

[150]

...

...

...

### 第三章 ラン藻のP型ATPaseによる カチオン濃度変化への応答機構

...

...

## 第一節 緒言～解析対象と手法の選択

ラン藻における環境適応の研究を進めるにあたって、まず、バクテリア界にも匹敵する1500以上もの様々な種の中から、どの種のどの細胞(株)を使い、何(遺伝子、タンパク質、現象)を対象に、どうアプローチするかを選択した。

ラン藻の生育環境は、砂浜、岩場、外洋、湖沼、土壌、樹木など水のあるところならほとんど全てと言って良いくらいの多岐にわたる。エネルギー獲得法も完全独立栄養のものから従属栄養的生育も可能なものもある。ひとことで光合成と言っても酸素発生型光合成の他に硫化水素を酸化しての光合成、水素分子を酸化しての光合成、グルコースのような有機物を酸化しての光合成を行えるものもある。細胞形態に関しても単細胞種と糸状体種があり、後者は異形細胞(ヘテロシスト)を一定頻度で分化させ窒素固定まで行っている[72, 73]。ラン藻はこのように実に多様な生物種であるが、実験株を選択するにあたっては、次の2点を考慮した。

① その株が実験株として広く使われていること。

② DNA、RNA、遺伝子操作が容易であること。

①は、入手のしやすさ、培養、取り扱いの容易さ、情報の蓄積、解析手法の発達が期待できるし、分子生物学的解析を進めるためには②がやはり必須条件であった。様々な文献を見る限りにおいて、広く研究対象になっている種としては、単細胞性の *Synechococcus* sp.、*Synechocystis* sp.、糸状体を形成する *Anabaena* sp.、*Nostoc* sp.、*Calothrix* sp. の5種を挙げるができる。さらに、これらの種の中で特に遺伝子レベルでの解析が進んでいる細胞(株)は *Synechococcus* sp. PCC7942、PCC7002と *Synechocystis* sp. PCC6803、*Anabaena* sp. PCC7120であると思われた。そこで最終的に、DNA、RNAの抽出法、プラスミドを使った形質転換、相同的組み換えが容易で、ちょうど当時、名古屋大学農学部へ赴任された小俣達男助教授によって膜画分の分離法もすでに確立されていた *Synechococcus* sp. PCC7942を実験株として使うこととした。

単細胞性ラン藻 *Synechococcus* sp. は、大腸菌よりやや小さいゲノムサイズを有する。完全独立栄養増殖を営み、海洋での光合成による基礎生産に重要な役割を果たしているピコプランクトンのひとつとしても注目されている(もっとも、PCC7942はおそらく淡水産で、海水程度の塩濃度では生育できないが)。PCC7942の最大のメリットは、大腸菌のコンピテントセルのように特別な調製を必要とせず、細胞外DNAを自発的に取り込み、さらにそのDNA内に自己のゲノムと相同な領域

があれば相同組み換えを起こすため、外来遺伝子を染色体に組み込むことが可能なことである。ただし、おそらくはDNAの光損傷からの防御系としてであろうが、ラン藻は一般的にゲノムのコピー数が10前後あるため、相同組み換えによる欠失変異株などの構築と確認には慎重を要する。また、2つのプラスミド(8kb、49kb)を元来もっているが、このうち8kbのものにpBR322系プラスミドを連結したpUC303 [74]や著者らがpUC19と連結させて構築したpSEA108などの大腸菌とのシャトルベクターも開発されており、ツールとして有効である。これらには、chloramphenicol (pUC303)、streptomycin (pUC303、pSEA108)、ampicillin (pSEA108)の抗生物質耐性マーカー遺伝子がのっており、PCC7942では使用濃度、培養条件等に若干の制限があるものの基本的に大腸菌、PCC7942どちらでもプラスミドが導入された細胞を容易に選択できる。また、PCC7942ではこの他に選択マーカーとして使いやすい抗生物質としてkanamycinがある。ただし、これらのプラスミドは当然内在性プラスミドと相同性をもち、高頻度で相同組み換えを起こしてしまい不安定なため、8kbの内在性プラスミドを失った*spc*株を本研究でも用いている。

では実際、*Synechococcus* sp. PCC7942の環境適応にどうアプローチするか。ここで考えたのは、

「植物同様に酸素発生型光合成を営む原核生物であるラン藻」を使って、結果にラン藻界を越えて植物界までの普遍性が期待できること。であった。これは第一章序論で述べたとおり、著者の研究において常に念頭に置いてきたポイントである。また分子微生物学的手法を駆使して、分子レベルの解析まで進めるには、現象探しからアプローチするのでは不確実、非効率と思われた。そこで、著者らが着目したのが、PCRによる遺伝子増幅の応用のひとつ、いわゆるMOPAC法であった。これは、アミノ酸一次配列上の2カ所に対応した混合オリゴヌクレオチドを用いたPCRによってゲノムDNAからその遺伝子の一部を増幅し、全体をクローン化するためのプローブとする方法である。この方法ならば、遺伝子ライブラリーとの併用で最短時間で効率良く目的遺伝子を取得することが可能である。幸いにも、PCC7942の $\lambda$ DASHライブラリーを岡崎基礎生物学研究所村田紀夫教授グループの和田元助手より分与していただくことができた。あと残るは、何の遺伝子に狙いを定めるかである。MOPAC法を利用するには、混合オリゴヌクレオチドのデザインのため最低6アミノ酸以上(17塩基以上)の配列2つがなければならない。また、何より、その遺伝子が何らかの環境応答系を介した適応機構に関与している可能性が高く、その遺伝子産物の生理機能や分子機構(発現制御など)に普遍性が期待できる

こと、そしてより確実に増幅断片を得るためには、広く生物界でアミノ酸配列の保存されたファミリーを形成していることが条件であった。P型ATPaseは、まさにこれらの条件を満たすターゲットであった。

生体にとって細胞内のイオン環境（濃度）を能動的に調節することは恒常性の維持や様々な生理反応にとって重要な意義をもつ。原核生物において、それは生育に必要なイオンの取り込みと有害なものの排出、あるいは細胞の浸透圧調節において重要であるし、高等生物においては、さらに膜電位の形成、イオン勾配の形成、細胞内情報伝達のシグナル放出と多様な意味をもつ。こうしたATPの加水分解によるエネルギーを利用したイオン（カチオン）の能動輸送を行うポンプとして機能しているのがP型ATPaseである[75]。現在、このファミリーに属する60以上の遺伝子が原核生物からヒトまで様々な生物種から同定され、 $H^+$ 、 $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ などに対してカチオン特異性をもつことが知られている。構造的には8ないし10の膜貫通領域があり、ATP結合領域、リン酸化領域（ATPにより $\beta$ -aspartyl phosphateの形で自己リン酸化するaspartate残基を含む）、脱リン酸化活性領域、イオン透過領域など機能的にもアミノ酸配列上も高度に保存された複数の領域が存在する。またこのいずれの領域もファミリー以外のタンパク質からは有意なホモロジーが見いだされないことから、これらのタンパク質の機能性は、唯一P型ATPaseファミリーに限定されたものであるといえる。しかし、その機能形態は $H^+$ -ATPaseや $Ca^{2+}$ -ATPaseのように単量体で機能していると考えられているものから $Na^+/K^+$ -ATPaseのように $\alpha$ 、 $\beta$ のヘテロダイマーで、あるいは大腸菌高親和性 $K^+$ 輸送体を構成するKdpBのように全く異なるKdpA、KdpCといったタンパク質との複合体の形で機能しているものまである。

環境適応におけるP型ATPaseの役割と分子レベルの制御機構については、原核生物由来のいくつかで研究が進んでおり、中でもkdpオペロンの浸透圧上昇に対する転写誘導については詳細な研究がなされている[76, 77]。

大腸菌では、浸透圧ショックや、高浸透圧条件での培養によって、第二章で述べた外膜タンパク質OmpF、OmpCの組成変化の他にも、特に、急激な脱水から身を守るために様々な分子レベルの応答をすることが知られている[78]。すなわち大腸菌は、高浸透圧条件下、速やかに細胞内浸透圧を上昇して脱水を防ぐため、まず $K^+$ を外環境から取り込み急場をしのいだのち（電荷による毒性を抑制するためのcounter partにはglutamateを利用しているらしい[79]）、trehalose、proline、pipecolic acid、glycine betaineといった物質をosmoprotectantとして能動的に取り込んだり

自ら合成して $K^+$ と置換して適応する[80~84]。そのため、これらに関わる遺伝子の多くが浸透圧ショックによって転写誘導を受けるが、最初のステップの $K^+$ の取り込みを行うのがkdpオペロンにコードされたKdpABCからなる高親和性輸送体である。そしてこのオペロンはEnvZ-OmpRと同じ二成分制御系に属するKdpD-KdpEによって正の転写調節を受けていることが明らかとなっている。浸透圧上昇は内膜タンパク質KdpDによって感知され、その情報はリン酸化の形で転写活性化因子KdpEに伝達され、リン酸化型KdpEはkdpオペロンのプロモーター上流に結合して転写を活性化しているのである。

さらに、詳細な分子機構はまだ不明であるが、高等植物細胞膜の $Ca^{2+}$ -ATPaseが塩ストレスによってやはり転写誘導されるという例が2つ報告されている。ひとつはtomato ER由来の $Ca^{2+}$ -ATPase遺伝子が50mM NaCl、1日の処理で葉で約3倍のmRNA増加が観察されたというもので[85]、もうひとつはtobacco ER由来の $Ca^{2+}$ -ATPase遺伝子が428mM NaCl、3~12日の処理で3~4倍のmRNA増加が観察されたという報告である[86]。

そこで著者らは、*Synechococcus* sp. PCC7942からP型ATPaseを同定し、環境適応における生理的意義と発現制御機構について明らかにすることを目的に以下の解析を進めた。第二節では、得られた2つの遺伝子pacLとpacSの塩基配列決定と推定アミノ酸一次配列の解析結果を、第三節では、pacL、pacSの生理的意義について遺伝子欠失変異株を使った解析の結果を、第四節では、pacSの転写制御について、そして第五節でPacSタンパク質の誘導とその局在性について述べていく。

## 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

原核生物から真核生物由来のものまで全てのP型ATPaseでは、複数の保存領域の存在が知られている[75]。そこで、MOPAC法によるPCRで用いるプライマーをデザインする領域を検索した結果、自己リン酸化領域のAsp-Lys-Thr-Gly-Thr-Leuからなるアミノ酸配列に対応した5'プライマー(17mer)と、ATP結合領域と考えられるAsp-Gly-(Thr/Ile/Val)-Asn-Asp-(Ala/Ser)に対応した3'プライマー(17mer)がアミノ酸レベルでの保存度の高さ、作成する混合オリゴヌクレオチドレベルでのバリエーションの少なさから考えて最適であると判断した。

作成した2つの混合オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、*Synechococcus* sp. PCC7942のゲノムDNAをテンプレートにPCRを行った。およそ650bpと約1000bpの2つのDNA断片が再現性良く増幅したのでそれぞれS、Lとした(Fig. 19 panel A)。これらのDNA断片をpUC119にクローン化し、塩基配列を決定したところ、S、L両方とも互いには異なるが明らかにP型ATPaseの一部であることが示唆された。

### 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

そこで、これらをプローブとしてその全領域を含むクローンを和田元博士より分与していただいたPCC7942の $\lambda$ DASHライブラリーから検索した。最終的に、probe-Sとハイブリダイズする5.1kbの*Bg*III-*Eco*RI断片と、probe-Lとハイブリダイズする4.7kbの*Eco*RI断片を取得、それぞれpUC119にクローン化して(pPAC-S、pPAC-L)、制限酵素地図を作成した(Fig. 19 panel B and C)。さらに、これらクローンのdeletion seriesを構築し、全塩基配列の決定を行った。決定した塩基配列のうち、図中“sequencing”と記してある5.1kbの*Bg*III-*Eco*RI断片中の*Bam*HI-*Eco*RI領域と、4.7kbの*Eco*RI断片中の*Eco*RI-*Sal*I領域については、GenBank/EMBL/DBJシーケンス

データライブラリーに1993年6月の時点で登録し、そのアクセッションナンバーはD16437とD16436である。

ORFの検索の結果、pPAC-Sの5.1kbの*Bgl*III-*Eco*RI断片からはprobe-Sの領域を含む2241bpのORF (747a. a.) が、またpPAC-Lの4.7kbの*Eco*RI断片からはprobe-Lを含む2778bpのORF (926a. a.) が同定できた (Fig. 19)。さらにpPAC-SのORFの上流逆向きに807bpからなるもうひとつのORF (269a. a.) を同定した (Fig. 23 panel A)。747a. a.、926a. a. からなるタンパク質の一次構造には明らかにP型ATPaseに普遍的ATP結合、自己リン酸化、脱リン酸化などに重要と考えられている特徴的なアミノ酸配列と、膜を貫通していると予想される複数の疎水性領域が存在した。したがって、この2つの遺伝子は確かにPCC7942のP型ATPaseをコードしていると判断し、それぞれ*pacS*、*pacL*と名付けた (P-type ATPase of cyanobacteria)。

### 3-2-3 *PacS*は重金属輸送性P型ATPaseと高い相同性を示した

原核生物から発見されデータバンクに登録、または論文報告されているP型ATPase遺伝子 (部分配列を含む) には、1994年11月現在、

- ① *Escherichia coli*由来で高親和性カリウム輸送体のサブユニットのK<sup>+</sup>-ATPase (682a. a.) をコードする*kdpB* [76]、
- ② *Staphylococcus aureus*のプラスミドに由来し、Cd<sup>2+</sup>-ATPase (727a. a.) をコードする*cadA* [87]、
- ③ *Bacillus firmus* (OF4株) 由来で*S. aureus*のものとアミノ酸一次配列が82%一致するCd<sup>2+</sup>-ATPase (723a. a.) をコードする*cadA*、
- ④ *Rhizobium meliloti*由来で窒素固定遺伝子群から同定されたが機能、カチオン特異性は不明のATPase (757a. a.) をコードする*fixI* [88]、
- ⑤ 単細胞性ラン藻*Synechococcus* sp. PCC6301由来でアミノ酸一次配列上、自己リン酸化領域のすぐ下流からC末端までに相当する部分塩基配列 [89]、
- ⑥ *Salmonella typhimurium*由来でMg<sup>2+</sup>-ATPase (908a. a.) をコードする*mgtB* [90, 91]、
- ⑦ 1987年に*Streptococcus faecalis* (= *Enterococcus hirae*) 由来のK<sup>+</sup>-ATPase (583a. a.) として報告されたが、1993年6月に塩基配列の一部を訂正して、Cu<sup>2+</sup>-ATPase (727a. a.) として再報告された*copA*ならびに [93]、

⑧ そのすぐ下流に発見された同じくCu<sup>2+</sup>-ATPase (745a. a.) と思われる *copB* [93]、

⑨ 1993年1月にアクセッションナンバーは取得、著者らが*pacS*、*pacL*について最初に論文報告したあとの12月に真核生物のCa<sup>2+</sup>-ATPaseとホモロジーが高い原核生物のP型ATPaseとして論文掲載された単細胞性ラン藻*Synechocystis* sp. PCC6803由来のPMA1 (915a. a.) [94]、

⑩ 著者らが本論分記載の全実験を完了した直後の1993年12月末に*Synechococcus* sp. PCC7942のCu<sup>2+</sup>-ATPaseをコードする遺伝子*synA* (推定されるタンパク質は790a. a.) としてデータバンク登録 (アクセッションナンバーU04356) され、著者らの論文報告後の1994年9月に名称変更して発表された*ctaA* (Cu<sup>2+</sup> transporting ATPase) がある [172]。

ホモロジー検索の結果、747a. a. からなるPacSはアミノ酸一次配列上Cu<sup>2+</sup>-ATPaseのひとつCopAに最も似ており、全領域にわたって約44%が一致し、約24%の類似性 (計68%の相同性) が認められた (Fig. 20)。次いで似ていたのが、CadA、FixIで30%を越えて一致し、25%前後の類似性があった。さらに、KdpB、CopBとも500~650a. a. というかなり広い範囲で30%前後の一致がみられた (data not shown)。カチオン特異性やその結合部位に関する研究はCa<sup>2+</sup>-ATPaseなどで精力的に進められているが [162, 163]、PacSが何のポンプとして機能しているかを予測する上で注目されるのはそのN末端領域であり、原核生物由来のCopA、CtaA、CadA、FixIならびに最近相次いでヒト銅代謝異常疾患Menkes病、Wilson病の原因遺伝子として同定された2つのP型ATPaseに共通に存在する "Gly-Met-X-Cys-X-X-Cys" のモチーフがPacSにもある点である。興味深いことに、この重金属結合部位と考えられているdithiol domainはこれらP型ATPaseの他に*Serratia*属 (霊菌) のプラスミド上にコードされている水銀結合タンパク質MerPや水銀還元酵素MerAにも見いだすことができる (Fig. 21 panel A and B)。さらに、このモチーフを有するP型ATPaseの全てでion-transductionに重要と考えられている保存領域中に "Cys-Pro-Cys" というもうひとつ別の共通配列があることが指摘されているが、PacSにもやはりこの配列が存在する (Fig. 20 and 21 panel A)。したがって、PacSは銅や水銀といった重金属のポンプとして機能していることが予想された。

一方、*Synechocystis* sp. PCC6803のPMA1は、MgtBを除く原核生物由来の既知のP型ATPaseと比較して分子量、構造 (一次配列) が大きく異なり、PacSのホモログではなく、むしろ後述するようにPacLのホモログであることが示唆された (



Fig. 22)。

*Synechococcus* sp. PCC6301からの部分配列は、*Synechococcus* sp. PCC7942のCtaA (SynA) のC末端側と、アミノ酸一次配列上100%一致していることから同一遺伝子の一部と考えられる。事実、*ctaA*はPCC6301の部分配列同様、ATP synthase  $\epsilon$  subunitをコードする *atpE*の下流逆向きに位置しているP型ATPaseとして取得されており、報告者らが同じ*Synechococcus* sp.でも実験株としてより広く使用されているPCC7942からこのP型ATPaseの全領域をクローン化したことが論文に記載してある[172]。そのCtaAは全域にわたって、PacS、CopAとも35%前後一致し、2つの特徴的モチーフ”Gly-Met-X-Cys-X-X-Cys”と”Cys-Pro-Cys”も存在した (Fig. 20)。したがってCtaAはPCC7942においてPacSと同一タンパク質ではないものの機能的相関があるP型ATPaseである可能性が高い。この点については考察で述べる。

以上のアミノ酸配列の解析結果から、単細胞性ラン藻*Synechococcus* sp. PCC7942が有するPacSは、時期を同じくして、原核生物、真核生物両方から相次いで報告された重金属イオンの輸送に関与するユニークなP型ATPaseのひとつであることが推察された。

#### 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

著者らが、*pacS*、*pacL*を同定する以前、P型ATPaseについて一般的に信じられていたのは、P型ATPaseは原核生物から、高等真核生物にまで広く存在し、アミノ酸配列上複数の保存領域が見られるものの、全体としての構造に着目すると、明らかに原核生物と、真核生物由来のものには違いがあるということであった[75]。つまり、真核生物のP型ATPaseは、900~1200a. a. からなり、 $H^+$ 、 $K^+/H^+$ 、 $Na^+/K^+$ 、 $Ca^{2+}$ を輸送して細胞内または外部との間に生理的に必要なイオン勾配を形成するのに対し、原核生物のものは700a. a. 前後と分子量が小さく、保存領域以外の部分で配列およびその長さが大きく異なる上、生育に必要な $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ の取り込み系や有害な $Cd^{2+}$ の排出系の構成因子として同定されていた。またMgtBは、当時知られていた原核生物由来のP型ATPaseより分子量が大きく (908a. a.)、真核生物のP型ATPaseと25%程度一致する分子として初めて報告されていたが[90]、それ以外に報告はなかった。

著者らがPacLについて既知のP型ATPaseとホモロジーサーチをした結果は、こ

の「原核生物に真核生物のもつようなP型ATPaseはない」という認識を改める必要性を一層強く示唆した。926a. a. からなる *Synechococcus* sp. PCC7942のPaclは、真核微生物である *Saccharomyces cerevisiae*のCa<sup>2+</sup>-ATPase (950a. a.) PMR1と全領域にわたって35%の高い一致と23%の類似性が認められたのである[98]。ギャップが生じたアミノ酸残基は全体のわずか4%に過ぎなかった (Fig. 22)。さらに、ヒトのER、SR由来のCa<sup>2+</sup>-ATPaseと90%の領域で37%の一致が見られ、同じくヒトのNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseとも95%の領域で31%一致したのである (data not shown)。これらの結果は、原核生物であるラン藻由来のPaclが少なくともアミノ酸一次配列上では明らかに、真核生物のP型ATPaseの範疇に入ることを示唆していた。

また、Paclは、ほぼ同時期に報告された *Synechocystis* sp. PCC6803のPMA1の95%以上の領域と39%の一致が見られたことから、これら2つのP型ATPaseは *Synechococcus* sp.と *Synechocystis* sp. がそれぞれ有する機能的には同一のホモログであることが示唆された (Fig. 22)。

### 3-2-5 *pacS*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 (*smpX*) があつた

*pacS*のコーディング領域の先頭Aの613bp上流から *pacS*とは逆向きに転写されると思われるORFにコードされた269a. a. のタンパク質は疎水性に富み膜タンパク質であることが予想された (Fig. 23 panel A)。そこでこの遺伝子を *smpX* (*Synechococcus* membrane protein) と名付け、ホモロジーサーチを行った。その結果、SmpXは原核生物から、真核生物まで広く存在が知られている膜チャンネルの一群、MIPファミリーに属するタンパク質であることが明らかとなった (panel B) [99, 100, 171]。MIPファミリーの代表例としては、bovineのlens fiber junction membrane proteinとしてみつかりファミリーネームに用いられているMIP (major intrinsic protein)、 *Drosophila*のneurogenic proteinであるBIB (big brain protein)、 *E. coli*内膜でglycerol facilitatorとして機能するGlpF [101, 102]、kidney beanの液胞膜主要タンパク質TIP、aquaporin (water channel) [103]として同定されたkidney renal tubule (細尿管) 由来のCHIP28 [104~107]とkidney collecting tubule (集合管) 由来のWCH-CD [108]、Soybeanの根粒で乾燥ストレスで発現するNod26 [109]、 *Arabidopsis thaliana*の種子と成熟体からそれぞれ同定されたα-TIPとγ-TIP

[110, 111]、*Tobacco*で根特異的発現のみられるTobRB7、*Antirrhinum majus* (キンギョソウ) の成熟種子や暗下で生育させた場合に発現するDIP [112]、などが挙げられる。これらに共通しているのは、機能的に水または低分子物質 (イオン、代謝産物) を細胞内と外側あるいは細胞内器官と細胞質の間で濃度勾配にしたがって透過させるチャンネルとして機能していること (能動輸送を行うポンプではない)、植物由来のもの多くが、乾燥、浸透圧ショック、塩ストレス、あるいは細胞伸長直後といった細胞が水を必要とする条件下で発現誘導される点である [103]。実際、aquaporinと考えられているWCH-CDを *Xenopus oocytes* で発現すると、確かに細胞膜の水の透過性が上昇することが確認されている [108]。またその構造上の特徴としては、全体で6つの膜貫通疎水性領域をもち、2、3番目と5、6番目の膜貫通領域のスペース中の "Asn-Pro-Ala" の配列を含め22のアミノ酸残基が保存されており、前後3つずつの貫通領域が膜に対して対照的に配置し、2分子ないしは4分子が会合して1つの透過孔を形成していると考えられている (panel B and C)。

以上のように高等植物葉緑体の原型であるラン藻から見つかったMIPファミリータンパク質SmpXは、細胞内のイオン、水分環境の調節における生理機能の面から、ラン藻界を越えて植物界まで通じる普遍性を内包している可能性が充分ある。さらに *smpX* がカチオン (イオン) 輸送に関わるP型ATPaseの近傍に存在していたことは、少なくともラン藻においてはこれらが何らかの形で協調的に機能していることを予感させる。しかしながら、この興味深いテーマに関して、著者自身は時間的制約等の理由からこれ以上の解析は行っていない。ただ共同研究者の柏木によると、*smpX* は単独で欠失させても、乾燥耐性、塩耐性、重金属耐性に変化は見られなかったが、*smpX-pacS* 二重欠失変異株は、*pacS* 単独欠失変異株と比較して *smpX* 依存的に有意に銅感受性が高くなっていることが示唆されている。しかし、*pacS* との協調的転写制御を示唆するような環境刺激による *smpX* の転写量の増加はこれまでのところ観察されていない (data not shown)。

