

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	深海由来好圧性細菌Shewanella violacea DSS12株の高圧環境下におけるヒートショック関連遺伝子の発現解析
Title(English)	
著者(和文)	佐藤寛
Author(English)	
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第5995号, 授与年月日:2005年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:小島英理
Citation(English)	Degree:Doctor of Science, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第5995号, Conferred date:2005/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

G2004
Sa

深海由来好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株の
高圧環境下におけるヒートショック関連遺伝子の発現解析

東京工業大学大学院 生命理工学研究科
生命情報専攻

佐藤 寛
2004年度 博士論文
02D23047

第1章 序論

- 1.1. 好圧性微生物とその研究背景 1
- 1.2. 圧力が生物に与える影響 2
- 1.3. 本実験における高圧環境の定義 4
- 1.4. シャペロン 5
- 1.5. HSPs (heat shock proteins) によるストレス応答 6
- 1.6. 本研究の目的と論文の構成 9
- Fig.1 10
- Table1 20

第2章 ヒートショック関連遺伝子のクローニングと解析

- 2.1. 緒言 22
- 2.2. 実験方法 23
 - 2.2.1. 使用菌株、培養条件および基本操作 23
 - 2.2.2. 染色体 DNA の精製 23
 - 2.2.3. プロブの作成 24
 - 2.2.4. サザンハイブリダイゼーション 24
 - 2.2.5. クローニングおよびコロニーハイブリダイゼーション 25
 - 2.2.6. 塩基配列の決定と塩基配列情報の解析方法 25
- 2.3. 結果および考察 26
 - 2.3.1. *rpoH* 遺伝子の解析 26
 - 2.3.2. *groE* オペロンの解析 28
 - 2.3.3. *dnaKJ* オペロンの解析 29
 - 2.3.4. *grpE* 遺伝子の解析 30
 - 2.3.5. *tig, lon* 遺伝子の解析 30
 - 2.3.6. *clpP, clpX, hupB, ppiD* 遺伝子の解析 32
- 2.4. まとめ 33
- Fig.2 34

第3章 好冷好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株における GroEL のストレス応答の解析

- 3.1. 緒言 53
- 3.2. 実験方法 54
 - 3.2.1. 使用菌株、培養条件および基本操作 54
 - 3.2.2. 染色体 DNA の精製 54
 - 3.2.3. 全タンパク質の調整方法 54
 - 3.2.4. ウェスタンブロット解析 55
 - 3.2.5. 全 RNA の回収 55
 - 3.2.6. プローブの作成 56
 - 3.2.7. ノーザンブロット解析 56
 - 3.2.8. プライマーエクステンション法 57
- 3.3. 結果 58
 - 3.3.1. ヒートショック応答時における GroEL 発現量の解析 58
 - 3.3.2. 高圧環境下における *groE* オペロンの転写産物量の変化 59
 - 3.3.3. 高圧環境下における *groE* オペロンの転写開始点の解析 60
 - 3.3.4. 高圧環境下における GroEL タンパク質の発現量の解析 61
- 3.4. 考察 61
- 3.5. まとめ 63
- Fig.3 65

第4章 高圧環境下における

ヒートショック関連遺伝子の発現誘導の解析

- 4.1. 緒言 70
- 4.2. 実験方法 71
 - 4.2.1. 使用菌株および培養条件 71
 - 4.2.2. 実験操作 71
- 4.3. 結果 72
 - 4.3.1. 高圧環境下における *dnaKJ* オペロンの転写産物量の変化 72
 - 4.3.2. 高圧環境下における *grpE* 遺伝子の転写産物量の変化 72
 - 4.3.3. 高圧環境下における *rpoH* 遺伝子の転写産物量の変化 73

4.3.4.	高圧環境下における <i>dnaKJ</i> オペロンの転写開始点の解析	73
4.3.5.	高圧環境下における <i>grpE</i> 遺伝子の転写開始点の解析	74
4.3.6.	高圧環境下における <i>rpoH</i> 遺伝子の転写開始点の解析	75
4.3.7.	高圧環境下における DnaK タンパク質の発現量の解析	75
4.3.8.	高圧環境下における RpoH タンパク質の発現量の解析	76
4.4.	考察	76
4.5	まとめ	80
Fig.4		82

第5章 高圧環境下において

GroEL-ES 複合体の標的となるタンパク質の解析

5.1.	緒言	93
5.2.	実験方法	95
5.2.1.	使用菌株および培養条件	95
5.2.2.	全タンパク質の調整方法	95
5.2.3.	免疫沈降法	95
5.2.4.	プロットとアミノ酸 N 末端シーケンス	96
5.2.5.	ウェスタンブロット解析	96
5.3.	結果	9
5.3.1.	免疫沈降によって GroEL-ES 複合体と共沈してくるタンパク質	96
5.3.2.	免疫沈降によって検出されるタンパク質の同定	97
5.4.	考察	97
5.4.1	RplB タンパク質について	97
5.4.2	anti-GroEL による免疫沈降の結果について	98
5.4.3.	高圧環境下で変性するタンパク質の同定の試み	100
5.5.	まとめ	101
Fig.5		103

第6章 総括

.....106

プライマーリスト

.....109

参考文献リスト

.....110

謝辞

報文目録

本論文は以下の報告を元に作成されています。

Hiroshi Sato, Kaoru Nakasone, Chiaki Kato, Transcriptional analysis under hydrostatic pressure conditions of genes for heat shock-induced proteins from a deep sea piezophilic and psychrophilic bacterium, *Shewanella violacea*. (in press)

第 1 章 序論

1.1. 好圧性微生物とその研究背景

19 世紀の終わり Certes らによる Travaillier and Talisman 航海調査が多数の深海生物を報告するまで、長年、深度数千 m を超える深海は暗く冷たい生命の希薄な世界と信じられてきた。低温かつ高水圧という極限環境を考えれば無理のないことであった。しかし、1960 年の世界最深海域マリアナ海溝チャレンジャー海淵、深度 11,000 m への潜航で、多様な深海生物が視認されたことにより、深海にもその環境に適応した多様な生物が存在していることを疑うものはいなくなった[Piccard 1961]。現在、深海にはこれまで考えられてきたような暗く冷たい静的な環境だけではなく、300℃以上の熱水を吹き出す深海底熱水噴出口や、断層に沿って硫化水素を含む冷水がしみ出す冷水湧出帯など、非常に活動的な環境の存在が確認されており、その環境に適応した生物群も発見され非常に興味深い研究対象となっている[Kato 1997]。こうした極限環境に共通し、深海の特徴ともいえるのが高水圧である。高水圧に適応し、大気圧下より高圧環境下を好む微生物の存在は 1949 年に Zobell らにより予測され、barophilic microorganisms と命名し定義されたが[Zobell 1949]、その実証は 1979 年の Yayanos らによる分離を待たねばならなかった[Yayanos 1979]。さらに Yayanos らは 1981 年に大気圧下では全く生育できない絶対性好圧性細菌の単離にも成功している[Yayanos, Dietz et al. 1981]。現在ではこれら好圧性微生物は重さを表すギリシャ語 *baro* から、より正確な意味で圧力を表す *piezo* を用いて *piezophilic microorganisms* と呼ばれている[Yayannos 1995]。日本では、掘越らによって海洋科学技術センター（現、独立行政法人海洋研究開発機構）において深海環境プログラム、通称 DEEPSTAR プロジェクトとして 1990 年に本格的な深海微生物研究がスタートした。海洋研究開発機構では有人潜水調査艇「しんかい 6500」（Fig.1-1）や無人調査艇「かいこう」、さらに深海微生物実験システム（Fig.1-2）、加圧培養器（Fig.1-3）などを備え、DEEPSTAR プロジェクトでは新規の好圧性微生物を単離することが試みられた。その結果、琉球海溝、日本海溝、伊豆小笠原海溝、マリアナ海溝などから各種の好圧性微生物、絶対好圧性微生物を単離することに成功した[Kato 1995; Kato, Smorawinska et al. 1996; Kato 1997]。これ

らの菌は 16S rRNA 遺伝子の全塩基配列を元にした系統学的解析、および各種生理学的試験によって同定され、現在、*Colwellia* 属、*Photobacterium* 属、*Moritella* 属、*Psychromonas* 属そして *Shewanella* 属に属する株が報告されており、これらは全てプロテオバクテリウム γ サブグループに属している [Deming 1988; Nogi, Kato et al. 1998; Nogi, Kato et al. 1998; Nogi, Masui et al. 1998; Nogi and Kato 1999; Nogi, Kato et al. 2002; Nogi, Hosoya et al. 2004] (Fig.1-4)。

当研究室ではこうした微生物の圧力適応機構の解明を目ざし、そのモデル生物として好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株を用いて解析を行った。本菌株は琉球海溝深度 5,110 m の底泥より分離され、0.1-70 MPa (大気圧～深海底 7,000 m に相当する圧力、1 atm = 1.01325 x 10⁵ Pa) の圧力条件下で生育可能であり、生育至適が 8℃、30 MPa に存在する好圧性細菌であり、15℃以上では生育できない好冷性細菌でもある [Kato 1995; Nogi, Kato et al. 1998] (Fig.1-5)。系統学的位置から *Escherichia coli* に近縁であるが好圧性、好冷性の特徴がありモデル生物として優れているだけでなく、食品添加物や医薬品として用いられる高度不飽和脂肪酸エイコサペンタ塩酸 (EPA) や分泌性プロテアーゼを生産するなど有用物質生産菌としても期待される。現在のところ、RNA ポリメラーゼと各種 σ ファクターの加圧による発現調節や [Ikegami, Nakasone et al. 2000; Nakasone, Ikegami et al. 2000]、鉄イオンを媒介とした呼吸鎖の研究 [Nakasone, Yamada et al. 2001]、細胞分裂に必要な FtsZ の加圧下での安定性に関する研究などが進められてきた [Ishii, Nakasone et al. 2002; Kawano, Suzaki et al. 2004]。そして、本菌の全ゲノム解析も 2004 年に解析が終了した [Aono et al, 論文中]。

1.2. 圧力が生物に与える影響

圧力はある反応系の全体の体積変化(ΔV)、もしくは活性化の過程における体積変化(ΔV^*)に対して影響を及ぼすことが理論的に説明される。この効果は、次の 2 式で表される。

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial P}\right)_T = -\Delta V / RT \quad (1)$$

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial P}\right)_T = -\Delta V^* / RT \quad (2)$$

このとき、 K は平衡定数、 k は反応速度定数、 R は気体定数、 T は絶対温度、 P は圧力を表す。つまり、体積増加を伴う反応は圧力下で阻害されること、その逆に体積の減少する反応は促進されることがわかる。この効果によって、重要な生合成、細胞機能が阻害されることが *in vitro* の実験から明らかとされている。例えば水分子は水素と水酸化イオンに分離して平衡を保っているが、圧力下ではこれが解離する方向に平衡が移動することが知られている。この結果は、タンパク質周辺の水と水の量などに影響を与え、酵素-基質間の相互作用などに大きな影響を与えることが推測されている。さらに、リボソームのサブユニット構造や、アクチン、ミオシン、チューブリンフィラメント等の伸長反応は体積増加を伴うため脱重合に向かうことが知られている [Abe, Kato et al. 1999] (Table1-1)。

圧力が微生物へ与える生理学的影響は圧力生理学 Piezophysiology として研究が進められてきた。圧力生理学は深海微生物の発見以来行われてきた圧力に適応した生物の生理学的機能の解明を目的とした 100 MPa までの分野と、食品加工技術および殺菌方法としての圧力利用を目的とした 100 MPa 以上の分野とに大別することができる [Schmid, Ludemann et al. 1979; Gould 2000; Aertsen, Vanoirbeek et al. 2004]。微生物の生理的な研究では Marquis らによりまとめられた微生物への影響の解析 [Marquis 1976]、好圧性細菌の各種圧力条件でのタンパク合成能や細胞分裂に関する解析 [Jannasch and Taylor 1984]、細胞膜の脂肪酸組成に関する解析 [DeLong and Yayanos 1985; Wirsen, Jannasch et al. 1987] などが報告されている。近年では圧力下でのタンパク質の構造を解析するため、核磁気共鳴法(NMR)を利用する方法なども開発されている [Kitahara, Sareth et al. 2000]。これらの研究の多くは *Escherichia coli* を用いて行われており、50 MPa 付近では DNA 合成が、58 MPa 付近で RNA 合成が、77 MPa でタンパク質の合成が止まることなどが報告されている [Zobell and Cobet 1962; Zobell and Cobet 1964]。また、興味深い現象として、圧力下で *E. coli* において lag phase が延長されること、*E. coli* を含むいくつかの桿菌で 50 MPa で菌体の伸長がおきて増殖が停止することなどがよく知られている [Zobell and Cobet 1962; Zobell and Cobet 1964]。また、圧力への応答に関する研究では二次元電気泳動による加圧下でのタンパク質発現量の変化や [Welch, Farewell et al. 1993]、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の変化 [Ishii, Oshima et al. 2004] が報告されている。一方、深海から単離

されてきた好圧性細菌では *E. coli* と比べてより高圧環境下で生存することが可能であるだけでなく高圧環境に至適生育条件を持つ(Fig.1-6)。さらに高圧環境下での RNA ポリメラーゼのサブユニットの安定性[Kawano, Nakasone et al. 2004] や、高圧環境下で安定な酵素も単離されている[Ohmae, Kubota et al. 2004]。当然、こうした微生物は圧力によって *E. coli* で観察されるような生理的な阻害は観察されず、これらの表現型の違いを解析していくことで圧力適応能の解明につながると考えられる。

これまで細胞に対する圧力の影響は、低温による影響との類似性が指摘されており、低温環境下では細胞膜の流動性が低下して、外界との物質交換などに影響がでると考えられており[Vigh, Maresca et al. 1998]、これに対する適応機構として、膜中の不飽和脂肪酸の割合を上げることで流動性を取り戻す Homeoviscous adaptation という機構が提唱されてきた [McElhaney, 1976 #109][Sinensky 1974]。圧力条件下の微生物においてもこの様な脂肪酸組成の変化がみられたことから [Macdonald 1984]、膜の流動性が圧力センサーとして働いている可能性が指摘されている [Allen, Facciotti et al. 1999]。しかし、*E. coli* における DNA マイクロアレイ解析およびプロテオーム解析の圧力応答の結果からは、多くの HSP といくつかの CSP が同時に誘導されるなど [Wirsen, Jannasch et al. 1987; Ishii, Oshima et al. 2004]、圧力に特徴的な生理的な阻害や、それに対する応答は未だ明らかではない。

1.3. 本実験における高圧環境の定義

微生物に与える様々な環境からの影響を論ずるにあたって、どの程度の時間その環境を変化させるかということはとても重要なことである。その影響を生育のともなわないような短時間でとらえるのか、それとも生育可能である十分な時間の中でとらえるのか、ということにはもっと注意が傾けられてよいと考える。比較的短時間の環境変化の場合その影響から起こる細胞秩序の崩壊を不可逆的な崩壊に至る前に食い止めればよく、言い換えるなら、どのような細胞秩序の崩壊がおきようとも、本来細胞の持つ恒常性で対処できる範囲であれば構わない。しかし、生育をともなう場合、その影響から起こる細胞秩序の崩壊を食い止め、復旧し、新たにその環境に適応しなければならない。多くの高圧

環境下での実験は、至適条件で生育した菌体を比較的短時間加圧した条件で行われてきた。これは主に対象とする微生物が圧力感受性であり高圧環境下では生育できない、もしくは生育が非常に悪いためであると推察される。しかし本実験で用いた *Shewanella violacea* DSS12 は大気圧から高圧環境まで比較的良好に生育できる。本研究の目的は深海に生息する生物の高圧環境適応機構の解明であることから、植菌直後から高圧環境下に暴露し生育を待った後、実験に用いた。

1.4. シャペロン

DNA、RNA、タンパク質と続くセントラルドグマは生命の基本原理である。DNA、RNA に配列情報として蓄積、継承される情報は一次元の情報であり、そこからできるタンパク質も必然的にひも状の分子である。しかし、実際の細胞内で機能を有するタンパク質のほとんどはひも状に存在しているのではなく、アミノ酸の側鎖どうし、また側鎖と水分子が会合することによって各側鎖が三次元的な位置関係をとる。このタンパク質がとりうる形態、いわゆるコンフォメーションはタンパク質内に自由に回転できる結合が多く存在することから膨大な数に上ることになる。しかし、疎水性アミノ酸が水と接触しないように分子内部に折り畳まれることで固有かつ多くの場合単独のコンフォメーションをとるに至る。このコンフォメーションによりタンパク質は本来備わった性質を発揮し、細胞内で必要とされる分子識別や触媒作用を担う[Anfinsen 1973]。

しかし熱などによってこの構造が乱れると、内部に折り畳まれていた疎水性アミノ酸が分子表面に露出し、タンパク質同士が凝集体をつくってしまう。細胞はこのような変性タンパク質に対して結合し凝集を抑えるタンパク質や変性タンパク質の再生を促進するタンパク質を持つことが知られていた[Yamamori and Yura 1982; Kusakawa and Yura 1988; Parsell and Sauer 1989]。このようなタンパク質の高次構造を形成、維持するために一過的に標的タンパク質に結合するタンパク質を分子シャペロンと呼ぶ[Ellis 1987; Gething and Sambrook 1992] (Fig.1-7)。しかも、1990年代に入って、これらの機能を持つタンパク質は凝集体が形成されるような緊急時だけでなく細胞の正常な代謝や生存にとって必須の役割を担っていることが明らかになってきた[Fayet, Ziegelhoffer et al. 1989;

Miyata and Yahara 1992]。例えば、タンパク質の生合成の過程において合成途中のポリペプチドはリボソーム上で、疎水性アミノ酸残基が露出した構造になっている。これら新生ペプチドは合成途中で凝集しやすいが、いくつかのタンパク質が一過的に結合して凝集を防ぐことができ、正しいコンフォメーションへ折り畳まれる [Pelham 1986; Hendrick, Langer et al. 1993; Hartl 1996]。タンパク質のコンフォメーションの乱れは本来そなわった機能を阻害し、ひいては細胞内秩序の崩壊を引き起こす。分子シャペロンが担う折り畳みの過程は転写、翻訳に続く生命を維持する上で非常に重要な過程である。

100 MPa を超えるような超高圧環境下においてはサブユニット構造の崩壊などに加え、タンパク質のコンフォメーションの崩壊が引き起こされる。いくつかの酵素において超高圧環境下での失活や変性が報告されている [Schmid, Ludemann et al. 1979; Paladini and Weber 1981]。これは超高圧によって、コンフォメーションを維持する疎水性アミノ酸の結合よりも、水分子が構造内に入り込むことで得られる体積減少の方がエネルギー的に有利に働き、タンパク質のコンフォメーションが崩壊すると考えられている [Gross and Jaenicke 1994; Vidugiris, Markley et al. 1995; Hummer, Garde et al. 1998]。これを利用して食品加工では超高圧によりタンパク質を変性させることもある [San Martin, Barbosa-Canovas et al. 2002]。また、一部のシャペロンと変性タンパク質は疎水性結合によって結合することが知られており [Lin, Schwartz et al. 1995; Csermely, Miyata et al. 1997; Ben-Zvi and Goloubinoff 2001]、疎水性結合は加圧によって阻害されるためその機能も阻害される可能性はある。しかし、圧力によって生じた変性に対してシャペロンが機能するかは未だ明らかでない。また、深海環境程度の圧力によってコンフォメーションが乱れるほど体積減少が有利に働くかも定かではない。むしろ、その程度の圧力では大きな変性が引き起こされることはないという報告もある [Weber and Drickamer 1983]。しかし、深海環境の圧力でタンパク質の安定性を検討した例は少なく、さらにほとんどが *in vitro* での結果であり、好圧性細菌の持つシャペロンの報告もまだないのが現状である。

1.5. HSPs (heat shock proteins) によるストレス応答

生物の環境適応を研究していくにあたってストレス応答というものは古くか

ら注目されてきた。主として修復に関与するストレスタンパク質はストレスがかかったときに合成され、ストレス環境に対する生物の回答として知られており恒常性を維持するうえで重要な機能を果たしている。ストレスには重金属、有機溶媒などの有毒性物質への暴露の他に熱によるダメージをはじめ、低酸素、低温などの環境からのストレスなどもあげられる。多細胞生物の場合には発熱、虚血、組織損傷、ウイルス感染などもストレスとなる[Nagata 1996]。微生物の場合、*Escherichia coli* におけるヒートショック応答がもっともよく研究され、ストレス応答の研究においてモデルとなっている[Arsene, Tomoyasu et al. 2000]。圧力に対する応答解析においてもヒートショック応答に似た発現傾向が見られることから、ヒートショック応答の解析は圧力適応機構の解明につながるものと考えられた。

ヒートショック応答は生育温度の急激な上昇によって引き起こされる応答で、温度変化に対応するために HSPs (heat shock proteins) と呼ばれる一群のタンパク質が一過的に誘導される[Sträus, Walter et al. 1987]。このヒートショック応答における HSPs の誘導は様々な微生物で報告されており、比較的保存性の高いシステムである。いくつかの代表的な HSPs は分子量によって区別されており、HSP100, HSP90, HSP70 (DnaK), HSP60 (GroEL) や、small HSPs と呼ばれる低分子量のタンパク質などが含まれる。それに加え、ATP 依存性のプロテアーゼ ClpP や Lon なども HSPs に分類されている。一般的に HSPs はタンパク質の折り畳みを担うシャペロン機能や、タンパク質の分解、タンパク質複合体形成、膜を介したタンパク質の輸送などの重要な役割を担っている[Nagata, Mori et al. 2001]。

多くのタンパク質が HSPs の仲間として報告されているがその働きの中心は分子シャペロンである。分子シャペロンは *E. coli* からヒトまで保存されていることが知られている (Table1-2)。その働きは正しいコンフォメーションをとっていない、変性したタンパク質に一過的に結合し恒常性を維持することである。代表的なものはシャペロン DnaK とそれに結合する DnaJ、GrpE による機構と、カゴ状の分子シャペロン GroEL とコシャペロン GroES による機構がある。DnaK を中心とした機構は 30 KDa 以上の大きめのタンパク質を優先的に標的としており、ATP 型 DnaK が伸張中の不安定なポリペプチドに結合することで間違ったコンフォメーション形成や凝集を防いでいる。その後、DnaJ の ATPase 活性

化機能により ATP が加水分解され ADP 型 DnaK となることで基質との安定化がおこる。さらに GrpE の ADP/ATP 交換反応がおこり、基質は DnaK から解離し正しいコンフォメーションに折り畳まれる [Straus, Walter et al. 1990] (Fig.1-8)。一方、GroEL は、もっとも解析の進んだシャペロンで特にシャペロニンと呼ばれている。GroEL は7つの単量体からなるドーナツ状の複合体を形成し、さらにそのドーナツ型のリングが二つ重なったシリンダー状の構造をとる。GroES も7つの単量体からドーム状の複合体を形成する。これらの高次構造によって形成された空洞に変性したタンパク質をとらえ、シャペロンとしての機能を果たす。空洞内は疎水性アミノ酸残基が豊富にあり、変性したタンパク質と結合し、ATP を利用した反応サイクルを経て折り畳みなおすと考えられている [Sigler, Xu et al. 1998; Wang and Boisvert 2003] (Fig.1-9)。

E. coli において、主要な HSPs の急速で一過的な誘導を調節しているのは *rpoH* 遺伝子から転写、翻訳されるストレス特異的転写因子 RpoH (σ^{32}) の細胞内存在量である。RpoH は RNAP (core RNA polymerase) と結合し、HSPs をコードするヒートショック関連遺伝子に特有のプロモーター配列を認識することで通常時、ストレス応答時の両方で HSPs の発現を制御している [Straus, Walter et al. 1987]。また RpoH 以外にもいくつかのヒートショック関連遺伝子では RpoN (σ^{54})、RpoE (σ^{24}) によっても転写が行われている [Missiakas and Raina 1998]。さらに RpoE は RpoH の転写の一部を担っており、高温での生存に必須であることが知られている [Nagai, Yano et al. 1990; Hiratsu, Amemura et al. 1995]。RpoH の細胞内存在量は安定性と生産量とによって制御されており、ストレスにさらされていない状態では RpoH は DnaK や Lon といった HSPs と相互作用することによって不活性化および分解促進されている。この分解は非常にはやく RpoH の半減期は1分以下と報告されている。一方、ストレスにさらされた場合、*rpoH* mRNA からの翻訳量が10倍以上に上昇するだけでなく、HSPs が細胞内でおきた変性などの異常に対処するため一時的に RpoH との相互作用が解消される。これによって分解を逃れた RpoH は RNAP と複合体を形成し、ヒートショック関連遺伝子の転写を促進することでストレスに応答、対処する。さらに発現が促進された HSPs により再び RpoH が不活性化、および分解されることで熱ショック応答の急速で一過的な誘導が行われている [Straus, Walter et al. 1987; Craig and Gross 1991; Arsene, Tomoyasu et al. 2000] (Fig.1-10)。

1.6. 本研究の目的と論文の構成

本研究の目的は深海に生息する生物の環境適応機構の解明の一環として、好圧性細菌のもつ HSPs (heat shock proteins) の高圧環境下における応答機構を解析することであり、深海環境、大気圧環境にそれぞれ適応した生物の比較解析から、これを検討とすることを旨とした。深海生物のモデルとしては、5,110 m の深海底より単離された好圧、好冷性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株を用いた。深海微生物の研究の歴史は比較的新しく、その遺伝子構造などは未だ明らかではなく、分子遺伝学的手法も開発されていない。圧力に対する応答を含め、ストレス応答についても好圧性細菌用いた解析は歴史が新しく未解析な部分が多い。本研究では深海由来好冷好圧性細菌 *S. violacea* DSS12 株の HSPs に注目し、ヒートショック関連遺伝子のクローニングを行い、遺伝子の構造を調べアミノ酸レベルで他の細菌由来の HSPs と比較した。次に GroEL タンパク質の発現量を指標に *S. violacea* のヒートショック応答について解析した。さらに対照菌株として *Escherichia coli* を用い、高圧環境下における HSPs の転写、発現解析を行い圧力に対する HSPs の応答を解析した。さらに主なヒートショック関連遺伝子において転写開始点の解析を行った。最後に高圧環境下で特異的に GroEL-ES 複合体に結合しているタンパク質を同定し、HSPs の標的となる変性タンパク質について解析を試みた。

本論文は 6 章からなり、第 1 章では序論として研究背景と目的を述べた。第 2 章では *S. violacea* のヒートショック関連遺伝子をクローニングした結果を示し、他の細菌由来の HSPs と比較した結果について述べた。第 3 章では *groEL* に注目し *S. violacea* のヒートショック時、高圧環境下における *groEL* の転写、発現の解析とプライマーエクステンション法による転写開始点の解析について述べた。第 4 章ではさらに *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *rpoH* の各ヒートショック関連遺伝子に関して高圧環境下における転写と発現について解析した結果と、プライマーエクステンション法による転写開始点の解析について述べた。第 5 章では高圧環境下でのシャペロンの働きを推測するために GroEL-ES 複合体を免疫沈降により分画し結合しているタンパク質の解析を試みた。第 6 章ではこれらの研究結果の総括を行い、今後の展望について述べた。

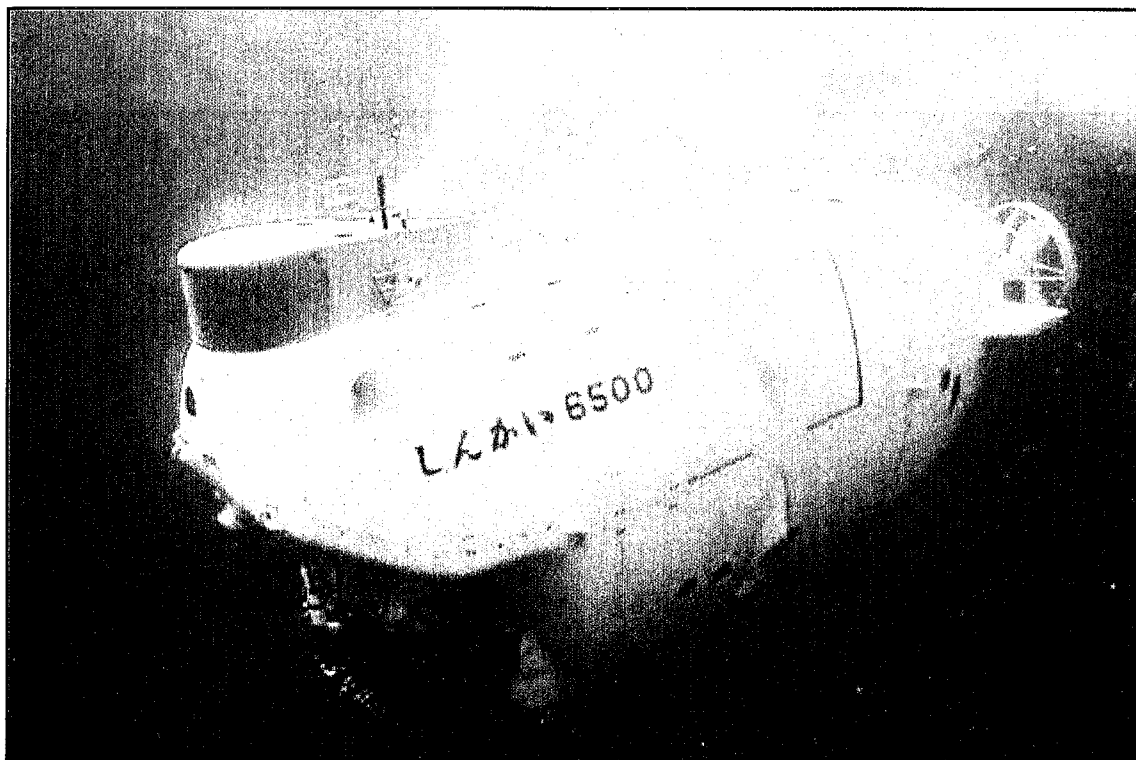


Fig.1-1 潜水調査艇「しんかい6500」

深海調査に用いられている潜水調査艇「しんかい6500」の写真。

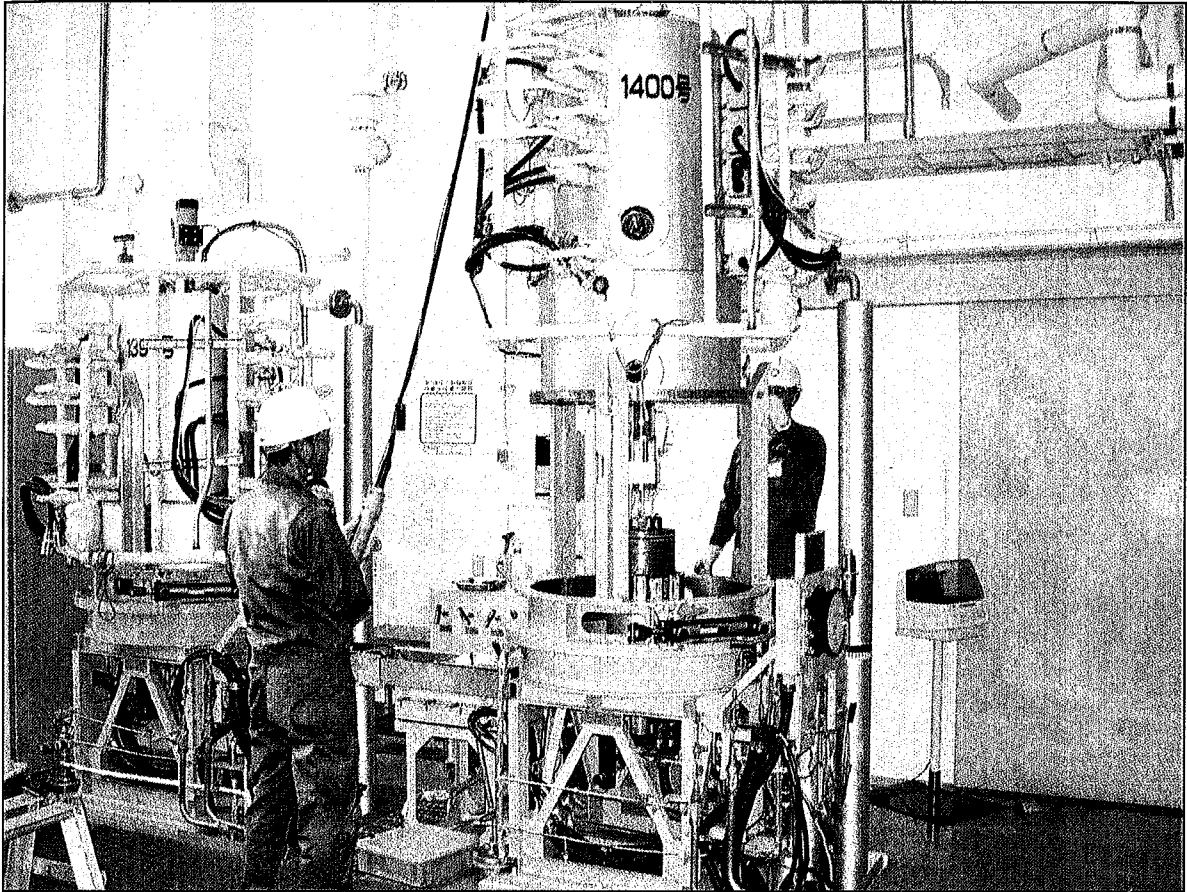


Fig.1-2 深海微生物実験システム

新規微生物実験システム (DEEP BATH)の保圧培養装置の写真。

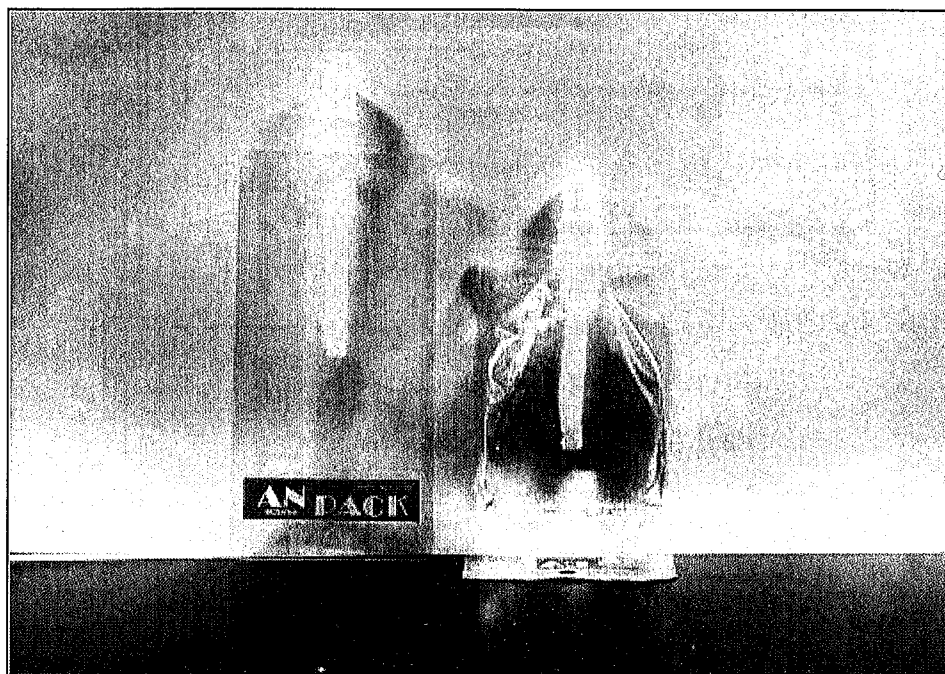
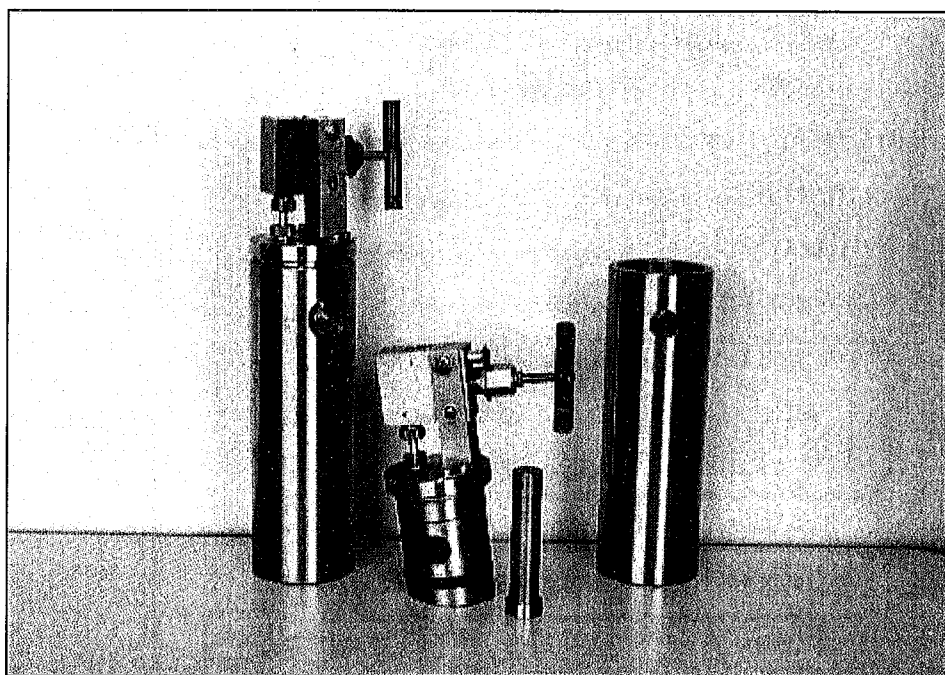


Fig.1-3 加圧培養器

加圧に使用する小型圧力容器（上）と保圧パック（下）の写真。

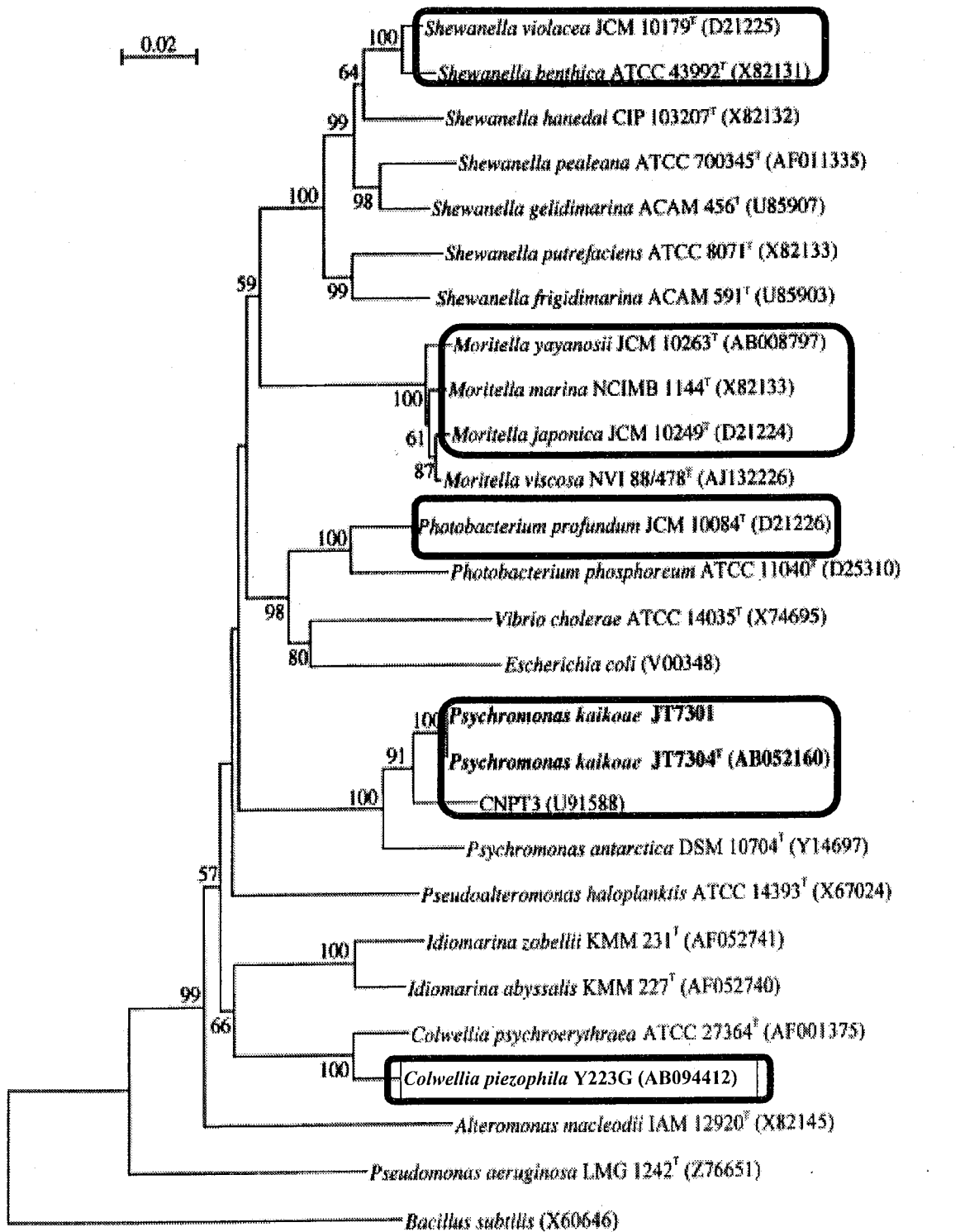


Fig.1-4 16S rDNAの塩基配列による系統樹

 ; Piezophilic species

16S rDNAの塩基配列を用いてN-J法によって計算し作成した系統樹を示した。

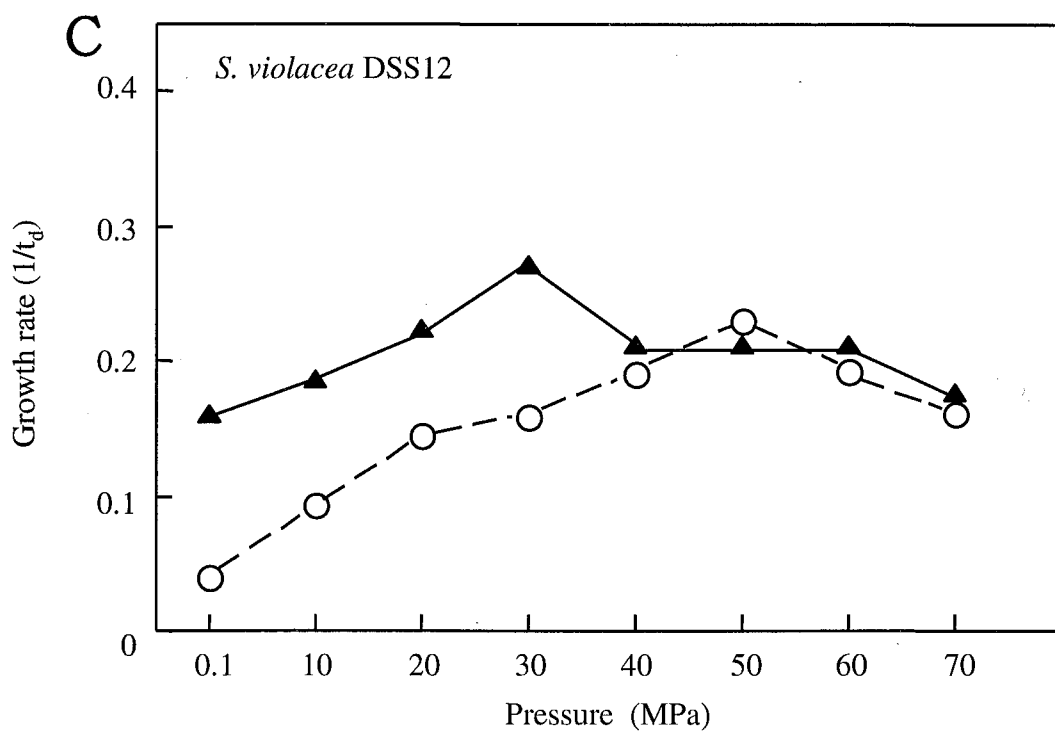
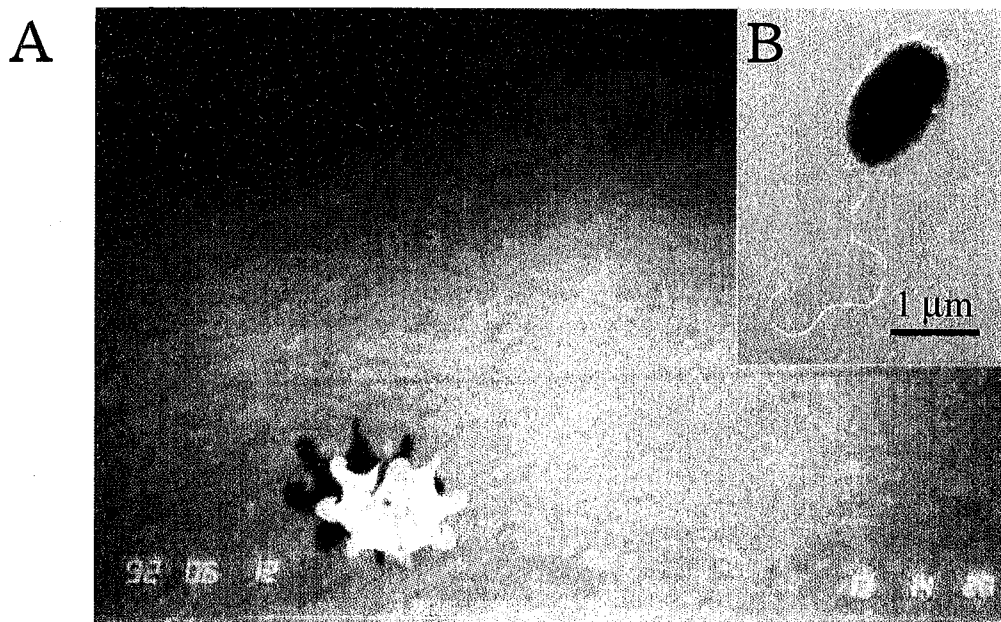


