

目・次

**ラン藻 *Synechococcus* 6301 の
核酸結合性タンパク質に関する研究**

名古屋大学遺伝子実験施設

杉田 千恵子

名古屋大学図書



11315889

目次

要旨	3
1 章 序論	4
2 章 材料と実験方法	9
2-1) 材料	9
2-2) 方法	10
2-2-1) DNA 技術	10
2-2-2) タンパク質技術	12
3 章 結果	16
3-1) ラン藻 <i>Synechococcus</i> 6301 の ssDNA 結合タンパク質	16
3-1-1) ssDNA 結合タンパク質の分画	16
3-1-2) 38 kDa の ssDNA 結合タンパク質のアミノ酸配列	16
3-1-3) 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質のアミノ酸配列	18
3-2) 12 kDa の RNA 結合タンパク質の機能解析	18
3-2-1) <i>Synechococcus</i> 6301 と <i>Synechococcus</i> 7942 の <i>rbp1</i> と <i>rbp2</i> 遺伝子	19
3-2-2) <i>rbp1</i> , <i>rbp2</i> 遺伝子の欠損変異体の作製	19
3-2-3) 温度条件による変異株の増殖の差異	25
3-2-4) 欠損変異体の mRNA 蓄積量	25
3-3) 38 kDa の ssDNA 結合タンパク質の遺伝子の解析	28
3-3-1) 38 kDa の ssDNA 結合タンパク質の遺伝子のスクリーニング	28
3-3-2) 38 kDa の ssDNA 結合タンパク質の遺伝子の相同性検索	28
3-3-3) リボソームタンパク S1 の分子内構造と機能	31
3-3-4) <i>Synechococcus</i> 6301 の <i>rps1</i> 遺伝子の周辺領域に存在する <i>orf</i> の相同性検索	33
3-3-5) <i>rps1</i> 遺伝子のサザン解析	35
3-3-6) <i>rps1</i> の発現解析	35
3-4) 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質の遺伝子の解析	38
3-4-1) 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質の遺伝子のスクリーニング	38
3-4-2) 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質の相同性検索	38
3-4-3) 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質遺伝子の周辺領域に存在する <i>orf</i> の相同性検索	42
3-4-4) 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質遺伝子のサザン解析	42
3-5) 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質と 3 種のリボソームタンパク S1 の比較	44
3-6) 大腸菌による大量発現系での組換えタンパク質の作製	47

3-7) 細胞内の局在性.....	52
3-7-1) 抗体の特異性.....	52
3-7-2) 細胞内成分の分画	54
3-7-3) 細胞内の局在性.....	54
3-7-4) ショ糖平衡密度勾配遠心法.....	56
3-8) 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質の核酸結合特性	58
3-8-1) 非変性状態の組換えタンパク質の精製.....	59
3-8-2) ssDNA との結合特性.....	59
3-8-3) RNA ホモポリマーとの結合特性	61
3-8-4) mRNA との結合特性.....	62
 4 章 考察.....	 65
4-1) 2 種類の 12 kDa の RNA 結合タンパク質 Rbp1、Rbp2 の機能解析.....	65
4-2) ラン藻のリボソームタンパク S1 について.....	68
4-3) 原核生物のリボソームタンパク S1 について.....	70
4-4) <i>Synechococcus</i> 6301 のリボソームタンパク S1 に構造の似たタンパク質について	74
4-5) <i>Synechococcus</i> 6301 の Nbp1 の機能について.....	76
 参考文献.....	 78
謝辞	85
付録	
副論文	86
参考論文	87

要旨

ラン藻は葉緑体の起源生物と考えられているが、その転写と翻訳の分子機構は、これまで単純に大腸菌と同じであると考えられてきたためほとんど研究されてこなかった。本研究はラン藻に特有の遺伝子発現制御に関わる因子を分離同定することを目的として、*Synechococcus* 6301 株より一本鎖 DNA(ssDNA)カラムを用いて分離した核酸結合性タンパク質のうち、分子量が 12 kDa、33 kDa、38 kDa のタンパク質の構造と機能の解析を行った。得られた結果は次のとおりである。

(1) 12 kDa のタンパク質は真核生物型の RNA 結合モチーフを持つ 2 種類の RNA 結合タンパク質 Rbp1 と Rbp2 であった。これらの機能を調べるため、それぞれのタンパク質をコードする遺伝子破壊株を作製した。その結果、Rbp1 遺伝子を破壊した株は低温条件での生育が妨げられた。このことは Rbp1 は低温耐性タンパク質である可能性を示している。一方、Rbp2 遺伝子破壊株は低温条件下でも野生型と同じ増殖を示した。

(2) 38 kDa のタンパク質は、葉緑体のリボソームタンパク CS1 および大腸菌のリボソームタンパク S1 と相同なタンパク質であることを明らかにした。しかし、その分子量は葉緑体 CS1 とほぼ同じであるが大腸菌 S1 の 3 分の 2 しかない。そこで、これまで報告されている原核生物のリボソームタンパク S1 または S1 ホモログの生物種間の多様性について考察した。

(3) 33 kDa のタンパク質は、38 kDa タンパク質のアミノ酸配列と 80.4% の類似性を持つことを明らかにした。2 つのタンパク質それぞれの抗体を作製してリボソーム画分と反応させたところ、38 kDa タンパク質のみがリボソームタンパク質であり、33 kDa タンパク質はリボソームタンパク質ではないことを明らかにした。さらに、両タンパク質の核酸結合特性を比較したところ、38 kDa タンパク質は RNA ホモポリマーとの結合が強いのに対し、33 kDa タンパク質は RNA ホモポリマーよりも DNA、特に ssDNA との結合が強いことを明らかにした。また、mRNA との結合力を 2 つのタンパク質で比較したところ、33 kDa タンパク質は 38 kDa タンパク質の 6 分の 1 であることを明らかにした。これらのことから、33 kDa タンパク質は、リボソームタンパク S1 とアミノ酸配列は類似しているが機能は異なる、新規の核酸結合性タンパク質であると同定した。33 kDa タンパク質を Nbp1 (Nucleic acid binding protein 1) およびその遺伝子を *nbp1* と命名した。最後に Nbp1 の機能について考察した。

1章 序論

ラン藻は酸素発生を伴う植物タイプの光合成を行い、独立栄養で生育できる原核生物である。16S rRNA と光合成に関する遺伝子の塩基配列に基づく系統進化学的研究でラン藻と葉緑体は進化的に近縁であることが示され (Giovannoni et al. 1988, Janssen et al. 1989)、古ラン藻が宿主細胞に取り込まれ細胞内で共生進化していったのが葉緑体であるとする細胞内共生説(Margulis 1981, Gray 1989)を不動のものとした。

独自のゲノムと独自の転写、翻訳機構を持つ葉緑体では、遺伝子発現において転写制御だけでなく、mRNA のプロセッシングやスプライシング、エディティングなどの転写後制御や翻訳開始や翻訳効率を調節する翻訳制御がよく調べられている(Sugita and Sugiura 1996, Sugiura et al. 1998)。タバコの葉緑体ゲノムには 121 種の遺伝子が存在するだけ(Shinozaki et al. 1986, Wakasugi et al. 1998)で、葉緑体を構成するタンパク質をコードする遺伝子の大部分は葉緑体ゲノムから核ゲノムに移行していると推定される。葉緑体の転写後制御や翻訳制御は核ゲノムへの移行に伴って獲得した新しい遺伝子発現システムと考えられている。これらの制御に関わると想定される RNA 結合タンパク質のリボヌクレオプロテイン(RNPs) がタバコ葉緑体から 5 種類分離された(Li and Sugiura 1990, Ye et al. 1991)。RNPs はアラビドプシス(Ohta et al. 1995)、ホウレンソウ(Schuster and Gruissem 1991)、トウモロコシ(Cook and Walker 1992)などの高等植物に広く存在する。これらは分子量 29 kDa から 33 kDa で葉緑体中に多量に存在するタンパク質であり(Nakamura et al. 1999)、ホウレンソウでは mRNA のプロセッシングや安定性に関わることが報告がされている (Schuster and Gruissem 1991, Hayes et al. 1996)。

葉緑体と進化的に近縁なラン藻ではあるが、転写、翻訳機構は同じグラム陰性菌である大腸菌(*Escherichia coli*)のそれと単純に同じとこれまでは考えられてきた。しかし、近年 *E. coli* に見られないが、葉緑体には存在するような転写後制御や翻訳制御の機構がラン藻にも存在する可能性が示唆されてきた。ひとつは、真正細菌にはないとされていたイントロンが、数種類のラン藻の Leu-tRNA(UAA)遺伝子に発見されたことである(Xu et al. 1990, Kuhsel et al. 1990)。このイントロンはグループ I イントロン(Zang et al. 1993)に属し、イントロンの挿入位置やイントロンの一次構造および二次構造が陸

上植物の葉緑体の Leu-tRNA(UAA)遺伝子のイントロン(Steinmetz et al. 1982, Shinozaki et al. 1986)と極めて類似している。このことは葉緑体とラン藻の共通祖先がすでにイントロンを持っていたこと、すなわちスプライシング機構をもっていたことを示唆している。*Synechococcus* sp. PCC6301 も同様に Leu-tRNA(UAA)遺伝子にイントロンを持つことが確かめられている (Sugita et al. 1995a)。もうひとつは、翻訳開始における mRNA の Shine-Dalgarno 配列 (SD 配列)についてである。この配列はリボソーム 30S サブユニットの構成成分である 16S rRNA の 3'末端と相補性があり(Shine and Dalgarno 1974)、リボソームが正しい位置からの翻訳開始を決める上で重要な役割を持つ(de Smit and van Duin 1994)。*E. coli* の mRNA の多くは翻訳開始コドン上流のほぼ決められた位置に SD 配列を持つ。しかし、*Synechococcus* 6301 の mRNA は SD 配列が保存された位置ではなかったり、まったく SD 配列を持たないものもある。*Synechococcus* 6301 は *E. coli* とは異なった mRNA 構造を持ち、その翻訳制御も異なっている可能性が提唱された(Sugiura et al. 1998)。また、*Synechocystis* sp. PCC6803 の ORF の翻訳開始コドンの上流 12 nt 以内に SD 配列があるかをサーチしたところ、多くの ORF でそのような配列が存在しないことが報告されている(Sazuka and Ohara 1996)。

当研究室ではこれまで *E. coli* 遺伝子の相同性をもとに、ラン藻 *Synechococcus* 6301(*Anacystis nidulans* 6301)の翻訳に関わる基本因子をコードする遺伝子を同定してきた。rRNAs (Tomiooka and Sugiura 1983, Kumano et al. 1983), tRNAs (Tomiooka and Sugiura 1984, Sugita et al. 1995a), EF-Tu と EF-G (Meng et al. 1989), リボソームタンパク質(Sugita et al. 1995b, 1997), tmRNA (Watanabe et al. 1997)などである。最近、糸状性ラン藻 *Anabaena variabilis* M3 から 40 種類のリボソームタンパクが分離され、その N 末端配列が決定された(Sato et al. 1998)。また、*Synechocystis* PCC6803 の全塩基配列が決定され、2 コピーの rRNA 遺伝子クラスター、42 個の tRNA 遺伝子、そして *E. coli* との相同性から検索された 103 個の翻訳機構のタンパク質遺伝子が明らかになった (Kaneko et al. 1996a)。

葉緑体 RNA 結合タンパク質の分離に用いられた一本鎖 DNA (ssDNA) 親和性カラム(Li and sugiura 1990)を使用して、*Synechococcus* 6301 よりラン藻固有の RNA 結合タンパク質を分離することが試みられた。まず、2 種類の RNA 結合タンパク質 (Rbp1,

Rbp2)が分離された(Sugita and Sugiura 1994)。これらのタンパク質は葉緑体の RNPs と同じように RNA 結合ドメイン (CS-RBD)を持つ。CS-RBD は、真核生物の多くの種類の RNA 結合タンパク質に存在する 2つのモチーフ RNP-2 と RNP-1 を含む RNA 結合ドメイン(Burd and Dreyfuss 1994)で、4つのアンチパラレルな β シートと2つの α ヘリックスより構成される(Nagai et al. 1995)。CS-RBD を持つタンパク質は多岐にわたる RNA 代謝機能に関わっている(Mattaj 1993)。 *Synechococcus* 6301 の Rbp1 と Rbp2 は、原核生物にも CS-RBD を持つタンパク質が存在することを初めて証明したものである。Rbp1, Rbp2 は典型的 RNA 結合ドメイン CS-RBD を 1 個持ち、葉緑体の RNPs が CS-RBD を 2つ持つ点で異なっている。*A. variabilis* も *Synechococcus* 6301 の Rbps のような RNA 結合タンパク質を数種類持つことが報告された(Sato 1994, Mulligan et al. 1994)。

Synechocystis 6803 ゲノムの全塩基配列には、3種類の Rbps ホモログの遺伝子が報告されている(Kaneko et al. 1996a)。 *Synechococcus* 6301 の Rbp1 と Rbp2 は 62%のアミノ酸配列の一致性を示す。106 アミノ酸残基 の Rbp1 は C 末端側にグリシン残基に富んだ領域をもち、99 アミノ酸残基の Rbp2 はそのような領域を持たない。どちらのタンパク質も poly (U)と poly (G)からなる RNA ホモポリマーと強い親和性を持ち、RNA の G/U に富んだ領域に結合することが推測される。また、培養温度を 30℃から 20℃に下げると *rbp1* の mRNA の蓄積量は数倍に上がる(Sugita and Sugiura 1994)。同様に *A. variabilis* M3 の *rbp* ファミリーの多くは低温で mRNA の蓄積量が増加することが報告されている(Sato 1994)。通常培養条件での *Synechococcus* PCC6301 の *rbp1*mRNA 量は *rbp2* の少なくとも 20 倍多く、また、*rbp2* は低温で発現誘導されない。このように 2つの遺伝子の発現が異なった制御を受けていることが示唆される。そこで、さらに機能を解析するため本研究で *rbp* 遺伝子欠損変異株を作製して調べることにした。

Synechococcus 6301 とその近縁種 *Synechococcus* sp. PCC7942 の 2つの *rbp* 遺伝子およびそれらの周辺領域の配列はほとんど同じなので、形質転換が容易な *Synechococcus* 7942 を用いて行った。

つぎに、ssDNA 親和性カラムより 1.2 M NaCl で溶出した *Synechococcus* 6301 のタンパク質のうち、多量に存在する 38 kDa と 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質を分離し、それらの遺伝子の構造を決定したので報告する。これらのタンパク質は葉緑体の

RNA 結合タンパク質 RNPs の分子量とほぼ同じなので、RNPs のカウンターパートであることが期待された。しかし、解析の結果 38 kDa の ssDNA 結合タンパク質は RNPs ではなく、葉緑体のリボソームタンパク S1 と相同性があった。さらに、33 kDa の ssDNA 結合タンパク質もリボソームタンパク S1 との相同性を示した。

リボソームタンパク S1 については *E. coli* で最もよくその構造と機能が調べられている。*E. coli* のリボソームタンパク S1 は 556 アミノ酸残基からなり、その C 末端側に約 80 アミノ酸残基からなる繰り返し配列が 4 コピー存在していることが明らかになった。この繰り返し配列は S1 ドメインと呼ばれ、C 末端側の 4 つの S1 ドメインは mRNA との結合に関わり、また、N 末端側はリボソームと結合することが報告されている(Subramanian 1983, 1984)。N 末端側にも 2 つの S1 ドメインが見い出された。リボソームタンパク S1 の機能についての最近の仮説では、C 末端側は mRNA の 5' 非翻訳領域にある SD 配列より上流に存在するピリミジンリッチな配列に結合し(Boni et al. 1991)、二次構造を取りやすい mRNA を巻き戻し(de Smit and van Duin 1994)、N 末端側で 30S リボソームと結合して(Walliczek et al. 1990)、リボソームが翻訳開始の正確な位置にエンタリーさせるというものである。大腸菌の *in vitro* 翻訳系では、保存性の高い SD 配列を持つ mRNA 種は S1 を除いたリボソームでも翻訳されるが、保存性の低い SD 配列を持った mRNA 種はほとんど翻訳されないことが報告されている(Roberts and Rabinowitz 1989)。また、*in vivo* での mRNA 翻訳には S1 が必須であることが明らかにされている(Sørensen et al. 1998)。S1 ドメインは翻訳開始因子 1 (IF-1) や加リン酸分解酵素(PNPase)など原核生物、真核生物を問わず多くの RNA 代謝に関わるタンパク質に見い出される。*E. coli* の PNPase の S1 ドメインが NMR 解析によって構造決定がなされた(Bycroft et al. 1994)。S1 ドメインは 5 つのアンチパラレルな β シートからなる球状ドメインで、大腸菌や枯草菌の低温で発現誘導されるコールドショックタンパク(Graumann and Marahiel 1998)などに見られるコールドショックドメイン(Schindelin et al. 1993)と三次元構造がよく似ていて、広義には OB-フォールド(Muezin 1993, 考察 4-1 参照)に属する。

Synechococcus 6301 には、38 kDa と 33 kDa タンパク質の 2 種類のリボソームタンパク S1 が存在する可能性ができたが、ここでいくつかの疑問が生じる。これらは 2

種類のリボソームタンパク S1 として、*Synechococcus* 6301 のリボソームの構成成分として存在するのだろうか。両タンパク質がひとつのリボソーム中で相互作用し協調的に働くのだろうか、またはどちらかのタンパク質だけが環境条件などに応じて択一的にリボソームの成分となりうるのだろうか。または、一方のみがリボソームタンパク S1 で、他方は全く別の機能を持つタンパク質なのだろうか。本研究ではこれらの疑問を解決するために、それぞれのタンパク質に特異的な抗体を作製し *Synechococcus* 6301 のリボソームと反応させることによって、リボソームタンパク質であるかどうかを明らかにした。さらに細胞内の局在性を決定し、2つのタンパク質の核酸結合特性を調べた。

2 章 材料と実験方法

2-1) 材料

2-1-1) 大腸菌株

Escherichia coli P2-392

遺伝子型 *hsdR514* ($r_k^- m_k^+$), *supE44*, *supF58*, *lacY*, *galK2*, *galT22*, *metB1*, *trpR55*, *mcrA*
(P2)

Escherichia coli XL1-Blue

遺伝子型 *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [F' *proAB*,
lacIqZΔM15 Tn10 (Tet^r)]c

培地及び培養は Molecular Cloning (Sambrook et al. 1989)の方法に従った。

2-1-2) ラン藻株

Synechococcus sp. PCC6301 株

Synechococcus sp. PCC7942 株 (自然形質転換可能株)

BG-11 培地 (Rippka et al. 1979) または Kratz と Myers の C 培地 (Kratz and Myers 1955) で、蛍光灯による光照射 (2500 lux) 下、30℃で振とう速度 100 rpm の培養条件で行った。20ℓの大量培養は BG-11 (1mM NaHCO₃を追加) で滅菌した空気を通気して上記の照度および温度で培養を行った。

2-1-3) オリゴヌクレオチド

5'RNP1:5'-AAGAATTCTCTCCGAAATTTGCTCTC-3'

3'RNP1: 5'-AAGAATTCATCTAGAGATTAAGTGATTCAATT-3'

5'RNP2:5'-AAGAATTCCGTTTTCCCGAACAGTCCGATT-3'

3'RNP2:5'-AAGAATTCAATGAGCACCTACCCTGCCAA-3'

38P: 5'-GTIAC(C/G)CA(A/G)GA(C/T)ATCCCIGCIGTIGA(C/T)ATCGGITT(C/T)AC-3'

33P: 5'-GGIGTIACIGCIGAT(T/C)TIGA(A/G)GGI(T/C)TI(C/A)GIGCITT(T/C)ATICC-3'

38N: AAAGGATCCGTCACACAGGACATCCCAGCGGTTCGAT

38C : AATAAGCTTCTATTCGGTAACGACCAGACCTTCAGC

33N : GTAGGATCCCCCTTCTGCCGCCAACACCCCTTCCTAC

33C : GTCAAGCTTTACTGCGACTCCAGTTGCTTACGGGCT

2-1-4) 試薬類

試薬類は、和光純薬工業、ナカライ、Sigma 社製の特級および生化学用の純度の高いものを使用した。制限酵素、Ligation Kit ver.2, Blunting Kit, Exonuclease III, Mungbean nuclease, Alkaline phosphatase は TaKaRa, New England Biolab, 日本ジーン、MBL を用いた。プラスミドベクター pBluescript II KS+, pBluescript II SK+, T-vector, pQE30 は、Stratagene, Promega, Qiagen 社製のを使用した。アガロースは、Pharmacia 社製の Type II EEO と SeaKem GTG を使用した。

2-2) 方法

2-2-1) DNA 技術

2-2-1-1) DNA 組換え操作、サザン解析とノーザン解析

基本的な組換え DNA 操作は Molecular Cloning (Sambrook et al. 1989)の方法に従った。

DNA クローンのスクリーニングは、 λ EMBL4 に挿入された *Synechococcus* 6301 ゲノミック DNA ライブラリー(Meng et al. 1989)と 3' end fluorescein-11-dUTP ラベル (Amersham)された合成オリゴヌクレオチドプローブを用いた。ハイブリダイゼーション条件は $5 \times$ SSC を含む Denhardt's 溶液で 42°C で一晩行い、洗浄は $0.5 \times$ SSC (150 mM NaCl, 15 mM クエン酸)で 42°C で 5 分間 1 回と室温で $2 \times$ SSC で 2 回行ったのみである。検出は Amersham のプロトコールに従った。

サザン解析は、精製した *Synechococcus* 6301 DNA 1-3 μg を制限酵素で切断し、 $1 \times$ TAE バッファー[40 mM トリス-酢酸(pH8.0), 1 mM EDTA] を含む 1%アガロースゲル電気泳動して Hybond N+メンブレン(Amersham)にブロッティングした。プローブには ECL direct nucleic acid labeling and detection kits (Amersham) でラベルした DNA を用いて行った。ハイブリダイゼーション条件は Amersham のプロトコールに従った。

ノーザン解析に用いた RNA の抽出方法は hot phenol 法(Mohamed and Jansson 1989)で行った。30℃で培養した対数増殖期中期 (Klett 値 70) の *Synechococcus* 7942 を 10℃に移して 2 時間培養し、速やかに氷中で集菌し液体窒素で凍結した細胞より RNA を抽出した。5 μ g の RNA を、5 %ホルムアルデヒド, 1 \times MOPS [20 mM 3-(N-モノホリノ)プロパンスルホン酸, 5 mM 酢酸ナトリウム, 1 mM EDTA], 1.2%のアガロースゲル電気泳動で分離し、Hybond N+のメンブレンにプロテイングした。 α -³²P-CTP でラベルした遺伝子特異的領域の DNA をプローブとして使用し、ハイブリダイゼーションおよび洗浄は 65℃で行った。解析は Fuji バイオイメージアナライザー BAS2000 で行った。

2-2-1-3) DNA シークエンスとコンピューター解析

サブクローン化したプラスミド DNA はアルカリ-SDS 法と CsCl-エチジウムブロマイド (EtBr) 密度勾配超遠心法の組み合わせ(Sambrook et al. 1989)、または QIAGEN 社製の plasmid Midi kit を用いて精製した。段階的欠損法 (Yanisch-Perron et al. 1985) に従い作製した各欠損クローンの DNA はプラスミド調製機 (KURABO PI100) で調製し、RNAase 処理してフェノール処理で精製した。シーケンス反応は、Dye Primer Cycle Sequencing Kit と Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems) を用いて、DNA シークエンサー (Perkin Elmer Applied Biosystems, 373A) で塩基配列を決定した。塩基配列データの結合および解析には GENETYX プログラム、Sequencher 2.0 を用いた。類似性検索はアミノ酸配列のデータベース (Swiss-Prot., NBRF-PDB) を使用した。また、DDBJ の BLAST プログラムも使用した。

2-2-1-4) ラン藻 *Synechococcus* 7942 の形質転換

図 3 で示したように、*rbp1* 遺伝子を含む 1.2 kbp の *Bam*HI/*Hind*III 断片を pBluescript ベクターに挿入したプラスミド pAN7(Sugita and Sugiura 1994)の *Stu*I と *Bst*PI 部位にカナマイシン耐性遺伝子のカセットを挿入し、*rbp1* 遺伝子破壊プラスミド pKA7 と pKA8 を得た。また、*rbp2* 遺伝子を含む 2.7 kbp の *Bam*HI/*Hind*III 断片を pBluescript ベクターに挿入したプラスミド pAN21(Sugita and Sugiura 1994)の *Xmn*I 部位にカナマイシン

耐性遺伝子のカセットを挿入し、*rbp2* 遺伝子破壊プラスミド pKA4 を得た。ポジティブコントロールとして、*rps1* 遺伝子を含む 2.0 kbp の *EcoRI/SalI* 断片を pBluescript ベクターに挿入したプラスミド pES5 の *BglII* 部位 (*rps1* 遺伝子上流-90 位置) に、カナマイシン耐性遺伝子のカセットを挿入したプラスミド pKA6 を得た。pAN7 の *BstPI* 部位と pES5 の *BglII* 部位は Klenow fragment で平滑末端化してからカナマイシン耐性遺伝子のカセットを挿入した。pHSG298 (Takeshita et al. 1987, TaKaRa) より切り出した 1.1 kbp の *Cfr13I* 断片をカナマイシン耐性遺伝子のカセット (プロモーターとターミネーターを含む) として使用した。

CsCl 密度勾配超遠心法で精製した PKA7, pKA8, pKA4, pKA6 のプラスミド DNA の各々 1 μ g を *Synechococcus* 7942 の形質転換に用いた。対数増殖期中期 (Klett 値 50) まで培養した *Synechococcus* 7942 を 8×10^8 細胞濃度に濃縮し、そのうちの 0.1ml をプラスミド DNA と混合して 30℃ の 2500 lux 光照射下で 5 時間置いた。BG-11 の寒天培地に UV 照射して滅菌した Hybond C メンブレン (Amersham) を置き、その上に *Synechococcus* 7942-DNA 混合液の一部を拡げる。2 日後、5 μ g/ml のカナマイシンを含んだ寒天培地にメンブレンを移し、さらに 7 日置きに新しいカナマイシン入り寒天培地に移し、カナマイシン耐性コロニー形成を促し、その形成コロニーの数を記録した。各カナマイシン耐性コロニーよりランダムに 20 個選択し、2ml の 3 μ g/ml のカナマイシンを含む BG-11 で液体培養した。各カナマイシン耐性ラン藻細胞より DNA を抽出し、PCR またはサザン解析を行った。

2-2-2) タンパク質技術

2-2-2-1) ssDNA 結合タンパク質の調製

約 10g の *Synechococcus* 6301 の細胞を 8 g の石英砂と 5 ml のバッファー S [50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF] とともに約 30 分間ねばりが出るまで乳鉢で擦り潰した。ホモジェネートを 8,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清に固形の硫酸アンモニウムを徐々に 80% 飽和濃度まで加え、可溶性タンパク質を硫酸沈澱させた。硫酸沈澱を 10ml のバッファー T [10 % glycerol, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.1 mM DTT, 1 mM PMSF] に溶解し、dsDNA (calf thymus dsDNA-cellulose,

Sigma) カラムに 2 回通して dsDNA 結合タンパク質を除去した。dsDNA カラムを素通りした溶液を ssDNA (calf thymus ssDNA-cellulose, Sigma)カラムにかけ、倍量のバッファ T で洗浄した。ssDNA 結合タンパク質を 0.3, 0.6, 1.2, 2.0 M の NaCl を含む バッファ T で段階的に溶出した。各フラクションをアセトン沈澱で濃縮し、0.1 % SDS-15 %ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)で分離した。PVDF メンブレンに電氣的にブロッティングし、クーマシーブリリアントブルー (CBB) 染色した時に検出された 12 kDa, 38 kDa, 33 kDa のバンドを切り出し、気相プロテインシーケンサー (Perkin Elmer Applied Biosystems, 470A)にかけその N 末端配列を決定した(Matsudaira 1987)。メンブレンより溶出した 33 kDa タンパク質 (15 μ g)をさらにアルギニルエンドペプチダーゼ(TaKaRa) で 23 時間保温してペプチド断片に切断し、それぞれの N 末端配列を決定した。全ての生化学操作は 4℃以下で行った。

2-2-2-2) 38 kDa と 33 kDa のタンパク質の精製およびそれらの抗体作製

38 kDa タンパク質をコードする DNA 断片は、 λ CS211(Sugita et al. 1995b)をテンプレートとしてプライマー 38N と 38C を用いて PCR で増幅させた。33 kDa タンパク質をコードする DNA 断片は、pB2.5 をテンプレートとしてプライマー 33N と 33C を用いて PCR で増幅させた。それぞれの DNA 断片を pGEM-T (Promega)にクローニングした後、*Bam*HI-*Hind*III で切断した発現ベクター pQE30 にサブクローンした。形質転換体を 30℃で培養し、イソプロピル β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を最終濃度 0.5 mM 加えてさらに 2 時間培養し、組換えタンパク質を誘導させた。集菌した形質転換体を変性条件下で溶解させ、N 末端に 6 残基のヒスチジンを持つ組換えタンパク質を Ni-NTA カラム(QIAGEN)を用いて精製した。抗体精製のためにそれぞれ約 1 mg の組換えタンパク質を 1 週間毎に数回うさぎに注射した。*in vitro* 結合実験のためには、組換えタンパク質を非変性条件下で精製した。

