

Pseudomonas putida の分子

シャペロンの機能解析

生命科学研究科 生命科学専攻 博士後期課程

4910110001 伊藤 史浩

目次

序論-----	1
第1章 <i>Pseudomonas putida</i> の分子シャペロンおよび ATP 依存性プロテアーゼ遺伝子欠損株の作製と性状の解析	
緒言-----	5
1-1 <i>Pseudomonas putida</i> の分子シャペロンおよび ATP 依存性プロテアーゼ遺伝子欠損株の作製	
第1節 実験方法-----	11
第2節 実験結果および考察	
1) 分子シャペロンおよび ATP 依存性プロテアーゼ遺伝子欠損株の作製-----	15
2) 分子シャペロンおよび ATP 依存性プロテアーゼ遺伝子欠損株の生育可能温度---	18
3) 分子シャペロンおよび ATP 依存性プロテアーゼ遺伝子欠損株の倍加時間-----	21
1-2 <i>Pseudomonas putida</i> の分子シャペロンおよび ATP 依存性プロテアーゼ遺伝子欠損株の性状の解析	
第1節 実験方法-----	23
第2節 実験結果および考察	
1) <i>dnaJ</i> 欠損株の J-ドメインタンパク質遺伝子による相補試験-----	26
2) 高温処理による生存率-----	30
3) 過酸化物質に対する感受性-----	32
1-3 <i>Pseudomonas putida</i> における <i>dnaK</i> の変異と生育との関わり	
第1節 実験方法-----	34
第2節 実験結果および考察	
1) 長期培養によって蓄積する変性タンパク質の特定-----	36
2) <i>P. putida</i> の形態におよぼす <i>dnaK</i> の変異の影響-----	39

第2章 *Pseudomonas putida* の熱ショック応答機構

緒言-----	40
2-1 <i>Pseudomonas putida</i> の熱ショック応答	
第1節 実験方法-----	41
第2節 実験結果	
1) <i>P. putida</i> のタンパク質レベルでの熱ショック応答	
①10~12°Cの温度上昇が Hsp の発現を強く誘導する-----	45
②熱処理により elongation factor G と 30S リボソームサブユニット タンパク質 A が減少する-----	48
③ σ^{32} 量の変化は Hsp 量の変化よりも鋭敏である-----	48
④ σ^{32} 量の調節は細胞膜の変化を認識して起きる可能性が高い-----	49
2) <i>P. putida</i> の転写レベルでの熱ショック応答	
①Hsp 遺伝子の発現量は σ^{32} の量に相関している-----	50
②熱処理時に転写レベルでの elongation factor G と 30S リボソーム サブユニットタンパク質 A の調節が起きる-----	51
③45°Cでの <i>rpoH</i> 遺伝子の発現は σ^{24} に依存している-----	52
④ <i>P. putida</i> の <i>cbpA</i> は熱ショックにより誘導される-----	54
第3節 考察-----	59
2-2 <i>Pseudomonas putida</i> の CbpA の熱による誘導	
第1節 実験方法-----	64
第2節 実験結果および考察	
1) <i>P. putida</i> CbpA の <i>E. coli</i> における発現と <i>P. putida</i> での検出-----	67
第3章 <i>Pseudomonas putida</i> におけるタンパク質の熱凝集と再生	
緒言-----	71
第1節 実験方法-----	72

第2節 実験結果

1) 細胞質タンパク質の熱凝集と再生

- ①*P. putida* の細胞壁タンパク質----- 72
- ②熱処理により不溶性タンパク質は増加する----- 72
- ③熱ストレスにより生じた凝集タンパク質の再生には ClpB と DnaK
システムが必要である----- 74

2) 遺伝子相補による細胞質タンパク質の熱凝集と再生への影響

- ①*clpB* 欠損株における *clpB* の相補----- 78
- ②*dnaJ* 欠損株における J-ドメインタンパク質遺伝子による相補----- 79

3) R2 株およびその変異株における細胞質タンパク質の熱凝集と再生----- 80

4) R2 株およびその変異株における熱ショックタンパク質の増加----- 84

第3節 考察----- 85

第4章 *Pseudomonas putida* の有機溶媒耐性における分子シャペロン、ATP 依存性 プロテアーゼおよび AhpC の機能

緒言----- 89

第1節 実験方法----- 92

第2節 実験結果

1) 分子シャペロンおよび ATP 依存性プロテアーゼ遺伝子欠損株の有機溶媒耐性- 96

2) OxyR 結合部位削除株および *recG* 欠損株の作製とその形質の解析----- 98

第3節 考察----- 103

要約および総括----- 105

参考文献----- 112

謝辞----- 124

序論

生物の細胞には、非常に多くの種類のタンパク質が含まれている。タンパク質は生体内のほとんどすべての生命現象の過程に関わり、それぞれのタンパク質は、ごく限られた立体構造となっているときにだけ、それぞれに固有の機能を示すことが知られている。生物におけるタンパク質の合成は、転写と翻訳の二つの過程を経て行われる。タンパク質の遺伝情報が保存されている DNA の塩基配列は、RNA ポリメラーゼによる転写の過程により、メッセンジャーRNA (mRNA) の塩基配列へと置き換えられ、その情報をもとにリボソーム、種々の翻訳因子、およびアミノアシルトランスファーRNA (tRNA) が関わる合成の過程を経て、新生ポリペプチド鎖へと翻訳される。しかし、細胞内で機能するタンパク質となるためには、正しい立体構造へと正確に折りたたまなければならない。比較的 low molecular weight の新生ポリペプチドの折りたたみは自発的に進むが、高分子のポリペプチドの多くは、自発的に正しい立体構造へと折りたたむことができないため、新生ポリペプチドの正しい折りたたみを介助するタンパク質が細胞内に存在する。これらのタンパク質は分子シャペロンと呼ばれ、クライアントタンパク質と相互作用することによって、それらが機能的な立体構造となることを介助、あるいはその形成を補助し、最終的にはクライアントタンパク質から離れるものとして定義される (Hartl *et al.*, 2011)。分子シャペロンは、熱ショックタンパク質 (Heat shock protein, Hsp) として、その存在が知られるようになった。Hsp には、分子シャペロンや ATP 依存性のプロテアーゼなどが含まれ、その発現は、熱や化学物質などの多くのストレスにより誘導されるが、その発見の歴史から一般に上記の名称で呼ばれている。分子シャペロンは、およそその分子量に従って分類されており、生物において普遍的に存在する Hsp70/Hsp40 によるシステム、Hsp60/Hsp10 によるシステム、Hsp90、Hsp100、低分子 Hsp などが見出されている (Hartl *et al.*, 2011)。

成熟したタンパク質は、酵素として生体内の一連の化学反応を触媒するほか、細胞を形作る基礎となり、環境からの刺激を受容し、物質の輸送に携わるなど

多種多様の役割を担う。しかしながら、タンパク質は、熱、有機溶媒、金属、浸透圧などの様々なストレスにより変性し、タンパク質の立体構造が壊れることで、本来持っている機能を失うことがある。熱ショック応答は、熱や他のストレスにより変性したタンパク質の増加に対応する普遍的な細胞応答であり、正しくフォールディングされていない状態のタンパク質が増加することにより、Hsp の発現が誘導されると考えられてきた。生物は温度などの環境の変化に対応するために多くの適応機構を備えており、生育環境に基づいて遺伝子の発現を調節する。微生物においても、環境ストレスに対する非常に多くの遺伝子発現調節因子が存在することが明らかとなっている。*Escherichia coli* をはじめとするグラム陰性菌においては、非主要シグマ因子である σ^{32} によって、Hsp の発現は制御されている (Straus *et al.*, 1987; Morita *et al.*, 2000; Guisbert *et al.*, 2008)。

細胞内で生じた変性タンパク質は、疎水性領域が露出している状態であるため、互いに凝集しやすく、凝集体を形成する傾向にある。生じた凝集体は細胞に重大な損害を与え、特定の凝集体の蓄積は、ある疾患の発症につながる。例えば、ヒトではパーキンソン病やアルツハイマー病などの神経疾患をもたらす (Tran and Miller, 1999)。細胞の中では、これらの凝集したタンパク質を脱凝集 (再溶解) し、元の機能のもったタンパク質へと再生できることが知られている (Parsell *et al.*, 1994; Glover and Lindquist, 1998)。これらの再生にも、分子シャペロンが関わっており、Hsp104 と呼ばれる分子シャペロンが、Hsp70 などと協同的に働くことで、凝集体からポリペプチドを引き出し、タンパク質の立体構造の再構築と再生を助ける。分子シャペロンは、タンパク質を正しい立体構造に折りたたむことを助けるが、分子シャペロンが正常な立体構造へ導けなかった場合や、環境ストレスにより細胞内の変性タンパク質が増加した場合には、変性タンパク質は ATP 依存性プロテアーゼによる分解系により分解・除去される。このような知見は、熱ショック応答の解析によってもたらされたものであり、分子シャペロンや ATP 依存性のプロテアーゼは、細胞内のタンパク質の品質管理を行い、恒常性 (いわゆるプロテオスタシス) を保っている。

本研究の題材となっている *Pseudomonas putida* は、地球に広く普遍的に生息

するグラム陰性細菌であり、多才な代謝機能により、さまざまな環境条件に適応することができる (Timmis, 2002)。 *P. putida* は、比較的高い有機溶媒耐性を持ち、いくつかの因子が耐性の能力に関与することが知られている (Ramos *et al.*, 2002)。 *E. coli* では、RNA ポリメラーゼのシグマ因子として、主要シグマ因子である σ^{70} (RpoD) のほかに、 σ^{54} (RpoN)、 σ^{38} (RpoS)、 σ^{32} (RpoH)、 σ^{28} (RpoF)、 σ^{24} (RpoE)、 σ^{19} (FecI) の合計 7 種類知られているが、*Pseudomonas* 属に含まれる緑膿菌 (*P. aeruginosa*) は、主要なシグマ因子 RpoD 以外に 19 個の細胞刺激に応答する extracytoplasmic function (ECF) と呼ばれるシグマ因子を持っており、少なくとも合計で 24 個を有している (Potvin *et al.*, 2008)。 *P. putida* も同程度の数のシグマ因子をもつことが、ゲノム解析により判明しており (Nelson *et al.*, 2002)、また、遺伝子の数も 5,000 個以上であり、*E. coli* と比べると 1,000 近く多い。これ故に、*P. putida* は様々な環境の変化へと対応する能力が高いと思われる。細菌の熱ショック応答は、これまで *E. coli* において非常に詳細な研究がなされており (Arsène *et al.*, 2000; Yura and Nakahigashi, 1999)、細菌における分子シャペロンや ATP 依存性プロテアーゼの構造や機能についての知見は、ほとんどが *E. coli* に由来するものである。一方、*Pseudomonas* 属の熱ショック応答についての解析例は多くない (Allan *et al.*, 1988; Keith *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2007)。

有機溶媒などを含むストレス環境下では、細胞の生存に分子シャペロンは必要不可欠であると考えられる。これらのストレス条件下では、ストレス応答時の転写調節因子やタンパク質の品質管理に関わる分子シャペロンが総合的に作用することで、ストレス環境や環境変化への適応ができると考えられる。特に、ストレスによって変性、凝集するタンパク質の品質管理を行うことは、微生物の生育に必要な細胞内の代謝機能の調節に重要である。分子シャペロンの機能やストレス応答に関する研究を解析し、それらの得られた知見を蓄積することで、将来的に、*P. putida* をバイオレメディエーションなどの環境浄化や、物質変換に利用することが期待できる。特に、物質変換や環境浄化を安定して行うためには、それらの情報の蓄積は必要不可欠である。微生物は多様であり、細

胞を構成する分子も必ずしも同一ではない。遺伝子発現の調節機構や、タンパク質の役割も異なる可能性は少なくない。大腸菌と *P. putida* では、生育環境や遺伝子の数が異なることから、分子シャペロンの機能やストレス応答が必ずしも同じでないと考えられる。得られた情報を統合することで、ストレス耐性の高い *P. putida* 菌株を作製することで、毒性の高い物質が高濃度含まれる環境において、安定した物質変換や環境浄化を行うことが可能になると考えられる。*E. coli* と *P. putida* では、過酸化水素分解酵素遺伝子の発現調節 (Hishinuma *et al.*, 2006) や非主要シグマ因子の σ^S の制御 (Venturi, 2003) をはじめとして、異なる機構をもつことが知られているため、熱ショック応答や、分子シャペロンあるいは ATP 依存性プロテアーゼの機能についても、*E. coli* のものと異なる可能性があることが予想された。本研究では、*P. putida* の熱ショックタンパク質遺伝子の欠損株を作製し、それらを各種のストレスで処理することにより、主に、*P. putida* の分子シャペロンの機能を解析したものである。

第1章 *Pseudomonas putida* の分子シャペロンおよび ATP 依存性プロテアーゼ 遺伝子欠損株の作製と性状の解析

緒言

先に述べたように、分子シャペロンは生体におけるタンパク質の品質管理に、極めて重要な役割を果たしている。また、ATP 依存性プロテアーゼは、タンパク質基質分子を特異的に認識し、選択的に加水分解することで、タンパク質の秩序ある分解と再生に役立っている。本章では、*Pseudomonas putida* のタンパク質の品質管理を行うタンパク質の機能に関する知見を得るために、分子シャペロンや ATP 依存性プロテアーゼをコードする遺伝子欠損株の作製と、得られた菌株の性状の解析を行った。分子シャペロンや ATP 依存性プロテアーゼについて、これまでに得られている知見を以下に概説するとともに、*P. putida* KT2442 株のトルエン耐性変異株についても紹介する。

Hsp70 は、タンパク質の立体構造の構築だけでなく、凝集したタンパク質の脱凝集や立体構造の再構築、組み立て、不要なタンパク質の除去などのタンパク質の品質管理を行うとともに、タンパク質の輸送にも関わっており、ストレス応答や細胞内のシャペロンネットワークの中心となっている (Genevaux *et al.*, 2007; Hartl *et al.*, 2011)。細菌の Hsp70 ホモログの中で、最も詳細に研究されているのが、*E. coli* における DnaK システムである。DnaK システムは、DnaK、DnaJ、GrpE から構成されており、DnaK は DnaJ の補助によりあるいは単独で、リボソームから合成された新生ポリペプチドや変性したタンパク質の疎水性領域に結合し、露出したポリペプチドの疎水性領域が互いに凝集することを防いでいる (Genevaux *et al.*, 2007; Hartl *et al.*, 2011)。*E. coli* のゲノム DNA には、3 つの Hsp70 メンバー (DnaK、HscA、HscC) が存在し、対応する Hsp70 のコシャペロンとして働く Hsp40 が 6 つ (DnaJ、CbpA、DjlA、HscB、YbeS、YbeV) 存在する (Hennessy *et al.*, 2005)。細菌の DnaK は、高度に保存された 44kDa の N 末端 ATPase ドメインとそれに続く 15kDa の基質結合ドメイン、および C 末端

ドメインからなる。Hsp70/DnaK のシャペロン機能は、結合したヌクレオチドの状態では調節されている。DnaK に ATP が結合している場合は、基質ポリペプチドは基質結合ドメインから結合と解離を繰り返すが、Hsp40/DnaJ が DnaK のもつ ATPase 活性を活性化し、その加水分解を促進することで ADP へと変換されることにより、DnaK の立体構造の変化を導き、基質ポリペプチドとの結合が強固になる (Genevaux *et al.*, 2007)。DnaK と DnaJ による ATP 変換サイクルは、ヌクレオチド交換因子 (GrpE) によってさらに調節を受けており、GrpE は DnaK の基質タンパク質の放出を促進する働きをもっている (Straus *et al.*, 1990; Szabo *et al.* 1994; McCarty *et al.*, 1995; Wawrzynów *et al.*, 1995; Laufen *et al.*, 1999; Siegenthaler and Christen, 2006)。また、*E. coli* の DnaK 遺伝子変異株は、温度感受性を示すことが知られている (Georgopoulos, 1977; Peak and Walker, 1987)。

我々の研究室では、これまでに *P. putida* KT2442 株 (KT 株) のトルエン耐性株である *P. putida* KT2442-R2 株 (R2 株) について、全ゲノム配列を決定するとともに、タンパク質の発現パターンや、リアルタイム PCR や DNA マイクロアレイによる遺伝子の発現解析を行ってきた (Kobayashi *et al.*, 2011)。R2 株は、分子シャペロンとして機能する DnaK をコードする遺伝子 (*dnaK*) に点変異 (*dnaK1* 変異) をもち、DnaK の 445 番目のアルギニンがプロリンに置換されている。R2 株における DnaK の変異部位は、基質タンパク質結合 β ドメインのループ 4.5 に存在する。445 番目のアルギニンは、DnaK に結合した ATP が加水分解した際に、C 末端ドメインの一部から成り、 β ドメインに被さる蓋のような働きをする α ヘリックス領域のアミノ酸と相互作用し、 β ドメインと α ヘリックス領域との構造の安定化に寄与すると考えられている (Zhu *et al.*, 1996)。ループ領域へのプロリン残基の導入は、高次構造の大きな変化を引き起こす可能性があることから、*dnaK1* 変異によって DnaK と基質との安定な結合が妨げられ、R2 株では本来の DnaK のもつ機能が発現せずに、基質タンパク質の正しい折りたたみや、凝集したタンパク質の再生がうまくいかないものと推測されている。*E. coli* において、DnaK は DNA 複製や多くの細胞機能にも関わることが報告されており (Bukau and Horwich, 1998)、このため、R2 株は野生株と比べて温度感

受性が高く、35°C以上の温度ではコロニーを形成できないと考えられている。また、(野生株においては非ストレス条件と考えられる) 通常の培養条件温度である 30°Cで培養すると、KT 株と比較して定常期以降に熱ショックタンパク質 (Hsp) を高発現し、細胞内に蓄積する特徴を持つ。これも、正常な DnaK が生産されていないことから、Hsp の発現を制御しているシグマ因子 (σ^{32}) と DnaK システムとの相互作用や、FtsH プロテアーゼによる分解がおきず、安定化した σ^{32} により、Hsp が高発現するという表現型を示すものと考えられている (Kobayashi *et al.*, 2011)。 *P. putida* においては、*dnaK* 破壊株は作製できておらず、必須遺伝子である可能性が示されている。

DnaK のコシャペロンとして機能する Hsp40 (DnaJ) は、先に述べたように DnaK の ATP の加水分解を促進させる役割を担い、DnaK の中心的調節因子である (Hennessy *et al.*, 2005)。Hsp40 ファミリーに属する DnaJ は、4つのドメイン領域から構成され、J-ドメイン領域、グリシンとフェニルアラニンに富む領域 (G/F-rich region)、ジンクフィンガードメイン、および C 末端ドメインからなる。Hsp40 の J-ドメイン領域は、一般的に Hsp70 と相互作用し、ATPase 活性を促進する (Hennessy *et al.*, 2005)。DnaJ は基質ペプチドの芳香族アミノ酸や脂肪族アミノ酸の疎水性領域と結合し、DnaK に基質ペプチドとして提供する (Rüdiger *et al.*, 2001)。 *E. coli* においては、*dnaK* 欠損株と同様に *dnaJ* の欠損株は温度感受性を示すことが知られている (Sell *et al.*, 1990)。前述のように、*E. coli* では DnaJ のアナログとされているタンパク質が 5つ存在するが、その内の CbpA (Ueguchi *et al.*, 1995) と DjlA (Genevaux *et al.*, 2001) も DnaK と相互作用し、コシャペロンとして機能することが明らかとなっている。DnaJ の G/F-rich region と、ジンクフィンガードメインに存在する 2つの亜鉛結合部位 (Zinc binding site) のうちの 1つは、基質の結合と関係することが報告されている (Perales-Calvo *et al.*, 2010; Linke *et al.*, 2003)。一方、*E. coli* の CbpA は Zinc binding site を有していないことから、異なる基質の結合様式を持つ可能性もある。しかしながら、*cbpA* は、コピー数が高ければ *dnaJ* 変異株の高温での生育をサポートすることから、CbpA は生体内でも DnaJ と同様の機能を持つと推測され (Genest *et al.*, 2011;

Ueguchi *et al.*, 1995)、DnaJ と同様に σ^{32} の活性化と安定化に関わると考えられている (Tatsuta *et al.*, 1998)。

DnaK (Hsp70) システムに加えて、主要な折りたたみ装置として GroE システム (GroEL/ES) が存在する (Hartl *et al.*, 2011)。GroEL は Hsp60 ファミリーに含まれシャペロニンと呼ばれる。生体内では、分子量約 57kDa からなるサブユニット 7 つから成る構造体が、上下に重なった 14 量体構造をしており、リング状の構造を構成して内部に空洞を持つ。GroES (Hsp10) は、7 量体から構成されており、GroEL の補助因子として働く。GroEL/ES は、*E. coli* では全タンパク質の約 10% の折りたたみに関与しており、*groEL/ES* は必須遺伝子と考えられている。GroEL/ES は DnaK システムとともに、ストレス条件下だけではなく、通常の生育条件下においてもタンパク質の折りたたみを促進させる重要な役割を担う普遍的に存在する主要なシャペロンである。

酵母の Hsp104 や細菌の ClpB は、ATP 依存型の分子シャペロンであり、AAA+ (ATPases associated with various cellular activities) スーパーファミリーに含まれ、Clp/Hsp100 サブファミリーに属するタンパク質である。この Hsp104 や ClpB は、生物における熱耐性にとって重要であり、不溶化した凝集体からタンパク質を脱凝集する機能をもつことが報告されている。Hsp104 や ClpB は、4 つのドメインから構成されており、N 末端ドメイン (NTD)、2 つのヌクレオチド結合ドメイン (NBD-1、NBD-2)、ミドル (M) ドメインからなっている。Hsp104/ClpB は六量体のリング状の構造をしており、中央に穴が開いた構造をしている。現時点では、Hsp104/ClpB は ATP の加水分解エネルギーを利用して、Hsp104/ClpB の中央の穴に凝集体からポリペプチドをほどこき、穴に通すことにより脱凝集を行うと考えられ (Schlieker *et al.*, 2004)、Hsp104/ClpB は、細胞内では Hsp70 システム (DnaK システム) との協同的に働くことが知られている (Parsell *et al.*, 1994; Glover and Lindquist, 1998; Mogk *et al.*, 1999; Tomoyasu *et al.*, 2001; Doyle and Wickner, 2009; Tyedmers, *et al.*, 2010; Seyffer *et al.*, 2012)。タンパク質の脱凝集は、凝集体に DnaK/DnaJ と相互作用することから始まると考えられており (Weibezahn, *et al.*, 2004; Acebrón *et al.*, 2008)、この後、凝集体に ClpB が結合す

ることが可能になる (Acebrón *et al.*, 2009)。 *E. coli* の ClpB は、高温処理後の細胞の生存を補助するタンパク質として機能する (Squires *et al.*, 1991)。

Hsp90 は真核生物において高度に保存された分子シャペロンであり、多くの細胞内の機能に関与し、例えば、タンパク質輸送やシグナル伝達、レセプタータンパク質の成熟に関係している (Hartl *et al.*, 2011)。 Hsp90 はコシャペロンとともにタンパク質の折りたたみと活性化を行う。一方、細菌における Hsp90 のホモログである HtpG は、Hsp90 と同様にタンパク質の成熟に関わると考えられているが、真核生物と比べてその機能についての報告例は乏しい。HtpG (Hsp90) は二量体で機能し、それぞれのプロトマーは、保存された ATP の結合と加水分解が行われる N 末端ドメイン、ミドル (M) ドメイン、二量体化に重要な C 末端ドメインの 3 つから成る。少なくとも、これまでに *E. coli* においてリボソームタンパク質 L2 が HtpG の ATPase 活性の活性化に関与していること (Motojima-Miyazaki *et al.*, 2010) や、DnaK システムによる不活性タンパク質の再活性化を補助することが分かっているが (Genest *et al.*, 2011)、基質についての知見はほとんど得られていない。

タンパク質の品質管理を行うのは、分子シャペロンだけではない。様々なストレス条件下では、折りたたみに失敗したタンパク質や異常なタンパク質が細胞内に増加する。不要なタンパク質の除去をすることは、細胞の生存に重要であると考えられ、間違っって折りたたまれたタンパク質や異常なタンパク質は、細胞内のプロテアーゼによって分解される。*E. coli* においては、主要な ATP 依存型プロテアーゼとして ClpAP・ClpXP、HslUV、Lon、FtsH が存在する (Gur *et al.*, 2011)。 ClpAP や ClpXP は、プロテアーゼサブユニットである ClpP が、ClpA もしくは ClpX と相互作用したものである。 ClpA や ClpX は、ATPase 活性を持ちシャペロンと同様の活性を持つ。 Lon と ClpP は、*E. coli* の細胞内のタンパク質の分解の約 70~80%に関わっていると報告されている (Goldberg *et al.*, 1994; Laskowska *et al.*, 1996; Porankiewicz *et al.*, 1999; Tsilibaris *et al.*, 2006)。 ClpP は特定のタンパク質の分解に関わっていることが知られている。*E. coli* の ClpXP は、定常期特異的なシグマ因子 (σ^{38}) の分解に関わり、対数増殖期には ClpXP によ

って細胞内の σ^{38} の量は低く保たれている (Schweder *et al.*, 1996)。

FtsH は、ATP 依存型の亜鉛メタロペプチダーゼである。FtsH も、ClpB や ClpP と同様に AAA+ファミリーに属しており、ホモヘキサマーとして機能し、内在性膜タンパク質の品質管理に役割を担う。FtsH は *E. coli* では増殖に必須とされている他、シグマ因子 (σ^{32}) の分解に関わっていると考えられている (Herman *et al.*, 1995; Tomoyasu *et al.*, 1995; Tatsuta *et al.*, 1998)。FtsH は、DnaK システムと協同して σ^{32} の分解を行っていることから、通常の培養条件下では、 σ^{32} の細胞内の量を調節していると考えられる。以上のことから、分子シャペロンに関わらず、プロテアーゼも細胞内のタンパク質の品質管理に重要な役割を果たしている。

細菌の熱ショック応答は、*E. coli* で多く研究されているが、*Pseudomonas* 属の細菌の熱ショック応答についての報告は限られている。同様に、*P. putida* の分子シャペロンタンパク質の機能についても、詳細な解析はなされていない。このため、*P. putida* における分子シャペロンタンパク質および ATP 依存性プロテアーゼの機能について解析を行った。第 1 章では、*P. putida* のタンパク質の品質管理を行うタンパク質に関する知見を得るために、分子シャペロンや ATP 依存性プロテアーゼをコードする遺伝子を破壊し、得られた遺伝子欠損株の解析を行った。

1-1 *Pseudomonas putida* の分子シャペロンおよび ATP 依存性プロテアーゼ
遺伝子欠損株の作製

第1節 実験方法

1) 使用菌株、プラスミド、プライマー

使用した菌株、プラスミド、プライマーを表 1-1 に示した。菌株やプラスミドについては、文献や供給元が記載されていないものは、本研究において作製したものである。

表 1-1. 使用菌株、プラスミド、プライマー

菌株	特徴	文献あるいは供給元
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2442 株 (KT 株)	<i>hsdR</i> Rif ^R	Franklin <i>et al.</i> , 1981
KTΔ <i>cbpA</i> 株	<i>cbpA</i> ⁻ derivative of KT2442, Km ^R	
KTΔ <i>clpB</i> 株	<i>clpB</i> ⁻ derivative of KT2442, Km ^R	
KTΔ <i>clpP</i> 株	<i>clpP</i> ⁻ derivative of KT2442, Km ^R	
KTΔ <i>djlA</i> 株	<i>djlA</i> ⁻ derivative of KT2442, Km ^R	
KTΔ <i>dnaJ</i> 株	<i>dnaJ</i> ⁻ derivative of KT2442, Km ^R	
KTΔ <i>htpG</i> 株	<i>htpG</i> ⁻ derivative of KT2442, Km ^R	
KTΔ <i>lon-1</i> 株	<i>lon-1</i> ⁻ derivative of KT2442, Km ^R	
KTΔ <i>lon-2</i> 株	<i>lon-2</i> ⁻ derivative of KT2442, Km ^R	
KT2442-R2 株 (R2 株)	<i>dnaK1</i> (DnaK Arg ⁴⁵⁵ to Pro) derivative of KT2442	Kobayashi <i>et al.</i> , 2011
R2Δ <i>cbpA</i> 株	<i>cbpA</i> ⁻ derivative of KT2442-R2, Km ^R	
R2Δ <i>clpB</i> 株	<i>clpB</i> ⁻ derivative of KT2442-R2, Km ^R	
R2Δ <i>clpP</i> 株	<i>clpP</i> ⁻ derivative of KT2442-R2, Km ^R	
R2Δ <i>djlA</i> 株	<i>djlA</i> ⁻ derivative of KT2442-R2, Km ^R	
R2Δ <i>dnaJ</i> 株	<i>dnaJ</i> ⁻ derivative of KT2442-R2, Km ^R	
R2Δ <i>htpG</i> 株	<i>htpG</i> ⁻ derivative of KT2442-R2, Km ^R	
R2Δ <i>lon-1</i> 株	<i>lon-1</i> ⁻ derivative of KT2442-R2, Km ^R	
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α 株	Δ(<i>lacZ</i>)M15	Gibco BRL
CC118λ <i>pir</i> 株	<i>recA pir</i> lysogen, host for pKNG101	Herrero <i>et al.</i> , 1990

プラスミド	特徴	文献あるいは供給元
pNEB193	Cloning vector, Ap ^R	New England Biolabs
pUC4K	Cloning vector, Km ^R	Pharmacia Biotech
pKNG101	<i>SacB</i> Sm ^R	Kaniga <i>et al.</i> , 1991
pKNG101-Δ <i>cbpA</i>	pKNG101 with <i>cbpA</i> -9 to 674, 262::Km ^R	
pKNG101-Δ <i>clpB</i>	pKNG101 with <i>clpB</i> 497 to 1546, Δ756-915::Km ^R	
pKNG101-Δ <i>clpP</i>	pKNG101 with <i>clpP</i> 36 to 634, Δ225-453::Km ^R	
pKNG101-Δ <i>djlA</i>	pKNG101 with <i>djlA</i> 7 to 538, 202::Km ^R	
pKNG101-Δ <i>dnaJ</i>	pKNG101 with <i>dnaJ</i> 58 to 812, Δ572-609::Km ^R	
pKNG101-Δ <i>htpG</i>	pKNG101 with <i>htpG</i> 821 to 1497, 1170::Km ^R	
pKNG101-Δ <i>lon-1</i>	pKNG101 with <i>lon-1</i> 206 to 941, 739::Km ^R	
pKNG101-Δ <i>lon-2</i>	pKNG101 with <i>lon-2</i> -49 to 484, 109::Km ^R	

プライマー	配列 (5'→3')
<i>cbpA</i> F-19B	TCACATTGGGGATCCATAAATGGA
<i>cbpA</i> R+686B	ACAGTGAGGATCCGGTCATGACCT
<i>cbpA</i> F-217	TTGGAGGTGCCAAAGTCGAT
<i>cbpA</i> R+773	TCAGGACGGATGGTCAGGTT
<i>clpB</i> F+489S	ATACACCGTCGACCTGACCAA
<i>clpB</i> R+1557S	GTGCTGGTCGACCATCTGCA
<i>clpB</i> F+299	AGAAGGGCGACCAGTTCATTT
<i>clpB</i> R+1655	AGCATCTTGGCCACAGGAAT
<i>clpP</i> F+26B	AGAGCTCTGGGATCCAGGCCGCA
<i>clpP</i> R+645B	GGTTCAGGATCCCAGTTGCCGCTT
<i>clpP</i> F-144	TCTCGTACGAAGAAGCCGTTA
<i>clpP</i> R+759	GTCAGTCATTCGATCGATCCAA
<i>djlA</i> F-5S	CTGACATGTGGTCGACAGGCACG
<i>djlA</i> R+551B	ACGCTTTCGGATCCCGTGGCCTT
<i>djlA</i> F-98	CAAGGTATCTGGCGAACACT

djlA R+631	GATACGCCTGCTTGACCTTA
dnaJ F+47B	CCACTGAAGCGGATCCCAAGAAG
dnaJ R+824B	GTGTAGCGGATCCGCACTTCACA
dnaJ F-117	TGGCGTATCTGGAATTCGAGA
dnaJ R+1019	TGACGGCGACTGAGATTGA
htpG F+811S	CACAACAAGGTGACGGCAAGCTC
htpG R+1510B	CTTCTTCCGGATCCAGCTTGCCCA
htpG F+682	GAAGAGTGGGAAACCGTCAA
htpG R+1767	GTGATCCAGCTTCTCGATCA
lon-1 F+198S	CGAAACGGTCGACCTGGTAGCCA
lon-1 R+955B	CGGTTTCCAGGATCCCCAGTTTGC
lon-1 F+110	CGGACAAGGTCTACGTCATC
lon-1 R+1048	GCTTGAGGTGCGAGCTTGTCT
lon-2 F-61B	ATTAGGTCCAAGGATCCTTTCCA
lon-2 R+533	TCCTGCTTCTGCTCGATCTT
lon-2 F-149	GGTTCTCGGTTGCAAGCAA
lon-2 R+608	AGGAGGTGCGATTTTCGGCAT

R, resistance; Rif, rifampicin; Km, kanamycin; Ap, ampicillin; Sm, streptomycin.
 太字は、遺伝子破壊株の作製に用いたプライマーを示す。

2) 培地

培地は以下の組成となるように調製した。必要な試薬を溶解後、オートクレーブ滅菌 (121°C、20 分間) したものをを用いた。平板培地には、Agar を 1.5% (w/v) となるように加えた。

- ① LB 培地 : Tryptone (Bacto) 10g, Yeast extract (Bacto) 5g, NaCl 5g/1L
- ② LB Top-agar : Tryptone 10g, Yeast extract 5g, NaCl 5g, agar 6g/1L
- ③ 5%スクロース+LB 培地 : Tryptone 10g, Yeast extract 5g, NaCl 5g, sucrose 50g/1L

抗生物質は、培地中の最終濃度が、ampicillin は 100µg/ml、rifampicin は 100µg/ml、kanamycin (Km) は 50µg/ml、streptomycin (Sm) は 100µg/ml (*E. coli*)、あるいは 250µg/ml (*P. putida*) になるように加えた。

3) 培養条件

培養は、特記がないかぎり 30°Cで行った。平板培地上のコロニーから菌体を少量、楊枝などで採取し、2ml の液体培地に接種し、16φの試験管で 160 往復/分で一晩 (O/N) 培養し、前培養液を得た。前培養液 100μl を、200ml のバッフル付き三角フラスコ中の LB 液体培地 50ml に添加し、200 r.p.m.で好氣的に培養を行った。対数増殖期は、600nm の濁度が 1.0 になったときとした。

各温度における倍加時間の測定は、以下のように行った。200ml のバッフル付き三角フラスコに、50ml の LB 液体培地を加え、試験温度に設定した湯浴でフラスコを 30 分間放置した。LB 培地で 30°C、O/N 前培養して得た試験菌株の前培養液 100μl を、各温度の LB 培地に植菌し、その後、各温度で培養して適当な時間経過後に培養液を採取し、濁度を測定することで倍加時間を求めた。

4) 遺伝子破壊プラスミドの構築

DNA の取り扱い操作は、基本的に Ausubel ら (1992) のプロトコールに従って行った。遺伝子破壊プラスミドの作製は、自殺ベクター pKNG101 (Kaniga *et al.*, 1991) を用いて行った。破壊を試みた遺伝子の DNA 配列の一部を、表 1-1 に記載された太字のプライマーを用いて PCR により増幅し、SmaI で処理した pNEB193 を用いてクローニングした。このプラスミドを調製後、クローニングした DNA 配列の内部のみで切断できる制限酵素を用いて処理し、それにより生じた末端部分に、pUC4K から調製した Km 耐性 (Km^R) 遺伝子を組み込み、*E.coli* DH5α に導入した。その際、平滑末端でない場合は、T4DNA ポリメラーゼにより DNA の末端を平滑化してから Km 遺伝子を組み込んだ。これにより構築したプラスミドを BamHI や SalI、もしくはその両方の制限酵素で処理して生じた DNA 配列を、同様の制限酵素で処理した pKNG101 ベクターにサブクローニングして遺伝子破壊用のプラスミドを得た。

5) 遺伝子欠損株の作製

遺伝子欠損株は、以下に記載した手順で作製した。構築した遺伝子破壊用プ

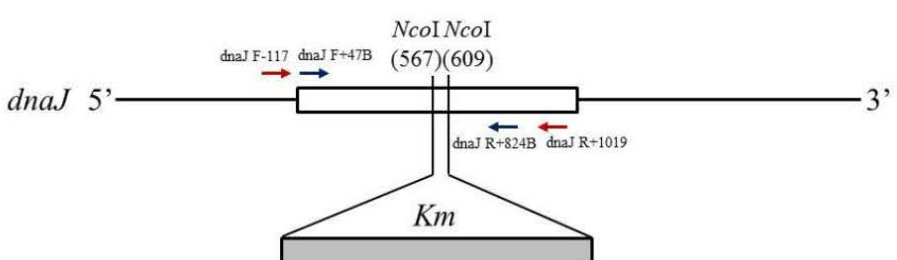
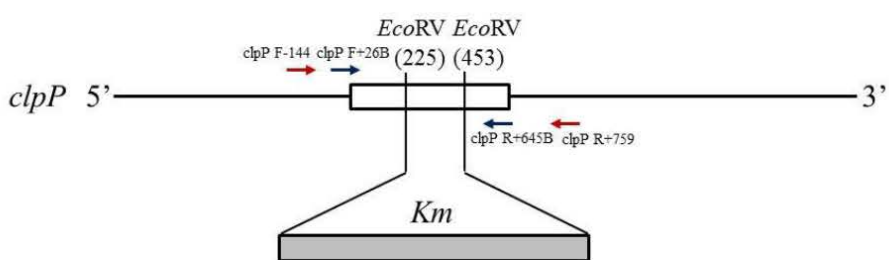
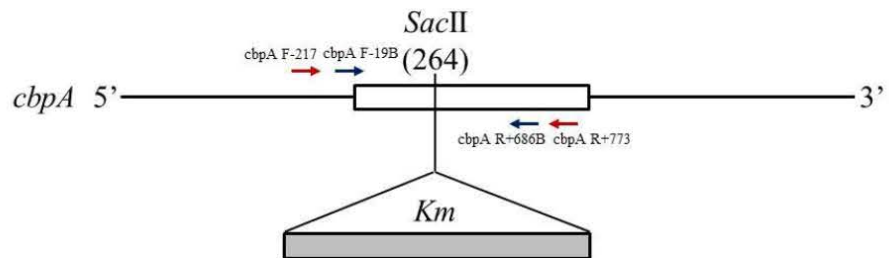
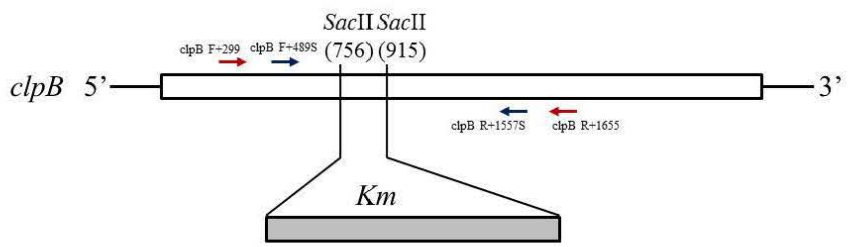
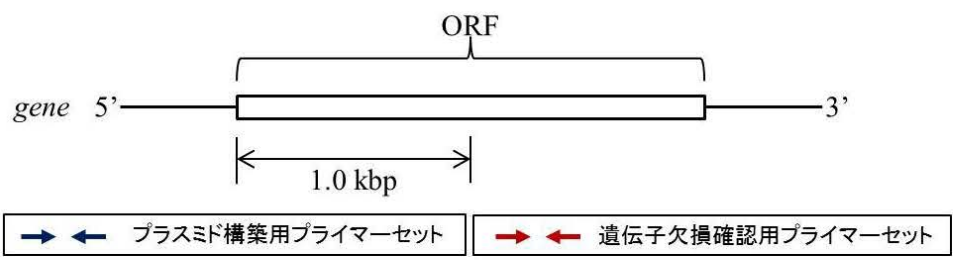
ラスミドを、遺伝子の欠損を導入する株にエレクトロポレーション法により導入し、 Km^R および Sm^R の菌株を、それぞれの抗生物質を含む平板培地により選抜した。各遺伝子のコピー数を確認後、 Km (50 μ g/ml) を含む 5%のスクロース +LB 液体培地もしくは同組成の平板培地で培養し、 Km^R 、 Sm 感受性の株を選抜した。遺伝子の欠損の確認は、PCR による方法とサザンブロット法により行った。

