

学 位 論 文
Doctor's Thesis

論文題名 : 大腸菌における YibP タンパク質の機能解析
(Functional analysis of YibP protein in *Escherichia coli*)

著者名 : 市村 俊治
Ichimura Toshiharu

指導教官名 : 細胞複製学教授
氏 名 平賀 壯太 前教授

審査委員名 : 分子遺伝学担当教授 氏 名
微生物学担当教授 氏 名
組織制御学担当教授 氏 名
生化学第二学担当教授 氏 名

2 0 0 2 年 度

目次

| | |
|---|----|
| 要旨 | 3 |
| 発表論文リスト | 5 |
| 謝辞 | 6 |
| 略語一覧 | 7 |
| 研究の背景と目的 | 8 |
| 材料と実験方法 | 10 |
| 1. 菌株 | 10 |
| 2. プラスミド | 11 |
| 3. 培地 | 12 |
| 4. 蛍光-位相差顕微鏡観察法 | 12 |
| 5. 蛍光抗体顕微鏡観察法 | 12 |
| 6. <i>yibP</i> 破壊変異株の作製 | 13 |
| 7. YibP-His6 タンパク質を発現するプラスミドの作製 | 15 |
| 8. YibP-His6 タンパク質の細胞内局在性の解析 | 15 |
| 9. スフェロプラストの調製 | 16 |
| 10. YibP-His6 融合タンパク質の精製法 | 16 |
| 11. YibP-His6 融合タンパク質のプロテアーゼ活性の解析 | 17 |
| 12. トランスポゾンTn _{phoA} によるYibPタンパク質の局在 | 17 |
| 13. λファージ誘導 | 17 |
| 14. <i>yibP</i> 破壊変異株の高温感受性を抑制する変異の分析 | 18 |
| 15. <i>yibP</i> 破壊変異株の抑制変異を相補する遺伝子のクローニング ... | 18 |

| | |
|--|----|
| 実験結果 | 19 |
| 1. YibP タンパク質の構造 | 19 |
| 2. <i>yibP</i> 破壊変異株の特性 | 21 |
| 3. YibP-His6 タンパク質の細胞内局在 | 26 |
| 4. YibP-His6 タンパク質のプロテアーゼ活性 | 28 |
| 5. <i>yibP</i> 破壊変異株の高温感受性を抑制する サプレッサー変異の解析 | 30 |
| 6. YibP タンパク質とホモロジーを持ったタンパク質の検索 ... | 34 |
| 考察 | 37 |
| 結語 | 39 |
| 参考文献 | 40 |

要旨

大腸菌の機能未知なタンパク質 YibP タンパク質の機能を明らかにした。YibP タンパク質は 47.4 kDa で、2 つの長いコイルドコイル構造を持ち、その N 端に膜貫通シグナル、C 端の球状ドメインは M23/M37 ペプチダーゼファミリーとホモロジーを持つ。私は *yibP* 破壊変異株を分離し、その形質を解析した。*yibP* 破壊変異株は 37℃では生育できるが高温(42℃)では生育できない。*yibP* 破壊変異株では、42℃において細胞分裂と FtsZ リング形成が阻害され、細胞は多数の核様体を持つフィラメント状になり、最終的には溶菌する。この細胞分裂阻害は、SulA/SfiA タンパク質の SOS 誘導によるものではない。また、*yibP* 破壊変異株の高温感受性は 5%のグリシンベタインを含む高浸透圧培地では抑制される。親株と *yibP* 破壊変異株の薬剤に対する感受性を調べたが、リファンピシリン、ナリジクス酸、エチジウムブロマイド、メタンスルホン酸メチル、ラウリル硫酸ナトリウム等では両株間に感受性の差はみられなかった。YibP タンパク質は、ザルコシル法で分画した細胞質画分と内膜画分から回収されるが、外膜画分からは回収されなかった。スフェロプラストをプロテアーゼ K で処理しても YibP は分解されなかったので、YibP はペリプラズムではなく細胞質中に存在することが明らかになった。YibP-PhoA 融合タンパク質をコードするプラスミドをもつ株の解析から YibP タンパク質のコイルドコイル領域は細胞質に存在し、ペリプラズムには存在しない事を明らかにした。精製した YibP ヒスタグ融合タンパク質は、 β カゼインを分解するプロテアーゼ活性を持つことが明らかになった。*yibP* 破壊変異株の高温感受性を相補する 2 つの低温感受性株を分離し解析した結果、*fba* 遺伝子(フルクトース 1,6-二リン酸アルドラーゼ)と *rbfA* 遺伝子(30S リボソーム結合因子)の変異であった。

コンピューター検索によって、YibP タンパク質のペプチダーゼ M37 ホモロジー領域のホモログはグラム陰性菌プロテオバクテリアの γ サブディビジョンに属する種に広く分布することが明らかになった。

Summary

Escherichia coli YibP protein (47.4 kDa) has a membrane-spanning signal at the N-terminal region, two long coiled coil regions in the middle part, and a C-terminal globular domain, which involves homologous amino acid sequences to the peptidase M23/M37 family. A *yibP*-disrupted mutant grows in rich medium at 37°C, but not at 42°C. In the *yibP* null mutant, cell division and FtsZ ring formation are inhibited at 42°C without the SOS induction, resulting in filamentous cells with multinucleoids, and finally in cell lysis. Five percent of betaine(glycinebetaine) suppresses the temperature sensitivity of the *yibP*-disrupted mutation. The mutant has the same sensitivity to drugs, such as nalidixic acid, ethidium bromide, ethylmethane sulfonate, and sodium dodecyl sulphate, as the parental strain.

YibP protein is recovered in the inner membrane and cytoplasmic fractions, but not in the outer membrane fraction. Analysis of cells with plasmids encoding YibP-PhoA fusion proteins suggests that coiled coil regions and the C-terminal globular domain of YibP are localized in the cytoplasmic space, but not in the periplasmic space. Purified YibP has a protease activity that splits the substrate β -casein.

Two cold-sensitive mutations, which are located in *fba* (fructose-1,6-bisphosphate aldolase) and *rbfA* (a 30S ribosome binding factor), suppress the temperature sensitivity of the *yibP* disrupted mutation.

発表論文リスト

1. Ichimura, T., Yamazoe, M., Maeda, M., Wada, C. and Hiraga, S. Proteolytic activity of YibP protein in *Escherichia coli*. 2002 May 15; 184(10):2595-2602. Journal of Bacteriology.

2. Yamazoe, M., Onogi, T., Sunako, Y., Niki, H., Yamanaka, K., Ichimura, T. and Hiraga, S. Complex formation of MukB, MukE and MukF proteins involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. The EMBO Journal 1999 Nov 1;18(21):5873-5884.

謝辞

本研究は、熊本大学発牛医学研究センター細胞複製部門において、平賀壯太教授の指導のもとに行いました。研究その他の多面にわたりご指導いただき、深く感謝いたします。

また、熊本大学発牛医学研究センター細胞複製部門 小椋光教授、山中邦俊助手、同一ノ瀬千代女技官には、論文作成および日頃の研究において貴重なご指導、ご助言をいただきました。

さらに、熊本大学発牛医学研究センター細胞複製部門研究室の皆様には、常日頃からご助言、ご協力をいただきました。皆様に心より感謝いたします。

略語一覧

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

CBB: Coomassie Brilliant Blue

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid

IPTG: isopropyl-1-thio- β -galactopyranoside

PCR: polymerase chain reaction

Salkosyl: sodium lauryl sarcosinate

SDS-PAGE: sodium lauryl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

XP: 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate

アミノ酸の1文字表記

A=アラニン

E=グルタミン酸

Q=グルタミン

D=アスパラギン酸

N=アスパラギン

L=ロイシン

G=グリシン

K=リジン

S=セリン

V=バリン

R=アルギニン

T=トレオニン

P=プロリン

I=イソロイシン

M=メチオニン

F=フェニルアラニン

Y=チロシン

C=システイン

W=トリプトファン

H=ヒスチジン

研究の背景と目的

大腸菌は、1997年に Blattner 等によって全遺伝子の配列が決定された (Blattner *et al.*, 1997)が、全遺伝子の機能が明らかになったわけではない。大腸菌には 4407 の遺伝子が存在し、必須の遺伝子が 230、未必須でない遺伝子が 2373、機能が明らかになっていない遺伝子が 1804 ある (<http://shigen.lab.nig.ac.jp/ecoli/pec/>)。このように約半分の遺伝子の機能が未だ未知である。これらの遺伝子の機能を明らかにするために我々は、長いコイルドコイル構造を持つと予想されるタンパク質に注目した。コイルドコイル構造とは、2本の α ヘリックスが互いに巻きついた超らせん構造のことである。このコイルドコイル構造を持つタンパク質は様々な機能を有し、血液凝固で重要な役割を果たすフィブリノーゲン、いくつかの RNA 及び DNA 結合タンパク質、コレクチンとよばれる一群の細胞表面認識タンパク質、アクチン分子に結合するスペクトリンとジストロフィン、筋タンパク質のミオシンなどが知られている。

私は機能未知である長いコイルドコイル構造を持つタンパク質をコードする *yibP* 遺伝子に着目した。*yibP* 遺伝子の生理的機能はこれまで明らかになっていない。コンピュータ解析により、YibP タンパク質のアミノ酸配列は、N 端に 1 つの膜貫通部位、2 つの長いコイルドコイル領域、C 端に球状ドメインを持つことがわかった。また、YibP タンパク質の C 端の球状ドメインには、M23/M37 ファミリー (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getcc?PF01551>) との相同領域が存在していた。M23/M37 ファミリーは領域特異性の亜鉛の金属ペプチダーゼのファミリーである。M37 ファミリーは Gly-Gly エンドペプチダーゼであり (Sugai *et al.*, 1997)、M23 ファミリー [MEDLINE: 95405261] もエンドペプチダーゼである。M37 ファミリーには、大腸菌の NlpD タンパク質 (Ichikawa *et al.*, 1994, Lange *et al.*, 1994) などがあり、いくつかのバクテリアのリポタンパク質が知られている。ただし、NlpD 等のリポタンパク質ではプロテアーゼ活性はまだ知られていない。B-lytic エンドヌクレアーゼは、M23 ファミリーに属するバクテリアの金属ペプチダーゼである。グリシン結合である Gly-Gly+Xaa (Xaa はヒドロフォビックのアミノ酸) に特異性を持ち分解する。これらのエンドペプチダーゼは亜鉛を含有しているが、

金属結合リガンドの正確な位置は明らかではない。

本研究で、私は *yibP* 破壊変異株が 42°C でコロニー形成ができないことを明らかにし、42°C で *yibP* 破壊変異株の FtsZ リングが阻害されること、*yibP* 破壊変異株のその他の特性や YibP タンパク質の局在を明らかにした。また、精製した YibP タンパク質は β -カゼインを分解するタンパク分解活性を持つことを証明した。そして、YibP タンパク質は内膜に結合する新しいタイプのエンドペプチダーゼであると結論した。