Fig.1-5 *Shewanella. violacea* DSS12 株

- A) *S. violacea* が生息していた環境の写真。左下はタコ。
 B) *S. violacea* の電子顕微鏡写真。
 C) *S. violacea* の各圧力条件下における 8°C (▲)、15°C (○) の生育速度を示した。

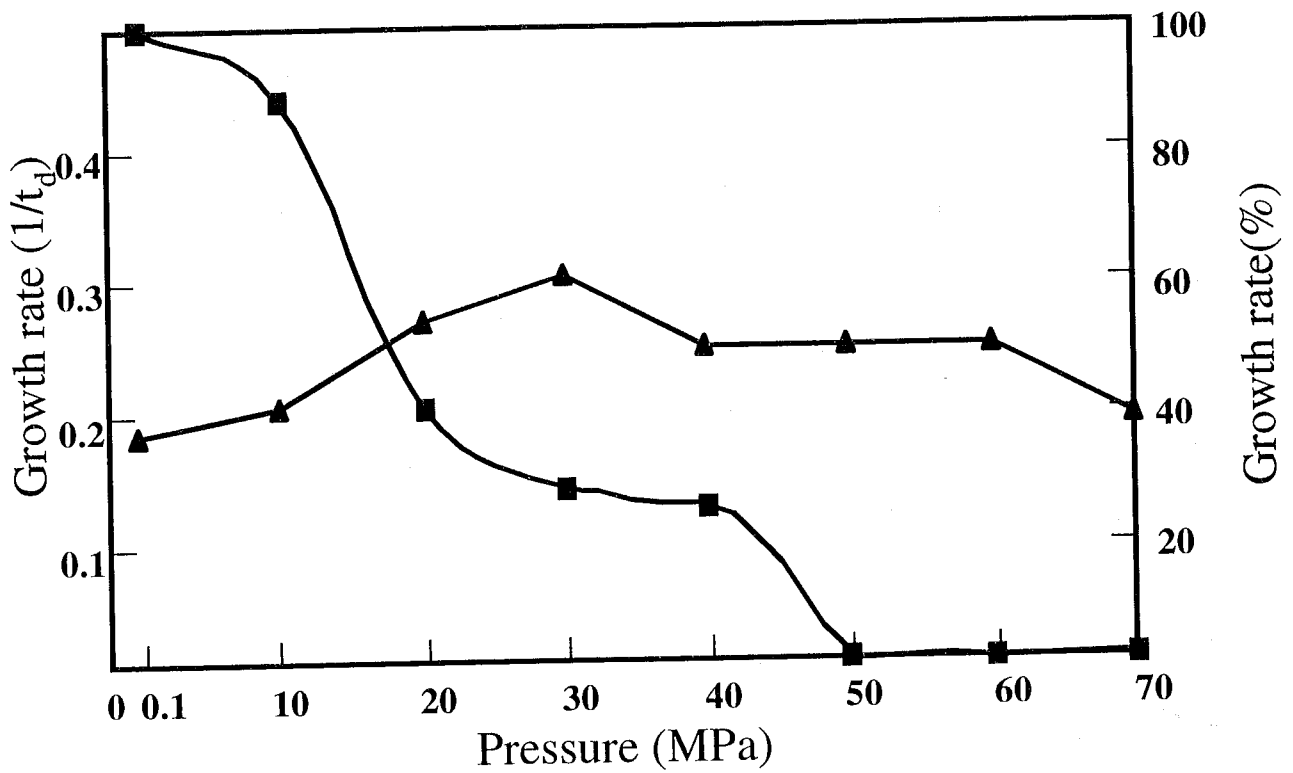


Fig.1-6 高圧環境下における生育曲線

高圧環境下における *E. coli* (▲) および *S. violacea* (■) の生育曲線を示した。
E. coli は大気圧下を100%とした生育速度(LB 培地中で 37℃)、*S. violacea* は 1/t_d
 による生育速度(MarinBroth 培地中で 8℃) から求めた生育曲線を示した。

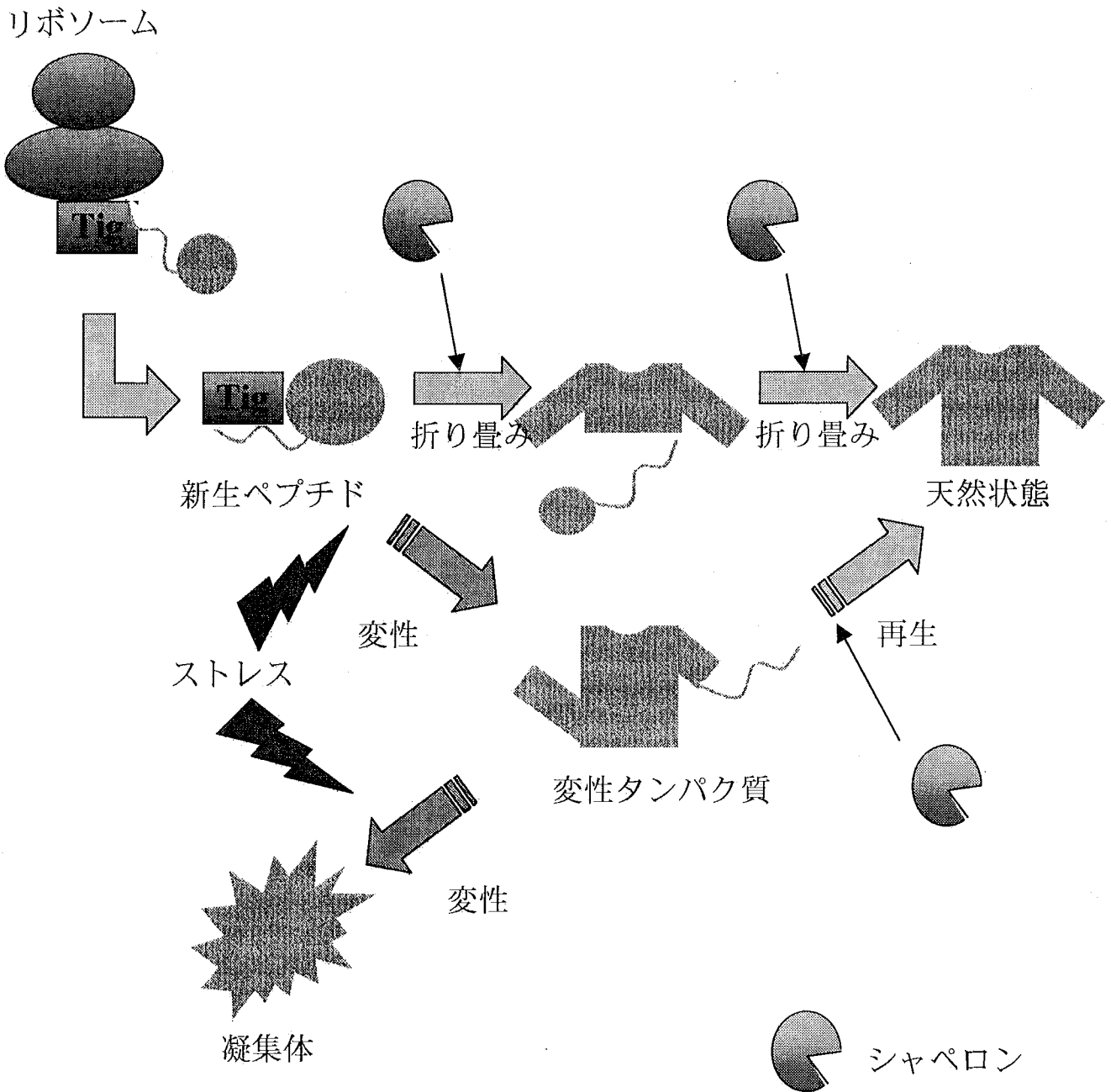


Fig.1-7 タンパク質の折り畳み(folding)とシャペロンの働き

タンパク質の折り畳み(folding)とシャペロンの働きの模式図を示す。
 新生ペプチドには伸長途中から Tig が結合し凝集を防ぐ。
 伸長終了後の新生ペプチドは自発的に折り畳まれて、活性を持つ天然状態(native)になる。シャペロンは、必要に応じてこの過程を助ける。
 さらにシャペロンはストレスにより変性した非天然状態(non-native)のタンパク質を再生(refolding)し致命的な凝集体の形成から細胞を守る。

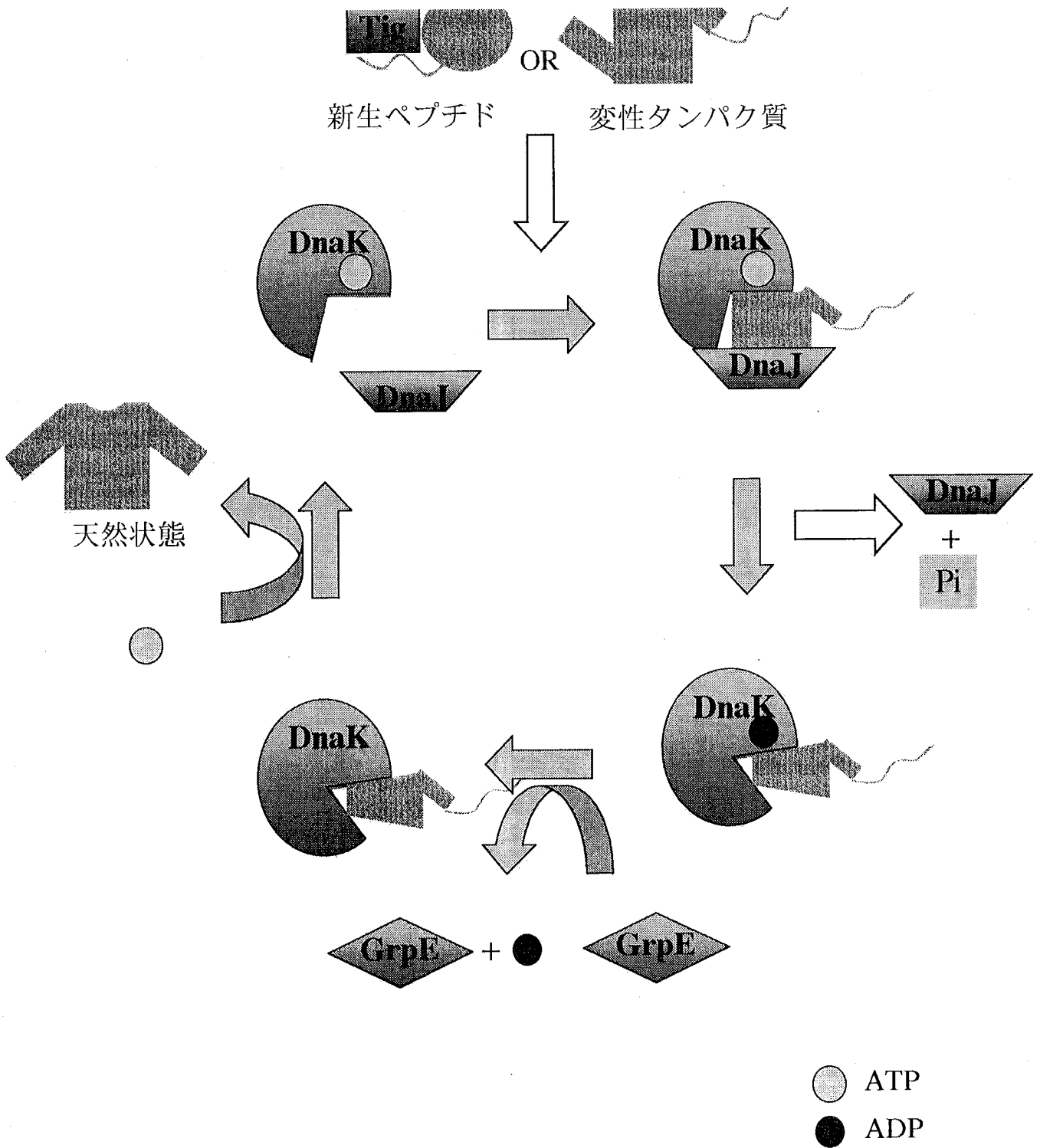


Fig.1-8 DnaK タンパク質を中心とした折り畳み機構

シャペロン DnaK, DnaJ, GrpE による折り畳み(folding)機構の模式図を示した。ATP 型 DnaK は基質(新生ペプチド、変性タンパク質)との親和性が高く、相互作用後 DnaJ により加水分解され ADP 型 DnaK となり基質と安定化する。さらに GrpE により ADP が取り除かれ、ATP と結合し再び ATP 型 DnaK となる際に基質を解離する。

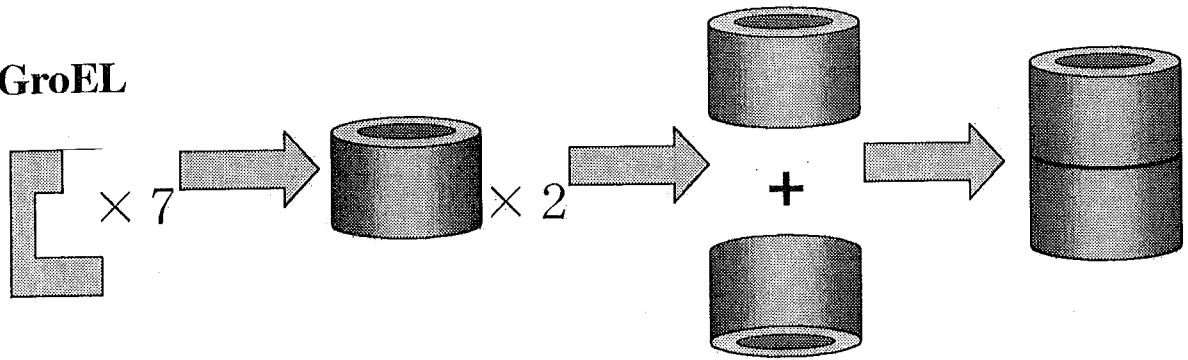
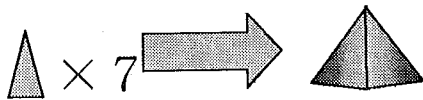
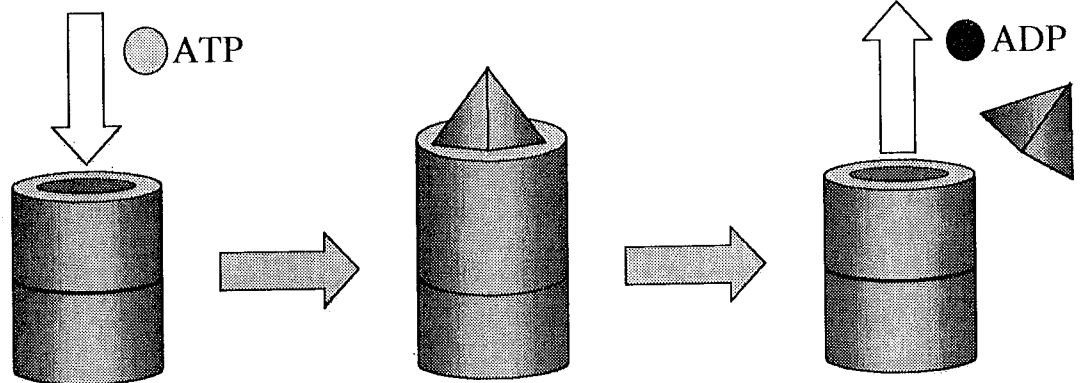
A**GroEL****GroES****B**

Fig.1-9 GroEL-ES 複合体と、その折り畳み機構

GroEL 14量体と GroES 7量体の模式図を A に示した。

GroEL-ES 複合体の折り畳み機構を B に示した。

GroEL 14量体の空洞内に基質(新生ペプチド、変性タンパク質)を取り込む。

GroES 7量体の結合により構造が変化し、内部で折り畳みが始まる。

ATP が加水分解され折り畳まれた基質が解離する。

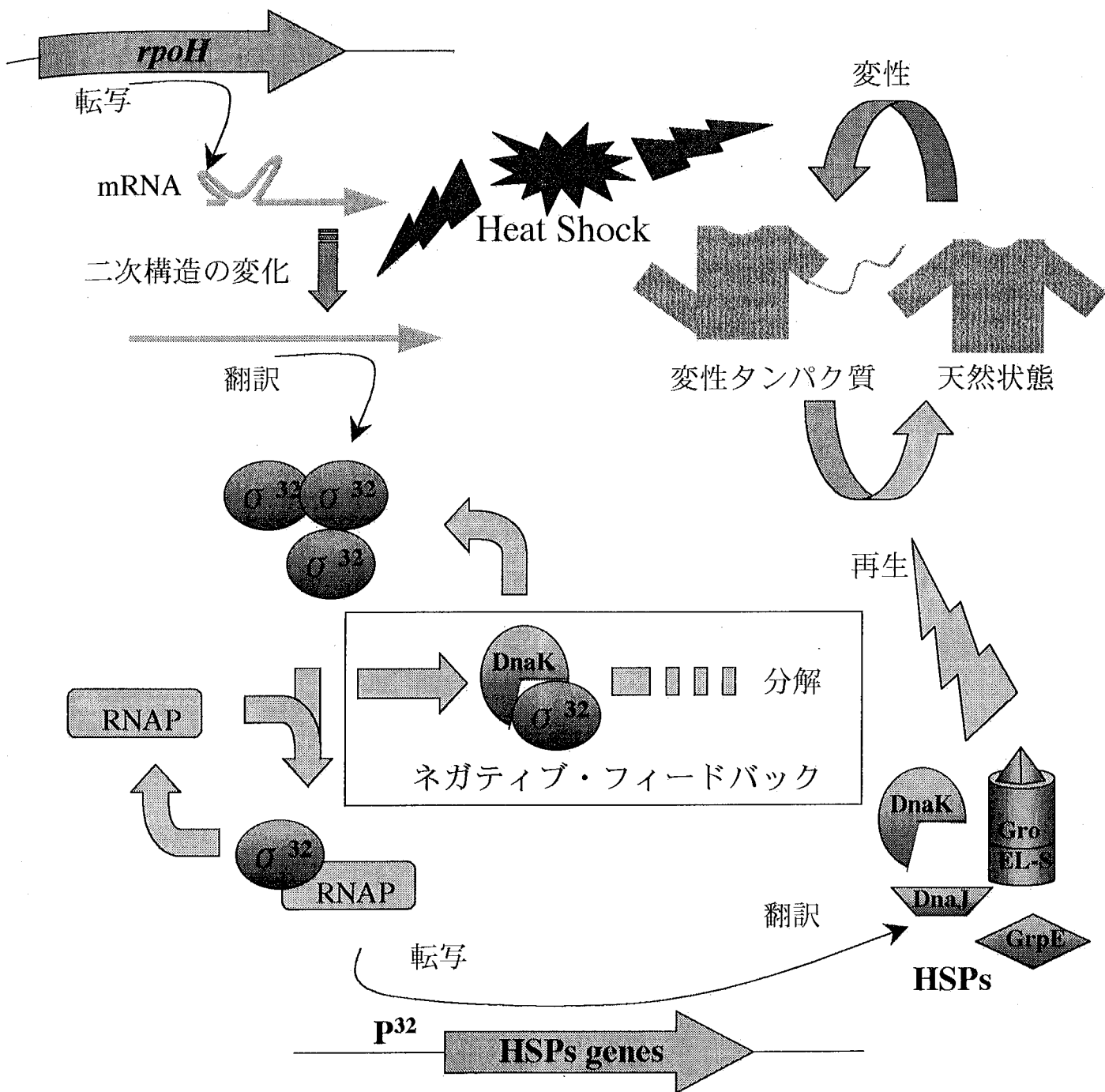


Fig.1-10 *E. coli* における RpoH(σ^{32})によるヒートショック応答機構

通常 DnaK などの HSPs により不活性化(ネガティブ・フィードバック)されている RpoH はヒートショックにより転写、翻訳が促進され、HSPs の発現を誘導する。誘導された HSPs は変性タンパク質の再生などを行う。過剰になった HSPs は再び RpoH を分解し定常状態に戻る。
 p^{32} : RpoH認識プロモーター
 RNAP: RNAポリメラーゼコア酵素

Reaction	ΔV or ΔV^* (ml mol ⁻¹)	Refs
Protonation / ion-pair formation		
H ₂ O → H ⁺ + OH ⁻	-21.0	van Eldik, <i>et al.</i> , 1989
H ₂ PO ₄ → HPO ₄ ²⁻ + H ⁺	-26.1	van Eldik, <i>et al.</i> , 1989
H ₂ CO ₃ → HCO ₃ ⁻ + H ⁺	-26.0	van Eldik, <i>et al.</i> , 1989
Protein-COOH → Protein-COO ⁻	-10	Gross and Jaenicke 1994
Protein-NH ₂ + H ₂ O → Protein-NH ₃ + OH ⁻	-20	Gross and Jaenicke 1994
Protein subunit dissociation		
Actin	-9 to -328	Garcia, <i>et al.</i> , 1992
Tublin	-90	Salmon, 1975
70S ribosomal subunit → 30S + 50S	-242	Pande and Wishnia, 1986
Hexokinase	-115 to -160	Ruan and Weber, 1988
Tryptophan synthetase	-196 to -632	Sindern, <i>et al.</i> , 1995
Ca ₂ ⁺ -ATPase	-43 to -50	Coelho-Sampaio, <i>et al.</i> , 1991
<i>lac</i> repressor tetramer → dimer	-82	Royer, <i>et al.</i> , 1990
Activation volumes		
α-chymotrypsin	-6 to 2	Makimoto and Taniguchi, 1988
Thermolysin	-71 to -95	Kunugi, <i>et al.</i> , 1997
Transcriptional elongation	55 to 65	Erijman and Clegg, 1998
DNA-helix formation	-11.8	Lin and MacGregor, 1996
DNA-helix transition	39.9	Lin and MacGregor, 1996
DNA-duplex formation	-23 to 17	Lin and MacGregor, 1997

Table1-1 各生化学的反應における体積変化

これまでに報告されている化学反応における系の体積、もしくは活性化体積の変化をまとめて示した。(Abe, *et al.*, 1999より抜粋、一部改変)

ファミリー	<i>E. coli</i>			酵母			哺乳類動物		
	サイトゾル	小胞体	ミトコンドリア	サイトゾル	小胞体	ミトコンドリア	サイトゾル	小胞体	ミトコンドリア
HSP110		Sse1,2					Hsp110/105	Grp170/Orp150	
							Hsp70RY/Hsp70h		
							Apg1/Osp94		
							Apg2		
HSP100	ClpA, B, C ClpX, Y	Hsp104		Hsp78			Skd3		ClpX
HSP90	HtpG	Hsc82 Hsp82							Trap1/Hsp75
HSP70	DnaK	Ssa1, 2, 3, 4	Kar2/BiP	Ssc1			Hsp70/Hsp72	Grp78/Bip	Grp75/Pbp74
	Hsc66	Ssb1, 2	Ssi1/Lhs1	SsH1/Ssq1			Hsc70/Hsc73	Stch	Mot-1, 2
	Hsc62	Pbr13					Hsc70t		
							Hsc70-2, 3, 6, 7		
							Hsc54		
HSP60	GroEL	Cct1~8		Hsp60 Tcm62			Cct $\alpha \sim \theta$ MKKS		Hsp60/Cpn60
HSP47								Hsp47	
HSP40	DnaJ	Ydj1/Mas5	Scj1	Mdj1			Hsdj/Hdj2	Mtj1	hTid1
	CbpA	Sis1	Sec63	Mdj2			Rdj2/mDj3	hDj9/Hwdj	
	DjlA/RcsG	Zuotin	Jem1				mmDjA4	hSec63	
	HscB/Hsp20	Caj1					Hsp40/Hdj1	mDj7/Mdg1	
	YbeS	Djp1					Hsj1		
	YbeV	Jac1					Mrj/mDj4		
							Msj1		
							Hsc40		
							mDj5, 6, 8, 10		
							Zrf1/Mida1		
							p58		
							Csp		
							auxilin		
							Tpr2/mDj11		
HSP33	Hsp33								
HSP27	IbpA	Hsp26					Hsp27/28		
	IbpB	Hsp42					α A-crystallin		
							α B-crystallin		
							p20/HSBX		
							HSPB2/MKBP		
							HSPB3/HspL27		
							cvHsp		
HSP24	GrpE			Mge1					mt-GrpE
HSP15	Hsp15								
HSP10	GroES			Hsp10					Hsp10/Cpn10
GimC	Gim1, 5	Gim1~6					Prefoldin		

Table1-2 分子シャペロンとそれらのホモログ

分子シャペロンとそれらのホモログと細胞内局在を示した。

スラッシュ (/) は同一異名。

本稿であつかったシャペロンは太字で示した。 文献 Nagata, et al., 2000 より改変

第2章 ヒートショック関連遺伝子のクローニングと解析

2.1. 緒言

生物の生理を研究していくにあたってストレス応答というものは古くから注目されてきた。主として修復に関与するストレスタンパク質はストレスがかかったときに合成され、ストレス環境に対する生物の回答として知られており恒常性を維持するうえで重要な役割を果たしている。微生物の場合、*Escherichia coli* におけるヒートショック応答がもっともよく研究されており、その担い手は HSPs (heat shock proteins) である。熱によって生じるもっとも大きな影響はタンパク質の変性であり様々な生命活動を阻害する。変性タンパク質は HSPs の働きにより、隔離、再生もしくは分解される。近年、好熱菌の HSPs が単離精製され環境温度によって使い分けを行う特異な機構が注目を集めた[Yoshida, Yohda et al. 2003]。HSPs には GroEL-ES や DnaK-J といったシャペロンが存在し、酵素の安定化や耐熱性の向上などを目的とした応用研究も試みられている。一方、低温、高圧という特殊な環境に適応した好圧性細菌においても特異な HSPs を持っている可能性が考えられた。また、高圧環境に適応するにあたり HSPs が何らかの役割をはたしていることも示唆されており、高圧環境への適応機構の解明のためにも好圧性細菌の HSPs の解析が必要と考えられた。そこで、深海由来好冷好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株から HSPs とその転写制御因子である RpoH (σ^{32}) をコードするヒートショック関連遺伝子のクローニングを試みた。HSPs からは代表的なシャペロンをコードする *groEL*, *groES* および *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*、新生ペプチドに結合する Trigger factor をコードする *tig* さらに代表的な HSPs プロテアーゼをコードする *lon* をターゲットとした。

ヒートショック応答は多くの生物種で保存されたシステムで、それらを担う HSPs も比較的保存性が高いことが知られている。このことから、データベース上の HSPs をアミノ酸レベルで比較し、保存性の高い領域からプライマーを設計増幅し、これをプローブとして *S. violacea* のゲノムから HSPs をコードする領域をクローニングした結果を本章に示した。

また本研究と平行してホールゲノムショットガン法により *S. violacea* の全ゲノム解析が近畿大学、奈良先端大学、慶応大学、海洋研究開発機構の共同研究

で行われており、その解析結果とも比較し相関していることを確かめた。

2.2. 実験方法

2.2.1. 使用菌株、培養条件および基本操作

深海由来好冷好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株は Marine Broth 2216 を使用し 0.1 MPa、8℃で培養した。加圧培養においては、新鮮な培地に対数増殖期中期まで培養した前培養液を 1%植菌し、滅菌された保圧パックを用いて気泡が入らないように密閉した。加圧は保温した加圧培養器を用い目的圧力まで加圧した後、対数増殖器中期まで培養した。遺伝子組み替えの宿主として大腸菌は *Escherichia coli* K-12 株 W3110 を使用した。大腸菌は必要に応じて抗生物質 Ampicillin (50 μ g/ml) を添加した Luria-Bertani (LB) 培地中で 0.1 MPa、37℃で培養した。遺伝子組み替え用のベクターとしては pUC118 (Toyobo) を使用した。なお遺伝子組み替え操作および培地、緩衝液の組成は、特に記載のないかぎり Molecular Cloning -A Laboratory Manual- に従い、各種酵素および検出試薬キット等の使用条件は取扱説明書に従った。

2.2.2. 染色体 DNA の精製

S. violacea は 48 時間、*E. coli* は 4 時間、対数増殖期になるまで振盪培養した。100 ml の培養液を遠心分離 (4℃, 10,000 xg, 10 min) により集菌した。菌体を 2 ml の DNA 抽出 buffer (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) に懸濁し、これに 200 μ l の Lysozyme (10 mg/ml, SIGMA) を加えおだやかに攪拌後、30 分間氷上に静置した。これに 120 μ l の 10% SDS 溶液を加えおだやかに攪拌後、30 分間 37℃に静置後、さらに 10 μ l の proteinase K 溶液 (10 mg/ml, SIGMA) を加えおだやかに攪拌後、37℃で一時間静置することで溶菌させた。菌液に等量の TE 平衡化フェノールを加えて混和した後、遠心分離 (4℃, 6,000 xg, 15 min) を行い、上層を回収する操作を数回繰り返した後、等量のフェノール・イソアミルアルコール (25 : 24 : 1)、および等量のクロロホルムを加えてタンパク質を除去し遠心分離 (室温, 10,000 xg, 15 min) により DNA 溶液を回収した。DNA 溶液に 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.2) を加えて混和した後、2 倍量のエタノールを重層し、ガラス棒によって界面より DNA を巻き

取った。巻き取った染色体 DNA は 70%エタノールにより洗浄後、風乾し、TEbuffer に溶解して染色体 DNA サンプルとした。なお、染色体 DNA サンプルは分光光度計 (Beckman Model DU) を用いて定量し適当な濃度に希釈後、使用まで 4℃で保存した。

2.2.3. プローブの作成

rpoH 遺伝子およびヒートショック関連遺伝子を検出するプローブの作製のため、類縁菌 (*E. coli* K-12, *Shewanella oneidensis* MR-1, *Vibrio cholerae* O1 biovar eltor str. N16961, *Salmonella typhimurium* LT2, *Yersinia pestis* KIM) のゲノム情報を参照し *S. violacea* 染色体 DNA から対応領域を増幅するプライマーを設計した。DIG システム (Roche) の所定の条件で PCR ラベル法により DNA thermal cycler model 9600 (Perkin-Elmer) を用いて DIG 標識プローブを作製した。*S. violacea* DSS12 株からの *rpoH* 遺伝子およびヒートショック関連遺伝子の検出は、作製した DIG 標識プローブをプレハイブリダイゼーション buffer (5 x SSC, 1% Blocking reagent (Roche), 1% N-Lauroylsarcosine, 0.02% SDS, pH 7.0) に溶解して以下の操作に用い解析した。

2.2.4. サザンハイブリダイゼーション

制限酵素により消化した *S. violacea* の染色体 DNA を 1% アガロースゲル中で電気泳動した。分子量マーカーには DIG DNA molecular weight markerII (Roche) を用いた。電気泳動後、ゲルを 0.25N HCl 溶液につけ室温で 5 分間振盪し、その後、蒸留水で軽く洗浄した。脱プリン化するため、ゲルを変性溶液 (0.5N NaOH, 1.5 M NaCl) 中で 15 分間、振盪して洗浄した。これを 2 回繰り返し、蒸留水で洗浄した後、中和溶液 (0.5 M Tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7.5) で 15 分間振盪した。これを 2 回繰り返し、蒸留水で洗浄した後、バキューム装置に Hybond-N+メンブレン (Amersham)、およびゲルを設置し、20 x SSC をゲル上に滴下しながら 30 分間吸引した。メンブレンを 2 x SSC で洗浄した後、UV クロスリンクにより DNA をメンブレン上に固定した。次にプレハイブリダイゼーション buffer (5 x SSC, 1% Blocking reagent (Roche), 1% N-Lauroylsarcosine, 0.02% SDS, pH 7.0) 中で 68℃、2 時間インキュベートした後、DIG 標識プローブ溶液を用いて 68℃、16 時間ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後のメンブレンは 2 x SSC 洗浄液 (2 x SSC, 0.1% SDS) によって室温で 2 回 5 分間洗浄した後、0.1 x SSC 洗浄液 (0.1 x SSC, 0.1% SDS) を用い 68°C で 2 回 15 分間洗浄した。次に Buffer 1 (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5) に 1 分間浸した後、Buffer 2 (Buffer 1 with 10% Blocking solution) で室温、30 分間インキュベートした。その後、Buffer 2 で 5000 倍に希釈された anti-DIG Alkaline phosphatase conjugate 抗体 (Roche) 溶液中で 30 分間インキュベートし抗体を結合させ、Buffer 1 によって室温で 2 回 15 分間洗浄した。Buffer 3 (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH9.5) で 2 分間平衡化した後、発色溶液 (ニトロブルー・テトラゾリウム塩溶液 (Roche) 45 μl, X-phosphate (Roche) 35 μl, 10 ml Buffer 3) に浸し、発色が検出されるまで静置した。発色後は、TEbuffer で 5 分間メンブレンを洗浄し反応を停止した。

2.2.5. クローニングおよびコロニーハイブリダイゼーション

制限酵素 (*Pst*I, *Hind*III, *Pvu*II, *Sph*I, *Eco*RV) により消化した *S. violacea* の染色体 DNA を、1% アガロースゲルにより電気泳動を行った。電気泳動後のゲルからサザンハイブリダイゼーションにより決定した目的遺伝子断片を含むサイズの DNA を切り出し、精製した。精製した DNA 断片は、適当な制限酵素により消化後、脱リン酸化処理したプラスミドベクター (pUC118) に連結し、コンピテントセル処理を施した *E. coli* に導入し形質転換を行った。これを LB 固形培地 (50 μg/ml Ampicilin, 50 μg/ml X-gal, 0.1 mM IPTG) に塗布し 37°C で一晚培養した。DSS12 株の染色体 DNA 断片を含む形質転換株から、目的遺伝子断片を含むものを 2.2.4. で用いたプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。コロニーハイブリダイゼーションには Molecular Cloning -A Laboratory Manual- に従い菌体を Hybond-N+メンブレン (Amersham) に固定後、サザンハイブリダイゼーションと同様に検出を行った。スクリーニングした形質転換株からは、アルカリ SDS 法によりプラスミドを精製し後述の方法で塩基配列を決定した。

2.2.6. 塩基配列の決定と塩基配列情報の解析方法

塩基配列の決定は、DYEnamic ET terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham) を用いてプロトコルにしたがって反応を行い、ABI prism 377 automatic DNA

sequencer (Applied Biosystems) によって配列の決定を行った。塩基配列情報の解析には AutoAssembler Version 2.0 (Applied Biosystems) を、編集および解析には GENETYX-MAC version 11 (Software Development) をそれぞれ用いた。また、予測された ORF の解析には FASTA プログラム (<http://spiral.genes.nig.ac.jp/homology/fasta.shtml>) および、BLAST プログラム (<http://blast.genome.ad.jp/>) を用いた。

2.3. 結果および考察

Shewanella violacea DSS12 株からヒートショック関連遺伝子のクローニングを行った。まず数種類の近縁なバクテリア (*Escherichia coli* K-12, *Shewanella oneidensis* MR-1, *Vibrio cholerae* 01 biovar eltor str. N16961, *Salmonella typhimurium* LT2, *Yersinia pestis* KIM) の HSPs のアミノ酸配列からアラインし、保存性の高い領域からプライマーを設計した。このプライマーを用いて *S. violacea* のゲノムから PCR で増幅し塩基配列を決定した。その結果、他の細菌における各種 HSPs と高い相同性を示した。各種制限酵素で消化したゲノムを、この PCR 産物をプローブとしてサザンブロットィング解析により目的遺伝子を含む領域を決定した。この断片を切り出しにより精製後、pUC118 ベクターに連結し形質転換を行った。培養後、出現したコロニーからコロニーハイブリダイゼーションによりヒートショック関連遺伝子を含むクローンを選択し塩基配列決定を行った。塩基配列決定の結果から ORF を抽出し、推定したアミノ酸配列をもとにデータベースからコードするタンパク質を推定した。さらに、ゲノムプロジェクトの結果と照らし合わせ配列、周辺構造を確認した (Fig.2-1)。さらに *E. coli* K-12 と *S. oneidensis* MR-1 における当該遺伝子の周辺構造と比較した。また、ヒートショック関連遺伝子についてはアミノ酸レベルで類縁菌と比較し、系統樹を作成した。

2.3.1. *rpoH* 遺伝子の解析

S. violacea の染色体 DNA から増幅したプローブを用いてスクリーニングした結果、*rpoH* 遺伝子は *Pst*I によって消化された 4120 bps の DNA 断片の塩基配列中に存在した。塩基配列決定および ORF 解析の結果に基づき、制限酵素地図

を作成した。この断片には他に2つずつの ORF と ORF の一部を含んでおり、それぞれの ORF を Genbank データベースにより決定した結果、細胞分裂に関する *ftsY*, *ftsE*, *ftsX* を含む事が推測された。*rpoH* を含む上流の遺伝子の順序および転写の方向性は *E. coli* K-12 および *S. oneidensis* MR-1 と同様の順序、方向性で *ftsY*, *ftsE*, *ftsX* が存在していることが解った。一方 *rpoH* の下流は *S. oneidensis* MR-1 の ORF (SO4576) と非常によく似た ORF を部分的に含んでいたが、*S. oneidensis* MR-1 では下流に transposase をコードした ORF が存在し3種間でそれぞれ異なった周辺構造をしていることがわかった (Fig.2-2)。

S. violacea の RpoH タンパク質は *S. oneidensis* MR-1 と系統樹上で最も近縁で、アミノ酸レベルで 83.9%の相同性を示した。RpoH タンパク質にはその機能を担う重要な領域が報告されている [Campbell, Muzzin et al. 2002]。-10 領域とコア酵素との結合を担う Sigma-70 region2 は *S. violacea* でも非常に高い保存性を維持していた。一方、-35 領域との結合を担う Sigma-70 region4 は比較的多様性に富んでいた (Fig.2-3)。このことから *E. coli* において報告されている RpoH の認識するコンセンサス配列 (SNcTTGAAA---<N₁₄>---RNCCCCATNt) [Cowing, Bardwell et al. 1985]は-10 領域については *S. violacea* においても比較的相同性の高い配列であり、-35 領域については相同性の低い配列であることが予想された。

E. coli において *rpoH* の mRNA はそれ自身が温度センサーとなるような二次構造をとっており環境の温度変化に応じて翻訳を調節していることが知られている。さらにこの二次構造のうち stem I と呼ばれる開始コドンを含んだ構造が、特に翻訳調節の中心的な構造であり、ヒートショック応答時の急速で顕著な翻訳誘導を担っている [Morita, Kanemori et al. 1999; Morita, Tanaka et al. 1999]。 *S. violacea* の mRNA を検討すると、こちらも二次構造を形成しており、開始コドン周辺に stem 構造を持つことが予測され、同様に翻訳調節を担っていることが考えられた。それぞれの構造の持つ自由エネルギーは *E. coli* では-60.90 kcal/mol、 *S. violacea* では-50.16 kcal/mol であり、 *E. coli* の mRNA の方が 10 kcal/mol 程度低く安定していることが予想された (Fig.2-4)。これは *S. violacea* が好冷性細菌であり、より低い温度でのヒートショック応答が必要なためと考えられた。

2.3.2. *groE* オペロンの解析

groEL 遺伝子および *groES* 遺伝子は他の細菌との比較からオペロンを形成していることが予想された。そこで *S. violacea* の染色体 DNA から増幅した *groEL* のプローブを用いてクローニングを行った。*groEL* 遺伝子は *PstI* によって消化された 7288 bps の DNA 断片の塩基配列中に存在した。塩基配列決定および ORF 解析の結果に基づき、制限酵素地図を作成した。この断片には予想通り *groEL*, *groES* 遺伝子がオペロンを形成していた。さらにこの断片中には他に 3 つの ORF を含んでおり、それぞれの ORF を Genbank データベースにより推定した結果 *groE* オペロンの他、Na⁺-driven multidrug efflux pump をコードする *matE* 遺伝子と二つの機能未知な ORF を含む事が推測された。*groE* オペロンの順序および転写の方向性は *E. coli* K-12 および *S. oneidensis* MR-1 などと同じであった。周辺の構造は上流部分に関しては *S. oneidensis* MR-1 に近く下流部分に関しては 3 種間で異なった構造をしていることがわかった(Fig.2-5)。

S. violacea の GroEL タンパク質は *S. oneidensis* MR-1 と系統樹上で最も近縁で、アミノ酸レベルで 91.9% の相同性を示したのに加え、他の種のものとも全て 80% 以上の相同性を示し、非常に保存性が高いタンパク質であることがわかった(Fig.2-6)。同様に *S. violacea* の GroES タンパク質も *S. oneidensis* MR-1 と系統樹上で最も相同性が高くアミノ酸レベルで 88.5% の相同性を示したのに加え、他の種のものとも全て 80% 以上の相同性を示し、こちらも非常に保存性が高いタンパク質であることがわかった(Fig.2-7)。しかし、GroEL では *S. violacea* にだけ見られるアミノ酸置換も 17 ヶ所存在し、GroES では 4 ヶ所存在した。その中には GroEL-ES 複合体がダイナミックにコンフォメーションを変化させる際に繋ぎ目 (hinge 領域) となる重要な 137 番目のアミノ酸 (*E. coli* で Pro、*S. violacea* で Glu) など含まれており、高圧、低温といった環境に適応するアミノ酸置換が起こっている可能性もある。実際に、活性化体積を測定しなければ確かなことは言えないが、GroEL-ES 複合体における内部の容積を拡大させるようなコンフォメーション変化や、複合体-変性タンパク質間の疎水性結合は高圧環境下では阻害されることが考えられる。このような阻害を回避するアミノ酸置換が起きているのかも知れない。保存性が高い故、高圧環境下の影響をアミノ酸レベルで研究するよい材料になると期待される。

2.3.3. *dnaKJ* オペロンの解析

dnaJ 遺伝子および *dnaK* 遺伝子は他の細菌との比較からオペロンを形成していることが予想された。そこで *S. violacea* の染色体 DNA から増幅した *dnaJ* のプローブを用いてクローニングを行った。*dnaJ* 遺伝子は *PvuII* によって消化された 5031 bps の DNA 断片の塩基配列中に存在した。塩基配列決定および ORF 解析の結果に基づき、制限酵素地図を作成した。この断片には予想通り *dnaJ*, *dnaK* 遺伝子がオペロンを形成していた。さらにこの断片中には他に 2 つの ORF を断片的に含んでおり、それぞれの ORF を Genbank データベースにより推定した結果 *dnaKJ* オペロンの他二つの ORF は機能未知の SO1137 と integral membrane domain をもつタンパク質をコードしている ORF であった。周辺の遺伝子の順序および転写の方向性は *E. coli* K-12 とは異なり *S. oneidensis* MR-1 に近い構造であったが、*S. oneidensis* MR-1 には *dnaJ* と SO1137 の間におよそ 6.3 kbps のトランスポゾンによると思われる挿入領域が存在した(Fig.2-8)。

S. violacea の DnaJ タンパク質は *S. oneidensis* MR-1 と系統樹上で最も近縁で、アミノ酸レベルで 88.3% の相同性を示したのに加え、他の種のものとも全て 73% 以上の相同性を示し、保存性が高いタンパク質であることがわかった(Fig.2-9)。

同様に *S. violacea* の DnaK タンパク質も *S. oneidensis* MR-1 と系統樹上で最も近縁で、アミノ酸レベルで 87.5% の相同性を示したのに加え、他の種のものとも全て 76% 以上の相同性を示し、保存性が高いタンパク質であることがわかった(Fig.2-10)。DnaJ タンパク質は 3 つのドメインを持つことが知られている [Kelley 1998; Martinez-Yamout, Legge et al. 2000]。N 末端に位置し DnaK タンパク質と結合しシャペロン活性を担う DnaJ ドメイン、中央に位置し Zn^{2+} と結合し基質との結合にも関わる DnaJ_CXXCXGXG、C 末端に機能未知の DnaJ_C の 3 つのドメインであり、DnaJ ドメイン、DnaJ_C 共によく保存されている他、DnaJ_CXXCXGXG も 4 つずつ存在し他の報告と同様に 2 つの Zn^{2+} と結合することが予想され全体的に保存性が高いことがわかった。DnaK タンパク質は N 末端に ATPase domain を持ち C 末端に基質結合部位を持つことが知られている [Bukau and Horwich 1998]。DnaK が認識するのは不安定なタンパク質の疎水性領域である。N 末端は比較的保存性が高かったが C 末端は保存性が低く、標的となるタンパク質に違いがある可能性を示唆する。