KT Δ *cbpA* 株および R2 Δ *cbpA* 株の遺伝子破壊株の作製は、pKNG101 由来の遺伝子破壊用プラスミド (pKNG101- Δ *cbpA*) を KT 株もしくは R2 株に導入して行った。同様に、KT Δ *clpB* 株および R2 Δ *clpB* 株、KT Δ *clpP* 株および R2 Δ *clpP* 株、KT Δ *djlA* 株および R2 Δ *djlA* 株、KT Δ *dnaJ* 株および R2 Δ *dnaJ* 株、KT Δ *htpG* 株および R2 Δ *htpG* 株、KT Δ *lon-1* 株および R2 Δ *lon-1* 株、KT Δ *lon-2* 株は、KT 株もしくは R2 株に、それぞれ pKNG101- Δ *clpB*、pKNG101- Δ *clpP*、pKNG101- Δ *djlA*、pKNG101- Δ *dnaJ*、pKNG101- Δ *htpG*、pKNG101- Δ *lon-1*、pKNG101- Δ *lon-2* を導入することにより作製した。

第2節 実験結果および考察

1) 分子シャペロンおよび ATP 依存性プロテアーゼ遺伝子欠損株の作製

分子シャペロンおよび ATP 依存性プロテアーゼ遺伝子の機能について解析するために、KT 株と R2 株からこれら遺伝子の欠損株の作製を試みた。KT 株では、遺伝子破壊を試みた分子シャペロン遺伝子の *clpB*、*dnaJ*、*cbpA*、*djlA*、*htpG*、およびプロテアーゼ遺伝子の *clpP*、*lon-1*、*lon-2* のすべての遺伝子欠損株の作製に成功した。また、R2 株においては、*clpB*、*dnaJ*、*cbpA*、*djlA*、*htpG*、*clpP*、*lon-1* の遺伝子欠損株の作製には成功したが、*lon-2* 欠損株は作製できなかった。各遺伝子における Km 遺伝子の挿入位置と、変異株の作製にあたり使用したプライマー、および挿入位置を確認するために使用したプライマーの配置を図 1-1 に示した。



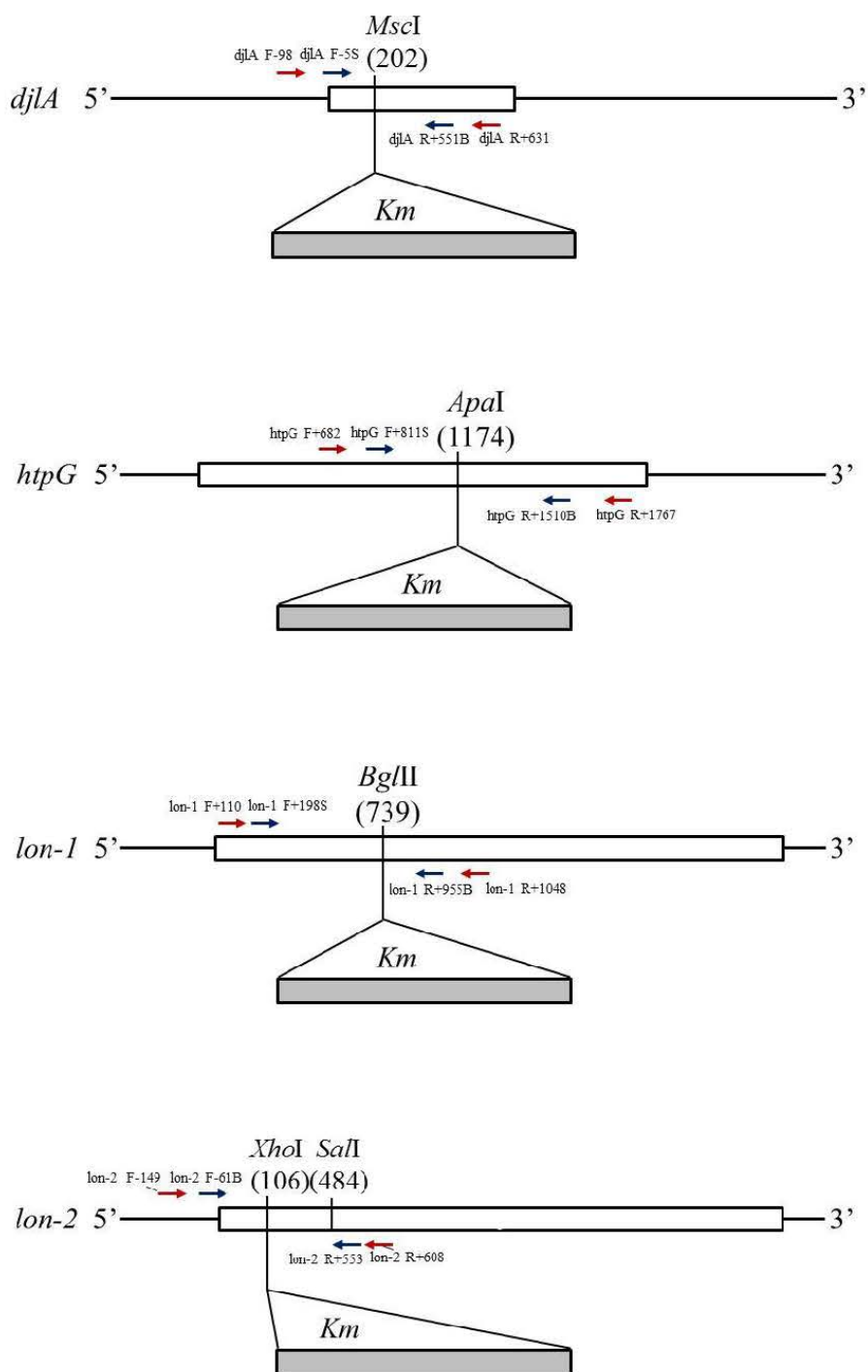


図 1-1. 各変異株の遺伝子内のカナマイシン耐性遺伝子の挿入部位と使用したプライマーの結合位置
 ORF; オープンリーディングフレーム、*Km*; *Km* 耐性遺伝子、() の数字は各遺伝子の ORF の開始コドン (ATG) の A を 1 として計算した場所を示した。

2) 分子シャペロンおよび ATP 依存性プロテアーゼ遺伝子欠損株の生育可能温度

得られた変異株の生育温度域を、LB 平板培地上におけるコロニー形成により検討したところ、35°Cでは、KT株の *dnaJ* 欠損株 (KTΔ*dnaJ* 株) においてコロニー形成能の著しい低下が見られ、37°Cではさらに形成能が低下したことから、同株は、*dnaK* 遺伝子に変異をもつ R2 株 (35°Cでコロニーを形成することができない) ほどではないが、温度感受性株であることが明らかとなった (図 1-2)。KTΔ*dnaJ* 株が、R2 株のように温度感受性を示したことから、DnaK/DnaJ シャペロンシステムは生育温度域の決定に深く関係していることが示唆された。DnaK システムは、繰り返し配列の複製に際して生じる DNA 複製フォークの誤った構造の修復に関与することが示されており (Goldfless *et al.*, 2006)、DnaK や DnaJ の機能不全は、より高い温度における生育において障害となるものと考えられる。これにより、DnaJ のアナログであり、J-ドメイン領域をもつ Hsp40 ファミリーに属する CbpA、あるいは Dj1A は、*dnaJ* の欠失を補うことができないことが明らかとなった。これらの J-ドメインタンパク質遺伝子の欠損株 (KTΔ*cbpA* 株、KTΔ*dj1A* 株) では、生育温度に変化はなかったことから、通常よりも高い温度での平板培地上での生育においては、DnaJ は固有の機能をもつものと考えられる。凝集タンパク質の再生に関与する ClpB の遺伝子 (*clpB*) や、プロテアーゼ遺伝子である *clpP*、*lon-1*、*lon-2* の欠損株については、生育範囲に変化はなかった。また、Hsp90 ファミリーに属する HtpG の遺伝子 (*htpG*) 欠損株 (KTΔ*htpG* 株) については、37°Cでは増殖は遅延するが、コロニー形成温度範囲に違いは見られなかった。R2 株から作出された各変異株の生育温度範囲についても、同様に検討を行った。図 1-3 に示したように、J-ドメインタンパク質遺伝子破壊株の R2Δ*cbpA* 株と R2Δ*dj1A* 株は、R2 株と同様に 33°Cまで生育し、R2 株と比較してコロニー形成速度に大きな違いは無かった。R2Δ*dnaJ* 株は、著しく増殖速度が低下してはいたが、33°Cまで生育することが示された。*dnaK* 変異と *dnaJ* 欠損の二重変異株である R2Δ*dnaJ* 株においては、生育温度範囲が R2 株に比べてさらに低下しなかったことから、DnaK システムが生育温度範囲に影響を与えるが、

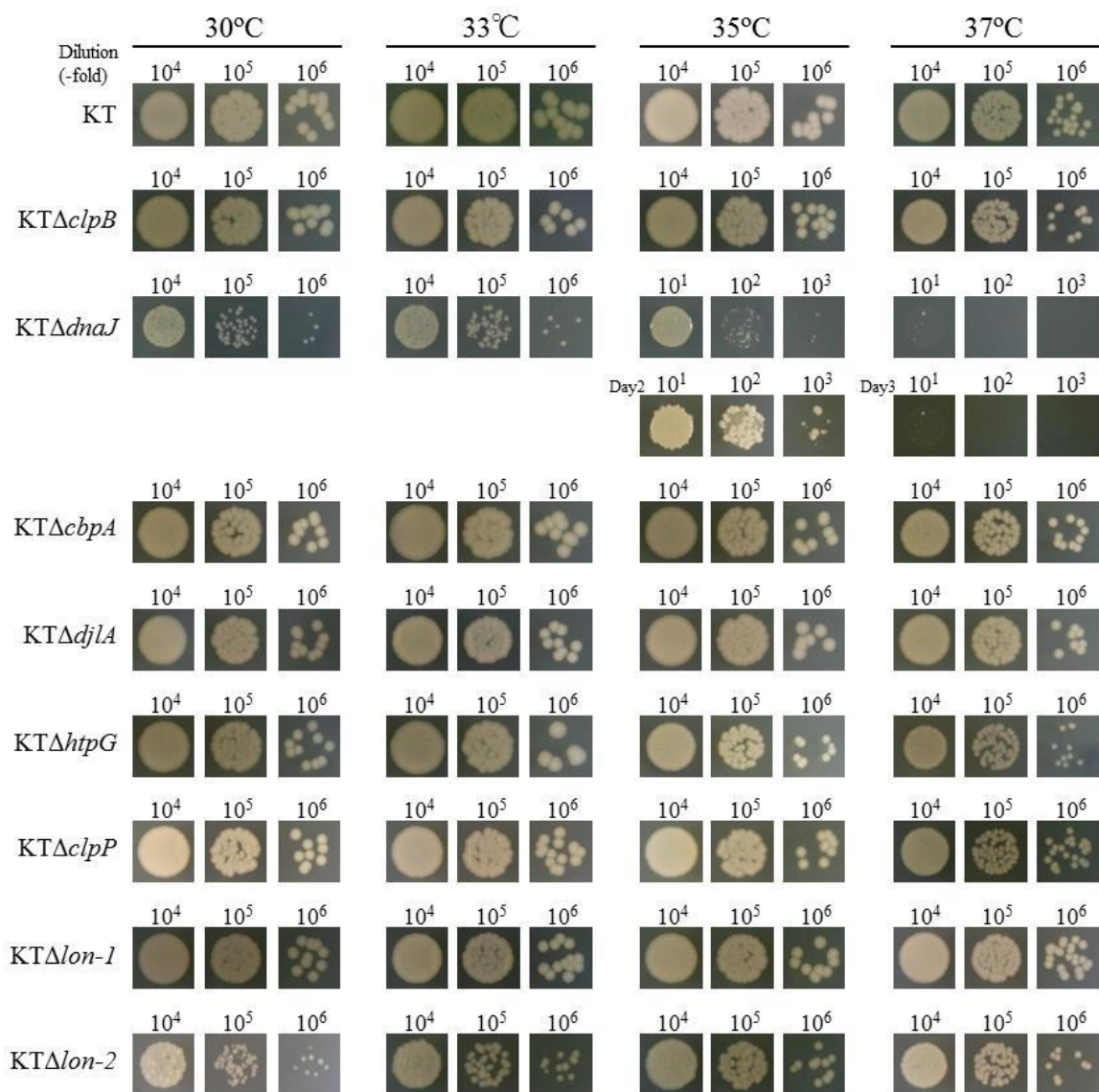


図 1-2. *Pseudomonas putida* KT2442 株とその変異株の生育温度範囲

培養 1 日目（ラベルなし）、培養 2 日目（Day2）、培養 3 日目（Day3）のコロニーの写真を示した。

その中で特に *dnaK* が大きく影響を与えているものと考えられる。一方、*R2ΔhtpG* 株は、33°C では増殖速度が顕著に遅くなり、コロニー形成能も低下していた。また、プロテアーゼ遺伝子の欠損株では、*R2ΔclpP* 株は *R2* 株と生育温度範囲に差異は見られなかったが、*R2Δlon-1* 株は、*R2ΔhtpG* 株と同様に 33°C ではコロニー形成能が顕著に低下していた（図 1-3）。

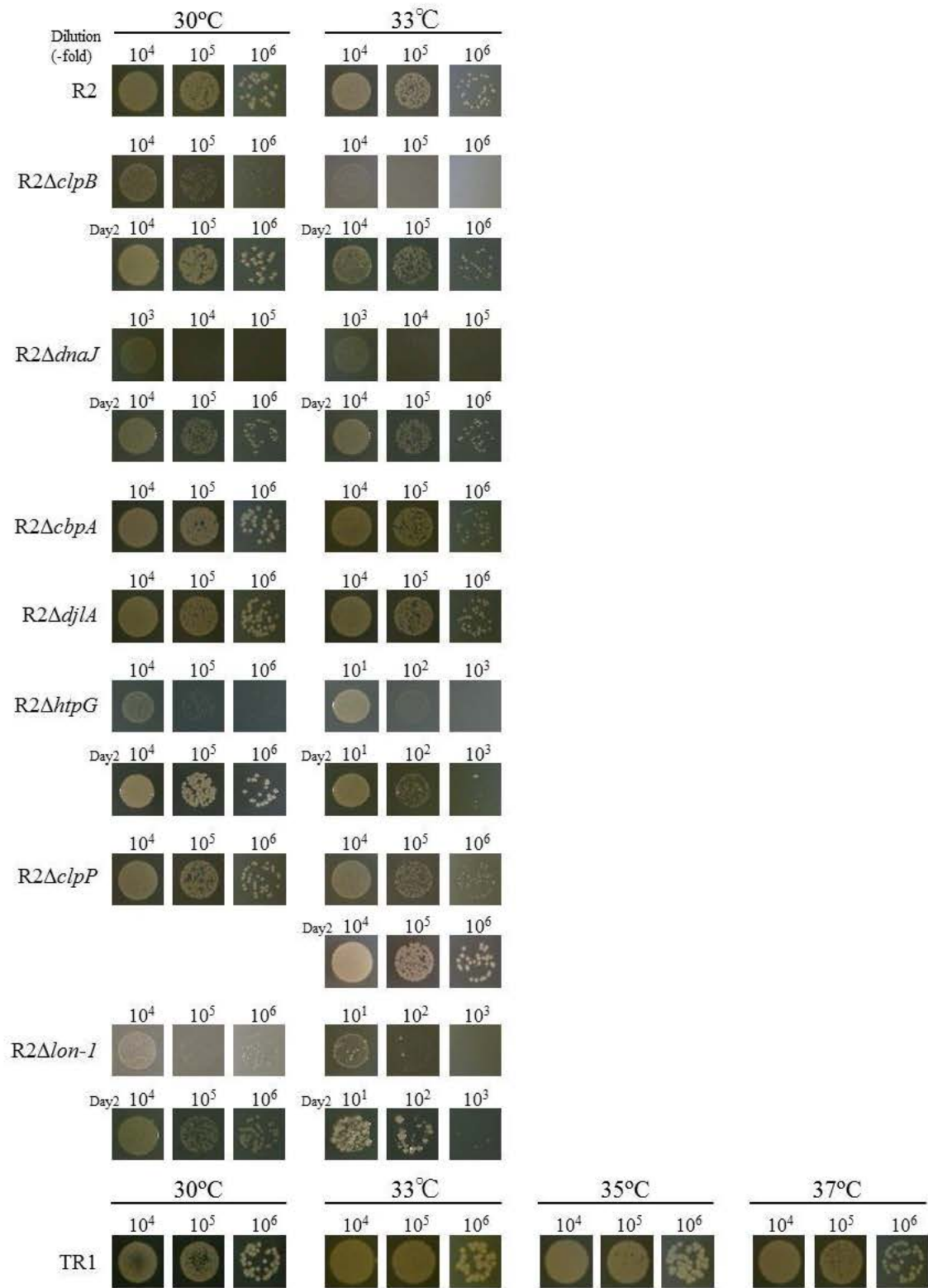


図 1-3. *Pseudomonas putida* KT2442-R2 株とその変異株の生育温度範囲

TR1; R2 株から得られた *dnaK* 機能復帰、温度感受性復帰変異株
 培養 1 日目 (ラベルなし)、培養 2 日目 (Day2) のコロニーの写真を示した。

3) 分子シャペロンおよび ATP 依存性プロテアーゼ遺伝子欠損株の倍加時間

LB 培地における各変異株の倍加時間を、対数増殖期における濁度の増加に基づいて測定した。表 1-2 に示したように、特に KT 株および R2 株の *dnaJ* 欠損株で、試験した各温度で生育の遅延が見られた。KT 株の *dnaJ* 欠損株 (KT Δ *dnaJ* 株) は、30°C における倍加時間が元の株と比較して約 1.6 倍、25°C では 2 倍以上に増加し、著しい増殖の遅延が起こることが分かった。DnaJ は、DnaK と GrpE とともに、細胞の増加や成長に必要な新生ポリペプチドの折りたたみを介助することから、正しい立体構造 (機能) をもつタンパク質が効率的に生成されず、DnaJ の欠損が生育速度に大きく影響していると思われる。

表 1-2. 各遺伝子欠損株の温度別倍加時間

菌株	倍加時間 (分)				
	25°C	30°C	33°C	35°C	37°C
<i>Pseudomonas putida</i>					
KT2442 (KT)	46±2 ¹⁾	36±1	33±1	31±1	35±1
KT Δ <i>cbpA</i>	45±1	37±1	32±1	ND ²⁾	36±1
KT Δ <i>clpB</i>	44±2	36±1	33±0	32±1	38±2
KT Δ <i>clpP</i>	ND	42±1	ND	ND	ND
KT Δ <i>djlA</i>	46±2	36±1	32±1	ND	35±1
KT Δ <i>dnaJ</i>	102±2	59±2	51±1	51±1	NL ³⁾
KT Δ <i>htpG</i>	46±1	38±0	37±1	ND	44±2
KT Δ <i>lon-1</i>	ND	37±1	ND	ND	ND
KT Δ <i>lon-2</i>	ND	48±1	ND	ND	ND
KT2442-R2 (R2)	53±2	45±1	58±2	NL	—
R2 Δ <i>cbpA</i>	54±1	45±2	59±3	NL	—
R2 Δ <i>clpB</i>	53±1	47±2	83±3	NL	—
R2 Δ <i>djlA</i>	54±1	43±1	58±3	NL	—
R2 Δ <i>dnaJ</i>	100±5	77±2	100±2	NL	—
R2 Δ <i>htpG</i>	60±3	61±1	NL	—	—
R2 Δ <i>lon-1</i>	ND	45±1	ND	—	—

¹⁾平均±SD (n=3)、²⁾Not determined、³⁾Not logarithmically grown

R2 株では、*dnaK* の変異により、25°Cでも生育が KT 株に比べて遅いが、KT 株における *dnaJ* の欠損は遥かに増殖の遅延を引き起こすことから、生育において、他の J-ドメインタンパク質では補うことのできない DnaJ の特別な役割の存在が強く示唆された。また、KT 株では *clpP* および *lon-2* 欠損株も、KT 株と比べて倍加時間にそれぞれ約 1.2 倍および 1.3 倍の増加が起きていた。*lon-1* 欠損株では、倍加時間の顕著な増加は起きなかったことから、対数増殖時には Lon-1 の機能は増殖に大きくは関与しないものと推測される。*E. coli* において Lon プロテアーゼは 1 種類のみ確認されているが、*P. putida* においては 2 種類 (Lon-1 および Lon-2) が確認されている (Nelson *et al.*, 2002)。*P. putida* の Lon-1 は、*E. coli* の Lon と 70%近い相同性であるが、Lon-2 との相同性は 40%であることから、特有の機能を持つ可能性があり、*P. putida* の Lon-2 の機能は、生育に深く関わるものと考えられる。一方、*htpG* 欠損株は、高い温度で培養するほど、増殖の遅延が起きた。KT 株の *htpG* 欠損株では 37°Cで 10 分ほど遅くなり、R2 株の *htpG* 欠損株では、最高生育温度である 33°Cで培養すると、より顕著に増殖の遅延が起こることが明らかとなった。*E. coli* において、*htpG* 欠損株は、高い温度での増殖が遅くなることが報告されている (Bardwell and Craig, 1988; Thomas and Baneyx, 1998)。また、*E. coli* の HtpG は、特定のタンパク質と相互作用することも報告されている (Motojima-Miyazaki *et al.*, 2010)。*P. putida* においても同様に、HtpG は高い温度で働く特定のタンパク質の成熟や折りたたみに関与していると思われる。また、KT Δ *clpB* 株については、各温度 (25-37°C) で KT 株と同様な倍加時間を示した。しかし、R2 Δ *clpB* 株の倍加時間は、25°Cと 30°Cでは変化が、ほぼ見られなかったのに対して、33°Cでかなり増殖の遅延が見られたことから、ClpB はより高い温度において機能することが示唆された。

1 - 2 *Pseudomonas putida* の分子シャペロンおよび ATP 依存性プロテアーゼ
遺伝子欠損株の性状の解析

第 1 節 実験方法

1) 使用菌株および培地

第 1 章、1 - 1 の第 1 節に記載したものを使用した。

2) プラスミドおよびプライマー

使用したプラスミドとプライマーを表 1-3 に示した。

表 1-3. 使用したプラスミドおよびプライマー

プラスミド	特徴	文献あるいは供給元
pZErO-2	Cloning vector, Km ^R	Invitrogen
pKT231	Shuttle vector, Sm ^R	Bagdasarian <i>et al.</i> , 1981
pKT231-clpB	pKT231 with <i>clpB</i> - 190 to 2743	
pKT231-dnaJ	pKT231 with <i>dnaJ</i> - 150 to 1331	
pKT231-cbpA	pKT231 with <i>cbpA</i> - 150 to 1146	
pKT231-djlA	pKT231 with <i>cbpA</i> - 150 to -7, and <i>djlA</i> - 6 to 884	

プライマー	配列 (5'→3')
clpB F-199Xho	CGTTGAAACTCGAGGTGTACCTGTG
clpB R+2757Xho	TGCTGGTGTCTCGAGTAGTGCCT
dnaJ F-157Xho	TTTGCCCTCGAGCTGGTAGGATGT
dnaJ R+1347H	AACTCGTCGGCAAGCTTGGCCA
cbpA F-160Xho	AATGGGCTTCTCGAGGCAAAACG
cbpA R+1160Xho	CAGTTCAGCTCGAGGTGCAGCTT
cbpA R-7	ATCACCAATGTGAATGTGCATGT
djlA F-6	CCATAAATGTGGTGGCCAGGCACGGTG
djlA R+898H	CCAGTACCGAAGCTTGTCATTGATTGC

R, resistance; Km, kanamycin; Sm, streptomycin.

3) 相補試験用プラスミドの構築

① *dnaJ*

dnaJ 相補用プラスミドの構築のために、表 1-3 に記載した *dnaJ* F-157Xho と *dnaJ* R+1347H プライマーを用いて PCR を行い、*P. putida* KT2442 株 (KT 株) のゲノム DNA から *dnaJ* 遺伝子全域を含む DNA 断片を増幅した。得られた断片を、pZErO-2 ベクターを用いてクローニングし、調製した目的の DNA 配列を含むプラスミドを *Xho*I と *Hind*III で処理し、pKT231 へサブクローニングし pKT231-*dnaJ* を得た。

② *cbpA*

cbpA 相補用プラスミドの構築のために、表 1-3 に記載した *cbpA* F-160Xho プライマーおよび *cbpA* R+1160Xho プライマーを使用して PCR を行い、KT 株のゲノム DNA から *cbpA* 遺伝子全域を含む DNA 断片を増幅した。目的の長さに増幅された DNA 断片を *Xho*I で処理し、*Xho*I で処理した pKT231 プラスミドと連結し、pKT231-*cbpA* を調製した。

③ *djlA*

djlA 相補用のプラスミドの構築のために、*cbpA* のプロモーター領域を表 1-3 に記載した *cbpA* F-160Xho と *cbpA* R-7 のプライマーを用いて、KT 株のゲノム DNA から PCR により増幅した。この PCR 産物を *Eco*RV で処理した pZErO-2 ベクターと連結し、*E. coli* DH5 α に導入し、挿入された配列が目的の向きに挿入されているプラスミドを選択した。また、*djlA* F-6 と *djlA* R+898H のプライマーにより *djlA* を増幅後、この PCR 産物を *Hind*III で処理した。この *Hind*III で処理した PCR 産物と、前述の *cbpA* のプロモーター領域をクローン化したプラスミドを *Eco*RV と *Hind*III で消化したものと連結し、*cbpA* のプロモーターの下流に *djlA* が組み込まれたプラスミドを構築した。これを *Xho*I と *Hind*III で処理し、生じた約 1.0 kbp の DNA 配列を同じ制限酵素で処理した pKT231 ベクターと連結し、得られたプラスミドを pKT231-*djlA* とした。

④ *clpB*

clpB 相補用プラスミドの構築のために、表 1-3 に記載した *clpB* F-199Xho およ

び *clpB* R+2757Xho プライマーを用いて PCR を行い、KT 株のゲノム DNA から *clpB* 遺伝子全域を含む DNA 断片を増幅し、pZErO-2 ベクターを用いてクローニングした。*clpB* 領域を含む調製したプラスミドを *XhoI* で処理し、pKT231 にサブクローニングして pKT231-*clpB* を得た。

4) 相補菌株の生育温度試験

試験菌株を、Sm を加えた LB 液体培地 2ml で O/N 培養後、培養液を LB 液体培地で $10\sim 10^6$ 倍に段階希釈を行い、あらかじめ各温度で温めておいた Sm を含む LB 平板培地に $5\mu\text{l}$ ずつ塗抹した。その後、各温度で培養し、形成したコロニーを経時的に確認し、生存率を算出した。

5) 高温耐性試験

試験菌株を、LB 液体培地もしくは適切な抗生物質を含む LB 液体培地 2ml で前培養を行い、前培養液の 0.6OD 分の菌液を LB 培地と混合し、全量を 2ml にした。この溶液を 30°C 、160 往復/分、各株の倍加時間の 5 倍の時間だけ振とう培養し、定常期の細胞を含む培養液を得た。培養液を LB 液体培地で $10\sim 10^6$ 倍に段階希釈を行い、LB 平板培地に段階希釈した培養液を $5\mu\text{l}$ ずつスポットした。

同時に、サイズが $15\text{mm}\times 100\text{mm}$ の試験管 (Dispo Tube / DP-15M) に培養液を $500\mu\text{l}$ 採取し、 50°C で 5 分間処理した。処理後、同様に段階希釈し、LB 平板培地に $5\mu\text{l}$ ずつスポットして 30°C で培養し、形成したコロニー数から生存率を算出した。生存率は、(熱処理後、LB 平板培地上で生育したコロニー形成数 CFU/ml) \div (熱処理前に LB 平板培地上で生育したコロニー形成数 CFU/ml) で求めた。

6) 過酸化物耐性試験

試験菌株を LB 液体培地 2ml で前培養を行い、前培養液の 0.6OD 分の菌液を溶解させた LB Top-agar 4ml と混合し、LB 平板培地に重層した。重層した培地 が固まった後、ペーパーディスク 抗生物質検定用 厚手 8mm (ADVANTEC) を培地 1 枚につき 3 個置き、そのペーパーディスクに過酸化水素 (30%) $10\mu\text{l}$ 、もし

くはジメチルスルホキシドで希釈して調製した *tert*-Butyl hydroperoxide (3%) 10 μ l を浸み込ませた。その後、平板培地を 30°C、O/N 培養し、生じた増殖阻止円の直径 (mm) を測定した。

第 2 節 実験結果および考察

1) *dnaJ* 欠損株の J-ドメインタンパク質遺伝子による相補試験

DnaJ のアナログである CbpA と DjlA は、*E. coli* において細胞の成長をサポートし (Ueguchi *et al.*, 1995; Genevaux *et al.*, 2001)、凝集タンパク質の再生を補助することが知られている (Gur *et al.*, 2004)。前述のように、*P. putida* の *dnaJ* 欠損株は温度感受性を示すことが、本研究により明らかとなっている。このことが、*dnaJ* の欠損により引き起こされたか否かを確認するために、プラスミド上の *dnaJ* により相補されるか、また、*P. putida* の CbpA および DjlA が、35°C あるいは 37°C での *dnaJ* 欠損株の生育に、DnaJ と同じように機能するかを検討するために、*dnaJ*、*cbpA*、*djlA* 相補プラスミドを KT 株の *dnaJ* 欠損株に導入し、各温度でのコロニー形成率を調べた。

図 1-4 に示したように、KT Δ *dnaJ* 株は、*dnaJ* を導入することにより 37°C まで生育し、また生育速度も野生株 (KT 株) と同程度に回復した。このことから、*P. putida* においては、37°C での生育には *dnaJ* が重要な役割を果たしていることが確認された。*cbpA* を導入した株では、35°C では生育がほぼ完全に回復した。しかしながら、37°C ではある程度のコロニー形成率の上昇がみられたが、完全には回復しなかった。また、*djlA* を導入した場合には、コロニー形成率はいずれの温度でも回復しなかった。

コロニーの形成については、プラスミド由来の *dnaJ* を導入することにより回復したが、液体培地による培養では、増殖速度の明らかな回復は認められなかった (表 1-4)。30°C では、*dnaJ*、*cbpA*、*djlA* のいずれで相補しても、倍加時間

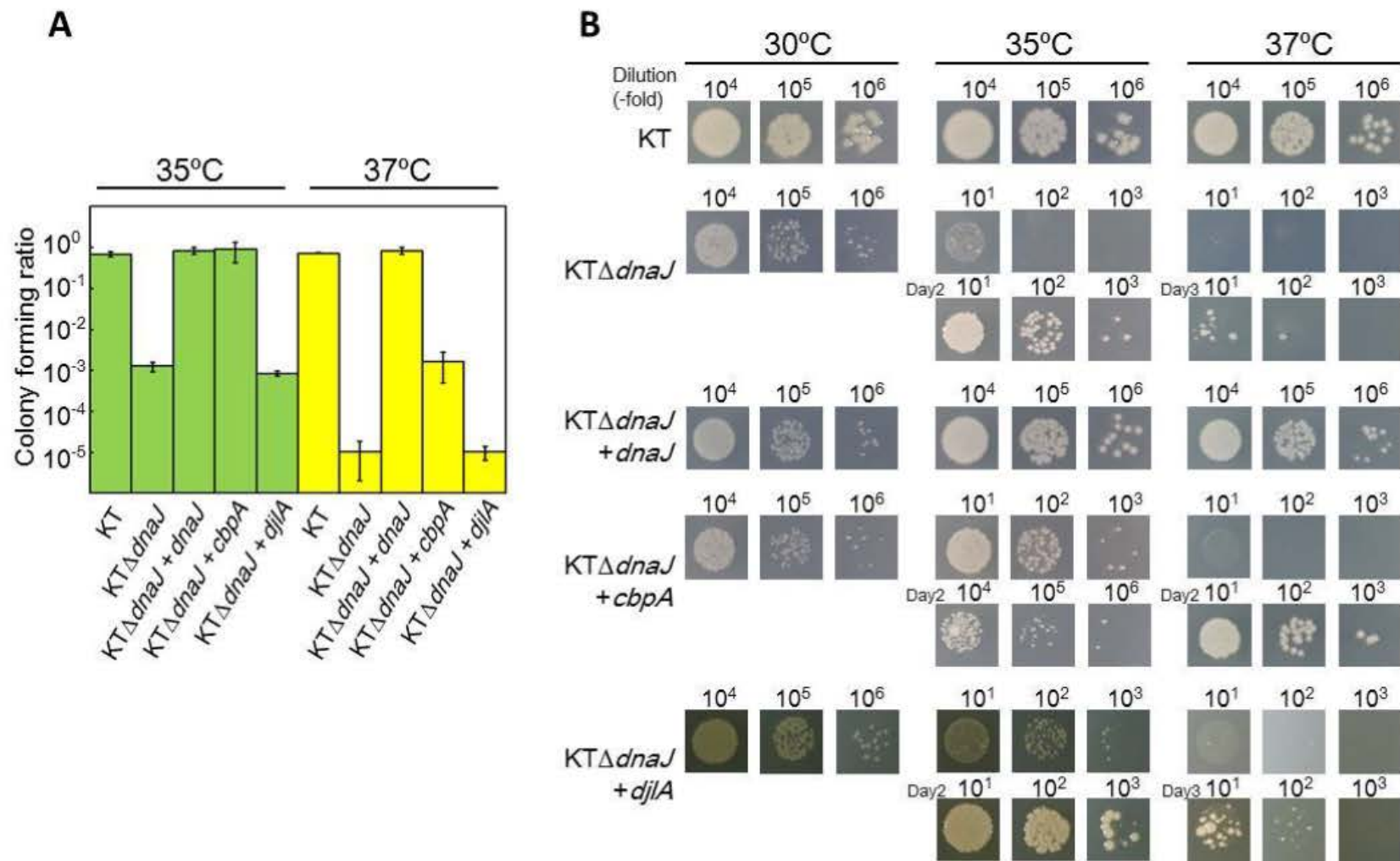


図 1-4. *Pseudomonas putida dnaJ* 欠損株と J-ドメインタンパク質遺伝子相補株の各温度における生育

A, 35°Cと 37°Cにおける平板培地上でのコロニー形成率

30°Cで形成したコロニー数を 1 とした相対値で示した。KT 株と *KTΔdnaJ* 株はプラスミド pKT231 を導入したものをを用いた。*KTΔdnaJ* 株には、*dnaJ*、*cbpA*、*djlA* をいずれかを含む pKT231 プラスミドが導入したものの結果を併せて示した。値は別々に 3 回行った操作によって計算された平均値を表し、エラーバーは SD を示す。段階希釈液は平板培地に 5μl ずつ塗抹した。

B, 各温度での生育

培養 1 日目 (ラベルなし)、培養 2 日目 (Day2)、培養 3 日目 (Day3) のコロニーの写真を示した。

の上昇は見られず、*dnaJ* 欠損の影響を回復することはできなかった。このことは、図 1-4 に示した平板培地においても観察された。本研究で導入したプラスミドにおいて、*dnaJ* は *dnaJ* 自身の、*cbpA* と *djlA* は *cbpA* の熱誘導性プロモーターによりその遺伝子発現が制御されている。後述するように、*dnaJ* および *cbpA* のプロモーターは熱誘導性であるため、30°Cでは遺伝子の発現が充分でないと推察される。35°Cと 37°Cでは、*dnaJ* を相補した菌株で最も倍加時間が短くなったが、野生株に比べるとより長く、増殖速度の低下は完全には回復しなかった。この理由は明らかでないが、シス的な影響があることが考えられる。一方、*cbpA* や *djlA* を相補した場合には、35°Cにおいてベクターを導入した株よりも生育がやや早くなり、何らかの相補的な効果をもつことが示唆された。

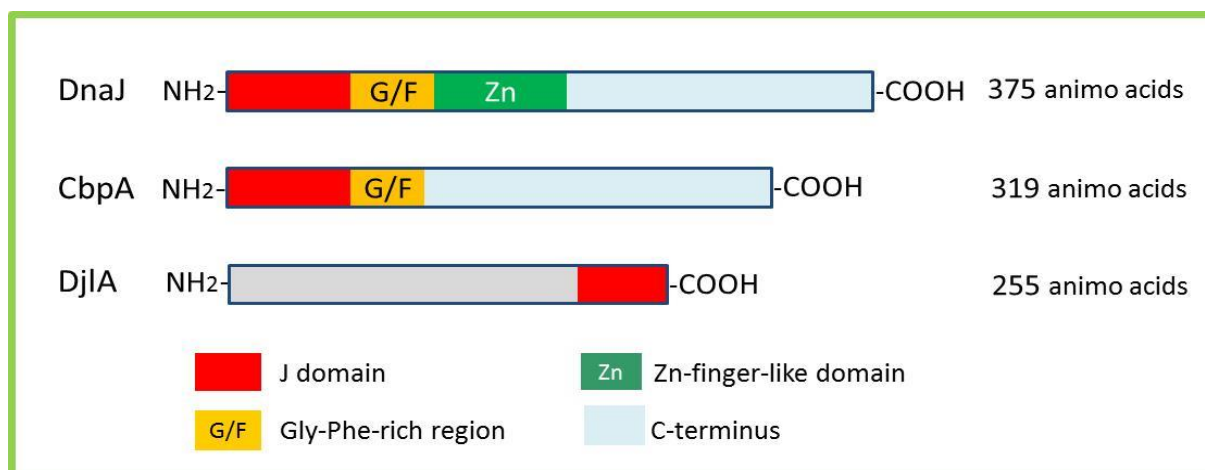
表 1-4. *KTΔdnaJ* 株の遺伝子相補による温度別の倍加時間

菌株	倍加時間 (分)		
	30°C	35°C	37°C
<i>Pseudomonas putida</i>			
KT (pKT231)	37±1 ¹⁾	32±1	35±1
<i>KTΔdnaJ</i> (pKT231)	55±0	51±1	NL ²⁾
<i>KTΔdnaJ</i> (pKT231- <i>dnaJ</i>)	55±2	42±1	41±1
<i>KTΔdnaJ</i> (pKT231- <i>cbpA</i>)	55±2	45±0	88±7
<i>KTΔdnaJ</i> (pKT231- <i>djlA</i>)	55±0	47±1	NL