2-2-2-3) *Synechococcus* 6301 の細胞画分の調製

Synechococcus 6301 は 20 ℓ の BG-11 培地で 30℃で対数増殖中期 (Klett 値 70) まで培養した。約 8 g の細胞を等量の石英砂とともに徐々にバッファ A [20 mM Tris-HCl

(pH 8.0), 10 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, 20 mM NH_4Cl , 5 mM β -mercaptoethanol] を 15ml まで加えながら乳鉢で擦り潰した。軽い遠心分離により細胞残渣を取り除いた後、30,000 g で 30 分遠心し、上清 (S30) を集めた。バッファー A を含む 0.4 M と 1.2 M のショ糖溶液二層の上に S30 画分を重層し、100,000 g で 4 時間遠心した。上清約 4 分の 1 の透明な層を S100 画分として集めた。また、沈澱物をバッファー B [20 mM Tris-HCl (pH7.6), 10 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, 1 M NH_4Cl , 5 mM β -mercaptoethanol] で溶解し、100,000 g で 3 時間遠心することを 4 回繰り返して洗浄した。最終沈澱物を 0.5 ml のバッファー B に溶解して、精製リボソーム画分とした。また、最初の洗浄液を硫酸沈澱して、リボソーム洗浄 (ribosome wash, RW) 画分として保存した。大腸菌 P2 392 株のリボソームも同様にして精製した。全ての生化学操作は 4℃以下で行った。

2-2-2-4) 免疫反応解析

各 10 μg (または図に指示した μg) タンパク質量の細胞分画成分に 5×サンプルバッファー (3 % SDS, 15 % β -mercaptoethanol, 50 % glycerol, 0.2 % BPB)を加え 98℃で 5 分加熱した後、15 %の SDS-PAGE し、ProBlot メンブレン (Perkin Elmer Applied Biosystems Ltd.) に電氣的にブロッティングした。20 μl の S30 画分(200 μg タンパク質量)を 13.5 ml の 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, 0.1 M NH_4Cl と 5 mM β -mercaptoethanol を含む 10 - 30 %ショ糖平衡密度勾配に重層した。日立 RPS40-T ローターを用いて 2℃で 25,000 rpm で 16 時間遠心分離した。底部より 1 ml ずつ分画し、 A_{260} と A_{280} の吸光度を測定してからアセトン沈澱したサンプルを 15 %の SDS-PAGE しブロッティングした。ブロッティングしたメンブレンは 1/4000 に希釈した抗体と反応させ、ECL ウェスタンブロッティング解析システム(Amersham Pharmacia Biotech Ltd.)で解析をおこなった。

2-2-2-5) 38 kDa と 33 kDa タンパク質の核酸結合実験

それぞれ 15 μg の核酸量を含む ssDNA, dsDNA-cellulose (SIGMA), poly (U), poly (C), poly (G)-agarose (SIGMA), poly (A)-sepharose (SIGMA)を、各モル数の NaCl を含む結合バッファー [10 mM Tris-HCl (pH7.5), 2.5 mM MgCl_2 , 0.5 % Triton X-100, 1 mM PMSF]

で2回洗浄してから、0.3 μ g の精製された組換えタンパク質を加え、4℃で10分間ロータリーシェーカーを用いてゆっくり攪拌しながら結合させた。2 mg / ml heparin (SIGMA)と NaCl を含む結合バッファー 1 ml で10分間洗浄した後、NaCl を含む結合バッファー 1 ml で2回洗浄した。それぞれの核酸ビーズに、20 μ l の蒸留水と10 μ l の5×サンプルバッファーを加えて、98℃で5分加熱して結合タンパク質を分離し、15 % SDS-PAGE にかけた。検出は免疫反応を利用したウェスタン解析で行った。

2-2-2-6) ゲルシフト解析

Synechococcus 6301 の *psbAI* 遺伝子の 102 bp の 5'-UTR と 330 bp のコード領域を持つ 432 bp の *Bam*HI-*Hind*III DNA 断片を pBluescript II SK+に挿入したプラスミドを睦田氏より提供された。*Hinf*I と *Acc*I で切断されたプラスミドをテンプレートとして使用し、T3 RNA polymerase を用いて *in vitro* 転写キット(Ambion)のプロトコールに従って α -³²P-UTP で標識された RNA を作成した。ラベルされた 124 nt と 328 nt の RNA の精製は電気泳動したゲルより切り出すことによって行われた。また、コントロールとして *Kpn*I で切断した pBluescript II SK+ をテンプレートに用いて同様に 121 nt の RNA を合成した。0.3 μ g の組換えタンパク質 (または図に指示した ng) を 10 μ l のバッファー G [20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂ and 5 mM DTT, 2 mg/ml heparin] 中で 22℃ で 5 分間保温した後、それぞれの ³²P でラベルされた RNA (50,000 cpm, 50 fmole) を加え、さらに 22℃ で 15 分間保温してタンパク質と核酸の結合を促進させた。サンプルは速やかに 8 % ポリアクリルアミドゲル (1/30 bis) [50 mM Tris, 50 mM ホウ酸, 1 mM EDTA (pH 8.3)] で 22℃ で 150 V、90 分間電気泳動した。基本的操作は Current Protocols in Molecular Biology に従った。ゲルをろ紙に密着させてゲルドライヤーで乾燥させイメージングプレートに感光させて、BAS2000 (Fuji) で解析した。

3章 結果

3-1) ラン藻 *Synechococcus* 6301 の ssDNA 結合タンパク質

3-1-1) ssDNA 結合タンパク質の分画

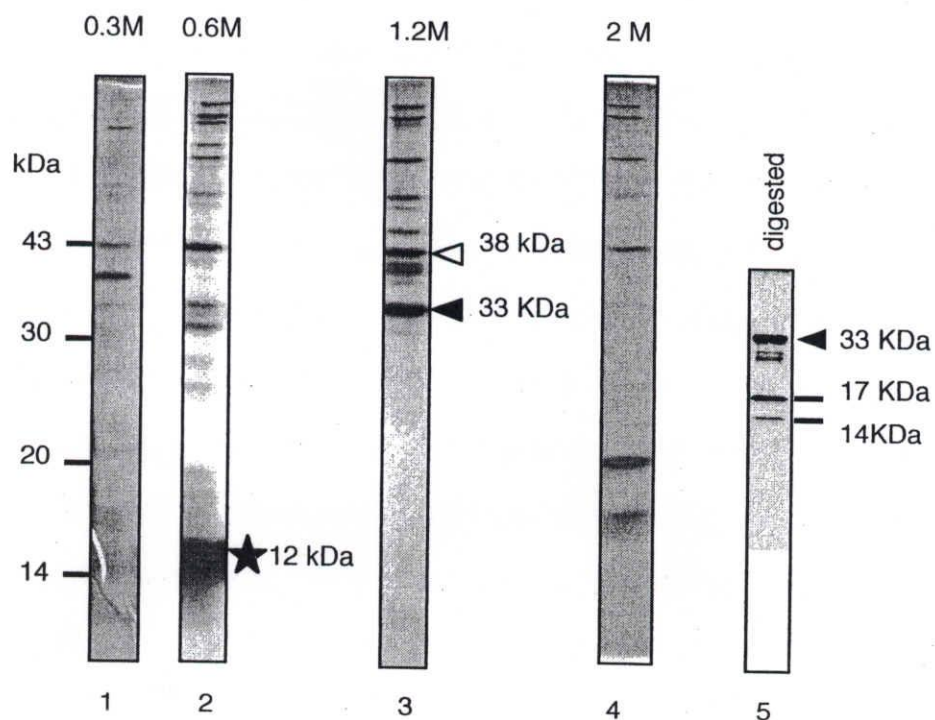
ラン藻はグラム陰性細菌に属することから、その翻訳過程は大腸菌に類似していると考えられてきたが、近年ラン藻には独自の翻訳調節機構の存在が示唆されるようになってきた。そこでラン藻 *Synechococcus* sp. PCC6301 に特有の RNA 代謝に関わる因子を同定することを目的として、多くの RNA 結合タンパク質が一本鎖 DNA (ssDNA) によく結合する性質を利用して、*Synechococcus* 6301 細胞の可溶性画分を ssDNA カラムに吸着させた。0.3 M, 0.6 M, 1.2 M, 2.0 M の NaCl を含むバッファー S (10 % glycerin, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM DTT, 1 mM PMSF) で ssDNA 結合タンパク質を段階的に溶出させた。各溶出画分のタンパク質の電気泳動の結果を図 1 に示す。

0.6 M NaCl で多量に溶出されてくる 12 kDa のタンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列は S/TIYVGNLS(Y/F)E(V/A)TEADLT XV FAXYGPVKRVQRNA [(/) は 2 種類のアミノ酸残基の可能性があることを示す。また、X は決定できないアミノ酸残基を示す] であり、RNA 結合タンパク質であることが明らかになった (Sugita and Sugiura 1994)。

0.6 M から 1.2 M 画分にかけて溶出されてくる 38 kDa のタンパク質および 1.2 M で多量に溶出されてくる 33 kDa のタンパク質についてさらに解析を行った。

3-1-2) 38 kDa の ssDNA 結合タンパク質のアミノ酸配列

Synechococcus 6301 細胞の可溶性画分の ssDNA 結合タンパク質のうち 1.2 M NaCl で溶出されるタンパク質をゲルろ過で脱塩し、ULTRACENT-10 (東ソー) で濃縮し、さらにアセトン沈澱して SDS-PAGE にかけた (図 1、レーン 3)。電気泳動後、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜にブロッティングし、気相プロテインシークエンサーにかけ N 末端アミノ酸配列を決定した。VTQDIPAVDIGFTXEXXA (X は決定できないアミノ酸残基を示す) であることが分かった。このアミノ酸配列をタンパク質のデータベース Swiss-Prot. Rel. 25 と NBRF-PDB Rel.37 で検索したが、類似性を示すタンパク質が得られなかったため、未知のタンパク質であると結論づけた。



決定されたアミノ酸配列

12 kDa (S/T)IYVGNLS(Y/F)E(V/A)DLTXVFAXYGPVFAXYGPVRVQRNA
 38 kDa VTQDIPAVDIGFTXEXXA
 33 kDa PSAANTP
 17 kDa GVTADLEGLRAFTPRRTLNEKED
 14 kDa not determined

図1

Synechococcus 6301のssDNA結合タンパク質のSDS-PAGEパターン
 細胞の可溶性画分をssDNAカラムに通して、0.3 M (レーン1), 0.6 M (レーン2), 1.2M (レーン3), 2.0 M (レーン4)のNaCl濃度を含むバッファーで段階的に溶出した各分画を15%SDS-PAGEで分離し、銀染色した。星印は12 kDaのタンパク質、白抜き三角は38 kDaのタンパク質、黒色三角は33 kDaのタンパク質を示す。レーン5は33 kDaのタンパク質をさらにアルギニルエンドペプチダーゼで分解した産物の17%SDS-PAGEパターンを示す。気相プロテインシーケンサーで決定した各々のペプチドのアミノ酸配列を下に示した。(/)は2通りの可能性が考えられたアミノ酸残基、Xは決定できなかったアミノ酸残基を意味する。

3-1-3) 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質のアミノ酸配列

38 kDa タンパク質のアミノ酸配列を決定する同過程で、33 kDa タンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定した。それは PSAANTP であった (図 1、 レーン 3)。しかし、このアミノ酸配列をもとに合成オリゴヌクレオチドを設計してこのタンパク質に対応する遺伝子の分離を試みたが成功しなかった。そこで、藤城らによって 33 kDa タンパク質の内部アミノ酸配列が決定された。PVDF 膜から溶出された 33 kDa タンパク質をアルギニルエンドペプチダーゼ (TaKaRa) で 37℃ 23 時間保温し 18 % SDS-PAGE を行った (図 1、 レーン 5)。この酵素による切断で 17 kDa と 14 kDa のポリペプチド断片が生じた。14 kDa のポリペプチド断片はバンドが薄く、プロテインシークエンサーにかけてもアミノ酸配列は決定できなかった。17 kDa のペプチド断片の N 末端側の 23 残基のアミノ酸配列が GVTADLEGLRAFTPRRTLNEKED であると決定された。38 kDa タンパク質の相同性検索と同様に、33 kDa タンパク質の内部アミノ酸配列の類似性を調べたところ、放線菌の一種が持つエリスロマイシン生合成信号伝達タンパク質 ERYC1 と相同性を示した。しかし、相同性は 47.8 % であるが、分子量が 39 kDa とちがうことから機能的に関連があるとは考えにくく別のタンパク質であると推測した。このタンパク質も未知のタンパク質であると結論づけた。

3-2) 12 kDa の RNA 結合タンパク質の機能解析

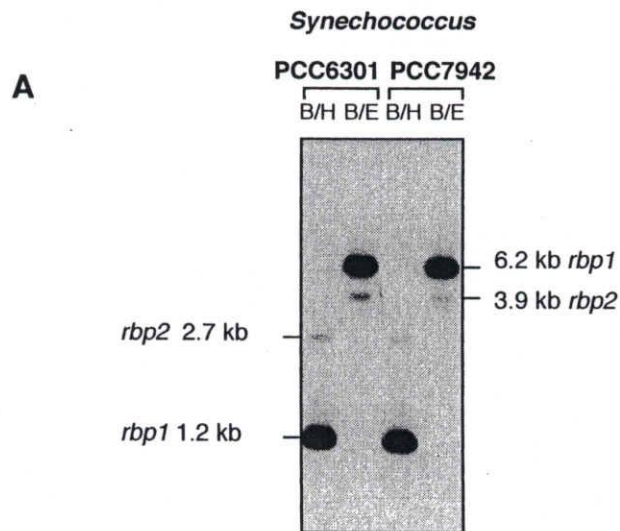
12 kDa の ssDNA 結合タンパク質をコードする遺伝子 (*rbp1*, *rbp2*) が *Synechococcus* 6301 ゲノム DNA ライブラリーから分離同定された (Sugita and Sugiura 1994)。それぞれの遺伝子はゲノム上に 1 コピーであり、金子らによって両遺伝子のゲノム上の位置が決定された (Kaneko et al. 1996b)。Sugita と Sugiura (1994) によって転写開始点の決定とノーザン解析が行われ、それぞれの遺伝子はモノシストロニックに転写されることが分かった。これらのことより、それぞれの遺伝子を破壊しても他の遺伝子構造に与える影響はないと考えられたので以下の実験を行った。

3-2-1) *Synechococcus* 6301 と *Synechococcus* 7942 の *rbp1* と *rbp2* 遺伝子

Synechococcus 7942 と *Synechococcus* 6301 は以前は *Anacystis nidulans* R2 と 6301 と呼ばれ、同種の変異株と考えられている。*Synechococcus* 7942 は外来 DNA の自然取り込み率が高いため形質転換効率が大変高い株なので、相同組換えによる遺伝子破壊実験によく使用される(Golden et al. 1987)。*Synechococcus* 6301 の形質転換法も開発された(Takeshima et al. 1994)が、熟練した技術が要される。そこで、*Synechococcus* 7942 を用いた遺伝子破壊実験を行うために、プライマー 5'RNP1 と 3'RNP1、5'RNP2 と 3'RNP2 を用いて *Synechococcus* 7942 ゲノム DNA から *rbp1* および *rbp2* 遺伝子を含む領域を PCR し、塩基配列を決定した。図 2B に示したようにほとんど塩基配列が一致するが、*rbp2* のコード領域に 1 ケ所ちがいが見つかった。*Synechococcus* 6301 では t のところが *Synechococcus* 7942 では a になってバリン残基がアスパラギン酸残基に変化している。また、サザン解析でも全く同じパターンを示し(図 2A)、これらの遺伝子領域の同一性が確認された。そこで、以降の実験を *Synechococcus* 7942 を用いて行った。

3-2-2) *rbp1*, *rbp2* 遺伝子の欠損変異体の作製

図 3 に示した様に *rbp1* および *rbp2* の遺伝子にカナマイシン耐性遺伝子カセットを挿入したプラスミド DNA (pKA4、 pKA7、 pKA8) を用いて形質転換した結果を表 1 に示す。ポジティブコントロールとして *rps1* 転写開始点より上流の位置にカナマイシン耐性カセットを挿入した pKA6 を使用し、ネガティブコントロールとして等量のバッファーのみを使用した。3 回の形質転換実験を行い、pKA6 と pKA4 を用いた形質転換実験ではネガティブコントロールの 5 倍から 50 倍の形質転換体が生じた。このうち 20 コロニーを分離して継代培養を繰り返し、PCR でカナマイシン耐性遺伝子挿入位置を確認した形質転換体の中から 1 つを、*rbp2* 欠損変異体 M407 と命名し、今後の実験に用いた。



B *Synechococcus* PCC7942 *rbp1*

```

aactctctcttttcggagacaactccatgtctatattacgttggttaacctgtcctacgaggttacagaagctgacttgaccgccgtatttacg 91 nt
      M S I Y V G N L S Y E V T E A D L T A V F T 22 aa

gagtatggtgcggtcaagcgagttcaactgcctatcgatcggtgaaaccgggtcggtgctggttttcggttttgcgaaatgagcgctgat 181
E Y G A V K R V Q L P I D R E T G R M R G F G F V E M S A D 52
                                     StuI
gcagaagaagatgctgcgattgctgcacttagcggagctgagtggatggcgccgagggcctccgctcaacaaagcaaagccccgtgaggag 271
A E E D A A I A A L G G A E W M G R G L R V N K A K P R E E 82

cgcagtggtggcggtcgtctcgccgggtggcggtggcggtggcggtggcggtggcggtggcggtggcggtggcggtggcggtggcggtggcggt 361
R S G G G S F G G G G R R G G G G G G G Y R N Y * 107

gaaccattgcaaacattcactgaaattta 390

```

C *Synechococcus* PCC7942 *rbp2*

```

ctcgccttaggatacgcaagtgcgatttacgttggttaactcttccgcgcgacccgaggaagatggttcggaagtgttcgcagagtat 90 nt
      V T I Y V G N L S F R A T E E D V R E V F A E Y 24 aa
                                     XmnI

ggccccgttagtcgggttagcctgcctgacgatcggtgaaacaggtgcgcctccgtggttcgctttcattgaaatggaagaagatgctcac 180
G P V S R V S L P D D R E T G R L R G F A F I E M E E D A H 54
      t
      v
gaagatgctgctatcagcgagctcgatggcgctgagtgggttggtcgccagctgcgcgctcagcaaaagcgctcccaagatgatcgctcgt 270
E D A A I S E L D G A E W F G R Q L R V S K A R P K D D R R 84

cctgccgcacgtagcggtgctacgccgacaactaagcaattgactgtctaaagttaaatctgtgtgtgaagagtctgggcaagcgctcagg 360
P A A R S G A T P T T K Q L T V * 100

cttttttg 369

```

図2

A. ゲノムサザン解析 *Synechococcus* 6301と*Synechococcus*7942のDNA (0.5 µg)をEcoRI/HindIII (E/H)または BamHI/HindIII (B/H)で切断した。プローブには*Synechococcus* 6301*rbp1*のCS-RBDをコードする249 bpのDNAを使用した。*Synechococcus* 7942の*rbp1* (**B**), *rbp2* (**C**)の塩基配列と推定されるアミノ酸配列 カナマイシン耐性遺伝子カセットを導入した制限酵素部位を下線で示した。*Synechococcus* 6301と異なる塩基およびアミノ酸残基は太字で示し、その上下に*Synechococcus* 6301の塩基およびアミノ酸残基を二重下線で示した。

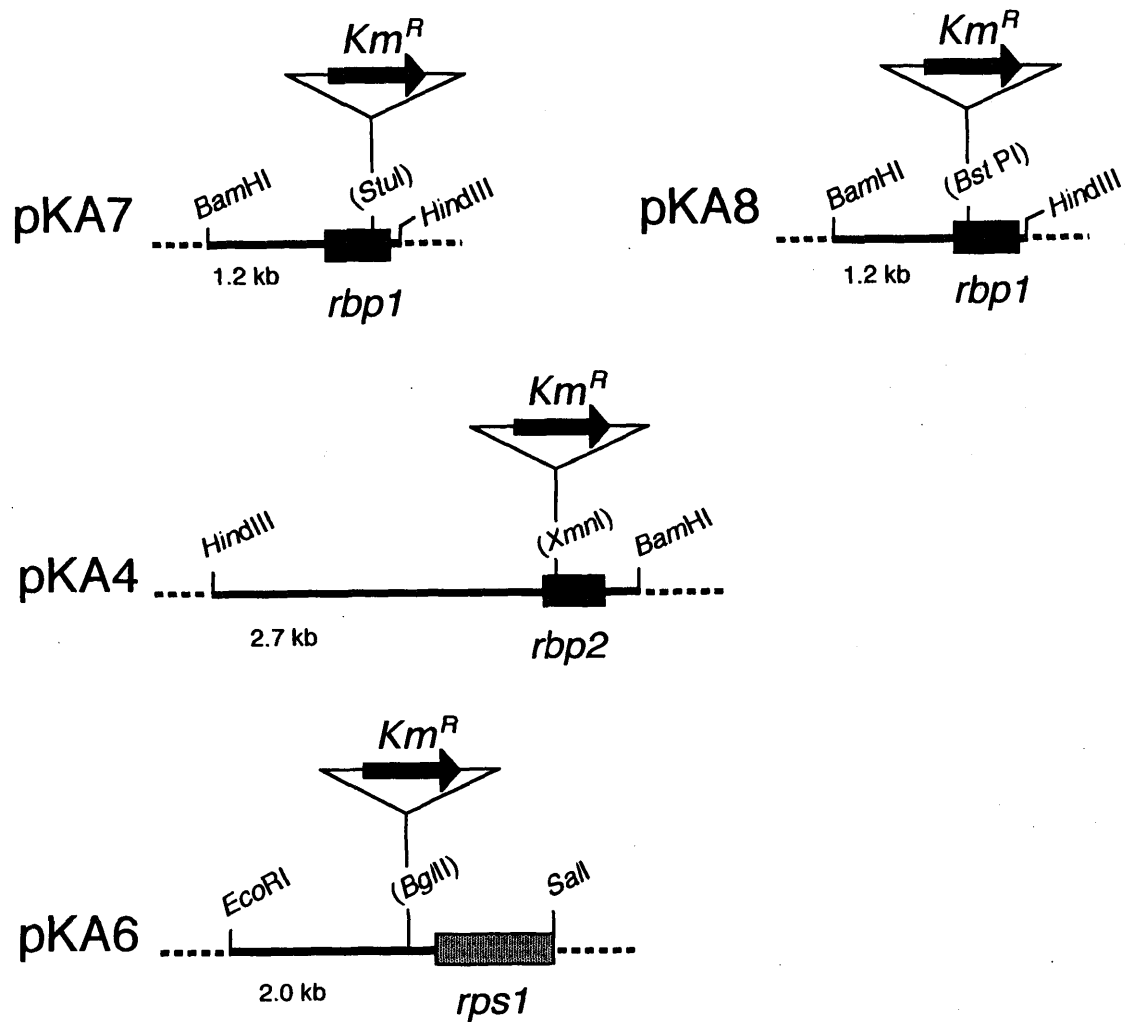


図3

*rbp1*および*rbp2*遺伝子破壊実験に用いたプラスミドDNAの模式図
*Km^R*はカナマイシン耐性遺伝子カセットを、その下の矢印は転写方向を示す。黒色のボックスは遺伝子を、太い実線は相同組換えに用いた遺伝子の周辺領域を示す。カッコで示した制限酵素部位にカナマイシン耐性カセットを挿入した。

plasmid	*Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Mutant cell
Numbers of colonies per plate				
No	30	270	192	
pKA6 (<i>rpsI</i>)	> 10,000	> 1,000	>10,000	
pKA4 ($\Delta rbp2$)	> 2,000	> 1,000	> 10,000	M407
pKA7 ($\Delta rbp1$)	118	384	n. d.	M710, M711
pKA8 ($\Delta rbp1$)	n. d.	n. d.	177	
*Exp, experiment				
n, d., not determined.				

表 1

3 回の独立した形質転換実験で出現したカナマイシン耐性コロニーの数

pKA7 と pKA8 を用いた形質転換実験では、ネガティブコントロールの 1 倍から 4 倍程度の形質転換体しか生じなかった。このうち 20 クローンを分離しカナマイシンを含む液体培地で継代培養をつづけた。pKA8 を用いた形質転換実験ではカナマイシン耐性形質転換体は得られなかった。pKA7 によるカナマイシン耐性を示した形質転換体の PCR 解析を行ったところ、4 クローンが得られた。このうちカナマイシン挿入位置が *rbp1* にあり、全てのゲノムが置換されたホモザイガスな *rbp1* 欠損変異体を M710 と命名し、これを今後の解析に用いた。M711 はカナマイシン耐性のセレクションを繰り返し行ってもヘテロザイガスなまま変わらなかった。

rbp2 欠損変異体 M407 と *rbp1* 欠損変異体 M710 の DNA を精製しサザン解析を行った結果を図 4 に示す。*rbp1* 翻訳領域をプローブにすると野生型では 6.2 kbp の *Bam*HI と 1.2 kbp の *Bam*HI-*Hind*III 断片にハイブリダイズする。M407 は *rbp1* 遺伝子については野生型なので、同等の結果を示す。M710 は *rbp1* 遺伝子に 1.1 kbp のカナマイシン耐性遺伝子カセットが挿入されているため、7.3 kbp の *Bam*HI 断片にハイブリダイズする。また、カナマイシン耐性遺伝子カセットには *Hind*III 部位があるために 1.6 kbp と 0.6 kbp の *Bam*HI-*Hind*III 断片にハイブリダイズする。また、M710 は *rbp1* 遺伝子座において完全に変異型に置換されていることがわかる。

次に、*rbp2* 翻訳領域をプローブにすると野生型では 3.9 kbp の *Bam*HI と 2.7 kbp の *Bam*HI-*Hind*III 断片にハイブリダイズする。M710 は *rbp2* 遺伝子については野生型なので、同等の結果を示す。M407 は *rbp2* 遺伝子に 1.1 kbp のカナマイシン耐性遺伝子カセットが挿入されているため、5.0 kbp の *Bam*HI 断片にハイブリダイズする。また、カナマイシン耐性遺伝子カセットには *Hind*III 部位があるために 3.1 kbp と 0.7 kbp の *Bam*HI-*Hind*III 断片にハイブリダイズする。また、M407 は *rbp2* 遺伝子座において完全に変異型に置換されていることがわかる。

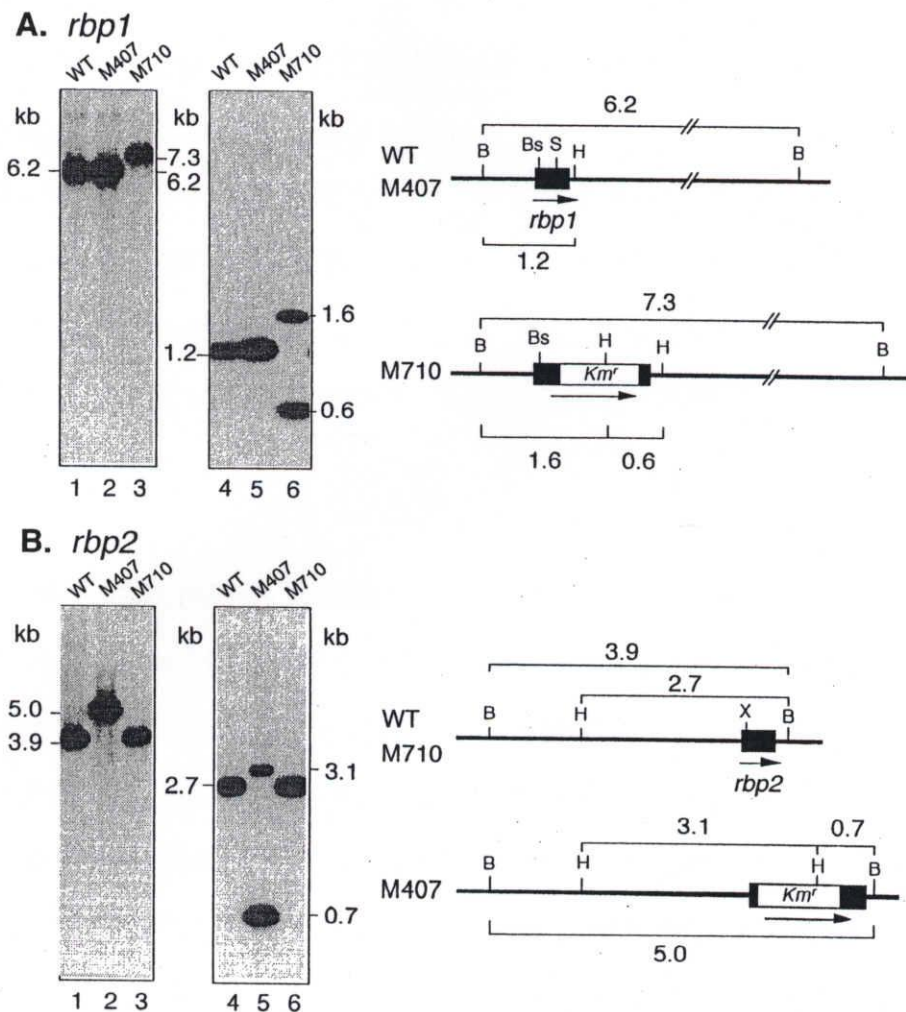


図4

野生株と変異株のゲノムサザン解析 野生株 (WT) と変異株 (M407, M710) のゲノムDNAを *Bam*HI (レーン1-3) または *Bam*HI/*Hind*III (レーン4-6) で切断し、*rbp1* (A), または *rbp2* (B) に特異的な領域をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。野生型 *rbp* 遺伝子と変異型遺伝子の制限酵素地図を右側に示した。水平の太い線は *Synechococcus* 7942 のゲノムDNAを示し、*rbp* と *Km^r* 遺伝子は黒色と白色のボックスで示した。B (*Bam*HI) と H (*Hind*III) の制限酵素部位をサザン解析に使用した。また、S (*Stu*I), Bs (*Bst*PI), X (*Xmn*I) はそれぞれ *Km^r* 遺伝子を挿入した制限酵素部位を示す。矢印は転写の方向を示す。数字はハイブリダイズしたバンドのサイズ (kbp) を表す。