2.3.4. *grpE* 遺伝子の解析

S. violacea の染色体 DNA から増幅したプローブを用いてスクリーニングした結果、*grpE* 遺伝子は *Hind*III によって消化された 5425 bps の DNA 断片の塩基配列中に存在した。塩基配列決定および ORF 解析の結果に基づき、制限酵素地図を作成した。この断片には他に 4 つの ORF と 1 つ部分的な ORF を含んでおり、それぞれの ORF を Genbank データベースにより決定した結果 *grpE* の他、*yffB* のホモログ、DUF599 region を持つ膜タンパク質、carboxyl-terminal protease をコードする遺伝子、および機能未知の ORF と *dsbD* の一部を含む事が推測された。周辺の遺伝子の構造は *E. coli* K-12 および *S. oneidensis* MR-1 と同様に *grpE* の上流に inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase をコードすると思われる *yffB* が存在したがさらに上流では 3 種間ともに異なった構造をしていた。また *grpE* 遺伝子の下流についてはクローニングできた領域が少なかったため比較できなかった。(Fig.2-11)。

S. violacea の GrpE タンパク質は *S. oneidensis* MR-1 と系統樹上で最も近縁で、アミノ酸レベルで 68.6% の相同性を示した。他の種のものとは全て 40~50% 程度の比較的低い相同性を示し、比較的保存性が高くないタンパク質であることがわかった(Fig.2-12)。他細菌の GrpE タンパク質との比較や SD (Shine-Dalgarno) 配列と想定される配列から *S. violacea* の *grpE* は 33 bps 下流に存在する 2 番目の開始コドンから発現している可能性もあると考えられた。しかし、本研究においてはどちらの開始コドンが発現に関与しているかまでは明らかにされていないため、ORF にしたがって 1st ATG を開始コドンとして解析を行った。

2.3.5. *tig, lon* 遺伝子の解析

S. violacea の染色体 DNA から増幅したプローブを用いてスクリーニングした結果、*tig* 遺伝子は *pst*I によって消化された 8124 bps の DNA 断片の塩基配列中に存在した。また、*lon* 遺伝子は *Eco*RV によって消化された 7863 bps の DNA 断片の塩基配列中に存在した。それぞれの断片の塩基配列決定を行ったところ、この二つの断片は互いに重複していることがわかった。そこでこの二つの断片をまとめて ORF 解析および制限酵素地図作成を行うこととした。この断片には *tig* 遺伝子、*lon* 遺伝子の他に 6 の ORF を含んでおり、それぞれの ORF を Genbank データベースにより決定した結果 *tig, lon* の他それぞれ HSPs プロテア

一ゼをコードする *clpP*, *clpX* および、*hupB*, *ppiD*, VPA1301, *folD* と推定された。遺伝子の構造は HSPs 関連のクラスターとその上流、下流の 3 つにわけられた。*tig* から *clpP*, *clpX*, *lon*, *hupB*, *ppiD* (*E. coli* では *ybaU* と呼ばれる) と続く HSPs 関連のクラスターは *E. coli* K-12 および *S. oneidensis* MR-1 と同じ順序、転写方向で存在した。上流領域は *folD*, を含み *S. oneidensis* MR-1 の持つ構造と近い構造をしていた。下流領域には *S. violacea* には VPA1301 が存在していたが、*S. oneidensis* MR-1 には ORF が見られず、*E. coli* K-12 では全く違うオペロンが存在し 3 種間ともに異なった構造をしていた(Fig.2-13)。他細菌の Lon タンパク質との比較や SD (Shine-Dalgarno) 配列と想定される配列から *S. violacea* の *lon* は 33 bps 下流に存在する 2 番目の開始コドンから発現している可能性もあると考えられた。しかし、本研究においてはどちらの開始コドンが発現に関与しているかまでは明らかにされていないため、ORF にしたがって 1st ATG を開始コドンとして解析を行った。

S. violacea の Tig タンパク質は *S. oneidensis* MR-1 と系統樹上で最も近縁で、アミノ酸レベルで 82.9%の相同性を示したのに加え、他の細菌のものとも全て 58~63%程度の相同性を示し全体的に比較的保存性が高いが、*Shewanella* 属で特によく保存されたタンパク質であることがわかった(Fig.2-14)。Tig タンパク質にはその機能を担う重要な領域が 3 つ報告されている[Deuerling, Patzelt et al. 2003]。N 末端に位置して large ribosomal subunit と結合する Trigger_N、中央に位置する FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase、C 末端に位置して機能未知な Trigger_C は *S. violacea* において *S. oneidensis* MR-1 の当該領域と較べた場合ではどの領域もよく保存されていた。他の細菌の Tig と較べた場合 Trigger_N が他の 2 つ領域よりも比較的保存性が低くなっていることがわかった。

同様に *S. violacea* の Lon タンパク質も *S. oneidensis* MR-1 と系統樹上で最も近縁で、アミノ酸レベルで 90.3%の相同性を示したのに加え、他の種のものとも全て 80%以上の相同性を示し、非常に保存性が高いタンパク質であることがわかった(Fig.2-15)。Lon タンパク質にはその機能を担う重要な領域が 3 つ報告されている[Confalonieri and Duguet 1995] [Vasilyeva, Kolygo et al. 2002]。N 末端に位置する ATP-dependent protease La (LON) domain、中央部分に位置する ATPase ドメインである AAA、C 末端側に位置する Lon protease (S16) C-terminal proteolytic domain は 3 つとも比較的良く保存されていた。

2.3.6. *clpP*, *clpX*, *hupB*, *ppiD* 遺伝子の解析

tig, *lon* 遺伝子をクローニングした領域に含まれていた6つ ORFのうち、*E. coli* においてヒートショック関連遺伝子であるとされている *clpP*, *clpX*, *hupB*, *ppiD* についても同様に他の種とアミノ酸レベルで比較解析した。

S. violacea の ClpP タンパク質も *S. oneidensis* MR-1 と系統樹上で最も近縁で、アミノ酸レベルで 90.3%の相同性を示したのに加え、他の種のものとも全て 75%以上の相同性を示し、非常に保存性が高く特に *Shewanella* 属において保存されているタンパク質であることがわかった(Fig.2-16)。ClpP タンパク質はセリンプロテアーゼであり報告されている CLP_Protease ドメインはよく保存されており、酵素活性を担う Ser(111), His(136), Asp(185)も保存されていた[Wang, Hartling et al. 1997]。

S. violacea の ClpX タンパク質も *S. oneidensis* MR-1 と系統樹上で最も近縁で、アミノ酸レベルで 89.6%の相同性を示したのに加え、他の種のものとも全て 80%以上の相同性を示し、非常に保存性が高いタンパク質であることがわかった(Fig.2-17)。ClpX タンパク質は ClpP と複合体をつくる ATPase でありシャペロンとしての機能も報告されている。C4-Type Zinc Finger である zf-C4_ClpX ドメイン、ATPase ドメインである AAA もよく保存されていた[Confalonieri and Duguet 1995; Wojtyra, Thibault et al. 2003]。

S. violacea の HupB タンパク質も *S. oneidensis* MR-1 と系統樹上で最も近縁で、アミノ酸レベルで 93.3%の相同性を示したのに加え、他の種のものとも全て 70%以上の相同性を示し、保存性が高く特に *Shewanella* 属において保存されているタンパク質であることがわかった(Fig.2-18)。HupB タンパク質は HU-2 とも呼ばれ、HU-1 と共同して核様体に結合してその高次構造を維持している[Tanaka, Yasuzawa et al. 1995]。*E. coli* において高圧環境下では核様体構造が崩れている可能性が示唆されており、核様体に結合する H-NS の欠損は圧力感受性に影響を与える[Ishii, Oshima et al. 2004]。同様に核様体に結合し高次構造を維持している HupB は高圧環境下で何らかの機能を担っているのであろうか。HupB は全長 90 a.a.のタンパク質でありそのうち *S. violacea* 特有アミノ酸変化が 6 a.a.存在する。高圧環境下での機能について興味を持たれる。

S. violacea の PpiD タンパク質も *S. oneidensis* MR-1 と系統樹上で最も近縁で、アミノ酸レベルで 64.4%の相同性を示した。しかし、他の種のものとは全て 30%

台の相同性を示したに過ぎず、他の HSPs に較べて保存性の低いタンパク質であることがわかった(Fig.2-19)。PpiD タンパク質はまれに生じるプロリンのシス型異性体をトランス型に変換する酵素で、外膜タンパク質のフォールディングに必要とされているシャペロンでもある[Dartigalongue and Raina 1998]。活性部位として知られる Rotamase ドメインも全体的に見た場合と同じ程度の保存性であった。また、*S. oneidensis* の PpiD とくらべその N 末端が 14 a.a 多く、2 番目の開始コドンから翻訳が行われている可能性が考えられた。

2.4. まとめ

深海由来好冷好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株から RpoH (σ^{32}) と代表的な HSPs (heat shock proteins) である DnaJ, DnaK, GroEL, GroES, GrpE, Tig, Lon をコードする遺伝子のクローニングを行った。その結果、*clpP*, *clpX*, *hupB*, *ppiD* を加えた 11 種類のヒートショック関連遺伝子をクローニングした。データベース解析の結果、各タンパク質とも系統的に *Shewanella oneidensis* MR-1 由来のものと最も近いことがわかった。また他細菌との比較から *S. violacea* でのみ見られるアミノ酸置換も存在したものの、全体的にはその保存性が示され、好冷性、好圧性といった性質に関する特徴的な知見は得られなかった。今後、他の好圧性細菌での知見の蓄積が望まれる。*S. violacea* 由来のいくつかの酵素では、高圧環境下での活性が調べられている[Kawano, Nakasone et al. 2004; Ohmae, Kubota et al. 2004]。それらの知見に基づけば、高圧環境下に適応した酵素と大気圧下に適応した酵素に大きな構造上の変化がない場合もあり、今後は高圧環境下における酵素学的なアプローチから *S. violacea* 由来の HSPs を特徴づけることができる可能性もある。しかし、現状では圧力はもちろん温度に関しても *S. violacea* は至適生育温度を決定したに過ぎず、今回クローニングしたヒートショック関連遺伝子が熱に対して応答するかも定かではない。そこで本研究ではヒートショック関連遺伝子の中でも解析がすすんでおり、類縁菌間での保存性も最も高い *groEL* および *groES* に注目しヒートショック応答、および高圧環境下での転写、および発現を解析した。その結果を次章に述べる。

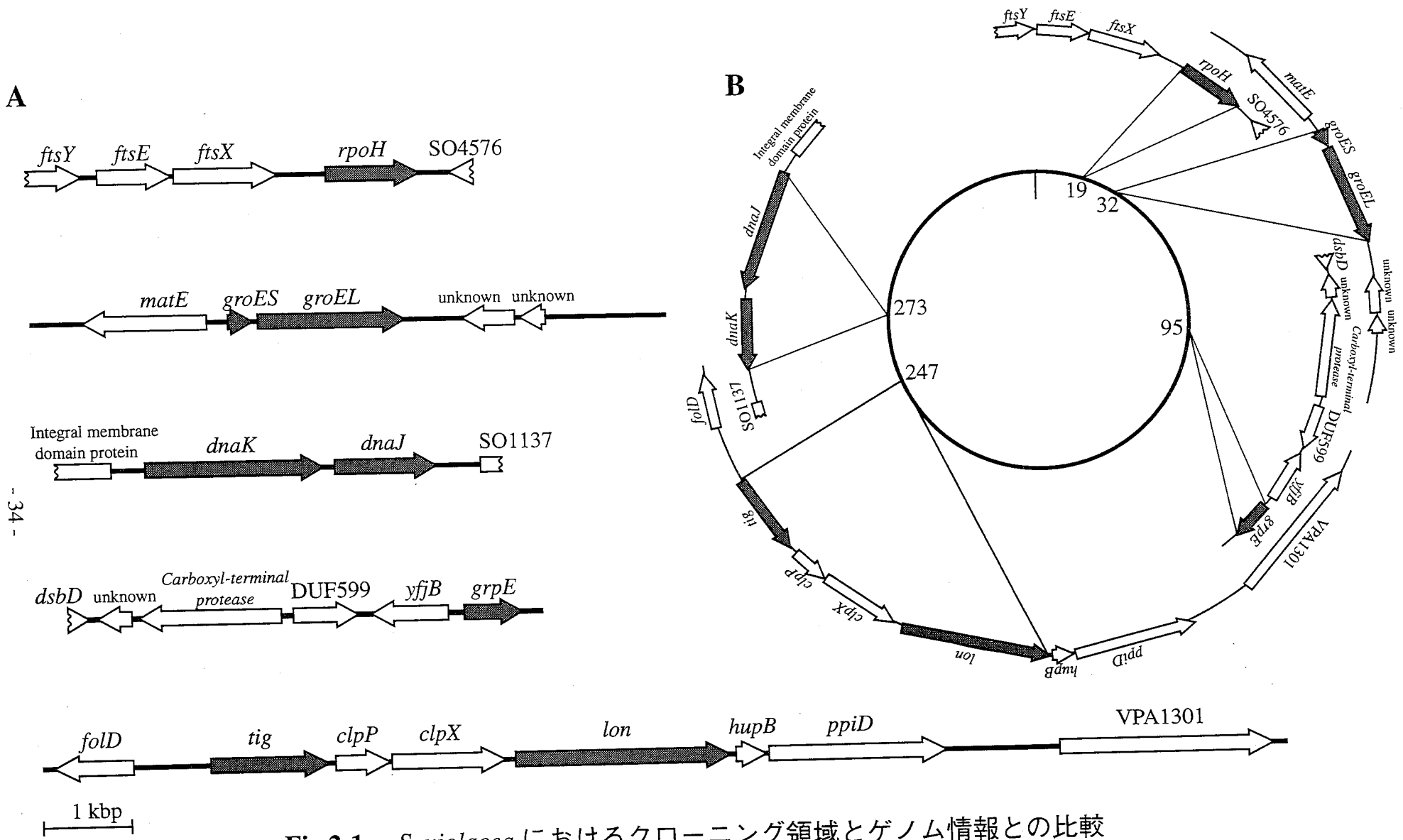


Fig.2-1 *S. violacea* におけるクローニング領域とゲノム情報との比較

S. violacea から得たクローニング断片とその ORF を A に示した。
S. violacea のゲノム情報から取得した領域の位置を角度と模式図で B に示した。

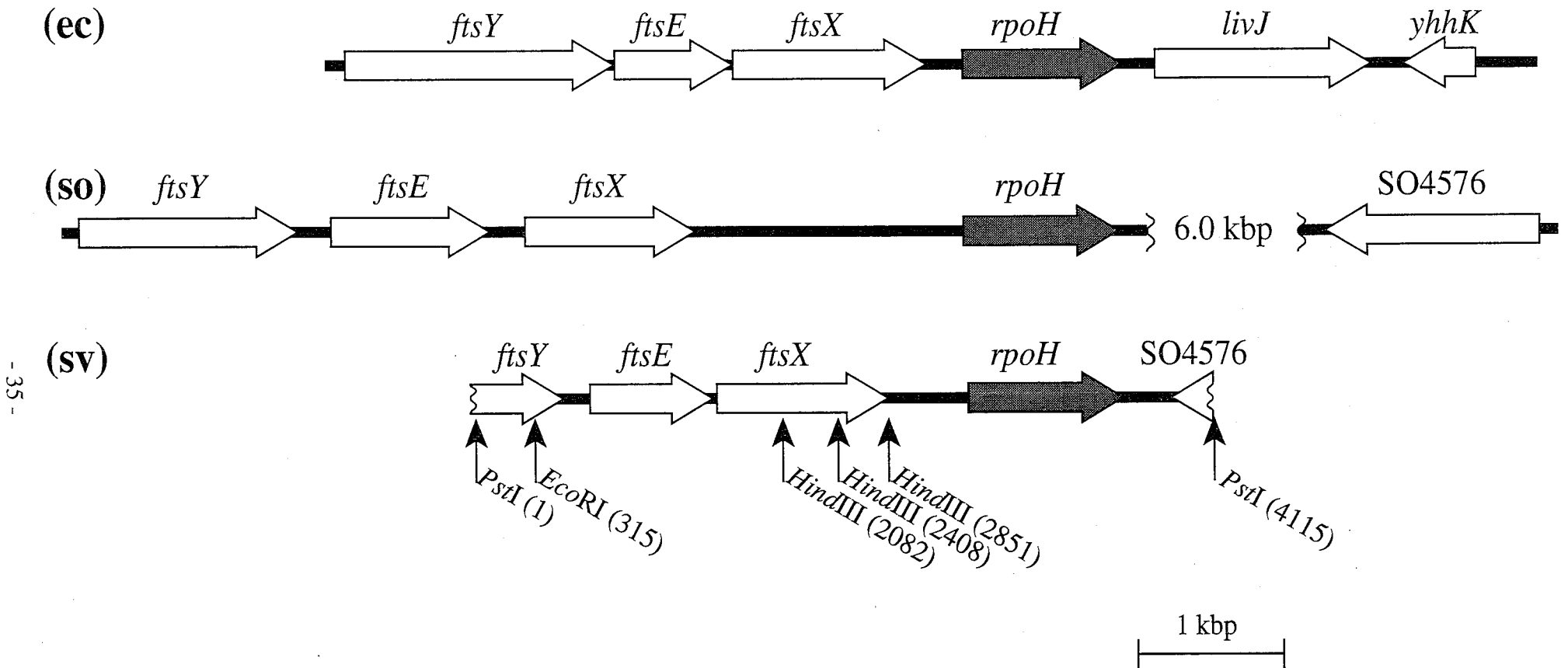




Fig.2-2 *rpoH* 遺伝子における *S. violacea* と類縁菌との周辺構造の比較

Shewanella violacea DSS12 (sv) から得たクローニング断片と、これまでに決定されている *Escherichia coli* K-12 (ec), *Shewanella oneidensis* MR-1 (so) との周辺構造を比較した。クローニング断片には代表的な制限酵素サイトと塩基数を矢印で示した。

A

RpoH(sv)	1	TTDITQSMALVVPHGSGS	SAVHSHHINISL	EAKQSEHLAKA	DETSDIQRAKQ	IMHLRFV	HVAKGS	SVGLP	ADL	DEGNI	GLMKAV	KRF	DFNV	100		
RpoH(ec)	1	TTDKMISLALAPVGN---	DSV	RAANAWML	SDDEALAK	QVHSD	EAAKTL	SHLRFV	HVAAN	AVGLP	ADL	DEGNI	GLMKAV	RAF	97	
RpoH(so)	1	ITFQTSMALITVPGSSS	SAVH	SVTSMNL	DAETVE	LAKA	DETSD	QRAKQ	IMHLRFV	HVAKGS	SVGLP	ADL	DEGNI	GLMKAV	KRF	100
RpoH(vc)	1	ITIQAVPMALVQSQS---	DSV	HSVNGV	SLSDDE	LAKA	DETSD	QRAKQ	IMHLRFV	HVAKGS	SVGLP	ADL	DEGNI	GLMKAV	KRF	97
RpoH(st)	1	ITKEMQNLALAPVGN---	DSV	RAANAWML	SDDEALAK	QVHSD	EAAKTL	SHLRFV	HVAAN	AVGLP	ADL	DEGNI	GLMKAV	RAF	97	
RpoH(y)	1	ITKEMQTLALVPQGS---	SAVH	GANAVR	MLTFRERE	ALAKA	DETSD	QRAKQ	IMHLRFV	HVAAN	SVGLP	ADL	DEGNI	GLMKAV	RAF	97
RpoH(sv)	101	SWRLVSPAVHNTKAE	THEVWL	NIRIWK	ATTKAQRKLFN	AKS	KALGW	SDAEV	GWREN	LGW	SKADV	TEHESR	RAQDPA	FLAS	NDDDIQDYAP	200
RpoH(ec)	98	SWRLVSPAVHNTKAE	THEVWL	NIRIWK	ATTKAQRKLFN	AKT	QALGW	SDAEV	GWREN	LGW	TSKQV	TEHESR	RAQDIT	FLS	DDSDSQP-MR	196
RpoH(so)	101	SWRLVSPAVHNTKAE	THEVWL	NIRIWK	ATTKAQRKLFN	AKS	KALGW	SDAEV	GWREN	LGW	SKADV	TEHESR	RAQDPA	FLAS	NDDEH-DFAP	199
RpoH(vc)	98	SWRLVSPAVHNTKAE	THEVWL	NIRIWK	ATTKAQRKLFN	AKS	KALGW	SDAEV	GWREN	LGW	EPRE	TEHESR	RAQDPA	FLAS	REDENGMAYT	197
RpoH(st)	98	SWRLVSPAVHNTKAE	THEVWL	NIRIWK	ATTKAQRKLFN	AKT	QALGW	SDAEV	GWREN	LGW	SSKQV	TEHESR	RAQDIT	FLS	DDSDSQP-MR	196
RpoH(y)	98	SWRLVSPAVHNTKAE	THEVWL	NIRIWK	ATTKAQRKLFN	AKT	QALGW	SDAEV	GWREN	LGW	TSKQV	TEHESR	RAQDIT	FLS	DDSDSQP-MR	197
RpoH(sv)	201	ALVLETHSLSL	INQVET	FRADNQTAL	LAHIKTL	DERSDI	LQARIL	ENKTTI	LO	LAATV	QVSAERI	QOLEKNANK	LKAR	IA	286	
RpoH(ec)	197	AVVLDQKSNFAG	EDT	TEQANAL	TDAMQGL	DERSDI	LQARIL	ENKSS	LO	LADQV	QVSAERI	QOLEKNANK	LKAR	IA	284	
RpoH(so)	200	VHVLETHSLSL	EN	EN	SNQGL	LSHIKTL	DERSDI	LQARIL	ENKTTI	LO	LAETV	QVSAERI	QOLEKNANK	LKAR	IA	285
RpoH(vc)	198	AVVLETHSLSL	EN	EN	SNQGL	LSHIKTL	DERSDI	LQARIL	ENKTTI	LO	LAEMV	QVSAERI	QOLEKNANK	LKAR	IA	286
RpoH(st)	197	AVVLDQKSNFAG	EDT	TEQANAL	TDAMQGL	DERSDI	LQARIL	ENKSS	LO	LADQV	QVSAERI	QOLEKNANK	LKAR	IA	284	
RpoH(y)	198	AVVLDQKSNFAG	EDT	TEQANAL	TDAMQGL	DERSDI	LQARIL	ENKSS	LO	LADQV	QVSAERI	QOLEKNANK	LKAR	IA	285	

 Sigma70_region 2
 Sigma70_region 4

B

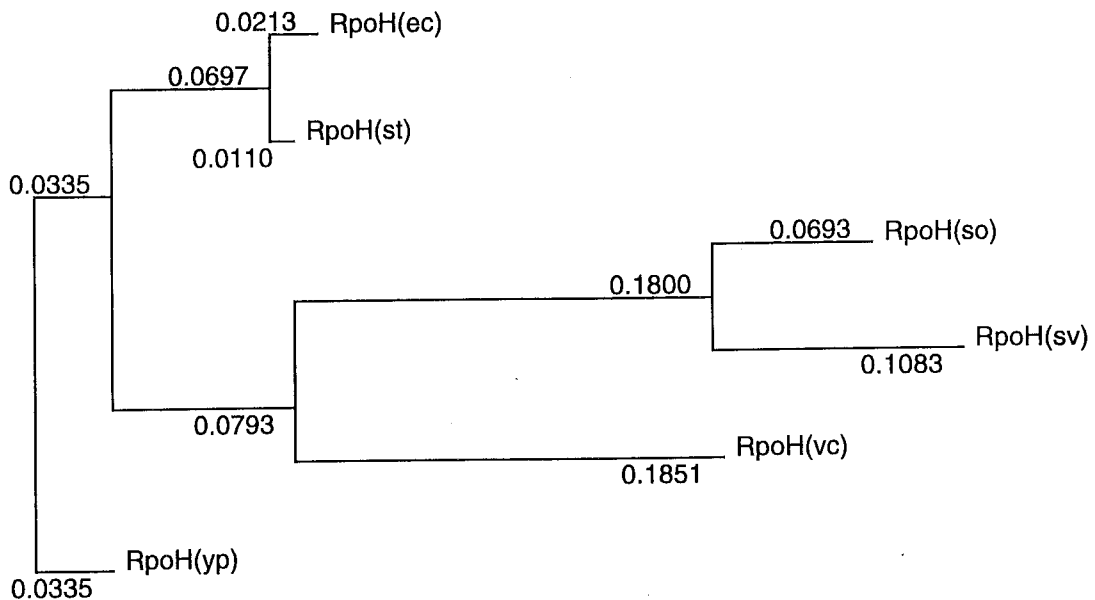
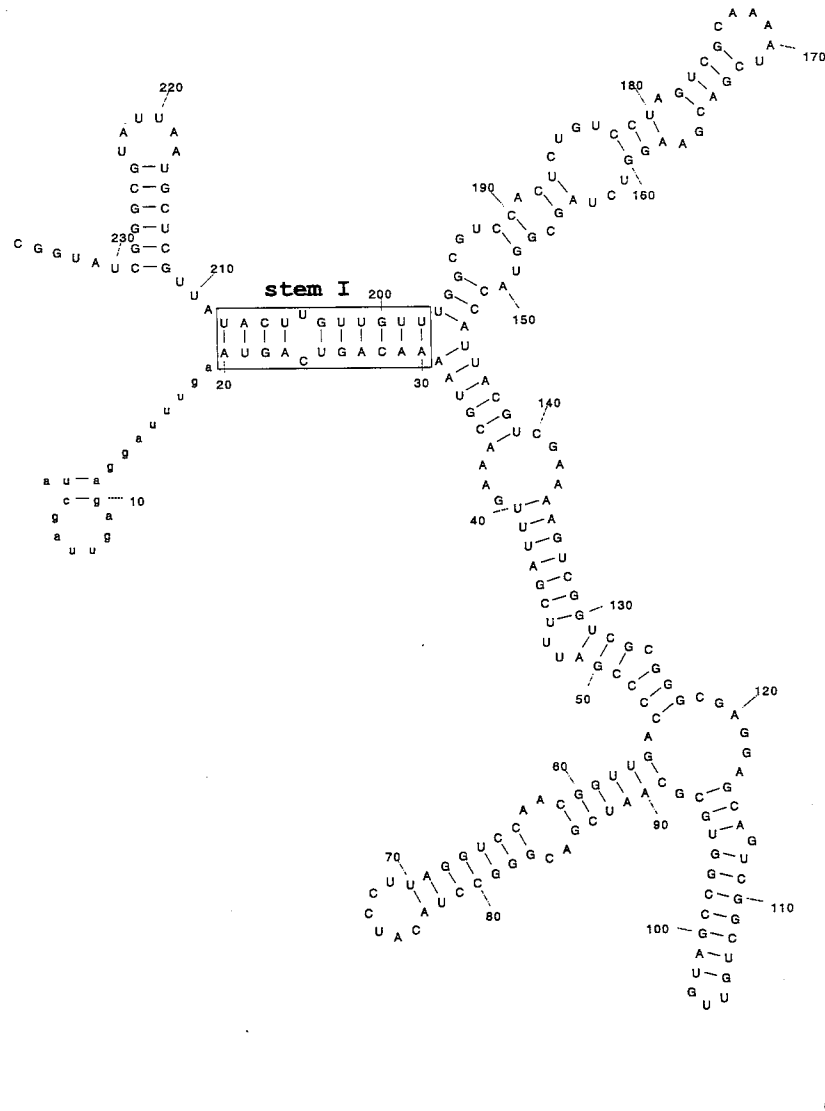


Fig.2-3 RpoH タンパク質のアミノ酸配列における多重整列と系統樹解析

Shewanella violacea (sv) と、これまでに決定されている *Escherichia coli* (ec), *Shewanella oneidensis* (so), *Vibrio cholerae* (vc), *Salmonella typhimurium* (st), *Yersinia pestis* (yp) とのアミノ酸配列比較した。

多重整列の結果をおよび報告されている domain を A に、系統樹解析の結果を B に示した。

A



B

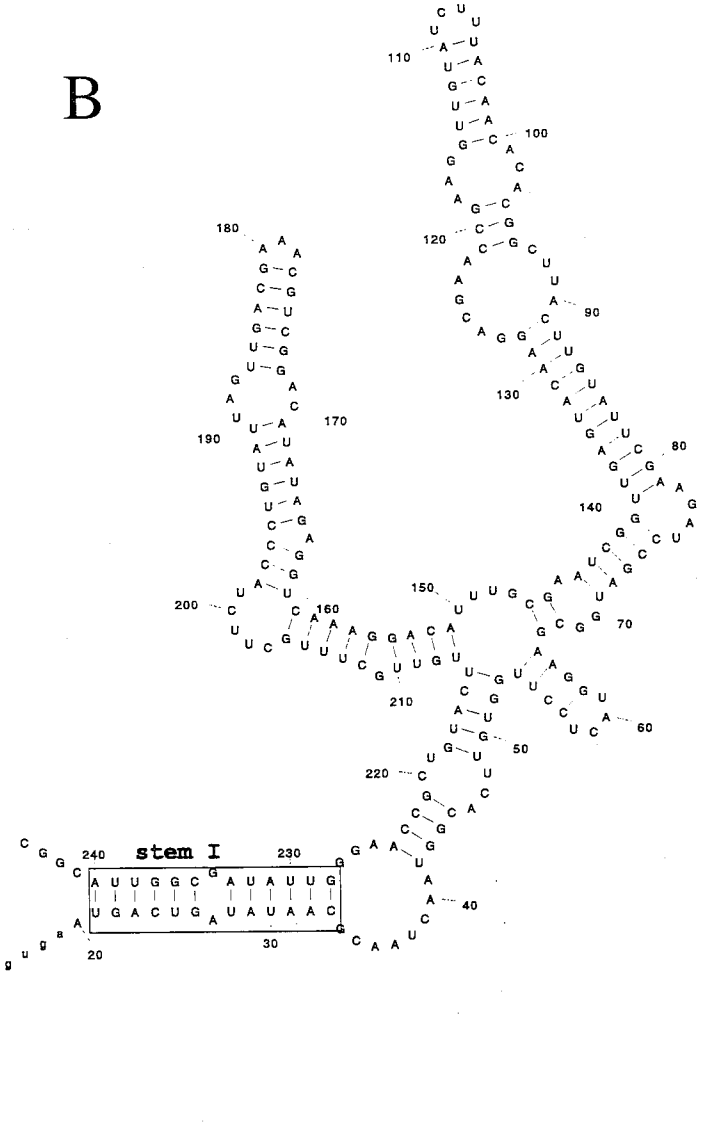


Fig.2-4 *rpoH*mRNAの部分的な二次構造予測

翻訳領域を大文字で、非翻訳領域を小文字で示した。開始コドン近傍の stem を枠で囲った。

A) *E. coli* の *rpoH*mRNA の二次構造の一部を示した。Minimum Free Energy:-60.90 kcal/mol。

B) *S. violacea* の *rpoH*mRNA の二次構造の一部を示した。Minimum Free Energy:-50.16 kcal/mol。

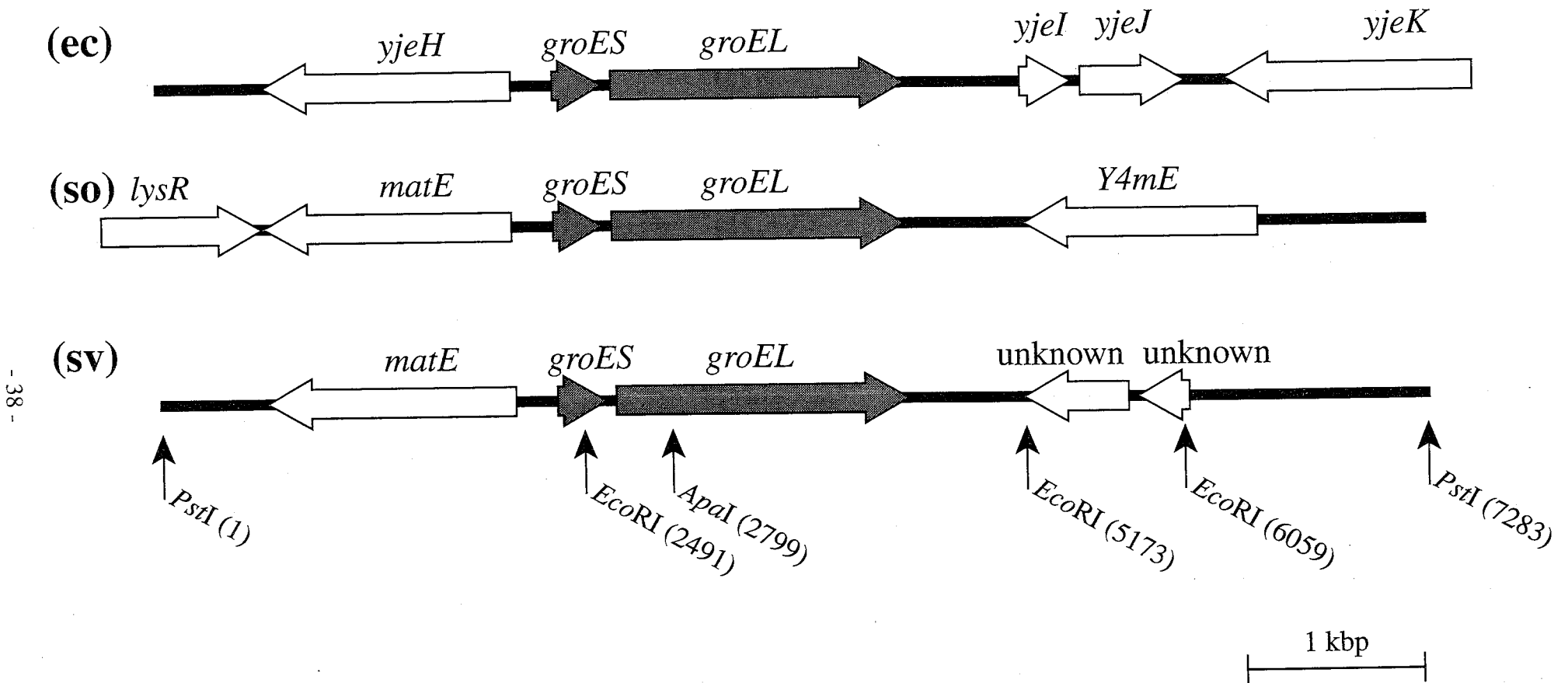


Fig.2-5 *groE* オペロンにおける *S. violacea* と類縁菌との周辺構造の比較

Shewanella violacea DSS12 (sv) から得たクローニング断片と、これまでに決定されている *Escherichia coli* K-12 (ec), *Shewanella oneidensis* MR-1 (so) との周辺構造を比較した。クローニング断片には代表的な制限酵素サイトと塩基数を矢印で示した。

A

GroEL(sv)	1	MAAKEMFGNDAPKMLBQVNLAVKVTLGPKGRNWLDKSFQSPITKDGWVAKDIELEEDKEMNGRMWKEVASANDAGDGTITATVLAQIV	100
GroEL(ec)	1	MAAKEMFGNDAPKMLBQVNLAVKVTLGPKGRNWLDKSFQSPITKDGWVAKDIELEEDKEMNGRMWKEVASANDAGDGTITATVLAQII	100
GroEL(so)	1	MAAKEMFGNDAPKMLBQVNLAVKVTLGPKGRNWLDKSFQSPITKDGWVAKDIELEEDKEMNGRMWKEVASANDAGDGTITATVLAQIV	100
GroEL(vc)	1	MAAKEMFGNDAPKMLBQVNLAVKVTLGPKGRNWLDKSFQSPITKDGWVAKDIELEEDKEMNGRMWKEVASANDAGDGTITATVLAQIV	100
GroEL(st)	1	MAAKEMFGNDAPKMLBQVNLAVKVTLGPKGRNWLDKSFQSPITKDGWVAKDIELEEDKEMNGRMWKEVASANDAGDGTITATVLAQII	100
GroEL(y)	1	MAAKEMFGNDAPKMLBQVNLAVKVTLGPKGRNWLDKSFQSPITKDGWVAKDIELEEDKEMNGRMWKEVASANDAGDGTITATVLAQII	100
GroEL(sv)	101	NEGLKAVVAGGNMFDLKRGIQKAWIARVRELKLSQEDSQAIDVGTISANSDDTVGKLIATAMDVGEQWITVEEQALELQWVEGMDQFDQVLL	200
GroEL(ec)	101	NEGLKAVVAGGNMFDLKRGIQKAWIARVRELKLSQEDSQAIDVGTISANSDDTVGKLIATAMDVGEQWITVEEQALELQWVEGMDQFDQVLL	200
GroEL(so)	101	NEGLKAVVAGGNMFDLKRGIQKAWIARVRELKLSQEDSQAIDVGTISANSDDTVGKLIATAMDVGEQWITVEEQALELQWVEGMDQFDQVLL	200
GroEL(vc)	101	NEGLKAVVAGGNMFDLKRGIQKAWIARVRELKLSQEDSQAIDVGTISANSDDTVGKLIATAMDVGEQWITVEEQALELQWVEGMDQFDQVLL	200
GroEL(st)	101	NEGLKAVVAGGNMFDLKRGIQKAWIARVRELKLSQEDSQAIDVGTISANSDDTVGKLIATAMDVGEQWITVEEQALELQWVEGMDQFDQVLL	200
GroEL(y)	101	NEGLKAVVAGGNMFDLKRGIQKAWIARVRELKLSQEDSQAIDVGTISANSDDTVGKLIATAMDVGEQWITVEEQALELQWVEGMDQFDQVLL	200
GroEL(sv)	201	SPVFINTEGDELSPVLLVQKSNIRELPLLEGLAKTQAPLLIADVEVEGALATLWVNTIRGIVKVAWVKAPGFGDRAKAMLQDITLTGTV	300
GroEL(ec)	201	SPVFINTEGDELSPVLLVQKSNIRELPLLEGLAKTQAPLLIADVEVEGALATLWVNTIRGIVKVAWVKAPGFGDRAKAMLQDITLTGTV	300
GroEL(so)	201	SPVFINTEGDELSPVLLVQKSNIRELPLLEGLAKTQAPLLIADVEVEGALATLWVNTIRGIVKVAWVKAPGFGDRAKAMLQDITLTGTV	300
GroEL(vc)	201	SPVFINTEGDELSPVLLVQKSNIRELPLLEGLAKTQAPLLIADVEVEGALATLWVNTIRGIVKVAWVKAPGFGDRAKAMLQDITLTGTV	300
GroEL(st)	201	SPVFINTEGDELSPVLLVQKSNIRELPLLEGLAKTQAPLLIADVEVEGALATLWVNTIRGIVKVAWVKAPGFGDRAKAMLQDITLTGTV	300
GroEL(y)	201	SPVFINTEGDELSPVLLVQKSNIRELPLLEGLAKTQAPLLIADVEVEGALATLWVNTIRGIVKVAWVKAPGFGDRAKAMLQDITLTGTV	300
GroEL(sv)	301	ISEEIGLELEKATLEDLQAKRWITKNTITIDGVSQAIDQAWSDIKIDEEISTSDVDKELQERAKLAGGVAVIKVGAATEVENKEKKRWEDAL	400
GroEL(ec)	301	ISEEIGLELEKATLEDLQAKRWITKNTITIDGVSQAIDQAWSDIKIDEEISTSDVDKELQERAKLAGGVAVIKVGAATEVENKEKKRWEDAL	400
GroEL(so)	301	ISEEIGLELEKATLEDLQAKRWITKNTITIDGVSQAIDQAWSDIKIDEEISTSDVDKELQERAKLAGGVAVIKVGAATEVENKEKKRWEDAL	400
GroEL(vc)	301	ISEEIGLELEKATLEDLQAKRWITKNTITIDGVSQAIDQAWSDIKIDEEISTSDVDKELQERAKLAGGVAVIKVGAATEVENKEKKRWEDAL	400
GroEL(st)	301	ISEEIGLELEKATLEDLQAKRWITKNTITIDGVSQAIDQAWSDIKIDEEISTSDVDKELQERAKLAGGVAVIKVGAATEVENKEKKRWEDAL	400
GroEL(y)	301	ISEEIGLELEKATLEDLQAKRWITKNTITIDGVSQAIDQAWSDIKIDEEISTSDVDKELQERAKLAGGVAVIKVGAATEVENKEKKRWEDAL	400
GroEL(sv)	401	HATRAAWEEGWVGGGVALPAAASKLADLRQNEEDLQKVAARAMEPLAQIATVAGEEASVANNVNGSDVYNAGNDTVGMLLEIGILDPTKVT	500
GroEL(ec)	401	HATRAAWEEGWVGGGVALPAAASKLADLRQNEEDLQKVAARAMEPLAQIATVAGEEASVANNVNGSDVYNAGNDTVGMLLEIGILDPTKVT	500
GroEL(so)	401	HATRAAWEEGWVGGGVALPAAASKLADLRQNEEDLQKVAARAMEPLAQIATVAGEEASVANNVNGSDVYNAGNDTVGMLLEIGILDPTKVT	500
GroEL(vc)	401	HATRAAWEEGWVGGGVALPAAASKLADLRQNEEDLQKVAARAMEPLAQIATVAGEEASVANNVNGSDVYNAGNDTVGMLLEIGILDPTKVT	500
GroEL(st)	401	HATRAAWEEGWVGGGVALPAAASKLADLRQNEEDLQKVAARAMEPLAQIATVAGEEASVANNVNGSDVYNAGNDTVGMLLEIGILDPTKVT	500
GroEL(y)	401	HATRAAWEEGWVGGGVALPAAASKLADLRQNEEDLQKVAARAMEPLAQIATVAGEEASVANNVNGSDVYNAGNDTVGMLLEIGILDPTKVT	500
GroEL(sv)	501	ASALQFARSIAGLNIITTEAVIADVQDASAPDMGG--MGG--GGGGGNN	546
GroEL(ec)	501	ASALQVARSVAGLNIITTEAVITDLPNDAP-DLQAGGQGGGGGGNN	548
GroEL(so)	501	ASALQFARSIAGLNIITTEAVIELPKADAP-DMGG--MGG--GGGGGNN	545
GroEL(vc)	501	ASALQFARSIAGLNIITTEAVITELPKADAPAMP---D--MG--GGGGGNN	544
GroEL(st)	501	ASALQVARSVAGLNIITTEAVITDLPNDAP-DLQAGGQGGGGGGNN	548
GroEL(y)	501	ASALQVARSVAGLNIITTEAVITDLPADDKADMDAGG--MGGGGGGNN	548

B

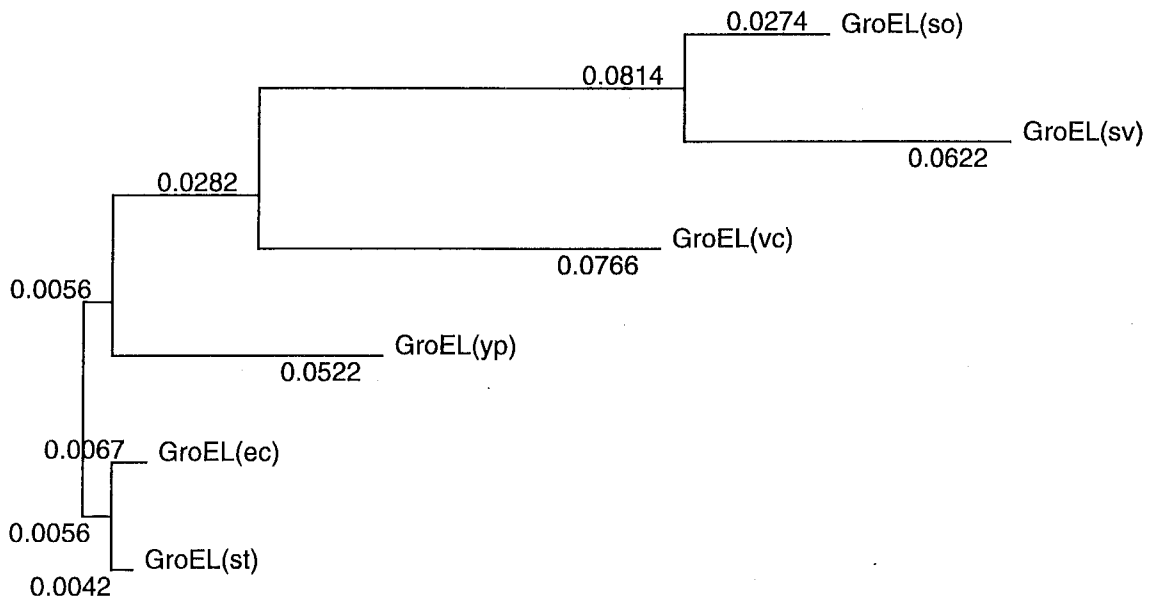


Fig.2-6 GroEL タンパク質のアミノ酸配列における多重整列と系統樹解析

Shewanella violacea (sv) と、これまでに決定されている *Escherichia coli* (ec), *Shewanella oneidensis* (so), *Vibrio cholerae* (vc), *Salmonella typhimurium* (st), *Yersinia pestis* (yp) とのアミノ酸配列比較した。

多重整列の結果を A に、系統樹解析の結果を B に示した。

A

GroES(sv)	1	NRPLHQRWIV	AKEMET	SAGGIWLTG	AAAEQ	STRG	AVD	GRIL	NGS	QPLQW	VGD	WIF	NEQV	KEK	IQG	EWLI	SEDL	MV	GS-	96
GroES(ec)	1	NRPLHQRWIV	AKEMET	SAGGIWLTG	AAAEK	STRG	AVD	GRIL	NGE	KPLQW	VGD	WIF	DDVG	SEK	IQN	BEVLI	SESD	AI	VA	97
GroES(so)	1	NRPLHQRWIV	AKEMET	SAGGIWLTG	AAAEK	STRG	AVD	GRIL	NGT	QPLQW	VGD	WIF	DDVG	SEK	IQG	EWLI	SEDL	MV	GS-	96
GroES(st)	1	NRPLHQRWIV	AKEMET	SAGGIWLTG	AAAEK	STRG	AVD	GRIL	NGS	QPLQW	VGD	WIF	DDVG	SEK	IQN	BEVLI	SESD	AI	VA	97
GroES(vc)	1	NRPLHQRWIV	AKEMET	SAGGIWLTG	AAAEK	STRG	AVD	GRIL	NGS	QPLQW	VGD	WIF	DDVG	SEK	IQG	EWLI	SEDL	MV	GS-	96
GroES(yp)	1	NRPLHQRWIV	AKEMET	SAGGIWLTG	AAAEK	STRG	AVD	GRIL	NGE	KPLQW	VGD	WIF	DDVG	SEK	IQN	BEVLI	SESD	AI	VA	97

