

大腸菌 *relA* 遺伝子の発現制御機構の解析

中川 明

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 生体情報
(森浩禎教授)

平成 18 年 9 月 21 日提出

目次

第一章 <i>relA</i> のプロモーターの同定	……	2
I. 序論	……	2
II. 材料と方法	……	12
III. 結果	……	20
IV. 考察	……	31
第二章 CRP による <i>relAP2</i> の転写制御	……	34
I. 序論	……	34
II. 材料と方法	……	39
III. 結果	……	43
IV. 考察	……	51
第三章 H-NS による <i>relAP2</i> の転写制御	……	52
I. 序論	……	52
II. 材料と方法	……	59
III. 結果	……	65
IV. 考察	……	81
総合討論	……	87
謝辞	……	89
参考文献	……	90

第一章

relA のプロモーターの同定

．序論

緊縮応答とRelA、SpoTの同定

バクテリアは、温度変化や浸透圧変化、pH の変化や炭素源、窒素源枯渇など刻一刻と変化する環境に応答しながら生存しており、それぞれの環境変化に対応する特異的な応答システムを備えている。こうした環境応答システムの中に緊縮応答と呼ばれる、アミノ酸飢餓になると rRNA や tRNA (stable RNA) の転写を劇的に抑制する機構が存在している。

緊縮応答は、アミノ酸飢餓になると RNA 合成が即座に止まるということから、もともと RNA control (RC) と呼ばれていた (Borek et al., 1956)。当初、アミノ酸と RNA 合成の関係がよくわかっていなかったために研究者たちの興味を惹き、その後アミノ酸飢餓下で RC が見られなくなるような表現型を示す遺伝座 *relA* が同定され、その変異株を元に研究が進んだ (Stent and Brenner, 1961)。RNA 合成が一気に止まるという野生株の表現型である stringent に対して、*relA* の表現型は、relax と呼ばれ、*relA* の "rel" の由来となった (Stent and Brenner, 1961)。Cashel らの一連の研究から、stringent な表現型は、アミノ酸飢餓下で見られる二種類の核酸、3'-5'-ピロフォスファチジルグアノシン (ppGpp) と 3'-トリフォスホ 5'-ピロフォスファチジルグアノシン (pppGpp) の蓄積と関係があり、relax な表現型を示す菌株ではそれらが蓄積しないことがわかった (Cashel and Gallant, 1969, Cashel, 1969)。その後の Haseltine らの研究により、ppGpp 及び pppGpp が RelA によって作られること (Haseltine et al., 1972)、rRNA の合成が ppGpp 及び pppGpp によって阻害されることが *in vitro* で証明され (Haseltine and Block, 1973)、ppGpp 及び pppGpp が緊縮応答を引き起こす分子であることがわかった。尚、現在までに ppGpp 及び pppGpp は生理学的な特性の違いが認められないため、二つを合わせて (p)ppGpp と呼称されている (Cashel et al., 1996)。

relA の塩基配列の決定は Metsger らによってなされ (Metsger et al., 1988)、完全に RelA 活性を失った *relA* アリルが作製されるに至ったが、この時の観察から (p)ppGpp の合成には RelA だけではなく、別の酵素も関わっていることが示唆された (Metzger et al., 1989)。この RelA に依存しない (p)ppGpp 合成活性は、*spoT* 遺伝子にコードされている SpoT タンパク質によるものであった (Xiao et al., 1991)。*spoT* はもともとアミノ酸飢餓下において、薄層クロマトグラフィーで見られる pppGpp のスポット (spot) が消失する表現型 (spotless) を示す変異として認識されていた (Fiil et al., 1977)。RelA が

(p)ppGppの合成活性のみを持っているのに対して、SpoTは(p)ppGppの合成と分解の両方の活性を持っている(An et al., 1979, Sarubbi et al., 1989)。大腸菌が緊縮応答を引き起こす条件として、アミノ酸飢餓の次に研究されているのがグルコース飢餓であり、SpoTがその際の(p)ppGpp集積に中心的な役割を果たしていると考えられている(Chaloner-Larsson et al., 1978, Cashel et al., 1996)。relA-spoT二重破壊株では(p)ppGppはまったく検出されなかったことから、(p)ppGppの全てはRelA、SpoTによって合成されていると考えられており、現在はrelA-spoT二重破壊株はppGpp null株として理解されている(Xiao et al., 1991)。

細胞内における(p)ppGppの代謝

(p)ppGppにまつわる代謝反応を図1に示す。pppGppは、GTPの3'-ヒドロキシル基にATPからのピロリン酸がRelAやSpoTのピロリン酸転移活性により結合され生成する(Cashel et al., 1996)。ピロリン酸のドナーとしては他にdATPもRelA、SpoTの基質として認識されるが、他のリボ、デオキシリボ核酸三リン酸は認識されない(Cochran and Byrne, 1974)。Gppタンパク質はグアノシン5リン酸脱リン酸酵素であり、pppGppをppGppに分解する(Somerville and Ahmed, 1979)。gpp変異株ではアミノ酸飢餓下でpppGpp量が3~4倍に増えるが、緊縮応答そのものは野生株と大きくは変わらない(Somerville and Ahmed, 1979)。SpoTは、(p)ppGpp合成活性だけでなく、(p)ppGpp分解活性も持っており、pppGppをGTPとピロリン酸に、ppGppをGDPとピロリン酸にそれぞれ分解する。以上のことから、(p)ppGppの量の制御はRelA、SpoTの合成活性及びSpoTの分解活性のバランスによって実現されるといえよう。

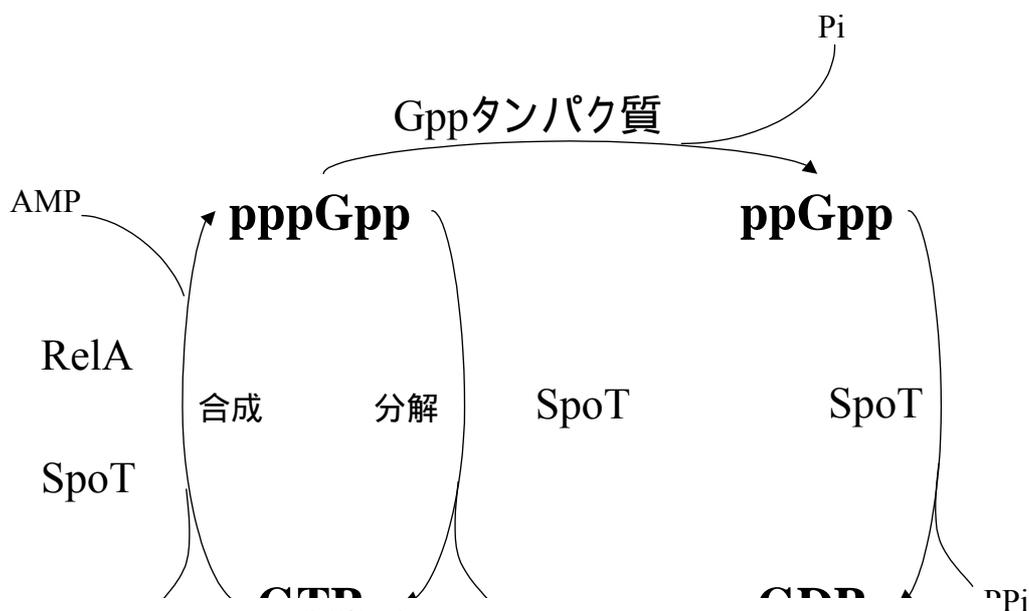


図1 (p)ppGppの代謝経路。

Piはリン酸基、矢印は反応方向を示す。図はCashelらの図を改変して用いた(Cashel et al., 1996)

RelAの(p)ppGpp合成活性メカニズム

緊縮応答時の(p)ppGpp 合成活性は、リボソームの存在に依存しており (Haseltine et al., 1972)、また、リボソーム画分で観察されていた (Cochran and Byrne, 1974) . 更に、RelA はそれだけでは、非常に弱い(p)ppGpp 合成活性しか持っていないが (Schreiber et al., 1991)、in vitro の研究から、アミノアシル化されていない tRNA、伸張中の mRNA、リボソームから構成される複合体 (3 次複合体) が存在すると、(p)ppGpp の合成能が強く活性化される (Haseltine and Block, 1973) . 現在までに、図 2 に示すような RelA のアミノ酸飢餓下における(p)ppGpp 合成能の活性化モデルが提唱されている (図 2) . アミノ酸飢餓になると、tRNA がアミノアシル化されず、フリーの tRNA が蓄積し、翻訳伸張中のリボソームの A 部位に入り込み、リボソームのペプチド伸張反応を阻害する (Haseltine and Block, 1973) . RelA は、このストールした 3 次複合体を認識し 2 量体でリボソームに結合することにより (Yang and Ishiguro, 2001)、(p)ppGpp 合成能が活性化され、その結果、(p)ppGpp が集積する . このモデルは、細胞がアミノ酸飢餓を、tRNA プールを介してリボソームが感知しており、リボソーム本体が環境応答における重要なセンサーとなりうることを意味している . RelA ホモログは多くの微生物、植物に保存されているおり、植物といくつかのバクテリアにおいて、同様のメカニズムが報告されていることからこのメカニズムは普遍的であると考えられている (*Mycobacterium tuberculosis*: Avarbock et al., 2000、*Streptomyces coelicolor*: Martinez-Costa et al., 1998、*Porphyromonas gingivalis*: Sen et al., 2000、*Pisum sativum*: Kasai et al., 2004) .

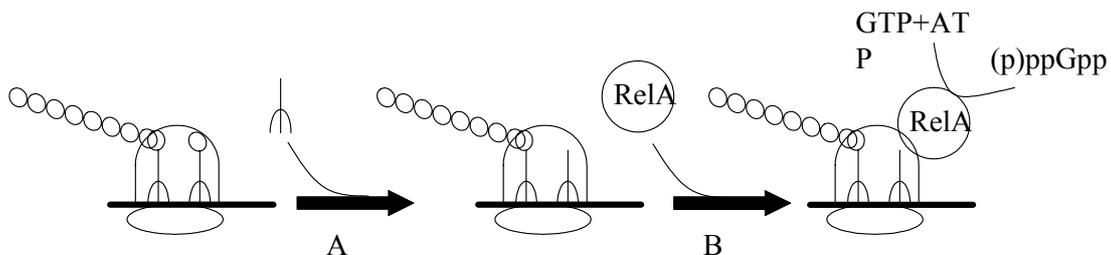


図 2 RelA の(p)ppGpp 合成活性の活性化メカニズム

RelA の(p)ppGpp 合成活性化メカニズムを模式的に示す . : 翻訳伸張中のリボソーム、mRNA、tRNA 複合体 (3 次複合体) . : アミノアシル化されていない tRNA が A 部位に入り込み、ストールした 3 次複合体 . : RelA が 3 次複合体に結合し、(p)ppGpp を合成する . A: アミノ酸枯渇によりアミノアシル化されていない tRNA が増える . B: RelA の 3 次複合体の認識と(p)ppGpp の集積

SpoTによる(p)ppGppの合成と分解

SpoTは 79 kDaの(p)ppGppを合成、分解できる 2 機能性の酵素である。(p)ppGpp合成活性は、特にグルコース飢餓下において見られるが、RelAとは異なり、リボソームによる活性化を受けない(Cashel et al., 1996)。現在のところ、そのSpoTの(p)ppGpp合成活性化メカニズムはわかっていない。(p)ppGppの分解活性は当初細胞抽出液のリボソーム画分に見出されたが、その後の研究によりリボソームなしでも(p)ppGpp分解活性があること、リボソームと結合しないことから、単独で(p)ppGpp分解活性を有していると考えられている(Sy, 1977)。SpoTの(p)ppGpp合成活性にはMn²⁺は必要ないが、分解活性には必須であり、(p)ppGppの合成と分解のスイッチングメカニズムに関係している可能性もある(Sy, 1977)。いずれにせよ、SpoTの(p)ppGpp合成と分解活性のメカニズムの解明は、大腸菌における(p)ppGpp量の制御研究にとって、今後の重要な課題と考えられる。

Rel/Spoの(p)ppGpp合成、分解メカニズム

一般にグラム陽性細菌は、大腸菌をはじめとするグラム陰性細菌と異なり、Rel/Spo と呼称される(p)ppGpp 代謝酵素を持っている(Jain et al., 2006)。Rel/Spo は他に Rel や RelA/SpoT、単に RelA 等いくつかの呼び名があるが、本論文では、グラム陽性細菌のもつ(p)ppGpp 代謝酵素については Rel/Spo と呼ぶ。Rel/Spo は、大腸菌の RelA と同様にリボソームに結合するとその(p)ppGpp 合成活性が活性化され、アミノ酸飢餓に応答する(例えば、Avarbock et al., 2000)。しかし、大腸菌の RelA とは異なり、(p)ppGpp 分解活性を持っており、大腸菌の SpoT 同様に 2 機能性の酵素である。すなわち Rel/Spo は大腸菌の RelA の性質と SpoT の性質を併せ持つような酵素といえよう。*Streptococcus dysgalactiae* の Rel/Spo の 2.1 の結晶構造解析によると、アミノ末端側から(p)ppGpp 分解活性ドメイン、ヒンジ部分、(p)ppGpp 合成活性ドメインの 3 つの部分から成り立っている(Hogg et al., 2004)。分解活性中心に(p)ppGpp が結合するとヒンジ部分を介して合成活性ドメインの構造が変化し、その結果(p)ppGpp 合成ができなくなる。更にその逆も起こり、GTP がカルボキシル末端側の合成活性中心に結合すると分解活性ドメインが影響され、(p)ppGpp を分解できなくなる。このように Rel/Spo は、合成と分解のメカニカルなスイッチングシステムを持っている。もしかすると、大腸菌の SpoT も同様のシステムを持っているのかもしれない(Hogg et al., 2004)。

RNAポリメラーゼのプロモーター認識と転写の開始について

本研究は大腸菌の転写制御に関して行われており、また、(p)ppGpp の機能が RNA ポリメラーゼ(RNAP)の機能に関わっているために、(p)ppGpp の生理学的な機能を論ずる前に、RNAP のプロモーター認識について簡単に説明する。

大腸菌のRNAPは α_2 、 β 、 β' の 5 つのサブユニットからなっている。転写伸張

をつかさどっているのは σ_{24} 、 σ_{32} の 4 つのサブユニットで、RNAポリメラーゼコア酵素 (RNAPコア) と呼ばれ、サブユニットはプロモーターの認識に重要であり、RNAPコアと σ 因子を合わせて、RNAポリメラーゼホロ酵素 (RNAPホロ酵素) と呼ぶ。本論文では、特に断わりがない限り、RNAPホロ酵素を単にRNAPと呼称する。大腸菌は 7 種類のサブユニットを持ち、ハウスキーピングな転写に重要な σ^{70} 、定常期、ストレス応答時特異的なプロモーターを認識する σ^S 、高温ストレス応答時に誘導される σ^H 、不溶性タンパクの蓄積やストレス応答時に機能する σ^E 、窒素源枯渇下特異的な σ^N 、鉄輸送系の遺伝子群のプロモーターを認識する σ^{fecI} 、鞭毛形成や走化性に関する遺伝子群を制御している σ^F 、である (Baumberg, 1999)。ここでは σ^{70} のプロモーター認識について述べる。

σ^{70} は主に対数増殖期に発現する遺伝子群を制御しており、ハウスキーピングな因子である。 σ^{70} のプロモーター認識に重要なシスエレメントは転写開始点上流 10 bp を中心とする -10 配列、35 bp 付近の -35 配列である (Hawley and McClure, 1983, Dombroski et al., 1992)。その他にもいくつかの転写制御を活性化するエレメントが報告されているが、上記の 2 つが遺伝子間で比較的保存された配列である (Keilty and Rosenberg., 1987, Liu et al., 2004)。-10 配列の σ^{70} 認識共通配列は TATAAT、-35 配列は TTGACA であり、それら 2 つの配列の間は 13 ~ 20 bp であるという報告があるが、一般に σ^{70} のプロモーター認識には 17 bp が最も適切である (Hawley and McClure, 1983, Harlay and Reynolds, 1987, Dombroski et al., 1996)。-10 配列は σ^{70} のプロモーター認識に必須であるが、アクチベーターの制御を受けているプロモーターの場合、明らかな -35 配列が存在しない場合もある (Baumberg, 1999)。

転写の開始はまず、DNA、RNAP、場合によってはアクチベーターで複合体を形成し、これを閉鎖複合体 (closed complex) と呼ぶ。この複合体形成は、比較的速く平衡に達するが、DNA を解離する反応に必要な RNAP の構造変化は (中間体) なかなか起きにくく、例えば σ^N に依存的なプロモーターでは、アクチベーターによる ATP 分解活性が必要になる (Craig et al., 1998, Guo et al., 2000)。中間体形成後、RNAP のヘリカーゼ活性により、部分的な DNA の解離を有した開鎖複合体 (open complex) を形成し、転写が開始される (図 3, Craig et al., 1998)。

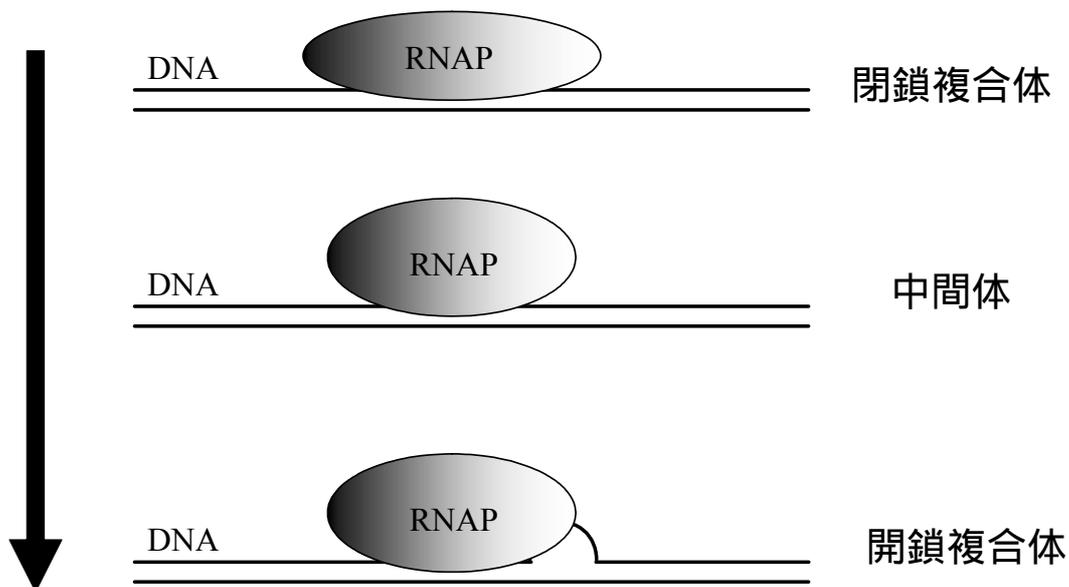


図3 RNAPの開鎖複合体形成過程

RNAPによる開鎖複合体(open complex)形成過程を模式的に示す。RNAPはDNAに結合し、閉鎖複合体(closed complex)を形成する。閉鎖複合体からRNAPのヘリカーゼ反応の際にRNAP自身の構造が変化する。このときの反応は平衡に達するまでにエネルギーを費やし時間がかかることが知られている(Craig et al., 1998)。その後開鎖複合体を形成する。

(p)ppGppのRNAPに対する結合

リファンピシニンに耐性を示す *rpoB* (RNAPのサブユニットをコードしている) 変異株内で、緊縮応答が見られなくなることから、(p)ppGppはRNAPを制御する因子なのではないかと以前より考えられていた(Little et al., 1983)。その後、リファンピシニン耐性型の RpoB が *in vitro* 転写の実験系で(p)ppGppに応答しないことが示され(Zhou and Jin, 1998)、(p)ppGppの効果がRNAPに直接作用することがわかり、最終的に、(p)ppGppはRNAPのサブユニットに結合すると結論付けられた(Chatterji et al., 1998、Perederina et al., 2004)。しかし、効果的な(p)ppGppとRNAPの結合には、DksAというアダプター様の機能を持つタンパク質が必要で、DksAをコードしている *dksA* 遺伝子の変異株はrelaxな表現型を示す(Perederina et al., 2004、Paul et al., 2005)。更に *spoT* 遺伝子上流に位置する *rpoZ* はRpoZタンパク質をコードしており、RpoZもまた、(p)ppGppとRNAPの結合を促進する。DksAがあればRpoZがなくとも(p)ppGppは効果的にRNAPと結合できるが、RpoZは過剰発現しなければ、*dksA*の破壊をサプレス

することはできない (Vrentas et al., 2005) . (p)ppGpp の RNAP への結合は、RNAP 自体の構造変化をもたらし、その転写能を変化させると考えられている (Perederina et al., 2004) .

(p)ppGppによる負の転写制御

(p)ppGpp による負の転写制御においてもっとも研究されているのが、rRNA クラスター-B を制御している *rrnBP1* プロモーターである . 大腸菌には7つの *rrn* オペロンが存在しており、そのオペロン内の構造が微妙に異なっているものの、プロモーター領域は高度に保存されている (Paul et al., 2004) . よって *rrnBP1* のプロモーターの研究は、全ての *rrn* オペロンの制御に通ずると考えられていることから (Paul et al., 2004)、本論文では一般化して rRNA の転写に最も寄与しているプロモーターを単に *rrnP1* と呼称する . *rrnP1* の転写活性は対数増殖期で最も強く、*rrn* の転写も全 RNA 量の 80% 以上を占め、アクチベーターである Fis や UP-element と呼ばれる RNAP が直接結合することのできる塩基配列によって、その高活性を実現している (Paul et al., 2004, Nilsson et al., 1990, Gourse et al., 1986) . 一方で、-10 配列と-35 配列の距離が 16 bp と転写の活性化に最適ではなく、更に-10 配列の直下流に存在する GC に富んだ配列 (discriminator 配列) は open complex をもともと不安定にさせやすい (Travers et al., 1984, Zacharias et al., 1991) . (p)ppGpp-RNAP 複合体は、*rrnP1* を認識することができるものの、転写開始における open complex を安定的に維持することができず、結果として *rrn* の発現を抑制する (Ohlsen and Gralla, 1992a, Barker et al., 2001) . このように *rrnP1* は、discriminator 配列等の潜在的に open complex を形成しにくいプロモーター配列を持っているために (p)ppGpp に感受性を示すが、同様のメカニズムは tRNA 遺伝子でも報告されている (Nagase et al., 1988) . よって、アミノ酸飢餓下では (p)ppGpp が蓄積し、(p)ppGpp と結合した RNAP は stable RNA の転写を安定的に開始することができず、その結果アミノ酸飢餓下で stable RNA の転写が下がり緊縮応答が観察されるのである .

stable RNA 以外にも (p)ppGpp によって転写を抑制されるプロモーターは多く報告されており、リボソームタンパク質 (Kajitani and Ishihama, 1984, Raghavan and Chatterji, 1998)、核酸合成酵素 (Donahue and Turnbough, 1990, Chang et al., 2002)、核酸や糖の取り込みに関与するトランスポーター (Chang et al., 2002)、DNA 合成に関与する因子群 (Chiaramello and Zyskind, 1990) などである . これらの因子群は細胞増殖に必須なものであることから、(p)ppGpp は、飢餓が解消するまで最小限のエネルギーで生きながらえるために、生育を抑える機能を持っていると考えられている (Cashel et al., 1996) .

(p)ppGppによる正の転写制御

緊縮応答により、翻訳に関与する遺伝子群の転写が抑えられるが、アミノ酸合成酵素をコードしているアルギニンオペロン、ヒスチジンオペロン、イソロイシンオペロン、トレオニンオペロンのプロモーターは、in vivo、in vitro で ppGpp と DksA により活性化される (Paul et al., 2005) . その研究の中で、(p)ppGpp が転写を正に制御するメカニズムとして、open complex 形成に至るまでのエネルギーが *rrnP1* と異なるというモデルが提唱されている . (p)ppGpp に活性化されるプロモーターは、中間体を形成するのに比較的多くのエネルギーを必要とするが、中間体から open complex を形成するのに放出される自由エネルギーが大きく、いったん中間体を形成すれば、open complex を形成しやすくなる . 一方で、*rrnP1* は中間体形成にはそれほど大きいエネルギーを必要としないが、open complex を形成するよりも中間体形成前に戻るほうが経済的であり、open complex を形成しにくい . (p)ppGpp はその中間体形成までのエネルギーを下げるような働きがあり、以上のアミノ酸合成酵素遺伝子群の発現が上がるというモデルである (Paul et al., 2005) .

アミノ酸合成に関与する酵素遺伝子群が (p)ppGpp によって活性化されるということは、アミノ酸飢餓下で大腸菌がよりアミノ酸を生産しようとすることを意味しており、生理学的に理解しやすい応答である . しかし、一方で、diauxie (薄いグルコースと通常用いられる濃度のラクトースを含む培地で大腸菌を生育させると先にグルコースを消費し、ラクトースを消費するまでに生育のラグが見られる現象) 下で (p)ppGpp が集積するが (Harshman and Yamazaki, 1971)、ヒスチジンとアルギニン合成酵素以外のアミノ酸合成酵素遺伝子は、その転写が下がるという報告もあり (Chang et al., 2002)、(p)ppGpp 集積時のアミノ酸合成酵素遺伝子群の発現制御については、もう少し詳細な解析が必要である .

ribosome modulating factor (RMF) をコードしている *rmf* もまた (p)ppGpp によって正に転写を制御されている (Izutsu et al., 2001) . RMF は、2 つの 70S リボソームを結合し、二量体を形成させるアダプターのような働きを持っており、翻訳活性を阻害するはたらきがある . RMF は、通常の生育では定常期で最も蓄積するが、新しい培地に菌体を移した瞬間にリボソームと解離し分解され、リボソームは翻訳を再開する (Yoshida et al., 2002) . このような機能を持った因子を正に制御することも、(p)ppGpp が生育に適した環境になるまで生命活動を停止させ、大腸菌が生きながらえようとさせていることを反映している .

(p)ppGppのRNAPコアの 因子に対する結合能の制御

菌体内のRNAPコアの量は、1細胞あたり2000個程度とプロモーターの数や転写量から考えると非常に少なく (Ishihama 1981)、プロモーター同士で、RNAPを奪い合っていると考えられている . こうした観点から、全転写量の90%以上を占めるstable RNAの合成が(p)ppGppによって抑えられるという現象は、フリーのRNAP量を増大させ、普

段は転写されにくい他のプロモーターがRNAPを利用できるようになると考えられる (Zhou and Jin, 1998)。(p)ppGppが集積するような環境におけるマイクロアレイの結果から、ストレス応答に重要な遺伝子を含む、70 近い遺伝子の発現が上昇することがわかった (Chang et al., 2002)。これらの中には、stable RNAの合成が止まったことによって転写が活性化されている遺伝子もあるかもしれない (Chang et al., 2002, Zhou and Jin, 1998)。また、(p)ppGppは 70 と S のRNAPコアに対する競合的な結合を制御しているという報告がある (Jishage et al., 2002)。その研究では、in vitroでRNAPコアとの結合力の弱い、環境応答に重要な S が(p)ppGpp存在下で結合できるようになり、環境応答遺伝子群が転写される (Jishage et al., 2002)。実際に S 依存的な転写は (p)ppGppが存在しないと起こらず (Kvint et al., 2000)、(p)ppGppはRNAPコアと 因子の選択性に関与している。大腸菌における 因子間のRNAPコアに対する競合的な結合は、 70 と S または H で報告されているが、*Pseudomonas*では 70 と N 間で知られており、普遍的な現象なのかもしれない (Jishage et al., 2002, Laurie et al., 2003)。このように、(p)ppGppはRNAPに結合することによる直接的な転写制御以外にもゲノムワイドな転写に影響を及ぼす因子である。

(p)ppGppの医療や工業的な研究における役割

(p)ppGpp は、病原性を示すバクテリアにおいて、病原性を呈する遺伝子群の転写を活性化することが知られている (Song et al., 2004, Pizarro-Cerda et al., 2004, Silva et al., 2006, Nakanishi et al., 2006)。また、人間は *relA* を持っていないために薬のターゲットとして適しており、(p)ppGpp の研究は、感染症の予防や治療に役立つかもしれない。(p)ppGpp を合成できなくなったサルモネラ菌をマウスに経口摂取させた研究では、サルモネラ菌は感染することができず、更にそのマウスは野生型のサルモネラ菌に対する免疫を獲得していた (Na et al., 2006)。こうした研究は(p)ppGpp 研究が医療に役立つかもしれないことを意味しており、今後の研究が期待される。

アミノ酸は、D-型、L-型の 2 種類あるが、現在のところこれら 2 つを選択的に人工合成することは、実用化されておらず、生物工学的に合成されている。(p)ppGpp はアミノ酸合成を正に制御しているため、(p)ppGpp を過剰に生産させた株ではグルタミン酸、リシンなどのアミノ酸が多く生産される (Imaizumi et al., 2006)。(p)ppGpp の過剰生産は大腸菌の生育を止めるような働きがあり、回収率を減らしてしまうために単純な応用とはいかないが、今後の研究により(p)ppGpp の工業的な利用も期待される。

(p)ppGpp量の制御研究の問題点

(p)ppGpp 量の制御をテーマとする研究は、古くから行われてきた。しかし、その観察条件は、アミノ酸飢餓という非常に特異的な環境が主であった。アミノ酸飢餓はアミノ酸が枯渇するような環境ではなく、一つ、または複数のアミノ酸が作れなくなるような環

境である。例えば、最少培地にバリンのみを加えるとその酵素学的なフィードバック制御からイソロイシン飢餓が引き起こされる。また、アミノ酸アナログを利用したり、アミノ酸合成酵素変異株内を利用したりすることによりアミノ酸飢餓を実現している。しかし、このような条件は、恐らく自然界には存在しない非常に稀な状況であり、(p)ppGpp の量制御における大腸菌の生理学的な意義を本質的に理解するには適していない。実際にアミノ酸飢餓培地ではない LB 培地でも(p)ppGpp の効果は認められており(例えば、Izutsu et al., 2001、Silva et al., 2006)、既存の条件以外での(p)ppGpp 量の制御を研究することが大腸菌の生理を理解する上で重要であると考えられる。

本研究の目的

このように、(p)ppGpp は、細胞生理学上重要な役割を果たしている。また(p)ppGpp 合成酵素コードしている *relA* のホモログは、ほとんどのバクテリアや、植物において見つかっており普遍的な遺伝子である。RelA の酵素学的な(p)ppGpp 合成活性の研究は、広く行われており、詳細にわたって解明されてきた。一方で、*relA* の転写制御における研究は Metzgerらによってなされているが、構造遺伝子上流 178 bp に転写開始点が発見されているだけであった。更に、(p)ppGpp 研究のほとんどは、その検出の難しさから、アミノ酸飢餓、グルコース飢餓といった非常に特異な環境下のみでの現象について行われてきており、より自然に近い条件下では、酵素学的な RelA の制御だけではなく、*relA* の転写レベルでの(p)ppGpp 量の制御も十分に考えられる。以上の観点から、本研究では、(p)ppGpp 量の制御を完全に理解するために、*relA* 遺伝子の転写制御機構と(p)ppGpp の合成の関係をアミノ酸飢餓等の特殊な環境下ではなく、LB 培地で明らかにすることを試みた。

材料と方法

菌株

本研究に用いた大腸菌株を表 1 に記す。

表 1. 研究に用いた大腸菌株とプラスミド

Name	Genotype	Reference
大腸菌株		
MC4100	(<i>argF-lac</i>)U169 <i>rpsL150 relA1 araD139 flbB5301 deoC1 ptsF25</i>	Casadaban, 1976
W3110	Wild type (lineage A)	Jishage and Ishihama, 1997
RM177	MC4100 (RZ-5)	Oshima et al., 1995
AN155	pRelA455 によって形質転換された W3110	This study
AN106	W3110 <i>relA25I</i>	^a Xiao et al., 1991
AN506	MC4100 (<i>3relAupM-lacZ</i>)	This study
AN507	MC4100 (<i>P1m10-lacZ</i>)	This study
AN508	MC4100 (<i>P1m35-lacZ</i>)	This study
AN516	MC4100 (<i>p3-lacZ</i>)	This study
AN526	MC4100 (<i>P2-lacZ</i>)	This study
AN582	W3100 transformed by p8M	This study
AN616	MC4100 (<i>P2m10-lacZ</i>)	This study
AN623	MC4100 (<i>5relAupM-lacZ</i>)	This study
AN624	MC4100 (<i>1relAupM-lacZ</i>)	This study
AN627	MC4100 (<i>8relAupM-lacZ</i>)	This study
AN634	MC4100 (<i>CRPdown-lacZ</i>)	This study
AN682	W3110 <i>rumA::Kn^r</i>	^a Baba et al., 2006
AN718	W3110 with -10 box mutation of <i>relAP2</i>	This study
AN730	MC4100 (<i>P1m25-lacZ</i>)	This study
AN731	MC4100 (<i>P2m35-lacZ</i>)	This study
AN766	W3110 で <i>relAP1</i> の-10 配列が機能していない変異を持つ株	This study
AN767	W3110 で <i>relAP1</i> 及び <i>relAP2</i> の-10 配列が機能していない変異を持つ株	This study
プラスミド		
pMKt1403	<i>lacZ</i> operon 様融合プラスミド	Kawano, 2002
p8M	<i>8relAupM</i> を保持している pMKt1403	This study
pRelA455	ppGpp 過剰産生プラスミド	Izutsu et al., 2001
pKO3	mutation introducing vector	Link et al., 1997
prelAP2m10HR	pKO3 に P2m10 変異を含む上下流 1kbp をクローニングしているプラスミド	This study
prelAP1m10P2m10HR	pKO3 に P1m10、P2m10 変異を含み P1m10 の上下流 1kbp をクローニングしているプラスミド	This study

^aオリジナルの株から P1 フェージにより変異アリルを移した。

培地

本章における研究に用いた培地はすべて LB 培地 (10 g/l Bacto Tryptone (Difco)、5 g/l Bacto Yeast Extract (Difco)、10 g/l NaCl) が基準となっている。必要に応じて、クロラムフェニコール 25 µg/ml、アンピシリン 50 µg/ml、カナマイシン 25 µg/ml、50 µg/ml

5 プロモ 4 クロロ 3 インドリル D ガラクトシド (X Gal) を適宜加えた。寒天培地は LB 培地に 1.5% (w/v) (ファージ調製用のソフトアガーは 0.7% (w/v)) の寒天をまぜ、熱した後、必要な各種薬剤を混和し、固まらせて作製した。全ての培地は 121、20 分の高圧滅菌処理を行った。また、培養は全て 37 で好氣的に行った。

表2 本研究で用いたプライマー

Name	Sequence
pr58	TCGACGTCAAACAATGCC
pr55	ATGTGCAACCTGAAGATCGCG
pr53	GCCGTGGGCGAAAAACG
pr51	GGATATGTTCCCACACACGG
pr3M	CATCGTCTCTCCTTTAGGG
pr35	CCATACCGCAGAACAGATCC
pr5P1m10	CTATTCGTATAGTTTATG CCCGGG GTAACCCTGCAA ^a
pr3P1m10	TTGCAGGGTTAC CCCGGG CATAAACTATAC ^a
pr5P1m25	TGGAACCTATT CCCGGG TTTATGTATCCT ^a
pr3P1m25	AGGATACATAAA CCCGGG GAATAGGTTCCA ^a
pr5P1m35	AAATTATAAA CCCGGG CTATTTCGTATAG ^a
pr3P1m35	CATAAACTATACGAATAG CCCGGG TTTATAATTT ^a
pr5P1mAT	GCAGCAAATTAT CC CTGGAACCTATTTCG ^a
pr3P1mAT	CGAATAGGTTCCAG GGGG ATAATTTGCTGC ^a
pr5P2m10	CCCCGATAGTGAG GAT CCCGAAACCGTCTC ^a
pr3P2m10	GAGACGGTTTCGG GAT CCTACTATCGGG ^a
pr5P2m25	CTGTATCTCG CGGAT CCAGTGAGATACTCG ^a
pr3P2m25	CGAGTATCTACT GGAT CCGGCGAGATACAG ^a
pr5P2m35	GAAGGCCTGGAT GGAT CCCTCGCCCCGATAG ^a
pr3P2m35	CTATCGGGGGCGAG GGAT CCATCCAGGCCTTC ^a
pr5P2mCD	ATCGCGAAAA CGGAT CCGCTTTTCGCATTC ^a
pr3P2mCD	GAATGCGAAAAG CGGAT CCGTTTTTCGCGAT ^a
pr5relAP1HR	<u>TAAGCGGCCGCGCG</u> CAAAAACGCTATTTATCC ^b
pr3relAP1HR	<u>TAAGCGGCCG</u> CATAGCAATCCTGTAAACG ^b
pr5relAP2HR	<u>TAAGCGGCCG</u> CTCATCATAAACCGAAATCG ^b
pr3relAP2HR	<u>TAAGCGGCCG</u> CGTTAACGACCGACTTACC ^b
pr3rumA	CCTTTAACGCGCGAGAAAAAGTAC
pr3barA	CCGCCGAGAATTTTGCTGGCTTC
pr3mazE	CCCCAGACTTCCTTATCTTTTCGG
pr5rumA	GCCGCGCAATTCTACTCTGCAA