材料と実験方法

1. 菌株

Table 1 に示した。使用した菌株は全て大腸菌 K-12 株由来である。

TABLE 1

| Strain | Relevant characteristics | Source or reference |
|-----------|---|---------------------------------|
| W3110 | wild-type | Laboratory strain |
| YK1100 | <i>trpC9941</i> | Yamanaka <i>et al.</i> , 1996 |
| MS8 | F' Δ <i>lacX74 strA araD139 Δ(<i>ara leu</i>)7697 <i>galU galK</i> <i>hsr⁻ hsm⁺ mhA::cat</i></i> | Ohmori <i>et al.</i> , 1995 |
| BL21(DE3) | F' <i>ompT hsdS</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>gal</i> with the λ phage DE3 lysogen containing the T7 RNA polymerase gene under the control of the <i>lacUV5</i> promoter | Studier <i>et al.</i> , 1990 |
| CC118 | Δ (<i>araABC-leu</i>)7679 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA20 galE galK thi</i> <i>rpsE rpoB argE</i> (Am) <i>recA1</i> | Manoil <i>et al.</i> , 1985 |
| CC202 | CC118/F42 <i>lacI3 zcf-2::TnphoA</i> | Manoil <i>et al.</i> , 1985 |
| DF264 | HfrC <i>pgk-2 relA1 pit-10 spoT1 tonA22 T2^r zgd-210::Tn10</i> | A. Nishimura |
| BD18 | HfrH <i>rpsL</i> Δ <i>cya-851</i> Δ <i>crp-96 thi zhd-732::Tn10</i> | MacLachlan <i>et al.</i> , 1985 |
| CH1524 | F' <i>trpA36 lysA xyl-4 ilvD130 argH1 zib-137::Tn10</i> | Lin <i>et al.</i> , 1983 |
| IT101 | YK1100 <i>rpsL</i> (Sm ^r) | This study |
| IT106 | IT101 <i>yibP::kan</i> | This study |
| IT107 | BL21 (DE3) harboring pETY | This study |
| IT110 | IT106 (DE3) | This study |
| IT201 | IT101 <i>yibP::kan cs-1</i> | This study |
| IT202 | IT101 <i>yibP⁺ cs-1</i> | This study |
| IT301 | IT101 <i>yibP::kan cs-13</i> | This study |
| IT302 | IT101 <i>yibP⁺ cs-13</i> | This study |
| IT401 | CC118 harboring pIT401 | This study |
| IT402 | CC118 harboring pIT402 | This study |
| IT601 | IT106 (λ) ⁺ | This study |

2. プラスミド

Table 2 に示した。

TABLE 2

| Plasmid | Relevant characteristics | Source or reference |
|------------------|---|--------------------------------------|
| pHSG396 | Cm ^r : cloning vector | Takara |
| pACYC177 | Km ^r : ColE1 cloning vector | Chang <i>et al.</i> , 1978 |
| pKH5002 | Ap ^r : <i>D ori rpsL</i> ⁺ | Ohmori <i>et al.</i> , 1995 |
| pHSG415s | Cm ^r : temperature-sensitive plasmid | Hashimoto-Gotho <i>et al.</i> , 1981 |
| pET21b | Ap ^r ; T7 promoter vector | Novagen |
| pACYC184 | Cm ^r Tc ^r ; ColE1 cloning vector | Chang, 1978 |
| pIT101 | Cm ^r : <i>yibP</i> cloned at <i>Bam</i> HI and <i>Kpn</i> I sites of pHSG396 | This study |
| pIT102 | Cm ^r Km ^r : <i>kan</i> cassette inserted at <i>Aor</i> 51HI sites of pIT101 | This study |
| pIT201 | Ap ^r Km ^r : <i>Bam</i> HI- <i>Kpn</i> I <i>yibP</i> :: <i>kan</i> segment inserted at <i>Bam</i> HI and <i>Kpn</i> I sites of pKH5002 | This study |
| pHSGY | Cm ^r : <i>yibP</i> fragment inserted at <i>Pst</i> I and <i>Sma</i> I sites of pHSG415s | This study |
| pETY | Ap ^r : <i>yibP</i> fragment inserted at <i>Nde</i> I and <i>Xho</i> I sites of pET21b | This study |
| pIT301 | Cm ^r : <i>epd-pgk-fba</i> fragment inserted at <i>Bam</i> HI site of pACYC184 | This study |
| pIT- <i>epd</i> | Cm ^r : pIT301 from which sequences to the <i>Pst</i> I sites were deleted | This study |
| pIT- <i>pgk</i> | Cm ^r : pIT301 from which sequences to the <i>Sma</i> I sites and <i>Pvu</i> I- <i>Nru</i> I sites were deleted | This study |
| pIT- <i>fba</i> | Cm ^r : pIT301 from which sequences to the <i>Sma</i> I sites were deleted | This study |
| pIT- <i>rbfA</i> | Cm ^r : <i>rbfA</i> fragment inserted at <i>Bam</i> HI site of pACYC184 | This study |
| pIT401 | Cm ^r : <i>TnphoA</i> inserted to <i>yibP</i> of pIT101 | This study |
| pIT402 | Cm ^r : <i>TnphoA</i> inserted to <i>yibP</i> of pIT101 | This study |

3. 培地

菌体の培養には、以下の培地を使用した。M9 グルコース培地 (0.2%グルコース) (Miller *et al.*, 1972)、使用前に L-トリプトファン (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加えて使用した。L 培地 : 1% Bact-tripton, 0.5% Bact-yeast extract, 0.5% NaCl.

4. 蛍光-位相差顕微鏡観察法

Hiraga *et al.*(1989)の方法に従い、L 培地で培養した細胞を遠心分離し、生理食塩水 (0.8%) で洗浄し、100~200 μl の生理食塩水に再び懸濁した。懸濁液を、ポリ-L-リジン(シグマ社)で処理したカバーガラスに滴下し乾燥後、100%メタノールで5分間固定し、ピーカー (500 ml) 内の水道水で洗浄し再び乾燥させた。生理食塩水で 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈した DAPI で細胞を染色し蛍光-位相差顕微鏡により観察した。

5. 蛍光抗体顕微鏡観察法

Hiraga *et al.*(1998)の方法に従い、対数増殖中の細胞を 80%メタノールで固定し、一次抗体にはウサギ抗 FtsZ ポリクローナル抗体 (Dr. Lawrence I. Rothfield) を 200 倍希釈し、二次抗体は Cy3 で標識されたヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (アマシャムファルマシアバイオテク社) 抗体を 500 倍希釈し使用した (Hiraga *et al.*, 1998)。他の大腸菌タンパク質との交差反応を防ぐため、二次抗体は YK1100 株の細胞抽出液で前処理した。

6. *yibP*破壊変異株の作製

*yibP*破壊変異株は以下の様に作製した (Fig. 1参照)。

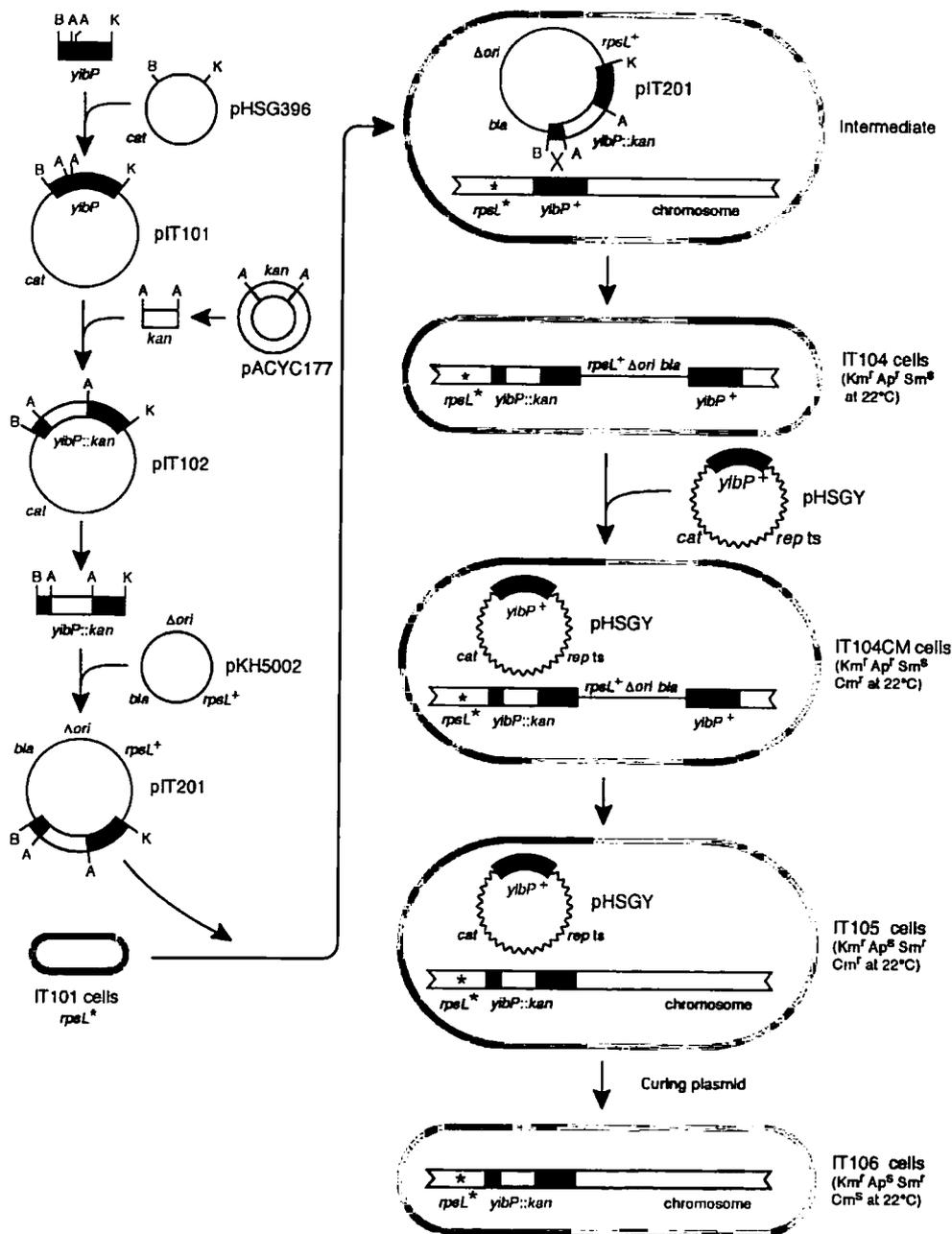


FIG. 1.

