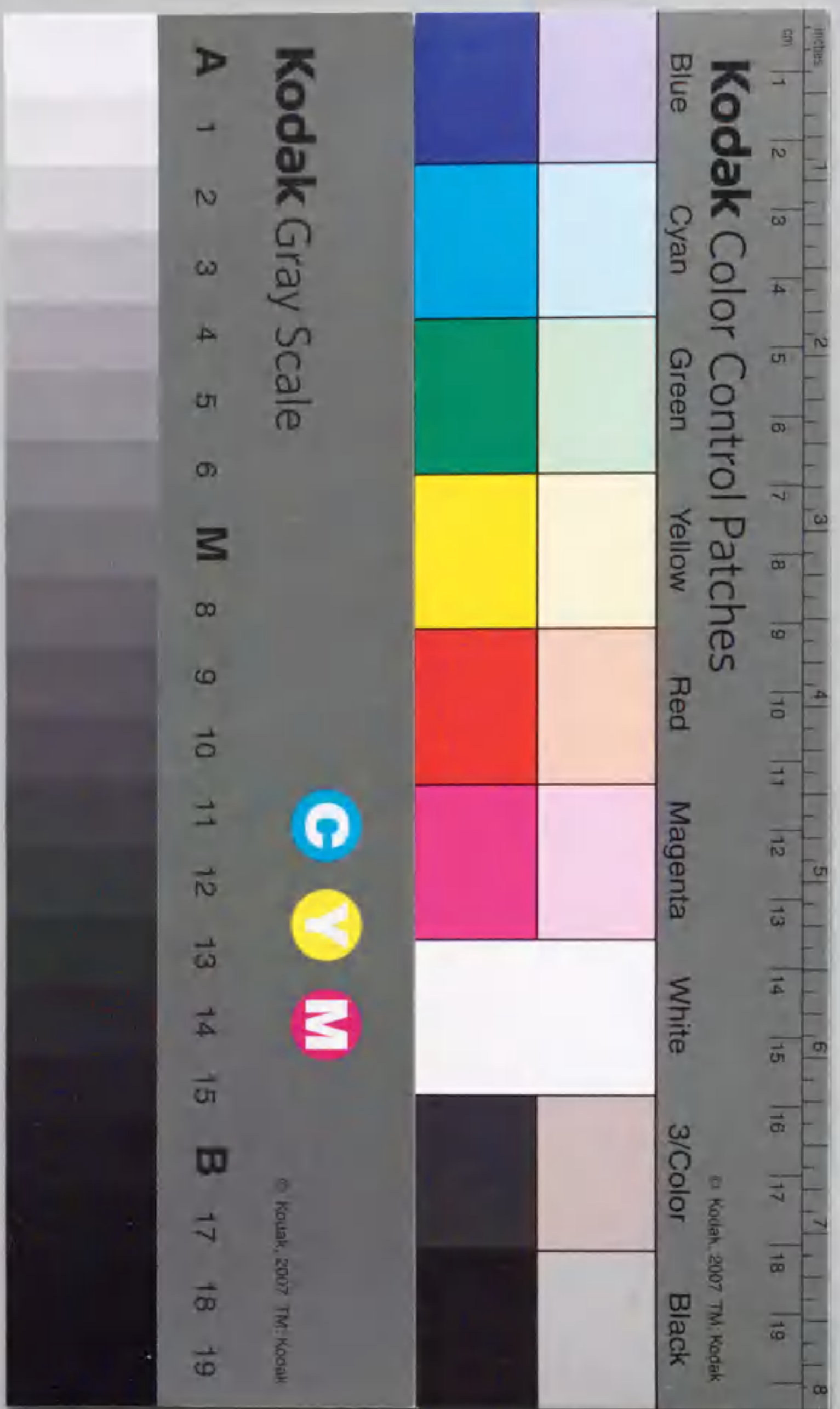


大腸菌とラン藻を用いた  
微生物環境適応系の分子機構解析

金丸研吾



報告書 乙 4757 号

①

大腸菌とラン藻を用いた  
微生物環境適応系の分子機構解析

金丸研吾

大正天皇御即位二十周年紀念  
皇太后陛下御即位二十周年紀念

皇太后陛下御即位二十周年紀念

目次

第一章 皇太后陛下御即位二十周年紀念の意義  
第二章 皇太后陛下御即位二十周年紀念の経緯  
第三章 皇太后陛下御即位二十周年紀念の準備  
第四章 皇太后陛下御即位二十周年紀念の式典  
第五章 皇太后陛下御即位二十周年紀念の祝賀  
第六章 皇太后陛下御即位二十周年紀念の追善  
第七章 皇太后陛下御即位二十周年紀念の功績  
第八章 皇太后陛下御即位二十周年紀念の意義  
第九章 皇太后陛下御即位二十周年紀念の経緯  
第十章 皇太后陛下御即位二十周年紀念の準備  
第十一章 皇太后陛下御即位二十周年紀念の式典  
第十二章 皇太后陛下御即位二十周年紀念の祝賀  
第十三章 皇太后陛下御即位二十周年紀念の追善  
第十四章 皇太后陛下御即位二十周年紀念の功績

目次	1
略語表	5
第一章 序論～微生物の環境適応をどうとらえ、どう解析するか	7
第二章 大腸菌の浸透圧応答における細胞内情報伝達系	
第一節 緒言～制御因子EnvZとOmpRについての3テーマ	11
第二節 ompR3変異を復帰させるenvZ30変異の解析	
2-2-1 envZ30は <i>in vivo</i> でompR3に由来するOmpF <sup>-</sup> 、OmpCCの表現型をほぼ野生型に 復帰させた	15
2-2-2 EnvZ30*は <i>in vitro</i> で自己リン酸化しなかった	16
2-2-3 EnvZ30*は <i>in vitro</i> でOmpR3をリン酸化も脱リン酸化もできなかった	17
Fig. 1～5	18
第三節 二成分制御系で保存されたアミノ酸残基のEnvZ、OmpRにおける重要性	
2-3-1 EnvZ243R*は <i>in vitro</i> で自己リン酸化能、OmpRのリン酸化、脱リン酸化能 全てを失っていた	23
2-3-2 OmpR55Qは <i>in vitro</i> でリン酸化能を失っていた	23
2-3-3 OmpR12Vは <i>in vitro</i> でわずかしかりん酸化しなかった	24
2-3-4 envZ243Rは <i>in vivo</i> でenvZ欠失株の表現型を示した	25
2-3-5 ompR55Qは <i>in vivo</i> でOmpFもOmpCも発現できなかった	25
2-3-6 ompR12Vは <i>in vivo</i> でユニークな表現型を示した	26
Fig. 6～11	27
第四節 リン酸化非依存的に機能するOmpR55Q/102C、OmpR102Cの解析	
2-4-1 ompR55Q/102Cは <i>in vivo</i> でompF、ompCの転写を活性化した	33
2-4-2 ompR55Q/102C、ompR102Cは <i>in vivo</i> でenvZ非依存的に正常な浸透圧応答を 示した	34
2-4-3 OmpR55Q/102Cは <i>in vitro</i> でリン酸化能を失ったままだった	35

2-4-4	OmpR102Cは <i>in vitro</i> でリン酸化能を回復していた	35
2-4-5	OmpR55Q/102C、OmpR102Cは <i>in vitro</i> で特異的DNA結合能が上昇していた	35
2-4-6	<i>ompR55Q</i> を <i>in vivo</i> で多コピー化するにつれて表現型は回復した	36
	Fig. 12~18	37

第五節	考察	44
-----	----	----

#### 第六節 実験材料と実験方法

2-6-1	試薬関連、合成オリゴヌクレオチド	56
2-6-2	菌株、プラスミド、培地	57
2-6-3	部位特異的変異法、MNNG変異法	62
2-6-4	アガロースゲル電気泳動とDNA断片のエリューション	64
2-6-5	$\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定	66
2-6-6	大腸菌外膜画分の調製	66
2-6-7	SDS-PAGE、urea-SDS-PAGEとゲル染色	67
2-6-8	ウェスタンブロッティング	68
2-6-9	シーケンシング	69
2-6-10	EnvZ*の精製と定量	70
2-6-11	OmpRの精製と定量	71
2-6-12	EnvZ*の <i>in vitro</i> 自己リン酸化能の解析	72
2-6-13	EnvZ*-OmpR間の <i>in vitro</i> リン酸転移反応の解析	73
2-6-14	EnvZ*によるOmpRの <i>in vitro</i> 脱リン酸化の解析	74
2-6-15	<i>in vitro</i> ゲルシフトアッセイ	74
2-6-16	<i>in vitro</i> クロスリンキング	75

### 第三章 ラン藻のP型ATPaseによるカチオン濃度変化への適応機構

第一節	緒言~解析対象と手法の選択	76
-----	---------------	----

#### 第二節 ラン藻のP型ATPase遺伝子*pacS*、*pacL*のクローニングと塩基配列決定

3-2-1	合成混合オリゴヌクレオチドによるPCRで2つのプローブが得られた	80
-------	----------------------------------	----

3-2-2	$\lambda$ DASHライブラリーから全領域を含むクローンを取得し、塩基配列を決定した	80
3-2-3	PacSは重金属輸送性P型ATPaseと高い相同性を示した	81
3-2-4	PacLは真核生物由来のカルシウム輸送性P型ATPaseと高い相同性を示した	83
3-2-5	<i>pacS</i> 上流逆向きにMIPファミリーのひとつをコードする遺伝子 ( <i>smpX</i> ) があった	84
	Fig. 19~23	86
第三節 <i>pacS</i> 、 <i>pacL</i> の欠失によるカチオン要求性、耐性の変化		
3-3-1	DEL-L、DEL-Sとも塩耐性、浸透圧耐性の低下が認められた	91
3-3-2	DEL-Sは銅、銀に対する耐性の低下が顕著だった	92
	Fig. 24~26	94
第四節 <i>pacS</i> の転写制御		
3-4-1	<i>pacS</i> mRNAは銅、銀の培地への添加で速やかに増加した	97
3-4-2	<i>pacS</i> の転写開始点は翻訳開始コドンの33bp上流にあった	98
	Fig. 27~29	99
第五節 PacSタンパク質の合成誘導と局在性		
3-5-1	MBP-PacSフュージョンタンパク質を用いてマウスで抗体を作成した	102
3-5-2	PacSタンパク質は銅、銀の培地への添加で速やかに細胞内に蓄積した	102
3-5-3	PacSタンパク質は大部分が細胞膜ではなくチラコイド膜に局在した	103
	Fig. 30, 31	104
第六節 考察		
		106
第七節 実験材料と実験方法		
3-7-1	試薬関連、合成オリゴヌクレオチド	115
3-7-2	菌株、プラスミド、ラン藻用BG11培地及び培養・保存条件	116
3-7-3	ラン藻からのゲノムDNA調製	121
3-7-4	MOPAC法によるPCR	121
3-7-5	サザンハイブリダイゼーション	122

3-7-6	ブランクハイブリダイゼーション	124
3-7-7	$\lambda$ DASHファージDNAの調製	124
3-7-8	シークエンシング	125
3-7-9	<i>pacS</i> 、 <i>pacL</i> 、 <i>smpX</i> 、 <i>pacS-smpX</i> 欠失変異株の作成	126
3-7-10	ラン藻のプラスミドによる形質転換	127
3-7-11	蛍光分析による培地中の銅濃度測定	127
3-7-12	ラン藻からのRNA調製	127
3-7-13	ノーザンハイブリダイゼーション	128
3-7-14	プライマーエクステンション	130
3-7-15	MBP-PacSの大腸菌での大量合成と精製	131
3-7-16	MBP-PacSに対するマウスポリクローナル抗体の作成	132
3-7-17	ラン藻全細胞画分の調製	132
3-7-18	ラン藻膜画分の外膜、内膜、チラコイド膜への分離	132
3-7-19	ウェスタンブロッティング	133

#### 第四章 二成分制御系とP型ATPase研究の新展開

第一節	細胞内情報伝達系の生物界における普遍性の拡大	134
-----	------------------------	-----

第二節	P型Cu <sup>2+</sup> -ATPaseの生物界における普遍性の拡大	137
-----	--	-----

第五章	要約	140
-----	----	-----

引用文献	142
------	-----

報文目録	153
------	-----

参考論文目録	154
--------	-----

謝辞	155
----	-----



Faint, illegible text on the left page, likely bleed-through from the reverse side of the paper.

略語表

略語表  
1. ...  
2. ...  
3. ...  
4. ...  
5. ...  
6. ...  
7. ...  
8. ...  
9. ...  
10. ...  
11. ...  
12. ...  
13. ...  
14. ...  
15. ...  
16. ...  
17. ...  
18. ...  
19. ...  
20. ...  
21. ...  
22. ...  
23. ...  
24. ...  
25. ...  
26. ...  
27. ...  
28. ...  
29. ...  
30. ...  
31. ...  
32. ...  
33. ...  
34. ...  
35. ...  
36. ...  
37. ...  
38. ...  
39. ...  
40. ...  
41. ...  
42. ...  
43. ...  
44. ...  
45. ...  
46. ...  
47. ...  
48. ...  
49. ...  
50. ...  
51. ...  
52. ...  
53. ...  
54. ...  
55. ...  
56. ...  
57. ...  
58. ...  
59. ...  
60. ...  
61. ...  
62. ...  
63. ...  
64. ...  
65. ...  
66. ...  
67. ...  
68. ...  
69. ...  
70. ...  
71. ...  
72. ...  
73. ...  
74. ...  
75. ...  
76. ...  
77. ...  
78. ...  
79. ...  
80. ...  
81. ...  
82. ...  
83. ...  
84. ...  
85. ...  
86. ...  
87. ...  
88. ...  
89. ...  
90. ...  
91. ...  
92. ...  
93. ...  
94. ...  
95. ...  
96. ...  
97. ...  
98. ...  
99. ...  
100. ...

A ; adenine  
a. a. ; amino acids  
APS ; ammonium peroxodisulfate  
ATP ; adenosine-5'-triphosphate  
BCIP ; 5'-bromo -4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucoside  
BIS ; N,N'-methylenebisacrylamide  
bp ; base pair(s)  
BPB ; bromo phenol blue  
BSA ; bovine serum albumin  
C ; cytosine  
CBB ; coomassie brilliant blue  
dATP ; deoxyadenosine-5'-triphosphate  
dCTP ; deoxycytidine-5'-triphosphate  
DEAE-cellulose ; diethylaminoethyl-cellulose  
dGTP ; deoxyguanosine-5'-triphosphate  
DMS ; dimethyl sulfoxide  
DNA ; deoxyribonucleic acid  
dNTPs ; deoxyadenosine-5'-triphosphate, deoxyguanosine-5'-triphosphate,  
deoxycytidine-5'-triphosphate, deoxythymidine-5'-triphosphate  
DTT ; dithiothreitol  
EDTA ; ethylenediaminetetraacetic acid  
EGTA ; ethylene glycol bis ( $\beta$ -aminoethylether) N,N',N'-tetraacetic acid  
ER ; endoplasmic reticulum  
FCA ; Freund's complete adjuvant  
FIA ; Freund's incomplete adjuvant  
G ; guanine  
GSH ; glutathione  
HQ ; 8-hydroxyquinoline  
IPTG ; isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside  
kb ; kilo-base pair(s)  
kDa ; kilo-dalton(s)  
2-MET ; 2-mercaptoethanol

MNNG ; N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine  
MOPAC ; Mixed Oligonucleotide Primed Amplification  
MOPS ; 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid  
NBT ; nitro blue tetrazolium  
ONPG ; o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside  
ORF ; open reading frame  
PAG ; polyacrylamide gel  
PAGE ; polyacrylamide gel electrophoresis  
PCR ; polymerase chain reaction  
PEG ; polyethylene glycol-6000  
PIPES ; piperazine-N,N'-bis (2-ethanesulfonic Acid)  
PMSF ; phenylmethylsulfonyl Fluoride  
POPOP ; 1,4-bis [2-(5-phenyloxazolyl)] benzene  
PPO ; 2,5-diphenyloxazole  
PT ; 1,10-phenanthroline  
SR ; sarcoplasmic reticulum  
SDS ; sodium dodecyl sulfate  
TCA ; trichloroacetic acid  
TEMED ; N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine  
TES ; N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic Acid  
Tris ; Tris (hydroxymethyl) aminomethane  
XC ; xylene cyanol

1997年10月1日発行  
発行所：東京大学出版会  
ISBN 4-13-031000-0  
定価：2,800円（税別）  
送料：別記  
印刷：東京大学出版会印刷局  
製本：東京大学出版会製本局  
発行部局：東京大学出版会  
〒100-8302 東京都千代田区千代田1-7-8  
TEL 03-5541-1234 FAX 03-5541-1235  
E-MAIL info@tokyo-u-pub.co.jp  
URL http://www.tokyo-u-pub.co.jp

# 第一章 序論～微生物の環境適応をどうとらえ、どう解析するか

微生物は地球上に広く分布し、多様な環境に適応して生存している。その生存戦略は、環境の変化に迅速に対応できる能力に由来する。本章では、微生物の環境適応のメカニズムを解説し、その解析方法を論じる。

微生物の環境適応は、遺伝子発現の調節、代謝経路の変更、細胞膜の組成変化などによって行われる。これらの過程は、環境の変化に対するセンサーによって感知され、シグナル伝達経路を通じて実行される。本章では、これらのメカニズムを詳しく説明し、最新の解析技術を用いた研究の進捗を報告する。

「微生物の環境適応」。まず、この言葉が内包するところについて掘り下げ、著者がどういう点に着目し、どう取り組んだかを明確にしておく。

自然界における微生物の生育環境は実に多様である。これらは客観的に互いに重複し合う面もあるが大きく、物理・化学的条件、生物的条件、そしてそれらを総合した上での安定性、の3要素に分けてとらえることができるだろう。物理・化学的条件としては、例えば温度、湿度、圧力、光、無機物、有機物、pH、大気（酸素、窒素、二酸化炭素）などが挙げられる。生物的条件とは、そこに生育する生物間の相互作用と換言できるもので、共生、寄生、拮抗（競争）、捕食・被食関係などがある。そして安定性とは、その空間が長期にわたって物理・化学的条件の変化が小さく、その結果生物的にも固定的な状態なのか、それとも物理・化学的条件が短期間で大きく変化して生物的にも動的な状態かということである。

これら3要素を、主観的に（微生物の生育面から）とらえ、例を挙げて説明すると次のようになる。まず微生物にとってこれらの「環境」要因は生育に有利にも不利（阻害的）にも作用しうる。一般に環境ストレスと認識されているものには、高温、低温、高圧、乾燥、高塩濃度、過剰な重金属、有機溶媒、高浸透圧、強酸、強アルカリ、強光、栄養飢餓などがあり、大部分の生物が生育する「標準的な」環境から大きくはずれた、例えば熱水中や数100気圧の深海、pH10以上やpH4以下といった条件下で生育する「極限環境微生物」も数多くいる。しかし、ある微生物がある環境条件で「生育できる」状態には、「耐えている」場合と「好んでいる（必要とする）」場合の2つがあり、どれだけ極端な環境条件で生育できるかという問題と、どれだけ広い範囲の環境条件変化に適応できるかは次元の異なる問題である。つまり、熱水中や4M以上の塩水中に生息し、安定した生物群集を長期間維持していても、常温や生理食塩水の条件ではあっけなく死滅する微生物がいる一方で、熱水や極端な塩濃度では生きられないが、50°C以上の温度変化や1~2M程度の塩濃度変化には個体が耐性で、刻々変動する環境条件に適応して個体群を維持できる微生物がいるのである。また生物間の相互作用も見逃せない問題で、栄養に富む培地で純粋培養すれば充分肉眼で観察できるコロニーを形成する土壌微生物であっても、実際土壌中でのコロニーの大きさはせいぜい数10 $\mu$ mにしか過ぎない。これはわずかに数10 $\mu$ mしか離れていない隣接する微小空間の物理的・化学的条件が異なるからということもあるが、むしろ拮抗菌が存在しているため、その微生物が生存能力を駆使してその環境に適応して生育しようとしても、生存が許容されないためである。

ここで次に、「適応」とは何かを考えてみたい。適応は、最終的には種の維持のために機能しているという差し支えないであろうが、個体レベルの適応と、個体群としての適応に分けられる。前者は主に遺伝子発現を通じて行われ、後者は、突然変異、自然淘汰を通じて達成される。きわめて単純化すれば、100万匹いる微生物が、基本的に100万匹全て生き残ろうとするのが個体レベルの適応で、1匹でもいいから生き残ろうとするのが個体群としての適応である。個体の遺伝子発現の多様性をもってしても環境変化の多様性に対応できない場合、個体群として多様性をもつことが種を維持していくためには重要で、この場合は遺伝子変異の多様性が環境適応を可能にするのである。自然界における適応過程は生物の表現型に着目すると「環境変化A→個体の生理、生態特性の変化→生物間、非生物間との相互作用→個体群の維持、増加→環境変化B」というサイクルとして観察されるであろう。さらに個体レベルの適応の場合、この最初のステップに「環境変化→感知→遺伝子発現→生理、生態特性の変化」という過程が存在することになる。

環境変化に対する適応の中身は生態学的にはどう大別できるだろう。それは孢子（耐久細胞）形成のように個体または個体群がそれまで属していた環境や生物群集との関係を断ち切る場合と、エネルギーや物質を効率よく取り入れ効果的に利用したり、逆に生育に阻害的なものを排出あるいは代謝して無毒化したり、細胞構成因子（膜構造、タンパク質、核酸など）を強化、安定化するように生理特性を変化させるといった、あくまで周囲の環境や生物群集との関係のなかで生命活動を維持する場合の2つになると思われる。

以上のような認識に立脚して、では著者がいかに「微生物の環境適応」というテーマに取り組んだかを端的に抽象化すると「特定の微生物が特定の環境変化（ストレス）に、個体レベルで生理特性を変化させる適応現象について、直接関与するごく少数の遺伝子、タンパク質をごく限られた方法で機械論的に解析し、広く生物に共通した法則（普遍性）を見いだそう」としたと表現できる。したがって上述した、自然生態系の複雑さ、複合的な環境、生物の多様性、個性、特殊性といった因子はほとんど無視している。これはいわゆる分子微生物学的アプローチと言えるが、こうしたスタンスに立脚した方法で、生命現象の基本メカニズムに関して広く普遍性をもつ数多くの知見が得られてきていることは確かである。そしてまだごく一部ではあるが、個々の遺伝子発現の解析から一歩進んで複数の遺伝子群が関与する複雑な情報系の全体像の解明を目指すグローバルな研究や多様性の追求も進展し

つつあり、例えば複数の遺伝子群が共通の発現制御を受けるレギュロン (regulon) が発見され、さらにある種の外的刺激に应答して逐次的な遺伝子発現が起こるスティミュロン (stimulon) 遺伝子群という捉え方も提唱されている。最終的には、一個体を越え、複雑な生物群集 (自然生態系) をいかに理解するかが課題となるであろうが、鍵となるのはこうした生態の諸現象にどのような分子生物学的パラメーターをどれだけ多数設定できるかであり、著者の研究や本論もこうした展望を意識したものとなっている。

具体的に著者が実験材料として用いた微生物は、大腸菌とラン藻である。大腸菌は、地球上で最もよく調べられた生物と言っても過言ではなく、膨大な知識の蓄積と、解析のための技術やツールが多数開発されている。一方ラン藻は、酸素発生型光合成を営むユニークな原核生物で、植物葉緑体の原型 (原始葉緑体) として、光合成系の研究に用いられるだけでなく、糸状性のラン藻は栄養飢餓条件下で窒素固定能をもつ異型細胞 (ヘテロシスト) を分化させることから、窒素固定や分化の分子機構を解析する上でも有用な微生物である。

次に、これらの実験生物を用い、どんな環境因子に対するどの適応段階を解析したかであるが、さきほど個体レベルの適応の場合、「環境変化→感知→遺伝子発現→生理、生態特性の変化」という過程が存在することを述べた。

大腸菌ではすでに数多くの遺伝子発現レベルでの環境応答系が知られている。そのひとつに、「培地浸透圧変化→EnvZによる感知→OmpRによる *ompF*、*ompC* の発現調節→外膜タンパク質の組成変化」という osmoregulation の系があり、分子レベルの解析が可能になっていた。そこで、著者はこの適応過程の「EnvZによる感知→OmpRによる *ompF*、*ompC* の発現調節」(感知→遺伝子発現) における、リン酸転移反応を介した制御因子 EnvZ-OmpR 間の情報伝達と OmpR の活性調節について解析し、原核生物における細胞内情報伝達系の分子機構における普遍性の探求を志向した。このことについて、第二章で述べる。

一方ラン藻は、原核生物としての特徴と植物としての特徴を合わせ持ち「一人で生きる葉緑体」ともいえるユニークな生態をもっている。そこで著者は光合成という、複雑で巧妙な化学反応を細胞内膜系のチラコイド膜で営むこの生物の「培地無機環境の変化→感知→遺伝子発現→無機物輸送系による細胞内環境の安定化」という適応過程に注目した。そして遺伝子、タンパク質レベルでこの現象を探る手がかりとして、広く生物界でカチオン輸送系を構成する P 型 ATPase を取り上げ、「遺伝

Chapter 11. ...

Chapter 12. ...

Chapter 13. ...

Chapter 14. ...

Chapter 15. ...

