

博士論文

大腸菌及び近縁種における alternative  $\sigma$  のレギュロン、プロモーター、  
プロモーター認識に関する研究

野中 源

# 目次

略語	2
序章	3
実験材料と実験方法	19
第一章： $\sigma^{32}$ プロモーターと $\sigma^{32}$ レギュロンの網羅的解明	31
1-1 序論	31
1-2 結果	33
1-3 まとめと考察	52
第二章： $\sigma^E$ における全プロモーターの網羅的な挙動解析	58
2-1 序論	58
2-2 結果	61
2-3 まとめと考察	75
第三章： $\sigma^{32}$ における全プロモーターの網羅的な挙動解析	77
3-1 序論	77
3-2 結果	79
3-3 まとめと考察	85
終章 総括と討論	88
参考文献	92
発表論文一覧	110
謝辞	111

## 略語

*C. crescentus* : *Caulobacter crescentus*

CTD : C-terminal domain

E-10 : extended -10

*E. coli* : *Escherichia coli*

ECF : extracytoplasmic function

$E\sigma$  : RNAP holoenzyme

GFP : green fluorescent protein

HSF : heat shock factor

hsp : heat shock protein

HSR : heat shock response

LPS : lipopolysaccharide

OD : optical density

OMP : outer membrane protein

ORF : open reading frame

PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis

PWM : position weight matrix

5'RACE : 5' rapid amplification of cDNA ends

RFU : relative fluorescence unit

RNAP : RNA polymerase

*S. coelicolor* : *Streptomyces coelicolor*

SOM : self-organized maps

SR : SRP receptor

sRNA : small RNA

SRP : signal recognition particle

TU : transcription unit

## 序章

### バクテリアにおける RNA ポリメラーゼと $\sigma$ 因子について

バクテリアの RNA ポリメラーゼ (RNAP) は、 $\alpha_2\beta\beta'\omega$  の 4 サブユニット 5 量体からなる本体 (コア酵素) 及び  $\sigma$  サブユニット ( $\sigma$  因子) から構成され、コア酵素に  $\sigma$  が結合することで活性型のホロ酵素となる。 $\alpha$  サブユニットは転写の初期の段階でプロモーター上流の UP エレメントの認識を行う (Ross et al. 1993; Esterm et al. 1998)。 $\beta$  及び  $\beta'$  サブユニットはいずれも DNA に結合し転写の進行に機能するサブユニットである。 $\beta'$  サブユニットは転写初期の段階でプロモーターの巻き戻し (melting) に関与し、プロモーターと RNAP ホロ酵素の開放型複合体 (open complex) を形成させる (Young et al. 2001; Young et al. 2004)。 $\omega$  サブユニットは最も小さなサブユニットであり、主に  $\beta'$  への作用などを通じて RNAP の構造維持に寄与する補助的な因子である (Mathew and Chatterji 2006)。 $\sigma$  サブユニットは転写の開始に必要な重要な因子であり、プロモーターの認識 (recognition) と DNA の melting の機能を担っている (Gross et al. 1998)。プロモーター上には  $\sigma$  によって認識され  $\sigma$  による結合を受ける -10、extended-10 (E-10)、-35 と呼ばれる保存された特徴的な配列 (コアプロモーターモチーフ) が存在する。転写の開始に際しては、 $\sigma$  が RNAP コア酵素と結合することでホロ酵素を形成し、これによって  $\sigma$  の DNA 結合ドメインが表面に露出し機能するようになる (Dombroski et al. 1993)。そして  $\sigma$  によるプロモーターの認識とプロモーターへの結合 (RNAP の誘導) が行われ、転写が開始されるのである。プロモーターによっては複数の  $\sigma$  によって認識されるものも存在するが、通常はプロモーター (に制御される遺伝子) と  $\sigma$  がセットになっており、転写する遺伝子に応じて  $\sigma$  を使い分ける。多くのバクテリアは housekeeping  $\sigma$  と呼ばれる生育に必須な遺伝子を発現するための  $\sigma$  の他に、環境変化やストレスへの応答、そして形態変化などの限られた状況に必要な特別なセットの遺伝子 (レギュロン) を発現するための alternative  $\sigma$  と呼ばれる  $\sigma$  を複数保持している。それぞれの  $\sigma$  にはそれぞれの  $\sigma$  が認識する特徴的なプロモーター配列 (コンセンサス配列) があり、これを用いることで一群のレギュロンを支配する。図1に RNAP と  $\sigma$ 、プロモーターの模式図を示した。

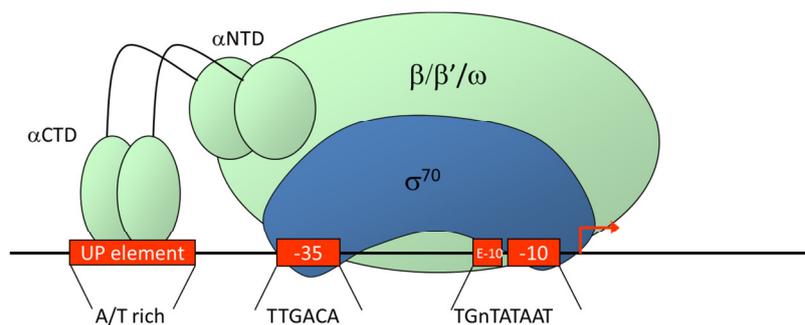
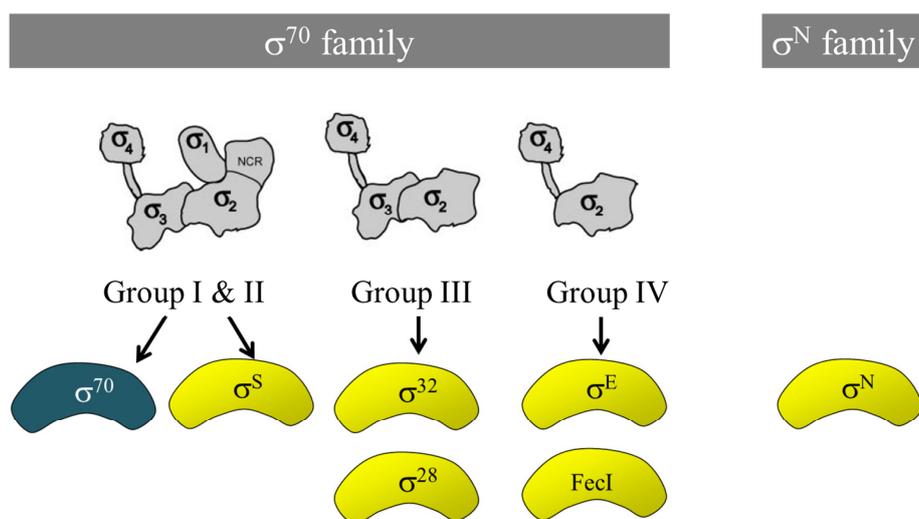


図1 RNAP と  $\sigma$ 、プロモーターの模式

$\sigma^{70}$  を擁した RNAP ホロ酵素とプロモーター ( $\sigma^{70}$  のコンセンサス配列) を示した。E-10 は extended-10、 $\alpha$ CTD は  $\alpha$ サブユニットの C 末端ドメイン、 $\alpha$ NTD は  $\alpha$ サブユニットの N 末端ドメインを表す。

$\sigma$  は大きく 2 つのグループに分類される。一つは  $\sigma^{70}$  を代表とする  $\sigma^{70}$  ファミリーであり (Lonetto et al. 1992; Gruber and Gross 2003; Paget and Helmann 2003)、もう一つは  $\sigma^N$  を代表とする  $\sigma^N$  ( $\sigma^{54}$ ) ファミリーである (Bush and Dixon 2012) (図 2)。alternative  $\sigma$  の多くは、配列と構造の点から housekeeping  $\sigma$  である  $\sigma^{70}$  と類縁であり、 $\sigma^{70}$  ファミリーに属する。このファミリーは系統学的に 4 つのサブグループに分類される (図 2)。まず Group 1 は  $\sigma^{70}$  及びそのオルソログを含むグループである。生育に必須な“housekeeping”遺伝子の転写を司り、対数増殖期の RNAP ホロ酵素 ( $E\sigma$ ) のほとんどはこのグループの  $\sigma$  を擁している。“housekeeping”の呼び名に相応しく、制御する遺伝子 (レギュロン) の数も通常 1000 を超える大所帯である。一方で特殊な任務を担当する alternative  $\sigma$  のレギュロンは通常数 10~100 程度にとどまる。アクチベーターやリプレッサーといった転写調節因子の利用に関しても housekeeping  $\sigma$  と alternative  $\sigma$  で大きく異なる。alternative  $\sigma$  による転写ではアクチベーターやリプレッサーといった転写調節因子がほとんど利用されないのに対し、housekeeping  $\sigma$  による転写ではこれらが多用される (Browning and Busby 2004)。Group 2 は Group 1 と構造上非常によく似ているが、生育に必須ではない。最もよく研究されているのは *E. coli* のストレス因子である  $\sigma^S$  である。Group 3 は Group 1 からは構造上更にかげ離れる。熱ショック応答 (*E. coli* の  $\sigma^{32}$  など) や鞭毛合成 (*E. coli* の  $\sigma^{28}$  など)、胞子形成などに関与するものがよく知られている。Group 4 は Group 1 からは最も遠い存在になる。最小限のドメインのみをもつ最も小さな  $\sigma$  である。*E. coli* のペリプラズムのストレス応答に関与する  $\sigma^E$  などがよく知られる。また、多くの細菌は  $\sigma^{70}$  ファミリーとは異なるファミリーである  $\sigma^N$  ( $\sigma^{54}$ ) ファミリーの  $\sigma$  を保有する (Bush and Dixon 2012)。両ファミリーは、構造においても、そして  $\sigma$  としてのプロモーターの認識や open complex 形成の様式においても、大きく異なる。まず両ファミリーの間には配列上の相同性が全くない。そして認識するプロモーターの配列やコアエレメントの位置に関しても、 $\sigma^N$  ファミリーの  $\sigma$

は $\sigma^{70}$ ファミリーの $\sigma$ とは大きく異なる (Barrios et al. 1999)。また open complex 形成の様式にも大きな違いがあり、 $\sigma^{70}$ ファミリーの $\sigma$ がこのプロセスを自力で行うのに対し、 $\sigma^N$ ファミリーの $\sigma$ はエンハンサーと ATP を必要とする (Buck et al. 2000; Studholme and Buck 2000)。 *E. coli* では窒素源に関連する遺伝子を制御する $\sigma^N$  ( $\sigma^{54}$ ) が知られている (Hunt and Magasanik 1985; Reitzer et al. 1987)。



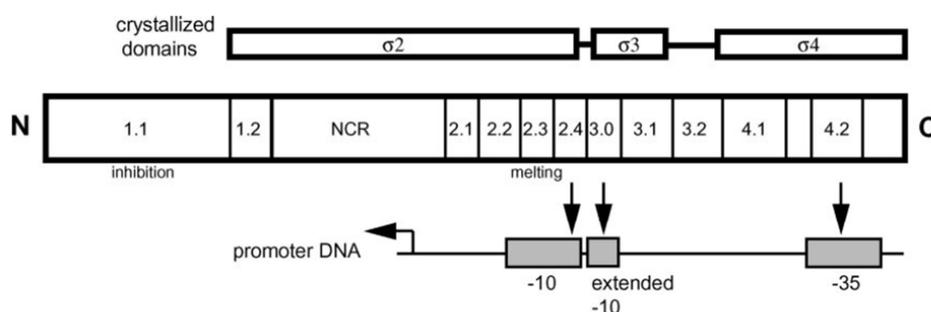
Gruber and Gross *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:441-66 を改変

## 図2 $\sigma$ の分類

$\sigma$ ファミリーの分類 ( $\sigma^{70}$ ファミリーと $\sigma^N$  ( $\sigma^{54}$ ) ファミリー)。  $\sigma^{70}$ ファミリー $\sigma$ のドメイン構造 ( $\sigma_1$ - $\sigma_4$ ) とドメイン構造によるグループ分け (Group I-IV)。 *E. coli* の7つの $\sigma$ の分類 ( $\sigma^{70}$ 、 $\sigma^S$ 、 $\sigma^{32}$ 、 $\sigma^{28}$ 、 $\sigma^E$ 、Fecl、 $\sigma^N$ )。ドメイン $\sigma_1$ 、 $\sigma_2$ 、 $\sigma_3$ 、 $\sigma_4$ 、NCRは図3に基づく。

$\sigma^{70}$ ファミリーの $\sigma$ は最大で4つのドメイン ( $\sigma_1$ - $\sigma_4$ ) からなるモジュール構造をとっており、各ドメインは機能により更に細分化された Region を形成し、各 Region が DNA の認識、RNAP と DNA への結合、DNA の melting といった $\sigma$ の機能を担っている (図3; Gross et al. 1998)。DNA 結合決定因子は3箇所あり、 $\sigma_2$ の Region2.4 が-10の (Campbell et al. 2002)、 $\sigma_4$ の Region4.2 が-35の (Gardella et al. 1989; Siegele et al. 1989)、 $\sigma_3$ の Region3.0 が E-10 (Barne et al. 1997; Koo et al. 2009a,b) の認識をそれぞれ行う。Group 1-3 の $\sigma$ は全ての DNA 結合決定因子を保持するが、Group 4  $\sigma$ は Region3.0 を持たない。 $\sigma_1$ の Region

1.1 は Group 1  $\sigma$  にのみ存在し、ホロ酵素を形成していないフリーな  $\sigma^{70}$  の DNA 結合決定因子をマスクすることで自己制御を行う領域である (Dombroski et al. 1992, 1993; Hook-Barnard and Hinton 2009)。 $\sigma_2$  の Region2.3 はプロモーターの 2 本鎖 DNA の melting の機能を担っている。また、Region2.2 は  $\beta'$  との相互作用において重要な役割を果たしていることが示唆されている。Group1 と Group 2  $\sigma$  は 4 つのドメイン  $\sigma_1$ - $\sigma_4$  を全てを持ち、Group 3  $\sigma$  は  $\sigma_2$ - $\sigma_4$  を持ち、Group 4  $\sigma$  は最も小さな  $\sigma$  であり  $\sigma_2$  と  $\sigma_4$  のみを持つ。



Gruber and Gross *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:441-66 より引用

図3  $\sigma$  の保存された Region 構造と  $\sigma^{70}$  をベースとしたその機能の割り当て  
4 つの保存された Region (Region1-Region4) と更にその Subregion、NCR (non conserved region) が示されている。下段には -35、-10、extended-10 から成る典型的な保存されたプロモーターの構造が示されている。矢印は  $\sigma$  の各 Subregion が作用するプロモーター領域を示している。上段には、結晶化された  $\sigma$  のドメイン ( $\sigma_2$ 、 $\sigma_3$ 、 $\sigma_4$ ) を示している。

*E. coli* は合計 7 つの  $\sigma$  因子を持つ。6 つの  $\sigma^{70}$  ファミリーに属する  $\sigma^{70}$  (RpoD)、 $\sigma^S$  (RpoS)、 $\sigma^{32}$  (RpoH)、 $\sigma^{28}$  (FliA)、 $\sigma^E$  (RpoE)、FecI、そして  $\sigma^N$  ファミリーに属する  $\sigma^N$  (RpoN) の合計 7 つである (図 2, 図 4)。Group 1 の  $\sigma$  は  $\sigma^{70}$  である。前述の通り、housekeeping  $\sigma$  であり、1000 を超える生育に必要な遺伝子を支配する必須の  $\sigma$  因子である。Group 2 の  $\sigma$  は  $\sigma^S$  である。構造上非常に  $\sigma^{70}$  に近い  $\sigma$  であり、一般的なストレス応答ならびに定常期での遺伝子発現に関与する。認識するプロモーターの配列も  $\sigma^{70}$  と非常に似ており (Gaal et al. 2001)、全遺伝子の ~10% を直接もしくは間接的に支配しているとも言われている (Weber et al. 2005)。酸化ストレス、UV ストレス、浸透圧ストレス、酸性ストレス、エタノールストレス等、広範なストレスに対応する (Hengge-Aronis 2002)。Group 3 の  $\sigma$  は  $\sigma^{32}$  と  $\sigma^{28}$  の 2 因子である。 $\sigma^{32}$  は、熱ショックやその他ストレスによる細胞質の異常タンパク質の蓄

積によって誘導される。傘下には、異常タンパク質の修復除去などに関わるシャペロンやプロテアーゼなどを擁する (Nonaka et al. 2006)。 $\sigma^{28}$  は運動性を付与する鞭毛の構築に関わる遺伝子群を傘下に置き、その遺伝子の数は $\sim 25$ 個程度である (Zhao et al. 2007)。Group 4 の $\sigma$  は $\sigma^E$  と FecI の 2 因子である。 $\sigma^E$  は、熱ショックやエタノールショック、その他によるペリプラズムの異常タンパク質の蓄積によって活性化され、主にペリプラズムのタンパク質 (ポーリン等) や LPS の恒常性維持に関わる遺伝子を支配下に置く。また、同じく熱ショックに関連する $\sigma^{32}$  をも支配下に置く。*E. coli* において約 50 の $\sigma^E$  プロモーターが存在することがわかっている (Rhodius et al. 2006)。FecI は、iron citrate を細胞内に輸送する輸送担体である *fecABCDE* を支配する。鉄の枯渇と環境中の iron citrate の存在の 2 つのシグナルによって活性化される (Visca et al. 2002)。

*E. coli* は、こうした 7 つの $\sigma$  を使い分けるのと同時に、350 個存在するとも言われる転写調節因子を動員することで (Perez-Rueda and Collado-Vides 2000)、複雑かつ精巧な転写を行っている。*E. coli* における一連の転写制御の様式を図 4 に示した。

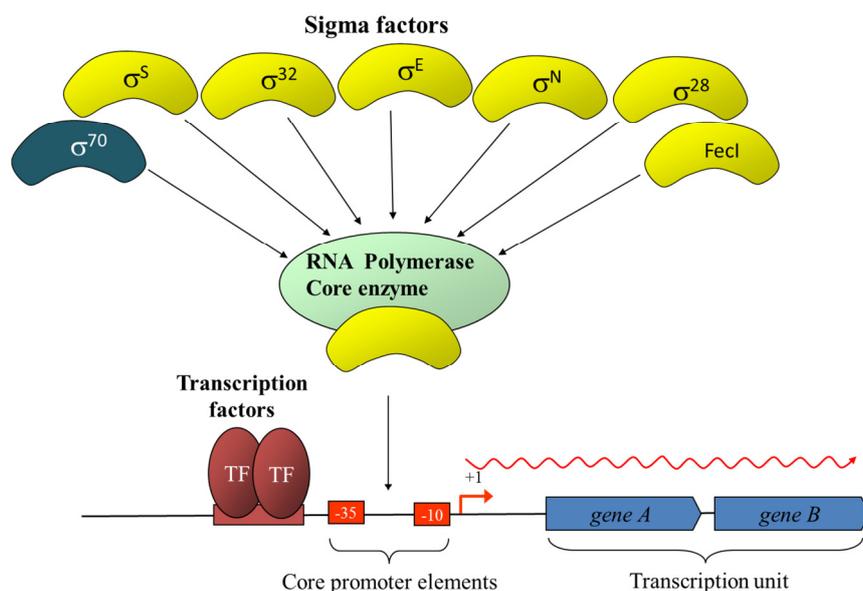


図 4 *E. coli* における転写の制御

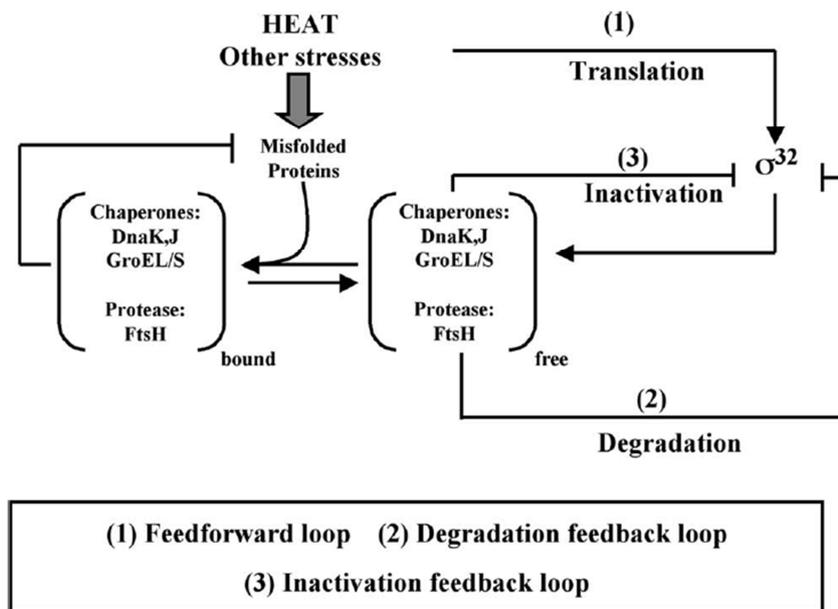
### *E. coli* の熱ショック応答と $\sigma^{32}$ 、 $\sigma^E$

細胞が熱ショックに晒されたとき、熱ショックタンパク質 (Heat-shock proteins; hsp) と呼ばれる一群のタンパク質が素早くそして選択的に誘導される。この熱ショック応答と呼ばれる現象 (Heat-shock response; HSR) は Ritossa (1963) によりはじめて発見された。彼らは熱ショック下での *Drosophila* 唾液腺染色体の puffing パターンが一瞬にして変化することを見出したのである。そして、Tissieres et al. (1974) は分子レベルでの解析を行い、この変化が少なくとも 7 つのタンパク質の誘導によることを突き止めた。そして、誘導される hsp がいったいどのような機能を持ったタンパク質であるのか、また HSR が *Drosophila* 特異的であるのかあるいは生物に広く保存された生理機能であるのか等、多くの疑問が投げかけられた。その後、幾つかの生物における実験の結果から、hsp の多くはタンパク質の折り畳み (folding) を補助するシャペロンであることが判明した (Pelham 1986; Beckmann et al. 1990; Gaitanaris et al. 1990; Skowyra et al. 1990)。これらの研究の結果から、HSR の主要な機能が細胞内のタンパク質の適切な折り畳み状態の維持であることが明らかとなっただけでなく、Hsp70 や Hsp90 のようにいくつかのシャペロンが全ての生物に存在することも明らかとなった (Bardwell and Craig 1984, 1987)。このように、HSR と幾つかの hsp はあらゆる生物で普遍的に保存されている、生物にとって重要な現象なのである。*E. coli* における hsp の発見は 1978 年に遡る (Lemaux et al. 1978; Yamamori et al. 1978)。そして、一群の hsp の発現を制御する因子として、またはじめての alternative  $\sigma$  として、 $\sigma^{32}$  が同定された (Grossman et al. 1984)。その後、第二の熱ショック  $\sigma$  として  $\sigma^E$  の存在が明らかとなった (Erickson and Gross 1989)。こうして *E. coli* における HSR が 2 つ alternative  $\sigma$  である  $\sigma^{32}$ 、 $\sigma^E$  によってとり行われることが明らかとなった。 $\sigma^{32}$  は主に細胞質の、 $\sigma^E$  は主にペリプラズムの異常タンパク質の蓄積によって活性化され、それぞれ支配下の遺伝子を誘導する。hsp の合成は高温へのシフトによって誘導され、低温へのシフトにより抑制される (Lemaux et al. 1978; Yamamori et al. 1978; Straus et al. 1987, 1989; Taura et al. 1989)。この温度の変化に対する細胞の素早い応答を可能にしているのが  $\sigma^{32}$  と  $\sigma^E$  それぞれが持つ巧みな制御機構である (後述)。

### *E. coli* における $\sigma^{32}$ の制御機構と $\sigma^{32}$ レギュロン

*E. coli* の細胞質の HSR を司る  $\sigma^{32}$  (*rpoH* 遺伝子によってコード) は複雑かつ精巧な機構によって制御されている (図 5)。まず、2 つの negative feed-back loop によって  $\sigma^{32}$  の転写開始因子としての活性 (Straus et al. 1989; Blaszczyk et al. 1999) 及び  $\sigma^{32}$  タンパク質の安定性 (Straus et al. 1987) が制御されている。 $\sigma^{32}$  の活性は  $\sigma^{32}$  自身の支配下にある 2 つのシャペロンチーム、DnaKJ と GroESL によって調節される。定常状態の非ストレス下 (異常タンパク質が蓄積しないような温度) では、DnaKJ と GroESL は  $\sigma^{32}$  に結合し  $\sigma^{32}$  を不活化しているが、熱ショック時に異常タンパク質が増加した際には異常タンパク質の処置にこれらシャペロンチームが動員される。その結果、 $\sigma^{32}$  への結合が外れ、 $\sigma^{32}$  が活性化す

るのである (Gamer et al. 1996; Tatsuta et al. 1998; Guisbert et al. 2004)。 $\sigma^{32}$  タンパク質の分解安定性は $\sigma^{32}$  自身の支配下にあるプロテアーゼである FtsH を介して調節される。FtsH は細胞膜に局在し、定常状態の非ストレス下では $\sigma^{32}$  を分解するが、熱により異常タンパク質が増加した場合には FtsH はこれらのタンパク質の分解に使われるため $\sigma^{32}$  の分解が行われなくなる。こうして熱ショック時には $\sigma^{32}$  は分解を免れるのである (Herman et al. 1995; Tomoyasu et al. 1995; Tatsuta et al. 1998)。 $\sigma^{32}$  分子の多くは SRP (signal recognition particle) 及び SR (SRP receptor) を介した内膜へのターゲティングにより、内膜に結合した状態で細胞内に存在する (Lim et al. 2013)。これにより内膜タンパク質である FtsH による制御を可能にしている。こうして FtsH プロテアーゼが $\sigma^{32}$  の安定性を調節し、DnaKJ と GroESL のシャペロンが $\sigma^{32}$  の活性を調節するのである。また positive feed-forward loop によって合成が制御されている。*rpoH* mRNA は定常状態 (定常温度) では翻訳が阻害されるような 2 次構造をとっているが、高温に晒された際には 2 次構造が緩み、翻訳が促進される (Yuzawa et al. 1993; Morita et al. 1999a, b; El-Samad et al. 2005)。また、ペリプラズムの異常タンパク質によって誘導される $\sigma^E$ によっても $\sigma^{32}$  が転写レベルで直接の支配を受ける (Rhodius et al. 2006)。ペリプラズムの異常タンパク質は高温によって蓄積することから、熱ショックへの対処という点で $\sigma^E$  は $\sigma^{32}$  と連携をとっているであろう。



Guisbert et al. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008;72(3):545-54 より引用

図5  $\sigma^{32}$  の制御メカニズム

3つのモードから成る $\sigma^{32}$ の制御。(1)非ストレス下では過剰に存在するDnaKJとGroESLシャペロンが直接 $\sigma^{32}$ に結合し不活化する。(2)非ストレス下のFtsHプロテアーゼによる $\sigma^{32}$ の分解。熱ショックによるmisfolded proteinの蓄積により、これらシャペロンやプロテアーゼが $\sigma^{32}$ 制御の任務から外れ、レギュロンの転写が活性化される。(3)温度(高温)による $\sigma^{32}$ の翻訳効率の変化(の向上)。

$\sigma^{32}$ が支配する遺伝子としては、 $\sigma^{32}$ とHSRの発見から長い間は専ら熱によりダメージを受けた細胞質のタンパク質を修復分解するシャペロンやプロテアーゼが知られてきた。そして、知られるプロモーターの数は~20程度であった(Yura et al. 1999)。その後のmicroarray等を用いたグローバルな手法による研究は、その幅の拡大に大きく貢献しているが(Zhao et al. 2005; Wade et al. 2006)、検証の不十分さや擬陽性を拾いやすさなどの問題点も指摘される。一方で、この後述べる本研究は、 $\sigma^{32}$ が支配する遺伝子を網羅的に突き止めた研究としては量・精度共に最も信頼性の高いものの一つと考えられる。本研究の貢献により、現在では $\sigma^{32}$ が支配するプロモーターが約60個、そして遺伝子が約90個知られることとなった。その機能も細胞質のみならず細胞膜のタンパク質の恒常性維持やタンパク質のみならずDNAやRNA、脂質などの恒常性維持にまで広がった。非常に強く保存されたコンセンサス配列:STTGAAA-N<sub>11-12</sub>-GNCCCATWAも明らかとなった(Nonaka et al. 2006)。詳しい研究成果を第一章で述べる。

## *E. coli*における $\sigma^E$ の制御機構と $\sigma^E$ レギュロン

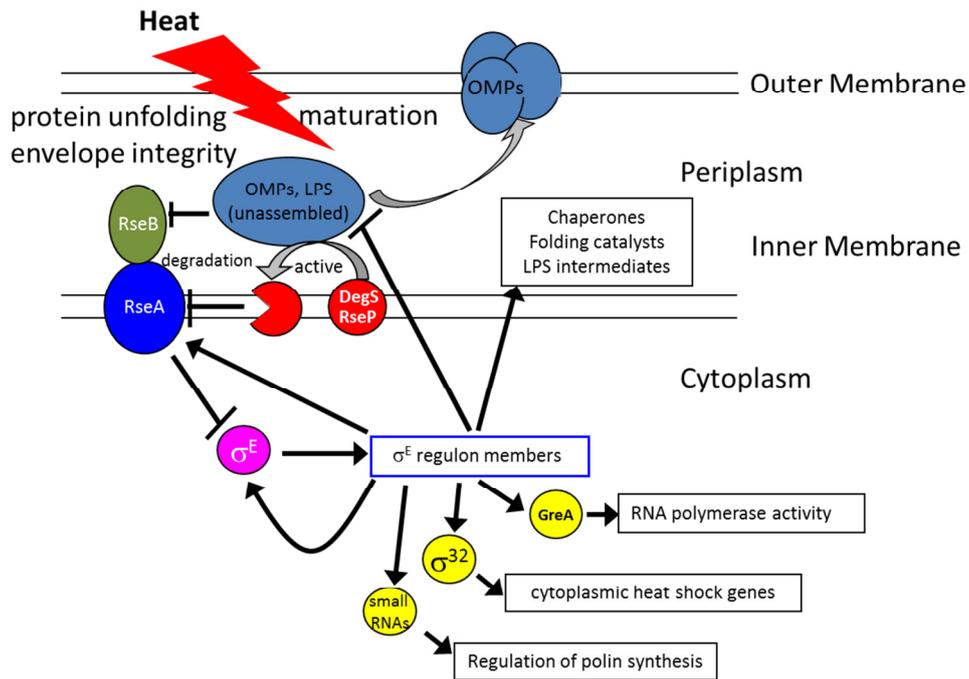
ペリプラズムの恒常性維持の主要な役割を担うのは $\sigma^E$ である。熱ショックはペリプラズムに異常タンパク質を蓄積し $\sigma^E$ を活性化させる要因の一つである。 $\sigma^E$ は *rpoE* 遺伝子によってコードされており、 $\sigma^E$ の負の制御に働く *rseA*、*rseB*、*rseC* と同一のオペロンを構成している。 $\sigma^{32}$ と同様に、様々なレベルでの複雑な制御を受けることが知られている(図6)。

まずは、転写レベルでの制御について以下に述べる。*rpoE*を含むオペロン自体が $\sigma^E$ の直接の支配下にあり、mRNAのレベルの feed-forward loop が存在する。一方で、同一オペロンにある *rseA* は $\sigma^E$ の anti- $\sigma$  RseA をコード、*rseB* は RseA を分解から守ることで $\sigma^E$ を負に制御するモジュレーター RseB をコードしている。ここに feed-back loop が存在する。*rseC* は、未知のメカニズムで $\sigma^E$ を正に制御するモジュレーター RseC をコードしている (Missiakas et al. 1997)。また $\sigma^E$ 活性化のシグナル(後述)でもある外膜タンパク質 (OMP) の合成を抑えるため、3つの small RNA、MicA、RybB、MicL を $\sigma^E$ 自身の支配下(レギュロン)におさめている (Rhodius et al. 2006; Guo et al. 2014)。MicA、RybB は外膜のポーリンをコードする複数の遺伝子 (*omp* 遺伝子) からの転写産物を負に制御する sRNA である (Papenfort et al. 2006; Gogol et al. 2011)。また、MicL は外膜リポタンパク質 Lpp を負に制御する sRNA である (Guo et al. 2014)。

$\sigma^E$ は活性レベルでも複雑な制御を受ける。 $\sigma^E$ を活性化させる3つのシグナルが知られている。まず第一のシグナルはポーリンをはじめとする OMP のアセンブルの状態である (Mecbas et al. 1993; Ades et al. 1999)。ここで働く中心的役者は $\sigma^E$ の anti- $\sigma$ である RseA と OMP の状態のセンサーの働きをする DegS である。RseA は1回膜貫通型の膜タンパク質であり、細胞質側に向けたドメインが $\sigma^E$ と結合し、ストレスが存在しないときには $\sigma^E$ をトラップし不活化している (De La Penas et al. 1997a; Missiakas et al. 1997; Campbell et al. 2003; Grigorova et al. 2004)。そしてペリプラズムへのストレスにより、DegS、RseP という2つのプロテアーゼを含むカスケードが作動し、最終的には RseA を完全に分解することで $\sigma^E$ を活性化する (Ades et al. 1999; Alba et al. 2002; Alba et al. 2004)。ペリプラズムに存在するプロテアーゼ DegS はセンサーの働きをする (Walsh et al. 2003)。ストレスが存在しないときには DegS は自身の持つ PDZ ドメインによりプロテアーゼ活性の活性中心がマスクされることで自身を不活化している (Sohn et al. 2007, Sohn and Sauer 2009)。そしてストレス存在下には異常外膜タンパク質が蓄積し、これら異常タンパク質の C 末端に存在する YXF と呼ばれるモチーフが DegS-PDZ ドメインに結合することで DegS が活性化され(それまで PDZ にマスクされていた活性中心が表面に現れる)、RseA のペリプラズム側のドメインを分解できるようになる (Walsh et al. 2003; Wilken et al. 2004)。ポーリンの C 末端はアセンブルした状態では3量体のインターフェイスに隠れているが、アセンブルが阻止された場合には YXF モチーフが表に露出するのである。活性化した DegS による RseA の分解により、膜局在の RseP プロテアーゼが RseA にアクセスし RseA の分解(膜

からの切り離し)を行うことが出来るようになり、これにより RseA の細胞質側のドメインが細胞質に放たれる (Kanehara et al. 2002; Kanehara et al. 2003)。細胞質の RseA は ClpXP、ClpAP、Lon、FtsH、HslUV 等のプロテアーゼによって完全に分解され、こうして  $\sigma^E$  が細胞質内で完全にフリーとなり RNAP とのホロ酵素の形成が可能になるのである (Chaba et al. 2007)。これらの細胞質内でのプロテアーゼの多くが  $\sigma^{32}$  の支配下であり、また  $\sigma^{32}$  は  $\sigma^E$  の支配下にあることも、制御の一面なのであろう。第二のシグナルは LPS のアセンブルと外膜への輸送の状態である。ここで重要なセンサーの働きをするのが RseB である (Wollmann and Zeth 2007; Chaba et al. 2011; Lima et al. 2013)。RseB は  $\sigma^E$  の負の制御因子であり、ストレスの非存在下では RseA に結合することで DegS による攻撃から RseA を守っていると考えられている (Cezairliyan and Sauer 2007; Chaba et al. 2011)。熱ショックなどで LPS のアセンブルと外膜への輸送に異常が生じた際には、蓄積した異常 LPS が RseB に結合し、RseB の RseA への結合が阻害され、結果 RseA が DegS をスタートとする一連のプロテアーゼのカスケードによって分解され  $\sigma^E$  が活性化する (Lima et al. 2013)。第三のシグナルは、OMP や LPS の経路とは無関係な、生育のフェーズや栄養分の貧富によるシグナルである。 $\sigma^E$  は定常期に活性化されること、そしてこの制御に ppGpp が関与することが知られている (Costanzo and Ades 2006; Costanzo et al. 2008)。ppGpp による  $\sigma^E$  の制御については第二章で詳細を述べる。このように  $\sigma^E$  の制御は非常に複雑でありかつ巧みであり、細胞質のストレス因子である  $\sigma^{32}$  と関連しながら熱ショックをはじめとするタンパク質のダメージへの応答機構として働いているのである。

$\sigma^E$  のレギュロン、プロモーターについては Rhodius 等の研究により、多くのことがわかってきている (Rhodius et al. 2006)。この研究では、DNA microarray を用いた  $\sigma^E$  過剰発現後に誘導される遺伝子の網羅的な解析と、バイオインフォマティクスの手法によるプロモーターの予測とゲノム上の検索、これらから得られた候補因子の転写開始点のマッピングならびに in vitro 転写実験による検証という一連の解析により、ほぼ完全な  $\sigma^E$  レギュロンのセットが見出された。その結果、*E. coli* において約 50 個の  $\sigma^E$  プロモーター、そのプロモーター支配下にある 80 個以上の遺伝子が明らかとなった。この  $\sigma^E$  レギュロンに関する研究は、本研究を行う上での非常に重要な先行研究となったため、以下にそのポイントを簡単に述べる。



Rhodium et al. *PLoS Biol.* 2006;4(1):e2 より改変

図 6  $\sigma^E$  の制御メカニズム

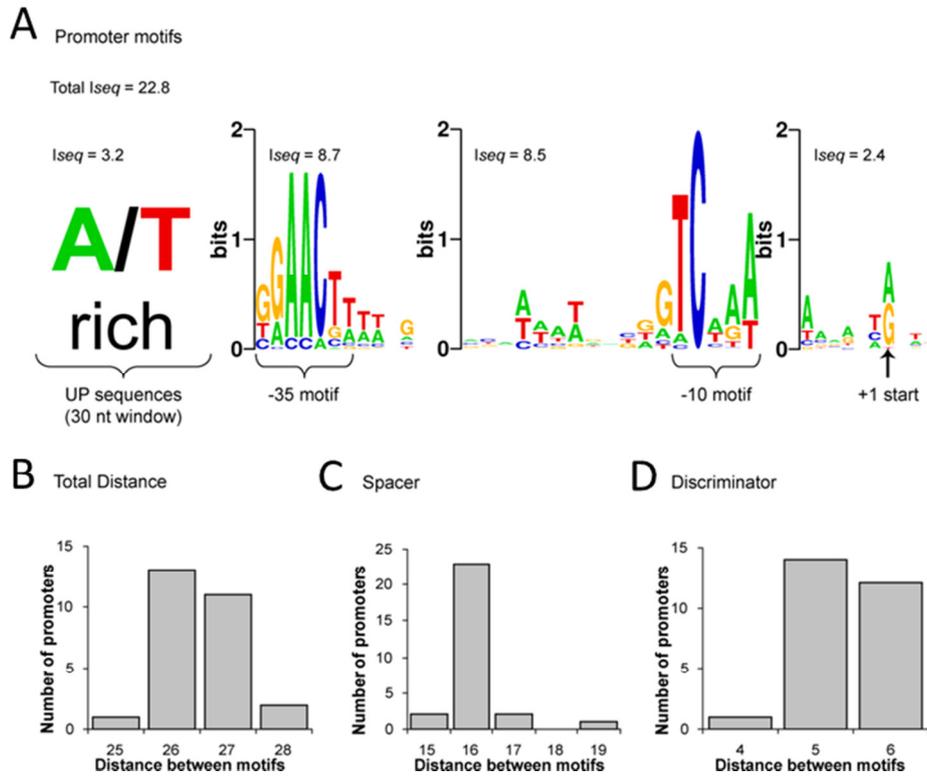
熱などによるストレスによりアセンブルに失敗した OMP、LPS が蓄積、これが引き金となりプロテアーゼのカスケードが活性化され、最終的には anti- $\sigma$  である RseA が分解されることで  $\sigma^E$  が活性化される。 $\sigma^E$  のレギュロンメンバーには  $\sigma^E$  自身、RseA、LPS、sRNA (OMP の folding やアセンブル、外膜への挿入をを助けるペリプラズムのシャペロンなど、OMP の発現を抑制する sRNA) が含まれる。 $\sigma^E$  の活性化により自身が誘導される一方で、先述の RseA、シャペロン、sRNA 等の誘導は  $\sigma^E$  を過剰に活性化させないためのブレーキとなる。

