

博士論文

大腸菌緊縮応答制御におけるポリリン酸の役割
(Roles of inorganic polyphosphate on the stringent control
in *Escherichia coli*)

野村 和孝

広島大学大学院先端物質科学研究科

2005年3月

目次

1. 主論文

大腸菌緊縮応答制御におけるポリリン酸の役割
(Roles of inorganic polyphosphate on the stringent control in *Escherichia coli*)
野村 和孝

2. 公表論文

(1) Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*.

Akio Kuroda, Kazutaka Nomura, Ryo Ohtomo, Junichi Kato, Tsukasa Ikeda, Noboru Takiguchi, Hisao Ohtake, and Arthur Kornberg
Science, **293**, 705-708 (2001).

(2) Effects of inorganic polyphosphate on the proteolytic and DNA-binding activities of Lon in *Escherichia coli*.

Kazutaka Nomura, Junichi Kato, Noboru Takiguchi, Hisao Ohtake, and Akio Kuroda
The Journal of Biological Chemistry, **279**, 34406-34410 (2004).

3. 参考論文

(1) A simple method to release polyphosphate from activated sludge for phosphorus reuse and recycling.

Akio Kuroda, Noboru Takiguchi, Takafumi Gotanda, Kazutaka Nomura, Junichi Kato, Tsukasa Ikeda, and Hisao Ohtake
Biotechnology and Bioengineering, **78**, 333-338 (2002).

(2) 蘇るか分子化石～長鎖ポリリン酸による蛋白質分解酵素の活性調節

黒田章夫、野村和孝、大竹久夫
蛋白質核酸酵素, **47**, 801-807 (2002).

(3) Lon によるリボソーム蛋白質のリサイクリングシステム

野村和孝、大竹久夫、黒田章夫
蛋白質核酸酵素, **49**, 1069-1070 (2004).

主論文

本論文の要旨

第1章 緒言

ポリリン酸はATPと同様の高エネルギーリン酸結合によって重合した無機ポリマーであり、高等生物を含め、生物に普遍的に存在する。ポリリン酸はその形状からリンあるいはエネルギーの貯蔵物質と考えられていたが、近年、分子生物学的な解析によって定常期における生存や病原性に関わることが明らかにされてきた。当研究室ではこのような背景のもと、大腸菌を用いてポリリン酸の蓄積機構およびその生理作用の解明を行ってきた。その結果、アミノ酸飢餓によって引き起こされる緊縮応答によりポリリン酸が蓄積すること、また蓄積したポリリン酸によって細胞内の自己タンパク質の分解を活性化することがわかってきた。ポリリン酸は飢餓への適応に必要なアミノ酸の供給に関与することが明らかとなった。そこで、本研究では緊縮応答で蓄積したポリリン酸がどのようにしてアミノ酸供給系に関与するのかについて解析した。

第2章 ポリリン酸によるプロテアーゼ活性調節機構の発見

ポリリン酸により制御を受けるプロテアーゼの同定を行った。大腸菌内のタンパク質の分解は、80%以上がエネルギー依存的に起こると言われている。そこで、ATP依存性プロテアーゼに注目して、その変異株による解析を行った結果、LonとClpがポリリン酸依存的なタンパク質分解に関わることを明らかにした。また、*in vitro*の結合実験からLonはポリリン酸に強く結合することがわかった。次に、ポリリン酸存在下でLonにより分解される基質を探索したところ、リボソームタンパク質S2,L9,L13の3種類を発見した。Lonは完全なリボソームに対しては分解を示さないことから、細胞内にプールとして存在する遊離のリボソームタンパク質を標的にしていると考えられる。アミノ酸飢餓時には、緊縮応答によりrRNAの転写が抑制されることから、リボソームタンパク質のプールは不要になる。ポリリン酸によるLonプロテアーゼの活性調節は、アミノ酸飢餓時に細胞内で不要になったリボソームタンパク質をアミノ酸の供給源として分解するリサイクリングシステムに重要であると考えられた。

第3章 プロテアーゼおよびDNA結合活性におよぼすポリリン酸の効果

ポリリン酸によるLonの活性調節に関して詳細な解析を行った。ポリリン酸はLonだけでなくリボソームタンパク質にも結合することから、両者のポリリン酸への結合が分解に関係していると考えられた。そこで、最初にポリリン酸がどちらに結合することが重要であるか調べたところ、Lonはポリリン酸と最初に結合し、複合体としてリボソームタンパク質を分解することが明らかになった。一方、Lonのみで分解する基質に対してポリリン酸はむしろ阻害効果を示すことから、ポリリン酸はLonに結合し、構造を変化させることで基質特異性を変化させていることが考えられた。また、Lonは古くから非特異的なDNAとの結合性を持つことが知られている。Lonの欠失タンパク質の解析から、ポリリン酸とDNAはLonの同

じ領域に結合することがわかった。さらに、DNA に結合した Lon がポリリン酸により遊離することを *in vitro* において示した。これらの結果から、Lon は通常核様体に局在しており、アミノ酸飢餓で蓄積したポリリン酸と結合して核様体から遊離することで基質へのアクセスが可能になるというモデルが考えられた。

第4章 ポリリン酸による Lon の細胞内局在の変化

第3章で示したモデルが細胞内でも正しいことを示すために、Lon の GFP 融合タンパク質を用いて細胞内局在を観察した。ポリリン酸を蓄積しない栄養条件では Lon-GFP は染色体 DNA の集合体である核様体に局在した。一方、アミノ酸飢餓では Lon-GFP は核様体から遊離し、ポリリン酸-Lon-GFP 複合体の粒子として確認できた。我々はこの粒子をストリンジेंटプロテアーゼ複合体と名付けた。また、ポリリン酸合成酵素である PPK についても同様に局在を調べたところ、栄養条件では大部分が極付近に、一部が核様体内にドット状に局在していることがわかった。一方、アミノ酸飢餓では核様体の外側に PPK の局在が変化し、ポリリン酸が合成されていた。ここで、核様体に局在していた Lon は合成されたポリリン酸に移行し、ストリンジेंटプロテアーゼ複合体として核様体から遊離すると考えられた。

第5章 ポリリン酸を介した DNA 結合タンパク質の活性調節機構

ポリリン酸と結合するタンパク質は *in vitro* において数多く見つかっており、その中には DNA 結合タンパク質が含まれている。そこで、Lon と同様な局在の変化を示す DNA 結合タンパク質を探索した。その結果、核様体を構成する主要なタンパク質の一つであり、グローバルな転写に関わる Fis を発見した。また、*in vitro* において Fis は Lon によりポリリン酸依存的に分解されることを見いだした。さらに、DNA が存在してもポリリン酸依存的に分解されることを示した。これらの結果は、Lon とポリリン酸による新規の転写調節機構の存在を示唆している。今後、細胞内における Fis の分解や転写への影響についてさらに詳細な解析が必要であると考えられた。

第6章 総括

本研究は、ポリリン酸の細胞機能を分子レベルで明らかにした最初の例といって過言ではない。特に、ポリリン酸のような無機ポリマーがプロテアーゼに直接作用することで局在を変化させると同時に基質の認識を変化させることは、今までまったく考えられていなかった新しい機構であり、非常に興味深い現象であるといえる。また、本研究のもう一つの重要な発見は、転写調節因子である Fis の局在や分解がポリリン酸によって調節されることである。この発見をもとに今後ポリリン酸による転写調節についても明らかになっていくものと考えられた。

主論文目次

第1章 緒言	1
1-1 本研究の背景	2
1-1-1 ポリリン酸とは	2
1-1-2 大腸菌のポリリン酸蓄積機構	2
1-1-3 アミノ酸飢餓で蓄積するポリリン酸の生理作用	4
1-2 本研究の概要	5
第2章 ポリリン酸によるプロテアーゼ活性調節機構の発見	7
2-1 序論	8
2-2 アミノ酸飢餓への適応に関わるプロテアーゼの同定	8
2-3 ポリリン酸と Lon プロテアーゼの相互作用	10
2-3-1 ゲルシフト実験でみる Lon とポリリン酸の結合	10
2-3-2 Lon に対するポリリン酸の結合力の測定	10
2-4 ポリリン酸-Lon 複合体によるリボソームタンパク質の分解	12
2-4-1 ポリリン酸-Lon 複合体の基質の探索	12
2-4-2 ポリリン酸の鎖長による分解の比較	13
2-4-3 アセンブルされたリボソームに対する分解作用	15
2-4-4 細胞内における S2 の分解	16
2-5 ポリリン酸-Lon によるリボソームタンパク質の認識機構	17
2-5-1 S2 のポリリン酸結合実験	17
2-5-2 ポリリン酸-Lon 複合体による S2 の認識	17
2-6 考察	17
第3章 プロテアーゼおよび DNA 結合活性におよぼすポリリン酸の効果	21
3-1 序論	22
3-2 ポリリン酸による Lon の基質特異性の変化	23
3-2-1 ポリリン酸は Lon の基質特異性を変化させる	23
3-2-2 ポリリン酸-Lon 複合体の形成がリボソームタンパク質の分解に重要である	24
3-3 Lon の DNA およびポリリン酸結合領域の限定	25
3-4 Lon に対する結合において競合するポリリン酸と DNA	28
3-5 Lon の DNA 結合特性	29
3-6 考察	31

第4章	ポリリン酸による Lon の細胞内局在の変化	35
4-1	序論	36
4-2	Lon の細胞内局在	36
4-2-1	Lon-GFP のポリリン酸および DNA 結合性	36
4-2-2	Lon-GFP の細胞内局在の観察	38
4-3	PPK の細胞内局在	40
4-4	考察	41
第5章	ポリリン酸を介した DNA 結合タンパク質の活性調節機構	43
5-1	序論	44
5-2	ポリリン酸により局在が変化する DNA 結合タンパク質の探索	44
5-3	Lon とポリリン酸による Fis の分解	45
5-4	考察	46
第6章	総括	49
	実験材料と実験方法	54
	参考文献	66
	謝辞	72

第1章

緒言

1-1 本研究の背景

1-1-1 ポリリン酸とは

ポリリン酸はATPと同様の高エネルギーリン酸結合によって重合した無機ポリマーである(Fig.1-1)(34)。ポリリン酸は高等生物を含め、普遍的に存在する。ポリリン酸はその形状からリンあるいはエネルギーの貯蔵物質と考えられていた。また、分解されると酸性になることからアルカリストレスに応答する緩衝剤としての機能や金属イオンのキレート剤としての機能が考えられていた。しかし、分子生物学的な解析ができなかったため、生物はなぜ多くのエネルギーを使ってこのような物質を合成するのかについて詳しく調べられていなかった。

1990年代に入り、ポリリン酸合成酵素の遺伝子(*ppk*)がスタンフォード大学の Arthur Kornberg 研究室でクローニングされ、分子生物学的な解析が進み始めた(2)。その結果、ポリリン酸を作ることができない大腸菌変異株は、定常期における生存率が低下することや、また、緑膿菌の変異株では、運動性が悪く、病原性や感染力が低下することが明らかになってきた(45)。

ポリリン酸は、バクテリアが過酷な環境になった時に必要であることがわかってきた。当研究室ではこのような歴史的背景のもと、大腸菌を使ってポリリン酸蓄積の分子メカニズムの解析、およびその生理作用の解明を行ってきた。

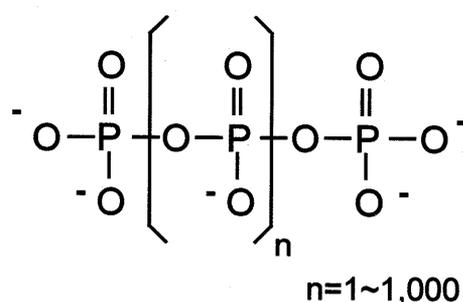


Fig. 1-1 ポリリン酸の構造

1-1-2 大腸菌のポリリン酸蓄積機構

大腸菌のポリリン酸合成酵素は、ATPの末端のリン酸基をポリリン酸に転移して約700個のリン酸が重合したポリリン酸を合成する。ポリリン酸合成酵素は多くの細菌で見いだされ

ており、今では15種類近い細菌からその遺伝子がクローニングされている。多量のポリリン酸を液胞に蓄積する酵母では、候補遺伝子が絞り込まれているが、その合成機構は不明である(40)。大腸菌のポリリン酸合成酵素はポリリン酸とADPが存在すると、逆反応でATPを生産する。ポリリン酸合成酵素が簡単に精製できるようになってから、ポリリン酸の測定方法が飛躍的に進歩した。すなわち、この逆反応を使ってポリリン酸からATPを生成させ、そのATPを発光法で測定することによってポリリン酸の量を知ることができる(5)。

大腸菌の増殖期には、通常わずかな量(0.1~1 nmol polyP/mg protein)のポリリン酸しか蓄積していない(36)。しかし、栄養飢餓などのストレスを与えると、数十分で100倍近く(約50 nmol polyP/mg protein)増加する(Fig.1-2)(36)。このポリリン酸の蓄積には緊縮応答(ストリンジェント応答)が関係する。緊縮応答とは、栄養飢餓などに応答してrRNAやtRNAの合成が抑制される現象として最初発見されたが、細胞分裂の停止やDNA複製の阻害など、様々な生理活動の変化を伴う現象であることがわかっている(10)。この中心になる分子が、

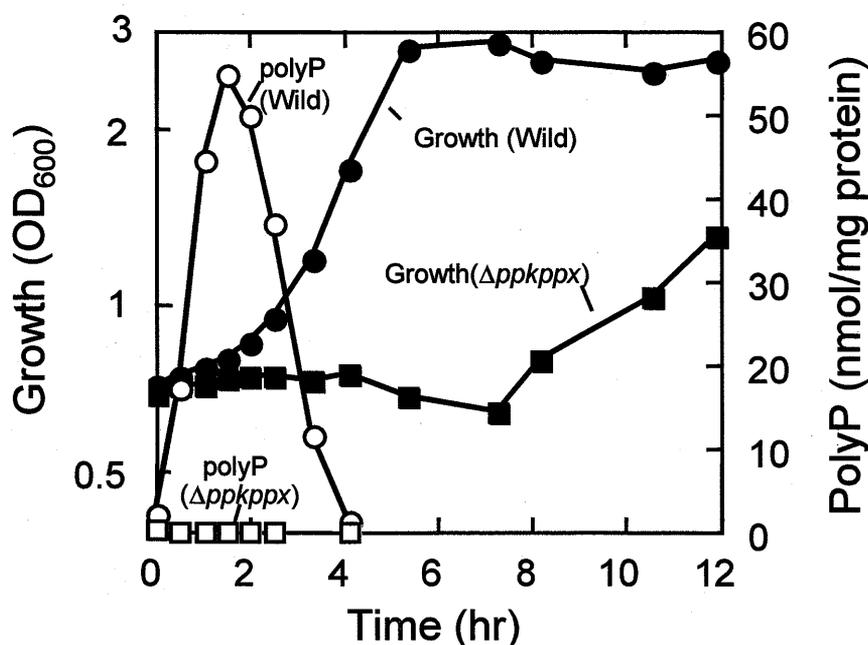


Fig. 1-2 大腸菌ポリリン酸合成酵素欠損株($\Delta ppk ppx$)の性質 栄養培地で増殖中の菌体を最少培地に移す。野生株ではポリリン酸が蓄積し、再び増殖が開始するとポリリン酸が減少する。ポリリン酸を蓄積できない $\Delta ppk ppx$ 株では最少培地への増殖適応が悪い。

グアノシン5リン酸(pppGpp)とグアノシン4リン酸(ppGpp)である。この低分子の合成には RelA と呼ばれる酵素が関与する。RelA はリボソーム上に存在し、アミノアシル化していない tRNA を介してアミノ酸の補給状態を監視している。すなわち、アミノ酸飢餓によってアミノアシル化していない tRNA が増加し、リボソームに結合すると、RelA タンパク質が活性化し、ATP と GTP から pppGpp を合成する。さらに、この pppGpp と ppGpp がポリリン酸分解酵素を拮抗的に阻害することがわかった(35)。緊縮応答を起こしている時の pppGpp の濃度では、ポリリン酸分解酵素の活性は 10%以下に落ち込む。すなわち、ポリリン酸は常に合成と分解を繰り返しているが、アミノ酸飢餓状態に晒されると、(p)ppGpp がポリリン酸の分解を阻止するために、ポリリン酸が蓄積するのではないかと考えられた。

1-1-3 アミノ酸飢餓で蓄積するポリリン酸の生理作用

大腸菌の野生株はアミノ酸飢餓に陥ると、いったん増殖を停止した後、速やかに増殖を再開する。しかし、ポリリン酸合成酵素を欠損させた変異株では、増殖能力の再開に遅延が見られた(Fig.1-2)。すなわち、緊縮応答で蓄積したポリリン酸は、その後の生育に重要な役割があると考えられた。大腸菌は、アミノ酸飢餓に陥ると、自分でアミノ酸を合成できるように酵素を誘導する。ポリリン酸合成酵素を欠損させた変異株はアミノ酸生合成系遺伝子の転写の低下がみられたことから、ポリリン酸は転写に関わっていることが示唆された。しかし、ごくわずかのアミノ酸を供給すると、この変異株はアミノ酸飢餓に適応できた。アミノ酸生合成系の酵素を誘導するためにも、またアミノ酸が必要である。つまり、極度のアミノ酸飢餓に突然陥った際、翻訳に必要なアミノ酸の供給が問題になってくるが、大腸菌は、自己の古いタンパク質を積極的に分解することによって、アミノ酸を供給する経路があると昔から知られていた。このことから変異株は、自己タンパク質の分解活性も減少していることが考えられた。実際、細胞内のタンパク質を¹⁴C-ロイシンで標識した後、アミノ酸飢餓にして自己タンパク質の分解を測定したところ、野生株では、アミノ酸飢餓に陥ると自己タンパク質

の分解が進むが、ポリリン酸を蓄積できない株では自己タンパク質の分解が促進されないことが明らかにされた (Fig.1-3) (6)。このことから、ポリリン酸はアミノ酸生合成系遺伝子の転写だけでなく、アミノ酸飢餓に適応するために必要なアミノ酸の供給に関わることが考えられた。

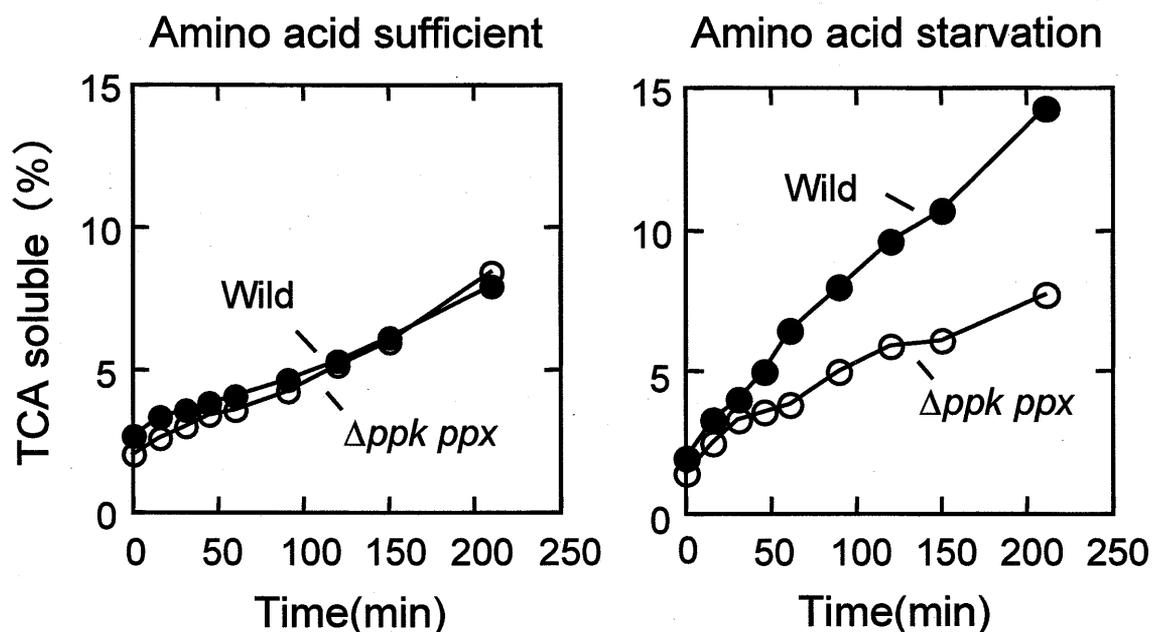


Fig. 1-3 緊縮応答を起こした細胞のタンパク質のターンオーバー 栄養培地(^{14}C -ロイシンを含む)で増殖中の菌体を、 ^{14}C -ロイシンを除いた(非放射性ロイシンは含む)栄養培地(左)と最少培地(右)に移し、細胞内タンパク質の分解を測定した。タンパク質に取り込まれた ^{14}C -ロイシンはトリクロロ酢酸(TCA)で沈殿するが、アミノ酸まで分解されるとTCA可溶性画分に移る。

