

自然科学研究 徳島大学大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部 (査読論文)
第 27 卷 4 号 81-88 頁

アミトロール抵抗性大腸菌株におけるタンパク質発現解析

山口 安亮、宮野 百代、京極 仁美、山口 綾野、青木 拓、佐藤 高則*

徳島大学大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部生物化学研究室
770-8502 徳島市南常三島町 1-1

Protein Expression Analysis in Amitrole-Resistant *E.coli* Strains

Yasuaki YAMAGUCHI¹, Momoyo MIYANO-ONO¹, Hitomi KYOGOKU-TSUJINAKA¹,
Ayano YAMAGUCHI¹, Taku AOKI², and Takanori SATOH^{3,*}

¹Faculty of Integrated Arts and Sciences, The University of Tokushima, ² Graduate school of Human and Natural Environment Sciences, The University of Tokushima, ³Institute 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

It was reported that the *E.coli* mutant strain exhibited the resistance against amitrole (AT) which had used as a pesticide and inhibits the bacterial growth. In order to elucidate the mechanism on the AT-resistance in *E.coli*, we prepared the *E.coli* mutant strain by treating with chemical mutagen, MNNG, and then selected the AT-resistant *E. coli* strain. The obtained mutant strain was possible for proliferating even in the M9 minimal medium containing 2 mg/ml AT. Therefore, we examined the expressed proteins in the mutant strain, which was cultured under various conditions. As a result, it was suggested the expression of 22 kDa protein (P1) was suppressed as the AT concentration was increased in M9 medium. By the amino acid sequence analysis, it was proved that P1 must be alkyl hydroperoxide reductase C22 protein (ahpC). On the other hand, the expression of P2 protein in mutant strain has increased in the M9 medium containing 2mg/ml AT, and partial amino acid sequence of P2 was consistent with zinT (yodA) protein. From these results, it is likely that the amitrole-resistance in *E.coli* might be regulated by *soxRS* regulon, not *oxy R*, like adaptation for the oxidative stress.

Keywords: Amitrole, Adaptation, Expression, *E.coli*, Chemical mutagen

1. 緒言

種々の細菌は、その生育環境に適応し、環境ストレスに対する応答機構(環境ストレス応答)を有している。環境ストレス応答としては、酸化ストレス応答(Oxidative stress response)、熱ショック応答(Heat-shock response)、SOS 応答(SOS response)、緊縮応答(Stringent response)などが知られており⁽¹⁾、各応答機構に関与する遺伝子・タンパク質群の解明が進んでいる。酸化ストレス応答は、大腸菌でよく研究され、O₂⁻による酸化ストレスと H₂O₂による酸化ストレスに各々区別して応答している⁽²⁾。O₂⁻による酸化ストレスを受けると転写制御因子 *SoxRS* の転写抑制が外され、

sodA, *zwf*, *nfo* などの遺伝子が発現する。一方 H₂O₂ の場合は、転写制御因子 *OxyR* の転写抑制が外され、*katG*, *ahpCF*, *gorA* などの遺伝子が発現し、活性酸素種(ROS)を除去する⁽²⁾。熱ショック応答は、熱ショックを受けた場合、*rpoH* 遺伝子により σ 32 (RpoH)が合成され、 σ 32 が RNA ポリメラーゼと結合して、*rpoH*, *dnaKJ*, *groESL* などの heat shock 応答遺伝子群を発現する。GroESL や DnaKJ はシャペロニンとして働き、タンパク分子の変性を抑制し、タンパク質の folding を助けることが知られている^{(1),(3)}。SOS 応答では、DNA の損傷が起きた場合、RecA が LexA リプレッサー(SOS 応答遺伝子群を抑制)を分解し、*recA*, *ruvABC*, *uvrABC* などの SOS 応答遺伝子群が働き、DNA の修復が行われる^{(1),(4)}。緊縮応答の場合は、

栄養飢餓状態になると、*relA* 遺伝子により RelA が合成されアラームである pppGpp や ppGpp が蓄積する。飢餓状態の間、アラームはアラーム合成タンパク質の RelA とアラーム分解タンパク質 SpoT により、アラーム濃度が維持される⁽⁵⁾⁻⁽⁷⁾。これらは RNA polymerase の RNA 合成や転写を抑制し、タンパク質合成速度が低下することで、細菌増殖は静止期に入る⁽⁸⁾。