#### $\sigma^E$ プロモーターとレギュロンの網羅的解明

本研究に先行して行われた  $\sigma^E$  プロモーターとレギュロンの網羅的解明の手法の概要は以下の通りである。まず、DNA microarray を用いることで  $\sigma^E$  誘導後のタイムコースでの発現データを取得し、ここから 75 個の有意に誘導される遺伝子を抽出した。次に 75 遺伝子の周辺遺伝子の発現パターンとオペロン構造を分析、その結果 42 個の TU (Transcription unit) に集約された。この中から、 $\sigma^E$  による直接の支配を受ける TU を見出すため、生化学的手法による検証を行った。ここでは、mRNA の 5'末端のマッピングの手法である 5'RACE を用いて (詳細は実験材料と実験方法の章及び第一章を参照) *rpoE*<sup>+</sup> 株と *rpoE* 株における各 TU の転写産物の比較を行い  $\sigma^E$  特異的な転写産物の検出と転写開始点 (5'末端) の同定を行った。その結果、42 個の TU のうち 28 個において  $\sigma^E$  依存の転写開始点が見つ

かった (表 1A)。次に 28 個の TU の上流配列の alignment から共通するプロモーターモチーフの検索を行った。その結果、非常に強く保存された -10、-35 等のプロモーターエレメントが見出され、また spacer や discriminator 等のモチーフ間の距離の傾向が明らかとなった (図 7)。

次に、明らかとなった 28 個のプロモーターの情報を利用し、ゲノムの検索により更に多くの  $\sigma^E$  プロモーターを同定することを目的に、in silico でのプロモーターのモデリングを行った。ここでは UP エlement、-35、-10、+1 の配列に対して PWM (position weight matrix) (Schneider et al. 1986) の構築を行った。PWM は各プロモーターモチーフ内の塩基の座位に対してその座位に登場する各塩基の頻度 (保存性) に応じたスコアを与えるマトリクスであり、そのスコアの合計によって各エレメントそしてプロモーター全体のスコアを算出することができる (詳細は Rhodius et al. 2006 参照)。この  $\sigma^E$  プロモーターの PWM を使用し、更に spacer や discriminator 等のモチーフ間の距離によるカットオフの条件を加えることで、*E. coli* K-12 株のゲノムの検索から多数の  $\sigma^E$  プロモーター候補を得た。ここで得られた候補及び、過去に提唱された  $\sigma^E$  プロモーターを in vitro 転写実験によって検証することで更に多数の  $\sigma^E$  プロモーターを追加することができた。そして最終的には *E. coli* K-12 株において 49 個の  $\sigma^E$  プロモーターを見出すことに成功した (表 1A、C)。PWM をベースとしたプロモーターモデルは、近縁種 (K-12 株以外の病原性大腸菌や *Salmonella*、*Shigella*、*Ervinia* 等) のゲノムの検索でも効果を発揮し、最終的には合計で 89 個の  $\sigma^E$  プロモーターを見出した。そして  $\sigma^E$  の種を超えた保存された機能や種ごとに特異的な機能を突き止めることに成功した。DNA microarray を用いたグローバルな手法と、in silico での解析、そしてこれに生化学的な検証実験をうまく融合させることで  $\sigma^E$  のプロモーターを多数見つけ出した網羅性と精度を兼ね備えた非常に効果の高い解析手法と言える。



Rhodus et al. *PLoS Biol.* 2006;4(1):e2 より引用

図7  $\sigma^E$ プロモーター

(A) -35、-10、+1、A/T-rich UP エLEMENTの sequence logos (Crooks et al. 2004)。各モチーフの information content ( $I_{seq}$ ; Schneider et al. 1986) が示されている。(B-D)各モチーフ間の距離の度数分布。(B) +1~-35、(C) -10~-35、(D) +1~-10。

表 1 *E. coli* K-12 株の $\sigma^E$  レギュロン

Transcription Unit	Unique ID	Ratio			$\sigma^E$ Promoter Sequence	Evidence
			+1	Score		
<b>A/ Significantly differentially regulated and identified promoter</b>						
<i>degP</i> <sup>2</sup>	b0161	17.24	-40 <sup>a</sup>	0.34	<u>GGAACCTT</u> CAGGCTATAAAACGAA <u>TCTGA</u> AGAACA <b>C</b>	K <sup>2</sup> R
<i>(yaeL<sup>1</sup>)yaeT<sup>1</sup>hlpA<sup>1</sup>lpxD<sup>1</sup>fabZlpxA1lpxB rnhB dnaE</i>	b0176-84	5.95	-902	1.17	<u>GGAACCTA</u> AAAGCCGTAGATGGTA <u>TCCGA</u> ACGCCT <b>g</b>	R
<i>sbmA<sup>6</sup>yaiW<sup>6</sup></i>	b0377-8	3.12	-85	-0.59	<u>CGAACTA</u> AGCGCTTGCTATGGG <u>TCCACA</u> ATGGCG <b>g</b>	K <sup>6</sup> R
<i>clpXlon</i>	b0438-9	2.18	-44.8	-0.45	<u>TGAACCTT</u> ATGGCGCTTCATACGGG <u>TCAAT</u> CATTAG <b>a</b>	R
<i>ybfG</i>	b0690	2.59	-44	0.21	<u>GGAACCTT</u> AATATTTAAAAAATG <u>TCCAT</u> ACAAT <b>t</b>	R
<i>ompX</i>	b0814	0.16	-94	-0.22	<u>GAACTCT</u> TTCGCGATTTGTGAT <u>TCTAA</u> CGGGCC <b>a</b>	PT reverse
<i>mdoG<sup>1</sup>mdoH<sup>1</sup></i>	b1048-9	5.92	-80	-0.27	<u>TGAACGA</u> TACCCGGATTCTGTG <u>TCCGA</u> ATGGCT <b>g</b>	K <sup>1</sup> R
<i>lpp</i>	b1677	0.49	-125	-0.72	<u>GGCACTT</u> ATTTTGGATCGTTCCG <u>TCAA</u> GAAGC <b>a</b>	PT reverse
<i>yeaY<sup>6</sup>jadD</i>	b1806-5	2.71	-28	0.5	<u>GAAACTT</u> CCGGGCAAGAATGA <u>TCTTA</u> AGAGT <b>a</b>	K <sup>6</sup> R
<i>sixA<sup>6</sup></i>	b2340	2.73	-187	-0.13	<u>GCAACTG</u> ACCTGCAATAAGAAGG <u>TCAA</u> GCAT <b>a</b>	K <sup>6</sup> R
<i>ddg<sup>6</sup></i>	b2378	2.06	-64	-0.63	<u>GGAACCA</u> TTCGCTACATGATGG <u>CCCAA</u> CCAAT <b>g</b>	K <sup>6</sup> R
<i>yfeK yfeS</i>	b2419-20	5.89	-27	0.39	<u>GAACTT</u> TACCTGATTCGGCAG <u>TCAA</u> TCCGGT <b>g</b>	R
<i>yfeY<sup>6</sup>yfeX</i>	b2432-1	5.97	-26	0.87	<u>GGCACTT</u> TTTGGTGAATTTGCAC <u>TCCAA</u> GCAAC <b>g</b>	K <sup>6</sup> R
<i>yfgC yfgD</i>	b2494-5	3.3	-26	0.21	<u>GGAACGA</u> TATTTACAGATATCGG <u>TCAA</u> TGACT <b>a</b>	R
<i>(yfgM)yfgLyfgK</i>	b2513-1	2.61	-323 <sup>b</sup>	0.04	<u>GGAACCTT</u> GCGGCAAAATTTGTGG <u>ACAAA</u> AATG <b>a</b>	R
<i>rpoE<sup>3</sup>rseA<sup>3</sup>rseB<sup>3</sup>rseC<sup>3</sup></i>	b2573-0	23.76	-76	0.08	<u>GGAACCTT</u> TACAAAAACGAGACA <u>TCTAA</u> CCCTT <b>g</b>	K <sup>3</sup>
<i>rseA<sup>3</sup>rseB<sup>3</sup>rseC<sup>3</sup></i>	b2572-0	6.56	-228	-0.37	<u>CGAACCC</u> TGAGAACTTAATGTT <u>TCCAG</u> AGAACT <b>g</b>	R
<i>yfiO<sup>1</sup></i>	b2595	3.36	-185/6	-0.05	<u>GGAACAT</u> TTCGCCAAAGCCGTGA <u>TCTAA</u> CGCTT <b>g</b>	R
<i>(xerD)<sup>1</sup>dsbC<sup>1</sup>recJ<sup>1</sup>prfB</i>	b2894-1	1.8	-810 <sup>c</sup>	-1.59	<u>TGAACGC</u> TACCGTACCGATCT <u>TCAAT</u> GATGGT <b>g</b>	R
<i>yggN<sup>1</sup>ansB</i>	b2958-7	5.09	-178	0.3	<u>CGAACTT</u> TTCGACGTTTGGTGGG <u>ACTAA</u> GAAA <b>g</b> C <b>A</b>	K <sup>1</sup> R
<i>ygiM<sup>1</sup>cca</i>	b3055-6	4.28	-165	0.69	<u>CGAACTT</u> AATGCGATCTTTTTT <u>TCCAG</u> AGATA <b>g</b>	R
<i>bacA<sup>6</sup></i>	b3057	2.32	-43	0.75	<u>TAAACCA</u> AACGGTTATAACCTGG <u>TCTAA</u> CGCAGT <b>a</b>	K <sup>6</sup> R
<i>(yraO)yraP<sup>1</sup></i>	b3149-50	2.85	-337 <sup>d</sup>	0.31	<u>TGCACTA</u> AATACTGATAATGTT <u>TCTTA</u> ACGGC <b>g</b>	R
<i>greA</i>	b3181	4.37	-137(8)	2.05	<u>GGAACCTT</u> CAGGTAATGACTT <u>TCAA</u> ATGT <b>G</b> a <b>a</b>	R
<i>(yhbN)yhbGrpNyhbH ptsNyhbJ</i>	b3200-5	2.07	-548 <sup>e</sup>	-3.27	<u>GAAAAGG</u> TAGAACATCCATGAAAT <u>TCAA</u> ACAA <b>a</b>	R
<i>fkpA<sup>4</sup></i>	b3347	6.6	-106(7)	0.65	<u>GAAACTA</u> ATTTAAACAAAAGAG <u>TCTGA</u> AAAT <b>a</b> <b>g</b>	K <sup>4</sup> R
<i>malQ</i>	b3416	2.32	-329	-2.08	<u>GGAACCA</u> GTGAAGCAATCTGGC <u>CAA</u> GGCT <b>a</b>	PT
<i>rpoH<sup>5</sup></i>	b3461	2.03	-87	1.09	<u>TGAACCTT</u> GTGGATAAAATCACCG <u>TCTGA</u> TAAAC <b>a</b>	K <sup>5</sup> R
<i>yhjJ</i>	b3527	4.54	-76	-1.15	<u>TGACATT</u> TTCATGTTCTTGGC <u>TCTAA</u> CACG <b>a</b> <b>a</b>	R
<i>yieE</i>	b3712	3.9	-40	-0.77	<u>CGAACTT</u> TAGCGCTTTAGTCTG <u>TCCAT</u> CATTCC <b>a</b>	R
<i>plsB</i>	b4041	7.12	-132	0.11	<u>AGAACCT</u> TTTTTACATTATGACCG <u>TCAAT</u> ATCAGT <b>g</b>	R
<b>B/ Significantly differentially regulated but no identified promoter</b>						
<i>dnaKdnaJ</i>	b0014-5	1.53				
<i>surA<sup>1</sup>pdxA<sup>1</sup>ksgA<sup>1</sup>apaG<sup>1</sup></i>	b0053-0	3.64				
<i>leuA leuB leuC</i>	b0074-2	1.51				
<i>tsx</i>	b0411	0.56				
<i>ybil ybiX</i>	b0805-4	0.42				
<i>ycbK</i>	b0926	1.9				
<i>ompF</i>	b0929	0.05				
<i>pqiA pqiB ymbA</i>	b0950-2	1.35				
<i>ompA</i>	b0957	0.22				
<i>cutC<sup>1</sup></i>	b1874	3.21				
<i>ompC</i>	b2215	0.08				
<i>nlpB<sup>1</sup></i>	b2477	4.75				
<i>ptrA recB recD</i>	b2821-19	11.2				
<i>rpoD<sup>1</sup></i>	b3067	1.92				
<i>yhcN</i>	b3238	0.41				
<i>mreB mreC mreD yhdE ecfA</i>	b3251-47	2.55				
<i>yhjW</i>	b3546	5.71				
<i>yidQ<sup>1</sup></i>	b3688	3.09				
<i>yidR</i>	b3689	2.34				
<i>fabR</i>	b3963	1.65				
<b>C/ Not significantly differentially regulated but identified promoter</b>						
<i>ftsZ</i>	b0095	1.43	-766	-0.34	<u>TGAACGT</u> TGTGGCTGAAAGTTG <u>ACCAA</u> CTGAT <b>a</b>	PT
<i>ybaB<sup>6</sup>recR<sup>6</sup></i>	b0471-2	0.9	-367		<u>CGAACTT</u> TTCGCTACCAAACCTGG <u>TCCGA</u> CAGGT <b>g</b>	K <sup>6</sup> T
<i>ybcR ybcS ybcT</i>	b0554-6	1.14	-525	-2.41	<u>TGAACCTT</u> TATTAATAAATGATG <u>TCACT</u> CGCG <b>g</b>	PT
<i>ycdC</i>	b1013	1.04	-108	-0.81	<u>TAAAAATA</u> CTGGTAAAAAGTGG <u>ACTAA</u> ACGGT <b>a</b>	PT
<i>(narY)narWnarV</i>	b1467-5	1.13	-1378 <sup>f</sup>	-0.59	<u>GAAACCA</u> AACCGGCAATGGTT <u>TCCGA</u> AAAAC <b>g</b>	PT
<i>ydhYdhJ ydhK</i>	b1643-5	1.17	-27	-0.15	<u>CGCACTT</u> AAAGAATATTTTAA <u>TCTAA</u> CGCAAT <b>a</b>	PT
<i>(rnt)lhr</i>	b1652-3	0.92	-734 <sup>g</sup>	-0.95	<u>TGCAATT</u> TATCCGTATAAGAGAA <u>TCCAG</u> ATGCC <b>g</b>	PT
<i>(wza)wzbwzc</i>	b2062-0	1.11	-1095 <sup>h</sup>	0.72	<u>TGAATTT</u> GATGCCATTATGGTG <u>TCACT</u> AACTT <b>g</b>	PT
<i>snpA<sup>6</sup></i>	b2617	1.35	-109		<u>TAAACTT</u> TTTTCCTGCTCACGG <u>TCCAG</u> GTAA <b>a</b>	K <sup>6</sup> T
<i>yfiO</i>	b2631	no data	-328	-0.42	<u>TGAACCTA</u> CGCACCATTGAAGGT <u>TCTTA</u> AAAA <b>g</b> T <b>a</b>	PT
<i>gspA pioO</i>	b3323-2	1.14	-236	0.35	<u>CGACCTT</u> ATGCTTATAAATATA <u>TCAAT</u> ATATT <b>g</b>	PT
<i>fusA<sup>6</sup></i>	b3340	1.27	-171		<u>CGAACTT</u> TCTGATGCTGCAGAA <u>ACCAA</u> GGT <b>a</b>	K <sup>6</sup> T
<i>yiaK yiaL</i>	b3575-6	1.41	-13	0.02	<u>GAAATTT</u> TAGCCAAAAAGCGA <u>TCAA</u> AAAA <b>a</b>	PT
<i>yicJ yicI</i>	b3657-6	1.08	-678	-0.97	<u>TGAACCA</u> ATTAATCTGTATGGCAG <u>TCTGA</u> TATT <b>g</b>	PT
<i>yiiS<sup>6</sup>yiiT<sup>6</sup></i>	b3922-3	no data	-98		<u>TGAACCTT</u> TCACCTTAAGCAAT <u>TCAA</u> AAAA <b>a</b>	K <sup>6</sup> T
<i>psd<sup>6</sup>yjeP</i>	b4160-59	1.53	-278		<u>GGAACCA</u> ATCACTCAGGGCTTTG <u>TCCGA</u> ATCC <b>a</b>	K <sup>6</sup> T

Rhodium et al. *PLoS Biol.* 2006;4(1):e2 より引用

(次頁に続く)

表 1 (前頁からの続き)

(A) *rpoE* の過剰発現により有意に誘導された遺伝子のうち、 $\sigma^E$  プロモーターが確認されたもの、(B) *rpoE* の過剰発現により有意に誘導された遺伝子のうち、 $\sigma^E$  プロモーターが確認されなかったもの、(C) *rpoE* の過剰発現により有意に誘導されなかったが、 $\sigma^E$  プロモーターが確認されたもしくは過去の文献で確認されているもの。Transcription Unit: TU は染色体上の順番に従って並べられている。TU 内の遺伝子は転写の順で並べられている。括弧内の遺伝子は、プロモーターが ORF 内部に位置するため有意に誘導されたが翻訳はされないと考えられる。Ratio: 発現比 *rpoE* 過剰発現/*rpoE*<sup>wt</sup> の誘導後 10 分から 60 分までの平均値 (TU の先頭の遺伝子)。Distance: TU の先頭の遺伝子から +1 までの距離。Score: プロモーターモデルにおけるスコア (詳細は原著論文参照)。Sequence: -35 と -10 モチーフが下線で示されている。転写開始点 +1 が小文字で示されている。Evidence:  $\sigma^E$  プロモーターであることを示す根拠; K: 既知、P: プロモーターモデルによる予測、R: 5'RACE による確認、T: in vitro transcription による確認、V: in vivo promoter assay による確認。

<sup>a</sup> Distance from translation start point of *yaeT*.

<sup>b</sup> Distance from translation start point of *b2512*.

<sup>c</sup> Distance from translation start point of *dsbC*.

<sup>d</sup> Distance from translation start point of *yraP*.

<sup>e</sup> Distance from translation start point of *yhbG*.

<sup>f</sup> Distance from translation start point of *narW*.

<sup>g</sup> Distance from translation start point of *lhr*.

<sup>h</sup> Distance from translation start point of *wzb*.

<sup>1</sup> Dartigalongue *et al.* 2001

<sup>2</sup> Lipinska *et al.* 1988; Erickson and Gross 1989

<sup>3</sup> Rouviere *et al.* 1995

<sup>4</sup> Danese and Silhavy 1997

<sup>5</sup> Erickson *et al.* 1987

<sup>6</sup> Rezuchova *et al.* 2003

### 本研究の内容と構成について

これまでの長い研究の歴史を通じて、*E. coli* の HSR を司る  $\sigma^{32}$  と  $\sigma^E$  がどのようなシグナルによりどのようなメカニズムで活性化され、どのような機能の遺伝子群を支配下に置いてその機能を発揮しているのか、一定の理解には至っている。一方で、いくつかの疑問は未だ解決に至っていない。その一つは、細胞質を  $\sigma^{32}$  が、そしてペリプラズムを  $\sigma^E$  が感知しているが、それでは細胞膜のタンパク質の異常はどちらが (或いは別の役者が) 感知し修復する役割を担っているのかという疑問である。また、熱によるタンパク質のダメージに対する修復の機構はわかっているが、それ以外のもの、例えば DNA や RNA、脂質などはいったいどちらが (或いは別の役者が) 感知し修復する役割を担っているのかという疑問

である。こうした疑問に答えるためにも、未だ完全解決には至っていなかった $\sigma^{32}$ 全レギュロンの解明ということに興味を持たれた。先にも述べた $\sigma^E$ レギュロンの網羅的解明において用いられたアプローチの有効性と実績は、レギュロンメンバーが完全には網羅できていなかった $\sigma^{32}$ において同様の手法を試す動機付けとなった（本論文第一章）。また、ある特定の alternative  $\sigma$ の全セットがほぼ網羅されているという点も注目に値する。ある特定の $\sigma$ に対して全レギュロンを対象とした挙動の解析が可能となる。 $\sigma^E$ や $\sigma^{32}$ のレギュロン全体がもつダイナミックな応答の様式を紐解くきっかけとなった（本論文第二章及び第三章）。こうした一連の研究の流れの原点となっている点で、 $\sigma^E$ のレギュロンの解明に関する研究成果は非常に重要である。

本研究では、*E. coli*の alternative  $\sigma$ を中心に、様々な角度からの検証を行った。第一章では、細胞質の HSR で中心的な役割を担う $\sigma^{32}$ を扱う。網羅的なグローバルな手法と生化学的な検証を組み合わせることで、 $\sigma^{32}$ のレギュロンメンバーのほぼ全貌を捉えることに成功した（Nonaka et al. 2006）。第二章では、 $\sigma^E$ のプロモーターを扱う。Rhodius 等の研究で明らかとなった 60 個（49 個の *E. coli* の $\sigma^E$ プロモーター及び 11 個の近縁種の $\sigma^E$ プロモーター）の全 $\sigma^E$ プロモーターの発現挙動をレポーターにより解析、 $\sigma^E$ レギュロンのダイナミックな応答の様式を明らかとした。ある特定の $\sigma$ のレギュロンを全セットで捉えた貴重な研究結果である（Mutalik et al. 2009）。第三章では、 $\sigma^{32}$ の全プロモーターの発現挙動を解析した。全プロモーター挙動を見ることで $\sigma^{32}$ がもつプロモーターの melting に関わる特性がいかにか転写というアウトプットに大きな影響を及ぼしているかを明らかとした（Koo et al. 2009c）。一連の研究は、「レギュロン」「プロモーター」「 $\sigma$ のプロモーター認識」という 3 つをテーマとし、*E. coli*の alternative  $\sigma$ と HSR の理解を大きく前進させたものである。

本論文は筆者がバクテリアの転写制御の大家であるカリフォルニア大学サンフランシスコ校の Carol Gross 教授の研究室に留学し、同教授の指導の下に行った一連の研究をまとめたものである。序章に述べた $\sigma^E$ レギュロンの解明に関する研究は、筆者が同研究室の Virgil Rhodius 博士と共同で行った研究である。第一章に述べた $\sigma^{32}$ レギュロンの解明に関する研究は、筆者が中心に行った研究である。第二章に述べた $\sigma^E$ プロモーターの発現挙動に関する研究は、筆者が同研究室の Vivek Mutalik 博士と共同で行った研究である。そして第三章に述べた $\sigma^{32}$ プロモーターの発現挙動に関する研究は、筆者が同研究室の Byoung-Mo Koo 博士と共同で行った研究である。それぞれの研究成果をまとめた原著論文のリストを『発表論文一覧』のセクションに掲載した。

## 実験材料と実験方法

### 菌株、プラスミド、培養条件

本研究で用いた菌株とプラスミドを表 2 に記載した。 $\sigma^{32}$  と  $\sigma^E$  におけるプロモーターライブラリーを用いた GFP 蛍光の測定には LB 培地 (Luria-Bertani) を用い、32°C で培養を行った。 $\sigma^{32}$  過剰発現下での DNA microarray のための培養及び 5'RACE のための培養には全て M9 complete 培地を用い、30°C にて行った。パルスチェイス実験には M9 complete からメチオニンを除いた培地を用い、30°C で培養を行った。なお M9 培地 (Sambrook et al. 1989) に 0.2% グルコース、1 mM  $\text{MgSO}_4$ 、ビタミン、全アミノ酸 (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を添加した培地を“M9 complete”と呼ぶ。添加した抗生物質の濃度は以下の通りである：アンピシリン (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、カナマイシン (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、テトラサイクリン (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、クロラムフェニコール (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、スペクチノマイシン (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

### パルスチェイス

メチオニンを除いた M9 complete にて対数増殖期 ( $\text{OD}_{450}=0.3$ ) まで培養した CA50002 (IPTG での誘導が可能な *rpoH* を保有) の培養液に IPTG を添加し (最終濃度 1 mM) *rpoH* を誘導、誘導後の各タイムポイント (0、2.5、5、10、15、20、30、45、60 分) にてサンプルを取得し、パルスチェイス実験に供した。各タイムポイントの培養液 750  $\mu\text{L}$  を抜き取り、80  $\mu\text{C}$  [ $^{35}\text{S}$ ]メチオニンで 1 分間のパルスラベル、ラベル無しの過剰のメチオニンの添加後に 1 分間のチェイス、そして 100  $\mu\text{L}$  の氷冷 50% TCA による沈殿 (氷上で 15 分) と遠心分離、最後は 50  $\mu\text{L}$  の 2% SDS 50 mM Tris (pH 7.5) に懸濁した。7.5% PAGE の各レーンにそれぞれ同量 (カウント) をロードし、GroEL と DnaK タンパク質に相当するバンドを ImageQuant 1.2 プログラムを用いて定量した。各タイムポイントの数値は 0 分の数値によって標準化した (0 分の合成量を 1 とした)。

表 2 菌株とプラスミド

Strain/Plasmid	Relevant Genotype	Origin/construction
<i>Bacterial Strains</i>		
MG1655 (CAG45113)	<i>Escherichia coli</i> K-12 (MG1655) <i>rph</i> -1	(Guyer et al. 1981; Jensen 1993) <i>E. coli</i> Genetic Stock Center
CAG39145	MG1655 $\Delta rpoH::kan$ , pRpoH-His	This work
CAG45146	MG1655 $\Delta lacX74$ [ $\Phi\lambda$ <i>hipGP1::lacZ</i> ]	This work
CAG50001	CAG45146, pTrc99A	This work
CAG50002	CAG45146, pTG2	This work
CAG50003	CAG45146 [ $\Delta rpoH::kan$ ], pKV1561	CAG45146 + P1/CAG39154
MC1061	<i>E. coli</i> K-12 <i>araD</i> $\Delta(ara-leu)$ 7697 $\Delta(codB-lacI)$ <i>galK16 galE15 mcrA0</i> <i>relA1 rpsL150 spoT1 mcrB9999 hsdR2</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center (Casadaban et al. 1980)
CAG 22216	MC1061 $\Delta lacX74$ [ $\Phi\lambda$ <i>rpoH P3::lacZ</i> ] <i>rpoE::<math>\Omega</math>Cm</i>	(De Las Penas et al. 1997)
CAG45114 (CAG25196)	MG1655 $\Delta lacX74$ [ $\Phi\lambda$ <i>rpoH P3::lacZ</i> ]	(Rhodius et al. 2006)
CAG58200 (CAG25197)	CAG45114 pLC245	(Rhodius et al. 2006)
CAG55761	CAG58200 pUA66	This work
CAG55661	CAG22216 pUA66	This work
CAG55861	CAG45113, pUA66	This work
CAG55906	CAG45114 $\Delta relA$	This work, P1 $\Delta relA::kan$ (Keio collection; Baba et al. 2006)
CAG55907	CAG55906 $\Delta spoT::cam$	This work, P1 SEA2010 (Costanzo et al. 2008)
CAG 55922	CAG55907 pUA66	This work
$\Delta relA::kan$ (Keio collection)	BW25113 ( <i>E. coli</i> K-12, <i>rrnB3</i> $\Delta lacZ4787$ <i>hsdR514</i> $\Delta(araBAD)$ 567 $\Delta(rhaBAD)$ 568 <i>rph</i> -1) $\Delta relA::kan$	Keio collection (Baba et al. 2006)
SEA2010	MG1655 $\Delta lacX74$ [ $\Phi\lambda$ <i>rpoH P3::lacZ</i> ] $\Delta relA251::kan$ $\Delta spoT207::cam$	(Costanzo et al. 2008)
CAG57101	MG1655 $\Delta lacX74$ , $\Delta rpoH::aadA$ , $P_{BAD\_groESL::cat}$ CmR, SpR	(Koo et al. 2009a)
<i>Plasmids</i>		
ASKA library	A complete set of <i>E. coli</i> K-12 ORF Archive plasmid library: contains every ORF of <i>E. coli</i> K-12 W3110 cloned downstream of the IPTG inducible <i>T5/lac</i> promoter in the vector pCA24N, Cm <sup>R</sup> .	(Kitagawa et al. 2005)
pKV1561	pBR322 ori, Ap <sup>R</sup> . <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>lacUV5p-groESgroEL</i>	(Kanemori et al. 1994)
pQE-8	His-tagged expression vector, Col E1 ori, Ap <sup>R</sup> .	
pRpoH-His	<i>rpoH</i> cloned on a <i>Bam</i> HI- <i>Hin</i> dIII fragment in pQE-8 downstream of the IPTG inducible <i>T5/lac</i> promoter, Ap <sup>R</sup> .	This work
pTG2	<i>rpoH</i> cloned in pTrc99A downstream of the IPTG inducible <i>trc</i> promoter, Ap <sup>R</sup> .	(Liberek et al. 1992)
pUA66	Vector, SC101 ori, KanR GFP reporter plasmid carrying <i>gfpmut2</i>	(Zaslaver et al. 2004)
pUA E1-E60	Long $\sigma^E$ promoter library. Used to measure activity of $\sigma^E$ -dependent long promoter fragments (-65 to +20) cloned in <i>Xho</i> I- <i>Bam</i> HI sites upstream of <i>gfpmut2</i> in pUA66 (60 constructs)	This work
pUA Et1-Et60	Short $\sigma^E$ promoter library. Used to measure activity of $\sigma^E$ -dependent short promoter fragments (-35 to +20) cloned in <i>Xho</i> I- <i>Bam</i> HI sites upstream of <i>gfpmut2</i> in pUA66 (60 constructs)	This work
pTrc99A	Vector, pBR322 ori, ApR. Expression vector containing an IPTG inducible <i>trc</i> promoter	(Rhodius et al. 2006)
pLC245	<i>rpoE</i> cloned in pTrc99A downstream of the IPTG inducible <i>trc</i> promoter, ApR	(Rhodius et al. 2006)
pSAKT32	Expression plasmid of $\sigma^{32}$ ; <i>rpoH</i> cloned under IPTG inducible <i>lac</i> promoter, ApR	(Wang et al. 2003)
pBK131	$\sigma^{32}$ -I54N in pSAKT32, ApR	(Koo et al. 2009a)
pBK163	$\sigma^{32}$ -F104Y, H107W in pBK131, ApR	This work
pUA H1-H50	Long $\sigma^{32}$ promoter library. Used to measure activity of $\sigma^{32}$ -dependent long promoter fragments (-65 to +20) cloned in <i>Xho</i> I- <i>Bam</i> HI sites upstream of <i>gfpmut2</i> in pUA66 (50 constructs)	This work

別表 A  $\sigma^{32}$  プロモーターライブラリー

Plasmid	Relevant Genotype	Origin/construction
pUA H1	$P_{dnaK P1}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H2	$P_{dnaK P2}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H3	$P_{ileS}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H4	$P_{hepA}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H5	$P_{yadF}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H6	$P_{yafD}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H7	$P_{ribE}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H8	$P_{clpP}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H9	$P_{lon}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H10	$P_{hipG P1}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H11	$P_{hipG P2}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H12	$P_{ybeD}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H13	$P_{ybez}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H14	$P_{glnS}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H15	$P_{yceI}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H16	$P_{ycef}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H17	$P_{phoX}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H18	$P_{topA}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H19	$P_{ycaS}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H20	$P_{yexX}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H21	$P_{mlc}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H22	$P_{ydhQ}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H23	$P_{gapA}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H24	$P_{sdaI}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H25	$P_{hipX}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H26	$P_{narP}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H27	$P_{clpB}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H28	$P_{grpE}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H29	$P_{yjfN}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H30	$P_{ygaD}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H31	$P_{ygbF}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H32	$P_{xerD}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H33	$P_{yggV}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H34	$P_{rpoD}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H35	$P_{fhsJ}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H36	$P_{yhdN}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H37	$P_{prfC}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H38	$P_{mutM}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H39	$P_{ibpA}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H40	$P_{hslV}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H41	$P_{yjfG}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H42	$P_{yghH}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H43	$P_{fhsA}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H44	$P_{groES}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H45	$P_{mutL}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H46	$P_{miaA}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H47	$P_{hfq}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H48	$P_{holC}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H49	$P_{creA}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)
pUA H50	$P_{rrnB P1}$ (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Nonaka et al. 2006)

別表 B  $\sigma^E$  プロモーターライブラリー (Long)

Plasmid	Relevant Genotype	Origin/construction
pUA E1	<i>P<sub>degB</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E2	<i>P<sub>yaeI</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E3	<i>P<sub>zbnA</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E4	<i>P<sub>zlpX</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E5	<i>P<sub>ybfG</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E6	<i>P<sub>ompX</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E7	<i>P<sub>mdoG</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E8	<i>P<sub>pp</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E9	<i>P<sub>yaeI</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E10	<i>P<sub>sixA</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E11	<i>P<sub>tdg</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E12	<i>P<sub>yfck</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E13	<i>P<sub>yfcl</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E14	<i>P<sub>yfgC</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E15	<i>P<sub>yfgL</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E16	<i>P<sub>rpoE</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E17	<i>P<sub>rxaA</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E18	<i>P<sub>yfjO</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E19	<i>P<sub>dsbC</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E20	<i>P<sub>yggN</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E21	<i>P<sub>yglM</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E22	<i>P<sub>nacI</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E23	<i>P<sub>yraf</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E24	<i>P<sub>grxA</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E25	<i>P<sub>yhbG</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E26	<i>P<sub>yhpA</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E27	<i>P<sub>matQ</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E28	<i>P<sub>rpoH</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E29	<i>P<sub>yhjl</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E30	<i>P<sub>yieE</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E31	<i>P<sub>plsB</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E32	<i>P<sub>yixZ</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E33	<i>P<sub>ybab</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E34	<i>P<sub>ybcK</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E35	<i>P<sub>yecC</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E36	<i>P<sub>narW</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E37	<i>P<sub>ydhI</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E38	<i>P<sub>hr</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E39	<i>P<sub>wzb wzc</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E40	<i>P<sub>ompA</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E41	<i>P<sub>yfjO</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E42	<i>P<sub>gypA</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E43	<i>P<sub>yxA</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E44	<i>P<sub>yiak</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E45	<i>P<sub>yicL</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E46	<i>P<sub>yiiS</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E47	<i>P<sub>psd</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E48	<i>P<sub>ahpF</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E49	<i>P<sub>yhw</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E50	<i>P<sub>yecI</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E51	<i>P<sub>rybB</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E52	<i>P<sub>c0428</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E53	<i>P<sub>AtF(c0919)</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E54	<i>P<sub>c4860</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E55	<i>P<sub>STM0019</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E56	<i>P<sub>STM0084</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E57	<i>P<sub>yecR(STM1072)</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E58	<i>P<sub>STM1676</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E59	<i>P<sub>yehI(STM1782)</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA E60	<i>P<sub>micaA</sub></i> (-65 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)

別表 C  $\sigma^E$  プロモーターライブラリー (Short)

Plasmid	Relevant Genotype	Origin/construction
pUA Et1	<i>P<sub>degB</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et2	<i>P<sub>yaeI</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et3	<i>P<sub>abnA</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et4	<i>P<sub>dhx</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et5	<i>P<sub>ybgG</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et6	<i>P<sub>ampX</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et7	<i>P<sub>mdoG</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et8	<i>P<sub>ipp</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et9	<i>P<sub>yaeY</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et10	<i>P<sub>saxA</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et11	<i>P<sub>tdg</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et12	<i>P<sub>yfck</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et13	<i>P<sub>yfex</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et14	<i>P<sub>yfgC</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et15	<i>P<sub>yfgL</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et16	<i>P<sub>rpoE</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et17	<i>P<sub>rseA</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et18	<i>P<sub>yfiO</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et19	<i>P<sub>dsbC</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et20	<i>P<sub>yggN</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et21	<i>P<sub>yglM</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et22	<i>P<sub>nacA</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et23	<i>P<sub>yraf</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et24	<i>P<sub>gret</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et25	<i>P<sub>yhbG</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et26	<i>P<sub>yhpA</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et27	<i>P<sub>malQ</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et28	<i>P<sub>rpoH</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et29	<i>P<sub>yshJ</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et30	<i>P<sub>yieE</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et31	<i>P<sub>yisB</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et32	<i>P<sub>yisZ</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et33	<i>P<sub>ybab</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et34	<i>P<sub>ybcK</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et35	<i>P<sub>yecC</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et36	<i>P<sub>narW</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et37	<i>P<sub>yshI</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et38	<i>P<sub>hir</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et39	<i>P<sub>wzb wzc</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et40	<i>P<sub>ympA</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et41	<i>P<sub>yjiO</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et42	<i>P<sub>gspA</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et43	<i>P<sub>yisA</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et44	<i>P<sub>yiaK</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et45	<i>P<sub>yicL</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et46	<i>P<sub>yisS</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et47	<i>P<sub>psd</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et48	<i>P<sub>ahpF</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et49	<i>P<sub>yjw</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et50	<i>P<sub>yecL</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et51	<i>P<sub>yrbB</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et52	<i>P<sub>0428</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et53	<i>P<sub>siE(c0919)</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et54	<i>P<sub>es860</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et55	<i>P<sub>STM0019</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et56	<i>P<sub>STM0084</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et57	<i>P<sub>yecR(STM1072)</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et58	<i>P<sub>STM1676</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et59	<i>P<sub>yehH(STM1782)</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)
pUA Et60	<i>P<sub>mecA</sub></i> (-35 to +20) in pUA66, Km <sup>R</sup>	This study, (Rhodius et al. 2006)

#### タイムコースでの *microarray* 実験 (サンプル調製)

一晚培養したフレッシュな菌体 CAG50002 (IPTG での誘導が可能な *rpoH* を保有) もしくは CAG50001 (ベクターコントロール) を 500-mL コニカルフラスコに 100 mL 張り込んだ M9 complete に OD<sub>450</sub>=0.02 となるように植えつけ、ウォーターバス・シェーカー (model G76, New Brunswick Scientific) により 240 rpm、30°C で好氣的に培養した。OD<sub>450</sub>=0.3 において IPTG (最終濃度 1 mM) を添加し、*rpoH* を誘導した。誘導直前 (0 分) と直後 2.5 分、5 分、10 分、20 分にて各 10 mL のサンプルを取得し、直ちに氷冷した 5%水飽和フェノールのエタノール溶液と混合、6600 g にて遠心分離を行い、菌体を調製した。菌体を液体窒素によって直ちに冷凍し、-80°Cにて保管した。プローブの調製 (mRNA の調製、cDNA の調製、Cy3/Cy5 によるラベル等) は全て Rhodius et al. (2006) に記載の方法に従った。簡単にその手順を記す。まずホットフェノール法にて total RNA を調製 (16 µg)、そして random hexmer (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA) をプライマーとした逆転写により cDNA を調製した。この際 dNTP mix と aa-dUTP (amino-allyl dUTP) を用いることで cDNA に aa-dUTP を導入、ここへ Cy3 と Cy5 をそれぞれカップリングさせることで標識した。

#### DNA *microarray* の手順 (ハイブリダイズ、画像データ取得)

DNA *microarray* の手順は全て Rhodius et al. (2006) に記載の方法 (一般的なガラススライドの前処理とハイブリダイズ、洗浄の手法を採用) に従った。*E.coli* MC4100 株の ORF (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL3500>) が貼り付けられたガラススライドの cDNA *microarray* を使用し、2 蛍光 (Cy3/Cy5) を用いたハイブリダイズにより mRNA の相対比較をした。ハイブリダイズ後のガラススライドのイメージをスキャナーで取り込み、取り込んだ TIFF の画像を GENEPIX3.0 ソフトウェア (Axon Instruments Inc., CA, USA) により解析した。

#### DNA *microarray* データの解析

発現データの標準化補正 (normalize) は、両サンプルのはじめの mRNA 量が等しいという仮定 (Rhodius et al. 2002) に基づき、Rhodius et al. (2006) に記載の方法に従って行った。はじめに、dye に依存するバイアスの補正のために、MA-plot を利用し lowess smoothing (Tseng et al. 2001; Yang et al. 2002) を行った。*microarray* の生データ及び標準化補正されたデータが NCBI GEO ウェブサイト (<http://www.ncbi.nih.gov/geo/>) に accession code GSE4321 で登録されている。

有意に発現変動した遺伝子を抽出するために統計解析ソフト“Significance Analysis of Microarrays” (SAM v1.2) (Tusher et al. 2001) を使用した。SAM による解析のために、4 つの独立した 10 分のタイムポイントの発現データを使用した。4 つのうちの 3 つはそれぞれ独立したタイムコースデータ、1 つは 10 分 1 点でのタイムポイントデータである。有

意に発現変動した遺伝子の選別には厳しい cut-off の条件を採用 (FDR at the median percentile=0.39%)、これにより合計 111 個の遺伝子が抽出された。IPTG によって直接誘導されたと考えられる 4 遺伝子 (*lacZYA*, *rpoH*) と典型的なタイムコースでの応答パターンと明らかに異なる挙動を示した 2 遺伝子 (*leuD*, *livJ*) の 6 遺伝子を除いた合計 105 個の遺伝子が有意に誘導された遺伝子として最終的に残った。

