



Title	生体内ポリリン酸の遺伝子転写制御に関する研究
Author(s)	堤, 香織
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第5502号
Issue Date	2001-03-23
DOI	https://doi.org/10.11501/3182333
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51500
Type	doctoral thesis
File Information	000000399915.pdf



生体内ポリリン酸の遺伝子転写制御に関する研究

堤 香織

北海道大学

2001年

第1章 序論

1-1-1 研究の背景

学位論文題名
「生体内ポリリン酸の遺伝子転写制御に関する研究」

1-1-2 生体内におけるポリリン酸の存在

1-1-3 ポリリン酸の機能

1-1-4 *mpk5* 遺伝子について

1-1-5 ROS について

2 本論文の研究目的

3 参考文献

第2章 *mpk5* 遺伝子転写におけるポリリン酸の影響

2-1 概要

2-2 実験方法

2-2-1 飼育した菌株及びプラスミド

2-2-2 使用した菌株及び培養

2-2-3 過酸化水素感受性試験

2-2-4 *β*-galactosidase 活性

2-2-5 Star 北海道大学大学院工学研究科 分子化学専攻
生物機能化学講座 生体高分子化学分野

2-2-6 *mpk5* 遺伝子転写の測定

2-2-7 *mpk5* 遺伝子転写の抑制

2-2-8 結果

2-3 結果及び考察

2-3-1 過酸化水素感受性

2-3-2 *mpk5* 遺伝子転写抑制への影響

堤 香織

目次

第1章 序論	1
1-1 ポリリン酸について	1
1-1-1 はじめに	1
1-1-2 生体内におけるポリリン酸の局在	2
1-1-3 ポリリン酸の機能	2
1-2 ストレス応答性遺伝子について	7
1-2-1 <i>rpoS</i> 遺伝子について	7
1-2-2 SOS 応答について	8
1-3 本論文の研究目的	9
1-4 参考文献	11
第2章 <i>rpoS</i> 遺伝子転写におけるポリリン酸の影響	14
2-1 緒言	14
2-2 実験方法	15
2-2-1 使用した菌株及びプラスミド	15
2-2-2 使用した培地及び試薬	15
2-2-3 過酸化水素感受性試験	16
2-2-4 β -galactosidase assay 法	16
2-2-5 Starvation の条件	17
2-2-6 exopoly(P)ase 活性測定法	17
2-2-7 その他の操作方法について	18
2-2-8 装置	18
2-3 結果及び考察	18
2-3-1 過酸化水素感受性	18
2-3-2 <i>katE</i> 遺伝子発現量への影響	19

2-3-3	ポリリン酸分解酵素高発現株における RpoS タンパク含量	19
2-3-4	<i>rpoS</i> 遺伝子発現量への影響	20
2-3-5	<i>rpoS</i> 遺伝子を過剰発現させた際の <i>katE</i> 遺伝子発現量への影響	20
2-3-6	Growth による <i>rpoS</i> 遺伝子転写量の変化	20
2-3-7	RpoS 依存性遺伝子の転写への影響	21
2-3-8	ポリリン酸分解酵素高発現系の菌体への影響	21
2-4	結言	34
2-5	参考文献	36
第3章	SOS 遺伝子群の発現におけるポリリン酸の影響	39
3-1	緒言	39
3-2	実験方法	40
3-2-1	使用した菌株及びプラスミド	40
3-2-2	使用した培地及び試薬	40
3-2-3	MMC 感受性及び UV 感受性試験法	40
3-2-4	<i>recA</i> mRNA 量の定量法	41
3-2-5	菌体内 ポリリン酸の定量法	41
3-2-6	その他の操作方法について	42
3-2-7	装置	42
3-3	結果及び考察	42
3-3-1	MMC 及び UV 感受性試験	42
3-3-2	<i>recA</i> 遺伝子転写に及ぼすポリリン酸の影響	43
3-3-3	<i>umuDC</i> 遺伝子の転写に及ぼすポリリン酸の影響	44
3-3-4	RecA 活性化に及ぼすポリリン酸の影響	45
3-3-5	<i>lexA</i> 欠損株における <i>umuDC</i> 転写誘導効率への影響	45
3-3-6	PPK 発現による <i>recA</i> 遺伝子転写誘導効率への影響	46
3-3-7	ポリリン酸による大腸菌遺伝子転写制御の特異性についての検討	46

3-4 結言	62
3-5 参考文献	64
第4章 ポリリン酸と RNA polymerase の相互作用とポリリン酸による RNA polymerase の安定効果	66
4-1 緒言	66
4-2 実験方法	67
4-2-1 使用した菌株及びプラスミド	67
4-2-2 使用した培地及び試薬	67
4-2-3 タンパク安定効果試験	67
4-2-4 鎖長約 65 のポリリン酸の調製法について	67
4-2-5 exopoly(P)ase 反応について	68
4-2-6 Gel-shift assay 法について	68
4-2-7 Native-PAGE 法について	68
4-2-8 菌体内 ポリリン酸の定量法	69
4-2-9 その他の操作方法について	69
4-3 結果と考察	69
4-3-1 <i>in vitro</i> におけるポリリン酸と RNA polymerase の相互作用	69
4-3-2 ポリリン酸による RNA polymerase の安定効果	70
4-3-3 <i>in vivo</i> におけるポリリン酸と RNA polymerase の相互作用の確認	71
4-4 結言	80
4-5 参考文献	82
第5章 総括	84

第1章 序論

1-1 ポリリン酸について

1-1-1 はじめに

ポリリン酸 (inorganic polyphosphate [poly(P)]) はリン酸 (Pi) が数個から数千個直鎖状に高エネルギーリン酸結合した化合物である。自然界においては、バクテリアなどの原核生物から酵母のような真核生物、更にはほ乳類に至る様々な生物でその存在が確認されている (Kornberg 1995; Kornberg 1999; Kulaev 1979; Kulaev and Vagabov 1983; Wood and Clark 1988)。

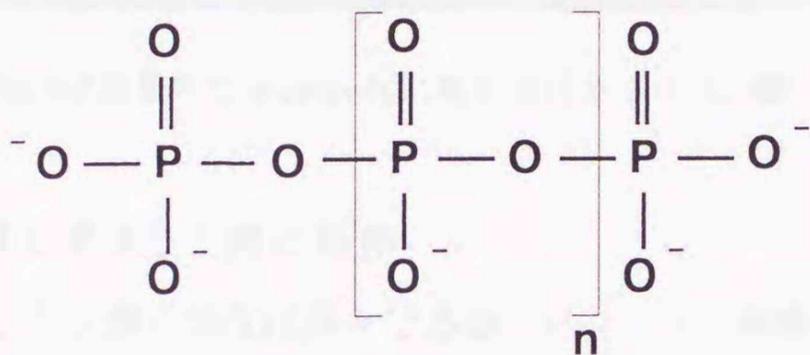


Fig. 1-1 ポリリン酸の構造

歴史的には、ポリリン酸は19世紀初頭に青色の塩基性色素にピンク色に染まる微少な粒子として観察され、「volutin」と呼ばれていた (Meyer 1904)。ポリリン酸が核酸内に多く存在し、また、負電荷を帯びていることからしばらくの間は核酸と間違えられることが多かったが、電子顕微鏡の精度の向上によりこの粒子が高い屈折率を有する物質であり、また、電子銃照射下で消失するものであることが分かり「ポリリン酸」として同定された。これを契機に、その後多くのバクテリアでポリリン酸の存在が確認されるようになった。1940年代に入ってから生化学的にも着目され、「酸化的リン酸化の際、どのようにPiはADPと無水結合するのか」という問題と関連づけられて議論されるようになった。更に、1990年代の大腸菌ポリリン酸リン酸化酵素 (polyphosphate kinase; PPK) (Ahn and Kornberg 1990; Akiyama et al. 1992) ポリリン酸分解酵素 (exopolyphosphatase; PPX) (Akiyama et al. 1993) の発見に伴い、ポリリン酸の生理的な機能が着目を浴びるようになった。近年では、ポリリン酸が広く様々な生物に存在し、その生物内で様々な生物学的な役割を果たしていること

が徐々に明らかになり、ポリリン酸が生物において非常に重要な役割を担っていることが分かりはじめてきた。

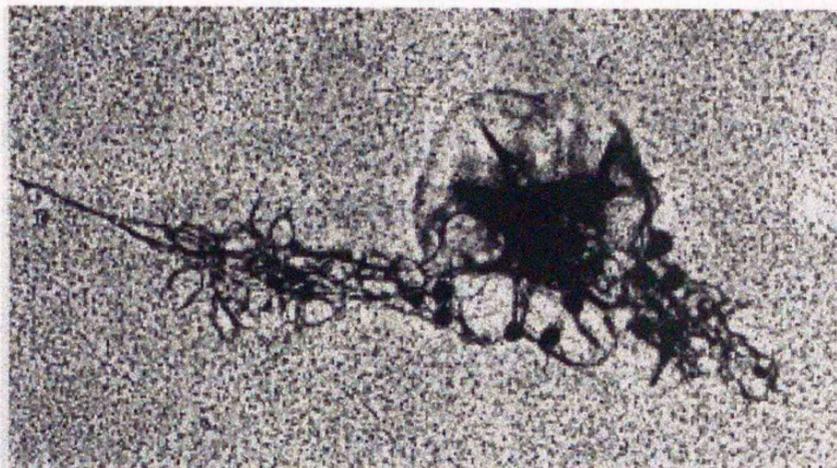


Fig. 1-2 細胞内で granule 状に観察されるポリリン酸

1-1-2 生体内におけるポリリン酸の局在

生体内におけるポリリン酸の局在は様々である。バクテリア細胞内においては膜、細胞質ともに存在しているが、真核生物では核付近に最も多くのポリリン酸が存在している。また、酵母においては液胞に大腸菌の100倍ものポリリン酸を蓄積している。ほ乳類においても、あらゆる臓器に存在していることが分かっているが、特に活動の活発な脳や心臓、また、胎児において多くのポリリン酸を蓄積していることが分かっておりエネルギー貯蔵庫としてのポリリン酸の可能性が示唆されている。

1-1-3 ポリリン酸の機能

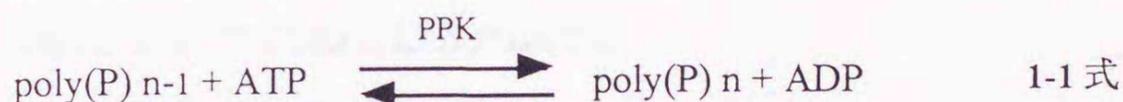
近年徐々に明らかになってきたポリリン酸の機能を以下に記す。しかしながら、現在分かっているポリリン酸の機能は、ポリリン酸の持つ多くの機能のうちの極一部でると考えられる。ポリリン酸の機能の多くは未だ未解明であり今後より多くの機能が解明されていくものと思われる。

1-1-3-1 ATP 及びエネルギー供与体としての機能

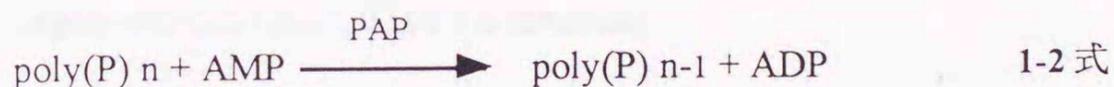
ポリリン酸の代謝には、ポリリン酸リン酸化酵素 PPK (Ahn et al. 1990; Akiyama et al. 1992)、ポリリン酸分解酵素 PPX (Akiyama et al. 1993)、poly(P)-AMP phosphotransferase (PAP) (Bonting et al. 1991; Kornberg 1995, Shiba et al. 2000)、

polyphosphate glucokinase (Hsieh et al. 1993)、endopolyphosphatase (PPN) などの様々な酵素が関与している。PPK は ATP を基質としたポリリン酸の重合反応 (1 式) を触媒する。この反応は可逆的であり、合成されたポリリン酸 (poly(P)n) は ADP 存在下において分解し ATP とポリリン酸 (poly(P)n-1) となる。PAP は *Myxococcus xanthus* の膜画分から単離され (Kornberg 1995)、下記 1-2 式の様にポリリン酸と AMP から ADP を合成する反応を触媒する酵素である。また、ADK は 1-3 式の様に ADP から ATP 及び AMP を合成する反応を触媒する。*Myxococcus xanthus* ではこの PAP と ADK の働きにより菌体内での ATP の再生を行っている (Kornberg 1995)。ポリリン酸は上記の様に ATP を生成する能力を有し (1-1 式, 1-2 式, 1-3 式)、また、分子内に豊富に高エネルギーリン酸結合を持つという構造から、ポリリン酸は ATP の貯蔵庫あるいはエネルギーの貯蔵庫として働いていると考えられている。また、細胞内の ATP 濃度は 5 ~ 10 mM の間で一定に保たれていることから、ポリリン酸は ATP の貯蔵庫として働きながら細胞内の ATP 濃度を一定に保っていると考えられる。

poly(P) synthetic reaction ; PPK reaction



PAP reaction



ADK reaction

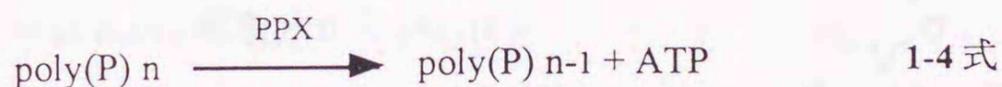


1-1-3-2 リン酸供与体としての機能

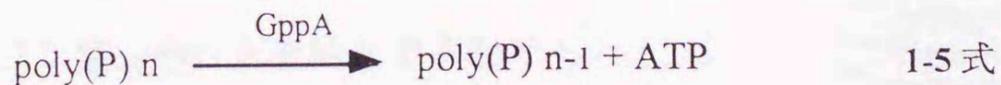
多くのバクテリアでは、リン酸は代謝や成長に非常に重要な役割を果たしている。ポリリン酸はリン酸が直鎖状に結合した化合物であることより、ポリリン酸は分子内

に多量のリン酸を蓄積している。ポリリン酸はポリリン酸分解酵素や酸加水分解によって容易に分解しリン酸を放出することから、ポリリン酸は細胞内においてリン酸貯蔵庫として働いていると考えられている。ポリリン酸を末端から分解するPPXは*E.coli* や *Pseudomonas aeruginosa*、その他のバクテリアにおける主要なポリリン酸分解酵素である(1-4式)。GppA (guanosine pentaphosphate phosphohydrolase) は pppGpp (guanosine-5'-diphosphate-3'-triphosphate) を ppGpp (guanosine-5'-diphosphate-3'-diphosphate) に分解する酵素であるが(1-5式)、これもまたポリリン酸分解活性を持つことが解っている(Keasling et al. 1993)。PPNは*Saccharomyces cerevisiae*の液胞から単離された酵素でポリリン酸を合成または分解する反応を触媒する酵素である(Kumble and Korberg 1996, 1-6式)。バクテリアではこれら酵素の働きによりポリリン酸からリン酸を供給し、Pho regulon と共に細胞内のリン酸濃度を程良く保っていると考えられる。また、この様なリン酸貯蔵体としてのポリリン酸の機能は活性汚泥の中の有害な有機リン酸の除去に役立っている。活性汚泥の中のバクテリアには汚泥の中のリン酸をPPKの働きによりポリリン酸として蓄積する機能を有するものが存在する。

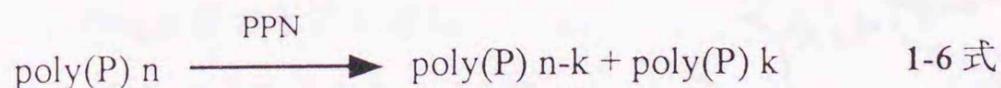
poly(P) depolymeric reaction I (PPX reaction)



poly(P) depolymeric reaction II (GppA reaction)



poly(P) depolymeric reaction I (PPN reaction)



1-1-3-3 カチオンキレーターとしての機能

ポリリン酸は Fig. 1-1 に示す様に負電荷を帯びた分子である。この構造から、ポリ

リン酸は重金属イオンの強いキレーターとしての機能を有する。環境中に存在する有害な重金属をポリリン酸がキレートして無害にしている可能性が考えられる (van Veen et al. 1993; Archibald and Fridovich 1982)。また、多くの生体内代謝反応は Mg^{2+} や Ca^{2+} 要求性であることから、ポリリン酸がこれらカチオン濃度を調節することにより代謝反応を間接的に制御している可能性が考えられる。

1-1-3-4 アルカリイオンに対する緩衝剤としての機能

酵母の様な真菌は液胞に多くのポリリン酸を蓄積している (Pick and Weiss 1991)。細胞がアルカリ pH にさらされるとアミンが液胞内に入りポリリン酸の加水分解によって放出されたプロトンがこれを中和すると考えられている。

1-1-3-5 DNA 取り込みのチャンネルとしての機能

バクテリアにプラスミドを導入する際のコンピテント細胞の作製には広くカルシウムセル法が用いられている。しかしながら、プラスミドが導入されるには高電荷の DNA 分子が細胞を取り囲んでいる脂質二重層を通過しなければならず、プラスミドが導入される詳細な仕組みについては未解明な点が多い。

Reusch らは *E.coli* 膜画分から poly(P)- Ca^{2+} -poly- β -hydroxybutyrate 複合体を単離した (Reusch et al. 1988)。この複合体は外側に poly- β -hydroxybutyrate (PHB)、内側にポリリン酸、それらを結合する形で Ca^{2+} が存在する double-helix 構造をとっていると考えられている。コンピテントセル中ではこの複合体の形成が増加し、DNA が容易に膜内に侵入できるようにしていると思われる (Huang and Reusch 1995; Castuma et al. 1995)。

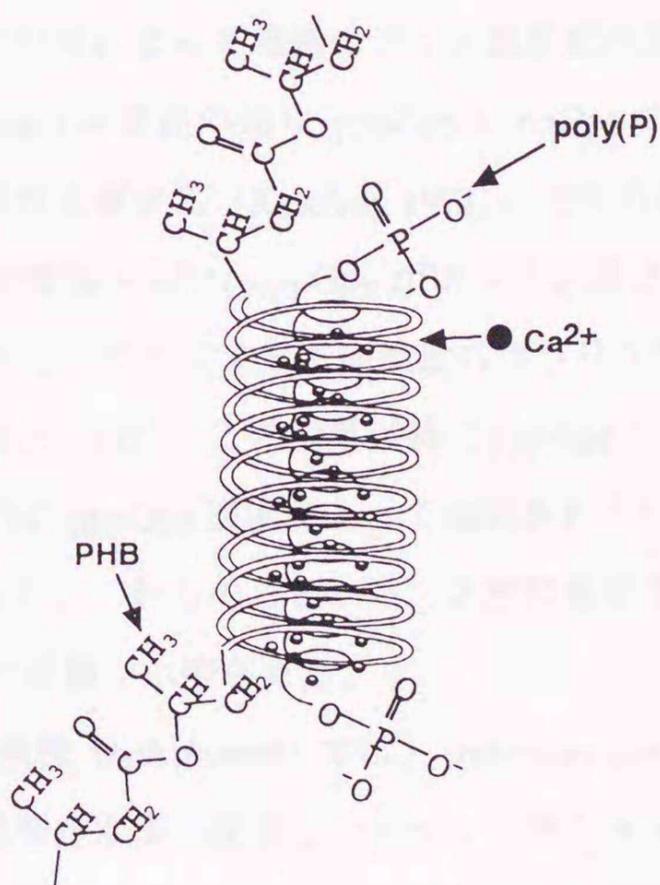


Fig. 1-3 poly(P)- Ca^{2+} -PHB複合体のモデル図

1-1-3-6 NDKとしてのPPKの機能

Kurodaらは、PPKの働きとしてADKとしての働きの他に、ポリリン酸とGDPやその他のNDPsをNTPsに変換するnucleotide diphosphate kinase (NDK)としての働きが有することを*E.coli*と*Pseudomonas aeruginosa*において確認した(Kuroda and Kornberg 1997, Shiba et al. 2000)。反応基質の特異性はADP > GDP > UDP, CDPの順である。これによって、ポリリン酸がヌクレオチド代謝に広く関わっていることが示唆された。さらにPPKは、ppppGやppGppをポリリン酸と作用させることでGDPに変換する能力を有すること、また、ppppGはPPXによって分解されてGTPとPiとなることなども彼らによって同時に確認された(Kuroda and Kornberg 1997)。

1-1-3-7 ストレスに対する調節因子としての機能

*E.coli*におけるpppGppとppGpp(以下、両者を合わせて(p)ppGppと記す。)はアミノ酸飢餓等に対する緊縮応答因子としてよく知られている(Nyström 1998)。細胞がアミノ酸飢餓に陥ると細胞内の(p)ppGpp濃度が急激に上昇し、この(p)ppGppの蓄積はいくつかのストレス応答遺伝子発現のシグナルとなる(Nyström 1998)。これによって発現する遺伝子はストレス環境下において生存するために必要なタンパク合成に関与するものが多く、これらの遺伝子の発現によって細胞はアミノ酸飢餓状態においても生きながらえることができる。GppAは前述の通りpppGppをppGppに分解する酵素であると同時にポリリン酸分解活性を有する(Keasling 1993)。近年の研究により、アミノ酸飢餓において(p)ppGppが蓄積すると(p)ppGppがポリリン酸と競合してPPXによるポリリン酸分解活性が低下し、これによって高濃度のポリリン酸が蓄積することが明らかとなった(Kuroda et al. 1997)。この効果は特にpppGppにおいて強く観られたことからPPX活性が細胞内のpppGpp濃度によって制御されている可能性が考えられている(Kuroda et al. 1997)。これらのことから、各種緊縮応答因子(Stringent factor)と生体内ポリリン酸の関係が示唆された。

また、大腸菌ポリリン酸リン酸化酵素欠損株(*ppk* mutant)では、stationary phaseで生き残っていく耐性が見られず、更には過酸化水素、浸透圧ショック、熱ショックに対する耐性を欠く(Rao and Kornberg 1996)。*ppk*変異株にみられる熱感受性の向上は、菌体内にストレス応答遺伝子の一つであるRpoS(stationary phaseに特異的に

働く RNA polymerase シグマ因子の一つ) を高発現させることで回復したことから (Rao and Kornberg, A. 1996)、*ppk* 変異株における各種ストレス耐性低下には RpoS が関与しているものと考えられている。また、*rpoS* 遺伝子の転写は緊縮応答因子である (p)ppGpp の蓄積がシグナルとなっていることが知られていることから (Lange et al. 1995; Gentry et al. 1993)、ポリリン酸が緊縮応答因子の蓄積に影響を及ぼしている可能性も考えられる (Ault-Riché et al. 1998)。これらのことから、ポリリン酸とストレス耐性の関連性が考えられている。

1-2 ストレス応答性遺伝子について

細菌やその他多くの生物は、様々な環境に適応するための機能を有し、それによって生物は劣悪な環境下においても生存することができ種を保存することができる。*Bacillus*、*Clostridium*、*Streptomyces*、*Myxococcus* の様な細菌では、強靱な孢子を形成することにより各種環境ストレスから身を守っている。また、*E. coli* をはじめとする多くの細菌では stationary phase や栄養飢餓、酸素ラジカル、浸透圧ショック、熱ショック、DNA 損傷物質等の各種ストレス環境下にさらされると、それに応じて特異的な各種遺伝子を発現し、それらから身を守ることが分かっている。前述した *rpoS* 遺伝子もその一つであり、stationary phase やアミノ酸飢餓の際に特異的に発現してそれらストレス環境下においても生存できる様に働いている。また、SOS 応答は DNA が損傷した際に働く救急応答でありここにも多くの遺伝子発現が関与しており *recA* 遺伝子はその最も重要な遺伝子の一つである。*rpoS* 遺伝子、*recA* 遺伝子は特に本論文において重要な遺伝子であるので以下にそれぞれについて記述する。

1-2-1 *rpoS* 遺伝子について

RpoS は RNA polymerase の σ サブユニットの一つであり、*rpoS* 遺伝子によって産出される (村松正実, 1997; Henнге-Aronis 1993)。通常遺伝子の発現は RNA polymerase σ サブユニットの中でも σ^{70} によって発現が制御されているが、stationary phase やアミノ酸飢餓状態にさらされると RpoS (σ^{38}) が主として機能するようになり、ストレス環境下における生存に必要な各種遺伝子の発現を誘導する (Henнге-

Aronis 1993)。一方、*rpoS* の遺伝子の発現は RelA または SpoT を介してできる ppGpp 濃度の増加がシグナルとなっていることが分かっている (Nyström 1998)。(p)ppGpp は緊縮応答を上流で制御しているシグナル分子である (Nyström 1998)。

1-2-2 SOS 応答について

自然界には UV や DNA 損傷の原因となる多くの物質が存在し、大腸菌をはじめとするほとんど全ての生物はその環境下で損傷した DNA を修復しながら生存している。大腸菌における DNA 修復には、a) 光修復、b) 除去修復、c) 組換え修復、d) SOS 修復、e) 適応修復の 5 種類があり (野島博 1996)、それぞれ DNA の損傷具合や重度によって臨機応変に機能している。SOS 修復は DNA の損傷がシグナルとなって緊急処置として働く修復機構で、*umuDC* 遺伝子や *recA* 遺伝子などの SOS 応答遺伝子がここでは重要な役割を果たす (Walker 1984)。SOS 修復による DNA 修復機構はエラー頻度が高いのが特徴である。大腸菌の緊急時に働くこの修復機構では複製の正確さよりも細胞分裂を重要視することによって大腸菌を生存へと導き、種を保存

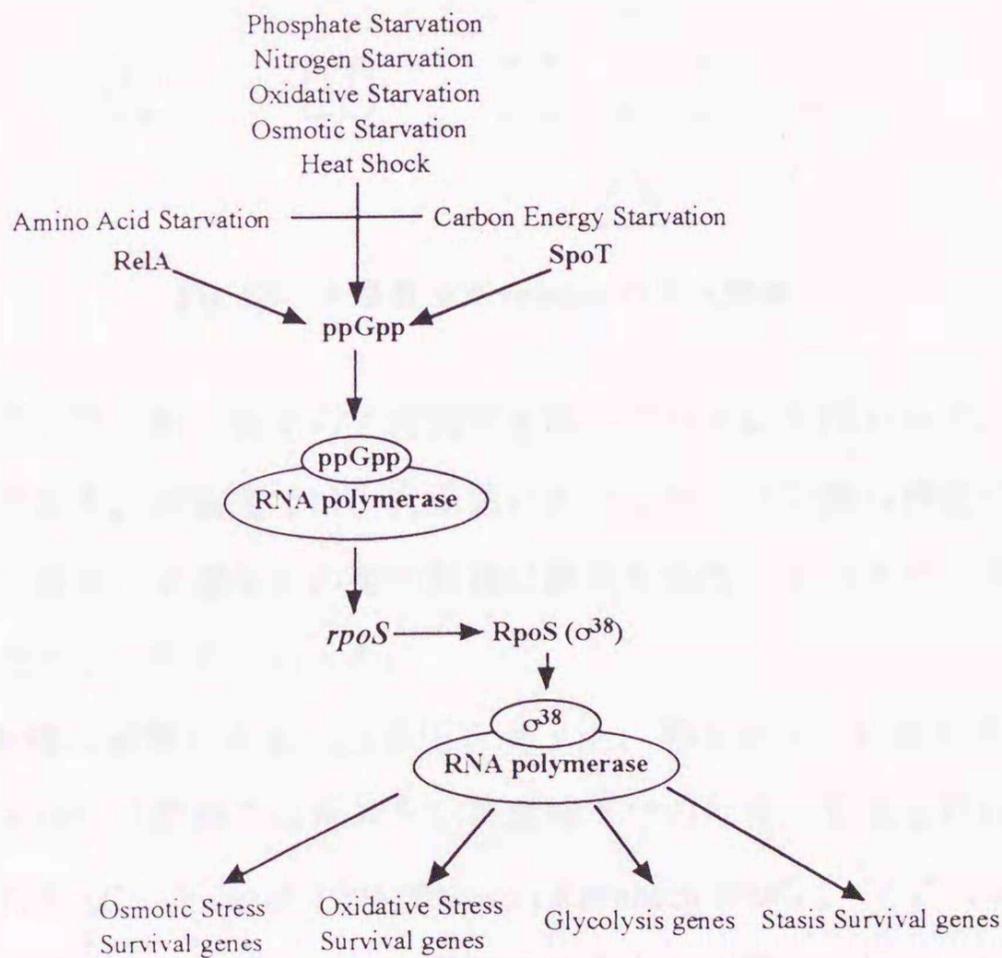


Fig. 1-4 RpoS による遺伝子発現制御機構のモデル図

しようと働く。SOS 応答とは、大腸菌が UV や DNA 損傷物質にさらされたときに活性化された RecA タンパクが SOS regulon のレプレッサーである LexA タンパクを分解し、それによって SOS regulon の転写が誘導される一連の応答のことである。SOS 応答は種の保存にとって非常に重要な救急応答機構であると言える。