1-2 本論文の概要

以上の背景をもとに、私は緊縮応答で蓄積したポリリン酸がどのようにしてアミノ酸供給系に関与するのかについて解析した。その結果、自己タンパク質の分解を行うプロテアーゼが Lon と Clp であることを明らかにした。さらに、ポリリン酸存在下で Lon の基質特異性が変化し、リボソームタンパク質群を分解することを発見した。緊縮応答により rRNA や tRNA

の転写が抑制されることは昔からよく知られている。この時、ポリリン酸による Lon プロテアーゼの活性調節によって、余った遊離のリボソームタンパク質が分解されると考えられる。このリボソームタンパク質のリサイクリングシステムは、アミノ酸飢餓時にアミノ酸を供給し、必要な酵素に作りかえるためのシステムであると考えられた。(第2章)。さらに詳しくポリリン酸による Lon の活性調節機構を調べた結果、活性化にはポリリン酸と Lon が最初に結合して複合体を形成することが重要であることがわかった。一方、Lon はもともと DNA 結合タンパク質として知られていた。Lon の DNA 結合領域とポリリン酸結合領域が一致するために、ポリリン酸存在下では Lon が DNA から遊離することがわかった。このことから細胞内において Lon は核様体に結合し、アミノ酸飢餓で蓄積したポリリン酸によって核様体から遊離するモデルを考えた。細胞内の主要なプロテアーゼである Lon は核様体に格納されることによって基質へのアクセスが抑制されていると考えられる。ポリリン酸は基質特異性を変化させるだけでなく、Lon の局在を変化させることによって Lon の活性を厳密に制御しているのではないかと考えた(第3章)。このモデルを検証するために、Lon と GFP の融合タンパク質を用いて *in vivo* での解析を行った。その結果、Lon-GFP は増殖時には核様体に存在し、アミノ酸飢餓に晒された時、核様体から遊離することがわかった。その際、複数の巨大なポリリン酸-Lon 複合体が核様体から遊離する様子が観察できた。初めて生体内で可視化することに成功したポリリン酸プロテアーゼ複合体をストリンジェントプロテアーゼ複合体と名付けた。さらに、PPK についても同様に局在を調べ、ストリンジェントプロテアーゼ複合体によるアミノ酸供給の分子機構についてまとめた(第4章)。緊縮応答で蓄積したポリリン酸は転写にも影響を及ぼすことが知られている。ポリリン酸によって Lon が核様体から遊離することから、その他の核様体に結合するタンパク質についても同様に局在性への影響が考えられた。ここではポリリン酸によって核様体から遊離する転写調節タンパク質を同定し、ポリリン酸による転写調節の可能性について考えた(第5章)。最後にこれらを総括してポリリン酸を介した緊縮応答の分子ネットワークに関してまとめた(第6章)。

第2章

ポリリン酸によるプロテアーゼ活性調節機構の発見

2-1 序論

大腸菌がアミノ酸飢餓に適応するためには、自己タンパク質分解の活性化による細胞内でのアミノ酸の供給が必要であり、その経路にポリリン酸が関わるということが明らかにされた。以前はタンパク質分解とはエネルギー非依存的に起こるものであり、単なる消化であると考えられていた。しかし、その後の研究から、タイミングよく特定の標的タンパク質を分解することで増殖制御やストレス応答など細胞機能の調節が行われていることが明らかとなっていった。さらにこのタンパク質分解は大部分がエネルギー(ATP)に依存して起こることも明らかになっている。大腸菌内のタンパク質の分解は、80%以上がエネルギー依存的に起こると言われている(37)。大腸菌には、FtsH, Lon, ClpAP, ClpXP, HslVU の5種類の ATP 依存性プロテアーゼが存在し、異常タンパク質の除去に働くほか、それぞれが分担して特異的な短寿命調節タンパク質を分解することで、基本的な細胞機能を調節していることが明らかとなっている(41)。ポリリン酸合成酵素欠損株は野生株と比較して細胞内 ATP 濃度に大きな差が見られなかったことから、ポリリン酸の機能としてはエネルギー供給ではなく、おそらく直接相互作用することによりこれらのプロテアーゼ活性に影響を及ぼすことが考えられた。そこで、アミノ酸飢餓においてポリリン酸により制御を受けるプロテアーゼを明らかにし、その活性調節のメカニズムについて詳細な解析を行った。

2-2 アミノ酸飢餓への適応に関わるプロテアーゼの同定

大腸菌の ATP 依存性プロテアーゼのうち、FtsH は増殖に必須なタンパク質であるため、Lon, ClpAP, ClpPX, HslVU 欠損株(32)についてアミノ酸飢餓における適応を観察した。その結果、Lon, Clp プロテアーゼが欠損すると、ポリリン酸合成酵素欠損株と同じようにアミノ酸飢餓への適応が悪いことが分かった(Fig.2-1-A)。実際、¹⁴C-ロイシンを用いたタンパク質ターンオーバーの実験を行った結果、Lon, Clp プロテアーゼは、アミノ酸飢餓における細胞内タ

タンパク質のターンオーバーの上昇に関わっていることがわかった。さらに、*lon*, *clp*, *ppk* 三重変異株の自己タンパク質分解は、*lon*, *clp* 二重変異株のそれと変わらないことから、ポリリン酸が関与するタンパク質の分解は Lon、Clp と同じ経路であると考えられた(Fig.2-1-B)。

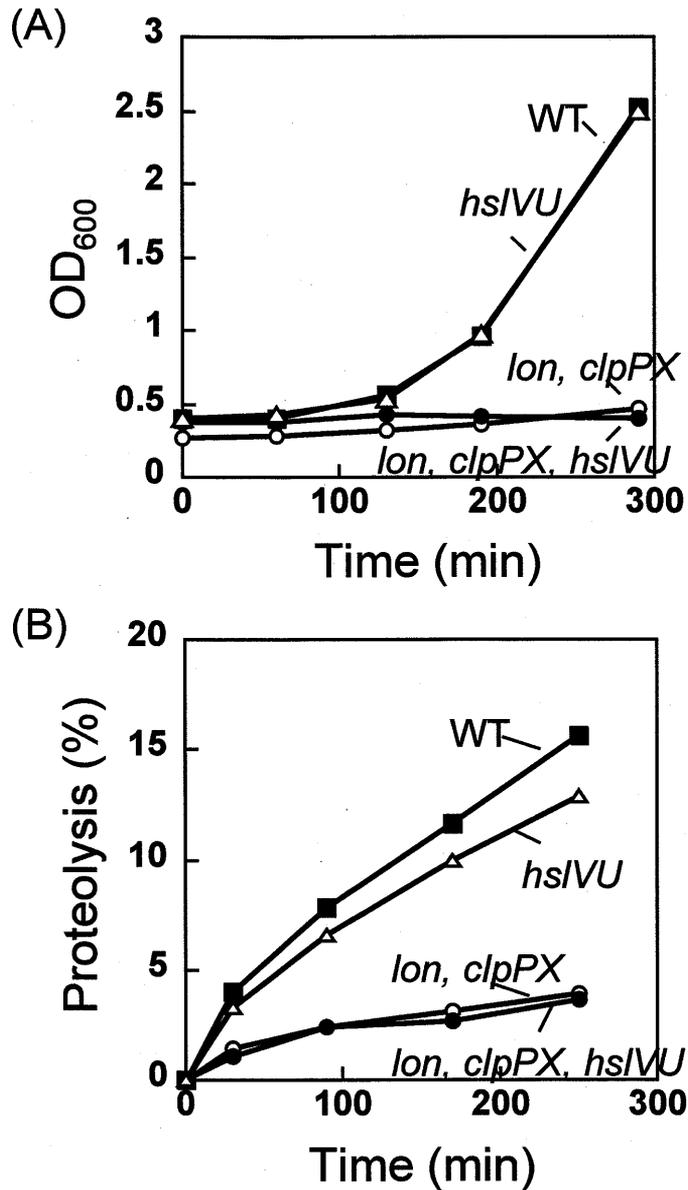


Fig. 2-1 アミノ酸飢餓時における大腸菌のプロテアーゼ変異株の増殖と細胞内タンパク質の分解 (A)大腸菌MG1655(WT)とその変異株 KY2966(*hslVU*), KY2347(*lon*, *clpPX*), KY2350(*lon*, *clpPX*, *hslVU*)を2×YT培地で対数期まで培養後、MOPS最少培地に移した後、吸光度600nmで増殖を測定した。(B)細胞内タンパク質の分解は、¹⁴C-ロイシンが取り込まれた全タンパク質のうち、トリクロロ酢酸に可溶性の画分にくる放射活性の割合として測定した。

2-3 ポリリン酸と Lon プロテアーゼの相互作用

2-3-1 ゲルシフト実験でみる Lon とポリリン酸の結合

Lon は大腸菌において最初に発見された ATP 依存性プロテアーゼであり、細胞の中で最も活性が高い(14)。Lon は古くから非特異的な DNA 結合性を持つことが知られているが(12)、その生理的な意味は未だ明らかになっていない。ポリリン酸は電荷的な性質が DNA とよく似ていることから、Lon と直接相互作用することが考えられた。そこで、ゲルシフト実験により両者の結合を調べることにした(Fig.2-2)。³²P でラベルしたポリリン酸[大腸菌のポリリン酸合成酵素により作製した鎖長約 700 のポリリン酸(1)]を、精製した Lon と混合して、アガロースゲル電気泳動すると、Lon の量に応じてポリリン酸のバンドが高分子側にシフトした。さらにポリリン酸と等量(モル)の DNA(pUC119)を加えた場合においても、Lon によるポリリン酸のシフトに影響は見られなかった。この結果から、Lon に対して DNA よりもポリリン酸の方が強い結合力を持つことが考えられた。なお、対照としてとして牛血清アルブミン(BSA)を Lon の 100 倍量(モル)加えたが、ポリリン酸のバンドのシフトは確認されなかった。したがって、Lon とポリリン酸の結合は特異的であるといえる。

2-3-2 Lon に対するポリリン酸の結合力の測定

Lon とポリリン酸の結合について、化学量論的な測定をするためにニトロセルロースを用いたフィルター結合実験を行った(Fig.2-3)。ポリリン酸はニトロセルロースフィルターを素通りするが、タンパク質はフィルターに結合することから、³²P-ポリリン酸を用いれば Lon に結合したポリリン酸はフィルター上の放射活性で定量できる。測定結果をスキッチャードプロットで表したところ、その直線の傾きから算出できた解離定数(K_d)は 0.5nM であった。また、1mM の ATP 存在下でも解離定数が変わらないことから、ポリリン酸の結合は ATP と競合しないことがわかった。さらに、プロットの直線と X 軸との切片からポリリン酸の最大

結合濃度が2~2.5nMであった。この時使用したLon(4量体)の濃度が約2nMであることから、Lon(4量体)1分子に、1分子の長鎖ポリリン酸が結合していると推定できた。

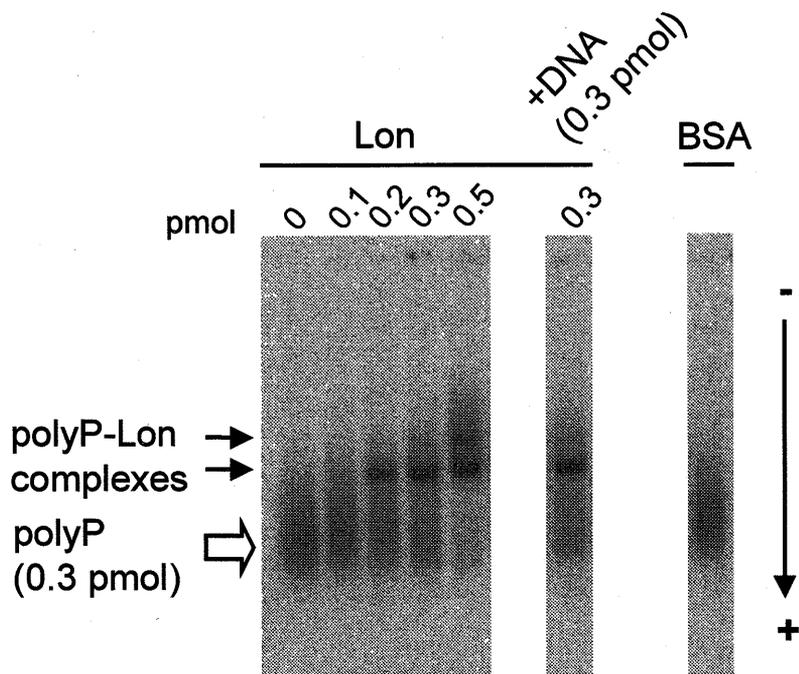


Fig. 2-2 ゲルシフト実験によるLonとポリリン酸の結合 ^{32}P -ポリリン酸と精製したLonを50mM Tris-HCl (pH7.4), 10mM MgCl_2 , 10mM P_i 中で室温で保温した。電気泳動は1%アガロースゲルでTAE bufferで行った。電気泳動後、放射線により感光させて検出した。

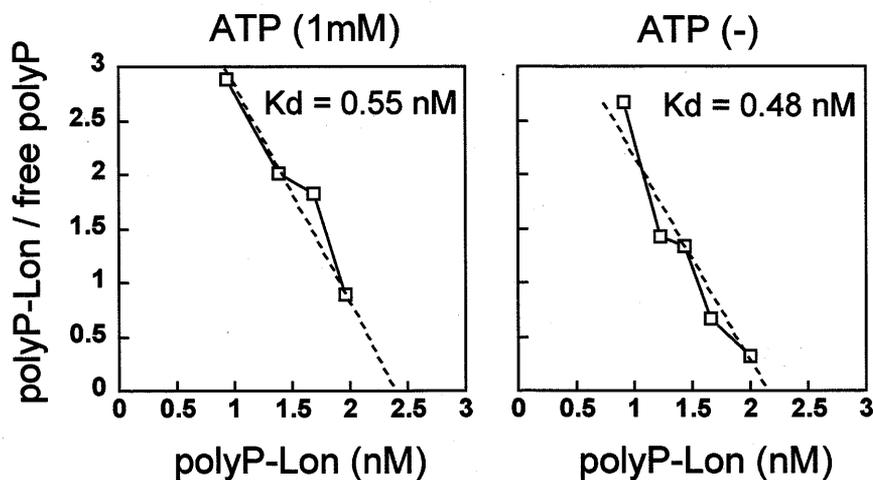


Fig. 2-3 Lonのポリリン酸結合力の測定 Lon(4量体として2.5nM)のポリリン酸結合実験はニトロセルロースフィルターを用いて行った。 ^{32}P -ポリリン酸は0.86から8.6nMの濃度で使用した。スキッチャードプロットの直線の傾きは $-1/K_d$ 、X軸との切片はポリリン酸-Lonの最大濃度を示す。

2-4 ポリリン酸-Lon 複合体によるリボソームタンパク質の分解

2-4-1 ポリリン酸-Lon 複合体の基質の探索

ポリリン酸によってタンパク質のターンオーバーが上昇する理由として、ポリリン酸が Lon に結合し、複合体を形成することで分解する基質が存在するのではないかと考えた。具体的に、今まで Lon 単独では分解しなかった、あるいは分解が遅かった基質タンパク質に対して、その分解活性の上昇がみられるかどうか検証した。大腸菌全タンパク質をホスホセル

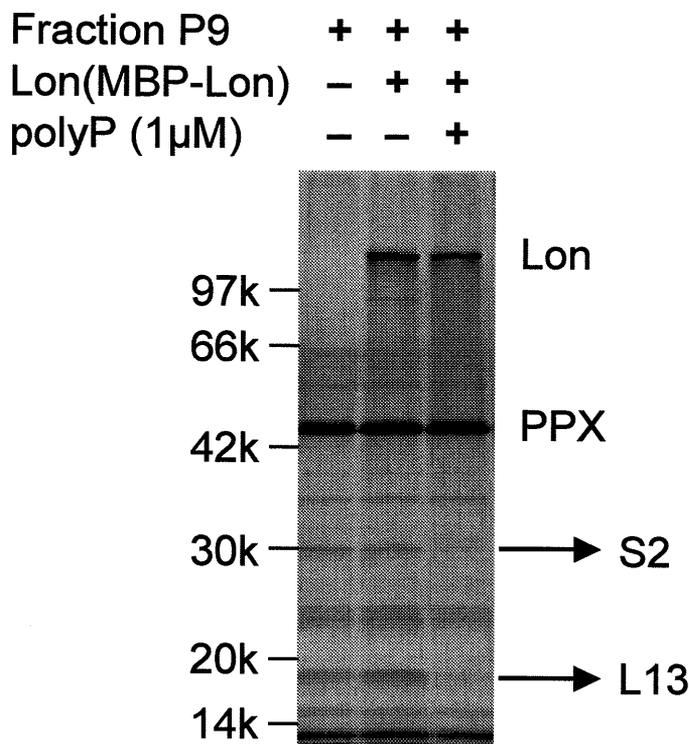


Fig. 2-4 Lonによりポリリン酸依存的に分解される基質の同定 Fraction P9と MBP-Lon (0.6 μ g)をポリリン酸(リン酸として0.7mM、ポリマーとして1 μ M)存在下で反応を行った。37°C60分後、ポリリン酸分解酵素(酵母由来、 3×10^4 U)を加えて5分間ポリリン酸を分解させた。12% SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)によりタンパク質を分離後、銀染色により検出を行った。N末端アミノ酸配列を決定し、その配列からタンパク質の同定を行った。

ロースやDEAEセルロースで分画した後に、全ての画分にLonとポリリン酸を混合して、ポリリン酸存在下で分解される基質タンパク質を探索した。数百のタンパク質を検討した結果、ホスホセルロースカラムの画分の一つからポリリン酸存在下でLonによって分解されるものを3種類発見した。これらのN末端アミノ酸配列を決定したところ、いずれもリボソームタンパク質(S2、L9、L13)であった(Fig.2-4)。

2-4-2 ポリリン酸の鎖長による分解の比較

分解を促進するポリリン酸の濃度を調べたところ、 $1\mu\text{M}$ で十分であることが明らかとなった(Fig.2-5)。また、S2の分解を経時的に追ったところ、ポリリン酸存在下で分解が促進していることが確認できた(Fig.2-6)。さらに、リボソームからrRNAを除いたリボソームタンパク質を基質に用いて分解をみたところ、最初に発見した3種類以外のタンパク質もポリリン酸依存的にLonにより分解された。しかし、ポリリン酸の鎖長が長くなければその効果がなく、リン酸の数が15個以下であると分解の促進効果が見られなかった(Fig.2-7)。

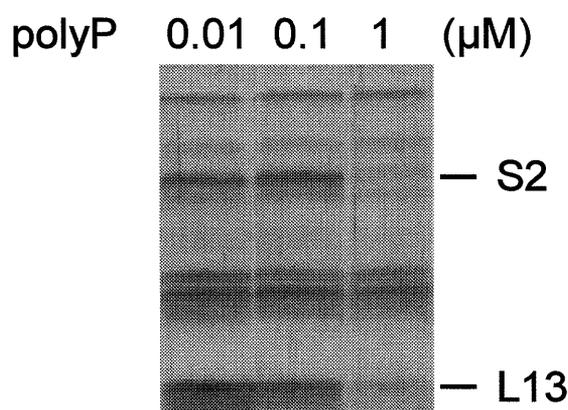


Fig. 2-5 Lonの分解におけるポリリン酸の濃度依存性 Fraction P9とMBP-Lon (0.6μg)をポリリン酸(0.01, 0.1, 1μM)存在下で37°C60分反応させた。その他の条件はFig.2-4と同じ。