3-2-3) 温度条件による変異株の増殖の差異

野生型、*rbp2* 欠損変異体 M407、*rbp1* 欠損変異体 M710 を 30℃、36℃、20℃で培養し、世代時間を測定した。30℃では 12 時間と 3 種の株に違いは見られなかった。36℃では野生型と M407 では 8.5 時間と短くなったが、M710 では 11 時間とあまり 30℃での培養より世代時間は短くならなかった。

顕著な違いは、20℃のときに見られた。野生型と M407 では世代時間は 36 時間と長くはなるが増殖を続けることができた。しかし、M710 では 20℃ではほとんど成長することができなかった(図 5)。このことは、*rbp1* 欠損変異体 M710 は低温に弱い性質を持つことを示している。すなわち、Rbp 1 は低温での細胞増殖のための機能を持つことが推定される。

3-2-4) 欠損変異体の mRNA 蓄積量

低温での *rbp1* と *rbp2* の発現量を見るために、30℃で対数増殖中期まで培養した野生型と変異体 M407、M710 を 10℃に移して 2 時間後に全 RNA を抽出してノーザン解析を行った(図 6)。*rbp1* 欠損変異体 M710 では *rbp1* mRNA は検出できなかった。また、*rbp2* 欠損変異体 M407 でも *rbp2* mRNA は検出できなかった。

まず、*rbp1* の低温での mRNA 蓄積量を見ると、野生型で 10 倍、M407 でも 5 倍に増加していた。3-2-3 同様に Rbp 1 は低温での機能を持つことが推定される。

次に、*rbp2* の低温での mRNA 蓄積量を見ると、野生型でも M710 でもほとんど検出されなくなる。プローブ濃度、RI の比活性はほとんど同じであるにもかかわらず、*rbp2* の mRNA 蓄積量は *rbp1* のそれにくらべかなり低いことが分かる。これは、転写量を反映しているのか、mRNA の安定性を反映しているのかさらに調べる必要がある。

また、低温にシフトした時の他の遺伝子の mRNA 蓄積量を見ると遺伝子ごとに異なっている。光化学系 II の D2 タンパク質をコードする *psbB* では低温では mRNA 蓄積量はほとんど消失する。リボソームタンパク S1 をコードする遺伝子 *rps1* は逆に低温になると mRNA 蓄積量は増加する。リボソームタンパク S1 は 30℃の時にも

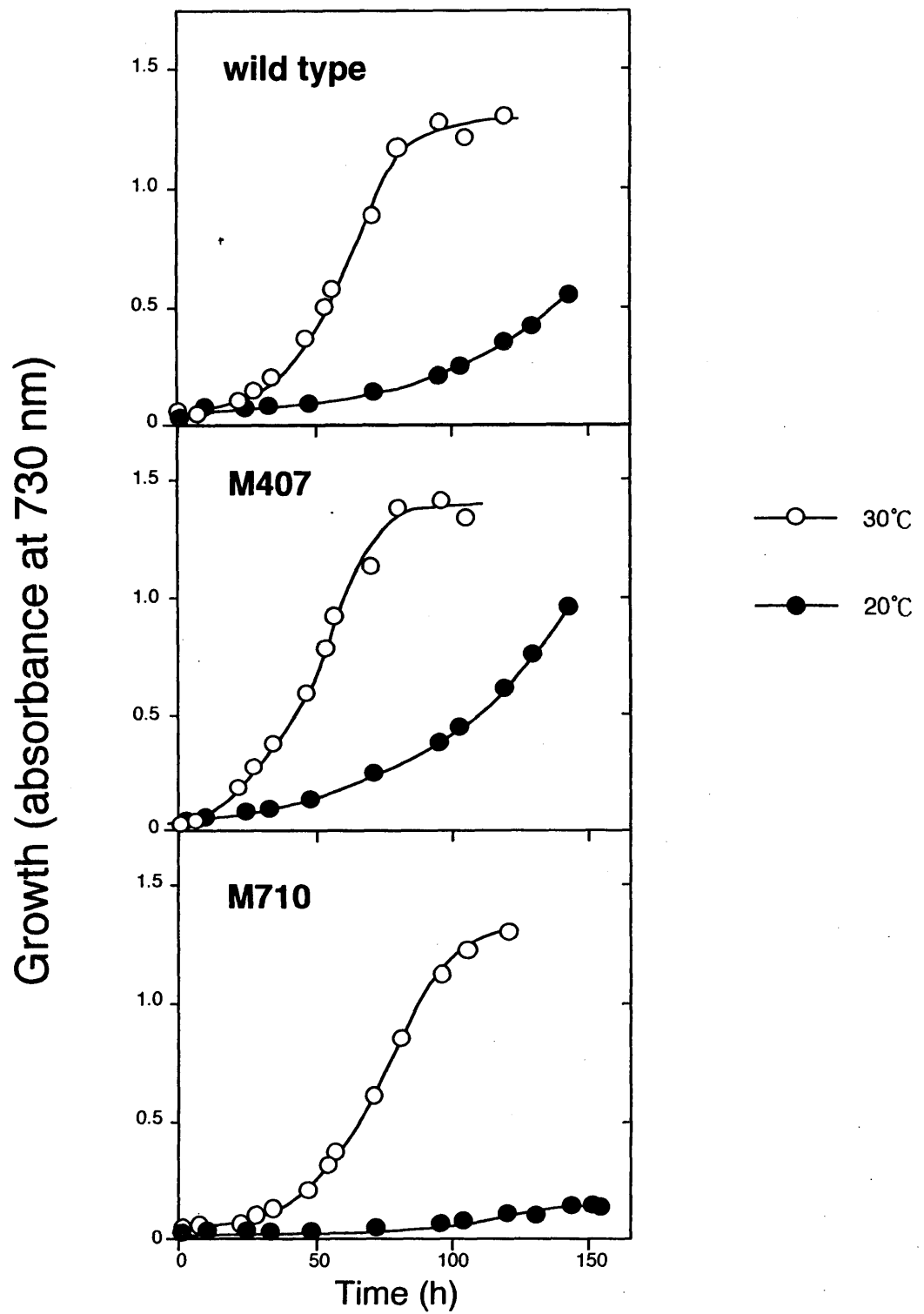


図5

野生株と rbp 遺伝子破壊株の異なった温度による増殖曲線
細胞はKratz and MyersのC培地で2500 luxの照度, 100 rpmの振とう条件で増殖させた。細胞濃度は730 nmの吸収で測定し、データは3種類の株の各々の増殖を示す。白丸と黒丸は30°Cと20°Cの時の培養をそれぞれ表す。

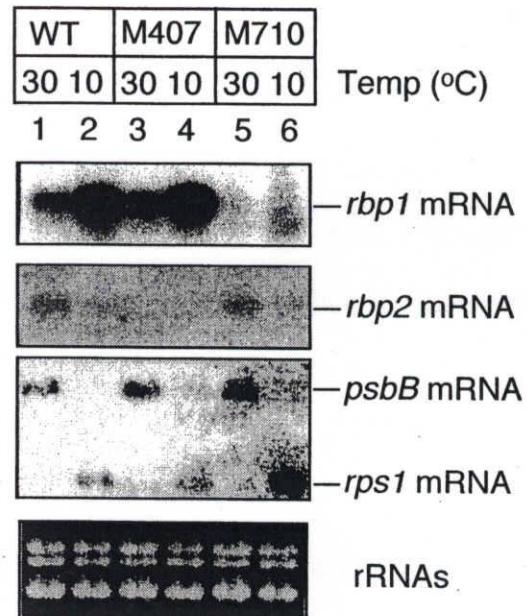


図6

コールドショック後の*rbp*のノーザン解析

野生株と変異株の全RNAを抽出し、各々の遺伝子に特異的な領域をプローブとしてハイブリダイゼーションさせた。30°Cで対数増殖期初期まで培養し（レーン1, 3, 5）、10°Cに2時間置いた後に集菌しRNAを抽出した（レーン2, 4, 6）。最下段のパネルは全RNAのエチジウムブロマイド染色のパターンのうちrRNAの量を示した。

転写翻訳はされているはずなので、30℃の時に mRNA 蓄積量がほとんど検出されないのは mRNA の安定性が極めて低く、ターンオーバーが速いと推測される。10℃での *rps1* の mRNA 蓄積量が増加することは、安定性が増すためと考えられる。*rbp1* 欠損変異体 M710 での 10℃での *rps1* の mRNA 蓄積量が野生型に比べ増加しているのは、やはり RNA の安定性と関係があるのかもしれない。*rbp2* 欠損変異体 M407 では他の mRNA 蓄積量に与える顕著な影響はここでは見られなかった。

3-3) 38 kDa の ssDNA 結合タンパク質の遺伝子の解析

3-3-1) 38 kDa の ssDNA 結合タンパク質の遺伝子のスクリーニング

38 kDa の ssDNA 結合タンパク質をコードする遺伝子を分離同定するために、Meng ら(Meng et al. 1989)によって作成されたラン藻 *Synechococcus* 6301 ゲノム DNA ライブラリーをブランクハイブリダイゼーションによってスクリーニングした。プローブには、決定されたアミノ酸配列 1 から 13 残基および開始コドンのメチオニン残基より作成された合成オリゴヌクレオチド 42 mer を用いた。スクリーニングの結果、図 7 に示すように 18.5 kbp の λ クローン λ CS211 が分離された。さらに、プローブにハイブリダイゼーションする領域、2.0 kbp の *EcoRI*-*SaII* 断片、1.5 kb の *PstI* 断片が pBluescript II KS⁺ にサブクローンされ、それらの塩基配列 2359 bp が決定された(図 8)。この領域には 18 アミノ酸残基から成る *orfX* の C 末端部分、*orf168*、*orf307* が同一鎖上に存在していた。*orf307* から推測される N 末端アミノ酸配列は、38 kDa タンパク質の N 末端アミノ酸配列と完全に一致することから、*orf307* は 38 kDa タンパク質の遺伝子であると決定した。

3-3-2) 38 kDa の ssDNA 結合タンパク質の遺伝子の相同性検索

アミノ酸配列の分析より N 末端にはメチオニン残基を含まないことから、成熟タンパク質は 306 アミノ酸残基より成ると決定した。*orf307* より推定されるアミノ酸配列を Swiss-Prot.Rel25 および当時の発表論文を検索したところ、ホウレンソウの葉緑体のリボソームタンパク CS1 (chloroplast ribosomal protein S1 を略し CS 1) と顕著な相

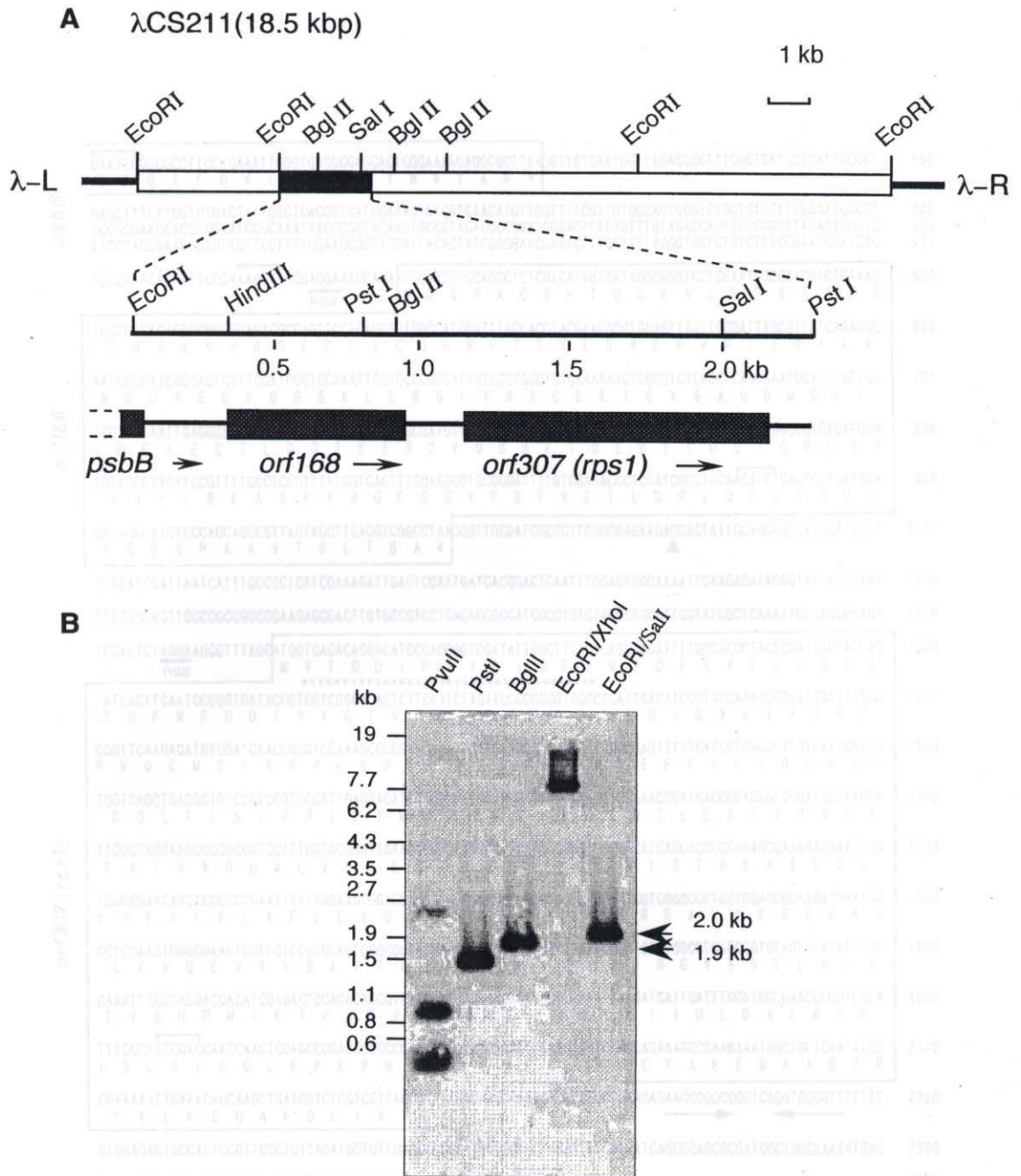


図7

A. 38 kDaのssDNA結合タンパク質遺伝子を含む λ CS211クローンの制限酵素地図
 白色のボックスは18.5 kbのインサートを示し、黒色のボックスはプローブにハイブリ
 ダイズした領域を示す。 λ -R, λ -Lは λ EMBL4の右と左のアームを表す。中段はサブ
 クローンされた領域の詳細な制限酵素地図、下段は塩基配列を決定した結果唆され
 た3つの*orf*を示す。

B. λ CS211クローンのサザン解析
 プロープには1.1 kbpのSalI-BglII断片を使用した。
 この塩基配列はDDBJのD28752に登録されている。

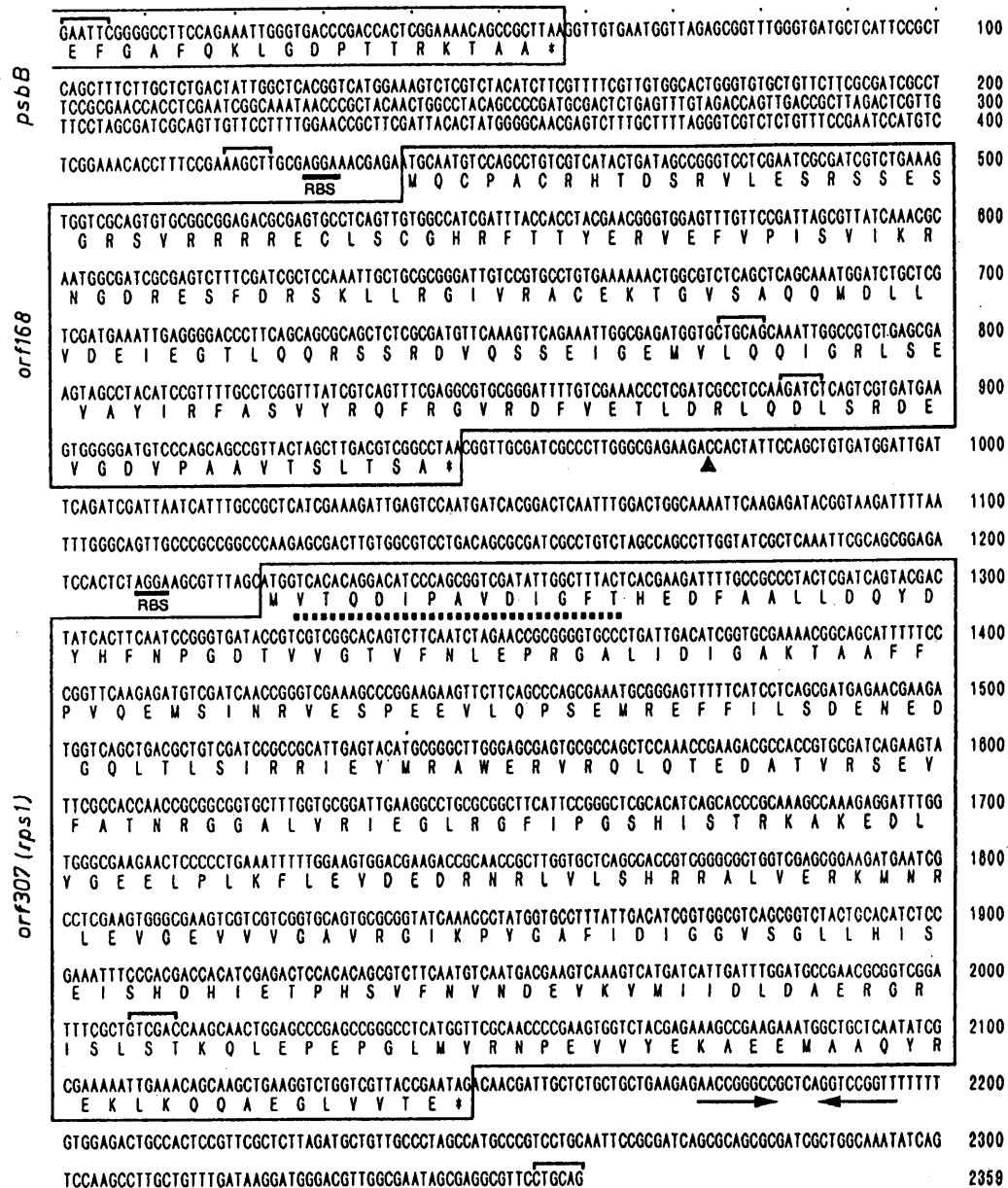


図8

λ CS211の内2.3 kbpのEcoRI-PstI領域の全塩基配列と推定されるアミノ酸配列タンパク質をコードする可能性のある領域を枠で囲った。orf307の破線の下線を引いたアミノ酸配列は、38 kDaのssDNA結合タンパク質から決定したアミノ酸配列のN末端13アミノ酸残基と一致した。リボソーム結合部位 (RBS) と推定される塩基配列を太い実線で示した。三角はorf307の転写開始点を示す。逆位反復配列を2本の逆向きの矢印で示した。この塩基配列はDDBJのD28752に登録されている。

同性を示した。図 9A にそのアライメントを示したように、40.8 %のアミノ酸の一致性、86.3 %のアミノ酸の類似性があった。CS1 は核ゲノムにコードされ、41 アミノ酸残基のトランジットペプチドを持つ全長 411 アミノ酸残基から成る。葉緑体に輸送後 370 アミノ酸残基の成熟タンパク質になりその分子量は約 40 kDa であることが報告されている (Franzetti et al. 1992a)。この当時発表されていた原核生物のリボソームタンパク S1 は、*Escherichia coli* (Schnier and Isono 1982), *Providencia* sp. (unpublished), *Rhizobium melilotii* (Schnier et al. 1988)のみであった。*E. coli* S1 は 557 アミノ酸残基から成る約 60 kDa のタンパク質で分子量が大きく異なる。当時、紅藻 *Porphyra pupurea* の葉緑体 DNA の全塩基配列が決定され、葉緑体のリボソームタンパク S1 が高等植物とは異なり葉緑体ゲノムにコードされていることが発表された(Reith and Munholland 1993)。Reith らの好意により紅藻葉緑体リボソームタンパク S1 の塩基配列より推定されたアミノ酸配列を送付してもらった。2つの葉緑体のリボソームタンパク S1 との相同性から、*Synechococcus* 6301 の 38 kDa の ssDNA 結合タンパク質はリボソームタンパク S1 であると決定した。このラン藻はグラム陰性細菌の一種であるにもかかわらず、大腸菌などのグラム陰性細菌より植物葉緑体のリボソームタンパク S1 により近いことがわかる。このことから、ラン藻は葉緑体の始源生物であるという細胞内共生説を支持できる。

3-3-3) リボソームタンパク S1 の分子内構造と機能

大腸菌のリボソームタンパク S1 (*E. coli* S1 を略して ES1) は、その機能と構造が最もよく調べられている(序章、Subramanian 1983, 1984)。その分子内構造は、S1 ドメインと言われる約 80 アミノ酸残基からなる内部繰り返し領域が 6 個タンデムに並んでいる。N 末端側の 2 つの S1 ドメインは、タンパク質同士の相互作用によりリボソームと結合し、C 末端側の 4 つのドメインは mRNA の 5' 非翻訳領域 (UTR) と結合し、正しい翻訳開始位置の決定と翻訳効率に関わっている。ホウレンソウ葉緑体リボソームタンパク CS1 の分子内構造は、3 つのドメインがタンデムに並んだ構造を持っていることが調べられている(Franzetti et al. 1992a)。ES1 の半分の機能ドメインしか持たないにもかかわらず、CS1 はリボソーム結合能と RNA 結合能の両方の機能を持つことが

A

spinach	CS1	1	MASLAQQLAGGLRCPLSNSNLSPKHTLKPRFSPIVSAVAVSNAQTRERQKLKQLF	60
Porphyra	CS1	1	-----	0
PCC6301	38K	1	-----	0
spinach	CS1	61	EDAYERCRNAPMEGVSTIDDFHTALDKYDFNSEMGSRVKGTVFCTDANGALVDITAKSS	120
Porphyra	CS1	1	-----MTKNNESFTHRNFAAVLQKYKYDLNLGDIVAGTIFSFELNGVLVDIGTPVS	51
PCC6301	38K	1	----SVTQDIPAVDIGFTHEDEFAALLDQYDYHFNPGDTPVVGTVFNLEPRGALIDIGAKTA	56
		 * * * * *	
spinach	CS1	121	AYLPLAEACIYRIKNVEEAGIIPGVREEFVIIGENEADDSLILSLRQIQYELAWERCRL	180
Porphyra	CS1	52	AYLPIQEVSSNQELNNFNLSLNDTREFFLLDYNVESRQLILSIRREYIRAWKRIRQL	110
PCC6301	38K	57	AFFPVQEMSINRVESPEEV-LQPSEMREFFILSDENEDGQLTSLIRRIEYMRWERVRQL	115
			* * * * * * *	
spinach	CS1	181	QAEDVVVKGKIVGANKGGVVALVEGLRGFVPFSQISSKSSAEELLEKEIPLKFVEVDEEQ	240
Porphyra	CS1	111	LAEDSLLDVRIKGFNKGGMIVNLEGISGFVPNSHLNFSKNTSSTNKFIKLKLNVEEKS	170
PCC6301	38K	116	QTEDATVRSEVFATNRGGALVRIEGLRGFIPGSHISTRKAKEDLVGEELPLKFLEVEDR	175
			..** * * * *	
spinach	CS1	241	SRLVMSNRKAMADSQ-AQLGIGSVVTGTQSLKPYGAFIDIGGINGLLHVSQISHDRVSD	299
Porphyra	CS1	171	NNLILSHRRALIAQASSNLIVGNIEGVINQITPYGLFIKAGNLKGLVHISEINVQVER	230
PCC6301	S1	176	NRLVLSHRRALVERKMRLEVEGVVGAVRGIKPYGAFIDIGGVSGLLHISEISHDIET	235
			..* * * * * *	
spinach	CS1	300	IATVLQPGDTLKVMIISHDRERGRVSLSTKKLEPTPGDMIRNPKLVFEKAEMAQTFRQR	359
Porphyra	CS1	231	IPSQFKIGDTIKAVIIHVDKKQGRSLSMKHLK-----	263
PCC6301	38K	236	PHSVFNVNDEVKVMIIDLDAERGRISLSTKQLEPEPGLMVRNPEVVYEKAEMAAQYREK	295
		 * * * *	
spinach	CS1	360	I-AQAEAMARADMLRFQPEGLTLSSDGILGPLTSDLPAEGLDLSVPPAVES	411
Porphyra	CS1	264	-----	263
PCC6301	38K	296	LKQQAEGLVVTE-----	307
			...	

