGCG</u> GGTGGTC	This study
turB_ct-N-His-R	<u>CTCGAGTCAGCGTACCCAGCTTTCTAC</u>	This study
pCAR1-157-158-F	GGATTGGCTGGTGAGTGAGT	This study, Suzuki <i>et al.</i> , 2011
pCAR1-157-158-R	CAATGGATTTCGCATGTTGTC	This study, Suzuki <i>et al.</i> , 2011
pCAR1-20-F	GACCTGCAAGGCCAGGTG	This study, Suzuki <i>et al.</i> , 2011
pCAR1-20-R	CTCGACATCCTGGTCAACAA	This study, Suzuki <i>et al.</i> , 2011
M13-F	GTAACACGACGGCCAGT	Takahashi <i>et al.</i> , 2009b
M13-R	GGAAACAGCTATGACCATG	Takahashi <i>et al.</i> , 2009b
Oligo X	GCAAGCTTGTCAGCATGCGGATCNNNNNNNNNN NNNNAATTCGCAGCTGCAGTCTAGAC	Yanagisawa and Schmidt, 1999
Oligo Y	GCAAGCTTGTCAGCATGCGGATC	Yanagisawa and Schmidt, 1999
Oligo Z	GTCTAGACTGCAGTGCGAATT	Yanagisawa and Schmidt, 1999
Oligo X2	GAACGTTAGCCTGTAGGAGTACCNNNNNNNNNN NNNNAGTCCACTGATCCTGACGACAC	This study
Oligo Z2	GTGTCGTCAGGATCAGTGGACT	This study

^a*NdeI* and *XhoI* restriction sites are underlined. N represents any of the nucleotides of A, T, G, or C.

4-2-7 Digoxigenin (DIG) ラベルしたプローブを用いたゲルシフトアッセイ

DIG Gel Shift Kit 2nd Generation (Roche) を用い、添付のプロトコールを参考に行った。

<プローブの作製>

- ① 1.5 mL チューブに以下の反応系 (total volume 20 μ L) を混合し、37°C で 1 時間インキュベートした。

x μ L	プローブ作製に使用する DNA 断片 (100 ng)
10-x μ L	MilliQ 水
4 μ L	5×Labeling buffer (vial 1)
4 μ L	CoCl ₂ solution (vial 2)
1 μ L	DIG-ddUTP solution (vial 3)
1 μ L	Terminal transferase (vial 4)

- ② 氷上に移し、2 μ L の 0.2 M EDTA と 3 μ L の MilliQ 水を加え、-20°C で保存した。

<電気泳動用ゲルの作製>

電気泳動には Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad) を使用した。Acrylamide/Bis (19:1) 濃度は 5% で行った。

試薬

- 10×TBE buffer
108 g Tris
55 g Boric acid
MilliQ 水に溶解させ、40 mL の 0.5 M EDTA を加え、1 L に fill up して室温で保存した。
- 30% (w/v) Acrylamide/Bis (19:1) (Bio-Rad)
- TEMED
- APS

操作 (試薬はゲル 2 枚分の量を示した。)

- ① 30% (w/v) Acrylamide/Bis (19:1) 3.32 mL, 10×TBE buffer 0.5 mL, MilliQ 水 16.18 mL, TEMED 15 μ L, 20% APS 100 μ L を穏やかに混合した。ただし TEMED と APS は以下の操作に進む直前に加えた。
- ② 組み立てた Mini-Protean 3 Cell のゲル板の上部まで①の溶液を流し込み、コームを差し、室温で 30 分程静置してゲルを完全に固めた。
- ③ ポリアクリルアミドゲルを泳動槽にセットし、0.25×TBE buffer を泳動槽に満たして 120 V の電圧をかけて 30 分以上静置した (プレラン)。

<タンパク質と DNA のインキュベート, 電気泳動>

試薬

- TEN buffer (pH 8.0)
10 mM Tris
1 mM EDTA

100 mM NaCl

MilliQ 水を用いて作製し，室温で保存した．

操作

- ① 1.5 mL チューブに以下の反応系 (total volume 10 μ L) を混合し，室温で 15 分間インキュベートした．なおプローブ (DIG ラベルした DNA 断片) は TEN buffer で 10 倍希釈してから使用した．

2 μ L 5 \times Binding buffer (vial 5)

0.5 μ L Poly [d(I-C)] (vial 9)

0.5 μ L Poly L-lysine (vial 11)

0.5 μ L DIG ラベルした DNA 断片 (TEN buffer で 10 倍希釈したもの)

y μ L 精製タンパク質

z μ L コンペティターDNA (DIG ラベルしていない DNA 断片)

6.5-y-z μ L MilliQ 水

- ② 2.5 μ L の Loading buffer with bromophenol blue (vial 13) を各サンプルに加え，プレランを終了したゲルに全量アプライした．
- ③ 120 V の電圧をかけて泳動し，bromophenol blue がゲルの下端まで移動したところで泳動を終了した．

<メンブレンへの転写>

- ① ゲル 1 枚につき，縦 7 cm \times 横 9 cm に切断したメンブレン (Biodyne[®] B 0.45 μ m, PALL)，縦 10 cm \times 横 12 cm に切断した濾紙を 8 枚準備し，0.25 \times TBE buffer に浸した．
- ② セミドライ式転写装置に，下から，濾紙 4 枚，メンブレン，ゲル，濾紙 4 枚の順に重ねてローラーで気泡を抜き，300 mA 定電流，30 V 以下で 60 分間ブロッティングした．
- ③ メンブレンをラップで包み，転写した面を下向きにして，FAS-II (Toyobo) を用いて UV に 3 分間照射した．なおこの段階で，必要に応じて 4 $^{\circ}$ C で一晩保存した．

<検出>

試薬

- 10 \times Maleic acid buffer
1 M Maleic acid
1.5 M NaCl
粒状の NaOH 及び 1 N NaOH を用いて pH 7.5 に調整し，オートクレーブ後に室温で保存した．
- Maleic acid buffer
10 \times Maleic acid buffer を MilliQ 水で 10 倍に希釈し，オートクレーブ後に室温で保存した．
- Blocking stock solution
Maleic acid buffer に Blocking reagent を 10% (w/v) となるように溶解させ，オートクレーブ後に 4 $^{\circ}$ C で保存した．

- Detection buffer

0.1 M Tris

0.1 M NaCl

1 N HCl で pH 9.5 に調整し、孔径 0.22 μm のフィルターで濾過して 4°C で保存した。

操作 (メンブレン 1 枚あたりの操作を示した.)

- ① メンブレンを maleic acid buffer が入った容器に移し、5 分間振盪した。その後バッファを捨てた。
- ② 容器に maleic acid buffer 9 mL と blocking stock solution 1 mL を加えて混合し、30 分間ゆっくり振盪した。その後バッファを捨てた。
- ③ 容器に maleic acid buffer 10 mL と anti-digoxigenin AP-Fab fragment (vial 14) 1 μL を加えて混合し、30 分間ゆっくり振盪した。その後バッファを捨てた。
- ④ 容器に十分量の maleic acid buffer を入れ、15 分間激しく振盪した。その後バッファを捨てた。
- ⑤ ④の操作をもう一度繰り返した。
- ⑥ メンブレンを少量の detection buffer に浸して約 2 分間静置した。
- ⑦ ラップの上に 1 mL の detection buffer を乗せ、10 μL の CSPD (vial 15) を加えて混合した。この溶液にメンブレンを浸し、10 分間静置した。
- ⑧ バイオイメージングアナライザー LAS1000 plus (FUJIFILM) で検出を行った。

4-2-8 ^{32}P ラベルしたプローブを用いたゲルシフトアッセイ

<プローブの作製>

- ① 1.5 mL チューブに以下の反応系 (total volume 50 μL) を混合し、37°C で 30 分間インキュベートした。

x μL	プローブ作製に使用する DNA 断片 (50 ng)
40-x μL	MilliQ 水
5 μL	10 \times T4 Polynucleotide Kinase buffer (Takara Bio)
2 μL	10 \times T4 Polynucleotide Kinase (Takara Bio)
3 μL	$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (9.25 MBq, Perkin Elmer)
- ② illustraTM MicroSpinTM G-25 Columns (GE Healthcare) を用いて未反応の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を除去した。操作は添付のプロトコールに従った。
- ③ 液体シンチレーションカウンター LSC-5100 (Aloka) を用いてラベリング効率を確認した。クリアゾル I (Nacalai Tesque) を用いて②の操作終了後の溶液 1 μL あたりの counts per minute (cpm) を測定し、数万 cpm 以上の値が出ることを確認して次の操作に進んだ。

<電気泳動用ゲルの作製>

4-2-7 の同項と同様に、Acrylamide/Bis (19:1) 濃度を 6% にして作製した。0.25 \times TBE buffer, 120 V で 30 分以上プレランを行った。

<タンパク質と DNA のインキュベート, 電気泳動>

- ① 1.5 mL チューブに以下の反応系 (total volume 10 μ L) を混合し, 室温で 15 分間インキュベートした. プローブは TEN buffer (4-2-7 参照) で 10 倍希釈してから使用した. 反応系中の poly[d(I-C)]の量を変更する場合は MilliQ 水の量を減らすことで対応した. またタンパク質溶液は MagneHis Binding/Wash Buffer (Promega) でバッファー交換したものを同バッファーで希釈して使用した.

2.5 μ L MilliQ 水

2 μ L 5 \times Binding buffer (DIG Gel Shift Kit 2nd Generation, Roche, vial 5)

0.5 μ L Poly[d(I-C)] (1 μ g/ μ L, DIG Gel Shift Kit 2nd Generation, Roche, vial 9)

3 μ L タンパク質溶液

2 μ L ³²P ラベルした DNA 断片 (TEN buffer で 10 倍希釈したもの)

- ② 2.5 μ L の Loading buffer with bromophenol blue (DIG Gel Shift Kit 2nd Generation, Roche, vial 13) を各サンプルに加え, プレランを終了したゲルに全量アプライした.
- ③ 120 V の電圧をかけて泳動し, bromophenol blue がゲルの下端まで移動したところで泳動を終了した.

<検出>

- ① ゲル 1 枚につき縦 10 cm \times 横 12 cm に切断した濾紙を 4 枚準備し, 4 枚重ねた濾紙の上に泳動が終了したゲルを乗せ, 食品用ラップフィルムで包み, ゲルドライヤーを用いて 70°C で 30 分間乾燥させた.
- ② イメージングプレートに 3 時間〜一晩感光させた.
- ③ イメージングプレートを FLA-5000 (FUJIFILM) で検出した. IPS モード, Gradation 16 bit, Resolution 50 μ m, Laser 635 nm に設定して検出を行った.

4-2-9 原子間力顕微鏡による観察

原子間力顕微鏡 (atomic force microscopy, AFM) を用いた観察は Dame *et al.* (2000, 2005) の方法を参考に, MultiMode scanning probe microscope (Veeco) と Nanoscope IIIa controller (Veeco) を用いて行った. なお本項で使用したプラスミド pUC19 は LaboPassTM Mini, Plasmid DNA Purification Kit (Hokkaido System Science) を用いて精製した.

試薬

- 5 \times AFM buffer
 - 200 mM HEPES (pH 7.9)
 - 50 mM MgCl₂
 - 300 mM KCl
- MilliQ 水で調製し, 室温で保存した.

操作

- ① 1.5 mL チューブに以下の反応系 (total volume 10 μ L)を混合し, 30°C で 30 分間インキュ

べートした。なお、精製タンパク質を加えずにプラスミドのみで観察する場合には、タンパク質精製のバッファーのみを加えた。

2 μ L 5 \times AFM buffer

x μ L pUC19 (82 ng)

y μ L 精製タンパク質（またはバッファーのみ）

8-x-y μ L MilliQ 水

- ② インキュベート後の溶液に 70 μ L の MilliQ 水を加えて混合した。
- ③ 観察用の基盤として使用する薄い雲母板 (SPI Supplies) をセロハンテープで 1 枚めくり、新しい面を出した。
- ④ 雲母板の表面に②の溶液 (計 80 μ L) のうち 20 μ L を乗せて、室温で 5 分間静置した。
- ⑤ MilliQ 水 1 mL で雲母板の表面を流し、水分をエアダスターで吹き飛ばした。
- ⑥ 雲母板を本体にセットし、空気中におけるタッピングモードで表面の観察を行った。プローブには NCHV silicon probes (Veeco) を使用し、1.0 Hz で走査した。観察像は全て "flatten auto" で処理を行い、高さは 3 nm に設定した。

4-2-10 *P. putida* KT2440 株からの total DNA の抽出

試薬

- ・ TE buffer
- ・ 10% SDS
- ・ 20 mg/mL Proteinase K solution
- ・ 5 M NaCl
- ・ Hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)/NaCl solution

4.1% (w/v) NaCl

10% (w/v) CTAB

調製後は室温で保存した。

- ・ クロロホルム
- ・ フェノール/クロロホルム
- ・ 2-プロパノール
- ・ 70% エタノール
- ・ RNase A (Nippon Gene)

操作

- ① *P. putida* KT2440 株のシングルコロニーを LB 培地 5 mL に植菌し、30°C, 300 strokes/min で 17~22 時間培養した。
- ② 2 mL チューブに集菌し、TE buffer 567 μ L を加えて菌体を懸濁した。
- ③ 10% SDS を 30 μ L, proteinase K solution を 3 μ L 加え、ローテーターで 5 分間穏やかに攪拌した。

- ④ 37°C で 7 時間インキュベートした。
- ⑤ 5 M NaCl を 100 μ L, 65°C に加温した CTAB/NaCl solution を 80 μ L 加え、ローテーターで 3 分間穏やかに攪拌した後、65°C で 10 分間インキュベートした。
- ⑥ クロロホルムを 800 μ L 加えてローテーターで 3 分間穏やかに攪拌し、13,000 rpm, 室温で 5 分間遠心を行った後、上清を新しい 2 mL チューブに回収した。この際 DNA が切れることを防ぐために、チップの先端をハサミで切断し太くしてからゆっくりと回収した。
- ⑦ フェノール/クロロホルムを 400 μ L 加えてローテーターで 3 分間穏やかに攪拌し、13,000 rpm, 室温で 5 分間遠心を行った後、上層を新しい 1.5 mL チューブに⑥と同様に回収した。
- ⑧ 2-プロパノールを 700 μ L 加えてローテーターで 5 分間穏やかに攪拌した後、13,000 rpm, 室温で 5 分間遠心を行い、上層を除去した。
- ⑨ 70%エタノールを 400 μ L 加え、チューブ壁面を穏やかに洗浄した後、15,000 rpm, 室温で 5 分間遠心を行い、上清を除去した。
- ⑩ デシケーターで 5 分程度乾燥させた。
- ⑪ 100 μ L の TE buffer を加えて沈殿を溶解させ、RNase A を終濃度 0.1 mg/mL になるように加えて 37°C で 1 時間インキュベートした。その後 -20°C で保存した。

4-2-11 *P. putida* KT2440(pCAR1)株のゲノムライブラリーの作製

<DNA の断片化>

東京農業大学の吉川博文先生、松本貴嗣博士の指導のもと実験を行った。

- ① 4-2-10 の方法で調製した 5 μ g の total DNA を 130 μ L の TE buffer に溶解させた。
- ② Acoustic Solubilizer (Covaris) を 200 bp の断片が最も多くなるように設定し、推奨プロトコールに従い超音波破碎による DNA の断片化を行った。
- ③ ①, ②の操作をさらに 2 回繰り返し、計 15 μ g 分の DNA 断片溶液を得た。
- ④ 得られた DNA 断片を QIAquick PCR purification kit (Qiagen) と MinElute Spin column (Qiagen) を用いて精製、濃縮した。操作は添付のプロトコールに従った。
- ⑤ 2%アガロースゲルで泳動し、マーカーの 100, 200, 300 bp のバンドを目印に、100~300 bp の領域を切り出した。
- ⑥ QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) を用いて DNA 断片を精製した。操作は添付のプロトコールに従った。

<DNA 断片の末端修復>

東京農業大学の吉川博文先生、松本貴嗣博士の指導のもと実験を行った。操作は Illumina 社の Multiplexing Sample Preparation Guide に従って行った。

- ① 以下の反応系 (total volume 100 μ L) を氷上で混合した。
45 μ L MilliQ 水

30 μ L 断片化後の DNA 溶液

10 μ L T4 DNA Ligase Buffer with 10 mM ATP (New England Biolabs)

4 μ L 10 mM dNTP mix (New England Biolabs)

5 μ L T4 DNA Polymerase (New England Biolabs)

1 μ L Klenow Enzyme (New England Biolabs)

5 μ L T4 Polynucleotide Kinase (New England Biolabs)

② サーマルサイ클ラーを用いて, 20°C で 30 分間インキュベートした.

③ QIAquick PCR purification kit (Qiagen) を用いて DNA 断片を精製, 濃縮した.

<ゲノムライブラリーの取得>

① pUC118 *HincII*/BAP (Takara Bio) と DNA 断片をモル比で 1:5, 1:7, 1:10 となるように混合し, DNA 溶液の半分量の Ligation high (Toyobo) を混合して 16°C で 16 時間インキュベートした.

② 各ライゲーション産物で *E. coli* DH5 α を形質転換した. コンピテントセルには Competent high DH5 α (Toyobo) (100 μ L \times 3 本) を用い, 推奨プロトコールに従って形質転換を行った. 回復培養後に得られた形質転換体の培養液計 2,700 μ L を LB プレートで培養し, LB 液体培地で全コロニーを懸濁して集菌した.

③ LaboPassTM Mini, Plasmid DNA Purification Kit (Hokkaido System Science) を用いてプラスミドを精製し, -20°C で保存した.

4-2-12 Genomic-SELEX

Moss and LeBlanc (2009) 及び Teramoto *et al.* (2010) の方法を参考にして行った.

試薬

- TE buffer
- フェノール/クロロホルム
- 氷冷 100%エタノール
- 氷冷 70%エタノール
- Ethachinmate (Nippon Gene)
- 3 M sodium acetate (Nippon Gene)

操作

<Genomic-SELEX スクリーニングに用いるための DNA 断片の準備>

① 以下の反応系 (total volume 50 μ L) を氷上で混合した. 本実験では PCR 酵素として KOD -plus- Neo (Toyobo) を使用した. 推奨プロトコールに従って PCR を行った.

32 μ L MilliQ 水

5 μ L 10 \times KOD -plus- Neo buffer

5 μ L 2 mM dNTPs

3 μ L 25 mM MgSO₄

1.5 μ L M13-F primer (10 μ M)
1.5 μ L M13-R primer (10 μ M)
1 μ L 4-2-11 で作製したゲノムライブラリー
1 μ L KOD -plus- Neo

- ② PCR 産物に MilliQ 水 50 μ L とフェノール/クロロホルム 100 μ L を加えてよく混合した後, 15,000 rpm, 室温で 10 分間遠心を行い, 上層を新しい 1.5 mL チューブに移した.
- ③ 3 M sodium acetate を 3.3 μ L, ethachinmate を 1 μ L, 氷冷 100%エタノールを 250 μ L 加えてよく混合し, 氷上で 5 分間静置した.
- ④ 15,000 rpm, 4°C で 15 分間遠心を行った後, 上清を除去し, 氷冷 70%エタノールを 200 μ L 加え, チューブ壁面を穏やかに洗浄した.
- ⑤ 15,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心を行った後, 上清を除去し, デシケーターで 10 分程度乾燥させた.
- ⑥ 50 μ L の TE buffer を加えて沈殿を溶解させた.
- ⑦ PCR 産物 1.2 μ g 分を MilliQ 水に計 60 μ L となるように溶解させ, MagneHis Protein Purification System (Promega) の Ni-Particles を 10 μ L 混合し, 1 分間程度攪拌した後, 上清を分取した. (Ni-Particles に非特異的に結合する DNA 断片を取り除くための操作)

<SELEX スクリーニング 1 回目>

- ⑧ 以下の反応系 (total volume 100 μ L) を混合し, 室温で 15 分間インキュベートした.
65 μ L ⑦の上清
20 μ L 5×Binding buffer (DIG Gel Shift Kit 2nd Generation, Roche, vial 5)
x μ L Pmr_ct (精製後 5 mM Tris-HCl, pH 7.5 に置換したもの)
15-x μ L MilliQ 水
- ⑨ MagneHis Protein Purification System (Promega) を用いて Pmr_ct-DNA 複合体を精製した. 操作は添付のプロトコールに従った.
- ⑩ 精製後の溶液を用いて②～⑤の操作を繰り返すことで, 複合体から DNA 断片のみを精製した. 沈殿は MilliQ 水 20 μ L に溶解させた.
- ⑪ 以下の反応系 (total volume 50 μ L) を氷上で混合し, 推奨プロトコールに従って PCR を行った.
13 μ L MilliQ 水
5 μ L 10×KOD -plus- Neo buffer
5 μ L 2 mM dNTPs
3 μ L 25 mM MgSO₄
1.5 μ L M13-F primer (10 μ M)
1.5 μ L M13-R primer (10 μ M)
20 μ L ⑩の DNA 溶液
1 μ L KOD -plus- Neo

⑫ ②～⑥の方法で PCR 産物を精製した.

<SELEX スクリーニング 2 回目>

⑬ 以下の反応系 (total volume 100 μ L) を混合し, 室温で 15 分間インキュベートした.

20 μ L 5 \times Binding buffer (DIG Gel Shift Kit 2nd Generation, Roche, vial 5)

x μ L Pmr_ct (精製後 5 mM Tris-HCl, pH 7.5 に置換したもの)

y μ L PCR 産物 (1.2 μ g)

80-x-y μ L MilliQ 水

⑭ MagneHis Protein Purification System (Promega) を用いて Pmr_ct-DNA 複合体を精製した.
操作は添付のプロトコールに従った.

⑮ 精製後の溶液を用いて②～⑤の操作を繰り返すことで, 複合体から DNA 断片のみを精製した. 沈殿は MilliQ 水 20 μ L に溶解させた.

⑯ ⑪の方法で PCR を行った.

⑰ ②～⑥の方法で PCR 産物を精製した.

<SELEX スクリーニング 3 回目以降>

⑱ ⑬～⑰を必要な回数繰り返した.

4-2-13 Klenow Fragment を用いた二本鎖 DNA の合成

Table 4-2 の Oligo X と Oligo Z, または Oligo X2 と Oligo Z2 をそれぞれ 1:2 (モル比, 1,000 pmol と 2,000 pmol または 600 pmol と 1,200 pmol) となるように混合し, MilliQ 水で計 42 μ L となるように調整した後, サーマルサイクラーを用いて 95°C で 3 分間加熱した. その後温度を 37°C に設定し, 5 μ L の 10 \times Klenow Fragment buffer (Takara Bio), 2 μ L の dNTP mix (2.5 mM each, Takara Bio), 1 μ L の Klenow Fragment (Large Fragment *E. coli* DNA Polymerase I, Takara Bio) をこの順に加えて 60 分間インキュベート後, 65°C で 5 分間加熱することで酵素を失活させた. 反応産物を Agarose X (Nippon Gene) と 0.5 \times TBE buffer を用いたアガロースゲル電気泳動 (第 2 章 2-2-4 と同様に行った) に供し, 目的の反応産物を含むゲルを切り出して MonoFas[®] DNA 精製キット I (GL Sciences) で添付のプロトコールに従い精製した.

4-2-14 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) を用いた DNA の定量

DNA 1000 Kit (Agilent Technologies) を使用し, 操作は添付のプロトコールに従った.

4-2-15 SELEX

① 以下の反応系 (total volume 100 μ L) を混合し, 室温で 15 分間インキュベートした.

x μ L Pmr_ct, TurA_ct, または TurB_ct

[精製後 MagneHis Binding/Wash Buffer (Promega) でバッファー交換したもの]

20 μ L 5 \times Binding buffer (DIG Gel Shift Kit 2nd Generation, Roche, vial 5)

y μ L 4-2-13 で Oligo X と Oligo Z を用いて作製した DNA ライブラリー

2 μL Poly[d(I-C)] (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, DIG Gel Shift Kit 2nd Generation, Roche, vial 9)
78-x-y μL MilliQ 水

- ② 400 μL 1 \times Binding buffer 及び MagneHis Protein Purification System (Promega) の Ni-Particles を 30 μL 加え, 4°C, 10 rpm 程度で 1 時間インキュベートした.
- ③ 上清を除去し, MagneHis Binding/Wash Buffer (Promega) 500 μL で 1 回, 150 μL で 3 回 Ni-Particles の洗浄を行った. その後 MagneHis Elution Buffer 100 μL でタンパク質-DNA 複合体を溶出させた.
- ④ フェノール/クロロホルム 100 μL を加えてよく混合した後, 15,000 rpm, 室温で 10 分間遠心を行い, 上層を新しい 1.5 mL チューブに移した.
- ⑤ 3 M sodium acetate を 3.3 μL , ethachinmate を 1 μL , 氷冷 100%エタノールを 250 μL 加えてよく混合し, -20°C で 30 分間インキュベートした.
- ⑥ 15,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心を行った後, 上清を除去し, 氷冷 70%エタノールを 200 μL 加え, チューブ壁面を穏やかに洗浄した.
- ⑦ 15,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心を行った後, 上清を除去し, デシケーターで 10 分程度乾燥させた.
- ⑧ 20 μL の MilliQ 水を加えて沈殿を溶解させた.
- ⑨ 以下の反応系 (total volume 50 μL) を氷上で混合し, 推奨プロトコールに従って PCR を行った.

11 μL MilliQ 水

5 μL 10 \times KOD -plus- Neo buffer

5 μL 2 mM dNTPs

3 μL 25 mM MgSO_4

1.5 μL Oligo Y (10 μM)

1.5 μL Oligo Z (10 μM)

20 μL ⑧の DNA 溶液

2 μL DMSO

1 μL KOD -plus- Neo

- ⑩ PCR 産物を 4-2-14 の方法で定量した.

4-3 結果

4-3-1 Pmr の DNA 結合能の評価

(Suzuki *et al.*, 2011, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75:711-717 及び修士論文より改変・引用)

まず精製した Pmr を用いて *in vitro* で DNA への結合能を評価できるか調べるために, Pmr を用いてゲルシフトアッセイを試みた. プローブには, 以前行われた ChAP-chip 解析 [Yun and Suzuki *et al.*, 2010] において Pmr の結合が見られていた pCAR1 上の ORF157, 158 の内部に含まれる 255 bp の DNA 断片と, 結合が見られていなかった ORF20 の内部に含まれる 254 bp の DNA 断片を使用し (Fig. 4-1), DIG ラベルしたプローブを用いる手法 (4-2-7) でゲルシフトアッセイを行った. しかし, いずれのプローブを用いた場合にも Pmr の濃度を上げると分子量の大きな DNA-タンパク質複合体が観察され, Pmr の各 DNA 断片に対する親和性を評価することは難しいと判断された (Fig. 4-2). この原因として, Pmr 多量体の分子量が大きいために急激にバンドシフトが起こってしまい, DNA への親和性が見えにくくなっている可能性が考えられた.