大腸菌の*yibP*破壊変異株の取得方法を示した。*rpsL**はストレプトマイシン耐性を与える*rpsL*遺伝子の変異である(野生型の対立遺伝子の方が変異型の対立遺伝子より優性である)。*repts*は、プラスミド複製の開始タンパク質をコードしている*rep*遺伝子の温度感受性変異を示している。*ori*はプラスミド複製の開始領域の欠失を示す。*bla*、*kan*、*cat*はそれぞれアンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコールの耐性を示す遺伝子。B、K、Aはそれぞれ制限酵素*Bam*HI、*Kpn*I、*Aor*51HIを示す。

yibP 遺伝子を含む染色体 DNA の一部 (3283 bp) を *Bam*HI および *Kpn*I 制限酵素切断部位を付加したプライマーを使用し PCR により増幅した。プライマーの塩基配列を以下に示す。

5'-CGCGGATCCTGGTCGTTACTACGCGATGGACCGCGATAA-3'

5'-CGGGGTACCAAACGCGGTCGCACCATCGCATTACGCGTA-3'

pHSG396 プラスミド (Takara 社) のクローニングサイト *Bam*HI-*Kpn*I 部位に増幅した *yibP* 遺伝子 *Bam*HI-*Kpn*I 断片を挿入し、そのプラスミドを pIT101 とした。pIT101 プラスミドを制限酵素 *Aor*51HI で切断し、その部位に pACYC177 プラスミド (Chang and Cohen, 1978) 由来のカナマイシン耐性遺伝子カセット (*Aor*51HI 断片, 1.4 kbp) を挿入した。作製したカナマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドを pIT102 とした。pIT102 プラスミドの *Bam*HI-*Kpn*I 部位を切り出して pKH5002 プラスミド (Ohmori *et al.*, 1995) の *Bam*HI-*Kpn*I 部位に挿入し pIT201 プラスミドを作製した。pIT201 プラスミドは、RNase H 破壊変異株 (MS8) においては増殖できる。作製したプラスミド pIT201 を IT101 株に導入して 22°C で培養し、アンピシリン (50 µg/ml) 耐性である IT102 株を得た。IT102 株を L 培地 (アンピシリン 50 µg/ml) で一晩培養したものをカナマイシン (30 µg/ml) およびストレプトマイシン (100 µg/ml) を含む L 培地に塗布し、得られた株を IT103 株とした。IT103 株からアンピシリン感受性のものを単離し IT104 株とした。

高温で増幅できない pHSG415s プラスミドの *Pst*I-*Sma*I 部位に pIT101 の *yibP* 遺伝子 *Pst*I-*Hinc*II 断片を挿入しプラスミド pHSGY を作製した。プラスミド pHSGY を IT104 株に導入し IT104CM 株とした。IT104CM 株からアンピシリン感受性株を単離し IT105 株とした。IT105 株を 42 °C で 1 時間増殖後 L 培地に塗布し 22 °C で培養した。プラスミド pHSGY を失うことによりクロラムフェニコール感受性となり、42 °C で増殖できない高温感受性 *yibP* 破壊変異株を IT106 株とした。*yibP* 破壊変異株であることは、PCR 法により確認した。

7. YibP-His6 タンパク質を発現するプラスミドの作製

W3110 株の染色体を抽出し、*yibP* 遺伝子を含む染色体 DNA の一部 (1283 bp) を *NdeI* および *XhoI* 制限酵素切断部位を付加したプライマーを使用し PCR により増幅した。プライマーの塩基配列を以下に示す。

5'-ATCCCTCCATATGAGGGGAAAGGCGATTAA-3'

5'-CCGCTCGAGTCTTCCCAACCACGGCTGTGG-3'

pET-21b プラスミド (Novagen 社) の *NdeI*-*XhoI* 部位に増幅した *yibP* 遺伝子 *NdeI*-*XhoI* 断片を挿入し、そのプラスミドを pETY とした。プラスミド pETY は YibP タンパク質の C 端に His6 を付加した YibP-His6 融合タンパク質をコードしており、その発現は IPTG (最終濃度 1 mM) により誘導できる。また、プラスミド pETY は、*yibP* 破壊変異株 IT106 の変異株である IT110 を IPTG (最終濃度 1 mM) の存在に関係なく高温感受性を相補する。

8. YibP-His6 タンパク質の細胞内局在性の解析

BL21(λ DE3)株に pETY を導入した IT107 株を アンピシリン(25 μ g/ml)を含む培地を用いて 37°C (OD600 = 0.18) で培養し、IPTG (最終濃度 1 mM) を添加しさらに 4 時間培養した。培養液から遠心分離 (5,000 \times g, 15 min) により菌体を回収し、緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0) で懸濁し超音波処理により破碎した。遠心分離後 (12,000 \times g, 10 min) さらに遠心分離 (157,000 \times g, 30 min) を行い、上清 (細胞質分画) と沈殿物 (膜分画) を得た。沈殿物は緩衝液 (20 mM リン酸バッファー, 1.2% Sarkosyl, pH 7.6) に懸濁し、遠心分離 (157,000 \times g, 30 min) を行った。得られた上清を内膜分画とし、沈殿物を緩衝液 (20 mM リン酸バッファー, 1.2% Sarkosyl, pH 7.6) に懸濁し外膜分画とした。各分画のタンパク量は 260 nm と 280 nm の吸光度を吸光度計により測定し算出した。それぞれの分画を SDS-PAGE、ウエスタブプロテイングを行い一次抗体に抗 Penta-His モノクローナル抗体 IgG1 (キアゲン社)、二次抗体にヤギ抗マウス IgG (アマシャムファルマシアバイオテ

ク社) を使用し、キット (NEN ライフサイエンス社) を用いて染色し解析した。

9. スフェロプラストの調製

Ito *et al.* (1977)の方法により、IT111 株からスフェロプラストを調整した。また、調整したスフェロプラストを Kihara *et al.* (1997)の方法によりプロテアーゼ K と反応させた。

10. YibP-His6 タンパク質の精製法

L 培地で IT107 株を 37°C で培養 (OD600 = 0.18) 後、IPTG を最終濃度 1 mM 添加し 4 時間培養した。上記で示したように細胞質画分、内膜画分、外膜画分を得た。内膜画分をニッケルキレートアフィニティーカラム (HiTrap Chelating HP 5 ml, アマシャムファルマシアバイオテク社) に添加し溶出 (20 mM リン酸バッファー, 500mM 塩化ナトリウム, 500mM イミダゾール, pH 7.6) した。得られた溶出画分を脱塩カラム (HiTrap Desalting 5 ml, アマシャムファルマシアバイオテク社) に添加し溶出 (20 mM リン酸バッファー, pH 7.6) した。得られた溶出画分を陽イオン交換カラム (HiTrap SP HP 1 ml, アマシャムファルマシアバイオテク社) に添加し塩化ナトリウムのグラジエント (0~500 mM) により精製した。さらに、得られた溶出画分をニッケルキレートアフィニティーカラム (HiTrap Chelating HP 5 ml, アマシャムファルマシアバイオテク社) に添加し、イミダゾールのグラジエント (0~300 mM) により精製した。得られた溶出画分は SDS-PAGE (15 % gel) 後、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色により確認した。

11. YibP-His6 融合タンパク質のプロテアーゼ活性の解析

精製した YibP-His6 融合タンパク質 (2 μg) を緩衝液 (最終濃度 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 5 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, 1 mM DTT) 中で β -カゼイン (2 μg) と全体量 15 μl 中で様々な時間で反応 (37°C) させた。反応後は SDS-PAGE (15 % gel) 後 CBB 染色により解析した。アミノ酸の N 端の決定は SDS-PAGE (15 % gel) 後 PVDF 膜にブロッキングしペプチドシーケンサー (Shimadzu PPSQ-23) により解析した。このアミノ酸の N 端の決定は依頼 (Dr Maki Maeda, Dr Chieco Wada, personal communication) し解析して頂いた。

12. トランスポゾン TnphoA による YibP タンパク質の局在性の解析

プラスミドを CC202 株に形質転換し、得られた形質転換体を 37°C で一晚培養後 L 培地 (カナマイシン 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, XP 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で培養しコロニーを得た。得られたコロニーからプラスミドを抽出し、CC118 株に形質転換した。この時、遺伝子産物は得られる形質転換体が青であればペリプラスム側に存在し、白であればペリプラスム側に存在する (Manoil *et al.*, 1985)。得られた形質転換体からプラスミドを抽出し、そのプラスミドの塩基配列を決定し *phoA* が挿入されている位置を明らかにした。塩基配列の決定は DNA シークエンサー (アプライドバイオシステム社 ABI PRISM 310) により決定した。

13. λ フェージ誘導

L 培地で IT601 を 30°C で培養後、42°C への温度シフトの効果をみるために 30 分間隔で 2.5 時間、培養液を採取し希釈後インディケイターである YK1100 と共にソフトアガー法により L 寒天培地に塗布した。プレートは 37°C で一晚培養し、プラーク数を数えた。また、UV の効果をみるために L 培地で IT601 を 30°C で培養後、UV (15 W, 50 cm, 5 min) を照射し L 培地で培養 (37°C) した。42°C への温度シフトのときと同様に 30 分間隔で 2.5 時間サンプリングし、ソフトアガー法により L 寒天培地に塗布し、37°C で一晚培養後プラーク

数を数えた。

14. *yibP* 破壊変異株の高温感受性を抑制する変異の分析

yibP 破壊変異株(IT106 株)を L 寒天培地 (1.5%) 上に塗布し、42°C で増殖する変異株を得る。得られた株 200 個の中から 22°C で生育できない低温感受性株を 2 株得た。それぞれを IT201、IT301 と命名した。

15. *yibP* 破壊変異株の抑制変異を相補する遺伝子のクローニング

pACYC184 の *Bam*HI 部位に *Sau*3AI で部分分解した C600 株の染色体断片を挿入したプラスミドライブラリーを作製した (Katoh *et al.*, 2001)。プラスミドライブラリーを IT201, IT301 に導入し、クロラムフェニコール (5 µg/ml) を添加した L 培地中で 22°C で生育でき 42°C で生育できないクローンのプラスミドを抽出し、挿入された遺伝子の塩基配列を DNA シークエンサー (ABI 社 370) により決定した。

実験結果

1. YibP タンパク質の構造

コンピュータ解析 (<http://shigen.lab.nig.ac.jp/ecoli/pec/>) により推定された YibP (427 アミノ酸、47.4 kDa) タンパク質のアミノ酸配列は N 端に膜貫通領域 (Pro22~Ala40)、中央部に 2 つの長いコイルドコイル領域 (<http://spock.genes.nig.ac.jp/~genome/gtop-j.html>)、C 端に球状ドメインを持っていることが確認された (Fig. 2A, B)。さらに、コンピュータ解析 (<http://www.ch.embnet.org/GeneratedItems/EPScript.js>) により N 端の膜貫通部位はペリプラスムに局在し、C 端は細胞質に局在すると推定された。342 ~ 424 のアミノ酸領域はペプチダーゼ M37 ファミリー (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF01551>) とホモロジーがあった (Sugai *et al.*, 1997)。YibP タンパク質には亜鉛結合領域 (考察参照) や DNA 結合配列 (Houten *et al.*, 1990, Walker *et al.*, 1996) はみられなかった。これらのコンピュータ解析結果に基づき YibP タンパク質のモデルを推定した (Fig. 2C)。YibP タンパク質は長さの異なる 2 つのコイルドコイル領域をもっている。YibP タンパク質はこれらのコイルドコイル領域が対応する配列でホモダイマーを形成すると推定される。YibP タンパク質のホモダイマーは N 端の膜貫通領域で内膜に固定されていると推測される。膜貫通領域の C 側は細胞質側に局在することが予想されるので、YibP タンパク質の膜貫通部位を除くほとんどが細胞質に局在しているものと考えられる。YibP タンパク質のホモダイマーはコイルドコイルの間に存在するヒンジの部位で折り曲げることが可能である。このモデルは以下に述べる実験結果と矛盾していないと考えられる。