B

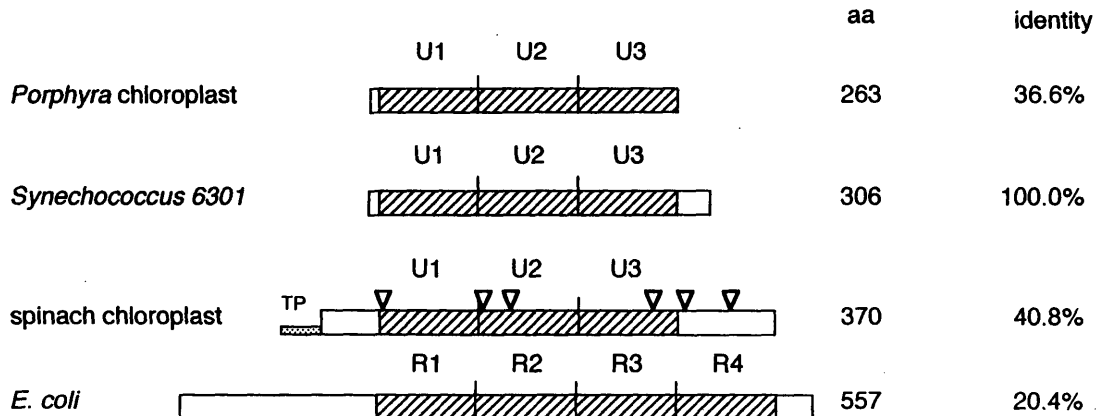


図9

A. 3種類のタンパク質のアライメント

PCC6301 38Kは*Synechococcus* 6301のorf307から推定されるアミノ酸配列、spinach CS1とPorphyra CS1はホウレンソウと紅藻の葉緑体リボソームタンパクS1を示す。*は3つのアミノ酸配列が一致したもの、.は3種のうち2つのアミノ酸残基が一致したもの、-はギャップを示す。

B. 4種類の生物のリボソームタンパクS1の模式図

斜線の領域は内部繰り返し配列U1-U3を表す。R1からR4は*E. coli*のS1で決定されたS1 RNA結合ドメインを示す。TPはトランジットペプチドを示す。aaは成熟タンパクS1のアミノ酸残基数を示し、identityは*Synechococcus* 6301のS1を100%とした時のアミノ酸配列の一致性を示す。spinach chloroplastの三角はイントロンの挿入位置を示す。

報告されている。*Synechococcus* 6301 のリボソームタンパク S1(*Synechococcus* 6301 ribosomal protein S1 を略して SS1)と推定される 38 kDa タンパク質の分子内構造を調べると、図 9B で表したように CS1 と同様に約 80 アミノ酸残基からなる繰り返り単位が 3 つタンデムに並んだ構造をしている。CS1 に比べ、38 kDa タンパク質は 306 アミノ酸残基とさらに短くそれは S1 ドメインを含まない N 末端側と C 末端側の両方の領域で短くなっている。これらのことから 38 kDa タンパク質は葉緑体リボソームタンパク CS1 とよく似た構造であることがわかる。また、Franzetti らは CS1 のゲノミッククローンも分離し 6 個のイントロンの位置を決定した(Franzetti et al. 1992b)。CS1 は *Synechococcus* 6301 のリボソームタンパク S1 より N 末端側と C 末端側が長い、第 1 イントロンと第 6 イントロンはちょうどその位置に挿入されている。葉緑体から核ゲノムへ移行していく過程で新たなエクソンを得るという仮説によくあっている。

3-3-4) *Synechococcus* 6301 の *rps* 1 遺伝子の周辺領域に存在する *orf* の相同性検索

*rps*1 遺伝子上流に存在する 2 つの *orf* 遺伝子 (*orf*X, *orf*168) より推定されるアミノ酸配列をプロテインデータベース Swiss-Prot との相同性検索を行った。ORFX の C 末端配列は葉緑体の光化学系 II P680 クロロフィルアポプロテインをコードする光合成遺伝子 *psbB* の C 末端と高いアミノ酸の一致性を示した(図 10A)。*orf*168 遺伝子は機能未知の遺伝子 *E. coli* の *ybaD* と相同性を示した (図 10B)。大腸菌の *rpsA* 遺伝子上流には *mssA* (または *cmK*、シチジンメチルキナーゼをコードする)が同鎖上にあり、紅藻の *rps*1 上流には相補鎖上に機能未知の遺伝子 *ycf29* と小さな *orf* がある。ラン藻 *Synechococcus* 6301 の *rps*1 遺伝子上流の遺伝子配置とは全く異なった形をしている。

A Alignment of C-terminus of *orfX* and Tobacco chloroplast *psbB*

```

psbB  MGLPWYRVHT VVLNDPGRLL SVHIMHTALV AGWAGSMALY ELAVFDPSDP VLDPMWRQGM 60 aa
      FVIPFMTRLG ITNSWGGWSI TGGTVTNPGI WSYEGVAGAH IVFSGLCFLA AIWHWVYWDL 120
      EIFCDERTGK PSLDLPKIFG IHLFLSGVAC FGFGAFHVTG LYGPGIWVSD PYGLTGKVQP 180
      VNPAWGVEGF DPFVPGGIAS HHIAAGTLGI LAGLFHLSVR PPQRLYKGLR MGNIETVLSS 240
      SIAAVFFAAF VVAGTMWYGS ATTPIELFGP TRYQWDQGYF QQEIYRRVSA GLAENQSLSE 300
      AWSKIPEKLA FYDYIGNNPA KGGLFRAGSM DNGDGIAGVW LGHPIFRDKE GRELFVRRMP 360
      TFFETFPVVL VDGDGIVRAD VPFRAESKY SVEQVGVTVE FYGGELNGVS YSDPATVKKY 420
      ARRAQLGEIF ELDRATLKSD GVFRSSPRGW FTFGHASFAL LFFFGHIWHG ARTLFRDVFA 480
      GIDPDLDQV  EFGAFQKLGD PTTKRQAA 508
                ***** *** **
orfX  ----- EFGAFQKLGD PTTRKTAA

```

B Alignment of ORF168 and *E. coli ybaD*

39.9 %

```

orf168 MQCPACRHTD SRVLESRSSE SGRSVRRRRE CLSCGHRFTT YERVEFVPIS VIKRNGDRES 60 aa
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ybaD   MHCPCFAVD TKVIDSRLVG EGSSVRRRRQ CLVCNERFTT FEVAELVMPR VVKSNQDVREP 60

orf168 FDRSKLLRGI VRACEKTGVS AQQMDLLVDE IEGTLQQRSS RDVQSSEIGE MVLQQIGRLS 120
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ybaD   FNEEKLRSGM LRALEKRPVS SDDVEMAINH IKSQLRATGE REVPSKMIGN LVMEQLKKLD 120

orf168 EVAYIRFASV YRQFRGVRDF VETLDRLQDL SRDEVGDVPA AVTSLTSA 168
      ***** * * * * * * * * * *
ybaD   KVAYIRFASV YRSFEDIKEF GEEIARLED- ----- 149

```

図10

Synechococcus 6301の*rps1*遺伝子上流にある*orfX*と*orf168*の相同性検索
A. *orfX*のC末端配列とタバコ葉緑体の光化学系IIの遺伝子*psbB*のコードするタンパク質とのアライメント。

B. *orf168*と*E. coli*の*ybaD*のコードする機能未知のタンパク質とのアライメント。
 *はアミノ酸残基が一致したもの、-はギャップを示す。

3-3-5) *rps1* 遺伝子のサザン解析

Synechococcus 6301 のゲノム DNA とのサザン解析を行った結果、8.8 kbp の *EcoRI* 断片, 20 kbp 以上の *SalI* 断片, 1.9 kbp の *BglI* 断片に一本ずつシグナルがでた (図 11B)。このことは、ラン藻の *rps1* 遺伝子はゲノム上にシングルコピーとして存在していることを示している。さらに、*SwaI* および *PmeI* で切断したゲノム DNA をパルスフィールド電気泳動後サザン解析した結果、125 kbp の *SwaI* 断片, 1250 kbp の *PmeI* 断片にシグナルがでた (図 11A)。これらの結果から、金子らによって作製された *Synechococcus* 6301 の物理地図 (Kaneko et al. 1996b)に載せると図 11C のようになる。

3-3-6) *rps1* の発現解析

Synechococcus 6301 を通常培養条件で対数増殖期中期まで培養して全 RNA を抽出したものと、図 12 で示した *rps1* 遺伝子を含む 2.3 kbp の *EcoRI-SalI* 領域 (A)をプローブにしてノーザン解析をおこなった。2.0 kbp, 1.2 kbp, 0.7 kbp の主に 3 つの転写物が検出された。1.2 kbp の *BglI-SalI* 領域(D)をプローブにすると、1.2 kbp の強い転写物と 0.7 kbp の弱い転写物が検出された。*rps1* 遺伝子が単一で転写されるとおよそ 1.2 kbp の長さになる。これらの結果を考えあわせると、*rps1* の mRNA はモノシストロニックに転写され、比較的大量に存在することがわかる。また、0.6 kbp の *HindIII-BglI* の領域(C)をプローブにした結果は強い 0.7 kbp と弱い 2.0 kbp の転写物が検出された。また、1.1 kbp の *EcoRI-BglI* の領域 (B)をプローブにした結果は、強い 2.0 kbp と弱い 0.7 kbp の転写物が検出された。結果を考えあわせると、*orf168*は 0.7 kbp の単一な転写単位として転写されることが分かった。この mRNA も安定に大量に存在することが分かった。

杉田によってプライマー伸長法によって mRNA の 5'末端が決定された(Sugita et al. 1995b)が、翻訳開始コドンより上流-250nt の位置であることが分かった。この上流には原核生物に共通する典型的なプロモーター配列は観察されない。3'末端は決定されていないが、図 9 で示したように *rps1* の 3'UTR 領域に短い逆位反復配列が存在するので、ここに出来た安定なステムループ構造が転写終結点あるいは mRNA

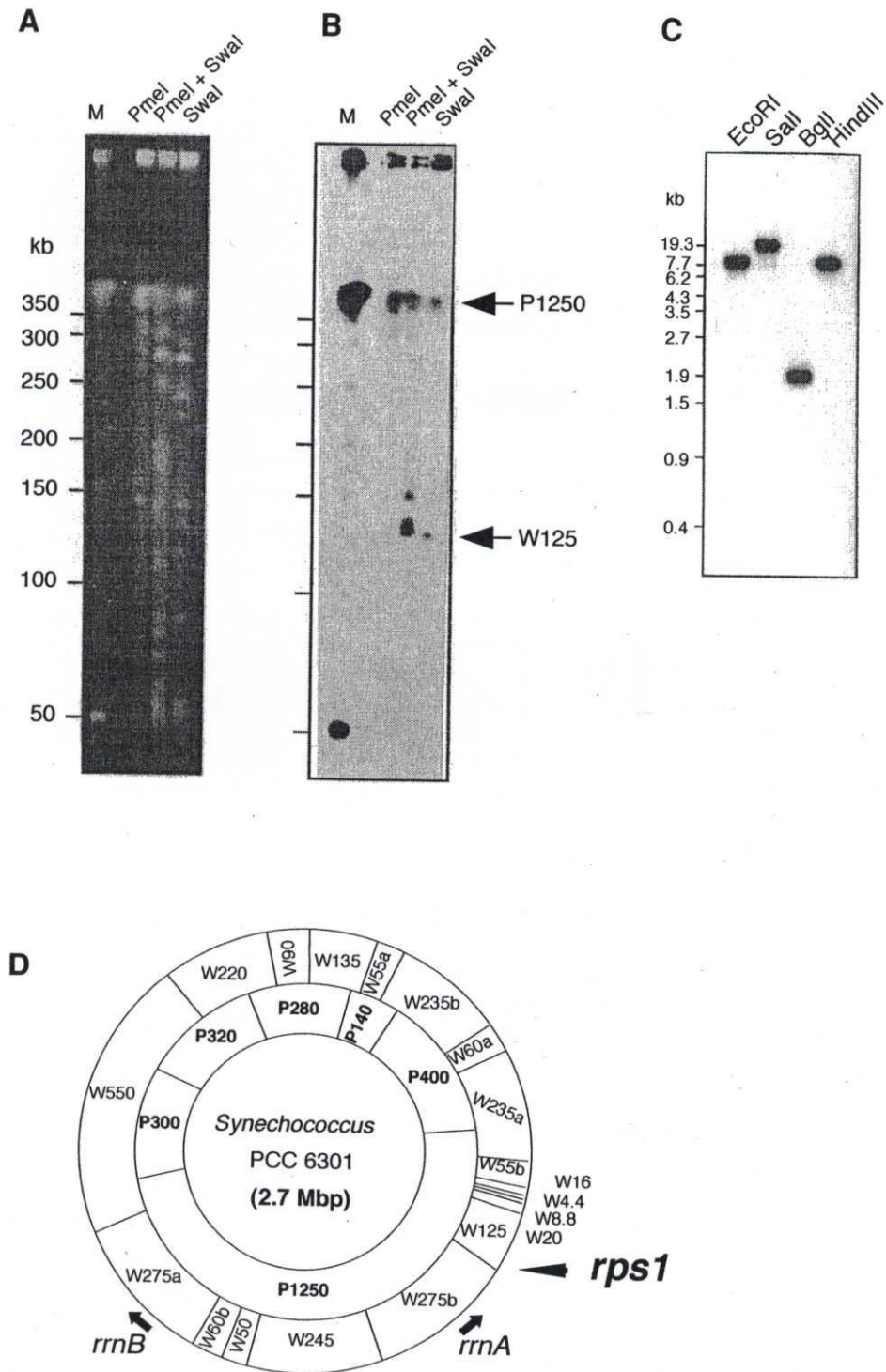


図11

Synechococcus 6301の*rpsI*遺伝子のゲノムサザンとゲノム上の位置

- A.** *Synechococcus* 6301のゲノムDNAをPmeI, SwaIで切断、または両酵素で二重切断し、パルスフィールドアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した。
- B.** *rpsI*遺伝子をプローブとしてAで作製したメンブレンとサザンハイブリダイゼーションを行った。λ DNAも同時にラベルしサイズマーカーを検出させた。
- C.** *Synechococcus* 6301のゲノムDNAをEcoRI, SalI, BamHI, HindIIIで切断し *rpsI*遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。
- D.** Bで求めたサザンハイブリダイゼーションの結果より、*rpsI*遺伝子の位置をゲノム上に示した。

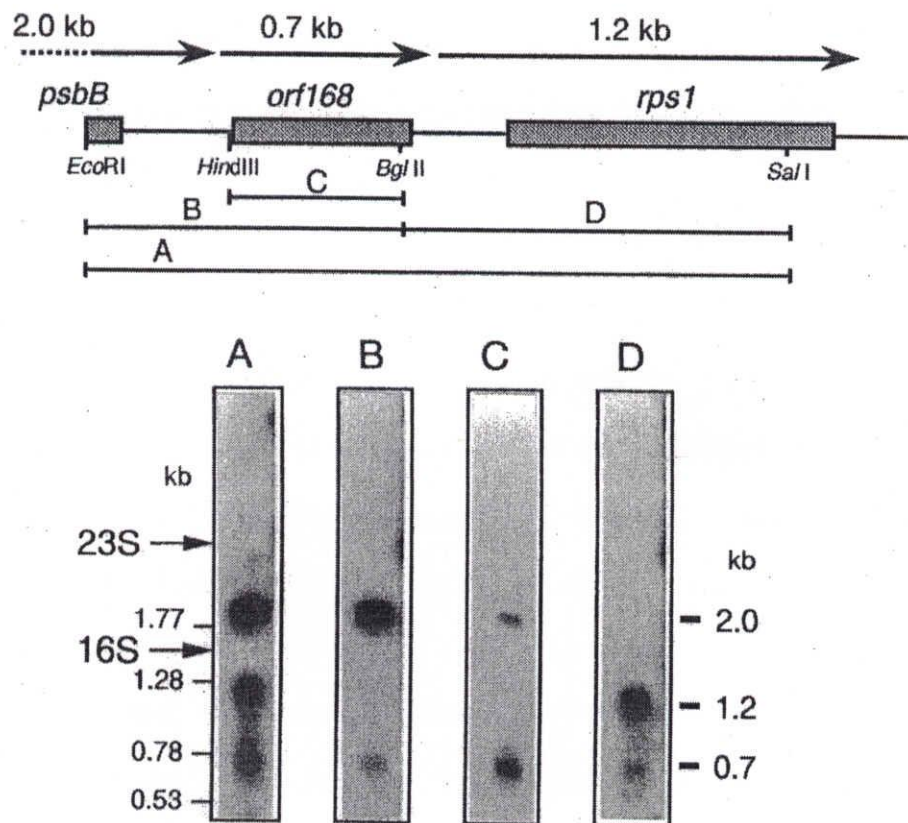


図12

rps 1 とその上流の領域のノーザン解析

上の遺伝子地図に示したように、Aは2.0 kbの *Eco*RI-*Sal*I断片, Bは0.88 kbの *Eco*RI-*Bgl*II断片, Cは0.46 kbの *Hind*III-*Bgl*II断片, Dは1.13 kbの *Bgl*II-*Sal*I断片である。AからDまでの各断片を ³²Pでラベルしてプローブとしてノーザン解析を行った結果を下に示す。矢印は転写の方向を示す。RNAのサイズマーカーは23Sと16SのrRNAおよび530 ntから1770 ntのRNAラダー(BRL)を使用した。

の 3' プロセス部位であろう。

3-4) 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質の遺伝子の解析

3-4-1) 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質の遺伝子のスクリーニング

33 kDa の ssDNA 結合タンパク質をコードする遺伝子を分離同定するために、上記の *Synechococcus* 6301 ゲノム DNA ライブラリーをプラークハイブリダイゼーションによってスクリーニングした。プローブには、アルギニルエンドペプチダーゼで切断された 17 kDa のポリペプチドのアミノ末端より決定されたアミノ酸配列 1 から 13 残基より作成された合成オリゴヌクレオチド 42 mer を用いた。スクリーニングの結果、図 13 に示すように 18.5 kbp の λ クローン λ 33K-1 を分離した。さらに、プローブにハイブリダイゼーションする領域、2.5 kbp の *Bam*HI 断片、1.1 kb の *Bam*HI-*Hind*III 断片を pBluescript II KS+ にサブクローンし、それらの塩基配列 2435 bp を決定した(図 14)。この領域には 23 アミノ酸残基から成る *orfY* の C 末端部分、*orf295*、*orf285*、*orfZ* の N 末端部分が同一鎖上に存在していた。*orf295* から推測されるアミノ酸配列 3 から 9 残基は、33 kDa タンパク質の N 末端アミノ酸配列と完全に一致した。また、*orf295* から推測されるアミノ酸配列 129 から 151 残基は、17 kDa ポリペプチドの N 末端アミノ酸配列 23 残基と完全に一致した。ことから、*orf295* は 33 kDa タンパク質の遺伝子であると決定した。

3-4-2) 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質の相同性検索

アミノ酸配列の分析より N 末端にはメチオニン残基およびセリン残基を含まないことから、成熟タンパク質は 293 アミノ酸残基より成ると決定した。*orf295* より推定されるアミノ酸配列を BLAST で検索したところ、*Synechococcus* 6301 の 38 kDa ssDNA 結合タンパク質であるリボソームタンパク S1、ホウレンソウの葉緑体のリボソームタンパク CS1 と相同性を示した。図 15 に *Synechococcus* 6301 の S1 とのアライメントを示した。

また、Cyanobase で相同性検索を行ったところ、slr1984 と最も相同性が高く 41.0% のアミノ酸の一致性があった。*Synechocystis* sp. PCC6803 のこの遺伝子も *rpsI* に仮分

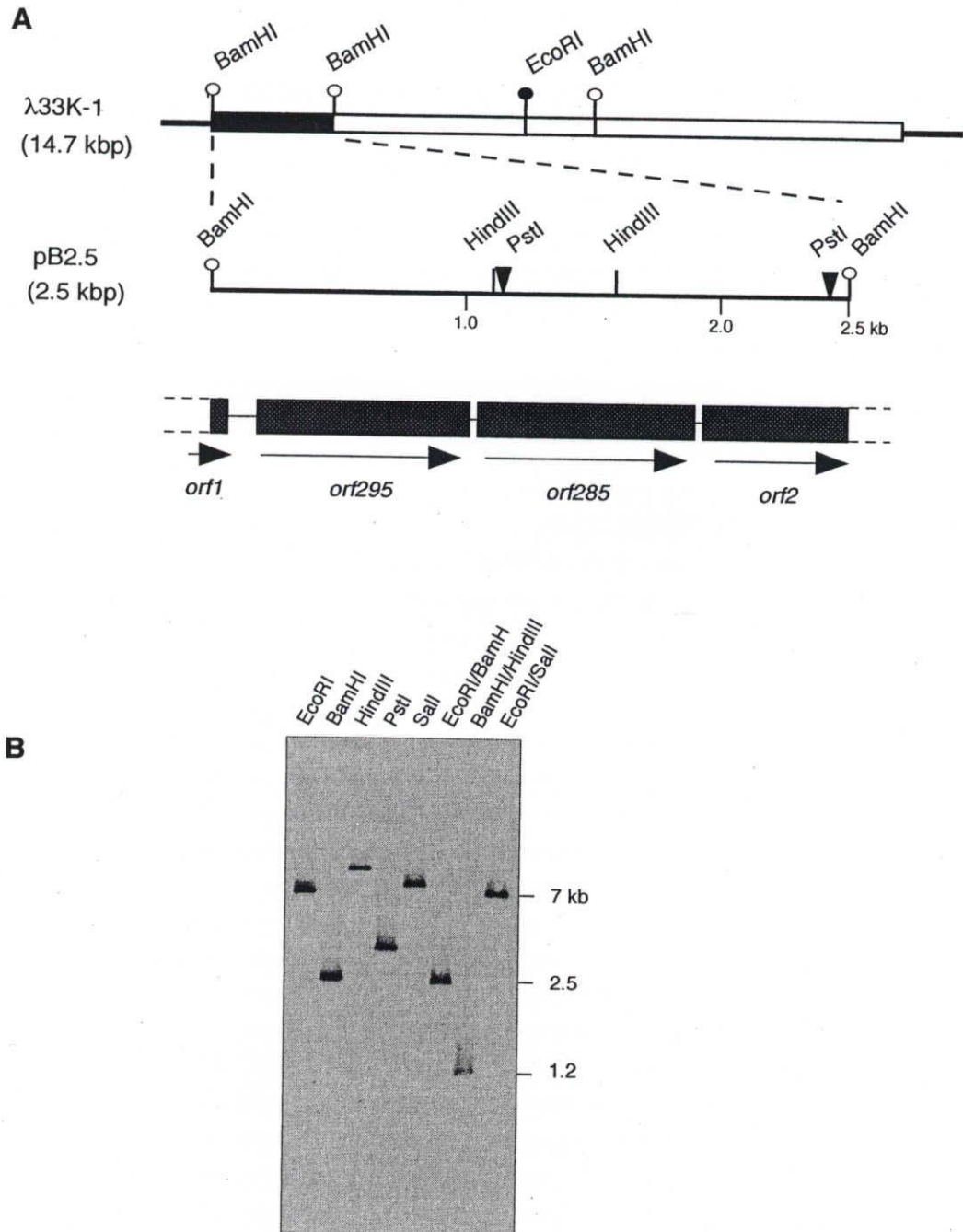


図13

A. 33kDaのssDNA結合タンパク質遺伝子を含むλ33K-1クローンの制限酵素地図
白色のボックスは14.7 kbのインサートを示し、黒色のボックスはプローブにハイブリダイズした領域を示す。中段は、サブクローンされた領域の詳細な制限酵素地図 下段は塩基配列を決定した結果、4つのorfの存在が示唆された。

B. λ33K-1クローンのサザン解析

λ33K-1のDNA (0.5 μg)を各々の制限酵素で切断しハイブリダイゼーションを行った。プローブにはオリゴヌクレオチド33P(2-1-3参照)を使用した。

33K	PSAANTPSYDDFALALEAQSLDSQKGQLVRGKVCEYSTDGAYIDIGGKAPAF LPK	55
	...*** * * . * * . . . ** * *	
SS1	VTQDIPAVDIGFTHE DFAALLDQYDYHFNPGDTVVGTVFNLEPRGALIDIGAKTAAFFPV	60
33K	REAALHAVLDLEAHLPKDEELEFLVIRDQNE DGQVTVSLRALALEQAWTRVAELQEGGQT	115
	. * . . . * . * . * . * * * * *	
SS1	QEMSINRVESPEEVLQPSEMREFFILSDENEDGQLTSLIRRIEYMR AWEVRQLQTEDAT	120
33K	VQVKVTGSNKGGV TADLEGLRAFIPRSHLNEKEDLSLKGKTLTVAFLEVN RADKKLVLS	175
	* . * . . . * * * * *	
SS1	VRSEVFATNRGGALVRIEGLRGFIPGSHISTRKAKEDLVGEELPLKFLE VDEDRNRLVLS	180
33K	ERQAARTALVREIEVGQLINGKVTGLKPF GVFVDLGGATALLPINQISQKFVADVGAIFK	235
	. * . * . . . * * * * *	
SS1	HRRALVERKMNRLLEVGEVVVGAVRGIKPYGAFIDIGGVSGLLHISEISHDHIETPHSVFN	240
33K	IGDPIQALVVAIDNTKGRISLS TKVLENHPGEILENVAELQASAADRAERARKQLESQ	293
	. * * * * * *	
SS1	VNDEVKVMII DLDAERGRISLS TKQLEPEPGLMVRNPEVVYEKAEMAAQYREKLKQQA E	
SS1	GLV VTE	306

identity 37.4%
similarity 80.4%

図15

33 kDaの ssDNA結合タンパク質と*Synechococcus* 6301のリボソームタンパクS1のアライメント

上段は33 kDaのssDNA結合タンパク質 (33K)の amino 酸配列、下段は*Synechococcus* 6301のリボソームタンパクS1 (SS1)の amino 酸配列を示す。*は amino 酸残基が一致したもの、.は類似性のある amino 酸残基を示す。

類されていて、*Synechocystis* 6803 では *slr1356* と *slr1984* の 2 つのリボソームタンパク質 S1 遺伝子が存在することになっている。

Synechococcus 6301 にも S1 および S1 に類似したタンパク質の 2 つが存在するので、ここで新たな疑問が生じる。*Synechococcus* 6301 と *Synechocystis* 6803 のリボソームには 2 種類の S1 タンパクが構成成分として存在するのだろうか。それらは、協調的にまたは択一的にリボソーム成分となりうるのだろうか。または、全く別の機能を持つタンパク質なのだろうか。これらの疑問を解決するために 3-5 以降の実験を行った。

3-4-3) 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質遺伝子の周辺領域に存在する *orf* の相同性検索

33 kDa タンパク質遺伝子 *orf295* の 39 bp 上流には *orfY* 遺伝子の 3' 側が存在する。*orf295* の同一鎖上 3 bp 下流に *orf285* があり、さらにその 3 bp 下流に *orfZ* の 5' 側が存在していた。これらの遺伝子より推定されるアミノ酸配列をプロテインデータベース Swiss-Prot での相同性検索を行った。*orfZ* は大腸菌の抗生物質 MccB17 のプロセッシングに関わる因子の遺伝子 *pmbA* 遺伝子と相同性を示した。*orf285* は顕著な相同性を示す結果は得られなかった。しかし、Cyanobase との相同性検索では *Synechococcus* 6301 の *orfY*, *orf285*, *orfZ* は *Synechocystis* 6803 の *slr1618*, *sll2002*, *slr1435* と相同性を示した。*Synechocystis* 6803 のそれぞれの遺伝子 *slr1618*, *slr1984*, *sll2002*, *slr1435* のゲノム上の位置は 363433, 1815454, 1273248, 1058537 と全く別々の位置に存在していた。これらから分るように、*Synechococcus* 6301 と *Synechocystis* 6803 の遺伝子配置は全く異なった形をしていると考えられる。

3-4-4) 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質遺伝子のサザン解析

Synechococcus 6301 のゲノム DNA とのサザン解析を行った結果、9 kbp の *EcoRI* 断片、1.9 kbp の *BglII* 断片に一本ずつシグナルがでた (図 16A)。このことは、33 kDa タンパク質遺伝子はゲノム上にシングルコピーとして存在していることを示している。さらに、*SwaI*, *PmeI*, *I-CeuI* での切断またはそれぞれの制限酵素の二重切断したゲノム DNA をパルスフィールド電気泳動しサザン解析した結果、135 kbp の *SwaI* 断片、280

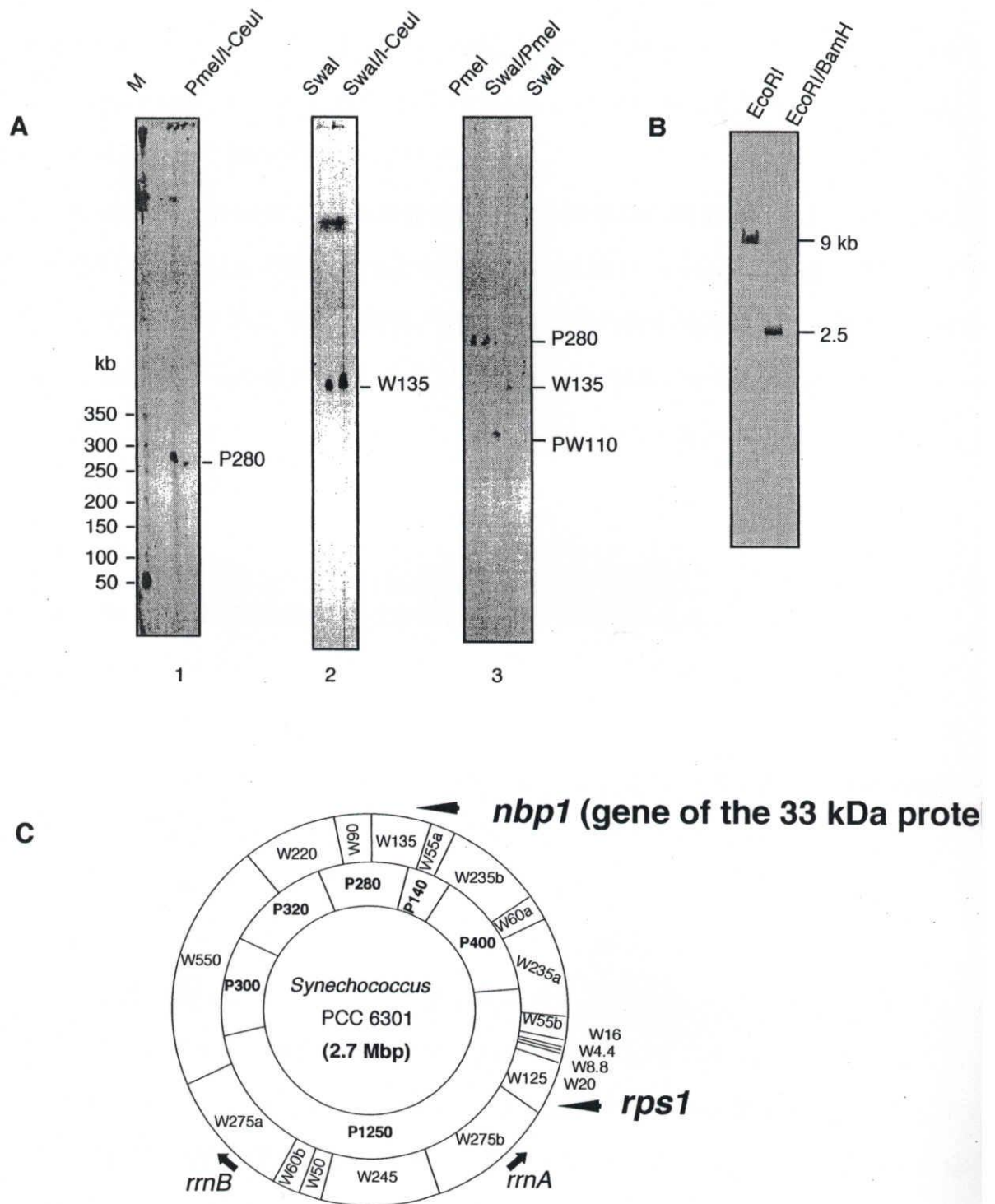


図16

Synechococcus 6301の*nbp1*遺伝子のゲノムサザンとゲノム上の位置

A. *Synechococcus* 6301のゲノムDNAを*PmeI*, *SwaI*, *I-CeuI*で切断、または両酵素で二重切断し、パルスフィールドアガロースゲル電気泳動を行い作製したメンブレンとサザンハイブリダイゼーションを行った。*nbp1*遺伝子をプローブとして、レーン1ではλ DNAも同時にラベルしサイズマーカーを検出させた。

