

学 位 論 文

大腸菌リジル tRNA 合成酵素遺伝子 *lysU* の
発現制御機構の研究

平成9年3月博士(理学)申請

東京大学理学系研究科
生物化学専攻

大 島 拓

学位論文

大腸菌リジルトRNA合成酵素遺伝子 $lysU$ の発現制御機構の
研究

平成9年3月博士（理学）申請

東京大学理学系研究科

生物化学専攻

大島 拓

目次

	頁
第1章 序論	1
1-1 細菌の遺伝子発現と環境応答	1
1-2 大腸菌のリジルtRNA合成酵素	2
1-3 大腸菌リジルtRNA合成酵素遺伝子 <i>lysU</i> の発現の特徴	4
1-4 H-NS蛋白質	5
1-5 LRP蛋白質	6
1-6 細菌の転写制御におけるbent(彎曲)構造の役割	8
1-7 本論文の構成	9
第2章 <i>lrp</i> 遺伝子の転写制御機構の解析	11
2-1 序	11
2-2 材料と方法	11
2-2-1 菌株	11
2-2-2 プラスミド	12
2-2-3 培地	13
2-2-4 試薬、酵素、アイソトープ	13
2-2-5 β -ガラクトシダーゼ活性測定	14
2-2-6 ゲルシフト活性測定	14
2-2-7 ノザンプロテティング	15
2-2-8 プライマー伸長法	16
2-3 結果	16
2-3-1 <i>lrp</i> 遺伝子の自己制御機構	16
2-3-2 <i>lrp</i> 遺伝子の転写開始点と制御領域	18
2-3-3 H-NSによる <i>lrp</i> 遺伝子の制御	19
2-3-4 ノザンプロテティング解析	20
2-4 章括	20
図表	22

第3章 大腸菌染色体12.7 -28.0 min領域の塩基配列決定

	32
3-1 序	32
3-2 材料と方法	33
3-2-1 小原クローンからの大腸菌DNAの調整	33
3-2-2 増幅したDNAの断片化とサイズセレクション	33
3-2-3 M13一本鎖DNA(ssDNA)の精製	34
3-2-4 DNAシーケンシング	34
3-2-5 ギャップ領域の塩基配列の決定	35
3-2-6 アッセンブルと得られたシーケンス情報の解析	35
3-3 結果	36
3-3-1 大腸菌染色体塩基配列の決定	36
3-3-2 大腸菌染色体塩基配列情報によるORF予測	36
3-4 章括	37
図表	38

第4章 LRPのDNA結合様式の解析

4-1 序	39
4-2 材料と方法	40
4-2-1 LRP認識配列の予測	40
4-2-2 LRP蛋白質の精製	41
4-2-3 ゲル電気泳動	42
4-2-4 ゲルシフト活性測定	42
4-2-5 ノザンプロテイング	43
4-3 結果	43
4-3-1 LRP結合配列の予測	43
4-3-2 ゲルシフト活性測定によるLRP認識配列の検証	44
4-3-2-1 予測結合配列の検証	44
4-3-2-2 LRPと結合可能なDNA断片の解析	45
4-3-3 複合体形成のin vivoでの意義	46
4-3-4 ゲルシフト活性測定に用いたDNA断片の構造予測	47
4-3-5 <i>lysU</i> 遺伝子上流に存在すると思われるLRP認識配列の推定	48

4-4 章括	49
図表	52
 第5章 <i>lysU</i> 遺伝子の転写制御機構の解析	 60
5-1 序	60
5-2 材料と方法	61
5-2-1 菌株	61
5-2-2 プラスミド	61
5-2-3 培地	62
5-2-4 試薬、酵素、アイソトープ	62
5-2-5 β -ガラクトシダーゼ活性測定	62
5-2-6 <i>in vitro</i> transcription	63
5-2-6-1 試験管内転写反応	63
5-2-6-2 プライマー伸長法	64
5-2-7 DNaseI footprint	64
5-3 結果	65
5-3-1 <i>In vivo</i> でのLRPおよびH-NSの <i>lysU-lacZ</i> 融合遺伝子の発現の抑制	65
5-3-2 DNaseI footprint	65
5-3-3 <i>in vitro</i> transcription	66
5-3-3-1 <i>in vitro</i> 転写系	66
5-3-3-2 LRPおよびH-NSの転写抑制	67
5-3-4 ゲルシフト活性測定	68
5-4 章括	68
図表	71
 第6章 総合討論	 79
6-1 本研究の骨子	79
6-2 <i>lrp</i> 遺伝子の発現制御機構	79
6-3 LRPのDNA結合様	81
6-4 LRPによる <i>putA</i> 遺伝子の転写の抑制	82
6-5 <i>lysU</i> 遺伝子上流のLRP認識配列	83
6-6 <i>lysU</i> 遺伝子の制御領域	84

6-7	LRPとH-NSによる <i>lysU</i> 遺伝子の転写制御機構	86
6-8	<i>lysU</i> 遺伝子特異的な負の転写制御(上流からの転写の抑制)	87
6-9	DNA構造と転写制御	89
6-10	負の転写制御が2つの因子で行なわれる必要性	92
6-11	<i>lysU</i> 遺伝子の転写制御機構モデルと今後の展望	94
	図表	96

参考文献	99
------	----

謝辞	109
----	-----

補足	110
----	-----

第1章

序論

1-1 細菌の遺伝子発現と環境応答

生物は、様々な環境要因により、その生存に脅威を与えられる。特に細菌は、直接外界に接する単細胞生物であるため、外界のストレスに対する対応は特に重要である。ストレスは、多くの場合、栄養条件や生育環境の温度変化、pH変化、紫外線、そして、有害物質など多岐にわたっている。これらのストレスに迅速に対応するため、アミノ酸や核酸、そして、リン酸などを介して発現が1つの制御因子により制御される遺伝子群、いわゆるレギュロンを構成しているストレス応答機構も多い。大腸菌では、培地中の炭素源の変化に対応するサイクリックAMP（以降cAMP）-CRPレギュロン（cAMPがカ타ボライトアクティベーター蛋白質と結合し、糖代謝系の多くのオペロンの転写を促進、抑制する）、SOSレギュロンなど様々なレギュロンが存在する。このようなレギュロンには、通常、1つの制御因子が存在し、広く細胞の生理機能を集約的に制御している。*lysU*遺伝子は、このようなレギュロンのなかでも、大腸菌の生存環境の変化に対応するため、ロイシンを介して生合成や代謝に機能する遺伝子を統合的に制御しているLRP（Leucine-Responsive Regulatory Proteinの略）の制御する遺伝子群、ロイシン-LRPレギュロンに含まれている。

他方、1つの制御因子により、多くの遺伝子の遺伝子発現を集約的に制御する仕組みは大腸菌のDNA（染色体構造）の構造を決定することによっても行われていると考えられている。これは、HU,H-NS,IHF,FISといった核様体蛋白質と呼ばれる、一群の蛋白質により、細菌の特定の核様体構造を維持したり変化させたりすることにより行われている。例えば、大腸菌のrRNA遺伝子である*rrnB*遺伝子はFISおよびH-NS蛋白質により正負に発現が制御されている（Tippner et al., 1994）。また、翻訳など転写以外の領域でも、核様体蛋白質の関わる生理機能は多い（Yamashino et al., 1994; 1995）。さらに、正常な染色体の複製の開始や、細胞分裂に伴う、染色体の分配にもこれら四つの因子が関与している可能性も示唆されており（Dixon et al., 1984; Filutowics et al., 1992; Polaczek et al., 1990; Kaidow et al., 1995）、核様体蛋白質の機能は大腸菌の生理機能全般に寄与している。

1-2 大腸菌のリジルトRNA合成酵素

大腸菌リジルトRNA合成酵素遺伝子*lysU*は大腸菌のアミノアシルtRNA合成酵素をコードする遺伝子である。大腸菌に存在するアミノアシルtRNA合成酵素の遺伝子は、対応するアミノ酸に対し1つずつ存在する。しかし、リジンに対応するアミノアシルtRNA合成酵素のみ、*lysS*および*lysU*の2つの遺伝子によりコードされている。大腸菌では、これら2つの遺伝子は*lysS*遺伝子が62min.に（Emerish and Hirshfield, 1987）、*lysU*遺伝子が93.5min.にmapされており（Vanbogelen et al., 1983）、発現系も完全に独立している。*lysU*

遺伝子は、lysS遺伝子が構成的な発現を示すのに対し、様々な環境要因により発現が誘導される。lysU遺伝子の発現が上昇する環境要因は、通常の実験室における培養条件では、低温（32℃）から高温（42℃）への生育温度の上昇や、培地中のロイシン、アラニンなど枝鎖アミノ酸の濃度の上昇、培地のpHの酸性への変化、嫌気的な培養条件、栄養飢餓条件、そして、stationary phaseでの発現の上昇など多岐にわたる(Putzer et al., 1995)。

注目すべき点は、これらの要因により、一過性に発現が上昇するのではなく、発現が持続的に上昇する点である(Ito et al., 1993)。この2つの遺伝子によってコードされている蛋白質の分子量は、LysS蛋白質が57.6kD、LysU蛋白質が57.8kDと非常に近く、2つの蛋白質はアミノ酸レベルで88%の相同性を持つ(Clark and Neidhardt, 1990; Leveque et al., 1990)。しかしながら、2つのリジンtRNA合成酵素は高い相同性を有しているものの、活性が若干異なることが指摘されている。もっとも顕著に見いだされた特性の相違はLysUとリジンとの親和性がLysSより高いことである。さらに、42℃におけるLysUのアミノアシル化活性の低下がLysSより低いことも観察されている(Brevet et al., 1995)。

2つのリジンtRNA合成酵素遺伝子の発現様式や合成酵素自身の活性の相違は、大腸菌において、リジンのtRNA合成酵素のみが唯一、2種存在している理由を説明するための重要な観察と揃えても良いかもしれない。また、大腸菌の近縁種である、*Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* などでもリジンのアミノアシルtRNA合成酵素遺伝子が2種存在していることから、リジンのアミノアシルtRNA合成酵素が2種、存在することは、細菌にとってなんらかの生理的意義が存在すると思われる(Sulta and

Hirshfield, 1995)。しかしながら、現在までに、2つのリジルtRNA合成酵素の存在する理由について明確な解答は出されていない。

1-3 大腸菌リジルtRNA合成酵素遺伝子*lysU*の発現の特徴

*lysU*遺伝子は高温の発現が強く見られることから、ヒートショック蛋白質をコードする遺伝子の1つとして捕えられてきた。しかし通常のヒートショックシグマ依存的な遺伝子の発現様式は、高温への温度変化に付随した一過的な発現の上昇が見られるのみで、*lysU*遺伝子の発現上昇に特異的なヒートインダクションというべき持続した発現を説明できるものではない (Ito et al., 1993)。 *lysU*遺伝子の発現の熱誘導に関しては、これまでの様々な解析により以下のことが判明している。すなわち、*lysU*遺伝子の発現はヒートショックシグマを破壊、もしくは過剰発現させても変化しない (Hassani et al., 1992; Vanbogelen et al., 1987)。 *lysU*遺伝子の発現制御領域にヒートショックシグマ特異的な結合領域は見当たらない (Clark and Neidhardt, 1990; Leveque et al., 1990; Kawakami et al., 1989)。これらは、*lysU*遺伝子の高温での遺伝子の発現促進、もしくは低温での発現の抑制が独自の発現制御系を介したものであることを示している。

われわれの研究室では、*lysS*遺伝子を破壊すると、低温でのリジルtRNA合成酵素の絶対的な量の減少から、低温でのみ菌の生存が不可能になることを発見した (Kawakami et al., 1992)。この低温感受性株を用いて、低温でも*lysU*遺伝子の発現が見られる様々な変異株 (abandonment of *LysS*; als変異株)の分離に成功した (Kawakami et al., 1992; Ito

et al., 1993; 1994)。分離された変異株の一部は、LRP、および核様体蛋白質H-NSの欠損株であった。この2つの蛋白質は低温で*lysU*遺伝子の発現を抑制している因子と考えられた。

1-4 H-NS蛋白質

H-NSは分子量、約16000Daの蛋白質である。H-NSは多くの細菌でその存在が確認され、大腸菌と同様に転写や組み替え、複製といった細菌の重要な生理機能に関与している(Higgins et al., 1990; Ussery et al., 1994)。また、H-NSは、H-NSと同様に核様体蛋白質として知られているHUと同様、真核生物にも機能的に類似な蛋白質も見いだされている(Bianchi et al., 1994; Timchenko et al., 1996)。また、大腸菌内にも、相同な蛋白質、StpAが存在することが知られており、お互いにその発現を制御しあい、機能的にも相同性があることが証明されている(Zhang et al., 1996; Sonden et al., 1996)。これらの事実、H-NSのような核様体蛋白質が、生物種を越えて、生理的に重要であることを示唆している(Travers et al., 1994; Imamoto, 1996)。

H-NSは当初、低分子量で細胞中に非常に豊富に存在するDNA結合蛋白質として捕えられていた(Rouviere-Yaniv and Gros, 1975)。その後、Higginsらによる精力的な解析により、*in vivo*および*in vitro*において、DNAの構造を大きく変化させる能力が存在することが確かめられた。彼等は、H-NSが存在する大腸菌と、欠損した大腸菌内から調整したpACYC184プラスミドが異なる超螺旋構造をとることを発見し(Higgins et al., 1988)、

またin vitroにおいてはH-NSの量依存的にプラスミドの構造が大きく変化することを見出した(Tupper et al., 1994)。また、bent構造をとるDNAの解析から、H-NSがbent構造に特異的に結合することが見い出され(Yamada et al., 1990)、さらにH-NSがDNAの構造特異的にDNAの特定の領域に結合することが確認された(Tupper et al., 1994)。その結合は塩基配列に特異的なものではなく、bent構造に依存する、比較的、非特異的な結合に近いものであった。一方で、H-NSの転写に対する直接の影響は確かめられていなかったが、Owen-Hugesらにより*proUV*遺伝子の転写制御因子であることが示唆され(Owen-Huges et al., 1992)、Ueguchiらによって*proUV*遺伝子の転写に対して単独で働く負の制御因子であることがin vitroで確かめられた(Ueguchi et al., 1993)。その後、H-NSが様々な遺伝子の制御因子として働くことが見い出されたが(Ussery et al., 1994)、その転写制御の様式は、完全には解明されていない。しかしながら、その転写制御の様式は、*proUV*遺伝子のように、転写を直接抑制するものが存在する一方で、*rmb*遺伝子の様に、転写活性化因子であるFIS蛋白質の結合を阻害することにより強い抑制活性を示すものなど(Tippner et al., 1994)、多様であると考えられている。

1-5 LRP蛋白質

LRPは分子量、約19000Daの転写制御因子である。溶液中では、2量体として存在し、典型的な、DNA結合ドメインとしてのヘリックス-ターン-ヘリックス構造とそれに続く2量体形成ドメインとしての β -シート構造を持つ(Platko et al., 1994; Oshima et al.,

1995)。この2つの特徴的な構造は、典型的なDNA結合蛋白質であるCro蛋白質にも見いだされる(Pabo and Sauer, 1984)。LRPは、多くの細菌で高い相同性を持つ蛋白質の存在が証明されており(Friedberg et al., 1995; Keuntje et al., 1995)、近年の細菌のゲノムプロジェクトの完成に伴って、枯草菌でもその存在が確認されている。また大腸菌にも相同性のある蛋白質AsnC(Willins et al., 1991)および、ゲノムプロジェクトで見いだされた、相同的な蛋白質の存在が知られている(Oshima et al., 1996参照)。

LRPはまず、*ilvIH*遺伝子の制御蛋白質としてIHB (Ricca et al., 1989)として、分離精製され、その性質が決定された(Willins et al., 1991)。さらに、*ilvIH*遺伝子の解析を通じて、LRPの*ilvIH*遺伝子の制御領域への結合が、協調的であること(Wang et al., 1993)、その結合によりDNAに折れ曲がり構造が形成されること(Wang et al., 1993b)、協調的な結合により、直接*ilvIH*遺伝子の転写を正に制御していることが判明した(Willins et al., 1992)。その後、様々な遺伝子の制御因子として変異株がクローニングされた(Rex et al., 1991; Lin et al., 1992b; Ernsting et al., 1992; Tchétina et al., 1995; Ferrario et al., 1995)。LRPの特徴的な点は多くの生合成系の遺伝子群を正あるいは負に制御し、2次元の蛋白質電気泳動をもちいた解析では、*ltp*遺伝子破壊株において、特定の蛋白質の増減が少なくとも約75の蛋白質において確認されていることである(Newman et al., 1992)。さらに、LRPの認識配列が非常に緩やかな特異性をもつ15 bpの塩基配列であることが明らかにされ(Cui et al., 1995)、LRPもまた、H-NSの様に、DNAにかなり緩やかな特異性を持って結合し、DNA構造を変化させることにより転写制御因子として機能し

ているのではないかという議論もなされている (Newman, 1995; Newman et al., 1996)。

このような解析から、現在では、LRPはCRPなどと同じく大腸菌のグローバルレギュレーターとして認識されている。

LRPによる*lysU*遺伝子の転写制御については、まず、LinらおよびItoらにより、*lysU*遺伝子の転写がLRPにより抑制されていることが報告された (Lin et al., 1992; Ito et al., 1993)。一方で、*lysU*遺伝子の制御領域に対する遺伝学的な解析がなされ、*lysU*遺伝子の転写量を増加させる複数の*lysU*遺伝子のcis-elementの変異株が分離され、大まかにではあるが、LRPの協調的な結合と、結合による*lysU*遺伝子の発現の負の制御についての報告もなされている (Kawakami et al., 1992; Gazeau et al., 1994; Ito et al., 1993)。

1-6 細菌の転写制御におけるbent(彎曲)構造の役割

細菌の転写制御機構については、基本的なプロモーター要素はすでに明らかにされている。それは、-10および-35boxと呼ばれるDNA構造であり、この要素を認識しRNAポリメラーゼは鋳型DNAと開始複合体を形成すると考えられている。しかしながら、プロモーターの一部として-35box上流に存在するbent構造、いわゆるup-elementが存在するという意見も存在する (Choy and Adhya, 1996)。このup-elementは*rmB*遺伝子のP1プロモーターの転写を促進する、転写制御因子とは全く独立な要素であり、*rmB*遺伝子の転写開始点の上流-40から-60 bp上流の領域に相当し、RNAポリメラーゼの α -サブユニットと相互作用することにより転写を促進する (Ross et al., 1993)。さらに-60から上流に存在す

る bent 構造も *gal* 遺伝子において転写を促進するように働くことが報告されており (Lavigne et al., 1992)、プロモーター上流に存在する bent 構造が転写の促進要素として機能することを考慮することは細菌の転写制御機構を理解する上で今後、重要な位置を占めると思われる。

1-7 本論文の構成

本研究は大腸菌リジル tRNA 合成酵素遺伝子 *lysU* の転写制御機構の解明を最終的な目標とした。この目標を達成するために、まず次の点を明らかにした。それは、*lysU* 遺伝子の転写制御因子である LRP をコードする *lpp* 遺伝子の転写制御機構および LRP の DNA 結合様式である。これらの点は、*lysU* 遺伝子を制御する LRP および H-NS を比較したとき、H-NS をコードする *hns* 遺伝子の転写制御機構が既に解析され、H-NS が特異的な塩基配列ではなく、bent 構造に結合することが明らかにされているのに対して、LRP に関して最も解析が遅れている点であった。そこで、本論文では第2章で *lpp* 遺伝子の転写制御機構を解析し、*lpp* 遺伝子の転写が LRP および H-NS により抑制されていることを示した。それに付随して、LRP と H-NS が1つの遺伝子の転写を同時に制御することが大腸菌に広く存在する一般的な制御系であることを考察した。第3章では、大腸菌ゲノムプロジェクトに参画して700kbpの連続した塩基配列情報を作成した。第4章では、決定した大腸菌ゲノムの塩基配列情報に対して LRP の認識配列の予測を試みた。また、ゲルシフト活性測定を用いて、現実には LRP が DNA に結合するためには認識配列のみでは不十分であり、

複数の認識配列へのLRPの協調的な結合が必要であることを示した。さらに、LRPと同様な典型的なヘリックス-ターン-ヘリックス構造を持ち、2量体を形成してDNAと結合するCro蛋白質のDNA結合モデルを参考にして、LRPとDNAとの結合モデルを推測した。これらの解析から、*lysU*遺伝子上流のLRP結合部位を予測した。第5章では第2、4章の結果、およびH-NSに関するこれまで解析をもとにして、LRPとH-NSによる*lysU*遺伝子の転写の抑制に関する生化学的な検証を行った。第6章では、これらの結果を元に*lysU*遺伝子の転写抑制モデルを提出し、LRPとH-NSが抑制因子としてはこれまで類をみないほどプロモーターの上流に結合し機能しうる転写抑制因子であること、および*lysU*プロモーターの上流に存在するbent構造を介した転写抑制のメカニズムについて考察を加えた。

第2章

lrp遺伝子の転写制御機構の解析

2-1 序

序論でも述べたように、*lysU*遺伝子の転写制御因子は大腸菌内でグローバルレギュレーターとして機能するLRPおよびH-NSである。従って、*lysU*遺伝子の発現制御機構を明らかにする為にも、*hns*、および*lrp*遺伝子の発現制御機構を解明することが重要である。本章では、*lysU*遺伝子の発現制御機構の解明の一貫として、*hns*遺伝子に比べて解析の遅れていた*lrp*遺伝子の転写制御機構について解析した。その結果、(1)*lrp*遺伝子に自己制御機構が存在することを示し、(2)*lrp*遺伝子の転写開始点を決定し、(3)*lrp*遺伝子の転写制御機構に係わる第2の制御因子としてH-NSを同定した。

2-2 材料と方法

2-2-1 菌株

MC4100は*lacZ*遺伝子破壊株である。RM430はMC4100の*lrp*遺伝子を破壊した株である(*lrp::Tn10 Tet^r*)。MC4100-81はMC4100の*hns*遺伝子を破壊した株である(*hns::Tn10 Kan^r*)。