クラスター解析を行うため、105 個の有意に誘導された遺伝子の 4 つの独立した  $\log_2(\text{R/G})$  発現比の値を各タイムポイントごとに平均し、平均値からなる一つのタイムコースのデータに変換した。Hierarchical clustering を行うにあたりソフトウェア Cluster と Tree View (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>; Eisen et al. 1998) を使用した。Self-organizing map (SOM) を行うにあたりソフトウェア GeneCluster2.0 (Golub et al. 1999) を使用した。時間的な特徴 (素早いレスポンスと遅いレスポンス) による分類を行う際には  $\log_2(\text{R/G})$  発現比の値をそろえるため、タイムコースを通じて平均 0、分散 1 となるよう標準化 (normalize) した。量的な特徴 (強いレスポンスと弱いレスポンス) による分類を行う際には  $\log_2(\text{R/G})$  発現比の値の生データを使用した。

プロモーター予測には、MEME (Bailey et al. 2006) と BioProspector (Liu et al. 2001) を使用、各 TU の先頭の ORF 上流 300 nt を検索にかけた。両方のプログラムによって共通してモチーフが検出されたものをプロモーター候補とした。

### 5'RACE PCR

$\sigma^{32}$  特異的な転写産物の 5'末端のマッピングには 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends (Frohman 1994)) の手法を利用した。Rhodius et al. (2006) に記載の方法に従い、*rpoH<sup>+</sup>* (CAG50002) と *rpoH<sup>-</sup>* (CAG50003) からの mRNA を比較した。以下簡単に手順を記す (図 10A 参照)。*rpoH<sup>+</sup>* (CAG50002) と *rpoH<sup>-</sup>* (CAG50003) の両株を M9 complete 培地にて 30°C で培養、OD<sub>450</sub>=0.3 にて集菌し total RNA を調製した。CAG50002 は集菌する 10 分前に IPTG による *rpoH* の誘導を行った。CAG50003 は *lacUV5* プロモーターから GroESL を誘導発現させるため培養開始時点から IPTG の添加を行った (*rpoH<sup>-</sup>* 株を 30°C で培養する際には GroESL の誘導発現が必要である)。14  $\mu\text{g}$  の total RNA を用い、5 U Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP; Epicentre Technologies) による反応で 5'末端の  $\gamma$  と  $\beta$  の脱リン酸化を行った。TAP 処理した RNA の 5'末端に 100 pmol の RNA oligo (5'-GAGGACUCGAGCUCAAGC-3'; MWG Biotech) を 5 U T4 RNA Ligase (Epicentre Technologies) を用いて付加させた。oligo RNA が付加された RNA を鋳型とし、サンプルとなる各プロモーターに特異的なプライマー (GSP1; ORF 内部からプロモーターの方に向かうプライマー) を用い、200 U SuperScript II RT (Invitrogen) によって逆転写を行い cDNA の調製を行った。そして、更にこの cDNA をテンプレートに、各プロモーターに特異的な別のプライマー (GPS2; ORF 内部からプロモーターの方に向かうプライマーであり、かつ、GPS1 よりもプロモーター近くに位置する) と RNA oligo に特異的なプライマーによって

PCR 産物を得た。この PCR 産物を 7.5% PAGE によって分離し、*rpoH<sup>+</sup>*株と *rpoH<sup>-</sup>*株の比較から *rpoH<sup>+</sup>*株に特異的なバンド（すなわち $\sigma^{32}$ 特異的な転写産物由来の DNA 断片）を検出した。*rpoH<sup>+</sup>*株に特異的な DNA 断片をゲルから精製し、GPS2 を用いたシーケンシングにより転写開始点の特定を行った（RNA oligo との繋ぎ目が+1 となる）。

### *In vitro* 転写実験

本研究によって予測されたプロモーターと過去に報告された $\sigma^{32}$ プロモーターに対して、PCR によって調製された鋳型を用いた multi-round *in vitro* 転写解析を実施した。転写開始点の正確にマッピングを行うために、転写産物 RNA の逆転写によって作られた cDNA を、サイズマーカーとしてのシーケンシング反応 DNA 産物と並べて電気泳動に供した。RNAP コア酵素と His<sub>6</sub>- $\sigma^{70}$  の精製は Sharp et al. (1999) に記載の方法で、His<sub>6</sub>- $\sigma^{32}$  の精製は Gamer et al. 1996 に記載の方法で行った。ホロ酵素の再構成は、5  $\mu$ l の反応にて 1 mM コア RNAP と 1 mM  $\sigma^{32}$  もしくは $\sigma^{70}$  を protein dilution buffer (20 mM HEPES pH 7.9, 300 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 10% glycerol, 12  $\mu$ g/mL BSA, 0.1% Tween) の中で混合し、氷上で 10 分間保温した。等量の transcription mix (20 mM HEPES pH 7.9, 300 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 100 nM DNA template, 4 mM ATP, 2 mM GTP, 2 mM UTP, 2 mM CTP) を添加することで転写を開始し、10 分間 30°C にてインキュベートした後 5  $\mu$ l 25 mM EDTA を加えることで反応を停止した。反応産物をフェノール/クロロホルムによる抽出とエタノール沈殿の後に 8  $\mu$ l の H<sub>2</sub>O に懸濁した。転写産物 RNA を鋳型に、逆転写による放射標識を行った。この際~100 nt 下流に設計されたプライマー（鋳型 DNA を作る時に用いたものと同じ下流のプライマー）を用いた。アニーリングのためプライマーをあらかじめ 70°C で 10 分間保温したあと氷上に移した。逆転写反応の組成は以下の通りである。15  $\mu$ l の反応系に、8  $\mu$ l 鋳型 RNA, 10  $\mu$ M プライマー, 1x StrataScript RT Buffer, 50 U StrataScript RNase H-RT (Stratagene), 200  $\mu$ M dCTP/dGTP/dTTP, 10  $\mu$ M dATP, 6  $\mu$ Ci[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (3000 Ci/mmol), 8 U RNA Inhibitor (Boehringer Mannheim) を添加した。反応は室温 10 分、42°C 1 時間 50 分の保温の後、9  $\mu$ l stop solution (95%脱イオンホルムアミド, 25 mM EDTA, 0.05% (w/v) bromophenol blue, 0.05% (w/v) xylene cyanol FF) の添加によって停止した。cDNA 産物は 90°C 2 分間熱変性をかけた後で、その 8  $\mu$ l を 6%変性ポリアクリルアミド・シーケンシング・ゲルでの電気泳動に供した。正確な転写産物のサイズを検出するため、DNA シーケンシング反応によるサイズマーカーを同時に電気泳動に供した。画像処理には Molecular Dynamics Storm 560 PhosphorImager Scanning system を用いた。

マッピングにより決定された転写開始点上流からの $\sigma^{32}$ プロモーターエレメントの同定

WCONSENSUS (Hertz and Stormo 1999) を用い、Rhodius et al. (2006) に記載の方法により、保存された $\sigma^{32}$ プロモーターエレメントの同定を行った。-10、-35 コアモチー

フの検索のために WCONSENSUS の設定を“second cycle”（全ての配列から 1 つのモチーフを拾い上げる設定）とした。コアモチーフ検索の最適なマトリクスを選択するため、シーケンスのウインドウ幅の設定を以下に示すように行った。-10 モチーフの検索は、転写開始点を基準に配列を整列させ、-5~-20 のウインドウを検索した。-35 モチーフの検索は、-10 モチーフを基準に配列を整列させ、-10 から 9 nt 上流から 20 nt のウインドウを検索した。上流 A/T-rich モチーフの検索のために WCONSENSUS の設定を“first cycle”（全ての配列から必ず 1 つのモチーフを拾うのではなく、モチーフが見つかった場合にのみモチーフとして拾い上げる設定）とした。A/T-rich モチーフの検索には、-35 モチーフを基準に配列を整列させ（-35 モチーフの“T”を-35 座位と定義）、以下に示すウインドウを検索した。proximal motif : -36~-51、distal motif : -46~-60、complete motif : 36~-60。

### GFP アッセイ用菌株の構築

全ての菌株は *E. coli* K-12 株 MG1655 もしくは MC1061 に由来する。 $\sigma^E$  プロモーターのアッセイに用いた全ての菌株は CAG22216 ( $\Delta rpoE$  株)、CAG45113 (対照株)、CAG55907 (ppGpp<sup>0</sup> 株)、CAG58200 (*rpoE* 過剰発現株) からの派生菌株であり、「長い」及び「短い」 $\sigma^E$  プロモーターを連結した GFP (green fluorescent protein) 発現ベクター pUA66 を保持している。各 $\sigma^E$  プロモータープラスミドを保持する菌株を LB 培地で 96well プレートにて培養し、グリセロールストックとして保存した。 $\sigma^E$  欠損株および“basal level” $\sigma^E$  株のアッセイには CAG22216 (MC1061  $\Delta lacX74$  [ $\Phi\lambda rpoHP3::lacZ$ ] *rpoE::\Omega Cm*) および CAG45113 (MG1655) を用いた。 $\sigma^E$  過剰発現株のアッセイには CAG58200 (MG1655  $\Delta lacX74$  [ $\Phi\lambda rpoHP3::lacZ$ ]) に pLC245 を保持させた菌株を使用した。pLC245 には IPTG による誘導が可能である *trc* プロモーターに *rpoE* が連結されている。“basal level” $\sigma^E$  における ppGpp<sup>0</sup> 株のアッセイには CAG55907 (Mg1655 *lacX74* [ $\Phi\lambda rpoHP3::lacZ$ ]  $\Delta relA$   $\Delta spoT::cam$ ) を用いた。ppGpp<sup>0</sup> 株である CAG55907 の構築は以下に示す方法で行った。はじめに、Keio Collection (Baba et al. 2006) 由来の $\Delta relA::kan$  遺伝子型を CAG45114 (Mg1655 *lacX74* [ $\Phi\lambda rpoHP3::lacZ$ ]) に形質導入 (transduction) により導入し CAG55906 を構築、pCP20 により *kan* マーカーを除去したあと pCP20 の脱落したクローンを選択した (Datsenko et al. 2000)。次に、同じく形質導入 (transduction) により SEA2010 由来  $\Delta spoT207::cam$  遺伝子型を CAG55906 に導入し CAG55907 を構築した。遺伝子型を PCR によって確認し、また ppGpp<sup>0</sup> の表現型をアミノ酸要求性によって確認した (アミノ酸を欠く M9 最少培地での生育ができない (Xiao et al. 1991))。全てのアッセイにおいて、少なくとも 2 つの独立に取得された形質導入株 (transductant) を用いて再現性を確認した。 $\sigma^{32}$  プロモーターのアッセイには、CAG57101 ( $\Delta rpoH$  P<sub>BAD</sub>-*groESL* を持つ) を親株としてここに pBK131 (wt $\sigma^{32}$  発現プラスミド) もしくは pBK163 (YW $\sigma^{32}$  発現プラスミド) を導入した株を使用した。

### プロモーター・ライブラリー・プラスミドの構築

全ての $\sigma^E$ プロモーターと $\sigma^{32}$ プロモーターの構築は、*gfpmut2* レポーター遺伝子 (Cormack et al. 1996) からの GFP 発現をドライブする低コピーベクター pUA66 (Zaslaver et al. 2004) において行った。「長い」 $\sigma^E$ プロモーターライブラリー (プラスミド pUA E1~E60) は、*E. coli* K-12 MG1655、*E. coli* CFT073、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium LT2 のゲノム DNA より PCR によって調製された-65~+20 (転写開始点を基準に) を含む断片から成り立っている。各順方向プライマーには *XhoI* サイトが、逆方向プライマーには *BamHI* サイトがあらかじめ組み込まれており、これらプライマーによる PCR 産物を pUA66 の *XhoI*-*BamHI* にクローニングし、そしてシーケンシングにより配列の確認を行った。「短い」 $\sigma^E$ プロモーターライブラリー (プラスミド pUA Et1~Et60) は、-35 モチーフ~+20 (転写開始点を基準に) を含む断片から成り立っている。同じくあらかじめプライマーに組み込まれた *XhoI* と *BamHI* サイトを利用して pUA66 の *XhoI*-*BamHI* にクローニングし、そしてシーケンシングにより配列の確認を行った。 $\sigma^{32}$ プロモーターライブラリー (プラスミド pUA H1~H50) は、*E. coli* K-12 MG1655 のゲノム DNA より PCR によって調製された-65~+20 (転写開始点を基準に) を含む断片から成り立っている。各順方向プライマーには *XhoI* サイトが、逆方向プライマーには *BamHI* サイトがあらかじめ組み込まれており、これらプライマーによる PCR 産物を pUA66 の *XhoI*-*BamHI* にクローニングし、そしてシーケンシングにより配列の確認を行った。 $\sigma^E$ プロモーターの-35 モチーフの同定は、アラインメントされた各プロモーター配列から共通する配列として見いだされるコンセンサス (GGAACCTT) を基準とした (Rhodius et al. 2006)。 $\sigma^{32}$ プロモーターの-35 モチーフの同定は、アラインメントされた各プロモーター配列から共通する配列として見いだされるコンセンサス (TTGAAA) を基準とした (Nonaka et al. 2006)。

なお、プロモーターライブラリーを構成する各プラスミドを別表 A、B、C に記載した。

### *In vivo* プロモーターアッセイ

$\sigma^E$  のプロモーターアッセイは以下述べる方法で行った。アッセイに用いる菌株を deep 96-well プレート (1 mL) を利用し、グリセロールストックとして保存した。金属製の 96 ピンを使用して、96-well のグリセロールストックから 96-well プレートに 150  $\mu$ l 張り込んだ LB 培地に植菌し、前培養を開始した。前培養には 96-well U-bottom tissue culture プレートと通気可能なシーリングフィルム (sterile AeraSeal; E&K Scientific) を利用した。30°C、16 時間、振盪条件 (850 rpm on Elmi shaker) にて培養を行った。本培養には 150  $\mu$ l のフレッシュな培地を張り込んだ平底の透明な 96-well プレート及び透明なシールを使用、一晚培養した前培養液を 1:200 希釈となるように植菌し multimode microplate reader-incubator-shaker (Varioksan; Thermo Fisher Scientific) にて培養した。 $\sigma^E$  の過剰発現株 (CAG58200 派生株) には *rpoE* の誘導のために 100  $\mu$ M IPTG を添加した。培養

は直径 6 mm の軌道を 480 rpm で回転する条件での攪拌により、8 時間行った。15 分おきに OD の測定 (OD<sub>600</sub>) と蛍光の測定 (relative fluorescence unit [RFU]; 励起 481 nm・発光 507 nm) を行った。全ての実験は 3 回独立に行った。実験ごとの誤差は 5%以下であることが確認された。フラスコによる培養とマイクロプレートによる培養における生育と発現の違いは無視できるレベルであることを確認した。また、マイクロプレート上での場所による違いも無視できるレベルであることを確認した。

$\sigma^{32}$  のプロモーターアッセイは以下述べる方法で行った。プロモーターアッセイのための培養は、形質転換体を直接 LB 培地 (適当な抗生物質を含む) に植菌することによって行った。96-well プレートに 150  $\mu$ l 張り込んだ LB 培地に植菌し、前培養を開始した。前培養には 96-well U-bottom tissue culture プレートと通気可能なシーリングフィルム (sterile AeraSeal; E&K Scientific) を利用した。32°C、一晩、振盪条件 (400 rpm on Elmi shaker) にて培養を行った。本培養には 150  $\mu$ l のフレッシュな培地を張り込んだ平底の透明な 96-well プレート及び透明なシールを使用、一晩培養した前培養液を 1:100 希釈となるように植菌し multimode microplate reader-incubator-shaker (Varioksan; Thermo Fisher Scientific) にて培養した。培養時に *rpoH* の誘導のため 100  $\mu$ M IPTG を添加した。培養は直径 6 mm の軌道を 480 rpm で回転する条件での攪拌により、32°Cで行った。30 分おきに OD<sub>600</sub> の測定と蛍光の測定 (relative fluorescence unit [RFU]; 励起 481 nm・発光 507 nm) を行った。全ての実験は 3 回独立に行った。なお、CAG57101 (*rpoH* 欠損株) の培養には、GroESL の発現を誘導するため、全培養行程で 0.1% L-(+)-アラビノースを添加した (Koo et al. 2009a)。

#### プロモーターアッセイのデータ解析

バックグラウンドの蛍光強度を測定するため、プロモーターを含まない pUA66 ベクターを導入した各親株を 3 連で培養し、各タイムポイントでの OD と蛍光強度 (RFU) の平均値を用いた標準曲線 (OD 対 RFU) を作成した。そして各プロモーターを含むプラスミドライブラリーにて測定された同じ OD 値における蛍光値から標準曲線の蛍光値を差し引いた値を用いることで、バックグラウンドの影響を差し引いた OD 対 RFU プロットを作成した。このプロットの傾きを各プロモーターの強度とした。バックグラウンドの蛍光値の傾き (OD 対 RFU) は、OD<sub>600</sub> 値が 0.7~1.4 の場合には -2~-0.8、OD<sub>600</sub> 値が 1.5~2.7 の場合には ~0 であった ( $\sigma^E$  プロモーターの実験時)。

各  $\sigma^E$  プロモーターのプラスミドライブラリーを保有するレポーター株の生育フェーズの分類 (対数増殖期あるいは定常期) を行うにあたり、 $\sigma^E$  活性の生育フェーズによる制御に関する既報 (Costanzo et al. 2008) を参考とした。本実験と既報 (Costanzo et al. 2008) の実験での測定系による OD の違いを補正し両実験データの比較を可能にするため、M9 complete と LB での両測定系 (150  $\mu$ l 培地を張り込んだ 96-well プレートの Varioskan での測定値と通常の分光光度計を用いた 1-mL cuvette での測定値) の測定データの取得を行

った。M9 complete での OD<sub>450</sub> の変換ファクターが 3.8、LB での OD<sub>600</sub> の変換ファクターが 3.4 との実験結果が得られたため、この換算を用いることで既報 (Costanzo et al. 2008) を参考にレポーター株の生育フェーズの分類 (対数増殖期あるいは定常期) を行った。OD 対 RFU プロットを作成し、このプロットの傾きを各プロモーターの強度とした。全ての実験は 3 回独立に行い、平均値を使用した。

σ<sup>32</sup> プロモーターの解析において、*rrnB* P1 プロモーターは非常に強く σ<sup>70</sup> に依存することから解析からは外すこととした。また *xerD* プロモーターは非常に活性が弱いため解析から外すこととした。

Varioskan での予備的なデータ分析にはソフトウェア SkanIT を使用した。その後のデータ分析は Matlab (Mathworks) において自家製のスクリプトを用いて行った。

#### プロモーターモチーフの *information content* の計算

アラインされたプロモーターモチーフの *information content* ( $I_{seq}$ ) の計算は以下の式によって行った。

$$I_{seq} = \sum_i \sum_b f_{b,i} \log_2 \frac{f_{b,i}}{p_b}$$

$i$  はサイトの中の位置 (position) を、 $b$  はそれぞれ可能な塩基を、 $f_{b,i}$  はその位置に各塩基が登場する頻度を、 $p_b$  はゲノム全体での  $b$  塩基が存在する頻度 (*E.coli* では A/G/C/T それぞれが 0.25 であると仮定) を表す (Schneider et al. 1986)。

# 第一章： $\sigma^{32}$ プロモーターと $\sigma^{32}$ レギュロンの網羅的説明

## 1-1 序論

HSR は細胞の温度への適応という全ての生命に共通する重要な環境適応の応答である。*E. coli* では 2 つの alternative  $\sigma$  である $\sigma^{32}$  と $\sigma^E$  が HSR を司っている。 $\sigma^{32}$  はシャペロンやプロテアーゼ等の古くから知られるいわゆる hsp を誘導し、細胞質のタンパク質の恒常性維持を行う重要な役割を担っている。一方で、 $\sigma^E$  は OMP や LPS 等のアセンブリや輸送などを含むペリプラズムと外膜の恒常性維持を担当している。 $\sigma^E$  においてはシステムティックな解析によりレギュロンの大半が解明された (Rhodius et al. 2006) 一方で、 $\sigma^{32}$  については未だ完璧な手法による網羅的な解明には至っていない。また、 $\sigma^{32}$  や $\sigma^E$  による細胞の HSR という観点でも未だ解決されていない領域が存在する。その一つは細胞膜の HSR である。細胞質を $\sigma^{32}$  が、そしてペリプラズムを $\sigma^E$  が感知していることが知られているが、細胞膜のタンパク質の異常を感知し修復する役割については明らかとなっていない。二つ目はタンパク質以外のダメージに対する HSR である。熱によるタンパク質のダメージに対する修復の機構については多数の知見が存在するが、それ以外のもの、例えば DNA や RNA、脂質などへのダメージに対してはどのような対応がなされるのか多くは明らかとなっていない。こうした疑問に答えるためにも、 $\sigma^{32}$  の全レギュロンの解明ということに期待が持たれた。実際、これまでも $\sigma^{32}$  のレギュロンの発見を通じて新たな機能が明らかとなったことが多々ある。例えば Hsp33 は、真核生物から原核生物まで広く保存された hsp であり、還元下で活性化するシャペロンであることが明らかとなった (このタイプのシャペロンとしては初めての発見であった) (Jalob et al. 1999)。また、FtsJ は 23S rRNA を基質とするメチル基転移酵素であることが明らかとなり、これによって HSR と RNA という予想し難かった両者の関係が明らかとなった (Bugl et al. 2000)。

*E. coli* においては、 $\sigma^{32}$  の支配下にある遺伝子を同定するために、これまで幾つかのアプローチが用いられてきた。熱ショック後のタンパク質の 2 次元電気泳動や転写解析のアプローチ (Chuang et al. 1993; Richmond et al. 1999) が行われた。また 2000 年代には DNA microarray 等のグローバルな手法が定着し、解析の幅が広がった。Zhao 等は、DNA microarray により、 $\sigma^{32}$  により誘導される多数の遺伝子を同定している (Zhao et al. 2005)。しかしながら DNA microarray は簡便でかつ網羅的な手法である一方で、この手法のみでは直接的な影響と間接的な 2 次的な影響を区別することが難しい。したがって、時にシステムティックな検証の実験を組み合わせることが必要となる。こうした点を欠いていることは、 $\sigma^{32}$  が直接支配する遺伝子という点で不確定さを含む結果となっていることが否めない。また、Wade 等は、 $\sigma^{32}$  ホロ酵素に結合する DNA 断片を抽出し DNA microarray へのハイブリダイズによって同定する手法 (ChIP-Chip) により、生化学的な網羅的解析を行い多くの候補を提唱した (Wade et al. 2006)。しかしながら、この手法では、“functional”

なプロモーター以外の非特異的な結合を拾い上げるリスクを伴う。実際に実験の手法上の擬陽性の出現頻度の高さを指摘する報告もある (Waldminghaus and Skarstad 2010; Schindler and Waldminghaus 2013)。

本章では、大方の $\sigma^{32}$  支配下の遺伝子を網羅的に解明した成果について述べる。本研究での手法は序章において詳しく述べた $\sigma^E$  の網羅的なプロモーターの解析の手法に倣っている (序章参照; Rhodius et al. 2006)。すなわち、 $\sigma^{32}$  過剰発現直後の DNA microarray を用いた whole-genome expression 解析と、ここから抽出された各遺伝子の転写開始点のマッピング及び in vitro 転写実験による確認という手法を用いた。DNA microarray による網羅性と生化学的な検証実験を組み合わせることで、先に述べたこれまでに行われた $\sigma^{32}$  レギュロン同定の試み (Chuang et al. 1993; Richmond et al. 1999; Zhao et al. 2005; Wade et al. 2006) の問題点の多くを克服できたものと考えられる。また $\sigma^{32}$  を活性化する新たなシグナルとして、膜タンパク質の過剰発現が見出された。このことは $\sigma^{32}$  が細胞質のみならず、細胞膜の恒常性をも感知していることを示唆する結果である。本研究により、新たに多くの $\sigma^{32}$  依存のプロモーターから誘導される遺伝子が明らかとなり、その数はこれまで知られていたものから 3 倍に増加した。そしてこれにより、HSR のターゲットがより広範で複雑な細胞内プロセスそしてタンパク質の保護に及ぶことが明らかとなった。これまで $\sigma^{32}$  は細胞質の恒常性維持に働いていると考えられてきたが、本研究において見つかった新規のレギュロンの中には細胞膜の恒常性維持に関与するものが少なからず見られた。細胞膜に局在する FtsH プロテアーゼがなぜ細胞質に局在する $\sigma^{32}$  の安定性を制御するのか、その機能面での関係性が見えてきた。

## 1-2 結果

### $\sigma^{32}$ プロモーター及び $\sigma^{32}$ レギュロンの同定 (方法論)

本章では、序章に述べた $\sigma^E$ でのケース (Rhodius et al. 2006) を $\sigma^{32}$ に展開することで、 $\sigma^{32}$  プロモーター及び $\sigma^{32}$  レギュロンを網羅的に解明することを目的とした。以下にそのスキームの概要を述べる。まず、 $\sigma^{32}$ によって転写が活性化される遺伝子を網羅的につかむため、DNA microarray を使用し、 $\sigma^{32}$ をコードする *rpoH* 遺伝子を誘導した際に有意に転写が上がる遺伝子を抽出した。次にこれらの遺伝子の中から $\sigma^{32}$ によって直接支配される遺伝子を選別し、そのプロモーターを明らかとするため、プロモーターの解析を行った。そのためにまず、取得された遺伝子を転写ユニット (Transcription unit; TU) に分類した。各 TU の上流 300 nt の配列を用い、コンピュータープログラムにより共通するモチーフを抽出した。このモチーフは既知の $\sigma^{32}$  プロモーターのコンセンサス配列と非常によく類似していた。こうして、既知の $\sigma^{32}$  レギュロンからは既知のプロモーターが正しく抽出され、また新規のレギュロン候補からは候補プロモーターが取得された。そこで、次にコンピューター予測された新規の候補プロモーターを実験によって確認するため、転写産物の 5'末端をマッピングする手法である 5'RACE を用い、各新規のプロモーター候補に対して $\sigma^{32}$  特異的な転写産物の同定と 5'末端のマッピングを行った。同時に、コンピューター予測によるプロモーター候補が得られなかった TU に対しても 5'RACE を行い、 $\sigma^{32}$  プロモーターの有無を検証した。こうして、実験によって確認の取れた新規 $\sigma^{32}$  プロモーターを多数選定した。更に、プロモーター予測があるにもかかわらず 5'RACE での検証に漏れた候補について、別の検証手段として *in vitro* 転写実験を行い、 $\sigma^{32}$  依存の転写産物の検出と転写開始点のマッピングを行った。こうした一連の手法 (DNA microarray を用いたグローバルな手法とコンピューター予測、そして生化学的な実験による検証) を駆使することで、29 個の新規 $\sigma^{32}$  プロモーターを取得することに成功し、既知の $\sigma^{32}$  プロモーターと合わせて合計で 51 個の $\sigma^{32}$  プロモーターを明らかとした。一連の解析で明らかとなったプロモーターの情報を表 3 に、また一連のスキームを図 8 に示した。以下にはその詳細を述べる。

### $\sigma^{32}$ の過剰発現により転写が誘導される遺伝子の網羅的な同定

$\sigma^{32}$ によって制御される遺伝子を網羅的に同定するため、DNA microarray を用いた解析を行った。*rpoH* 欠損株は通常の培養温度 (例えば 30°C、37°C など) での生育が非常に悪いため、*rpoH* +株と *rpoH* 株の発現の違いを比べる手法では生育の影響を排除できない。そこで、欠損株を用いた解析ではなく、誘導発現によるアプローチを採用した。IPTG により誘導される *rpoH* 遺伝子をプラスミド上に持つ菌株 (*trc* プロモーターに連結) と空ベクターを持つ菌株の IPTG 添加後のタイムコースでの発現パターンを比較した。 $\sigma^{32}$  の活性は $\sigma^{32}$  自身のレギュロンである DnaKJ と GroESL によるフィードバック阻害を受けることが知られているため (Gamer et al. 1996; Guisbert et al. 2004)、誘導後に活性が上昇した後には減衰することが予想された。そこで、タイムコースを設定する上で重要な情報となる $\sigma^{32}$

活性のピークを把握するため、 $\sigma^{32}$ の過剰発現後の hsp 合成のキネティクスを調べることにした。ここでは $\sigma^{32}$ の代表的なレギュロンである DnaKJ と GroESL の $\sigma^{32}$ 誘導後の各タイムポイント（0分～60分）での合成量をパルスチェイスによって解析した。その結果、hsp 合成のピークが $\sigma^{32}$ 過剰発現後 10-15 分後にあることがわかった（図 9A）。そこで DNA microarray 実験のためのサンプリングのタイムコースを $\sigma^{32}$ 過剰発現後 0～20 分の区間に設定した。DNA microarray の実験には *E. coli* の全 ORF の約 96% をカバーするガラススライドの cDNA microarray を使用し（データベース Gene Expression Omnibus (GEO) の accession# GPL3500; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL3500> に詳細を掲示）、Cy3 と Cy5 の 2 蛍光による mRNA 量の相対比較を行った。4 つの独立した DNA microarray の実験データを SAM (statistical analysis of microarrays; Tusher et al. 2001) による統計解析にかけ、 $\sigma^{32}$ 過剰発現 10 分後に有意に誘導される 105 個の遺伝子を抽出した。ここでタイムコース中の 10 分後というタイムポイントを採用した理由は、このステップではできるだけレギュロン候補を漏れなく拾い上げておくことが重要と考えたためである。考察のセクションで議論するが、 $\sigma^{32}$ に直接支配される $\sigma^{32}$ レギュロンの誘導は非常に早い傾向（例えば $\sigma^{32}$ 過剰発現後 2.5 分など）が見られたことから、10 分後で抽出される遺伝子の中には $\sigma^{32}$ に間接的に支配されるもの（ $\sigma^{32}$ 誘導に伴う 2 次的な影響などによる）も多く存在すると考えられた。次に得られた 105 遺伝子を Hierarchical clustering の手法によりタイムコースの発現パターンで並べ替え、遺伝子誘導の様子を可視化した（図 9B）。更に SOM (Self-organized maps) により、特徴的な発現パターンを示すサブグループを見出した。時間的な特徴（素早いレスポンスと遅いレスポンス；図 9C）、量的な特徴（強いレスポンスと弱いレスポンス；図 9D）を持つグループを見出した。こうした SOM による発現パターンのグループ分けは、 $\sigma^{32}$ による直接の支配を受ける遺伝子と間接的な支配を受ける遺伝子の選別に非常に有効であることが示唆された（考察のセクションで議論する）。

#### $\sigma^{32}$ 依存プロモーターと $\sigma^{32}$ レギュロンの同定

$\sigma^{32}$ で活性化される 105 遺伝子の中には、 $\sigma^{32}$ に直接支配される遺伝子と間接的に支配される遺伝子（ $\sigma^{32}$ 誘導に伴う 2 次的な影響などによる）が含まれることが予想された。そこで、 $\sigma^{32}$ に直接支配される遺伝子（ $\sigma^{32}$ レギュロン）とそのプロモーター（ $\sigma^{32}$ プロモーター）を同定するため、まず 105 個の有意に誘導された遺伝子を転写ユニット (transcription unit; TU) に落とし込む作業を行った。比較的発現の弱かった遺伝子まで手広く含む TU を見出すため、105 遺伝子とその近傍の遺伝子を対象に、以下の基準に従って DNA microarray による発現データを再度見直した。遺伝子が隣り合っていること、同じ転写方向に位置していること、タイムコースを通して似たような発現のキネティクスを有すること、そして典型的なオペロンの発現パターンを有していること（先頭の遺伝子の発現が最も強く、下流に行くに従い発現強度が弱くなる）。これにより、105 遺伝子に 22 遺伝子を加えた合計

127 個の遺伝子が抽出され、66 個の TU に集約された。この 66 TU の上流 300 bp の配列をそれぞれ取り出して使用し、 $\sigma^{32}$  依存のプロモーターの検索を行った。プロモーター候補の検索には MEME (Multiple EM for Motif Elicitation; Bailey et al. 2006) 及び BipProspector (Liu et al. 2001) を用いた。いずれのプログラムも複数の配列に共通して存在するモチーフを抽出するプログラムである。結果、42 TU 上流から 43 個のプロモーターが予測された。その内訳は、14 個の既知 $\sigma^{32}$ プロモーター (13 個の TU; *htpG* オペロンには 2 つのプロモーターが存在するためプロモーター数が TU 数より 1 つ多い) と 29 個の新規 $\sigma^{32}$ プロモーターの候補 (29 個の $\sigma^{32}$  依存 TU 候補; この時点では生化学的な実験による検証が行われていないため、コンピューターによって予測された「候補」と呼ぶ) であった。全 66 TU のうち 42 TU から予想プロモーターが見出され、25 TU からはプロモーターは見出されなかったということになる。プロモーターが見いだされなかった 25 TU の内訳は、4 つの既知 $\sigma^{32}$  依存の TU (6 個の $\sigma^{32}$ プロモーター; *mutL miaA hfq hflX hflK hflC* オペロンには 3 つのプロモーターが存在するためプロモーター数が TU 数より 2 つ多い) と、21 個の新規 $\sigma^{32}$ レギュロン候補 (プロモーターが予測されなかった) である。6 つの既知 $\sigma^{32}$ プロモーターがコンピューター予測から漏れたが、このうちの 4 つ (*rpoD*, *mutL*, *miaA*, *hfq*) はプロモーターが ORF 上流 300 nt よりも更に上流に存在するためである。ここまでに述べられた TU の数を合計すると 67 個の TU となるが、これは 2 つのプロモーターを持つ *dnaK dnaJ yi81\_1 yi82\_1* オペロンが 2 重に TU として計上されたためであり、TU は全 66 個で変わりはない。

次に生化学的実験によりプロモーターの検証を行った。まずは 5'RACE (Rapid amplification of cDNA ends) の手法による $\sigma^{32}$  依存の転写開始点のマッピングを行った。この手法では、抽出した mRNA の 5'末端に RNA オリゴを付加し、マッピングの対象となる ORF 特異的なプライマーより cDNA を合成、更に RNA オリゴに特異的なプライマーと ORF 特異的なプライマーにより PCR 断片を取得、シーケンシングにより転写開始点を同定することができる (図 10A)。本実験では $\sigma^{32}$  特異的な mRNA を検出するため、 $\sigma^{32}$  を持つ細胞と持たない細胞それぞれから mRNA を調製し、 $\sigma^{32}$  を持つ細胞に特異的な転写産物 (転写開始点) を検出することとした (図 10B)。20 個の既知のプロモーター (14 個のプロモーター予測ありと 6 個のプロモーター予測なし) はいずれも既に DNA microarray で有意な誘導が確認されていることから、これ以上の検証は不要と判断した。5'RACE での検証の対象はそれ以外の全ての TU とした。すなわち 29 個の新規プロモーター候補が見出された TU と 21 個のプロモーターが見出されなかった候補 TU (プロモーターが見つからなかった全 25 TU から既知の 4 TU を差し引いた 21 TU) の合計 50 TU である。5'RACE の実験の結果、29 個のプロモーター候補の中で 18 個が確認され (予想されたプロモーター直下に転写開始点が見つかった)、また 21 個のプロモーター候補が見つからなかった TU からは 4 つの転写開始点が決定された。プロモーター候補が見つかりながらも、5'RACE において $\sigma^{32}$  依存の転写開始点が見出されなかった或いは見出された転写開始点が予想された

プロモーターの位置からずれていたものが 11 例存在した。例えば、*rrnBP1* は $\sigma^{32}$  と $\sigma^{70}$  依存のプロモーターがオーバーラップしていることが知られている (Newlands et al. 1993)。今回 5'RACE において $\sigma^{32}$  特異的な転写開始点として見出されなかったものについては、こいうした $\sigma^{32}$  と $\sigma^{70}$  のオーバーラップであった可能性が考えられた。そこで、これら 11 個の TU について *in vitro* の転写実験によって確認することとした。*in vitro* の転写実験では、まず精製したコア RNAP と $\sigma$  (ここでは $\sigma^{32}$  と $\sigma^{70}$ )、そして対象となるプロモーター DNA (鋳型) を混合し、*in vitro* において転写反応を実施、続いて転写産物を鋳型として放射線標識した dATP を用いた逆転写によって cDNA を合成し、ポリアクリルアミドゲルによって分離検出した。また、放射線標識したそれぞれの dNTP を用いたシーケンシング反応のサンプルを同時に電気泳動に供することで、転写開始点を正確にマッピングした。その結果、5 つの dual- $\sigma^{32}/\sigma^{70}$  依存のプロモーターと 2 つの $\sigma^{32}$  依存のプロモーターが追加された (図 11)。結局、合計で 29 個の新規 $\sigma^{32}$  プロモーターを本研究で見出した (表 3A)。また、過去に $\sigma^{32}$  依存のプロモーターとして提唱されていたが本研究での DNA microarray 実験では有意な誘導が認められなかった 7 つのプロモーターについても *in vitro* の転写実験を行ったが、 $\sigma^{32}$  依存の転写産物は検出されなかった (表 3C)。Zhao et al. (2005) が electrophoretic mobility gel shift により $\sigma^{32}$  との相互作用を提唱した *ldhA*、*macB*、*ybbN* の 3 つのプロモーターについては、今回の 5'RACE と *in vitro* 転写のいずれにおいても“functional”なプロモーターとして見出されなかった (表 3B)。これらに関しては既報で偽陽性の結果を得た可能性あるいは本研究で偽陰性の結果を得た可能性が考えられる。

### $\sigma^{32}$ プロモーターの特徴

29 個の新たに同定された $\sigma^{32}$  依存のプロモーター、20 個の今回確認された既知の $\sigma^{32}$  依存のプロモーター、そして 2 つの今回確認されなかったが (本研究での DNA microarray に遺伝子が載っていなかったため) 過去に実証されている $\sigma^{32}$  依存のプロモーター、これらを合計すると 49 個の TU をドライブする 51 個の $\sigma^{32}$  依存のプロモーターが知られることとなった。本研究では $\sigma^{32}$  プロモーターを大幅に増加させたことから、より多くのそして精度の高いプロモーター配列の情報が得られた。そこで、これらのプロモーター配列をソースに、モチーフの検索ツールである WCONSENSUS (Hertz and Stormo 1999) を使用し、保存された $\sigma^{32}$  プロモーターエレメントの同定を行った。50 個の染色体上のプロモーター (*repE* は F 因子上に存在するためここでは考慮しない) の保存されたプロモーター配列モチーフと配列上の特徴を表現する sequence logo を図 12A に示した。非常に高度に保存された -10 と -35 モチーフが明らかとなった。information content ( $I_{seq}$ ) と呼ばれる配列情報のスコアを計算すると 18.3 bit となり、 $\sigma^{70}$  の 9.2 bit (Shultzaberger et al. 2007) に比べ非常に高いことがわかった。これは、それだけ強いプロモーターの配列傾向 (コンセンサス配列) を持つことを意味する。なお、information content ( $I_{seq}$ ) は以下に示す数式で定義される (Schneider et al. 1986)。

$$I_{seq} = \sum_i \sum_b f_{b,i} \log_2 \frac{f_{b,i}}{p_b}$$

$i$  は対象配列内のポジションを、 $b$  は可能な塩基 (A/G/T/C) を、 $f_{b,i}$  はポジション  $i$ 、塩基  $b$  の観察される頻度を、 $p_b$  はゲノム全体での塩基  $b$  の頻度を (A/G/T/C それぞれ 0.25 と仮定) 示す。

実際には、**information content** を決めていた特徴的な配列は専ら -10 (CCCATWT) と -35 (TTGAAA) のコア配列であり、スペーサーの配列の保存性はきわめて低いことが明らかとなった。図 12B、図 12C には各プロモーターエレメント間の距離の分布を表すヒストグラムを示した。ほとんどのプロモーターは -10 と +1 の間に 7 nt のスペーサーを、-10 と -35 の間に 13-14 nt のスペーサーを持つことがわかった。一方で、5 つのプロモーターは極端に短いスペーサーを持つことがわかった (図 12B)。このうちの 4 つは保存配列からかけ離れた -35 配列を保持していることから、最適なスペーサーを介して -35 近傍で非特異的な結合をしている可能性が考えられる。或いは、これらは共通して A/T-rich なスペーサー配列を持つことから、RNAP との結合の際にプロモーターをねじれさせることで短いスペーサーを介してでも -35 との結合を可能にしているという可能性も考えられる。図 12D にはプロモーターから ORF までの距離の分布を表すヒストグラムを示した。 $\sigma^{32}$  依存プロモーターの多くは翻訳開始点から非常に近い範囲に存在しており (66% の  $\sigma^{32}$  依存プロモーターは翻訳開始点から 100 nt 以内に存在している)、この点は  $\sigma^{70}$  依存プロモーターに類似していることがわかった (Burden et al. 2005)。図 12E には  $\sigma^{32}$  と  $\sigma^{70}$  のコンセンサス配列の比較を示した。-35 は 1 塩基が異なるのみで非常によく類似しており、また -10 についても部分的に非常によく類似していた。実際に本研究で  $\sigma^{32}$  と  $\sigma^{70}$  のプロモーターのオーバーラップがいくつか確認された。プロモーターのコンセンサスの類似性とプロモーターのオーバーラップについては考察のセクションで再び述べる。