B

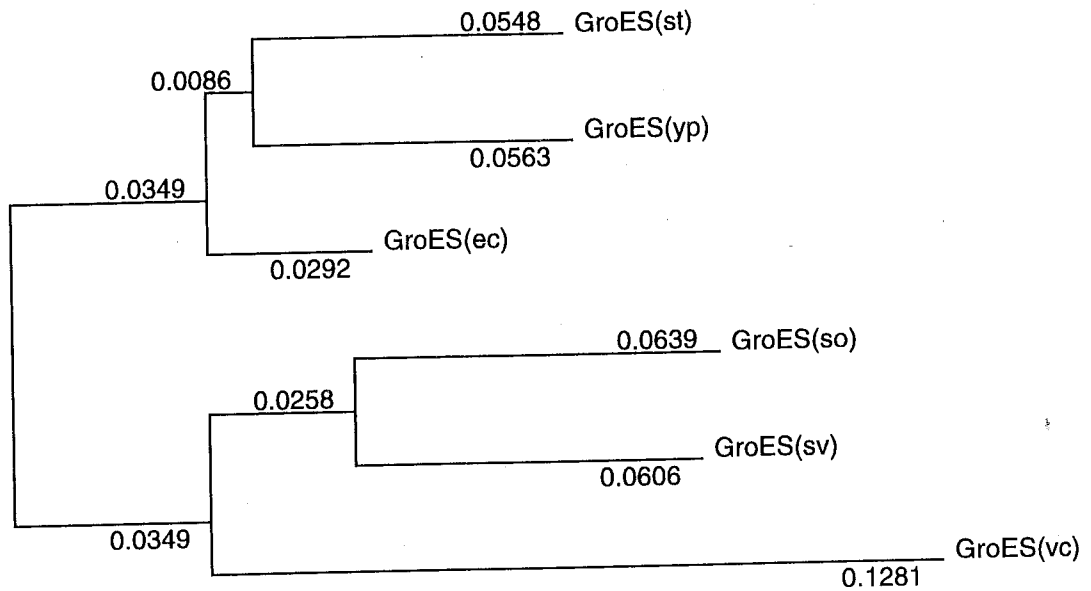


Fig.2-7 GroES タンパク質のアミノ酸配列における多重整列と系統樹解析

Shewanella violacea (sv) と、これまでに決定されている *Escherichia coli* (ec), *Shewanella oneidensis* (so), *Vibrio cholerae* (vc), *Salmonella typhimurium* (st), *Yersinia pestis* (yp) とのアミノ酸配列比較した。多重整列の結果を A に、系統樹解析の結果を B に示した。

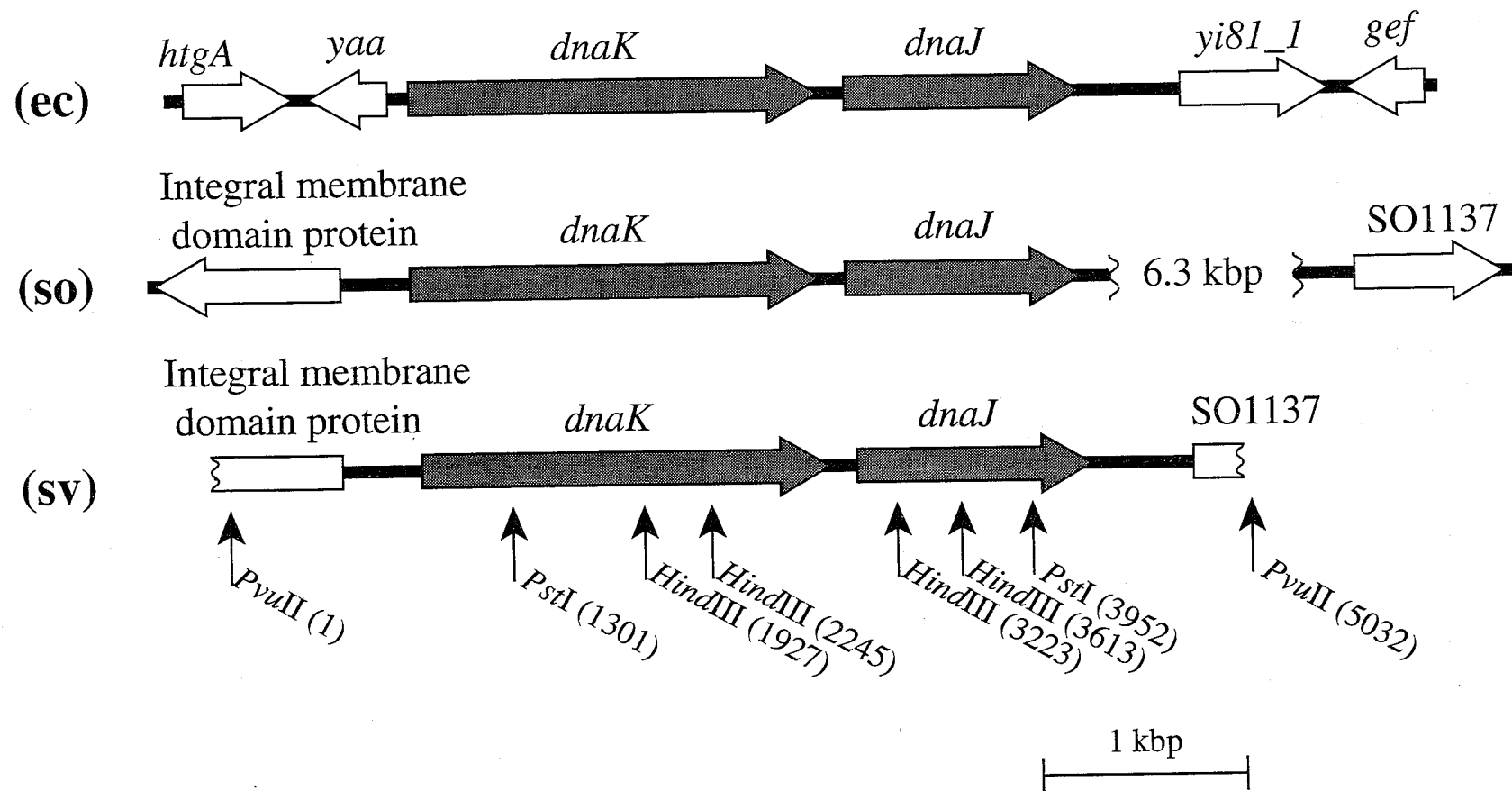


Fig.2-8 *dnaKJ* オペロンにおける *S. violacea* と類縁菌との周辺構造の比較

Shewanella violacea DSS12 (sv) から得たクローニング断片と、これまでに決定されている *Escherichia coli* K-12 (ec), *Shewanella oneidensis* MR-1 (so) との周辺構造を比較した。クローニング断片には代表的な制限酵素サイトと塩基数を矢印で示した。

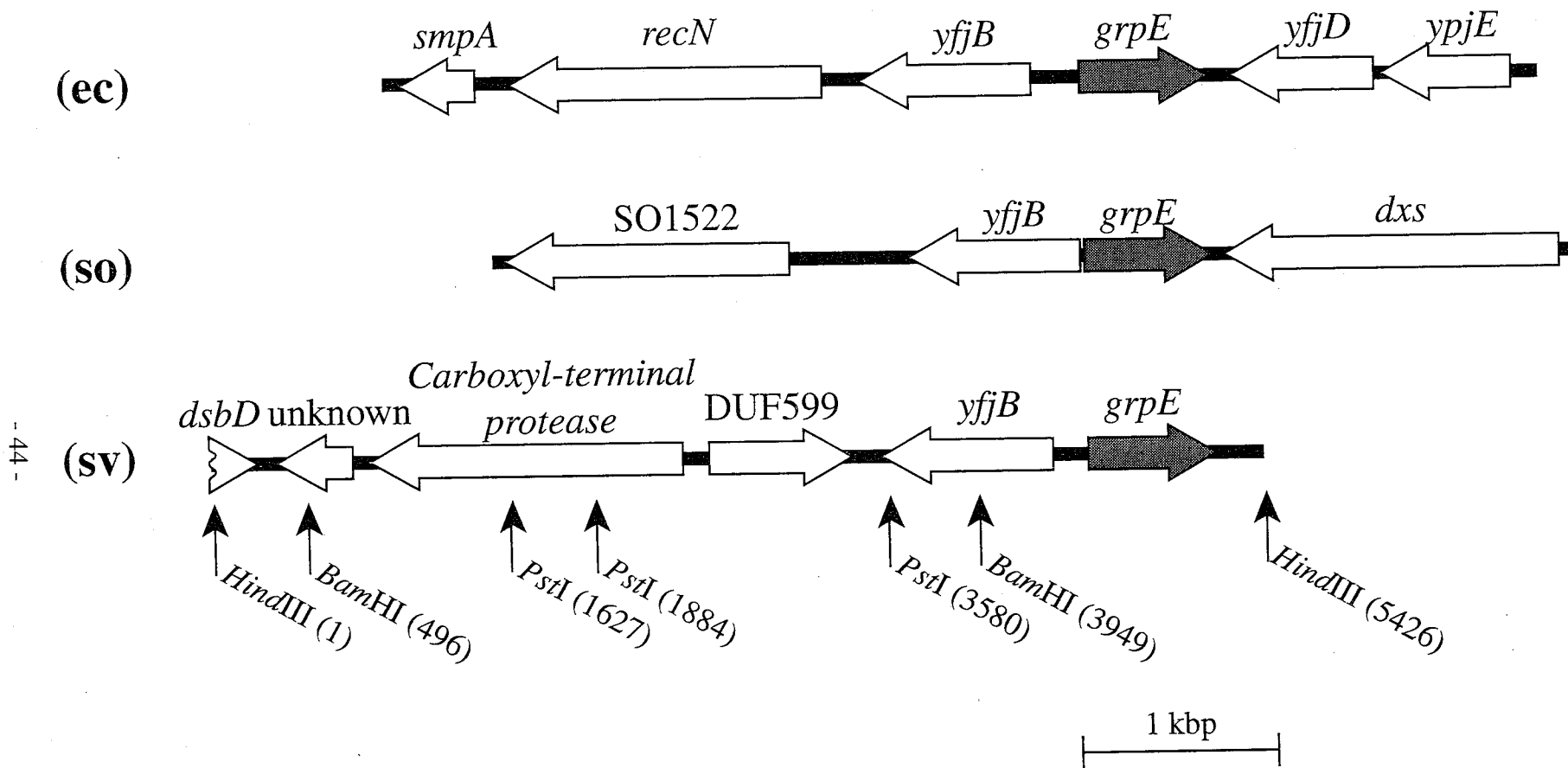


Fig.2-11 *grpE* 遺伝子における *S. violacea* と類縁菌との周辺構造の比較

Shewanella violacea DSS12 (sv) から得たクローニング断片と、これまでに決定されている *Escherichia coli* K-12 (ec), *Shewanella oneidensis* MR-1 (so) との周辺構造を比較した。クローニング断片には代表的な制限酵素サイトと塩基数を矢印で示した。

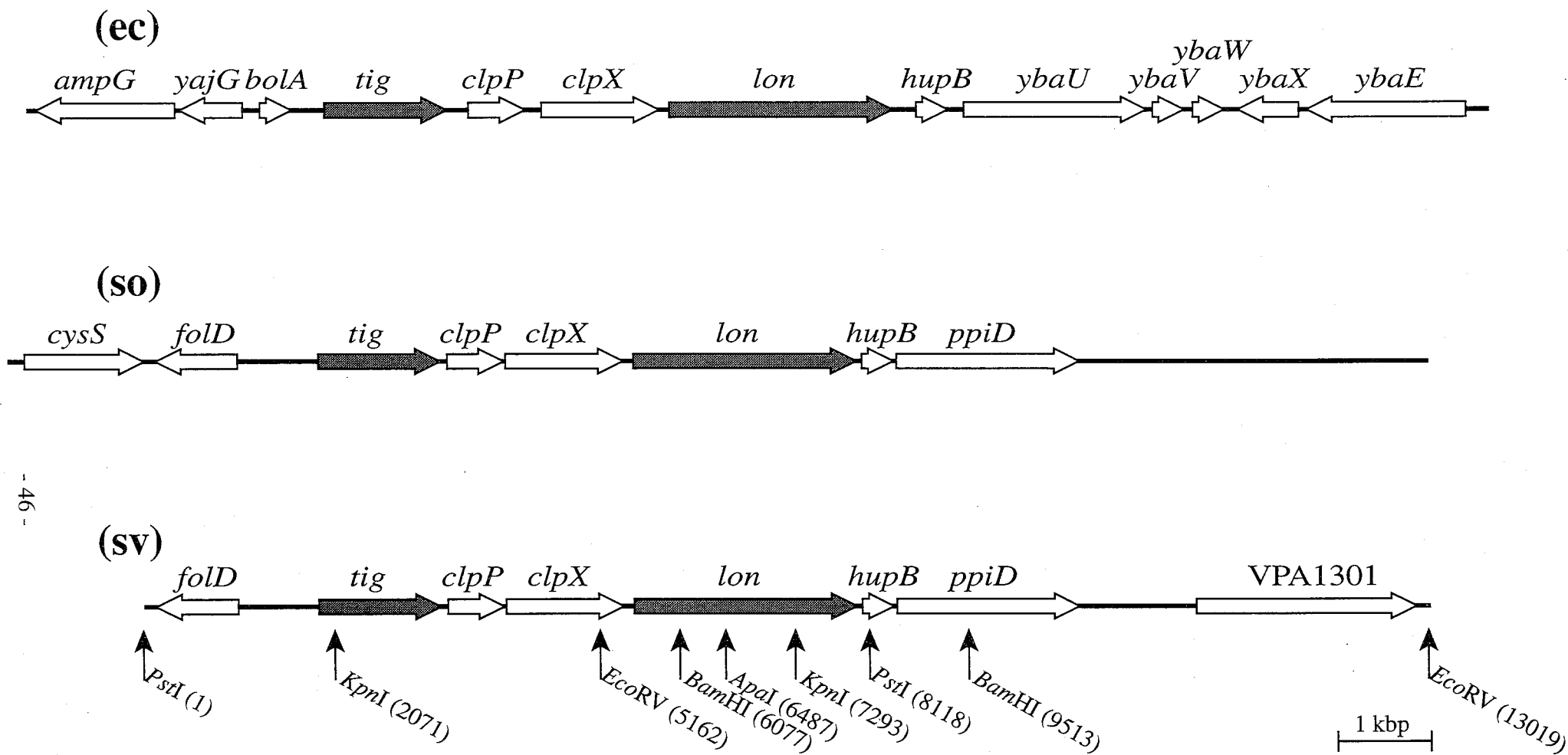
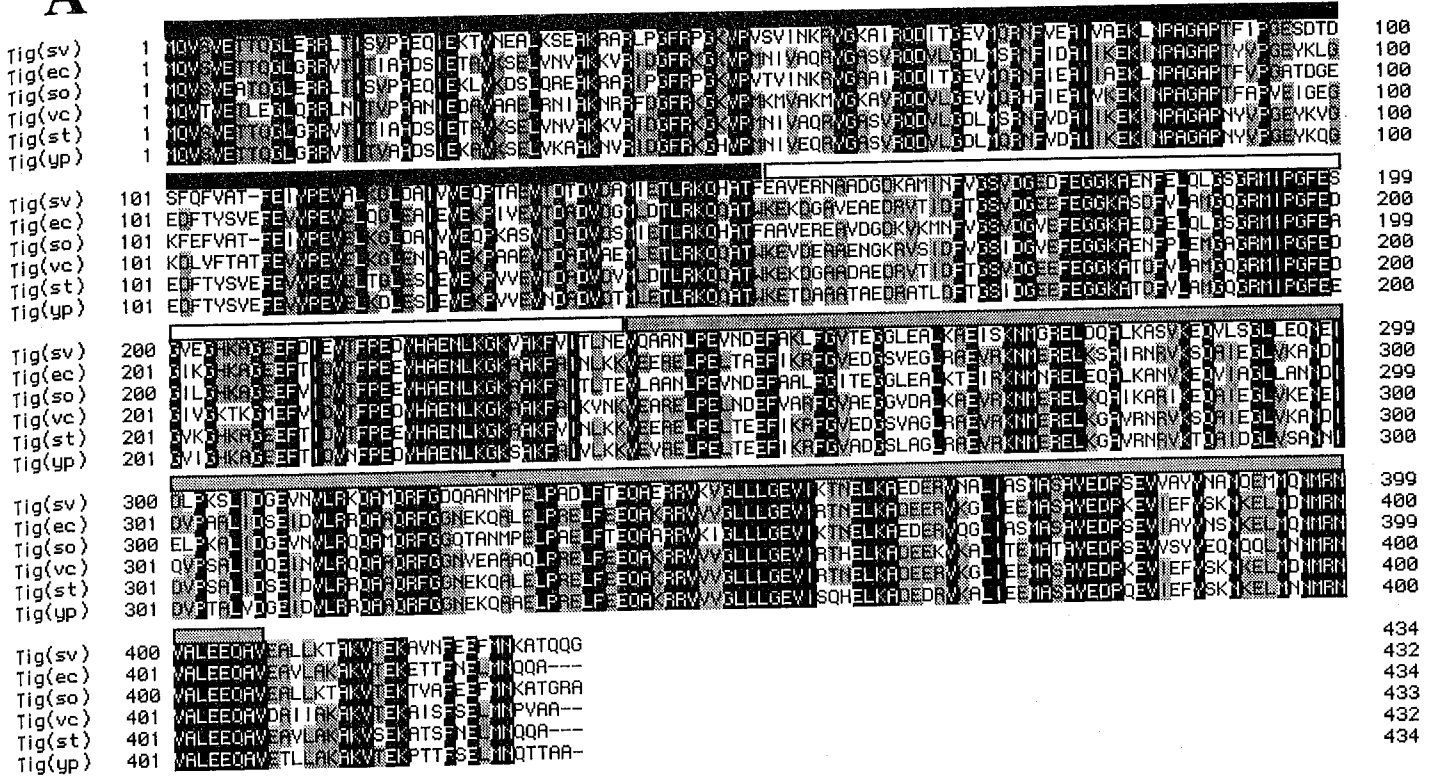


Fig.2-13 *lon*, *tig* 遺伝子における *S. violacea* と類縁菌との周辺構造の比較

Shewanella violacea DSS12 (sv) から得たクローニング断片と、これまでに決定されている *Escherichia coli* K-12 (ec), *Shewanella oneidensis* MR-1 (so) との周辺構造を比較した。クローニング断片には代表的な制限酵素サイトと塩基数を矢印で示した。

A



■ Trigger_N domain
 □ FKBP_C domain
 ■ Trigger_C domain

B

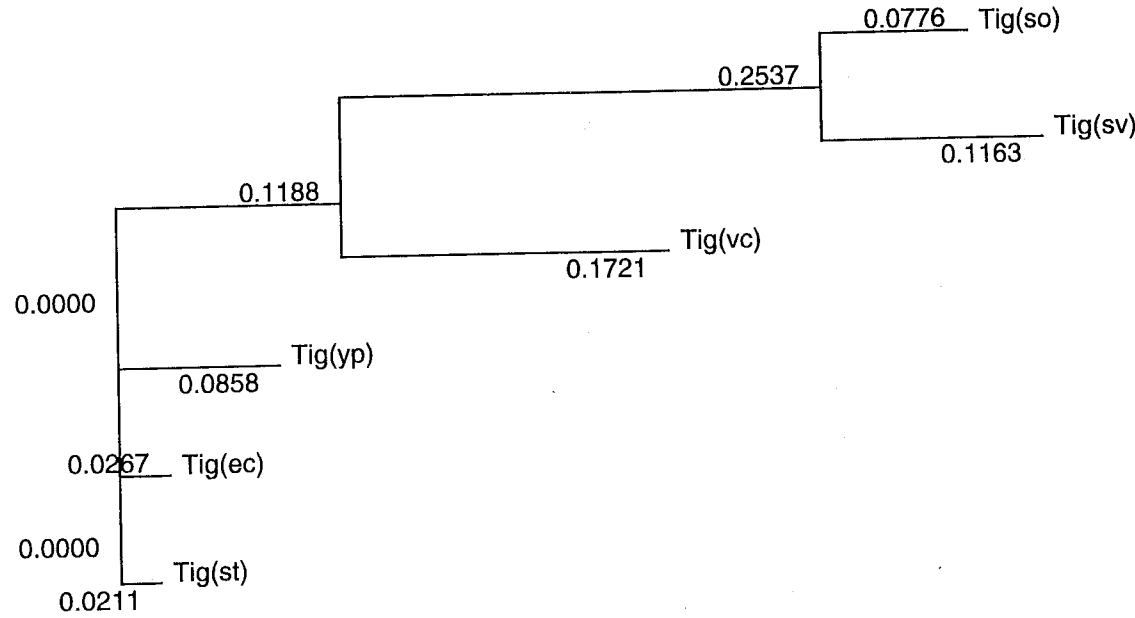


Fig.2-14 Tig タンパク質のアミノ酸配列における多重整列と系統樹解析

Shewanella violacea (sv) と、これまでに決定されている *Escherichia coli* (ec), *Shewanella oneidensis* (so), *Vibrio cholerae* (vc), *Salmonella typhimurium* (st), *Yersinia pestis* (yp) とのアミノ酸配列比較した。多重整列の結果をおよび報告されている domain を A に、系統樹解析の結果を B に示した。

A

Lon(sv)	1	MISIIIKRNAITQESERITIEFVLPFLRDVWVPHMVPLFVGRKESICLEARMHDQKILVWADQFELDSDIDITFVGTVAIILQLKLPDGTVK	100
Lon(ec)	1	-----IPEIEFVLPFLRDVWVPHMVPLFVGRKESICLEARMHDQKILVWADQFELDSDIDITFVGTVAIILQLKLPDGTVK	89
Lon(so)	1	-----TLEEARHIEFVLPFLRDVWVPHMVPLFVGRKESICLEARMHDQKILVWADQFELDSDIDITFVGTVAIILQLKLPDGTVK	89
Lon(vc)	1	-----TLEFVLPFLRDVWVPHMVPLFVGRKESICLEARMHDQKILVWADQFELDSDIDITFVGTVAIILQLKLPDGTVK	89
Lon(st)	1	-----IPEIEFVLPFLRDVWVPHMVPLFVGRKESICLEARMHDQKILVWADQFELDSDIDITFVGTVAIILQLKLPDGTVK	89
Lon(y)	1	-----IPEIEFVLPFLRDVWVPHMVPLFVGRKESICLEARMHDQKILVWADQFELDSDIDITFVGTVAIILQLKLPDGTVK	89
Lon(sv)	101	VLVEGGRARRKVSDEESFVATHLVYSESMAKKEEVVWASHVGFQFEGIKLNKIPPEVLTSLSGIDEARALADTIAAHMFLKLEDKQSMLEIVD	200
Lon(ec)	90	VLVEGGRARRSALSUNGEHSKTYLESSEITIDEREDEVWATHLVSEFEGIKLNKIPPEVLTSLSGIDPARALADTIAAHMFLKLEDKQSMLES	189
Lon(so)	90	VLVEGGRARRTRYTQEDFVYKTEEPELEDEKKEEVVWASHVGFQFEGIKLNKIPPEVLTSLSGIDEARALADTIAAHMFLKLEDKQSMLEINTI	189
Lon(vc)	90	VLVEGGRARRNHFKESDFELTEEFIVTPELDEREEVWASHVGFQFEGIKLNKIPPEVLTSLNGIDEARALADTIAAHMFLKLEDKQSMLEITD	188
Lon(st)	90	VLVEGGRARRSALSUNGEHSKTYLESSEITIDEREDEVWATHLVSEFEGIKLNKIPPEVLTSLSGIDPARALADTIAAHMFLKLEDKQSMLES	189
Lon(y)	90	VLVEGGRARRTTLSLSSGEGHARDAVLESSEVMDREDEVWATHLVSEFEGIKLNKIPPEVLTSLSGIDPARALADTIAAHMFLKLEDKQSMLESFI	189
Lon(sv)	201	GERLELVMTMIESEIDLLQVEKRIRVVKKQNEKSOREVWLNEDMKRATQKEVE-DESDHEFETLAKK-IIEAKTPEEAKEKTRLEKLVKINSPIASAA	299
Lon(ec)	190	NERLELVMTMIESEIDLLQVEKRIRVVKKQNEKSOREVWLNEDMKRATQKEVE-MDDAPDENEALKAKIDAKTIPKFAKKEKRELEKLVKINSPIASAA	288
Lon(so)	190	GERLELVMTMIESEIDLLQVEKRIRVVKKQNEKSOREVWLNEDMKRATQKEVQDLEDGDFEVLNLRK-IIEGANIPSDAKKAVDELKLVKINSPIASAA	288
Lon(vc)	189	TERLELVMTMIESEIDLLQVEKRIRVVKKQNEKSOREVWLNEDMKRATQKEVQEMEDAPDEFETLQKIDES-KIPQFAKREKTEQELKLVKINSPIASAA	287
Lon(st)	190	NERLELVMTMIESEIDLLQVEKRIRVVKKQNEKSOREVWLNEDMKRATQKEVE-MDDAPDENEALKAKIDAKTIPKFAKKEKRELEKLVKINSPIASAA	288
Lon(y)	190	TERLELVMTMIESEIDLLQVEKRIRVVKKQNEKSOREVWLNEDMKRATQKEVREVYVNEQMKRATQKER-KIEAAKIPKDRERETHELKLVKINSPIASAA	288
Lon(sv)	300	TWRSVMDNNTSVFWRASKIKQVAKRREVLDTHBLEKWKORILEYLAVDSFRQLKGLLCLVGGPPGVGKTSLSGSIARATGRVIRVHALGGVWDE	399
Lon(ec)	289	TWRSVMDNNTSVFWRASKIKVROTEIITDTHBLEKWKORILEYLAVDSFRQLKGLLCLVGGPPGVGKTSLSGSIARATGRVIRVHALGGVWDE	388
Lon(so)	289	TWRSVMDNNTSVFWRASKIKQVAKRREVLDTHBLEKWKORILEYLAVDSFRQLKGLLCLVGGPPGVGKTSLSGSIARATGRVIRVHALGGVWDE	388
Lon(vc)	288	TWRSVMDNNTSVFWRASKIKVROTEIITDTHBLEKWKORILEYLAVDSFRQLKGLLCLVGGPPGVGKTSLSGSIARATGRVIRVHALGGVWDE	387
Lon(st)	289	TWRSVMDNNTSVFWRASKIKVROTEIITDTHBLEKWKORILEYLAVDSFRQLKGLLCLVGGPPGVGKTSLSGSIARATGRVIRVHALGGVWDE	388
Lon(y)	289	TWRSVMDNNTSVFWRASKIKVROTEIITDTHBLEKWKORILEYLAVDSFRQLKGLLCLVGGPPGVGKTSLSGSIARATGRVIRVHALGGVWDE	388
Lon(sv)	400	REIRGHARTVIGSPGKVIQKMSVGVKGNPLFLDIDKNSDMAGDPASALLEVLDPEQNVAFSDHVLEVVDVLDQMFVATSNNSMNIIPGALLDRNEVI	499
Lon(ec)	389	REIRGHARTVIGSPGKVIQKMSVGVKGNPLFLDIDKNSDMAGDPASALLEVLDPEQNVAFSDHVLEVVDVLDQMFVATSNNSMNIIPGALLDRNEVI	488
Lon(so)	389	REIRGHARTVIGSPGKVIQKMSVGVKGNPLFLDIDKNSDMAGDPASALLEVLDPEQNVAFSDHVLEVVDVLDQMFVATSNNSMNIIPGALLDRNEVI	488
Lon(vc)	388	REIRGHARTVIGSPGKVIQKMSVGVKGNPLFLDIDKNSDMAGDPASALLEVLDPEQNVAFSDHVLEVVDVLDQMFVATSNNSMNIIPGALLDRNEVI	487
Lon(st)	389	REIRGHARTVIGSPGKVIQKMSVGVKGNPLFLDIDKNSDMAGDPASALLEVLDPEQNVAFSDHVLEVVDVLDQMFVATSNNSMNIIPGALLDRNEVI	488
Lon(y)	389	REIRGHARTVIGSPGKVIQKMSVGVKGNPLFLDIDKNSDMAGDPASALLEVLDPEQNVAFSDHVLEVVDVLDQMFVATSNNSMNIIPGALLDRNEVI	488
Lon(sv)	500	ALSGVTEDEKLNIAKRALVQDFANAKGELTVDQSAIVSIRVWTREAGVRSLERESKLQKRWKILLSKTLKHVVDQDILKSFQWQDFDVGK	599
Lon(ec)	489	ALSGVTEDEKLNIAKRALVQDFANAKGELTVDQSAIVSIRVWTREAGVRSLERESKLQKRWKILLSKTLKHVVDQDILKSFQWQDFDVGK	588
Lon(so)	489	ALSGVTEDEKLNIAKRALVQDFANAKGELTVDQSAIVSIRVWTREAGVRSLERESKLQKRWKILLSKTLKHVVDQDILKSFQWQDFDVGK	588
Lon(vc)	488	ALSGVTEDEKLNIAKRALVQDFANAKGELTVDQSAIVSIRVWTREAGVRSLERESKLQKRWKILLSKTLKHVVDQDILKSFQWQDFDVGK	587
Lon(st)	489	ALSGVTEDEKLNIAKRALVQDFANAKGELTVDQSAIVSIRVWTREAGVRSLERESKLQKRWKILLSKTLKHVVDQDILKSFQWQDFDVGK	588
Lon(y)	489	ALSGVTEDEKLNIAKRALVQDFANAKGELTVDQSAIVSIRVWTREAGVRSLERESKLQKRWKILLSKTLKHVVDQDILKSFQWQDFDVGK	588
Lon(sv)	600	FESNNTISQWTLANTVEVGDLITETACVPGKGLITGSLGDMQDESIQAAITVWFRARAKGLINGDFYEKVDIHVHWPEGATPKDGFPSAGANMCTAL	699
Lon(ec)	589	FONEFVSVQWTLANTVEVGDLITETACVPGKGLITGSLGDMQDESIQAAITVWFRARAKGLINGDFYEKVDIHVHWPEGATPKDGFPSAGANMCTAL	688
Lon(so)	589	FESNNTISQWTLANTVEVGDLITETACVPGKGLITGSLGDMQDESIQAAITVWFRARAKGLINGDFYEKVDIHVHWPEGATPKDGFPSAGANMCTAL	688
Lon(vc)	588	FESNNTISQWTLANTVEVGDLITETACVPGKGLITGSLGDMQDESIQAAITVWFRARAKGLINGDFYEKVDIHVHWPEGATPKDGFPSAGANMCTAL	687
Lon(st)	589	FONEFVSVQWTLANTVEVGDLITETACVPGKGLITGSLGDMQDESIQAAITVWFRARAKGLINGDFYEKVDIHVHWPEGATPKDGFPSAGANMCTAL	688
Lon(y)	589	FONEFVSVQWTLANTVEVGDLITETACVPGKGLITGSLGDMQDESIQAAITVWFRARAKGLINGDFYEKVDIHVHWPEGATPKDGFPSAGANMCTAL	688
Lon(sv)	700	VSLTGMPVADAVANTGEITLRGQWLPVIGGLKEKLLAAHRGGKTVLIPKBERDLEEIPVWADQIYVAVNIDMVLKELKALRPIEFVFWKNAG	796
Lon(ec)	689	VSLTGMPVADAVANTGEITLRGQWLPVIGGLKEKLLAAHRGGKTVLIPKBERDLEEIPVWADQIYVAVNIDMVLKELKALRPIEFVFWKNAG	784
Lon(so)	689	VSLTGMPVADAVANTGEITLRGQWLPVIGGLKEKLLAAHRGGKTVLIPKBERDLEEIPVWADQIYVAVNIDMVLKELKALRPIEFVFWKNAG	785
Lon(vc)	688	VSLTGMPVADAVANTGEITLRGQWLPVIGGLKEKLLAAHRGGKTVLIPKBERDLEEIPVWADQIYVAVNIDMVLKELKALRPIEFVFWKNAG	783
Lon(st)	689	VSLTGMPVADAVANTGEITLRGQWLPVIGGLKEKLLAAHRGGKTVLIPKBERDLEEIPVWADQIYVAVNIDMVLKELKALRPIEFVFWKNAG	784
Lon(y)	689	VSLTGMPVADAVANTGEITLRGQWLPVIGGLKEKLLAAHRGGKTVLIPKBERDLEEIPVWADQIYVAVNIDMVLKELKALRPIEFVFWKNAG	784

Lon domain
 AAA domain
 Lon_C domain

AAA:ATPase family associated with various cellular activities

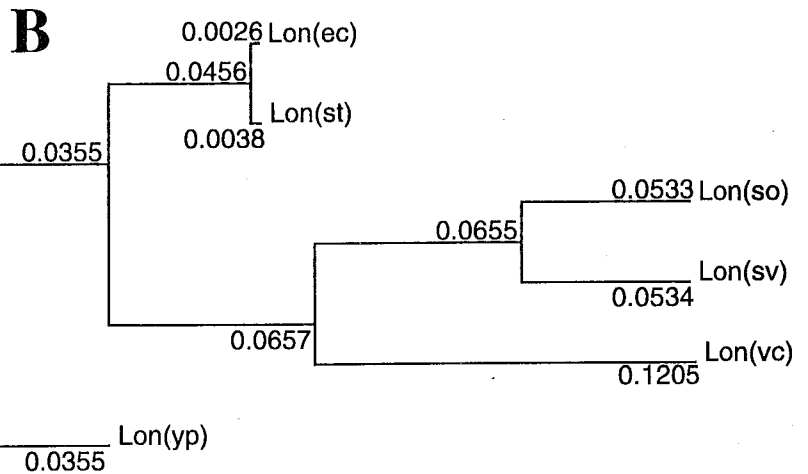


Fig.2-15 Lon タンパク質のアミノ酸配列における多重整列と系統樹解析

Shewanella violacea (sv) と、これまでに決定されている Escherichia coli (ec), Shewanella oneidensis (so), Vibrio cholerae (vc), Salmonella typhimurium (st), Yersinia pestis (yp) とのアミノ酸配列比較した。多重整列の結果をおよび報告されている domain を A に、系統樹解析の結果を B に示した。

A

ClpP(sv)	1	-----MQNAPESVLNALWPMWV	EQTAKGERSYDI	SALLKERI	IFLV	QVE	SHMANLV	QQL	LFLESE	PD	DI	LV	INSPGGSV	TAGN	I	VDTHQFIK	94	
ClpP(ec)	1	MSYSGER-DNFA	HMAL-WPMWV	EQTAKGERSYDI	SALLKERI	IFLV	QVE	SHMANLV	QQL	LFLESE	PD	DI	LV	INSPGGSV	TAGN	I	VDTHQFIK	98
ClpP(so)	1	-----MHNASDIQS-ALWPMWV	EQTAKGERSYDI	SALLKERI	IFLV	QVE	SHMANLV	QQL	LFLESE	PD	DI	LV	INSPGGSV	TAGN	I	VDTHQFIK	93	
ClpP(vc)	1	-----MS	IFDALWPMWV	EQTAKGERSYDI	SALLKERI	IFLV	QVE	SHMANLV	QQL	LFLESE	PD	DI	LV	INSPGGSV	TAGN	I	VDTHQFIK	98
ClpP(st)	1	MSYSGER-DNLAR	HMAL-WPMWV	EQTAKGERSYDI	SALLKERI	IFLV	QVE	SHMANLV	QQL	LFLESE	PD	DI	LV	INSPGGSV	TAGN	I	VDTHQFIK	98
ClpP(yp)	1	MSYSGER-DQFAR	HMAL-WPMWV	EQTAKGERSYDI	SALLKERI	IFLV	QVE	SHMANLV	QQL	LFLESE	PD	DI	LV	INSPGGSV	TAGN	I	VDTHQFIK	98
ClpP(sv)	95	PWSTV	IGQAR	ENGAFLLAG	PKR	PLNSRWNI	HQPLGG	QGOAS	DI	HAQE	ILGI	NKL	QML	HTGSP	EV	IEROTDRNF	SARQAEVGL	194
ClpP(ec)	99	PWSTV	IGQAR	ENGAFLLAG	PKR	PLNSRWNI	HQPLGG	QGOAT	DI	HAQE	ILGI	NKL	QML	HTGSP	EV	IEROTDRNF	SARQAEVGL	198
ClpP(so)	94	PWSTV	IGQAR	ENGAFLLAG	PKR	PLNSRWNI	HQPLGG	QGOAS	DI	HAQE	ILGI	NKL	QML	HTGSP	EV	IEROTDRNF	SARQAEVGL	193
ClpP(vc)	91	PWSTV	IGQAR	ENGAFLLAG	PKR	PLNSRWNI	HQPLGG	QGOAS	DI	HAQE	ILGI	NKL	QML	HTGSP	EV	IEROTDRNF	SARQAEVGL	190
ClpP(st)	99	PWSTV	IGQAR	ENGAFLLAG	PKR	PLNSRWNI	HQPLGG	QGOAT	DI	HAQE	ILGI	NKL	QML	HTGSP	EV	IEROTDRNF	SARQAEVGL	198
ClpP(yp)	99	PWSTV	IGQAR	ENGAFLLAG	PKR	PLNSRWNI	HQPLGG	QGOAT	DI	HAQE	ILGI	NKL	QML	HTGSP	EV	IEROTDRNF	SARQAEVGL	198
ClpP(sv)	195	WDSV	MSKGG-															203
ClpP(ec)	199	WDSI	LTHRN-															202
ClpP(so)	194	WDSV	MSKGG-															200
ClpP(vc)	191	WDSV	LKHAGE															207
ClpP(st)	199	WDSI	LTHRN-															207
ClpP(yp)	199	WDSV	LTHRN-															207

Clp_Protease

B

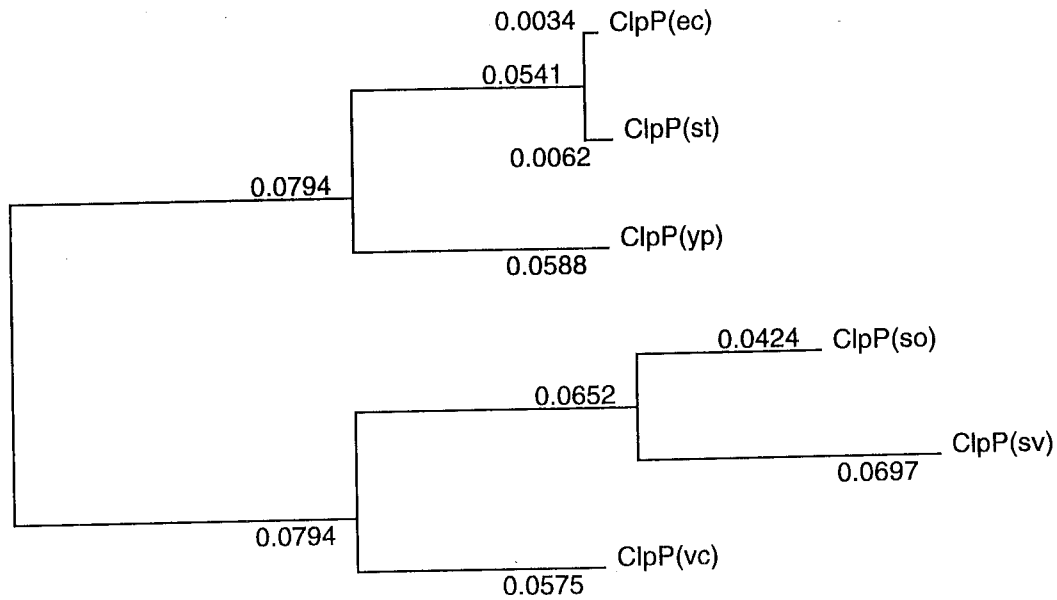

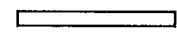


Fig.2-16 ClpP タンパク質のアミノ酸配列における多重整列と系統樹解析

Shewanella violacea (sv) と、これまでに決定されている *Escherichia coli* (ec), *Shewanella oneidensis* (so), *Vibrio cholerae* (vc), *Salmonella typhimurium* (st), *Yersinia pestis* (yp) とのアミノ酸配列比較した。多重整列の結果をおよび報告されている domain を A に、系統樹解析の結果を B に示した。

A

ClpX(sv)	1	IGDINKSTDSGKLVCSFQCGKSOHEVRKLIAGPSWVYDDECVLNCNIIREEIKKISPKQDDKLPPTLRAHLDDWVIGDQARKKVLQMAVWNHVKRL	100
ClpX(ec)	1	IGDINKSTDSGKLVCSFQCGKSOHEVRKLIAGPSWVYDDECVLNCNIIREEIKKISPKQDDKLPPTLRAHLDDWVIGDQARKKVLQMAVWNHVKRL	99
ClpX(so)	1	IGDINKSTDSGKLVCSFQCGKSOHEVRKLIAGPSWVYDDECVLNCNIIREEIKKISPKQDDKLPPTLRAHLDDWVIGDQARKKVLQMAVWNHVKRL	100
ClpX(vc)	1	IGDINKSTDSGKLVCSFQCGKSOHEVRKLIAGPSWVYDDECVLNCNIIREEIKKISPKQDDKLPPTLRAHLDDWVIGDQARKKVLQMAVWNHVKRL	100
ClpX(st)	1	IGDINKSTDSGKLVCSFQCGKSOHEVRKLIAGPSWVYDDECVLNCNIIREEIKKISPKQDDKLPPTLRAHLDDWVIGDQARKKVLQMAVWNHVKRL	99
ClpX(yp)	1	IGDINKSTDSGKLVCSFQCGKSOHEVRKLIAGPSWVYDDECVLNCNIIREEIKKISPKQDDKLPPTLRAHLDDWVIGDQARKKVLQMAVWNHVKRL	99
ClpX(sv)	101	KISNPKDQV-ELGKSNILLIGPTGSGKTLLETARRLMPFTMADATTLTEAGVWGEDVENIQKLLQCCVDVQKARGIWWIDEIDKISAKSNPSI	199
ClpX(ec)	100	KISNPKDQV-ELGKSNILLIGPTGSGKTLLETARRLMPFTMADATTLTEAGVWGEDVENIQKLLQCCVDVQKARGIWWIDEIDKISAKSNPSI	198
ClpX(so)	101	KISNPKDQV-ELGKSNILLIGPTGSGKTLLETARRLMPFTMADATTLTEAGVWGEDVENIQKLLQCCVDVQKARGIWWIDEIDKISAKSNPSI	199
ClpX(vc)	101	KISNPKDQV-ELGKSNILLIGPTGSGKTLLETARRLMPFTMADATTLTEAGVWGEDVENIQKLLQCCVDVQKARGIWWIDEIDKISAKSNPSI	200
ClpX(st)	100	KISNPKDQV-ELGKSNILLIGPTGSGKTLLETARRLMPFTMADATTLTEAGVWGEDVENIQKLLQCCVDVQKARGIWWIDEIDKISAKSNPSI	198
ClpX(yp)	100	KISNPKDQV-ELGKSNILLIGPTGSGKTLLETARRLMPFTMADATTLTEAGVWGEDVENIQKLLQCCVDVQKARGIWWIDEIDKISAKSNPSI	198
ClpX(sv)	200	TRDWSGEGVQDALLKLEGTARMPDGGGAKHPDDEFLOWDTSKILFICGGAFGLWVIEDRAHVSIGFGAQIKGSEKATISEI-MQ-VEP-DLV	298
ClpX(ec)	199	TRDWSGEGVQDALLKLEGTARMPDGGGAKHPDDEFLOWDTSKILFICGGAFGLWVIEDRAHVSIGFGAQIKGSEKATISEI-MQ-VEP-DLV	297
ClpX(so)	200	TRDWSGEGVQDALLKLEGTARMPDGGGAKHPDDEFLOWDTSKILFICGGAFGLWVIEDRAHVSIGFGAQIKGSEKATISEI-MQ-VEP-DLV	298
ClpX(vc)	201	TRDWSGEGVQDALLKLEGTARMPDGGGAKHPDDEFLOWDTSKILFICGGAFGLWVIEDRAHVSIGFGAQIKGSEKATISEI-MQ-VEP-DLV	299
ClpX(st)	199	TRDWSGEGVQDALLKLEGTARMPDGGGAKHPDDEFLOWDTSKILFICGGAFGLWVIEDRAHVSIGFGAQIKGSEKATISEI-MQ-VEP-DLV	297
ClpX(yp)	199	TRDWSGEGVQDALLKLEGTARMPDGGGAKHPDDEFLOWDTSKILFICGGAFGLWVIEDRAHVSIGFGAQIKGSEKATISEI-MQ-VEP-DLV	297
ClpX(sv)	299	YGLIPEFIGALPWATLTLDELDEALVQILSEPKNALTKQVAFLENEVLEAFREDALDIAAKAMARKTGAGGLASIEGILLQIVLPSIEDVE	398
ClpX(ec)	298	YGLIPEFIGALPWATLTLDELDEALVQILSEPKNALTKQVAFLENEVLEAFREDALDIAAKAMARKTGAGGLASIEGILLQIVLPSIEDVE	397
ClpX(so)	299	YGLIPEFIGALPWATLTLDELDEALVQILSEPKNALTKQVAFLENEVLEAFREDALDIAAKAMARKTGAGGLASIEGILLQIVLPSIEDVE	398
ClpX(vc)	300	YGLIPEFIGALPWATLTLDELDEALVQILSEPKNALTKQVAFLENEVLEAFREDALDIAAKAMARKTGAGGLASIEGILLQIVLPSIEDVE	399
ClpX(st)	298	YGLIPEFIGALPWATLTLDELDEALVQILSEPKNALTKQVAFLENEVLEAFREDALDIAAKAMARKTGAGGLASIEGILLQIVLPSIEDVE	397
ClpX(yp)	298	YGLIPEFIGALPWATLTLDELDEALVQILSEPKNALTKQVAFLENEVLEAFREDALDIAAKAMARKTGAGGLASIEGILLQIVLPSIEDVE	397
ClpX(sv)	399	DESWMKDESSALIVENSEPKKAGAK-	425
ClpX(ec)	398	DESWMKDESSALIVENSEPKKAGAK-	424
ClpX(so)	399	DESWMKDESSALIVENSEPKKAGAK-	426
ClpX(vc)	400	DESWMKDESSALIVENSEPKKAGAK-	426
ClpX(st)	398	DESWMKDESSALIVENSEPKKAGAK-	423
ClpX(yp)	398	DESWMKDESSALIVENSEPKKAGAK-	423

