



Title	Molecular Analysis of the phoH Gene, Belonging to the Phosphate Regulon in Escherichia coli
Author(s)	金, 守基
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38106
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

氏名	金守基
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第10612号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Molecular Analysis of the <i>phoH</i> Gene, Belonging to the Phosphate Regulon in <i>Escherichia coli</i> (大腸菌リン酸レギュロン遺伝子 <i>phoH</i> の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 中田 篤男 (副査) 教授 杉野 明雄 教授 島田 和典

論文内容の要旨

(目的)

大腸菌リン酸レギュロンは、培地中のリン酸が欠乏すると *phoB* 遺伝子に依存して発現誘導が起こる遺伝子群の総称で、今まで6個 (*phoA*, *phoB-phoR*, *phoE*, *pst-phoU*, *ugp*, *phn*) の遺伝子 (あるいはオペロン) が知られている。これらの遺伝子産物は、いずれもリン酸の有効利用に働いている。本研究は、リン酸レギュロンに属する遺伝子の検索を試みた。新たに *phoH* 遺伝子を同定し、その遺伝子のプロモーター領域と遺伝子産物の機能解析を行ったものである。

(方法及び結果)

1) *pho* プロモーターの検索と *phoH* プロモーター領域のクローニング

λ placMu 53 (Km^r) ファージを *pho* プロモーターの検索に用いた。このファージは *lacZ* が発現するようなプロモーターをもたず、大腸菌染色体の様々な場所に組込まれると、組込まれた遺伝子のプロモーターによって *lacZ* が発現する。 λ placMu 53 ファージを大腸菌 SE5000 (*recA*) 株に感染させ、溶原化した株 (Km 耐性) の中から低リン酸濃度の培地で *Lac⁺* 表現型を示す株を 54 株分離した。54 株のうちファージが 1 ゲノムだけ組込まれたものは 5 株で、うち 3 株は *phn* オペロンに、1 株は *psiE* に組込まれたものであった。残り 1 株 (SE5008) は未同定の遺伝子に組込まれており、以下にその遺伝子 (*phoH*) の解析を行った。SE5008 株から染色体 DNA を分離し、*SstI* (λ placMu 53 の *lacZ* の中に切断部位がある) と *BamHI* (λ placMu 53 の *lacZ* より上流には切断部位が存在しないので、染色体上の *BamHI* 部位で切断されることが期待される) 酵素で処理した。DNA 断片を電気泳動で分離し、*lacZ*-DNA とハイブリダイズする断片を pMC1403 の *lacZ* の上流域にクローニングした。この組換え体プラスミッドを大腸菌に導入して、*lacZ* の発現を指標としてクローニングした DNA 断片がリン酸欠乏によって発現誘導が起こるプロモーター領域 (染色体由来) を含んでいることを確かめた。

2) *phoH* プロモーターのマッピングと *phoH* 遺伝子のクローニング

このプロモーターを含む DNA 断片と小原らの λ ファージ整列クローン群とのハイブリダイゼーションによって λ placMu 53 ファージが遺伝子地図上 23.6 分 (λ クローン 10E11) に組込まれたことを確認した。 λ クローン 10E11 から 23.6 分領域に当たる *BamHI-EcoRI* DNA 断片をクローニングして、先のプロモーター領域とハイブリダイズする DNA 断片の 2,250 bp の塩基配列を決定した。この領域には 2 個の ORF があり、 λ ファージが組込まれた方の