B. *Synechococcus* 6301のゲノムDNAを*EcoRI*, *EcoRI* / *BamHI*で切断し *nbp1*遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。

C. Aで求めたサザンハイブリダイゼーションの結果より、*nbp1*遺伝子の位置をゲノム上に示した。

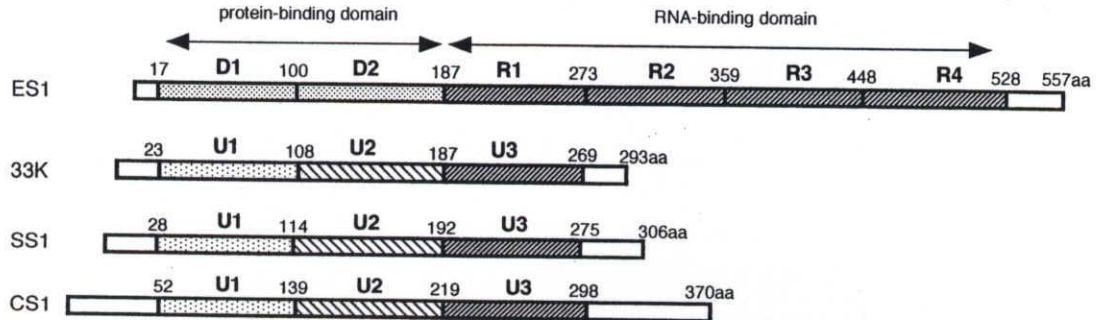
kbp の *PmeI* 断片にシグナルがでた (図 16B)。これらの結果から、金子らによって作製された *Synechococcus* 6301 の物理地図 (Kaneko et al. 1996b)に載せると図 16C のようになり、*rps1* とは全く別な位置に存在した。

また、*Synechococcus* 6301 を通常培養条件で対数増殖期中期まで培養して全 RNA を抽出したものと、33 kDa の遺伝子 *orf295* を含む PCR 産物 0.9 kbp の領域、をプローブにしてノーザン解析をおこなった結果、主に 3 本の転写物が検出された。また、*orf295* の上 3 bp 下流にある *orf285* をプローブにしてノーザン解析した結果も全く同じパターンを示した。このことから、33 kDa の ssDNA 結合タンパク質の mRNA はポリシストロニックに転写されることがわかった。

3-5) 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質と 3 種のリボソームタンパク S1 の比較

Synechococcus 6301 の 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質は 38 kDa の ssDNA 結合タンパク質であるリボソームタンパク S1 と 37.4 % のアミノ酸の一致性と 80.4 % の類似性を示した。分子内構造の繰り返し配列を調べると、3 つの S1 ドメイン構造を持つことが分かった。*Synechococcus* 6301 の 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質 (以後、33K と略す)、*Synechococcus* 6301 リボソームタンパク S1 (以後、SS1 と略す)、ホウレンソウ葉緑体のリボソームタンパク S1 (以後、CS1 と略す)、大腸菌のリボソームタンパク S1 (以後、ES1 と略す) の分子内構造模式図とアライメントを図 17 に示した。ES1 は 6 つの S1 ドメインを持つが、33K、SS1、CS1 はいずれも 3 つの S1 ドメインしか持たない。そこで、各ドメインがどのような機能を持つかを類推するために、ドメイン間の相同性検索とアライメントを行った。33K の S1 ドメインを N 末端側から 33K:U1, U2, U3 と命名した。SS1、CS1 も同様に SS1:U1, U2, U3 そして CS1: U1, U2, U3 と命名した。結果を表 2 に現した。この結果より分かったことは、まず、33K、SS1、CS1 の各ドメインが U1 同士, U2 同士, U3 同士で最も高い相同性を示したことである。このことは、3 つの S1 ドメインを持つ祖先型タンパク質が存在し、*Synechococcus* 6301 内で重複して 2 つの S1 様タンパク質が出現したこと、そして、葉緑体の CS1 はラン藻の祖先型タンパク質が進化して形成された可能性を示唆している。次に、33K-U3

A



B

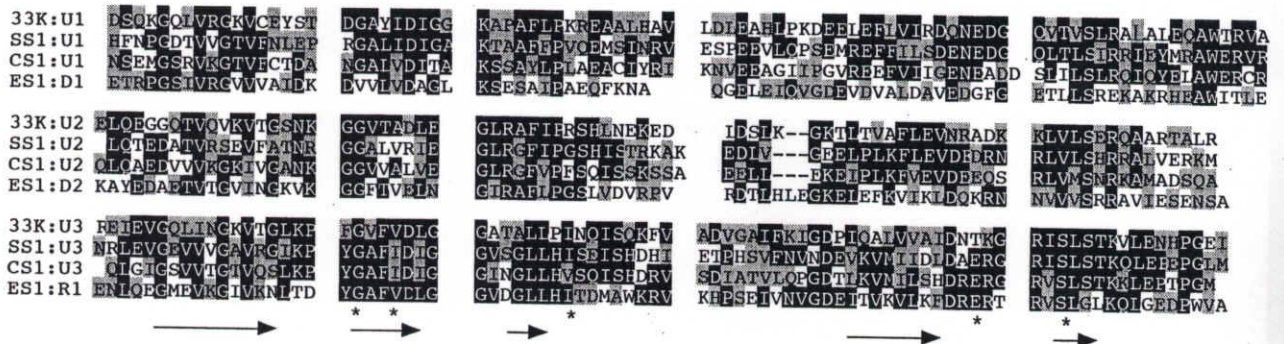


図17

A. 33 kDaのssDNA結合タンパク質と3種類の生物のリボソームタンパクS1の分子内構造の模式図
E. coli リボソームタンパク S1 (ES1), 33 kDa のssDNA結合タンパク質(33K), *Synechococcus* 6301リボソームタンパク S1 (SS1), そしてハウレンソウ葉緑体のリボソームタンパク S1(CS1)を示す。U1からU3は内部繰り返し配列を表す。R1からR4は*E. coli*のS1で決定されたmRNA結合に関わるS1 ドメイン、D1, D2はリボソームとの結合に関わるS1ドメインを示す。数字は、各領域の始まりと終わりのアミノ酸残基の位置を示す。

B. Aで示した4種類のタンパク質の各繰り返し配列のアライメント
 黒はアミノ酸残基の一致性を、灰色はアミノ酸残基の類似性を示す。*E. coli*のポリヌクレオチド加リン酸分解酵素のS1ドメインのNMR分析によって決定されたRNA結合に関わるアミノ酸残基(*)とβシート(矢印)を示した。

repeat units		33 K			SS1		
		U1	U2	U3	U1	U2	U3
33 K	U1		27.6	28.4	<u>39.5</u>	25.3	24.4
	U2	27.6		24.1	19.8	<u>39.2</u>	22.4
	U3	28.4	24.1		20.5	18.5	<u>36.1</u>
SS1	U1	<u>39.5</u>	19.8	20.5		29.9	29.1
	U2	25.3	<u>39.2</u>	18.5	29.9		24.7
	U3	24.4	22.4	<u>36.1</u>	29.1	24.7	
CS1	U1	<u>33.3</u>	23.0	16.1	<u>44.8</u>	23.9	26.1
	U2	19.8	<u>38.5</u>	17.7	25.6	<u>44.3</u>	20.0
	U3	24.4	21.2	<u>36.8</u>	33.7	26.7	<u>58.8</u>
ES1	D1	<u>30.7</u>	22.5	22.2	<u>26.1</u>	23.2	24.4
	D2	29.1	<u>28.8</u>	25.6	19.8	<u>33.3</u>	21.4
	R1	26.1	21.7	<u>33.7</u>	23.9	26.2	<u>40.7</u>
	R2	13.8	17.9	27.1	22.7	23.5	37.9
	R3	20.5	14.6	31.7	19.3	15.9	34.1
	R4	25.6	26.3	26.8	22.1	25.6	30.6

表 2

4 種類のタンパク質の各領域間の相同性 (%)

Synechococcus 6301 の 33 kDa タンパク質(33K)、*Synechococcus* 6301 のリボソームタンパク S1 (SS1)、ホウレンソウ葉緑体のリボソームタンパク S1(CS1)の分子内繰返し配列領域 U1 から U3 および *E. coli* リボソームタンパク S1 (ES1) の S1 ドメイン D1, D2, R1 から R4 の各領域のアミノ酸配列の相同性(%)を示した。Genetyx-Mac 9.0 のマキシマムマッチングプログラムを使用し、最も高い%を四角で囲った。各領域は図 17A を参照。

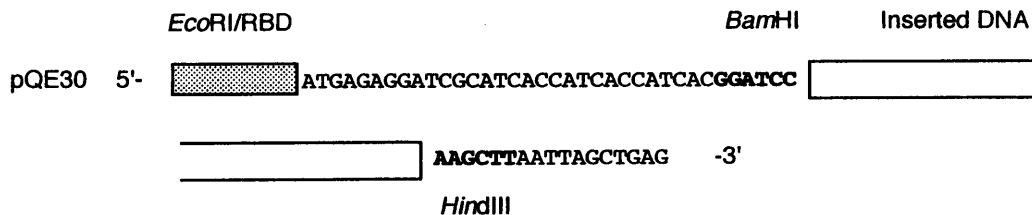
は C 末端側の ES1: R1 から R4 と相同性が高く、33K:U1, U2 は C 末端側よりはむしろ N 末端側の ES1:D1, D2 に近い相同性を示した。このことから、33K:U3 は RNA 結合機能を持つと推測され、33K:U1, U2 はタンパク質と相互作用する可能性が示唆された。

3-6) 大腸菌による大量発現系での組換えタンパク質の作製

Synechococcus 6301 の 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質はリボソームタンパクであるかどうかを調べるため、33 kDa タンパク質の抗体が必要になる。そこで、33 kDa タンパク質を大腸菌内で大量発現させ組換え 33 kDa タンパク質 (以後、r33K と略す) を精製することを試みた。同時に、コントロールとして使用する *Synechococcus* 6301 リボソームタンパク S1 の抗体を作製するために、組換えリボソームタンパク S1 (以後、rSS1 と略す) の精製も行った。

まず、それぞれのタンパク質遺伝子を導入した発現プラスミドを用いて N 末端にヒスチジン 6 残基を付加した r33K (図 18B) を 37℃ で発現誘導させたところ、発現が確認された。細胞質画分に発現誘導のかかったタンパク質が検出できたので非変性条件で精製が可能だと最初は思われた。しかし、Ni-NTA スピンカラムで精製を試みたところ、非変性状態では Ni-NTA カラムに結合せず、透過してしまい、溶出できないことが分かった (図 19A)。さらに、変性条件下でも、Ni-NTA スピンカラムでは pH 4.5 のバッファーでも溶出することが出来なかった (図 19B)。そこで、変性条件下で 100 mM EDTA を含む pH 4.5 のバッファーで溶出を行ったところ精製できた (図 19C)。大量培養し、この方法で精製を行ったところ、タンパク質濃度が 3 mg/ml だったのでそのまま透析した。しかし、透析後のサンプルは凝集してしまい不溶状態になってしまったので、沈殿物を 0.4 % の SDS を含むバッファーで再溶解させた。500 ml 培養から 3 mg の r33K が精製できた。そのうち 1 mg を抗体作製のための抗原に使用した。精製 r33K のアミノ酸分析を行ったところ、確かに N 末端に 6 ヒスチジン残基があり、導入した制限酵素から形成されるアミノ酸残基 GS が付加された後、本来のアミノ酸配列が続いていた。また、非変性条件下、変性条件下ともに Ni-NTA スピンカラムに結合できず素通りする 33 kDa のタンパク質のアミノ酸配列の N 末端分析を

A



B r33K

EcoRI BamHI

1 GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAGTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGA 60
M R G S H H H H H H G

61 TCCCTTCTGCGCCAAACACCCCTTCTTACGACGACTTTGCCCCTAGCCTTGAAGCCAG 120
S P S A A N T P S Y D D F A L A L E A Q

121 TCGCTGGATTCCCAAAAAGGCCAACTGGTACGCGGCAAGGTCTGCGAATACAGCACCGAT 180
S L D S Q K G Q L V R G K V C E Y S T D

C rSS1

EcoRI BamHI

1 GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAGTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGA 60
M R G S H H H H H H H G

61 TCCGTCACACAGGACATCCAGCGGTGATATTGGCTTTACTCACGAAGATTTTGC CGC 120
S V T Q D I P A V D I G F T H E D F A A

121 CTACTCGATCAGTACGACTATCACTTCAATCCGGGTGATACCGTCGTCGGCAGCTCTTC 180
L L D Q Y D Y H F N P G D T V V G T V F

181 AATCTAGAACCGCGGGGTGCCCTGATTGACATCGGTGCGAAAACGGCAGCATTTTTCGCG 240
N L E P R G A L I D I G A K T A A F L P

241 GTTCAAGAGATGTCGATCAACCGGGTCAAAGCCCGGAAGAAGTTCTTCAGCCAGCGAA 300
V Q E M S I N R V E S P E E V L Q P S E

図18

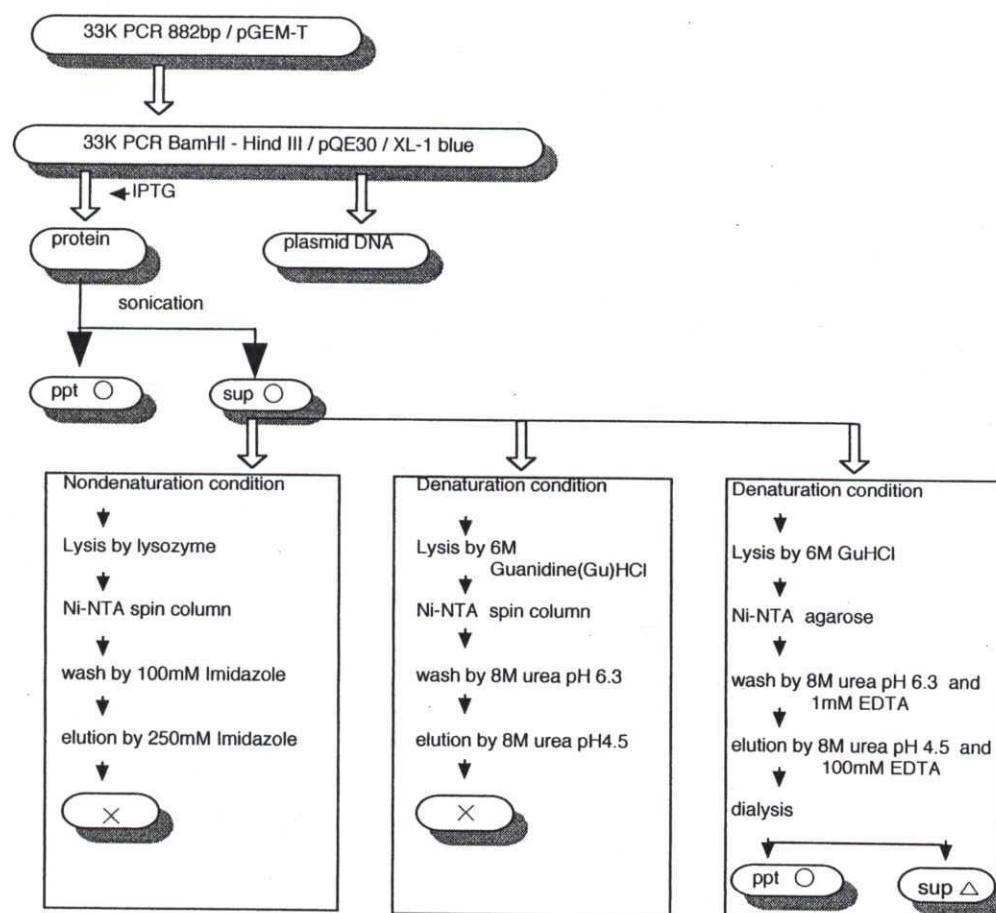
A. 発現ベクターpQE30のクローニング部位の模式図

BamHIとHindIIIの部位に各遺伝子のコード領域をインフレームで挿入した。RBDはリボソーム結合部位を示す。

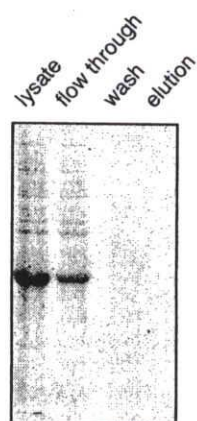
B. pQE30に挿入された33 kDaのssDNA結合タンパク質の遺伝子の組換え部位の塩基配列と塩基配列から推定されるアミノ酸配列

C. pQE30に挿入されたSynechococcus 6301のS1の遺伝子の組換え部位の塩基配列と塩基配列から推定されるアミノ酸配列

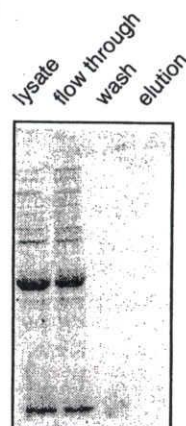
A



B



C



D

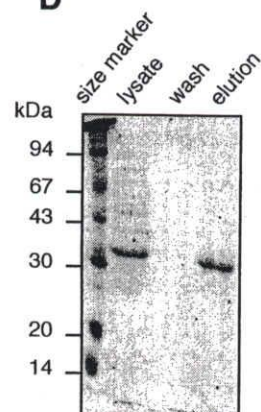


図19

33 kDaのssDNA結合タンパク質の大量発現と精製方法の検索

A. 組換えタンパク質の溶解と精製の方法の模式図

B. 非変性条件下での溶解(レーン lysate)とNiカラムに吸着させた時の透過画分(レーン flow through)、洗浄画分(レーン wash)、イミダゾールによる溶出画分(レーン elution)のSDS-PAGEパターン。

以下同様に、**C.** 変性条件下での溶解とpH勾配による溶出

D. 変性条件下での溶解とEDTAによる溶出

A



peptide 1 → OmpA
peptide 2 → r33K

B 決定されたアミノ酸配列

peptide 1 **APKDNTWYTGAK (L/S) GWXQYXDDGXX (R/N) NNXPX**

peptide 2 **MRGSHHHHHGSPSAANTPXYYDDFALAXEAQXLDX**

C

peptide 1

APKDNTWYT GAKLGWXQYX DDGXXNNNXP
***** ** * * * *

<i>E. coli</i>	MKKTATIAIAV	ALAGFATVAQ	AAPKDNTWYT	GAKLGWSQYH	DTGFINNNGP	THENQLGAGA
OmpA	FGGYQVNPYV	GFEMGYDWLG	RMPYKGSVEN	GAYKAQGVQL	TAKLGYPITD	DLDIYTRLGG
	MVWRADTKSN	VYGKNHDTGV	SPVFAGGVEY	AITPEIATRL	EYQWTNNIGD	AHTIGTRPDN
	GMLSLGVSYR	FGQGEAAPVV	APAPAPAPEV	QTKHFTLKSD	VLNFNKATL	KPEGQAALDQ
	LYSQLSNLDP	KDGSVVVLGY	TDRIGSDAYN	QGLSERRAQS	VVDYLISKGI	PADKISARGM
	GESNPVTGNT	CDNVKQRAAL	IDCLAPDRRV	EIEVKGIKDV	VTQPQA	

図20

A. 組換えタンパク質r33Kを大量発現させた細胞ライセートのSDS-PAGEのパターン
大量発現した上のバンドをpeptide 1とし、下のバンドをpeptide 2として、気相プロ
テインシーケンサーでそれぞれのアミノ酸配列を決定した(**B**)。(/)は2通りのア
ミノ酸残基のピークが読み取れることを示している。プロテインデータベースで検索
し、相同性のあった*E. coli*の外膜タンパク質OmpAとのアライメントを**C**に示す。

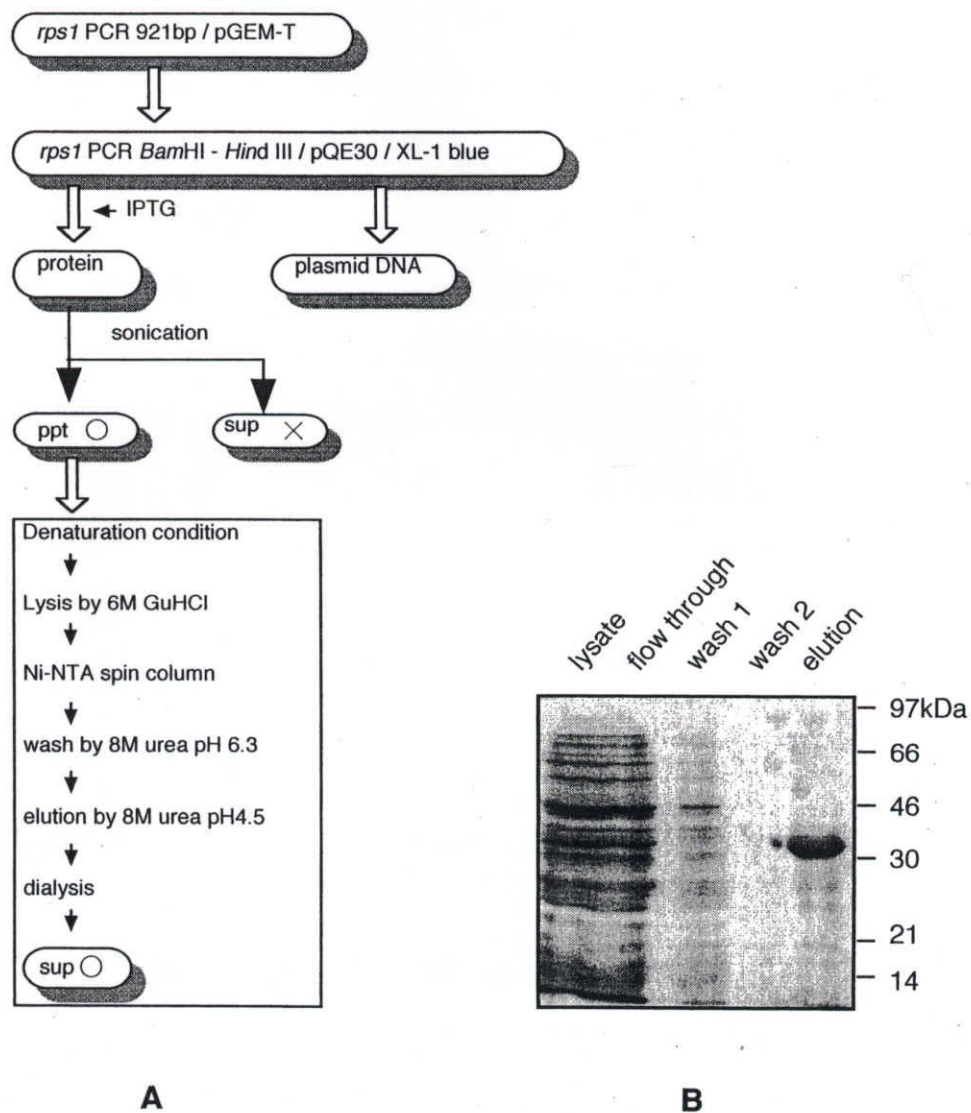


図21

Synechococcus 6301リボソームタンパクS1の大量発現と精製方法の検索

A. 組換えタンパク質の溶解と精製の方法の模式図

B. 変性条件下での溶解 (レーン lysate) とNiカラムに吸着させた時の透過画分 (レーン flow through)、2回の洗浄 (レーン wash1, 2)、pH勾配による溶出 (レーン elution) の各画分のSDS-PAGEパターン。

行ったところ、大腸菌の外膜タンパク質である OmpA であることが分かった。図 20B に示すように、*Synechococcus* 6301 の ssDNA 結合タンパク質 33 kDa タンパク質を大腸菌内で大量発現させると確かに、ほぼ同じ分子量のタンパク質が 2 本多量に存在することが確認できた。OmpA は大腸菌内では量の多いタンパク質ではあるが、rSS1 を誘導させた時には、OmpA が大量発現する傾向は見られなかった。

Synechococcus 6301 のリボソームタンパク S1 も同様に、プラスミドを用いて N 末端にヒスチジン 6 残基を付加した rSS1 (図 18C) を 37℃ で発現誘導させたが、発現しなかった。そこで、培養温度を 30℃ に変えて発現誘導させたところ、発現させることができた。次に、細胞画分を調べたら不溶性であることが分かったので、変性条件下での精製を行った (図 21)。Ni-NTA アガロースカラムからの溶出液のうち、pH 5.2 から pH 4.5 の画分に rSS1 が存在していた。これらの画分まとめて透析した。80 ml 培養より、1.4 mg の rSS1 が精製できた。そのうち 1 mg を抗体作製のための抗原に使用した。精製 rSS1 のアミノ酸分析を行ったところ、確かに N 末端に 6 ヒスチジン残基がつき、導入した制限酵素から形成されるアミノ酸残基 GS が付加された後、本来のアミノ酸配列が続いていた。

3-7) 細胞内の局在性

3-7-1) 抗体の特異性

まず、rSS1 と r33K を抗原とする抗体 (α -rSS1, α -r33K) の特異性を調べた。図 22B, C に示すようにそれぞれの抗体はお互いの抗原にクロス反応しない。また、タバコの葉緑体の S30 画分と大腸菌の S30 画分とウェスタン解析をおこなったが、リボソームタンパク S1 と思われる分子量のタンパク質とはクロス反応を示さなかった。

α -rSS1 と *Synechococcus* 6301 の S30 画分のウェスタン解析を行うと、rSS1 より分子量の小さい約 38 kDa のタンパク質と強く反応した。これは、確かに内在性のリボソームタンパク S1 を検出できたことを示している。また、抗体の使用量を増やしたり、ウェスタン解析の感光時間を長くすると、 α -rSS1 は *Synechococcus* 6301 の S30 画分の 55 kDa、33 kDa、30 kDa、17 kDa タンパク質とクロス反応する (図 22E)。