1-3 本論文の研究目的

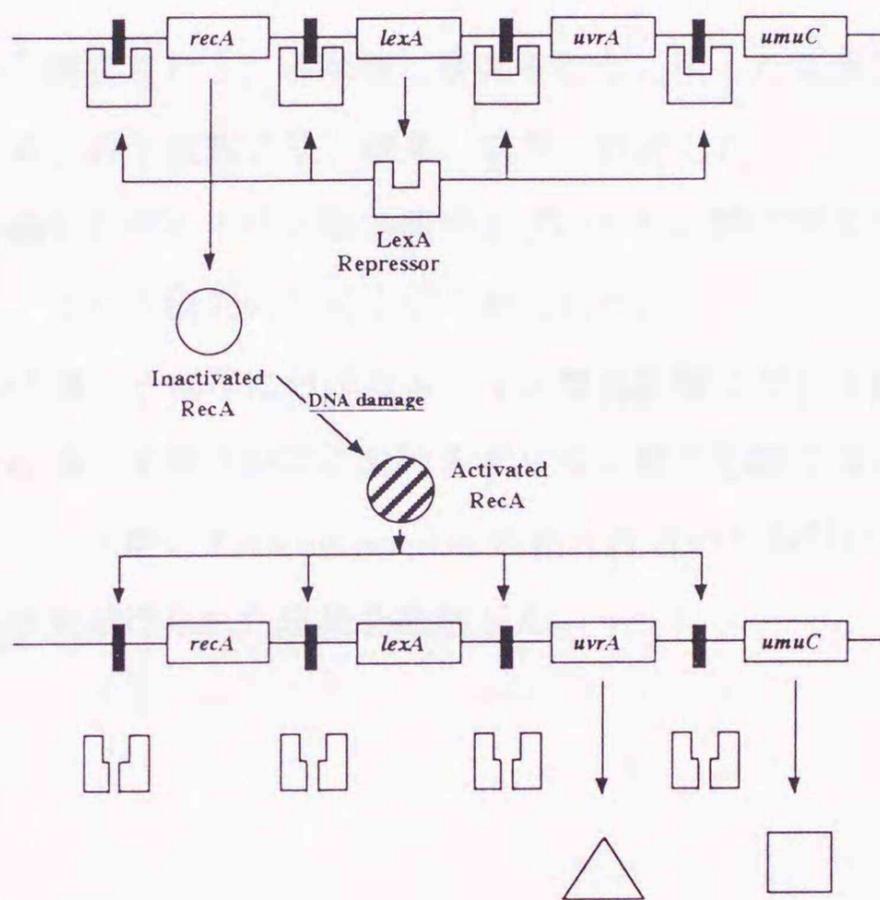


Fig. 1-5 大腸菌 SOS regulon の発現機構

前述の様に、ポリリン酸は種々の生理機能を有しているにも関わらず、その詳細は未解明なままである。本論文では、大腸菌におけるポリリン酸の機能の一つであるストレス応答に関係する遺伝子の発現制御に焦点をあて、そのメカニズムを明確にすることを目的として研究を行った。

大腸菌 *ppk* 欠損株は過酸化水素や浸透圧ショック、熱ショックに対する耐性が低下することからポリリン酸がこれらストレス環境下での生育に重要な役割を果たしていると考えられる (Crooke et al. 1994; Rao and Kornberg 1996)。そこで本論文では、ポリリン酸がストレス応答遺伝子の発現に何らかの影響を及ぼしている可能性を考え、ポリリン酸の遺伝子転写制御因子としての機能を解明することを試みた。

そのために、ストレスとして栄養飢餓及びUV、マイトマイシンC (MMC) を使用し、それらに関係する遺伝子 *rpoS*、*recA* 等の発現を観察した。また、大腸菌 *ppk* 欠損株はその表原型が不安定であることから (Rao and Kornberg 1996)、ストレスとポリリン酸の関係をより安定に観察する方法を構築した。

本論文におけるこれらの試みは今後ポリリン酸の遺伝子転写制御因子としての機能を明らかにする上での足がかりとなるものである。

本論文は5章から構成される。各章毎に研究を行うに至った背景及び研究の目的を緒言としてまとめ、以下実験方法、結果、結言を記述した。

第1章では、序論としてポリリン酸の機能及びポリリン酸に関する既往の研究成果について記述し、また本研究の目的を明らかにした。

第2章では、*rpoS* 遺伝子転写におけるポリリン酸の影響について観察した。

第3章では、SOS 遺伝子群の転写におけるポリリン酸の影響について観察した。

第4章では、ポリリン酸と RNA polymerase の相互作用の可能性について検討した。

第5章では、本研究で得られた成果を総括した。

Table 1-1 本論文に関わる主なタンパク質及び遺伝子について

タンパク質	遺伝子	機能
PPK	<i>ppk</i>	ポリリン酸リン酸化酵素
PPX	<i>ppx</i>	ポリリン酸分解酵素
RpoS (σ^{38})	<i>rpoS</i>	RNA polymerase のサブユニットの一つ。stationary phase やアミノ酸飢餓状態において発現する遺伝子の転写制御因子。
KatE	<i>katE</i>	過酸化水素分解酵素 (HPII)
Fic	<i>fic</i>	cAMP により誘導される filamentation 誘導タンパク質。遺伝子は σ^{38} 依存性。
RecA	<i>recA</i>	SOS 遺伝子群の一つ。活性化RecAはSOS 遺伝子群のリプレッサータンパク質である LexA を特異的部位で切断して不活化する。
UmuD	<i>umuD</i>	SOS 遺伝子群の一つ。活性化 UmuD は RecA、UmuC とともに DNA polymerase III と複合体を形成し、損傷 DNA の修復に貢献する。
UmuC	<i>umuC</i>	SOS 遺伝子群の一つ。RecA、UmuD とともに DNA polymerase III と複合体を形成し、損傷 DNA の修復に貢献する。
LexA	<i>lexA</i>	SOS 遺伝子群の一つ。SOS 遺伝子群のリプレッサータンパク質。
LacZ	<i>lacZ</i>	β -galactosidase。ラクトースをグルコースとガラクトースに分解する酵素。

1-4 参考文献

- Ahn, K. and Kornberg, A.** (1990) Polyphosphate Kinase from *Escherichia coli* *J. Biol. Chem.* 265: 11734-11739.
- Akiyama, M., Crooke, E. and Kornberg, A.** (1992) The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein. *J Biol Chem.* 267: 22556-22561.
- Akiyama, M., Crooke, E. and Kornberg, A.** (1993) An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. *J. Biol. Chem.* 5: 633-639.
- Archibald, F.S. and Fridovich, I.** (1982) Investigations of the state of the manganese in *Lactobacillus plantarum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 215: 589-596.
- Ault-Riché, D., A., Fraley, C. D., Tzeng, C., and Kornberg, A.** (1998) Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180: 1841-1847.
- Bonting, C. F. C., Kortstee, G. J. J. and Zehnder, A. J. B.** (1991) Properties of polyphosphate: AMP phosphotransferase of *Acinetobacter* strain 210A. *J. Bacteriol.* 173: 6484-6488.
- Castuma, C. E., Huang, R., Kornberg, A., and Reusch, R. N.** (1995) Inorganic polyphosphates in the acquisition of competence in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270: 12980-12983.
- Crooke, E., Akiyama, M., Rao, N. N., and Kornberg, A.** (1994) Genetically altered levels of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269: 6290-6295.
- Gentry, D. R., Hernandez, V. J., Nguyen, L. H., Jensen, D. B., and Cashel, M.** (1993) Synthesis of the stationary-phase sigma factor σ^S is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.* 175: 7982-7989.
- Hengge-Aronis, R.** (1993) Survival of hunger and stress: The role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* 72: 165-168.
- Hsieh, P. C., Shenoy, B. C., Jentoft, J. E. and Phillips, N. F.** (1993) Purification of polyphosphate and ATP glucose phosphotransferase from *Mycobacterium tuberculosis*

H37Ra: evidence that poly(P) and ATP glucokinase activities are catalyzed by the same enzyme. *Protein Expr Purif.* 4: 76-84.

Huang, R. and Reusch, R. N. (1995) Genetic competence in *Escherichia coli* requires poly-beta-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate membrane complexes and certain divalent cations. *J Bacteriol.* 177: 486-490.

Kornberg, A. (1995) Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.* 177: 491-496.

Kornberg, A. (1999) Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 23: 1-18.

Kulaev, I. S. (1979) The biochemistry of inorganic polyphosphates. John Wiley & Sons, New York.

Kulaev, I. S. and Vagabov, V. M. (1983) Polyphosphate metabolism in microorganisms. *Adv. Microbiol.* 15: 731-738.

Kumble, K. D. and Kornberg, A. (1995) Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. *J Biol Chem.* 270: 5818-5822.

Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M. and Kornberg, A. (1997) Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272, 21240-21243.

Lange, R. and Hengge-Aronis, R. (1994) The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev.* 8;1600-1612.

Meyer, A. (1904) Orientierende Untersuchungen ueber Verbreitung, Morphologie, und Chemic des Volutins. *Bot.Zeit.* 62: 113-152.

Nyström, T. (1998) To be or not to be: the ultimate decision of the growth-arrested bacterial cell. *FEMS Microbiol. Reviews* 21: 283-290.

Pick, U. and Weiss, M. (1991) Polyphosphate hydrolysis within acidic vacuoles in response to amine-induced alkaline stress in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 87;

1234-1240.

Rao, N. N., and Kornberg, A. (1996) Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178: 1394-1400.

Reusch, R. N. and Sadoff, H. L. (1988) Putative structure and functions of a poly-beta-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85; 4176-4180.

Shiba, T., Tsutsumi, K., Ishige, K. and Noguchi, T. (2000) Inorganic polyphosphate and polyphosphate kinase: their novel biological functions and applications. *Biochemistry (Mosc)* 65: 315-323.

van Veen, H. W., Abee, T., Kortstee, G. J. J., Koning, W. N. and Zehnder, A. J. B. (1993) Mechanism and energetics of the secondary phosphate transport system of *Acinetobacter johnsonii* 210A. *J. Biol. Chem.* 268; 19377-19383.

Walker, G. C. (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 48: 60-93.

村松正実 (1997) 分子細胞生物学辞典, 東京化学同人

野島博 (1996) 遺伝子工学の基礎, 東京化学同人, 109-121.

第2章 *rpoS* 遺伝子の転写におけるポリリン酸の影響

2-1 緒言

E. coli ppk 変異株は、過酸化水素、浸透圧ショック、熱ショックに対する耐性が大きく減少することから、ポリリン酸とストレス耐性との関係が考えられてきた (Rao and Kornberg 1996)。また、*ppk* 変異株にみられる熱ショック耐性の低下は菌体内に *rpoS* 遺伝子を高発現させることで回復することから、ポリリン酸とストレス耐性の関係に *rpoS* が関与している可能性が示唆されてきた (Rao and Kornberg 1996)。しかしながら、*ppk* 変異株の表現型は非常に不安定であり各種耐性試験においても一週間程で wild type 並にストレス耐性のある small colony が現れてくるため (Rao and Kornberg 1996)、大腸菌ストレス耐性とポリリン酸の関係を解明することはこれまで困難であった。そこで、*ppk* 変異株を使用せずに菌体内のポリリン酸濃度を減少させる方法として、大腸菌菌体内にポリリン酸分解酵素を高発現させる方法を考えた。本章では、まずポリリン酸分解酵素高発現系の構築を行った。酵母ポリリン酸分解酵素 scPPX1 は非常に活性が高く、大腸菌の約 40 倍の比活性を持つことから (Wurst et al. 1995)、ここでは大腸菌菌体内への酵母ポリリン酸分解酵素の導入を試みた。本章では、ここで構築したポリリン酸分解酵素高発現系を利用して過酸化水素耐性試験を行った。大腸菌カタラーゼには KatG (HPI カタラーゼ) と KatE (HPII カタラーゼ) の二つが存在する (Mulvey et al. 1988)。KatE は主として stationary phase で作用し、KatG は主として log phase で作用する。stationary phase で作用する KatE の発現は、stationary phase に特異的な遺伝子発現を制御している RpoS (σ^{38}) に依存している。また、RpoS タンパクをコードする *rpoS* 遺伝子の発現は、緊縮応答因子である (p)ppGpp のシグナル的な濃度上昇に依存することから (Nyström 1998)、過酸化水素耐性におけるポリリン酸の影響を明らかにするためにはこれらの因子に与える影響をそれぞれ観察する必要がある。本章ではそれらについても検討し、ポリリン酸と過酸化水素耐性の関係及びこれらに関わる遺伝子発現との関連性を明らかにすることを目的として研究を行った。

2-2 実験方法

2-2-1 使用した菌株及びプラスミド

本章で使用した大腸菌株及びプラスミドをTable 2-1に示した。KT1008EL株は *katE-lacZ* 転写 fusion 遺伝子をゲノムに持つ大腸菌株であり東京大学田中寛助教授の御好意により分与して戴いたものを使用した (Tanaka et al. 1997)。 *rpoS-lacZ* 転写 fusion 遺伝子をゲノムに持つKT1008SL株は以下の様に構築した。 *rpoS* 遺伝子の promoter 領域 1.4 kb *clai* - *draI* 断片をプラスミド pRS551 (Simons et al. 1987) に挿入して *rpoS-lacZ* 転写 fusion 遺伝子を作製し、これを λ RS45 に導入した後KT1008株へ transduction した (Takayanagi et al. 1994)。

酵母ポリリン酸分解酵素高発現プラスミド pTrcPPX1 は、1484 bp の PPX1 をコードする遺伝子を含む *Bam*HI 断片を vector pTrcHisB (Invitrogen) の multicloning site に導入したものである (Wurst et al. 1995)。

pLGPPX1 及び pSUPPX1 は以下の通り構築した。 *PPX1* 遺伝子の全領域及び、 *lacI^a* 遺伝子、 *trc* promoter を含む pTrcPPX1 の 3.0 kb *Sph*I - *Bg*III 断片を、それぞれ pLG339 及び pSU2719 の *Sph*I - *Bam*HI 消化部位に挿入した。 pLGHisB 及び pSUHisB は、 pLGPPX1 及び pSUPPX1 から *PPX1* 遺伝子を含む *Bam*HI 断片を欠損させた control vector である。

プラスミド pBS-*rpoS* は pT7 の multicloning site に組み込まれた *rpoS* (大阪大学牧野耕三助教授の御好意により分与して戴いた) の全領域を *Xba*I - *Hind*III で切り出し、この DNA 断片を pBluescriptII SK(+) (Stratagene) の *lac* promoter の下流 *Xba*I - *Hind*III site に挿入したものである。

不活性な PPX1 を合成するプラスミド pTrcDPPX1 は以下の通り構築した。 599 ~ 1299 領域の 700 bp *Bam*HI-*Fsp*I *rPPX1* DNA 断片を調製した。 vector pTrcHisB (Invitrogen) は *Eco*RI で消化した後に T4 DNA polymerase で blunting し、再び *Bam*HI で消化した。これに先の DNA 断片を挿入し pTrcDPPX1 とした。このプラスミドが合成する DPPX1 は、PPX1 の N 末端 232 アミノ酸残基をコードしている。

2-2-2 使用した培地及び試薬

通常の培養は Luria-Bertani (LB) 培地 (DIFCO) (Sambrook et al. 1989) を使用した。

M9 最小培地 (Sambrook et al. 1989) は、 NH_4Cl 未添加のものに 16 mM glucose、0.2 % casamino acid、1 mg/ml thiamine を添加したものを使用した。MOPS 培地 (Neidhardt et al. 1974) は、16 mM glucose と 2.4 mM K_2HPO_4 を添加して使用した。

DNA 修飾操作には Takara Shuzo (Kyoto) または New England Biolabs. の試薬を用いた。 $[^{32}\text{P}]$ orthophosphate ($[^{32}\text{P}]\text{Pi}$) は Amersham のものを使用した。Polyethyleneimine-cellulose 薄層クロマトグラフィー (PEI-TLC) プラスチックプレートは Merck のものを使用した。抗 RpoS 抗血清は東京大学田中寛助教授の御好意により分与して戴いたものを使用した (Tanaka et al. 1993)。

2-2-3 過酸化水素感受性試験

各大腸菌株を LB 培地で over night (O/N) 培養し、1 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加して更に 1hr 培養しポリリン酸分解酵素の発現を誘導した。この stationary phase culture を wash した後 0.15 M NaCl に懸濁して $\text{OD}_{600}=5.0$ となる様に揃えた。42 mM H_2O_2 を添加し、25 °C で incubation した。時間毎にサンプリング後直ちに 0.15 M NaCl によって 10^{-1} から 10^{-7} 倍に希釈した。LB プレートに播種し 37°C で一晩 incubation した後コロニー数をカウントし、処理時間 0 min のものを 100 % として生存率を計算した。

2-2-4 β -galactosidase assay 法 (Sambrook et al. 1989)

β -galactosidase はラクトースをグルコースとガラクトースに加水分解する酵素であり、アリアル及びアルキル- β -D-ガラクトシドが基質となる。大腸菌では *lacZ* 遺伝子にコードされており、単量体当たりの分子量は約 116,450 Da であり四量体で活性を示す。目的遺伝子のプロモーターの下流にこの *lacZ* 遺伝子を連結して β -galactosidase の発現量をその活性によって観察することで、間接的に目的遺伝子の転写活性を確認することができる。本章の実験では以下の手順で操作を行った。

assay に使用するサンプルは全てサンプリング後直ちに液体窒素で凍結し、-80 °C で保存した。各サンプルの調製方法についてはその都度記載した。凍結保存したサンプルは使用直前に解凍し、50 mM 2-mercaptoethanol、40 mM NaH_2PO_4 、60 mM Na_2HPO_4 、10 mM KCl、1 mM MgSO_4 を含む Z-buffer に 10 - 100 μl 添加した。これに 10 μl tolu-

eneを添加してvortex mixerで10 sec攪拌し、37°Cでtolueneが蒸発するまで振とうした。tolueneの蒸発後、28°Cで4 mg/ml 2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG)を添加した。黄色に発色したところで1 M NaCO₃を添加して反応を停止し、420 nm及び550 nmの吸光度を測定した。β-galactosidase 活性を2-1式に基づいて計算した。

$$\text{activity (unit)} = \frac{A_{420} - (1.75 \times A_{550})}{T \times V \times A_{600}} \times 1000 \quad \text{2-1 式}$$

A₄₂₀: 420nm における吸光度 (ABS)

A₅₅₀: 550nm における吸光度 (ABS)

A₆₀₀: 600nm における吸光度 (ABS)

T: 反応時間 (min)

V: 反応に用いたサンプルの容量 (ml)

2-2-5 Starvation の条件

大腸菌のストレス応答遺伝子 (*rpoS*、*katE*) は大腸菌が栄養飢餓状態になった際に特異的に発現する遺伝子である (Stoker et al. 1982; Chandler 1991; Akiyama et al. 1993)。本方法では、栄養培地である LB 液体培地で生育した菌を最小培地に移すことによって人工的に窒素飢餓の状態をつくり、これらの遺伝子の発現を誘導した。操作方法は以下の通りである。

大腸菌を LB で log phase (OD₆₀₀=0.3) まで培養した。これを集菌後 M9 最小培地または MOPS 最小培地で wash した後再び 1/10 量の M9 最小培地または MOPS 最小培地 (本章実験方法参照) に懸濁して濃縮した。37°C で振とうし、各時間毎に菌液を採取し直ちに 0°C で保存若しくは液体窒素で凍結した。

2-2-6 exopoly(P)ase 活性測定法

各大腸菌 lysate の exopoly(P)ase 活性は以下の方法で測定した。それぞれの株を LB 培地で log phase まで培養し、1 mM IPTG を添加後 3 hr 振とう培養した。集菌、洗浄後 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) に懸濁し氷上で sonication した。15000 rpm で 60 min 遠心し上清を得た。この lysate の exopoly(P)ase 活性を測定した。それぞれの lysate または

controlとして使用した37.8 unitsの精製 *E.coli* PPXI (Ahn and Kornberg 1990) を $[^{32}\text{P}]\text{poly(P)}$ と混合後 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NH_4COOH 、4 mM MgCl_2 条件下 37°C で 30 min 処理し、 $[^{32}\text{P}]\text{poly(P)}$ を $[^{32}\text{P}]\text{Pi}$ に加水分解した (Wurst 1994)。反応液を 0.75 M KH_2PO_4 (pH 3.5) を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィーで展開し $[^{32}\text{P}]\text{poly(P)}$ と $[^{32}\text{P}]\text{Pi}$ を分離した。展開した TLC をイメージングプレート (IP) に露光し、放射能を radio-image analyzer (BAS2000, FUJIX) で処理することにより視覚化した。

2-2-7 その他の操作方法について

タンパク濃度は BIO-RAD protein assay kit を用いた Bradford 法により測定した (Bradford 1976)。SDS-PAGE、western blotting、各 DNA 操作に関しては Molecular Cloning (Sambrook et al. 1989) 及び「バイオ実験 イラストレイテッド」(西方, 中山 1997) を参考にした。

2-2-8 装置

分光光度計: HITACHI 「U2001 形ダブルビーム分光光度形」

Radio-image analyzer: FUJIX 「BAS2000」

2-3 結果と考察

2-3-1 過酸化水素感受性

大腸菌 *ppk* 変異株では、過酸化水素感受性が高くなることが分かっている (Crooke et al. 1994)。そこでまず、*ppk* 変異株に見られるこの感受性の上昇がポリリン酸高発現系においても観察されるか否かを確認した。本実験では、CSH7 株及び、NY001 株、UM178 株にそれぞれ pTrcPPXI または pTrcHisB を導入した株を使用し、過酸化水素感受性試験は本章実験方法に示した方法で行った。その結果、大腸菌菌体内にポリリン酸分解酵素を高発現させて菌体内のポリリン酸濃度を極度に低下させた場合 (以下 PPXI と記した。)、wild type では約 10 倍の過酸化水素感受性の上昇が観察された (Fig. 2-1A)、特に *kaiG* 変異株においては、PPXI における過酸化水素耐性が vector プラスミドの入った control と比較して約 1000 倍低下した (Fig. 2-1B)。一方、*kaiE* 変異株では、wild

type とほぼ同程度の感受性の向上がみられた (Fig. 2-1C)。 *katG* 変異株では HPII カタラーゼである KatE のみが機能していることから、本実験により菌体内ポリリン酸が KatE の活性若しくは KatE の安定性、若しくは *katE* 遺伝子の発現に関与している可能性が示唆された。

2-3-2 *katE* 遺伝子発現量への影響

次に、菌体内ポリリン酸濃度が極度に低い状態における *katE* 遺伝子の転写量を観察した。本実験では、*katE-lacZ* 転写 fusion 遺伝子をゲノムに持つ KT1008EL 株に pTrcPPX1 または pTrcHisB を導入し、これらを early-log phase まで培養した後に直ちに M9 最小培地で窒素飢餓状態にし、その際の転写誘導を各時間毎に観察した。転写量は β -galactosidase assay により観察した。その結果、vector プラスミドを含む株では速やかに *katE* 遺伝子の転写が誘導されたのに対し、ポリリン酸分解酵素を高発現させた株 PPX1 では *katE* 遺伝子の発現誘導が起こらず、5 hr 後の転写量が control の約 1/3 程度に留まったことから、*katE* 遺伝子の発現誘導にポリリン酸が必要であることが分かった (Fig. 2-2)。この結果より、Fig. 2-1 にみられた PPX1 の過酸化水素感受性の向上は、*katE* 遺伝子の転写誘導効率の低下によるものであると予想された。

2-3-3 ポリリン酸分解酵素高発現株における RpoS タンパク含量

katE 遺伝子の発現は RNA polymerase の σ 因子の一つである RpoS タンパク (σ^{38}) に依存している (Henнге-Aronis 1993)。このことから次に、ポリリン酸が *katE* 遺伝子の転写をさらに上流で制御している RpoS 発現量に及ぼす影響を観察した。本実験は Fig. 2-2 と同様の株を用い、また、Fig. 2-2 と同様の方法でサンプルを調製した。発現量の観察には抗 RpoS 抗血清を用いた western blotting を用い、発色はアルカリフォスファターゼを用いた発色反応を利用した。その結果、窒素飢餓状態にすると control では時間経過とともに菌体内の RpoS タンパク含量が増加するのに対して、PPX1 では starvation 開始後 4 hr が経過しても RpoS タンパク含量の増加がほとんどみられなかった (Fig. 2-3)。このことより、ポリリン酸が RpoS タンパクの安定化または *rpoS* 遺伝子の発現を転写レベルあるいは翻訳レベルで制御している可能性が示唆された。

2-3-4 *rpoS* 遺伝子発現量への影響

次に、ポリリン酸が*rpoS*遺伝子の発現を転写レベルで制御している可能性を考えて、*rpoS*遺伝子の転写誘導を観察した。本実験では、KT1008SL株を使用し、Fig. 2-2と同様の実験条件でM9最小培地によってstarvationをかけた。発現量は β -galactosidase assayにより観察した。その結果、ポリリン酸分解酵素を菌体内に高発現させると*katE*遺伝子同様*rpoS*遺伝子の転写誘導も抑制され、control vectorを含む株の1/3程度となった(Fig. 2-4)。この結果より、Fig. 2-2にみられた*katE*遺伝子転写誘導効率の低下は*rpoS*遺伝子の転写誘導が抑制されたことによる二次的なものである可能性が示唆された。更にこれを確かめるために次に以下の実験を行った。

2-3-5 *rpoS* 遺伝子を過剰発現させた際の*katE* 遺伝子発現量への影響

大腸菌菌体内にポリリン酸分解酵素を高発現させた際にみられる*katE*遺伝子転写誘導効率の低下が*rpoS*遺伝子転写誘導効率が低下したことによる二次的なものである可能性を確かめるために、菌体内に*rpoS*遺伝子を高発現させた際の*katE*遺伝子の転写量を観察した。本実験では、Fig. 2-2で用いた株にそれぞれ*rpoS*遺伝子高発現プラスミドpBS-*rpoS*を導入した株を使用した。転写量は β -galactosidase assayにより観察した。この状態では菌体内に充分量のRpoSタンパクが存在するため、*katE*遺伝子の転写がポリリン酸によって直接制御されているのであれば、RpoSタンパクの有無に関わらず*katE*遺伝子の転写誘導抑制が起こるはずである。しかしながら、Fig. 2-5に示すように、大腸菌菌体内に*rpoS*遺伝子を高発現させることにより菌体内のRpoSタンパクを過剰にした場合、恒常的な*katE*遺伝子の転写誘導が観察された(Fig. 2-5)。この結果より、ポリリン酸分解酵素を高発現させた際にみられる*katE*遺伝子転写誘導の減少が*rpoS*遺伝子の転写誘導効率が低下したことによる二次的なものであることが示された。

2-3-6 Growthによる*rpoS* 遺伝子転写量の変化

*rpoS*遺伝子はstationary phaseに特異的に発現する遺伝子である。そこで、ポリリン酸分解酵素高発現株における*rpoS*遺伝子転写量を各growth毎に観察した。転写量の変化は β -galactosidase assayにより観察した。本実験では、特にstarvationをかけることな

く LB 培地を用いて培養した。その結果を Fig. 2-6 に示した。PPXI 及び vector control を含む株の growth はほぼ同速度であるにも関わらず、両者における *rpoS* 遺伝子の転写量には大きな差があった。vector control を含む株においては 12 hr の培養で約 5 倍に転写量が増加しているのに対して、PPXI では 2 倍弱の転写誘導効率の増加がみられたのみであった。この結果より、stationary phase における *rpoS* 遺伝子の転写誘導は菌体内におけるポリリン酸含量によって制御されている可能性が示唆された。

