



Purification and Characterization of a Repressor for the Bacillus subtilis gnt Operon

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 三輪, 泰彦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/931

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 78号	学位授与年月日	平成 元年 3月27日
氏 名	三 輪 泰 彦		
論文題目	Purification and Characterization of a Repressor for the <u>Bacillus subtilis</u> <u>gnt Operon</u> (枯草菌グルコン酸オペロンのレプレッサーの精製及び解析)		

Purification and Characterization of a Repressor for the *Bacillus subtilis* *gnt* Operon

(枯草菌グルコン酸オペロンのレプレッサーの精製及び解析)

論文の内容の要旨

グラム陰性菌の代表である大腸菌のラクトースオペロンの誘導系の分子レベルでの研究の結果、有名な Jacob-Monod 仮説が立証された。グラム陽性菌ではこのような誘導系の研究が全く皆無であり、大腸菌等のグラム陰性菌と同様に Jacob-Monod の負の制御系があてはまるかどうか不明である。そこで、グラム陽性菌の代表である枯草菌のグルコン酸オペロンを対象にその誘導系の分子レベルでの解明を目指した。

枯草菌グルコン酸オペロンはグルコン酸代謝に関与しグラム陽性菌の分解系のオペロンの中では最も詳細に分子レベルで研究されている系である。グルコン酸オペロンは4つの *gnt* 遺伝子から成るが、最初の遺伝子 (*gntR*) の産物は本オペロンの転写のレプレッサーである。グルコン酸オペロンは *gntR* 遺伝子の上流に存在するプロモーターから4つの *gnt* 遺伝子をコードするポリシストロニックな mRNA として転写され、その合成はグルコン酸により誘導される。そこで本研究ではレプレッサータンパク質を精製し、生体外転写系を組み、グルコン酸オペロンの誘導系の再現を試みた。

(方法) 本オペロンのプロモーターとレプレッサー遺伝子 (*gntR*) を含む DNA 断片を枯草菌と大腸菌の共用ベクター (pLS 353) にクローン化し、レプレッサー遺伝子が大腸菌内で発現させた。大腸菌に合成されたレプレッサータンパク質を硫酸分画、Bio-Gel A-1.5m によるゲルろ過、DEAE-セルロース及び P-セルロースによるカラムクロマトグラフィーによって精製した。

精製レプレッサーを用いたゲル移動度シフト法によりグルコン酸オペロンのオペレーター-局在化及び本オペロンの誘導物質の検索を行った。さらに枯草菌の精製 RNA ポリメラーゼ (σ^{43}) とグルコン酸オペロンのプロモーターをもつ DNA 断片を用いて生体外転写系を構成し、グルコン酸オペロンの誘導系を再現した。

(結果と考察) 大腸菌にクローン化したレプレッサー遺伝子の発現は培地中にグルコン酸を添加した場合に誘導され、全タンパク質の5%にも及ぶレプレッサータンパク質の合成がみられた。さらにこの遺伝子の転写を S1 マッピング法により解析したところ、大腸菌の RNA ポリメラーゼがグルコン酸オペロンのプロモーターを効率よくしかも正確に認識し、かつグルコン酸オペロンの誘導系が大腸菌でも作動することが明らかになった。

大腸菌内で大量生産されたレプレッサータンパク質を上記の方法で単一なタンパク質まで精製した。この精製レプレッサーの N 末端から10個のアミノ酸配列とアミノ酸組成を決定したところ、レプレッサー遺伝子から予想されるものと一致した。これよりグルコン酸オペロンのレプレッサーが精製されたものと結論した。精製レプレッサーは重合状態にあり、極低濃度 (数 ng/ml) では最小単位として二量体で存在することが判明した。

この精製レプレッサーを用いたゲル移動度シフト法でレプレッサーと DNA 断片の結合能を解析したところ、オペレーターはグルコン酸オペロンのプロモーターの近傍にあることが判明した。この結合はグルコン酸とグルコノ- δ -ラクトンによって特異的に阻害された。従ってグルコン酸とグルコノ- δ -ラクトンがグルコン酸オペロンの誘導物質であると考えられた。そこで実際に生体外転写系を組みグルコン酸オペロンの誘導系の再現を試みたところ、レプレッサーはグルコン酸オペロンのプロモーターからの転写を阻害し、この阻害はグルコン酸とグルコノ- δ -ラクトンの添加により回復された。