子発現→生理、生態特性の変化」のステップの一例を見だし、発現制御、タンパク質の構造と機能に関する普遍性の発見を目指した解析を行った。このことについて、第三章で述べる。

そして第四章では、著者が対象としたこれら2つの系の分子メカニズムの普遍性が、生物界においてどこまで拡大してきているかについて紹介する。

## 第二章 大腸菌の遺伝子発現系における 細胞内情報伝達系



10

11

## 第二章 大腸菌の浸透圧応答における 細胞内情報伝達系

11

## 第一節 緒言～制御因子EnvZとOmpRについての3テーマ

グラム陰性通性嫌気性桿菌大腸菌 (*Escherichia coli*) は外膜、内膜のリン脂質二重層からなる細胞膜を有する。外的環境と直接接し、細胞形態の維持、物質の透過障壁として機能する外膜は、リポ多糖 (LPS; lipopolysaccharides) からなる外葉と、phosphatidyl ethanolamine (PE)、phosphatidyl glycerol (PG) を主成分とする内葉の非対称構造に内側からペプチドグリカン (peptide glycan) 層がリポタンパク質 (Lpp; lipoprotein) を介して結合した構造をとっている。外膜からは、これまでに50前後のタンパク質が同定されているが、内膜タンパク質と比較するとその種類は少なく、主要外膜タンパク質OmpA、OmpF、OmpCとLppが1細胞当たりそれぞれ10～100万分子と量的には大部分を占める。分子量700程度までの親水性物質はこの主要外膜タンパク質等が形成するポリン (porin) を介して透過するが、分子量がそれ以上の物質や、抗生物質、界面活性剤といったものの透過は制限され、LPSが重要な働きを果たしている。一方、内膜は外膜内葉と同じPE、PGを主成分としたリン脂質二重層であり、電子伝達系、タンパク質分泌系、イオンチャンネル、イオンポンプ、糖類取り込み系 (PTS; phosphotransferase system)、アミノ酸やその他炭素源の取り込み系、これから論ずるEnvZを含めた様々な環境sensor系、など数百の様々な機能をもったタンパク質が存在している。

著者らが、解析の対象とした外膜タンパク質OmpF、OmpCの生合成における浸透圧調節 (osmoregulation) は1970年代後半に報告された現象で、培地浸透圧が低いときに大腸菌はOmpFを優先的に発現するが、浸透圧が高くなるとOmpFの発現量は減少し、かわってOmpCが増大するというものである [1, 2]。OmpFとOmpCはともに約37kDaのタンパク質でアミノ酸一次配列上、両者には70%程度の一致がみられ、ホモ三量体または両者によるヘテロ三量体で親水性低分子物質の透過孔を形成している [3]。これまでOmpF、OmpC両タンパク質間に明確な機能、特異性の差は認められておらず、osmoregulationの生理的意義ははっきりしないが、培地にsucroseやNaClを加えるだけで容易に観察できる現象でもあり、大腸菌における環境応答系の分子機構解析を進めるためのモデル系のひとつとして精力的に研究が進められた。その結果、最初の報告から著者が本研究に携わるまでの10年間に、その遺伝的背景、制御機構の大筋は、以下のとおり既に明らかにされていた [4]。

大腸菌染色体21分の *ompF*、47分の *ompC* は、74分に位置する *ompB* 領域の *ompR-envZ* によって正の転写調節を受けている [5]。EnvZは推定分子量49.5kDaの内膜

タンパク質であり何らかの機構で浸透圧変化を感知するsensorとして機能していると予想される[6]。また、その情報は推定分子量26kDaの転写活性化因子OmpRに伝達されompF、ompCプロモーター上流のOmpR結合部位に結合することで転写を活性化している[7,8]。この点に関して補足すると、ompCプロモーターと上流のOmpR結合部位の間に塩基挿入して転写活性を調べた前田らの解析結果から、DNAの1螺旋周期11bpの整数倍の挿入では活性が見られるが半螺旋回転するような挿入では活性がなく、したがって、OmpRによる転写の活性化はOmpRとRNA polymeraseの三次元的位置関係が重要であることが示唆されている[9]。

ompCのさらに上流には逆向きにompF mRNAのリボソーム結合部位ならびにATGコドンを含む5'末端領域に相補的な配列をもち、いわゆるアンチセンスRNAとして機能する最初の例として報告されたmicFが存在し、ompF、ompCの転写調節を迅速かつ完全に行う補助因子として機能している[10,11]。またmicFはosmoregulationの他に、温度上昇(20~24°C→37°C)によるOmpFの合成量低下というthermoregulationにも関与しており、envZ非依存的にmicF RNAの発現量が増加することでこの現象が制御されていることが示唆されている[12]。

EnvZ-OmpR間の情報伝達の本質についてin vitroでは、精製EnvZ\* (N末端80a.a.の疎水性領域を欠失した可溶性EnvZ)と精製OmpRの間で3つの生化学的反応、すなわち、ATP $\gamma$ 位のリン酸基によるEnvZ\*の自己リン酸化、リン酸化型EnvZ\*のリン酸基転移によるOmpRのリン酸化、ATP、EnvZ\*存在下でのリン酸化型OmpRの脱リン酸化が観察されていた[13~16]。また、

- ① 精製OmpRはリン酸化によってompF、ompCプロモーター上流の結合部位に対する親和性を上昇する[17]。
- ② envZ11変異株 (EnvZの247ThrがArgに置換) は、in vivoでOmpCC (OmpC constitutive) な表現型を示すが、in vitroで精製EnvZ11\*は野生型OmpRをリン酸化するが脱リン酸化できず、偽復帰変異株から得られたOmpR77 (16LeuがGlnに置換) はEnvZ11\*によってリン酸化を受けにくくなっている[18]。
- ③ ompR3変異株 (OmpRの15ArgがCysに置換) もまたin vivoでOmpCCであり、精製OmpR3はEnvZ\*によってリン酸化されるが脱リン酸化されない[18,19]。ことなどが示唆されており、リン酸化型OmpRの蓄積がompCの転写活性化に必要と考えられていた。

一方、EnvZ-OmpRに関してこうした知見が蓄積する中、原核生物の様々な環境応答系において、EnvZ-OmpRのように2つのタンパク質がペアで制御系を構成してい

る例が、あとを追うように次々報告された。しかも、これら2つのタンパク質の一方はEnvZのC末端側約150a. a. と（最近では、transmitter領域と呼ぶことが多い）、他方はOmpRのN末端側約100a. a.（同じくreceiver領域）とのホモロジーが指摘され、細胞内情報伝達機構に共通のリン酸化反応が使用されているらしいことが明らかとなってくるに至り、総称して二成分制御系（Two-component system）と呼ぶことが提唱されていた[20, 21, 22]。

これらの事実を踏まえ、著者が設定したテーマは、次の3点であった。

- ① *in vitro*で観察されたEnvZ-OmpR間のリン酸化反応は、本当に*in vivo*における情報伝達系の本質であるか。
- ② 転写活性化因子OmpRはリン酸化、脱リン酸化を介してどのように*ompF*、*ompC*の転写調節（スイッチング）を行っているのか。
- ③ OmpRのリン酸化はOmpRにどのような構造上の変化をもたらすのか。OmpRの活性化にはリン酸化そのものが必要なのか。

これらのテーマに対して著者は以下の3つのコンセプトで*envZ*変異、*ompR*変異を取得し、その解答を求めた。

まず、脱リン酸化能を失ったEnvZ11によるOmpCの表現型をリン酸化されにくくなったOmpR77がサプレスしたが、*envZ11*変異同様、OmpCの表現型を示し、*in vitro*で精製標品が野生型EnvZによって脱リン酸化されない*ompR3*変異を*in vivo*でサプレスする*envZ30*が饗場により取得されていた。そこで、この変異EnvZが*in vivo*でどのような表現型を与えるかをさらに詳細に観察し、*in vitro*でどのような活性変化が起こっているのかを解析することで、EnvZ-OmpR間のリン酸転移反応と転写活性化の相関性を一層明確にできないかと考えた。この結果について、第二節で論ずる。

次に、もっと直接的にEnvZ、OmpRのリン酸化部位を特定できないか、リン酸化できない変異EnvZやOmpRが作成できれば*in vivo*の表現型と*in vitro*の性質からOmpRのリン酸化と転写の活性化、スイッチングの関係を見いだすことができるのではないかと考えた。当時、既に、様々な原核生物の20前後もの環境応答系から二成分制御系に属するタンパク質が発見され、アミノ酸配列の比較から、情報伝達（＝リン酸化反応）を担っていると考えられる保存領域内にさらに全てのEnvZファミリー（sensorファミリー）、OmpRファミリー（regulatorファミリー）で保存されたアミノ酸残基が指摘されていた。そしてEnvZ/OmpRと平行して、窒素源の枯渇に応答するNtrB/NtrC [23, 24, 25]、走化性（鞭毛の回転）を制御するCheA/CheY [26]、リン酸

欠乏に応答するPhoR/PhoB [27]などの解析が進んでいたが、NtrB/NtrC、CheA/CheYではこれら保存されたアミノ酸残基中にリン酸化部位があることが既に示唆されていた。つまり、sensorタンパク質NtrBとCheAのリン酸基については酸性下で不安定だが中性やアルカリ性では安定なN結合性リン酸であり、アルカリ加水分解産物の二次元クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーからHis残基がリン酸化していること、トリプシン、キモトリプシン消化、逆層クロマトグラフィーでリン酸化しているポリペプチドを分離、そのアミノ酸配列を決定して、CheAでは48番目[28]、NtrBでは139番目[29, 30]の全てのsensorタンパク質で保存されているHis残基がリン酸化していることが証明されていた。また、regulatorタンパク質NtrC、CheYについては、リン酸基が酸にもアルカリにも不安定なアシルリン酸の形で結合していることが判明したため、さらにCheYについては化学的に [3H] 標識した水素化ホウ素ナトリウムで不安定なリン酸基を置換標識し、この還元生成物のマスペクトル解析から、57番目の全てのregulatorタンパク質で保存されたAsp残基がリン酸化していることが示唆されていた[31]。これを、EnvZ、OmpRに当てはめるとEnvZは243番目のHis残基、OmpRは55番目のAsp残基ということになり、この2つのアミノ酸残基を部位特異的変異法でそれぞれArg、Glnに置換する変異 *envZ*、*ompR* を構築した。また、CheYでは全てのOmpRファミリーで保存されているもう一つのAsp (13Asp) をValに置換するとわずかしかりん酸化されなくなることから[31]、OmpRで12番目に相当するこのAspをやはりValに置換した変異 *ompR* も併せて構築した。それまで、OmpRが構造的にN末端側半分のリン酸化領域とC末端側半分の特異的DNA結合領域とに明確に分離していることは示唆されていたが[32]、OmpRのリン酸化領域の分子構造についてさらに一步踏み込んだ解析結果を変異EnvZの結果と併せて第三節で論ずる。

一方、OmpRにとってリン酸化は構造を変化させるために必要なものであって、リン酸化（あるいはリン酸基）そのものは転写活性化因子としての機能に必須ではないと仮定するならば、リン酸化非依存的に転写を活性化できる構造の変異OmpRが取得可能ではないかと考えた。もし取得できれば、さらにその性質の解析からOmpRがリン酸化することの真の意義を構造面や活性面から示唆できるのではないかと。さらに、*ompF*、*ompC*の転写調節についてもリン酸化という可変因子を除去した条件で観察できることから今まで見えなかった調節機構の存在も示唆できるかも知れないと考えた。そこで、リン酸化能を失い、*ompF*、*ompC*共に転写を活性化できない変異OmpRをコードすることが第三節で判明した *ompR55Q* に二次変異を導入し、EnvZ非依存的に転写を活性化しうる変異OmpRの取得と生化学的解析を試みた。

## 第二節 ompR3変異を復帰させる envZ30変異の解析

### 2-2-1 envZ30は *in vivo*で ompR3に由来する OmpF<sup>-</sup>、OmpCCの表現型をほぼ野生型に復帰させた

SM2007株は培地浸透圧に関わらず、OmpF<sup>-</sup>、OmpCC (OmpC constitutive) の表現型を示す ompR3型の変異株である[19]。また、20% sucrose存在下の高浸透圧条件でも親株のAB2847株は通常に生育できるのに対し、SM2007株では顕著な生育速度の低下が認められた。そこで、SM2007株から20% sucrose存在下で正常な生育を示す復帰変異株の取得したところ、外膜画分のurea-SDS-PAGE解析よりその中から、低浸透圧条件下でのOmpCの発現が抑制されOmpFの発現が回復している株が見つかった。HAI0013株はそのひとつであり、以下の解析に使用した。

Fig.1 panel Aに示すように、HAI0013株のOmpFは親株のAB2847株と較べると有意に量は少ないものの、明らかに培地浸透圧の変化に応答して合成され外膜に局在していた。では、HAI0013株は ompR3変異の真復帰変異株なのか、それとも envZ変異による偽復帰変異株なのか。HAI0013株を野生型 envZをのせたハイコピープラスミド pAT2004で形質転換した結果は、それが偽復帰変異である可能性を強く示唆した。すなわち、形質転換株は再びOmpF<sup>-</sup>、OmpCCの表現型を呈したのである。

著者らはHAI0013株の ompR-envZ上に起こった二次変異を同定するため、クロモゾームDNAから ompR-envZ (ompB) 領域をカバーする5.3kbの BamHI-SaII消化断片をクローニングベクターとライゲーションした。効率よくクローンを選択するため、このライゲーション液で ompR2変異株であるMH760 recA株を形質転換した。それは、目的のクローンをライゲートしたプラスミドはMH760 recA株[33]のOmpF<sup>+</sup>、OmpC<sup>-</sup>の表現型を高浸透圧条件下でOmpC<sup>+</sup>に変えると考えたからであった。形質転換株を15% sucrose培地でOmpC特異的なTuIbフェージとクロスストリークした結果は予想通りで、HAI0013株からの ompR-envZ領域のクローン化ができた。

クローン化DNAから AvaI-HpaI消化断片2.7kbをさらに別のプラスミドに移し、 ompR-envZ領域全塩基配列の決定を行った (Fig.1 panel B)。HAI0013株の envZでは、3'近傍の1052AがCに塩基置換しているのが認められ (塩基番号は envZの翻訳開始コドンのAを1とした場合の位置)、450a. a. からなるEnvZの<sup>351</sup>TyrがSerに置換していると推測された。 ompR上にOmpRの<sup>15</sup>ArgをCysに置換する ompR3変異はそのまま残っ

ており、他に変異はなかったことから、この変異envZをenvZ30と名付けた。

次に、HAI0013株で観察された表現型が、本当にenvZ30に対応しているかどうかを確かめるため、Fig.2 panel Aに示した一連のキメラompB領域をのせたシングルコピープラスミドで $\Delta ompB$ 株のSG480 $\Delta$ 76株[34]を形質転換し、ompF、ompCの発現について外膜画分のurea-SDS-PAGEで解析した (Fig.2 panel B)。SM2007株由来のpHAI030 (ompR3-envZ) で形質転換すると培地浸透圧に関わらずOmpCのみを合成したが、HAI0013株由来のpHAI031の場合 (ompR3-envZ30) では低浸透圧条件下で、OmpF<sup>+</sup>、OmpC<sup>+</sup>の表現型を示した。一方、pHAI030のDNA断片AとpHAI031のDNA断片BからなるpHAI032もまた、pHAI031と同様の表現型を示したことから、HAI0013株の表現型は確かにenvZ30に対応していることが明らかとなった。さらに、野生株由来のDNA断片AとHAI0013株由来のDNA断片BのキメラをのせたpHAI033 (ompR-envZ30) は、野生株由来のpMAN104 (ompR-envZ) と明らかに異なる表現型を示した。ウェスタンブロッティングの結果から、EnvZ30の細胞内合成量は野生型EnvZと比して低下しているとは認められず、envZ30変異はEnvZの機能そのものに何らかの変化をもたらしていることが予想された。そこで、EnvZ30の機能を、特にOmpRのリン酸化、脱リン酸化能の点から*in vitro*で解析することとした。

以上2-2-1の中で復帰変異株HAI0013の取得からenvZ30の変異点決定、キメラプラスミドの構築までは、共同研究者の饗場が行ったものであり、著者は外膜画分のurea-SDS-PAGE解析を担当した。以下の2章に関する実験は、全て著者の手で遂行した。

## 2-2-2 EnvZ30\*は*in vitro*で自己リン酸化しなかった

*in vitro*リン酸化実験に供するため、N末端側80a.a.を欠失して可溶性にしたtruncated EnvZ (以下EnvZ\*) およびEnvZ30\*を精製した[13]。饗場らによって、すでにATPによるEnvZ\*の自己リン酸化が観察されていたので、精製したEnvZ30\*について同様に0.1mM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP、5mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl存在下で自己リン酸化反応を試みた (Fig.3)。野生型EnvZ\*の場合、リン酸基の取り込みが約10分でプラトーに達したのに対し、EnvZ30\*では反応20分経過後もメンブレンフィルターに捕捉したタンパク質からカウントは検出されず、全くリン酸基の取り込みが認められなかった (panel A)。同様に、EnvZ\*に対して5倍量のEnvZ30\*を使ってリン酸化反応を行い、SDS-PAGEで分離後、オートラジオグラムを得た実験からもリン酸化したEnvZ30\*のバ

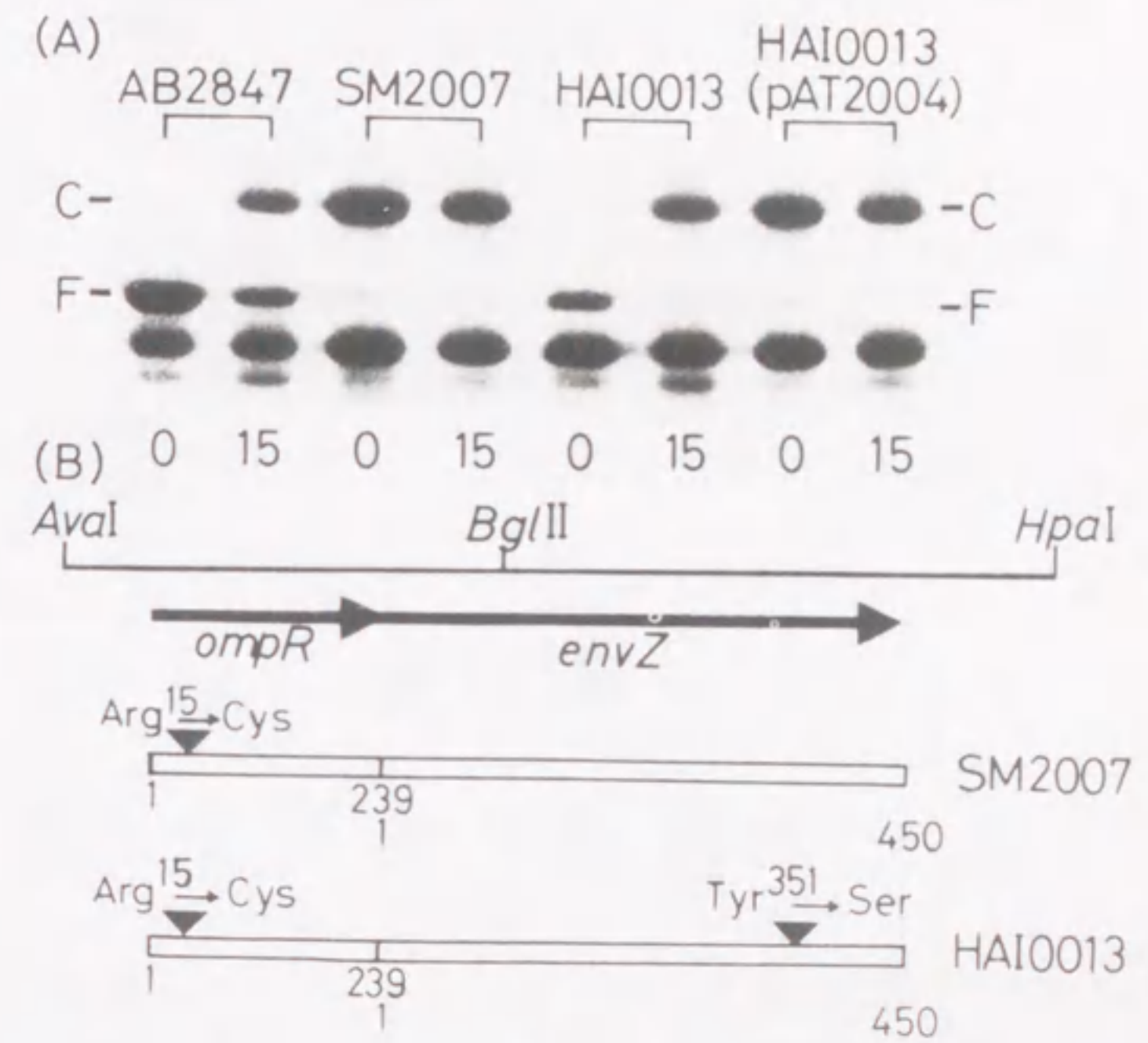
ンドは現れなかった (panel B)。したがって、EnvZ30\*は少なくとも *in vitro* でほぼ完全に自己リン酸化能を失っていることが判明した。

### 2-2-3 EnvZ30\*は *in vitro* でOmpR3をリン酸化も脱リン酸化もできなかった

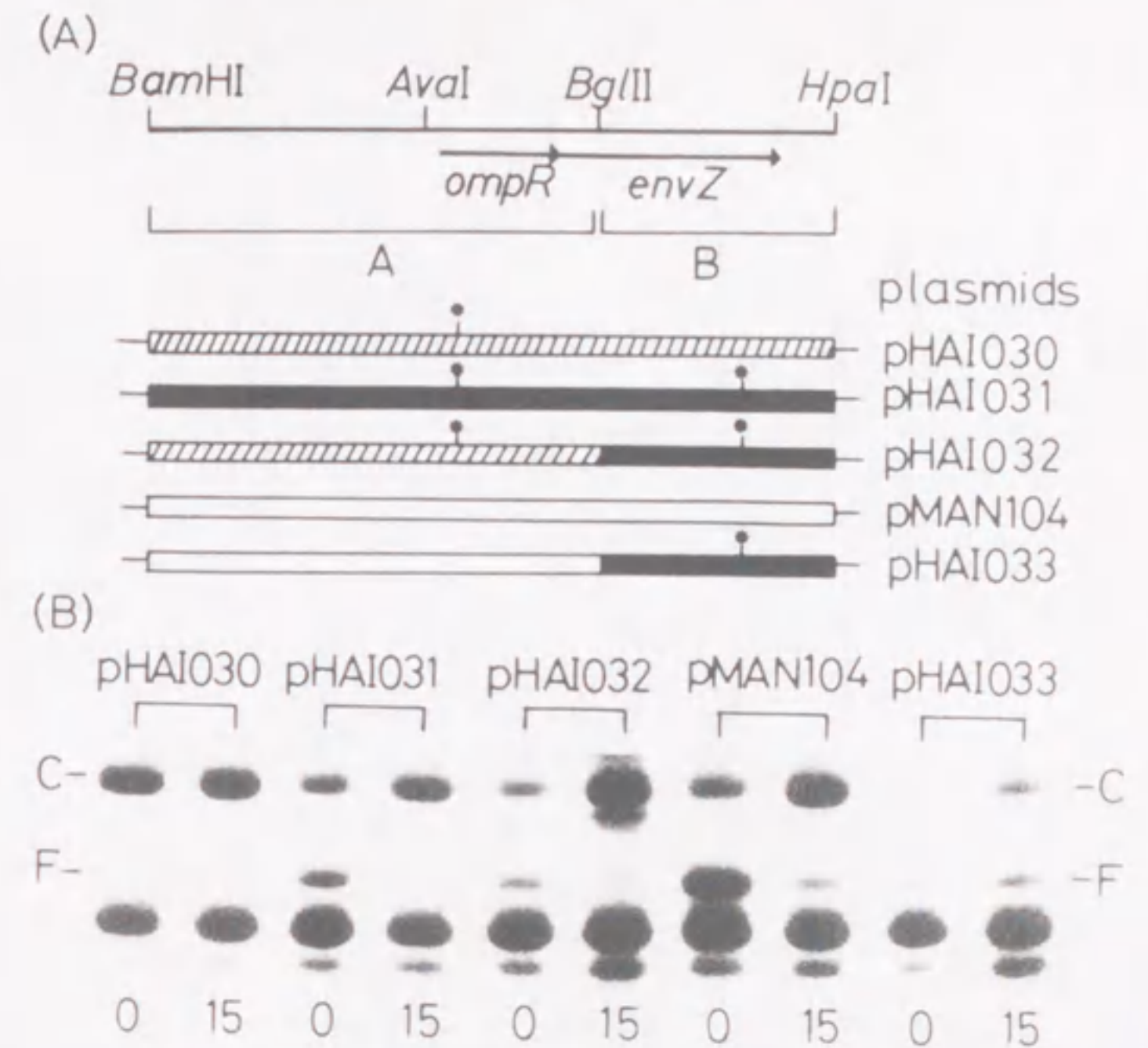
饗場らは野生型EnvZ\*が *in vitro* でOmpRをリン酸化する能力があることを示唆していた[13]。そこで、EnvZ30\*にこのkinase活性があるかどうかを解析するため、野生型OmpRおよびOmpR3を精製した[35]。脱リン酸化がほとんど起こらない性質を持つ精製OmpR3を0.1mM [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP、5mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl存在下EnvZ\*と反応し、1分、10分後にサンプリングしてSDS-PAGEで分離、オートラジオグラムをとると、Fig. 4に示したとおり安定的なOmpR3のリン酸化が認められた (lanes 4 and 5)。野生型OmpRとEnvZ\*を用いた実験からも脱リン酸化反応が同時に進行するためOmpR3ほど強いシグナルではないが明らかにOmpRのリン酸化が確認できた。一方EnvZ30\*の場合は、OmpR3、野生型OmpRどちらを使ってもリン酸化したOmpRのバンドは検出できなかった (lanes 2 and 3 and data not shown)。したがって、EnvZ30\*は少なくとも *in vitro* でほぼ完全に、OmpRに対するリン酸化能 (kinase活性) を失っていることが判明した。

では、EnvZ\*で見つかっているもう一つの活性、ATP存在下におけるリン酸化型OmpRの *in vitro* 脱リン酸化能について、EnvZ30\*はどうなっているのだろうか。この点を明らかにするため、まず精製したEnvZ11\*を、[ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATPで自己リン酸化後、分子ふるいカラム (Sephadex G-75) で未反応のATPを除いた。これをFig. 5に示したように、精製OmpRと混合し、その2分後さらにATP (panel A)、ATPとEnvZ\* (panel B)、ATPとEnvZ30\* (panel C) を反応液に加えてリン酸基の経時変化を追った。反応開始後わずか30秒でEnvZ11\*からOmpRへのリン酸転移はほぼ完了するが、EnvZ11\*はOmpRを脱リン酸化できない変異EnvZ\*であるためにATPを反応液に加えただけでは、リン酸化型OmpRの脱リン酸化は起こらず (panel A)、野生型EnvZ\*をATPと共に加えて初めて速やかな脱リン酸化が観察された (panel B)。しかし、この現象もEnvZ30\*では観察できなかったことから (panel C)、EnvZ30\*はOmpRに対する脱リン酸化能をも失っていることが判明した。

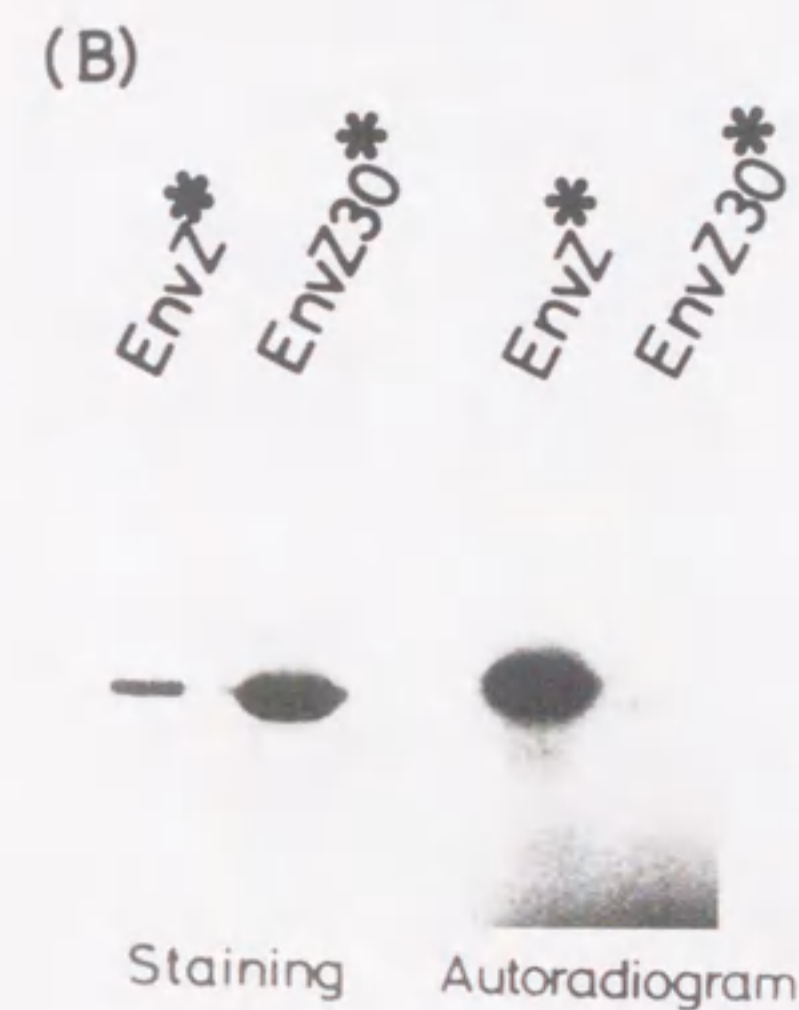
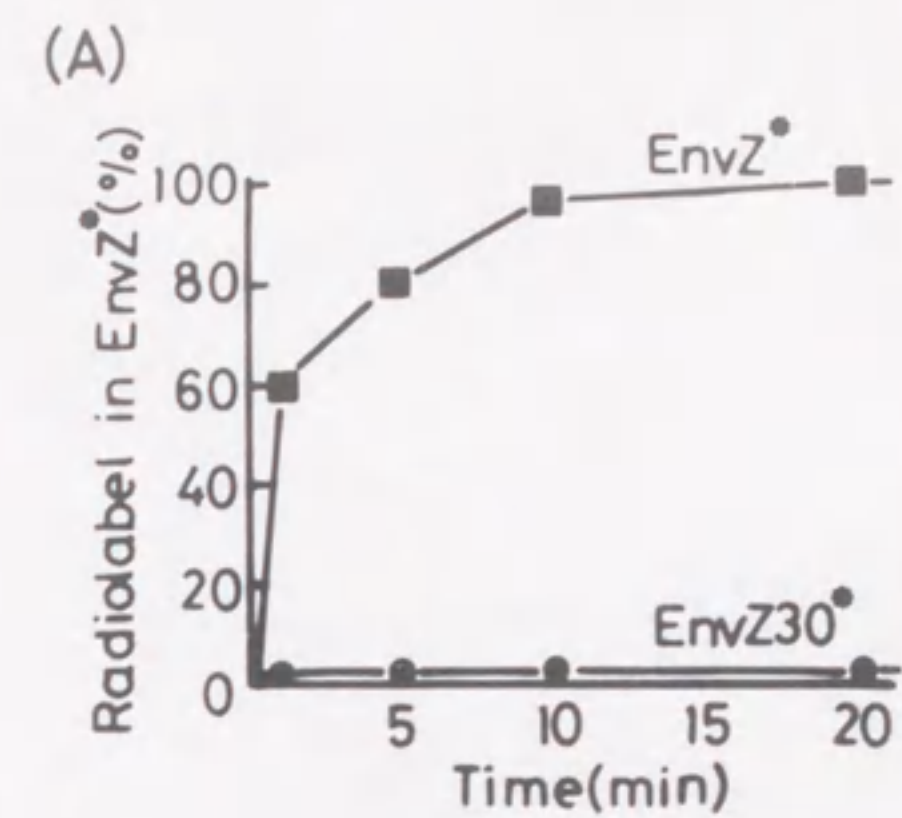