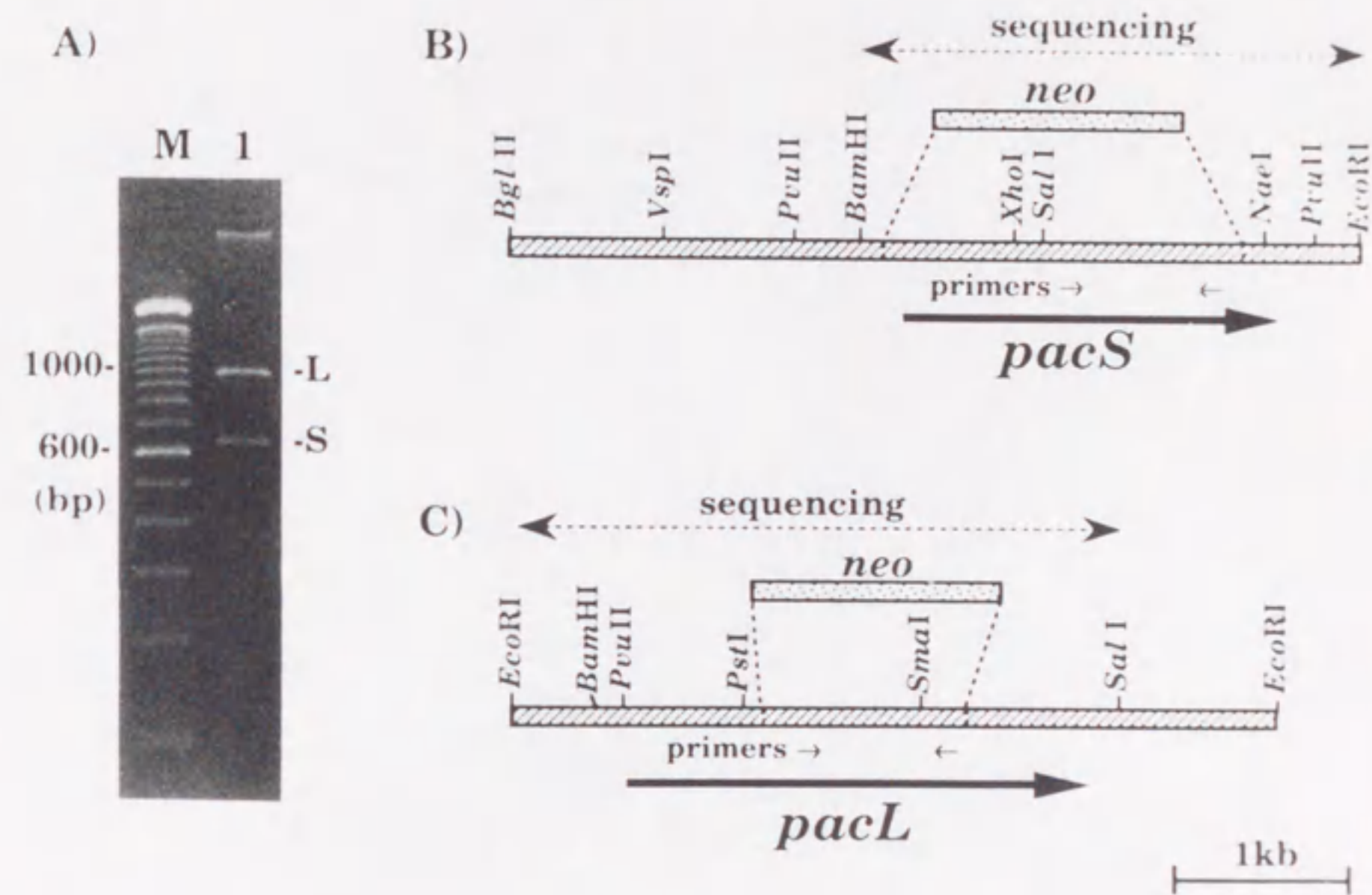


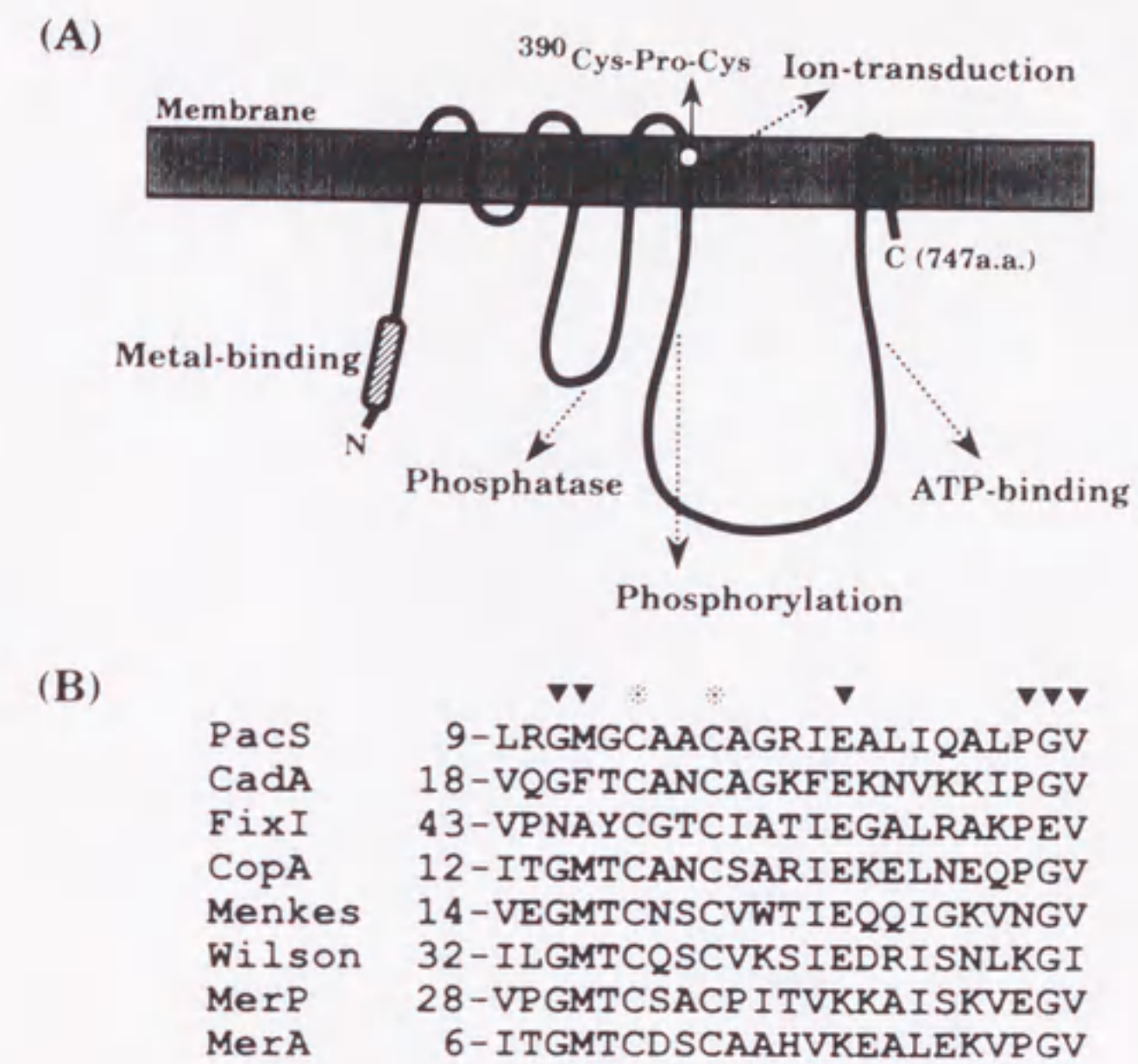
Fig. 19 Cloning of the genes encoding P-type ATPases from *Synechococcus* sp. PCC7942. Panel A. A PCR-amplification profile on 2% agarose gel is shown in lane 1. Lane M represents a 100-bp DNA ladder-marker. Note that the amplified DNA fragments, denoted by S and L, were characterized in this study. Panel B. Schematic representation of the *Synechococcus* chromosomal region encompassing the *pacS* gene. Panel C. Schematic representation of the *Synechococcus* chromosomal region encompassing the *pacL* gene. Other details are given in the text.

```

CtaA 1' MPAAIVHSADPSSSILVEVEGMKCAAGVAAVERLLQQTAGVEAVSVNLIRLAKVDYDA
PacS 1' M..*VNQQLTLRGMKCAACAGRIEALQALPGVQECVNF..*GAEQAQVCYDP
CopA 1' MATNTKMETFVITGMTCANCSARTEKELNEQPQMSATVNLATEKASVKYTD
metal binding
61' ALIEDPTVLTTEITGLGFRALRQD-DNPLTLPIAEIPPLQQRL--QLAIAAFLIVS
50' ALTQVAAT-QAAIEAAGYHAFPLQDPWDNEVAERHRRARSQRQAQRVWVSLIASLL
53' TTTE--RL-IKSVENIGYGAILYDEAHKQKI-AEE--KQTYLRKMPDLIFSAILTLPL
117' SWGHLGHWLDHPLPGTDQLWF---HALLATWAL-LGGRSILQAGWQLRCGAPNMNSL
109' VIGSLPMLGISIPGI-PMWLHPGLQLGLTLPV-LWAGRSFFINAWKAFRQNTATMDTL
106' MLAMIAMMLGSHGP-I-VSFFHLSLVQLLFPVQFVYQWRFYKGYHALKTKAPNMOVL
172' VLLGTGSAYLASL-VALL--W---PQLGMVCFDEPVMLLGFILLGRTLEEQRFRSQAA
167' VAVGTGAFLYSLAVTLFPQWLTRQGLPPDYYEAIIVIIALLLLGRSLEERAKGQTSAA
166' VAIGTSAF---ALSIVQGFPSH--SHDLYFESSMIITLILLGKYLEHTAKSKTGDA
226' LQNLALQPETTQLLTAPSSIAQDLEAPAIWPAQLRAGDYVQVLPGDRIPVDGCVI
227' IRQLIGLQAKTARVL-----RQGQELTLPIEVQVDMWRVRPGEKVPVDGEVI
221' IKQMSLQTKTAQVL-----RDGKEETIAIDVMIODDILVIRPGEQVPTDGRIZ
286' AGQSTLDTAMTGELPQPCQVDRVCAGTLNSHRLVIRAEQTSQTRLAAIVRCVAEA
276' DGRSTVDESMTGSLPVQKQVGEVIGATLNKTGSLTIRATRVGRETFIAQIVLVQQA
270' AGTSALDESMTGESVPEKKEKDMVFGTINTNGLIQVSVQIGKDTVLAQIQMWEDA
dephosphorylation
346' QQRKAPVQRFADAIAGRFVYGVCAIAALTFGFWATLGSRWMPQVLPGLLHAPHHG
336' QASKAPIQLADQVTGFWPAVIAIAIITFLWF-----NW-----
330' QGSKAPIQIADKISGFVPIVFLALVTLV-T-----GW-----
406' MEMAPHSPL-LLALTLAISLVVACPCALGLATPTAILVATGLAAEQGILVRGGDL
371' -----IGNV-TLALITAVGMIIACPCALGLATPTIMGTGKGAEYILIKSAESL
363' -----LTKDWQLALLHSVSVLIACPCALGLATPTAIMGTGVGAHNGILIKGGEAL
ion transduction
465' EQLARIKHVFDKTGTLTQGFELIEIQPLADVDPR-LLQMAALEADSRHPLATALQT
423' ELAQITVILDKTGTLTQGPSVTDFLAIQDRDQQQLLGMASLENYSEHPLAEIVR
416' EGAHLNSIILDKTGTLTQGRPEVD--VIGPKE---IISLFYSEHASEHPLGKAIVA
autophosphorylation (S1prime)
524' AAQANLAPIAASDRQVPGLVGSGTCDGRSLRLGNPTW---VQVATAKLPT----GSA
483' YGEAQITLSTVDFEAI..*PGSGVQVQVEGIMLQIGTQRMGELGIETSALQNWEDWEAA
470' YGAKVGAKTQPTDFVAHPGAGISGTINGVHYFAGTRKRLAEMNLSDFEQALELEQA
576' AATSINLADDQQLACFWLQDQPRPEAAEVVQALRSRGATVQILSGDRQTTAVALAQQLG
543' GKTVVGAADGHLQAILSIADQLKPSVAVVRSRLQLGLQVVM..*TGDNRRTADAIAQAVG
530' GKTVMFLANEEQLGMIAVADQIKEDAKQIEQLQKGVDFVMVTDGNRAAQAIKQVVG
636' LESETVAEVLPEDKAAIAALQSQGDVAMIGGINDAPALATAAVGISLAAGSDIAQD
602' I--TQVLAEVRPDQKAQVAQLQSRGQVAMGGINDAPALAQADVIAIGTGDVAIA
590' IDSDFIAEVLPEEKANYEKLQAGKVGWGGINDAPALRLADVGIAMSGTDIAME
ATP binding (S2prime)
696' SAGLLSRDLDSVLVAMNLSQMLRTIRQNLTWALGYNVMLPLAAGFLPAYGLALTP
661' ASDITLISGDLQGITVIAIQSRATMTNIRQNLFFAFIYNVAGTPIAAGILYPLLQWLLSP
650' TADVTLNLSHTSINQMESLAAATLKKIXQNLFWAFIYNTIGIPFAA---F---G-FLNP
756' AIAGACMVSLSLVSNLSLL-RYWFRRSLNHSVSV
721' MLAGAAMFSSVSVTNALRL-RQFQPR
703' ILAGGAMFSSISVLLNSLSLRKYIK

```

Fig.20 The amino acid sequence of PacS in comparison with that of CtaA and CopA. The amino acid sequence of PacS (middle line) was aligned with that of the CtaA from *Synechococcus* sp. PCC7942 (upper line) [172] and that of the CopA from *Enterococcus hirae* (lower line) [93] using the algorithm of Lipman and Pearson. Note that the entire sequence is presented in all cases. An asterisk denotes an identical residue, whereas a colon denotes a similar residue. The conserved residues, which are comprised of the active center of metal binding, dephosphorylation, ion transduction, autophosphorylation and ATP binding, are double-underlined. Among them, the sites of autophosphorylation and ATP binding were used to design appropriate primers for PCR-amplification.



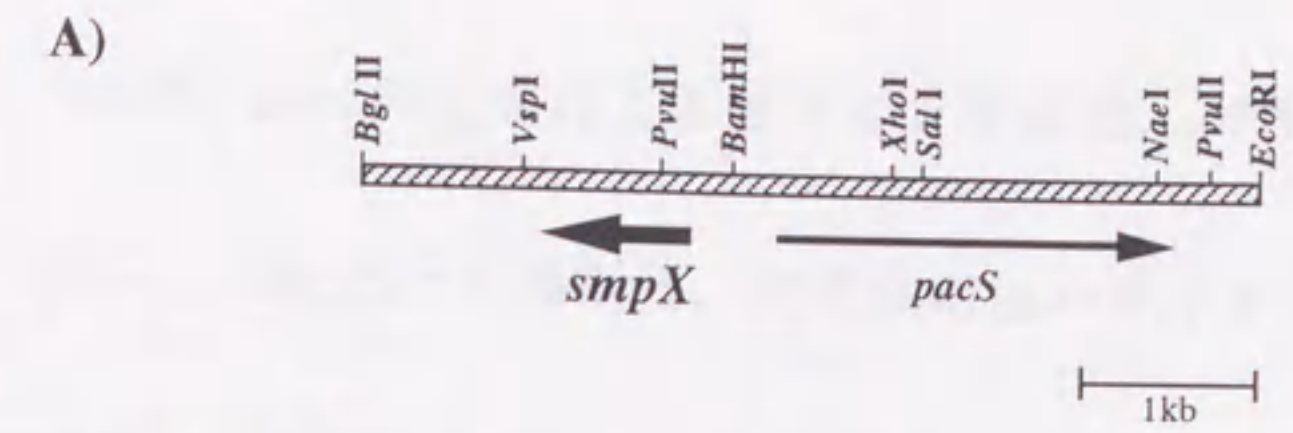
**Fig.21** Schematic illustration of the structure and function of PacS ATPase with a putative metal-binding motif.

A. A folding model of PacS in the membrane, based on the result of hydrophobicity analysis. The positions of four functional domains, conserved in PacS as well as all other P-type ATPases, are schematically indicated. In addition, a hatched rod indicates the position of a putative metal-binding domain in PacS. It should be noted that this is a hypothetical model of the PacS topology in the membrane, and also that assignment of each functional domain is based on sequence comparison among a number of related P-type ATPases (Matthew and Milton, 1994).

B. The amino acid sequence corresponding to the metal-binding domain of PacS is shown in comparison with those proposed for other P-type ATPases (CadA, FixI, CopA, Menkes ATPase and Wilson ATPase) and other metal-binding proteins (MerP and MerA). In the aligned metal-binding sequences, highly conserved amino acids are indicated by triangles and invariant cysteine residues by asterisks. The position of a sequence (Cys-Pro-Cys) conserved among all these P-type ATPases listed is also indicated in the structure of PacS. For detailed features of each protein, and relevant references, see the text.

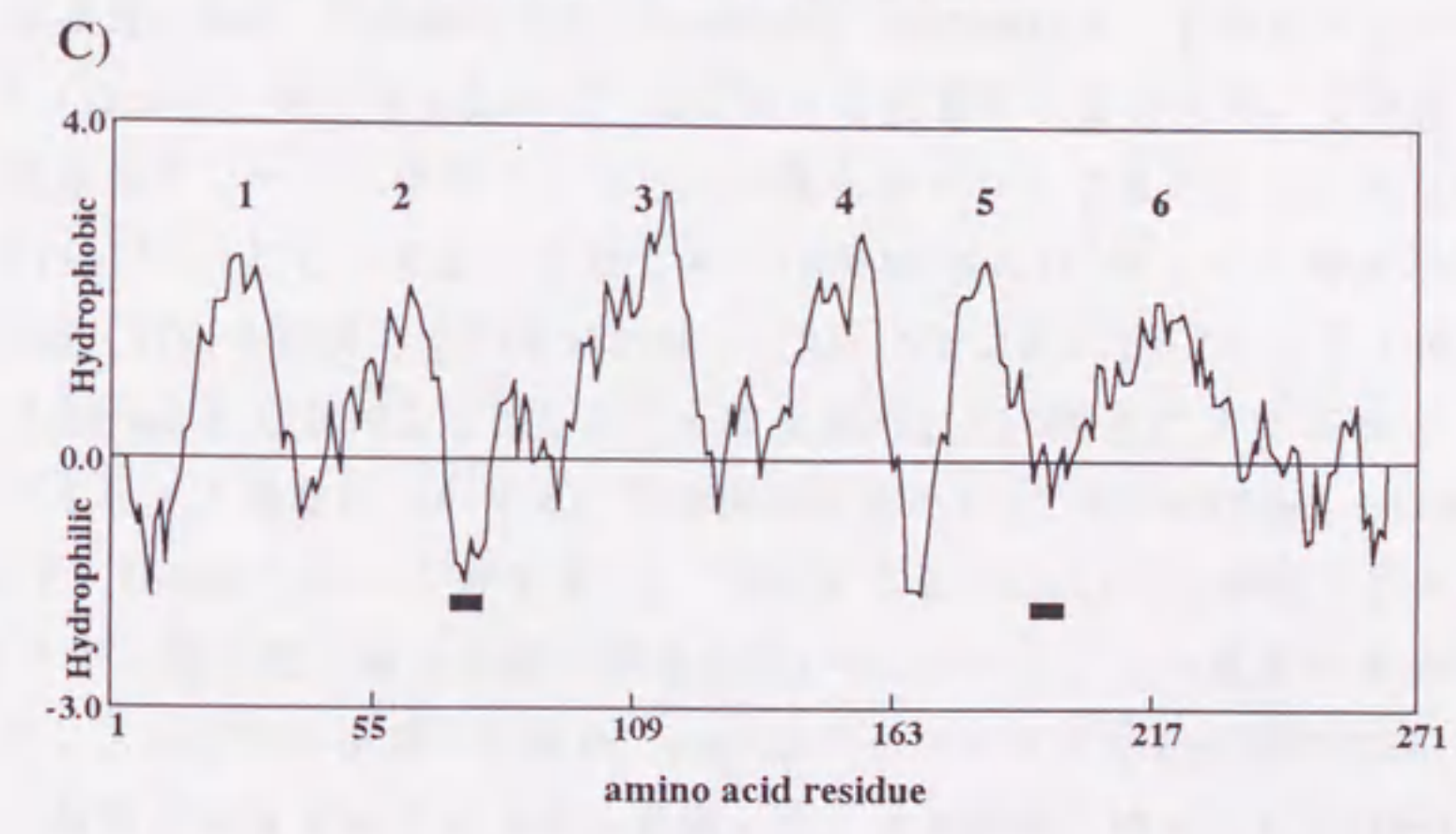
PMA1 1' MGAFPLPPNYGFPHLKFLLPPSPSTRGRHSRFAHRSRF--RSD  
 PaL 1' MKGAVSASLTDVROPTAHHSILTYEECHQQLDAHRN-GL-T  
 PMR1 1' MSNPFNASLLDEDSRREILDATAEALSKPSPSLEYCTLSDVEAL EKLDTDKNGGLRS  
 43' SGAVAQRYEQYGRNELKFKPKPAMLRFLQFHOPLLYILLIAGTKAF LGSRTNAR--  
 41' AEVAADRILALYGNELVEQAGRSPLQILNDQFANIMLMLAVAVVSGALDRDGF PKD  
 61' SNEANRRSLYGPNEITVEDESLFKFLSNFIEDRMILL--IGSAVVS LFMGNIDDA  
 100' --VINGVTLVNAITGYTQAKAGATASLAKAVTTEATVLRDGNLRIPSQQLVIGDIVS  
 101' AIAILVIVLNAVLYLQESRAEKALAAKGMAPLVRVRRNRDQEPVAGLVPGLIL  
 118' --VSTLAFIVTVVGFVQYRSEKSELEALNKLVPALMRCGQESHVASTLVPGLVH  
 158' LASGQKVPADRLKVRNLQVTE SALTGEAVPVEK----AVELL--PEETP-LAERLN  
 161' LEAGDQVPADARLVE SANLQVKE SALTGEAFVQK----LADQQL--PTDVV-IGORTN  
 177' FRI GDRIPADIRIEAIDL SIDSALTGEAFVQK----LADQQL--PTDVV-IGORTN  
 209' MAYAGSFVTFGGTGVVATANATEMGQTSQSMKQVSLMPLTRKFAFSHTLLYVIVT  
 213' CLFGGTEVLQGRGQALVYATGHNTELGRITALLQSVSEKTPLOQLDKLVLSGAL I  
 237' IAYMGLVKEGHRGIVVGTGNTSFGAVFEMNNTEKPKTPLQLTMDLGRDLSVFSI  
 269' LAFTFAVQNGRGSPLMEFAAVALVSGIPEQLPAVVITLAIQVNRHAKRNIIRKL  
 273' LVAIVVGLGVLNGQSMELLSVGLSMAVAIVPEQLPAVITVALATGQRMVQRESLIRRL  
 297' VIGMELVGIQGRSMEMQISVSLAVAATPEQLPIIVITVALGVLRAKRRKATVRRRL  
 329' PAVEALGSATVVCSDKTGLTENQMTVQAVYAGQK-HYEVSGGYSKPEFNOVMEVD  
 333' PAVETLGSVTTICSDKTGLTENQMTVQAVYAGQK-HYEVSGGYSKPEFNOVMEVD  
 357' PSVETLGSVMICSDKTGLTENQMTVQAVYAGQK-HYEVSGGYSKPEFNOVMEVD  
 388' NVLDGLPPVLEECLLTQMLCNDQLEHRCDDAVVGDPTGALLASAARAGFSQGLAS  
 388' -IVPNYRDLMLL-LAAGAVCNDALVASEHMSIVGDPTGALLASAARAGFSQGLAS  
 413' -LKNYLTEDVRET-LTIGNLNNASF--SQEHATFGNPTDVAL--EQLANFEMPDIRN  
 448' QKPRLSIPFESDYQYM-----ATLHGDGRTIYKGSVESL LORCESMEL--LD  
 447' VLPRQDIPFTESEKRRMSVVADLGETTLTIREGOPYLVYKGSVELL LORCESMEL--LD  
 468' TVQVQELPFNSKRKLM-----A-----TKILNPVQKCTVYKGAERILEYSTYLSKSG  
 493' DG--QMSIDRGEIEENVEDMAQGLRVLAF AKTVEPHHAIENHDIETGLTFLQOQH  
 505' AQLES LTAATRQOILAAGEAMASAGMVLGFAYR--PSATADVEDAETDLTILGLMGQ  
 520' KKTETEAQKATINECANSHASEGLRVFGAKLT-LSDSSTPLTEDLIKDLTFTGLIGH  
 553' IDPPRPEATAAVHACHDAGIEVKMITGDHISTAQAIAKRMGIAAG-DGIAFEGROLATH  
 562' IDAPRPEVREAVORCRQAGIRTLMITGDHPLTAQAZARDLITTEVGF-IP-VLTGQQLSAM  
 579' NDPPRPNWKFATLQLOGGVHIIHMITGDSENTAVNIAGIPIVDPKL SVLSGDKLDEM  
 612' GPAELAQAAEDSCVFAVAPAQQLQVEALQEKGHIVAMTGDQVNDAPALKRADIETAMG  
 620' NGAELDAVRSVEVYARVAPEHKLRIVESLORQGEFVAMTGDQVNDAPALKQANIGVAMG  
 639' SDDQLANVINDHNTIFARATPEHKLNEVRALRRKGDVAMTGDQVNDAPALKLSDIGVSMG  
 672' KGGTEVARESSDMLTDDNFASIEAAVEEGRTVYQNRKATALLPVNGGESMTILISVL  
 680' ITGTDVSKESADMVLLDDNFATVAAVEEGRTVYQNRKATALLPVNGGESMTILISVL  
 699' RIGTDVAKEASDMVLTDDNFSTLTAIEEGRTVYQNRKATALLPVNGGESMTILISVL  
 731' LAL-NLPILSLQVRLNHNINSITMTVPLAFESPGITMQQAPRNPNEPLITKLLHRIIL  
 740' LGLGAVPLTPLLQILNMLVTDGIPALALAVEPGDPTIQRPPHNPQESIFARGLGTYHLR  
 758' FXL-PNPLNMQILWILMDGPPAQLGVEPVDEHMKPPRKRTOKELTHNV--MKR  
 791' VSLFNWTLIFGMFNWRTYDDLALARTMAIQALVAARVYLLSISQGRSF--LQVYTG  
 800' VQVVSFAFTIVLMTIAYQ-YTQVPLP-QLDPKRW-QTMVFTTLGLAQMGHIAVRSLLT  
 812' L--LTTAACTVGTVYIFVKEHAE-DQVARD-TTMTFTCFVDFDMNACRHNKTS  
 848' K-RQTITKASILLGIAVATLQIGFSQLPMMVLEKTAPEMDDQWAIKLLPHIPHPVR  
 856' I-QPMRTNPLNLSVIVTALQLALVYVSPKQFFGTHSLSQLDLAICLGFSLLLFVYL  
 870' IFEGFTNKNMNYAVGLSLLGQKATYIPFQSTFKTERLGTSDILLLLISSSVIVD  
 907' ILAN-RLDP  
 915' EAEK-MVRHGRY  
 930' ELRKLNRKKNEEDSTYFSNV

Fig.22 The amino acid sequence of PaL in comparison with that of PMA1 and PMR1. The amino acid sequence of PaL (middle line) was aligned with that of the PMA1 from *Synechocystis* sp. PCC6803 [94] (upper line) and that of the PMR1 from *Saccharomyces cerevisiae* [98] (lower line) [98]. Other details are essentially the same as those given in the legend to Fig.21.



B)

SmpX	1	MKMLRALKHHWPEYLIEAWGLGLFMVAAGVVGLVFYQSPAYQA
Nod26	1	MADYSAGTESQEVVNVTKNTSETIQRSDSLVSVPFLQKLVAEAVGTYFLIFAGCASL-V
	46	IADPFLQ---RVMGLGMGLTAMIIMYSPWGKRSAGHINPAVTLTFYRLKKAIAAWDAFFY
	60	VNENYNYMITFPGIAIVWGLVLTVLVYTV-GHISGGHFNPAVTIAFASTRRFLIQVPAY
	103	VVFQFIGLLGVVLAFLQTPFTQAPVNVVTVPGKQGAIVACIAEYFIAVLMMSV-L
	119	VV---AQLLGSILASGTLRLLFMGNHDQFSGTVP-NGTNLQAFVFEFIMTFFLMFVICG
	162	FTSNQPKLERFTPFFAGCLIVSYVIFESPLSGFGMNPARTVASALPSGIWTAIWLYFLAP
	174	VATDNRAVGELAGIAIGSTLLNVIIGGPVTGASMNPARSLGPAFVHGEYEGIWIYLLAP
	222	IAGMLTAAELYLRMIGPRKIFCAKLYHDPLYRCIHCGLIHWHRPHLR
	234	VVGAIAGAWYIVRYTDKPLSEITKSASFLLKGRAASK



**Fig.23 SmpX belongs to the MIP family.**  
 A) A schematic representation of *smpX*. The hatched bar indicates the cloned *BglII-EcoRI* fragment (5.1kb) harboring *pacS* and *smpX*.  
 B) The amino acid sequence of SmpX in comparison with that of Nod26. The amino acid sequence of SmpX (upper line) was aligned with that of the Nod26 from *soybean* [109] (lower line) using the algorithm of Lipman and Pearson. Note that the entire sequence is presented in all cases. An asterisk denotes an identical residue, whereas a colon denotes a similar residue.  
 C) Hydropathy plot of SmpX (269a.a.) showing 6 potential transmembrane regions. The method of Kyte and Doolittle was used with a window of 10a.a. The number of 1 to 6 in the plot indicates potential transmembrane regions. Conserved two "Asn-Pro-Ara" sequences are represented by bold bars.



