

大腸菌リン酸レギュロンの遺伝子発現機構

Signal transduction and gene expression in the phosphate regulon of *Escherichia coli*

代表研究者 大阪大学微生物病研究所助手 牧野耕三
Instructor, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka Univ.
Kozo MAKINO

In *Escherichia coli*, a number of genes, including *phoA*, *phoE*, *pst-phoU* operon and *ugp* operon, are all involved in the transport and assimilation of phosphate, and are inducible by phosphate starvation. They constitute a single phosphate (*pho*) regulon and are regulated by multiple regulator genes that constitute a cascade regulatory network. With limited phosphate, they are positively regulated by the products of *phoB* and *phoR* and with excess phosphate, they are negatively regulated by the product of *phoR*. The *phoM* can substitute for a positive regulatory function of PhoR in a *phoR*-defective strain. In addition, these genes are negatively regulated by the genes constituting the *pst-phoU* operon such as *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB*, and *phoU*. The phosphate levels in the medium are monitored by the *pstS* gene product and the signal is transduced by the function of the *pst-phoU* operon to PhoR, which in turn modulates the PhoB function.

The genes in the *pho* regulon such as *phoA*, *phoE*, *pstS*, and *phoB* share a common regulatory element in the promoter regions. The well-conserved sequence (CTG/TTCATAA/TAA/TCT-GTCAC/T), named the *pho* box, was found 10 nucleotide upstream from the Pribnow boxes. The sequence is the site with which PhoB interacts to activate the transcription from the *pho* genes.

The *phoB* gene product is the direct transcriptional activator for the *pho* regulon and the gene is genetically and physiologically regulated in the same way as the genes in the *pho* regulon. The *phoB* and *phoR* genes constitute an operon, therefore *phoR* is also regulated by phosphate in the medium. Regulation of the *pho* regulon by the *phoB* requires the function of the *phoR* gene. The PhoB/PhoR pair is structurally as well as functionally similar to many two-component regulators of bacteria that respond to environmental changes. PhoR-like proteins are sensors or transducers which modulate the activator function of PhoB-like proteins in response to environmental signals.

To examine biochemical property of PhoR, we constructed a plasmid with a mutant *phoR* gene (*phoR1084*), which encoded a PhoR protein (PhoR1084) lacking the amino-terminal hydrophobic region of the intact protein. Purified PhoR1084 was autophosphorylated in the presence of ATP, and the phosphate group on the protein was rapidly transferred to PhoB. The phosphoryl group in phospho-PhoR1084 is a phosphohistidine. In the case of phospho-PhoB, the phosphate is linked to an acyl group of glutamate or aspartate. Phosphorylation of PhoB mediated by PhoR enhances the binding of PhoB to the *pho* box. Transcription from the *pstS* promoter *in vitro* required RNA polymerase containing the major sigma factor (σ^{70}) and phospho-PhoB.

In the absence of the functional PhoR, PhoM activates PhoB by phosphorylation. To elucidate the function of PhoM, a hybrid protein (PhoM1206) in which hydrophobic amino-terminal half of the native PhoM was replaced by β -galactosidase was purified. PhoM1206 was autophosphorylated at a histidine residue in the presence of ATP. Phospho-PhoM1206 phosphorylated ORF2 protein, the natural substrate of PhoM, and PhoB. Phospho-PhoR1084 could not phosphorylate ORF2. Crosstalk by protein phosphorylation occurs from PhoM, but not from PhoR to ORF2.

表 1. リン酸レギュロン関連遺伝子

遺 伝 子	機 能 ^{a)}	遺伝子座位 (分)
<i>phoA</i>	アルカリ性ホスファターゼ	8.8
<i>phoB-phoR</i> オペロン		9.1
<i>phoB</i>	正の調節	
<i>phoR</i>	正・負の二重調節	
<i>pst-phoU</i> オペロン		84.0
<i>pstS</i>	リン酸結合タンパク } リン酸の膜輸送系 } 負の調節	
<i>pstC</i>		
<i>pstA</i>		
<i>pstB</i>		
<i>phoU</i>		?
<i>ugp</i> オペロン		76.0
<i>ugpB</i>	<i>sn</i> -グリセロール-3-リン酸結合タンパク	
<i>ugpA</i>	} <i>sn</i> -グリセロール-3-リン酸の膜輸送系	
<i>ugpE</i>		
<i>ugpC</i>		
<i>ugpQ</i>		
<i>phoE</i>	ホスフォジェステラーゼ 外膜ポリリン e	5.8
<i>phoM</i>	正の調節	99.8
<i>phn (psiD)</i> オペロン	炭素-リン酸化合物の膜輸送と分解	93.5