本研究では化学物質に対する細菌の適応機構に関する知見を得るため、環境ホルモンの中で特に水に対する溶解度が高く、処理しにくい物質であるアミトロール (AT)⁽⁹⁾に着目した。AT は塗料や写真薬品、樹脂の硬化剤として使用され、過去には農薬 (除草剤) としても使用されていた (1975 年失効)。この物質は細菌への成長阻害効果を示すことが知られており⁽¹⁰⁾、またこれまでの研究により大腸菌やサルモネラ菌では遺伝子変異剤で処理すると、AT 存在下でも生育可能な AT 抵抗性を示す変異株が出現することが報告されている^{(11),(12)}。しかしながら、細菌の AT 抵抗性に関与するタンパク質および適応機構に関する知見はほとんどない。そこで本研究では細菌の AT 抵抗性機構の解明を最終目標とし、その一環として大腸菌 JM109 の AT 抵抗性をもつ変異株を作製し、AT 抵抗性大腸菌における発現タンパク質の検討と同定を行った。

2. 実験方法

AT 抵抗性大腸菌変異株の作製⁽¹⁾

E.coli JM109 株 (以下、野生株と略記) を Luria-Bertani (LB) 培地 (0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) tryptone, 1% (w/v) NaCl) で 37°C、OD_{600nm}=0.5 まで培養し集菌した後、M9 最小培地 (1.2% (w/v) Na₂HPO₄, 0.6% (w/v) KH₂PO₄, 0.1% (w/v) NaCl, 0.2% (w/v) NH₄Cl, 2mM MgSO₄, 22mM Glucose, 0.002% (w/v) Vitamin B₁, 0.2mM CaCl₂) で懸濁した。これに終濃度 50ug/ml になるように 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 培地に懸濁後、37 °C、1 時間大腸菌を増殖させ、得られた培養液を適宜希釈し、1.5mg/ml AT を含む M9 最小寒天培地に塗布した。37°C、40 時間培養し、得られたコロニーを再度 1.5mg/ml AT を含む M9 最小寒天培地にストリークし 1 次スクリーニングを行った。得られた生育可能なコロニーを、2mg/ml AT を含む M9 最小寒天培地および 1mg/ml AT を含む M9 最小液体培地にて培養することにより、2 次スクリーニングを行った。両培地共に生育可能なコロニーを得てこれを変異株とし、以後の実験に使用した。

各菌株からの粗抽出液の調製とタンパク質の定量

野生株および変異株を、終濃度 0、1、2mg/ml AT を含む M9 最小培地にて、37°C で 15-30 時間培養後、遠心分離により集菌し、Bugbuster (Novagen) に懸濁後、30°C、20 分間振とうし大腸菌を溶菌させた。その後、12,000rpm、15 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⁽¹³⁾。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、タンパク質濃度を決定した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびゲルの画像解析

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-PAGE) は Ornstein および Davis の方法に従って行った^{(14),(15)}。支持体としてポリアクリルアミドゲル濃度を、分離用 10%、濃縮用 3% とした。また SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、Laemmli らの方法⁽¹⁶⁾に従って行った。支持体としてポリアクリルアミドゲル濃度を、分離用 12.5%、濃縮用 3% とした。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 により移動度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

SDS-PAGE ゲルからの PVDF 膜への Electroblotting は、下記の通り行なった。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, pH 8.3) 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。また P2 タンパク質は、終濃度 2mg/ml AT を含む M9 最小培地 1L で大量培養後の大腸菌抽出液を、DEAE-cellulose 陰イオン交換クロマトグラフィーおよび TSK-gel G3000SW ゲルろ過クロマトグラフィーにて部分

精製後、上記に従い Electroblothing およびタンパク質の 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。

野生株および変異株の genomic DNA の調製

野生株および変異株の genomic DNA の調製は、Wirzard 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。

大腸菌由来 Alkyl hydroperoxide reductase C22 protein (AhpC) 遺伝子および zinT (yodA) 遺伝子のクローニングと塩基配列解析