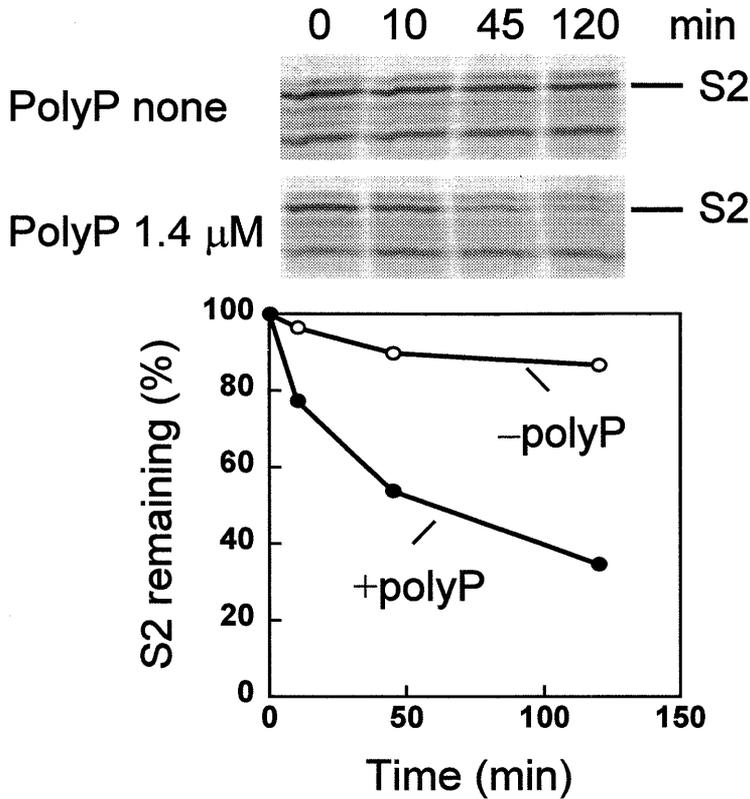


Fig. 2-6 ポリリン酸-LonによるS2分解の経時変化 Fraction P9とMBP-Lon (1 μ g)をポリリン酸(1.4 μ M)存在下で反応させた。経時的にサンプリング後、Fig.2-4と同じ条件で分析した。

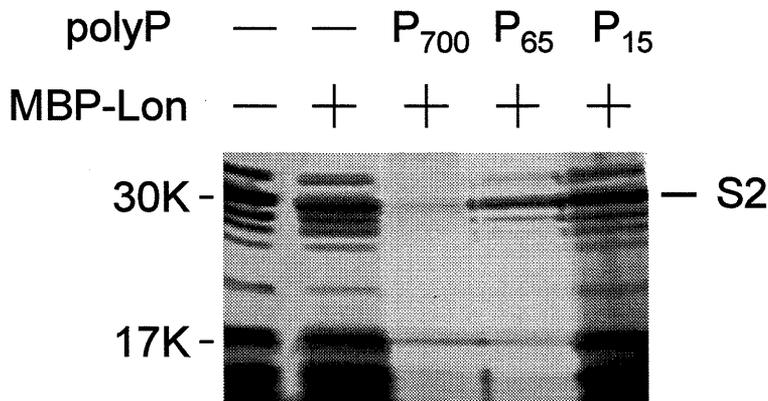


Fig. 2-7 Lonの分解におけるポリリン酸の鎖長依存性 異なる鎖長のポリリン酸をリボソームから抽出したリボソームタンパク質の分解に用いた。リボソームタンパク質(1 μ g)とMBP-Lon(0.1 μ g)を各ポリリン酸(リン酸として0.64mM)存在下で37 $^{\circ}$ C60分反応させた。その他の条件はFig.2-4と同じ。P700: 大腸菌のポリリン酸合成酵素により作製した鎖長約700のポリリン酸、P65: 市販の平均鎖長65のポリリン酸、P15: 市販の平均鎖長15のポリリン酸

2-4-3 アセンブルされたリボソームに対する分解作用

Lon とポリリン酸により、リボソームタンパク質を効率よく分解できることが明らかとなった。そこで、ポリリン酸-Lon 複合体は完全なリボソームを基質として分解できるかどうか調べた。その結果、完全なリボソームは分解できないが、RNase により rRNA を少し分解することで複合体はリボソームタンパク質を分解することがわかった(Fig.2-8)。どの程度リボソームの構造がくずれると複合体が作用するかについては今のところ明らかになっていないが、少なくともリボソームから遊離したリボソームタンパク質に対しては効率よく分解できることがわかった。

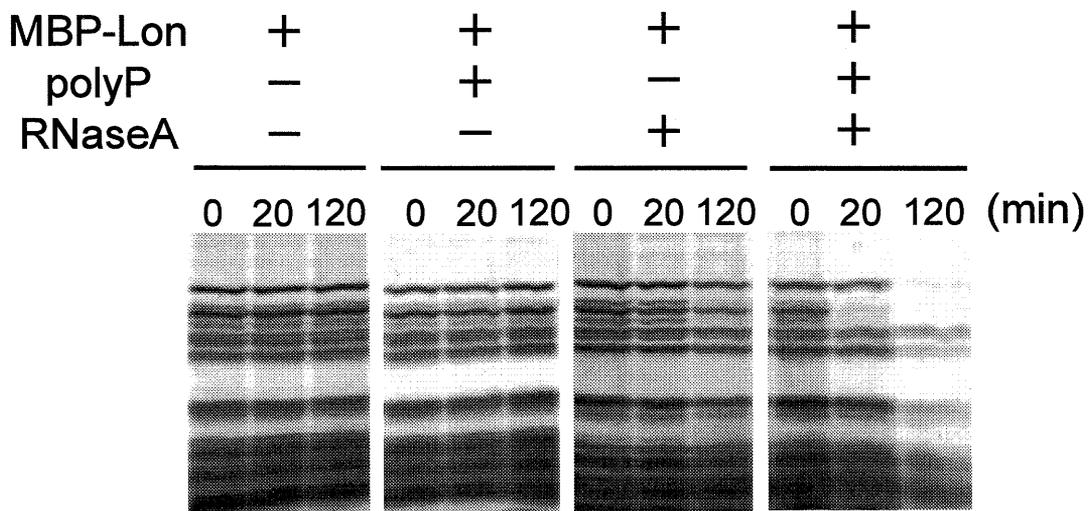


Fig. 2-8 アセンブルされたリボソームに対する作用 リボソーム(7.3 μ g)とMBP-Lon (3.6 μ g)をポリリン酸(1.6 μ M)およびRNaseA (0.3 μ g)存在下、37 $^{\circ}$ Cで反応させた。各サンプルはFig.2-4と同じ条件で分析した。

2-4-4 細胞内における S2 の分解

これまで、*in vitro* におけるリボソームタンパク質の分解について示してきた。次に、細胞内における Lon とポリリン酸によるリボソームタンパク質の分解について解析を行った。S2-V5 エピトープ融合タンパク質(14 アミノ酸からなるペプチドであり、抗 V5 抗体によりウェスタン解析ができる)を野生株および $\Delta ppk ppx$ 株で発現させ、アミノ酸飢餓における分解を比較した(Fig.2-9)。栄養培地において、両株とも S2-V5 の分解に差は見られないが、アミノ酸飢餓にシフトすることで、野生株のみ顕著な分解促進が起こった。このことから、*in vivo* においてもポリリン酸がリボソームタンパク質の分解を促進することが明らかとなった。

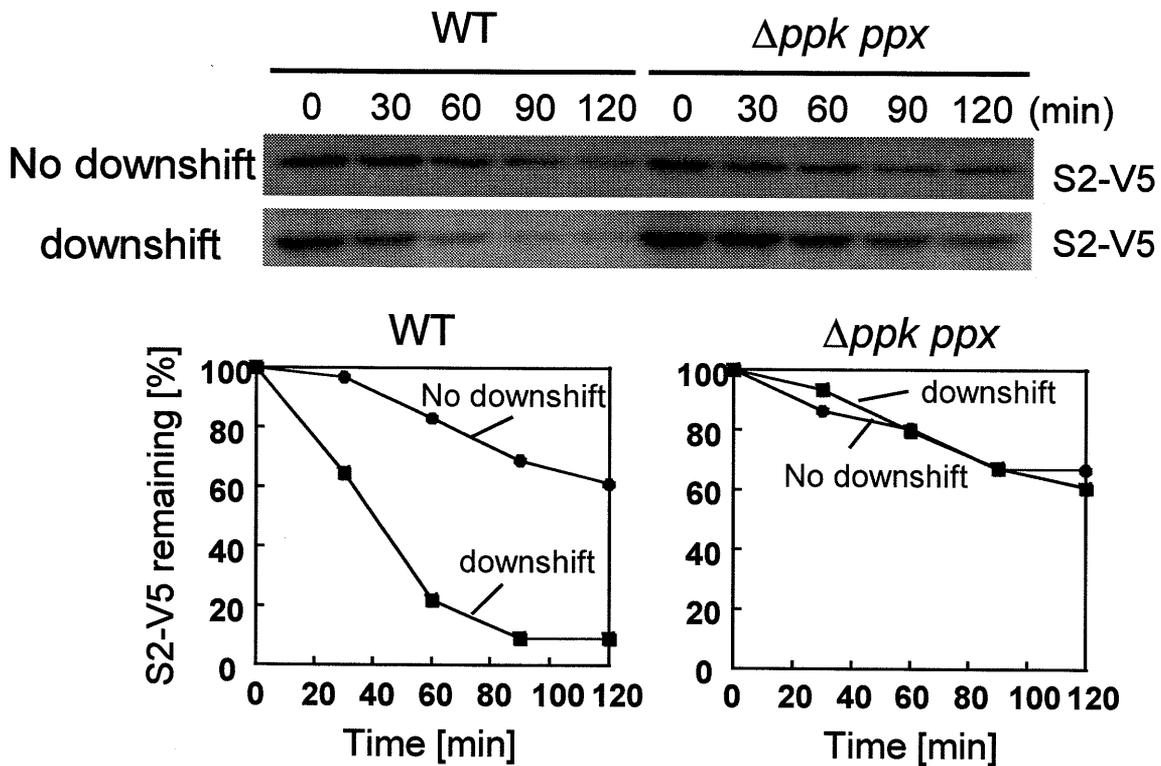


Fig. 2-9 細胞内におけるS2の分解 野生株と $\Delta ppk ppx$ 株を0.2% L-アラビノースを含む2×YT培地で2時間培養し、S2-V5融合タンパク質を発現させた。細胞を集菌後、L-アラビノースを含まない2×YT培地(No downshift)とL-アラビノースを含まないMOPS最少培地(downshift)に懸濁した。各時間の全タンパク質(100μl分の菌体)をSDS-PAGE後、抗V5抗体(invitrogen)を用いてウェスタン解析を行った。X線フィルムに感光させた後のバンドの定量はBIO IMAGEを用いた。

2-5 ポリリン酸-Lon 複合体によるリボソームタンパク質の認識機構

2-5-1 S2 のポリリン酸結合実験

リボソームタンパク質は rRNA と結合する強い塩基性タンパク質であることからポリリン酸との相互作用が考えられる。そこで、S2 のポリリン酸結合性をフィルター結合実験により調べた(Fig.2-10)。精製した S2 と ^{32}P -ポリリン酸の混合液を、ニトロセルロースフィルターでろ過すると、フィルター上に放射活性が検出されることから、S2 はポリリン酸と結合することが確認できた。この時、S2 とポリリン酸の解離定数は 12nM 程度であった。さらに、質量で 10 倍の pUC119 DNA や大腸菌の全 RNA を競合させた場合でもフィルター上にポリリン酸が検出できたことから、特異的な結合であるといえた。

2-5-2 ポリリン酸-Lon 複合体による S2 の認識

Lon の MBP 融合タンパク質 (MBP-Lon) を S2 タンパク質と混合して、アミロースカラム (MBP と特異的に結合する) に添加した。MBP-Lon はアミロースカラムに結合するが、S2 は全て溶出した。しかし、ポリリン酸を MBP-Lon と S2 の混合液 (分解を防ぐため ATP は除いている) にあらかじめ混ぜておくことにより、S2 の一部がカラムに保持された。次にマルトースを添加すると MBP-Lon と S2 が同時に溶出した(Fig.2-11)。このことから、ポリリン酸存在下で、Lon プロテアーゼは S2 を認識して結合できるようになることが明らかとなった。

2-6 考察

これまでの結果から、大腸菌緊縮応答時のポリリン酸によるリボソームタンパク質分解促進機構モデルを示す(Fig.2-12)。大腸菌はアミノ酸飢餓に陥ると (p)ppGpp と呼ばれる緊縮因子が蓄積する。(p)ppGpp は rRNA や tRNA の転写を抑制すると共に、ポリリン酸分解酵素 (PPX) を拮抗的に阻害することでポリリン酸が蓄積すると考えられている(35)。この蓄積したポリ

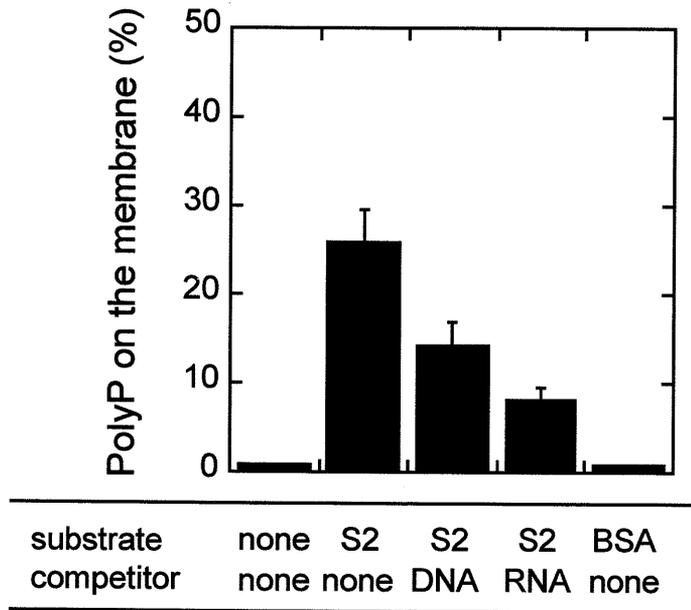


Fig. 2-10 S2のポリリン酸結合性 精製したS2(0.45 μ g)、あるいはBSA(2 μ g)と 32 P-ポリリン酸(0.04 μ g = 11nM)を混合してニトロセルロースフィルター上で結合を調べた。競合剤としてpUC119 DNA(0.45 μ g)および大腸菌全RNA(0.48 μ g)を用いた。

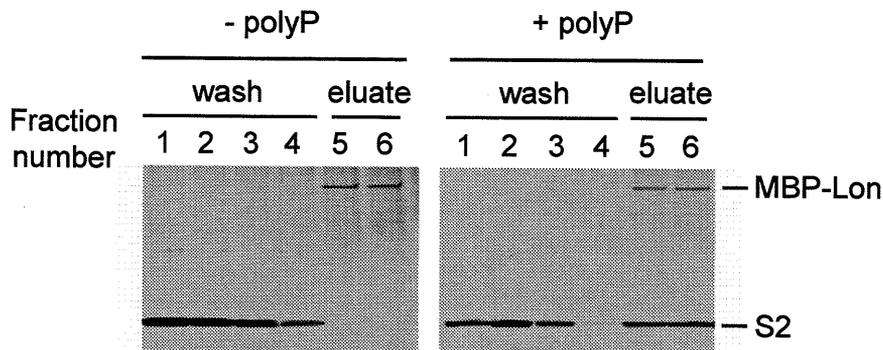


Fig. 2-11 ポリリン酸存在下におけるLonとS2の複合体形成 精製したMBP-Lon(12 μ g)とS2(50 μ g)をポリリン酸(0.2 μ M)を含む、あるいは含まない緩衝液(20mM Tris-HCl pH7.4, 5mM MgCl₂)中で37°C10分保温した。混合液(500 μ l)をアミロースレジンを充填した1mlカラムに添加した。50mM Tris-HCl pH7.4, 200mM NaClで洗浄後(画分1~4)、10mMマルトースを含む同じ緩衝液でMBP-Lonを溶出した(画分5, 6)。全ての画分はSDS-PAGE後、銀染色により検出した。

リン酸が ATP 依存性プロテアーゼの一つである Lon と結合することで細胞内の遊離リボソームタンパク質を分解することを発見した。栄養条件では約 10% のリボソームタンパク質が遊離の状態で存在するといわれている(53)。特に、S2 はリボソームの表面に存在し、20% 近くも遊離の状態で存在することが知られている(53)。アミノ酸飢餓では(p)ppGpp の働きにより rRNA の転写が抑制されることから、プールとして存在する遊離リボソームタンパク質は不要になる。したがって、この不要なタンパク質を分解することで細胞内にアミノ酸を供給し、アミノ酸飢餓に適応するために必要な酵素に作りかえるのではないかと考えている。さらに、この機構はアミノ酸飢餓時の翻訳活性の低下にも関わるといえる。しかし、リボソーム自体の数を減らすかどうかに関しては、不明瞭な部分がある。RNase によりある程度リボソームを分解することで、ポリリン酸-Lon 複合体により分解できることから、リボソームを標的とする RNase を同定することができれば、アミノ酸飢餓によるリボソームの減少を説明できるかもしれない。

次に細胞内の Lon やポリリン酸の濃度を鑑みて、このモデルの妥当性を考えてみた。大腸菌の細胞内 ppGpp 濃度は通常 20 μ M であるが、アミノ酸飢餓に陥った時には 1mM に達する。ppGpp による PPX の阻害定数 K_i は 200 μ M であることから十分にポリリン酸の分解を抑制できる。ポリリン酸の分解が停止した結果、ポリリン酸（鎖長約 700 のポリマーとして）の濃度が通常の 0.1 μ M 以下から 15 μ M 程度まで上昇する。この濃度は試験管内において Lon を活性化する濃度（1 μ M）を上回る。またこの時 1 細胞あたりのポリリン酸の分子数は約 20,000 であり、Lon の分子数約 3,000 を上回る。アミノ酸飢餓時、ポリリン酸により活性化されるタンパク質分解は全タンパク質の 5% 程度である(1-1-3 参照)。また、遊離リボソームタンパク質は全タンパク質の約 2.5% を占めることから(53)、遊離のリボソームタンパク質の全てが分解されたとすると、ポリリン酸により活性化されるタンパク質の約半分を説明できたことになる。このことから、おそらくリボソームタンパク質以外にも Lon とポリリン酸により分解される基質の存在が考えられた（第5章で発見する Fis の分解も含まれるだろう）。ま

た、アミノ酸飢餓におけるタンパク質分解には、Lon だけでなく、Clp も同程度関与している。よって今後、Clp とポリリン酸についても解析が必要であると考えられた。

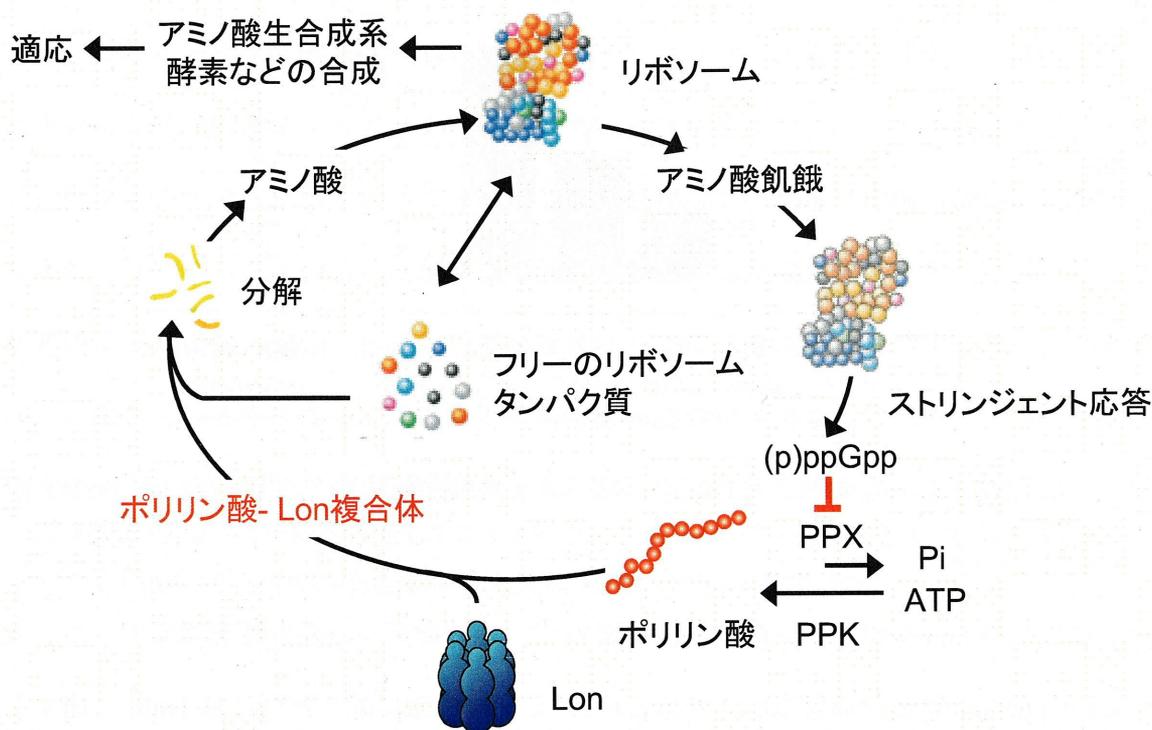


Fig. 2-12 大腸菌緊縮応答時のポリリン酸によるリボソームタンパク質分解促進機構

第3章

プロテアーゼおよびDNA 結合活性に およぼすポリリン酸の効果

3-1 序論

大腸菌がアミノ酸飢餓において蓄積するポリリン酸は、ATP 依存性プロテアーゼの一つである Lon と結合して複合体を形成することで、細胞内の遊離リボソームタンパク質の分解を促進することを発見した。これは、大腸菌がアミノ酸飢餓に適応するために必要なアミノ酸を供給するための、リボソームタンパク質のリサイクリングシステムであると考えられる。ポリリン酸は Lon だけでなく、リボソームタンパク質とも結合する。基質の分解には、この基質自身へのポリリン酸の結合も重要であることを示唆するデータが得られている。ポリリン酸への Lon とリボソームタンパク質の結合の順序が Lon の活性発現に重要な意味を持つかもしれないが、それに関してはまだ明らかになっていなかった。