次に -35 ~ -60 付近に存在することが知られる UP エレメントの探索を行った。UP エレメントは A/T-rich モチーフからなるプロモーターエレメントであり、RNAP の  $\alpha$ -C 末端ドメイン ( $\alpha$ CTDs) と結合することで転写を調節する機能を持つ (Ross et al. 1993; Esterm et al. 1998)。-35 に近い領域 (“Proximal” と呼ぶ; -36 ~ -51)、遠い領域 (“Distal” と呼ぶ; -46 ~ -60)、全体を含む領域 (“Complete” と呼ぶ; -36 ~ -60) の 3 つの領域においてモチーフの探索を行った (探索には WCONSENSUS を使用) (図 13)。その結果、約 40% の  $\sigma^{32}$  プロモーターがこれらの UP エレメントのモチーフを持ち、このうちの約半数が “Distal”モチーフのみを持つ、そして残りの半数が “Complete” もしくは “Complete”、 “Proximal”、 “Distal” の組み合わせを持つことが明らかとなった (図 14)。実際、*rrnB* P1 プロモーターの上流領域には 3 つのモチーフが全て存在し、 $\sigma^{32}$  依存での転写開始に寄与していることが示されている (Newlands et al. 1993)。興味深いことに、 $\sigma^{70}$  プロモーターでは “Proximal”

のみを持つことは一般的に見られることであるが、一方で $\sigma^{32}$  プロモーター (図 14) と $\sigma^S$  プロモーターでは (Typas and Hengge 2005) “Proximal”のみを持つケースは存在しない。おそらく、 $\alpha$ CTDs と相互作用をすることで“Proximal”に依存する転写を促進する $\sigma^{70}$  分子上の残基が、 $\sigma^S$ においては保存されておらず (Typas and Hengge 2005)、また $\sigma^{32}$ においては非常に僅かにしか保存されていないためであろうと想像される。

#### $\sigma^{32}$ レギュロンメンバーの局在と機能の分類

次に確証のとれた一連の $\sigma^{32}$  レギュロンメンバーに対して、局在と機能による分類を行った (表 4A, B)。本研究では相当数の $\sigma^{32}$  レギュロンが新たに見出されたため、これらの局在や機能を見ることで、 $\sigma^{32}$ のこれまで知られていなかった新たな機能や役割が浮かび上がってくるのが期待された。まず、局在に関する重要な所見として、有意な数のレギュロンメンバーが細胞膜に局在するタンパク質をコードすること (~25%) が明らかとなった。このことから、 $\sigma^{32}$ による応答の役割の一つがストレス時の細胞膜のモニターと恒常性維持にある可能性が示唆された。これまで、 $\sigma^{32}$ が細胞質、そして $\sigma^E$ がペリプラズムの恒常性維持を担っていることが明らかとなっていたが、細胞膜 (内膜) の担当がブラックボックスであった。本研究で相当数の膜タンパク質が $\sigma^{32}$ がによって支配されており、かつこれらの膜タンパク質の機能の多くが内膜の恒常性維持と関連し得ることが明らかとなったということは、 $\sigma^{32}$ が内膜の恒常性維持の重要な役割を担っているということの傍証と言える。

また、これまで専らシャペロンやプロテアーゼが代表的なレギュロンメンバーとして知られていたが、本研究による網羅的なレギュロン全体像の解明により $\sigma^{32}$ の新たな一面が浮かび上がった。 $\sigma^{32}$ レギュロンメンバーの中には細胞内 DNA の安定保持や修復に関わるものが散見されることから、DNA の制御との関わりが考えられた。また、レギュロンメンバーの中には tRNA や rRNA の産生やプロセッシングに関するものが散見されることから、RNA や翻訳機能の恒常性維持への役割が考えられた。中央代謝や物質の膜輸送とも密接な関連がみとめられた。 $\sigma^{32}$ はマスターレギュレーターであり、他の転写調節因子の発現制御や転写装置そのものの制御にも関与することが明らかとなった。このように、 $\sigma^{32}$ による HSR は、これまで知られていたダメージを受けた細胞質のタンパク質の保全という役割だけではなく、熱によるストレスに対するより全般的な細胞質の恒常性維持や細胞膜の恒常性維持の重要な役割を担っていることが強く示唆された。 $\sigma^{32}$ の新たな機能の側面については考察のセクションで更に詳しく述べる。

#### 外来タンパク質の発現による $\sigma^{32}$ 依存 HSR の誘導

ここまでの解析により、 $\sigma^{32}$ による内膜の恒常性維持への役割が示唆されてきた。そこで、 $\sigma^{32}$ が内膜のセンサーとしての機能を有しているかについて更なる解析を行うこととした。感知しているシグナルが何であるかを探る上で、タンパク質の過剰発現による応答をグローバルに解析する手法は有効である。例えば、ポーリンの過剰発現は $\sigma^E$ によるペリプラズ

ムのストレス応答を誘導することが知られており (Mecsas et al. 1993)、更にその後の研究によりアセンブルが正常に行われなかったポーリンの蓄積によって $\sigma^E$  誘導へのシグナル伝達を開始されることが明らかとなった (Walsh et al. 2003)。そこで、*E. coli* K-12 株の全 ORF が各々のプラスミド上に IPTG による誘導が可能なコンストラクトとして搭載されている ASKA ライブラリー (Kitagawa et al. 2005) を用いて、 $\sigma^{32}$  による HSR の誘導因子を網羅的に探索することとした。ASKA ライブラリーの全プラスミドをプールし、そして  $\sigma^{32}$  依存であることが知られる *htpG* プロモーターに *lacZ* を連結したレポーターを保持する菌株に同プラスミドプールを導入し、平均的な  $\sigma^{32}$  活性よりも高い活性を示すクローンを triphenyltetrazolium lactose 指示薬を含むプレートから拾い上げた (白コロニー; ラクトースの資化能を指標とした)。更に候補クローンを MacConkey lactose プレート (赤コロニー) 及び Xgal + IPTG プレート (青コロニー) にて確認した。27 個の候補クローンを取得し、シークエンシングにより HSR の誘導に関与した ORF を同定した (表 5)。27 個の候補クローンは重複を除くと 25 個の ORF に集約された。その結果、 $\sigma^{32}$  を活性化させた因子の ~60% が膜タンパク質をコードしていることが明らかとなった。*E. coli* の全タンパク質の 20% が膜タンパク質である (Serres et al. 2004) ことから考えると、60% という数字は有意に膜タンパク質に偏っていることを示している。これは、 $\sigma^{32}$  による内膜の恒常性維持と内膜の状態のセンスという役割に関して、その可能性を支持する結果と言える。 $\sigma^{32}$  分子の多くが SRP 依存で内膜に運ばれ (Lim et al. 2013)、そして内膜のプロテアーゼである FtsH によって制御される (分解される) (Herman et al. 1995; Tomoyasu et al. 1995; Tatsuta et al. 1998) ことを考慮すると、こうした  $\sigma^{32}$  と内膜の恒常性維持との関連は非常に理にかなった機構である。一方で、全ての膜タンパク質が HSR を誘導するわけではない (例えば LacY は  $\sigma^{32}$  を誘導しなかった)。

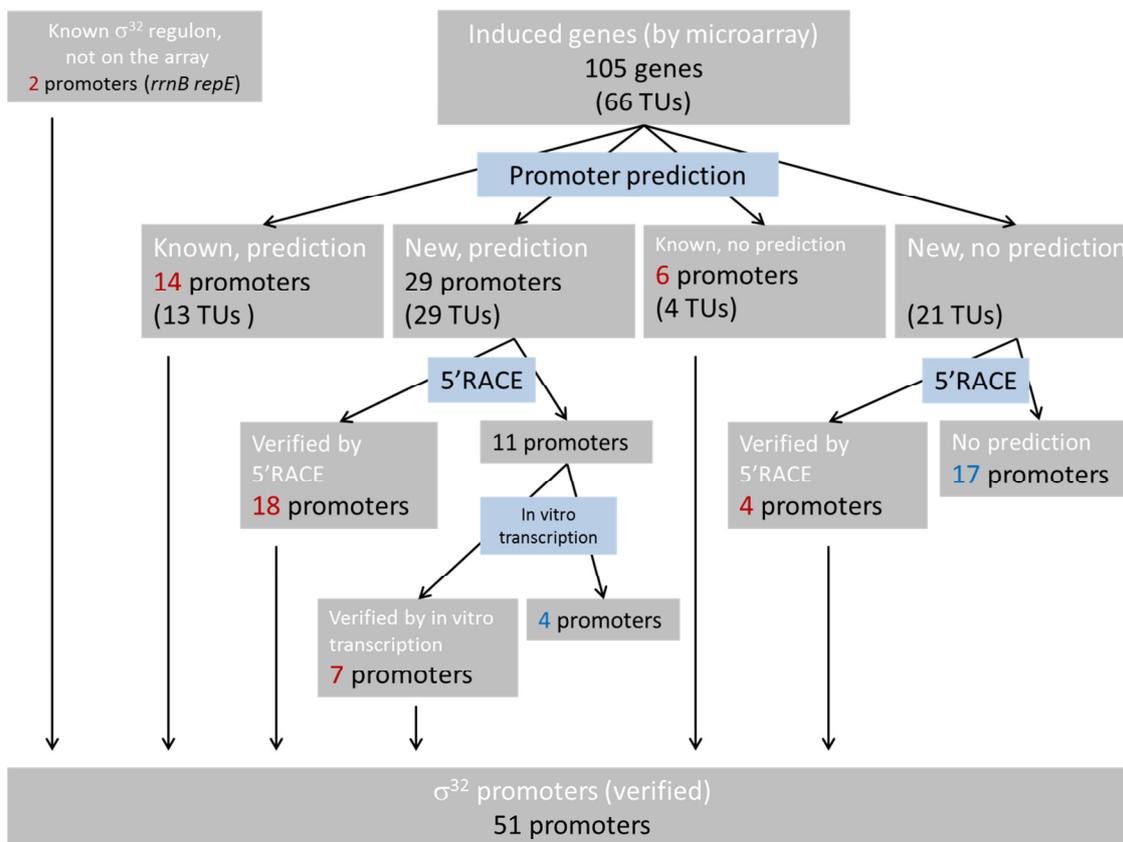


図8  $\sigma^{32}$  プロモーター解析のスキーム

$\sigma^{32}$  プロモーター解析のスキームと各解析の過程で検証されたプロモーターの数を示した。赤字は本研究において検証済みと認定された $\sigma^{32}$ のプロモーターの数を、青字は本研究において確認できずと認定された $\sigma^{32}$ のプロモーターの数をそれぞれ表す。DNA microarray において $\sigma^{32}$ の過剰発現で有意に誘導された105個の遺伝子は66個のTU (Transcription Units) に分類され、最終的には既知の $\sigma^{32}$ プロモーターを含む合計51個の $\sigma^{32}$ プロモーターが見出された。“Known”は既知の $\sigma^{32}$ プロモーターを、“New”は新規の $\sigma^{32}$ プロモーター(候補)を表す。なお、図中の「14 promoters (13 TUs)」の表記は、*htpG*プロモーターが2つのプロモーターを持つためTUの数よりもpromoterの数が1つ多くなることによる。「6 promoters (4 TUs)」の表記は、*mutL miaA hfq hflX hflK hfl* オペロンにプロモーターが3つ含まれるためTUの数よりもpromoterの数が2つ多くなることによる。13TUs、29TUs、4TUs、21TUsの合計が67となり、66TUsよりも1多くなることは、*dnaK*の2つのプロモーターが重複してカウントされているためである。

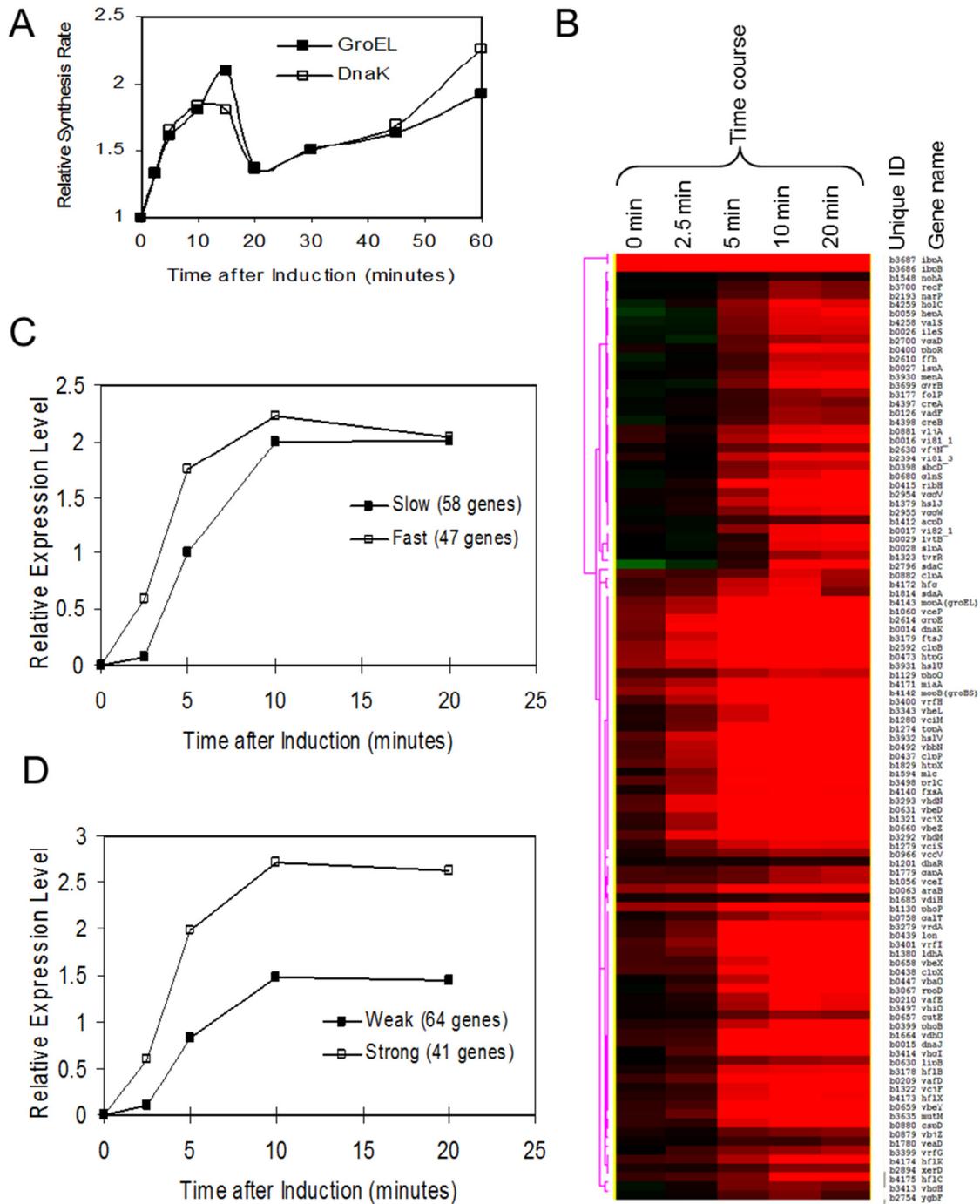


図9 *rpoH* 過剰発現後の $\sigma^{32}$  レギュロンの発現プロファイル

(A) *rpoH* 過剰発現後の $\sigma^{32}$  の活性。IPTG による *rpoH* 誘導後の各タイムポイントでの DnaK、GroEL の合成速度をパルスチェイスにより解析した。対数増殖期の CAG50002 株 (IPTG 誘導可能な *rpoH* 遺伝子を持つ) の 30°C、M9 complete (w/o L-Met) 培地での培養液に、OD<sub>450</sub>=0.3 (t=0) で IPTG を添加し *rpoH* を誘導した。(次頁に続く)

図 9 (前頁からの続き)

データは0分での合成速度で標準化した(0分での合成速度を1とした)。(B) *rpoH*過剰発現株(CAG50002)と野生株(CAG50001)の比較において抽出された105個の遺伝子(*rpoH*過剰発現後に有意に発現が変化した遺伝子)のHierarchical clustering。各タイムポイントでの3つの独立した実験データからの平均値を用いて色付けを行った。ただし、10分のデータは4つの独立した実験データの平均値からなる。CAG50002対CAG50001において、赤色はCAG50002でmRNAが増加、緑色はCAG50002でmRNAが減少したことを表す。色の濃さは発現量を反映しており、最も濃い最大値は4倍以上の変動を表す。最上部に*rpoH*誘導後のタイムコースと各遺伝子の遺伝子IDと遺伝子名を示した。(C, D) *rpoH*過剰発現後に有意に発現が増加した遺伝子のSOM解析。各遺伝子の独立した3連のタイムコースの各時点での平均値を用いた。各遺伝子は、発現の早さ(fast/slow; C)もしくは、強さ(strong/weak; D)によりグループ化されている。各グループの遺伝子の各時点での平均値を用い、各グループの変化の様子をグラフ化した。(C)では発現の応答速度を示すために、強度によって標準化した。(D)では発現の強度を示すために、生データを使用した。いずれも $\log_2$ の値を示した。

表3  $\sigma^{32}$  レギュロンメンバー

Transcription Unit	Unique ID	Induction Ratio	$\sigma^{32}$ promoter Distance	Sequence	Evidence
<b>A) Significantly induced and identified promoter</b>					
<i>dnaK&lt;P1&gt; dnaJ yj81_1 yj82_1</i>	b0014-7	18.2 F, S	-150	<u>CTTGATGACGTGGTTTACGACCCCATTTAGTAGTCA</u>	K (Cowing <i>et al.</i> 1985)
<i>dnaK&lt;P2&gt; dnaJ yj81_1 yj82_1</i>	b0014-7	18.2 F, S	-75	<u>GTTGAAACGACAGCTTTTCGCCCTATTACAGACTCA</u>	P, K (Cowing <i>et al.</i> 1985)
<i>ileS lspA fkpB ispH</i>	b0026-9	3.3 S, W	-198	<u>GTTGCAATGGACCTTTACGGTCCCATATACAAGTAG</u>	P, R
<i>hepA</i>	b0059	3.6 S, W	-360	<u>CTTGCAATATCAGAATCGCGCACCATTAAGTACGTA</u>	R
<i>yadF</i>	b0126	2.4 S, W	-69	<u>GTTTAAATCGTCCGGAGTTGCCATATATTAGCCAAA</u>	P, T
<i>yafD yafE</i>	b0209-10	6.3 F, S	-86	<u>GTTGAAAGAGTGAGCTAAAATCCCTATAA</u>	P, R
<i>ribE nusB thiL pgpA</i>	b0415-8	9.9 S, S	-178	<u>CTTGAGAAATTAGCCGACGCCCCCAATTTAAATTC</u>	P, R
<i>clpP clpX</i>	b0437-8	11.4 F, S	-108	<u>CTTGAAATATGGTATGCGGTACCCATAACACAGGGA</u>	P, K (Li <i>et al.</i> 2000)
<i>lon</i>	b0439	9.3 S, S	-111	<u>GTTGAATGTGGGGAAACATCCCATATACTGACGTA</u>	K (Chin <i>et al.</i> 1988)
<i>htpG&lt;P1&gt;</i>	b0473	18.4 F, S	-80	<u>CTTGAAATTTCTCCCTGTGCCCATCTCTCCCACT</u>	P, K (Cowing <i>et al.</i> 1985)
<i>htpG&lt;P2&gt;</i>	b0473	18.4 F, S	-71	<u>ATTCTCCCTGTGCCCATCTCTCCCACTCTGTTTT</u>	P, K (Cowing <i>et al.</i> 1985)
<i>ybeD lipB</i>	b0631-0	9.5 F, S	-99	<u>CTTGAAAGTGTAATTTCCGTCCCATATACTAANGCA</u>	P, T
<i>ybeZ ybeY ybeX cutE</i>	b0660-57	7.4 F, S	-126	<u>CTTGTTTTTCTCTCTTTATCCCACTTTATATGCA</u>	P, R
<i>glnS</i>	b0680	3.4 S, W	-130	<u>CTTTTTTTTTCATCAATCATCCCATATACTCTGTTA</u>	P, T
<i>yceJ yceI</i>	b1057-6	1.5 S, W	-62	<u>GTTGCAATTCATTTCCGACACGCCATTTTCTTCTCT</u>	P, T
<i>yceP</i>	b1060	6.9 F, S	-111	<u>CTTTAAATAATTCGGTGAATACCTTACTTATGGTATA</u>	P, R
<i>phoP phoQ</i>	b1130-29	6.9 S, S	-76	<u>GTTTATTAATGTTTACCACATAACCCATAA</u>	P, R
<i>topA</i>	b1274	6.0 F, S	-104	<u>GTTGATATCCGACAGAGCGAGTCCATATCGGTAAC</u>	P, K (Lesley <i>et al.</i> 1990)
<i>yciS yciM pyrF yciH</i>	b1279-82	3.7 F, W	-143	<u>GTTGATTTTCCGAATTTAGCCCTTAAATCATCAACA</u>	P, R
<i>ycjX ycjF tyrR</i>	b1321-3	6.9 F, S	-83	<u>GTTGATAATCAATGGCCTGGCCCCACATTCATATC</u>	P, R
<i>mle ynfK</i>	b1594-3	5.5 F, S	-62	<u>ATTGAAATGGCTTACCCATAGCCATCAGATATTTTC</u>	P, K (Shin <i>et al.</i> 2001)
<i>ydhQ</i>	b1664	11.3 S, S	-110	<u>GTTTAAACAGAGTTGTTGCCACCATCTCAATCTCT</u>	P, R
<i>gapA yeaD</i>	b1779-80	2.4 S, W	-190	<u>CTTTAAATAATTCGGGGCCGACCCCATGTTGTTCTCAAG</u>	P, K (Charpentier and Branlant 1994)
<i>sdaA</i>	b1814	3.9 F, W	-155	<u>CTACTTGAGACAATCATCGCAATATAGTTAA</u>	R
<i>hipX</i>	b1829	12.1 F, S	-77	<u>CTTGAAATAGTCGCGTAACCCATACGATGTGGGTA</u>	P, K (Kornitzer <i>et al.</i> 1991)
<i>narP</i>	b2193	2.3 S, W	-115	<u>GTTGATGTTTTCACACTACATGTCCATACATAAATGGGG</u>	P, R
<i>clpB</i>	b2592	21.5 F, S	-67	<u>CTTGAAATATGAGGGATGACCTCATTAATCTCCA</u>	P, K (Kitagawa <i>et al.</i> 1991)
<i>grpE</i>	b2614	14.2 F, S	-74	<u>CTTGAAACCCGTGAAACTGATCCCATATAAAGCGAA</u>	P, K (Lipinska <i>et al.</i> 1988)
<i>yjfN</i>	b2630	2.0 S, W	-45	<u>GTATTTATTGTAGAGTTCCCATATGTTCTCATG</u>	P, T
<i>ygaD recA</i>	b2700-699	2.4 S, W	-81	<u>GTAAAAATGCAACGCCAACCCATCTTCTGACG</u>	R
<i>ygbF</i>	b2754	1.9 F, W	-99	<u>CTGGAGAATAACAACCGCCGCCACCTGAAGATGCA</u>	P, R
<i>xerD dsbC recJ</i>	b2894-2	2.1 S, W	-140	<u>CTGGAACCGTAAAAAAGACCCATATTCATAACG</u>	P, T
<i>rdgB yggW</i>	b2954-5	3.9 S, W	-97	<u>ATTGAAAAGGCGAACTTGGCCGCCACAA</u>	P, R
<i>rpoD</i>	b3067	10.5 F, S	-395	<u>CTTGAAAACACTGTGATGTGGACGATATAGCAGATA</u>	K (Cowing <i>et al.</i> 1985)
<i>rrmJ ftsH folP</i>	b3179-7	7.4 F, S	-103	<u>ATTGAAAACGGGTCATTTCTACGCCATCTCCCATATA</u>	P, K (Herman <i>et al.</i> 1995)
<i>yhdN zntR</i>	b3293-2	11.9 F, S	-73	<u>GTTTTTTTATACCCGTAGTATCCCACTTATCTACAA</u>	P, R
<i>(yrfG) yrfH hsp33</i>	b3399-401	17.0 F, S	-274	<u>CTTGATTTATTACTTCCACCCACACATTTGGTTATC</u>	P, R
<i>(gntX) gntY</i>	b3413-4	8.8 F, S	-202	<u>CTTGAAATGCCCCGTGCAAGGTCCCATATGGTGATTG</u>	P, R
<i>prfC yhiQ</i>	b3498-7	9.2 F, S	-92	<u>ATTGAAATTCACACTTAAACCCATGCTACACACA</u>	P, T
<i>mutM</i>	b3635	12.4 F, S	-58	<u>GTTTTTTGTTATCTGCTTGCCTCCATATGACTGCA</u>	P, R
<i>ibpA ibpB</i>	b3687-6	13.4 F, S	-131	<u>CTTGAAAAGTTTCAATTTCCAGACCCATTTTACATCG</u>	P, K (Chuang <i>et al.</i> 1993a)
<i>hslV hslU menA</i>	b3932-0	15.5 F, S	-97	<u>GTTGAAACCCCTCAAAAACCCCATCTATATTG</u>	P, K (Chuang <i>et al.</i> 1993a)
<i>fxsA</i>	b4140	4.4 F, W	-96	<u>CTTGAAATTTTGCTAATGACCAACATATAAGCTAAA</u>	P, R
<i>groES groEL</i>	b4142-3	9.1 F, S	-109	<u>CTTGAAAGGGCGAAGCCTCATCCCATTTCTCTGGTCA</u>	P, K (Cowing <i>et al.</i> 1985)
<i>mutL miaA hfq hflX hflK hflC</i>	b4170-5	N/A	-402	<u>CTGGCGAACAGTCAGTCTGACCCCTATTAAAGCCAGG</u>	K (Tsui <i>et al.</i> 1996)
<i>miaA hfq hflX hflK hflC</i>	b4171-5	9.9 F, S	-307	<u>ATTGATTTCCAGTCAGATGCAAGCATGTGACCATCA</u>	K (Tsui <i>et al.</i> 1996)
<i>hfq hflX hflK hflC</i>	b4172-5	5.0 F, W	-926	<u>GTTGATAAGCGTTGATTTCTGCTTATTATACAAAGGGA</u>	K (Tsui <i>et al.</i> 1996)
<i>holC valS</i>	b4259-8	3.9 F, W	-29	<u>ATTTAAATCCACCACAAGAAGCCCATTTATGAAA</u>	P, R
<i>creA creB creC</i>	b4397-9	2.1 S, W	-315	<u>CTTGAAATAACCTGTTTTGCCGCTACATTTGTCGAGCG</u>	R

(次頁に続く)

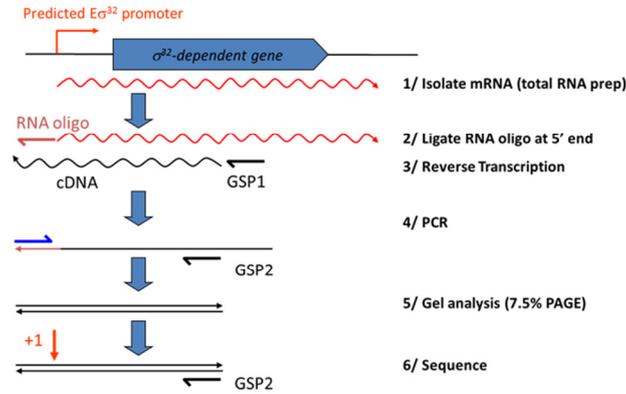
表 3 (前頁からの続き)

B) Significantly induced but no identified promoter						
<i>araB</i>	b0063	11.8 S, St	-136	<u>ATTGATTATTTGCACGGCTCAGACTT</u>		P, Tf
<i>sbcD</i>	b0398	2.9 S, W				
<i>phoB phoR</i>	b0399-0	5.1 S, W				
<i>ybaO</i>	b0447	4.5 S, W				
<i>ybbN</i>	b0492	11.6 F, St				Tf
<i>galT</i>	b0758	2.9 S, W				
<i>macB</i>	b0879	2.0 S, W				Tf
<i>cspD</i>	b0880	4.1 S, W	-133	<u>TGTCAAATGCTTGACGGCTCGCCCTAATT</u>		P, Tf
<i>yljA clpA</i>	b0881-2	3.5 S, W				
<i>ycxY</i>	b0966	2.4 F, W				
<i>yegU</i>	b1201	1.2 S, W				
<i>ldhA hslJ</i>	b1380-79	15.8 S, St	-104	<u>GTTGATGAATTTTCAATATCGCCATAG</u>		P, Tf
<i>acpD</i>	b1412	1.5 S, W				
<i>nohA</i>	b1548	1.3 S, W				
<i>ydiH</i>	b1685	1.5 S, W				
<i>yi81_3</i>	b2394	4.7 S, W				
<i>fjh</i>	b2610	2.9 S, W				
<i>sdaC sdaB</i>	b2796-7	5.3 S, W	-272	<u>GTTTAATGGCAAATATTGCCCTTAAAT</u>		P, Tf
<i>yrdA</i>	b3279	7.7 F, St				
<i>yheL</i>	b3343	4.7 F, W				
<i>recF gyrB</i>	b3700-699	4.4 S, W				
C) Not significantly induced but reported promoter						
<i>repE</i>	F factor	no data	-62	<u>ATTGACTCTTTTTATTTAGTGTGACAATCTAAAACTTGTCACT</u>	K (Wada <i>et al.</i> 1987)	
<i>rrnB P1</i>	b3968	no data	-329	<u>CTTGTGACGGCCGAATAACTCCCTATAATGCGCCACCA</u>	K (Newlands <i>et al.</i> 1993)	
<i>hpiY</i>	b0011	1.1	-120	<u>TTTGAGGGGAAAATGAAAATTTTCCCGGTTCCGGTATC</u>	K, Tf (Missiakos <i>et al.</i> 1993)	
<i>ppiD</i>	b0441	1.8	-105	<u>CTTGTGGCTGACAATTGC<del>CCCGTTTC</del></u>	K, Tf (Dartigalongue and Raina 1998)	
<i>pphA</i>	b1838	1	-449	<u>GGCGAAAATGAGTCTGGCACCGTTTATAGAAC</u>	K, Tf (Missiakos and Raina 1997)	
<i>ptsH ptsI</i>	b2415	1.2	N/A	N/A	K, Tf (Ryu 1998)	
<i>htrM</i>	b3619	0.8	-152	<u>CATGAAGGACTAGCTAAAA<del>CCCAA</del>CTAGTT</u>	K, Tf (Raina and Georgopoulos 1991)	
<i>htrC</i>	b3989	1.1	-69	<u>CTGAACTAATTGAGTCAAAC<del>TGGCA</del>GGATTTCGATA</u>	K, Tf (Raina and Georgopoulos 1990)	
<i>metA</i>	b4013	1.1	-76	<u>ATTGGCAATTTCTGGTTAT<del>CTTCAGCTA</del></u>	K, Tf (Biran <i>et al.</i> 1995)	

(A) *rpoH* の過剰発現により誘導される遺伝子のうち、上流に実験による検証済みの $\sigma^{32}$ プロモーターを持つ遺伝子。(B) *rpoH* の過剰発現により誘導される遺伝子のうち、上流に実験による $\sigma^{32}$ プロモーターが確認できなかった遺伝子。(C) *rpoH* の過剰発現により誘導が確認されなかった遺伝子のうち、文献にて $\sigma^{32}$ プロモーターが報告されている遺伝子。(Transcription unit)TU は染色体上の順番に並べられている。TU 内の遺伝子は転写の順番に並べられている。括弧で示されている遺伝子は誘導されるが、ORF 内に $\sigma^{32}$ プロモーターが存在するため翻訳されていないと予想される遺伝子。幾つかは 1 つの TU に 2 つ以上の $\sigma^{32}$ プロモーターが存在する (*dnaK dnaJ yi81\_1 yi81\_2* と *htrG* オペロンには 2 つ、*mutL mia hfq hflX hflK hflC* オペロンには 3 つ存在する)。複数のプロモーターを保持する TU も 1 つの TU としてカウントするため、TU の総数は 66 となる (A と B の合計)。(Ratio)TU の先頭の遺伝子の平均の発現誘導の率 (*rpoH*-induced/*rpoH*<sup>wt</sup>) (10 分のタイムポイントにおける)。SOM による誘導の kinetics (図 9) の情報も含む。(F)fast、(S)slow、(St)strong、(W)weak。( $\sigma^{32}$  promoter) 同定されたもしくは予想された $\sigma^{32}$ プロモーター。(Distance)TU の先頭の遺伝子の翻訳開始点からの-35 モチーフ 5'末端までの距離。(Sequence)-35、-10、転写開始点 (下線) を含む $\sigma^{32}$ プロモーターの配列。(Evidence)  $\sigma^{32}$ プロモーターの根拠。(K)既知。(P)MEME と BioProspector の両方による予想。(R)5'RACE による確認。(T) in vitro 転写実験による確認。(Tf) in vitro 転写実験を行ったが、 $\sigma^{32}$  依存の転写産物が確認されなかった。

(注) : microarray でのシグナルが弱かったために *mutL* の正確な発現データは得られなかった。microarray に存在しない遺伝子である *repE* と *rrnB* の発現データは存在しない。5'RACE での配列解読が不明瞭であったため、*yafD* と *yggV* の正確な+1 は得られなかった。*holC* の+1 はこれまでに提唱されていた翻訳開始点の 8 nt 下流に当たるため、別の翻訳開始点が存在する可能性を含む。

A



B

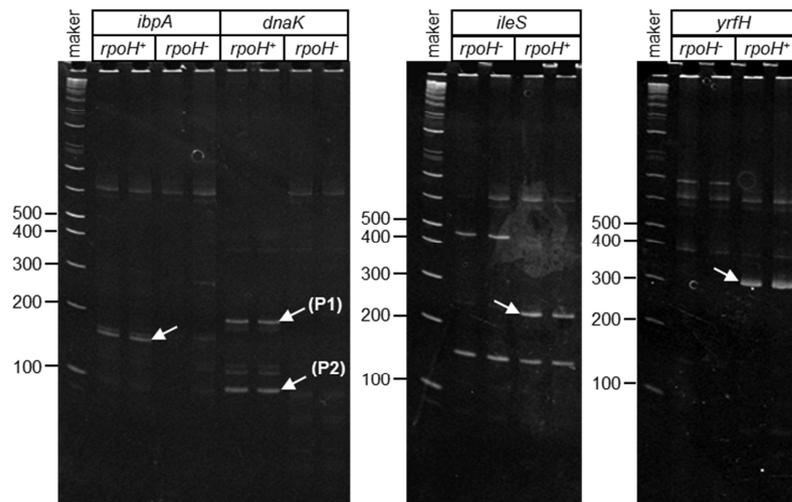


図 10 5'RACE による $\sigma^{32}$  特異的な転写開始点の同定

(A) 5'RACE の手法の概念図 (実験材料と実験方法参照)。(B) 5'RACE の結果 22 個の $\sigma^{32}$  依存のプロモーターが確認された。 $\sigma^{32}$  特異的な転写産物を検出するため、*rpoH*<sup>+</sup> と *rpoH*<sup>-</sup> 株 (CAG50002 と CAG50003) からの mRNA を RNA oligo の付加によって 5'ラベルし、逆転写、PCR 増幅を経て 7.5%PAGE にて可視化した (実験材料と実験方法参照)。*rpoH*<sup>+</sup> で見られるが *rpoH*<sup>-</sup> では見られないバンドを $\sigma^{32}$  特異的とみなした。まず 2 つの既知の $\sigma^{32}$  依存プロモーターである *dnaK* と *ibpA* のテストにより系の作動を確認、そして 50 個の新規の $\sigma^{32}$  で誘導される TU から 22 個の新規の $\sigma^{32}$  依存プロモーターを見出した。表示している図は各 2 連で行った、2 つの新規 (*ileS*, *yrfH*) と 2 つの既知 (*dnaK*, *ibpA*) のデータ。

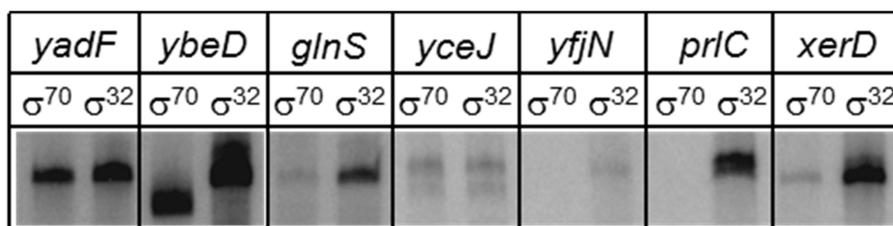


図 11 *in vitro* 転写での $\sigma^{32}$ による転写産物の検出

11個の予想プロモーターのうち7つにおいて $\sigma^{32}$ による転写産物が見られた(図に示した7プロモーター)。そのうち、5つにおいては $\sigma^{70}$ による転写産物が同時に検出された(*yadF*、*ybeD*、*glnS*、*yceJ*、*xerD*)。実験系の作動を確認するため6つの既知の $\sigma^{32}$ プロモーターを用いた実験も同時に行った。各プロモーターのテンプレートにRNAP及び $\sigma^{32}$ もしくは $\sigma^{70}$ を添加し multiround *in vitro* 転写によって行った。放射線標識されたdATPを用いた転写産物からの逆転写によってcDNAを合成、6% PAGEで分離し可視化した。



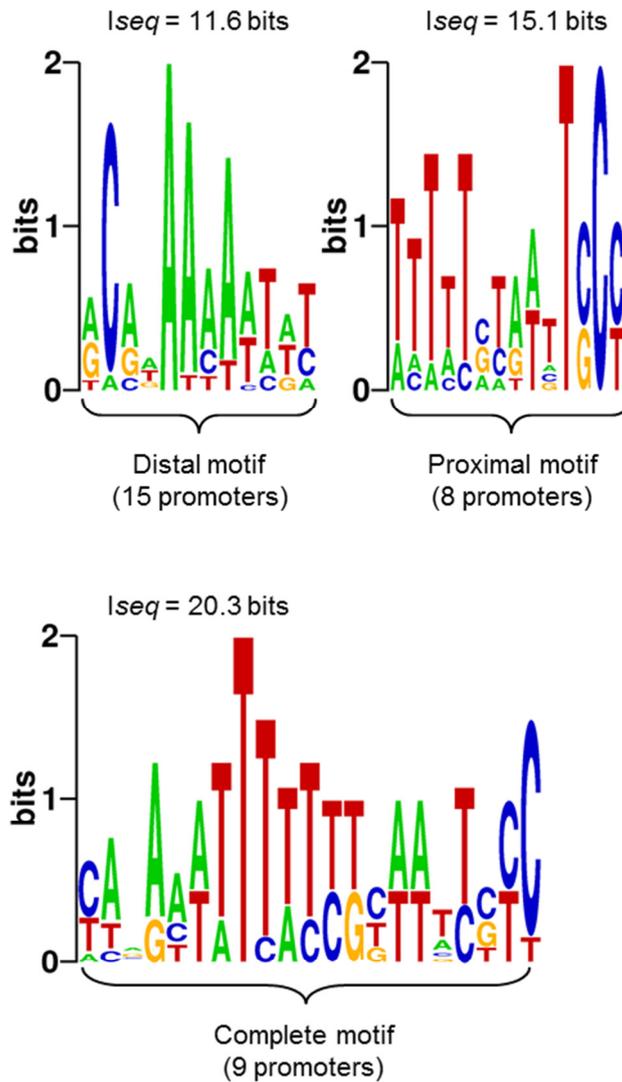


図 13  $\sigma^{32}$  プロモーター上流の A/T-rich モチーフの Sequence Logo  
 WCONSENSUS を用いて 50 個の  $\sigma^{32}$  プロモーターに対して -35 上流の検索を行った (*repE* を除く)。  
 “Distal”、“Proximal”、“Complete”モチーフがそれぞれ -46~-60、-36~-51、-36~-60 の領域から見出さ  
 れた。-35モチーフの最初の“T”を-35と定義し、-35をアラインメントのポジションの基準とした。