4-3-2 Pmr の DNA 結合ドメインの同定

(Suzuki *et al.*, 2011, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75:711-717 及び修士論文より改変・引用)

4-3-1 の結果から, Pmr の DNA 結合能を評価するためには DNA 結合ドメインのみを用いる方が良いと判断し, Pmr の DNA 結合ドメインの同定を行うことにした. 第 2 章 Fig. 2-4 のアラインメントからは, N 末端側と C 末端側に保存性の高い領域が, その間に保存性の低い領域が見出だされていた. そこで C 末端側の 46 残基 (N 末端側から数えて 74~119 番目までの残基) を Pmr の DNA 結合ドメインと予測した. 本来 flexible linker が存在する箇所に His-tag を付加する方がより Pmr 全長での挙動に近いと考え, N 末端側に His-tag を付加したタンパク質 (Pmr_{ct}) を発現するプラスミドを pET26b(+)ベクターを用いて作製した. 発現条件検討は 4-2-3 の方法で行い, ベクターコントロールにはインサートを持たない pET-26b(+)を保持した *E. coli* BL21 (DE3)を使用した. Tricine-SDS-PAGE の結果 (Fig. 4-3A) から, 25°C, IPTG 終濃度 0.1 mM が最適な発現条件であると考えた. そこで誘導培養後の大腸菌から得た細胞抽出液から metal chelate affinity chromatography (4-2-4) により Pmr_{ct} を精製した. 100 mM イミダゾールで夾雑タンパク質を洗浄後, 200 mM に上昇させることで Pmr_{ct} を溶出させ (Fig. 4-3B), 十分に精製できたことを Tricine-SDS-PAGE で確認した (Fig. 4-3C). この方法で精製できたタンパク質を LB 培地 1 L あたりに換算すると約 20 mg であった.

Pmr_{ct} は二量体/多量体化ドメインを除いており単量体で存在することが予想されたため, タンパク質間クロスリンク法を用いてこの点を確認することにした. タンパク質濃度

を 0.14 mg/mL (23 μ M), 架橋剤 DMS 添加後のインキュベート時間を 60 分に固定して, DMS の濃度を変化させて実験を行った. Tricine-SDS-PAGE で検出したところ, Pmr_{ct} は DMS の濃度を上昇させても単量体以外のバンドが出現しなかった (Fig. 4-4). 以上の結果から, Pmr_{ct} は溶液中において単量体で存在することが明らかとなった.

そこで Pmr_{ct} を用いて 4-3-1 と同様にゲルシフトアッセイを行った (Fig. 4-5). いずれのプローブでも Pmr_{ct} の濃度を上昇させると泳動度が変化した, 実験に用いた Pmr_{ct} が 33~65 pmol の間では, ChAP-chip 解析で結合が見られた領域由来のプローブのみで泳動度の変化が見られた. またいずれのプローブでもコンペティター (プローブ作製に使用した DNA 断片の DIG ラベルしていないもの) を加えた場合では, Pmr_{ct} がプローブから解離する様子が観察された. 以上の結果から Pmr_{ct} が Pmr の DNA 結合ドメインであること, Pmr よりも Pmr_{ct} を用いた方が DNA への親和性を正確に評価できることが明らかとなった.

4-3-3 原子間力顕微鏡による Pmr-DNA 複合体の観察

(Suzuki *et al.*, 2011, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75:711-717 及び修士論文より改変・引用)

H-NS が多くの遺伝子の転写を抑制する分子機構は未だ明らかとなっていないが, H-NS が DNA を架橋することは以前から知られており, この作用が転写抑制に重要な働きを持つと考えられている [Dorman and Kane, 2009; Dillon and Dorman, 2010]. そこで Pmr も DNA を架橋するのか確認するために, Dame *et al.* (2000, 2005) の方法を参考にして, Pmr 存在下と非存在下におけるプラスミド pUC19 の形状の変化を原子間力顕微鏡で観察した.

pUC19 は, Pmr 非存在下では Fig. 4-6A で示すように円形に観察された. 一方, 82 ng の pUC19 に対して 64 ng の Pmr を加え (モル比 Pmr:DNA = 88:1, one dimer per 61 bp), 30°C で 30 分間インキュベート後に原子間力顕微鏡で観察したところ, H-NS の場合と同様に架橋された構造が観察された (Fig. 4-6B). しかし, 82 ng の pUC19 に対して 84 ng の Pmr_{ct} を加え (モル比 Pmr_{ct}:DNA = 280:1, one monomer per 9.6 bp), インキュベート後に観察を行ったところ, Pmr の場合とは異なり, 観察されたプラスミドの形状はタンパク質を加えていない時の形状と同様であった (Fig. 4-6C). 以上の結果から, Pmr は H-NS と同様に DNA を架橋すること, DNA 架橋の過程には二量体/多量体化ドメインが重要な役割を果たすことが明らかとなった.

4-3-4 Genomic-SELEX 法による Pmr_{ct} の高親和性塩基配列同定の試み

(修士論文より改変・引用)

ここまでの結果から, Pmr_{ct} が Pmr の DNA 結合ドメインであること, Pmr よりも Pmr_{ct} を用いた方が DNA への親和性を正確に評価できることが明らかとなった. そこで Pmr_{ct} を *in vitro* で *P. putida* KT2440(pCAR1)株ゲノムライブラリー由来の DNA 断片に結合させる

Genomic-SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法 (Fig. 4-7) [Shimada *et al.*, 2005] を用いて Pmr_{ct} の高親和性塩基配列の同定を試みることにした。

(1) ゲノムライブラリーの作製

P. putida KT2440(pCAR1)株から 4-2-10 の方法で total DNA を抽出し、Acoustic Solubilizer (Covaris) を用いて超音波破碎により断片化した。200 bp の断片長が最も多くなるように設定し、4-2-11 の方法で DNA を断片化した後、サンプルをアガロースゲル電気泳動に供し、マーカーを指標に 100~300 bp の領域を切り出して DNA 断片を精製した。DNA 断片の末端の平滑化及び 5'末端側のリン酸化は 4-2-11 の方法に従って行った。

ライブラリー作製のベクターには pUC118 *Hinc*II/BAP (Takara Bio) を用い、上述の DNA 断片と混合してライゲーション反応を行った。ライゲーション産物で Competent high DH5 α (Toyobo) を形質転換し、合計 1.6×10^5 の形質転換体を得た。*P. putida* KT2440(pCAR1)株の全ゲノム長は 6.4×10^6 bp であり、今回得られた DNA 断片の平均長が 200 bp であると仮定すると、 1.6×10^5 の形質転換体を持つインサート長の合計は全ゲノムの 5 倍の長さに匹敵するためライブラリーとして十分に機能すると考えられた。また X-Gal を添加した培地で白コロニー 20 個と青コロニー 8 個をランダムに選び、各コロニー由来のプラスミドを抽出して *Hinc*II サイト両側の *Xba*I, *Pst*I サイトで切断したところ、白コロニー全てと青コロニー 5 個で様々な長さのインサートが確認された (Fig. 4-8)。インサートが見られた 25 個のうち 4 個でバンドが 2 本見られたが、これはインサート内に偶然 *Xba*I, *Pst*I サイトが入っていたものと思われる。この点も考慮して得られたインサートの長さを計算すると、100 bp 未満が 1 個、100~199bp が 12 個、200~299 bp が 4 個、300~399 bp が 5 個、400 bp 以上が 3 個であった。以上から、ゲノムライブラリーの多様性も十分であると判断した。よって得られた形質転換体の全コロニーを回収してプラスミドを精製し、得られた混合プラスミド溶液を Genomic-SELEX のライブラリーとして使用することにした。

(2) Pmr_{ct} を用いた Genomic-SELEX

(1)で得られたゲノムライブラリーと Pmr_{ct} を用いて Genomic-SELEX を試みた。インサートを挿入したマルチクローニングサイトのすぐ外側に結合する M13-F, M13-R プライマーを用いてインサートを PCR で増幅させ、得られた DNA 断片 1.2 μ g (インサート長が 200 bp と仮定すると約 10 pmol に相当) に対して Pmr_{ct} 0, 150, 300 pmol を加えて室温で 15 分インキュベートした。インキュベート時のバッファーには、Pmr_{ct} の結合が検出されていたゲルシフトアッセイで用いたものを使用した。インキュベート後のサンプルから MagneHis Protein Purification System (Promega) で Pmr_{ct} を精製し、精製後の溶液から DNA 断片を抽出した。この DNA 断片を鋳型として、M13-F, M13-R プライマーを使用した PCR により増幅させた DNA 断片を次の SELEX スクリーニングに使用した。以上の操作を 6 回繰り返し、Pmr_{ct} と親和性が高い塩基配列が濃縮されたか確認するために、アガロースゲル電気泳動

によるバンドパターンの変化（最初はスメアで検出されるが濃縮が進むとラダーに見える
と予想される）を観察した。しかし上述の操作を 3~6 回繰り返す過程におけるバンドパ
ターンの変化は見られなかった (Fig. 4-9)。また Pmr_{ct} を入れずに行った実験 (Pmr_{ct} 0 pmol)
でも PCR 産物の増幅が見られており (Fig. 4-9)、この方法では Ni-Particles に非特異的に吸
着する DNA を除き切れていないと考えられた。以上より、本手法で Pmr_{ct} の高親和性塩
基配列を濃縮することは難しいと判断された。

4-3-5 SELEX 法による Pmr, TurA, TurB の DNA 結合ドメインの高親和性塩基配列の探索

4-3-4 の結果を受け、Yanagisawa and Schmidt (1999) の方法を参考により短い DNA 断片を
用いることで、Ni-Particles への DNA の非特異的吸着を抑えて SELEX を行うことにした。
また TurA, TurB についても DNA 結合ドメインを同定し、Pmr_{ct} と高親和性塩基配列の比較
を行うことにした。

(1) ライブラリーの作製

両端に約 20 塩基の固定配列を、中央にランダムな 15 塩基を持つ一本鎖 DNA (Oligo X) を
合成し、Oligo X の 3' 端と相補的な塩基配列を持つ Oligo Z を用いて Klenow Fragment (Takara
Bio) により二本鎖にしたものをライブラリーとして使用することにした。反応は 4-2-13 の
方法で行い、反応産物をアガロースゲル電気泳動で確認したところ、Oligo X を泳動した場
合に見られるバンドが消失し、60 bp のバンドが見られた (Fig. 4-10)。この 60 bp のバンド
を切り出し、DNA 断片を精製して Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) で定量した
ところ、目的の反応産物のピーク以外は検出されなかったため (Fig. 4-11)、純度も問題無い
と考えられた。よってこの反応産物をライブラリーとして使用することにした。

(2) TurA, TurB の DNA 結合ドメインの同定

第 2 章 Fig. 2-4 のアラインメントから、TurA については C 末端側の 48 残基 (N 末端側か
ら数えて 78~125 番目までの残基)、TurB については C 末端側の 45 残基 (N 末端側から数
えて 75~119 番目までの残基) を各々の DNA 結合ドメインと予測した。Pmr_{ct} と同様に N
末端側に His-tag を付加したタンパク質 (TurA_{ct} 及び TurB_{ct}) を発現するプラスミドを
pET26b(+)ベクターを用いて作製した。発現条件検討は 4-2-3 の方法に従って行い、ベク
ターコントロールにはインサートを持たない pET-26b(+)を保持した *E. coli* BL21 (DE3) を使用
した。Tricine-SDS-PAGE の結果から (Fig. 4-12)、TurA_{ct} については 30°C、IPTG 終濃度 0.1
mM が、TurB_{ct} については 25°C、IPTG 終濃度 0.5 mM が最適な発現条件であると考えた。
そこで誘導培養後の大腸菌から得た細胞抽出液から metal chelate affinity chromatography
(4-2-4) によって TurA_{ct}, TurB_{ct} を精製した。いずれも 100 mM イミダゾールで夾雑タンパ
ク質を洗浄後、200 mM に上昇させることで溶出させ (Fig. 4-13A, B)、十分に精製できたこ

とを Tricine-SDS-PAGE で確認した (Fig. 4-13C, D). この方法で精製できたタンパク質を LB 培地 1 L あたりに換算すると, TurA_ct の場合約 30 mg, TurB_ct の場合約 40 mg であった. またタンパク質間クロスリンク法により会合度の確認を行ったところ, TurA_ct, TurB_ct の場合も Pmr_ct と同様に単量体で存在することが明らかとなった (Fig. 4-14).

そこで TurA_ct, TurB_ct が DNA 結合能を持つか確認するため, (1)で作製したライブラリーをプローブとしてゲルシフトアッセイを行った. ^{32}P でラベルしたプローブを用いたところ, Pmr_ct と同様, TurA_ct や TurB_ct でもタンパク質の濃度を上昇させるとゲル上方にスメアが広がっていく様子が観察された (Fig. 4-15). この結果から, TurA_ct, TurB_ct が TurA, TurB の DNA 結合ドメインであること, (1)で作製したライブラリーには Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct が結合する配列が含まれていることが確認された.

(3) SELEX 法による高親和性塩基配列同定の試み

(2)の結果から, (1)で作製したライブラリーの中に Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct が結合する配列が含まれていることが示されたが, もしこれらのタンパク質がランダムな 15 bp の配列ではなく両端の約 20 bp の固定配列を特異的に認識して結合していた場合, SELEX を行っても高親和性塩基配列を濃縮することはできない. そこで Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct が両端の固定配列を認識して結合している可能性を排除するため, この固定配列に対して 1 bp おきにランダムに変異を入れた新たなライブラリーを Table 2 の Oligo X2 及び Oligo Z2 を用いて 4-2-13 の方法で作製し, その一部を ^{32}P でラベルしてプローブを作製しゲルシフトアッセイを行った. もし Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct が両端の固定配列を認識して結合しているなら, (1)で作製したライブラリーをプローブとした場合と比べてタンパク質-DNA 複合体の移動度に変化が生じると予想されたが, 両プローブ間で移動度に差は見られなかった (Fig. 4-16). よってこれらのタンパク質は両端の固定配列を特異的に認識しているわけではないと判断した.

そこで(1)で作製した DNA ライブラリー 20 pmol (800 ng) に対して Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct を 200 pmol (3 μg) ずつ加えて室温で 15 分インキュベートした. インキュベート時のバッファーには上述のゲルシフトアッセイで用いたものを使用した. インキュベート後のサンプルに MagneHis Protein Purification System (Promega) の Ni-Particles を加え, Ni-Particles を洗浄用バッファーで 4 回 (500 μL で 1 回, 150 μL で 3 回) 洗浄した後, 各タンパク質を溶出させ, 溶出液から DNA 断片を抽出した. この DNA 断片を鋳型として, 両端の固定配列に対して設計したプライマー (Oligo Y, Oligo Z) を用いて PCR を行い, 反応産物を Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) で定量したが, DNA 断片の増幅は見られなかった (データ示さず). そこで実験に供するタンパク質の割合を増やし, DNA ライブラリー 10 pmol (400 ng) に対して Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct を 3,600 pmol (40 μg) ずつ用いて, 同様の操作を行った. ただし, Ni-Particles の洗浄は洗浄用バッファー 500 μL で 1 回に減らした. その結果, 実験を行う回ごとに PCR 産物が検出される回と検出されない回が生じて

しまい、回によってはタンパク質を入れないコントロール実験でも PCR 産物が検出された (Fig. 4-17). このことから、Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct と DNA との親和性は低く、タンパク質のアフィニティー精製における洗浄の過程で結合していた DNA が解離してしまう可能性が考えられた.

DNA 結合タンパク質の場合、例えば真核生物の HMGB タンパク質の例に見られるように、配列非特異的に DNA に結合するタンパク質は DNA との親和性が低いことが知られている (HMGB タンパク質の場合、直鎖状 DNA との結合における解離定数は 5×10^{-5} M) [Štros, 2010]. そこで Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct の DNA 認識も特異性が低いのではないかと考え、ポリデオキシイノシン-デオキシシチジン酸 (poly[d(I-C)]) をゲルシフトアッセイのコンペティターとして加えた時に、各タンパク質が DNA から解離するか確認した. なおこれまでのゲルシフトアッセイではいずれの実験でも poly[d(I-C)] を 0.5 μ g 加えていたため、0.5 μ g 以上の量を加えて実験を行った. その結果、Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct のいずれも poly[d(I-C)] を 2.0 μ g 加えた時に顕著に DNA から解離する様子が観察された (Fig. 4-18). このことから、Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct が DNA に結合する際の配列特異性は通常の転写因子より低く、SELEX 法を用いて各タンパク質の高親和性塩基配列を同定することは難しいと予想された.

4-4 考察

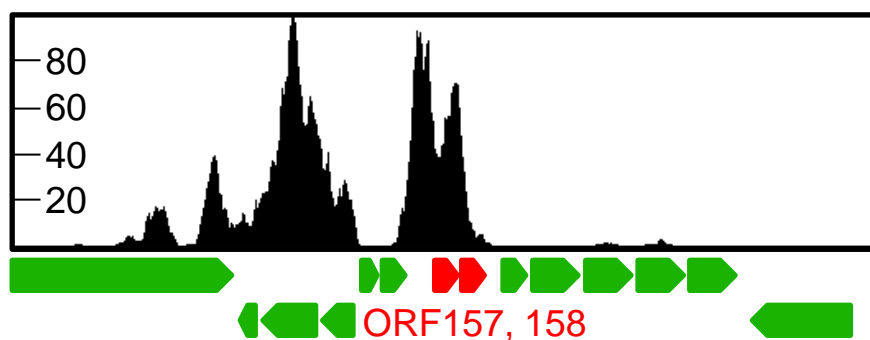
本章では Pmr, TurA, TurB の DNA 結合ドメイン (Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct) を同定し, Pmr と Pmr_ct を用いた解析から, 二量体/多量体化ドメインが DNA の架橋に重要な一方で, *in vitro* で様々な塩基配列に対する親和性を評価する妨げになることが判明した. そこで Genomic-SELEX 法や SELEX 法で Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct の高親和性塩基配列の探索を行ったが, 配列特異性が低いために多様な塩基配列中から高親和性塩基配列を同定することは難しいと判断された. 一方で, Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct が真に配列非特異的に DNA に結合しているとは現時点では考えにくい. 例えば Pmr_ct は ChAP-chip 解析 [Yun and Suzuki *et al.*, 2010] において Pmr の結合が見られていた領域と結合が見られなかった領域をプローブにしてゲルシフトアッセイを行った結果, 結合が見られていた領域から作製したプローブに対してより高い親和性を示している (Fig. 4-5). また SELEX 用の DNA ライブラリーの一部をプローブとしてゲルシフトアッセイを行った場合, Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct のいずれにおいてもタンパク質-DNA 複合体が検出されているが, シフトバンドが見え始めるタンパク質の濃度が Pmr_ct, TurB_ct と TurA_ct では異なっており (Fig. 4-15), 同一プローブに対する親和性は異なると考えられる. これらの結果は特定の配列に対してタンパク質-DNA 間の親和性を定量することで, 三者間の配列特異性の違いを議論できる可能性を示唆している.

最近, ChAP-chip 法による配列特性なども含めた詳細な解析が共同研究者によって行われた結果, Pmr, TurA, TurB の結合領域はほぼ一致しているものの, 各結合領域における Pmr, TurA, TurB の *p*-value (この値が小さいほど当該領域がタンパク質-DNA 複合体のアフィニティー精製によって濃縮されたことを表す) の値に差が見られること, 大部分の結合領域では Pmr や TurA の *p*-value よりも TurB の *p*-value が大きい値を示すことが明らかとなった (Fig. 4-19) [高橋ら, 未発表データ]. さらに, 結合領域内の genome signature [n 連塩基($n \geq 2$) の出現頻度] を調べたところ, Pmr の *p*-value が TurA, TurB の *p*-value よりも小さい領域では ATA や TATAT のような A と T が交互に繰り返される配列が多く含まれ, 反対に TurB の *p*-value が Pmr, TurA よりも小さい領域では当該配列の割合が小さくなることが明らかとなった [高橋ら, 未発表データ]. *p*-value の値が DNA 上に形成されたヘテロ多量体中の各タンパク質の割合を反映しているとすれば, 以上の結果は TurB よりも Pmr の方が A と T が交互に繰り返される配列に高い親和性を持つことを示唆している. 今後は同様の解析によって Pmr, TurA, TurB の高親和性塩基配列の候補を探索し, 各候補について Pmr, TurA, TurB の結合親和性を生化学的に定量する必要があるだろう.

なお本章の内容の一部については以下の原著論文で発表した.

Suzuki C, Yun CS, Umeda T, Terabayashi T, Watanabe K, Yamane H, Nojiri H. 2011. Oligomerization and DNA-binding capacity of Pmr, a histone-like protein H1 (H-NS) family protein encoded on IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**:711-717.

Pmrの結合が検出された領域



Pmrの結合が検出されなかった領域

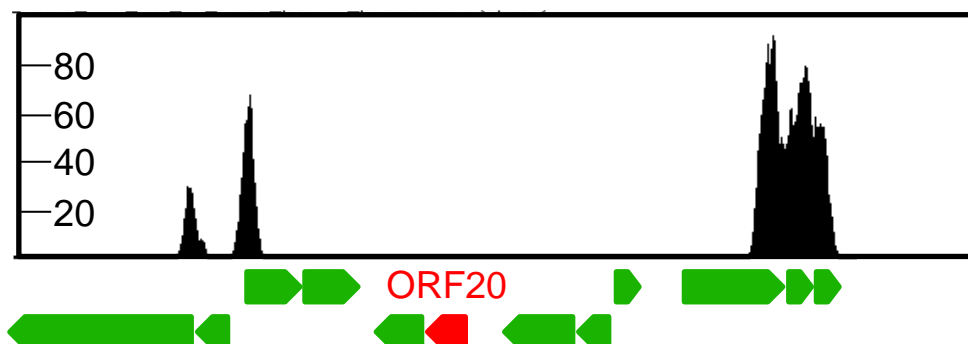
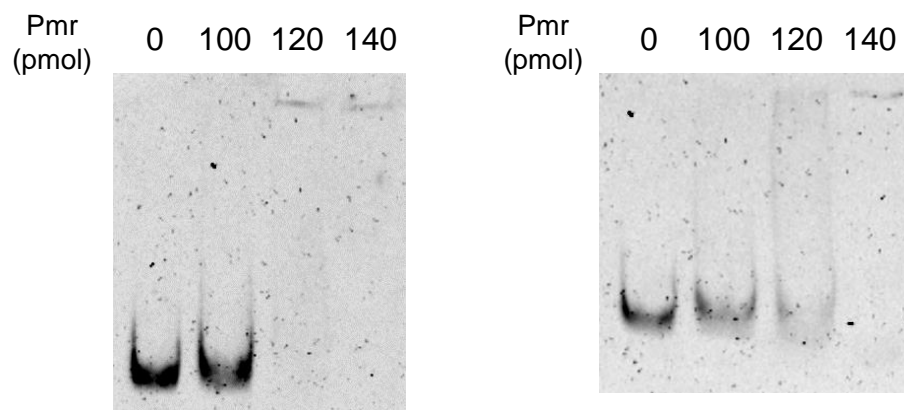


Fig. 4-1. ゲルシフトアッセイのプローブとして用いた領域のChAP-chip解析の結果.
ChAP-chip解析のデータはYun and Suzuki *et al.* (2010) で報告済みのものを使用した. 横軸はpCAR1上の領域を, 縦軸はPmrによる結合の確からしさを示している. 各五角形は遺伝子の位置と向きを表している.

A



B

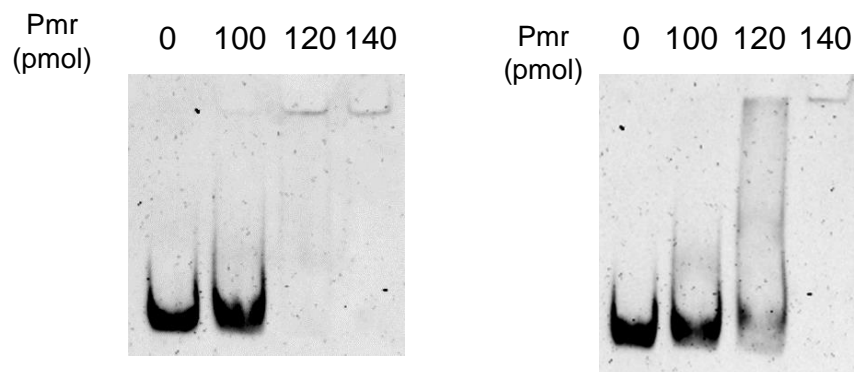


Fig. 4-2. Pmrを用いたゲルシフトアッセイ.

プローブには以前行われたChAP-chip解析 [Yun and Suzuki *et al.*, 2010] において (A) Pmrの結合が見られた領域と, (B) 結合が見られなかった領域 (Fig. 4-1参照) からそれぞれ約250 bpの領域を選択し, DNA断片をDIGラベルして用いた. 各レーンの数値は用いたPmrの量 (pmol) を表している. (A), (B)それぞれについて2種類の代表的な泳動パターンを示した.

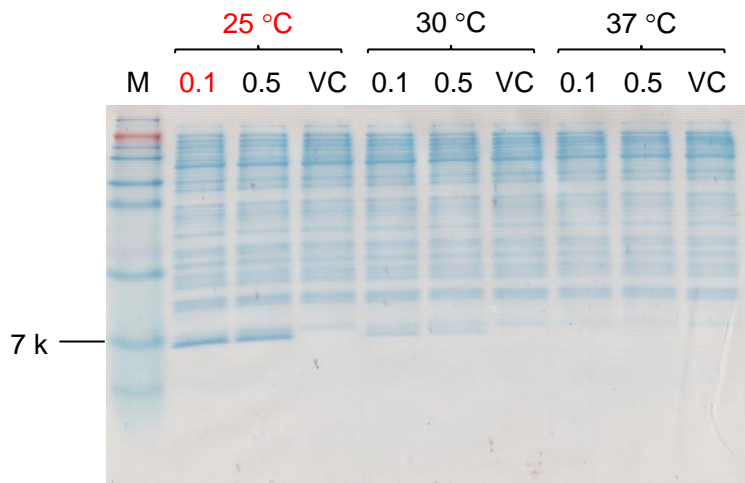
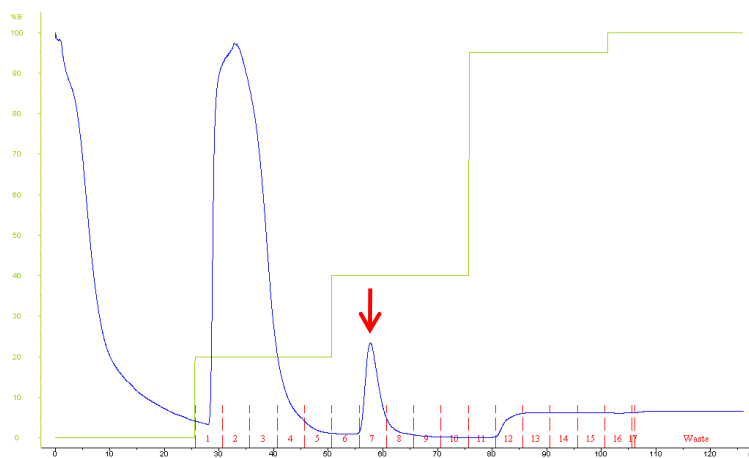
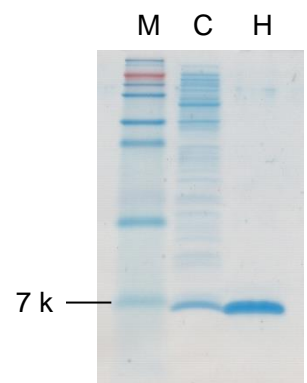
A**B****C**

Fig. 4-3. Pmr_{ct}の大腸菌における発現条件検討とアフィニティー精製.