ORF を *phoH* と命名した。塩基配列から *phoH* は分子量約 39kDa のヌクレオチド結合ドメインをもつ蛋白をコードすると推定した。

3) 転写開始点の決定と *pho box* 領域への PhoB 蛋白の結合

リン酸レギュロンを構成的に高いレベルで発現している突然変異株 (*pstS*) と野生型株とから mRNA を分離し、*phoH* プロモーターを含む DNA 断片をプローブとした S1 マッピング法により、転写開始点が 2箇所 (P1 と P2) あることを見つけた。富リン酸培地中で培養すると、突然変異株 (*pstS*) では P1 と P2 からの転写が見られ、野生型株では P2 のみの転写が見られた。つまり、P1 からの転写はリン酸欠乏の時に、P2 からの転写は構成的に起っている。P2 の上流には -10 配列と -35 配列が存在し、P1 の上流には -10 配列と *pho box* (リン酸レギュロン遺伝子群のプロモーター領域に見られる 18 塩基対のコンセンサス配列) が存在していた。DMS フットプリント法によってリン酸化 PhoB 蛋白 (リン酸レギュロン遺伝子に共通した転写のアクチベーター) が *pho box* を含む領域に結合することを証明した。

4) *in vivo* でのプロモーター領域の解析

phoH の調節領域を含む DNA 断片を上流から段階的に欠失させて、*cat* (クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ) 遺伝子の上流につないだ組換え体プラスミッドを作成した。これらのプラスミッドを各種 *pho* 突然変異体に導入して *in vivo* でのプロモーター活性を測定し、*pho box* は P1 からの転写には不可欠で、P2 からの転写には無関係であること、また、P2 プロモーターの -35 配列が予想した通り P2 からの転写に不可欠であることを証明した。また、炭素および窒素欠乏、UV 照射などによる P2 プロモーターの活性を調べたが、いずれも構成的に発現しており、発現調節の生理学的条件を明らかにすることはできなかった。

5) *phoH* 蛋白の精製および ATP 結合能

T7 プロモーター発現系で *phoH* を高発現させ、分子量 39kDa の蛋白を多量産生させて、精製した。N 末端の 15 個のアミノ酸配列を解析して、塩基配列と一致することを確認した。フォト・アフィニティ・ラベル法によって *phoH* 蛋白が ATP アナログである $[\gamma^{32}P] 8N_aATP$ と結合すること (*phoH* が ATP 結合能をもつ蛋白であること) を証明した。しかし、*phoH* 蛋白の ATPase 活性は証明することができなかった。

(総括)

λ placMu 53 (Kmr^r) ファージを大腸菌の *pho* プロモーターの検索に用い、リン酸レギュロンに属する新しい遺伝子、*phoH* を同定した。*phoH* にはプロモーターが 2 個存在し、P1 からの転写はリン酸の欠乏によって *phoB* 遺伝子の機能に依存して起こり、P2 からの転写は調べた限りでは構成的に起こる。*phoH* 遺伝子産物は ATP 結合能をもつ蛋白質で、細胞質に存在しており、リン酸代謝系で働いていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

大腸菌の培養液から無機リン酸を欠乏させると、リン酸レギュロンと呼ばれる一連の遺伝子の発現誘導が起こる。それらの遺伝子産物は無機リン酸あるいはリン酸化合物の効率的な利用に働いている。つまり、この反応はリン酸欠乏という環境に対する適応現象である。

本論文は、リン酸レギュロンに属する遺伝子を検索する目的で、 λ placMu 53 ファージを組込ませた大腸菌の中からリン酸欠乏によって Lac^r の表現型を示す株を分離し、その中から新たな *phoH* 遺伝子を同定したものである。*phoH* は遺伝子地図上 23.6 分にマップされ、全塩基配列からその遺伝子産物がヌクレオチド結合ドメインをもつ蛋白質であることを推定した。*phoH* にはプロモーターが 2 個存在し、P1 プロモーターはリン酸の欠乏によって *phoB* 遺伝子に依存して発現し、P2 プロモーターはリン酸濃度とは関係なしに構成的に発現することを証明した。T7 プロモーター発現系で *phoH* 蛋白を多量産生させ、精製し、フォト・アフィニティ・ラベル法によって *phoH* 蛋白が ATP 結合能をもつことを明らかにした。以上の研究結果は、リン酸レギュロンに属する遺伝子 *phoH* を発見し、解析した点で重要であり、博士論文に値するものと認める。