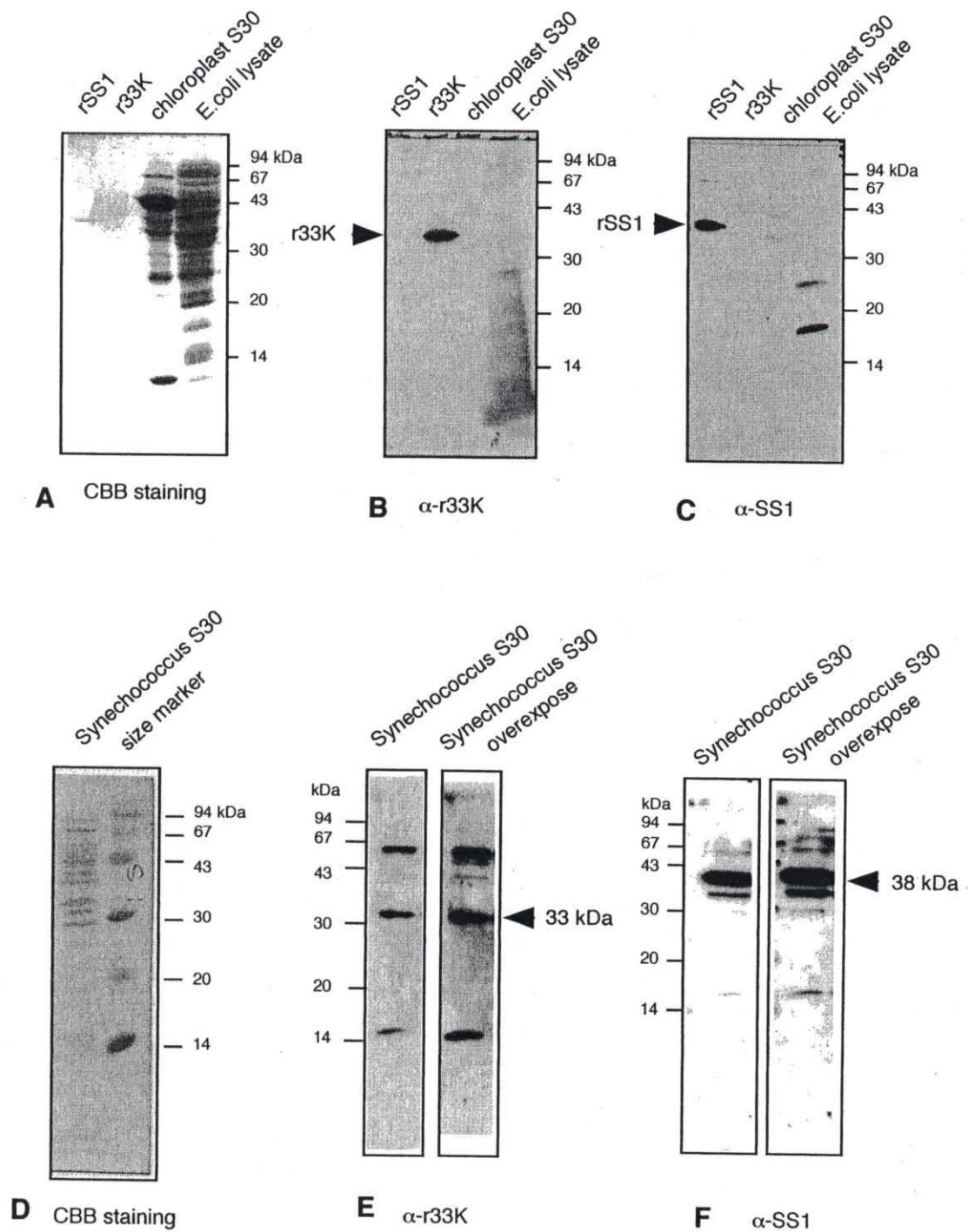


図22

組換えタンパク質r33KとrSS1に対する抗体の特異性の検定
 A. 抗原r33K (50 ng), rSS1 (50 ng), タバコ葉緑体のS30画分 (20 μ g), *E. coli*全細胞画分 (20 μ g) をSDS-PAGEしCBB染色したパターン。
 B.およびC.はAで作製したメンブレンとr33K抗体またはrSS1抗体を使用したウェスタン解析。
 D.は*Synechococcus* 6301のS30画分(10 μ g)をSDS-PAGEしCBB染色したパターン。
 E.およびF.はDで作製したメンブレンとr33K抗体またはrSS1抗体を使用したウェスタン解析。

α -r33K と *Synechococcus* 6301 の S30 画分のウェスタン解析を行うと、r33K より分子量の小さい約 33 kDa のタンパク質と強く反応した。これは、確かに内在性の 33 kDa ssDNA 結合タンパク質を検出できたことを示している。また、抗体の使用量を増やしたり、ウェスタン解析の感光時間を長くすると、 α -r33K は *Synechococcus* 6301 の S30 画分の 60 kDa と 15 kDa タンパク質とクロス反応する (図 22F)。

3-7-2) 細胞内成分の分画

Synechococcus 6301 の 33 kDa ssDNA 結合タンパク質は SS1 にアミノ酸配列および分子内構造が似ているのでリボソームの構成成分であるかもしれない。この可能性を調べるために、33 kDa タンパク質の *Synechococcus* 6301 の細胞内の局在性を調べた。通常培養条件で対数増殖後期まで培養した *Synechococcus* 6301 細胞を擦り潰したのち、30,000 g 遠心の上清 S30 画分 (S30) と沈殿物 (ppt) に分離する。ppt には未破碎の細胞や細胞残滓、膜成分などが含まれる。細胞質成分が全て含まれる S30 画分をさらにショ糖平衡密度勾配で 100,000 g で遠心し、完全に透明な上清分画 (S100) と、沈澱 (粗リボソーム画分) に分離する。この時、透明な層と沈殿物の間には、青色の層、次に紫の層、そして暗黒緑の層が生じる。沈殿物を 1 M の塩化アンモニウムを含むバッファーで 4 回洗浄して精製リボソームを得る (ribosome)。この時、最初の洗浄液にはいろいろな翻訳因子が含まれているので、硫酸アンモニウム沈澱してリボソームウォッシュ (RW) として回収した (図 23A)。

3-7-3) 細胞内の局在性

上記の各分画を rSS1 と r33K を抗原とする抗体を用いて免疫反応を利用したウェスタン解析によって SS1 および 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質の細胞内の局在性を調べた。

SS1 は確かにリボソーム画分に存在している(図 23B 下レーン ribosome)。さらに RW 画分にも多量に存在している。このことは、大腸菌の ES1 はリボソームとゆるく結合していて解離しやすいというデータとよく一致している。また、S30 画分にはもちろんとして S100 画分にも存在していることが分かる。このことは、リボソームと

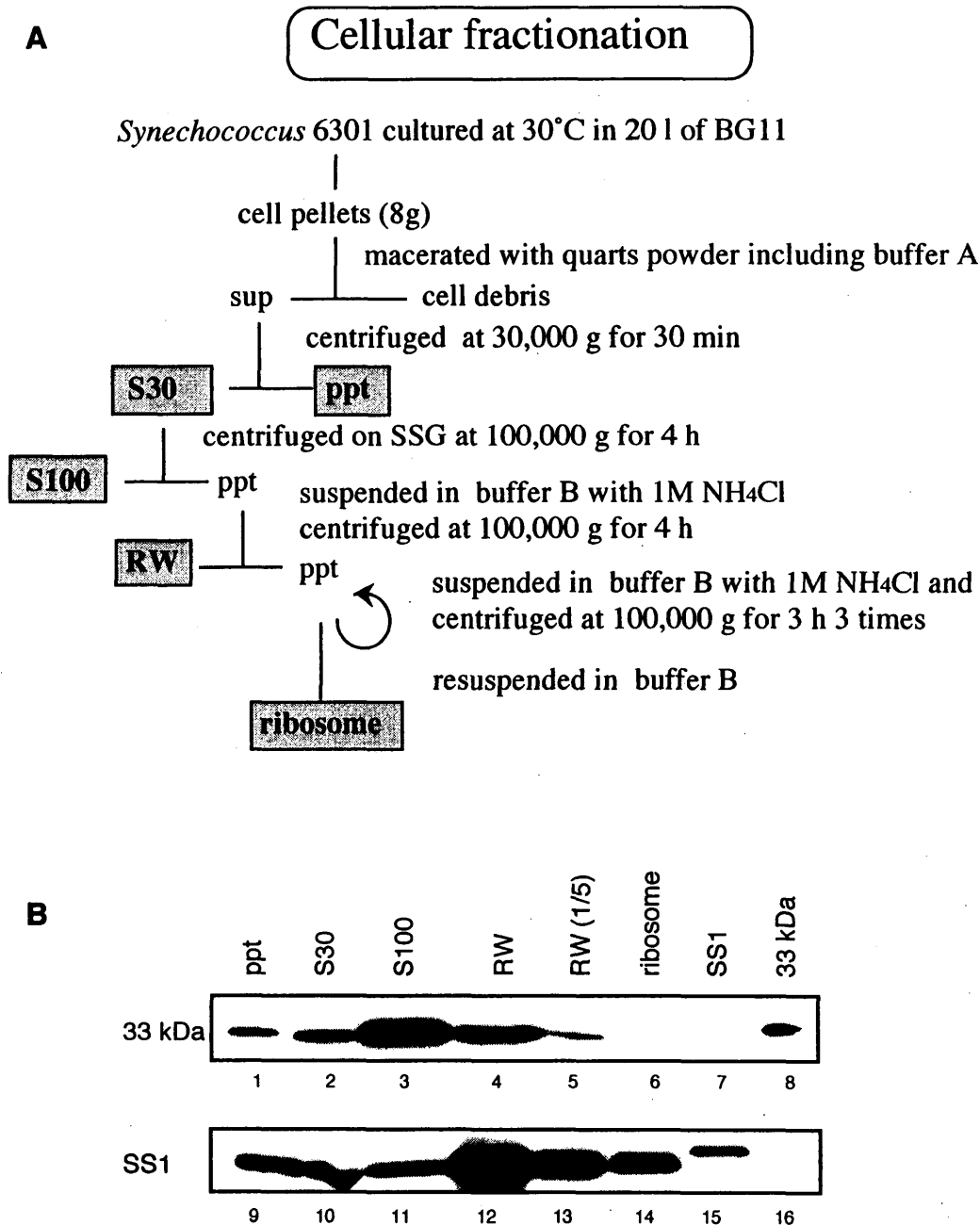


図23

A. 細胞内画分の調製の方法の模式図

B. 33 kDaタンパク質 (33 kDa)とリボソームタンパクS1 (SS1) の細胞内の局在性

Aの方法で調製した各画分をSDS-PAGEした。レーン1から4、9から12は全タンパク質含量10 μ g、レーン5と13は全タンパク質含量2 μ g、レーン6と14は全タンパク質含量1 μ g、レーン7、8、15、16は全タンパク質含量50 ngをアプライした。上段は33 kDaタンパク質の抗体で、下段はSS1の抗体でウェスタン解析した。

結合していない遊離な状態の SS1 が細胞質中にある事を示している。

では、33 kDa タンパク質の細胞内の局在性はどうか。まず、**ribosome** 画分には全く存在していないことがわかる (図 23B 上, レーン **ribosome**)。このことは、33 kDa タンパク質は SS1 とよく似た分子構造をしているにもかかわらずリボソームの構成成分ではないことを示している。しかし、**RW** 画分には少量存在するので、リボソームと何らかの相互作用を持つ可能性も考えられるが、リボソーム祖抽出液への他の画分の混在の可能性も考えられる。33 kDa タンパク質の主な存在画分は **S100** 画分である (図 23B 上, レーン **S100**)。このことは、33 kDa タンパク質は細胞質中で遊離な状態で存在していることを示している。

3-7-4) ショ糖平衡密度勾配遠心法

細胞内画分のウェスタン解析の結果 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質はリボソームの構成成分でないことを示したが、さらに別な方法、ショ糖平衡密度勾配遠心法によるリボソームまたはそのサブユニットの分離を行い、リボソーム分画に存在するかどうかを調べた。

はじめに、大腸菌リボソームを精製し遠心条件の検討を行った。日立 RPS40-T ローターを用いて 10 %から 30 %のショ糖平衡密度勾配で、22,000 rpm を 16 時間の遠心で、大腸菌の 70 S のリボソーム単量体および 50 S と 30 S のサブユニットを分離できることがわかった。この遠心条件を用いて、はじめは精製 *Synechococcus* 6301 リボソームを分離してみたが、精製リボソーム量が少ないことと大腸菌に比べリボソームが不安定 (大腸菌リボソームの精製方法をそのまま使用したため) になっているようで OD₂₆₀ と OD₂₈₀ の吸光度による明確なプロフィールは得られなかった。そこで、*Synechococcus* 6301 の S30 画分をそのままショ糖平衡密度勾配遠心することにした。図 24A にそのプロフィールを示す。同時に遠心した大腸菌のリボソーム 70 S, そのサブユニット 50 S と 30 S のピークを示した。これらのフラクションをウェスタン解析して 33 kDa タンパク質の存在様式を調べた。同時に SS1 の解析を行った。

まず、SS1 の抗体を用いてウェスタン解析すると、70 S および 30 S のピークよりやや大きいフラクションにシグナルが検出された (図 24B 下, レーン 2 と レーン 5-8)。

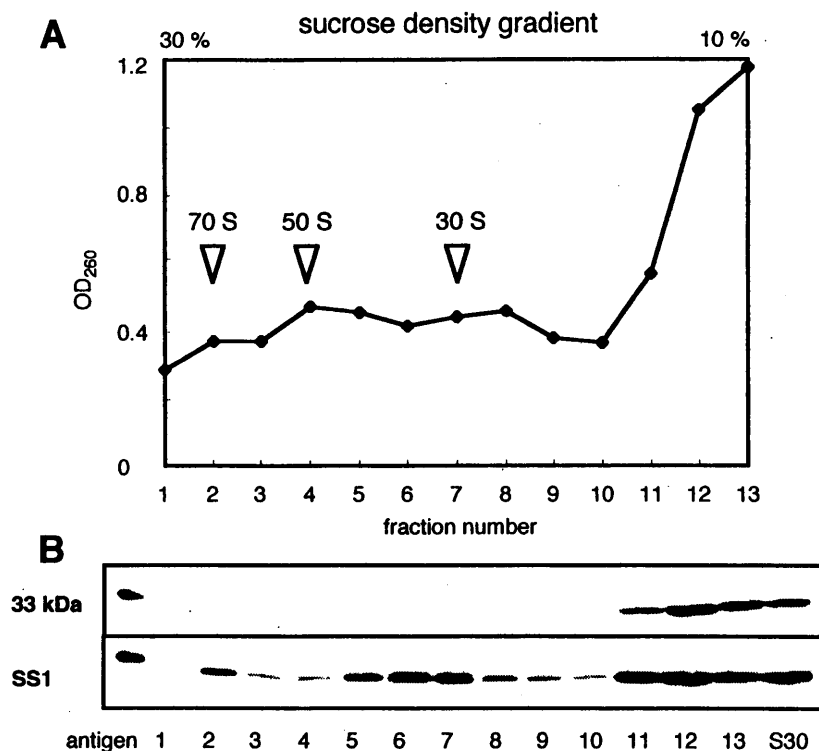


図24

33 kDaタンパク質とSS1のリボソームサブユニットとの結合

A. *Synechococcus* 6301のS30画分をシュクロース平衡密度勾配遠心し、13に分割した各フラクションのOD₂₆₀のプロフィールを示す。白抜き三角は同一遠心条件で得た*E. coli*リボソーム (70 S)およびそれらのサブユニット (50 S, 30 S)のピークの位置を示す。

B. 33 kDaタンパク質 (上段) とSS1 (下段) の抗体を使用したウェスタン解析
 レーン antigenは組換えタンパク質r33K (上段)とrSS1(下段)を50 ng、レーン S30は遠心前の*Synechococcus* 6301のS30画分を10 μgアプライした。ラン藻のリボソーム30Sサブユニットと*E. coli*の30 Sサブユニットのピークが一致しないのはサイズが異なる可能性がある。葉緑体のリボソームは*E. coli*に見られないいくつかのリボソームタンパクが存在することが調べられている (Subramanian1993)。

しかし、50 S のピークには検出されなかった（図 24B 下，レーン 3, 4）。このことは、確かに SS1 はリボソームタンパクであり、リボソームの小サブユニットに存在していることを示している。また、上部の軽いフラクションにも SS1 は検出される（図 24B 下，レーン 11-13）。このことは、リボソームという複合体に結合しない遊離な状態での存在を示している。細胞分画の S100 画分にも多量に存在するという前述の結果ともよく一致している。30S のピークよりやや大きいフラクションに検出されるのは、SDG 遠心後底部より分画していくため上部はやや拡散してしまいブロードになってしまったためと、*Synechococcus* 6301 のリボソームサブユニットのサイズは厳密には測定されておらず、大腸菌とは必ずしも一致しない可能性が考えられる。実際、古ラン藻を祖先に持つと推定されている植物葉緑体のリボソームの場合、大腸菌には存在しないリボソームタンパクが数種類報告されている（Subramanian 1993）。このことから類推しても大腸菌のリボソームとラン藻のリボソームがサイズの的に完全に同じとは考えにくい。

33 kDa タンパク質の抗体を用いてウェスタン解析すると、70 S, 50 S, 30 S のピークのフラクションにシグナルはまったく検出されなかった（図 24B 上，レーン 2-8）。上部の軽いフラクションにのみ 33 kDa タンパク質は検出された（図 24B 上，レーン 11-13）。このことは、33 kDa タンパク質はやはりリボソームタンパクではないことを示している。その存在様式は細胞質中で遊離な状態で存在していると思われる。細胞分画の S100 画分に存在するという前述の結果ともよく一致している。

また、この一連の実験で α -r33K とクロス反応した 15 kDa のタンパク質はリボソームの大サブユニットの成分であることが分かった。

3-8) 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質の核酸結合特性

33 kDa の ssDNA 結合タンパク質はリボソームタンパクではないことが分かったので、核酸と結合特性を調べリボソームタンパク S1 との違いを明らかにさせるため以下の実験を行った。

3-8-1) 非変性状態の組換えタンパク質の精製

抗体作製のために精製した変性状態のタンパク質では核酸結合能をもつかどうかかわからないので、非変性状態で精製することを試みた。予備実験の結果ではどちらの組換えタンパク質も不溶性のため非変性状態では精製できないことが分かっていたが、大腸菌細胞質中で可溶性の組換えタンパク質が全く存在しないとは考えにくい。そこで、大腸菌の細胞中にわずかでも可溶性タンパク質として存在するであろう組換えタンパク質を非変性条件下で精製するために、大量培養を行った。10 培養で r33K を 30 μ g、rSS1 を 3 μ g 精製することができた。以下の実験にはこれらの組換えタンパク質を用いた。

3-8-2) ssDNA との結合特性

まず、組換えタンパク質 r33K, rSS1 が生体中のタンパク質同様に ssDNA 結合能を持つことを調べた。図 25A に示すように、r33K, rSS1 どちらも 0.1 M NaCl の存在下では ssDNA と結合するので、これらの組換えタンパク質を使用することが可能である。

NaCl 濃度を 0.5 M にすると、r33K は ssDNA との結合は続くが、rSS1 はほとんど結合しない。このことは、38 kDa の SS1 は ssDNA カラムから 0.6 M NaCl で多量に溶出されてくるが 33 kDa タンパク質は溶出されてこないという *in vivo* での結果とよく一致している。NaCl 濃度を 1.0 M にすると r33K は ssDNA とほとんど結合しない。33 kDa タンパク質は 1.2 M NaCl で多量に溶出されてくるという *in vivo* での結果とよく一致している。

以上のことより、組換えタンパク質の核酸結合性能は *in vivo* のタンパク質と同等であることが明らかになったので、さらに以下の *in vitro* 実験を行った。また、非変性状態で精製してきた r33K は何本かのバンドに分解されて検出される（図 25A 上）が、これはタンパク質が不安定で分解が速いためと考えられる。SDS-PAGE を行った時の検出結果は変性状態で精製してきた r33K に検出されるサイズと同じバンドのみを示すことにした。

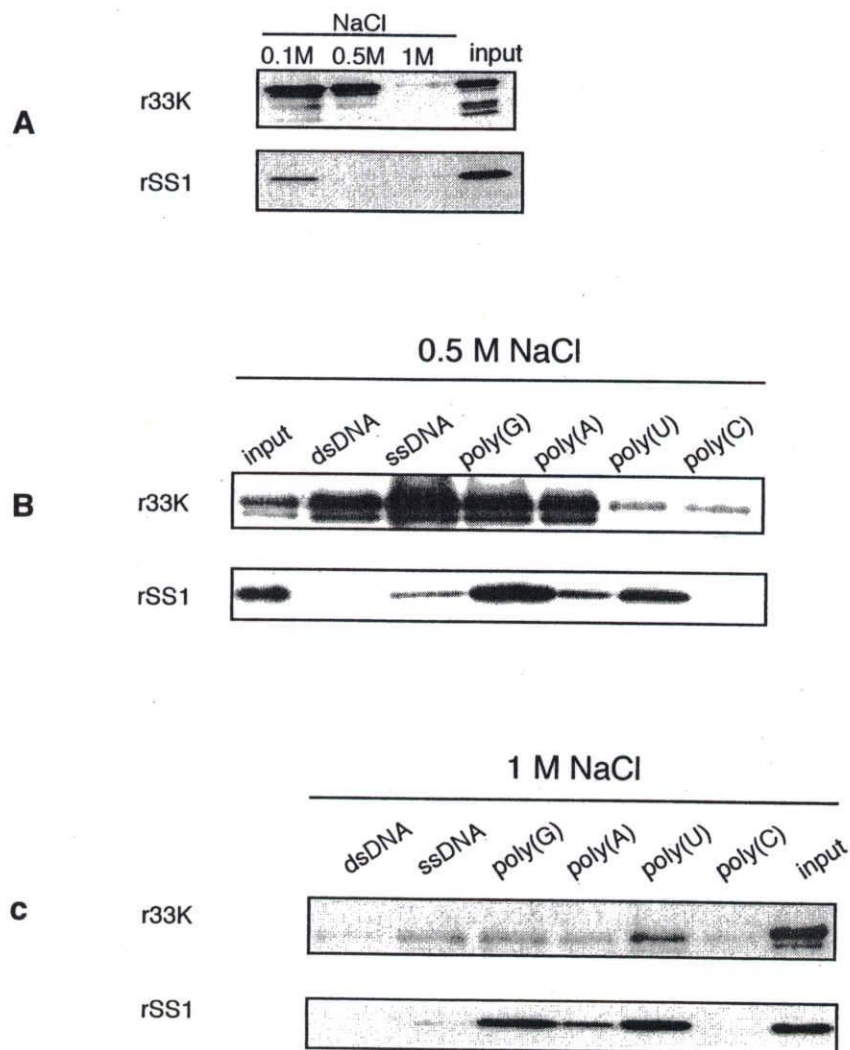


図25

組換えタンパク質r33KとrSS1の核酸結合特性

A. 3種類の塩濃度下でのssDNAとの結合活性

非変性条件下で精製された組換えタンパク質r33KとrSS1を、0.1 M, 0.5 M, 1 Mの3種類のNaClを含む結合バッファー中で仔牛胸腺のssDNA-セルロースビーズと結合させた。SDSを含むサンプルバッファーで過熱してビーズから溶出させ、SDS-PAGEを行いウェスタン解析で検出した。レーン inputは結合実験に使用された5%タンパク質量 (15 ng) の組換えタンパク質をアプライした。

B. 0.5 MのNaClを含む結合バッファー下での各核酸ビーズとの結合性

仔牛胸腺のdsDNA, ssDNA-セルロースビーズ、poly(G), poly(U), poly(C)-アガロース、poly(A)-セファロースのRNAホモポリマーと結合させた。ほかはAと同様に行った。

C. 1 MのNaClを含む結合バッファー下での各核酸ビーズとの結合性

3-8-3) RNA ホモポリマーとの結合特性

33 kDa の ssDNA 結合タンパク質 (33K) は、SS1 と分子構造は似ているがリボソームタンパクではないので、生体内での役割を探るために詳細な核酸結合能を調べた。

dsDNA, ssDNA および poly(G), poly(A), poly(U), poly(C) の RNA ホモポリマービーズを用意し、r33K, rSS1 とそれぞれ結合させた。

SS1 は、0.5M NaCl 存在下では dsDNA, ssDNA にはほとんど結合しないが、RNA ホモポリマーとは結合が強い (図 25B)。1.0 M NaCl 存在下でも RNA ホモポリマーとは結合する (図 25C)。このことは、SS1 は DNA より RNA との親和性が高いことを示し、ES1 の結果とよく一致している。RNA ホモポリマーのうち 0.5 M NaCl 存在下では poly(G), poly(A), poly(U) とは結合するが、poly(C) とはほとんど結合していない (図 25B)。1.0 M NaCl 存在下でも 0.5 M NaCl 存在下での結果とほとんど同じである。このことは、SS1 は RNA の G、A、U の塩基を含む配列に親和性が高いが、C クラスターのような配列には親和性は高くないことを意味している。ES1 は poly(U) またはピリミジンに富む配列に親和性が高いというデータと異なる (Boni et al. 1991)。種によってリボソームタンパク S1 の RNA との親和性における配列特異性が存在するのかもしれない。

一方、33 kDa タンパク質は 0.5 M NaCl 存在下では dsDNA, ssDNA にも結合し、いずれの RNA ホモポリマーとも結合する。もっとも強く結合するのは ssDNA である。また、RNA ホモポリマーのうちでは poly(G), poly(A) の方が poly(U), poly(C) よりやや強く結合する (図 25B)。しかし、1.0 M NaCl 存在下では DNA にも RNA ホモポリマーにも結合する量が減少する (図 25C)。これらのことは、33 kDa タンパク質は DNA にも RNA にも親和性が高いことを示し、リボソームタンパク S1 のような RNA 特異的結合性とはあきらかに異なった性質を持つ。また、33 kDa タンパク質が結合する RNA の塩基配列特異性については顕著な特徴はないが、ピリミジン塩基よりはプリン塩基の方を好む傾向がある。

3-8-4) mRNA との結合特性

33 kDa の ssDNA 結合タンパク質 (33K) とリボソームタンパク S 1 (SS1) の合成 RNA ホモポリマーとの親和性の差を検出したが、実際の mRNA との親和性かどうかをゲルシフト解析によって調べた。

大腸菌の S1 は mRNA の翻訳開始コドン上流の 5'UTR に結合し、30 S リボソームおよび fMet tRNA と翻訳開始複合体を形成する上で、重要な働きをすることが知られている。また、葉緑体のリボソームタンパク S1 は、光合成遺伝子 *psbA* の 5'UTR に結合し翻訳制御に関わっていることが報告されている(Alexander et al. 1998)。そこで、*Synechococcus* の光合成遺伝子 *psbAI* (Golden et al. 1986)を用いて T3 RNA polymerase による *in vitro* RNA 合成を行い、その mRNA との親和性の違いを調べた。

まず、図 26A に示すように 3 種類の RNA (mRNA1, mRNA2, control-RNA) を準備した。mRNA1 は *psbAI* 由来の 5' UTR およびコード領域を持つ 328 nt の RNA、mRNA2 は *psbAI* 由来の 5' UTR 部分のみを持つ 124 nt の RNA である。control-RNA は、mRNA1 と mRNA2 が共通にもつ T3 プロモーター領域を持ち、プラスミドのマルチクローニング配列から作製した 121 nt の RNA である。アイソトープでラベルしたこれらの RNA と 300 ng の r33K, rSS1 をそれぞれインキュベートし電気泳動した結果を図 26B に示す。mRNA1 は r33K, rSS1 どちらのタンパク質とも結合するが、mRNA2 には rSS1 のみが結合し r33K はわずかに一部が結合している結果を示している。コントロールとして使用した RNA にはどちらのタンパク質も結合しなかった。また、mRNA1, mRNA2 のどちらにもウシ血清アルブミン (BSA) は結合しないことを確認している。

この結果から *Synechococcus* 6301 のリボソームタンパク S1 も光合成遺伝子 *psbAI* の mRNA の 5' UTR に結合することを確認できた。一方、33 kDa タンパク質は *psbAI* の mRNA の 5' UTR のうち 31 nt より上流にはほとんど結合できないことをあらわしている。しかし、5' UTR とコード領域を含む 328 nt の mRNA には結合できることから mRNA との結合性能はあり、しかも、control-RNA とは結合できないことから不特定の RNA に対して結合しているわけではないことが示唆される。但し、33 kDa タンパク質が mRNA1 に結合して mRNA2 にほとんど結合しないのは、RNA 配列特異性

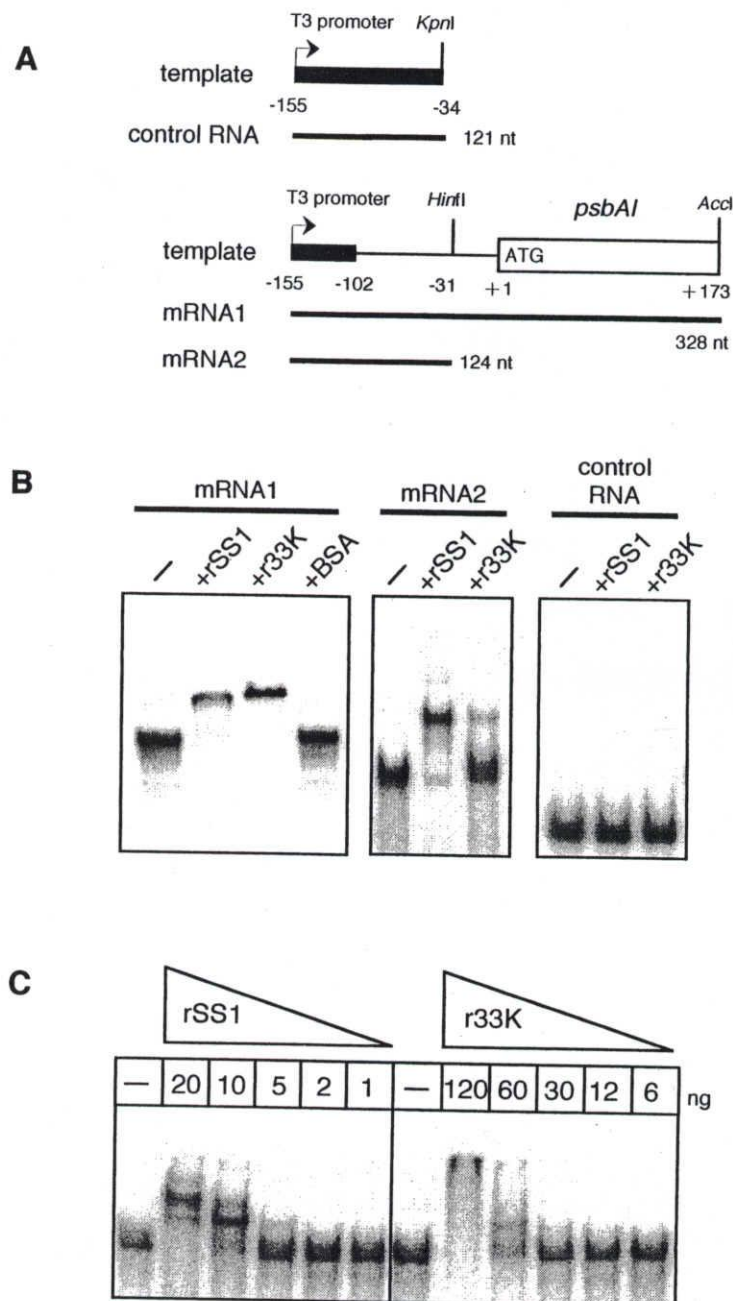


図26

組換えタンパク質r33KとrSS1のmRNAとの結合効率

A. 基質に用いたRNA作製の模式図

Synechococcus 6301の*psbAI*を鋳型としてT3 RNA ポリメラーゼによって2種類のmRNAを作製した。また、同じT3 RNA ポリメラーゼで*psbAI*をクローニングしたベクターのみからコントロールRNAを作製した。黒色のボックス、細い水平の線、白色のボックスはそれぞれベクター配列、5'UTR領域、コード領域の配列を示す。太い線は作製されるRNAを表し、そのサイズをntで示した。