(A) Pmr_{ct}の発現条件検討. Mはマーカを, VCはベクターコントロールを, 各レーンの数値はIPTG濃度 (mM) を表す. 細胞抽出液由来のタンパク質を2 μ gずつTricine-SDS-PAGEに供した. また最適な発現条件と判断した温度, IPTG濃度を赤字で示した. (B) Metal chelate affinity chromatographyにおける溶出プロファイル. 目的タンパク質のピークを赤い矢印で示した. 青い線はタンパク質由来の波長280 nmの吸光度を, 黄緑色の線はbuffer B (0.5 Mイミダゾールを含む) の割合 (縦軸) を, 赤い線と数字はフラクションを表す. (C) 精製状態の確認. Mはマーカを, Cは細胞抽出液を, Hはアフィニティー精製後のサンプルを表す. 各レーン2 μ gのタンパク質をTricine-SDS-PAGEに供した.

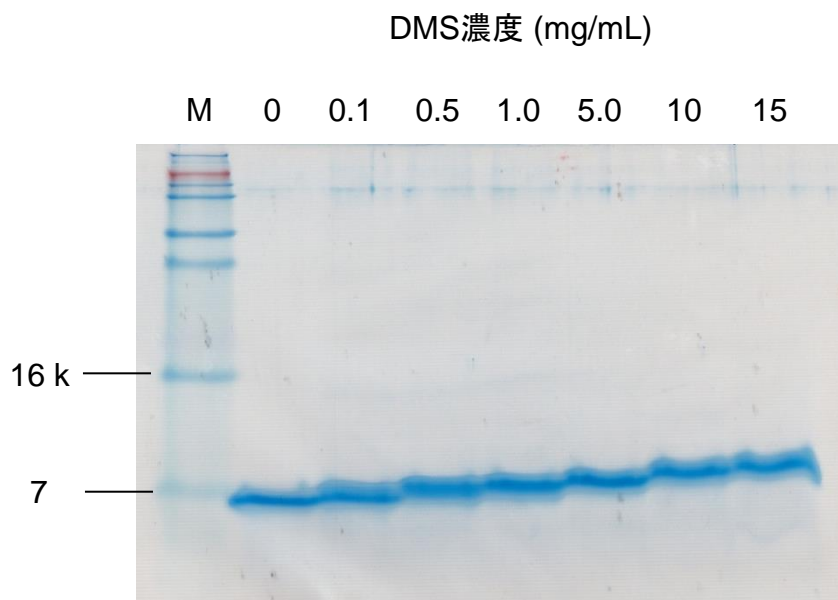


Fig. 4-4. タンパク質間クロスリンク法によるPmr_ctの会合度の確認.
 架橋反応後のPmr_ctを2 μ gずつ供したTricine-SDS-PAGEの結果を示した. MIはマーカーを, 各レーンの数値はDMS濃度を表している. タンパク質濃度0.14 mg/mL (23 μ M), 架橋剤添加後のインキュベート時間60分で実験を行った.

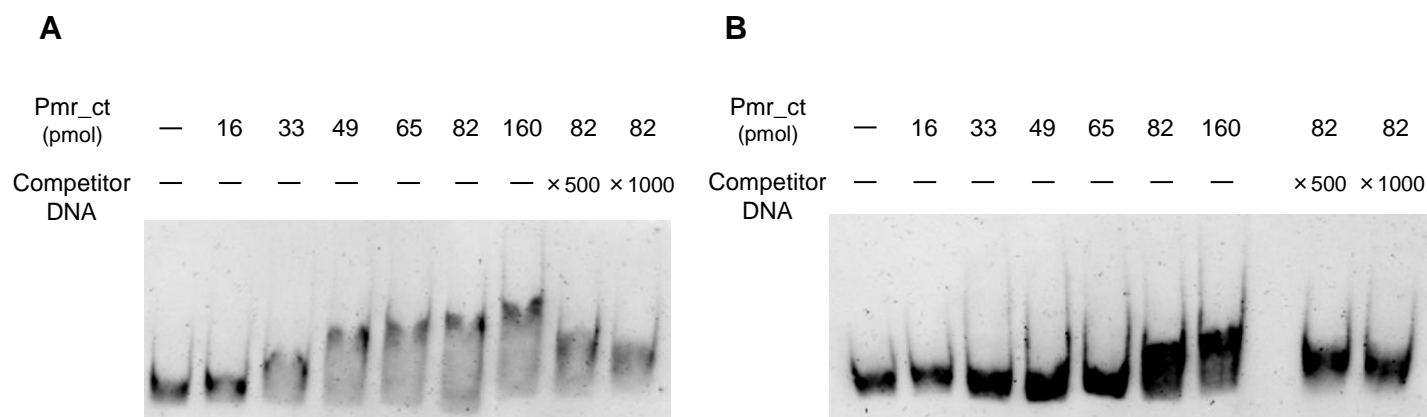


Fig. 4-5. Pmr_ctを用いたゲルシフトアッセイ.
 プロブには以前行われたChAP-chip解析 [Yun and Suzuki *et al.*, 2010] において (A) Pmrの結合が見られた領域と, (B) 結合が見られなかった領域 (Fig. 4-1参照) からそれぞれ約250 bpの領域を選択し, DNA断片をDIGラベルして用いた. 各レーンの数値は用いたPmr_ctの量 (pmol) を表している. コンペティターには, プロブに使用したのと同じDNA断片をDIGラベルせずに用い, 各々についてプロブの500倍, 1000倍量を加えた.

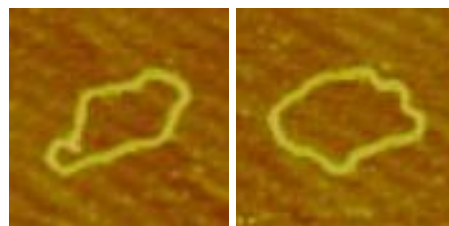
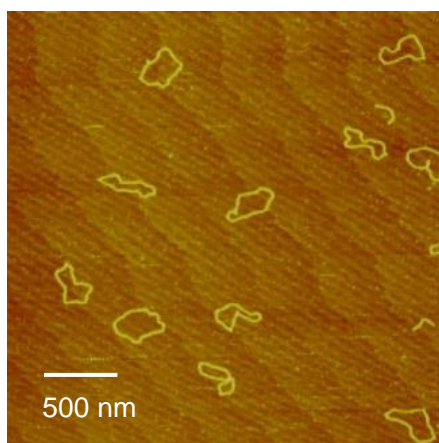
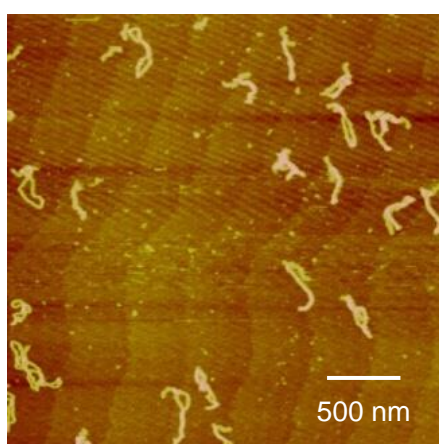
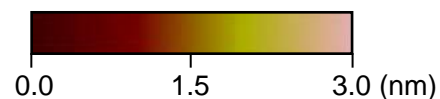
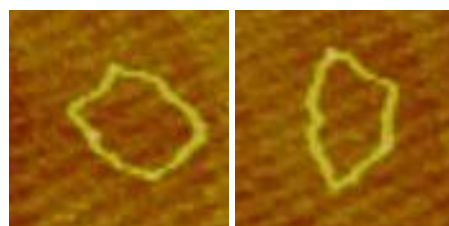
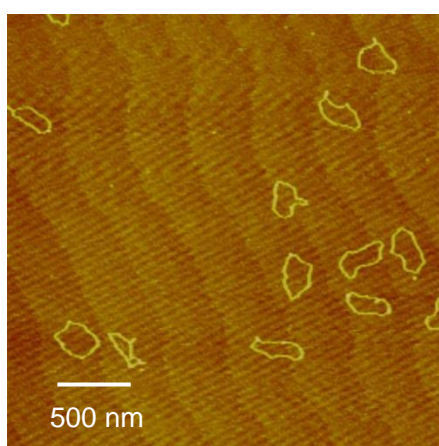
A**B****C**

Fig. 4-6. 原子間力顕微鏡で観察したプラスミドpUC19とPmr, Pmr_{ct}との複合体の様子.
 (A) Pmrを加えずにpUC19を原子間力顕微鏡で観察した画像, (B) PmrをPmr:DNA=88:1となるように加えて観察した画像, (C) Pmr_{ct}をPmr_{ct}:DNA=280:1となるように加えて観察した画像をそれぞれ示した. 各パネル右側は左側の画像の一部を拡大したもので, 一辺が500 nmを表す. 高さは暗色から明色にかけて0.0~3.0 nmを表している.

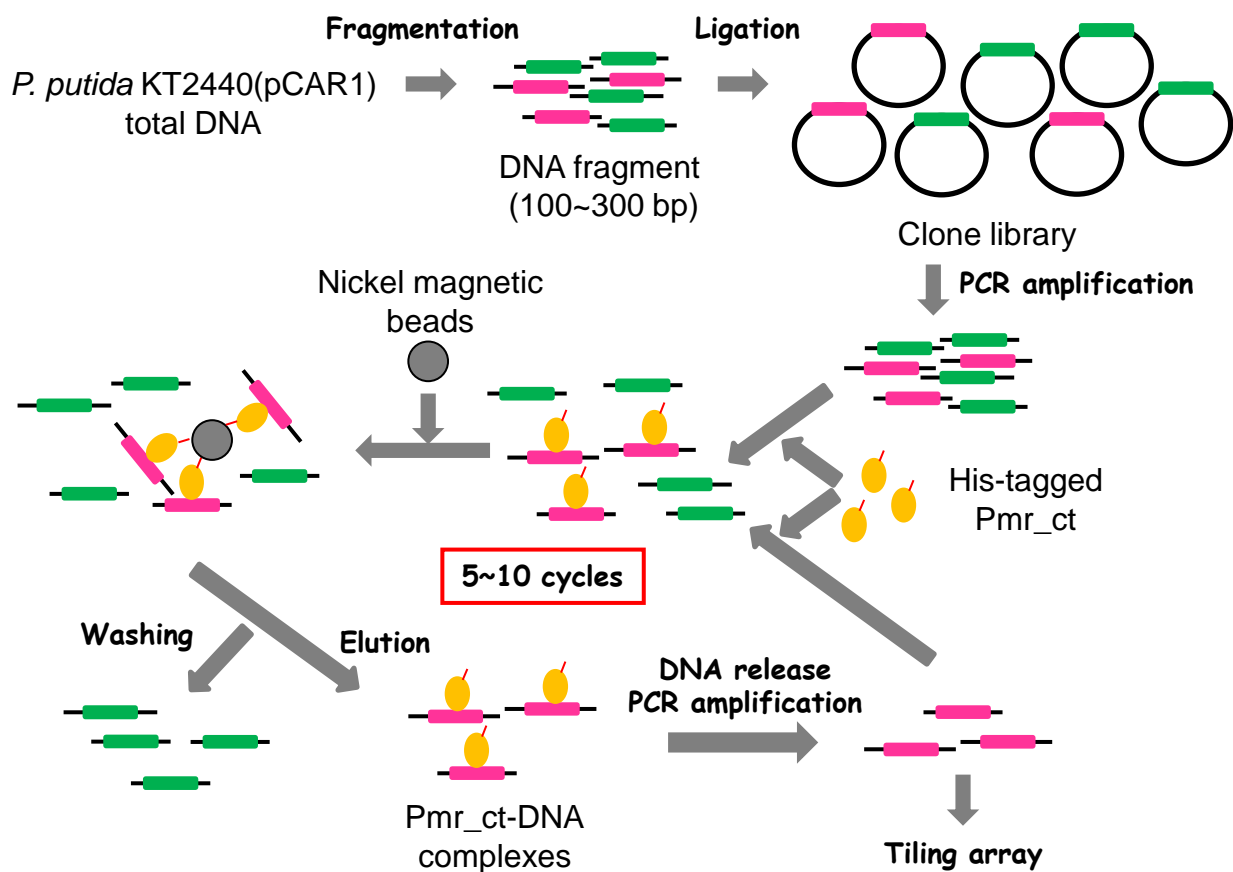


Fig. 4-7. Genomic-SELEX法の手順の模式図.

P. putida KT2440(pCAR1)ゲノムをライブラリーとして用いてPmr_{ct}の結合配列を同定する手順を模式的に示した.

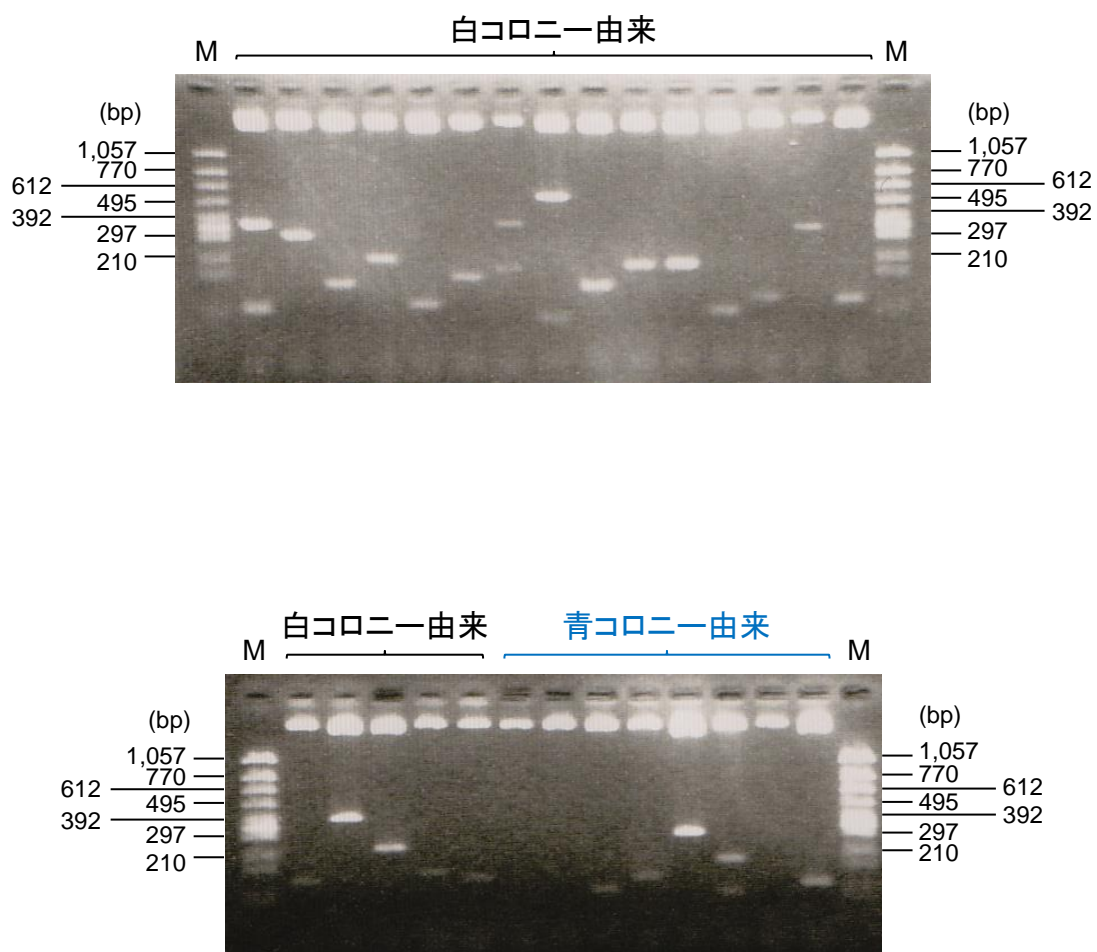


Fig. 4-8. ゲノムライブラリーに含まれるインサートの多様性の確認.

X-galを加えたLBプレートにおいて、ゲノムライブラリー作製時に得られた白コロニー20個と青コロニー8個からプラスミドを精製した。インサートを挿入した *HincII* サイトの両側の *XbaI*, *PstI* サイトで切断し、3%アガロースゲルを用いた電気泳動でインサートの有無と長さを確認した。Mはマーカーを表す。

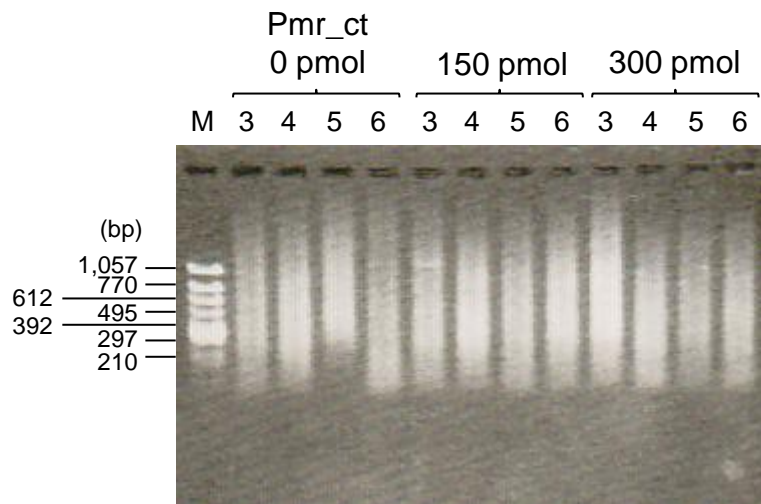


Fig. 4-9. Genomic-SELEX後のDNAの泳動パターン.

各レーンの数字はGenomic-SELEXの操作を繰り返した回数を, Mはマーカを表す. Pmr_ct 0, 150, 300 pmolを用いて精製されたDNAを抽出後, PCRで増幅して得られたDNA断片を1 μ gずつ2%アガロースゲルを用いた電気泳動に供した.

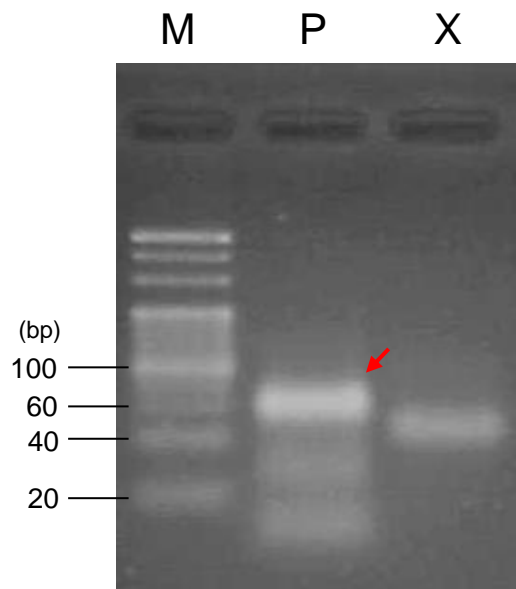


Fig. 4-10. Klenow Fragmentを用いた二本鎖DNAの合成.

一本鎖DNAのOligo Xと, Oligo Xの3'端と相補的な塩基配列を持つOligo Zを用いて Klenow Fragmentで反応させた産物を, 3%アガロースゲルを用いた電気泳動に供した. Mはマーカを表す, Pは反応産物を, XはOligo Xを供したレーンを表す. 目的の二本鎖DNAと判断されたバンドを赤矢印で示した.

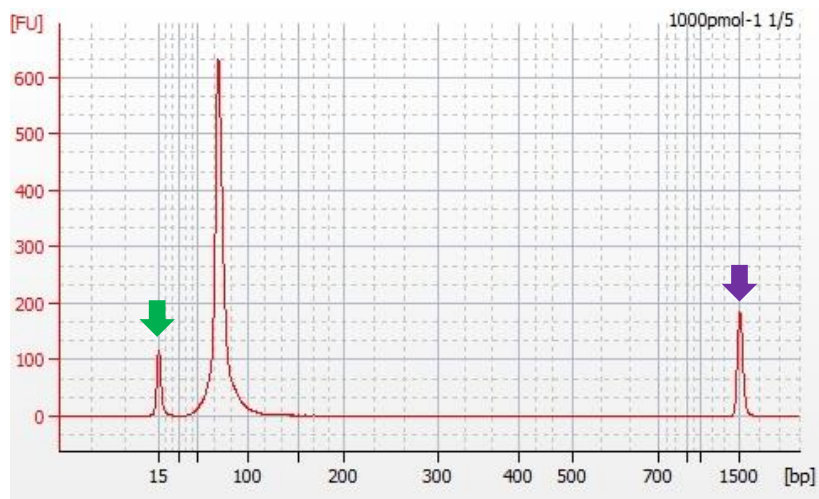


Fig. 4-11. SELEX用ライブラリーの純度の評価.

Klenow Fragmentを用いて合成した二本鎖DNA溶液1 μL を, DNA 1000 Kit (Agilent Technologies) を用いてAgilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) に供した時の電気泳動図を示した. 縦軸は蛍光強度を, 横軸はDNAの長さ (bp) を表す. 緑色と紫色の矢印は, 各々15 bpと1,500 bpのマーカーを表している. 元のライブラリーを5倍希釈したものをサンプルとして使用し, ピークから計算されたDNA濃度は32.4 ng/ μL であった.

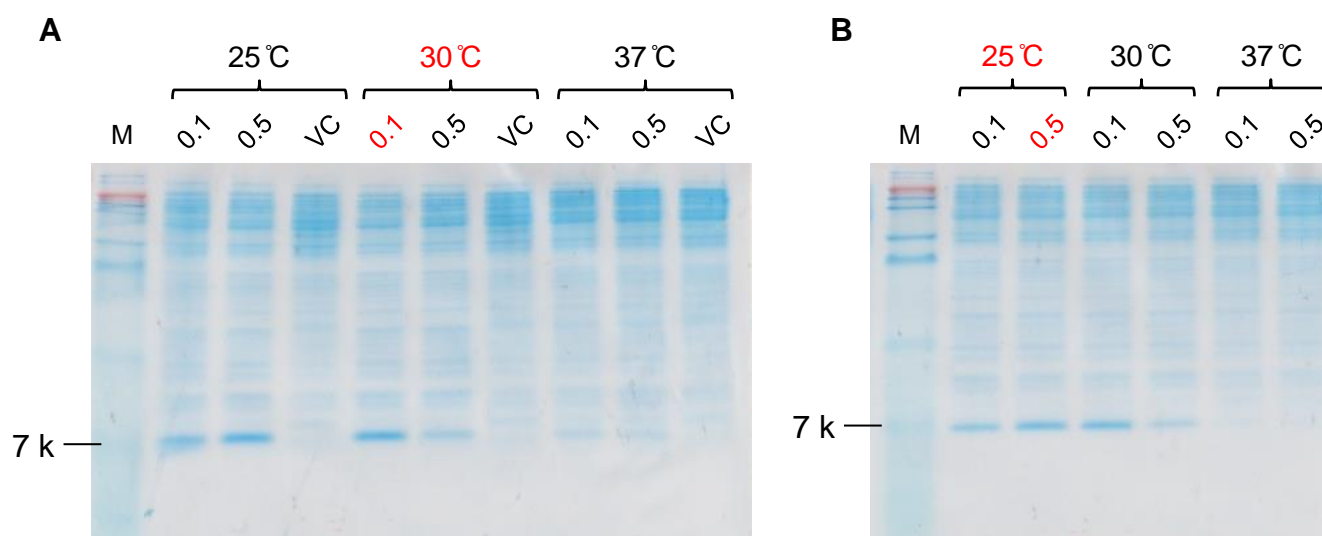


Fig. 4-12. TurA_ct, TurB_ctの大腸菌における発現条件検討.

(A) TurA_ct, (B) TurB_ctの結果を示した. Mはマーカーを, VCはベクターコントロールを, 各レーンの数値はIPTG濃度 (mM) を表す. 細胞抽出液由来のタンパク質3 μg を Tricine-SDS-PAGEに供した. また最適な発現条件と判断した温度, IPTG濃度を赤字で示した.

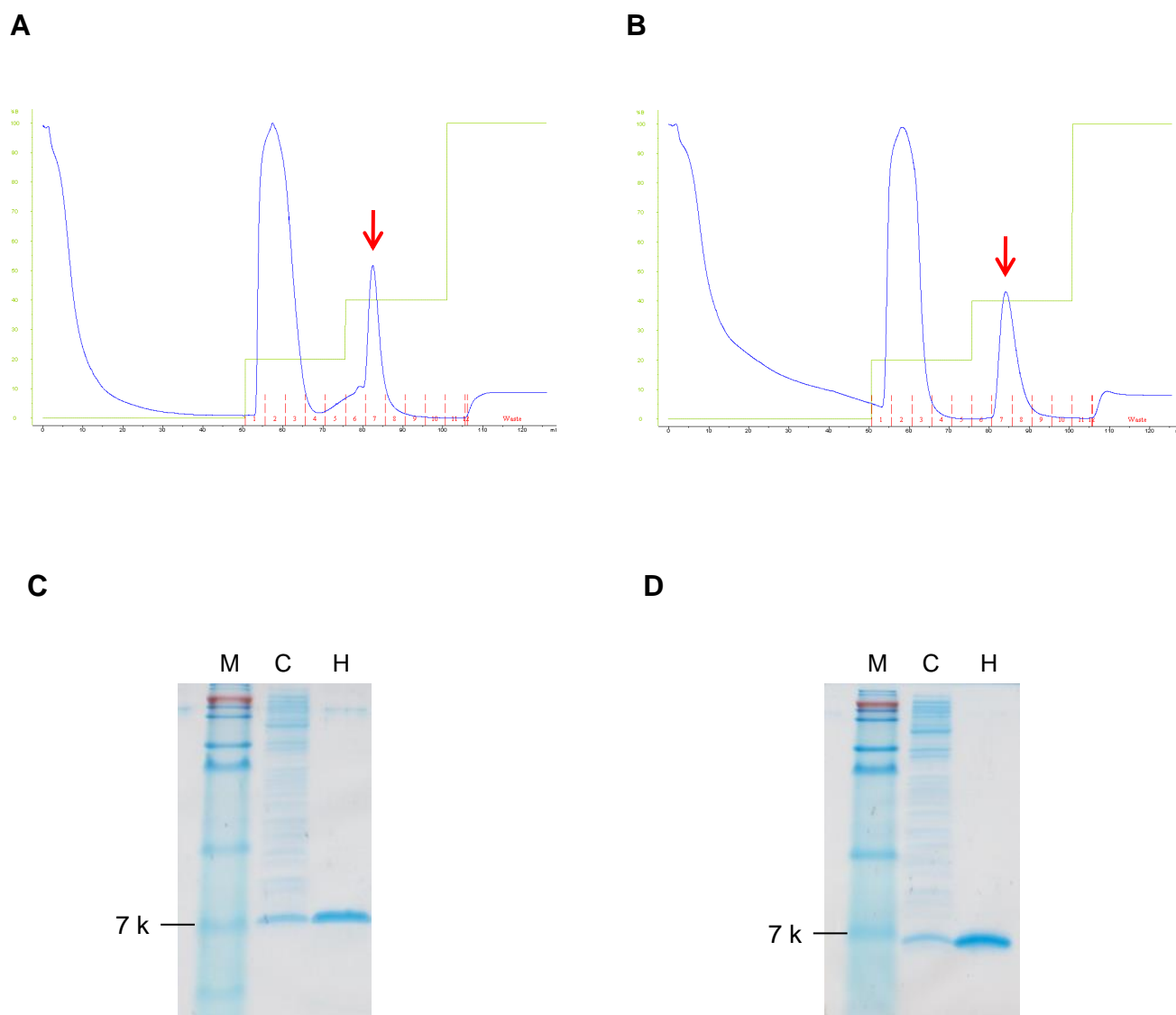


Fig. 4-13. TurA_ct, TurB_ctのアフィニティー精製.