¹⁾平均±SD (n=3), ²⁾Not logarithmically grown

P. putida の 3 種の J-ドメインタンパク質 (DnaJ、CbpA、Dj1A) の模式的な構造を、図 1-5 に示した。Hsp70 のコシャペロンとして機能する J-ドメインタンパク質は、高度に保存された His-Pro-Asp (HPD) トリペプチドを J-ドメイン領域に持っており、*P. putida* のいずれのタンパク質においてもこれが見出された。*P. putida* の DnaJ は、*E. coli* の DnaJ と 67% のアミノ酸の相同性を有しており、共通の機能をもつ可能性が高い。CbpA については、相同性はやや低く 54% であるが、*P. putida* の CbpA は *E. coli* の CbpA と異なり、DnaJ で確認できるような明らかな Gly/Phe-rich domain を持っている (図 1-5A)。一方、*P. putida* の Dj1A は *E. coli* のものとは相同性 (30%) はそれほど高くなく、J-ドメイン領域を持ってはいるが、DnaJ や CbpA の J-ドメイン領域のアミノ酸配列における相同性は極めて低い (図 1-5)。

A *Pseudomonas putida* の J-ドメインタンパク質



B *Pseudomonas putida* の J-ドメインタンパク質のアミノ酸配列

	Helix I	Helix II	Helix III	Helix IV	
DnaJ :	5	DYYEVLGVERGATEADLKKAYRRLAMKY	HPD	RNP-GDKESEDKFKEANEAYEVLSDASKRAAFD	QYG 70
CbpA :	5	DYYKILGVEPTADEKAIKAAYRKLARKY	HPD	VSKERDA--EEKFKEANEAYEVLGDAQKRAE	FDEIR 69
Dj1A :	190	AALRLAVDADTDTDKVKQAYRRLVSRH	HPD	KLAGTGA-SEAQVREATARTRELHQAYAMIRKRRGL	255

図 1-5. *Pseudomonas putida* の J-ドメインタンパク質の模式的構造と J-ドメイン領域のアミノ酸配列

J-ドメインタンパク質において保存されている配列を、□で示した。

相補実験により、*P. putida* の 3 種の J-ドメインタンパク質のうち、CbpA は DnaJ と機能的に重なる部分がある可能性が高いが、DjlA については細胞の生育という観点からは、DnaJ と機能的に異なることが強く示唆された。

2) 高温処理による生存率

次に、定常期における各株の高温処理時の生存率について検討を行った (図 1-6)。定常期の細胞を 50°C、5 分処理した場合、*dnaK* の変異株であり温度感受性を示す R2 株は、予想に反して野生株 (KT 株) と同程度の生存率を示した。R2 株は、定常期に種々の Hsp を高発現することから、これらの Hsp が高温に対する耐性を付与している可能性がある。これに対して、*clpB* 欠損株は KT 株、R2 株の両欠損株ともに、高温処理後の細胞の生存率が、大幅に低下することが明らかとなり、高い温度に曝された場合の ClpB の重要性が示された。一方、KT 株由来の他の変異株は、*clpB* 欠損株以外の株では高温処理時の生存率の変化はなく、各株は約 10% の生存率を示した。生育遅延が見られた KT 株の *dnaJ* 欠損株については、熱ショック後の生存率が野生株よりも高いことが示された。一方、R2 株由来の変異株では、*djlA* 欠損株と *htpG* 欠損株については R2 株と同程度の生存率を示したが、他の変異株は、明らかに熱処理後の生存率が低下し、R2Δ*cbpA* 株、R2Δ*dnaJ* 株および R2Δ*lon-1* 株の高温処理後の生存率は有意に低かった。温度感受性株である R2 株は、元々 *dnaK* 変異を持っており、その変異に加えて、さらなる変異が挿入されたことで、生存率に影響を与えたと考えられる。KT 株と R2 株は、互いに生存率が約 10% であったのに対して、R2Δ*clpB* 株の生存率は、KTΔ*clpB* 株よりもさらに減少した。このことは、DnaK と ClpB が協同的に働いていることを示唆するものと考えられる。*clpB* の欠損が高温処理時の生存率に影響を与えていることを証明するために、プラスミドを利用して *clpB* 欠損株に *clpB* を相補した。それらの株を用いて、高温処理時の生存率を確認したところ、KTΔ*clpB* 株、R2Δ*clpB* 株ともに、*clpB* の相補により生存率が顕著に上昇したが、R2Δ*clpB* については完全な回復は見られなかった (図 1-6)。KT 株の *clpB* と *dnaJ*、*cbpA*、*djlA* および *htpG* の変異株においては、対数増殖期

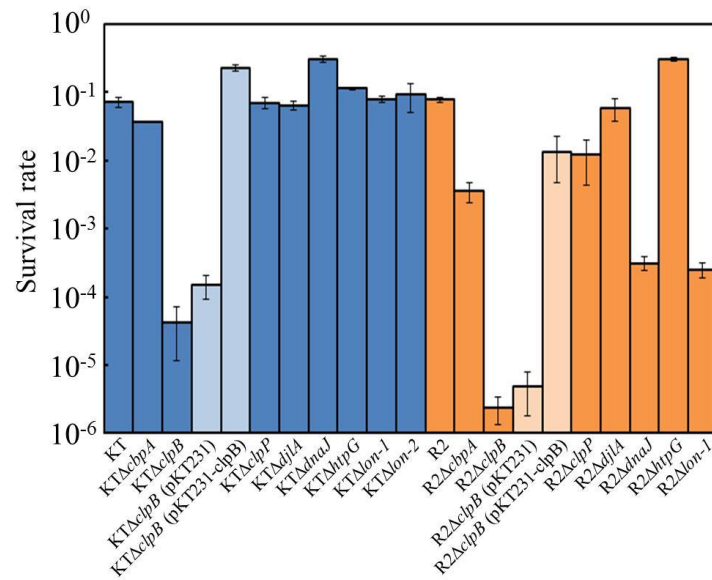


図 1-6. 定常期の *Pseudomonas putida* 各株の 50°C 処理後の生存率
 括弧内は導入したプラスミドを示す。値は 3 回の平均値を表し、エラーバーは SD を示した。

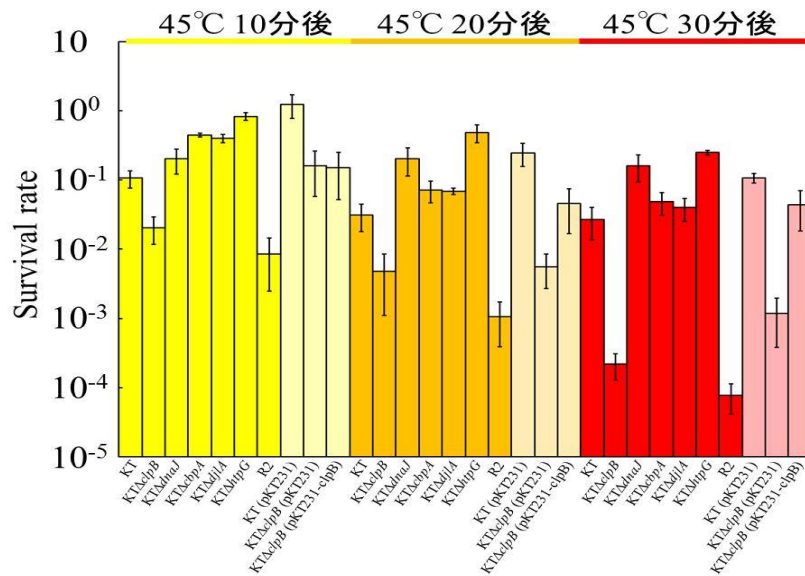


図 1-7. 対数増殖期の *Pseudomonas putida* 各株の 45°C 処理後の各株の生存率
 括弧内は導入したプラスミドを示す。値は 3 回の平均値を表し、エラーバーは SD を示した。

の細胞を用いて 45°C の処理を行い、生存率を測定した (図 1-7)。どの株も、対数増殖期の細胞は定常期と比べて熱処理に対してより感受性であった。このことは、*P. aeruginosa* でも同様な現象が確認されている (Jørgensen *et al.*, 1999)。45°C においても、*clpB* 欠損株は、他の株に比べて生存率が著しく低かった。

3) 過酸化物に対する感受性

各変異株の過酸化物に対する耐性度を検討した (表 1-5)。過酸化物としては、*tert*-Butyl hydroperoxide (BHP) および過酸化水素 (H_2O_2) の 2 種類を用いた。KT 株由来の変異株では、BHP に対する影響は大きく見られなかった。一方、 H_2O_2 に関しては、*clpP* 欠損株において H_2O_2 に対して、やや感受性となることが分かった。他のプロテアーゼ遺伝子欠損株 ($\Delta lon-1$ 株、 $\Delta lon-2$ 株) においては、 H_2O_2 に対する顕著な影響は見られなかった。また、R2 株由来の変異株においても、同様に過酸化物耐性試験を行ったが、R2 株と比べ、BHP や H_2O_2 のいずれかに対して感受性となった。興味深いことに、R2 株の *dnaJ* 欠損株においては、BHP に対しては、R2 株と比べ、やや耐性となったのに対し、 H_2O_2 に対しては大きく感受性となった。また、R2 株の *clpP* 欠損株については、KT 株の *clpP* 欠損株と同様に、 H_2O_2 に対しては感受性となった。KT 株の *lon-1* 欠損株は、 H_2O_2 に対する差は見られなかったが、R2 株の *lon-1* 欠損株では、増殖阻止円の差が見られた。R2 株は、ストレスに対する影響を、Hsp の高発現により補っているように考えられる。

表 1-5. *Pseudomonas putida* 各株の過酸化水素に対する感受性

菌株	増殖阻止円の直径 (mm)	
	BHP* (3%)	H ₂ O ₂ (30%)
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2442 (KT)	27±2 ¹⁾	20±1
KTΔ <i>cbpA</i>	29±1	21±0
KTΔ <i>clpB</i>	28±2	21±0
KTΔ <i>clpP</i>	27±1	23±0
KTΔ <i>djlA</i>	29±0	21±0
KTΔ <i>dnaJ</i>	27±2	21±1
KTΔ <i>htpG</i>	25±1	21±0
KTΔ <i>lon-1</i>	28±1	21±1
KTΔ <i>lon-2</i>	28±1	21±1
KT2442-R2 (R2)	24±1	23±0
R2Δ <i>cbpA</i>	26±0	24±1
R2Δ <i>clpB</i>	27±1	24±1
R2Δ <i>clpP</i>	24±2	26±0
R2Δ <i>djlA</i>	25±0	25±1
R2Δ <i>dnaJ</i>	23±0	28±1
R2Δ <i>htpG</i>	26±1	25±1
R2Δ <i>lon-1</i>	24±1	26±0

¹⁾平均±SD (n=3)、BHP : *tert*-Butyl hydroperoxide

1-3 *Pseudomonas putida* における *dnaK* の変異と生育との関わり

第1節 実験方法

1) 使用菌株、培地および培養方法

使用した菌株を表 1-6 に示し、第 1 章、1-1 の第 1 節に記載した培地および方法により培養した。

表 1-6. 使用菌株

菌株	特徴	文献あるいは供給元
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2442 (KT)	<i>hsdR</i> Rif ^R	Franklin <i>et al.</i> , 1981
KT2442-R2 (R2)	KT derivative (toluene ^R , temperature ^S), <i>dnaK</i> G1334→C, DnaK Arg455→Pro	Kobayashi <i>et al.</i> , 2011
R2-TR1 (TR1)	R2 derivative (toluene ^S , temperature ^R), <i>dnaK</i> G1333→T and G1334→C, DnaK Arg455→Ser	Kobayashi <i>et al.</i> , 2011
R2-TR2 (TR2)	R2 derivative (toluene ^S , temperature ^R), <i>dnaK</i> G1334→T, DnaK Arg455→Leu	Kobayashi <i>et al.</i> , 2011

R, resistance; S, sensitive; Rif, rifampicin.

2) SDS-PAGE

SDS-ポリアクリルアミドゲル(PAG)電気泳動(SDS-PAGE)は、(Laemmli, 1970)の方法で行った。分離ゲルは、12%あるいは10%のアクリルアミドゲルを用いた。泳動はミニプロテアン 3 セル (BIO-RAD) を用いて行った。試料は、特記がない限り、SDS および 2-メルカプトエタノールを含む 1×サンプルバッファー中で 100°C、5 分間処理したものをウェルにアプライし、泳動した。泳動後のゲルはクーマシーブリリアントブルー (CBB) 染色液により染色した。培養液の濁度 (OD₆₀₀) を測定し、OD₆₀₀=1.0 の場合には 1ml の培養液に含まれる菌体

を、1.5ml プラスチックチューブを用いて、6,000 rpm、2 分間遠心分離して回収した。これを菌体 1.0OD unit と定義した。得られた菌体を、1×サンプルバッファ 100 μ l に懸濁し、100°C、5 分間熱処理して、15,000 r.p.m.、25°C、5 分間遠心分離によって得られた上清を、SDS-PAG により泳動した。

3) 不溶性タンパク質の調製

試験菌株を LB 培地にて、30°C、O/N 培養し、200OD unit / 30ml となるように調製し、200ml のバツフル付き三角フラスコに入れ、45°Cの湯浴で 140 往復/分で 30 分間振とう処理した。また、同条件で、熱処理後、30°Cの湯浴に戻し、2 時間または 5 時間 140 往復/分で振とう処理し、処理菌液を 8,730 \times g、5 分間遠心して菌体を回収した。他の温度の処理も同様に行った。

不溶性タンパク質の調製は以下のように行った。遠心分離により回収した菌体を 20mM Tris-Cl (pH8.0) 3ml に懸濁し、プレチプレス (800psi) により菌体の破碎を 3~5 回行った。2,180 \times g、4°C、10 分間遠心分離し、上清をさらに 18,000 \times g、4°C、1 時間遠心分離し、上清は可溶性タンパク質の画分として回収した。沈殿物は、洗浄バッファ A (1% Triton X-100, 50mM Tris-Cl, 150mM NaCl) で懸濁し、4°Cで 2 時間放置した後、18,000 \times g、4°C、1 時間遠心分離した。生じた沈殿物を洗浄バッファ B (50mM Tris-Cl, 150mM NaCl) で懸濁し、18,000 \times g、4°C、1 時間遠心分離し、再び生じた沈殿物を洗浄バッファ B で懸濁し、18,000 \times g、4°C、1 時間遠心分離した。生じた沈殿物を不溶性タンパク質画分とし、溶解バッファ (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 100mM DTT, 0.2% Bio-Lyte) に溶解させた。

タンパク質量の定量は、ウシグロブリンを標準タンパク質として、Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を用いて行った。またタンパク質の同定は、第 2 章に記載した方法により PMF 法により行った。

4) ウエスタンブロットティング

タンパク質の転写は、iBlot ドライブロットティングシステム (invitrogen) を用いて行った。転写操作は以下のようにマニュアル書に従って行った。iBlot ゲル

トランスファー装置に、シーリングを取り除いた iBlot 陽極スタック (Bottom) をトレイと一緒にブロッキング面に直接置き、泳動したゲルを陽極スタックの PVDF メンブレン上に載せ、その上に iBlot ろ紙をのせた後、陰極スタック (Top) の電極面を上にしてのせ、スポンジの金属がふたの右上隅の電極に合うように取り付けた。20V、7 分間処理してタンパク質を転写した。転写後のメンブレンを、マレイン酸バッファー (0.10M マレイン酸, 0.15M NaCl, pH7.5) で 5 分間振とうした後、ハイブリパックにメンブレンを入れ、ブロッキング溶液 {PVDF Blocking Reagent (TOYOBO)} を用いて、4°C で O/N 処理した。

免疫学的検出は、その後、洗浄バッファー (マレイン酸バッファー + 0.05% (v/v) Tween20) でメンブレンを 15 分間、3 回洗浄後、Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO) で希釈した一次抗体で 60 分間振とうを行い、抗体反応を行った。反応後、メンブレンを洗浄バッファーで 15 分間、3 回洗浄後、Can Get Signal Solution 2 (TOYOBO) で希釈した二次抗体 (Alkali Phosphatase-Anti Rabbit IgG 抗体) で 60 分間振とうを行い、さらに抗体反応を行った。また、同様にメンブレンを洗浄バッファーで 15 分間、3 回洗浄後、メンブレンを適当量の検出溶液 (0.1M Tris-Cl, 0.1M NaCl, pH9.5) で浸し、平衡化後、NBT/BCIP 発色基質溶液に浸し、シグナルを検出した。バンドが目的の濃さになったときにメンブレンをミリ Q 水で洗浄し、反応を停止した。一次抗体は、 σ^{32} の検出には抗 *Serratia marcescens* σ^{32} 抗体 (Abcam, Cambridge, MA, USA)、DnaJ の検出には、抗 *E.coli* DnaJ 抗体 (Abcam)、DnaK の検出には抗 *P. putida* DnaK 抗血清を使用した。

第 2 節 実験結果および考察

1) 長期培養によって蓄積する変性タンパク質の特定

P. putida KT2442 株 (KT 株) の *dnaK* 変異株である *P. putida* KT2442-R2 株 (R2 株) は、30°C で長期培養することにより、徐々にコロニー形成能が低下し、8 日目以降にはコロニー形成能は完全に消失した (図 1-8)。一方、野生株の KT

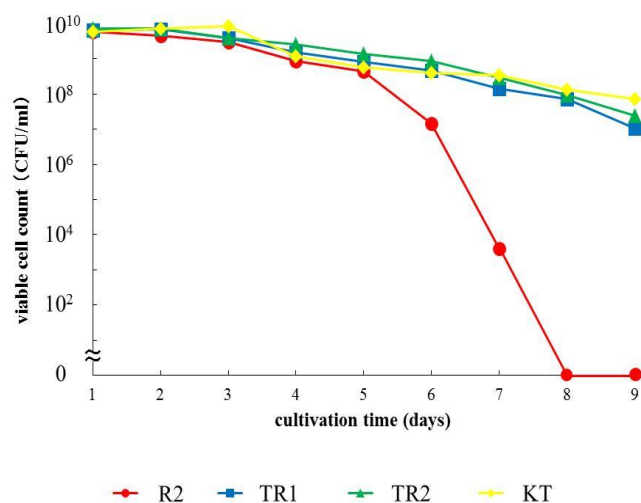


図 1-8. 培養日数によるコロニー形成能の変化

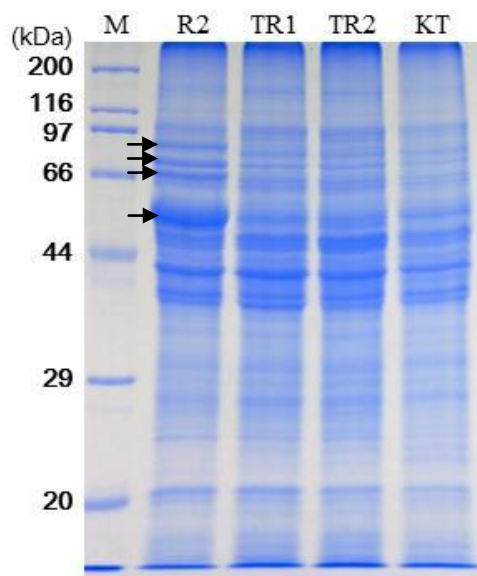


図 1-9. 長期培養時（培養 9 日目）の細胞内全タンパク質の CBB 染色写真
各レーンには 0.10OD unit 分を泳動した。矢印（→）は、上から ClpB、DnaK、
HtpG、GroEL を示す。

株と、R2 株から得られた温度感受性復帰変異株である *P. putida* KT2442-R2-TR1 株（TR1 株）、および *P. putida* KT2442-R2-TR2（TR2 株）は、9 日目でもコロニー形成能は高いレベルで維持されており、R2 株で観察されたコロニー形成能の

消失は見られなかった。このことは、R2 株における *dnaK* の変異が、細胞の生存や増殖開始のシグナルに関係していることが示唆された。培養 9 日目における細胞内全タンパク質を、SDS-PAGE により調べたところ、R2 株においては、熱ショックタンパク質 (Hsp) の ClpB、DnaK、HtpG、GroEL が細胞内に蓄積していることが確認された (図 1-9)。2 種の温度感受性復帰変異株は、KT 株と同様に、これら 4 種類の Hsp の蓄積は見られなかった。培養 9 日目の R2 株に存在する凝集タンパク質を、不溶性タンパク質として菌体から調製し、SDS-PAGE により解析した。その結果、R2 株で蓄積が多く確認された 4 種類の Hsp のうち、DnaK と思われるタンパク質が不溶性の画分に蓄積していることが分かった。また、その他には、R2 株に特異的と考えられる不溶性タンパク質は確認できなかった。

R2 株で蓄積していたタンパク質が DnaK か否か確認するため、抗 DnaK 抗体を用いて DnaK の免疫化学的検出を行った。図 1-10 に示すように、R2 株においては、DnaK と分子量の異なる多種の大きささまざまなタンパク種が抗 DnaK 抗体により検出されることが明らかとなった。R2 株を長期間培養した場合は、DnaK は多くが凝集タンパク質として存在し、おそらくは分解され、または他のタンパク質と強く結合して細胞内に存在するものと推測できる。

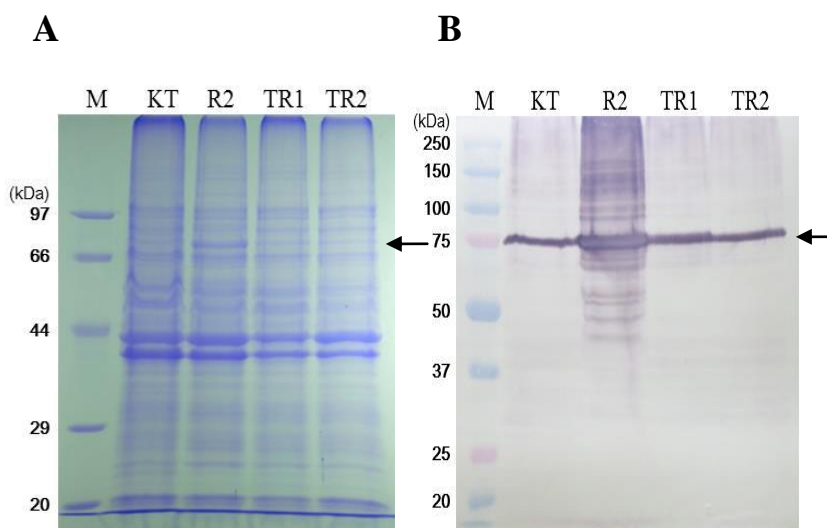


図 1-10. 長期培養時の不溶性タンパク質と DnaK の免疫学的検出
矢印 (→) は、DnaK の位置を示す。

2) *P. putida* の形態におよぼす *dnaK* 変異の影響

P. putida の KT 株、R2 株、TR1 株、および TR2 株の、各増殖時期における形態を観察した。対数増殖期には、いずれの株も桿状の形態をしていた。一方、定常期以降においては、KT 株、TR1 株、TR2 株は、いずれも真球に近い細胞の形態が観察されたにも関わらず、*dnaK* 変異株の R2 株では、対数増殖期ほどではないが桿状の形態であり、O/N 培養時も R2 株はやや桿菌に近い形態が観察できた。2 種の温度感受性復帰株の形態が、野生株と同様であったことから、R2 株における桿状の形態は、*dnaK* の変異が関係していることが示唆された。

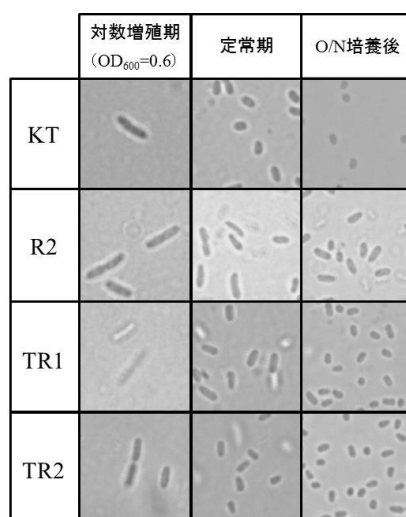


図 1-11. *Pseudomonas putida* の形態

第2章 *Pseudomonas putida* の熱ショック応答機構

緒言

熱ショック応答は、熱などのタンパク質の立体構造を損ねるストレスに対して、生物において起こる普遍的な応答である。熱ショック応答により、第1章において述べたように、Hsp104、Hsp90、Hsp70、Hsp60を始めとするHspが高発現し、細胞のプロテオスタシスを維持している。細菌の熱ショック応答については、*E. coli* において最も研究がされており (Arsène *et al.*, 2000; Yura and Nakahigashi, 1999)、多くのプロテオバクテリアの熱ショック応答は、ストレス応答性シグマ因子である σ^{32} によって制御されることが知られている (Straus *et al.*, 1987; Morita *et al.*, 2000; Guisbert *et al.*, 2008)。

非ストレス状態では、DnaKはシグマ因子の中で σ^{32} にのみ存在する領域 (σ^{32} ボックス)を含む領域に結合し、RNAポリメラーゼと結合すること妨げることで、シグマ因子として機能することを阻害し、さらに二つの主要なシャペロンシステムであるDnaK/DnaJ/GrpEとGroEL/ESは、FtsHによる σ^{32} の分解に関わることで、 σ^{32} の活性と量を制御し、負のフィードバックとして作用することが分かっている (Guisbert *et al.*, 2008)。 σ^{32} は、*Hsp* 遺伝子のプロモーター領域に存在する認識配列 (CTTGAA-n₁₃₋₁₇-CCCCATnT; Yura *et al.*, 2000)に結合し、 σ^{32} レギュロンに含まれる遺伝子の転写量を増加させる。*E. coli*における σ^{32} のレギュロンは、約50の転写ユニットから構成されており、約90個の遺伝子から成り立っており (Nonaka *et al.*, 2006)、多くのグローバル転写調節因子や、DNAやRNAの完全性の維持に関与するタンパク質の遺伝子が含まれている。

熱ショックなどにより、 σ^{32} は一時的に安定化されることが分かっている (Yura *et al.*, 2000)。この現象は、前述の負のフィードバックに関わるDnaKシステムやGroEL/ESが、ストレスにより変性したタンパク質の再生に関わるために、 σ^{32} から離れることが一因であると考えられている (Guisbert *et al.*, 2008)。 σ^{32} は、ストレスにより安定化し、それに伴い σ^{32} レギュロン遺伝子の一時的な誘導が起きる。この誘導は、5-15分後にピークに達するが、ストレスの原因因子が取り

除かれた場合や細胞がストレス条件に適応した場合には、 σ^{32} は急速に不安定化し、膜結合型 ATP 依存性プロテアーゼ FtsH によって分解されることにより、その細胞内レベルは低下する (Herman *et al.*, 1995; Tomoyasu *et al.*, 1995; Tatsuta *et al.*, 1998)。

Pseudomonas 属の熱ショック応答についての解析例は、極めて限られている (Allan *et al.*, 1988; Keith *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2007)。微生物の遺伝子発現機構の解析において、生物間で発現調節が異なる例が多く見出されている。例えば、*E. coli* と *P. putida* では、非主要シグマ因子の σ^S の制御機構は大きく異なっている (Venturi, 2003)。細菌の熱ショック応答は、*E. coli* において詳細な解析がなされているが、その調節は多様である可能性がある。このため、*P. putida* における熱ショック応答について検討し、Hsp および σ^{32} の発現制御機構についての解析を行った。

2-1 *Pseudomonas putida* の熱ショック応答

第1節 実験方法

1) 使用菌株、プライマー

菌株は、第1章の表 1-1 に記載したものを使用した。各遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により定量するためのプライマーを、表 2-1 に示した。

2) 菌体の調製

試験菌株を LB 培地で前培養し、前培養液 100 μ l を 200ml のバツフル付き三角フラスコに入れた LB 培地 50ml 内に植菌した。濁度が 1.0 まで培養後、三角フラスコを所定の温度 (30 $^{\circ}$ C、33 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、42 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C もしくは 50 $^{\circ}$ C) の湯浴に入れ、140 往復/分で 0、10、20、30 分間熱処理を行った。目的のサンプリングタイムには、1.5ml プラスチックチューブに 1ml の培養液を回収し、菌

表 2-1. リアルタイム PCR 用プライマー

プライマー	配列 (5'→3')
cbpA F+93	GTATCACCCCGATGTCAGTAAGG
cbpA R+200	TCATCGAACTCGGCACGTTTC
clpB F+36	TGCAATATCCGATGCCCAGTC
clpB R+176	CCATTGATGTGCGAAGCCTAC
djlA F+57	ACCGGGTGCCTTGCTCGGT
djlA R+147	ACCCAGGCGTTTCGCGCATGT
dnaK F+35	CCAACCTCGTGCCTCCATTC
dnaK R+149	ACCAGGATTTTCGCCATCGTTC
dnaJ F+289	CGGCGATGTGTTTCAGCGACTT
dnaJ R+397	GCACCGCTTCTTCCAGGTTCA
fusA-1 F+37	ATTGGTATCTGTGCCACGT
fusA-1 R+130	GCACCTCGCCATTTTGT
groEL F+27	CATTTTGTTACGAGCGGAATCA
groEL R+196	AAGCGTCTTTCAGCTCGATTTC
grpE F-26	CCACAAAATTGCGCAGGAGAGA
grpE R+74	CGGGGTATCAGCTGCATTGCC
htpG F+66	ATGATTCACTCGCTGTACTCG
htpG R+207	GCGAATCTTCAGGTCAGCATC
lon-1 F+161	AGGTACTGCCGGTGATCGTCAA
lon-1 R+253	TGAAGAACAGCGCCAGGCAG
rpoD F+16	CAACAGCAGTCTCGTATCAAAG
rpoD R+167	ATCCCATGTCGTTGATCATG
rpoH F+8	CATCGTTGCAACCTGCCTATG
rpoH R+204	ACTACGGGCGATATGTACGAC
rpsA F+42	AACCCTCAATCTTCAGCCG
rpsA R+143	ATGACGCCCTCGGACTTC
rplB F+54	GGTGGTCAACAAGGAGCTGCAC
rplB R+163	CAACGTGACGAGTGGTAATGCGG
rpsE F+99	CTTACC GCGCTGACCGTG
rpsE R+213	GTTGCGGCGAGCAGCTTCC
secA F+46	GGCCGCCCTCCATCCCTAA
secA R+149	AGCATGCGTTTGACTTCACGCTC
tig F+40	CGCATGACCATCGCCGTTC
tig R+138	AGGACGGAAGCCCGCAATC

体を 4,000×g で室温・5 分間遠心分離した。培養上清を除き、沈殿した菌体に 1× サンプルバッファー {50mM Tris-Cl (pH6.8)、2% SDS、6% 2-メルカプトエタノール、12.5% (w/v) グリセロール、0.01mg/ml ブロモフェノールブルー} を 100μl 加えて懸濁し、-20℃で保存した。

3) SDS-PAGE

SDS-PAGE は、第 1 章、1-3 記載の方法により行った。

4) MALDI-TOF-MS によるタンパク質の特定

MALDI-TOF-MS を用いたペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 法によるタンパク質の特定は、以下のように行った。SDS-PAGE により分離したタンパク質を含むゲルを切り出し、1.5ml のプラスチックチューブへと移した。チューブ内に脱色液 (50mM ammonium bicarbonate, 50% CH₃CN) を 100μl 入れ、15 分間浸した。15 分間浸した後、脱色液を廃棄し、再度脱色液を入れ、これらの操作をさらに 2 回繰り返す、ゲル内に含まれる CBB 色素を除いた。その後、ゲルを 5 分間減圧乾燥し、トリプシン溶液 (20μg/ml トリプシン, 4mM ammonium bicarbonate, 0.9% CH₃CN) 20μl にゲルを室温で 5 分間浸した。5 分後、トリプシン反応希釈バッファー (40mM ammonium bicarbonate, 9% CH₃CN) をチューブ内に 50μl 加え、37℃で 3 時間から O/N 酵素処理した。酵素処理後、酵素消化液に 5% トリフルオロ酢酸 (TFA) を 7.7μl 加え、最終濃度 0.5% TFA になるようにした。ピペットマンに Zip Tip μ-C18 を装着し、100% CH₃CN を吸引し、吐出した。次いで、0.1% TFA を吸引し、吐出した。次に、酵素消化液を吸引、吐出を繰り返し、カラム内にペプチドを吸着させた。カラム内にペプチドを吸着後、0.1% TFA を吸引・吐出し、カラムを洗浄した。最後に、マトリックス溶液 (α-Cyano- 4-hydroxycinnamic acid 10mg/ml, 0.05% TFA, 50% CH₃CN) を 2μl 吸引し、MS プレート上に吐出させ、乾燥させた。その後、質量分析計で MS ピークを測定した。MS ピークは、Angiotensin II と ACTH fragment をスタンダードとして、サンプルを校正した。得られた MS ピークは Mascot 検索により解析し、タ

ンパク質を特定した。

5) ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは、第1章、1-3記載の方法により行った。

6) *Pseudomonas putida* からの全 RNA の調製

培養液を目的のサンプリングタイム時に 400 μ l 採取し、1.5ml のプラスチックチューブにあらかじめ分注しておいた 2 倍量の RNA Protect Bacteria Regent (QIAGEN) 800 μ l に加え、直ちにボルテックスして混合した。室温で 5 分間静置後、13,000 r.p.m.、25 $^{\circ}$ C、10 分間遠心し、上清を廃棄した。その後、サンプルは使用するまで -20 $^{\circ}$ C に保存した。

全 RNA の調製は RNesay Mini Kit (QIAGEN) を用いて、RNA Bacteria Regent Handbook に従って行った。抽出した RNA の濃度は、分光光度計を用いて測定した A260nm 値により決定した。この Total RNA をリアルタイム定量 PCR のテンプレート RNA とした。

7) リアルタイム定量 PCR

Light Cycler システムを用いたリアルタイム定量 RT-PCR は、Quantitect SYBR Green RT-PCR (QIAGEN) を用いて、PCR キャピラリーにより行った。RT-PCR は、反応溶液中に Total RNA 1 μ g、2 \times Quantitect SYBR Green RT-PCR Master Mix 10 μ l、Quantitect RT Mix 0.2 μ l、プライマーミックス (各 10 μ M) 2 μ l を含み、全量が 20 μ l となるように RNase Free Water で調製し、ガラスキャピラリーに挿入した。RT-PCR 反応は、各遺伝子の mRNA 転写量を測定するために、逆転写反応 (50 $^{\circ}$ C、20 分間)、変性処理 (95 $^{\circ}$ C、15 分間) のあとに PCR 反応 (94 $^{\circ}$ C、15 秒間 \rightarrow 55 $^{\circ}$ C、20 秒間 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、25 秒) を 40 サイクル行い、melting 処理 (95 $^{\circ}$ C、0 秒 \rightarrow 65 $^{\circ}$ C、15 秒 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C、0 秒) と cooling (40 $^{\circ}$ C、30 秒) を経て、閾値の蛍光強度を超えるサイクル数を求めることにより行った。プライマーは表 2-1 に記載したものを使用した。

第2節 実験結果

1) *P. putida* のタンパク質レベルでの熱ショック応答

得られた各種変異株の、細胞タンパク質の発現パターンについて観察した。O/N 培養後の全タンパク質を SDS-PAGE により検出したところ、KT 株の *clpB*、*cbpA*、*djlA*、*htpG*、*clpP*、*lon-1*、*lon-2* 各欠損株は、全タンパク質の発現に大きな違いはなかった。しかし、KT Δ *dnaJ* 株は、R2 株ほどではないが、KT 株と比べて DnaK と GroEL のタンパク質量がわずかに増加していた (図 2-1)。

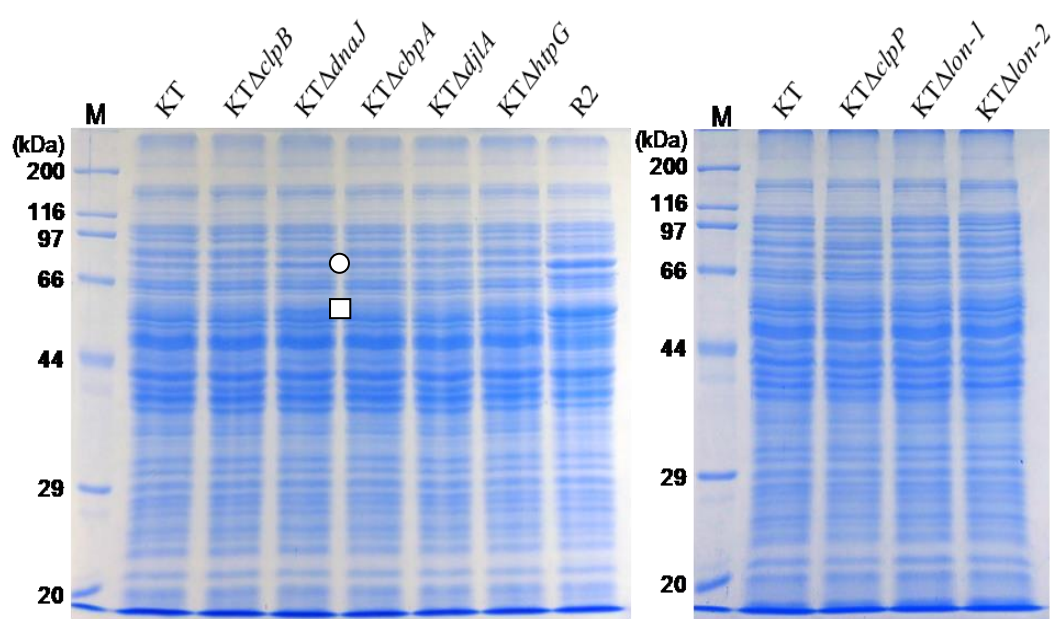


図 2-1. *Pseudomonas putida* 各菌株の O/N 培養後の細胞内全タンパク質
○, DnaK、□, GroEL

①10~12℃の温度上昇が Hsp の発現を強く誘導する

対数増殖期 (OD₆₀₀ ~ 1.0) の KT 株の培養液を、様々な温度 (33℃、35℃、37℃、40℃、42℃、45℃、50℃) で処理し、SDS-PAGE により全タンパク質を観察することで、熱ショック応答を調べた (図 2-2A)。通常の培養温度である 30℃から、33℃へとシフトした場合は、Hsp 量の増加はほとんど観察されなかった。35℃へシフトした場合は、代表的な Hsp である DnaK、GroEL、HtpG のわずかな増