Lon は真正細菌からアーキア、さらには真核生物のミトコンドリア内に存在する非常に保存された酵素である(11)。Lon は機能未知の N 末端ドメイン、典型的な Walker 型の ATP 結合モチーフを含む ATPase ドメイン、679 番目のセリンを活性中心とする C 末端のプロテアーゼドメインから構成される(4,13,37,58)。さらに、N 末端には BAB(basic-acidic-basic)領域(18)が、ATPase とプロテアーゼドメインの間に SSD(sensor and substrate discrimination)ドメイン(49)が存在すると報告されている。

Lon は、放射線への耐性、細胞分裂、莢膜の成分である多糖類の生産、あるバクテリオファージの溶原性など細胞内におけるいくつかの重要な機能の調節に関わっている(24,25,26)。また、大腸菌の Lon は非特異的に DNA と結合することが知られている(12)。しかしながら、ヒトのミトコンドリア Lon は一本鎖の高 GT 含量のミトコンドリア DNA に特異的に結合するという報告もある(21)。さらに、大腸菌の Lon が II 型ヒト免疫不全症ウイルスのエンハンサー内にある高 GT 含量の領域(pets site)に結合することも報告されている(22)。ただし、大腸菌の染色体上で Lon が特異的に結合する配列の存在については明らかにされていない。Lon の DNA 結合領域は BAB ドメインに含まれることが示唆されている(13)。また、一方で LexA の DNA 結合領域との相同性から、Lon のプロテアーゼドメインに DNA 結合領域が存在する

という報告もある(46)。しかし、いずれの場合もアミノ酸配列からの予測であり、実験的に示されたわけではないことから、LonのDNA結合領域は不明であった。

本章では、DNAとポリリン酸が共にLonのATPaseドメインに結合することを実験的に示し、その結果からポリリン酸によるLonのDNA結合活性の制御について議論した。

3-2 ポリリン酸によるLonの基質特異性の変化

3-2-1 ポリリン酸はLonの基質特異性を変化させる

第2章において、リボソームから抽出したリボソームタンパク質の多くがポリリン酸存在下でLonにより分解されることを示した。そこで、完全精製が可能であった9種類のリボソームタンパク質(L1, L3, L6, L9, L13, L15, L17, L18, L24)について、ポリリン酸存在下における分解を調べた。その結果、L1, L3, L6, L24はポリリン酸存在下で分解が促進された(Fig.3-1-A)。また、L9, L13, L17についてもポリリン酸により分解が促進したが、L15, L18はポリリン酸添加の効果が見られなかった(データは示さない)。このように、ポリリン酸により分解が促進されるものとされないものがあることがわかったが、その違いをアミノ酸配列上の共通性からみいだすことはできていない。

また、Lonは細胞内においていくつかの調節タンパク質の分解を行うことが知られている(37)。SOS応答で誘導される細胞分裂の阻害タンパク質であるSulAもその一つである。実際に、精製したMBP-SulA融合タンパク質はLonにより分解された。一方、ポリリン酸存在下では、分解が阻害された(Fig.3-1-B)。これは、ポリリン酸の結合によりLonの基質認識部位の構造が変化したためではないかと考えている。これらの結果から、ポリリン酸はLonによる分解を常に活性化するわけではなく、Lonの基質特異性に影響を与えているといえる。

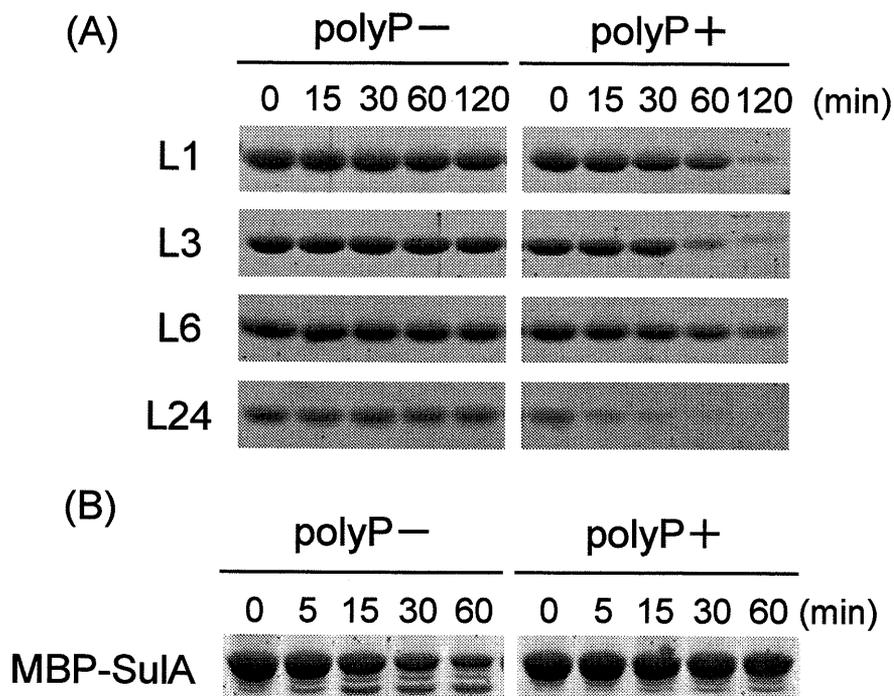


Fig. 3-1 ポリリン酸存在下でのLonによる基質タンパク質の分解 (A) 精製したリボソームタンパク質(5 μ g)とLon(1.5 μ g)をポリリン酸(1.4 μ M)存在下(polyP+)および非存在下(polyP-)において37 $^{\circ}$ Cで反応させた。(B) MBP-SulA(5 μ g)を(A)と同じ条件で反応させた。反応後のサンプルは12.5% SDS-PAGEにより分離し、SYPRO Orangeによる蛍光染色を行った。

3-2-2 ポリリン酸-Lon 複合体の形成がリボソームタンパク質の分解に重要である

Lon もリボソームタンパク質もポリリン酸に結合する。ポリリン酸は最初に Lon と結合し、複合体としてリボソームタンパク質を分解するのか？あるいは、ポリリン酸が最初にリボソームタンパク質に結合し、Lon はこの複合体を認識するのか？後者の場合、ポリリン酸は真核細胞におけるユビキチンのような分子タグの役割を持つといえるかもしれない。この疑問を解決するために、L24 の分解において、ポリリン酸の加える順番の効果をみた(Fig.3-2)。ポリリン酸と Lon を最初に混合して結合させておいた後に L24 を加えて反応を開始した場合、L24 は効率よく分解された。一方で、ポリリン酸と L24 を最初に結合させておいた後に Lon を加えて反応を開始した場合、L24 はわずかししか分解されなかった。また、L6 に関しても同

様な結果が得られた。これらの結果から、Lon とポリリン酸は最初に複合体を形成することが重要であり、ポリリン酸はタグの役割を果たしているわけではないことが明らかとなった。

ポリリン酸存在下で Lon により分解が促進されるリボソームタンパク質はいずれもポリリン酸と結合する。このことから、ポリリン酸を介した分解には、最初に Lon とポリリン酸が複合体を形成することが重要であるが、基質とポリリン酸の結合も必要であると考えられる。しかし、ポリリン酸と結合する全てのタンパク質がポリリン酸存在下で Lon により分解される訳ではない。例えば、ポリリン酸合成酵素やリボソームタンパク質 L15、L18 はポリリン酸と結合するが、ポリリン酸存在下で Lon により分解されない。このことから、ポリリン酸存在下の Lon による分解に、基質へのポリリン酸の結合は必要であるが、それだけでは十分でないようである。

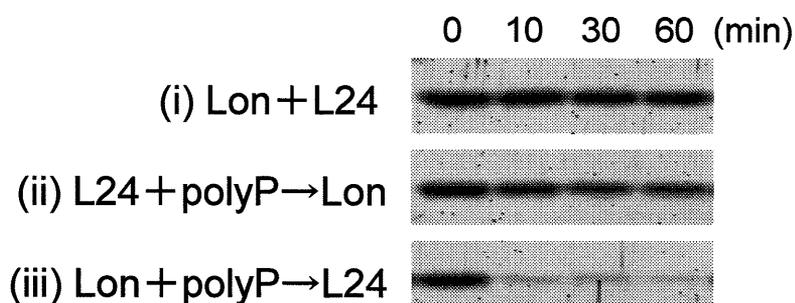


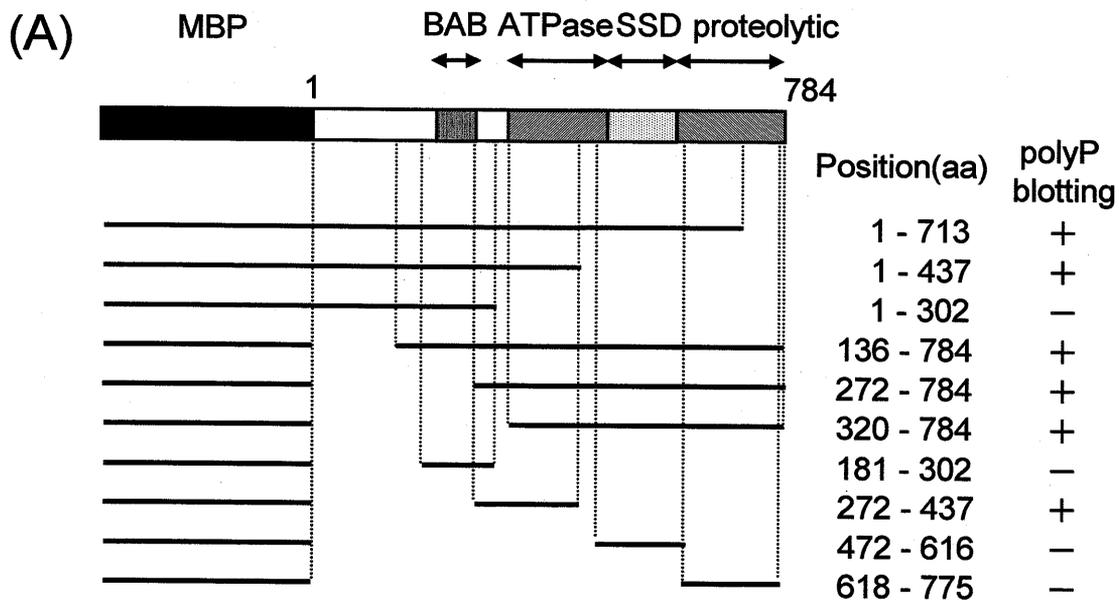
Fig. 3-2 LonによるL24の分解におけるポリリン酸の加える順序の影響 リボソームタンパク質L24(1.2 μ g)、Lon(0.6 μ g)およびポリリン酸(0.7 μ M)を異なる順番で混合して反応させた。(i) LonとL24をポリリン酸非存在下で混合した。(ii) L24とポリリン酸を37°C5分保温した後、Lonを加えた。(iii) Lon とポリリン酸を37°C5分保温した後、L24を加えた。それぞれのサンプルはFig.3-1と同様に分離、染色を行った。

3-3 Lon の DNA およびポリリン酸結合領域の限定

Lon には、BAB、ATPase、SSD、proteolytic の四つのドメインが存在する(Fig.3-3-A)。ポリリン酸結合領域を限定するために、MBP-Lon の欠失タンパク質を作製した。これらの欠失タ

ンパク質とポリリン酸の結合は polyP blotting により確認した。polyP blotting とは SDS-PAGE で分離したタンパク質をニトロセルロース膜に転写後、界面活性剤処理により膜上でリフォーリングさせ、³²P-ポリリン酸との結合をみる方法である。実験の結果、Lon272-437 はポリリン酸結合能を持つことがわかった(Fig.3-3-B)。さらに、Lon320-784 もポリリン酸と結合することから、アミノ酸で 320 番目から 437 番目の領域にポリリン酸結合部位が存在すると予想された。この領域は基質のアンフォールドに関わる ATPase ドメインに含まれていた。さらに、アミロースカラムおよび陰イオン交換カラムにより精製した欠失タンパク質のポリリン酸結合力をフィルター結合実験により調べた。その結果、Lon272-437 は全長の Lon と同程度の結合を示した(Fig.3-4-A)。

Lon は最初に DNA 結合タンパク質として同定されたにもかかわらず、DNA 結合領域は明らかにされていなかった。そこで、精製した欠失タンパク質を用いて DNA 結合領域の限定を行った。³²P でラベルした *leuC* DNA(Lon に結合する DNA 断片、詳細は以下に示す)をプローブとして上述したフィルター結合実験を行った。その結果、DNA もポリリン酸と同じ ATPase ドメイン内に結合することが明らかとなった(Fig.3-4-B)。



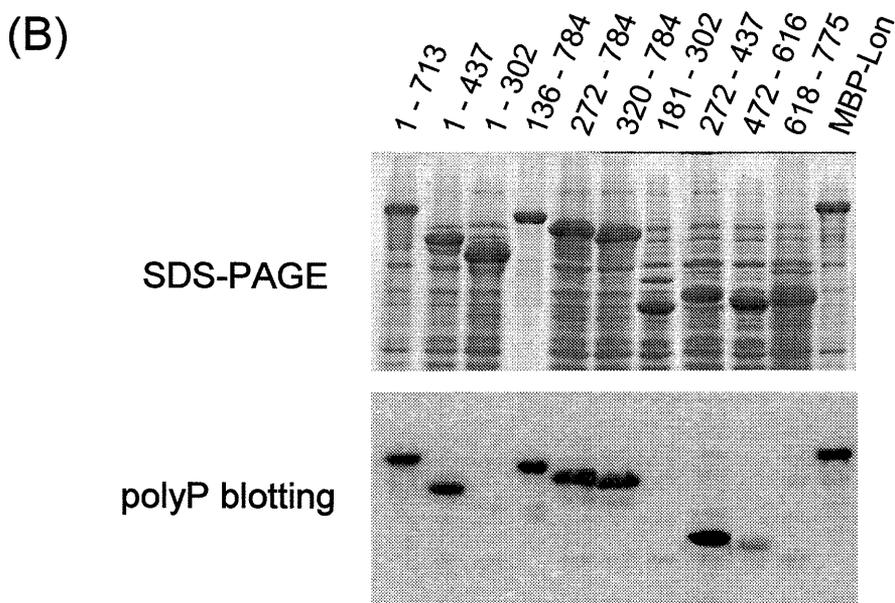


Fig. 3-3 Lonのポリリン酸結合領域の限定 (A) MBP-Lonの一次構造で予想されるドメインを示す。BABはbasic-acidic-basic、SSDはsensor and substrate discriminationの略。欠失タンパク質の構造はMBPと融合したLonのアミノ酸(aa)の番号で示している。また、polyP blottingの結果を図の右に示した。(B) MBP-Lonおよび欠失タンパク質を発現させた大腸菌の全タンパク質をSDS-PAGEにより分離した後、クマシー染色を行った。polyP blottingには ^{32}P -ポリリン酸をプローブとして用いた。

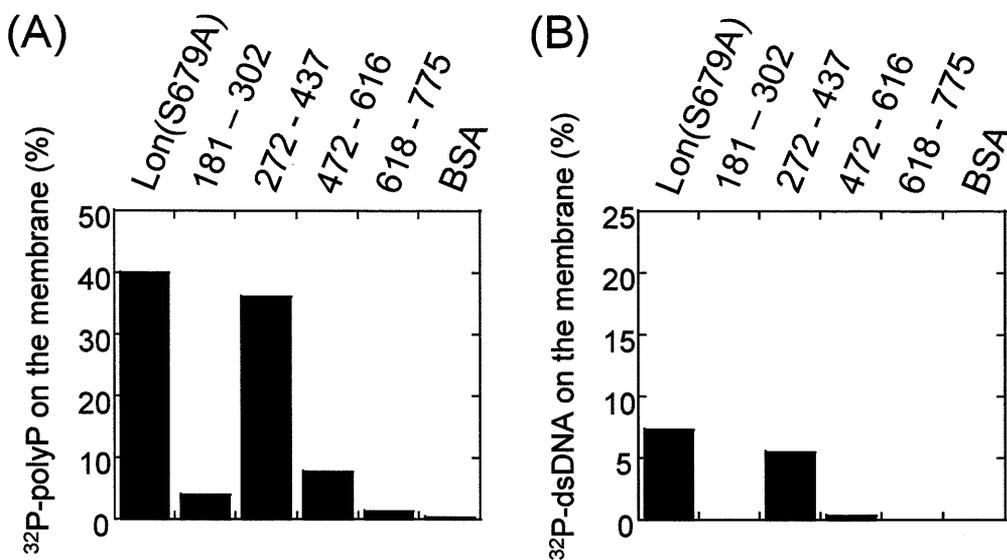


Fig. 3-4 Lonのポリリン酸およびDNA結合領域の比較 精製したMBP-Lon (S679A)と欠失タンパク質のポリリン酸およびDNAの結合性をフィルター結合実験により比較した。(A) 精製した各タンパク質(35pmol)およびBSA(30pmol)と ^{32}P -ポリリン酸(1pmol)を室温で5分反応後、ニトロセルロースフィルターに通過させた。(B) ^{32}P -ポリリン酸のかわりに ^{32}P -*leuC* DNA (1pmol)を用いて、同様の実験を行った。

3-4 Lon に対する結合において競合するポリリン酸と DNA

ポリリン酸と DNA が Lon の同じ領域に結合することから、Lon に対する両者の結合が競合すると予想された。このことを確かめるために、ゲルシフト実験による DNA-Lon 複合体へのポリリン酸の影響を調べた。DNA(*leuC*)と Lon を混合してアガロースゲル電気泳動をすると複合体が観察できた。しかし、DNA と等量(モル)のポリリン酸存在下では、DNA と Lon の複合体は観察できなかった(Fig.3-5)。この結果は、両者の結合が競合することだけでなく、DNA よりポリリン酸の方が Lon に強く結合することを示唆している。さらに、DNA セルロースカラムに結合させた MBP-Lon へのポリリン酸の効果を調べた。MBP-Lon は緩衝液で洗浄しても溶出しないが、ポリリン酸を流すことでカラムからの溶出が確認できた(Fig.3-6)。この結果は、DNA とポリリン酸が Lon の同じ部分に結合し、競合することにより起こると考えられる。