2-3-7 RpoS 依存性遺伝子の転写への影響

これまでの結果により、stationary phase における *rpoS* 遺伝子の転写誘導が菌体内におけるポリリン酸含量によって制御されている可能性が示唆された。RpoS は各種ストレス応答遺伝子の発現を制御している。菌体内ポリリン酸濃度の減少による *katE* 遺伝子転写誘導効率の低下も *rpoS* 遺伝子の転写誘導効率が低下したことによる二次的なものであった。よって次に、*katE* 遺伝子以外の RpoS 依存性遺伝子の転写への影響として *fic* 遺伝子の転写へ及ぼす影響を観察した。本実験では、KT1008 株に *fic-lacZ* fusion 遺伝子を持つプラスミド pAL1 (Kawamukai 1989) を導入したものに更にポリリン酸分解酵素の高発現プラスミド pSUPPX1 (Shiba et al. 1997) または control vector プラスミド pSUHisB (Shiba et al. 1997) を導入した株を使用した。両株を log phase まで培養した後 MOPS 最小培地によって starvation をかけた。その結果、菌体内にポリリン酸分解酵素を高発現させると、*fic* 遺伝子の転写量が control と比較して恒常的に低下した (Fig. 2-7)。本実験により、ポリリン酸が *katE* 遺伝子、*fic* 遺伝子のみならず、その他の RpoS 依存性遺伝子の転写を制御している可能性が示唆された。

2-3-8 ポリリン酸分解酵素高発現系の菌体への影響

最後に、本章で用いたポリリン酸分解酵素高発現系が菌体に及ぼす影響を観察した。これまでの実験により、菌体内にポリリン酸分解酵素を高発現させることにより *rpoS* 遺伝子の転写誘導効率が低下することが示された。しかしながら、これが菌体内にポリリン酸分解酵素が高発現したことによるストレスに基づくものである可能性が考えられるため以下の実験を行った。不活性な PPXI を合成するプラスミド pTrcDPPXI は、PPXI の N 末端 232 アミノ酸残基をコードしている (本章実験方法参照)。これを大腸

Table 2-1 Bacterial strains and plasmids

Strain	Relevant genotype	Source of references
CSH7	<i>lacI^y, rpsL, thi-1</i>	Loewen et al. (1994)
UM178	CSH7 <i>katE1, his, lac⁺</i>	Loewen et al. (1994)
UM196	UM178 <i>katG17:: TnI0</i>	Loewen et al. (1994)
NY001	CSH7 <i>katG17:: TnI0</i>	This study
KT1008	F ⁻ , Δ(<i>arg-lac</i>) U169, <i>araD139, rpsL150, ptsF25, flbB5301, rbsR, deoC1</i>	Tanaka et al. (1997)
KT1008EL	KT1008 λRS45: <i>katE-lacZ</i>	Tanaka et al. (1997)
KT1008SL	KT1008 λRS45: <i>rpoS-lacZ</i>	This study
CA10	JM101 <i>ppk, ppx</i>	Rao and Kornberg (1996)
Plasmid	Characteristics	
pTrcHisB	Expression vector of His-tagged protein with <i>lacI^q</i> gene and <i>trc</i> promoter (Invitrogen)	Brosius (1984)
pTrcPPX1	pTrcHisB derivative carrying <i>PPX1</i> gene	Wurst et al. (1995)
pLGHisB	Expression vector of His-tagged protein with <i>lacI^q</i> gene and <i>trc</i> promoter derived from pSC105	This study
pLGPPX1	pLGHisB derivative carrying <i>PPX1</i> gene	This study
pSUHisB	Expression vector of His-tagged protein with <i>lacI^q</i> gene and <i>trc</i> promoter derived from pACYC184	This study
pSUPPX1	pSUHisB derivative carrying <i>PPX1</i> gene	This study
pMMkat F3	pBT153 (a pBR322 derivative) with <i>rpoS</i> gene	Mulvey et al. (1988)
pBC29	pUC18 derivative carrying <i>E. coli ppk</i> gene	Akiyama et al. (1993)
pBS-rpoS	pBluescript II SK(+) derivative carrying <i>rpoS</i> gene	This study
pAL1	pMC1403 derivative carrying <i>fic-lacZ</i> fusion gene	Kawamukai et al. (1989)

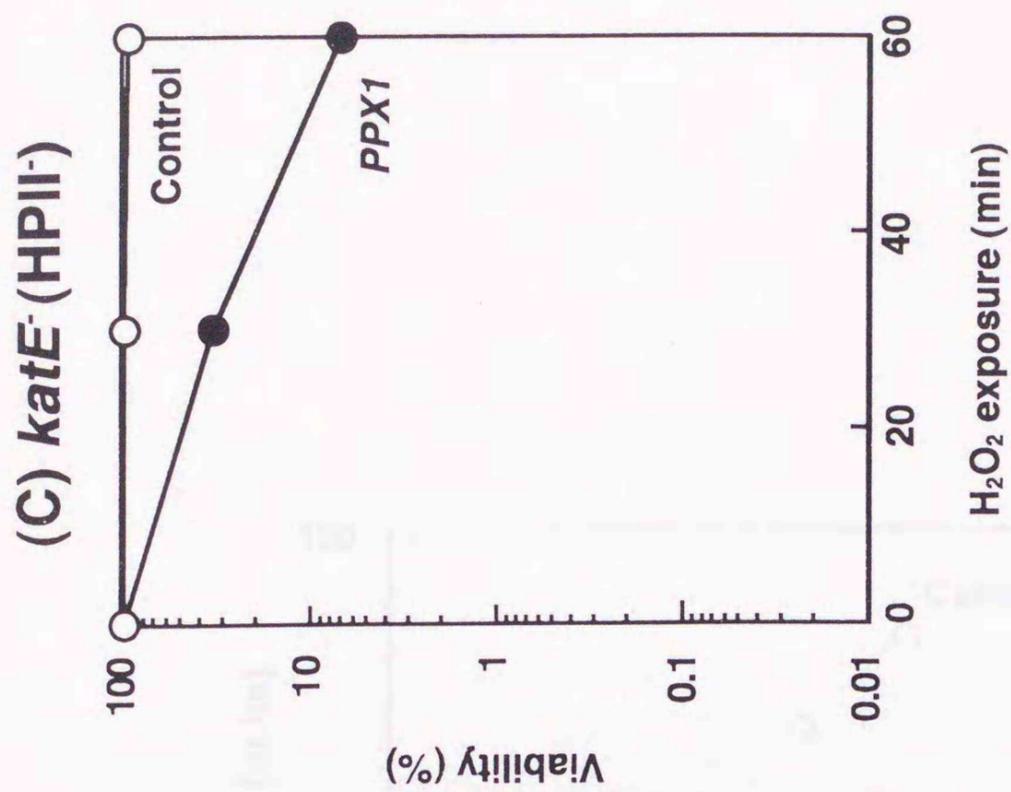
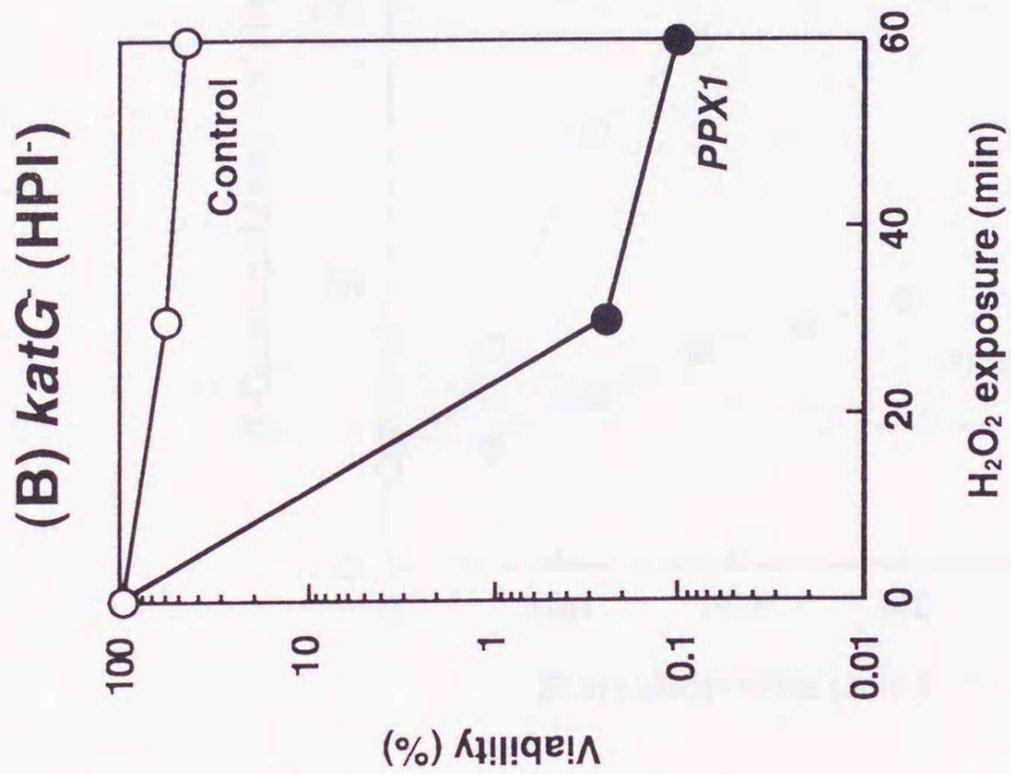
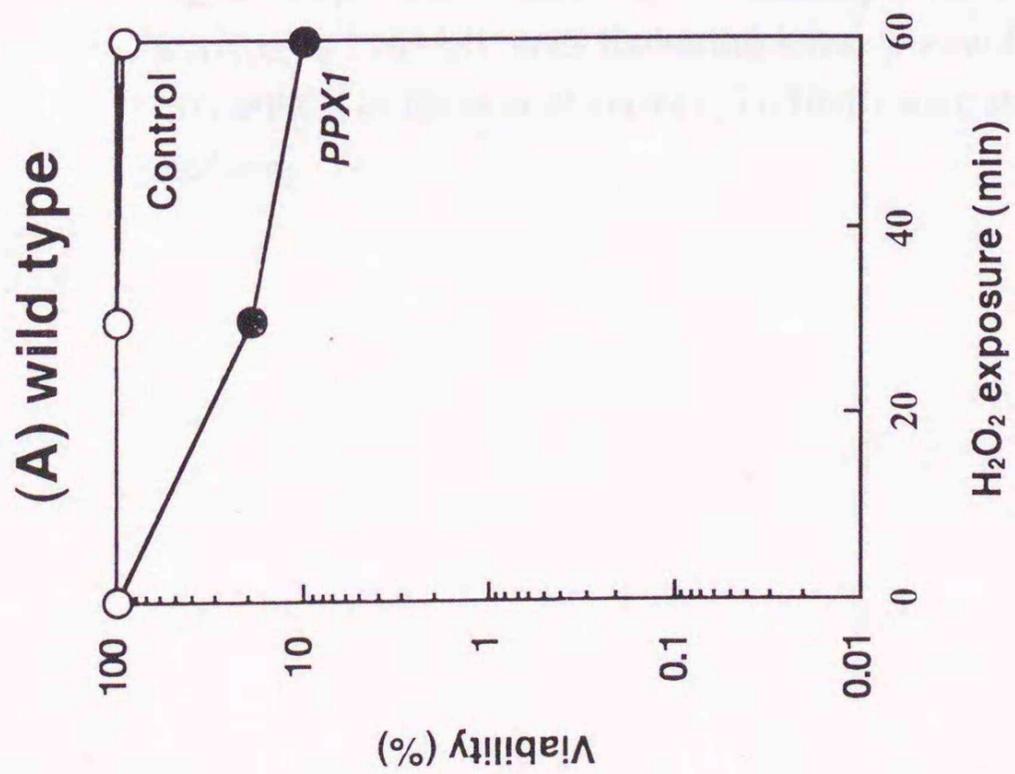


Fig. 2-1 Effects of exopoly(P)ase overproduction on H₂O₂ sensitivity in catalase-deficient strains. The wild type strain (CSH7) in A, or the *katG* mutant (NY1001) in B, or the *katE* mutant (UM178) in C, harbored either the plasmid with the *PPX1* gene (pTrcPPX1) (closed symbols) or the control vector (pTrcHisB) (open symbols). Cells were exposed to 42 mM H₂O₂ at 25 °C. The viable cell number were determined by plating onto agar.

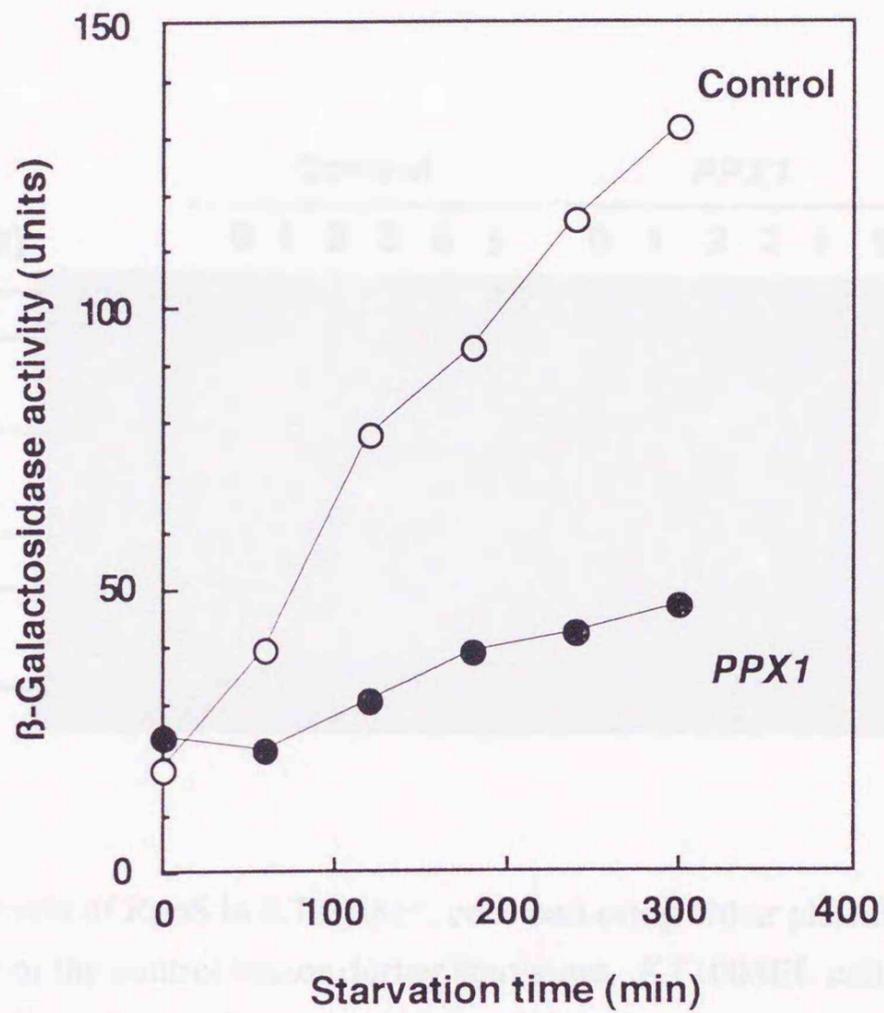


Fig. 2-2 Expression of the *katE-lacZ* transcriptional fusion by β -galactosidase activity. KT1008EL cells harboring either plasmids with the *PPX1* gene (pTrcPPX1) or the control vector (pTrcHisB) were starved in a M9 minimal medium.

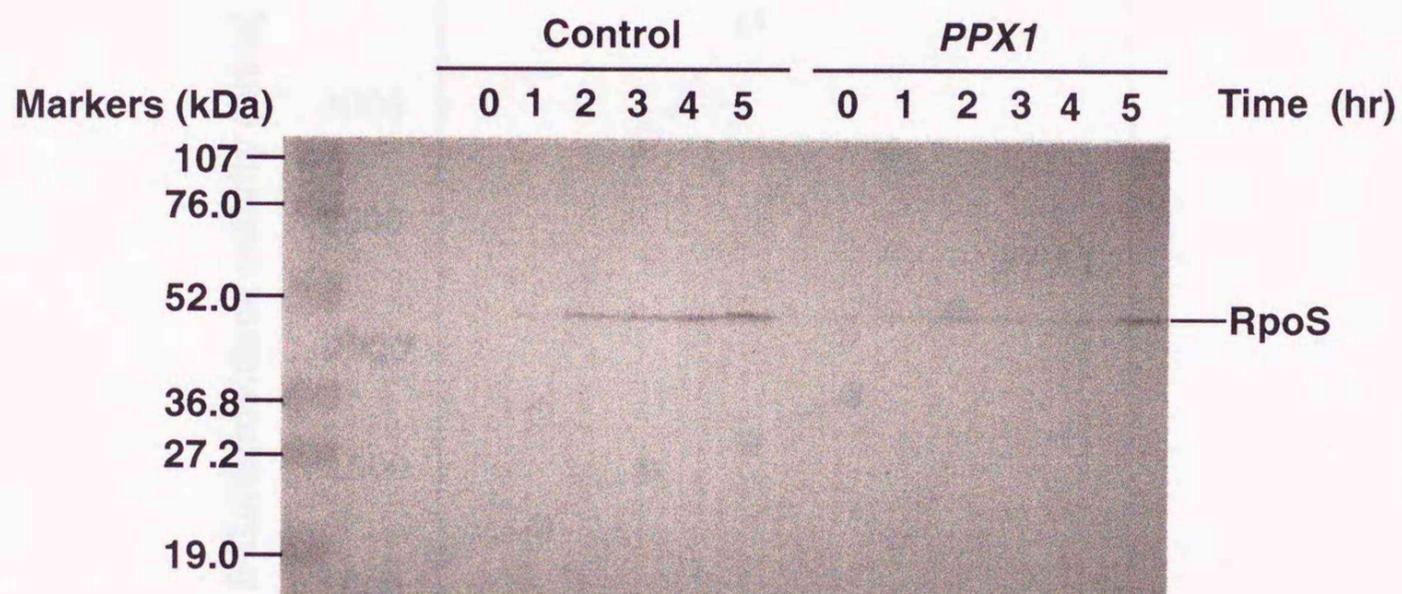


Fig. 2-3 Levels of RpoS in KT1008EL cells harboring either plasmids with the *PPX1* gene or the control vector during starvation. KT1008EL cells harboring either plasmids with the *PPX1* gene (pTrcPPX1) or the control vector (pTrcHisB) were starved in a M9 minimal medium. Proteins were subjected to western blotting with anti-RpoS antiserum and visualized with an alkaline phosphatase-conjugated second antibody.

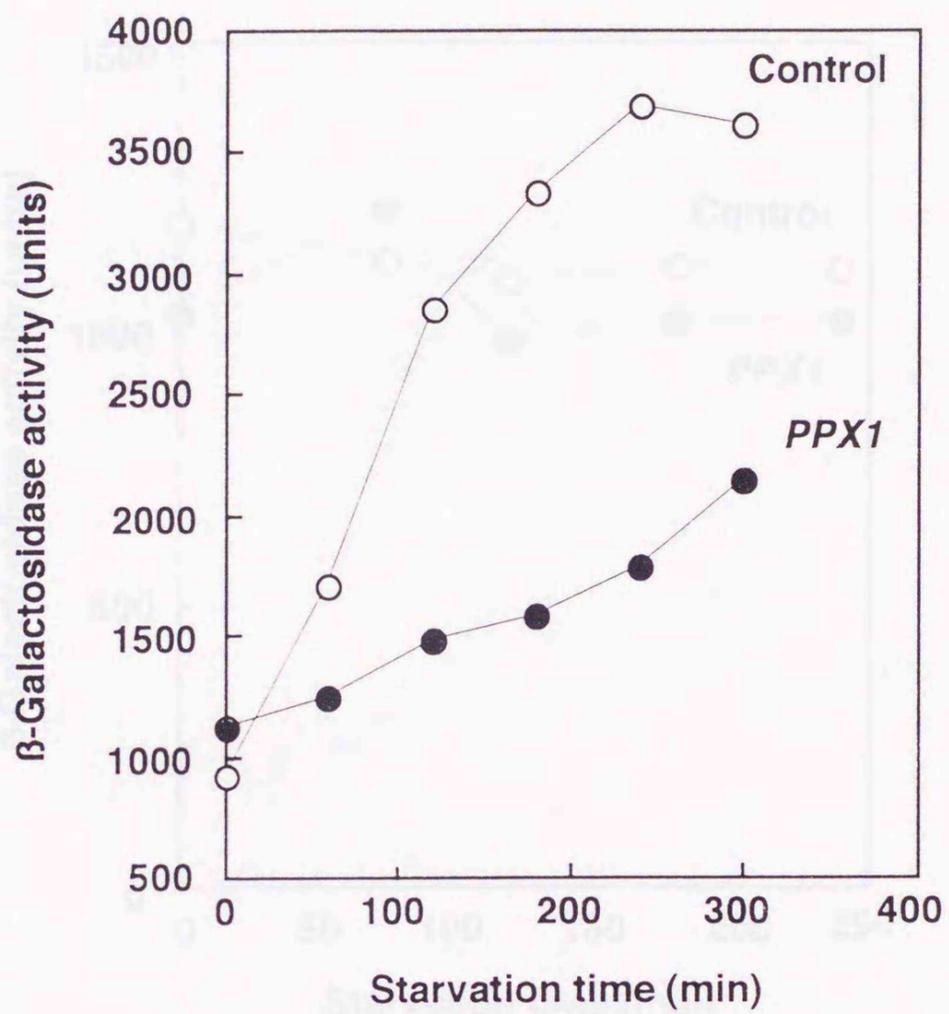


Fig. 2-4 Expression of the *rpoS-lacZ* transcriptional fusion by β -galactosidase activity. KT1008SL cells harboring either plasmids with the *PPX1* gene (pTrcPPX1) or the control vector (pTrcHisB) were starved in a M9 minimal medium.

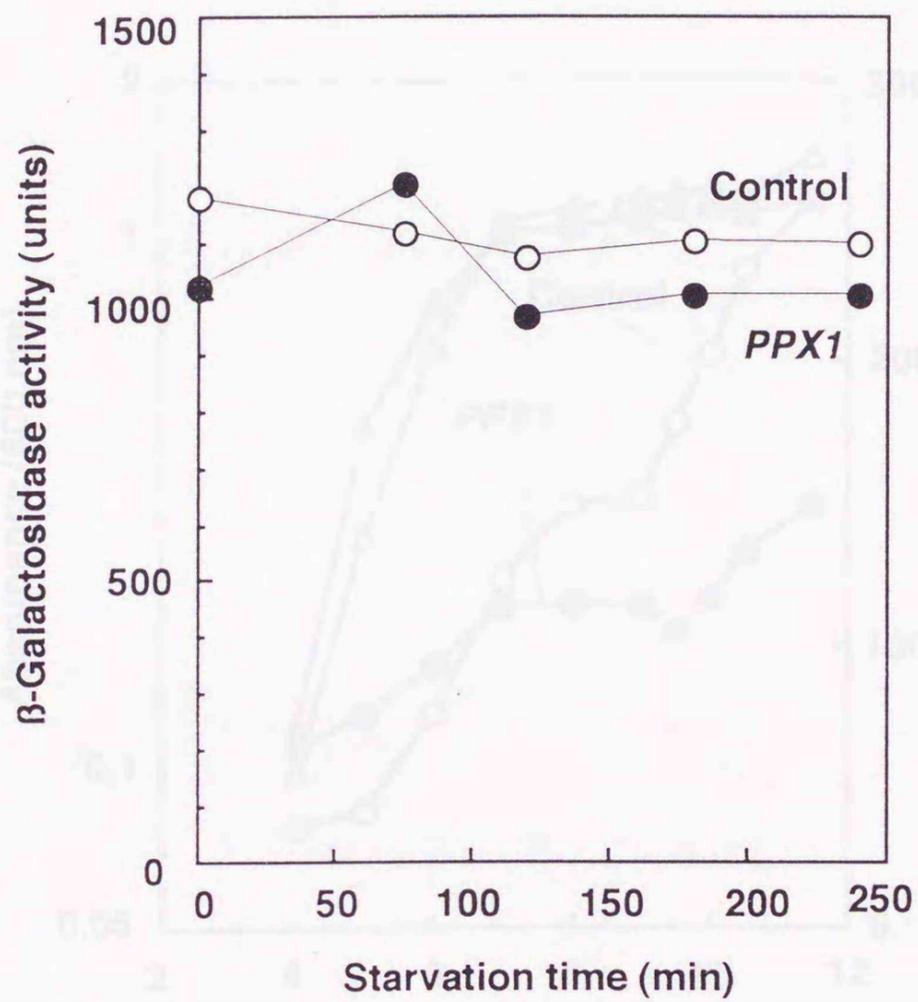


Fig. 2-5 Expression of the *rpoS-lacZ* transcriptional fusion in RpoS overproducing cells by β -galactosidase activity. KT1008SL cells harboring either plasmids with the *PPX1* gene (pSUPPX1) or the control vector (pSUHisB) were transformed again with pBS-*rpoS* (carrying the *rpoS* gene). Cells were starved in a MOPS minimal medium.

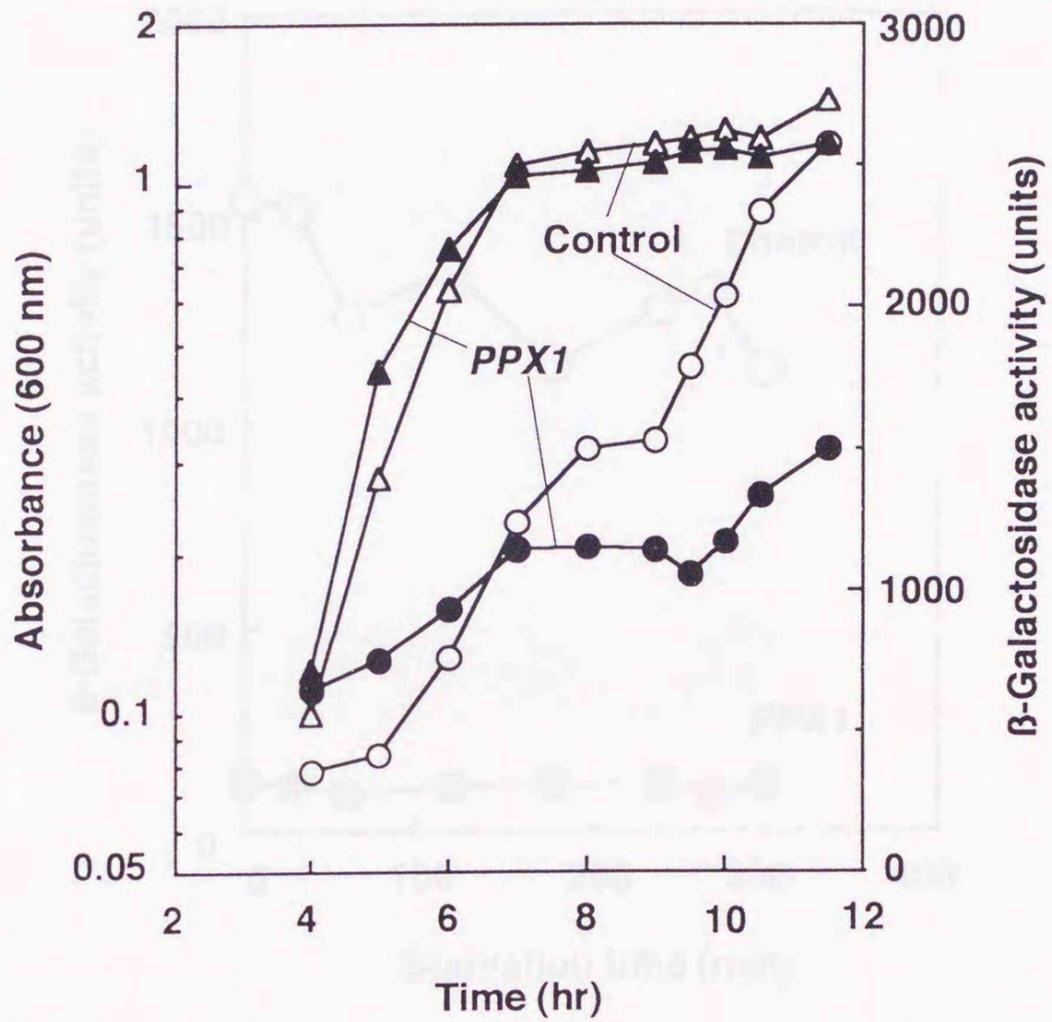


Fig. 2-6 Expression of the *rpoS-lacZ* transcriptional fusion by β -galactosidase activity. KT1008SL cells harbored either plasmids with the *PPX1* gene (pTrcPPX1) or the control vector (pTrcHisB). Expression of the *rpoS-lacZ* fusion was tested during growth in LB.