 **zf-C4_Clpx**
 **AAA domain**
AAA:ATPase family associated with various cellular activities

B

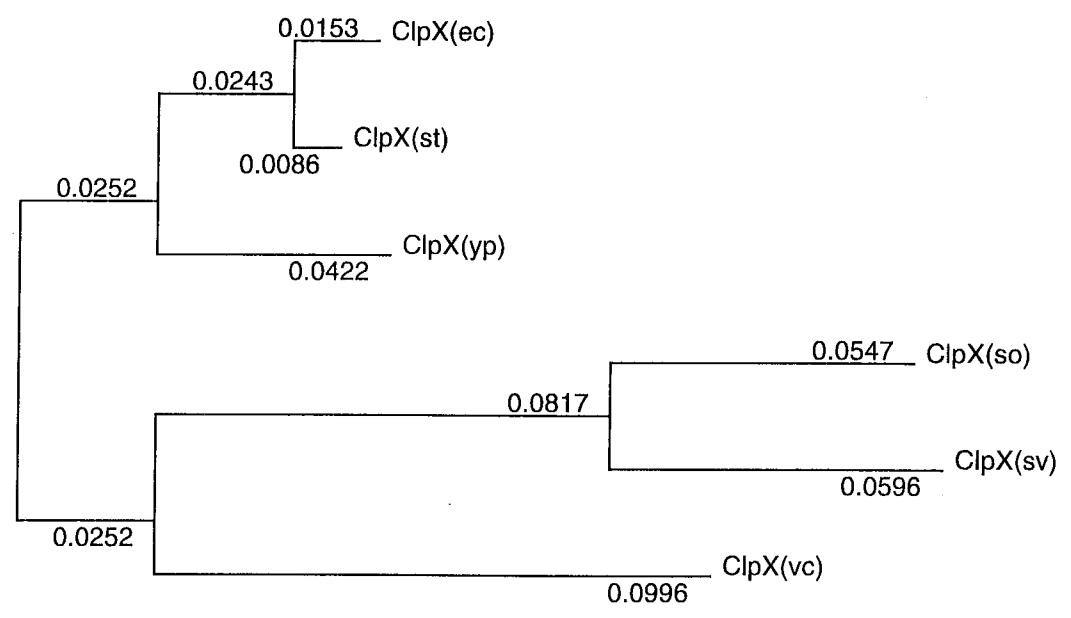


Fig.2-17 ClpX タンパク質のアミノ酸配列における多重整列と系統樹解析

Shewanella violacea (sv) と、これまでに決定されている *Escherichia coli* (ec), *Shewanella oneidensis* (so), *Vibrio cholerae* (vc), *Salmonella typhimurium* (st), *Yersinia pestis* (yp) とのアミノ酸配列比較した。
 多重整列の結果をおよび報告されている domain を A に、系統樹解析の結果を B に示した。

A

HupB(sv)	1	MINKSELK	IASGADISKAAGRALDSF	GANIDG	LDQKISLWGFQTFE	QDREARTGRNP	TDGEIKI	AAAHIPAFKAGK	LKDAVN	90
HupB(ec)	1	MINKSELK	IASGADISKAAGRALDSF	IASWISL	SDDVLLWGFQTFE	QDREARTGRNP	TDGEIKI	AAAHIPAFKAGK	LKDAVN	90
HupB(so)	1	MINKSELK	IASGADISKAAGRALDSF	AAWISGL	SDDKISLWGFQTFE	QDREARTGRNP	TDGEIKI	AAAHIPAFKAGK	LKDAVN	90
HupB(vc)	1	MINKTQLVED	IAANADISKAAGRALDSF	EAWSGT	LDSDQVALWGFQTFE	QDREARTGRNP	TDGEIKI	AAAHIPAFKAGK	LKDAVN	90
HupB(st)	1	MINKSELK	IASGADISKAAGRALDSF	IASWISL	SDDVLLWGFQTFE	QDREARTGRNP	TDGEIKI	AAAHIPAFKAGK	LKDAVN	90
HupB(yp)	1	MINKSELK	IASGADISKAAGRALDSF	ITSWISL	SDDVLLWGFQTFE	QDREARTGRNP	TDGEIKI	AAAHIPAFKAGK	LKDAVN	90

B

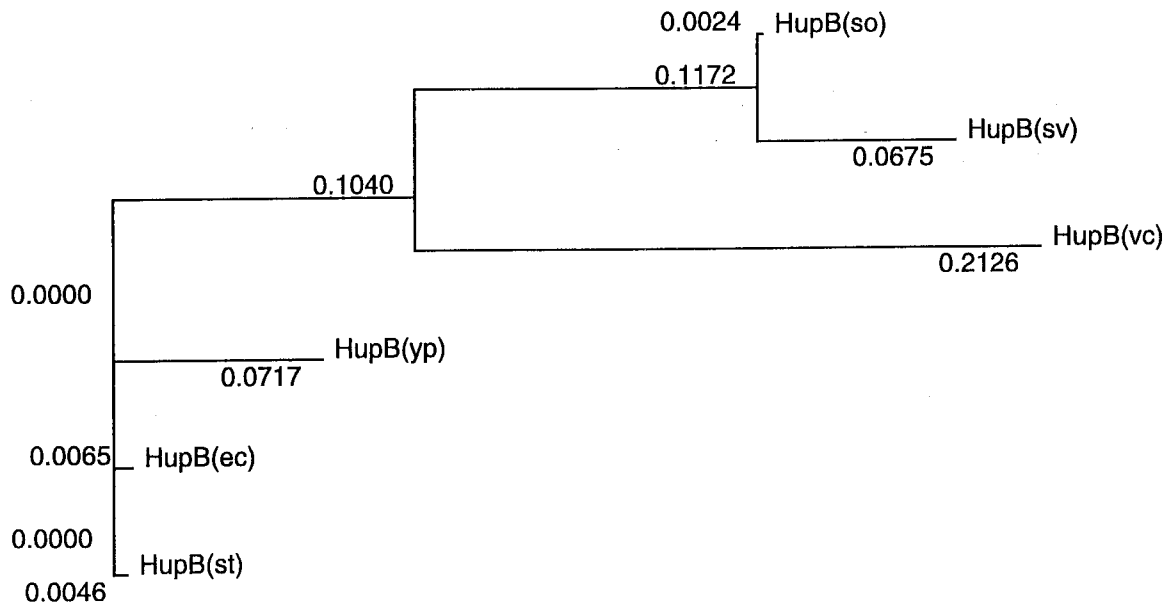


Fig.2-18 HupB タンパク質のアミノ酸配列における多重整列と系統樹解析

Shewanella violacea (sv) と、これまでに決定されている *Escherichia coli* (ec), *Shewanella oneidensis* (so), *Vibrio cholerae* (vc), *Salmonella typhimurium* (st), *Yersinia pestis* (yp) とのアミノ酸配列比較した。
多重整列の結果を A に、系統樹解析の結果を B に示した。

第3章 好冷好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株における GroEL のストレス応答の解析

3.1. 緒言

微生物のストレス応答の解析においては、*Escherichia coli* におけるヒートショック応答がもっともよく研究されている。ヒートショック応答は高熱にさらされた際に、急激に一連のストレス応答タンパク質が応答・発現し、高熱による被害に対応する機構であり、超好熱菌から好冷性細菌にまで広く存在する [Trent, Osipiuk et al. 1990; La Terza, Papa et al. 2001]。この応答には生育温度と加熱温度、時間が重要で *E. coli* を 37°C で生育させた場合、42°C、1 分未満で発現応答が起きる非常にはやい種類のストレス応答である。この応答においては RpoH (σ^{32}) によって調節される HSPs (heat shock proteins) が高発現し、熱によって生じた変性タンパク質を隔離し致命的な凝集体の形成を阻止したうえ、さらに再生、もしくは分解する。

E. coli においてはヒートショック応答に対する理解だけでなく、比較的短時間の圧力ショックに対しても HSPs の発現の促進が報告されている [Welch, Farewell et al. 1993]。一方、好圧性細菌のヒートショック関連遺伝子においては加圧に対する応答はもちろんヒートショック応答に関しても、まだ何も明らかにされていない。好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株は至適生育温度を 8°C、生育限界温度を 15°C に持つ好冷性細菌でもある。好冷性細菌のヒートショック応答の研究は報告例も少なく、深海由来の微生物での報告はない。そういった観点からも、圧力ストレスに対する応答を研究し圧力適応機構の解明を目指す観点からも、ストレス応答でもっとも研究が進んでいるヒートショック応答を *S. violacea* において検討したいと考えた。

ヒートショック応答には様々なプロセスがあるが本実験では、HSPs の代表格である GroEL が比較的よく保存されたタンパク質であること、*E. coli* の GroEL に対する抗体が市販されていること、発現量が多いため検出が簡便であること、ヒートショック後にすみやかに増加していくことなどの利点から、anti-GroEL を用いたウェスタンブロット解析によって *S. violacea* におけるヒートショック応答を評価した。

さらに *E. coli* では 100 MPa を超えるような超高压環境下や、圧力ショックでの生存に HSPs が関わっていることが示唆されている[Aertsen, Vanoirbeek et al. 2004]。一方、好圧性細菌では圧力と HSPs の関連性について報告された例はまだない。そこで高压環境下における *S. violacea* の *groEL* および *groES* の転写産物量、発現量を定量するとともに、プライマーエクステンション解析により *groE* オペロンの転写開始点を解析した。

3.2. 実験方法

3.2.1. 使用菌株、培養条件および基本操作

好圧性細菌のモデルとして深海由来好冷好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株を用いた。培養には Marine Broth 2216 (DIFCO) を使用し 0.1 MPa、8℃ で培養した。熱によるストレス応答の解析には 42 時間培養後の対数増殖期にある培地に、適当に加温した新鮮な Marine Broth 2216 を等量加え、8℃、12℃、15℃、18℃、21℃に 2 時間静置したものをヒートショック応答の温度を検討するサンプルとした。同様に 42 時間培養後の対数増殖期にある培地に、適当に加温した新鮮な Marine Broth 2216 を等量加え 18℃にしたものを 0、0.5、1、2、4、8 時間静置したものをヒートショック応答の時間を検討するサンプルとした。転写、発現解析にあたり比較対象として *Escherichia coli* K-12 株を用いた。培養には Luria-Bertani (LB) 培地中を用い 37℃で生育させた。加圧培養においては、新鮮な培地に対数増殖期中期まで培養した前培養液を 1%植菌し、滅菌された保圧パックを用いて気泡が入らないように密閉した。加圧は保温した加圧培養器を用い目的圧力まで加圧した後、対数増殖器中期まで培養した。培地、緩衝液の組成は、特に記載のないかぎり Molecular Cloning –A Laboratory Manual- に従い、各種酵素および検出試薬キット等の使用条件は取扱説明書に従った。

3.2.2. 染色体 DNA の精製

染色体 DNA の精製に関する操作は 2.2.2. に記述した方法に従った。

3.2.3. 全タンパク質の調整方法

菌体からの全タンパク質の調整は、まず遠心分離 (4℃, 5,000 xg, 15 min) に

て回収後、氷冷した Trisbuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.8) に懸濁した。氷上において超音波破碎機 (model UR-20P, TOMY) を用いて最大出力で2分間の超音波破碎を二回繰り返し、菌体抽出液とした。菌体抽出液は遠心分離 (4°C, 8,000 xg, 15 min) により未破碎菌体を取り除き全タンパク質とした。全タンパク質は BIO-RAD PROTEIN ASSAY (BIO-RAD) を用いて Bradford 法によりウシ血清アルブミン (BSA) を標準とし定量を行った [Bradford, Brownlow et al. 1966]。定量した全タンパク質は分注後、液体窒素で凍結し -80°C に保存した。

3.2.4. ウェスタンブロット解析

サンプル 10 μ l を Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって分離した。SDS-PAGE は Laemmli の方法に従い 10% acrylamide gel を用いて行った [Laemmli, Beguin et al. 1970]。ウェスタンブロット解析は NovaBlot キット (Amersham Pharmacia biotech) を用い PVDF 膜 (MILLIPORE) に 0.8 mA/cm² の定電流で 60 分間通電した。ブロッティング後の PVDF 膜を蒸留水で軽くすすいだ後、終濃度 3% のゼラチンを含む TBSbuffer (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) 中において 60 分間室温で振盪しブロッキングを行った。TTBSbuffer (TBSbuffer, 0.05% (v/v) Tween20) で 10 分間洗浄した後、終濃度 1% のゼラチンを含む TBSbuffer に 1/5000 希釈した anti-GroEL 抗体 (SIGMA)、もしくは 1/5000 希釈した anti-GroES 抗体 (SIGMA) を加え一晩室温でおだやかに振盪し一次抗体を結合させた。TTBSbuffer を用いて 5 分間室温で洗浄を 2 回繰り返した後、終濃度 1% のゼラチンを含む TBSbuffer に 1/3000 希釈した二次抗体 (Goat anti-Rabbit IgG(H+L)-AP Conjugate, BIO-RAD) を加えた溶液中において 1 時間室温で振盪し二次抗体を結合させた。TTBSbuffer で同様に 2 回洗浄した後、TBSbuffer でさらに 10 分洗浄することで未結合の抗体を除去した。洗浄後アルカリ Buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH9.5) で 2 分間平衡化した後、発色溶液 (ニトロブルー・テトラゾリウム塩溶液 (Roche) 45 μ l, X-phosphate (Roche) 35 μ l, 10 ml Buffer 3) に浸し、発色が検出されるまで静置した。発色後は蒸留水で充分すすぐことで反応を停止させた。

3.2.5. 全 RNA の回収

遠心分離 (4°C, 5,000 xg, 15 min) により集菌した菌体 5 x 10⁶ cells/ml を 1 ml

の Sepasol-RNA I (Nakarai tesque) に懸濁し室温で 5 分静置し完全に溶解させた。200 μ l のクロロフォルムを加えよく懸濁し室温で 3 分静置した。次に遠心分離 (4°C, 12,000 xg, 15 min) を行い上層を回収した。回収した上層に 500 μ l のイソプロパノールを加え室温で 10 分静置した後、遠心分離 (4°C, 12,000 xg, 10 min) を行った。上清を取り除き 75%エタノールを加え沈殿を洗った。さらに遠心分離 (4°C, 12,000 xg, 10 min) を行い回収された沈殿を乾かしエタノールを完全に取り除き RNA を精製した。精製された RNA は 20 μ g に対して 2 units RQ1 RNase-free DNase I (Promega) と共に DNasebuffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, pH 7.9) 中で 37°C、1 時間インキュベートして染色体 DNA を完全に切断した。RNA はフェノール抽出後、エタノール沈殿によって回収し、A₂₈₀ をもとに濃度を測定後、Diethylene pyrocarbonate (DEPC) (Nakarai tesque) 処理水に 5 μ g/ μ l になるように溶解させた。

3.2.6. プローブの作成

groEL, *groES* 遺伝子検出用のプローブを作製するため、*S. violacea* DSS12 株および、*E. coli* の染色体 DNA から当該領域を増幅するプライマーを設計した。DIG システム (Roche) の所定の条件で PCR ラベル法により DNA thermal cycler model 9600 (Perkin-Elmer) を用いて DIG 標識プローブを作製した。作製した DIG 標識プローブをプレハイブリダイゼーション buffer (5 x SSC, 1% Blocking reagent (Roche), 1% N-Lauroylsarcosine, 0.02% SDS, pH 7.0) に溶解して以下の操作に用い解析した。

3.2.7. ノーザンブロット解析

実験には NorthernMax-Gly™ Northern Blotting Kit (Ambion) を用いた。試料 RNA に対し、等量の Glyoxal Load Dye を加え、ヒートブロックを用いて 50°C で 30 分間熱変成させた。泳動ゲルは変性剤を含む 1% Agarose-LE を用いた。分子量マーカーには DIG RNA molecular weight markerII, および III (Roche) を用いた。泳動後、バキューム装置を用い、上述の Kit に含まれる Transfer Buffer を滴下しながら吸引することで Hybond-N+メンブレン (Amersham) 上にトランスファーした。メンブレンは洗浄した後、UV クロスリンクにより固定を行った。次にプレハイブリダイゼーション buffer 中で 68°C、2 時間インキュベートした。

後、3.2.6.の DIG 標識プローブ溶液を用いて 68°C、16 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後のメンブレンは 2 x SSC 洗浄液(2 x SSC, 0.1% SDS)によって室温で2回5分間洗浄した後、0.1 x SSC 洗浄液(0.1 x SSC, 0.1% SDS)を用い 68°Cで2回15分間洗浄した。次に Buffer 1 (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5)に1分間浸した後、Buffer 2 (Buffer 1 with 10% Blocking solution)で室温、30分間インキュベートした。その後、Buffer 2 で5000倍に希釈された anti-DIG Alkaline phosphatase conjugate 抗体(Roche)溶液中で30分間インキュベートして、Buffer 1 によって室温で2回15分間洗浄した。Buffer 3 (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH9.5)で2分間平衡化した後、発色溶液(ニトロブルー・テトラゾリウム塩溶液(Roche) 45 μl, X-phosphate (Roche) 35 μl, 10 ml Buffer 3)に浸し、発色が検出されるまで静置した。発色後は、TEbuffer で5分間メンブレンを洗浄し反応を停止した。特に記述のない場合、RNA を使用した操作については DEPC 処理水を用いた。

3.2.8. プライマーエクステンション法

各圧力条件下での *S. violacea* の *groE* オペロンの転写解析にはプライマーとして設計した 5'末端をビオチン化したオリゴヌクレオチドを使用した。1 pg のプライマーと、各圧力条件下で培養した菌体から回収した全 RNA (10 μg) を全量 12.5 μl になるように DEPC 処理水に混合し、80°Cで15分間保温した後、室温で放冷することでアニーリングを行った。アニーリング後、全量 19.5 μl になるように Transcript buffer (1 x First Strand buffer, 4 mM dNTP, 5 mM DTT) を加え、さらに 0.5 μl の SUPER SCRIPT II RNase H-Reverse Transcriptase (GIBCO BRL) を加えることで逆転写反応を 42°C、1時間行った。逆転写反応後、0.5 μl の RNase cocktail (Ambion) と 24.5 μl の水を加えて 37°Cで1時間、RNA の消化を行った。その後、エタノール沈殿法により逆転写産物を回収しプライマーエクステンションサンプルとした。また、DNA ladder は上記のプライマーおよび Sequitherm Long-Read Cycle Sequencing Kit-LC (EPICENTRE TECHNOLOGIES) を用いて調整した。プライマーエクステンションサンプルと DNA ladder は 95°Cで2分間加熱変性後、急冷したものをサンプルとして LI-COR DNA sequencer model 4000 (ALOKA) を用いて電気泳動した。電気泳動後のゲルに Hybond-N+メンブレン (Amersham) を密着させ一晩静置しトランスファ

一した。メンブレンは洗浄した後、UV クロスリンクにより固定を行った。特に記述のない場合、RNA を使用した操作については DEPC 処理水を用いた。固定後のメンブレンは Buffer 1 (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5) に 1 分間浸した後、Buffer 2 (Buffer 1 with 10% Blocking solution) で室温、30 分間インキュベートした。その後、Buffer 2 で 1000 倍に希釈された Streptavidin Alkaline phosphatase conjugate (SIGMA) 溶液中で 30 分間インキュベートして、Buffer 1 によって室温で 2 回 15 分間洗浄した。Buffer 3 (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH9.5) で 2 分間平衡化した後、発色溶液 (ニトロブルー・テトラゾリウム塩溶液 (Roche) 45 μl, X-phosphate (Roche) 35 μl, 10 ml Buffer 3) に浸し、発色が検出されるまで静置した。発色後は、TEbuffer で 5 分間メンブレンを洗浄し反応を停止した。

必要に応じて NIHimage (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) を用いて各バンドの相対的な濃度を測定した。

3.3. 結果

3.3.1. ヒートショック応答時における GroEL 発現量の解析

GroEL はヒートショック応答時に急速に生産され、熱によって生じた変性に対応する。このヒートショック応答の強さは熱に暴露する温度と時間によって変化する。これは微生物の特性や生育温度に依存し、例えば 37°C に至適生育温度を持つ *Escherichia coli* では 42°C, 1 分程度暴露するのが一般的であるが、30°C で生育させた *E. coli* では 35°C, 5 分程度暴露でヒートショック応答を引き起こす。

E. coli では非常によく研究されているヒートショック応答だが好冷性細菌での報告例はまだ少なく微生物によって応答までの時間や温度が違うことが知られている。そこでまず *Shewanella violacea* DSS12 株の GroEL の発現量が高温に曝すことに対してどのような変化を示すのか、さらにヒートショック応答を引き起こす条件を調べるために温度および時間の条件を変え GroEL の発現量を比較した。

最初に anti-GroEL 抗体、および anti-GroES 抗体が *S. violacea* の GroEL, GroES を認識できるかどうかを調べるために *E. coli* と *S. violacea* の全タンパク質サン

プルに対してウェスタンブロット解析を行った。結果、この抗体により両サンプルにおいて当該分子量（約 57 kDa と約 10 kDa）の単一バンドが検出された (Fig.3-1)。このことから anti-GroEL 抗体および anti-GroES 抗体は *S. violacea* の GroEL, GroES に対しても十分な特異性を持つことがわかった。

次にヒートショック応答を引き起こす時間および温度を検討した。*S. violacea* を至適温度である 8℃で対数増殖期中期まで培養した後、加温した培地を等量加えヒートショックを与えた。時間、温度をそれぞれ変えてサンプル調製を行い、ウェスタンブロット解析により GroEL タンパク質の発現量の変化を検討した。その結果 15℃、2 時間以上の条件において GroEL の発現量が増加していることが示された (Fig.3-2)。

3.3.2. 高圧環境下における *groE* オペロンの転写産物量の変化

高圧環境下における *groE* オペロンの転写産物量の変化を定量するため *S. violacea* および *E. coli* を 0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa のそれぞれの圧力環境下で対数増殖期中期まで生育させた。この菌体から全 RNA を注出しそれぞれの染色体 DNA から増幅したプローブを用いてノーザンブロットティング解析により転写産物量を定量した (Fig.3-3)。

groES 遺伝子をプローブに用いた場合 *E. coli* では *groE* オペロンの転写産物量は 0.1 MPa で最も強く検出され、30 MPa でおよそ半分に減少し 0.6 倍となり 50 MPa では顕著に減少して 0.1 倍になっており、高圧環境になるにしたがって転写産物量は減少していることが明らかになった。一方 *S. violacea* においては *groE* オペロンの転写産物量は 0.1 MPa では非常に弱く検出されるのに対し、30 MPa で 3.9 倍、50 MPa で 8.2 倍と高圧環境になるにしたがって転写産物量は顕著に増加していることが明らかになった。

groEL 遺伝子をプローブに用いた場合でも *groES* 遺伝子を用いた場合と同様の傾向を示した。*E. coli* では *groE* オペロンの転写産物量は 0.1 MPa で最も強く検出され、30 MPa でわずかに減少し 0.9 倍となり 50 MPa ではおよそ半分に減少して 0.5 倍になっており、高圧環境になるにしたがって転写産物量は減少していることが明らかになった。一方 *S. violacea* においては *groE* オペロンの転写産物量は 0.1 MPa では非常に弱く検出されるのに対し、30 MPa で 5.8 倍、50 MPa で 34.7 倍と高圧環境になるにしたがって転写産物量は顕著に増加している。

ことが明らかになった。

3.3.3. 高圧環境下における *groE* オペロンの転写開始点の解析

S. violacea における *groE* オペロンの転写開始点の解析を行った (Fig.3-4)。高圧環境下での転写開始点および産物の変化を解析するためノーザンブロット解析と同様に 0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa のそれぞれの圧力環境下で対数増殖期中期まで生育させた菌体から回収した全 RNA を用いてプライマーエクステンションを行った。その結果、5つの転写開始点 P1 (+90A)、P2 (+73A)、P3 (+70T)、P4 (+64T)、P5 (+53A,+52T) が認められた。P2, P3, P4 はいずれの圧力条件下においても転写産物量に大きな変化が観察されない開始点であった。一方、P1, P5 は圧力に依存して顕著に産物が増加する転写開始点であり、P1 の上流には *E. coli* において報告されている RpoH (σ^{32}) のコンセンサス配列

(SNcTTGAAA---<N₁₄>---RNCCCCATNt) [Cowing, Bardwell et al. 1985] と相同性の高い領域が見いだされた。0.1 MPa 環境下の P1 からの転写産物量を 1 とした相対値を求めた場合、P1 においては 30 MPa では 2.9 倍、50 MPa では 9.2 倍の転写産物量が観察された。P5 においても 0.1 MPa では P1 と同等の値を示し 30 MPa で 2.9 倍、50 MPa で 5.9 倍の値を示した。

S. violacea における転写開始点の解析結果を *E. coli* において報告されている転写開始点と比較した。*E. coli* の *groEL*, *groES* は ES-EL の順に並んだ *groE* オペロンを形成しており、*groES* 遺伝子上流に二つの転写開始点が報告されている [Cowing, Bardwell et al. 1985]。一つは開始コドンから 49nt 上流にある RpoD (σ^{70}) 依存の転写開始点 (+49C) であり、もう一つは開始コドンから 73nt 上流にある RpoH 依存の転写開始点 (+73A) である。*S. violacea* と *E. coli* の *groE* オペロンのプロモーター領域を塩基配列レベルで比較すると全体的にはあまり保存性は高くないものの、*S. violacea* の P2 上流と *E. coli* の RpoD 依存の転写開始点上流は部分的に相同性の高い領域があり、先ほど述べた P1 上流にある RpoH のコンセンサス配列と相同性の高い -10 および -35 領域とあわせ、*S. violacea* においても RpoD と RpoH の認識配列を上流に持つ転写開始点が存在することがわかった。また P3, P4 も P2 と同じプロモーター領域から RpoD によって支配されていると考えられた。

3.3.4. 高圧環境下における GroEL タンパク質の発現量の解析

次に *S. violacea* および *E. coli* における GroEL, GroES タンパク質の発現量を解析した。0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa のそれぞれの圧力環境下で対数増殖期中期まで生育させた菌体から回収した全タンパク質を用いて anti-GroEL 抗体、もしくは anti-GroES 抗体を用いたウェスタンブロット解析によって発現量の解析を行った (Fig.3-5)。その結果、*E. coli* では各圧力下で GroEL, GroES タンパク質共に発現量には大きな変化は見られなかった。一方 *S. violacea* においてはノーザンブロット解析による転写産物解析の結果と同様に圧力に依存して顕著に増加しており、GroEL タンパク質は 0.1 MPa に対して 30 MPa で 2.1 倍、50 MPa で 6.4 倍になっており、GroES タンパク質は 0.1 MPa に対して 30 MPa で 2.1 倍、50 MPa で 3.1 倍になっていることが明らかになった。

3.4. 考察

Shewanella violacea DSS12 株のヒートショック時における GroEL の発現量は 15°C、2 時間以上の条件において増加していることが明らかとなった。ヒートショック応答の誘導される温度 15°C は生育至適より 7°C 高い値である。これは *Escherichia coli* の場合、生育至適 37°C でヒートショック応答は 42°C で誘導され 5°C 高い温度 [Bukau 1993]、*Synechococcus vulcanus* の場合、生育至適 55°C、ヒートショック応答は 63°C で誘導され 8°C 高い温度 [Tanaka, Hiyama et al. 1997]、*Colwellia maris* は生育至適 10~15°C、ヒートショック応答は 20°C で誘導され 5~10°C 高い温度 [Yamauchi, Okuyama et al. 2003] などと較べて、特に大きな特徴は見られなかった。ヒートショックに対する応答の誘導される時間は 2 時間以上と非常に長く、また発現量も他の細菌で見られるような大きな増加は観察できなかった。これは *S. violacea* が単離されてきた深海は低温かつ安定な環境であったためヒートショック応答が他の細菌にくらべ鈍っていることが考えられる。一方、一部の深海には熱水が吹き上げるような環境もあり、そのような環境からも深海由来微生物が見つかった。現在も続々と見つかった他の深海由来の細菌での解析が望まれる。

E. coli における圧力条件下での GroEL の発現量の変化は既に報告がある。大気圧条件下で培養後、短時間高圧環境に曝したこの実験では GroEL の転写産物

量、発現量が加圧によって増加していることが示された[Welch, Farewell et al. 1993]。一方、本実験での各圧力条件下で培養し調製したサンプルに対してのノーザンブロット解析からは *E. coli* では高圧環境になるにしたがって減少していた。これは主に培養条件の違いによるものと考えられる。十分な培養後に短時間高圧環境下に曝す条件では、高圧によって生じた問題に短時間対処すればいいのに対し、高圧環境下で増殖するには対処しつづけてはならない。短時間高圧環境下に曝した場合、*E. coli* において生存率の低下が報告されていることから、死菌ないし死にゆく菌体を観察しているものと思われる[Zobell and Cobet 1962]。細胞の形状からもその違いは明らかで、短時間高圧環境下に曝した場合は通常の状態を維持しているのに対し高圧環境下で増殖させた場合は細胞が伸張している[Zobell and Cobet 1964]。また、ヒートショック応答と同様に高圧環境に対する応答も短時間で急激に応答し時間経過とともに一定の値に落ち着くのだとすれば、短時間高圧環境下に曝した場合はその応答を、高圧環境下で増殖させた場合は落ち着いた状態を観察しているのかもしれない。本実験では圧力適応機構の解明を目的としているため、高圧環境下で増殖させる条件で実験を行った。このため以前の報告とは異なる結果を得たものと考えられる。*S. violacea* における高圧環境下での転写産物量の増加および発現量の増加は顕著であり、GroEL-ES 複合体が高圧環境下で何らかの働きをしていることが推測される。しかし高圧環境下で GroEL-ES 複合体がいままで知られているようなシャペロンとしての働きをしているのか、またそれが圧力下での生育、適応に貢献しているのかについては明らかではない。

S. violacea では、第2章での解析から *groEL*, *groES* 遺伝子はアミノ酸レベルでも DNA レベルでも非常に良く保存されており、既に報告されている他の細菌と同じくオペロンを形成している。*S. violacea* と *E. coli* では共に RpoH (σ^{32}) の認識配列を持ち、その下流からの転写産物も確認された。また圧力に影響を受けず比較的安定に転写の行われている転写開始点 P2、P3、P4 の上流には *E. coli* における RpoD (σ^{70}) のコンセンサス配列と相同性が高領域が存在し、各転写開始点とも RpoD 依存の転写が疑われる。GroEL および GroES は *E. coli* において生育に必須なタンパク質であることが知られており *S. violacea* でも同様に最低限の必要量を、ハウスキーピングを担う RpoD による転写から、ストレス応答時には RpoH による転写から供給していることが考えられた。RpoH の認識

配列の下流から転写量が増加する転写開始点 P1 が存在したことから、ノーザンブロット解析などから本章において明らかとなった高圧環境下での *groE* オペロンの活性化は、少なくとも一部は RpoH 依存の転写が原因であると推測された。一方、もうひとつの高圧環境になるにしたがって転写量が増加する転写開始点 P5 の上流には RpoH のコンセンサス配列は確認できなかった。P5 からの転写の制御は *E. coli* で報告されている RpoH のコンセンサス配列とは大きく異なる *S. violacea* 独自の配列に由来する可能性、もしくは他の σ ファクターが関与している可能性がある。*S. violacea* では 8 つの σ ファクターが報告されている。そのうち二つは新規の σ ファクターであり、圧力に依存して転写を正に調節している RpoN (σ^{54}) の存在も確認されている [Ikegami, Nakasone et al. 2000]。これらが高圧環境によって生じるストレスに応答して発現調節を行っているのかもしれない。本研究においては *E. coli* におけるコンセンサス配列を *S. violacea* にも当てはめて考えており、今後 *S. violacea* の持つ σ ファクターについて詳細な研究が必要である。

3.5. まとめ

深海由来好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株においてヒートショック応答の行われる条件について検討した。その結果、温度変化に対して緩慢ながらもヒートショック応答が行われていることが確認された。

Escherichia coli および *S. violacea* を各圧力条件下で培養し調製したサンプルに対して行ったノーザンブロット解析、ウェスタンブロット解析によりそれぞれの菌において異なったストレス応答が確認された。*E. coli* においては高圧環境になるにしたがって転写産物量が減少することが明らかとなり、*S. violacea* においては高圧環境になるにしたがって転写産物量、発現量ともに顕著に増加していることが明らかとなった。

S. violacea の *groE* オペロンにおける転写開始点の決定、およびそれぞれの転写開始点からの転写量を比較した。その結果、高圧環境に対する応答は 2 つの転写開始点に由来して増加していることが明らかになった。さらに、この応答にはヒートショック応答を司る転写因子 RpoH (σ^{32}) が関与していることが示唆された。

高温への暴露に対して *S. violacea* は、他の好冷性細菌での知見と同様に比較的低温でも応答が見られた。しかし、応答までの時間は 2 時間以上と長く、深海の安定した環境に適応しているため鋭敏な反応は必要ではなかったのではないかと考えられた。また、高圧環境下での生育に GroEL-ES の高発現が有利に働く直接的な証拠はまだないが本章の結果から、高圧環境下で *S. violacea* は *E. coli* と比較して特徴的な転写誘導を受けており、その結果高圧環境下で発現量も増加していることが明らかになった。さらにこの応答は RpoH が関与している可能性が示唆されたことから、他の HSPs (heat shock proteins) も同様に特徴的な応答をしていることが考えられた。そこで他の HSPs および RpoH の転写を解析し、抗体が入手できるものに関しては発現量の解析を行った。この結果を次章に述べる。

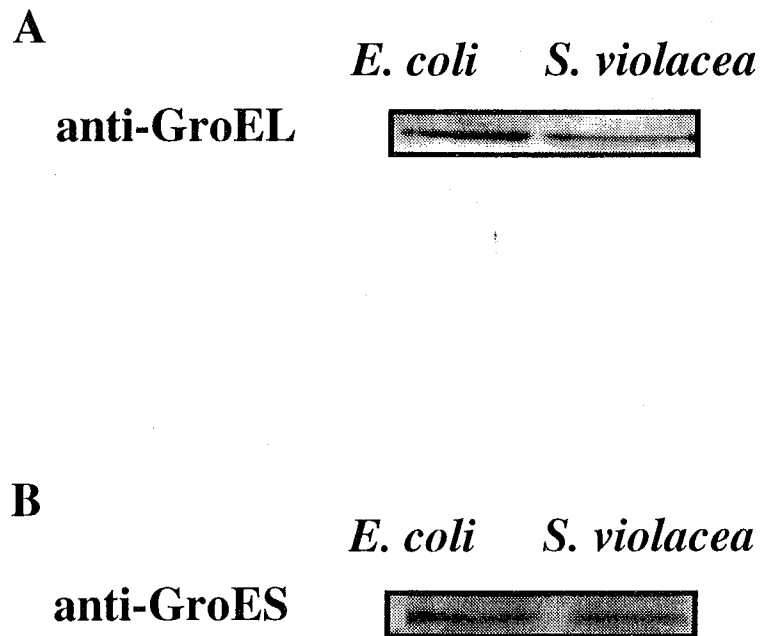


Fig.3-1 anti-GroEL, anti-GroES 抗体の特異性の評価

E. coli および *S. violacea* の全タンパク質をノーザンブロット解析し、抗体の特異性を評価した。anti-GroEL 抗体 (A)、anti-GroES 抗体 (B) いずれを用いた場合もシングルバンドが得られた。

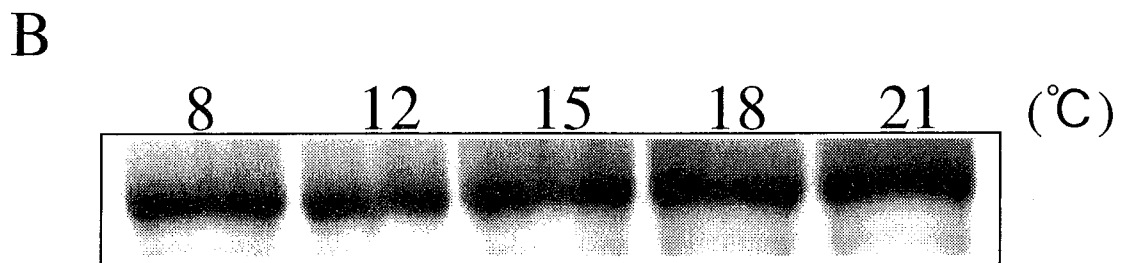
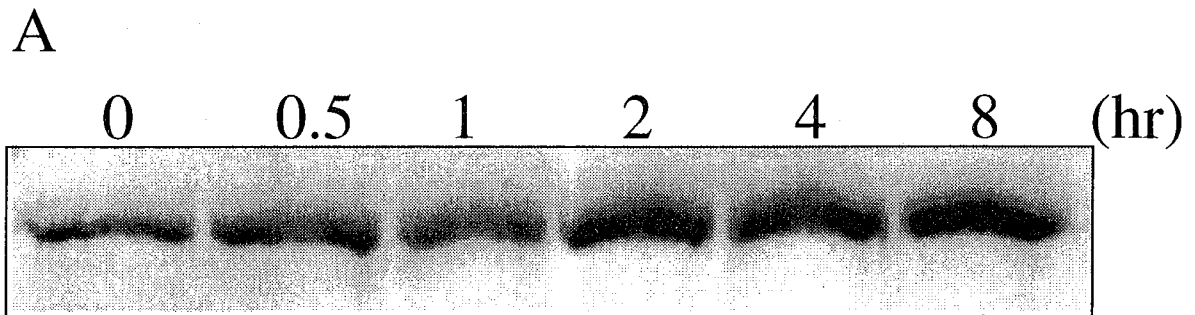


Fig.3-2 *S. violacea* におけるヒートショック応答条件の検討

各条件でヒートショックを与えた菌体から全タンパク質を抽出し anti-GroEL 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

A) 15°Cに各時間曝しヒートショック応答の起こる時間を検討した。

B) 各温度に2時間曝しヒートショック応答の起こる温度を検討した。

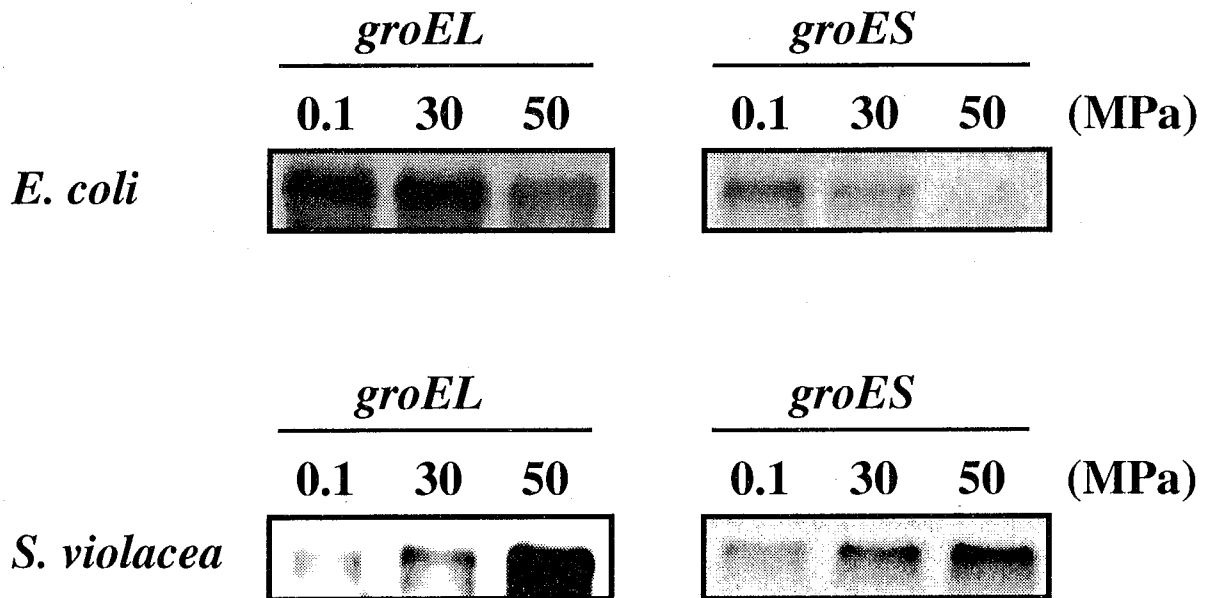


Fig.3-3 各圧力環境下における *groEL*, *groES* の転写産物量

0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa の各圧力環境下における
E. coli および *S. violacea* の転写産物量をノーザンブロット解析により定量した。

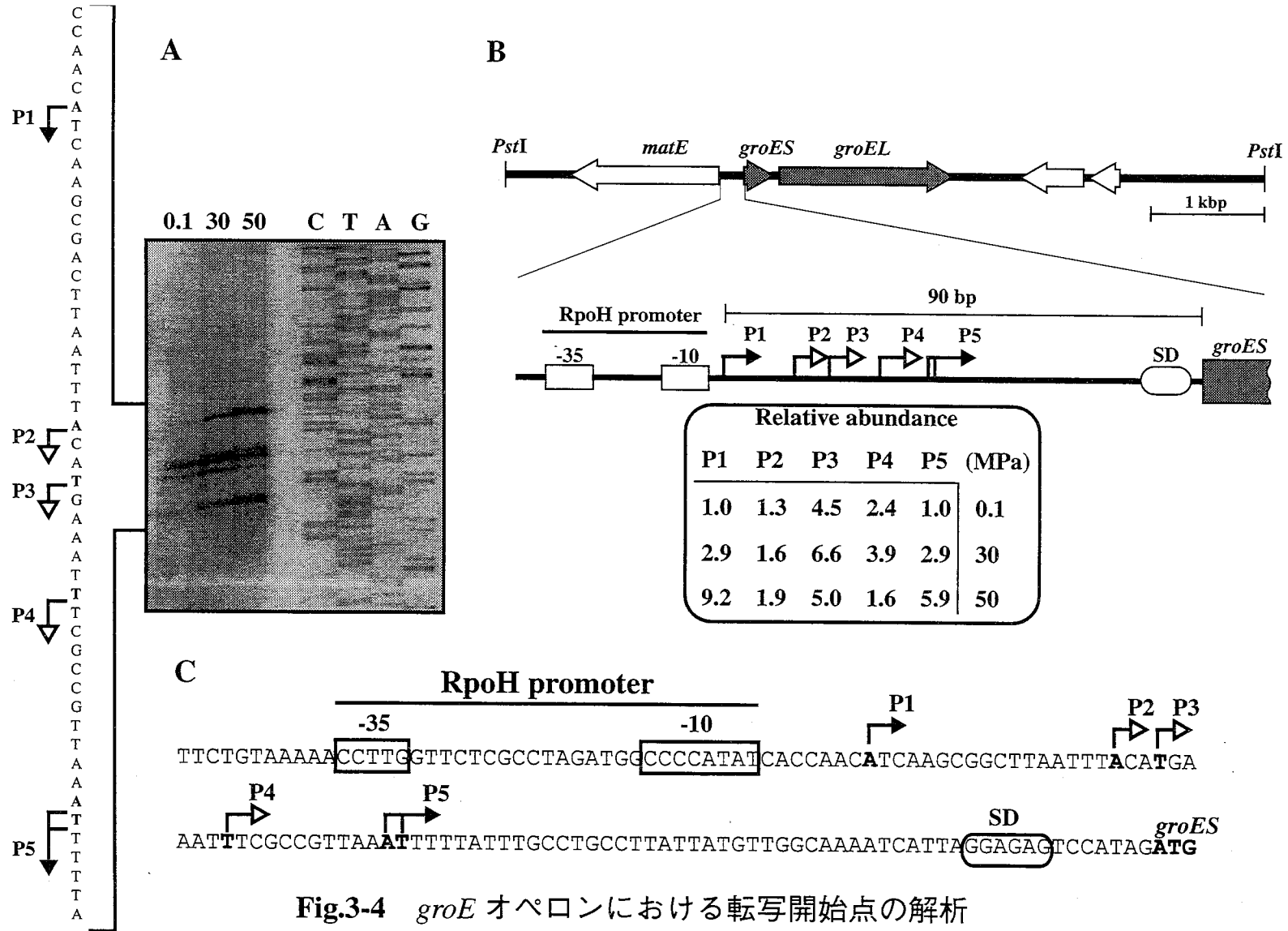


Fig.3-4 *groE* オペロンにおける転写開始点の解析

プライマーエクステンション法を用いて 0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa の各圧力条件下における転写開始点を決定した。圧力環境に応じる転写開始点を → で、一定の転写開始点を ⇨ で示した。

