

F-2. *Ralstonia pickettii* A1 細胞外 PHB 分解オペロン遺伝子の転写調節蛋白質 EpdR(Extracellular PHB Degrading Regulator)の精製

大槻 和重・張 開・齊藤 光実(神奈川大・理・応用生物)

【目的】 *Ralstonia pickettii* A1 は細胞外 PHB 分解のオペロン(PHB デポリメラーゼ、3HB-オリゴマーハイドロラーゼを含む)をもっており、このオペロンの発現は培地に加える炭素源の違いにより大きく異なる。よって、このオペロンの発現を調節している蛋白質(EpdR)が存在するものと考えられ、これを分離精製することを目的とした。

【操作】 *Ralstonia pickettii* A1 を SM 培地(コハク酸ナトリウム 0.4%)で培養した。得られた菌体を遠心し、集菌して超音波破碎し、この粗抽出液を超遠心にかけて、その上清を下記の各カラムクロマトグラフィーと電気泳動により、活性のあるフラクションを回収した。以降の手順は以下の通り(lane 番号は Fig.1. に対応)。

- ・ DEAE-Toyopearl (lane 3)
- ・ Phenyl-Toyopearl (lane 4)
- ・ 調製用未変性ポリアクリルアミドゲル(10%)電気泳動 (lane 5)

【結果】

調節蛋白質の探索 この細胞外 PHB 分解オペロンがコードする酵素の発現は培地の炭素源が PHB の時は非常に強いが、コハク酸ナトリウムときはほとんど発現しない。この結果より、PHB が存在するときに転写を促進するか、もしくはコハク酸で培養したときに転写を抑制している蛋白質があると考えられた。そこで、コハク酸で培養した菌と、PHB で培養した菌の粗抽出液を用い、オペロンのプロモータ領域を含む DNA 断片を ³²P でラベルし、ゲルシフトアッセイを行ったところ、コハク酸で培養した菌を用いたときに強いシグナルが観察された。これより、コハク酸で培養したときに転写を抑制している可能性のある蛋白質が存在していることがわかった(Fig.1. lane 6,7)。

調節蛋白質の精製 カラムクロマトグラフィーとプレップセル(調製用電気泳動槽)を用いて精製したところ、分子量がおよそ 16 kDa の蛋白質であった(Fig.1. lane 5)。

ゲルシフトアッセイ Binding site と思われる-35 領域の合成 DNA (32 bp)と精製蛋白質の濃度を変えていき、ゲルシフトアッセイを行ったところ、蛋白質濃度に比例してシグナルが強くなった(Fig.2. lane 1-4)。また、プロモーター領域の上流領域(166 bp プロモーター部分は含まない)の DNA 断片をラベルし、ゲルシフトアッセイを行ったところ、ゲルシフトが起こらなかったことから(Fig.2. lane 5,6)、この蛋白質はプロモーター領域に特異的に結合する蛋白質であると思われる。

【考察】今回 DNA 結合蛋白質の精製はできたが、正確な binding site は決定していないため、フットプリンティング法を行い正確な binding site を決定する必要がある。また、一連の実験により、A1 はコハク酸で培養するときに分解酵素の発現を抑制していることはわかったが、完全には抑制されていないことをイムノブロットにより確認した。そのためこの調節蛋白質が実際にどのように調節を行っているのかは不明である。また、DNA と結合するときこの蛋白質が DNA に何量体で結合しているのか、並びに DNA がどのような角度で蛋白質と結合しているのか等は今後更に調べる必要がある。

精製蛋白質の N 末端配列を読み、類似性を検索した結果、今までわかっている調節タンパク質とは類似性が無く、NDP キナーゼと類似性が高いという結果がでた。このため、もう一度 N 末端配列を確認する必要があるが、この蛋白質はキナーゼと何か関係があると思われるため、キナーゼ活性があるかどうか調べる必要がある。

N 末端-AIERTLLIIKPDAAKAVIIQIYAAFFGAG...

Fig.3. N末端アミノ酸配列

今後、この蛋白質遺伝子をクローニングし、lacZ 等につなぎ大腸菌に組み込み詳しい調節様式を調べ、今回発見した蛋白質以外に調節因子がないのかも調べる必要がある。

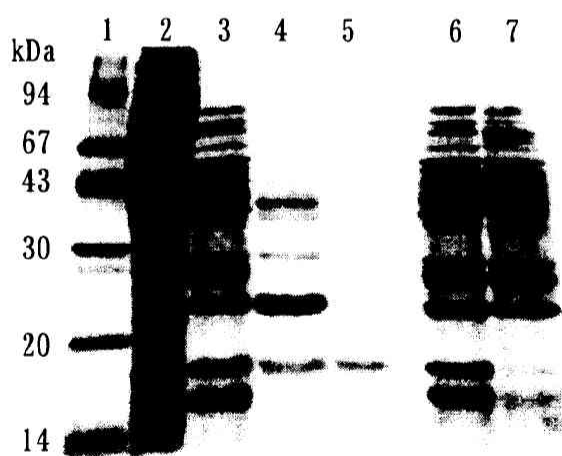


Fig.1. SDS-PAGE

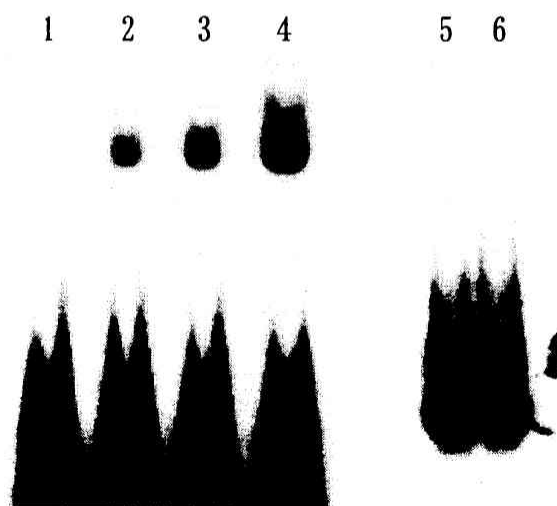


Fig.2. gel-shift assay