### 第三節 *pacS*、*pacL*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

単細胞性ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942のP型ATPase、*PacL*、*PacS*の生理的重要性を探るひとつのアプローチとして、野生株と *pacL*、*pacS*の大部分を kanamycin耐性遺伝子に置換 (Fig. 19 panel B and C) した DEL-L ( $\Delta^{1Met-686Thr}$ )、DEL-S ( $\Delta^{271Leu-685Val}$ ) を様々な環境にさらした場合に、生育あるいは生存率に差が出ないかどうかを調べる方法が有効である。P型ATPaseがカチオンの輸送に関わっていること、*E. coli* *kdp*オペロン [76, 77] や *tomato* や *tobacco* のER局在型の  $Ca^{2+}$ -ATPase 遺伝子が培地浸透圧 (培地塩濃度) 上昇に対して転写誘導されるといった報告 [85, 86] を鑑み、数多くの環境刺激の中からまず、塩ストレスと浸透圧ショックを選び、耐性の違いについて解析した (Fig. 24)。

その結果、NaCl (panel A)、sorbitol (panel B) をそれぞれ段階的に0~300mM、0~700mMまで加えたプレート上に野生株、DEL-L、DEL-Sをストリークしたところ、高濃度のNaCl (150mM以上)、sorbitol (600mM以上) を含むプレート上で、DEL-L ( $\Delta pacL$ ) DEL-S ( $\Delta pacS$ ) はどちらも生育できなかった。この差を、希釈した細胞を各プレートに塗布してコロニー数をカウントする方法で、より正確、定量的にviabilityとして算出したところ、150mMのNaClに対して、野生型ではほぼ100%のviabilityを維持しているのに比べ、DEL-Sでは既に1%以下にまで低下していた。また200mMまで上げるとDEL-Lでも野生株の1/10程度にまで下がっていた。sorbitolを加えた場合についても、その傾向は変わらず、500mMでDEL-Sは野生株の1/100以下、600mMでDEL-Lが野生株の1/10以下にまでviabilityが低下した。

そこで、特に野生株との差が顕著なDEL-Sについて、この現象が本当に *pacS* に依存しているかどうかを調べるため、*pacS* をのせたプラスミド pCOM-S で DEL-S を形質転換し、耐性が回復するかどうかを観察した。その結果、明らかに pCOM-S によって DEL-S では塩耐性、浸透圧耐性の回復が見られた (data not shown)。

したがって、明らかに *pacS* の欠失は塩耐性、浸透圧耐性の低下を招き、また *pacL* についても *pacS* ほどその影響は顕著でないが有意に細胞の塩耐性、浸透圧耐性を低下させることが示唆された。

また補足すると、 $Na^+$  以外に  $K^+$  (5  $\mu$ M~200mM)、 $Mg^{2+}$  (5  $\mu$ M~150mM)、 $Ca^{2+}$  (0.5  $\mu$ M~100mM) に関しても、過剰に加えた場合と、培地から除いた場合について生

育に与える影響を調べたが野生株とDEL-L、DEL-S間に顕著な差は見られなかった。特に、PacLはアミノ酸一次配列上Ca<sup>2+</sup>輸送に関与している可能性があったので、積極的にCa<sup>2+</sup>をキレートする目的で培地にEGTAを添加してみたが(～1mM)、少なくともこれらの実験からPacLがCa<sup>2+</sup>-ATPaseであることを生理的に示唆するような生育への影響は観察されなかった(data not shown)。

### 3-3-2 DEL-Sは銅、銀に対する耐性の低下が顕著だった

3-2-4で述べたように、PacSのN末端には重金属結合部位と思われる"Gly-Met-X-Cys-X-X-Cys"のモチーフが存在し、PacSは何らかの重金属イオンの透過に関与していることが予想されたので、次にDEL-S(およびDEL-L)の重金属耐性の変化および重金属欠乏による生育への影響について解析した。

培地に添加してその影響を見たのは、Ag<sup>+</sup>(～50μM)、Cd<sup>2+</sup>(～5μM)、Co<sup>2+</sup>(～5μM)、Cr<sup>3+</sup>(～5μM)、Cu<sup>2+</sup>(～10μM)、Fe<sup>3+</sup>(～500μM)、Hg<sup>2+</sup>(～2μM)、Mn<sup>2+</sup>(～500μM)、Ni<sup>2+</sup>(～5μM)、Pb<sup>2+</sup>(～5μM)、Zn<sup>2+</sup>(～50μM)の11種の重金属である。Fe<sup>3+</sup>とMn<sup>2+</sup>を除き、実験は野生株の生育限界濃度まで行った。その結果、再現性良くAg<sup>+</sup>とCu<sup>2+</sup>に対しDEL-Sの感受性が高くなっていることが明らかとなった。つまり野生株ではプレート上で10μMのCu<sup>2+</sup>、50μMのAg<sup>+</sup>存在下でも生育が可能であったのに対し、DEL-Sは2μMのCu<sup>2+</sup>、30μMのAg<sup>+</sup>の添加で完全に生育できなくなった(Fig. 25 panel B)。一方、他の重金属に対する感受性の変化はプレート、液体培地のどちらからも観察されなかった(data not shown)。また、DEL-Lではどの重金属に対しても感受性の変化は観察されなかった(data not shown)。

DEL-Sの銅や銀に対する感受性の上昇が、*pacS*に依存していることを確認するため、DEL-SをpCOM-Sで形質転換し、プラスミドで*pacS*を相補した場合について同様の生育実験を行ったところ、確かに*pacS*を相補した株では、Ag<sup>+</sup>、Cu<sup>2+</sup>に対する耐性が回復しプレート上で生育が認められた(Fig. 25 panel A and B)。

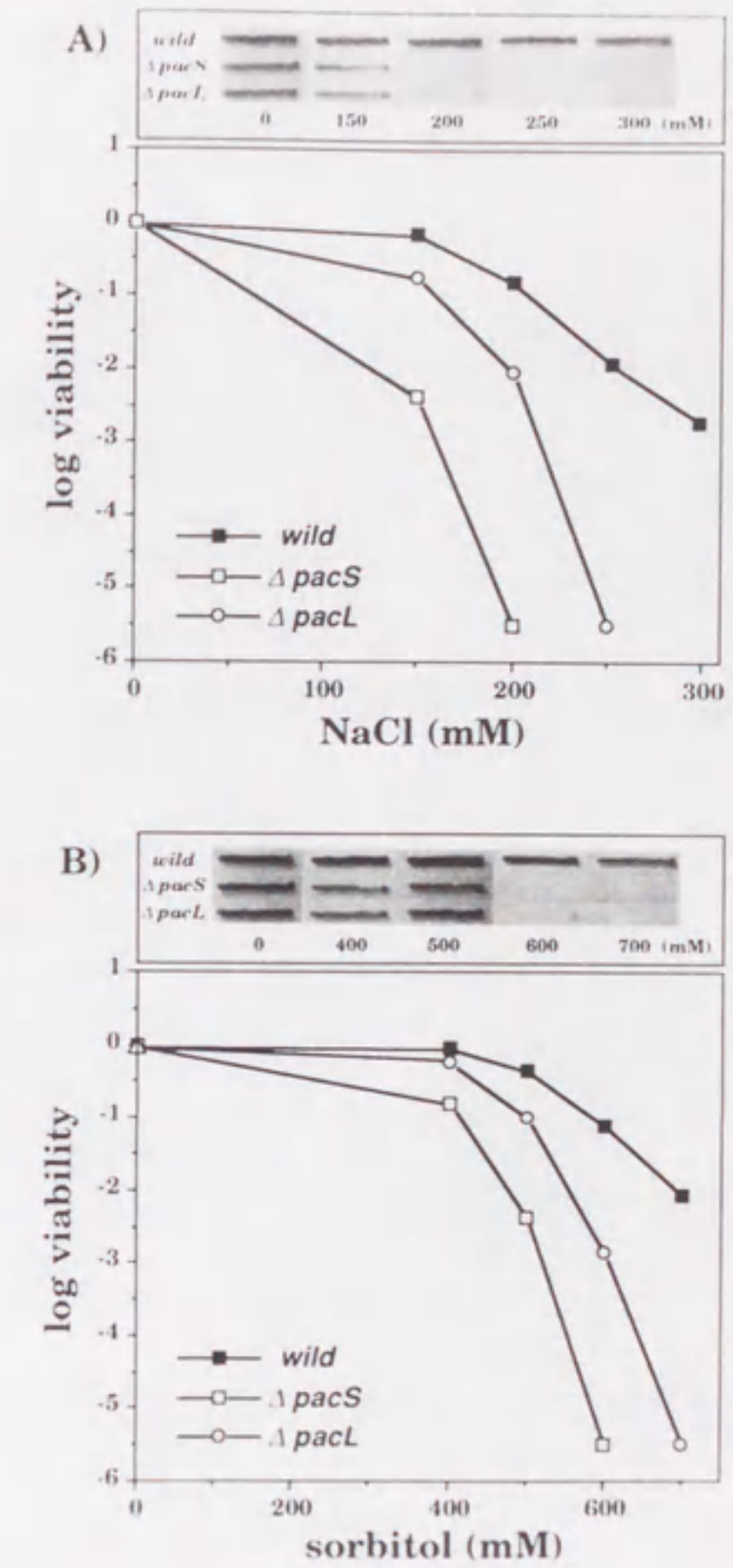
これらの点をさらに詳しく観察するため、野生株、DEL-S、DEL-S/pCOM-Sをそれぞれ通常のBG11、2μM、5μMのCuSO<sub>4</sub>を含むBG11液体培地で培養し、約12時間毎にO.D. 730nmを測定、成長曲線を作成した(Fig. 26)。野生株では、どの培地でも同様の曲線を描いたのに対し(panel A)、DEL-Sでは終濃度5μMのCuSO<sub>4</sub>存在下、明らか

に著しい生育阻害が認められた。また、 $\text{CuSO}_4$ 添加後から阻害効果が現れるまで、10時間以上のラグタイムが観察された (panel B)。しかし、この阻害効果は、pCOM-SでpacSを相補することではほぼ完全に抑制され (panel C)、やはりpacS依存的事であることが確認された。

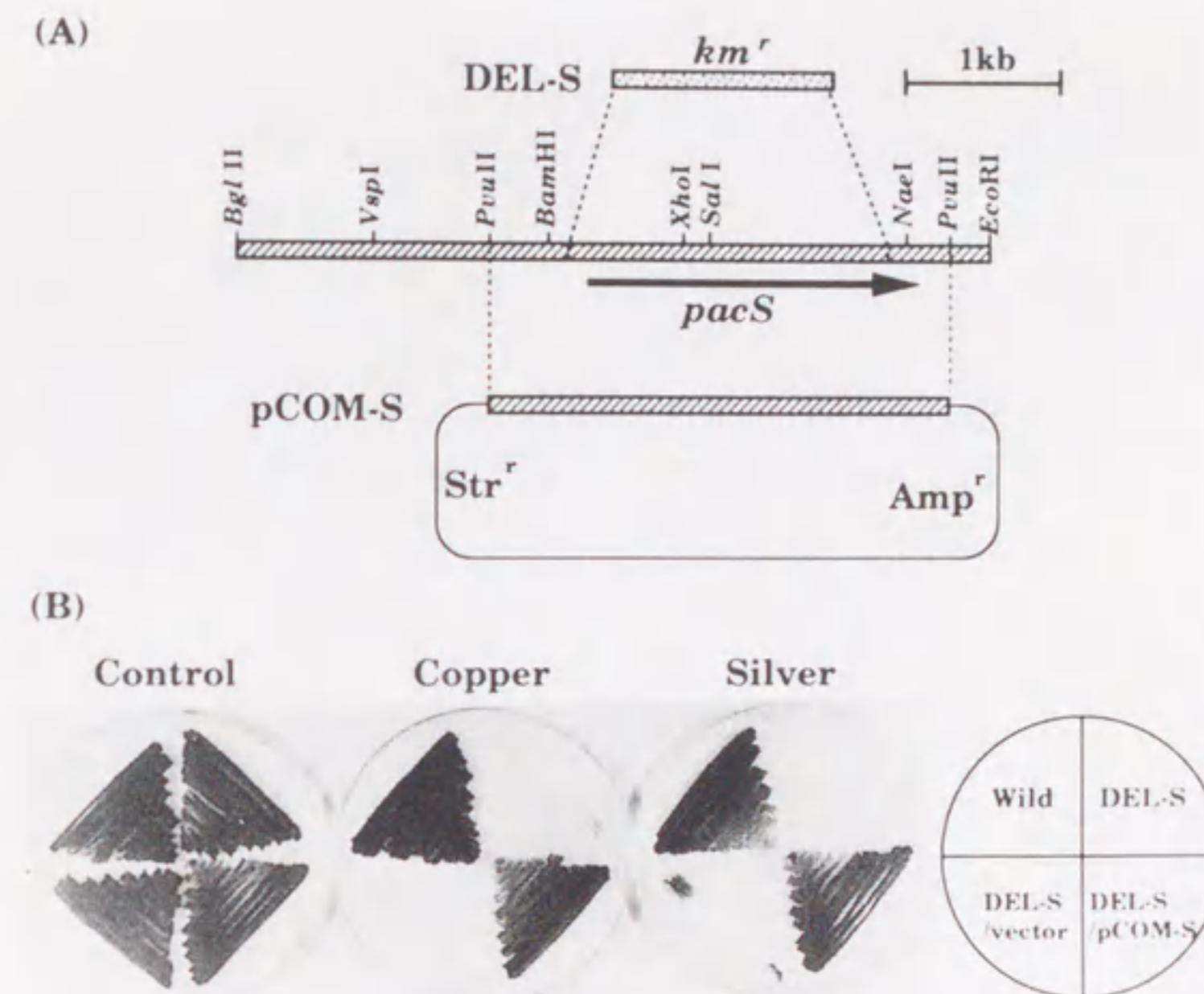
したがって、pacSの欠失によって細胞の $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 耐性が特異的に低下することが明らかとなった。

一方、BG11培地にはラン藻の生育に必須な金属を供給するためFerric(III) citrate、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ が含まれている。そこで次に、金属イオン濃度を下げた場合の影響について、これらのいずれか一元素を除いた液体培地をMilli-Q水でそれぞれ調製し、野生株とDEL-Sの生育の違いを観察した ( $\text{Fe}^{3+}$ を枯渇させる場合については、等モルのcitrateを別に加えた)。しかし、 $\text{Fe}^{3+}$ 以外の重金属の枯渇に対しては見かけ上生育に全く影響がなく、 $\text{Fe}^{3+}$ についてもDEL-Sと野生型では同程度の生育阻害しか見られなかった。またPacSが $\text{Cu}^{2+}$ 濃度の上昇だけでなく減少にも対応しているかどうかを調べるため、重金属のキレート剤であるPTとHQをそれぞれ培地に添加してみたが、再現性のある違いは野生株との間に認められなかった (data not shown)。

したがって少なくともこれらの方法で検証しうる範囲 (金属イオン環境) において、野生株とpacS欠失株の間に重金属イオンの欠乏による影響の差はないと結論した。



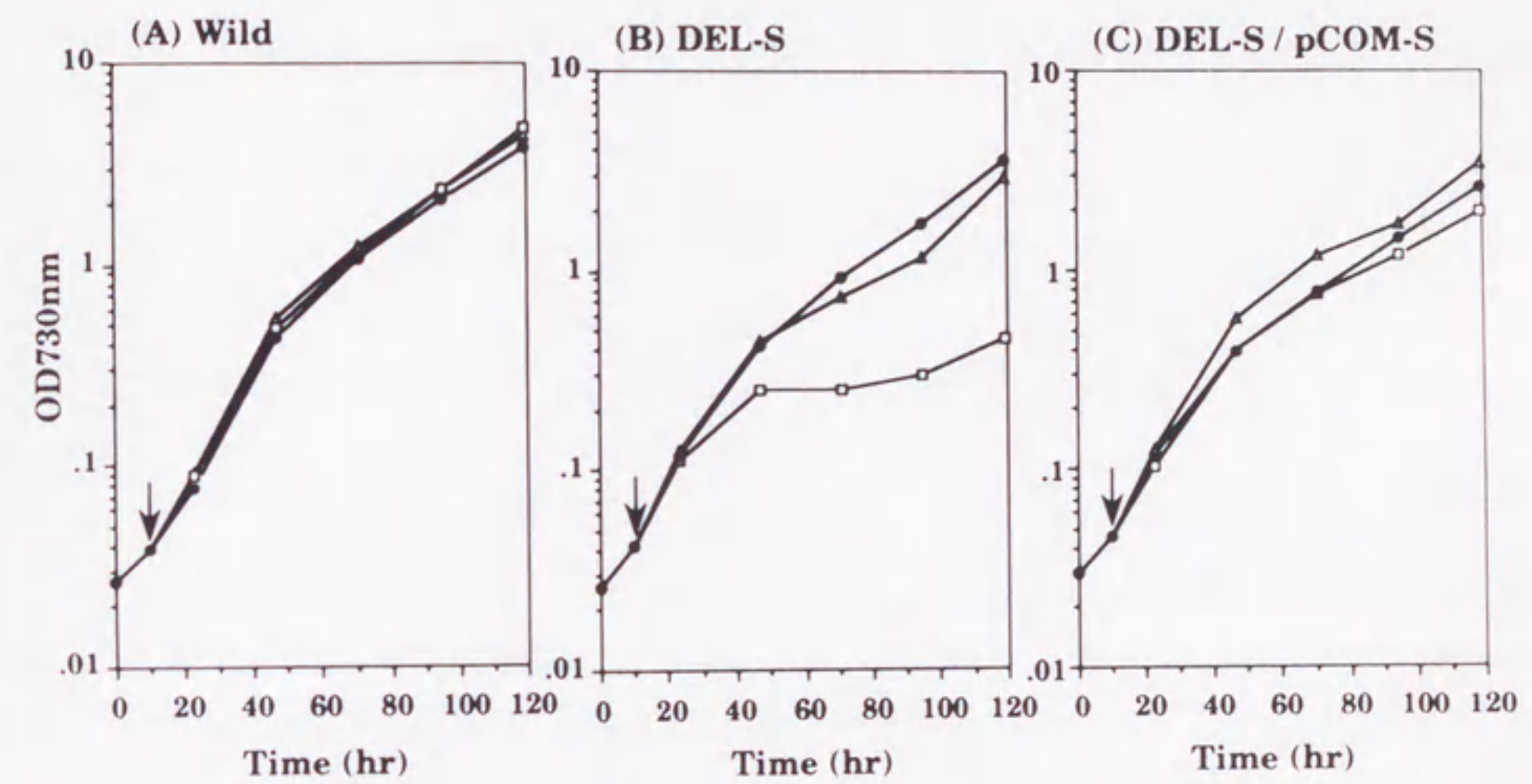
**Fig.24** Growth ability of *Synechococcus* sp. PCC7942 mutants lacking either the *pacS* or *pacL* gene. The  $\Delta pacS$  and  $\Delta pacL$  strains, as well as their parental wild-type strain, were streaked on solid BG-11 medium containing different concentrations of NaCl (Panel A) or sorbitol (Panel B), as indicated. After incubation for 135 h at 30°C, pictures of the plates were taken. Similarly, these mutants grown on BG-11 medium were serially diluted with fresh BG-11 medium, and then spread on plates containing different concentrations of NaCl (Panel A) or sorbitol (Panel B). After incubation for 135 h at 30°C, the number of colonies was determined and expressed relative to the colony number on control plates supplemented with neither NaCl nor sorbitol.



**Fig.25** An insertional inactivation mutant of the *pacS* gene exhibits copper and silver hypersensitivity as to growth.

A. A schematic representation of an insertional inactivation mutant of the *pacS* gene (Kanamaru *et al.*, 1993). The resultant deletion mutant was designated as DEL-S, in which the *pacS* gene was replaced by a kanamycin-resistance gene (*km<sup>r</sup>*) on the chromosome. Plasmid pCOM-S carries a *Synechococcus* DNA segment encompassing the entire *pacS* gene, as schematically indicated.

B. A set of appropriate strains, indicated by the illustration at the right-hand side, was streaked on solid BG11 medium containing additional copper (5  $\mu$ M) or silver (25  $\mu$ M), as indicated. The plates were incubated at 32°C for 96 h.



**Fig.26** Growth curves of the *pacS* deletion mutant in a liquid medium containing excess copper. The following strains, wild-type (A), DEL-S (B) and DEL-S harbouring plasmid pCOM-S (C), were grown in standard BG11 medium (●) or the same medium supplemented with  $\text{CuSO}_4$  ( $\Delta$ , 2  $\mu\text{M}$ ;  $\square$ , 5  $\mu\text{M}$ ) (see also Fig. 6). The growth curves were monitored as absorbance at 730 nm.

#### 第四節 *pacS*の転写制御

##### 3-4-1 *pacS* mRNAは銅、銀の培地への添加で速やかに増加した

P型ATPaseのいくつかは、浸透圧ショック、塩ストレス、重金属の存在などで転写誘導されることが知られている。しかも*PacS*には、N末端に重金属結合モチーフが見いだされること (Fig. 22)、培地への銅、銀の添加で*pacS*欠失株の生育が阻害されること (Fig. 25 and 26) から*pacS*が銅や銀によって特異的に転写誘導されている可能性が充分考えられた。そこで、この予想を確かめるため、対数増殖期中期の野生株を、生育限界濃度の様々な重金属 ( $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ ) を含むBG11培地に移して30分間培養し、細胞からRNA画分を分離抽出、プローブに5'末端を $^{32}\text{P}$ 標識した*pacS*の翻訳開始コドン周辺の塩基配列に相補的な21merのオリゴヌクレオチドを用いてサザンプロットングを行った (Fig. 27)。通常のBG11で培養した細胞のRNAからは有意な量の*pacS* mRNAが検出されなかったのに対して (lane 1)、 $\text{CuSO}_4$ や $\text{AgNO}_3$ を添加した場合にはプローブとハイブリダイズするバンドが予想通り検出された (lanes 2 and 3)。このバンドの推定長は約2.4kbで*pacS*遺伝子全体 (2.24kb) を充分カバーしている。実験で使用した他の重金属については、いずれも*pacS* mRNA (2.4kb) の顕著な増加は認められなかった (lanes 4~12)。ただし、2.4kbより短い約1.5kbのバンドが $\text{CuSO}_4$ や $\text{AgNO}_3$ を添加した場合だけでなく $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ や $\text{ZnCl}_2$ を添加した際にも弱いながら観察された。これが有意な現象なのか、*pacS* mRNAの分解産物なのかどうかについては不明だが、少なくとも3-3-2で述べたとおり、DEL-Sを使った生育実験から $\text{Hg}^{2+}$ や $\text{Zn}^{2+}$ に対する感受性の変化は観察されていない。

そこで次に銅と銀による*pacS* mRNAの誘導に関して、そのカイネティクスを調べた (Fig. 28)。対数増殖期中期の野生株のBG11培養液に終濃度 $5\mu\text{M}$ および $40\mu\text{M}$ になるよう $\text{CuSO}_4$ と $\text{AgNO}_3$ をそれぞれ加え、経時毎にサンプリング、RNAを抽出してサザンプロットングを行い、オートラジオグラムで得られたバンドをデンストメーターで数値化した。過剰の $\text{CuSO}_4$ を添加した場合、20倍以上の*pacS* mRNAの蓄積が1時間以内に起こっており、さらに4時間後でも依然高いレベルのmRNAが維持されていた (panel A)。 $\text{AgNO}_3$ の場合もわずか30分で30倍以上の*pacS* mRNAの増加が認められたが、1時間から2時間経過する間に急速にmRNA量が減少した (panel B)。しかし、こ

これはAg<sup>+</sup>による*pacS* mRNAの蓄積が一時的なものであるというより、エアレーションによって銀が可溶性から不溶性物質となり培地中のAg<sup>+</sup>イオン濃度が低下することに起因すると考えられ、事実、培養液がこの間急速に黒く濁ってくるのが観察されている。

もう一つの疑問として、重金属の枯渇による*pacS* mRNAの増加が起こるのかどうか挙げられる。そこで、本来BG11に加える全ての重金属を除いたBG11培地をMilli-Q水を使って調製した。この方法で、少なくともCu<sup>2+</sup>イオン濃度は0.01 μM以下にまで低下した。対数増殖期中期の細胞を集菌し、2回このmetal-depleted BG11で洗浄したのち、50時間培養しながらサンプリングを行った。しかし、*pacS* mRNAの増加は、黄変がすでに始まった50時間経過後でも全く認められなかった (Fig. 28 panel C)。

また、3-3-1で述べたように、DEL-Sでは塩耐性、浸透圧耐性の低下が観察されていたので、NaClまたはsorbitolが*pacS* mRNAの蓄積を誘発するかどうかをサザンブロッティングで確認したが、全く転写誘導は見られず、*pacS*依存的な塩耐性や浸透圧耐性機構には少なくとも転写レベルでの制御機構が存在しないことが示唆された (data not shown)。

以上の結果を総合すると、*pacS*は細胞にとって過剰な銅と銀 (実体はそのイオン) の存在に対して特異的に転写レベルで誘導されることが明らかとなった。

#### 3-4-2 *pacS*の転写開始点は翻訳開始コドンの33bp上流にあった

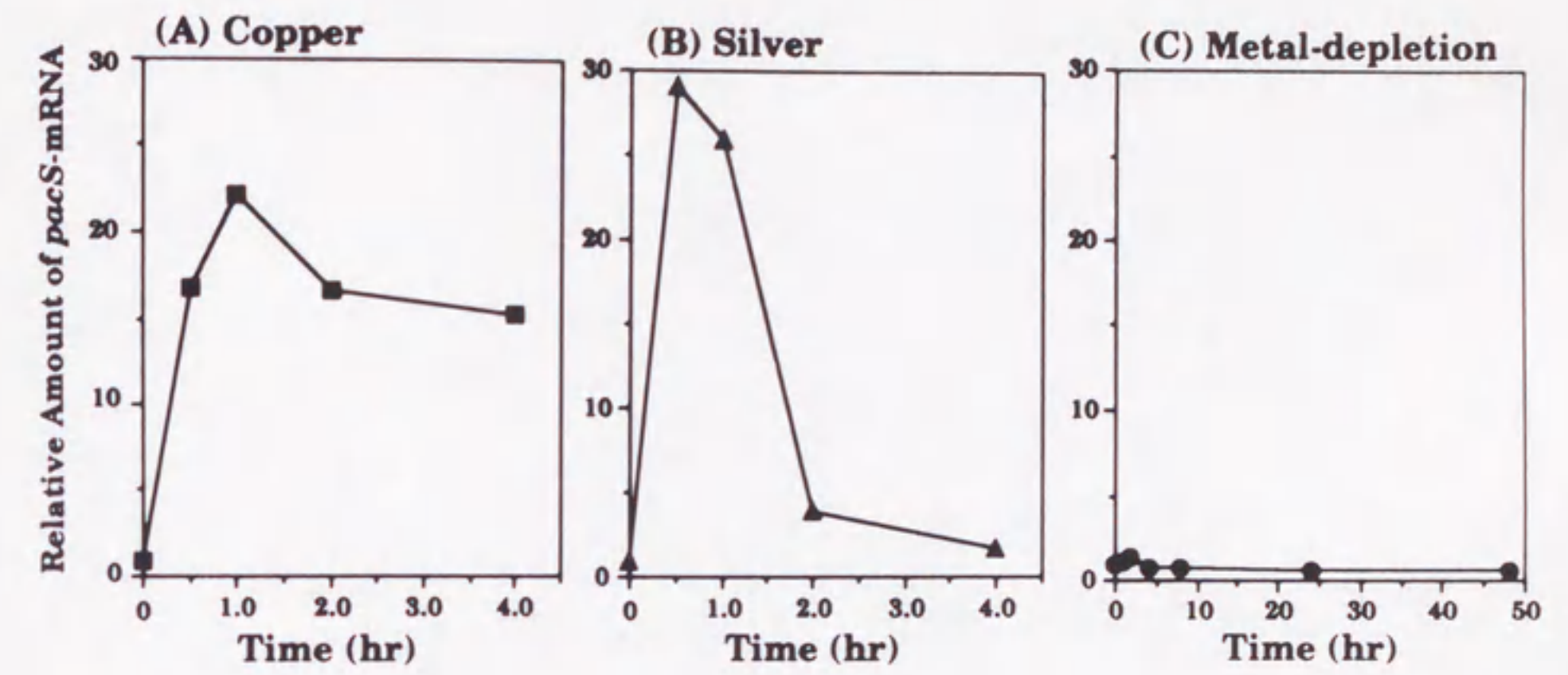
*pacS*の転写制御の分子機構を探る上で、その転写開始点を決定することは重要なことである。そこで、通常のBG11、CuSO<sub>4</sub>またはAgNO<sub>3</sub>存在下で*pacS* mRNAを蓄積させた野生株の培養液からRNAを抽出し、ノーザン解析と同じ<sup>32</sup>P標識した21merのオリゴヌクレオチドを使ってプライマーエクステンションを行い、シーケンスゲルで解析した。その結果、*pacS*の翻訳開始コドンのAから33bp上流のGの位置にCuSO<sub>4</sub>、AgNO<sub>3</sub>添加時にのみ特異的に現れるバンドが検出できた。さらに上流250bpの範囲で他にバンドは認められなかった (Fig. 29 and data not shown)。