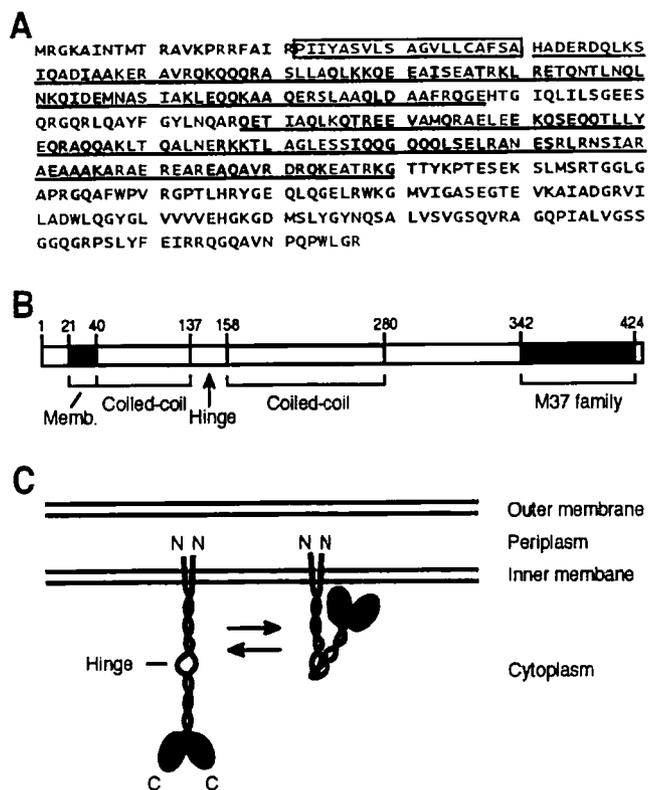


FIG. 2.

(A) YibPタンパク質のアミノ酸配列：枠で囲んだ部分（21～40）は膜貫通部位、下線部分（41～137と158～280）はコイルドコイル領域、342～424の部分はペプチダーゼM37ファミリー(<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF01551>)のホモロジー領域。

(B) YibPタンパク質のドメインの模式図。

(C) 二量体のYibPタンパク質のモデル。

2. *yibP* 破壊変異株の特性

材料と実験方法で示したように *yibP* 破壊変異株 IT106 株を単離した。*yibP* 破壊変異株は L 寒天培地 (0.5% 塩化ナトリウム) 37°C と 37°C 以下ではコロニーを形成できるが、42°C ではコロニー形成できない (Fig. 3A)。培地の浸透圧を上げるために、培地にベタイン (グリシンベタイン) (Csonka *et al.*, 1996) を加えた。1%のベタイン(Csonka *et al.*, 1996)を加えても相補しなかったが、5%のベタインを培地に加えると、*yibP* 破壊変異株のコロニー形成の高温感受性を相補した (Fig. 3A)。コロニー形成の高温感受性は 1%の塩、塩化カリウム、塩化ナトリウム、または塩化カリウムと塩化ナトリウムを合わせて 1%にしたものを L 培地に加えても相補される。さらに L 培地に 10%のシュークロースを加えても、コロニー形成の高温感受性は相補される。しかし、10%のグルコースでは高温感受性は相補されなかった。これらの結果から YibP タンパク質は、低い浸透圧の環境下では 42°C で生存するために必須のタンパク質である。

L 培地で *yibP* 破壊変異株を 30°C で対数増殖期まで増殖後に 42°C に移すと、2 時間後には培地の濁度は増化しなくなる (Fig. 3B)。

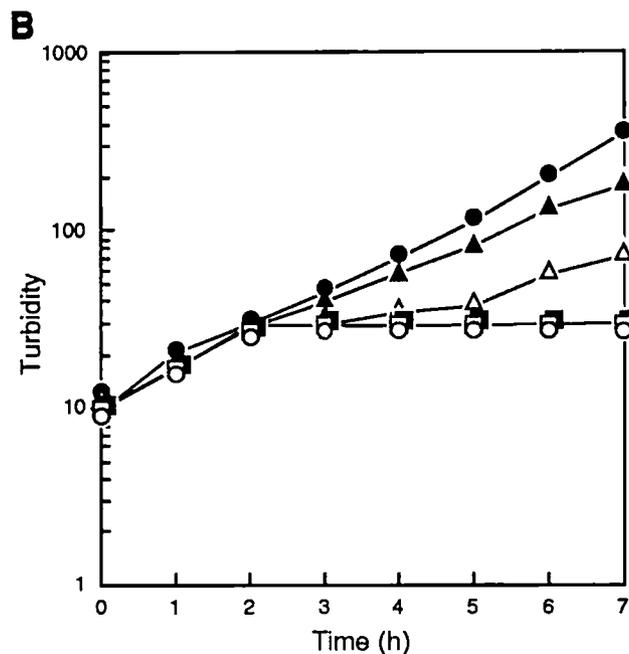
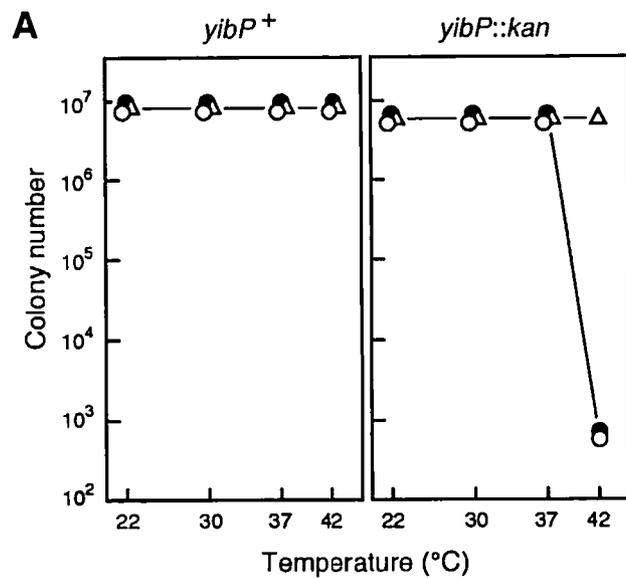


FIG. 3

(A) L寒天培地での親株 (左) と *yibP*破壊変異株 (右) の高温感受性に関するベタインの効果。黒丸はベタインなし。白丸は1%のベタイン含有。白三角は5%のベタイン含有。

(B) L培地での様々な温度における *yibP*破壊変異株の増殖曲線。IT106株を30°Cで増殖し、6つに分けサンプルの0時間とした。黒丸は30°C、白丸は42°C、黒三角は1時間42°Cで培養後30°Cに移した。白三角は2時間42°Cで培養後30°Cに移した。黒ひし形は3時間42°Cで培養後30°Cに移した。白ひし形は3時間42°Cで培養後30°Cに移した。

温度シフト後、細胞は伸長し多数の核様体を持ちくびれのない長い細胞になる (Fig. 4A)。温度シフトして 2 時間後、一部の長い細胞は溶菌していた。4 時間後では、細胞は伸長し続けるが、大部分の長い細胞が溶菌するので、培地の濁度はほとんど増加しない。42°C で 1 時間培養後 30°C に戻すと、濁度は 30°C で培養し続けた培地と比較するとわずかにゆっくり増加した。42°C で 2 時間以上増加し 30°C に戻すと、濁度の増加は著しく阻害される (Fig. 3A)。したがって、42°C で長く培養している間に細胞は伸長し生育できなくなる。42°C で SOS 応答(Walker *et al.*, 1996)により SulA/SfiA が発現され、細胞分裂が間接的に阻害される可能性を調べるために、野性株の λ フェージで溶原化させた *yibP* 破壊変異株 (IT601 株) を解析した。42°C で培養しても、フェージは誘導されなかった (Fig. 5A)。同じ株に UV 照射後では、 λ フェージは誘導された (Fig. 5B)。したがって、*yibP* 破壊変異株で観察された細胞分裂の阻害は SOS 応答によるものでないことが明らかになった。

42°C に温度シフト後、*yibP* 破壊変異株の FtsZ リング形成について解析した。温度シフト前では、親株 (IT101) と同様に *yibP* 破壊変異株の 95%以上の細胞で 1 つの FtsZ リングが細胞の中央に観察された (Fig. 4)。しかし、42°C で 2 時間培養後では大部分 (約 90%) の伸長した細胞には、FtsZ リングが見られない、残りの 10%の伸長細胞では 1 つの FtsZ リングが見られるだけだった。これらの伸長細胞では、細胞の一端から 2 μ m の位置に FtsZ リングが存在していた。それに対して、親株 (IT101 株) ではほとんどの細胞が細胞の中央に 1 つの FtsZ リングが見られた (Fig. 4B)。リファンピシリン、ナリジクス酸、エチジウムブロマイド、メタンスルホン酸メチル、ラウリル硫酸ナトリウムを用いて親株 (IT101 株) と *yibP* 破壊変異株との間に感受性の差がみられるか試験したが、両株の間にこれらの薬剤に対する感受性に差はみられなかった。

C 端の 147 アミノ酸 (Gly280~Arg427) を欠失した *yibP* 遺伝子のプラスミドは *yibP* 破壊変異株である IT106 株の高温感受性を相補できなかった。以上から、M37 ファミリーのホモロジドメインである C 端領域は、生体内で YibP タンパク質の重要な機能領域であると推測される。

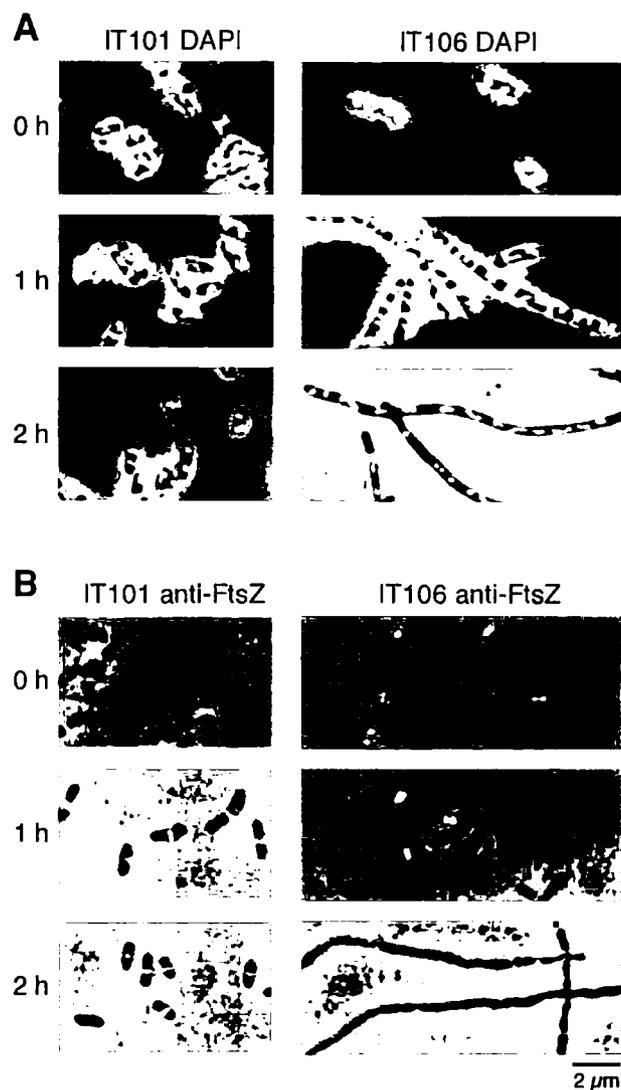


FIG. 4

42°C に温度シフトしたときの細胞の形態やFtsZリングの形成を示した。
 IT101株とIT106株は30°Cと 42°C (zero time)では特に増殖の差は見られない。
 サンプルは経時的に分取し解析した。