^a太字斜体は変異を入れた塩基を示している

^b下線はクローニング用に挿入した制限酵素認識部位を示している

プラスミド、プライマー、プライマーの組み合わせ

本研究で使用したプラスミド、及びプラスミドに組み込んだ DNA 断片の増幅に使用したプライマーをそれぞれ表 1、表 2 に記す。relA のプロモーターアレル作製には表 3 に示すようなプライマーセットを用いた。

表3. プライマーセットとプロモーター

Name	Primer set	Location ^a
8 <i>relA</i> upM	pr58-pr3M	+3 ~ -880
5 <i>relA</i> upM	pr55-pr3M	+3 ~ -502
3 <i>relA</i> upM	pr53-pr3M	+3 ~ -300
1 <i>relA</i> upM	pr51-pr3M	+3 ~ -108
P2	pr58-pr35	-457 ~ -880
8Y	pr58-pr3ygcA	-47 ~ -880
8I	pr58-pr3 <i>relA</i> INT	+330 ~ -880
p3	pr5p3-pr3p3	-1352 ~ -1602
P1	pr53-pr3ygcA	-47 ~ -300
P1m10	pr53-pr3P1m10, pr5P1m10-pr3M	+3 ~ -300
P1m25	pr53-pr3P1m25, pr5P1m25-pr3M	+3 ~ -300
P1m35	pr53-pr3P1m35, pr5P1m35-pr3M	+3 ~ -300
P1mUP	pr53-pr3P1mAT, pr5P1mAT-pr3M	+3 ~ -300
P2m10	pr58-pr3P2m10, pr5P2m10-pr35	-457 ~ -880
P2m25	pr58-pr3P2m25, pr5P2m25-pr35	-457 ~ -880
P2m35	pr58-pr3P2m35, pr5P2m35-pr35	-457 ~ -880
CRPdown	pr58-pr3P2mCD, pr5P2mCD-pr35	-457 ~ -880

^aこれらの数字は*RelA*の開始コドンからの距離を示している(ATGのAを+1とし、上流方向をとした)

遠心分離について

本研究では全ての遠心分離は以下の機器を使用した。

サンプルが 2 ml 以下のとき: 久保田製作所製インバータマイクロ冷却遠心機 1910

サンプルが 2 ml を超えるとき: SRX-1 TOMY SEIKO Co., LTD, Tokyo, Japan

P1 ファージを用いた形質導入

P1 ファージによる形質導入はMillerのプロトコールに準拠した(Miller, 1972)。LB培地で一昼夜コロニーから培養したオリジナルの株に、約 10^7 pfu(plaque forming unit)を持つP1 virを 100 μ l混ぜ、5 mlソフトアガーと混和の後、LB寒天培地に広げた。一昼夜培養後、形成されたプラークをソフトアガーごと回収し、5~10 mlのLB培地、終濃度 2%クロロホルムを加え、激しく攪拌後、5000 rpm、4 で5分遠心した。上清を回収し、4 で保存した。こうして得られたP1 ファージは、通常 10^8 ~ 10^{10} 程度のpfuであった。宿主の菌株は、一昼夜コロニーからLB培地で培養した後、100 μ lを 4000 rpm、4、5分遠心し、沈殿物をMC緩衝液(10 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂)100 μ lにけん濁した。そこにP1 ファージ 100 μ lを混ぜ、37 に30分放置した。その後、4000 rpm、4、5分遠心し、1 mlのクエン酸緩衝液(0.1 M クエン酸ナトリウム pH5.5)、200 μ lで洗浄した。同様の洗浄を更に 2 回繰り返した後、適当な抗生物質を含む寒天培地に全量をまいた。寒天培地で一昼夜培養後、生えてきたコロニーを2~6個を適当な抗生物質に植え

継ぐことを 3 回繰り返した。最終的に得られた株を正しく変異アリルが導入されているか、PCRにて確認した。プライマーは*rumA::Kn^r*の確認にはpr3*relA*-pr3*barA*、*relA251*の確認にはpr5*rumA*-pr3*mazE*を用いた。

LacZ活性測定株の作製

LacZ 活性測定株の作製には、pMKt1403 プラスミド(Kawano, 2002)を用いた。pMKt1403 は、本研究室の川野により作製された pMC1403 由来(Casadaban et al., 1987)のオペロン様融合 *lacZ* 用プラスミドである。クローニングサイト上流には pTRC99 (Takara)由来の *rrnBT1T2* ターミネーターがあり、上流域の転写の流れ込みを防いでいる。このベクターから翻訳される LacZ タンパクは pMS434 由来の TrpB のシャインダールガルノ配列で制御され、比較的安定な翻訳を実現しており、低い転写活性を検出するのに適している(Hirano et al., 1987)。*relA* プロモーター配列の DNA 断片の作製は、PCRにより行った。PCRは、表3に示すプライマーセットで小原クローン455のファージ液を鋳型として(Kohara et al., 1987)、KOD(東洋紡)にて増幅した。また、プロモーターに変異を入れた DNA 断片の作製には、cross-over 法を用いた(Chen and Przybyla, 1994)。こうして得られた DNA 断片を T4 polynucleotide kinase(Takara)でリン酸化した後にこの pMKt1403 の *SmaI* 部位にクローニングした。配列はプラスミド作製後に確認した。プラスミドは ファージ溶原株である RM177 に形質転換され、マイトマイシン C 処理することにより、ラムダファージとプラスミドの *in vivo* での相同組み換えを行った。溶菌したライセートをクロロホルム処理し、遠心することによりデブリスを除き、4 に保存した。ライセートは MC4100 株に感染させ、pMkt1403 にプロモーター配列が導入された配列を持つ ファージ溶原菌を作製し、これを LacZ 活性測定株とした。尚、LacZ 活性測定株はその *att* 部位にただ一つのファージしか持っていないことを PCR により確認してある(Powell et al., 1994)。

pKO3 システムによるゲノムDNA上の*relA*プロモーターの変異導入株の作製

preLAP2m10HR の作製法を図4に記す。その作製はまず、pr5*relAP2HR*-pr3P2m10、pr5P2m10-pr3*relAP2HR* のプライマーセットをそれぞれ用いて、W3110のコロニーを鋳型として ExTaq (Takara)にて増幅し、DNA 断片を作製した。続いて、pT7Blue (Novagen)にそれらの断片を TA クローニングした。挿入された DNA 断片の向きは PCR の増幅により確認した後、配列を確認した。*relAP2* よりも上流断片、下流断片が、pT7Blue の *lacZ* 遺伝子と *relA* 遺伝子方向に対する向きが同じになるようにクローニングされたプラスミドを選び、それぞれ pT7P2HRupper、pT7P2HRlower と呼称した(図4)。pT7P2HRlower を *BamHI* で切断後、短い方の断片を pT7P2HRupper の *BamHI* 部位にクローニングし、向きを PCR で確認した。このプラスミドを pT7P2HR と呼称した。pT7P2HR を *NotI* で切断後、2 kbp の断片を pKO3 の *NotI* 部位にクローニングし、でき

たプラスミドを *prelAP2m10HR* と呼称した。

pKO3 は相同組み換えを用いた遺伝子破壊用プラスミドで、高温感受性の複製開始点、シュクロース存在下で致死性を示す *sacB* 遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子を持っている (Link et al., 1997) . P2m10 変異導入株の選択は Link らのプロトコールに従った (Link et al., 1997) . ゲノム上の *relAP2* の -10 領域を破壊するために作製した *prelAP2m10HR* で W3110 を形質転換した . 形質転換したコロニーを 1 ml の LB にサスペンドし、そのうち 2 μ l を 25 μ g/ml クロラムフェニコールを含む LB プレートに撒き、42 $^{\circ}$ C で一昼夜培養した . このようにして生えてきた株は、42 $^{\circ}$ C という pKO3 プラスミドが保持されない条件下でクロラムフェニコール耐性を示すために、プラスミドが相同組み換えによりゲノム上に挿入された株であると考えられる . この株は P2m10 を持つ *relAP2* と野生型の *relAP2* を 1 kbp 間隔で併せ持っており、プラスミド配列を抜き出すために 5% シュクロースを含む LB 培地に植菌したのち一昼夜培養した . こうして得られた株は、*sacB* を持っていないために、プラスミド配列がゲノム DNA 上から抜け落ちたと考えられる . しかし、P2m10 を持っている株と持っていない株の 2 種類が混在しており、そのため P2m10 を含む領域を PCR で増幅した後、*Bam*HI で切断して判断した (AN718、表 1) .

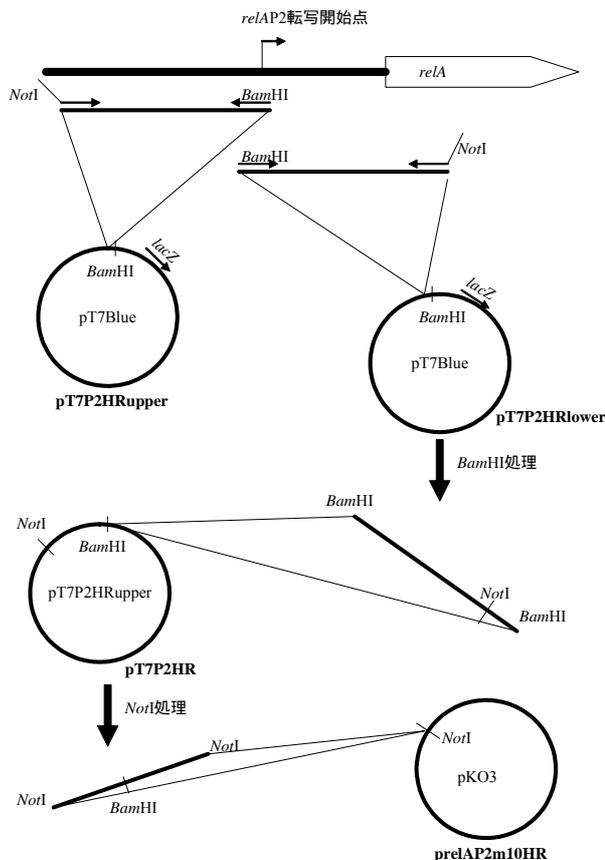


図 4 preAP2m10 の作製法

preAP2m10HR の作製法を模式的に示す。円はプラスミド、太線は DNA 断片を表す。円内に記載した名前は、クローニングする際のプラスミド名、円の下に記載した名前はクローニング後のプラスミド名をそれぞれ表す。詳細は本文参照のこと。

続いて、P1m10-P2m10 二重変異アリルを持つ株を作製した。AN718 のコロニーを鋳型に pr5relAP1HR-pr3P1m10、pr5P1m10-pr3relAP1HR をプライマーとして、DNA 断片を作製し、preAP2m10HR と同様の手順で pKO3 にクローニングした。但し、P1m10 は SmaI 部位で作製されているので、preAP2m10HR 作製時の BamHI を SmaI で行った。このようにしてできた preAP1m10P2m10HR で W3110 及び AN718 を形質転換し、AN718 株作製時と同様のセレクションを経て、P1m10 変異株 (AN766、表 1)、P1m10-P2m10 変異株 (AN767、表 1) を作製した。最終段階での確認は pr58-pr3M のプライマーセットを用いて、DNA 断片を PCR で増幅し、BamHI 及び SmaI または両方の制限酵素で処理することにより行われた。変異部位の挿入は変異部位の上流と下流でそれぞれ 1 回ずつ組み換えが起こることによって実現し、そのため変異部位の上流と下流の長さは組み換え効率を同じにするためにほぼ同じ長さにしてある。逆に言えば上流と下流の長さが異なれば、片側のみで高確率で組み換えが起こってしまい、変異部位が挿入される可能性は劇的に低くなる。つまり、preAP1m10P2m10HR において、P1m10 変異はアリルの中心に位置しているが、P2m10 変異は中心より 500 bp も離れているために、W3110 で preAP1m10P2m10 を用いて相同組み換えを行っても P2m10

変異がゲノム DNA 上に残る可能性は非常に低く、この二重変異を持つ *prelAP1m10P2m10HR* で P1m10 の単一変異株 (AN766) の単離に成功した。

LacZ活性の測定

LacZ活性の測定はMillerの実験プロトコールに従った (Miller, 1972) . 菌体は示された時間で回収し、適宜 1 ~ 10 倍程度に生育時に用いた培地液で薄め、0.4 mlに統一した . そこに 0.6 mlのZ-buffer、0.01%SDS、1%クロロホルムを加え激しく攪拌後、28 のウォーターバスに 5 分放置した . 4 mg/mlの *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)200 μ lを加え、LacZ反応をさせた後、1M Na₂CO₃にて反応を止め、吸光度を図り、LacZ活性を計算した (Miller, 1972) .

RNA抽出とプライマー伸張法

RNAの回収はConwayらのプロトコールに従った (Conway et al., 1991) . 大腸菌を 2 ml LB 培地にてコロニーより一昼夜前培養を行い、そのうち 100 μ l (図 5B) または 800 μ l (図 9B) をそれぞれ 50 ml LB-アンピシリン培地、または 800 ml LB 培地に加え、本培養を行った . それぞれ示した時に菌体を回収した . 回収した菌体は、1/10 量の 10 \times Solution A (10% SDS, 200 mM 酢酸ナトリウム, 10 mM EDTA, pH 5.5) を加え、混和した後、回収量と等量の 65 に熱したフェノールを加え、混和した後、5分間 65 のウォーターバスで振蕩した . 7500 rpm、4 にて 5分遠心の後、上清を約半分回収し、それと等量の 65 に熱したフェノールを加え、混和した後、5分間 65 のウォーターバスで再び振蕩した . 7500 rpm、4 にて 5分遠心の後上清を回収し、2倍量の氷で冷やしたエタノールを加え、混和後、7500 rpm、4 にて 5分遠心した . 液体を捨て、風乾した後 DEPC で処理した水 (DEPC 水) 400 μ l に溶かし、RNeasy kit (Quiagen) にて精製した . 通常、RNeasy kit を用いるとゲノム DNA は混入しないが、本実験では混入していたために精製したトータル RNA に DNase I (Takara) 処理を行い、ゲノム DNA を分解し、再度フェノール処理、クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、DEPC 水に溶かした .

プライマー伸張法はAusubelらの方法に従った (Ausubel et al., 1987) . 100 pmolのプライマーをT4 polynucleotide kinase (Takara) と [γ -³²P]ATP でラベルし、1 サンプルあたり 2 pmol使用した . *relAP1* からの転写産物の検出にはpr3M (表 3)、*relAP2* からの転写産物にはpr35 (表 3) を用いた . 逆転写にはAMV reverse transcriptase (Life Science, Inc.) を用いた . シークエンスラダーは、pr58-pr3INTを用いたPCR産物を鋳型として、それぞれのプライマーを用いてBcaBEST™ Dideoxy Sequencing Kit (Takara) にて作製した . 泳動はLong Ranger 50% Gel Solution (Cambrex) を用いて 7 M尿素を含むアクリルアミド 5%の変性ゲルで 1500 V、1.5 時間行った . 泳動緩衝液はTBE緩衝液 (89 mM Tris, 89 mMホウ酸, 1 mM EDTA pH8.0) を使用した . 泳動後のゲルは、乾燥させ、

BAS2500にて感光、解析した(BAS2500, Fuji) .

Western blot

W3110、AN718、AN766、AN767をコロニーより2 ml LB培地で前培養した後、そのうち100 μ lを50 ml LB培地に入れ、本培養を行った。菌体は、対数増殖期(log)のサンプルとしてOD₆₀₀ = 0.4、定常期(sta)のサンプルとしてOD₆₀₀ = 2.5の時に10 ml回収した。15000 rpm、2分遠心し、培地を破棄した後、1 mlのTESバッファ(50 mM Tris-HCl pH 7.9, 0.3 M NaCl, and 0.1 mM EDTA)に菌体を懸濁した。ゲノムDNAを破砕する目的で、MISONIX社製のAstrason XLによってレベル4で30秒超音波処理した後logのサンプルを20 μ l、staのサンプル3.2 μ lを等量の2×サンプルバッファと混ぜた。staのサンプルは終量を40 μ lに合わせるために16.8 μ lのTESと2×サンプルバッファを加えた。タンパク質の泳動及びWestern blottingは村松のプロトコルを参照した(村松, 1996)。サンプルを96 で5分処理した後、SDS-PAGEを行った。この際の下側のアクリルアミドゲルの濃さは7.5%であった。30 mA、3時間泳動後、下側のゲルを回収し、セミドライ方式でATTO社製のAE6675-Pによって、2 mA/cm²で20分間PVDF膜(Millipore)にblottingした。RelAタンパク質、PykAタンパク質の検出は、それぞれのタンパク質で免疫したマウスの抗血清を使用した。抗RelA抗血清は15000倍希釈、抗PykA抗血清は30000倍希釈して用いた。シグナルの検出はECL Plus Western blotting detection reagents (Amersham Biosciences)を用いた。シグナルの解析にはDolphin-1D image analyzer (Wealtec)を用いた。

LB培地における(p)ppGpp量の測定

2 ml LB培地でコロニーから一昼夜前培養を行った菌株10 μ lを0.1 mCi/mlのPHOSPHORUS-32 (Amersham)を含む1 ml LB培地に植え継ぎ、本培養を行った。OD₆₀₀は、RIを入れていない培地で測定した。核酸の回収、測定はIzutsuらのプロトコルに従った(Izutsu et al., 2001)。各回収ポイントでは5 μ lずつ菌体を回収し、終濃度1 Mになるようにギ酸を加えた後、氷上で5分放置した。15000 rpm、4 で5分遠心後、上清を取り菌体数で5 μ lに標準化し、PEIセルロースプレート(Merk)にスポットした。溶媒には1 M リン酸水素2カリウムを用いた。プレートを風乾の後、BAS2500にて感光、解析した(BAS2500, Fuji) .

結果

relAには少なくとも2つのプロモーターが存在する.

大腸菌 *relA* の転写開始点は Metsger らによって 1 つ同定されていた (Metsger et al. 1988). しかし、その上流域に更なるプロモーターの存在の可能性が示唆されていたため (Cashel, 1996)、*relA* の制御領域の決定を試みた. 実験は RelA の開始コドン上流域 880 bp を図 5A のようにシステムティックに欠失させていき、その領域のプロモーター活性を *lacZ* と融合させて、LacZ 活性を指標に観察することにより行った. その結果、880 bp~502 bp を欠失させるとその転写活性が約 40%減少した (*8relAupM* と *5relAupM* を比べる). この 880 bp~502 bp 領域のみを *lacZ* に融合させた株では、明らかな LacZ 活性が観察されたことから、この領域に転写活性があることが示唆された. また、502 bp~300 bp を欠失させてもほとんど変化がないことから (*5relAupM* と *3relAupM* を比べる)、この領域には明らかな転写活性がないことが示唆された. そして、*1relAupM* の LacZ 活性がほとんど見られなかったことから、108 bp~開始コドンの領域にはプロモーター活性がなく、また、300 bp~108 bp にプロモーター活性が存在していることが示唆された. 尚、この 300 bp~108 bp の領域は先に述べた既知の転写開始点が含まれる. 以上のことから RelA 開始コドン上流 880 bp 内に少なくとも 2 つのプロモーターが存在することが示唆された. 簡単のため仮に *relA* の構造遺伝子から近いプロモーターを p1、遠いプロモーターを p2 と呼称する.

次にプロモーター配列を決定するために、プライマー伸張法により転写開始点を同定した (図 5B). サンプルのトータル RNA は、RelA 開始コドン上流 880 bp をクローニングしているプラスミドを持った野生株 (AN582、表 1) から回収した (方法と材料を参照のこと). 実験は p1 においては RelA 開始コドンから上流方向へ向けたプライマー (pr3M、表 2) を、p2 においては RelA 開始コドン上流 502bp から上流方向へ向けたプライマー (pr35、表 2) を用いた. その結果、どちらのプロモーターにおいても特異的なバンドが確認された (図 5B). p1 における転写開始点は RelA 開始コドン上流 178 bp、p2 におけるそれは RelA 開始コドン上流 626 bp に位置していた. p1 における転写開始点は先の報告 (Metzger et al., 1988) と同じであり、p2 は本研究によって初めて同定された *relA* のプロモーターである. よって *relA* には少なくとも 2 つのプロモーターが存在すると結論付けた. ここで、正式に p1 を *relAP1*、p2 を *relAP2* と呼称する (図 5C).

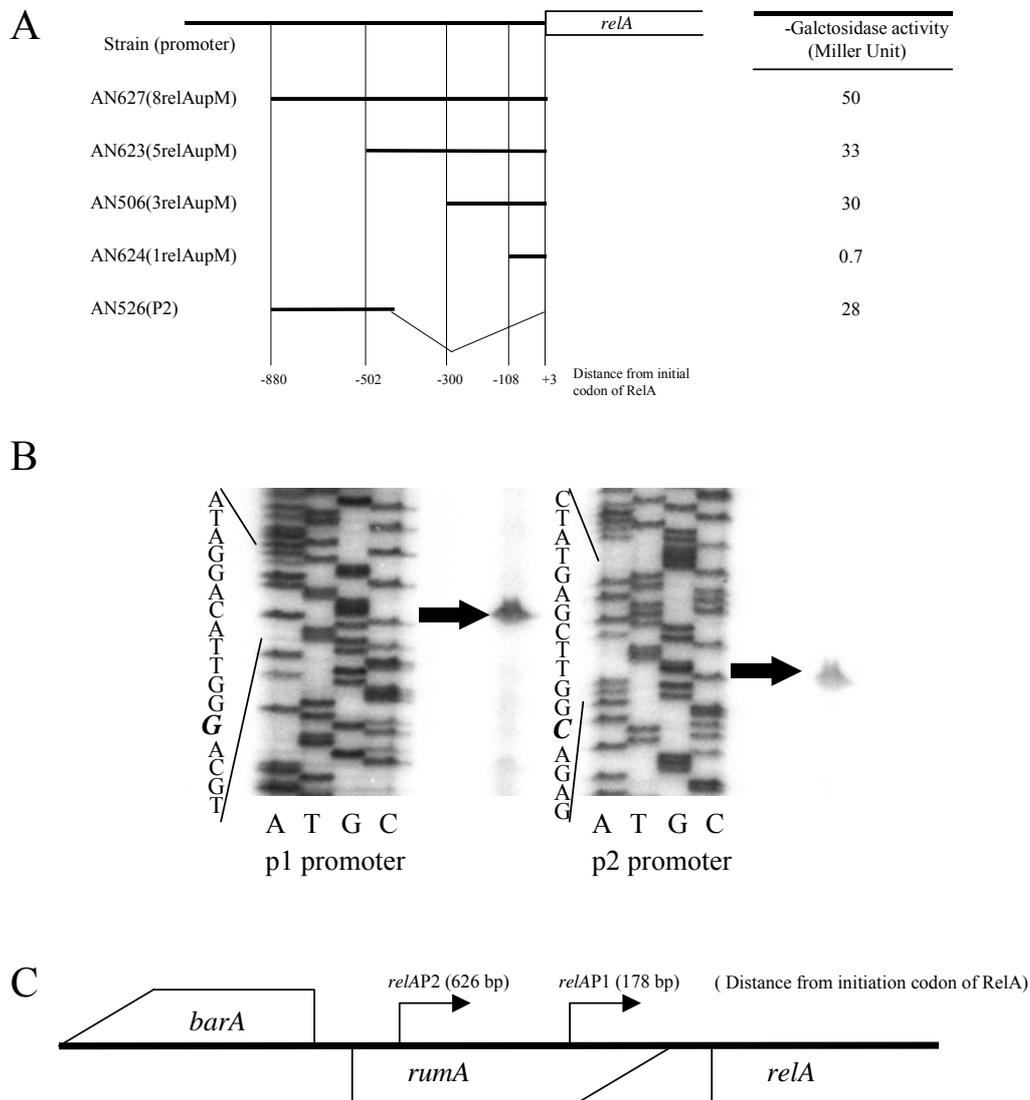


図 5. *relA* 遺伝子の転写制御領域の決定

A) *relA* の構造遺伝子上流域 880 bp を順次欠失させたときの転写活性を LacZ 活性によって測定した結果を示す。+1 は *relA* 開始コドン ATG の A の位置を示す。菌体は over-night 培養液を 500 倍に薄めて 50 mL LB にて 15 時間培養したものをを用いた。LacZ 活性は Miller のプロトコルに従い測定した (Miller, 1972)。B) プライマー伸張法による *relA* 転写開始点の決定を示す。菌体は AN582 を over-night 培養液を 500 倍に薄めて 25 μ g/mL のアンピシリンを含んだ 50 mL LB にて OD₆₀₀=1.5 の時に培養したものをを用いた。p1 に関しては pr3M、p2 においては pr35 のプライマーを用いた。C) 同定した *relA* の 2 つのプロモーターの位置関係を図で示す。*rumA* は *relA* の開始コドン上流 47 bp に終止コドンを持ち、23S リボソーム RNA メチル化酵素をコードしている (Agarwalla et al., 2002)。

relAの発現にはrumA上流域及びrumAとrelAの間のnon-coding領域はほとんど寄与しない。

rumA-relA 間 47 bp における転写活性は殆どなかった(図 5A)が、この領域にはパリンδροームが存在していた。パリンδροームは転写制御因子の認識や転写の終結に関与していることが知られており、この領域に転写活性がなくとも、*relA* の発現に対して負の制御をしている可能性が考えられた。そこで、図 5 で同定したプロモーター以外に *relA* の転写を制御している領域を探索すべく、図 6A に示すような 3 つの領域、RelA 開始コドン上流 880 bp ~ RelA 開始コドン(8M)、~ RumA 終止コドン(8Y)、~ RelA110 番目のコドン(8I)の各領域を *lacZ* に融合させ、LacZ 活性を測定した(図 6B)。8M と 8I の LacZ 活性はほぼ同じであったことから、*relA* 構造遺伝子の N 末側には *relA* の転写を制御するエレメントは存在しないことが示唆された。一方で、8Y では 8M に比べその活性がおよそ 30% 増していた。このことは RumA の終止コドンから RelA の開始コドンまでの間に *relA* の転写を負に制御しているエレメントが存在していることを示唆している。しかし、その原因についてはわかっていない。いずれにせよ、2 つのプロモーターの転写活性を等価に研究するには *rumA-relA* 間の領域は不必要であると考え、今後特に断りがない限りは *relA*P1 の転写活性は RelA 開始コドン上流 300 bp ~ *rumA* の終止コドンまでの領域が持つ転写活性と定義する。

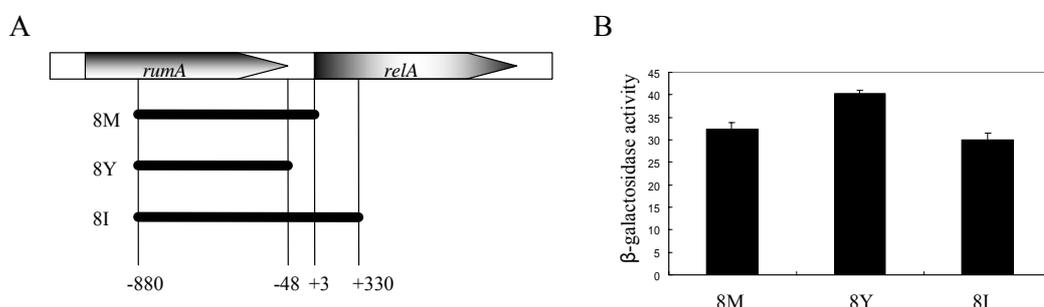


図 6. *rumA-relA* 間の *relA* の転写に対する影響

A) 実験で検討した領域を示す。8M は RelA 開始コドン上流 880 bp ~ RelA 開始コドンの領域、8Y は RelA 開始コドン上流 880 bp ~ RumA 終止コドンの領域、8I は RelA 開始コドン上流 880 bp ~ RelA110 番目コドンまでの領域を示している。それぞれの領域は operon 様に *lacZ* と融合させた。B) LacZ 活性の測定結果を示す。菌体は 2mL LB でコロニーから一昼夜培養したものを測定した。本実験に限り、5 つの独立した株の測定値の平均をその領域の LacZ 活性とした。

図 5 で同定した 2 つのプロモーターはいずれも *rumA* 構造遺伝子内に存在している(図 5C)。更に *relA* と *rumA* は 47 bp しか離れていないことからこの 2 つの遺伝子はオペロンを組んでいる可能性が考えられた(Marianocsky et al., 2001)。そこで、*rumA* の

上流域の転写活性が *relA* の発現に及ぼす影響について検証した、実験は *rumA* の上流に逆向きに位置する *barA* (図 7A) の開始コドンから *rumA* の開始コドンまでの領域 (仮に p3 と呼称する、図 7A) を *lacZ* に融合させた株 (AN516) の LacZ 活性を測定することにより行った (図 7)。その結果 *relAP1*、*relAP2*、p3 の転写活性合計に対する p3 の転写活性の占める割合は 1/10 以下であった。また AN516 株は X-Gal を含有した LB プレート上ではほぼ白色を呈し、LacZ 活性を殆ど持たないように見えた。以上の結果から p3 の *relA* の発現に対する影響は *relAP1*、*relAP2* に比べ低いといえる。よって *relA* の発現に対する研究は *relAP1*、*relAP2* に絞って行うこととした。

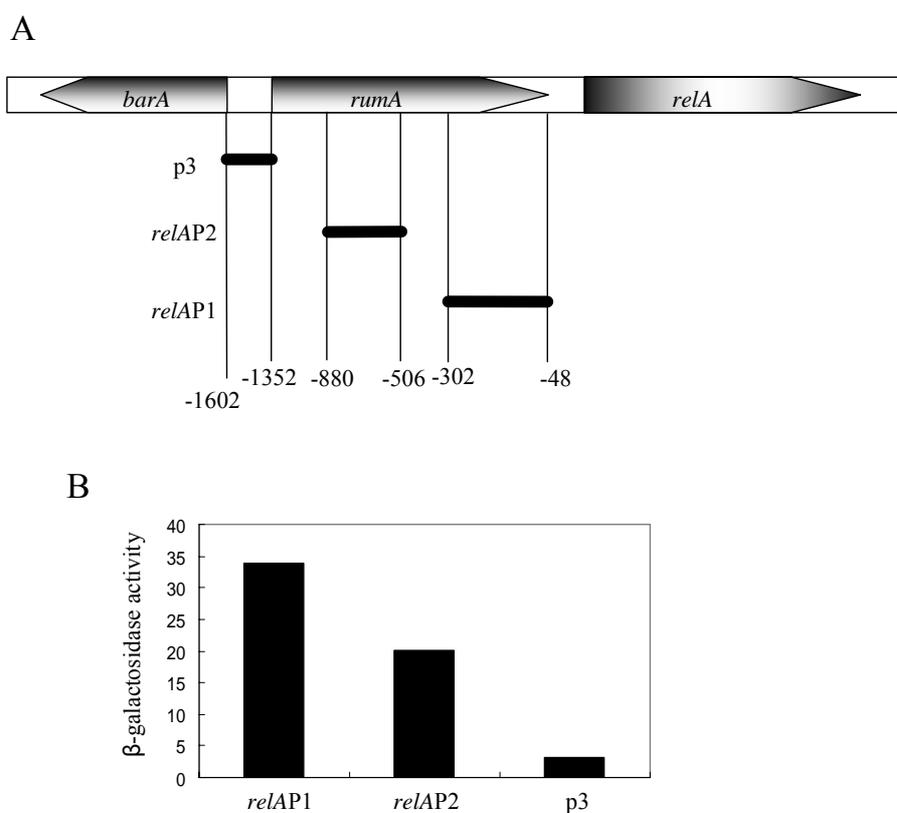


図 7. *rumA* 上流域の *relA* の転写に対する影響

A) 実験で検討した領域を示す。p3 は *RumA* 開始コドン ~ *BarA* 開始コドンの領域を示している。それぞれの領域は operon 様に *lacZ* と融合させた。図内の数字は *RelA* 開始コドンからの距離を表している。B) LacZ 活性の測定結果を示す。*relAP1*-*lacZ* を持つ株 (AN525)、*relAP2*-*lacZ* を持つ株 (AN526)、p3-*lacZ* を持つ株 (AN516) を一昼夜前培養した後、500 倍希釈して 15 時間 50 ml LB 培地で培養後菌体を回収し、LacZ 活性を測定した。

relAP1 およびrelAP2 の転写制御エレメントの同定

relAP1、*relAP2* に対する転写開始点が同定でき(図 5B)、そこから得られた配列情報(図 8A)から各々の転写制御機構を推察した。大腸菌のRNAポリメラーゼサブユニットの中で 因子はそのプロモーター認識を司っており、中でも ⁷⁰はハウスキーピングな遺伝子の発現に重要であることが知られている(Baumberg, 1999)。⁷⁰は転写開始点上流 10 bpと 35 bpに明瞭な 6 bpの共通配列を持ち、-10 共通配列はTATAAT、-35 共通配列はTTGACAである(Hawley and McClure, 1983, Dombroski et al., 1992)。*relAP1*、*relAP2* ともに転写開始点上流 10 bp付近に明らかな ⁷⁰認識-10 配列が存在していたが、明瞭な-35 配列は見つからなかった(図 8A)。⁷⁰に依存した遺伝子の中には-35 配列に共通配列を持たないものも存在しており(Baumberg, 1999)、*relA*の2つのプロモーターもこのケースに相当するものと考えられた。そこで、この2つのプロモーターにおける-10 配列および本来ならば-35 共通配列が存在する場所の配列が、それぞれの転写活性に対して機能的であるか否かを検証すべく、この領域に変異を入れたDNA断片を作製した(図 8A)。それらのDNA断片を*lacZ*と融合させ、*LacZ*活性を指標に変異の影響を調べた(図 8B)。その結果、まず、*relAP1* プロモーターの-10 配列を *Sma*I認識部位に置き換えた変異は野生型*relAP1* の転写活性に比べその活性を著しく低下させた(図 8B、P1m10)。同様に*relAP2* の-10 配列を *Bam*HI認識部位に置き換えた変異は野生型*relAP2* の転写活性に比べその活性を著しく低下させた(図 8C、P2m10)。以上の結果から*relAP1*、*relAP2* ともにその-10 配列は転写活性に必須であり、恐らくはどちらのプロモーターも ⁷⁰に依存していると考えられる。一方で、*relAP1*、*relAP2* ともに明瞭な-35 領域の共通配列を持たないにもかかわらず、その変異は転写活性を著しく低下させた(図 8B:P1m35、図 8C:P2m35)。この結果は少なくともこの領域は*relAP1*、*relAP2* の転写活性に必須であり、どちらも ⁷⁰によって制御されていると仮定すると、-35 配列として機能していると可能性も考えることができる。以上の結果から、-10 配列の共通配列に対する類似性および転写活性に必須であるという特性から*relAP1*、*relAP2* は ⁷⁰によって制御されている可能性が示唆された。転写開始点上流 25 領域に変異を入れた株も同時に作製したが(図 8A、P1m25、P2m25)、驚いたことに*relAP1* で約半分程度、*relAP2* では 80%も転写が抑制された。このことは、-25 領域もそれぞれの転写に重要であることを示唆しており、⁷⁰によって認識されるプロモーターには既知の-10 配列、-35 配列以外にも転写に重要なエレメントが存在する可能性がある。

続いて、配列解析により、*relAP1* 付近には A(アデニン)、T(チミン)に富んだ UP-element 様の配列が見つかった。UP-element は rRNA や tRNA、アミノ酸合成に関連した遺伝子群のプロモーターに見られる配列であり、その多くは構成的に発現する(Paul et al., 2004)。また、UP-element は RNA ポリメラーゼの サブユニットに直接認識され、その結合も確認されている(Estrem et al., 1999)。*relAP1* における UP-element

様の配列が転写活性に影響を及ぼしている可能性が考えられたので、その 3'側半分
の配列を C(シトシン)に置換した DNA 断片を作製し(図 8A:P1mAT)、*lacZ* と融合さ
せ、LacZ 活性を測定することにより、UP-element に対する変異の影響を観察した(図
8B:P1mAT)。その結果、予想通り UP-element 様の配列に対する変異は *relAP1* の転
写活性を著しく低下させた。このことは *relAP1* の UP-element が機能を持っていること
を示唆している。-10、-35 領域の解析結果とあわせて考えると、*relAP1* は少なくとも
UP-element、-10 配列、-35 領域の配列を持ってはじめてプロモーターとして転写活性
を呈することができるといえる。

relAP2 付近には CRP 認識共通配列様の配列が見つかった。CRP 結合配列は転写
開始点上流 61.5 bp にその中心が位置すると最も強い転写の活性化を促すことが知ら
れている(Ebright, 1993、第 2 章序論を参照のこと)。*relAP2* における CRP 認識共通配
列様の配列も転写開始点上流 60.5 bp に位置しており、最適な位置と非常に近い場所
に存在していることから、CRP による直接的な転写の活性化が強く疑われた。よって
relAP2 の CRP 結合共通配列様配列の 5'側を *Bam*HI 認識部位と置換した DNA 断片
を作製し(図 8A:CRPdown)、*lacZ* と融合させ、LacZ 活性を指標に CRP 結合共通配
列様配列に対する変異の影響を観察した(図 8C:CRPdown)。その結果、CRP 結合共
通配列様配列に変異が入った株では LacZ 活性がほとんど失われていた。このことは
relAP2 の CRP 結合共通配列様配列がその転写活性に必須であることを示唆しており、
relAP2 の転写活性が CRP によって直接的に活性化されることが考えられた。*relAP2*
の CRP による制御は第 2 章で詳しく述べる。