調製した大腸菌野生株および変異株の genomic DNA を鋳型として、AhpC および zinT (yodA) 遺伝子⁽¹⁷⁾を Pyrobest DNA Polymerase (Takara)を用いた PCR(98°C, 10 秒→57°C (AhpC)または 61°C (zinT), 1 分→72°C, 1.5 分を 30 サイクル)により増幅した。AhpC 遺伝子の PCR プライマーは、upper プライマーが 5'-CGGGGGTACCAATTGATGTCCTTGATTAACACCAA -3' (35mer, *E.coli* AhpC の 5'-非翻訳領域と Met1-Asn5 に相当)、lower primer が、5'-GCCCAAGCTTAGATTTACCAACCAGGTCCAGAGA -3' (35mer, *E.coli* AhpC の Val184-Ile187 と 3'-非翻訳領域に相当)を用いた。また zinT (yodA) 遺伝子の PCR プライマーは、upper プライマーが 5'-GGGGGTACCAATTGATGGCGATTTCGCTTTA-3' (31mer, *E.coli* zinT の 5'-非翻訳領域と Met1-Leu5 に相当)、lower primer が 5'-GCCCAAGCTTCAATGAGACATCA TTTCCT-3' (29mer, *E.coli* zinT の Met213-His216 と 3'-非翻訳領域に相当)を使用した。得られた遺伝子増幅断片を、pUC118 ベクターに組み込み DNA 塩基配列決定を行った。得られた塩基配列を Genetyx Mac ver.8.0 (Genetyx) を用いて解析した。

3. 実験結果

大腸菌 AT 抵抗性変異株の作製

本研究では、大腸菌の AT 抵抗性機構に関与するタンパク質を探索するために、実験方法に記した手順に従い大腸菌の AT 抵抗性変異株の作製を行なった。まず、野生株を化学的変異剤 MNNG で処理し、1.5mg/ml AT を含む M9 最小寒天培地に塗布した。37°C、40 時間培養したところ、94

Wild type Mutant



Fig.1 Cultures of *E.coli* wild type and mutant strain on the M9 medium agar plate containing AT
Each strain was streaked on the agar plate of M9 minimum medium containing 1.5mg/ml AT, and cultured at 37°C for 24h.

個のコロニーが得られたため、再度 1.5mg/ml AT を含む M9 最小寒天培地にストリークして 1 次スクリーニングを行った (Fig.1)。得られた生育可能なコロニー (57 個)を、2mg/ml AT を含む M9 最小寒天培地および 1mg/ml AT を含む M9 最小液体培地にて培養し 2 次スクリーニングを行った。両培地共に生育可能なコロニー (1 個)が得られ、これを AT 抵抗性変異株とした。

大腸菌野生株および変異株の AT 存在下における成長曲線

次に、大腸菌野生株と AT 抵抗性変異株の増殖に対し、AT がどのような影響を与えるかを検討するため、AT を終濃度 0, 1, 2mg/ml 含む M9 最小培地における成長曲線を検討した (Fig.2)。その結果、大腸菌野生株は AT 濃度の上昇につれ増殖が阻害され、AT 濃度 2mg/ml ではほとんど成長が見られなかった (Fig.2 (A))。一方 AT 抵抗性変異株では、AT 濃度が 0, 1, 2mg/ml のいずれの条件においても、37°C での培養時間が 15-30 時間で定常期まで達した (Fig.2 (A),(B))。このことから AT 抵抗性変異株では、AT を含む M9 最小寒天培地および M9 最小液体培地のいずれでも生育が可能であることが明らかとなった (Fig.1,2)。

野生株および変異株の AT 存在下における発現タンパク質の検討

上記で培養した大腸菌野生株および変異株において、AT 濃度により大腸菌の発現タンパク質がどのように変化しているかを検討するため、各培養液を集菌し、粗抽出液を調製した。次に、各 AT 濃度で培養した大腸菌の粗抽出液を、SDS-PAGE (12.5%ゲル)により分析を行った (Fig.3 (A))。ゲルを Scion image により画像解析を行った結果 (Fig.3 (B))、変異株において AT 濃度の上昇に伴い発現量が顕著に減少する 22.4kDa のタンパク質が観察され、これを P1 とした。