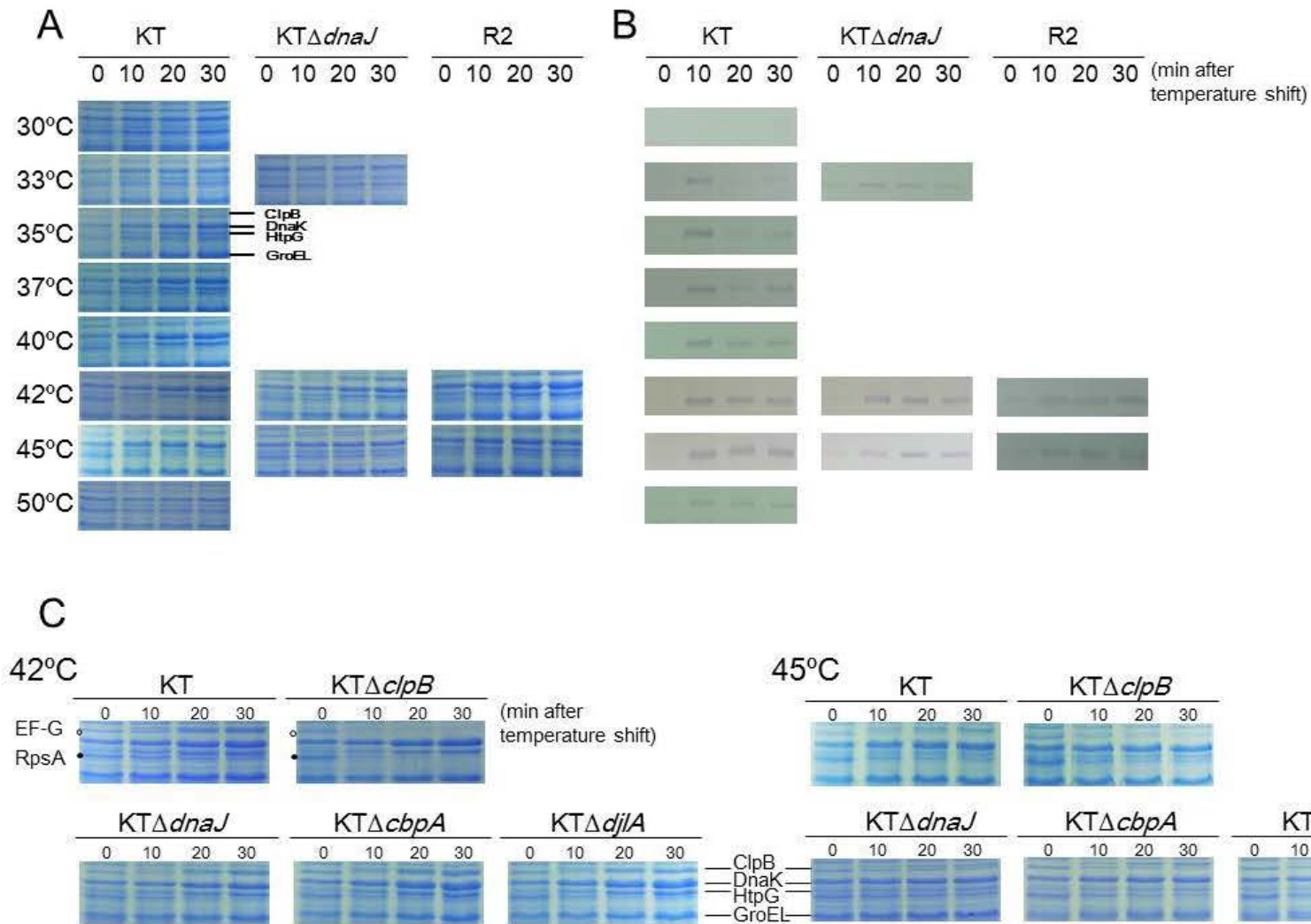


図 2-2. *Pseudomonas putida* におけるタンパク質レベルでの熱ショック応答

A, タンパク質レベルでの熱ショック応答 (HSR)

各株を対数増殖期 (OD₆₀₀ ~ 1.0) まで 30°C で培養後、それぞれの温度で処理した。100µl から得られた菌体の全タンパク質を、10% のゲルで電気泳動後 CBB 染色した。温度シフト後、タンパク質量の増加が見られた Hsp は、MS 解析により特定した。余白の部分に ClpB、DnaK、HtpG、GroEL の位置を示した。

B, ウェスタンブロット法による σ^{32} の検出

ウェスタンブロット法による σ^{32} の検出には、A でもちいたサンプルと同一のもの の処理液 50µl から得られた菌体由来のタンパク質を使用した。

C, 各種変異株の HSR

加が見られ、37°C とした場合にはさらに Hsp の増加が見られた。40°C および 42°C では、DnaK、GroEL、HtpG に加えて ClpB の増加が認められたのに対して、45°C においては 42°C では著しい増加が確認された DnaK、HtpG、GroEL の大きな誘導は確認できなかった。しかし、ClpB は 45°C でも時間の経過とともに増加が見られた。ClpB については、40°C から 45°C の熱処理により強く誘導されるが、*P. putida* KT2442 株の生育可能な温度の 37°C までは、タンパク質量の顕著な増加が見られなかったことは興味深い。さらに、高い温度の 50°C の処理では、いずれのタンパク質の合成も停止しているように思われた。KT 株の各変異株において、42°C および 45°C で熱ショック応答を調べたところ、どの株でも基本的に 42°C における熱ショック応答は確認され、Hsp (主に、ClpB、DnaK、HtpG、GroEL) の発現の増加が確認された (図 2-2C)。高温処理により生存率が低下する *KTΔclpB* 株についても、ClpB 以外の熱ショック応答 (Hsp 量の増加) は KT 株と本質的には同じであった。また、J-ドメインタンパク質遺伝子を含む他の遺伝子変異株も、Hsp の誘導は野生株と同様に起こった。しかし、*KTΔdnaJ* 株においては、42°C の処理において、Hsp の誘導がわずかに鈍いよう思われた。また、*dnaK* 変異株である R2 株も、42°C においては KT 株と同様に熱ショック応答が起こり、ClpB、DnaK、HtpG、GroEL の量の増加が確認されたが、*KTΔdnaJ* 株と同様に熱ショック応答が他の株に比べて鈍かった。

②熱処理により elongation factor G と 30S リボソームサブユニットタンパク質 A が減少する

すべての株において、42°Cと45°Cともに、84kDaと66kDaの二つのタンパク質が熱処理により減少していた(図2-2C)。特にKT Δ clpB株では、これら二つのタンパク質の減少が顕著であった。熱処理により減少が観察された2種類のタンパク質を、MALDI-TOF-MSによるPMF法により同定したところ、それぞれ、elongation factor G (EF-G) および 30S ribosomal protein S1 (RpsA) であることが判明した。EF-Gは、リボソームのトランスロケーションを引き起こすタンパク質であり、RpsAはmRNAの5'非翻訳領域と相互作用して、mRNAにリボソームが結合することを助けるため、*E. coli*においてほとんどのタンパク質の合成に必要とされるタンパク質である(Sørensen *et al.*, 1998)。一方、生育可能な温度である37°Cの処理では、これらのタンパク質の減少は見られなかった。40°Cの処理でも、EF-GやRpsAの減少は確認されたが、42°C処理に比べると顕著ではなかった。42°C処理時に、Hspの合成が促進されていたにも関わらず、タンパク質の合成に必須と考えられるタンパク質が減少することは興味深い。高温に曝されたときに、熱に対して不安定なタンパク質を合成することは、誤った立体構造をもち、凝集する分子の数を増やすことに繋がるため、生育に悪影響を与える可能性が高い。*P. putida*は、熱ショック時にEF-GやRpsAの量を下げることによって、タンパク質の合成速度を下げ、細胞内に豊富に存在するHsp遺伝子のmRNAにより、合成能をもつリボソームを飽和させて、Hsp以外のタンパク質の合成を制限することが推測され、さらに高温に曝された場合には、Hspの合成でさえも停止させるものと考えられる。

③ σ^{32} 量の変化はHsp量の変化よりも鋭敏である

*E. coli*では、熱ショック応答は σ^{32} の量に依存することが知られている(Straus *et al.*, 1987)。熱処理による σ^{32} 量の変化を、 σ^{32} の抗体を用いて測定した(図2-2B)。KT株では熱処理前の細胞内には σ^{32} のシグナルは見られず、 σ^{32} の量は低いレベル

に抑えられていることが確認された。しかし、興味深いことに、細胞を 33°C に曝すと、前述したように Hsp の増加は SDS-PAGE では観察されなかったが (図 2-2A)、免疫学的検出により明らかに σ^{32} のシグナルが観察された (図 2-2B)。20 分後には σ^{32} のシグナルが 10 分後に比べて顕著に低下していたが、30 分後には 20 分後よりもやや強いシグナルが検出された。35°C や 37°C においても、温度シフト 10 分後に最も σ^{32} のシグナルは強くなり、その後 33°C の場合と類似した変化を示した。40°C および 42°C 処理では、やはり 10 分間の熱処理後に σ^{32} のシグナルが最も高くなり、その後、 σ^{32} の量が減少したが、より低温の場合のように、はっきりとしたシグナルの低下は起きなかった。一方、45°C の熱処理では、10 分から 30 分の温度処理を行っても、 σ^{32} の量が時間の経過とともに減少する傾向は見られなかった。この理由として、45°C では DnaK のタンパク質量の増加が見られないことから、DnaK シャペロンチームと FtsH プロテアーゼの分解機構が機能せず、 σ^{32} の量が減少しなかったと考えられる。また、50°C にシフトした際にも σ^{32} 量の増加が観察されたが、環境温度が上昇する間に生成した可能性が高いと考える。

また、KT Δ dnaJ 株と R2 株は、野生株とは異なり熱処理を行う前の細胞内にも、 σ^{32} が検出できるレベルに蓄積していることが分かった。KT Δ dnaJ 株では 33°C で処理した場合に、 σ^{32} の量は大きく変化しなかった (図 2-2B)。

④ σ^{32} 量の調節は細胞膜の変化を認識して起きる可能性が高い

細胞が Hsp 合成の最大のレベルに到達させる温度は、生物によってそれぞれであり、至適生育温度から 10-12°C への増加が一般的に最適の誘導とされる (Yamamori and Yura, 1980; Key *et al.*, 1981)。本研究により、*P. putida* の細胞が変性タンパク質の高蓄積を引き起こしそうにない、わずか 3°C の温度シフトでさえ Hsp 遺伝子の鋭敏な発現調節を引き起こすことが明らかになった。どのように、*P. putida* の細胞が温度のわずかな変化を感知しているかは明確ではないが、*E. coli* では *rpoH* の mRNA の翻訳制御は、温度の変化に直接反応することが報告されている (Guisbert *et al.*,

2008; Kortmann and Narberhaus, 2012)。しかし、翻訳時の制御でも、わずかな温度変化がもたらす σ^{32} の量的変化を完全には説明できない。近年、内膜上への σ^{32} の局在が報告された (Lim *et al.*, 2013)。 σ^{32} は、シグナル認識粒子 (SRP) と SRP レセプターにより膜表面に移行し、シャペロンを介した活性制御や FtsH による分解制御に影響されることが、これまでの知見を総合したモデルとして提唱されている。このモデルでは、 σ^{32} の制御は、折りたたまれていないもしくは、間違っただけで折りたたまれたタンパク質の蓄積によって引き起こされるのではなく、細胞膜が環境温度の変化を感知することにより、 σ^{32} の活性および量的調節が引き起こされると考えられている。

2) *P. putida* の転写レベルでの熱ショック応答

① *Hsp* 遺伝子の発現量は σ^{32} の量に相関している

タンパク質レベルの熱ショック応答を検討したのと同じサンプルを用いて、33°C、35°C、37°C、40°C、42°Cおよび45°Cにおいて、4つの *Hsp* 遺伝子 (*clpB*、*dnaK*、*htpG* および *groEL*) と、2つのシグマ因子遺伝子 (σ^{70} をコードする *rpoD* および σ^{32} をコードする *rpoH*) の転写量を、リアルタイム定量 PCR により測定した (図 2-3、表 2-2)。いずれの温度においても、熱処理 10 分後には *Hsp* 遺伝子の mRNA 量の著しい増加が見られた。*Hsp* 遺伝子の発現量は、図 2-2B において示した σ^{32} の量と、高い相関を示していた。より低い温度での処理の際において見出された σ^{32} 量の上下変動が、*groEL* 以外の *Hsp* 遺伝子の発現においても明確に表れた。すなわち、33°C では *clpB*、*dnaK*、*htpG* の mRNA 量は、温度シフト 10 分後には一時的に著しい増加が見られ、続く 20 分後には減少し、さらに 30 分後には再び増加していた。この現象は、KT Δ *clpB* 株でも同様に観察されたが (結果は示していない)、KT Δ *dnaJ* 株では見ることができなかった。33°C (あるいは 35°C、37°C)、10 分間の処理では *rpoH* の mRNA 量の増加は少なく、 σ^{32} の変化とは大きく異なっていた。これは、*E. coli* において明らかにされているように、温度シフトにより σ^{32} が安定化されているこ

とを示すと考えられるが (Yura *et al.*, 2000)、3°Cの温度上昇により変性したタンパク質が速やかに、かつ多量に生成されることは考えにくく、異なった誘導機構が存在する可能性を、強く示唆する知見であると考えられる。また、低い温度での処理により σ^{32} は一時的に誘導され、その後減少したにもかかわらず、*rpoH* の mRNA 量はその温度でも増加し続けた。対照的に、*rpoD* は最初の 10 分間は誘導され、その後は、定常レベルに戻った。

低い温度で見られた mRNA の著しい上下変動は、より高い温度での処理では観察されなかった。*Hsp* 遺伝子は 40°C、42°C および 45°C の処理で、ほぼ同じ誘導パターンを示し、それらの温度では、mRNA 量は 30 分後も高く保たれていた。

②熱処理時に転写レベルでの elongation factor G と 30S リボソームサブユニットタンパク質 A の調節が起きる

42°Cあるいは45°Cにおける処理で、2つのタンパク質の合成に重要なタンパク質 (EF-G および RpsA) が減少することが見出された。これらのタンパク質をコードする遺伝子 (*fusA-1* および *rpsA*) の、mRNA 量の変化を測定したところ、いずれも熱処理により mRNA 量の減少が見られ、これらの2つのタンパク質の量的制御に、転写レベルでの調節が関わることを示された (図 2-3、表 2-2)。

マイクロアレイ解析により、EF-G をコードする *fusA-1* 遺伝子 (PP_0451) は、リボソームタンパク質をコードする *rpsL* 遺伝子 (PP_0449) と *rpsG* 遺伝子 (PP_0450)、および EF-Tu をコードする *tuf-2* 遺伝子 (PP_0452) とオペロンを形成することが明らかとなっている。また、*rpsA* を含むリボソームタンパク質遺伝子のうち、約3分の2が *P. putida* では極めて発現量の高い遺伝子であることが報告されている (Frank *et al.*, 2011)。そこで、熱処理による *fusA-1* や *rpsA* の減少が、これらの遺伝子に特異的であるか検討するために、42°Cと45°Cの熱処理による、50S リボソームタンパク質 L2 をコードする *rplB* (PP_0457) と、30S リボソームタンパク質 S5 をコードする *rpsE* (PP_0471) の mRNA 量の変化を観察した (表 2-2)。その結果、42°Cでは

rpsE はわずかに減少し、*rplB* は *fusA-1* と同程度に減少した。また、45°Cでは2つの遺伝子ともに、mRNA量は *fusA-1* と同様に著しく減少した。これらの結果は、生育することのできない温度域では、リボソームタンパク質や、ペプチドの伸長因子の合成を抑制し、タンパク質の *de novo* 合成を抑制することを表すものと考えられる。

③45°Cでの *rpoH* 遺伝子の発現は σ^{24} に依存している

KT Δ *clpB* 株、KT Δ *dnaJ* 株、KT Δ *algU* 株、R2 株について、4つの *Hsp* 遺伝子 (*clpB*、*dnaK*、*htpG* および *groEL*) と、2つのシグマ因子遺伝子 (σ^{70} をコードする *rpoD* および σ^{32} をコードする *rpoH*) の mRNA レベルを、42°Cおよび45°Cで測定した (図2-4、表2-2)。 *P. putida* の AlgU は、 σ^{24} ファミリーに属し、*rpoH* の発現に関与することが報告されているため (Aramaki *et al.*, 2001)、KT Δ *algU* 株におけるこれらの遺伝子の発現量を測定した。KT株や他のKT株に由来する変異株とKT Δ *algU*株では、遺伝子の誘導パターンにおいて、45°Cで処理したときの *rpoH* の発現のみが異なっていた (図2-4)。熱処理10分後には、*rpoH* の mRNA の増加が見られるが、引き続き処理をすると、mRNA量は減少することが明らかとなった。この結果は、42°Cまでは、*rpoH* の mRNA の合成は大部分が σ^{70} に依存しているが、45°Cでは主に AlgU (σ^{24}) に依存することを強く示唆するものである。

E. coli の σ^{32} 遺伝子 (*rpoH*) のプロモーターには、4つのプロモーター配列 (P1、P3、P4、P5) が存在し、その内、P1、P4、P5は σ^{70} により認識され、P3は σ^{24} による制御を受けていると考えられている (Arsène *et al.*, 2000)。 *P. putida* では3つのプロモーター配列 (P1、P2、P3) が存在し、P1とP3は σ^{70} に、P2は σ^{24} により制御を受けると考えられている (Aramaki *et al.*, 2001; Manzanera *et al.*, 2001)。第3章において述べるように、 σ^{70} は温度の上昇に伴い変性し、不溶性タンパク質として検出されることが判明した。ハウスキーピング遺伝子の発現に関わる σ^{70} は、高温では σ^{32} や σ^{24} にその役割を渡すことで、細胞は熱に対して感受性の高いタンパク質の合成を停止し、環境適応に必要なタンパク質を優先的に合成していると推測できる。

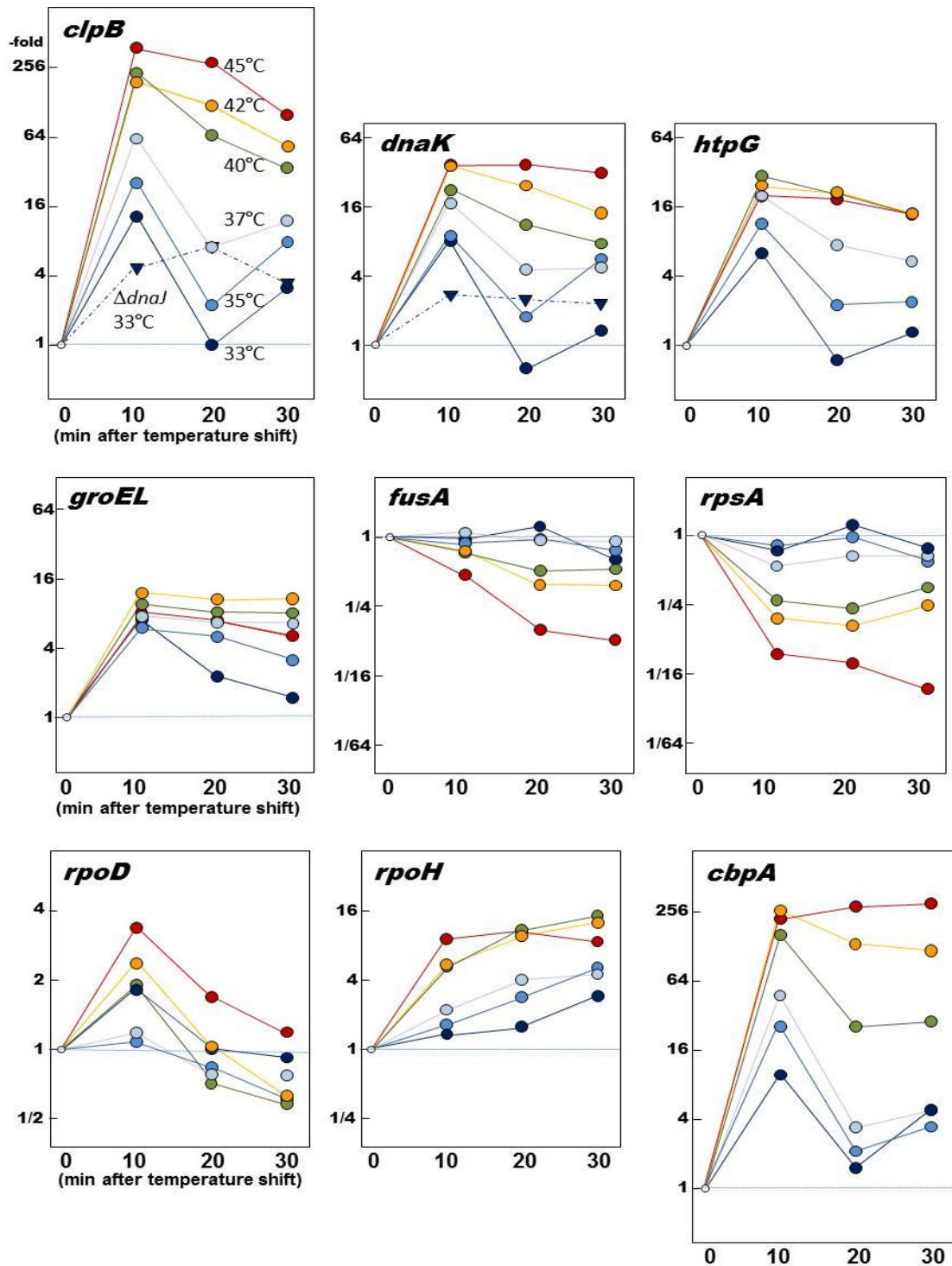


図 2-3. *Pseudomonas putida* の各温度での転写レベルでの熱ショック応答

各株を 30°C で対数増殖期 (OD₆₀₀ ~ 1.0) まで培養後、それぞれの温度で処理した。別々に 3 回行った操作によって CP 値の平均を求め、熱処理前の CP 値に対して、CP 値が 1 減少した場合に mRNA 量が 2 倍となったとして得られた相対値を示した。CP 値の実測値は表 2-2 に示した。シンボルは、濃紺 (33°C)、青 (35°C)、薄青 (37°C)、緑 (40°C)、黄 (42°C)、赤 (45°C) を表す。

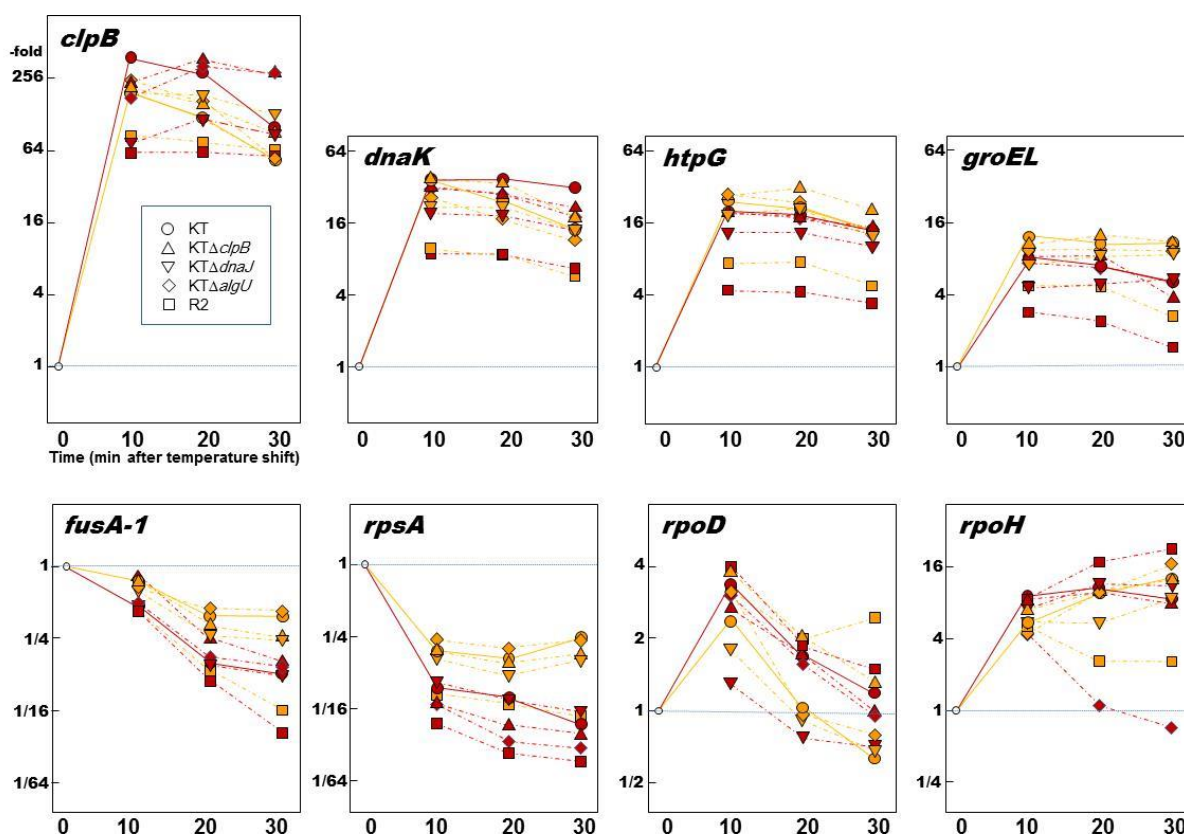


図 2-4. *Pseudomonas putida* 各株の転写レベルでの熱ショック応答

各株を 30°C で対数増殖期 ($OD_{600} \sim 1.0$) まで培養後、42°C (黄色) および 45°C (赤色) で処理した。別々に 3 回行った操作によって CP 値の平均を求め、熱処理前の CP 値に対して、CP 値が 1 減少した場合に mRNA 量が 2 倍となったとして得られた相対値を示した。CP 値の実測値は表 2-2 に示した。

④ *P. putida* の *cbpA* は熱ショックにより誘導される

E. coli の多くの *Hsp* 遺伝子は、 σ^{32} によって認識される典型的な熱ショックプロモーター配列 (CTTGAA-n₁₃₋₁₇-CCCCATnT) を持っており、同シグマ因子による発現調節を受けている (Koo *et al.*, 2009)。これまでの研究から、*E. coli* では σ^{32} の制御下にある 50 個以上の転写単位のうち、約 3 分の 2 は開始コドンの上流 100bp 以内に σ^{32} が認識するプロモーター配列が位置している (Nonaka *et al.*, 2006)。 *P. putida* のゲノム配列 (Nelson *et al.*, 2002) から、 σ^{32} のプロモーター領域として考えられる

表 2-2. *Pseudomonas putida* 各株における培養温度のシフトに伴う遺伝子発現量の変化

Genes	Wild-type 33°C		KTΔ <i>dnaJ</i> 33°C		Wild-type 35°C		Wild-type 37°C		Wild-type 40°C		
	CT	ΔCT ^c	CT	ΔCT	CT	ΔCT	CT	ΔCT	CT	ΔCT	
<i>clpB</i>	0	18.37 (0.58)	–	19.15 (0.38)	–	18.26 (0.43)	–	19.07 (0.07)	–	18.56 (0.55)	–
	10	14.63 (0.58)	3.74 (0.41)	16.91 (0.57)	2.24 (0.29)	13.59 (0.49)	4.67 (0.51)	13.12 (0.21)	5.94 (0.24)	10.73 (0.77)	7.83 (0.24)
	20	18.46 (0.80)	–0.09 (0.69)	16.33 (0.52)	2.82 (0.26)	17.10 (0.79)	1.16 (0.57)	16.25 (0.24)	2.82 (0.21)	12.47 (0.50)	5.96 (0.21)
	30	16.76 (1.16)	1.61 (0.72)	17.38 (0.57)	1.77 (0.20)	15.35 (0.36)	2.92 (0.45)	15.50 (0.38)	3.57 (0.31)	13.42 (1.06)	5.14 (0.55)
<i>dnaK</i>	0	12.62 (0.52)	–	11.73 (0.56)	–	12.37 (0.34)	–	12.91 (0.02)	–	12.34 (0.49)	–
	10	9.79 (0.22)	2.84 (0.43)	10.30 (0.36)	1.44 (0.61)	9.20 (0.15)	3.17 (0.21)	8.85 (0.18)	4.07 (0.17)	7.87 (0.51)	4.48 (0.27)
	20	13.37 (0.63)	–0.75 (0.35)	10.44 (0.30)	1.30 (0.27)	11.55 (0.43)	0.82 (0.10)	10.74 (0.20)	2.17 (0.19)	8.88 (0.59)	3.46 (0.59)
	30	12.29 (0.47)	0.34 (0.92)	10.55 (0.11)	1.19 (0.63)	10.91 (0.29)	1.46 (0.08)	10.70 (0.30)	2.21 (0.31)	9.43 (0.57)	2.92 (0.57)
<i>groEL</i>	0	13.42 (0.48)	–	–	–	13.82 (0.69)	–	14.24 (0.54)	–	13.53 (0.89)	–
	10	10.92 (0.82)	2.84 (0.62)	–	–	11.24 (0.60)	2.62 (0.07)	11.35 (0.28)	2.89 (0.28)	10.10 (0.67)	3.44 (0.22)
	20	12.23 (0.38)	1.19 (0.82)	–	–	11.49 (0.54)	2.33 (0.24)	11.49 (0.13)	2.75 (0.46)	10.47 (0.70)	3.06 (0.26)
	30	12.93 (0.52)	0.49 (0.55)	–	–	12.14 (0.55)	1.69 (0.26)	11.47 (0.59)	2.76 (0.58)	10.50 (0.14)	3.03 (0.75)
<i>cbpA</i>	0	20.20 (0.64)	–	–	–	19.74 (0.30)	–	19.87 (0.62)	–	19.71 (0.48)	–
	10	16.92 (0.69)	3.28 (0.39)	–	–	15.07 (0.10)	4.67 (0.39)	14.37 (0.74)	5.50 (0.30)	12.35 (0.44)	7.35 (0.89)
	20	19.61 (0.81)	0.59 (1.32)	–	–	18.68 (0.12)	1.06 (0.42)	17.98 (0.30)	1.74 (0.11)	15.09 (0.41)	4.62(0.87)
	30	17.97(0.94)	2.23 (0.74)	–	–	17.98 (0.52)	1.76 (0.22)	17.65 (0.58)	2.22 (0.90)	14.87 (0.30)	4.83 (0.59)
<i>htpG</i>	0	13.05 (0.28)	–	–	–	13.29 (0.33)	–	13.54 (0.32)	–	13.43 (0.59)	–
	10	10.39 (0.46)	2.66 (0.38)	–	–	9.76 (0.05)	3.52 (0.38)	9.20 (0.14)	4.35 (0.38)	8.52 (0.31)	4.91 (0.32)
	20	13.47 (0.35)	–0.42 (0.28)	–	–	12.11 (0.11)	1.19 (0.23)	10.63 (0.26)	2.91 (0.58)	9.04 (0.52)	4.39 (0.14)
	30	12.88 (0.42)	0.19 (0.29)	–	–	12.03 (0.26)	1.25 (0.34)	11.09 (0.61)	2.45 (0.52)	9.62 (0.46)	3.81 (0.33)
<i>fusA-1</i>	0	11.99 (0.85)	–	–	–	12.06 (0.29)	–	12.31 (0.37)	–	11.84 (0.44)	–
	10	12.05 (0.31)	–0.06 (0.59)	–	–	12.24 (0.51)	–0.18 (0.26)	12.17 (0.60)	0.14 (0.44)	12.30 (0.54)	–0.46 (0.10)
	20	11.67 (0.55)	0.32 (0.47)	–	–	12.13 (0.22)	–0.07 (0.29)	12.41 (0.16)	–0.10 (0.41)	12.82 (0.41)	–0.99 (0.41)
	30	12.62 (0.84)	–0.63 (0.09)	–	–	12.44 (0.37)	–0.38 (0.15)	12.42 (0.55)	–0.11 (0.59)	12.73 (0.38)	–0.89 (0.17)
<i>rpsA</i>	0	11.64 (0.24)	–	–	–	12.23 (0.36)	–	12.25 (0.34)	–	11.75 (0.49)	–
	10	12.02 (0.62)	–0.39 (0.44)	–	–	12.54 (0.44)	–0.30 (0.15)	13.15 (0.36)	–0.90 (0.19)	13.64 (0.49)	–1.90 (0.12)
	20	11.28 (0.81)	0.35 (0.86)	–	–	12.30 (0.42)	–0.07 (0.22)	12.84 (0.23)	–0.59 (0.14)	13.83 (0.30)	–2.08 (0.20)
	30	12.01 (0.43)	–0.38 (0.19)	–	–	13.00 (0.85)	–0.77 (0.50)	12.84 (0.12)	–0.59 (0.42)	13.27 (0.59)	–1.52 (0.53)
<i>rpoD</i>	0	14.95 (0.19)	–	–	–	14.96 (0.59)	–	14.72 (0.09)	–	14.61 (0.60)	–
	10	14.08 (0.50)	0.87 (0.61)	–	–	14.85 (0.58)	0.11 (0.11)	14.48 (0.13)	0.23 (0.09)	13.67 (0.07)	0.94 (0.54)
	20	14.94 (0.19)	0.01 (0.33)	–	–	15.22 (0.02)	–0.26 (0.59)	15.07 (0.56)	–0.35 (0.47)	15.15 (0.48)	–0.54 (0.14)
	30	15.07 (0.94)	–0.12 (0.82)	–	–	15.70 (0.34)	–0.74 (0.30)	15.08 (0.32)	–0.36 (0.29)	15.39 (0.27)	–0.78 (0.64)
<i>rpoH</i>	0	15.15 (0.23)	–	–	–	15.42 (0.46)	–	15.28 (0.36)	–	15.34 (0.28)	–
	10	14.73 (0.43)	0.42 (0.61)	–	–	14.70 (0.11)	0.75 (0.40)	14.00 (0.37)	1.28 (0.13)	12.95 (0.21)	2.40 (0.11)
	20	14.50 (0.54)	0.65 (0.73)	–	–	14.20 (0.15)	1.56 (0.25)	13.28 (0.12)	2.00 (0.30)	11.86 (0.27)	3.48 (0.07)
	30	13.59 (1.20)	1.56 (1.36)	–	–	13.09 (0.76)	2.33 (0.36)	13.11 (0.39)	2.17 (0.64)	11.50 (0.21)	3.84 (0.16)

表 2-2. 続き

42°C Genes	Wild-type		KTΔ <i>clpB</i>		KTΔ <i>dnaJ</i>		KTΔ <i>algU</i>		R2		
	CT	ΔCT ^c	CT	ΔCT ^c	CT	ΔCT ^c	CT	ΔCT	CT	ΔCT	
<i>clpB</i>	0	18.60 (0.47)	–	17.97 (0.47)	–	17.84 (0.85)	–	18.75 (0.13)	–	16.36 (0.92)	–
	10	11.00 (0.22)	7.60 (0.56)	10.15 (0.57)	7.82 (0.46)	10.35 (0.33)	7.49 (0.53)	10.80 (0.47)	7.95 (0.40)	9.95 (0.48)	6.41 (0.71)
	20	11.70 (0.14)	6.90 (0.60)	10.72 (0.94)	7.25 (0.68)	10.37 (0.53)	7.46 (0.31)	11.36 (0.36)	7.39 (0.25)	10.15 (0.27)	6.21 (0.71)
	30	12.88 (0.11)	5.72 (0.51)	11.49 (0.42)	6.48 (0.14)	10.89 (0.27)	6.95 (0.94)	12.96 (0.55)	5.79 (0.58)	10.34 (0.52)	6.02 (0.43)
<i>dnaK</i>	0	11.91 (0.21)	–	12.04 (0.12)	–	12.18 (0.11)	–	11.94 (0.26)	–	10.26 (0.46)	–
	10	6.76 (0.21)	5.15 (0.30)	6.81 (0.65)	5.23 (0.54)	7.78 (0.11)	4.40 (0.07)	7.21 (0.49)	4.73 (0.31)	6.92 (0.27)	3.34 (0.66)
	20	7.31 (0.29)	4.60 (0.39)	6.91 (0.73)	5.13 (0.61)	7.77 (0.35)	4.41 (0.26)	7.83 (0.40)	4.11 (0.45)	7.17 (0.53)	3.09 (0.76)
	30	8.08 (0.12)	3.82 (0.27)	7.89 (0.61)	4.15 (0.49)	8.40 (0.25)	3.78 (0.37)	8.41 (0.12)	3.53 (0.29)	7.74 (0.89)	2.52 (0.86)
<i>groEL</i>	0	12.88 (0.42)	–	13.08 (0.71)	–	13.56 (0.11)	–	13.21 (0.28)	–	11.63 (0.97)	–
	10	9.28 (0.24)	3.60 (0.60)	9.65 (0.40)	3.43 (0.41)	10.75 (0.20)	2.81 (0.24)	9.96 (0.30)	3.26 (0.09)	9.52 (0.13)	2.12 (0.87)
	20	9.47 (0.42)	3.42 (0.49)	9.27 (0.46)	3.81 (0.46)	10.47 (0.20)	3.09 (0.14)	9.98 (0.64)	3.22 (0.74)	9.74 (0.66)	1.89 (1.39)
	30	9.45 (0.20)	3.43 (0.43)	9.57 (0.44)	3.51 (0.31)	10.39 (0.59)	3.17 (0.48)	10.00 (0.13)	3.21 (0.16)	10.23 (0.26)	1.40 (1.06)
<i>cbpA</i>	0	20.93 (0.25)	–								
	10	12.88 (0.39)	8.04 (0.15)								
	20	13.81 (1.15)	7.12 (1.25)								
	30	14.08 (0.21)	6.85 (0.46)								
<i>rpoH</i>	0	14.50 (0.20)	–	14.94 (0.16)	–	14.94 (0.45)	–	15.33 (0.61)	–	14.73 (1.14)	–
	10	12.06 (0.42)	2.44 (0.35)	12.13 (0.30)	2.81 (0.20)	12.53 (0.34)	2.42 (0.28)	13.19 (0.59)	2.15 (0.68)	12.38 (0.70)	2.35 (0.69)
	20	11.25 (0.24)	3.25 (0.15)	11.60 (0.14)	3.34 (0.17)	12.53 (0.48)	2.42 (0.07)	12.01 (0.37)	3.32 (0.57)	13.35 (0.48)	1.38 (0.71)
	30	10.84 (0.09)	3.66 (0.11)	11.32 (0.35)	3.62 (0.27)	11.82 (0.30)	3.12 (0.17)	11.28 (0.32)	4.05 (0.59)	13.36 (0.64)	1.37 (0.75)
<i>fusA-1</i>	0	11.14 (0.40)	–	11.24 (0.63)	–	11.91 (0.77)	–	11.77 (0.51)	–	12.07 (0.59)	–
	10	11.54 (0.32)	–0.39 (0.18)	11.66 (0.19)	–0.42 (0.46)	12.64 (0.53)	–0.73 (0.60)	12.35 (0.57)	–0.58 (0.54)	13.27 (1.20)	–1.19 (0.62)
	20	12.52 (0.29)	–1.38 (0.46)	12.84 (0.65)	–1.60 (0.31)	13.87 (0.55)	–1.96 (0.36)	12.94 (0.89)	–1.17 (1.06)	14.97 (1.31)	–2.90 (0.82)
	30	12.54 (0.24)	–1.40 (0.16)	13.18 (0.88)	–1.96 (0.66)	13.99 (0.81)	–2.07 (0.31)	13.01 (0.10)	–1.24 (0.60)	16.08 (1.20)	–4.01 (0.87)
<i>rpsA</i>	0	11.39 (0.43)	–	11.35 (0.36)	–	11.95 (0.21)	–	12.11 (0.44)	–	11.76 (0.23)	–
	10	13.79 (0.63)	–2.40 (0.24)	13.73 (0.25)	–2.37 (0.19)	14.57 (0.70)	–2.62 (0.49)	14.18 (0.29)	–2.07 (0.19)	15.38 (1.15)	–3.62 (0.93)
	20	14.01 (0.75)	–2.62 (0.32)	14.07 (0.47)	–2.72 (0.13)	15.04 (0.71)	–3.09 (0.50)	14.44 (0.46)	–2.33 (0.04)	15.61 (0.85)	–3.85 (0.68)
	30	13.41 (0.42)	–2.02 (0.09)	13.80 (0.49)	–2.45 (0.15)	14.64 (0.74)	–2.69 (0.53)	14.22 (0.53)	–2.11 (0.65)	15.97 (0.74)	–4.21 (0.66)
<i>rpoD</i>	0	14.82 (0.30)	–	14.98 (0.33)	–	14.71 (0.25)	–	14.95 (0.60)	–	15.04 (0.41)	–
	10	13.58 (0.58)	1.24 (0.28)	13.02 (0.30)	1.97 (0.06)	13.87 (0.43)	0.84 (0.18)	13.28 (0.40)	1.67 (0.26)	13.37 (0.52)	1.67 (0.38)
	20	14.75 (0.44)	0.08 (0.18)	13.95 (0.64)	1.03 (0.36)	14.55 (0.66)	0.15 (0.58)	14.99 (0.47)	–0.04 (0.22)	14.06 (0.76)	0.98 (0.58)
	30	15.49 (0.51)	–0.67 (0.30)	14.57 (0.74)	0.41 (0.45)	15.16 (0.39)	–0.45 (0.27)	15.28 (0.48)	–0.33 (0.28)	13.75 (0.65)	1.28 (0.90)
<i>rpoH</i>	0	14.50 (0.20)	–	14.94 (0.16)	–	14.94 (0.45)	–	15.33 (0.61)	–	14.73 (1.14)	–
	10	12.06 (0.42)	2.44 (0.35)	12.13 (0.30)	2.81 (0.20)	12.53 (0.34)	2.42 (0.28)	13.19 (0.59)	2.15 (0.68)	12.38 (0.70)	2.35 (0.69)
	20	11.25 (0.24)	3.25 (0.15)	11.60 (0.14)	3.34 (0.17)	12.53 (0.48)	2.42 (0.07)	12.01 (0.37)	3.32 (0.57)	13.35 (0.48)	1.38 (0.71)
	30	10.84 (0.09)	3.66 (0.11)	11.32 (0.35)	3.62 (0.27)	11.82 (0.30)	3.12 (0.17)	11.28 (0.32)	4.05 (0.59)	13.36 (0.64)	1.37 (0.75)