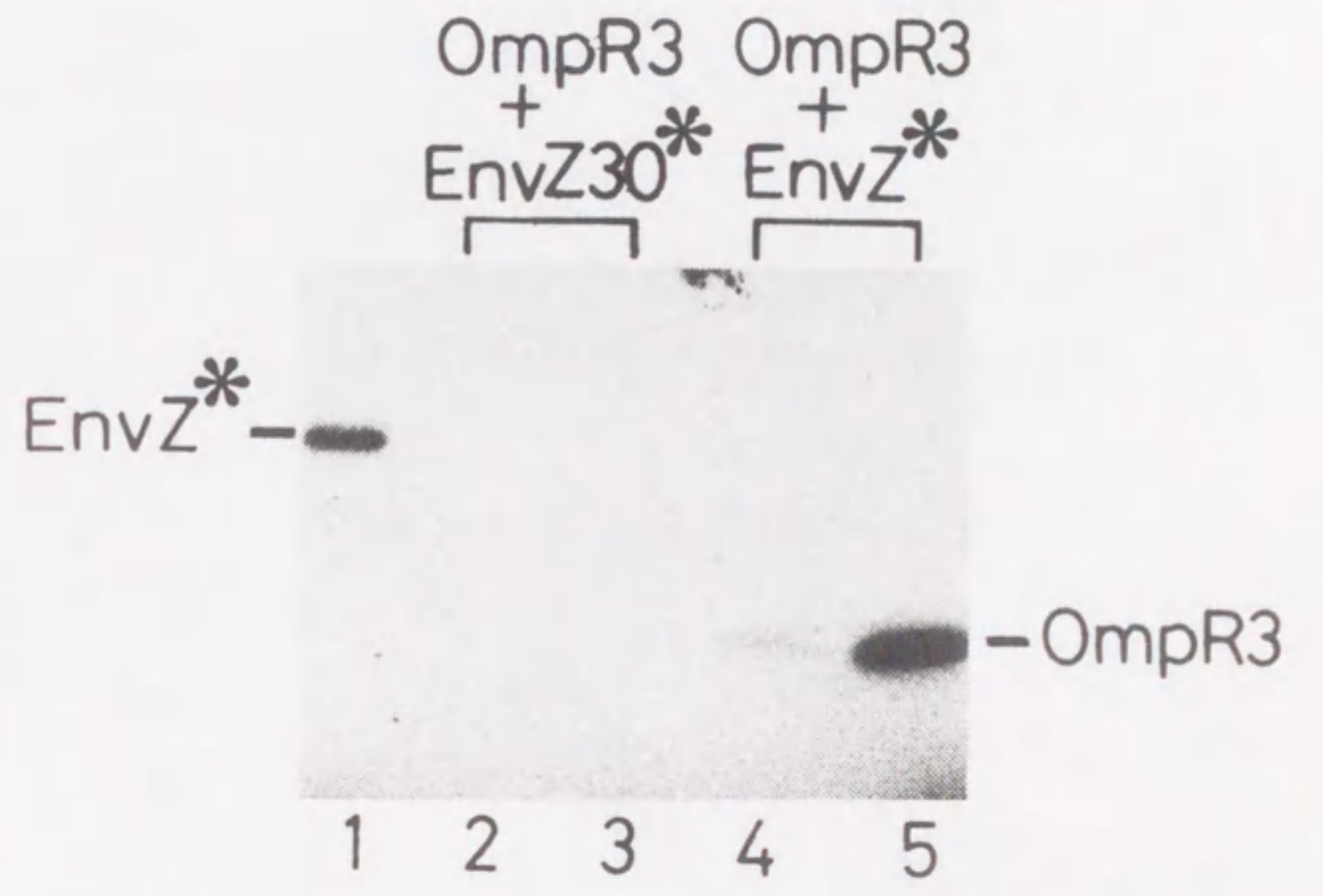
**Fig. 1** Urea-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showing expression of the *ompF* and *ompC* genes in the *ompR3* suppressor mutant, *envZ30*, and a summary of the amino acid changes in the *ompB* operon of strains harboring the *ompR3* and *envZ30* mutations. *A*, strains AB2847 (wild type), SM2007 (*ompR3*-type), HAI0013 (*ompR3*-suppressor), and HAI0013 carrying plasmid pAT2004 were grown in a medium containing the indicated concentrations of sucrose (0 and 15%). Outer membrane proteins were prepared from the cell envelopes and subjected to urea-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The positions of the OmpC and OmpF proteins are indicated by letters *C* and *F*, respectively. *B*, alterations in the deduced amino acid sequences of the OmpR3 and EnvZ30 proteins are shown. The positions of amino acid residues in the OmpR and EnvZ proteins are numbered from the respective NH<sub>2</sub> termini.



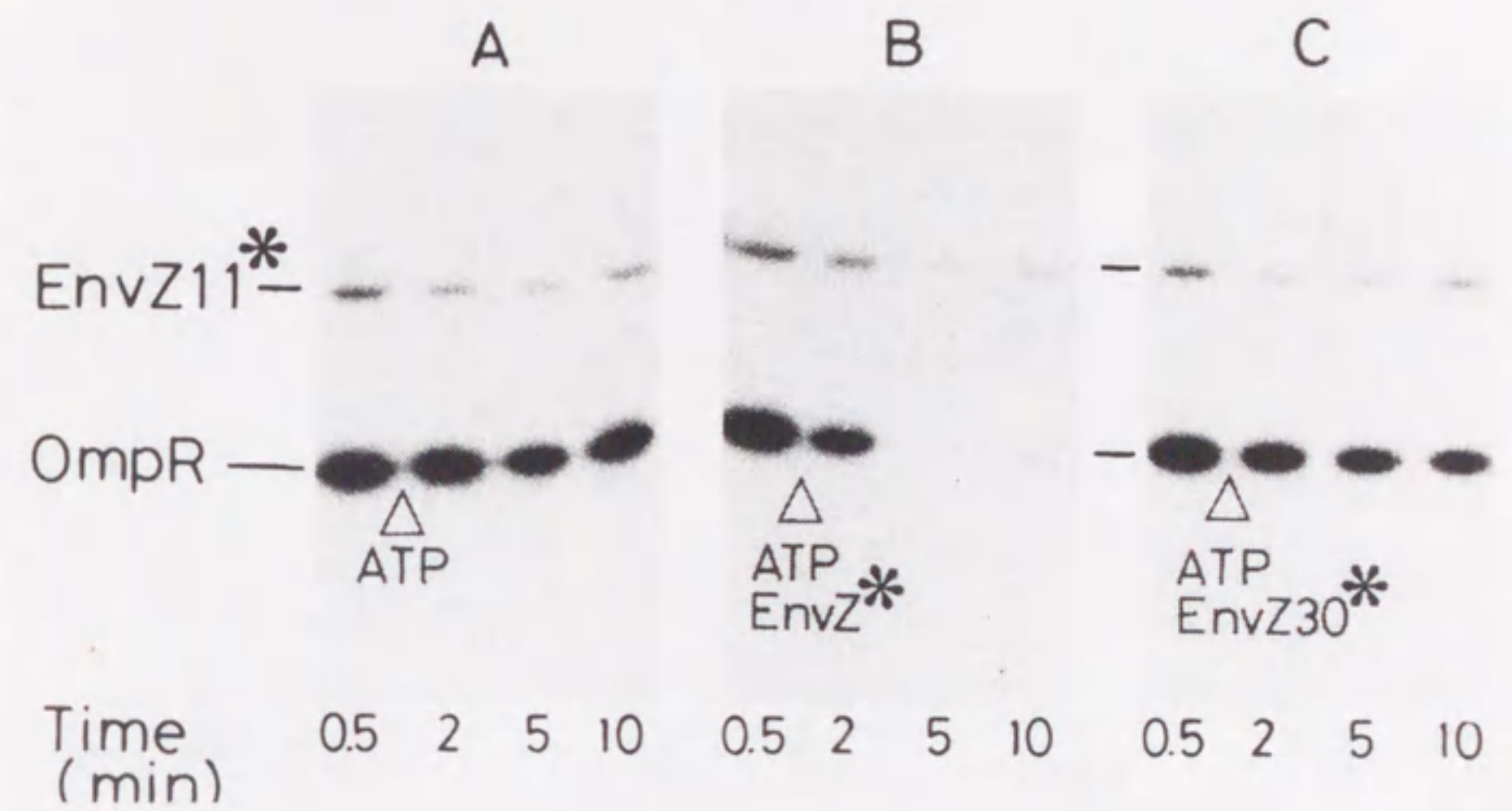
**Fig. 2** Schematic representation of the series of chimeric *ompB* regions cloned into a single-copy-number plasmid and expression of the *ompF* and *ompC* genes in strain SG480 $\Delta$ 76 ( $\Delta$ *ompB*) harboring the series of plasmids. *A*, the coding regions for the *ompR* and *envZ* genes are indicated by arrows. Fragment A is a 3.2-kb *Bam*HI-*Bgl*II fragment which contains the entire *ompR* gene and the coding region for the NH<sub>2</sub>-terminal portion of the *EnvZ* protein. Fragment B is a 1.5-kb *Bgl*II-*Hpa*I fragment which contains the coding region for the *EnvZ* protein devoid of the NH<sub>2</sub>-terminal portion. The chimeric *ompB* operons cloned onto plasmids pHA1030, pHA1031, pHA1032, pHA1033, and pMAN104 are schematically shown. ▨, ■, and □ represent the DNA fragments derived from SM2007 (*ompR3*-type), HA10013 (*ompR3*-suppressor), and the wild-type strain, respectively. The positions of base substitutions in these fragments are indicated by asterisks. *B*, strain SG480  $\Delta$ 76 ( $\Delta$ *ompB*) carrying the indicated plasmids was grown in a medium containing the indicated concentrations of sucrose (0 and 15%). Outer membrane proteins were prepared and analyzed by urea-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The positions of the OmpC and OmpF proteins are indicated by letters C and F, respectively.



**Fig.3** Autophosphorylation of EnvZ30\*. *A*, purified EnvZ\* (4  $\mu$ M) or EnvZ30\* (4  $\mu$ M) was incubated in the presence of 0.1 mM [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (2000 cpm/pmol) in TEDG buffer containing 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 50 mM KCl at room temperature. Aliquots of the reaction mixture were removed at the indicated times and the amount of trichloroacetic acid-precipitable radiolabel at each time point was determined. The counts were expressed relative to the maximum amount obtained for EnvZ\* (145 cpm/pmol). *B*, EnvZ\* (2  $\mu$ M) or EnvZ30\* (10  $\mu$ M) was incubated with 0.1 mM [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (2000 cpm/pmol) for 20 min in TEDG buffer containing 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 50 mM KCl at room temperature. Then samples were immediately subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by staining (*left panel*) or autoradiography (*right panel*). Note that the amount of EnvZ30\* used was five times larger than that of EnvZ\* used.



**Fig.4** Autoradiogram showing phosphorylation of the OmpR protein by the EnvZ protein. Purified OmpR3 (12  $\mu$ M) was incubated with either EnvZ30\* (2  $\mu$ M) or EnvZ\* (2  $\mu$ M) in the presence of 0.1 mM [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (2000 cpm/pmol) in TEDG buffer for 1 min (lanes 2 and 4) or 10 min (lanes 3 and 5) at room temperature. The reaction mixtures were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by autoradiography. Lane 1 shows a control experiment, in which EnvZ\* alone was incubated for 10 min under the same conditions as described above.



**Fig. 5** Autoradiograms showing the time course of OmpR-dephosphorylation. Radioactively phosphorylated EnvZ11\* ( $2 \mu\text{M}$ ), which was prepared as described previously (10), was incubated with OmpR ( $3 \mu\text{M}$ ) in TEDG buffer at room temperature for 0.5 min. Subsequently, at the indicated time (1 min) nonphosphorylated EnvZ\* ( $2 \mu\text{M}$ ) (B) or EnvZ30\* ( $2 \mu\text{M}$ ) (C) was added together with  $0.1 \text{ mM}$  ATP. A control experiment was also carried out in the presence of ATP but without the addition of EnvZ\* (A). Aliquots were removed from the reaction mixtures at the indicated times and immediately subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by autoradiography.

### 第三節 二成分制御系で保存されたアミノ酸残基のEnvZ、OmpRにおける重要性

#### 2-3-1 EnvZ243R\*は*in vitro*で自己リン酸化能、OmpRのリン酸化、脱リン酸化能全てを失っていた

EnvZの構造と機能に関する知見を得るため、部位特異的変異法により *envZ* 中の 728A を G に一塩基置換し（塩基番号は *envZ* の翻訳開始コドンの A を 1 とした位置）、全ての二成分制御系で保存され、自己リン酸化に重要と予想されている EnvZ の 243His を Arg にアミノ酸置換する *envZ243R* を構築した。そして EnvZ\* 同様、N 末端 80a. a. を欠失した可溶性 EnvZ243R\* を精製した [13]。

EnvZ243R\* の自己リン酸化能について解析したのが、Fig. 6 である。0.1mM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP、5mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl 存在下 EnvZ243R\* を 20 分間保温したが、コントロールの EnvZ\* の 5 倍量のタンパク質を反応に供しても (Staining)、SDS-PAGE でリン酸化した EnvZ243R\* のバンドは認められず (Autoradiogram)、EnvZ243R\* は自己リン酸化能を完全に失っていることが明らかとなった。

さらに EnvZ243R\* は ATP 存在下で OmpR をリン酸化できなかつただけでなく (data not shown)、Fig. 7 panel B に示すように、未反応の ATP を除いたリン酸化型 EnvZ11\* によってリン酸化した OmpR を ATP 存在下で脱リン酸化することもできなかつた。したがって EnvZ243R\* は少なくとも *in vitro* で EnvZ-OmpR 間のリン酸化反応における自己リン酸化能、OmpR のリン酸化能、脱リン酸化能の全活性を失っていることが示唆された。

#### 2-3-2 OmpR55Q はリン酸化能を失っていた

OmpR の構造と機能に関する知見を得るため、部位特異的変異法により *ompR* 中の 163G を C、165T を G に二塩基同時に置換し（塩基番号は *ompR* の翻訳開始コドンの A を 1 とした位置）、全ての二成分制御系で保存され、リン酸化に重要と予想されている OmpR の 55Asp を Gln にアミノ酸置換した *ompR55Q* を構築し、ランナウェイベクター pSY343 にのせ大量発現させた [35]。OmpR55Q は、700ml の培養液から回収した 2.63g

の菌体から、最終段階の脱塩濃縮でもほとんど析出、分解することなく（回収率90%以上）約0.9mgを精製できた。

精製OmpR55Qのリン酸化能を確認するため、0.1mM  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 、5mM  $\text{MgCl}_2$ 、50mM  $\text{KCl}$ 存在下EnvZ\*と反応し、5分、15分、30分後にサンプリングしてSDS-PAGEで分離、オートラジオグラムを得たが（Fig. 8 lanes 7~9）、OmpR55Qのリン酸化は全く認められなかった。未反応のATPを除去したリン酸化型EnvZ11\*からリン酸転移する方法でも同様に、リン酸化型OmpR55Qのバンドは検出できなかった（Fig. 9 lanes 6 and 7）。また、*ompF*、*ompC*両遺伝子のプロモーター上流領域（OmpR結合領域）を用いたゲルシフトアッセイでは、野生型OmpRの非リン酸化時に見られる弱い結合能はOmpR55Qでも観察されたが、ATP、EnvZ\*存在下で野生型OmpRにはみられる結合能の上昇がOmpR55Qでは起こらなかった（data not shown）。したがって、二成分制御系で保存された<sup>55</sup>AspをGlnに置換したOmpR55Qは、少なくとも*in vitro*でリン酸化能を失っており、リン酸化条件下での特異的DNA結合能の上昇も起こらないことが示唆された。

### 2-3-3 OmpR12Vは*in vitro*でわずかしかリン酸化しなかった

OmpRの構造と機能に関し、全ての二成分制御系で保存された2カ所のAsp残基のもう一方、OmpRの<sup>12</sup>AspをValにアミノ酸置換する *ompR12V*も、部位特異的変異法により *ompR*の<sup>35</sup>AをTに一塩基置換することで構築し、ランナウェイベクターpSY343にのせ、3ℓの培養液から13.2gの菌体を回収、約1.7mgのOmpR12Vを精製した。この際、OmpR12VはDE52オープンカラムでシャープなピークが得られず多画分に分散し、最終段階での回収率も30%台とかなり低く（野生型OmpRで80%）、精製後も不安定だったため、実験は全て精製から4日以内に行った。

OmpR55Q同様、精製OmpR12Vのリン酸化能を確認するため、0.1mM  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 、5mM  $\text{MgCl}_2$ 、50mM  $\text{KCl}$ 存在下EnvZ\*と反応し、5分、15分、30分後にサンプリングしてSDS-PAGEで分離、オートラジオグラムを得た（Fig. 8 lanes 4~6）。野生型に較べるとごくわずかではあったが（lanes 1~3）、15分、30分と経過するに連れリン酸化したOmpR12Vのバンドが認められた。さらに最長3時間まで経時変化を追ったが、リン酸化型OmpR12Vの量は約1時間でプラトーに達し、その量は野生型より依然少量でFig. 8 lane 6の2倍程度であった（data not shown）。未反応のATPを除去し

たリン酸化型EnvZ11\*からリン酸転移する方法でも、リン酸化型OmpR12Vのバンドは確かに反応後約5分から認められたが、15分後にピークに達し30分後には減少した (Fig.9 lanes 4 and 5)。また最初の反応方法と較べてピーク時の量的増加は有意には認められなかった。したがって、OmpR12Vは、少なくとも *in vitro* で明らかにリン酸化するが、非常にリン酸化されにくく、さらにリン酸化可能な分子が全体のごく一部であるか、もしくはリン酸化型のリン酸基が非常に不安定であることが示唆された。

#### 2-3-4 *envZ243R*は *in vivo* で *envZ* 欠失株の表現型を示した

*envZ243R*が *in vivo* で表現型に与える影響を観察するため、*ompR-envZ* 欠失株 SG480  $\Delta 76$  を *ompR-envZ243R* をのせたシングルコピープラスミド pMF21Z (Fig. 10) で形質転換し、15% sucroseの有無で培地浸透圧を変化させた場合の外膜タンパク質 OmpF、OmpCの発現様式を urea-SDS-PAGE で解析した (Fig. 11)。

その結果、低浸透圧条件下でわずかに OmpF の発現が見られ、高浸透圧条件下、さらに OmpC の発現がわずかに認められた。この表現型は、*envZ* を欠失させた場合に見られるパターンであり、実際に *ompR* のみをのせた pHAI047 の表現型と同じであった。またこのとき EnvZ243R が野生型 EnvZ と同量程度細胞内に存在することもウェスタンブロッティングより確認した (data not shown)。さらに活性がごくわずかに残っている可能性を考慮して、*envZ* 欠失株 AT142 中でハイコピープラスミド pBR322 から EnvZ243R を発現させたが、*envZ* 欠失株そのものと全く同じ表現型であった (data not shown)。したがって、*envZ243R* は *in vivo* でも *envZ* の機能を全く果たさない *envZ* 変異であることが示唆された。

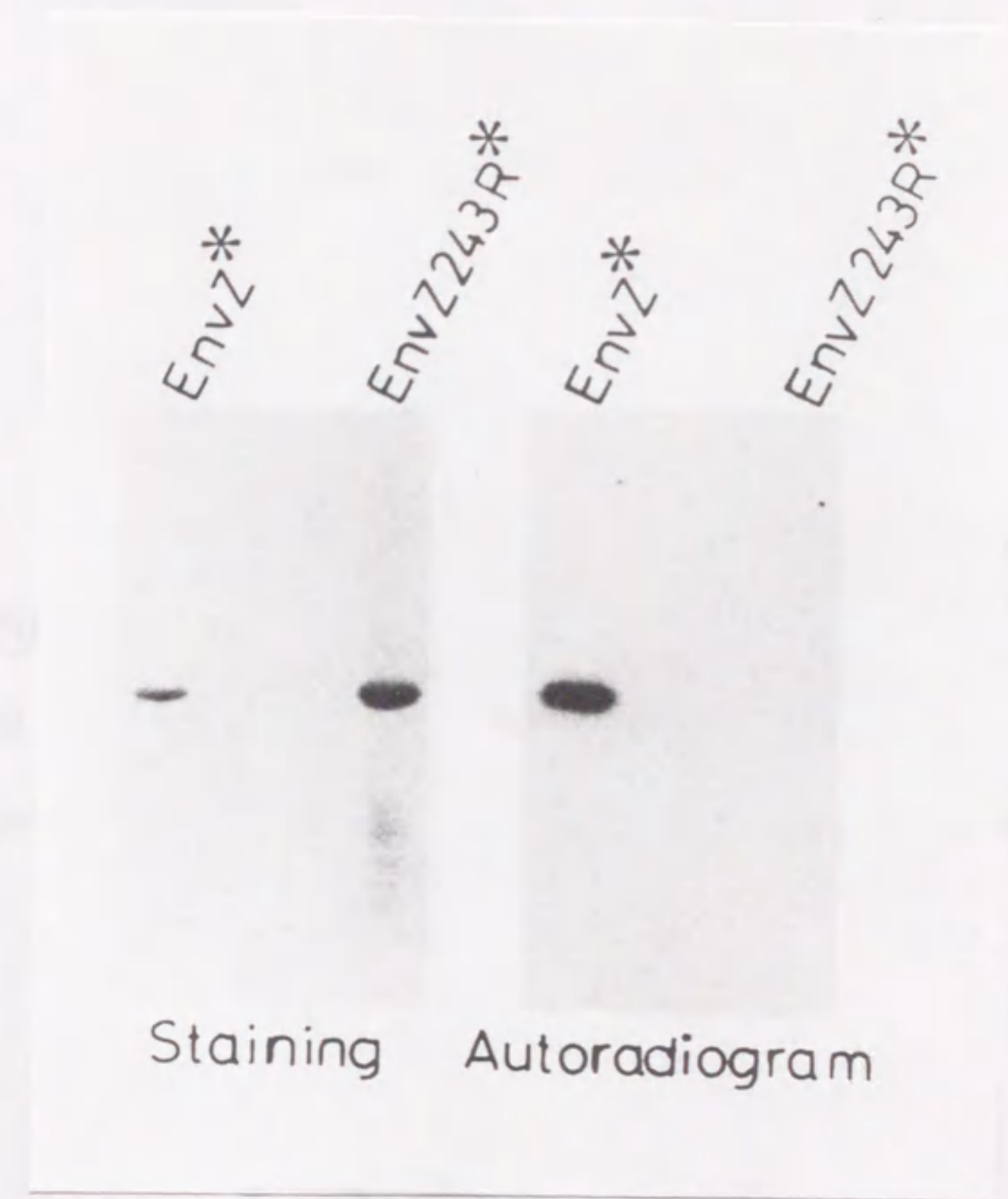
#### 2-3-5 *ompR55Q* は *in vivo* で OmpF も OmpC も発現できなかった

*ompR55Q* が *in vivo* で表現型に与える影響を観察するため、SG480  $\Delta 76$  株を *ompR55Q-envZ* をのせたシングルコピープラスミド pMF21Q (Fig. 10) で形質転換し、培地浸透圧を変化させた場合の外膜タンパク質 OmpF、OmpC の発現様式を解析した (Fig. 11)。

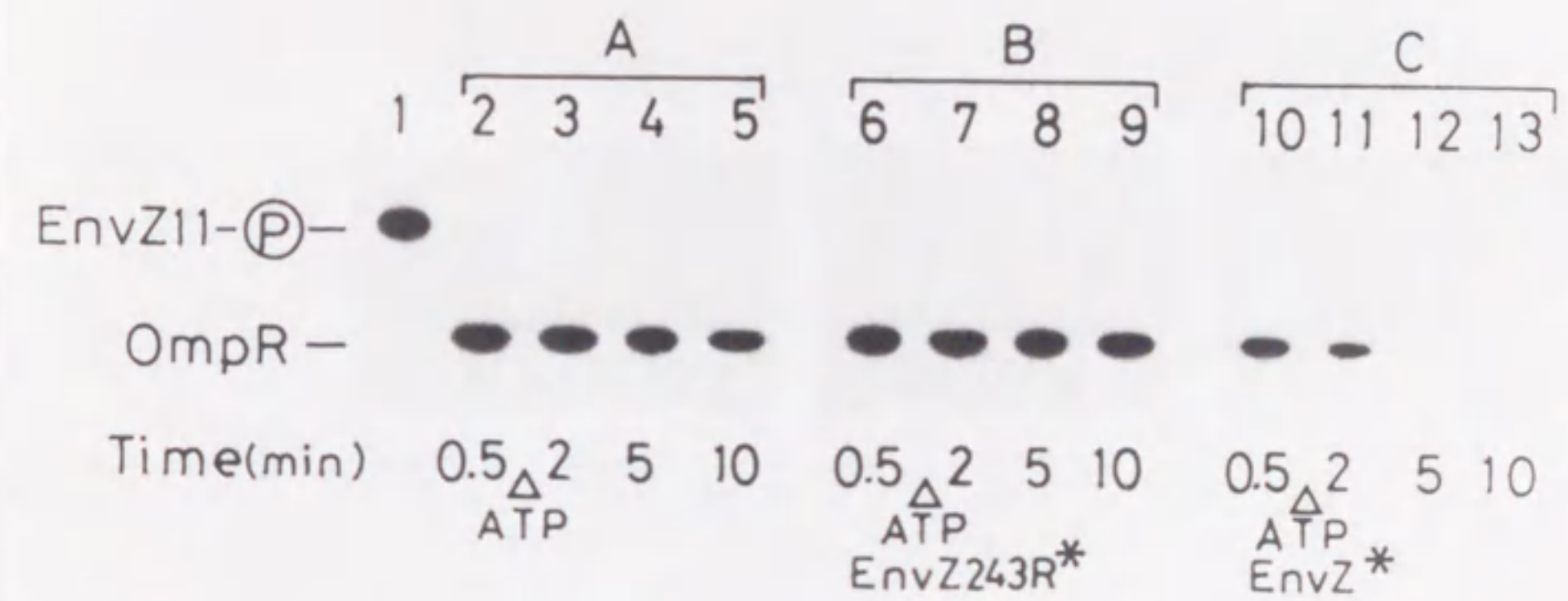




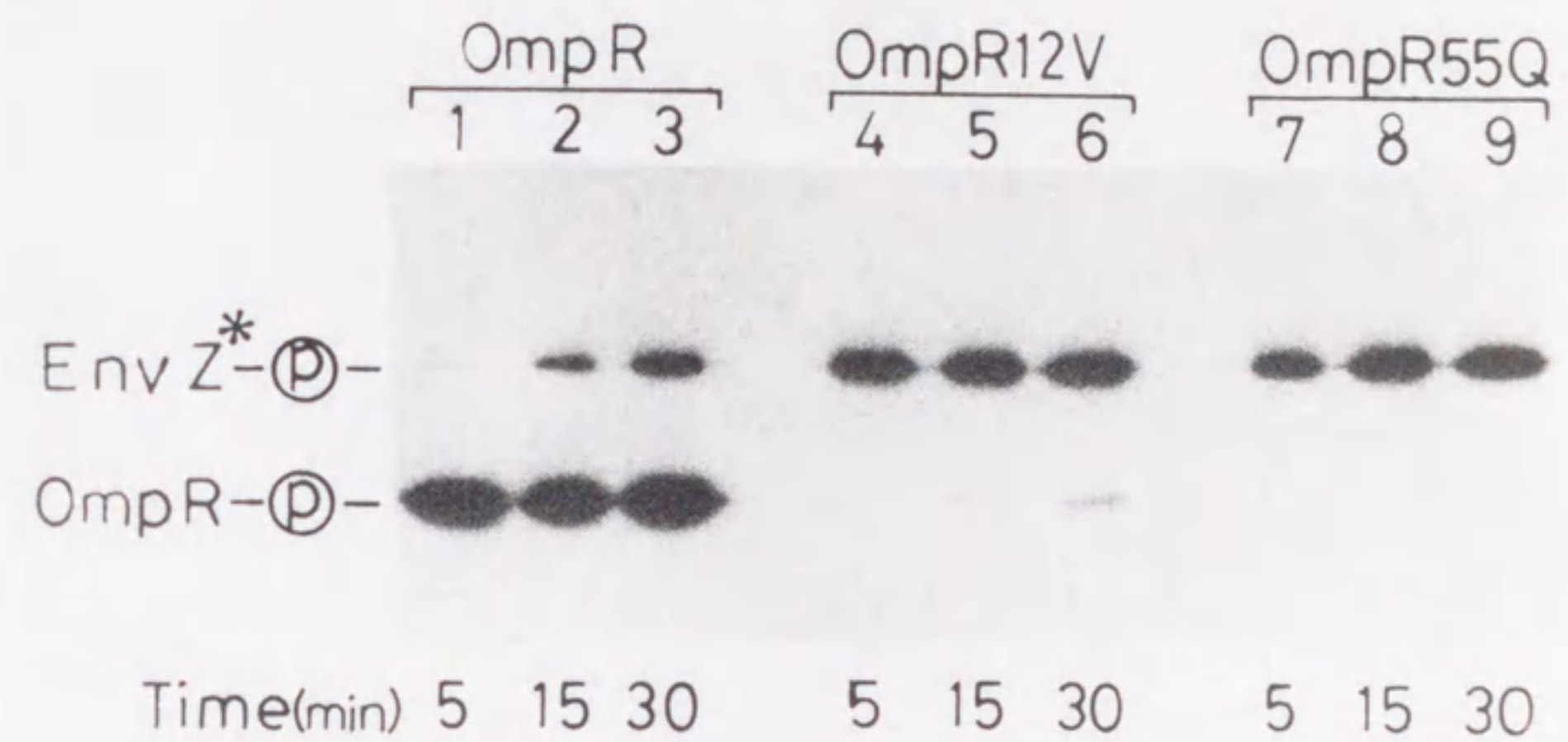
Faint, illegible text from the reverse side of the page, likely bleed-through from the other side of the paper.