(A) TurA_ct, (B) TurB_ctのmetal chelate affinity chromatographyにおける溶出プロファイル. 目的タンパク質のピークを赤い矢印で示した. 青い線はタンパク質由来の波長280 nmの吸光度を, 黄緑色の線はbuffer B (0.5 Mイミダゾールを含む)の割合(縦軸)を, 赤い線と数字はフラクションを表す. (C) TurA_ct, (D) TurB_ctの精製状態の確認. Mはマーカーを, Cは細胞抽出液を, Hはアフィニティー精製後のサンプルを表す. 各レーン3 μ gのタンパク質をTricine-SDS-PAGEに供した.

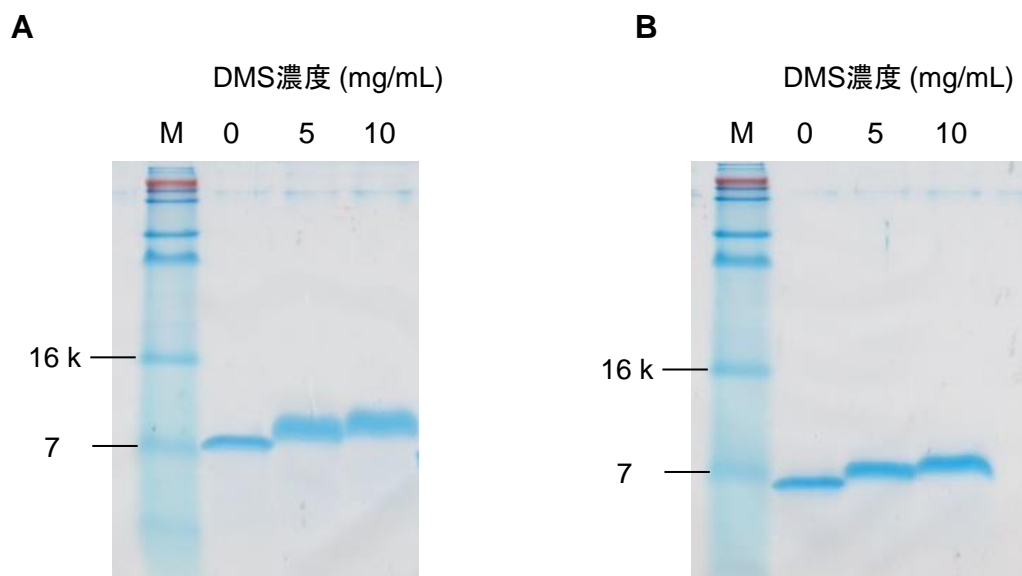


Fig. 4-14. タンパク質間クロスリンク法によるTurA_ct, TurB_ctの会合度の確認.
 (A) TurA_ct, (B) TurB_ctを用いて, 架橋反応後のタンパク質を2 μ gずつ供した Tricine-SDS-PAGEの結果を示した. Mはマーカ―を, 各レーンの数値はDMS濃度を表している. タンパク質濃度は0.14 mg/mL, 架橋剤添加後のインキュベート時間60分で実験を行った.

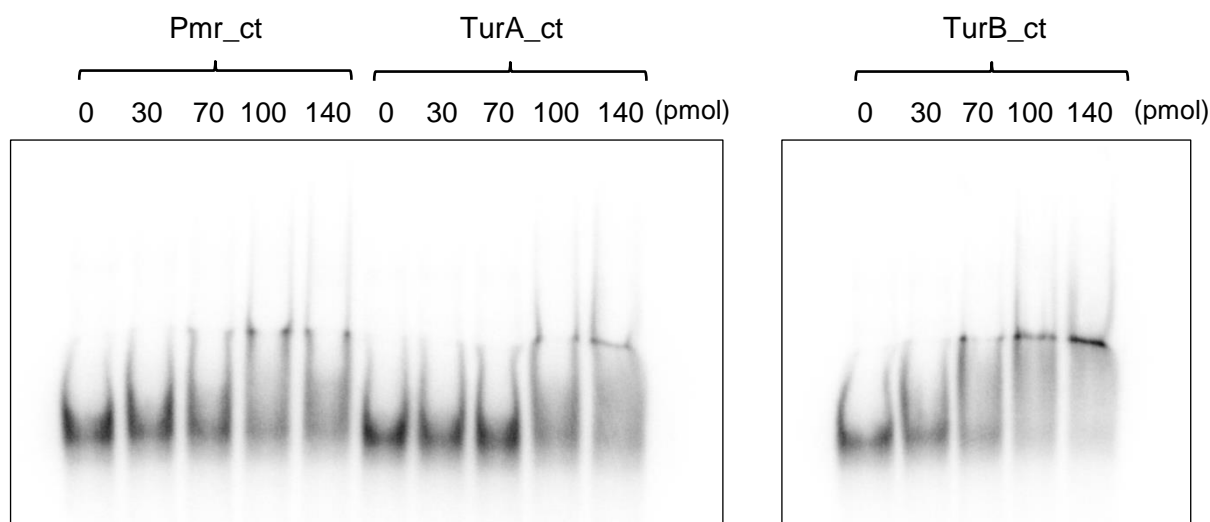


Fig. 4-15. Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ctを用いたゲルシフトアッセイ.
 プロブにはSELEX用に作製した二本鎖DNAライブラリーの一部を 32 Pラベルして用いた. 各レーンの数値は用いたタンパク質の量 (pmol) を表している.

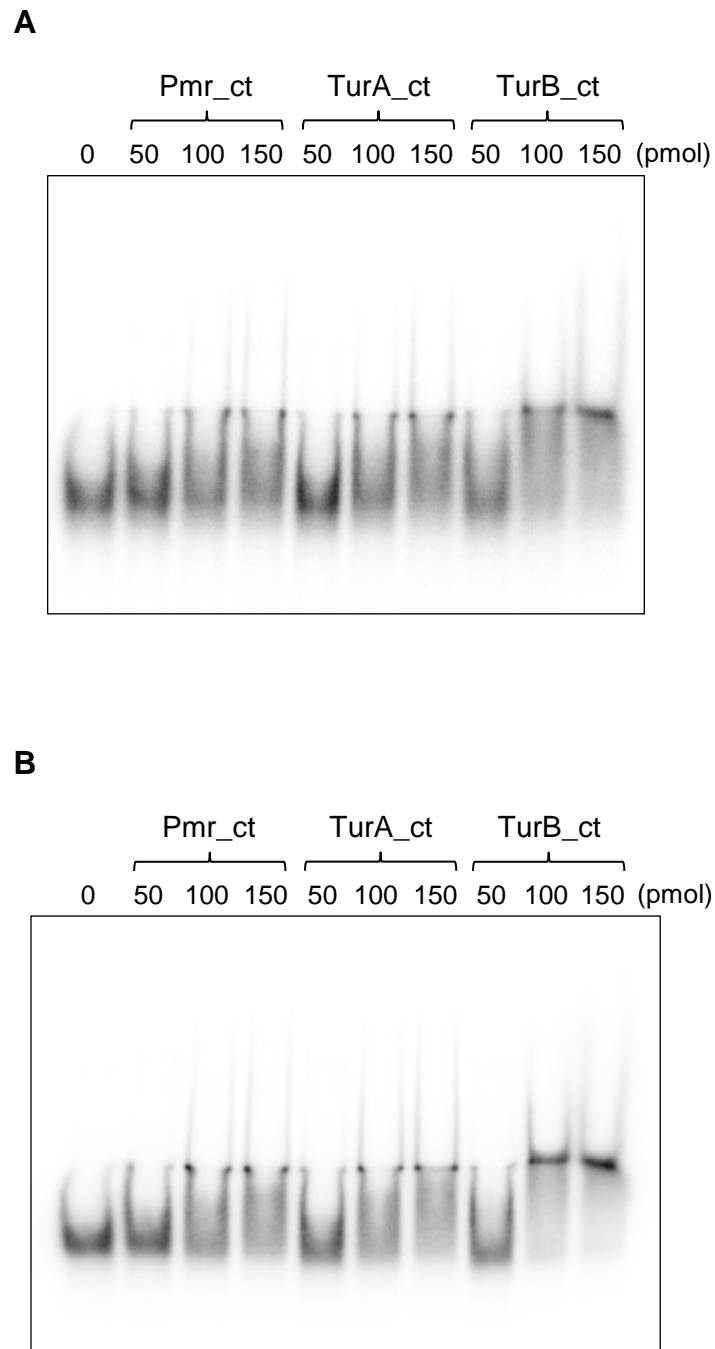


Fig. 4-16. 両端の固定配列が異なるライブラリーをプローブとしたゲルシフトアッセイ.
 プローブには, (A) SELEX用に作製した二本鎖DNAライブラリーの一部 (Oligo XとOligo Zを用いて作製), 及び (B) 固定配列に対して1 bpおきにランダムに変異を入れた新たなライブラリーの一部 (Oligo X2とOligo Z2を用いて作製) を³²Pラベルして用いた. 各レーンの数値は用いたタンパク質の量 (pmol) を表している.

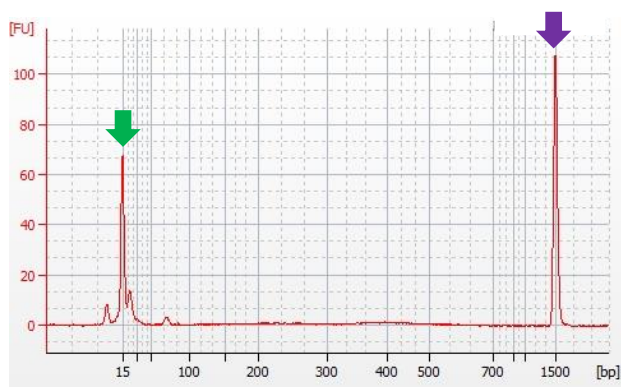
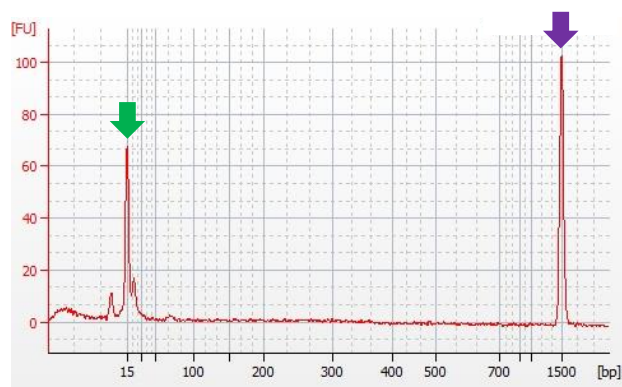
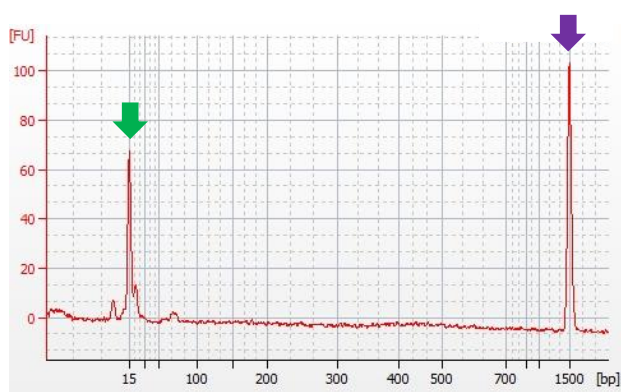
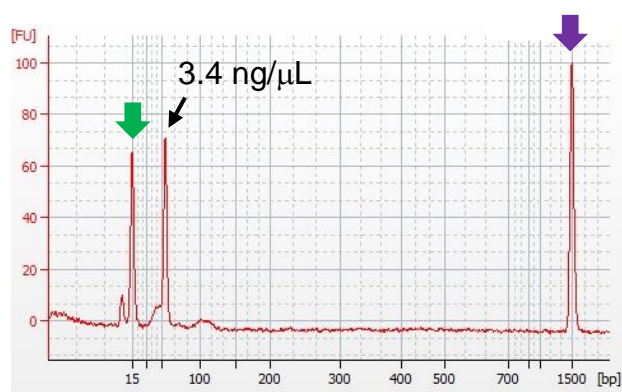
A**B****C****D**

Fig. 4-17. SELEX後のPCR産物の定量.

(A) Pmr_{ct}, (B) TurA_{ct}, (C) TurB_{ct}を用いて、または (D) タンパク質を入れずに SELEXを行い、PCR後の溶液1 μ LをAgilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) に供した時の電気泳動図を示した。縦軸は蛍光強度を、横軸はDNAの長さ (bp) を表す。緑色と紫色の矢印は、各々15 bpと1,500 bpのマーカを表している。得られたピークについては、測定データから計算されたDNA濃度を図中に示した。

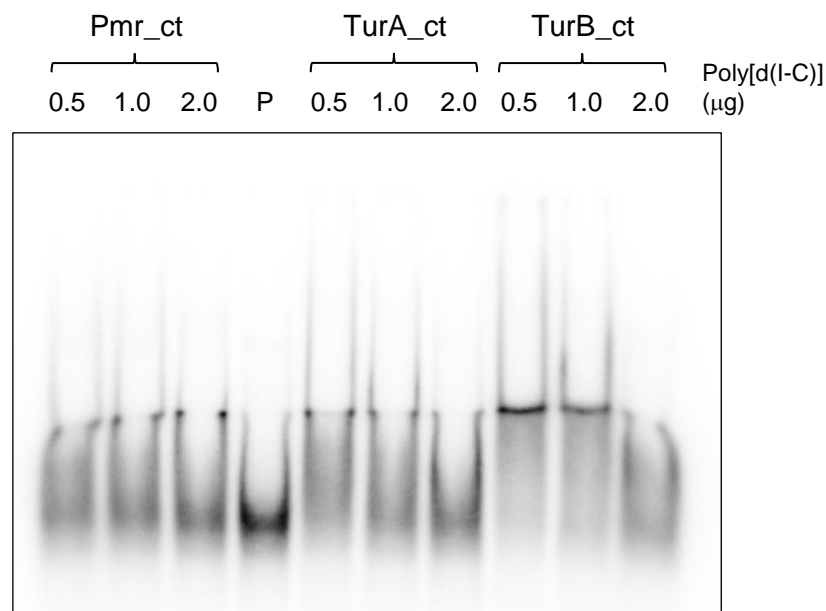


Fig. 4-18. Poly[d(I-C)]の濃度を振ったゲルシフトアッセイ.

プローブにはSELEX用に作製した二本鎖DNAライブラリーの一部を³²Pラベルして用いた. 各レーンの数値は加えたpoly[d(I-C)]の量 (μg) を表しており, タンパク質はいずれの場合も150 pmol使用した. Pはタンパク質を加えず, poly[d(I-C)] 0.5 μgとプローブを混合して供したレーンを表す.

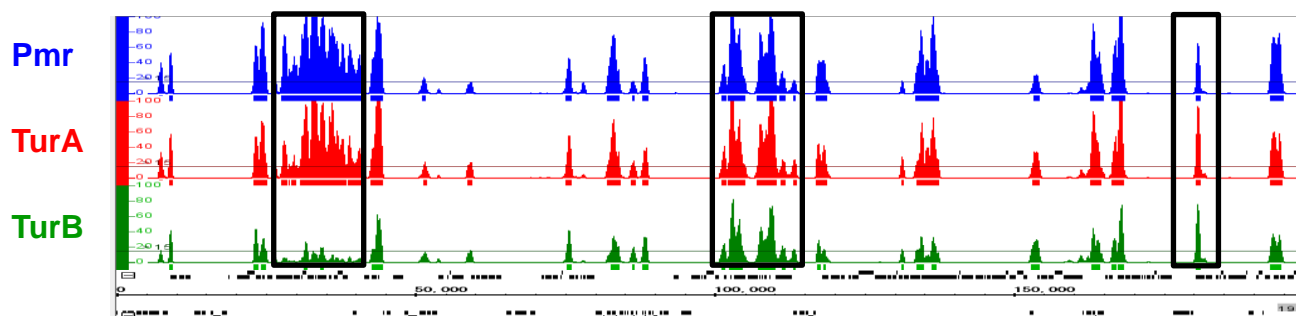


Fig. 4-19. ChAP-chip解析においてPmr, TurA, TurBのp-valueが異なる領域の例.

P. putida KT2440(pCAR1)株におけるPmr, TurA, TurBのChAP-chip解析結果 (pCAR1上全体) に対して, p -valueが特にTurBで異なる領域を四角で囲んだ. 横軸はpCAR1上の位置を, 横軸下方の黒色の四角は各ORFを示している. 縦軸は $-\log_{10}(p\text{-value})$ で表しているため, この図で大きな値を示している領域ほど p -valueが小さいことを示している. [高橋ら, 未発表データ]

第 5 章

Pmr 及び **Pmr-R8A** の結晶化条件のスクリーニング

5-1 緒言

第 2 章及び第 3 章の結果から **Pmr** のホモ・ヘテロ多量体形成機構について興味深い知見が得られたものの、**MvaT** ホモログの構造情報が無いために、**Pmr** のホモ多量体形成に重要な残基・領域の役割やヘテロ多量体形成に重要な領域は不明なままであった．そこで本章では **Pmr** とホモ多量体形成能が低下した **Pmr-R8A** を用いて結晶構造の取得を試みた．

5-2 材料と方法

5-2-1 使用した菌株、プラスミド、及び培養条件

本章では Pmr 及び Pmr-R8A 発現のための宿主に *E. coli* BL21(DE3)株 (Novagen) を、発現用プラスミドとして第 2 章の pET-C-His-pmr 及び pET-C-His-pmr-R8A を使用した。培養条件は第 2 章 2-2-1 に従った。

5-2-2 *E. coli* BL21(DE3)株を用いた目的タンパク質の大量発現

第 2 章 2-2-13 と同様に行った。Pmr については第 2 章 2-3-1 で決めた発現条件を採用し、Pmr-R8A についても同条件で発現させた。

5-2-3 His-tag による目的タンパク質のアフィニティー精製

第 2 章 2-2-14 と同様に buffer A (20 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.5 M NaCl, 10% グリセリン) 及び buffer B (20 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.5 M NaCl, 10% グリセリン, 0.5 M イミダゾール) を用いて行った。

5-2-4 Pmr-R8A のゲルろ過クロマトグラフィーによる精製

カラムは HiLoad 16/60 Superdex 200 (column volume 120 mL; GE Healthcare) を、バッファは 5-2-3 の buffer B を使用した。バッファを流速 0.5 mL/min で 2 時間流しカラムを平衡化した後、5-2-3 の方法でアフィニティー精製したサンプルをカラムに供し、流速 0.5 mL/min で溶出させた。各フラクションは 2 mL とした。

5-2-5 サンプルの濃縮及びバッファ交換

Amicon[®] Ultra-4 (3K device) 及び Amicon[®] Ultra-15 (3K device) (Millipore) を使用して行った。Amicon[®] Ultra-4 については fixed angle rotor, $7,500 \times g$ で、Amicon[®] Ultra-15 については swinging bucket rotor, $4,000 \times g$ で限外ろ過を行った。

5-2-6 SDS-PAGE, Tricine-SDS-PAGE

第 2 章 2-2-12 と同様に行った。

5-2-7 Pre-Crystallization Test

PCT[™] Pre-Crystallization Test (Hampton Research) を用いて行った。プレートには VDX[™] Plate (Hampton Research)を、カバーガラスには Siliconized Cover Slides Circles (Hampton Research) を使用し、5-2-8「24 穴プレートでのスクリーニング」と同様の方法で、添付のプロトコールに従って行った。

5-2-8 結晶化条件のスクリーニング

96 穴プレートでのスクリーニング

Hydra II Plus-One (Apogent Discoveries) を用いてシッティングドロップ法で行った.

試薬

- JCSG+ (Qiagen)
- Crystal Screen HT (Hampton Research)
- Index HT (Hampton Research)
- SaltRX HT (Hampton Research)
- Wizard Classic 1 & 2 block (Emerald Bio Systems)
- Wizard Classic 3 & 4 block (Emerald Bio Systems)
- Wizard Cryo 1 & 2 block (Emerald Bio Systems)

操作

- ① ゲルろ過クロマトグラフィー後の Pmr-R8A を結晶化バッファー (5 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.3 M NaCl, 10% グリセリン) を用いて 5-2-5 の方法でバッファー交換し, Nanosep MF GHP 0.45 μm (Pall) でろ過した. バッファー交換については, 「限外ろ過で濃縮後, 結晶化バッファーで 10 倍希釈する」という操作を 3 回繰り返すことで行った. Pmr についてはアフィニティー精製後のサンプルをバッファー交換せずに用いた.
- ② 結晶化用 96 穴プレートに 50 μL の結晶化試薬を入れ, 結晶化試薬とタンパク質溶液を 0.3 μL ずつ混合した.
- ③ プレートをシールし, 20°C でインキュベートを行った.

24 穴プレートでのスクリーニング

試薬

Hampton Research 社の Optimize Reagents から適切な物を購入して使用した.

操作

- ① VDX™ Plate (Hampton Research) に結晶化試薬を 500 μL 入れた.
- ② Siliconized Cover Slides Circles (Hampton Research) の埃をエアダスターで除き, タンパク質を 1 μL のせ, そこに①の結晶化試薬を 1 μL 加えた.
- ③ ②のカバーガラスを裏返してウェルに被せ, プレートと密着させた.
- ④ 20°C でインキュベートを行った.

添加剤のスクリーニング

上述の「24 穴プレートでのスクリーニング」と同様の方法でタンパク質と結晶化試薬を混合したドロップに対して, Additive Screen (Hampton Research) を添付のプロトコールに従って使用した.

5-2-9 ミクロシーディング

0.1 M Tris (pH8.5), 0.1 M ammonium tartrate dibasic の結晶化試薬を用いた際に生じた微結晶を用いて行った。微結晶が生じたドロップをマイクロチューブに回収し、上述の結晶化試薬を等量加え、顕微鏡下で微結晶がほとんど見えなくなるまで 200 μ L チップですり潰した (2 倍希釈液)。これを 5 倍した 10 倍希釈液から、100 倍、1,000 倍希釈液を作製し、タンパク質と結晶化試薬を 1 μ L ずつ混合したドロップに、2, 10, 100, 1,000 倍希釈液を 0.5 μ L ずつ添加した。その後 20°C でインキュベートを行った。

5-3 結果

5-3-1 Pmr の結晶化条件のスクリーニング

まず第 2 章で発現・精製系を構築した Pmr について結晶化条件のスクリーニングを試みた。5-2-2, 5-2-3 の方法で Pmr を発現・精製し、5-2-7 の方法で Pre-Crystallization Test に供した。Pre-Crystallization Test では代表的な沈殿剤（硫酸アンモニウムとポリエチレングリコール）を含む結晶化試薬を用いて、様々なタンパク質濃度に調整したサンプルを結晶化試薬と混合したドロップ中に沈殿が生じるかを確認し、もし全く沈殿が生じないようであればタンパク質濃度を上げる必要があると判断する。Pmr の場合、3.8 mg/mL の精製タンパク質を用いたところ良好な沈殿が得られたので、この濃度のサンプルを用いて 5-2-8 の方法で 96 穴プレートでの結晶化条件のスクリーニング（計 672 条件）を行ったが、結晶は得られなかった。

この原因の一つとして、Pmr 精製後のバッファーが 0.5 M の NaCl と 475 mM のイミダゾールを含んでいるために、結晶化試薬を混ぜても塩濃度と pH がほとんど変わらず、スクリーニングが行えていない可能性が考えられた。そこでまずはバッファーからイミダゾールを除くために、精製後のサンプルを用いて 5-2-3 の buffer A へのバッファー交換を、限外ろ過を用いた 5-2-5 の方法で試みたものの、Pmr は高濃度になると凝集するため濃縮効率が悪く、この方法でバッファー交換を行うことはできなかった。

5-3-2 Pmr-R8A の結晶化用バッファーの検討

5-3-1 から Pmr を用いた結晶化条件のスクリーニングは難しいと判断し、Pmr に比べて濃縮効率が良く、様々なバッファーでの安定性が高い Pmr-R8A を用いて結晶化条件のスクリーニングを行うことにした。Pmr-R8A は第 2 章 2-3-6 で示した通り、Pmr よりもホモ多量体の会合度が低下したアラニン置換体である (Fig. 2-16, 17)。Pmr と同様に発現・アフィニティー精製を行い、5-2-4 の方法でゲルろ過クロマトグラフィーを行った後、目的タンパク質が溶出されたフラクションを回収した。Pmr-R8A を 580 μ M でゲルろ過クロマトグラフィーのカラムに供した際の溶出プロファイルと、140 μ M で供した際の溶出プロファイル (第 2 章 Fig. 2-17) を重ねたものを Fig. 5-1 に示した。Pmr-R8A を 140 μ M で供した際に見られる void volume のピークには Pmr-R8A が含まれないことが示されているが (第 2 章 Fig. 2-17C)、このピークは Pmr-R8A を 580 μ M でカラムに供した際に大きくならなかったことから、当該ピークが Pmr-R8A に由来するものではないことが示唆された。一方 Pmr-R8A のピークは 580 μ M でカラムに供した場合には高分子量側にシフトし、140 μ M で供した際の推定分子量が 90 k (6-mer 相当) に対して、580 μ M で供した際の推定分子量は 180 k (12-mer 相当) であった。アフィニティー精製及びゲルろ過クロマトグラフィー後の Pmr-R8A の精製度を確

認した Tricine-SDS-PAGE を Fig. 5-2 に示した.