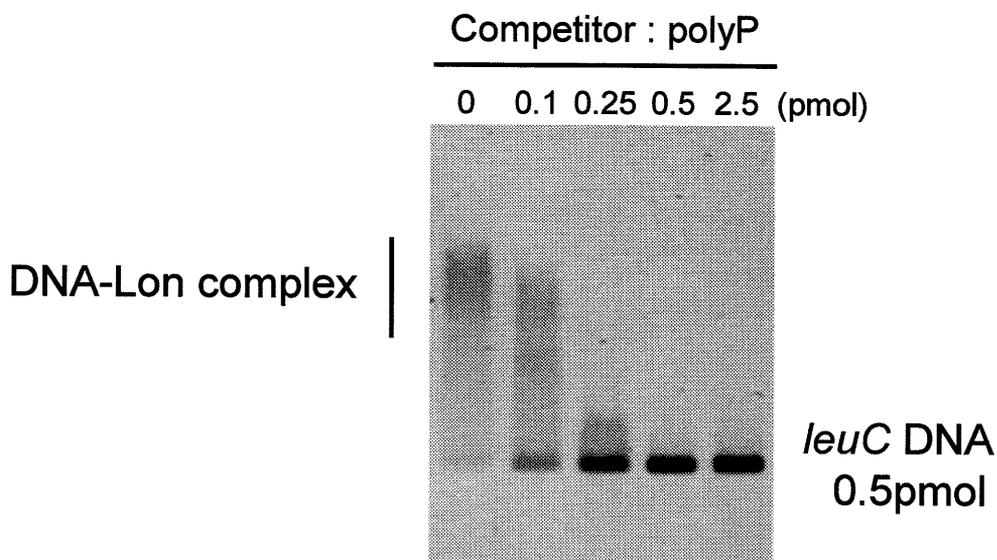


Fig. 3-5 DNA-Lon複合体のゲルシフト実験 *leuC* DNA(0.5pmol)とLon(1 μ g=12pmol)をポリリン酸(0~2.5pmol)存在下で室温5分保温した。各サンプルを泳動用色素と混合後、1%アガロースゲル電気泳動により分離した。臭化エチジウムで染色後、DNAをUVで検出した。

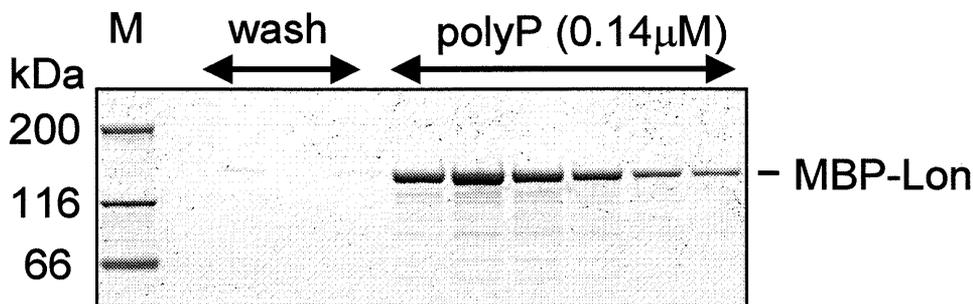


Fig. 3-6 ポリリン酸によるDNA固定化カラムからのLonの溶出 MBP-Lon(50 μ g)を20mM Tris-HCl, pH 8.0, 50mM NaClで平衡化したDNA-cellulose (アマシャムバイオサイエンス)に添加した。同じ緩衝液で2カラム体積分洗浄後、0.14 μ Mのポリリン酸を含む緩衝液でMBP-Lonを溶出した。それぞれの画分はSDS-PAGEにより分離し、銀染色により検出した。Mは分子量マーカを示す。

3-5 Lon の DNA 結合特性

Lon は古くから非特異的に DNA と結合すると言われてきた(12)が、Fu らは大腸菌の Lon が II 型ヒト免疫不全症ウイルスのエンハンサー内にある高 GT 含量の領域(pets site)に結合することを報告した(22)。しかし、Lon が大腸菌の染色体上で特異的な配列に結合するかどうかは明らかにされていない。そこで、この問題を明らかにするために、アミロースカラムにより MBP-Lon と共に精製される大腸菌の DNA 断片のクローニングを行い、その塩基配列を調べた。ランダムに 21 個のクローンを選出して解析を行った結果を Table 1 に示す。これらの断片の塩基配列間で明らかな類似は見られなかった。また、得られた断片は ORF 内部のものが多く、Lon が結合することで転写開始を活性化したり抑制したりする可能性も低いと考えられた。この結果から、Lon は大腸菌の染色体 DNA に対して非特異的に結合すると結論づけた。

また、Lon に対する *leuCDNA* と *pets DNA* の結合の強さを比較した。上述したゲルシフト実験において、ポリリン酸の代わりに、合成した 36bp の *pets DNA* を競合させたところ、モル比で 100 倍存在しても *leuCDNA* と Lon の複合体が観察できた(データは示さない)。こ

Table.1 MBP-Lon と共精製される大腸菌 DNA 断片

Gene	position ^a
<i>b0899</i>	893 to 1363
<i>b2324</i>	-45 to 964
<i>b2973</i>	2200 to 2806
<i>cynS</i>	204 to 700
<i>ftsJ</i>	-84 to 546
<i>leuC</i>	514 to 1189
<i>lon</i>	845 to 1616
<i>lpdX</i>	686 to 1071
<i>malE</i>	313 to 932
<i>rhsE</i>	1006 to 1864
<i>rplM</i>	162 to 664
<i>secD</i>	-67 to 673
<i>yacK</i>	118 to 675
<i>yafA</i>	703 to 1417
<i>ybbC</i>	31 to 413
<i>yecA</i>	72 to 605
<i>yecS</i>	393 to 1072
<i>yejB</i>	-23 to 512
<i>yfhK</i>	430 to 1033
<i>ygcU</i>	375 to 861
<i>ymfE</i>	15 to 498

^aNucleotide number from the start site of translation is indicated.

の結果は、Lon に対する *pets* DNA の結合が *JeuC* DNA と比較して特別強いものでないことを示している。

3-6 考察

タンパク質分解を介した制御は、細胞内で厳密におこなわれている。特に、真核生物では、ユビキチンを付加したタンパク質のプロテアソームによる分解系がよく知られている(7,15,28)。バクテリアにおいても、何らかの原因で翻訳が停止した際にできた不完全なタンパク質に SsrA と呼ばれるタグを付加し、分解の目印にするというおもしろい機構が存在する(33)。それゆえ、ポリリン酸は Lon を介した分解のタグとして働くかと推測した。しかし、今回の実験から、ポリリン酸は分解のタグとして働くわけではなく、Lon の構造に直接影響を及ぼすことで、基質特異性を変化させていることが明らかとなった。ポリリン酸-Lon 複合体の詳細な構造は明らかになっていないが、ゲル濾過クロマトグラフィーにより分子量 200 万以上の巨大な複合体であることを示した。さらに、動的光散乱により分子量約 875 万であると推定できた(データは示さない)。また、Lon 4 分子にポリリン酸 1 分子結合することから(第2章参照)、Lon に多くのポリリン酸が結合して巨大になったわけではなく、自己会合により規則的な構造をとるようになっているのではないかと予想される。

Lon の欠失タンパク質の解析から、ポリリン酸と DNA の結合部位が ATPase ドメイン内に存在することが明らかとなった。また、ポリリン酸は DNA よりも強く Lon に結合し、Lon に結合した DNA がポリリン酸に置き換わることを示した。このことから、Lon は通常、染色体 DNA の集合体である核様体に存在しており、アミノ酸飢餓で蓄積したポリリン酸により遊離することでリボソームタンパク質を分解するモデルが考えられた(Fig.3-7)。しかし、Lon が DNA に結合する意味はよくわかっていない。Goff と Goldberg らは Lon の過剰発現が、正常なタンパク質の分解を引き起こし、細胞が致死性を示すことを報告している(23)。通常条

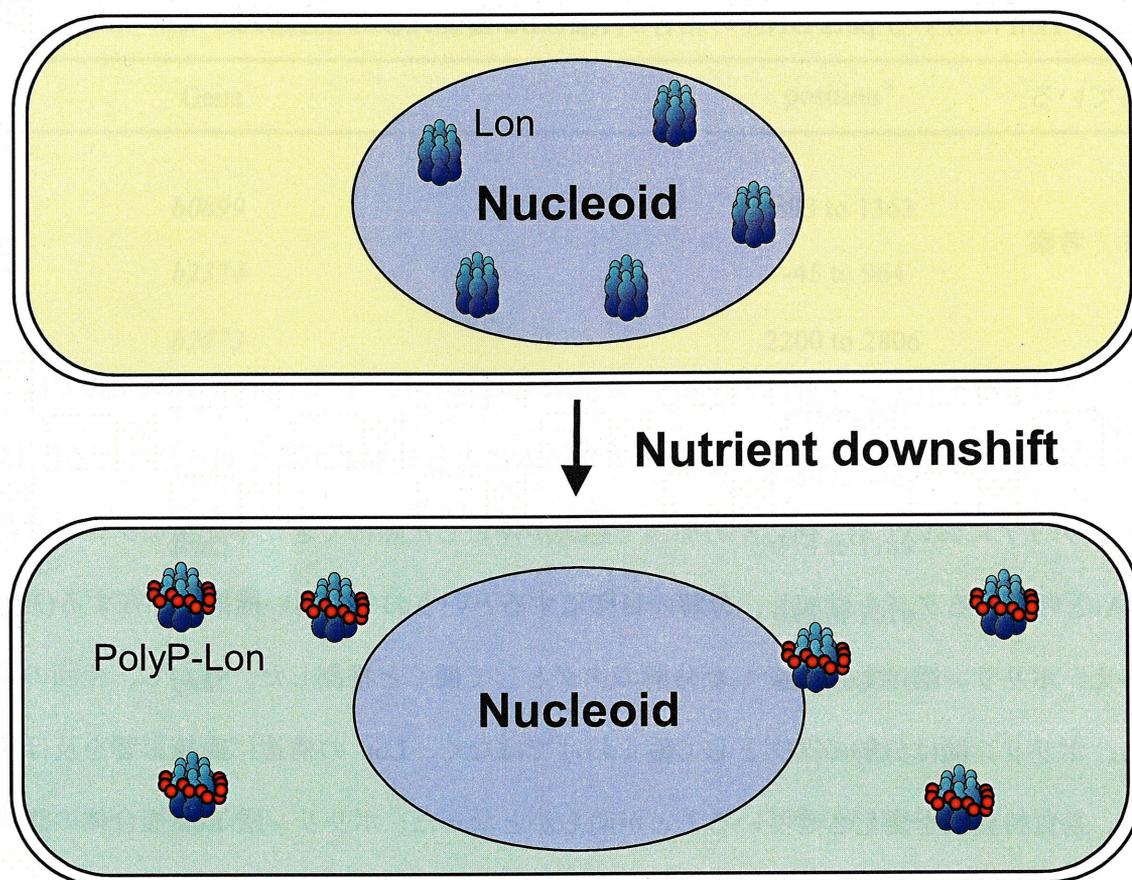


Fig. 3-7 ポリリン酸を介したLonの活性制御モデル

件では、Lon の存在は細胞にとって都合が悪いのかもしれない。Sonezaki らは正常な条件において、Lon と DNA は核様体内で複合体を形成しており、その結果、基質へのアクセスが制限されることで分解が抑えられていると推測している(52)。また、彼らは、変性した BSA(Lon の基質になる)存在下で Lon が DNA から遊離するが、未変性の BSA は Lon の遊離を引き起こさないことや、Lon を 47°C で処理することで DNA 結合活性が低下するが、プロテアーゼ活性には影響がないことを *in vitro* で示した。これらの発見は、細胞がヒートショックに晒された時、Lon が DNA から遊離して熱変性したタンパク質を分解することを示唆している。このように、Lon はさまざまなストレスにより DNA から遊離することで活性が制御されると考えられている。

Lon の DNA 結合性は、基質へのアクセスの制限以外にも機能があるかもしれない。例えば、

転写因子などの分解に Lon の DNA 結合性に関わる可能性も考えられる。実際、初期の研究において、Lon が *gal* オペロンの転写量の調節に関わっていることが報告されている(29)。これが事実だとすれば、ポリリン酸は転写調節にも関わっているといえる。しかし、Lon は大腸菌の染色体に非特異的に結合することから、Lon による転写制御の可能性を明らかにするためにはさらに多くの研究が必要であると思われる。Lon の DNA 結合性の本質が、基質へのアクセスの制限による活性の抑制なのか、あるいは転写調節因子の分解なのか、また双方なのかは今のところはっきりとしていない。しかし、いずれにおいても、アミノ酸飢餓において細胞内のポリリン酸濃度が劇的に変化することで Lon の DNA 結合活性に影響をおよぼし、それにより細胞機能が調節される可能性が本章において示された。

第4章

ポリリン酸による Lon の細胞内局在の変化

4-1 序論

第3章の *in vitro* における解析から、Lon は通常 DNA に結合して存在しており、アミノ酸飢餓で蓄積したポリリン酸に結合することで DNA から遊離し、さらに基質特異性が変化するというモデルを考えた。次に、このモデルが正しいかどうか細胞内で調べる必要がある。タンパク質の細胞内局在の解析には、一般的に GFP (green fluorescent protein) が用いられる。例えば、DNA 結合タンパク質の一つである HU と GFP の融合タンパク質は DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) で染色される核様体に局在することが報告されている(55)。DAPI は DNA だけでなくポリリン酸も染色することができ、蛍光波長の差により区別することができる。この特徴を利用して、大腸菌のアミノ酸飢餓における Lon-GFP の局在を観察した。また、ポリリン酸を合成する酵素である PPK の GFP 融合タンパク質を用いた局在の観察から、ポリリン酸が細胞内のどこで合成されるかについて調べた。本章では、この二種類のタンパク質の局在からアミノ酸飢餓におけるポリリン酸を介した Lon の活性調節について議論した。

4-2 Lon の細胞内局在

4-2-1 Lon-GFP のポリリン酸および DNA 結合性

Lon の局在解析には N 末端に 6×His タグ、C 末端に GFP を融合した Lon を用いた。*lon-gfp* 遺伝子は *lac* プロモーターからの発現を LacI リプレッサーにより厳密に制御できるマルチコピーのプラスミド(pHis₆-*lon-gfp*)上にコードされる。まず、精製した Lon-GFP を用いて *in vitro* での活性を確認した。 α -カゼインを基質とした時のプロテアーゼ活性は、Lon と比較してほぼ 30%程度であった(Fig.4-1-A)。また、リボソームタンパク質 L9 のポリリン酸依存的な分解に関しても α -カゼインの場合と同程度の活性であった(データは示さない)。N 末端に MBP を融合した MBP-Lon ではプロテアーゼ活性に変化がないことから、GFP の影響というより

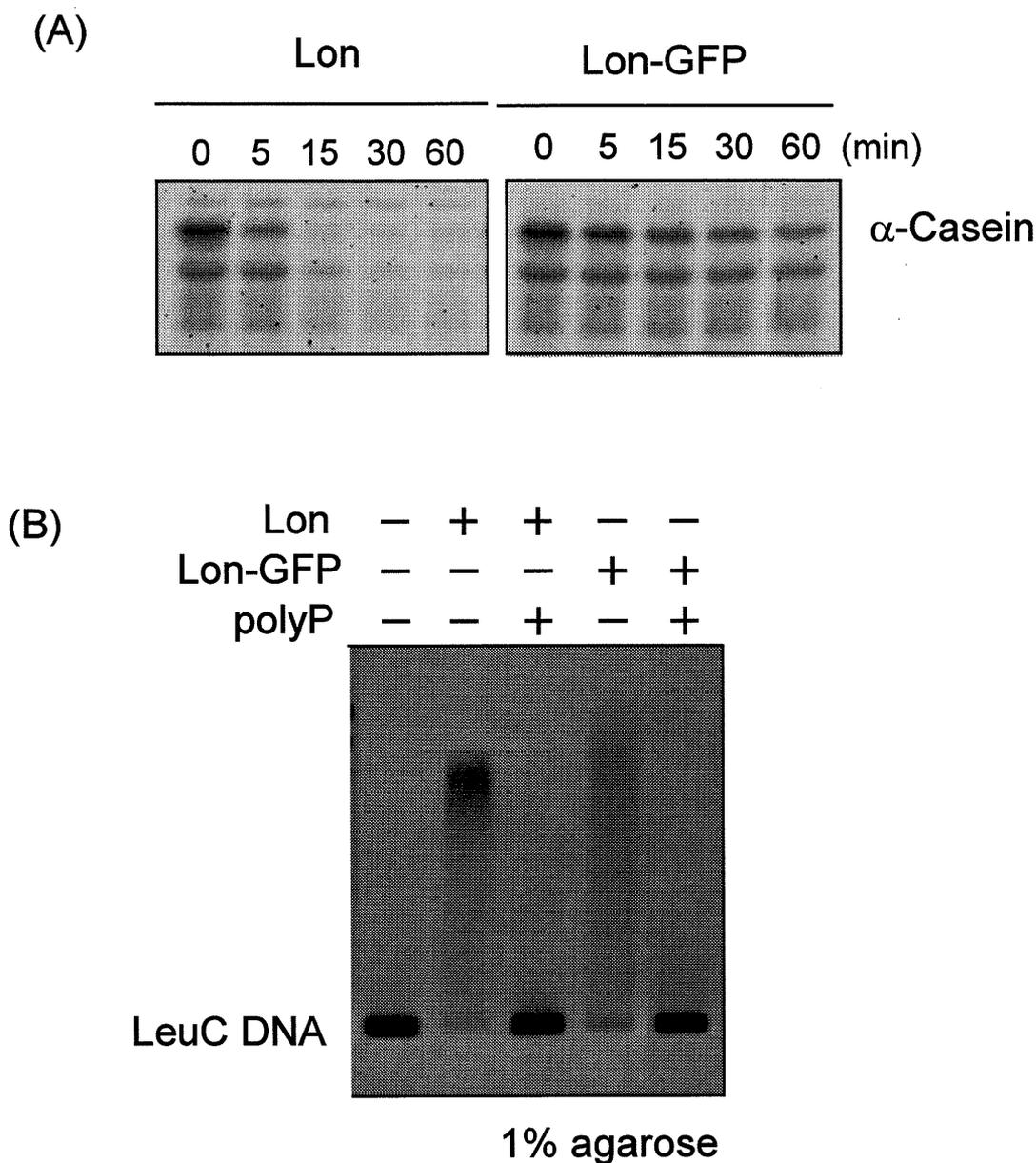


Fig. 4-1 LonとLon-GFPの活性の比較 (A) α -カゼイン (sigma)(2 μ g)にLon(1 μ g=12pmol)およびLon-GFP(1.5 μ g=12pmol)を加え、37°Cで図に示した時間反応させた。反応後のタンパク質は12.5%SDS-PAGEにより分離後、SYPRO Orangeにより染色を行った。(B) ゲルシフト実験はFig3-5と同様の条件で行った。*leuC* DNA(0.5pmol)とLon(1 μ g)およびLon-GFP(1.5 μ g)をポリリン酸(0.5pmol)存在、非存在下で室温5分反応させた。反応液を泳動用色素と混合後、1%アガロースゲル電気泳動により分離した。DNAは臭化エチジウムにより染色後、UVで検出した。

は C 末端にタンパク質を融合したことによりプロテアーゼ活性が低下したと考えられる。次に Lon-GFP の DNA およびポリリン酸結合活性をゲルシフト実験により調べた。ポリリン酸がない場合、DNA (*leuC*) は Lon-GFP と複合体を形成するが、DNA と等量(モル)のポリリン酸存在下では DNA と Lon-GFP の結合はほぼ完全に阻害された(Fig.4-1-B)。よって、Lon-GFP の DNA およびポリリン酸結合性は Lon と同程度であることが示された。Lon-GFP はプロテアーゼ活性が低下しているものの、Lon と同程度のポリリン酸および DNA の結合活性を有することから局在の解析に使用可能であると判断した。

4-2-2 Lon-GFP の細胞内局在の観察

pHis₆-lon-gfp を保持した $\Delta ppk\ ppx$ 株(ポリリン酸を蓄積できない変異株)および MT4 株(ポリリン酸を高蓄積する *phoU* 変異株)(38)を MOPS 最少培地で培養後、蛍光顕微鏡により観察を行った(Fig.4-2-A)。核様体とポリリン酸は DAPI(4',6'-diamidino-2-phenylindole)により検出した(3)。DAPI 染色により、核様体は青色の、ポリリン酸は黄緑色の蛍光で区別することができる。 $\Delta ppk\ ppx$ 株において Lon-GFP は核様体に局在していた。一方、MT4 株では核様体の外側に蓄積したポリリン酸に局在を示した。この結果から、Lon は通常、核様体に局在しており、ポリリン酸の蓄積によって核様体から遊離することが示唆された。次に、実際にアミノ酸飢餓によって局在性が変化するかどうかを検証した。Lon-GFP は栄養十分な培地においても核様体に局在していた。さらに、pHis₆-lon-gfp を保持した野生株を栄養十分培地から最少培地にダウンシフトすることで、Lon-GFP の核様体からの遊離が確認できた(データは示さない)。しかし、野生株がアミノ酸飢餓で蓄積するポリリン酸量では DAPI により視覚的に確認することができなかった。この問題を解決するために、アミノ酸飢餓時のポリリン酸合成活性を上昇させることを考えた。そこで、pMWppk (*ppk* 遺伝子を含む低コピープラスミド)を pHis₆-lon-gfp と共存させて、同様の実験を行った(Fig.4-2-B)。その結果、アミノ酸飢餓で蓄積したポリリン酸を DAPI で確認することができ、核様体から遊離するポリリン酸-Lon 複合体