これらは*lrp-lacZ*融合遺伝子を含むプラスミドを導入し、 β -ガラクトシダーゼ活性測定に使用した。RM460は*lysU*遺伝子の上流領域を含む2.5kbpの断片と*lacZ*遺伝子との融合遺伝子を染色体上に溶原化した株である。RM598はRM460の*lrp*遺伝子をTn10を用いて破壊した株である(*lrp::miniTn10 Tet'*)。RM538は*lrp*遺伝子の上流領域を含む1.8kbpの断片と*lacZ*遺伝子との融合遺伝子を染色体上に溶原化した株である。OT11はRM538の*lrp*遺伝子が破壊された株である(*lrp::miniTn10 Tet'*)。RM539は*ilvIH*遺伝子の上流領域を含む363bpの断片と*lacZ*遺伝子との融合遺伝子を染色体上に溶原化した株である。OT12はRM539の*lrp*遺伝子が破壊された株である(*lrp::miniTn10 Tet'*)。RK6は*lrp*遺伝子の上流領域を含む493 bpの断片と*lacZ*遺伝子との融合遺伝子を染色体上に溶原化した株である。RK5, およびRK4はそれぞれ、RK6の*hns*および*hns,lrp*遺伝子を破壊した株である(*hns::Tn10 Km'*), (*lrp::miniTn10 Tet'*)。これらの菌株はすべて β -ガラクトシダーゼ活性測定に使用した。RM551(*lrp::miniTn10 Tet'*)およびRM597(*hns::Kan'*)は、W3110(野性型株)の*lrp*遺伝子および*hns*遺伝子を破壊した株である。これらは全RNAの分離に使用した。

2-2-2 プラスミド

pOT1151,106,107,108,109,はそれぞれ*lrp*遺伝子の上流領域を含む1.5 kbpから200 bpの断片がpMC1403上の*Bam*HI siteで*lacZ*遺伝子との融合遺伝子を形成している。これらは、MC4100に導入し β -ガラクトシダーゼ活性測定に使用した。pFRP22はpACYC184-1(pACYC184 *tet::kan'*)の*Eco*RI siteに*lrp*遺伝子を含む4 kbpの断片を含んでいる。

pRP18はpACYC184のEcoRI siteに*lrp*遺伝子を含む4 kbpの断片を含んでいる。

pLRP11,12,31,41,61,81はpRP22の*lrp*遺伝子のORF中にLRP蛋白質のDNA結合能を欠損させる点突然変異が存在する(大島 拓、修士論文; Oshima et al., 1995)。

2-2-3 培地

培地は通常の培養にはLB培地(Bacto triptone, 10g; Yeast extract, 5g (DIFCO LABORATORIES); NaCl, 5g/l)を、 β -ガラクトシダーゼ活性測定時には最小培地としてSSA(K_2HPO_4 , 10.5g; KH_2PO_4 , 4.5g; $(NH_4)_2SO_4$, 1.0g; Sodium citrate dihydrate, 0.97g; $MgSO_4$, 0.05g/l)にグルコースを0.2%に、ビタミンB₁を2 μ g/mlに、イソロイシン、バリンを20 μ g/ml、プロリンを50 μ g/mlになるように加え、使用した。これらの培地に、必要に応じてそれぞれアンピシリン(萬有製薬) 50 μ g/ml; テトラサイクリン(Sigma) 15 μ g/ml; クロラムフェニコール(Sigma) 15 μ g/ml; カナマイシン(明治製薬) 50 μ g/mlを加えて菌の増殖に使用した。

2-2-4 試薬、酵素、アイソトープ

本研究において使われた試薬は特に断りのないかぎり和光純薬、ナカライテスク社製を使用した。本研究において使用したすべての酵素は宝酒造の製品を使用した。

[γ -³²P]ATPおよび[α -³²P]dCTPはアマシャムより購入した。

2-2-5 β -ガラクトシダーゼ活性測定

測定する菌株をSSA培地中で32℃で振盪培養し、対数増殖期（600nmの吸光度が0.6-1.0(OD600)）に培養を停止し、培養液中にクロラムフェニコールを最終濃度100 μ g/mlになるように加えて、それ以上の増殖および新規蛋白質の合成を停止させる。この培養液を適量分取し全体量が1mlになるようにZバッファー（0.1 M Sodium phosphate buffer, 0.01M KCl, 0.001M MgSO₄, 0.005M 2-メルカプトエタノール）を小試験管で混合し、50 μ lの0.1%SDSと100 μ lのクロロホルムを加え、一定時間（約10秒間）良く攪拌した。これを28℃のウォーターバスで10分以上保温して、サンプルの温度をを反応温度に合わせ、200 μ lの4mg/mlのo-ニトロソフェニル- β -D-チオガラクトピラノシドを加え、反応を開始させた。反応溶液が黄色に変化したところで500 μ lの1M Na₂CO₃溶液を加え、反応を停止させた。この溶液の420nm(OD420)および550nm(OD550)の吸光度を測定し、次式によって酵素活性を算出した。

$$\text{Units} = 1000(\text{OD420} - 1.75 \text{ OD550}) / \text{time}(\text{min}) / \text{volume}(\text{1ml}) / \text{OD600}$$

（OD420, OD550, OD600の対応する数値は本文中で示した。）

2-2-6 ゲルシフト活性測定

ゲルシフト活性測定に使用した、H-NS蛋白質は名大農学部、水野、上口両博士から分与していただいた(Yamada et al., 1990)。DNA-蛋白質複合体形成に用いたDNA断片はpRFP18を鋳型に用いたPCR法により増幅し、この断片を精製後、末端を³²Pで標識する

ことにより、作成した(sense primer, 5'-GTTAACAATTTGTGCAATCGGCAG-3'; antisense primer, 5'-GTTACGATCGATACGGTCGAGATCTAA-3'). 複合体形成反応は20mM Tris-Cl pH7.5, 2mM EDTA, 7mM β -メルカプトエタノール, 1mM PMSF, 100mM NaCl, 5mM $MgCl_2$, 10%グリセロールを含む50 μ lの反応溶液中で、適当量のDNA断片 (1000cpm以上) と精製H-NSを室温で30分間反応させた。複合体は、5%ポリアクリルアミドゲルを用いて、200Vで約2時間、電気泳動してプローブと分離した。

2-2-7 ノザンプロットティング

RNAの調整はAibaらの方法にしたがった(Aiba et al., 1981)。28℃に保ったLB培地中で対数増殖期まで培養し、この菌からRNAを調整した。電気泳動およびノザンプロットティングはSambrookらの方法にしたがった(Sambrook et al., 1989)。20 μ gの大腸菌、全RNAをホルマリンを含む1.2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、Hybond-N⁺ (アマシャム) にプロットした。ハイブリダイゼーションには、*lpp*遺伝子を含む500 bpのDNA断片と*lpp*遺伝子を含む500 bpの断片を用いて、BcaBEST Labeling Kit (宝酒造) によりランダム標識し作成したDNA断片をプローブとして使用した。内部標準として使用した*lpp*遺伝子は細胞膜の構造形成蛋白質をコードしておりその発現量は一定であると考えられる。この*lpp*遺伝子の転写量を用いて*lpp*遺伝子の転写量の変化を定量した。ハイブリダイゼーションのコンディションはアマシャムの使用説明書に従った。

2-2-8 プライマー伸長法

大腸菌全RNAの調整は2-2-7に従った。全RNAはpOT1151を導入したMC4100から調整した。末端を放射標識したプライマー (M5, 5'-CGAAAGGGGGATGTGCT-3') を50mgの全RNAと共にエタノール沈殿し、Hybridization buffer(10mM Tris-HCl pH8.3, 1mM EDTA pH8.0, 0.25M KCl)を10 μ l加え、5分間、100℃で保温する。その後、室温で30分間放置する。この反応液に40 μ lのRT buffer(60mM Tris-HCl pH8.3, 12mM MgCl₂, 1.2mM DTT, 2.4mM dNTP, 1000units/ml RNAase inhibitor)を加える。RAV-2 (宝酒造) を1 μ l(1-2unit)加えて、42℃で1時間、逆転写反応を進行させる。反応の停止は、0.5M EDTAおよび5mg/mlのRNaseを1 μ l加え、37℃で30分間保温し行なった。反応停止後、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿でDNAを回収し、6%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により生成したDNA断片を分離した。

2-3 結果

2-3-1 *lrp*遺伝子の自己制御機構

序論でも述べたように、*lysS*遺伝子を破壊した大腸菌は低温感受性を示す。この低温感受性を相補するようなドミナントネガティブ変異が、LRPの典型的なDNA結合モチーフであるヘリックススーターナーヘリックス構造中、2量体形成に必要とされる β -シート構造中に分離された(大島 拓、修士論文 1994; Oshima et al., 1995)(表2-1)。これらの

変異を有するLRPは、LRPが特異的に結合することが報告されている*ilvIH*遺伝子上流領域への結合が観察されない（大島 拓., 修士論文 1994）。序論で、LRPは正負に転写を調節する性質を持つことを述べたが、確かに多コピーの野性型LRPの導入により、*lysU-lacZ*融合遺伝子の発現は*lrp1*倍体株に比べ抑制され、*ilvIH-lacZ*融合遺伝子の発現は野性型に比べ促進された(*ilvIH*遺伝子はLRP蛋白質により転写が促進される) (表2-2、2-3)。さらに、前述したDNA結合能の欠損した変異LRPを多コピーで細胞内に導入すると、*lysU*遺伝子の転写量は、*lrp*遺伝子破壊株の*lysU*遺伝子の発現には及ばないものの、多コピーの野性型LRPを導入したときにみられる*lysU-lacZ*融合遺伝子の発現抑制は全く観察されず、その上、1倍体株の*lysU-lacZ*融合遺伝子の発現よりも増加した(表2-2)。また、*ilvIH-lacZ*融合遺伝子の発現は野性型LRPが過剰に存在することにより1倍体株に比べて促進されるが、変異LRPが過剰に存在すると、*ilvIH-lacZ*融合遺伝子の発現は*lrp*遺伝子破壊株よりも上昇するものの1倍体株より減少した(表2-3)。したがって、これらの変異は、野性型LRPの特異的なDNAへの結合を阻害するドミナントネガティブ変異である。

これらの変異LRPと*lrp-lacZ*融合遺伝子を染色体上に持つ菌株を用いて、*lrp*遺伝子の自己制御機構を検証した。*lrp-lacZ*融合遺伝子の発現は染色体上の1コピーのLRPの存在で有為に抑制された(表2-4)。また、過剰な野生型LRPの導入により*lrp-lacZ*融合遺伝子の発現は強く抑制された。さらにドミナントネガティブ変異LRPが過剰に存在する条件下、野性型LRPの有無にかかわらず、*lrp*遺伝子欠損株と同等の発現が観察された(表2-4)。

これらの結果は、*lrp*遺伝子が自らがコードするLRPにより抑制されることを示している。

しかも、*lysU*遺伝子、*ilvIH*遺伝子および*lrp*遺伝子に対するLRPの正、負の転写制御機構が、野生型LRPが存在していても過剰なDNA結合能欠損変異LRPの存在により阻害されることから、LRPの転写制御が複数のLRPによる協調的な結合による制御であることが示唆された。

2-3-2 *lrp*遺伝子の転写開始点と制御領域

*lrp*遺伝子の転写開始点を決定するために作成した*lrp-lacZ*融合遺伝子は図の通りである(図2-1A)。図示されているように全てのプラスミドはpMC1403上に異なる長さの*lrp*遺伝子上流を挿入したものである。それぞれのプラスミドを野性型株(MC4100,*lrp*,*hns*⁺)に導入し、*lrp-lacZ*融合遺伝子の発現量を測定するとpOT1151,106,107に対し、pOT108,109は発現量が極端に低かった。したがって、主要な転写開始点およびプロモーターは*lrp*遺伝子の1塩基目より約260bpから320bp上流の範囲内に存在することがわかった(図2-1C)。さらに、プライマー伸長法を用いて転写開始点を正確に決定したところ、*lrp*遺伝子の上流265bpのアデニンであった。次に、*lrp*遺伝子のLRPによる制御領域を特定するため、pOT1151-pOT109を野生型および*lrp*遺伝子破壊株に導入しβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。pOT1151,pOT106を導入した*lrp*遺伝子欠損株における*lrp-lacZ*融合遺伝子の発現は野性型に比べ約2倍に上昇した。しかしpOT107を導入した場合、発現の上昇は約1.3倍にとどまった。したがって、LRPによる*lrp-lacZ*融合遺伝子の発現の抑制にはpOT106に含

まれる *lrp* 遺伝子上流領域が必要であることが示唆された。これはLRPの特異的な結合に必要な領域が-120から下流であることを示唆している。Wangらは、DNaseI footprintによりLRPの結合領域を解析し、LRPが-23から-108までの領域に結合することを報告している。この結果は本項で示唆された結果と完全に一致している(Wang et al., 1994)。したがって、*lrp* 遺伝子の転写制御領域は-20から-120の領域であることが示唆された(図2-5)。興味深いことに、-20から-120を含む転写開始点付近から約100 bp上流までの領域はA:Tの連続する配列が豊富に存在する特徴的な領域である(図2-5)。

2-3-3 H-NSによる *lrp* 遺伝子の制御

lrp 遺伝子の転写開始点上流にはA:Tの連続する特徴的な配列が存在する。これはbent構造をとる領域に見いだされる特徴である。そこで、既に報告されているmatrixを用いて *lrp* 遺伝子上流領域に対して、bent構造の予測を行った(De santis et al., 1986)。その結果、*lrp* 遺伝子上流はbent構造を取ることが予測された。DNA結合蛋白質であるH-NSはbent構造に好んで結合し(Yamada et al., 1990)、その結合により特定の遺伝子の転写が制御されることが示唆されている(Ueguchi et al., 1993)。したがって、*lrp* 遺伝子上流領域に、H-NSが結合し *lrp* 遺伝子の転写が制御される可能性が存在する。この点に注目して、H-NSが *lrp* 遺伝子上流のbent構造に結合して、*lrp* 遺伝子の転写を制御するかを解析した。pOT106, 107, 108, 109を野性型と *hns* 遺伝子破壊株に導入し *lrp-lacZ* 融合遺伝子の発現に対するH-NSの影響を調べた。その結果、pOT106上の *lrp-lacZ* 融合遺伝子の発現のみが *hns*

遺伝子欠損株で上昇した(表2-1B)。これより、H-NSが-56から-116の領域に依存して、抑制因子として機能していることが示唆された。さらに、H-NSの抑制効果を正確に解析するため、*lrp*遺伝子上流の-116から-56を含む*lrp-lacZ*融合遺伝子を染色体に導入したRK5を用いた β -ガラクトシダーゼ活性測定を行なった。その結果、*hns*遺伝子破壊株では*lrp*遺伝子の発現が有為に増加していることが確かめられた(表2-5)。次に、*lrp*遺伝子上流をプローブとしたゲルシフト活性測定を行った。H-NSはin vitroにおいて*lrp*遺伝子上流領域に強く結合した。しかも、その結合はbent構造をとるコンペティターにより強く阻害されるが、bent構造をとらないコンペティターでは阻害効果は低い(図2-3)。この結果は、H-NSが*lrp*遺伝子の上流領域のbent構造に好んで結合していることを示している。以上の結果は、H-NSが*lrp*遺伝子のプロモーター上流に存在するbent構造に結合し、*lrp*遺伝子の転写を抑制していることを強く示唆している。

2-3-4 ノザンプロテイング解析

最後に、*lrp*遺伝子の転写量をノザンプロテイングにより測定した。その結果、*hns*遺伝子破壊株における*lrp*遺伝子のmRNA量は*lysU*遺伝子と同様(Ito et al., 1994)、野性型株より増加していた(図2-4)。

2-4 章括

*lrp*遺伝子の自己制御機構の存在については、NewmanおよびNakamuraとItoによる総説に

において推測されていた(Newman et al., 1992; Nakamura and Ito, 1993)。本章では、*lrp-lacZ*融合遺伝子を用いて*lrp*遺伝子の転写が現実にはLRPにより抑制されることを示した。さらに*lrp*遺伝子の転写制御領域を決定し、その領域がbent構造をとることを推測した。しかも、その領域にH-NSが構造特異的に結合することをゲルシフト活性測定を用いて確認した。また、*hns*遺伝子の欠損株において*lrp-lacZ*融合遺伝子の発現量と*lrp*遺伝子のmRNA量が増加することにより、H-NSによる*lrp*遺伝子の転写の抑制が示された。H-NSおよびLRPは*lrp*遺伝子上流に存在するbent構造に結合することにより、転写におけるbent構造の促進機能を阻害しているのかもしれない(bent構造の転写促進機能に関しては4章および5章で詳しく記述する)。*lrp*遺伝子に限らず、多くの遺伝子でH-NSとLRPが同時に一つの遺伝子の転写制御に機能している例が知られている(Levinthal et al., 1994; Landgraf et al., 1994)。*lysU*遺伝子もLRPとH-NSによって転写が抑制されていることが明らかにされている。これは大腸菌内において、LRPとH-NSが多くの遺伝子を同時に転写制御していることを示唆している。H-NSは大腸菌内で核様体構造を保持するために機能していると考えられている(Userry et al., 1994)。LRPを核様体蛋白質として捕える考えも提出されており(Newman et al., 1992)、この2つのグローバルレギュレーターは大腸菌染色体のDNA構造を介して、相補的に機能しているのかもしれない。

遺伝子型	塩基の変化	アミノ酸の変化	変異が生じた部位の2次構造
------	-------	---------	---------------

<i>lrp-701</i>	G-214→A	Ala-72→Thr	β-sheet
<i>lrp-702</i>	C-142→T	Arg-48→Cys	Helix-2
<i>lrp-703</i>	C-110→T	Leu-34→Phe	Helix-1
<i>lrp-704</i>	G-134→A	Cys-45→Tyr	Helix-2
<i>lrp-705</i>	C-130→T	Pro-44→Ser	Helix-2
<i>lrp-706</i>	C-114→T	Ser-35→Phe	Helix-1

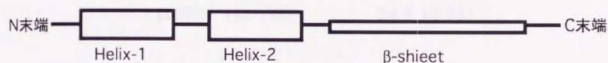


表2-1 *lrp*遺伝子上に分離されたドミナントネガティブ変異

*lrp*遺伝子上に分離された点突然変異の位置を示す。点突然変異は多くのDNA結合蛋白質に見い出されるヘリックス・ターン・ヘリックス構造と、Cro蛋白質などが持つ、ホモ2量体形成に必要なβ-シート構造中に生じていた。これらの変異はLRPのDNAとの結合に不可欠な、2量体の形成とヘリックス・ターン・ヘリックス構造を介したDNAとの相互作用を阻害していると予想される。

菌株 (遺伝子型)	プラスミド (遺伝子型)	β -ガラクトシダーゼ活性 (Units (Stdev))
RM460 (<i>lrp</i> ⁺)	None	6.03 (0.77)
	pFRP22 (<i>lrp</i> ⁺)	0.63 (0.49)
	pLRP11 (<i>lrp-701</i>)	5.17 (0.76)
	pLRP12 (<i>lrp-702</i>)	44.0 (3.21)
	pLRP31 (<i>lrp-703</i>)	21.1 (5.56)
	pLRP41 (<i>lrp-704</i>)	21.6 (2.17)
	pLRP61 (<i>lrp-705</i>)	11.6 (1.80)
	pLRP81 (<i>lrp-706</i>)	34.3 (2.35)
RM598 (<i>lrp</i> ⁻)	None	59.5 (2.30)
	pFRP22 (<i>lrp</i> ⁺)	0.98 (0.83)
	pLRP11 (<i>lrp-701</i>)	9.93 (0.55)
	pLRP12 (<i>lrp-702</i>)	40.1 (0.53)
	pLRP31 (<i>lrp-703</i>)	35.7 (7.34)
	pLRP41 (<i>lrp-704</i>)	39.7 (3.78)
	pLRP61 (<i>lrp-705</i>)	11.1 (3.03)
	pLRP81 (<i>lrp-706</i>)	47.6 (2.49)

表2-2 *lysU*遺伝子の転写に対する、変異*lrp*遺伝子の導入の効果

RM460(*lrp*⁺)とRM598(*lrp::tet*)は染色体上に*lrp-lacZ*融合遺伝子を含んでいる。この株に変異*lrp*プラスミドを導入し、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。実験の条件は表2-1および材料と方法に記述してある。

菌株 (遺伝子型)	プラスミド (遺伝子型)	β -ガラクトシダーゼ活性 (Units (Stdev))
RM539 (<i>lrp</i> ⁺)	None	1.26 (0.73)
	pfrp22 (<i>lrp</i> ⁺)	3.14 (0.23)
	pLRP11 (<i>lrp-701</i>)	1.57 (0.11)
	pLRP12 (<i>lrp-702</i>)	0.30 (0.19)
	pLRP31 (<i>lrp-703</i>)	0.21 (0.064)
	pLRP41 (<i>lrp-704</i>)	0.15 (0.075)
	pLRP61 (<i>lrp-705</i>)	0.21 (0.065)
	pLRP81 (<i>lrp-706</i>)	0.13 (0.087)
OT12 (<i>lrp</i>)	None	0.095 (0.035)
	pfrp22 (<i>lrp</i> ⁺)	1.33 (0.11)
	pLRP11 (<i>lrp-701</i>)	0.44 (0.15)
	pLRP12 (<i>lrp-702</i>)	0.19 (0.040)
	pLRP31 (<i>lrp-703</i>)	0.065 (0.078)
	pLRP41 (<i>lrp-704</i>)	0.12 (0.16)
	pLRP61 (<i>lrp-705</i>)	0.4 (0.1)
	pLRP81 (<i>lrp-706</i>)	0.076 (0.045)

表2-3 *ilvIH*遺伝子の転写に対する、変異*lrp*遺伝子の導入の効果

RM539(*lrp*⁺)とOT12(*lrp::tet*)は染色体上に*lrp-lacZ*融合遺伝子を含んでいる。この株に変異*lrp*プラスミドを導入し、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。実験の条件は表2-1および材料と方法に記述してある。

菌株 (遺伝子型)	プラスミド (遺伝子型)	β -ガラクトシダーゼ活性 (Units (Stdev))
RM538 (<i>lrp</i> ⁺)	None	22.5 (0.62)
	pFRP22 (<i>lrp</i> ⁺)	9.53 (0.57)
	pLRP11 (<i>lrp-701</i>)	14.2 (1.80)
	pLRP12 (<i>lrp-702</i>)	36.8 (2.89)
	pLRP31 (<i>lrp-703</i>)	39.1 (1.64)
	pLRP41 (<i>lrp-704</i>)	35.7 (4.48)
	pLRP61 (<i>lrp-705</i>)	12.9 (1.36)
	pLRP81 (<i>lrp-706</i>)	35.5 (5.77)
OT11 (<i>lrp</i> ⁻)	None	37.0 (1.80)
	pFRP22 (<i>lrp</i> ⁺)	11.7 (0.81)
	pLRP11 (<i>lrp-701</i>)	14.9 (1.16)
	pLRP12 (<i>lrp-702</i>)	37.9 (1.88)
	pLRP31 (<i>lrp-703</i>)	37.8 (1.73)
	pLRP41 (<i>lrp-704</i>)	39.2 (2.82)
	pLRP61 (<i>lrp-705</i>)	15.0 (2.15)
	pLRP81 (<i>lrp-706</i>)	34.3 (2.06)

