

自然科学研究 徳島大学総合科学部 (査読論文)  
第 23 卷 3 号 82-90 頁

## 中等度好熱性細菌 *Geobacillus stearothermophilus* 生育温度変異株におけるタンパク質発現解析

京極 仁美、山口 安亮、小野(宮野) 百代、山口 綾野、佐藤 高則\*

徳島大学総合科学部自然システム学科生物化学研究室、770-8502 徳島市南常三島町 1-1

### Protein Expression Analysis in Temperature-adapted Mutant Strains of Moderately thermophile *Geobacillus stearothermophilus*

Hitomi Kyogoku, Yasuaki Yamaguchi, Momoyo Miyano-Ono, Ayano Yamaguchi, Takanori Satoh\*

Laboratory of Biochemistry, Department of Mathematical and Natural Sciences, Faculty of Integrated Arts and Sciences, The University of Tokushima, Tokushima city, Tokushima 770-8502, Japan

\*To whom correspondence should be addressed. e-mail: tsatoh@ias.tokushima-u.ac.jp

#### ABSTRACT

Optimum growth of moderately thermophile *Geobacillus stearothermophilus* (*Bst*) has been observed at 55°C, and suppressed by the downshift to lower temperature. In order to understand the relationship between growth temperature and protein expression, we made *Bst* mutant strains which were adapted to lower temperature (30°C) compared with wild type strain, and then we examined their protein expression under various growth temperatures. When they were cultured at 55°C, different expression patterns of six proteins (P1-P6) were observed between wild type and mutant strains, whereas five proteins (A1-A5) were found only in mutant strains cultured at 37°C. Furthermore, expression of five proteins (DS1-DS5) was increased according to the downshift of growth temperature to 37°C. Among all 16 proteins, abundant three proteins (P1, DS3, and DS5) were electroblotted to PVDF membrane, followed by analyzed N-terminal amino acid sequences. As a result, it was suggested that P1 must be Surface-layer protein A (sbsA), whereas DS3 and DS5 were unknown proteins.

Keywords: Thermophile, Adaptation, Expression, Growth temperature, *Geobacillus stearothermophilus*

#### 1. 緒言

好熱性細菌は、自然界の火山、温泉、温水熱水孔などの高温環境下に存在し、一般には 55°C 以上で生育可能な細菌をいう。好熱性細菌には真正細菌もしくは古細菌が含まれ、その至適生育温度により、中等度好熱性細菌(55-75°C)、高度好熱性細菌(75°C以上)、超好熱性細菌(90°C以上)に分類される。これら好熱性細菌の構成成分(タンパク質、酵素、核酸、細胞膜など)は、一般に耐熱性である。好熱性細菌のような極限環境微生物の構成成分は、工業的、産業的に有用であり、幅広く利用されている。また、好熱性細菌自身も産業的に利用されている。

中等度好熱性細菌の一種である *Geobacillus stearothermophilus* (*Bst*) は、至適生育温度を 55°C に持ち、堆肥などに存在している。以前は *Bacillus stearothermophilus* と呼ばれていたが、亜種が多数存在するために、細菌分類や特性が明確であり商業的に入手可能な *Bacillus stearothermophilus* については *Geobacillus stearothermophilus* と改名された<sup>1)</sup>。この *Bst* の高温適応機構については古くから研究されており、他の好熱性細菌同様、常温菌と比べ、上記の細胞構成要素や内在性酵素が耐熱化していることが報告されている<sup>1-5)</sup>。

また *Bst* の生育温度を変化させると、種々のタンパク質の発現量に変化することも知られて

いる。代表的な例としては Heat shock protein (Hsp)があり、培養温度を上昇させると(Upshift 適応)、dnaK, hrcA repressor, GroEL などの Hsp が発現誘導されることが報告されている<sup>6-9)</sup>。また別の報告では、培養温度を上昇させた場合に Glutamine transport system のタンパク質 (GlnH (Glutamine-binding protein), GlnQ (Membrane-binding protein)) などの発現が誘導され、細菌の高温適応に関与するとの報告もある<sup>3), 10)</sup>。一方培養温度を低下させた場合(Downshift 適応)には、分子量 1 万以下の cold shock protein (Csp)の発現が誘導されており、細菌の孢子形成のシグナル伝達経路に関与すると考えられている<sup>11), 12)</sup>。上記の *Bst* の upshift 適応および downshift 適応に関する報告は *Bst* P1<sup>11)</sup>, TLS33<sup>12)</sup>, NUB36<sup>13)</sup> でなされているが、これら *Bst* に関する生育温度と発現タンパク質の相関に関しては、*Bst* の全ゲノム解析が終了しておらず、網羅的なプロテオーム解析のデータベースも存在しないため、*Bst* に共通して存在している環境適応遺伝子・タンパク質や、株に固有のタンパク質に関しては不明な点が多い。そこで本研究は、*Bst* の中でも温度や pH に対し高い孢子耐性を有し、殺菌法の指標として用いられている *Bst* ATCC7953 株<sup>14-16)</sup>の生育温度適応機構の解明と生育温度変異株の有効利用を最終目的とし、その一環として、生育温度が変化した *Bst* ATCC7953 株の生育温度変異株を作製し、野生株および変異株の培養温度変化と発現タンパク質の相違について解析を行った。