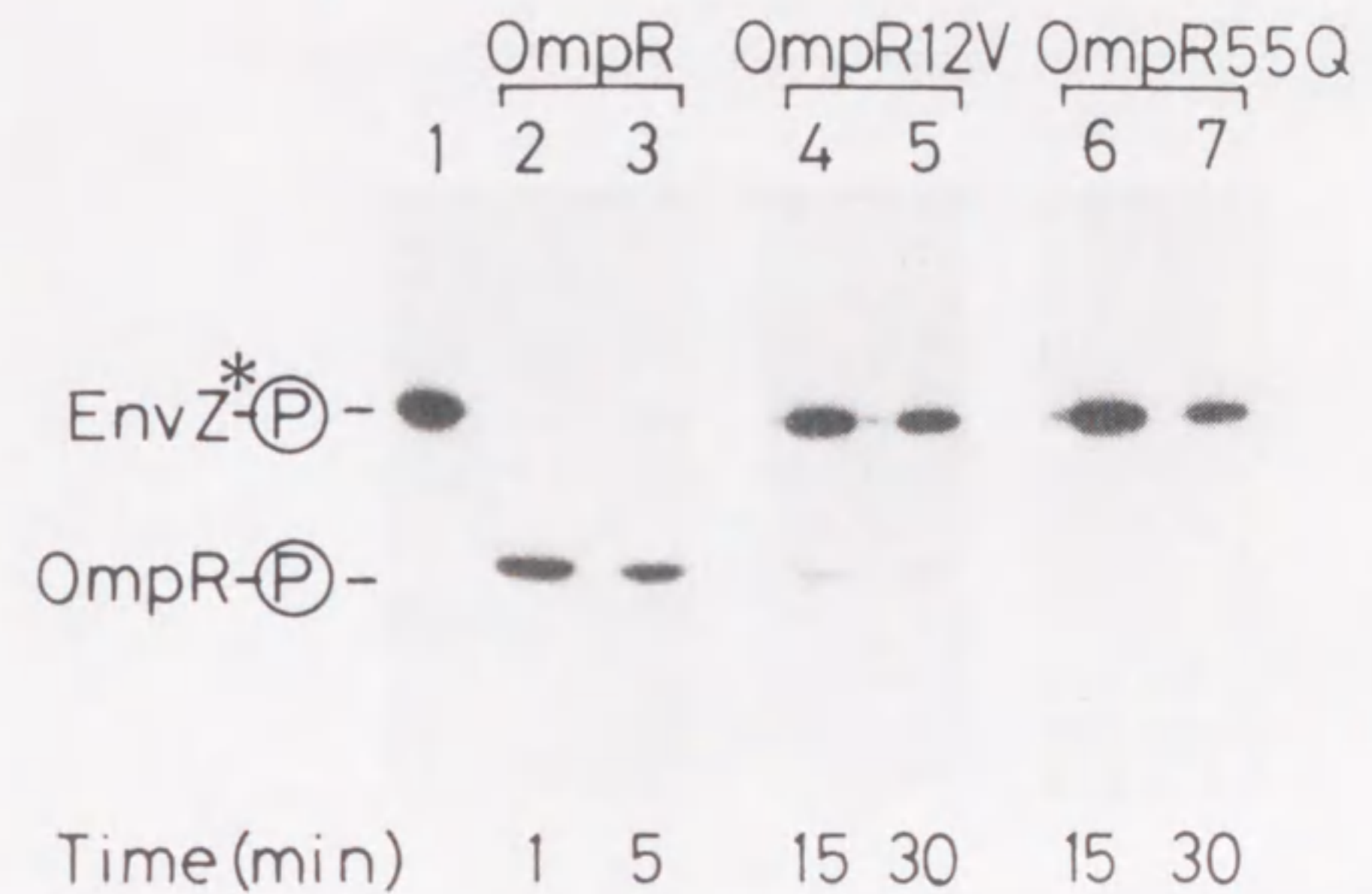
**Fig.6** Autophosphorylation of EnvZ243R\*. EnvZ\* (2  $\mu$ M) or EnvZ243R\* (10  $\mu$ M) was incubated with 0.1 mM [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (2,000 cpm/pmol) for 20 min in 10  $\mu$ l of TEDG buffer containing 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 50 mM KCl at 25°C. The samples were immediately subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by staining (left panel) or autoradiography (right panel). Note that the amount of EnvZ243R\* used was five times more than that of EnvZ\* used.



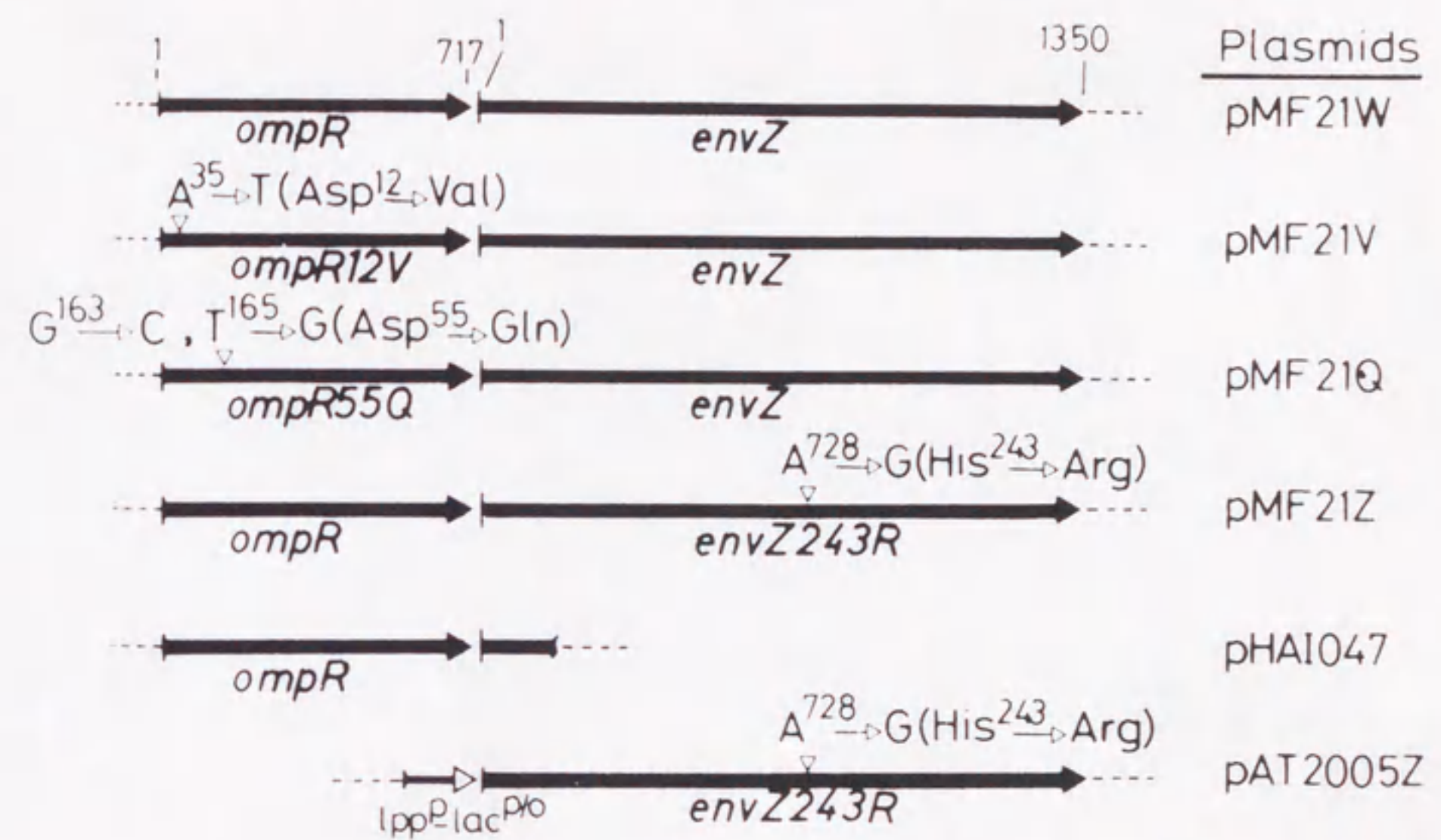
**Fig.7** Autoradiograms showing the time course of OmpR-dephosphorylation mediated by the EnvZ protein. Radioactively phosphorylated EnvZ11\* ( $2 \mu\text{M}$ ), which was prepared as described previously (10), was incubated with OmpR ( $3 \mu\text{M}$ ) in TEDG buffer at room temperature for 0.5 min. Subsequently, at the indicated time (1 min) nonphosphorylated EnvZ243R\* ( $2 \mu\text{M}$ ) (B) or EnvZ\* ( $2 \mu\text{M}$ ) (C) was added together with 0.1 mM ATP. A control experiment was also carried out in the presence of ATP but without the addition of EnvZ\* (A). Aliquots were removed from the reaction mixtures at the indicated times and immediately subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by autoradiography.



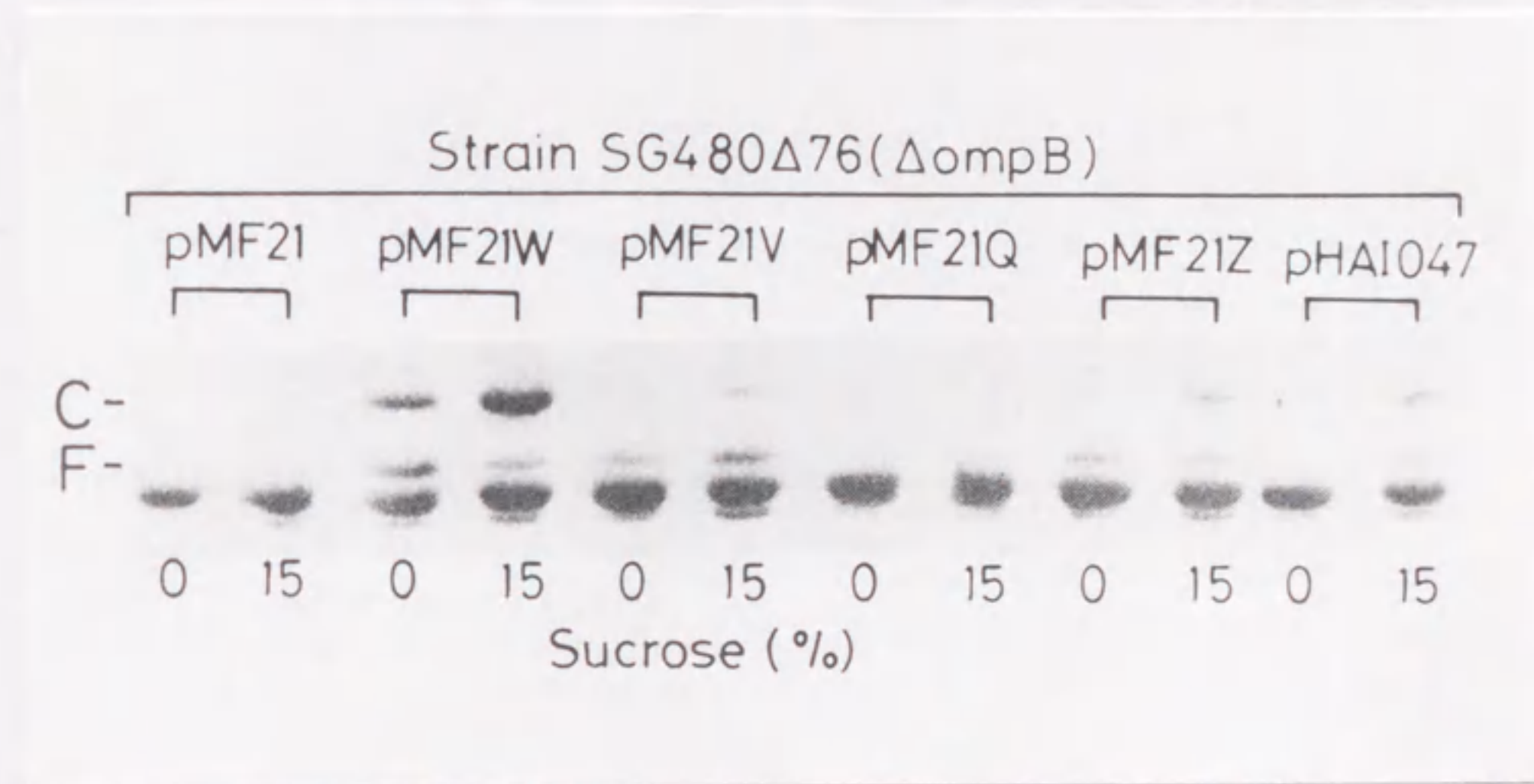
**Fig.8** Autoradiogram showing phosphorylation of the OmpR protein by the EnvZ protein. Purified OmpR, OmpR12V, and OmpR55Q (2.5  $\mu$ M each) were incubated with EnvZ<sup>\*</sup> (1.6  $\mu$ M) in the presence of 0.1 mM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (2,000 cpm/pmol) in 12  $\mu$ l of TEDG buffer containing 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 400 mM KCl for the indicated times at 25°C. The samples were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by autoradiography.



**Fig.9** Autoradiogram showing the transfer of a phosphoryl group from the EnvZ protein to the OmpR protein. Radioactively phosphorylated EnvZ<sup>\*</sup> (1.6  $\mu$ M) was purified and incubated with either OmpR, OmpR12V, or OmpR55Q (2.5  $\mu$ M each) in 12  $\mu$ l of TEDG buffer containing 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 50 mM KCl for the indicated times at 25°C. The samples were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by autoradiography. Note that a very faint band observed at the position near to that of OmpR in lane 6 is not derived from the phosphorylated OmpR, but rather appeared to be attributed to a degradation product of the purified pre-phosphorylated EnvZ<sup>\*</sup> used in this experiment. The band migrated to the position, not identical to, but just below that of OmpR.



**Fig. 10** Schematic representation of the sets of mutant *ompR* and *envZ* genes cloned onto a single-copy-number plasmid. The *ompR* and *envZ* coding regions are indicated by horizontal arrows denoted by *ompR* and *envZ*, respectively. The mutant genes, *ompR12V*, *ompR55Q*, and *envZ243R*, were constructed, in this study, by means of site-directed mutagenesis. Alterations in their nucleotide sequences and deduced amino acid sequences are shown. The position of a nucleotide is indicated by a superscript number, the 5' terminus of the respective coding sequence being taken as 1. The position of an amino acid is also indicated by a superscript number, the N-terminus of the amino acid sequence of each protein being taken as 1. Notes that plasmid pAT2005Z is a high-copy-number plasmid carrying the *envZ243R* gene, which is expressed under the control of an *lpp/lac* promoter-operator.



**Fig.11** Urea-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showing expression of the *ompF* and *ompC* genes. Strain SG480Δ76, which is an *ompR-envZ* deletion mutant, was transformed with each of the series of single-copy-number plasmids listed in Fig.10. The cells were grown in a medium containing the indicated concentrations of sucrose (0 and 15%). Outer membrane proteins were prepared and analyzed by urea-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The positions of the OmpC and OmpF proteins are indicated by letters C and F, respectively.

#### 第四節 リン酸化非依存的に機能するOmpR55Q/102C、OmpR102Cの解析

##### 2-4-1 *ompR55Q/102C*は*in vivo*で*ompF*、*ompC*の転写を活性化した

第三節で述べたように、OmpRは二成分制御系で保存されている<sup>55</sup>AspをGlnに置換してしまうと(*ompR55Q*変異)、*in vitro*でリン酸化能を失い(Fig. 8 and 9)、リン酸化依存的特異的DNA結合能の上昇も起こらなくなり(data not shown)、OmpF、OmpCどちらも全く発現できなくなった(Fig. 11)。そこで、*ompR55Q*の機能的欠損を相補する二次変異を*ompR55Q*または*envZ*に導入する試みをした。その方法を図示したのがFig. 12である。まず*ompR55Q-envZ*をのせたシングルコピープラスミドpSAC117QでDB225株( $\Delta ompR-envZ ompC'-lacZ$ )を形質転換した。この株をMNNGで処理し、MacCONKEY AGARプレート上で、元々白いコロニーを形成する形質転換株から変異によって赤いコロニーを形成するようになったものを選択した。これらから、プラスミドを精製し、再度DB225株の形質転換を行い、プラスミド依存的に*ompC*の転写が回復して赤コロニーを形成するものを検索した。さらにオリジナルのpSAC117Qとキメラを作成して解析した結果、それらは2つのグループに大別された。一つは、変異がシングルコピープラスミドの骨格上に起こって、本来1細胞当たり1~2コピーのはずが、pUC系並のコピー数に上昇したグループ、もう一方は、239a. a. からなるOmpR55QのN末端側半分(1Met~122Arg)をコードする遺伝子領域に変異があるグループで、*envZ*上に変異のあるものはなかった。*ompR55Q*上に二次変異が予想される8つの独立して取得したプラスミドはDB513株( $\Delta ompR-envZ ompF'-lacZ$ )を形質転換した場合も、全てMacCONKEY AGARプレート上で赤いコロニーを形成した。このことから、これらの*ompR*変異は*ompC*だけでなく*ompF*の転写も活性化できることが示唆された。

シーケンスの結果、8つのプラスミドはいずれも<sup>305</sup>AがGに変化しており、その結果、<sup>102</sup>TyrがCysに置換していることが予想された(Fig. 12)。また、元々の*ompR55Q*変異はそのまま残っていた。そこでこの二次変異*ompR*を*ompR55Q/102C*と名付け、以下の解析に用いた。

さらに二次変異の影響のみを解析する目的で、*ompR55Q/102C*の<sup>55</sup>Glnを野生型のAspに戻して二次変異のみを残した*ompR102C*も併せて構築した。



#### 2-4-2 *ompR55Q/102C*、*ompR102C*は*in vivo*で*envZ*非依存的に正常な浸透圧応答を示した

*ompR55Q/102C*、*ompR102C*の与える表現型についてさらに詳細に解析するため、シングルコピープラスミドにいくつかの組み合わせで*ompR-envZ*をのせたシリーズを構築した (Fig. 13)。これらで  $\Delta ompR-envZ$  株である AT141 株 [36] を形質転換し、urea-SDS-PAGE による培地浸透圧変化に応答した外膜タンパク質組成の変化を解析した (Fig. 14)。

野生型 *ompR-envZ* をのせた pSAC112B では、通常の浸透圧応答が観察された (lanes 5 and 6)。一方、ベクターのみあるいは *ompR55Q-envZ* をのせた pSAC117Q では培地浸透圧変化に関わらず OmpF、OmpC とも全く発現が見られなかった (lanes 1~4)。ところが対照的に、*ompR55Q* に二次変異を導入して *ompF*、*ompC* 両方の転写活性を回復した *ompR55Q/102C* と野生型 *envZ* (pSAC112CQ) の組み合わせでは明らかに野生型と同じ浸透圧応答が見られ、低浸透圧条件下で OmpF、高浸透圧条件下で OmpC が優先的に発現していた (lanes 9 and 10)。さらに驚くべきことに、この表現型は *ompR55Q/102C* のみをのせた pSAC106CQ、あるいは *ompR102C* のみをのせた pSAC106C においても観察され、*envZ* を必要としない osmoregulation であることが示唆されたのである (lanes 11~14)。

そこで、この osmoregulation が本当に転写段階で調節されているかどうかを検証するため、これらのプラスミドで形質転換した DB513 株 ( $\Delta ompR-envZ$  *ompF'-lacZ*)、DB225 株 ( $\Delta ompR-envZ$  *ompC'-lacZ*) の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。その結果、pSAC102CQ (*ompR55Q/102C*)、pSAC102C (*ompR102C*) で形質転換した株は基本的に pSAC117B (野生型 *ompR-envZ*) で形質転換した株と同等の活性値を培地浸透圧変化に対して示し、見かけ上正常な osmoregulation は確かに転写レベルで行われていることが確認された (data not shown)。

したがって、102Tyr を Cys に置換する OmpR の二次変異は、それ単独で (一次変異を必要としない)、EnvZ 非依存的 (それは多分にリン酸化非依存的) に *ompF*、*ompC* の転写を活性化したのみならず、培地浸透圧の変化に応じた発現制御さえも可能にしていることが明らかになった。

#### 2-4-3 OmpR55Q/102Cは*in vitro*でリン酸化能を失ったままだった

OmpR55Q/102Cが実際にEnvZによるリン酸化に非依存的に機能しているのかどうかを、*in vitro*で生化学的に確認するため、OmpR55Q/102C、OmpR102Cの精製を行った[35]。得られたタンパク質はそれぞれ0.05mM  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 、5mM  $\text{MgCl}_2$ 、400mM KCl、EnvZ\*存在下、30°Cで保温し、5分、10分、20分後にサンプリングし、SDS-PAGE後、オートラジオグラムを得た (Fig. 15)。コントロールの野生型OmpRは反応開始後5分でリン酸化が認められたが (lanes 2~4)、OmpR55QおよびOmpR55Q/102Cでは予想通り全くリン酸化は認められなかった。この点をさらに*in vivo*に近い状態で観察するため、時下らが確立した膜内在性EnvZを使った反応系でもリン酸化反応を試したが、膜内在性EnvZあるいは共存する他の膜タンパク質によるOmpR55Q/102Cのリン酸化は認められなかった (data not shown)。

したがって<sup>102</sup>TyrをCysに置換するOmpRの二次変異は、<sup>55</sup>Asp以外の部位でのリン酸化を可能にしているわけではないことが示唆された。

#### 2-4-4 OmpR102Cは*in vitro*でリン酸化能を回復していた

一方、OmpR55Q/102Cの<sup>55</sup>Glnを本来のAspに戻したOmpR102Cでは野生型OmpRとほぼ同様のEnvZ\*によるリン酸化と脱リン酸化が観察された (Fig. 15 lanes 11~13 and data not shown)。したがって、<sup>102</sup>TyrをCysに置換するOmpRの二次変異は、それ単独ではOmpRのリン酸化、脱リン酸化にほとんど影響しないが、OmpRをリン酸化型と類似した構造に変換して、OmpR55Q/102C、OmpR102Cが*in vivo*でリン酸化非依存的に機能することを可能にしていると考えられた。

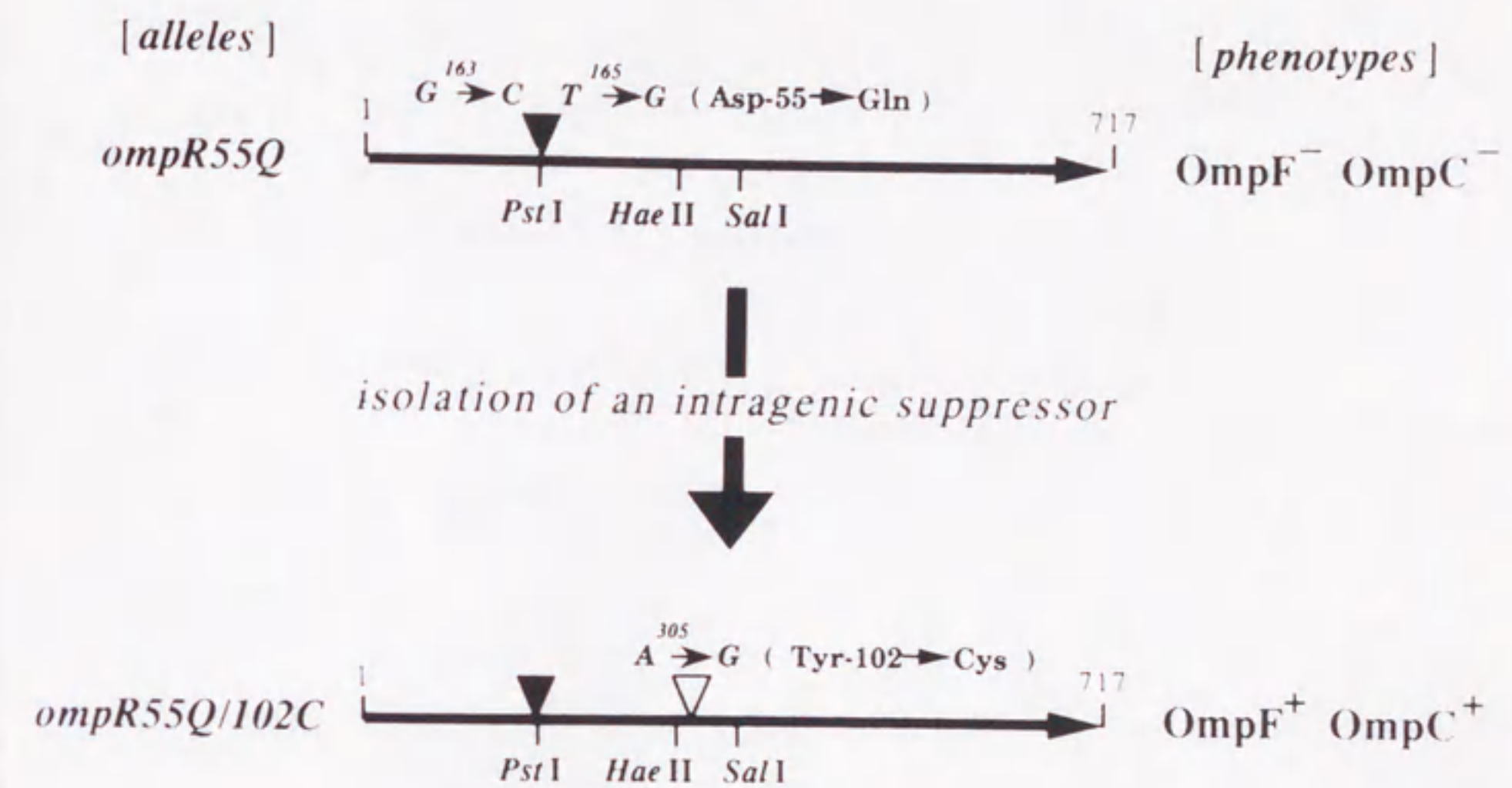
#### 2-4-5 OmpR55Q/102C、OmpR102Cは*in vitro*で特異的DNA結合能が上昇していた