ここで、*relAP1*、*relAP2* について大腸菌の生育に応じた発現様式を観察した。一般的に mRNA の観察には Northern blot 法が用いられるが、本研究では *relA* の mRNA は明瞭には観察できなかった。その原因は不明であるが、*relA* の mRNA は観察されにくいことが報告されている (Bochkanov et al., 1983)。そこで、プライマー伸張法を用いて *relAP1*、*relAP2* 特異的に生産される mRNA を定量的に観察することを試みた (図 9B)。プライマー伸張法による mRNA の定量的な観察は、例えば *mazEF* の様に有効であることが示されている (Marianocsky et al., 2001)。実験は野生株 W3110 におけるトータル RNA を生育に応じて回収し (図 9A)、図 5B の実験と同じプライマーを用いて逆転写を行った。その結果、*relAP1* からの転写産物は生育を通じてほぼ一定であったのに対し、*relAP2* からの転写産物は生育の初期、すなわち対数増殖期では殆ど観察されなかったが、 $OD_{600} = 1.0$ の時に一過的に見られ、定常期以降は再び殆ど観察されなくなった。以上の結果から *relAP1* は constitutive なプロモーターであり、*relAP2* は transient なプロモーターであることが判明した。尚、これらの特異的なバンドは *rumA* の欠失株 (AN682) では見られなかったことから (図 9B: lane 7)、*relA* の mRNA を観察していると考えられる。

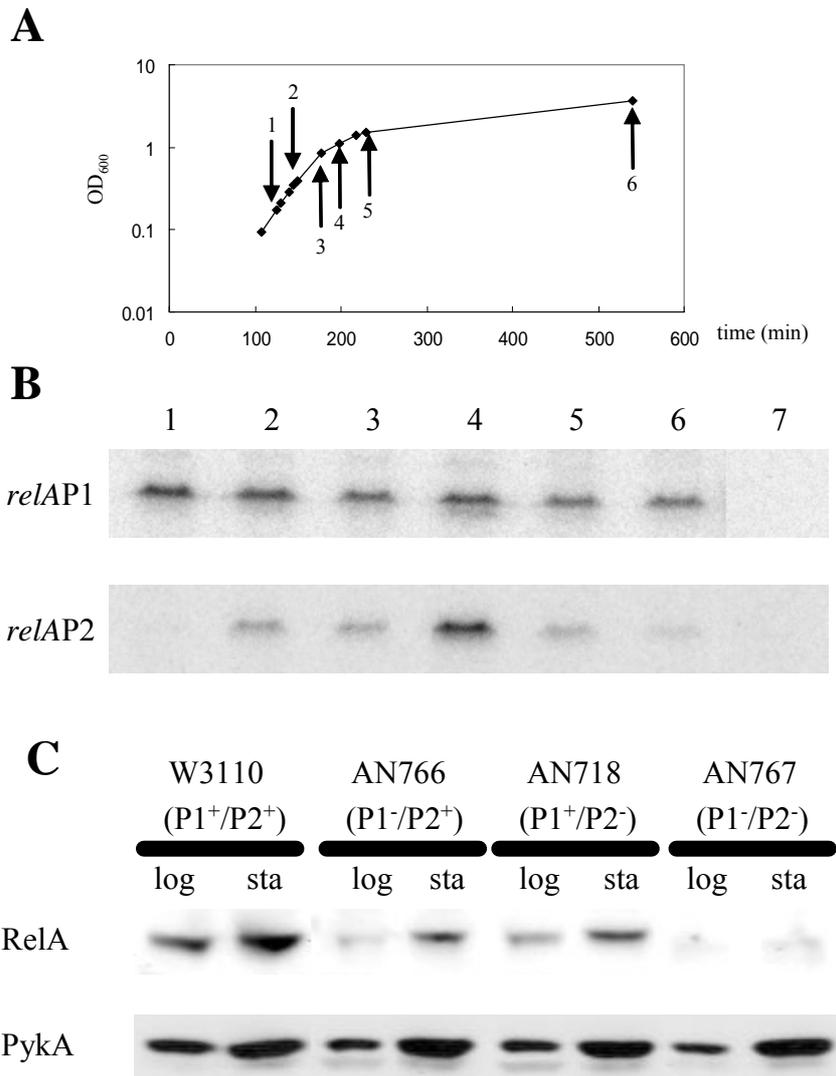


図9 生育時期ごとの *relAP1*、*relAP2* からの mRNA 量と RelA タンパク質量

A) サンプルしたタイミングと生育状況を示す。over-night培養した各株を 1000 倍希釈して 800mL LB にて生育させ、各サンプリングポイントで菌体を回収した。矢印はサンプリングポイントでB)のlane番号に対応している。それぞれの番号における回収時吸光度はそれぞれ 1, OD₆₀₀ = 0.2; 2, OD₆₀₀ = 0.4; 3, OD₆₀₀ = 0.8; 4, OD₆₀₀ = 1.0; 5, OD₆₀₀ = 1.5; 6, OD₆₀₀ = 3.5 である。B)プライマー伸張実験をプロモーターごとに行った結果を示す。lane番号はA)のサンプリングポイントに対応している。また、lane 7, *rumA* 欠失株 (OD₆₀₀ = 1.5) から回収したtotal RNAを鋳型としてプライマー伸張実験を行った。C) 野生株、*relAP1* 変異株、*relAP2* 変異株、*relAP1-relAP2* 二重変異株における対数増殖期及び定常期のRelAタンパク質量をウェスタンブロットング法で測定した結果を示す。内部コントロールとしてPykAタンパク質に対するウェスタンブロットング法も同じ膜で行った。logは対数増殖期を意味しており、OD₆₀₀ = 0.4 で回収した。staは定常期を意味しており、OD₆₀₀ = 2.5 で回収した。各サンプルはOD₆₀₀の値で標準化している。

各プロモーターの転写活性とRelAタンパク質量の関係について

relA の 2 つのプロモーター活性はその発現時期に違いがあるが(図 9B)、その違いが RelA タンパク質の量にどのように影響があるかを調べた。野生株 W3110 のゲノム上の各 *relA* プロモーターの-10 配列を図 8A に示したように変異を入れた株を作製し、その菌体内の RelA タンパク質量を Western blot 法により定量することを試みた(図 9C)。プロモーター変異株は相同組み換え、致死遺伝子、高温感受性の origin を持つプラスミドを利用した pKO3 システムにより作製した(Link et al., 1994)。RelA の同定にはマウス由来の抗 RelA 血清を用いた(名古屋大学、饗場浩文助教授による)。その結果、野生株で RelA は対数増殖期より検出され、定常期に蓄積することがわかった(図 9C 上段: W3110)。同様の傾向は *relAP1*、*relAP2* のうちどちらかが転写活性を持っている場合(AN766 及び AN718)にも見られた(図 9C 上段: AN766、AN718)。しかし、その量は野生株に比べシグナルが半分程度弱く、このことは定常期における十分な RelA の集積には両方のプロモーターの転写活性が必要であることを示唆している。また、両方とも転写活性を持っていない株(AN767)では、RelA 自体ほとんど検出されなかった(図 9C 上段: AN767)。これは RelA の発現は *relAP1*、*relAP2* がそのほとんどを制御していることを示唆するものであり、少なくともこの条件下において、*relA* の主要なプロモーターは *relAP1* と *relAP2* の 2 つであると考えられる。更に対数増殖期における RelA の量は AN718 の方が AN766 よりも多いが定常期ではほぼ等しいことから、対数増殖期では *relAP1* が、定常期では両方のプロモーターが RelA タンパク質の合成に寄与していることがわかった。尚、本実験は内部標準としてピルビン酸キナーゼ である PykA のウェスタンブロットティングを同じ膜上で行っている。PykA もまた定常期に集積する傾向が見られたが、その傾向は各株間でほぼ同じ結果であった(図 9C 下段)。

RelAタンパク質はLB培地でのppGppの合成にほとんど関与していない可能性がある。

relA の各プロモーターの転写活性が RelA タンパク質の集積に関与していることがわかった(図 9C)。RelA タンパク質は ppGpp 合成酵素であるので(序論参照)、*relA* の転写制御が ppGpp 量にどのように関わっているかを検証することにした。ここまで述べてきた *relA* の発現の特性は全て LB 培地での結果であり、ppGpp 量も LB 培地での測定を試みた。まず、初期の条件検討として RelA の ppGpp 量に対する寄与を観察した。実験は LB 培地に 1 mCi/mL の 32-P orthophosphate を加えた培地で野生株(W3110)および *relA* 変異株(AN106)を生育させ(図 10A)、時間を追って菌体を回収し、ギ酸抽出物を薄層クロマトグラフィーに展開することによって行った(図 10B)。AN106 株の持つ *relA251* アリルは緊縮応答しない *relA* 変異として知られアミノ酸飢餓時に ppGpp が集積しないが(Metzger et al., 1989)、LB 培地では野生株とほぼ同一の生育を示し

た(図 10A) . 野生株において ppGpp は定常期に移行してから明瞭な集積が観察された(図 10B: W3110) . *relA* 変異株においてもほぼ同様の結果が得られた(図 10B: *relA251*) . このことは RelA が LB 培地での ppGpp 集積にほとんど関与していない可能性を示唆するものであり、*relA* の各プロモーターの ppGpp 量に対する影響をこの実験系では観察することができないことを意味している . よって本研究では LB 培地での *relA* のプロモーターの ppGpp 量に対する寄与を検証することは断念した .

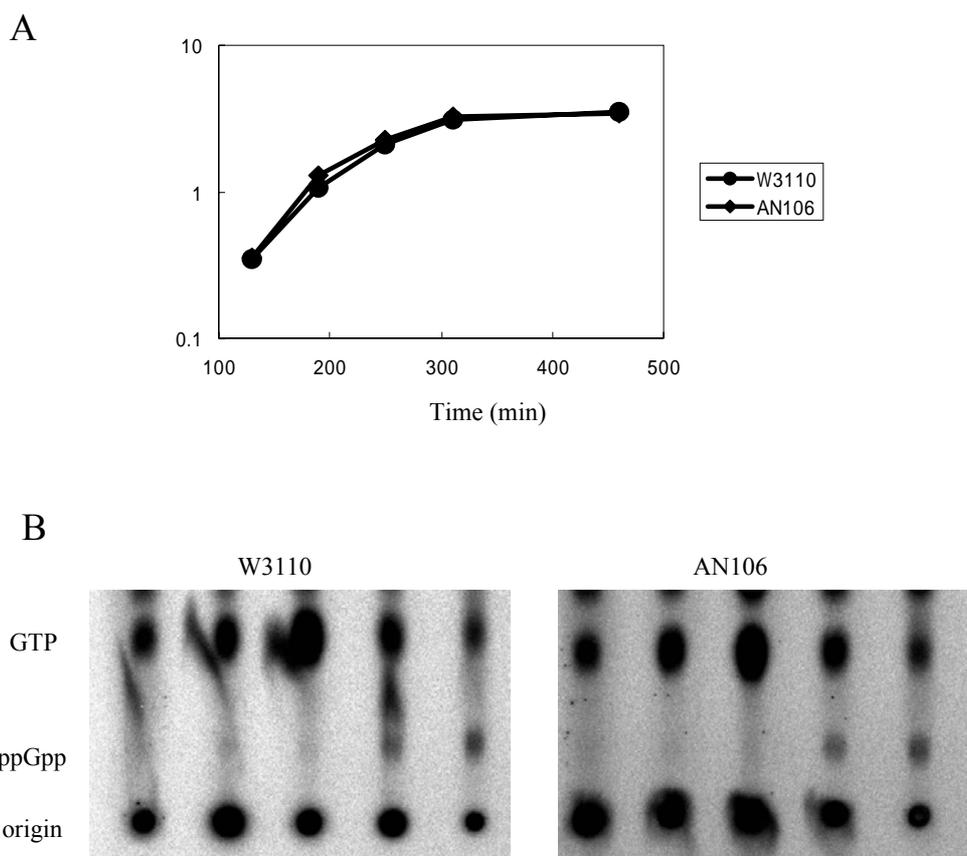


図 10 LB 培地で大腸菌を生育させたときの ppGpp 量とそれに対する RelA タンパク質の寄与

A) サンプリングしたタイミングと生育状況を示す . 一昼夜培養した野生株 (W3110) , *relA* 変異株 (AN106) を 100 倍希釈して 0.1mCi の [32-P]orthophosphate を含む 2mL LB にて生育させ、各サンプリングポイントで菌体を回収した . 菌体はそれぞれ $OD_{600} = 0.35, 1.0, 2.0, 3.0, 3.5$ の時の 5 ポイントで回収した . 四角は W3110、ダイヤは AN106 の結果を示している . B) ギ酸抽出物を薄層クロマトグラフィーで展開させた結果を示す . 左が野生株、W3110 の場合で右が *relA* 変異株、*relA251* の場合である . 展開するギ酸抽出物の量は $OD_{600} = 0.35$ の時のサンプル 5 μ l 分を基準に OD_{600} の値で標準化した . ppGpp、GTP の位置は ppGpp 過剰産生株 (AN155) および ppGpp ヌル株 (CF1678、Xiao et al., 1991)、更には Izutsu らの論文を参考に同定した (Izutsu et al., 2001) .

考察

本研究では既に報告のあるプロモーター (Metzger et al., 1988) を含む 2 つの *relA* のプロモーターを検出した (図 5) . *relAP2* は、今回発見した新しい *relA* のプロモーターであった . *relAP2* の転写開始点は RelA 開始コドン上流 626 bp と比較的離れた位置に存在していたが (図 5B, C)、RelA の開始コドンまでの領域で典型的なシャインダルガルノ配列を含む ORF は認められなかった . 更に *relAP2* の不活化は RelA タンパク質の集積を減少させたことから (図 9C; AN718)、*relAP2* が *relA* のプロモーターであると結論付けられた .

relA の上流に同じ向きで存在する *rumA* のプロモーター領域は *relAP1*、*relAP2* よりも活性は非常に弱く、*relA* の発現に対する寄与は少なかった (図 7) . よって、*relA* は *rumA* とオペロンを形成しているかもしれないが、その制御は LB 培地下では *relA* に対して重要ではないと考えられる . RumA は 23S リボソーム RNA のメチル化酵素であるが (Agarwalla et al., 2002)、*barA-rumA* 間の転写活性は Miller Units で 3 程度と極めて低く (図 7)、LB 培地下ではほとんど発現していないと考えられる . *rumA-relA* 間には *relA* の転写を下げるエレメントが存在していたが (図 6)、その効果は *barA-rumA* 間と同様に *relA* の発現に対して大きなものではなかった . *relAP1* 及び *relAP2* の二重変異株 (AN767) 内では RelA タンパク質がほとんど観察されなかったことと (図 9C) あわせて考えると、*relA* の転写は、*relAP1* と *relAP2* に大きく依存していると判断した . しかし、本章の実験は全て LB 培地で行われたものであり、異なった条件下では、*rumA-relA* 間や *barA-rumA* 間の領域が *relA* の転写に大きく影響する可能性は十分に考えられる .

2 つのプロモーターは ⁻⁷⁰によって認識されることが示唆されたが (図 8)、明瞭な -35 共通配列は見つからなかった (図 8A) . しかし、-35 領域に変異を入れると転写活性が著しく減少し、更に特に ⁻⁷⁰の認識に関係があるという報告のない -25 領域の変異も、どちらのプロモーターに関しても転写を減少させた (図 8) . ⁻⁷⁰のプロモーター認識機構は主に *lacUV5* プロモーターといった比較的強い転写活性を持つプロモーターで研究されているが (Jeong and Kang 1995, Owens et al., 1998 など)、*relA* の両プロモーターの転写活性は非常に弱い . よって *relA* の各プロモーターで観察された、コンセンサスと大きく異なる -35 配列や -25 領域の配列が転写活性に影響を及ぼすという現象は、転写活性の弱さゆえに観察されたのかもしれない . すなわち、弱い転写活性のプロモーターの場合、-10 配列や -35 配列以外に 25 領域を含むプロモーター領域全体が ⁻⁷⁰のプロモーター認識に影響を及ぼしているかもしれない . もしそうであるならば、こうした知見は、配列からのプロモーター予測や転写活性の強度調節の研究に重要なデータとなりうると思われる . しかし、導入した変異は、PCR によるチェックが容易なパリ

ンドロームである制限酵素認識配列であるため、アーティファクトである可能性も否めない。いずれにせよ、今後は、ポイント変異等の更なる研究が必要である。

また、*relAP2* には-16-TG--15 という配列がある(図 8A; 下段)。この位置に存在する TG は TG モチーフと呼ばれ、⁷⁰ に依存的なプロモーターで報告があり (Keilty and Rosenberg., 1987)、⁷⁰ の結合を促進する配列である。よって *relAP2* もこの TG モチーフがその転写活性に影響を及ぼしているかもしれない。

relAP1 は生育を通じて一定の発現を呈していたが、*relAP2* は一過的に菌体にストレスがかかり始める生育相移行期に発現していた(図 9B)。*relAP1* 付近には、stable RNA (tRNA や rRNA) をコードしている遺伝子群に多く見られる UP-element が見つかった (Paul et al., 2004, 図 8A)。*relAP1* の生育を通しての転写活性は、トータル RNA を基準に観察されたが(図 9B、上段)、トータル RNA の中には 90% 以上の stable RNA が含まれており、その結果として構成的に発現しているように観察されたと考えられる。一方で *relAP2* は、ストレス応答の始まる生育相移行期に一時的に活性化されており(図 9B、下段)、*relAP2* はストレス誘導型のプロモーターであると考えられる。このような両 *relA* プロモーターの特性の違いは、RelA タンパク質の制御に反映されており、対数増殖期の RelA 量には *relAP1* が主として寄与しており、定常期では両方のプロモーターが寄与していた(図 5C)。以上の結果から、*relAP1* は基本的な RelA 量を規定するプロモーターで、*relAP2* はストレスに呼応した RelA の集積に寄与していると推察できる。

定常期で *relAP2* の転写活性が下がっているにもかかわらず(図 9B 下段)、RelA の集積が野生株と AN718 において、定常期に向けて集積するのは(図 9C)、恐らく RelA タンパク質の安定性か *relA* mRNA の転写後制御が対数増殖期と定常期で異なることに起因していると考えられる。すなわち RelA または *relA* mRNA の安定性か翻訳効率が生育相移行期以降で増すのかもしれない。いずれにせよ、ppGpp 量制御の完全理解のためには、今後研究をしなければならないテーマである。

relA は 2 つのプロモーターにより複雑な転写制御を受けているが、野生株と *relA* 変異株で ppGpp 量に違いは見られなかった(図 10)。この時検出された ppGpp は、SpoT 由来のものであると考えられ、LB 培地下での ppGpp の合成は、SpoT に依存していると考えられる。しかし、*relA* 変異株でないと *spoT* を破壊できないことから (Xiao et al., 1991) から、この条件下で RelA が機能的であることは間違いない。よって、本実験で検出できない程度の差が存在している可能性が考えられる。こうした考察から *relAP1*、*relAP2* の ppGpp 量に対する寄与を観察するために、今後は HPLC 等のより精度の高い実験系による検証が必要だと思われる。また、*relA* の転写が、^E、^H といった環境応答に重要な 因子ではなく、ハウスキーピングな ⁷⁰ によって制御されていることは、環境が変化する前の段階で応答するための準備を行っている可能性が考えられる。そのように考えると、LB 培地下における RelA は、将来大腸菌が遭遇する、アミノ酸飢

餓をはじめとする栄養源枯渇ストレスに応答するppGpp合成を、SpoTは生育に必要な基本レベルでのppGpp合成を担っているのかもしれない。

今回の研究では、*relA* が複雑な転写制御を受けているにもかかわらず、その生理学的な意義を見出すことができなかったが、2つの特性の異なるプロモーターによって制御されているということは、何らかの意味があると考えられる。今後は、例えば、宿主の腸内における挙動といった、より自然な状態で、まだ研究の進んでいない環境下での研究に発展させたいと考えている。

第二章

CRP による *relAP2* の転写制御

I. 序論

グルコース飢餓とCRP

大腸菌は、グルコースを含む複数種類の糖が培地中に存在するとき、グルコースを消費してから別の糖を利用して生育する (Loomis and Magasanik, 1967) . よってグルコース存在下では、グルコースを消費するための代謝ネットワークや遺伝子群の発現制御を実現しており、一方で、グルコース以外の糖代謝に必要な遺伝子群、酵素は発現や活性を抑えられる . こうしたグルコース存在下で見られるさまざまな制御を総じて、グルコース効果と呼ぶ (Meadow et al., 1990) . 例えば、グルコース分解に関わっている phosphotransferase system (PTS) 内の酵素群は、リプレッサー Mlc が DNA に結合できないことによって、その遺伝子の転写が活性化され、また、ラクトースやマルトースなどの、グルコース分解に不要な糖分解酵素をコードしている遺伝子群は、それぞれ特異的なリプレッサーによってその発現を抑えられている (Plumbridge, 1998, Tanaka et al., 2000, Gilbert and Muller-Hill, 1966, Reidl et al., 1989) . グルコース効果はグルコースの枯渇で見られなくなる . グルコース飢餓下の転写レベルの応答において最も中心的な役割を果たしているのが、cAMP と転写調節因子 cAMP receptor protein (CRP) である . CRP は cAMP と結合することにより構造変化を引き起こされ、その DNA 結合活性及び特異性を増大させる (Shabb and Corbin, 1992) . こうして生成した cAMP-CRP 複合体は、現在までに様々な生命現象に関わっていることが示されているが、cAMP のみ、CRP のみの効果はほとんど報告されていない (Kolb et al., 1993) . よって、本論文では cAMP-CRP 複合体を単に CRP、cAMP が結合していない CRP をフリーの CRP と呼ぶ . CRP がグルコース飢餓下で機能する例をグルコースとラクトースの diauxie において説明する (Siebold et al., 2001, 図 11) . グルコースが培地中に存在しているときは、リン酸化型 IIA のリン酸基は、大腸菌の膜上にあるグルコーストランスポーターは (ICB^{Glc}) に渡され、グルコース 6 リン酸の生成に用いられるが、培地中のグルコースが枯渇すると、リン酸化型 IIA^{Glc} が多くなり、Cya を活性化する (Takahashi et al., 1998) . Cya は ATP から cAMP を合成する活性を持っており (Tao and Lippman, 1969)、その結果、cAMP が蓄積し、フリーの CRP が活性化される . CRP は、ラクトースオペロンの制御領域に結合することができるが、ラクトースオペロンのリプレッサーである LacI の影響で転写は活性化されない . グルコースが存在する時は脱リン酸化型 IIA^{Glc} がラクトーストランスポーターに結合し、ラクトースの取り込みを阻害しているが、グルコースを

消費した後のリン酸化型 IIA^{Glc} は、ラクトーストランスポーターに結合することができず、結果ラクトーストランスポーターがラクトースを取り込めるようになる。菌体内にラクトースが入り込むとその異性体であるアロラクトースが蓄積し、アロラクトースが LacI に結合する。アロラクトース- LacI 複合体はDNA結合能を持っておらず、ラクトースオペロンの制御領域から解離し、CRPによる転写の活性化が行われる (Inada et al., 1996)。このようなグルコース飢餓下におけるCRPによる発現制御は、多く報告されており (例えば、Richet et al., 1991、Taniguchi et al., 1979、Fraser and Yamazaki, 1980)、また、糖代謝遺伝子群のみならず、アミノ酸合成酵素 (Lim et al., 1994)、鞭毛合成系 (Soutourina et al., 1999) 等、200 以上の遺伝子発現調節に関わっている。

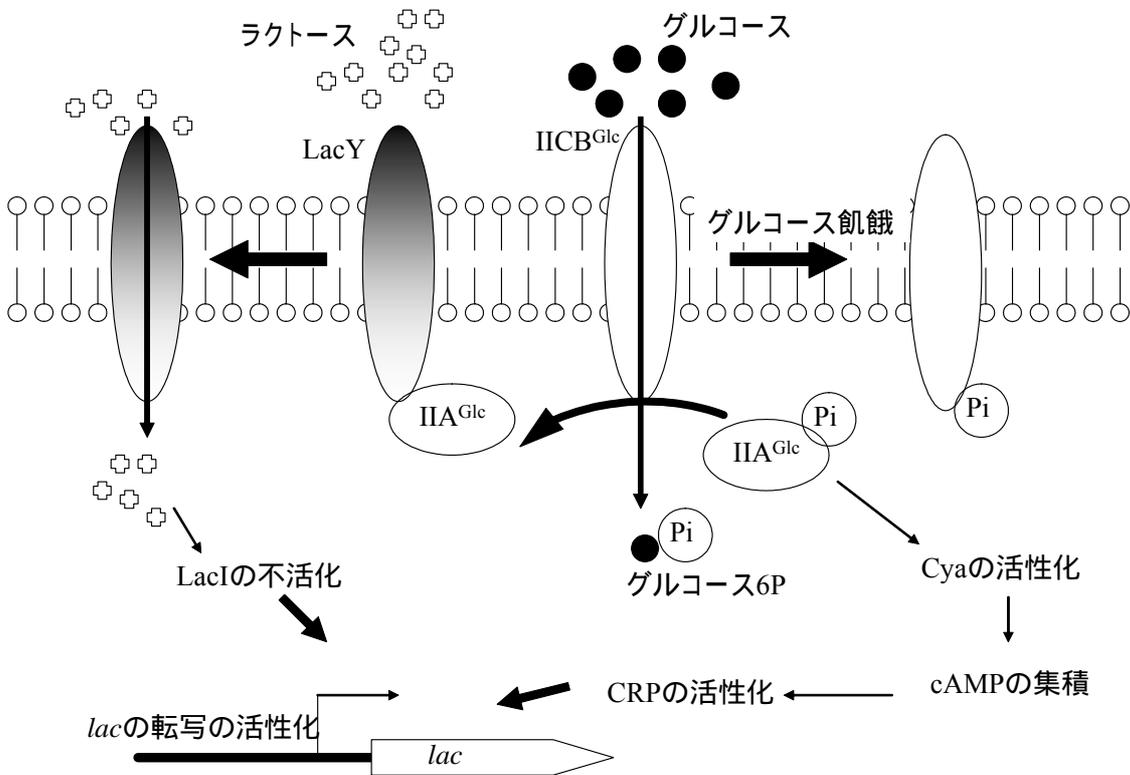


図 11 グルコース-ラクトースの diauxie における *lac* オペロン誘導過程

リン酸化型 IIA^{Glc} のリン酸基はホスホエノールピルビン酸由来のもので、グルコースが枯渇するとリン酸基を渡す相手がなくなり、その結果、 IIA^{Glc} に結合したままの状態になり、Cyaを活性化することができるようになる。活性化したCyaはcAMPの集積を引き起こし、ひいてはCRPを活性化する。一方で、リン酸化型 IIA^{Glc} はLacYに結合することができず、LacYはラクトース取り込み活性を持つようになる。取り込まれたラクトースはLacIを不活化し、先の活性化されたCRPの影響により転写が誘導される。

CRPによる転写制御

CRP は二量体を組み、左右対称的な共通配列、aaaTGTGA-tctaga-TCACA-ttt を認識する。大文字で示した配列は保存性が高く、小文字で示したものはあまり保存性がないが、CRP の DNA に対する親和性に影響を及ぼしている配列である (Berg and von Hippel, 1988, Ebright et al., 1989)。

CRPによる転写の活性化は、転写開始点からの距離やRNAポリメラーゼ(RNAP)との相互作用形式によって3つのクラスに分類されている(図12)。Class Iに属するCRP依存的なプロモーターの多くは、そのCRP結合配列が転写開始点上流61.5 bpを中心とするように存在している(図12)。CRP結合配列が、66.5 bpに位置するような人工的なプロモーターの場合、CRPによる転写の活性化はほとんど見られないが、DNA螺旋のおよそ1回転分典型的な位置から離れた71.5 bpに位置した場合には、転写活性が61.5 bpにあるときと比べ半分に下がるものの、確実にCRPによる転写の活性化が見られる(Gaston et al., 1990)。これらのことからClass IタイプのCRPによる転写の活性化は、RNAPに対する位置と向きが重要であることがわかっている(Ebright, 1993)。61.5 bp以外には71.5 bp、82.5 bp、93.5 bpでClass IタイプのCRPによる転写の活性化が報告されている(Busby and Ebright, 1999)。Class IIにおいて、その転写の活性化に必須な領域は156~164番目のアミノ酸残基(AR1 と呼称されている)であり(Bell et al., 1990)、RNAP サブユニットのC末端側領域(-CTD)に直接結合し、転写を活性化することが知られている(Savary et al., 1998)。Class IIに対して、Class IIタイプのCRPによる転写の活性化は、ガラクトースオペロンのP1 プロモーター(*galP1*, Gaston et al., 1990)などに見られ、それらのCRP結合部位は、転写開始点上流41.5にその中心が位置している(図12:中段)。この位置は⁷⁰の認識配列である-35配列とオーバーラップしており、DNAに結合したCRPに覆いかぶさるようにしてRNAPのサブユニットが結合していると考えられている(図12 中段)。Class IIにおけるCRPとRNAPの結合はClass Iと異なり、3箇所では結合している。AR1と-CTD(Zhou et al., 1994, Savary et al., 1998)、19、21、101番目のアミノ酸残基(AR2)とサブユニットのN末端側の領域(-NTD)(Rhodius et al., 1997)と52~58番目のアミノ酸残基(AR3)と⁷⁰のregion4である(Rhodius and Busby, 2000)。どの結合も重要で、一つでも欠けるとCRPによる転写の活性化は起きない。Class IIにおけるCRPの働きは、CRP-RNAP-DNAのclosed complexからopen complexへの移行を促進することにある(Niu et al., 1996)。Class IIIは、Class IとIIを併せ持ったようなプロモーターで複数のCRP結合配列をプロモーター近傍に持っている(図12 下段)。基本的なCRPによる活性化はClass I、IIと同様であるが、複数のCRPによる制御や別の転写因子の影響もあり、その転写活性化メカニズムの詳細はわかっていない。

転写の活性化だけではなく、CRP は転写を抑制する働きも持っている。ガラクトース

オペロンの P2 プロモーター (*galP2*) は、-35 と CRP がほぼ同じ位置にあり、CRP がその位置に結合すると RNAP がアクセスできなくなって結果として転写が抑制される (Rostocs et al., 2000) .

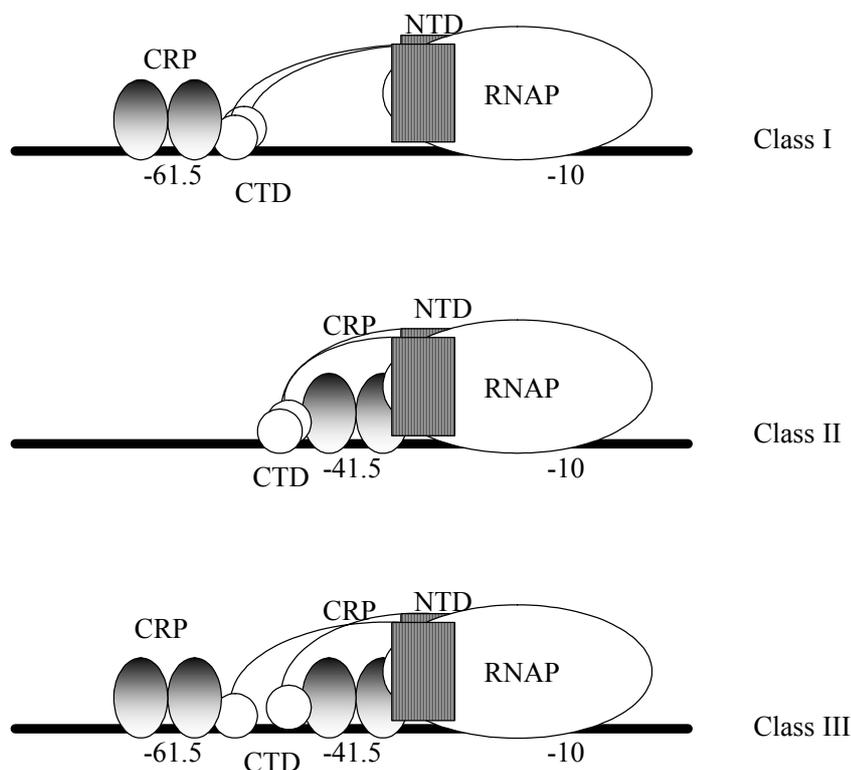


図 12 CRP による転写活性化の分類

CRP による転写の活性化は Class I ~ III の 3 つに分類される . 各 Class の RNAP との位置関係を示す . 簡単のため 、 、 は RNAP として省略した . CTD は サブユニットのカルボキシル末端側のドメイン (白丸)、 NTD は サブユニットのアミノ末端側のドメイン (縦じまの四角)、をそれぞれ表している . CRP はグラデーシオンのついた楕円で表しており、それぞれ、 Class I タイプの活性化の時は -CTD に、 Class II タイプの活性化の時は NTD に結合している . Class III タイプは Class I と Class II が合わさったような制御であり、その一例を示した . 図中の数値は転写開始点からの距離を表している .

本研究の目的

グルコース飢餓下で (p)ppGpp が蓄積するが、その集積は SpoT による効果が主であると考えられてきた (Chaloner-Larsson et al., 1978) . SpoT の (p)ppGpp の合成と分解の

スイッチングメカニズムが不明であるために、グルコース飢餓下で(p)ppGpp がなぜ蓄積するのかは、未だに明らかになっていない。一方で、最近の研究で、RelA もグルコース飢餓下における(p)ppGpp の集積に関与していることが示唆されていた (Murray et al., 2003; Traxler et al., 2006)。第一章における研究から、*relAP2* が CRP によって転写レベルで Class I タイプの活性化を受けると推測できる。よって、グルコース飢餓下で CRP が活性化し、*relAP2* の転写活性が促進され、その結果、グルコース飢餓下で *relAP2* 依存的な(p)ppGpp の集積が観測されるのではないかと考えた。そこで、本研究の目的は、まず、*relAP2* が CRP によって転写を制御されているかどうかを明らかにし、もし、それが事実であれば、グルコース飢餓下における(p)ppGpp の集積に *relAP2* における転写が関わっているかを検証することである。

II. 材料と方法

菌株

本章における研究に用いた大腸菌株を表 4 に記す.

培地

本章における研究に用いた培地を以下に示す. 必要に応じて、クロラムフェニコール 25 µg/ml、アンピシリン 50 µg/ml、カナマイシン 25 µg/ml、1 mM イソプロピルチオ D-ガラクトシド(IPTG)、50 µg/ml 5 プロモ 4 クロロ 3 インドリル D ガラクトシド(X Gal)を適宜加えた. 寒天培地はLB培地に1.5%(w/v) (ファージ調製用のソフトアガーは0.7%(w/v))の寒天をまぜ、熱した後、必要ならば各種薬剤を混和し、固まらせて作製した. 全ての培地は121 °C、20分の高圧滅菌処理を行った. また、培養は全て37 °Cで好氣的に行った.