この P1 タンパク質に関する知見を得るために、

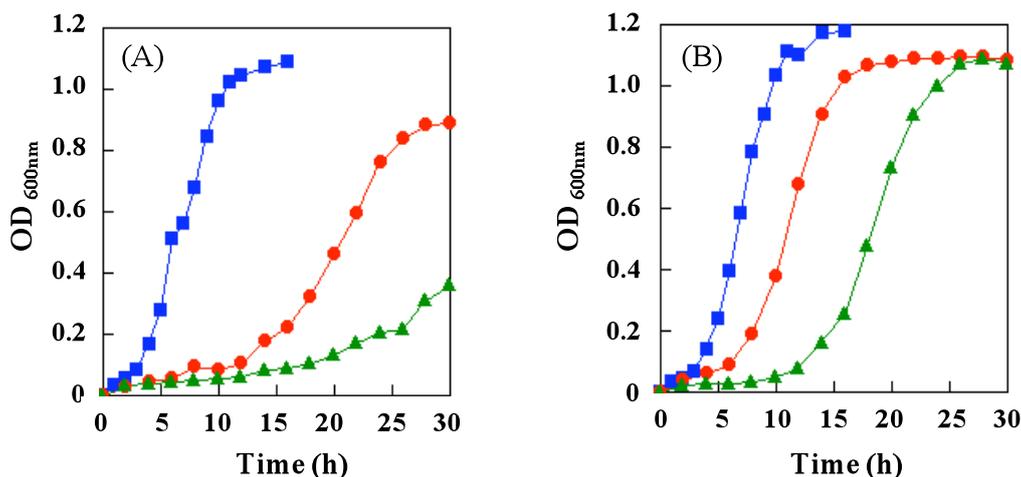


Fig.2 Growth curves of *E.coli* wild type and mutant strain in the presence of AT

(A) *E.coli* wild type strain, (B) *E.coli* AT-resistant mutant strain. Each strain was cultured at 37°C with a 135rpm shaking rate in 100ml of M9 minimum medium containing the indicated final concentration of AT, after it was pre-cultured in M9 medium up to OD_{600nm} = 0.9. Symbols: ■, none; ●, AT 1mg/ml; ▲, AT 2mg/ml

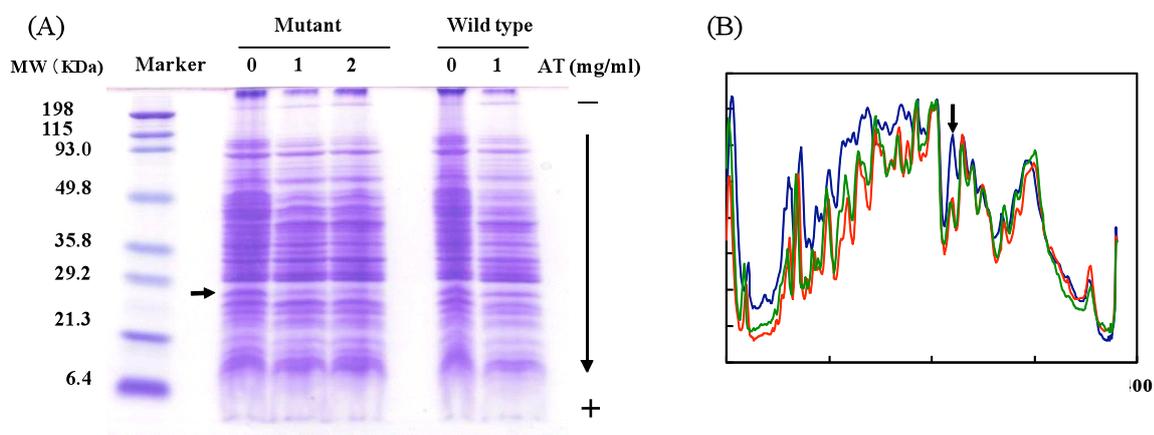


Fig.3 SDS-PAGE and image analysis of cell extract for *E.coli* wild type and mutant strain in the presence of AT

(A) SDS-PAGE of cell extract for *E.coli* wild type and mutant strain in the presence of AT; *E.coli* wild type and mutant strain were cultured in the presence of the indicated concentration of AT, and their crude extracts were prepared as described in Materials and Methods. 20ug of each protein was analyzed by SDS-PAGE on 15% gel. (B) Image analysis for each lane of mutant strain on the SDS-PAGE gel (Panel A). Zero point of migration was set on the top of gel, and intensity of each band was calculated from the scanned gel image by Scion image software (Scion. Co.). Lines: —, None; —, 1mg/ml AT; —, 2mg/ml AT. In panels (A) and (B), P1 protein was indicated by the arrow.

AT 非存在下の大腸菌変異株粗抽出液を、SDS-PAGE (12.5%ゲル)を行なった後、PVDF膜に転写し、該当するバンド部分を切断し、N末端配列分析 (8 残基)を行った。その結果、N末端から SLINTKIK の配列が検出され (Table 1)、ホモロジ

ーサーチの結果、大腸菌の過酸化脂質消去酵素である Alkyl hydroperoxide reductase C22 protein (AhpC, UniProtKB/Swiss-Prot database: P0AE08)の N末端の配列 (Ser1-Lys8, 開始コドンの Met を除く)と一致した。

Table I N-terminal amino acid sequence analysis for P1 protein

Cycle	Amino acid	Yield (pmol)
1	S	14.9
2	L	30.2
3	I	19.0
4	N	31.3
5	T	20.4
6	K	26.9
7	I	19.3
8	K	21.8