表2-4 *lrp*遺伝子の転写に対する、変異*lrp*遺伝子の導入の効果

RM538(*lrp*⁺)とOT11(*lrp::tet*)は染色体上に*lrp-lacZ*融合遺伝子を含んでいる。この株に変異*lrp*プラスミドを導入し、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。適量のクロラムフェニコールを含むSSA培地(材料と方法参照)を用いて大腸菌を37℃で対数増殖期まで培養した後、分取し、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。活性はMiller unitsで示した。導入した変異については、表2-4に詳細を記述した

菌株	β -ガラクトシダーゼ活性 (Units (stdev))
WT	24.1 (0.57)
Δhns	40.7 (0.78)
$\Delta hns, lrp$	48.8 (6.01)

表2-5 *hns*遺伝子の欠損による*lrp*遺伝子の転写の脱抑制

RK6(*lrp*⁺)、RK5(*hns::kan*)およびRK4(*hns::kan, lrp::tet*)は染色体上に*lrp-lacZ*融合遺伝子を含んでいる。SSA培地(材料と方法参照)を用いて37℃で大腸菌を対数増殖期まで培養した後、分取し、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。活性はMiller unitsで示した。

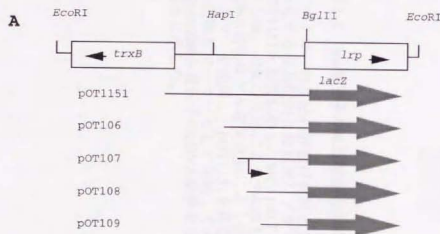


図2-1 *lrp*遺伝子上流領域の削除による*lrp-lacZ*融合遺伝子の発現に対する効果

A. 矢印から上流に伸びている線はpMC1403に挿入された*lrp*遺伝子上流領域を含むDNA断片を示している。それぞれのDNA断片は、*lrp*遺伝子のORF内に存在する*BglIII*サイトで切断し、pMC1403上の*lacZ*遺伝子とインフレームで融合するようpMC1403の*BamHI*サイトに導入した。

B. 野生型(MC4100, *lrp*⁺)およびRM430 (*lrp*⁻)にA.で示したそれぞれのプラスミドを形質転換しβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。適量のアンピシリン(材料と方法参照)を含むLB培地中で、37℃で大腸菌を対数増殖期まで培養した後、分取しβ-ガラクトシダーゼ活性を測定して、*lrp-lacZ*融合遺伝子の発現量を測定した。活性はMiller unitsで示した。

C. 野生型(MC4100)およびMC4100-81 (*hns*⁻)にA.で示したそれぞれのプラスミドを形質転換しβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。実験の条件はB.に記述したものと同様である。

B

プラスミド	β-ガラクトシダーゼ活性測定 (Units(stddev))	
	WT	Δ <i>hns</i>
pOT1106	315.7 (6.72)	423.7 (56.9)
pOT1107	525.2 (48.2)	552.8 (123.3)
pOT1108	107.9 (1.91)	165.3 (28.0)
pOT1109	55.9(6.29)	74.4 (7.7)

C

プラスミド	β-ガラクトシダーゼ活性測定 (Units(stddev))	
	WT	Δ <i>lrp</i>
pOT1151	546.2 (25.2)	1044.1 (9.12)
pOT1106	306.7 (11.9)	565.9 (21.8)
pOT1107	744.8 (89.8)	1000.9 (33.2)
pOT1108	107.2 (1.20)	142.4 (3.11)
pOT1109	52.0 (2.90)	62.4 (5.44)

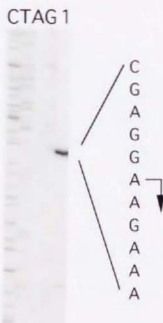


図2-2 *lrp*遺伝子の転写開始点の決定

プライマー伸長法の詳細は材料と方法に記述した。pMC1403上に存在する塩基配列と相補的なプライマーの末端を32Pで標識し、pOT1151を形質転換したMC4100より精製した全RNAとハイブリさせた後、逆転写反応により5'末端を検出した。*lrp-lacZ*融合遺伝子のcDNA産物はゲル電気泳動により分離した。逆転写反応に用いたプライマーを使用し、pOT1151を鋳型として用いて反応したシーケンス産物をマーカーとして泳動してある(ゲル左)。レーン1に*lrp-lacZ*融合遺伝子のcDNA産物を示す。転写開始点は矢印で塩基配列上に示した。

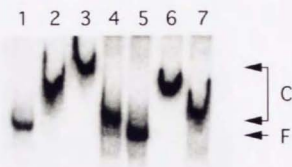


図2-3 ゲルシフト法を用いた*lrp*遺伝子上流領域とH-NSの結合に関する解析

*lrp*遺伝子の制御領域を含む516bpのDNA断片の末端を ^{32}P で標識し、プローブとして使用した。5ngのプローブに精製H-NS、およびコンペティターDNAを加え、室温で30min.放置した後、5%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で、プローブ(F)とプローブ-H-NS複合体(C)を分離した。実験の詳細は材料と方法に記述した。コンペティターDNAにはbent構造をとるDNA断片、およびとらないDNA断片を用いた。各々のレーンに泳動したサンプルは、1. プローブのみで反応させたもの。2. 40pmolの精製H-NSとプローブと反応させたもの。3. 80pmolの精製H-NSとプローブを反応させたもの。4. 2.と同様の条件でコンペティターDNAとしてbentDNAを1 μg 加えたもの。5. 4.と同様な反応でコンペティターDNAの量を5 μg に変えたもの。6. 4.と同様な反応でコンペティターDNAをbent構造を取らないDNAに変えたもの。7. 6.と同様な反応でコンペティターDNAの量を5 μg に変えたもの。である。

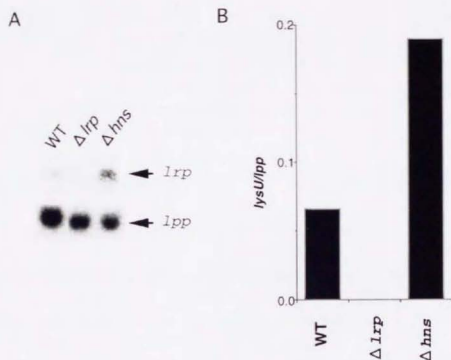


図2-4 ノザンハイブリダイゼーションによる*hns*遺伝子欠損株中での*lrp*遺伝子の転写産物の解析

野生型(W3110)、RM551(*lrp::tet*)およびRM597(*hns::kan*)より全RNAを精製し、それぞれの菌株から精製した全RNAを20 μ g電気泳動した後、ナイロンメンブレンにプロットした(詳細は材料と方法参照)。*lrp*および*lpp*転写産物特異的なプローブを用いて、ハイブリダイズしBAS2000(富士フイルム)を用いて定量した。A. 野生型、 Δlrp 株および Δhns 株中における*lrp*遺伝子および*lpp*遺伝子の転写産物のバンドを示した。B. 各々の菌株の*lrp*、*lpp*遺伝子の転写産物を定量し*lrp*転写産物量/*lpp*転写産物量の値を棒グラフで示した。

[illegible]

第3章

大腸菌染色体12.7-28.0 min領域の塩基配列決定

3-1 序

LRPはグローバルな転写制御因子であるために、その認識配列も大腸菌染色体上に、かなり広く分布するものとみられる。そのような分布を明らかにすることは、LRPによる転写調節機構ならびに大腸菌のグローバルな環境応答機構を解明する上で不可欠である。これまでは、そのような体系化された研究はあまりなされていない。その原因は、大腸菌ゲノムの完全な塩基配列がいまだ決定されていないことに由来する。そこで、筆者は、大腸菌ゲノムプロジェクトに参加し、染色体上の広い領域の塩基配列を決定した上で、あらためてLRP認識配列の染色体分布を解析することにした。大腸菌ゲノムプロジェクトは、日本(Yura et al., 1992; Fujita et al., 1994)、および米国(ウイスコンシン大学、Blattnerらのグループ(Daniels et al., 1992; Plunkett et al., 1993; Burland et al., 1993; Blattner et al., 1993; Sofia et al., 1994; Burland et al., 1995))のグループにより、日本は0 min.から時計周りに、米国は反時計周りにシーケンスを進めている(図3-1)。本章では、正確なゲノムシーケンス情報を得るために、日本の大腸菌ゲノムプロジェクト、堀内班に参加し、約700kbpの塩基配列を正確に決定した(Oshima et al., 1996; 本論文末

尾に補足として示した)。

3-2 材料と方法

3-2-1 小原クローンからの大腸菌DNAの調整

W3110の全ゲノムはKoharaらにより(Kohara et al., 1987)、既にラムダファージによる整列クローンが調整されている。この整列クローンを形成する個別のラムダファージは、宿主であるW3110をNZCYM培地(Sambrook et al., 1989)で培養し、PEG沈後、QIAGEN lambda kit(Qiagen GmbH)を用いて調整した。次に、得られたlambda DNA上の大腸菌DNA部分をGeneAmp XL PCR kit(Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division)を用いて増幅した(primer1, 5'-ACAGTCGGTGGTCCGGCAGTACAATGGATTACC-3'; primer2, 5'-GCAACCT-GCAACGTATTGAGCGCAAGAATCAGC-3')。ここで用いたプライマーはprimer1がlambda EMBL4のBamHI siteより678 bp上流に、primer2が640 bp下流から相補的な塩基配列が存在する。増幅したDNA断片は0.4%アガロースゲルで電気泳動し、EASYTRAP (宝酒造)を用いて精製した。

3-2-2 増幅したDNAの断片化とサイズセレクション

5gの増幅DNA断片をBranson Sonifier(Heat Systems)を用いて10秒から20秒間、超音波処

理で、さらに細かく断片化した。細かく断片化したDNAは、末端をDNA blunting kit (宝酒造)を用いて平滑化した後、6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。0.6 kbpから2.0 kbpの細かく断片化されたDNA断片をゲルごと切り出した後、ゲルを細かく破壊してMG elution buffer(500mM ammonium acetate, 10mM Magnesium acetate, 1mM EDTA, 0.1%SDS)を加え、37℃で一晩放置してDNAをゲル中より溶出させ、回収した。回収したDNA断片は、M13mp19上のSmaI siteに挿入しTG1(Sambrook et al., 1989)に導入した。導入されたTG1はX-galとIPTGが含まれるLB培地上にプレーティングし、1種類の増幅断片に付き250以上の独立したブラークを分離した。

3-2-3 M13一本鎖DNA(ssDNA)の精製

分離したM13ファージはTG1を宿主として2 X YT培地(Sambrook et al., 1989)で8時間培養した。ファージ粒子は2mlの培養液中から、PEG沈殿により回収した。ssDNAは通常のフェノール、クロロホルム抽出により抽出後、エタノール沈殿して調整した。

3-2-4 DNAシーケンシング

DNA シーケンシングには、Dye primer cycle sequencing ready reaction -21M13およびRev kit(Perkin Elmer/Applied Biosystems Division)を用いた。反応終了後、反応産物を373Sおよび377 DNA sequencer(Applied Biosystems Division)に供与することにより塩基配列を決定した。

3-2-5 ギャップ領域の塩基配列の決定

本研究では、調整したssDNAサンプルについてまず-21M13 kit (3-2-4参照) を用いて塩基配列を決定した。しかし、得られた塩基配列情報では完全に双方向の塩基配列を決定できなかった領域が存在した。塩基配列の完全な決定は、適当なssDNAサンプルを鋳型にしたPCRによるM13の挿入断片の増幅(ABJ-1, 5'-CTGCAAGGCGATTAAGTTGGG-TAA-3'; ABJ-2, 5'-TGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTG-3')を行ない、その断片をRev kit (3-2-4参照) を用いてシーケンスすることにより決定した。それでも決定できない場合には、ABJ1,2を用いず、目的とする領域の前後に個別の合成プライマーを作成し、ラムダファージを鋳型にして目的の領域を増幅し-21M13 kitおよびRev kitを用いてシーケンスした。

3-2-6 アッセンブルと得られたシーケンス情報の解析

各々のM13ssDNAから得られた塩基配列の情報はAuto assembler(Applied Biosystems Division)とATSQ(Software)を用いてアッセンブルした。50アミノ酸長以上のORFをPIR、SWISSPROTを対象に、blastpを用いて相同性検索を行い、スコア100以上のものを有意とした。全長に渡って95%以上の一致を見たものを既知ORF、それ以外のものをホモログORFとした。相同性を示さなかったORFについては、GeneMarkを用いて遺伝子の予測を行った。ORFのN末端の決定は、既知遺伝子に関してはデータベースに従い、ホモロ

グ、GeneMarkで予測されたもの、C末端断片の既知遺伝子に関しては、直前のORFの終止コドンの次の塩基から開始コドン候補(ATG, GTG, TTG)を検索し、Barrickらのmatrixをもちいて(Barrick et al., 1994)、スコア3.8を超えた場合、開始コドンとして採用した。この方法で予測されたORFのうち、目で見ても極端に重なり的大きいORF同士は長いものを採用した(Oshima et al., 1996)。

3-3 結果

3-3-1 大腸菌染色体塩基配列の決定

筆者は大腸菌ゲノムプロジェクトに班員として参加し、22.1 min.から24.3 min.までの塩基配列を完全に決定した。さらに、700 kbp全体についても塩基配列の決定に協力し、配列データを作製した。これは既に、発表されており(Oshima et al., 1996; *E. coli* genome data base 奈良先端大学)、インターネット上で検索が可能な状態になっている(<http://bsw3.aist-nara.ac.jp>)。したがって本論文中には示さない。

3-3-2 大腸菌染色体塩基配列情報によるORF予測

3-3-2で決定した塩基配列情報を元に、ORFを推定した(本論文末尾に補足として記述した)。

3-4 章 括

本研究では大腸菌染色体の12.7 min.から28.0 min.の718,122 bpの連続した塩基配列を決定した。ORF予測により、この領域には618のORFが存在する可能性があり、そのうち277(41%)が既知のORF、147(22%)が既知の蛋白質と相同性のあるORF、139(20%)がデータベースに登録されているhypothetical geneと一致する、もしくは類似のORF、そして118(17%)がデータベース上のORFと全く相関のないORFであった。また、これまで知られていないRNA遺伝子を見い出した。本研究以降、日本大腸菌ゲノムプロジェクト、堀内班は、さらに解析を進め、現在60 min.までの塩基配列をほぼ決定している。したがって、1997年の2月末には、大腸菌の完全なゲノムシーケンスを得ることが可能である。



図3-1 大腸菌ゲノムプロジェクトの現状

大腸菌ゲノムプロジェクトは米国(Blattnerのグループ)が反時計回りに0 min.から60 min.まで日本は0 min.から28 min.までが既に報告されており、堀内班は12.7 min.以降を決定している。さらに50 min.までの全塩基配列も決定済みであり、論文準備中である。50 min.から60 min.については現時点で塩基配列決定の最終段階である。

第4章

LRPのDNA結合様式の解析

4-1 序

*lysU*遺伝子の制御機構の解明には、DNA結合蛋白質であるLRPおよびH-NSのDNA結合様式の理解と、LRPとH-NSによる抑制機構の解明が不可欠である。H-NSに関しては、これまでの解析により、特別な認識配列は存在しないものの、bent構造に好んで結合し、直接、転写を抑制する例がしられている(Yamada et al., 1990; Ueguchi et al., 1993)。*lysU*遺伝子上流にはbent構造をとる領域が存在することが予測されており(Ito et al., 1994)、H-NSはこのbent構造に結合するものとみられる(Ito et al., 1994)。一方、*lysU*遺伝子の転写制御領域に関しては、IS2の挿入により*lysU*遺伝子の発現が上昇するような変異株や、あるいはLRPの結合低下により*lysU*遺伝子の発現が上昇するような変異が分離されている(Kawakami et al., 1992; Gazeau et al., 1994)。これらの報告では、LRPによる*lysU*遺伝子の転写抑制に必要な領域をおおまかに決定し、それが*lysU*遺伝子上流に存在する約100 bpの領域であることも報告された。しかしながら、LRPが*lysU*遺伝子の転写抑制因子であることが1992年に報告されたにもかかわらず(Lin et al., 1992; Ito et al., 1993)、LRPによる*lysU*遺伝子の転写の抑制の作用機序に関する詳しい解析はなされていない。この問題が、解決されない背景には、(1)LRPの一般的な認識配列が比較的あ

いまいであること、(2)これまでに発表されていたLRPの認識配列 (Rex et al., 1992)が *lysU* 遺伝子の制御にかかわる領域に見いだせないこと、がある(Gazeau et al., 1994)。本章では、大腸菌ゲノムプロジェクトに参画して得られた700 kbpの塩基配列に対して、LRP結合部位の予測プログラム(Cui et al., 1995)の検証を(1) 予測プログラムを用いたLRP認識配列の予測、(2)予測された認識配列を含むDNA断片と精製LRPとを用いたゲルシフト活性測定による予測認識配列の検証、の手順で行なった。この検証をもとに、この予測プログラムを使用した場合に予想されるLRPの結合部位が、かなり正確である条件を推定し、最終的にこの予測プログラムを用いて *lysU* 遺伝子上流領域についてLRPの認識配列を予測した。この結果、予測されたLRP認識配列の位置は、今までの遺伝学的な解析と全く矛盾せず、さらに筆者およびGazeauらの生化学的な解析とも合致した(Gazeau et al., 1994; 本研究)。

4-2 材料と方法

4-2-1 LRP認識配列の予測

LRPの認識配列は、Cuiらにより報告されている(Cui et al., 1995)。これは、SELEX法(Tuerk and Gold, 1990)を用いて決定された、LRP-DNA複合体をもっとも形成しやすい15 bpの塩基配列である(YAGHAWATTWTDCTR; Y=C/T, H=not G, W=A/T, D=not C, R=A/G)。この報告に記述されたmatrixを用い、multiple regression analysis (Stromo et al.,

1986)を利用して、結合スコア(結合エネルギーを示すスコア)を予測した。この予測は認識配列に含まれる全ての塩基がそれぞれ独立にDNAとLRPとの結合に寄与するとした場合、15 bp中のそれぞれ位置に来る塩基の種類により結合強度を計算したものである。予測はスコア3以上を示す15 bpの塩基配列をLRPの予想認識配列とするものと、50 bpの範囲に2か所以上のスコア2以上を示す15 bpの塩基配列が存在する領域についてのみ、その2つの15 bpの塩基配列をLRPの予想認識配列とする、とした2つの基準を元に行なった。

4-2-2 LRP蛋白質の精製

LRPの精製は概ねWillinsらの方法に従った(Willins et al., 1991)。SSA培地(2-2-3参照)でpIRP18(2-2-2参照)を導入したRM538(2-2-1参照)を5I培養し、菌体を遠心分離して回収した(これ以降の操作は、すべて4℃で行なった。)。この菌体をResuspend buffer(10mM Tris-Cl pH8.0, 10%グリセロール, 0.1mM EDTA, 0.1mM DTT, 0.2M NaCl)に懸濁し、再度、遠心して菌体を回収した。菌体を-80℃で凍結したのち、適量の酸化アルミナを混ぜ、乳鉢ですり潰した。すり潰した菌体を再度、Resuspend bufferに懸濁し遠心した。上清を回収し30mlのP11(Whatman)カラムに供与した。NaClの濃度を0.2Mから1.5 Mに直線的に上昇させ、吸着した蛋白質を溶出した。LRPの活性測定は*ilvIH*遺伝子のLRP結合領域を含むDNA断片をブローブに用いたゲルシフト活性測定で行なった。LRPの活性の存在する画分を集め、Resuspend bufferで透析した後、7mlのヘパリンアガロ

ース(Sigma H6508)カラムに供与した。3倍量のResuspend bufferでカラムを洗浄し、次に1.5MまでNaCl濃度を直線的に上昇させることにより蛋白質を溶出した。LRPの活性のあった画分をSDS-PAGEしてLRPのバンドを確認し、クマジー染色のレベルで単一のバンドを示す画分について、精製標品とした。保存は、グリセロール Buffer (10mM Tris-Cl pH8.0, 50%グリセロール, 0.1mM EDTA, 0.1mM DTT, 0.1M NaCl)に透析し、-80℃に保管した。精製標品は、抗LRP抗体 (His6-tagged LRP [pRsetB(Invitrogene)に、N末端の8アミノ酸が欠けたLRP-His6タグ融合蛋白質ができるようpFRP22 (2-2-2参照)のBgII-EcoRI断片を挿入し、T7ポリメラーゼによる発現で、融合蛋白質を過剰発現させた。常法にしたがって、ニッケルカラムに蛋白質を吸着させた後、イミダゾールの濃度を上昇させ、融合蛋白質を溶出した。SDS-PAGEによる確認でクマジー染色のレベルで単一のバンドとなった画分を、保存 Bufferで透析し、His6-tagged LRPとして保存した。) を抗原として使用し、マウスを用いて常法により抗LRP抗体を作成した。) により認識されることを確認し、LRPであることを保証している。

4-2-3 ゲル電気泳動

蛋白質のSDS-PAGEはMolecular cloning, 2nd edition (Sambrook et al., 1989)に従った。

4-2-4 ゲルシフト活性測定

プローブは、PCRにより小原の整列クローンを鋳型に用いて増幅した。増幅する断片は、1つを除いて、すべて300 bpの大きさになるようにPCRプライマーが設計されている(断片2については240 bp)。ポジティブコントロールとして使用した*lysU*遺伝子のLRP結合領域を含む断片については、Gazeauらにより報告されたLRP結合領域のみを持つように120 bpの断片が増幅されるようPCRプライマーを設計した(Gazeau et al., 1994)。増幅されたDNA断片の回収は3-2-2に従って行なった。ゲルシフト活性測定は2-2-6に従った。