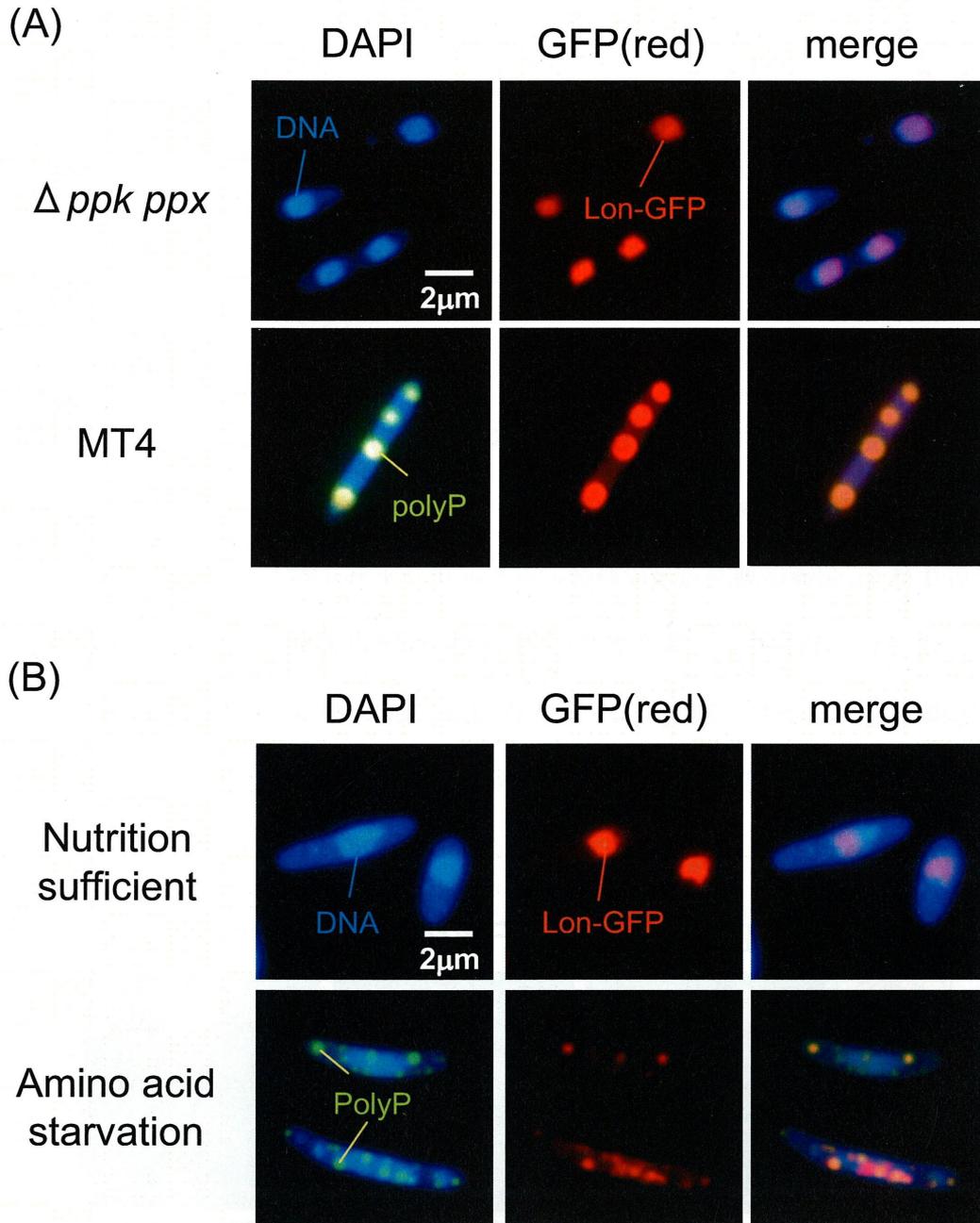


Fig. 4-2 Lon-GFPの細胞内局在 (A) $\Delta ppk ppx$ はポリリン酸を蓄積しない変異株。MT4はポリリン酸を高蓄積する変異株。Lon-GFPは0.1mM IPTGを含むMOPS最少培地で4時間誘導を行った。(B) Lon-GFPはpMWppkを保持した野生株において0.3mM IPTGを含む栄養培地(2×YT)で2時間誘導した。上段(Nutrition sufficient)は誘導後の細胞、下段(Amino acid starvation)は誘導後の細胞をMOPS最少培地で洗浄、再懸濁して2時間培養した細胞。それぞれの細胞をDAPI染色後、蛍光顕微鏡により観察した。青色はDNA、黄色はポリリン酸、赤はLon-GFP(GFPの色はポリリン酸と区別するためにコンピューター上で赤色に変更してある)を示す。スケールのバーは2 μ m。

の粒子が複数確認できた。これはアミノ酸飢餓で形成した複合体を初めて可視化できた重要な結果であり、第3章で提唱したモデルの妥当性を細胞内において示すことができたといえる。

4-3 PPK の細胞内局在

MT4 の顕微鏡観察から、ポリリン酸は核様体の外側に存在することが確認できたが、PPK の局在については不明であった。そこで、PPK の局在を調べることにした。pHis₆-ppk-gfp を保持した野生株を、栄養培地から最少培地にダウンシフトした時の PPK-GFP の局在を蛍光顕微鏡により観察した(Fig.4-3)。栄養培地において PPK-GFP は大部分が極付近に局在しており、一部が核様体内にドット状に局在していた。さらに、最少培地にダウンシフトすることで、DAPI で確認できる量のポリリン酸を蓄積していた。これは、発現させた PPK-GFP がポリリン酸合成活性を持っていることを示している。また、この時、PPK-GFP は核様体の外側でポ

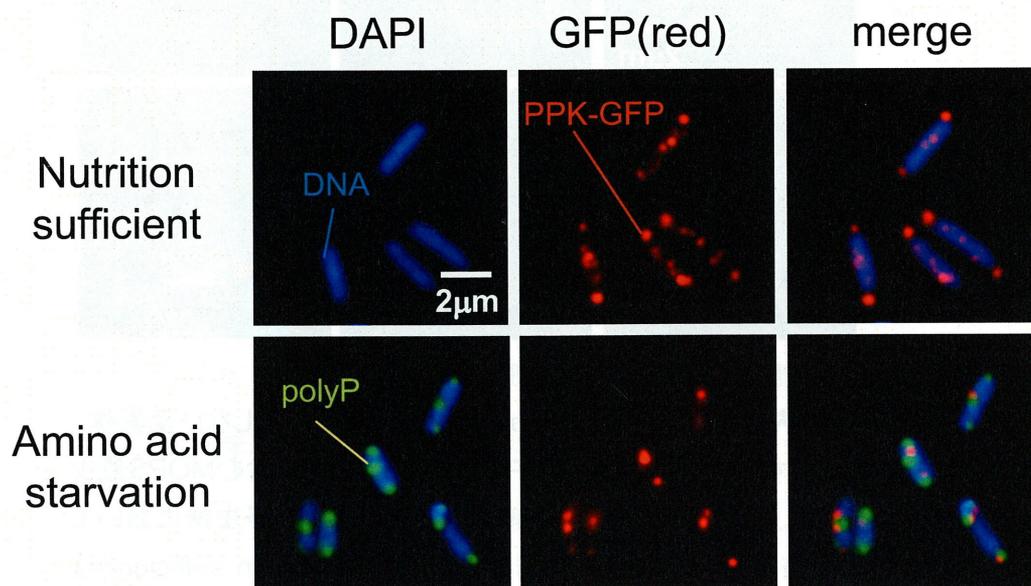


Fig. 4-3 PPK-GFPの細胞内局在 PPK-GFPは野生株において0.05mM IPTGを含む栄養培地(2×YT)で2時間誘導した。上段(Nutrition sufficient)は誘導後の細胞、下段(Amino acid starvation)は誘導後の細胞をMOPS最少培地に移して2時間培養した細胞。写真の詳細はFig.4-2と同じ。

リリン酸と隣接するように局在していた。これらの結果から、PPK はアミノ酸飢餓で局在が変化し、核様体の外側でポリリン酸を合成していることが示唆された。

4-4 考察

第3章では、DNAと結合しているLonは、ポリリン酸が存在する場合、ポリリン酸とLonの複合体を形成することによってDNAから遊離することを*in vitro*で示した。このことから*in vivo*ではLonは核様体に結合し、アミノ酸飢餓で蓄積したポリリン酸によって核様体から遊離するモデルを考えた。この生理的意味はLonの活性制御であると考えられる。すなわち、Lonを核様体に局在させることにより基質へのアクセスを制限する機構であると考えられる。そしてアミノ酸飢餓時に蓄積したポリリン酸はLonを細胞質に遊離させることで基質へのアクセスを可能とし、Lonの活性を制御していると考えられる。本章ではLon-GFPの局在性を追跡することにより本モデルの妥当性について検証した。その結果、Lon-GFPは増殖時には核様体に存在し、アミノ酸飢餓で蓄積したポリリン酸により核様体から遊離することを示した。おもしろいことに野生株ではアミノ酸飢餓に晒した時、核様体から遊離するポリリン酸-Lon複合体の粒子が複数確認できた。蛍光顕微鏡の画像から推定する粒子のサイズは100~500nmに達する巨大な複合体であった。これまでに動的光散乱などの結果からポリリン酸-Lon複合体は分子量800万程度の巨大な複合体であることが分かっている。我々はアミノ酸飢餓による緊縮応答によって形成されるこの複合体をストリンジェントプロテアーゼ複合体と名付けることを提唱したいと考えている。このストリンジェントプロテアーゼ複合体は細胞質において、遊離のリボソームタンパク質を分解すると考えられる。今後、細胞内から複合体を精製し、その中に含まれる成分の検証、さらにその大きさや活性について詳細に調べたいと考えている。

また、PPK-GFPを用いた結果、PPKの大部分が極付近に、一部が核様体内にドット状に局

在していることがわかった。PPKはRNAポリメラーゼと結合することが報告されている (unpublished data)。さらにRNAポリメラーゼは核様体内に局在する(27)ことから、PPKとの複合体として存在している可能性が考えられる。もしかすると極付近のPPKとは違う役割を持っているのかもしれない。一方、アミノ酸飢餓では核様体の外側にPPKの局在が変化し、ポリリン酸が合成されていた。ここで、核様体に局在していたLonは合成されたポリリン酸に移行し、複合体として核様体から遊離すると考えられた。以上のことを統合し、アミノ酸飢餓におけるポリリン酸を介したLonの活性制御モデルを図示した(Fig.4-6)。

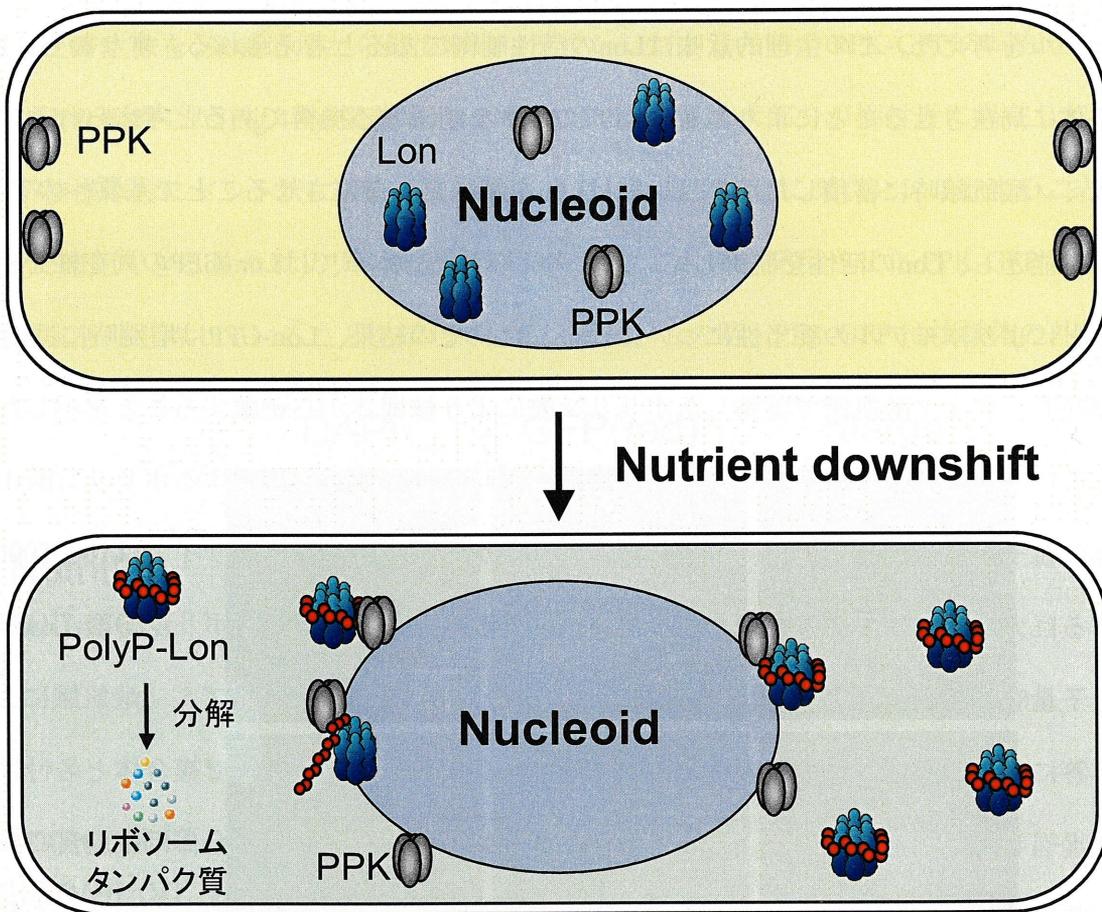


Fig. 4-6 ストリンジェントプロテアーゼ複合体によるアミノ酸供給の分子機構

第5章

ポリリン酸を介した DNA 結合タンパク質の 活性調節機構

5-1 序論

ポリリン酸と結合するタンパク質は *in vitro* において数多く見つかり、その中には DNA 結合タンパク質も含まれている(unpublished data)。したがって、Lon 以外にも同様な局在の変化を示す DNA 結合タンパク質の存在が予想される。細胞内で豊富に存在するいくつかの DNA 結合タンパク質は、細胞長の 1,000 倍以上も長い染色体 DNA を凝集することによりコンパクトな核様体構造を構成する。大腸菌の核様体を構成する主要なタンパク質として、Fis (factor for inversion stimulation)、H-NS (histone-like nucleoid structuring protein)、HU (heat-stable nucleoid protein)、IHF (integration host factor) および定常期特異的に発現する Dps (DNA binding protein from starved cells) が知られている(17,30,43,47)。これらのタンパク質は、核様体の構造を維持するだけでなく、それぞれが特異的な遺伝子の転写に関わることも知られている(16)。また、増殖の段階に応じて核様体を構成するタンパク質の存在比が変化することで、グローバルな転写の調整を行っていると考えられている(6)。本章では、これら核様体タンパク質のポリリン酸による局在の変化を調べ、ポリリン酸を介した転写調節の可能性について議論した。

5-2 ポリリン酸により局在が変化する DNA 結合タンパク質の探索

Lon は通常、核様体に局在しており、ポリリン酸が蓄積することで核様体からポリリン酸に移行する。細胞内においてポリリン酸と結合するタンパク質は Lon だけでないことから、Lon と同様の局在性の変化を示すタンパク質の存在が予想される。実際、HU などの DNA 結合タンパク質はポリリン酸と結合することが知られている。そこで、DNA 結合タンパク質、とくに核様体に局在するタンパク質について Lon と同様の局在の変化を示すタンパク質の探索を行った。核様体に結合するタンパク質については Azam らによって詳細な解析がおこなわれ

ている(6)。そこで、彼らが解析に用いたDNA結合タンパク質について、GFP融合タンパク質の発現プラスミドを用いてこれまでと同様に $\Delta ppk ppx$ 株およびMT4株での局在を観察した。その結果、Fis-GFPが $\Delta ppk ppx$ 株では核様体に、MT4株ではポリリン酸に局在を示すことを発見した(Fig.4-4)。Fisは対数増殖期において最も多く存在する核様体タンパク質であり、rRNAやtRNAの転写を含めたグローバルな転写因子として知られている(8)。このことから、ポリリン酸はFisを核様体から遊離させることでFisが関与する転写に影響を与えているのではないかと考えた。

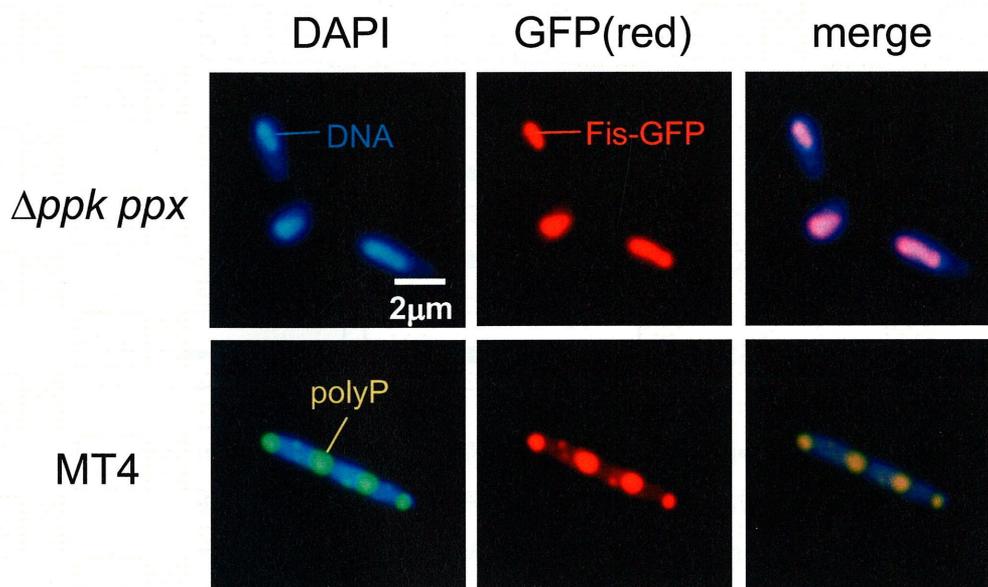


Fig. 4-4 Fis-GFPの細胞内局在 $\Delta ppk ppx$ はポリリン酸を蓄積しない変異株。MT4はポリリン酸を高蓄積する変異株。Fis-GFPを0.1mM IPTGを含むMOPS最少培地で4時間誘導した。写真の詳細はFig.4-2と同じ。

5-3 Lonとポリリン酸によるFisの分解

Fisは対数増殖期に最も多く存在する一方、定常期にはほとんど見られない。この細胞内における劇的な量の変化について、転写レベルでは解析が進んでいるが、タンパク質の分解経路に関しては明らかになっていない。また、アミノ酸飢餓において、緊縮応答により*fis*の転写が抑制されることが知られている(39)。このことから、アミノ酸飢餓においてFisはポリリ

ン酸により核様体から遊離するだけでなく、Lonにより分解されるのではないかと考えた。そこで、*in vitro*における分解について調べることにした(Fig.4-5)。精製したFisはLonのみではわずかしか分解を示さなかったが、ポリリン酸存在下で分解が促進した。さらに、大腸菌の染色体DNAを競合させた場合でもポリリン酸依存的な分解がみられた。また、Fisが特異的に結合する35bpのDNA (*rrnB*-P1)を競合させた場合、効果は弱くなるもののポリリン酸依存的な分解がみられた。この結果から、DNAに結合した状態のFisをLonとポリリン酸で分解できることが明らかとなった。

