

枯草菌内で複数の σ 因子の活性を調節する蛋白質複合体の機能解析

●中村 顕

筑波大学大学院生命環境科学研究科

〈研究の目的と進め方〉

枯草菌内には18種の σ 因子が存在し、個々の σ 因子が独立した遺伝子群の発現を制御することによりゲノム全体の遺伝子発現調節がなされるが、多くの σ 因子では翻訳後に活性調節を受けることが知られている。ストレス応答に関与する σ B因子に関しては、その活性調節機構が最近明らかになってきた。また胞子形成開始過程を制御する σ H因子は、翻訳後に安定化・活性化などの制御を受けると考えられるが、詳細は不明である。本研究では、枯草菌内に8種あるRsbRパラログタンパク質のうち、IspUとYojHの欠損が σ H依存のkinA-lacZ発現に負の影響を与えることを見出し、 σ H活性調節に関与しているものと推察している。さらに細胞内でIspU、YojHそしてRsbRが複合体を形成することを明らかにしている。また他の研究グループにより、IspU、YojHを含むRsbRパラログタンパク質の欠損変異のうち、いくつかは σ B活性にも大きな影響を与えることが報告された。

以上のことから、RsbRパラログは細胞内で複合体を形成し、 σ B因子と σ H因子を含む複数の σ 因子の活性を調節し、遺伝子発現をゲノムレベルで調節していると考えられている(図1)。本研究ではこのモデルの妥当性を検証し、 σ H活性調節機構の全貌を明らかにすることを目的とする。

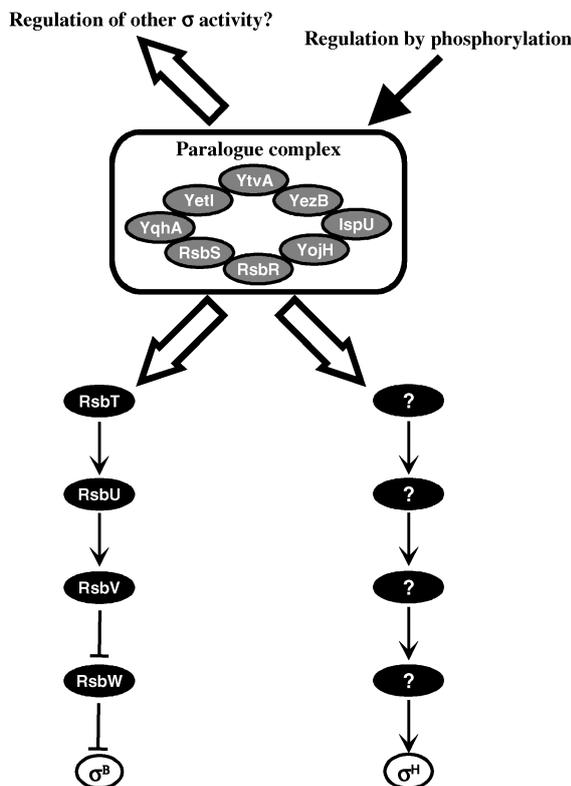


図1 RsbRパラログ複合体による複数の σ 因子の活性調節機構モデル

〈研究開始時の研究計画〉

1) RsbRパラログ間の σ H活性調節における役割の推定

IspU及びYojHについては、二重欠損変異の影響など、 σ H活性調節における役割の解析が進んでいるが、他のパラログタンパク質に関しては、その単独欠損変異が σ H活性に及ぼす影響についてしか検討していない。そこでYqhA, YtvA, YetI-YezBをそれぞれ異なる薬剤耐性遺伝子の挿入により破壊し、これら相互、あるいはIspU, YojHの欠損変異を組み合わせた多重変異株を作製し、この変異が σ H活性に及ぼす影響を明らかにする。この解析を通じて、RsbRパラログタンパク質が σ H活性調節機構の中でどのような相互関係にあるのかを明らかにする。

2) IspU、YojHに対するリン酸化の有無とその効果に関する解析

RsbRはT171、T205の2ヶ所でRsbTによりリン酸化され、その活性を失う。IspU、YojHのいずれも対応する残基は保存されており、RsbTあるいは未同定のキナーゼによる修飾を受ける可能性が充分考えられる。そこでIspU及びYojHのリン酸化部位であるThr残基(いずれの蛋白質でもT186、T220)を、リン酸化された状態をmimicするAsp残基、あるいはリン酸化されないAla残基に置換した変異を作製し、野生型枯草菌のゲノムに導入して、これらの変異が σ H活性及び σ B活性に与える影響を調べる。実際には、 σ H活性は σ H因子により転写されるkinA-lacZ融合遺伝子を、 σ B活性についてはctc-lacZ遺伝子をモニター遺伝子として用いる。

3) σ H因子と σ B因子の活性調節機構の異同に関する解析

図1に示すように、 σ H活性調節機構を構成するタンパク質は同定されておらず、RsbRパラログタンパク質と σ H因子とを結ぶ独立した制御pathwayが存在するのか、それとも σ B活性調節機構と一部、あるいは全部重複しているのかは明らかではない。また、 σ H因子と σ B因子の間でcore RNA polymeraseに対する競合が存在し、これが原因となって σ H活性が間接的に調節されている可能性も考えられる。これらの点を明らかにするために、 σ B因子をコードするsigB遺伝子、ならびに σ B因子の活性調節に関与するsigBオペロン遺伝子(rsbT, rsbU, rsbV, rsbW)の欠損変異を作製し、これらの変異が σ H活性に与える影響を明らかにする。またこれらの変異とIspUやYojHの欠損変異を組み合わせた場合の影響を調べ、 σ H活性調節機構と σ B活性調節機構の異同を明らかにする。