## 2. 実験方法

### *Bst* の生育温度変異株の作製<sup>13)</sup>

*Geobacillus stearothermophilus* ATCC7953 株(以下、*Bst* 野生株と略記)は ATCC(American Type Culture Collection)より購入した。*Bst* 野生株を Luria-Bertani (LB) 培地で、55°C、OD<sub>600nm</sub>=0.4 まで培養し集菌した後、LB 培地で懸濁した。さらに、終濃度 50 μg/ml または 100 μg/ml の N-メチル-N'-ニトロ-N ニトロソグアニジン (MNNG, 遺伝子変異剤)を加えて、37°C、1 時間処理を行った。その後集菌し、LB 培地に再懸濁後、55°C、1 時間野生株 *Bst* を増殖させ、LB 寒天培地に塗布し、30°C で 40 時間培養後、出現したコロニーを BM1、BM2、BM3 として Glycerol stock を作製し、*Bst* の生育温度変異株として以後の実験に使用した。

### 野生株および各変異株の genomic DNA の調製

*Bst* 野生株および変異株の genomic DNA の調製は、Wizard SV genomic DNA purification system (Promega)により行った。まず、各株を LB 培地 1ml にて終夜 55°C で培養し、集菌後 nuclei

lysis solution に懸濁した。80°C、5 分間加熱し、室温まで冷却後、RNase で 37°C、1 時間処理を行った。さらに、protein precipitation solution を添加し、不要なタンパク質を除去した後、isopropanol 沈殿により DNA を回収した。これを DNA hydration solution により溶解させ、4°C で保存した。

### 16SrRNA 遺伝子の PCR-RFLP による解析<sup>17)</sup>

野生株および変異株の Genomic DNA の 16SrRNA 遺伝子を PCR で増幅し、制限酵素 *Sau* 3AI で消化後、得られたサンプルを 15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、臭化エチジウムにより染色した。PCR は、Upper primer として、5' - ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA-3' (23mer, Tm:53°C)、Lower primer として 5' - ATG GTA CCG TGT GAC GGG CGG TGT GTA -3' (27mer, Tm:67°C) を用いて、98°C、10 秒変性後、98°C、10 秒、58°C、60 秒、72°C、90 秒のサイクルを 30 サイクル行い、さらに 72°C、90 秒伸長反応を行った。

### 野生株および変異株の生育温度直接適応

まず、野生株および各変異株のグリセロールストックを、イノキュレーションループにてかきとり、LB 寒天培地に直接塗布した。これを、37°C および 55°C の各温度で終夜培養した。このマスタープレート上の各菌株から、LB 液体培地に植菌し、上記 LB 寒天培地と同じ培養温度(37°C および 55°C)でそれぞれ培養を行った。各株培養液の濁度 (OD<sub>600nm</sub>) を測定し、これを成長曲線とした。

### 野生株および変異株の生育温度 downshift 適応

野生株および各変異株のグリセロールストックを、イノキュレーションループにてかきとり、LB 寒天培地に直接塗布した。これを 55°C で終夜培養した。次に、このマスタープレートから、LB 液体培地に植菌し 55°C で前培養後、1/100 量を新たに LB 液体培地に植え継ぎ、培養温度を 37°C に downshift させて培養を行った。各株培養液の濁度 (OD<sub>600nm</sub>) を測定し、これを成長曲線とした。

### 各菌株からの粗抽出液の調製とタンパク質の定量

*Bst* 野生株および変異株を各条件で培養後、遠心分離により集菌し、20mM Tris-HCl buffer (pH8.0)に懸濁した。これを超音波破碎(各 1 分×6 回)により溶菌し、12,000rpm、10 分間、4°C で遠心分離を行い、上清を粗抽出液とした。また、タンパク質濃度の測定は、ブラッドフォード法を用いた<sup>18)</sup>。標準タンパク質としてウシ血清アルブミン (BSA) により作成した検量線を用いて、測定した吸光度より各タンパク質溶液の濃度を決定した。

### SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびゲルの解析

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Laemmli らの方法<sup>19)</sup>に従って行った。粗抽出液と試料処理液を混合したものを、沸騰水中で5分間ボイルした後、4-20%または15-25% gradient gel (Bio-rad 社)を用いて180V, 40mAで電気泳動を行った。泳動終了後、Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250により50°Cで30分染色し、その後ゲルのバックグラウンドが透明になるまで脱色を行った。電気泳動の画像解析は、Scion image (Scion Co., <http://www.scioncorp.com/>)を用いて行った。得られたデータをMicrosoft ExcelによりRfと強度でグラフ化し、各試料の発現タンパク質の解析を行った。