a) 一部のものは DNA 塩基配列より予想した。

研究目的

原核、真核細胞を問わず生物は外界から何らかの刺激を受けるとその刺激に対して的確に応答し、新しい環境に適応する。しかしながら外界からの要因の多様性、また細胞の引き起こす対応反応の複雑さのために個々の独立した問題として取り上げられてきた。近年、遺伝子のクローニングおよびその構造と機能の解析が可能になり分子レベルでこの多岐にわたる応答機構の実態が明らかとなってきた。例えば、長年の遺伝学的研究の蓄積が豊富で遺伝学的解析法も確立されている大腸菌の場合、nitrogen fixation, chemotaxis, osmolarity 変化への応答など一見独立に見えるの応答機構がタンパク質のリン酸化という共通の分子機構で制御されていることが明らかにされつつある。単純な原核細胞でえられた知見をもとにしてより複雑な高等生物の生命現象を解明する糸口にすることは意義深いことである。

大腸菌はリン酸の欠乏状態に対応して 25 個以上の遺伝子の発現誘導が起こる。これらの遺伝子は phosphate starvation inducible (*psi*) 遺伝子

と名付けられており総称してリン酸スティミュロンと呼ばれている。その中で大腸菌アルカリ性ホスファターゼを代表とする遺伝子群は遺伝学的に共通の調節遺伝子の支配下にあり、リン酸レギュロン (*pho regulon*) と呼ばれている。これらの遺伝子群はリン酸の欠乏時に発現誘導が起こり、できるだけ効率良くリン酸やリン酸化合物を細胞内に取り込むための能動膜輸送系やリン酸化合物の代謝などに関する種々のタンパクをコードしており、各遺伝子は大腸菌染色体地図上で別の座位に位置し、あるものはオペロンを構成している。

本研究ではリン酸レギュロンの調節遺伝子 *phoR*, *phoM* および *phoB* に着目し、遺伝学的に解析された各遺伝子の役割を基にそれらの遺伝子産物の持つ生化学的性質を明らかにし、かさねて転写誘導のメカニズムを *in vitro* で明らかにすることを目的とした。

研究経過

大腸菌リン酸レギュロンの研究は 1950 年代の終わりアルカリ性ホスファターゼの発現調節機構の研究として始まった。この酵素の生産能は寒天

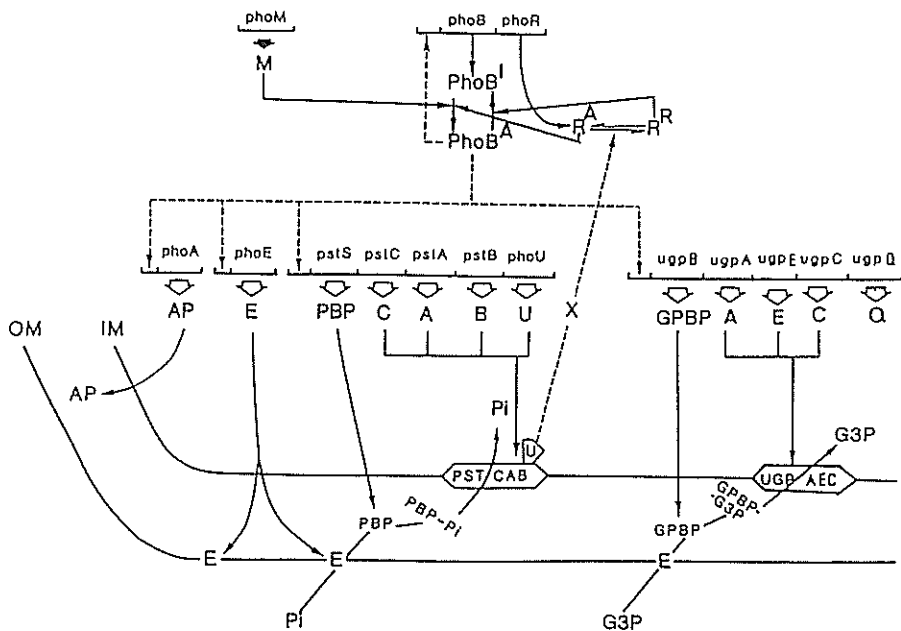


図1. 大腸菌リン酸レギュロン遺伝子群.