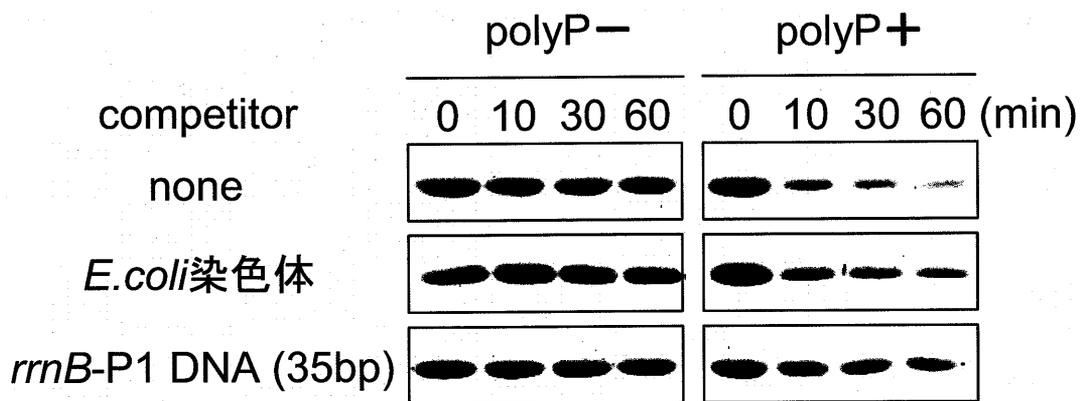


Fig. 4-5 Lonとポリリン酸によるFisの分解 精製したFis (2 μ g)とLon (1 μ g)をポリリン酸 (1.4 μ M)存在下(polyP+)および非存在下(polyP-)において37 $^{\circ}$ Cで反応させた。競合剤として*E. coli*染色体 (1.2 μ g)および*rrnB*-P1 DNA (1.2 μ g)を用いた。15% SDS-PAGE後、クマシー染色により検出を行った。

5-4 考察

第4章で示したようなポリリン酸を介した局在の変化による活性調節は、Lon以外のタンパク質でもなされている可能性があると考えた。そこで、特に核様体に結合するタンパク質に注目して解析したところ、Fisタンパク質がLonと同じ局在の変化を示すことがわかった。Fisは対数増殖期において最も多く核様体に存在するタンパク質(1細胞あたり6万分子、染色DNA 160bpにFisの2量体が1分子結合する計算)であり(6)、rRNAやtRNAなど様々な遺伝子

の上流に存在する高AT含量の配列に特異的に結合することで、転写を活性化することが知られている(19)。今回得られた結果とあわせて考えると、ポリリン酸はFisが関与する転写調節を制御している可能性がある。さらに、Fisは緊縮応答により転写が抑制されることから、アミノ酸飢餓におけるFisの分解にもポリリン酸が関わっているのではないかと考えた。そこで、*in vitro*における分解を調べたところ、FisはLonによりポリリン酸依存的に分解されることが明らかとなった。また、DNAが存在してもポリリン酸依存的に分解されることも示した。これらの結果は、Lonとポリリン酸による新規の転写調節機構の存在を示唆している。今後、細胞内におけるFisの分解や転写についてさらに詳細な解析が必要であると考えた。ところで、第2章でポリリン酸依存的に分解される基質を探索した際にFisは見つからなかった。これは、基質タンパク質に細胞内可溶性画分を対象としたためであった。DNAに結合する画分も含めて、Fisに続く新たなタンパク質の探索も行っていきたいと考えている。

第6章

総括

ポリリン酸は、バクテリアから哺乳動物細胞などの高等生物に至るまで、数多くの生命体で検出されている。その存在は古くから知られていたが、分子生物学的な手法がなかったため、単にリンの貯蔵物質や金属イオンのキレーターとして考えられていた。その後、ポリリン酸合成酵素の遺伝子(*ppk*)がクローニングされたことで、分子生物学的な解析が可能となった。その結果、ポリリン酸を作れない大腸菌変異株は、定常期における生存率が低下することや、緑膿菌の変異株では、運動性が悪く、病原性や感染力が低下することが明らかとされ、予想以上にポリリン酸が様々な機能をもっていると考えられるようになった。

第1章では、ポリリン酸がアミノ酸飢餓で誘発する緊縮応答によって蓄積することを述べた。また、ポリリン酸の役割について本研究を始めるまでに明らかになっていたことをまとめた。具体的には、大腸菌がアミノ酸飢餓に適応するためにポリリン酸が必要であること、そして、自己タンパク質の分解の活性化によるアミノ酸の供給にポリリン酸が必要であることを述べた。また、本博士論文の概要についてまとめた。

第2章では、自己タンパク質の分解の活性化に関与するプロテアーゼを同定し、ポリリン酸による新しい活性調節機構を発見した。細胞内タンパク質分解の約80%はエネルギー依存的に起こるといわれていることから、ATP依存性プロテアーゼに注目して、その変異株を用いた解析を行った結果、LonとClpがポリリン酸依存的なタンパク質分解に関わることを明らかにした。また、Lonについて解析を進めたところ、ポリリン酸はLonと強く結合し、通常ほとんど分解しないリボソームタンパク質を分解することを発見した。これはアミノ酸飢餓時に細胞内で不要なリボソームタンパク質をアミノ酸の供給源として分解する新規のリサイクリングシステムであると考えられた。

第3章では、このポリリン酸によるLonの活性調節に関して詳細な解析を行った。Lonはポリリン酸と最初に結合し、複合体としてリボソームタンパク質を分解することを明らかにした。一方、Lonのみで分解する基質に対してポリリン酸はむしろ阻害効果を示すことから、

ポリリン酸は Lon に結合し、構造を変化させることで基質特異性を変化させていることが考えられた。また、Lon は古くから非特異的な DNA との結合性を持つことが知られている。詳しく調べたところ、ポリリン酸と DNA は Lon の同じ領域に結合することがわかった。さらに、DNA に結合した Lon がポリリン酸により遊離することを示した。この結果から、Lon は通常核様体に局在しており、アミノ酸飢餓で蓄積したポリリン酸と結合して核様体から遊離することで基質へのアクセスが可能になるというモデルが考えられた。

第4章では第3章で考えたモデルが細胞内に適応できるかどうかについて検証した。Lon の GFP 融合タンパク質を用いて細胞内の局在性を調べたところ、ポリリン酸を蓄積しない栄養条件では、Lon-GFP は染色体 DNA の集合体である核様体に局在を示した。一方、アミノ酸飢餓では Lon-GFP は核様体から遊離し、Lon-GFP-ポリリン酸複合体の粒子が確認できた。この粒子をストリンジェントプロテアーゼ複合体と名付けた。

第5章では、Lon と同様にポリリン酸による細胞内局在の変化を示す DNA 結合タンパク質を探索した。その結果、核様体を構成する主要なタンパク質の一つであり、グローバルな転写に関わる Fis (Factor for inversion stimulation) を発見した。また、Fis は *in vitro* において Lon によりポリリン酸依存的に分解されることを見いだした。このことから、Fis はポリリン酸による局在のコントロールだけでなく、分解も制御されることが示唆された。この発見は、今後、ポリリン酸が転写にも関与するという他の研究者らのデータを説明する糸口になると期待できる。

本研究は、ポリリン酸の細胞機能を分子レベルで明らかにした最初の例といって過言ではない。特に、ポリリン酸のような無機ポリマーがプロテアーゼに直接作用することで局在を変化させると同時に基質の認識を変化させることは、今までまったく考えられていなかった新しい機構であり、非常に興味深い現象であるといえる。今回、Lon がポリリン酸と結合することで複合体を形成し、リボソームタンパク質を分解することを示したが、未解明な部分

も残されている。ポリリン酸-Lon 複合体はいくつかの実験から分子量 800 万程度のユニークな巨大分子であることを示したが、その会合状態まではわかっていない。今後、詳細な構造を解析するためには、電子顕微鏡等による可視化が必要であろう。また、ポリリン酸は Lon の基質である MBP-SulA の分解に関して阻害的に働くことから、会合状態だけでなく Lon 内部の基質認識部位に構造変化が起こることも考えられる。基質の認識にはアンフォールドに関わる ATPase ドメインやその近くに位置する SSD ドメインが重要であると考えられている。ポリリン酸が ATPase ドメイン内に結合するという結果から、基質認識部位の構造変化も十分に考えられる。

また、ポリリン酸-Lon 複合体によるリボソームタンパク質の認識機構に関しても完全には解明できていない。基質となるリボソームタンパク質は共通してポリリン酸と結合する性質を持つことから、基質へのポリリン酸の結合が必要であることが考えられる。しかし、ポリリン酸と結合するタンパク質すべてを分解するわけでないことから、ポリリン酸の結合だけでは十分ではない。では、なにが必要であるのか？通常 ATP 依存性プロテアーゼに特異的な基質は N 末端あるいは C 末端の認識配列を持っていることが多く(20)、Lon では SulA の C 末端 8 アミノ酸が分解が必要であることが報告されている(31)。また、変性したタンパク質の場合、一般的にはタンパク質表面に露出した疎水性のアミノ酸残基を認識して分解すると考えられている。基質となるリボソームタンパク質についてアミノ酸配列上の共通性は今のところみいだすことができていない。このことから、ポリリン酸は基質の構造に変化を与え、変性に近い状態を作り出すことで認識されるのではないかと予想している。今後、ポリリン酸による基質タンパク質の構造変化について解析することで、ポリリン酸-Lon 複合体による基質認識機構が明らかになるかもしれない。

本論文のもう一つの重要な発見は、DNA 結合タンパク質の局在性がポリリン酸により変化することである。さらに、今回発見した Fis はポリリン酸により局在が変化するだけでなく、ポリリン酸-Lon 複合体により分解されたことから、Lon とポリリン酸による新規な転写調節

機構の可能性が示唆された。転写調節についてポリリン酸が関係することは以前から示唆されていたが、そのメカニズムは不明であった。今回、転写調節因子である Fis の局在や分解がポリリン酸によって調節されることを発見したことで、今後、転写調節についても明らかになっていくものと考えられる。本論文での発見が、今後のポリリン酸の細胞機能に関する研究の基礎として位置づけられ、さらなる発展を遂げることを期待したい。

実験材料と実験方法

使用菌株とプラスミド

本研究で用いた菌株とプラスミドは Table 2 に示した。ポリリン酸の生理作用の研究には野生株 MG1655 株を用いた。プラスミドの調製等の遺伝子操作には、大腸菌 MV1184 株を用いた。

培養条件

大腸菌の培養に用いた培地の組成は Table 3 に示す。特に示さない場合、培養は 37°C で振とうして行った。また、本培養は 2×YT 培地で一日培養したものを 1% 植菌して行った。抗生物質の添加が必要な場合は、アンピシリン(100 mg/l)、テトラサイクリン (10 mg/l)、カナマイシン (50 mg/l)、クロラムフェニコール(25 mg/l)を添加した。

遺伝子工学的的方法

プラスミド抽出、電気泳動、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) など、一般的な方法については、(48) にしたがった。

プラスミドの作製

[S2-V5 発現用プラスミド] 大腸菌染色体を鋳型に、Table 4 に示したプライマー *rpsB*-F と *rpsB*-R を用いて PCR により *rpsB*(S2) 遺伝子を増幅した。PCR 産物を pBAD-TOPO にクローニングした。方法はキットのマニュアルに従った。

[Lon 欠失タンパク質発現用プラスミド] pMAL-Lon(S679A)を鋳型に、Table 4 に示したプライマーを用いて PCR によりそれぞれの DNA 断片を増幅した。PCR 産物は pMAL-c-2x (New England BioLabs)の *XmnI/EcoRI* サイトにクローニングした。Lon1-302, Lon1-437, Lon136-784,

Lon272-784, Lon320-784, Lon181-302, Lon272-437, Lon320-437, Lon472-616, Lon618-775 は F1 と R302, F1 と R437, F136 と R784, F272 と R784, F320 と R784, F181 と R302, F272 と R437, F320 と R437, F472 と R616, F618 と R775 のプライマーの組み合わせにより作製した。

[Fis 発現用プラスミド] 局在解析に用いた pHis₆-fis-gfp を *NotI* 処理により *gfp* 遺伝子を切り出し、セルフライゲーションすることで pHis₆-fis を得た。

細胞内タンパク質のターンオーバーの測定

¹⁴C-ロイシンを用いた細胞内タンパク質の分解の測定方法は (36) に従った。

タンパク質の精製

[Lon の精製] マルトース結合タンパク質を融合した Lon(MBP-Lon) は pMAL-Lon を保持した DH5 α で発現させた。培養条件およびアミロースカラムによる精製は (51) に従った。MBP-Lon はさらに陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。カラムは HiTrapQ HP 1ml (アマシヤムバイオサイエンス) を用い、緩衝液 A (20mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA, 20% glycerol) で 0~1M NaCl のグラジエントにより溶出した。また、欠失タンパク質も同様に精製した。さらに Lon は (51) に従って FactorXa による MBP の切断後に精製した。プロテアーゼ活性のない Lon(S679A) は、pMAL-Lon(S679A) を保持した DH5 α で発現させ、Lon と同様に精製した。

[ホスホセルロースカラムによる分画(Fraction P9 の調整)] 大腸菌 MG1655 株を 2 \times YT 培地において 37 $^{\circ}$ C、4 時間振とう培養した。培養液を 5,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 20 分間遠心後、菌体を緩衝液 B (50mM Tris-HCl pH7.5, 20% sucrose) に懸濁し凍結した。氷上で溶解させ、終濃度 250 μ g/ml のリゾチームを加え、超音波処理を行った。80,000rpm 1 時間 超遠心を行い、上清を 0.1M リン酸カリウムで平衡化したホスホセルロース(P11, Whatman) に添加した。0.1M から 0.4M のリン酸カリウムのグラジエントで溶出し、画分を分取した。Fraction P9 は 0.4M 付近のリン酸カリウムで溶出した。

[リボソームタンパク質の精製] リボソームタンパク質は細胞から分離したリボソームより精製した。超遠心による大腸菌 MG1655 株からのリボソームの分離は(56)に従った。分離したリボソームを 4.5M LiCl と 6mM β -メルカプトエタノールで 4°C、20 時間保温することによりリボソームタンパク質を抽出した(9)。5,000×g、5 分の遠心でリボソーム RNA を沈殿させ、上清を緩衝液 C (50mM Ammonium Acetate, pH5.6, 10% glycerol, 0.15M NaCl)で透析した。透析後のサンプルを陽イオン交換カラム Poros CM/M (パーセプティブバイオシステム)に添加し、緩衝液 C で 0.15M~0.75M NaCl のグラジエント(15 カラム体積以上)により溶出した。また、いくつかのリボソームタンパク質はゲル濾過カラム Superdex 75 (アマシャムバイオサイエンス)を用いて緩衝液 C でさらに精製を行った。

[MBP-SulA の精製] MBP-SulA の発現および精製は(50)に従った。

[Lon-GFP の精製] pHis₆-lon-gfp を保持した MV1184 を、28°Cで OD600 が 0.6 になるまで 2×YT 培地で培養後、0.3mM IPTG を添加してさらに 4 時間培養を行った。集菌後、リゾチームと超音波処理で破碎を行い、遠心上清を Hitrap Chelating HP (1ml) (アマシャムバイオサイエンス)カラムにより精製を行った。緩衝液 D (50mM HEPES-NaOH pH7.4, 500mM NaCl)で洗浄後、0.5M imidazol を含む緩衝液 D で溶出した。さらに溶出後のタンパク質を緩衝液 A で希釈して HitrapQ HP (1ml) により精製を行った。カラムからの溶出は 0.2M~1M NaCl のグラジエントにより行った。

[Fis の精製] pHis₆-fis を用いて、Lon-GFP と同じ条件で発現および Hitrap Chelating カラムによる精製を行った。さらに溶出後のタンパク質を緩衝液 E (50mM Hepes-NaOH, pH7.5, 1mM EDTA, 1mM DTT, 20% glycerol)で希釈して同じ緩衝液で HitrapSP HP (1ml) (アマシャムバイオサイエンス)により精製した。溶出は 0.2M~1M NaCl のグラジエントにより行った。

Lon によるタンパク質の分解

すべての反応は、緩衝液 F (25mM Tris-HCl, pH7.8, 5mM MgCl₂, 4mM ATP)中で 37°Cにおい

て行った。各反応で使用したタンパク質およびポリリン酸量は図中の説明に示した。また、反応に加えたポリリン酸は特に示さない限り、鎖長約 700 のもの(polyP₇₀₀)を用いた。polyP₇₀₀ はポリリン酸合成酵素により ATP から合成した(1)。また、平均鎖長 15 および 65 のポリリン酸(シグマ)は市販のものを用いた。Fis の分解に用いた大腸菌染色体は(48)に従って抽出した。また、合成した *rrnB*-P1DNA (42)を用いた。反応後のサンプルは SDS-PAGE により分離した。泳動後のゲルはクマシー染色、シルバーステインキット(アトー)による銀染色、SYPRO Orange(モレキュラープローブ)による蛍光染色を行った。蛍光染色の場合、イメージアナライザーである Typhoon(アマシャムバイオサイエンス)により検出した。

ウェスタン解析

pBAD-rpsB を保持した野生株および Δ *ppk ppx* 株を 0.2% L-アラビノースを含む 2×YT 培地で 2 時間培養した。細胞を 3,000×g, 10 分の遠心で集菌後、L-アラビノースを含まない 2×YT 培地と L-アラビノースを含まない MOPS 最少培地に懸濁した。各時間の全タンパク質(100μl 分の菌体)を SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜に転写を行った。ウェスタン解析には抗 V5 抗体(invitrogen)および ImmunoStarKit for Mouse (和光純薬工業)を用いた。X 線フィルム(富士フィルム)に感光させ、BIO IMAGE (B.I. Systems Corporation)によりバンドの定量を行った。

ポリリン酸結合実験

[ゲルシフト法による結合実験] 各量の精製した Lon と ³²P-ポリリン酸を 10μl の緩衝液 G (50mM Tris-HCl, pH7.4, 10mM MgCl₂, 10mM P_i)中で室温 5 分保温した。また、対照として牛血清アルブミンを、競合剤として pUC119 DNA を用いた。サンプルを 1%アガロースゲル電気泳動後、ゲルドライヤー(アトー)で乾燥し、BAS イメージングプレート(富士フィルム)に感光させた後、BAS2000 (富士フィルム)により検出した。

[フィルター結合実験] 精製したタンパク質と ^{32}P -ポリリン酸を 50 μl の緩衝液 H (20mM Tris-HCl, pH7.4, 5mM MgCl_2) 中で 37°C 5 分間保温した。各反応で使用したタンパク質およびポリリン酸量は図中の説明に示した。混合液はニトロセルロース膜(孔径 0.45 μm 、直径 25mm)(アドバンテック)でろ過した。タンパク質と結合していない遊離のポリリン酸を 100mM NaCl を含む緩衝液 H で洗浄後、フィルター上に残った放射活性をシンチレーションカウンター(パッカー)で測定することでポリリン酸と結合したタンパク質量を測定した。

[polyP blotting] MBP-Lon の欠失タンパク質を大腸菌 DH5 α で発現させた。各発現プラスミドを保持した大腸菌を 2 \times YT 培地において 2 時間培養後、0.5mM IPTG を添加してさらに 2 時間培養した。細胞を遠心により集菌し、SDS 試料緩衝液(48)に懸濁した。5 分煮沸した後、12.5% SDS-PAGE により分離した。分離したタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、膜を緩衝液 I (50mM Tris-HCl, pH7.4, 50mM NaCl, 1mM MgCl_2 , 0.1% Triton-X100) で二回洗浄した。さらに、1%の牛血清アルブミン(シグマ)を含む緩衝液 I で 37°C、12 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、 ^{32}P -ポリリン酸(10.3pmol)を加え、37°C で 2 時間保温した。緩衝液 I で二回洗浄した後、BAS イメージングプレートに感光させ、Typhoon9210(アマシャムバイオサイエンス)により検出した。

DNA 結合実験

[DNA の調整] DNA 結合実験には、*leuC* 遺伝子をコードする 722bp の DNA 断片(翻訳開始点から数えて 514~1189bp まで)を使用した。*leuC* DNA は pUC-*leuC* を鋳型にし、Table 4 に示したプライマー pUC119-SmaI-F と pUC119-SmaI-R を用いて PCR により増幅した。PCR 産物はフェノール・クロロホルム処理後、エタノール沈殿を行い、滅菌水に溶かした。

[フィルター結合実験] 実験には [γ - ^{32}P]ATP で末端ラベルした(48) *leuC* DNA を用いた。DNA を用いること以外はポリリン酸結合実験と同じ条件で行った。

[ゲルシフト法によるポリリン酸の競合実験] *leuC* DNA と Lon(S679A)および Lon-GFP に各

濃度のポリリン酸を競合させ、緩衝液 H 中で室温 5 分保温した。混合液に泳動用色素を加え、1%アガロースゲル電気泳動により DNA を分離した。臭化エチジウムにより染色後、UV で DNA を検出した。また、合成した *pets* DNA を競合剤とした実験も行った。