したがって、*pacS*はこの位置からCu<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>特異的に転写が開始されていると結論した。

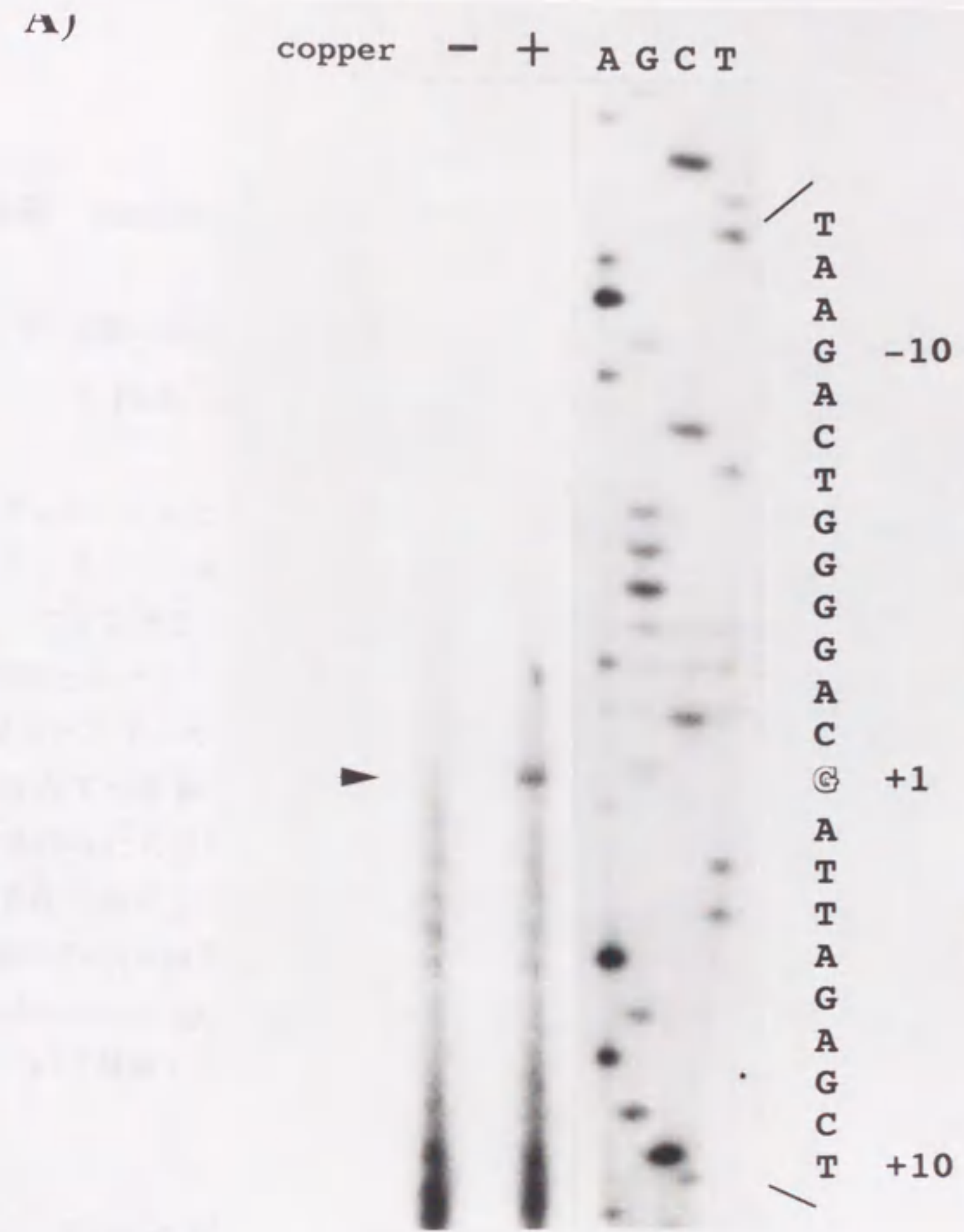




**Fig.27** Induction of *pacS* mRNA by metals in the growth medium. A series of Northern hybridization analyses was carried out with a probe specific to *pacS* mRNA (see the *Experimental procedures*). A total RNA fraction was prepared from cells treated with each of the following metals for 1 h: lane 1, standard BG11 medium; lane 2, 5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>; lane 3, 40  $\mu$ M AgNO<sub>3</sub>; lane 4, 2  $\mu$ M Hg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>; lane 5, 2  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>; lane 6, 5  $\mu$ M CrCl<sub>3</sub>; lane 7, 5  $\mu$ M NiCl<sub>2</sub>; lane 8, 5  $\mu$ M PbCl<sub>2</sub>; lane 9, 0.5 mM FeCl<sub>3</sub>; lane 10, 0.5 mM MnCl<sub>2</sub>; lane 11, 30  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>; lane 12, 5  $\mu$ M Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. A set of rRNAs was used as molecular markers to estimate the apparent sizes of the hybridized bands.



**Fig.28** Time course of the appearance of *pacS* mRNA in response to metal treatment. A, B. The kinetics of the induction of *pacS* mRNA in response to copper and silver treatment ( $5 \mu\text{M CuSO}_4$ ,  $40 \mu\text{M AgNO}_3$ ), respectively. C. The kinetics of the induction of *pacS* mRNA in response to depletion of metals (iron, manganese, zinc, copper, etc.). These data are based on the results of a series of Northern hybridization analyses, followed by densitometric quantification of autoradiograms. In particular, the area corresponding to the whole smear was traced (see Fig. 2). The value was expressed as a 'relative amount', in which the basal level, determined for the untreated cells, was taken as one.



B)

-250	-240	-230	-220	-210	
<u>GGATCCAATG</u>	CGGTTGACA	AAACGAAAGA	GGCATTGACG	AGGGGCCGTC	
<i>Bam</i> HI					
-200	-190	-180	-170	-160	
GCTCAAGCGG	GCAAAGCACT	TGAGCCTTAA	CATGTGCTTG	ACTCCGATCG	
-150	-140	-130	-120	-110	
TTCTCTCTC	AGCTTGGCTA	CGTCTGGGAG	<u>CAAGCAGTAG</u>	AGCAGGTCGA	
			DEL-S		
-100	-90	-80	-70	-60	
AAGAGGCCCA	ATTGGGCTGG	GGCAGGGCGA	TCGCGCTTTT	AAGAGAAGTT	
-50	-40	-30	-20	-10	
TTGTCACTCG	<u>TCTTGACTCT</u>	GCAGTCAACT	AGAGACTTAA	<u>GACTGGGGAC</u>	
+1	+10	+20	+30	+40	+50
GATTAGAGCT	ACGTTTCGAGT	CTGGAGTCCA	GTCATGGTCA	ATCAGCAAAC	
		SD	<i>pacS</i>	M V N Q Q T	

Fig. 29 Transcription start site of *pacS*.  
 A) Decision of the transcription start point by primer extension. The sequence ladders were generated with same primers.  
 B) Nucleotide sequence of the promoter region. The sequence begins at *Bam*HI site positioned 250bp upstream from the transcription start site. Assigned -35 and -10 regions are underlined.

## 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大量発現させマウスで抗体を作成した

PacSについてタンパク質レベルでの解析を進めるためには抗体が必要不可欠だった。そこで、発現ベクターpMAL-c上で*E. coli* maltose binding protein (MBP) をコードする遺伝子*malE*の下流に*pacS*をin frameで連結し、*pacS*の9LeuからC末端までがMBPとのフュージョンタンパク質として発現するプラスミドを構築した。*malE*は*tac*プロモーターの制御下にあるので構築したプラスミドで形質転換したTB1株を1mM IPTG存在下で培養したところ、SDS-PAGE上でMBP-PacS (123kDa) の推定泳動位置にIPTG依存的に大量発現するタンパク質が現れたので、このタンパク質を精製、マウスの免疫に使用した。取得した抗PacS抗体は、ウェスタンブロッティングで確かに精製MBP-PacSを特異的に認識したので (Fig. 30 lane 1)、単細胞性ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942のCu<sup>2+</sup> (Ag<sup>+</sup>) 輸送性P型ATPase PacSの合成誘導と局在性について解析した。

### 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

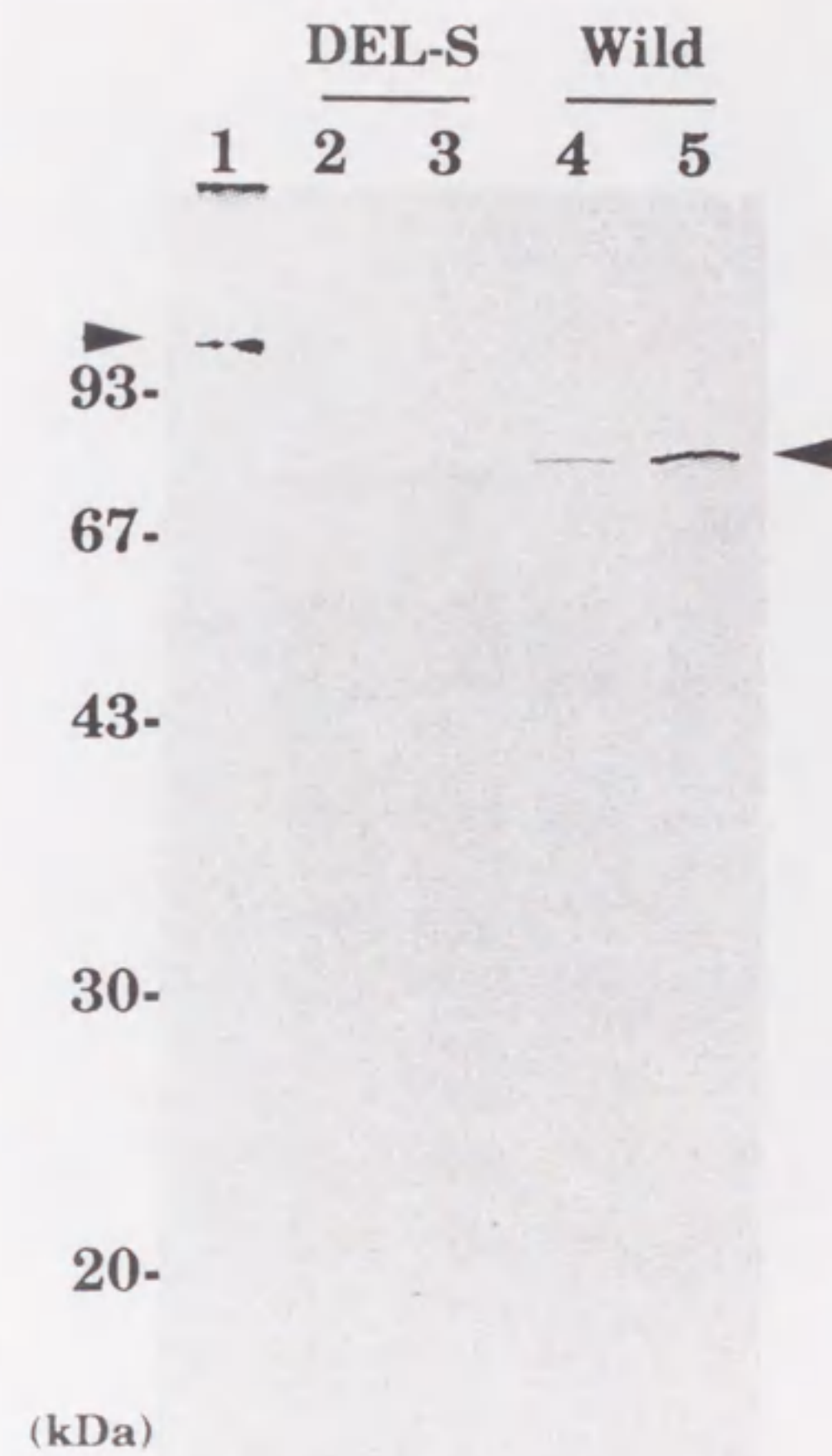
銅や銀による*pacS* mRNAの蓄積というノーザンブロッティングの結果は、そのまま細胞内におけるタンパク質レベルでのPacSの安定した存在、蓄積までを保証するものではない。この点について確かめるため、通常のBG11、10 μMのCuSO<sub>4</sub>、40 μMのAgNO<sub>3</sub>を含むBG11の3種類の液体培地で野生株とDEL-Sを1時間培養し、全細胞画分を調製した。これをSDS-PAGEで分画し、抗PacS抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った (Fig. 30)。その結果、*pacS*欠失株であるDEL-Sからは培地条件に関わらず、抗PacS抗体と親和性をもったバンドが検出されなかったのに対し (lanes 2 and 3)、期待通り野生株においては、通常の培地ではごくわずかしが存在しないが (lane 4)、生育に阻害的な濃度のCuSO<sub>4</sub>、AgNO<sub>3</sub>の存在によって顕著に増加、安定に存在し、かつPacSの推定分子量とも一致する約80kDaのバンドが検出された (lane

5 and data not shown)。

したがって、PacSはタンパク質レベルでも、銅や銀によって細胞内の蓄積量が増加することが明らかとなった。

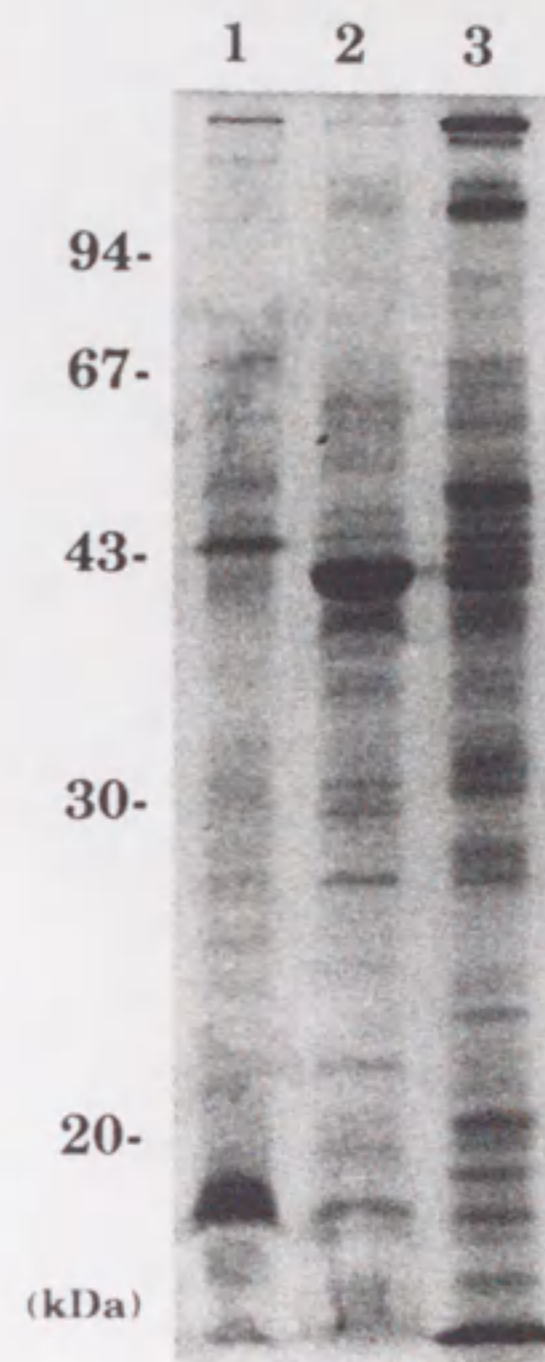
### 3-5-3 PacSは大部分が細胞膜ではなくチラコイド膜に局在した

さらに、PacSの機能についてのヒントを得るため、その局在性について解析した。ラン藻は大腸菌同様グラム陰性原核生物であると同時に、酸素発生型光合成を営む。そのために、その膜構造にはいわゆるバクテリアの細胞膜（外膜、内膜）の他に光合成タンパク質複合体が配位した細胞内膜系のチラコイド膜を保有している。そこで、小保らの方法に従い、 $10\mu\text{M}$ の $\text{CuSO}_4$ を含むBG11で1時間培養した細胞からこれら3つの膜画分を分離精製した。分離が良好であることは、① SDS-PAGE後のCBB染色で、各々の画分のタンパク質組成に明確な違いが見られたこと、② 光合成色素を含むチラコイド膜は緑色なのに比べ、チラコイド膜がコンタミしやすい内膜は橙色、および比重の最も重い外膜画分は灰色（この色自体はペプチドグリカンに由来する）を呈したこと、③  $200\sim 800\text{nm}$ の吸光スペクトルのパターンが報告されているものと一致したことから判断した (Fig. 31 panel A and data not shown)。これらの膜サンプルについて抗PacS抗体によるウェスタンブロッティングを行った結果、PacSは外界との透過障壁として機能する外膜や内膜ではなく、そのほとんど全てが光合成の場である細胞内膜系のチラコイド膜画分に存在することが判明した (panel B)。

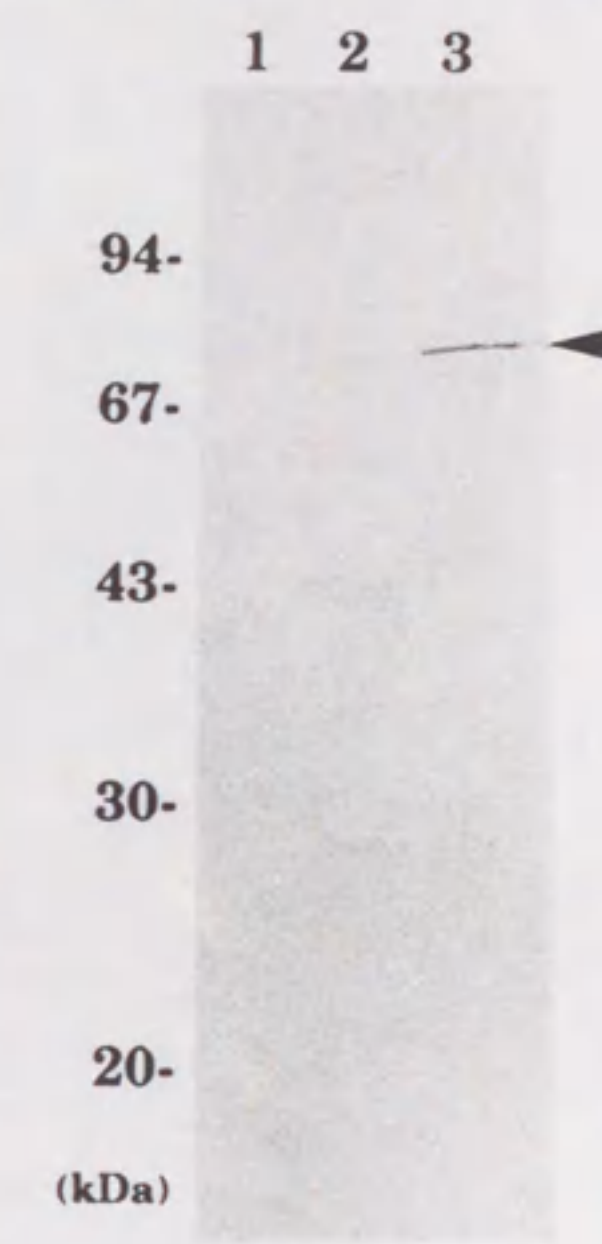


**Fig.30** Immunological detection of the PacS protein. Total cellular proteins were isolated from cells grown in BG11 medium without (lanes 2 and 4) and with added copper (10  $\mu$ M) (lanes 3 and 5). They were subjected to Western blotting analysis with an anti-PacS antiserum. The *pacS* deletion mutant (DEL-S) as well as wild-type cells were subjected to the analysis, as indicated. Lane 1 represents the purified PacS protein fused to the *E. coli* maltose-binding protein (0.1  $\mu$ g), which was used for preparation of the anti-PacS antiserum in mouse.

(A) Staining



(B) Western blotting



**Fig.31** Subcellular localization of the PacS protein. Wild-type cells were grown in BG11 medium supplemented with copper ( $10\mu\text{M}$ ). A total membrane fraction was separated further into outer membrane (lane 1), cytoplasmic membrane (lane 2), and thylakoid membrane (lane 3) fractions. These samples were analysed either by SDS-PAGE with Coomassie brilliant blue staining (A) or by Western blotting analysis with an anti-PacS antiserum (B), as indicated. Each lane contained  $40\mu\text{g}$  of protein.

## 第六節 考察

原核生物（グラム陰性細菌）でありながら、植物のように酸素発生型光合成を営む「一人で生きる葉緑体」ラン藻における環境適応機構の一端を探るために、単細胞性ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 から2つのP型ATPase遺伝子を同定し、その生理的意義と発現制御に関する解析結果について述べてきた。その要点は、

「PCC7942は少なくとも2つのP型ATPaseをもっており、PacLはこれまで原核生物では一例しか知られていなかった構造上真核生物のもの（特にCa<sup>2+</sup>-ATPase）とよく似たP型ATPaseで塩（浸透圧）ストレスに対する防御機構に関与していた。また、PacSはN末端に重金属結合モチーフをもち、塩（浸透圧）ストレス、銅（銀）ストレスに対する防御機構として生理的に機能しており、*pacS*遺伝子は銅（銀）で転写誘導され、翻訳産物は光合成の場である細胞内膜系チラコイド膜に局在した。さらに*pacS*の上流に膜チャンネルを構成するMIPファミリータンパク質SmpXがコードされていた。」

ということである。

ラン藻における、塩（浸透圧）ストレス耐性の機構に関しては、ストレスによる脱水を防ぐために細胞内に蓄積するosmoprotectantについて、広範な研究がなされている。そして、少なくとも *Synechococcus* sp. PCC6311、PCC6301、*Synechocystis* sp. PCC6714 などでは、大腸菌同様K<sup>+</sup>がそのひとつとして使われていると報告されている[115, 116, 117]。その際、K<sup>+</sup>の細胞内濃度の上昇分は最大100~200mMであり、大腸菌の場合とほぼ同じである。ただし、ラン藻におけるK<sup>+</sup>の能動的な取り込みによる蓄積は20時間から40時間という長時間をかけて進行し、大腸菌のように、塩（浸透圧）ショック後30分以内に迅速に細胞内濃度が最大に達し、その後、glycine betaineなどの蓄積（最大1M以上）に合わせて減少し、約1時間でほぼもとのレベルに戻るのとは様相を異にする。これらのラン藻ではsucroseなどの糖類の蓄積もみられるが、むしろこれらの方が、K<sup>+</sup>より先に10~20時間で最大500mM程度まで蓄積されている。いずれにせよ基本的に、大腸菌もラン藻もグラム陰性菌でありその表層構造は類似性が高いにもかかわらず、明らかにラン藻と大腸菌では適応（osmoprotectantの蓄積）までに数十倍という極端な時間差が存在する。確かに、ラン藻（PCC7942）は大腸菌とエネルギー獲得形態が異なり、増殖速度（倍化時間）も10倍程度遅いが、もし両者の膜構造が物理的に塩（浸透圧）ストレスによる塩類



の進入、脱水などについて同様の挙動を示すならば、細胞障害が現れるまでの時間に大差はないはずで（ラン藻の生命線は細胞内環境の変化に敏感なチラコイド膜での光合成系であり、むしろ大腸菌より生理的に深刻なダメージを受けるかもしれない）、適応を完了させるのに与えられた時間もこれほどの差はないはずである。したがって、この差は塩（浸透圧）ストレスによる物理的挙動が大腸菌とラン藻では異なり、ラン藻ではかなりゆっくりと細胞内環境の悪化（塩類の進入、脱水など）が進行するためと考えられる。ここで重要な機能を果たしている可能性があるのが、種々の糖類とuronic acidを主成分とする所謂ラン藻特有の鞘（sheath）と呼ばれる細胞表面の層状構造である。鞘はその構成成分から非常に吸水性に富む構造体と考えられ、塩（浸透圧）ストレスによる細胞膜を介した急激な物理的変化を緩和する役目を果たしうる。実際、その微細構造や構成成分が細胞の生育状態によって変化し、しばしばヘミセルロース状の多糖類を主成分とする繊維状構造を含むことが観察されており、ラン藻において鞘構造の環境ストレスに応答した分子レベルでの変化、制御系の解析は興味深いテーマのひとつかも知れない。

また、Mackayらは、細胞（株）の塩耐性と細胞内蓄積物の関係を調べているが、より強い塩耐性を獲得した細胞（株）になるにつれosmoprotectantとして sucrose、trehalose、glucose、fructoseといった単糖、二糖から glucosylglycerol を利用するようになり、さらに4M NaClにも耐えられるようなものになると大腸菌や植物でもosmoprotectantとして利用されている glycine betainを蓄積するようになることを示唆している[118]。

したがって、PCC7942において、仮に *pacS*、*pacL* が塩（浸透圧）ストレスに直接応答した適応系であったにしても、ストレス直後（～2時間）に転写誘導が観察されなかったのは当然であったかもしれない。しかし著者は、*pacS* 欠失変異株、*pacL* 欠失変異株で観察された生育阻害は、*PacS*、*PacL* が塩ストレスに対する主要な防御機構として機能しているからではなく、カチオンポンプの不在によって細胞内のイオン（カチオン）バランスを補正できないことによる生育への影響（不安定さ）が、通常の培地ではほとんど観察できないものの、塩（浸透圧）ストレスによって顕在化したためではないかと考えている。このことは、*PacL*、*PacS* ともアミノ酸一次配列上、 $K^+$  輸送系として機能している *KdpB* と特に類似性が高いわけではないこと（*KdpA*、*KdpC* と相同的なタンパク質も前後にはない）、耐性の低下が単に物理的浸透圧上昇だけを招く sorbitol より細胞内にも大量に取り込まれ、イオン環境を大きく乱す NaCl ( $Na^+$ ) でより顕著だったことからもうかがわれる。