### Electroblotting およびアミノ酸配列決定

まず、PVDF-PLUS メンブレン (MICRON SEPARATION INC.)を100% methanolで5秒間、超純水で5分間、transfer buffer (25mM Tris-192mM Glycine, 15% MeOH, pH8.3)で15分間それぞれ振とうした。陰極側から、ろ紙、SDS-PAGE ゲル、上記処理をしたPVDF-PLUS メンブレン、ろ紙の順にセットし、4°C、35Vで1.5時間電気泳動を行った。その後、メンブレンを取り出し、風乾した後、超純水で15分間洗浄後、CBBで5分間染色した。これを脱色液1(45% MeOH, 7% 酢酸)で15分間振とうし、さらに脱色液2(90% MeOH, 7% 酢酸)で40秒間振とう、洗浄後、メンブレンを乾燥させた。転写されたPVDFメンブレンをアプロサイエンス社に委託し、Procise 494 HT (ABI)気相式プロテインシーケンサーにて、タンパク質のN末端アミノ酸配列決定を行った。得られたアミノ酸配列をBLASTおよびFASTAにて相同性解析を行った。

## 3. 実験結果

### *Bst* 生育温度変異株の作製

実験方法に記した手順に従い、*Geobacillus stearothermophilus* ATCC7953株(*Bst*野生株)の生育温度の変化した生育温度変異株を作製した。LB寒天培地にて37°Cで生育可能であった株をBM1およびBM2、30°Cで生育可能であった株をBM3とした。これらの変異株を、55°C、37°Cおよび30°CでLB寒天培地上で培養した結果、野生株では30°Cと37°Cで生育が見られなかったが、変異株BM1およびBM3ではいずれの温度でも生育可能であった(Fig. 1)。

### *Bst* 変異株の16S rRNA遺伝子のPCR-RFLPによる解析

先に得られた変異株が、*Bst*変異株であるか否かを検討するために、野生株および変異株から

genomic DNAを抽出し、16SrRNA遺伝子をPCRで増幅した後、制限酵素 *Sau*3AIで切断し、その切断パターンをPCR-RFLPにより比較検討した(Fig. 2)。この結果、変異株のうち、BM1とBM3は*Bst*野生株と類似したパターンが観察され、一方BM2については、*Bst*野生株とRFLPパターンが大きく異ったため、以後の実験はBM1およびBM3について行った。

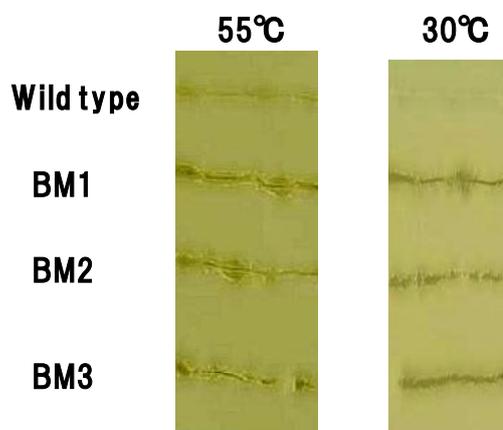


Fig.1 各温度で培養後の野生株と変異株

LB寒天培地に各株をストリークし、55°C, 18時間または30°C, 60時間培養した。野生株は30°C培養後も増殖は見られなかった。

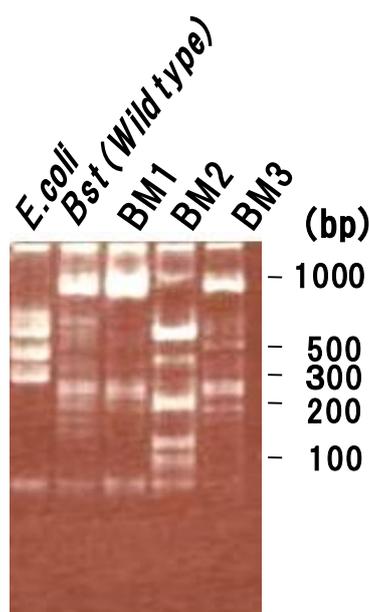


Fig.2 各変異株の16S rRNA遺伝子のPCR-RFLPによる解析

*Bst*野生株および変異株よりgenomic DNAを調製し、16SrRNA遺伝子を増幅後、制限酵素 *Sau* 3AIで切断し、15%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。対照として大腸菌の泳動パターンも示した。