4-2-5 ノザンプロットティング

ノザンプロットティングは2-2-7に従った。ハイブリに用いたプローブの作製には *putA*, *prfC*, および *mdoA* 遺伝子の ORF の全体もしくは一部を含む、300 bp から 4.5 kbp の DNA断片を使用した。

4-3 結果

4-3-1 LRP結合配列の予測

Cuiらは、selex法を用いて、LRPの強い結合特性を示す認識配列として15 bpの塩基配列を決定しており、その配列を持つDNA断片とLRPとの結合強度に関するmatrixを公開している(Cui et al., 1995)。そこで本研究におけるLRPの認識配列の予測は、Cuiらの

matrixを元に行なった。その結果、結合に最も最適な配列ではないものの、他の多くの塩基配列よりLRPが好んで結合しうる配列をスコア化して、LRPの認識配列を予測した。LRPの認識配列は、スコア3以上の塩基配列、および50 bp中にスコア2以上の塩基配列が2つ以上存在することを閾値とした(図4-1参照)。

4-3-2 ゲルシフト活性測定によるLRP認識配列の検証

4-3-2-1 予測結合配列の検証

蛋白質のレベルでLRPにより制御されていると想定されている遺伝子は約75個であると報告されている(Newman et al., 1992)。この解析で、転写レベルの発現制御と翻訳レベルの発現制御の違い、実験の感度の問題など問題点は多いが、平均すれば、100 kbpにつき2個弱の遺伝子がLRPにより制御されていることが予想されている。一方、本研究では、22.1min.から24.3min.までの100 kbpに約60の認識配列の候補が存在した。このうち、約300 bpのDNA断片中に、(1) スコアが3以上の認識配列1つを含むもの(断片6, 11, 12, 13)、(2) 50bp中にスコア2以上の認識配列を2個以上含むもの(断片5, 7, 8, 9, 10)、(3) (1)と(2)には含まれない(断片1, 2, 3)、合計12のDNA断片をPCRを用いて増幅した(それぞれのPCR断片についての詳しい情報は図4-2に示した)。この増幅されたDNA断片および*lysU*遺伝子上流のLRP結合領域(以降、*lysU*断片)と精製LRPによるゲルシフト活性測定を行ない、これらのDNA断片と精製LRPとの複合体の形成能について解析した。

*lysU*遺伝子上流を除いた12のDNA断片の内、断片8（スコア3以上の認識配列が50bp中に2つ存在する断片）、および、断片10（スコア3以上の認識配列およびスコア2以上の認識配列が50bp中に2つ存在する断片）がLRPと強く結合し、断片7（スコア2以上の認識配列が50bp中に2つ存在する断片）と断片13（スコア4以上の認識配列が1つ存在する断片）が弱く結合した(図4-2)。

4-3-2-2 LRPと結合可能なDNA断片の解析

*lysU*断片とLRPとの複合体形成反応に対するコンペティターとして断片8、10、13を用い、LRPと断片8、10、13の結合の特異性を解析した。その結果、*lysU*断片の5000倍mol量で断片10だけが*lysU*断片とLRPの複合体の形成を阻害することがわかった（図4-3a）。しかし、断片8および13は断片10と同じmol量では、LRPと*lysU*断片との結合を阻害できなかった。これは、断片10とLRPとの結合が、断片8および断片13とLRPの結合より特異的であることを示している。さらに、断片8とLRPの結合が、LRPの認識配列に特異的であること検証するため、*lysU*断片をコンペティターとして用い、断片8とLRPとの複合体形成反応の配列特異性を検証した。その結果、*lysU*断片により、複合体形成が阻害された（図4-3b）。以上の結果より、断片10および断片8とLRPとの結合は、弱いながらも配列特異的なものであり、LRPと結合可能な各々の断片の結合強度は*lysU*断片>断片10>断片8>断片13、7であることが示された（図4-2、4-3）。

4-3-3 複合体形成のin vivoでの意義

LRPが結合した断片8は、*putA*遺伝子の制御領域を含んでいる(Nakao et al., 1988)。一方、断片10は*mdoA*遺伝子の約1 kbp上流に存在し、特定の遺伝子の制御領域を含んでいない(Oshima et al., 1996)。遺伝子の発現制御領域に結合することにより、LRPが転写因子として機能するならば、*lrp*遺伝子破壊株中の*putA*遺伝子のmRNA量は上昇し、一方*mdoA*遺伝子のmRNA量は変化しないであろうと予想された。また、前章で述べたLRPとH-NSの転写制御機能の相関があるならば、*hns*遺伝子破壊株における*putA*遺伝子の転写量も変化することも予想された。そこで、野性型株、*lrp*遺伝子破壊株および*hns*遺伝子破壊株における*putA*遺伝子および*mdoA*遺伝子のmRNA量を定量した。その結果、*lrp*遺伝子欠損株、および*hns*遺伝子の欠損株では、*putA*遺伝子のmRNA量が著しく低下していた。従って、LRPは*putA*遺伝子の正の転写制御因子であり、H-NSも*putA*遺伝子の転写制御因子であることが強く示唆された(図4-4)。また断片10が1 kbp上流に存在する*mdoA*遺伝子の転写はLRPによる影響は受けていなかった。このことは、LRPが結合する部位が、遺伝子の制御領域である場合に限り、LRPが遺伝子の転写制御因子として機能することを示している。認識配列を含むDNA断片と、LRPとがすべて結合するわけではなく、本章で示した頻度で結合し、しかも、認識配列が制御領域に存在しなければならないことから、Newmanらの提出したLRPにより制御される遺伝子数の推測は、かなり妥当なものであるかもしれない(Newman et al., 1992)。

4-3-4 ゲルシフト活性測定に用いたDNA断片の構造予測

本章の予測に用いたLRP認識配列にはLRPの2量体が結合することが既に報告されている(Cui et al., 1996)。ところで、4-3-2-1で示されたように、LRPが強く結合することが可能なDNA断片は断片8および10である。このDNA断片には、共にLRP認識配列が50 bp中に2つ存在することが予測されていた。第2章で述べたように、LRPは協調的にDNAと結合することが予想されている。断片8と断片10に存在する2つの認識配列に、LRPが結合するとした場合、その結合が協調的でないならば3種類のDNA-LRP複合体が検出されるはずである。しかしながら、DNA-LRP複合体が1種類しか検出されないということは、LRPと断片8と断片10との結合が協調的であることを支持している。また、断片8および10に存在するLRPが強く認識した認識配列は、断片10が21 bp、断片8が28 bpの間隔において異なるDNA鎖に存在していた。さらに、LRPと特異的に結合した2種の断片は、断片自身が連続するA:Tの豊富なbent構造を取りやすいDNA断片であった。第2章で記述したようにLRPはCro蛋白質とよく似たDNA結合ドメインと2量体形成ドメインを持つ、これらのドメインは機能的にもCro蛋白質と似ていると考えられる(2章参照)。そこでCro蛋白質のDNA結合モデルを参考にして(Pabo and Sauer, 1984)、断片10および8とLRPとの結合モデルを構築した(図4-5)。DNAの螺旋構造が約10 bpで1回転すると、異なる鎖に認識配列が存在する場合、20 bpの間隔で認識配列が存在する状態でDNAの同じ面に2つのLRP2量体が結合できる。したがって、断片10は、ほぼ同じ面にLRPが結合していると

考えられる。断片8は10に比較すると、結合する面にずれがありこれが結合の強度を低めていると示唆される。これらの結果は、LRPとDNAとの強い結合には、LRPの認識配列が2カ所、50 bp以内のDNAの同じ面に存在し、2つのLRP2量体が協調的に結合する必要があることを示唆している。しかしながら、LRPとDNAの結合を解析した12の断片中、このような特徴をもつ断片でLRPと強く結合しない断片が1つ存在した。この断片は断片9であり、2つの認識配列が同じ鎖に24 bpの間隔で存在しているため、DNA断片の同じ面に認識配列が2つ存在していると予想される。この断片がLRPと結合しないことは、上記の条件の他にDNA構造と認識配列の関係で付け加えるべき点が、いまだ残っていることを示している。

4-3-5 *lysU*遺伝子上流に存在すると思われるLRP認識配列の推定

DNAの狭い範囲内に複数のLRP結合配列が予測され、それがDNAの同じ面に存在し、しかもLRPの結合配列を含む領域がbent構造を取る可能性が高い場合、LRPは特異的に、結合部位に結合できることが示唆された。さて、*lysU*遺伝子上流領域について考えると、*lysU*遺伝子上流領域はbent構造をとることが予想されている(Ito et al., 1994)。また、LRPが複数この領域に結合することも示唆されている(Gazeau et al., 1994; Oshima et al., 1995; 本論文)。そこで、Gazeauらにより示唆されていたLRPによる制御に必要な*lysU*遺伝子の上流領域についてLRPの結合部位を予測した(Gazeau et al., 1994)。その結果、スコア3以上のサイト1およびスコア1以上のサイト2および3が予測された(図4-2-1、図

4-5、図6-1)。興味深いことに、サイト1とサイト2は16 bpの間隔を隔てて、同じDNA鎖に存在しており、DNAの同じ面に位置していた(図4-5)。次章で詳しく述べるが、予測された3つのサイトのうち、サイト1およびサイト2は認識配列として機能しうることが遺伝学的に示唆されていた。またサイト3については、サイト2と認識配列が一部重なるため、このサイトについては考慮しないことにした。この認識配列の情報を元に、LRPと良く似た構造をとると推察されるCro蛋白質(CroもLRPと同様、ヘリックス-スーター-ヘリックス構造とそれにつづく2量体形成に機能する β -シート構造を有する)のDNA結合モデルを参考にして、*lysU*断片とLRPの結合様式モデルを推察した。このモデルにあてはめると、図4-5に示されるように、最も強くLRPと結合する2つの断片である断片10および*lysU*断片とLRPの結合モデルは、ほぼ一致する。

4-4 章括

本章では、大腸菌のゲノム塩基配列データを元にLRPの認識配列を予測した。次に、予測された認識配列にどのくらいの割合でLRPが特異的な結合をするかを検証した。無作為に抽出したDNA断片の内、2つのDNA断片のみがLRPにより強く塩基配列特異的にDNA-LRP複合体を形成した。この2つの断片の内、1つの断片は、*putA*遺伝子の制御領域を含んでいた。本章では、さらに、ノザンハイブリダイゼーションにより*putA*遺伝子の転写がLRPにより正に制御されていることを明らかにし、*in vivo*でもLRPが*putA*遺伝子の制御に係わることを証明した。これらの事実は、*in vitro*で見いだされたLRPとDNA断片

の特異的な結合が、in vivoでのLRPの機能に必要とされることを示唆している。また、この特定のDNA断片に対するLRPの特異的な結合能は、認識配列が存在するだけでは不十分であった。すなわち、50 bp中に2つの結合部位が存在し、なをかつ、bent構造を取るような場合、特異的な結合が可能であることが示唆された。このことはLRPの結合がA:Tの豊富な塩基配列に依存するという筆者およびGazeauらの考察と矛盾しない(Gazeau et al., 1994; Oshima et al., 1995)。また、今回LRPによる転写制御が確かめられた*putA*遺伝子は同時にH-NSによっても転写が影響されていた。前項でも述べたように、LRPが転写を制御している遺伝子が、同時にbent構造に依存してH-NSにより転写が制御され、制御の多様性を確保することは大腸菌において、一般的な転写制御機構の1つなのかもしれない。さらに、断片8および10にはLRPの認識配列が複数あるにもかかわらず、どのようなLRPの濃度においても、ただ1つの複合体を形成した。これらの事実は、LRPの特異的な結合には、複数のLRP2量体とDNAとの協調的な結合が必要であり、そのためには認識配列が同じ面に存在しなければならないことを示唆している。この、考察を踏まえ、このLRP認識配列予測プログラムを用いて、*lysU*遺伝子上流領域におけるLRPの結合部位を予測した。この結果は、すでに報告されている遺伝学的な解析と矛盾せず(くわしい考察は総合討論で加える)(Kawakami et al., 1992; Gazeau et al., 1994)、また第5章で記述する、LRPによるDNaseI footprintにより特定された、*lysU*遺伝子上流の2つのLRPの結合部位とも一致した。さらに、*lysU*遺伝子上流とLRPとの結合モデルを推定したところ、LRPと最も強く結合した断片10とLRPとの結合モデルと非常に酷似した

結合状態をとることが予想された(図4-5)。このことは、*lysU*遺伝子上流とLRPとの結合が非常に強いことを説明している(図4-2)。これらの結果より、LRPの結合部位が*lysU*遺伝子上流に2カ所存在し、そこに4量体を作って協調的に結合することにより転写を抑制しているというモデルを立てることが可能となった。

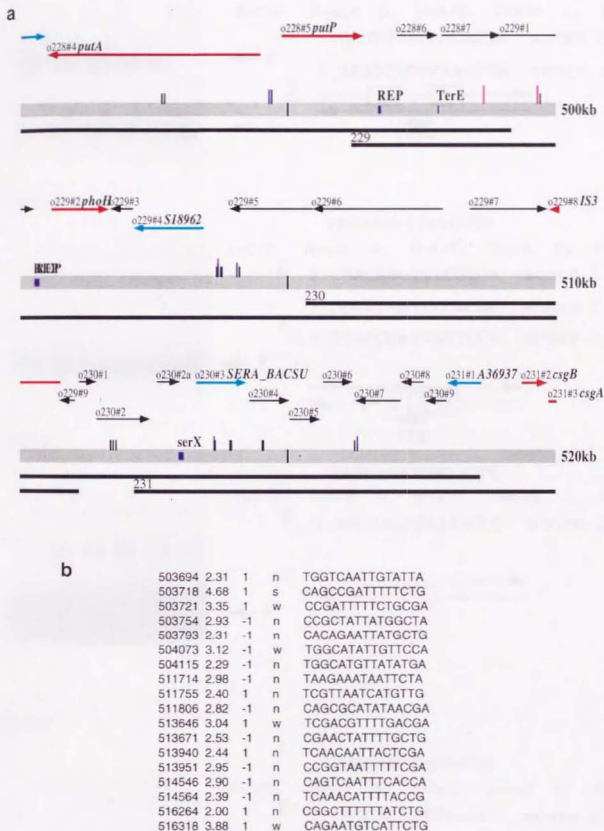
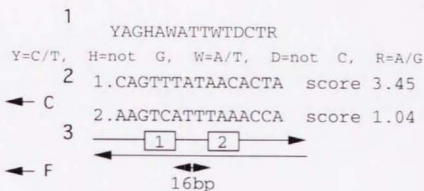
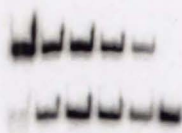


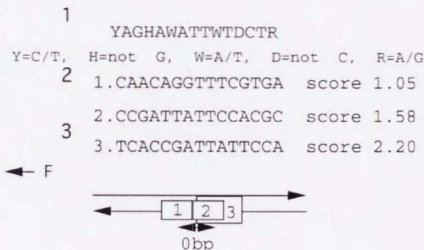
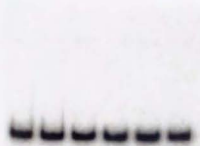
図4-1 LRP認識配列の予測の例

LRPの認識配列を予測した例を示す。スコア2以上(bではn)が黒棒、スコア3以上(bではw)が青棒、スコア4以上(bではs)がピンクの棒で示されている(a)。これらの予想認識配列は配列データとして得られ(b)、ゲルシフト法に用いるプローブはこのデータを元にして設計した。

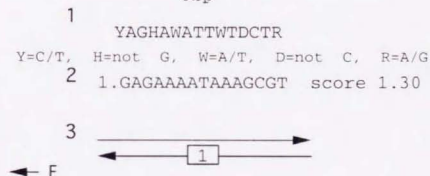
lysU



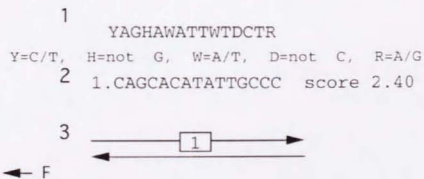
断片1



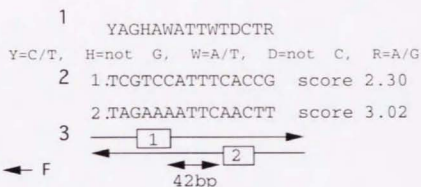
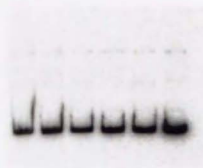
断片2



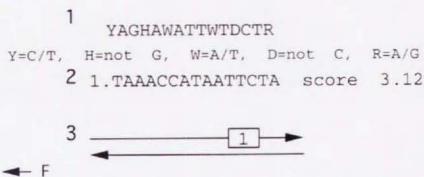
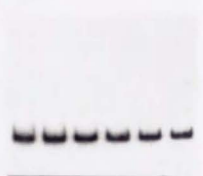
断片3



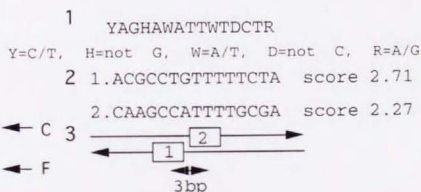
断片5



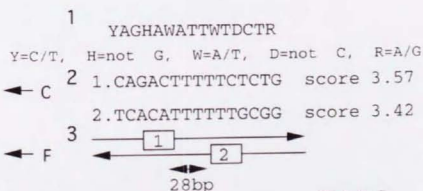
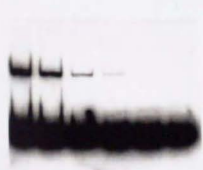
断片6



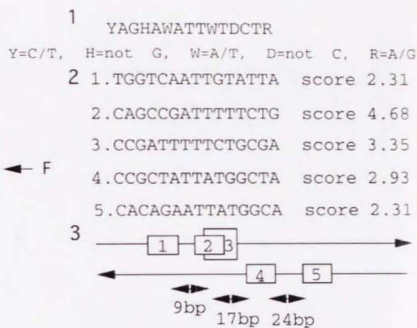
断片7



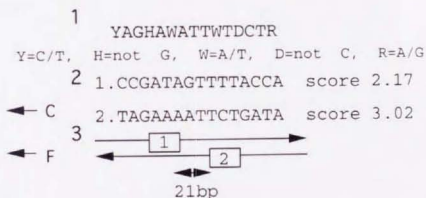
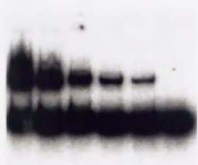
断片8



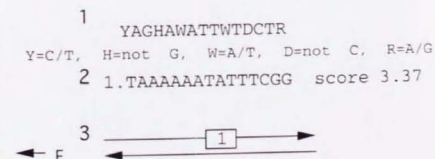
断片9



断片10



断片11



断片12

1

YAGHAWATTWTDCTR

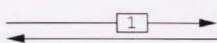
Y=C/T, H=not G, W=A/T, D=not C, R=A/G

2

1.CAGCAAATTTATTTA score 3.48

3

← F



断片13

1

YAGHAWATTWTDCTR

Y=C/T, H=not G, W=A/T, D=not C, R=A/G

2

1.TAGAATGTTTGGCTA score 4.49

← C

3

← F

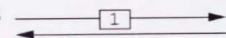


図4-2 ゲルシフト法を用いた予測LRP結合配列と精製LRPとの結合の解析

ゲルシフト法の詳細は材料と方法参照。各々のプローブは0.005pmolで一定に保たれている。反応系には各々のプローブとポリdI-dC(2mg/ml)1μlおよび精製LRPを加え、室温で30分放置した。精製LRPはゲルの左から500ng, 250ng, 125ng, 62.5ng, 31.25ng, 0ng加えられている(最右端はコントロール)。ゲル右のFおよびCの矢印はそれぞれF:フリーのプローブ、およびC: DNA-LRP複合体の位置を示している。各々のゲルの右側には、1. Cuiらにより予測されたLRPの認識配列。2. プローブに含まれる予想認識配列とその結合スコア。3. 認識配列のプローブ中の位置 (2本の矢印はそれぞれDNAの1本の鎖を意味しており、矢印の下には、隣り合った認識配列がどれくらいの間隔を隔てているかを明示した。)を示した。

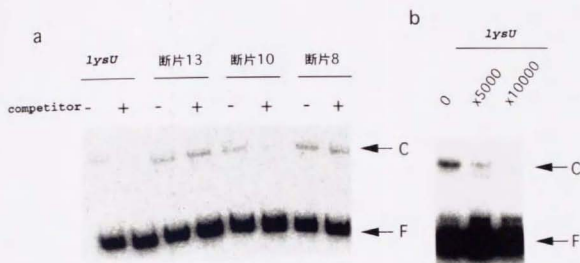
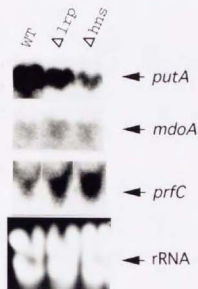


図4-3 断片10および断片8とLRPとの結合の特異性

ゲルシフト法の詳細は材料と方法参照。それぞれのプローブは0.005pmolで一定である。a. 反応に用いたコンペティターの種類をゲルの上に記述した。それぞれプローブとして*lysU*遺伝子上流を含むDNA断片の加えられた反応系に対して5000倍mol量の各々のコンペティターを加えた条件(+), 加えない条件(-)で精製LRP62.5ngを加え、室温で30min.放置した。これを5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動しプローブ(F)とDNA-LRP複合体(C)を分離した。b. 断片8をプローブとして反応系に加え、ゲルの上に記述したmol量の*lysU*遺伝子上流を含むDNA断片をコンペティターとして反応系に加えた。次に250ngの精製LRPを加え、室温で30min.放置した。電気泳動の条件はa.と同様である。

A



B

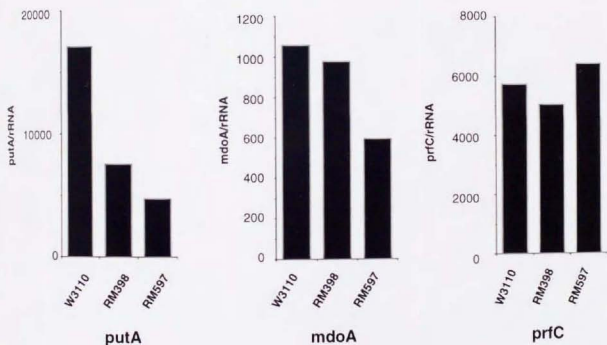


図4-4 ノザンハイブリダイゼーションによる転写産物の解析

野性型(W3110)、RM398(*lrp::tet*)およびRM597 (*hns::kan*)より全RNAを精製し、それぞれの菌株から精製した全RNAを20 μ g電気泳動した後、ナイロンメンブレンにプロッティングした(詳細は材料と方法参照)。*putA*、*mdoA*、*prfC*遺伝子転写産物特異的なプローブを用いて、ハイブリダイズしBAS2000(富士フイルム)を用いて定量した。A. 野性型、 Δlrp 株および Δhns 株中における*putA*、*mdoA*、*prfC*遺伝子の転写産物のバンドを示した。一番下には16Sおよび23SrRNAのエチブロ染色によるバンドを示した。B. それぞれの転写産物のバンドをBAS2000を用いて定量したものをデンストメーターを用いて定量したrRNAの量で標準化した棒グラフを示す。