PacLはアミノ酸配列上、*Saccharomyces cerevisiae*のCa<sup>2+</sup>-ATPaseと推定されているPMR1と最もよく似ていたが、PMR1そのものがCa<sup>2+</sup>輸送性ポンプであるかどうかははっきりしていない。これまでのところその根拠は、PMR1のアミノ酸配列比較の結果と、null alleleである*pmr1-1::LEU2*で生育におけるCa<sup>2+</sup>要求性が高まり、1 μM以下では、野生型の倍化時間2.5時間に対して5.4時間と生育が遅れたこと、その一方で、液体培地中、*pmr1-1::LEU2*は、stationary phaseでのviabilityの低下が見られ、この傾向は高濃度(20mM)のCa<sup>2+</sup>の存在下でさらに強まったこと、の3点だけであり、転写誘導やタンパク質レベルの生化学的解析はなされていない[98]。ただ、PMR1、PacLとも一次配列上は、ER、SR局在性のCa<sup>2+</sup>-ATPaseの全域と非常によく似ているのは確かであり、同じCa<sup>2+</sup>-ATPaseでも細胞膜局在性のものとは、特にC末端の、配列、構造が大きく異なっている(data not shown)。葉緑体の原型と考えられるラン藻であるが、PacLの発見が葉緑体におけるカチオン輸送機構の研究にどれほどのインパクトを与えるかは、現時点ではわからない。というのも少なくともCa<sup>2+</sup>について高等植物葉緑体は、細胞質から光合成電子伝達系による膜ポテンシャルエネルギーを利用しNAD kinase、1,6-bisphosphataseによって、光照射に依存して内部に取り込むとされており、P型ATPaseの関与は示唆されていないからである[119~122]。

一方Gambelらは、グラム陰性細菌*Flavobacterium odoratum*のP型Ca<sup>2+</sup>-ATPaseについて、詳細な酵素化学的解析を行っている[123, 124]。P型ATPase阻害剤orthovanadateに特異的に感受性のあったATP依存的カルシウム輸送を検出した彼らは、膜タンパク質を界面活性剤C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>で可溶化し、55-80%硫酸分画により、60kDaの部分精製タンパク質標品を得て、ATPによるカルシウム依存的でvanadateで阻害されるこのタンパク質のカルシウム、ATPに対するKm値の測定、リン酸化を確認している。特に興味深いのは、カルシウム依存的リン酸化の「依存性」であり、高等真核生物由来のP型Ca<sup>2+</sup>-ATPaseがカルシウムの枯渇(1 μM以下)によってリン酸化が促進されるのに対し、*Flavobacterium odoratum*のP型Ca<sup>2+</sup>-ATPaseではカルシウム濃度の上昇(10→5000 μM)によってリン酸化が促進されるという正反対の性質を示したことである。したがって、彼らの発見した原核生物のP型Ca<sup>2+</sup>-ATPaseは、高等真核生物由来のものはもちろん既知のP型ATPaseのどれより分子量が小さい上に、異なった反応サイクルで輸送を行っていることになり、遺伝子レベルでの解析結果の報告が期待される。

いずれにせよPacLが、彼らの発見した原核生物P型Ca<sup>2+</sup>-ATPaseのホモログなのかどうかの判断を含めてその機能をはっきりさせるには、やはり最終的に精製細胞膜やリボソームを用いた酵素化学的解析を行う必要がある。

PacSは機能的にも、発現制御上も銅と銀に対する特異性を示したが、生理的には銅の重要性が高い。それは、銅がいくつかのoxygenaseや電子伝達系タンパク質の微量必須因子であると同時に非常に毒性のある重金属でもあり、多くの生物が細胞内の銅濃度を厳密に調節していることが示唆されているからである。PacSが銅輸送性P型ATPaseであり、外界との透過障壁となっている細胞膜でなく、光合成の場となっている細胞内膜系チラコイド膜に局在していることから、その生理的機能について考察すると2つの可能性が挙げられる。つまり、PacSはチラコイド膜内腔へ銅を蓄積（濃縮）するシステムとして機能しているか、内腔から細胞質へ銅を排出するシステムを構成しているかのいずれかである。

チラコイド膜内腔への銅濃縮システムとして機能していると仮定した場合に注目されるのは、銅が金属結合性タンパク質の代表的微量必須因子であることである。特に、高等植物のチラコイド膜内腔には含銅光合成系タンパク質plastocyaninが存在している[125]。このタンパク質はチラコイド膜内腔側にある光合成系I (PSI) の反応中心への電子供与体として機能しており、いくつかのラン藻でも確かにこのタンパク質を利用していることが判明している[126]。ただし、これまでのところ*Synechococcus* sp. PCC7942については、遺伝学的解析と免疫学的解析の両方からplastocyaninの存在は否定されている[127,143]。そして、C-type cytochromes (C<sub>553</sub>) が電子供与体としての代替機能をもっていることが示唆されている[144]。チラコイド膜内腔でplastocyanin以外のタンパク質が銅を必要としている可能性は否定できないが、少なくともpacS欠変異株が、銅感受性を上昇させたことから、PacSがチラコイド膜内腔への銅蓄積（濃縮）システムとして機能している可能性は低いと思われる。

一方、PacSが内腔から細胞質へ銅を排出するシステムを構成しているというモデルについて、まず銅が細胞内で $\text{Cu}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{Cu}^{2+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$  の酸化反応を触媒して強力な毒性をもつhydroxy radicalsを生成させることに注目する必要がある。反応性の高いhydroxy radicalsは、脂質の過酸化、タンパク質や核酸の酸化修飾など細胞に有害な化学反応を引き起こす[128]。*Synechococcus* sp.においても他の生物同様、これらの反応性の高い酸素分子を処理するためのsuperoxide dismutaseとcatalaseをもっているが、チラコイド膜内腔の過剰な銅の触媒作用による酸化的障

害には充分対応しきれないのかも知れない[129,130]。少なくとも細胞質で合成される superoxide dismutase や catalase がチラコイド膜の内腔側で機能するためにはチラコイド膜系をタンパク質透過系を介して通過することが必要である。しかし、これは大きな律速段階となるはずで、superoxide dismutase や catalase だけで急激な内腔環境の悪化に迅速に対応するのは困難であることが想像できる。能動的に銅そのものを排出する機構の存在は充分意義があるであろう。またいくつかの光合成系タンパク質はマンガンや鉄を活性発現に必要な補因子として利用しているが、過剰な銅はこれらの補因子と置換して活性を発揮できなくすることも考えられる。

いずれにせよ、これらの知見を総合すると生理的にはチラコイド内腔の銅濃度は低く保たれている方が光合成反応や生育に有利と思われ、PacS は内腔から細胞質へ銅を排出するシステムを構成している可能性が高い。そして、細胞質側に排出された過剰の銅は後述するように metallothionein などによって無毒化されたり、未知の銅ポンプによって細胞外に排出されるのではないだろうか。

PacS のアミノ酸配列は、Odermatt らによって再報告された *Enterococcus hirae* の CopA と最も高い相同性を示し、機能的にも銅輸送に関与する点で共通性が示唆された。copA の 32bp 下流からは、copB がコードされているが、CopA と CopB はともに P 型 ATPase であるものの N 末端側 100 a. a. のアミノ酸配列が全く異なり、CopB の N 末端には "Met-X-His-X-X-Met-Ser-Gly-Met-X-His-Ser" の配列が 3 回繰り返して存在する [93]。この配列は tomato に感染する *Pseudomonas syringae* の銅耐性株由来のペリプラズム局在性銅結合タンパク質 CopA (P 型 ATPase ではない) でも認められることから、この領域が CopB における銅結合領域であることが推測されている。抗 CopB 抗体を用いたウェスタンブロット解析から CopB の合成は、生育阻害を引き起こす濃度の  $\text{Cu}^{2+}$  (2mM)、 $\text{Ag}^+$  (5 $\mu\text{M}$ )、 $\text{Cd}^{2+}$  (5 $\mu\text{M}$ ) で誘導され、生育限界濃度の  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{La}^{3+}$ 、 $\text{Au}^{3+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Bi}^{3+}$  では誘導されないことが示唆されている。さらに重金属キレーターである PT や HQ によっても CopB の強い誘導が見られ、等モルの銅の添加によって定常レベルに戻ったことから、CopB は銅の過剰と枯渇の両方に対して合成誘導されるとしている。ここで彼らは、copA-copB がオペロンを形成しており、CopA の発現も CopB と同じ制御を受けているであろうと推察している。また、高濃度 (6mM) の銅に対して copB 欠変異株と copA-copB 二重欠変異株は銅感受性を示し、野生型と copA 欠変異株は生育可能であった。しかし、copA 欠変異株は野生株では生育に影響を受けない濃度の PT (重金属キレーター) を含む培地中、2~3 世代で生育が止まることや、化学的に (生理

反応上) 銅を代替できる銀が過剰 (5  $\mu$ M) に含まれる培地では、野生株と *copB* 欠失変異株が生育できないのに対し、*copA* 欠失変異株と *copA-copB* 二重欠失変異株は耐性を獲得していた。これらの結果をもとに、彼らは CopA が重金属 (銅) の取り込み系として機能するのに対して、CopB は排出系として機能しているのではないかと考察している。しかし、これらの結論には、いくつか重大な問題点もある。まず、彼らは PacS のホモログである CopA の発現制御に関し、*copA-copB* が隣接しているからオペロンであろうと考え、両者が同様の制御を受けているとしているが、機能的に彼らの主張するとおり正反対 (取り込み系と排出系) であるならばその必然性はないはずであり、CopB の発現誘導のパターンをそのまま CopA にあてはめるのは整合性に乏しい。また、この機能的分担を示唆するのに、彼らは PT、HQ の影響を重要な根拠としているが、その重金属特異性はかなり広範であり、銅添加でその影響が解消されたという点も本当に銅のキレートが原因であったことの証明にはならない。少なくとも 1 分子の銅イオンは 2 ないし 3 分子の PT と反応して 1 つの錯体を形成するのであり、「等モル」の銅を加える方法では何を観察しているのかわからず、少なくとも彼らの考えるような PT と反応した分の銅を過不足無く補うための処理にはなっていない。掲載のデータを見ても、ウェスタンブロッティングに用いた SDS-PAGE のサンプル (タンパク質量) にばらつきがあるようであり、それを補正すると、PT に銅を等モル添加しても、高い水準の CopB 発現量が依然維持されていると著者には解釈される。実際著者らも、PacS に関して PT、HQ の影響を様々な条件で解析したが、生育上 *pacS* の欠失で PT、HQ 耐性が低下したり、転写が PT、HQ によって誘導されるといった現象は観察されなかった。さらに、過剰量の銅と生理上銅を置換できる銀に対して、*copA-copB* 二重欠失変異株が全く逆の生理特性を獲得している (銅に感受的、銀に耐性) ことには何ら考察を加えていない。ただここで、強調すべきことは、CopA、CopB が明らかに外界との透過障壁である細胞膜に局在するのに対して、PacS は細胞内膜系のチラコイド膜に局在する点で生理的機能、意義に違いがあることは充分考えられることである。

CopA、CopB に関して以上の疑問点を指摘した上で興味を持たれるのは、本論分の校正中に、*Synechococcus* sp. PCC7942 の P 型  $\text{Cu}^{2+}$ -ATPase として Phung らから論文発表された CtaA (SynA) である。ctaA は ATP synthase の  $\epsilon$  サブユニット遺伝子 *atpE* の下流逆向きにコードされているが、*pacS* の上流 2.4 kb、下流 470 bp に *synA* を含む 4.4 kb と重複する領域はなく、少なくとも *pacS* と *synA* は DNA 配列上、異なる locus に位置している。しかし、アミノ酸配列が PacS と SynA では 37% の一致が見られ、N 末端に

はやはり重金属結合モチーフがあることから、機能的に類似、もしくは相補的な関係にあると予想される。類似機能を持つ場合、その重金属特異性の違いが考えられる。PacSは銅（銀）で特異的に誘導され、その毒性から細胞（特に光合成系）を防御していることが示唆されるが、その他の有害な重金属（亜鉛、カドミウム、クロム、鉛など）に対しては生理的にも、発現誘導の上でも無効である。一方、PacSと相補的な機能をもつと考えると、細胞内での銅代謝においてチラコイド膜局在性のPacSは銅の毒性から光合成系を防御する上では有効であるが、細胞内に侵入した銅を細胞外に排出して細胞内銅濃度そのものを下げる機能はないと思われる。したがって、CtaAは細胞膜上に局在し、細胞外への銅排出ポンプとして機能している可能性がある。もしそうならば、発現制御そのものはPacSと同様のパターンを示すことが予想され、共通の転写調節因子の制御下にある可能性もある。この興味深い点に関してしかし彼らの論文は、既知のP型ATPaseとのアミノ酸配列の比較や系統樹における位置づけの主張の他には、唯一、欠変異株が銅耐性を獲得したというデータのみを発表したpreliminaryなものであった。ただ、その唯一のデータを信頼するならば、先述の2つの可能性に対してはどちらにも否定的で、むしろ、CtaAもまたチラコイド膜に局在して、チラコイド内腔への銅取り込み系として機能しているとの説明が合理的である。もっともPhungら自身は、著者らの報文の掲載以前に執筆したらしく、CtaAは細胞質膜でCopAのように銅取り込み系として機能していると推察している（その根拠に問題点が多いのは先述のとおりである）。しかし、CtaAが彼らの推察どおり細胞質に局在しているならば、それはそれで非常に教務深い問題を投げかけてくれるであろう。すなわち構造のよく似たPacSとSynAがどのようにして、チラコイド膜と細胞膜に分配されるのか、その特異性を決めているPacSやCtaA自身のアミノ酸配列や決定因子（細胞内タンパク質輸送系、膜内在性タンパク質、膜脂質組成の違いなど？）が何かという点である。ただし少なくとも、PacS、CtaAの配列を見る限り、どちらも大腸菌外膜タンパク質などに見られるようなシグナル配列はないようである。

ともあれ、PacS、CtaAとCopA、CopBの機能や発現制御について比較するには、CtaA、CopA、CopBそれぞれについて少なくとも著者がおこなった程度の生理学的解析と転写、翻訳制御の解析がなされた上でなくては推論の域を出ないであろう。

原核生物における銅耐性機構についてはいくつかの菌について解析が進行中である。まず、先述した*Pseudomonas syringae*の銅耐性株由来のペリプラズム局在性

銅結合タンパク質CopAは二成分制御系に属する *copRS* の制御下、 $10\sim 100\mu\text{M}$  の  $\text{CuSO}_4$  で転写誘導され、タンパク質レベルでも合成誘導が確認されている [131, 132, 133]。 *copA* (*copABCD* オペロン) のプロモーターのすぐ上流には二成分制御系 PhoR-PhoB の転写制御下にある大腸菌リン酸欠乏に応答した *pho* レギュロンで見られる PhoB 結合領域のコンセンサス *pho* box [169] に似た配列 (*cop* box) があり crude cell extract を使った DNase I フットプリントでこの領域がプロテクトされることも示唆されている。

大腸菌においても銅耐性変異株や銅感受性変異株の遺伝学的解析から、銅の取り込みや輸送に関与する *cutA* から *cutF* (*copper uptake and transport*) まで locus の異なる遺伝子が同定され、制御因子として *cutR* の存在が示唆されている。しかし、それらの詳しい機能や生化学的解析についてはまだ報告がない。また大腸菌に銅耐性を付加するプラスミドからは *pcoABCDRS* が同定され、*copABCD* と *pcoABCD* の類似性や、*pcoRS* も二成分制御系に属するらしいことまでは示唆されている。しかし、これらの遺伝子産物から P 型 ATPase はこれまでのところ見つかっておらず、大腸菌に *pacS* のホモログが存在するかどうかは不明である。

また、生物界で広く重金属耐性機構に組み込まれているのが、構造上もよく保存されている Cys リッチな低分子量タンパク質 metallothionein である [135, 136]。 *Saccharomyces cerevisiae* や *Candida glabrata* といった酵母の metallothionein (MT) は高濃度の銅の毒性から細胞を防御する機能と、銅濃度が低いときに自身の転写を抑制するフィードバック機能を持っており (直接的、間接的のどちらで機能しているかは不明)、Cys リッチな銅結合領域をもった転写因子 ACE1 (*S. cerevisiae*) や AMT1 (*C. glabrata*) によって活性化される [137]。さらに、ACE1 や AMT1 と相同性の高い銅結合領域、DNA 結合領域を有し、重金属耐性だけでなく、高温耐性や過酸化水素耐性にも関与する転写因子 MAC1 も *Saccharomyces cerevisiae* から同定されている [138]。

一方 *Synechococcus* sp. PCC7942 から最近、metallothionein 遺伝子 *smtA* が同定された [136]。 *smtA* の転写は生育限界濃度の重金属に対し、 $\text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} / \text{Cd}^{2+} > \text{Co}^{2+} / \text{Ni}^{2+} / \text{Hg}^{2+} / \text{Cr}^{3+}$  の順で強く活性化されるが、 $\text{Cd}^{2+}$  処理の有無で *smtA* mRNA の安定性に差はなく、これらの金属添加によって転写量そのものの増加が起こっていることが示唆されている。先述のとおり、おそらく細胞質内の過剰な銅は SmtA によって捕捉されていると考えられる。

重金属防御系遺伝子群の転写活性化の分子機構に関しては、MerR について興味

深い報告がO' Halloranのグループから出ている[139, 140]。Tn501にコードされたMerRは水銀耐性遺伝子群 (*mer* オペロン) の転写活性化因子として機能するが、*mer* オペロンの-10、-35領域はスパーサー領域が本来の17±1bpより長い19bpであるためその状態では不活性である。この-10、-35領域間の2つの対照的な6bpの配列 (TCCGTAC) を認識して結合しているMerRは直接Hg<sup>2+</sup>と結合すると-10、-35領域間を33度湾曲させて三次元的に近づけるというユニークな機構で転写を活性化しているというのである。

*pacS*の転写が、*copRS*、*pcoRS*のように二成分制御系のリン酸化を介した情報伝達系で活性化されているのか、ACE1、AMT1、MAC1、MerRといった直接重金属と結合する転写因子によってなのか、あるいは全く新しい機構によるのかは今後の解析を待たねばならない。そもそもラン藻の転写装置やプロモーター構造に関する基本について未解明な点が多い現状で論ずることには問題があるが、大腸菌との類似性を指摘する報告もあるので[170]、若干のコメントを付記する。*pacS* mRNAの転写はATGコドンの33bp上流の"G"から始まるが、-38~33にTTGACT (大腸菌-35コンセンサス; TTGACA)、-13~7にTAAGACT (大腸菌-10コンセンサス; TATAAT)のプロモーター様配列、+23~26にGGAG (AGリッチ)のリボソーム結合部位様の塩基配列が見つかる (Fig. 29)。しかしプロモーター様配列の上流には、*pho* box、*cop* boxに類似した配列はなく、プロモーター様配列のスパーサー領域は通常より長い19bpであるが、2つの対称的配列はその間に存在しない。また、*pacS* (および*pacL*)の上流を含むクローン化した全域をのせたプラスミドで大腸菌CSR603株を形質転換してMaxi cellを使って翻訳産物の確認を試みたが、検出できなかったことから*pacS*の発現は、大腸菌の転写複合体からは読まれないか、活性化因子が必要な可能性はある (data not shown)。

以上、*Synechococcus* sp. PCC7942由来のP型ATPase、PacLとPacSの機能と発現制御について考察してきたが、ラン藻の環境適応の分子機構を研究する上で興味深い材料を得られたと考えている。さらに、PacLが既知の原核生物由来のP型ATPaseの枠を超えて真核生物由来のP型ATPaseに近いことは既に述べたが、逆にこれまで原核生物固有の構造と思われていたタイプのP型ATPaseもヒトやマウスから最近見つかった[95, 96, 141]。しかもこれらが機能的にPacSと同じ銅代謝に関与していることが示唆されており、図らずも著者らはP型ATPaseの普遍性の拡大という局面の中で本研究を進められたことになる。この点について、第四章で述べる。



## 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

遺伝子操作、PCR、シーケンシングには、TaKaRaの制限酵素、bacterial alkaline phosphatase、Taq DNA polymerase、klenow fragment、Kilo-Sequence用 Deletion Kit、BcaBEST Dideoxy Sequencing Kit、DNA Ligation Kit、USB社の Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit、GIBCO BRL社の100bp DNA ladderを用いた。

合成オリゴヌクレオチドは、名古屋大学理学部遺伝子実験施設に依頼して、

dGA (TC) AA (AG) AC (AGCT) GG (AGCT) AC (AGCT) CT (PCR用)

dG (CA) (AG) TC (AG) TT (AGCT) (AG) (TC) (AGCT) CC (AG) TC (PCR用)

dACCATGACTGGACTCCAGACT (pacS転写制御解析用)

の混合17merおよび21merを作成し、各種実験に用いた。カッコ内が混合した塩基である。

サザンブロッティング、ノーザンブロッティング、ハイブリダイゼーションにはBoehringer Mannheim社のDIG system、Amersham社のMultiprime DNA labelling system、Rapid hybridization buffer、Hybond-N+を用いた。

プライマーエクステンションには、TaKaRaのMEGALABEL、reverse transcriptase (RAV-2)を用いた。

アイソトープ標識化合物 [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP (111TBq/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ロン社の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。

ラン藻用培地には、SIGMA社のTESを用いた。

大腸菌用培地には、Difco社のTRYPTONE、YEAST EXTRACT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。

### 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

#### 【ラン藻】

- 1) *Synechococcus* sp. PCC7942 spc# (別称 *Anacystis nidulans* R2)  
#: small plasmid cured strain
- 2) DEL-L (PCC7942 *pacL::neo*)
- 3) DEL-S (PCC7942 *pacS::neo*)
- 4) DEL-SX (PCC7942 (*pacS-smpX*)::neo)
- 5) DEL-X (PCC7942 *smpX::neo*)

#### 【大腸菌K-12由来株】

- 1) JA221 (*F<sup>-</sup> lacI<sup>q</sup> lac<sup>+</sup> pro<sup>+</sup>:lpp trpE5 leuB6 lacY recA1*)
- 2) JM83 (*ara Δ (lac-proAB) rpsL φ80 lacZ ΔM15*)
- 3) TB1 (*ara Δ (lac-proAB) rpsL φ80 lacZ ΔM15 hsdR*)
- 4) Ymel (*F<sup>+</sup>:mel-1 supF58*)

#### 【プラスミド】

- 1) pCOM-L; pPAC-Lの*pacL*を含むEcoRI-XbaI消化断片5.1kbとシャトルベクターpSEA108のEcoRI-XbaI消化断片約10kbを連結した*pacL*相補実験用プラスミド。
- 2) pCOM-S; pPAC-Sの*pacS*を含むPvuII消化断片3.2kbとシャトルベクターpSEA108のSmaI消化、BAP処理断片約11kbを連結した*pacS*相補実験用プラスミド。
- 3) pCOM-SX; pPAC-Sの*pacS-smpX*を含むEcoRI-BglIII消化断片4.7kbとシャトルベクターpSEA108のEcoRI-BamHI消化断片約10kbを連結した*pacS-smpX*相補実験用プラスミド。
- 4) pCOM-X; pPAC-Sの*smpX*を含むScaI-BglIII消化断片3.1kbとシャトルベクターpSEA108のSmaI-BamHI消化断片約11kbを連結した*smpX*相補実験用プラスミド。
- 5) pDEL-L(=pKPL70); pSEQ-LFのDeletion SeriesのひとつpSEQ-SF15のEcoRI-PstI

消化断片1.9kb、pSEQ-LRのdeletion seriesのひとつpSEQ-LR15のEcoRI-HindIII消化断片1.0kb、pUC19のHindIII-PstI消化断片2.7kb、pSI029のneoを含むEcoRI断片1.4kbを連結したDEL-L (PCC7942 *pacL::neo*) 構築用プラスミド。相同的組み換えの際には、HindIII-BamHI消化断片4.3kbを用いた。

6) pDEL-S(=pKPS71) ; pSEQ-SFのdeletion seriesのひとつpSEQ-SF14のEcoRI-SphI消化断片2.3kb、pSEQ-SRのdeletion seriesのひとつpSEQ-SR19のEcoRI-HindIII消化断片0.9kb、pUC19のHindIII-SphI消化断片2.7kb、pSI029のneoを含むEcoRI断片1.4kbを連結したDEL-S (PCC7942 *pacS::neo*) 構築用プラスミド。相同的組み換えの際には、VspI消化断片3.6kbを用いた。

7) pDEL-SX(=pKWD58) ; pDEL-SのSmaI消化断片とpDEL-XのSmaI消化断片を連結したDEL-SX (PCC7942 (*pacS-smpX::neo*) 構築用プラスミド (5.8kb) )。相同的組み換えの際には、XbaI-HindIII消化断片3.1kbを用いた。

8) pDEL-X(=pKSX65) ; pSEQ-SFのdeletion seriesのひとつpSEQ-SF17のEcoRI-SphI消化断片0.9kb、pSEQ-SRのdeletion seriesのひとつpSEQ-SR4のEcoRI-HindIII消化断片1.4kb、pUC19のHindIII-SphI消化断片2.7kb、pSI029のneoを含むEcoRI断片1.4kbを連結したDEL-X (PCC7942 *smpX::neo*) 構築用プラスミド。相同的組み換えの際には、XbaI-HindIII消化断片3.8kbを用いた。

9) pMAL-c ; Ampicillin耐性遺伝子をマーカーに、*lacI-tac*プロモーター-malE( $\Delta 2-26$ )-polylinker (factor Xaの切断部位IEGR↓を含む) -*lacZ $\alpha$ -rrnB* terminatorの構造からなる6145bpの大腸菌pUC系ハイコピープラスミドで、目的のタンパク質をMalEとのフュージョンタンパク質として大量合成できる。Biolab社から市販。

10) pMAL-S(=pMES9L) ; pSEQ-SRのdeletion seriesの一つpSEQ-SR8をベクター由来のSacIとクローン中のPvuII部位で切断して得たDNA断片2.5kbとpMAL-cのSacI-StuI消化断片6.1kbを連結したMalE-PacS( $\Delta 1\text{Met}-8\text{Thr}$ )フュージョンタンパク質の精製用プラスミド。

11) pPAC-L(=pKDP7-3) ;  $\lambda$  DASHライブラリーから得たprobe-Lとハイブリダイズする4.7kbのEcoRI消化断片をpUC19のEcoRI部位に挿入した*pacL*クローン化プラスミド。

12) pPAC-S(=pKDP11-7) ;  $\lambda$  DASHライブラリーから得たprobe-Sとハイブリダイズする7kbのEcoRI消化断片をpUC19のEcoRI部位に挿入した*pacS-smpX*クローン化プラスミド。

13) pSEA108 ; pUC303 *SalI-XbaI*消化断片約8.3kbとpUC19 *SalI-XbaI*消化断片2.7kbを連結したstreptomycin、ampicillin耐性遺伝子をマーカーにもった大腸菌とPCC7942のシャトルベクター。

14) pSEQ-LEB(=pKDP7-06) ; pPAC-Lにクローン化した*EcoRI*断片をさらに*BamHI*消化で二分し、それぞれklenow fragmentによる末端平滑化処理したうちの0.6kb断片をpUC119の*HincII*部位に挿入した*pacL*上流領域の塩基配列決定用プラスミド。

15) pSEQ-LF(=pKDP7-41FW) ; pPAC-Lにクローン化した*EcoRI*断片をさらに*BamHI*消化で二分し、各々klenow fragmentによる末端平滑化処理したうちの4.1kb断片をpUC119の*HincII*部位に*pacL*がベクターの*lacZ $\alpha$* と逆方向になるよう挿入した*pacL*塩基配列決定用プラスミド。

16) pSEQ-LR(=pKDP7-41RV) ; pPAC-Lにクローン化した*EcoRI*断片をさらに*BamHI*消化で二分し、各々klenow fragmentによる末端平滑化処理したうちの4.1kb断片をpUC119の*HincII*部位に*pacL*がベクターの*lacZ $\alpha$* と順方向になるよう挿入した*pacL*塩基配列決定用プラスミド。