次に, この精製タンパク質を用いて結晶化用バッファーの検討を行った. 精製直後の Pmr-R8A のバッファーは, 5-2-4 の方法でゲルろ過クロマトグラフィーを行っているため buffer B (20 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.5 M NaCl, 10% グリセリン, 0.5 M イミダゾール) である. Pmr-R8A は Pmr とは異なり, 限外ろ過を用いた 5-2-5 の方法でイミダゾールを除いた buffer A への交換が可能であった. そこで buffer A からさらに塩濃度を下げるため, 以下の 6 種類のバッファーを結晶化用バッファーの候補として検討した.

- ・ 5 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 10% グリセリン
- ・ 5 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.1 M NaCl, 10% グリセリン
- ・ 5 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.2 M NaCl, 10% グリセリン
- ・ 5 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.3 M NaCl, 10% グリセリン
- ・ 5 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.4 M NaCl, 10% グリセリン
- ・ 5 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.5 M NaCl, 10% グリセリン

まず Pmr-R8A 溶液 (600 µg の Pmr-R8A を含む) を上述のバッファーで 10 倍希釈したところ, NaCl を含まないバッファーでは直ちにタンパク質の凝集が観察された. 他の 5 種類のバッファーについては凝集が観察されなかったので, 「限外ろ過で濃縮後, 再度上述のバッファーで 10 倍希釈する」という操作を 2 回繰り返し, 残存タンパク質量を定量することでバッファー交換後の収量・収率を求めた (Table 5-1). この結果から, 今回試したバッファーの組成では NaCl 濃度が 0.2~0.5 M では収量・収率に顕著な差は見られないものの, 0.1 M では収量・収率が著しく低下することが明らかとなった. 以上の結果を踏まえて, Pmr-R8A の結晶化用バッファーは上述の 0.3 M NaCl のものを使用することにした.

Table 5-1. 各バッファーで限外ろ過を行った時の Pmr-R8A の収量と収率.

バッファーの組成	収量 [µg]	収率 [%] ^a
5 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.1 M NaCl, 10% グリセリン	40	7
5 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.2 M NaCl, 10% グリセリン	360	60
5 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.3 M NaCl, 10% グリセリン	390	65
5 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.4 M NaCl, 10% グリセリン	430	72
5 mM Tris-HCl [pH 7.5, 4°C], 0.5 M NaCl, 10% グリセリン	420	70

^a 元の溶液に含まれていた Pmr-R8A の量 (600 µg) を基に算出した.

5-3-3 Pmr-R8A の結晶化条件のスクリーニング

Pmr-R8A を 5-3-2 で決めた結晶化バッファーにバッファー交換後, 結晶化条件のスクリーニングを試みた. 5-2-7 の方法で Pre-Crystallization Test に供したところ, 1.5~4.6 mg/mL の精製タンパク質で良好な沈殿が得られたので, 1.5 mg/mL と 4.6 mg/mL のサンプルを用いて 5-2-8 の方法で 96 穴プレートでの結晶化条件のスクリーニングを行った. なお Emerald Bio

Systems 社の結晶化試薬は全体的に沈殿剤の濃度が高めであったため、Pmr-R8A 4.6 mg/mL のサンプルは使用せず、1.5 mg/mL については 672 条件、4.6 mg/mL については 384 条件の計 1,056 条件でスクリーニングを行った。その結果、結晶が得られる条件は見出だせなかったものの、以下の 4 条件でタンパク質に由来すると思われる液滴が観察された (Fig. 5-3)。なお液滴が見られたのは Pmr-R8A 4.6 mg/mL の時のみで、1.5 mg/mL では見られなかった。

- (1) 0.1 M HEPES (pH7.0), 30% (v/v) Jeffamine M-600 (pH7.0)
- (2) 0.1 M MES monohydrate (pH6.5), 1.6 M magnesium sulfate heptahydrate
- (3) 0.1 M sodium citrate tribasic dihydrate (pH5.6), 0.5 M sodium chloride, 2% (v/v) ethylene imine polymer
- (4) 0.1 M Tris (pH8.5), 0.7 M ammonium tartrate dibasic

そこで、上述の 4 条件について周辺条件の検討と再現性の確認を 5-2-8 の方法で 24 穴プレートを用いて行った。以下にそれぞれの結晶化試薬について、検討した周辺条件と結果を順に述べる。

(1) 0.1 M HEPES (pH7.0), 30% (v/v) Jeffamine M-600 (pH7.0)

Pmr-R8A の濃度を 1.8, 3.6, 5.4, 7.2 mg/mL で、Jeffamine M-600 (pH7.0) を 5~35% (v/v) まで 5% 刻みで検討したが、Pmr-R8A と結晶化試薬を混合したドロップに変化は見られなかった。

(2) 0.1 M MES monohydrate (pH6.5), 1.6 M magnesium sulfate heptahydrate

Pmr-R8A の濃度を 1.8, 3.6, 5.4, 7.2 mg/mL で、magnesium sulfate heptahydrate の濃度を 0.2~1.4 M まで 0.2 M 刻みで検討したが、Pmr-R8A と結晶化試薬を混合したドロップに変化は見られなかった。

(3) 0.1 M sodium citrate tribasic dihydrate (pH5.6), 0.5 M sodium chloride, 2% (v/v) ethylene imine polymer

Pmr-R8A の濃度を 0.9, 1.8, 2.7, 3.6, 5.4, 7.2 mg/mL で、sodium citrate tribasic dihydrate (pH5.6) の濃度を 0.1~0.7 M まで 0.1 M 刻みで、ethylene imine polymer の濃度を 0.5~4.0% (v/v) まで 0.5% 刻みで検討したところ、0.2~0.4 M sodium citrate tribasic dihydrate (pH5.6), 1.0~4.0% (v/v) ethylene imine polymer の多くの条件で Pmr-R8A が固まって存在しているのが観察された (Fig. 5-4)。さらに細かく sodium citrate tribasic dihydrate (pH5.6) と ethylene imine polymer の濃度を振ったところ、Pmr-R8A の固形物が生じる両者の濃度には相関関係があることが明らかになった (Table 5-2)。そこで、Pmr-R8A の固形物が生じる条件で sodium chloride の濃度を 0.1, 0.3, 0.7, 0.9 M に、sodium citrate tribasic dihydrate の pH を 5.0, 5.3, 5.9, 6.2 に変更して観察したが、結晶が生じる条件を見出すことはできなかった。

Table 5-2. Pmr-R8A が固形物を形成する周辺条件の検討.

Sodium citrate tribasic dihydrate (pH5.6) [M]	Ethylene imine polymer [%]							
	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0.5
	0.50	○	○	○	×	×	×	×
	0.40	○	○	○	○	○	×	×
	0.30	×	×	×	○	○	○	×
	0.25	×	×	×	×	○	○	○
	0.20	×	×	×	×	○	○	○
	0.15	×	×	×	×	×	○	○
	0.10	×	×	×	×	×	○	○
	0.05	×	×	×	×	×	×	○
	0.01	×	×	×	×	×	×	×

3.0, 5.0, 7.0, 9.0 mg/mL の Pmr-R8A と結晶化試薬を 1 μ L ずつ混合し, 24 穴プレートを用いてハンギングドロップ法で行った. 20°C でインキュベートを行い, 3 日程度で観察した. 表中の○は上述のいずれかの濃度の Pmr-R8A を用いた際に固形物が観察された条件を, ×はどの濃度においても固形物が観察されなかった条件を表す.

(4) 0.1 M Tris (pH8.5), 0.7 M ammonium tartrate dibasic

Pmr-R8A の濃度を 1.8, 3.6, 5.4, 7.2 mg/mL で, ammonium tartrate dibasic の濃度を 0.1~1.0 M まで 0.1 M 刻みで検討したところ, 0.1 M ammonium tartrate dibasic を使用した Pmr-R8A 7.2 mg/mL のドロップで針状の微結晶が生じた. これらのドロップ中では複数の針状結晶により形成された無数の結晶の塊が観察された (Fig. 5-5). この条件を基本として 5-2-8 の方法で添加剤のスクリーニングを行ったが, 得られた結晶に変化は見られなかった. そこで微結晶を用いて 5-2-9 の方法でマイクロシーディングを行った. 微結晶を破砕した溶液を 2, 10, 100, 1,000 倍希釈し, 8.0 mg/mL の Pmr-R8A を用いて作製したドロップに添加したところ, 2, 10, 100 倍希釈した溶液を用いた場合に同様の微結晶が得られたものの, X 線を当てられるような大きさの結晶は得られなかった (Fig. 5-6).

5-4 考察

本章では Pmr 及び Pmr-R8A を用いて結晶化条件のスクリーニングを行い、バッファの検討を経て最終的に Pmr-R8A の微結晶が生じる条件を見出した。今後 X 線結晶構造解析に進むためにはより大きな結晶の取得が必須であるが、そのためには微結晶が得られた条件の pH の検討やシッティングドロップ法への変更、マイクロシーディングを行う際の添加物の使用など、さらに多くの結晶化条件を検討する必要があると考えられる。一方で、H-NS や MvaT ホモログには二量体／多量体化ドメインと DNA 結合ドメインの間に flexible linker が存在し、これが決まった構造をとらないために結晶が生じにくいとも考えられる。このため、今後はタンパク質全長を用いた結晶化条件のスクリーニングに加えて、各ドメインのみを用いた結晶化条件のスクリーニングも進める必要があるだろう。

なお今年度、共同研究者により TurB の二量体／多量体化ドメイン (TurB_{nt61}) の同定、及び二量体で安定に存在するアラニン置換体 (TurB_{nt61}-R8A) の取得が行われた [川妻ら, 未発表データ]。TurB_{nt61}-R8A を 5-3-2 で決めた結晶化バッファでバッファ交換後、96 穴プレートでの結晶化条件のスクリーニングに供したところ、現在までに複数の条件でタンパク質のものと思われる結晶が得られている [川妻ら, 未発表データ]。これらの結晶から構造情報を取得することができれば、MvaT ホモログの二量体・多量体形成機構についてより詳細な議論が可能になるだろう。

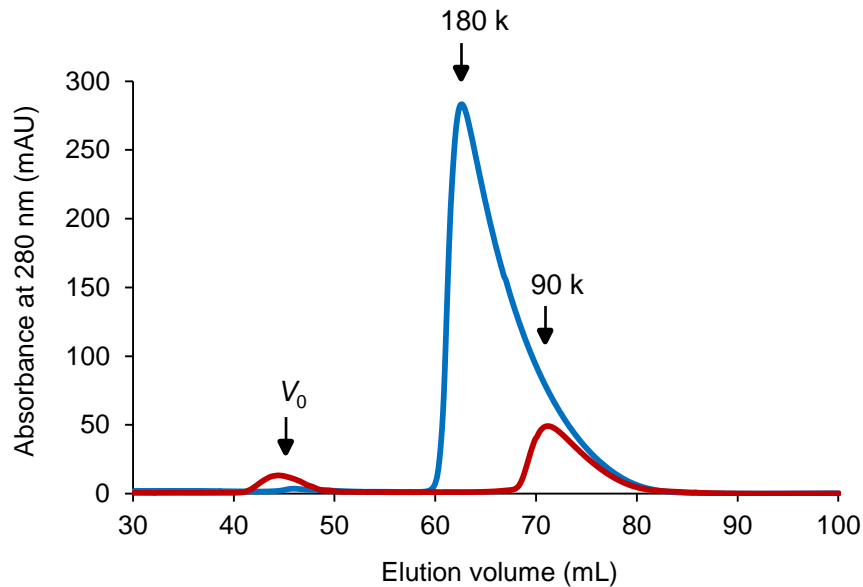


Fig. 5-1. Pmr-R8Aのゲルろ過クロマトグラフィーにおける溶出プロファイル.

縦軸はタンパク質由来の波長280 nmの吸光度を, 横軸は溶出容量を表す. 青色線はPmr-R8Aを580 μ Mで, 赤色線は140 μ Mで1 mLずつカラムに供した時の溶出プロファイルを示している. Fig. 2-17Aの検量線から推定される分子量とvoid volume ($V_0 = 45$ mL) を図中に示した.

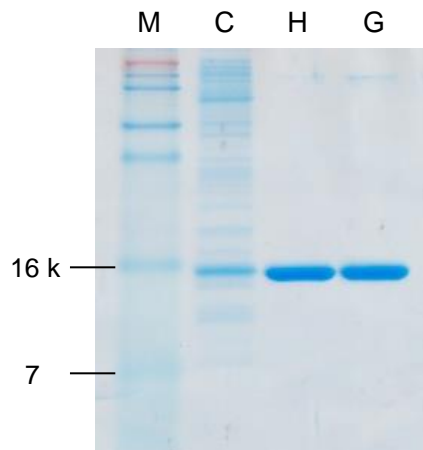


Fig. 5-2. Pmr-R8Aの精製状態の確認.

Mはマーカを, Cは細胞抽出液を, Hはアフィニティー精製後のサンプルを, Gはゲルろ過クロマトグラフィー後のサンプルを表す. 各レーン3 μ gのタンパク質をTricine-SDS-PAGEに供した.

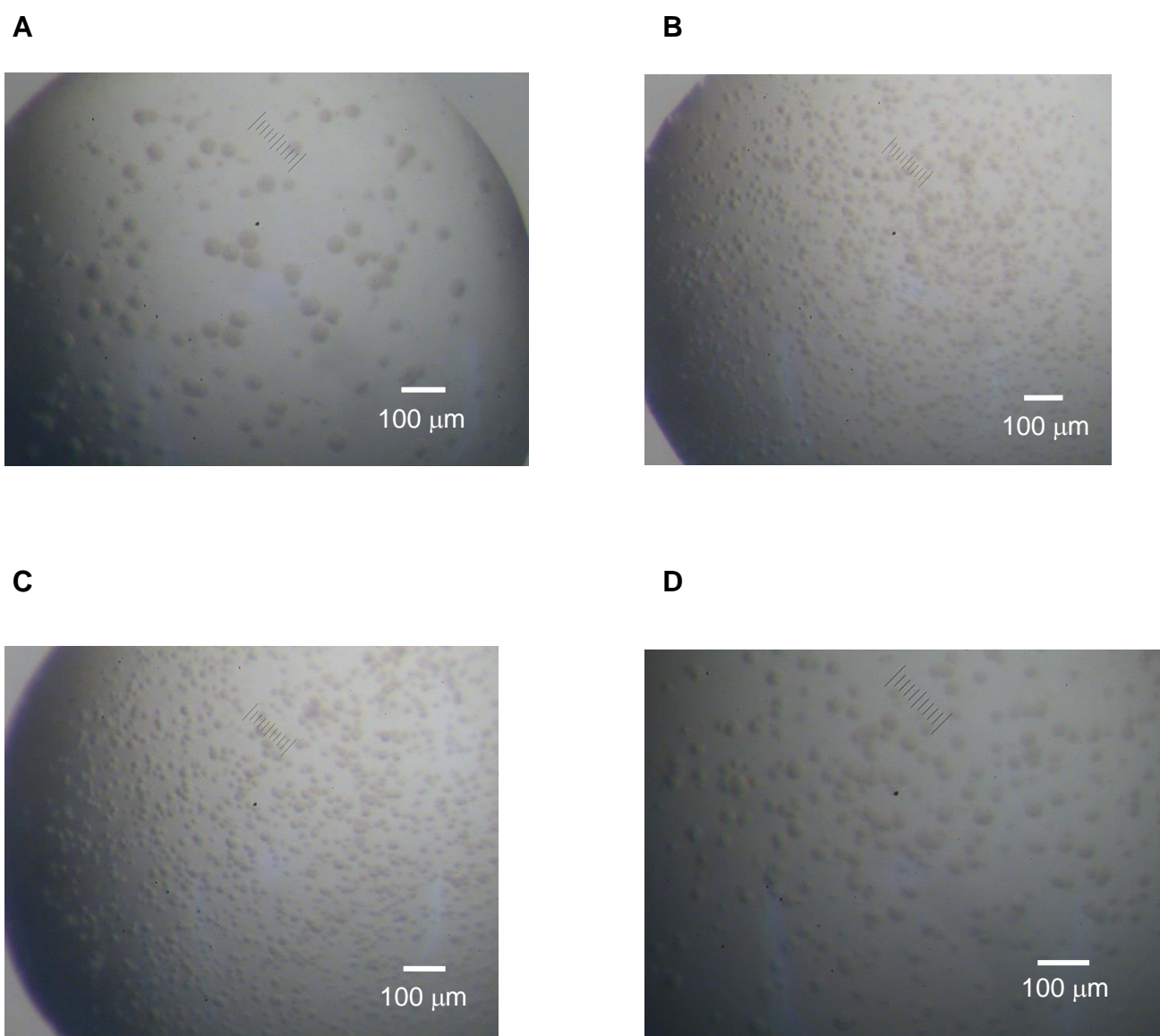


Fig. 5-3. Pmr-R8Aの結晶化条件のスクリーニング.

4.6 mg/mLのPmr-R8Aと結晶化試薬を0.3 μ Lずつ混合し、96穴プレートを用いてシッティングドロップ法を行った。結晶化試薬には、(A) 0.1 M HEPES (pH7.0), 30% (v/v) Jeffamine M-600 (pH7.0), (B) 0.1 M MES monohydrate (pH6.5), 1.6 M magnesium sulfate heptahydrate, (C) 0.1 M sodium citrate tribasic dihydrate (pH5.6), 0.5 M sodium chloride, 2% (v/v) ethylene imine polymer, (D) 0.1 M Tris (pH8.5), 0.7 M ammonium tartrate dibasicを用いた。20°Cでインキュベートを行い、5日程度で図のような液滴が観察された。

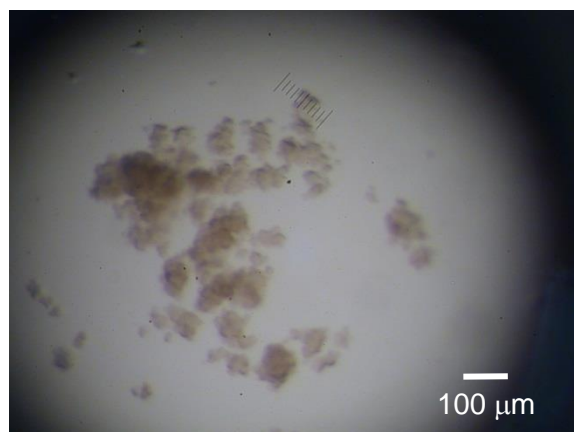


Fig. 5-4. Pmr-R8Aの固形物.

2.7 mg/mLのPmr-R8Aと結晶化試薬を1 μ Lずつ混合し、24穴プレートを用いてハンギングドロップ法で行った。結晶化試薬には、0.4 M sodium citrate tribasic dihydrate (pH5.6), 0.5 M sodium chloride, 3% (v/v) ethylene imine polymerを用いた。20°Cでインキュベートを行い、3日程度で図のような固形物が観察された。

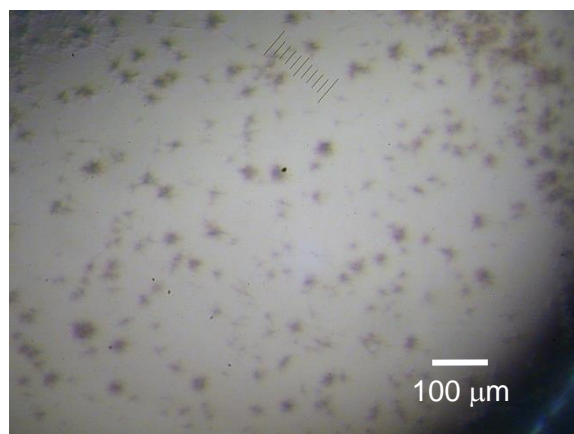


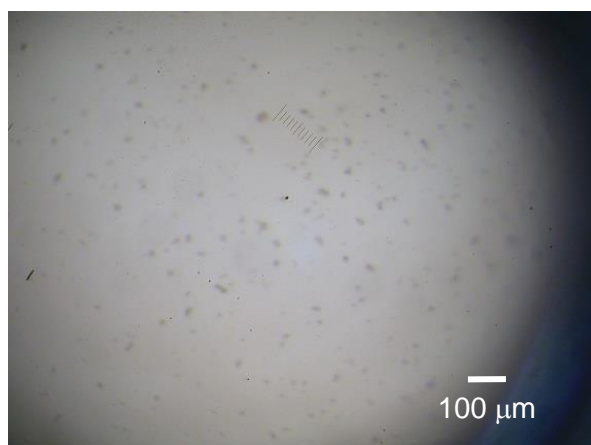
Fig. 5-5. Pmr-R8Aの微結晶.

7.2 mg/mLのPmr-R8Aと結晶化試薬を1 μ Lずつ混合し、24穴プレートを用いてハンギングドロップ法で行った。結晶化試薬には、0.1 M Tris (pH8.5), 0.1 M ammonium tartrate dibasicを用いた。20°Cでインキュベートを行い、1週間程度で図のような微結晶が観察された。

A



B



C

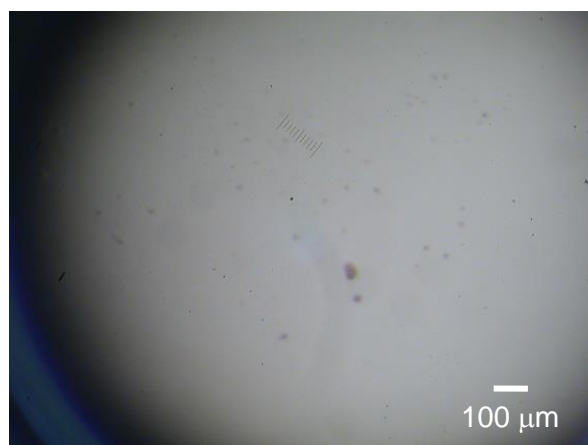


Fig. 5-6. ミクロシーディング法で得られたPmr-R8Aの微結晶.

微結晶を破碎した溶液を2, 10, 100倍希釈し, 8.0 mg/mLのPmr-R8Aと0.1 M Tris (pH8.5), 0.1 M ammonium tartrate dibasicを1 μLずつ混合して作製したドロップに0.5 μLずつ添加し, 20°Cでインキュベートを行った. (A) 2倍希釈液, (B) 10倍希釈液, (C) 100倍希釈液を添加したドロップの結果を示した. 3日程度で図のような微結晶が観察された.

第 6 章

総括と展望

本研究では Pmr の多量体形成様式と DNA との結合様式について、Pmr と H-NS との比較、及び Pmr, TurA, TurB 間の比較を行うことで、Pmr が転写制御を行う分子機構の解明を試みた。本章ではこれらの比較について、本研究から明らかとなったことを記述する。

(1) Pmr と H-NS との比較

本研究開始当初は Pmr のタンパク質としての解析は行われておらず、また *P. aeruginosa* PAO1 株の MvaT についてもタンパク質としての解析は行われていなかったため、本研究ではまず Pmr が腸内細菌の H-NS と同様のホモ多量体形成能や DNA 結合能を持つのかについて調べた。第 2 章及び第 4 章の結果からは、Pmr が溶液中でホモ多量体を形成すること、DNA 結合能・架橋能を持つこと、N 末端側に二量体／多量体化ドメインを、C 末端側に DNA 結合ドメインを持つことが明らかとなり、これらの特徴は全て H-NS と共通していた。しかし第 2 章の結果からは、Pmr のホモ多量体化に重要な領域は H-NS のホモ多量体化に重要な領域とは異なることが示唆された。H-NS は N 末端側の 2 つのヘリックス H1, H2 と flexible linker 近傍領域の 2 つのヘリックス H3, H4 がそれぞれ anti-parallel に二量体を形成することでホモ多量体を形成する [Arold *et al.*, 2010]。一方、Pmr の二量体／多量体化ドメインである Pmr_nt₆₁ においてホモ多量体形成に重要であることが示された 7 残基のうち 6 残基はモデル構造上で H-NS のヘリックス H1, H2 に相当する領域に分布しており、Pmr_nt₆₁ の C 末端側 (flexible linker 近傍領域) や推定 flexible linker 領域のホモ多量体形成への寄与は認められなかった。この結果から、Pmr では二量体／多量体化ドメインの N 末端側のみがホモ多量体形成に主要な役割を担っており、Pmr は H-NS とは異なるホモ多量体形成様式を持つことが示唆された。これまで *Pseudomonas* 属細菌の MvaT ホモログは「機能も機能発現のための分子機構も腸内細菌の H-NS と同じ」だと認識されてきたが、本研究から、少なくとも Pmr については機能発現に重要なホモ多量体形成機構が H-NS とは異なることが示唆された。

一方第 4 章において Pmr の DNA 結合ドメインである Pmr_ct を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、Pmr_ct は ChAP-chip 解析で Pmr の結合が見られた領域由来のプローブ (GC 含量 55%) に対して、結合が見られなかった領域由来のプローブ (GC 含量 70%) よりも高い親和性を示した。これは Pmr の ChAP-chip 解析において、Pmr がゲノム上の GC 含量の低い領域に多く結合が見られたことと一致していた [Yun and Suzuki *et al.*, 2010]。また ChAP-chip 解析で Pmr の結合が見られた箇所の genome signature の解析では、Pmr は ATA や

TATAT のような A と T が交互に繰り返される配列に高い親和性を持つことが示唆されている [高橋ら, 未発表データ]. この結果は H-NS が T-A step に高い親和性を示すことと一致しており [Gordon *et al.*, 2011], Pmr も H-NS と同様に DNA の minor groove を認識して結合している可能性が示唆された. 以上より, Pmr は DNA 認識機構については H-NS と同様の特徴を示すと考えられた.