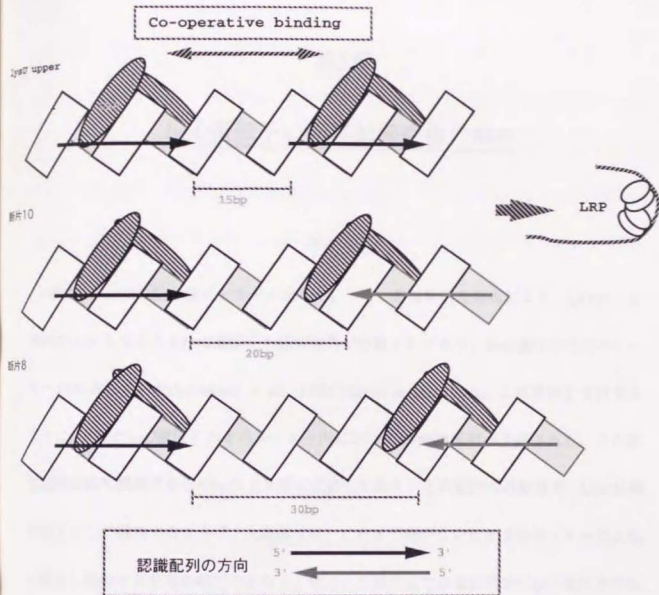


図4-5 LRPのDNA結合モデル

ジグザグを描く白と灰色の四角はB型DNAの2重螺旋構造を模式的に示したものである。四角と四角の間がメジャーグループを示している。LRPのDNA結合蛋白質としての構造はCro蛋白質と類似している。すなわちDNAと接触するべき2つの α -ヘリックスが存在し、それに続いて2量体を形成するために必要な β -シートが存在する(Pabo and Sauer, 1984)。しかも筆者の分離したLRPのDNA結合能欠損変異はこの2つの構造に生じた点突然変異であったことを考慮すると、この2つの立体構造がCro蛋白質の同様の構造(DNA結合能に必須である構造)と同じ機能を持つことが推察される。LRPがCro蛋白質と同じ様式でDNAと結合すると、DNAの反対側から2量体を形成する一分子ずつのLRPがメジャーグループと接触し2量体でDNAと結合する。LRPの認識配列が15bp離れた同じ鎖上に存在するとLRPは一番上の図の様にDNAのメジャーグループと接触し結合する。したがってDNAに結合した全てのLRP分子はDNAの同じ面に存在する(a)。一方、20bpの間隔で、それぞれ異なる鎖にLRPの認識配列が存在する場合、LRPは真ん中の図の様にDNAと結合する(b)。結果的に、(a)と(b)は全く同様なDNA結合様式を示すと考えられる。さらに30bpの間隔でそれぞれ異なる鎖にLRPの認識配列が存在する場合は一番下の図の様にLRPがメジャーグループと接触し結合する(c)。この場合でも、DNAに結合した全てのLRP分子はDNAの同じ面に存在している。本研究で、LRPとDNAが強く結合することが示された状態は、(a)と(b)であると推測される(*lysT*遺伝子上流領域とLRPおよび断片10とLRP)。

第5章

*lysU*遺伝子の転写制御機構の解析

5-1 序

4章では、LRPの結合様式をモデル化した。一方、遺伝学的な解析により、LRPによる抑制がかからなくなる*lysU*遺伝子上流の変異が分離されており、*lysU*遺伝子のオペレーターが示されていた(Kawakami et al., 1992; Gazeau et al., 1994)。この事実を支持するように、4章で*lysU*遺伝子のオペレーター内に2つのLRP認識配列が予測された。この認識配列は転写開始点から60bp以上上流に位置しており、この配列への結合で、LRPが抑制因子として機能するならば、大腸菌では、これまで例がないほどプロモーターの上流に結合し機能する転写抑制因子となる。他方、当研究室では遺伝学的に*lysU*遺伝子の転写の抑制因子としてH-NSを特定した(Ito et al., 1994)。しかしながら、H-NSがどのような転写抑制因子として機能し、*lysU*遺伝子の転写を抑制しているかは解析されていなかった。また、LRPおよびH-NSの転写抑制因子としての相互の関係も明らかにされてはいなかった。本章では、LRPとH-NSが転写抑制因子として、いかに*lysU*遺伝子の転写制御を行っているかに焦点をあて、まず*lysU-lacZ*融合遺伝子を染色体上に持つ菌株を用い、LRPとH-NSが、それぞれ独立に*lysU*遺伝子の転写を抑制する活性を持つことを示唆した。次に、in vivoにおいてLRPとH-NSによる*lysU*遺伝子の転写抑制に必要な領域を示

した。さらにfootprintでH-NSおよびLRPが、示唆された領域に結合することを示した。またin vitro転写により、LRPとH-NSが*lysU*遺伝子の転写を直接抑制することを示し、同時に*lysU*遺伝子上流のbent構造が転写を促進する機能を持つことを示した。また、ゲルシフト活性測定ではLRPおよびH-NSは同時に*lysU*遺伝子上流に結合できた。この結果、LRPおよびH-NSがプロモーターから離れた位置に結合し、直接抑制因子として機能することが示唆された。

5-2 材料と方法

5-2-1 菌株

MC4100は野生型の菌株として、 β -ガラクトシダーゼ活性測定に使用した。RM460は*lysU-lacZ*融合遺伝子を染色体上に持っている。RM598 (*lrp::Tn10 Tet^r*), RM460-81 (*hns::Kan^r*), RM598-81 (*lrp::Tet^r, hns::Kan^r*)はそれぞれRM460の*lrp*遺伝子、*hns*遺伝子を単独あるいは2重に破壊した株である。RM430およびRM4100-81はそれぞれMC4100の*lrp*遺伝子破壊株(*lrp::Tn10 Tet^r*)および*hns*遺伝子破壊株(*hns::Kan^r*)である。これらも、 β -ガラクトシダーゼ活性測定に使用した。

5-2-2 プラスミド

pFALLはpUC118のマルチクローニングサイトに*lysU*遺伝子のファーストメチオニンを

含む、*lysU*遺伝子上流304 bpを挿入したプラスミドである。これは、in vitro transcriptionに用いた。pFAII-SmaI, pFAII-VXI, pFAII-XIはそれぞれpFAIIの誘導体である。構造を、図5-1に示す。これらも、in vitro transcriptionに用いた。pFAII-lacおよびpFAII-VXI-lac, pFAII-XI-lacはそれぞれpFAII, pFAII-VXI, pFAII-XIの、pUC118への挿入断片をpMC1403に再挿入し*lacZ*遺伝子と*lysU*プロモーターを融合させたものである。これらは、 β -ガラクトシダーゼ活性測定に用いた。pNE73はpSU19に*prfC*遺伝子を含むDNA断片を挿入したプラスミドである (Mikuni et al., 1994)。これは、in vitro transcriptionに使用した。

5-2-3 培地

LBおよびSSA培地を使用した。SSA培地にロイシンが含まれる場合には20 μ g/mlである。

その他の条件は、2-2-3参照。

5-2-4 試薬、酵素、アイソトープ

2-2-4参照。

5-2-5 β -ガラクトシダーゼ活性測定

β -ガラクトシダーゼ活性測定は2-2-5参照。*lysU*遺伝子上流を持つプラスミドが野生株と*hns*遺伝子破壊株で β -ガラクトシダーゼ活性測定の数値に影響を及ぼすコピー数の変動がないことは確認している。また、*lrp*破壊株でのプラスミドをもちいた β -ガラクトシ

ダーゼ活性測定では、プラスミドのコピー数の変動が活性に関係しないことが報告されている(Gazeau et al., 1994)。

5-2-6 in vitro transcription

5-2-6-1 試験管内転写反応

試験管内転写反応は、まず転写Buffer (42mM Tris-Cl pH8.3, 8.5%グリセロール, 0.12mM EDTA, 1mM DTT, 10mM MgCl₂, 50mM グルタミン酸カリウム, 17mM NaCl, 50μg/ml BSA, 20U RNase inhibitor) 中に鋳型となるプラスミドを適量添加し、5分間、37℃で保温した後、すぐに0.26mg/mlのRNAポリメラーゼ(σ 70ホロ酵素を含む。伊藤により本研究室で精製されたもの(伊藤 耕一, 博士論文, 1993))を2μl加え、さらに37℃で10分間保温した。転写制御因子による転写の制御を加えたい場合は、RNAポリメラーゼを添加する前に、適量の制御因子を加え、10分間、37℃で保温しておいた。転写のrun offは0.2mMのNTPを加えることにより、開始させ、正確に10分間で転写反応を停止させた。停止は、良く冷やした蒸留水を添加して行なった。この蒸留水には50μgの大腸菌rRNAがキャリアーとして入っている。生成されたRNAをフェノール、クロロホルム抽出後、回収し、プライマー伸長法により転写開始点を特定して、*lysU*および*prfC*, *bla*それぞれの遺伝子のプロモーターに依存した転写産物を検出した。

5-2-6-2 プライマー伸長法

用いたプライマーはM4(宝酒造)、AMP(5'-CAGGAAGGCAAAATGCCGCA-3'(Willins et al., 1992)), PflC(5'-TCATAATTCTTTCTTCTTGAGTAAG-3'(Mikuni et al., 1994))である。これらは、末端が³²Pで標識してある。プライマー伸長法は2-2-8参照。

5-2-7 DNaseI footprint

DNaseI footprintはファルマシアのSure track footprinting kit (ファルマシア) を用いて行なった。使用したDNA断片は、末端標識したM4および標識されていないRVプライマー(宝酒造)を用いて、もしくは、末端標識したRVおよび標識されていないM4プライマーを用いて、pFAIIを鋳型としてPCR法で増幅した*lysU*上流304 bpを含む片側のみが標識された約350 bpの断片である。LRP-DNAもしくはH-NS-DNA複合体を室温で形成させた後、ファルマシアの使用説明書に従って反応を行なった。反応産物は6%シーケンエスゲルを用いて電気泳動した。マーカーは末端標識したM4およびRVプライマーを用いてpFAIIを鋳型としたサンガー法でシーケンスしたものを使用した。

5-3 結果

5-3-1 In vivoでのLRPおよびH-NSの*lysU-lacZ*融合遺伝子の発現の抑制

LRPの抑制に必要な*lysU*遺伝子上流の領域はすでに本研究室とGazeauらによりすでに-35から-138の領域であることが、 β -ガラクトシダーゼ活性測定により明らかにされている(Oshima and Ito., unpublished data; Gazeau et al., 1994) (図6-1、図6-2)。本研究では、この解析をさらに詳しく行い、in vivoにおけるH-NSおよびLRPによる*lysU*遺伝子の抑制に必要な領域を決定した(図5-1c)。その結果、H-NSによる発現の抑制に必要な領域は-41から-64であり(図6-2)、LRPによる発現の抑制には-64より上流が必要であることが示された(図5-1、図6-2)。この領域は連続するA:Tが豊富な領域であり、bent構造をとることが既に予測されている領域であった(Ito et al., 1994) (図6-1)。次に、*lysU-lacZ*融合遺伝子を染色体上に持ち、さらに*lrp*もしくは*hns*、*lrp*、*hns*遺伝子を共に欠損した株を作製し、*lysU*遺伝子の発現の変化を観察した。その結果、*lrp*および*hns*遺伝子の欠損株は野生型と比較して約4倍の発現が見られ、さらに*lrp*、*hns*遺伝子を共に欠損した場合、約8倍の発現が観察された(表5-1参照)。このことはLRPおよびH-NSがin vivoで、それぞれ独立に*lysU*遺伝子の転写を抑制していることを示している。

5-3-2 DNaseI footprint

次に、*lysU*遺伝子の上流領域のH-NSおよびLRP結合領域をin vitroで特定した。LRPの

結合領域は、これまでに報告されている、LRPの結合領域に含まれていた (Lin et al., 1992; Gazeau et al., 1994)。さらに、第3章で予測した、2つのLRP認識配列を含んでいた。従って、LRPの結合部位はこの2か所であることが強く示唆された(図5-2)。また、H-NSは*lysU*遺伝子上流のプロモーターより上流に比較的広い範囲で結合することがわかった(図5-2)。前項で示唆されたH-NSの*lysU-lacZ*融合遺伝子の発現の抑制に必要な領域はこの結合領域に含まれていた(図5-2)。

5-3-3 in vitro transcription

5-3-3-1 in vitro転写系

LRPおよびH-NSの抑制因子としての機能を解析するため、in vitro転写による活性測定を行なった。まず、in vitroにおける転写が*lysU*遺伝子本来のプロモーターから開始されるかどうかを検証した(図5-3)。in vivoではLRPおよびH-NSが存在しない場合、2つの主要なプロモーター(PI or PII)から転写が開始していた。しかし、in vitro転写系では上流の1つのプロモーター(PI)からの転写のみが観察された(図5-3)。本章で作製したin vitro転写系は、厳密にはin vivoの転写開始点の使用頻度を再現はしなかった。しかしながら、Levequeらによって報告された*lysU*遺伝子の転写プロモーターの予測から、-10および-35の完全なプロモーター単位を持つ転写開始点はPIであることが指摘されていた(Leveque et al., 1990)。従って、鋳型の構造が一定に保たれているin vitro転写系では、

pIが強いプロモーター活性を示すのは妥当であると判断し、以降の実験を行った。まず、3つの*lysU*遺伝子のプロモーター領域を改変した鋳型を用いたin vitro転写を行なった。この結果、鋳型量が一定であるにも係わらず、-41から-64までの領域を持たないとPIからの転写量は約2/3に減少した。さらに、-41の位置にGGGCCC配列を挿入しDNAを215度回転させた鋳型を用いた場合、PIからの転写開始が2/3に減少する一方、PIIからの転写が増加した(図5-4)。これは-41から-64までが転写の開始に必要であり、bent構造の向きが変化すると転写の開始が低下することを示唆している(図5-5)。

5-3-3-2 LRPおよびH-NSの転写抑制

さらにin vitro転写系を用いて、LRPの転写抑制能を観察した。in vitro転写系にはLRP、RNAポリメラーゼおよび鋳型DNAのみが含まれているだけでも係わらず、LRPの量依存的に、*lysU*遺伝子の転写開始は特異的に抑制された。これは、LRPが単独で*lysU*遺伝子上流に何らかの働き掛けをして、転写開始を阻害しうること示している(図5-6)。次にH-NSの抑制効果を解析した。H-NSは、bent構造をとるDNAを認識し、結合することが知られている。本研究のin vitro転写系の内部標準として用いていた*bla*遺伝子はプロモーター上流にbent配列を持っており、恐らくその構造によりH-NSによって抑制された。従って、*lysU*遺伝子のH-NS特異的な抑制効果の有無を調べるために、pNE73を転写系に導入しprfCの転写産物を内部標準とした。in vitro転写系にはH-NS、RNAポリメラーゼおよび鋳型DNAのみが含まれているだけでも係わらず、H-NSの量依存的に、*lysU*遺

伝子の転写開始が特異的に抑制された(図5-6)。従って、LRPおよびH-NSは単独で *lysU* 遺伝子の転写を抑制する活性があることが示唆された。

5-3-4 ゲルシフト活性測定

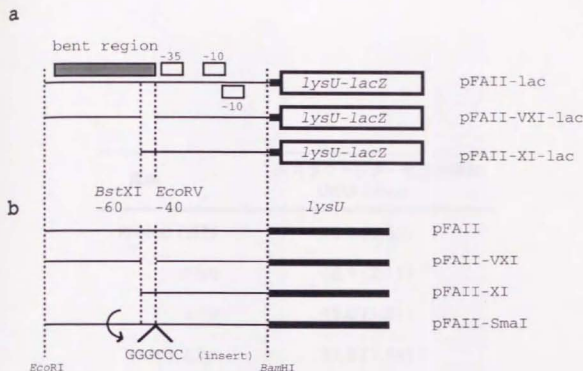
LRPとH-NSが同時に、しかも独立に機能するためには *lysU* 遺伝子上流に同時に結合できる必要がある。そこで *lysU* 遺伝子上流とLRPおよびH-NSが複合体を形成するかを解析した。その結果、LRPと *lysU* 遺伝子上流領域との複合体を形成させた後、H-NSを加えると、LRP-H-NS-*lysU* 遺伝子上流領域とが複合体を形成することが示された(図5-7)。

5-4 章括

本章により、LRPとH-NSが *in vitro* において直接、独立に抑制因子として働きうることが確認された(抑制のメカニズムに関しては総合討論で詳しく議論する)。さらに、H-NSは抑制因子として-35boxの上流に結合して転写を抑制し、LRPは-60より上流に結合して転写を抑制していた。この転写の抑制は、大腸菌の多くの転写抑制因子が転写開始点に近接した位置に結合して転写を抑制するのに対して、転写開始点より、はるかに上流に結合して転写を抑制している点が新しい点である。この抑制機構は転写抑制因子のプロモーターへの結合による通常のRNAポリメラーゼの開始複合体形成の阻害モデルでは説明ができないが、*lysU* 遺伝子の転写プロモーター単位の特長であるDNAのbent構造を考

慮すると説明できるかもしれない。Braccoらは、-35boxを欠損し、転写プロモーターとしての活性を失った*gal*遺伝子のプロモーター単位に、bent構造を導入することで転写プロモーターとして活性が回復すること、そのbent構造に依存してH-NSにより抑制されるような転写が観察されることを報告している(Bracco et al., 1989)。*lysU*遺伝子上流のbent構造とプロモーター、および転写開始点の存在位置はBraccoらが作成したプロモーターと非常によく似ており、*lysU*遺伝子の転写のH-NSによる抑制はこのbent構造によるものと考えられる(詳しくは総合討論で議論する)。このことは、bent構造を回転させた銕型DNAをin vitro 転写に用いた時のみ、PIIからの転写開始が開始されることにより、さらに支持されるかも知れない。なぜなら、PIIには転写プロモーターに-35boxが欠落している。従って、Braccoらの人工的なbent構造が-35boxを代替することを考慮すると(Bracco et al., 1989)、*lysU*遺伝子の-35boxより上流のbent構造が、PIIからの転写開始に必要な向きになったためにPIIからの転写が促進したと考えられる(図5-5)。これは、通常PIの転写を強めるために働いているbent構造の向きが変化することによりPIIの転写を高めることが可能であることを示唆している。In vivoでは様々な環境要因の変化にともない核様体構造が変化している。したがって、in vivoでの転写開始がPIおよびPII双方からの、bent構造が仲介した核様体構造の転写への関与によるものなのかもしれない。このbent構造を介した、転写の制御機構は、H-NSの*lysU*遺伝子の転写抑制にbent構造が必要であること、またin vitroでは、このbent構造にH-NSが結合しうること、さらにH-NS単独で*lysU*遺伝子の転写が抑制されることより強く支持されている(総合討論で

詳しく述べる)。さらにLRPの認識配列が、さらに上流のbent構造に存在することから、このbent構造も転写因子としての機能を持つことが考えられる。*ga*遺伝子の解析から、-70から-100の領域に存在するbent構造が開始複合体形成に重要な役割を果たすことが示唆されている(Lavigne et al., 1992) (図6-2)。この機能を*lys*遺伝子上流のbent構造が担っているならば、LRPは開始複合体の形成を阻害するのかも知れない。



c

プラスミド	β -ガラクトシダーゼ活性測定 (Units (stdev))		
	WT	Δhns	Δlrp
pFAII-lac	31.7 (0.57)	43.8 (4.76)	53.0 (0.70)
pFAII-VXI-lac	27.7 (3.02)	31.5 (1.71)	46.3 (1.79)
pFAII-XI-lac	40.7 (8.22)	76.2 (11.5)	49.6 (4.12)

図5-1 *lysU*遺伝子上流領域の削除の*lysU-lacZ*遺伝子の発現に対する効果

a. *lysU-lacZ*融合遺伝子上流に伸びている線はpMC1403に挿入された*lysU*遺伝子上流領域を含むDNA断片を示している。融合遺伝子は、*lysU*遺伝子のORF中、2番目のアミノ酸でインフレームで融合されている。b. *lysU*遺伝子上流に伸びている線はpUC118のマルチクローニングサイトに挿入された*lysU*遺伝子上流領域を含むDNA断片を示している。pFAII-SmaIは*lysU*遺伝子上流に存在する*Eco*RVサイトに*Sma*Iリンカー(GGGCCC) (宝酒造)を挿入したものである。この挿入により*lysU*遺伝子の*Eco*RVサイトより上流のDNAのラセン構造は約215°回転すると予想される。c. 野生型(MC4100)、MC4100-81(*hns*-)、RM430(*lrp*-)にa.で示したそれぞれのプラスミドを形質転換し β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。適量のアンピシリン(材料と方法参照)を含むLB培地中で、37℃で大腸菌を対数増殖期まで培養した後、分取し β -ガラクトシダーゼ活性を測定して、*lysU-lacZ*融合遺伝子の発現量を測定した。活性はMiller unitsで示した。

菌株	β -ガラクトシダーゼ活性測定 Units (stdev)
RM460 (WT)	10.7 (0.62)
Δhns	48.5 (2.11)
Δlrp	45.0 (1.31)
$\Delta hns, \Delta lrp$	81.8 (1.43)

表5-1 *hns*および*lrp*遺伝子の欠損による*lysU*遺伝子の転写の脱抑制

RM460(*lrp*⁺)、RM398(*lrp*::*tet*)、RM597(*hns*::*kan*)およびRM398-81(*hns*::*kan*, *lrp*::*tet*)は染色体上に*lysU-lacZ*融合遺伝子を含んでいる。LB培地(材料と方法参照)を用いて37℃で大腸菌を対数増殖期まで培養した後、分取し、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。活性はMiller unitsで示した。