OM 及び IM は各々大腸菌の外膜および内膜を示し、両者のは間がペリプラズムである。PhoR および PhoM タンパクは内膜に存在しているがここでは都合上細胞質に記した。

培地上のコロニーに色素液を噴霧して発色させるという簡単な方法で検出できるため、種々の制御遺伝子の変異株が分離され詳細な遺伝学的な解析がなされてきた。表1にリン酸レギュロン遺伝子とそれぞれの機能及び大腸菌染色体上の位置を示した。また、図1に予想される各遺伝子の上下関係、細胞内での位置や役割を示した。外膜にあるポリン e の構成する穴を通してリン酸およびリン酸化合物はペリプラズムに入る。ここにはアルカリ性ホスファターゼ、リン酸結合タンパク、sn-グリセロール-3-リン酸結合タンパクなどがある。アルカリ性ホスファターゼはリン酸モノエステル結合を有する化合物に働き無機リン酸を遊離する。リン酸結合タンパクあるいは sn-グリセロール-3-リン酸結合タンパクなどにより濃縮されたリン酸およびリン酸化合物は内膜に存在する能動輸送系により細胞内に取り込まれる。

これらの遺伝子群の発現を上位で調節している遺伝子に *phoB*, *phoR* および *phoM* 遺伝子がある。*phoB* 変異株ではリン酸レギュロン遺伝子群

の発現誘導が起こらなくなることから、*phoB* は正の調節遺伝子と考えられた。後述するように *phoB* 遺伝子産物はリン酸レギュロンの転写のアクチベーターである。*phoR* 遺伝子は *phoB* 遺伝子の上位にあって、リン酸欠乏状態では促進的に、高リン酸状態では抑制的に PhoB タンパクに働いていると考えられる。*phoM* 遺伝子産物は *phoR* 遺伝子の機能が失われた株でのみ PhoR タンパクのもつ正の調節機能を培地中のリン酸濃度に関係なく代行できる。*phoM* オペロンは、*orf1-orf2-phoM-orf4* の四つの遺伝子からなり、PhoM は PhoR と相同性の高いタンパクであることが判明した。また、ORF2 タンパクは PhoB タンパクと高い相同性を持つことから、*orf2/phoM* は別のレギュロンの調節遺伝子であり、リン酸レギュロンとクロストークしているものと考えられる。

pst-phoU オペロンのどの遺伝子に変異がおきてもリン酸レギュロンは構成的に発現することから、これらは間接的に負の調節を行っていると考えられる。

phoA : CAGTAAAAAGTTAATCTTTTCAACAGCTGTCATAAAAGTTGTCACGGCCGAGACTTATAGTCGCTTTGTTTTTA-
 (-10) -mRNA
 TTTTTTAATGTATTGTTACATGGAGAAAATAAAGTG
 (SD) Met

pstS : CTCTCTGTCATAAAACTGTCATATTCCTTACATATAACTGTCACCTGTTTGTCCTATTTTGCTTCTCGTAGCC-
 (-10) -mRNA
 AACAAACAATGCTTTATGAATCCTCCAGGAGACATTATG
 (SD) Met

phoE : TACCACATTTTAAGAATATTATTAATCTGTAATATATCTTTAACAATCTCAGGTTAAAAACTTTCCTGTTTTC-
 (-10)
 AACGGGACTCTCCCGCTGAATATTCCGCGCTTAATTA^AAATCAGGAATGAAAATG
 (SD) Met

phoB : ATAACCTGAAGATATGTGCGACGAGCTTTTCATAAAATCTGTCATAAAATCTGACGCATAATGACGTCGCATTAA-
 (-10) -mRNA
 TGATCGCAACCTATTTATTACAACAGGGCAAATCATG
 (SD) Met

Consensus sequence of
 the phosphate box :



図2. リン酸レギュロン遺伝子群のプロモーター領域の比較。

phoA pstS phoE および *phoB* 遺伝子の転写開始点付近の DNA 塩基配列を示した。開始コドン(Met), Shine-Dalgarno 配列 (S. D.), mRNA 開始点, -10 配列 (-10) およびホスフェートボックス (下線) をそれぞれ示す。

えられる。*pstS, pstC, pstA* および *pstB* 遺伝子の産物は無機リン酸の膜輸送系を構成していることから、これらの遺伝子に変異が起きるとリン酸の取り込みが起こらなくなる。しかし、Pst (phosphate specific transport) 系により細胞内に取り込まれた無機リン酸が直接リン酸レギュロンの発現調節のシグナルではない。なぜなら *phoU* 突然変異体ではリン酸の取り込みは正常に起こるがリン酸レギュロンの発現は構成的になるからである。いまのところ直接のシグナルが何かは明らかではないが、Pst-PhoU 系が構成するリン酸膜輸送エネルギー変換系により生じたシグナルが PhoU タンパクを質的に変化させ、下位の PhoR タンパクの機能を正から負に変換すると考えられる。そして最終的に PhoR が PhoB を活性型あるいは不活性型に変換してリン酸レギュロンの発現を調節していると考えられる。

phoB 遺伝子に依存した発現誘導が起こるリン酸レギュロン遺伝子群のプロモーター領域には相同の塩基配列が存在し、その領域が PhoB タンパクの認識部位であることが予想される。各リン酸レギュロン遺伝子の mRNA 開始点の決定を行