(A)細胞はHiraga等の方法(Hiraga *et al.*, 1998)でDAPI染色した。

(B)細胞はHiraga等の方法(Hiraga *et al.*, 1989)である蛍光抗体顕微鏡観察法でFtsZタンパク質の細胞内局在を解析した。

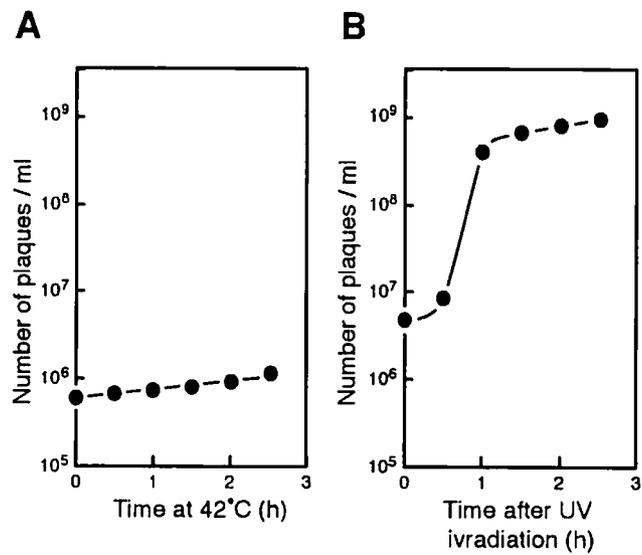


FIG. 5

IT601株の溶原化させたλファージのインダクションにおいて温度シフトとUV照射における異なる効果。

(A) 42°C への温度シフト。

(B) UV照射。材料と実験方法を参照。

3. YibP-His6 タンパク質の細胞内局在

YibP-His6 タンパク質の局在を明らかにするために、ザルコシル法により IT107 株を細胞質画分・内膜画分・外膜画分の 3 画分に分けた。YibP-His6 タンパク質は細胞質画分と内膜画分に検出されたが、外膜画分には検出されなかった (Fig. 6A)。この結果は、上述したモデルにおいて YibP-His6 タンパク質の膜貫通領域が内膜に挿入されていることを示す。YibP タンパク質は膜貫通領域を除く部分がペリプラズム側に存在するのか、あるいは細胞質側かを明らかにするために、IT111 株からスフェロプラストを調製し、プロテアーゼ K に対する YibP-His6 タンパク質の感受性を調べた。YibP-His6 タンパク質はプロテアーゼ K に対して耐性だった (Fig. 4B)。この結果は YibP-His6 タンパク質が細胞質側に存在していることを示す。さらに、上述した方法で *Tn10phoA* がプラスミド上の *yibP* 遺伝子内に挿入された株を単離した。60.5 kDa の YibP-PhoA タンパク質 (YibP タンパク質の Met1-Met87 に PhoA タンパク質が融合) をコードするプラスミド pIT401 と 66.6 kDa の YibP-PhoA タンパク質 (YibP タンパク質の Met1-Tyr162 に PhoA タンパク質が融合) をコードするプラスミド pIT402 が YibP-PhoA タンパク質を発現することと DNA 配列を決定した (Fig. 6B)。これらの融合タンパク質は、細胞質画分と内膜画分に検出されたが、外膜画分からは検出されなかった (Fig. 6C)。IT401 株と IT402 株はそれぞれ、プラスミド pIT401 とプラスミド pIT402 を持っていて (Table 1)、XP を含む L 寒天培地で白コロニーを形成する。このことは、YibP-PhoA タンパク質の PhoA ドメインはペリプラズムではなく細胞質側に局在していることを示す。以上の結果から YibP タンパク質のコイルドコイル領域は細胞質側に局在していると結論した (Fig. 2C)。

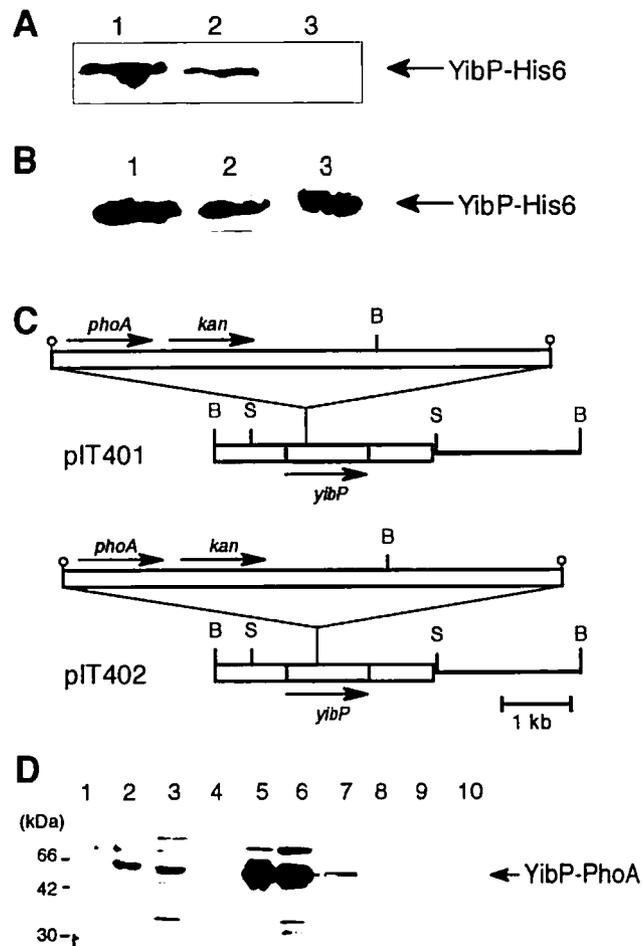


FIG. 6

- (A) YibP-His6タンパク質の各画分での局在。IT107株の3つの画分を抗His-tag抗体を用いてウエスタンブロッティングにより解析した。それぞれのサンプルは10 μ g ゲルにアプライした。Lane 1、細胞質画分。Lane 2、内膜画分。Lane 3、外膜画分。
- (B) プラスミドへのトランスポゾンTn*phoA* の挿入位置。B、Sは制限酵素*Bam*HI、*Sac*Iを示す。
- (C) 各サンプルはSDS-PAGE (15% gel)を行い抗PhoA抗体を用いてウエスタンブロッティングにより解析した。
- (D) Lane 1、分子量マーカー。Lanes 2~4、プラスミドpIT401をもつサンプル。Lanes 5~7、プラスミドpIT402をもつサンプル。Lanes 8~10、プラスミドをもたないサンプル。Lanes 2、5、8は細胞質画分。Lanes 3、6、9は内膜画分。Lanes 4、7、10は外膜画分。

4. YibP-His6 タンパク質のプロテアーゼ活性

精製した YibP-His6 タンパク質は SDS-PAGE により解析した。YibP-His6 タンパク質 (48.3 kDa) は SDS-PAGE で 42 kDa の分子量マーカーとほぼ同じ位置に検出された (Fig. 7A)。精製した YibP-His6 タンパク質は 95%以上の精製度であった。精製した YibP-His6 タンパク質は、 β -カゼインを分解するプロテアーゼ活性を持っていた (Fig. 7)。分解物 (20 kDa) が検出された (Fig. 7)。ATP や亜鉛イオンの添加による、YibP タンパク質の β -カゼイン分解活性への影響はなかった (Fig. 7A)。この結果は、YibP タンパク質に典型的な ATP 結合モチーフがないことと一致する。マグネシウムイオンの存在はプロテアーゼ活性に影響しないが、10 mM EDTA の添加はプロテアーゼ活性を阻害する。このことは YibP タンパク質が何らかの金属イオンを含んでいることを示唆している。

プロテアーゼ活性が精製した YibP-His6 タンパク質のサンプルに少量混在したタンパク質によるものでないことを示すために、抗 His-tag マウスモノクローナル IgG1 抗体とプロテイン A セファロースで YibP-His6 タンパク質を前処理した。遠心分離後、上清を反応に用いると、 β -カゼイン分解活性はなかった (Fig. 7B, lane 5) ことから β -カゼインを分解するタンパク質分解活性は YibP-His6 タンパク質にのみ存在することが示された。

基質である β -カゼインは 37°C、10 時間の反応で完全に分解していた (Fig. 7C)。高濃度 (4 μ g/ml) の β -カゼインを含む反応液で 10 時間反応させると、20 kDa の他に 17 kDa の分解物が検出された (Fig. 7D)。これらの分解物と基質の β -カゼインの N 端のアミノ酸配列の解析を行った。20-kDa と 17-kDa の 2 つの分解物共に N 端のアミノ酸配列は RELEELNV だった。 β -カゼインの N 端のアミノ酸配列も同様であった。これは使用した基質の β -カゼインがすでに N 端の 15 アミノ酸 MKVLILACLVALALA を欠失していたことを示している。基質として α -カゼインを用いても、タンパク質分解活性はみられなかった。基質の α -カゼインの N 端のアミノ酸配列は MKLLILTCLVAVALA であった。これは基質 α -カゼインがすでに N 端の 15 アミノ酸 MKLLILTCLVAVALA を欠失していたことを示している。一方、YibP-His6 タンパク質は 10 時間の反応でも変化はみられなかった。