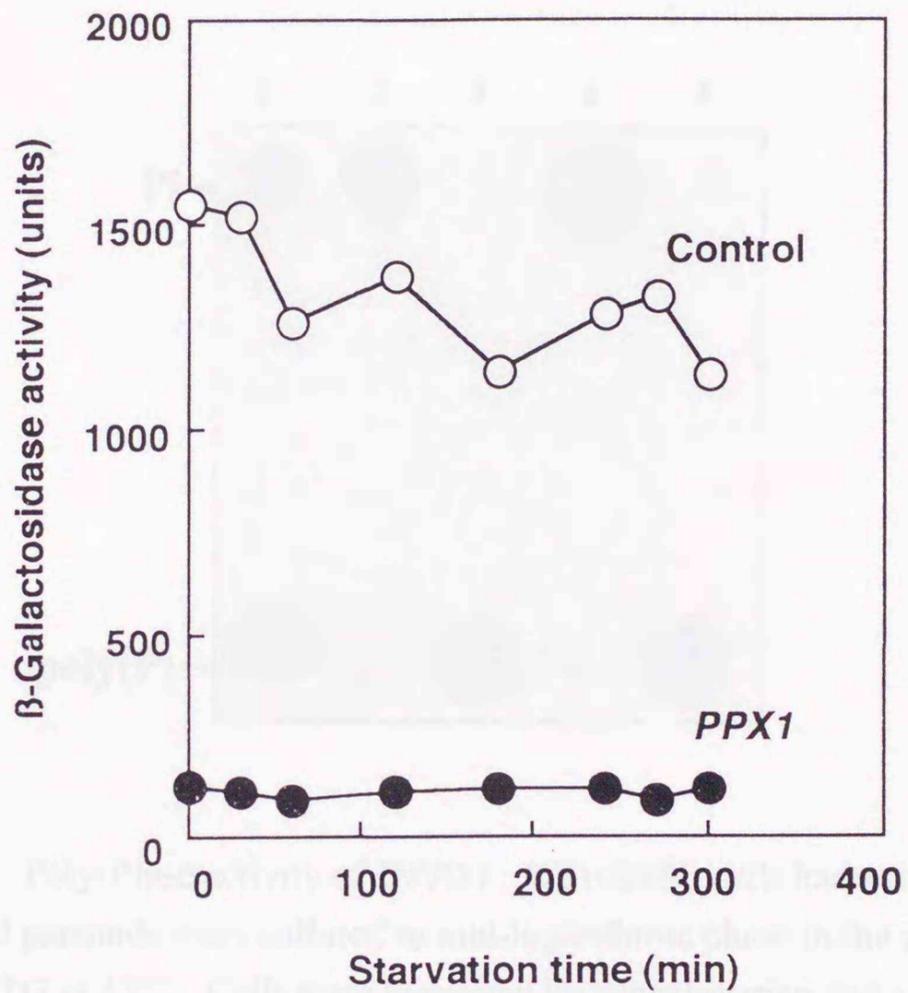


Fig. 2-7 Expression of the *fic-lacZ* transcriptional fusion by β -galactosidase activity. KT1008 cells harboring either plasmids with the *PPX1* gene (pSUPPX1) or the control vector (pSUHisB) were transformed again with pAL1 (carrying the *fic-lacZ* transcriptional fusion gene). Cells were starved in a MOPS minimal medium.

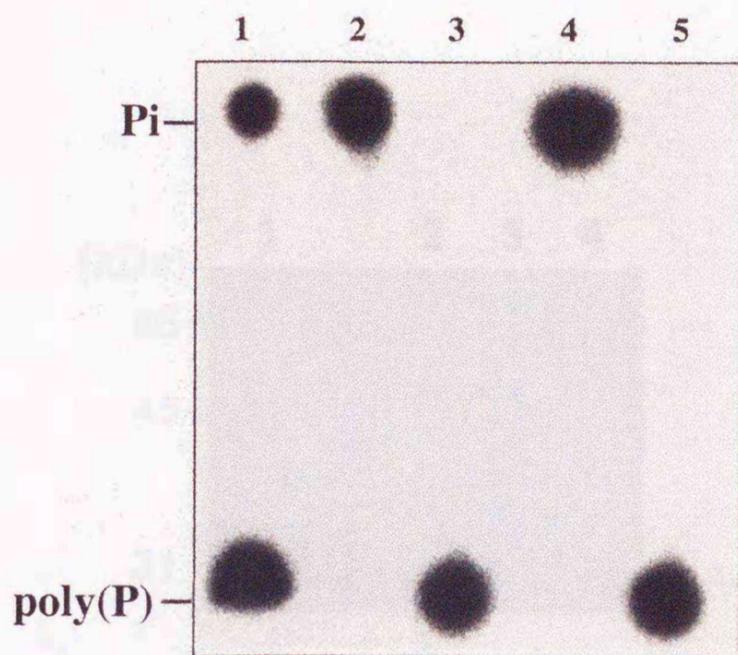


Fig. 2-8 Poly(P)ase activity of *DPPX1*. KT1008SL cells harboring the indicated plasmids were cultured to mid-logarithmic phase in the presence of 1mM IPTG at 37°C. Cells were harvested by centrifugation and sonicated, then centrifuged again. The resultant supernatant (crude extract) was collected, and the protein concentration was measured using a BIO-RAD protein assay kit (BIO-Rad). Aliquots of the crude extracts containing 1.9 µg of protein were incubated with [³²P]poly(P) at 37°C for 30 min. After the reaction [³²P]Pi and [³²P]poly(P) were separated by PEI-TLC plates. Lane 1, [³²P]poly(P) standard; lane 2, reaction containing purified scPPX1; lane 3, reaction containing KT1008SL/ pTrcHisB cell lysate; lane 4, reaction containing pTrcPPX1/KT1008SL/cell lysate; lane 5, reaction containing pTrcDPPX1/KT1008SL cell lysate.

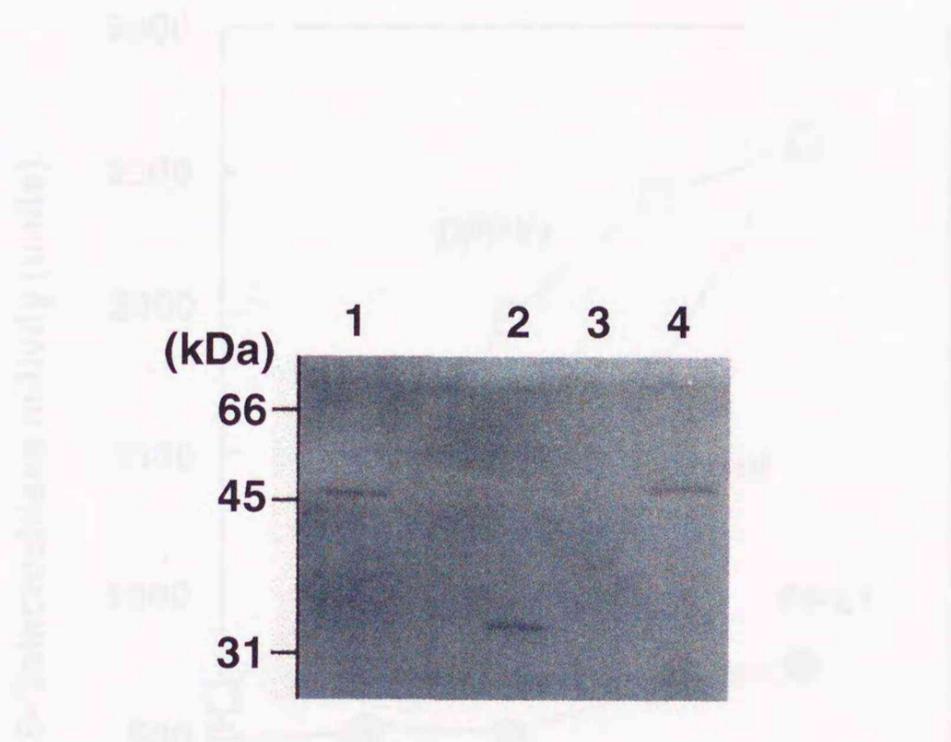


Fig. 2-9 Expression level of *PPX1* and *DPPX1*. KT1008SL cells harboring the indicated plasmids were cultured to mid-logarithmic phase in the presence of 1mM IPTG at 37°C. Aliquots of the crude extracts containing 8.5 µg of protein were separated by 12.5% SDS-PAGE and the proteins were visualized by Western blotting with the alkaline phosphatase conjugate Ni-NTA for detection of 6 × His-tagged proteins. Lane 1, purified PPX1; lane 2, pTrcDPPX1/KT1008 extract; lane 3, pTrcHisB/KT1008 extract; lane 4, pTrcPPX1/KT1008 extract.

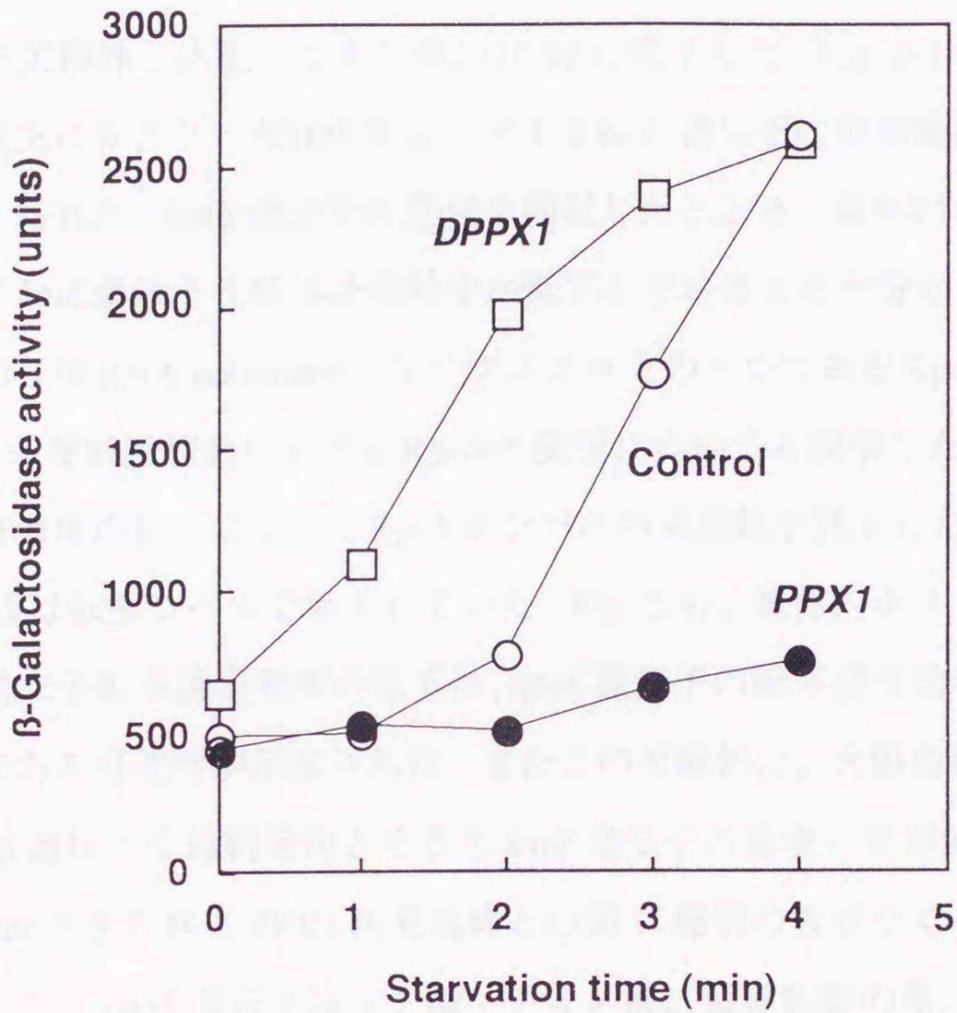


Fig. 2-10 Effect of overproduction of *DPPX1* on *rpoS* expression. KT1008SL cells harboring the indicated plasmids were cultured to mid-logarithmic phase in the presence of 1mM IPTG at 37°C. *rpoS-lacZ* expression was monitored in KT1008 cells harboring the following plasmids: pTrcPPX1 (closed circular symbols), pTrcHisB (open circular symbols), and pTrcDPPX1 (open square symbols).

2-4 結言

本章では、大腸菌におけるポリリン酸とストレス耐性の関係をより安定に観察するために大腸菌菌体内に活性の高い酵母ポリリン酸分解酵素をプラスミドによって高発現させることにより菌体内のポリリン酸濃度を極度に低下させる方法を試みた。その結果、*ppk*変異株の場合と同様にポリリン酸分解酵素高発現株では過酸化水素に対する耐性が大きく減少した。この感受性の向上は*katG* 遺伝子欠損株において顕著にみられ、*katE* 遺伝子欠損株と比較して生存率が1/100に低下した (Fig. 2-1)。この結果より、ポリリン酸は主にカタラーゼHPHIIをコードする*katE* 遺伝子の制御範囲に影響を及ぼしていると考えられた。*katE* 遺伝子の発現を観察したところ、菌体内ポリリン酸濃度の低下によって*katE* 遺伝子の転写誘導効率が低下していることが分かった (Fig. 2-2)。*katE* 遺伝子の転写はRNA polymeraseのサブユニットの一つであるRpoS (σ^{38}) に依存することから、栄養飢餓状態におけるRpoSの発現についても観察した。その結果、菌体内ポリリン酸濃度の低下によってRpoSタンパクの発現量が低下した (Fig. 2-3)。その際、RpoSの発現は転写レベルで低下していた (Fig. 2-4)。菌体内ポリリン酸濃度の低下による*katE* 遺伝子転写誘導効率の低下は、*rpoS* 遺伝子の転写誘導効率の低下による二次的なものである可能性が示唆された。またこの可能性は、大腸菌菌体内にプラスミドにより *rpoS* 遺伝子を過剰発現させると *katE* 遺伝子の発現が恒常的となり (Fig. 2-5)、control vector を含む株と PPX1 高発現株との間に発現の差がなくなることによっても裏付けられた。*rpoS* 遺伝子はリン酸、アミノ酸、窒素飢餓の際、あるいは stationary phase などの緊縮状態において蓄積する緊縮応答因子、グアノシンヌクレオチド (pppGpp 及び ppGpp) の存在がシグナルとなって発現する (Lange et al. 1995; Gentry et al. 1995)。そのため、ポリリン酸分解酵素高発現株における *rpoS* 遺伝子転写誘導効率の低下が、(p)ppGpp の蓄積が阻害されたことに起因する可能性も考えられる。しかしながら、本研究室における研究において、ポリリン酸分解酵素高発現株における菌体内(p)ppGpp 濃度に差がみられなかったことからその可能性は否定された (Shiba et al. 1997)。また、cAMP 濃度の上昇もみられなかった (Shiba et al. 1997)。ポリリン酸分解酵素高発現株の菌体内で *rpoS* 遺伝子を高発現させると、過酸化水素に対する耐性が回復した。この結果より、大腸菌菌体内にポリリン酸分解酵素を高発現させた際、あるいは *E. coli ppk* 変異株にみられる過酸化水素耐性の低下は菌体内ポリリン酸濃度が低

下したことによる *rpoS* 遺伝子転写効率の低下によるものである可能性が示唆された。ポリリン酸は直接的に *rpoS* 遺伝子の転写を制御していると同時に、stationary phase に特異的に発現する RpoS 依存性の遺伝子の発現をも間接的に制御していると考えられた。*katE* 遺伝子以外の RpoS 依存性遺伝子として *fic* 遺伝子の転写への影響を観察したところ、ポリリン酸分解酵素高発現株では *fic* 遺伝子転写量が恒常的に低下した (Fig. 2-7)。

菌体内へ酵素を高発現することが *rpoS* 遺伝子の転写誘導効率へ影響を及ぼしている可能性を考え、ポリリン酸分解酵素活性を持たない DPPX1 を菌体内に高発現させた際の *rpoS* 遺伝子の転写誘導を観察した。その結果、control と同レベルで *rpoS* 遺伝子の発現が誘導されていたことから、ポリリン酸分解酵素高発現株にみられる *rpoS* 遺伝子転写誘導効率の低下が確かにポリリン酸の影響であることを確認することができた。

本章により、ポリリン酸と大腸菌の過酸化水素耐性獲得の関係を明らかにすることができた。また、ポリリン酸による *rpoS* 遺伝子の転写制御因子としての働きを示すことができた。

2-5 参考文献

- Ahn, K. and Kornberg, A.** (1990) Polyphosphate Kinase from *Escherichia coli* *J. Biol. Chem.* 265: 11734-11739.
- Akiyama, M., Crooke, E. and Kornberg, A.** (1992) The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the ppk gene and membrane location of the protein. *J Biol Chem.* 267: 22556-61.
- Akiyama, M., Crooke, E. and Kornberg, A.** (1993) An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon. *J. Biol. Chem.* 5: 633-639.
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Brosius, J.** (1984) Toxicity of an overproduced foreign gene product in *Escherichia coli* and its use in plasmid vectors for the selection of transcription terminators. *Gene* 27: 161-172.
- Chandler, M. S.** (1991) New shuttle vectors for *Haemophilus influenzae* and *Escherichia coli*: P15A-derived plasmids replicate in *H.influenzae* Rd. *Plasmid* 25: 221-224.
- Crooke, E., Akiyama, M., Rao, N. N., and Kornberg, A.** (1994) Genetically altered levels of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 289: 6290-6295.
- Gentry, D. R., Hernandez, V. J., Nguyen, L. H., Jensen, D. B., and Cashel, M.** (1993) Synthesis of the stationary-phase sigma factor σ^S is positively regulated by ppGpp. *J.Bacteriol.* 175: 7982-7989.
- Hengge-Aronis, R.** (1993) Survival of hunger and stress: The role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E.coli*. *Cell* 72: 165-168.
- Kawamukai, M., Matsuda, H., Fujii, W., Utsumi, R. and Komano, T.** (1989) Nucleotide sequences of *fic* and *fic-1* genes involved in cell filamentation induced by cyclic AMP in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 171: 4525-4529.
- Lange, R., Fischer, D., and Hengge-Aronis, R.** (1995) Identification of transcriptional starts sites and the role of ppGpp in the ecpresion of *rpoS*, the structural gene for the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 177: 4676-4680.

Loewen, P.C. & Henнге-Aronis, R. (1994) The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu Rev Microbiol.* 1994;48:53-80. Review. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 53-80.

Mulvey, M. R., Sorby, P. A., Triggs-Raine, B. L. and Loewen, P.C. (1988) Cloning and physical characterization of *katE* and *katF* required for catalase HPII expression in *Escherichia coli*. *Gene.* 73: 337-345.

Mulvey, M. R., Switala, J., Borys, A. and Loewen, P. C. (1990) Regulation of transcription of *katE* and *katF* in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 172: 6713-6720.

Nyström, T. (1998) To be or not to be: the ultimate decision of the growth-arrested bacterial cell. *FEMS Microbiol. Reviews* 21: 283-290.

Rao, N. N., and Kornberg, A. (1996) Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 178: 1394-1400.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, New York.

Simons, R. W., Houman, F., and Kleckner, N. (1987) Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* 53: 85-5396.

Shiba, T., Tsutsumi, K., Yano, H., Ihara, Y., Kameda, A., Tanaka, K., Takahashi, H., Munekata, M., Rao, N.N., and Kornberg, A. (1997) Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11210-11215.

Shiba, T., Tsutsumi, K., Ishige, K. and Noguchi, T. (2000) Inorganic polyphosphate and polyphosphate kinase: their novel biological functions and applications. *Biochemistry (Mosc)* 65: 315-323.

Stoker, N.G., Faiweather, N.F. and Spratt, B.G. (1982) Versatile low-copy-number plasmid vectors for cloning in *Escherichia coli*. *Gene* 18: 335-341.

Takayanagi, Y., Tanaka, K. and Takahashi, H. (1994) Structure of the 5' upstream region and the regulation of the *rpoS* gene of *Escherichia coli*. *Mol.Gen.Genet.* 243: 525-531.

Tanaka, K., Takayanagi, Y., Fujita, N., Ishihama, A. and Takahashi, H. (1993) Heterogeneity of the principal sigma factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, sigma 38, is a second principal sigma factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3511-3515.

Tanaka, K., Handel, K., Loewen, P. C., and Takahashi, H. (1997) Identification and analysis of the *rpoS*-dependent promoter of *katE*, encoding catalase HPII in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta*. 1352: 161-166.

Wurst, H., Shiba, T., and Kornberg, A. (1995) The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177: 898-906.

村松正実 (1997) 分子細胞生物学辞典, 東京化学同人

西方敬人, 中山広樹 (1997) バイオ実験イラストレイテッド第1-5巻, 秀潤社

第3章 SOS 遺伝子群の発現におけるポリリン酸の影響

3-1 緒言

前章では、*ppk* 欠損株が過酸化水素、浸透圧ショック、熱ショックに対して高感受性となることに着目し (Rao and Kornberg 1996)、ポリリン酸と大腸菌ストレス耐性の関係を考察してきた。その結果、菌体内にポリリン酸リン酸化酵素を高発現させることにより菌体内のポリリン酸濃度を低下させると、ストレス応答遺伝子の一つである *rpoS* 遺伝子の転写誘導効率が低下することが確認された。またこの際、緊縮応答因子 (p)ppGpp 濃度への影響は観察されなかったことから (Shiba et al 1997)、ポリリン酸がストレス応答遺伝子の転写を制御している可能性が示唆された。

本章では、ポリリン酸が *rpoS* 遺伝子以外のストレス応答遺伝子の転写制御因子としても働いている可能性を考え、SOS 遺伝子群の転写への影響に着目した。SOS 遺伝子群は UV や DNA 損傷試薬によって DNA が損傷した際に発現する遺伝子群であり (Walker 1984)、*umuDC* 及び *recA* 遺伝子はその中の代表的な遺伝子の一つである。特に、*recA* 遺伝子産物である RecA の活性型は SOS 遺伝子群のレプレッサーである LexA を壊裂する働きを有することから *recA* 遺伝子は SOS 遺伝子群の中でも特に重要な遺伝子である。本章では、DNA 損傷試薬である mitomycin C (MMC) 及び UV で大腸菌を処理し、その際の生存率をポリリン酸分解酵素高発現株 (*PPXI*) 及び control vector を含む株の両者で比較した。また、ポリリン酸が SOS 遺伝子群の転写誘導効率へ及ぼす影響を観察するために、*recA* 遺伝子及び *umuDC* 遺伝子の転写量を β -galactosidase assay 及び RT-PCR 法により観察した。また、菌体内へのポリリン酸リン酸化酵素の発現誘導が *recA* 遺伝子の転写誘導へ及ぼす影響についても検討した。更に本章では、ポリリン酸がストレス応答遺伝子のみならず全ての遺伝子の転写に関与している可能性を考え、*lacZ* 遺伝子転写誘導に対するポリリン酸の影響についても検討した。

本章では、ポリリン酸による SOS 応答遺伝子群及び *lacZ* 遺伝子の転写制御に関して観察することでポリリン酸による遺伝子転写制御の特異性を検討することを目的として研究を行った。

3-2 実験方法

3-2-1 使用した菌株及びプラスミド

本章で使用した大腸菌株を Table 3-1 に、使用したプラスミドを Table 3-2 に示した。

KT1071 株は GW2730 の *lexA::Tn5* を KT1008 株に transduction することにより作製した。

pRSRecA は以下の通り構築した。プラスミド pTM2 (Horii et al. 1980) 0.1 μ g を鋳型として *E. coli recA* promoter 領域 -179 ~ 109 (Sancar et al. 1980) を PCR 法 (94 °C for 45 sec, at 58 °C for 30 sec, and at 72 °C for 90 sec) により増幅した。増幅プライマーには P0 (5'-AAGAATTCGTCGGCACCGTCTGGTTTGC-3') 及び P1 (5'-AAGGATCCGTTTCTCAATCTGGCCCAGT-3') を使用した。増幅 DNA 断片を *EcoRI* 及び *BamHI* で消化し pRS551 (Simons et al. 1987) の *EcoRI-BamHI* 消化部位に導入した。

プラスミド pMWPPK は以下の通り構築した。プラスミド pTrcPPK (Ishige et al. 1998) を *Sph I* で消化し、得られた *E. coli ppk* 断片をプラスミド pMW119 (Bernardi and Bernardi 1984) *Sph I* 消化部位に挿入した。

3-2-2 使用した培地及び試薬

通常の培養は Luria-Bertani (LB) 培地 (DIFCO) (Sambrook et al. 1989) を使用した。Davis 最小 buffer (Kato et al. 1980) は 40 mM K_2HPO_4 、15 mM KH_2PO_4 、7.5 mM $(NH_4)_2SO_4$ 、2 mM Na-citrate、0.8 mM $MgSO_4$ を添加したものを使用した。MOPS 最小培地 (Sambrook et al. 1989) は、20 mM glucose、1 mM K_2HPO_4 、0.1 % casamino acid を添加したものを使用した。抗 UmuD 血清は大阪大学岩崎氏の御好意により分与して戴いたものを使用した。DNA の修飾酵素は Takara Shuzo (Kyoto) の試薬を使用した。

3-2-3 MMC 感受性及び UV 感受性試験法

MMC 感受性試験は以下の通り行った。LB 培地で early-log phase まで培養した大腸菌株に 0.2 μ g/ml MMC 及び 1 mM IPTG を添加し、その後更に 37 °C で 1 hr 振とう培養した。集菌後 Davis 最小 buffer で wash し、その後再び Davis 最小 buffer に懸濁した。各濃度の MMC を添加し 4 °C で incubation した。各時間毎にサンプリング後直ちに 0.15 M NaCl によって 10^{-1} から 10^{-7} 倍に希釈した。希釈した菌液を LB プレート

に播種した。37℃で一晩 incubation した後コロニー数をカウントし、処理時間 0 min のものを 100% として生存率を計算した。

UV 感受性試験は以下の通り行った。LB 培地で early-log phase まで培養した大腸菌株を 0.15 M NaCl によって約 2×10^4 cells/ml となるように希釈して LB プレートに播種した。これにクリーンベンチの UV 灯を各時間照射した後 37℃で 24 hr incubation した。生じたコロニー数をカウントし、処理時間 0 min のものを 100% として生存率を計算した。

3-2-4 *recA* mRNA 量の定量法

RT-PCR は以下の通り行った。各サンプルの Total RNA を Promega SV Total RNA Isolation System (Promega) により調製した。逆転写反応は「逆転一発」(TOYOBO) を用いて 60℃で 60 min 行った。*recA* 遺伝子の promoter 領域 93 bp の増幅には、PRE1 (5'-AACTGCAGCCGGTATTACCCGGCA-3') 及び PRE2 (5'-AAGGATCCGTTTCTCAATCTGGCCCAGT-3') の二つの特異的プライマーを使用した。PCR 法による増幅は 94℃× 60 sec → 56℃× 90 sec の条件で行い、10、15、20、25 サイクル毎にサンプリングした。内分標準としては 16S rRNA を使用し、二つの特異的プライマー PRN1 (5'-GCCTCTTGCCATCGGATGTG-3') 及び PRN2 (5'-CTTCGCCACCGGTATTCCTC-3') は *recA* 遺伝子増幅用と同一反応液に混合した。増幅した DNA は 6% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後画像解析ソフト (NIH image) によって増幅 DNA 濃度を定量化した。*recA* mRNA 量は 16S rRNA 基準とした相対値として計算した。

3-2-5 菌体内 ポリリン酸の定量法

Early-log phase まで LB 培地で培養した大腸菌を MOPS 最小培地 (Sambrook et al 1989) に培地交換し、その際に 7.4×10^7 Bq の $[^{32}\text{P}]$ orthophosphate を添加し 37℃で 1 hr 振とう培養した。1 mM IPTG 及び 2 µg/ml MMC を添加することで *PPX1* 及び SOS 応答遺伝子群の発現を誘導した。時間毎に採取して集菌した。菌体内ポリリン酸は Glassmilk (BIO101) を使用して調製した (Ault-Riché et al. 1998)。調製したポリリン酸は精製された 37.8 units の *PPX1* (Wurst and Kornberg 1994) で処理することにより Pi に分解し、ポリリン酸であることを薄層クロマトグラフィーにより確認した。

