

Title	Regulation of the phosphate regulon in Escherichia coli : analysis of PhoB and PhoR mutants causing different phenotypes
Author(s)	山田, 雅巳
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/37103
rights	Copyright © American Society for Microbiology
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	やま	だ	まさ	み
学位の種類	山	田	雅	巳
学位記番号	医	学	博	士
学位授与の日付	第	9080	号	
学位授与の要件	平成2年3月24日			
学位論文題目	医学研究科生理系専攻 学位規則第5条第1項該当 Regulation of the phosphate regulon in <i>Escherichia coli</i> : analysis of <i>PhoB</i> and <i>PhoR</i> mutants causing different phenotypes (大腸菌リン酸レギュロン遺伝子群の発現調節 : <i>PhoB</i> 及び <i>PhoR</i> 突然変異体の解析)			
論文審査委員	(主査) 教授	中田 篤男		
	(副査) 教授	松代 愛三	教授	吉川 寛

論文内容の要旨

(目的)

大腸菌のリン酸レギュロンは、培地中のリン酸が欠乏すると発現が起る。これまでに *PhoA* (アルカリ性ホスファターゼ : 以下 AP と略す), *PhoB-PhoR* オペロン (調節遺伝子), *PhoE* (外膜ポリン蛋白質), *pst* オペロン (無機リン酸特異的膜輸送系), *ugp* オペロン (グリセロリン酸膜輸送系) などが知られ、いずれもリン酸の有効利用に働くと考えられている。これらの発現は *PhoB/PhoR* 遺伝子によって調節されている。*PhoB* 蛋白質はリン酸濃度が低いときに *PhoR* 蛋白質によって活性化され (*PhoR* の正の機能) これらの遺伝の転写を促進する。リン酸濃度が高いと *PhoR* は *PhoB* を不活性化する (負の機能)。このような一対の調節遺伝子によって調節されている系は two-component regulatory system (TCR系) と呼ばれ、機能の類似の調節系が知られている。TCR系の調節蛋白質の間にはそれぞれ相同性がみられ、機能の類似性が論じられている。

これまでに分離されている *PhoB* 突然変異株は AP 非産生株として分離されたものであるが、その中には PiBP (*PstS* 遺伝子産物で、無機リン酸結合蛋白質) を産生するものと、しないものがある。また、*PhoR* 突然変異株にも負の機能だけが欠損したものと、正負両機能が欠損したものがある。このような突然変異株間の機能の相違は、蛋白質の機能ドメインを反映すると考え、突然変異遺伝子の塩基配列を分析し、*PhoB* 蛋白質の機能上、特に重要な領域を推定した。また、*PhoR* 蛋白質の局在を明らかにし、機能を保持した蛋白質の精製を試みた。

(方法ならびに結果)

1. *PhoB*, *PhoR* 突然変異株について

4 個の *PhoB* 突然変異株の表現型の相違を定量的に調べるため *PhoA*, *PhoB*, *PhoE* および *pstS* 遺伝子のプロモーター活性を CAT アッセイ法により測定した。*PhoA* はいずれの株でも発現しなかったが、1 株では他の 3 個の遺伝子も全く発現しなかった。残り 3 株は *PhoA* 以外の遺伝子がいろいろなレベルで発現する漏出突然変異株であった。これら 4 株から突然変異遺伝子を分離し塩基配列を決定した。全ての遺伝子が発現しない株では Glu9 が Lys に、他の 3 株ではそれぞれ Gly185 が Arg に、Arg201 が His に、Thr158 と Arg201 が Lys と Cys に置換したミスセンス突然変異であった。Glu9 の領域は、TCR 系の他の遺伝子群との間で特に高い相同性がみられ、PhoR によって活性化される領域と考えられる。また、PhoB 蛋白質 (228 個のアミノ酸) の C 末端領域は、転写促進に関与するドメインと考えられており、漏出度は突然変異蛋白質と各遺伝子のプロモーターとの親和性を反映していると考えられる。一方、*PhoR*⁻ の 6 株のうち 5 株は正負の両機能が、1 株は負の機能だけが欠損している。突然変異遺伝子の塩基配列から、負の機能だけが欠損した株は Thr220 が Asn に置換したミスセンス突然変異で、正負両機能が欠損した 5 株は全てナンセンス突然変異であった。

2. PhoR 蛋白質の局在と機能

phoR は N 末端の疎水性領域で内膜と結合していると推測される。*phoR* の局在と機能を解析するため、PhoR (431 個のアミノ酸) の N 末端を欠失させて、*trc* プロモーターで発現する遺伝子を作成した。PhoR1084 (N 末端の 83 個のアミノ酸が欠失) と PhoR1159 (158 個欠失) とは正の機能を保持していたが、PhoR1263 (262 個欠失) では消失していた。いずれも負の機能は消失していた。このことはモジュレーター蛋白質の N 末端領域は刺激 (あるいは環境変化) を感知し、C 末端領域はアクチベーター蛋白質 PhoB を活性化するという推論と一致している。

PhoR1084 蛋白質を電気泳動で分離し、抗血清を作成し、ウエスタンブロッティング法で PhoR 蛋白質の局在を調べた。野生型 PhoR 蛋白質は内膜と結合し、N 末端領域が欠失した蛋白質は全て可溶性画分に存在することを証明した。PhoR1084 は精製が容易で、*in vitro* での PhoB 蛋白質の活性化の実験の道を開いた。

(総括)

PhoB, *PhoR* 突然変異株の突然変異遺伝子の塩基配列を解析した。*PhoB* の突然変異は、いずれも類似の蛋白質間で相同性が高い領域にあり、他のデータと合わせて機能ドメインを推論した。また、PhoR 蛋白質の抗血清を作成して、それが内膜に局在することを証明した。さらに、PhoR の N 末端領域を欠失させて、正の (*PhoB* を活性化する) 機能を保持した蛋白質の精製を可能にした。

論文の審査結果の要旨

大腸菌のリン酸レギュロンはリン酸欠乏時に発現し、リン酸の効率的な取り込みに働く、その発現は、*PhoB*と*PhoR*の2個の調節遺伝子で制御されており、それぞれ表現型の異なった突然変異株が分離されている。*PhoB*の4株と*PhoR*の6株から突然変異遺伝子をクローニングし、その塩基配列を解析した結果、*PhoB*の突然変異はすべてミスセンス変異であった。それらを表現型と対比して*PhoB*蛋白質の機能ドメインを推論した。*PhoR*は一個を除いてすべてナンセンス変異で、機能ドメインの推論は不可能であった。一方、*PhoR*のN端の疎水性領域を欠失させ、単独で高発現する遺伝子を作成し、それが*PhoB*を活性化する機能を保持することを確認した。このN端が欠失した蛋白質は可溶性で、分離精製が容易であった。それを用いて抗血清を作成し、ウエスタン・ブロット法で*PhoR*が内膜に局在することを証明した。

以上の成果は、*PhoB*から*PhoR*への細胞内情報伝達機構を*in vitro*で証明した研究の基礎となったもので、学位授与に価するものである。