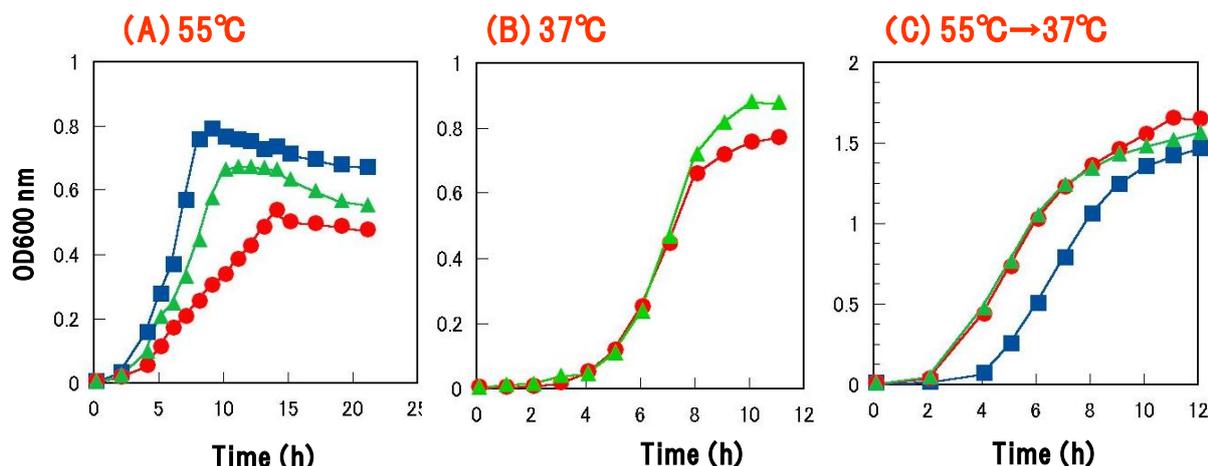


Fig.3 直接適応および downshift 適応による *Bst* 野生株および変異株の成長曲線

(A) 55°C培養における成長曲線;(B)37°C培養における成長曲線;(C)55°C前培養後、37°Cに培養温度を downshift させた成長曲線

(A)および(B)は直接適応を、(C)は downshift 適応を示す。■; 野生株、●; BM1、▲; BM3

直接適応((A),(B))は、各温度で前培養した培養液(OD<sub>600nm</sub>=0.15) 1 ml を添加した LB 培地 100ml で培養を行った。(B)における野生株は、前培養で増殖が見られなかったため測定を行わなかった。(C)の downshift 適応は、55°Cで前培養した培養液(OD<sub>600nm</sub>=0.15) 1 ml を添加した LB 培地 100ml で培養を行った。いずれの場合も振とう速度は 135rpm/min とした。

### 直接適応による各株の成長曲線

次に *Bst* の生育温度変異株 BM1 および BM3 の LB 液体培地における 55°C および 37°C での成長曲線を検討した。まず、野生株と変異株のグリセロールストックを LB 寒天培地に塗布し、55°C または 37°C で一晚培養した。得られた菌株を、2ml の LB 液体培地で 55°C または 37°C で前培養し、このうち 1ml を 100ml の LB 培地に植え継いだ。その後、55°C または 37°C にて、振とう速度 135rpm/min にて培養し、一定時間ごとに各株培養液の濁度 (OD<sub>600nm</sub>) を測定した (Fig. 3 (A), (B))。これより、55°C 培養では野生株、変異株とも生育可能であったが、37°C では変異株のみ生育が観察された。

### 生育温度 downshift 適応による各株の成長曲線

野生株および各変異株のグリセロールストックから、LB 寒天培地に直接塗布し、55°C で終夜培養した。得られた菌株を 2ml の LB 液体培地にて 55°C で前培養し、このうち 1ml を 100ml の LB 培地に植え継いだ。その後、培養温度を 37°C に downshift させて培養を行った。各株培養液の濁度 (OD<sub>600nm</sub>) を測定し、これを成長曲線とした (Fig. 3 (C))。これより、変異株では生育温度の downshift に対し、野生株よりも短時間で適応していることが示唆された。

### 直接適応および downshift 適応における発現タンパク質の相違

先の直接適応もしくは downshift 適応の条件で培養した野生株および変異株を集菌した。得られた約 1g の菌体から、実験方法に記載した手順に従い粗抽出液を調製した。このタンパク質 10 μg を 4-20% および 15-25% グラジエントゲルを用いた SDS-PAGE により分析した (Fig. 4, 5)。まず、55°C における直接適応 (Fig. 4) では、野生株と変異株の電気泳動ゲルの解析結果 (Fig. 4 (B)) より、野生株に多く見られる P1 タンパク質と、BM3 に多く見られる P2 タンパク質に相違が見られた。

次に、変異株の 37°C における直接適応のタンパク質発現を 15-25% グラジエントゲルによる SDS-PAGE で分析し、野生株の 55°C 直接適応の場合と比較検討を行った (Fig. 5)。この結果、55°C 直接適応でのみ見られた 4 種のタンパク質 (P3-P6) が観察され、一方、変異株の直接適応 37°C では低分子量 (20kDa 以下) の 5 種のタンパク質 (A1-5) の発現の増加が見られた。さらに、生育温度を 55°C から 37°C に低下させた downshift 適応では、主に変異株で発現の見られる 5 種のタンパク質 (DS1-5) の存在が示唆された。特に DS5 は BM3 で発現の顕著な増大が観察された。以上の結果より、野生株および変異株では、その

培養条件により発現タンパク質に相違のあることが明らかとなった(Table 1)。55°C直接適応でのみ発現が見られるものが6種(P1-P6)、37°C直接適応でのみ発現の見られるものが5種(A1-A5)、downshift 適応で発現の見られるものが5種(DS1-DS5)の計16種のタンパク質を、*Bst*の生育温度に關与する可能性のあるタンパク質として、これらのうち4種のタンパク質についてN末端アミノ酸配列決定を行った。