そこで、*in vitro*におけるOmpR55Q/102C、OmpR102Cの特異的DNA結合能について野生型OmpRと比較した。野生型OmpR、OmpR55Q/102Cと<sup>32</sup>Pで末端標識したompF、

*ompC*プロモーター領域 (OmpR結合部位を含むDNA断片) を、EnvZ\*やATPを加えない条件下で混合し、非変性PAGEでゲルシフトアッセイを行い、オートラジオグラムを得た (Fig. 16)。野生型OmpRはリン酸化条件下で顕著に特異的DNA結合能を上昇させることが明らかとなっているが、非リン酸化条件下でも、弱いながら結合能を保持している (panel A and B lanes 2~7)。それに対してOmpR55Q/102Cは、*ompF*プロモーターに対して非リン酸化型OmpRと較べて8倍以上強い結合能を示した (panel A lanes 9~14)。また*ompC*プロモーターに対しても、*ompF*プロモーターほど顕著ではないが、野生型OmpRより明らかに強い結合能がみられた (panel B lanes 9~14)。この現象はOmpR102Cでも観察された (data not shown)。したがって、OmpRの102TyrがCysに置換する変異は、少なくとも*in vitro*でリン酸化非依存的に*ompF*、*ompC*両プロモーターDNAに対する結合能を上昇させていることが明らかとなった。

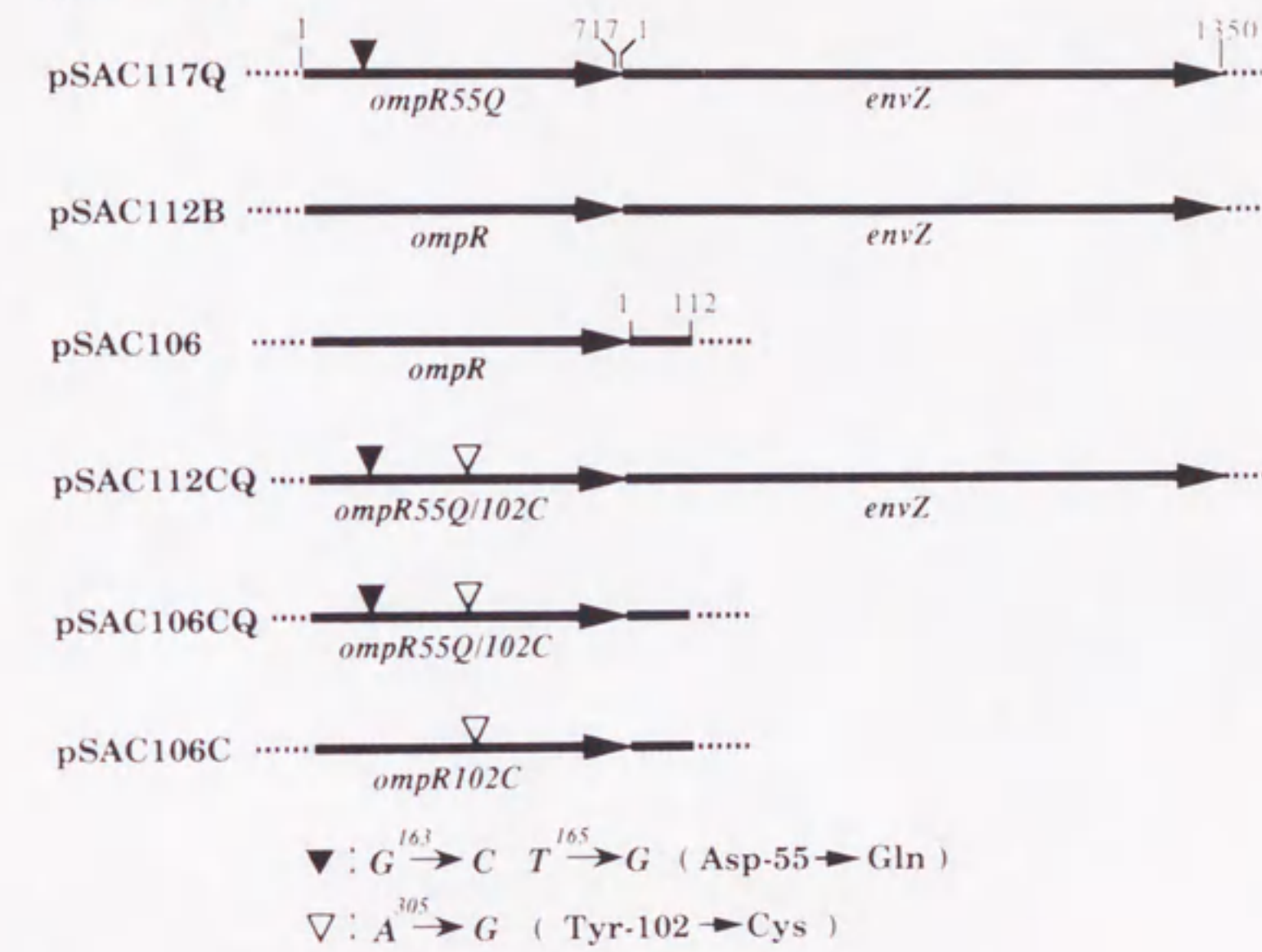
#### 2-4-6 *ompR55Q*を*in vivo*で多コピー化するにつれて表現型は回復した

上記の結果に基づき、*in vivo*においては非リン酸化型OmpRも大量に存在すれば*ompF*、*ompC*プロモーターに結合して転写を活性化しうるのではないかと考え、*ompR-envZ*欠失株AT141 [36]を*ompR55Q*だけをpBR322 (15~20コピー/細胞)、pUC19 (500~700コピー/細胞) にのせたハイコピープラスミドpBR55Q、pUC55Qで形質転換し、urea-SDS-PAGEで培地浸透圧に応答した外膜タンパク質組成の変化を解析した (Fig. 17)。その結果、pBR55Qでも、高浸透圧条件下でOmpFの発現がわずかに回復し (lanes 1 and 2)、pUC55Qでは、ほぼ正常な浸透圧応答が観察された (lanes 3 and 4)。OmpR55Qがリン酸化能を失っているものの潜在的な結合能を維持していたことを考えると、この結果は一定の条件下、すなわち非リン酸化型OmpRが細胞内に過剰に存在し、おそらく充分機能的に*ompF*、*ompC*プロモーターDNAに結合できるなら、*ompF*、*ompC*ともに転写が活性化され、EnvZを必要としない何らかの機構で発現制御も可能であることを示唆したと言える。

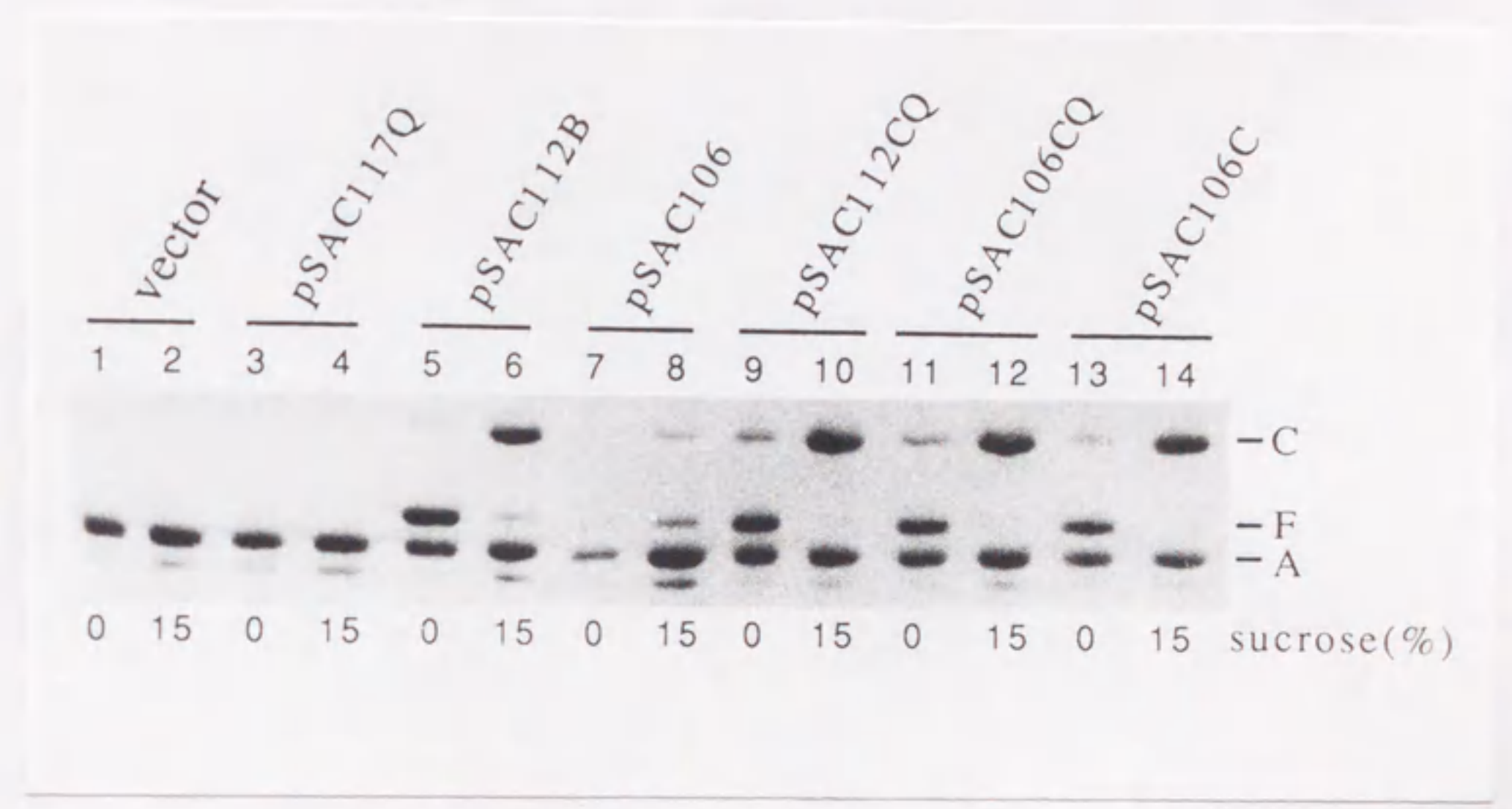


**Fig. 12** Summary of the isolation of the intragenic suppressor mutant, *ompR55Q/102C*, from *ompR55Q*. Alterations in the nucleotide sequences, and those in the deduced amino acid sequences are shown. The osmoregulatory phenotype as to expression of OmpF and OmpC exhibited by each mutant is also indicated. The 5'-terminus of the *ompR* coding sequence is taken as 1. The relevant restriction sites in the *ompR* gene are also indicated (see Fig. 2). The amino acid residues in the OmpR protein are numbered from its N-terminal Met.

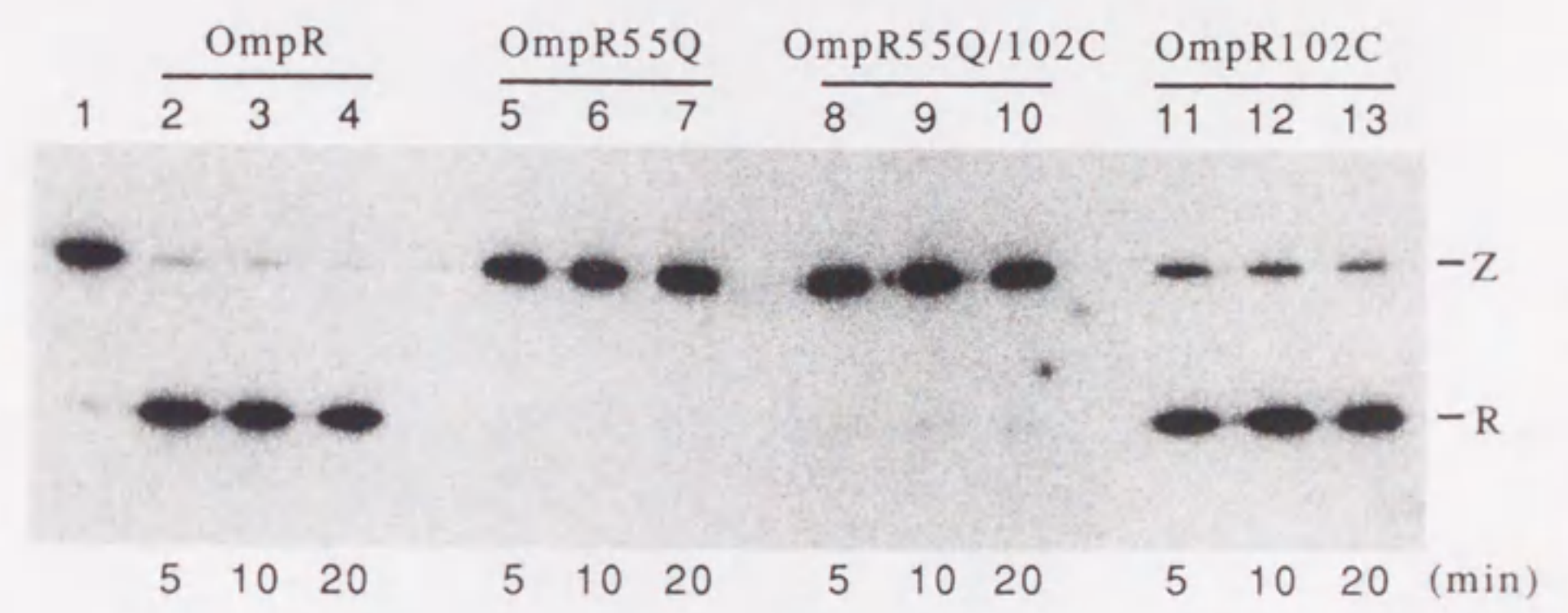
[ plasmids ]



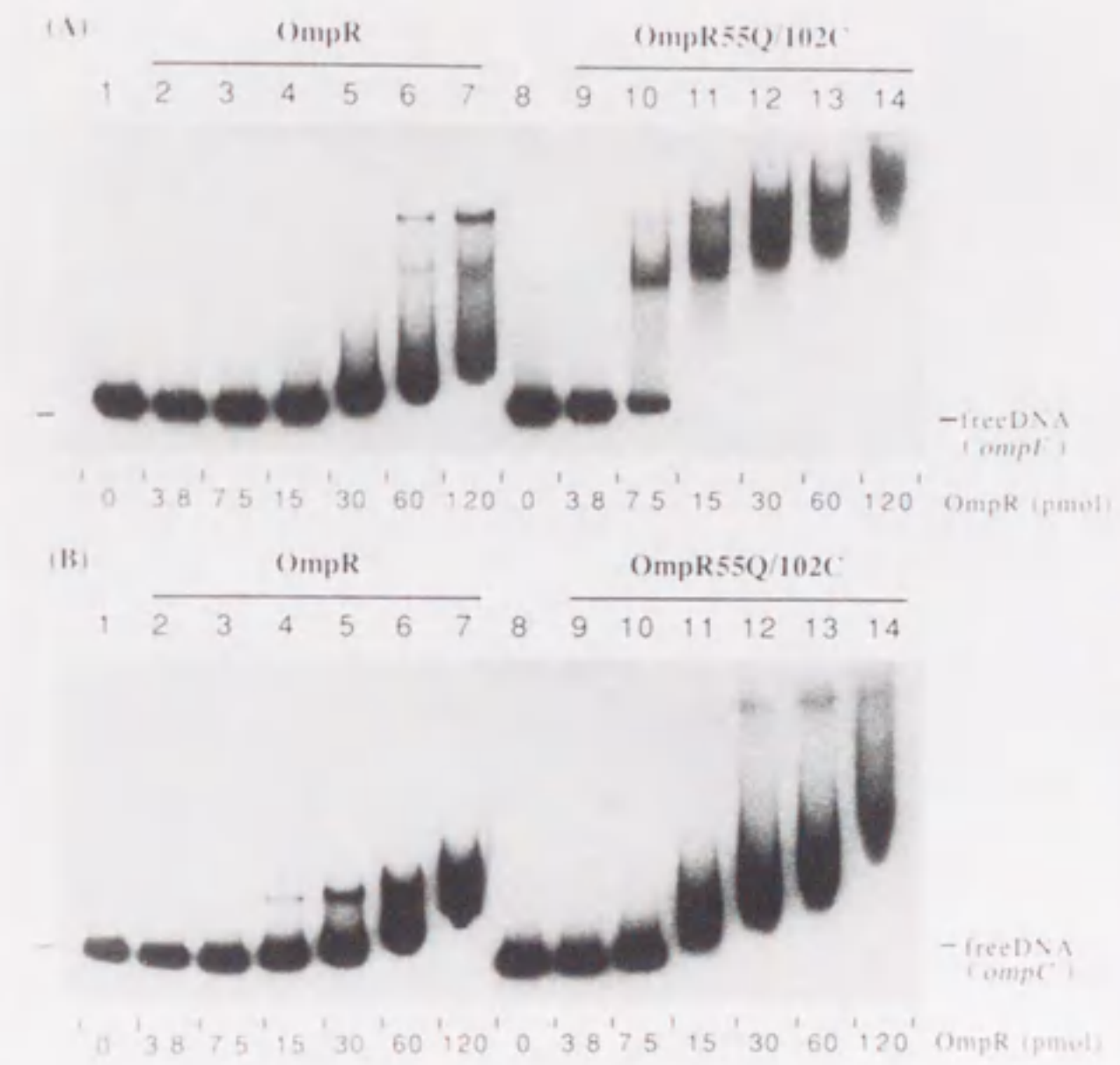
**Fig.13** Schematic representation of the set of recombinant *ompR* and *envZ* genes carried on a single-copy-number plasmid. The arrows denoted by *ompR* and *envZ* indicate the *ompR* and *envZ* genes, respectively. The mutant, *ompR55Q*, was constructed previously by means of site-directed mutagenesis. The mutation, *ompR55Q/102C*, was identified in this study. The mutant, *ompR102C*, was constructed by gene manipulation by using the appropriate restriction sites (see Fig. 1). Other details are the same as those described in the legend to Fig. 1.



**Fig.14** The osmoregulatory phenotype exhibited by the cells carrying the set of mutant *ompR* and *envZ* genes. Strain AT141 harboring an entire *ompR-envZ* deletion was transformed with each single-copy-number plasmid listed in Fig. 2. The cells were grown in medium A containing the indicated concentrations of sucrose. Outer membrane proteins were prepared and analyzed by urea-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The positions of the OmpC, OmpF, and OmpA proteins are indicated by letters, C, F, and A, respectively.

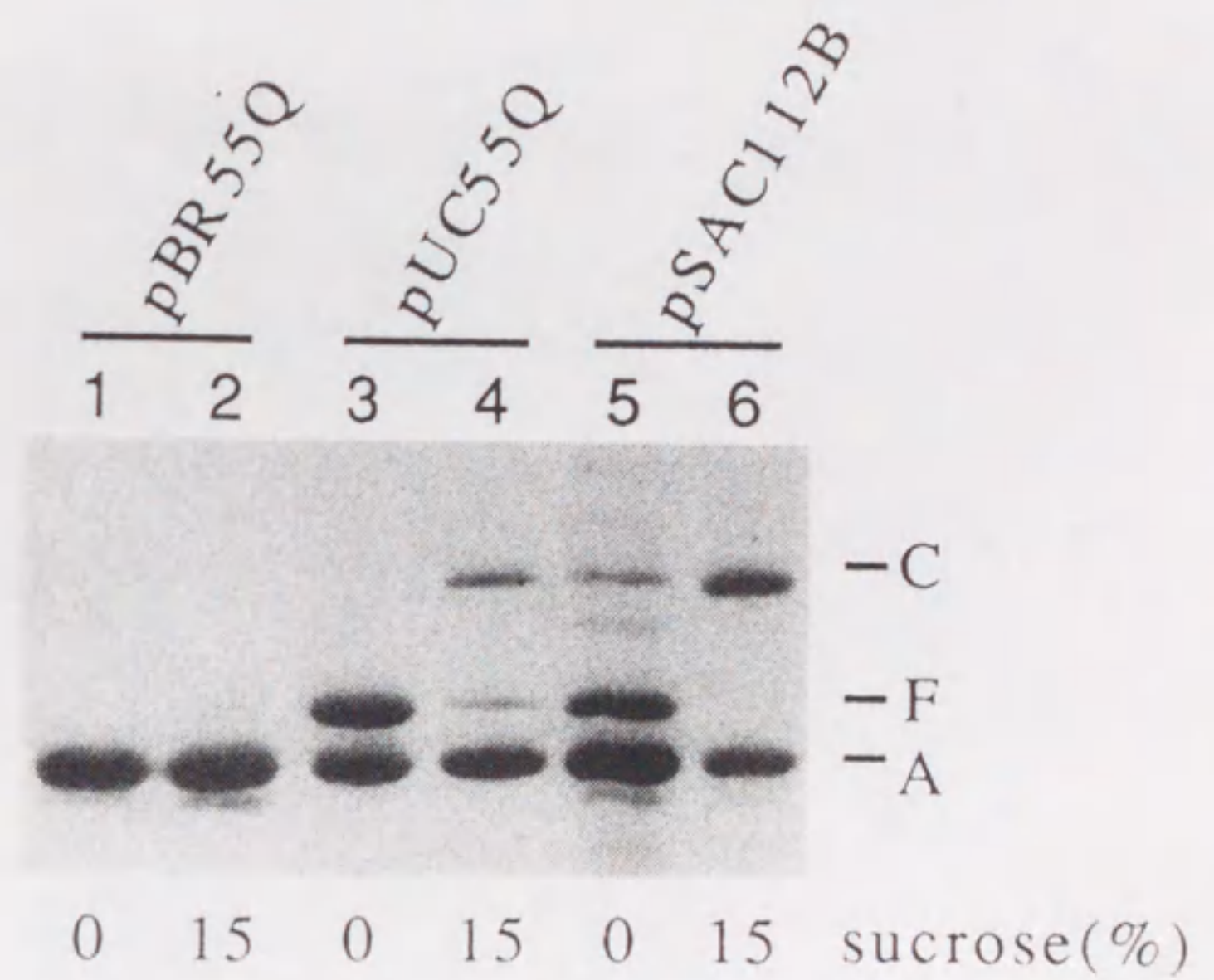


**Fig.15** Autoradiogram showing the time course of phosphorylation of OmpR by the truncated form of EnvZ. Purified OmpR (lanes 2, 3, and 4), OmpR55Q (lanes 5, 6, and 7), OmpR55Q/102C (lanes 8, 9, and 10), and OmpR102C (lanes 11, 12, and 13) (1.0  $\mu$ M each) were incubated with EnvZ\* (0.5  $\mu$ M) in the presence of 0.05 mM [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (6,000 cpm/pmol) in 10  $\mu$ l of a buffer containing 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 400 mM KCl for the indicated times at 30°C. The sample were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by autoradiography. Phospho-EnvZ\* was also loaded on lane 1 as a control. The bands corresponding to phospho-EnvZ\* and phospho-OmpR are indicated by letters, Z and R, respectively.



**Fig.16** DNA-binding ability of the nonphosphorylated form of OmpR to the *ompF* and *ompC* promoter DNAs. A DNA fragment end-labeled with  $^{32}\text{P}$ , which encompasses either *ompF* or *ompC* promoter sequence (0.1 pmol) (panels A and B, respectively), was incubated with nonphosphorylated form of wild-type OmpR (lanes 2 to 7) and mutant OmpR55Q/102C (lanes 9 to 14) in 20  $\mu\text{l}$  of a buffer containing 5 mM  $\text{MgCl}_2$  and 100 mM KCl for 5 min at 4°C. The amounts of OmpR used are indicated under each lane. The samples were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by autoradiography.





**Fig.17** Osmoregulatory expression of *ompF* and *ompC* observed in the *envZ* deletion strain carrying high-copy-number plasmids harboring the mutant *ompR55Q* gene. Strain AT141 was transformed with the following plasmids. Plasmid pBR55Q carries the *ompR55Q* gene on pBR322-vector (lanes 1, 2), while plasmid pUC55Q carries the same gene on pUC19-vector (lanes 3, 4). Plasmid pSAC112B carries both the wild-type *ompR* and *envZ* gene. Other details are the same as those described in the legend to Fig. 3.