さらに Native-PAGE により、各 AT 濃度で培養した大腸菌の粗抽出液の発現タンパク質の分析を行った(Fig.4(A))。ゲルを Scion image により画像解析を行った結果 (Fig.4(B))、変異株において AT 濃度の上昇に伴い発現量が顕著に増加するタンパク質(Rf 値 0.68)が観察され、これを P2 とした。

P2 タンパク質については、電気泳動ゲルから

P2 タンパク質の N 末端アミノ酸配列決定を行った。その結果 4 パターン(No.1-4)のアミノ酸配列が検出され (Table II)、ホモロジーサーチよりいずれの配列も大腸菌の Metal-binding protein である zinT (yodA) protein (UniProtKB/Swiss-Prot database: P76344)の N 末端近傍配列(No.1: Asp46 – Arg53, No.2: Ala40 – Asp47, No.3: Gln38 – Phe45, No.4: Thr34 – Ala41)と一致した。

大腸菌野生株および変異株の AhpC 遺伝子および zinT (yodA)遺伝子のクローニングと塩基配列

以上の結果より、AT 濃度の上昇に伴い AT 抵抗性大腸菌変異株では、AhpC タンパク質の発現量の減少と、zinT(yodA)タンパク質の発現量の増加が見られた。これらの発現量の差異が、野生株と変異株の AhpC 遺伝子および zinT (yodA)遺伝子の塩基配列の相違に由来するのかを検討した。

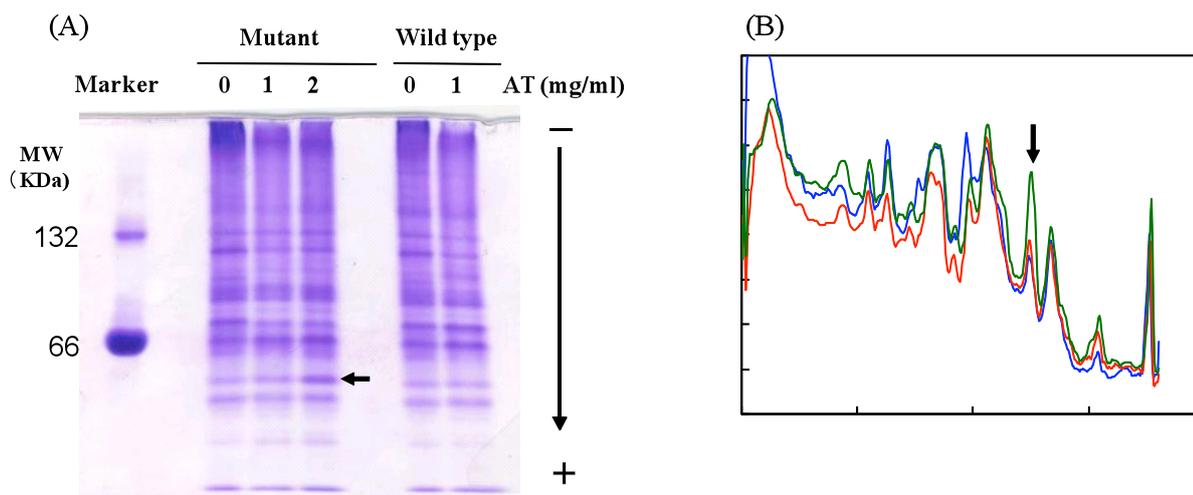


Fig.4 Native-PAGE and image analysis of cell extract for *E.coli* wild type and mutant strain in the presence of AT

(A) Native-PAGE of cell extract for *E.coli* wild type and mutant strain in the presence of AT; *E.coli* wild type and mutant strain were cultured in the presence of the indicated concentration of AT, and their crude extracts were prepared as described in Materials and Methods. 20ug of each protein was analyzed by Native-PAGE on 10% gel. (B) Image analysis for each lane of mutant strain on the Native-PAGE gel (Panel A). Zero point of migration was set on the top of gel, and intensity of each band was calculated from the scanned gel image by Scion image software (Scion. Co.). Lines: —, None; —, 1mg/ml AT; —, 2mg/ml AT. In panels (A) and (B), P2 protein was indicated by the arrow.