A) プライマーエクステンションの結果を示した。

B) 転写開始点の模式図と各転写開始点からの相対的な転写産物量を示した。

C) 翻訳領域上流の塩基配列と転写開始点を示した。

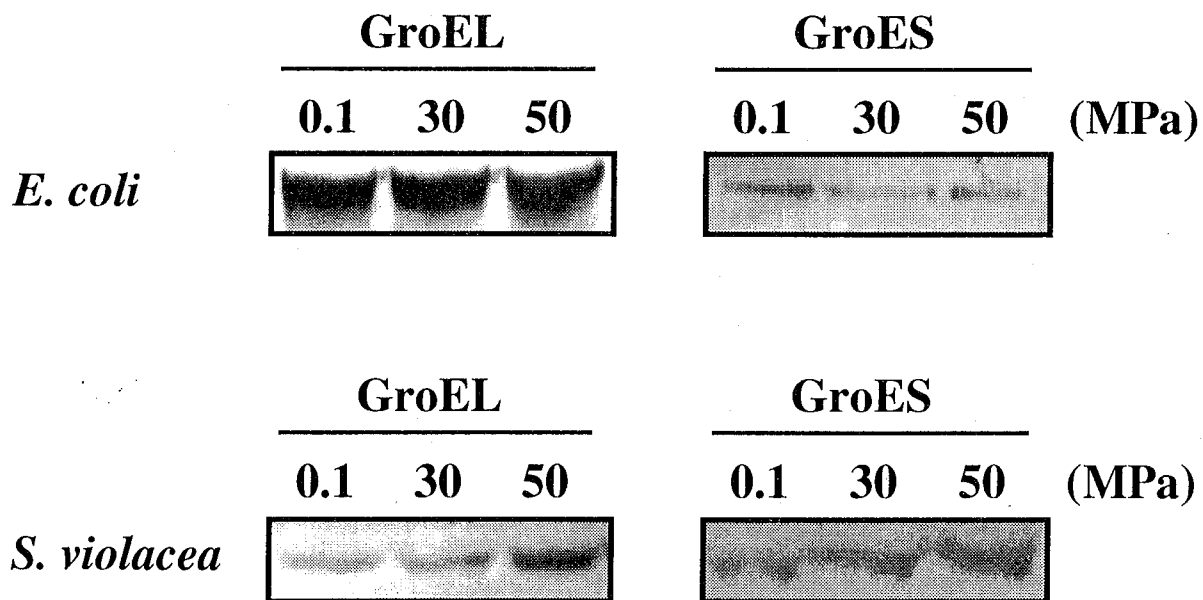


Fig.3-5 各圧力環境下における GroEL, GroES の発現量

0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa の各圧力環境下における
E. coli および *S. violacea* の発現量をウェスタンブロット解析により定量した。

第4章 高圧環境下における

ヒートショック関連遺伝子の発現誘導の解析

4.1. 緒言

groE オペロンにおいて観察された高圧環境下での発現誘導はプライマーエクステンション法による転写開始点の解析からヒートショック応答を司る σ ファクターである RpoH (σ^{32}) が関与している可能性が示唆された。RpoH によって高圧環境下で発現誘導が行われているとすると同様に他の HSPs (heat shock proteins) においても発現誘導が行われている可能性が高い。特に RpoH の安定性に大きく関わる DnaK などの応答に興味を持たれる。そこで高圧環境下で他のヒートショック関連遺伝子も同様に発現誘導されているのかを検討するためにノーザンブロット解析によりヒートショック関連遺伝子の各圧力環境下での転写産物量を定量し、抗体が入手できるものに関しては発現量の解析を行った。さらに、RpoH による転写誘導が行われているかを検討し、*S. violacea* における RpoH の認識するコンセンサス配列を決定するためにプライマーエクステンション法により各ヒートショック関連遺伝子の転写開始点を解析した。

序論でもふれたようにヒートショック応答の際には RpoH によって調節されている HSPs の発現誘導は、過剰に発現した HSPs によって RpoH が不活性化、および分解されるネガティブ・フィードバックが知られている。このネガティブ・フィードバックによってヒートショック応答は急速で一過的な誘導が保証されている。このヒートショック応答における *rpoH* の転写、発現量は詳細に調べられている [Straus, Walter et al. 1987; Craig and Gross 1991; Arsene, Tomoyasu et al. 2000]。しかし、本稿における実験条件では *S. violacea* が持つ高圧環境下で生育可能な適応機構について検討しているため、高圧環境に曝しはじめてから生育までの十分な時間高圧環境に曝している。*groE* オペロンの発現誘導からは高圧環境下への応答はヒートショック応答のように短期間で収束する誘導ではない可能性も示唆されており、高圧環境下における HSPs の応答と、RpoH との関係は明らかでなく高圧環境下における *rpoH* の転写、発現量に興味を持たれる。さらに、*E. coli* における *rpoH* の転写には複数の因子が関わっており環境に応じて複雑に制御されている。しかし第2章の結果から *S. violacea* においては *rpoH* 遺伝子上流の配列は *E. coli* の配列と大きく異なり以前の知見からの推

定は困難であった。そこで RpoH に関してもノーザンブロット解析による転写産物量、ウェスタンブロット解析による発現量の定量、およびプライマーエクステンション法により転写開始点を解析した。

4.2. 実験方法

4.2.1. 使用菌株および培養条件

深海由来好冷好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株は Marine Broth 2216 を使用し 8℃で培養した。比較対象とした大腸菌は *Escherichia coli* K-12 株 W3110 を使用し、LB 培地を用い 37℃で培養した。加圧培養においては、新鮮な培地に対数増殖期中期まで培養した前培養液を 1%植菌し、滅菌された保圧パックを用いて気泡が入らないように密閉した。加圧は保温した加圧培養器を用い目的の圧力まで加圧した後、対数増殖器中期まで培養した。なお緩衝液の組成は、特に記載のないかぎり Molecular Cloning -A Laboratory Manual- に従い、各種酵素および検出試薬キット等の使用条件は取扱説明書に従った。

4.2.2. 実験操作

染色体 DNA の精製に関する操作は 2.2.2 に記述した方法に従った。全 RNA 調整方法、全タンパク質の調整方法、ノーザンブロット解析に関する操作は前章に記述した方法に従った。

プローブの作成は *rpoH* 遺伝子およびヒートショック関連遺伝子の検出用プローブを作製するため、*S. violacea* および、*E. coli* の染色体 DNA から対応領域を増幅するプライマーを設計し、3.2.6.に記述した方法に従った。

ウェスタンブロット解析に関する操作は、一次抗体に、1/1000 希釈した anti-sigma ポリクローナル抗体 (A. Ishihama から分与)、1/3000 希釈した anti-HscA 抗体 (A. Nishimura and T. Uehara から分与) を使用し、3.2.4.に記述した方法に従った。

プライマーエクステンション法は *S. violacea* の各遺伝子およびオペロンの転写解析のために設計した 5'末端をビオチン化したオリゴヌクレオチドをプライマーとして、3.2.8.に記述した方法に従った。

4.3. 結果

4.3.1. 高圧環境下における *dnaKJ* オペロンの転写産物量の変化

高圧環境下における *dnaKJ* オペロンの転写産物量の変化を解析するために *Shewanella violacea* DSS12 株および *E. coli* K-12 株を 0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa のそれぞれの圧力環境下で対数増殖期中期まで生育させた。この菌体から全 RNA を注出しそれぞれの染色体 DNA から増幅したプローブを用いてノーザンブロット解析により転写産物量を定量した(Fig.4-1)。

dnaK 遺伝子をプローブに用いた場合 *E. coli* では *dnaKJ* オペロンの転写産物量は 0.1 MPa で最も強く検出され、30 MPa で減少し 0.9 倍となり 50 MPa ではおよそ半分まで減少して 0.6 倍になっており、高圧環境になるにしたがって転写産物量は減少していることが明らかになった。一方 *S. violacea* においては *dnaKJ* オペロンの転写産物量は 0.1 MPa では弱く検出されるのに対し、30 MPa で 1.6 倍、50 MPa で 6.1 倍と高圧環境になるにしたがって転写産物量は顕著に増加していることが明らかになった。

dnaJ 遺伝子をプローブに用いた場合でも同様の傾向を示した。*E. coli* では *dnaKJ* オペロンの転写産物量は 0.1 MPa で最も強く検出され、30 MPa でおよそ半分に減少して 0.5 倍となり 50 MPa ではほとんど検出されず 0.1 倍以下になっており、高圧環境になるにしたがって転写産物量は顕著に減少していることが明らかになった。一方 *S. violacea* においては *dnaKJ* オペロンの転写産物量は 0.1 MPa では非常に弱く検出されるのに対し、30 MPa で 1.5 倍、50 MPa で 7.3 倍と高圧環境になるにしたがって転写産物量は顕著に増加していることが明らかになった。

4.3.2. 高圧環境下における *grpE* 遺伝子の転写産物量の変化

高圧環境下における *grpE* 遺伝子の転写産物量の変化を定量するため *S. violacea* および *E. coli* を 0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa のそれぞれの圧力環境下で対数増殖期中期まで生育させた。この菌体から全 RNA を注出しそれぞれの染色体 DNA から増幅したプローブを用いてノーザンブロット解析により転写産物量を定量した(Fig.4-2)。

E. coli では *grpE* 遺伝子の転写産物量は 0.1 MPa で最も強く検出され、30 MPa、

50 MPa では共に顕著に減少して 0.1 倍以下になっており、高圧環境になるにしたがって転写産物量は顕著に減少していることが明らかになった。一方 *S. violacea* においては *grpE* 遺伝子の転写産物量は 0.1 MPa では弱く検出されるのに対し、30 MPa で 1.5 倍、50 MPa で 1.8 倍と高圧環境になるにしたがって転写産物量はなだらかに増加していることが明らかになった。

4.3.3. 高圧環境下における *rpoH* 遺伝子の転写産物量の変化

高圧環境下における *rpoH* 遺伝子の転写産物量の変化を定量するため *S. violacea* および *E. coli* を 0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa のそれぞれの圧力環境下で対数増殖期中期まで生育させた。この菌体から全 RNA を注出しそれぞれの染色体 DNA から増幅したプローブを用いてノーザンブロット解析により転写産物量を定量した(Fig.4-3)。

E. coli では *rpoH* 遺伝子の転写産物量は 0.1 MPa で最も強く検出され、30 MPa, 50 MPa では共に顕著に減少して 0.1 倍以下になっており、高圧環境になるにしたがって転写産物量は顕著に減少していることが明らかになった。一方 *S. violacea* においては *rpoH* 遺伝子の転写産物量は 0.1 MPa で検出されるのに対し、30 MPa で微増し 1.1 倍、50 MPa で 4.1 倍と高圧環境になるにしたがって転写産物量は顕著に増加していることが明らかになった。

4.3.4. 高圧環境下における *dnaKJ* オペロンの転写開始点の解析

S. violacea における *dnaKJ* オペロンの転写開始点の解析を行った。高圧環境下における転写開始点および産物量の変化を解析するためノーザンブロット解析と同様に 0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa のそれぞれの圧力環境下で対数増殖期中期まで生育させた菌体から回収した全 RNA を用いてプライマーエクステンションを行った(Fig.4-4)。その結果、0.1, 30, 50 MPa の全てにおいて転写開始点 P3 (+42A) が観察されたのに加え 50 MPa でのみ P1 (+82C)、P2 (+52C) の二つの転写開始点が観察された。転写開始点 P3 からの転写産物量は高圧環境になるにしたがって増加しており、0.1 MPa 環境下の P3 からの転写産物量を 1 とした相対値をとると、30 MPa では 1.9 倍、50 MPa では 2.8 倍の転写産物量が観察され、同様に 50 MPa でのみ観察された P1 においては 2.9 倍、P2 では 2.4 倍の転写産物量が観察された。

S. violacea における転写開始点の結果を *E. coli* において報告されている転写開始点と比較した。*E. coli* の *dnaK*、*dnaJ* は K-J の順に並んだ *dnaKJ* オペロンを形成しており、*dnaK* 遺伝子上流に RpoH (σ^{32}) によって制御されている二つの転写開始点が報告されている[Cowing, Bardwell et al. 1985]。一つは開始コドンから 40nt 上流にある転写開始点 (+44A, 41C, 42T) であり、もう一つは開始コドンから 115nt 上流にある転写開始点 (+115A) である。一方、*S. violacea* の場合 P2 上流には RpoH のコンセンサス配列と相同性の高い-10 および-35 領域が存在し、P1 の上流には RpoD (σ^{70}) のコンセンサス配列と相同性のたかい-10 および-35 領域 (TTAAGAA---<N₁₆>---TAATCT) が存在することがわかった。P3 の上流にも RpoD のコンセンサス配列と相同性のたかい-10 および-35 領域 (TTGAAA---<N₁₈>---TATATC) が存在したが、P2 上流にある RpoH の認識配列とも近いことためそちらの影響も受けていることが考えられた。

4.3.5. 高圧環境下における *grpE* 遺伝子の転写開始点の解析

S. violacea における *grpE* 遺伝子の転写開始点の解析を行った。高圧環境下における転写開始点および転写産物量の変化を解析するためノーザンブロット解析と同様に 0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa のそれぞれの圧力環境下で対数増殖期中期生育させた菌体から回収した全 RNA を用いてプライマーエクステンションを行った(Fig.4-5)。その結果、転写開始点は 3つ検出され、全ての転写開始点は高圧環境になるにしたがって顕著に産物が増加することを見いだした。0.1 MPa 環境下の P1 からの転写産物量を 1 とした相対値を見積もると翻訳領域に最も近い P3 (+16A) では 0.1 MPa において 1.6 倍、30 MPa において 2.0 倍、50 MPa においては 5.1 倍の転写産物が観察された。200 bp 近く上流にある P1 (+217A)、P2 (+209C) は 30 MPa において 2.7 倍と 1.8 倍、50 MPa では 4.9 倍と 4.1 倍とほぼ同じような転写産物量が観察された。

またこの *S. violacea* の結果を *E. coli* において報告されている転写開始点と比較した。*E. coli* における *grpE* 遺伝子の転写開始点は RpoH によって制御される転写開始点 (+41A) と RpoD によって制御される転写開始点 (+37T) の 2つが報告されている[Lipinska, King et al. 1988]。一方、*S. violacea* においては P1 の上流に RpoH(σ^{32})のコンセンサス配列の-10 と相同性のある配列が見いだされ、下流にある P2 にも影響を与えているかも知れない。しかし、*E. coli* と異なり

RpoD によって制御される転写開始点は見いだされなかった。

4.3.6. 高圧環境下における *rpoH* 遺伝子の転写開始点の解析

S. violacea における *rpoH* 遺伝子の転写開始点の解析を行った。高圧環境下における転写開始点および産物量の変化を解析するためノーザンブロット解析と同様に 0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa のそれぞれの圧力環境下で対数増殖期中期まで生育させた菌体から回収した全 RNA を用いてプライマーエクステンションを行った(Fig.4-6)。その結果、少なくとも 7 つの転写開始点が存在した。特に P1 (+214C)、P3 (+176G)、P4 (+146T, +143C) からは比較的強い発現が観察された。しかし、全ての転写開始点において高圧環境に依存した発現の変化はみとめられなかった。

E. coli において報告されている *rpoH* 遺伝子の転写開始点は 5 つ存在し、RpoE (σ^{24})、RpoD といった σ ファクターにくわえ CytR/CRP (anti-activator/cAMP receptor protein) や DnaA などにより複雑に支配されている[Wang and Kaguni 1989] [Kallipolitis and Valentin-Hansen 1998; Ramirez-Santos, Collado-Vides et al. 2001]。 *S. violacea* における *rpoH* の転写開始点上流のプロモーター解析をしたところ、RpoD の認識配列と思われるものが多数見いだされたが RpoE の認識配列と思われるものは見いだされなかった。P3、P4、P6、P7 の上流には RpoD の認識配列が見いだされたが P1、P2、および P5 の上流には RpoD の認識は見いだされなかった。また *E. coli* において報告されている CytR の認識配列 (WSTGCAAC---<N₁₁>---GTTRCATT) および CRP の認識配列 (TGTGA---<N₆>--TCACA)、DnaA の認識配列 (TTATMCAMA) は *S. violacea* の *rpoH* 遺伝子上流 400 bps 以内に見いだされず、プロモーター領域に近似性は見いだせなかった。

4.3.7. 高圧環境下における DnaK タンパク質の発現量の解析

S. violacea および *E. coli* における DnaK タンパク質の発現量の変化を解析した。0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa のそれぞれの圧力環境下で対数増殖期中期まで生育させた菌体から回収した全タンパク質を用いて anti-HscA 抗体によるウェスタンブロット解析によって発現量の解析を行った(Fig.4-7)。その結果、*E. coli* では各圧力下において DnaK タンパク質の発現量には大きな変化は見られな

った。一方 *S. violacea* においてはノーザンブロット解析による転写産物解析の結果と同様に高圧環境になるにしたがって増加しており、DnaK タンパク質は 0.1 MPa に対して 30 MPa で 1.2 倍、50 MPa で 1.8 倍になっていることが明らかになった。

4.3.8. 高圧環境下における RpoH タンパク質の発現量の解析

次に *S. violacea* および *E. coli* における RpoH タンパク質の発現量を解析した。0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa のそれぞれの圧力環境下で対数増殖期中期まで生育させた菌体から回収した全タンパク質を用いて anti-sigma ポリクローナル抗体によるウェスタンブロット解析によって発現量の解析を行った(Fig.4-8)。その結果、*E. coli* では各圧力下において RpoH タンパク質の発現量には大きな変化は見られなかった。一方 *S. violacea* においてはノーザンブロット解析による転写産物解析の結果と同様に高圧環境になるにしたがって顕著に増加しており、RpoH タンパク質は 0.1 MPa に対して 30 MPa で 2.9 倍、50 MPa で 5.9 倍になっていることが明らかになった。

4.4. 考察

ノーザンブロット解析の結果から *Escherichia coli* K-12 株におけるヒートショック関連遺伝子の転写産物量は高圧環境になるにしたがって減少しているが *S. violacea* DSS12 株では、高圧環境になるにしたがって増加していることがわかった。それぞれの遺伝子で増加、減少の程度に差はあるものの第3章での *groE* オペロンの結果と同様の傾向が観察された。解析した *S. violacea* のヒートショック関連遺伝子は *E. coli* で報告されているように RpoH (σ^{32}) による制御を受けていると考えられ、*S. violacea* においては高圧環境になるにしたがってヒートショック遺伝子が RpoH によって転写誘導されていることが考えられた。また、プライマーエクステンション法による転写開始点の予測からも *rpoH* を除く全ての HSPs で高圧環境下において転写量が増加する転写開始点が観察されており、それぞれのノーザンブロット解析の結果と相関した。さらに高圧環境下において転写量が増加する転写開始点の上流には *E. coli* において RpoH のコンセンサス配列と相同性の高い領域が存在することもわかった。このことから

ノーザンブロット解析で確認された転写応答は RpoH の活性化の影響を受けていることが明らかとなった。一方 *rpoH* 上流の転写開始点の解析においてはノーザンブロット解析で確認された転写産物量の増加と相関する顕著な転写産物量の変化がおこる転写開始点は見いだされず、この原因について詳細は明らかでないが、今回解析した転写開始点のさらに上流に高圧環境に応答する転写開始点が存在するのかも知れない。

次に HSPs (heat shock proteins) の発現量の解析からは *E. coli* におけるウェスタンブロット解析の結果から少なくとも GroEL、GroES、DnaK、RpoH タンパク質はいずれの圧力環境下においても発現量に大きな差は見られなかった。高圧環境下における各タンパク質の安定化などの理由も考えられが、生育曲線から考えて分解系の阻害による可能性が高いと思われる。しかし、詳細は明らかではない。しかし、RpoH タンパク質が減少していないことは興味深い。通常 *E. coli* の RpoH タンパク質は非常に分解が早いことが知られている。この分解は DnaK タンパク質による不活性化と HSPs プロテアーゼによるところが大きい。HSPs が十分に発現している状態で RpoH タンパク質が安定化しているとなれば、HSPs の働きが鈍っている、もしくは他のタンパク質を標的としているため RpoH の分解にまで至らない可能性がある。このことから高圧環境によって HSPs が認識するような細胞内の障害、たとえば変性タンパク質の増加などが起きている可能性が考えられる。

S. violacea においては GroEL、GroES、DnaK、RpoH におけるノーザンブロット解析の結果とウェスタンブロット解析の結果は相関しており高圧環境になるにしたがって転写産物量、発現量ともに増加していることが明らかになった。各ヒートショック関連遺伝子の転写産物量および発現量の増加の原因はプライマーエクステンションの結果から考えると、少なくとも一部は RpoH による転写の活性化が原因と考えられる。RpoH タンパク質は高圧環境下で転写量とともに発現量が増加しており、この発現誘導が転写活性化の原因であることが考えられる。30 MPa における *rpoH* の転写産物量、発現量に注目すると転写産物量は 1.1 倍に過ぎないが発現量は 2.9 倍になっている。これは翻訳が促進されているか、RpoH タンパク質が安定化している可能性がある。第 2 章においてもふれたが *E. coli* においては RpoH の翻訳には転写産物の二次構造が深く関わっていることが知られている。常温時にはこの二次構造が開始コドン付近に

stem をつくることで翻訳を抑制しており、高温環境に曝された場合に二次構造がゆるむことによって翻訳が促進される温度センサーとして働いている[Morita, Kanemori et al. 1999; Morita, Tanaka et al. 1999]。 *S. violacea* においてもこのような二次構造が形成され、機能しているかは明らかではないが、配列情報から二次構造を予測すると最も重要な構造は維持されており似たような機構が働いていることが予想される。二次構造の自由エネルギーは *E. coli* では-60.90 kcal/mol、*S. violacea* では-50.16 kcal/mol でありヒートショック応答時における温度や時間の差に相関していた (Fig.2-4)。このような RNA の二次構造が圧力によってどの程度影響を受けるのかは想像の域をでないが、圧力が高まると stem を形成している水素結合は解離に向かうことから mRNA の二次構造が圧力センサーの役割を果たしている可能性がある。また、*E. coli* における発現量解析の考察と同様に圧力によって DnaK などのシャペロンや HSPs プロテアーゼが標的とするようなタンパク質の変性が起きていれば、ヒートショック応答機構のネガティブ・フィードバックが阻害され RpoH タンパク質が安定化するかも知れない。ヒートショックの場合と異なり、本実験では菌体の生育をともなう十分な時間、高圧環境に曝している。ヒートショック応答においては HSPs は修復すべき変性タンパク質のもと、すみやかに通常時の数倍まで発現し、修復完了とともにネガティブ・フィードバックにより発現量が低下する。本実験の場合、ストレス直後の極大値を観察しているというよりも（機能しているならば）ネガティブ・フィードバックにより落ち着いた状態を観察していることが考えられる。ネガティブ・フィードバックにもっとも影響を受ける RpoH の発現量は、高圧環境下において増加していることから、高圧環境になるにしたがって HSPs が要求されていることが考えられた。*E. coli* と同様に、好圧性細菌である *S. violacea* においても高圧環境下で HSPs の機能が低下しているか、HSPs が認識する変性タンパク質が増加している可能性が示唆される。しかし、*E. coli* においてはヒートショック遺伝子の応答は見られず、*S. violacea* にのみヒートショック遺伝子の発現誘導が見られた。これは、*E. coli*, *S. violacea* とともに高圧環境になるにしたがって HSPs の必要性が増しているが、*S. violacea* は高圧環境下でも継続的に HSPs を生産できているのではないかと考えられた。

プライマーエクステンションによる *S. violacea* におけるヒートショック関連遺伝子の転写開始点の解析から *rpoH* 上流に 7 つ、*groE* 上流に 5 つ、*dnaK* 上流

に3つ、*grpE* 上流に3つの転写開始点が見いだされた(Fig.4-9)。このうち高圧環境になるにしたがって転写が活性化される転写開始点は、*groE*-P1, P5、*dnaK*-P1, P2, P3、*grpE*-P1, P2, P3であった。*groE*-P1、*dnaK*-P2, P3、*grpE*-P1, P2の上流には RpoH の認識配列と思われる配列が存在することからこれらの高圧環境になるにしたがって起こる転写活性化は RpoH によって制御されている可能性が高いことがわかった。これらの配列を比較し、*S. violacea* における RpoH のコンセンサス配列を (YYTG---<N₁₆>---CcCCATAW) と推定した (Fig.4-10)。このコンセンサス配列をもとに考えると *grpE* 遺伝子上流 (+67~+96 nt) にも見いだされた。さらにこの配列は *E. coli* のコンセンサス配列とも非常に相同性が高いことがわかった。しかし、プライマーエクステンションの結果からはこの認識配列からの転写産物は観察されなかった。この結果は認識配列のわずかな違いにより転写が制御されている可能性もあるが、他の転写制御因子が存在し *grpE* の転写を制御している可能性をより強く示唆していると考えられた。また高圧環境になるにしたがって転写が活性化されるが、RpoH の認識配列を持たない転写開始点は、*groE*-P5、*dnaK*-P1、*grpE*-P3 の3つで、このうち *dnaK*-P1 は上流に RpoD (σ^{70}) の認識配列を有するが他の二つには見いだされなかった。この *groE*-P5、*grpE*-P3、の上流を比較すると相同性のある領域 (TATNNNCAACA---<N₂₀>---GNANTTTC) が見いだされた。この配列が高圧環境下での転写制御に関わっているかは未だ明らかではないが他の σ ファクターの関与や他の転写制御因子の存在を示唆しており今後解析される転写開始点において注目すべきであると考えられる。

さらに第2章でクローニングした *tig*, *lon* 遺伝子を含むヒートショック関連遺伝子のクラスター領域において、推定した *S. violacea* における RpoH のコンセンサス配列を基にプロモーター解析を行った(Fig.4-11)。*tig* 遺伝子上流には2つ、*clpX*, *lon*, *hupB* 遺伝子上流にそれぞれ1つずつのコンセンサス配列と近い配列を見いだした。さらに、*ppiD* 遺伝子の翻訳領域にもコンセンサス配列と近い配列があり、これは *ppiD* 遺伝子がヒートショック応答時には二番目の Met から翻訳されている可能性があると考えられた。これらの遺伝子は *E. coli* においてヒートショック関連遺伝子である [Wada, Kano et al. 1988; Gottesman, Clark et al. 1993; Dartigalongue and Raina 1998] とされており、*S. violacea* においても RpoH によって転写制御されていることが示唆されたが、相同性のあまり高くない配

列もあり実験的な確認が必要である。一方、*E. coli* においてヒートショック関連遺伝子とされている *clpP* 遺伝子上流には、コンセンサス配列と近い配列は見いだされなかった。これは上流の遺伝子からオペロンになっていなどの可能性が考えられるが、詳細は明らかではない。今後 RpoH コンセンサス配列を確かめるためには、さらに他のヒートショック関連遺伝子のプロモーター領域の解析が必要である。

4.5 まとめ

第3章に引き続き *dnaK*、*dnaJ*、*grpE*、*rpoH* 遺伝子の各圧力環境での転写産物量の変化を定量した結果、*Escherichia coli* K-12 株では高圧環境になるにしたがって減少するが、*Shewanella violacea* DSS12 株においては高圧環境になるにしたがって増加していることが明らかとなった。

次に、DnaK、RpoH タンパク質の各圧力環境での発現量の変化を定量した。*E. coli* ではほぼ一定であるのに対し、*S. violacea* においては高圧環境になるにしたがって増加していることが明らかとなった。

また、*S. violacea* の *dnaKJ* オペロン、*grpE*、*rpoH* の転写開始点を決定した結果、圧力に依存して転写量が増加する転写開始点を見いだした。さらに各転写開始点上流を比較検討し、*S. violacea* における RpoH(σ^{32})のコンセンサス配列を (YYTG---<N₁₆>---CcCCATAW) と推定した。第3章の結果と合わせ、*S. violacea* においてもヒートショック関連遺伝子は高圧環境下で RpoH による転写活性化をはじめとした様々な制御を受けていることを強く示唆する結果が得られた。

E. coli においてヒートショック関連遺伝子はネガティブ・フィードバックにより、必要性に応じて転写量、発現量が制御されていることが知られており、*S. violacea* においても同様のメカニズムが働いていることが予想される。必要量以上に発現した HSPs (heat shock proteins) はネガティブ・フィードバックを引き起こし、応答を収束させる。しかしネガティブ・フィードバックによってもっとも影響を受けるはずの RpoH の発現量も *S. violacea* において高圧環境下で増加していた。このことから、高圧環境下において HSPs の機能が阻害されているなどして、HSPs の要求量が増していることが考えられた。これは高圧

環境下において HSPs が標的とする変性タンパク質が増加している可能性を示唆していると考えられたが、直接的な証拠はまだない。しかし遺伝子破壊や形質転換といった手法が *S. violacea* においては未だ確立されておらず直接 HSPs の必要性を検討するのは困難であると考えられた。そこで、HSPs のなかでも変性タンパク質を複合体内に取り込む GroEL-ES 複合体に注目し、解析することで間接的に高圧環境下での HSPs の機能を推定することを試みた。その結果を次章に述べる。

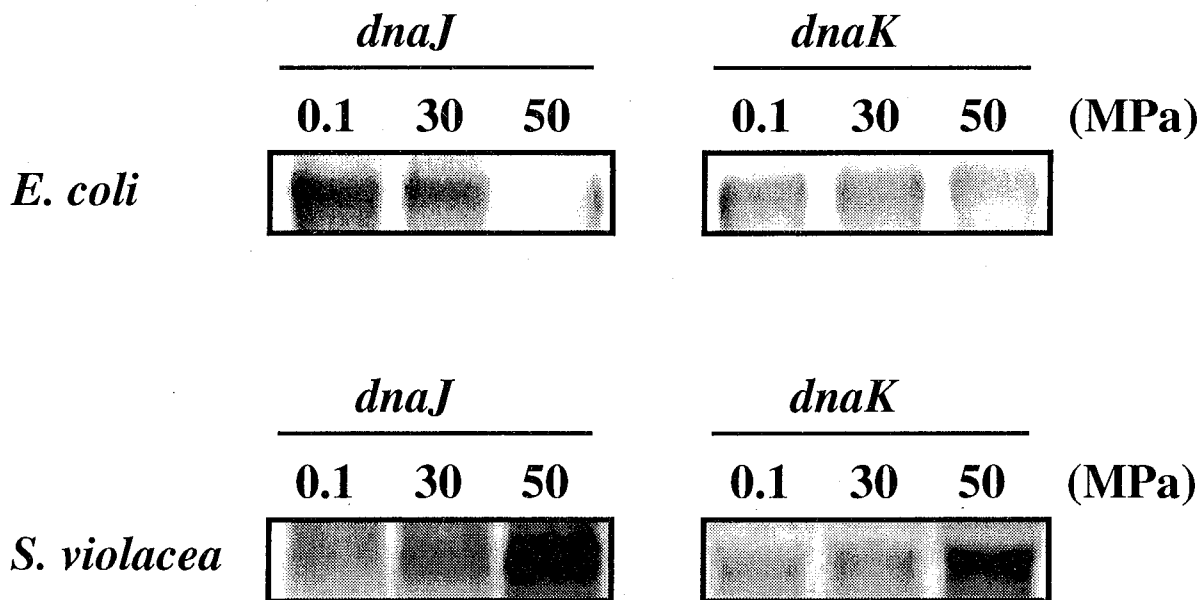


Fig.4-1 各圧力環境下における *dnaJ*, *dnaK* の転写産物量

0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa の各圧力環境下における
E. coli および *S. violacea* の転写産物量をノーザンブロット解析により定量した。

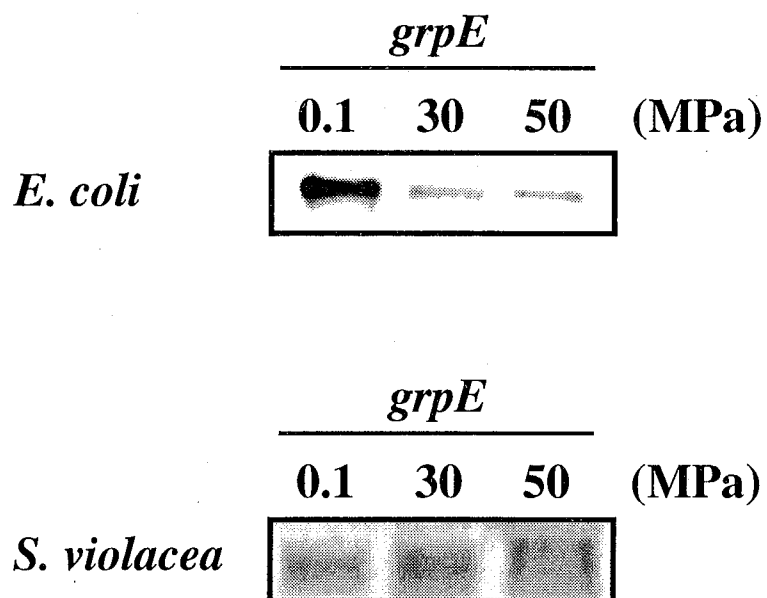


Fig.4-2 各圧力環境下における *grpE* の転写産物量

0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa の各圧力環境下における
E. coli および *S. violacea* の転写産物量をノーザンブロット解析により定量した。

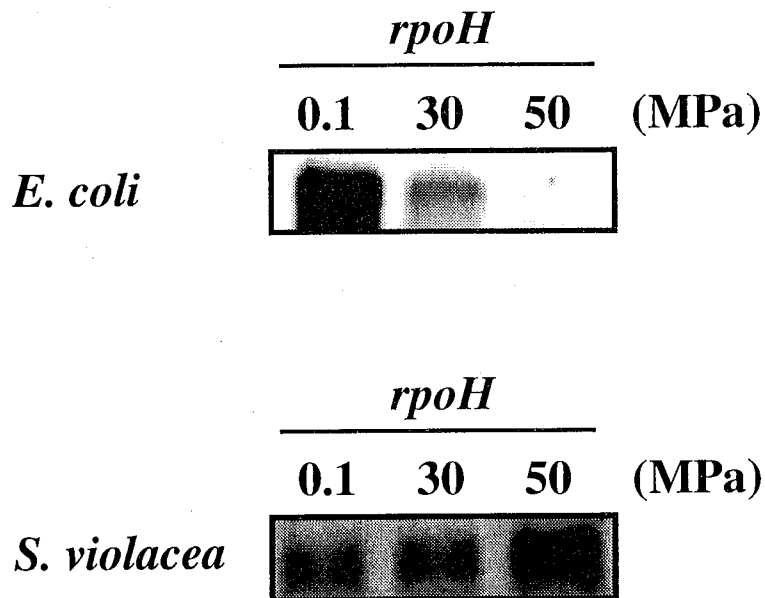


Fig.4-3 各圧力環境下における *rpoH* の転写産物量

0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa の各圧力環境下における
E. coli および *S. violacea* の転写産物量をノーザンブロット解析により定量した。

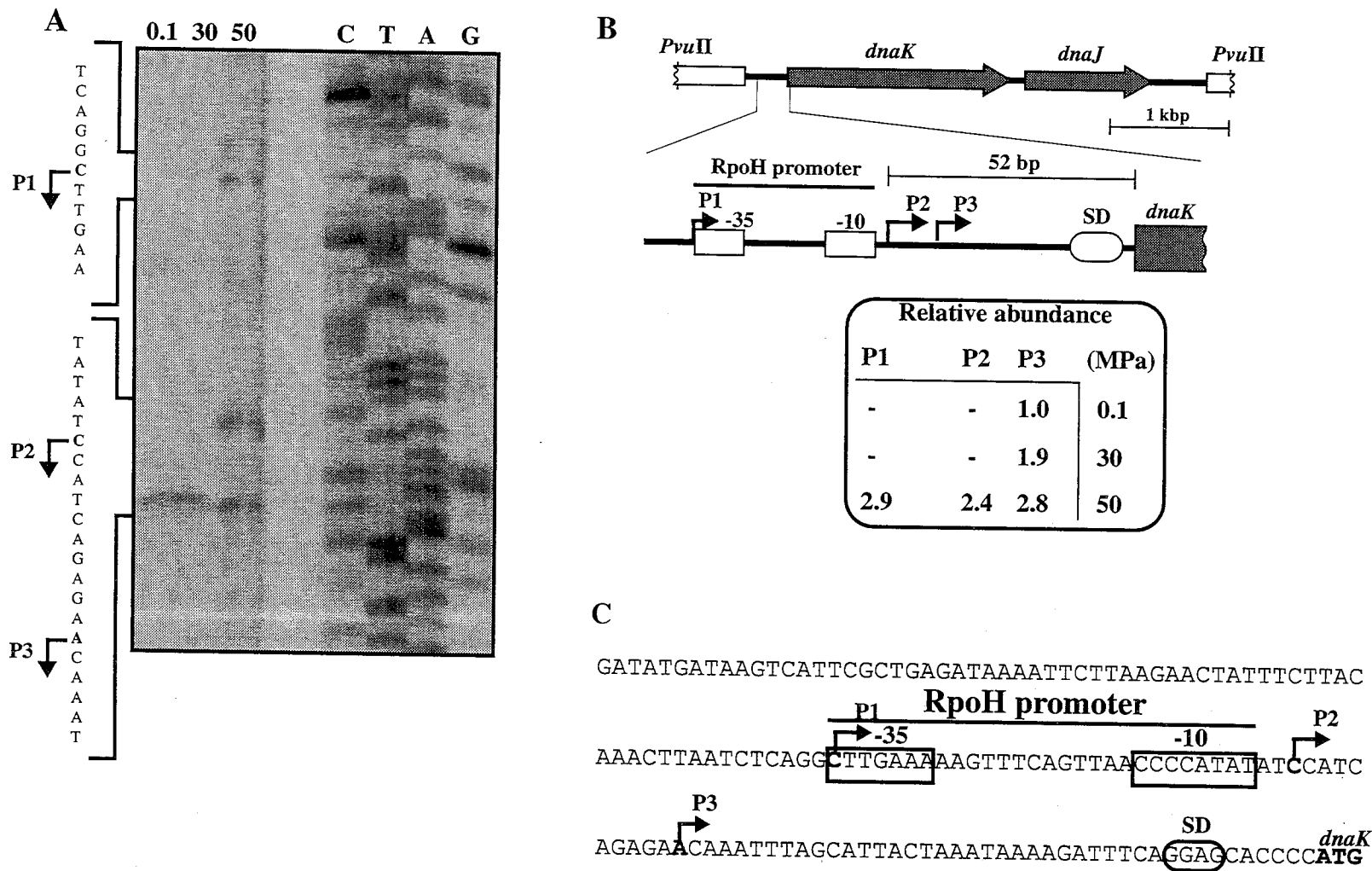


Fig.4-4 *dnaJK* オペロンにおける転写開始点の解析

プライマーエクステンション法を用いて 0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa の各圧力条件下における転写開始点を決定した。圧力環境に応じる転写開始点を \rightarrow で、一定の転写開始点を \rightarrow で示した。

A) プライマーエクステンションの結果を示した。

B) 転写開始点の模式図と各転写開始点からの相対的な転写産物量を示した。

C) 翻訳領域上流の塩基配列と転写開始点を示した。

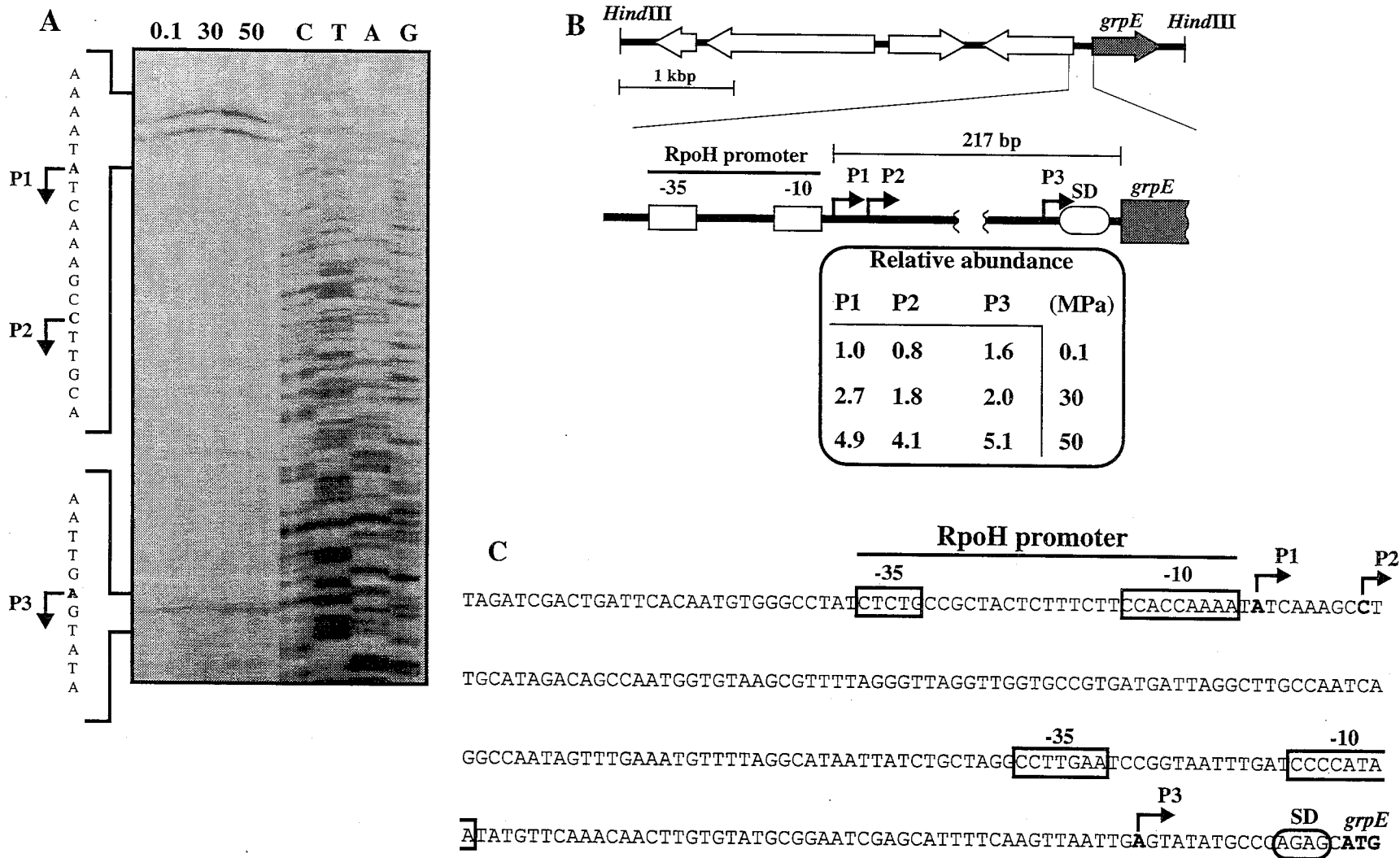


Fig.4-5 *grpE* における転写開始点の解析

プライマーエクステンション法を用いて 0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa の各圧力条件下における転写開始点を決定した。圧力環境に応じる転写開始点を → で、一定の転写開始点を → で示した。