い、プロモーター領域の比較を行った (図2)。いずれの遺伝子でも転写開始点上流に -10 配列に相同な配列が見られるが、-35 配列に相当する配列は見られず、その代わりにいずれのプロモーターでも -10 配列から 10 塩基対離れて各プロモーターに共通してよく保存された 18 塩基対の配列が見られる。我々はこの 18 塩基対からなる相同配列をホスフェートボックス (*pho* box) と名づけた。*pstS* プロモーターにおいてはさらに上流にもう一つホスフェートボックスに相同な配列が見られる。

PhoB タンパクは後述するようにホスフェートボックスを含む領域に結合するが、そのみでは転写は起こらず、転写が起こるために RNA ポリメラーゼホロ酵素が必要である。PhoB タンパクがプロモーター上のホスフェートボックスに結合すると、RNA ポリメラーゼは DNA 上の PhoB タンパクおよび -10 配列を認識して転写を促進していると考えられる。

調節遺伝子 *phoB·phoR* は一つのオペロンを構成しており、プロモーター領域にはホスフェートボックスが存在している (図2)。したがって、

PhoB/PhoR タンパクは自分自身の発現調節も行っている。PhoB/PhoR のペアは、様々な外界刺激に対する適応応答を司る調節遺伝子産物 (OmpR/EnvZ, VirG/VirA, NtrC/NtrB, DctD/DctB, SfrA/CpxA, CheB/CheA, ORF2/PhoM など) と相同性があり、two-component 制御系と呼ばれ、刺激応答に共通の反応系がある可能性が指摘されている。PhoB 様タンパクは例外を除けば転写のアクチベーターと考えられており、また PhoR 様タンパクは外界刺激のセンサーあるいはモデュレーターと考えられており、受け取ったシグナルを PhoB 様タンパクに伝達していると考えられている。

研究の成果

リン酸レギュロンにおいてはその生体内反応は色々の経路が複雑に絡み合っていて、全体の反応系を *in vitro* で再構成することは困難である。そこで調節タンパク PhoB, PhoR 及び PhoM の精製を行い、それらの諸性質を生化学的に明らかにするとともに、*in vitro* 転写系を用いて転写誘導機構を明らかにした。

PhoB タンパクは *lpp-lac* promoter の下流に *phoB* 遺伝子を融合させて作成したプラミッド pINB1 を持つ菌株を用いてその培養液中に IPTG を加えて多量生産させた。粗抽出液に Polymin P を最終濃度 0.2% に成るように加えた。沈澱を遠心して集め 0.35 M NaCl 溶液に溶かした。50%飽和硫酸で沈澱後、50 mM NaCl を含む緩衝液に溶かして cellulose phosphate に吸着させ、0.05 M-0.55 M NaCl で溶出した。PhoB タンパクは 0.26 M NaCl 濃度で溶出した。さらに DEAE-cellulose カラムで精製を行った。カラムクロマトグラフィーの各フラクションでの PhoB タンパクの検出は PhoB-LacZ 融合タンパクを使って産生させた抗 PhoB 抗体を用いた Western blotting 法により行った。これらの操作により 95%以上純粋な PhoB タンパクを得た。

PhoR タンパクはそのアミノ末端側に疎水性アミノ酸を多く持ち、内膜に結合したタンパクである。我々は PhoR タンパクの精製を試みたが機能を持った形で膜から可溶化することができなかつ

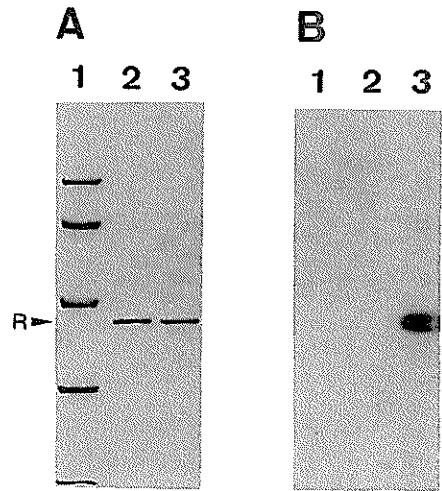


図3. PhoR1084 タンパクの自己リン酸化。精製した PhoR1084 と $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (レーン2) または $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (レーン3) と反応させ電気泳動後、染色、脱色したものを A に示し、そのオートラジオグラムを B に示す。レーン1はマーカータンパクを示す。