Table II N-terminal amino acid sequence analysis for P2 protein

Cycle	No.1*		No.2*		No.3*		No.4*	
	Amino acid	Yield (pmol)						
1	D	11.5	A	7.5	Q	2.1	T	1.0
2	D	11.5	A	6.7	K	2.5	E	1.5
3	A	14.1	N	2.8	A	14.1	V	2.4
4	N	10.4	G	3.6	A	4.9	E	2.0
5	V	13.4	V	13.4	N	2.2	Q	1.6
6	Q	7.6	F	3.2	G	2.4	K	2.1
7	N	8.1	D	3.9	V	2.6	A	3.0
8	R	8.0	D	3.6	F	2.4	A	3.4

*No.1-4 sequences were detected by N-terminal sequence analysis of P2 protein. All these sequences are consistent with those of N-terminal region of *E.coli* zinT (yodA) protein as follows. No.1: Asp46-Arg53, No.2: Ala40-Asp47, No.3:Gln38-Phe45, No.4: Thr34-Ala41, respectively.

まず、大腸菌野生株および変異株より genomic DNA を調製し、これを鋳型として実験方法に示した PCR primer を用いて、AhpC 遺伝子および zinT (yodA) 遺伝子を PCR により増幅した。その後、制限酵素 *Kpn* I および *Hin* d III で消化し、得られた遺伝子断片を同様の制限酵素で切断した pUC118 ベクターに挿入した。クローニングされた野生株および変異株の AhpC 遺伝子(564bp)と zinT(yodA)遺伝子(651bp)について、M13 Reverse および M13 Forward sequence primer により各遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、AhpC 遺伝子、zinT(yodA)とも野生株と変異株の間に塩基配列の相違は見られなかった(AhpC 遺伝子: Yamaguchi, Y. *et al.* (2008) DDBJ/EMBL/GenBank accession number.AB428377, zinT (yodA)遺伝子: Yamaguchi, Y. *et al.* (2008) DDBJ/EMBL/GenBank accession number AB428376)。これらの結果より、先の野生株と変異株における AhpC タンパク質と zinT(yodA)タンパク質の発現量の差異は、各遺伝子の変異に起因するものではないことが示唆された。

4. 考察

本研究では細菌の AT 抵抗性機構の解明を最終目標とし、その一環として大腸菌 JM109 の AT 抵抗性をもつ変異株を作製し、AT 抵抗性大腸菌における発現タンパク質の検討と同定を行った。

まず、化学的変異剤(MNNG)により処理をした大腸菌JM109変異株を作製し、そのAT抵抗性について成長曲線を指標として検討を行った(Fig.1, 2)。その結果、大腸菌野生株はAT存在下において生育が阻害されたが、変異株ではATをそれぞれ1

および2mg/mlを含む培地においても定常期まで生育可能であり、ATに対し抵抗性を示すことが明らかとなった(Fig.2)。これより、変異株では野生株に比べてATに対する何らかの適応機構が作用しており、その原因となるタンパク質や遺伝子が存在する可能性が考えられた。そこで、先の野生株および変異株をAT存在下および非存在下で定常期まで培養後、SDS-PAGE、Native-PAGEを用いた発現タンパク質の差異の検討を行った(Fig.3,4)。各電気泳動の結果(Fig.3(A),Fig.4(A))および画像解析の結果(Fig.3(B), Fig.4(B))より、特に発現量に差異の見られた2つのタンパク質に注目し、それらのタンパク質をP1およびP2としてタンパク質の同定を行った。各電気泳動のゲルから electroblotting により PVDF 膜に転写し、アミノ酸配列決定を行った結果 (Table I および II)、P1 タンパク質は AhpC タンパク質であり、P2 タンパク質は zinT (yodA) タンパク質であることが明らかとなった。最後に、野生株と変異株において、AhpC および zinT (yodA) 遺伝子の塩基配列や推定されるアミノ酸配列に差異が生じているかを検討するため、野生株および変異株より、AhpC および zinT (yodA) 遺伝子の PCR クローニングと遺伝子解析を行った。その結果、各遺伝子において野生株と変異株では塩基配列の相違は認められなかった。

本研究において、AT 存在下変異株で発現の減少した P1 タンパク質 (Alkyl hydroperoxide reductase C22 protein; AhpC) は Peroxiredoxin (Prx) family の一種で、*E.coli* や *Salmonella typhimurium* などグラム陰性細菌の抗酸化酵素として報告されており、酸化ストレスなどにより生じたアルキルペルオキシドを還元する酵素である⁽¹⁸⁾⁻⁽²⁰⁾。一方、変異株で AT 存在下発現量の増加した P2 タンパク質(zinT(yodA))は 216 残基の単量体タン