表 2-2. 続き

45°C Genes	Wild-type		KTΔ <i>clpB</i>		KTΔ <i>dnaJ</i>		KTΔ <i>algU</i>		R2		
	CT	ΔCT ^c	CT	ΔCT	CT	ΔCT	CT	ΔCT	CT	ΔCT	
<i>clpB</i>	0	18.70 (0.19)	–	18.36 (0.90)	–	18.03 (0.56)	–	18.44 (0.44)	–	16.46 (1.44)	–
	10	10.11 (0.64)	8.60 (0.76)	10.50 (0.70)	7.86 (0.44)	11.84 (1.21)	6.18 (0.77)	10.96 (0.69)	7.48 (0.50)	10.53 (0.56)	5.93 (1.44)
	20	10.53 (1.20)	8.17 (1.22)	9.88 (0.61)	8.48 (0.47)	11.18 (1.25)	6.85 (0.96)	10.15 (0.58)	8.29 (0.56)	10.51 (0.51)	5.92 (0.93)
	30	11.15 (0.65)	7.55 (0.56)	10.26 (1.07)	8.10 (0.59)	11.61 (0.55)	6.42 (0.18)	10.32 (0.92)	8.12 (0.50)	10.64 (0.22)	5.82 (1.32)
<i>dnaK</i>	0	12.43 (0.80)	–	12.25 (0.65)	–	12.70 (0.10)	–	12.55 (0.43)	–	9.65 (0.37)	–
	10	7.23 (0.57)	5.16 (0.60)	7.23 (0.47)	5.02 (0.27)	8.45 (0.54)	4.25 (0.45)	7.59 (0.10)	4.96 (0.39)	6.53 (0.08)	3.13 (0.32)
	20	7.17 (0.40)	5.25 (0.52)	7.44 (0.69)	4.81 (0.12)	8.53 (0.30)	4.17 (0.39)	7.76 (0.10)	4.79 (0.52)	6.53 (0.05)	3.13 (0.41)
	30	7.47 (0.09)	4.96 (0.74)	7.79 (0.81)	4.46 (0.58)	8.95 (0.15)	3.75 (0.23)	8.39 (0.49)	4.16 (0.61)	6.93 (0.67)	2.72 (0.99)
<i>groEL</i>	0	13.12 (0.70)	–	13.63 (1.01)	–	14.23 (0.44)	–	13.89 (0.32)	–	11.16 (0.63)	–
	10	10.08 (0.52)	3.04 (0.19)	10.17 (0.40)	3.12 (0.46)	12.04 (0.21)	2.20 (0.22)	10.70 (0.53)	3.19 (0.26)	9.64 (0.44)	1.53 (0.27)
	20	10.32 (0.64)	2.80 (0.10)	10.47 (0.49)	3.17 (0.57)	11.93 (0.12)	2.63 (0.33)	10.83 (0.21)	3.06 (0.16)	9.88 (0.21)	1.27 (0.77)
	30	10.74 (0.17)	2.38 (0.53)	11.65 (0.46)	1.97 (0.56)	11.77 (0.74)	2.46 (0.78)	11.24 (0.55)	2.78 (0.41)	10.60 (0.77)	0.56 (0.18)
<i>cbpA</i>	0	20.29 (0.99)	–								
	10	12.51 (1.32)	7.78 (0.39)								
	20	12.15 (0.51)	8.14 (0.53)								
	30	11.99 (1.17)	8.30 (0.39)								
<i>htpG</i>	0	13.31 (0.60)	–	13.10 (0.73)	–	13.24 (0.04)	–	13.22 (0.30)	–	10.76 (0.23)	–
	10	9.01 (0.22)	4.30 (0.45)	8.79 (0.44)	4.31 (0.29)	9.54 (0.27)	3.70 (0.24)	8.91 (0.18)	4.32 (0.12)	8.39 (0.41)	2.16 (0.58)
	20	9.08 (0.52)	4.16 (0.21)	8.92 (0.63)	4.18 (0.39)	9.55 (0.33)	3.68 (0.32)	9.08 (0.26)	4.14 (0.50)	8.46 (0.33)	2.08 (0.44)
	30	9.53 (0.92)	3.78 (0.84)	9.05 (0.67)	4.04 (0.06)	9.93 (0.53)	3.31 (0.51)	9.52 (0.18)	3.70 (0.34)	8.77 (0.19)	1.77 (0.40)
<i>fusA-1</i>	0	11.33 (0.14)	–	11.90 (1.14)	–	12.32 (0.38)	–	12.43 (0.52)	–	11.82 (0.12)	–
	10	12.43 (0.40)	-1.11 (0.49)	12.15 (0.75)	-0.25 (0.50)	13.43 (0.52)	-1.12 (0.70)	13.44 (0.14)	-1.01 (0.40)	13.16 (0.59)	-1.27 (0.40)
	20	13.96 (0.23)	-2.63 (0.36)	13.93 (0.92)	-2.03 (0.41)	15.09 (0.42)	-2.77 (0.30)	14.98 (0.12)	-2.55 (0.60)	15.01 (0.62)	-3.19 (0.52)
	30	14.32 (0.56)	-2.99 (0.64)	14.54 (1.10)	-2.64 (0.45)	15.38 (0.43)	-3.07 (0.30)	15.23 (0.44)	-2.80 (0.90)	16.48 (0.33)	-4.66 (0.21)
<i>rpsA</i>	0	11.01 (0.17)	–	11.24 (0.47)	–	12.38 (0.33)	–	12.02 (0.16)	–	11.57 (0.38)	–
	10	14.45 (0.35)	-3.44 (0.23)	15.06 (0.73)	-3.82 (0.35)	15.73 (0.20)	-3.36 (0.18)	15.94 (0.06)	-3.92 (0.23)	15.99 (0.71)	-4.41 (0.54)
	20	14.71 (0.44)	-3.70 (0.41)	15.77 (0.73)	-4.53 (0.38)	16.16 (0.15)	-3.77 (0.18)	16.92 (0.56)	-4.90 (0.53)	16.80 (0.53)	-5.23 (0.50)
	30	15.54 (0.81)	-4.53 (0.66)	16.26 (0.93)	-4.68 (0.79)	16.48 (0.29)	-4.10 (0.21)	17.12 (0.28)	-5.11 (0.29)	17.08 (0.44)	-5.52 (0.33)
<i>rpoD</i>	0	15.02 (0.22)	–	14.81 (0.47)	–	14.89 (0.27)	–	14.71 (0.26)	–	15.19 (0.17)	–
	10	13.27 (0.37)	1.74 (0.17)	13.26 (0.55)	1.55 (0.32)	14.50 (0.85)	0.38 (0.58)	13.10 (0.44)	1.61 (0.20)	13.20 (0.62)	1.99 (0.52)
	20	14.26 (0.32)	0.76 (0.11)	14.02 (0.61)	0.79 (0.14)	15.26 (0.23)	-0.37 (0.16)	14.05 (0.00)	0.66 (0.26)	14.28 (0.84)	0.91 (0.74)
	30	14.75 (0.55)	0.26 (0.37)	14.79 (0.51)	0.02 (0.05)	15.37 (0.50)	-0.49 (0.39)	14.78 (0.50)	-0.07 (0.40)	14.61 (0.19)	0.58 (0.36)
<i>rpoH</i>	0	14.44 (0.17)	–	14.81 (0.90)	–	15.30 (0.58)	–	15.44 (0.43)	–	14.28 (0.43)	–
	10	11.26 (0.54)	3.18 (0.52)	11.71 (0.90)	3.09 (0.31)	12.47 (0.42)	2.87 (0.16)	13.35 (0.33)	2.09 (0.44)	11.15 (0.43)	3.13 (0.44)
	20	11.02 (0.08)	3.39 (0.25)	11.48 (0.60)	3.32 (0.48)	11.76 (0.24)	3.54 (0.34)	15.30 (0.35)	0.14 (0.40)	10.15 (0.37)	4.13 (0.54)
	30	11.33 (0.28)	3.11 (0.33)	11.80 (0.31)	3.01 (0.81)	11.84 (0.42)	3.45 (0.19)	16.02 (0.52)	-0.48 (0.52)	9.73 (0.69)	4.56 (0.89)

表 2-2. 続き

Genes	Wild-type 42°C		Wild-type 45°C		
	CT	ΔCT^c	CT	ΔCT^c	
<i>rplB</i>	0	9.81 (0.12)	–	9.72 (0.09)	–
	10	10.50 (0.20)	–0.69 (0.26)	11.76 (0.40)	–2.04 (0.45)
	20	10.95 (0.15)	–1.14 (0.13)	13.90 (0.40)	–3.85 (0.30)
	30	10.96 (0.15)	–1.16 (0.14)	14.64 (1.15)	–4.63 (0.64)
<i>rpsE</i>	0	12.90 (0.42)	–	12.70 (0.65)	–
	10	13.12 (0.19)	–0.22 (0.16)	13.99 (0.24)	–1.29 (0.54)
	20	13.28 (0.19)	–0.38 (0.12)	16.20 (0.76)	–3.50 (1.18)
	30	13.13 (0.67)	–0.24 (0.50)	17.61 (0.64)	–4.91 (0.67)
<i>dnaJ</i>	0	16.99 (0.71)	–	16.53 (1.06)	–
	10	13.79 (0.79)	3.20 (0.46)	12.84 (0.54)	3.69 (0.68)
	20	14.95 (0.22)	2.04 (0.63)	13.72 (0.50)	2.81 (0.65)
	30	15.44 (0.47)	1.55 (1.01)	13.74 (0.55)	2.79 (0.42)
<i>lon-1</i>	0	19.03 (0.31)	–	18.28 (0.61)	–
	10	15.19 (0.51)	3.85 (0.59)	16.68 (0.36)	1.61 (0.70)
	20	16.51 (0.58)	2.53 (0.27)	17.13 (0.47)	1.16 (0.62)
	30	16.70 (0.47)	2.33 (0.46)	16.39 (0.26)	1.89 (1.00)
<i>hfq</i>	0	16.66 (0.10)	–	16.04 (0.04)	–
	10	14.07 (0.66)	2.59 (0.61)	12.33 (0.25)	3.71 (0.68)
	20	15.00 (0.75)	1.60 (0.65)	13.05 (0.37)	2.98 (0.41)
	30	15.88 (0.67)	0.78 (0.57)	13.06 (0.09)	2.98 (0.06)
<i>secA</i>	0	16.41 (0.26)	–	14.99 (0.37)	–
	10	15.61 (0.51)	0.80 (0.25)	14.20 (0.35)	0.78 (0.56)
	20	17.02 (0.19)	–0.61 (0.40)	15.03 (0.57)	–0.04 (0.69)
	30	16.79 (0.80)	–0.38 (0.70)	15.49 (0.44)	–0.50 (0.80)

数値は基準蛍光強度に達したサイクル数であり、3回の平均値を示した。()内はSDを示す。

$^c\Delta\text{CT}$: CT value (before treatment) – CT value (treated)

配列 (CTTGAA-n₁₃₋₁₇-CCCCATnT) を探索した。条件として、コンセンサス配列からの置換は最大 3 ヶ所とし、-35 配列と -10 配列の長さについてのバイアスは考慮しなかった。解析の結果、 σ^{32} 依存性遺伝子の候補として、図 2-5 に示したものが検出された。なお、候補と考えられる配列は、遺伝子内には存在しなかった。図に示したように、すでに σ^{32} に依存する遺伝子として同定されている *clpB*、*dnaK*、*groES*、*grpE*、*hslV*、*htpG*、*lon-1*、*rpoD* のほかに、J-ドメインタンパク質である *cbpA*、host factor-I をコードする *hfq* (PP_4894)、タンパク質輸送に関わる SecA をコードする *secA* (PP_1345) が、 σ^{32} の認識する配列をもつ可能性が示された (図 2-5)。

E. coli の CbpA は DnaK のコシャペロンの機能をもつ J-ドメインタンパク質であるが (Hennessy *et al.*, 2005)、CbpA の発現は定常期特異的シグマ因子である σ^S によって制御され、定常期、もしくはリンが欠乏した場合に発現が誘導され、熱による誘導は起きないことが報告されている (Yamashino *et al.*, 1994)。*P. putida* においては、対数増殖期の *cbpA* の mRNA 量は、他の *Hsp* 遺伝子よりもかなり少なく、*clpB* よりもなお少なかった。一方、培養温度を高くシフトした場合には、*cbpA* の mRNA 量は熱処理前と比べて 2 オーダーほど上昇し、熱ショック誘導が起きることが明らかとなった (図 2-3、表 2-2)。また結果は示していないが、*cbpA* は *rpoS* 欠損株においても、熱処理時に誘導されることが確認された。

第 3 節 考察

この章では、*P. putida* の転写レベルおよび翻訳レベルにおける熱ショック応答についての解析を行った。*P. putida* においては、熱ショック応答を制御するシグマ因子である σ^{32} の活性および量的制御に、*E. coli* と同様なシステムが関わっていることが明らかとなった。しかしながら、*P. putida* と *E. coli* では、熱ショック応答の過程のすべてのシステムについて、同じ機構あるいは調節を受けているのではないことも明らかとなった。

E. coli では、熱ショック応答を制御する σ^{32} 量および活性は、DnaK/DnaJ/GrpE

Identified	-35	-10	Possible SD	Initiation codon
<i>cbpA</i>	CCAAGTCGGT CTTGAA AGGCTATGCTTGAC CCCTATCT TCAGTTGCAA-----CATGCACATTCACATTGGT			GATCCATAA ATG
<i>clpB</i>	CCCCGCTAAG CTTGAA TCTTCCAGAATCAG CCTTATCT ATAAAGTCAT (42bp)		TCCGACCTGCCCTTTAAAGGAAGGTACACC	ATG
<i>dnaK</i>	AATGAAAAGG CTTGAA ATCCTTCGGGGCAT CCCATCT AGGTGTCAAG (38bp)		CTACCAAATTCAGTTTCGGGAGAGTTAAC	ATG
<i>groES</i>	TATCTCGAGC CTTGTA ATCGGATGTGGCGG CCTCATGT ATGTGGTCAC (108bp)		ATGAAAACCACAATTTGGGAGAGATCGACA	ATG
<i>grpE</i>	TACCTTGCC CTTGAA CCTGGTTTTTCCGG CCCATAT AGCCGACATC (18bp)		CAGTCCACAAAATTGCGCAGGAGAGACCC	ATG
<i>hfq</i>	TGTCCCGCAC CTTGAA ATACCTTGGGGCCAT CTCCATAT TGAGCTGAG (63bp)		CTATTATTTATCCTTACAGGAGTGCGGCAT	ATG
<i>hslV</i>	ATCCCCCG GTTGAA ATCCTTCCCCCAC CCCATAT GAGTCTGCAT-CAGGC		ACTTTGCCCCGCTGCGTGGAGACTCTCCC	TTG
<i>htpG</i>	CGGAAAAGCC CTTGAA ATCATCCGGGCAGC CCCATCT GCATGACATC (35bp)		CAACGCCATCAGATCGGAGTTTCGAAGACC	ATG
<i>ibpA</i>	CTATTTATC CTTGAA AGCATTTCCTCGG CCATATCT TTTGAGTACG (22bp)		AATGACTTACTTGCTGAATCTCAGGAGTTT	ATG
<i>lon-1</i>	CTCCGAACC ATTGAA ACCCATCCCTCCCG CCCATCT AAGCACCAT-----AGTC		ATTACGCAGGTGCCCC	ATG
<i>rpoD</i>	GGCCGACAAC CTTGAA CAACAGTTTTTCGAC ACTATAA CTAGCTTGTC (178bp)		GCCCGCCAAGACCTTCGTGGATAGGGTGT	ATG
Unidentified				
<i>secA</i>	GTTGCCAAGC CTTGAA CTCAGTGAAAATGC CCCTATCT AAAACAGGCC (36bp)		CCACTTTCCTCACCATCGTTTCCGGGTAGA	ATG

図 2-5. 推定される σ^{32} の認識配列をもつ *Pseudomonas putida* 遺伝子のプロモーター配列
 -35 領域と -10 領域は赤色で、開始コドン (Initiation codon) は青色で示した。

からなり、細胞内タンパク質の品質管理を行う中心的なシャペロンである DnaK シャペロンチームにより制御されている (Gamer *et al.*, 1996; Calloni *et al.*, 2012)。 *P. putida* の *dnaK* 変異株である R2 株は、定常期において Hsp が蓄積することから、 *E. coli* と同様に、 *P. putida* においても DnaK 分子シャペロンは σ^{32} の量を制御すると考えられる (Kobayashi *et al.*, 2011)。 *E. coli* においては、DnaK システムもしくは、GroEL/GroES のシステムの欠如は、同様に Hsp の蓄積を引き起こすことが知られている (Tomoyasu *et al.*, 1998; Guisbert *et al.*, 2008)。しかし、 *P. putida* の *dnaJ* 欠損株では、R2 株と同様な Hsp の蓄積は起こらなかった。我々は、 *P. putida* においては、CbpA が DnaJ に代わる熱ショック応答の制御のための J-ドメインタンパク質として働いているためであると推察している。 *P. putida* の CbpA と *E. coli* の CbpA とは、アミノ酸配列における高い相同性 (67%) をもっており、共通の機能を有するものと推測できる。一方、 *P. putida* の CbpA は、 *P. putida* の DnaJ と同様にアミノ酸配列における相同性が高く、特に J-ドメイン領域のヘリックス II とヘリックス III が高い類似性を示している (図 1-5)。 *P. putida* において DnaJ が欠除した場合、 σ^{32} の制御が不全となり、Hsp 遺伝子の一時的な高発現を引き起こすことが想定される。このとき、 *P. putida* の *cbpA* が、 *E. coli* と同様に σ^S によって制御されているのであれば、熱ショック時に誘導がかからず、CbpA レベルは低いままであり、 σ^{32} への DnaK システムによる負の制御が起こらないと考えられる。しかし、本研究において明らかになったように、 *P. putida* の *cbpA* は σ^{32} によって制御されており、その mRNA 量は熱ショックにより増加し、CbpA が誘導される。 *P. putida* の CbpA は、おそらく DnaJ と基質タンパク質を共有しており、 σ^{32} と結合することで RNA ポリメラーゼから σ^{32} を隔離し、熱ショック応答を調節し Hsp 遺伝子の発現を抑制すると考えられる。実際に、 *dnaJ* 欠損株の Hsp 遺伝子の mRNA レベルは、他の株の発現量とは大きく異なっていなかった (表 2-2)。 *dnaJ* 欠損株においては、他の株に比較すると、より多くの σ^{32} 、DnaK、および GroEL が存在すること示されている。このことは、FtsH による σ^{32} の分解の過程において、CbpA は DnaJ よりもその寄与が低い、もしくは、 σ^{32} の制御においては、DnaJ が特有の機能を有している可能性が考え

られる。

E. coli において、熱ショックシグマ因子である σ^{32} の結合した RNA ポリメラーゼが認識するプロモーターの多くが、主要シグマ因子である σ^{70} の結合した RNA ポリメラーゼにより転写され、転写開始点も同じであることが報告されている (Wade *et al.*, 2006)。図 2-4 に示したように、*P. putida* の *rpoD* の発現量は熱ショックにより一時的に増加するが、継続的に高い温度に曝された場合には徐々に減少した。Hsp には明らかに 2 つのグループがあり、通常の生育条件においても多く発現している DnaK、GroEL および HtpG と、熱ショック時に強く誘導される ClpB、CbpA、Lon-1、HslU などである。次の章で述べるように、 σ^{70} は高温で凝集する傾向が高く、転写レベルとタンパク質の安定性の面から、高温では通常の生育条件で必要とされる分子シャペロンの遺伝子と、熱ショック時に誘導される分子シャペロンおよび ATP 依存性プロテアーゼ遺伝子が、 σ^{32} が結合した RNA ポリメラーゼによって転写されるものと考えられる。

本研究により、環境温度を 30°C から 33°C に変化させた場合に、熱ショック応答により σ^{32} が誘導されるが、33°C では σ^{32} は非常に不安定であり、また *Hsp* 遺伝子の mRNA の中で、少なくとも *clpB*、*dnaK*、*htpG*、および *cbpA* の mRNA は、温度シフト 10 分後に比べて、20 分後の量が著しく減少していたことから、速やかに分解されることが明らかとなった。さらに、30 分後には、これらの遺伝子の mRNA 量が再び増加していたことから、 σ^{32} の量や遺伝子の発現量において微細な調節が行われていることを明確に示しているものと考えられる。一方、*groEL* の mRNA についてはこのような増減が見られなかった。栄養細胞において、通常必要とされるハウスキーピング遺伝子である *fusA-1* や *rpsA* の mRNA 量において、*dnaK* などで見られた急激な減少が見られなかったことは、特異的な遺伝子産物の分解が起きていることを、強く示唆するものと考えられる。比較的低い温度での熱ショック時において、経時的に mRNA 量が急激に上下したものは、*groES/groEL* の mRNA と比べて、mRNA の 5'非翻訳領域が短いことが共通している。細胞内での RNA の分解には数種の RNase が関わり、その立体構造が半減期に大きく影響することが知られており (Mackie, 2013)、*Hsp* 遺伝子の

mRNA についても、5'非翻訳領域を短くすることで半減期の調節を行っていることが推測できる。

2-2 *Pseudomonas putida* の CbpA の熱による誘導

2-1において、*P. putida cbpA* 遺伝子上流領域に、 σ^{32} の認識する塩基配列が存在し、その mRNA 量が熱処理によりが増大することが見出された。これにより、*cbpA* の発現は、 σ^{32} により制御されている可能性が高いことが示唆された。*E. coli* の *cbpA* は、 σ^S により制御を受けることから、*P. putida* とはその調節機構が異なることが示された。これまでに得られた結果は、*P. putida* の CbpA は、*E. coli* のものとは発現調節、ならびに機能が異なる可能性を示唆するものと考えられるが、この見解は、熱処理時の mRNA のレベルの増減により導いたもので、CbpA タンパク質が Hsp であるか否かについては、CbpA を実際に検出する必要がある。このため、*P. putida* の CbpA を *E. coli* において高発現させた後に精製し、その抗体を作製することで CbpA の免疫学的検出を試みた。

第1節 実験方法

1) 使用菌株、プラスミド、プライマー

使用した菌株、プラスミド、プライマーを表 2-3 に示した。

表 2-3. 使用した菌株・プラスミドおよびプライマー

菌株	特徴	文献あるいは供給元
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2442 (KT 株)	<i>hsdR</i> Rif ^R	Franklin <i>et al.</i> , 1981
KT Δ <i>cbpA</i> 株	CbpA ⁻ derivative of KT2442, Km ^R	
KT Δ <i>rpoS</i> 株	RpoS ⁻ derivative of KT2442, Km ^R	Hishinuma <i>et al.</i> , 2006
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α 株	Δ (<i>lacZ</i>)M15	Gibco BRL
BL21(DE3)株	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen

プラスミド	特徴	文献あるいは供給元
pET-30b (+)	Expression vector, T7lac, Km ^R	Novagen
pET30-cbpA-His	pET-30b (+) with <i>P. putida cbpA</i> (from +1 to +930)	
pET30-cbpA	pET-30b (+) with <i>P. putida cbpA</i> (from +1 to +975)	
プライマー	配列 (5'→3')	
cbpA F-13Nde	TGGTGATCCACATATGGACTTCA	
cbpA R+944Sal	GTCCTCGGGTTCGACCGCAGCTTTC	
cbpA R+990Bam	CCAGTTGAAGGATCCGGGTGCTGC	
Ec cbpA F-181	CACCCTTTTTACCTGTTTA	
Ec cbpA R+30	CATGATGGCGTAATAATCCT	
Ec fis F-289	CGGGAAATCCAGCATTATCT	
Ec fis R+17	ACGCGTTGTTTCGAACATAGT	

R, resistance; Rif, rifampicin; Km, kanamycin.

2) 培地および培養条件

第1章、1-1の第1節に記載した培地をもちいて培養した。

3) CbpA 発現用プラスミドの構築と *E. coli* を用いた発現

① His タグ付 CbpA 発現プラスミドの構築と His タグ付 CbpA の精製

表 2-3 に記載したプライマー-cbpA F-13Nde および cbpA R+944Sal を用いて、KT 株のゲノム DNA から PCR により対象となる DNA 配列を増幅した。増幅された DNA 断片を *Nde*I と *Sal*I で処理し、*Nde*I と *Sal*I で処理した pET-30b (+) と連結して、*E. coli* DH5α に導入した。目的の挿入配列を含むプラスミドを *E. coli* DH5α から調製し、このプラスミドを発現用プラスミド pET30-cbpA-His とした。この pET30-cbpA-His を *E. coli* BL21 (DE3) に導入し、Novagen 社のプロトコールに従って、His タグ付 CbpA の誘導を以下のように行った。まず、Km (50μg/ml) を含む LB 液体培地 2ml に、目的のプラスミドを含む *E. coli* BL21 (DE3) のコロニーを植菌し、37°C、160 往復/分で前培養を行った。翌日、500ml のバッフル

付き三角フラスコに同組成の Km を含む 100ml の LB 液体培地に前培養液を 0.2%分植菌した。37°Cで 200 r.p.m. で OD₆₀₀ (濁度) が 0.6 になるまで培養し、その時に IPTG を 0.4mM IPTG となるように加えて、37°Cで再度振とう培養した。IPTG の添加前と添加 3 時間後に菌体を回収し、SDS-PAGE により、細胞内の全タンパク質を検出して CbpA の誘導を確認した。誘導が確認できた菌体をレンチプレス (800 psi) により、細胞を破砕した。破砕液を 30,000 r.p.m.、4°Cで 1 時間超遠心し、可溶性画分と不溶性画分に分離した。この可溶性画分を HisTrap HP カラム (GE ヘルスケアバイオサイエンス) に通すことで、His タグ付 CbpA を一時的に結合させた後、0.5M イミダゾールを含む Tris-Cl (pH7.5) バッファーで溶出した。His タグ付 CbpA を含む溶液を 50mM Tris-Cl (pH 8.8)で透析もしくは限外濾過により脱塩し、100mM Tris-Cl (pH8.8)で平衡化した HiTrap DEAE FF カラム (GE ヘルスケアバイオサイエンス) に通したパスサンプルを回収することで、精製 His タグ付 CbpA を得た。

②CbpA 発現用プラスミドの構築と *E. coli* を用いた発現

表 2-3 に記載したプライマー-cbpA F-13Nde および cbpA R+990Bam を用いて、KT 株のゲノム DNA から PCR により、DNA 配列を増幅した。増幅された DNA 断片を *Nde*I と *Bam*HI で処理し、*Nde*I と *Bam*HI で処理した pET-30b (+)と連結して、*E. coli* DH5 α に導入した。目的の挿入配列を含むプラスミドを *E. coli* DH5 α から調製し、このプラスミドを発現用プラスミド pET30-cbpA とした。この pET30-cbpA を *E. coli* BL21 (DE3)に導入し、His タグ付 CbpA の誘導と同様の方法で CbpA を誘導した。

4) ウエスタンブロッティングによる *P. putida* CbpA の検出

細胞全タンパク質の分離は、前述の SDS-PAGE により行った。*P. putida* の抗 CbpA 血清は、*E. coli* から精製した His タグ付 *P. putida* CbpA をウサギに免疫することにより作製した。なお、抗血清の作製は T. K. craft 社に依頼した。作製された抗血清 (一次抗体) を、30,000 倍希釈してタンパク質と反応させ、WesternSure

HRP Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) を 10,000 倍希釈したものを、二次抗体として用いた。また、基質は WesternSure PREMIUM Chemiluminescent Substrate を使用した。免疫学的検出は、第 1 章に記載した方法で行い、シグナルの検出には、C-Digit ブロットスキャナー (LI-COR 社製) を使用した。

第 2 節 実験結果と考察

1) *P. putida* CbpA の *E. coli* における発現と *P. putida* での検出

E. coli BL21(DE3)株と発現ベクター pET システムを用いて、His タグ付および通常の *P. putida* CbpA の発現を試みた。それぞれの CbpA をコードするプラスミドを *E. coli* BL21(DE3)株へ導入し、対数増殖期に IPTG により誘導し、3 時間経過後に菌体を回収し、細胞内全タンパク質を SDS-PAGE により検出した。

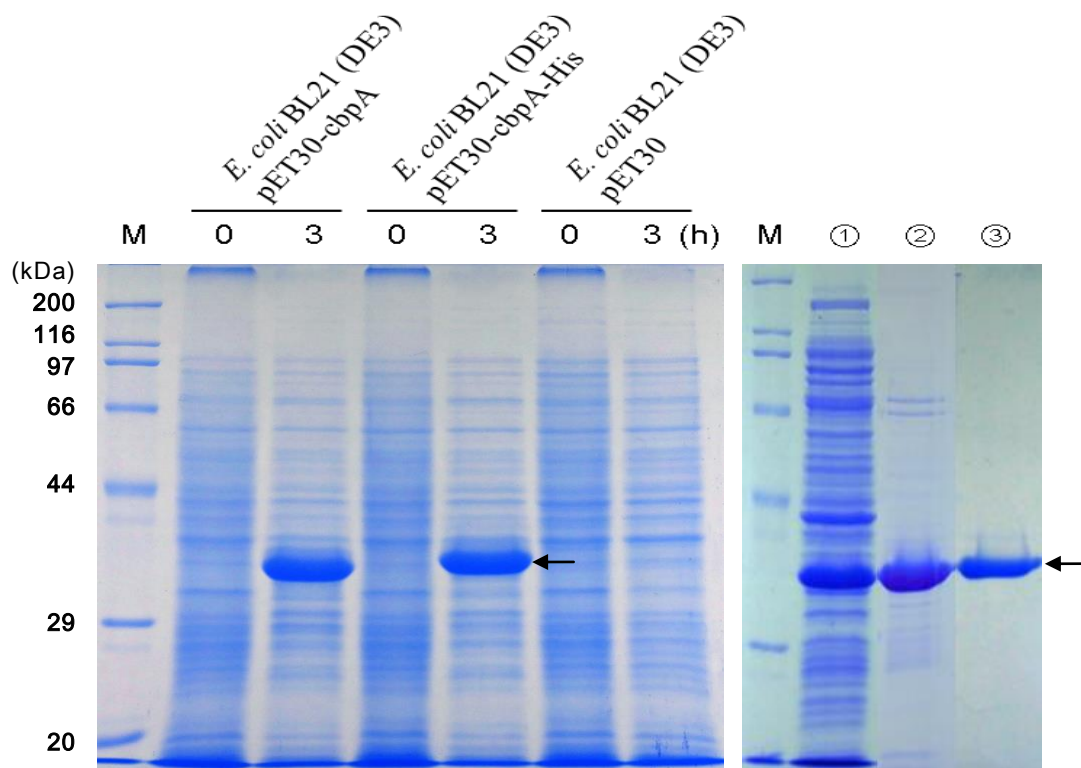


図 2-6. *Pseudomonas putida* CbpA の *Escherichia coli* BL21(DE3)株における発現
IPTG 誘導前 (0) と誘導後 3 時間後 (3) の細胞内全タンパク質を泳動した。
His タグ付 CbpA の精製過程を、右側のパネルに示した。①プレチプレス後
(可溶性画分)、②Ni⁺カラム精製画分、③DEAE カラムパス画分
黒矢印は His タグ付き CbpA の位置を示す。

図 2-6 に示したように、His タグ付の CbpA、および通常の CbpA の強い誘導が観察された。His タグ融合 CbpA を回収するために、CbpA の発現を行った *E. coli* BL21(DE3)の菌体を、プレチプレスを用いて破碎し、超遠心分離により可溶性画分を分離した。この可溶性タンパク質画分を SDS-PAGE により泳動したところ、CbpA と思われるタンパク質（以下 CbpA）バンドが観察され、組換えタンパク質は可溶性画分に多く含まれることが確認された。その後、CbpA を Ni²⁺カラムにより回収し、DEAE カラムに通すことで精製した（図 2-6）。この精製した His タグ融合 CbpA を抗原として抗体を作製した。

作製された抗 CbpA 抗体を使用し、ウエスタンブロッティングにより、CbpA を検出した（図 2-7）。KT 株、 σ^S (σ^{38}) をコードする *rpoS* の欠損株 (KT Δ *rpoS* 株)、および KT Δ *cbpA* 株において CbpA のシグナルを検出した結果、KT Δ *cbpA* 株ではシグナルが観察されず、KT 株で観察できた約 35kDa のシグナルが、CbpA であるものと考えられた。また、42°C で熱処理を行うと、KT 株においては処理前に比べて有意に CbpA のシグナルの強さが高くなったため、CbpA は Hsp であることが確認できた。また、KT Δ *rpoS* 株においても、同様に時間の経過とともに CbpA の増加が確認されたため、*rpoS* は CbpA の熱誘導には必須ではないことが明らかとなった。

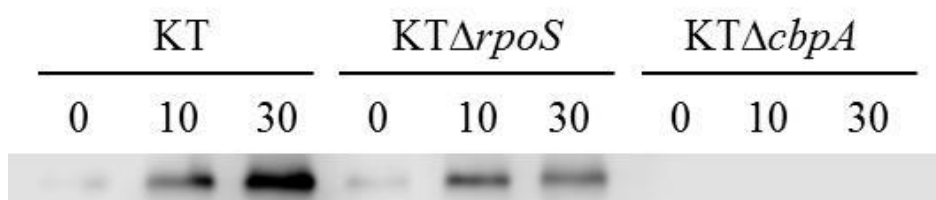


図 2-7. ウエスタンブロッティングによる CbpA の検出
数字は 42°C で処理後に菌体を回収した時間（分）。

本研究により、*P. putida* の CbpA はストレスにより誘導される熱ショックタンパク質であることが明らかにされた。*E. coli* とは異なる調節を受けることは、

両者の CbpA は違う機能を持つ可能性を示唆するものとする。腸内細菌である *E. coli* は、ヒト体内に存在している場合には、環境温度は一定の条件であるとともに、エネルギー代謝や生合成に必要な栄養源が、土壌環境と比べ獲得しやすい。しかし、土壌細菌である *P. putida* は、通常は貧栄養の環境で生育し、その温度も一定ではないため、細胞が受けるストレスの種類や頻度も多い環境で生存するものと思われる。第1章で記したように、*dnaJ* の欠損は生育速度を大きく低下させ、特に高い温度における生育について影響が顕著であった。DnaJ は通常の生育において、DnaK シャペロンシステム内で機能する中心的な J-ドメインタンパク質であり、細胞内に一定量存在する必要がある。一方、*cbpA* の欠損は見かけ上、生育に関して影響を及ぼさないことが示された。*P. putida* においては、生命の維持や細胞の成長については、DnaK のコシャペロンとして DnaJ が機能するが、細胞に必要なタンパク質の変性を引き起こすようなストレス条件下においては、変性タンパク質の凝集防止や凝集体の再生を、DnaJ だけでは効率的に行うことができないために、CbpA がその役割を補助していると思われる。マイクロアレイやリアルタイム PCR による解析から、通常培養条件時には、*dnaJ* の発現は *cbpA* よりも顕著に高いことが分かっている。これらの遺伝子は、いずれも σ^{32} により発現制御されているにもかかわらず、発現量が大きく異なることは、細胞内での機能を反映しているものと考えられる。また、*cbpA* の発現量が低く保たれていることは、*dnaJ* のものとは異なる調節因子が存在するものと考えられる。

E. coli では、CbpM と呼ばれるモジュレーターが CbpA に結合して、コシャペロンとしての活性を負に制御している (Chenoweth *et al.*, 2007)。*P. putida* においても、ゲノムに *cbpM* が *cbpA* に隣接して存在しており、同様な機構により CbpA の活性を調節しているものと推察される。*E. coli* では、J-ドメインタンパク質である DnaJ、DjlA の高発現は、生育を阻害することが報告されている (Genevaux *et al.*, 2007)。DnaJ や CbpA は、細胞質において DnaK へ基質タンパク質を提供する働きをもつコシャペロンであり、基質タンパク質と結合するために、細胞内で高発現することによって、より頻繁に基質タンパク質との結合と解離を繰

り返すことで、タンパク質の正しい立体構造の形成の妨げとなると考えられる。*P. putida* において、*dnaJ* と *cbpA* の二重変異株の作製を試みていないが、二重変異株はさらなる生育温度範囲の制限や生育速度の低下、ストレスに対する影響が著しく現れることが予想される。以上のように、*P. putida* は *dnaJ* が機能できないときに備えて、ストレスによる影響を緩和させるために、部分的に共通した機能をもつ他の J-ドメインタンパク質を持ったものと考えられ、*P. putida* は CbpA を DnaJ に置き換えられる J-ドメインタンパク質として、独自に進化させてきたと考えられる。また *P. putida* において、J-ドメインタンパク質が、ある程度過剰に存在する場合には、熱ストレスにより生じる凝集タンパク質の生成を緩和させることが明らかとなった。これらの知見から、産業的に *P. putida* を利用する場合、DnaJ や CbpA を高発現させることで、ストレスに強い菌株が作製され、ストレス環境条件下でも安定した物質変換や環境浄化が可能になると考えられる。

第3章 *Pseudomonas putida* におけるタンパク質の熱凝集と再生

緒言

Pseudomonas putida KT2442 株 (KT 株) のトルエン耐性株である *P. putida* KT2442-R2 株 (R2 株) は、分子シャペロンとして機能する DnaK をコードする遺伝子 (*dnaK*) に点変異をもつ。分子シャペロン DnaK は、真核細胞の Hsp70 のホモログであり、タンパク質の正しい立体構造への折りたたみを介助する役割をもつことが知られている。R2 株の *dnaK* の変異部位は、DnaK と基質との結合の安定化に関わる部分に挿入されており、R2 株では正常な機能をもつ DnaK が生産されず、タンパク質の折りたたみや凝集したタンパク質の再生が正常に行われないうえに、野生株と比べて温度感受性が高く、35°C以上の温度ではコロニーを形成できないものと思われる。また R2 株は、通常の培養条件温度である 30°Cで培養すると、KT 株と比較して定常期以降に Hsp を高発現し、細胞内に蓄積する特徴を持つ。これも、正常な DnaK が生産されていないことから、細胞内に誤った立体構造をもつタンパク質が増加し、これらが DnaK システムと相互作用することにより、あるいは DnaK が σ^{32} と正しい相互作用ができないために、Hsp 遺伝子の発現を制御している σ^{32} が安定化し、分子シャペロンや ATP 依存性プロテアーゼが高発現するものと考えられている (Kobayashi *et al.*, 2011)。