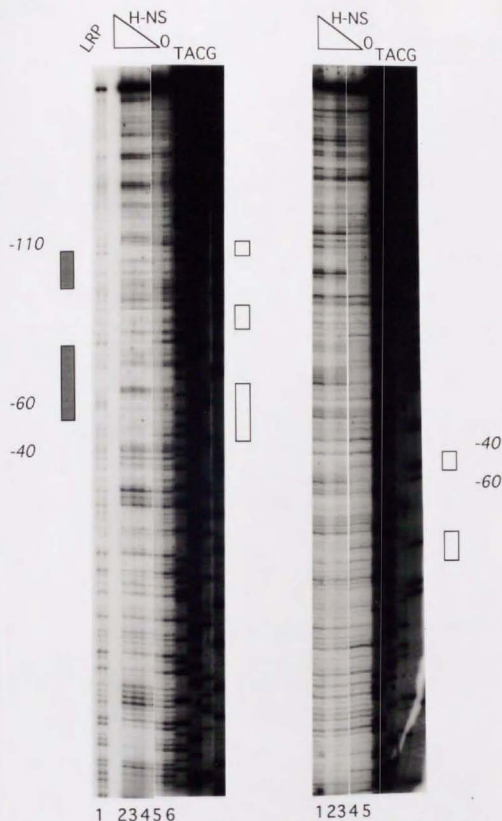


図5-2 DNaseI footprintによる *lysU* 遺伝子上流領域のH-NSおよびLRP結合部位の解析

DNaseI footprintの詳細は材料と方法に記述した。a. anti-sense鎖に対するDNaseI footprint。レーン1には反応系に2.6molのLRPと1μgのポリdI-dC（ファルマシア）を加えた場合の反応産物を泳動した。レーン2から6は反応系に左から160, 80, 40, 10, 0pmolのH-NSを加えた場合の反応産物を泳動した。その右には末端を32Pで標識したM4プライマーを用い、pFAIIを鋳型としたシーケンス反応産物をマーカーとして泳動した。b. sense鎖に対するDNaseI footprint。レーン1から5は反応系に左から160, 80, 40, 10, 0pmolのH-NSを加えた場合の反応産物を泳動した。その右には末端を32Pで標識したRVプライマーを用い、pFAIIを鋳型としたシーケンス反応産物をマーカーとして泳動した。それぞれのゲルの脇に、LRPでプロテクションされた領域を灰色の四角でH-NSでプロテクションされた領域を白い四角で示した。

a

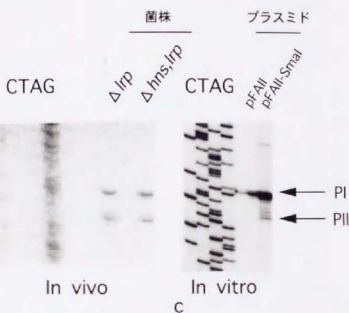
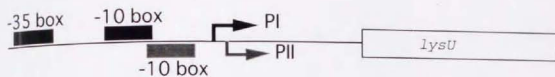


図5-3 In vivoおよびIn vitroにおける $lysU$ 遺伝子の転写開始点の解析

a. $lysU$ 遺伝子の2つの転写開始点および-10、-35boxを示した。上流に存在する転写開始点PIは、-10および-35boxを有する一方、下流の転写開始点PIIは-10boxのみを有している。b. RM398($lrp::tet$)、およびRM398-81($hns::kan$, $lrp::tet$)より全RNAを調整し、末端を32Pで標識したO28プライマー(5'-GTGCCGCCAGTTTTCGCGGCG-3')とハイブリさせた後、RAV-2(宝酒造)を用いた逆転写反応により $lysU$ 遺伝子の転写産物の5'末端を検出した。c. In vitro転写反応の詳細は材料と方法に記述した。転写の鋳型となるプラスミドを転写系に加えた後、37℃で5min.放置した後、RNAポリメラーゼを加えて37℃で15min.放置する。NTPを加えて転写反応を開始させた後、正確に10min.で反応を停止させる。転写産物とM4プライマーとをハイブリさせた後、RAV-2(宝酒造)を用いた逆転写反応により $lysU$ 遺伝子の転写産物の5'末端を検出した。各々のcDNAは6%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離した。pFAllおよびpFAll-SmaIの構造は図5-1に示した。

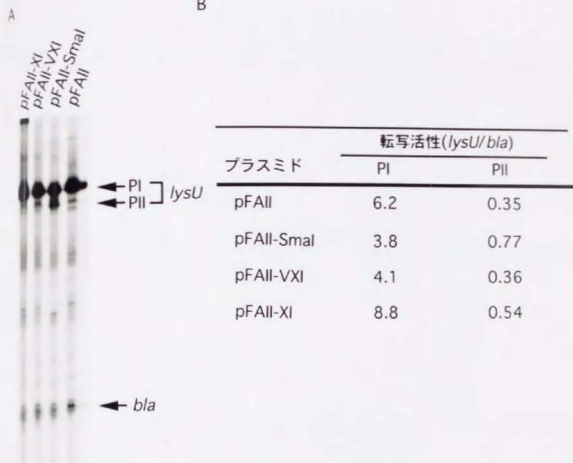


図5-4 様々な鋳型プラスミドを用いたIn vitro転写反応による*lysU*遺伝子上流領域の解析

A. 鋳型に用いたプラスミドの構造は図5-1 b.に示した。In vitro転写反応の詳細は材料と方法に記述した。転写の鋳型となる0.4pmolのプラスミドを転写系に加えた後、37℃で5min.放置した。さらにRNAポリメラーゼを加えて37℃で10min.放置する。NTPを加えて転写反応を開始させた後、正確に10min.で反応を停止させる。転写産物と末端を32Pで標識したM4およびAMPプライマーをハイブリさせた後、RAV-2（宝酒造）を用いた逆転写反応により*lysU*遺伝子および*bla*遺伝子の転写産物の5'末端を検出した。各々のcDNAは6%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離した。ゲル上部に各々の転写反応に用いた鋳型プラスミドを、ゲル右側の矢印で*lysU-lacZ*融合遺伝子および*bla*遺伝子のcDNA産物のバンドの位置を示している。B. A.で示した各々のバンドの強度をBAS2000で定量し、*lysU*遺伝子の2つの転写開始点より転写が開始された転写産物の量を定量した。定量の標準化には*bla*遺伝子の転写産物を用いた。

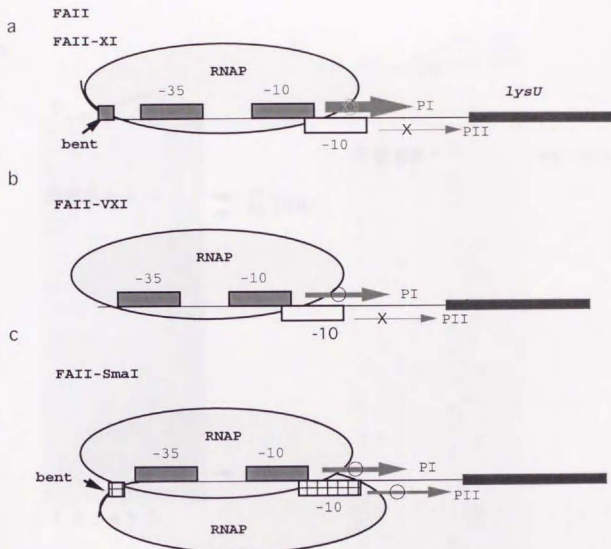


図5-5 bent構造に依存した*lysU*遺伝子の転写開始モデル

a. pFAIIおよびpFAII-XIを転写の鋳型として用いた場合、*lysU*遺伝子のプロモーター上流の-40から-60の領域に存在するbent構造が共にRNAポリメラーゼ(RNAP)と相互作用して*lysU*遺伝子のPIからの転写開始を促進する。一方、PIIからの転写開始は、プロモーターの基本構造を構成する-35 boxが欠けているため非常に低レベルである。b. pFAII-VXIを転写の鋳型として用いた場合、*lysU*遺伝子のプロモーター上流の-40から-60の領域に存在するbent構造が欠損しているため、RNAポリメラーゼと-40から-60領域との相互作用が消滅し、*lysU*遺伝子のPIからの転写開始能は低下する。しかしながら、PIIからの転写開始に関与する環境は変化していないため、PIIからの転写開始はa.の場合と変化しない。c. pFAII-SmaIを転写の鋳型として用いた場合、*lysU*遺伝子のプロモーター上流の-40から-60の領域に存在するbent構造は6bpのDNA断片の挿入により180°以上回転し、pFAIIと比較するとDNAのほぼ反対の面に向いていると予想される。この結果、PIの転写開始を促進すべきbent構造が欠損した場合と同様な環境が作り出され、PIからの転写開始は減少する。一方、PIIのプロモーターの-10 boxはPIのプロモーターの反対のDNA面に存在している。これを考慮すると、6 bpのDNA断片の挿入により、bent構造はPIIのプロモーターに促進的に働く向きに変化し、RNAポリメラーゼと相互作用して*lysU*遺伝子のPIIからの転写開始を促進する。

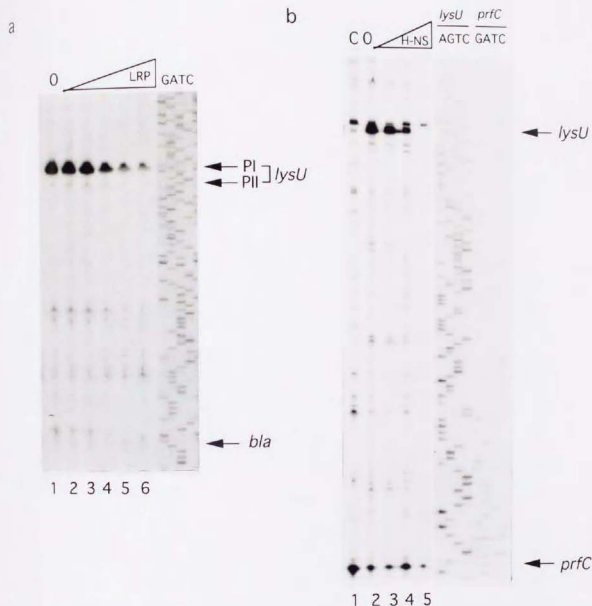
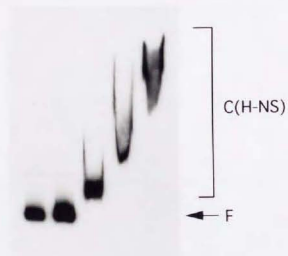


図5-6 In vitro転写反応によるLRPおよびH-NSの*lysU*遺伝子の転写抑制能の解析

a. In vitro転写反応の詳細は材料と方法に記述した。転写の鋳型として0.2pmolのプラスミド(pFAII)を転写系に加えた後、37℃で5min.放置した。続いて、LRPを適量加え、37℃で10min.放置する。さらにRNAポリメラーゼを加えて37℃で10min.放置させた後、NTPを加えて転写反応を開始させた。転写開始後、正確に10min.で反応を停止させる。転写産物と末端を32Pで標識したM4およびAMPプライマーとをハイブリさせた後、RAV-2 (宝酒造) を用いた逆転写反応により*lysU*遺伝子および*bla*遺伝子の転写産物の5'末端を検出した。それぞれのレーンは左から、0, 1.625pmol, 3.25pmol, 6.5pmol, 13pmol, 26pmolの精製LRPを転写系に加えた場合の、転写産物を泳動している。その右には末端を32Pで標識したM4プライマーを用い、pFAIIを鋳型としたシーケンス反応産物をマーカーとして泳動した。b. In vitro転写反応の条件はaと同様である。逆転写反応は用いたプライマーが末端を32Pで標識されたM4およびPrfCに変更されたのみで他の点はaと同様である。それぞれのレーンには、1. 転写系に鋳型としてpNE73のみを加えた場合の転写産物(control), 2. 0pmol, 3. 4pmol, 4. 20pmol, 5. 80pmolの精製H-NSを転写系に加えた場合の転写産物を泳動している。マーカーとして、a.に用いたシーケンス産物および末端を32Pで標識したPrfCプライマーを用い、pNE73を鋳型としたシーケンス反応産物を泳動した。

a



b

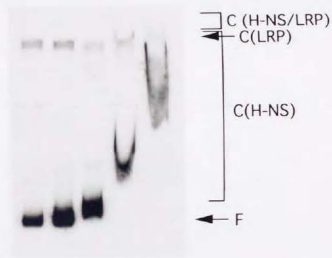


図5-7 LRPとH-NSの*lysU*遺伝子上流への結合

a. ゲルシフトの条件は2-2-6に記述した。反応系にはレーン左から、0, 10, 20, 40, 80pmolのH-NSが加えられている。プローブは5-2-7に記述したDNA断片を使用した。FはH-NSの結合していないプローブを、CはH-NSとプローブの複合体を示している。b. 実験の条件は反応系に2.6pmolのLRPが加えられている点のみがa.と異なっている。FはH-NSの結合していないプローブを、CはH-NSおよびLRPとプローブの複合体を示している。プローブと複合体を形成する抑制因子の種類はCの右の括弧の中に示した。

第6章

総合討論

6-1 本研究の骨子

LRPおよびH-NSによる*lysU*遺伝子の転写抑制機構の統合的な理解のためには、(1)抑制因子をコードする遺伝子の発現制御機構、(2)抑制因子のオペレーター認識機構の特性、(3)LRP、H-NSそれぞれの転写抑制機構の解析が必要である。本研究では、まず、抑制因子の発現制御機構に焦点をあて、*hns*遺伝子に比べて、全く解析のなされていなかった*lrp*遺伝子の転写制御機構について解析した。さらに、LRPのDNA結合特性について解析を行い、LRPおよびH-NSの*lysU*遺伝子制御領域への結合様式を予測した。この予測をもとに、生化学的にLRPおよびH-NSの*lysU*遺伝子に対する結合様式と転写抑制活性を解析し、転写抑制モデルを構築することを試みた。

6-2 *lrp*遺伝子の発現制御機構

*lysU*遺伝子の発現制御機構を考えるうえで、*lrp*および*hns*遺伝子の発現制御機構の解析は大きな意味を持つ。なぜなら、2つの因子の細胞内の存在量の変化が*lysU*遺伝子の転写を制御することが予想されるためである。*hns*遺伝子の自己制御機構については既に報告されており、細胞内のH-NSの存在量は大きく変化しないことが示唆されている

(Pon et al., 1988)。本研究では、(1)*ltp*遺伝子の転写がLRPにより抑制されていること、(2)LRPによる*lysU*遺伝子、*ltp*遺伝子の転写の抑制、および*ilvIH*遺伝子の転写の促進がLRPの協調的な結合を介しており、従って、LRPのDNAへの結合が協調的であること、(3)*ltp*遺伝子の転写抑制が、規則的に連続するA:Tが存在し構造予測(De santis et al., 1986)によりbent構造をとる様な*ltp*プロモーター上流領域へのH-NSおよびLRPの結合によるものであると示唆されること、さらに、(4)*ltp*遺伝子上流のbent構造をとる領域に現実にはH-NSが結合していることが示された。既に、LRPが*ltp*遺伝子上流に結合することも確かめられていることから(Wang et al., 1994; Oshima. et al., 1995)、*ltp*遺伝子上流のbent構造には2つのグローバルレギュレーターが結合し、転写を抑制することが明かとなった。本章において、後に詳しく議論するが、プロモーター上流のbent構造は転写開始複合体を形成するために必要とされる。*ltp*遺伝子のプロモーター上流領域も転写に寄与していることが十分考えられる。LRPとH-NSはこの領域に結合することにより、この寄与を阻害しているのかもしれない。本研究における*ltp*遺伝子の転写制御機構の解析や、*lysU*および*ilvIH*遺伝子の転写制御機構の解析からもわかるように(Ito et al., 1994; Levinthal et al., 1994)(第2章参照)、LRPとH-NSによる1つの遺伝子の転写制御機構は、大腸菌ではかなり一般的なメカニズムである。このような機構が多くの遺伝子で見い出されるのは、LRPがあいまいながらも認識配列を持ち、H-NSに比べると特定の配列に依存した転写制御因子であるのに対し、H-NSがbent構造のみに依存した、比較的、シーケンスにたいする特異性を持たないDNA結合蛋白質であるという、特性の異なる2つのグロー

パルレギュレーターにより1つの遺伝子の転写を同時に制御することによって、大腸菌内の転写制御の多様性を確保するためなのかもしれない。

6-3 LRPのDNA結合様

DNA結合能の欠損した変異LRPを多コピー大腸菌に導入するとドミナントネガティブな効果を持つことから、LRPのDNAとの結合は、単独のLRP2量体では持ち得ないことが示唆されていた(Platko et al., 1993; Oshima et al., 1995; 大島 拓, 修士論文, 1994)。

確かに、*ilvIH*遺伝子上流のオペレーターへのLRPの結合に関しては、複数存在する認識配列の1つを破壊することによりLRP-DNA複合体の形成が正常に起こらなくなることから、LRPの*ilvIH*遺伝子上流への結合には協調的な複数のLRPの2量体の結合が必須であることが示された(Wang et al., 1993)。

一方、多くの遺伝子で特定されたLRP結合領域の塩基配列のアライメントによる予測から、LRPとDNAの結合に必須と予想される配列も既にいくつかのグループから報告されていた(Rex et al., 1991; Wang et al., 1993)。

しかしながら、*lysU*遺伝子上流には、LRPの予想認識配列が見い出せないでいた(Gazeau et al., 1994)。

その後、Cuiらにより、SELEX法をもちいた詳細なLRPの結合配列についての解析がなされ(Cui et al., 1995)、最適な15 bpの塩基配列が発表された。彼らは、これまでの、LRPとDNAの結合には、複数のLRPの2量体による協調的な結合が必須であると主張とは異なり、この最適な配列にはLRPの2量体は単独で結合しうることを示した。しかしながら、この主張は少なくとも*ilvIH*遺伝子の解析により示唆された、協調的

なLRPのDNA結合様式とは矛盾している(Wang et al., 1993)。本論文では、これら複数の相異なる主張に対し、連続する100 kbpの連続した塩基配列中から無作為に抽出した12個の予想認識配列を含む300 bpのDNA断片のうち、特に強い結合を示した2つの結合領域に関する解析から、(1)認識配列の予測された結合強度が比較的高い(4以上)場合を除いて、50 bp中に2つの認識配列が存在する、(2)存在する認識配列が同じ結合強度であった場合、2つの認識配列がDNAの同じ面に存在する、(3)2つの認識配列の間に、連続するA:Tが存在するようなDNA断片が、強くLRPと結合しうることを示した。これは既に*ilvIH*遺伝子上流のLRP結合領域や*lysU*遺伝子、*lrp*遺伝子上流が本来的に曲がっている(Wang et al., 1993b; Ito et al., 1994; Gazeau et al., 1995; Oshima et al., 1995; 本論文)こと、*ilvIH*遺伝子上流には複数のLRP認識配列が存在することと一致し(Wang et al., 1993)、このような領域に含まれる複数のLRP認識配列とLRPとの協調的な結合を支持している。

6-4 LRPによる*putA*遺伝子の転写の抑制

本研究における副次的な成果として、LRPは*putA*遺伝子の正の転写制御因子であることがわかった。このことは、本研究で用いたLRP認識配列の予想プログラムを用いて予想された認識配列が特定の遺伝子の制御領域内に存在し、LRPがその領域に結合する場合、その遺伝子の転写が*in vivo*においてLRPにより制御される可能性が高いことを示している。非常に興味深いことに、*Rhodobacter capsulatus*ではこのPutAと非常に相同性の

高い蛋白質を保持しており、しかも、その転写制御がLRPの相同蛋白質であるPutRにより正に制御されている(Keuntje et al., 1995)。このことは、LRPが種を越えて、細菌におけるグローバルレギュレーターとして生合成や代謝系を制御するための機能を保持しつづけていることを示しているのかも知れない。

6-5 *lysU*遺伝子上流のLRP認識配列

LRPの結合様式の解析をふまえ、Cuiらのmatrixを用いて(Cui et al., 1995)、*lysU*遺伝子上流のいわゆるLRP結合領域(Kawakami et al., 1992; Gazeau et al., 1995; Lin et al., 1992)内のLRP認識配列を予測したところ、予測された3つの認識配列のうち2つの認識配列は現実にLRPが結合する条件を持っていた。すなわち、(1)複数のLRP認識配列が存在する、(2)認識配列を含む結合領域はbent構造をとっている、(3)LRPの結合する領域は、*lysU*遺伝子オペレーターとして機能し、*lysU*遺伝子の転写はLRPによる制御を受けている、さらに、(4)2つのLRP認識配列はDNAの同じ面に存在する。また、予測された2つの認識配列中には遺伝学的に*lysU*遺伝子の発現を上昇させ、LRPとLRP結合領域との結合を弱めるような点突然変異が多数分離されていた(図6-1)。さらに、2つの認識配列のうち的一方を破壊するような変異によってLRPとLRP結合部位の結合が弱まり、*lysU*遺伝子の発現が上昇することが報告されていた(Gazeau et al., 1994)。これらの結果は、本研究で予測された*lysU*遺伝子上流のLRPの認識配列に、(1)現実にLRPが結合し*lysU*遺伝子の転写を抑制していること、(2)その結合は協調的であること、を支持している。

6-6 *lysU*遺伝子の制御領域

*lysU*遺伝子上流領域に予測されたLRPの認識配列は、ほぼ-60から-110の領域に2つ存在していた。in vivoにおいて、LRPによる*lysU-lacZ*融合遺伝子の発現の抑制は、確かに*lysU*遺伝子上流の-60より上流の領域に依存していた。さらにLRPによる*lysU*遺伝子の転写の抑制には、-140より下流の領域が必須であることが報告されていた(Gazeau et al., 1994)。したがって、-60から-140までに存在する、2つのLRPの認識配列にLRPが結合することにより、*lysU*遺伝子の転写が抑制されていることがさらに支持された。一方、H-NSによる*lysU-lacZ*融合遺伝子の発現の抑制は-40から-60までの領域に依存していた。この領域は、強くbentすることが予測されており(Ito et al., 1994)、このbent構造にH-NSが強く結合することにより*lysU*遺伝子の転写が抑制されていると予想された。footprint法により-40から-140に存在するLRPの2つの予測認識配列と、H-NSが認識するであろうbent構造に、現実にはLRPとH-NSが結合することが示された。この領域についての遺伝学的な解析はすでに報告されている(Gazeau et al., 1995; Kawakami et al., 1992)。Gazeauらは*lysU-lacZ*融合遺伝子を染色体上に持つ菌株をもちいて、*lysU-lacZ*融合遺伝子の発現が上昇する、Kawakamiらは*lysS*遺伝子欠損株の低温致死性を回避するcis-elementの変異株を前者はPCR mutagenesisを、後者は自然に発生する変異として分離した。これらの変異がどの部位に発生したかを、図6-1に示す。これよりわかるように点突然変異が集中した部位は本研究により示されたLRP認識配列であり、結合に必ず必須であると予測され