PPX1 による処理条件及び薄層クロマトグラフィーの展開及び検出条件は第2章実験方法と同様の方法で行った。

3-2-6 その他の操作方法について

タンパク濃度は BIO-RAD protein assay kit を用いた Bradford 法により測定した (Bradford 1976)。 β -galactosidase assay 法は第2章実験方法に記した方法で行った。SDS-PAGE、western blotting、DNA 操作に関しては Molecular Cloning (Sambrook et al. 1989) 及び「バイオ実験 イラストレイテッド」(西方, 中山 1997) を参考にした。

3-2-7 装置

分光光度計：HITACHI 「U2001 形ダブルビーム分光光度形」

PCR 装置：PE Applied Biosystems 「GeneAmp PCR System 9700」

Radio-image analyzer：FUJIX 「BAS2000」

3-3 結果及び考察

3-3-1 MMC 及び UV 感受性試験

大腸菌 MMC 耐性及び UV 耐性に対するポリリン酸の影響を観察した。本章においても、菌体内のポリリン酸濃度を低下させる方法として菌体内にポリリン酸分解酵素 *PPX1* を高発現させる方法を用いた。大腸菌 KT1008 株にプラスミド *pLGPPX1* または control vector *pLGHisB* を導入し、この MMC 及び UV 感受性を観察した。両感受性試験は実験方法に記載した方法により行った。その結果、MMC 未処理のサンプルではほとんど生存率は変化しなかったにも関わらず、5 μ g/ml MMC 処理後の *PPX1* における生存率は 30 min で vector control の約 1/40 倍となった (Fig. 3-1A)。また、UV 感受性についても同様に *PPX1* における生存率が control と比較して減少したことから (Fig. 3-1B)、本実験により菌体内のポリリン酸の濃度が低下すると MMC または UV に対する耐性が低下することがわかった。

次に、この結果が確かに菌体内ポリリン酸濃度の低下によるものであることを確認するために、ポリリン酸分解酵素高発現株に更にプラスミド *pTrcPPK* を導入することによって菌体内にポリリン酸リン酸化酵素を高発現させた際の MMC 及び UV 感

受性について観察した。その結果、菌体内にポリリン酸分解酵素を高発現させることで減少した MMC 及び UV に対する耐性が、ポリリン酸リン酸化酵素を高発現させることによって回復していることを確認することができた (Table 3-3)。特に、UV 感受性に関してはポリリン酸リン酸化酵素の高発現によって生存率がほぼ 100% にまで回復した。この結果より、MMC 及び UV に対する耐性獲得にポリリン酸が重要な役割を果たしていることが示唆された。

3-3-2 *recA* 遺伝子転写に及ぼすポリリン酸の影響

前章においてポリリン酸が *rpoS* 遺伝子の転写を制御している可能性が示唆された (Shiba et al. 1997)。また、Fig. 3-1A 及び Fig. 3-1B、Table 3-3 によってポリリン酸と MMC 及び UV 耐性の関係が示唆された。これらの結果より、MMC 及び UV 耐性獲得とポリリン酸による遺伝子転写制御の関連性が考えられる。SOS 修復は、大腸菌が MMC や UV にさらされた際の DNA 修復機構でありまた大腸菌の救出機構である。ここではポリリン酸がこの SOS 修復において重要な役割を果たす遺伝子である *recA* 遺伝子の転写誘導効率へ及ぼす影響について観察した。本実験では、*recA-lacZ* 転写 fusion 遺伝子を導入した KT1008 株に pLGPPX1 または pLGHisB を導入し、これらを early-log phase ($OD_{600} = 0.2$) まで培養した後 2 $\mu\text{g/ml}$ MMC を添加することで *recA* 遺伝子の転写を誘導した。転写量は β -galactosidase assay により測定した。その結果、control では MMC 添加後 50 min で約 3 倍まで転写量が増加したのに対して PPX1 ではほとんど転写誘導がみられなかった (Fig. 3-2)。この結果よりポリリン酸が *recA* 遺伝子の転写を制御している可能性が示唆された。

このことを更に確認するために、ポリリン酸と *recA* 遺伝子転写誘導の関係を *recA* mRNA レベルで測定した。*recA* mRNA 量は RT-PCR 法により測定した。本実験では更に、菌体内にポリリン酸リン酸化酵素を高発現させた際の *recA* mRNA 量も合わせて測定するために KT1008 株に pLGPPX または pLGHisB を導入したものに更に pTrcPPK または pTrcHisB を導入した株を使用した。各株を early-log phase ($OD_{600} = 0.2$) まで培養した後 2 $\mu\text{g/ml}$ MMC を添加後 3 hr 培養した。これらより total RNA を調製した後本章実験方法に記載した方法により RT-PCR を行った。その結果を Fig. 3-3 に示した。Fig. 3-3A に示す様に、PCR 増幅サイクルが 15 の際が DNA の増幅が飽

和しておらず、定量に最も適していると考え、電気泳動写真の増幅サイクル15のバンドを解析ソフト NIH image を用いて解析し、その結果を Fig. 3-3B に示した。その結果、*PPXI* では β -galactosidase assay による結果同様に *recA* 遺伝子の mRNA 量が vector control を含む株と比較して少ないことが分かった。また、菌体内にポリリン酸リン酸化酵素を高発現させると *recA* mRNA 量が増加することを確認することができた。これは、*PPXI* 株にポリリン酸リン酸化酵素を高発現させた場合も同様であり、Table 3-2 で観察されたポリリン酸リン酸化酵素の導入による MMC 及び UV 耐性の回復が、*recA* mRNA 量の増加によるものであることを確認することができた。また、実際にこの株における蓄積ポリリン酸濃度を測定した結果を Fig. 3-5 に示した。これより、control では MMC 処理後 50 min で菌体内のポリリン酸濃度が上昇しているのに対して、*PPXI* では確かに菌体内のポリリン酸濃度は検出限界以下に留まっていることを確認出来た。また、両株ともポリリン酸リン酸化酵素の導入によって菌体内に数十 nmol/mg protein ものポリリン酸を蓄積していることを確認することができた (Fig. 3-4)。この結果より、ポリリン酸リン酸化酵素導入による MMC または UV 耐性の向上及び *recA* mRNA 量の増加が確かに菌体内ポリリン酸濃度に依存していることを確認することができた。

3-3-3 *umuDC* 遺伝子の転写に及ぼすポリリン酸の影響

以上の結果より、ポリリン酸が SOS 遺伝子群の発現を制御している可能性が示唆されたことから、次にポリリン酸が SOS 応答遺伝子の一つである *umuDC* 遺伝子の転写誘導に及ぼす影響を観察した。本実験では、KT1008 株に *umuC-lacZ* fusion 遺伝子を持つプラスミド pSKMF10 (Shinagawa 1983) を導入したものに更にポリリン酸分解酵素の高発現プラスミド pSUPPX1 (Shiba et al. 1997) または control vector プラスミド pSUHisB (Shiba et al. 1997) を導入した株を使用した。これら両株を early-log phase ($OD_{600} = 0.2$) まで培養した後 2 μ g/ml MMC を添加して *umuC* の転写を誘導した。その結果、control vector では転写誘導後 3 hr で 50 倍まで転写量が増加しているのに対し、*PPXI* では control と比較して約 1/9 程度の転写誘導がみられたのみだった (Fig. 3-5)。本実験により、ポリリン酸が広く SOS 応答遺伝子群の発現を制御している可能性が示唆されたことから、ポリリン酸分解酵素の高発現による MMC 及び UV 感受性の向

上が菌体内ポリリン酸濃度の減少によって SOS 遺伝子群の発現が円滑に行われなかったためと考えられた。

3-3-4 RecA 活性化に及ぼすポリリン酸の影響

SOS 遺伝子群の発現は、RecA タンパクが活性化されて SOS regulon のレプレッサーである LexA が解離されることによって誘導される。よって、もしポリリン酸が RecA の活性化に影響を及ぼしているとする当然 SOS 遺伝子群の発現は誘導されないことになる。そこで、UmuD の壊裂を観察することよりポリリン酸分解酵素高発現下における RecA の活性化を観察した。本実験では、*trc* promoter の下流に *umuD* 遺伝子の構造遺伝子をもつプラスミド pTrcUmu を KT1008 株に導入し、これに更にポリリン酸分解酵素高発現プラスミド pLGPPX1 またはその control vector pLGHisB を導入した株を使用した。両株を early-log phase ($OD_{600} = 0.2$) まで培養した後に 1 mM IPTG 及び 2 $\mu\text{g/ml}$ MMC を添加して PPX1 及び UmuD の発現を誘導した。UmuD の解裂 (UmuD*) は western blotting によって観察した。

その結果 Fig. 3-6 に示す通り PPX1 高発現株における UmuD の解裂は control vector と同程度であった。このことより、ポリリン酸は RecA の活性化には影響を及ぼさず、UmuD の解裂もしくは LexA の解裂には関与していないと考えられた。

3-3-5 *lexA* 欠損株における *umuDC* 転写誘導効率への影響

次に *lexA* 遺伝子欠損株の菌体内にポリリン酸分解酵素を高発現させた際の *umuDC* 遺伝子の転写を観察した。*lexA* 欠損株では SOS 遺伝子群のレプレッサーである LexA が欠損しているため SOS 遺伝子群の転写が常に誘導されていると考えられる。本実験では KT1008 の *lexA* 遺伝子欠損株 KT1071 に *umuC-lacZ* 転写 fusion 遺伝子をもつプラスミド pSKMF10 を導入し、これに更に pSUPPX または pSUHisB を導入した株を用いた。両株を early-log phase まで培養し 2 $\mu\text{g/ml}$ MMC を添加することで SOS 応答遺伝子群の発現を誘導したところ、両株とも恒常的な *umuDC* 遺伝子の転写が観察された (Fig. 3-7)。

3-3-6 PPK 発現による *recA* 遺伝子転写誘導効率への影響

ポリリン酸が *recA* 遺伝子の転写を制御していることの更なる確認のために、*recA* 遺伝子の転写が、MMC や UV 等の DNA 損傷あるいは RecA による LexA の解裂がなくてもポリリン酸によって誘導されるか否かを確認した。その確認には KT1008 株または、バックグラウンドの RecA の影響を除くために *recA* 欠損株である KT1009 株を使用した。KT1008 株または KT1009 株に *recA-lacZ* 転写 fusion 遺伝子をもつプラスミドを導入し、これに更にポリリン酸リン酸化酵素発現プラスミドである pMWPPK またはその control vector である pMW119 を導入した。両株を early-log phase ($OD_{600} = 0.2$) まで培養し、そこで 1 mM IPTG のみを添加して *ppk* 遺伝子の転写を誘導した。その結果、KT1008 株 (Fig. 3-8)、KT1009 株 (Fig. 3-9) とともに、MMC や UV の処理がなくても *ppk* 遺伝子の転写を誘導することで、*recA* 遺伝子の転写を 150 min で 1.5 倍にまで誘導することができた。すなわち、菌体内におけるポリリン酸の濃度上昇が *recA* 遺伝子の転写を誘導したと考えることができた。*recA* 欠損株においてもこのことを確認することができたことから、菌体内ポリリン酸の蓄積と *recA* 遺伝子の転写誘導の密接な関係を示すことができた。

3-3-7 ポリリン酸による大腸菌遺伝子転写制御の特異性についての検討

これまでの実験により、*rpoS* 遺伝子の転写や *recA* 遺伝子の転写など、ポリリン酸の遺伝子転写制御因子としての可能性を更に明らかにすることができた (Shiba et al. 1997; Tsutsumi et al. 2000)。本実験では、ポリリン酸による遺伝子転写制御が非特異的なものである可能性を考え、大腸菌において通常時に発現する遺伝子である *lacZ* 遺伝子の転写への影響を観察した。本実験では、まず、*lacUV5-lacZ* 転写 fusion 遺伝子を用いて *lacUV5* の遺伝子の転写量を β -galactosidase assay により観察した。KT1008 株に *lacUV5-lacZ* 転写 fusion 遺伝子をコードするプラスミド (pUR290) を導入し、それにさらにポリリン酸分解酵素高発現プラスミド (pSUPPX1) または control vector (pSUHisB) を導入した株を early-log phase まで培養し、そこで IPTG を添加することで PPX1 の発現を誘導した。その結果、Fig. 3-10 に示すように両転写量の間にはほとんど差はみられなかった。また次に、野生株 MG1655 (Hengge-Aronis1993) にポリリン酸リン酸化酵素 (PPK) 高発現プラスミド pBC29 または control vector

pUC18 を導入し、その *lacZ* の転写誘導を IPTG 存在下及び非存在下において観察した。転写量は β -galactosidase assay により測定した。その結果、PPK 高発現株と control の間に *lacZ* 遺伝子転写量の差は確認されなかった (Fig. 3-11)。以上、Fig. 3-10 及び Fig. 3-11 の結果より、大腸菌におけるポリリン酸の遺伝子転写制御が非特異的なものではなく、*rpoS* 遺伝子や *recA* 遺伝子あるいはその他のストレス応答性遺伝子などに働く特異的なものである可能性が示唆された。

Table 3-1. Bacterial strains

Strain	Relevant Makers	Source or references
KT1008	F-, Δ(<i>arg-lac</i>)U169, <i>araD139</i> , <i>rpsL150</i> , <i>ptsF25</i> , <i>flbB5301</i> , <i>rpsR</i> , <i>deoC</i>	Tanaka et al. (1997)
GW2730	<i>recA441</i> , <i>lexA71</i> ::Tn5, <i>sulA</i>	Marsh et al. (1985)
KT1071	As KT1008 but <i>lexA71</i> ::Tn5	This study
KT1008SL	As KT1008 but λRS45: <i>rpoS-lacZ</i>	Shiba et al. (1997)
KT1009	As KT1008 but <i>recA-srIR</i> ::Tn10	This study
MG1655	λF ⁻ : prototroph	Kuroda et al. (1997)

Table 3-2. Plasmids

Plasmid	Characteristics	Source of references
pTrcHisB	Expression vector of His-tagged protein with <i>lacI^h</i> gene and <i>trc</i> promoter (Invitrogen)	Brosius (1984)
pTrcPPX1	pTrcHisB derivative carrying <i>PPX1</i> gene	Wurst et al. (1995)
pLGHisB	Expression vector of His-tagged protein with <i>lacI^h</i> gene and <i>trc</i> promoter derived from pSC105	Shiba et al. (1997)
pLGPPX1	pLGHisB derivative carrying <i>PPX1</i> gene	Shiba et al. (1997)
pSUHisB	Expression vector of His-tagged protein with <i>lacI^h</i> gene and <i>trc</i> promoter derived from pACYC184	Shiba et al. (1997)
pSUPPX1	pSUHisB derivative carrying <i>PPX1</i> gene	Shiba et al. (1997)
pTrc99A	Expression vector with <i>lacI^h</i> gene and <i>trc</i> promoter (Amersham Pharmacia)	Yanisch-Perron et al. (1985)
pTrcPPK	pTrc99A derivative carrying <i>ppk</i> gene	Ishige et al. (1998)
pUR290	pBR322 derivative carrying <i>lacUV5-lacZ</i> fusion gene	Rüther et al. (1983)
pSKMF10	pMF3 derivative carrying <i>umuC-lacZ</i> fusion gene	Shinagawa et al. (1983)
pTrcUmu	pTrc99A derivative carrying <i>umu</i> gene	H.Iwasaki (Osaka Univ.)
pTM2	pBR322 derivative carrying the complete gene of <i>recA</i>	Horii et al. (1980)
pRSRecA	pRS551 derivative carrying <i>recA</i> promoter	This study
pMW119	Cloning vector derived from pSC101	Bernardi and Bernardi (1984)
pMWPPK	pMW119 derivative carrying <i>ppk</i> gene	This study
pBC29	pUC18 derivative carrying <i>ppk</i> gene	Akiyama et al. (1993)

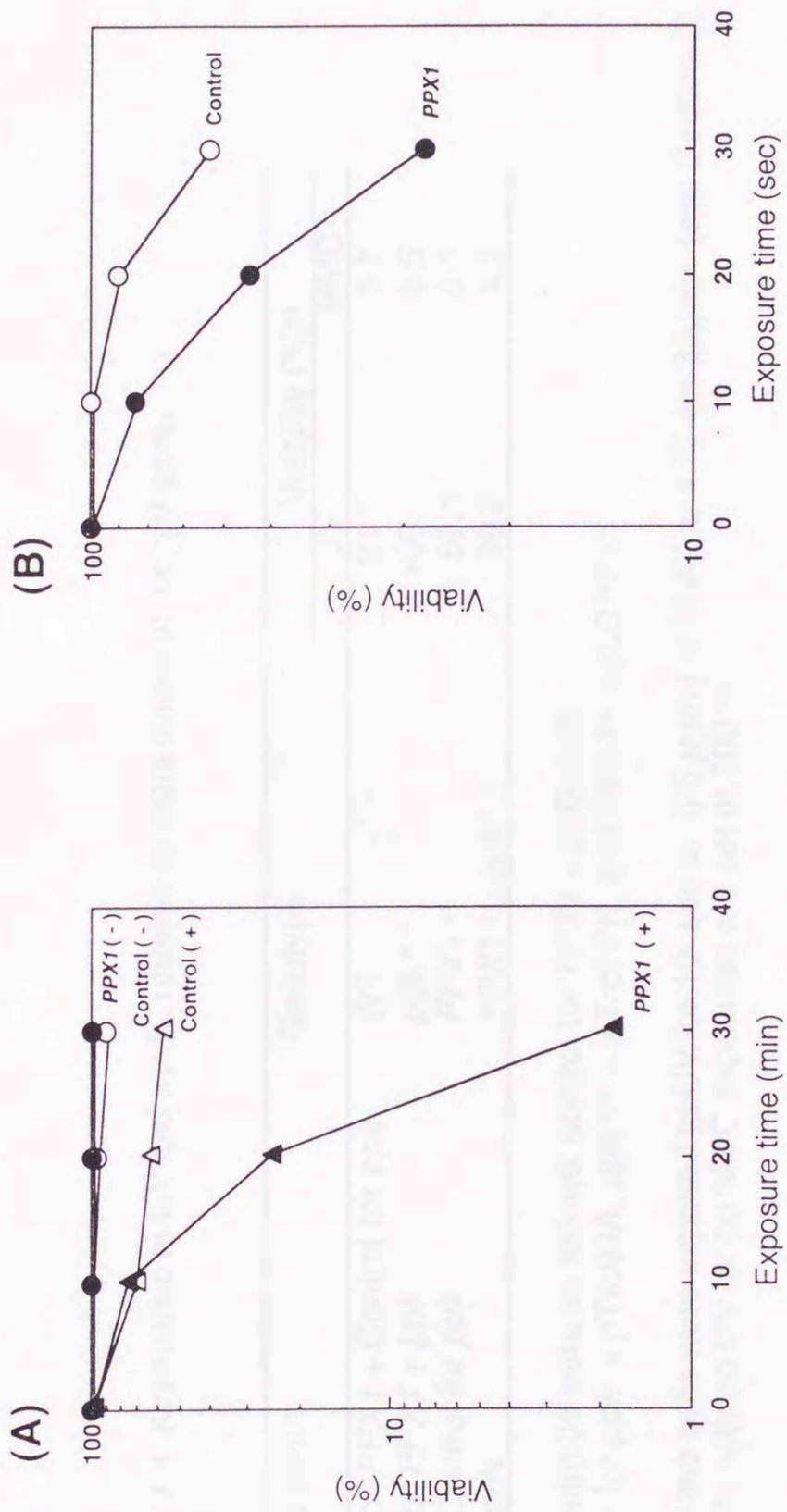


Fig. 3-1 Effects of exopoly(P)ase overproduction on (A) MMC and (B) UV sensitivity. KT1008 cells harboring either the plasmid with the *PDX1* gene (pLGPPX1) (closed symbols) or the control vector (pLGHISB) (open symbols) were treated with (A) 5 μ g/ml of MMC (triangles, also indicated as +), or without MMC (circles, also indicated as -) or (B) UV. Viability with no UV or no MMC exposures are set at 100 %.

Table 3-3 Resistance to UV and MMC restored by extra copies of the *ppk* gene.

Vectors ^a	Genotype	Viability (%) ^b	
		UV	MMC
Control for <i>PPX1</i> + Control for <i>ppk</i>	WT	81.5	5.7
Control for <i>PPX1</i> + <i>ppk</i>	<i>ppk</i> ⁺⁺	100	5.5
<i>PPX1</i> + Control for <i>ppk</i>	<i>PPX1</i> ⁺	50.1	0.3
<i>PPX1</i> + <i>ppk</i>	<i>PPX1</i> ⁺ , <i>ppk</i> ⁺⁺	98.9	4.3

^a The plasmids were as follows: control for *PPX1* = pLGHisB, control for *ppk* = pTrc99A, *ppk*⁺⁺ = pTrcPPK, and *PPX1*⁺ = pLGPPX1

^b Log-phase cells were exposed to UV for 10 sec or 0.5 μg/ml of MMC at 4 °C for 30 min. (see Section 2). Viability with no UV or no MMC exposures are set at 100 %.

Superscripts + and ++ indicate overexpression of genes that were carried in a low-copy-number plasmid and a high-copy-number plasmid, respectively.

(A)

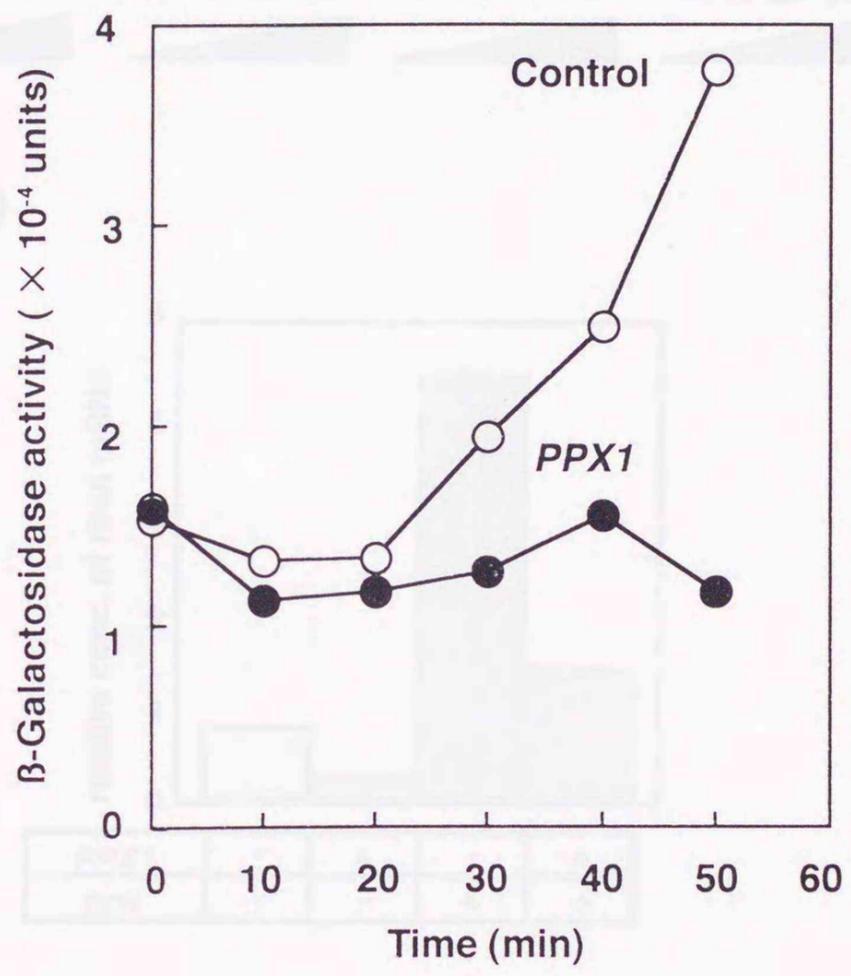
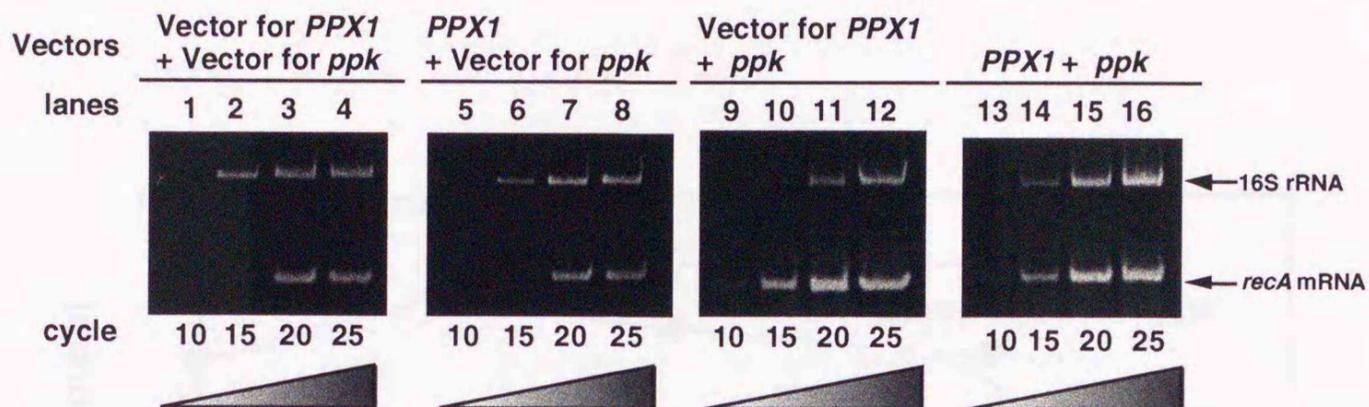


Fig. 3-2 Effect of poly(P) on induction of *recA* expression. KT1008 cells harboring the plasmid with *recA-lacZ* fusion gene (pRSRecA) plus either a plasmid with the *PPX1* gene (pLGPPX1) (closed symbols) or the control vector (pLGHisB) (open symbols) were exposed to 2 μ g/ml of MMC in the presence of 1 mM IPTG at 37°C.

(A)



(B)

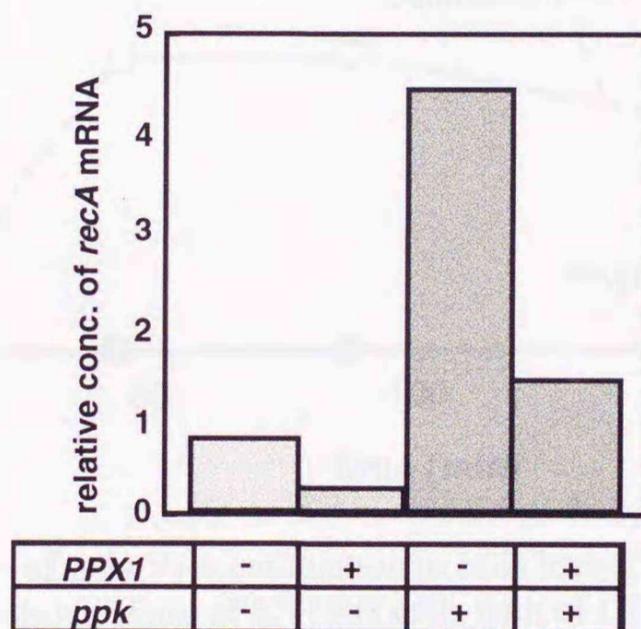


Fig. 3-3 Cellular levels of *recA* mRNA in the presence or absence of poly(P). (A) Quantitative PCR of *recA* mRNA. KT1008 cells with pLGHisB and pTrc99A (vector for *PPX1* + vector for *ppk*), pLGHisB and pTrcPPK (vector for *PPX1* + *ppk*), pLGPPX1 and pTrc99A (*PPX1* + vector for *ppk*), or pLGPPX1 and pTrcPPK (*PPX1* + *ppk*) were incubated with 1 mM IPTG at 37 °C for 3 hours. Total RNA was purified from cells, and RT-PCR was performed (see Methods). The amplified DNA bands were visualized by ethidium bromide staining after 6 % polyacrylamide gel electrophoresis. (B) Relative amount of *recA* mRNA. DNA bands at 15 cycles of PCR amplification (lanes 2, 6, 10 and 14) were quantified using image-analyzing software (NIH-image), and the relative amount of *recA* mRNA was calculated by comparison with the amount of 16S rRNA as an internal control.