第1章で述べたように、R2 株は LB 液体培地において長期間培養することによって、コロニー形成能および増殖能が消失することが分かっている。R2 株では、正常な機能を持つ DnaK が生産されていないことから、ストレスなどにより細胞内で生じた変性タンパク質の分解、あるいは再生機構が正常に機能しないことで凝集体が蓄積し、長期の培養によるコロニー形成能の消失、あるいは細胞死が起こるものと考えられる。KT 株や R2 株の各種変異株において、変性タンパク質の蓄積により生じた凝集体を解析することで、DnaK の機能および微生物における細胞死についての知見が得られると考えられた。そこで第1章で作製した各種菌株を、より高い温度に曝すことにより、細胞内に蓄積する凝集タンパク質 (不溶性タンパク質) の検出と同定を試みた。

第1節 実験方法

1) 使用菌株およびプラスミド

第1章に記載した菌株およびプラスミドを使用した。

2) 不溶性タンパク質の調製

第1章に記載した方法で行った。タンパク質量の定量は、ウシγグロブリンを標準タンパク質として、Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を用いて行った。またタンパク質の同定は、第2章に記載した方法により PMF 法により行った。

第2節 実験結果

1) 細胞質タンパク質の熱凝集と再生

P. putida において生じる不溶性（凝集）タンパク質の検出と、その脱凝集についての解析を行った。通常の培養条件において、不溶性タンパク質画分に含まれる *P. putida* の主要細胞壁タンパク質、および 30°C から 45°C の間の温度で熱処理することで形成される不溶性（凝集）タンパク質の解析結果を、図 3-1、表 3-1 および表 3-2 に示した。

① *P. putida* の細胞壁タンパク質

PMF 法による同定の結果、熱処理を行わない細胞に存在する不溶性タンパク質として、表 3-1 に示したように Porin D、OprF、OmpA などの外膜タンパク質が同定され、これらが *P. putida* の細胞壁の主要タンパク質であることが確認された。

② 熱処理により不溶性タンパク質は増加する

O/N 培養した KT 株を様々な温度（30-45°C）で 30 分間処理し、凝集タンパク質として細胞の不溶性タンパク質を調製し、SDS-PAGE により不溶性タンパク質を検出した（図 3-1）。30°C で培養した際の不溶性タンパク質と比較して、37°C

表 3-1. *Pseudomonas putida* の主要細胞壁タンパク質

	Gene	Size (kDa)	Protein
1	PP_1206	46	Porin D
2	PP_2089	37	Outer membrane protein OprF
3	PP_1121	24	OmpA family protein
	PP_2648	34	Universal stress protein
4	PP_0504	24	Outer membrane protein OprG
5	PP_1185	22	Outer membrane protein H1
6	PP_1223	18	Outer membrane protein OprL
7	PP_0258	16	LysM domain protein

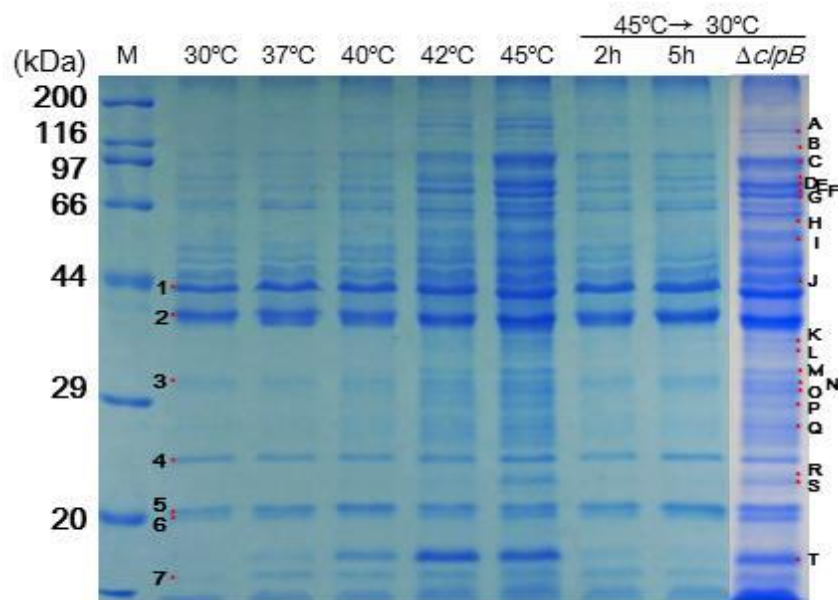


図 3-1. *Pseudomonas putida* の主要細胞壁タンパク質とタンパク質凝集の温度依存性

各レーンには、KT株の菌体を各温度で30分間処理後、0.50 ODunit分の菌体に相当する不溶性タンパク質を泳動した。45°Cで処理をしたものは、その後30°Cで2時間培養した場合と5時間培養した後の不溶性タンパク質も泳動した。

KT Δ clpB株 (Δ clpB) については、45°Cで30分間処理後、さらに30°Cで5時間処理した菌体から調製した不溶性タンパク質を泳動した。

の処理では KT 株から得られた不溶性タンパク質の種類には、大きな違いはなかったが、20 kDa 未満の低分子量のタンパク質が、より多く含まれていることが観察できた。37°C と 40°C では凝集タンパク質と考えられる不溶性タンパク質の種類には差異は見られなかったが、さらに処理温度を上昇するに従って、不溶性タンパク質の量的および種類の増加が観察された。25 kDa 以下タンパク質の凝集はほとんど認められなかったが、それより分子量の大きいタンパク質については、非常に多種類のものが熱処理によって不溶化（凝集）することが示された。熱処理によって生じた凝集タンパク質の同定を、PMF 法により行った。結果を表 3-2 に示した。タンパク質の合成や DNA の複製に関わる因子、あるいは代謝に関わる酵素類が含まれていた。PurL、Aconitate hydratase 2、タンパク質伸長因子 G (Elongation factor G)、IbpA については、*E. coli* においても凝集しやすいタンパク質として報告されている (Mogk *et al.*, 1999)

③熱ストレスにより生じた凝集タンパク質の再生には ClpB と DnaK システムが必要である

45°C、30 分間の処理後、30°C で細胞を再び培養すると、2 時間後には不溶性タンパク質の量が著しく減少し、熱処理前のレベルに近づくことが明らかとなった (図 3-1)。このことは、熱処理によって凝集した不溶性タンパク質が、何らかの機構により可溶化した、あるいはプロテアーゼにより分解されたかのいずれかによるものと考えられる。本論文においては、熱処理後に 30°C で培養した後の不溶性タンパク質の減少を、「再生」として記述する。

E. coli などにおいて、凝集タンパク質の脱凝集に関わることが報告されている ClpB の遺伝子 (*clpB*) や、J-ドメインタンパク質の遺伝子欠損株において、熱処理後の不溶性タンパク質の検出、および 30°C で再び細胞を培養した後の凝集タンパク質の再生の挙動について観察した。いずれの株においても、45°C で処理すると細胞内の不溶性タンパク質が 4~5 倍に増加・蓄積することが分かった (図 3-2)。

表 3-2. *Pseudomonas putida* KTΔ*clpB* 株で見出された熱凝集タンパク質

	Gene	Size (kDa)	Protein
A	PP_1037	141	Phosphoribosylformylglycinamide synthase PurL
B	PP_1145	106	ATP-depedent helicase HepA
C	PP_2339	94	Aconitate hydratase 2
D	PP_0451	79	Elongation factor G
	PP_0387	69	RNA polymerase sigma factor RpoD
E	PP_0451	79	Elongation factor G
	PP_3668	82	Catalase/peroxidase HPI
F	PP_0356	78	Malate synthase G
G	PP_5044	67	GTP-binding protein TypA/BipA
H	PP_0674	62	ABC transporter, ATP-binding protein
I	PP_3099	56	Hypothetical protein
J	PP_4037	49	Glutamate synthase, small subunit, putative
K	PP_3511	37	Branched-chain amino acid aminotransferase
L	PP_5040	67	Fructose-1,6-bisphosphatase class 1
M	PP_4573	32	ATPase, AAA family
N	PP_1121	24	OmpA family protein
O	PP_1591	27	30S Ribosomal protein S2
	PP_2648	34	Universal stress protein
P	PP_1638	30	Ferredoxin-NADP reductase
Q	PP_0460	26	30S Ribosomal protein S3
R	PP_3089	19	Hypothetical protein
S	PP_0466	20	50S Ribosomal protein L5
T	PP_1982	16	Heat-shock protein IbpA

KTΔ*clpB* 株では、45℃での処理後に 30℃で培養することで、野生株では再生された凝集タンパク質がほとんど再生されず、細胞内に不溶化したまま蓄積していることが明らかとなった（図 3-2、図 3-3）。45℃の熱処理前後の不溶性タンパク質を、PMF 法により同定したところ、elongation factor G (EF-G) やリボソームタンパク質 S3、L5、などの多種多様のタンパク質であることが分かった。

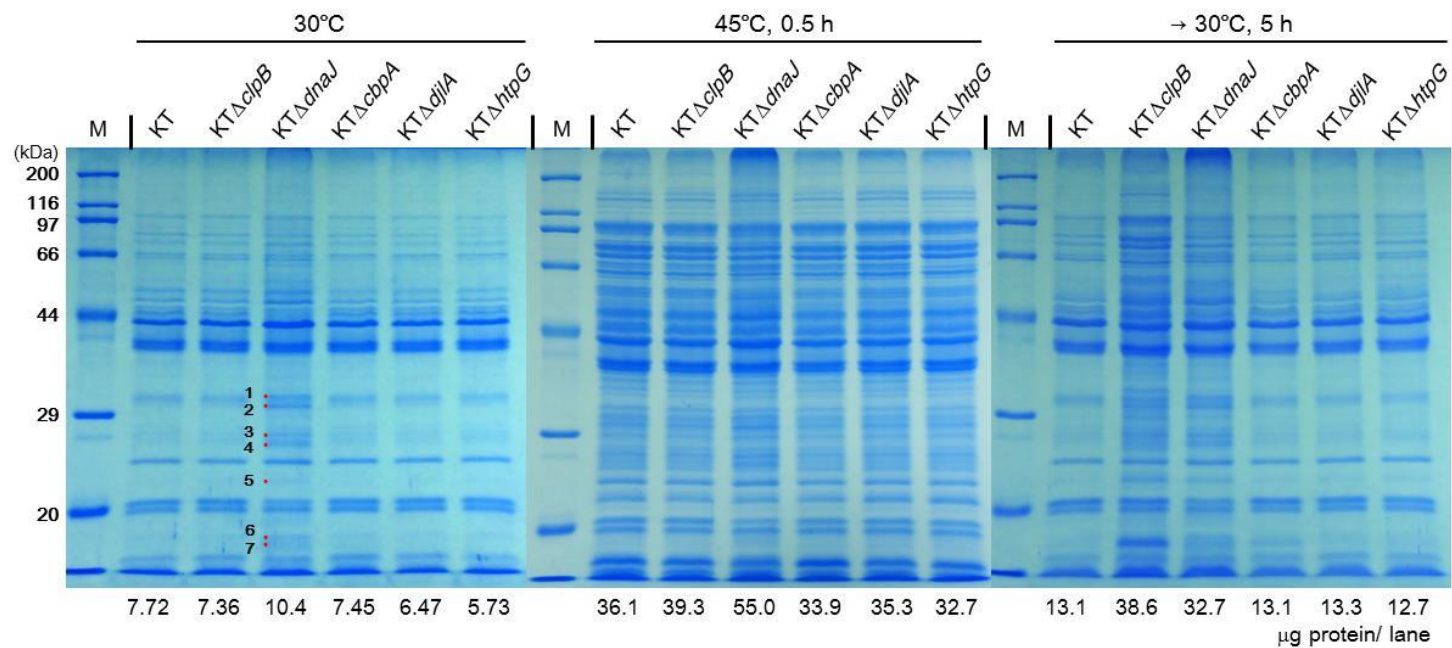


図 3-2. *Pseudomonas putida* 各株の熱処理時の不溶性タンパク質の検出

各レーンには、菌体 0.50 ODunit に由来する不溶性タンパク質量を泳動した。下の数字は、泳動した不溶性タンパク質量を示す。

PMF 法により同定したタンパク質：1, 50S リボソームタンパク質 L2、2, 30S リボソームタンパク質 S2、3, 30S リボソームタンパク質 S3、4, 50S リボソームタンパク質 L3 と 30S リボソームタンパク質 S4、5, 50S リボソームタンパク質 L5、6, 50S リボソームタンパク質 L16、7, 30S リボソームタンパク質 S9。

clpB 欠損株が高温の熱処理後、コロニー形成能が消失することは、ClpB の欠失により、タンパク質が再生・可溶化できないからであると推測できる。特に、EF-G やリボソームタンパク質が不溶化して、機能を持たないことが、*clpB* 欠損株が熱処理後にコロニーを形成できない理由の一つである可能性が示唆された。

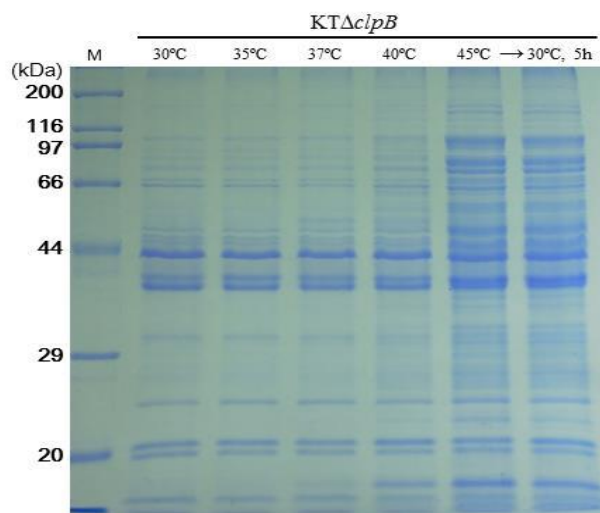


図 3-3. *Pseudomonas putida* KT Δ *clpB* 株の温度別凝集タンパク質
各レーンには、菌体 0.50 ODunit に由来する不溶性タンパク質量を泳動した。

dnaJ 欠損株においては、熱処理を行う前の 30°C で O/N 培養後の細胞内に、他の株と比べて不溶性タンパク質が多く蓄積していた (図 3-2)。それら不溶性タンパク質を、PMF 解析により同定したところ、すべてがリボソームを構成するタンパク質であることが判明した。また、KT Δ *dnaJ* 株では 45°C の熱処理を行うと、KT 株や他の変異株と比較して、より多くの凝集タンパク質が蓄積することが分かった (図 3-2)。特に、200kDa 以上の高分子のタンパク質が多く蓄積していた。*dnaJ* 欠損株では、熱処理時に生成された凝集タンパク質のうち、比較的分子量のものでは再生されていたが、高分子、特に 200kDa 以上のタンパク質は再生されにくいことが判明した (図 3-2、図 3-4)。生成した凝集タンパク質のかなりの割合が再生していたことは、他の因子が再生の過程における DnaJ の機能を補完する可能性を示唆するものであると考える。

一方、KT Δ *cbpA* 株、KT Δ *djlA* 株および KT Δ *htpG* 株は、熱処理前 (O/N 培養時)、熱処理後の凝集タンパク質の生成、および 30°C 処理後のタンパク質の再生については、KT 株と同様であると思われた (図 3-2)。

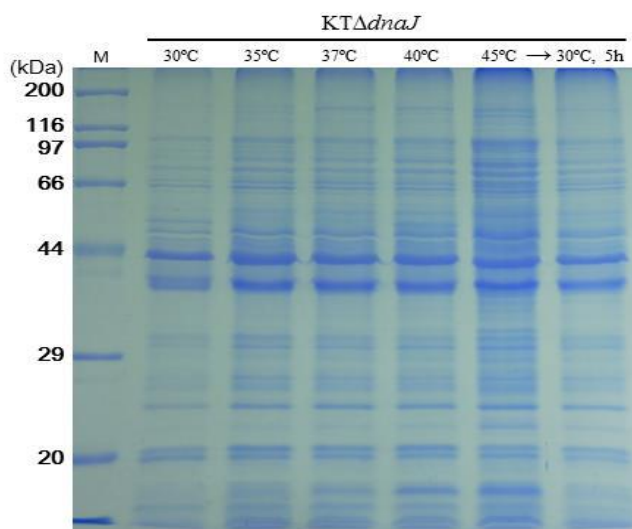


図 3-4. *Pseudomonas putida* KT Δ *dnaJ* 株の温度別凝集タンパク質

各レーンには、菌体 0.50 ODunit に由来する不溶性タンパク質量を泳動した。

2) 遺伝子相補による細胞質タンパク質の熱凝集と再生への影響

① *clpB* 欠損株における *clpB* による相補

clpB 遺伝子を、プラスミドを用いて KT Δ *clpB* 株に導入し、熱処理、および 30°C での処理による凝集タンパク質の蓄積と再生についての検討を行った。結果を図 3-5 に示した。

clpB 遺伝子を含むプラスミドを導入することによって、熱処理時の凝集タンパク質の生成においては、若干の減少が見られたのみであったが、その後の再生の過程では、熱処理で生じた凝集タンパク質のほとんどが再生されており、プラスミドにより導入した *clpB* 遺伝子が、正しく機能しゲノム上の *clpB* 遺伝子の欠失を相補したものと考えられた。

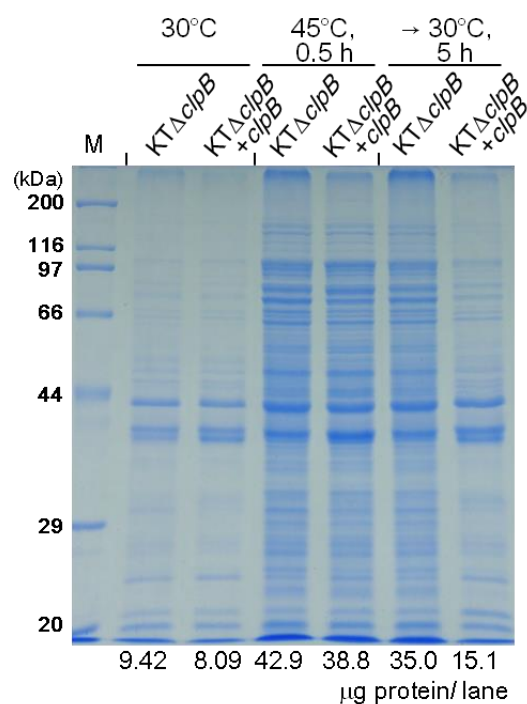


図 3-5. *clpB* 相補による熱処理時の不溶性タンパク質の検出

KTΔ*clpB* 株に、プラスミド pKT231 (pKT231)、あるいは *clpB* を含む pKT231 プラスミド (pKT231-*clpB*) を導入し、各レーンには、菌体 0.50 ODunit に由来する不溶性タンパク質量を泳動した。下の数字は泳動した不溶性タンパク質量を示した。

② *dnaJ* 欠損株における J-ドメインタンパク質遺伝子による相補

ゲノム上の *dnaJ* の機能を、プラスミド上の *dnaJ* が相補することが可能か、また、同じく J-ドメインタンパクの遺伝子である *cbpA* が、*dnaJ* の欠失を相補することができるかを、プラスミドを用いて *dnaJ*、もしくは *cbpA* を KTΔ*dnaJ* 株に導入することにより解析した。結果を図 3-6 に示した。熱処理後の不溶性タンパク質については、*dnaJ* を相補した場合と *cbpA* を相補した場合で、不溶性タンパク質の量はほとんど差が無く、野生株である KT 株と同程度の凝集タンパク質が生成していた。その後の 30°C での再生においては、*dnaJ* を相補した場合の方が、不溶性タンパク質は減少したが、*cbpA* を導入した場合でも、プラスミド pKT231 のみを導入した場合に比べて、凝集タンパク質の再生の度合いは高かった。このことから、*cbpA* は *dnaJ* の機能の一部を相補できる可能性が示唆された。

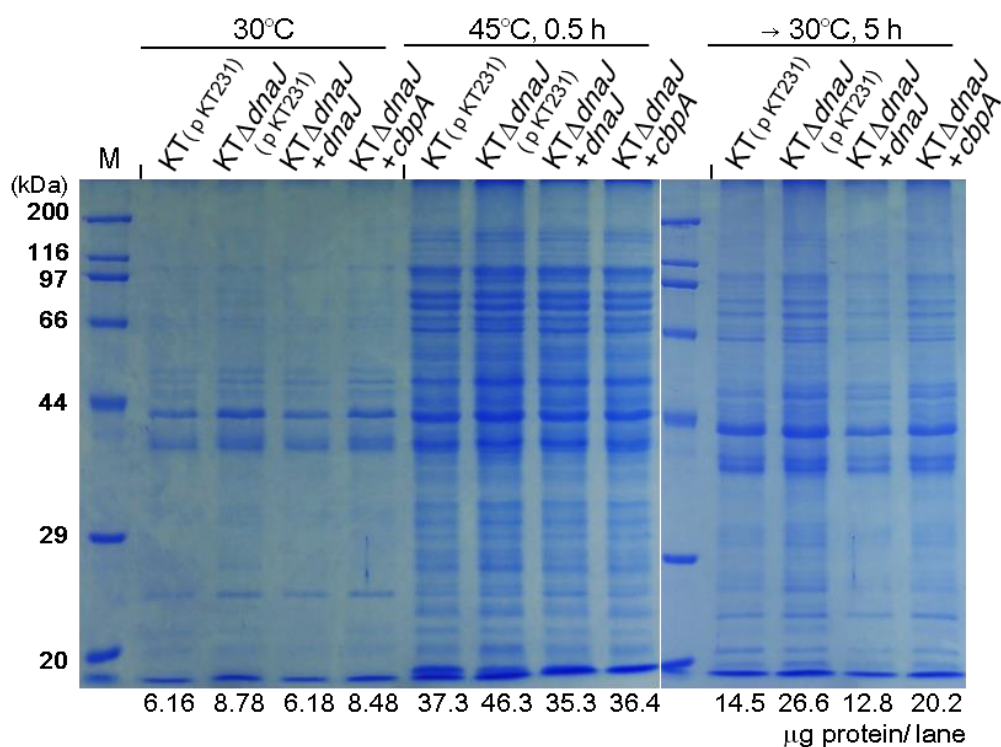


図 3-6. *Pseudomonas putida* *dnaJ* 欠損株と J-ドメインタンパク質遺伝子相補株の熱処理時の不溶性タンパク質の検出

各レーンには、菌体 0.50 ODunit に由来する不溶性タンパク質量を泳動した。下の数字は泳動した不溶性タンパク質量を示す。KT 株の *dnaJ* 欠損株には、pKT231 プラスミド、*dnaJ* もしくは *cbpA* を含む pKT231 プラスミドを導入した。

3) R2 株およびその変異株における細胞質タンパク質の熱凝集と再生

KT 株由来の *dnaK* 変異株である R2 株と、その温度感受性復帰変異株である TR1 株および TR2 株について、同様の操作・処理により、凝集タンパク質を検出した (図 3-7)。R2 株では、45°C の処理により生成される凝集タンパク質量が、著しく少ないことが明らかとなった。一方、R2 株由来の温度感受性復帰変異株 (DnaK の機能が回復していると考えられる) では、KT 株と同程度の凝集タンパク質の生成が認められた。これは、復帰変異株ではタンパク質の凝集を妨げる働きをもつ Hsp の蓄積が起きないことにより、熱凝集したタンパク質が多く生成したものと推測される。30°C で培養することにより、R2 株の温度感受性復帰変異株はいずれも凝集タンパク質が顕著に減少し、DnaK の機能が回復していることを裏付けるものとする。

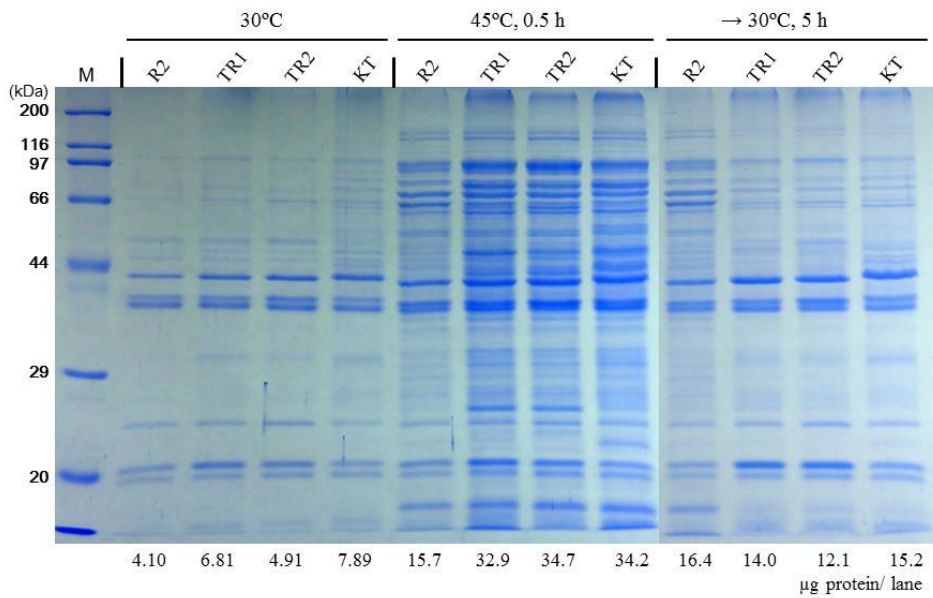


図 3-7. R2 株および温度感受性復帰変異株の熱処理時の不溶性タンパク質の検出
各レーンには、菌体 0.50 ODunit に由来する不溶性タンパク質量を泳動し、下の数字は泳動した不溶性タンパク質量を示す。

TR1 株および TR2 株は、それぞれ DnaK の 445 番目のアミノ酸が Ser および Leu に変異した *dnaK* 遺伝子をもつ R2 株由来株であり、KT 株と同様に 37°C まで生育できる。

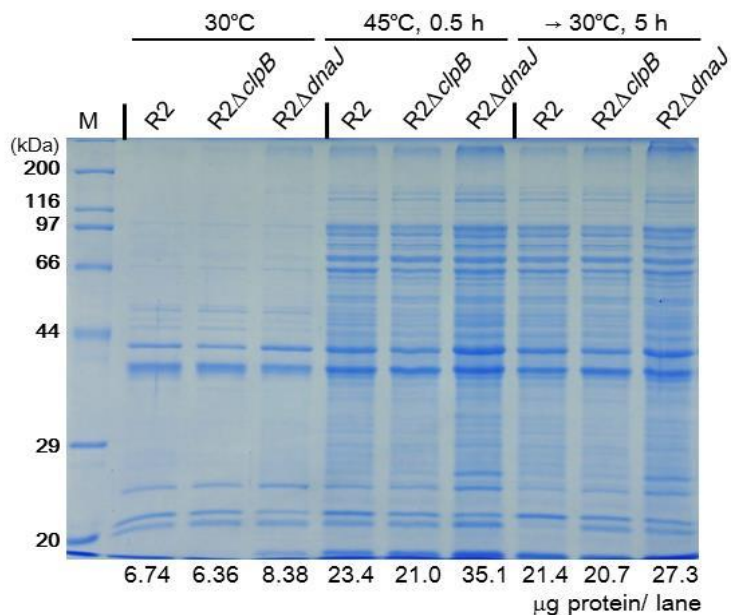


図 3-8. R2 株とその変異株の熱処理時の不溶性タンパク質の検出

各レーンには、菌体 0.50 ODunit に由来する不溶性タンパク質量を泳動した。下の数字は泳動した不溶性タンパク質量を示す。

R2株に由来する、分子シャペロン遺伝子変異株の $R2\Delta clpB$ 株、および $R2\Delta dnaJ$ 株についても同様に熱処理を行い、凝集タンパク質を検出した(図 3-8)。 $R2\Delta clpB$ 株は、R2株と同様に、KT株に比べて凝集タンパク質の生成が少なかったが、 $R2\Delta dnaJ$ 株は KT株由来の菌株と同程度の凝集タンパク質が生成されることが分かった。30°Cでの培養により、 $R2\Delta clpB$ 株では R2株と同様に、熱により生じた凝集タンパク質の再生が起きていないように見られたが、 $R2\Delta dnaJ$ 株ではわずかに凝集タンパク質量が減少していた。これについては、脱凝集による再生、プロテアーゼによる分解のいずれによるかは明らかではない。

$R2\Delta htpG$ 株は、R2株に由来する遺伝子破壊株の中で、最も温度感受性が高く、33°Cではほとんどコロニーを形成することができない。 $R2\Delta htpG$ 株を 33°Cで培養した際に、特異的に生成される凝集タンパク質が、HtpGの機能についての知見をもたらすものと考えた。R2株と $R2\Delta htpG$ 株を、30°Cおよび 33°Cで培養した際の不溶性タンパク質を図 3-9 に示した。*htpG* 遺伝子の破壊株の作製において、遺伝子全長の約 2/3 の位置に薬剤耐性遺伝子を導入したために、HtpG の

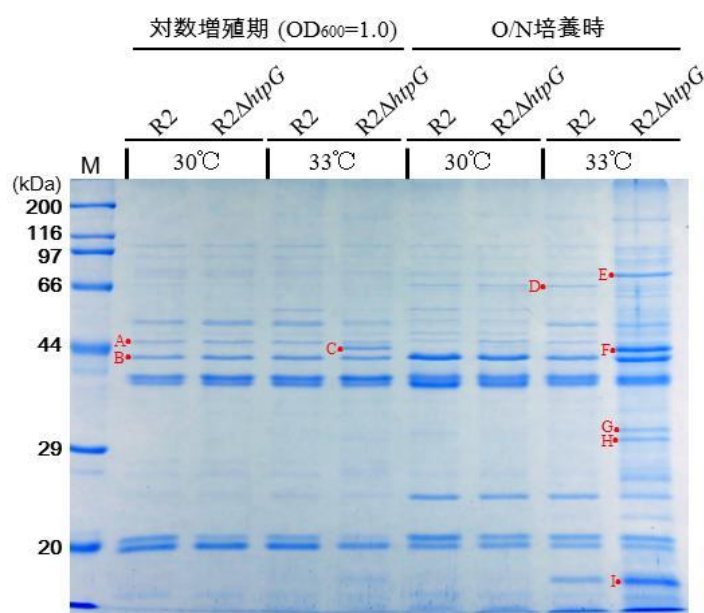


図 3-9. R2株と $R2\Delta htpG$ 株の 30°Cおよび 33°C培養時の不溶性タンパク質の検出
各レーンには、等量の菌体 (0.50 ODunit) に由来する不溶性タンパク質量を泳動した。

N 末端側のポリペプチドが約 45kDa のバンドとして存在している。これに加えて、DnaK、およびリボソームタンパク質などが、凝集タンパク質として検出された（表 3-3）。

表 3-3. R2 株と R2 Δ htpG 株で同定された不溶性タンパク質

	Gene	Protein
A	PP_0268	porin (OprE3)
B	PP_1206	porin D (OprD)
C, F	PP_4179	HtpG
D	PP_4838	outer membrane copper receptor
E	PP_4727	DnaK
G	PP_0457	50S ribosomal protein L2
H	PP_1591	30S ribosomal protein S2
I	PP_1982	IbpA

図 1-3 に示したように、R2 Δ htpG 株は 33°C で培養すると、著しくコロニー形成能が低下する。33°C で O/N 培養した R2 Δ htpG 株における不溶性タンパク質を検出したところ、DnaK、50S リボソームタンパク質 L2、30S リボソームタンパク質 S2 が不溶化することが示された。これらの結果が、*dnaK* と *htpG* の二重変異によってもたらされたことから、少なくとも部分的には DnaK と HtpG は協同的に機能すると考えられる。R2 Δ clpB 株においても、33°C の培養では生育速度が著しく低下しており、変性し凝集したタンパク質の再生に関わる ClpB の欠失が高温での生育に影響をおよぼすものと推測できるが、R2 Δ htpG 株が 33°C で高い温度感受性を示すことは、真核生物のホモログである Hsp90 のように、HtpG 特定のタンパク質の折りたたみに関与し、特に DnaK やリボソームタンパク質の折りたたみにおいて支障をきたすことが、生育の遅延に繋がる可能性を示唆するものと考えられる。

4) R2 株およびその変異株における熱ショックタンパク質の増加

R2 株は、*dnaK* の変異によって σ^{32} が安定化することにより、定常期に Hsp を蓄積する特徴をもつ。対数増殖期の R2 株が、Hsp を蓄積しない理由は明らかではない。R2 株に由来する遺伝子破壊株において、30°C および 33°C 培養での対数増殖期、および一夜培養時の Hsp の発現パターンを調べ、Hsp 量におよぼす各遺伝子の欠失の影響を検討した。

図 3-10 に示したように、凝集タンパク質の再生に関わる *clpB* を破壊した株 (R2 Δ *clpB* 株) では、30°C で培養した際の対数増殖期において、R2 株に比べて有意に Hsp の蓄積量が増加することが判明した。33°C では、30°C に比べて R2 株での発現量が増えるために、その差は少なくなっていたが、*clpB* 破壊株の方が、主要な Hsp である DnaK、HtpG、および GroEL の量は多かった。O/N 培養時においても、30°C で培養した場合には、R2 Δ *clpB* 株の方が Hsp 量は多いことが示された。

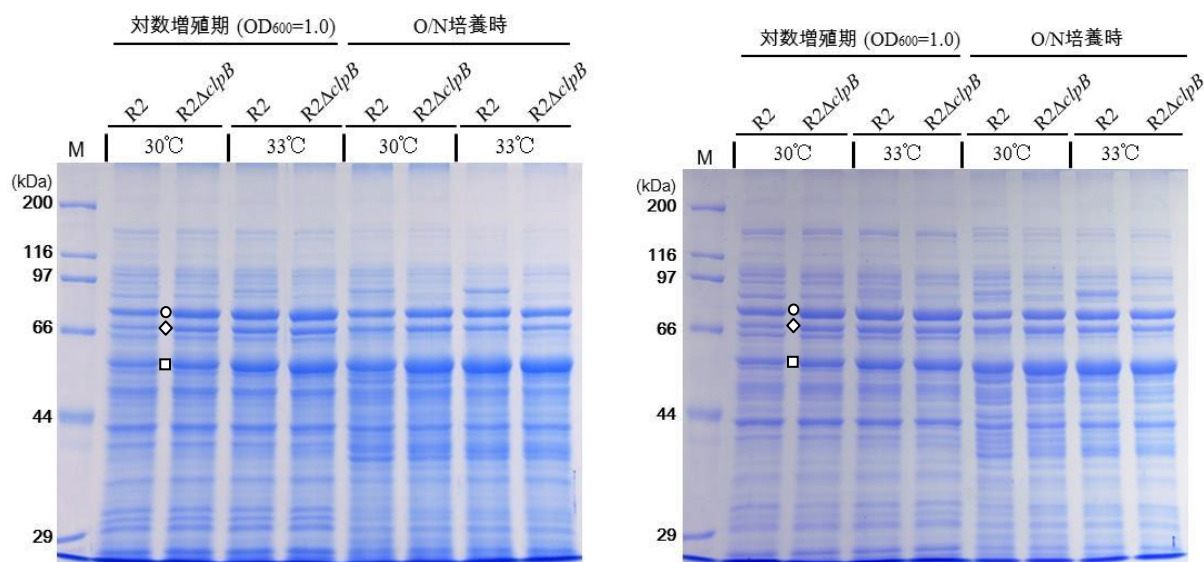


図 3-10. R2 株と R2 Δ *clpB* 株の温度別培養時の細胞タンパク質の検出
左、全タンパク質、右、可溶性タンパク質。各レーンには 0.10OD unit 分の菌体に由来するタンパク質を泳動した。

○, DnaK、◇, HtpG、□, GroEL

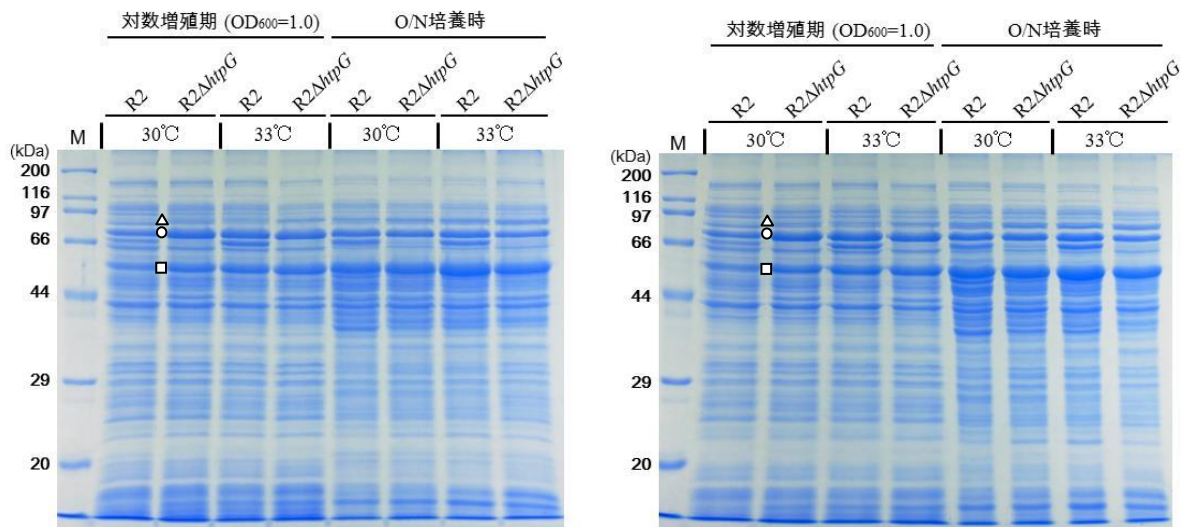


図 3-11. R2 株と R2Δ*htpG* 株の温度別培養時の細胞内全タンパク質の検出
 左, 全タンパク質、右, 可溶性タンパク質。各レーンには 0.10OD unit 分の菌体
 に由来するタンパク質を泳動した。
 △, ClpB、○, DnaK、□, GroEL

同様に、R2Δ*htpG* 株についても、各温度、培養時期での Hsp の発現パターンを解析したところ、図 3-11 示したように、30°C で培養した際の対数増殖期において、R2 株に比べて主要な Hsp である DnaK、ClpB、および GroEL の量は多かった。*htpG* 破壊株の場合には、33°C 培養時の対数増殖期や、O/N 培養時において、Hsp 量の顕著な上昇は観察されなかった。

第 3 節 考察

第 1 章で述べた *clpB* 欠損株における高温処理時の生存率の低下は、熱ストレスにより生じる細胞内の凝集タンパク質が、脱凝集されないことが主な要因であると考えられる。しかし、熱ストレス後の凝集タンパク質の再生・分解・除去だけが、熱処理後に再び細胞が増殖するために必要とされるかは明確でない (Weibezahn *et al.*, 2004)。ClpB は DnaK システムと協同的に働き、凝集したタンパク質を脱凝集し、元のタンパク質へと再生することが知られている

(Glover and Lindquist, 1998; Goloubinoff *et al.*, 1999)。本研究により、*P. putida* においても ClpB は、熱などにより生成した凝集タンパク質の脱凝集に関わることが確認された。*clpB* 欠損株において、一旦形成した凝集タンパク質の再生が起きなかったことは、ClpB が脱凝集に直接関わることを示すものと考えられるが、加えて、分解に関わるプロテアーゼが変性し、その再生に ClpB が関わっている可能性も否定できない。熱などのストレスにより、多くの種類のタンパク質が変性し、その機能を失うと思われる。ClpB が機能しないことで、比較的細胞内に多く存在する転写や翻訳系に関わるタンパク質や代謝に関わる酵素類を始め、DNA 複製や細胞周期の切り替えに関わる転写因子などの、細胞内で極めて少ない数しか存在しないタンパク質分子の多くが、変性したまま機能を回復できない状態になると考えられる。*E. coli* においても、RNA ポリメラーゼのサブユニットや EF-G のように、細胞が増殖するために必須のタンパク質が、熱処理により凝集するとされている (Mogk *et al.*, 1999)。*P. putida* においても、*clpB* 破壊株で、熱処理後に再生されない不溶性タンパク質を同定したところ、EF-G に加えていくつかのリボソームタンパク質が再生されないことが分かった (図 3-1、図 3-2、表 3-2)。細胞機能に必須のタンパク質が変性・凝集し、それが再生されなかったとしても、凝集タンパク質が直接細胞に有害な働きをしない限りは、新たにそのタンパク質が合成されることで、細胞の機能不全は解消される。このため ClpB は、おそらく DNA 複製やタンパク質合成の根幹に関わる因子の再生、あるいはタンパク質複合体において生じた多分子から成る変性 (凝集) 状態からの復帰に関わるものと推測できる。