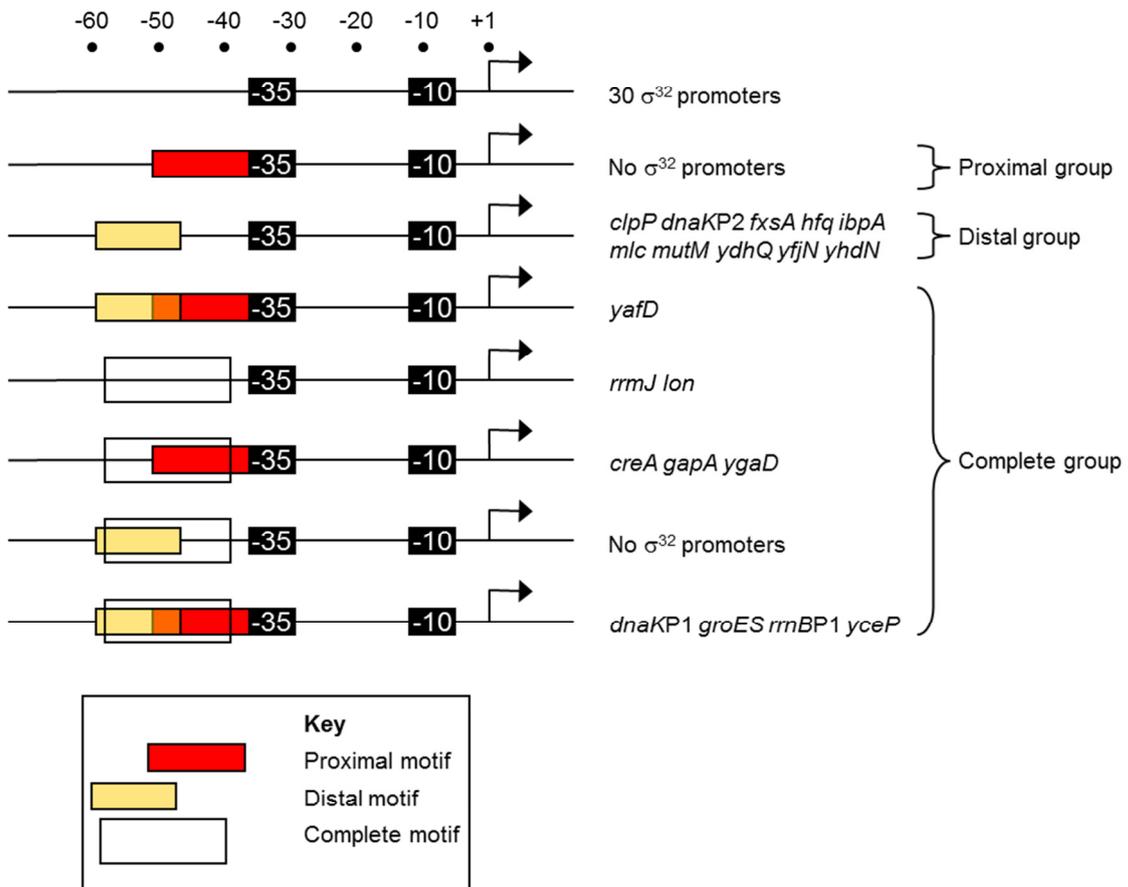


図 14  $\sigma^{32}$  プロモーター上流の A/T-rich モチーフの位置関係図

図 13 で見出された“Distal”、“Proximal”、“Complete” A/T-rich モチーフの配置を示した。

表 4 局在と機能による $\sigma^{32}$  レギュロンの分類

A/ Location	Regulon members
Periplasm (2)	DsbC YceI
Inner Membrane (18)	CreC CutE FtsH FxsA GntY <sup>a</sup> HflX HflK HflC HtpX LipB <sup>a</sup> LspA MenA PgpA PhoQ YbeX <sup>a</sup> YbeZ <sup>a</sup> YceJ <sup>a</sup> YcjF <sup>a</sup>
Cytoplasm (48)	ClpB ClpP ClpX CreB DnaJ DnaK FkpB GapA GlnS GroELS GrpE HepA Hfq HolC Hsp33 HslU HslV HtpG IbpA IbpB IleS IspH Lon MiaA Mlc MutL MutM NarP NusB PhoP PrlC PyrF RecA RecJ RdgB RpoD <i>rrnB</i> RrmJ SdaA TopA TyrR ValS XerD YciH YfjN YrfH ZntR
Unknown (25)	CreA FolP RibE ThiL YadF YafD YafE YbeD YbeY YceP YciH YciM YciS YcjX YdhQ YeaD YfjN YgaD YgbF YggW YhdN YhiQ yi81_1 yi82_1 YnfK
B/ Functional category	Regulon members
Metabolism	CutE FolP GapA IspH LipB LspA MenA PgpA PyrF RibE SdaA ThiL YadF YafE YceJ YggW YgaD
Chaperone/Folding catalysts	ClpB DnaJ DnaK DsbC FkpB GroELS GrpE Hsp33 HtpG IbpA IbpB
Protein degradation	ClpP ClpX FtsH HflX HflK HflC HslU HslV HtpX Lon PrlC
DNA modification	HolC MutL MutM RecA RecJ RdgB TopA XerD
RNA state	GlnS Hfq IleS MiaA <i>rrnB</i> RrmJ ValS YciH YfjN YrfH YbeD
Transcription regulators	CreB CreC HepA Mlc NarP NusB PhoP PhoQ RpoD TyrR ZntR
Transporter	YbeX YbeZ
Miscellaneous	FxsA GntY YciH YfjN YhiQ yi81_1 yi82_1 YciM YciS
Unknown function	CreA YafD YbeY YceI YceP YcjF YcjX YdhQ YeaD YgbF YhdN YnfK

検証済みの $\sigma^{32}$  プロモーターでありかつ染色体にコードされているレギュロンメンバーのみを取り扱った。確かな局在の情報がないタンパク質は **unknown** に分類した。機能が既知もしくは予想されているタンパク質と有意な相同性が見出されないタンパク質は **unknown function** とした。

<sup>a</sup> “membrane” のアノテーションの中で、内膜に局在すると想像される膜タンパク質。

表 5 熱ショックのインデューサー

Location	HSR inducers
Periplasm (3)	MalM RzpD YbjL
Inner Membrane (14)	FecE FecR FliL GspO HybC LepA LpxK YdgK YhhQ YiiR YijD <sup>a</sup> YmgF YqjE YrbC
Cytoplasm (5)	Cca FabB YccR <sup>a</sup> YieM YqaE
Unknown (3)	CreA YagY YbbC

<sup>a</sup> 27 の配列が解読された遺伝子の中で 2 度重複して取得された遺伝子

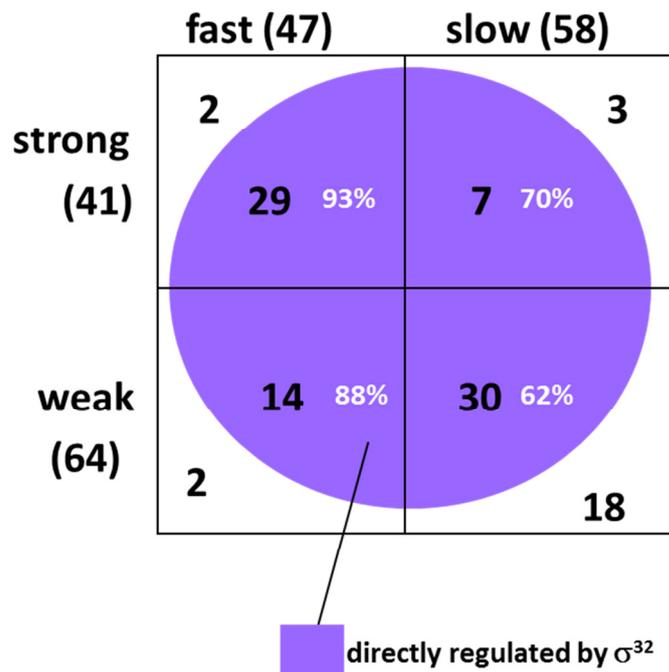


図 15 発現挙動と $\sigma^{32}$ プロモーターの有無の関連

図 9 での SOM 解析における分類と、プロモーター解析により見出された $\sigma^{32}$ プロモーターの有無の関連。発現のキネティクス (fast/slow) と発現の強度 (strong/weak) による 4 象限への分類と $\sigma^{32}$ プロモーターの有無 (青色の円) による分類。数値は分類されるプロモーターの数を、%は各 4 象限の分類区の $\sigma^{32}$ プロモーターの保有率を表す。

### 1-3 まとめと考察

#### $\sigma^{32}$ レギュロン解明のアプローチと結果について

本章では、グローバルな手法を用いることでほぼ網羅的に $\sigma^{32}$  レギュロンを解析した。その結果、 $\sigma^{32}$  のレギュロンがこれまで知られていた以上に広範であり、多面的な機能を担っていることが明らかとなった。本研究により 29 個の新規 $\sigma^{32}$  プロモーターと 57 個の新規レギュロンメンバーが明らかとなった。現状では合計で 51 個の $\sigma^{32}$  プロモーターと 49 個の TU、そしてこれらの中に存在する 89 個の染色体上の ORF と 1 つの rRNA、1 つの F 因子上の ORF が知られることとなった (表 3)。本研究での手法により既知の $\sigma^{32}$  依存 TU が高効率で探し当てられていることから考えると、一連の解析により相当数の $\sigma^{32}$  依存 TU が同定され、ほぼ全貌が解明されたものと推測される。25 個のこれまでに提唱された TU のうちの 23 個の TU が array に存在し、そのうちの 16 個が $\sigma^{32}$  の過剰発現によって顕著な誘導を示した。7 つの誘導されなかった TU は筆者が行った *in vitro*、*in vivo* のいずれの系においても $\sigma^{32}$  依存の転写がみとめられなかっただけでなく、 $\sigma^{32}$  プロモーターのコンセンサス配列から非常にかげ離れていることがわかった (表 3C)。従って、これらの 7 つの TU は、他に何らかの制御因子を必要としている、あるいはもともと $\sigma^{32}$  には認識されないという可能性が考えられる。結局、本研究での DNA microarray に存在する ORF に関しては、過去に提唱された TU のうちで確度が高いと考察される全ての TU の確認を取ることができたと言える。

DNA microarray は簡便かつ効率的に、そして網羅的に遺伝子を解析する上で非常に有用な手法である。しかしながら、ある刺激に対する直接の応答だけではなく、その応答によって引き起こされる 2 次的、3 次的な遺伝子発現の変化までも拾い上げてしまう (実際に本研究で $\sigma^{32}$  が多数の転写調節因子を制御下に収めていることが明らかとなった)。従って、本研究のようなある特定の $\sigma$  が直接支配するプロモーターとレギュロンの解明という目的のためにはこれだけでは十分とは言えない。そこで本研究では、生化学的な実験による検証のステップを組み込んだ。これにより、 $\sigma^{32}$  が直接支配するプロモーターとレギュロンを精度良く見つけ出すことに成功した。一方で、DNA microarray による発現データのキネティクスを丁寧にみることで、直接支配される遺伝子に特徴的な挙動を捉えることができた。図 15 には図 9 に示した SOM 解析による発現パターンの特徴でのグループ分けの結果 (各グループに含まれる各々の遺伝子は表 3 に示されている) と後の解析で $\sigma^{32}$  プロモーターを持つことが判明した遺伝子の数の関係を示した。その結果、「早い」かつ「強い」遺伝子は実に 98% が $\sigma^{32}$  プロモーターに直接支配される遺伝子であった (31 遺伝子中で当たりが 29、外れが 2)。続いて、「早い」「弱い」では 88% と比較的高い確率を示した。「早い」ということが非常に重要であると言える。一方で「遅い」グループは $\sigma^{32}$  プロモーターの直接支配である確率が大きく下がった («遅い」「強い」で 70%、「遅い」「弱い」では 62%)。「早い」グループと「遅い」グループの違いは誘導後 2.5 分で発現が上がるか 5 分で上がるかの僅かな違いである (図 9C)。こうした僅かな違いを丁寧にみることで、レスポンスの

早いバクテリアであっても誘導のカスケードを DNA microarray で捉えることが可能と考えられた。

#### $\sigma^{32}$ プロモーター

本研究により確証が得られた50個のプロモーター配列により、非常に強く保存されたコンセンサス配列が明らかとなった (図 12)。保存された塩基の重要性は、Wang and deHaseth (2003) が *groE* プロモーターのコア配列を一つずつ全て置換した変異プロモーターの解析から導き出された“functional promoter”と概ね一致した。図 12E には  $\sigma^{32}$  と  $\sigma^{70}$  のコンセンサス配列の比較をした。-35 は 1 塩基が異なるのみで非常によく類似しており、また -10 についても部分的に非常によく類似していることがわかった ( $\sigma^{70}$ : TTGACA-N<sub>17</sub>-TATAAT、 $\sigma^{32}$ : TTGAAA-N<sub>14</sub>-CCCCATWT)。-35 からのスペーサー長から考えると、おそらく  $\sigma^{32}$  の -10 領域のコンセンサス配列である CCCCCATWT のはじめの 2 つの CC は  $\sigma^{70}$  の E-10 (extended -10) のポジションに、後ろの ATAT は -10 (TATAAT) のポジションに相当すると考えられる。 $\sigma^{32}$  では非常によく保存された特徴的な E-10 である CC をもつことがわかった。 $\sigma^{32}$  は  $\sigma^{70}$  に比べ  $\sigma$  が持つプロモーターの melting の能力が低いために、代わりに強力なプロモーター配列を必要とすることがわかっている (Koo et al. 2009c)。また CCCCCATWT の中心付近に位置する A は 100%保存されていることから、melting の開始時にはじき出される (flip) 重要な -11 位の A と考えられる (Lim et al. 2001; Schroeder et al. 2009)。

これまで知られていた *rrnBP1* (Newlands et al. 1993) に加え、今回新たに 5 つ (*yadF*, *ybeD*, *glnS*, *yceJ*, *xerD*) の dual- $\sigma^{32}/\sigma^{70}$  依存のプロモーターを見出した。ただし *ybeD* は in vitro 転写実験の結果からは、 $\sigma^{32}$  と  $\sigma^{70}$  の転写において 2~3 bp ほど転写開始点がずれていることがわかる。これに対しては、完全にプロモーターがオーバーラップしているが転写開始点は異なる可能性と、プロモーターがそもそも完全にはオーバーラップしておらず 2~3 bp ほどずれている可能性が考えられる。 $\sigma^{32}$  と  $\sigma^{70}$  のコアプロモーター配列の類似性から考えると両ホロ酵素は同じコアプロモーター配列を認識することは自然なことと考えられる。しかしながら、5'RACE で確認した 22 個の  $\sigma^{32}$  プロモーターは  $\sigma^{32}$  特異的な転写を示したことから  $\sigma^{70}$  ホロ酵素が更に多数の  $\sigma^{32}$  プロモーターを認識するという可能性は非常に低いであろう。*Pseudomonas putida* においては  $\sigma^{32}$  と  $\sigma^S$  のホロ酵素が両方とも Pm プロモーターを認識するということが知られていることから (Dominguez-Cuevas et al. 2005)、*E. coli* においても  $\sigma^{32}$  と  $\sigma^S$  のプロモーターのオーバーラップのケースは十分あり得ると考えられる。今回多くのオーバーラッププロモーターが見出されたことから、こうした  $\sigma$  によるオーバーラップの機構と生理的な意義についても興味をもたれる。

$\sigma^{32}$  レギュロンについての考察(1) ~ $\sigma^{32}$  による高温への適応には種々の細胞内ターゲットが存在する~

既知の $\sigma^{32}$  レギュロンの半数以上はシャペロンもしくはプロテアーゼであったことから、 $\sigma^{32}$  レギュロンの第一の役割はタンパク質の恒常性維持であることは疑いのないことと言える (表 3A)。今回の結果から、 $\sigma^{32}$  の役割が更に広範な細胞内ターゲットに及ぶことが明らかとなった。(i)まず、活性中心に鉄硫黄クラスターを持つタンパク質やリポ修飾を持つタンパク質を十分供給するという側面でのタンパク質の恒常性維持に貢献している可能性が明らかとなった。これらタンパク質がどの程度ダメージを受けて修復を受けているかは分かっていないが、これら熱不安定なタンパク質が高温ストレスの状況で盛んに合成されていることは知られている。 $\sigma^{32}$  レギュロンには、鉄硫黄の活性中心を持つことが知られるタンパク質 (SdaA、IspH) と鉄硫黄の活性中心を持つことが推定されるタンパク質 (YggW)、そして鉄硫黄クラスターの生合成に関与することが推測される IscA ホモログ (GntY) (Giel et al. 2006; Angelini et al. 2008) が含まれた。GntY は 4Fe-4S クラスターを apo-aconitase に渡す役割から、Fe-S クラスター-scaffold protein と呼ばれる。また、 $\sigma^{32}$  レギュロンには、リポタンパク質リガーゼ (LipB) が含まれたことから、リポタンパク質のダメージへの対処の機能が考えられる。(ii)  $\sigma^{32}$  レギュロンにはコファクターであるリボフラビン (RibE)、チアミン (ThiL)、葉酸 (FolP)、ビオチン (YafE) 等の生合成に関与するものや、NAD のリサイクルに関わる YgaD (Galeazzi et al. 2011) が含まれた。高温ストレス下では、これらのコファクターの供給がタイトになっている可能性が考えられる。例えば RibE や FolP は経路の分岐点の酵素であり、また ThiL は ATP 依存の酵素であることなど、高温ストレス下での律速点になっている可能性は十分考えられる。(iii)今回明らかとなった現象の一つとして、 $\sigma^{32}$  レギュロンが DNA や RNA の熱への防御に働いている可能性が挙げられる (表 4B)。ゲノムを無傷の状態に保つことは生命の維持のために必須であり、おそらく熱は誤取込 (misincorporation) や染色体へのダメージを増加させるのであろう。 $\sigma^{32}$  レギュロンとして見出された遺伝子がコードする酵素には以下のようなものが存在する; mismatch や excision の修復に関わる MutL、MutM、一般的な組み換えの機能としての double-strand break を担う RecA、RecJ、site-specific recombination システムにおける染色体 2 本鎖の分離に関与する XerD。また、 $\sigma^{32}$  による応答は、おそらくは熱耐性を高めるための、RNA の修飾にも関与する。まずは MiaA である。この酵素は既知の $\sigma^{32}$  レギュロンであり、23S rRNA (FtsJ) のメチル化を行うこと (Bugl et al. 2000)、そして $\Delta^3$ -isopentyl-PP を t-RNA の A37 に転移することで t-RNA を修飾することが知られている (Tsui et al. 1996)。今回新たに見つかった IspH もまた $\Delta^3$ -isopentyl-PP の合成を担うことで t-RNA の修飾に関与する。この t-RNA の修飾は codon-anticodon のペアリングを安定化させ (Bjork and Hagervall 2005)、そしてこの修飾ができない場合には温度感受性になること (Tsui et al. 1996) が知られている。また、 $\sigma^{32}$  のレギュロンには rRNA のプロセッシングに関する遺伝子が含まれたことから、高熱下での rRNA の恒常性維持にも関わっている可能性が考えられる。YbeY は 16S rRNA の成熟化とリボゾームのクオリティーコントロールに働く endoribonuclease であり (Davies et al. 2010; Jacob et al. 2013; Grinwald et al. 2013)、同遺伝子の欠損は高温感

受性になることが知られている (Rasouly et al. 2009)。YhiQ (RsmJ) は 16S rRNA の G1516 のメチル化に関与しており、同遺伝子の欠損は低温感受性になることが知られている (Basturea et al. 2012)。また、機能は未知であるが、YgbF は endoribonuclease 活性を持つタンパク質であり、何らかの RNA の成熟化に関与している可能性が提唱されている (Beloglazora et al. 2008)。最後に、small RNA の機能に必要な RNA シャペロンである Hfq (Chuang and Blattner 1993; Tsui et al. 1996) も  $\sigma^{32}$  レギュロンに含まれた。(iv)  $\sigma^{32}$  レギュロンの機能として高温下での転写と翻訳の促進が考えられる。これまでに知られていた  $\sigma^{32}$  レギュロンの一つである TopA は転写の一般的なエフェクターであるが (Lesley et al. 2000)、これに加え新たに HepA と NusB が  $\sigma^{32}$  レギュロンのメンバーとして今回の研究で同定された。これら 3 因子は全て高温下で変化した supercoil に対する応答である可能性が考えられる。過去の研究から、トポイソメラーゼ TopA (RNA polymerase associating) は高温下での正常な転写パターンの維持に必須であり (Cheng et al. 2003)、また熱耐性にも必須であること (Qi et al. 1996) がわかっている。HepA (RapA) もまた RNA polymerase associating タンパク質であり (Sukhodolets et al. 2001)、supercoil 化され強固に固められた DNA から RNA ポリメラーゼを回収するときに必要である。rRNA 転写の antitermination に働くことが知られる NusB (Zellars and Squires 1999; Torres et al. 2004) が高温で誘導されることの意味合いは、おそらくは高温下で変化した DNA supercoil の状態に対応させるための rRNA の antitermination の変化であろう (おそらくは、R-loop の形成を減らすことによって (Drolet 2006))。(v) 次に翻訳との関連についてであるが、Korber 等 (Korber et al. 2000) によって過去に提唱されている。彼らは、Hsp15 (YfrH) が 50S リボゾームサブユニットを nascent chain に結合させることでリボゾームのリサイクルを促進している可能性を示した。そしてこの状況は高温下でより顕著となる (Korber et al. 2000)。おそらくは致命的な高温においては翻訳が不完全な状態で終了してしまうことがしばしばあり (VanBogelen and Neidhardt 1990)、リボゾームのリサイクルの必要性が高まるのであろう。YciH はリボゾームに結合することが知られており、翻訳開始因子である可能性が提唱されている (Lomakin et al. 2006)。先述の YbeY 等 rRNA の成熟化に関するものも翻訳の促進に貢献している可能性が考えられる (Rasouly et al. 2009)。(vi) 今回の解析により  $\sigma^{32}$  は RpoD を含む 7 つの転写因子を制御するマスターレギュレーターであることが明確となった。かつて *E. coli* の alternative  $\sigma$  の中で唯一  $\sigma^S$  が応答を大きく拡張することができる (種々の転写因子を誘導することで) と考えられていたが (Weber et al. 2005)、今回の解析により  $\sigma^{32}$  も  $\sigma^S$  に劣らず多くの転写因子を支配下においていること (レギュロンのうちの ~8%) が明らかとなった。 $\sigma^{32}$  支配下の転写因子の多くは細胞外の状態を感知するためのものである。Mlc はグルコースを、PhoP/Q は低  $Mg^{2+}$  を、ZntR は過剰の  $Zn^{2+}$  を、そして NarP は nitrite/nitrate を感知することが知られている。興味深いことに、これら転写因子に支配される因子の多くは膜に局在するトランスポーターやその他の膜タンパク質であり、細胞膜の状態と  $\sigma^{32}$  による応答を関連付ける傍証と言える。(vii) 最後

に、本研究により  $\sigma^{32}$  と細胞膜の恒常性維持との関連が明らかとなった。これについては、以下のセクションで詳細を述べる。

#### $\sigma^{32}$ レギュロンについての考察(2) ~細胞膜は $\sigma^{32}$ による HSR のターゲットである~

これまでに見出されていた  $\sigma^{32}$  レギュロンメンバーの中には、細胞膜の品質管理において重要な役割を担っているものがいくつか含まれた。FtsH (Herman et al. 1995)、HflX、HflC (Chuang and Blattner 1993; Tsui et al. 1996)、HtpX (Kornitzer et al. 1991) がそれにあたる。FtsH とその制御因子である HflX、HflC は、アセンブルができなかった膜タンパク質を分解除去する働きがあり、HtpX もまた FtsH と重複した機能をもつ。本研究により、 $\sigma^{32}$  レギュロンメンバーによる細胞膜の恒常性維持における新たな重要な役割が見えてきた (表 4)。これにより、主に  $\sigma^{32}$  が細胞質と細胞膜を、主に  $\sigma^E$  がペリプラズムを管理するという分担が明確となった。以下にその所見を挙げる。

- (1) 二酸化炭素を重炭酸 (bicarbonate) に変換する carbonic anhydrase (YadF) (Merlin et al. 2003) の発現を上げることで脂肪酸の合成のキャパシティを向上させる。脂肪酸合成の最初の重要なステップは重炭酸である (Merlin et al. 2003)。
- (2) トランスポーターの発現を上げることで、膜輸送の特性を変える。
- (3) メナキノン合成に関わる MenA と SS 結合イソメラーゼ DsbC の発現を上げることで、タンパク質の SS 結合の形成と架け替え (isomerization) のポテンシャルを向上させる。なお、メナキノンは嫌気条件下での DsbB (protein disulfide oxidoreductase) の再酸化に必要であることが知られている (Bader et al. 1999)。
- (4) シグナルペプチダーゼ II (IspA) や apolipoprotein N-acyltransferase (CutE) の発現を上げることで、リポタンパク質の成熟化を維持する。なお、CutE は N 末のシステイン残基にパルミチン酸を付加することでリポタンパク質を活性化することが知られている (Wu 1996)。
- (5) PgpA の発現を上げることで、脂質 2 重層の組成を変化させる。PgpA は定常期に増加する内膜のマイナーなリン脂質である cardiolipin の合成に関与する酵素である (Hiraoka et al. 1993)。細胞は定常期に溶菌を防ぐために様々な物質を産生するが、cardiolipin は脂質 2 重層の安定化に寄与する可能性が考えられている。
- (6) 2 つの膜局在のヒスチジンキナーゼ (CreC と PhoQ) とそれぞれの細胞質に局在する応答因子 (2 成分制御因子のキナーゼとレギュレーター) の発現を上げることで、膜のセンシングの能力を変化させる。
- (7) LPS のエンベロープ (ペリプラズム) への輸送とアセンブリの機能を高めることで  $\sigma^E$  によるエンベロープの恒常性維持の機能を助ける。YciM (LapB)、YciS (LapA) は細胞膜に局在するタンパク質であり、LPS のエンベロープへの輸送とアセンブリの機能を有する (Klein et al. 2014; Muhalakshmi et al. 2014)。また、YeaD は YciM の essentiality のサブレッサーであることから、この経路に関与している可能性が示唆され

ている (Soo et al. 2011)。エンベロープのストレス応答の制御因子である $\sigma^E$ のレギュロンに $\sigma^{32}$ が含まれていることは非常に興味深い。*E. coli*近縁のバクテリアで調べた限りの全てにおいて $\sigma^E$ 傘下に $\sigma^{32}$ が存在することから、非常に保存された応答の様式であることが想像される (Rhodius et al. 2006)。細胞膜を介してエンベロープへの **building block** タンパク質の輸送がコントロールされることから、エンベロープの恒常性維持に $\sigma^{32}$ が必要なのであろう。

genome-wide な網羅的な解析の結果、細胞質のタンパク質に比べ膜タンパク質が量比に応じた確率を明らかに上回るレベルで $\sigma^{32}$ を誘導したことは興味深いことである。メカニズムはともあれ、 $\sigma^{32}$ が膜タンパク質に敏感 (膜タンパク質の過剰発現で $\sigma^{32}$ が活性化された) であることを考慮すると、自身が膜タンパク質でありかつ膜タンパク質の分解除去の機能を有する FtsH が $\sigma^{32}$ を分解することは非常に理にかなっていると言える。FtsH が膜 (タンパク質) の品質管理と $\sigma^{32}$ の分解という 2 つの機能を持つことによりこの 2 つのアクションを連携させることが可能となり (膜の修繕を行うと同時に、応答因子である $\sigma^{32}$ を off にする)、それによって細胞が細胞膜の恒常性を評価する手段をもたらししていると考えられる。

#### *E. coli* の HSR と真核生物の HSF

真核生物の HSF (heat shock factor) によって直接支配される遺伝子と、 $\sigma^{32}$ によってとり行われる HSR を比較すると、シャペロンのみが両方のレギュロンに共通する遺伝子である (Hahn et al. 2004; Yamamoto et al. 2005)。しかしながら、両レギュロンの支配する遺伝子の数や、支配する遺伝子の機能グループの観点では両者は類似している。例えば、タンパク質の分解、低分子のトランスポート、転写因子、RNA ポリメラーゼの修飾、DNA に関連するタンパク質等が共通の機能である。熱ストレスに対する応答は生物種を問わず共通なのであろう。

## 第二章： $\sigma^E$ における全プロモーターの網羅的な挙動解析

### 2-1 序論

バクテリアの多くは複数の $\sigma$ を保有し、これらを状況に応じて使い分けることで通常の生育から特殊環境への適応や形態変化までを制御している。housekeeping  $\sigma$  (*E. coli*では $\sigma^{70}$ )は必須遺伝子を多数含む通常の生育（生存）に必要な一群の遺伝子の転写を行う文字通りの“housekeeping function”を担う $\sigma$ であり、1000にも及ぶ多数の遺伝子を支配下に置く。また、転写調節因子を多用することも特徴であり、これによりこうした大量の遺伝子群の発現制御を行っている。多くのバクテリアは housekeeping  $\sigma$ の他に、形態変化や環境からのシグナルへの特別な応答などを担う alternative  $\sigma$ を保有する (Gruber and Gross 2003; Helmann 2002)。多くの alternative  $\sigma$ は 50~100 の遺伝子の転写を制御し、多くの場合は補助的な転写調節因子を要さない。この点は housekeeping  $\sigma$ と大きく異なる点である。数的な限りがあることや転写調節因子を要しないといた性質をもつことから、ある特定の alternative  $\sigma$ に注目してその完全なセットのプロモーターに対しての個々の挙動を調べることは実質的に可能である。プロモーター自身がどのように応答するかを調べることにより、転写のアウトプットに寄与しているかという全貌を知ることが期待される。本章では、*E. coli*の alternative  $\sigma$ である $\sigma^E$ に着目し、 $\sigma^E$ により認識される全プロモーターセットの挙動を解析した。

*E. coli*及び関連するバクテリアにおいて、 $\sigma^E$ によって誘導されるペリプラズムのストレス応答 (envelope stress response) には、2つの重要な機能がある。外膜の恒常性維持の機能と宿主への感染における病原性の決定因子としての機能である (Hayden and Ades 2008; Rowley et al. 2006)。 $\sigma^E$  レギュロンの生物種を超えた比較の結果、限られた小数のコアグループのプロモーターが種間で保存されているに留まり、大半のグループのプロモーターは種間で変化に富むことがわかった (Rhodius et al. 2006)。2つの最も保存されたプロモーターはいずれも制御回路を構成する。一つ目は、 $\sigma^E$ 自身及び、細胞質の HSR に関わる $\sigma^{32}$ のプロモーターである。二つ目は、ポーリン (porin) とリポポリサッカライド (LPS) の合成とアセンブルに直接関連する機能をもつ遺伝子のプロモーターである (Nikaido 2003)。このグループには、以下の3つが存在する。複数のポーリンを負に制御する2つの small RNA (sRNAs) (Bossi and Figueroa-Bossi 2007; Johansen et al. 2006; Papenfort et al. 2006; Thompson et al. 2007; Udekwu and Wagner 2007)、 $\beta$ -バレルタンパク質の外膜への挿入を行う machine を構成する4つの因子 (Sklar et al. 2007; Wu et al. 2005)、そして $\beta$ -バレル挿入の machine にポーリンの前駆体を運ぶシャペロンである。これら種間で保存されたコアグループはいずれも外膜の恒常性維持に関与する因子である。 $\sigma^E$  レギュロンの大半は種間で保存されていない（もしくは保存性が低い）種特異的なものであり、これらの多くが病原性に関与する。

$\sigma^E$  を活性化するシグナルは3つ知られている。まず第一に、 $\sigma^E$ の活性はポーリンのア

センブリの状態に非常に敏感である (Ades et al. 1999; Meccas et al. 1993)。ペリプラズムに異常なポーリンが蓄積した場合には、一連のプロテアーゼのカスケード (DegP、RseP) が始動し最終的には $\sigma^E$ の anti- $\sigma$ である RseA が分解され、 $\sigma^E$ が活性化される (詳しくは序章を参照)。第二に、 $\sigma^E$ の活性は LPS の状態に敏感であり (Chaba et al. 2011; Lima et al. 2013)、異常な LPS が蓄積した場合には、通常 RseA を分解から守っている RseB が RseA から外れ、その結果 RseA が分解され $\sigma^E$ が活性化される (詳しくは序章を参照)。第三のシグナルは、RseA、RseB や一連のプロテアーゼの経路とは無関係の、生育のフェーズと栄養分の貧富に応答する細胞内のシグナルである (Costanzo and Ades 2006; Costanzo et al. 2008; Gopalkrishnan et al. 2014)。 $\sigma^E$ の活性は定常期への移入に際し有意に高まることが知られており、ppGpp と co-activator である DksA が直接的ならびに間接的の 2 つの異なる方法でこの応答を仲介することが示唆されている。まずは、直接的な $\sigma^E$ の活性化についてであるが、in vitro 転写実験において ppGpp の添加が $\sigma^E$ による転写を強めたことから ppGpp が直接 $\sigma^E$ ホロ酵素による転写を促進すると考えられる (Costanzo et al. 2008)。また、ppGpp による間接的な $\sigma^E$ の活性化については、 $\sigma^{70}$ ホロ酵素を rRNA オペロンから開放することで、 $\sigma^E$ 依存の転写への RNAP の利用率を増加させる可能性が示唆されている。実際に対数増殖期の $\sigma^{70}$ ホロ酵素による rRNA の転写は、転写量全体 50%以上を占める (Bremer and Dennis 1996)。そして、一般的に $\sigma$ は RNAP に対して過剰に細胞内に存在し、絶えず RNAP をめぐり $\sigma$ の争いが存在すると考えられている (Grigorova et al. 2006)。ppGpp により rRNA の転写から RNAP が開放されることで (Gourse et al. 1998)、 $\sigma^E$ が RNAP を捕らえる確率が上がるのである。このように、バクテリアの細胞において $\sigma^E$ ホロ酵素は非常に複雑な制御を受けている。

これまでの研究では、レギュロンにおける in vivo でのプロモーターの寄与を定量的に詳細に調べた例はほとんどない。一部存在したとしてもそのほとんどは転写調節因子の結合領域に関わるものである。例えば、PhoP の結合領域を変化させた場合のプロモーター強度との相関 (Miyashiro and Goulian 2007; Perez and Groisman 2009; Perez et al. 2009)、Cpx 支配下のプロモーターの特異的な応答 (Price and Raivio 2009) 等がこれに該当する。alternative  $\sigma$ のプロモーター強度に焦点を絞った研究は唯一 $\sigma^S$ に関するものが知られている。しかしながら、この解析においては 500 bp にわたる領域を使用していることから、プロモーターそのものに限定した寄与を観察したとは言い難い (Shimada et al. 2004)。

第二章では、Carol Gross 研究室における過去の研究から明らかとなった全ての $\sigma^E$ プロモーターを用い、 $\sigma^E$ プロモーターの $\sigma^E$ ホロ酵素への寄与を解析した。ここでは *E. coli* (K-12 MG1655 と CFT073) 及び *Salmonella typhimurium* の $\sigma^E$ 特異的なプロモーターを使用した (Rhodius et al. 2006)。最も強い部類のプロモーターは、いずれも $\sigma^E$ レギュロンの主要な機能と言える、転写調節因子やポーリンの恒常性維持に関わるものであった。RNAP の  $\alpha$ -サブユニット C 末端が結合する UP エlement (-35~-65) の存在により、ほとんどのプロモーターの強度は強められることがわかった。また、これまでに僅か数個のプロモ-

ターの事例から推論されていた ppGpp による  $\sigma^E$  プロモーターの活性化の現象も、今回複数の  $\sigma^E$  プロモーターで確認された。そして、 $\sigma^E$  プロモーターは、様々な生理的な状態において変化する  $\sigma^E$  ホロ酵素の量に対して、応答することがわかった。

## 2-2 結果

### 実験の方法論

序章で述べた Carol Gross 研究室での網羅的な解析により 60 の  $\sigma^E$  依存のプロモーターが明らかとなっている (Rhodius et al. 2006)。この全てのプロモーターの生体内での発現挙動を定量的に捉えることを目的に、全  $\sigma^E$  依存のプロモーターと GFP を融合させたプロモーターライブラリーを作製した。プロモーターライブラリーの母体には GFP を搭載した低コピープラスミド pUA66 を使用した。

プロモーター領域の長さで発現プロファイルの違いを調べるため、全ての遺伝子に対して 2 種類のプロモーター長を検討することとした。すなわち、-35 から +20 までを含む「短い」プロモーターと、-65 から +20 までを含む「長い」プロモーターを構築した。「短い」プロモーターはコアモチーフである -10 と -35 のみを含むものであり、「長い」プロモーターは上流の UP エlement までを含むものである (Ross et al. 1993)。この 2 つのプロモーターを比較することで全レギュロンレベルでの UP エlement の効果を検証することを目的とした。序章で述べた  $\sigma^E$  プロモーターだけではなく、第一章で述べた  $\sigma^{32}$  プロモーターにおいても多くから UP エlement と思われる A/T-rich モチーフが検出され、これら alternative  $\sigma$  において UP エlement が重要な役割を担っている可能性が考えられた。*E. coli* において  $\sigma^E$  は支配下に置くプロモーターの数が ~50 程度であり、かつこれらが全てが特定されていることから、特定の  $\sigma$  を対象とした全レギュロンでの UP エlement の効果を検証することが可能である。また、+20 までを含む形でクローニングした理由は、RNAP のプロモーターからの離脱 (promoter escape) に関与する転写開始のはじめの配列を残すことで、その影響を反映させるためである。

次に、アッセイに用いた宿主について述べる。本研究では、まずストレス状況下での全レギュロンの挙動を調べることを目的に、 $\sigma^E$  を過剰発現させた菌株 (overexpressed) における状況を定常状態の菌株 (basal) と比較した。また、 $\sigma^E$  プロモーターの中には  $\sigma^E$  非依存のプロモーター活性がどのくらい存在するかを検討するため、 $\sigma^E$  をコードする *rpoE* 遺伝子を欠損した株におけるレギュロンの挙動を調べた。第一章では  $\sigma^{32}$  のプロモーターのいくつかは  $\sigma^{70}$  によっても転写されるという現象が明らかとなった。 $\sigma^E$  においてもこうした他の  $\sigma$  とのオーバーラップがあるのか興味もたれた。

生育フェーズによる比較と ppGpp の影響について述べる。 $\sigma^E$  は定常期への移行の際に活性化されることがわかっている。また、この活性化には ppGpp が関与していることが示唆されている。こうした知見は、 $\sigma^E$  レギュロンの一つである *rpoH* プロモーターを用いた解析によって明らかとされた (Costanzo and Ades 2006; Costanzo et al. 2008; Gopalkrishnan et al. 2014)。そこで、定常期での  $\sigma^E$  の活性化の状況と ppGpp の効果について、全レギュロンのレベルでの解析を行うことを目的に、対数増殖期と定常期の比較及び ppGpp の影響について検討を行った。

次に実験のシステムについて述べる。各プロモーターバリエーションを各々保持する菌株の

培養には 96-well のプレートを使用し、Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo Fischer Scientific) を用いて、通気条件で温度を制御した状態での振盪培養と同時に既定の時間間隔での生育 (OD) と GFP 蛍光の測定を行った。OD の増加に対する GCF 強度の増加 (相対変化; GCF/OD の傾き) をプロモーターの強度と規定し、以降の実験データは全てこのプロモーター強度のパラメーターを棒グラフによって表示した (図 16)。なお、この条件でのプラスミドの安定保持 (コピー数の安定性) については本研究での検討及び Alon のラボでの検討 (Kaplan et al. 2008) によって確認されている。また、実験手法の全体像については「実験材料と実験方法」の項に詳細に記述した。 $\sigma^E$  依存の *rpoH* プロモーター近傍には $\sigma^{70}$  依存のプロモーターがオーバーラップして存在していることが知られており、本実験でのコンストラクトにはこの $\sigma^{70}$  依存のプロモーターが含まれている (Erickson and Gross 1989)。一方で、しばしば研究に用いられる $\sigma^E$  依存の *rpoHP3::lacZ* レポーターにはこの $\sigma^{70}$  依存のプロモーターは含まれない。