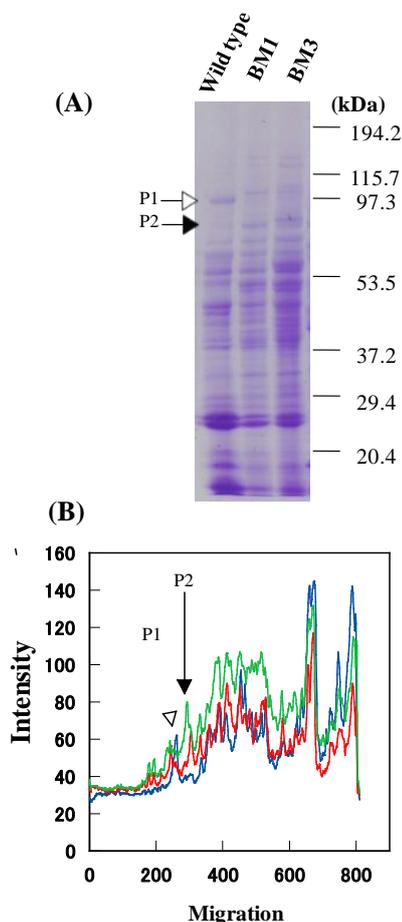


Fig. 4 55°C培養における *Bst* 野生株および変異株粗抽出液中のタンパク質解析

(A) 4-20% gradient gel による SDS-PAGE *Bst* 野生株および変異株の粗抽出液中のタンパク質 10 μg をゲルにアプライし、電気泳動を行った。  
 ▸; P1 タンパク質、 ▸; P2 タンパク質  
 (B) 各レーンの画像解析 パネル(A)における各レーンの移動度とバンド強度の関係を表わしたものである。P1 タンパク質は野生株で、P2 タンパク質はBM3でのみバンド強度の増大が見られる。  
 — ;野生株、— ; BM1、— ; BM3

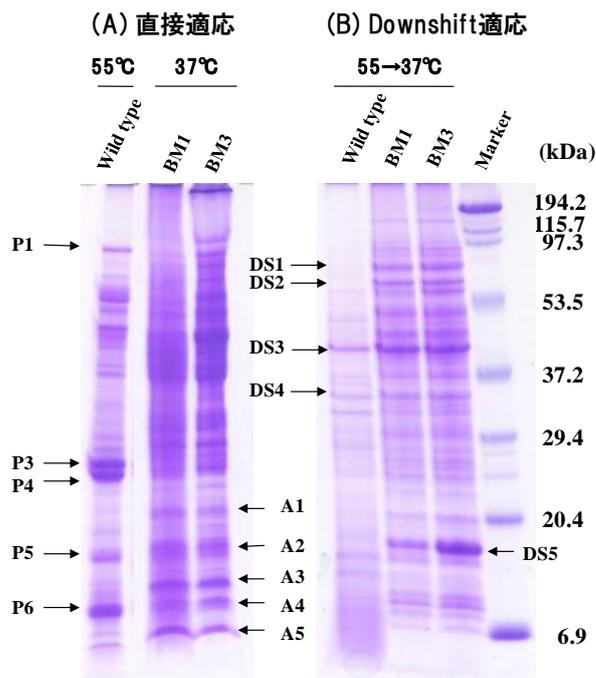


Fig.5 直接適応および downshift 適応条件下における *Bst* 野生株および変異株粗抽出液中のタンパク質解析

(A) 直接適応条件下で培養した各株粗抽出液のタンパク質解析 野生株は55°C、変異株は37°Cで培養した。Pは55°C直接適応で発現量の著しい増加の見られるタンパク質を、Aは37°C直接適応でのみ変異株に発現量の著しい増加の見られるタンパク質を示す。

(B) Downshift 適応条件下で培養した各株粗抽出液のタンパク質解析 各株を55°Cで前培養後、新たにLB培地に植え継ぎ、37°Cで培養した。DSはDownshift 適応でのみ発現量の著しい増加の見られるタンパク質を示す。

いずれの場合も、*Bst* 野生株および変異株の粗抽出液中のタンパク質 10 μg を15-25% gradient gel ゲルにアプライし、電気泳動を行った。

#### 発現タンパク質のN末端アミノ酸配列解析

Table 1の発現に差異の見られた16種のタンパク質のうち、まず55°C直接適応の野生株でのみ見られたP1タンパク質のアミノ酸配列決定を行うために、SDS-PAGEゲルからPVDF膜へのelectroblottingを行った。その結果、P1タンパク質のPVDF膜への転写が確認されたため、該当するバンド部分を切断し、N末端配列分析を行った。その結果、N末端からATDVATVVの配列が検出され(Table 2)、ホモロジーサーチの結果、*Bst*

の S(surface)-Layer protein A (sbsA) の N 末端の配列と一致した。

次に、*Bst* 変異株において、37°C 直接適応で発現の観察されたタンパク質のうち、55°C で直接適応させた野生株と発現の異なるタンパク質が約 25kDa 以下に検出された (A1-5; Table 1)。このうち比較的量の多い BM3 株の A3 タンパク質の N 末端配列分析を行った (Table 3)。その結果、複数のアミノ酸が検出されたため (A/M-K/I-K/E-I/V)、ホモロジーサーチおよびタンパク質の推定は困難であった。