P. putida の *dnaK* 変異株である R2 株も、熱処理後に生じる凝集タンパク質をほとんど再生できなかったが、R2 株由来の株で形成される凝集タンパク質の量は、KT 株を同様に処理したときに生じる場合よりもかなり少なかった (図 3-7)。*E. coli* において、Hsp (特に GroEL/ES、DnaJ) がタンパク質を凝集から保護していることが報告されており (Gragerov *et al.*, 1992)、R2 株においても、おそらく Hsp が高発現しているために、凝集タンパク質の生成が抑えられたものと推測できる。一方、定常期の R2 株は、KT 株と同程度の高温耐性をもっていた

にも関わらず、熱処理後の R2 Δ clpB 株の生存率は、R2 株に比べて著しく低下していた (図 1-6)。R2 株では、熱により生成した凝集タンパク質が再生されないにも関わらず、生存率が野生株 (KT 株) と同程度であったことは、熱による凝集タンパク質の蓄積と再生の不全は、コロニー形成能の消失 (あるいは細胞死) に、直接関係しているとは限らないとも考えられる。しかしながら、細胞内でごく限られた数のタンパク質分子の再生が、増殖可能な状態への復帰に必要であれば、表面的には凝集タンパク質の減少が観察されないと思われる。

KT 株の *dnaJ* 欠損株 (KT Δ *dnaJ* 株) において、凝集タンパク質、特に 200kDa を超える高分子凝集体が顕著に蓄積したことは、熱によるタンパク質の凝集の防御に、DnaJ が極めて重要な役割をもつ J-ドメインタンパク質であることを示している。また、*dnaJ* 欠損株では、熱処理後に通常の培養温度へとシフトしても、凝集タンパク質の多くが再生されないままであった。DnaJ は、巨大なタンパク質凝集体に結合し、DnaK への基質分子の提供を補助するとされており (Acebrón *et al.*, 2008)、*dnaJ* 欠損株において、高分子の凝集体が再生されないことと強いつながりをもつと考えられる。*E. coli* において *cbpA* は、*dnaJ* のマルチコピーサプレッサーとして機能することが報告されている (Ueguchi *et al.*, 1995)。本研究結果から、*P. putida* における凝集タンパク質の再生についても、DnaJ の機能は CbpA に置き換えられるものと考えられる。*E. coli* においては、*cbpA* は σ^S によって制御されており、たとえ DnaJ と CbpA が同じ機能をもっている、熱ショックにより誘導されない可能性が高く、このことが、*E. coli* のゲノム上の *cbpA* が、*dnaJ* の欠失を効果的に補うことができない原因の一つと考えられる。一方、*P. putida* の *cbpA* は先に述べたように、*dnaJ* と同様に σ^{32} による制御を受けており、熱により誘導されるため、*dnaJ* 欠損株において凝集タンパク質の生成が野生株 (KT 株) より顕著に多かったことは、凝集タンパク質の生成阻害において、CbpA の機能が DnaJ に比べて低い、あるいは凝集タンパク質の生成阻害においては、熱処理時の J-ドメインタンパク質量が重要で、通常培養時の CbpA 量では、十分な効果が得られない可能性を示すものと考えられる。しかしながら、プラスミドを用いて *cbpA* で相補した際に、凝集タンパク質の形成が KT 株

と同程度であったことは、*E. coli* の場合と同様に、*P. putida* においても凝集タンパク質の生成の阻害とその再生の過程において、*cbpA* は *dnaJ* の機能を相補することを強く示唆している。

第4章 *Pseudomonas putida* の有機溶媒耐性における分子シャペロン、ATP 依存性プロテアーゼおよび AhpC の機能

緒言

有機溶媒は細胞に侵入し、細胞膜などの細胞構造を乱し、呼吸鎖やエネルギーの生産に支障をきたすために、多くの生物にとって有害であるが、いくつかの細菌が、キシレンやトルエンなどの有機溶媒の存在下で生育することが報告されている (Sikkema *et al.*, 1995; Ramos *et al.*, 2002; Segura *et al.*, 2012)。本研究において用いてきた *P. putida* KT2442-R2 株 (R2 株) も、トルエンに対する耐性株として分離されたものである (Kobayashi *et al.*, 2011)。*Pseudomonas* における有機溶媒の耐性に、分子シャペロンが関与するといういくつかの報告があるが (Segura *et al.*, 2005; Domínguez- Cuevas *et al.*, 2006; Volkens *et al.*, 2006)、それらは、有機溶媒により分子シャペロンが誘導されたことを示すのみであり、直接的に有機溶媒耐性に関わっている科学的な根拠を示すものではない。一方、グラム陽性菌 (Tomas *et al.*, 2003; Desmond *et al.*, 2004) においては、芳香族炭化水素ではないが、有機溶媒の耐性を上昇させる遺伝子として *groEL/ES* が報告されている。*E. coli* においても有機溶媒耐性に寄与する遺伝子として *groEL/ES* (Zingaro and Papoutsakis, 2013)、および以下に述べる AhpC ペルオキシレドキシシン (Ferrante *et al.*, 1995) が報告されている。*E. coli* は、細菌の中では有機溶媒の耐性度が比較的高いことが知られている。しかしながら、*Pseudomonas* 属細菌、特に *P. putida* の有機溶媒耐性は突出している。細菌における有機溶媒耐性機構において、最も重要な役割を果たすのが、グラム陰性菌の細胞壁を貫通する形で存在する RND (resistance-nodulation-cell division) 薬剤排出ポンプであるが (Godoy *et al.*, 2010)、ABC 排出ポンプも関わるということが知られている (Kim *et al.*, 1998)。これに対して、本研究において *P. putida* の分子シャペロン、および ATP 依存性プロテアーゼに関して解析を進める過程で、これらのタンパク質をコードする遺伝子の欠失が、有機溶媒の耐性に影響を与えることが明らかになってきた。

有機溶媒による細胞への影響には、酸素ストレスに起因する可能性が強く示唆されている。酸素は好気性生物にとって、物質を効率的に酸化してエネルギーを獲得するために不可欠な分子種である。酸素は呼吸鎖によりエネルギーを生み出す過程での最終酸化物として用いられ、その還元反応において不完全な還元反応により、スーパーオキシドやヒドロキシラジカルなどの反応性の高い活性酸素種を産生する可能性がある。活性酸素は DNA の損傷や脂質の過酸化などを引き起こし、老化を促進するなどの細胞に悪影響を与えるため、酸素を最終酸化剤として用いる生物種は、活性酸素種に対する防御機構を有している必要がある。細菌における活性酸素種の除去過程については、*E. coli* においても研究が進んでいる。*E. coli* における活性酸素種の除去過程は、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) によるスーパーオキシドの不均化や、カタラーゼなどによる過酸化水素 (H_2O_2) から水への分解経路と、チオレドキシン、グルタレドキシン等を含む酸化された物質の還元経路が存在する。活性酸素分子種の除去過程に関わる主要な制御因子として、OxyR や SoxR などが存在する (Imlay *et al.*, 2013)。OxyR は約 34kDa の LysR 型の転写調節因子であり、*oxyR* レギュロンの発現を活性化し、酸化ストレス応答に対する抗酸化において重要な役割を担っている (Toledano *et al.*, 1994; Åslund *et al.*, 1999)。OxyR は酸化型では、*E. coli* において (ATAG-n7-CTAT-n7-ATAG-n7-CTAT) のコンセンサス配列を認識すると提唱されている。OxyR により調節を受ける遺伝子群は、*E. coli* では *katG* (hydroperoxidase I 遺伝子)、*gorA* (glutathione reductase 遺伝子)、や *ahpCF* (alkyl hydroperoxide reductase 遺伝子) などを含むことが知られている。

偏性好気性細菌である *P. putida* は、呼吸鎖により分子状酸素へ電子を送ることが、効率良く ATP を合成するために不可欠であることから、同様の酸化ストレス防御機構が働いていると考えられる。しかしながら、*P. putida* の酸化的ストレス応答については、*E. coli* と比較すると知られていない部分も多い (Kim and Park, 2014)。一部の SoxR レギュロンの一部は、*E. coli* とは異なり、FinR (Yeom *et al.*, 2010) あるいは HexR (Kim *et al.*, 2008) により調節を受けていることが報告されている。我々の研究室で作出された *P. putida* KT2442-*oxyR1* 株 (KT-*oxyR1*

株)は、トルエン耐性菌である *P. putida* KT2442-TOL 株において見出された OxyR をコードする遺伝子 (*oxyR*) の点変異 (*oxyR1*) を、*P. putida* KT2442 株 (KT 株) に導入した株である。*oxyR1* 変異により、OxyR 中の Phe¹⁰⁶ が Ile に変化し、OxyR 制御下の遺伝子の発現が高まる (Hishinuma *et al.*, 2006)。OxyR は過酸化物の存在下で酸化され、そのタンパク質内部の 2 つのシステイン残基間でのジスルフィド結合の形成により立体構造が大きく変化し、RNA ポリメラーゼの α サブユニットと相互作用することで、標的遺伝子の発現を促進する。ペルオキシレドキシシン遺伝子 (*ahpC*, alkyl hydroperoxide reductase C サブユニット遺伝子) は、一般に OxyR によって制御を受けることが知られており、*P. putida* においても *ahpC* が OxyR 依存性であることがすでに確認されており、KT2442-*oxyR1* 株は特に *ahpC* を高発現する (Fukumori and Kishii, 2001; Hishinuma *et al.*, 2006)。*P. putida* の過酸化物の除去に関わる酵素であるペルオキシレドキシシン AhpC は、アルキル過酸化物と H₂O₂ の両方に対する K_m 値が、カタラーゼに比べて非常に低く、*E. coli* において報告されているように、内因性の過酸化水素を迅速に分解するための主要な除去機構であると考えられる (Poole and Ellis, 1996)。しかし、酸化された AhpC は、再活性化のためにペルオキシレドキシシン還元酵素 AhpF と NADH による還元を必要とするため、AhpC は大量の過酸化物の分解には適していないと考えられる。一方、カタラーゼは、好気性菌に広く分布しており、触媒活性が高く、また NADH のような化合物を必要としないことから、多量の H₂O₂ の分解に適していると考えられる。また、微生物の中には複数カタラーゼを有するものや、ペルオキシダーゼ活性を併せもつ 2 機能的なカタラーゼを有する種も存在することから、酸化ストレス防御において重要なタンパク質の一つである。*P. putida* KT2440 株のゲノム DNA には、4 つのカタラーゼ遺伝子 {PP_0015 (*katE*)、PP_0481 (*katA*)、PP_2887 (unknown)、PP_3668 (*katB*)} が存在する (Nelson *et al.*, 2002)。酸化ストレスによって生じる過酸化物は、これらのペルオキシレドキシシンやカタラーゼが協同的に無毒化すると推測される。一般に、ペルオキシレドキシシン遺伝子の発現は酸化ストレスにより誘導され、OxyR の制御を受けることが知られている (Storz *et al.*, 1990; Mongkolsuk *et al.*, 2000;

Ochsner *et al.*, 2000)。 *ahpC* は OxyR により制御されていることは、確実であるが、転写調節については不明な点も多く、プロモーターを認識するシグマ因子も推定できていない。この章では、*P. putida* の *ahpC* プロモーター領域の OxyR 結合部位を欠失させ、得られた株を解析することで、転写調節機構についての知見を得ることを目的にした。また、多くの細菌において、DNA ヘリカーゼ (RecG) の遺伝子 (*recG*) は、OxyR とオペロンを形成している。*E. coli* の RecG は二本鎖 DNA ヘリカーゼであり (Sharples *et al.*, 1999)、Holliday junctions、three-strand junctions、さまざまなループ構造などの DNA をターゲットとして、DNA の複製、修復、組換え、転写などにおいて重要な役割を担っている (Rudolph *et al.*, 2010)。このため、*recG* についても欠損株を作出し、有機溶媒耐性との関係性を考察した。

第 1 節 実験方法

1) 使用菌株、プラスミドおよびプライマー

使用した菌株、プラスミドおよびプライマーを表 4-1 に示した。

表 4-1. 使用菌株、プラスミド、プライマー

菌株	特徴	文献あるいは供給元
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2442 株(KT 株)	<i>hsdR</i> Rif ^R	Franklin <i>et al.</i> , 1981
KTΔOBD 株	KT2442 lacking the OxyR binding site for <i>ahpC</i>	
KT2442-oxyR1 株 (KT-oxyR1 株)	<i>oxyR1</i> (OxyR Phe ¹⁰⁶ to Ile) derivative of KT2442	Hishinuma <i>et al.</i> , 2006
KT-oxyR1ΔOBD 株	KT-oxyR1 lacking the OxyR binding site for <i>ahpC</i>	
KTΔ <i>recG</i> 株	<i>recG</i> ⁻ derivative of KT2442, Km ^R	
KTΔOBDΔ <i>recG</i> 株	<i>recG</i> ⁻ derivative of KT2442ΔOBD, Km ^R	
KT-oxyR1Δ <i>recG</i> 株	<i>recG</i> ⁻ derivative of KT2442-oxyR1, Km ^R	

KT-oxyR1 Δ OBD Δ recG 株	<i>recG</i> ⁻ derivative of KT2442-oxyR1 Δ OBD, Km ^R	
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α 株	Δ (<i>lacZ</i>)M15	Gibco BRL
CC118 λ pir 株	<i>recA pir</i> lysogen, host for pKNG101	Herrero <i>et al.</i> , 1990
R, resistance; Rif, rifampicin; Km, kanamycin.		

プラスミド	特徴	文献あるいは供給元
pNEB193	Cloning vector, Ap ^R	New England Biolabs
pKNG101	<i>SacB</i> Sm ^R	Kaniga <i>et al.</i> , 1991
pZErO-2	Cloning vector, Km ^R	Invitrogen
pUCP26Km	Cloning vector, Km ^R	Kobayashi <i>et al.</i> , 2011
pKNG101- Δ OBD	pKNG101 with <i>ahpC</i> promoter lacking the OxyR binding site	
pKNG101- Δ recG	pKNG101 with <i>P. putida recG::Km^R</i>	
pUCP26Km- <i>ahpC</i>	pUCP26Km with <i>P. putida ahpC</i> (from -231 to +698)	
pUCP26Km- <i>ahpCF</i>	pUCP26Km with <i>P. putida ahpC-ahpF</i> (from -231 to +1712)	
R, resistance;	Ap, ampicillin; Sm, streptomycin.	

プライマー	配列 (5'→3')
<i>ahpC</i> F-311	TTGAATGTCGACGTTGCAAG
<i>ahpC</i> R-99Bg	GTTTTGGCTAGATCTGGGGTTAT
<i>ahpC</i> F-83B	GCTTTGCCAAGGATCCTTCAGCGG
<i>ahpC</i> R+423B	CGACAATCTGGATCCGGCCTTCC
<i>ahpC</i> R-37	GGATAGAATCCTAACTAATCAT
<i>ahpC</i> F-238	CATGGGCTCGAGCGTAGACC
<i>ahpC</i> R+708B	CATACGGGCGGATCCTTTTTCAAA
<i>ahpF</i> R+1720B	TCCTGAGGGATCCGCAGTAAGCAT
<i>recG</i> F+2S	TGAGTGAGCTGTCGACGGTCCCG
<i>recG</i> R+746B	GCACGCAGGATCCGCAGGCTTTC
<i>recG</i> F-57	GATTCGATCCGCCTGTGCT
<i>recG</i> R+866	TCGTGCTGGCTAAGGTCGTA

2) 培地

第 1 章に記載したものおよび以下の PB-I 培地を使用した。

PB-I 培地 : polypepton 5g, polypepton-S 5g, Yeast extract 5g, NaCl 5g, glucose 1g/L, MgSO₄ は別に滅菌し 10mM となるように加えた。

3) 有機溶媒耐性試験

試験菌株を LB 液体培地 2ml で前培養を行い、前培養液を LB 液体培地で 10~10⁶ 倍に段階希釈を行った。その後、LB プレートおよび PB-I プレートに希釈した培養液を 5 μ l ずつスポットした。PB-I プレート上に菌液をスポットしたものについては、室温で 2 時間、静置した。その後、KT 株とその変異株については *p*-キシレン 15ml、R2 株と R2 株に由来する変異株はトルエン 15ml を PB-I プレート上に重層した。その後、LB プレートとともに 30°C で ON 培養した。生存率は、(有機溶媒を重層した PB-I プレート上で生育したコロニー形成数 CFU/ml) \div (LB プレート上で生育したコロニー形成数 CFU/ml) で求めた。

4) *ahpC* プロモーター領域の OxyR 結合領域削除

pKNG101- Δ OBD プラスミドの構築のために、表 4-1 に示した菌株、プラスミドおよび PCR プライマーを使用した。まず、*ahpC* F-311 および *ahpC* R-99 プライマーを用いて、KT2442 株のゲノム DNA から PCR により DNA 断片を増幅した。この PCR 産物を *Sma*I で処理した pNEB193 と連結し、*E. coli* DH5 α に導入した。この形質転換した *E. coli* から、プラスミドを調製後、*Bgl*II でプラスミドを処理した。また、プライマー *ahpC* F-83B および *ahpC* R-423B で同様に増幅した DNA 断片を *Bam*HI で処理し、この PCR 産物を前述した *Bgl*II で処理したプラスミドと連結し、*E. coli* DH5 α に導入した。そのプラスミドを調製後、*Bam*HI と *Sal*I で切り出される DNA 断片を同制限酵素で処理した pKNG101 に組み込み、*E. coli* CC118 λ *pir* に導入した。この調製したプラスミドを pKNG101- Δ OBD とした。構築したプラスミド pKNG101- Δ OBD を、エレクトロポレーション法により KT 株および KT-*oxyR1* 株に導入した。Sm (250 μ g/ml) を含む LB 平板培地上で

生育したコロニーを、5%スクロースを含む LB 平板培地に画線し、菌を室温で培養した。数回の画線培養により形成したシングルコロニー中から、Sm 感受性のコロニーを選抜した。選抜したコロニーから、プライマー *ahpC* F-311 および *ahpC* R-37 を用いてコロニーPCR を行い、本来増幅される DNA 断片の長さより、DNA が短く増幅されたコロニーを選抜した。

5) *recG* 遺伝子欠損用プラスミドの構築と *recG* 遺伝子欠損株の作出

pKNG101- Δ *recG* の構築は、*recG* 遺伝子の DNA 配列の一部を、表 4-1 に記載したプライマー *recG* F+2S と *recG* R+746B を用いて PCR により増幅し、*Sma*I で処理した pNEB193 を用いてクローニングした。このプラスミドを調製後、クローニングした DNA 配列の内部のみで切断できる *Nco*I を用いて処理し、T4DNA ポリメラーゼにより、末端を平滑化した。生じた末端部分に pUC4K プラスミドから調製した Km 耐性遺伝子と連結し、耐性遺伝子配列を組み込み、*E. coli* DH5 α に導入した。これにより作製したプラスミドを *Bam*HI と *Sal*I で処理して生じた DNA 配列を同様の制限酵素で処理した pKNG101 ベクターにサブクローニングした。*recG* 欠損株の作製は、構築した遺伝子破壊用プラスミド (pKNG101- Δ *recG*) を破壊したい株にエレクトロポレーション法により導入し、Km 耐性および Sm 耐性の菌株を、抗生物質を含む平板培地により選抜した。コピー数を確認後、Km (50 μ g/ml) を含む 5% のスクロース + LB 液体培地もしくは同組成の平板培地で培養し、Km 耐性、Sm 感受性の株を選抜した。遺伝子欠損の確認は、PCR による方法により確認した。

6) *ahpC* および *ahpF* 相補用プラスミドの構築

表 4-1 に記載した、プライマー *ahpC* F-238 および *ahpC* R+708B を用いて *ahpC* の全長を含む DNA 断片を、プライマー *ahpC* F-238 および *ahpF* R+1720B を用いて *ahpC* と *ahpF* の全長を含む DNA 断片を、KT2442 株のゲノム DNA から PCR により増幅した。得られた PCR 産物 (約 0.95 kbp および約 2.7 kbp) それぞれを、*Eco*RV で処理した pZErO-2 と連結し、*E. coli* DH5 α に導入した。目的のインサー

トを含むプラスミドを調製し、そのプラスミドを *Bam*HI と *Xho*I で処理して得られた DNA 断片を、*Bam*HI と *Sal*I で処理した pUCP26Km と連結し *E. coli* DH5 α に導入した。目的のインサートを含むプラスミドを、それぞれ pUCP26Km-ahpC、pUCP26Km-ahpCF とした。

7) 倍加時間の測定

第 1 章の 1 - 1 に記載した方法で行った。

8) 過酸化物質耐性試験

第 1 章の 1 - 2 に記載した方法で行った。

第 2 節 実験結果

1) 分子シャペロンおよび ATP 依存性プロテアーゼ遺伝子欠損株の有機溶媒耐性

P. putida KT2442 株 (KT 株) は、有機溶媒に対する耐性度が高く、多くの生物が増殖することのできないキシレンの重層下でも、1/10 程度の細胞が生育し、コロニーを形成することができる。また、KT 株の *dnaK* 変異株である *P. putida* KT2442-R2 株 (R2 株) は、より毒性の高いトルエンに対してかなりの耐性を持っており、1/10 程度の細胞がその重層下でコロニーを形成する。今回、作出された分子シャペロンおよび ATP 依存性プロテアーゼ遺伝子欠損株について、KT 株とそれに由来する株はキシレンを用いて、R2 株とそれに由来する株についてはトルエンを用いて、遺伝子破壊が有機溶媒の耐性におよぼす影響を、有機溶媒重層下におけるコロニーの形成率を測定することにより検討した (図 4-1)。

前述したように、KT 株のキシレン重層下におけるコロニー形成率 (生存率) は、約 10%ほどであった。また、実験に供した各遺伝子破壊株 (図 4-1 に示し

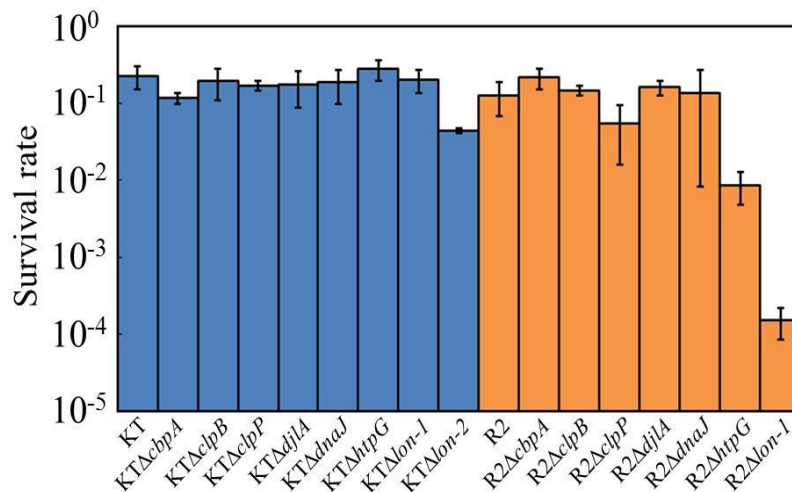


図 4-1. 有機溶媒重層によるコロニー形成率

KT 株由来の菌株にはキシレンを、R2 株由来の菌株にはトルエンを重層した。別々に3回行った操作によって計算された平均値とSD(エラーバー)を示した。

た)においても、キシレン重層下における菌の生存率はKT株と比べて、*lon-2*以外は大きな差は見られなかった。また、KT株の*dnaJ*欠損株は、キシレン重層条件下においてコロニーの形成率は野生株(KT株)と有意な差は見られないが、図4-2Aに示すように、平板培地上で目視できるコロニーが形成するまでに3日ほどかかり、生育の遅延が起きることが分かった。

R2株由来の遺伝子破壊株については、*dnaJ*欠損株において、KT株の*dnaJ*欠損株で見られた増殖の遅延が観察され、トルエン重層下では大きく生育速度が下がることが示された(図4-2B)。また、*htpG*欠損株と*lon-1*株欠損株については、トルエンによる生存率への影響が見られた(図4-1)。特に*lon-1*株については、コロニー形成能が約1/1,000に低下することが分かった。Lonは、*E. coli*において異常なタンパク質の分解に関わる主要なプロテアーゼとされていることから(Gur *et al.*, 2011)、トルエンの処理によって細胞内に異常なタンパク質が蓄積し、それらが分解・除去できないことにより、コロニー形成率が減少する可能性が考えられた。*htpG*欠損株では、生育については大きな差異は見られなかったが、生存率が他の株に比べて1/10程度となっていた。HtpGは特定のタン

パク質の成熟に関わっているとされているため、トルエン耐性に関わるタンパク質の成熟に関わっている可能性があると考えられた。

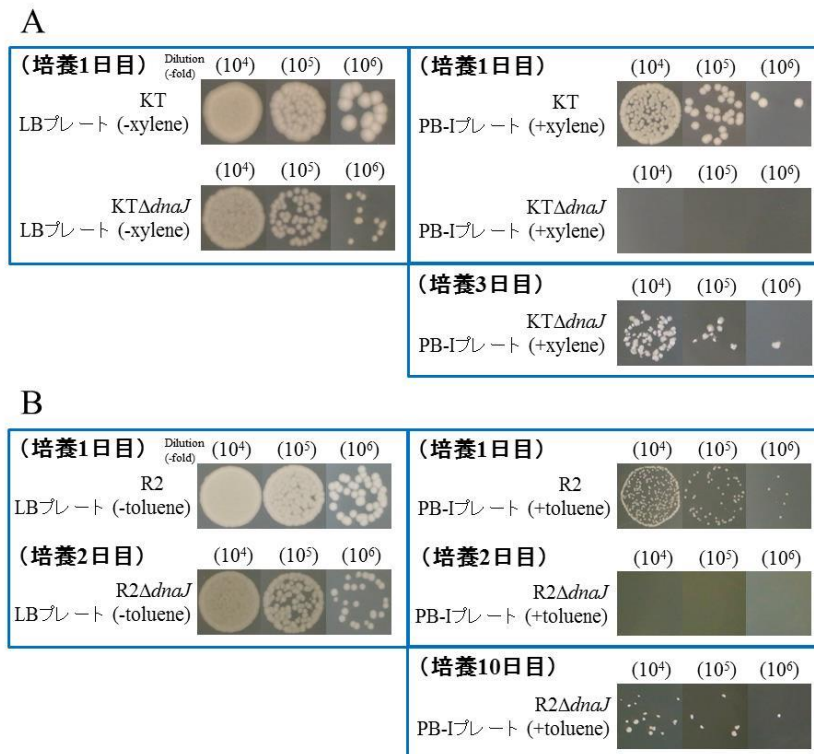


図 4-2. *dnaJ* 欠損株の有機溶媒存在下での生育

A; KT 株と *KTΔdnaJ* 株のキシレン重層下でのコロニー形成、B; R2 株と *R2ΔdnaJ* 株のトルエン重層下でのコロニー形成

左側は有機溶媒なしで、右側は有機溶媒を重層して培養した。

2) OxyR 結合部位削除株および *recG* 欠損株の作製とその形質の解析

有機溶媒耐性におけるペルオキシレドキシシン AhpC の役割を調べるために、AhpC 遺伝子 (*ahpC*) のプロモーター近傍に存在する、OxyR 結合部位 (OBD) の削除を試みた。*ahpC* のプロモーター領域の DNA 配列を、図 4-3 に示した。相同組換え株の AhpC の発現量を指標とすることで、KT 株および *KT-oxyR1* 株において、OBD を削除した株 (*KTΔOBD* 株および *KT-oxyR1ΔOBD* 株) を作製することに成功した。また、KT 株、*KT-oxyR1* 株、*KTΔOBD* 株、*KT-oxyR1ΔOBD*

株のそれぞれにおいて、*recG* 欠損株についても作製に成功した。欠損株の Km 耐性遺伝子の挿入位置と、同株の作製に使用したプライマーの位置を図 4-4 に示した。

ahpC プロモーター領域の塩基配列

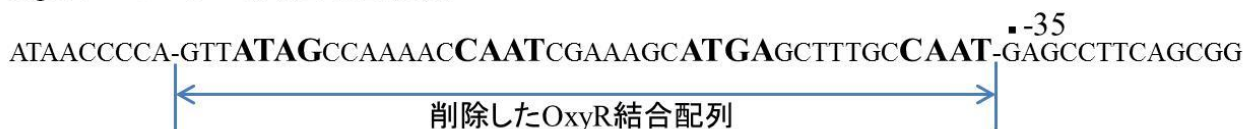


図 4-3. *ahpC* プロモーター領域の OxyR 結合部位の削除部位
OxyR 結合部位のコンセンサス配列： **ATAG-n7-CTAT-n7-ATAG-n7-CTAT**

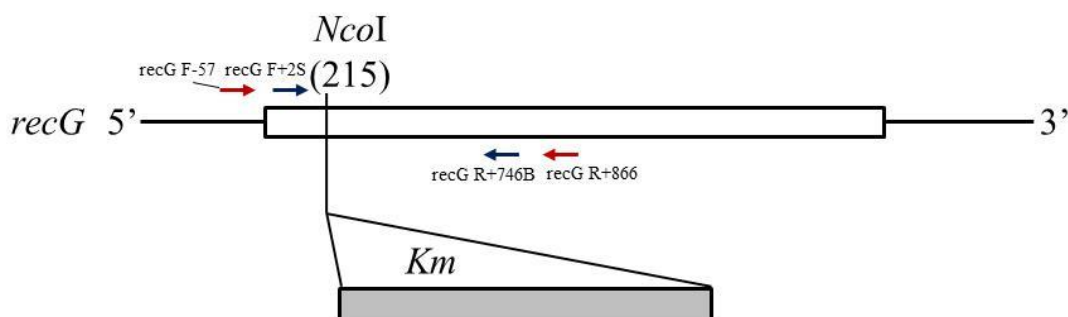


図 4-4. *recG* 欠損株の遺伝子内のカナマイシン耐性遺伝子の挿入部位と使用したプライマーの結合位置
ORF; オープンリーディングフレーム、*Km*; Km 耐性遺伝子、() の数字は ORF の開始コドン ATG の A の部位を 1 として計算した場所を示した。

各変異株の 30°Cにおける倍加時間を測定したところ、OBD の欠失の影響は、ほとんどなかった。一方、*recG* の欠失により、やや生育速度が遅くなることが分かった (表 4-2)。*recG* は、細胞の生育に必須ではないが、細胞が分裂するときの DNA の複製に関わるとされており、生育に影響したものと考えられた。

各株の過酸化剤に対する感受性を調べたところ、OBD の欠失により、KT 株および KT-oxyR1 株の両株で、アルキル過酸化剤である *tert*-Butyl hydroperoxide (BHP) に対する耐性度が顕著に低下した (表 4-3)。

表 4-2. *Pseudomonas putida* 各株の 30℃における倍加時間

Strains	倍加時間 (分)
<i>Pseudomonas putida</i>	
KT2442 (KT)	36±1 ¹⁾
KTΔOBD	37±1
KT-oxyR1	36±1
KT-oxyR1ΔOBD	36±1
KTΔrecG	39±1
KTΔOBDΔrecG	39±1
KT-oxyR1ΔrecG	40±1
KT-oxyR1ΔOBDΔrecG	42±2

¹⁾平均±SD (n=3)

表 4-3. *Pseudomonas putida* 各株の過酸化物にに対する耐性

Strains	増殖阻止円の直径 (mm)	
	BHP [※]	H ₂ O ₂
	(3%)	(30%)
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT	28±1 ¹⁾	21±1
KTΔOBD	34±1	23±1
KTΔOBD (pUCP26Km)	34±1	23±1
KTΔOBD (pUCP26Km-ahpC)	28±0	23±0
KTΔOBD (pUCP26Km-ahpCF)	25±1	23±1
KTΔrecG	32±1	23±1
KTΔOBDΔrecG	37±1	28±1
KT-oxyR1	16±0	20±1
KT-oxyR1ΔOBD	33±1	19±1
KT-oxyR1ΔOBD (pUCP26Km)	34±0	19±1
KT-oxyR1ΔOBD (pUCP26Km-ahpC)	15±1	23±1
KT-oxyR1ΔOBD (pUCP26Km-ahpCF)	14±1	23±1
KT-oxyR1ΔrecG	22±1	21±1
KT-oxyR1ΔOBDΔrecG	37±0	27±1

¹⁾平均±SD (n=3)、BHP[※] : *tert*-Butyl hydroperoxide

oxyR1 変異をもつ KT-*oxyR1* 株は、KT 株に比べて BHP などのアルキル過酸化物に対する耐性が著しく高いが、*ahpC* の OBD が欠失することにより、KT 株の OBD 欠損株とほぼ同じ感受性となった。このことは、*ahpC* の誘導に、OxyR の活性化と OBD の存在が不可欠であることを示すものである。一方、 H_2O_2 の耐性においては、KT-*oxyR1* 株は KT 株と大きな差はないことが分かっている。*ahpC* の OBD が欠失することにより、両株の H_2O_2 に対する耐性度は大きくは変化しなかったが、KT 株では耐性度がわずかに低下し、逆に KT-*oxyR1* 株ではわずかに耐性となった (表 4-3)。KT-*oxyR1* Δ OBD 株の O/N 培養時の細胞内全タンパク質を確認したところ、OBD の欠失前と比べて、KatB カタラーゼ量がやや増加しているように見えた (結果は示していない)。このため、KT-*oxyR1* Δ OBD 株は、 H_2O_2 に対する耐性が若干高くなったものと考えられる。*ahpC* の OBD が失われたことにより OxyR は、他の遺伝子の同タンパク質結合領域に結合する頻度が高くなると予想される。活性化された OxyR は、標的遺伝子の転写量を上昇させるが、不活性のものは抑制的に働く可能性が高い (Toledano *et al.*, 1994)。このため、*ahpC* の OBD の欠失により、二つの株で過酸化水素に対する耐性度の変化に差が見られたものと考えられる。OBD 欠損株に、自身のプロモーターをもつ *ahpC* 遺伝子を、プラスミドにより導入したところ、BHP に対する耐性度は元の株のレベルに回復した。さらに、*ahpC* とオペロンを形成し AhpC を還元する AhpF の遺伝子 (*ahpF*) を併せて導入したところ、BHP に対してさらに耐性度が増加した。しかし、 H_2O_2 に対する耐性は、どちらの株でも回復しなかった。

KT 株と KT-*oxyR1* 株の *recG* 欠損株についても、BHP と H_2O_2 に対する耐性を調べたところ、両株共に、*recG* の欠失は BHP に対する耐性度を特に低下させることが明らかとなった (表 4-3)。 H_2O_2 に対する耐性もやや低下していたが、顕著ではなかった。KT 株における *recG* の欠失は、BHP に対する耐性に関して、同株における OBD の欠失と同程度に影響したが、KT-*oxyR1* 株では、その影響が KT 株ほどではなかった。このことは、OxyR が標的遺伝子のプロモーター上流領域に結合する際に、野生型 OxyR と変異型 OxyR では、RecG が果たす役割が異なる可能性があることを示すものと考えられる。加えて、OBD の欠損株におい

ても、*recG* の欠失が更なる過酸化物に対する耐性度の低下につながったことから、OxyR と RecG は、互いに協同的に働くと推測された。

各株の有機溶媒に対する耐性を調べるために、キシレン重層下でのコロニー形成能について検討した。結果を、図 4-5 に示した。*ahpC* プロモーターの OBD を欠失した場合には、有機溶媒耐性が顕著に低下することが分かった。

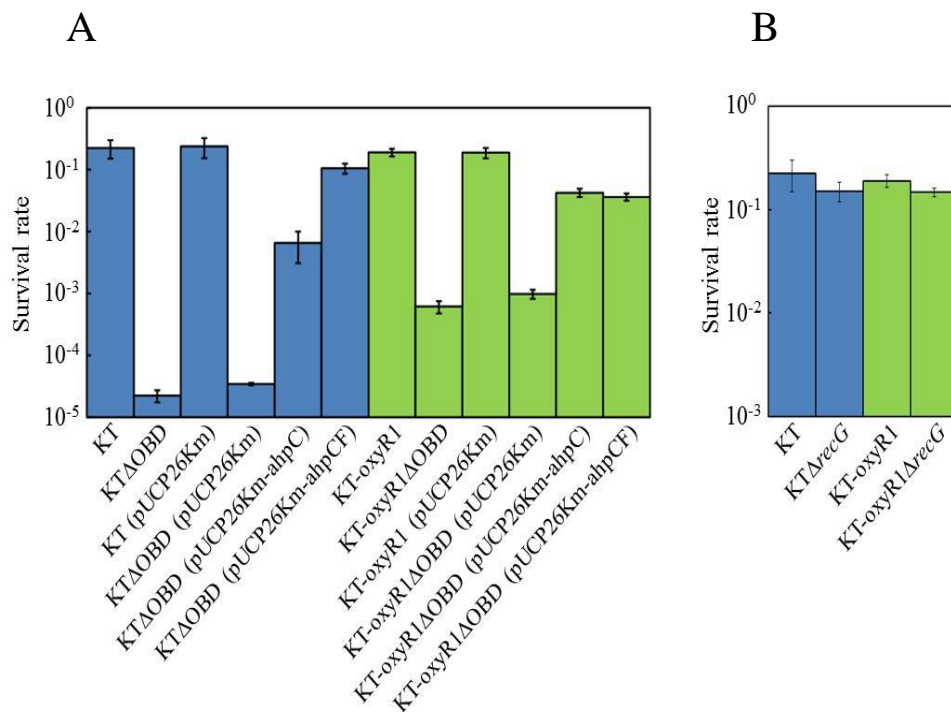


図 4-5. 変異株のキシレン耐性

A, OxyR 結合部位の損失によるキシレン耐性の影響

括弧内は導入したプラスミドを示す。ベクタープラスミド pUCP26Km、*ahpC* のみを含むプラスミド pUCP26Km-ahpC、および *ahpC* と *ahpF* を含むプラスミド pUCP26Km-ahpCF を導入した。3 回の平均値と SD (エラーバー) を示した。

B, *recG* 欠損によるキシレン耐性の影響

3 回操作を行った平均値と SD (エラーバー) を示した。

特に、KT 株では OBD が欠失することで、1/10⁴ 程度にコロニー形成能が低下した。KT-oxyR1ΔOBD 株では、KT 株の場合ほどではないが、約 1/300 にコロニー形成能が低下していた。有機溶媒の重層下でコロニー形成能が低下すること

は、エネルギー生産を行う呼吸鎖の電子伝達系が異常を起こし、細胞内で過酸化水素などの活性酸素種が生成されることから、細胞が死に至る可能性がある。本研究により作出した OBD の欠損株は、OxyR の活性化による *ahpC* の誘導が起こらないことから、細胞内で生じた活性酸素分子が増加して、細胞死に至ると推測される。KT-*oxyR1*ΔOBD 株が KTΔOBD 株よりも生存率が高かったのは、*oxyR* の変異によって KT-*oxyR1* 株において発現量が増加した、他の酸化ストレスに関わる遺伝子産物が、キシレンの毒性を緩和しているものと考えられる。