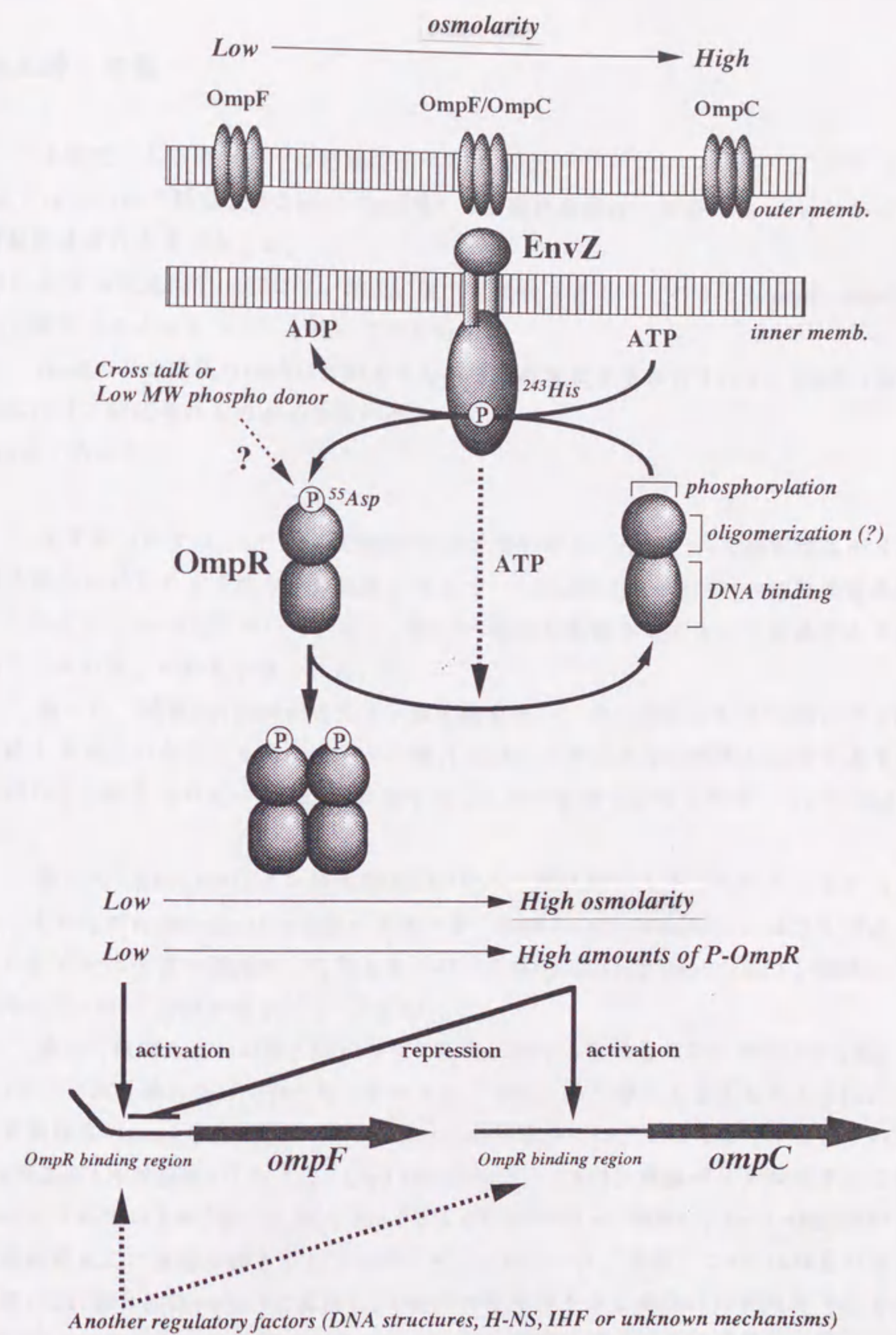


Fig.18 The schematic model of osmoregulation in *E. coli*, mediated phosphotransfer between EnvZ and OmpR

## 第五節 考察

本研究におけるテーマは序論で述べたように、

- ① *in vitro*で観察されたEnvZ-OmpR間のリン酸化反応は、本当に*in vivo*における情報伝達系の本質であるか。
  - ② 転写活性化因子OmpRはリン酸化、脱リン酸化を介してどのように*ompF*、*ompC*の転写調節（スイッチング）を行っているのか。
  - ③ OmpRのリン酸化はOmpRにどのような構造上の変化をもたらすのか。OmpRの活性化にはリン酸化そのものが必要なのか。
- の3点であった。

まず第二節では、*in vivo*でOmp<sup>CC</sup>の表現型を示し、*in vitro*で精製標品がリン酸化能を保持したまま脱リン酸化能を失っていた*ompR3*変異[18, 19]の偽復帰変異として同定した*envZ30*について解析し、EnvZの構造と機能を考える上で意義のある、いくつかの新しい知見が得られた。

第一に、精製EnvZ30\*が自己リン酸化能を失い、その結果としてOmpRのリン酸化能も失っていたことからOmpRのリン酸化にはEnvZの自己リン酸化が必須であり、EnvZのリン酸基そのものがOmpRに転移することが一層強く示唆された (Fig. 3 and 4)。

第二に、EnvZ30\*はリン酸化型OmpRの脱リン酸化能をも失っていたことから、EnvZそのものにphosphatase活性があるのか、OmpRのautophosphatase活性を促進しているのかは今後の課題として残るものの、本質的にEnvZがOmpRの脱リン酸化にも関与していることが示唆された (Fig. 5)。

第三に強調したいのは、EnvZのリン酸化に関する能力全てが、351TyrからSerへの1アミノ酸置換によって引き起こされた点である。第三節でも言及したように、二成分制御系のsensorファミリーのtransmitter領域中には、それら全てで保存されたHis残基が1カ所存在し[20, 21]、CheAやNtrBでは、このHis残基がリン酸化することが示唆されていたが[28, 29, 30]、EnvZではそれが243Hisが相当し、EnvZ-OmpR間のリン酸転移反応に重要な働きをしていると考えられていた。事実、このHis残基のすぐ近傍の247番目のThrがArgに置換し、Omp<sup>CC</sup>の表現型を与えるEnvZ11が同定されている[18]。しかし、sensorファミリーではこのHis残基を中心とした直接リン酸化されると思われる保存領域のC末端側にさらに3つの保存領域があることも示されていた

[20, 21]。そのひとつが、"Asn-X-X-X-Asn-Ala" からなる配列で、EnvZの場合343番目から348番目の配列に相当するが、EnvZ30の変異点はまさにこの近傍の351番目の置換であった点に興味深い。このことは、リン酸化部位と思われるHis残基を中心とした領域の他にも、そこから100アミノ酸残基近くも下流に一次配列の解析から見つかった保存配列"Asn-X-X-X-Asn-Ala" 周辺の領域がsensorタンパク質のリン酸化反応に重要であることを示唆していると考えられる。

さらに、*in vitro*リン酸化実験の結果と (Fig. 3~5)、*in vivo*での表現型 (Fig. 2) の関係から、EnvZ、OmpRの機能と転写調節について考察すると、*in vitro*でEnvZ30\*がリン酸化に関する全ての能力を失い、*in vivo*で*ompR-envZ30*が $\Delta envZ$ と同じ表現型を示したことは、EnvZの*in vivo*における機能がまさにOmpRのリン酸化そのものであり、この反応がEnvZ-OmpR間の情報伝達の本質であることを、強く示唆したと言える。一方、*in vitro*でリン酸化はするが脱リン酸化しないOmpR3が*in vivo*でOmpCのみを発現するように機能していたのが、EnvZとしての機能を失った*envZ30*変異によってほぼ野生型に近い表現型に戻った事実は、*in vivo*においてはOmpRがEnvZ以外の何らかの因子によってもリン酸化されうることを推察させる。

この点に関しては、少なくとも*in vitro*においては、走化性を制御するCheA/CheY、窒素代謝を制御するNtrB/NtrC、そしてEnvZ/OmpRの異なる環境応答系制御因子間で、CheAからNtrC、NtrBからCheY、CheAからOmpR、EnvZからNtrCへリン酸転移反応が起こりうることを示唆されている[37, 38]。したがって、こうした細胞内におけるEnvZ以外のsensorを介したクロストーク (cross talk) によるリン酸化の可能性がまず挙げられる。

また、こうした他のsensorタンパク質によらず、細胞内に存在するacetyl phosphate、carbamyl phosphate、phosphoramidateといった低分子化合物がリン酸供与体として機能している可能性がPhoB、CheY、NtrCについて*in vitro*、*in vivo*両面から指摘されており、特に細胞内acetyl phosphate量の変動がこれらの系の表現型に直接影響していることが観察されている[39, 40, 41]。しかしこれまでのところ、OmpRが*in vivo*でこうしたクロストークや低分子化合物によって活性調節されているといった報告はない。

第三節では、二成分制御系で一次配列上保存され、リン酸化に直接関与しているか、リン酸化反応に重要な役割を果たしていると予想されるEnvZの243His、OmpRの12Asp、55Aspを部位特異的変異法によってArg (EnvZ243R)、Val (OmpR12V)、Gln

(OmpR55Q) にそれぞれ置換し、*in vitro*、*in vivo*両面からその影響を解析した。置換後のアミノ酸残基は、DNAレベルでHis、Aspのコドンが置換した上で、制限酵素による切断部位も創出するように合成オリゴヌクレオチドをデザインした結果に依存している。

EnvZ243Rは、*in vitro*でリン酸化に関する全ての能力を失い (Fig. 6, 7)、*in vivo*で $\Delta envZ$ 株と同じ表現型 (OmpF<sup>+</sup> OmpC<sup>±</sup>) を示し (Fig. 11)、EnvZとしての機能を失っていることが示唆された。この点に関し、Forstらは著者らと同様に243HisをValに置換した変異EnvZを使った解析を行っている[42]。そして彼らはこの変異EnvZがOmpRのリン酸化能を完全に失っていること (脱リン酸化活性については解析していない)、変異*envZ*が*ompR*存在下、OmpF<sup>-</sup> OmpC<sup>±</sup>の表現型を示したと報告している。そして、この時点で彼らは*in vivo*における*ompF*と*ompC*の転写調節に関して、「非リン酸化型OmpRがOmpCを活性化し、リン酸化型OmpRがOmpFを活性化する」というモデルを提唱していた。しかし、この結果は、*in vivo*の表現型の点で著者らの結果と一致しない。これは、著者らが変異遺伝子の機能をより厳密に観察するため、シングルコピープラスミドから発現させているのに対し、彼らが野生型OmpRと変異EnvZをハイコピープラスミド (pBR322) から同時に発現していることに起因していると考えられる。事実、OmpRのみを $\Delta envZ$ 株 (AT142株) でハイコピープラスミドから発現するとOmpF<sup>-</sup> OmpC<sup>±</sup>の表現型を示すことを著者らは確認している (data not shown)。また、著者らの解析では、*in vitro*でリン酸化能を失っていたOmpR55Qを*in vivo*で発現するとOmpFだけでなくOmpCも全く発現せず、*ompF*、*ompC*どちらの転写活性化にもリン酸化型OmpRが必要なことを示している (Fig. 8~11)。これらの結果と、*ompR3/envZ30*、*envZ11/ompR77* [18]から得られた解析結果は、どれもForstらのモデルと真っ向から対立していた。さらに、饗場、Slauchらから独立に報告された*in vitro*転写実験等の結果もまた著者らの考えを支持していた[43, 44]。つまり、彼らは*ompF*、*ompC*の転写が共に非リン酸化状態のOmpRでは起こらず、リン酸化型OmpRの量を増加させていくと、まず*ompF*の転写が活性化され、さらにリン酸化すると*ompF*の転写量は減少傾向に転じ、かわって*ompC*の転写量が増加すると報告した。そして、転写調節のモデルとして、低浸透圧条件下でリン酸化型OmpRの量はEnvZによって低く保たれ、*ompF*が優先的に発現するが、高浸透圧条件下では相対的にEnvZの脱リン酸化活性が抑制されてリン酸化型OmpRの量が増加し、*ompF*の転写は抑制され*ompC*の転写が増加するという考えを提唱していた (Fig. 18)。

ここで、注目すべきはOmpR12Vの性質である。*in vitro*で野生型OmpRに較べ

ずかしかリン酸化しなかったこの変異OmpRは、*in vivo*で低浸透圧条件下ほとんどOmpFもOmpCも発現できず、浸透圧上昇に対して、野生株とは反対にOmpFを増加させて、野生株の低浸透圧条件下の様相に近いOmpF、OmpCの発現パターンを示した (Fig. 8~11)。この一見ユニークな表現型は、低浸透圧条件下、OmpR12VはompFをも活性化できない程度にしかリン酸化せず、浸透圧上昇によってやっと低浸透圧条件下で野生型OmpRが受ける程度にまでリン酸化型が増加したためであると解釈でき、彼らのモデルを支持する結果である。

OmpRのリン酸化の程度が転写調節に重要であることは共同研究者の中島らの次の実験からも示唆されている[45]。彼女らは、OmpRのN末端半分 (OmpR-N; 1Metから122Arg) を野生株中でpBR322上から発現させると、OmpCは全く発現しなくなり、OmpFも顕著に減少する一方、*envZ11*変異株のOmpCCの表現型に対しては、これを野生型同様の正常な表現型に回復させること、しかし、この効果は55AspをGlnに置換すると見られなくなることを示した。つまり、本来OmpRに転移されるはずのリン酸基をOmpR-Nが奪ってしまうsignal titrationが起こって表現型がより低浸透圧側にシフトしてしまっていることを示唆していると言える。

そして、当初、発現調節モデルについて対立していたForstら自らが*in vivo*におけるOmpRのリン酸化について直接観察することに成功して、この問題はほぼ決着した[46]。そのデータは、饗場、Slauchらのモデルどおり浸透圧上昇によって、細胞内のリン酸化型OmpRが約4倍に増加すること、OmpCCの表現型を示す*envZ11*変異株では、リン酸化型OmpR量が約2.4倍増加し、*in vitro*でEnvZ11\*が脱リン酸化能を失っておりリン酸化型OmpRを蓄積させるという結果と一致する[18]ことを示唆した。さらに、彼らの転写調節に関するモデルを誤らせた原因の、*envZ*が機能しない (=欠失、または243Hisの置換による) 条件でOmpRのみをpBR322上から発現させるとOmpCCとなる現象について、確かに*envZ*が正常に機能している場合に較べてリン酸化型OmpRが2.4倍に増加しており $\Delta envZ$ の条件でクロストレーキングによるOmpRの過剰なリン酸化の可能性を示している。

そしてEnvZのリン酸化部位については、EnvZが本来CheAのresponse regulatorであるCheYを*in vitro*でリン酸化でき、EnvZ、CheAどちらのリン酸基もN結合性リン酸であること[38]、そしてCheAのリン酸化部位48His [28]に相当するEnvZの243Hisを置換してしまうと、EnvZはリン酸化能を完全に失ってしまうという著者らの結果 (Fig. 6) を考えあわせると、EnvZのリン酸化部位は243Hisであることが強く示唆されたが、事実、このことは最近生化学的に確かめられた[49]。

一方、OmpRのリン酸化部位に関しても、OmpRが少なくとも *in vitro* で本来CheYのkinaseであるCheAによって正常にリン酸化され[38]、アミノ酸一次配列上だけでなく構造上も確かに両タンパク質の保存領域が似ていると考えられること、OmpRのリン酸基もCheYと同じacyl phosphateであること[42]、そのCheYのリン酸化部位が57Aspであり[31]、OmpRでこれに相当する55AspをGlnに置換したOmpR55Qが完全にリン酸化能を失ったという著者らの結果を総合すると、OmpRのリン酸化部位はほぼ間違いなく55Aspであることが示唆された。こちら最近Delgadoらが、リン酸化部位を生化学的に決定し、“基本的に” (後述) 55番目のAspであることを証明した[49]。

一方regulatorファミリー (OmpRファミリー) の保存領域約130a. a. (receiver領域、リン酸化領域) 全体の立体構造に関しては、CheYのX線構造解析から、この領域が5つの平行に位置する $\beta$ -sheetのまわりを5つの $\alpha$ -helix構造が取り囲む形をしていて、保存された2つのAspと1つのLys残基 (CheYでは13Asp、57Asp、109Lys、OmpRでは12Asp、55Asp、105Lys) はタンパク質表面に互いに三次元的には近接して位置していることが明らかとなった[48]。

さらにOmpRのリン酸化領域の構造について、著者らの報告のあと、まずBrissetteらがやはり、OmpRの11AspをAsn (OmpRD11N)、12AspをGln (OmpRD12Q)、55AspをGln (OmpRD55Q) に置換した変異OmpRの性質について報告している[47]。彼女らはこれらをpBR322上から発現させた場合、いずれもほとんど *ompF*、*ompC* を活性化できないことを示した。そして彼女らは *ompRD11N* の偽復帰変異としてOmpRD11Nに48SerからPheへの二次変異が導入された *ompRD11N/S48F* とEnvZの240GlyがGluに置換する *envZG240E* を取得している。特に興味深いのは、EnvZG240Eの変異点がEnvZ11のそれと近く (247ThrがArg)、実際、*envZG240E* が野生型 *ompR* に対し *envZ11* 同様のOmpCCの表現型を与え、逆に *envZ11* が *ompRD11N* の表現型をほぼサプレスすることができたと報告していることである。このことは、acidic pocketを形成するOmpRの11、12Aspの変異が、OmpRをリン酸化されにくくし、*ompF*、*ompC* の転写活性化能を著しく低下させている点で、著者らのOmpR12Vの結果と一致した (Fig. 8 and 9)。

しかし、OmpRのリン酸化部位を生化学的に決定したDelgadoらは同じ論文で、部位特異的変異法の際に大きい側鎖をもつアミノ酸残基に置換することによる構造のゆがみの影響を排して、11Asp、12Asp、55Aspの重要性について再検討するためそれぞれAlaに置換 (OmpRD11A、OmpRD12A、OmpRD55A) する変異 *ompR* を構築し、改めてこれらのアミノ酸の重要性について解析し直した結果を報告している[49]。彼らは、11Asp、12Aspどちらか一方のみを置換してSG480 $\Delta$ 76 ( $\Delta$ *ompR-envZ*) のゲノム

*nlpA*サイトに*envZ*とともに挿入すると、*ompRD11A*ではOmpF、OmpCとも確かに発現量は若干減少したものの、Brissetteらの構築した*ompRD11N*ほど顕著ではなく（しかも彼女らは、その発現にpBR322を使っていた）、*ompRD12A*では全く正常な表現型を示し、Brissetteらの*ompRD12Q*や著者らの構築した*ompR12V*のように表現型が変化しないことを示唆している。そして、*ompRD11A/D12A*の二重変異にして初めてOmpFもOmpCも発現しなくなることを示唆した。これらの結果は、「OmpRのリン酸化領域においてacidic pocketを形成し、三次元的にも<sup>55</sup>Aspと近接する<sup>11</sup>Asp、<sup>12</sup>Aspがリン酸転移反応に直接関与しており、この領域の変異がOmpRをリン酸化しにくくする」という著者やBrissetteらの結論を覆すものではないものの、著者やBrissetteらの行った置換では、リン酸化領域全体のゆがみの影響も少なからずあることを示唆しており、部位特異的変異法による解析結果の解釈の難しさ、限界、危険性を露呈したと言える。また、*ompRD11A/D12A*の二重変異にして初めてOmpFもOmpCも発現しなくなったことは、acidic pocketではアミノ酸の種類より電荷（数）がリン酸転移反応に重要である可能性を示唆しているとも言える。さらにDelgadoらは、リン酸化部位を置換したはずの*ompRD55A*が*in vivo*で明らかに転写活性化能、転写調節能を残存しており、*in vitro*リン酸化実験では確かにリン酸化が認められないが、*in vivo*リン酸化実験ではOmpRD55Aもリン酸化しているという驚くべきデータを示している。彼らはこのリン酸化について、リン酸基がacyl phosphateであり、*ompRD12A/D55A-envZ*でもOmpF、OmpCの発現が認められるのに対し、*ompRD11A/D55A-envZ*では全く発現しなくなったことから、第二のリン酸化部位候補は<sup>12</sup>Aspであるとしている。これが先に<sup>55</sup>Aspが”基本的に”リン酸化部位であると断り書きした理由であるが、野生型OmpRのリン酸化部位同定の過程でも<sup>12</sup>Aspのリン酸化が起こっているという証拠は全く示唆されておらず、Delgadoら自身その意義について深く言及していない。ただこの第二のリン酸化が仮にartifactであって野生型OmpRでは機能していないにせよ<sup>11</sup>Asp、<sup>12</sup>Asp周辺のacidic pocketと、<sup>55</sup>Asp、<sup>105</sup>Lysから立体的に構成されているリン酸化領域において必ずしも<sup>55</sup>Asp自身のリン酸化が活性化型への正常な構造変化を誘導するのに必須でないことは確かであり、OmpRの活性化において<sup>55</sup>Aspのリン酸基そのものは、OmpRの転写活性化能に必須でないという著者らの解析結果を支持している。

CheY、OmpRの他に、NtrCについてもCheY、OmpRのリン酸化部位に相当する<sup>54</sup>Aspがリン酸化することが証明されており[51]、これまでのところ二成分制御系のリン酸化部位は全て保存されたHisとAspであるとされている。したがっておそらく



すべての二成分制御系に属するタンパク質についてこの基本構造や原理（普遍性）が維持されているのは間違いないと思われる。ただし、すべての二成分制御系が、単純にkinaseのHis残基からresponse regulatorのAsp残基へのリン酸転移だけで細胞内情報伝達系を構成しているわけではなく、その分子メカニズムに多様性があることも明らかになってきている。

その第一例は、*Escherichia coli*の嫌氣的条件下における好氣的代謝系酵素の遺伝子発現抑制の制御因子ArcB [52]、同じく*Escherichia coli*の夾膜多糖合成を制御するRcsC [53]、*Bordetella pertussis*のtoxin合成の制御因子BvgS [54]、*Myxococcus xanthus*の走化性を制御するFrzE [55]、*Agrobacterium tumefaciens*のVirA [56]といったsensor kinaseの存在であり、これらはその他の多くの二成分制御系 sensor kinaseと同じく、Hisを含む約150a. a.の保存領域（transmitter領域）をもつが、さらに下流にresponse regulatorの保存された2つのAspと1つのLys残基を含む保存領域（receiver領域）を合わせ持った構造をしている。これらハイブリッドタンパク質にはそれぞれ固有のresponse regulatorが別に存在することから、このC末端receiver領域はsensor kinaseとしての機能を調節する役割があると考えられている。事実、ArcBについては、このC末端receiver領域がtransmitter領域によってリン酸化し、receiver領域がリン酸化していることがArcB transmitter領域のHis残基から本来のresponse regulatorであるArcAのAsp残基へのリン酸転移に必須であることなどが示唆されている[52]。

第二例は、*Bacillus subtilis*の胞子形成開始に重要なSpoOF/SpoOAの場合であり、このsensor kinaseとresponse regulatorのリン酸化の間には、もうひとつSpoOBのリン酸化が介在しており、少なくとも*in vitro*でresponse regulatorのSpoOAは直接sensor kinaseのSpoOFによってリン酸化されないことが示されている[165]。胞子形成という細胞形態を全く変えてしまうような適応機構においてはこうしたphosphorelayの存在が、その開始という菌にとっての「決断」に何段階ものチェック機構を取り入れ、厳密に制御するために役立っているものと思われる。

第三の例は、ごく最近、石毛らによって報告された“dual-signaling transduction”である[166]。この現象は、初めこれまで何の機能も報告されいなかったArcB、BarA [158]のC末端領域がOmpRによるompCの転写を活性化するという発見に端を発している。実は、ArcB、BarAとも第一例で紹介したハイブリッド型のsensor kinaseであるが、さらに一次配列をよく比較するとRcsC、VirAなどとは異なり、C末端側のreceiver領域の下流にさらに150a. a.程度の配列が続いている。こう

したタイプには他にBvgS、FrzEなども含まれる。彼らはこのうちArcBについてより詳細に解析し、OmpRはArcBのtransmitter領域でも、receiver領域でもないC末端領域のみのポリペプチド (ArcBC) で活性化されていることをまず明らかにした。さらにこの領域の配列に注目した彼らは、このタイプのものに共通するHis残基が存在し、周辺が弱いながらCheAのリン酸化領域と相同性のある配列であることを見いだしたのである。そして、*in vitro*においてArcBCがOmpRをリン酸化できること、しかし、このHis残基を置換してしまうと*in vitro*におけるリン酸化能が失われ、*in vivo*におけるOmpRの活性化もできなくなることを示し、このHis残基周辺がシグナルを発することのできる新たな領域であることを示唆した。さらに、ArcBCのリン酸化はArcBそのものが共存している場合にのみ起こったことから、C末端 (ArcBC) のHisのリン酸化はArcBのN末端側のtransmitter領域の助けを借りて行われていること、またArcBCのリン酸基が逆にArcBに (おそらくreceiver領域のAspに) 転移することを示した。これらの結果は、1つのsensor kinaseタンパク質中に2つのリン酸化するHis残基が存在し、異なる2種類の刺激に1つのタンパク質が応答してシグナル (リン酸基) をそれぞれ別のresponse regulatorに伝達したり、自身の活性を調節している可能性を示唆したと言える。

これら3つの例は、明らかに二成分制御系の基本形がさらに発展し、より巧妙な制御を可能にした分子メカニズムであると考えられる。

第四節では、OmpRのリン酸化による構造的、機能的変化の詳細を探るため、リン酸化能と転写活性化能を失ったOmpR55Qから転写活性化能を回復する二次変異が起こったOmpR55Q/102Cを取得し、詳細な解析を行った。

二次変異は102TyrをCysへ置換するものであったが、この変異によってOmpR55Qは*in vivo*でOmpF<sup>-</sup>、OmpC<sup>-</sup>からEnvZ非依存的にOmpF<sup>+</sup>、OmpC<sup>+</sup>に転じ (Fig. 14)、*in vitro*においてもリン酸化能を回復することなくリン酸化非依存的に特異的DNA結合能を上昇させていた (Fig. 15 and 16)。またEnvZへの依存性は、55Glnを再びAspに戻してリン酸化能を回復させたOmpR102Cでも回復しなかったことから (Fig. 14~16)、102TyrのCysへの置換は単独でOmpRにEnvZ非依存的転写活性化能を与えていることが示唆された。そして、OmpRのリン酸化は単に特異的DNA結合能を上昇させているのであって、RNA polymeraseにとってOmpRのリン酸化 (あるいはリン酸基) そのものは、 $\alpha$ -subunitのC末端領域でOmpRと直接相互作用し、ompF、ompCの転写を活性化する上で必須でないことが示唆された [167, 168]。言い換えるなら、Fig. 17でも明ら

かなようにリン酸化できない変異OmpRでも細胞内濃度を極端に高め、わずかにもっている特異的DNA結合能で機能的にompF、ompCのプロモーターを占有できるような状況にするとompF、ompCの転写を活性化するということである。ただし、これは通常のOmpRの発現量においては、EnvZによるOmpRのリン酸化を介した制御機構と対立するものでは全くない。

では、OmpRのリン酸化はどのようにしてDNA結合能の上昇に影響しているのだろうか。この構造上の疑問に関連して、共同研究者の中島らは、培地浸透圧変化に無関係にompFもompCも活性化できない2つのompR変異、ompR96A (96GluがAlaに置換) とompR115S (115ArgがSerに置換) を取得している[57]。in vitroリン酸化実験で、OmpR96A、OmpR115Sは、野生型と同等のリン酸化能と脱リン酸化を示したが、リン酸化依存的な特異的DNA結合能の上昇がみられなかった。そこで彼女らは、DMSによるOmpRのクロスリンキング実験を行い、野生型OmpRがin vitroでリン酸化依存的に多量体化するのに対して、変異OmpRが両方とも単量体のままであることを示し、OmpRは本来リン酸化依存的に構造上多量体化し、DNA結合能を上昇させているのではないかと提唱している。同時に、96Glu、115Argを含むOmpRの中央部領域 (receiver領域C末端側) が直接OmpR間の相互作用に働いているか、もしくはリン酸化依存的なOmpRの構造変化に深く関わっていることを示唆している。

またBrissetteらも、OmpRの94GlyがAsp (OmpRG94D)、111GluがLys (OmpRE111K) に変異すると、リン酸化能は正常なのにDNA結合能を失って、ompF、ompCとも活性化できないことを報告している[58]。

ここで注目されるのは、OmpRの中央部領域 (しかしreceiver領域中) に同定されたこれらの変異点 (94Gly、96Glu、111Glu、115Arg) のすぐ近傍に全てのresponse regulatorで保存されている105Lysが存在する点である。このLysの重要性について、CheYでは独立に2つのグループから、107Lysとリン酸化部位の57Aspとの直接的相互作用がリン酸化によって誘導される構造変化に深く関わっていることが報告されている[59, 60]。

これらの事実と、OmpR55Q/102Cの二次変異点、まさにこの領域中の102TyrのCysへの置換であったことは、この変異が本来EnvZによるリン酸化によって誘導されるOmpRの構造変化 (多量体化) をリン酸化非依存的に促進していることを強く示唆する。

また、ごく最近、都築らは、in vitroで弱いDNA結合能は認められるものの、in vivoでほとんど転写活性をもたないOmpR-C (OmpRの123GlnからC末端までのポリ

ペプチド) を使い、PCR変異法で、転写活性が部分的に回復したものを取得した[61]。その結果、227Gly (本来のOmpRの1Metを1とする) のCysへの置換が有効であり、*in vitro*で還元剤DTT非存在下、この変異OmpR-Cはdimerとして観察され、さらに酸化剤ferricyanideの添加で二量体化の傾向が強まったことを示している。このときOmpR-CのDNA結合能と転写活性も平行して上昇しており、OmpRはN末端側の二成分制御系のreceiver領域がなくても多量体化を促進する変異によってある程度の転写活性化が可能になることを示唆している。