A) プライマーエクステンションの結果を示した。

B) 転写開始点の模式図と各転写開始点からの相対的な転写産物量を示した。

C) 翻訳領域上流の塩基配列と転写開始点を示した。

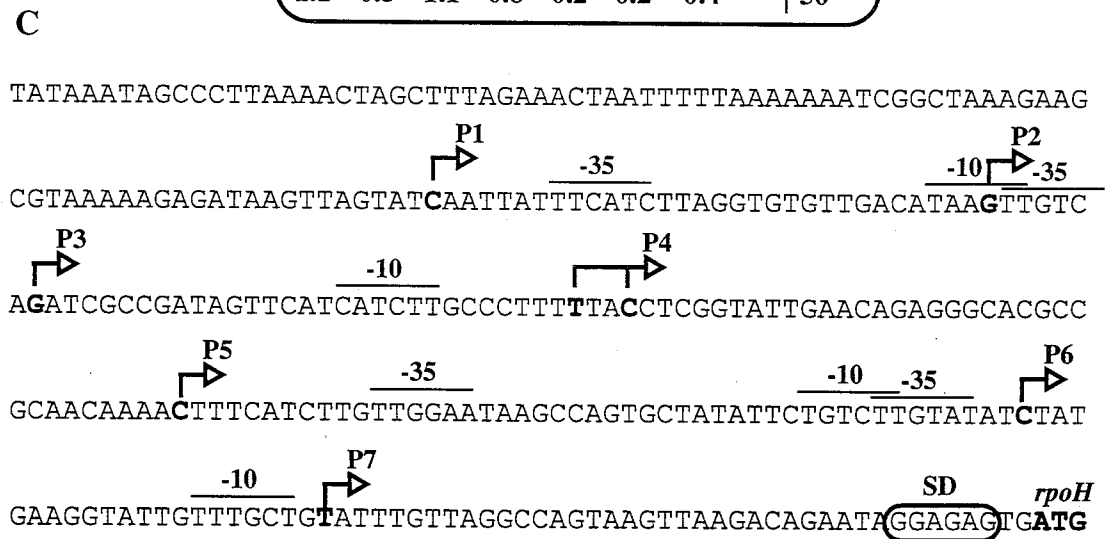
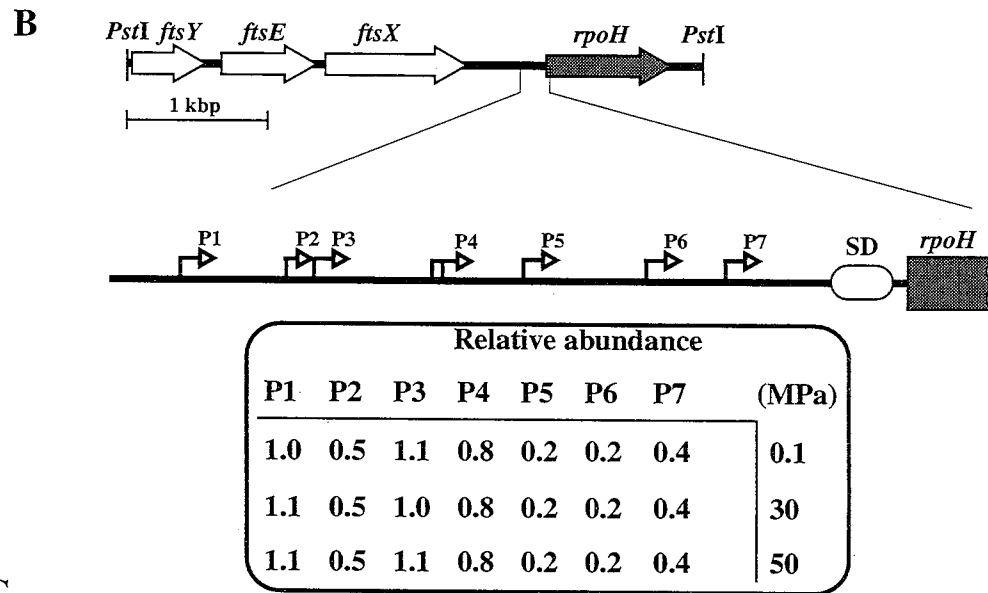
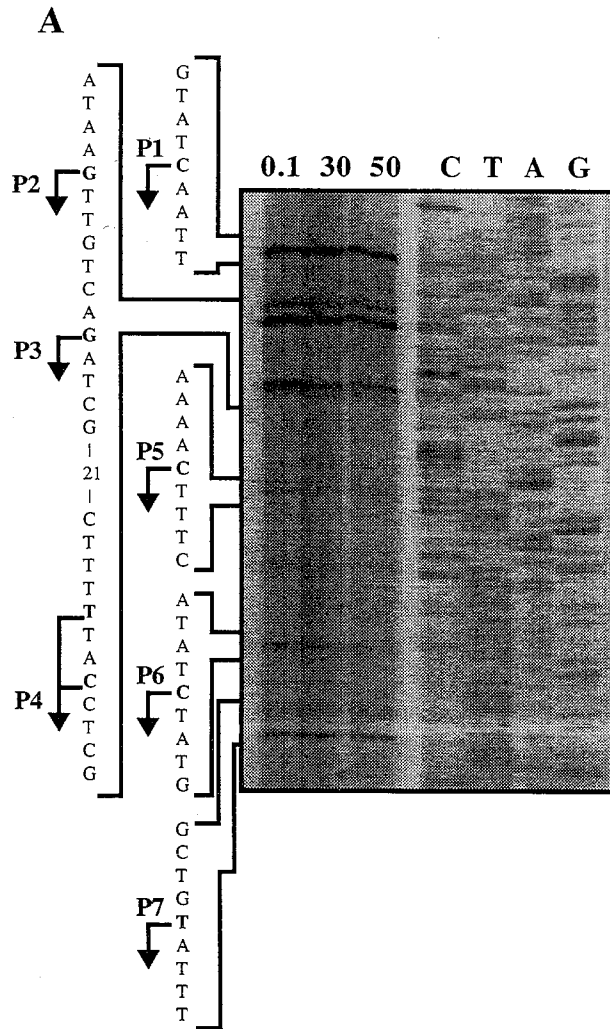


Fig.4-6 *rpoH* における転写開始点の解析

プライマーエクステンション法を用いて 0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa の各圧力条件下における転写開始点を決定した。

A) プライマーエクステンションの結果を示した。

B) 転写開始点の模式図と各転写開始点からの相対的な転写産物量を示した。

C) 翻訳領域上流の塩基配列と転写開始点を示した。予測されるRpoD(σ^{70})認識配列を -35 , -10 として示した。

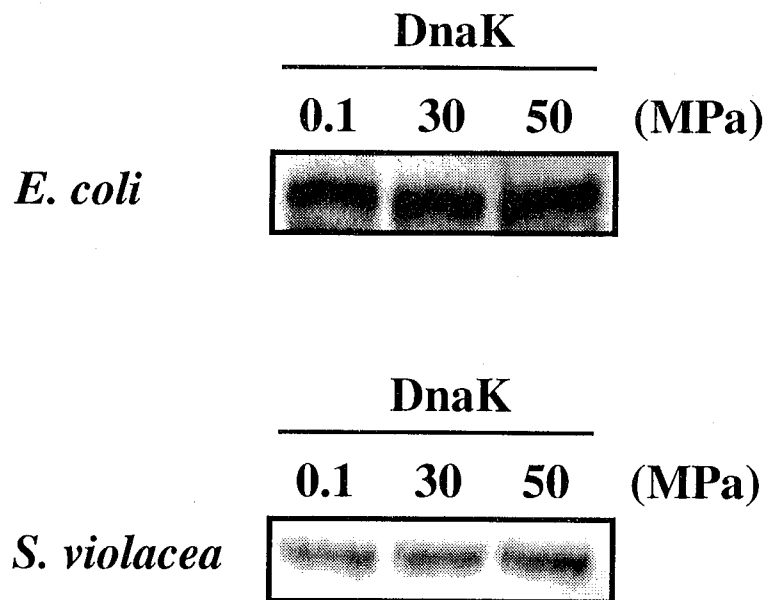


Fig.4-7 各圧力環境下における DnaK の発現量

0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa の各圧力環境下における
E. coli および *S. violacea* の発現量をウェスタンブロット解析により定量した。

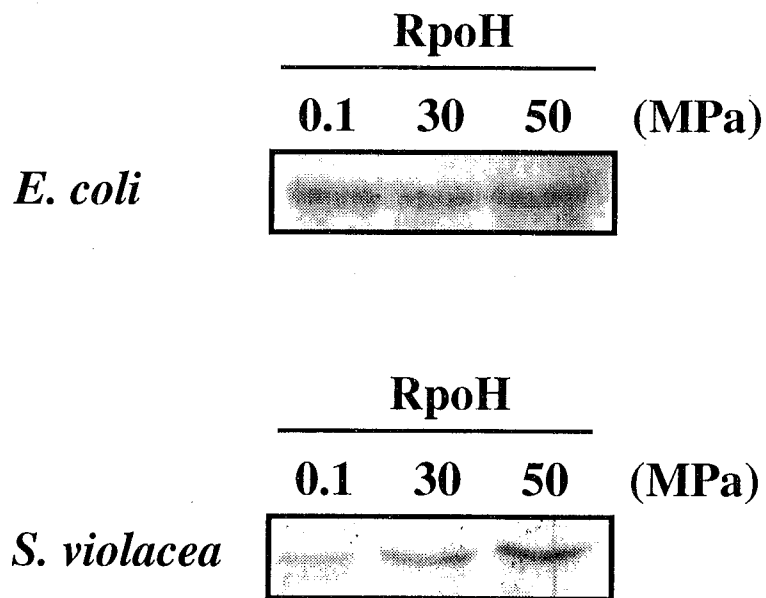


Fig.4-8 各圧力環境下における RpoH の発現量

0.1 MPa, 30 MPa, 50 MPa の各圧力環境下における
E. coli および *S. violacea* の発現量をウェスタンブロット解析により定量した。

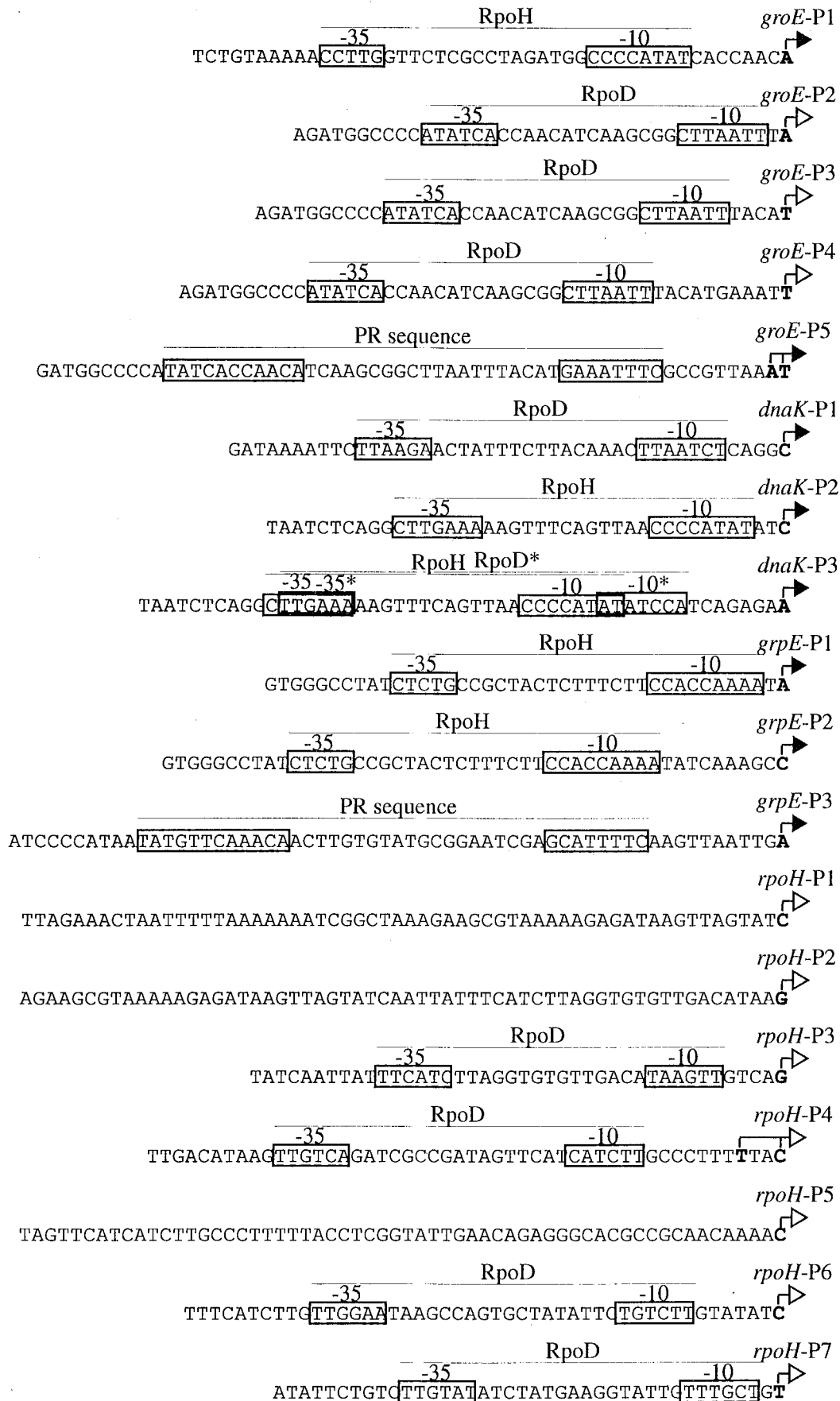


Fig.4-9 ヒートショック関連遺伝子のプロモーター領域の解析

S. violacea におけるヒートショック関連遺伝子上流に見いだされた転写開始点および推定されるプロモーターを示した。高圧環境に依存して誘導される転写開始点を、誘導されない転写開始点を で示した。RpoH, RpoD の -10, -35 領域を枠で囲んだ。*groE*-P5, *grpE*-P3 の上流に見いだされた共通の配列を PR sequence とし枠で囲んだ。

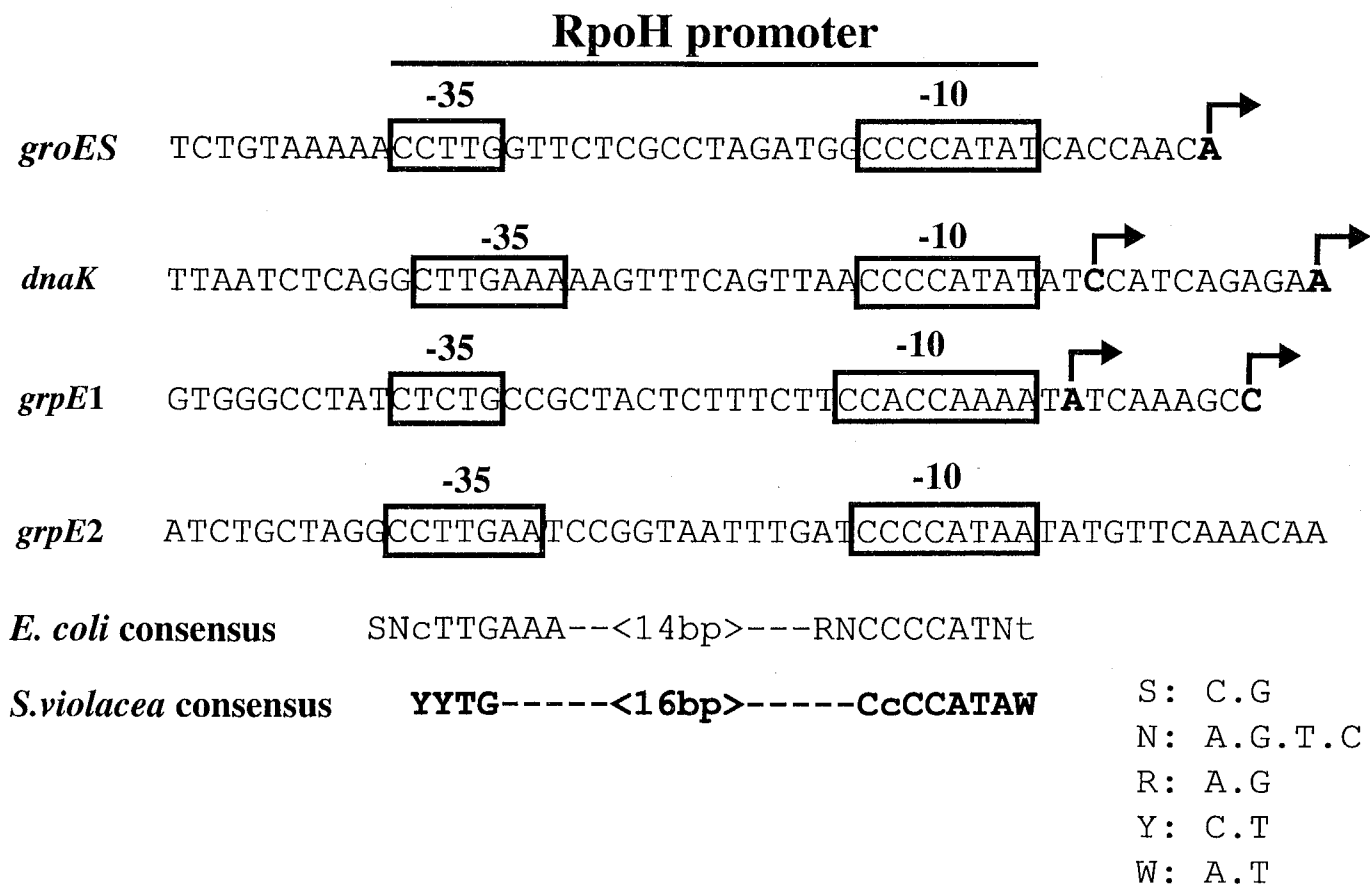


Fig.4-10 *S. violacea* における RpoH 認識配列の推定

それぞれの遺伝子上流に見いだされた *E. coli* の RpoH 認識配列と近い配列を枠で囲んだ。またプライマーエクステンションによって決定された転写開始点を矢印で示した。これらの結果から推定した *S. violacea* における RpoH 認識配列を太字で示した。

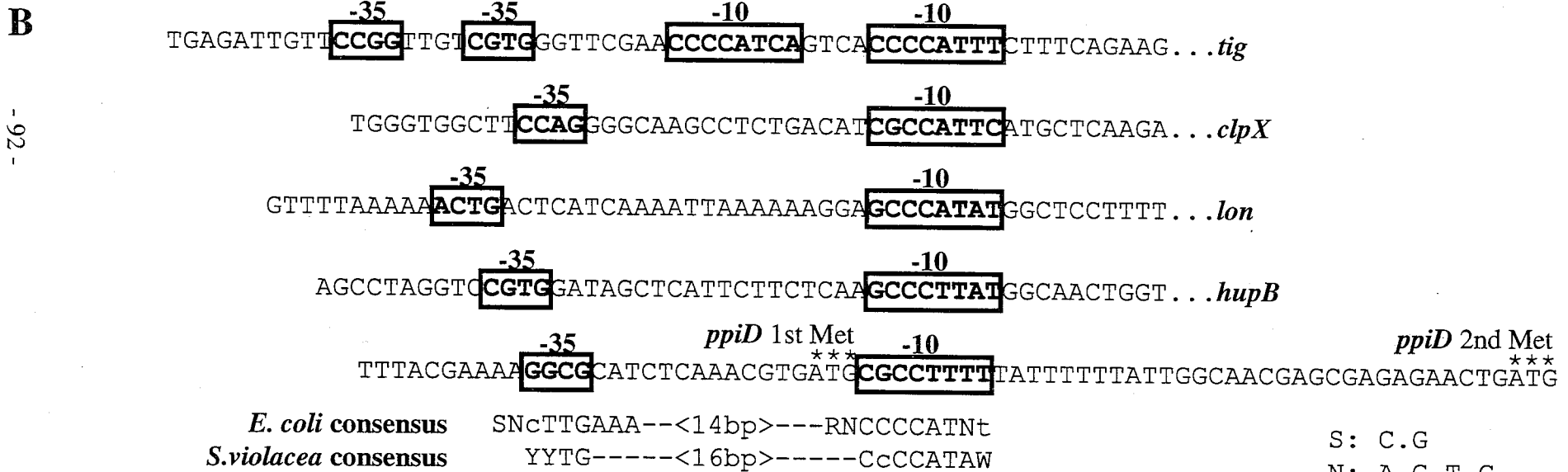
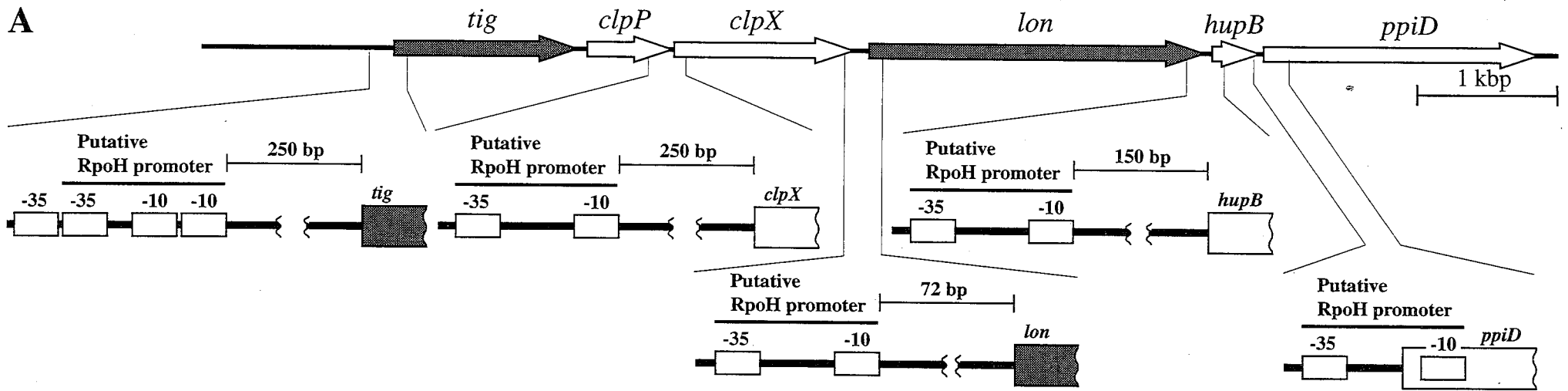


Fig.4-11 *tig, lon*を含むクラスターにおける RpoH 認識配列の推定

解析した *tig, lon* を含むクラスターと RpoH 認識配列と思われる位置を A に示した。

RpoH 認識配列と推定された領域の塩基配列を示した。

それぞれに見いだされた RpoH コンセンサス配列と近い配列を枠で囲んだ。

下流にある遺伝子を (...*tig*) で示した。さらに *ppiD* の 1st, 2nd の Met コドン (***) で示した。

第5章 高圧環境下において

GroEL-ES 複合体の標的となるタンパク質の解析

5.1. 緒言

序論でも述べたように疎水的な分子が水中に露出するとその周りに水の構造が形成され結果的に体積が減少することが知られている。つまり疎水性相互作用は圧力環境下では阻害される傾向がある。このような原理で超高水圧によってタンパク質はコンフォメーションを維持する疎水性アミノ酸の結合が阻害され変性すると考えられている。本研究で検討された 50 MPa の圧力が生体内のタンパク質構造にどの程度影響を与えるかは未だ明らかではないが、高圧環境がタンパク質の構造を維持する疎水結合に影響することでタンパク質を不安定化し、これらを標的とするヒートショック関連遺伝子が発現誘導している可能性が考えられた。また、疎水結合の阻害が他の影響を与えている可能性も考えられる。HSPs (heat shock proteins) と標的となるタンパク質は疎水性部位を介して結合しており、例えば GroEL の作用機構で重要な、基質タンパク質との結合も疎水性相互作用によって行われている。こうした結合への影響により HSPs の増加が必要となり高圧環境下での発現誘導に関わっている可能性も考えられる。HSPs の高圧環境下での機能、および必要性を検討するにあたりヒートショック関連遺伝子の破壊、相補などを検討することが考えられる。しかし、*Shewanella violacea* DSS12 株においては遺伝子破壊や形質転換といった手法が未だ確立されておらず直接 HSPs の必要性を検討するのは困難であると考えられた。そこで HSPs が認識しているタンパク質を精製、同定することで間接的に HSPs の高圧環境下での機能、および必要性を推測することにした。

HSPs が認識し隔離、再生もしくは分解する標的となるタンパク質は主に非天然構造のタンパク質である。非天然 (non-native) 構造は読んで字のごとく、天然 (native) 構造ではないタンパク質という逆説的な定義であり、非常に多様な構造のタンパク質が非天然構造に含まれる。界面活性剤などの変性剤を加え完全に変性した状態、二次構造、二次構造同士の会合がすすんで形成されるサブドメイン、ドメインといった部分構造などはもちろんのこと、最終的に天然構造をとるために必要な二次構造の再配置や側鎖のパッキングなどの微調整

が終わるまでの全ての中間体が非天然構造である。したがって、これらすべての構造中間体が HSPs の標的となる。また、タンパク質のコンフォメーションは固定されている強固な構造ばかりではなくその多くはある範囲内のゆらぎの中に存在していると考えられている。構造を維持する結合への影響から大きくゆらいだタンパク質も標的になると考えられる。しかし、こうした標的に対していろいろな HSPs がばらばらに結合するのではなく、それぞれ結合する構造には特異性があり結合の順序も存在する。DnaK は比較的伸びきった構造を標的にしているが、GroEL は二次構造をもったより天然構造よりのタンパク質を標的としている。圧力によって変性が起きていたとしても本実験において扱っている 50 MPa 程度の圧力では大きな構造の変化をとまなうような変性は考えにくい。そこで比較的天然構造に近いタンパク質を標的とし、また *Escherichia coli* においては GroEL-ES 複合体によって認識される非天然構造のタンパク質についての知見が蓄積されており、*Shewanella violacea* DSS12 株においてもこの GroEL-ES 複合体が高圧環境下で認識しているタンパク質について比較検討できると考えられた。さらに GroEL-ES 複合体は認識したタンパク質をその複体内にできる空洞に取り込むため、認識しているタンパク質を精製するにも都合がよいと考えられた。そこで GroEL-ES 複合体とその認識しているタンパク質について解析することにした。

序論においても GroEL-ES 複合体についてふれたが、さらにここで詳しい構造とその反応サイクルについて述べる(Fig.5-1)。分子量 57 kDa の GroEL の単量体は、赤道ドメイン、頂点ドメイン、その両者をつなぐ中間ドメインの3つのドメインからなる。赤道ドメインは ATP 結合領域を含んでおり、頂点ドメインには GroES 結合領域でもある変性タンパク質との結合領域がある。さらに、中間ドメインは、頂点ドメインと赤道ドメインのひねりを可能とし大きな構造変化を起こすための2つの hinge 部位を含んでいる。GroEL は単量体 7 つから成るドーナツが背中合わせに2つ重なった 14 量体構造をとる。このドーナツ構造をとることで内部には空洞ができる。この空洞内は疎水性残基が多数存在し、変性したタンパク質をとらえる。タンパク質をとらえた GroEL 7 量体は ATP と結合して大きな構造変化を起こす。中間ドメインの2つの hinge 部位を中心にひねることで GroEL が伸び上がり内部の空洞の体積が約 2 倍に増大するだけでなく、疎水性残基も入り口方向に移動しとらえた変性タンパク質を引き延ばす。

入り口付近に移動した疎水性残基は、こちらも 7 量体を形成した GroES (分子量 10 kDa) に結合する。この構造変化により空洞内は疎水性から親水性に変化し、変性タンパク質が再生する環境を整える。この構造は ATP が加水分解され ADP になる約 20 秒程度の時間安定に保たれる。加水分解が終了すると 14 量体の反対側に変性タンパク質と ATP が結合する。この ATP 結合が引き金となり GroES と内部にとらわれていたタンパク質が放出される。このサイクルによって GroEL と GroES は複合体を形成し、変性タンパク質を再生する[Goto 1997]。このサイクルには ATP と Mg^{2+} が必要であり、これらを除くことにより変性タンパク質を内部にとらえた状態で維持することができる[Miller, Maghlaoui et al. 1993]。こうした原理を利用して、高圧環境下で GroEL-ES 複合体と特異的に結合しているタンパク質を検討するために大気圧下、高圧環境下でそれぞれ生育させた *S. violacea* から EDTA を用いて Mg^{2+} をキレートした条件下で全タンパク質の調製し anti-GroEL 抗体を用いた免疫沈降によって精製、解析を試みた。

5.2. 実験方法

5.2.1. 使用菌株および培養条件

使用菌株および培養条件は 4.2.1. に記述した方法に従った。

5.2.2. 全タンパク質の調整方法

菌体からの全タンパク質の調整は、まず遠心分離 (4°C, 5,000 xg, 15 min) にて回収した菌体を、氷冷した免疫沈降用 buffer (20 mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 150mM NaCl pH 7.8) に懸濁した後、3.2.3. に記述した方法に従い調製した。

5.2.3. 免疫沈降法

10 μ g/ μ l の全タンパク質サンプルを等量の免疫沈降用 buffer (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7.8) で懸濁後、遠心分離 (4°C, 15,000 xg, 30 min) し上清を回収することで不溶性画分を除いた。さらにもう一度遠心分離 (4°C, 15,000 xg, 30 min) し上清を回収後、GroEL-ES に捕獲されている変性タンパク質を解離させるため $MgCl_2$ (final 25 mM) と ATP (final 10 mM, SIGMA) を加え 4°C で一時間振盪した。その後、遠心分離 (4°C, 15,000 xg, 30 min) し不溶

性画分を除いた anti-GroEL 抗体 (SIGMA) を 1/50 量加え攪拌しながら 4°C で一晩、抗体を結合させた。次に遠心分離 (4°C, 15,000 xg, 30 min) し上清を取り除いた後、等量の免疫沈降用 buffer で再懸濁し沈殿を洗った。この操作を 2 回繰り返した後、遠心分離 (4°C, 15,000 xg, 30 min) 後の沈殿を Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって分離した。SDS-PAGE は Laemmli の方法に従い 10% acrylamide gel を用いて行った [Laemmli, Beguin et al. 1970]。

5.2.4. プロットとアミノ酸 N 末端シーケンス

SDS-PAGE 後の acrylamide gel を NovaBlot キット (Amersham Pharmacia biotech) を用い PVDF 膜 (MILLIPORE) に 0.8 mA/cm² の定電流で 60 分間通電しプロットした。プロットした PVDF 膜を蒸留水で軽くすすいだ後、CBB 染色液 (0.1% CBB-R250, 45% MeOH, 10% CH₃COOH) 中で 5 分間染色した。次に脱色液 (90% MeOH, 7% CH₃COOH) で脱色後、目的のバンドを切り出し、アミノ酸 N 末端シーケンスを行った。アミノ酸 N 末端シーケンスは株式会社アプロサイエンス (<http://www.aprosoci.com/>) に委託し、Hewlett-Packard G1005A (Hewlett-Packard) を用いて解析した。解析結果は *Shewanella violacea* DSS12 株のゲノム情報と比較しタンパク質を同定した。アミノ酸配列の編集および解析には GENETYX-MAC version 11 (Software Development) を用いた。

5.2.5. ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロット解析は 3.2.4. に記載した方法に従った。

5.3. 結果

5.3.1. 免疫沈降によって GroEL-ES 複合体と共沈してくるタンパク質

anti-GroEL 抗体を用いた免疫沈降法により、0.1 MPa および 50 MPa の圧力環境下で生育させた *Shewanella violacea* DSS12 株の全タンパク質から GroEL および GroEL と結合しているタンパク質を共沈した (Fig.5-2)。コントロールとして ATP と Mg²⁺ を加え、停止させていた GroEL-ES 複合体の反応サイクルを再開し複合体を解離させたサンプルを解析に用いた。複合体の分離は共沈してくる

GroES タンパク質の量的変化から評価したが、CBB 染色では検出が微量だったため anti-GroES 抗体を用いたウェスタンブロット解析により検出した。その結果、ATP と Mg^{2+} の添加により GroES が共沈されなくなることを確かめた。SDS-PAGE の結果、50 MPa の圧力環境下で優位に GroEL-ES 複合体と共沈してくるタンパク質を 30 kDa 付近に見いだした。このタンパク質は ATP と Mg^{2+} を加え、複合体を分離した場合には検出されず、0.1 MPa よりも 50 MPa で生育させた菌体から顕著に強く検出された。

5.3.2. 免疫沈降によって検出されるタンパク質の同定

30 kDa 付近に免疫沈降によって GroEL と共沈してくるバンドを同定するために、PVDF 膜にブロットし、アミノ酸 N 末端シーケンスを行った。その結果、N 末端から 5 残基のアミノ酸を決定した。検出されたアミノ酸は N 末端から Ala-Ile-Val-Lys-Cys と確認できた。開始コドンから翻訳された Met の次に Ala が結合する場合、Met が脱落して N 末端が Ala になることが頻繁に起こることは良く知られている。今回共沈してきたタンパク質も Met が脱落したものと予想された。そこで (Met)-Ala-Ile-Val-Lys-Cys の配列を *S. violacea* のゲノム解析結果から得た ORF の情報と比較した結果、N 末端配列と一致するタンパク質として RplB が適合することがわかった。また RplB の推定分子量は 30 kDa であり、分子量からも 30 kDa 付近に免疫沈降によって GroEL と共沈してくるタンパク質は RplB である可能性が高いと考えられた。ゲノム解析結果から得た RplB の全アミノ酸配列を第 2 章のヒートショック関連遺伝子と同様に類縁菌と比較し系統樹を作成した (Fig.5-3)。

5.4. 考察

5.4.1 RplB タンパク質について

同定された RplB タンパク質は 50 S リボソームのサブユニットであり Ribosomal protein L2 とも呼ばれる (Fig.5-3)。Ribosomal protein L2 は 50 S リボソームのサブユニットの中では分子量約 30 kDa で最大のサブユニットであり、リボソームの活性に必須である。複数の機能を持ち、他のサブユニットの会合に必須であり、23S rRNA と結合しペプチジルトランスフェラーゼ活性部位を

構成する [Romero, Arredondo et al. 1990; Nakagawa, Nakashima et al. 1999]。様々な微生物間においてアミノ酸レベルで高い保存性を有し、23S rRNA との結合ドメインとその結合を安定化させる C 末ドメインを含んでいる [Diedrich, Spahn et al. 2000]。 *Shewanella violacea* DSS12 株の RplB も他の類縁菌とアミノ酸レベルで 82% 以上の高い相同性を有しており、系統樹上もっとも近い *Shewanella oneidensis* とはアミノ酸レベルで 92.0% の相同性であった。また、リボソームは X 線構造解析が行われており (PID: 1m90)、RplB は全アミノ酸中 50% 近い疎水性アミノ酸によって非常に β シートに富んだ構造をしている。 *Escherichia coli* において高圧環境下でリボソームの解離が促進され生存率と相関することが示されており [Zobell and Cobet 1962]、サブユニットの会合に必須である RplB が高圧環境下での適応の鍵になっている可能性が考えられた。

5.4.2 anti-GroEL による免疫沈降の結果について

anti-GroEL による免疫沈降によって、RplB は高圧環境下で優位に GroEL と共沈してくることが示された。また、この共沈は ATP と Mg^{2+} の添加によって消失することから RplB が抗体に結合するなどのアーティファクトではないと確認された。anti-GroES 抗体によるウェスタンブロット解析では、ATP と Mg^{2+} を加えたサンプルを anti-GroEL 抗体によって免疫沈降した場合 GroES は検出されなかった。これは ATP, Mg^{2+} を加えたことによって反応サイクルが再開し、GroES が GroEL と分離したためと考えられる。この際に、GroEL-ES 複合体に取り込まれていた変性タンパク質も分離したことが予想される。はたして、RplB は GroEL とどのような結合により共沈されてきたのであろうか。最もありそうなのが、やはり GroEL-ES 複合体の空洞内に取り込まれている可能性である。空洞内に取り込まれるタンパク質の分子量は 60 kDa 以下であり、RplB の分子量 30 kDa は空洞内に取り込まれる条件を満たしている。RplB の全アミノ酸のうち疎水性アミノ酸の割合は 50% 近く、構造解析から β シートに富んだタンパク質であることが解っており、RplB は変性の影響を受けやすく GroEL-ES 複合体に優先的に認識されている可能性がある。さらに RplB が構成するリボソームに注目すると、ストレス環境下においてシャペロンとの関係が深いことが報告されている。高温環境下における RplB などのサブユニットが会合してリボソームになるまでの過程において、DnaK, DnaJ, GrpE によるフォールディング

機構[Alix and Nierhaus 2003]、および GroEL, GroES のフォールディング機構が必要とされている[El Hage, Sbai et al. 2001]。また、リボソームを構成するいくつかのサブユニットは実際に GroEL-ES 複合体により認識されている。*E. coli* において温度変化によって生じる変性タンパク質のうち、GroEL-ES 複合体が認識し結合するものを同定した報告からは 300 以上のタンパク質が検出され、その中に ribosomal protein L7, L12 などが含まれている[Houry, Frishman et al. 1999]。この報告においては RplB に関する記述はないが、これは RplB の等電点の関係で検出領域外にあり、この報告は GroEL-ES 複合体による RplB の認識を否定するものではない。ヒートショック時に RplB は ribosomal protein L7, L12 と同じく GroEL-ES 複合体によって認識されているのかも知れない。また、当研究室において行われた高圧環境下で生育している *E. coli* の DNA マイクロアレイの結果からは生育阻害にも関わらずリボソーム関連の遺伝子は数倍に転写誘導されている[Ishii, Oshima et al. 2004]。これらのことは今回明らかになった高圧環境下において GroEL と共沈してくる RplB が、変性し GroEL-ES 複合体の空洞内に取り込まれている可能性を強く示唆する。リボソームは生体内に非常に多量に存在するタンパク質であり、このリボソームが高圧環境下で影響を受けやすいとすれば、高圧環境下での HSPs (heat shock proteins) の発現誘導は RplB を中心としたリボソームの解離を修復するために HSPs の必要性が増している可能性が考えられる。さらに、リボソームの機能阻害はヒートショック応答やコールドショック応答と同様の応答を引き起こすことが知られている。リボソームを阻害する抗生物質 Kanamycin や、Puromycin などは *E. coli* においてヒートショック応答を引き起こし、Chloramphenicol や Tetracycline はコールドショック応答を引き起こす。特にコールドショック応答には翻訳レベルでの調節が重要であることが報告されており、ストレス応答においてリボソームが細胞内センサーの役割を担っている可能性が示唆されている[VanBogelen and Neidhardt 1990; Graumann and Marahiel 1996]。序論でふれたように高圧環境下では多くの HSPs とともに、いくつかのコールドショック関連の遺伝子、タンパク質も活性化していることが明らかとなっている。高圧環境下でもリボソームが圧力を感知し、ストレス応答を行っているのかもしれない。細胞内多量に存在するリボソームが変性した場合、細胞の生存に大きな影響を与えると思われる。リボソームの変性が圧力センサーとして働き、好圧性細菌 *Shewanella violacea*

DSS12 株では HSPs の発現誘導によりリボソームの変性による影響を最小限に抑えている可能性が考えられる。

ただし本研究の結果からは、共沈の原因となった RplB と GroEL との結合について他にいくつかの可能性が考えられる。ひとつは直接 GroEL と結合している可能性、GroES を介して結合している可能性である。どの場合も ATP, Mg²⁺の存在によって共沈されなくなることを説明できる。直接 GroEL と結合している場合、GroEL の構造変化に依存して結合していれば ATP, Mg²⁺の存在によって構造変化が起こり分離する。これらのモデルを支持するデータとして、SDS-PAGE の結果から見積もられる mol 比があげられる。GroEL と GroES は複合体を形成する多量体の mol 比から考えて 14 : 7 の比率で結合していることが反応サイクルのモデルから予想され、標的となる変性タンパク質は全ての複合体が取り込んでいると仮定しても 14 : 7 : 1 の mol 比であると計算できる。しかし実際の免疫沈降後の SDS-PAGE の結果は GroEL と RplB の濃度差から見積もられる mol 比はおよそ 2 : 1 の割合であり計算値に較べ非常に多い。この結果は空洞内への取り込み以外の結合を示唆するが、等電点の大きな違い (GroEL : pH=4.58, RplB : pH=11.41) が染色に用いた CBB の結合に定量性を失わせる可能性が考えられ、空洞内への取り込みを完全に否定するものではない。

5.4.3. 高圧環境下で変性するタンパク質の同定の試み

本章において免疫沈降によって GroEL と共沈してくるタンパク質の解析から高圧環境下で変性するタンパク質の同定を試みた。本研究において高圧環境下で特徴的に GroEL に結合するタンパク質として RplB が同定された。共沈してきた RplB と GroEL の濃度からは大多数の GroEL は RplB と結合している結果であった。しかし、*E. coli* において温度変化によって生じる変性タンパク質のうち、GroEL-ES 複合体が認識し結合するものを同定した報告からは 300 以上のタンパク質が検出され、ribosomal protein L7, L12 などが同定されている。*groEL* が必須遺伝子であることを考えると高圧環境下においてももっと多くのタンパク質と結合していてもよいと思われる。したがって本研究においては変性するタンパク質全ての同定、および高圧環境によって生じる変性タンパク質総量の増加を検証するまでには至らなかった。これは免疫沈降によって共沈してくるタンパク量が、複合体との結合比からも微量のためで、RplB 以外のタンパク質

が高圧環境下で GroEL-ES 複合体に認識、結合しているのかどうかは本研究では明らかにならなかった。効率化のためにセファロース A を用いた免疫沈降も試みたがセファロース A に吸着するタンパク質が多く見られ実用は難しいと思われた (data not shown)。今後、buffer の検討、検出系の改善などが必要である。また、精製した GroEL, GroES を過剰に加えることで変性したタンパク質を検出する方法も検討するべきであろう。

5.5. まとめ

免疫沈降によって GroEL-ES 複合体と共沈してくるタンパク質を検出することで、高圧環境下において生じる変性タンパク質の増加についての検証を試みた。しかし、検出感度等の問題から変性タンパク質の増加、同定についてはっきりした確証は得られなかった。しかし、高圧環境下で GroEL とともに顕著に共沈してくるタンパク質が検出され、それがリボソームのサブユニット RplB (Ribosomal protein L2) であると同定した。その結合様式についての詳細は不明であるが、変性タンパク質として GroEL-ES 複合体の空洞内に取り込まれている可能性が示唆された。

リボソームは高圧環境下でサブユニットの解離が起こることが知られており、今後、高圧環境への適応とリボソームの安定性との関係について検討が必要であると考えられる。今回試みた免疫沈降では *in vivo* で生じた変性タンパク質を、網羅的に解析することは困難であったが、HSPs (heat shock proteins) の高圧環境下での役割を検証するためにも今後も研究を続ける必要があると考えられる。また、ある環境下で遺伝子の必要性を検討する際によく用いられる方法として、遺伝子の破壊や、過剰発現などの手法によって直接的に証明する方法があげられる。高圧環境下で HSPs の必要性を検討するにあたって、まず *Shewanella violacea* DSS12 株において遺伝子の破壊や過剰発現を試みるべきであろう。しかし、深海微生物では安定なベクター系や形質転換方法が確立されておらず *S. violacea* においてもそういった遺伝学的手法が利用できる基盤研究の重要性が再確認された。また、タンパク質の変性をシャペロンが認識する機構が圧力によってどのような影響を受けているかなど、分子レベルでの研究の発展も望まれる。今回の結果から、50 MPa という比較的小さな圧力でも *in vivo* ではタン

パク質に変性作用があることが示唆され、特にリボソームの変性が疑われた。今後、主に超高圧で検討されてきた変性作用を生物が生存可能な圧力条件下でも検討すること、リボソームの高圧環境下における assembly の解析などが望まれる。

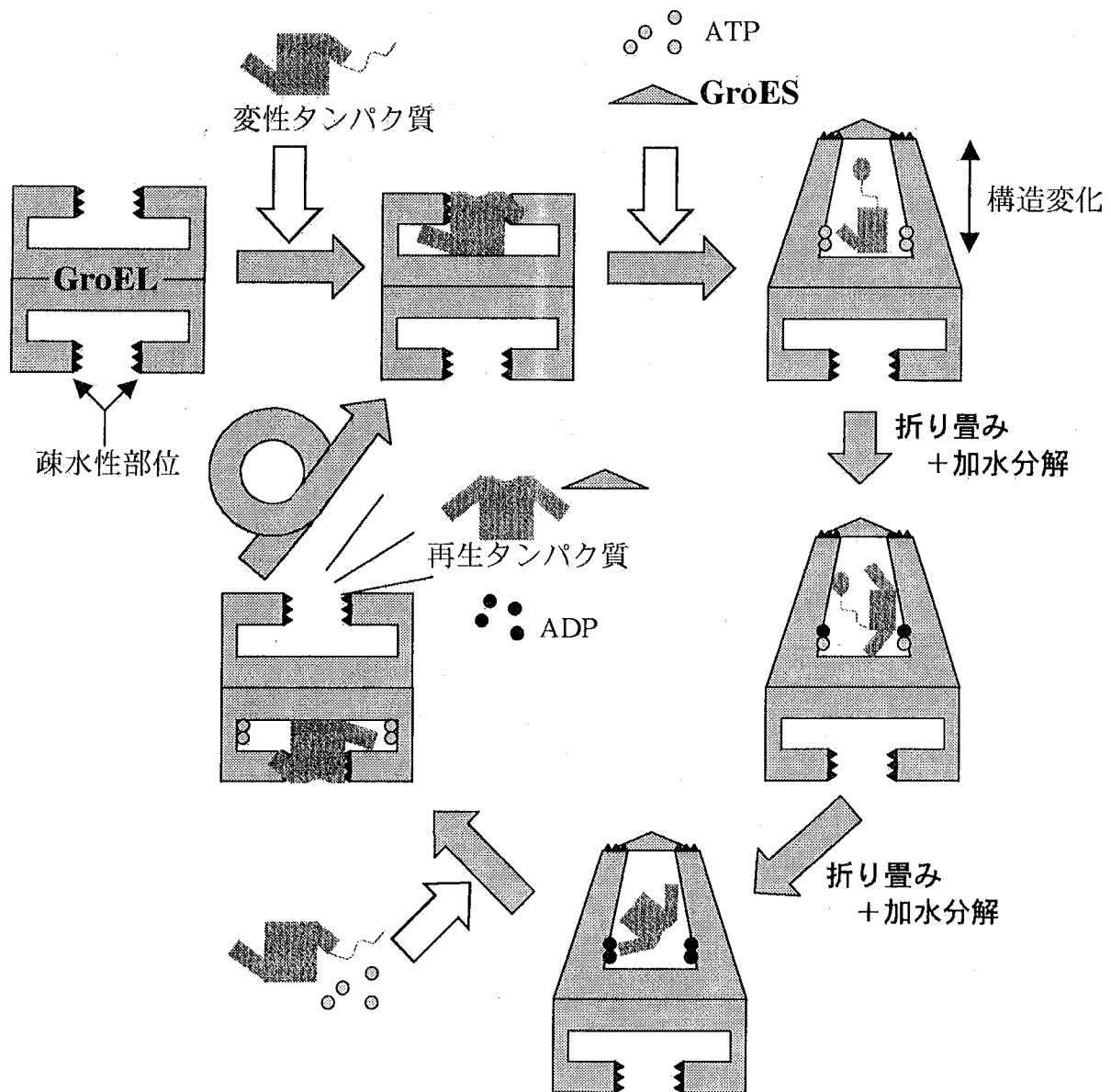


Fig5-1 GroEL-ES 複合体による変性タンパク質の再生サイクル (断面図)