た。そこでアミノ末端側の疎水性領域の 83 個のアミノ酸を除き、ここに新たに二つのアミノ酸 Met (開始コドン) と Ala が付くように塩基配列を変換した。そしてこの *phoR* 変異体 (*phoR1084*) を強力プロモーター (*trc*) の下流に付けて PhoR1084 タンパクを多量生産させた。しかもこの変異体 *phoR1084* はリン酸レギュロン遺伝子群を常に構成的に発現した。この操作により、機能を持った PhoR1084 が産生された後、細胞質内に留まり、精製が容易になった。このプラスミッドを *phoB-phoR*, および *phoM* 欠失株に導入し、IPTG により PhoR1084 の発現を誘導した。細胞を超音波処理により破碎後、硫酸沈澱し、cellulose phosphate クロマトグラフィーにより精製した。得られたタンパクは 95%以上純粋でアミノ末端の 12 個のアミノ酸配列は予想される PhoR1084 のそれと一致した。現在までに two-component 制御系の外界刺激のセンサーあるいはモデュレーターとして機能する PhoR タンパクと相同性の高い NtrB, CheA および EnvZ においてこれらのタンパクが自己リン酸化能をもつことが報告されている。精製した PhoR1084 は図3

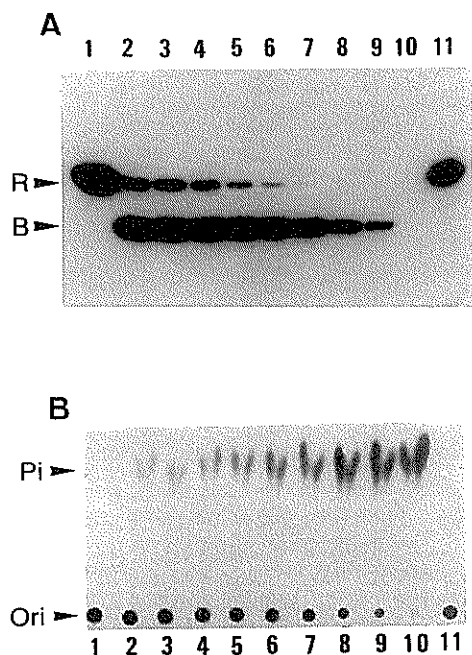


図4. PhoBタンパクのリン酸化.

リン酸化 PhoR1084 を精製し、PhoB タンパクと反応させた。各時間で反応を停止し、電気泳動及び薄層クロマトグラフィーを行った後、X線フィルムに感光した。(A)電気泳動の結果(B)薄層クロマトグラフィーの結果。レーン1から10はそれぞれ0秒、15秒、30秒、1分、2.5分、5分、10分、20分、30分および60分で反応を停止した結果を、また、レーン11はPhoBタンパクを入れずに60分反応した結果を示す。RおよびBは電気泳動におけるPhoR1084とPhoBタンパクの位置を示す、Pi及びOriはリン酸と原点の位置を示す。

に見られるようにATPの γ 位のリン酸基を使って自己リン酸化された。この自己リン酸化反応は、dATP、ADP、UTPにより阻害された。化学量論的実験からPhoR1084 1分子当たり0.6個のリン酸が結合しており、1分子あたり1個のリン酸が結合していることが推定された。リン酸化されたPhoR1084の化学的安定性を調べたところ、中性およびアルカリ性では安定で、酸性になると非常に不安定であり、ピリジンやヒドロキシルアミンにより脱リン酸化が促進された。これらの性質はN-結合リン酸に特有のものである。また、first order rate定数をとるとphospho-CheAや

phospho-NtrBの場合と類似していた。CheAやNtrBにおいては自己リン酸化の部位はヒスチジン残基であるが、生化学的実験からPhoR1084の場合もヒスチジン残基がリン酸化されていることを明らかにした。現在のところ各モジュレーター間の相同性の比較からPhoRタンパクのアミノ末端側から213番目にあるヒスチジン残基が最有力候補である。