・LB 培地(1 L あたり)

Bacto Trypton (Difco)	10 g
Yeast Extract (Difco)	5 g
NaCl	10 g

・M9-CAA 培地(1 L あたり)

Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1 g
1 mM MgSO ₄	
0.1 mM CaCl ₂	
0.2 % (w/v) カザミノ酸 (Difco)	
0.4 % (w/v) グルコース、アラビノースまたはマルトース	

・MOPS-リン酸飢餓培地(1 L あたり)

25 ml	Forty-X solution (Wanner, 1994)
1 ml	0.528 M MgCl ₂
1 ml	0.276 M K ₂ SO ₄
1 ml	0.1 M K ₂ HPO ₄
	0.4 % (w/v) のグルコースまたはマルトース

必要に応じて、終濃度 50 $\mu\text{Ci/ml}$ の PHOSPHORUS-32 (Amasham) を加えた。

表4. 研究で用いた大腸菌株とプラスミド

Name	Genotype	Reference
大腸菌株		
MC4100	(<i>argF-lac</i>)U169 <i>rpsL150 relA1 araD139 flbB5301 deoC1 ptsF25</i>	Casadaban, 1976
AN106	W3110 <i>relA251</i>	第一章
AN155	W3110 pRelA455	第一章
AN525	MC4100 (<i>P1-lacZ</i>)	第一章
AN526	MC4100 (<i>P2-lacZ</i>)	第一章
AN541	AN525 <i>crp::Kn^r</i>	^a Baba et al., 2006
AN543	AN526 <i>crp::Kn^r</i>	^a Baba et al., 2006
AN549	AN526 を pSTV29 で形質転換させた株	This study
AN550	AN526 を pSHA7 で形質転換させた株	This study
AN551	AN543 を pSTV29 で形質転換させた株	This study
AN552	AN543 を pSHA7 で形質転換させた株	This study
AN582	W3110をp8Mで形質転換させた株	第一章
AN155	W3110をpRelA455で形質転換させた株	This study
AN563	W3110 <i>crp::Kn^r</i>	^a Baba et al., 2006
AN583	AN563をp8Mで形質転換させた株	This study
AN718	W3110 P2m10	第一章
W3110	Wild type (lineage A)	Jishage and Ishihama, 1997
BL21(DE3)pLysS	F <i>ompT hsdS_B(r_B m_B) gal dcm</i> pLysS	Novagen
MAN001	BL21(DE3)pLysS transformed by pCRP-His	This study
プラスミド		
pET29b	PET システム発現ベクター	Novagen
pCRP-His	pET29b に CRP の ORF をクローニングしているプラスミド	This study
pSTV29	クローニングベクター	Takara
pCRP	<i>crp</i> が <i>bla</i> プロモーターで転写されるアリルを持つ pSTV29	^b Ishizuka et al., 1994

^aオリジナルの株からP1 ファージにより変異アリルを移した。referenceにはオリジナルな株についての文献を示している。

^bオリジナルのプラスミドpHA7からpSTV29にサブクローニングされている。

P1 ファージを用いた形質導入

P1 ファージによる形質導入は第一章と同様に行った。

relAP2CRPup-lacZを持つ株の作製

relAP2CRPup-lacZ の作製は第一章の LacZ 活性測定株の作製に準じた。*lacZ* と融合させるプロモーター配列は、5'-CGAAAACTGTGACGCTTTTCACATTCTGAAG G-3'と 5'-CCATACCGCAGAACAGATCC-3'による PCR 産物と 5'-CCTTCAGAATGT GAAAAGCGTCACAGTTTTTCG-3'と 5'-TCGACGTCAAACAATGCC-3'による PCR 産物を用いて cross-over 法により作製した (Chen and Przybyla, 1994)。

CRP-Hisの作製と精製

カルボキシル末端側にヒスチジンタグを付加したCRPタンパク質 (CRP-His) を作製す

るために、PETシステム (Novagen) を用いた。CRPのORFを増幅させるようなプライマーで、MC4100株のコロニーを鋳型としてPCRを行った。用いたプライマーは5'-GGCCA TGGTGCTTGGCAAACCGC-3' と5'-CCCTCGAGACGAGTGCCGTAAACGACGATG-3' である。プライマーの5' 末端側にはクローニング用に制限酵素部位が付加してある。PCR産物は、*Nco*I、*Xho*I処理した後、同じ制限酵素で処理したpET29bにクローニングし、シーケンスにより変異がないことを確認した。こうしてCRP-Hisを発現するプラスミドpCRP-Hisを得た。pCRP-HisによってBL21(DE3)pLysSを形質転換し、MAN001を得た。CRP-Hisの精製はまず、MAN001を、25 μ g/mlカナマイシンを含むLB培地で一昼夜培養後、カナマイシン25 μ g/ml、1 mM IPTGを含む10 ml LBにて一昼夜培養した。MAN001は5000 rpm、4℃にて10分遠心して集菌し、沈殿物をTES緩衝液(50 mM Tris-HCl pH 7.9, 0.3 M NaCl, and 0.1 mM EDTA)に懸濁した。その後、MISONIX社製のAstrason XLによってレベル4で30秒超音波処理することを4回繰り返し、15000 rpm、4℃にて30分遠心して上清を回収した。ヒスチジンタグを用いた精製にはNi-NTAアガロース (Qiagen) を用いた。200 μ lのNi-NTAアガロースを詰めたカラムを調製し、50 mMイミダゾールを含むTES 1 mlで洗浄後、先に回収した菌体破砕液をカラムに注入した。50 mMイミダゾールを含むTES 1 mlで6回カラムを洗浄した後に、250 mMイミダゾールを含むTES 167 μ lで3回CRP-Hisを溶出した。回収したCRP-Hisは、SDS-PAGEで1本の特異的なバンドであることを確認した後、TESにて透析を行い、イミダゾールを除いた。タンパク質の量はBradford assay (Bio-Rad)にて定量し、終濃度400 ng/ μ lになるように調整した。

LacZ活性の測定

LacZ活性測定は第一章と同様に行った。グルコース飢餓におけるLacZ活性は、以下のように行った。AN525、AN526を2 ml M9-CAA-グルコース培地でコロニーより一昼夜培養し、100 μ lを50 ml M9-CAA-グルコース培地に植え継いだ。OD₆₀₀ = 0.2の時培養液を回収し、フィルトレーションにより、糖を含まない50 ml M9-CAA培地で2回洗浄した。その後、糖を含まない50 ml M9-CAA培地で菌体を回収し、10 mlずつにわけ、0.4 % (w/v)のグルコース、アラビノース、マルトースを別々に加え、培養を開始した。基準となるtime 0のサンプルは、新たに糖を加える前に回収し、LacZを測定した。他のサンプルは示した時間で回収し、LacZ活性を測定した。

RNAの抽出とプライマー伸張法

RNAの抽出とプライマー伸張法は第一章と同様に行った。*bla*の転写開始点同定には5'-CCAACTGATCTTCAGCATC-3'のプライマーを用いた。大腸菌の培養は、菌株(AN582、AN583、表1)を2 ml LB培地にてコロニーより一昼夜前培養を行い、そのうち800 μ lを800 ml LB-アンピシリン培地に加え、本培養を行った。

ゲルシフトアッセイ

DNA断片は、野生型、CRPdown、CRPupを含む*relAP2* をクローニングしたプラスミドを鋳型として 5' - GATGATTTTGCGCCATACC-3' と 5' - GGTTTCACACCCGCATTGACC-3' のプライマーセットでPCRを行うことにより準備した。PCR産物は*relAP2* 転写開始点上流 118 bp ~ 下流 91 bp の 209 bp である。PCR後のDNAは、アガロースゲル電気泳動法により分離し、ゲル抽出を行って、Eppendorf社製のGel Cleanup Kitにより精製した。DNAの濃度はエチジウムブロマイド染色を行い、輝度により測定した。およそ 20 µgのDNA断片をT4 ポリヌクレオチドカイネース (Takara) 及び $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ により、放射標識した。遊離の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を取り除くためにDNAをフェノール抽出、クロロホルム抽出を順次行い、エタノール沈殿後、1 M NaCl液中に溶かした。反応緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH7.9, 100 mM NaCl, 3 mM MgSO₄, 0.1 mM cAMP (Sigma), 0.1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 200 ng poly(dI-dC)-(dI-dC) (Pharmacia)) 中に 80,000 cpmのDNA断片と示したCRP-Hisタンパク質と混ぜ、37 °C、30分放置した。0.1 mM cAMPを含む5%ポリアクリルアミドゲルに反応液をアプライし、17 V/cmで電気泳動を行った。泳動後、ゲルを乾燥させ、BAS2500にて感光、解析した (BAS2500, Fuji)。

グルコースショック時の(p)ppGpp量の測定

W3110、AN718 をMOPS-0.4 %グルコースリン酸飢餓培地にてコロニーより一昼夜培養した後、10 mLの 50 µCi/ml PHOSPHORUS-32 (Amasham) を含むMOPS-0.4%グルコースリン酸飢餓培地に 100 µl 植え継ぎ、OD₆₀₀ = 0.2 の時に 37 °C、4500 rpm、5分遠心後、糖を除いたMOPSリン酸飢餓培地に溶かし、菌体を洗浄した。再び、37 °C、4500 rpm、5分遠心後、0.4 %グルコースまたはマルトースを含む 50 µCi/mlの PHOSPHORUS-32 (Amasham) MOPS-リン酸飢餓培地にて菌体を懸濁し、培養を開始した。メチル-β-D-グルコピラノシドによるグルコース取り込み阻害は、終濃度 40 mM になるようにメチル-β-D-グルコピラノシドの粉末を菌体がOD₆₀₀ = 0.2 の時に加えることにより行った。

III. 結果

*crp*の変異は*relAP2*の転写活性をほぼ完全に失わせる.

relAP2 が CRP によって正に制御されていることが示唆された(第一章). よって詳しい *crp* 変異の影響を調べるために生育を通じた *relAP1*, *relAP2* の転写活性を、LacZ 活性を指標に野生株、*crp* 変異株で測定した. まず、生育について、*crp* 変異株は野生株に比べ生育が遅く、最終的な到達濁度も低かった(図 13A, B). *relAP1* はサンプリングの初期で *crp* 変異株内では野生株と比べその活性が大きかったが、最終的な *relAP1* の転写活性は野生株と *crp* 変異株とでは差が見られなかった(図 13C). 対数増殖期で *crp* 変異株内の *relAP1* の LacZ 活性が上がっていることは、*crp* 変異株の生育が遅いため、前培養時の LacZ 活性が十分に下がらなかったことに起因していると考えられる. このような現象は、本培養直後のサンプルでの観察を行うような実験系で報告されている(Conter et al., 1997). よって、*relAP1* の転写活性が CRP に依存しないと判断された. 一方で *relAP2* の転写活性は生育を通じて活性化することはなかった(図 18D). これは CRP が *relAP2* を活性化することを示しており、第一章の図 18 における CRPdown の LacZ 活性と合わせて考えると、その制御は直接的なものであることを強く示唆している. *crp* 変異の *relAP2* の転写活性に及ぼす効果が、例えば *crp* 変異の導入のために挿入したカナマイシン耐性遺伝子による効果等の、*crp* 変異によらない影響、すなわち極効果(polar effect)ではないことを検証するために、*relAP2-lacZ* を持つ *crp* 変異株に CRP を過剰に供給する株を作製し、その株の LacZ 活性を測定した(表 5). CRP は *bla* プロモーターで発現制御を受けており、細胞内の CRP 量には独立的に発現する(Ishizuka et al., 1994). その結果、CRP の過剰発現が *crp* 変異株内で *relAP2-lacZ* の LacZ 活性を相補し(表 5)、*crp* 変異の効果が、極効果ではないことを示していた. 更に野生株に CRP を過剰に供給した場合も *relAP2-lacZ* の活性は上昇した(表 5).

LacZ活性は、LacZの酵素活性であるため、タンパク質としての安定性や集積に依存していることが考えられる. *crp*の変異がそれらの要素に関与している可能性を排除するために、mRNAレベルでも、CRPが*relAP2*の転写活性を正に制御しているかを確かめた. 実験は、*relA*上流域 880 bpをクローニングしたpMKt1403を持つ野生株(AN582)と*crp*変異株(AN583)からトータルRNAを抽出し、*relAP2*に対するプライマー伸張法により、定量的に*relAP2*からの転写活性を測定した. 内部標準として、pMKt1403が持つ*bla*のプロモーターに対するプライマー伸張法も同じサンプルで行った(図 14). その結果、*crp*変異株では*relAP2*からの転写はまったく検出することができなかった. 一方で、野生株ではOD₆₀₀ = 1.2の時に強い転写誘導が見られた(図 14: 上段). *crp*変異株でも*bla*遺伝子の発現が観察されたことから(図 14: 下段)、*crp*変異株

内では $relAP2$ の転写がまったく見られないことを意味している。変異株内でのLacZ活性(図13)、及びmRNAの観察(図14)、外来性のCRPによる相補性テスト(表5)を踏まえて、 $relAP2$ がCRPによって正に制御されていると結論付けられた。

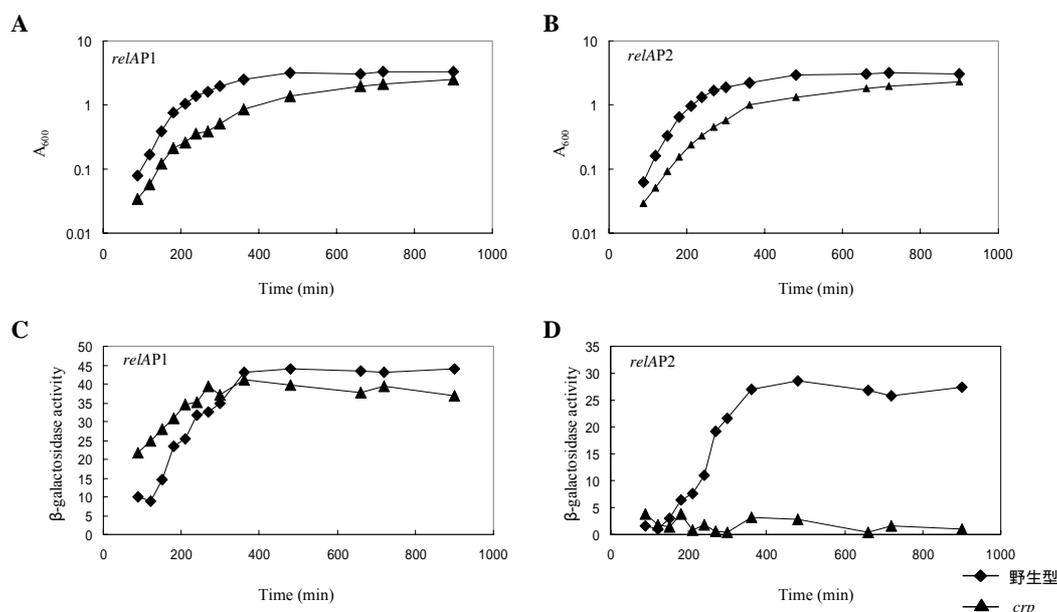


図13 $relAP1$ 及び $relAP2$ に対する crp 変異の影響

$relAP1$ 及び $relAP2$ を $lacZ$ に融合させたアリルを持つ野生株または crp 変異株における生育 (A, B) と LacZ 活性 (C, D) を示す。over-night 培養液を 500 倍希釈して 50mL LB で生育させ、時間ごとにサンプリングを行った。A), B) $relAP1-lacZ$ を持つ株についての結果を示す。ダイヤモンド: AN525 ($crp+$), 三角: AN541 ($crp-$) を表している。C), D) $relAP2-lacZ$ を持つ株についての結果を示す。ダイヤモンド: AN526 ($crp+$), 三角: AN543 ($crp-$)。

表 5. CRP 過剰発現による $relAP2-lacZ$ の LacZ 活性に対する影響

菌株 (genotype)	プラスミド	
	pSTV29	pSHA7
AN526 ($crp+$)	23.4±0.28	30.3±1.63
AN543 ($crp-$)	0.60±1.21	29.8±1.34

それぞれの菌株の LacZ 活性を Miller Unit で表した。± は標準偏差を示している。

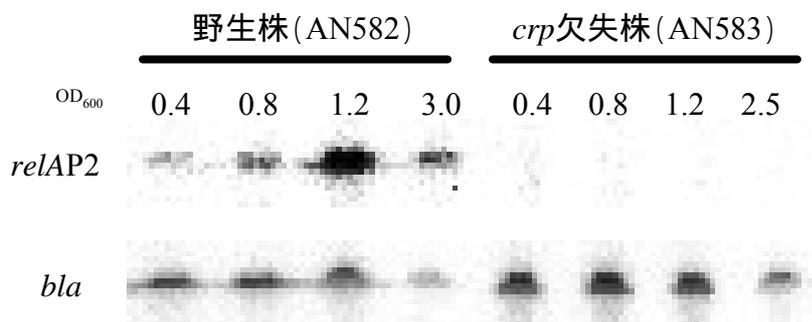


図 14 *crp* 変異株内での *relAP2* 由来の mRNA

一昼夜培養した各株を 1000 倍希釈して 50 μ g/ml のアンピシリンを含む 800mL LB にて生育させ、各 OD₆₀₀ の時に菌体を回収した。バンドの位置は、シーケンスラダーで確認した。トータル RNA は 10 μ g ずつ使用し、プロモーターごとに別々のゲルにて泳動を行った。

cAMP-CRP は *relAP2* 領域の DNA 断片に直接結合する。

前述のように CRP が直接的に *relAP2* を活性化することが強く示唆されたため、*relAP2* 領域に対する CRP タンパク質の結合をゲルシフトアッセイによって検証した (図 15)。実験はまず、野生型の *relAP2* 付近の DNA 断片 (P2 wild-type)、CRP 共通配列様配列の一部を *Bam*HI 認識配列に置き換えた DNA 断片 (図 15B: CRPdown、GGATCcgctttTCGCA を含む断片)、CRP 共通配列様配列を CRP 共通配列の完全一致させた配列に置き換えた DNA 断片 (図 15C: CRPup、TGTGAcgctttTCACA を含む断片) の 3 つを同じ長さで用意した。そして、それらに対し様々な量の精製したカルボキシル基末端にヒスチジンタグ残基が結合した CRP タンパク質 (CRP-His と呼称する) を混ぜ、その結合能を検証した。その結果、野生型の DNA 断片には CRP は 3 ng 以上で明瞭なシフトバンドが観察され (図 15A)、野生型 DNA 断片に CRP タンパク質が結合できることを示している。一方で CRPdown の DNA 断片は CRP-His を 400ng 加えても特異的なシフトバンドは検出されなかった (図 15B)。これは CRPdown の DNA 断片が CRP と結合しないことを意味している。野生型の結果とあわせて考えると CRP は、*relAP2* 領域の恐らくは CRP 共通配列様配列に直接結合することが示唆された。*relAP2* の LacZ アッセイの結果 (図 13D) とゲルシフトアッセイの結果から、*relAP2* の転写活性は cAMP-CRP に直接的に活性化されると結論付けられた。また、CRPup においては、実験で用いた最小量の 0.78 ng の CRP-His で非常に明瞭なシフトバンドが検出された (図 15C)。シフトバンドの濃さは野生型の *relAP2* の DNA 断片の場合よりも明らかに濃く、非常に強い結合であることが示唆された。CRP-His と結合していない DNA のバンドは RI ラベルが強いために正確な定量的なバンドの濃さの比較はできなかつ

たが、野生型の DNA 断片と CRPup のシフトバンドのその条件下であえて比較すると (図 15A, C: lane 6 12.5ng の CRP-His を使用)、CRPup の方が少なくとも 80 倍は濃い。よって、野生型 *relAP2* と cAMP-CRP の結合は弱いことが示された。

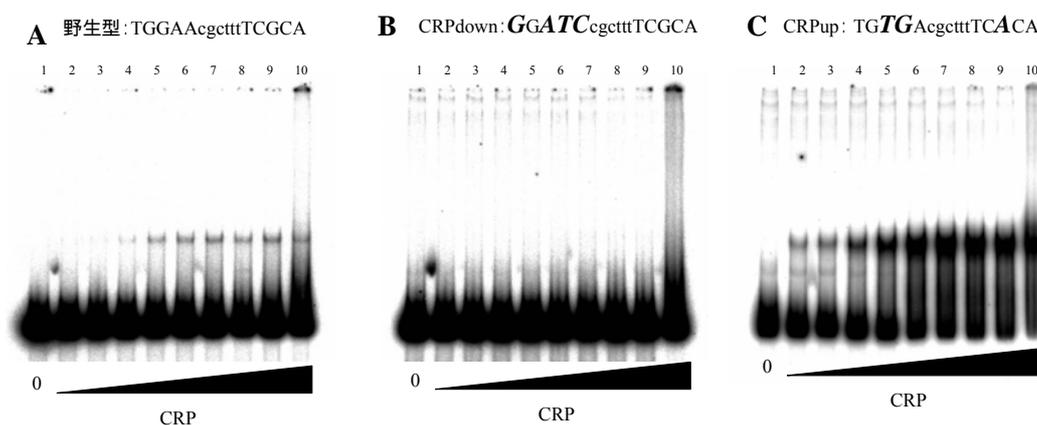


図 15 CRP-His の *relAP2* 領域に対する結合能の検証

relAP2 の転写開始点を+1 とした時、-118 ~ +91 の領域の DNA 断片を野生型(A)、CRP 結合共通配列様配列に変異を入れたもの(B)、CRP 結合共通配列様配列を完全な共通配列に変えたもの(C)を 32-P ATP によりラベルした。ラベルした DNA はエタノール沈殿処理後サンプルあたり 80,000cpm に調整し、精製した CRP-His、0、0.78125、1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400 ng と混ぜた(材料と方法参照)。各レーンは左から CRP-His の量に対応している。泳動ゲルには 0.1mM cAMP が含まれている。

グルコース培地から炭素源をアラビノース、マルトースに変えると *relAP2* は活性化される。

relAP2 は cAMP-CRP 複合体によって直接活性化されることから、グルコース飢餓時に *relAP2* が活性化される可能性が考えられた。よって、cAMP 蓄積されるような条件下 (Inada et al., 1996)、すなわちグルコース培地で生育中の大腸菌をより poor な炭素源培地移す条件下で *relAP2* が活性化される可能性について検証した。実験は *relAP1-lacZ*、*relAP2-lacZ* を持つ大腸菌 (AN525、AN526) を、0.4% グルコースを含む M9-CAA 培地で生育させ、midlog 期 ($OD_{600} = 0.2$) で一度菌を回収し、炭素源を含まない M9-CAA 培地で洗浄後、グルコース、アラビノースまたはマルトースを含む

M9-CAA培地に懸濁し、時間を追ってLacZ活性を測定した(図 16)。その結果、*relAP1* において、どの炭素源で培養してもその転写活性にほとんど違いは見られなかった(図 16A)。*relAP2* においては、グルコースを含むM9-CAA培地ではほとんどその活性は見られなかった(図 16B)。しかし、グルコース含む培地からアラビノースまたはマルトースを含む培地に変えると*relAP2* の転写活性は15分で一過的におよそ6倍になり、その後下がっていった(図 16B)。cAMPの細胞内濃度はグルコース飢餓になると急激に上がりその後下がることから(Inada et al., 1996)、*relAP2* の転写活性の変化はcAMP-CRPによって制御されていることと符合する。以上のことから、*relAP2* は恐らくcAMP-CRPによって活性化されるために、大腸菌をグルコース培地からアラビノース、マルトース培地に移すと急激に活性化されると考えられる。

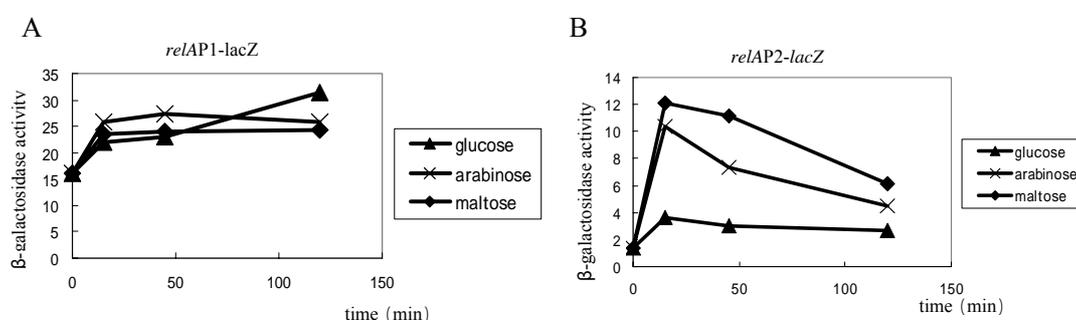


図 16 異なる炭素源における *relA* の各プロモーターの転写活性

relAP1-lacZ(A) 及び *relAP2-lacZ*(B) の活性をグルコース、アラビノース、マルトースをそれぞれ炭素源とした時に測定した。実験は AN525 (*relAP1-lacZ*) 及び AN526 (*relAP2-lacZ*) を、0.4%グルコースを含むM9-CAA培地でOD₆₀₀=0.2 まで培養後、フィルトレーションにより菌体を炭素源を加えていないM9-CAA培地で洗浄し、3 つに分け、それぞれの炭素源を加えたM9-CAA培地で再び培養を開始した。培養を再開した時間を 0 とした。△がグルコース、×がアラビノース、◇がマルトースをそれぞれ炭素源として加えた時の結果を示す。

グルコース培地から炭素源をマルトースに変えるとppGppは急速に集積するが、*relAP2* の活性とは関係がないかもしれない。

relAP2 が大腸菌をグルコース培地からマルトース培地に移すと急激に活性化されること、グルコース飢餓下においてppGppの速やかな集積が報告されていることから(Chaloner-Larsson et al., 1978, Murray et al., 2003)、グルコース飢餓下のppGppの集積は*relAP2* の活性化に起因している可能性を考えることができる。この仮説を検証す

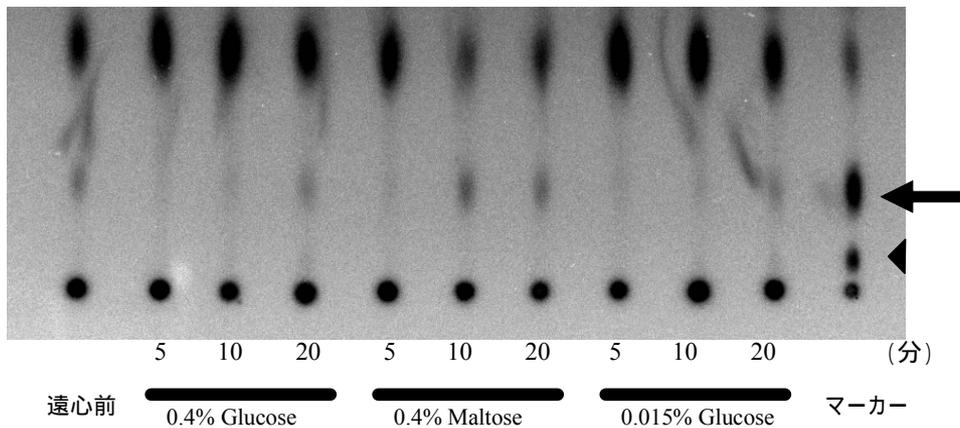
るために、ゲノムDNA上の*relAP2* が不活化している変異株を作製し、この株がグルコース培地からマルトース培地に移された時にppGppを蓄積することができるか否かを確認した。実験は野生株(W3110)と*relAP2* 変異株(AN718)を、0.4%グルコースを含むMOPS培地でOD₆₀₀ = 0.2 まで生育させ、菌体を遠心により回収の後、MOPS培地で洗浄し、2 つに分け、グルコースまたはマルトースを含むMOPS培地で再び生育させた。時間を追って菌体を回収し、ギ酸抽出物を薄層クロマトグラフィープレートに展開し、ppGppの集積の様子を観察した(図 17)。その結果、野生株をグルコース培地からグルコース培地に移した時は 20 分後にppGppの集積が見られ、それはグルコースの濃度には依存していなかった。一方でグルコース培地からマルトース培地に移した時は 10 分後には強いppGppの集積が観察され、以降もその集積状態は維持された(図 17A)。この結果はMurrayらの報告とほぼ一致した現象である(Murray et al., 2003)。一方、*relAP2* がppGppの集積を引き起こすと予想していたが、*relAP2* 変異株でも野生型とほぼ同様の結果が得られた(図 17B)。以上の結果は、グルコース培地からマルトース培地へ菌を移した際に観察されるppGppの集積に*relAP2* の活性化は関係ないことを示唆している。

メチル-*-D*-グルコピラノシド添加によるグルコース飢餓下ではRelA依存的なppGppの集積が見られるが、その集積に*relAP2* の発現制御は関わっていない。

グルコースからマルトースへの炭素源のダウンシフトは比較的穏やかな条件でのグルコース枯渇である。更にその実験では菌体を一度回収し、洗浄するという細胞に対して炭素源の交換以外のストレスを与えている。よって、より強いグルコース飢餓を引き起こすことができ、かつ細胞に余計なストレスを与えない実験で *relAP2* の ppGpp 集積に対する寄与を観察した。グルコースのアナログであるメチル-*-D*-グルコピラノシド (*-MG*)を培地に添加するとグルコーストランスポーターである PtsG に結合し、グルコースの選択的な取り込みを拮抗阻害するので、激しいグルコース枯渇条件が実現できる(Hernandez-Asensi et al., 1975)。そこで培養中の野生株(W3110)、*relAP2*(AN718)変異株、*relA* 変異株(AN106)に対し、*-MG* を作用させ、ppGpp の集積を観察した(図 18)。野生株において *-MG* を加えない条件下では ppGpp の有意な蓄積は見られなかったが(図 18A)、*-MG* を加えると加えてから 5 分後には強い ppGpp の蓄積が観察された(図 18B)。この蓄積は *relA* 変異株では見られなかったことから(図 18D)、*-MG* によって RelA 依存的な ppGpp の集積が引き起こされていることを意味している。しかし、*relAP2* 変異株内でも野生株と同等の ppGpp の集積が見られたことから(図 18C)、*-MG* が引き起こす ppGpp の集積は、*relAP1* 由来の RelA によって生産され、*relAP2* の転写活性はほとんど寄与していないことが示唆された。マルトースショックの結果(図 16、図 17)とあわせて考えると、*relAP2* はグルコース飢餓下で発現が誘導されるが、グルコース飢餓下での ppGpp の集積にはあまり関与していないと結論付けられ

た.

A W3110



B AN718 (*relAP2*m10変異株)

・左から5分後、10分後、20分後

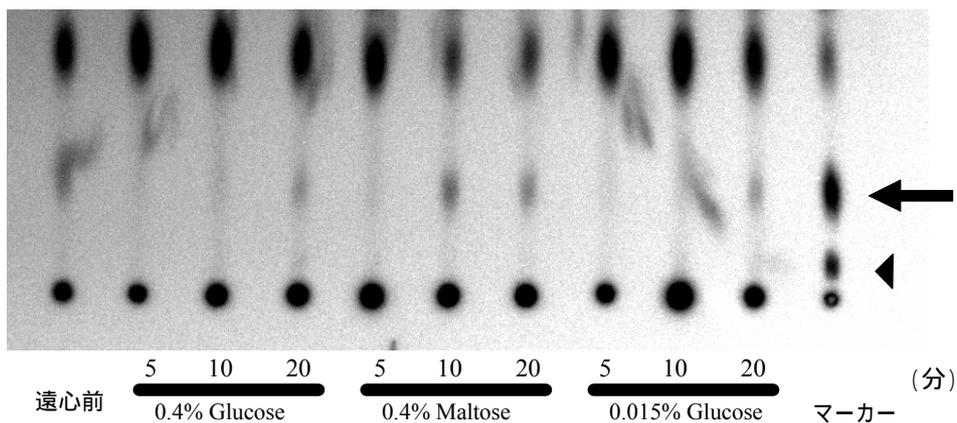


図 17 糖源ダウンシフトによる ppGpp の集積とその *relAP2* の寄与

菌体を MOPS-0.4% グルコース培地で $OD_{600}=0.2$ まで生育させ、遠心により集菌し、MOPS-0.4% グルコース、MOPS-0.4% マルトース、MOPS-0.015% グルコース培地にそれぞれサスペンドした。サンプルは遠心前、サスペンド後 5 分、10 分、20 分に回収し、ギ酸抽出物を薄層クロマトグラフィーで展開した。ppGpp の位置は ppGpp 過剰生産株 (AN155) のギ酸抽出物を元に同定した (マーカー、矢印)。三角は pppGpp のスポットを示している。野生株 (W3110) 及び *relAP2* 変異株 (AN718) の結果をそれぞれ A、B に示す。

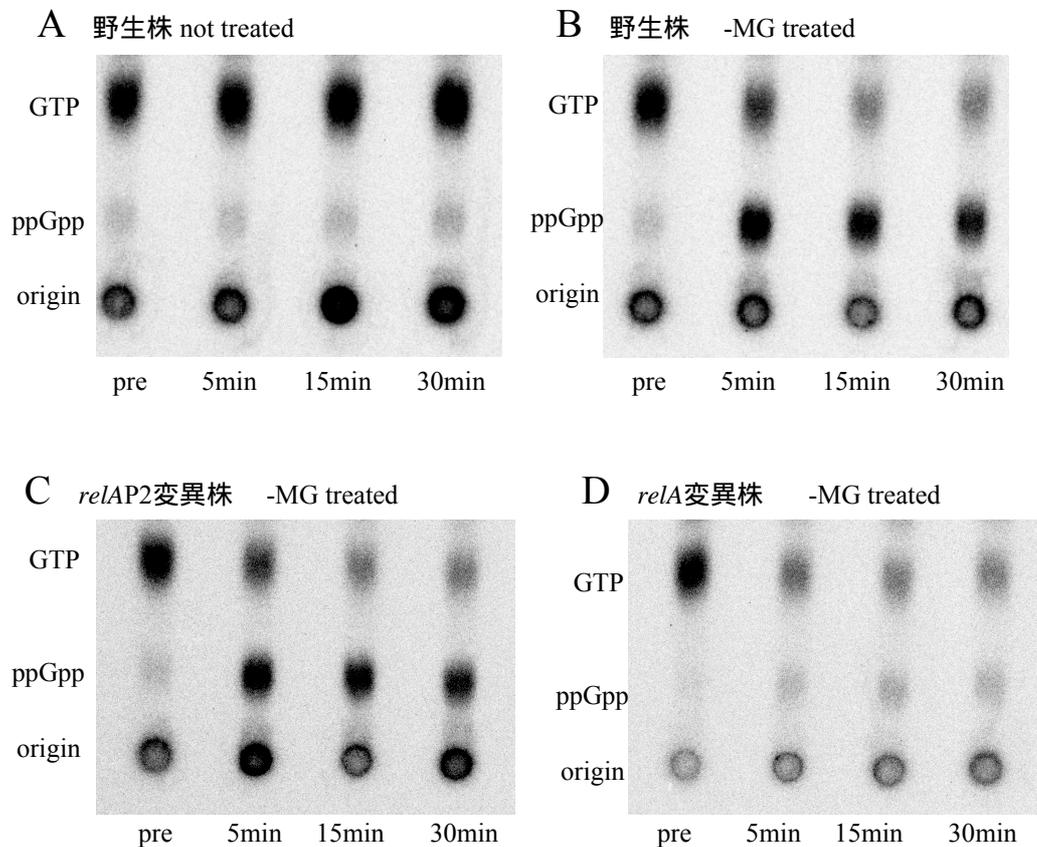


図 18 野生株、*relA* 変異株、*relAP2* 変異株におけるメチル- α -D-グルコピラノシド処理時における ppGpp の集積

野生株 (W3110)、*relA* 変異株 (AN718)、*relAP2* 変異株 (AN106) を 50 μ Ci/mL の orthophosphate を含む MOPS 培地で生育させ、OD₆₀₀=0.2 まで培養後、メチル- α -D-グルコピラノシド (-MG) の粉末を終濃度 250 mM になるように加えた。サンプリングは -MG を加える前 (pre)、加えてから 5 分後、15 分後、30 分後に行った。各サンプルのギ酸抽出物を薄層クロマトグラフィーに展開して観察した結果を示している。A) 野生株に -MG を加えなかった時、B) 野生株に -MG を加えた時、C) *relAP2* 変異株に -MG を加えた時、D) *relA* 変異株に -MG を加えた時の結果をそれぞれ表している。

IV. 考察

CRPのrelAP2を活性化するメカニズム

relAP2 は CRP によって直接的に転写を活性化されることが示された (図 13, 14, 15). 生育を通じて *crp* 変異株内では *relAP2-lacZ* の LacZ 活性及びマルチコピープラスミド上からの mRNA をほとんど観測できなかったことから (図 13, 4)、*relAP2* の転写活性は CRP に完全に依存しているといえる. CRP の *relAP2* プロモーター領域に対する結合は非常に弱かったが、非常に弱い CRP 結合配列を持つプロモーターも *in vivo* で結合できるという報告もあり (Graingner et al., 2005)、*relAP2* もそのようなプロモーターの一つではないかと考えられる. CRP による制御は、炭素源をグルコースからダウンシフトさせると *relAP2* の転写活性が増すということからも証明された (図 16). 以上の結果から、CRP が直接的に *relAP2* を Class I タイプの活性化を行うことは疑う余地がないと思われる.

グルコース飢餓下におけるRelA依存的なppGppの集積について

relAP2 はグルコース培地でほとんど転写活性を持たなかった (図 16). 菌体内の ppGpp 量の測定実験において用いられるほとんどの培地は、グルコースを用いた最少培地であるために、既知の ppGpp 産生は、*relAP2* が不活化している条件で観察されたものである. よって *relAP2* の ppGpp 量の制御を観察するには、*relAP2* が活性化されるような条件を探さねばならないと考えている.

-MG によるグルコース飢餓において、少なくともこの実験条件では、ppGpp の集積に RelA が強く関わっていた (図 18). このことは、グルコース枯渇下の ppGpp の集積は SpoT に依存しているという定説を覆すものであり、RelA もまた関与しているという、Murray らや Traxler らの主張をサポートする直接的な証拠である (Murray et al., 2003; Traxler et al., 2006). また、RelA 依存的な ppGpp の集積は、*relAP1* の支配下で合成された RelA 由来の活性に依存していると考えられる.

CRPがrelAP2を制御している生理学的な意味

炭素源をグルコースからマルトースに換えたときの ppGpp の集積には *relAP2* の転写活性はほとんど寄与していなかった (図 17). これらの観察は、グルコース枯渇における ppGpp の集積は転写レベルでは制御されておらず、既に細胞内に存在している RelA タンパク質の酵素学的な応答に起因するものであると考えられる. しかし、*relAP2* は CRP によって制御されており、炭素源の変化も感知することができる (図 16). 以上のことから *relAP2* が CRP に制御されているということは、RelA の酵素学的な応答に対する準備を行うことを意味しているのではないかと推察できる. よって CRP が構成的に活性化しているような条件等で *relAP2* の ppGpp 集積に対する効果は観察できる可能性があり、今後の課題である.