さらに、55°C から 37°C への生育温度 downshift 適応における変異株 BM3 で特に差異の見られたタンパク質 (DS1-DS5) のうち、比較的量の多い DS3 および DS5 タンパク質の N 末端配列分析を行った。その結果、DS3 は N 末端から GVTIT の配列が検出され (Table 4)、DS5 は N 末端から ANQDN の配列が検出された (Table 5)。Blast および FASTA によるホモロジーサーチの結果、*Bst* において既知の該当するタンパク質はなかったため、新規タンパク質の可能性が示唆された。

Table 1 発現に差異が見られたタンパク質の分子量

培養条件	タンパク質	分子量(kDa)
55°C 直接適応	<b>P1</b>	<b>100.3</b>
	P2 (BM1)	89.2
	P2 (BM3)	85.3
	P3	25.0
	P4	23.9
	P5	14.8
	P6	10.8
37°C 直接適応	A1	19.5
	A2	15.5
	<b>A3</b>	<b>12.7</b>
	A4	11.4
	A5	9.7
Downshift 適応	DS1	76.7
	DS2	70.5
	<b>DS3</b>	<b>47.8</b>
	DS4	36.5
	<b>DS5</b>	<b>15.3</b>

赤字は N 末端アミノ酸配列決定を行ったタンパク質を示す。

Table 2 P1 タンパク質の N 末端アミノ酸配列決定

Cycle	Amino acid	Yield (pmol)
1	A	13.0
2	T	6.2
3	D	5.4
4	V	7.2
5	A	10.5
6	T	5.6
7	V	7.5
8	V	8.3

Table 3 A3 タンパク質の N 末端アミノ酸配列決定\*

Cycle	Amino acid	Yield (pmol)
1	A/M	16.7/13.5
2	K/I	11.5/ 8.5
3	K/I	7.9/ 6.5
4	K/E	7.2/ 6.2
5	I/V	8.4/ 5.9

\*PTH アミノ酸収量の多かった 2 種のアミノ酸について示した。

Table 4 DS3 タンパク質の N 末端アミノ酸配列決定

Cycle	Amino acid	Yield (pmol)
1	G	16.1
2	V	11.5
3	T	6.0
4	I	6.2
5	T	5.2

Table 5 DS5 タンパク質の N 末端アミノ酸配列決定

Cycle	Amino acid	Yield (pmol)
1	A	139.1
2	N	83.4
3	Q	67.7
4	D	76.6
5	N	55.3

#### 4. 考察

本研究では、中等度好熱性細菌の*Geobacillus stearothermophilus* (*Bst*) ATCC7953野生株および生育温度変異株を用い、これまで報告のないATCC7953株の生育温度と発現タンパク質との相関の検討を行った。

まず、遺伝子変異剤(MNNG)で処理した*Bst*の生育温度変異株の作製を行った。その結果、30°Cで生育可能な3種の変異株(BM1-BM3)が得られたが(Fig. 1)、16SrRNA遺伝子のPCR-RFLP解析(Fig. 2)により野生株と類似したパターンを示したBM1およびBM3を実験に用いた。野生株および変異株を55°Cまたは37°Cで培養した場合(直接適応)と、培養温度を55°Cから37°Cにdownshiftさせた場合(downshift適応)について、定常期まで培養後集菌し、粗抽出液中の発現タンパク質をSDS-PAGEで検討した。その結果、55°C直接適応で発現の見られるタンパク質が6種(P1-P6)、変異株の37°C直接適応で発現の見られるタンパク質が5種(A1-A5)、さらにdownshift適応で発現の見られるタンパク質が5種(DS1-DS5)の16種のタンパク質発現に相違が観察された(Table 1)。このうち、4種のタンパク質のN末端アミノ酸配列解析およびタンパク質の同定を行った。

55°Cにおける直接適応条件下では、野生株で最も成長が早く(Fig. 3)、かつP1タンパク質の発現量が多いこと(Fig. 4)から、P1タンパク質のN末端アミノ酸配列を分析し、その配列(ATDVATVV)をデータベースにて照合したところ、P1はSurface layer protein A (sbsA)であることが判明した。このsbsAは*Bst* 細胞壁ペプチドグリカンの外側に位置する表層タンパク質sbsの中の主だったタンパク質であり、格子状の構造を形成し、細胞の一番外側のenvelopeを形成していることが知られている<sup>20,21)</sup>。Sbsタンパク質(S-layer protein)は、sbsA (130kDa), sbsB (98kDa), sbsC (92kDa), sbsD (96.2kDa)からなっており、Scholzらは生育温度のupshift (57→67°C)により、S-layer proteinの合成が阻害されると報告している<sup>22)</sup>。また、このS-layer proteinのN末端領域は、GlcNAcとManNAc からなる*Bst*の高分子細胞壁ポリマー(SCWP)に固定されるとの報告もある<sup>4)</sup>。さらに、*Bst*のS-layer protein(sbsA, sbsB)は培養条件により発現が調節される。sbsB遺伝子はメガプラスミド上にあり、調節因子は染色体上にある。sbsB遺伝子の染色体への転座により発現が誘導されるとの報告もある<sup>23)</sup>。