遺伝学的解析の結果から培地中のリン酸濃度を感知してPhoRが何らかの形でPhoBの機能を調節していることが示唆されている。PhoR1084構成的にリン酸レギュロンを発現させる機能を持つことから、PhoBを常に活性化していると考えられる。精製したphospho-PhoR1084を用いて精製したPhoBタンパクへのリン酸基の移行を調べた。図4に示すように速やかにphospho-PhoR1084からPhoBにリン酸基の転移が起きた。phospho-PhoBは不安定で半減期約8分で受け取ったリン酸を放出した。phospho-PhoBの化学的安定性を調べたところ酸性では安定で、アルカリ性あるいはヒドロキシルアミン処理には不安定であった。この結果はPhoBタンパクにおいてはリン酸基がNあるいはOHグループに結合しているものではなく、glutamateあるいはaspartateのacylグループにリン酸基が結合していることを示している。

PhoRタンパクによりリン酸化されるということがPhoBタンパクの機能をどのように変化させているのであろうか。この点を明らかにするために、精製したPhoBタンパクをPhoR1084タンパク、ATPの存在下でリン酸化し、*pstS*遺伝子の調節領域のホスフェートボックスへのPhoBタンパクの結合能をDNase Iを用いたFootprinting法で調べた(図5)。PhoR1084によりPhoBがリン酸化されるとリン酸化されていない場合に比べてホスフェートボックスへの結合能が約10倍増加した。また、*pstS*遺伝子のプロモーター領域を鋳型とした*in vitro*の転写系でPhoBのリン酸化の影響を調べた。図6に示すようにリン酸化されたPhoBのみがRNA polymerase holoenzymeによる*pstS*プロモーターからの転

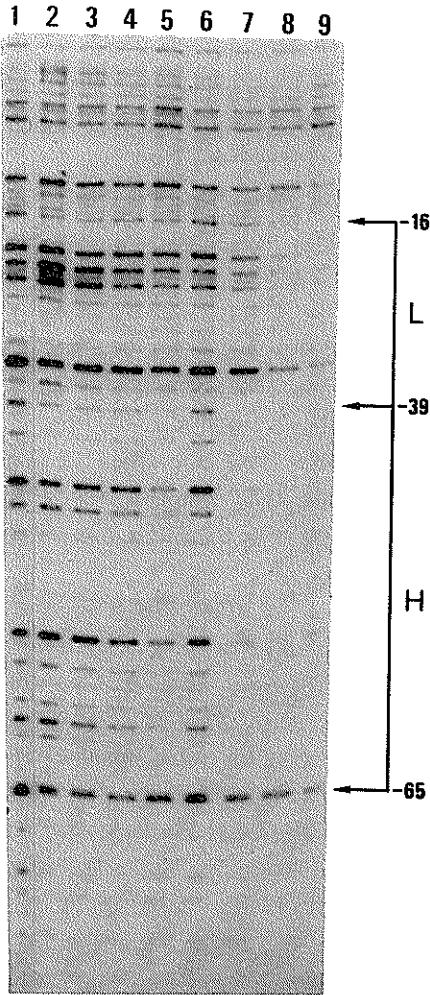


図5. リン酸化による PhoB タンパクの DNA 結合能の上昇.

いずれのレーンもラベルした *pstS* プロモーター領域をもつ DNA および ATP 存在下でフットプリンティングを行った. PhoB タンパクの濃度は, 0 (レーン 1, 6), 6.25 nM (レーン 2, 7), 12.5 nM (レーン 3, 8), 25 nM (レーン 4, 9), 50 nM (レーン 5) である. レーン 1~5 は PhoR1084 を加えない場合を, レーン 6~9 は加えた場合を示す. 矢印で囲んだ領域は PhoB タンパクが結合した領域を示し, 数字は転写開始点からの距離を示す. この領域には二つのホスフェートボックスが存在する (図 2 参照). H および L は結合能の高いあるいは低い領域をそれぞれ示す.

$E\sigma^{70}$	+	+	+
R	+	-	+
B	-	+	+

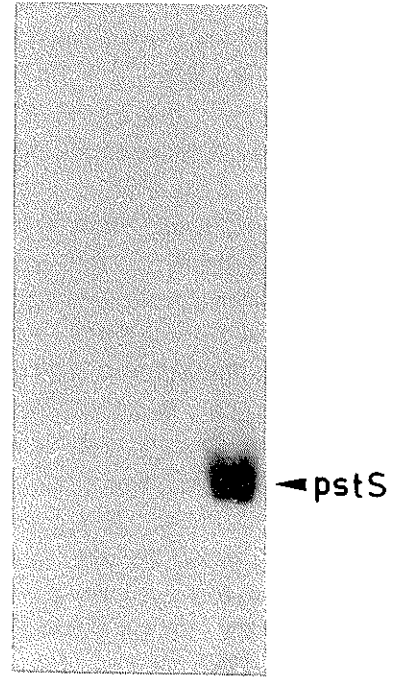


図6. *pstS* プロモーターからの転写の活性化.