(2) Pmr, TurA, TurB 間の比較

当研究室で以前行われた *pmr*, *turA*, *turB* 単独破壊株のトランスクリプトーム比較の結果, 各破壊株で転写変動した遺伝子の多くが互いに重複しないことが明らかとなった [尹ら, 未発表データ] (Fig. 1-16). この結果は Pmr, TurA, TurB の機能が互いの「バックアップ」ではなく, 各因子が独自の機能を持つことを示唆していたが, ChAP-chip 解析で得られた各因子の結合箇所はほぼ一致しており, 結合箇所の違いから各因子の機能の違いを議論することはできなかった [Yun and Suzuki *et al.*, 2010; 尹ら, 未発表データ] (Fig. 1-17). このため本研究では Pmr, TurA, TurB の多量体形成機構と DNA 認識機構を比較することにより, 上述の結果が得られた理由を考察した. 第 3 章の結果から TurA, TurB も Pmr と同様にホモ多量体を形成すること, Pmr は TurA, TurB とヘテロ多量体を形成することが示され, TurA と TurB がヘテロ多量体を形成することは過去に示されていることを考慮すると [Rescalli *et al.*, 2004], ChAP-chip 解析において各因子の結合箇所が一致しているように見えたのは Pmr, TurA, TurB が DNA 上でホモ・ヘテロ多量体を形成しており, どの因子を標的にして ChAP-chip 解析を行った場合にもこのホモ・ヘテロ多量体の結合領域が検出されたためだと考えられる (Fig. 6-1). しかし本研究の結果からは, 各結合領域で形成されたホモ・ヘテロ多量体内の Pmr, TurA, TurB の割合が異なる可能性が強く示唆されている. Pmr, TurA, TurB も H-NS と同様に各々の高親和性塩基配列に結合し, 最初に結合した分子を「足場」として DNA 上でホモ・ヘテロ多量体を形成すると考えられるが, 第 3 章の結果からは Pmr, TurA, TurB の各「足場」に対する Pmr の結合比が TurB-Pmr 間と TurA-Pmr, Pmr-Pmr 間で異なることが示唆された. また第 4 章で述べたように, 最近共同研究者によって行われた ChAP-chip 解析からは, Pmr の *p*-value が TurA, TurB の *p*-value よりも小さい領域では A と T が交互に繰り返される配列が多く含まれることが明らかとなっている [高橋ら, 未発表データ]. 以上の結果を考慮すると, Pmr, TurA, TurB は各因子の DNA 結合ドメインと DNA との親和性に基づき互いに競合するように DNA 上に「足場」を形成し, その後各因子のタンパク質間相互作用の親和性と結合比に基づきホモ・ヘテロ多量体を形成するが, これらの親和性や結合比が各因子によって異なるために DNA 上に形成されたホモ・ヘテロ多量体の組成は結合箇所によって異なり, 結果的に *pmr*, *turA*, *turB* 単独破壊株では野生型株と同様のホモ・ヘテロ多量体を形成することができず, MvaT ホモログが DNA を覆う領域 (転写が抑制される領域) が野生型株とは変化し, 各破壊株で異なる遺伝子の転写変動が見られたと考えられた.

上述のように、本研究では Pmr のホモ・ヘテロ多量体形成機構に着目し、これまで機能が同じと考えられてきた H-NS と MvaT ホモログ (Pmr) では機能発現の分子機構が異なること、Pmr, TurA, TurB による転写制御にはヘテロ多量体の組成が重要であることが明らかとなった。本研究中では Pmr, TurA, TurB がホモ二量体を基本構造としてホモ・ヘテロ多量体を形成することを示したが、H-NS が自身のホモログである StpA とヘテロ二量体を形成することを考慮すると [Johansson *et al.*, 2001], Pmr, TurA, TurB がヘテロ二量体を形成する可能性も十分に考えられる。事実、共同研究者が精製タンパク質を用いてヘテロ二量体の検出を試みたところ、いずれの組み合わせでもヘテロ二量体は検出され、さらに Pmr-TurA 間と TurA-TurB 間ではヘテロ二量体の形成率に差があることが示唆されている [川妻ら, 未発表データ]。以上より、今後は Pmr, TurA, TurB のホモ多量体形成時の結合比の違い、ヘテロ二量体形成時の親和性の違い、各因子の DNA との親和性の違いが生じる分子機構の解析が重要になると考えられる。そのためには各因子の構造情報の取得が必須であるが、本研究第 5 章では Pmr-R8A の微結晶が、共同研究者の研究からは TurB の二量体/多量体化ドメインのアラニン置換体の結晶がこれまでに取得されている [川妻ら, 未発表データ]。今後はこれらの結晶化条件をさらに詰めることで構造情報を取得し、上述の Pmr, TurA, TurB 間の違い、及び H-NS と MvaT ホモログ間の分子レベルの違いについて議論が進むことが期待される。

また本研究では Pmr に着目したが、pCAR1 には他に Pnd, Phu の 2 種類の核様体タンパク質がコードされている。Pmr と Pnd, Pmr と Phu のヘテロ多量体はこれまでに検出されていないものの (補章参照)、Pnd がホモ多量体を形成すること (補章参照)、Phu がホモ二量体を形成することを考慮すると [武田, 2011], Pnd や Phu も染色体由来のホモログと協調的に機能する可能性が高い。P. putida KT2440 株染色体には 1 つの NdpA ホモログ (NdpA, PP_0973) 及び 3 つの HU ホモログ (HupA または HupP, PP_5313; HupB, PP_2303; HupN, PP_0975) がコードされている [Bartels *et al.*, 2001; Cases and de Lorenzo, 2002; Nelson *et al.*, 2002]。今後は Pnd, Phu についても Pmr と同様に染色体由来ホモログとの関係を調べることで、P. putida KT2440(pCAR1)株の核様体タンパク質を介した協調的転写制御機構が明らかになると期待される。

さらに序論でも述べたように当研究室では複数の宿主を用いた実験も行われており、pCAR1 を保持した際に示す表現型や転写変動する染色体上・プラスミド上の遺伝子が宿主によって異なることも報告されている [Shintani *et al.*, 2010; Shintani *et al.*, 2011; Takahashi and Shintani *et al.*, submitted]。この現象は、宿主由来の核様体タンパク質と pCAR1 由来の核様体タンパク質が協調的に機能して宿主の表現型に結び付くと考えれば、宿主の違いは核様体タンパク質の違いであるとも捉えられる。プラスミドは環境中において接合伝達により様々な宿主に保持されることから、将来的には P. putida KT2440 株以外の宿主も用いて研究を進めることにより、環境中における分解プラスミドの挙動が明らかになるだろう。

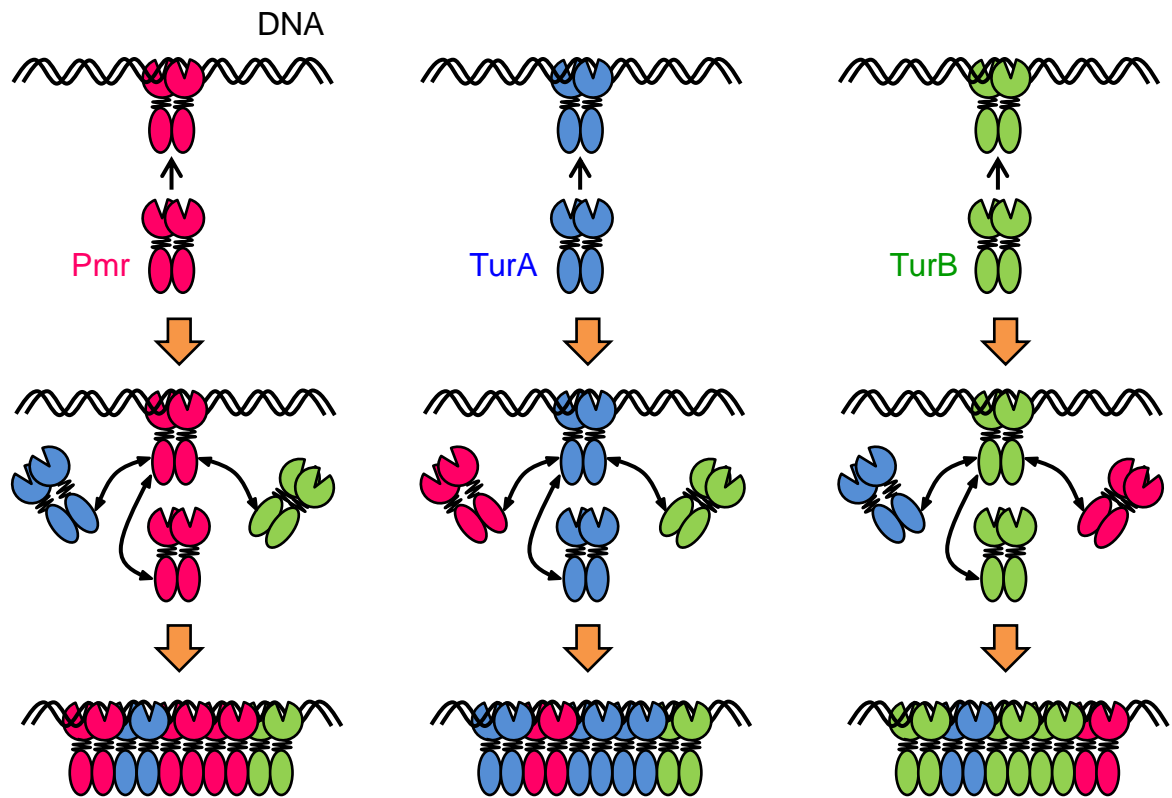


Fig. 6-1. Pmr, TurA, TurBによるDNAとの結合の模式図.

各因子はホモ二量体で表現した。Pmr, TurA, TurBが最初にDNAに結合した箇所が「足場」となって、各因子が各々のDNAとの親和性とタンパク質間の親和性と結合比に基づきホモ・ヘテロ多量体を形成すると考えられる。この時、最終的に生じた各因子のホモ・ヘテロ多量体の組成が図中のように異なっていたとしても、ChAP-chip解析を行った場合にはいずれの領域も各因子の結合箇所として検出されると考えられる。

補章

Pnd, Phu のタンパク質間相互作用の解析と

両遺伝子の転写開始点の決定

補-1 緒言

核様体タンパク質の一種である HU は、nick や gap を含む二本鎖 DNA に高い親和性を持つものの、DNA への結合時に配列特異性を示さないことが知られている [Castaing *et al.*, 1995; Pinson *et al.*, 1999]. また多くの細菌ではホモ二量体を形成し（大腸菌では例外的に α サブユニットと β サブユニットのヘテロ二量体を形成する）、染色体に複数のホモログをコードする多くのグラム陰性細菌では各遺伝子を単独で破壊しても顕著な表現型は見られないものの、一つしかコードしていない多くのグラム陽性細菌では遺伝子破壊株が致死になることが知られている [Claret and Rouviere-Yaniv, 1997; Grove, 2011]. 一方、NdpA についてはグラム陰性細菌に広く保存されているものの、大腸菌におけるホモログ YejK が核様体に含まれること [Murphy *et al.*, 1999] が報告されていることを除いて研究例が無く、その機能には不明な点が多い.

プラスミド pCAR1 には MvaT ホモログ Pmr, NdpA ホモログ Pnd, HU ホモログ Phu の 3 種類の核様体タンパク質がコードされている. 当研究室ではこれまでに *P. putida* KT2440 株をモデル宿主とした研究から、各遺伝子の単独破壊株及び *pnd* と *phu* の二重破壊株では顕著な表現型は見られないものの、*pmr* と *pnd*, *pmr* と *phu* の 2 つの二重破壊株では pCAR1 の安定性が低下すること [武田, 2011] 及び pCAR1 の接合伝達頻度が低下すること [松井, 2014] が明らかとなっていた. しかし Pnd, Phu については遺伝子・タンパク質レベルでの基礎的解析がほとんど行われておらず、上述の二重破壊株で表現型が変化する分子機構については不明なままであった. そこで本章では Pnd, Phu の機能解析の一環として、タンパク質間相互作用の解析と両遺伝子の転写開始点の決定を行った.

補-2 材料と方法

補-2-1 使用した菌株, プラスミド, 及び培養条件

本章ではタンパク質発現のために *E. coli* BL21(DE3)株 (Novagen) を使用した. 本章で使用したプラスミドはTable 補-1に示した. 大腸菌の培養条件は第2章2-2-1に従った. *P. putida* KT2440 株についてはコハク酸を唯一の炭素源とする培地 (NMM-4 培地 [Shintani *et al.*, 2005] にコハク酸二ナトリウム六水和物を 0.1% [w/v] となるように加えた) を用いて 30°C で培養した.

Table 補-1. 本章で使用したプラスミド.

Plasmid vectors	Relevant properties	Reference or Source
pET26b(+)	pBR322 replicon, Km ^r , T7 promoter, <i>lacI</i>	Novagen
pET-C-His-pmr	pET-26b(+), <i>NdeI-XhoI</i> fragment containing <i>pmr</i>	Yun and Suzuki <i>et al.</i> , 2010
pET-C-His-pnd	pET-26b(+), <i>NdeI-XhoI</i> fragment containing <i>pnd</i>	武田, 2011
pET-C-His-phu	pET-26b(+), <i>NdeI-XhoI</i> fragment containing <i>phu</i>	武田, 2011
pFLAG-CTC	Ap ^r , <i>lacI</i> , <i>tac</i> promoter expressing FLAG-tag	Sigma-Aldrich
pFLAGpmr	pFLAG-CTC, <i>NdeI-SalI</i> fragment containing <i>pmr</i>	Yun and Suzuki <i>et al.</i> , 2010
pFLAGpnd	pFLAG-CTC, <i>NdeI-XhoI</i> fragment containing <i>pnd</i> which is ligated into <i>NdeI-SalI</i> site	武田, 2011
pFLAGphu	pFLAG-CTC, <i>NdeI-XhoI</i> fragment containing <i>phu</i> which is ligated into <i>NdeI-SalI</i> site	武田, 2011
pZErO TM -2	Km ^r , T7 promoter, ColE1 and f1 origin, <i>ccdB</i> lethal gene, M13 priming sites	Invitrogen

^aAp^r and Km^r represent resistance to ampicillin and kanamycin, respectively.

補-2-2 *E. coli* BL21(DE3)株を用いた目的タンパク質の大量発現

第2章2-2-13と同様にLB培地5mLの系で行った.

補-2-3 Tricine-SDS-PAGE

第2章2-2-12と同様に行った.

補-2-4 ウェスタンブロッティング

試薬は第3章3-2-5と同じものを使用した.

- ① メンブレン (Sequi-BlotTM PVDF Membrane, Bio-Rad) を縦5cm×横9cmに切断し, メタノールに浸して活性化させた.
- ② ①のメンブレンと, 縦5cm×横9cmに切断した濾紙6枚を blotting buffer に浸した.
- ③ Tricine-SDS-PAGE の泳動終了後に分離ゲルを blotting buffer に浸して20分間振盪した.
- ④ セミドライ式転写装置に, 下から, 濾紙3枚, メンブレン, ゲル, 濾紙3枚の順に重ねてローラーで気泡を抜き, 20Vで40分間ブロッティングした.
- ⑤ メンブレンをすぐにブロッキング試薬に浸して1時間振盪した.

- ⑥ メンブレンを T-PBS buffer に浸して 5 分間振盪した。その後バッファーを交換し、さらにこの操作を 4 回繰り返した。
- ⑦ 一次抗体として Monoclonal ANTI-FLAG[®] M2-Peroxidase (HRP) antibody (Sigma-Aldrich) を T-PBS buffer で 1,000 倍希釈し、メンブレンを浸して 1 時間振盪した。
- ⑧ ⑥の操作を繰り返した。
- ⑨ 二次抗体として ECL Peroxidase labeled anti-mouse antibody (GE Healthcare) を T-PBS buffer で 20,000 倍希釈し、メンブレンを浸して 1 時間振盪した。
- ⑩ ⑥の操作を繰り返した。
- ⑪ Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate を添付のプロトコールに従って調製し、メンブレンを浸して 5 分間静置した。その後、バイオイメージングアナライザー LAS1000 plus (FUJIFILM)で検出を行った。

補-2-5 プルダウンアッセイ

本項では His-tag 融合 Pmr を His-Pmr, FLAG-tag 融合 Pmr を FLAG-Pmr のように表記する。

- ① 補-2-2 の方法で His-tag 融合タンパク質と FLAG-tag 融合タンパク質を大量発現させた大腸菌細胞抽出液を得た。
- ② His-Pmr を含む細胞抽出液由来のタンパク質 2,000 μ g, His-Pnd を含む細胞抽出液由来のタンパク質 700 μ g, His-Phu を含む細胞抽出液由来のタンパク質 200 μ g に対して、それぞれ FLAG-Pmr を含む細胞抽出液由来のタンパク質 400 μ g 及び FLAG-Pnd を含む細胞抽出液由来のタンパク質 1,200 μ g を混合した。
- ③ MagneHis Protein Purification System (Promega) の Ni-Particles を 30 μ L 加え、4°C, 10 rpm で 1 時間インキュベートした。
- ④ MagneHis Protein Purification System (Promega) の推奨プロトコールに従い His-tag 融合タンパク質を溶出した。
- ⑤ 補-2-3 の方法で Triclen-SDS-PAGE を、補-2-4 の方法でウェスタンブロッティングを行った。

補-2-6 RNA の抽出

RNA 抽出に用いる *P. putida* KT2440(pCAR1)株の培養液は、サンプリング後速やかに等量の RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen) と混合し、集菌後上清を除いて RNA 抽出時まで -80°C で保存し、Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel) を用いて粗精製を行った。RQ1 RNase-free DNase (Promega) を用いてサンプル中に含まれる DNA を分解した後、Nucleospin RNA Binding Column (Macherey-Nagel) を用いて RNA を精製した。操作はいずれも添付のプロトコールに従った。

補-2-7 5'-RACE 解析

SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて行った. cDNA の合成は添付のプロトコールに従った. 5'-RACE PCR はキット付属の Universal Primer A Mix と Table 補-2 のプライマーを用い, 合成した cDNA を鋳型として, KOD -plus- Neo (Toyobo) を使用して推奨プロトコールに従い行った. Nested PCR はキット付属の Nested Universal Primer A と Table 補-2 のプライマーを用い, 5'-RACE PCR 産物を鋳型として, KOD -plus- Neo (Toyobo) を使用して推奨プロトコールに従い行った. Nested PCR 産物は pZErO™-2 (Invitrogen) の EcoRV サイトに組み込み, M13-F, M13-R プライマーを用いて配列の確認を行った.

Table 補-2. 本章で使したプライマー.

Primer	Sequence (5' → 3')	Reference
pnd498	GGACTGCTTGTTGTTCTGCCATTCG	This study
pnd308	CCGGTTGAGAGGTTTCGATTCTTCCAT	This study
phu258	CTTGAAGGACTTGCCAGGGGTGAACT	This study
phu157	TTGACTCGAAAGTACCAAAGCCCACGAG	This study
phu79	TATTCAGCACCTCTCCACGGTTGAC	This study
phu_up745	GGGTCTTGGTCTCAGTGGCTATGCTG	This study
phu_up564	GAGGTTCCCGGAGTGGTCAATGATAATG	This study
phu_up448	GTCCGAAGTGCAGCTTTGTTTTTCAGC	This study
phu_up395	CATTACCACACTTCGGACAGAGCAATCC	This study
M13-F	GTAAAACGACGGCCAGT	Takahashi <i>et al.</i> , 2009b
M13-R	GGAAACAGCTATGACCATG	Takahashi <i>et al.</i> , 2009b

補-3 結果

補-3-1 Pmr, Pnd, Phu 間の相互作用の解析

Pmr (分子量約 14 k), Pnd (分子量約 38 k), Phu (分子量約 10 k) のタンパク質間相互作用検出のために, His-tag 融合 Pmr, Pnd, Phu と FLAG-tag 融合 Pmr, Pnd, Phu を用いたプルダウンアッセイを行った. 本項では His-tag 融合 Pmr を His-Pmr, FLAG-tag 融合 Pmr を FLAG-Pmr のように表記する. *E. coli* BL21(DE3)を用いた各タンパク質の発現は, 武田が採用した発現条件である 25°C, IPTG 終濃度 0.1 mM で行った [武田, 2011]. この条件で His-Pmr, His-Pnd, His-Phu, FLAG-Pmr, FLAG-Pnd は良好に発現したが (Fig. 補-1, 2, FLAG-Pmr については Fig. 補-3A のレーン 1 を参照), FLAG-Phu については培養温度 25°C, 30°C の 2 条件を用いて複数コロニーで発現を確認したものの可溶性・不溶性画分の両方で発現が認められなかった (Fig. 補-2). このため FLAG-Phu は本解析から除外した. プルダウンアッセイは補-2-5 の方法に従い, bait タンパク質 (His-Pmr, His-Pnd, His-Phu) を含む大腸菌細胞抽出液と, prey タンパク質 (FLAG-Pmr, FLAG-Pnd) を含む大腸菌細胞抽出液を混合し, MagneHis Protein Purification System (Promega) を用いて His-tag 融合タンパク質を精製した後, ウェスタンブロッティングで FLAG-tag 融合タンパク質を検出した. 各タンパク質の発現量と MagneHis Protein Purification System での精製効率を考慮し, His-Pmr を含む細胞抽出液由来のタンパク質 2,000 μ g, His-Pnd を含む細胞抽出液由来のタンパク質 700 μ g, His-Phu を含む細胞抽出液由来のタンパク質 200 μ g に対して, それぞれ FLAG-Pmr を含む細胞抽出液由来のタンパク質 400 μ g 及び FLAG-Pnd を含む細胞抽出液由来のタンパク質 1,200 μ g を混合した. インキュベート後に His-tag 融合タンパク質を精製し, 精製画分を Tricine-SDS-PAGE で分離した後 (Fig. 補-3A), 抗 FLAG-tag 抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出した (Fig. 補-3B). His-Pmr と FLAG-Pmr がホモ多量体を形成することは第 2 章や第 3 章と同様に確認された (Fig. 補-3B, レーン 2). また同様に His-Pnd と FLAG-Pnd を混合したサンプルから FLAG-Pnd が検出されたことから (Fig. 補-3B, レーン 8), Pnd もホモ多量体を形成することが示唆された. 一方, その他の組み合わせについてはいずれの場合も FLAG-tag 融合タンパク質は検出されず, Pmr, Pnd, Phu 間のヘテロ相互作用は少なくとも Pmr-Pmr 間, Pnd-Pnd 間よりは弱い, またはヘテロ多量体が全く形成されないことが示唆された.

補-3-2 *pnd, phu* の転写開始点の決定

当研究室の過去の研究から, *pmr* は開始コドン上流 69 塩基から σ^{70} 依存的に転写が開始することが示されていた [Yun and Suzuki *et al.*, 2010]. 一方 *pnd* 及び *phu* の転写開始点については過去にプライマー伸長解析が試みられていたものの, *pnd* の内部配列に由来するプライマーを用いた場合は伸長産物が検出されず, また *phu* の内部配列に由来するプライマーを

用いた場合は実験の回によって異なる伸長産物が検出されてしまい、転写開始点を決定することはできなかった [武田, 2011]. そこで本研究では 5'-RACE 法によって *pnd*, *phu* の転写開始点の決定を試みた.

当研究室で行われた定量 RT-PCR 法による解析から、コハク酸を唯一の炭素源とする培地で生育させた *P. putida* KT2440 株においては、*pnd*, *phu* とも定常期に比べて対数増殖期に多く転写されることが明らかとなっていた [高橋ら, 未発表データ]. そこで対数増殖期の菌体から抽出した RNA を用いて cDNA を合成し、まず *pnd* の内部配列に由来するプライマーを用いて 5'-RACE 解析を行った. *pnd* の開始コドンから数えて 498 番目の塩基から作製した *pnd*498 プライマーを用いて cDNA を鋳型に補-2-7 の方法で 5'-RACE PCR を行い、*pnd* の開始コドンから数えて 308 番目の塩基から作製した *pnd*308 プライマーを用いて 5'-RACE PCR 産物を鋳型に nested PCR を行ったところ、アガロースゲル電気泳動で 2 種類の nested PCR 産物が確認された (Fig. 補-4). そこでこれらの PCR 産物を精製・クローニングし、生じた大腸菌のコロニーが持つインサートの配列を確認した. 約 500 bp の DNA 断片をクローニングしたところ、10 個のコロニーのうち 5 個で開始コドン上流 224 塩基が、3 個で上流 254 塩基が、残りの 2 個で上流 223 塩基と 184 塩基が PCR 産物の 5'末端として検出された. また開始コドン上流 254 塩基と 224 塩基の直上流には *Pseudomonas* 属細菌の σ^{70} 依存的プロモーターに見られる-35 配列及び-10 配列 (*P. putida* の場合はそれぞれ TTGAcC 及び TATAcT, 太字>大文字>小文字の順に保存性が高い) [Domínguez-Cuevas and Marqués, 2004] と考えられる配列が認められた (Fig. 補-4). 一方、約 400 bp の DNA 断片をクローニングした場合には、13 個のコロニーのうち 6 個で開始コドン上流 33 塩基が PCR 産物の 5'末端として検出され、残りの 7 個で上流 32, 31 塩基が 2 個ずつ、上流 30, 37, 38 塩基が 1 個ずつ検出された. 最も数が多かった上流 33 塩基の直上流の配列を調べたところ、上述の σ^{70} 依存的プロモーターに見られる-35 配列及び-10 配列の存在も、*Pseudomonas* 属細菌の σ^{54} 依存的プロモーターに見られる-24 配列及び-12 配列 [Valls *et al.*, 2004] の存在も認められなかった (Fig. 補-4). 以上より、*pnd* は開始コドン上流 254 塩基及び 224 塩基から σ^{70} 依存的に転写が開始されると考えられた. この結果は *P. putida* KT2440(pCAR1)株のトランスクリプトーム解析において、*pnd* の転写が開始コドン上流約 200 塩基から始まると予想されたことと一致していた [武田, 2011] (Fig. 補-5).