4) IspU、YojHを含むprotein complexの解析

酵母two hybrid systemを用いた解析により、RsbRパラログタンパク質同士が相互作用することが推定されているが、タンパク質レベルでは十分に解析されていない。そこで、各パラログタンパク質のC末端に、それぞれ異なるpeptide-tagを付加した遺伝子を作製し、これを枯草菌ゲノムに導入する。得られた菌株の抽出液より、それ

ぞれのpeptide-tagに対する抗体を用いた免疫沈降及び別のpeptide-tagに対する抗体を用いた検出を行う、いわゆるpull down assayを行うことにより、RsbRパラログタンパク質が複合体を形成していることをタンパク質レベルで明らかにする。また、同様の解析により、複合体中に含まれるRsbRパラログタンパク質以外のタンパク質を同定し、これらのタンパク質が σ H活性調節機構に関与しているのかどうかを明らかにする。

〈研究期間の成果〉

1) RsbRパラログ間の σ H活性調節における役割の推定

IspU, YojH, YezB,及びYtvAについて、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子の挿入により各破壊株を作製し、またその変異を組み合わせて、 σ H活性に及ぼす影響を σ H依存のkinA-lacZ発現をモニターすることにより検討した。その結果、各RsbRパラログタンパク質が σ H活性調節にどのような相互関係で関与しているかを推定した。特に従来の結果よりもytvAの寄与が大きいことが示された。

2) IspU, YojHに対するリン酸化の有無とその効果に関する解析

RsbR, IspU, YojHについて、リン酸化状態をmimicする変異(rsbrT205D, ispUT220D, yojHT220D)を作製し、これらの変異が σ H依存のkinA-lacZ発現に与える影響を検討したところ、rsbRの変異は同遺伝子の発現にほとんど影響を与えなかったが、ispU及びyojHの変異では顕著な増大が認められた。また、リン酸化が起こらないIspUの変異(ispUT220A)では発現量の若干の低下が認められた。このことから、 σ H活性調節におけるIspU及びYojHの機能は、T220残基のリン酸化によって制御されていることが強く示唆された。

3) σ H因子と σ B因子の活性調節機構の異同に関する解析

σ B因子の活性調節に関与するrsbT, rsbUの各遺伝子に対してin frame欠損変異を導入し、これらの変異が σ H活性に与える影響を検討したところ、rsbT変異では σ H活性が低下し、逆にrsbU変異では活性の上昇が認められた。また、rsbT変異とRsbRパラログタンパク質の各欠損変異を組み合わせて検討した結果、RsbT及びRsbRパラログタンパク質の σ H活性調節機構上の相互関係を推定した。さらにsigB欠損変異は σ H活性にはほとんど影響しないことを示し、 σ H因子と σ B因子の間にはcore RNA polymeraseに対する競合がほとんど存在しないことを示した。

4) IspU, YojHを含むprotein complexの解析

RsbRパラログタンパク質-peptide-tagの構築を、全てのパラログタンパク質について行い、大腸菌内でlacプロモーターを用いて発現させたところ、YojH, YezB, YtvA及びIspUについては、peptide-tagに対する抗体で検出することができた。また、このうちytvA-VSV-Gの構築を枯草菌に導入し、YtvAの検出を試みたが、Western blot上で検出することができなかった。

5) YtvAの機能解析

当初計画には含まれないが、RsbRパラログタンパク質の機能解析の一環として、YtvAを取り上げて解析を行った。RsbRパラログタンパク質のうちでは、YtvAのみがN末端側にLOVドメインを有しており、青色光に対する受容体として機能することが生化学的に示されている。ま

た、この光受容にはCys52を介したFMNとのadduct形成は重要であることが示唆された。そこでこの点について検討を加え、 σ B因子の塩ストレスに対する応答がYtvA依存的に光により強化されること、FMNとのadductを形成できないYtvAの変異体(ytvAC62A)では、光存在下でも上記の σ B因子の強い活性化が起こらないことを示した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

RsbRパラログタンパク質の機能については、未だに十分に解析されておらず、 σ B因子の活性調節機構と関連があることしか明らかになっていない。また、タンパク質レベルでの詳細な解析もなされていない。その点で本研究の成果は、特にRsbRパラログタンパク質が σ B因子以外の σ 因子の活性調節にも関与する事を示している点でユニークであり、独創的である。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

kinA-lacZなどのレポーターを用いた遺伝子発現解析については、現時点ではほぼ達成できたが、タンパク質レベルでの解析を十分に進めることができなかった。また、RsbRパラログタンパク質と σ H因子を結ぶ活性調節機構を構成するタンパク質あるいは遺伝子を同定するには至らず、 σ H活性調節機構の存在を立証するには至らなかった。これらの解析が十分にできなかった理由としては、個々のRsbRパラログタンパク質を検出する手法や、RsbRパラログタンパク質複合体を検出する手法の確立が困難であったためだと考えられる。

〈今後の課題〉

上述のように、タンパク質レベルでの解析が充分になされていないので、RsbRパラログタンパク質の検出系を確立し、またRsbRパラログタンパク質と相互作用するタンパク質を同定していくことが今後の課題である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

なし