鋳型 DNA としては *pstS* はプロモーターを使い, ATP 存在下で, タンパクのリン酸化とオープンコンプレックス形成を行わせるために, + および - で示したタンパクと 10 分間前反応を行った. その後ラベルした UTP を含む 4NTP を加えて転写を行い, 電気泳動後 X 線フィルムに感光した. $E\sigma^{70}$, R, B はそれぞれ RNA ポリメラーゼホロ酵素, PhoR 1084, PhoB タンパクを示す. + は反応系にいられたこと, - はいれなかったことを示す. 矢印は *pstS* プロモーターからの転写産物を示す.

写を促進した. これらの結果は PhoR1084, ATP の存在下で PhoB がリン酸化されることにより活性型の PhoB になり, リン酸レギュロンの発現を誘導することを示している.

phoR 遺伝子が機能しない時にはリン酸レギュロンの発現に *phoM* および *phoB* 遺伝子が必要である. PhoM は PhoR と同様に two-component 制御系において外界の刺激を感知するセンサーと

して働く膜タンパクと考えられている。そこで、transmembrane 構造を含む N 末端側から 205 個のアミノ酸を欠失させて β -galactosidase の C 末端に繋いだ融合タンパクをコードする遺伝子を構築した。このプラスミッドを *phoR*, *phoM* 両遺伝子の欠失株に導入するとアルカリ性ホスファターゼを産生した。このことは PhoM タンパクは 206 番目以降の部分があれば正の調節遺伝子の機能を発揮できることを示している。このプラスミッドを用いて LacZ'-PhoM 融合タンパク (PhoM1206) を多量生産し、TPEG-Sepharose アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーにより精製した。精製した PhoM1206 は ATP の γ 位のリン酸を使って自己リン酸化した。リン酸化した PhoM1206 の化学的安定性を調べると中性およびアルカリ性で安定で、酸性では不安定であった。さらに ^{32}P 標識 PhoM1206 をアルカリで分解して合成した 1-, および 3-ヒスチジンリン産と混合して Dowex 1 カラムクロマトグラフィーで分別して PhoM-1206 はヒスチジン残元の N-3 位がリン酸化されていることを明らかにした。リン酸化した PhoM1206 は PhoB および本来の基質と考えられる ORF2 にそのリン酸基を移すことができた。逆に ORF2 は PhoR1084 によってはリン酸化されなかった。化学的安定性などから PhoM 1206 によりリン酸化された PhoB は PhoR1084 によりリン酸化されたものと質的な差はないと思われる。リン酸レギュロンの発現における PhoM の役割は PhoR の機能が失われた時のみクロストークして PhoB をリン酸化により活性化していると考えられる。

今後の課題と展望

PhoB タンパクは 229 個のアミノ酸からなり少なくとも三つの機能ドメイン (1. DNA 結合ドメイン 2. RNA ポリメラーゼとの結合ドメイン 3. リン酸化ドメイン) が存在している。*phoB* 遺伝子の各種欠失および塩基置換突然変異体を数多く分離し、解析中であるが、現在のところドメイン 1, 2 は PhoB タンパクの 139 番目のアミノ酸より C 末端側にありその中でも 177 から 203 番

目までのアミノ酸が特に重要であった。ドメイン 3 は N 末端側の 127 個のアミノ酸のみで十分であり、その中でも 53 番目の Asp が特に重要であった。リン酸化 PhoB の化学的安定性などの結果から、リン酸基はこの Asp53 に結合している可能性が高い。この点に関しては部位特異的変異体のさらなる解析が必要であろう。N 末端の欠失した PhoB タンパクはリン酸化していない野性型の PhoB に比べて 1 および 2 の機能が低い。このことはリン酸化されていない N 末端側は C 末端側にある 1 および 2 の機能をブロックしていると考えられる。リン酸化によって PhoB タンパクの高次構造がドラマチックに変化して転写を誘導するものと思われる。PhoB タンパクの結晶化により、X 線解析を行うことによりその実像が明らかになるだろう。

リン酸レギュロンの転写誘導は PhoR タンパク (あるいは PhoM タンパク) による PhoB タンパクのリン酸化である。PhoB タンパクの不活化機構はただ単にタンパクからのリン酸基の離脱が早いことだけではなく、より積極的に不活化が起こっていることは遺伝学的研究から確かなことである。この不活化反応は PhoR タンパクによる phospho-PhoB タンパクの脱リン酸化である可能性が高い。すなわち、リン酸欠乏時に PhoB タンパクにキナーゼとして働く PhoR タンパクが、高リン酸時にはホスファターゼとして PhoB タンパクに働くという考えである。キナーゼ活性のみ、あるいはホスファターゼ活性のみを有する PhoR 突然変異体の分離を試みているので PhoB タンパクの不活化機構についても近い将来公表できるだろう。