パク質で、シグナルペプチド(No.1-23)が切断され大腸菌ペリプラズムで発現する。zinT (yodA)は当初大腸菌のカドミウムストレスで発現が誘導されるタンパク質(yodA)として見いだされたが⁽²¹⁾、その機能は不明であった。その後、Cd,Zn,Niと結合したyodAの三次元立体構造⁽²²⁾やNi,Zn,Cd,Hgに結合するタンパク質であることが報告されたことからzinTと改称され⁽²³⁾、zinT(yodA)がCdと結合することで大腸菌がCdストレスを緩和していると考えられている⁽²⁴⁾。このzinT (yodA)に関してはさらに、大腸菌の生育pHをpH 7.0からpH 5.8に変化させた時にzinT (yodA)タンパク質が発現誘導されDye-ligandに結合する性質のあることや⁽²⁵⁾、Benzoate添加により発現が誘導されることも報告されており⁽²⁶⁾、Cd以外にも大腸菌のストレス応答に対するzinT (yodA)の関与が示唆されている。

緒言で述べたように、大腸菌への代表的なストレスである酸化ストレスの場合、大腸菌には2つの酸化ストレス応答の制御機構があり、H₂O₂による酸化ストレスとO₂⁻による酸化ストレスを区別している⁽²⁾。このうちH₂O₂による酸化ストレスに前者に応答する転写制御因子はOxyRであることが知られており、katG(カタラーゼ)、gorA(グルタチオンレダクターゼ)、grxA(グルタレドキシシン)などとともに、本研究で見出されたAhpCもOxyRレギュロンの制御下にあると報告されている^{(2),(27)}。

一方、O₂⁻による酸化ストレスに対する転写制御因子はSoxRSで、sodA(Mn-スーパーオキシドジスムターゼ)、zwf(グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)などがSoxRSレギュロンの制御下にあると考えられている⁽²⁾。本研究でAT存在下発現量の増加したzinT (yodA)は、Cdストレス条件下におけるzinT (yodA)の転写レベルを検討した報告より⁽²⁸⁾、OxyRには依存せずSoxSとFurに依存し、また緊縮応答の関与は低いとされている。これより大腸菌のカドミウム応答は、上記で述べた酸化ストレス応答に類似しており、そのうちO₂⁻による酸化ストレス応答の経路に類似していると推定されている⁽²⁸⁾。

一方、本研究の結果では、変異株へのAT添加によりAhpCの発現量が減少し、zinT (yodA)の発現量が増大した(Fig.3,4)。上記の大腸菌での酸化ストレス応答機構を踏まえ、本研究における大腸菌変異株のAT抵抗性機構の場合は、ATはH₂O₂系ではなくO₂⁻系の酸化ストレスを大腸菌に与え、先述のCdによる大腸菌の酸化ストレス応答⁽²⁸⁾のように転写制御因子SoxRSによりzinT (yodA)タンパク質の発現量が増大したものと推定される。先に述べたように、zinT (yodA)タンパク質の主な機能は重金属結合レセプターとして考えられているが⁽²³⁾、このzinT (yodA)の一次構造および立体構造上の比較から⁽²²⁾、calycin

superfamilyのうち、疎水性低分子に結合するlipocalin/calycin familyやABC transporterの金属結合レセプターとも相同性が見られるため、lipocalinと類似した機能を持つと推定されている。この点において、AT存在下で発現誘導をされたzinT (yodA)が(Fig.4)、ATの細胞内への流入を減少させ、ATによる酸化ストレス損傷を低下させている可能性が考えられるが、zinT (yodA)の金属結合以外の機能に関する知見は得られておらず、ATとzinT (yodA)が直接相互作用するかどうかは現段階では不明である。また、zinT (yodA)は大腸菌ペリプラズムに輸送される際にシグナルペプチドの切断を受けるが、本研究におけるP2タンパク質のアミノ酸配列分析で複数の配列が見られたことから(Table II)、その際シグナルペプチドの切断異常が生じていることが考えられ、このことがzinT (yodA)の機能に影響を与えている可能性もある。この点も含め、現在、zinT (yodA)タンパク質のlipocalin機能について詳細な検討を行っており、これにより大腸菌のAT抵抗性機構に対するzinT (yodA)の役割が明らかになることが期待される。