17) pSEQ-SF(=pKDP11-50FW) ; pPAC-Sにクローン化した*EcoRI*断片をさらに*BgIII*消化して得た5.1kb断片をklenow fragmentによる末端平滑化処理したのち、pUC119の*HincII*部位に*pacS*がベクターの*lacZ $\alpha$* と順方向になるよう挿入した*pacS-smpX*塩基配列決定用プラスミド。

18) pSEQ-SR(=pKDP11-50RV) ; pPAC-Sにクローン化した*EcoRI*断片をさらに*BgIII*消化して得た5.1kb断片をklenow fragmentによる末端平滑化処理したのち、pUC119の*HincII*部位に*pacS*がベクターの*lacZ $\alpha$* と逆方向になるよう挿入した*pacS-smpX*塩基配列決定用プラスミド。

19) pSI029 ; kanamycin、ampicillin耐性遺伝子をマーカーにもった5.3kbからなる複製開始点温度感受性の大腸菌ローコピープラスミド。

20) pUC303 ; chloramphenicol、streptomycin耐性遺伝子をマーカーにもった11kbからなる大腸菌とPCC7942のシャトルベクター[74]。

#### 【ラン藻用培地BG11】

1) Stock solution I ;

Citrate 3g、Ferric(III) citrate 3.67g、EDTA 0.5g、NaOHでpH8に調整

/ ℓ

2) Stock solution II ;

$\text{NaNO}_3$  30g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.78g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5g /  $\ell$

3) Stock solution III ;

$\text{CaCl}_2$  110.99g /  $\ell$

4) Stock solution IV ;

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  20g /  $\ell$

5) Stock solution B ;

TES 229.2g、NaOHまたはKOHでpH8に調整 /  $\ell$

0.22  $\mu\text{m}$  フィルターで濾過滅菌。

6) Stock solution A6 ;

$\text{H}_3\text{BO}_3$  5.72g、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  3.62g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  444mg、 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  780mg、

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  158mg、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  98.8mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  80.8mg /  $\ell$

時間が経つに連れて析出物が増加するので、1~2カ月ごとに再調製。

7) Stock solution V ;

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  24.82g / 100m $\ell$

0.22  $\mu\text{m}$  フィルターで濾過滅菌。4°C保存。

Stock solutionは全てMilli-Q水で調製し、Vを除き常温保存。

8) 混合

Milli-Q水 400m $\ell$ 、Stock solution I 2m $\ell$ 、Stock solution II 50m $\ell$ 、Stock solution III 250 $\mu\ell$ 、Stock solution IV 1m $\ell$ 、Stock solution B 20m $\ell$ 、Stock solution A6 500 $\mu\ell$

液体培地の場合は、上記を攪拌しながら順に加え、Milli-Q水で1 $\ell$ にメスアップしてオートクレーブ (121°C20分間)。

プレートにする場合は、上記を攪拌しながら順に加え、Milli-Q水で500m $\ell$ に

メスアップし、500mℓの2.8%寒天と別々にオートクレーブ後に混合、さらに1mℓのStock solution Vを加えてプレートにまいた。

NaCl、KCl、sorbitolを加えた培地を作成する際は、液体の場合は溶質を加えてメスアップしオートクレーブにかけ、プレートの場合は2.8%寒天液の側に加えてオートクレーブにかけた。その他の、微量金属、CaCl<sub>2</sub>、PT、HQを加える場合は、予めフィルター濾過した10mMから4MのStock solutionを用意しておき、オートクレーブ後の培地に添加した。

### 【ラン藻の培養・保存条件】

#### 1) 液体培養；

50mℓ試験管、500mℓまたは1ℓ用ラン藻培養管にそれぞれ40mℓ、500～800mℓ、1～1.3ℓのBG11と菌体をいれ、綿濾管を通したシリコ栓で封じ、32℃の恒温室でエアポンプで5%硫酸銅溶液を通して高湿度、滅菌状態の空気を送り込みながら、終日2～4000luxの光をあてて培養した。この条件で、対数増殖期の一世代時間は50mℓ試験管、500mℓ用ラン藻培養管で10～12時間、1ℓ用ラン藻培養管でその1.5～2倍であった。

#### 2) プレート培養；

BG11プレートに先を丸めた白金耳の穴が完全に埋まる程度の菌体を取り、できるだけ全面に塗布して32℃の人工気象器内で終日2000～4000luxの光をあてて培養した。3～4日間の培養でほぼ全面が緑色になったが、プレート表面の乾燥、養分枯渇による死滅を抑制するため、この時点で人工気象器からプレートを取り出し、透明なビニル袋にいれ実験室（室温）に置いた。この状態で長くて約3週間生菌を確保できたがviabilityそのものはかなり落ちることが避けられない。また必要に応じてコンタミがあるかどうかを菌をL-brothプレートに移し30～37℃、暗黒下で培養する方法で確認した。

#### 3) 凍結保存；

対数増殖期後期（O. D. 730nm=1.5～2）にある40mℓの菌液を25℃、5000rpm、10分間の遠心で集菌後1～2mℓの2×BG11に懸濁し20% glycerol 1mℓを入れた滅菌バイアルに等量加え直ちにドライアイスエタノールで凍結、そのまま-80℃で凍結保存した。この方法も時間経過とともにviabilityの低下が起こり、複数のバイアルに保

存して順番に使っていく方法が比較的安全ではあったが、同法による大腸菌の半永久的保存とは性質が異なる点に留意が必要である。

### 3-7-3 ラン藻からのゲノムDNA調製

対数増殖期後期の培養液250mlから遠心で回収した菌体(約0.5g)を $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結、 $55^{\circ}\text{C}$ で融解した。これに8.5mlのBCL buffer (10mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM  $\text{MgCl}_2$ 、320mM sucrose、1% Triton X-100)を加えてよく懸濁し、さらに2mgのproteinase Kを溶解した1mlのBCL buffer、 $500\mu\text{l}$ の10% SDSを順に加え、 $55^{\circ}\text{C}$ で15分間保温した。10mlのTE飽和phenolを加えローテーターで15分間攪拌、 $25^{\circ}\text{C}$ 、8000rpm、5分間遠心して上層を回収、再度phenol抽出したのち、24:1 chloroform-isoamylalcohol抽出、ethanol沈殿を行った。真空乾燥したDNAはさらにRNase処理、phenol抽出、ethanol沈殿して $500\mu\text{l}$ のTE buffer (10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA)に溶解して凍結保存した。

### 3-7-4 MOPAC法によるPCR

10mM Tris-HCl (pH8.3)、1.5mM  $\text{MgCl}_2$ 、50mM KCl、各 $5\mu\text{M}$  合成17mer混合オリゴヌクレオチド (500pmol/反応)、 $50\mu\text{M}$  dNTPs、 $2\mu\text{g}$  ゲノムDNA、2units Taq DNA polymerase /  $100\mu\text{l}$

上記反応液を $0.65\text{ml}$  エッペンチューブにいれ、 $100\mu\text{l}$ のミネラルオイルを重層してPerkin Elmer社のThermal Cyclerで、 $94^{\circ}\text{C}$ 1分、 $60^{\circ}\text{C}$ 1~2分、 $72^{\circ}\text{C}$ 1~2分のサイクルを30回行った。水層を回収、Ether洗浄、ethanol沈殿したのち、1.2~1.5%アガロースゲルでGIBCO BRL社の100bp DNA ladderをマーカーに増幅産物の確認を行った。

### 3-7-5 サザンハイブリダイゼーション

#### 【DIG systemを用いた方法】

##### 1) プローブ用DNA断片のDIG標識;

標識には基質として0.5 $\mu$ gのPCR産物(650bp、1000bp)またはこれらをpUC19にサブクローンし適当な制限酵素で切断、エリューションしたDNA断片を使い、添付のマニュアルに従い12時間DIG標識し、ethanol沈殿後100 $\mu$ lのTEに溶解して凍結保存した。

##### 2) サザンブロッキング;

ゲノムDNA(5 $\mu$ g以上)、プラスミドを適当な制限酵素で消化後、アガロースゲル電気泳動(ethidium bromide入りMUPIDゲル 泳動距離10cm)を行い、UV照射下定規を当てて写真撮影後そのまま合計30秒間UV照射を続けた。次に、0.4N NaOHを注いだトレイにフナコシのフナバット(支持体)を浸し充分吸水させた後、濾紙をのせ、ゲルを底面が上に向くようひっくり返して置き、Hybond-N+フィルターを気泡が入らないよう注意しながら密着させ、さらに濾紙3枚、キムタオル20枚、ガラス板、重し(150g程度)をのせて、室温で2時間キャピラリーブロッキングを行った。DNAが完全にフィルターに移ったことをUV照射下で確認し、フィルターをNeutralization buffer(1.5M NaCl、500mM Tris-HCl(pH7.2)、1mM EDTA)で10分間、2回振とう洗浄し、さらに蒸留水でリンスして温風乾燥した。

##### 3) ハイブリダイゼーション;

DNAをトランスファーしたフィルターを一回り大きいビニル袋にいれ10mlのHybridization solution(5 $\times$ SSC#, 0.5%(W/V) Blocking Reagent, 0.1% sodium N-lauroyl sarcosinate, 0.02% SDS)を注いでシールし、1時間66 $^{\circ}$ Cで振とうしながらプレハイブリダイズを行ってから、Hybridization solutionを交換、94 $^{\circ}$ C3分間保温後急冷した10 $\mu$ lのDIG標識したプローブを直接フィルターにつかないよう加えて、66 $^{\circ}$ C8時間以上ハイブリダイゼーションした。

取り出したフィルターは、50~100mlのWashing solution 1(2 $\times$ SSC, 0.1% SDS)で室温、5分間、2回、プレウォームしたWashing solution 2(0.1 $\times$ SSC, 0.1% SDS)で66 $^{\circ}$ C、15分間、2回振とう洗浄して温風乾燥した。

#; 20 $\times$ SSC(3M NaCl、300mM trisodium citrate)を適宜希釈して使用。



4) 免疫学的検出；

フィルターへのDIG-AP抗体のハイブリダイズおよびアルカリフォスファターゼによる発色は添付のマニュアルに従った。

【Multiprime DNA labelling systemを用いた方法】

1) プロンプ用DNA断片の<sup>32</sup>P標識；

標識には基質として0.5 $\mu$ gのPCR産物(650bp、1000bp)またはこれらをpUC19にサブクローンし適当な制限酵素で切断、エリューションしたDNA断片を使い、添付のマニュアルに従い2時間半<sup>32</sup>P標識し、ethanol沈殿後100 $\mu$ lのTEに溶解して凍結保存した。

2) サザンブロッティング；

DIG systemの場合に準じた。

3) ハイブリダイゼーション；

DNAをトランスファーしたフィルターを一回り大きいビニル袋にいれ10mlのRapid Hybridization solutionを注いでシールし、1時間66°Cで振とうしながらプレハイブリダイズを行ってから、94°C3分間保温後急冷した10 $\mu$ lの<sup>32</sup>P標識したプローブを直接フィルターにつかないよう加えて再びシールし、66°C2時間ハイブリダイゼーションした。

取り出したフィルターは、50~100mlのWashing solution 1 (2 $\times$ SSC、0.1% SDS) で室温、10分間、2回、プレウォームしたWashing solution 2 (1 $\times$ SSC、0.1% SDS) で66°C、15分間、1回、プレウォームしたWashing solution 3 (0.7 $\times$ SSC、0.1% SDS) で66°C、15分間、2回、振とう洗浄した。

4) オートラジオグラフィーによる検出；

フィルターをピンセットでつまみあげ、ティッシュに一端を接触させて余分のWashing solution 3を吸い取ったのち、予め広げておいたサララップにしわがでないよう注意しながらのせた。水分が漏れでないようにラップで包み込み、-80°Cで4時間から一晩X線フィルムを感光させオートラジオグラムを得た。

### 3-7-6 ブラークハイブリダイゼーション

#### 1) スクリーニング用プレートの作成:

ADS200以上に培養した10mℓのYmelを集菌して2mlの10mM  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ に懸濁した。懸濁菌液150 $\mu$ ℓにPCC7942の $\lambda$ DASHライブラリー液をブラーク数が500前後になるように加え、37°C、10分間保温して10mℓのLB-0.7% Soft agarと混合、LB-1.4% agar plate (14×10cm ディスポーザブル角型シャーレ)に上層した。37°Cで8時間から一晩保温し、軟寒天がはがれにくくするために1時間以上冷蔵庫で冷却した。

#### 2) ブラークハイブリダイゼーション:

PCC7942の $\lambda$ DASHライブラリーを展開したディスポーザブル角型シャーレの軟寒天表面に9.7×13.7cmにカットしたHybond-N+をピンセットで正確に密着させ30～60秒ファージをトランスファーした。フィルターを軟寒天がはがれないように慎重にはがし、接触面を上にして0.4N NaOHを注いであるシャーレに5分間浸したのち、Neutralization buffer (1.5M NaCl, 500mM Tris-HCl (pH7.2), 1mM EDTA) で7分間中和して温風乾燥した。

ハイブリダイゼーションは、乾燥したフィルターを一回り大きいビニル袋にいれ、DIG標識、<sup>32</sup>P標識のプローブを使い3-7-5と同様の方法で行った。

#### 3) 検出:

使用したプローブの種類によって (DIG標識または<sup>32</sup>P標識) 3-7-5の方法に準じた方法で免疫学的検出またはオートラジオグラフィーを行ったが、結果的には<sup>32</sup>P標識のプローブを使った場合の方が、プローブとハイブリダイズしたブラークの強いシグナルとその他のブラークからのバックグラウンドのシグナルの両方が観察できてブラークの位置を特定しやすかった。

### 3-7-7 $\lambda$ DASHファージDNAの調製

強いシグナルの出たブラークを爪楊枝でつつき、Ymelを含むLB-0.7% soft agarを上層したのプレートにストリークし、37°C、9時間保温後4°Cで保存した。

この軟寒天の一部をスパーテルで削り取り、対数増殖期前期のYme1培養液5ml 2本に  
いれ、37°Cで振とう培養して菌が溶菌して濁度がプラトーになるまで5~9時間  
ファージを増殖した。200  $\mu$  l のchloroformを添加し、さらに20分間振とうして4  
°C、10000rpm、5分間遠心して上清を回収した。このうち1ml は200  $\mu$  l の  
chloroformをいれた滅菌バイアルに移して4°Cで保存し、残りのファージ液からDNA  
を抽出した。

9ml のファージ液に3M NaCl-30% PEGを加え、4°Cで30分間冷却後、10000rpm、  
15分間遠心して沈殿を800  $\mu$  l の $\lambda$  buffer (50mM Tris-HCl (pH7.5)、0.1M NaCl、  
8mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、10mg gelatin / 100ml) に溶解、4°C、12000rpm、5分間遠心  
して上清を回収、20  $\mu$  gのRNaseと20  $\mu$  gのDNase Iを加えて37°C、1時間保温した。次  
に、10  $\mu$  l の10% SDSと20  $\mu$  l の250mM EDTAを加えて65°C、15分間保温し、phenol抽  
出3回、Ether抽出2回後、等量のisopropanolを加えて-80°Cで1時間冷却、15000rpm  
、15分間遠心して沈殿を真空乾燥した。これを再びTEに溶解してethanol沈殿して乾  
燥後、200  $\mu$  l のTEに溶解して凍結保存した。

### 3-7-8 シークエンシング

#### 【Deletion Seriesの作成】

*pacL*を含むクローン化した4.7kbのEcoRI断片のシークエンスには、pSEQ-LF、  
pSEQ-LRをXbaI-KpnI消化して得た7.3kb断片からKilo-Sequence用 Deletion Kitを  
使って作成したdeletion seriesおよびpSEQ-LEBを用いて行った。

*pacS*を含むクローン化した5.1kbのEcoRI-BglIII断片のシークエンスには、  
pSEQ-SF、pSEQ-SRをXbaI-KpnI消化して得た8.2kb断片からKilo-Sequence用  
Deletion Kitを使って作成したdeletion seriesを用いて行った。

Kilo-Sequence用 Deletion Kitの使用は添付のマニュアルに従って行った。

#### 【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。

BcaBEST DNA polymerase、Sequenase Ver2.0によるシーケンシング反応は、それぞれTaKaRaのBcaBEST Dideoxy Sequencing Kit、USB社のSequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kitに添付のマニュアルに従って行った。ただし、これらKitは第二章では使用していない。詳しくは第二章「実験材料と実験方法」の項を参照のこと。

#### 【シーケンスゲル】

20×TBE 2mℓ、urea 24g、38:2 acrylamide-BIS 7.5mℓ、H<sub>2</sub>O 21.8mℓ、APS 25mg / 50mℓ

上記を溶解後、16μℓのTEMEDを加え、長さ40cmのシーケンス用ゲル板上部から流し込みシャーコームの平らな側を1cm程度差し込み固化させた。

泳動は、泳動用バッファーに0.8×TBEを使い、ゲル板にウォータージャケットをあて10分以上のプレランののち、電力一定50W、電圧限界2800Vで、XCが30cmまたは55cmの位置に達するまで行った。30cmの泳動時には、泳動開始直前に下側の泳動槽に30mℓの1M CH<sub>3</sub>COONaをよく混合しシーケンスラダーがスタックするようにした。

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、本法は第二章では利用していない。詳しくは、第二章の「実験材料と実験方法」の項を参照のこと。

#### 3-7-9 *pacS*、*pacL*、*smpX*、*pacS-smpX*欠失変異株の作成

40mℓの対数増殖期後期にあるPCC7942を25℃、5000rpm、10分間の遠心で集菌し、4mℓのBG11に懸濁した。これを1mℓずつエッペンチューブに分注し、pDEL-LのHindIII-BamHI消化断片4.3kb、pDEL-SのVspI消化断片3.6kb、pDEL-SXのXbaI-HindIII消化断片3.1kb、pDEL-XのXbaI-HindIII消化断片3.8kbを各々0.1μg程度加え、vortex mixerでよく混合した。人工気象器中で32℃、12時間以上、光照射の条件で培養したのち、200μℓずつ20μg/mℓのkanamycinを含むBG11プレートに

塗布し、人工気象器中で32°C、7日間培養した。得られたkanamycin耐性株を白金耳でかき集めて4日目ごと2回プレートに植え継いだのち、50  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$  にkanamycin濃度を上げたBG11プレート上でsingle colony isolationした。

欠失が完全であるかどうかは、得られた欠失変異株からゲノムDNAを調製、サザンハイブリダイゼーションで検出可能な感度内で相同的組み換えが済んでいないゲノムコピーがないこと、PCRでprobe-Lまたはprobe-Sが増幅しないことで確認した。

### 3-7-10 ラン藻のプラスミドによる形質転換

40m $\ell$  の対数増殖期後期にある野生株、DEL-L、DEL-S、DEL-X、DEL-SXをそれぞれ25°C、5000rpm、10分間の遠心で集菌し、各4m $\ell$  のBG11に懸濁し、1m $\ell$  ずつエッペンチューブに分注した。大腸菌から精製したpSEA108 (全株)、pCOM-L (野生株、DEL-L)、pCOM-S (野生株、DEL-S、DEL-SX)、pCOM-X (野生株、DEL-X、DEL-SX)、pDEL-SX (野生株、DEL-SX) を各々0.1  $\mu\text{g}$ 程度それぞれカッコ内の株に加え、vortex mixerでよく混合した。人工気象器中で32°C、12時間以上、光照射の条件で培養したのち、200  $\mu\ell$  ずつ15  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$  のstreptomycinを含むBG11プレートに塗布し、人工気象器中で32°C7日間培養し、得られたstreptomycin耐性株を実験に用いた。

### 3-7-11 炎光分析による培地中の銅濃度測定

BG11培地中の銅濃度は、日立のAutomatic Absorption Spectrophotometer MODEL Z6100を使い、ABSモードでマニュアルに従って市販の硫酸銅標準液でスタンダードを作成後、サンプルについて4回ずつ測定し、その平均から算出した。

### 3-7-12 ラン藻からのRNA調製

対数増殖期中期まで (O.D. 730nm < 1.0) の培養液50~100m $\ell$  を0.6容量の水を

予め入れて凍結しておいた遠心ボトルに注ぎ、激しく攪拌して急冷した後、0°C、10000rpm、5分間遠心して上清を捨て、菌体をボトル内にわずかに残ったBG11で vortex mixerを使い懸濁、エッペンチューブに移して再集菌、直ちにドライアイスエタノール中で凍結して-80°Cで保存した。

凍結した菌体を60°Cで30秒程度保温後、600 $\mu$ lのSTE buffer (50mM Tris-acetate (pH7.8)、10mM EDTA、0.5% SDS) を加えてvortex mixerでよく懸濁、600 $\mu$ lのTE飽和phenolを加えてよく混和後、60°C、10分間保温した。室温で15000rpm3分間遠心し、上層を界面、下層を吸い込まぬよう細心の注意を払いながら新しいエッペンチューブに移し、600 $\mu$ lの25:24:1 phenol-chloroform-isoamylalcoholを加えて30秒間vortex mixerで混合した。室温で15000rpm3分間遠心し、上層500 $\mu$ lを新しいエッペンチューブに移し、50 $\mu$ lの3M Na-acetate (pH5.2)、1mlのethanolを加えて、4°C、15000rpm、10分間遠心した。上清を完全に捨て(乾燥はしない)、沈殿を360 $\mu$ lの滅菌Milli-Q水に溶解後、120 $\mu$ lの10M LiClを加え、4°C、1時間冷却し、4°C、15000rpm、10分間遠心した。上清を完全に捨て、沈殿を180 $\mu$ lの滅菌Milli-Q水に溶解後、20 $\mu$ lの3M Na-acetate (pH5.2)、500 $\mu$ lのethanolを加えて、4°C、15000rpm、10分間遠心した。沈殿をethanol washし、真空乾燥、110 $\mu$ lの滅菌Milli-Q水に溶解してうち10 $\mu$ lのO.D. 260nmを測定して、40 $\mu$ g RNA/O.D.の関係式からRNA量を換算した。精製したRNAは-80°Cで凍結保存した。

### 3-7-13 ノーザンハイブリダイゼーション

#### 1) プロンプ用合成オリゴヌクレオチドの<sup>32</sup>P標識:

*pacS* mRNAの5'端側に相補的な21merの合成オリゴヌクレオチド9pmolを、T4 Polynucleotide Kinaseで5'端を<sup>32</sup>P標識し、100 $\mu$ lの滅菌Milli-Q水に溶解した。反応にはMEGALABELを用い、操作手順はそのマニュアルに従った。

#### 2) ノーザンプロットイング:

解析するRNA30 $\mu$ gを真空乾燥し、5.5 $\mu$ lの滅菌Milli-Q水、1 $\mu$ lの10 $\times$  Running buffer (0.2M MOPS (pH7.0)、80mM Na-acetate、10mM EDTA)、10 $\mu$ lのformamide、3.5 $\mu$ lのformaldehydeを加えて溶解し、65°C、10分間保温後急冷し、2 $\mu$ lの10 $\times$  Sample dye (50% glycerol、1mM EDTA 0.25%) をくわえて4°C保存、ゲ

ルにのせるサンプルとした。

Formaldehyde-Agarose gelは、72mlの滅菌Milli-Q水、10mℓの10×Running buffer、1gのagaroseを電子レンジで溶解後、18mℓのformaldehyde、2μℓの10mg/mℓ ethidium bromideをさらに加えて混合したものを型に流して作成した。

1×Running bufferを注いだMUPID泳動槽にformaldehyde-agarose gelをセットし、10.5μℓのサンプルをアプライして、電圧一定50Vで2時間半泳動した。ゲルからformaldehydeをぬきRNAのトランスファー効率を上げるため、泳動後のゲルを0.05N NaOH中で30分間穏やかに振とうした。このゲルをUV照射下で規定を当てて写真撮影し、そのまま合計30秒間UVを照射し続けた。次に、0.4N NaOHを注いだトレイにフナコシのフナバット（支持体）を浸し充分吸水させた後、濾紙をのせ、ゲルを底面が上に向くようひっくり返して置き、Hybond-N+フィルターを気泡が入らないよう注意しながら密着させ、さらに濾紙3枚、キムタオル20枚、ガラス板、重し（150g程度）をのせて、室温で3時間キャピラリーブロッティングを行った。RNAが完全にフィルターに移ったことをUV照射下で確認し、フィルターをMilli-Q水で10分間振とう洗浄し温風乾燥した。

### 3) ハイブリダイゼーション；

RNAをトランスファーしたフィルターを一回り大きいビニル袋にいれ、10mℓのRapid Hybridization Bufferを注いでシールし、50℃、1時間半プレハイブリダイゼーションを行った。MEGALABELで<sup>32</sup>P標識した合成オリゴヌクレオチド3pmol相当（30μℓ）を94℃、2分間保温後急冷して、プレハイブリダイゼーションと液交換の済んだビニル袋に添加し再シールした。50℃、6時間ハイブリダイゼーションしたのち、取り出したフィルターをプレウォームした100mℓのWashing solution（2×SSC、0.1% SDS）で50℃、10分間、2回洗浄した。

### 4) オートラジオグラフィーによる検出；

フィルターをピンセットでつまみあげ、ティッシュに一端を接触させて余分のWashing solution 3を吸い取ったのち、予め広げておいたサランラップにしわがでないよう注意しながらのせた。水分が漏れでないようラップで包み込み、-80℃で一晩X線フィルムを感光させオートラジオグラムを得た。

### 3-7-14 プライマーエクステンション

#### 1) プライマー用合成オリゴヌクレオチドの<sup>32</sup>P標識:

*pacS* mRNAの5'端側に相補的な21merの合成オリゴヌクレオチド18pmolを、T4 polynucleotide kinaseで5'端を<sup>32</sup>P標識し、80 $\mu$ lの滅菌Milli-Q水に溶解した。反応にはMEGALABELを用い、操作手順はそのマニュアルに従った。

#### 2) プライマーエクステンション:

解析するRNA80 $\mu$ gと<sup>32</sup>P標識したプライマー3.3pmol (15 $\mu$ l)を混合し、ethanol沈殿した。乾燥後の沈殿を50 $\mu$ lのAnnealing buffer (40mM PIPES (pH6.4)、1mM EDTA、400mM NaCl)に溶解し、85 $^{\circ}$ C、10分間保温後、44 $^{\circ}$ C、3時間保温し、150 $\mu$ lのethanolを加えて遠心沈降した。次に、DNA-RNA複合体、50mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、3mM DTT、0.1% Nonidet P-40、75 $\mu$ M dNTPs、18units reverse transcriptase (RAV-2) /20 $\mu$ lからなる反応液を42 $^{\circ}$ C、1時間保温後、2 $\mu$ lの250mM EDTA、25 $\mu$ lの1M NaCl、150 $\mu$ lのethanolを加えてDNA-RNA複合体を遠心沈降した。乾燥した沈殿は、2 $\mu$ lのTEと2 $\mu$ lの Stop solution (Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kitに付属)に溶解した。

#### 3) シークエンスゲルによる電気泳動:

3-7-8に記載した組成でシークエンスゲルを作成、94 $^{\circ}$ C、2分間保温後急冷したサンプルのうち2 $\mu$ lをアプライした。また同時に、同じプライマーを使ってpSEQ-SFをテンプレートにsequenaseでシークエンス反応したサンプルを泳動して、転写開始点の決定に利用した。泳動条件は、電力一定40W、電圧限界2800VでBPBがゲル下端に到達するまで泳動した。また、転写開始点がプライマーの3'端から50bp以内にある可能性を考え、下側の泳動槽に1M CH<sub>3</sub>COONaは加えなかった。