有機溶媒の耐性度の低下が、AhpC および（あるいは）AhpF の発現量の低下によるものであることを検討するために、プラスミドを用いた相補実験を行った（図 4-5A）。*ahpC* のみを相補した場合と、*ahpC* とオペロンを形成し、*ahpC* の再生に関わる *ahpF* と *ahpC* の両方を相補した場合のいずれにおいても、有機溶媒耐性度の上昇が観察された。KT-*oxyR1*ΔOBD 株の場合は、*ahpC* のみを相補した場合と、両方を相補した場合でほとんど差はなかったが、完全には元の耐性度に戻らなかった。KTΔOBD 株では、*ahpC* と *ahpF* の両方を相補した場合に、耐性度が KT 株に近いレベルまで回復した。*ahpC* のみを相補した場合には、回復の度合いは低かった。AhpC の還元には AhpF（および NADH）を必要とするが、*ahpC* のみを相補した場合に耐性度の顕著な上昇が見られたことから、OxyR による誘導を受けない場合にも、*ahpCF* の基礎的な転写があり、それにより生成された AhpF により、誘導され大量に発現した AhpC を還元することができるものと考えられる。一方、*recG* の欠損は、有機溶媒耐性にほとんど影響しなかった（図 4-5B）。

第3節 考察

P. putida において、*ahpC* プロモーター領域の OxyR 結合部位を除去した株を作製することで、AhpC ペルオキシレドキシンの有機溶媒耐性における機能を評価できるようになった。*ahpC* が *E.coli* の有機溶媒耐性に関わることは、以前に報告されているが（Ferrante *et al.*, 1995）、本研究により、AhpC が有機溶媒の耐

性に直接関わっていることを明らかにすることができたと考える。有機溶媒による細胞への影響は、細胞膜への有機溶媒の蓄積により、膜の流動性や細胞内の pH、あるいは膜電位を変化させる。これにより、細胞死が起きると考えられている。有機溶媒の耐性の獲得は、排出ポンプの発現、膜構成の不飽和脂肪酸のシス型からトランス型への異性化、Hsp の発現などが関係することが知られている (Segura *et al.*, 2012)。 *P. putida* は、 *E. coli* と比較して高い有機溶媒耐性を持っており、 *P. putida* KT2440 株の OxyR レギュロンのいくつかの遺伝子がトルエンによって誘導され (Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006)、フェノールによって AhpC が誘導されることが報告されている (Santos *et al.*, 2004)。 *ahpC* の OxyR 結合部位の除去により、AhpC が誘導されず、細胞内に生じた過酸化物が分解できず、有機溶媒耐性が顕著に低下したものと考えられる。細胞内で生じる過酸化物は、DNA に障害を与え、変異を導入させることから、細胞分裂ができずに死に至ると思われる。

過酸化物を基質とする AhpC の OxyR による誘導が起こらないことで、特に、アルキル過酸化物 (BHP) に対する耐性度が顕著に低下した。 *oxyR* とオペロンを形成していると考えている *recG* についても、欠損株を作製して、その影響を確認した。RecG は酸化ストレスに対して重要な因子であり、OxyR に依存する遺伝子の制御に OxyR と RecG が協同的に作用する可能性が考えられている。

(Yeom *et al.*, 2012)。また、 *P. aeruginosa* において *recG* の欠損株により、過酸化物に対する耐性度が低下することが報告されている (Ochsner *et al.*, 2000)。 *P. putida* においても、 *recG* の欠損により、BHP と H₂O₂ に対する耐性度が低下し、OxyR の結合部位を削除した場合と *recG* の欠損した二重変異株では、さらに過酸化物に対して感受性となった。このことから、 *oxyR* とオペロンを形成していると考えられる *recG* は、OxyR と協同的に転写を調節していると考えられる。RecG は DNA の組換えなどに関係している ATP 依存性ヘリカーゼである。本研究により、酸化ストレスに関係していることが明らかとなったが、有機溶媒耐性における役割は顕著ではなかった。

要約および総括

1) 要約

①DnaK/DnaJ システムは 35°C以上での生育に重要な役割をもつ

生物において Hsp70 は、タンパク質の立体構造の構築だけでなく、凝集したタンパク質の脱凝集や立体構造の再構築、組み立て、不要なタンパク質の除去などのタンパク質の品質管理を行うとともに、タンパク質の輸送にも関わっており、ストレス応答や細胞内のシャペロンネットワークの中心となっている。細菌の Hsp70 ホモログの中で、最も詳細に研究されている大腸菌の DnaK システムは、DnaK、DnaJ、GrpE から構成されており、DnaK は DnaJ (Hsp40) の補助により、あるいは単独で、リボソームから合成された新生ポリペプチドや変性したタンパク質の疎水性領域に結合し、露出したポリペプチドの疎水性領域が互いに凝集することを防いでいる。DnaK に ATP が結合している場合は、基質ポリペプチドは基質結合ドメインから結合と解離を繰り返すが、Hsp40 による ATP の加水分解の促進が、基質ポリペプチドとの結合を安定化し、Hsp40 としては DnaJ、CbpA、DjlA が存在する。また、大腸菌の DnaK 遺伝子変異株、および DnaJ 遺伝子欠損株は、いずれも温度感受性を示すことが知られている。我々の研究室では、これまでに *P. putida* KT2442 株 (KT 株) のトルエン耐性株である *P. putida* KT2442-R2 株 (R2 株) について、全ゲノム配列を決定するとともに、タンパク質の発現パターンや、リアルタイム PCR や DNA マイクロアレイによる遺伝子の発現解析を行ってきた。R2 株は、分子シャペロンとして機能する DnaK をコードする遺伝子 (*dnaK*) に点変異 (*dnaK1* 変異) をもち、野生株と比べて温度感受性が高く、35°C以上の温度ではコロニーを形成できない。また、(野生株においては非ストレス条件と考えられる) 通常の培養条件温度である 30°C で培養すると、KT 株と比較して定常期以降に Hsp を細胞内に蓄積する特徴を持つ。これは、Hsp の発現を制御するシグマ因子 (σ^{32}) の、量的および活性の制御に関わる DnaK の機能不全により、 σ^{32} が安定化したためと考えられている。

本研究において作出した KT 株の *dnaJ* 欠損株 (KT Δ *dnaJ* 株) は、R2 株と同様

にすべての生育温度域で著しい増殖速度の低下が観察された。また、35°Cではコロニー形成能が0.1%程度に、37°Cではさらにその1/100程度にコロニー形成能が低下し、*dnaK* 変異株の R2 株ほどではないが、高い温度感受性を示すことが判明した。他の J-ドメインタンパク質遺伝子の欠損をもつ株 (KTΔ*cbpA* 株、KTΔ*djlA* 株) では、増殖に影響はなかった。*dnaJ* のアナログとされている *cbpA* を、プラスミドにより KTΔ*dnaJ* 株に導入した場合、35°Cでは生育の遅延は完全に回復することはできなかったが、コロニー形成能を回復した。一方、37°Cでは十分に相補することはできなかった。また、*djlA* はそれらの回復に全く機能しなかった。このことは、*P. putida* において、DnaK および DnaJ が生育温度域の決定に深く関係しており、DnaJ は通常よりも高い温度での生育において、CbpA や DjlA が相補できない機能をもつことを強く示唆するものである。

② *Pseudomonas putida* の熱ショック応答

対数増殖期 (OD₆₀₀ ~ 1.0) の KT 株の培養温度を、様々な温度 (33°C、35°C、37°C、40°C、42°C、45°C、50°C) にシフトし、SDS-PAGE による全タンパク質を観察することで、タンパク質レベルでの熱ショック応答を確認した。30°Cの培養温度から 33°Cへとシフトした場合は、Hsp 量の増加は観察されなかった。35°Cへシフトした場合は、DnaK、GroEL、HtpG のわずかな増加が見られ、Hsp の増加が確認された。さらに、高い温度の 37°Cでも同様な Hsp の増加が見られた。40°C、42°Cでは主に ClpB、DnaK、GroEL、HtpG の増加が見られた。増加が観察された Hsp の中でも、ClpB については、40°C、42°C、45°Cで熱処理の時間の経過とともに増加が見られるが、*P. putida* KT2442 株の生育可能な温度の 37°Cまでは、ClpB の顕著な増加は見られなかった。また、45°Cにおける熱ショック応答を確認したところ、42°Cではタンパク質量の増加が確認された DnaK、HtpG、GroEL の大きな増加は確認できなかった。しかし、ClpB のみにおいては、45°Cの処理後、時間の経過とともに、他の Hsp と比べて、優先して ClpB 量が増加していることが確認できた。さらに、高い温度の 50°Cの処理では、Hsp だけでなく様々なタンパク質の合成も停止しているように見えた。KT 株の各変異株

で 42°C、45°C の熱ショック応答を確認したところ、どの株でも基本的に 42°C における熱ショック応答は確認され、Hsp（主に、ClpB、DnaK、HtpG、GroEL）の発現の増加が確認された。高温処理後の生存率が低下する *KTΔclpB* 株の熱ショック応答は *KT* 株と同じであった。しかし、*KTΔdnaJ* 株においては、42°C の処理において、Hsp の誘導が鈍った。*dnaK* 変異株である R2 株も同様に、42°C で熱ショック応答が起こったが、*KTΔdnaJ* 株と同様に Hsp の誘導が鈍った。また、熱処理により、elongation factor G (EF-G) と 30S ribosomal protein S1 (RpsA) の二つのタンパク質が、経時的に減少しており、特に *KTΔclpB* 株ではそれが顕著であった。これらのタンパク質の量的調節は、少なくとも転写レベルで起きていることが、遺伝子発現解析により明らかとなった。

大腸菌では、熱ショック応答は、 σ^{32} の量の変化に依存することが知られている。ウエスタンブロッティングにより、熱処理による σ^{32} の変化を検出した。*KT* 株では熱処理前の σ^{32} の量は、低いレベルに抑えられていた。しかし、細胞を 33°C に 10 分間さらすと、Hsp の増加は観察されなかったが、 σ^{32} 量の顕著な増加が観察された。この増加は一時的で、20 分後には低下したが、30 分後では再び増加していた。リアルタイム定量 PCR により、*KT* 株で熱処理前後の細胞から調製した RNA を定量することで、4 つの *hsp* 遺伝子 (*clpB*、*dnaK*、*htpG*、*groEL*) の転写量を測定したところ、*clpB*、*dnaK*、*htpG* の発現は、 σ^{32} の変化と高い相関をもつことが明らかとなった。この発現量の上下は、より高い温度では振れ幅が少なくなり、発現は上昇する傾向があった。しかし、*groEL* においては、この現象は見られなかった。*groEL* の mRNA は 5'非翻訳領域が長く、明確なステムループ構造を少なくとも 3 つもっているのに対して、*clpB*、*dnaK*、*htpG* の mRNA は、5'非翻訳領域が短く安定な構造をとることは難しい。このことが、mRNA の安定性に大きく関わるものが推測される。

③ *Pseudomonas putida* の CbpA は熱ショックタンパク質である

大腸菌の *Hsp* 遺伝子の多くは、 σ^{32} により認識される典型的な熱ショックプロモーター配列を持っている。これまでの研究から、大腸菌では σ^{32} の制御下にあ

る 50 個以上の転写単位のうち、約 3 分の 2 のプロモーターは、最も上流にある遺伝子の開始コドンの上流 100bp 以内に位置している。*P. putida* のゲノム配列から、 σ^{32} のプロモーター配列 (CTTGAA-n₁₃₋₁₇-CCCCATnT) をもつと考えられる遺伝子を検索したところ、すでに同定されていた σ^{32} 依存性の *Hsp* 遺伝子のほかに *cbpA*、*hfq* (host factor-I をコードする PP_4894)、*secA* (タンパク質輸送に関わる SecA をコードする PP_1345) が新たに見出された。前述したように、大腸菌の CbpA は DnaK の ATPase 活性を促進させる DnaJ の、機能的なアナログとされる J-ドメインタンパク質であり、*cbpA* は *dnaJ* 欠損株の成長をサポートし、凝集タンパク質の再生を補助することが知られている。大腸菌においては、*cbpA* の発現は定常期特異的シグマ因子である σ^S によって制御され、定常期もしくはリンが欠乏した場合に発現することが報告されている。これに対して、*P. putida* では定常期での *cbpA* の発現量の増加は見られなかった。*P. putida* における熱ショック時の *cbpA* の mRNA 量を測定したところ、熱処理前と比べ 2 オーダーほど高く誘導され、熱処理時の誘導は、 σ^S をコードする *rpoS* の欠損株でも同様に起こることが判明した。さらに、CbpA タンパク質量は熱処理によって 5 倍程度増加することが、*P. putida* の CbpA に対して作製した抗血清を用いて確認することができた。これらの結果から、*P. putida* の CbpA は大腸菌とは異なり、 σ^{32} 依存性の *Hsp* であると結論づけられた。

④ClpB は高温耐性と凝集タンパク質の再生に重要であり DnaK システムと協同して機能する

分子シャペロンおよび ATP 依存性プロテアーゼの欠損が、*P. putida* の高温耐性におよぼす影響を検討した。野生株 (KT 株) では、*clpB* 遺伝子の欠損だけが、50°C 処理後の生存率の大幅な低下を引き起こした。*dnaK* に変異をもつ R2 株においては、*dnaJ* の欠損が *clpB* ほどではないが、生存率を低下させた。また R2 Δ *clpB* 株は、高温処理で KT Δ *clpB* 株よりもさらに生存率が低下し、高温耐性に DnaK システムと ClpB が協同的に働いている可能性が示唆された。

次いで、熱処理による不溶性 (凝集) タンパク質の生成と、その再生につい

て検討を行った。KT株を様々な温度（30-45℃）で30分間処理し、凝集タンパク質として細胞の不溶性タンパク質を調製した。熱処理前の不溶性タンパク質を、PMF法により同定したところ、Porin DやOuter membrane protein OprFなど膜タンパク質が検出された。37℃の処理では低分子のタンパク質凝集体の形成が見られ、熱処理の温度を高くするにしたがって、凝集タンパク質と考えられる不溶性タンパク質の種類と量は増加した。45℃、30分間の処理により、細胞内の不溶性タンパク質が3~4倍ほど増加したが、その後30℃で2時間程度培養した後は、かなりの割合で凝集タンパク質の再生が起こっていた。*P. putida*の各変異株を同様に処理したところ、KTΔ*clpB*株は45℃熱処理時に生じた凝集タンパク質がほとんど再生されなかった。熱処理により生じた不溶性タンパク質を、PMF法により同定したところ、elongation factor Gやリボソームタンパク質S3、同L5、などの多種多様のタンパク質が不溶化していることが分かった。

酵母のHsp104や細菌のClpBは、ATP依存型の分子シャペロンで、生物における熱耐性や凝集タンパク質の脱凝集に、それぞれHsp70システムやDnaKシステムと協同的に働くことが知られている。*P. putida*の*clpB*欠損株において、高温の熱処理後にコロニー形成能が大きく低下することは、ClpBの欠失により、凝集したタンパク質が再生・可溶化できないからであると推定できる。特に、EF-Gやリボソームタンパク質が不溶化して機能を持たないために、*clpB*欠損株が熱処理後にコロニーを形成できない理由の一つである可能性が示唆された。

また、*dnaJ*欠損株においては、熱処理を行う前の30℃でO/N培養後の細胞内に、他の株ではほとんど見出せない数種の不溶性タンパク質が蓄積していた。解析の結果、それらはリボソームタンパク質であることが分かった。KTΔ*dnaJ*株は、熱処理により他のKT株に由来する株よりも、多くの凝集タンパク質が蓄積し、特に200kDa以上の高分子の凝集タンパク質が蓄積することが分かった。タンパク質の凝集を防ぐ働きをもつDnaJの欠失が、この原因であると考えられる。*dnaJ*欠損株では、*clpB*欠損株とは異なり、凝集タンパク質の再生は起きるが、200kDa以上の高分子の凝集タンパク質は再生されにくかった。KTΔ*dnaJ*株に*dnaJ*もしくは*cbpA*を、プラスミドにより相補した場合、*dnaJ*ではKT株と

同程度、*cbpA* では *dnaJ* よりは少ないが、かなりの凝集タンパク質の再生が起きたことから、*cbpA* は凝集タンパク質の再生における *dnaJ* の機能を、一部を相補できる可能性が示唆された。また、*dnaK* 変異株である R2 株に由来する株では、ほとんど不溶性タンパク質が再生されないように思われた。

2) 総括

P. putida の分子シャペロン遺伝子の機能解析のために、様々な分子シャペロン遺伝子の欠損株を作出し、主に熱ショックによるストレスの影響を調べることにより解析を進めた。同じグラム陰性細菌の大腸菌の熱ショック応答は、シグマ因子の σ^{32} によって制御されていることが知られている。*P. putida* においても熱ショック応答は、 σ^{32} により同様な制御を受けていることが確認された。しかしながら、すべてが大腸菌と同一ではないことも明らかとなった。大腸菌では σ^{38} (σ^S) に制御されており、定常期に発現誘導される J-ドメインタンパク質の CbpA は、*P. putida* では Hsp であり、かつ σ^{32} によって制御されている可能性が高いことが示唆された。腸内細菌である大腸菌と異なり、*P. putida* は土壌微生物であるために、生育環境の違いや転写調節因子の相違から、*P. putida* は CbpA を DnaJ の機能を相補できる J-ドメインタンパク質として、独自に進化させたものと考えられる。

熱ストレスによって細胞内に生じる凝集タンパク質（不溶性タンパク質）の再生・可溶化には、Clp ファミリーの ClpB と DnaK シャペロンチームが関わりとされている。*P. putida* においても、同様にその再生の過程に *clpB*、*dnaK*、*dnaJ* が深くかかわっていることが明らかとなった。非常に高い温度に細胞を曝した場合、*clpB* 欠損株では、コロニー形成能が著しく低下し、その際に生じると考えられる不溶性タンパク質は、大腸菌の欠損株と同様に再生がほとんど起こらず、不溶化したままであることが明らかとなった。加えて、*dnaJ* の欠損は、その菌株の温度感受性を引き起こすこと、リボソームタンパク質の折りたたみに影響を与えることや、また、熱ストレスにより、高分子の凝集タンパク質の生成を引き起こすことが明らかとなった。さらに、*dnaK* における変異も、同様に

凝集タンパク質の再生を妨げる要因であることが明らかとなった。

P. putida は高温にさらされたときには、elongation factor G や 30S リボソームサブユニットタンパク質 A などのタンパク質合成に極めて重要な役割をするタンパク質の合成を抑制し、停止させると考えられた。熱に不安定なタンパク質の合成は、細胞にとって今後の生育に悪影響を増大させる可能性があるため、さらに、高温の場合は、Hsp の合成でさえ停止させると考えられる。加えて、45°Cでは細胞内に豊富に存在する *Hsp* 遺伝子の mRNA の存在は、Hsp 以外のタンパク質合成を妨げる働きをしている可能性がある。

本研究は、*P. putida* における分子シャペロンの機能について、熱ストレス応答を中心に、詳細な解析を行ったものである。*P. putida* における分子シャペロンが関わるストレス適応機構は、本質的には大腸菌のものときわめて類似しているが、それぞれの分子種の機能について生物間での差異が存在し、微生物の多様性を示唆するものであると確信する。

参考文献

- Acebrón, S.P., Fernández-sáiz, V., Taneva, S. G., Moro, F., and Muga, A. (2008) DnaJ recruits DnaK to protein aggregates. *J. Biol. Chem.* **283**: 1381-1390.
- Acebrón, S.P., Martín, I., del Castillo, U., Moro, F., and Muga, A. (2009) DnaK-mediated association of ClpB to protein aggregates. A chaperone network at the aggregate surface. *FEBS Lett.* **583**: 2991-2996.
- Allan, B., Linseman, M., MacDonald, L.A., Lam, J.S., and Kropinski, A.M. (1988) Heat shock response of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **170**: 3668-3674.
- Aramaki, H., Hirata, T., Hara, C., Fujita, M., and Sagara, Y. (2001) Transcription analysis of *rpoH* in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**: 165-169.
- Arsène, F., Tomoyasu, T., and Bukau, B. (2000) The heat shock response of *Escherichia coli*. *J. Food Microbiol.* **55**: 3-9.
- Åslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., and Storz, G. (1999) Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular-thiol disulfide status. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 6161-6165.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Sedman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1992) *Short Protocols in Molecular Biology*, 2nd edn. New York, NY, USA: Green/Wiley.
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F.C., Bagdasarian, M.M., Frey, J., and Timmis, K.N. (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**: 237-247.
- Bardwell, J.C.A., and Craig, E.A. (1988) Ancient heat shock gene is dispensable. *J. Bacteriol.* **170**: 2977-2983.
- Bukau, B., and Horwich, A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**: 351-366.
- Calloni, G., Chen, T., Schermann, S.M., Chang, H.C., Genevoux, P., Agostini, F., *et al.*

- (2012) DnaK functions as a central hub in the *E. coli* chaperone network. *Cell Rep.* **1**: 251-264.
- Chenoweth, M.R., Trun, N., and Wickner, S. (2007) In vivo modulation of a DnaJ homolog, CbpA, by CbpM. *J. Bacteriol.* **189**: 3635-3638.
- Desmond, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., and Ross, R.P. (2004) Improved stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5929-5936.
- Domínguez-Cuevas, P., González-Pastor, J.E., Marqués, S., Ramos, J.L., and de Lorenzo, V. (2006) Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *J. Biol. Chem.* **281**: 11981-11991.
- Doyle, S.M., and Wickner, S. (2009) Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. *Trends Biochem. Sci.* **34**: 40-48.
- Ferrante, A.A., Augliera, J., Lewis, K., and Klibanov, A.M. (1995) Cloning of an organic solvent-resistance gene in *Escherichia coli*: The unexpected role of alkylhydroperoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7617-7621.
- Frank, S., Klockgether, J., Hagendorf, P., Geffers, R., Schöck, U., Pohl, T., *et al.* (2011) *Pseudomonas putida* KT2440 genome update by cDNA sequencing and microarray transcriptomics. *Environ. Microbiol.* **13**: 1309-1326.
- Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M., and Timmis, K.N. (1981) Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning of the genes for the entire regulated aromatic ring-cleavage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 7458-7462.
- Fukumori, F., and Kishii, M. (2001) Molecular cloning and transcriptional analysis of the alkyl hydroperoxide reductase genes from *Pseudomonas putida* KT2442. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **47**: 269-277.
- Gamer, J., Multhaup, G., Tomoyasu, T., McCarty, J.S., Rüdiger, S., Schönfeld, H.J., *et al.* (1996) A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones

- regulates activity of the *Escherichia coli* heat shock transcription factor σ^{32} . *EMBO J.* **15**: 607-617.
- Genest, O., Hoskins, J.R., Camberg, J.L., Doyle, S.M., and Wickner, S. (2011) Heat shock protein 90 from *Escherichia coli* collaborates with the DnaK chaperone system in client protein remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 8206-8211.
- Genevaux, P., Georgopoulos, C., and Kelley, W.L. (2007) The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions. *Mol. Microbiol.* **66**: 840-857.
- Genevaux, P., Schwager, F., Georgopoulos, C., and Kelley, W. (2001) The *djlA* gene acts synergistically with *dnaJ* in promoting *Escherichia coli* growth. *J. Bacteriol.* **183**: 5747-5750.
- Georgopoulos, C.P. (1977) A new bacterial gene (*groPC*) which affects λ DNA replication. *Mol. Gen. Genet.* **151**: 35-39.
- Glover, J.R., and Lindquist, S. (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**: 73-82.
- Godoy, P., Molina-Henares, A.J., Torre, J., Duque, E., and Ramos, J.L. (2010) Characterization of the RND family of multidrug efflux pumps: in silico to in vivo confirmation of four functionally distinct subgroups. *Microb. Biotechnol.* **3**: 691-700.
- Goldberg, A.L., Moerschell, R.P., Chung, C.H., and Maurizi, M.R. (1994) ATP-dependent protease La (lon) from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **244**: 350-375.
- Goldfless, S.J., Morag, A.S., Belisle, K.A., Sutera, V.A., and Lovett, S.T. (2006) DNA repeat rearrangements mediated by DnaK-dependent replication fork repair. *Mol. Cell* **21**: 595-604.
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T., and Bukau, B. (1999) Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 13732-13737.

- Gragerov, A., Nudler, E., Komissarova, N., Gaitanaris, G.A., Gottesman, M.E., Nikiforov, V. (1992) Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10341-10344.
- Guisbert, E., Yura, T., Rhodius, V.A., and Gross, C.A. (2008) Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the *Escherichia coli* heat shock response. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**: 545-554.
- Gur, E., Biran, D., Shechter, N., Genevaux, P., Georgopoulos, C., and Ron, E.Z. (2004) The *Escherichia coli* DjlA and CbpA proteins can substitute for DnaJ in DnaK-mediated protein disaggregation. *J. Bacteriol.* **186**: 7236-7242.
- Gur, E., Biran, D., and Ron, E. Z. (2011) Regulated proteolysis in gram-negative bacteria - how and when? *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 839-848.
- Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**: 324-332.
- Hennessy, F., Nicoll, W.S., Zimmermann, R., Cheetham, M.E., and Blatch, G.L. (2005) Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. *Protein Sci.* **14**: 1697-1709.
- Herman, C., Thévenet, D., D'Ari, R., and Bouloc, P. (1995) Degradation of σ^{32} , the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3516-3520.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6557-6567.
- Hishinuma, S., Otsu, I., Fujimura, M., and Fukumori, F. (2008) OxyR is involved in the expression of thioredoxin reductase, TrxB, in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Lett.* **289**: 138-145.
- Hishinuma, S., Yuki, M., Fujimura, M., and Fukumori, F. (2006) OxyR regulated the expression of two major catalases, KatA and KatB, along with peroxiredoxin, AhpC

- in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* **8**: 2115-2124.
- Imlay, J.A. (2013) The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 443-454.
- Jørgensen, F., Bally, M., Chapon-Herve, V., Michel, G., Lazdunski, A., Williams, P., and Stewart, G.S. (1999) RpoS-dependent stress tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **145**: 835-844.
- Kaniga, K., Delor, I., and Cornelis, G.R. (1991) A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**: 137-141.
- Keith, L.M., Partridge, J.E., and Bender, C.L. (1999) *dnaK* and the heat stress response of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**: 563-574.
- Key, J.L., Lin, C.Y., and Chen, Y.M. (1981) Heat shock proteins of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 3526-3530.
- Kim, K., Lee, S., Lee, K., and Lim, D. (1998) Isolation and characterization of toluene-sensitive mutants from toluene-resistant bacterium *Pseudomonas putida* GM73. *J. Bacteriol.* **180**: 6769-6772.
- Kim, J., Jeon, C.O., and Park, W. (2008) Dual regulation of *zwf-1* by both 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate and oxidative stress in *Pseudomonas putida*. *Microbiology* **154**: 3905-3916.
- Kim, J., and Park, W. (2014) Oxidative stress response in *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 6933-6946.
- Kobayashi, Y., Ohtsu, I., Fujimura, M., and Fukumori, F. (2011) A mutation in *dnaK* causes stabilization of the heat shock sigma factor σ^{32} , accumulation of heat shock proteins and increase in toluene-resistance in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* **13**: 2007-2017.
- Koo, B.M., Rhodius, V.A., Campbell, E.A., and Gross, C.A. (2009) Dissection of recognition determinants of *Escherichia coli* σ^{32} suggests a composite-10 region with an 'extended -10' motif and a core -10 element. *Mol. Microbiol.* **72**: 815-829.

- Kortmann, J., and Narberhaus, F. (2012) Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**: 255-265.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laskowska, E., Kuczynska-Wisnik, D., Skorko-Glonek, J., and Taylor, A. (1996) Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of *Escherichia coli* proteins aggregated *in vivo* by heat shock; HtrA protease action *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Microbiol.* **22**: 555-571.
- Laufen, T., Mayer, M.P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J., and Bukau, B. (1999) Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ co-chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5452-5457.
- Lim, B., Miyazaki, R., Neher, S., Siegele, D.A., Ito, K., Walter, P., *et al.* (2013) Heat shock transcription factor σ^{32} co-opts the signal recognition particle to regulate protein homeostasis in *E. coli*. *PLoS Biol.* **11**: e1001735.
- Linke, K., Wolfram, T., Bussemer, J., and Jakob, U. (2003) The roles of the two zinc binding sites in DnaJ. *J. Biol. Chem.* **278**: 44457-44466.
- Mackie, G.A. (2013) RNase E: at the interface of bacterial RNA processing and decay. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 45-57.
- Manzanera, M., Aranda-Olmedo, I., Ramos, J. L., and Marqués, S. (2001) Molecular characterization of *Pseudomonas putida* KT2440 *rpoH* gene regulation. *Microbiology* **147**: 1323-1330.
- McCarty, J.S., Buchberger, A., Reinstein, J., and Bukau, B. (1995) The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J. Mol. Biol.* **249**: 126-137.
- Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rüdiger, S., Röder, D., Langen, H., and Bukau, B. (1999) Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.* **18**: 6934-6949.
- Mongkolsuk, S., Whangsuk, W., Fuangthong, M., and Loprasert, S. (2000) Mutations

- in *oxyR* resulting in peroxide resistance in *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.* **182**: 3846-3849.
- Morita, M.T., Kanemori, M., Yanagi, H., and Yura, T. (2000) Dynamic interplay between antagonistic pathways controlling the σ^{32} level in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 5860-5865.
- Motojima-Miyazaki, Y., Yoshida, M., Motojima, F. (2010) Ribosomal protein L2 associates with *E. coli* HtpG and activates its ATPase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **400**: 241-245.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A. *et al.* (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**: 799-808.
- Nonaka, G., Blankschien, M., Herman, C., Gross, C.A., and Rhodius, V.A. (2006) Regulation and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, σ^{32} , reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes Dev.* **20**: 1776-1789.
- Ochsner, U.A., Vasil, M.L., Alsabbagh, E., Parvatiyar, K., and Hassett, D.J. (2000) Role of the *Pseudomonas aeruginosa oxyR-recG* operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of *katB-ankB*, *ahpB*, and *ahpC-ahpF*. *J. Bacteriol.* **182**: 4533-4544.
- Paek, K.-H., and Walker, G.C. (1987) *Escherichia coli dnaK* null mutants are inviable at high temperature. *J. Bacteriol.* **169**: 283-290.
- Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A., and Lindquist, S. (1994) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* **372**: 475-478.
- Perales-Calvo, J., Muga, A., and Moro, F. (2010) Role of DnaJ G/F-rich domain in conformational recognition and binding of protein substrates. *J. Biol. Chem.* **285**: 34231-34239
- Poole, L.B., and Ellis, H.R. (1996) Flavin-dependent alkylhydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 1. Purification and enzymatic activities of over-

- expressed AhpF and AhpC proteins. *Biochemistry* **35**: 56-64.
- Porankiewicz, J., Wang, J., and Clarke, A.K. (1999) New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Mol. Microbiol.* **32**: 449-458.
- Potvin, E., Sanschagrin, F., and Levesque, R. C. (2008) Sigma factor in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 38-55.
- Ramos, J.-L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-González, M.I., Rojas A., Terán, W., and Segura, A. (2002) Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 743–768.
- Rüdiger, S., Schneider-Mergener, J., and Bukau, B. (2001) Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *EMBO J.* **20**: 1042-1050.
- Rudolph, C.J., Upton, A.L., Briggs, G.S., and Lloyd, R.G. (2010) Is RecG a general guardian of the bacterial genome? *DNA Repair* **9**: 210-223.
- Santos, P.M., Benndorf, D., and Sa-Correia, I. (2004) Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics. *Proteomics* **4**: 2640-2652.
- Schlieker, C., Weibezahn, J., Patzelt, H., Tessarz, P., Strub, C., Zeth, K., *et al.* (2004) Substrate recognition by the AAA+ chaperone ClpB. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**: 607-615.
- Schweder, T., Lee, K., Lomovskaya, O., and Martin, A. (1996) Regulation of *Escherichia coli* starvation sigma factor (σ^S) by ClpXP protease. *J. Bacteriol.* **178**: 470-476.
- Segura, A., Godoy, P., van Dillewijn, P., Hurtado, A., Arroyo, N., Santacruz, S., and Ramos, J.-L. (2005) Proteomic analysis reveals the participation of energy- and stress related proteins in the response of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to toluene. *J. Bacteriol.* **187**: 5937-5945.
- Segura, A., Molina, L., Fillet, S., Krell, T., Bernal, P., Muñoz-Rojas, J., and Ramos, J.-L. (2012) Solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.*

- 23**: 415-421.
- Sell, S.M., Eisen, C., Ang, D., Zylicz, M., and Georgopoulos, C. (1990) Isolation and characterization of *dnaJ* null mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 4827-4835.
- Seyffer, F., Kummer, E., Oguchi, Y., Winkler, J., Kumar, M., Zahn, R., *et al.* (2012) Hsp70 proteins bind Hsp100 regulatory M domains to activate AAA+ disaggregase at aggregate surfaces. *Nature Struct. Mol. Biol.* **19**: 1347-1355.
- Sharples, G.J., Ingleston, S.M., and Lloyd, R.G. (1999) Holliday junction processing in bacteria: insights from the evolutionary conservation of RuvABC, RecG, and RusA. *J. Bacteriol.* **181**: 5543-5550.
- Siegenthaler, R.K., and Christen, P. (2006) Tuning of DnaK chaperone action by nonnative protein sensor DnaJ and thermosensor GrpE. *J. Biol. Chem.* **281**: 34448–34456.
- Sikkema, J., de Bont, J.A. and Poolman, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev.* **59**: 201–222.
- 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.* **24**: 561-569.
- Squires, C.L., Pedersen, S., Ross, B.M., and Squires, C. (1991) ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J. Bacteriol.* **173**: 4254-4262.
- Storz, G., Tartaglia, L. A., and Ames, B.N. (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* **248**: 189-194.
- Straus, D., Walter, W., and Gross, C. (1987) The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of σ^{32} . *Nature* **329**: 348-351.
- Straus, D., Walter, W., and Gross, C. (1990) DnaK, DnaJ, GrpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of σ^{32} . *Genes Dev.* **4**: 2202-2209.
- Szabo, A., Langer, T., Schröder, H., Flanagan, J., Bukau, B., and Hartl, F.U. (1994)

- The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10345-10349.
- Tatsuta, T., Tomoyasu, T., Bukau, B., Kitagawa, M., Mori, H., Karata, K., and Ogura, T. (1998) Heat shock regulation in the *ftsH* null mutant of *Escherichia coli*: dissection of stability and activity control mechanisms of σ^{32} in vivo. *Mol. Microbiol.* **30**: 583-593.
- Thomas, J.G., and Baneyx, F. (1998) Role of *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HtpG in vivo. *J. Bacteriol.* **180**: 5165-5172.
- Tilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., Van Melderen, L. (2006) Biological roles of the Lon ATP-dependent protease. *Res Microbiol.* **157**: 701-713.
- Timmis, K.N. (2002) *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ. Microbiol.* **4**: 779-781.
- Toledano, M.B., Kullik, I., Trinh, F., Baird, P.T., Schneider, T.D., and Storz, G. (1994) Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection. *Cell* **78**: 897-909.
- Tomas, C.A., Welker, N.E., and Papoutsakis, E.T. (2003) Overexpression of *groESL* in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4951-4965.
- Tomoyasu, T., Gamer, J., Bukau, B., Kanemori, M., Mori, H., Rutman, A.J., *et al.* (1995) *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor σ^{32} . *EMBO J.* **14**: 2551-2560.
- Tomoyasu, T., Ogura, T., Tatsuta, T., and Bukau, B. (1998) Levels of DnaK and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **30**: 567-581.
- Tomoyasu, T., Mogk, A., Langen, H., Goloubinoff, P., and Bukau, B. (2001) Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and

- degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Mol. Microbiol.* **40**: 397-413.
- Tran, P.B., and Miller, R.J. (1999) Aggregates in neurodegenerative disease: crowds and power? *Trends Neurosci.* **22**: 194-197.
- Tyedmers, J., Mogk, A., and Bukau, B. (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**: 777-788.
- Ueguchi, C., Shiozawa, T., Kakeda, M., Yamada, H., and Mizuno, T. (1995) A study of the double mutation of *dnaJ* and *cbpA*, whose gene products function as molecular chaperones in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 3894-3896.
- Venturi, V. (2003) Control of *rpoS* transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: why so different? *Mol. Microbiol.* **49**: 1-9.
- Volkers, R.J.M., de Jong, A.L., Hulst, A.G., van Baar, B.L.M., de Bont, J.A.M., and Wery, J. (2006) Chemostat-based proteomic analysis of toluene-affected *Pseudomonas putida* S12. *Environ. Microbiol.* **8**: 1674-1679.
- Wade, J.T., Castro Roa, D., Grainger, D.C., Hurd, D., Busby, S.J., Struhl, K., and Nudler, E. (2006) Extensive functional overlap between σ factors in *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**: 806-814.
- Wawrzynów, A., Banecki, B., Wall, D., Liberek, K., Georgopoulos, C., and Zylicz, M. (1995) ATP hydrolysis is required for the DnaJ-dependent activation of DnaK chaperone for binding to both native and denatured protein substrates. *J. Biol. Chem.* **270**: 19307-19311.
- Weibezahn, J., Tessarz, P., Schlieker, C., Zahn, R., Maglica, Z., Lee, S., *et al.* (2004) Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. *Cell* **119**: 653-665.
- Yamamori, T., and Yura, T. (1980) Temperature-induced synthesis of specific proteins in *Escherichia coli*: evidence for transcriptional control. *J. Bacteriol.* **142**: 843-851.
- Yamashino, T., Kakeda, M., Ueguchi, C., and Mizuno, T. (1994) An analogue of the DnaJ molecular chaperone whose expression is controlled by σ^S during the stationary phase and phosphate starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **13**:

475-483.

- Yeom, J., Lee, Y., and Park, W. (2012) ATP-dependent RecG helicase is required for the transcriptional regulator OxyR function in *Pseudomonas* species. *J. Biol. Chem.* **287**: 24492-24504.
- Yeom, S., Yeom, J., and Park, W. (2010) Molecular characterization of FinR, a novel redox-sensing transcriptional regulator in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbiology* **156**: 1487-1496.
- Yura, T., Kanemori, M., and Morita, T. (2000) The heat shock response: regulation and function. In: *Bacterial Stress Response*, Storz, G., Hengge-Aronis R, (eds). Washington, DC: ASM Press, pp. 3-18.
- Yura, T., and Nakahigashi, K. (1999) Regulation of the heat-shock response. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 153-158.
- Zhao, B., Yeo, C.C., Tan, C.L., and Poh, C.L. (2007) Proteome analysis of heat shock protein expression in *Pseudomonas alcaligenes* NCIMB 9867 in response to gentisate exposure and elevated growth temperature. *Biotechnol. Bioeng.* **97**: 506-514.
- Zingaro, K.A., and Papoutsakis, E.T. (2013) GroESL overexpression imparts *Escherichia coli* tolerance to *i*-, *n*-, and 2-butanol, 1,2,4-butanetriol and ethanol with complex and unpredictable patterns. *Metab. Eng.* **15**: 196-205.
- Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W.F., Gragerov, A., Ogata, C.M., Gottesman, M.E., and Hendrickson, W.A. (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* **272**: 1606-1614.

謝辞

本論文を作成し、審査して頂くにあたり、懇切なご指導、ご鞭撻および暖かい配慮を賜りました東洋大学教授 福森 文康先生に深甚の謝意を表します。

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、懇切且つ適切なお指導を賜りました東洋大学教授 藤村 真先生に心から感謝の意を表します。また、本論文を精読して頂き、多くの貴重なご助言を賜りました東洋大学教授 道久 則之先生、ならびに東京大学大学院農学生命科学研究科助教 新井 博之先生に深く御礼申し上げます。

さらに、本研究の遂行にあたり、研究に関する協力などいただいた研究室の皆様、心より感謝の意を表します。