#### ストレス条件下での $\sigma^E$ 依存プロモーターの活性

$\sigma^E$  の活性はフィードバックならびにフィードフォワードにより巧みに制御されている。ストレスの存在下においては、anti- $\sigma$  である RseA が素早く分解され、 $\sigma^E$  が anti- $\sigma$  の結合からはずれることで活性化し、転写が可能となる (Ades et al. 1999)。そして、更に $\sigma^E$  による自身 (*rpoE*) の転写促進 (Rouviere et al. 1995) により $\sigma^E$  はますます増加し、この増加はストレスが治まり RseA の分解が鈍るまで続く。こうしたストレスの影響を実験に反映させるため、まずは $\sigma^E$  過剰発現条件下での解析を行った。対数増殖期 ( $OD_{600}$ , 0.7~1.4) (図 17) と定常期への移行期 ( $OD_{600}$ , 1.5~2.7) (図 18) の両方について実験を行った。実験には全て $\sigma^E$  プロモーターの「短い」構築と「長い」構築の両方を用い、LB 培地での培養にて $\sigma^E$  を過剰発現させた。その結果、ほぼ全ての場合において「長い」プロモーターが「短い」プロモーターよりも高い活性を示し、UP エlement への $\alpha$ -C 末ドメインの結合がプロモーター活性を上昇させていることが示唆された。しかしながら、その度合いは各々変化に富み、多くは~1.5 から 3.0 倍程度 (例えば *rpoE*, *clpX*) である中でいくつかは 5 から 7 倍もの違いを示した (例えば *rybB*, *micA*)。他と明確に異なる挙動で「短い」プロモーターが「長い」プロモーターよりも高い活性を示した数少ない例外も存在した (*rpoH* と *psd*)。先にも述べたように、本実験で用いた *rpoH* プロモーターには $\sigma^{70}$  依存のプロモーターが含まれるため、他の $\sigma$  による影響が大きい場合にこうした現象が見られる可能性が考えられる。いずれにしても、レギュロン全体で見た際に、(程度の違いはあるものの) ほぼ全てが UP エlement の影響を受け、活性が高められているという興味深い実態が明らかとなった。

一連の対数増殖期のプロモーター強度のデータから、約 40 個のプロモーターは有意な活性を持っていることが明らかとなり、またその強度は非常に広いレンジで変化に富むことがわかった (~100 倍のレンジ)。興味深いことに、最も強い部類に当たる一連のプロモーターは特に $\sigma^E$  の保存された機能に関わっていると考えられた。例えば、制御因子である $\sigma^E$

自身とその負の制御因子である anti- $\sigma$  (*rpoE* と *rseA*)、そして $\sigma^{32}$  (*rpoH*) は強いプロモーターの部類に含まれた。また外膜のポーリンの恒常性維持に関連する因子も強い $\sigma^E$  プロモーター活性を持つことがわかった。ポーリンを負に制御することが知られる 2 つの sRNA (*rybB* と *micA*)、外膜へのタンパク質の挿入に働く因子 (*yaeT*、*smpA*、*yfgL*)、ポーリンの外膜への輸送に関わる因子 (*degP*) などがこれに当てはまる。「長い」プロモーターの上位の 10 プロモーターは「短い」プロモーターの上位の 10 プロモーターでもあることから、コアプロモーターからの発現がプロモーター強度に最も影響を及ぼしていることがわかった。その中で *rybB* は、UP エlement が特に強度に大きく影響しているという点で例外と言える挙動を示した。

#### 対数増殖期と定常期における $\sigma^E$ 活性の比較

次に、図 17 と図 18 のデータをもとに、生育期の違いによる $\sigma^E$  レギュロンのプロモーター挙動の違いについて比較を行った。その結果、非常に特徴的ないくつかの傾向が見られた。まず強度であるが、概ね 3 倍程度の違い（定常期で強い）が認められ、そのバラつきは非常に小さなものであった（図 19）。この傾向は「長い」プロモーターでも「短い」プロモーターでも同じであった。おそらく UP エlement の効果は、生育期とは無関係にプロモーター全般に活性を高める効果であると考えられた。強度の順位については、対数増殖期と定常期で酷似していた（図 17 と図 18 の比較）。例えば、対数増殖期での強度が 10 位以内に含まれるプロモーターのうち 8 つは定常期においても 10 位以内に含まれており、更に強さの順位についても大きな入れ替わりはない（例えば対数増殖期で最も強い活性を示した *rpoE* プロモーターは定常期においても第二位の強度を示した）。

$\sigma^E$  プロモーターの定常期での発現上昇については、 $\sigma^E$  レギュロンの一つである *rpoH* プロモーターを用いた研究による知見があり、ppGpp が関与している可能性が指摘されている（Costanzo and Ades 2006; Costanzo et al. 2008; Gopalkrishnan et al. 2014）。本研究において $\sigma^E$  プロモーターライブラリーを用いて検証したところ、多数のプロモーターにおいて ppGpp の影響が確認された（図 22; 後述）。

以上の結果から、定常期への移行において、ほとんどの $\sigma^E$  プロモーターはどれも同じようなレベルで発現が上昇することがわかった。これまで、*rpoH* プロモーターを利用した系においてこうした定常期での $\sigma^E$  活性の上昇が報告されてきたが、今回他の多数の $\sigma^E$  プロモーターにおいてもはじめてこの現象が確認された。

#### $\sigma^E$ 非依存のプロモーター活性

第一章でも述べたとおり、複数の $\sigma$ のプロモーターがオーバーラップして存在しているケースが散見される。そこで、次に今回対象としたプロモーターが $\sigma^E$  非依存的な活性を有するかを調べるため、 $\sigma^E$  を保持しない株を用いた実験を行った（図 20）。なお、 $\sigma^E$  をコードする *rpoE* 遺伝子の欠損は致死であるため、本実験にはサブレッサー変異株 (De Las Penas et

al. 1997b) を用いた。その結果、 $\sigma^E$  非依存の活性は 9 つのプロモーターのみで検出された。その中の 3 つ (*plsB*, *yjfO*, *rpoH*) は「長い」「短い」両方のプロモーターにおいて  $\sigma^E$  存在下でより高い活性を示したことから、 $\sigma^E$  依存の活性が優勢であったと考えられる。残りの 6 つのプロモーター (*yhjJ*, *yieE*, *ybcR*, *ybjW*, *yecI*, *yehH*) については、「長い」「短い」に関わらず、 $\sigma^E$  存在下ならびに非存在下でほぼ同等もしくは非存在下で強い活性を示した。これらのことから、 $\sigma^E$  による認識に加え他の  $\sigma$  による認識も受ける可能性が考えられる。なお、過去に行った 5'RACE による転写開始点のマッピングの実験において、少なくとも *yhjJ*, *yieE* については  $\sigma^E$  特異的な転写開始点が見出されたことから、 $\sigma^E$  による同プロモーターの認識は確実であると考えられる (Rhodius et al. 2006)。また、いくつかについては、 $\sigma^E$  依存の転写開始点の近傍に  $\sigma^E$  非依存の転写開始点が認められ、これらの  $\sigma^E$  非依存の転写産物は  $\sigma^E$  存在下では消失したり或いは弱まったりすることから (Rhodius et al. 2006)、 $\sigma^E$  と別の  $\sigma$  が競合している可能性が考えられる。 $\sigma^E$  の存在下ではプロモーター領域が  $E\sigma^E$  に占領されるため競合する別の  $\sigma$  による転写が抑制されるが、 $\sigma^E$  の非存在下では競争がなくなるため別の  $\sigma$  による転写が促進されるものと考えられる。なお *rpoH* プロモーター (*rpoHP3*) では  $\sigma^E$  と  $\sigma^{70}$  の競合が実証されている (Erickson and Gross 1989)。

本実験の結論として、大多数の  $\sigma^E$  プロモーターは完全に  $\sigma^E$  依存であり、ごく一部のみが別の  $\sigma$  とオーバーラップして制御されているということが明らかとなった。 $\sigma^{32}$  の場合にも約 50 個のプロモーター中で 6 つにおいてのみ  $\sigma^{70}$  とのオーバーラップが見られた(第一章)。以上のことから、これらの alternative  $\sigma$  は、概して、限られた数のレギュロンをほぼ単独で独占的に支配していることがわかった。

#### “通常の生育 (basal)”条件下での $\sigma^E$ 依存プロモーターの活性

序章で述べたとおり、 $\sigma^E$  の活性はフィードバックとフィードフォワードによる複雑な機構で制御されている。ここまでの実験では、主にストレス存在下のプロモーターの挙動を調べるために  $\sigma^E$  の過剰発現株を用いて実験を行ってきた。しかしながら、自然環境においてはストレスへの対応を完了した後ストレスが取り除かれた際には、 $\sigma^E$  は速やかに抑制される。ストレスの存在しない通常の生育の状態では  $\sigma^E$  の細胞内での活性は非常に低く抑えられていると考えられるため、ストレスの存在しない通常の生育条件下 (basal)、すなわち  $\sigma^E$  が制限された状態と、ストレス存在下の  $\sigma^E$  が過剰である状態 (overexpression) の比較をすることは非常に興味深いと考えられた。そこで、まずはストレスの存在しない通常の生育条件下 (basal) の状況を調べるため、内在性の  $\sigma^E$  を持つ (野生型) 株のプロモーター挙動の検討を行った (図 21)。しかしながらストレス非存在下では全般的にプロモーター活性が低いことから、*E. coli* の細胞自身の蛍光発光 (バックグラウンド) のために、有意な発光の検出には限界があった (プロモーター強度がバックグラウンドの 2 倍以上必要であった)。そこで、最も活性の強かった 10 個のプロモーターに限って検証を行うこととした (図 21)。その場合に問題となるのが  $\sigma^E$  非依存の活性をもつプロモーターの扱いである。

10 個のプロモーターの中には、6 つの $\sigma^E$ 非依存のプロモーター活性を有すものが含まれた (*yecI*, *plsB*, *yehH*, *rpoH*, *yhjO*, *ybcR*; 図 20)。実際に 4 つのプロモーターは対数増殖期に、 $\sigma^E$  存在下よりも非存在下において強いプロモーター活性を示した (*yecI*, *plsB*, *yehH*, *rpoH*; 図 21A)。 $\sigma^E$  非依存の活性は定常期では全般的に目立たなくなる傾向がみられた (図 21B)。いずれにしても $\sigma^E$  非依存の活性を定量的に考慮することは難しいため、まずは $\sigma^E$  と直接関わる現象を正しく捉えることを目的に、 $\sigma^E$  依存の活性のみをもつ 4 つのプロモーター (*micA*, *rpoE*, *rseA*, *rybB*) に限って考察と議論を行うこととする。こうした視点で観察すると、 $\sigma^E$  制限条件 (basal) で非常に特徴的なプロモーターの挙動が見えてきた。一つは、定常期への移行においてである。 $\sigma^E$  制限条件 (basal) では定常期でのダイナミックな上昇(対数増殖期に比べて)が見られた(図 21A と図 21B の比較及び表 6“Growth phase”(表 6 については後に詳しく述べる))。例えば *micA* を例にとると、 $\sigma^E$  制限条件 (basal) では対数増殖期から定常期で約 30 倍ものプロモーター活性の上昇が見られた (*micA* の図 21A Long-basal と図 21B Long-basal の比較)。ストレス条件下 (overexpressed) での定常期への移行時の変化が概ね 2~3 倍程度であったこと (図 19A) に比べるとはるかにダイナミックな変化と言える。もう一つは、UP エLEMENT の効果である。 $\sigma^E$  制限条件 (basal) では「長い」プロモーターでのダイナミックな上昇が見られた (図 17 と図 21A の Long と Short の比較、図 18 と図 21B の Long と Short 比較及び表 6“UP effect”(表 6 については後に詳しく述べる))。例えば *micA* の $\sigma^E$  過剰発現条件では UP エLEMENT による活性上昇の効果は概ね 3~4 倍程度であったが (図 17、図 18)、 $\sigma^E$  制限条件 (basal) では UP エLEMENT の効果が 20~30 倍まで増加した。この二つの特徴的なプロモーターの挙動は $\sigma^E$  非依存のプロモーター活性を一切持たない 4 つのプロモーター (*micA*, *rpoE*, *rybB*, *rseA*) に限らず、10 個全てに共通して当てはまる現象であり非常に興味深い $\sigma^E$  プロモーターの挙動と言える (後述)。そこで、以下に、 $\sigma^E$  制限条件 (basal) と $\sigma^E$  過剰下 (overexpression) の詳細を検証、考察する (表 6)。

まず、 $\sigma^E$  制限下 (basal) では過剰下に比べ、定常期移行時にダイナミックなプロモーター活性の上昇が見られた (表 6“Growth phase”)。定常期移行時の変化について、 $\sigma^E$  制限下 (basal) では「長い」プロモーターで平均約 20 倍、「短い」プロモーターで平均約 7 倍増加するが、この増加は $\sigma^E$  過剰下 (overexpressed) では僅か 3-4 倍にとどまった (表 6)。この平均値は 4 つの完全な $\sigma^E$  依存のプロモーターの間であっても、全プロモーターの間であっても大きくは異なることから、 $\sigma^E$  に依存した性質と考えられた。次に、定常期移行時のプロモーター活性の上昇と ppGpp の影響を全レギュロンを対象に調べるため (これまで $\sigma^E$  依存の *rpoH* プロモーターにおいて ppGpp の影響が知られていた)、 $\sigma^E$  プロモーターライブラリーを用いて検証することとした。宿主には 2 つの ppGpp 合成酵素をコードする *relA* と *spoT* を欠損することで ppGpp を生合成できないように改変した ppGpp<sup>0</sup> 株を使用した。図 22 に野生株及び ppGpp<sup>0</sup> 株の「長い」及び「短い」プロモーターの対数増殖期と定常期のプロモーター活性を示した。なお、ここでも野生株の $\sigma^E$  プロモーター活性の絶

対値が総じて小さいため、バックグラウンドに対して有意なシグナルと考えられた上位 10 個のプロモーターのみを取り上げた。野生株において定常期移行で見られるプロモーター活性の上昇が、ppGpp<sup>0</sup>株においては全般的に全く見られなくなるもしくは弱まることから、 $\sigma^E$ プロモーターの定常期での発現上昇に ppGpp が関与していることが示唆された (UP エlementの有りに無しに関わらず)。こうした定常期への移行時における ppGpp 依存の $\sigma^E$ の活性化は既に *rpoH*, *rybB* で報告されているが (Costanzo and Ades 2006; Costanzo et al. 2008; Thompson et al. 2007)、その他多くの $\sigma^E$ プロモーターでも見られる一般的な現象であることが今回明らかとなった。

次に、 $\sigma^E$ 制限下 (basal) では過剰下 (overexpressed) に比べ、「長い」プロモーターでのダイナミックな上昇が見られた (表 6“UP effect”)。特に発現量の絶対値が比較的高い定常期の条件において顕著であり、この条件での定量値は信頼できる有意な値と考えられた。まずは、4つの完全な $\sigma^E$ 依存のプロモーターについて議論する。UP エlementの存在 (「長い」プロモーター) により $\sigma^E$ 制限下 (basal) では 15 倍増加するが $\sigma^E$ 過剰下 (overexpressed) では 3.6 倍の増加にとどまったことから、 $\sigma^E$ 制限下 (basal) では UP エlementによる活性上昇の効果が顕著であることがわかった。同じ傾向は全 10 個のプロモーターでも共通に見られることから (表 6)、 $\sigma^E$ 制限下 (basal) では UP エlementが $\sigma^E$ プロモーターの強度に大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。 $\sigma^{70}$ 依存のプロモーターにおいては UP エlementが RNAP のプロモーターへの結合を強化することが知られていることから (Haugen et al. 2008)、 $\sigma^E$ プロモーターにおいても同様のことが起きている可能性が考えられる。恐らくは、 $\sigma^E$ 過剰下 (overexpressed) では $\sigma^E$ プロモーターが既に $\sigma^E$ ホロ酵素で飽和されてしまっているために UP エlementの影響が小さく、また $\sigma^E$ 制限下 (basal) では $\sigma^E$ ホロ酵素の分子数が少ないために UP エlementによる結合力の影響が大きいのであろう。こうした考察から、次のような UP エlementの新たな機能が推測できる。 $\sigma^E$ プロモーターの UP エlementの役割の一つは、対数増殖期から定常期への移行で大きく変わる $\sigma^E$ ホロ酵素のレベルに応答してプロモーターの強度をダイナミックに変化させることにあるのかもしれない。

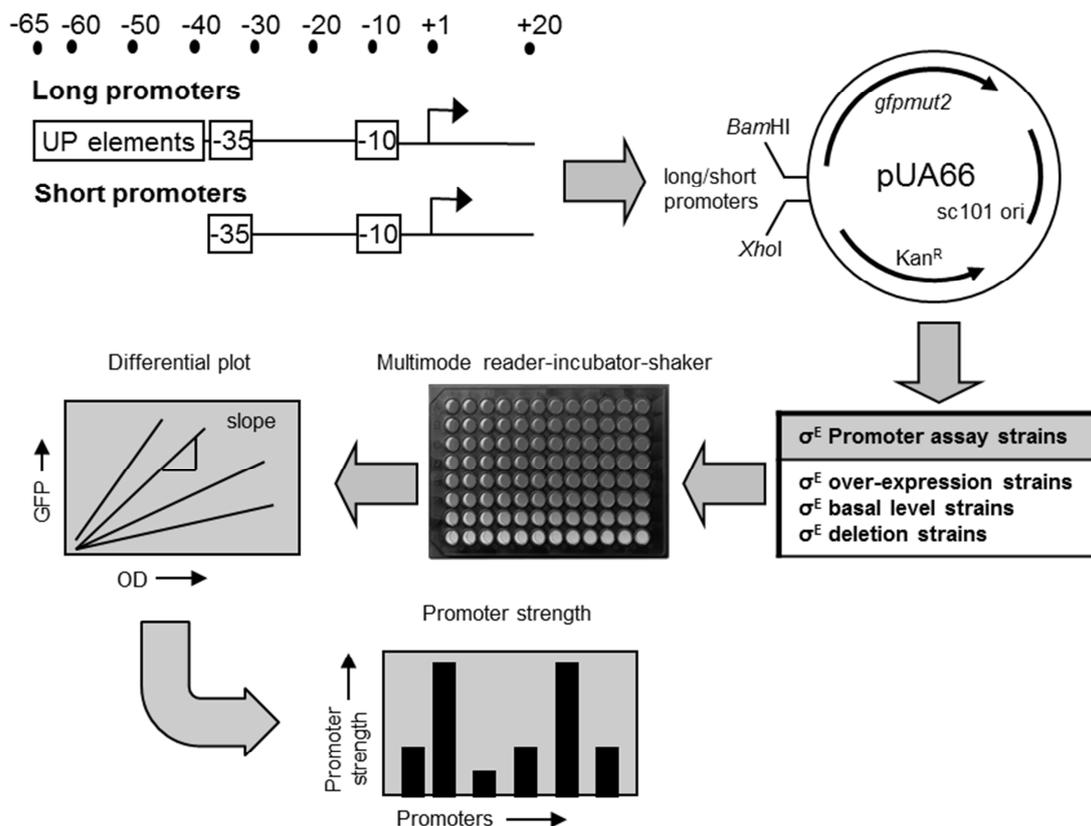


図 16  $\sigma^E$  依存プロモーターの強度の測定における方法論

60 個の  $\sigma^E$  依存のプロモーターについて、-35、-10 からなるコアエレメント (-35~+20) を含む「短い」フラグメントと UP エレメントまで (-65~+20) を含む「長い」フラグメントを GFP 発現ベクター pUA66 にクローニングした。これらのプロモーターライブラリーをアッセイに用いる菌株である  $\sigma^E$  過剰発現株 (CAG58200 からの派生株)、 $\sigma^E$  制限株 (basal level) (CAG45113 と CAG55907 株からの派生株)、 $\sigma^E$  欠損株 (CAG22216 株からの派生株 ( $\sigma^E$  の必須性をサプレスする変異を持つ)) に導入した。各ライブラリー導入株を 96-well プレートにて Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo Fischer Scientific) を使用した 32°C の通気条件 (振盪) にて培養した。15 分間隔で菌体生育 (OD) と GFP 蛍光 (RFU) を測定した。各菌株について、菌体生育 (横軸) と GFP 蛍光 (縦軸) の相関をプロットした。対数増殖期と定常期のそれぞれについて、プロットの傾きをプロモーター強度として計算した。全てのプロモーター強度の計算において、対照としてプロモーターを持たない GFP ベクター pUA66 を保持する菌株のアッセイを行い、この値をバックグラウンドの蛍光値として差し引いた。詳細は実験材料と実験方法のセクションを参照のこと。

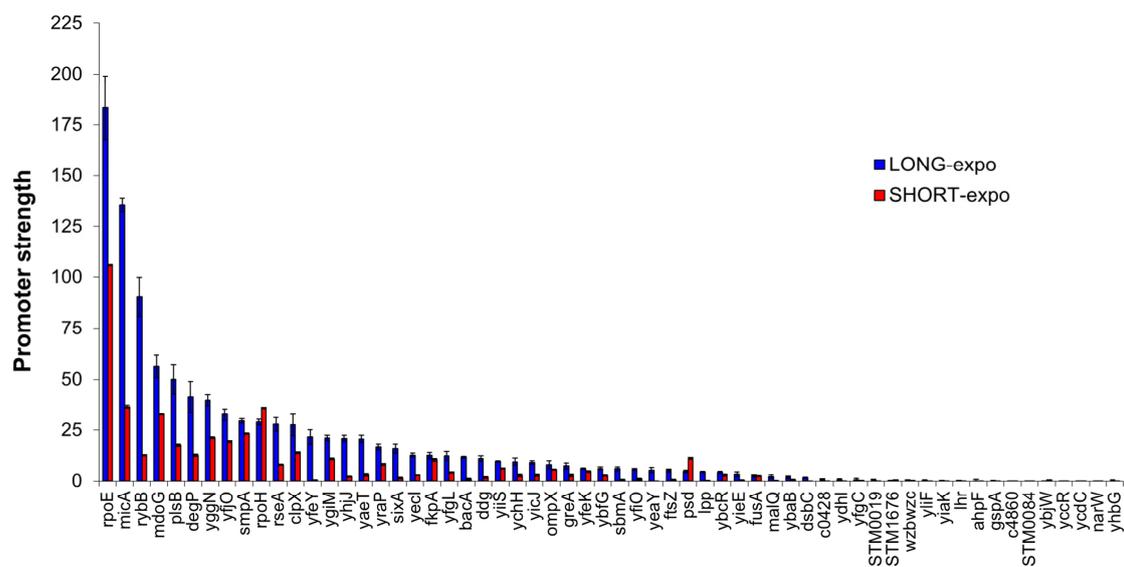


図 17  $\sigma^E$  過剰発現後の対数増殖期における「短い」及び「長い」 $\sigma^E$  プロモーターの挙動  
 LB 培地 32°C での培養における、 $\sigma^E$  発現プラスミド pLC245 を保持する  $\sigma^E$  過剰発現株 CAG58200 を宿主  
 に各プロモーターライブラリーを導入した派生株の対数増殖期 (OD<sub>600</sub> 0.7-1.4) での「短い」及び「長い」  
 $\sigma^E$  プロモーターの発現強度を示した。100  $\mu$ M の IPTG により  $\sigma^E$  の誘導を行った。bar は 3 つの独立した  
 実験の平均値を表し、error bar は 1 標準偏差を表す。

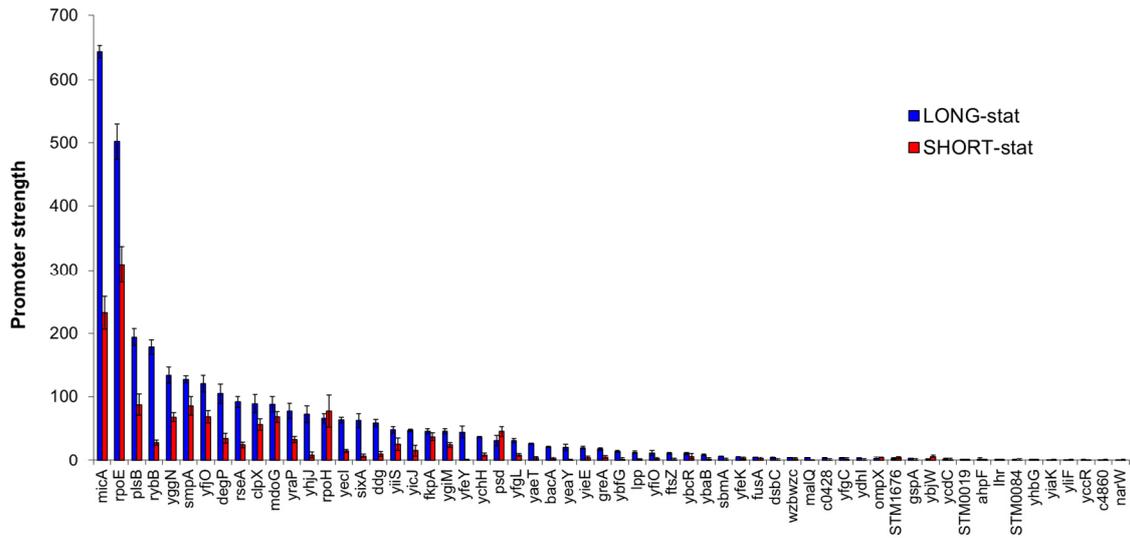
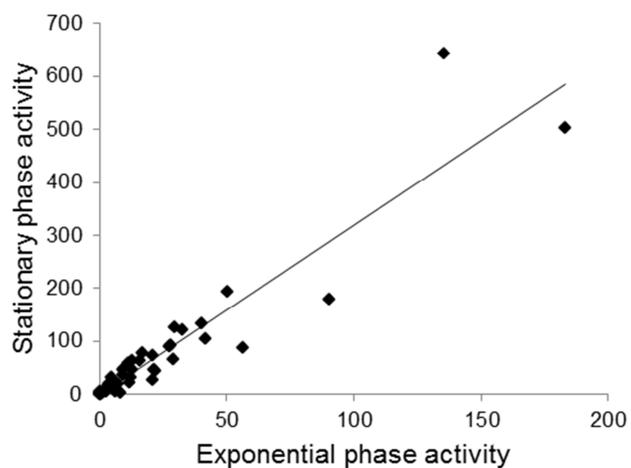


図 18  $\sigma^E$  過剰発現後の定常期における「短い」及び「長い」 $\sigma^E$ プロモーターの挙動  
 LB 培地 32°Cでの培養における、 $\sigma^E$ 発現プラスミド pLC245 を保持する $\sigma^E$ 過剰発現株 CAG58200 を宿主に各プロモーターライブラリーを導入した派生株の定常期 (OD<sub>600</sub> 1.5-2.7) での「短い」及び「長い」 $\sigma^E$ プロモーターの発現強度を示した。100  $\mu$ M の IPTG により $\sigma^E$ の誘導を行った。bar は 3つの独立した実験の平均値を表し、error bar は 1標準偏差を表す。

A



B

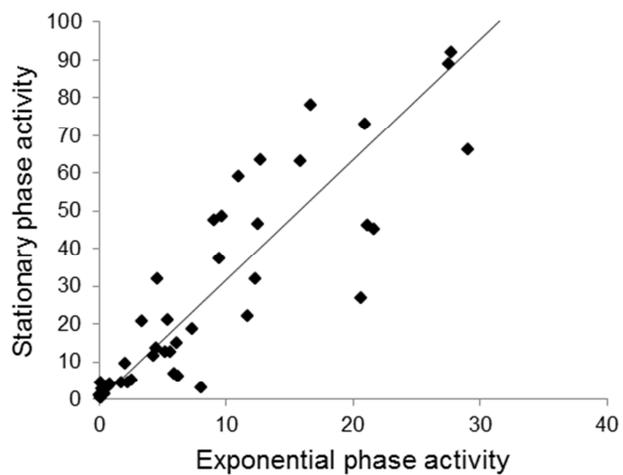


図 19 対数増殖期と定常期のプロモーター強度の比較

$\sigma^E$  過剰発現後の「長い」プロモーター(A)と「短い」プロモーター(B)の、対数増殖期（横軸）と定常期（縦軸）における強度を比較した scatter プロット。発現データは図 17 及び図 18 に由来する。

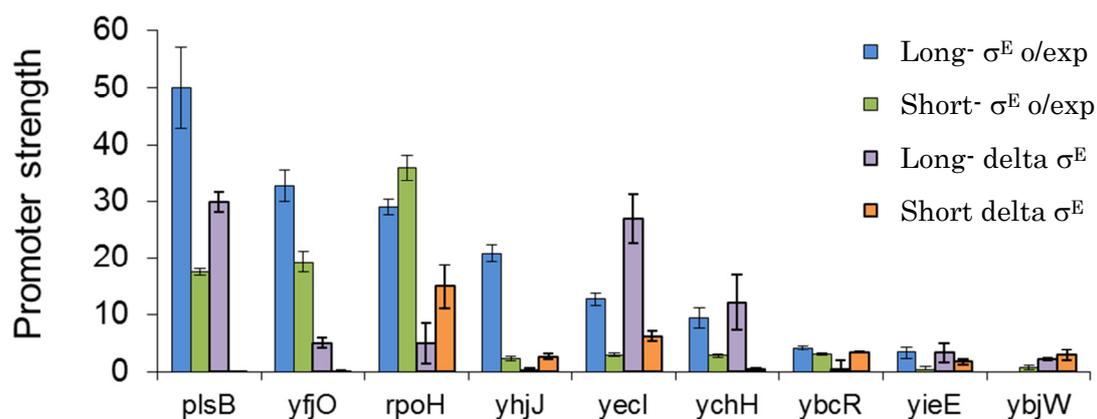


図 20  $\sigma^E$  非依存の「長い」及び「短い」プロモーターの強度

$\sigma^E$  過剰発現株 ( $\sigma^E$  o/exp;  $\sigma^E$  発現プラスミド pLC245 を保持する CAG58200 を宿主とする) と  $\sigma^E$  欠損株 (delta  $\sigma^E$ ; CAG22216 を宿主とする) の「長い」及び「短い」 $\sigma^E$  プロモーターの強度の比較がグラフに示されている。有意な  $\sigma^E$  非依存のプロモーター活性を示したプロモーターは僅かに 9 つであった。全てのプロモーター強度の解析は、LB 培地 32℃ 培養での対数増殖期 (OD<sub>600</sub> 0.7-1.4) において行った。100  $\mu$ M の IPTG により  $\sigma^E$  の誘導を行った。bar は 3 つの独立した実験の平均値を表し、error bar は 1 標準偏差を表す。

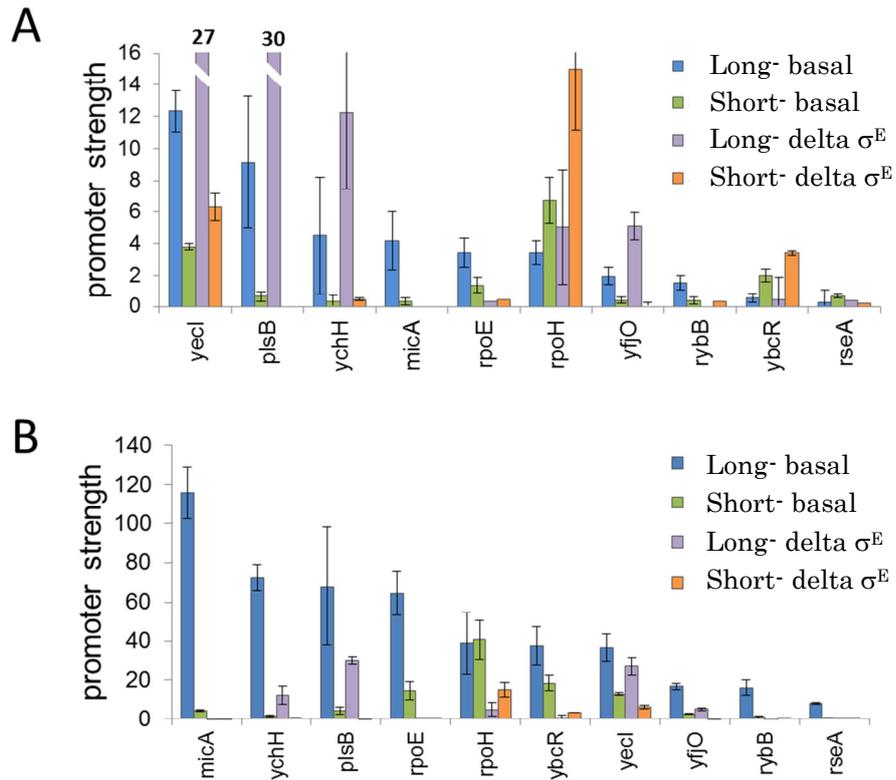


図 21  $\sigma^E$ 制限下 (basal level) での「長い」及び「短い」 $\sigma^E$ 依存プロモーターの強度上位 10 の発現強度をもつ「長い」及び「短い」プロモーターを対象とした、 $\sigma^E$ 制限下 (basal; CAG45113 を宿主とした) 及び $\sigma^E$ 非存在下 (delta  $\sigma^E$ ; CAG22216 を宿主とした) の比較。プロモーター強度の測定は、LB 培地 32°C培養での対数増殖期(A)もしくは定常期(B)において行った。bar は 3 つの独立した実験の平均値を表し、error bar は 1 標準偏差を表す。*yecI*及び*plsB*プロモーターの活性は、bar のレンジを越えているため数値にて表示した ((A)において)。

表 6  $\sigma^E$  制限下 (basal) と過剰発現下 (overexpression) のプロモーターの性質の比較

Promoter <sup>c</sup>	Fold change in promoter strength							
	Growth phase <sup>a</sup>				UP effect <sup>b</sup>			
	Long (stat/exp)		Short (stat/exp)		Basal (long/short)		o/Exp (long/short)	
	Basal	o/exp	Basal	o/exp	Exp	Stat	Exp	Stat
<i>micA</i>	27.6	4.8	14.3	6.3	13.7	26.4	3.7	2.8
<i>rpoE</i>	18.7	2.7	10.6	2.9	2.5	4.5	1.7	1.6
<i>rseA</i>	29.8	3.3	0.9	3.2	0.4	13.7	3.5	3.7
<i>rybB</i>	10.5	2.0	2.3	2.3	3.9	17.9	7.2	6.3
<i>plsB</i> *	7.4	3.9	6.9	5.0	14.3	15.4	2.9	2.2
<i>rpoH</i> *	11.4	2.3	6.0	2.2	0.5	1.0	0.8	0.9
<i>ybcR</i> *	68.4	2.7	9.3	2.3	0.3	2.0	1.4	1.7
<i>yehH</i> *	16.1	4.0	5.3	3.4	13.6	41.4	3.4	4.0
<i>yecI</i> *	3.0	5.0	3.4	5.3	3.2	2.8	4.3	4.1
<i>yjgO</i> *	8.6	3.7	6.8	3.6	4.9	6.2	1.7	1.8
Avg	20.1	3.4	6.6	3.6	5.7	13.1	3.1	2.9

<sup>a</sup> プロモーター強度の成育期 (定常期 / 対数増殖期) による変化の比較。「長い (Long)」及び「短い (Short)」のプロモーターそれぞれについての  $\sigma^E$  制限下 (Basal) と  $\sigma^E$  過剰発現下 (o/exp) の定常期 (stat) / 対数増殖期 (exp) 比を示した。示されている値は定常期 / 対数増殖期の比。

<sup>b</sup> 「長い」及び「短い」プロモーターの比較による UP エLEMENT の影響の比較。  $\sigma^E$  制限下 (Basal) と  $\sigma^E$  過剰発現下 (o/exp) のそれぞれについて対数増殖期 (Exp) と定常期 (Stat) の「長い (long)」 / 「短い (short)」比を示した。示されている値は「長い」と「短い」プロモーターの値の比。

<sup>c</sup> \*, 有意な  $\sigma^E$  非依存の活性を示したプロモーター (図 20)。

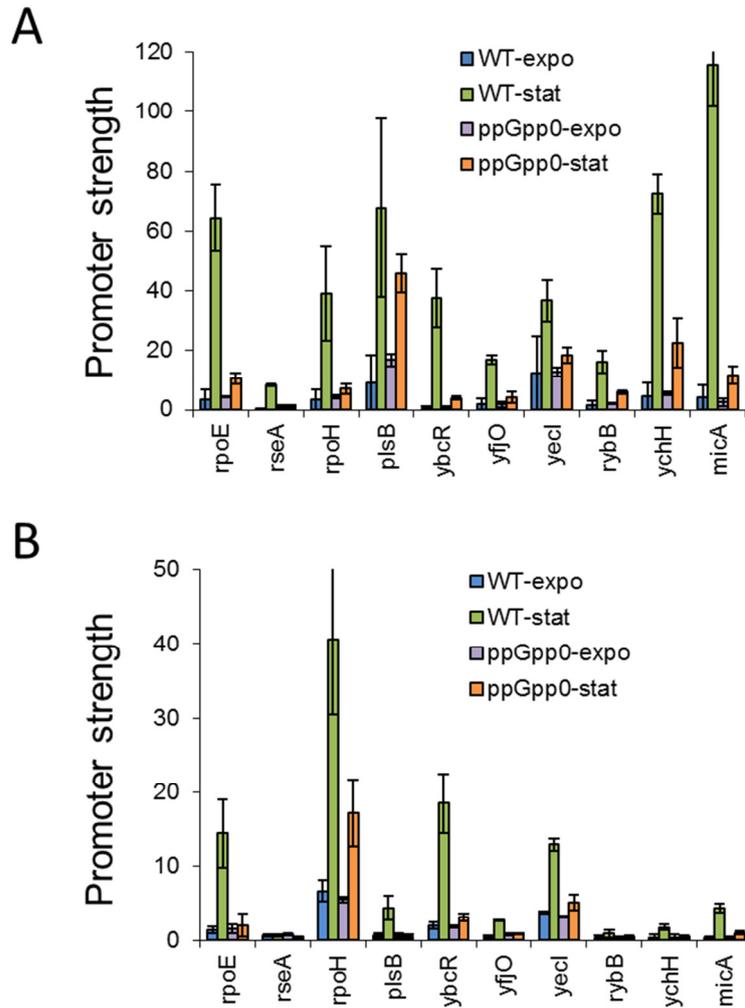


図 22  $\sigma^E$  依存プロモーターにおける ppGpp の影響

上位 10 の発現強度をもつ「長い」(A)及び「短い」(B)プロモーターを対象とした、 $\sigma^E$  制限下 (basal level) での対数増殖期 (expo) と定常期 (stat) における野生株 (CAG45113 を宿主とした) 及び ppGpp<sup>0</sup> 株 (CAG55907;  $\Delta relA \Delta spoT$  を宿主とした) の比較。bar は 3 つの独立した実験の平均値を表し、error bar は 1 標準偏差を表す。

## 2-3 まとめと考察

本研究では、初めて $\sigma$ 因子の全てのターゲットプロモーターの挙動を網羅的に解析した。こうした研究を可能としたのは、バクテリアの **alternative  $\sigma$**  が支配するプロモーターの数に限りがあるという事実とそのプロモーターが網羅的に把握されていたことによる。一連の研究で明らかとなった全プロモーターの情報を用いることで、本章で示したような完全なレギュロンの挙動解析というアプローチの研究が展開できたと言える。

本研究を通じて、多くの新たな知見を得た。まず、 $\sigma^E$ プロモーターがいかにダイナミックな強度のレンジで分布しているかが明らかとなった。とても強いと言えるプロモーターは非常に少なく、中程度と言えるプロモーターは強いプロモーターよりは若干多く、大多数は弱いプロモーターであった。興味深いことに、プロモーターの強度はその遺伝子の機能と強く関連していることが分かった。強度の上位 3 つのプロモーターはいずれも $\sigma^E$ による制御に関わる遺伝子のプロモーターであった。最も強いプロモーターは $\sigma^E$ 自身を転写するものであり、これに続く第 2 第 3 のプロモーターはいずれも **sRNA** のプロモーターであった。これら 2 つの **sRNA** はポーリン産生を負に制御する機能を有しており、これによって $\sigma^E$ を活性化するシグナルそのものを弱めることができる。これらのプロモーター領域は *E. coli* の菌株間や *E. coli* 近縁の各種間で高く保存されており、プロモーターとしての強度も生物種を超えて高く保存されていることが予想される。こうした、主要なレギュロンメンバーが自身の制御に関わるという現象は他にも例があり、種を横断した多数のゲノムを対象とした **PhoP** レギュロンに関する研究では **PhoP** に直接支配される因子は全てのゲノムにおいて *phoPQ* オペロン自身とその負の制御因子である *slyB* であることが明らかとなっている (Perez et al. 2009)。中程度の強度の $\sigma^E$ プロモーターを持つ遺伝子も多くの種のバクテリアで保存されており、また弱いプロモーターの多くは種間での保存性が低い遺伝子のプロモーターである。この弱いグループのレギュロンは別の種からの水平伝播や或いは遺伝子上流制御領域の変異によって、進化の上では最近になってから $\sigma^E$ のレギュロンに加わったものと考えられる。これら、弱いグループの機能的保存性の低いレギュロンはバクテリアにおけるレギュロンの多様性と柔軟性を支えているのであろう。

