The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	大腸菌アルカリ性ホスファターゼの促進的調節遺伝子phoMのクローニングとその諸性質
Author(s)	牧野, 耕三
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34646
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【33】

氏名・（本籍）	牧（まき） 野（の） 耕（こう） 三（ぞう）
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 6827 号
学位授与の日付	昭和60年3月25日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**大腸菌アルカリ性ホスファターゼの促進的調節遺伝子 phoM のクローニングとその諸性質**
論文審査委員	（主査） 教 授 角永 武夫 （副査） 教 授 松代 愛三 教 授 松原 謙一

論 文 内 容 の 要 旨

（目　的）

phoA 遺伝子にコードされている大腸菌のアルカリ性ホスファターゼ（以下APaseと略す）によって代表されるリン酸レギュロン（phoAの他にphoE：ポリンeやphoS：リン酸結合タンパクなどが知られている）は，生理的にはリン酸の欠乏によって産生されるが，その遺伝学的調節機構は複雑である。APase の産生は phoR phoS phoV phoT pstB phoU 遺伝子群によって抑制的に，phoB phoM phoR 遺伝子群によって促進的に調節されている。

この複雑なリン酸レギュロンの発現調節機構を分子レベルで解明するためのアプローチとして，促進的に働くphoM遺伝子をクローニングし，遺伝子産物の同定，遺伝子産物の作用機序とその増幅によるphoA 遺伝子発現への影響，融合遺伝子を用いたphoM遺伝子自身の発現の調節などの諸性質を明らかにすることにより，リン酸レギュロンにおけるphoM遺伝子の役割を解明することを目的とした。

（方法ならびに成績）

大腸菌染色体 DNA 及びベクター・プラスミド pMF 3（菌体あたり1～2コピー）を制限酵素で切断し，リガーゼを用いて両者を結合させた。一方，phoM遺伝子は thr 遺伝子と隣接していることが知られているのでphoM phoR 欠損株（APaseを産生しない）からスレオニン要求株を分離した。このphoM phoR thr 欠損株をカルシウム処理し，上記の DNA を混合した後，アンピシリン添加M9培地にまきスレオニン非要求性でアンピシリン耐性の形質転換体を分離した。この形質転換体はスレオニン非要求性で APase を産生するようになっており，thr 遺伝子とphoM遺伝子とを含むプラスミドを持つためと考えられる。このプラスミド上には約10.8キロベース対（kb）の大腸菌染色体 DNA が

クローニングされていた。種々の制限酵素を用いて欠失プラスミッドを作成しphoM thr 両遺伝子のDNA上の位置を決定した。また，トランスポゾンTn 1000 挿入欠損法によってphoM遺伝子の領域が約1.5 kb であることを明らかにした。phoM遺伝子がコードしているタンパクをmaxicell法を用いて調べ，それが約60000ダルトンであることも明らかにした。Tn 1000の挿入の部位と，それによってできたtrunkatedのポリペプチドの関係から，phoM遺伝子の転写の方向が大腸菌遺伝子地図上で時計回りになっていることも分かった。さらに，強い発現力を持つプロモーター（lac tacプロモーター）をphoM遺伝子に連結することにより遺伝子産物の増産にも成功した。

phoM遺伝子は調節遺伝子であるから，その発現がどのように調節されているかを直接調べることができない。そこで，in vitroでphoMとlacZ遺伝子との融合遺伝子を作成し（それによりphoM遺伝子の転写方向が上述と一致することを確かめた），b－ガラクトシダーゼの活性を定量することによってphoMの発現を測定した。phoM遺伝子は，既知のどのリン酸レギュロン調節遺伝子の突然変異株のなかでも，培地中のリン酸濃度と無関係に，低いレベルで一定量発現していた。このとき，phoM－lacZ融合遺伝子を含むプラスミッドを持った菌のAPaseの産生を調べると，phoR欠損株ではその抑制が見られた。これは融合遺伝子の産物である融合タンパクが宿主染色体由来のphoMタンパクとの相互作用によってそれの誘導活性を阻害しているためと考えられる。

phoMの誘導活性はphoRの誘導活性の無いときにだけ働くと考えられる。phoM遺伝子を含む多コピープラスミッドを種々の突然変異株に導入し，APaseの産生を調べると，phoR欠損株でのみAPase産生の上昇が見られた。このことも上の考えを支持している。APaseの産生（phoA遺伝子の発現）にはphoB遺伝子産物が必須で，phoBの活性化にphoRまたはphoMが働くというモデルを我々のグループは提唱した。多コピーphoM遺伝子とphoB－lacZ融合遺伝子を共存させ，種々の突然変異株でphoBの発現を調べると，この場合でもphoR欠損株でのみphoBの発現が促進されていることが分かり，我々のモデルを支持している。

（総　括）

APaseの生理学的な役割についての定説はない。我々は，APaseを含むリン酸レギュロンの遺伝子群の発現は，大腸菌などの腸内細菌がリン酸の欠乏という生存に不利な条件下におかれたとき，乏しいリン酸をできるだけ効率よく取り込むための一種の適応的な反応であると考えている。リン酸レギュロンの発現の誘導にはphoB遺伝子産物が必須であり，上の実験その他の実験から，phoM phoR遺伝子はその上位でphoBの発現を調節していると考えられる。phoR遺伝子はAPase産生の促進と制御の両方の機能をもち（恐らく，phoB遺伝子を介して），その発現もリン酸の濃度に依存しており，発現の高低によって両機能の切り替えが起ると考えてもよい結果も得ている。一方，phoM遺伝子は抑制的機能をもたず，phoR遺伝子産物のない（あるいはphoM産物よりは少ない）ときにphoBの発現を促進し，それによってAPaseの産生を促すと考えられる。phoM遺伝子がphoR遺伝子の働かないときにだけ働くという機構については推測の域をでないが，phoR遺伝子産物の方が分子数が多いとか，phoB遺伝子に対してより強力に働くためなどが考えられる。APaseがリン酸の欠乏だけでなく核酸前駆体の欠乏とか，浸透圧の上昇によって誘導されることが報告されている。このような現象は，高濃度のリン

酸存在下でphoRの発現が抑制されているとき，phoM遺伝子の発現がリン酸以外の代謝経路によって誘導され，その産物が量的にphoR遺伝子産物を上まわるためにAPaseの誘導が起こるという可能性もある。何故なら，活性の高いtacプロモーターを結合させてphoM遺伝子産物を増幅させると，phoRはじめすべての調節遺伝子が正常である野性型株の中で，高濃度のリン酸存在下でもAPaseの産生がみられるからである。先に述べた抑制的調節遺伝子の中，phoS phoV phoT pstB phoU 遺伝子群はリン酸の細胞内への取り込みに関与しており，この経路から取り込まれたリン酸の代謝物がphoR遺伝子産物の機能と関連していると考えられる。phoM遺伝子の活性化はこれとは異なる環境の変化（浸透圧の変化とか核酸前駆体の欠乏など）に対応しておこると考えている。

論文の審査結果の要旨

大腸菌のリン酸レギュロン遺伝子群（phoA, phoE, phoSなど）は，生理的にはリン酸の欠乏により発現するが，遺伝学的調節機構は複雑である。本研究は，リン酸レギュロンの促進的な調節に働くphoM遺伝子をクローニングし，DNAレベルでの解析を行なっている。また，phoM蛋白を同定するとともに，種々の遺伝的背景のもとでphoM遺伝子発現の調節機構について調べ，phoM遺伝子の役割と機能について，興味深い知見を発見した。よって，本論文は博士論文として価値あるものと認める。