次に *phu* の内部配列に由来するプライマーを用いて 5'-RACE 解析を行った. *phu* の開始コドンから数えて 258 番目の塩基から作製した *phu*258 プライマーを用いて cDNA を鋳型に補-2-7 の方法で 5'-RACE PCR を行い、*phu* の開始コドンから数えて 157 番目の塩基から作製した *phu*157 プライマーを用いて 5'-RACE PCR 産物を鋳型に nested PCR を行ったところ、アガロースゲル電気泳動で 4 種類の nested PCR 産物が確認された (Fig. 補-6). そこでまず約 300 bp の DNA 断片をクローニングしたところ、16 個のコロニーのうち 5 個で開始コドン上流 24 塩基が、2 個で上流 122 塩基が、残りの 9 個で上流 124, 78, 51, 43, 35, 25, 23, 4 塩基、及び遺伝子内部 33 塩基 (開始コドンから数えた場合) が PCR 産物の 5'末端として検出

された。また約 200 bp の DNA 断片をクローニングしたところ、15 個のコロニーのうち 4 個で開始コドン上流 24 塩基が、3 個で上流 51 塩基が、残りの 8 個で上流 52, 28, 26, 25, 19, 5 塩基、及び遺伝子内部 7, 13 塩基（開始コドンから数えた場合）が PCR 産物の 5'末端として検出された。これら全 31 コロニーにおいて 2 個以上のコロニーで確認された開始コドン上流 122, 51, 24 塩基の直上流の配列を確認したところ、上流 122 塩基及び 51 塩基では-35 配列及び-10 配列と推定される配列が認められたが、上流 24 塩基ではそのような配列は認められなかった (Fig. 補-6)。

一方、*phu* の内部配列と開始コドン上流 745 塩基及び 448 塩基から作製したプライマーを用いて、cDNA を鋳型として PCR を行ったところ、いずれの組み合わせでも PCR 産物の増幅が確認されたことから (Fig. 補-7)、上述の nested PCR で見られた 4 種類の PCR 産物のうち 800~1,000 bp の 2 種類についても *phu* の開始コドン上流にプライマーを作製して解析することにした。*phu* の開始コドン上流 395 塩基から作製した *phu_up395* プライマーを用いて cDNA を鋳型に補-2-7 の方法で 5'-RACE PCR を行い、*phu* の開始コドン上流 564 塩基から作製した *phu_up564* プライマーを用いて 5'-RACE PCR 産物を鋳型に nested PCR を行ったところ、アガロースゲル電気泳動で 2 種類の nested PCR 産物が確認された (Fig. 補-8)。このうち 300 bp 弱の DNA 断片をクローニングしたところ、解析した 12 個全てのコロニーで開始コドン上流 788 塩基が PCR 産物の 5'末端として検出された。また 200 bp 弱の DNA 断片をクローニングしたところ、11 個のコロニーのうち 8 個で開始コドン上流 714 塩基が、2 個で上流 704 塩基が、1 個で上流 713 塩基が PCR 産物の 5'末端として検出された。数が多く検出された開始コドン上流 788 塩基と 714 塩基の直上流の配列を確認したところ、いずれの場合も-35 配列及び-10 配列と推定される配列が認められた (Fig. 補-8)。以上より、*phu* は開始コドン上流 788, 714, 122, 51 塩基から σ^{70} 依存的に転写が開始されると考えられた。これらの結果は *P. putida* KT2440(pCAR1)株のトランスクリプトーム解析において、*phu* の転写が開始コドン上流約 700 塩基から始まり、*phu* の遺伝子周辺で高いシグナル値が観察されることと一致していた [武田, 2011] (Fig. 補-9)。

補-4 考察

本章では Pnd, Phu の機能解析の一環として Pmr, Pnd, Phu 間の相互作用の検出を試みたが、三者のヘテロ多量体は検出されなかった。この結果から、pCAR1 の安定性や接合伝達頻度に関わる Pmr, Pnd, Phu の協調的機能には、三者間の直接相互作用よりは三者が協調的に行う DNA の折り畳み様式が重要であると考えられた。Maurer らは、H-NS, HU, IHF の 3 種の核様体タンパク質を混合して DNA に結合させると、各タンパク質を単独で結合させた場合よりも高次に折り畳まれた DNA が観察されたと報告している [Maurer *et al.*, 2009]。この例のように、*P. putida* KT2440(pCAR1)株においても *pmr* と *pnd*, *pmr* と *phu* の 2 つの二重破壊株では DNA の折り畳み様式が大きく変化し、その結果様々な遺伝子の転写が変動して表現型の変化に結びついたと考えられる。また別の可能性として、Pmr, Pnd, Phu は DNA が足場として存在した時のみ直接相互作用する可能性も否定できない。例えば H-NS と FIS の 2 種の核様体タンパク質は溶液中における直接相互作用は検出されていないものの、大腸菌を用いた ChIP-chip 解析において両者の結合箇所は顕著に重複していたことが報告されている [Grainger *et al.*, 2006]。ただしこの報告については、その後別の研究グループから矛盾する結果が報告されていることには注意が必要である [Kahramanoglou *et al.*, 2011]。Pmr, Pnd, Phu が協調的に機能する分子機構を明らかにするためには、今後各タンパク質の DNA との結合やタンパク質間相互作用について詳細に調べていく必要があるだろう。

また Pmr と *P. putida* KT2440 株染色体由来の MvaT ホモログ TurA, TurB との関係を考慮すれば、Pnd と Phu についても今後染色体由来ホモログとの関係を調べていく必要があると考えられる。*P. putida* KT2440 株染色体には 1 つの NdpA ホモログ (NdpA, PP_0973) 及び 3 つの HU ホモログ (HupA または HupP, PP_5313; HupB, PP_2303; HupN, PP_0975) がコードされており [Bartels *et al.*, 2001; Cases and de Lorenzo, 2002; Nelson *et al.*, 2002], Pnd は NdpA とアミノ酸配列の保存性が高く (86% identity), Phu は HupB と高い保存性を示す (44% identity)。過去に行われた *P. putida* KT2440 株の pCAR1 保持・非保持株における経時的トランスクリプトーム解析から、これらの遺伝子の転写プロファイルは pCAR1 の有無で変化しないことが示唆されていた [Takahashi and Shintani *et al.*, submitted] (Fig. 補-10)。また上述の遺伝子の転写量は *pnd*, *phu* の各単独破壊株において変化しなかったことから [武田, 2011], Pnd, Phu は染色体由来ホモログの「バックアップ」ではなく、独自の機能を持つ可能性も考えられる。今後は Pnd, Phu についても Pmr と同様に染色体由来ホモログとの関係を調べていく必要があるだろう。

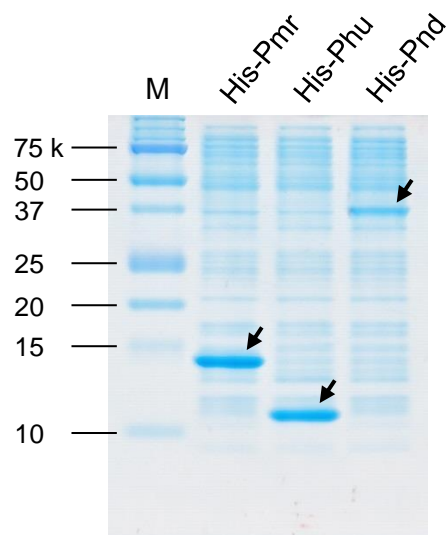


Fig. 補-1. His-Pmr, His-Pnd, His-Phuの大腸菌における発現の確認.

Mはマーカを表す. 菌体は25°Cで培養し, IPTGは終濃度0.1 mMとなるように添加した. 細胞抽出液由来のタンパク質を4 μ gずつTricine-SDS-PAGEに供した. 各レーンにおいて目的タンパク質のバンドを矢印で示した.

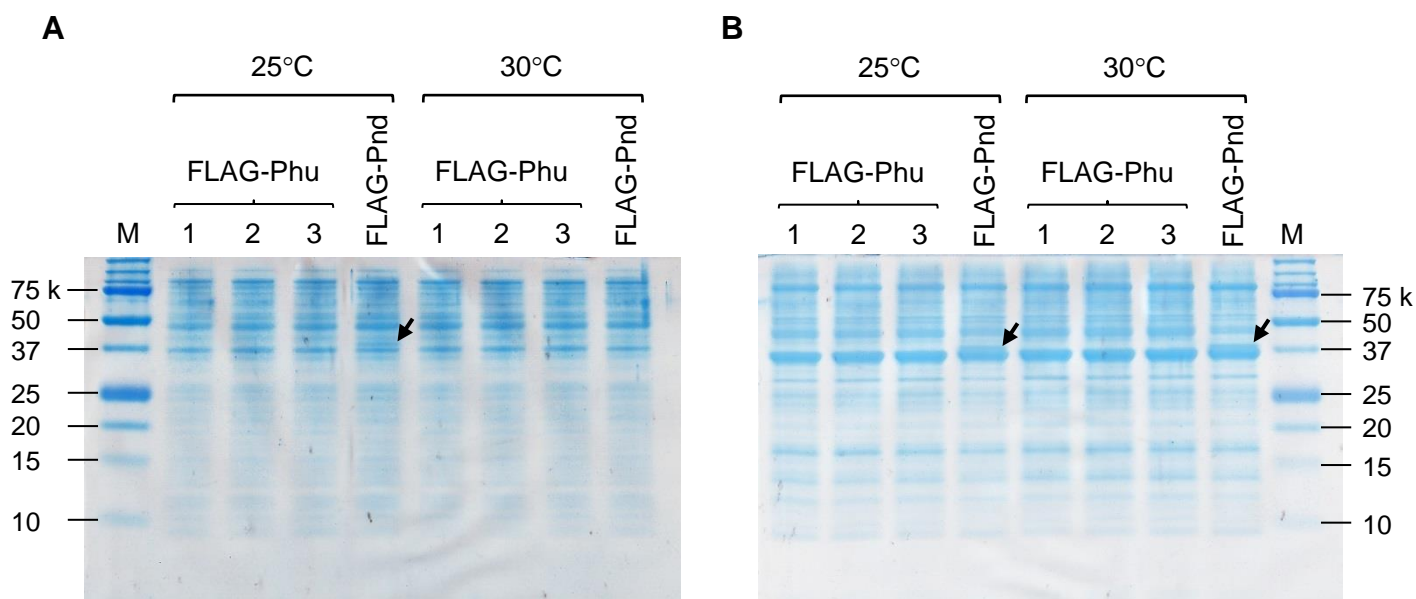


Fig. 補-2. FLAG-Pnd, FLAG-Phuの大腸菌における発現条件検討.

Mはマーカを表す, 各レーンの数値はFLAG-Phu発現用プラスミドを保持したクローンの番号を表す. IPTGは終濃度0.1 mMとなるように添加した. (A) 可溶性画分の結果. 細胞抽出液由来のタンパク質を2 μ gずつTricine-SDS-PAGEに供した. (B) 不溶性画分の結果. 細胞破碎後に残った沈殿物の一部を懸濁してTricine-SDS-PAGEに供した. 目的タンパク質の発現が確認できたレーンでは該当するバンドを矢印で示した.

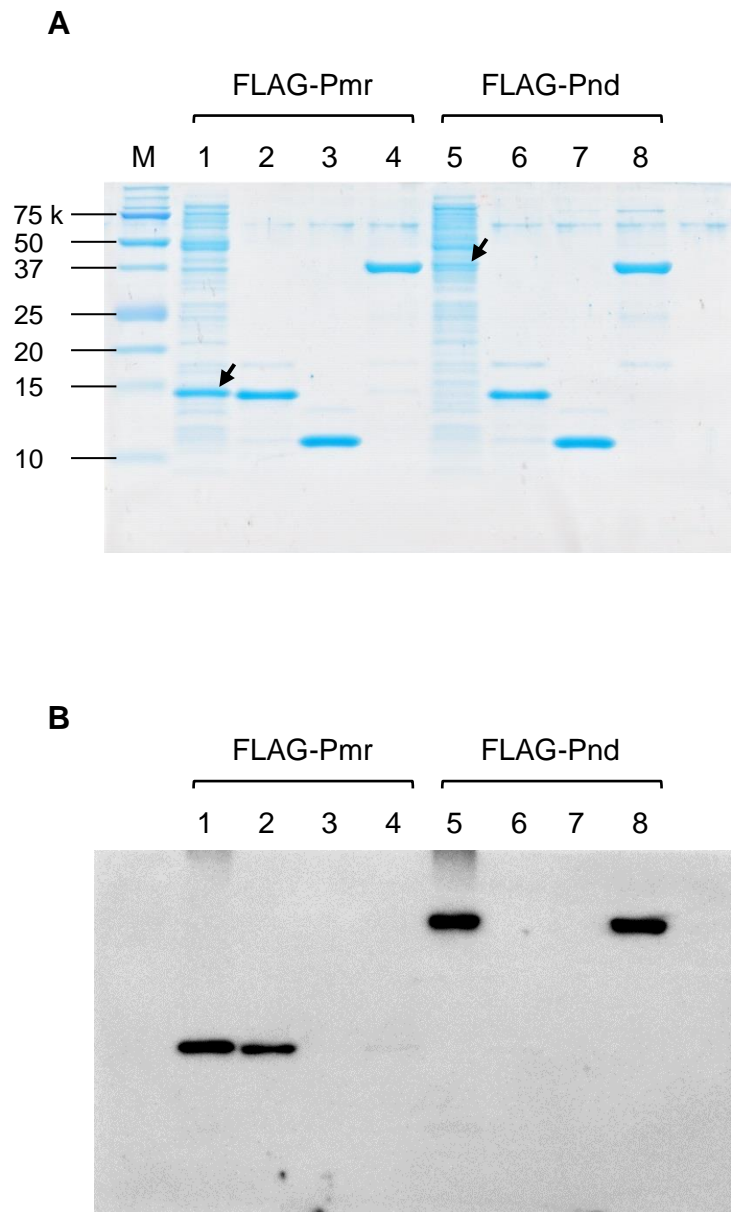


Fig. 補-3. プルダウンアッセイによるPmr, Pnd, Phu間の相互作用の検出.

His-tag融合タンパク質を含む細胞抽出液とFLAG-tag融合タンパク質を含む細胞抽出液を混合し、His-tagとニッケルのアフィニティーによって精製したサンプルを、(A) Tricine-SDS-PAGE, (B) 抗FLAG-tag抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した。Mはマーカ―を表す。“1”、“5”にはそれぞれFLAG-Pmr, FLAG-Pndを含む大腸菌細胞抽出液由来のタンパク質を4 μ gずつ供した。“2”、“3”、“4”にはそれぞれHis-Pmr, His-Phu, His-PndとFLAG-Pmrを用いたプルダウンアッセイ後のサンプルを2 μ gずつ供した。“6”、“7”、“8”にはそれぞれHis-Pmr, His-Phu, His-PndとFLAG-Pndを用いたプルダウンアッセイ後のサンプルを2 μ gずつ供した。パネルAではFLAG-Pmr (レーン1) 及びFLAG-Pnd (レーン5) のバンドを矢印で示した。

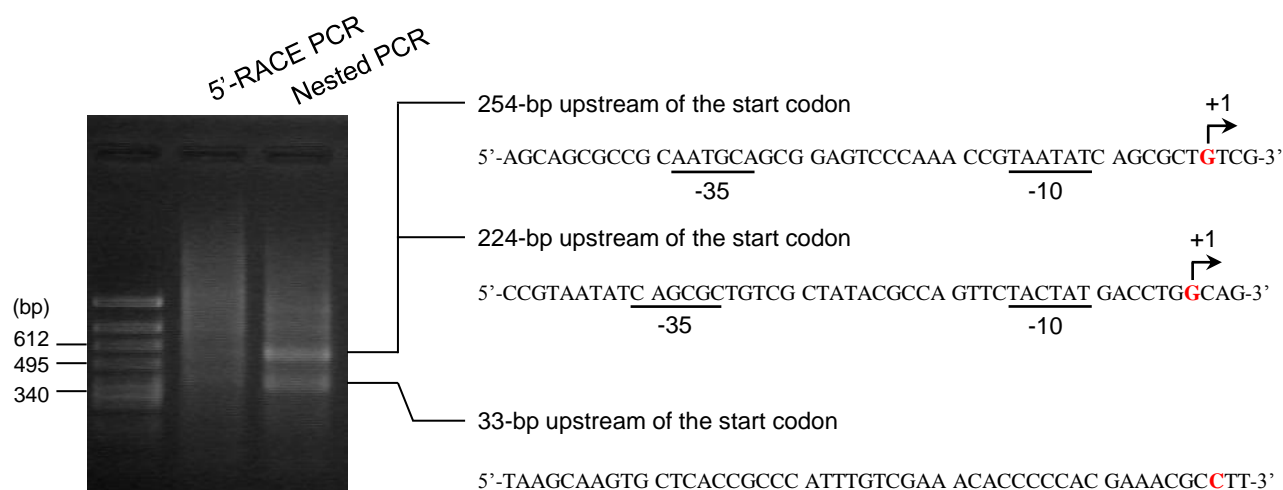


Fig. 補-4. *pnd*の5'-RACE解析.

5'-RACE PCRはcDNAを鋳型にpnd498プライマーを用いて行い, nested PCRは5'-RACE PCR産物を鋳型にpnd308プライマーを用いて行った. Nested PCR産物の5'末端の塩基を赤字で示した. 推定される転写開始点を矢印 (+1) で, 推定-35配列, -10配列を下線で示した.

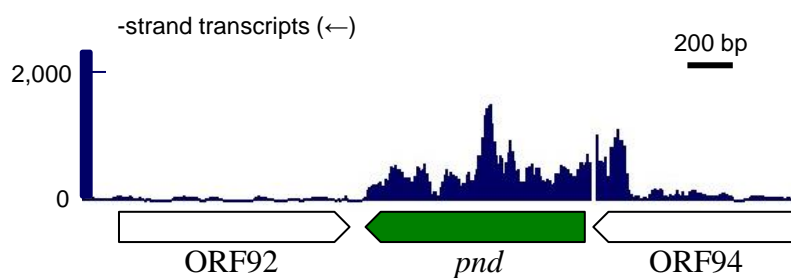


Fig. 補-5. *P. putida* KT2440(pCAR1)株のトランスクリプトーム解析における*pnd*の周辺領域.

青色で示したシグナル値は当該領域の転写量を反映している. 五角形で各遺伝子の位置と向きを表した.

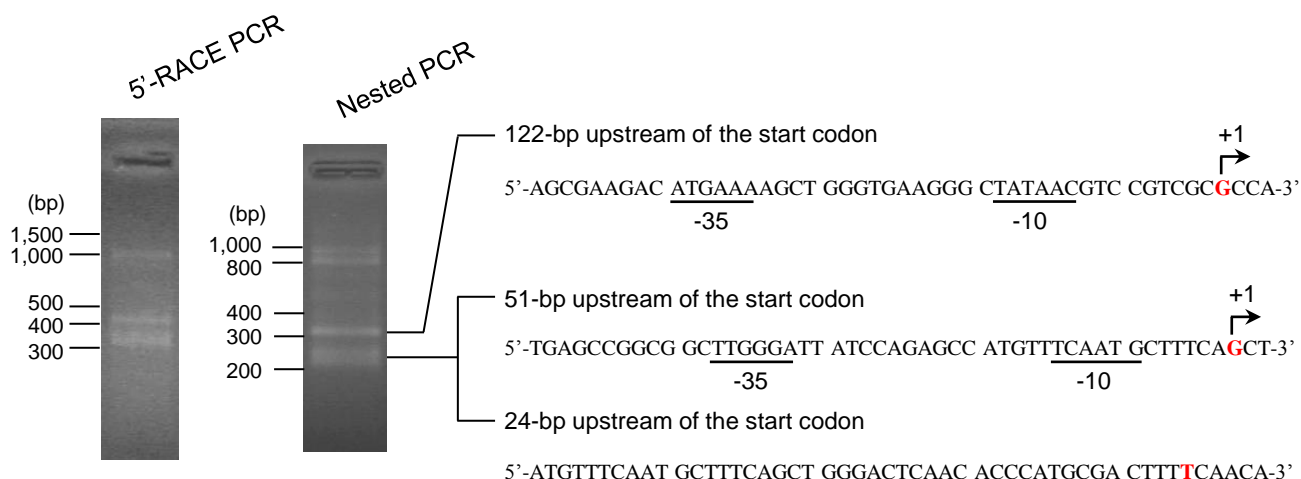


Fig. 補-6. *phu*の5'-RACE解析.

5'-RACE PCRはcDNAを鋳型にphu258プライマーを用いて行い, nested PCRは5'-RACE PCR産物を鋳型にphu157プライマーを用いて行った. Nested PCR産物の5'末端の塩基を赤字で示した. 推定される転写開始点を矢印 (+1) で, 推定-35配列, -10配列を下線で示した.

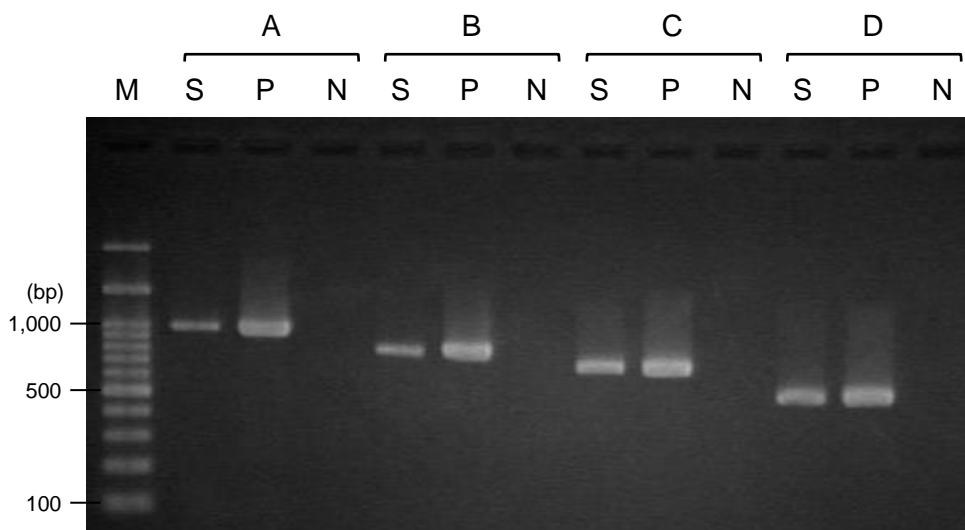


Fig. 補-7. *phu*の開始コドン上流745塩基及び448塩基からの転写産物の確認.

MIは100~1,000 bpまで100 bp毎にバンドが見られるマーカを表す. Sは*P. putida* KT2440(pCAR1)株由来のRNAから合成したcDNAを鋳型に, Pは同株由来のtotal DNAを鋳型に(ポジティブコントロール), Nは*P. putida* KT2440株由来のtotal DNAを鋳型に(ネガティブコントロール)行ったPCRの結果を表す. プライマーの組み合わせは, “A”, *phu*開始コドン上流745塩基から作製したプライマー (*phu_up745*, 以下同様) と*phu*遺伝子内部258塩基から作製したプライマー (*phu258*, 以下同様), “B”, *phu_up745*と*phu79*, “C”, *phu_up448*と*phu258*, “D”, *phu_up448*と*phu79*, を用いた.

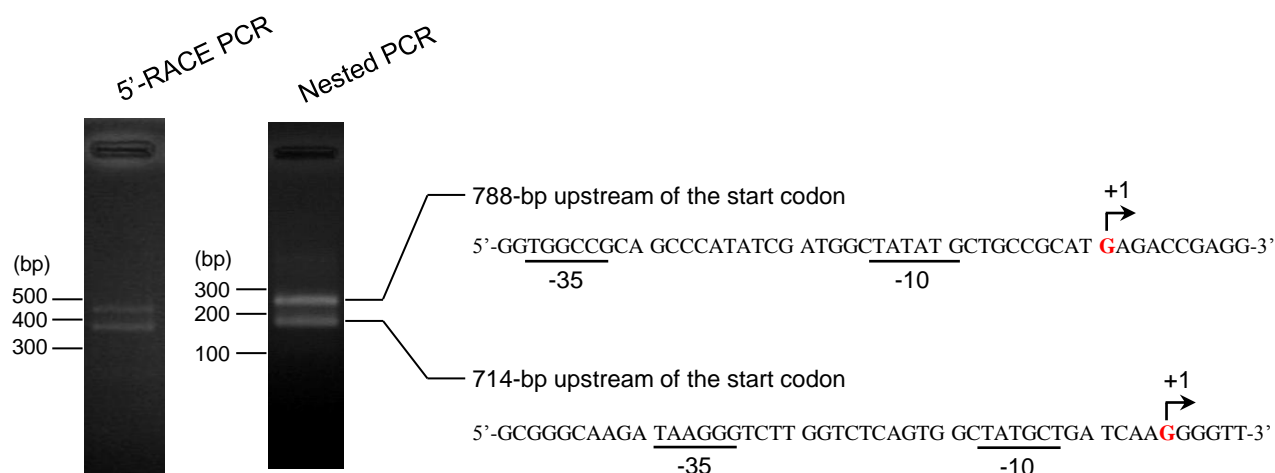


Fig. 補-8. *phu*上流の5'-RACE解析.

5'-RACE PCRはcDNAを鋳型にphu_up395プライマーを用いて行い, nested PCRは5'-RACE PCR産物を鋳型にphu_up564プライマーを用いて行った. Nested PCR産物の5'末端の塩基を赤字で示した. 推定される転写開始点を矢印 (+1) で, 推定-35配列, -10配列を下線で示した.

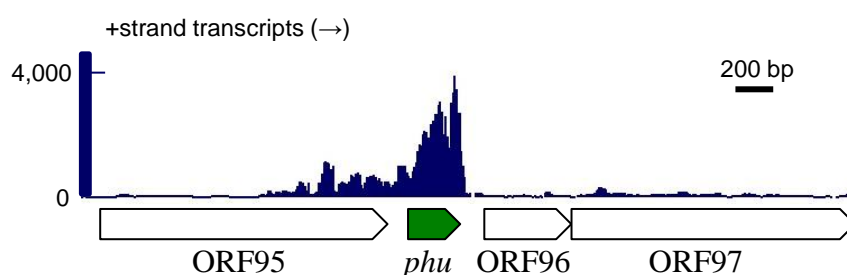


Fig. 補-9. *P. putida* KT2440(pCAR1)株のトランスクリプトーム解析における*phu*の周辺領域.

青色で示したシグナル値は当該領域の転写量を反映している. 五角形で各遺伝子の位置と向きを表した.

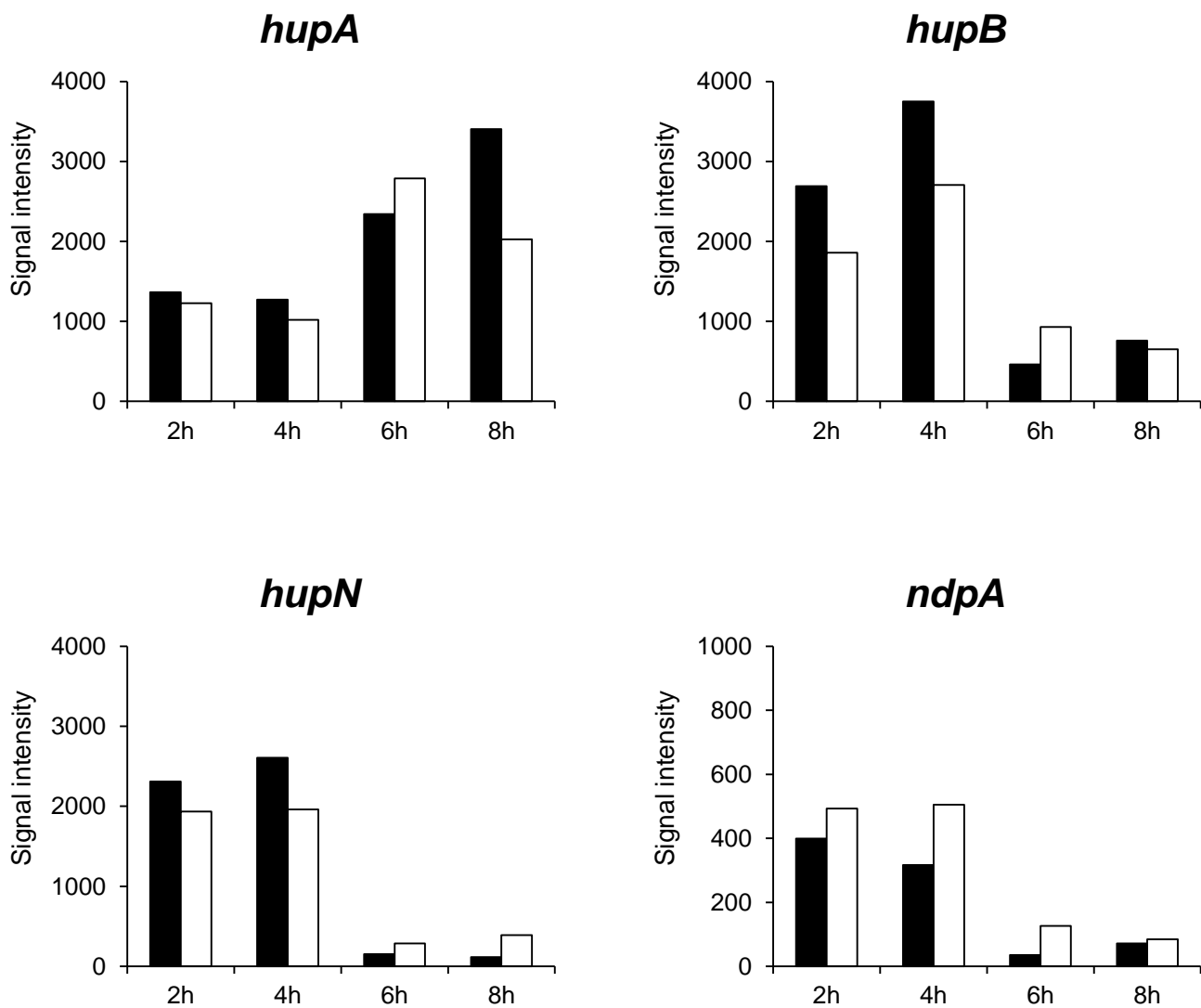


Fig. 補-10. *hupA*, *hupB*, *hupN*, *ndpA*の転写プロファイル.