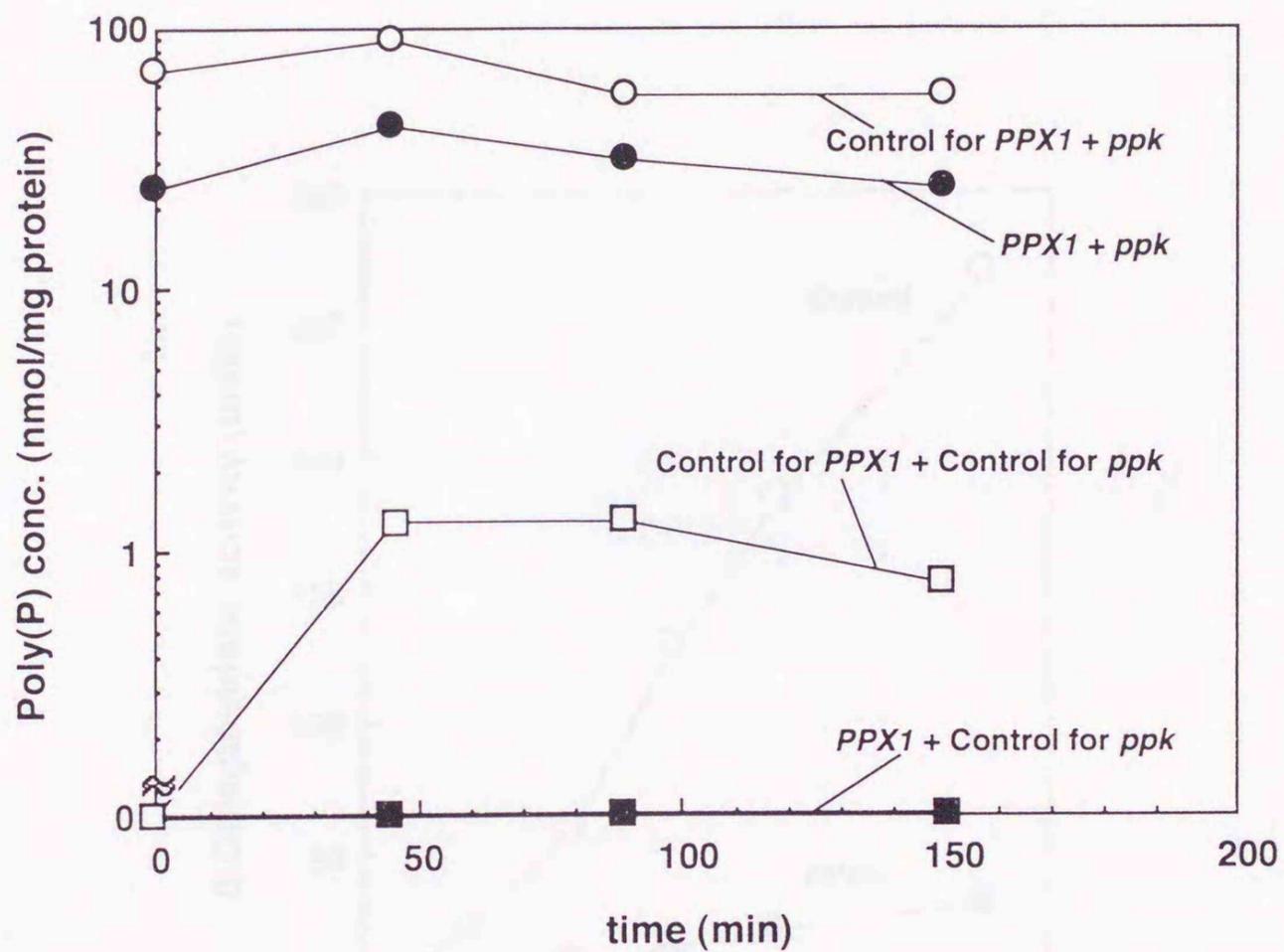


Fig. 3-4 Recovery of poly(P) accumulation in cells harboring the plasmid with the *PPK*. Early-logarithmic phase of KT1008 cells with pLGHisB and pTrc99A (open square symbols), pLGHisB and pTrcPPK (open circle symbols), pLGPPX1 and pTrc99A (closed square symbols), and pLGPPX1 and pTrcPPK (closed circle symbols) were labeled with 1.85 MBq/ml of [32 P]orthophosphate for 1 hour in MOPS minimal medium, and IPTG (1 mM) and MMC (2 μ g/ml) were added. Cells were harvested at the times indicated, and poly(P) was extracted from each sample by using glassmilk (see Materials and methods).

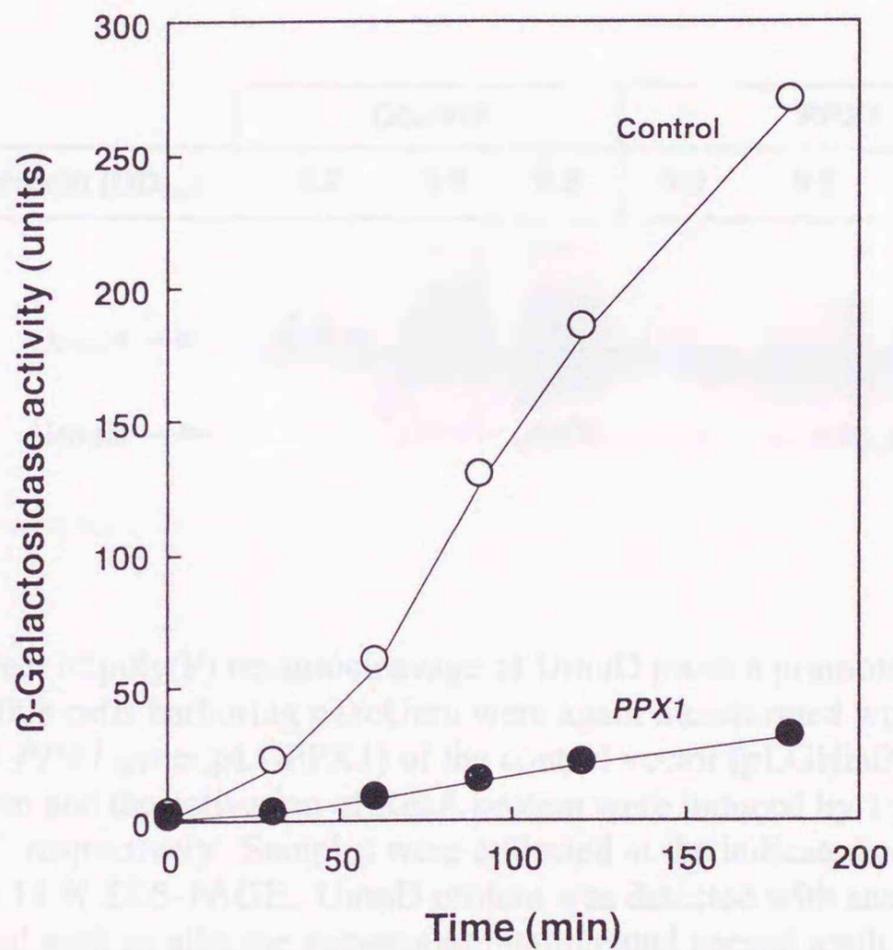


Fig. 3-5 Effect of poly(P) on induction of *umuDC* expression. KT1008 cells harboring the plasmid with the *umuC-lacZ* fusion gene (pSKMF10) and either the plasmid with the *PPX1* gene (pSUPPX1) (closed symbols) or the control vector (pSUHisB) (open symbols) were exposed to 2 $\mu\text{g/ml}$ of MMC in the presence of 1 mM IPTG at 37 $^{\circ}\text{C}$.

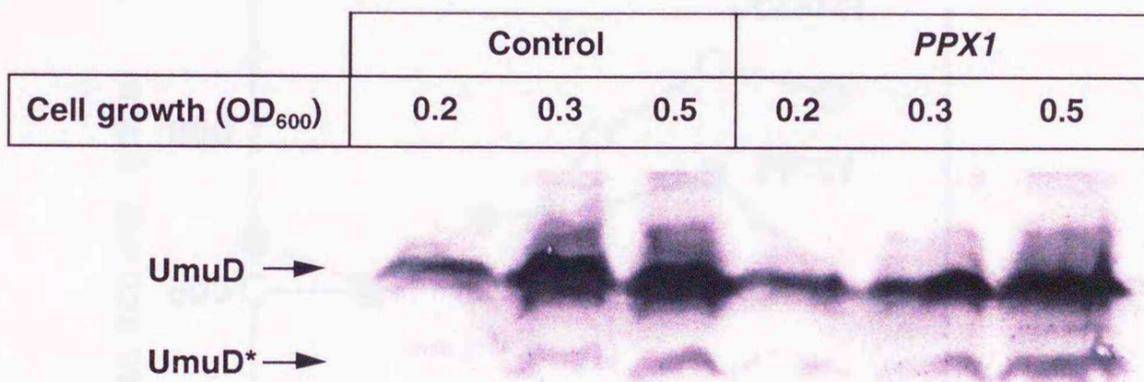


Fig. 3-6 Effect of poly(P) on autocleavage of UmuD protein promoted by activated RecA. KT1008 cells harboring pTrcUmu were again transformed with either a plasmid with the *PPX1* gene (pLGPPX1) or the control vector (pLGHisB). Production of UmuD protein and the activation of RecA protein were induced by 1 mM IPTG and 2 μ g/ml MMC, respectively. Samples were collected at the indicated cell density and applied onto 14 % SDS-PAGE. UmuD protein was detected with anti-UmuD serum and visualized with an alkaline phosphatase-conjugated second antibody. Cleaved UmuD protein is indicated as UmuD*.

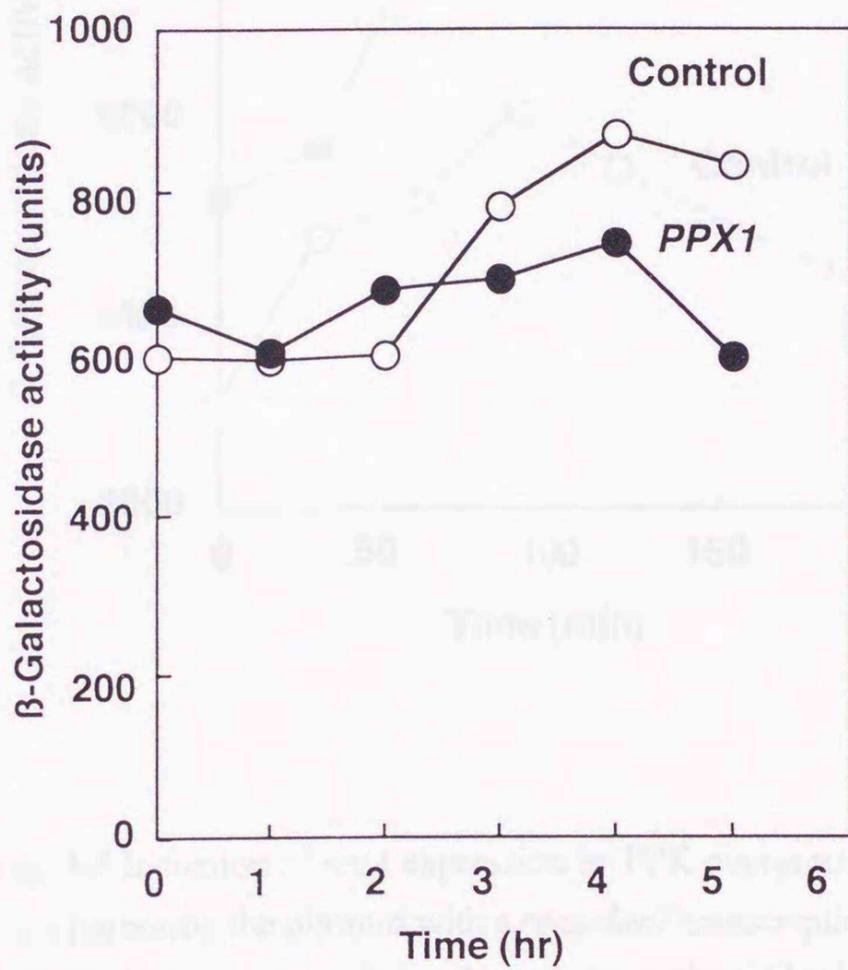


Fig. 3-7 Effect of poly(P) on induction of *umuDC* expression in *lexA* mutant cells. KT1071 cells harboring the plasmid with the *umuC-lacZ* fusion gene (pSKMF10) and either the plasmid with the *PPX1* gene (pSUPPX1) (closed symbols) or the control vector (pSUHisB) (open symbols) were exposed to 2 $\mu\text{g/ml}$ of MMC in the presence of 1 mM IPTG at 37 °C.

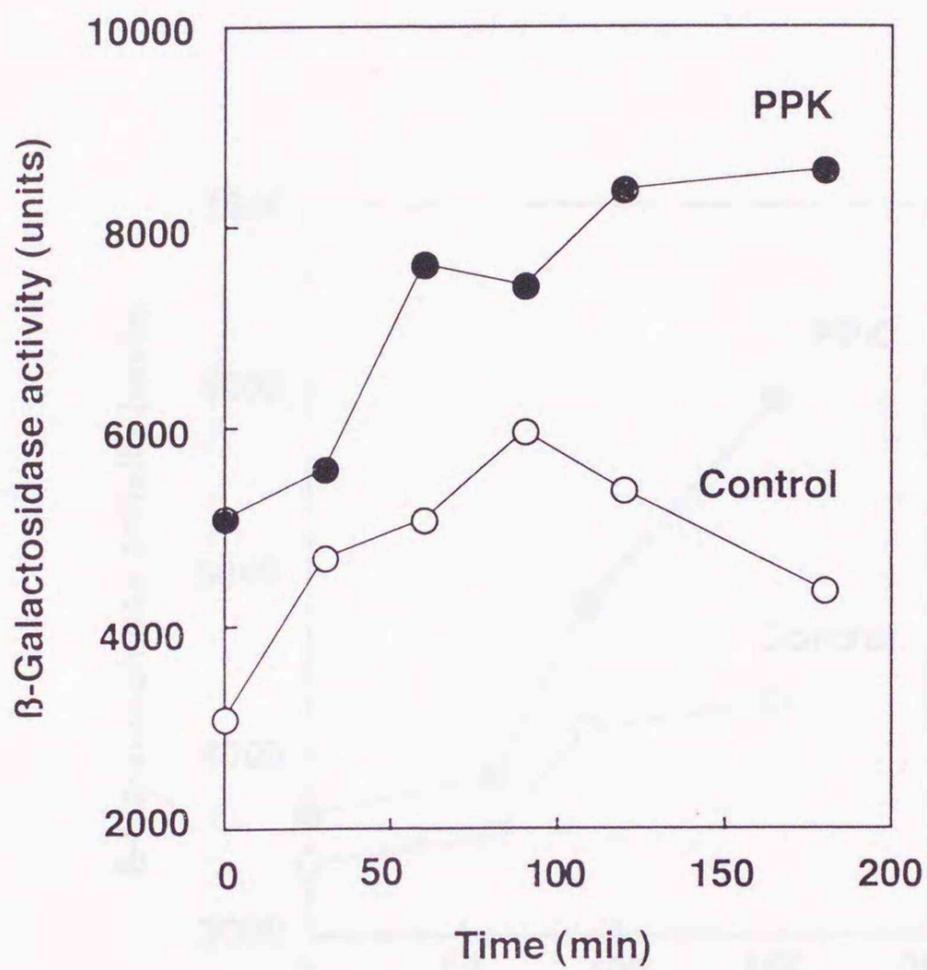


Fig. 3-8 Induction of *recA* expression by PPK overproduction. KT1008 cells harboring the plasmid with a *recA-lacZ* transcriptional fusion gene (pRSRecA) were transformed again by a plasmid with the *ppk* gene (pMWPPK, closed symbols) or the control vector (pMW119, open symbols). In early-logarithmic phase cells ($OD_{600} = 0.2$), *ppk* expression was induced by IPTG (1 mM). The β -galactosidase activity was monitored at the times indicated.

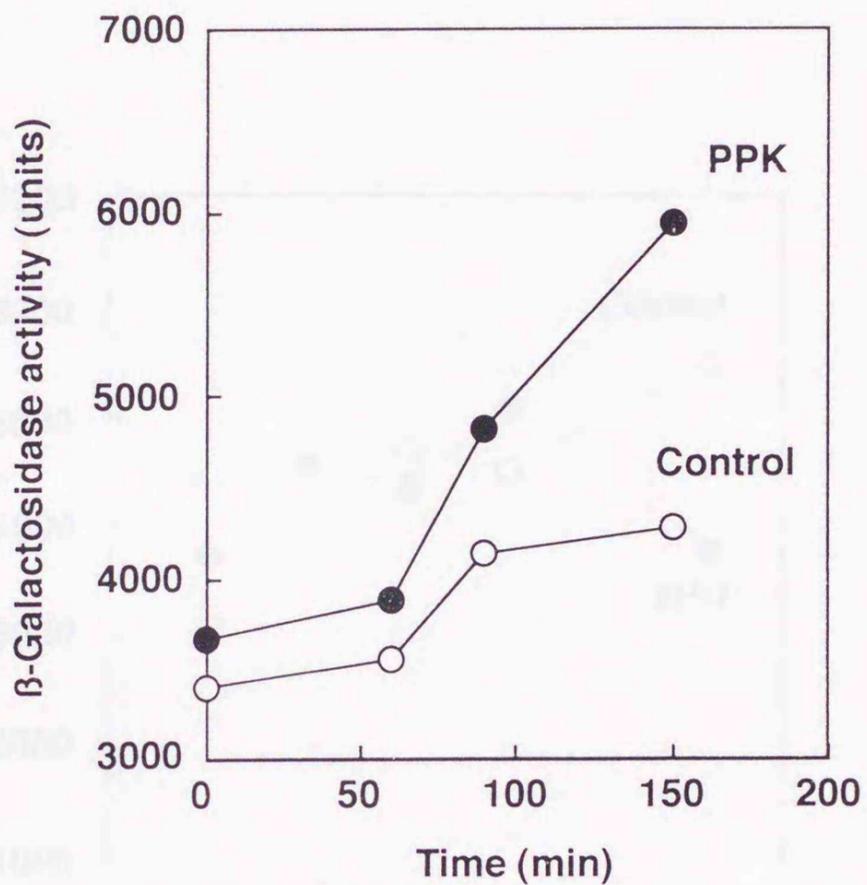


Fig. 3-9 Induction of *recA* expression by PPK overproduction. KT1009 cells harboring the plasmid with a *recA-lacZ* transcriptional fusion gene (pRSRecA) were transformed again by a plasmid with the *ppk* gene (pMWPPK, closed symbols) or the control vector (pMW119, open symbols). In early-logarithmic phase cells ($OD_{600} = 0.2$), *ppk* expression was induced by IPTG (1 mM). The β -galactosidase activity was monitored at the times indicated.

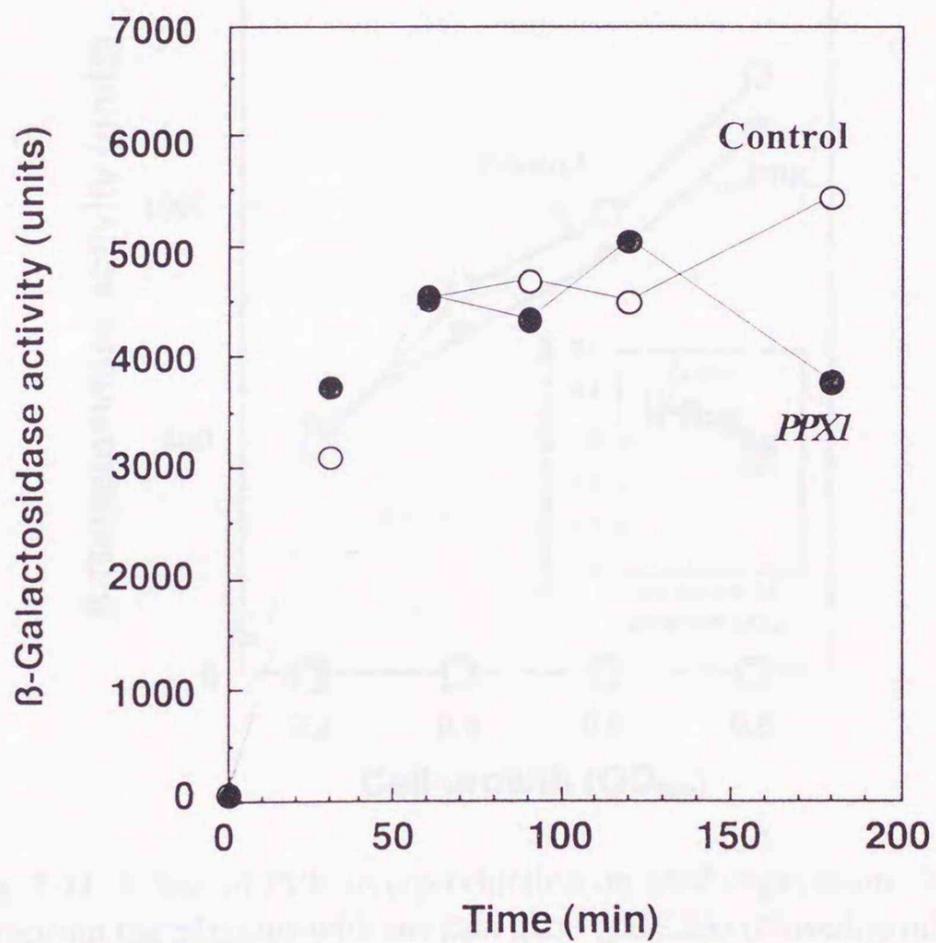


Fig. 3-10 Effect of poly(P) on induction of *lacUV5* expression. KT1008 cells harboring the plasmid with the *lacUV5-lacZ* fusion gene (pUR290) and either the plasmid with the *PPXI* gene (pSUPPX1) (closed symbols) or the control vector (pSUHisB) (open symbols) were cultured to mid-log phase and IPTG was added to the final concentration of 1 mM.

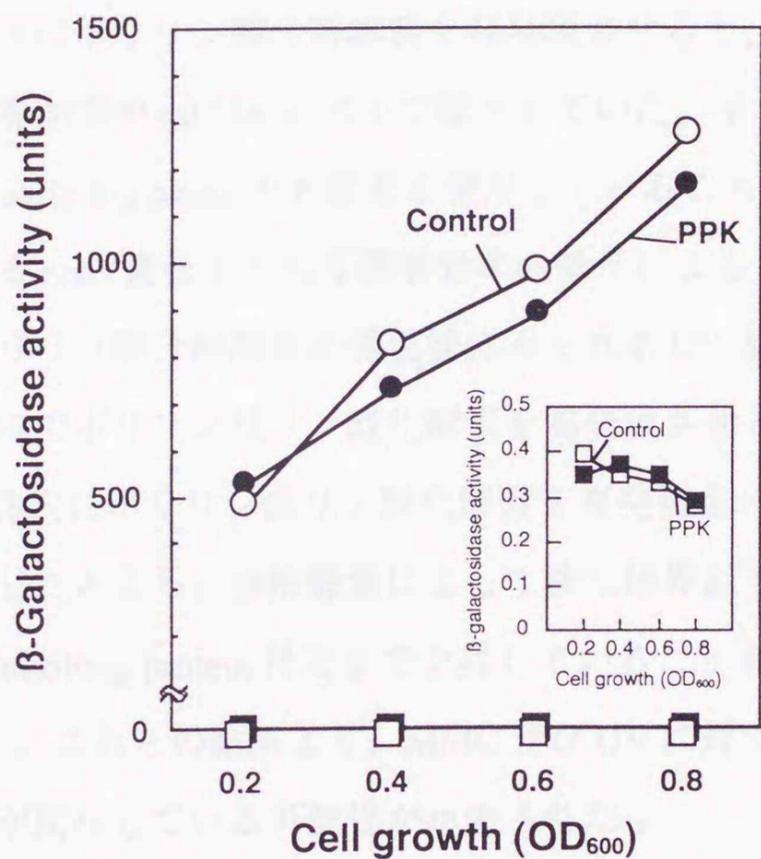


Fig. 3-11 Effect of PPK overproduction on *lacZ* expression. MG1655 cells harboring the plasmid with the *ppk* gene (pBC29) (closed symbols), or the control vector (pUC18) (open symbols) were cultured with (circles) or without (squares) IPTG. IPTG (1 mM) was added at $OD_{600}=0.1$.

(inset) *lacZ* expression in cells cultured in the absence of IPTG.

3-4 結言

本章では、大腸菌ポリリン酸が *rpoS* 遺伝子以外のストレス応答遺伝子の転写を制御している可能性を考え、ポリリン酸が SOS 遺伝子群の転写制御に及ぼす影響について観察した。本章においても前章同様に、菌体内にポリリン酸分解酵素を高発現させることにより菌体内のポリリン酸濃度を減少させた。その結果、菌体内にポリリン酸分解酵素を高発現させると UV 及び mitomycin C (MMC) に対する感受性が向上した (Fig. 3-1)。SOS 遺伝子群の転写誘導に対するポリリン酸の影響を観察した結果、大腸菌菌体内にポリリン酸分解酵素を高発現させると、MMC の添加による *recA* 遺伝子の転写誘導効率が mRNA レベルで低下していた。本章の実験は全て *rpoS* 遺伝子の発現しない early log phase の大腸菌を使用していることから、菌体内ポリリン酸濃度の低下による *rpoS* 遺伝子の転写誘導効率の低下による影響は除外することができる。また、ポリリン酸分解酵素高発現株にみられる UV 及び MMC に対する感受性の向上は、菌体内でポリリン酸リン酸化酵素を高発現させるとこによって回復した (Table 3-2)。菌体内にポリリン酸リン酸化酵素を高発現させた際の菌体内のポリリン酸濃度を測定したところ、分解酵素によって検出限界以下にまで減少したポリリン酸濃度が 100 nmol/mg protein 付近まで上昇していることを確認することができた (Fig. 1, Tables 2)。これらの結果より、MMC 及び UV に対する耐性獲得に菌体内ポリリン酸の蓄積が関与している可能性が示唆された。

ポリリン酸が RecA の活性化に及ぼす影響を観察した結果、ポリリン酸分解酵素高発現株においても control vector 導入株と同レベルに UmuD の解裂が観察された (Fig. 3-6)。この結果より、ポリリン酸は RecA の活性化及び LexA の不活化には影響を及ぼさないと考えられた。また *recA* 遺伝子の転写は、菌体内にポリリン酸リン酸化酵素の発現を誘導することで UV や MMC による DNA 損傷の有無に関わらず誘導された (Fig. 3-8)。また、*recA* 遺伝子欠損株においてもこれと同様の結果が得られた (Fig. 3-9)。これらの結果より、ポリリン酸が RecA-LexA ネットワークに依存することなく SOS 遺伝子群の発現を制御している可能性が示唆された。

recA 遺伝子以外の SOS 遺伝子として *umuDC* 遺伝子の転写への影響を観察したところ、菌体内のポリリン酸濃度が低下すると *umuDC* 遺伝子の転写誘導効率も低下することが分かった (Fig. 3-5)。これらの結果より、ポリリン酸が SOS 遺伝子群の転

写誘導にも関与していることが分かった。また、ポリリン酸が、大腸菌内すべての遺伝子の転写誘導制御にグローバルに関わっている可能性を調べる目的で、ストレス応答遺伝子以外の遺伝子である *lacZ* の転写誘導にポリリン酸が与える影響について調べた。その結果、ポリリン酸の *lacZ* 遺伝子転写誘導への影響は認められなかった (Figs. 3-10, 3-11)。これらの結果より、ポリリン酸による転写誘導の制御は大腸菌すべての遺伝子に対する非特異的なものではないことが分かった。

3-5 参考文献

- Akiyama, M., Crooke, E. and Kornberg, A.** (1993) An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. *J. Biol. Chem.* 5: 633-639.
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7: 72:248-254.
- Bernardi, A. and Bernardi, F.** (1984) Complete sequence of pSC101. *Nucleic. Acids. Res.* 12: 9415-9426.
- Brosius, J.** (1984) Toxicity of an overproduced foreign gene product in *Escherichia coli* and its use in plasmid vectors for the selection of transcription terminators. *Gene* 27: 161-172.
- Horii, T., Ogawa, T. and Ogawa, H.** (1980) Organization of the *recA* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 313-317.
- Ishige, K., Kameda, A., Noguchi, T. and Shiba, T.** (1998) The polyphosphate kinase gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *DNA Research* 5: 157-162.
- Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M. and Kornberg, A.** (1997) Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272, 21240-21243.
- Marsh, L. and Walker, G. C.** 1985. Cold sensitivity induced by overproduction of UmuDC in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 162: 155-161.
- Rao, N. N. and Kornberg, A.** (1996) Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178: 1394-1400.
- Rüther, U. and Müller-Hill, B.** (1983) Easy identification of cDNA clones. *EMBO* 2:1791-1794.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, New York.