B. ゲルシフト解析

³²Pでラベルした各RNA (50 fmole) と0.3 μgの組換えタンパク質を22℃で15分間結合させ、8%のネイティブPAGEを行った。レーン"マイナス (-)", "+r33K", "+rSS1", "+BSA" はタンパク質を加えない、組換えタンパク質r33Kを加えた、組換えタンパク質 rSS1加えた、BSA (ウシ血清アルブミン) を加えたことを示している。

C. タンパク質量を可変にしたゲルシフト解析

20 ng (0.5 pmole)のrSS1および120 ng (3.6 pmole)のr33KをラベルされたRNAと結合させた。他はBと同じ。

によるのではなく RNA の長さに依存する可能性も考えられるがここでは決定できない。

さらに、mRNA1 との結合様式を詳しく調べるためにタンパク質濃度を変えてゲルシフト解析を行った（図 26C）。このとき、微量な濃度での検出を可能にするために、非特異的結合を阻害するために用いるヘパリンを除いて解析を行った。rSS1 は 10 ng のタンパク質量でも RNA との結合が検出された。タンパク質対 RNA のモル比は 12 : 1 に相当する。また、20 ng のタンパク質量を用いた時 2 本のバンドが検出でき（図 26C 左レーン 10, 20）2 種類の複合体状態をとることが示唆される。一方、r33K は 60 ng 以上になった時に初めて mRNA1 との結合が検出される。さらに、タンパク質量を増やすとスーパーシフトしてしまう（図 26C 右レーン 60）。この結果は、*psbAI* の mRNA との親和性は SS1 のほうが 33K より少なくとも 6 倍は高いことを示している。

4 章 考察

4-1) 2 種類の 12 kDa の RNA 結合タンパク質 Rbp1、Rbp2 の機能解析

ゲノムの相同組換えによる遺伝子破壊実験の結果 *rbp1*, *rbp2* それぞれの遺伝子を完全に破壊された変異株が得られたことより、*Synechococcus* 7942 では Rbp1、Rbp2 それぞれは生存に必須ではないことを示した。しかし、Rbp1 は Rbp2 の、また Rbp2 は Rbp1 の機能を相補しているために、それぞれの欠損変異体 M710, M407 が生育できている可能性はある。さらに二重欠損変異体の作製がなされることでその決定は可能になるだろう。

rbp1 欠損体 M710 は顕著な表現型を示した。30℃、36℃では野生型と成長はほとんど変わらなかったが、20℃またはそれ以下の温度になると、野生型ラン藻の生育は遅くはなるが増殖を続けるのに比べ、M710 はほとんど成長せず、長期間低温にさらされると死滅してしまう(図 5)。一方、*rbp2* 欠損体 M407 は培養温度条件による環境変化に対しては野生株と顕著な違いを示さなかった。このことは、低温に於いて、Rbp2 は Rbp1 の機能を補うことができず、Rbp1 は低温耐性に必須のタンパク質であることを示している。

グラム陰性菌の *E. coli* やグラム陽性菌の *B. subtilis* は低温耐性にコールドショックタンパク質ファミリー (Csps) が機能している(Jones et al. 1996, Graumann and Marahiel 1998)。Csps は 5 つのアンチパラレルなβシートからなる Csp ドメインをもち(Schindelin et al. 1993)、構造的にはリボソームタンパク S1 に見られる S1 ドメインと同一の立体構造 OB-フォールド (oligo nucleotide-oligo saccharide binding domain, Muezin 1993)に分類される。OB-フォールドは進化的に古い構造で、核酸や多糖類と相互作用する多種多様のタンパク質に見い出される。現在のところ、Csps のホモログはこれまで調べられたラン藻タンパク質には見い出されず、全塩基配列の決定された *Synechocystis* 6803 ゲノム(Kaneko et al. 1996)にも対応するような ORF は存在していない事が明らかになった。これらのことから、Rbps は立体構造は異なっているが Csps のカウンターパートであると考えられる。両者の分子内構造をさらに詳細に見ると、RNA と直接相互作用するアミノ酸残基の配置する側面は保存された RNP-1 モチーフを持ち、CS-RBP

ドメインと Csp ドメインの共通性が見い出される。

Rbp1 は低温耐性機能をもつが、Rbp2 は持たない。両者の構造の違いは、C 末端にグリシンに富む領域があるかどうかである (図 27)。これまで、CS-RBP ドメインとグリシンに富む領域を持つタンパク質がほ乳類(Danno et al. 1997)と顕花植物 *Arabidopsis thaliana* (Carpenter et al. 1994)で報告されており、それらは核に局在し低温ストレス下における役割を担っていることが報告されている。グリシンに富む領域が特に低温下での機能に必須な構造なのかもしれない。糸状体ラン藻 *Anabaena variabilis* M3 は 8 種類の Rbps を持ち、7 種は低温で転写誘導され、1 種は低温下でも転写量は変わらない。低温で転写誘導される Rbps はグリシンに富む領域を持ち、誘導されない Rbps は持たない(Maruyama et al. 1999)。このことからグリシンに富む領域をもった Rbp の立体構造が低温耐性のための機能を果たす上で重要なのだろう。

では、低温耐性の機能とはどのようなものであろうか。Csps は、低温下で二次構造を作り翻訳活性の下がった mRNA をふたたびリラックスフォームに戻して翻訳可能な状態にする、RNA シャペロンであると考えられている(Jiang et al. 1997)。Csps の機能的類推からすると、Rbp1 は同様の RNA シャペロン機能を持つことが考えられる。実際、*Synechococcus* 6301 の Rbp1 と Rbp2 は *in vivo* で DNA ではなく RNA と結合しているという実験結果が出ている(Mutsuda et al. 1999)。グリシンに富む領域を持つ Rbp1 は低温下で選択的に mRNA と結合できるのか、またはさらに他の因子と相互作用することで RNA シャペロン機能を強化できるのかもしれない。さらに mRNA の安定性や翻訳制御における役割についても調べる必要があるだろう。

Rbp2 の機能については現在のところ未解明である。*E. coli* は 9 種の Csp ファミリーが同定されているが、CspC, CspD, CspE は低温で転写誘導されない(Graumann et al. 1998)。これらは、増殖の定常期に発現したり、細胞分裂に関わっていたりしていることが明らかになっている。Rbps が Csps のカウンターパートであると考えらるなら、Rbp2 が低温耐性以外の他のストレス耐性に関わっている可能性はある。また、M407 をつかった様々なノーザン解析の結果では mRNA の安定性に関わるようなデータも出ているがさらなる解析が必要である。

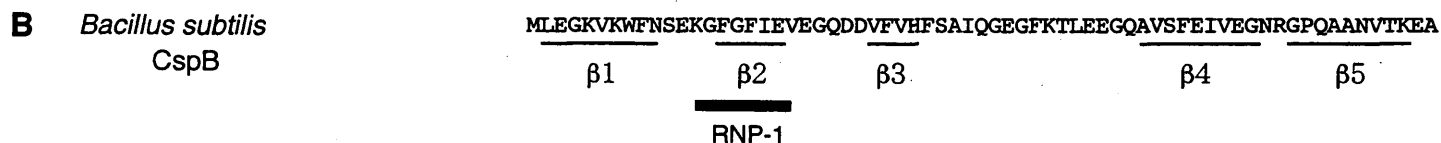
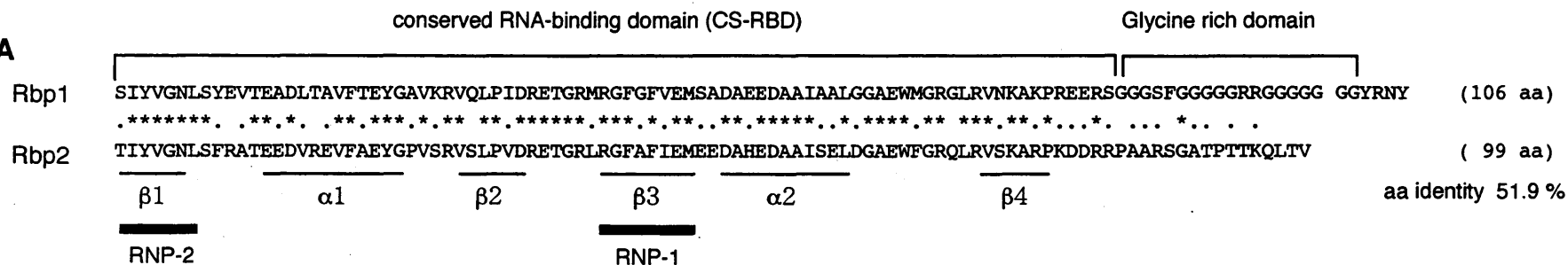


図27

A. *Synechococcus* 6301のRbp1とRbp2のアライメント

上段にRbp1、下段にRbp2のアミノ酸配列を示した。*は同一のアミノ酸残基、.は類似性のあるアミノ酸残基を示す。CS-RBDはRNA結合ドメインを、Glycine rich domainはRbp1に固有のグリシンに富んだ領域を示す。太い線はCS-RBDのうち特に保存性の高いモチーフRNP-2, RNP-1を示す。 β は β シート、 α は α ヘリックスを示す。予想される2次構造はKenan et al.1991の構造解析に基づいて記入した。

B. *Bacillus subtilis*のコールドショックタンパク質CspBのアミノ酸配列と2次構造(Schindelin et al. 1993)を示す。CS-RBDに保存されているRNP-1モチーフが β 2シートに存在する。

4-2) ラン藻のリボソームタンパク S1 について

葉緑体のリボソームタンパク S1 と相同性があることから、*Synechococcus* 6301 の 38 kDa の ssDNA 結合タンパク質をリボソームタンパク S1 であると同定した。これはラン藻のリボソームタンパク S1 として初めての報告であった。ハウレンソウの葉緑体のリボソームタンパク S1 (CS1)は核ゲノムにコードされ、分子量が 40 kDa であり (Franzetti et al. 1992a)、*E. coli* のリボソームタンパク S1 が 60 kDa である (Schnier and Isono 1982)のに比べて小さい。これまで調べられてきた葉緑体のリボソームタンパク質は *E. coli* のリボソームタンパク質と 33 % (L10)から 82 % (S12)のアミノ酸残基の同一性があり、分子量も *E. coli* のリボソームタンパクとよく似ている (表 3) 。CS1 だけが例外的であった。ここで、2つの可能性が考えられる。 1.) 葉緑体の起源生物は *E. coli* のような分子量の大きいリボソームタンパク S1 をもち、それが葉緑体ゲノムから核ゲノムに移行するにあたって小さくなったのか。 2.) 葉緑体の起源生物が *E. coli* のような細菌から分岐していく過程でリボソームタンパク S1 のサイズが小さくなったのか。今回単離した *Synechococcus* 6301 の 38 kDa のタンパク質が CS1 と相同性があり、CS1 のようにサイズが小さいことから、2の結果であると示唆された。

実験的にリボソームタンパク質であると証明された原核生物のリボソームタンパク S1 はグラム陰性菌の *E. coli* (Schnier and Isono 1982)と *Rhizobium meliloti* (Schnier et al. 1988)のもので、約 60kDa の分子量で6個の S1 ドメイン (うち RNA 結合は4個の S1 ドメイン) を持つことが報告されていた。ハウレンソウの葉緑体や *Synechococcus* 6301 のようなサイズの小さいリボソームタンパク S1 ホモログをコードする遺伝子は、紅藻の葉緑体、yeast のミトコンドリア、ゼニゴケのミトコンドリアなどで報告されている。S1 ドメインを2ないし3個持つことから、リボソームタンパク S1 であると推定されてきたわけである。しかし、これらの分子量の小さなタンパク質が本当にリボソームタンパク S1 であるかどうかはハウレンソウの葉緑体の CS1 のみで研究されてきただけである (Franzetti et al. 1992a)。Franzetti らはハウレンソウの葉緑体の 30 S リボソーム全体に対する抗体を用いて、CS1 を分離同定してきた。そして、CS1, 30 S

gene	r-protein	<i>E. coli</i> (AA)	<i>Synechocystis</i> (AA)	<i>Synechococcus</i> (AA)	tobacco chl (AA)	other chl (AA)	chl (AA) *N-encoded
<i>rpsA</i>	S1		305	293			
<i>rpsA</i>	S1	557	328	306			*370(spi)
<i>rpsB</i>	S2	241	269		236		
<i>rpsC</i>	S3	233	240	244	218		
<i>rpsD</i>	S4	206	202		201		
<i>rpsE</i>	S5	167	173	180			
<i>rpsF</i>	S6	131	113				
<i>rpsG</i>	S7	179	156	156	155		
<i>rpsH</i>	S8	130	133	133	134		
<i>rpsI</i>	S9	130	137				
<i>rpsJ</i>	S10	103	105				
<i>rpsK</i>	S11	129	130	130	138		
<i>rpsL</i>	S12	124	126	124	123		
<i>rpsM</i>	S13	118	127	125			
<i>rpsN</i>	S14	101	100	100	100		
<i>rpsO</i>	S15	89	89		87		
<i>rpsP</i>	S16	82	82		85		
<i>rpsQ</i>	S17	84	81	82			*(149) (Ara)
<i>rpsR</i>	S18	75	71		101		
<i>rpsS</i>	S19	92	92	91	92		
<i>rpsT</i>	S20	87	97				
<i>rpsU</i>	S21	71	60				
	S22	45					
**CS22(PSrp-1)							*237(spi)
**S31(SCS23)							*5 kDa(spi)

<i>rplA</i>	L1	234	238				
<i>rplB</i>	L2	273	276	287	274		
<i>rplC</i>	L3	209	213	213			
<i>rplD</i>	L4	201	210	210			*243(spi)
<i>rplE</i>	L5	179	200	179			*(280)(ric)
<i>rplF</i>	L6	177	179	179			
<i>rplI</i>	L9	149	172				*160(Ara)
<i>rplJ</i>	L10	165	173				*(220)(ric)
<i>rplK</i>	L11	142	141				
<i>rplL</i>	L12/L7	121	128		* 80		*129(rye)
<i>rplM</i>	L13	142	151				*191(spi)
<i>rplN</i>	L14	123	122	121	123		*160(pea)
<i>rplO</i>	L15	144	147	147			*197(Ara)
<i>rplP</i>	L16	136	139	142	134		
<i>rplQ</i>	L17	127	116	116			
<i>rplR</i>	L18	117	120	120			*96(pea)
<i>rplS</i>	L19	115	122				
<i>rplT</i>	L20	118	117		128		
<i>rplU</i>	L21	103	124				*201(spi)
<i>rplV</i>	L22	110	121	117	155		
<i>rplW</i>	L23	100	101	100	93		
<i>rplX</i>	L24	104	115	113	*(187)		*146(spi)
<i>rplY</i>	L25	94					*74(pea)
<i>rpmA</i>	L27	85	87		*128		
<i>rpmB</i>	L28	78	78		* 77		
<i>rpmC</i>	L29	63	73	64			
<i>rpmD</i>	L30	59					
<i>rpmE</i>	L31	70	81				
<i>rpmF</i>	L32	57	57		55		
<i>rpmG</i>	L33	55	65		66		
<i>rpmH</i>	L34	46	45				
<i>rpmI</i>	L35	65	67				*73(spi)
<i>rpmJ</i>	L36	38	38	37	37		
**CL40							* 80(spi)

表3 リボソームタンパク質のアミノ酸残基数(AA)の比較

E. coli (レーン*E. coli*), *Synechocystis* 6803 (レーン*Synechocystis*), *Synechococcus* 6301 (レーン*Synechococcus*), タバコ葉緑体 (レーンtobacco chl)および他の植物の葉緑体 (レーンother chl)のリボソームタンパク質のアミノ酸残基数(AA)を示す。 **は葉緑体に特異的なリボソームタンパク質を示す。 *は核コードのリボソームタンパク質で、トランジットペプチドを除いた成熟アミノ酸残基数を示す。*()はトランジットペプチドが決定されていない。(spi)はホウレンソウ、(rye)は大麦、(pea)はエンドウ、(ric)は米、(Ara)はアラビドプシスの葉緑体のリボソームタンパク質を示す。

サブユニット, fMet-tRNA, mRNA が翻訳開始複合体を形成するので、CS 1 がリボソームタンパク S1 であると決定した。しかし、私は SS1 の抗体を作製することで SS1 がリボソームタンパクの 30 S サブユニットの構成成分であることを直接証明した。また、細胞内画分の局在性を調べることでこれまで明らかになっている *E. coli* のリボソームタンパク S1 の特徴 (Subramanian 1983) (リボソームとゆるく結合し、高塩濃度の洗浄ではずれやすい) を同様に持っていることを明らかにした。

SS1 は poly(G), poly(A), poly(U) と高い親和性を示した。ホウレンソウの葉緑体の CS1 は、*in vitro* 実験では poly(A) と親和性が高く (Franzetti et al. 1992a)、*in vivo* 実験で *psbA* の mRNA の 5'UTR に存在するアデニンクラスター配列に結合している (Alexander et al.) ことが調べられている。ゲルシフト実験の結果、SS1 は *Synechococcus* の *psbAI* mRNA の 5'UTR と強い親和性を示した。このことは、SS1 は葉緑体の CS1 と構造的な相同性を持つだけでなく、機能的にも同じ様な役割を持っていることを表している。ただし、葉緑体の *psbA* mRNA の 5'UTR には A クラスターが存在するが、*Synechococcus* の *psbAI* mRNA の 5'UTR には A クラスターはなく、U クラスターが存在し、このような配列に SS1 が結合している可能性がある。CS1 のホモポリマーとの親和性の違いは、このように mRNA の 5'UTR の塩基配列の違いに依存しているのかもしれない。

4-3) 原核生物のリボソームタンパク S1 について

最近のゲノムプロジェクトの結果、11 種の生物でリボソームタンパク S1 ホモログが報告されている。これまで、グラム陽性菌にはリボソームタンパク S1 は存在しないと報告されてきた (Isono and Isono 1975) が、ゲノム解析の結果、*E. coli* の S1 に相同性のある *orf382(jofD)* が *Bacillus subtilis* に、*orf482* が *Mycobacterium tuberculosis* に存在することが明らかになった。*B. subtilis* ではこの *jofD* の上流に *orf225(jofC)* が存在し、*jofC* は *E. coli* の *mssA* に相同性があった。*E. coli* の *mssA* 遺伝子は *rpsA* のすぐ上流に位置し、共転写されることが調べられている (Pedersen et al. 1984)。*orf382(jofD)* がリボソームタンパク S1 であるかどうかの実験的な決定はされていないが、*E. coli* の *rpsA* との相同性の高さと遺伝子配置の類似性からリボソームタンパク S1 である可能性が高い

と報告されている(Sorokin et al. 1995)。現在、プロテインデータベースには上記2種の他に *Mycobacterium leprae*, *Leuconostoc lactis* のリボソームタンパク S1 のホモログが登録されている。これらのグラム陽性菌の S1 ホモログのアミノ酸残基数は *Synechococcus* 6301 の S1 よりは大きい、*E. coli* などのグラム陰性菌の S1 より小さい。分子内構造を調べると、*Mycobacterium* 属の S1 ホモログは *Bacillus* 属より約 100 アミノ酸残基大きい、S1 ドメインはどちらも4個であった。

プロテインデータベースより作製したリボソームタンパク S1 または S1 ホモログを表4にまとめた。分子量と S1 ドメインの数で大きく3グループに分類することができる。第1は、*Chlamydia pneumonia*, *Chlamydia trachomatis*, *Rhizobium meliloti*, *Rickettsia prowazekii*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Buchnera aphidicola*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *spirochete*, *Haemophilus influenzae*, *Aquifex aeolicus* のリボソームタンパク S1 または S1 ホモログで、約 550 アミノ酸残基、分子量は約 60 kDa、S1 ドメインの数は6個ある。これらはグラム陰性菌に属し、仮に大腸菌タイプのリボソームタンパク S1 と呼ぶ。第2は *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leuconostoc lactis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* のリボソームタンパク S1 ホモログで、約 400 アミノ酸残基、分子量約 45 kDa、S1 ドメインの数は4個である。これらはグラム陽性菌に属し、仮に枯草菌タイプのリボソームタンパク S1 と呼ぶ。第3は、*Synechococcus* 6301, *Synechococcus* PCC7942, *Synechocystis* 6803 のリボソームタンパク S1 ホモログで、約 300 アミノ酸残基、分子量約 35 kDa、S1 ドメインの数は3個ある。これらはラン藻に属し、仮にラン藻タイプのリボソームタンパク S1 と呼ぶ。プロテインデータベースにはないが 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質もこの中に含まれる。*Synechocystis* 6803 は2種類のサイズの S1 ホモログがあり、*Synechococcus* 6301 も同様である。*Synechococcus* 7942 のこのタンパク質は 33 kDa タンパク質のホモログである。*Providencia* sp.が例外的に短いがおそらく塩基配列の決定が完全でなかったため、部分的ペプチド配列になっているためと考えられる。

3グループのリボソームタンパク S1 はいつどのように出現し分岐したかに興味がわく。おそらく、1つの S1 ドメインが重複することで3ないし6個の繰り返し構造をもったりリボソームタンパク S1 が形成していくのであろう。ゲノム構造の保存性が

	ORGANISMS	ACCESSIONS	AA	MW	S1 domain
1	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	D72093	580	65020	6
2	<i>Chlamydia trachomatis</i>	A71556	569	63574	6
3	<i>Rhizobium meliloti</i>	P14129	568	62639	6
4	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Q9ZD28	568	63859	6
5	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	AF107093-2	561	61770	6
6	<i>Buchnera aphidicola</i>	Q44653	559	62529	6
7	<i>Escherichia coli</i>	S29161	557	61158	6
8	<i>Helicobacter pylori</i> (<i>Campylobacter pylori</i>)	P56008	556	62826	6
9	<i>Borrelia burgdorferi</i> (Lyme disease spirochete)	G70115	553	63535	6
10	<i>Haemophilus influenzae</i>	Q48082	549	59556	6
11	<i>Aquifex aeolicus</i>	AE000742-14	535	60787	6
12	<i>Providencia</i> sp.	P14128	378	41613	4
13	<i>Mycobacterium leprae</i>	P46836	482	53059	4
14	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (strain H37RV)	D70559	481	53201	4
15	<i>Leuconostoc lactis</i>	P50889	429	46386	4
16	<i>Bacillus cereus</i>	O06000	382	42227	4
17	<i>Bacillus subtilis</i>	P38494	382	42402	4
18	<i>Synechocystis</i> PCC6803 slr1358	P73530	328	36570	3
19	<i>Synechocystis</i> PCC6803 slr1984	P74142	305	33795	3
20	<i>Synechococcus</i> PCC6301 (38 kDa)	P46228	306	34492	3
21	<i>Synechococcus</i> PCC7942 (S1-like)	O33698	295	31785	3
22	<i>Spinacia oleracea</i> chloroplast	P29344	370	40257	3
23	<i>Porphyra purpurea</i> chloroplast	P51345	263	29692	3
24	<i>Marchantia polymorpha</i> mitochondrion	P26863	270	31099	
25	<i>Oenothera berteriana</i> mitochondrion	X78038-1	224	25317	
26	<i>Reclinomonas americana</i> mitochondrion	S78155	191	21856	
27	<i>Triticum aestivum</i> mitochondrion	S38800	170	19295	
28	<i>Penicillium janthinellum</i>	S38953	423	46496	
29	<i>Candida albicans</i> (Yeast)	P40910	255	28884	
30	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Yeast)	P23248	254	28681	
31	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Yeast)	Q09781	251	28357	
32	<i>Xenopus laevis</i> S3A (S1A)	I51635	246	26977	
33	<i>Xenopus laevis</i> S3B (S1B)	P47835	246	26977	
34	<i>Homo sapiens</i> (human) S1-like	JC4026	396	42513	4

表 4 プロテインデータベースに記載されているリボソームタンパク S1 および S1 ホモログのまとめ

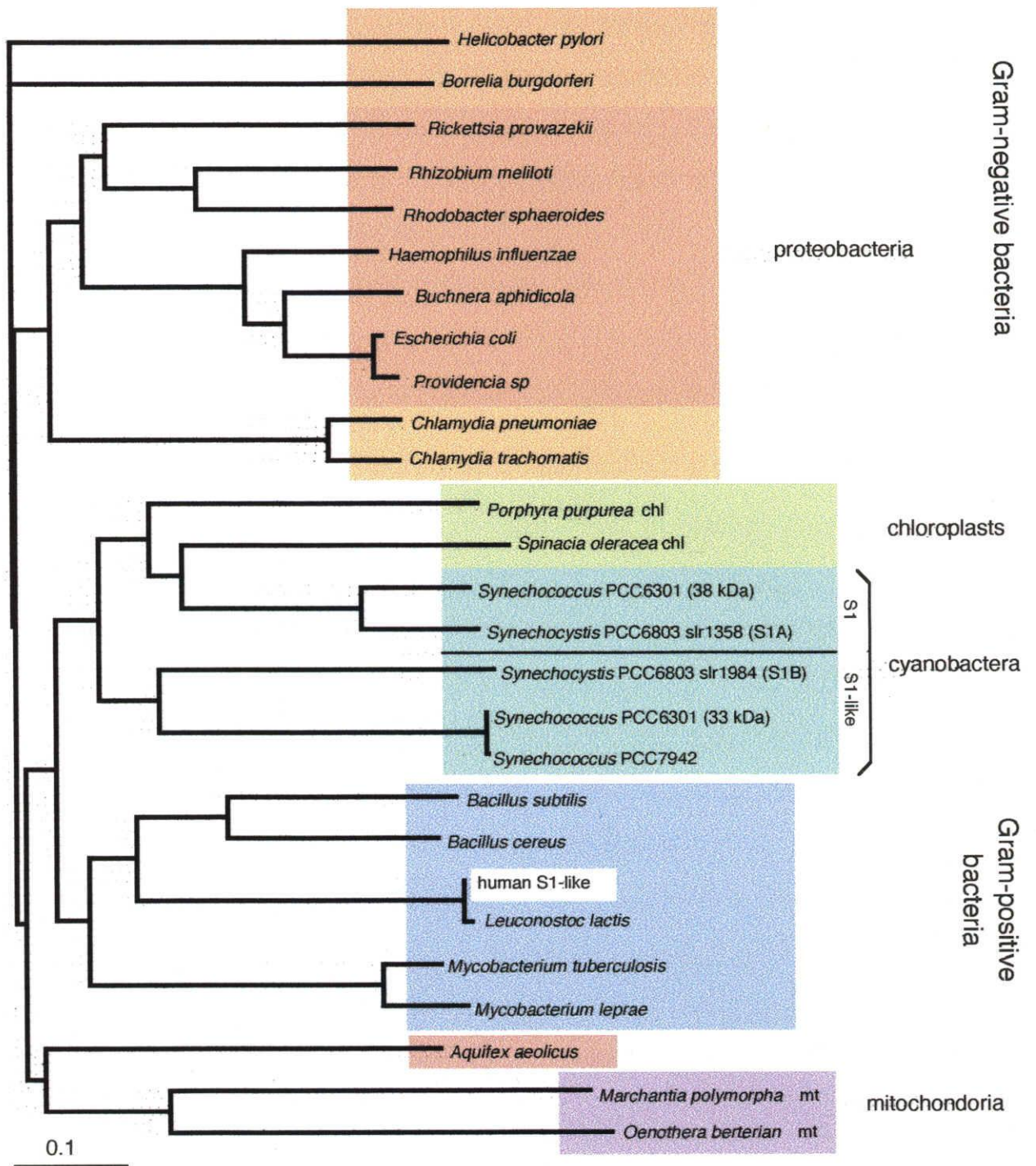


図28

リボソームタンパクS1またはS1ホモログの系統樹 表4のタンパク質のアミノ酸配列についてDDBJのClustal Wプログラムを使用して作製した。

ら考えるなら、大腸菌タイプと枯草菌タイプは起源を同一にしている、4ないし6個のS1ドメインを持ったリボソームタンパクS1の原形からS1ドメインが欠失したかさらに重複したかで2つのタイプに別れていったのだろう。ラン藻タイプのリボソームタンパクS1はS1ドメインの重複が独自に起ったのか、大腸菌タイプまたは枯草菌タイプどちらかを起源としているかは分からない。さらに、実験的な解析とともに詳細な進化的な解析が必要であろう。