以上、枯草菌グルコン酸オペロンの誘導系は本オペロンのオペレーター、レプレッサー、誘導物質 (グルコン酸またはグルコノ- δ -ラクトン) が関与する負の制御系で説明することができ、グラム陽性菌においても Jacob-Monod タイプの負の制御系が作動していることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

遺伝子発現の制御についての分子レベルでの研究は、まず大腸菌の *lac* オペロンの系を中心に著しく発展し、レプレッサーによる負の制御機構と、cAMP-カタボライト遺伝子活性化タンパク質 (CAP) 複合体による正の制御機構の存在が明らかとされた。しかし原核生物に限ってもこれで遺伝子発現制御機構がすべて説明された訳ではなく、たとえばcAMPを持たない枯草菌などのグラム陽性菌でのカタボライト抑制の機構は不明のまま残されていた。

そこで申請者の研究グループでは、枯草菌のカタボリックオペロンの一つであるグルコン酸オペロン (*gnt* オペロン) の発現調節を研究対象として取り上げ、本オペロンが、調節遺伝子 (*gntR*) とその下流のグルコン酸キナーゼ、グルコン酸透過酵素等グルコン酸代謝に関与する酵素の遺伝子からなる遺伝子転写単位であることや、その発現がグルコン酸により誘導され、グルコースにより抑制されることを1987年までに明らかにしていた。

本学位申請論文となった研究は、以上の研究の流れに沿って、*gntR* から産生されるタンパク質 (GntR タンパク質) を精製し、さらにこれを用いて *gnt* オペロンの誘導制御系を試験管内で再構成し、解析したものである。得られた主な結果、結論は次のとおりである。

1) GntR タンパク質精製のため、*gnt* オペロンのプロモーターと *gntR* を含むDNA断片を大腸菌と枯草菌のシャトルベクターに組み込んで大腸菌内で発現させた。大腸菌での *gntR* の発現はグルコン酸による誘導を受け、GntR タンパク質と思われるタンパク質が多量に産生されたので、これを硫酸分画及びBio-Gel A、DEAE-セルロース、P-セルロースクロマトグラフィーによりほぼ均一タンパク質にまで精製した。精製タンパク質はアミノ酸組成およびN末端アミノ酸配列が *gntR* の塩基配列から予想されるものと合致したことから、GntR タンパク質であると同定された。精製GntR タンパク質は、低濃度では分子量 29 kDa の同種のサブユニットからなる二量体として存在していた。

2) 枯草菌 PNA ポリメラーゼと *gnt* オペロンのプロモーターを含むDNA断片からなる試験管内転写系で、*gnt m* RNA と同一の転写開始部位からの “run-off” 転写産物が生成された。そしてこの転写は精製GntR タンパク質により抑制され、更にこの抑制はグルコン酸およびグルコノ- δ -ラクトンにより解除された。

3) *gnt* プロモーターを含むDNA断片と精製GntR タンパク質の結合をフットプリント法等で検討した。その結果、GntR タンパク質の結合部位 (オペレーター) は *gnt* プロモーターの極近傍 (-10 ~ +15) の回文構造を含む領域で、その中に転写開始部位を含んでいることが明らかとなった。また、この結合はグルコン酸とグルコノ- δ -ラクトンにより特異的に阻害された。

すなわち、以上の実験の結果、GntR タンパク質は枯草菌グルコン酸オペロンのレプレッサーであり、本オペロンの誘導系がオペレーター、それに結合するレプレッサーおよび誘導物質 (グルコン酸またはグルコノ- δ -ラクトン) からなる負の制御機構で見事に説明された。

審査委員会においては、以上の口頭発表の内容と提出された主論文、副論文について審議した。その結果、この研究はグラム陽性菌においても Jacob-Monod タイプの負の転写制御系が作動していることを初めて明らかにした価値あるものであり、しかも将来更に大きく発展することが期待されると高い評価を受けた。以上により、本研究は学位授与に十分価すると、審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	市	山	新		
	副査	教授	菅	野	剛	史	副査 教授 西村 願 治
	副査	教授	藤	瀬	裕		副査 助教授 鈴木 修