第三章

H-NS による *relAP2* の制御

I. 序論

核様体タンパク質の一般的な機能

大腸菌は核もヒストンも持っていないが、ゲノムDNAは、そのままの構造で細胞内に存在しているのではない。ゲノムDNAは、様々なタンパク質因子により、コンパクトにその構造を折りたたまれ、核様体を形成している。ゲノムDNAの高次構造形成に関わっているタンパク質を核様体タンパク質といい、核様体タンパク質とゲノムDNAを合わせて核様体という。核様体タンパク質の中には、Fis、HU、H-NS、IHF、LRP、Dpsなどが含まれる (Ishihama, 1999)。核様体構造は、DNAの曲がり具合や巻き具合を規定しているため、それがDNA複製 (Dixon and Kornberg, 1984, Kaidow et al., 1995)、相同組み換えやDNA修復 (Kamashev and Rouviere-Yaniv, 2000, O'gara and Dorman, 2000, Palchaudhuri et al., 1998) 等様々な生命現象に影響を及ぼしている。中でも転写に対する影響はゲノム上の遺伝子に対して広範にわたっており、また、最も研究されている分野である。核様体構造が転写に影響を及ぼしている遺伝子の例として、*ppc*が挙げられる。⁷⁰認識プロモーターにおける-10 配列、-35 配列間の最適な距離は、17 bpであるが、*ppc*は20 bpもの長いスペーサーを有している (Izui et al., 1985)。しかし、そのプロモーター領域がスーパーコイル状になると、その距離が短くなって最適な距離になり、強い転写活性を示すようになる (Steck et al., 1993)。核様体タンパク質は、生育相や環境に依存して集積しており、結果として核様体構造は生育や環境とともに変化し (Cabrera and Jin, 2003)、生育相依存的なプロモーターや環境応答遺伝子群を制御している。例えば、*rnmP1* プロモーターは対数増殖期で活性化され、定常期でその転写を抑えられるが、対数増殖期で豊富にあるFisによって転写を活性化されており、定常期ではH-NSによって負に制御される (Gourse et al., 1986)。また、アセチルコエンザイムA合成酵素をコードしている*acs*遺伝子のP2 プロモーター (*acsP2*) は、もともとCRPによって活性化されているが、FisとIHFによって負に制御されている。IHFは定常期で集積する核様体タンパク質であるので、対数増殖期ではFisによって、定常期ではIHFによって転写を抑制されるが、その間の生育相移行期では抑制から開放されるため一時的に発現する (Browning et al., 2004)。

H-NSのDNA結合様式とその機能

核様体タンパク質の中に histone-like nucleoid protein (H-NS) と呼ばれる 15 kDa の

小さいタンパク質がある。H-NSは、細胞内に多い時で30,000分子近くあり、DNAに結合して核様体構造を規定している(Azam et al., 1999)。H-NSの一つの機能として、DNAの負のスーパーコイル形成がある(Hulton et al., 1990, Tupper et al., 1994)。大腸菌のゲノムDNAはトポイソメラーゼIとジャイレースによってそのスーパーコイルの巻き具合を制御されており、トポイソメラーゼIはDNAの一本鎖を切断してスーパーコイルをリラックスさせ、ジャイレースはATPの加水分解エネルギーを用いて二本鎖を切断して負のスーパーコイルを増大させる(Gellert et al., 1976)。大腸菌のゲノムDNAは負のスーパーコイルを維持されており、その発生原因は主に転写であると考えられている(Liu and Wang, 1987)。転写はRNAポリメラーゼ(RNAP)によってなされるが、RNAPがDNA上を動く際に何らかの理由でRNAP自身が回転しない場合、DNAが回転することになり、RNAPが進む方向には正のスーパーコイルが、RNAPが進んできた方向には負のスーパーコイルが形成される。正のスーパーコイルはジャイレースの働きにより緩和され、その結果全体として負のスーパーコイルが形成される。H-NSがどのように負のスーパーコイルを増大させるかは未だに不明であるが、*in vitro*の実験系で、トポイソメラーゼI存在下でH-NSの量依存的に負のスーパーコイルが増大することが報告されている(Tupper et al., 1994)。H-NSによる負のスーパーコイル形成を介した転写調節は、*osmE*プロモーターが最もよく知られているが(Hulton et al., 1990, Gutierrez et al., 1995)、報告例は少ない。一方で負のスーパーコイルは、ジャイレース阻害剤で処理した細胞のマイクロアレイ解析から、およそ306もの遺伝子群の転写に関わっていることが示唆されている(Peter et al., 2004)。

H-NSのDNA結合特性として、強い配列特異性を持たず、ATに富んだカーブしているDNAに結合しやすい性質がある(Tupper et al., 1994, Yamada et al., 1991)。DNAに結合したH-NSは、DNAを曲げる(Tupper et al., 1994)、もしくはループ構造をとることによって(Dame et al., 2002)、局所的なDNA構造を介した遺伝子の転写調節に影響を及ぼしている。*hns*変異株のマイクロアレイの解析からH-NSは少なくとも250以上の遺伝子を制御していることが示唆されており、ゲノムワイドな遺伝子調節に関わっている(Hommais et al., 2001)。

H-NSのドメイン構造を図19Aに示す。H-NSはカルボキシル末端側にHTHモチーフのDNA結合ドメインを持ち、アミノ末端側には転写抑制に重要なドメインを持つ。この領域の変異は、DNAに結合することができるが、*bgl*オペロンにおける転写抑制に不十分であることが報告されている(Ueguchi et al., 1996)。また、H-NSは、二量体以上の多量体で機能することが*in vitro*、*in vivo*両方の結果から明らかになっており(Ueguchi et al., 1997, Badaut et al., 2002)、20~91アミノ酸残基領域は、H-NSの多量体形成に必須である。NMRの解析から64~90アミノ酸残基領域は二量体形成には不要であるが、多量体形成に必須であることがわかっている(Esposito et al., 2002)。以上の研究から図19Bに示すような自己相互作用をして多量体を形成しながら、二本の

DNA に結合し、DNA の高次構造を形成していると考えられている (Esposito et al., 2002) .

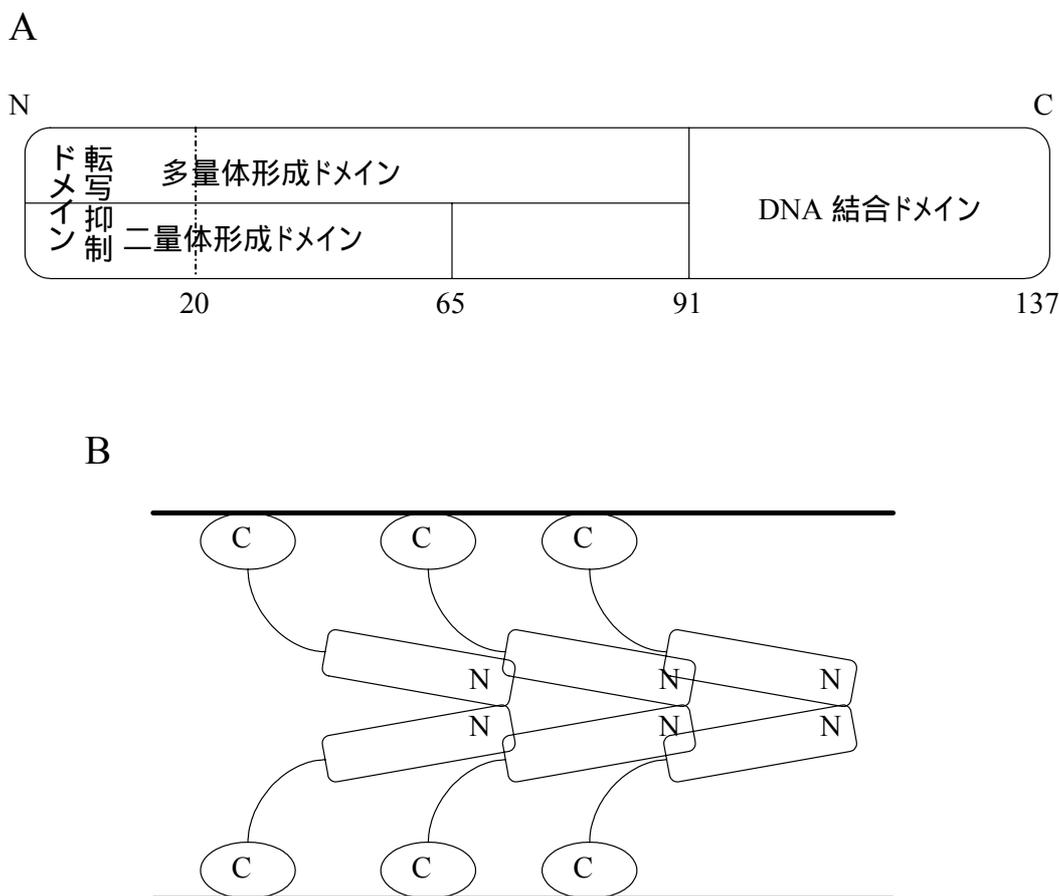


図 19 H-NS のドメイン構造と多量体構造

A) H-NS のドメイン構造を模式的に示す . H-NS は 137 アミノ酸を持つ 15 kDa のタンパク質である . 下に示した数字はアミノ末端 (N) 側からの距離で、カルボキシル末端 (C) までが 137 である . それぞれの数字は、実験的に示された数値であるが、文献によって 1 ~ 5 アミノ酸のずれがある (Hommais et al., 2001、Ueguchi et al., 1996) . B) 異なる DNA にそれぞれのモノマーが結合し、アミノ末端側のドメインで二量体を形成する . 二量体は、別の二量体に head-to-tail の法則で結合しながら多量体を形成し、全体として棒状の複合体になるというモデルがある (Esposito et al., 2002) .

HNSによる転写制御メカニズム

H-NS は H-NS による転写制御は、*bgl*、*proU* (Mukerji and Mahadevan, 1997、Ueguchi and Mizuno, 1993) をはじめとして多くの遺伝子において解析されているが

(Krin et al., 2002, Forsman et al., 1992, Bouvier et al., 1998, Fomenko et al., 2001, Conter et al., 1997, Ko and Park, 2000, Johansson et al., 1998)、そのほとんどは転写を抑えるリプレッサーとしての機能についてである。その転写制御メカニズムは、依然不明な点が多いもののいくつか報告されている。例えば *proV* は、プロモーター領域に AT に富んだ領域を 420 bp に渡って持っており、全体に H-NS が結合し、RNAP が転写開始のためのアクセスができなくなると考えられている (Lucht et al., 1994)。*proV* 制御領域中の AT に富んだ領域は、場所によって H-NS に対する親和性が異なっており、一つのモデルとして最も親和性の高い領域に H-NS が結合すると、その多量体形成能により次々と H-NS が結合し、結果として閉じた高次構造を誘導することが提唱されている (Lucht et al., 1994)。

rrnP1 の転写制御にも H-NS は関わっており、その転写を負に制御している (Afflerbach et al., 1998)。*rrnP1* は前述のとおり、Fis によって正に制御されているが、H-NS は Fis 結合部位に拮抗阻害的に結合する (Afflerbach et al., 1999)。Fis の方が DNA に対する親和性が高いが、生育相移行期以降で Fis の細胞内濃度が下がり (Ali-Azam et al., 1999)、その際に H-NS の拮抗阻害効果が見られ、Fis の結合を抑えている (図 20)。この時、H-NS は、*rrnP1* プロモーターを図 20 のようにループ状にし、RNAP をトラップもしくはアクセスできないようにするモデルが提唱されている (Dame et al., 2002)。いずれにせよ、その結果、RNAP は転写を開始することができず、*rrnP1* の転写は見られなくなる。前述の (p)ppGpp も *rrnP1* の転写を抑えるが、H-NS による *rrnP1* の転写抑制は (p)ppGpp に独立的である (Afflerbach et al., 1999)。同様の制御メカニズムは、*Shigella* の宿主への感染に必須な *virF* 遺伝子においても報告されている (Falconi et al., 2001)。

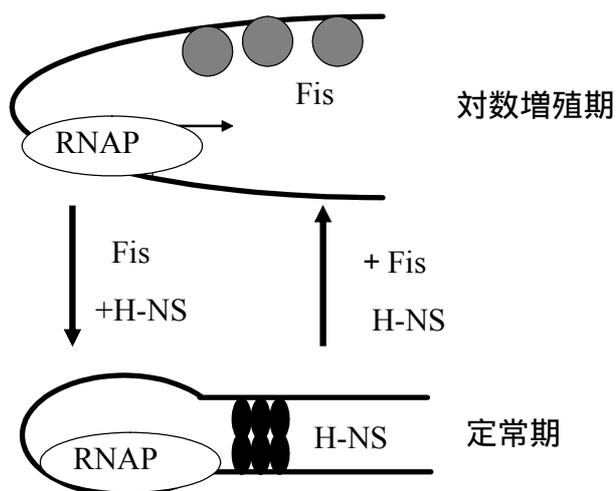


図 20 *rrnP1* プロモーターにおける Fis と H-NS の拮抗的な転写制御

対数増殖期では Fis が *rrn* プロモーター領域を開くような形で RNAP が容易に結合できるような構造を維持しているが、対数増殖期以降では、Fis の細胞内濃度が下がり、H-NS によるループ構造が形成され、RNAP がトラップもしくは、プロモーターにアクセスできなくなる。

プロモーター領域のDNA構造をループ上にし、RNAPをトラップしてしまう転写制御メカニズムは、*hdeAB*プロモーター (*hdeABp*)でも報告されている (Shin et al., 2005)。*hdeAB*は元々 *hns*変異株で蓄積するタンパク質として同定されており (Yoshida et al., 1993)、⁷⁰及び ^Sによってそのプロモーターを認識されうる。ところが、H-NSの抑制効果は ⁷⁰に対する転写にしか見られず、^Sによる転写はH-NSに影響されない。それは、図21に示すようにH-NSによるループ形成が、⁷⁰と結合しているRNAPのみをトラップし、^Sを持つRNAPはトラップされないことによるものであることが示唆された。これは、H-NSの核様体構造制御が、因子のプロモーター選択性に影響を及ぼしている (Shin et al., 2005)。*hdeABp*と同様に、*csgA*、*gadB*も ⁷⁰と ^Sに制御されており、かつH-NSに抑制されることから (Arnqvist et al., 1994, Waterman and Small, 2003)、同様のメカニズムが働いているのかもしれない。

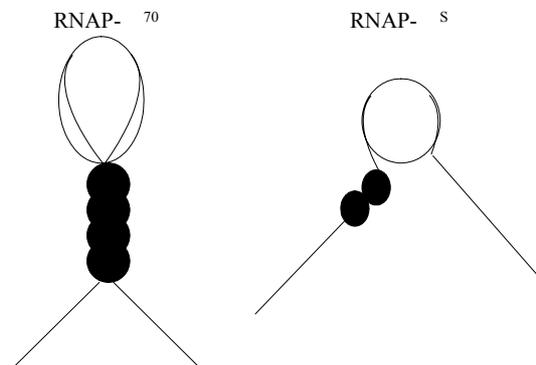


図21 *hdeA*プロモーターにおける ⁷⁰と ^Sに対するH-NSによるDNAの構造変化の違い

⁷⁰を持つRNAポリメラーゼホロ酵素は、H-NSによりトラップされてしまう(左)。しかし、^Sを持つRNAポリメラーゼホロ酵素は、H-NSがループ構造を形成することができないためにトラップされずに転写を活性化することができる (Shin et al., 2005)。

更にH-NSはDNAだけではなく、RNAにも結合できることが知られている (Brescia et al., 2004)。かねてより、*hns*変異株内では ^Sの量が増え、野生株に比べ凍結融解に耐性を示すという ^S過剰発現株の表現型を示していた (Yamashino et al., 1995)。Bresciaらの研究により、*hns*変異株内で ^Sの量が上がるのは、H-NSが *rpoS*のmRNAに結合すると *rpoS*-mRNAの分解が促進されることに起因することが示されている (Brescia et al., 2004)。このことは、H-NSが単に核様体構造を規定して転写を制御するだけではなく、RNAに結合して転写後に遺伝子発現を制御していることが示している。

H-NSによる転写に対する正の制御もいくつか報告がある。pRK100プラスミド上の *traJ*は、プラスミドの保持に重要なTraJタンパク質をコードしているが、*hns*変異株内でその転写量が下がることが示唆されていた (Staricic-Erjavec et al., 2003)。しかし、その後の研究で *traJ*のリプレッサーである *traM*がH-NSにより抑制されており、その結果

H-NS が正の制御をしているように観察されたことが示された (Will et al., 2006) . また、フラジェラ形成遺伝子群のマスター転写制御因子をコードしている *flhDC* は、H-NS によってその転写を強く正に、弱く負に制御されていることが示されていたが (Soutourina et al., 1999)、*flhDC* のリプレッサー HdfR が同定され、これが H-NS により負に制御されている可能性が示された (Ko et al., 2000) . これが本当であれば、H-NS の正の制御はリプレッサーを介した間接的な制御であるが、今のところ結論は出ていない . 唯一、H-NS の転写に対する正の制御で、リプレッサーを介していない例として *csiD* の発現制御がある (Germer et al., 2001) . *csiD* は CRP によって転写を活性化されるが、CRP 結合部位の転写開始点からの距離は、転写の活性化に重要である (第二章序論参照) . CRP 結合部位の転写開始点に対する位置を少しずつずらすと、野生株内では適した位置に CRP 結合部位がないと転写の活性化は起きないが、*hns* 変異株内ではその活性化は弱いものの適さない位置でも CRP による発現誘導が見られた . このことは、H-NS が CRP の特異性を決定付ける働きがあり、H-NS の DNA 構造の固定化が正しい転写制御に重要であることを示していた (Germer et al., 2001) . しかし、それがどのようにして起こっているかは不明のままである . このように H-NS による転写を正に制御する現象は見られるものの、そのメカニズムはあまりわかっていない .

H-NSと協調的に機能する因子

StpA の過剰発現は *hns* 変異で見られるいくつかの表現型をサプレスすることが知られていた (Shi and Bennett, 1994, Sonden and Uhlin, 1996) . H-NS の DNA 結合ドメインを持たない変異タンパク質でも、H-NS に抑制されている *bgl* の発現を抑制できることから、H-NS が何らかの DNA 結合タンパク質と相互作用していることが可能性として考えられていた (Ueguchi et al., 1996) . Free らの研究によりその候補が StpA であることがわかり (Free et al., 1998)、その後 H-NS と StpA は直接結合することが見出された (Johansson et al., 2001) . H-NS が細胞内に 30,000 分子近く存在するのに対し、StpA は高々 200 分子であることから、H-NS-StpA の相互作用は、野生株内ではそれほど機能していないと考えられているが、StpA はその発現を H-NS によって抑制されているため、*hns* 変異株内では StpA は蓄積し、その性質から H-NS のバックアップ的な働きが示唆されている (Zhang et al., 1996, Shi and Bennett, 1994) . その他にも Hha や YdgT が H-NS と直接結合し、転写抑制を行っている (Nieto et al., 2002, Paytubi et al., 2004) .

興味深いことに、*bgl* オペロンの転写抑制において、H-NS の DNA 結合ドメインを持たないタンパク質による抑制効果は、定常期特異的な因子である *rpoS* (σ^S をコードしている) 変異株では見られないという報告がある (Ohta et al., 1999) . その後この事実は別の研究チームにより肯定されたが (Shunetz, 2002)、そのメカニズムはほとんど明らかになっていない . この事実は、転写を司る因子が、核様体構造を制御している可能

性も示唆しており、H-NSと協調的な作用をしていることも考えられている(Ohta et al., 1999) .

hns-stpA 二重変異株は、非常に生育が悪く、長期にわたる栄養飢餓に弱いという表現型を示す(Johansson et al., 2000) . この表現型を一部サプレスする自然突然変異株は、*spoT* 遺伝子の変異株であり、この変異株では(p)ppGpp を合成できないという報告がある(Johansson et al., 2000) . その報告によれば、(p)ppGpp によって転写活性を抑えられるプロモーターの(p)ppGpp に対する感受性が、H-NS によって増大すると考えられている . この事実は、その後否定も肯定もされていないが、少なくとも *hns* 変異株の生育が悪くなるという表現型を一部サプレスすることから、(p)ppGpp は H-NS と何らかの協調的、または antagonistic な働きをしているのかもしれない .

最近の研究から *rrnP1* の転写が leucine-responsive regulatory protein(LRP) によって正に制御されている可能性が示唆された(Pul et al., 2005) . LRP は、ロイシンに応答して転写を正にも負にも制御する核様体タンパク質の一つである . LRP の *rrnP1* プロモーターに対する結合は、H-NS によって促進されるという in vitro の結果が得られている . LRP と H-NS が同時に制御している遺伝子は、浸透圧上昇時に誘導される *osmC*、ロイシン、イソロイシン、バリン合成酵素をコードしている *ilvIH*、F 因子転移酵素遺伝子 *traJ*、繊毛の構造タンパク質をコードしている *pap* オペロンなどがある(Bouvier et al., 1998、Leivinthal et al., 1994、Starcic-Erjavec et al., 2003、Forsman et al., 1992) . これらの遺伝子では、H-NS による LRP の結合促進が考えられるかもしれない(Pul et al., 2005) . これらの遺伝子は全て LRP がその転写を促進し、H-NS が転写を抑えているという antagonistic な関係にあり、H-NS がプロモーターの転写活性を抑えながら、アクチベーターの DNA 結合を助けているというモデルである . もしこのモデルが事実であるならば、H-NS がアクチベーターの DNA の結合を促進し、結果として転写を正に制御することが考えうる .

本研究の目的

これまでの研究から *relAP2* が、核様体タンパク質である H-NS により正の制御を受けていることが示唆された . また、生育相移行期に一時的に転写が活性化されることから、核様体構造と生育相移行期における転写制御研究においてよいモデルとなりうると考えられる . そこで、*relAP2* をモデルとして、ほとんど解明されていない H-NS の転写促進機能について研究を行った .

II. 材料と方法

菌株

本章における研究に用いた大腸菌株を表 6 に記す.

培地

本章における研究に用いた培地はすべて LB 培地 (10 g/l Bacto Tryptone (Difco)、5 g/l Bacto Yeast Extract (Difco)、10 g/l NaCl) が基準となっている. 必要がに応じて、クロラムフェニコール 25 µg/ml、アンピシリン 50 µg/ml、カナマイシン 25 µg/ml、テトラサイクリン 7.5 µg/ml を適宜加えた. 寒天培地は LB 培地に 1.5% (w/v) (ファージ調整用のソフトアガーは 0.7% (w/v)) の寒天をまぜ、熱した後、適宜抗生物質、X-Gal (50 µg/ml) を入れて固まらせて作製した. 全ての培地は 121 °C、20 分の高圧滅菌処理を行った. また、培養は全て 37 °C で好氣的に行った.

プラスミドとプライマー

本研究で使用したプラスミドとプライマーはそれぞれ表 6、7 にまとめた.

pHNSの作製

pHNS は、*hns* の構造遺伝子と *hns* のプロモーターを含む 1.4 kbp 断片がクローニングされている pUC19-*hns* (名古屋大学水野猛教授による) から、*Bam*HI-*Hind*III 制限酵素処理により生じた短い方の断片を pSTV29 (Takara) の同じ *Bam*HI-*Hind*III にクローニングして構築した. 制限酵素地図を作製することにより、クローニングの成否を確認した.

LacZ活性測定株の作製

本研究で使用した LacZ 活性測定株の作製は、第一章と同様に行った. 本章の研究で新たに作製した *relAP2* 付近のプロモーターとクローニングに使用したプライマーの対応を表 8 にまとめる.

P1 ファージを用いた形質導入

P1 ファージによる形質導入は第一章と同様に行った.

表 6. 本研究で使用した大腸菌株とプラスミド

Name	Genotype	Reference
大腸菌株		
MC4100	(<i>argF-lac</i>)U169 <i>rpsL150 relA1 araD139 flbB5301 deoC1 ptsF25</i>	Casadaban, 1976
RM177	MC4100 (RZ-5)	Oshima et al., 1995
W3110	Wild type (lineage A)	Jishage and Ishihama, 1997
BW25113	<i>lacIq rrmBT14 DlacZWJ16 hsdR514 DaraBADAH33 DrhaBADLD78</i>	Datsenko and Wanner, 2000
BW25113pFE <i>spoT</i>	<i>spoT</i> をクローニングしてある pFE604 を持つ BW25113	Yamamoto, unpublished
BW25113pFE <i>spoTDspoT</i>	BW25113pFE <i>spoT spoT::Kn^r</i>	Yamamoto, unpublished
AN314	MC4100 (<i>rmf-lacZ</i>)	^b Izutsu et al., 2001
AN525	MC4100 (P1- <i>lacZ</i>)	第一章
AN526	MC4100 (P2- <i>lacZ</i>)	第一章
AN529	AN526 <i>hns-205</i>	^a Yamashino et al., 1995
AN543	AN526 <i>crp::Kn^r</i>	第二章
AN545	AN525 <i>hns-205</i>	^a Yamashino et al., 1995
AN547	AN526 <i>crpnull</i>	^c Baba et al., 2006
AN549	AN526 を pSTV29 で形質転換させた株	第二章
AN550	AN526 を pCRP で形質転換させた株	第二章
AN551	AN543 を pSTV29 で形質転換させた株	第二章
AN552	AN543 を pCRP で形質転換させた株	第二章
AN555	AN529 を pSTV29 で形質転換させた株	第二章
AN556	AN529 を pCRP で形質転換させた株	第二章
AN557	AN526 <i>rpoS::Tet^r</i>	^a Yamada et al., 1991
AN558	AN529 <i>rpoS::Tet^r</i>	^a Yamada et al., 1991
AN559	AN525 <i>lrp::Kn^r</i>	^a Baba et al., 2006
AN561	AN526 <i>lrp::Kn^r</i>	^a Baba et al., 2006
AN562	AN547 <i>hns-205</i>	^a Yamashino et al., 1995
AN584	W3110 <i>hns-205</i>	^a Yamashino et al., 1995
AN631	AN526 を pHNS で形質転換させた株	This study
AN632	AN543 を pHNS で形質転換させた株	This study
AN633	AN529 を pHNS で形質転換させた株	This study
AN635	MC4100 (CRPup- <i>lacZ</i>)	第二章
AN644	MC4100 (P2 - <i>lacZ</i>)	This study
AN645	MC4100 (P2 - <i>lacZ</i>)	This study
AN646	MC4100 (P2 - <i>lacZ</i>)	This study
AN647	MC4100 (P2 - <i>lacZ</i>)	This study
AN657	MC4100 (P2 - <i>lacZ</i>)	This study
AN658	MC4100 (P2 - <i>lacZ</i>)	This study
AN659	AN657 <i>hns-205</i>	^a Yamashino et al., 1995
AN660	AN645 <i>hns-205</i>	^a Yamashino et al., 1995
AN661	AN646 <i>hns-205</i>	^a Yamashino et al., 1995
AN662	AN647 <i>hns-205</i>	^a Yamashino et al., 1995
AN663	AN658 <i>hns-205</i>	^a Yamashino et al., 1995
AN665	AN545 <i>rpoS::Tet^r</i>	^a Yamada et al., 1991
AN666	AN547 <i>rpoS::Tet^r</i>	^a Yamada et al., 1991
AN667	AN562 <i>rpoS::Tet^r</i>	^a Yamada et al., 1991
AN676	AN526 <i>spoT::Tn10-Tet^r</i>	^a This study
AN677	AN526 <i>rpoS::Kn^r</i>	^a Baba et al., 2006
AN678	AN677 <i>spoT::Tn10-Tet^r</i>	^a This study
AN706	AN314 <i>spoT::Tn10-Tet^r</i>	^a This study
AN770	AN525 <i>dps::Kn^r</i>	^a Baba et al., 2006
AN771	AN526 <i>dps::Kn^r</i>	^a Baba et al., 2006

AN774	AN525 <i>himA</i> ::Kn ^r	^a Baba et al., 2006
AN775	AN526 <i>himA</i> ::Kn ^r	^a Baba et al., 2006
AN776	AN525 <i>himD</i> ::Kn ^r	^a Baba et al., 2006
AN777	AN526 <i>himD</i> ::Kn ^r	^a Baba et al., 2006
AN900	AN635 <i>hns-205</i>	^a Yamada et al., 1991
AN901	AN635 <i>crp</i> ::Kn ^r	^a Baba et al., 2006

表 6 の続き

AN902	AN676 <i>relA251</i>	^a Xiao et al., 1991
AN903	AN526 <i>relAnull</i>	^c Baba et al., 2006
AN904	AN903 <i>spoT</i> ::Kn ^r	^a This study
AN905	AN526 <i>spoT</i> ::Kn ^r	^a This study
AN754	MC4100 (P2-10up <i>-lacZ</i>)	This study
AN755	AN754 <i>hns-205</i>	^a Yamashino et al., 1995
AN906	AN754 <i>crpnull</i>	^c Baba et al., 2006
AN907	AN906 <i>hns-205</i>	^a Yamashino et al., 1995
AN908	AN903 <i>spoT</i> ::Tn10-Tet ^r	^a This study
CF1678	MG1655 <i>relA251 spoT209</i>	Bremer et al., 1995

プラスミド

pMkt1403	<i>lacZ</i> operon fusion plasmid	Kawano, 2002
pSTV29	cloning vector	Takara
pUC19-HNS	pUC19 containing <i>hns</i>	T.Mizuno
pCP20	温度感受性複製開始点を持つ、フリッパーゼ発現プラスミド	Datsenko and Wanner, 2000
pHNS	pSTV29 containing <i>hns</i>	This study
pSHA7	<i>crp</i> が <i>bla</i> プロモーターで転写されるアリルを持つ pSTV29	Ishizuka et al., 1994

^aオリジナルの株からP1 ファージにより変異アリルを移した。

^bオリジナルの株から ファージ上に存在している*lacZ*融合遺伝子を ファージごとMC4100 株に移した。

^cオリジナルの株からP1 ファージにより変異アリルを移し、その後、カナマイシンアリルを除いた。(材料と方法を参照)

表 7 本研究で用いたプライマー

Name	Sequence
pr3yfhA	CCTTCCTTGAAATCGTTTGCATC
pr3yfhK	CCTTTCGTGTTTTTCGACGACGG
pr3mazE	CCCCAGACTTCCTTATCTTTCGG
pr58	TCGACGTCAAACAATGCC
pr3M	CATCGTCCCTCCTTTAGGG
pr35	CCATACCGCAGAACAGATCC
pr5P2-10up	CCCCGATAGTGATATAATCGAAACCGTCTC
pr3P2-10up	GAGACGGTTTCGATATATACTACTATCGGGG
pr5P2_18	TCTGGGCAGCTTACAAGC
pr5P2_12	GATGATTTTGCGCCATACC
pr5P2_6	AAAAACTGGAACGCTTTTCG
pr3P2_0	GACGGTTTCGAGTAATCTC
pr3P2_80	GGTTCACACCCGCATTGACC
pr5tetin	AACCACCAATAATAGGCC
pr3tetin	GCAGGAGAGATTTACCGC
pr5tetout	GGAAGGAACGTCAATTCCC
pr3tetout	GCTGCTTATAACAGGCACTG
pr5 <i>spoT</i>	GCCTATCTGTTTGAAAGCCTGAA
pr3 <i>spoT</i>	CCATTTCCGGTTTCGGGTGACTTT

^a太字斜体は変異を入れた塩基を示している

表 8. プライマーセットとプロモーター

Name	Primer set	Location ^a
P2 α	pr58-pr3P2_0	-254 ~ +2
P2 β	pr58-pr3P2_80	-254 ~ +91
P2 γ	pr5P2_18-pr35	-187 ~ +91
P2 δ	pr5P2_12-pr35	-118 ~ +169
P2 ϵ	pr5P2_6-pr35	-74 ~ +169
P2 ζ	pr5P2_6-pr3P2_0	-74 ~ +2
P2-10up	pr58-pr3P2-10up, pr5P2-10up-pr35	-254 ~ +169
CRPup	pr58-pr3P2mCU, pr5P2mCU-pr35	-254 ~ +169

^aこれらの数字は*relA*P2の転写開始点からの距離を示している(転写開始点を+1とし、上流方向を-とした)

*spoT*欠失株の作製

*spoT*の欠失株の作製は山本奈津子博士により行われた。*spoT*は必須遺伝子であるため(Xiao et al., 1991)、*spoT*の欠失株の作製は*SpoT*をプラスミドから発現させて相補しながら行われた。BW25113を、pFE604(Yamamoto unpublished)のIPTG誘導プロモーター下流に*spoT*構造遺伝子がクローニングされたプラスミドで形質転換し、BW25113pFE604*spoT*を作製した。この株に対して1mM IPTG存在下で、Datsenkoらの方法を用いて*spoT*欠失株が作製された(Datsenko and Wanner, 2000)。得られた株は、PCRによりその欠失を確認し、更にP1ファージにより野生株に導入されないことも確認した。本研究で用いられたAN904、AN905はもともと*relA*の変異株であったため*spoT*の欠失が導入できた(表6、Xiao et al., 1991)。

*crp null*及び*relA null*アレルの作製

Keio collectionは、各遺伝子がコードしているORFのうちアミノ末端側、カルボキシル末端側それぞれ3アミノ酸ずつを残した状態で、in-frameでカナマイシン耐性遺伝子が挿入され、破壊されている(Baba et al., 2006)。カナマイシン耐性遺伝子はその両端にフリッパーゼ認識部位を持っており、高温感受性の複製開始点、フリッパーゼを持つpCP20プラスミドにより除去することが可能である(Datsenko and Wanner, 2000)。また、*spoT*欠失株はカナマイシン耐性遺伝子によって破壊されていることから、*relA-spoT*二重欠失株の作製は、*relA null*アレルを作製した上で行った。AN526株にP1ファージにより*relA::K^r*アレルを形質導入し(Baba et al., 2006、第一章参照)、AN526 *relA::K^r*を作製し、この株及びAN543をpCP20によって形質転換した。形質転換株は、カナマイシン耐性遺伝子アレルが消失していることが期待される(Datsenko and Wanner, 2000)。形質転換株のコロニーを1ml LB培地に懸濁後、1 μ lを1000倍希釈し、それを1 μ l、寒天培地にまき、42 $^{\circ}$ Cで一昼夜培養した。生えてきたコロニーは、pCP20が高温感受性の複製開始点を持つことから、pCP20を持っていない株であることが考えられる。

こうして得られた株について、カナマイシン感受性、クロラムフェニコール感受性を調べた後、どちらにも感受性を示した株についてPCRにより*relA null*アレルを確認した。PCRには、pr58 と*relA*の下流に位置する*mazE*構造遺伝子の3'側のプライマー(pr3mazE)を使用し、野生株よりもその部位が短くなっていることを確認した。*crp null*についても同様に作製した。PCRによる確認には*crp*の上流に逆向きに位置する*yfhA*、下流に同じ向きで位置する*yfhK*それぞれの3'側のプライマーを使用した(pr3yfhA、pr3yfhK、表7)。

LacZ活性の測定

LacZ 活性測定は第一章と同様に行った。サンプルはそれぞれ示した時間に回収した。

RNAの抽出とプライマー伸張法

RNAの抽出とプライマー伸張法は第一章と同様に行った。一昼夜培養したW3110とAN584を1000倍希釈して800 ml LB培地に植え継ぎ、示したOD₆₀₀になった時に菌体を回収し、RNAを抽出した。

トランスポゾンによるmutagenesis

トランスポゾン mutagenesis は Kleckner らのプロトコール、トランスポゾンを用いた (Kleckner et al., 1991)。100 ml の LB 培地で一昼夜培養した AN529 株は、5,000 rpm、10 分、4 で遠心により集菌した。菌体は SM 緩衝液 (50mM Tris-HCl pH7.5, 0.1M NaCl, 7mM MgSO₄)、5 ml に懸濁し、5 ml の 10⁸⁻⁹ pfu の NK1323 と混ぜ、37 で 15 分、室温で 15 分静置した。その後、5,000 rpm、10 分、4 で遠心し、沈殿物を 2 ml のクエン酸緩衝液 (0.1 M クエン酸ナトリウム pH5.5) にて洗浄した。同様の洗浄を更に 2 回した後、2 ml のクエン酸緩衝液に菌体をけん濁した。菌体は、100 μl ずつテトラサイクリンを含む X-Gal LB プレートに撒いた。一昼夜培養後、青く見えるコロニーを回収し、テトラサイクリンを含む X-Gal LB プレートに再び植え継いだ。ここまでの実験は 3 回行い、18477 株のテトラサイクリン耐性のコロニーを得た。そのうち 69 株が青色に見え、植え継いだ。54 株は白いコロニーを形成した。コロニーの色が白に変わったことについては、単純に目の錯覚であるか、*lacZ* を持つ ファージの多コピー化が原因ではないかと考えられる。15 株について、P1 ファージによりテトラサイクリン耐性遺伝子座を MC4100 株に形質導入し、溶原化した状態で *lacZ* を保持している ファージと分離した。P1 ファージによる遺伝子座の回収は、ファージも同時に回収してしまうために形質導入時に悪影響を与えるためにこのような純化を行った。ファージと分離したテトラサイクリン耐性遺伝子座を再び P1 ファージにより回収し、今度は本来の親株である AN529 株に形質導入し、*relA*P2-*lacZ* の LacZ 活性が再びサプレスされるかを調べた。