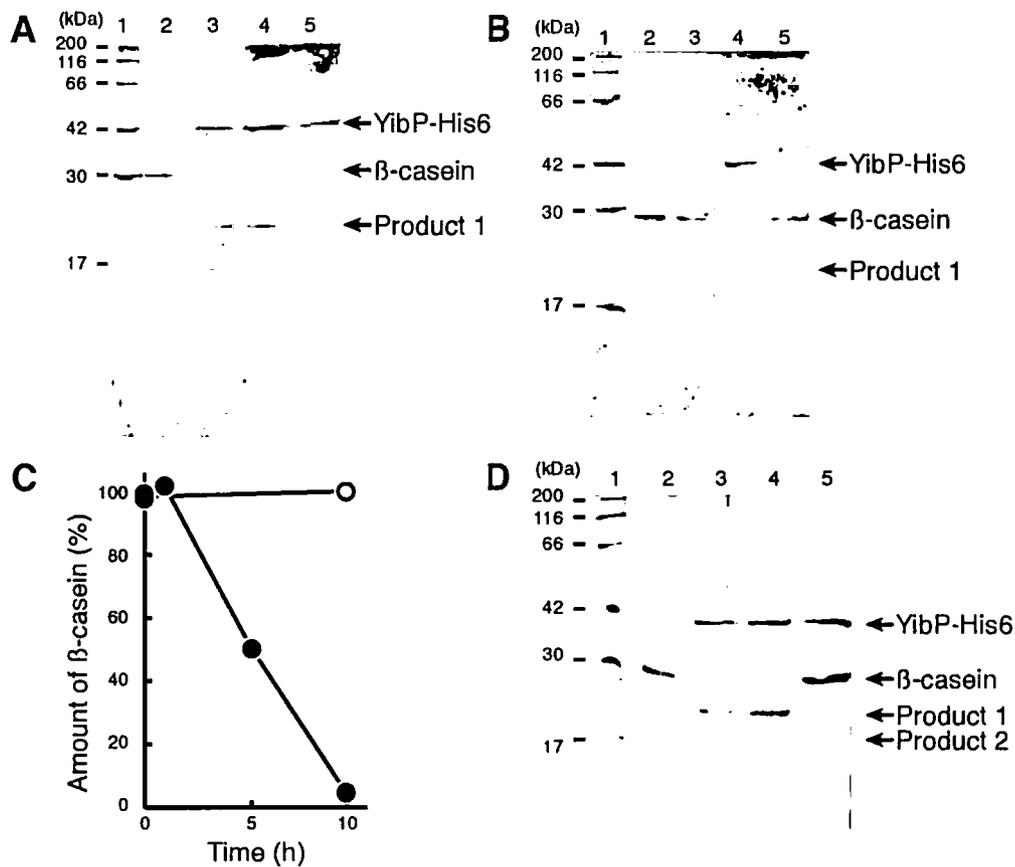


FIG. 7

精製したYibP-His6タンパク質と β -caseinを反応させた。

標準反応液は材料と実験方法に示した。ゲルのタンパク質はCBB染色した。

(A) Lane 1、分子量マーカー。Lane 2、YibP-His6タンパク質なし。Lane 3、1 mM ATPと25 μ M 酢酸亜鉛を添加。Lane 4、標準反応液。Lane 5、 β -caseinなし。すべてのサンプル (lanes 2 ~ 5) は37°Cで10時間反応した。

(B) Lane 1、分子量マーカー。Lane 2、YibP-His6タンパク質なし (0時間)。Lane 3、YibP-His6タンパク質なし。Lane 4、標準反応液。Lane 5、YibP-His6タンパク質なしで抗His-tagマウスモノクローナルIgG1とprotein A セファロースで前処理したYibP-His6タンパク質で反応させた。反応液 (lanes 3 ~ 6)は37°Cで10時間反応した。

(C) 分解反応の経時変化。

(D) 4 μ gの β -caseinを含む反応液を37. Cで10時間反応させた。Lane 1、分子量マーカー。Lane 2、標準反応液。Lane 3、マグネシウムイオンを除いた。Lane 4、マグネシウムイオンを除き10 mM EDTAを加えた。

5. *yibP*破壊変異株の高温感受性を抑制するサプレッサー変異の解析

YibP タンパク質の生体内機能を知るために、L 寒天培地で *yibP* 破壊変異株の 42°C でも増殖できる変異株を 200 個単離した。このなかから、22°C において生育できない低温感受性株を 2 株得た。それぞれを IT201 株と IT301 株とした。IT201 株と IT301 株の低温感受性変異を *cs-1* と *cs-13* とした (Table 3 の experiment 1)。P1 ファージにより IT201 株と IT301 株の *yibP::kan* 遺伝子を野性株の *yibP* 遺伝子に置換し IT202 株と IT302 株とした。*yibP* 遺伝子と *zib-137::Tn10* マーカーの組換え頻度は 7~8%だった (Table 4)。IT202 株と IT302 株も 22°C で低温感受性株を示した。したがって、*cs-1* と *cs-13* 変異は *yibP* 遺伝子の遺伝的背景で低温感受性を示す (Table 3 の experiment 1)。*cs-1* と *cs-13* 変異を明らかにするため、C600 株の染色体断片を持つプラスミドライブラリーを IT201 株と IT301 株に形質転換した。クロラムフェニコール耐性で、22°C で増殖でき 42°C で増殖できない形質転換体を単離した。IT201 株を相補したのはプラスミド pIT301 だった (Table 3 の experiment 1)。プラスミド pIT301 は、3 つの遺伝子 (*fba*, *pgk*, *epd*) を含む染色体断片を持っていた。さらに、プラスミド pIT301 の染色体 DNA から pIT-*epd*, pIT-*pgk*, pIT-*fba* をサブクローンした (Fig. 8C)。IT201 株を相補したのはプラスミド pIT-*fba* だけで、プラスミド pIT-*epd* と pIT-*pgk* は相補しなかった (Table 3 の experiment 2)。以上の結果から *cs-1* 変異は、fructose-1,6-bisphosphate aldolase (EC4.1.2.13) をコードする *fba* 遺伝子に存在していた。IT301 株を相補したのはプラスミド pIT-*rbfA* だった (Fig. 8D)。しかし、プラスミド pIT301、pIT-*epd*, pIT-*pgk*, pIT-*fba* では相補しなかった (Table 3 の experiment 3)。プラスミド pIT-*rbfA* で IT201 株は相補しなかった (Table 3 の experiment 2)。したがって、*cs-13* 変異は 30S ribosome binding factor (Jones *et al.*, 1996) をコードする *rbfA* 遺伝子に存在していた。*cs-1* と *cs-13* 変異をそれぞれ *zgd-210::Tn10* と *zhd-732::Tn10* に置き換えた P1 トランスダクションの結果は、上述した結果と一致している (Table 4 と Fig. 8A)。

TABLE 3

| Exp. | Strain | Relevant genotype | | Growth | | | |
|-------|--------|---------------------------------------|---|--------|------|------|------|
| | | Chromosome | Plasmid | 22°C | 30°C | 37°C | 42°C |
| 1 | IT101 | <i>yibP</i> ⁺ | | + | + | + | + |
| | IT106 | <i>yibP::kan</i> | | + | + | + | - |
| | IT201 | <i>yibP::kan cs-1</i> | | - | + | + | + |
| | IT202 | <i>yibP</i> ⁺ <i>cs-1</i> | | - | + | + | + |
| | IT208 | <i>yibP::kan cs-1</i> ⁺ | | + | + | + | - |
| | IT301 | <i>yibP::kan cs-13</i> | | - | + | + | + |
| | IT302 | <i>yibP</i> ⁺ <i>cs-13</i> | | - | + | + | + |
| | IT308 | <i>yibP::kan cs-13</i> ⁺ | | + | + | + | - |
| 2 | IT201 | <i>yibP::kan cs-1</i> | | - | + | + | + |
| | IT203 | <i>yibP::kan cs-1</i> | <i>epd</i> ⁺ <i>pgk</i> ⁺ <i>fba</i> ⁺ | + | + | + | - |
| | IT204 | <i>yibP::kan cs-1</i> | <i>epd</i> ⁺ | - | + | + | + |
| | IT205 | <i>yibP::kan cs-1</i> | <i>pgk</i> ⁺ | - | + | + | + |
| | IT206 | <i>yibP::kan cs-1</i> | <i>fba</i> ⁺ | + | + | + | - |
| | IT207 | <i>yibP::kan cs-1</i> | <i>rbfA</i> ⁺ | - | + | + | + |
| | 3 | IT301 | <i>yibP::kan cs-13</i> | | - | + | + |
| IT303 | | <i>yibP::kan cs-13</i> | <i>epd</i> ⁺ <i>pgk</i> ⁺ <i>fba</i> ⁺ | - | + | + | + |
| IT304 | | <i>yibP::kan cs-13</i> | <i>epd</i> ⁺ | - | + | + | + |
| IT305 | | <i>yibP::kan cs-13</i> | <i>pgk</i> ⁺ | - | + | + | + |
| IT306 | | <i>yibP::kan cs-13</i> | <i>fba</i> ⁺ | - | + | + | + |
| IT307 | | <i>yibP::kan cs-13</i> | <i>rbfA</i> ⁺ | + | + | + | - |

TABLE 4 . Co-transduction with phage P1*vir*.

| Donor strain | Recipient strain | Selective marker | Unselective marker | Co-transfer frequency |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| QT184 (<i>zib-137::Tn10</i>) | IT201 (<i>yibP::kan cs-1</i>) | Tetracycline resistance | Kanamycin sensitivity | 2/24 (8.3%) |
| QT184 (<i>zib-137::Tn10</i>) | IT301 (<i>yibP::kan cs-13</i>) | Tetracycline resistance | Kanamycin sensitivity | 2/30 (6.7%) |
| QT152 (<i>zgd-210::Tn10</i>) | IT201 (<i>yibP::kan cs-1</i>) | Tetracycline resistance | Cold-sensitivity | 3/34 (8.8%) |
| QT166 (<i>zhd-732::Tn10</i>) | IT301 (<i>yibP::kan cs-13</i>) | Tetracycline resistance | Cold-sensitivity | 2/22 (9.1%) |

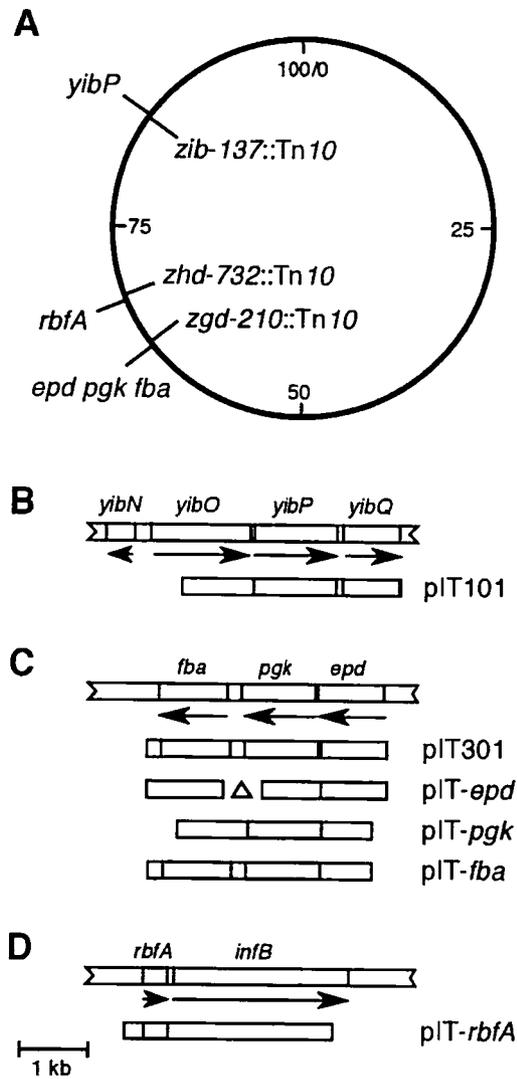


FIG. 8

(A) 大腸菌の染色体上での*yibP*、*fba*、*rbfA*、*zib-137::Tn10*、*zgd-210::Tn10*、*zhd-732::Tn10*の局在。染色体地図の位置：*yibP* (81.57 min)、*rbfA* (71.36 min)、*fba* (66.14 min)。