今回検証を行ったプロモーターの大半は完全に $\sigma^E$ の支配下にあり、ごく一部のみ (60 プロモーターの中の 9 プロモーター) に $\sigma^E$ 非依存のプロモーター活性が見出された。特別なセットの遺伝子が特別な $\sigma$ に厳密に支配されるという **alternative  $\sigma$** を使ったシステムの特徴がここにも見られた。 $\sigma^E$ 非依存の活性はおそらくは $\sigma^{70}$ 等、他の $\sigma$ とのプロモーターのオーバーラップなどによるのであろう。*E. coli*の **Group3**の **alternative  $\sigma$**  ( $\sigma^{32}$ と $\sigma^{28}$ )はプロモーターの **melting** の能力を下げることで、プロモーター配列の高い保存性を求め、これにより厳密なプロモーター認識を可能としている (Koo et al. 2009c)。 $\sigma^E$ をはじめとする **Group4**の $\sigma$ も **housekeeping  $\sigma$** で保存された **Region2.3**に存在する **melting**に関わるアミノ酸残基が保存されておらず (**housekeeping  $\sigma$** とは異なる)、やはり **melting**の能力と引き換えに厳密なプロモーター認識の術を獲得しているのであろう。また、本研究では

ppGpp による $\sigma^E$ の制御についてもこれまでの知見を支持する結果を得た。これまで *rpoH* プロモーターをモデルに ppGpp と $\sigma^E$ 活性の検討が行われてきたが (Costanzo and Ades 2006; Costanzo et al. 2008; Gopalkrishnan et al. 2014)、今回全レギュロンのレベルの解析により多くの $\sigma^E$ プロモーターが ppGpp によって生育フェーズに応じた制御を受けることが明らかとなった。これまでの研究から、 $\sigma^E$  プロモーター上流-65 から-35 の間にある AT-rich 配列が、RNAP の $\alpha$ サブユニットが結合する UP エlement である可能性が示唆されていた (Rhodius et al. 2006)。今回の検討において「長い」プロモーターで強い発現が見られたことは、こうした仮説を支持する結果であったと言える。また本研究では、 $\sigma^E$  プロモーターが $\sigma^E$  ホロ酵素の量に非常に強く影響されることが示された。 $\sigma^E$  レギュロンが非常にダイナミックであり、このことが随時変わる周囲の環境変化に適応する術をもたらしめているのであろう。

今回明らかとなった *in vivo* でのプロモーター強度の広いレンジやダイナミックな応答を考えると、細胞の応答、プロモーターの特定、プロモーターの強度を正しく理解することは非常に重要である。しかしながら、配列情報のみからプロモーターを見つけ出し、プロモーターの強度を予測することは難しい問題である。本研究の更なる展開としては、このプロモーターライブラリーを用いることで、プロモーター配列とプロモーター強度の関係をより詳細に調べ、プロモーター予測のモデリングに生かすことが考えられる (Rhodius et al. 2012)。

## 第三章： $\sigma^{32}$ における全プロモーターの網羅的な挙動解析

### 3-1 序論

ここまで *E. coli* の熱ショック応答に関与する alternative  $\sigma$  である  $\sigma^E$  及び  $\sigma^{32}$  について、グローバルな視点でその支配するプロモーターとレギュロンについて論じてきた。序章では  $\sigma^E$  について (Rhodius et al. 2006)、そして第一章では  $\sigma^{32}$  のプロモーターとレギュロンのほぼ全貌を明らかとした研究 (Nonaka et al. 2006) について述べた。そして、第二章ではこうした網羅的な解析から明らかとなった  $\sigma$  の知見を利用し、更に研究を進展させるべく、 $\sigma^E$  プロモーターの *in vivo* でのダイナミックな挙動を全プロモーターを対象に観察した (Mutalik et al. 2009)。本章では、第二章に引き続き、網羅的な解析から明らかとなった  $\sigma$  の知見を展開する観点での発想による研究について述べる。ここでは  $\sigma^{32}$  の全プロモーターの挙動解析を扱う。本章では第二章での  $\sigma^E$  におけるデモンストレーションを参考に、 $\sigma^{32}$  に対しても同様のアプローチを試みた。本研究の目的は、大きくは以下の 2 点となる。(i) 明らかとした  $\sigma^{32}$  の全プロモーターを対象に *in vivo* での挙動を観察すること、(ii)  $\sigma^{32}$  の全プロモーター挙動の解析ツールを用いることで  $\sigma^{32}$  の持つ promoter melting の能力と厳密なプロモーター認識の機構について解明すること。(ii) について背景となる Carol Gross 研究室での研究成果があるため (Koo et al. 2009c)、以下にその周辺情報を含めた詳細を述べる。

Housekeeping  $\sigma$  である  $\sigma^{70}$  と alternative  $\sigma$  では認識するプロモーターの数やプロモーター認識の戦略において多くの違いがある。housekeeping  $\sigma$  が 1000 以上ものプロモーターへと RNAP を誘導するのに対し、alternative  $\sigma$  は複数存在し一般的には比較的少数のプロモーターを認識する。housekeeping  $\sigma$  には広く融通のきくプロモーター認識が要求されるのに対し、alternative  $\sigma$  にはより厳格な認識が要求される。 $\sigma^{70}$  ではプロモーターの -35、-10 そして E-10 (extended -10) のモチーフが完全に備わっているケースはごく一部であり、多くのプロモーターは一部のモチーフのみから構成されている (Hook-Barnard and Hinton 2007)。最も典型的には、プロモーターが -10 と -35 を持つが、E-10 は持たない (Lisser and Margalit 1993)。逆にプロモーターが E-10 モチーフを持つ場合には -10 と -35 モチーフはコンセンサスからかけ離れているケースが多い (Mitchell et al. 2003)。E-10 を持つほとんどのプロモーターは -35 モチーフを必要とせず、また -35 を認識する  $\sigma$  側のドメインも必要としない (Ponnambalam et al. 1986; Kumar et al. 1993; Minakhin and Severinov 2007; Young et al. 2004)。また、幾つかは完璧な -35 配列を持つために、-10 の要求性は低い (Thuvenot et al. 2004; Hook-Barnard et al. 2006)。これとは完全に対照的に、alternative  $\sigma$  (例えば  $\sigma^{28}$ 、 $\sigma^{32}$ ) のプロモーターが機能するためには -35、-10、E-10 全ての高い一致が必要である (Koo et al. 2009a, b)。これを支持する知見として、プロモーターの配列の保存性の指標となるコア領域の information content (「実験材料と実験方法」参照; Schneider et al. 1986) の違いが挙げられる。 $\sigma^{32}$  プロモーターの information content

は 18.3 bit (Nonaka et al. 2006)、 $\sigma^{28}$  では 21.3 bit (V. Rhodius によるデータ; Koo et al. 2009c) と、 $\sigma^{70}$  での 9.2 bit (Shultzaberger et al. 2007) に比べはるかに高いのである。alternative  $\sigma$  が厳密な認証を必要とすることで限られたプロモーターのみを転写する仕組みはどのようになっているのか、そして  $\sigma$  がどのような機構で 3 つ全てのプロモーターモチーフに依存するようになっているのか、ここには興味深い疑問が残されていた。

$\sigma$  因子は最大で 4 つのドメイン構造 ( $\sigma$  ドメイン 1-4 ( $\sigma_{1-4}$ )) からなり、更に各ドメインが細分化された保存領域 (Region) を構成する (Gruber and Gross 2003) (詳細は序章を参照; 図 2、図 3)。DNA 結合決定因子は 3 箇所あり、 $\sigma$  の重要な役割の一つであるプロモーターの認識 (recognition) を行う。 $\sigma_2$  の Region2.4 が -10 を (Campbell et al. 2002)、 $\sigma_4$  の Region4.2 が -35 を (Gardella et al. 1989; Siegele et al. 1989)、 $\sigma_3$  の Region3.0 が E-10 (Barne et al. 1997; Koo et al. 2009a,b) をそれぞれ認識することがわかっている。そして  $\sigma$  のもう一つの重要な役割であるプロモーターの融解 (melting) は  $\sigma_2$  の Region2.3 によって行われる。これによって DNA の 2 本鎖の解離 (strand opening) が進み転写開始の重要なポイントである open complex (2 本鎖の解離したプロモーターと RNAP の複合体) の形成がなされる。

Carol Gross 研究室における研究では、alternative  $\sigma$  である  $\sigma^{28}$  及び  $\sigma^{32}$  と、housekeeping  $\sigma$  である  $\sigma^{70}$  の、melting の能力の違いが両  $\sigma$  の転写における戦略の違いに大きく寄与していることが明らかとなった (Koo et al. 2009c)。 $\sigma^{28}$  と  $\sigma^{32}$  がプロモーターの 3 つ全てのコアモチーフを必要とする原因が、プロモーターの melting に関与する Region2.3 ( $\sigma_2$  の 17-アミノ酸からなる) のアミノ酸残基の特徴に依存することを突き止めたのである。 $\sigma^{28}$  と  $\sigma^{32}$  の両  $\sigma$  は housekeeping  $\sigma$  で保存され melting に必要な Region2.3 の重要なアミノ酸残基を保持していないのである。そして、 $\sigma^{28}$  と  $\sigma^{32}$  のこれらのアミノ酸残基を housekeeping  $\sigma$  のアミノ酸残基に置換した場合には、プロモーターモチーフが完全である必要性は低くなり、また不完全なプロモーターにおける melting の能力が高まっていることがわかった。 $\sigma^{28}$  と  $\sigma^{32}$  の最適ではないアミノ酸残基の構成が、プロモーター側の完璧な配列により補われているのである。このように melting の能力とプロモーター認識の厳密さは trade-off の関係にあると考えられる。alternative  $\sigma$  はあえて melting の能力を弱めることで厳密なプロモーター認識を行う戦略を選んだのである。知られている限りでは Group 3 と Group 4 の alternative  $\sigma$  の全てが Region2.3 にコンセンサスから外れたアミノ酸残基を持つことがわかった。melting の能力を低下させることは、alternative  $\sigma$  が変化する環境に応じるよう限られたそして焦点を絞った計画的な遺伝子の発現を行うための一般的な戦略と考えられる。

## 3-2 結果

### $\sigma^{32}$ 全プロモーターの *in vivo* での挙動解析

第一章では *E. coli* の  $\sigma^{32}$  のプロモーター及びレギュロンの網羅的な解析を行った。第二章では  $\sigma^E$  を用い、明らかとなった全プロモーターの挙動を *in vivo* で観察する試みを行った。そこで、本章では第二章のアプローチに倣い、第一章で明らかとなった  $\sigma^{32}$  の全プロモーターの *in vivo* での挙動を解析することとした。実験の方法論と手法は第二章と同様である。まず 50 個の  $\sigma^{32}$  プロモーター（第一章で扱った 51 個の  $\sigma^{32}$  プロモーターから、F 因子にコードされている *repE* を除いた 50 個のプロモーター）を GFP 発現ベクターである pUA66 に全てクローニングし、 $\sigma^{32}$  のプロモーターライブラリーを構築した。ここでは UP エLEMENTの影響までを含めるため、転写開始点を基準に -65~+20 を含む領域を使用した（第二章の「長い」プロモーターに相当する）。レポーター株には  $\sigma^{32}$  発現プラスミドである pBK131 を導入した。同プラスミドは *lac* プロモーター下に  $\sigma^{32}$  が連結された  $\sigma^{32}$  の過剰発現プラスミドである pSAKT32 (Wang and deHaset 2003) がバックボーンとなっている。ただし、野生型の  $\sigma^{32}$  の代わりに恒常活性型変異である I54N 変異を持つ  $\sigma^{32}$  (Yura et al. 2007) を使用した。この変異により、本来 DnaKJ や GroESL により受ける負のフィードバックに対して耐性を示す。従って、IPTG による  $\sigma^{32}$  の誘導を行うことでストレス存在下の状況を想定しようとした本実験においては、この変異体を使用することが好ましいと判断した。なお、この変異はフィードバック阻害に対して影響を及ぼすのみで、 $\sigma^{32}$  のプロモーター認識には一切影響を及ぼさないことがわかっている (Koo et al. 2009a)。また、以降の実験で用いた  $\sigma^{32}$  は全てこの I54N 変異を持つが、WY 変異体と区別する上では I54N 変異のみを持つものを便宜上「野生型・wt」と表記する。各プロモーターバリエーションを各々保持する菌株の培養には 96-well のプレートを使用し、Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo Fischer Scientific) を用い、通気条件で温度を制御した状態での振盪培養と同時に既定の時間間隔での生育 (OD) と GFP 蛍光の測定を行った。OD の増加に対する GCF 強度の増加 (相対変化; GCF/OD の傾き) をプロモーターの強度と定義した。

図 23 に全プロモーターの活性を活性の高かった順に示した ( $\sigma^{70}$  依存の活性が強い *rrnB* と、活性の絶対値が微弱であった *xerD* を除いた全 48 プロモーターの結果)。先述の  $\sigma^E$  プロモーターと同様、非常に広範なレンジでの発現が見られ、 $\sigma^{32}$  レギュロンのダイナミックな様子が確認された。強いものと弱いものでは 100 倍のレンジでの違い (2 桁のレベルでの違い) が見られた。また、全般的には、熱ショックからのタンパク質の防御に関わるシャペロンやプロテアーゼ等のいわゆる hsp が強いプロモーターの部類に多く含まれる傾向が見られた。細胞質のタンパク質の恒常性維持が  $\sigma^{32}$  のコア機能であること (上位 20 個のうちの 60% を占める)、そしてこうした目立った挙動からこれまでの多くの研究でこうしたレギュロンメンバーが発見され研究されてきたという事実を再認識させる結果であった。一方で発現強度下位 20 個の 75% は新規で発見された  $\sigma^{32}$  プロモーターであったことから、第一章の研究の目的の一つでもあった網羅的な  $\sigma^{32}$  のレギュロンの解明という観点では、弱い

プロモーターを持つレギュロンが効率的に見つけ出されていたことがわかった。

次に、得られた GFP によるプロモーター強度と第一章での DNA microarray ( $\sigma^{32}$  誘導後 10 分) での発現値 (オペロン先頭の遺伝子の ratio) の比較結果を図 24 に示した。両実験系の大きな違いは、(i)検出方法 (GFP 蛍光と mRNA 量)、(ii)誘導条件 (GFP では $\sigma^{32}$  恒常高発現条件、DNA microarray では $\sigma^{32}$  誘導直後)、(iii)プロモーター領域 (GFP では -10、-35 エレメントから UP エレメントまで含むプラスミド上のプロモーター、DNA microarray では UP エレメントの更に上流まで含むネイティブな染色体上のプロモーター) の 3 点である。その結果、両実験では概ね相関があることがわかった。すなわち強いプロモーターはどちらの系でも強く、弱いプロモーターはどちらの系でも弱い傾向が見られた。一般に alternative  $\sigma$  は転写調節因子をほとんど利用しないことから、プロモーターのコアエレメントのみを持つ GFP の系と完全な染色体上のプロモーター及び上流配列を含む DNA microarray の系で大きな違いが見られなかったためであろうと考えられる。

#### *melting* 能力を強化した $\sigma^{32}$ 変異体 (YW $\sigma^{32}$ ) における全 $\sigma^{32}$ プロモーターの挙動

本実験の結果について述べる前に、まずその背景を簡単に説明する。本章の序論で述べたとおり Carol Gross 研究室では、 $\sigma^{32}$  と  $\sigma^{70}$  のレギュロンの数の違いや  $\sigma^{32}$  と  $\sigma^{70}$  によって要求されるプロモーター配列の厳密さの違いについて研究を進めた結果、 $\sigma^{70}$  の Region2.3 に存在する melting の機能に関する 2 つの保存されたアミノ酸残基 Y430 及び W433 (Juang and Helmann 1994; Fenton et al. 2000; Tomsic et al. 2001) が *E. coli* を含む全ての  $\gamma$ -プロテオバクテリアの  $\sigma^{32}$  では保存されておらず (Kourennaia and deHaseth 2007; Koo et al. 2009c) (図 25)、このことが  $\sigma^{32}$  と  $\sigma^{70}$  のプロモーター認識の戦略に大きな違いをもたらしていることを明らかとした。この研究の中で、 $\sigma^{32}$  の代表的なプロモーターである *groE* プロモーターを用い、 $\sigma^{70}$  の Y430 及び W433 に相当する  $\sigma^{32}$  の Region2.3 のアミノ酸残基をそれぞれ Y と W に置き換えた  $\sigma^{32}$  の変異体 (YW $\sigma^{32}$  と呼ぶ) が *groE* プロモーター内コアエレメントを 1 塩基ずつ置換することで弱められたプロモーター活性を相補することを示した。つまり、 $\sigma^{32}$  の melting 能力を高めることでプロモーター配列の厳密性は不要となるということであり、逆に考えると野生型  $\sigma^{32}$  は Region2.3 の melting に重要なアミノ酸残基をあえて保持しないことでプロモーターの melting の能力を低下させ、代わりにプロモーター配列の厳密性を求めるという結論である (Koo et al. 2009c)。こうして  $\sigma^{32}$  を含む alternative  $\sigma$  は限られた小数のレギュロンを厳密なプロモーター認識によって制御しているのであると考えられる。

この研究では、モデルとして *groE* プロモーターを使用している。一方で、自然に存在するプロモーターは、コンセンサス配列からの乖離や UP エレメント (Ross et al. 1993; Gourse et al. 2000) に関して、大きな違いがある (Zhao et al. 2005; Nonaka et al. 2006; Wade et al. 2006)。本研究では  $\sigma^{32}$  のレギュロンをほぼ全て明らかとし、更にその発展型として全プロモーターのライブラリーを作製し網羅的な発現挙動の解析手法を確立している。

そこで、この全プロモーターのライブラリーを用いた解析系を利用し、melting の能力を向上させた $\sigma^{32}$  の変異体である  $YW\sigma^{32}$  による全プロモーターの挙動を解析することとした。その結果、melting の能力の違いによる非常に興味深い現象が明らかとなった。図 26 には  $\sigma^{32}$ RNAP (野生型) による全プロモーター発現強度と  $YW\sigma^{32}$ RNAP (melting 強化された変異体) による全プロモーター発現強度の比較を示した。横軸には  $\sigma^{32}$ RNAP での発現強度を、縦軸には  $\sigma^{32}$ RNAP と  $YW\sigma^{32}$ RNAP の比の対数 ( $\log_2(YW/wt)$ ) を取った。つまり、0 より大きい場合には  $YW\sigma^{32}$ RNAP で発現が強く、0 より小さい場合には  $YW\sigma^{32}$ RNAP で発現が弱くなったことを表す。まず第一の所見として、 $\sigma^{32}$ RNAP によって弱く転写されるプロモーターは  $YW\sigma^{32}$ RNAP によってより強く転写されることがわかった (図 26)。このように、プロモーターDNA の melting に関わるアミノ酸残基が置換された  $YW\sigma^{32}$  は、コンセンサス配列から乖離した弱いプロモーターの転写を向上させることがわかった。つまり *groE* プロモーターで調べられた現象は全てのプロモーターに対して当てはまることが本プロモーターライブラリーを用いることで明らかとなった。第二の所見として、 $\sigma^{32}$ RNAP によって強く転写されるプロモーターは  $YW\sigma^{32}$ RNAP によって同等もしくはより弱く転写されることがわかった (図 26)。おそらくは melting が強化された代わりにプロモーター離れ (promoter clearance) が悪化したことが原因ではないかと推測される。全プロモーター挙動を見ることで、 $YW\sigma^{32}$  によって強いものが弱められ、弱いものが強められることが明らかとなった。 $\sigma^{32}$  レギュロンの一連のプロモーターは野生型 $\sigma^{32}$  によってドライブされる場合には $\sim 100$  倍のレンジでの転写の強弱の幅を持つが (図 23)、melting が強化された  $YW\sigma^{32}$  では僅か $\sim 20$  倍の幅に収まってしまった。 $\sigma$  因子が melting における最適なアミノ酸残基を有したときに、本来の強度での転写の制御から大きく外れてしまうことになる。このように、全プロモーター挙動を見ることで $\sigma^{32}$  が本来持つ非常に重要な性質が明らかとなった。

更に、 $\sigma^{32}$ RNAP で活性が強かった 30 個のプロモーターと  $YW\sigma^{32}$ RNAP で活性が強かった 19 個のプロモーターの各モチーフの information content (第一章及び実線材料と実験方法の章を参照; Schneider et al. 1986) を調べたところ、興味深いことがわかった (表 7)。 $YW\sigma^{32}$  と野生型 $\sigma^{32}$  で異なる嗜好性が見られたのは-35 モチーフであり、 $YW\sigma^{32}$  はコンセンサスから離れた-35 配列を好むことがわかった (表 7)。おそらくは、野生型 $\sigma^{32}$  では-35 配列が非常に重要な役割を果たしているのであろう。melting の能力がもともと低い野生型 $\sigma^{32}$  では、strand opening を行うためにできるだけ長い間 $\sigma$  をプロモーターに結合させておく必要があり、おそらくは-35 のコンセンサス配列が $\sigma$  の解離 (dissociation) の速度を遅らせる働きをしていると推測される。

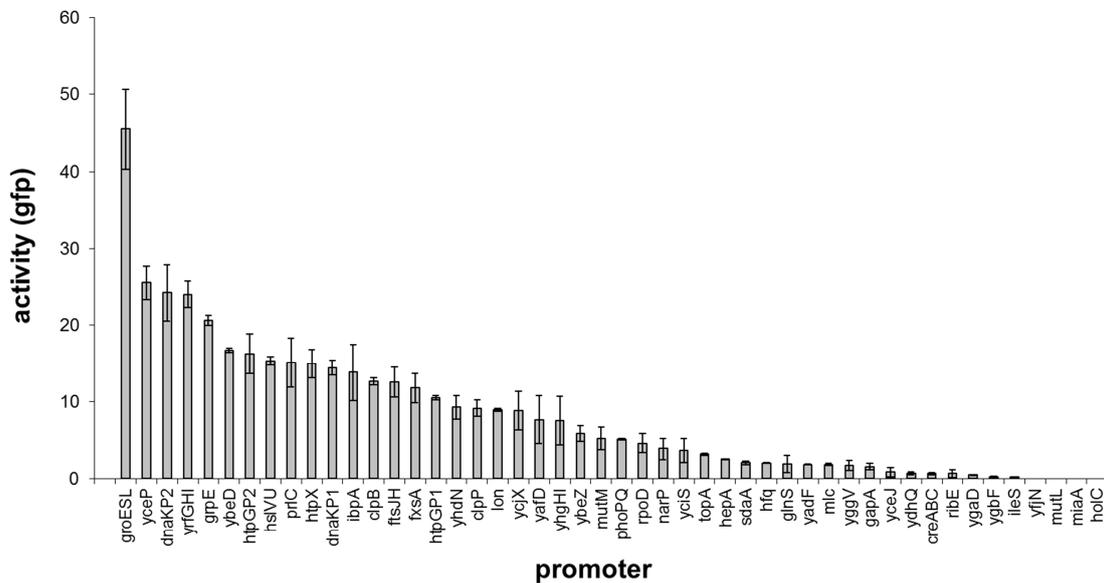


図 23  $\sigma^{32}$  過剰発現時の $\sigma^{32}$ プロモーターの活性 (GFP)

$\sigma^{32}$ によってドライブされるプロモーターの活性を GFP により定量。GFP に連結された全 50 種の *E. coli* が持つ $\sigma^{32}$ のプロモーター (Nonaka et al. 2006) を使用した。LB 培地 32°Cでの培養における、 $\sigma^{32}$ 発現プラスミド pBK131 を保持する $\sigma^{32}$ 過剰発現株 CAG57101 を宿主に各プロモーターライブラリーを導入した派生株の対数期での $\sigma^{32}$ プロモーターの発現強度を示した。100  $\mu$ M の IPTG により $\sigma^{32}$ の誘導を行った。なお、CAG57101 株は *rpoH*欠損により生育が非常に悪く、この生育障害を回避するため染色体上に *PBAD-GroESL* を保持させている。*GroESL*を発現させるため培養全行程で 0.1% L-(+)-アラビノースを添加した。bar は 3 つの独立した実験の平均値を表し、error bar は 1 標準偏差を表す。実験材料と実験方法に詳細を示した。

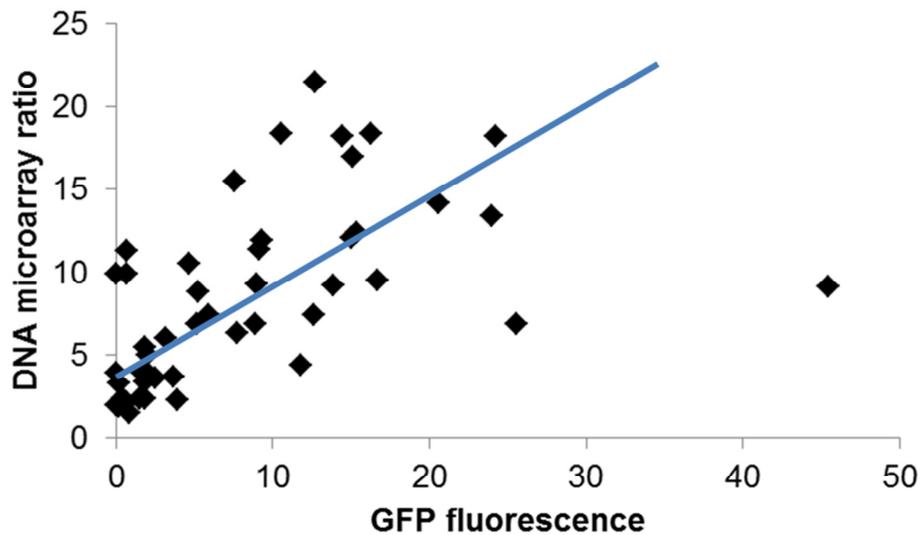


図 24  $\sigma^{32}$  過剰発現時の $\sigma^{32}$ プロモーターの活性値の比較 (GFP 対 DNA microarray)  
 $\sigma^{32}$ によってドライブされるプロモーター活性の GFP による定量値と DNA microarray による定量値 (発現 ratio) (オペロンの場合には先頭の遺伝子) の比較。DNA microarray のデータは表 3 に、GFP のデータは図 23 に基づく。

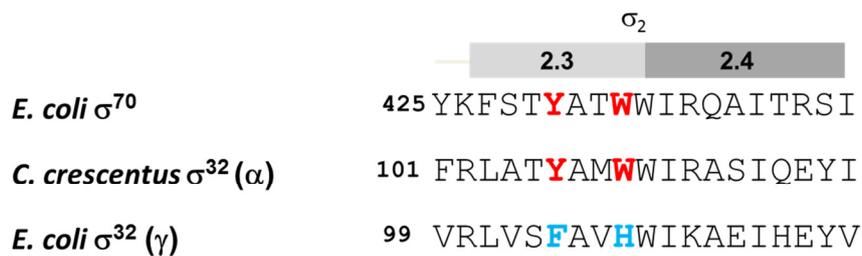


図 25 Region2.3 の melting に関わる 2 つの保存された芳香族アミノ酸の比較  
*E. coli*  $\sigma^{70}$ 、*E. coli*  $\sigma^{32}$ 、*C. crescentus*  $\sigma^{32}$  の Region2.3 と Region2.4 のアミノ酸配列のアラインメント。赤字は housekeeping  $\sigma$  と Group2  $\sigma$  で保存されている melting の機能に重要なアミノ酸残基。これらは $\alpha$ プロテオバクテリアに属する *C. crescentus* の Group3  $\sigma$  である $\sigma^{32}$ でも保存されている。一方 $\gamma$ プロテオバクテリアに属する *E. coli* の $\sigma^{32}$ では保存されていない (青字)。

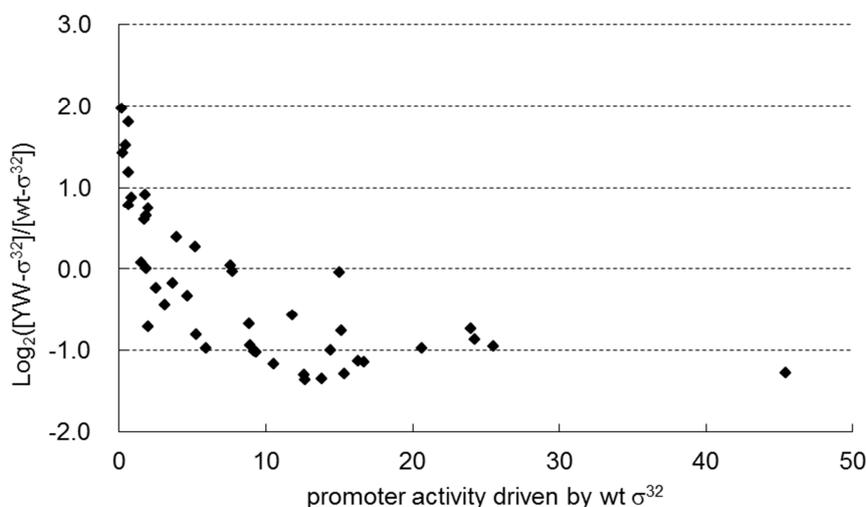


図 26 YW $\sigma^{32}$  によって活性化される $\sigma^{32}$  プロモーター

YW $\sigma^{32}$  及び野生型 $\sigma^{32}$  によってドライブされるプロモーター活性の  $\log_2$  の値を用いた比(Y 軸)と野生型 $\sigma^{32}$  によってドライブされるプロモーター活性(X 軸)の scatter plot。プロモーター強度は OD<sub>600</sub> 対 GFP 蛍光値 (RFU) のプロットの傾きにより計算、詳細は実験材料と実験方法を参照のこと。なお、野生型 $\sigma^{32}$  のデータは図 23 のデータに基づく。

表 7 野生型 $\sigma^{32}$  と YW $\sigma^{32}$  で優位なプロモーターにおける、各プロモーターエレメントの比較 (information content; bit)

Promoter more active with	Promoter motifs				
	up	-35	spacer	E-10	-10
wt $\sigma^{32}$	3.5	8.3	2.1	2.2	6.3
YW $\sigma^{32}$	4.6	6.0	2.4	2.5	5.9

野生型 $\sigma^{32}$  と YW $\sigma^{32}$  でのプロモーター活性の比較において、野生型でより活性が高かったもの (30 プロモーター) と YW $\sigma^{32}$  でより活性が高かったもの (19 プロモーター)、プロモーターモチーフの information content (bit)。計算方法は実験材料と実験方法に記載されている。各モチーフは以下の配列をカバーしている。UP エレメント: -60~-45、-35 モチーフ: -37~-31、スペーサー: -35 モチーフと-10 モチーフの間、E-10: -15 と-16、-10 モチーフ: -14~-9。

### 3-3 まとめと考察

本章では、網羅的なプロモーターとレギュロンの解明に引き続く研究の展開として、第二章の $\sigma^E$ の全プロモーターの挙動解析に倣い $\sigma^{32}$ の *in vivo*での全プロモーターの挙動解析を行った。その結果、 $\sigma^{32}$ のプロモーターが非常に大きな強度の幅（～100 倍のオーダーのレンジ）を持つことがわかり、 $\sigma^{32}$ による HSR が非常に広範でダイナミックであることが明らかとなった。また、古くから知られていたシャペロンやプロテアーゼ等のいわゆる hsp の多くは強いプロモーターの部類に含まれ、こうしたタンパク質の恒常性維持が $\sigma^{32}$ の重要な役割であることが再確認された。また、一方で新規 $\sigma^{32}$ プロモーターの多くは弱い部類に含まれることから、第一章での検討によりこれまで見つかりにくかったプロモーター及びレギュロンが効率よく明らかになったことが確認された。そして、最後には、 $\sigma^{32}$ の *melting* の能力の低さが厳密なプロモーター認識を可能とし、また更にはダイナミックなレンジでのレギュロンの発現にも寄与していることを明らかとした。こうしたプロモーターライブラリーを用いた手法は、 $\sigma^{32}$ のレギュロンを対象としたグローバルな視点での解析だけではなく、 $\sigma^{32}$ そのものの $\sigma$ としての性質を理解する上で非常に有用な手法であったと言える。

本章での研究（及び関連する研究（Koo et al. 2009c））は *alternative*  $\sigma$ による限られた数のプロモーターを厳密に認識し制御する機構を明らかとした点で非常に大きな成果と言える。おそらくは、もともと1つから始まった $\sigma$ が、進化により分岐し、サブグループを形成するようになったのであろう。それが *housekeeping*  $\sigma$ 、 $\sigma^{70}$ であり、またその他の *alternative*  $\sigma$ といえる。この進化によって、様々な制御の下にある $\sigma$ が特定の限られたプロモーターを認識するという遺伝子発現の重要な戦略が生み出されたのであろう。*housekeeping*  $\sigma$ は非常に多様なプロモーターを認識する (>1000) 一方で、*alternative*  $\sigma$ ははるかに厳格なプロモーター（配列やスペーシング）を要求することで高い選択性を獲得したと考えられる。そして、一連の研究結果から、 $\sigma$ による *melting* と *recognition* の機能のバランスがプロモーター認識の厳密性に重要な役割を果たしているとの新たな仮説を導くに至った。

$\sigma^{32}$ が最適ではない *melting* の能力を備えることには生理的な意義があると考えられる。プロモーターとしての機能を持つためには最適な配置と配列を持つ必要があるが、一方でコンセンサスがあればこそそこからの乖離によってプロモーター活性を弱めることができるということも重要な効果と言える。 $\sigma$ が正しいレギュロンの転写にフォーカスして、近い配列の別のプロモーターからの偶然の転写を防ぐことができることも、重要なことである。 $\sigma^{32}$ は最適ではない *melting* の能力を備えることで、限られた数のレギュロンを正しく認識することを可能としたのであろう。また一方で、 $\sigma^{32}$ は最適ではない *melting* の能力を備えることで広い発現のレンジを確保することを可能にしたということも非常に重要なポイントである。転写の開始におけるプロモーター認識と *melting* の2つのイベントは、原核生物から真核生物まで全ての生命で保存された現象である（Decker and Hinton 2013）。バクテリアでは $\sigma$ がこの2つのイベントを中心的に遂行する。そして、 $\sigma$ による認識と *melting* の

機能のバランスがプロモーター認識の厳密性に重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし、厳密性を求めるだけであれば、プロモーターの保存性と $\sigma$ による認識によってのみ制御することも可能のように思われる。なぜ **melting** の要素がプロモーターの厳密な認識に関わるのであろうか？本研究において、**melting** の強化された  $\text{YW}\sigma^{32}$  がプロモーターのダイナミックなレンジを損ねることが明らかとなったことは、そのヒントと言えるかもしれない。つまり、プロモーターと $\sigma$ の認識だけでは強度の微妙な調節に限界があり、**melting** の能力を利用することはじめて強弱に大きな幅を持たせることが可能になるのかもしれない。こうした **melting** を利用した $\sigma^{32}$ の転写の戦略は制御対象と発現強度の厳密な制御の点で、**HSR** という瞬時のフォーカスされた応答のためによく適合しているであろう。

最適ではない **melting** の能力を持つことで厳格な **recognition** を獲得する $\sigma$ の戦略は、 $\sigma$ の種そして生物種を超えて見られる。Carol Gross 研究室における研究では、 $\sigma^{32}$ だけではなく、同じ *E. coli* の Group3 の $\sigma$ であり鞭毛の合成に関与する $\sigma^{28}$ においても同様の解析を行い同様の結論を得ている (Koo et al. 2009c)。 $\sigma^{28}$ による鞭毛の合成は進化上はるか昔に分岐した Gram-negative と Gram-positive の両方のバクテリアで保存されており、そして $\sigma^{28}$ によって認識されるコンセンサス配列も変わらず保存されている。 $\sigma^{28}$ が持つ **melting** の性質もおそらく保存されているのであろう。*E. coli*やその他の $\gamma/\beta$ -プロテオバクテリアの $\sigma^{32}$ においては E-10 (extended -10) の依存度が非常に高く、 $\sigma_3$ の Region3.0にある保存されたアミノ酸残基 (K130) が配列の認識に重要であることがわかっている (Koo et al. 2009a)。一方で、 $\alpha/\delta/\epsilon$ -プロテオバクテリアでは E-10 の依存度は極めて低く (もしくは完全に依存しない)、また $\sigma_3$ の 130 番目のアミノ酸残基もリジン (K) ではなくアラニン、セリン、グルタミンである (Green and Donohue 2006; McGrath et al. 2007; Koo et al. 2009a)。おそらくは、同じプロテオバクテリアの中でも $\gamma/\beta$ -プロテオバクテリアと $\alpha/\delta/\epsilon$ -プロテオバクテリアでは **melting** の能力が異なるのであろう。例えば、 $\alpha$ -プロテオバクテリアに属する *Caulobacter crescentus* では *E. coli* のコア RNAP を導入した場合にも $\sigma^{32}$ プロモーターの E-10 の依存度は極めて低かったことから (Koo et al. 2009a)、 $\sigma^{32}$ そのものがプロモーター認識の厳密さをもたらしていると言える。そして、*C. crescentus*  $\sigma^{32}$  の Region2.3 の **melting** に重要な 2 つのアミノ酸残基 ( $\sigma^{70}$  の Y430 及び W433 に相当する) は $\sigma^{70}$ 型であることから、*C. crescentus* の $\sigma^{32}$ は **melting** の能力が高いために E-10 の依存性が低いのであろう。 $\alpha$ -プロテオバクテリアの $\sigma^{32}$ はしばしば熱ショックへの応答だけではなく他の機能も同時に持っている。例えば、*Myxococcus xanthus* における形態変化や (Ueki and Inoue 2001)、*C. crescentus* における重金属ショック応答等の別のストレスに対する応答などである (McGrath et al. 2007)。更に $\sigma^{32}$ の最も重要なレギュロンメンバーである *groEL* (Kusukawa and Yura 1988) は $\alpha$ -プロテオバクテリアでは別の機構の制御を受けることが知られている (Yura and Nakahigashi 1999)。このように、 $\alpha$ -プロテオバクテリアの $\sigma^{32}$ は $\gamma$ -プロテオバクテリア $\sigma^{32}$ と異なり、厳密な制御を放棄する代わりにより多くの遺伝

子の転写を行うと考えられる。Group4 の $\sigma$ もまた、Region2.3 において housekeeping  $\sigma$ と大きく異なる。melting の機能を弱めることは、多くの alternative  $\sigma$ にとってプロモーター認識を確かにするための戦略なのだろう。

## 終章 総括と討論

本研究では、*E. coli* の alternative  $\sigma$ を中心に、様々な角度からの検証を行った。alternative  $\sigma$ の生理的な意義を解明すべくレギュロン遺伝子全貌の解析に始まり、次には alternative  $\sigma$ のプロモーターがどのようにレギュロンの遺伝子発現というアウトプットに寄与しているかをプロモーターの側から解明、更には alternative  $\sigma$ による厳密かつダイナミックなレギュロン制御のメカニズムをプロモーター認識という $\sigma$ の側からの視点で解明した。「レギュロン」「プロモーター」「 $\sigma$ のプロモーター認識」という3つの視点から *E. coli* の alternative  $\sigma$ と HSR の解析を行い、その理解を大きく前進させた。

第一章では、細胞質の HSR で中心的な役割を担う $\sigma^{32}$ を扱った。 $\sigma^{32}$ のレギュロンメンバーを網羅的に解明することを目的とした。microarrayを用いた global な遺伝子抽出の手法とプロモーターを推定するためのバイオインフォマティクスの手法、そして全プロモーターを検証すべく転写開始点のマッピング及び in vitro 転写、これらを組み合わせることで網羅的かつ高い精度で $\sigma^{32}$ のレギュロンメンバーのほぼ全て（と推測される）を明らかとした。その結果、 $\sigma^{32}$ は約 50 個のプロモーター、約 90 個の遺伝子を支配下に置き、その HSR はこれまでに知られていたよりもはるかに広範な細胞内プロセス、そしてタンパク質の保護に及ぶことが明らかとなった。また、序章で述べた Carol Gross 研究室での研究においては、ペリプラズムの HSR で中心的な役割を担う $\sigma^E$ に対しても、同様の手法によって網羅的なレギュロンの解明を達成した (Rhodius et al. 2006)。こうした一連の研究は、ある特定の alternative  $\sigma$ のレギュロンの全貌とそこから明らかになる生理的な役割の全貌を見たという意味で非常に大きな成果と言える。また、 $\sigma^{32}$ と $\sigma^E$ という HSR の主役を通じて HSR の全貌が見えたことも大きい。