その結果、7 株が再び青色を呈し、その他の株は白コロニーを形成した。以上の結果からこの 7 株が *hns* のサプレッサー変異株であると判断して、トランスポゾンの挿入位置を確認した。トランスポゾン挿入位置の決定には inverse PCR 法を用いた (真木, 1999)。10 ml LB でトランスポゾン挿入株を一昼夜培養し、5,000 rpm、10 分、4℃ で遠心後、沈殿物を DNA 抽出緩衝液 (50mM Tris-HCl pH8.0, 0.4M NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS, 0.5 mg/ml proteinase K) にけん濁し、65℃ で一昼夜分解した。フェノール処理、クロロホルム処理後、エタノール沈殿を行い、沈殿物をパスツールピペットに巻き取り、500 µl の TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) に溶かした。10 µl (およそ 2 µg) の DNA を *PvuII* にて制限酵素処理を行い、フェノール処理、クロロホルム処理後、エタノール沈殿を行い、水に溶かした後、Takara Ligation Kit ver.1 (Takara) にてライゲーションを行った。ライゲーションされた DNA は、フェノール処理、クロロホルム処理後、エタノール沈殿を行い、水に溶かし、それを鋳型として pr5tetin-pr3tetin で PCR を行った。PCR 産物は 10 倍希釈して、2 回目の PCR を pr5tetout-pr3tetout で行った。その結果、7 株中 5 株において、およそ 300 bp に同一の特異的な増幅産物が見られた。その産物を鋳型に pr5tetout を用いてシーケンス反応を行い、Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) にてトランスポゾン挿入 ORF が *spoT* であることを決定した。トランスポゾン挿入位置は、*spoT* の塩基配列と見比べることにより判断した。シーケンス反応がうまくいかなかった株については、SpoTORF のプライマーを用いて PCR により *spoT* 構造遺伝子内にトランスポゾンの挿入を確かめた。

III. 結果

核様体タンパク質変異株内での*relA*プロモーターの転写活性

ppGppがアミノ酸飢餓やエネルギー飢餓下をはじめとするストレス応答に関与している今までの知見(Cashel et al., 1996)や*relAP2*が生育移行期に一時的に発現することを考えると、*relA*の転写レベルでの環境応答を考えることができる。環境応答において発現が誘導もしくは抑制される遺伝子の多くは、核様体タンパク質群によって制御されている。よって*relA*の転写が核様体タンパク質群による制御を受けているかを検討すべく、各プロモーターアレルと*lacZ*遺伝子の融合遺伝子を用いて、核様体タンパク質変異株内での発現を、LacZ活性を指標に観察した(図 22)。今回H-NS(*hns*)、LRP(*lrp*)、IHF(*himA*および*himD*)、Dps(*dps*) (カッコ内はその遺伝子名を表す)の核様体タンパク質の関与について検討した。Fisも環境応答に重要な核様体タンパク質の一つであるが(Ishihama, 1999)、OD₆₀₀ = 1.0の時の1 mlあたりの生菌数が、野生型において 1.16×10^9 に対して*fis*変異株ではおよそ 0.61×10^9 と低いために、菌体の吸光度で標準化する今回のLacZアッセイ系では観察することが不適切であると判断した。また、ゲノム上の広範にわたって核様体構造に影響を及ぼすHUの変異株作製には、HU₁、HU₂のホモダイマーが、各々の変異を相補してしまうために、*hupA-hupB*二重欠損株が必要であるが、本研究室では作製できなかったために断念した。実験の結果、*relAP1* において*hns*変異株内で20%程度その発現に減少が見られた。更に*himA*及び*himD*変異株内では40%程度の減少が見られた(図 22A)。その他の核様体タンパク質変異株内での*relAP1*の転写活性はほとんど変化が見られなかった。*relAP2* においては、*lrp*、*himA*、*himD*変異株でおおよそ40%程度の活性の減少が見られたが、*hns*変異株では、その活性が劇的に抑えられた。言い換えると*relAP2*はH-NSにほぼ依存していることが示唆された。以上の結果をまとめると、IHFは*relAP1*、*relAP2*の両方に同等に正に作用していることが示唆され、H-NS、CRP、LRPは*relAP2*を比較的特異的に正に制御していることが示唆された。一方でDpsはどちらのプロモーターにも作用していなかった。尚、IHFは*himA*がコードするIHFと*himD*がコードするIHFがヘテロダイマーを形成してのみ機能することから(Nash and Robertson, 1981)、*himA*、*himD*の変異株の結果がほぼ一致したのは適切である。しかし、制御の異なる2つのプロモーターで同じ因子が同様の制御を行っていることから、LacZのmRNAやタンパク質の安定性に影響している可能性をこの時点で排除できないために、これ以上の研究を断念した。

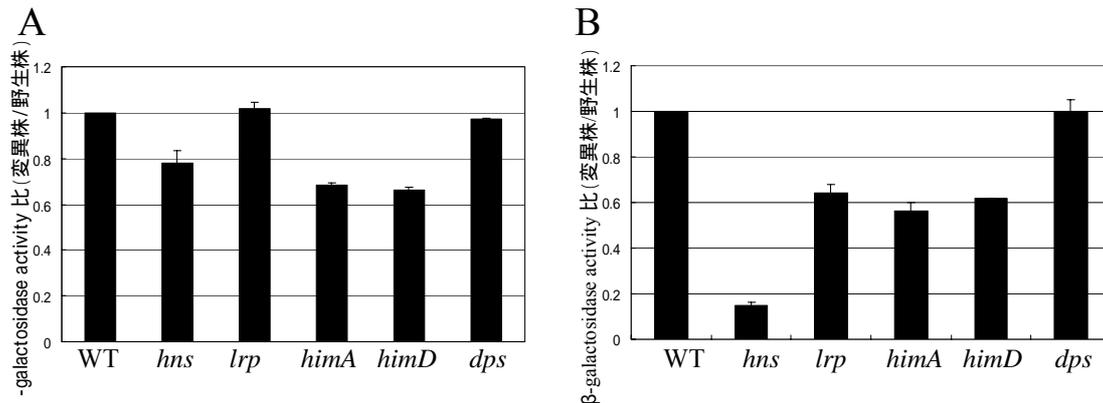


図 22 各核様体タンパク質変異株における *relAP1*、*relAP2* の活性

relAP1-lacZ(A)、*relAP2-lacZ*(B)の活性を野生株 (AN525、AN526: WT)、*hns*(AN545、AN529)、*lrp*(AN559、AN561)、*himA* (AN774、AN775)、*himD* (AN776、AN777)、および *dps* (AN770、AN771)変異株内で測定した。野生株の Miller Units を 1 とした時の相対値をグラフで示す。

H-NS は *relAP2* の発現を正に制御している。

hns 変異株内で *relAP2* の発現は著しく抑制されていた(図 22)。そこで、更に詳細に H-NS の *relAP2* に対する寄与を解析すべく、生育を通じた *relAP1* と *relAP2* の転写活性を野生株 (AN525、AN526) と *hns* 変異株 (AN545、AN529) で比べた(図 23)。 *hns* 変異株の生育は野生株に比べ遅く、最終濁度も低かった(図 23A、B)。この結果は Yamada らの観察結果と一致している (Yamada et al., 1991)。 *relAP1* の転写活性は、 *hns* 変異株内で生育を通じて野生株と比べ 20~30%抑えられていた(図 23C)。一方で *relAP2* においては、生育を通じてその活性は著しく抑えられていた(図 23D)。このような *relAP1* と *relAP2* の *hns* 変異に対する応答の違いは、 *relAP2* 特異的に H-NS が機能する要素があることを示唆しており、H-NS が *relAP2* を正に制御していると考えられた。H-NS を *hns* 変異株で過剰に発現させると *relAP2* の転写活性は相補されることから(図 27 参照; 詳しくは後述する)、 *hns* 変異株内の *relAP2* の転写活性が抑えられるという現象は、H-NS が合成されないことに起因すると判断できた。

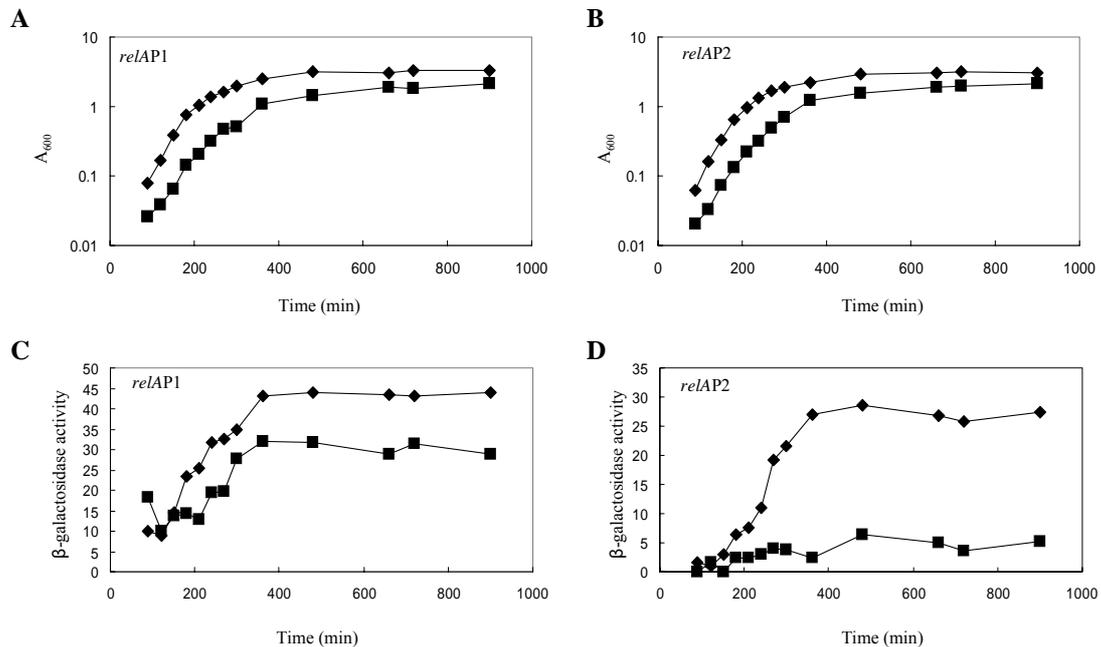


図 23 *relAP1* 及び *relAP2* に対する *hns* 欠失の影響

relAP1 及び *relAP2* を *lacZ* 遺伝子に融合させたアリルを持つ野生株または *hns* 欠失株における生育 (A, B) と LacZ 活性 (C, D) を示す。over-night 培養液を 500 倍希釈して 50mL LB で生育させ、時間ごとにサンプリングを行った。A, B) *relAP1-lacZ* を持つ株についての結果を示す。□: AN525 (野生株), ◇: AN545 (*hns*⁻) を表している。C, D) *relAP2-lacZ* を持つ株についての結果を示す。□: AN526 (野生株), ◇: AN529 (*hns*⁻)。

LacZ 活性の測定は、ファージを溶原化させた菌体で行われており (第一章、方法と材料参照)、H-NS の効果がファージ領域特異的なものである可能性が考えられた。よって、大腸菌が本来持つ *relA* 遺伝子座からの転写をプライマー伸張法により観察した (図 24)。実験は野生株 (W3110) と *hns* 変異株 (AN584) からトータル RNA を抽出し、*relAP1*、*relAP2* からの転写産物をそれぞれ同じサンプルから観察した。その結果、*relAP1* からの転写産物は、生育を通して *hns* 変異株内では若干減少していた (図 24、左側)。これは LacZ アッセイの結果と一致していた (図 23C)。一方 *relAP2* からの転写産物は *hns* 変異株内ではほとんど同定できず、劇的に減少していた (図 24、右側)。これは、*relAP2-lacZ* の LacZ 活性が *hns* 変異株内で減少するという LacZ アッセイの結果と一致していた (図 23D)。以上の結果から、図 23D で観察された *hns* 変異株内で *relAP2* の転写活性が抑えられるという現象は、mRNA レベルでも認められた。よって、*relAP2* は H-NS によって正に制御されていると結論付けられた。

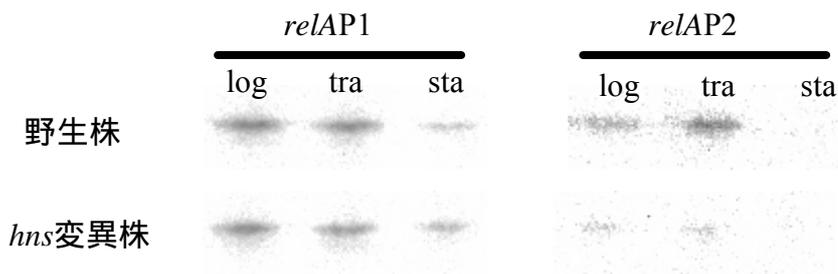


図 24 野生株と *hns* 変異株内での *relAP1* もしくは *relAP2* 由来の mRNA の定量

野生株 (W3110) および *hns* 変異株 (AN584) から抽出したトータルRNAを鋳型に pr3M (*relAP1*) または pr35 (*relAP2*) プライマーを用いてプライマー伸張法を行った結果を示す。全てのサンプルは 45 μ g のトータルRNAを用いることにより標準化した。logはOD₆₀₀ = 0.4、traはOD₆₀₀ = 1.0、staはOD₆₀₀ = 4.0 (W3110)、3.0 (AN584) で菌体を回収した。

H-NS は *relAP2* の転写開始点上流 74 bp から下流 2 bp の間に作用している。

H-NS はその特異性が低く、Km 値が μ M のオーダーで非特異的に DNA 断片と結合してしまう (Dorman, 2004)。よって、たとえ H-NS が直接的に *relAP2* のプロモーター領域に結合していたとしても、それが本当に機能している結合なのかを in vitro レベルで判断するのは難しい。そこで、少なくともどの領域に H-NS が in vivo で作用しているかを調べた。実験は図 25A に示すような *relAP2* のプロモーター領域を狭めたアリルを作製し、これを *lacZ* 遺伝子に融合させ、その LacZ 活性を指標に *hns* 変異に対する感受性を観察した (図 25B)。その結果、野生株において のアリルの転写活性が他のアリルに比べ 30%程度高かった。これは +2 ~ +91 の間に転写を抑制しているエレメントが存在していることを示唆している。また、-118 ~ -74 の領域を持たないアリルは (、) その転写活性が 40%程度減少していた。このように各アリルによって転写活性が若干異なっていた。しかし、すべてのアリルにおいて (P2 以外) *hns* 変異株内ではその転写活性が劇的に減少した (図 25B)。これは、すべてのアリルが H-NS による転写制御を受けており、その最小単位である 領域内に H-NS が作用しているエレメントが存在していることが示唆している。

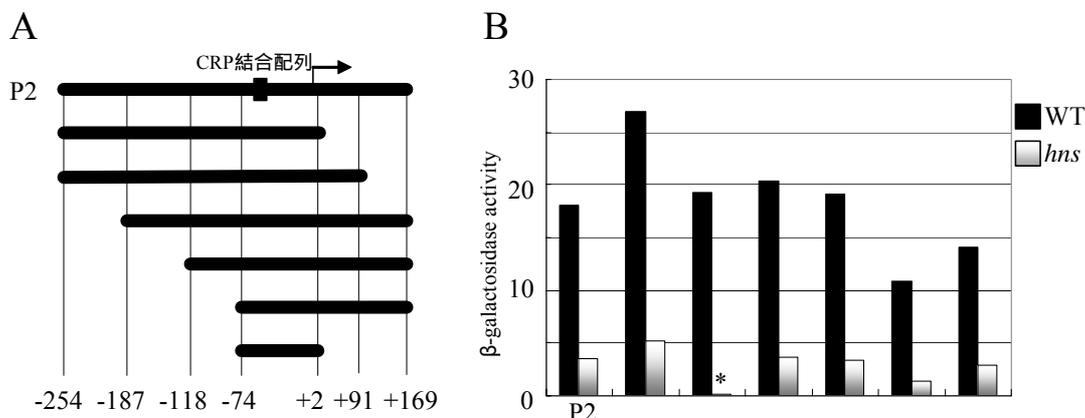


図 25 H-NS が作用するシスエレメント部位の限定

A)本実験で作製した *lacZ* 遺伝子と融合させたアレルの模式図を示す.それぞれのアレルには ~ までの名前をつけてあり, B)の図と対応している.下の数字は転写開始点を +1とした時の場所を示している. B)*lacZ*アッセイの結果を示す.実験は一昼夜前培養した液を 500 倍希釈で 50 ml LB 培地に入れ, サンプルングはその 15 時間後に行った.*:実験を行っていない.

H-NS は CRP の転写活性化に影響を及ぼしているかもしれない.

現在までにH-NSは単独で転写を活性化できるようなドメインを持つという報告はない.また, H-NSは*relAP2*上のCRPが結合する部位を含んだ領域に作用する(図25).以上のことから, H-NSが正に*relAP2*の転写活性を制御するメカニズムとして, CRPによる*relAP2*の活性化を助けるような働きがあるのではないかと考えられた.もし, H-NSがCRPの*relAP2*に対する制御に協調的に影響を及ぼしているのであれば, *hns-crp*二重変異株内での*relAP2-lacZ*のLacZ活性は*hns*変異株内及び*crp*変異株内のそれらとはほぼ同じ値を示すことが考えられる.一方でH-NSの作用がCRPと独立的であれば, その値は付加的になる.しかし, *crp*変異株, *hns*変異株における*relAP2*の転写活性は低すぎ(図13, 第三章図23D), CRPとH-NSが協調的に機能しているのか付加的に機能しているのかの判別が難しい.そこで*relAP2*の⁷⁰認識-10配列(GATACT)を100%一致させた変異(TATAAT)と置換した*relAP2*を作製し, *lacZ*と融合させた遺伝子を作製した(P2-10up, 表8).これを*relAP2-10up*と呼称する.TATAATは⁷⁰単独で認識が可能で, 付加的な転写因子がなくとも転写活性を持つことが知られている(Chan and Lebowitz, 1990).よってこのアレルを用いればLacZの基本的な活性が上がり, *hns*変異, *crp*変異, *hns-crp*二重変異による影響を観察しやすいことが期待された.そのような*lacZ*融合遺伝子を持つ*hns*変異株, *crp*変異株, *hns-crp*二重変異株のLacZ活性を

測定した(図 26) . *relAP2*-10upは野生株内で野生型*relAP2* と比べおよそ 7 倍強い LacZ活性を持っていた(図 26A,BのY軸を比べる) . 更にCRPに依存しない転写活性があることが示された(図 26B, *crp*) . *hns*変異に対する感受性も有しており、その値は *crp*変異と同じ程度であり、また、*hns*-*crp*二重変異ともほぼ同じ値を示した(図 26B) . 以上の結果からH-NSは基本的な転写活性には影響を及ぼさず、CRPによる転写の活性化に影響を及ぼしており、H-NSがCRPの*relAP2* の活性化に協調的に機能していることが示唆された . 尚、今回の実験では*crp*nullアリルを使用したが、*relAP2* に対する活性には*crp::Kn^r*アリルと違いはなかった(第二章) .

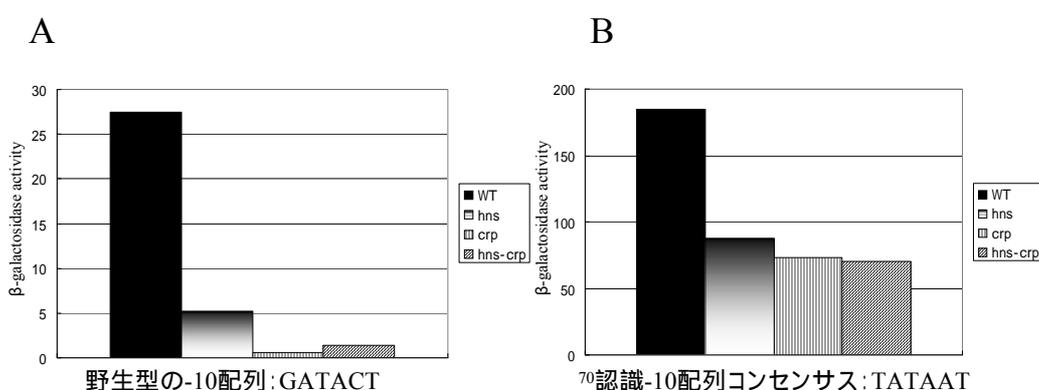


図 26 *relAP2* の-10 配列をコンセンサス配列に変えたときの *hns*、*crp*、*hns-crp* 変異に対する感受性

relAP2 の-10 配列を 70 認識コンセンサス配列に変えたプロモーター(表 8)を *lacZ* 遺伝子に融合させた株 (AN754) を作製し、その株に *hns* 変異 (AN755)、*crp* 変異 (AN906)、*hns-crp* (AN907) 二重変異を導入した . それぞれの株を一昼夜前培養した培養液を 500 倍希釈して 50 ml LB 培地で生育させ 15 時間後に菌体を回収後、LacZ 活性を測定した . A) 野生型の *relAP2* の-10 配列の結果 . WT、*hns*、*crp*、*hns-crp* はそれぞれ AN526、AN529、AN545、AN562 を用いた . B) 70 認識コンセンサス配列に変えたプロモーターの結果 .

H-NS 及び CRP は同時に存在しないと *relAP2* を制御できない .

もし、CRP と H-NS が協調的に *relAP2* を制御しているのであれば、*hns* 変異株内で CRP を過剰に発現しても転写は相補されないことが考えられる . その逆も考えられることから、この仮説を検証するために H-NS、CRP の過剰発現による *relAP2* の活性を測定した(図 27) . 実験は *relAP2-lacZ* を持つ野生株 (AN526)、*hns* 変異株 (AN529)、

crp 変異株 (AN543) を pCRP、pHNS、そしてそのバックボーンプラスミドである pSTV29 により形質転換させた株を作製した。それぞれの LacZ 活性を図 27 に示す。その結果、*hns* 変異株に H-NS を過剰発現させた場合 (AN632)、コントロール (AN555) に比べ明らかな転写誘導が観察されそのレベルは野生株で H-NS を過剰発現させた場合 (AN631) と同等であった。このことは pHNS が機能的であることを示している。更に pCRP においても同様に、CRP を *crp* 変異株で過剰発現させる (AN552) と野生株 (AN550) と同等の発現が観察されたことから、機能的であることが示された。しかしながら *hns* 変異株で CRP を過剰に発現させた場合 (AN556)、更に *crp* 変異株で H-NS を過剰に発現させた場合 (AN632) に、それぞれのコントロールと比べ (AN551 と AN555)、その発現に明らかな差は見られなかった。以上の結果と変異株の結果 (図 13D、図 23D) をあわせて考えると CRP だけもしくは H-NS だけでは *relAP2* を制御することができない。このことは H-NS が CRP による *relAP2* の活性化を助けるという本研究の仮説に矛盾しないものである。

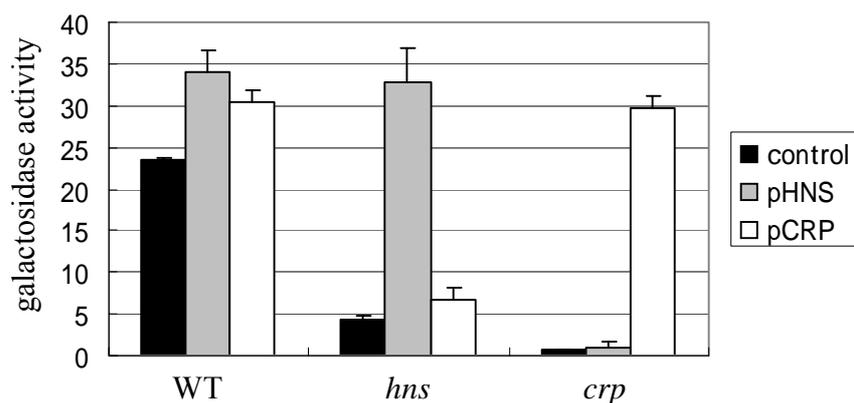


図 27 CRP 及び H-NS を過剰発現させたときの *relAP2* の活性

relAP2-lacZ を持つ、野生株 (AN526)、*hns* 変異株 (AN529)、*crp* 変異株 (AN545) に H-NS (pHNS) または CRP (pCRP) を過剰に供給した時の LacZ 活性を示す。control は何もクローニングしていない pSTV29 で形質転換させた株のデータを示している。大腸菌は一昼夜前培養の後 500 倍希釈して 50 ml LB-クロラムフェニコール培地にて培養した。菌体は inoculation 後 12 時間後に回収し、LacZ 活性を測定した。

CRP が強く結合できる場合、H-NS の依存性は見られない。

H-NS は核様体構造を規定している因子の一つであることから、H-NS による DNA 構造の制御が CRP の *relAP2* 領域に対する結合能に影響を及ぼしている可能性が考えられた。CRP の *relAP2* への結合は非常に弱く (図 15)、H-NS の影響を強く受けている可能性があるため、もし CRP が強く結合できるようなプロモーターであれば、H-NS なしでも転写が活性化されるのではないかと推測された。そこで、*relAP2* の CRP 結合配列

をコンセンサス配列と 100% 一致したアリルを作製し、*lacZ* と融合させ、LacZ 活性を指標に *hns* 変異に対する感受性を観察した (図 28)。その結果、野生株内での *relAP2CRPup* の発現は対数増殖期から強く誘導され、生育を通じて野生型の *relAP2* よりもおよそ 100 倍近い活性化が観察された。これは CRP の結合力とほぼ一致した結果であった (図 15A、C)。 *hns* に対する感受性は *relAP1-lacZ* の結果 (図 23C) と同程度でその最大値でおよそ 30% の減少が認められたものの、野生型 *relAP2* ほどの感受性 (図 23D) は示さなかった。以上の結果から CRP の結合が強いと H-NS に独立的に CRP による転写活性化が成されることが示唆された。

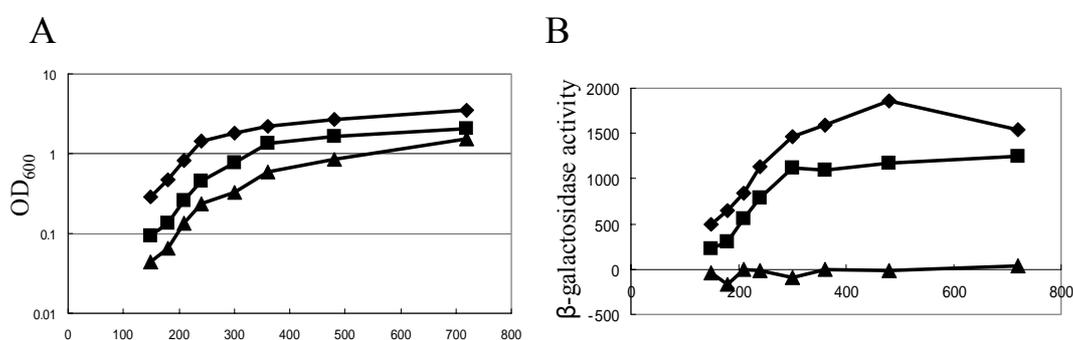


図 28 *relAP2* の CRP 結合配列をコンセンサス配列に変えたときの *hns*、*crp* 変異に対する感受性

relAP2CRPup-lacZ を持つ、野生株 (AN635)、*hns* 変異株 (AN900)、*crp* 変異株 (AN901) を一昼夜前培養の後 500 倍希釈で 50 ml LB 培地で生育させ、時間を追ってその生育 (A) と LacZ 活性 (B) を測定した。ダイヤは AN635、四角は AN900、三角は AN901 の結果を示している。

H-NS の存在下で CRP は *relAP2* にプロモーター領域に結合しやすくなるかもしれない。

図 28 の実験から H-NS が CRP の DNA 結合能に影響を及ぼす可能性を推測することができた。よって H-NS 存在下での CRP の *relAP2* DNA 断片に対する結合を観察した (図 29)。実験は CRP-His または精製された H-NS (名古屋大学水野猛教授による)、もしくはその両方を *relAP2* DNA 断片と混ぜてゲルシフトアッセイを行った。CRP-His のみと DNA 断片を混ぜたところ CRP-His-DNA の複合体が観察された (図 29, lane 2, 矢印)。これは先の第二章の結果と一致している。H-NS のみを DNA 断片と混ぜた場合明瞭なシフトバンドは観察されなかった (図 29, lane 3)。しかし、CRP-His と H-NS が同時に存在した場合、DNA のほとんどはスミア状にシフトしていた (図 29, lane 4)。このスミア状のシフトは、サンプルから cAMP を除くと見られなかったことから、少なくとも

CRP の DNA 結合活性が、スミア状のシフトを引き起こしていることが示唆された。現段階では、この現象が何を意味するかは不明であるが、少なくとも CRP と H-NS が同時に存在した場合、何らかの DNA-タンパク質複合体の形成が促進されるのかもしれない。

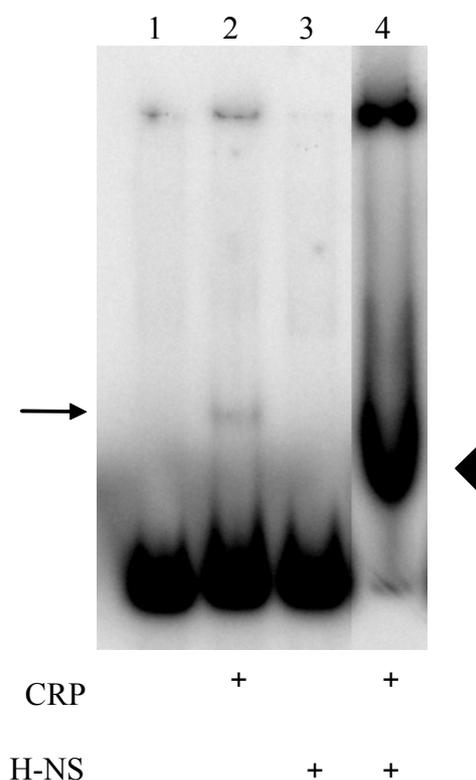


図 29 H-NS の CRP-his の *relAP2* プロモーターDNA に対する結合

relAP2 の転写開始点を+1とした時、-118 ~ +91 の領域の DNA 断片をラベルし、いかなるタンパク質とも混ぜなかったもの (lane 1)、200 ng の CRP-His と混ぜたもの (lane 2)、400 ng の H-NS と混ぜたもの (lane 3)、200 ng の CRP-His と 400 ng の H-NS と混ぜたもの (lane 4) をそれぞれポリアクリルアミドゲルに泳動した結果を示す。泳動ゲルには 0.1mM cAMP が含まれている。矢印は CRP-his と DNA 断片の複合体、三角は DNA 断片とタンパク質の複合体を示している。

***hns* 変異株内での *relAP2* が抑制される現象を *spoT* の変異がサプレッサーする。**

H-NS による *relAP2* の制御を更に理解すべく、トランスポゾンによるサプレッサー遺伝子の探索を行った。*relAP2-lacZ* を持つ *hns* 変異株 (AN529、表 6) は、X-Gal を含む LB プレート上で白色のコロニーを形成する。この株にトランスポゾン (Tn10) を作用させて青色を呈するコロニーが、*hns* 変異株の *relAP2* に対するサプレッサーである可能

性が高い。トランスポゾンにはテトラサイクリン耐性遺伝子があり、トランスポゾンが挿入された株はテトラサイクリンに耐性を示す。以上のような系を用いて実験を行ったところ、18,477株のテトラサイクリン耐性株が得られ、そのうち7株が青色を呈した。7株についてトランスポゾン挿入位置を同定したところ、すべてにおいて *spoT* 構造遺伝子内に発見された。トランスポゾン挿入位置はシーケンス反応が成功した5株について明らかになったが(図30A)、他の2株についても *SpoT* の両端のプライマーを用いたPCR反応で、*SpoT* 内にトランスポゾンが挿入されていることを確認した。これらの株はすべて *hns* 変異株内で *relAP2* の転写活性がほとんど見られないという表現型をサブプレスしていた(図30B)。

spoT は致死遺伝子であるが、*relA* が機能していないあるいは機能が弱い場合には破壊することができる(Xiao et al., 1991)。AN529はMC4100由来で *relA1* という *relA* 活性がほとんどない変異株であったため *spoT* を破壊することができたと考えられる。実際に野生型 *relA* を持つ W3110 株にこの *spoT::Tn10* アリルを P1 ファージによる形質導入を試みたところ、*spoT::Tn10* の導入は起こらなかった。

SpoT は ppGpp の合成と分解をする酵素であり、今回トランスポゾンにより得られた変異株は ppGpp の量が変化していることが考えられた。そこで、まず、ppGpp によって発現が誘導される遺伝子である *rmf-lacZ* (Izutsu et al., 2001) の LacZ 活性を指標に、ppGpp 量の変化を類推した(図30C)。実験は *rmf-lacZ* を持つ MC4100 株 (AN314、表6) と AN314 に P1 ファージにより *spoT::Tn10* を形質導入した株 (AN706、表6) を作製し、LacZ 活性を測定した(図30C)。その結果、*rmf* の転写は *spoT::Tn10* により著しく抑制され、*spoT::Tn10* は ppGpp を十分に合成できない株であることが示唆された。続いて実際に *spoT::Tn10* アリルを持つ株内での ppGpp 量を測定した(図30D)。実験は 32P-orthophosphate を含む LB 培地に野生株 (AN526、表6) と *spoT::Tn10* を持つ株 (AN676、表6) を生育させ、OD₆₀₀ が 1.0 (生育相移行期)、1.5 (早期定常期)、3.0 (定常期) の時に菌体を回収し、ppGpp 量を薄層クロマトグラフィー (TLC) により観察した(図30D)。その結果、AN676 は OD₆₀₀ = 1.5 の時に AN526 に比べ十分な ppGpp の集積ができないが、OD₆₀₀ = 3.0 の時には野生株とほぼ同量の ppGpp が検出された。これらの結果は、*spoT::Tn10* アリルは ppGpp を集積させることはできるが、その時期が遅くなるような変異であることを示唆している。

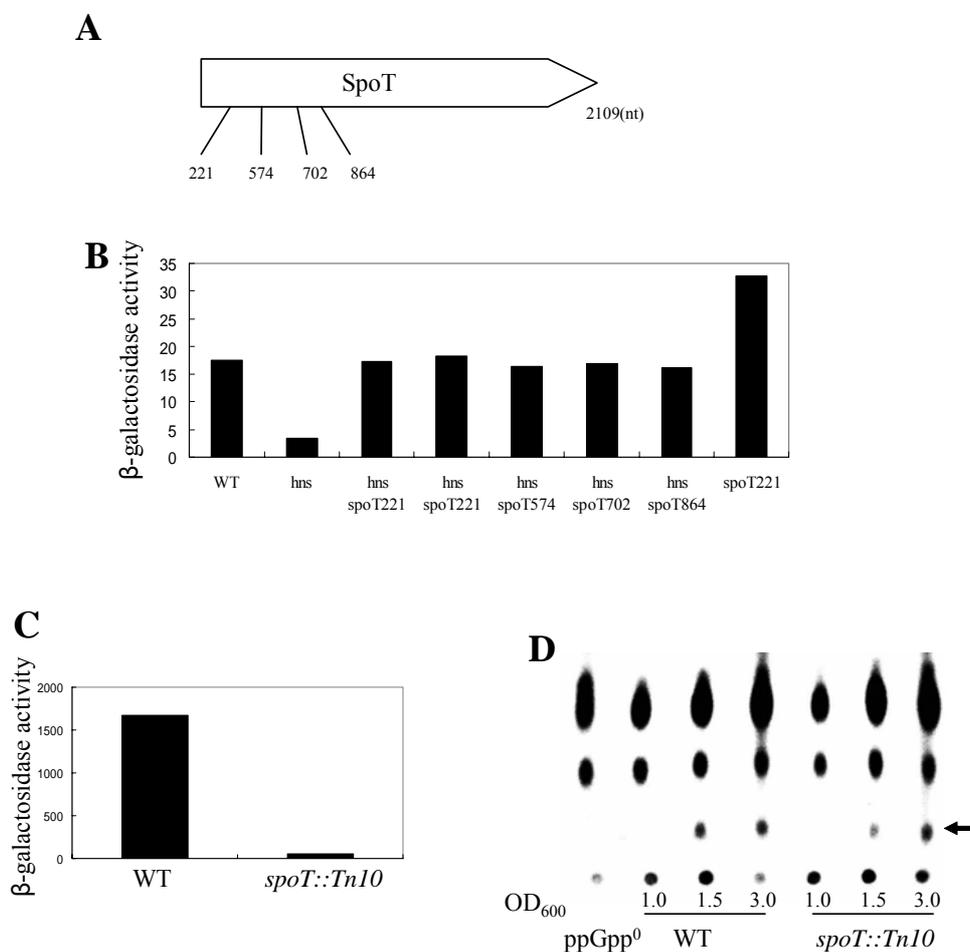


図 30 トランスポゾンによる *hns* 変異をサプレッサーする変異株の単離とその株の性質

A) トランスポゾン挿入位置. 7 株のサプレッサー株の内 5 株についてシーケンスが成功した. そのトランスポゾン挿入位置を示す. *spoT* 構造遺伝子内の 221 番目の塩基にトランスポゾンが挿入された株は 2 株得られた. B) サプレッサー及び *spoT221* アリルのみを持った株 (AN676) 内での *relAP2-lacZ* の LacZ 活性. 菌株は一昼夜前培養の後 500 倍希釈で 50 ml LB 培地で生育させ, 15 時間後に回収し, LacZ 活性を測定した. C) *rmf-lacZ* の *spoT221* アリル (*spoT::Tn10*) を持った株 (AN706) 内での LacZ 活性. WT は野生株 (AN314) を示す. B) と同様の条件で実験を行った. D) *spoT221* アリル (*spoT::Tn10*) を持った株 (AN676) 内の ppGpp 量を TLC により測定した. 矢印は ppGpp のスポットを示している. 菌体は LB 培地に 100 μ Ci/mL の 32 P-orthophosphate を含む培地で生育させ, OD₆₀₀ = 1.0, 1.5, 3.0 の時に回収し, 硝酸処理したものを TLC プレートに展開した. ppGpp⁰ は ppGpp を合成できない株として報告されている CF1678 の OD₆₀₀ = 3.0 の時のサンプルを展開した (Xiao et al., 1991).