Sancar, G. B., Tatsis, B., Cedeno, M. M. and Rieder, R. F. (1980) Proportion of hemoglobin G Philadelphia (alpha 268 Asn leads to Lys beta 2) in heterozygotes is determined by alpha-globin gene deletions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6874-6878.

Simons, R. W., Houman, F. and Kleckner, N. (1987) Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* 53: 85-96.

Shiba, T., Tsutsumi, K., Yano, H., Ihara, Y., Kameda, A., Tanaka, K., Takahashi, H., Munekata, M., Rao, N.N. and Kornberg, A. (1997) Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11210-11215.

Shiba, T., Tsutsumi, K., Ishige, K. and Noguchi, T. (2000) Inorganic polyphosphate and polyphosphate kinase: their novel biological functions and applications. *Biochemistry (Mosc)* 65: 315-323.

Shinagawa, H., Kato, T., Ise, T. Makino, K., and Nakata, A. (1983) Cloning and characterization of the *umu* operon responsible for inducible mutagenesis in *Escherichia coli*. *Gene* 23:167-174.

Tanaka, K., Handel, K., Loewen, P. C. and Takahashi, H. (1997) Identification and analysis of the *rpoS*-dependent promoter of *katE*, encoding catalase HPII in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1352:161-66.

Walker, G. C. (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 48:60-93.

Wurst, H., and Kornberg, A. (1994) A soluble exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269: 10996-11001.

Wurst, H., Shiba, T. and Kornberg, A. (1995) The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177:898-906.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.

村松正実 (1997) 分子細胞生物学辞典, 東京化学同人

西方敬人, 中山広樹 (1997) バイオ実験イラストレイテッド第1 - 5巻, 秀潤社

第4章 ポリリン酸と RNA polymerase の相互作用とポリリン酸による RNA polymerase の安定効果

4-1 緒言

これまでの章では、ポリリン酸が *rpoS* 遺伝子及び *recA* 遺伝子の転写制御に及ぼす影響を検討し、ポリリン酸の遺伝子転写制御因子としての働きを明らかにしてきた (Shiba et al. 1997; Shiba et al. 2000; Tsutsumi et al. 2000)。本章では、ポリリン酸が如何にして大腸菌遺伝子の転写を制御しているかについて、その可能性を検討した。ポリリン酸による遺伝子転写制御機構の可能性としては以下のものが考えられる。

Kusano and Ishihama は、ポリリン酸が RNA polymerase と *in vitro* において物理的に相互作用し、またこの複合体が σ^{70} を含む RNA polymerase の転写を *in vitro* において阻害している可能性を示唆した (Kusano and Ishihama 1997)。また、Blum らはポリリン酸とポリリン酸合成酵素 PPK が RNA degradosomes と相互作用することにより mRNA の分解に影響を及ぼしている可能性を示唆した (Blum et al. 1997)。これらはともにポリリン酸による遺伝子転写制御機構解明の一助となるものと考えられる。特に前者のポリリン酸と RNA polymerase の相互作用は非常に興味深い。本研究室では、ポリリン酸が線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factors, FGF-2) の安定性を高めることを *in vitro* において確認し (Shiba, T. JPN patent 1998、Shiba, T. US patent 1999)、また、Kuroda らは PPK が大腸菌におけるタンパク分解刺激に必要であることを示した (Kuroda et al. 1999)。これらのことはポリリン酸がタンパクと相互作用しうる可能性を示している。つまり、ポリリン酸が RNA polymerase と相互作用することにより RNA polymerase の安定性に作用している可能性が高いと考えられる。

本章では、ポリリン酸の遺伝子転写制御機構の一つの可能性として考えられているポリリン酸と RNA polymerase の相互作用をより直接的に観察することでポリリン酸による遺伝子転写制御機構の一部を明らかにすることを目的として研究を行った。

4-2 実験方法

4-2-1 使用した菌株及びプラスミド

大腸菌は KT1008 (F-, D(*arg-lac*)U169, *araD139*, *rpsI150*, *ptsF25*, *flbB5301*, *rpsR*, *deoC*) を使用した。また、プラスミドは pTrc99A 及び pTrcPPK を使用した (第3章実験方法参照)。

4-2-2 使用した培地及び試薬

通常の培養は Luria-Bertani (LB) 培地 (DIFCO) (Sambrook et al. 1989) を使用した。 $[^{32}\text{P}]$ orthophosphate ($[^{32}\text{P}]\text{Pi}$) は Amersham のものを使用した。Polyethyleneimine-cellulose 薄層クロマトグラフィー (PEI-TLC) プラスチックプレートは Merck のものを使用した。RNA polymerase は国立遺伝学研究所石浜明教授の御好意により分与して戴いたものを使用した。

4-2-3 タンパク安定効果試験

タンパクの安定効果試験は以下の通り行った。5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA polymerase holoenzyme または 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミン (BSA) に 1 mM poly(P)₆₅ または Na-phosphate buffer を添加し、それぞれ 0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinase K を加えて 0 $^{\circ}\text{C}$ 、または 0.005 % trypsin を加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ で処理、または 0.2 mM H_2O_2 を加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ で処理した。各時間毎にサンプリングし、SDS-PAGE sample buffer を添加することで反応を停止し煮沸した。ただし、 H_2O_2 の場合は SDS-PAGE sample buffer 添加後直ちに液体窒素によって凍結した。12.5 % アクリルアミドゲルで SDS-PAGE し、ウサギ抗 RNA polymerase 抗体または抗 BSA モノクローナル抗体 (CHEMICON International) を用いて western blotting を行った。発色はアルカリフォスファターゼ活性を利用した発色反応を利用し、残存するタンパク量を視覚化した。

4-2-4 鎖長約 65 のポリリン酸の調製法について

本章で用いた鎖長約 65 のポリリン酸は以下の通り調製した。 $[^{32}\text{P}]\text{poly}(\text{P})$ を $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ と精製 *E. coli* PPK (Ahn and Kornberg 1990) を用いて合成した。合成した $[^{32}\text{P}]\text{poly}(\text{P})$ に 20 mM HCl を添加後 70 $^{\circ}\text{C}$ で 1 min 処理し加水分解した。反応は 20 mM

NaOH を添加し中和することで停止した。反応液を 12.5 % ポリアクリルアミドゲル (泳動 buffer TBE) により電気泳動した。平均鎖長 65 の標準ポリリン酸の移動度を参照にして、鎖長約 65 付近のゲルを切り出し、細かく刻み 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で homogenized した。50 °C で 15 min 処理することでゲルからポリリン酸を溶出した。サンプルを spin column にのせ 10,000 rpm で 2 min 遠心し鎖長約 65 の [³²P]poly(P) を抽出した。

4-2-5 exopoly(P)ase 反応について

調製したポリリン酸の確認に exopoly(P)ase 処理を行った。調製した鎖長約 65 の [³²P]poly(P) または精製前の [³²P]poly(P) を 37.8 units の精製 *E.coli* PPX1 (Ahn and Kornberg, 1990) で 30 min 37°C で処理し [³²P]Pi に分解した (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NH₄-OAc、4 mM MgCl₂) (Wurst 1994)。反応液を 0.65 M KH₂PO₄ (pH 3.5) を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィーで展開した。展開した TLC をイメージングプレート (IP) に露光し、放射能を radio-image analyzer (BAS2000, FUJIX) で処理することにより視覚化した。

4-2-6 Gel-shift assay 法について

[³²P]poly(P) を用いた gel-shift assay は以下の通り行った。RNA polymerase holoenzyme または BSA を 50 mM Tris-HCl (pH 7.8 at 37 °C) を用いて各濃度 (0、0.1 pg、1 pg、10 pg、0.1 ng、1 ng、10 ng、100 ng、500 ng) に希釈した。調製した鎖長約 65 の [³²P]poly(P) を各濃度の RNA polymerase holoenzyme または BSA と混合し、37 °C で 5 min incubation した。この混合液を 12.5 % ポリアクリルアミドゲル (TBE) で 40 V-8 hr 電気泳動し、radio-image analyzer (BAS2000, FUJIX) によって視覚化した。

4-2-7 Native-PAGE 法について

本章における Native-PAGE は以下の通りサンプルを調製して行った。KT1008 株に pTrcPPK または control vector pTrc99A を導入した株を LB 培地で early-log phase まで培養した。ポリリン酸を蓄積させるために 2 µg/ml MMC 及び 1 mM IPTG を添加した。37 °C で 1 hr 培養した後集菌して 20 mM Tris-HCl (pH 7.8 at 37 °C) に懸濁した。

sonication 処理をした後菌体を 15000 rpm で 60 min 遠心し上清を得た。上清は直ちに液体窒素で凍結保存した。使用時にサンプルを溶解した後、6% ポリアクリルアミドゲルで Native-PAGE した。電圧は 30 V、温度は 4°C で行った。電気泳動後、ウサギ抗 RNA polymerase 抗体を用いた western blotting を行い RNA polymerase の移動度を観察した。

4-2-8 菌体内 ポリリン酸の定量法

Early log phase まで LB 培地で培養した大腸菌培養液に 2 $\mu\text{g/ml}$ MMC 及び 1 mM IPTG を添加した。37°C で 1 hr 培養した後集菌して 20 mM Tris-HCl (pH 7.8 at 37°C) に懸濁した。sonication 処理をした後菌体を 15000 rpm で 60 min 遠心し上清を得た。菌体内ポリリン酸は Glassmilk (BIO101) を使用して調製した (Ault-Rich D. et al. 1998)。調製したポリリン酸は ADP 存在下で PPK と反応させることで ATP に変換し、ATP 濃度を測定することでポリリン酸濃度を定量した。ATP 量は東洋ビーネット ATP 発光キット LL-100-1 を使用して測定した。

4-2-9 その他の操作方法について

タンパク濃度は BIO-RAD protein assay kit を用いた Bradford 法により測定した (Bradford 1976)。SDS-PAGE、western blotting、DNA 操作に関しては Molecular Cloning (Sambrook et al. 1989) 及び「バイオ実験 イラストレイテッド」(西方, 中山 1997) を参考にした。

4-2-10 装置

第 2 章及び第 3 章に準ずる。

4-3 結果と考察

4-3-1 *in vitro* におけるポリリン酸と RNA polymerase の相互作用

これまでの報告に、RNA polymerase とポリリン酸の相互作用を示唆するものがあることから、ポリリン酸による遺伝子転写制御機構の一つの可能性として RNA polymerase とポリリン酸の相互作用が考えられてきた。Kusano and Ishihama は、

phosphocellulose columns で精製した大腸菌 RNA polymerase が ADP 存在下で PPK と反応して ATP を生じることを示した (Kusano and Ishihama 1997)。このことは、RNA polymerase にポリリン酸が強く結合していることを示唆している (Kusano and Ishihama 1997)。本実験では、ポリリン酸と RNA polymerase の相互作用をより直接的に観察することにより、ポリリン酸と RNA polymerase の相互作用の可能性を明らかにした。相互作用を観察するために、まず鎖長約 65 の $[^{32}\text{P}]\text{poly}(\text{P})$ を調製した (Fig. 4-1)。調製した鎖長約 65 の $[^{32}\text{P}]\text{poly}(\text{P})$ は精製 *E. coli* PPK1 で処理することで完全に Pi に分解することから確かにポリリン酸であることを確認した (Fig. 4-2)。この調製した鎖長約 65 の $[^{32}\text{P}]\text{poly}(\text{P})$ を各濃度の RNA polymerase と混合し電気泳動した。その結果、0.1 ng ~ 500 ng RNA polymerase の範囲内ではウェル付近に $[^{32}\text{P}]\text{poly}(\text{P})$ によるバンドが確認された (Fig. 4-3)。この条件下では、RNA polymerase はほとんど流れずにウェル付近に留まることから、ウェル付近に観察されたバンドが RNA polymerase- $[^{32}\text{P}]\text{poly}(\text{P})$ 複合体の形成を示すバンドであると考えられる (Fig. 4-3)。しかしこれに対して BSA では BSA- $[^{32}\text{P}]\text{poly}(\text{P})$ 複合体の形成を示すバンドは観察されなかった (Fig. 4-3)。この結果より、ポリリン酸が確かに RNA polymerase と相互作用しうることを直接観察することができた。また、この複合体の形成は非特異的なものではない可能性が示唆された。

4-3-2 ポリリン酸による RNA polymerase の安定効果

Jishage and Ishihama によると、ポリリン酸が Rsd タンパクの安定性、また Rsd と σ^{70} の親和性を制御することで、転写の幅を制御している可能性が考えられている (Jishage and Ishihama 1999)。また、Kuroda らは PPK が大腸菌のタンパク分解に必要である可能性を示唆している (Kuroda et al. 1999)。更に本研究室ではポリリン酸が繊維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factors, FGF-2) の安定性を制御している可能性を確認した (Shiba, T. JPN patent 1998)。これらの観点より、ポリリン酸のタンパク安定効果とポリリン酸と RNA polymerase の相互作用を考え合わせ、ポリリン酸による RNA polymerase 安定効果を確認し、遺伝子転写制御との関連性を明らかにしようと試みた。そのために本実験では、RNA polymerase holoenzyme または BSA に 1 mM $\text{poly}(\text{P})_{65}$ または control として 1 mM Na-phosphate buffer を混合し、それぞれを

proteinase K、trypsin、 H_2O_2 で処理した（処理方法に関しては第4章実験方法参照）。これらの分解を western blotting によって観察した。その結果を Fig. 4-4 及び Fig. 4-5 に示した。まず RNA polymerase に関しては β 、 β' 、 σ の分解が早いことから α に着目して残存タンパク量を NIH-image により解析した結果を Fig. 4-4B に示した。その結果、いずれの処理群に関しても poly(P)₆₅ 存在下における α の安定性が Na-phosphate buffer の場合と比較して増加していることが分かった。また、過酸化水素で処理した際の β 及び β' 、 α に関しても poly(P)₆₅ 存在下において安定性が増加した。一方、BSA に関しては逆に poly(P)₆₅ 存在下の方が BSA の安定性が減少するという結果が得られた (Fig. 4-5A,B)。これらの結果より、ポリリン酸は RNA polymerase に何らかの形で相互作用しており、分解から保護している可能性が示唆された。また、BSA ではポリリン酸による分解促進効果が観察されたことから、ポリリン酸が BSA とも相互作用をしている可能性も考えられた。しかしながら、RNA polymerase には安定効果をもたらすのに対して、BSA には分解促進効果をもたらしていることから、ポリリン酸の BSA への作用の仕方が RNA polymerase の場合とは異なるものと考えられた。すなわち、ポリリン酸と RNA polymerase の相互作用は非特異的なものではない可能性が高いと思われる。ポリリン酸とタンパクとの相互作用は特異的に起こっていると考えられ、タンパクの安定化のみならず、分解を促進する場合もあることが考えられた。

4-3-3 *in vivo* におけるポリリン酸と RNA polymerase の相互作用の確認

Fig. 4-3 及び Fig. 4-4 ではポリリン酸が *in vitro* において確かに RNA polymerase と相互作用し RNA polymerase を分解から保護していることが示された。本実験では、ポリリン酸と RNA polymerase の相互作用が実際の大腸菌菌体内においても起こっている可能性について検討した。KT1008 株に pTrcPPK または control vector pTrc99A を導入した株を LB 培地で early-log phase まで培養した。ここで IPTG 及び MMC を添加してポリリン酸を蓄積させた (Fig. 4-6)。その大腸菌 lysate を Native-PAGE し抗 RNA polymerase 抗体を用いて western blotting した結果を Fig. 4-7 に示した。その結果、菌体にポリリン酸合成酵素を高発現させた株の lysate の方に RNA polymerase の移動度の増大が観察された (Fig. 4-7 *in vivo*)。また、これと同様の結果が *in vitro* で poly(P)₆₅

と RNA polymerase を混合して Native-PAGE を行った際にも観察されたことから (Fig. 4-7 *in vitro*)、この移動度の変化はポリリン酸が RNA polymerase と相互作用したことによって RNA polymerase の電荷が極度に負に変化したことに起因するものであると推測された。*in vivo* における移動度の変化が *in vitro* のにおける移動度の変化よりも大きいのは PPK によって合成される菌体内ポリリン酸の鎖長が、添加ポリリン酸と比較して鎖長の長いため、相互作用によってより負に帯電するためと思われる。本実験によって、ポリリン酸が *in vitro* 及び *in vivo* においても RNA polymerase と相互作用していることを確認することができた。

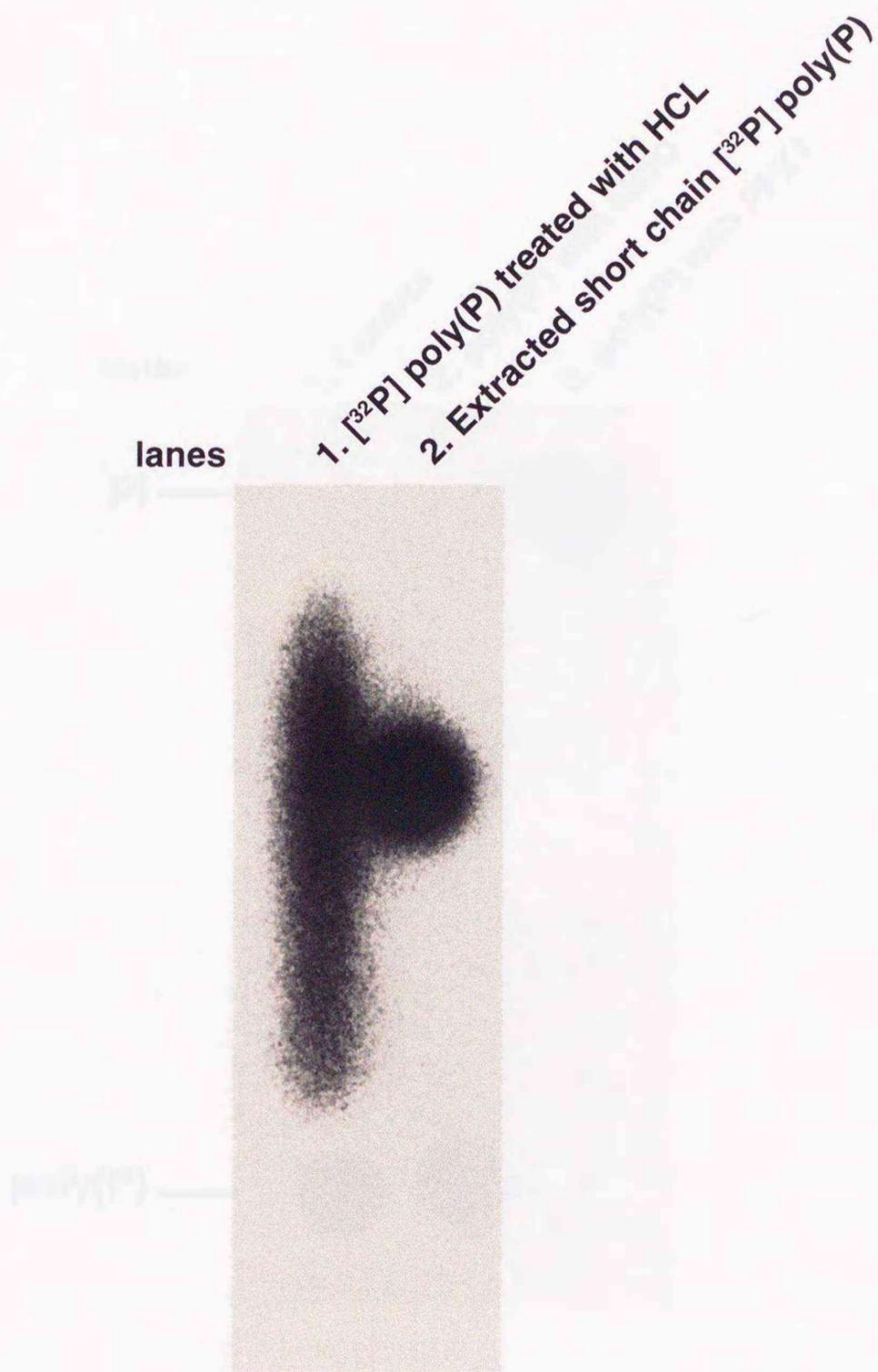


Fig. 4-1 Preparation of short chain poly(P). $[^{32}\text{P}]$ poly(P) was hydrolyzed by 20 mM of HCl at 70 for 1 min (lane 1) and extracted short chain poly(P) (lane 2) was separated by gel electrophoresis on 12.5 % polyacrylamide gel.

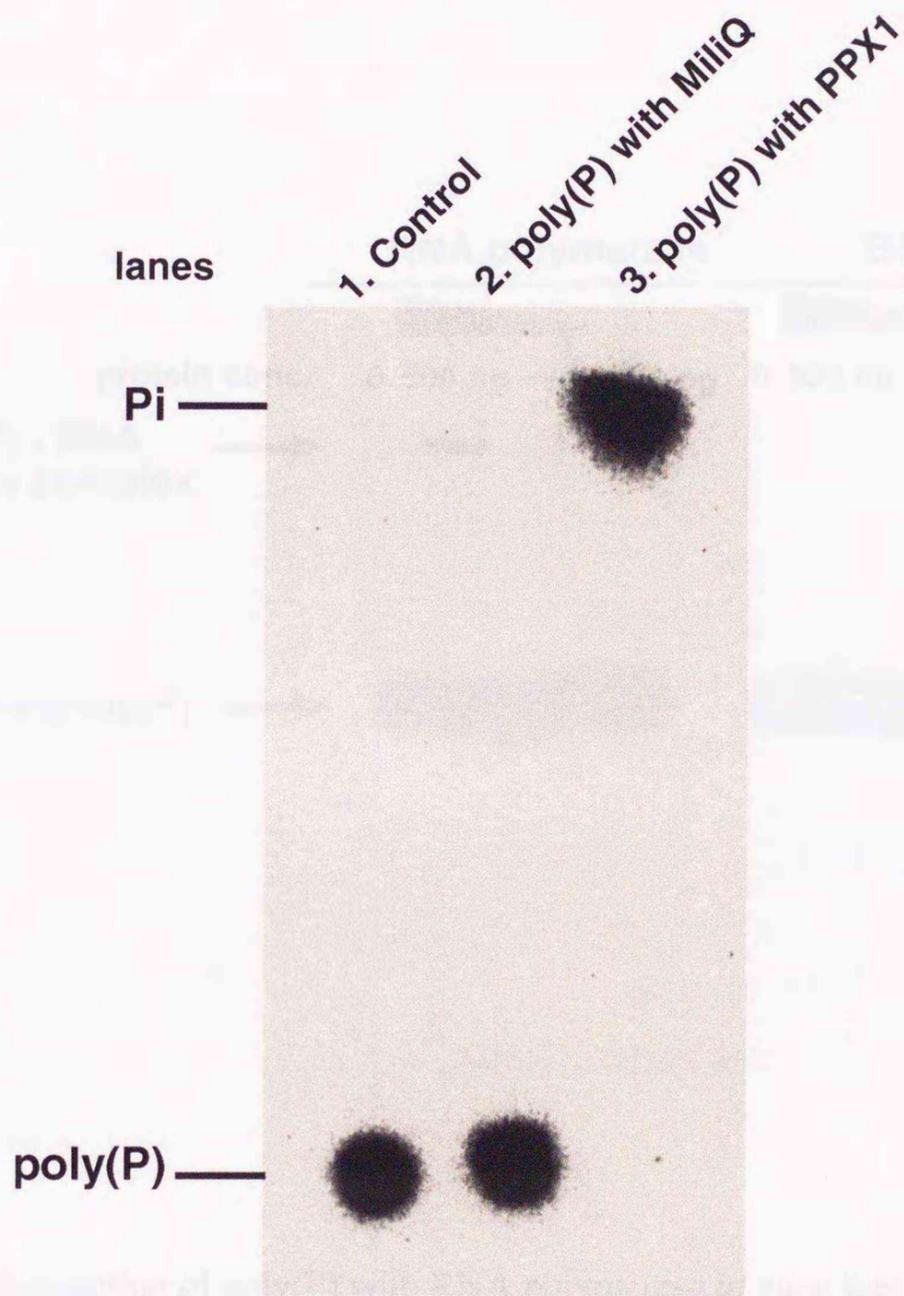


Fig. 4-2 Extracted poly(P) was checked by PPX1 hydrolyzation. Extracted poly(P) was incubated with PPX1 to completely hydrolyze poly(P) to Pi. The reactions was analyzed by thin-layer chromatography, 0.75 M KH_2PO_4 , and the radioactivity was visualized and quantified by a radio-image analyzer (BAS2000, FUJIX). lane 1 control for poly(P), lane 2 poly(P) incubated with MiliQ, lane 3 poly(P) incubated with PPX1.

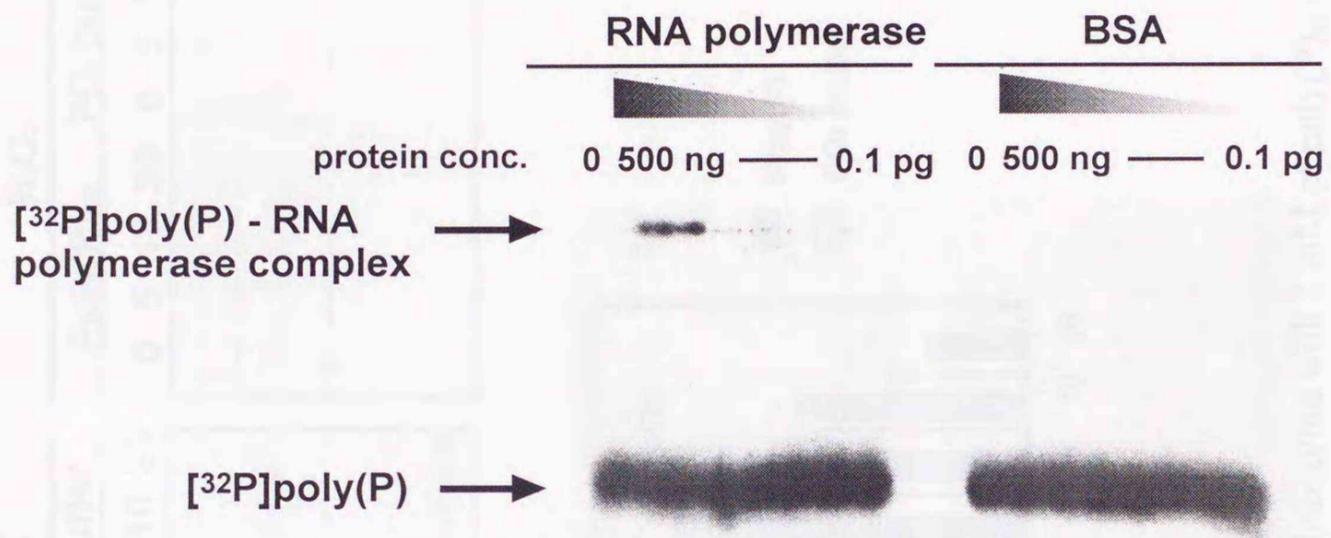


Fig. 4-3 Interaction of poly(P) with RNA polymerase *in vitro* was determined by gel-shift assay. Diluted RNA polymerase holoenzyme and bovine albumin serum (BSA) were incubated with [³²P]poly(P) (1 mM) at 37 °C for 5 min. The reaction mixtures were electrophoresed on 12.5 % acrylamide gel and were visualized by a radio-image analyzer (BAS2000, FUJIX).