*Bst*のS-layer proteinは以上の報告のように、*Bst*の生育温度と関連があり、本研究においても野生株ではP1タンパク質(sbsA)の発現が確認されていることから、55°Cで生育するためには必要であると推定される。しかしながら、同じく55°Cで生育できる変異株BM1および3では(Fig. 3)、

同じ分子量のタンパク質が認められない(Fig. 4)。従って、このsbsAタンパク質は高温での生育環境適応には影響を与えるが必須ではないと考えられる。さらに、Fig. 4の55°Cの直接適応における発現パターンを比較すると、約85kDa付近にBM1およびBM3のみにタンパク質のバンド(P2)が見られる。これらの高分子のバンドは、上記のS-layer proteinの分子量に近いことから、変異株では細胞表層タンパク質の変化が生じている可能性も考えられる。

一方、変異株を37°Cで直接適応により培養した場合(Fig. 3, Fig. 5)、そのタンパク質の発現は、55°Cのパターンと比較して、約50kDa付近の複数のタンパク質発現の増加が見られ、さらに25kDa以下の低分子量タンパク質(A1-A5)の発現増加が見られた。このうちA3タンパク質について、アミノ酸配列決定を行ったが、複数のアミノ酸が検出されたため同定には至らなかった。これら変異株では37°C直接適応からの粗抽出液で不溶化タンパク質が多く見られたため、二次元電気泳動などを用いて、タンパク質をさらに分離することにより、タンパク質の同定は可能であると考えられる。また、緒言で述べた生育温度downshiftで見られるCsp(分子量10kDa前後)のように、このA1-A5のような低分子量タンパク質の発現が、*Bst*変異株の生育温度適応に関与している可能性もある。

最後に、高温で培養した後に生育温度を低下させたdownshift適応(Fig. 3)では、そのタンパク質の発現パターン(Fig. 5)が55°C直接適応と比べ大きく異なっており、特に変異株においてはDS3およびDS5タンパク質の発現が顕著に見られた。そこで、これらのN末端アミノ酸配列決定を行った。その結果(DS3: GVTIT, DS5: ANQDN)をデータベースにて照合したところ、DS3、DS5共に*Bst*において合致するタンパク質が無いため、新規のタンパク質である可能性が示唆された。

DS3(GVTIT)は、分子量が47.8kDaと大きく、類似の分子量を持ち、かつ一致した配列をデータベース中で検索すると、*Acinetobacter radioresistens* OmpA-like protein や *Acinetobacter* sp. VP-26 outer membrane protein A protein<sup>24)</sup>、*Bacteroides fragilis* NCTC 9343 Putative transmembrane proteinなどがこの配列をN末端近傍に有している。合致した配列のN末端の部分がシグナル配列になっていると仮定すると、DS3タンパク質はOmpAに類似したタンパク質と推定される。OmpAは細菌細胞外膜の主要なポリンタンパク質であり、浸透圧など環境変化へのセンサータンパク質として知られている<sup>25,26)</sup>。細菌の環境適応においては、細胞膜、細胞壁の構成タンパク質がセンサーとして作用し、その情報が細胞内の遺伝子発現を制御する例がある<sup>3,10)</sup>。先のsbsAも細胞表層を構成するタンパ

ク質であることから、細胞膜や細胞壁に存在するタンパク質の発現の差異により生育温度適応に影響を与える可能性がある。

一方、DS5 (ANQDN) は分子量が小さく (15.3kDa)、類似の分子量を持ちかつ N 末端近傍にこの配列を有するものは、*Lactobacillus* 属の仮想タンパク質であった。さらに相同性を有するタンパク質のうち、*Bacillus* 属のものでは孢子 (Spore) 形成タンパク質や Cytochrome c oxidase などが検索された。また、他の属由来のタンパク質では核酸結合タンパク質が複数見られた。本研究では N 末端 5 残基のみ同定したが、さらに DS3 および DS5 に関するアミノ酸配列を分析することで、相同タンパク質の検索が可能になり、これらのタンパク質の機能類推が可能になると考えられる。

以上の結果から、本研究では *Bst* の生育温度変異株を作製し、その生育温度や条件により発現タンパク質に相違が見られることを見出した。これまで生育温度と発現タンパク質に関する研究は環境中から単離された *Bst* P1 株<sup>11)</sup> や TLS33 株<sup>12)</sup> などについてであり、これらと生育環境や生育温度等の異なる *Bst* ATCC7953 株および生育温度変異株を用いた研究は行われていないため、今後 *Bst* 野生株および生育温度変異株のタンパク質の二次元電気泳動とプロテオームを組み合わせた大規模な解析が必要であり、これらの解析を通じて *Bst* の生育温度適応に関与するタンパク質が明らかになると期待される。