ppGpp null 株でも *relAP2* の転写活性を *spoT::Tn10* 株と同程度抑制する.

spoT::Tn10 株内におけるppGpp量の減少が、*relAP2* の転写活性を脱抑制することから、まったくppGppを生産しない株 (ppGpp⁰) ではより強い脱抑制が観察されることが予想された。この仮説を検証するために、本研究室の山本の作製した*spoT*欠失株を用いて実験を行った。*spoT*遺伝子は*relA*が存在する場合致死遺伝子であるが、BW25113 株 (*relA*⁺) を用いて、プラスミドで相補しながら致死遺伝子破壊を実現する系により*spoT*遺伝子破壊株を作製した (Datsenko and Wanner, 2000)。このアリルは SpoT のアミノ基末端側、カルボキシル基末端側それぞれ 3 アミノ酸ずつしか残さないような形でカナマイシン耐性遺伝子が挿入されている (Baba et al., 2006)。更に MC4100 内にある*relA1* 変異は非常に弱いながらppGpp合成活性を持っているために *relA* アリルも in frame 欠失させた (Baba et al., 2006)。このような *relAnull*、*spoT* 欠失アリルを持つ株はppGppをまったく合成できないと考えられる。以上のようなアリルを持つ株、AN526 (*relA1*, *spoT*⁺)、AN676 (*relA1*, *spoT::Tn10*)、AN905 (*relA1*, *spoT::Kn^r*)、AN903 (*relAnull*, *spoT*⁺)、AN904 (*relAnull*, *spoT::Kn^r*)、AN908 (*relAnull*, *spoT::Tn10*) を用いてそれぞれにおける *relAP2-lacZ* の LacZ 活性を測定することにより *relAP2* の転写活性に対する、ppGpp⁰ の影響を検討した (図 31)。その結果、*spoT::Tn10* アリルと *spoT* 欠失アリル、ppGpp⁰ では *relAP2* に対する脱抑制効果はほぼ同じであった。以上の結果は、図 30D で観察された程度のppGppの減少とppGppがまったく作られないことは *relAP2* の発現制御にとって等しいことであり、TLC の観察下における野生株と *spoT::Tn10* 株のppGpp量のわずかな差が、*relAP2* の転写活性に影響を及ぼしたことを示唆している。また、*relA1* を *relAnull* に変えてもあまり影響がなかったことから、*relA1* によるppGppの合成能は *relAP2* の転写活性にはほとんど関係がないことがわかった。よって、*relAP2* はppGppによって抑制されており、*hns* 変異株内で *relAP2* の転写活性が下がるという現象がppGppの減少によってサプレスされると結論付けられた。

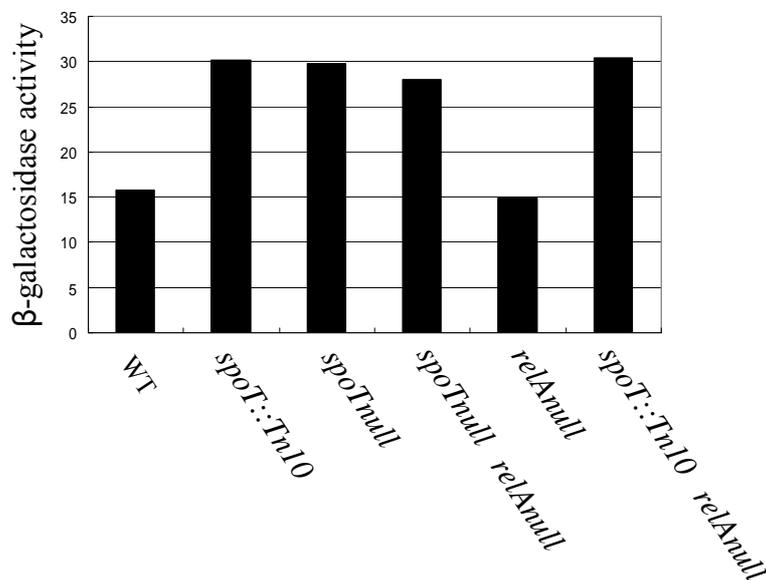


図 31 ppGpp null の *relAP2* に対する影響

*relAP2-lacZ*を持つ、AN526 (*relA1*, *spoT*⁺: WT)、AN676 (*relA1*, *spoT*::Tn10)、AN905 (*relA1*, *spoT*::Knr^r)、AN903 (*relAnull*, *spoT*⁺)、AN904 (*relAnull*, *spoT*::Knr^r)、AN908 (*relAnull*, *spoT*::Tn10)をLB培地で生育させ、15 時間後に菌体を回収し、LacZ活性を測定し、その結果を示している。AN903 以外のサンプルは全て 2 回以上実験を行ったが、AN903 は 1 回しか実験を行っていない。

rpoS の変異もまた *hns* 変異をサプレスする。

定常期特異的な 因子であるRpoSによる転写制御はppGppと協調的であることが知られている (Kvint et al., 2000) . 更に ⁷⁰によってプロモーターを認識される*uspB*は、RNAPコア酵素に対する ⁷⁰とRpoSの競合的な結合に影響され、結果としてppGppとRpoSに負に制御されている (Jishage et al., 2002) . これらの報告からppGppによって負に制御される*relAP2* は、RpoSによっても負に制御されるのではないかと考えられた . また、ppGpp量が少なくなる変異が*hns*変異をサプレスすることから、*rpoS*変異もまた*hns*変異をサプレスできることが予想された . 2 つの観点を検証すべく、*rpoS*、*hns-rpoS*変異株内での*relAP2* の発現を、生育を通じてLacZアッセイにより観察した (図 32) . その結果、*rpoS*単独の変異は生育の最初の方ではほとんど影響しなかったが、生育相移行期以降で*relAP2* の転写活性を上げるような効果があり、最終的に野生株と比べ 2 倍程度*relAP2* の転写活性が増した (図 32B、) . このことはRpoSが*relAP2* の転写活性

を抑えていることを意味しており、*spoT*のトランスポゾン挿入変異と同じ効果であった(図 30B)。*hns*に付加的に導入した*rpoS*の変異は、*hns*変異の生育が悪い表現型をある程度サプレスしていた(図 32A、×)。*relAP2* の転写活性に対する影響は予想通り、*hns*変異による*relAP2* の転写抑制を解除する働きがあった(図 32A、×と を比べる)。以上の結果からRpoSは*spoT*と同様に*relAP2* の転写活性を抑えており、その変異は*hns*変異をサプレスすることが示された。

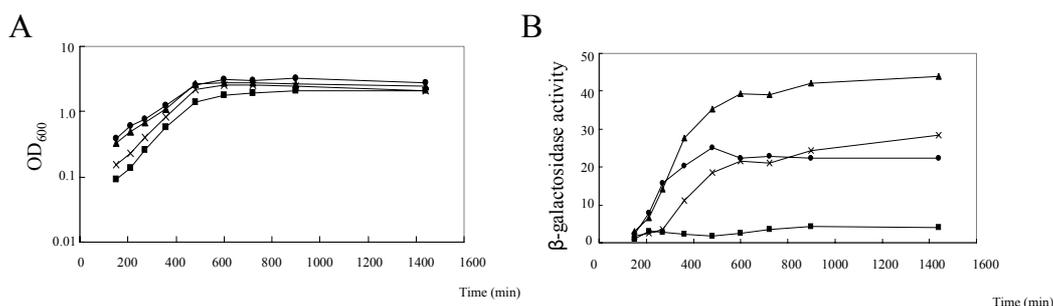


図 32 *relAP2* の *hns-rpoS* 二重変異に対する影響

relAP2-lacZ を持つ、野生株 (AN526、○)、*hns* 変異株 (AN529、□)、*rpoS* 変異株 (AN557、△)、*hns-rpoS* 二重変異株 (AN558、×)を一昼夜前培養し、500 倍希釈して 50 ml LB 培地で生育させ、時間を追ってその生育(A)と LacZ 活性(B)を測定した。

H-NS の *relAP2* に対する制御は RpoS に対する制御を介していない。

H-NS は *rpoS* の mRNA に直接結合し、その分解を促進することにより結果として RpoS を負に制御している (Yamashino et al., 1995、 Brescia et al., 2004)。*rpoS* の変異が *hns* の変異をサプレスすることと、RpoS が *relAP2* の転写活性を負に制御しているという結果から(図 32B)、H-NS が RpoS を抑えていることにより、結果として H-NS が *relAP2* を正に制御しているように見える可能性が考えられた。そのような可能性を検証するために、*relAP2-lacZ* を持った *rpoS* 変異株内、*hns-rpoS* 二重変異株内で H-NS を過剰発現することにより、その LacZ 活性を測定し、H-NS の効果が RpoS の有無に依存しているかどうかを検討した(図 33)。その結果、野生株、*hns* 変異株、*rpoS* 変異株、*hns-rpoS* 二重変異株内で H-NS を過剰に発現させたとき(図 33、pHNS)、すべての株においてその LacZ 活性がコントロールプラスミド(pSTV29)で形質転換させた株に比べ、増大した。このことは RpoS がなくても H-NS は *relAP2* の転写活性を正に制御できることを示しており、H-NS は RpoS とは独立的に *relAP2* を制御していると結論付けられた。

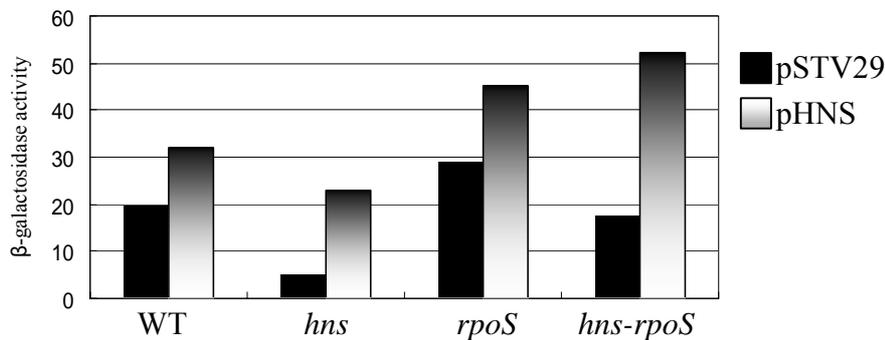


図 33 H-NS が RpoS の制御を介して *relAP2* に影響している可能性の検討

relAP2-lacZ を持つ、野生株 (AN526)、*hns* 変異株 (AN529)、*rpoS* 変異株 (AN557)、*hns-rpoS* 二重変異株 (AN558) を pSTV29、pHNS でそれぞれ形質転換した株を作製した。これらの株の一昼夜前培養液を 500 倍希釈して、50 ml LB 培地で生育させ、15 時間後に回収し、LacZ 活性を測定した。

RpoS と ppGpp の *relAP2* に対する制御は協調的であり、CRP に依存的である。

In vivo では、RpoS は ppGpp が存在してはじめて機能することが知られている (Kvint et al., 2000)。すなわち RpoS は、RNAP を介して ppGpp と協調的に転写を促進する。よって、*relAP2* に対する ppGpp、RpoS の影響が協調的であるのか付加的であるのかを検証するために、*spoT::Tn10-rpoS* 二重変異株を作製し、*relAP2-lacZ* に対する影響を観察した (図 34A)。その結果、*relAP2-lacZ* の活性は、*spoT::Tn10* 単独の変異、*rpoS* 単独の変異、*spoT::Tn10-rpoS* 二重変異においてほとんど同じであり、二重変異における付加的な効果は見られなかった。よって、ppGpp と RpoS は *relAP2* の転写活性に対して協調的に作用しており、恐らくは RNAP を介していると考えられる。

hns-rpoS 二重変異株及び *hns-spoT::Tn10* 二重変異株内で見られた H-NS に依存しない転写活性が、RNAP 自体の制御を介しており、CRP とは独立的に活性化される可能性がある。よってこの可能性を検証するために、*crp-rpoS* 二重変異株 (AN666、表 6)、*crp-rpoS-hns* 三重変異株 (AN667、表 6) を作製し、*relAP2-lacZ* の LacZ 活性を測定した (図 18)。その結果、*crp-rpoS* 二重変異株、*rpoS-hns-crp* 三重変異株ともにその LacZ 活性はほとんど消失していた。このことは、H-NS 非依存的な *relAP2* の転写活性が CRP に依存的であることを示している。尚、AN526 *crp-spoT::Tn10* は X-Gal 指示プレート上で白コロニーを呈しており、CRP 依存的であった。

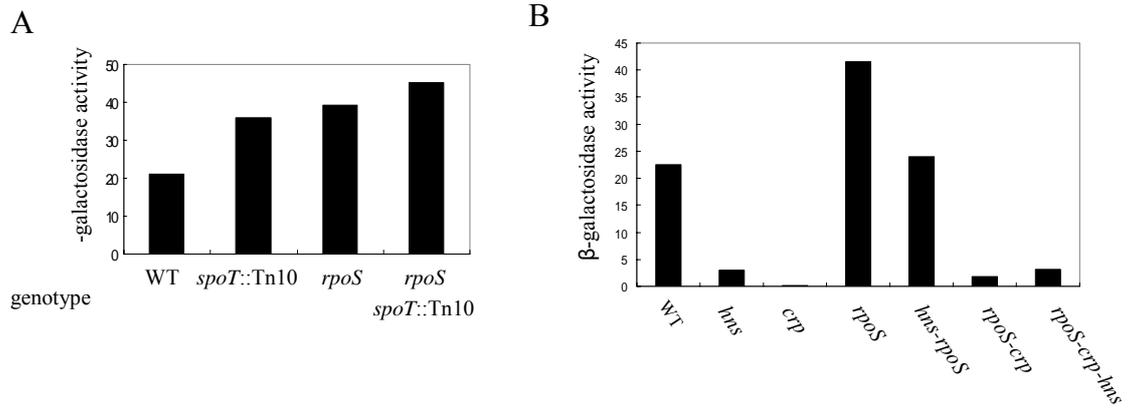


図 34 H-NS に依存しない *relAP2* の転写活性に対する ppGpp、RpoS の協調性と *crp* 欠失の影響

A) *relAP2-lacZ* を持つ野生株 (AN526)、*spoT::Tn10* (AN676)、*rpoS* (AN677)、*spoT::Tn10-rpoS* (AN678)を一昼夜前培養し、500 倍希釈して 50 ml LB 培地で生育させ、15 時間後に菌体を回収し、LacZ 活性を測定した結果を示している。B) *relAP2-lacZ* を持つ、野生株 (AN526)、*hns* (AN529)、*crp* (AN543)、*rpoS* (AN557)、*hns-rpoS* (AN558)、*crp-rpoS* (AN666)、*crp-hns-rpoS* (AN667)を一昼夜前培養し、500 倍希釈して 50 ml LB 培地で生育させ、15 時間後に菌体を回収し、LacZ 活性を測定し、その結果を示している。

IV. 考察

H-NS は CRP と協調的に *relAP2* を活性化する.

H-NS は *relAP2* の転写活性を正に制御しており(図 22、25、26)、また、*relAP2* は CRP によって活性化される(第二章). H-NS には転写を活性化するドメインを持っていないことから、本研究では、「H-NS は CRP の *relAP2* に対する活性化を助ける働きがある」という仮説を打ち立てた. 本研究ではこの仮説のメカニズムを解明するに至らなかったが、この仮説を支持する状況証拠を得ることができた(図 26 ~ 図 29).

relAP2 の -10 配列を ⁷⁰認識共通配列に変えた実験から、H-NS は CRP が *relAP2* を活性化する分にだけ働き、CRP に依存しない基本転写の部分には影響がなかった(図 26). この事実は本研究の仮説を支持する結果である. 尚、本実験では、-10 配列を ⁷⁰によって認識しやすく改変すると、CRP の効果は Miller Unit でおよそ 100 であったが、野生型の -10 配列では 22 程度であった(図 26). この結果から CRP による *relAP2* の活性化は、RNAP のプロモーター認識と相乗的になされていることがわかった.

更なる状況証拠として、過剰発現した CRP、H-NS は互いの変異を相補できないという結果が挙げられる(図 27). *hns* 変異株内で CRP 量がおよそ 25% 下がるという報告があるが(Johanson et al., 2000)、本実験では *hns* 変異を CRP の過剰発現が相補できなかったことから、*relAP2* に対する H-NS の制御が CRP 量の制御以外の経路で働いていることが示された. また、CRP の活性化には cAMP が必須であるが、H-NS が cAMP 量の制御に関わっていないことは、本実験で用いたのと同じバックグラウンドの MC4100 株で示されている(Krin et al., 2002). 以上の事実を踏まえた上で、H-NS と CRP の両方が存在しないと *relAP2* が活性化されないと考えられる.

relAP2 の CRP 結合配列をコンセンサス配列に置換したプロモーター (CRPup) の転写活性は、*hns* 変異に感受性をほとんど示さなかった(図 28). CRPup は、強い CRP との結合能を持つプロモーターであり(第二章)、この配列が *hns* 変異に対する感受性を野生型の *relAP2* ほどは示さないということから、もし本研究における仮説が正しいとすると、H-NS は CRP の結合を助けているという可能性を考えることができる. すなわち、野生型 *relAP2* の CRP 結合配列は弱いためにそれだけでは機能することができず、*relAP2* の活性化には H-NS のサポートが必要となるという可能性である. この可能性は、ゲルシフト実験の結果から(図 29)、十分にあり得るものと考えている. 尚、図 28 の結果において、*crp* 変異株のいくつかの結果において LacZ 活性が負の値を示しているが(図 30、), これは野生株、*hns* 変異株の活性が高すぎ、LacZ 活性の測定時間を短く設定したために、低い値の観測精度が悪くなったことによるものである.

最後の状況証拠として、H-NS の CRP との協調的な *relAP2* に対する結合を挙げる(図 29). 図 29 の実験はまだ *in vitro* における検証の初期段階の結果であるが、少なく

とも分子レベルで CRP と H-NS の間に何らかの協調的な作用が働いていることを示している。H-NS と CRP がともに存在しているときに観察されるシフトバンドは(図 29、三角)、サンプル中及びゲル中の cAMP を除くと観察されないことから (data not shown)、その協調的な作用には CRP の DNA 結合能が必要であると考えられる。また、シフトバンドのスミアな状態は、H-NS と DNA の結合時によく観察される現象である。以上のことから、図 29、三角で示したバンドは、CRP-H-NS-DNA 複合体である可能性が考えられ、CRP と H-NS は相乗的に DNA に結合できる可能性を推測できる結果である。しかしながら、この複合体の特異性や H-NS、CRP、DNA 断片の分子量比、更には CRP-DNA 複合体と似た位置(図 29、矢印)にシフトバンドが検出される理由等、本実験結果を正しく理解するには、更なる実験が必要である。

以上のように H-NS が CRP と協調的に *relAP2* を活性化していることが示唆されたが、そのメカニズムについては不明な点が多い。H-NS が CRP の DNA 結合能を促進する働きがあるというモデル以外に、H-NS が CRP の RNAP に対する活性化を促進するという、コファクター様の機能を持っているモデルも想定でき、この場合、本研究で得られた結果と矛盾しない。

relAP2 は ppGpp 及び RpoS によって協調的に転写を抑制される。

H-NSの*relAP2* に対する制御機構の研究過程において、ppGpp、RpoSが*relAP2* の転写を抑制していることを発見した(図 34)。ppGppとRpoSは⁷⁰に依存したプロモーターをRNAPコア酵素に対する競合的な結合を介してその転写活性を抑える働きがあり(Jishage et al., 2002)、*relAP2* も⁷⁰によって制御されていることから(第一章)、同様のメカニズムによって制御されているのかもしれない。しかし、ppGppとRpoSは協調的に定常期誘導型のプロモーターを制御しているために(Kvint et al., 2000)、ppGpp-RpoS 制御下にあるリプレッサーを介して*relAP2* が抑制されている可能性も完全には排除できない(総合討論参照)。

relAP2 は負のスーパーコイル形成によって転写を活性化されるかもしれない。

hns 変異の *relAP2* に対する影響を *spoT*、*rpoS* の変異がそれぞれサプレスし、ppGpp 及び RpoS は協調的に *relAP2* の転写活性を抑えていることから(図 30B、図 32B、図 34A)、ppGpp-RpoS には H-NS に対して逆の作用があると考えられる。RpoS は H-NS によって抑制されているが、*relAP2* の転写活性にはその効果は独立的であった(図 33)。同様に、ppGpp は *hns* 変異株内で減少するという報告があり(Yamashina et al., 1995、Johansson et al., 2000)、H-NS の制御が ppGpp の抑制効果を介しているとは考えられない。以上のことから H-NS と ppGpp-RpoS の逆の作用は、H-NS が ppGpp または RpoS を制御することを介することによる作用ではなく、*relAP2* を制御する何らかのメカニズムに対するものであると考えられる。

そのメカニズムとしてDNAの負のスーパーコイルによる制御を推測している。H-NSにはDNAの負のスーパーコイルを増大させる働きがあるが(Hulton et al., 1990、Tupper et al., 1994)、ppGppには負のスーパーコイルを減少させる働きが報告されている(Ohlsen and Gralla, 1992b)。その報告によると、緊縮応答時の菌株からプラスミドを回収すると、*relA*変異株では野生株に比べスーパーコイルが増大していた。更に、緊縮応答時の核様体をDAPIで染色した実験では、野生株における核様体はリラックスしているのに対し、*relA*変異株では、緊縮応答する前と変わらずに凝集していた(Cabrera and Jin, 2003)。これらの報告からppGppは、DNAの負のスーパーコイル形成においてH-NSと逆の働きを持っていると考えられる。*rpoS*変異株内における核様体観察の報告はないが、プラスミドレベルでRpoSが負のスーパーコイル形成を減少させる働きがあることが示唆されている(Reyes-Dominguez et al., 2002)。また、負のスーパーコイルをリラックスさせる働きのあるトポイソメラーゼIIは*topA*遺伝子にコードされているが、*topA*の5つあるプロモーターうちの 하나가RpoSによって転写される(Qi et al., 1997)。以上のことからRpoSにも負のスーパーコイルをリラックスさせる働きがあることが考えられる。*relAP2*に対するppGpp-RpoSの作用が協調的であることから、こうしたスーパーコイルをリラックスする働きは、RNAPを介した転写制御によるものかもしれない。実際に転写を阻害するリファンピシンを加えるとDAPI染色レベルで核様体がリラックスするという報告もある(Cabrera and Jin, 2003)。また、転写という現象が、DNAのスーパーコイル形成に促進することから(Liu and Wang, 1987、Figueroa and Bossi, 1988、Broccoli et al., 2004)、ppGpp-RpoS存在下ではRNAPコアに対する競合により⁷⁰の盛んな転写現象が抑えられ(Jishage et al., 2002)、代わってRpoSによるそれほど活発ではない転写現象のみとなり、結果として負のスーパーコイルが形成しにくくなるのかもしれない。

以上の報告から、本研究で得られた結果と合わせて考えると、*relAP2*は負のスーパーコイル形成によって活性化されるプロモーターである可能性がある。すなわち、H-NSによる負のスーパーコイル形成が*relAP2*を活性化し、ppGpp-RpoSによる負のスーパーコイルのリラックス化が*relAP2*を抑制するというものである。*relAP2*がスーパーコイルに感受性を示すプロモーターであるならば、そのエレメントは-74~+2の76 bpに含まれると考えられ、H-NSとCRPが協調的に機能することから恐らくは、CRP結合部位ではないかと思われる(図25)。また、LacZ活性による観察はファージの溶原化部位における転写活性を表しており(図23、材料と方法参照)、mRNAによる観察は実際の*relA*遺伝子座におけるものであるため(図24)、H-NSによるスーパーコイル形成は、少なくともこの2つの部位では、同様であると考えられる。

hns-spoT::Tn10、*hns-rpoS*二重変異株内における*relAP2*の転写活性はH-NSに依存しない転写活性で、H-NSに依存した転写活性とほぼ同等の強さであり(図30B、14B)、CRPに完全に依存している(図34B)。もし、上記のスーパーコイルモデルが正

しいとするならば、スーパーコイル形成は CRP の *relAP2* に対する DNA 結合能に影響を及ぼしているのかもしれない。すなわち、H-NS によるスーパーコイル形成により CRP が *relAP2* 制御領域に結合でき、転写を活性化し、*hns* 変異株内では、スーパーコイル形成が不全であるため CRP は結合できず、転写は起こらない。*hns-rpoS* または、*hns-spoT* 変異株内では、H-NS が存在するかのようなスーパーコイルを形成するようになり、CRP が H-NS なしで *relAP2* 領域に結合できるようになるというモデルが成り立つ。また、CRP と H-NS が協調的に *relAP2* を活性化するような DNA 構造を形成する可能性も考えられる。

以上の考察から *relAP2* の制御機構を図 35 に示すモデルとして提案する。H-NS 及び RpoS または ppGpp が存在しない時は (*hns-spoT::Tn10*, *hns-rpoS* 二重変異株)、H-NS に依存しない負のスーパーコイルが形成されると考えられ、この状態の DNA に CRP は結合できる。そこに H-NS が存在すると (*spoT::Tn10* もしくは *rpoS* 変異株)、負の超スーパーコイルとなり、CRP がより結合しやすくなり、*relAP2* の転写はより活性化される。しかし、H-NS が存在せずに RpoS+ppGpp が存在すると (*hns* 変異株)、DNA 構造はリラックスした状態になり、CRP が結合できない。よって *relAP2* の転写活性は見られなくなる。H-NS と RpoS+ppGpp が存在する時は (野生株)、バランスがとれ、*relAP2* が CRP によって活性化される。

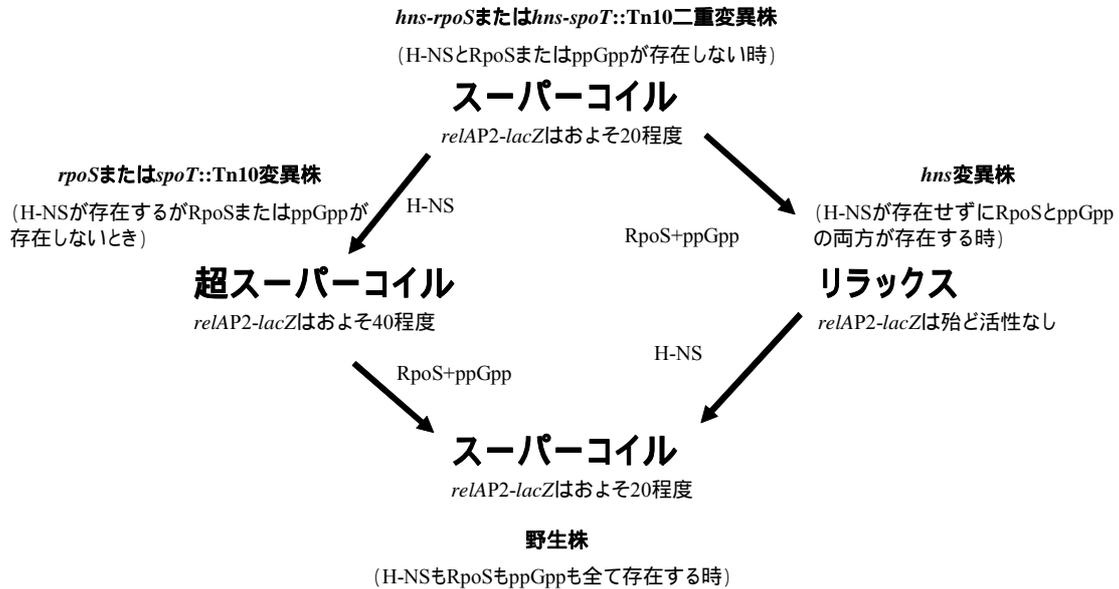


図 35 現在想定している H-NS と RpoS、ppGpp の DNA 構造に対する影響と *relAP2-lacZ* 活性の関係

H-NS はスーパーコイルを形成する方向に働き、RpoS、ppGpp は協調的に DNA をリラックスさせる働きがあると仮定している。H-NS 及び RpoS もしくは ppGpp が存在しないと恐らく DNA 構造は潜在的にある程度スーパーコイル構造を形成していると考えられる(上段)。そこに H-NS が加わると DNA は超スーパーコイル構造を形成する(中段左)。H-NS が存在せずに RpoS と ppGpp が同時に存在するような状況では、恐らく DNA 構造はリラックスしており、スーパーコイルの程度は低いと考えられる(中段右)。H-NS、RpoS、ppGpp が同時に存在する時は、スーパーコイル具合の正負のバランスがとれ、H-NS 及び RpoS もしくは ppGpp が存在しない時と同程度のスーパーコイルを形成すると考えている(下段)。*relAP2* は DNA のスーパーコイル構造が増大すると転写の活性化を受け、リラックスすると抑制されるという仮定をもとにモデル化すると *relAP2-lacZ* の活性は H-NS、RpoS、ppGpp によるスーパーコイル形成における仮説と相関する。

relAP2 が ppGpp によって制御されていることについて

hns 変異株内で *relAP2* の転写活性が下がるという現象を *spoT::Tn10* の変異がサプレステした(図 30)。また、*spoT::Tn10* 単独の変異は、*relAP2* の転写活性を 2 倍に上げた(図 32、図 33)。この現象は ppGpp の集積が遅れる、すなわち、*relAP2* が抑制され始める時期に野生株と比べ十分な ppGpp がいないことによって引き起こされると考えられる

(図 30C、D) . ppGpp⁰株と*spoT::Tn10* 株で*relAP2* の転写活性に対する影響に差がなかったことから(図 31)、TLCで観察された*spoT::Tn10* 株におけるわずかなppGppの減少が*relAP2* や*rmf*の転写制御に影響を及ぼすことが示唆された . ppGppの転写に対する影響は、主にアミノ酸飢餓時のようにppGppが飽和するような環境か、*relA-spoT*二重変異株内でのppGppがまったく合成されない環境で研究されてきた . しかし、今回、ppGppがわずかに減っただけで、ppGpp⁰と同等の効果を示したことから、ppGppにはそのdoseに応じた菌体の応答を促す作用があるかもしれない . すなわち、ppGppの作用には階層性があり、それぞれの濃度依存的な異なる菌体の応答がある可能性を考えることができる . もしそうであるならば、ppGpp研究においてその応答性は、ppGppの菌体内濃度をコントロールして、一つ一つ解明する必要がある .

ppGpp が *relAP2* の転写活性を抑制することから、*relAP2* の転写活性を介した負のフィードバックの可能性を想定することができる . すなわち、ppGpp 量が多くなると *relAP2* の転写活性が抑えられる可能性である . 分解-合成の二機能性 Rel/Spo は構造レベルでのメカニカルな負のフィードバックがモデルとして提唱されているが(Hogg et al., 2004)、大腸菌における合成のみを行う RelA のフィードバックモデルは、いまだ提唱されていない . こうしたことから、大腸菌 RelA の負のフィードバックは、*relAP2* の転写レベルで行われているかもしれない . 本研究で用いた LB 培地下では、RelA 依存的な ppGpp 合成はほとんど見られないが(第一章)、SpoT が *relA* の発現を抑えていることは、過剰な ppGpp の蓄積を軽減する効能があり、適当な培地条件で有効なパスウェイかもしれない . この転写レベルでのフィードバックモデルは、ppGpp の過剰生産株等を用いた実験で明らかにすべきである .

総合討論

ppGpp 集積における *relA* 遺伝子の転写の役割

*relA*の転写制御は、⁷⁰に依存していること、グルコース飢餓下で*relAP2*の発現が上がるもののその発現がppGpp合成に寄与していないことから、*relA*の転写制御はRelAの酵素レベルでのストレス応答に対する準備であると考えられる。菌体が遭遇するストレスには恐らく少なくとも二段階以上の階層性があり、*relAP2*は一段階目の比較的軽いストレスに応答して転写を活性化し、来るかもしれない二段階目のストレスに対する準備を行っていると考えられる。*relAP1*は最低限のRelAタンパク質量を保障する役割を担っており、いきなり二段階目の比較的重いストレスが加わっても耐えうように準備していると考えられる。よって実験室で与えるグルコース飢餓やアミノ酸飢餓は、二段階目の強いストレスであり、*relAP2*が寄与できなかったのではないかと推測している。自然界に存在している大腸菌は、恐らく複雑な環境変化の下で生育しており、徐々に加わるようなストレスに対しては、*relAP2*の存在意義が見出せるかもしれない。

relAP2 が生育相移行期で一過的に発現するメカニズムについて

以上の分子レベルでの観察、考察を踏まえたうえで *relAP2* が一過的に活性化される機構を説明すると以下のようなになる。対数増殖期では、*hns* 変異株で非常に弱い転写産物が観察された一方で、*crp* 変異株内で複数コピー数の *relAP2* プロモーターを含むプラスミド上では、まったく観察されなかったことから、この時期で *relAP2* は CRP に依存した非常に弱い転写の活性化を受けていると考えられる。CRP は弱いながらも DNA に単独で結合することができ、Class I タイプの転写活性化を行うことができるため見られた現象ではないかと推察できる。また、この時期の核様体は既にスーパーコイルを増大させつつあり、CRP が多少の親和性を持っていることも考えられる。生育相移行期では、H-NS が集積することから (Azam et al., 1999)、H-NS に依存した転写の活性化が起こり、恐らくそれは CRP による転写の活性化を助けるようにして、対数増殖期よりも活発な発現が見られる。生育相移行期では最もスーパーコイルが増大しているという報告もあり (Conter et al., 1997)、CRP が結合しやすくなり *relAP2* が活性化される。このスーパーコイル形成は恐らく H-NS 依存的であるが、H-NS に依存しないようなスーパーコイル形成も同時に起こっており、それは RpoS や ppGpp のスーパーコイルをリラックスさせる働きによって抑えられている。定常期では、H-NS が減少し、ppGpp、RpoS の量が増大することから、スーパーコイルが急激にリラックスされ、CRP が結合できなくなり、結果として転写が起こらなくなる。このようにして *relAP2* は生育相移行期のみで強く発現しているように見える。しかし、生育相に伴った、詳細な H-NS、CRP、cAMP、RpoS、ppGpp の量を同時に測定したデータはなく、スーパーコイル依存性も直接的な

証拠はまだ得られていない。モデルの確定には、更なる研究結果を待たなくてはならない。

H-NS が間接的に *relAP2* を制御している可能性について

本研究において、H-NSがリプレッサーを介して*relAP2* を制御している可能性を排除できなかった。H-NSがリプレッサーをリプレスしているとするならば、*rpoS*、*spoT*の変異がサプレッサーであるためにそのリプレッサー（仮にXとする）はRpoSに制御されていると考えられる。しかし、RpoSは定常期にのみ誘導される 因子で、特にLacZ活性の測定に用いたMC4100 株では対数増殖期でまったく検出されない(Jishage et al., 1996)。そう考えると、*hns*変異株内で対数増殖期において*relAP2* 発現が見られないのは矛盾してしまう。対数増殖期でXが発現するにはXが⁷⁰によって転写される必要がある。RpoS制御下のプロモーターの中にはin vitroで⁷⁰によって認識されるものもあるが、その多くはin vivoではRpoSに主に転写されており(Kim et al., 2004)、考えにくい。以上の観点から、H-NSがリプレッサーを介して*relAP2* を制御しているのではなく、DNA構造の制御を介して制御していると推察できる。但し、本研究の仮説も推察を重ねているために、更なる研究が必要である。

今後の課題

relAP2 がスーパーコイルによって制御されているというモデルは、推測の域を出ず、最も早急に直接的な証拠が必要であると考えられる。最終的にはスーパーコイルの巻き具合の異なるプラスミドを鋳型として in vitro 転写系で証明したいと考えている。更に、今回の研究では*relAP2* の存在意義や複雑に転写制御されていることの意味づけができなかった。しかし、global regulator である CRP、H-NS、ppGpp、RpoS により、高度に制御されているのはまぎれもない事実であり、何らかの意味があると考えられる。第一章で述べた構成的に発現する *relAP1* との関係を含め、例えば大腸菌が真核生物内に感染する際の ppGpp の役割やそれに付随する *relA* の発現制御等を研究することにより、今後明らかにしていきたいと考えている。

謝辞

はじめに、論文の読み方から研究の考え方、研究の方向性について、みっちりと基礎から指導して下さった大島拓博士のおかげで、何とかここまでやってこれました。心より感謝を申し上げます。名古屋大学饗場弘二教授、饗場浩文助教授には、pCRP、RelA抗体を頂き、また、私の研究に対して議論をしていただきました。ありがとうございます。名古屋大学水野猛教授にはH-NS過剰発現用プラスミドを頂きました。

森教授、中道朋子さんをはじめとする研究室のスタッフの方々、家族、友人、婚約者、業者の方々には、生活面を含め私が快適に研究に没頭できるように全面的にバックアップしていただいたことに感謝します。

和田千恵子先生には、論文を投稿する際の綿密な論理構成に深くアドバイスをいただきました。更に*rmf-lacZ*、CF1678株もいただきました。本当にありがとうございました。

最後に研究に対する深い議論、研究者たる姿、そして、進路、将来の方向性等に対して、親身にアドバイスをしてくださり、多岐にわたり学位取得にむけてお力添えをして下さった、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科長の小笠原直毅教授に心より感謝をいたします。

