The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Phosphate regulon in members of the family Enterobacteriaceae : comparison of the phoB-phoR operons of Escherichia coli,Shigella dysenteriae,and Klebsiella pneumoniae
Author(s)	李, 泰潤
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36947
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

【108】

氏名・(本籍)	李(り) 泰(て) 潤(ゆん)
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8963 号
学位授与の日付	平成2年2月2日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Phosphate regulon in members of the family *Enterobacteriaceae* : comparison of the *phoB-phoR* operons of *Escherichia coli, Shigella dysenteriae,* and *Klebsiella pneumoniae* **(腸内細菌のリン酸レギュロンの研究)**
論文審査委員	(主査) 教授 中田 篤男 (副査) 教授 三輪谷俊夫 教授 松代 愛三

論文内容の要旨

(目　的)

大腸菌のリン酸レギュロンは，培地中のリン酸欠乏時に発現して無機リン酸を効率的に利用するための適応的機構で，同様の機構は大腸菌と近縁の腸内細菌にも存在すると考えられる。リン酸レギュロンの発現はアルカリ性ホスファターゼ産生をマーカーとしてみることができるが，それには調節遺伝子*phoB*の機能が必須（正の調節）で，その上位でもう一つの調節遺伝子である*phoR*が正と負の制御を行っている。*phoB*と*phoR*は大腸菌では一個のオペロンを構成している。*phoR*の機能がない突然変異株の場合は，*phoM*遺伝子が正の機能だけを代行する。本研究では腸内細菌のリン酸レギュロンの機能を解明するため，*Shigella dysenteriae*と*Klebsiella pneumoniae*の*phoB-phoR*オペロンの解析を行った。

(方法ならびに成績)

菌株は，*S. dysenteriae* Sh（慶応大，深沢俊夫博士より，以下Sd-Sh株という），*S. dysenteriae* RIMD 3102008 NCTC 4837 Type 1（Sd-T 1株），RIMD 3102002 Type 2 EW 2（Sd-T 2株），RIMD 3102003 Type 3 EW 3（Sd-T 3株）（以上，阪大微研菌株保存室より），*K. pneumoniae* IFO 1388株（発酵研より，Kp株），および*Escherichia coli* K12株由来のＡＮＣＨ１（*phoB-phoR*欠失），ＨＢ101（*hsdR* 4）を用いた。

(1)Sd-Sh，Sd-T 1，Sd-T 2，Sd-T 3，およびKp株のアルカリ性ホスファターゼ産生を調べた。Sd-T 2，Sd-T 3，およびKp株は大腸菌と同様に産生したが，Sd-ShとSd-T 1株は全く生産しなかた。これは，アルカリ性ホスファターゼ構造遺伝子（*phoA*）かあるいは調節遺伝子（*phoB*あるいは*phoR*）

が欠損していることを示唆している。(2)大腸菌の*phoB-phoR*プラスミッドをSd-Shおよび Sd-T 1 株に導入しても同じ結果であった。これらは，構造遺伝子（*phoA*）に欠損があると考えられる。また，(3)大腸菌の*phoA* プラスミッドをこれらの株に導入して調べたが，同様の結果であった。従って，Sd-Shと Sd-T 1 株は，調節遺伝子にも欠損があると考えられる。(4)Sd-Sh，Sd-T 3，およびKp 株のゲノムDNAを各種制限酵素で切断し，大腸菌の*phoB* あるいは*phoR* の翻訳領域の一部を含むDNA断片をプローブとしたサザン・ブロッティング法によって調べ，*phoB-pohR* 両遺伝子を一断片に含む制限酵素で処理して，各DNA断片をpMF 3（ミニFプラスミッド）に連結し，大腸菌HB101株でゲノム・バンクを作成した後，ANCHI株に導入して$PhoB^+$表現型を示す形質転換株を選択した。(5)それぞれのプラスミッドを導入したANCH 1 株のアルカリ性ホスファターゼ生産を調べると，Sd-T 3 およびKp 株の*phoB-phoR* 断片をもつ株では，野生型と同じ制御様式で産生したが，Sd-Sh 株の*phoB-phoR* 断片をもつ株はアルカリ性ホスファターゼを構成的に産生した。従って，Sd-Sh 株は$phoB^+$，$phoR^-$であると考えられる。(6)Sd-Sh 株と Kp 株の*phoB-phoR* オペロン領域の塩基配列を決定した。その結果を要約すると，(a)リン酸レギュロンのプロモータ領域に特異的な塩基配列であるリン酸ボックス，および－10，SD配列は大腸菌のものと全く同一であった。(b)PhoB 蛋白質のアミノ酸配列の相同性は，Sd-Sh 株と大腸菌とは99%，Kp 株と大腸菌とは95%で，総アミノ酸残基数は三者同一であった。(c)PhoR 蛋白質のアミノ酸配列は，Kp 株と大腸菌とは86%相同であった。Sd-Sh 株では第297，298番コドン（AAAAAA）領域に，1個のA塩基の付加が見られた（その結果，第304コドンがナンセンス・コドンとなる)。Sd-Sh 株の$phoR^-$はこの塩基付加によると考えられる。この塩基付加を無視すると，大腸菌PhoR との相同性は97%で，総アミノ酸残基数も三者同一であった。(7)大腸菌では*phoR* の機能が欠損すると*phoM* が正の機能だけを代行する。大腸菌の*phoM*-DNA 断片をプローブとしたサザン・ブロッティングを行い，Sd-Sh 株と Sd-T 3 株は*phoM* をもつが，Kp 株は*phoM* をもたないことを明らかにした。

（総　　括）

近縁の腸内細菌の間での遺伝子構成には差異があるし，また，同種の別系統間でもわずかの差異が認められる場合がある，という結論を得た。

論文の審査結果の要旨

腸内細菌 *Klebsiella pneumoniae* は，リン酸レギュロンの代表的遺伝子産物であるアルカリ性ホスファターゼを産生するが，*Shigella dysenteriae* は産生しない。李泰潤氏は，*S. dysenteriae* の 4 株と *K. pneumoniae* の 1 株のリン酸レギュロンの調節遺伝子である *phoB* および *phoR* 遺伝子の解析を行い以下のような結果を得た。

1）*S. dysenteriae* のある株は *phoA*（アルカリ性ホスファターゼの構造遺伝子）が欠損している。

2）*phoB* は，いずれの株でも正常の機能がみられた。

3）*phoR* は，*S. dysenteriae* Sh と type 1 との 2 株では$phoR^-$で，type 2 と type 3 の 2 株と，*K. pneu-*

moniaeでは正常の機能がみられた。

4）塩基配列を決定した結果，

a．大腸菌の*phoB*，*phoR*と比較すると，*S. dysenteriae*の方が*K. pneumoniae*よりも高い相同性がみられた。

b．*S. dysenteriae* Sh株の*phoR*には一塩基対の挿入があり，これが*phoR*$^-$の原因と考えられる。

大腸菌などの腸内細菌のアルカリ性ホスファターゼは，菌の生育には必須ではないが，それと同様の発現調節を受ける遺伝子（群）がリン酸の欠乏の環境に適応するために必須であると考えられている。以上の結果は，大腸菌以外の腸内細菌にもこの機構が存在していることを示唆しており，学位授与に価する論文であると考えられる。