これらのS1ホモログをDDBJのClustal Wプログラムを使用して系統樹を作製した(図28)。3グループのおおまかな分類はここでも成立する。また、葉緑体のリボソームタンパクS1がラン藻に近いことがあらためて示された。

4-4) *Synechococcus* 6301 のリボソームタンパク S1 に構造の似たタンパク質について

Synechococcus 6301 のリボソームタンパク S1 (SS1)とアミノ酸配列の類似性の高い新たな 33 kDa の ssDNA 結合タンパク質を分離同定した。この 33 kDa のタンパク質は *E. coli* のリボソームタンパク S1 に見られるタンデムな繰り返し領域(S1ドメイン, Subramanian 1983)を持ち、このタンパク質もリボソームタンパク S1 である可能性が示唆された。すなわち、*Synechococcus* 6301 は2種類のリボソームタンパク S1 を持つ可能性が示唆された。33 kDa タンパク質と SS1 のそれぞれの S1 ドメイン(U, U2, U3)の比較の結果、U1 同士、U2 同士、U3 同士が他との比較より高い相同性を示した。このことは、1つのドメインがそれぞれ独自に繰り返し構造をとって2つのタンパク質が形成されたのではなく、3つのドメインを持った祖先型タンパク質の重複によって形成されたパラログ関係であることを示唆している。

33 kDa タンパク質に特異的な抗体を使用したウェスタン解析の結果は、リボソーム画分とは反応せず、主に細胞質の可溶性画分と反応した。このことは、33 kDa タンパク質はリボソームタンパク S1 ではないことを示し、*Synechococcus* 6301 は唯一のリボソームタンパク S1 を持つことを示唆している。しかし、リボソームは、環境ストレス下において翻訳を制御するために、リボソームの構成成分を変えることが知られている。*E. coli* のリボソームは低温ストレス下で *csdA* にコードされている RNA ヘリカ

一ゼ活性を持つ DEAD-box タンパクを補給することが知られている(Jones et al. 1996)。また、*Anabaena variabilis* M3 リボソームは低温環境でリボソームタンパク S21 と S5 の比率を変える(Sato et al. 1997)。これらの例から考えると、33 kDa タンパク質がストレス環境状態でのリボソームの構成成分になる可能性について、まだ完全には否定できない。

SS1 と 33 kDa タンパク質の RNA 結合特性はお互いに異なっている。SS1 が RNA に特異的に結合するのに比べて、33 kDa タンパク質は RNA ホモポリマーにも結合できるが特に ssDNA と強い親和性を示した。*Synechococcus* 6301 の全可溶性画分 (S30) では 33 kDa タンパク質は SS1 よりタンパク質量が少ないにもかかわらず、S30 を ssDNA カラムにかけて 1.2 M NaCl で溶出されたフラクションでは 33 kDa タンパク質は SS1 より多く約 3 倍量存在した。これは、33 kDa タンパク質の ssDNA との結合性の強さとよく一致している。ゲルシフト解析の結果は、33 kDa タンパク質は *psbAI* の mRNA と結合するにはより多くのタンパク質量を必要とすることが分かった。このことは、33 kDa タンパク質は SS1 とよく似た構造をしているが、異なった機能をしていることを示している。

Synechocystis 6803 の全塩基配列には、*rps1* と相同性のある 2 つの *orf*、*slr1358* と *slr1984* が記載されている(Kaneko et al. 1996a)。これらは、*Synechococcus* 6301 のリボソームタンパク S1 遺伝子との相同性に基づいて決定された。しかし、*slr1358* は SS1 と 75.5% のアミノ酸の一致性を示すが、*slr1984* は SS1 と 36.2% の一致性しかなく、33 kDa タンパク質とは 41.0% のアミノ酸の一致性を示した。このことから、*slr1984* は SS1 よりも 33 kDa タンパク質のホモログであると言えるだろう。

B. subtilis の 4 つの S1 ドメインをもつリボソームタンパク S1 ホモログは SS1 と 35.3%、33 kDa タンパク質とは 29.6% の相同性を示した。単純な相同性の比較ではやはりグラム陽性菌のリボソームタンパク S1 ホモログはリボソームタンパク S1 である可能性が高い。

リボソームタンパク S1 と分子量も近くアミノ酸配列の相同性も高く分子内構造もよく似ているが、リボソームタンパクではなく核酸結合性能も異なっているタンパク質が *Synechococcus* 6301 に存在することを初めて報告した。33 kDa ssDNA 結合タンパ

ク質が *in vitro* 実験で DNA にも RNA にも結合できることから、このタンパク質を核酸結合タンパク質 Nucleic acid binding protein (Nbp1) と命名しその遺伝子を *nbp1* と命名した。

4-5) *Synechococcus* 6301 の Nbp1 の機能について

では、Nbp1 はどのような機能をもつのだろうか。 *in vitro* 実験では RNA にも結合するが、ssDNA との強い結合性が示された。S1 ドメインをもつタンパク質が RNA 結合タンパク質ではなく DNA 結合タンパク質として機能する例が最近報告された。ヒトの顆粒白血球（多形核白血球）の cDNA ライブラリーから単離された、*CYBB* 遺伝子（白血球の食作用に関わるタンパク質をコードする）のプロモーターに結合するタンパク質である (Eklund et al. 1995)。このタンパク質は S1 ドメインが4つタンデムに並んでいて、分子全体の構造がリボソームタンパク S1 によく似ている。このタンパク質がリボソームタンパク質であるかどうかは調べられていないが、RNA とはほとんど結合せず DNA と強く結合することが報告されていて、S1 に類似したタンパク質が DNA 結合タンパク質として機能することが示唆された。おもしろいことに、このタンパク質 (JC4026) は系統樹の上ではグラム陽性菌の *Leuconostoc lactis* の S1 ホモログと近いところに位置している (図 28)。このように、Nbp1 が DNA 結合タンパク質として転写機構に関わる可能性は十分考えられる。また、*E. coli* の S1 はリボソームタンパク質としての機能以外に他の機能をもつことが知られている。Q β ファージの RNA 依存 RNA ポリメラーゼは、その構成成分に *E. coli* の S1 を含む (Subramanian, 1983)。また、*E. coli* の S1 は λ ファージの組換えタンパク質 β と複合体を形成し DNA 組換えに関わっている (Venkatesh and Radding, 1993)。このほかに、リボソームタンパク質が翻訳以外の機構に関わっている例も報告されている。ショウジョウバエの S3 ホモログは DNA 修復に関わっていることが報告されている (Grabowski et al. 1991, Wilson et al. 1993)。これらの例のように、Nbp1 はタンパク質と核酸をリンクさせ、翻訳機構以外の、転写や DNA 組換え、DNA 修復の機構において役割を持っている可能性は十分考えられる。

また、Nbp1 は少なくとも3つの遺伝子とオペロンを形成し、共転写される結果を

示した。*Synechococcus* 6301 では、機能的に関連のある遺伝子がオペロンをつくり転写制御を受けている例が報告されている。*Synechococcus* 6301 の光合成の暗反応で二酸化炭素を固定するリブローズ二リン酸カルボキシラーゼ/オキシダーゼの大サブユニットと小サブユニットをコードする遺伝子 *rbcL* と *rbcS* は同一鎖上に隣り合って位置し、共転写される(Shinozaki and Sugiura, 1985)。また、S10 オペロンはリボソームタンパク遺伝子がタンデムに 11 個並び共転写される(Sugita et al. 1995a)。これらの例から類推するなら、3bp ずつ隔ててインフレームに少なくとも 3 つの遺伝子がタンデムに並んでいることは偶然とは考えにくく機能的に関連があると言えよう。*nbp1* の下流にある *orf285* は顕著な相同性を示したのは *Synechocystis* 6803 の機能未知の遺伝子 *slr2002* (292aa) だけであった。しかし、そのさらに下流にある遺伝子 *orfZ* の 5'側は *Synechocystis* 6803 の PmbA (*slr1435*, 427 aa), *Methanococcus jannaschii* の PmbA (U67479-1, 416 aa)などと相同性が見られた。pMccB17 プラスミドをもった *E. coli* は抗生物質 microcin B17(MccB17)を産生する。PmbA は細胞の可溶性画分に存在し、他の因子とともに前駆体 Pro-MccB17 から成熟 MccB17 を形成させ細胞外に放出する反応過程に関わっていることが報告されている(Rodriguez-Sainz et al. 1990)。この MccB17 は DNA の複製を阻害する作用がある。PmbA 欠損株では pMccB17 プラスミドを持たない時には野生型と変わらないが、pMccB17 プラスミドをもった時には成長が抑制されプラスミド数が増えると内性の MccB17 の作用で死んでしまう。PmbA は MccB17 が自分自身の DNA の複製の抑制に働かない様プロテクトする機能をもつという仮説が提唱されている(Murayama et al. 1996)。*pmbA* のホモログ遺伝子が *Synechococcus* 6301 に存在し、*nbp1* と共転写されるということは Nbp1 は DNA の複製や修復の過程に関係があるのかもしれない。いずれにしても、機能解明のためには遺伝子破壊実験などさらに行う必要があるだろう。

参考文献

- Alexander, C., Faber, N. and Klaff, P. (1998) Characterization of protein-binding to the spinach chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region. *Nucleic Acids Res.* **26**: 2265-2272
- Boni, I. V., Isaeva, D. M., Musychenko, M. L. and Tzareva, N. V. (1991) Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. *Nucleic Acids Res.* **19**: 155-162
- Bryant, D. (1994) The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic publishers
- Burd, C. G. and Dreyfuss, G. (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* **265**: 615-621
- Bycroft, M., Hubbard, T. J., Proctor, M., Freund, S. M. and Murzin, A. G. (1997) The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell* **88**: 235-242
- Carpenter, C. D., Kreps, J. A. and Simon, A. E. (1994) Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiol.* **104**: 1015-1025
- Current Protocols in Molecular Biology UNIT 12.2, John Wiley & Sons, Inc.
- Danno, S., Nishiyama, H., Higashitsuji, H., Yokoi, H., Xue, J. H., Itoh, K., Matsuda, T. and Fujita, X (1997) Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich RNA-binding protein family, in human cells in response to cold stress. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**: 804-807
- Cook, W. B. and Walker, J. C. (1992) Identification of a maize nucleic acid-binding protein (NBP) belonging to a family of nuclear-encoded chloroplast proteins. *Nucleic Acids Res.* **20**: 359-364
- de Smit, M. H. and van Duin, J. (1994) Translational initiation on structured messengers. Another role for the Shine-Dalgarno interaction. *J. Mol. Biol.* **235**: 173-184
- Franzetti, B., Carol, P. and Mache, R. (1992a) Characterization and RNA-binding properties of a chloroplast S1-like ribosomal protein. *J. Biol. Chem.* **267**: 19075-19081
- Franzetti, B., Zhou, D. X. and Mache, R. (1992b) Structure and expression of the nuclear gene coding for the plastid CS1 ribosomal protein from spinach. *Nucleic Acids Res.* **20**: 4153-4157
- Giovannoni, S. J., Turner, S., Olsen, G. J., Barns, S., Lane, D. J. and Pace, N. R. (1988) Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* **170**: 3584-3592

- Golden, S. S., Brusslan, J. and Haselkorn, R. (1986) Expression of a family of *psbA* genes encoding a photosystem II polypeptide in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *EMBO J.* **5**: 2789-2798
- Golden, S. S., Brusslan, J. and Haselkorn, R. (1987) Genetic engineering of the cyanobacterial chromosome. *Methods Enzymol.* **153**: 215-231
- Grabowski, D. T., Deutsch, W. A., Derda, D. and Kelley, M. R. (1991) *Drosophila* AP3, a presumptive DNA repair protein, is homologous to human ribosomal associated protein P0. *Nucleic Acids Res.* **19**: 4297
- Graumann, P. L. and Marahiel, M. A. (1998) A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 286-290
- Gray, M. W. (1989) The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet.* **5**: 294-299
- Hayes, R., Kudla, J., Schuster, G., Gabay, L., Maliga, P. and Gruissem, W. (1996) Chloroplast mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins. *EMBO J.* **15**: 1132-1141
- Isono, S. and Isono, K. (1975) Role of ribosomal protein S1 in protein synthesis: effects of its addition to *Bacillus stearothermophilus* cell-free system. *Eur. J. Biochem.* **56**: 15-22
- Janssen, I., Jakowitsch, J., Michalowski, C. B., Bohnert, H. J. and Löffelhardt, W. (1989) Evolutionary relationship of *psbA* genes from cyanobacteria, cyanelles and plastids. *Curr. Genet.* **15**: 335-340
- Jiang, W., Hou, Y. and Inoue, M. (1997) CspA, the major cold-shock protein of *E. coli*, is an RNA chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 76-80
- Jones, P. G. and Inouye, M. (1994) The cold-shock response--a hot topic. *Mol. Microbiol.* **11**: 811-818
- Jones, P. G., Mitta, M., Kim, Y., Jiang, W. and Inouye, M. (1996) Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 76-80
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (1996a) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**: 109-136
- Kaneko, T., Matsubayashi, T., Sugita, M. and Sugiura, M. (1996b) Physical and gene maps of

- the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC6301 genome. *Plant Mol. Biol.* **31**: 193-201
- Kratz, W. A, and Myers, J. (1955) Nutrition and growth of several blue-green algae. *Amer. J. Bot.* **42**: 282-287
- Kuhse, M. G., Strickland, R. and Palmer, J. D. (1990) An ancient group I intron shared by eubacteria and chloroplasts. *Science* **250**: 1570-1573
- Kumano, M., Tomioka, N. and Sugiura, M. (1983) The complete nucleotide sequence of a 23S rRNA gene from a blue-green alga, *Anacystis nidulans*. *Gene* **24**: 219-225
- Li, Y. Q. and Sugiura, M. (1990) Three distinct ribonucleoproteins from tobacco chloroplasts: each contains a unique amino terminal acidic domain and two ribonucleoprotein consensus motifs. *EMBO J.* **9**: 3059-3066
- Lindahl, L. and Zengel, J. M. (1986) Ribosomal genes in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **20**: 297-326
- Margulis, L. (1981) Symbiosis in cell evolution, W. H. Freeman, San Francisco
- Maruyama, K., Sato, N. and Ohta, N. (1999) Conservation of structure and cold-regulation of RNA-binding proteins in cyanobacteria: probable convergent evolution with eukaryotic glycine-rich RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* **27**: 2029-2036
- Matsudaira, P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**: 10035-10038
- Mattaj, I. W. (1993) RNA recognition: a family matter? *Cell* **73**: 837-840
- Meng, B. Y., Shinozaki, K. and Sugiura, M. (1989) Genes for the ribosomal proteins S12 and S7 and elongation factors EF-G and EF-Tu of the cyanobacterium, *Anacystis nidulans*: structural homology between 16S rRNA and S7 mRNA. *Mol. Gen. Genet.* **196**: 25-30
- Mohamed, A., Jansson, C. (1989) Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol. Biol.* **13**: 693-700
- Muezin, A. G. (1993) OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J.* **12**: 861-867
- Mulligan, M. E., Jackman, D. M. and Murphy, S. T. (1994) Heterocyst-forming filamentous cyanobacteria encode proteins that resemble eukaryotic RNA-binding proteins of the RNP family. *J. Mol. Biol.* **235**: 1162-1170
- Murayama, N., Shimizu, H., Takiguchi, S., Baba, Y., Amino, H., Horiuchi, T., Sekimizu, K. and Miki, T. (1996) Evidence for involvement of *Escherichia coli* genes *pmbA*, *csrA* and a

- previously unrecognized gene *tldD*, in the control of DNA gyrase by *letD* (*ccdB*) of sex factor F. J. Mol. Biol. **256**: 483-502
- Mutsuda, M., Sgiura, M. and Sugita, M. (1999) Physiological characterization of RNA-binding protein-deficient cells from *Synechococcus* sp. strain PCC7942. Plant Cell Physiol. **40**: 1203-1209
- Nagai, K., Oubridge, C., Ito, N., Avis, J. and Evans, P. (1995) The RNP domain: a sequence-specific RNA-binding domain involved in processing and transport of RNA. Trends Biochem. Sci. **20**: 235-240
- Nakamura, T., Ohta, M., Sugiura, M. and Sugita, M. (1999) Chloroplast ribonucleoproteins are associated with both mRNAs and intron-containing precursor tRNAs. FEBS Lett. **460**: 437-441
- Ohta, M., Sugita, M. and Sugiura, M. (1995) Three types of nuclear genes encoding chloroplast RNA-binding proteins (cp29, cp31 and cp33) are present in *Arabidopsis thaliana*: presence of cp31 in chloroplasts and its homologue in nuclei/cytoplasms. Plant Mol. Biol. **27**: 529-39
- Pedersen, S., Skouv, J., Kajitani, M. and Ishihama, A. (1984) Transcriptional organization of the *rpsA* operon of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. **196**: 135-140
- Reith, M. and Munholland, X (1993) The ribosomal RNA repeats are non-identical and directly oriented in the chloroplast genome of the red alga *Porphyra purpurea*. J. Curr. Genet. **24**: 443-450
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. and Stanier, R. Y. (1979) Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteris. J. Gen. Microbiol. **111**: 1-61
- Roberts, M. W. and Rabinowitz, J. C. (1989) The effect of *Escherichia coli* ribosomal protein S1 on the translational specificity of bacterial ribosomes. J. Biol. Chem. **264**: 2228-2235
- Rodriguez-Sainz, M. C., Hernandez-Chico, C. and Moreno, F. (1990) Molecular characterization of *pmbA*, an *Escherichia coli* chromosomal gene required for the production of the antibiotic peptide MccB17. Mol. Microbiol. **4**: 1921-1932
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Horbor, NY.
- Sato, N. (1994) A cold-regulated cyanobacterial gene cluster encodes RNA-binding protein and ribosomal protein S21. Plant Mol. Biol. **24**: 819-823
- Sato, N., Tachikawa, T., Wada, A. and Tanaka, A. (1997) Temperature-dependent regulation of the ribosomal small-subunit protein S21 in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* M3. J.

Bacteriol. **179**: 7063-7071

Sato, N., Wada, A. and Tanaka, A. (1998) Ribosomal proteins in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* strain M3: presence of L25 protein. *Plant Cell Physiol.* **39**: 1367-1371

Sazuka, T. and Ohara, O. (1996) Sequence features surrounding the translation initiation sites assigned on the genome sequence of *Synechocystis* sp. strain PCC6803 by amino-terminal protein sequencing. *DNA Res.* **3**: 225-232

Schindelin, H., Marahiel, M. A. and Heinemann, U. (1993) Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein. *Nature* **364**: 164-168

Schnier, J. and Isono, K. (1982) The DNA sequence of the gene *rpsA* of *Escherichia coli* coding for ribosomal protein S1. *Nucleic Acids Res.* **10**: 1857-1865

Schnier, J., Thamm, S., Lurz, R., Hussain, A., Faist, G. and Dobrinski, B. (1988) Cloning and characterization of a gene from *Rhizobium meliloti* 2011 coding for ribosomal protein S1. *Nucleic Acids Res.* **16**: 3075-3089

Schuster, G. and Grussem, W. (1991) Chloroplast mRNA 3' end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein. *EMBO J.* **10**: 1493-1502

Shine, J. and Dalgarno, L. (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **71**: 1342-1346

Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Shinozaki, Y. K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B. Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. and Sugiura, M. (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome. *EMBO J.* **5**: 2043-2049

Shinozaki, K. and Sugiura, M. (1985) Genes for the large and small subunits of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase constitute a single operon in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* 6301. *Mol. Gen. Genet.* **200**: 27-32

Sorokin, A., Serron, P., Pujic, P., Azevedo, V. and Ehrlich, S. D. (1995) The *Bacillus subtilis* chromosome region encoding homologues of the *Escherichia coli* *mssA* and *rpsA* gene products. *Microbiology* **141**: 311-319

Steinmetz, A., Gubbins, E. J. and Bogorad, L. (1982) The anticodon of the maize chloroplast gene for tRNA^{Leu} UAA is split by a large intron. *Nucleic Acids Res.* **10**: 3027-3037

Subramanian, A. R. (1983) Structure and functions of ribosomal protein S1. *Prog. Nucleic*

Acid Res. Mol. Biol. **28**: 101-142

Subramanian, A. R. (1984) Structure and functions of the largest *Escherichia coli* ribosomal protein. Trends Biochem. Sci. **9**: 491-494

Subramanian, A. R. (1993) Molecular genetics of chloroplast ribosomal proteins. Trends Biochem. Sci. **18**: 177-181

Sugita, C., Mutsuda, M., Sugiura, M. and Sugita, M. (1999) Targeted deletion of genes for eukaryotic RNA-binding proteins, Rbp1 and Rbp2, in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC7942: Rbp1 is indispensable for cell growth at low temperatures. FEMS Microbiol. Lett. **176**: 155-161

Sugita, M. and Sugiura, M. (1994) The existence of eukaryotic ribonucleoprotein consensus sequence-type RNA-binding proteins in a prokaryote, *Synechococcus* 6301. Nucleic Acids Res. **22**: 25-31

Sugita, M., Murayama, Y. and Sugiura, M. (1994) Structure and differential expression of two distinct genes encoding the chloroplast elongation factor Tu in tobacco. Curr. Genet **25**: 164-168

Sugita, M., Luo, L., Ohta, M., Itadani, H., Matubayasi, T. and Sugiura, M. (1995a) Genes encoding the group I intron-containing tRNA^{Leu} and subunit L of NADH dehydrogenase from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 6301. DNA Res. **2**: 71-76

Sugita, M., Sugita, C. and Sugiura, M. (1995b) Structure and expression of the gene encoding ribosomal protein S1 from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 6301: striking sequence similarity to the chloroplast ribosomal protein CS1. Mol. Gen. Genet. **246**: 142-147

Sugita, M. and Sugiura, M. (1996) Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. Plant Mol. Biol. **32**: 315-326

Sugita, M., Sugishita, H., Fujishiro, T., Tsuboi, M., Sugita, C., Endo, T. and Sugiura, M. (1997) Organization of a large gene cluster encoding ribosomal proteins in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 6301: comparison of gene clusters among cyanobacteria, eubacteria and chloroplast genomes. Gene **195**: 73-79

Sugiura, M., Hirose, T. and Sugita, M. (1998) Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. Annu. Rev. Genet. **32**: 437-459

Sørensen, M. A., Fricke, J. and Pedersen, S. (1998) Ribosomal protein S1 is required for translation of most, if not all, natural mRNAs in *Escherichia coli* *in vivo*. J. Mol. Biol. **280**: 561-569

Takeshima, Y., Takatsugu, N., Sugiura, M. and Hagiwara, H. (1994) High-level expression of

human superoxide dismutase in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* 6301. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **91**: 9685-9689

Takeshita, S., Sato, M., Toba, M., Masahashi, W. and Hashimoto-Gotoh, T. (1987) High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for *lacZ* alpha-complementation and chloramphenicol- or kanamycin-resistance selection. Gene **61**: 63-74

Tomioka, N. and Sugiura, M. (1983) The complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from a blue-green alga, *Anacystis nidulans*. Mol. Gen. Genet. **191**: 46-50

Tomioka, N. and Sugiura, M. (1984) Nucleotide sequence of the 16S-23S spacer region in the *rrnA* operon from a blue-green alga, *Anacystis nidulans*. Mol. Gen. Genet. **193**: 427-430

Venkatesh, T. V. and Radding, C. M. (1993) Ribosomal protein S1 and NusA protein complexed to recombination protein beta of phage lambda. J. Bacteriol. **175**:1844-1846

Wakasugi, T., Sugita, M., Tsudzuki, T. and Sugiura, M. (1998) Updated gene map of tobacco chloroplast DNA. Plant Mol. Biol. Rep. **16**: 231-241

Walleczek, J., Albrecht-Ehrlich, R., Stoffler, G. and Stoffler-Meilicke, M. (1990) Three-dimensional localization of the NH₂- and carboxyl-terminal domain of ribosomal protein S1 on the surface of the 30 S subunit from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **265**: 11338-11344

Watanabe, T., Sugiura, M. and Sugita, M. (1997) A novel small stable RNA, 6Sa RNA, from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC6301. FEBS Lett. **416**: 302-306

Wilson, D. M. 3d., Deutsch, W. A., Kelley, M. R. (1993) Cloning of the *Drosophila* ribosomal protein S3: another multifunctional ribosomal protein with AP endonuclease DNA repair activity. Nucleic Acids Res. **21**:2516

Xu, M. Q., Kathe, S. D., Goodrich-Blair, H., Nierzwicki-Bauer, S. A. and Shub, D. A. (1990) Bacterial origin of a chloroplast intron: conserved self-splicing group I introns in cyanobacteria. Science **250**: 1566-1570

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

Ye, L. H., Li, Y. Q., Fukami-Kobayashi, K., Go, M., Konishi, T., Watanabe, A. and Sugiura, M. (1991) Diversity of a ribonucleoprotein family in tobacco chloroplasts: two new chloroplast ribonucleoproteins and a phylogenetic tree of ten chloroplast RNA-binding domains. Nucleic Acids Res. **19**: 6485-6490

Zaug, A. J., McEvoy, M. M. and Cech, T. R. (1993) Self-splicing of the group I intron from *Anabaena* pre-tRNA: requirement for base-pairing of the exons in the anticodon stem. Biochemistry **32**: 7946-7953

謝辞

本研究の遂行にあたり、研究の機会を与えてくださり終始懇切な御指導を賜りました名古屋大学遺伝子実験施設長杉浦昌弘教授ならびに杉田護助教授（現名古屋大学大学院人間情報学研究科教授）に深く感謝いたします。

本研究をまとめるにあたって有益な助言をいただきました若杉達也博士（現富山大学助教授）、廣瀬哲郎博士（現エール大学）、小保方潤一助教授にお礼申し上げます。

本研究の出発点であります *Synechococcus* 6301 の ssDNA 結合タンパク質の調製と分析に協力いただきました藤城常雄氏（萩原健康科学研究所）にお礼申し上げます。実験手法について有益な助言ならびにご指導いただきました金子貴一博士（かずさ DNA 研究所）、陸田径典氏、中村崇裕氏にお礼申し上げます。コンピューター操作に有益な助言をいただきました湯川泰博士、中邨真之博士にお礼申し上げます。アミノ酸配列の決定に間瀬明日香氏に御協力いただきました。その他いろいろな面で遺伝子実験施設の皆様すべてにお世話になりました。お礼申し上げます。

国立遺伝学研究所で研究へ興味をもつ機会を与えてくださいました理化学研究所篠崎一雄教授にお礼を申し上げます。

付録

副論文

Chieko Sugita, Michinori Mutsuda, Masahiro Sugiura and Mamoru Sugita

Targeted deletion of genes for eukaryotic RNA-binding proteins, Rbp1 and Rbp2, in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC7942: Rbp1 is indispensable for cell growth at low temperatures.

FEMS Microbiol. Lett. **176**, 155-161 (1999)

Chieko Sugita, Masahiro Sugiura and Mamoru Sugita

A novel nucleic acid-binding protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC6301: a 33 kDa soluble polypeptide with high sequence similarity to ribosomal protein S1

Mol. Gen. Genet. (accepted)

参考論文

Mamoru Sugita, Hiroyuki Sugishita, Tsuneo Fujishiro, Mari Tsuboi, Chieko Sugita, Toshiya Endo and Masahiro Sugiura

Organization of a large gene cluster encoding ribosomal proteins in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 6301: comparison of gene clusters among cyanobacteria, eubacteria and chloroplast genomes
Gene **195**, 73-79 (1997)

Mamoru Sugita, Chieko Sugita and Masahiro Sugiura

Structure and expression of the gene encoding ribosomal protein S1 from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC6301: striking sequence similarity to the chloroplast ribosomal protein CS1
Mol. Gen. Genet. **246**, 142-147 (1995)

Mamoru Sugita, Chieko Sugita and Masahiro Sugiura

Molecular characterization of cyanobacterial RNA binding proteins: structures of 12RNP1 and 12RNP2 genes from *Synechococcus* sp. Strain PCC7942.
Photosynthesis: from Light to Biosphere (Mathis, P., ed.), Vol. III, pp.524-528, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1995)

Kazuo Shinozaki, Chieko Yamada*, Naoyuki Takahata and Masahiro Sugiura

Molecular cloning and sequence analysis of the cyanobacterial gene for the large subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 4050-4054 (1983)

Kazuo Shinozaki, Noboru Tomioka, Chieko Yamada* and Masahiro Sugiura

Cloning and characterization of a plasmid DNA from *Anacystis nidulans* 6301
Gene, **19**, 221-224 (1982)

*は旧姓