参考文献

- Afflerbach H., Schroder O., and Wagner R. (1998) Effects of the *Escherichia coli* DNA-binding protein H-NS on rRNA synthesis in vivo. *Mol. Microbiol.* **28**, 641-653
- Afflerbach H., Schroder O., and Wagner R. (1999) Conformational changes of the upstream DNA mediated by H-NS and FIS regulate *E. coli* RmB P1 promoter activity. *J. Mol. Biol.* **286**, 339-353
- Agarwalla S., Kealey J.T., Santi D.V., and Stroud R.M. (2002) Characterization of the 23 S ribosomal RNA m5U1939 methyltransferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 8835-8840
- Ali Azam T., Iwata A., Nishimura A., Ueda S., and Ishihama A. (1999) Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* **181**, 6361-6370
- An G., Justesen J., Watson R.J., and Friesen J.D. (1979) Cloning the *spoT* gene of *Escherichia coli*: identification of the *spoT* gene product. *J. Bacteriol.* **137**, 1100-1110
- Arnqvist A., Olsen A., and Normark S. (1994) Sigma S-dependent growth-phase induction of the *csgBA* promoter in *Escherichia coli* can be achieved in vivo by sigma 70 in the absence of the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol. Microbiol.* **13**, 1021-1032
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., and and Struhl K. (1987) *Current protocols in molecular biology* Wiley. Interscience, New York, , N.Y
- Avarbock D., Avarbock A., and Rubin H. (2000) Differential regulation of opposing RelMtb activities by the aminoacylation state of a tRNA.ribosome.mRNA.RelMtb complex. *Biochemistry.* **39**, 11640-11648
- Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., and Mori H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006.0008
- Badaut C., Williams R., Arluison V., Bouffartigues E., Robert B., Buc H., and Rimsky S. (2002) The degree of oligomerization of the H-NS nucleoid structuring protein is related to specific binding to DNA. *J. Biol. Chem.* **277**, 41657-41666
- Barker M.M., Gaal T., Josaitis C.A., and Gourse R.L. (2001) Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and in vitro. *J. Mol. Biol.* **305**, 673-688
- Baumberg S. (1999) *Prokaryotic Gene Expression*, Oxford. University. Press, Oxford
- Bell A., Gaston K., Williams R., Chapman K., Kolb A., Buc H., Minchin S., Williams J., and Busby S. (1990) Mutations that alter the ability of the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein to activate transcription. *Nucleic. Acids. Res.* **18**, 7243-7250

- Berg O.G., and von Hippel P.H. (1988) Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. II. The binding specificity of cyclic AMP receptor protein to recognition sites. *J. Mol. Biol.* **200**, 709-723
- Bochkanov S.S., Kliachko E.V., and Shakulov R.S. (1983) Stringent control of *relA* gene transcription in cells of *Escherichia coli* *Mol. Biol. (Mosk.)* **17**, 958-964
- Borek E., Rockenbach J., and Ryan A. (1956) Studies on a mutant of *Escherichia coli* with unbalanced ribonucleic acid synthesis. *J. Bacteriol.* **71**, 318-323
- Bouvier J., Gordia S., Kampmann G., Lange R., Hengge Aronis R., and Gutierrez C. (1998) Interplay between global regulators of *Escherichia coli*: effect of RpoS, Lrp and H-NS on transcription of the gene *osmC*. *Mol. Microbiol.* **28**, 971-980
- Bremer H., and Ehrenberg M. (1995) Guanosine tetraphosphate as a global regulator of bacterial RNA synthesis: a model involving RNA polymerase pausing and queuing. *Biochim. Biophys. Acta.* **1262**, 15-36
- Brescia C.C., Kaw M.K., and Sledjeski D.D. (2004) The DNA binding protein H-NS binds to and alters the stability of RNA in vitro and in vivo. *J. Mol. Biol.* **339**, 505-514
- Broccoli S., Rallu F., Sanscartier P., Cerritelli S.M., Crouch R.J., and Drolet M. (2004) Effects of RNA polymerase modifications on transcription-induced negative supercoiling and associated R-loop formation. *Mol. Microbiol.* **52**, 1769-1779
- Browning D.F., Beatty C.M., Sanstad E.A., Gunn K.E., Busby S.J., and Wolfe A.J. (2004) Modulation of CRP-dependent transcription at the *Escherichia coli* *acsP2* promoter by nucleoprotein complexes: anti-activation by the nucleoid proteins FIS and IHF. *Mol. Microbiol.* **51**, 241-254
- Busby S., and Ebright R.H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* **293**, 199-213
- Cabrera J.E., and Jin D.J. (2003) The distribution of RNA polymerase in *Escherichia coli* is dynamic and sensitive to environmental cues. *Mol. Microbiol.* **50**, 1493-1505
- Casadaban M.J. (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* **104**, 541-555
- Cashel M. (1969) The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. IV. Relevance of unusual phosphorylated compounds from amino acid-starved stringent strains. *J. Biol. Chem.* **244**, 3133-3141
- Cashel M., and Gallant J. (1969) Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature.* **221**, 838-841
- Cashel M., Gentry D.R., Hernandez V.J., and Vinella D. (1996) The stringent response. In: F.C. Neidhardt, Editor, *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and molecular biology Vol. 1, ASM Press, pp. 1458-1496

- Chaloner Larsson G., and Yamazaki H. (1978) Effects of the *spoT* and *relA* mutation on the synthesis and accumulation of ppGpp and RNA during glucose starvation. *Can. J. Biochem.* **56**, 264-272
- Chan P.T., and Lebowitz J. (1990) Site-directed mutagenesis of the -10 region of the *lacUV5* promoter. Introduction of dA4.dT4 tract suppresses open complex formation. *J. Biol. Chem.* **265**, 4091-4097
- Chang D.E., Smalley D.J., and Conway T. (2002) Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model. *Mol. Microbiol.* **45**, 289-306
- Chatterji D., Fujita N., and Ishihama A. (1998) The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the beta-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Genes. Cells.* **3**, 279-287
- Chen B., and Przybyla A.E. (1994) An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR. *Biotechniques.* **17**, 657-659
- Chiaromello A.E., and Zyskind J.W. (1990) Coupling of DNA replication to growth rate in *Escherichia coli*: a possible role for guanosine tetraphosphate. *J. Bacteriol.* **172**, 2013-2019
- Chiuchiolo M.J., Delgado M.A., Farias R.N., and Salomon R.A. (2001) Growth-phase-dependent expression of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.* **183**, 1755-1764
- Cochran J.W., and Byrne R.W. (1974) Isolation and properties of a ribosome-bound factor required for ppGpp and ppGpp synthesis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **249**, 353-360
- Conter A., Menchon C., and Gutierrez C. (1997) Role of DNA supercoiling and *rpoS* sigma factor in the osmotic and growth phase-dependent induction of the gene *osmE* of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* **273**, 75-83
- Conway T., Fliege R., Jones Kilpatrick D., Liu J., Barnell W.O., and Egan S.E. (1991) Cloning, characterization and expression of the *Zyomonas mobilis eda* gene that encodes 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase of the Entner-Doudoroff pathway. *Mol. Microbiol.* **5**, 2901-2911
- Craig M.L., Tsodikov O.V., McQuade K.L., Schlaw P.E. Jr, Capp M.W., Saecker R.M., and Record M.T. Jr (1998) DNA footprints of the two kinetically significant intermediates in formation of an RNA polymerase-promoter open complex: evidence that interactions with start site and downstream DNA induce sequential conformational changes in polymerase and DNA. *J. Mol. Biol.* **283**, 741-756
- Dame R.T., Wyman C., Wurm R., Wagner R., and Goosen N. (2002) Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the *rrnB* P1. *J. Biol. Chem.* **277**, 2146-2150
- Datsenko K.A., and Wanner B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6640-6645
- Dersch P., Kneip S., and Bremer E. (1994) The nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is

- required for the efficient adaptation of *Escherichia coli* K-12 to a cold environment. *Mol. Gen. Genet.* **245**, 255-259
- Dixon N.E., and Kornberg A. (1984) Protein HU in the enzymatic replication of the chromosomal origin of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 424-428
- Dombroski A.J., Walter W.A., Record M.T. Jr, Siegele D.A., and Gross C.A. (1992) Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor sigma 70 exhibit specificity of binding to promoter DNA. *Cell.* **70**, 501-512
- Dombroski A.J., Johnson B.D., Lonetto M., and Gross C.A. (1996) The sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase senses promoter spacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8858-8862
- Donahue J.P., and Turnbough C.L. Jr (1990) Characterization of transcriptional initiation from promoters P1 and P2 of the *pyrBI* operon of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* **265**, 19091-19099
- Dorman C.J. (2004) H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 391-400
- Ebright R.H., Ebright Y.W., and Gunasekera A. (1989) Consensus DNA site for the *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP): CAP exhibits a 450-fold higher affinity for the consensus DNA site than for the *E. coli* lac DNA site. *Nucleic. Acids. Res.* **17**, 10295-10305
- Ebright R.H. (1993) Transcription activation at Class I CAP-dependent promoters. *Mol. Microbiol.* **8**, 797-802
- Esposito D., Petrovic A., Harris R., Ono S., Eccleston J.F., Mbabaali A., Haq I., Higgins C.F., Hinton J.C., Driscoll P.C., and Ladbury J.E. (2002) H-NS oligomerization domain structure reveals the mechanism for high order self-association of the intact protein. *J. Mol. Biol.* **324**, 841-850
- Estrem S.T., Ross W., Gaal T., Chen Z.W., Niu W., Ebright R.H., and Gourse R.L. (1999) Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *Genes. Dev.* **13**, 2134-2147
- Falconi M., Prosseda G., Giangrossi M., Beghetto E., and Colonna B. (2001) Involvement of FIS in the H-NS-mediated regulation of *virF* gene of Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **42**, 439-452
- Figueroa N., and Bossi L. (1988) Transcription induces gyration of the DNA template in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 9416-9420
- Fiil N.P., Willumsen B.M., Friesen J.D., and von Meyenburg K. (1977) Interaction of alleles of the *relA*, *relC* and *spoT* genes in *Escherichia coli*: analysis of the interconversion of GTP, ppGpp and pppGpp. *Mol. Gen. Genet.* **150**, 87-101
- Fomenko D., Veselovskii A., and Khmel I. (2001) Regulation of microcin C51 operon expression:

- the role of global regulators of transcription. *Res. Microbiol.* **152**, 469-479
- Forsman K., Sonden B., Goransson M., and Uhlin B.E. (1992) Antirepression function in *Escherichia coli* for the cAMP-cAMP receptor protein transcriptional activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 9880-9884
- Fraser A.D., and Yamazaki H. (1980) Mannose utilization in *Escherichia coli* requires cyclic AMP but not an exogenous inducer. *Can. J. Microbiol.* **26**, 1508-1511
- Free A., Williams R.M., and Dorman C.J. (1998) The StpA protein functions as a molecular adapter to mediate repression of the bgl operon by truncated H-NS in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 994-997
- Gaston K., Bell A., Kolb A., Buc H., and Busby S. (1990) Stringent spacing requirements for transcription activation by CRP. *Cell.* **62**, 733-743
- Gellert M., Mizuuchi K., O'Dea M.H., and Nash H.A. (1976) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 3872-3876
- Germer J., Becker G., Metzner M., and Hengge Aronis R. (2001) Role of activator site position and a distal UP-element half-site for sigma factor selectivity at a CRP/H-NS-activated sigma(s)-dependent promoter in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **41**, 705-716
- Gilbert W., and Muller Hill B. (1966) Isolation of the *lac* repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **56**, 1891-1898
- Gourse R.L., de Boer H.A., and Nomura M. (1986) DNA determinants of rRNA synthesis in *E. coli*: growth rate dependent regulation, feedback inhibition, upstream activation, antitermination. *Cell.* **44**, 197-205
- Gourse R.L., Gaal T., Aiyar S.E., Barker M.M., Estrem S.T., Hirvonen C.A., and Ross W. (1998) Strength and regulation without transcription factors: lessons from bacterial rRNA promoters. *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* **63**, 131-139
- Grainger D.C., Hurd D., Harrison M., Holdstock J., and Busby S.J. (2005) Studies of the distribution of *Escherichia coli* cAMP-receptor protein and RNA polymerase along the *E. coli* chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17693-17698
- Guo Y., Lew C.M., and Gralla J.D. (2000) Promoter opening by sigma(54) and sigma(70) RNA polymerases: sigma factor-directed alterations in the mechanism and tightness of control. *Genes. Dev.* **14**, 2242-2255
- Gutierrez C., Gordia S., and Bonnassie S. (1995) Characterization of the osmotically inducible gene *osmE* of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **16**, 553-563
- Harley C.B., and Reynolds R.P. (1987) Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic. Acids. Res.* **15**, 2343-2361
- Haseltine W.A., Block R., Gilbert W., and Weber K. (1972) MSI and MSII made on ribosome in idling step of protein synthesis. *Nature.* **238**, 381-384

- Haseltine W.A., and Block R. (1973) Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 1564-1568
- Hawley D.K., and McClure W.R. (1983) Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic. Acids. Res.* **11**, 2237-2255
- Hengge-Aronis R. (1996) Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In: F.C. Neidhardt, Editor, *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology ASM Press, Washington. D.C. pp. 1497-1512.
- Hernandez Asensio M., Ramirez J.M., and Del Campo F.F. (1975) The control by respiration of the uptake of alpha-methyl glucoside in *Escherichia coli* K12. *Arch. Microbiol.* **103**, 155-162
- Hogg T., Mechold U., Malke H., Cashel M., and Hilgenfeld R. (2004) Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response *Cell.* **117**, 57-68
- Hommais F., Krin E., Laurent Winter C., Soutourina O., Malpertuy A., Le Caer J.P., Danchin A., and Bertin P. (2001) Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol. Microbiol.* **40**, 20-36
- Hulton C.S., Seirafi A., Hinton J.C., Sidebotham J.M., Waddell L., Pavitt G.D., Owen Hughes T., Spassky A., Buc H., and Higgins C.F. (1990) Histone-like protein H1 (H-NS), DNA supercoiling, and gene expression in bacteria. *Cell.* **63**, 631-642
- Imaizumi A., Kojima H., and Matsui K. (2006) The effect of intracellular ppGpp levels on glutamate and lysine overproduction in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **125**, 328-337
- Inada T., Kimata K., and Aiba H. (1996) Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model. *Genes. Cells.* **1**, 293-301
- Ishihama A. (1981) Subunit of assembly of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Adv. Biophys.* **14**, 1-35
- Ishihama A. (1999) Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. *Genes. Cells.* **4**, 135-143
- Ishizuka H., Hanamura A., Inada T., and Aiba H. (1994) Mechanism of the down-regulation of cAMP receptor protein by glucose in *Escherichia coli*: role of autoregulation of the *crp* gene. *EMBO. J.* **13**, 3077-3082
- Izui K., Miwa T., Kajitani M., Fujita N., Sabe H., Ishihama A., and Katsuki H. (1985) Promoter analysis of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Escherichia coli*. *Nucleic. Acids. Res.* **13**, 59-71
- Izutsu K., Wada A., and Wada C. (2001) Expression of ribosome modulation factor (RMF) in *Escherichia coli* requires ppGpp. *Genes. Cells.* **6**, 665-676
- Jeong W., and Kang C. (1994) Start site selection at *lacUV5* promoter affected by the sequence

- context around the initiation sites. *Nucleic. Acids. Res.* **22**, 4667-4672
- Jishage M., Iwata A., Ueda S., and Ishihama A. (1996) Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. *J. Bacteriol.* **178**, 5447-5451
- Jishage M., and Ishihama A. (1997) Variation in RNA polymerase sigma subunit composition within different stocks of *Escherichia coli* W3110. *J. Bacteriol.* **179**, 959-963
- Jishage M., Kvint K., Shingler V., and Nystrom T. (2002) Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes. Dev.* **16**, 1260-1270
- Johansson J., Dagberg B., Richet E., and Uhlin B.E. (1998) H-NS and StpA proteins stimulate expression of the maltose regulon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 6117-6125
- Johansson J., Balsalobre C., Wang S.Y., Urbonaviciene J., Jin D.J., Sonden B., and Uhlin B.E. (2000) Nucleoid proteins stimulate stringently controlled bacterial promoters: a link between the cAMP-CRP and the (p)ppGpp regulons in *Escherichia coli*. *Cell.* **102**, 475-485
- Johansson J., Eriksson S., Sonden B., Wai S.N., and Uhlin B.E. (2001) Heteromeric interactions among nucleoid-associated bacterial proteins: localization of StpA-stabilizing regions in H-NS of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**, 2343-2347
- Kaidow A., Wachi M., Nakamura J., Magae J., and Nagai K. (1995) Anucleate cell production by *Escherichia coli* delta *hns* mutant lacking a histone-like protein, H-NS. *J. Bacteriol.* **177**, 3589-3592
- Kajitani M., and Ishihama A. (1984) Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase. Differential stringent control of the multiple promoters from ribosomal RNA and protein operons. *J. Biol. Chem.* **259**, 1951-1957
- Kamashev D., and Rouviere Yaniv J. (2000) The histone-like protein HU binds specifically to DNA recombination and repair intermediates. *EMBO. J.* **19**, 6527-6535
- Kasai K., Kanno T., Endo Y., Wakasa K., and Tozawa Y. (2004) Guanosine tetra- and pentaphosphate synthase activity in chloroplasts of a higher plant: association with 70S ribosomes and inhibition by tetracycline. *Nucleic. Acids. Res.* **32**, 5732-5741
- Keilty S., and Rosenberg M. (1987) Constitutive function of a positively regulated promoter reveals new sequences essential for activity. *J. Biol. Chem.* **262**, 6389-6395
- Kim E.Y., Shin M.S., Rhee J.H., and Choy H.E. (2004) Factors influencing preferential utilization of RNA polymerase containing sigma-38 in stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* **42**, 103-110
- Kleckner N., Bender J., and Gottesman S. (1991) Uses of transposons with emphasis on Tn10. *Methods. Enzymol.* **204**, 139-180
- Ko M., and Park C. (2000) H-NS-Dependent regulation of flagellar synthesis is mediated by a LysR family protein. *J. Bacteriol.* **182**, 4670-4672

- Kohara Y., Akiyama K., and Isono K. (1987) The physical map of the whole *E. coli* chromosome: application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library. *Cell*. **50**, 495-508
- Krin E., Sismeiro O., Danchin A., and Bertin P.N. (2002) The regulation of Enzyme IIA(Glc) expression controls adenylate cyclase activity in *Escherichia coli*. *Microbiology*. **148**, 1553-1559
- Kvint K., Farewell A., and Nystrom T. (2000) RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of sigma(s). *J. Biol. Chem.* **275**, 14795-14798
- Lange R., and Hengge Aronis R. (1994) The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes. Dev.* **8**, 1600-1612
- Laurie A.D., Bernardo L.M., Sze C.C., Skarfstad E., Szalewska Palasz A., Nystrom T., and Shingler V. (2003) The role of the alarmone (p)ppGpp in sigma N competition for core RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **278**, 1494-1503
- Levinthal M., Lejeune P., and Danchin A. (1994) The H-NS protein modulates the activation of the *ilvIH* operon of *Escherichia coli* K12 by Lrp, the leucine regulatory protein. *Mol. Gen. Genet.* **242**, 736-743
- Lim C.J., Hwang W., Park E.H., and Fuchs J.A. (1994) Cyclic AMP-dependent expression of the *Escherichia coli serC-aroA* operon. *Biochim. Biophys. Acta.* **1218**, 250-253
- Link A.J., Phillips D., and Church G.M. (1997) Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* **179**, 6228-6237
- Little R., Ryals J., and Bremer H. (1983) *rpoB* mutation in *Escherichia coli* alters control of ribosome synthesis by guanosine tetraphosphate. *J. Bacteriol.* **154**, 787-792
- Liu L.F., and Wang J.C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7024-7027
- Liu M., Tolstorukov M., Zhurkin V., Garges S., and Adhya S. (2004) A mutant spacer sequence between -35 and -10 elements makes the Plac promoter hyperactive and cAMP receptor protein-independent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 6911-6916
- Loomis W.F. Jr, and Magasanik B. (1967) Glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **93**, 1397-1401
- Lucht J.M., Dersch P., Kempf B., and Bremer E. (1994) Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**, 6578-6578
- Marianovsky I., Aizenman E., Engelberg Kulka H., and Glaser G. (2001) The regulation of the

- Escherichia coli mazEF* promoter involves an unusual alternating palindrome. J. Biol. Chem. **276**, 5975-5984
- Meadow N.D., Fox D.K., and Roseman S. (1990) The bacterial phosphoenolpyruvate: glucose phosphotransferase system. Annu. Rev. Biochem. **59**, 497-542
- Metzger S., Dror I.B., Aizenman E., Schreiber G., Toone M., Friesen J.D., Cashel M., and Glaser G. (1988) The nucleotide sequence and characterization of the *relA* gene of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **263**, 15699-15704
- Metzger S., Schreiber G., Aizenman E., Cashel M., and Glaser G. (1989) Characterization of the *relA1* mutation and a comparison of *relA1* with new *relA* null alleles in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **264**, 21146-21152
- Miller J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics Cold. Spring. Harbor. Laboratory. Press., Cold. Spring. Harbor, ., NY
- Mukerji M., and Mahadevan S. (1997) Characterization of the negative elements involved in silencing the *bgl* operon of *Escherichia coli*: possible roles for DNA gyrase, H-NS, and CRP-cAMP in regulation. Mol. Microbiol. **24**, 617-627
- Murray H.D., Schneider D.A., and Gourse R.L. (2003) Control of rRNA expression by small molecules is dynamic and nonredundant. Mol. Cell. **12**, 125-134
- Na H.S., Kim H.J., Lee H.C., Hong Y., Rhee J.H., and Choy H.E. (2006) Immune response induced by *Salmonella typhimurium* defective in ppGpp synthesis. Vaccine. **24**, 2027-2034
- Nagase T., Ishii S., and Imamoto F. (1988) Differential transcriptional control of the two tRNA(fMet) genes of *Escherichia coli* K-12. Gene. **67**, 49-57
- Nakanishi N., Abe H., Ogura Y., Hayashi T., Tashiro K., Kuhara S., Sugimoto N., and Tobe T. (2006) ppGpp with DksA controls gene expression in the locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* through activation of two virulence regulatory genes. Mol. Microbiol. **61**, 194-205
- Nash H.A., and Robertson C.A. (1981) Purification and properties of the *Escherichia coli* protein factor required for lambda integrative recombination. J. Biol. Chem. **256**, 9246-9253
- Nieto J.M., Madrid C., Miquelay E., Parra J.L., Rodriguez S., and Juarez A. (2002) Evidence for direct protein-protein interaction between members of the enterobacterial Hha/YmoA and H-NS families of proteins. J. Bacteriol. **184**, 629-635
- Nilsson L., Vanet A., Vijgenboom E., and Bosch L. (1990) The role of FIS in trans activation of stable RNA operons of *E. coli*. EMBO. J. **9**, 727-734
- Nilsson L., Verbeek H., Vijgenboom E., van Drunen C., Vanet A., and Bosch L. (1992) FIS-dependent trans activation of stable RNA operons of *Escherichia coli* under various growth conditions. J. Bacteriol. **174**, 921-929
- Niu W., Kim Y., Tau G., Heyduk T., and Ebright R.H. (1996) Transcription activation at class II

- CAP-dependent promoters: two interactions between CAP and RNA polymerase. *Cell*. **87**, 1123-1134
- Notley McRobb L., Death A., and Ferenci T. (1997) The relationship between external glucose concentration and cAMP levels inside *Escherichia coli*: implications for models of phosphotransferase-mediated regulation of adenylate cyclase. *Microbiology*. **143**, 1909-1918
- O'gara J.P., and Dorman C.J. (2000) Effects of local transcription and H-NS on inversion of the fim switch of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **36**, 457-466
- Ohlsen K.L., and Gralla J.D. (1992a) DNA melting within stable closed complexes at the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter. *J. Biol. Chem.* **267**, 19813-19818
- Ohlsen K.L., and Gralla J.D. (1992b) Interrelated effects of DNA supercoiling, ppGpp, and low salt on melting within the *Escherichia coli* ribosomal RNA *rrnB* P1 promoter. *Mol. Microbiol.* **6**, 2243-2251
- Ohta T., Ueguchi C., and Mizuno T. (1999) *rpoS* function is essential for bgl silencing caused by C-terminally truncated H-NS in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 6278-6283
- Oshima T., Ito K., Kabayama H., and Nakamura Y. (1995) Regulation of *lrp* gene expression by H-NS and Lrp proteins in *Escherichia coli*: dominant negative mutations in *lrp*. *Mol. Gen. Genet.* **247**, 521-528
- Owens J.T., Chmura A.J., Murakami K., Fujita N., Ishihama A., and Meares C.F. (1998) Mapping the promoter DNA sites proximal to conserved regions of sigma 70 in an *Escherichia coli* RNA polymerase-*lacUV5* open promoter complex. *Biochemistry*. **37**, 7670-7675
- Palchaudhuri S., Tominna B., and Leon M.A. (1998) H-NS regulates DNA repair in *Shigella*. *J. Bacteriol.* **180**, 5260-5262
- Patten C.L., Kirchhof M.G., Schertzberg M.R., Morton R.A., and Schellhorn H.E. (2004) Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Genet. Genomics.* **272**, 580-591
- Paul B.J., Ross W., Gaal T., and Gourse R.L. (2004) rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 749-770
- Paul B.J., Berkmen M.B., and Gourse R.L. (2005) DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7823-7828
- Paytubi S., Madrid C., Forns N., Nieto J.M., Balsalobre C., Uhlin B.E., and Juarez A. (2004) YdgT, the Hha paralogue in *Escherichia coli*, forms heteromeric complexes with H-NS and StpA. *Mol. Microbiol.* **54**, 251-263
- Perederina A., Svetlov V., Vassylyeva M.N., Tahirov T.H., Yokoyama S., Artsimovitch I., and Vassylyev D.G. (2004) Regulation through the secondary channel--structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell*. **118**, 297-309
- Peter B.J., Arsuaga J., Breier A.M., Khodursky A.B., Brown P.O., and Cozzarelli N.R. (2004)

- Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*.
Genome. Biol. **5**, R87
- Pizarro Cerda J., and Tedin K. (2004) The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. Mol. Microbiol. **52**, 1827-1844
- Plumbridge J. (1998) Control of the expression of the manXYZ operon in *Escherichia coli*: Mlc is a negative regulator of the mannose PTS. Mol. Microbiol. **27**, 369-380
- Powell B.S., Rivas M.P., Court D.L., Nakamura Y., and Turnbough C.L. Jr (1994) Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. Nucleic. Acids. Res. **22**, 5765-5766
- Pul U., Wurm R., Lux B., Meltzer M., Menzel A., and Wagner R. (2005) LRP and H-NS--cooperative partners for transcription regulation at *Escherichia coli* rRNA promoters. Mol. Microbiol. **58**, 864-876
- Qi H., Menzel R., and Tse Dinh Y.C. (1997) Regulation of *Escherichia coli* topA gene transcription: involvement of a sigmaS-dependent promoter. J. Mol. Biol. **267**, 481-489
- Raghavan A., and Chatterji D. (1998) Guanosine tetraphosphate-induced dissociation of open complexes at the *Escherichia coli* ribosomal protein promoters rplJ and rpsA P1: nanosecond depolarization spectroscopic studies. Biophys. Chem. **75**, 21-32
- Reidl J., Romisch K., Ehrmann M., and Boos W. (1989) Mall, a novel protein involved in regulation of the maltose system of *Escherichia coli*, is highly homologous to the repressor proteins GalR, CytR, and LacI. J. Bacteriol. **171**, 4888-4899
- Rhodus V.A., West D.M., Webster C.L., Busby S.J., and Savery N.J. (1997) Transcription activation at class II CRP-dependent promoters: the role of different activating regions. Nucleic. Acids. Res. **25**, 326-332
- Rhodus V.A., and Busby S.J. (2000) Transcription activation by the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein: determinants within activating region 3. J. Mol. Biol. **299**, 295-310
- Richet E., Vidal Ingigliardi D., and Raibaud O. (1991) A new mechanism for coactivation of transcription initiation: repositioning of an activator triggered by the binding of a second activator. Cell. **66**, 1185-1195
- Ross W., Aiyar S.E., Salomon J., and Gourse R.L. (1998) *Escherichia coli* promoters with UP elements of different strengths: modular structure of bacterial promoters. J. Bacteriol. **180**, 5375-5383
- Rostoks N., Park S., and Choy H.E. (2000) Reiterative transcription initiation from galP2 promoter of *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta. **1491**, 185-195
- Ryan V.T., Grimwade J.E., Nievera C.J., and Leonard A.C. (2002) IHF and HU stimulate assembly of pre-replication complexes at *Escherichia coli* oriC by two different mechanisms. Mol. Microbiol. **46**, 113-124

- Sarubbi E., Rudd K.E., Xiao H., Ikehara K., Kalman M., and Cashel M. (1989) Characterization of the *spoT* gene of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**, 15074-15082
- Savery N.J., Lloyd G.S., Kainz M., Gaal T., Ross W., Ebricht R.H., Gourse R.L., and Busby S.J. (1998) Transcription activation at Class II CRP-dependent promoters: identification of determinants in the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *EMBO. J.* **17**, 3439-3447
- Schneider D.A., Ross W., and Gourse R.L. (2003) Control of rRNA expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 151-156
- Schnetz K. (2002) Silencing of the *Escherichia coli* *bgl* operon by RpoS requires Crl. *Microbiology.* **148**, 2573-2578
- Schreiber G., Metzger S., Aizenman E., Roza S., Cashel M., and Glaser G. (1991) Overexpression of the *relA* gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**, 3760-3767
- Sen K., Hayashi J., and Kuramitsu H.K. (2000) Characterization of the *relA* gene of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* **182**, 3302-3304
- Shabb J.B., and Corbin J.D. (1992) Cyclic nucleotide-binding domains in proteins having diverse functions. *J. Biol. Chem.* **267**, 5723-5726
- Shi X., and Bennett G.N. (1994) Plasmids bearing *hfq* and the *hns*-like gene *stpA* complement *hns* mutants in modulating arginine decarboxylase gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**, 6769-6775
- Shin M., Song M., Rhee J.H., Hong Y., Kim Y.J., Seok Y.J., Ha K.S., Jung S.H., and Choy H.E. (2005) DNA looping-mediated repression by histone-like protein H-NS: specific requirement of Esigma70 as a cofactor for looping. *Genes. Dev.* **19**, 2388-2398
- Siebold C., Flukiger K., Beutler R., and Erni B. (2001) Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS). *FEBS. Lett.* **504**, 104-111
- Silva A.J., and Benitez J.A. (2006) A *Vibrio cholerae* relaxed (*relA*) mutant expresses major virulence factors, exhibits biofilm formation and motility, and colonizes the suckling mouse intestine. *J. Bacteriol.* **188**, 794-800
- Somerville C.R., and Ahmed A. (1979) Mutants of *Escherichia coli* defective in the degradation of guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate (pppGpp). *Mol. Gen. Genet.* **169**, 315-323
- Sonden B., and Uhlin B.E. (1996) Coordinated and differential expression of histone-like proteins in *Escherichia coli*: regulation and function of the H-NS analog StpA. *EMBO. J.* **15**, 4970-4980
- Song M., Kim H.J., Kim E.Y., Shin M., Lee H.C., Hong Y., Rhee J.H., Yoon H., Ryu S., Lim S., and Choy H.E. (2004) ppGpp-dependent stationary phase induction of genes on *Salmonella* pathogenicity island 1. *J. Biol. Chem.* **279**, 34183-34190
- Soutourina O., Kolb A., Krin E., Laurent Winter C., Rimsky S., Danchin A., and Bertin P. (1999) Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the

- cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. *J. Bacteriol.* **181**, 7500-7508
- Staric Erjavec M., van Putten J.P., Gaastra W., Jordi B.J., Grabnar M., and Zgur Bertok D. (2003) H-NS and Lrp serve as positive modulators of *traJ* expression from the *Escherichia coli* plasmid pRK100. *Mol. Genet. Genomics.* **270**, 94-102
- Steck T.R., Franco R.J., Wang J.Y., and Drlica K. (1993) Topoisomerase mutations affect the relative abundance of many *Escherichia coli* proteins. *Mol. Microbiol.* **10**, 473-481
- Stent G.S., and Brenner S. (1961) A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **47**, 2005-2014
- Sy J. (1977) In vitro degradation of guanosine 5'-diphosphate, 3'-diphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5529-5533
- Takahashi H., Inada T., Postma P., and Aiba H. (1998) CRP down-regulates adenylate cyclase activity by reducing the level of phosphorylated IIA(Glc), the glucose-specific phosphotransferase protein, in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **259**, 317-326
- Tanaka K., Takayanagi Y., Fujita N., Ishihama A., and Takahashi H. (1993) Heterogeneity of the principal sigma factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, sigma 38, is a second principal sigma factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 3511-3515
- Tanaka Y., Kimata K., and Aiba H. (2000) A novel regulatory role of glucose transporter of *Escherichia coli*: membrane sequestration of a global repressor Mlc. *EMBO. J.* **19**, 5344-5352
- Taniguchi T., O'Neill M., and de Crombrughe B. (1979) Interaction site of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein on DNA of galactose operon promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 5090-5094
- Tao M., and Lipmann F. (1969) Isolation of adenyl cyclase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **63**, 86-92
- Travers A.A. (1984) Conserved features of coordinately regulated E. coli promoters. *Nucleic Acids. Res.* **12**, 2605-2618
- Traxler M.F., Chang D.E., and Conway T. (2006) Guanosine 3',5'-bispyrophosphate coordinates global gene expression during glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 2374-2379
- Tupper A.E., Owen Hughes T.A., Ussery D.W., Santos D.S., Ferguson D.J., Sidebotham J.M., Hinton J.C., and Higgins C.F. (1994) The chromatin-associated protein H-NS alters DNA topology in vitro. *EMBO. J.* **13**, 258-268
- Ueguchi C., Suzuki T., Yoshida T., Tanaka K., and Mizuno T. (1996) Systematic mutational analysis revealing the functional domain organization of *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J. Mol. Biol.* **263**, 149-162

- Ueguchi C., Seto C., Suzuki T., and Mizuno T. (1997) Clarification of the dimerization domain and its functional significance for the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J. Mol. Biol.* **274**, 145-151
- Vrentas C.E., Gaal T., Ross W., Ebricht R.H., and Gourse R.L. (2005) Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the omega subunit and relief of this requirement by DksA. *Genes. Dev.* **19**, 2378-2387
- Wanner B.L. (1994) Gene expression in bacteria using *TnphoA* and *TnphoA'* elements to make and switch *phoA* gene, *lacZ* (op), and *lacZ* (pr) fusions. *Methods. in. Molecular. Genetics.*, vol. 3: 291-310
- Waterman S.R., and Small P.L. (2003) Transcriptional expression of *Escherichia coli* glutamate-dependent acid resistance genes *gadA* and *gadBC* in an *hns rpoS* mutant. *J. Bacteriol.* **185**, 4644-4647
- Will W.R., and Frost L.S. (2006) Characterization of the opposing roles of H-NS and TraJ in transcriptional regulation of the F-plasmid *tra* operon. *J. Bacteriol.* **188**, 507-514
- Xiao H., Kalman M., Ikehara K., Zemel S., Glaser G., and Cashel M. (1991) Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J. Biol. Chem.* **266**, 5980-5990
- Yamada H., Yoshida T., Tanaka K., Sasakawa C., and Mizuno T. (1991) Molecular analysis of the *Escherichia coli hns* gene encoding a DNA-binding protein, which preferentially recognizes curved DNA sequences. *Mol. Gen. Genet.* **230**, 332-336
- Yamashino T., Ueguchi C., and Mizuno T. (1995) Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, sigma S, in *Escherichia coli*: involvement of the nucleoid protein H-NS. *EMBO. J.* **14**, 594-602
- Yang X., and Ishiguro E.E. (2001) Dimerization of the RelA protein of *Escherichia coli*. *Biochem. Cell. Biol.* **79**, 729-736
- Yoshida H., Maki Y., Kato H., Fujisawa H., Izutsu K., Wada C., and Wada A. (2002) The ribosome modulation factor (RMF) binding site on the 100S ribosome of *Escherichia coli*. *J. Biochem. (Tokyo.)* **132**, 983-989
- Yoshida T., Ueguchi C., and Mizuno T. (1993) Physical map location of a set of *Escherichia coli* genes (*hde*) whose expression is affected by the nucleoid protein H-NS. *J. Bacteriol.* **175**, 7747-7748
- Zacharias M., Theissen G., Bradaczek C., and Wagner R. (1991) Analysis of sequence elements important for the synthesis and control of ribosomal RNA in *E. coli*. *Biochimie.* **73**, 699-712
- Zhang A., Rimsky S., Reaban M.E., Buc H., and Belfort M. (1996) *Escherichia coli* protein analogs StpA and H-NS: regulatory loops, similar and disparate effects on nucleic acid dynamics. *EMBO. J.* **15**, 1340-1349

- Zhou Y., Merkel T.J., and Ebright R.H. (1994) Characterization of the activating region of *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP). II. Role at Class I and class II CAP-dependent promoters. *J. Mol. Biol.* **243**, 603-610
- Zhou Y.N., and Jin D.J. (1998) The *rpoB* mutants destabilizing initiation complexes at stringently controlled promoters behave like "stringent" RNA polymerases in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2908-2913
- 村松正実 編 (1996) ラボマニュアル遺伝子工学 第3版、丸善、東京
- 真木 寿治 編 (1999) PCR Tips 可能性を広げるコツとヒント、秀潤社、東京