謝辞

本研究は、徳島大学教育改善推進費(奨励研究)および徳島大学総合科学部研究助成経費の支援により実施された。

文献

1. Foster, P.L. (2005) Stress responses and genetic variation in bacteria. *Mutation Research*, **569**, 3-11.
2. Farr, S.B., Kogoma, T. (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev.*, **55**, 4, 561-585.
3. Arsène, F., Tomoyasu, T., Bukau, B. (2000) The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.*, **55**, 3-9.
4. Erill, I., Campoy, S., Barbé, J. (2007) Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol. Rev.*, **31**, 637-656.
5. Chatterji, D. and Ojha, A.K. (2001) Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Current Opinion in Microbiology*, **4**, 160-165.
6. Kari, C., Török, I. and Travers, A. (1977) ppGpp Cycle in *Escherichia coli*. *Molec. gen. Genet.*, **150**, 249-255
7. Sy. J. (1977) *In vitro* degradation of guanosine

- 5'-diphosphate, 3'-diphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 12, 5529-5533.
8. Barker, M.M., Gaal, T., Gourse, R.L. (2001) Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. *J Mol Biol.*, **305**, 689-702.
 9. Pribyl, J., Herzel, F., Schmidt, G. (1978) Beitrag zur Rückstandsanalytik des Aminotriazol. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **289**, 81-85.
 10. Bamford, D., Sorsa, M., Gripenberg, U., Laamanen, I., Meretoja, T. (1976) Mutagenicity and toxicity of amitrole. III. Microbial tests. *Mutation Research*, **197**, 197-202.
 11. Toone, W.M., Rudd, K.E., Friesen, J.D. (1992) Mutations Causing Aminotriazole Resistance and Temperature Sensitivity Reside in *gyrB*, Which Encodes the B Subunit of DNA Gyrase. *Journal of Bacteriology*, **174**, 5479-5481.
 12. Rudd, K.E., Bochner, B.R., Cashel, M., Roth, J.R. (1985) Mutations in the *spoT* Gene of *Salmonella typhimurium*: Effects on his Operon Expression. *Journal of Bacteriology*, **163**, 534-542.
 13. 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.
 14. Ornstein, L. (1964) Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, Art 2, 231-249.
 15. Davis, B.J. (1964) Disc Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404-427.
 16. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
 17. Blattner, F.R., Plunkett, G. 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, **277**, 1453-1462.
 18. Storz, G., Jacobson, F.S., Tartaglia, L.A., Morgan, R.W., Silveira, L.A., Ames, B.N. (1989) An alkyl hydroperoxide reductase induced by oxidative stress in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: genetic characterization and cloning of *ahp*. *J. Bacteriol.*, **171**, 2049-2055.
 19. Seaver, L.C., Imlay, J.A. (2001) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **183**, 7173-7181.
 20. Ellis, H.R., Poole, L.B. (1997) Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry*, **36**, 13349-13356.
 21. Ferianc, P., Farewell, A., Nyström, T. (1998) The cadmium-stress stimulation of *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*, **144**, 1045-1050.
 22. David, G., Blondeau, K., Schiltz, M., Penel, S., Bentley, A.L. (2003) YodA from *Escherichia coli* is a Metal-binding, Lipocalin-like Protein. *J. Biol. Chem.*, **278**, 44, 43728-43735.
 23. Kershaw, C.J., Brown, N.L. and Hobman, J.L. (2007) Zinc dependence of *zinT* (*yodA*) mutants and binding of zinc, cadmium and mercury by *zinT*. *Biochem. Biophys. Acta.*, **364**, 66-71.
 24. Stojnev, T., Harichov, J., Ferianc, P., Nyström, T. (2007) Function of a Novel Cadmium-Induced YodA Protein in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, **55**, 99-104.
 25. Birch, R.M., O'Byrne, C., Booth, I.R., Cash, P. (2003) Enrichment of *Escherichia coli* proteins by column chromatography on reactive dye columns. *Proteomics*, **3**, 764-776.
 26. Kannan, G., Wilks, J.C., Fitzgerald, D.M., Jones, B.D., BonDurant, S.S. and Slonczewski, J.L. (2008) Rapid acid treatment of *Escherichia coli*: transcriptomic response and recovery. *BMC Microbiology*, **8**, 37, 1-13.
 27. Jung IL, Kim IG. (2003) Transcription of *ahpC*, *katG*, and *katE* genes in *Escherichia coli* is regulated by polyamines: polyamine-deficient mutant sensitive to H₂O₂-induced oxidative damage. *Biochem Biophys Res Commun.* **301**, 915-922.
 28. Puskarova, A., Ferianc, P., Kormanec, J., Homerova, D., Farewell, A., and Nyström, T. (2002) Regulation of *yodA* encoding a novel cadmium-induced protein in *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**, 3801-3811.

論文受付 2013年9月10日

改訂受付 2013年9月30日

論文受理 2013年9月30日