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 $^{\circ}$ C、30~60分間乾燥した。

#### 4) オートラジオグラフィーによる検出:

乾燥したゲルは、Intensifying sheetをあててオートラジオグラムを得たが、



プライマーエクステンションのシグナルがシーケンス反応のものより強かったので、X線フィルムに4時間および3日間あてて2枚のオートラジオグラムをとり、転写開始点の決定、英文論文用データの作成に使用した。

### 3-7-15 MBP-PacSの大腸菌での大量合成と精製

pMAL-Sで形質転換したTB1を一晩37°Cで50mℓのL-broth (100 μg/mℓのAmpicillinを含む) 中で培養し、450mℓの新しいL-brothに全量移して1時間半後、IPTGを終濃度1mMになるよう加え、さらに37°C、14時間培養を続けた。回収した菌体は-80°Cで凍結し、70mℓのbuffer B (50mM Tris-HCl (pH8.0)、250mM sucrose、1mM DTT) に懸濁後、Frecch Pressで638psi (High) 2回処理し、4°C、5000rpm、10分間遠心した。沈殿に5mℓのbuffer Bを加えソニケーションして懸濁させ、4°C、2000rpm、1分間遠心して上清を移し、再び4°C、5000rpm、10分間遠心した。沈殿を1mℓのbuffer Bに懸濁してエッペンチューブに移し、600 μℓの1×SM buffer (50mM Tris-HCl (pH6.8)、0.8% SDS、1% 2-MET、12% glycerol、5mg BPB / 100mℓ) を加えて1分間、2回ソニケーションした。37°Cで10分間保温後、25°C、15000rpm、5分間遠心して上清を移し1コーム、16×16cmのSDS-PAGE 2枚に300 μℓずつアプライし、電流一定25mAでBPBがゲルからぬけるまで泳動した。

ゲルをバットに移しStaining solution (50% methanol、10% acetate、0.1% CBB) で5分、Destaining solution (10% acetate、5% methanol) で30分間振とうして染色した。MBP-PacSフュージョンタンパク質のバンドを切り取り、1×Running buffer (Tris 3.03g、glycine 14.41g、SDS 1g / ℓ) を入れたVisking透析膜中で電流一定10mAの条件下14時間かけてエリューションした。回収した溶出液は再度Visking透析膜にいれ、Sephadex G-100をふりかけて1/3から1/4容積にまで濃縮し、5×SM bufferを適量加えて2回目のSDS-PAGEのサンプルとした。

再度、エリューションして回収した溶出液はPBS buffer (NaCl 8g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g、Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.15g、KCl 67mg / ℓ) に4°C、2回、計20時間透析し、Millipore社の Ultra Free C3-TKで濃縮し、抗原タンパク質としてマウスの免疫に使用した。

### 3-7-16 MBP-PacSに対するマウスポリクローナル抗体の作成

精製した50  $\mu$ gのMBP-PacSをPBS bufferで220  $\mu$ lにメスアップし、220  $\mu$ lのFCAを加え、1ml注射シリンジで出し入れしてよく混合した。これを2匹のマウス腹腔に150  $\mu$ lずつ注射した。12日後、40  $\mu$ gのMBP-PacSをPBS bufferで220  $\mu$ lにメスアップし、220  $\mu$ lのFIAを加え、2度目の注射を行った。さらに7日後、40  $\mu$ gのMBP-PacSをPBS bufferで400  $\mu$ lにメスアップし、アジュバントを加えずそのまま150  $\mu$ lずつ注射した。そして、10、12日後に約500  $\mu$ lずつ採血し、14日目に全採血した。血液は一晩4°Cにおいたのち、4°C、10000rpm、5分間、2回遠心して血清を回収、終濃度0.1%になるようNaN<sub>3</sub>を添加して-20°C保存しポリクローナル抗体として使用した。

### 3-7-17 ラン藻全細胞分の調製

50mlの野生株およびDEL-Sの対数増殖期中期 (O. D. 730nm=1) の培養液を15mlずつ3本の滅菌大試に分注し、何も加えない、および終濃度10  $\mu$ MのCuSO<sub>4</sub>、40  $\mu$ MのAgNO<sub>3</sub>を加えた条件にしてさらに1時間培養した。集菌後、それぞれを500  $\mu$ lの10mM TES-NaOH (pH7.0)に懸濁し、密閉式超音波細胞破碎装置UCD-200TM型を使い、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10回繰り返して細胞を破碎し、4°C、12000rpm、5分間遠心して未破壊の細胞を沈殿した。上清を100  $\mu$ lのStock buffer (10mM TES-NaOH (pH7.0)、0.1% SDS)に溶解し、Lowry法に従ってタンパク質量を算出した。

### 3-7-18 ラン藻膜画分の外膜、内膜、チラコイド膜への分離

1.3lの対数増殖期中期にある野生株の培養液2本に終濃度10  $\mu$ MでCuSO<sub>4</sub>を添加、3時間培養を続けて集菌し、-80°Cで凍結した。得られた1.6gの菌体を、30mlのMP buffer (10mM TES-NaOH (pH7.0)、600mM sucrose、2mM EDTA、0.03% lysozyme)に懸濁し、30°C、2時間保温し、4°C、12000rpm、10分間遠心、沈殿を30mlの

Washing buffer (10mM TES-NaOH (pH7.0)、600mM sucrose) に再懸濁、4℃、12000rpm、10分間遠心して、-80℃で凍結した。この菌体に、15mℓのWashing buffer、50μℓのDNaseI solution (1mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% DNaseI)、100μℓの3% PMSFを加えて、600psi (High) で2回French Press 処理して、4℃、15分間冷却後、4℃、6400rpm、10分間遠心して未破壊の細胞を沈殿した。上清をSeparation buffer (10mM TES-NaOH (pH8.0)、600mM sucrose) で20mℓにメスアップし、14.8mℓの90%(W/V) sucrose solution (90g sucroseを43.1mℓの24mM TES-NaOH (pH7.0)、12mM EDTA、24mM NaClに溶解) を加えて40PA遠心管に17mℓずつ注ぎ、39%、30%、10%(W/V) sucrose solutionを順に8mℓ、3mℓ、7mℓ重層した。これらをSRP28SAローターにセットし、4℃、28000rpm (=130000×g)、16時間超遠心し、外膜を沈殿画分、チラコイド膜、内膜を密度勾配の中に層として分離回収した。外膜は、10mM TES-NaOH (pH7.0)、10mM NaClで2回洗浄後、1.2mℓの10mM TES-NaOH (pH7.0)に懸濁して-80℃保存した。チラコイド膜、内膜はそれぞれ3倍容量の10mM TES-NaOH (pH7.0)、10mM NaClに懸濁し、RP65Tローターで4℃、59000rpm (300000×g)、1時間超遠心し、チラコイド膜は600μℓ、内膜は300μℓの10mM TES-NaOH (pH7.0)、10mM NaClに懸濁して-80℃保存した[142]。

各膜画分のタンパク質量はLowry法に従って算出した。

### 3-7-19 ウェスタンブロッティング

0.1μgの精製MBP-PacSタンパク質または40μgの膜画分をSDS-PAGEで分離し、MBP-PacSポリクローナル抗体を12μℓ使い、2-6-8に従ってウェスタンブロッティングを行った。

133

この論文は、1970年代後半から1980年代初頭にかけて、P型ATPaseの構造と機能に関する研究の進展を概観している。特に、P型ATPaseの構造的解析とその機能との関係が中心となっている。この論文は、P型ATPaseの構造的解析とその機能との関係が中心となっている。この論文は、P型ATPaseの構造的解析とその機能との関係が中心となっている。

この論文は、1970年代後半から1980年代初頭にかけて、P型ATPaseの構造と機能に関する研究の進展を概観している。特に、P型ATPaseの構造的解析とその機能との関係が中心となっている。この論文は、P型ATPaseの構造的解析とその機能との関係が中心となっている。

### 第四章 二成分制御系とP型ATPase研究の 新展開

この論文は、1970年代後半から1980年代初頭にかけて、P型ATPaseの構造と機能に関する研究の進展を概観している。特に、P型ATPaseの構造的解析とその機能との関係が中心となっている。この論文は、P型ATPaseの構造的解析とその機能との関係が中心となっている。

この論文は、1970年代後半から1980年代初頭にかけて、P型ATPaseの構造と機能に関する研究の進展を概観している。特に、P型ATPaseの構造的解析とその機能との関係が中心となっている。この論文は、P型ATPaseの構造的解析とその機能との関係が中心となっている。

## 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

二成分制御系 (two-component system) は、第三章で著者も実験材料として利用したラン藻を含め様々な原核生物からこれまでに数十にもものぼる環境応答系で機能していることが報告されている[145, 146]。そして、例外なくリン酸化を介した情報伝達はその本質的役割であるとされている。これほど広く原核生物から発見されるようになった二成分制御系であるが、果たして真核生物までその普遍性が拡大するのか否かが、著者らを含め多くの研究者の大きな関心事であった。

まず1991年に、Huangらが、*Saccharomyces cerevisiae*の全細胞画分中に、*in vitro*で二成分制御系のHistidine kinaseと同じ化学様式でHis残基がリン酸化する分子量32kDaのタンパク質を同定した[147]。翌年になると、Popovらが、ラット心臓のcDNAライブラリーから得られたミトコンドリアの分枝ケト酸デヒドロゲナーゼキナーゼ (branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase) のC末端側半分が二成分制御系のHistidine kinaseと相同性をもっていることを見つけたが、His残基の自己リン酸化は確認されなかった[148]。さらに、Kesslerらも紅藻類の色素体 (plastid) ゲノムからOmpRと約60%の相同性のあるタンパク質をコードする遺伝子を発見しているが、EnvZに相当するものはその下流からは見つからず、生化学的解析もなされていなかった[149]。しかし、これらの発見は、著者らに真核生物からも機能的に意味のある二成分制御系の発見に近いことを感じさせた。

そしてついに、1993年10月号の*Science*誌に、植物と酵母からそれぞれ二成分制御系のHistidine kinase遺伝子が報告された。Changらは*Arabidopsis thaliana*のエチレン応答系の初期に関わる*etr1*遺伝子をchromosome walkingにより取得した。エチレンは、果実の成熟、花の老化、器官脱離など様々な生育、分化局面で影響を与える植物ホルモンである。*etr1*変異は野生型に対して優性であり植物にエチレン非感受性を与えた。そしてこのETR1はBarA[158]、LemA、RcsCといったハイブリッドプロテイン型のHistidine kinaseであり、優性の*etr1*変異はセンサー領域と考えられるN末端側をコードするDNA配列にミスセンス変異が起こっていることが示唆されたのである[150]。またOtaとVarshavskyも、*Saccharomyces cerevisiae*からユビキチン依存性タンパク質分解系のN-end ruleが存在するとそのミスセンス変異が細胞にlethalityを与える遺伝子として*sln1*を同定し、これがやはりBarA、LemA、RcsCといったハイブリッドプロテイン型のHistidine kinaseをコードしていることを示唆した[151]。こうして、真核生物から初めてアミノ酸配列上の相同性だけでなく、細

胞内情報伝達系における具体的な関与も示唆される二成分制御系に属するタンパク質が発見されたのである。

さらに1994年3月号の*Nature*誌で前田らは、真核生物の情報伝達系における二成分制御系の具体的な関わりとその分子メカニズムについて重要な報告をした[152]。彼らはまず、Sln1タンパク質 (Sln1p) のリン酸化部位と予想される576Hisと1144AspをそれぞれGln、Asnに置換する*sln1HQ*と*sln1DN*を構築した。これらは単独では $\Delta sln1$  (*sln1::hisG*) のlethalityを相補できないが、共存させると相補でき、これらの部位でのリン酸化の重要性とリン酸基の分子間転移を示唆した。さらに彼らは、 $\Delta sln1$ を使ってextragenic suppressor変異株*ssk1*~4を取得した (suppressor of sensor kinase)。これらのうちSSK3はMAPキナーゼ (MAPK) のひとつであるHog1、SSK4はMAPキナーゼキナーゼ (MAPKK) のひとつPBS2と同一であることが判明した。Hog1タンパク質 (Hog1p) とPbs2タンパク質 (Pbs2p) は共に、*Saccharomyces cerevisiae*の浸透圧変化に対する情報伝達系に関わる遺伝子としてBrewsterらによって1993年3月号の*Science*誌に報告されていたもので、培地浸透圧の上昇によってHog1pがPBS2依存的にTyrosine残基のリン酸化を受けることが示唆されている[153]。一方、Ssk1pはC末端側に二成分制御系のreceiver領域をもつタンパク質で*ssk1*の欠失が、*sln1*の欠失によるlethalityを相補したこと、Ssk1pの機能を介してHog1pのTyrosine残基が特異的にリン酸化することが確かめられ、「浸透圧変化(?)→Sln1p→Ssk1p→Pbs2p→Hog1p→glycerol合成」という情報伝達系の概要が明らかとなり、真核生物において二成分制御系が原核生物と同様の分子メカニズムで情報伝達し、それはさらにMAPキナーゼカスケードに組み込まれているという真核生物の情報伝達系の研究における新たな領域を開拓したと言っても過言ではないだろう。

こうして、これまで原核生物でしかその重要性が示唆されていなかった二成分制御系が、真核生物においても機能していることが明らかとなりつつあるが[159]、では逆に、これまで真核生物においてその重要性が指摘されている、タンパク質のSer、Thr、Tyr残基のリン酸化、脱リン酸化を介した情報伝達系も、ある種の原核生物には存在するのではないかという期待が沸く。これもまた真であるというのが下の2例などである。

グラム陰性細菌*Myxococcus xanthus*は栄養飢餓の環境下で凝集 (aggregation) を始め、次第に子実体 (fruiting body) を形成し、その中で孢子 (myxospore) を分化させるという、独特の環境適応形態をとっている。この形態は真核生物であ

る粘菌類（変形菌類）*Dictyostelium discoideum*の場合とよく似ている。粘菌ではこの分化にSer/Thr kinaseが関与していることが知られていたが、1991年暮れに Munoz-Doradoらは*Cell*誌に*M. xanthus*からMOPAC法によりSer/Thr kinase遺伝子*pkn1*をクローン化し、Ser、Thr残基の自己リン酸化、胞子形成直前の発現誘導、欠失変異株のmyxospore産生能の低下が観察されたことを報告し、初めてある種の原核生物にも真核生物と同じSer/Thr kinaseを介した情報伝達系があることを証明した[154]。

またPottsらは1993年に、糸状性ラン藻*Nostoc commune* UTEX584から培地中のBCIPを加水分解するphosphomonoesterase活性をもつ分泌型タンパク質IphPを同定し、それが原核生物由来のalkaline phosphatase、acid phosphataseなどとは相同性がなく、真核生物由来のprotein-tyrosine phosphatase (PTPase)の活性中心と同じ”His-Cys-X-Ala-Gly-X-X-Arg”の配列をもっていることを見つけ報告した。精製タンパク質の性質を調べたところ、確かにlysozymeのリン酸化Tyr残基、cAMP依存的にリン酸化されたcaseinのSer残基を脱リン酸化したことから、IphPが原核生物では初めてのprotein-tyrosine/serine phosphataseであることが示唆された。一方、UTEX584の細胞内で約85kDaのタンパク質がphosphotyrosine抗体と反応し、このタンパク質が窒素源を枯渇させ異形細胞（ヘテロシスト）を分化させる条件下で脱リン酸化されることを示し、IphPもしくはその他のPTPaseが細胞内で機能していることを示唆した[155]。

このように、これまで細胞内情報伝達系の基本システムの種類を隔てていると思われてきた原核生物、真核生物という壁が、原核生物から真核生物へ、真核生物から原核生物へと両方向から崩され始めている。今後さらにこの壁は薄くなっていくのであろうが、第二章五節で論じたように、原核生物における二成分制御系の機構もより複雑、巧妙なものが知られるようになってきている。これまで報告されたETR1、Slnlp/Ssklpの結果だけで結論することはもちろんできないが、ETR1とSlnlpはどちらもtransmitter領域とreceiver領域を合わせ持つハイブリッド型のhistidine kinaseであったことや原核生物由来のresponse regulatorがN末端側にreceiver領域、C末端側にDNA結合能などの活性領域という構造をしているのに対して、Ssklpはreceiver領域がC末端側にあり、N末端側はregulatorファミリーのいずれの領域とも相同性がない点からも、真核生物では基本モードはそのまま使いながら、変化を取り入れていっていることがうかがわれ、改めて生命の連続性や進化といった問題について考えさせられる。

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

代謝系における銅の重要性は、第三章で述べた原核生物に限らず、ヒトを含む高等真核生物についても明らかになっており、30以上のタンパク質 (cytochrome oxidase、dopamine β-hydroxylase、lysyl oxidase、superoxide dismutase、tyrosinaseなど) が銅を活性に必要とする一方、ラジカル生成や脂質、タンパク質、核酸の直接酸化による細胞障害を引き起こす毒性も合わせ持っている。摂食によって体内に入る銅は一般的に必要量を大きく越えており、銅の吸収、細胞への輸送、タンパク質への取り込み、細胞での貯蔵と排出などいくつかの代謝メカニズムがあると考えられており、albuminが血中での銅輸送を担い、ceruloplasminが組織やタンパク質への銅供与体として、またmethallothioneinが細胞内の銅貯蔵、無毒化にそれぞれ機能している可能性が示唆されている。そして、ヒトでは銅代謝の異常が原因の遺伝疾患としてMenkes病とWilson病が知られている。

X染色体上の変異によるMenkes病は、含銅タンパク質の多くの活性が低下し、病状として、進行性の神経細胞の変性、精神的遅滞、皮膚のゆるみ、体温制御異常、結合組織異常、髪の毛のもつれや硬化、乳児段階での死亡を招く。細胞レベルでは、Menkes病患者から得た多くの培養細胞で銅が蓄積するが、肝細胞と柔突起細胞は正常という特徴的な表現型として銅輸送の異常が観察される。また、患者の体においては、腸粘膜で吸収され各組織に分配されるはずの銅が、腸粘膜、腎臓、結合組織に捕捉され、他の組織に分配されず細胞内の銅の欠乏が引き起こされていることが観察されている。

一方、常染色体 (第13染色体) 上の変異によるWilson病は、銅の毒性によるものである。これは肝臓中の銅がceruloplasminにうまく取り込まれず肝臓から胆汁を介して排出するはずの銅が排出されないことによる。その結果、銅の蓄積が、肝臓、腎臓、脳、角膜で起こり、肝硬変、進行性神経障害が幼児から青年期に現れる。

1993年1月号の*Nature Genetics*誌で3グループから独立してMenkes病の原因と思われる同一遺伝子の報告がなされた。これらのうち、全配列を明らかにしたVulpeらはMcIと名付けたこの遺伝子が1500a. a. からなるタンパク質をコードし、ホモロジーサーチの結果、これがP型ATPaseであり、しかも構造的に真核生物由来のもではなく、*Enterococcus hirae*のCu<sup>2+</sup>-ATPase CopAと最も相同性が高く、次いでCada



、FixI、KdpBといった原核生物由来のものに近いことを明らかにした[95]。特徴的なのはN末端側の600a. a. にもわたる親水性領域で、ここには23アミノ酸からなるモチーフが6回繰り返して存在する。そして、この配列の中心に第三章 (Fig. 22) で述べた、重金属結合モチーフ "Gly-Met-X-Cys-X-X-Cys" を見いだすことができる。一方、Chellyらは、Menkes病の患者16人のMcl1について調べた結果、14人でこの遺伝子のエクソンを含む領域が欠失していることを確認しており、Mcl1がMenkes病の原因遺伝子であることを強く示唆している[138]。そしてVulpeらは、Menkes病培養細胞における銅の蓄積が細胞膜ではない膜系を介した銅排出の欠陥によることから、Mcl1タンパク質は細胞内器官の膜上に局在すると推測している[95]。また10年以上も前にMenkes病患者の培養細胞は $Cd^{2+}$ や $Zn^{2+}$ には影響されないことが示唆されている[156]。

したがってMcl1タンパク質は、原核生物由来のP型ATPaseに近い構造をした真核生物で初めての例であり、N末端側の巨大な親水性領域の重金属結合モチーフで銅を特異的に結合してその排出ポンプとして機能していると考えられる。1994年4月号の*Nature Genetics*誌ではMcl1と89.9%相同なマウスのホモログが報告され、この遺伝子が広く高等生物に存在することが示唆されている[141]。ただし、彼らは続報で正常な個体と、Mcl1変異個体とでMcl1 mRNA量に違いがないことからMcl1の転写は細胞内の銅濃度の変化に依らないとも主張している[157]。

一方のWilson病であるが、先述のとおり、Menkes病が肝細胞では認められないのに対し、Wilson病は逆に肝臓が最も影響を受け、実験的に肝細胞の銅排出速度は繊維芽細胞より遅いとされている[164]。そこでVulpeらは、銅排出系には2つのシステムがあるが肝臓にはその一方しかなく、このもう一方のシステムの異常による疾患がWilson病かもしれないと考察していた。事実、Mcl1 mRNAが肝臓から検出されなかったことは、この仮説を支持していた。そして1993年12月、ついにWilson病の原因遺伝子と思われるWcl1もBullらによって報告された[96]。1411a. a. からなるWcl1タンパク質とMcl1タンパク質全体の相同性は57%、機能的保存領域では79%以上にのぼり、N末端にはやはり重金属結合モチーフを含み、Mcl1と相同的な6つの繰り返し配列（彼らはVulpeらの23a. a. より長い29a. a. についてアラインメントしている）があった。そして、Vulpeらが予測したように、Wcl1はWilson病の症状が最も強く現れる肝臓と腎臓で非常に強く発現していることが判明した。

1993年から1994年にかけて、原核生物である*Enterococcus hirae*からCopA、

CopB, *Synechococcus* sp. PCC7942からPacS, CtaA (SynA)、そしてヒト(真核生物)からもMcl, Wclと相次いで銅輸送に関与する6つのP型ATPaseが見つかった[160, 161]。これは、原核生物から真核生物まで普遍的な構造と機能を持ったP型ATPaseとして最初の例であり、Cu<sup>2+</sup>-ATPaseという新たなサブファミリーの概念をP型ATPaseにつけ加えた。しかも、その存在場所はCopA, CopBのように細胞膜であったり、PacSのようにチラコイド膜のような細胞内膜系であったり、Mclのようにほぼ全身の細胞で発現しているものもあれば、Wclのように肝臓、腎臓といった限られた器官で発現しているものもあつたりと、バラエティに富んでいる。構造上類似性が高いのは事実だが、N末端側にある重金属結合モチーフは原核生物のものは1つなのに、ヒトやマウスのものは6つももっている。この違いは、進化上どんな意味があるのだろうか。MclやWclのモチーフをひとつづつ短くしたり、逆に長くしたり、CopAやPacSのN末端側にモチーフを足していったら、銅との親和性や輸送能力に違いが出るのだろうか。このモチーフはP型ATPase以外にもMerRやMerPから見ついているが、このモチーフをもち、metallothioneinとは別の重金属捕捉機能を果たしているタンパク質群は真核生物を含めて、存在しないのだろうか。

また、臨床面で遺伝子診断や遺伝子治療が殊アメリカなどで盛んに行われるようになってきているが、全身の細胞で起こるMenkes病は無理としても、再生能の高い肝臓で症状が出るWilson病については、ウィルスベクターに正常なWcl遺伝子をのせて患者の肝細胞に導入して増殖後、体内に戻して発現させる方法で治療が可能になる日が近い将来訪れるのかもしれない。

... (faint text) ...

... (faint text) ...

### 第五章 要約

... (faint text) ...

微生物の個体レベルでの環境適応について、大腸菌外膜タンパク質OmpF、OmpCのosmoregulationにおける細胞内情報伝達と遺伝子発現制御、およびラン藻 (Synechococcus sp. PCC7942) の無機環境変化に対する遺伝子発現と生理特性の変化の2テーマを取り上げ、分子微生物学的にアプローチし、広く生物に共通した法則 (普遍性) を見いだそうとした。具体的に解析したのは、*ompF*、*ompC*の転写制御における二成分制御系因子であるEnvZ-OmpR間のリン酸転移反応とOmpRのリン酸化の意義、そしてカチオンポンプを構成するP型ATPase、Pacl、PacSの生理的役割と発現誘導、局在性についてである。その結果、以下の点が明らかとなった。

#### ① 大腸菌EnvZ、OmpRについて

*ompC*の表現型の*ompR3*変異を野生型に復帰させる*envZ30*変異は二成分制御系の保存領域近傍 (リン酸化部位からは100a. a. 以上も下流) で一アミノ酸置換 (351TyrがSer) が起こっており、*in vivo*のOmpR活性化能、*in vitro*のリン酸化能のどちらも失っていた。また二成分制御系で保存されリン酸化部位と考えられていたEnvZの243HisをArgに (EnvZ243R)、OmpRの55AspをGlnに (OmpR55Q) それぞれ置換すると、確かに*in vitro*のリン酸化能と*in vivo*の転写活性化機能の両方を失った。また、OmpR55Qは*ompF*、*ompC*とも活性化できないが、もうひとつの保存された12AspをValに (OmpR12V) に置換したものは*in vitro*でわずかしかりん酸化しなくなり、*in vivo*で浸透圧上昇に応じて、OmpFの発現が増す表現型を示した。さらに、OmpRは中央部領域の保存された105Lysの近傍でのアミノ酸置換 (102TyrがCys) によって (OmpR55Q/102C、OmpR102C)、リン酸化非依存的に特異的DNA結合能の上昇と、*ompF*、*ompC*両方に対する転写活性化能を獲得し、*in vivo*でEnvZ (リン酸化) 非依存的に正常なosmoregulationを可能にした。

したがって、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12Asp周辺もリン酸化反応に重要であること、*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

与していること、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ことが示唆された。

## ② *Synechococcus* sp. PCC7942のP型ATPaseについて

MOPAC法により、PCC7942から2つのP型ATPase、PacL、PacSを取得した。PacLはこれまで原核生物では一例（Mg<sup>2+</sup>-ATPase MgtB）しか知られていなかった構造上真核生物のもの（特にER、SR局在性Ca<sup>2+</sup>-ATPase）とよく似たP型ATPaseで塩（浸透圧）ストレスに対する防御機構に関与していた。また、PacSはN末端に重金属結合モチーフ“Gly-Met-X-Cys-X-X-Cys”をもち、塩（浸透圧）ストレス、銅（銀）ストレスに対する防御機構として生理的に機能していた。また、*pacS*遺伝子は銅（銀）イオンで転写誘導され、翻訳産物は光合成の場である細胞内膜系チラコイド膜に局在した。

したがって、PacLのように真核生物型と考えられていたP型ATPaseが原核生物にも存在すること、逆に原核生物型のPacSと高い相同性を示すP型ATPaseがヒト銅代謝遺伝疾患（Menkes病、Wilson病）の原因遺伝子として相次いで同定された（Mcl、Wcl）ことは、「P型ATPaseは原核生物と真核生物では構造が異なる」というこれまでの認識を改める必要性を強く示唆した。さらに、PacS、CtaA、CopA、CopB、Mcl、Wclの発見によってP型ATPaseにCu<sup>2+</sup>-ATPaseという新たなサブファミリーの存在が確立した。

また、*pacS*同定の過程で、さらに*pacS*の上流に膜チャンネルを構成するMIPファミリータンパク質SmpXがコードされているのが見つかった。



- [1] van Alphen, W., and Lugtenberg, B. ; *J. Bacteriol.* (1977) 131, 623-630.
- [2] Kawaji, H., Mizuno, T., and Mizushima, S. ; *J. Bacteriol.* (1979) 140, 843-847.
- [3] Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R.A., Jansonius, J.N. and Rosenbusch, J.P. ; *Nature* (1992) 358, 727-733.
- [4] Mizuno, T., and Mizushima, S. ; *Mol. Microbiol.* (1990) 4, 1077-1082.
- [5] Hall, M.N., and Silhavy, T.J. ; *Annu. Rev. Genet.* (1981) 15, 91-142.
- [6] Forst, S., Comeau, D., Norioka, S., and Inouye, M. ; *J. Biol. Chem.* (1987) 262, 16433-16438.
- [7] Jo, Y.-L., Nara, F., Ichihara, S., Mizuno, T., and Mizushima, S. ; *J. Biol. Chem.* (1986) 261, 15252-15256.
- [8] Norioka, S., Ramakrishnan, G., Ikenaka, K., and Inouye, M. ; *J. Biol. Chem.* (1986) 261, 17113-17119.
- [9] Maeda, S., Ozawa, Y., Mizuno, T., and Mizushima, S. ; *J. Mol. Biol.* (1988) 202, 433-441.
- [10] Mizuno, T., Chou, M.Y., and Inouye, M. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983) 81, 1966-1970.
- [11] Aiba, H., Matsuyama, S., Mizuno, T., and Mizushima, S. ; *J. Biochem., Tokyo* (1987) 169, 3007-3012.
- [12] Andersen, J., Forst, S.A., Zhao, K., Inouye, M., and Delihis, N. ; *J. Biol. Chem.* (1989) 264, 17961-17970.
- [13] Aiba, H., Mizuno, T., and Mizushima, S. ; *J. Biol. Chem.* (1989) 264, 8563-8567.
- [14] Igo, M.M., and Silhavy, T.J. ; *J. Bacteriol.* (1988) 170, 5971-5973.
- [15] Igo, M.M., Ninfa, A.J., and Silhavy, T.J. ; *Genes & Dev.* (1989) 3, 598-605.