## 謝辞

本研究は、徳島大学教育改善推進費 (奨励研究) の支援により実施された。

## 文献

- Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko, A. M., Petrunyaka, V. V., Osipov, G. A., Belyaev, S. S., Ivanov, M. V. (2001) Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 2, 433-446
- Reizer, J., Grossowicz, N., and Barenholz, Y. (1985) The effect of growth temperature on the thermotropic behavior of the membranes of a thermophilic *Bacillus*. Composition-structure-function relationships. *Biochim. Biophys. Acta.* **815**, 268-280
- Tolner, B., Poolman, B. and Konings, W. N. (1997) Adaptation of Microorganisms and Their Transport Systems to High Temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.* **118A**, 3, 423-428
- Sára, M., Dekitsch, C., Mayer, H.F., Egelseer, E. M. and Sleytr, U. B. (1998) Influence of the Secondary Cell Wall Polymer on the Reassembly, Recrystallization, and Stability Properties of the S-Layer Protein from *Bacillus stearothermophilus* PV72/p2. *J.Bacteriol.* **180**, 16, 4146-4153
- Satoh, T., Shinoda, H., Ishii, K., Koyama, M., Sakurai, N., Kaji, H., Hachimori, A., Irie, M., and Samejima, T. (1999) Primary structure, expression, and site-directed mutagenesis of inorganic pyrophosphatase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Biochem.* **125**, 48-57
- Herbort, M., Schön, U., Angermann, K., Lang, J. and Schumann, W. (1996) Cloning and sequencing of the *dnaK* operon of *Bacillus stearothermophilus*. *Gene* **170**, 81-84
- Mogk, A. and Schumann, W. (1997) Cloning and sequencing of the *hrcA* gene of *Bacillus stearothermophilus*. *Gene* **194**, 133-136
- Schon, U. and Schumann, W. (1993) Molecular cloning, sequencing, and transcriptional analysis of the *groESL* operon from *Bacillus stearothermophilus*. *J.Bacteriol.* **175**, 2465-2469
- Wu, L. and Welker, N. E. (1991) Temperature-induced protein synthesis in *Bacillus stearothermophilus* NUB36. *J.Bacteriol.* **173**, 4889-4892
- Wu, L. and Welker, N. E. (1991) Cloning and Characterization of a Glutamine Transport Operon of *Bacillus stearothermophilus* NUB36: Effect of Temperature on Regulation of Transcription. *J.Bacteriol.* **173**, 4877-4888
- Sinchalkul, S., Sookkheo, B., Phutrakul, S., Pan, F. M. and Chen, S.T. (2002) Proteomic study of cold shock protein in *Bacillus stearothermophilus* P1: Comparison of temperature downshifts. *Proteomics* **2**, 1316-1324
- Topanurak, S., Sinchaikui, S., Sookkheo, B., Phutrakul, S. and Chen, S.T. (2005) Functional proteomics and correlated signaling pathway of the thermophilic bacterium *Bacillus stearothermophilus* TLS33 under cold-shock stress. *Proteomics* **5**, 4456-4471

13. Chen, Z. F., Wojcik, S. F., Welker, N. E. (1986) Genetic analysis of *Bacillus stearothermophilus* by protoplast fusion. *J.Bacteriol.* **165**, 3, 994-1001
14. Bender, G. R. and Marquis, R. E. (1985) Spore Heat Resistance and Specific Mineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 6, 1414-1421
15. López, M., González, I., Condón, S., Bernardo, A. (1996) Effect of pH heating medium on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Int. J. Food Microbiol.* **28**, 405-410
16. Penna, T. C. , Machoshvili, I. A., Taqueda, M. E., Ishii, M. (2000) The effect of media composition on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **54**, 5, 398-412
17. Blanc, M., Marilley, L., Beffa, T. and Aragno, M. (1997) Rapid identification of heterotrophic, thermophilic, spore-forming bacteria isolated from hot composts. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **47**,1246-1248
18. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
19. Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685
20. Breitwieser, A., Gruber, K. and Sleytr, U. B. (1992) Evidence for an S-Layer Protein Pool in the peptidoglycan of *Bacillus stearothermophilus*. *J.Bacteriol.* **174**, 8008-8015
21. Egelseer, E. M., Danhorn, T., Pleschberger, M., Hotzy, C., Sleytr, U. B., Sára, M. (2001) Characterization of an S-layer glycoprotein produced in the course of S-layer variation of *Bacillus stearothermophilus* ATCC12980 and sequencing and cloning of the *sbsD* gene encoding the protein moiety. *Arch Microbiol.* **177**, 70-80
22. Scholz, H., Hummel, S., Witte, A., Lubitz, W., Kuen, B. (2000) The transposable element IS4712 prevents S-layer gene (*sbsA*) expression in *Bacillus stearothermophilus* and also affects the synthesis of altered surface layer proteins. *Arch Microbiol.* **174**, 97-103.
23. Scholz, H.C., Riedmann, E., Witte, A., Lubitz, W. and Kuen, B. (2001) S-Layer variation in *Bacillus stearothermophilus* PV72 is based on DNA rearrangements between the chromosome and the naturally occurring megaplasmids. *J.Bacteriol.* **183**, 1672-1679.
24. Walzer, G., Rosenberg, E., Ron, E.Z. (2006) The *Acinetobacter* outer membrane protein A (OmpA) is a secreted emulsifier. *Environmental Microbiology* **8**, 6, 1026-1032
25. Wang, Y. (2002) The function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* **292**, 2, 396-401.
26. Sugawara, E, Nikaido, H. (1992) Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**, 4, 2507-2511.

論文受付 2009年9月11日

改訂論文受付 2009年9月14日

改訂論文受理 2009年9月14日