外界の濃度の変化を感知して PhoR に情報を伝達するセンサーとして働くのは無機リン酸の膜輸送系を構成している Pst 系の各タンパクと PhoU タンパクである。この経路を辿って伝えられるシグナルは一体何なのか、さらにそのシグナルがどのようなメカニズムで PhoR タンパクの機能を正から負へ、あるいは逆に負から正へと変換するのか、これらの諸問題を解明していくことが今後の課題である。

謝 辞

日産科学振興財団のご援助により上記の研究が遂行されたことに対して深く感謝の意を表します。それにより得られた貴重なデータを基にして今後大腸菌リン酸レギュロンの発現調節機構の本質を極めるだけでなく、より広い生命現象の解明を目指していきたいと思えます。

本研究の基礎からご指導いただいている大阪大学微生物病研究所の中田篤男教授、品川日出夫助教授及び雨村光子技官に感謝いたします。

発 表 論 文

- 1) Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura and A. Nakata (1982): Cloning and Characterization of the alkaline phosphatase positive regulator gene (*phoB*) of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **187**, 181-186.
- 2) Amemura, M., H. Shinagawa, K. Makino, N. Otsuji and A. Nakata (1982): Cloning of and complementation tests with alkaline phosphatase regulatory genes (*phoS* and *phoT*) of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **152**, 692-701.
- 3) Shinagawa, H., K. Makino and A. Nakata (1983): Regulation of the *pho* regulon in *Escherichia coli* K-12. Genetic and physiological regulation of the positive regulatory gene *phoB*. *J. Mol. Biol.*, **168**, 477-488.
- 4) Makino, K., H. Shinagawa and A. Nakata (1984): Cloning and characterization of the alkaline phosphatase positive regulatory gene (*phoM*) of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **195**, 381-390.
- 5) Makino, K., H. Shinagawa and A. Nakata (1985): Regulation of the phosphate regulon of the *Escherichia coli* K-12. Regulation and role of the regulatory gene *phoR*. *J. Mol. Biol.*, **184**, 231-240.
- 6) Amemura, M., K. Makino, H. Shinagawa and A. Nakata (1985): Nucleotide sequence of the genes involved in phosphate transport and regulation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **184**, 241-250.
- 7) Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura and A. Nakata (1986): Nucleotide sequence of the *phoB* gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.*, **190**, 37-44.
- 8) Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura and A. Nakata (1986): Nucleotide sequence of the *phoR* gene, a regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **192**, 549-556.
- 9) Amemura, M., K. Makino, H. Shinagawa and A. Nakata (1986): Nucleotide sequence of the *phoM* region of *Escherichia coli*: four open reading frames that may constitute an operon. *J. Bacteriol.*, **168**, 294-302.
- 10) Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura, S. Kimura, A. Nakata and A. Ishihama (1988): Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*. Activation of *pstS* transcription by PhoB protein *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, **203**, 85-95.
- 11) Kimura, S., K. Makino, H. Shinagawa, M. Amemura and A. Nakata (1989): Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: Characterization of the promoter of the *pstS* gene. *Mol. Gen. Genet.*, **215**, 374-380.
- 12) Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura, T. Kawamoto, M. Yamada and A. Nakata (1989): Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J. Mol. Biol.*, **210**, 551-559.
- 13) Yamada, M., K. Makino, M. Amemura, H. Shinagawa and A. Nakata (1989): Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: analysis of mutant *phoB* and *phoR* genes causing different phenotypes. *J. Bacteriol.*, **171**, 5601-5606.
- 14) Lee, T., K. Makino, H. Shinagawa, M. Amemura and A. Nakata (1989): Phosphate regulon in members of the family Enterobacteriaceae: Comparison of the *phoB-phoR* operons of *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **171**, 6593-6599.
- 15) Yamada, M., K. Makino, H. Shinagawa and A. Nakata (1990): Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: Properties of *phoR* deletion mutants and subcellular localization of PhoR protein. *Mol. Gen. Genet.*, **220**, 366-372.
- 16) Amemura, M., K. Makino, H. Shinagawa and A. Nakata (1990): Cross talk to the phosphate regulon of *Escherichia coli* by the PhoM protein: PhoM is a histidine protein kinase and catalyzes phosphorylation of PhoB and ORF2. *J. Bacteriol.*, **172**, 6300-6307.