ている中央のATの豊富な部分に多数の変異が分離されている(Cui et al., 1995) (図6-1)。

なおかつ、第4章でのLRP認識配列の予測では、-100付近に存在するLRP結合配列のほうが-70付近の結合配列より強く結合すると予測された(最適なLRP結合配列に近い) (図4-2-1)。これと、協調するように-100付近には多くの点突然変異が分離されている(図6-1)。これらの変異のうちLRP結合配列の中央のAもしくはTが欠損したものは強くLRPの結合を阻害したことから(Gazeau et al., 1994)、塩基の欠損がLRPとDNAとの特異的な結合に強く影響することがわかる。これはCuiらが主張している、認識配列の回文構造を破壊するためかもしれない(Cui et al., 1995)。また、認識配列が2カ所存在しながら、その内のどちらか一つに変異が導入されるだけでLRPの結合が阻害される事実は、*lysU*遺伝子上流のLRPの結合が協調的であることを示している。このことは、Gazeauらのsite directed mutagenesisにより作製されたLRP結合領域内の変異の中で、本研究で予測された2カ所のLRPの認識配列の一方を完全に破壊するような変異のみがLRPの結合を強く阻害し、*lysU*遺伝子の転写抑制を解除することと一致する(Gazeau et al., 1994) (図6-1; GCGCで示した)。また、Kawakamiらが分離したIS2の挿入による変異は、2カ所の結合配列の間に位置しており、2カ所の認識配列へのLRPの協調的な結合を、結合部位の物理的な隔離により阻害していると理解できる(Kawakami et al., 1992)。Footprint法により示されたLRPの結合は、これらの変異や予測をさらに強く補強している。LRPの結合は予測された2カ所の認識配列の結合強度に無関係であり、LRPとDNAの結合は2つの認識配列に同時に起こることが示唆された。これは、*lysU*遺伝子上流とLRPとの複合体が1

種類しか形成されないことから支持される。さらに、他の変異に注目すると、2が所のLRPの認識配列以外にも変異が分離されている(Gazeau et al., 1994) (図6-1)。特に-43付近の変異は、まさにその領域がH-NSの結合部位に含まれており、この変異により、本来この領域が形成するべきbent構造が変化することにより、この領域へのH-NSの結合を阻害し、*lysU-lacZ*融合遺伝子の発現が上昇する変異が分離された可能性も考えられる。しかしながら、この変異によりLRPの結合領域への結合が若干弱まることが報告されており(Gazeau et al., 1994)、この変異はLRPとH-NSの制御領域への結合を阻害することにより、強く*lysU*遺伝子の転写を脱抑制しているのかもしれない。

6-7 LRPとH-NSによる*lysU*遺伝子の転写制御機構

前項で示唆された*lysU*遺伝子の転写抑制機構は、LRPとH-NSが異なる領域に依存し*lysU*遺伝子の転写を抑制しているものである。In vivoにおける*lysU-lacZ*融合遺伝子の発現は*lrp*および*hns*欠損株において約4倍に上昇し、*lrp*、*hns*遺伝子を共に欠く場合、約8倍の上昇を示した。これは、LRPおよびH-NSが独立に転写を抑制していることを示している(表5-1、図6-3)。さらに、LRPおよびH-NSが、ともに他方が存在する条件で、遺伝学的に*lysU*遺伝子の転写抑制因子としてクローニングされた事実は、両因子が独立にin vivoで機能していることを支持している。さらに、in vitroにおいてLRPおよびH-NSは*lysU*遺伝子の転写を単独で抑制することが示され、また、LRPが-40から-110に存在する2つの認識配列に協調的に結合して*lysU*遺伝子の転写を抑制し、H-NSが-40から-60の領

域に結合し転写を抑制していることが示された。さらに、両因子の存在するゲルシフト活性測定では、確かにH-NSの量依存的にLRP-DNA複合体のシフトバンドはさらにシフトし、両因子が共に*lysU*遺伝子上流に結合し、より強い抑制活性を維持していることが支持された。このモデルでは、特定の培養条件でどちらかの因子が*lysU*遺伝子上流に結合することが不可能な場合でも、LRPもしくはH-NSのどちらか一方は機能して転写抑制能を維持すると考えられる。

6-8 *lysU*遺伝子特異的な負の転写制御(上流からの転写の抑制)

これまで知られている大腸菌の負の転写制御因子の結合部位は、転写プロモーターに非常に近い領域に存在している(通常、-30より下流、大体は転写開始点の5bpから10bpの範囲内に存在している)(Gralla and Collado-Vides, 1996)。しかし*lysU*遺伝子におけるLRPの結合領域は-60から-140の範囲内であり非常に離れている。また、H-NSは-40から-60の領域に結合することにより*lysU*遺伝子の転写を抑制している。従って、*lysU*遺伝子の転写の抑制には、プロモーターから物理的に離れていても、

何らかの阻害機構が存在すると思われる。この機構については3つの可能性が考えられる。(1)LRPやH-NSと協調して働く他の因子が存在し、その因子がプロモーターの近くで働いている、(2)鋳型DNAへのRNAポリメラーゼの結合を物理的に阻害できるような位置にLRPもしくはH-NSが結合している、(3)何らかの正の転写制御機構が存在しLRPやH-NSはその機構を阻害している。まずin vitroの転写実験により、(1)の可能性は否定さ

れた。LRP、H-NSは単独で *lysU* 遺伝子の転写を抑制することが可能であった。(2)の可能性は、LRPがDNAのbent構造を強めることを考慮すると(Wang et al., 1993)、LRP結合領域のbent構造が変化し、周辺のDNA構造が変化して、RNAポリメラーゼの結合を阻害していることも考えられる。また、-40から-60bpの範囲は、多くの遺伝子でRNAポリメラーゼと相互作用する領域であることが知られており、この領域へのH-NSの結合は、(2)を十分満足している。*rmB* 遺伝子では、この領域がRNAポリメラーゼの α -サブユニットと相互作用して、あたかもCRPなどが存在している場合と同様に、RNAポリメラーゼの開始複合体形成を促進することが知られている。この領域はDNA自身が転写促進活性を示す領域として、up-elementと呼ばれている(Ross et al., 1993) (図6-2)。*lysU* 遺伝子の場合-40から-60の領域は確かに転写促進能を有しており(図5-4)、up-elementと同様の機能を有していると考えられる。(3)の可能性については、Gazeauらにより-227から-132がLRPの存在しない条件では、*lysU* 遺伝子の転写を高めるために必要な領域であることが示唆されており(Gazeau et al., 1994)、-60より上流に正の制御機構が存在する可能性も考えられる。このような例は、*gal* 遺伝子の-70から-110に存在するbent構造が、開始複体の形成を促進することが報告されている(Lavigne et al., 1992) (図6-2)。また、*rmB* 遺伝子や*tyrT* 遺伝子などでは-60から-150の領域にFISという核様体蛋白質が結合し、転写を促進することが知られている((Muskhelishvili et al., 1995; Ross et al., 1993) (図6-2)。*lysU* 遺伝子の場合、DNA構造自身がup-elementとしてCRPの代わりに転写を促進していることを参考にとすると、*rmB* 遺伝子のFISの代わりに-60より上流のbent構造が転写を促進

する因子として機能することも考えられる (図6-2)。LRPは-60から上流に結合するため、このような転写の促進を抑制するのかもしれない。本研究ではbent構造の向きの変化が *lysU* 遺伝子の2つ存在する転写開始点のうち、どちらの転写開始点から転写が開始されるかという点で大きく影響している可能性を示した(5-5で詳しく考察する)。これは、DNA構造の変化と *lysU* 遺伝子の転写開始が大きく係わりあっていることを示している。従って、(2)および(3)の転写抑制機構がDNA構造を介してLRPとH-NSにより形成されていると考えられる。

6-9 DNA構造と転写制御

H-NSはDNAシャペロンと呼ばれる一群の蛋白質のひとつとして認識されている。この蛋白質群は、DNAと複合体を形成した後、核様態の構造を変化させることにより、転写や複製を制御していると考えられている。LRPに関しても特異的な結合部位を持つ単純な転写制御因子と言うよりも、核様態蛋白質の一つとして捕え、転写のみならず核様態構造を介した大腸菌の生理機能全般への影響をも考えられている (Newman, 1995; Newman et al., 1996)。UsseryらはH-NSを古典的なDNA結合蛋白質とは捕えておらず、一般に考えられているようなサイレンサーではなく、核様態構造の変化を介した新しい転写の制御因子 (当然、正の制御因子としての機能も含まれる) という捕えかたを提唱している (Ussery et al., 1994)。核様体の構造変化が実際に転写に影響するのかという問題に対しては、*proUV* 遺伝子の発現機構について、多くの研究がなされている。

Higginsのグループは一連の研究により、H-NSが存在しないと浸透圧の変化による転写制御機構は働かないこと、この時H-NSが抑制的に働くこと、同時にH-NSが浸透圧の変化に伴う、DNAの構造変化を制御していること、そしてH-NSがin vitroでもDNAの構造を変化させることを報告している。また彼らは、プロモーターの構造の変化のみでH-NSの抑制効果が無くなることから、通常の負の制御因子によるプロモーターとRNAポリメラーゼとの結合、もしくは開始複合体の形成の阻害という、単純な説明はH-NSの抑制機構の説明にはそぐわないと主張している(Higgins et al., 1988; Owen-Hughes et al., 1992; Tupper et al., 1994)。一方、Ueguchiらは、(1)proUV遺伝子のin vitro転写系を構築し、proUV遺伝子の転写の抑制はH-NS単独で起こること、(2)浸透圧の変化により構造の変化した鋳型を調整して、H-NSの転写の抑制能をみたところ変化はなかったこと、(3)しかしながら、KClなど塩濃度の変化により、H-NSの抑制効果に影響がでることから、H-NSの抑制効果は直接、開始複合体の形成を阻害していると主張している。lysU遺伝子はどうか？ 前項でも言及したように、直接、DNAの構造変化とは関係しないが、DNA構造自身の転写への関与の例は、様々な遺伝子で知られている。例えば、rrnB遺伝子の転写制御機構には、DNA自身が因子とは独立に転写を活性化する機能があることが明らかにされ、その機構が正の制御因子に依存的な機構となら変わらないことがin vitroの転写系で証明されている(Leirimo and Gourse, 1990; Murakami et al., 1996)。また、lysU遺伝子の制御領域と考えられる、-35上流のBent配列が正の転写制御因子として働く状況と良く似た例がBacillus subtilisおよび大腸菌で報告されている。Bacillus subtilis

のspoVG遺伝子の転写はプロモーター上流のbent構造に依存している(Banner et al., 1983)。大腸菌では、人工的に合成したbent構造をとるDNA断片を、-35 boxを欠損し転写が開始されなくなった遺伝子上流に挿入することにより、転写能が回復することが観察されている(Bracco et al., 1989)。興味深いことに、bent構造をとるDNA断片を-38から上流に挿入した場合、特定のDNA断片の挿入では、この断片の下流に存在する遺伝子の転写能は確かに回復するものの、H-NSにより負の制御を受けるようになり、表面上、それほど回復しないことが報告されている(Zuber et al., 1994)。これは、lysU遺伝子上流の-40から-60に依存したH-NSの抑制とよく似た現象である(図5.5)。また、本研究におけるin vitro転写系による解析で、-35box上流のbent構造の転写への寄与が示された。これはlysU遺伝子のプロモーターに対して、このbent構造が正の因子として働き、しかも、bent構造が正の因子として機能するためには適切な向きである必要があることを示唆している。したがって、前項で考察したlysU遺伝子上流の正の制御に必要なDNA領域とRNAポリメラーゼとの正常な相互作用の阻害は、抑制因子の結合だけではなく、bent構造を変化させることによって可能であることが示唆された。bent構造の向きの変化による転写開始点の使い分けについては、興味深い報告がある。大腸菌のfur遺伝子は先に述べたgalやlysU遺伝子と同様、DNAの双方の面にプロモーターが存在する。このプロモーターは上流に存在するbent構造の向きと密接に関連しているらしい。bent構造に結合する正の転写制御因子によりfur遺伝子の転写産物の転写は促進される。もしbentの構造が1つのプロモーターの転写能を促進すると、他方の面に存在するプロモーターの転

写能は減少する(Peres-Martin et al., 1993)。この機構は、*lysU*遺伝子のbent構造を215度回転させることにより、PIの転写が若干抑制され、PIIの転写が促進される機構と良く似ている(図5-5)。もしかしたら、染色体構造がこの機構に重要な意味を持つものかもしれない。*lysU*遺伝子の発現制御が、染色体上の正しい位置にある場合と、異なる位置やプラスミド上にある場合とでは、制御の機作が異なることや、in vitro転写系とin vivoでの*lysU*遺伝子の転写開始点が異なること、さらにリン酸濃度に依存した染色体構造の変化による*lysU*遺伝子の転写制御モデル(樺山 博之 修士論文、1996)は、これを支持している(図5-3)。

6-10 負の転写制御が2つの因子で行なわれる必要性

現在、よく知られている大腸菌の転写制御因子で制御されている遺伝子の内、約69%は抑制因子により制御されている。このうち、わずか4%が2つ以上の抑制因子で制御されているにすぎない。これは正の制御因子によって制御されている遺伝子のうち14%が2つ以上の正の制御因子により制御されているのと比較しても非常にまれであることがわかる(Gralla and Collado-Vides, 1996)。しかしながら、核様体蛋白質が関与している2因子による抑制の例として、*gal*プロモーターにおけるHUとGalRによる抑制があげられる。*gal*プロモーターにはGalRという特異的な抑制因子が存在する。しかしin vitroにおいては、GalR単独では2つ存在する転写の開始点の内、一方から開始される転写のみしか阻害できない。HUはGalRの転写抑制能を、DNAの構造を変化させることにより2

つのプロモーターに同時に働くようにしているらしい (Aki et al., 1996)。lysU遺伝子の抑制の場合はどうだろうか? galプロモーターと同じく、lysU遺伝子にはLRPという若干特異的な制御因子とHUと同様、核様態蛋白質として働くH-NSが抑制因子として働いている。確かに転写開始点も2つ存在し、in vitroの転写実験で明らかにされたように、DNAの構造、おそらくbent構造の変化により使い分けがなされている。しかしながら抑制因子はお互いにただ1つで完全に転写を抑制することが可能であった。この点はgalプロモーターの抑制と大きく異なっている。ただ1つの因子のみで抑制が可能なのになぜ2つの因子が存在するのだろうか? これには、lysU遺伝子の環境応答機構に対するモードが2種類存在する仮説により説明できるかもしれない。1つは栄養状態に対する応答である。lysU遺伝子のLRPの抑制に対する抑制解除は、ロイシン、アラニンなどのアミノ酸による脱抑制により引き起こされる。このような状況では、lysU遺伝子の抑制因子として働きうるのはH-NSである。したがって、栄養条件がよいLB培地のような条件で大腸菌が生育する場合、H-NSは抑制因子として大きな役割を担うことになる。逆に、pH変化や浸透圧の変化したH-NSによる転写の抑制が脱抑制されるような条件では、LRPが抑制因子として大きな働きを担っているのかも知れない。このような機構が存在するならば、様々な環境条件に応じて、2つの転写抑制因子の転写抑制への寄与が変化し、それにより、lysU遺伝子の発現量が多様に変化する。このLysU量の多様な変化により、リジルRNA合成酵素を介して、もしくは影響を受けて合成されている細胞内の蛋白質やシグナル物質 (カダベリン、AP₄Aなど) が適切な量、生成され、細胞の様々な

生理的な機能が調節されているのかもしれない(Nakamura and Ito, 1993)。

6-11 *lysU*遺伝子の転写制御機構モデルと今後の展望

本研究では、以下のことが明かとなった。(1)*lrp*遺伝子の転写はLRPとH-NSにより抑制されている。(2)LRPは*lysU*遺伝子のプロモーター上流の2か所のLRP認識配列に協調的に結合して*lysU*遺伝子の転写を抑制している。(3)H-NS蛋白質は*lysU*遺伝子上流のbent領域を認識し、結合することにより、*lysU*遺伝子の発現を抑制している。(4)*lysU*遺伝子のプロモーター上流には*lysU*遺伝子の転写を促進するbent構造が存在している。(5)LRPおよびH-NSの抑制機能は同時に独立して発揮されうる。これらの結果を元に*lysU*遺伝子の転写抑制モデルを推定した(図6-3)。

1. *lysU*遺伝子上流の-40から-110までの領域に広がるbent構造は、RNAポリメラーゼと相互作用して開始複体の形成を助け、*lysU*遺伝子の転写を促進する。
2. H-NSは-40から-60までの領域に結合し、LRPとは独立に*lysU*遺伝子の転写を抑制している。この抑制は-40から-60のbent構造とRNAポリメラーゼ、 α -サブユニットとの相互作用を阻害していると予想される。
3. LRPはH-NSよりさらに上流に4量体を作って結合し、この領域に存在するbent構造とRNAポリメラーゼとの相互作用を阻害し、開始複体の形成を阻害していると予想される。

4. 2.および3.に示された、H-NSおよびLRPの抑制能は、互いに異なる領域に依存している。この異なる領域に2つの因子が同時に結合することにより、*lysU*遺伝子の転写は完全にシャットオフされる。

このモデルの検証のためにまずLRPおよびH-NS、RNAポリメラーゼのDNaseI footprintによる解析が必要であろう。もし、3者の結合領域が、相互作用する範囲内に重なっていれば、モデルの妥当性は高まるだろう。転写開始のどの時点で、抑制がかかっているのかも解析しなければならない点であろう。ヘパリン存在下でのゲルシフトアッセイやなどを行う必要があるだろう。また、*lysU*遺伝子の高温発現誘導は明らかとなっていない。新たな変異体の分離（高温誘導のかからない変異）も考えにいれる必要があるだろう。

本論文では、*lysU*遺伝子の通常では考えられない上流からの転写抑制機構の存在を明らかにし、それによって、原核生物における転写抑制機構に関して、プロモーター周辺に結合する転写因子による転写抑制という一般的な概念の他にも、プロモーター上流に存在するDNA自身の転写制御要素としての機能と、その機能の抑制因子による阻害という形態での転写抑制機構が存在する可能性があるという新しい概念を提出できた。今後のさらなる解析により、LRPの特殊な抑制機構や、*lysU*遺伝子の発現の誘導の仕組みが解決されるであろう。本研究が、これらの解析にわずかでも役に立つことを、切に祈って止まない。

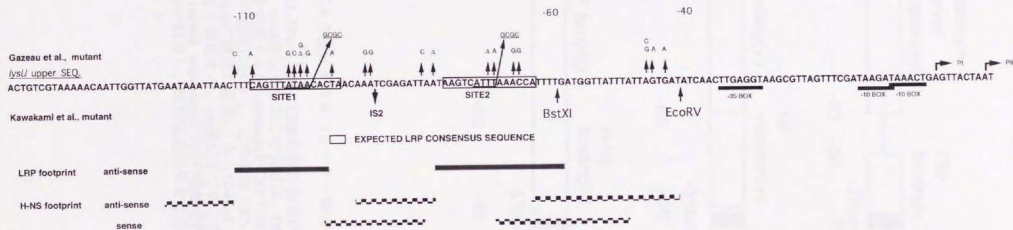


図6-1 *lysU*遺伝子上流領域に分離された*lysU*遺伝子の転写を促進するような変異の位置

変異の生じた塩基とLRPの結合部位およびH-NSの結合部位との関係を図に示した。図の左はしに変異およびDNaseI footprintおよび変異の報告された論文を示した。変異と制御因子の結合部位は*lysU*遺伝子上流の-40から-110のbent構造をとる領域に集中している。

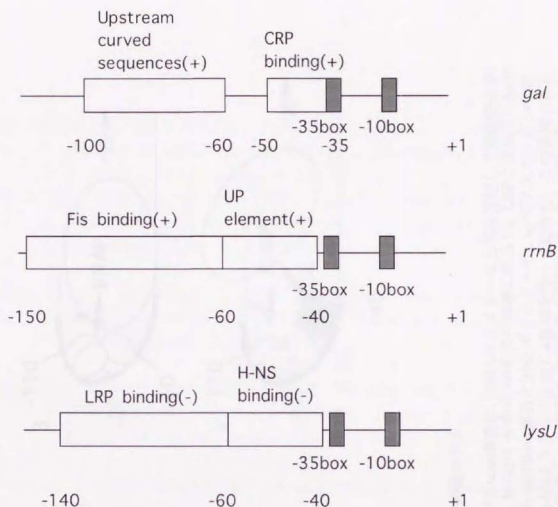


図6-2 様々な遺伝子のオペレーター領域の比較

*gal*遺伝子は-35box上流にCRPの結合領域が存在し、CRPにより転写が促進される。一方、*rrnB*遺伝子でのこの領域は、DNA自身がRNAポリメラーゼと相互作用し転写を促進する(up-elementがCRPの機能を代替する。)。 *lysU*遺伝子では、H-NSがこの領域に結合し、この領域とRNAポリメラーゼと相互作用を阻害する(up-elementの機能の阻害)。さらに-60より上流には*rrnB*遺伝子の場合FISが結合し、転写を促進する。*gal*遺伝子でのこの領域は、DNA自身が転写を促進する(upstream curved sequencesがFISの機能を代替する。)。 *lysU*遺伝子では、この領域にLRPが結合し、転写促進作用を阻害する(upstream curved sequencesの機能の阻害。))。