- [16] Igo, M.M., Ninfa, A.J., Stock, J.B., and Silhavy, T.J. ; *Genes & Dev.* (1989) 3, 1725-1734.
- [17] Aiba, H., Nakasai, F., Mizushima, S., and Mizuno, T. ; *J. Biochem., Tokyo* (1989) 106, 5-7.
- [18] Aiba, H., Nakasai, F., Mizushima, S., and Mizuno, T. ; *J. Biol. Chem.* (1989) 264, 14090-14094.
- [19] Nara, F., Matsuyama, S., Mizuno, T., and Mizushima, S. ; *Mol. Gen. Genet.* (1986) 202, 194-199.
- [20] Stock, J.B., Stock, A.M., and Mottonen, J.M. ; *Nature* (1990) 344, 395-400.
- [21] Stock, J.B., Ninfa, A.J. and Stock, A.M. ; *Microbiol. Rev.* (1989) 53, 450-490.
- [22] Ronson, C.W., Nixon, B.T., and Ausbel, F.M. ; *Cell* (1987) 49, 579-581.
- [23] Ninfa, A.J., and Magasanik, B. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83, 5909-5913.
- [24] Magasanik, B. ; *Trends in Biochem. Sci.* (1988) 13, 475-479.
- [25] Keener, J., and Kustu, S. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85, 4976-4980.
- [26] Bourret, R.B., Hess, J.F., Borkovich, K.A., Pakula, A.A., and Simon, M.I. ; *J. Biol. Chem.* (1991) 264, 7085-7088.
- [27] Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kawamoto, T., Yamada, M., and Nakata, A. ; *J. Mol. Biol.* (1989) 210, 551-559.
- [28] Hess, J.F., Bourret, R.B., and Simon, M.I. ; *Nature* (1988) 336, 139-143.
- [29] Weiss, V., and Magasanik, B. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85, 8919-8923.
- [30] Ninfa, A.J., and Bennett, R.L. ; *J. Biol. Chem.* (1991) 266, 6888-6893.
- [31] Sanders, D.A., Gillece-Castro, B.L., Stock, A.M., Burlingame, A.L., and Koshland, D.E., Jr. ; *J. Biol. Chem.* (1989) 264, 21770-21778.



- [32] Kato, M., Aiba, H., Tate, S., Nishimura, Y., and Mizuno, T. ; *FEBS Lett.* (1989) 249, 168-172.
- [33] Inokuchi, K., Furukawa, H., Nakamura, K., and Mizushima, S. ; *J. Mol. Biol.* (1984) 178, 653-668.
- [34] Garrett, S., Taylor, R.K., Silhavy, T.J., and Berman, M.L. ; *J. Bacteriol.* (1985) 162, 840-844.
- [35] Mizuno, T., Kato, M., Jo, Y.-L., and Mizushima, S. ; *J. Biol. Chem.* (1988) 263, 1008-1012.
- [36] Mizuno, T., and Mizushima, S. ; *J. Biochem., Tokyo* (1987) 101, 387-396.
- [37] Ninfa, A.J., Ninfa, E.G., Lupas, A.N., Stock, A., Magasanik, B., and Stock, J. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85, 5492-5496.
- [38] Igo, M.M., Ninfa, A.J., Stock, B.J., and Sihavy, T.J. ; *Genes & Dev.* (1989) 3, 1725-1734.
- [39] Feng, J., Atkinson, M.R., McCleary, W., Stock, J.B., Wanner, B.L., and Ninfa, A.J. ; *J. Bacteriol.* (1992) 174, 6061-6070.
- [40] Wanner, B.L., and Wilmes-Riesenberg, M.R. ; *J. Bacteriol.* (1992) 174, 2124-2130.
- [41] Lukat, G.S., McCleary, W., Stock, A.M., and Stock, J.B. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (89) 718-722.
- [42] Forst, S., Delgado, L., and Inouye, M. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989) 86, 6052-6056.
- [43] Aiba, H., and Mizuno, T. ; *FEBS Lett.* (1990) 261, 19-22.
- [44] Slauch, J.M., and Sihavy, T.J. ; *J. Mol. Biol.* (1989) 210, 281-292.
- [45] Nakashima, K., Kanamaru, K., Aiba, H., and Mizuno, T. ; *FEMS Microbiol. Lett.* (1991) 82, 43-48.
- [46] Forst, S., Delgado, J., Rampersaud, A., and Inouye, M. ; *J. Bacteriol.* (1990) 172, 3473-3477.
- [47] Brissette, R.E., Tsung, K., and Inouye, M. ; *J. Bacteriol.* (1991) 173, 601-608.

- [48] Stock, A.M., Mottonen, J.M., Stock, J.B., and Schutt, C.E. ; *Nature* (1989) 337, 745-749.
- [49] Robert, D.L., Bennett, D.W., and Forst, S.A. ; *J. Biol. Chem.* (1994) 269, 8728-8733.
- [50] Delgado, J., Forst, S., Harlocker, S., and Inouye, M. ; *Mol. Microbiol.* (1993) 10, 1037-1047.
- [51] Sanders, D.A., Gillece-Castro, B.L., Burlingame, A.L., and Koshland, D.E., Jr. ; *J. Bacteriol.* (1992) 174, 5117-5122.
- [52] Iuchi, S. ; *J. Biol. Chem.* (1993) 268, 23972-23980.
- [53] Stout, V., and Gottesman, S. ; *J. Bacteriol.* (1990) 172, 659-669.
- [54] Miller, J.F., Johnson, S.A., Black, W.J., Beattie, D.T., Mekalanos, J.J., and Falkow, S. ; *J. Bacteriol.* (1992) 174, 970-979.
- [55] McCleary, W.R., and Zusman, D.R. ; *J. Bacteriol.* (1990) 172, 6661-6668.
- [56] Jin, S., Roitsch, T., Ankenbauer, R.G., Gordon, m.P., and Nester, E.W. ; *J. Bacteriol.* (1990) 172, 525-530.
- [57] Nakashima, K., Kanamaru, K., Aiba, H., and Mizuno, T. ; *J. Biol. Chem.* (1991) 266, 10775-10780.
- [58] Brissette, R.E., Tsung, K., and Inouye, M. ; *J. Bacteriol.* (1992) 174, 4907-4912.
- [59] Lukat, G.S., Lee, B.H., Mottonen, J.M., Stock, A.M., and Stock, J.B. ; *J. Biol. Chem.* (1991) 266, 8348-8354.
- [60] Volz, K., and Matsumura, P. ; *J. Biol. Chem.* (1991) 266, 15511-15519.
- [61] Tsuzuki, M., Aiba, H., and Mizuno, T. ; *J. Mol. Biol.* (1994) 242, 607-613.
- [62] Porter, S.C., North, A.K., Wedel, A.B., and Kustu, S. ; *Genes & Dev.* (1993) 7, 2258-2273.
- [63] Klose, K.E., North, A.K., Stedman, K.M., and Kustu, S. ; *J. Mol. Biol.* (1994) 241, 233-245.

- [64] Brissette, R.E., Tsung, K., and Inouye, M. ; *J. Bacteriol.* (1991) 173, 3749-3755.
- [65] Graeme-Cook, K.A., May, G., Bremer, E., and Higgins, C.F. ; *Mol. Microbiol.* (1989) 3, 1287-1294.
- [66] Higgins, C.F., Hinton, J.C.D., Hulton, C.S.J., Owen-Hughes, T., Pavitt, G.D., and Seirafa, A. ; *Mol. Microbiol.* (1990) 4, 2007-2011.
- [67] Tsui, P., Helu, V., and Freundlich, M. ; *J. Bacteriol.* (1988) 170, 4950-4953.
- [68] Gidrol, X., and Farr, S. ; *Mol. Microbiol.* (1993) 10, 877-884.
- [69] Anderson, J., and Delihias, N. ; *Biochemistry* (1990) 29, 9249-9256.
- [70] Nanis, J.J., and Kline, B.C. ; *Mol. Gen. Genet.* (1977) 152, 175-182.
- [71] Laemmli, U.K. ; *Nature* (1970) 227, 680-685.
- [72] Packer, L., and Glazer, A.N. ; *Methods Enzymol.* (1988) 167.
- [73] Marsac, N.T., and Houmard, J. ; *FEMS Microbiol. Rev.* (1993) 104, 119-190.
- [74] Sherman, L.A., van de Putte, P. ; *J. Bacteriol.* (1982) 150, 410-413.
- [75] Fagan, M.J., and Saier, M.H., Jr. ; *J. Mol. Evol.* (1994) 38, 57-99.
- [76] Hesse, J.E., Wieczorek, L., Altendorf, K., Reicin, A.S., Dorus, E., and Epstein, W. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984) 81, 4746-4750.
- [77] Nakashima, K., Sugiura, A., Kanamaru, K., and Mizuno, T. ; *Mol. Microbiol.* (1993) 7, 109-116.
- [78] Csonka, L.N. ; *Microbiol. Review* (1989) 53, 121-147.
- [79] McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E.T., and Epstein, W. ; *J. Biol. Chem.* (1994) 269, 1911-1917.
- [80] Landfald, B., and Strom, A.R. ; *J. Bacteriol.* (1986) 165, 849-855.

- [81] Repoila, F., and Gutierrez, C. ; *Mol. Microbiol.* (1991) 5, 747-755.
- [82] Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M.W., Falkenberg, P., McDougall, J., and Strom, A.R. ; *Mol. Microbiol.* (1991) 5, 1049-1064.
- [83] Koo, S-P., and Booth, I.R. ; *Microbiology* (1994) 140, 617-621.
- [84] Gouesbet, G., Jebbar, M., Talibart, R., Bernard, T., and Blanco, C. ; *Microbiology* (1994) 140, 2415-2422.
- [85] Wimmers, L.E., Ewing, N.N., and Bennett, A.B. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89, 9205-9209.
- [86] Perez-Prat, E., Narasimhan, M.L., Binzel, M.L., Botella, M.A., Chen, Z., Valpuesta, V., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M. ; *Plant Physiol.* (1992) 100, 1471-1478.
- [87] Nucifora, G., Chu, L., Misra, T.K., and Silver, S. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989) 86, 3544-3538.
- [88] Kahn, D., David, M., Domergue, O., Daveran, M.-L., Chai, J., Hirsch, P.R., and Batut, J. ; *J. Bacteriol.* (1989) 171, 929-939.
- [89] Cozens, A.L., and Walker, J.E. ; *J. Mol. Biol.* (1987) 194, 359-383.
- [90] Snavely, M.D., Miller, C.G., and Maguire, M.E. ; *J. Biol. Chem.* (1991) 266, 815-823.
- [91] Smith, D.L., Tao, T., and Maguire, M.E. ; *J. Biol. Chem.* (1993) 268, 22469-22479.
- [92] Solioz, M., Mathews, S., and Furst, P. ; *J. Biol. Chem.* (1987) 262, 7358-7362.
- [93] Odermatt, A., Suter, H., Krapf, R., and Solioz, M. ; *J. Biol. Chem.* (1993) 268, 12775-12779.
- [94] Geisler, M., Richter, J., and Schumann, J. ; *J. Mol. Biol.* (1993) 234, 1284-1289.
- [95] Vulpe, C., Levinson, B., Whitney, S., Packman, S., and Gitschier, J. ; *Nature Genetics* (1993) 3, 7-13.
- [96] Bull, P.C., thomas, G.R., Rommens, J.M., Forbes, J.R., and Cox, D.W. ; *Nature Genetics* (1993) 5, 327-336.

- [97] Nucifora, G., Chu, L., Siver, S., and Misra, T.K. ; *J. Bacteriol.* (1989) 171, 4241-4247.
- [98] Rudolph, H.K., Antebi, A., Fink, G.R., Buckley, C.M., Dorman, L.S., LeVitre, J., Davidow, T.E., Mao, J., and Moir, D.T. ; *Cell* (1989) 58, 133-145.
- [99] Wistow, G.J., Pisano, M.M., and Chepelinsky, A.B. ; *Trends in Biochem. Sci.* (1991) 16, 170-171.
- [100] Pao, G.M., Wu, L.-F., Johnson, K.D., Hofte, H., Chrispeels, M.J., Sweet, G., Sandal, N.N., and Saier, M.H., Jr. ; *Mol. Microbiol.* (1991) 5, 33-37.
- [101] Muramatsu, S., and Mizuno, T. ; *Nucleic Acids Res.* (1989) 17, 4378.
- [102] Voegelé, R.T., Sweet, G.D., and Boos, W. ; *J. Bacteriol.* (1993) 175, 1087-1094.
- [103] Chrispeels, M.J., and Maurel, C. ; *Plant Physiol.* (1994) 105, 9-13.
- [104] Preston, G.M., and Agre, P. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88, 11110-11114.
- [105] Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B., and Agre, P. ; *Science* (1992) 256, 385-387.
- [106] Preston, G.M., Jung, J.S., Guggino, W.B., and Agre, P. ; *J. Biol. Chem.* (1994) 269, 1668-1673.
- [107] Walz, T., Smith, B.L., Zeidel, M.L., Engel, A., and Agre, P. ; *J. Biol. Chem.* (1994) 269, 1583-1586.
- [108] Fushimi, K., Uchida, S., Hara, Y., Hirata, Y., Marumo, F., and Sasaki, S. ; *Nature* (1993) 361, 549-552.
- [109] Guerrero, F.D., Jones, J.T., and Mullet, J.E. ; *Plant Mol. Biol.* (1990) 15, 11-26.
- [110] Hofte, H., Hubbard, L., Reizer, J., Ludevid, D., Herman, E.M., and Chrispeels, M.J. ; *Plant Physiol.* (1992) 99, 561-570.
- [111] Ludevid, D., Hofte, H., Himelblau, E., and Chrispeels, M.J. ; *Plant Physiol.* (1992) 100, 1633-1639.

- [112] Culianez-Macia, F.A., and Martin, C. ; *The Plant J.* (1993) 4, 717-725.
- [113] Mizuno, T. ; *Gene* (1987) 54, 57-64.
- [114] Chou, J.H., Greenberg, J.T., and Demple, B. ; *J. Bacteriol.* (1993) 175, 1026-1031.
- [115] Dewar, M.A., and Barber, J. ; *Planta* (1973) 113, 143-155.
- [116] Blumwald, E., Mehlhorn, R.J., and Packer, L. ; *Plant Physiol.* (1983) 73, 377-380.
- [117] Reed, R.H., and Stewart, D.P. ; *Biochim. Biophys. Acta* (1985) 812, 155-162.
- [118] Mackay, M.A., Norton, R.S., and Borowitzka, L.J. ; *J. Gen. Microbiol.* (1984) 130, 2177-2191.
- [119] Evans, D.E., Briars, S.-A., and Williams, L.E. ; *J. Exp. Bot.* (1991) 236, 285-303.
- [120] Muto, S., Izawa, S., and Miyachi, S. ; *FEBS Lett.* (1982) 139, 250-254.
- [121] Kriemer, G., Melkonian, M., Holtum, J.A.M., and Latzko, E. ; *Plant Physiology* (1988) 86, 423-428.
- [122] Muto, S., and Miyachi, S. ; *Molecular and Cellular aspects of calcium in plant development* (1986) Trewavas, A.J. [ed] Plenum Press, London and New York. 107-114.
- [123] Gambel, A.N., Desrosiers, M.G., and Menick, D.R. ; *J. Biol. Chem.* (1992) 267, 15923-15931.
- [124] Gambel, A.N., and Menick, D.R. ; *J. Biol. Chem.* (1993) 268, 20590-20597.
- [125] Boulter, D., Haslett, B.G., Peacock, D., Ramshaw, J.A.M., and Scawen, M.D. ; *International Review of Biochemistry and Plant Biochemistry II.* Northcote, D.H. [eds]. Baltimore: University Park Press (1977) 13, 1-40.
- [126] Aitken, A. ; *Biochem. J.* (1975) 149, 675-683.
- [127] Plas, J.V., Kruyt, A.B.F., Vrieze, G., Dassen, E., and Weibeeck, P. ; *Mol. Microbiol.* (1989) 3, 275-284.

- [128] Asada, K., and Takahashi, M. ; *Photoinhibition*. Kyle, D.J., Osmond, C.B., and Amtzen, C.J. [eds]. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. (1987) 227-287.
- [129] Laudenbach, D.E., Trick, C.G., and Straus, N.A. ; *Mol. Gen. Genet.* (1989) 216, 455-461.
- [130] Herbert, S.K., Samson, G., Fork, D.C., and Laudenbach, D.E. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89, 8716-8720.
- [131] Lim, C.-K., and Cooksey, D.A. ; *J. Bacteriol.* (1993) 175, 4492-4498.
- [132] Mills, S.D., Lim, C.-K., Cooksey, D.A. ; *Mol. Gen. Genet.* (1994) 244, 341-351.
- [133] Cha, J.-S., and Cooksey, D.A. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88, 8915-8919.
- [134] Brown, N.L., Rouch, D.A., and Lee, B.T.O. ; *Plasmid* (1992) 27, 41-51.
- [135] Winge, D.R., Nielson, K.B., Gray, W.R., and Hamer, D.H. ; *J. Biol. Chem.* (1985) 260, 14464-14470.
- [136] Huckle, J.W., Morby, A.P., Turner, J.S., and Robinson, N.L. ; *Mol. Microbiol.* (1993) 7, 177-187.
- [137] Zhou, P., and Thiele, D. ; *Genes & Dev.* (1993) 7, 1824-1835.
- [138] Chelly, J., Tumer, Z., Tonnesen, T., Petterson, A., Ishikawa-Brush, Y., Tommerup, N., Horn, N., and Monaco, A.P. ; *Nature Genetics* (1993) 3, 14-19.
- [139] Ansari, A.Z., Chael, M.L., and O'Halloran, T.V. ; *Nature* (1992) 355, 87-89.
- [140] Parkhill, J., Ansari, A.Z., Wright, J.G., Brown, N.L., and O'Halloran, T.V. ; *EMBO J.* (1993) 12, 413-421.
- [141] Mercer, J.F.B., Grimes, A., Ambrosini, L., Lockhart, P., Paynter, J.A., Dierick, H., and Glover, T.W. ; *Nature Genetics* (1994) 6, 374-378.
- [142] Omata, T., and Murata, N. ; *Plant Cell Physiol.* (1983) 24, 1101-1112.

- [143] Laudenbach, D.E., Herbert, S.K., McDowell, C., Fork, D.C., Grossman, A.R., and Straus, N.A. ; *Plant Cell* (1990) 2, 913-924.
- [144] Zhang, L., Pakrasi, H.B., and Whitmarsh, J. ; *J. Biol. Chem.* (1994) 269, 5036-5042.
- [145] Liang, J., Scappino, L., and Haselkorn, R. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89, 5655-5699.
- [146] Aiba, H., Nagaya, M., and Mizuno, T. ; *Mol. Microbiol.* (1993) 8, 81-91.
- [147] Huang, J., Wei, Y., Kim, Y., Osterberg, L., and Matthews, H.R. ; *J. Biol. Chem.* (1991) 266, 9023-9031.
- [148] Popov, K.M., Zhao, Y., Shimomura, Y., Kuntz, m.J., and Harris, R.A. ; *J. Biol. Chem.* (1992) 267, 13127-13130.
- [149] Kessler, U., Maid, U., and Zetsche, K. ; *Plant Mol. Biol.* (1992) 18, 777-780.
- [150] Chang, C., Kwok, S.F., Bleecker, A.B., Meyerowitz, E.M. ; *Science* (1993) 262, 539-544.
- [151] Ota, I.M., and Varshavsky, A. ; *Science* (1993) 262, 566-569.
- [152] Maeda, T., Wurgler-Murphy, S., and Saito, H. ; *Nature* (1994) 369, 242-245.
- [153] Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E., and Gustin, M.C. ; *Science* (1993) 259, 1760-1763.
- [154] Munoz-Dorado, J., Inouye, S., and Inouye, M. ; *Cell* (1991) 67, 995-1006.
- [155] Potts, M., Sun, H., Mockaitis, K., Kennelly, P.J., Reed, D., and Tonks, N.K. ; *J. Biol. Chem.* (1993) 268, 7632-7635.
- [156] Packman, S., O'Toole, C., Price, D., and Thaler, M. ; *J. Inorg. Biochem.* (1983) 19, 203-211.
- [157] Payter, J.A., Grimes, A., Lockhart, P., and Mercer, J.F.B. ; *FEBS Lett.* (1994) 351, 186-190.
- [158] Nagasawa, S., Tokishita, S., Aiba, H., and Mizuno, T. ; *Mol. Microbiol.* (1992) 6, 799-807.
- [159] Alex, L.A., and Simon, M.I. ; *Trends in Genet.* (1994) 10, 133-138.



- [160] Silver, S., Nucifora, G., and Phung, L.T. ; *Mol. Microbiol.* (1993) 10, 7-12.
- [161] Solioz, M., Odermatt, A., and Krapf, R. ; *FEBS Lett.* (1994) 346, 44-47.
- [162] Hofmann, F., James, P., Vorherr, T., and Carafoli, E. ; *J. Biol. Chem.* (1993) 268, 10252-10259.
- [163] Skerjanc, I.S., Toyofuku, T., Richardson, C., and MacLennan, D.H. ; *J. Biol. Chem.* (1993) 268, 15944-15950.
- [164] Waldrop, G.L., Palida, F.A., Hadi, M., Lonergan, P.A., and Ettinger, M.J. ; *Am. Physiol. Soc.* (1990) 259, G219-G224.
- [165] Burbulys, D., Trach, K.A., and Hoch, J.A. ; *Cell* (1991) 64, 545-552.
- [166] Ishige, K., Nagasawa, S., Tokishita, S., and Mizuno, T. ; *EMBO J.* (1994) 13, 5195-5202.
- [167] Slauch, J.M., Russo, F.D., and Silhavy, T.J. ; *J. Bacteriol.* (1991) 173, 7501-7510.
- [168] Sharif, T.R., and Igo, M.M. ; *J. Bacteriol.* (1993) 175, 5460-5468.
- [169] Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kimura, S., Nakata, A. ; *J. Mol. Biol.* (1988) 203, 85-95.
- [170] Houmard, J. ; *Microbiology* (1994) 140, 433-441.
- [171] Chrispeels, M.J., and Agre, P. ; *Trends in Biochem. Sci.* (1994) 19, 421-425.
- [172] Phung, L.T., Ajlani, G., and Haselkorn, R. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91, 9651-9654.
- [173] Tokishita, S., Yamada, H., Aiba, H., and Mizuno, T. ; *J. Biochem. Tokyo* (1990) ,108, 488-493.
- [174] Tokishita, S., Kojima, A., Aiba, H., and Mizuno, T. ; *J. Biol. Chem.* (1991) 266, 6780-6785.
- [175] Tokishita, S., Kojima, A., and Mizuno, T. ; *J. Biochem. Tokyo* (1992) 111, 707-713.
- [176] Tokishita, S., and Mizuno, T. ; *Mol. Microbiol.* (1994) 13, 435-444.

1981	1981
1982	1982
1983	1983
1984	1984
1985	1985
1986	1986
1987	1987
1988	1988
1989	1989
1990	1990
1991	1991
1992	1992
1993	1993
1994	1994
1995	1995
1996	1996
1997	1997
1998	1998
1999	1999
2000	2000
2001	2001
2002	2002
2003	2003
2004	2004
2005	2005
2006	2006
2007	2007
2008	2008
2009	2009
2010	2010
2011	2011
2012	2012
2013	2013
2014	2014
2015	2015
2016	2016
2017	2017
2018	2018
2019	2019
2020	2020
2021	2021
2022	2022
2023	2023
2024	2024
2025	2025

1981	1981
1982	1982
1983	1983
1984	1984
1985	1985
1986	1986
1987	1987
1988	1988
1989	1989
1990	1990
1991	1991
1992	1992
1993	1993
1994	1994
1995	1995
1996	1996
1997	1997
1998	1998
1999	1999
2000	2000
2001	2001
2002	2002
2003	2003
2004	2004
2005	2005
2006	2006
2007	2007
2008	2008
2009	2009
2010	2010
2011	2011
2012	2012
2013	2013
2014	2014
2015	2015
2016	2016
2017	2017
2018	2018
2019	2019
2020	2020
2021	2021
2022	2022
2023	2023
2024	2024
2025	2025

報文目錄

1) Kengo Kanamaru, Hirofumi Aiba, Shoji Mizushima, and Takeshi Mizuno  
Signal Transduction and Osmoregulation in *Escherichia coli*: A single amino acid change in the protein kinase, EnvZ, results in loss of its phosphorylation and dephosphorylation abilities with respect to the activator protein, OmpR

*Journal of Biological Chemistry* Vol. 264, No. 36, 21633-21637. (1989)

2) Kengo Kanamaru, Hirofumi Aiba, and Takeshi Mizuno  
Transmembrane Signal Transduction and Osmoregulation in *Escherichia coli*:  
I. Analysis by site directed mutagenesis of the amino acid residues involved in phosphotransfer between the two regulatory components, EnvZ and OmpR

*Journal of Biochemistry (Tokyo)* Vol. 108, No. 3, 483-487. (1990)

3) Kengo Kanamaru, and Takeshi Mizuno  
Signal Transduction and Osmoregulation in *Escherichia coli*: A novel mutant of the positive regulator, OmpR, that functions in a phosphorylation-independent manner

*Journal of Biochemistry (Tokyo)* Vol. 111, No. 4, 425-430. (1992)

4) Kengo Kanamaru, Seiji Kashiwagi, and Takeshi Mizuno  
The Cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7942, possesses two distinct genes encoding cation-transporting P-type ATPase

*FEBS letters* Vol. 330, No. 1, 99-104. (1993)

5) Kengo Kanamaru, Seiji Kashiwagi, and Takeshi Mizuno  
A copper-transporting P-type ATPase found in the thylakoid membrane of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942

*Molecular Microbiology* Vol. 13 (2), 369-377. (1994)