しかし、OmpR55Q/102Cについては*in vitro*でDNA結合能の上昇が観察されたにもかかわらず、予備的なクロスリンク実験では、野生型OmpRとの間に顕著な違いが見られなかった (data not shown)。ただこの結果については、実験条件、例えばDNAの不在 (反応系にompF、ompCプロモーターDNAは加えていない) の影響が考えられ、*in vivo*の状況をどこまで再現しているかに検討の余地が多く、確かな結論を得るには到っていない。

こうした、多量体化の重要性についてはOmpR以外にも、NtrCで報告されており、NtrCは少なくとも2つのダイマーが相互作用することが転写の活性化に必要で、N末端側のリン酸化はこのダイマー間の相互作用を促進することが示唆されている。ただNtrCの場合は、多量体化そのものは野生型NtrCのC末端側半分の領域だけでも観察され、直接的相互作用にはC末端側のみで充分であることが示唆されている点がOmpRとは異なる[62, 63]。

一方、OmpR55Q/102Cはシングルコピープラスミド上から発現させると*in vivo*でEnvZ非依存的に、正常な表現型を示した (Fig. 14)。すなわち、培地浸透圧変化に対して低浸透圧条件下ではOmpF、高浸透圧条件下ではOmpCを優先的に発現させた。同様の結果は、著者らが本実験を終了した直後に、Brissetteらからも報告されている[64]。彼女らは、同じOmpR55Qを出発点に、pBR322から発現させた場合に転写活性化能を回復する二次変異OmpRを2つ取得した。二次変異は、やはりOmpRの中央部領域に起こっており、83ThrからAlaへの置換と、94GlyからSerへの置換であった。そして彼女らの場合、これらをpBR322上から発現させるとenvZの有無に関わらず正常なosmoregulationの表現型となることを報告している。ここで重要な点を補足すると著者らは、OmpR55Q/102Cをより野生株に近い条件、つまりシングルコピープラスミドから発現させて表現型が野生株と変わらないことを示しているが、Brissetteらと同じようにpBR322上から発現した場合は、EnvZの有無、培地浸透圧に関わらず、完全にOmpCの表現型を示すことを観察している (data not shown)。一方、野生型

EnvZ-OmpRをpBR322から発現しても表現型は正常である。したがって、OmpR55Q/102Cは野生型OmpRのように *in vivo* で活性型、非活性型の両型をとるような修飾は受けていないことがわかれるとともに、Brissetteらの取得した2つの変異OmpRと比較してOmpR55Q/102Cは、相対的に強い活性をもった構造に転換していると考えられる。

ただ、いずれにせよこれらの結果は、EnvZによるリン酸化に依存しない形でDNA結合能を上昇するような変異がOmpR自身に起こると、転写調節そのものはEnvZがなくとも別の機構で十分可能であることを示唆する。その場合、重要な役割を果たしている可能性のある要因としては、まずDNA高次構造の変化が挙げられる。

事実これまでに、topoisomerase Iをコードする *topA* の変異でOmpCが減少したり、DNA gyraseをコードする *gyrB* の allele のなかにOmpCCにするものがみついている（他の *gyrB* allele では影響ない）。また、DNA gyrase inhibitor である novobiocin (DNA構造をrelax) の培地への添加で *ompF* の転写が減少し、*ompC* の転写にも弱い抑制効果があることが認められている[65]。さらに *ompF* 上流のDNA構造はOmpR結合領域内で湾曲していることが知られているが[113]、湾曲DNAを認識して結合する核様体タンパク質H-NSの *osmZ* 変異でも *ompC* の転写は増大、*ompF* の転写は減少している[66]。また、別の核様体タンパク質IHFについても *ompF* の転写を促進することが報告されている[67]。

また転写後調節の機構として、緒言でも言及したように *micF* が存在する[10, 11]。これまでの報告では、*micF* は、ethanol、温度上昇、sucrose、redox stressなどで誘導され、*ompF* mRNAを不安定化することでOmpFの発現量を減少させることが明らかになっている[12, 68, 114]。さらに、redox stress (活性酸素) に応答した発現誘導については、*micF* の転写開始点上流5'-flanking regionに結合するredox sensitiveな70kDaのRSBF (redox sensitive binding factor) とheat-resistantなHRBFの存在が示唆されているが[69]、その実体と機能、osmoregulationとの関与についての詳細な報告はまだである。

以上、大腸菌外膜タンパク質OmpF、OmpCのosmoregulationに関して、制御因子EnvZ-OmpR間のリン酸転移反応を軸に述べてきたが、これらをまとめて略図化したのがFig. 18である。そして、著者が本章冒頭で設定したテーマに対する解答を著者のデータを含め総合して端的に述べると、

「広く生物界に存在する二成分制御系で保存されたEnvZの243HisからOmpRの55Aspへ

のリン酸転移反応は、EnvZ-OmpR間の細胞内情報伝達系の本質であり、EnvZのリン酸化部位から100a. a. も下流の保存領域近傍や、OmpRのacidic pocketを形成している保存された<sup>12</sup>Asp周辺もリン酸化反応に重要である。ompF、ompCの転写調節（スイッチング）はリン酸化型OmpRの量が低浸透圧条件下で少なく、高浸透圧条件下で増加するようにEnvZによって制御されることで行われているが、OmpRを介した転写調節には、DNA高次構造などリン酸化以外の要素（因子）も関与している。また、リン酸基そのものはOmpRの活性化に必須ではなく、リン酸化は中央部領域を介した構造変化（多量体化）を誘導するのに必要である。」  
ということになる。

著者らが得た解析結果は、原核生物における環境適応における個体レベルの応答における「感知→遺伝子発現」過程の根幹のひとつ二成分制御系の基本メカニズムを解明する上で、多少なりとも貢献したものと考えているが、これまで原核生物にしか存在しないと考えられていたこのシステムが真核生物である酵母や植物から相次いで発見され、その普遍性は、さらに生物界全体に拡大しつつある。この点については、第四章で述べたい。

なお、本論文では、EnvZの浸透圧感知機構に関しては一切触れていないが、この問題に関しては、同期の時下進一博士の博士論文ならびに彼の報文を参考にしていただきたい[173~176]。

## 第六節 実験材料と実験方法

### 2-6-1 試薬関連、合成オリゴヌクレオチド

遺伝子操作、シーケンシングには、TaKaRaの制限酵素、T4 DNA ligase、T4 polynucleotide kinase、bacterial alkaline phosphatase、klenow fragment、T4 DNA polymerase、Dideoxy Sequencing Kit、DNA Ligation Kitを用いた。

合成オリゴヌクレオチドはApplied Biosystem社の試薬を用い、  
dGGGTAAGTCGC(T)GACTTGCGC (*envZ243R*作成)  
dGTGGTCGATGT(A)CGACATGCG (*ompR12V*作成)  
dGGTACTGC(G)AG(T)TTAATGTTAC (*ompR55Q*作成)

の各20merを合成した。下線が置換した塩基、カッコ内が野生型の塩基である。

アイソトープ標識化合物 [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP (111TBq/mmol、370MBq/ml)、  
[ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (222TBq/mmol、370MBq/ml) はAmersham社の製品を用いた。オートラジオグラムには富士フィルムのRX50を用いた。

アガロースゲルにはSIGMA社のAgarose TypeII medium EEOを用い、DNA断片のゲルからの抽出には、Visking社の透析膜及びダイヤトン社のDNA PREPを用いた。

タンパク質定量には、BIO-RAD社のPROTEIN ASSAY染色液を用いた。

タンパク質用低分子量マーカーには、Pharmacia Biotech社のLMW Kit Eを用いた。

ウェスタンブロッティングには、Millipore社のnitro-cellulose filter (GV pore size 0.22  $\mu$ m) を用いた。

EnvZ、OmpRの精製および*in vitro*実験には、Whatman社のmembrane filter GF/A、DEAE-cellulose DE52、Pharmacia Biotech社のSephadex-G75 (super fine)、Sephadex-G100、生化学工業のSepacal Miniカラムを用いた。

大腸菌用培地には、Difco社のTRYPTONE、YEAST EXTRACT、NUTRIENT BROTH、MacCONKEY AGARを用いた。

その他一般試薬は、和光純薬、片山化学、ナカライテスク、関東化学、米山薬品の特級試薬を用いた。

## 2-6-2 菌株、プラスミド、培地

### 【大腸菌K-12由来株】

- 1) AB2847 (*aroB tsx malA supE*) [36]
- 2) AT141 ( $\Delta lacU169 araD rpsL relA thiA flbB \Delta ompR-envZ$ ) [36]
- 3) AT142 ( $\Delta lacU169 araD rpsL relA thiA flbB \Delta envZ$ )
- 4) DB225 ( $\Delta lacU169 araD rpsL relA thiA flbB \Delta ompR-envZ ompC'-lacZ^+$ )
- 5) DB513 ( $\Delta lacU169 araD rpsL relA thiA flbB \Delta ompR-envZ ompF'-lacZ^+$ )
- 6) HAI0013 (*tsx malA supE ompR3 envZ30*)
- 7) JM83 (*ara*  $\Delta$  (*lac-proAB*) *rpsL*  $\phi 80 lacZ \Delta M15$ )
- 8) MH760 *recA* ( $\Delta lacU169 araD rpsL relA thiA flbB gyrA ompR2$ ) [33]
- 9) SG480  $\Delta 76$  ( $\Delta lacU169 araD rpsL relA thiA flbB \Delta malT-ompB$ ) [34]
- 10) SM2007 (*tsx malA supE ompR3*) [18]

### 【プラスミド】

- 1) pAT009; pBR322のAvaI-EcoRI断片1.9kbに、ompRを含むAvaI-EcoRI断片1.3kbをAvaI側にBamHI部位を導入する形で挿入したハイコピーompR発現用プラスミド。
- 2) pAT429; pBR322の骨格に、ompR-envZ (*ompB*) 領域を挿入したハイコピーompR-envZ発現用プラスミド。
- 3) pAT429Q; pAT429のBglIII-PvuII消化断片4.1kbに、pRDQ55のBglIII-PvuII消化断片1.8kbを挿入したハイコピーompR55Q-envZ発現用プラスミド。
- 4) pAT429QZ; pAT429ZのBglIII-PvuII消化断片4.1kbとpRDQ55のBglIII-PvuII消化断片1.8kbを挿入したハイコピーompR55Q-envZ243R発現用プラスミド。
- 5) pAT429V; pAT429のBglIII-PvuII消化断片4.1kbに、pRDV12のBglIII-PvuII消化断片1.8kbを挿入したハイコピーompR12V-envZ発現用プラスミド。
- 6) pAT429VQ; pAT429のBglIII-PvuII消化断片4.1kbに、pRDVQのBglIII-PvuII消化断片1.8kbを挿入したハイコピーompR12V/55Q-envZ発現用プラスミド。
- 7) pAT429Z; pAT429のMluI消化、BAP処理断片5.7kbに、pATZ243のMluI消化断片313bpを挿入したハイコピーompR-envZ243R発現用プラスミド。
- 8) pAT2004; *lpp*プロモーターの下流に野生型envZを挿入したハイコピーenvZ発現用プラスミド。



- 9) pAT2005S; pBR322を骨格とした、*lpp*プロモーター、*lac*プロモーター/オペレーター制御下でのハイコピー-*envZ*発現用プラスミド。
- 10) pAT2005Z; pAT2005Sの*EcoRI*-*HpaI*消化断片3.8kbに、pATZ243の*EcoRI*-*HpaI*消化断片1.4kbを挿入した、*lpp*プロモーター、*lac*プロモーター/オペレーター制御下でのハイコピー-*envZ243R*発現用プラスミド。
- 11) pAT4001; pBR322の*EcoRI*-*SaII*消化、BAP処理断片に、pAT2004を*EcoRI*-*SaII*消化して得た5'側を欠いた*envZ* (106GluからC末端まで)を含む断片2.4kbを挿入した部位特異的変異導入用プラスミド。
- 12) pATZ243; pAT4001に*envZ243R*作成のための部位特異的変異法を施し、一塩基置換した*MluI*消化断片313bpを再びpAT4001に戻したプラスミド。
- 13) pBOY-OH; pUC19を骨格に、*EcoRI*-*HindIII*消化で463bpの*ompF*プロモーター領域(*OmpR*結合部位)を切り出せるよう構築したプラスミド[17]。
- 14) pFN108; 温度感受性ランナウェイベクター-pSY343 (kanamycin耐性)を骨格とした、*OmpR*精製用プラスミド[35]。
- 15) pHAI030; pMF21の*BamHI*消化、末端平滑化断片14kbに、*ompR3-envZ*を含むSM2007株の*BamHI*-*HpaI*消化、末端平滑化断片3.6kbを挿入したシングルコピー-*ompR3-envZ*発現用プラスミド。
- 16) pHAI031; pMF21の*BamHI*消化、末端平滑化断片14kbに、*ompR3-envZ30*変異を含むHAI0013株の*BamHI*-*HpaI*消化、末端平滑化断片3.6kbを挿入したシングルコピー-*ompR3-envZ30*発現用プラスミド。
- 17) pHAI032; pMF21の*BamHI*消化、末端平滑化断片14kbに、*ompR3*変異を含むSM2007株の*BamHI*-*BgIII*断片2.1kbと*envZ30*変異を含むHAI0013株の*BgIII*-*HpaI*消化断片1.5kbのキメラ断片(末端平滑化)3.6kbを挿入したシングルコピー-*ompR3-envZ30*発現用プラスミド。
- 18) pHAI033; pMF21の*BamHI*消化、末端平滑化断片14kbに、野生型*ompR*を含むAB2847株の*BamHI*-*BgIII*断片2.1kbと*envZ30*変異を含むHAI0013株の*BgIII*-*HpaI*消化断片1.5kbのキメラ断片(末端平滑化)3.6kbを挿入したシングルコピー-*ompR-envZ30*発現用プラスミド。
- 19) pHAI047; pMF21を骨格とした、シングルコピー-*ompR*発現用プラスミド。
- 20) pHAI060; pMF21の*EcoRI*消化断片6.7kbに、pBR322由来のampicillin耐性遺伝子1.4kbを挿入したシングルコピー-プラスミド。
- 21) pHAI085; pBR322由来のpUSI2を骨格とした*tac*プロモーター/オペレーター下

- 流に *envZ\** をつないだ *EnvZ\** (81Tyr から C 末端まで) 精製用プラスミド。
- 22) pHAI089; pBR322 由来の pUSI2 を骨格とした *tac* プロモーター/オペレーター下流に *envZ11\** をつないだ *EnvZ11\** (81Tyr から C 末端まで) 精製用プラスミド。
- 23) pHAI094; pBR322 由来の pUSI2 を骨格とした *tac* プロモーター/オペレーター下流に *envZ30\** をつないだ *EnvZ30\** (81Tyr から C 末端まで) 精製用プラスミド。
- 24) pMAN104; pMF21 の *Bam*HI 消化、末端平滑化断片 14kb に、*ompR-envZ (ompB)* を含む AB2847 株の *Bam*HI-*Hpa*I 消化、末端平滑化断片 3.6kb を挿入したシングルコピー *ompR-envZ* 発現用プラスミド。
- 25) pMF21; kanamycin 耐性の miniF プラスミド (シングルコピー) [70]。
- 26) pMF21Q; pMF21 の *Bam*HI 消化、末端平滑化断片 14kb に、pAT429Q の *Hind*III-*Pvu*II 消化、末端平滑化断片 4.2kb を挿入したシングルコピー *ompR55Q-envZ* 発現用プラスミド。
- 27) pMF21QZ; pMF21 の *Bam*HI 消化、末端平滑化断片 14kb に、pAT429QZ の *Hind*III-*Pvu*II 消化、末端平滑化断片 4.2kb を挿入したシングルコピー *ompR55Q-envZ243R* 発現用プラスミド。
- 28) pMF21V; pMF21 の *Bam*HI 消化、末端平滑化断片 14kb に、pAT429V の *Hind*III-*Pvu*II 消化、末端平滑化断片 4.2kb を挿入したシングルコピー *ompR12V-envZ* 発現用プラスミド。
- 29) pMF21W; pMF21 の *Bam*HI 消化、末端平滑化断片 14kb に、pAT429 の *Hind*III-*Pvu*II 消化、末端平滑化断片 4.2kb を挿入したシングルコピー *ompR-envZ* 発現用プラスミド。
- 30) pMF21Z; pMF21 の *Bam*HI 消化、末端平滑化断片 14kb に、pAT429Z の *Hind*III-*Pvu*II 消化、末端平滑化断片 4.2kb を挿入したシングルコピー *ompR-envZ243R* 発現用プラスミド。
- 31) pOMPR-S; pAT009 上の *ompR* 中央部にアミノ酸置換を伴わずに *Sal*I 部位を部位特異的変異法で導入したハイコピー *ompR* 発現用プラスミド。部位特異的変異導入用プラスミドとしても利用 [32]。
- 32) pRDQ55; pOMPR-S に *ompR55Q* 作成のための部位特異的変異法を施し、二塩基置換したハイコピー *ompR55Q* 発現用プラスミド。
- 33) pRDQYC; pRDQ55 の *Bam*HI-*Eco*RI 消化断片 2.95kb と、pRDQ55 の *Bam*HI-*Hae*II 消化断片 544bp、二次変異を導入した pSAC117Q の *Hae*II-*Eco*RI 消化断片 736bp を連結したハイコピー *ompR55Q/102C* 発現用プラスミド。

- 34) pRDV12; pOMPR-Sに *ompR12V* 作成のための部位特異的変異法を施し、一塩基置換したハイコピー *ompR12V* 発現用プラスミド。
- 35) pRDVQ; pRDV12の *Bam*HI-*Nsp*V消化断片351bpとpRDQ55の *Bam*HI-*Nsp*V消化断片3.9kbを連結したハイコピー *ompR12V/55Q* 発現用プラスミド。
- 36) pRUN12V; pFN108の *Eco*RI-*Bam*HI消化断片8kbに、pAT429Vの *Eco*RI-*Bam*HI消化断片1.3kbを挿入した *OmpR12V* 精製用プラスミド。
- 37) pRUN55Q; pFN108の *Eco*RI-*Bam*HI消化断片8kbに、pAT429Qの *Eco*RI-*Bam*HI消化断片1.3kbを挿入した *OmpR55Q* 精製用プラスミド。
- 38) pRUN102C; pFN108の *Bam*HI-*Eco*RI消化断片8kbに、pRYC102の *Bam*HI-*Eco*RI消化断片1.3kbを挿入した *OmpR102C* 精製用プラスミド。
- 39) pRUN102CQ; pFN108の *Bam*HI-*Eco*RI消化断片8kbに、pRDQYCの *Bam*HI-*Eco*RI消化断片1.3kbを挿入した *OmpR55Q/102C* 精製用プラスミド。
- 40) pRYC102; pRDQ55の *Bam*HI-*Eco*RI消化断片2.95kbと、pAT009の *Bam*HI-*Hae*II消化断片544bp、二次変異を導入したpSAC117Qの *Hae*II-*Eco*RI消化断片736bpを連結したハイコピー *ompR102C* 発現用プラスミド。
- 41) pSAC106; pSAC117QZの *Bam*HI-*Nru*I消化断片10.1kbに、pOMPR-Sの *Bam*HI-*Nru*I消化断片1.1kbを挿入したシングルコピー *ompR* 発現用プラスミド。
- 42) pSAC106C; pSAC117QZの *Bam*HI-*Nru*I消化断片10.1kbに、pRYC102の *Bam*HI-*Nru*I消化断片1.1kbを挿入したシングルコピー *ompR102C* 発現用プラスミド。
- 43) pSAC106CQ; pSAC117QZの *Bam*HI-*Nru*I消化断片10.1kbに、pRDQYCの *Bam*HI-*Nru*I消化断片1.1kbを挿入したシングルコピー *ompR55Q/102C* 発現用プラスミド。
- 44) pSAC112B; pSAC117Qの *Bam*HI-*Nru*I消化断片10kbに、pOMPR-Sの *Bam*HI-*Nru*I消化断片1.1kbを挿入したシングルコピー *ompR-envZ* 発現用プラスミド。
- 45) pSAC112C; pSAC117Qの *Bam*HI-*Nru*I消化断片10.1kbに、pRYC102の *Bam*HI-*Nru*I消化断片1.1kbを挿入したシングルコピー *ompR102C-envZ* 発現用プラスミド。
- 46) pSAC112CQ; pSAC117Qの *Bam*HI-*Nru*I消化断片10.1kbに、pRDQYCの *Bam*HI-*Nru*I消化断片1.1kbを挿入したシングルコピー *ompR55Q/102C-envZ* 発現用プラスミド。
- 47) pSAC117Q; pHAI060の *Bam*HI消化、末端平滑化断片8.1kbに、pAT429Qの *Pvu*II-*Hind*III消化、末端平滑化断片3.7kbを挿入したシングルコピー *ompR55Q-envZ* 発現用プラスミド。
- 48) pSAC117QZ; pHAI060の *Bam*HI消化、末端平滑化断片8.1kbに、pAT429QZの *Pvu*II-*Hind*III消化、末端平滑化断片3.7kbを挿入したシングルコピー

*ompR55Q-envZ243R*発現用プラスミド。

49) pTRU243R; pUSI2の *Sa*II-*Bam*HI消化断片5.2kb、pHAI085の *Bam*HI-*Eco*RI消化断片104bp、pAT2005Zの *Eco*RI-*Sa*II消化断片2.4kbを連結し、*tac*プロモーター/オペレーター下流に *envZ243R\**をつないだEnvZ243R\* (81TyrからC末端まで) 精製用プラスミド。

50) pUC55Q; pUC19の *Bam*HI-*Sma*I消化断片2.7kbに、pRDQ55の *Bam*HI-*Nru*I消化断片1.1kbを挿入したハイコピー *ompR55Q*発現用プラスミド。

51) pUCI-OL; pUC19を骨格に、*Hind*III消化で516bpの *ompC*プロモーター領域 (*OmpR*結合部位) を切り出せるよう構築したプラスミド。

#### 【培地】

1) L-broth;

TRYPTONE 10g、YEAST EXTRACT 5g、NaCl 5g、2N NaOH 1.5mℓ / ℓ

2) medium A;

NUTRIENT BROTH 7g、YEAST EXTRACT 1g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.7g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.3g、glycerol 2g / ℓ

L-broth、medium Aともプレートにする場合は寒天1.4%を加えた。

3) Rich medium;

TRYPTONE 12g、YEAST EXTRACT 24g、glycerol 5g / 900mℓ  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12.5g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.8g / 100mℓ

上記2液を別々にオートクレーブ後、混合。

4) MacCONKEY AGAR plate;

MacCONKEY AGAR 50g / ℓ

### 2-6-3 部位特異的変異法、MNNG変異法

#### 【部位特異的変異法】

1) T4 DNA polymeraseによる*Pst*I消化末端の平滑化；

*Pst*I消化DNA断片、67mM Tris-HCl (pH8.8)、6.7mM MgCl<sub>2</sub>、16.6mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
10mM 2-MET、6.7μM EDTA、0.02% BSA、各330μM dNTPs、10units T4 DNA  
polymerase / 100μℓ

37°C30分間反応後、TE-phenol抽出、ether抽出、ethanol沈殿によるDNA断片の回収  
を行った。

2) 合成オリゴヌクレオチドの5'末端へのリン酸基付加；

500pmol 合成オリゴヌクレオチド、66mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>  
10mM 2-MET、30μM ATP、10units T4 polynucleotide kinase / 100μℓ

37°C60分間反応後、TE-phenol抽出、ether抽出、ethanol沈殿による合成オリゴヌク  
レオチドの回収を行った。

3) DNA断片、合成オリゴヌクレオチドと一反応当たりの使用量；

(*envZ243R*)

pAT4001の*Pst*I消化、末端平滑化 (T4 DNA polymerase) 断片6076bp 0.06pmol

pAT4001の*Eco*RI-*Mlu*I消化断片5644bp 0.06pmol

合成オリゴヌクレオチド20mer (5'-GGGTAAGTCGCGACTTGCGC-3') 60pmol

(*ompR12V*)

pOMPR-Sの*Pst*I消化、末端平滑化 (T4 DNA polymerase) 断片4227bp 0.06pmol

pOMPR-Sの*Bam*HI-*Nsp*V消化断片3880bp 0.06pmol

合成オリゴヌクレオチド20mer (5'-GTGGTCGATGTCGACATGCG-3') 60pmol

(*ompR55Q*)

pOMPR-Sの*Pst*I消化、末端平滑化 (T4 DNA polymerase) 断片4227bp 0.06pmol

pOMPR-Sの*Nsp*V-*Sal*I消化断片3962bp 0.06pmol

合成オリゴヌクレオチド20mer (5'-GGTACTGCAGTTAATGTTAC-3') 60pmol

4) Hetero duplex formation ;

各DNA断片及び合成オリゴヌクレオチド、200mM NaCl、130mM Tris-HCl (pH7.5)  
16mM MgCl<sub>2</sub>、2mM 2-MET / 40  $\mu$   $\ell$   
94°C3分、30°C30分、4°C30分、0°C10分間の順に温度を変化させDNA断片と合成オリ  
ゴヌクレオチドをアニーリングさせた。

5) DNA伸長及び連結反応 ;

20  $\mu$   $\ell$  アニーリング液、0.5mM dNTPs、1mM ATP、4units klenow fragment  
700units T4 DNA ligase / 40  $\mu$   $\ell$   
12.5°C20時間反応後、形質転換に使用した。

6) コンピテントセルの調製 ;

一晚37°Cで培養した5m  $\ell$ の大腸菌前培養液のうち500  $\mu$   $\ell$ を新しい40m  $\ell$ のL-  
brothに植え継ぎ37°Cで2時間振とう培養後、直ちに集菌し、菌体を4°Cに冷却した  
10m  $\ell$ の100mM CaCl<sub>2</sub>に懸濁した。そのまま4°Cで4時間以上静置した後、再集菌し1m  
 $\ell$ の100mM CaCl<sub>2</sub>に再懸濁して使用した。

7) 形質転換 ;

ライゲーションしたDNA溶液20  $\mu$   $\ell$ とコンピテントセル200  $\mu$   $\ell$ を混合し、4°C  
で20分間保温。41°Cで1分間処理後、1m  $\ell$ のL-brothに全量を加え1時間振とう培養  
した。培養液を、適当量ずつ選択培地にまき37°Cで保温した。

8) 塩基置換が導入されたプラスミドの選択 ;

本法に使用した合成オリゴヌクレオチドはそれぞれ、タンパク質レベルで  
243HisをArg (EnvZ243R)、12AspをVal (OmpR12V)、55AspをGln (OmpR55Q) に置換  
すると同時に、NruI (envZ243R)、NspV (ompR12V)、PstI (ompR55Q) の制限酵素  
消化部位ができるようにデザインした。したがって、得られた形質転換株からプラ  
スミドを抽出し、これらの制限酵素による消化断片を電気泳動で解析することで、  
容易に目的の変異が導入されているものが選択できた。しかし、念のため実験に使  
用するものは、改めてDNAシーケンシングを行って、他に変異が起こっていないこ  
とを確認した。

### 【MNNG変異法】

pSAC117Q (シングルコピーの *ompR55Q-envZ* 発現用プラスミド) で形質転換した DB513株 (*ompF'-lacZ ΔompR-envZ*) と DB225株 (*ompC'-lacZ ΔompR-envZ*) の対数増殖期 (ADS=100~150) にある細胞5ml分をそれぞれ集菌、4mlの100mM citrate (NaOHでpH5.5に調整) で2回洗浄後、0.2mgのMNNGを溶解した200μlの100mM citrate (pH5.5) に懸濁し、37°Cで30分間保温した。再集菌後、4mlの100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (NaOHでpH7.0に調整) で2回菌体を洗浄し、800μlのL-brothに懸濁、さらに同培地で10倍希釈したものに終濃度15μg/ml でampicillinを加えて37°C、1時間以上培養し、ADSが50~100程度に増加した時点で菌液1~10μlを20μg/ml ampicillinを含むMacCONKEYプレートにまき、37°Cで20時間程度保温した。得られたコロニーの中から赤色のものを選択し、新しいプレートに植え継ぎ、再現性のあるものからプラスミドを精製、DB513株とDB225株の両方を形質転換し、*ompF*、*ompC*両方の転写を活性化する復帰変異がプラスミド上にあるものを選択した。