Lon と共精製される大腸菌染色体 DNA の解析

pMAL-Lon(S679A)を保持した大腸菌 MG1655 を 2×YT 培地で 2 時間培養後、0.3mM IPTG を添加してさらに 2 時間培養した。MBP-Lon(S679A)を発現させた菌体を破碎後、遠心上清をアミロースカラムに添加した。0.25% Tween20 を含む緩衝液 J (20mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)で 5 カラム体積洗浄した後、さらに 200mM NaCl を含む緩衝液 J で 5 カラム体積洗浄した。遊離または弱い結合の DNA を完全に洗浄した後、10mM マルトースを含む緩衝液 J で MBP-Lon(S679A)を溶出した。MBP-Lon(S679A)を含む画分を等量のフェノール・クロロホルムで二回処理した後、エタノール沈殿を行った。水に溶かした DNA は pUC119 の *Sma*I サイトにクローニングした。クローニングの方法は(48)に従った。得られた形質転換体から 21 種類のクローンを抽出し、塩基配列を調べた。塩基配列の解析には DNA シーケンサー CEQ 2000 (ベックマンコールター) を用いた。PCR 反応、脱塩処理などはキットに添付のプロトコールに従った。

GFP 融合タンパク質の局在解析

[培養条件] Lon-GFP の局在観察において、pHis₆-lon-gfp を保持した $\Delta ppk ppx$ 株および MT4 株を 0.1mM IPTG を含む MOPS 最少培地で 4 時間培養した。Fis-GFP に関しても同じ条件で行った。また、アミノ酸飢餓における Lon-GFP の局在変化については、pHis₆-lon-gfp および pMWppk を保持した MG1655 を 0.3mM IPTG を含む 2×YT 培地で 2 時間培養後、遠心により集菌を行った。菌体を MOPS 最少培地で一度洗浄後、同じ培地に再懸濁してさらに 2 時間培養した。アミノ酸飢餓における PPK-GFP の局在変化については、pHis₆-ppk-gfp を保持し

た MG1655 を 0.05mM IPTG を含む 2×YT 培地で同様に培養した。

[蛍光顕微鏡による観察] 各菌体培養液に終濃度 5 μ g/ml になるように DAPI(4',6'-diamidino-2-phenylindole)(シグマ)を加え、氷上で 30 分静置した。菌液と 1%アガロースを等量混合したものをスライドガラスに滴下しカバーガラスで覆った後、蛍光顕微鏡により観察した。顕微鏡は OLYMPUS BX60(オリンパス)を、画像の記録にはデジタルカメラ OLYMPUS DP70(オリンパス)を使用した。

Table.2 使用菌株およびプラスミド

Strain or plasmid	Relevant characteristics ^a	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>endA1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) glnV44 thi-1 recA1 gyrA relA1Δ(lacIZYA-argF)U169 deoR [Φ80 lacZΔM15]</i>	(54)
MV1184	<i>araΔ(lac-proAB) rpsL thi</i> (Φ 80 lacZ Δ M15) <i>Δ(srl-recA)306::Tn10(Tet^r) F'</i> [<i>traD36 proAB⁺ lacI^A lacZΔM15</i>]	(54)
MG1655	<i>E. coli</i> K-12 strain (Wild-type)	(44)
CF5802	MG1655 derivative, <i>Δppk-ppx::Kan^r</i>	(35)
KY2966	MG1655 derivative, <i>ΔhslVU1172::Tc^r</i>	(32)
KY2347	MG1655 derivative, <i>Δ(clpPX-lon)1196::Cm^r</i>	(32)
KY2350	KY2347 derivative, <i>ΔhslVU1172::Tc^r</i>	(32)
KY2347ppkppx	KY2347 derivative, <i>Δppk-ppx::Kan^r</i>	This Study
MT4	MG1655 derivative, <i>phoU</i>	(38)
Plasmids		
pUC119	General cloning vector; Ap ^r	(54)
pBAD-TOPO	PCR cloning vector; Ap ^r	invitrogen
pMAL-c-2x	maltose binding protein fusion vector; Ap ^r	NEB

pBAD-S2	pBAD-TOPO containing <i>rpsB</i>	This Study
pMAL-Lon	pMAL-c-2x containing <i>lon</i>	(51)
pMAL-Lon(S679A)	pMAL-c-2x containing <i>lon</i> with proteolytically inactive mutation (S679A)	A gift from Dr. S. Sonezaki
pMAL-Lon1-302	pMAL-c-2x containing <i>lon</i> (1-906bp) fragment	This Study
pMAL-Lon1-437	pMAL-c-2x containing <i>lon</i> (1-1311bp) fragment	This Study
pMAL-Lon136-784	pMAL-c-2x containing <i>lon</i> (406-2352bp) fragment	This Study
pMAL-Lon272-784	pMAL-c-2x containing <i>lon</i> (814-2352bp) fragment	This Study
pMAL-Lon320-784	pMAL-c-2x containing <i>lon</i> (958-2352bp) fragment	This Study
pMAL-Lon181-302	pMAL-c-2x containing <i>lon</i> (541-906bp) fragment	This Study
pMAL-Lon272-437	pMAL-c-2x containing <i>lon</i> (814-1311bp) fragment	This Study
pMAL-Lon320-437	pMAL-c-2x containing <i>lon</i> (958-1311bp) fragment	This Study
pMAL-Lon472-616	pMAL-c-2x containing <i>lon</i> (1414-1848bp) fragment	This Study
pMAL-Lon618-775	pMAL-c-2x containing <i>lon</i> (1852-2325bp) fragment	This Study
pHis ₆ -lon-gfp	GFP fusion vector pCA24N containing <i>lon</i> ; Cm ^r	A gift from Dr. H. Mori
pHis ₆ -ppk-gfp	GFP fusion vector pCA24N containing <i>ppk</i> ; Cm ^r	A gift from Dr. H. Mori
pHis ₆ -fis-gfp	GFP fusion vector pCA24N containing <i>fis</i> ; Cm ^r	A gift from Dr. H. Mori

pHis ₆ -fis	pHis ₆ -fis-gfp derivative, removal of <i>gfp</i> gene with <i>NotI</i> digest	This Study
pUC- <i>leuC</i>	pUC119 containing <i>leuC</i> (514-1189bp) fragment	This Study
pMWppk	pMW119 containing <i>ppk</i>	(36)

^a Ap, ampicillin; Tc, tetracycline; Kan, kanamycin; Cm, chloramphenicol;

Table.3 使用した培地

2 x YT

ペプトン	16 g/l
酵母エキス (ナカライ)	10 g/l
NaCl	5 g/l

LB 培地

ペプトン	10 g/l
酵母エキス (ナカライ)	5 g/l
NaCl	5 g/l

MOPS 最少培地

MOPS 緩衝液(pH 7.2)	40 mM
グルコース	22.2 mM
ビタミン B ₁	0.02 mM
NaCl	50 mM
NH ₄ Cl	9.52 mM
トリシン	4 mM
K ₂ HPO ₄	2 mM
MgCl ₂	0.523 mM
K ₂ SO ₄	0.276 mM
FeSO ₄	0.01mM
CaCl ₂	0.0005mM
Trace metal	(14)

Table.4 使用したプライマーの塩基配列

primer	DNA sequence
F1	ATGAATCCTGAGCGTTCTGA
F136	AGCCAGTTCGAAGGCTACAT
F181	CAGTCTGTTCTGGAGATGTC
F272	GAAGCAGAGTTGCAGAAGCT
F320	GATACCGACCATTATGGTCT
F472	TCGAACTCCATGAACATTCCG
F618	GTTCCGGGTAAAGGCAAAGT
R302	ACGGAATTCTCACGGCACCTGTACCATCCA
R437	AAGGAATTCTCAGGCCGGATCGCCACGCAT
R616	ACCGAATTCTCATGCGGTTTCAATGGTCAG
R713	ACGGAATTCTCATACTGACCACGCAGAGTGA
R775	CTGGAATTCTCACGGTTCATTTTGCAGCGA
R784	ACGGAATTCTCACTATTTTGCAGTCACAACCT
rpsB-F	ATGGCAACTGTTCCATGCGCG
rpsB-R	CTCAGCTTCTACGAAGCTTTCT
pUC-smaI-F	CAGGTCGACTCTAGAGGATC
pUC-smaI-R	CAGTGAATTCGAGCTCGGTA

参考文献

- (1) Ahn, K. and Kornberg, A. (1990) Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *J. Biol. Chem.* **265**: 11734-11739.
- (2) Akiyama, M., Crooke, E. and Kornberg, A. (1992) The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein. *J. Biol. Chem.* **267**: 22556-22561.
- (3) Allan, R. A. and Miller, J. J. (1980) Influence of *S*-adenosylmethionine on DAPI-induced fluorescence of polyphosphate in the yeast vacuole. *Can. J. Microbiol.* **26**: 912-920.
- (4) Amerik, A. Y. u., Antonov, V. K., Gorbalenya, A. E., Kotova, S. A., Rotanova, T. V. and Shimbarevich, E. V. (1991) Site-directed mutagenesis of La protease. A catalytically active serine residue. *FEBS Lett.* **287**: 211-214.
- (5) Ault-Riche, D., Fraley, C. D., Tzeng, C. M. and Kornberg, A. (1998) Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 1841-1847.
- (6) Azam, T. A., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S. and Ishihama, A. (1999) Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* **181**: 6361-63670.
- (7) Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. and Seemuller, E. (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**: 367-380.
- (8) Bosch, L., Nilsson, L., Vijgenboom, E. and Verbeek, H. (1990) FIS-dependent trans-activation of tRNA and rRNA operons of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1050**: 293-301.
- (9) Cachia, C., Flamion, P. J. and Schreiber, J. P. (1991) Purification of *E. coli* 30S ribosomal proteins by high-performance liquid chromatography under non-denaturing conditions. *J.*

- Chromatogr. **539**: 343-353.
- (10) Cashel, M., Gentry, D. R., Hernandez, V and Vinella, D. (1996) in *Escherichia coli* and *Salmonella* 1458-1496.
- (11) Chandu, D. and Nandi, D. (2004) Comparative genomics and functional roles of the ATP-dependent proteases Lon and Clp during cytosolic protein degradation. Res. Microbiol. **155**: 710-719.
- (12) Charette, M. F., Henderson, G. W., Doane, L. L. and Markovitz, A. (1984) DNA-stimulated ATPase activity on the *lon* (*CapR*) protein. J. Bacteriol. **158**: 195-201.
- (13) Chin, D. T., Goff, S. A., Webster, T., Smith, T. and Goldberg, A. L. (1988) Sequence of the *lon* gene in *Escherichia coli*. A heat-shock gene which encodes the ATP-dependent protease La. J. Biol. Chem. **263**: 11718-11728.
- (14) Chung, C. H. and Goldberg, A. L. (1981) The product of the *lon* (*capR*) gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **78**: 4931-4935.
- (15) Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A. L. (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. Annu. Rev. Biochem. **65**: 801-847.
- (16) Dorman, C. J. and Deighan, P. (2003) Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. Curr. Opin. Genet. Dev. **13**: 179-184.
- (17) Drlica, K. and Rouviere-Yaniv, J. (1987) Histone-like proteins of bacteria. Microbiol. Rev. **51**: 301-319.
- (18) Ebel, W., Skinner, M. M., Dierksen, K. P., Scott, J. M. and Trempy, J. E. (1999) A conserved domain in *Escherichia coli* Lon protease is involved in substrate discriminator activity. J. Bacteriol. **181**: 2236-2243.
- (19) Finkel, S. E. and Johnson, R. C. (1992) The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore. Mol. Microbiol. **6**: 3257-3265.

- (20) Flynn, J. M., Neher, S. B., Kim, Y. I., Sauer, R. T. and Baker, T. A. (2003) Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol. Cell* **11**: 671-683.
- (21) Fu, G. K. and Markovitz, D. M. (1998) The human LON protease binds to mitochondrial promoters in a single-stranded, site-specific, strand-specific manner. *Biochemistry* **37**: 1905-1909.
- (22) Fu, G. K., Smith, M. J. and Markovitz, D. M. (1997) Bacterial protease Lon is a site-specific DNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* **272**: 534-538.
- (23) Goff, S. A. and Goldberg, A. L. (1987) An increased content of protease La, the *lon* gene product, increases protein degradation and blocks growth in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**: 4508-4515.
- (24) Goldberg, A. L. (1992) The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells. *Eur. J. Biochem.* **203**: 9-23.
- (25) Goldberg, A. L., Moerschell, R. P., Chung, C. H. and Maurizi, M. R. (1994) ATP-dependent protease La (*lon*) from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **244**: 350-375.
- (26) Gottesman, S. (1989) Genetics of proteolysis in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **23**: 163-198.
- (27) Grachev, M. A., Zaichikov, E. F., Laktionov, P. P. and Roshke, V. V. (1988) Immune electron microscope localization of RNA-polymerase on the *Escherichia coli* chromosome using monoclonal antibodies against the beta-subunit *Bioorg. Khim.* **14**: 405-407.
- (28) Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 425-479.
- (29) Hua, S. S. and Markovitz, A. (1975) Regulation of galactose operon at the *gal* operator-promoter region in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **122**: 510-517.

- (30) Ishihama, A. (1999) Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. *Genes Cells* **4**: 135-143.
- (31) Ishii, Y., Sonezaki, S., Iwasaki, Y., Miyata, Y., Akita, K., Kato, Y. and Amano, F. (2000) Regulatory role of C-terminal residues of Sula in its degradation by Lon protease in *Escherichia coli*. *J. Biochem. (Tokyo)* **127**: 837-844.
- (32) Kanemori, M., Yanagi, H. and Yura, T. (1999) The ATP-dependent HslVU/ClpQY protease participates in turnover of cell division inhibitor Sula in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 3674-3680.
- (33) Karzai, A. W., Roche, E. D. and Sauer, R. T. (2000) The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 449-455.
- (34) Kornberg, A. (1995) Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.* **177**: 491-496.
- (35) Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M. and Kornberg, A. (1997) Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**: 21240-21243.
- (36) Kuroda, A., Tanaka, S., Ikeda, T., Kato, J., Takiguchi, N. and Ohtake, H. (1999) Inorganic polyphosphate kinase is required to stimulate protein degradation and for adaptation to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 14264-14269.
- (37) Maurizi, M. R. (1992) Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia* **48**: 178-201.
- (38) Morohoshi, T., Maruo, T., Shirai, Y., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H. and Kuroda, A. (2002) Accumulation of inorganic polyphosphate in *phoU* mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4107-4110.
- (39) Ninnemann, O., Koch, C. and Kahmann, R. (1992) The *E. coli fis* promoter is subject to stringent

- control and autoregulation. *EMBO J.* **11**: 1075-1083.
- (40) Ogawa, N., DeRisi, J. and Brown, P. O. (2000) New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol. Biol. Cell* **11**: 4309-4321.
- (41) 小椋光, 秋山芳展. (1997) 原核生物のATP依存性プロテアーゼによる細胞機能調節 蛋白質核酸酵素 **42**: 2205-2211.
- (42) Pan, C. Q., Feng, J. A., Finkel, S. E., Landgraf, R., Sigman, D. and Johnson, R. C. (1994) Structure of the *Escherichia coli* Fis-DNA complex probed by protein conjugated with 1,10-phenanthroline copper(I) complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**: 1721-1725.
- (43) Pettijohn, D. E. (1988) Histone-like proteins and bacterial chromosome structure. *J. Biol. Chem.* **263**: 12793-12796.
- (44) Rao, N. N., Liu, S. and Kornberg, A. (1998) Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. *J. Bacteriol.* **180**: 2186-2193.
- (45) Rashid, M. H., Rumbaugh, K., Passador, L., Davies, D. G., Hamood, A. N., Iglewski, B. H. and Kornberg, A. (2000) Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**: 9636-9641.
- (46) Rotanova, T. V. (2002) [Peptide hydrolases with catalytic dyad Ser-Lys. Similarity and distinctions of the active centers of ATP-dependent Lon proteases, LexA repressors, signal peptidases and C-terminal processing proteases] *Vopr. Med. Khim.* **48**: 541-552.
- (47) Rouviere-Yaniv, J., Yaniv, M. and Germond, J. E. (1979) *E. coli* DNA binding protein HU forms nucleosome-like structure with circular double-stranded DNA. *Cell* **17**: 265-274.
- (48) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- (49) Smith, C. K., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (1999) Lon and Clp family proteases and chaperones

- share homologous substrate-recognition domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 6678-6682.
- (50) Sonezaki, S., Ishii, Y., Okita, K., Sugino, T., Kondo, A. and Kato, Y. (1995) Overproduction and purification of SulA fusion protein in *Escherichia coli* and its degradation by Lon protease in vitro. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 304-309.
- (51) Sonezaki, S., Kondo, A., Oba, T., Ishii, Y., Kato, Y. and Nakayama, H. (1994) Overproduction and purification of Lon protease from *Escherichia coli* using a maltose-binding protein fusion system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 313-318.
- (52) Sonezaki, S., Okita, K., Oba, T., Ishii, Y., Kondo, A. and Kato, Y. (1995) Protein substrates and heat shock reduce the DNA-binding ability of *Escherichia coli* Lon protease. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 484-488.
- (53) Ulbrich, B. and Nierhaus, K. H. (1975) Pools of ribosomal proteins in *Escherichia coli*. Studies on the exchange of proteins between pools and ribosomes. *Eur. J. Biochem.* **57**: 49-54.
- (54) Vieira, J. and Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**: 3-11.
- (55) Wery, M., Woldringh, C. L. and Rouviere-Yaniv, J. (2001) HU-GFP and DAPI co-localize on the *Escherichia coli* nucleoid. *Biochimie* **83**: 193-200.
- (56) Wickstrom, E. and Laing, L. G. (1988) Physical studies of the interaction of *Escherichia coli* translational initiation factor 3 protein with ribosomal RNA. *Methods Enzymol.* **164**: 238-258.
- (57) Yamagata, Y., Watanabe, H., Saitoh, M. and Namba, T. (1991) Volcanic production of polyphosphates and its relevance to prebiotic evolution. *Nature* **352**: 516-519.
- (58) Yoshida, M. and Amano, T. (1995) A common topology of proteins catalyzing ATP-triggered reactions. *FEBS Lett.* **359**: 1-5.

謝辞

本研究は広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻細胞構造機能学研究室の指導者、研究室所属学生並びに関係者各位からの数々の協力を得て行われたものであります。

研究室配属時より、研究方針や内容、論文の作成まで、あらゆる面で御指導をして頂いた主査である黒田章夫助教授に深く感謝します。また、研究に対する貴重な御助言から研究者としての心構えまで、一人前の研究者として自立出来るよう御指導して頂いた大竹久夫教授(現：大阪大学教授)および加藤純一教授に深く感謝します。さらに、機器の取り扱いや実験方法に関して数々の御助言を頂いた滝口昇助手に深く感謝します。

本論文を作成するにあたり、適切な御指導、御助言を頂いた宮川都吉教授および山田隆教授に深く感謝します。また、本研究で使用した菌株およびプラスミドを提供して頂いた石井克幸博士、金森正明博士、曾根崎修司博士、仁木宏典博士、森浩禎博士および由良隆博士に深く感謝します。

様々な面で支えて頂いた広島大学先端物質科学研究科の各講座の先生方、ならびに細胞構造機能学研究室の皆様に深く感謝します。

最後に、これまで私を経済的、精神的に支えてくれた家族に深く感謝します。

平成17年3月 野村 和孝

公表論文

- (1) Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*.

Akio Kuroda, Kazutaka Nomura, Ryo Ohtomo, Junichi Kato, Tsukasa Ikeda, Noboru Takiguchi, Hisao Ohtake, and Arthur Kornberg
Science, **293**, 705-708 (2001).

- (2) Effects of inorganic polyphosphate on the proteolytic and DNA-binding activities of Lon in *Escherichia coli*.

Kazutaka Nomura, Junichi Kato, Noboru Takiguchi, Hisao Ohtake, and Akio Kuroda
The Journal of Biological Chemistry, **279**, 34406-34410 (2004).

参考論文

- (1) A simple method to release polyphosphate from activated sludge for phosphorus reuse and recycling.

Akio Kuroda, Noboru Takiguchi, Takafumi Gotanda, Kazutaka Nomura, Junichi Kato, Tsukasa Ikeda, and Hisao Ohtake

Biotechnology and Bioengineering, **78**, 333-338 (2002).

- (2) 蘇るか分子化石～長鎖ポリリン酸による蛋白質分解酵素の活性調節

黒田章夫、野村和孝、大竹久夫

蛋白質核酸酵素, **47**,801-807 (2002).

- (3) Lon によるリボソーム蛋白質のリサイクリングシステム

野村和孝、大竹久夫、黒田章夫

蛋白質核酸酵素, **49**,1069-1070 (2004).