GroEL-ES 複合体による変性タンパク質の再生サイクルを模式図で示した。変性タンパク質は GroEL の疎水性部位に結合する。GroES と ATP が結合し起こる構造変化と、疎水性部位が GroES に結合することが空洞内部を親水性に変化させる。ATP の加水分解が行われる約20秒間に折り畳み(refolding)が行われる。GroEL の逆側に ATP が結合し再生タンパク質が ADP, GroES とともに解離する。上下が反転し逆側で同じ反応が繰り返される。

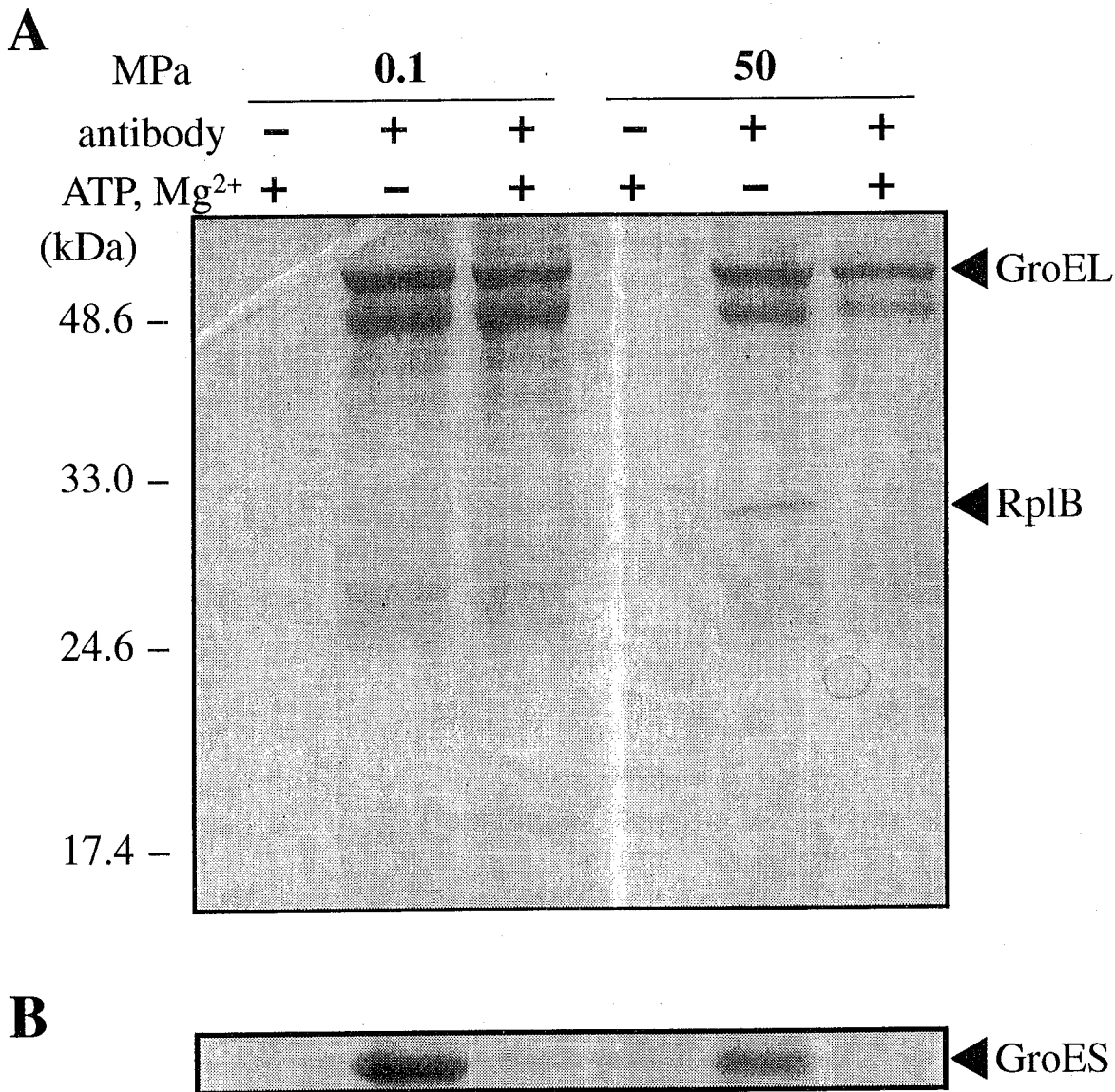


Fig.5-2 anti-GroEL 抗体を用いた免疫沈降の結果

各圧力環境下で生育させた菌体から全タンパク質を回収し、anti-GroEL 抗体を用いて免疫沈降を行った。コントロールとして抗体を加えないもの、ATP, Mg²⁺を加えたものを用いた。

A) 各サンプルを SDS-PAGE によって分離し、CBB 染色を行った。

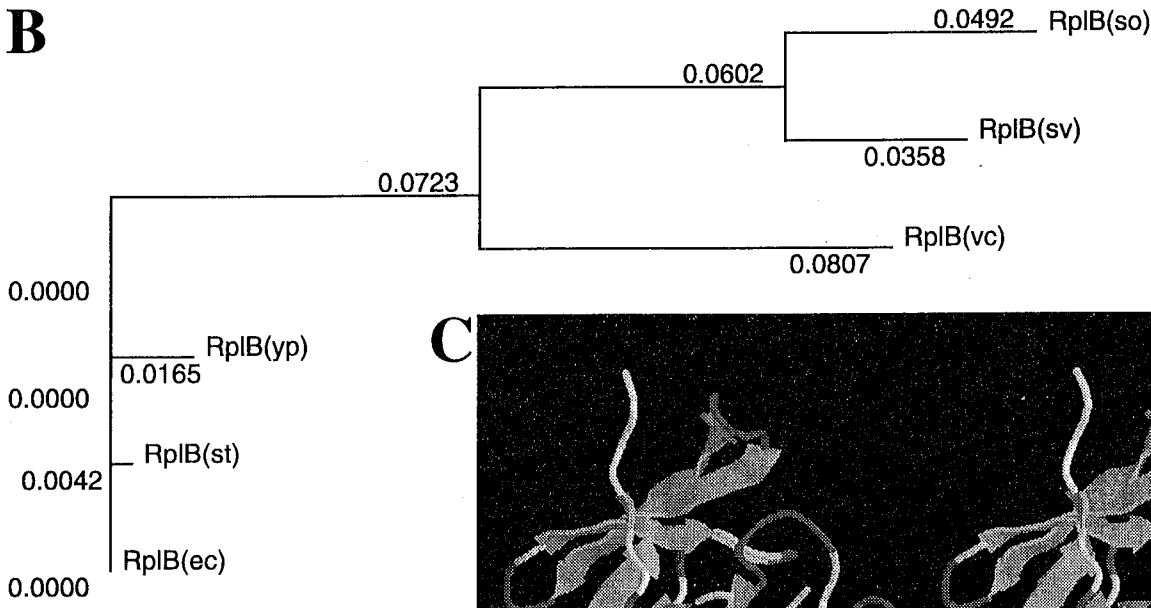
B) 同サンプルについて anti-GroES 抗体によりウェスタンブロット解析を行った。

A

RplB(sv)	1	MAI	KCKPTS	GRARH	VKWNKD	LHKGKP	PALE	AKSK	GGRRNH	GRIT	VAH	GGGHKO	VAI	DFKR	KDG	IPAK	ERLEYDPNR	SAI	IALVLY	ADGE	100		
RplB(ec)	1	MAV	KCKPTS	GRARH	VKWNPE	LHKGKP	PALE	AKSK	GGRRNH	GRIT	VAH	GGGHKO	VAI	DFKR	KDG	IPAV	ERLEYDPNR	SAI	IALVLY	ADGE	100		
RplB(so)	1	MAI	KCKPTS	GRARH	VKWNSD	LHKGKP	PALE	AKSK	GGRRNH	GRIT	VAH	GGGHKO	VAI	DFKR	KDG	IPAK	ERLEYDPNR	SAI	IALVLY	ADGE	100		
RplB(vc)	1	MAI	KCKPTS	GRARH	VKWNAD	LHKGKP	PALE	AKSK	GGRRNH	GRIT	VAH	GGGHKO	VAI	DFKR	KDG	IPAK	ERLEYDPNR	SAI	IALVLY	ADGE	100		
RplB(st)	1	MAV	KCKPTS	GRARH	VKWNPE	LHKGKP	PALE	AKSK	GGRRNH	GRIT	VAH	GGGHKO	VAI	DFKR	KDG	IPAV	ERLEYDPNR	SAI	IALVLY	ADGE	100		
RplB(y)	1	MAI	KCKPTS	GRARH	VKWNPE	LHKGKPY	PALE	AKSK	GGRRNH	GRIT	VAH	GGGHKO	VAI	DFKR	KDG	IPAV	ERLEYDPNR	SAI	IALVLY	ADGE	100		
RplB(sv)	101	PAV	IAH	GGHGGK	IQSGI	PAE	IKVSNK	PS	RIPI	SSV	HAVE	PKGGI	ARSAGT	QI	WARDG	ATL	LRS	GENAK	PV	QAT	GEV	200	
RplB(ec)	101	PAV	IAH	GGHGGK	IQSGI	PAE	IKVSNK	PS	RIPI	SSV	HAVE	PKGGI	ARSAGT	QI	WARDG	ATL	LRS	GENAK	VEA	QAT	GEV	200	
RplB(so)	101	PAV	IAH	GGHGGK	IQSGI	PAE	IKVSNK	PS	RIPI	SSV	HAVE	PKGGI	ARSAGT	QI	WARDG	ATL	LRS	GENAK	PV	QAT	GEV	200	
RplB(vc)	101	PAV	IAH	GGHGGK	IQSGI	PAE	IKVSNK	PS	RIPI	SSV	HAVE	PKGGI	ARSAGT	QI	WARDG	ATL	LRS	GENAK	L	SEG	QAT	200	
RplB(st)	101	PAV	IAH	GGHGGK	IQSGI	PAE	IKVSNK	PS	RIPI	SSV	HAVE	PKGGI	ARSAGT	QI	WARDG	ATL	LRS	GENAK	VEA	QAT	GEV	200	
RplB(y)	101	PAV	IAH	GGHGGK	IQSGI	PAE	IKVSNK	PS	RIPI	SSV	HAVE	PKGGI	ARSAGT	QI	WARDG	ATL	LRS	GENAK	Q	QAT	GEV	200	
RplB(sv)	201	MLR	L	GKAGR	ARAGI	RPT	WAGT	IN	PVDH	PHGG	EGR	NF	SKH	PW	PLNG	Q	TKG	K	STR	NK	ATD	K	275
RplB(ec)	201	MLV	L	GKAGR	ARAGI	RPT	WAGT	IN	PVDH	PHGG	EGR	NF	SKH	PW	PLNG	Q	TKG	K	STR	NK	ATD	K	273
RplB(so)	201	MLR	L	GKAGR	ARAGI	RPT	WAGT	IN	PVDH	PHGG	EGR	NF	SKH	PW	PLNG	Q	TKG	K	STR	NK	ATD	K	274
RplB(vc)	201	MLR	L	GKAGR	ARAGI	RPT	WAGT	IN	PVDH	PHGG	EGR	NF	SKH	PW	PLNG	Q	TKG	K	STR	NK	ATD	K	274
RplB(st)	201	MLV	L	GKAGR	ARAGI	RPT	WAGT	IN	PVDH	PHGG	EGR	NF	SKH	PW	PLNG	Q	TKG	K	STR	NK	ATD	K	273
RplB(y)	201	MLV	L	GKAGR	ARAGI	RPT	WAGT	IN	PVDH	PHGG	EGR	NF	SKH	PW	PLNG	Q	TKG	K	STR	NK	ATD	K	274

▬ Ribosomal_L2
 ▨ Ribosomal_L2_C

B



C

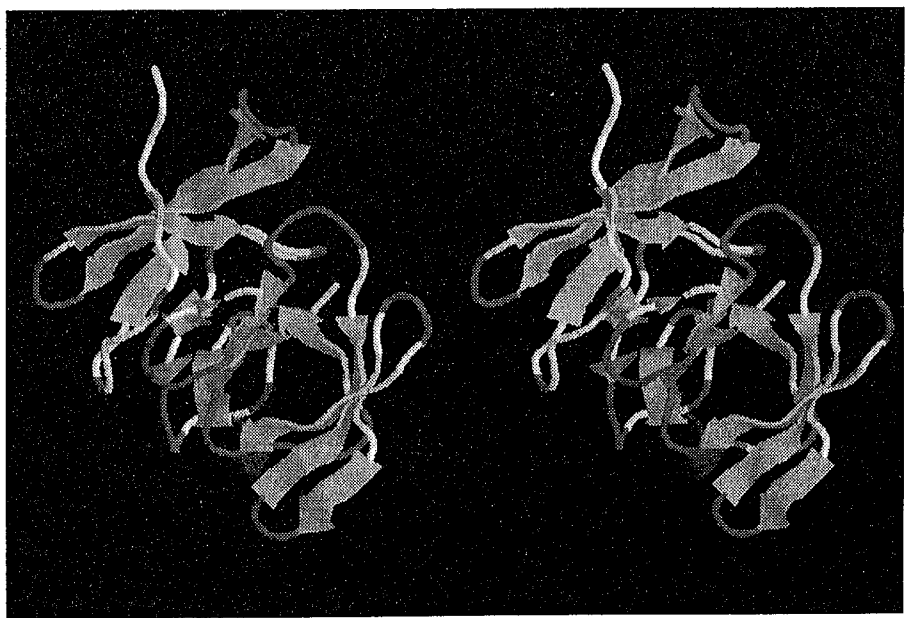


Fig.5-3 RplB タンパク質のアミノ酸配列における多重整列と系統樹解析

Shewanella violacea (sv) と、これまでに決定されている *Escherichia coli* (ec), *Shewanella oneidensis* (so), *Vibrio cholerae* (vc), *Salmonella typhimurium* (st), *Yersinia pestis* (yp) とのアミノ酸配列比較した。多重整列の結果をおよび報告されている domain を A に、系統樹解析の結果を B に示した。C に RplB タンパク質の構造予測結果を示した。

第6章 総括

高圧環境に対する生物の適応機構や、圧力が生物に与える影響についての研究はその端緒についたばかりであり、生理学的、特に遺伝的な知見については、研究を進めていく上で十分とは言い難い状況である。また、実験手法に関しても深海環境条件の再現や、高圧環境下での操作を進めることが困難であり、実験装置の開発など基礎的な研究を進めていかなければならない状況であるといえる。そうしたなかで、*Escherichia coli* において圧力がヒートショック関連遺伝子の発現を制御している可能性を示唆する報告がされ、高圧環境への適応機構にヒートショック関連遺伝子が関わっていることが考えられた。では、高圧環境に至適を持つ好圧性細菌において、ヒートショック関連遺伝子はどのような制御を受けているのであろうか。シャペロンを代表とする HSPs は高圧環境下での生育にどのような関わりを持っているのであろうか。こうした疑問に答えるべく本研究では圧力が *E. coli* に代表される微生物へ与える影響の知見を基盤として、好圧性細菌においても圧力をストレスとしてとらえ、ストレス応答の観点から高圧環境に対する適応機構について解析を行うこととした。そこで好圧性細菌 *Shewanella. violacea* DSS12 株をモデルとし、ヒートショック関連遺伝子をクローニングするとともに、高圧環境下におけるそれぞれの遺伝子の発現解析を行った。

ヒートショック関連遺伝子からは転写を制御する σ ファクター RpoH (σ^{32}) と代表的な HSPs (heat shock proteins) であるシャペロンをコードする *groEL*, *groES* および *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*、新生ペプチドに結合する Trigger factor をコードする *tig* さらに代表的な HSPs プロテアーゼをコードする *lon* のクローニングを行った。その結果、*clpP*, *clpX*, *hupB*, *ppiD* を加えた 11 種類のヒートショック関連遺伝子をクローニングした。データベース解析の結果、*S. violacea* においてもヒートショック関連遺伝子は比較的高度に保存されていることが明らかとなった。また他細菌の HSPs との比較から *S. violacea* でのみ見られるアミノ酸置換も存在したものの、全体的にはその保存性が示され、好冷性、好圧性といった性質に関する特徴的な配列上の知見は得られなかった。今後、他の好圧性細菌での知見の蓄積が望まれる。

高圧環境下においてこれらのヒートショック関連遺伝子の発現解析を行った

結果、*E. coli* においては *rpoH* を含めヒートショック関連遺伝子の転写産物量が高圧環境になるにしたがって減少するのに対し、*S. violacea* においては高圧環境になるにしたがって増加していることが明らかとなった。さらに、発現量の解析では *E. coli* においては一定の発現量であったのに対し、*S. violacea* においては高圧環境に応じて発現量も顕著に増加していることが明らかとなった。生育曲線からは至適とされた 30 MPa の環境下においても *S. violacea* のヒートショック関連遺伝子は応答していることが示され、生育至適環境においてもストレスタンパク質の発現が確認された。ヒートショック関連遺伝子はネガティブ・フィードバックにより、必要性に応じて転写産物量、発現量が制御されていることが知られており、このことから *S. violacea* において高圧環境に応じて HSPs の要求量が増加している可能性が考えられた。これは高圧環境下において変性タンパク質が増加し、変性タンパク質を標的とするシャペロンなどの HSPs がより必要とされることを示唆していると考えられた。また *E. coli* において以前に報告されていたヒートショック関連遺伝子の高圧環境下における応答と本稿における高圧環境下での応答とに違いが見られた。以前の報告では比較的短時間、高圧環境下に曝すのに対し、本稿では高圧環境下で生育を可能とする適応機構の解明を目的としており生育をともなう十分な時間高圧環境下に曝した。以前に報告されていた応答との相違はこうした圧力に曝す時間の長さにより原因があり、ストレス応答を論じる際にストレスに曝す時間の重要性を改めて認識させる結果であった。今後はこの結果を踏まえ、短時間のストレスに対する応答の比較解析や、時間軸にそった応答の解析も求められる。そのためには、短時間で加圧、脱圧ができるような装置の開発が必要であろう。

E. coli においてヒートショック関連遺伝子は RpoH によってその転写が制御されている。本研究で行われたプライマーエクステンションによって *S. violacea* のヒートショック関連遺伝子も同様に RpoH によって転写が制御され、高圧環境になるにしたがって増加する転写産物量が、少なくとも一部は RpoH によって制御されている証拠が示された。また、数種のヒートショック関連遺伝子の上流にあるプロモーターの解析から *S. violacea* における RpoH の認識するコンセンサス配列を定義した。一方、上流に RpoH の認識配列を持たないが高圧環境になるにしたがって転写産物量が増加する転写開始点も見いだされ RpoH 以外の σ ファクターや転写制御因子が高圧環境に応じた転写を制御している可能

性が示唆された。

これらの結果から好圧性細菌においてもヒートショック関連遺伝子が高圧環境下で何らかの役割を担っていることが強く示唆された。ヒートショック関連遺伝子は特に細胞内で変性したタンパク質に応答しており、このことから高圧環境下での発現誘導は圧力によって生じた変性タンパク質に由来することが考えられた。anti-GroEL 抗体を用いた免疫沈降の結果から、高圧環境下で GroEL とともに共沈してくるタンパク質が顕著に検出された。このタンパク質は N 末端アミノ酸配列決定の結果、リボソームのサブユニット RplB (Ribosomal protein L2) であると同定された。この RplB が高圧環境下で変性しているのかどうかは定かではないが、変性タンパク質として GroEL-ES 複合体の空洞内に取り込まれている可能性が強く示唆された。リボソームは細胞内に非常に多量に存在するタンパク質であり、高圧環境下でのヒートショック関連遺伝子の発現誘導は RplB を中心としたリボソームを修復するために HSPs の必要性が増している可能性が考えられる。リボソームは高圧環境下でサブユニットの解離が起こることが知られており、様々なストレスに対して細胞内センサーとして働く可能性も示唆されていることから、高圧環境下でのリボソームの働きに関して検討が必要であると考えられる。さらに今後、ヒートショック関連遺伝子に関して *S. violacea* において遺伝子の破壊や相補によって高圧環境下での役割を解析することを試みるべきであろう。しかし、深海微生物では安定なベクター系や形質転換方法が確立されておらず *S. violacea* においてもそういった遺伝学的手法が利用できる基盤研究の重要性が再認識される。

以上、本稿によって深海由来好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株の高圧環境下におけるヒートショック関連遺伝子の特徴的な発現誘導が明らかとされた。さらに 50 MPa 程度の圧力環境下においても *in vivo* ではリボソームの構成要素を中心としたタンパク質に変性作用がある可能性が示唆され、リボソームが圧力センサーとして HSPs の発現誘導を引き起こす可能性を提唱した。今後、主に超高圧で検討されてきたタンパク質の変性作用を生物が生存可能な比較的小さな圧力下でも検討することが望まれる。また、今後は今回用いた好圧性細菌以外にも大気圧で生育できない絶対好圧性細菌も単離されており、それらも合わせたより詳細な研究の発展が望まれる。

A	Gene	Fowerd primer	Reverse primer
	<i>groEL</i> sv	cqccgatcgtcgttaaagctatg	catgccqcccattgccaccc
	<i>dnaK</i> sv	ctgtctctgggtatcgaaccatg	ttcaaattcagcgtcgacaacatc
	<i>rpoH</i> sv	ggaaggtaacatcggcctgatg	cacggggccaccatttcgacttc
	<i>grpE</i> sv	gagcttacccaagccaatttccg	gagacaccatcaccatagcagg
	<i>lon</i> sv	gatgtgggtggtttatccgcacatg	gtactcacgctgggatttctccat
	<i>tig</i> sv	aaaggtaccacgctgaaaactta	ggtctgttattagcggaagttatc

B	Gene	Fowerd primer	Reverse primer
	<i>groEL</i> ec	atggcagctaaagacgtaaaattcggtaac	aagcttggtgcaaggcaattacatcatgcc
	<i>groES</i> ec	atgaatattcgtccattgcatgatcgcgtg	aagcttgccgattacgcttcaacaattgcc
	<i>dnaK</i> ec	cacaaccacatgatgaccga	cccttcgcccgtgtcagtat
	<i>dnaJ</i> ec	cctctccgcccgtgcattca	ttggggagggttagcgggtca
	<i>grpE</i> ec	aagttagcagatgaatgcg	gcgcgagagtgtggcggagt
	<i>rpoH</i> ec	gttgctaccactgaagcgcc	ccccggacttcatccaggg
	<i>groEL</i> sv	atggcagctaaagaagtattatttgg	aagcttacatcatgccgcccatacc
	<i>groES</i> sv	atgaacattcgtccattacatgacc	aagcttagctcactacagccattag
	<i>dnaK</i> sv	gcgtgagaatatgtcaaagcgagattacta	ctatcggcaatgcggggctttatcaactaa
	<i>dnaJ</i> sv	gatttcaggagcaccocatgggcagaatta	cgcccgtattcaataattcaggggttagcc
	<i>grpE</i> sv	tqcccagagcatgcagaaac	caaggcttaaggttqgaagt
	<i>rpoH</i> sv	qccagtqctatattctgtct	tctctttgaatctqgtqagc

C	Gene	Fowerd primer for template	Reverse 5'-biotinyl primer
	<i>rpoH</i> sv	gactacaggccgtgg	cgcttagccaactcatggttctgcttggc
	<i>grpE</i> sv	tatctcatcaccggg	ttcatcagtgcttgtcacagcttcatcggc
	<i>groE</i> sv	tccactaagtggcgc	gtacttcaccgcgagtcgattgctcggc
	<i>dna</i> sv	ggatctcccttgtcc	tagaaggggtcgtacgatcgccttcggc

実験に使用したプライマーリスト

- A) ヒートショック関連遺伝子の Cloning の際に Southern Blotting 解析およびコロニーハイブリダイゼーションに用いたプローブを増幅、DIG 標識したプライマーを示した。
- B) Northern Blotting 解析に用いたプローブを増幅、DIG 標識したプライマーを示した。
- C) Primer Extinction 法およびラダーの作成に使用したプライマーを示した。

参考文献リスト

- Abe, F., C. Kato, et al. (1999). "Pressure-regulated metabolism in microorganisms." Trends Microbiol **7**(11): 447-53.
- Aertsen, A., K. Vanoirbeek, et al. (2004). "Heat shock protein-mediated resistance to high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*." Appl Environ Microbiol **70**(5): 2660-6.
- Alix, J. H. and K. H. Nierhaus (2003). "DnaK-facilitated ribosome assembly in *Escherichia coli* revisited." Rna **9**(7): 787-93.
- Allen, E. E., D. Facciotti, et al. (1999). "Monounsaturated but not polyunsaturated fatty acids are required for growth of the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9 at high pressure and low temperature." Appl Environ Microbiol **65**(4): 1710-20.
- Anfinsen, C. B. (1973). "Principles that govern the folding of protein chains." Science **181**(96): 223-30.
- Arsene, F., T. Tomoyasu, et al. (2000). "The heat shock response of *Escherichia coli*." Int J Food Microbiol **55**(1-3): 3-9.
- Ben-Zvi, A. P. and P. Goloubinoff (2001). "Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones." J Struct Biol **135**(2): 84-93.
- Bradford, H. F., E. K. Brownlow, et al. (1966). "The distribution of cation-stimulated adenosine triphosphatase in subcellular fractions from bovine cerebral cortex." J Neurochem **13**(12): 1283-97.
- Bukau, B. (1993). "Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response." Mol Microbiol **9**(4): 671-80.
- Bukau, B. and A. L. Horwich (1998). "The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines." Cell **92**(3): 351-66.
- Campbell, E. A., O. Muzzin, et al. (2002). "Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit." Mol Cell **9**(3): 527-39.
- Confalonieri, F. and M. Duguet (1995). "A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function." Bioessays **17**(7): 639-50.

- Cowing, D. W., J. C. Bardwell, et al. (1985). "Consensus sequence for *Escherichia coli* heat shock gene promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(9): 2679-83.
- Craig, E. A. and C. A. Gross (1991). "Is hsp70 the cellular thermometer?" Trends Biochem Sci **16**(4): 135-40.
- Csermely, P., Y. Miyata, et al. (1997). "Binding affinity of proteins to hsp90 correlates with both hydrophobicity and positive charges. A surface plasmon resonance study." Life Sci **61**(4): 411-8.
- Dartigalongue, C. and S. Raina (1998). "A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*." Embo J **17**(14): 3968-80.
- DeLong, E. F. and A. A. Yayanos (1985). "Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure." Science **228**(4703): 1101-3.
- Deming, J. W., Somers, L. K., Straube, W. L., Swartz, D. G. and MacDonell, M. T. (1988). "Isolation of an obligately barophilic bacterium and description of a new genus, *colwellia* gen. nov." Syst. Appl. Microbiol. **10**: 152-160.
- Deuerling, E., H. Patzelt, et al. (2003). "Trigger Factor and DnaK possess overlapping substrate pools and binding specificities." Mol Microbiol **47**(5): 1317-28.
- Diedrich, G., C. M. Spahn, et al. (2000). "Ribosomal protein L2 is involved in the association of the ribosomal subunits, tRNA binding to A and P sites and peptidyl transfer." Embo J **19**(19): 5241-50.
- El Hage, A., M. Sbai, et al. (2001). "The chaperonin GroEL and other heat-shock proteins, besides DnaK, participate in ribosome biogenesis in *Escherichia coli*." Mol Gen Genet **264**(6): 796-808.
- Ellis, J. (1987). "Proteins as molecular chaperones." Nature **328**(6129): 378-9.
- Fayet, O., T. Ziegelhoffer, et al. (1989). "The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures." J Bacteriol **171**(3): 1379-85.
- Gething, M. J. and J. Sambrook (1992). "Protein folding in the cell." Nature **355**(6355): 33-45.
- Goto, U. (1997). "シャペロニンGroELによるタンパク質のフォールディング" 細胞工学 **16**(9): 1250-1257.

- Gottesman, S., W. P. Clark, et al. (1993). "ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence and *in vivo* activities." J Biol Chem **268**(30): 22618-26.
- Gould, G. W. (2000). "Preservation: past, present and future." Br Med Bull **56**(1): 84-96.
- Graumann, P. and M. A. Marahiel (1996). "Some like it cold: response of microorganisms to cold shock." Arch Microbiol **166**(5): 293-300.
- Gross, M. and R. Jaenicke (1994). "Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes." Eur J Biochem **221**(2): 617-30.
- Hartl, F. U. (1996). "Molecular chaperones in cellular protein folding." Nature **381**(6583): 571-9.
- Hendrick, J. P., T. Langer, et al. (1993). "Control of folding and membrane translocation by binding of the chaperone DnaJ to nascent polypeptides." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(21): 10216-20.
- Hiratsu, K., M. Amemura, et al. (1995). "The *rpoE* gene of *Escherichia coli*, which encodes σ^E , is essential for bacterial growth at high temperature." J Bacteriol **177**(10): 2918-22.
- Houry, W. A., D. Frishman, et al. (1999). "Identification of *in vivo* substrates of the chaperonin GroEL." Nature **402**(6758): 147-54.
- Hummer, G., S. Garde, et al. (1998). "The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(4): 1552-5.
- Ikegami, A., K. Nakasone, et al. (2000). "Cloning and characterization of the gene encoding RNA polymerase sigma factor sigma (54) of deep-sea piezophilic *Shewanella violacea*." Biochim Biophys Acta **1491**(1-3): 315-20.
- Ikegami, A., K. Nakasone, et al. (2000). "Glutamine synthetase gene expression at elevated hydrostatic pressure in a deep-sea piezophilic *Shewanella violacea*." FEMS Microbiol Lett **192**(1): 91-5.
- Ishii, A., K. Nakasone, et al. (2002). "Isolation and characterization of the *dcw* cluster from the piezophilic deep-sea bacterium *Shewanella violacea*." J Biochem (Tokyo) **132**(2): 183-8.

- Ishii, A., T. Oshima, et al. (2004). "Analysis of hydrostatic pressure effects on transcription in *Escherichia coli* by DNA microarray procedure." Extremophiles.
- Jannasch, H. W. and C. D. Taylor (1984). "Deep-sea microbiology." Annu Rev Microbiol **38**: 487-514.
- Kallipolitis, B. H. and P. Valentin-Hansen (1998). "Transcription of *rpoH*, encoding the *Escherichia coli* heat-shock regulator σ^{32} , is negatively controlled by the cAMP-CRP/CytR nucleoprotein complex." Mol Microbiol **29**(4): 1091-9.
- Kato, C., Li, L., Tamaoka, J. and Horikoshi, K. (1997). "Molecular analysis of the sediment of the 11,000-m deep Mariana Trench." Extremophiles **1**: 117-123.
- Kato, C., Sato, T. and Horikoshi, K. (1995). "Isolation and properties of barophilic and barotolerant bacteria from deep-sea mud samples." Biodiv. **4**: 1-9.
- Kato, C., M. Smorawska, et al. (1996). "Analysis of a pressure-regulated operon from the barophilic bacterium strain DB6705." Biosci Biotechnol Biochem **60**(1): 166-8.
- Kawano, H., K. Nakasone, et al. (2004). "Differential pressure resistance in the activity of RNA polymerase isolated from *Shewanella violacea* and *Escherichia coli*." Extremophiles **8**(5): 367-75.
- Kawano, H., Y. Suzaki, et al. (2004). "Cloning and overproduction of the *rpoZ* gene encoding an RNA polymerase omega subunit from a deep-sea piezophilic *Shewanella violacea* strain DSS12." DNA Seq **15**(2): 118-22.
- Kelley, W. L. (1998). "The J-domain family and the recruitment of chaperone power." Trends Biochem Sci **23**(6): 222-7.
- Kitahara, R., S. Sareth, et al. (2000). "High pressure NMR reveals active-site hinge motion of folate-bound *Escherichia coli* dihydrofolate reductase." Biochemistry **39**(42): 12789-95.
- Kusukawa, N. and T. Yura (1988). "Heat shock protein GroE of *Escherichia coli*: key protective roles against thermal stress." Genes Dev **2**(7): 874-82.
- La Terza, A., G. Papa, et al. (2001). "Divergence between two Antarctic species of the ciliate Euplotes, *E. focardii* and *E. nobilii*, in the expression of heat-shock protein 70 genes." Mol Ecol **10**(4): 1061-7.
- Laemmli, U. K., F. Beguin, et al. (1970). "A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation." J Mol Biol **47**(1): 69-85.

- Lin, Z., F. P. Schwartz, et al. (1995). "The hydrophobic nature of GroEL-substrate binding." J Biol Chem **270**(3): 1011-4.
- Lipinska, B., J. King, et al. (1988). "Sequence analysis and transcriptional regulation of the *Escherichia coli* *grpE* gene, encoding a heat shock protein." Nucleic Acids Res **16**(15): 7545-62.
- Macdonald, A. G. (1984). "The effects of pressure on the molecular structure and physiological functions of cell membranes." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **304**(1118): 47-68.
- Marquis, R. E. (1976). "High-pressure microbial physiology." Adv Microb Physiol **14**(11): 159-241.
- Martinez-Yamout, M., G. B. Legge, et al. (2000). "Solution structure of the cysteine-rich domain of the *Escherichia coli* chaperone protein DnaJ." J Mol Biol **300**(4): 805-18.
- Miller, A. D., K. Maghlaoui, et al. (1993). "*Escherichia coli* chaperonins *cpn60* (*groEL*) and *cpn10* (*groES*) do not catalyse the refolding of mitochondrial malate dehydrogenase." Biochem J **291** (Pt 1): 139-44.
- Missiakas, D. and S. Raina (1998). "The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation." Mol Microbiol **28**(6): 1059-66.
- Miyata, Y. and I. Yahara (1992). "The 90-kDa heat shock protein, HSP90, binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity." J Biol Chem **267**(10): 7042-7.
- Morita, M., M. Kanemori, et al. (1999). "Heat-induced synthesis of σ^{32} in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of *rpoH* mRNA secondary structure." J Bacteriol **181**(2): 401-10.
- Morita, M. T., Y. Tanaka, et al. (1999). "Translational induction of heat shock transcription factor σ^{32} : evidence for a built-in RNA thermosensor." Genes Dev **13**(6): 655-65.
- Nagai, H., R. Yano, et al. (1990). "Transcriptional regulation of the heat shock regulatory gene *rpoH* in *Escherichia coli*: involvement of a novel catabolite-sensitive promoter." J Bacteriol **172**(5): 2710-5.
- Nagata, K. (1996). 中外医薬, ストレス蛋白質-基礎と臨床-.

- Nagata, K., M. Mori, et al. (2001). シュプリンガー・フェアラーク東京, 分子シャペロンによる細胞機能制御.
- Nakagawa, A., T. Nakashima, et al. (1999). "The three-dimensional structure of the RNA-binding domain of ribosomal protein L2; a protein at the peptidyl transferase center of the ribosome." Embo J **18**(6): 1459-67.
- Nakasone, K., A. Ikegami, et al. (2000). "Isolation and piezoresponse of the *rpoA* gene encoding the RNA polymerase alpha subunit from the deep-sea piezophilic bacterium *Shewanella violacea*." FEMS Microbiol Lett **193**(2): 261-8.
- Nakasone, K., M. Yamada, et al. (2001). "Piezoresponse of the *cyo*-operon coding for quinol oxidase subunits in a deep-sea piezophilic bacterium, *Shewanella violacea*." Biosci Biotechnol Biochem **65**(3): 690-3.
- Nogi, Y., S. Hosoya, et al. (2004). "*Colwellia piezophila* sp. nov., a novel piezophilic species from deep-sea sediments of the Japan Trench." Int J Syst Evol Microbiol **54**(Pt 5): 1627-31.
- Nogi, Y. and C. Kato (1999). "Taxonomic studies of extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench and description of *Moritella yayanosii* sp. nov., a new barophilic bacterial isolate." Extremophiles **3**(1): 71-7.
- Nogi, Y., C. Kato, et al. (1998). "*Moritella japonica* sp. nov., a novel barophilic bacterium isolated from a Japan Trench sediment." J Gen Appl Microbiol **44**(4): 289-295.
- Nogi, Y., C. Kato, et al. (1998). "Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov." Arch Microbiol **170**(5): 331-8.
- Nogi, Y., C. Kato, et al. (2002). "*Psychromonas kaikoeae* sp. nov., a novel from the deepest piezophilic bacterium cold-seep sediments in the Japan Trench." Int J Syst Evol Microbiol **52**(Pt 5): 1527-32.
- Nogi, Y., N. Masui, et al. (1998). "*Photobacterium profundum* sp. nov., a new, moderately barophilic bacterial species isolated from a deep-sea sediment." Extremophiles **2**(1): 1-7.
- Ohmae, E., K. Kubota, et al. (2004). "Pressure-dependent Activity of Dihydrofolate Reductase from a Deep-sea Bacterium *Shewanella violacea* Strain DSS12."
- Paladini, A. A., Jr. and G. Weber (1981). "Pressure-induced reversible dissociation of enolase." Biochemistry **20**(9): 2587-93.

- Parsell, D. A. and R. T. Sauer (1989). "Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in *Escherichia coli*: dependence on protein level not protein degradation." Genes Dev **3**(8): 1226-32.
- Pelham, H. R. (1986). "Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins." Cell **46**(7): 959-61.
- Piccard, J. a. D., R. S. (1961). "Seven Miles down." Putnum, New York.
- Ramirez-Santos, J., J. Collado-Vides, et al. (2001). "Conserved regulatory elements of the promoter sequence of the gene *rpoH* of enteric bacteria." Nucleic Acids Res **29**(2): 380-6.
- Romero, D. P., J. A. Arredondo, et al. (1990). "Identification of a region of *Escherichia coli* ribosomal protein L2 required for the assembly of L16 into the 50 S ribosomal subunit." J Biol Chem **265**(30): 18185-91.
- San Martin, M. F., G. V. Barbosa-Canovas, et al. (2002). "Food processing by high hydrostatic pressure." Crit Rev Food Sci Nutr **42**(6): 627-45.
- Schmid, G., H. D. Ludemann, et al. (1979). "Dissociation and aggregation of lactic dehydrogenase by high hydrostatic pressure." Eur J Biochem **97**(2): 407-13.
- Sigler, P. B., Z. Xu, et al. (1998). "Structure and function in GroEL-mediated protein folding." Annu Rev Biochem **67**: 581-608.
- Sinensky, M. (1974). "Homeoviscous adaptation--a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(2): 522-5.
- Straus, D., W. Walter, et al. (1990). "DnaK, DnaJ, and GrpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of σ^{32} ." Genes Dev **4**(12A): 2202-9.
- Straus, D. B., W. A. Walter, et al. (1987). "The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of σ^{32} ." Nature **329**(6137): 348-51.
- Tanaka, H., K. Yasuzawa, et al. (1995). "Role of HU proteins in forming and constraining supercoils of chromosomal DNA in *Escherichia coli*." Mol Gen Genet **248**(5): 518-26.
- Tanaka, N., T. Hiyama, et al. (1997). "Cloning, characterization and functional analysis of *groESL* operon from thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*." Biochim Biophys Acta **1343**(2): 335-48.

- Trent, J. D., J. Osipiuk, et al. (1990). "Acquired thermotolerance and heat shock in the extremely thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus* sp. strain B12." J Bacteriol **172**(3): 1478-84.
- VanBogelen, R. A. and F. C. Neidhardt (1990). "Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(15): 5589-93.
- Vasilyeva, O. V., K. B. Kolygo, et al. (2002). "Domain structure and ATP-induced conformational changes in *Escherichia coli* protease Lon revealed by limited proteolysis and autolysis." FEBS Lett **526**(1-3): 66-70.
- Vidugiris, G. J., J. L. Markley, et al. (1995). "Evidence for a molten globule-like transition state in protein folding from determination of activation volumes." Biochemistry **34**(15): 4909-12.
- Vigh, L., B. Maresca, et al. (1998). "Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes?" Trends Biochem Sci **23**(10): 369-74.
- Wada, M., Y. Kano, et al. (1988). "Construction and characterization of the deletion mutant of *hupA* and *hupB* genes in *Escherichia coli*." J Mol Biol **204**(3): 581-91.
- Wang, J. and D. C. Boisvert (2003). "Structural basis for GroEL-assisted protein folding from the crystal structure of (GroEL-KMgATP)₁₄ at 2.0Å resolution." J Mol Biol **327**(4): 843-55.
- Wang, J., J. A. Hartling, et al. (1997). "The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis." Cell **91**(4): 447-56.
- Wang, Q. P. and J. M. Kaguni (1989). "*dnaA* protein regulates transcriptions of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*." J Biol Chem **264**(13): 7338-44.
- Weber, G. and H. G. Drickamer (1983). "The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules." Q Rev Biophys **16**(1): 89-112.
- Welch, T. J., A. Farewell, et al. (1993). "Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure." J Bacteriol **175**(22): 7170-7.
- Wirsen, C. O., H. Q. Jannasch, et al. (1987). "Membrane lipids of a psychrophilic and barophilic deep-sea bacterium." Curr. Microbiol. **14**: 319-322.
- Wojtyra, U. A., G. Thibault, et al. (2003). "The N-terminal zinc binding domain of ClpX is a dimerization domain that modulates the chaperone function." J Biol Chem **278**(49): 48981-90.

- Yamamori, T. and T. Yura (1982). "Genetic control of heat-shock protein synthesis and its bearing on growth and thermal resistance in *Escherichia coli* K-12." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(3): 860-4.
- Yamauchi, S., H. Okuyama, et al. (2003). "Gene structure and transcriptional regulation specific to the *groESL* operon from the psychrophilic bacterium *Colwellia maris*." Arch Microbiol **180**(4): 272-8.
- Yayanos, A. A. (1995). "Microbiology to 10,500meters in the deep sea." Annu. Rev. Microbiol. **49**: 777-805.
- Yayanos, A. A., Dietsz, A. S. and Van Boxtel, R. (1979). "Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics." Science **205**: 808-810.
- Yayanos, A. A., A. S. Dietz, et al. (1981). "Obligately barophilic bacterium from the Mariana trench." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(8): 5212-5.
- Yoshida, T., M. Yohda, et al. (2003). "[Archael molecular chaperones: protein folding mechanism of the archael chaperonin]." Tanpakushitsu Kakusan Koso **48**(1): 33-9.
- Zobell, C. E. and A. B. Cobet (1962). "Growth, reproduction, and death rates of *Escherichia coli* at increased hydrostatic pressures." J Bacteriol **84**: 1228-36.
- Zobell, C. E. and A. B. Cobet (1964). "Filament Formation by *Escherichia Coli* at Increased Hydrostatic Pressures." J Bacteriol **87**: 710-9.
- Zobell, C. E. a. J., F. H. (1949). "The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria." J. Bacteriol. **57**: 179-189.

謝辞

本研究は独立行政法人海洋研究開発機構において、東京工業大学大学院生命情報専攻 客員教授でいらした加藤千明博士のもとで行ったものであり、深海微生物という大変新しく、興味深いテーマを与えていただいたこと、研究、論文作成等に関して懇切丁寧なご指導を賜りましたことに深く御礼申し上げます。また、東京工業大学大学院生命情報専攻では外部で研究するにあたり格別のご配慮をいただきましたこと、指導教官をお引き受けいただいた小島英里博士をはじめ関係者の皆様に深く感謝いたします。この研究に関する実験は海洋研究開発機構において行われたものであり、これを許可していただいた海洋研究開発機構・極限環境生物圏研究センター、センター長掘越弘毅博士に心から感謝申し上げます。さらに、同機構、海洋生態・環境研究プログラムにおきましては研修生として暖かく迎えてくださり、プロジェクトディレクター丸山正博士をはじめプログラムの皆様に深く感謝いたします。特に折りにふれ有益なご助言とご教示をいただきました佐藤孝子博士、能木祐一博士、近畿大学工学部助教授である仲宗根 薫博士に感謝いたします。

快く抗体を提供していただいた日本生物科学研究所 石浜明博士、国立遺伝学研究所 西村昭子博士および上原剛氏に感謝申し上げます。

さらに本稿は多くの研究員、技術員、学生の皆様の共同研究の成果であり、本論文作成に当たって快くデータの使用を許可していただいたことに感謝いたします。また日々の研究を共にし、様々なご協力を頂きました諸先輩、後輩諸氏にお礼申し上げます。特に、同室にて日々有益な助言を与えていただきました河野広朗研究員、庶務雑務を進んで助けてくれた桑原宏和氏にお礼申し上げます。

博士課程前期および後期 1 年の間ご指導賜りました故青野力三博士に深甚の謝意を表すとともにご冥福をお祈り申し上げます。

最後になりましたが、経済的、精神的にこれまで支えてきてくれた両親、家族に感謝の意を表し、この論文の結びとさせていただきたいと思います。