(B)～(D) 染色体DNA断片が挿入された様々なプラスミド。矢印の方向は転写の方向を示す。

6. YibP タンパク質とホモロジーを持つタンパク質の検索

YibP タンパク質のペプチダーゼ M37 ファミリーホモロジー領域を含む 342 から 424 までのアミノ酸配列についてホモロジーサーチ (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/genom_table.cgi) を行った。50%以上のホモロジーを示すものが 17 種の細菌で見つかった。YibP タンパク質のペプチダーゼ M37 ホモロジー領域のホモログはグラム陰性菌プロテオバクテリアの γ サブディビジョンに属する種に広く分布していた。(Fig. 9)。Fig. 9 に示した結果を用いて系統樹を作成した (Fig. 10)。

また、ペプチダーゼ M37 ファミリーの保存ドメインサーチ (<file:///Macintosh%20HD/Desktop%20Folder/Homology/M37%20homolog>) では、Fig. 9 に示した結果とは一部異なるホモログが得られた。

YibP protein

MRGKAINTMT RAVKPRRF AI RPIIYASVLS AGVLLCAFSA HADERDQLKS
 IQADIAAKER AVRQKQQRA SLLAQLKKQE EAISEATRKL RETQNTLNQL
 NKQIDEMNAS IAKLEQQKAA QERSLAAQLD AAFRQGEHTG IQLILSGEES
 QRGQRLQAYF GYLNQARQET IAQLKQTREE VAMQRAELEE KQSEQQTLTY
 EQRAQQAKLT QALNERKKT L AGLESSIQQG QQQLSEL RAN ESRLRNSIAR
 AEA AAKARAE REAREAQAVR DRQKEATRKG TTYKPTSEK SLMSRTGGLG
 APRGQAFWPV RGPTLHRYGE QLQGELRWKG MVIGASEGTE VKAIADGRVI
 LADWLQGYGL VVVVEHGKGD MSLYGYNQSA LVS VGSQVRA GQP IALV GSS
 GGQGRPSLYF EIRRQ GQAVN PQPWLGR

 M37 homologous region

Escherichia coli K12 MG1655 (YibP)

Salmonella enterica serovar Typhi

Salmonella typhimurium LT2

Yersinia enterocolitica

Yersinia pestis

Klebsiella pneumoniae

Pasteurella multocida PM70

Actinobacillus actinomycetemcomitans

Methylococcus capsulatus

Vibrio cholerae

Shewanella putrefasciens

Pseudomonas aeruginosa PA01

Salmonella paratyphi A

Pseudomonas fluorescens

Pseudomonas putida KT2440

Xylella fastidiosa

Pseudomonas syringae

Haemophilus influenzae Rd

KAIADGRVILADWLQGYGLVVVEHGKGDMSLYGYNQSALVSVGSQVRAG
 KAIADGRVILADWLQGYGLVVVEHGKGDMSLYGYNQSALVSVGAQVRAG
 KAIADGRVILADWLQGYGLVVVEHGKGDMSLYGYNQSALVSVGAQVRAG
 KAIADGRVLLADWLQGYGLVVVEHGKGDMSLYGYNQSALVNVGAQVKAG
 KAIADGRVLLADWLQGYGLVVVEHGKGDMSLYGYNQSALVNVGAQVKAG
 RAIADGRVILADWLQGYGLVVVEHGKGDMSLYVYNQSALVSVGTQVRV
 KAIADGRVILADWLQGYGLVVVEHGKGDMSLYGYNQSALVSVGSQVRAG
 KAIADGRVILADWLQGYGLVVVEHGKGDMSLYGYNQSALVSVGSQVRAG
 KAIADGRVILADWLQGYGLVVVEHGKGDMSLYGYNQSALVSVGSQVRAG
 KAIADGRVILADWLQGYGLVVVEHGKGDMSLYGYNQSALVSVGSQVRAG
 RAVSGGKVIYADWLKGFGMVVIDHGKGYMSLYGHAQTLKSPGEMVKTG
 RAVHGGRVVFADWLRGAGLLVILDHGGGYLSLYGHNQSLLKDAGDTVKAG
 KAIADGRVILADWLQGYGLVVVEHGKGDMSLYGYNQSALVSVGSQVRAG
 AIADGRVILADWLQGYGLVVVEHGKGDMSLYGYNQSALVSVGSQVRAG
 RAVHGGRVVFADWLRGAGLLVILDHNGGYLSLYGHNQSLLKNA GDIVKAG
 AVADGMVVF AEWMTGYGMILIVDHGNGYMSLYANNDTLRNP GTYVKRG
 AVHGGRVVFADWLRGAGLLVILDHNGGYLTLYGHNQSLLKSA GDIVKAG
 KAIADGRVILADWLQGYGLVVVEHGKGDMSLYGYNQSALVSVGSQVRAG

Escherichia coli K12 MG1655 (YibP)

Salmonella enterica serovar Typhi

Salmonella typhimurium LT2

Yersinia enterocolitica

Yersinia pestis

Klebsiella pneumoniae

Pasteurella multocida PM70

Actinobacillus actinomycetemcomitans

Methylococcus capsulatus

Vibrio cholerae

Shewanella putrefasciens

Pseudomonas aeruginosa PA01

Salmonella paratyphi A

Pseudomonas fluorescens

Pseudomonas putida KT2440

Xylella fastidiosa

Pseudomonas syringae

Haemophilus influenzae Rd

QP IALV GSSGGQGRPSLYFEIRRQ GQAVNPQPW
 QP IALV GSSGGQGRPSLYFEIRRQ GQAVNPQPW
 QP IALV GSSGGQGRPSLYFEIRRQ GQAVNPQPW
 QP IALV GTSGGQGEPSLYFEIRRQ GQAVNPQPW
 QP IALV GTSGGQGEPSLYFEIRRQ GQAVNPQPW
 QP IALV GSSGVQGRPSLYFEIRRQ
 QP IALV GSSGGQSQSSLYFEIRRKGVAVNPVIGW
 QP IALV GSSGGQSKTALYFEIRRKGVAVNPVIGW
 QP IALV GSSGGQVEPGLYFGIREKGQALDPSQW
 QP IALV GSSGGQSRPALYFEIRRNRAENPSQW
 EAIALVGRSGGQTEPGLYFEIRYKQAVDP
 DP IATVGTSGGQGRPSLYFEIRRQ GQAVNPQPW
 QP IALV GSSGGQGRPSLYFEIRRVSRQSQPCW
 QP IALV GSSGGQDTPALYFAIRQQGHPSPDPAQW
 EAISTVGDSSGQDAAGLYFAIRQQGRPTDPSQW
 ELVAKVGRSGGQVSALYFELRHNGQPINPLSW
 EAISTVGNSSGQDTAALYFAIRQQGRPSDPAQW
 QP IALV GSSGEISR SALYFGISRKGTVPNPAGW

FIG. 9

YibPタンパク質のM37ホモロジー領域 (342-424) とのホモロジーサーチの結果。

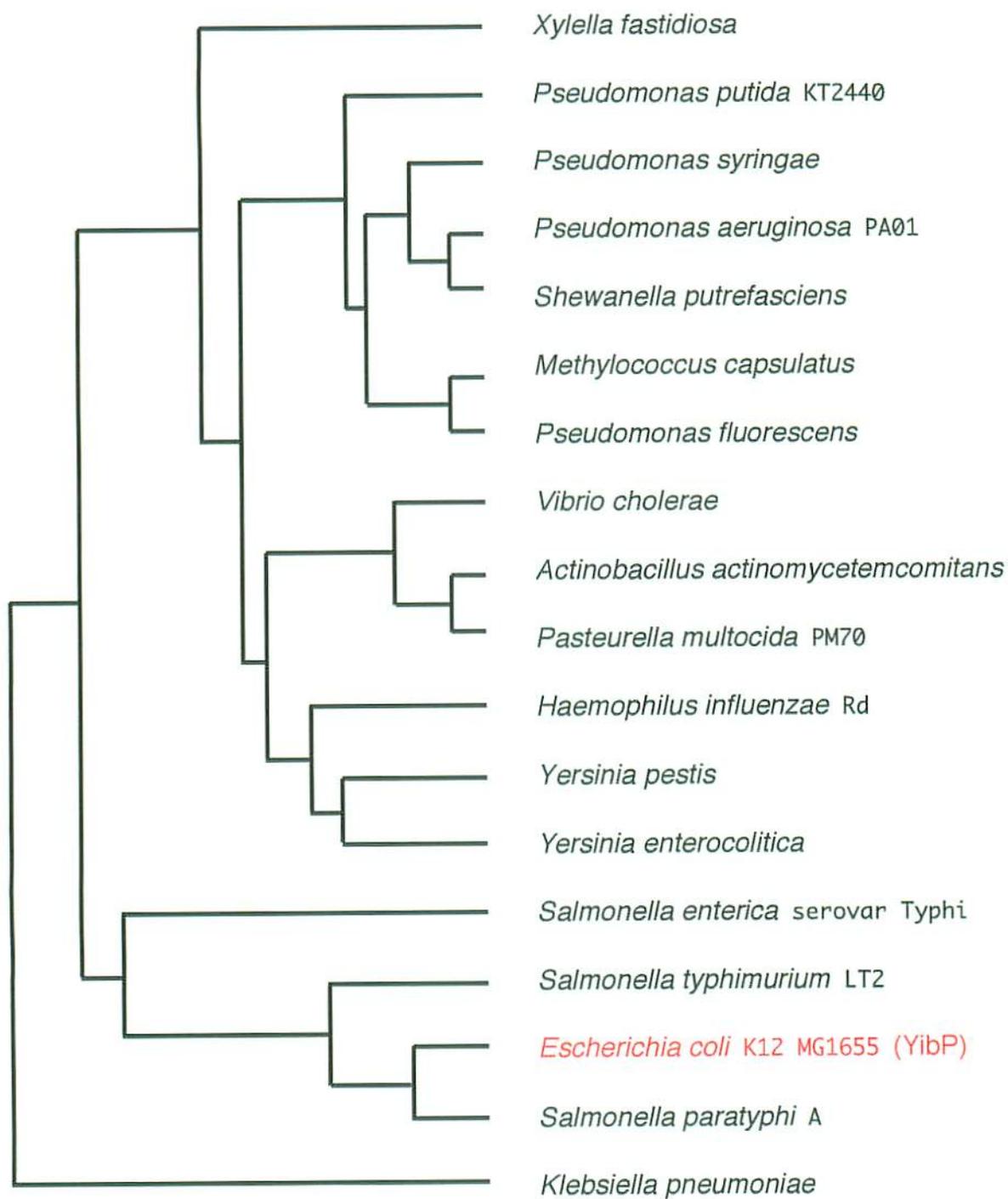


FIG. 10
 YibPタンパク質のM37ホモロジー領域 (342-424) とのホモログを用いての系統樹。

考察

実験結果から YibP タンパク質は、N 端の膜貫通部位は内膜に、コイルドコイルやヒンジはペリプラスムではなく細胞質側に存在していることが明らかになった。YibP タンパク質の膜貫通部位は N 端だけに一つ予想されることから、C 端の M23/M37 ホモログ領域を含む球状ドメインも細胞質側に存在しているものと推測される。YibP タンパク質は細胞内では多面的効果を持つと予測される。42°C において FtsZ リングの形成ができないことは YibP タンパク質が存在しないことによる多面的効果の一つであると考えられる。