### 2-6-4 アガロースゲル電気泳動とDNA断片のエリューション

#### 【アガロースゲル電気泳動】

1) 20×TBE ;

Tris 120g, EDTA 7.44g, boric acidでpH8.3に調整 / ℓ

2) 5×DNA dye ;

glycerol 50g, BPB 125mg, XC 125mg / 100ml

3) アガロースゲル ;

適当量のアガロース (通常は終濃度0.8%) を1×TBEに懸濁後、電子レンジで加熱溶解し、これに10mg/ml ethidium bromideを終濃度20μg/100mlで加えてバレットに流し込み固めたものを使用した。

4) 泳動条件 ;

1×TBEを満たした泳動槽にアガロースゲルをセットし陽極側に10mg/ml

ethidium bromideを1~2 $\mu$ l加え、DNA dyeを適量加えたサンプルをコームに流し込んだ。MUPIDを使用する場合は電圧一定100Vで1時間、それより大きいサブマリン型泳動槽の場合は、電圧一定200~250Vで泳動した。

#### 【DNA断片のエリューション】

##### 1) Visking透析膜を利用する方法；

Visking透析膜は、DNAの吸着による回収率の低下を防ぐため、水洗後2% NaHCO<sub>3</sub>、1mM EDTAで120°C10分間オートクレーブし、蒸留水ですすぎ、そのまま蒸留水に浸けた状態で冷蔵庫に保存しておいた。回収したいDNA断片を含む切り出したゲル小片は、片端をクローザーで止め0.5×TBEをいれた透析膜に気泡が入らないように移し、もう一端もさらにクローザーで閉じた。これを0.5×TBEを入れたサブマリン型泳動槽に置き、電圧一定100~200Vで30分~1時間泳動した。このとき、緩衝液の温度が上昇して、回収したサンプル中のアガロースの混在が増えないように電圧を調節した。泳動後、透析膜中の0.5×TBEをエッペンチューブに回収し、直ちにTE-phenol抽出、ether抽出、ethanol沈殿によるDNA断片の回収を行った。

##### 2) DNA-PREPを利用する方法；

回収したいDNA断片を含む切り出したゲル小片（100~200 $\mu$ l以内）をカミソリで2~3mm角に切断、エッペンチューブに移した。3倍容量のNaIを加え、55°Cでゲルが完全に溶解するまで2~3分間保温した（ただし、5分以上の保温は回収率の低下を招く）。5 $\mu$ lのグラスパウダーを加え、すぐにvortex mixerで混合、5分以上4°Cに静置したのち、卓上冷却遠心機で10000rpm、10秒間遠心して水層を除いた。Washing buffer 1mlを加え、チップの先で沈殿したグラスパウダーをほぐし、卓上冷却遠心機で10000rpm、10秒間遠心して再び水層を除いた。この洗浄作業は3回以上行った。最後に、Washing bufferを完全に吸い取った上で20 $\mu$ l程度のTE（10mM Tris-HCl（pH8.0）、1mM EDTA（pH8.0））を加え、55°Cで5分間保温、卓上冷却遠心機で15000rpm、1分間遠心したのち水層をグラスパウダーが混入しないように回収した。



## 2-6-5 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定

一晚5mlのmedium A、medium A-15% sucrose中37°Cで各々生育させた大腸菌前培養液のうち200 $\mu$ lを同じ新しい4mlの培地に加え、medium Aに植え継いだものは、ADSが60前後、medium A-15% sucroseに植え継いだものはADSが25以上になるまで37°Cで本培養した。500 $\mu$ lの菌液をエッペンチューブに移して集菌し、残りの菌液のO. D. 600nmを測定。1mlの250mM Na-phosphate buffer (pH7.1)を集菌したエッペンチューブに加え、この懸濁菌液50~200 $\mu$ lを小試験管に移し、Z buffer (60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、40mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、10mM KCl、1mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、50mM 2-MET) で500 $\mu$ lにメスアップした。7 $\mu$ lのtolueneを加えvortex mixerで混合後、37°Cで1.5時間振とう培養、次に30°Cの恒温水槽で10分間保温したのち、0.4mgのONPGを100 $\mu$ lの100mM Na-phosphate bufferに溶解した基質液を加えさらに10~30分間保温した。色が黄色くなりすぎないところで1mlの1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を加えて反応を停止させ、

O. D. 420nmとO. D. 550nmを測定。活性は、

$$(O. D. 420nm - 1.75 \times O. D. 550nm) \times 1000$$

／ 反応時間 (分) × 反応に供した懸濁菌液 (ml) × O. D. 600nm  
の換算式で算出した。

## 2-6-6 大腸菌外膜画分の調製

一晚5mlのmedium A、medium A-15% sucrose中、37°Cで各々生育させた大腸菌前培養液のうち200 $\mu$ lを同じ新しい4mlの培地に加え、medium Aに植え継いだものは、ADSが60以上、medium A-15% sucroseに植え継いだものはADSが30以上になるまで37°Cで本培養した。培養液を17mlのファルコンチューブに移し、8000rpm、5分間、4°Cで菌体を回収し、5mlの250mM Na-phosphate buffer (pH7.1)に懸濁した。O. D. 600nmを測定し、4/O. D. 600nm (ml) 相当の懸濁菌液を別のチューブに移して再度集菌した。500 $\mu$ lの10mM Na-phosphate bufferを加え、菌体を超音波破碎した。条件は、菌液をファルコンチューブに入れて共振棒を使うタイプのものについては、水中30Wで30秒2回または1分間1回ソニック、菌液を直接Beckman超遠心機用エッペンチューブに入れて密閉式超音波細胞破碎装置UCD-200TM型を使う場合は、

High positionで1分間ソニケーション、30秒間サンプル冷却のサイクルを5~8回繰り返した。最終的にBeckman超遠心機用エッペンチューブに移した500 $\mu$ lの菌体破砕液に等量の1% sodium N-lauroyl sarcosinateを加え室温20分間反応後、Beckman超遠心機用ローターTL-100.3にセットし、50000rpm、30分間、20 $^{\circ}$ Cで遠心した。沈殿物に50 $\mu$ lの1 $\times$ SM buffer (50mM Tris-HCl (pH6.8)、0.8% SDS、1% 2-MET、12% glycerol、5mg BPB / 100ml)を加えvortex mixer、UCD-200TM型で沈殿物を溶解した。このサンプルのうち10 $\mu$ lを90 $^{\circ}$ C以上5分間保温し、urea-SDS-PAGEに供した。

#### 2-6-7 SDS-PAGE、urea-SDS-PAGEとCBBゲル染色

##### 【SDS-PAGE】

5mlの4 $\times$ Lower buffer (1.5M Tris-HCl (pH8.8)、0.4% SDS)、8.3mlの30:0.8 acrylamide-BIS、6.7mlの滅菌蒸留水、6mgのAPSをよく混合し、20 $\mu$ lのTEMEDを加えて16 $\times$ 16cm、スぺーサー1mmのゲル板にコーム下端1cmの高さまで流し込んだ。下層ゲル固化後、1.25mlの4 $\times$ Upper buffer (0.5M Tris-HCl (pH6.8)、0.4% SDS)、750 $\mu$ lの30:0.8 acrylamide-BIS、3mlの滅菌蒸留水、5mgのAPSをよく混合し、10 $\mu$ lのTEMEDを加えたものを上層し、コームを差し込んだ。上層ゲル固化後、コームを流水下で慎重に抜き取り泳動に使用した[71]。

泳動時には、5 $\times$ Running buffer (Tris 15.15g、glycine 72.05g、SDS 5g / l)を希釈したものを泳動用bufferとして使用、電流一定40mAでBPBが下層ゲル下端に達するまで泳動した。

##### 【urea-SDS-PAGE】

5mlの4 $\times$ Lower buffer (1.5M Tris-HCl (pH8.8)、0.4% SDS)、8.3mlの30:0.8 acrylamide-BIS、6.7mlの滅菌蒸留水、6mgのAPS、14.4gのureaをよく混合し、36 $\mu$ lのTEMEDを加えて16 $\times$ 16cm、スぺーサー1mmのゲル板にコーム下端1cmの高さまで流し込んだ。下層ゲル固化後、1.25mlの4 $\times$ Upper buffer (0.5M Tris-HCl (pH6.8)、0.4% SDS)、750 $\mu$ lの30:0.8 acrylamide-BIS、3mlの滅菌蒸留水、5mgのAPSをよく混合し、10 $\mu$ lのTEMEDを加えたものを上層し、コームを差し込んだ。

上層ゲル固化後、コームを流水下で慎重に抜き取り泳動に使用した。

泳動時には、1×Running buffer (Tris 3.03g、glycine 14.41g、SDS 1g / ℓ) を泳動用バッファーとして使用、電流一定40mAでBPBが下層ゲルの上端から7cmに達するまで泳動した。

#### 【CBBゲル染色】

泳動後のゲルを板から外し、上層ゲルを切り取った後、I液 (isopropanol 500mℓ、acetic acid 200mℓ、CBB R-250 1g / 2ℓ) に10~30分、II液 (isopropanol 200mℓ、acetic acid 200mℓ、CBB R-250 0.1g / 2ℓ) に30分~一晩、III液 (acetic acid 200mℓ、CBB R-250 50mg / 2ℓ) に1時間~一晩、脱色液 (10% acetic acid) に5時間~一晩 (キムワイブ2枚をゲルの上のせ溶出した色素を吸着させる)、2% glycerolに30分~1時間 (ゲル中のacetic acidを抜き、乾燥時のひび割れを防ぐ) 浸けて振とうした。

適当な大きさに切った薄手の濾紙のせた染色済みのゲルを、サランラップをしわができないようにあててからゲルドライヤーにセット、70~80°Cで1時間半乾燥した。

#### 2-6-8 ウェスタンブロッティング

20~100 μgのタンパク質を含む細胞破碎液、精製膜画分のSDS-PAGEを行い、ゲルから予めmethanolで20秒ウェディングして、Blotting buffer (Tris 9.08g、glycine 43.3g、methanol 600mℓ / 3ℓ) に5分以上浸せきしておいたMillipore社のGV filterに75Vで1時間半ブロッティングした。

次にフィルターを30mℓのTBS (50mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl) -3% BSA中で1時間ブロッキング、30mℓのTBS-1% BSAに液交換し、ウサギを免疫して作成した抗OmpR抗体22.5 μℓもしくは抗EnvZ抗体6 μℓを加えて一晩室温で振とうした。

一次抗体を結合させたフィルターを0.05% (W/V) のTween-20を含む50mℓのTBSで10分間3回、TBSで10分間2回それぞれ室温で振とうし、新たに30mℓのTBSに浸したのち20 μℓ (発色時にNBTを併用する場合は5 μℓ) の50 μg/mℓ (50% glycerolに溶解、-20°C保存) アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ抗体を加えて2時間室温で振とうした。

二次抗体を結合させたフィルターは再び0.05%(W/V)のTween-20を含む50mℓのTBSで10分間2回、TBSで10分間3回それぞれ室温で振とうし発色させた。

発色は、10mgのBCIPを含む10mℓの0.1M Na-carbonate buffer (pH9.6)にフィルターを浸して37℃に保温する高コストで感度は低いバックグラウンドも低い方法と、10mℓのAP buffer (100mM tris-HCl (pH9.5)、100mM NaCl、5mM MgCl<sub>2</sub>)に66μℓの50mg/mℓ (70% dimethyl formamideに溶解、4℃保存) NBTと33μℓの50mg/mℓ (dimethyl formamideに溶解、4℃保存) BCIPを加えた発色液に浸し37℃に保温する高感度、低コストの方法を併用した。

## 2-6-9 シークエンシング

### 【シークエンス反応】

テンプレートにはアルカリ変性法、polyethylene glycol沈殿法で精製したdsDNAを、プライマーにはTaKaRaのM4およびRVを用いた。

klenow fragmentによるシークエンシング反応には、TaKaRaのDideoxy Sequencing Kitを使い、操作法は添付のマニュアルに従った。ただし、本Kitは第三章では使用していない。詳しくは第三章「実験材料と実験方法」の項を参照のこと。

### 【シークエンスゲル】

10×TBE 15mℓ、urea 32g、acrylamide 5.9g、BIS 0.34g、APS 75mg /75mℓ

上記を溶解後、長さ40cmのシークエンス用ゲル板にまず5mℓに20μℓのTEMEDを加えたものをゲル下端から毛細現象を利用して吸い上げさせ下端を固化、シーリングした。次いで、残り70mℓに25μℓのTEMEDを加えて上部から流し込みコームを差し込み固化させた。

泳動は、泳動用バッファーに2×TBEを使い、ゲル板にアルミ放熱板をあて、電力一定初期電圧設定1300Vで、XCが22~60cmの位置に達するまで行った。

泳動後のゲルは熱いうちにガラス板から濾紙に張り移し、しわや気泡が入らないようにラップで覆った上で、アスピレーター付ゲルドライヤーで80℃30~60分間乾燥して、オートラジオグラムを得た。

ただし、本法は第三章では利用していない。詳しくは、第三章の「実験材料と実験方法」の項を参照のこと。

#### 2-6-10 EnvZ\*の精製と定量

pHAI085 (EnvZ\*), pHAI089 (EnvZ11\*), pHAI094 (EnvZ30\*), pTRU243R (EnvZ243R\*)で形質転換したAT142株 ( $\Delta envZ$ ) [36]をそれぞれampicillinを終濃度50  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ で加えた5m  $\ell$ のL-broth中37°Cで前培養し、ADSが40に達したところでampicillinを終濃度30  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 、IPTGを終濃度0.2mMで加えた73m  $\ell$ のRich mediumに2.5m  $\ell$ ずつ各2本の坂口フラスコに植え継ぎ37°Cで10時間振とう培養した。集菌後、菌体を60m  $\ell$ のbuffer B (50mM Tris-HCl (pH8.0)、250mM sucrose、1mM DTT)で1回洗浄し、再集菌したものを20m  $\ell$ のbuffer Bに懸濁した。この段階での菌体の凍結操作はinclusion bodyの量を極端に減少させるので避けた。懸濁菌液をFrecch Pressで638psi (High) 2回処理し (条件厳守)、4°C、4000rpm、10分間遠心した。沈殿に5m  $\ell$ のbuffer Bを加えソニケーションして懸濁させ、4°C、5000rpm、10分間遠心、再び1.6m  $\ell$ のbuffer Bに懸濁した。この粗精製物を800  $\mu\ell$ ずつ4.4m  $\ell$ の53% Sucrose bed (sucrose 95.4g、1M Tris-HCl (pH7.8) 1.8m  $\ell$ 、250mM EDTA (pH8.0) 3.6m  $\ell$ 、DTT 27.6mg、滅菌蒸留水 79.2m  $\ell$ ) 2本にアブライしRPS40T2ローターにセット、4°C、36000rpm、5時間超遠心した。沈殿に計2m  $\ell$ のEnvZ buffer (50mM Tris-HCl (pH7.8)、2mM 2-MET、0.005% Tween80)を加えエッペンチューブに移した後、4°C、12000rpm、10分間遠心した。沈殿に2m  $\ell$ の6M guanidine hydrochloride溶液 (guanidine hydrochloride 57.32g、50mM Tris-HCl (pH7.8)、0.005% Tween80 / 100m  $\ell$ )を加えソニケーション、一晚4°Cで静置した。4°C、16000rpm、10分間遠心した上清をMillipore社のMillex-GV filter (0.22  $\mu\text{m}$ )で濾過し、Visking透析膜に移してクローザーで閉じた。これを各々500m  $\ell$ の2.5M (guanidine hydrochloride 119.42g、50mM Tris-HCl (pH7.8)、0.005% Tween80、還元型GSH 307.3mg、酸化型GSH 7.3mg / 500m  $\ell$ )、1M (guanidine hydrochloride 47.78g、50mM Tris-HCl (pH7.8)、0.005% Tween80、還元型GSH 307.3mg、酸化型GSH 7.3mg / 500m  $\ell$ ) guanidine hydrochloride液、EnvZ bufferに順に2時間半以上ずつ透析し、透析膜内の溶液を回収、4°C、12000rpm、10分間遠心して上清を精製EnvZ\*とした[13]。

タンパク質濃度は、精製タンパク質1~5 $\mu$ lを800 $\mu$ lにメスアップし200 $\mu$ lのBIO-RAD社のPROTEIN ASSAY液を加えて、BSAを用いて作成した検量線から算出した。上記の精製法で150mlの培地から1mg以上の精製標品が得られた。

純度の検定は、10 $\mu$ g以上の精製標品をSDS-PAGEで分離、CBB染色して確認した。

精製標品は一部を長期保存用にそのまま-20 $^{\circ}$ Cで凍結、1ヶ月以内に*in vitro*実験に供する分は0 $^{\circ}$ C(氷水中)保存した。

#### 2-6-11 OmpRの精製と定量

pFN108 (OmpR)、pRUN12V (OmpR12V)、pRUN55Q (OmpR55Q)、pRUN102CQ (OmpR55Q/102C)、pRUN102C (OmpR102C)で形質転換したSG480 $\Delta$ 76株 ( $\Delta$ ompR-envZ)をそれぞれkanamycinを終濃度50 $\mu$ g/mlで加えた5mlのL-broth中、30 $^{\circ}$ Cで一晩前培養し、1mlをkanamycinを終濃度40 $\mu$ g/mlで加えた100mlのRich medium (坂口フラスコ)に植え継ぎ30 $^{\circ}$ Cで8時間振とう培養、ADSが160~240に達したところで、kanamycinを終濃度30 $\mu$ g/mlで加えた700mlのRich medium (2 $\ell$ 羽根付き三角フラスコ)に全量を移した。これを40 $^{\circ}$ C、160rpmで11時間回転培養したのち集菌、100mlの100mM Na-phosphate buffer (pH7.1)で洗浄して-80 $^{\circ}$ Cで保存。凍結菌体に20mlのbuffer F (100mM Na-phosphate buffer (pH7.1)、5mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、PMSF 1.74mg、DNase 2mg / 100ml)を加え、懸濁菌液をFrecch Pressで638psi (High) 3回処理しRP65Tローターにセット、4 $^{\circ}$ C、45000rpm、3時間超遠心した。上清を回収しタンパク質濃度をBIO-RAD PROTEIN ASSAY液で定量、3mg/mlになるようDilution buffer (50mM Na-phosphate buffer (pH7.1)、2.5mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)で希釈し、4 $^{\circ}$ Cで45%硫酸沈殿(硫酸 27.7g/100ml)を30分以上かけて行った。硫酸添加終了後、さらに15分間攪拌、1時間静置、4 $^{\circ}$ C、12000rpm、10分間遠心して上清を除いた。沈殿を6mlのDialysis buffer (20mM Tris-HCl (pH7.8)、2mM 2-MET)に溶解し、Visking透析膜中に移し、3 $\ell$ のDialysis bufferで一晩、バッファー交換してさらに4時間、4 $^{\circ}$ Cで透析した。脱塩した粗精製液は4 $^{\circ}$ C、10000rpm、10分間遠心して上清をさらにMillex-GV filter (0.22 $\mu$ m)で濾過し、DEAE-celluloseカラム精製に供した。カラムはDE52を15ml充填したものを使い、20mM Tris-HCl (pH7.8)をLoading bufferとして、流速0.25ml/分、NaClで120mMまでグラディエントをかけ、2mlずつ

のフラクションにわけた。各フラクションは、

(O.D. 280nm×1.45) - (O.D. 280nm×0.74) の換算式で、タンパク質濃度を概算し、20 $\mu$   $\ell$  ずつSDS-PAGEで分離染色を行い、回収するOmpR画分を決定した。回収した精製OmpR画分はLoading bufferで4 $^{\circ}$ C、一晚脱塩し、さらにFPLC精製のサンプルに供した。FPLC精製では、Mono-Qカラムを使用し、Loading bufferとして20mM Tris-HCl (pH7.8)を用い、流速0.75m $\ell$ /分で、グラディエントを1M NaClで10mM/分の割合で200mMまでかけてOmpRを溶出分離した。フラクションは1.5m $\ell$  ずつ行い、タンパク質濃度定量、SDS-PAGEによるOmpR画分の絞り込みを経て、OmpR buffer (10mM Tris-HCl (pH7.8)、50mM KCl、0.1mM EDTA、0.1mM DTT) で4 $^{\circ}$ C、2回 (4時間、一晚) 透析した。これを、4 $^{\circ}$ C、15000rpm、10分間遠心して精製OmpRとした[35]。

タンパク質濃度は、精製タンパク質1~5 $\mu$   $\ell$  を800 $\mu$   $\ell$  にメスアップし200 $\mu$   $\ell$  のBIO-RAD社のPROTEIN ASSAY液を加えて、BSAを用いて作成した検量線から算出した。上記の精製法で800m $\ell$  の培地から1mg前後の精製標品が得られた。

純度の検定は、10 $\mu$  g以上の精製標品をSDS-PAGEで分離、CBB染色して確認した。

精製標品は一部を長期保存用にOmpR buffer-50% glycerol中-20 $^{\circ}$ Cにストックし、1ヶ月以内に*in vitro*実験に供する分はOmpR buffer中で0 $^{\circ}$ C (氷水中) 保存した。

#### 2-6-12 EnvZ\*の*in vitro*自己リン酸化能の解析

精製EnvZ\* (または変異EnvZ\*)、50mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5mM EDTA、2mM DTT、5mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl、10% (V/V) glycerol

反応は、上記に終濃度0.1mM (2000cpm/pmol) になるよう [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATPを加えて開始し、適当時間25 $^{\circ}$ Cで保温後、5 $\times$ SM buffer (250mM Tris-HCl (pH6.8)、4% SDS、5% 2-MET、60% glycerol、25mg BPB / 100m $\ell$ ) を加えて停止させた。サンプルは60 $^{\circ}$ C、1分間保温後SDS-PAGEにかけ、ゲルを乾燥してX線フィルムにあて、オートラジオグラムを得た。

また別法として、反応液を一定量、一定時間ごとにmembrane filter GF/Aに滴下して、10% TCA、1% Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>Oで30分、5% TCA、1% Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>Oで30分2回洗浄後、ethanolにさっと通して温風乾燥、1m $\ell$  のBray's scintillator (PPO 4g、

Naphthalene, 60g, POPOP 0.2g, ethylene glycol monoethyl ether 20mℓ、methanol 100mℓ / ℓ dioxane) の入ったバイアルに浸してシンチレーションカウンターで定量する方法も使った。

### 2-6-13 EnvZ\*-OmpR間の *in vitro* リン酸転移反応の解析

精製EnvZ\* (または変異EnvZ\*)、精製OmpR (または変異OmpR) ただし、EnvZ\* : OmpR=2 : 3 (モル比)、50mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5mM EDTA、2mM DTT 5mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl

反応は、上記に終濃度0.1mM (2000cpm/pmol) になるよう [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATPを加えて開始し、25°Cで保温しながら一定時間ごとに一定量を予め5×SM buffer (250mM Tris-HCl (pH6.8)、4% SDS、5% 2-MET、60% glycerol、25mg BPB / 100mℓ) を分注したエッペンチューブにサンプリングした。サンプルは60°C、1分間保温後 SDS-PAGEにかけ、ゲルを乾燥してX線フィルムにあて、オートラジオグラムを得た。

また別法として、未反応のATPを除去したリン酸化型EnvZ\*またはEnvZ11\*によるリン酸転移実験も行った。

手順としてはまず、2-6-12にしたがって30分間100~150  $\mu$ gのEnvZ\*またはEnvZ11\*を [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (2000cpm/pmol) 存在下でリン酸化した。このサンプルを、2mℓ (粉末重量約0.2g相当) のTEDG buffer (50mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5mM EDTA、2mM DTT、10%(V/V) glycerol) で平衡化したSephadex-G75を充填した Sepacal Miniカラムにのせ、TEDG bufferを1mℓずつ2、3回上層して、5滴ずつエッペンチューブに分画した。うち各1 $\mu$ ℓには1mℓのBray's scintillatorを加えて放射活性を計測し、さらに10 $\mu$ ℓでタンパク質量を定量した (PROTEIN ASSAY液使用)。この操作で~10<sup>4</sup>cpm/ $\mu$ gの比活性でリン酸化標識した20 $\mu$ g以上のEnvZ\*またはEnvZ11\*が得られた。次に、

ATPを含まないEnvZ\*またはEnvZ11\*、50mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5mM EDTA、2mM DTT 5mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl、10%(V/V) glycerol

からなる反応液に精製OmpR (または変異OmpR) をEnvZ\*の1.5倍量 (モル比) 加えて適当な間隔でサンプリングし、リン酸基の転移の様子を経時変化を追ってSDS-PAGEおよびオートラジオグラフィーで解析した。



#### 2-6-14 EnvZ\*によるOmpRの *in vitro* 脱リン酸化の解析

まず未反応のATPを除去したリン酸化型EnvZ11\*を2-6-13にしたがって精製し、同様の反応液中でOmpRまたは変異OmpRをEnvZ11\*の1.5倍量(モル比)に加え1分間リン酸転移反応を進行させ、直ちに標識していないATP(終濃度0.1mM)とEnvZ\*または変異EnvZ\*を添加した。反応液から、一定時間ごと、一定量をサンプリングしリン酸化型OmpRの脱リン酸化の様子を経時変化を追ってSDS-PAGEおよびオートラジオグラフィで解析した。

#### 2-6-15 *in vitro* ゲルシフトアッセイ

##### 【DNA断片の末端標識】

pBOY-OH *Hind*III消化断片(516bp)またはpUCI-OL *Eco*RI-*Hind*III消化断片(463bp) 10pmol、67mM K-phosphate buffer (pH7.4)、6.7mM MgCl<sub>2</sub>、1mM 2-MET  
40 μM dATP、dGTP、335nM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (222TBq/mmol)、4units klenow fragment  
/ 20 μl

37°C、30分間保温後、2 μl の250mM EDTA(pH8.0)と2 μl の1mg/ml tRNAを加えて反応を停止、phenol抽出、ether抽出、ethanol沈殿、真空乾燥を行い、100 μl の滅菌蒸留水に溶解した。

##### 【ゲルシフトアッセイ】

20nM 末端標識DNA断片、10%(W/V) calf thymus DNA、50mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5mM EDTA、2mM DTT、5mM MgCl<sub>2</sub>、100mM KCl、10%(V/V) glycerol、20~600nM OmpR (または変異OmpR)

反応は、30°C、8分間行い、5×DNA dye (glycerol 50g、BPB 125mg、XC 125mg / 100ml)を加えて停止させた。リン酸化条件で行う場合は上記組成から標識DNA断片を除いた反応液に、0.1mM ATP、20nM EnvZ11\* (終濃度)を加えて、10分間リン酸化反応後、標識DNA断片を加えてさらに8分間保温した。

### 【PAGE】

5% acrylamide、0.083% BIS、1×TBE、0.001% APS、0.0003% TEMED / 60mℓ  
ゲルは16×16cm、厚さ2mmで作成し、泳動バッファーにはE buffer (40mM Tris-acetate (pH7.4)、5mM CH<sub>3</sub>COONa、1mM EDTA) を用い、電圧一定100V、3時間泳動した。泳動終了後、ゲルを乾燥してX線フィルムにあて、オートラジオグラムを得た。

### 2-6-16 *in vitro*クロスリンキング

5μM OmpRまたはOmpR55Q/102C、5μM EnvZ\*、50mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5mM EDTA、2mM DTT、5mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl、10%(V/V) glycerol、1mM ATP / 60μℓ  
30°C、15分間保温後、10μℓの100mg/mℓ (2M triethanolamineに溶解) DMSを加え、30分間静置した。非リン酸化条件の場合は、反応液からEnvZ\*とATPまたはATPのみを除いて反応させた。架橋終了後、7倍容量のethanolでタンパク質を沈殿させ真空乾燥後、1×SM buffer (50mM Tris-HCl (pH6.8)、0.8% SDS、1% 2-MET、12% glycerol、5mg BPB / 100mℓ) に溶解、94°C、4分間保温してSDS-PAGEで分離、CBB染色またはWestern blottingを行った。