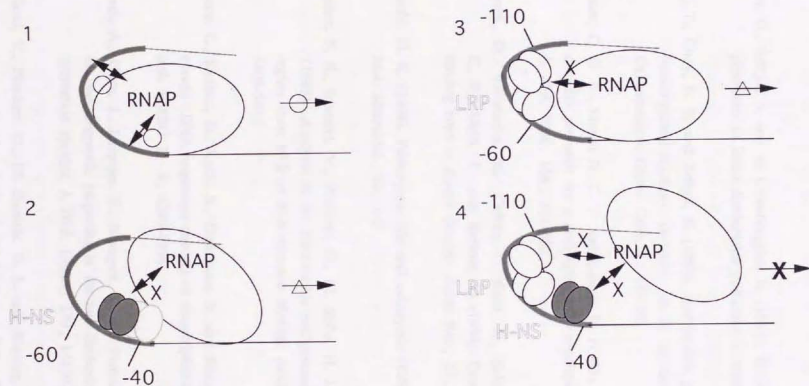


図6-3 *lysU*遺伝子のLRPおよびH-NSによる転写抑制モデル

1. *lysU*遺伝子上流の-40から-110までの領域に広がるbent構造は、RNAポリメラーゼと相互作用して開始複合体の形成を助け、*lysU*遺伝子の転写を促進する。2. H-NSは-40から-60までの領域に結合し、LRPとは独立に*lysU*遺伝子の転写を抑制している。この抑制は-40から-60のbent構造とRNAポリメラーゼ、 α -サブユニットとの相互作用を阻害していると予想される。3. LRPはH-NSよりさらに上流に4量体を作って結合し、この領域に存在するbent構造とRNAポリメラーゼとの相互作用を阻害し、開始複合体の形成を阻害していると予想される。4. 2および3に示された、H-NSおよびLRPの抑制能は、互いに異なる領域に依存している。この異なる領域に2つの因子が同時に結合することにより、*lysU*遺伝子の転写は完全にシャットオフされる。

参考文献

- Aiba, H., Adhya, S. and de Crombrughe, B. (1981). Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. J. Biol. Chem., 256, 11905-11910
- Aki, T., Choy, H. E. and Adhya, S. (1996). Histone-like protein HU as a specific transcriptional regulator: co-factor role in repression of *gal* transcription by Gal repressor. Genes Cells, 1, 179-188
- Banner, C. D. B., Moran Jr, C. P. and Losick, R. (1983). Deletion analysis of a complex promoter for a developmentally regulated gene from *Bacillus subtilis* J. Mol. Biol., 168, 351-365
- Barrick, D., Villanueva, K., Childs, J., Kalil, R., Schneider, T. D., Lawrence, C. E., Gold, L. and Stormo, G. (1994). Quantitative analysis of ribosome binding sites in *E.coli*. Nucleic Acids Res., 22, 1287-1295
- Bianchi, M. E. (1994). Prokaryotic HU and eukaryotic HMG1: a kinked relationship. Mol. Microbiol., 14, 1-5
- Blattner, F. R., Burland, V., Plunkett, G., III, Sofia, H. J. and Daniels, D. L. (1993). Analysis of the *Escherichia coli* genome. IV. DNA sequence of the region from 89.2 to 92.8 minutes. Nucleic Acid Res., 21, 5408-5417
- Bracco, L., Kotlarz, D., Kolb, A., Diekmann, S. and Buc, H. (1989). Synthetic curved DNA sequences can act as transcriptional activators in *Escherichia coli* EMBO J., 8, 4289-4296
- Brevet, A., Chen, J., Leveque, F., Blanquet, S. and Plateau, P. (1995). Comparison of the enzymatic properties of the two *Escherichia coli* lysyl-tRNA synthetase species. J. Biol. Chem., 270, 14439-14444
- Burland, V., Plunkett, G., III, Daniels, D. L. and Blattner, F. R. (1993). DNA sequence and analysis of 136 kilobases of the *Escherichia coli* genome: organizational symmetry around the origin of replication. Genomics, 16,

- Burland, V., Plunkett, G., III, Sofia, H. J., Daniels, D. L. and Blattner, F. R. (1995). Analysis of the *Escherichia coli* genome. VI: DNA sequence of the region from 92.8 to 100 minutes. *Nucleic Acid Res.*, 23, 2105-2119
- Choy, H. E. and Adhya, S. (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella*. Second edition, American Society for microbiology, Washington D. C., p1287-1299
- Clark, R. L. and Naidhardt, F. C. (1990). Roles of the two lysyl-tRNA synthetases of *Escherichia coli* analysis of nucleotide sequences and mutant behavior. *J. Bacteriol.*, 172, 3237-3243
- Cui, Y., Wang, Q., Stormo, G. D. and Calvo, J. M. (1995). A consensus sequence for binding of Lrp to DNA. *J. Bacteriol.*, 177, 4872-4880
- Cui, Y., Midkiff, M. A., Wang, Q. and Calvo, J. M. (1996). The Leucine-responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli* J. *Biol. Chem.*, 271, 6611-6617
- Daniels, D. L. Plunkett, G., III, Burland, V. and Blattner, F. R. (1992). Analysis of the *Escherichia coli* genome: DNA sequence of the region from 84.5 to 86.5 minutes. *Science*, 257, 771-778
- De santis, P., Palleschi, A., Savino, M. and Scipioni, A. (1986). Structures and superstructures in periodical polynucleotides, p. 31-49. Plenum Publishing Corp., New York.
- Dixon, N. E. and Kornberg, A. (1984). Protein HU in the enzymatic replication of the chromosomal origin of *Escherichia coli* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 424-428
- Emerish, R. V. and Hirshfield, I. N. (1987). Mapping of constitutive Lysyl-tRNA synthetase gene of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 169, 5311-5313
- Ernsting, B. R., Atkinson, M. R., Ninfa, A. J. and Matthews, R. G. (1992). Characterization of the regulon controlled by the leucine-responsive regulatory protein in *Escherichia coli* *J. Bacteriol.*, 174, 1109-1118

- Ferrario, M., Ernstring, B. R., Borst, D. W., Wiesel, D. E., Blumenthal, R. M. and Matthews, R. G. (1995). The leucine-responsive regulatory protein of *Escherichia coli* negatively regulates transcription of *ompC* and *micF* and positively regulates transcription of *ompF*. *J. Bacteriol.*, 177, 103-113
- Friedberg, D., Platko, J. V., Tyler, B. and Calvo, J. M. (1995). The amino acid sequence of Lrp is highly conserved in four enteric microorganisms. *J. Bacteriol.*, 177, 1624-1626
- Filutowics, M., Ross, W., Wild, J. and Gourse, R. L. (1992). Involvement of Fis protein in replication of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.*, 174, 398-407
- Fujita, N., Mori, H., Yura, T. and Ishihama, A. (1994). Systematic sequencing of the *Escherichia coli* genome: analysis of the 2.4-4.1 min. (110,917-193648 bp) region. *Nucleic Acid Res.*, 22, 1637-1639
- Gazeau, M., Delort, F., Fromant, M., Dessen, P., Blanquet, S. and Plateau, P. (1994). Structure-function relationship of the Lrp-binding region upstream of *lysU* in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 241, 378-389
- Gralla, J. D. and Collado-Vides, J. (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella* Second edition, American Society for microbiology, Washington D. C., p1232-1245
- Hassani, M., Pincus, D. H., Bennett, G. N. and Hirshfield, I. N. (1992). Temperature-dependent induction of an acid-inducible stimulon of *Escherichia coli* in broth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1038-1045
- Higgins, C. F., Dorman, C. J., Stirling, D. A., Waddell, L., Booth, I. R., May, G. and Bremer, E. (1988). A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell*, 52, 569-584
- Higgins, C. F., Hinton, J. C. D., Hulton, C. S. J., Owen-Hughes, T., Pavitt, G. D. and Seirafi, A. (1990). Protein H1: a role for chromatin structure in the regulation of bacterial gene expression and virulence? *Mol. Microbiol.*, 4, 2007-2012
- Ito, K. (1993). 転写終結制御機構の研究、東京大学学位論文

- Ito, K., Kawakami, K. and Nakamura, Y. (1993). Multiple control of *Escherichia coli* lysyl-tRNA synthetase expression involves a transcription repressor and a translational enhancer element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 302-306
- Ito, K., Oshima, T., Mizuno, T. and Nakamura, Y. (1994). Regulation of lysyl-tRNA synthetase expression by histon-like protein H-NS of *Escherichia coli* J. Bacteriol., 176, 7383-7386
- Imamoto, F. (1996). クロモゾームDNAの高次構造形成とその意義. 蛋白質核酸酵素, 41, 2009-2023
- Kabayama, H. (1996). 大腸菌 *lysU* 遺伝子の環境応答機構の解明、東京大学修士論文
- Kaidow, A., Wachi, M., Nakamura, J., Magae, J. and Nagai, K. (1995). Anucleate cell production by *Escherichia coli* Δhns mutant lacking a Histone-Like protein, H-NS. *J. Bacteriol.*, 177, 3589-3592
- Kawakami, K., Naito, S., Inoue, N., Nakamura, Y., Ikeda, H. and Uchida, H. (1989). Isolation and characterization of *herC*, a mutation of *Escherichia coli* affecting maintenance of ColE1. *Mol. Gen. Genet.*, 219, 333-340
- Kawakami, K., Ito, K. and Nakamura, Y. (1992). Differential regulation of two genes encoding lysyl-tRNA synthetases in *Escherichia coli lysU*-constitutive mutations compensate for a *lysS* null mutation. *Mol. Microbiol.*, 6, 1739-1745
- Keuntje, B., Masepohl, B. and Klipp, W. (1995). Expression of *putA* gene encoding proline dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus* is independent of NtrC regulation but requires an Lrp-like activator protein. *J. Bacteriol.*, 177, 6432-6439
- 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
- Landgraf, J., Levinthal, M. and Danchin, A. (1994). The role of H-NS in one carbon metabolism. *Biochimie*, 76, 1063-1070

- Lavigne, M., Herbert, M., Kolb, A. and Buc, H. (1992). Upstream curved sequences influence the initiation of transcription at the *Escherichia coli* galactose operon. *J. Mol. Biol.*, 224, 293-306
- Leirmo, S. and Gourse, R. L. (1990). Factor-independent activation of *Escherichia coli* rRNA transcription. I. kinetic analysis of roles of the upstream activator region and supercoiling on transcription of the *rmB* P1 promoter in vitro. *J. Mol. Biol.*, 220, 555-568
- Leveque, F., Plateau, P., Dessen, P. and Blanquet, S. (1990). Homology of *lysS* and *lysU*, the two *Escherichia coli* genes encoding distinct lysyl-tRNA synthetase species. *Nucleic Acids Res.*, 18, 305-312
- Levinthal, M., Lejeune, P. and Danchin, A. (1994). The H-NS protein modulates the activation of *ilvIH* operon of *Escherichia coli* K12 by Lrp, the leucine regulatory protein. *Mol. Gen. Genet.*, 242, 736-743
- Lin, R., Ernsting, B., Hirshfield, I. N., Matthews, K. G., Neidhardt, F. C. and Newman, E. B. (1992). The *lrp* gene product regulates expression of *lysU* in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 174, 2779-2784
- Lin, R., D'Ari, R. and Newman, E. B. (1992b). Lambda *placMu* insertions in genes of the leucine regulon: extension of the regulon to genes not regulated by leucine. *J. Bacteriol.*, 174, 1948-1955
- Mikuni, O., Ito, K., Moffat, J., Matsumura, K., McCaughan, K., Nobukuni, T., Tate, W. and Nakamura, Y. (1994). Identification of the *prfC* gene, which encodes peptide-chain-release factor 3 of *Escherichia coli* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 5798-5802
- Murakami, K., Fujita, N. and Ishihama, A. (1996). Transcription factor recognition surface on the RNA polymerase α subunit is involved in contact with the DNA enhancer element. *EMBO J.*, 15, 4358-4367
- Nakamura, Y. and Ito, K. (1993). Control and function of lysyl-tRNA synthetases: diversity and co-ordination. *Mol. Microbiol.*, 10, 225-231
- Nakao, T., Yamato, I. and Anraku, Y. (1988). Mapping of the multiple regulatory sites

for *putP* and *putA* expression in the *putC* region of *Escherichia coli* Mol. Gen. Genet., 214, 379-388

Newman, E. B., D'Ari, R. and Lin, R. T. (1992). The Leucine-Lrp regulon in *E. coli*: A global response in search of a raison d'Etre. Cell, 68, 617-619

Newman, E. B. (1995). Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. Annu. Rev. Microbiol., 49, 747-775

Newman, E. B., Lin, R. T. and D'Ari, R. (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella* Second edition, American Society for microbiology, Washington D. C., p1513-1525

Oshima, T. (1994). 大腸菌リジルtRNA合成酵素遺伝子 $lysU$ の発現制御機構の研究
東京大学修士論文

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

Oshima, T. et al., (1996). A 718-kb DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12 genome corresponding to the 12.7-28 min region on the linkage map. DNA Res., 3, 137-155

Owen-Huges, T. A., Pavitt, G. D., Santos, D. S., Sidebotham, J. M., Hulton, C. S. J., Hinton, J. C. D. and Higgins, C. F. (1992). The chromatin-associated protein H-NS interacts with curved DNA to influence DNA topology and gene expression. Cell, 71, 255-265

Peres-Martin, J. and Espinosa, M. (1993). Protein-induced bending as a transcriptional switch. Science, 260, 805-807

Platko, J. V. and Calvo, J. M. (1993). Mutations affecting the ability of *Escherichia coli* Lrp to bind DNA, activate transcription, or respond to leucine. J. Bacteriol., 175, 1110-1117

Plunkett, G., III, Burland, V., Daniels, D. L. and Blattner, F. R. (1993). Analysis of the *Escherichia coli* genome. III. DNA sequence of the region from 87.2 to 89.2 minutes. Nucleic Acid Res., 21, 3391-3398

- Polaczek, P. (1990). Bending of the origin of replication of *E. coli* by binding of IHF at a specific site. *New Biol.*, 2, 265-271
- Pabo, C. O. and Sauer, R. T. (1984). Protein-DNA recognition. *Ann. Rev. Biochem.*, 53, 293-321
- Pon, C. L., Calogero, R. A. and Gualerzi, C. O. (1988). Identification, cloning, nucleotide sequence and chromosomal map location of H-NS. *Mol. Gen. Genet.*, 212, 199-202
- Putzer, H., Grunberg-Manago, M. and Springer, M. (1995). tRNA: structure, biosynthesis, and function. American Society for Microbiology, Washington, 293-333
- Ross, W., Khoosheh, K. G., Saiomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K. and Gourse, R. L. (1993). A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the α -subunit of RNA polymerase. *Science*, 262, 1407-1413
- Rouviere-Yaniv, J. and Gros, F. (1975) Characterization of a novel, low-molecular-weight DNA-binding protein from *Escherichia coli* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72, 3428-3432
- Rex, J. H., Aronson, B. D. and Somerville, R. L. (1991). The *tdh* and *serA* operons of *Escherichia coli* mutational analysis of the regulatory elements of leucine-responsive genes. *J. Bacteriol.*, 173, 5944-5953
- Ricca, E., Aker, D. A. and Calvo, J. M. (1989). A protein that binds to the regulatory region of the *Escherichia coli* *ilvIH* operon. *J. bacteriol.*, 171, 1658-1664
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sofia, H. J., Burland, V., Daniels, D. L., Plunkett, G., III, and Blattner, F. R. (1994). Analysis of the *Escherichia coli* genome. V. DNA sequence of the region from 76.0 to 81.5 minutes. *Nucleic Acid Res.*, 22, 2576-2586

- 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
- Stormo, G. D., Schneider, T. D. and Gold, L. (1986). Quantitative analysis of the relationship between nucleotide sequence and functional activity. *Nucleic Acid Res.*, 14, 6661-6679
- Sulta, M. V. and Hirshfield, I. N. (1995). The occurrence of duplicate lysyl-tRNA synthetase gene homologs in *Escherichia coli* and other procaryotes. *J. Bacteriol.*, 177, 1872-1878
- Tchetina, E. and Newman, E. B. (1995). Identification of Lrp-regulated genes by inverse PCR and sequencing: Regulation of two *mal* operons of *Escherichia coli* by Leucine-responsive regulatory protein. *J. Bacteriol.*, 177, 2679-2683
- Timchenko, T., Bailone, A. and Devoret, R. (1996). Btdc, a mouse protein that binds to curved DNA, can substitute in *Escherichia coli* for H-NS, a bacterial nucleoid protein. *EMBO J.*, 15, 3986-3992
- Tippner, D., Afflerbach, H., Bradaczek, C. and Wagner, R. (1994). Evidence for a regulatory function of the histon-like *Escherichia coli* protein H-NS in ribosomal RNA synthesis. *Mol. Microbiol.*, 11, 589-604
- Travers, A. A., Ner, S. S. and Churchill, E. A. (1994). DNA chaperones: A solution to a persistence problem? *Cell*, 77, 167-169
- Tuerk, C. and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249, 505-510
- Tupper, A. E., Owen-Hughes, T. A., Ussery, D. W., Santos, D. S., Ferguson, D. J., Sidebotham, J. M., Hinton, J. C. D. and Higgins, C. F. (1994). The chromatin-associated protein H-NS alters DNA topology in vitro. *EMBO J.*, 13, 258-268
- Ueguchi, C. and Mizuno, T. (1993). The *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS functions directly as a transcriptional repressor. *EMBO J.*, 12, 1039-1046

- Ussery, D. W., Hinton, J. C. D., Jordi, B. J. A. M., Granum, P. E., Seirafi, A., Stephen, R. J., Tupper, A. E., Berridge, G., Sidebotham, J. M. and Higgins, C. F. (1994). The chromatin-associated protein H-NS. *Biochimie*, 76, 968-980
- Vanbogelen, R. A., Vaughn, V. and Neidhardt, F. C. (1983). Gene for heat-inducible lysyl-tRNA synthetase (*lysU*) maps near *cadA* in *Escherichia coli* J. *Bacteriol.*, 153, 1066-1068
- Vanbogelen, R. A., Acton, M. A. and Neidhardt, F. C. (1987). Induction of the heat shock regulon does not produce thermotolerance in *Escherichia coli* Genes and Dev., 1, 525-531
- Wang, Q. and Calvo, J. M. (1993). Lrp, a global regulatory protein of *Escherichia coli*, binds co-operatively to multiple sites and activates transcription of *ilvIH*. *J. Mol. Biol.*, 229, 306-318
- Wang, Q. and Calvo, J. M. (1993b). Lrp, a major regulatory protein in *Escherichia coli*, bends DNA and can organize the assembly of a higher-order nucleoprotein structure. *EMBO J.*, 12, 2495-2501
- Wang, Q., Sacco, M., Ricca, E., Lago, C. T., DeFelice, M. and Calvo, J. M. (1993c). Organization of Lrp-binding sites upstream of *ilvIH* in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.*, 7, 883-891
- Wang, Q., Wu, J., Friedberg, D., Plakto, J. and Calvo, J. M. (1994). Regulation of the *Escherichia coli* *lrp* gene. *J. Bacteriol.*, 176, 1831-1839
- Willins, D. A., Ryan, C. W., Plakto, J. V. and Calvo, J. M. (1991). Characterization of Lrp, an *Escherichia coli* regulatory protein that mediates a global response to leucine. *J. Biol. Chem.*, 266, 10768-10774
- Willins, D. A. and Calvo, J. M. (1992). In vitro transcription from the *Escherichia coli* *ilvIH* promoter. *J. Bacteriol.*, 174, 7648-7655
- Yamada, H., Muramatsu, S. and Mizuno, T. (1990). An *Escherichia coli* protein that preferentially binds to sharply curved DNA. *J. Biochem.*, 108, 420-425
- Yamashino, T., Kakeda, M., Ueguchi, C. and Mizuno, T. (1994). An analogue of the

DnaJ molecular chaperone whose expression is controlled by sigma s during the stationary phase and phosphate starvation in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol., 13, 475-483

Yamashino, T., Ueguchi, C. and Mizuno, T. (1995). Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, σ^s , in *Escherichia coli* involvement of the nucleoid protein H-NS. EMBO J., 14, 594-602

Yura, T., Mori, H., Nagai, H., Nagata, T., Ishihama, A., Fujita, N., Isono, K., Mizobuchi, K. and Nakata, A. (1992). Systematic sequencing of the *Escherichia coli* genome: analysis of the 0-2.4 min region. Nucleic Acid Res., 20, 3305-3308

Zhang, A., Sylvie, R., 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

Zuber, F., Kotlartz, D., Rimsky, S. and Buc, H. (1994). Modulated expression of promoters containing upstream curved DNA sequences by the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. Mol. Microbiol., 12, 231-240

謝辞

本研究にあたり終始、懇切丁寧なご指導を賜りました中村義一助教授に心から感謝いたします。

本研究にあたり、研究の場を提供して下さり、研究の心得を伝えていただきました、基礎生物学研究所遺伝子統御第2部門、堀内高教授に心から感謝いたします。

本研究にあたり終始、有益な御助言、御激励を承りました奈良先端大学院大学の森浩禎教授、本年度、医科研究癌体質学研究部を退官されました江川混二教授に心から感謝いたします。

本研究にあたり終始、有益な御助言、御激励をいただきました共同研究者の伊藤耕一助手に感謝いたします。

本研究の共同研究者としてコンピューター操作をしていただきました奈良先端大学院大学の伊藤剛氏、大腸菌ゲノムプロジェクトにおいてともに苦闘していただいた基礎生物学研究所遺伝子統御第2部門、林見司技官、シークエンス作業を手伝っていただきました白井雅代氏、さらに、大腸菌ゲノムプロジェクトを共に遂行して頂いたプロジェクトメンバーの方々に感謝いたします。

本研究にあたり、常に有益な御助言、御激励をいただきました現浜松医科大学、瀬尾尚宏博士、有益な議論をしていただきました基礎生物学研究所遺伝子統御第2部門、児玉顕一助手、定塚勝樹博士、本研究の共同研究者である現理化学研究所、樺山博之氏に感謝いたします。

本研究にあたり常に有益な御助言、御激励を頂いた、東京大学医科学研究所、癌体質学研究部および基礎生物学研究所遺伝子統御第2部門の皆様、に心から感謝いたします。

補足

大腸菌染色体12.7 -28.0 領域のORF MAP

ORFの予測方法については3-2-2参照。ORFは矢印の方向にN末端からC末端である。矢印の色が赤のものが既知のORF、青がホモログ、黒が既知のORFとは全く相同性のみられないORFである。様々な機能配列(tRNA, Chi, Ter etc.)については図中に記した。ライブラリー作成に使用した小原のラムダクローンについても図中に記した。図中の縦線は黒色の縦線がスコア3以上の予想LRP認識配列、ピンクがスコア4以上の予想LRP認識配列である。