培地に塩、シュークロース、ベタインを加えることにより *yibP* 破壊変異株の高温感受性が抑制された。したがって、YibP タンパク質は高温でかつ低浸透圧での環境下において生存していくのに必須のタンパク質である。42°C での *yibP* 破壊変異株の単離を別の方法で試みたが分離することができなかった (Dr. Takeyoshi Miki, personal communication)。このことは、私の実験結果と一致している。*yibP* 破壊変異株で細胞分裂、FtsZ リングが阻害される分子機構は明らかになっていない。

本研究において、精製した YibP-His6 タンパク質は β -カゼインを分解するタンパク質分解活性を持っていることが明らかになった。M23/M37 ファミリーは亜鉛を必要とする金属ペプチダーゼである。バクテリアの金属ペプチダーゼファミリーは亜鉛を含むが、金属に結合するリガンドの正確な位置は明らかになっていない。カルボキシペプチダーゼが D-Ala-D-Ala-の類似性に基づくように、結合部位は His-X-His モチーフを形成していると考えられる [MEDLINE: 95405261]。しかし、YibP タンパク質は His-X-His モチーフを持っていない。しかし、EDTA の存在下では YibP タンパク質のタンパク質分解活性は失われることから (Fig. 7D)、YibP タンパク質は金属イオンと結合している可能性があると考えられる。

私はコンピュータ解析により、YibP タンパク質とホモロジーを持つタンパク質を、原核生物において検索した。YibP ホモロジーは、膜貫通領域、長いコイルドコイル領域、C 端の球状ドメインを持ち、グラム陰性菌の β 及び γ サブディビジョンに分布していた。YibP タンパク質の 342-424 のアミノ酸配列は、ペプチダーゼ M23/M37 とのホモロジーである。大腸菌の *yebA*、*nlpD*

(Ichikawa *et al.*, 1994. Lange *et al.*, 1994)、b2865、にコードされるタンパク質はペプチダーゼ M37 とホモロジーがあるドメインを持つが、長いコイルドコイル領域は持っていない。バシラスサブチルス菌の YebA タンパク質についてもホモロジーがある(Borriss *et al.*, 1996)。大腸菌の膜リポタンパク質である NlpD タンパク質が、タンパク質分解活性を持っているか否かは明らかになっていない(http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/swisspfamget.pl?name=NLPD_ECOLI)。以上のことから、YibP タンパク質は内膜にアンカーした新しいタイプのエンドペプチダーゼであると結論できる。

YibP タンパク質のペプチダーゼ M37 ファミリーのホモロジーである 342 から 424 までのアミノ酸配列のホモロジーサーチから 50%以上のホモロジーを示すものが 17 種の菌で見つかった。17 種の菌は、グラム陰性菌プロテオバクテリアの γ サブディビジョンに属する種に広く分布していた。

fba 遺伝子の低温感受性変異 *cs-1* は *yibP* 破壊変異株の高温感受性を相補する。*fba* 遺伝子にコードされている Fba タンパク質は、フルクトース 1,6-二リン酸をジヒドロキシアセトンリン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸に分解する(Alefounder *et al.*, 1989)。ジヒドロキシアセトンリン酸は大腸菌のホスホリピッドの基質である (Cronan and Rock, 1996)。*fba* 変異株の温度感受性は、グルコース、フルクトース存在下では増殖できないが、グリセロールの存在下では 42°C でも増殖できる (Böck and Neidhardt, 1966(a), Böck and Neidhardt, 1966(b))。温度感受性 *fba* (*fda*)変異株は、増殖できない温度にシフトすると安定な RNA 合成を優先的に阻害する(Singer *et al.*, 1991(a))。この阻害は、転写開始に起こる(Singer *et al.*, 1991(b))。*fba* 遺伝子の欠失株を取得できないことから *fba* 遺伝子は増殖に必須である (Dr Jun-ichi Kato, personal communication)。30S リボゾーム結合因子をコードする *rbfA* 遺伝子の低温感受性変異 *cs-13* も *yibP* 破壊変異株の温度感受性を相補する。30S リボゾーム結合因子の過剰発現は、16S rRNA の低温感受性を相補する(Dammel *et al.*, 1995)。30S リボゾーム結合因子は、コールドショック応答のないコールドショックタンパク質である(Jones *et al.*, 1996)。*cs-1* や *cs-13* 変異による *yibP* 破壊変異株の高温感受性の抑制機構については、依然として不明であり、今後の研究課題である。

結語

大腸菌は全遺伝子の配列は決定したが、その総ての機能が決定したわけではない。私が今回着目した長いコイルドコイルを持つ YibP タンパク質も機能が明らかでなかったタンパク質の一つである。本研究において、YibP タンパク質はタンパク質分解活性を持つことを明らかにした。また、*yibP* 遺伝子破壊変異株は低浸透圧で高温 (42°C) の環境下では生育できないことを明らかにした。今後は、YibP タンパク質の大腸菌における基質の決定、さらなる機能を明らかにしていけるよう研究を進めていきたい。

参考文献

Alefounder, P. R., S. A. Baldwin, R. N. Perham, and N. J. Short. 1989. Cloning, sequence analysis and over-expression of the gene for class II fructose 1,6-bisphosphate aldolase of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **257**:529-534.

Blattner, F.R., G. Plunkett, 3rd., C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1474.

Böck, A., and F. C. Neidhardt. 1966. Isolation of a mutant of *Escherichia coli* with a temperature-sensitive fructose-1,6-diphosphate aldolase activity. *J. Bacteriol.* **92**:464-469.

Böck, A., and F. C. Neidhardt. 1966. Properties of a mutant of *Escherichia coli* with a temperature-sensitive fructose-1,6-diphosphate aldolase activity. *J. Bacteriol.* **92**:470-476.

Borriss, R., S. Porwollik, and R. Schroeter. 1996. The 52 degrees-55 degrees segment of the *Bacillus subtilis* chromosome: a region devoted to purine uptake and metabolism, and containing the genes *cotA*, *gabP* and *guaA* and the *pur* gene cluster within a 34960 bp nucleotide sequence. *Microbiology* **142**:3027-3031.

Chang, A. C. Y., and S. N. Cohen. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**:1141-1156.

Cronan, J. E. JR., and C. O. Rock. 1996. Biosynthesis of membrane lipids, p. 612-636. *In* Neidhardt, F. C., R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Renznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, 2nd ed. Vol. 1, ASM Press, Washington, D.C.

Csonka, L. N., and W. Epstein. 1996. Osmoregulation, p. 1210-1223. *In* Neidhardt, F. C., R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Renznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, 2nd ed. Vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.

Dammel, C. S., and H. F. Noller. 1995. Suppression of a cold-sensitive mutation in 16S rRNA by overexpression of a novel ribosome-binding factor. RbfA. *Genes Dev.* **5**:626-637.

Hashimoto-Gotoh, T., F. C. Franklin, A. Nordheim, and K. N. Timmis. 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors. I. Low copy number, temperature-sensitive, mobilization-defective pSC101-derived containment vectors. *Gene* **16**:227-235.

Hiraga, S., C. Ichinose, H. Niki, and M. Yamazoe. 1998. Cell cycle-dependent duplication and bidirectional migration of SeqA-associated DNA-protein complexes in *E. coli*. *Mol. Cell* 1:381-387.

Hiraga, S., H. Niki, T. Ogura, C. Ichinose, H. Mori, B. Ezaki, and A. Jaffé. 1989. Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells. *J. Bacteriol.* 171:1496-1505.

Houten, B. U. V. 1990. Nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 54:18-51.

Ichikawa, J. K., C. Li, J. Fu, and S. Clarke. 1994. A gene at 59 minutes on the *Escherichia coli* chromosome encodes a lipoprotein with unusual amino acid repeat sequences. *J. Bacteriol.* 176:1630-1638.

Ito, K., T. Sato, and T. Yura. 1977 Synthesis and assembly of the membrane proteins in *E. coli*. *Cell* 11:551-559.

Kihara, A., Y. Akiyama, and K. Ito. 1997 Host regulation of lysogenic decision in bacteriophage λ : Transmembrane modulation of FtsH (HflB), the cII degrading protease, by HflKC (HflA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5544-5549.

Jones, P. G., and M. Inouye. 1996. RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. *Mol. Microbiol.* 21:1207-1218.

Lange, R., and R. Hengge-Aronis. 1994. The *nlpD* gene is located in an operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation. *Mol. Microbiol.* 13:733-743.

Lin, R. J., and C. W. Hill. 1983. Mapping the *xyl mtl* and *lct* loci in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 156:914-916.

MacLachlan, P. R., and K. E. Sanderson. 1985. Transformation of salmonella typhimurium with plasmid DNA: differences between rough and smooth strains. *J. Bacteriol.* 161:442-445.

Manoil, C., and J. Beckwith. 1985. Tn ϕ oA, a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 82:8129-8133.

Miller, J. H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Ohmori, H, M. Saito, T. Yasuda, T. Nagata, T. Fujii, M. Wachi, and K. Nagai. 1995. The *pcsA* gene is identical to *dinD* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177:156-165.

Singer, M., P. Rossmiessl, B. M. Cali, H. Liebke, and C. A. Gross. 1991. The *Escherichia coli* *ts8* mutation is an allele of *fda*, the gene encoding fructose-1,6-diphosphate aldolase. *J. Bacteriol.* 173:6242-6248.

Singer, M., W. A. Walter, B. M. Cali, P. Rouviere, H. H. Liebke, R. L. Gourse, and C. A. Gross. 1991. Physiological effects of the fructose-1,6-diphosphate aldolase *ts8* mutation on stable RNA synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173:6249-6257.

Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, and J. W. Dubendorff. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185:60-89.

Sugai, M., T. Fujiwara, T. Akiyama, M. Ohara, H. Komatsuzawa, S. Inoue, and H. Suginaka. 1997. Purification and molecular characterization of glycylglycine endopeptidase produced by *Staphylococcus capitis* EPK1. *J. Bacteriol.* 179 :1193-1202

Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick, and N. J. Gay. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1:945-951.

Yamanaka, K., T. Ogura, H. Niki, and S. Hiraga. 1996. Identification of two new genes, *mukE* and *mukF*, involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 250:241-251.