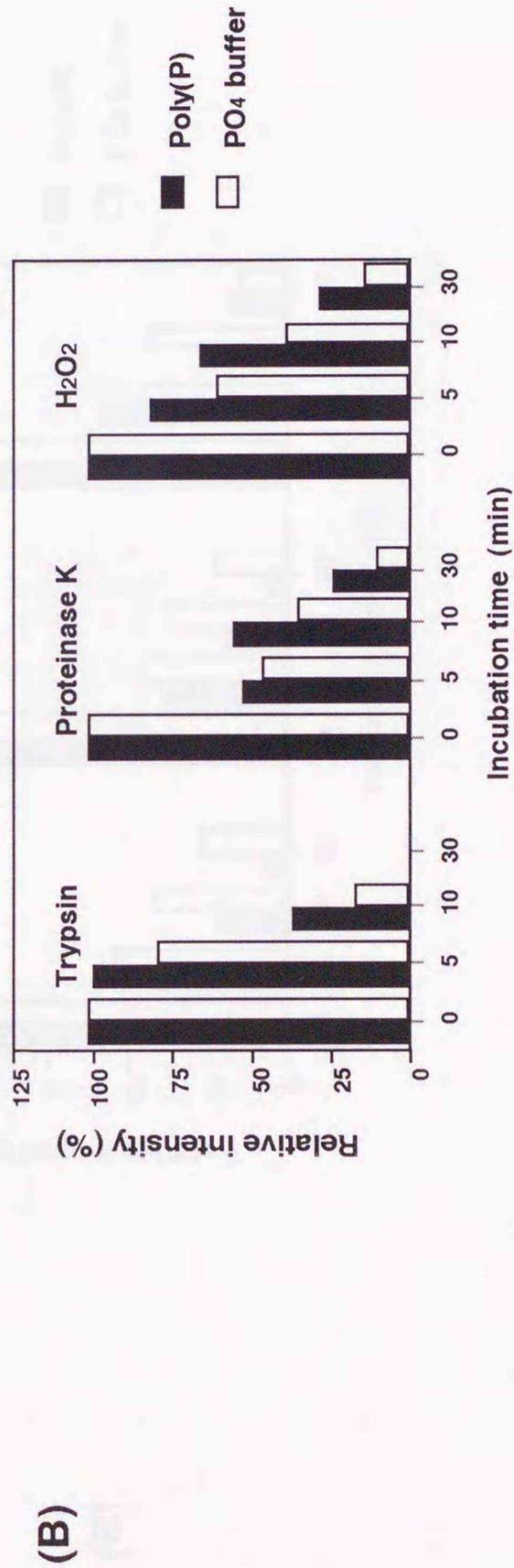
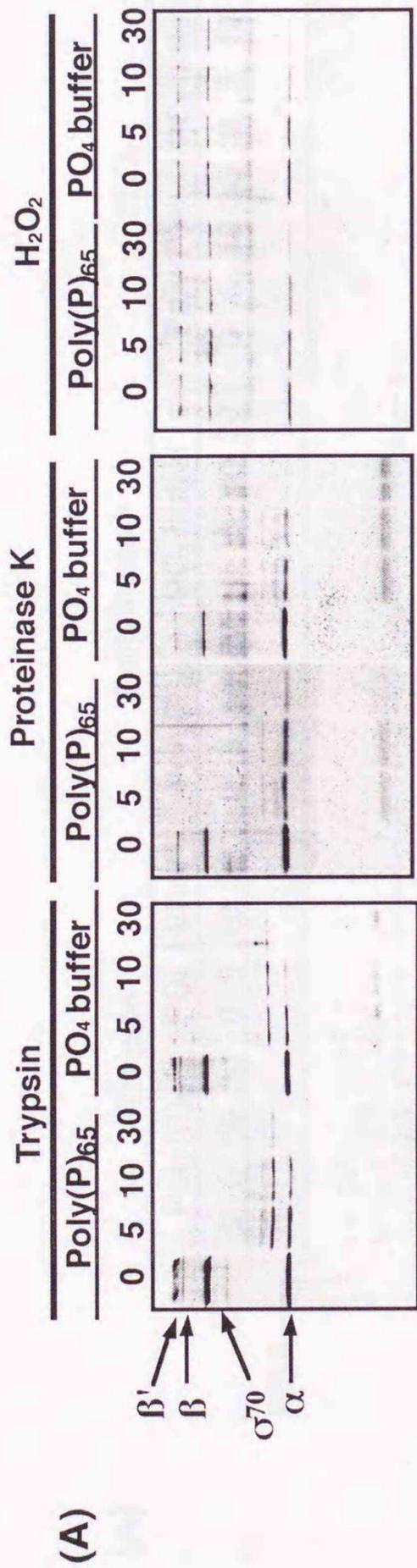


Fig. 4-4 Effect of poly(P) on RNA polymerase stabilization. RNA polymerase holoenzyme with 1 mM of poly(P)₆₅ or Na-phosphate buffer as a control were treated with proteinase K, trypsin and H₂O₂. At the times indicated, samples were collected and remained protein were visualized by western blotting. (A) western blotting, (B) Relative intensity of α subunit degradation. Relative intensities were analyzed by NIH-image.

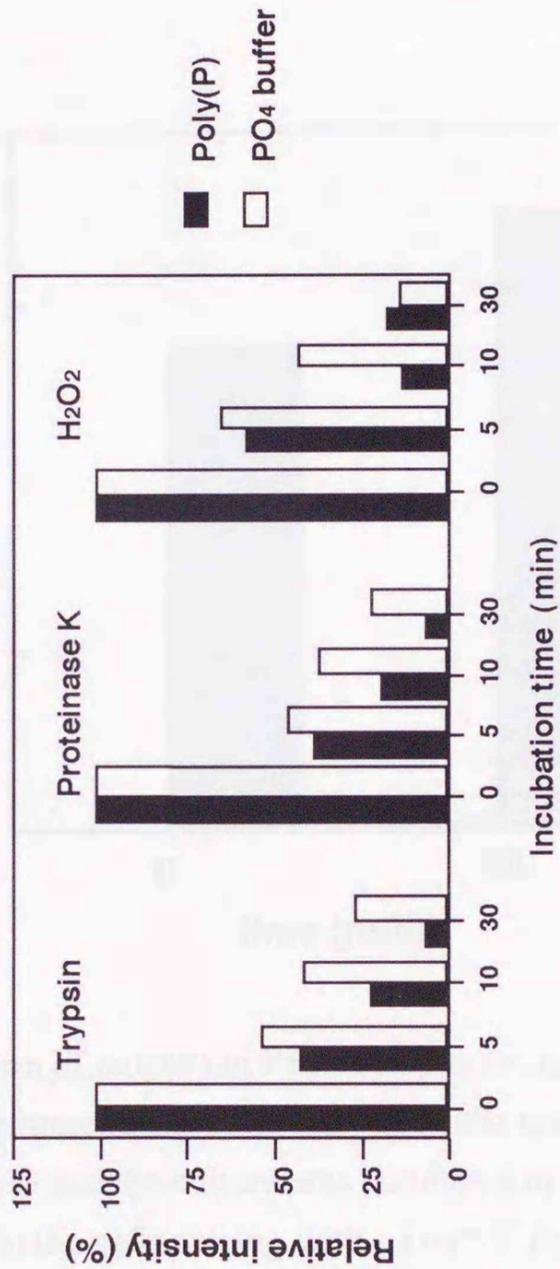
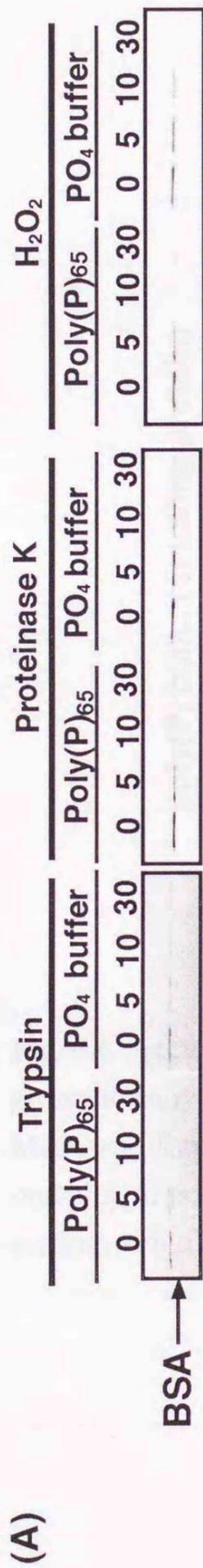


Fig. 4-5 Effect of poly(P) on BSA stabilization. BSA with 1 mM of poly(P)₆₅ or Na-phosphate buffer as a control were treated with proteinase K, trypsin and H₂O₂. At the times indicated, samples were collected and remained protein were visualized by western blotting. (A) western blotting, (B) Relative intensities were analyzed by NIH-image.

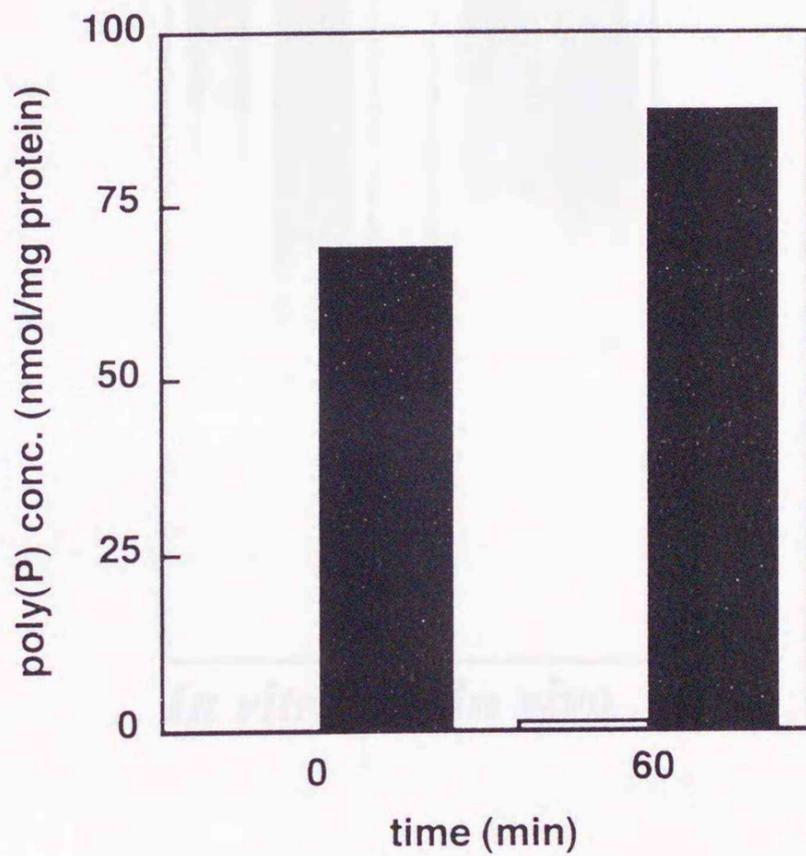


Fig. 4-6 Accumulation of poly(P) in PPK-overproducing cells. The cells were grown to early-logarithmic in LB medium. The cells were added with 2 $\mu\text{g/ml}$ MMC and 1 mM IPTG and the culture was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 1 hour. Accumulation of poly(P) in the cells carrying with pTrcPPK (closed bar) and cells carrying with pTrc99A (open bar).

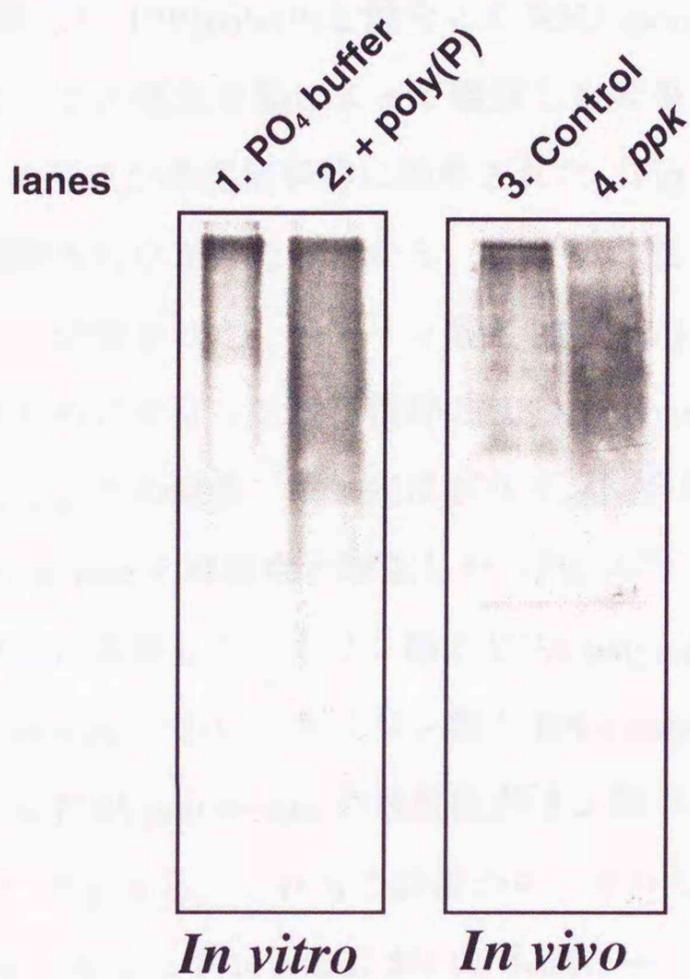


Fig. 4-7 The migration of RNA polymerase in PPK-overproducing cells on 12.5 % of Native-PAGE. The cells were grown to early-logarithmic in LB medium. The cells were added with 2 μ g/ml MMC and 1 mM IPTG and the culture was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 1 hour. The cells lysate were electrophoresed on 6 % acrylamide gel for native-PAGE at 4 $^{\circ}$ C, 30 V. After separation, western blotting was carried out. lane 1 RNA polymerase with Na phosphate buffer, lane 2 RNA polymerase with poly(P), lane 3 Cells carrying with pTrc99A, lane 4 Cells carrying with pTrcPPK.

4-4 結言

本章では、ポリリン酸による遺伝子転写制御機構の可能性の一つである、RNA polymerase との相互作用を *in vitro* 及び *in vivo* において観察し、転写制御との関連性を明らかにすることを目的として実験を行った。*in vitro* における相互作用を gel-shift assay によって観察した。 $[^{32}\text{P}]$ poly(P)と混合した RNA polymerase の移動度を 12.5 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって観察した結果、 $[^{32}\text{P}]$ poly(P)-RNA polymerase 複合体の形成が濃度依存的に観察された (Fig. 4-3)。しかしながら BSA との相互作用は観察されなかったことから、ポリリン酸と RNA polymerase の結合が特異的であることが示唆された。ポリリン酸と RNA polymerase の *in vivo* における相互作用を観察するためにポリリン酸蓄積時の RNA polymerase を Native-PAGE にかけて移動度を観察した。その結果、菌体内にポリリン酸合成酵素を高発現させることによって RNA polymerase の移動度が増加した (Fig. 4-7)。ポリリン酸合成酵素の高発現によって菌体内に蓄積したポリリン酸が RNA polymerase と相互作用しているものと考えられた。*in vitro* においてポリリン酸と RNA polymerase を混合した際も、Native-PAGE による RNA polymerase の移動度がリン酸バッファーを混合した場合と比較して増加した (Fig. 4-7)。これらの結果から、ポリリン酸と RNA polymerase の相互作用が *in vitro* のみならず *in vivo* においても起こっている可能性が示唆された。ポリリン酸の RNA polymerase に対するタンパク安定効果を *in vitro* において観察した。trypsin、proteinaseK、過酸化水素で処理した結果、いずれの処理に対してもポリリン酸存在時に安定効果が観察され、ポリリン酸が RNA polymerase を分解から保護している可能性が示唆された。以上の結果より、大腸菌菌体内においてポリリン酸は、RNA polymerase と相互作用することによって RNA polymerase の安定性を変化させ、その転写活性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。ポリリン酸によるタンパク安定化効果の可能性はいくつかの論文の中でも報告されている。Jishage and Ishihama は Rsd タンパクの安定性にポリリン酸が関与していることを報告している (Jishage and Ishihama 1999)。また、本研究室ではポリリン酸が線維芽細胞増殖因子の安定性を高めているとの結果を得ている (Shiba, T. JPN patent 1998、Shiba, T. US patent application number 384,384/09 Aug. 27, 1999)。さらに、Kuroda らは *E. coli* hole protein の安定性がポリリン酸存在時に増加していることを示している (Kuroda et al.

1999)。しかしながら、本章の結果より、ポリリン酸がタンパク安定作用のみならず分解促進作用をも持つ可能性が示唆されたことより、ポリリン酸が様々なタンパクと特異的に相互作用することによりそれらタンパクの安定性を制御している可能性が考えられた。その一つとして、遺伝子転写制御においてはポリリン酸が RNA polymerase と相互作用することによりその安定性を制御し、RNA polymerase の promoter の選択制に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

Wattford, M. M., & ... (1997) ...
 ... (1997) ...
 ... (1995) ...
 ... (1998) ...
 ... (1999) ...
 ... (1997) ...
 ... (1997) ...
 ... (1999) ...

4-5 参考文献

Ahn, K. and Kornberg, A. (1990) Polyphosphate Kinase from *Escherichia coli* *J. Biol. Chem.* 265: 11734-11739.

Ault-Riché, D., A., Fraley, C. D., Tzeng, C., and Kornberg, A. (1998) Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180: 1841-1847.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7: 72: 248-254.

Blum, E., Py, B., Carpousis, A.J., and Higgins. C.F. (1997) Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Molecular Microbiology.* 26: 387-398 .

Ishige, K., Kameda, A., Noguchi, T., and Shiba, T. (1998) The polyphosphate kinase gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *DNA Research* 5: 157-162.

Jishage, M. and Ishihama, A. (1999) Transcriptional organization and in vivo role of the *Escherichia coli* *rsd* gene, encoding the regulator of RNA polymerase sigma D. *J. Bacteriol.* 181: 3768-3776.

Kuroda, A., Tanaka, S., Ikeda, J., Takiguchi, N. and Ohtake, H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 : 14264-14269.

Kusano, S. and Ishihama, A. (1997) Functional interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with inorganic polyphosphate *Genes Cells* 2: 433-41.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, New York.

Shiba, T., Tsutsumi, K., Yano, H., Ihara, Y., Kameda, A., Tanaka, K., Takahashi, H., Munekata, M., Rao, N.N., and Kornberg, A. (1997) Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11210-11215.

Shiba, T., Tsutsumi, K., Ishige, K. and Noguchi, T. (2000) Inorganic polyphosphate and polyphosphate kinase: their novel biological functions and applications. *Biochemistry (Mosc)*

65: 315-323.

Shiba, T. JPN patent application number 10-242416 (Aug. 28, 1998)

Shiba, T. US patent application number 384, 384/09 (Aug. 27, 1999)

Tsutsumi, K., Shiba, T. and Munekata, M. (2000) Involvement of inorganic polyphosphate in expression of SOS genes. *Biochim Biophys Acta.* 1493: 73-81.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.

村松正実 (1997) 分子細胞生物学辞典, 東京化学同人

西方敬人, 中山広樹 (1997) バイオ実験イラストレイテッド第1 - 5巻, 秀潤社

第5章 総括

本論文では、ポリリン酸とストレス耐性の関係を、ポリリン酸の遺伝子転写制御因子としての働きに着目して明らかにすることを目的として研究を行った。以下に本論文で得られた結果をまとめた。

第2章

大腸菌菌体内にポリリン酸分解酵素を高発現させることにより菌体内のポリリン酸濃度を極度に低下させると、過酸化水素に対して高感受性となった。これは菌体内ポリリン酸濃度の低下によって *rpoS* 遺伝子の転写誘導効率が低下し、それによって *katE* 遺伝子の転写誘導効率が低下したことに起因するものであった。菌体内ポリリン酸がストレス応答遺伝子の発現制御因子である *rpoS* 遺伝子の転写を制御していることを明らかにすることができた。

第3章

大腸菌におけるポリリン酸の遺伝子転写制御因子としての可能性を更に広げるために SOS 遺伝子群の転写に与えるポリリン酸の影響を観察した。菌体内ポリリン酸濃度の低下によって MMC 及び UV に対して高感受性となった。菌体内ポリリン酸濃度の低下によって *recA* 遺伝子の転写誘導が減少し、また、菌体内でのポリリン酸リン酸化酵素の高発現によって *recA* 遺伝子の転写が誘導された。この結果より、ポリリン酸が SOS 遺伝子群の転写誘導に関与している可能性が示唆された。しかしながら、ポリリン酸の *lacZ* 遺伝子転写誘導への関与は認められなかった。ポリリン酸が遺伝子の転写を特異的に制御している可能性が考えられた。

第4章

ポリリン酸の遺伝子転写制御機構の一つの可能性として考えられているポリリン酸と RNA polymerase の相互作用について観察した。その結果、*in vitro* のみならず *in vivo* においても相互作用を示す結果が得られた。また、ポリリン酸による RNA polymerase の分解保護効果も観察されたことから、ポリリン酸が RNA polymerase の

安定性に作用することでRNA polymerase の promoter の選択性に影響を与え、それによって遺伝子の転写を制御している可能性が示唆された。

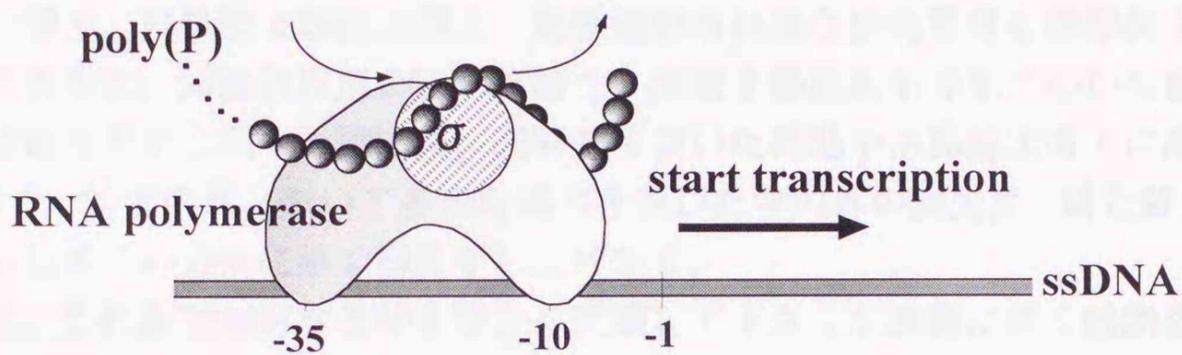


Fig. 5-1 生体内ポリリン酸による遺伝子転写制御のモデル図

本論文により、大腸菌におけるポリリン酸の遺伝子転写制御因子としての機能を明らかにすることができた。ポリリン酸の存在は広くバクテリアからほ乳類に至るまで確認されていることから、大腸菌以外の生体内においてもポリリン酸が転写制御因子として機能している可能性が大きい。今後更に多くの生物でポリリン酸に合成や分解、あるいはその他の代謝に関わる遺伝子がクローニングされることにより、ポリリン酸と遺伝子転写制御の関連性が解明されていくものと期待される。本論文で得られた成果は、今後ポリリン酸の遺伝子転写制御因子としての機能を明らかにする上での足がかりとなるものである。

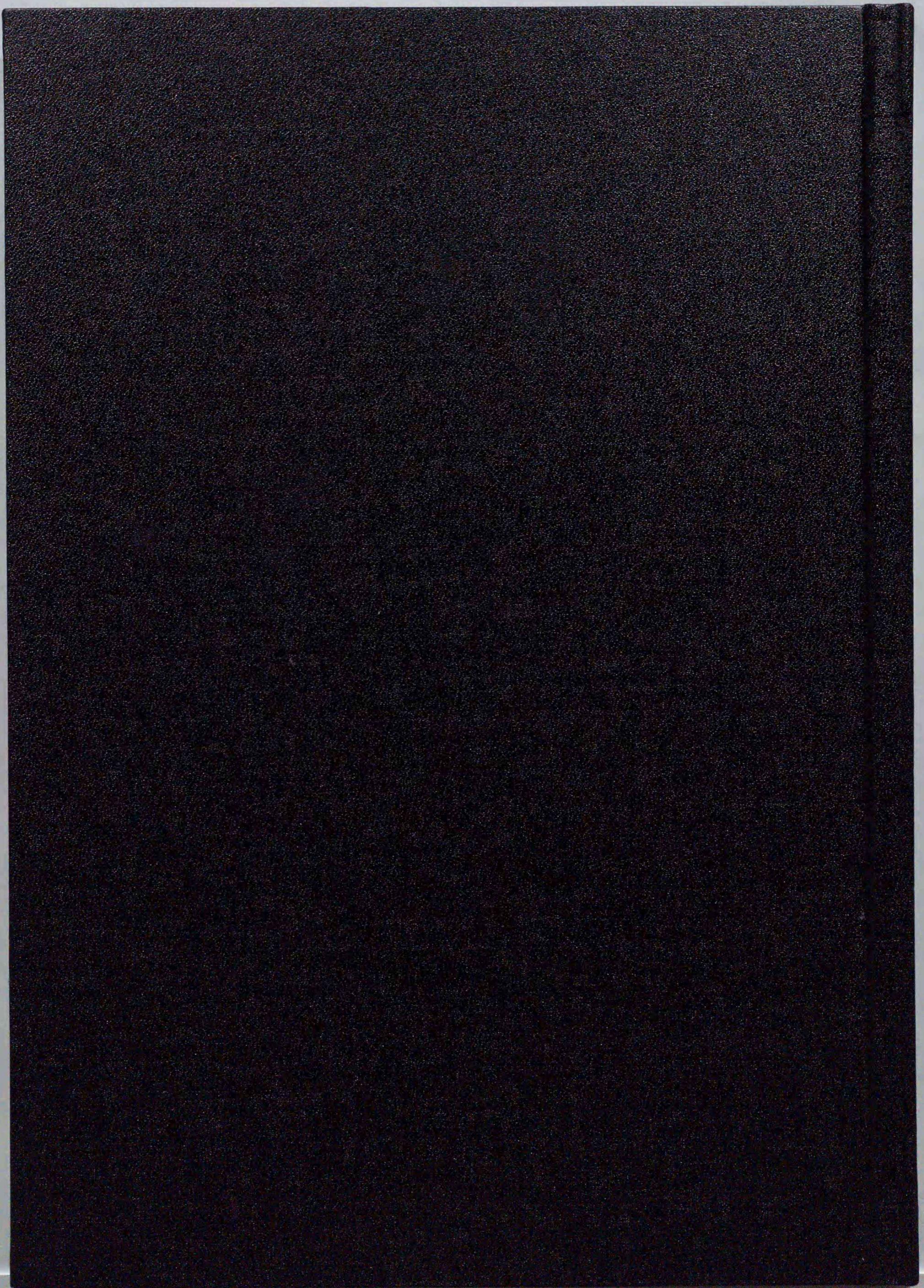
謝辞

本研究を遂行するに際し、終始適切な御指導、御助言を賜りました北海道大学大学院工学研究科教授棟方正信博士、直接御指導御鞭撻を頂きました同助教授柴肇一博士に厚く御礼申し上げます。本論文を作成するに当たり最終的な仕上げに御尽力頂いた同教授木下晋一博士、同教授上館民夫博士、実験機材等快適な研究環境を御提供下さった同教授高井光男博士、同助教授恵良田知樹博士、同助手藤原政司先生に心から感謝致します。研究開始当初から様々な御指導、御助言を頂いた同助手田島健次博士に深く感謝致します。また、研究内外において多大な協力を頂いた学内外の諸先生、諸先輩、同輩、後輩方、その他多くの方々に厚く御礼申し上げます。

最後に、これまで如何なる時も暖かく支援して下さいました両親に深く感謝致します。

2001年1月28日

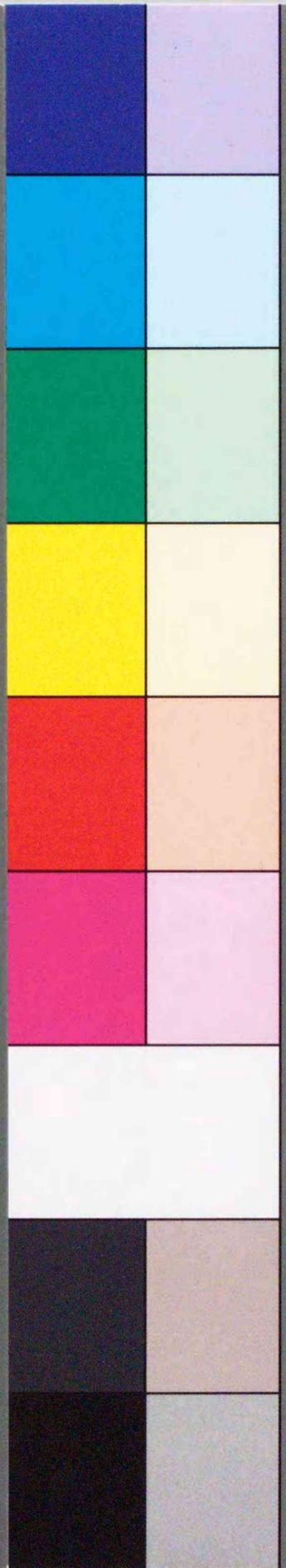
堤 香織



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale

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



© Kodak, 2007 TM: Kodak