P. putida KT2440株 (黒色) 及び *P. putida* KT2440(pCAR1)株 (白色) のトランスクリプトーム解析におけるシグナル値を示した。コハク酸を唯一の炭素源とする培地を使用し、対数増殖期 (2h, 4h) 及び定常期 (6h, 8h) にサンプリングを行った。[Takahashi and Shintani *et al.*, submitted]

参考文献

- Ali SS, Xia B, Liu J, Navarre WW. 2012. Silencing of foreign DNA in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**:175-181
- Arold ST, Leonard PG, Parkinson GN, Ladbury JE. 2010. H-NS forms a superhelical protein scaffold for DNA condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**:15728-15732
- Baños RC, Vivero A, Aznar S, García J, Pons M, Madrid C, Juárez A. 2009. Differential regulation of horizontally acquired and core genome genes by the bacterial modulator H-NS. *PLoS Genet.* **5**:e1000513
- Bartels F, Fernández S, Holtel A, Timmis KN, de Lorenzo V. 2001. The essential HupB and HupN proteins of *Pseudomonas putida* provide redundant and nonspecific DNA-bending functions. *J. Biol. Chem.* **276**:16641-16648
- Beloin C, Deighan P, Doyle M, Dorman CJ. 2003. *Shigella flexneri* 2a strain 2457T expresses three members of the H-NS-like protein family: characterization of the Sfh protein. *Mol. Genet. Genomics.* **270**:66-77
- Berger MF, Bulyk ML. 2009. Universal protein-binding microarrays for the comprehensive characterization of the DNA-binding specificities of transcription factors. *Nat. Protoc.* **4**:393-411
- Bloch V, Yang Y, Margeat E, Chavanieu A, Augè MT, Robert B, Arold S, Rimsky S, Kochoyan M. 2003. The H-NS dimerization domain defines a new fold contributing to DNA recognition. *Nat. Struct. Biol.* **10**:212-218
- Bouffartigues E, Buckle M, Badaut C, Travers A, Rimsky S. 2007. H-NS cooperative binding to high-affinity sites in a regulatory element results in transcriptional silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**:441-448
- Bowie JU, Lüthy R, Eisenberg D. 1991. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science.* **253**:164-170
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254
- Cases I, de Lorenzo V. 2002. The genomes of *Pseudomonas* encode a third HU protein. *Microbiology* **148**:1243-1245
- Castaing B, Zelwer C, Laval J, Boiteux S. 1995. HU protein of *Escherichia coli* binds specifically to DNA that contains single-strand breaks or gaps. *J. Biol. Chem.* **270**:10291-10296
- Castang S, McManus HR, Turner KH, Dove SL. 2008. H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**:18947-18952
- Castang S, Dove SL. 2010. High-order oligomerization is required for the function of the H-NS family member MvaT in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **78**:916-931
- Castang S, Dove SL. 2012. Basis for the essentiality of H-NS family members in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **194**:5101-5109
- Cerdan R, Bloch V, Yang Y, Bertin P, Dumas C, Rimsky S, Kochoyan M, Arold ST. 2003. Crystal structure of the N-terminal dimerisation domain of VicH, the H-NS-like protein of *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol.* **334**:179-185
- Claret L, Rouviere-Yaniv J. 1997. Variation in HU composition during growth of *Escherichia coli*: the heterodimer is required for long term survival. *J. Mol. Biol.* **273**:93-104
- Cordeiro TN, Schmidt H, Madrid C, Juárez A, Bernadó P, Griesinger C, García J, Pons M. 2011. Indirect DNA

readout by an H-NS related protein: structure of the DNA complex of the C-terminal domain of Ler. *PLoS Pathog.* **7**:e1002380

Dame RT, Wyman C, Goosen N. 2000. H-NS mediated compaction of DNA visualized by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.* **28**:3504-3510

Dame RT, Luijsterburg MS, Krin E, Bertin PN, Wagner R, Wuite GJL. 2005. DNA bridging: a property shared among H-NS-like proteins. *J. Bacteriol.* **187**:1845-1848

Deighan P, Beloin C, Dorman CJ. 2003. Three-way interactions among the Sfh, StpA and H-NS nucleoid-structuring proteins of *Shigella flexneri* 2a strain 2457T. *Mol. Microbiol.* **48**:1401-1416

Diggle SP, Winzer K, Lazdunski A, Williams P, Cámara M. 2002. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J. Bacteriol.* **184**:2576-2586

Dillon SC, Dorman CJ. 2010. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:185-195

Dillon SC, Cameron AD, Hokamp K, Lucchini S, Hinton JC, Dorman CJ. 2010. Genome-wide analysis of the H-NS and Sfh regulatory networks in *Salmonella* Typhimurium identifies a plasmid-encoded transcription silencing mechanism. *Mol. Microbiol.* **76**:1250-1265

Domínguez-Cuevas P, Marqués S. 2004. Compiling sigma-70-dependent promoters. *Pseudomonas* vol.2. Ramos, J. L. (eds). New York, USA: Kluwer Academic / Plenum Publishers, pp. 319-343

Dorman CJ. 2004. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:391-400

Dorman CJ, Kane KA. 2009. DNA bridging and antibridging: a role for bacterial nucleoid-associated proteins in regulating the expression of laterally acquired genes. *FEMS Microbiol. Rev.*, **33**:587-592

Doyle M, Fookes M, Ivens A, Mangan MW, Wain J, Dorman CJ. 2007. An H-NS-like stealth protein aids horizontal DNA transmission in bacteria. *Science* **315**:251-252

Esposito D, Petrovic A, Harris R, Ono S, Eccleston JE, Mbabaali A, Haq I, Higgins CF, Hinton JCD, Driscoll PC, Ladbury JE. 2002. H-NS oligomerization domain structure reveals the mechanism for high order self-association of the intact protein. *J. Mol. Biol.* **324**:841-850

Eswar N, Marti-Renom MA, Webb B, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen M, Pieper U, Sali A. 2006. Comparative protein structure modeling with MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, Inc., Supplement 15, 5.6.1-5.6.30

Falconi M, Gualtieri MT, La Teana A, Losso MA, Pon CL. 1988. Proteins from the prokaryotic nucleoid: primary and quaternary structure of the 15-kD *Escherichia coli* DNA binding protein H-NS. *Mol. Microbiol.* **2**:323-329

Fang FC, Rimsky S. 2008. New insights into transcriptional regulation by H-NS. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**:113-120

Fernández-de-Alba C, Berrow NS, Garcia-Castellanos R, García J, Pons M. 2013. On the origin of the selectivity of plasmidic H-NS towards horizontally acquired DNA: linking H-NS oligomerization and cooperative DNA binding. *J. Mol. Biol.* **425**:2347-2358

Forns N, Baños RC, Balsalobre C, Juárez A, Madrid C. 2005. Temperature-dependent conjugative transfer of

- R27: role of chromosome- and plasmid-encoded Hha and H-NS proteins. *J. Bacteriol.* **187**:3950-3959
- Free A, Dorman CJ.** 1997. The *Escherichia coli* *stpA* gene is transiently expressed during growth in rich medium and is induced in minimal medium and by stress conditions. *J. Bacteriol.* **179**:909-918
- Gordon BR, Imperial R, Wang L, Navarre WW, Liu J.** 2008. Lsr2 of *Mycobacterium* represents a novel class of H-NS-like proteins. *J. Bacteriol.* **190**:7052-7059
- Gordon BR, Li Y, Wang L, Sintsova A, van Bakel H, Tian S, Navarre WW, Xia B, Liu J.** 2010. Lsr2 is a nucleoid-associated protein that targets AT-rich sequences and virulence genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**:5154-5159
- Gordon BR, Li Y, Cote A, Weirauch MT, Ding P, Hughes TR, Navarre WW, Xia B, Liu J.** 2011. Structural basis for recognition of AT-rich DNA by unrelated xenogeneic silencing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**:10690-10695
- Grainger DC, Hurd D, Goldberg MD, Busby SJ.** 2006. Association of nucleoid proteins with coding and non-coding segments of the *Escherichia coli* genome. *Nucleic Acids Res.* **34**:4642-4652
- Grove A.** 2011. Functional evolution of bacterial histone-like HU proteins. *Curr. Issues Mol. Biol.* **13**:1-12
- Hinton JC, Santos DS, Seirafi A, Hulton CS, Pavitt GD, Higgins CF.** 1992. Expression and mutational analysis of the nucleoid-associated protein H-NS of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **6**:2327-2337
- Hulton CS, Seirafi A, Hinton JC, Sidebotham JM, Waddell L, Pavitt GD, Owen-Hughes T, Spassky A, Buc H, Higgins CF.** 1990. Histone-like protein H1 (H-NS), DNA supercoiling, and gene expression in bacteria. *Cell* **63**:631-642
- Johansson J, Eriksson S, SONDÉN B, Wai SN, Uhlin BE.** 2001. Heteromeric interactions among nucleoid-associated bacterial proteins: localization of StpA-stabilizing regions in H-NS of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:2343-2347
- Kahramanoglou C, Seshasayee AS, Prieto AI, Ibberson D, Schmidt S, Zimmermann J, Benes V, Fraser GM, Luscombe NM.** 2011. Direct and indirect effects of H-NS and Fis on global gene expression control in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **39**:2073-2091
- Krivov GG, Shapovalov MV, Dunbrack RL Jr.** 2009. Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4. *Proteins.* **77**:778-795
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685
- Lang B, Blot N, Bouffartigues E, Buckle M, Geertz M, Gualerzi CO, Mavathur R, Muskhelishvili G, Pon CL, Rimsky S, Stella S, Babu MM, Travers A.** 2007. High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **35**:6330-6337
- Leonard PG, Ono S, Gor J, Perkins SJ, Ladbury JE.** 2009. Investigation of the self-association and hetero-association interactions of H-NS and StpA from Enterobacteria. *Mol. Microbiol.* **73**:165-179
- Li C, Wally H, Miller SJ, Lu CD.** 2009. The multifaceted proteins MvaT and MvaU, members of the H-NS family, control arginine metabolism, pyocyanin synthesis, and prophage activation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **191**:6211-6218

- Lim CJ, Whang YR, Kenney LJ, Yan J.** 2012. Gene silencing H-NS paralogue StpA forms a rigid protein filament along DNA that blocks DNA accessibility. *Nucleic Acids Res.* **40**:3316-3328
- Liu Y, Chen H, Kenney LJ, Yan J.** 2010. A divalent switch drives H-NS/DNA-binding conformations between stiffening and bridging modes. *Genes Dev.* **24**:339-344
- Lobley A, Sadowski MI, Jones DT.** 2009. pGenTHREADER and pDomTHREADER: new methods for improved protein fold recognition and superfamily discrimination. *Bioinformatics.* **25**:1761-1767
- Lucchini S, Rowley G, Goldberg MD, Hurd D, Harrison M, Hinton JC.** 2006. H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathog.* **2**: e81
- Lucchini S, McDermott P, Thompson A, Hinton JC.** 2009. The H-NS-like protein StpA represses the RpoS (sigma 38) regulon during exponential growth of *Salmonella* Typhimurium. *Mol. Microbiol.* **74**:1169-1186
- Luijsterburg MS, Noom MC, Wuite GJ, Dame RT.** 2006. The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective. *J. Struct. Biol.* **156**:262-272
- Luijsterburg MS, White MF, van Driel R, Dame RT.** 2008. The major architects of chromatin: architectural proteins in bacteria, archaea and eukaryotes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **43**:393-418
- Lüthy R, Bowie JU, Eisenberg D.** 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* **356**:83-85
- Maeda K, Nojiri H, Shintani M, Yoshida T, Habe H, Omori T.** 2003. Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *J. Mol. Biol.* **326**:21-33
- Maurer S, Fritz J, Muskhelishvili G.** 2009. A systematic *in vitro* study of nucleoprotein complexes formed by bacterial nucleoid-associated proteins revealing novel types of DNA organization. *J. Mol. Biol.* **387**:1261-1276
- Mellies JL, Barron AM, Carmona AM.** 2007. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infect. Immun.* **75**:4199-4210
- Moss T, LeBlanc B.** 2009. DNA-Protein Interactions: Principles and Protocols, Third Edition. Humana Press, NY. pp.139-150
- Müller CM, Schneider G, Dobrindt U, Emödy L, Hacker J, Uhlin BE.** 2010. Differential effects and interactions of endogenous and horizontally acquired H-NS-like proteins in pathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **75**:280-293
- Murphy LD, Rosner JL, Zimmerman SB, Esposito D.** 1999. Identification of two new proteins in spermidine nucleoids isolated from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:3842-3844
- Navarre WW, Porwollik S, Wang Y, McClelland M, Rosen H, Libby SJ, Fang FC.** 2006. Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**:236-238
- Navarre WW.** 2010. H-NS as a defence system. In: Dame RT, Dorman CJ (eds) Bacterial chromatin. Springer, Berlin, pp. 251-322
- Nelson KE, Weinl C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos VA, Fouts DE, Gill SR, Pop M, Holmes M, Brinkac L, Beanan M, DeBoy RT, Daugherty S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, White O,**

- Peterson J, Khouri H, Hance I, Chris Lee P, Holtzapple E, Scanlan D, Tran K, Moazzez A, Utterback T, Rizzo M, Lee K, Kosack D, Moestl D, Wedler H, Lauber J, Stjepandic D, Hoheisel J, Straetz M, Heim S, Kiewitz C, Eisen JA, Timmis KN, Dusterhöft A, Tümmeler B, Fraser CM. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**:799-808
- Nojiri H, Sekiguchi H, Maeda K, Urata M, Nakai S, Yoshida T, Habe H, Omori T. 2001. Genetic characterization and evolutionary implications of a *car* gene cluster in the carbazole degrader *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* **183**:3663-3679
- Oshima T, Ishikawa S, Kurokawa K, Aiba H, Ogasawara N. 2006. *Escherichia coli* histone-like protein H-NS preferentially binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase. *DNA Res.* **13**:141-153
- Ouchiya N, Zhang Y, Omori T, Kodama T. 1993. Biodegradation of carbazole by *Pseudomonas* spp. CA06 and CA10. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**:455-460
- Pinson V, Takahashi M, Rouviere-Yaniv J. 1999. Differential binding of the *Escherichia coli* HU, homodimeric forms and heterodimeric form to linear, gapped and cruciform DNA. *J. Mol. Biol.* **287**:485-497
- Ramos JL, Marqués S, Timmis KN. 1997. Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**:341-373
- Renault M, García J, Cordeiro TN, Baldus M, Pons M. 2013. Protein oligomers studied by solid-state NMR--the case of the full-length nucleoid-associated protein histone-like nucleoid structuring protein. *FEBS J.* **280**:2916-2928
- Rescalli E, Saini S, Bartocci C, Rychlewski L, De Lorenzo V, Bertoni G. 2004. Novel physiological modulation of the *Pu* promoter of TOL plasmid: negative regulatory role of the TurA protein of *Pseudomonas putida* in the response to suboptimal growth temperatures. *J. Biol. Chem.* **279**:7777-7784
- Rimsky, S. 2004. Structure of the histone-like protein H-NS and its role in regulation and genome superstructure. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:109-114.
- Rosenthal RS, Rodwell VW. 1998. Purification and characterization of the heteromeric transcriptional activator MvaT of the *Pseudomonas mevalonii* *mvaAB* operon. *Protein Sci.* **7**:178-184
- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring harbour, NY
- Schägger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**:368-379
- Schägger H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **1**:16-22
- Sette M, Spurio R, Trotta E, Brandizi C, Brandi A, Pon CL, Barbato G, Boelens R, Gualerzi CO. 2009. Sequence-specific recognition of DNA by the C-terminal domain of nucleoid-associated protein H-NS. *J. Biol. Chem.* **284**:30453-30462
- Shi X, Bennett GN. 1994. Plasmids bearing *hfq* and the *hns*-like gene *stpA* complement *hns* mutants in modulating arginine decarboxylase gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**:6769-6775
- Shi J, Blundell TL, Mizuguchi K. 2001. FUGUE: sequence-structure homology recognition using

- environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties. *J. Mol. Biol.* **310**:243-257
- Shimada T, Fujita N, Maeda M, Ishihama A.** 2005. Systematic search for the Cra-binding promoters using genomic SELEX system. *Genes Cells.* **10**:907-918
- Shindo H, Iwaki T, Ieda R, Kurumizaka H, Ueguchi C, Mizuno T, Morikawa S, Nakamura H, Kuboniwa H.** 1995. Solution structure of the DNA binding domain of a nucleoid-associated protein, H-NS, from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **360**:125-131
- Shindo H, Ohnuki A, Ginba H, Katoh E, Ueguchi C, Mizuno T, Yamazaki T.** 1999. Identification of the DNA binding surface of H-NS protein from *Escherichia coli* by heteronuclear NMR spectroscopy. *FEBS Lett.* **455**:63-69
- Shintani M, Habe H, Tsuda M, Omori T, Yamane H, Nojiri H.** 2005. Recipient range of IncP-7 conjugative plasmid pCAR2 from *Pseudomonas putida* HS01 is broader than from other *Pseudomonas* strains. *Biotechnol. Lett.* **27**:1847-1853
- Shintani M, Yano H, Habe H, Omori T, Yamane H, Tsuda M, Nojiri H.** 2006. Characterization of the replication, maintenance, and transfer features of the IncP-7 plasmid pCAR1, which carries genes involved in carbazole and dioxin degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3206-3216
- Shintani M, Takahashi Y, Tokumaru H, Kadota K, Hara H, Miyakoshi M, Naito K, Yamane H, Nishida H, Nojiri H.** 2010. Response of the *Pseudomonas* host chromosomal transcriptome to carriage of the IncP-7 plasmid pCAR1. *Environ. Microbiol.* **12**:1413-1426
- Shintani M, Tokumaru H, Takahashi Y, Miyakoshi M, Yamane H, Nishida H, Nojiri H.** 2011. Alterations of RNA maps of IncP-7 plasmid pCAR1 in various *Pseudomonas* bacteria. *Plasmid* **66**:85-92
- Smyth CP, Lundbäck T, Renzoni D, Siligardi G, Beavi R, Layton M, Sidebotham JM, Hinton JC, Driscoll PC, Higgins CF, Ladbury JE.** 2000. Oligomerization of the chromatin-structuring protein H-NS. *Mol. Microbiol.* **36**:962-972
- Sonden B, Uhlin BE.** 1996. Coordinated and differential expression of histone-like proteins in *Escherichia coli*: regulation and function of the H-NS analog StpA. *EMBO J.* **15**:4970-4980
- Štros M.** 2010. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1799**:101-113
- Takahashi Y, Shintani M, Yamane H, Nojiri H.** 2009a. The complete nucleotide sequence of pCAR2: pCAR2 and pCAR1 were structurally identical IncP-7 carbazole degradative plasmids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**:744-746
- Takahashi Y, Shintani M, Li L, Yamane H, Nojiri H.** 2009b. Carbazole-degradative IncP-7 plasmid pCAR1.2 is structurally unstable in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, which accumulates catechol, the intermediate of the carbazole degradation pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:3920-3929
- Takeda T, Yun CS, Shintani M, Yamane H, Nojiri H.** 2011. Distribution of genes encoding nucleoid-associated protein homologs in plasmids. *Int. J. Evol. Biol.* **2011**:685015
- Tendeng C, Bertin PN.** 2003. H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins. *Trends Microbiol.* **11**:511-518
- Tendeng C, Soutourina OA, Danchin A, Bertin PN.** 2003. MvaT proteins in *Pseudomonas* spp.: a novel class of H-NS-like proteins. *Microbiology* **149**:3047-3050

- Teramoto J, Yoshimura SH, Takeyasu K, Ishihama A.** 2010. A novel nucleoid protein of *Escherichia coli* induced under anaerobic growth conditions. *Nucleic Acids Res.* **38**:3605-3618
- Ueguchi C, Suzuki T, Yoshida T, Tanaka K, Mizuno T.** 1996. Systematic mutational analysis revealing the functional domain organization of *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J. Mol. Biol.* **263**:149-162
- Ueguchi C, Seto C, Suzuki T, Mizuno T.** 1997. Clarification of the dimerization domain and its functional significance for the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J. Mol. Biol.* **274**:145-151
- Uyar E, Kurokawa K, Yoshimura M, Ishikawa S, Ogasawara N, Oshima T.** 2009. Differential binding profiles of StpA in wild-type and *hns* mutant cells: a comparative analysis of cooperative partners by chromatin immunoprecipitation-microarray analysis. *J. Bacteriol.* **191**:2388-2391
- Vallet I, Diggle SP, Stacey RE, Cámara M, Ventre I, Lory S, Lazdunski A, Williams P, Filloux A.** 2004. Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial *cup* gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. *J. Bacteriol.* **186**:2880-2890
- Vallet-Gely I, Donovan KE, Fang R, Joung JK, Dove SL.** 2005. Repression of phase-variable *cup* gene expression by H-NS-like proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**:11082-11087
- Valls M, Cases I, de Lorenzo V.** 2004. Transcription mediated by *rpoN*-dependent promoters. *Pseudomonas* vol.2. Ramos, J. L. (eds). New York, USA: Kluwer Academic / Plenum Publishers, pp. 289-317
- Westfall LW, Carty NL, Layland N, Kuan P, Colmer-Hamood JA, Hamood AN.** 2006. *mvaT* mutation modifies the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux operon *mexEF-oprN*. *FEMS Microbiol. Lett.* **255**:247-254
- Yanagisawa S, Schmidt RJ.** 1999. Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant J.* **17**:209-214
- Yun CS, Suzuki C, Naito K, Takeda T, Takahashi Y, Sai F, Terabayashi T, Miyakoshi M, Shintani M, Nishida H, Yamane H, Nojiri H.** 2010. Pmr, a histone-like protein H1 (H-NS) family protein encoded by the IncP-7 plasmid pCAR1, is a key global regulator that alters host function. *J. Bacteriol.* **192**:4720-4731
- Yuste L, Hervás AB, Canosa I, Tobes R, Jiménez JI, Nogales J, Pérez-Pérez MM, Santero E, Díaz E, Ramos JL, de Lorenzo V, Rojo F.** 2006. Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray. *Environ. Microbiol.* **8**:165-177
- Zhang A, Rimsky S, Reaban ME, Buc H, Belfort M.** 1996. *Escherichia coli* protein analogs StpA and H-NS: regulatory loops, similar and disparate effects on nucleic acid dynamics. *EMBO J.* **15**:1340-1349
- 高橋裕里香, 2012, 東京大学博士論文
- 武田俊春, 2011, 東京大学博士論文
- 寺林継乃, 2007, 東京大学修士論文
- 松井一泰, 2014, 東京大学博士論文

謝辞

本研究を行うにあたり、素晴らしい研究環境とテーマを与えてくださると共に、公私共に親身なご指導と温かい励ましを頂きました東京大学生物生産工学研究センター環境保全工学部門教授 野尻秀昭先生に心より感謝致します。また、本研究を進める上で様々なご配慮と励ましを頂きました同センター准教授 岡田憲典先生に深く感謝致します。また、卒業研究から博士課程一年目まで指導教員として直接ご指導いただき、異動後も折に触れて温かい励ましを頂きました現・帝京大学教授 山根久和先生に心より感謝致します。

タンパク質間クロスリンク法, SELEX 法についてご助言を頂きました生物生産工学研究センター植物機能工学部門准教授 柳澤修一先生, タンパク質のモデリングを親身になってご指導くださいました農学生命科学研究科アグリバイオインフォマティクス教育研究ユニット特任准教授 寺田透先生, 原子間力顕微鏡を快く貸してくださいました現・東京薬科大学教授 渡邊一哉先生に深く感謝致します。ゲノムライブラリーの作製にあたり DNA 断片化装置を快く貸してください, 親身になってご指導くださいました東京農業大学応用生物科学部バイオサイエンス学科教授 吉川博文先生, 同大学生物資源ゲノム解析センター 松本貴嗣博士に心より感謝致します。また表面プラズモン共鳴法について親身になってご指導くださいました農学生命科学研究科応用生命化学専攻教授 田之倉優先生, 技術面において数々のきめ細やかなご指導を頂きました現・英国オックスフォード大学博士研究員 堀田彰一朗博士, GE ヘルスケア・ジャパン株式会社ライフサイエンス統括本部の皆様心より感謝致します。またタンパク質の結晶化装置を快く貸してください, 結晶化の技術を親身になってご指導くださいました農業生物資源研究所主任研究員 藤本瑞博士に深く感謝致します。

卒業研究で実験を始めた時からご助言を頂き、温かく見守ってくださいました環境保全工学研究室卒業生 梅田隆志博士に深く感謝致します。また本研究の共同研究者であり様々なご助言やご協力、温かい励ましを頂きました、現・静岡大学准教授 新谷政己先生、現・理化学研究所博士研究員 尹忠銖博士、現・帝京大学博士研究員 宮本皓司博士、環境保全工学研究室卒業生 武田俊春博士、同研究室 高橋裕里香博士、松井一泰氏、廣谷龍輔氏、川妻孝平氏に心より感謝致します。また日々の生活の中で多くの元気や励ましを頂き、苦しい時でも前に進む力を与えてくださった同研究室の皆様、卒業生の皆様に心より感謝致します。

最後に、本研究を進めるにあたり常に温かく見守ってくださった祖母をはじめとする家族、温かい励ましを頂いた友人たちに感謝の意を表し、本論文の結びとさせていただきます。

2014 年 3 月