第二章では、 $\sigma^E$ のプロモーターを扱った。先行研究で明らかとなった約 60 個 (*E. coli* 及び近縁種) の全 $\sigma^E$ プロモーター (Rhodius et al. 2006) の発現挙動をレポーターにより解析した。その結果、 $\sigma^E$ のレギュロンの挙動は予想以上にダイナミックなレンジ (~100 倍のオーダーでのレンジ) をもっていること、そしてごく少数の非常に強いプロモーターと大半の弱いプロモーターから構成されていることがわかった。興味深いことに、強いプロモーターは転写調節因子やポーリンの恒常性維持に関わるものであり、*E. coli* とその近縁種でよく保存されているものであった。更には $\sigma^E$ プロモーターが ppGpp やプロモーター上流の UP エレメントの影響を受け、そして $\sigma^E$ ホロ酵素の細胞内レベルに応じた複雑な制御を受けていることが明らかとなった。ある特定の alternative  $\sigma$ レギュロンの全セットでの挙動を調べた貴重な報告であるばかりでなく、随時変わる環境への適応のための $\sigma^E$ レギュロン全体がもつダイナミックな応答の様式を垣間見た点でも重要な知見と言える。alternative  $\sigma$ の全プロモーターが明らかとなった後の研究の展開のとして、本研究で示した手法は非常に有意義であると言える。

第三章では、網羅的なプロモーターとレギュロンの解明に引き続く研究の展開として、

第二章の $\sigma^E$ の全プロモーターの挙動解析に倣い $\sigma^{32}$ の *in vivo*での全プロモーターの挙動解析を行った。その結果、 $\sigma^{32}$ のプロモーターも $\sigma^E$ に劣らず非常にダイナミックなレンジでの挙動を示し（ $\sim 100$ 倍のオーダーのレンジ）、 $\sigma^{32}$ による広範でダイナミックな HSR が明らかとなった。そして、シャペロンやプロテアーゼ等のいわゆる古典的な hsp は強いプロモーターの部類に含まれ、タンパク質の恒常性維持が $\sigma^{32}$ の最も重要な役割の一つであることが再確認された。また、一方で本研究により見いだされた新規 $\sigma^{32}$ プロモーターの多くは弱い部類に含まれることから、第一章での検討によりこれまで隠れていたプロモーターとレギュロンが効率よく明らかとなったことが確認された。そして、更には、 $\sigma^{32}$ の本来持つ melting の能力の低さが厳密なプロモーター認識を可能とし、またダイナミックなレンジでのレギュロンの発現にも寄与していることを明らかとした。1000もの遺伝子の発現を司る housekeeping  $\sigma$ とは異なり、alternative  $\sigma$ は $\sigma$ 自身のこうした melting 能力を巧みに利用した戦略により、環境に応じた特定の限られた小数のセットから成る遺伝子の発現を可能にしていると考えられる。

研究全体を通して、網羅的な $\sigma$ のプロモーターの発見と、その後の網羅的なプロモーター解析の展開が非常に多くの知見をもたらすことが示された。本研究での一連の手法は $\sigma$ を解明する上で非常に有用であったと言える。

今後の展開の可能性について以下に述べる。 $\sigma^{32}$ 依存プロモーター及び $\sigma^{32}$ レギュロンの研究の今後の展開のためには、 $\sigma^E$ に関する研究 (Rhodius et al. 2006) が非常に参考となる。この $\sigma^E$ の研究においては、本論文で取り扱った $\sigma^{32}$ と同じ手法により網羅的なプロモーターとレギュロンの解明をまず行い、これによって明らかとなった多数の $\sigma^E$ 依存のプロモーターの情報からプロモーターのモデリング (PWM (position weight matrix) によるプロモーターのスコア化) を行った。そして、この PWM を用いて *E. coli* K-12 株のゲノムを検索することで、生化学的な実験での同定に漏れた更に複数のプロモーターを突き止めることができ、網羅性を高めることができたのである。本研究で $\sigma^{32}$ にて用いた一連の手法では、ORF 上流の制御領域に存在するプロモーターを見出すことはできるが、ORF 以外の領域や ORF 内に存在するプロモーターを見つけることは難しい。興味深いことに、 $\sigma^E$ における PWM による検索では多数の ORF 内外の $\sigma^E$ プロモーターの候補が見いだされ、これらのいくつかは sRNA をコードしていることが後に明らかとなっている (Papenfort et al. 2006; Gogol et al. 2011; Guo et al. 2014)。また、PWM を用い近縁種のゲノムを検索することで、種を超えた $\sigma^E$ レギュロンの網羅的な解明と種間の比較を可能とした。こうした展開を $\sigma^{32}$ でも実現できれば、*E. coli*における $\sigma^{32}$ レギュロンの網羅性を更に高め、また $\sigma^{32}$ の種を超えて保存された機能や種特異的な機能を知ることができる。更には、 $\sigma^E$ においては PWM をベースとした UP エlement までを含むプロモーター強度のモデリングにも成功している (Rhodius et al. 2012)。一方で、 $\sigma$ が異なればモデリングの難易度も大きく異なる。実際に $\sigma^E$ で行ったモデリングをそのまま $\sigma^{32}$ に当てはめることは困難であった (V. Rhodius

私信)。その一つの原因として、UP エLEMENTの存在、その他の明らかとなっていないモチーフやモチーフ間のスパーサーなど未知の要素の存在等が考えられる。第一章の解析から $\sigma^{32}$ プロモーターには種々のUP ELEMENTのパターンが存在することが示唆され、また第二章の研究からはUP ELEMENTが転写に与える影響の大きさがうかがわれた。-10、-35と言ったコアモチーフのモデリングだけではおそらく不十分であり、UP ELEMENTの正確な把握とモデリングが必要なのであろう。スパーシングやスパーサー内の塩基によってもたらされるDNAの3次元構造もまたPWMでは全く表現できない要素である。こうした、UP ELEMENTやその他の要素を解明し、数式化することが $\sigma^{32}$ の完全なモデリングには求められるのであろう。

alternative  $\sigma$ のプロモーターを網羅的に取り扱う過程で、複数の $\sigma$ によるプロモーターのオーバーラップのケースが多数見られた。 $\sigma^{32}$ では、これまでに知られていた *rrnBP1* プロモーターに加え新たに 5 つの $\sigma^{32}$ プロモーターが $\sigma^{70}$ プロモーターとオーバーラップしていることが明らかとなった。また、 $\sigma^E$ においても全 60 個の $\sigma^E$ プロモーターの中の 9 プロモーターにおいて $\sigma^E$ 非依存の活性が検出され、おそらくは他の $\sigma$ による活性が存在するものと推測された。これまでに報告されているプロモーターのオーバーラップの例は乏しく (Newlands et al. 1993; Dominguez-Cuevas et al. 2005)、偶然であるのかあるいは何らかの生理的意義を伴うのか完全には明らかとはなっていない。本研究で相当数のケースが確認されたことから考えると、プロモーターのオーバーラップには何らかの生理的意義があり、細胞内でしばしば起こっている現象なのかもしれない。最近明らかとなった *clr* 遺伝子における $\sigma^{70}$ と $\sigma^{54}$ によるプロモーターのオーバーラップを利用した発現制御の機構は非常に興味深い (Zafar et al. 2014)。 $\sigma^{54}$ による転写の開始点は $\sigma^{70}$ による転写の開始点と 13 nt ほどずれており、これにより $\sigma^{54}$ はリボゾーム結合領域を含まない mRNA (翻訳されない RNA) を作る。プロモーターへの結合は $\sigma^{54}$ と $\sigma^{70}$ で競合するため、こうして $\sigma^{70}$ による“functional”な mRNA の転写が $\sigma^{54}$ に抑制されるのである。オーバーラッププロモーターの機能に関する報告は *clr* プロモーターが初めてであろう。 $\sigma$ によって最適なプロモーター配列が異なり、 $\sigma$ によって UP ELEMENTの利用の度合いが異なり、また状況に応じて活性化した $\sigma$ の量が異なり、そして複数の $\sigma$ が絶えずフリーなコア RNAP を巡って競合していることを考えると、プロモーターをオーバーラップさせることで何かを巧みにコントロールしている可能性は十分考えられる。こうした観点での研究にも今後期待がもたれる。

細菌は長年の進化の過程で、様々なタイプの $\sigma$ を生み出し利用するようになった。ある細菌は $\sigma^{70}$ と $\sigma^{54}$ の両タイプを保有し、またある細菌は $\sigma^{70}$ ファミリーだけを保有する。保有する $\sigma^{70}$ ファミリー $\sigma$ の数においても 1 (*Mycoplasma* sp.) から 60 (*S. coelicolor*) まで多様である。複雑で多様なライフサイクル、そしてその過程で受ける様々な形態変化や環境変化、そしてストレスに対応する巧みなメカニズムを $\sigma$ が担っているのである。*E. coli*には 7 つの $\sigma$ が存在する。本研究では、このモデル生物でもある *E. coli* を主

に取扱い、様々なレベルでの $\sigma$ が持つ巧みなメカニズムを明らかとした。複数の $\sigma$ がどのように RNAP を共有し、プロモーターのネットワークを調節し、協奏しているのか、今後の更なる研究の進展に期待が持たれる。

## 参考文献

- Ades, S. E., L. E. Connolly, B. M. Alba, C. A. Gross. 1999. The *Escherichia coli*  $\sigma^E$ -dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti- $\sigma$  factor. *Genes Dev* **13**: 2449-61.
- Alba, B. M., and C. A. Gross. 2004. Regulation of the *Escherichia coli*  $\sigma^E$ -dependent envelope stress response. *Mol Microbiol* **52**: 613-9.
- Alba, B. M., J. A. Leeds, C. Onufryk, C. Z. Lu, C. A. Gross. 2002. DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the  $\sigma^E$ -dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev* **16**: 2156-68.
- Angelini, S., C. Gerez, S. Ollagnier-de Choudens, Y. Sanakis, M. Fontecave, F. Barras, B. Py. 2008. NfuA, a new factor required for maturing Fe/S proteins in *Escherichia coli* under oxidative stress and iron starvation conditions. *J Biol Chem* **283**: 14084-91.
- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, H. Mori. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**: 2006.
- Bader, M., W. Muse, D. P. Ballou, C. Gassner, J. C. Bardwell. 1999. Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell* **98**: 217-27.
- Bailey, T. L., N. Williams, C. Misleh, W. W. Li. 2006. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res* **34**(Web Server issue): W369-73.
- Bardwell, J. C., and E. A. Craig. 1984. Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* heat-inducible *dnaK* gene are homologous. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 848-52.
- Bardwell, J. C., and E. A. Craig. 1987. Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 5177-81.
- Barne, K. A., J. A. Bown, S. J. Busby, S. D. Minchin. 1997. Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase  $\sigma^{70}$  subunit is responsible for the recognition of the 'extended-10' motif at promoters. *EMBO J* **16**: 4034-40.
- Barrios, H., B. Valderrama, E. Morett. 1999. Compilation and analysis of  $\sigma^{54}$ -dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res* **27**: 4305-13.
- Basturea, G. N., D. R. Dague, M. P. Deutscher, K. E. Rudd. 2012. YhiQ is RsmJ, the methyltransferase responsible for methylation of G1516 in 16S rRNA of *E. coli*. *J Mol Biol* **415**: 16-21.

- Beckmann, R. P., L. E. Mizzen, W. J. Welch. 1990. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* **248**: 850-4.
- Beloglazova, N., G. Brown, M. D. Zimmerman, M. Proudfoot, K. S. Makarova, M. Kudritska, S. Kochinyan, S. Wang, M. Chruszcz, W. Minor, E. V. Koonin, A. M. Edwards, A. Savchenko, A. F. Yakunin. 2008. A novel family of sequence-specific endoribonucleases associated with the clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *J Biol Chem* **283**: 20361-71.
- Biran, D., N. Brot, H. Weissbach, E. Z. Ron. 1995. Heat shock-dependent transcriptional activation of the *metA* gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**: 1374-9.
- Bjork, G., and T. Hagervall. 2005. Transfer RNA Modification. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. (ed. R.C. III), pp. Module 4.6.2. ASM Press, Washington, D.C.
- Blaszczak, A., C. Georgopoulos, K. Liberek. 1999. On the mechanism of FtsH-dependent degradation of the  $\sigma^{32}$  transcriptional regulator of *Escherichia coli* and the role of the Dnak chaperone machine. *Mol Microbiol* **31**: 157-66.
- Bossi, L., and N. Figueroa-Bossi. 2007. A small RNA downregulates LamB maltoporin in *Salmonella*. *Mol Microbiol* **65**: 799-810.
- Bremer, H., and P. P. Dennis. 1996. Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell by Growth Rate, p. 1553-1569. In R. Curtiss III, J. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology, 2 ed*, vol. **2**. ASM Press, Washington, D.C.
- Browning, D. F., and S. J. Busby. The regulation of bacterial transcription initiation. 2004. *Nat Rev Microbiol* **2**: 57-65.
- Buck, M., M. T. Gallegos, D. J. Studholme, Y. Guo, J. D. Gralla. 2000. The bacterial enhancer-dependent  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ) transcription factor. *J Bacteriol* **182**: 4129-36.
- Bugl, H., E. B. Fauman, B. L. Staker, F. Zheng, S. R. Kushner, M. A. Saper, J. C. Bardwell, U. Jakob. 2000. RNA methylation under heat shock control. *Mol Cell* **6**: 349-60.
- Burden, S., Y. X. Lin, R. Zhang. 2005. Improving promoter prediction for the NNPP2.2 algorithm: a case study using *Escherichia coli* DNA sequences. *Bioinformatics* **21**: 601-7.
- Bush, M., and R. Dixon. 2012. The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of  $\sigma^{54}$ -dependent transcription. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**: 497-529.

- Campbell, E. A., O. Muzzin, M. Chlenov, J. L. Sun, C. A. Olson, O. Weinman, M. L. Trester-Zedlitz, S. A. Darst. 2002. Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity  $\sigma$  subunit. *Mol Cell* **9**: 527-39.
- Campbell, E. A., J. L. Tupy, T. M. Gruber, S. Wang, M. M. Sharp, C. A. Gross, S. A. Darst. 2003. Crystal structure of *Escherichia coli*  $\sigma^E$  with the cytoplasmic domain of its anti- $\sigma$  RseA. *Mol Cell* **11**: 1067-78.
- Casadaban, M. J., and S. N. Cohen. 1980. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **138**: 179-207.
- Cezairliyan, B. O., and R. T. Sauer. 2007. Inhibition of regulated proteolysis by RseB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 3771-6.
- Chaba, R., I. L. Grigorova, J. M. Flynn, T. A. Baker, C. A. Gross. 2007. Design principles of the proteolytic cascade governing the  $\sigma^E$ -mediated envelope stress response in *Escherichia coli*: keys to graded, buffered, and rapid signal transduction. *Genes Dev* **21**: 124-36.
- Chaba, R., B. M. Alba, M. S. Guo, J. Sohn, N. Ahuja, R. T. Sauer, C. A. Gross. 2011. Signal integration by DegS and RseB governs the  $\sigma^E$ -mediated envelope stress response in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 2106-11.
- Charpentier, B., and C. Branlant. 1994. The *Escherichia coli gapA* gene is transcribed by the vegetative RNA polymerase holoenzyme E $\sigma^{70}$  and by the heat shock RNA polymerase E $\sigma^{32}$ . *J Bacteriol* **176**: 830-9.
- Cheng, B., C. X. Zhu, C. Ji, A. Ahumada, Y. C. Tse-Dinh. 2003. Direct interaction between *Escherichia coli* RNA polymerase and the zinc ribbon domains of DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* **278**: 30705-10.
- Chin, D. T., S. A. Goff, T. Webster, T. Smith, A. L. Goldberg. 1988. Sequence of the lon gene in *Escherichia coli*. A heat-shock gene which encodes the ATP-dependent protease La. *J Biol Chem* **263**: 11718-28.
- Chuang, S. E., and F. R. Blattner. 1993. Characterization of twenty-six new heat shock genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 5242-52.
- Chuang, S. E., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, D.L. Daniels, F.R. Blattner. 1993a. Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the *hslITS/ibpAB* and *hslVU* operons in *Escherichia coli*. *Gene* **134**: 1-6.
- Chuang, S. E., D. L. Daniels, F. R. Blattner. 1993b. Global regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 2026-36.
- Cormack, B. P., R. H. Valdivia, S. Falkow. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-8.
- Costanzo, A., and S. E. Ades. 2006. Growth phase-dependent regulation of the

- extracytoplasmic stress factor,  $\sigma^E$ , by guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp). *J Bacteriol* **188**: 4627-34.
- Costanzo, A., H. Nicoloff, S. E. Barchinger, A. B. Banta, R. L. Gourse, S. E. Ades. 2008. ppGpp and DksA likely regulate the activity of the extracytoplasmic stress factor  $\sigma^E$  in *Escherichia coli* by both direct and indirect mechanisms. *Mol Microbiol* **67**: 619-32.
- Cowing, D. W., J. C. Bardwell, E. A. Craig, C. Woolford, R. W. Hendrix, C. A. Gross. 1985. Consensus sequence for *Escherichia coli* heat shock gene promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 2679-83.
- Crooks, G. E., G. Hon, J. M. Chandonia, S. E. Brenner. 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* **14**: 1188-90.
- Danese, P. N., and T. J. Silhavy. 1997. The  $\sigma^E$  and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **11**: 1183-93.
- Dartigalongue, C., and S. Raina. 1998. A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *EMBO J* **17**: 3968-80.
- Dartigalongue, C., D. Missiakas, S. Raina. 2001. Characterization of the *Escherichia coli*  $\sigma^E$  regulon. *J Biol Chem* **276**: 20866-75.
- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-5.
- Davies, B. W., C. Köhrer, A. I. Jacob, L. A. Simmons, J. Zhu, L. M. Aleman, U. L. Rajbhandary, G. C. Walker. 2010. Role of *Escherichia coli* YbeY, a highly conserved protein, in rRNA processing. *Mol Microbiol* **78**: 506-18.
- Decker, K. B., and D. M. Hinton. 2013. Transcription regulation at the core: similarities among bacterial, archaeal, and eukaryotic RNA polymerases. *Annu Rev Microbiol* **67**: 113-39.
- De Las Penas, A., L. Connolly, C. A. Gross. 1997a. The  $\sigma^E$ -mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of  $\sigma^E$ . *Mol Microbiol* **24**: 373-85.
- De Las Penas, A., L. Connolly, C. A. Gross. 1997b.  $\sigma^E$  is an essential  $\sigma$  factor in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 6862-4.
- Dombroski, A. J., W. A. Walter, M. T. Record, Jr, D. A. Siegele, C. A. Gross. 1992. Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor  $\sigma^{70}$  exhibit specificity of binding to promoter DNA. *Cell* **70**: 501-12.
- Dombroski, A. J., W. A. Walter, C. A. Gross. 1993. Amino-terminal amino acids modulate

- $\sigma$ -factor DNA-binding activity. *Genes Dev* **7**: 2446-55.
- Dominguez-Cuevas, P., P. Marin, J. L. Ramos, S. Marques. 2005. RNA polymerase holoenzymes can share a single transcription start site for the Pm promoter. Critical nucleotides in the -7 to -18 region are needed to select between RNA polymerase with  $\sigma^{38}$  or  $\sigma^{32}$ . *J Biol Chem* **280**: 41315-23.
- Drolet, M. 2006. Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol Microbiol* **59**: 723-30.
- Eisen, M. B., P. T. Spellman, P. O. Brown, D. Botstein. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14863-8.
- El-Samad, H., H. Kurata, J. C. Doyle, C. A. Gross, M. Khammash. 2005. Surviving heat shock: control strategies for robustness and performance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 2736-41.
- Erickson, J. W., V. Vaughn, W. A. Walter, F. C. Neidhardt, C. A. Gross. 1987. Regulation of the promoters and transcripts of *rpoH*, the *Escherichia coli* heat shock regulatory gene. *Genes Dev* **1**: 419-32.
- Erickson, J. W., and C. A. Gross. 1989. Identification of the  $\sigma^E$  subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate  $\sigma$  factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev* **3**: 1462-71.
- Estrem, S. T., T. Gaal, W. Ross, R. L. Gourse. 1998. Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9761-6.
- Fenton, M. S., S. J. Lee, J. D. Gralla. 2000. *Escherichia coli* promoter opening and -10 recognition: Mutational analysis of  $\sigma^{70}$ . *EMBO J* **19**: 1130-7.
- Flynn, J. M., I. Levchenko, R. T. Sauer, T. A. Baker. 2004. Modulating substrate choice: the SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation. *Genes Dev* **18**: 2292-301.
- Frohman, M. A. 1994. On beyond classic RACE (rapid amplification of cDNA ends). *PCR Methods Appl* **4**: S40-58.
- Gaal, T., W. Ross, S. T. Estrem, L. H. Nguyen, R. R. Burgess, R. L. Gourse. 2001. Promoter recognition and discrimination by Eo<sup>S</sup> RNA polymerase. *Mol Microbiol* **42**: 939-54.
- Gaitanaris, G. A., A. G. Papavassiliou, P. Rubock, S. J. Silverstein, M. E. Gottesman. 1990. Renaturation of denatured lambda repressor requires heat shock proteins. *Cell* **61**: 1013-20.

- Galeazzi, L., P. Bocci, A. Amici, L. Brunetti, S. Ruggieri, M. Romine, S. Reed, A. L. Osterman, D. A. Rodionov, L. Sorci, N. Raffaelli. 2011. Identification of nicotinamide mononucleotide deamidase of the bacterial pyridine nucleotide cycle reveals a novel broadly conserved amidohydrolase family. *J Biol Chem* **286**: 40365-75.
- Gamer, J., G. Multhaup, T. Tomoyasu, J. S. McCarty, S. Rudiger, H. J. Schonfeld, C. Schirra, H. Bujard, B. Bukau. 1996. A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the *Escherichia coli* heat shock transcription factor  $\sigma^{32}$ . *EMBO J* **15**: 607-17.
- Gardella, T., H. Moyle, M. M. Susskind. 1989. A mutant *Escherichia coli*  $\sigma^{70}$  subunit of RNA polymerase with altered promoter specificity. *J Mol Biol* **206**: 579-90.
- Giel, J., D. Rodionov, M. Liu, F. R. Blattner, P. J. Kiley. 2006. IscR-dependent gene expression links iron-sulfur assembly to the control of O<sub>2</sub>-regulated genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **60**: 1058-75.
- Gogol, E. B., V. A. Rhodius, K. Papenfort, J. Vogel, C. A. Gross. 2011. Small RNAs endow a transcriptional activator with essential repressor functions for single-tier control of a global stress regulon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 12875-80.
- Gopalkrishnan, S., H. Nicoloff, S. E. Ades. 2014. Co-ordinated regulation of the extracytoplasmic stress factor,  $\sigma^E$ , with other *Escherichia coli*  $\sigma$  factors by (p)ppGpp and DksA may be achieved by specific regulation of individual holoenzymes. *Mol Microbiol* **93**: 479-93.
- Gourse, R. L., T. Gaal, S. E. Aiyar, M. M. Barker, S. T. Estrem, C. A. Hirvonen, W. Ross. 1998. Strength and regulation without transcription factors: lessons from bacterial rRNA promoters. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**: 131-9.
- Gourse, R. L., W. Ross, T. Gaal. 2000. UPs and downs in bacterial transcription initiation: The role of the  $\alpha$  subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol Microbiol* **37**: 687-95.
- Golub, T. R., D. K. Slonim, P. Tamayo, C. Huard, M. Gaasenbeek, J. P. Mesirov, H. Coller, M. L. Loh, J. R. Downing, M. A. Caligiuri, C. D. Bloomfield, E. S. Lander. 1999. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**: 531-7.
- Green, H. A., and T. J. Donohue. 2006. Activity of *Rhodobacter sphaeroides* RpoHIII, a second member of the heat shock  $\sigma$  factor family. *J Bacteriol* **188**: 5712-21.
- Grigorova, I. L., R. Chaba, H. J. Zhong, B. M. Alba, V. Rhodius, C. Herman, C. A. Gross. 2004. Fine-tuning of the *Escherichia coli*  $\sigma^E$  envelope stress response relies on

- multiple mechanisms to inhibit signal-independent proteolysis of the transmembrane anti- $\sigma$  factor, RseA. *Genes Dev* **18**: 2686-97.
- Grigorova, I. L., N. J. Phleger, V. K. Mutalik, C. A. Gross. 2006. Insights into transcriptional regulation and  $\sigma$  competition from an equilibrium model of RNA polymerase binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5332-7.
- Grinwald, M., and E. Z. Ron. 2013. The *Escherichia coli* translation-associated heat shock protein YbeY is involved in rRNA transcription antitermination. *PLoS One* **8**:e62297.
- Gross, C. A., C. Chan, A. Dombroski, T. Gruber, M. Sharp M, J. Tupy, B. Young. 1998. The functional and regulatory roles of  $\sigma$  factors in transcription. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **63**: 141-55.
- Grossman, A. D., J. W. Erickson, C. A. Gross. 1984. The *htpR* gene product of *E. coli* is a  $\sigma$  factor for heat-shock promoters. *Cell* **38**: 383-90.
- Gruber, T. M., and C. A. Gross. 2003. Multiple  $\sigma$  subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57**: 441-66.
- Guisbert, E., C. Herman, C. Z. Lu, C. A. Gross. 2004. A chaperone network controls the heat shock response in *E. coli*. *Genes Dev* **18**: 2812-21.
- Guisbert, E., T. Yura, V. A. Rhodius, C. A. Gross. 2008. Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the *Escherichia coli* heat shock response. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 545-54.
- Guo, M. S., T. B. Updegrove, E. B. Gogol, S. A. Shabalina, C. A. Gross, G. Storz. 2014. MicL, a new  $\sigma^E$ -dependent sRNA, combats envelope stress by repressing synthesis of Lpp, the major outer membrane lipoprotein. *Genes Dev* **28**: 1620-34.
- Guyer, M. S., R. R. Reed, J. A. Steitz, K. B. Low. 1981. Identification of a sex-factor-affinity site in *E. coli* as gamma delta. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **45 Pt 1**: 135-40.
- Hahn, J. S., Z. Hu, D. J. Thiele, V. R. Iyer. 2004. Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol* **24**: 5249-56.
- Haugen, S. P., W. Ross, R. L. Gourse. 2008. Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nat Rev Microbiol* **6**: 507-19.
- Hayden, J. D., and S. E. Ades. 2008. The extracytoplasmic stress factor,  $\sigma^E$ , is required to maintain cell envelope integrity in *Escherichia coli*. *PLoS One* **3**: e1573.
- Herman, C., D. Thevenet, R. D'Ari, P. Bouloc. 1995. Degradation of  $\sigma^{32}$ , the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3516-20.

- Helmann, J. D. 2002. The extracytoplasmic function (ECF)  $\sigma$  factors. *Adv Microb Physiol* **46**: 47-110.
- Hengge-Aronis, R. 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the  $\sigma^S$  (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 373-95.
- Hertz, G.Z., and G. D. Stormo. 1999. Identifying DNA and protein patterns with statistically significant alignments of multiple sequences. *Bioinformatics* **15**: 563-77.
- Hiraoka, S., H. Matsuzaki, I. Shibuya. 1993. Active increase in cardiolipin synthesis in the stationary growth phase and its physiological significance in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **336**: 221-4.
- Hook-Barnard, I. G., and D. M. Hinton. 2007. Transcription initiation by mix and match elements: Flexibility for polymerase binding to bacterial promoters. *Gene Regul Syst Bio* **1**: 275-93.
- Hook-Barnard, I. G., and D. M. Hinton. 2009. The promoter spacer influences transcription initiation via  $\sigma^{70}$  region 1.1 of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 737-42.
- Hook-Barnard, I. G., X. B. Johnson, D. M. Hinton. 2006. *Escherichia coli* RNA polymerase recognition of a  $\sigma^{70}$ -dependent promoter requiring a -35 DNA element and an extended -10 TGn motif. *J Bacteriol* **188**: 8352-9.
- Hunt, T. P., and B. Magasanik. 1985. Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG*, and *glnL*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 8453-7.
- Jakob, U., W. Muse, M. Eser, J. C. Bardwell. 1999. Chaperone activity with a redox switch. *Cell* **96**: 341-52.
- Jacob, A. I., C. Köhrer, B. W. Davies, U. L. RajBhandary, G. C. Walker. 2013. Conserved bacterial RNase YbeY plays key roles in 70S ribosome quality control and 16S rRNA maturation. *Mol Cell* **49**: 427-38.
- Jensen, K. F. 1993. The *Escherichia coli* K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels. *J Bacteriol* **175**: 3401-7.
- Johansen, J., A. A. Rasmussen, M. Overgaard, P. Valentin-Hansen. 2006. Conserved small non-coding RNAs that belong to the  $\sigma^E$  regulon: Role in down-regulation of outer membrane proteins. *J Mol Biol* **364**: 1-8.
- Juang, Y. L., and J. D. Helmann. 1994. A promoter melting region in the primary  $\sigma$  factor of *Bacillus subtilis*. Identification of functionally important aromatic

- amino acids. *J Mol Biol* **235**: 1470-88.
- Kanehara, K., K. Ito, Y. Akiyama. 2002. YaeL (EcfE) activates the  $\sigma^E$  pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti- $\sigma^E$ , RseA. *Genes Dev* **16**: 2147-55.
- Kanehara, K., K. Ito, Y. Akiyama. 2003. YaeL proteolysis of RseA is controlled by the PDZ domain of YaeL and a Gln-rich region of RseA. *EMBO J* **22**:6389-98.
- Kanemori, M., H. Mori, T. Yura. 1994. Effects of reduced levels of GroE chaperones on protein metabolism: enhanced synthesis of heat shock proteins during steady-state growth of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**: 4235-42.
- Kaplan, S., A. Bren, A. Zaslaver, E. Dekel, U. Alon. 2008. Diverse two-dimensional input functions control bacterial sugar genes. *Mol Cell* **29**: 786-92.
- Kitagawa, M., T. Ara, M. Arifuzzaman, T. Ioka-Nakamichi, E. Inamoto, H. Toyonaga, H. Mori. 2005. Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (*A Complete Set of E. coli K-12 ORF Archive*): Unique Resources for Biological Research. *DNA Research* **12**: 291-299.
- Kitagawa, M., C. Wada, S. Yoshioka, T. Yura. 1991. Expression of ClpB, an analog of the ATP-dependent protease regulatory subunit in *Escherichia coli*, is controlled by a heat shock  $\sigma$  factor ( $\sigma^{32}$ ). *J Bacteriol* **173**: 4247-53.
- Klein, G., N. Kobylak, B. Lindner, A. Stupak, S. Raina. 2014. Assembly of lipopolysaccharide in *Escherichia coli* requires the essential LapB heat shock protein. *J Biol Chem* **289**: 14829-53.
- Koo, B. M., V. A. Rhodius, E. A. Campbell, C. A. Gross. 2009a. Dissection of recognition determinants of *Escherichia coli*  $\sigma^{32}$  suggests a composite -10 region with an 'extended -10' motif and a core -10 element. *Mol Microbiol* **72**: 815-29.
- Koo, B. M., V. A. Rhodius, E. A. Campbell, C. A. Gross. 2009b. Mutational analysis of *Escherichia coli*  $\sigma^{28}$  and its target promoters reveals recognition of a composite -10 region, comprised of an 'extended -10 motif' and a core -10 element. *Mol Microbiol* **72**: 830-43.
- Koo, B. M., V. A. Rhodius, G. Nonaka, P. L. deHaseth, C. A. Gross. 2009c. Reduced capacity of alternative  $\sigma$ s to melt promoters ensures stringent promoter recognition. *Genes Dev* **23**: 2426-36.
- Korber, P., J. M. Stahl, K. H. Nierhaus, J. C. Bardwell. 2000. Hsp15: a ribosome-associated heat shock protein. *EMBO J* **19**: 741-8.
- Kornitzer, D., D. Teff, S. Altuvia, A. B. Oppenheim. 1991. Isolation, characterization, and sequence of an *Escherichia coli* heat shock gene, *htpX*. *J Bacteriol* **173**: 2944-53.
- Kourennaia, O. V., and P. L. deHaseth. 2007. Substitution of a highly conserved

- histidine in the *Escherichia coli* heat shock transcription factor,  $\sigma^{32}$ , affects promoter utilization in vitro and leads to overexpression of the biofilm-associated flu protein in vivo. *J Bacteriol* **189**: 8430-6.
- Kumar, A., R. A. Malloch, N. Fujita, D. A. Smillie, A. Ishihama, R. S. Hayward. 1993. The -35-recognition region of *Escherichia coli*  $\sigma^{70}$  is inessential for initiation of transcription at an 'extended -10' promoter. *J Mol Biol* **232**: 406-18.
- Lemaux, P. G., S. L. Herendeen, P. L. Bloch, F. C. Neidhardt. 1978. Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E. coli* following temperature shifts. *Cell* **13**: 427-34.
- Lesley, S. A., S. B. Jovanovich, Y. C. Tse-Dinh, R. R. Burgess. 1990. Identification of a heat shock promoter in the *topA* gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**: 6871-4.
- Li, C., Y. P. Tao, L. D. Simon. 2000. Expression of different-size transcripts from the *clpP-clpX* operon of *Escherichia coli* during carbon deprivation. *J Bacteriol* **182**: 6630-7.
- Liberek, K., T. P. Galitski, M. Zylicz, C. Georgopoulos. 1992. The DnaK chaperone modulates the heat shock response of *Escherichia coli* by binding to the  $\sigma^{32}$  transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 3516-20.
- Lim, B., R. Miyazaki, S. Neher, D. A. Siegele, K. Ito, P. Walter, Y. Akiyama, T. Yura, C. A. Gross. 2013. Heat shock transcription factor  $\sigma^{32}$  co-opts the signal recognition particle to regulate protein homeostasis in *E. coli*. *PLoS Biol* **11**: e1001735.
- Lim, H. M., H. J. Lee, S. Roy, S. Adhya. 2001. A 'master' in base unpairing during isomerization of a promoter upon RNA polymerase binding. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 14849-52.
- Lima, S., M. S. Guo, R. Chaba, C. A. Gross, R. T. Sauer. 2013. Dual molecular signals mediate the bacterial response to outer-membrane stress. *Science* **340**: 837-41.
- Lipinska, B., J. King, D. Ang, C. Georgopoulos. 1988. Sequence analysis and transcriptional regulation of the *Escherichia coli* *grpE* gene, encoding a heat shock protein. *Nucleic Acids Res* **16**: 7545-62.
- Lisser, S., and H. Margalit. 1993. Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nucleic Acids Res* **21**: 1507-16.
- Liu, X., D. L. Brutlag, J. S. Liu. 2001. BioProspector: discovering conserved DNA motifs in upstream regulatory regions of co-expressed genes. *Pac Symp Biocomput*: 127-38.
- Lomakin, I. B., N. E. Shirokikh, M. M. Yusupov, C. U. Hellen, T. V. Pestova. 2006. The fidelity of translation initiation: reciprocal activities of eIF1, IF3 and YciH.

- EMBO J* **25**: 196-210.
- Lonetto, M., M. Gribskov, C. A. Gross. 1992. The  $\sigma^{70}$  family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* **174**: 3843-49.
- Mahalakshmi, S., M. R. Sunayana, L. SaiSree, M. Reddy. 2014. *yciM* is an essential gene required for regulation of lipopolysaccharide synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **91**: 145-57.
- Mathew, R., and D. Chatterji. 2006. The evolving story of the  $\omega$  subunit of bacterial RNA polymerase. *Trends Microbiol* **14**: 450-5.
- McGrath, P. T., H. Lee, L. Zhang, A. A. Iniesta, A. K. Hottes, M. H. Tan, N. J. Hillson, P. Hu, L. Shapiro, H. H. McAdams. 2007. High-throughput identification of transcription start sites, conserved promoter motifs and predicted regulons. *Nat Biotechnol* **25**: 584-92.
- Meccas, J., D. W. Cowing, C. A. Gross. 1991. Development of RNA polymerase–promoter contacts during open complex formation. *J Mol Biol* **220**: 585-97.
- Meccas, J., P. E. Rouviere, J. W. Erickson, T. J. Donohue, C.A. Gross. 1993. The activity of  $\sigma^E$ , an *Escherichia coli* heat-inducible  $\sigma$ -factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev* **7**: 2618-28.
- Merlin, C., M. Masters, S. McAteer, A. Coulson. 2003. Why is carbonic anhydrase essential to *Escherichia coli*? *J Bacteriol* **185**: 6415-24.
- Minakhin, L., and K. Severinov. 2007. On the role of the *Escherichia coli* RNA polymerase  $\sigma^{70}$  region 4.2 and  $\alpha$ -subunit C-terminal domains in promoter complex formation on the extended  $-10$  *galP1* promoter. *J Biol Chem* **278**: 29710-8.
- Missiakas, D., C. Georgopoulos, S. Raina. 1993. The *Escherichia coli* heat shock gene *htpY*: mutational analysis, cloning, sequencing, and transcriptional regulation. *J Bacteriol* **175**: 2613-24.
- Missiakas, D., M. P. Mayer, M. Lemaire, C. Georgopoulos, S. Raina. 1997. Modulation of the *Escherichia coli*  $\sigma^E$  (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Mol Microbiol* **24**: 355-71.
- Missiakas, D., and S. Raina. 1997. Signal transduction pathways in response to protein misfolding in the extracytoplasmic compartments of *E. coli*: role of two new phosphoprotein phosphatases PrpA and PrpB. *EMBO J* **16**: 1670-85.
- Mitchell, J. E , D. Zheng, S. J. Busby, S. D. Minchin. 2003. Identification and analysis of ‘extended  $-10$ ’ promoters in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **31**: 4689-95.
- Miyashiro, T., and M. Goulian. 2007. Stimulus-dependent differential regulation in the *Escherichia coli* PhoQ PhoP system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 16305-10.

- Morita, M., M. Kanemori, H. Yanagi, T. Yura. 1999a. Heat-induced synthesis of  $\sigma^{32}$  in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of *rpoH* mRNA secondary structure. *J Bacteriol* **181**: 401-10.
- Morita, M.T., Y. Tanaka, T.S. Kodama, Y. Kyogoku, H. Yanagi, T. Yura. 1999b. Translational induction of heat shock transcription factor  $\sigma^{32}$ : evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev* **13**: 655-65.
- Mutalik, V. K., G. Nonaka, S. E. Ades, V. A. Rhodius, C. A. Gross. 2009. Promoter strength properties of the complete sigma E regulon of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **191**: 7279-87.
- Newlands, J. T., T. Gaal, J. Meccas, R. L. Gourse. 1993. Transcription of the *Escherichia coli rrnB* P1 promoter by the heat shock RNA polymerase ( $E\sigma^{32}$ ) in vitro. *J Bacteriol* **175**: 661-8.
- Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 593-656.
- Nonaka, G., M. Blankschien, C. Herman, C. A. Gross, W. A. Rhodius. 2006. Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor,  $\sigma^{32}$ , reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes Dev* **20**: 1776-89.
- Paget, M. S., and J. D. Helmann. 2003. The  $\sigma^{70}$  family of  $\sigma$  factors. *Genome Biol* **4**: 203.
- Papenfort, K., V. Pfeiffer, F. MIka, S. Lucchini, J. Hinton, J. Vogel. 2006.  $\sigma^E$ -dependent small RNAs of *Salmonella* respond to membrane stress by accelerating global *omp* mRNA decay. *Mol Microbiol* **62**: 1674-88.
- Pelham, H. R. 1986. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* **46**: 959-61.
- Perez, J. C., and E. A. Groisman. 2009. Transcription factor function and promoter architecture govern the evolution of bacterial regulons. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 4319-24.
- Perez, J. C., D. Shin, I. Zwir, T. Latifi, T. J. Hadley, E. A. Groisman. 2009. Evolution of a bacterial regulon controlling virulence and  $Mg^{2+}$  homeostasis. *PLoS Genet* **5**: e1000428.
- Pérez-Rueda, E., and J. Collado-Vides. 2000. The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* **28**: 1838-47.
- Ponnambalam, S., C. Webster, A. Bingham, S. Busby. 1986. Transcription initiation at the *Escherichia coli* galactose operon promoters in the absence of the normal  $-35$  region sequences. *J Biol Chem* **261**: 16043-8.
- Price, N. L., and T. L. Raivio. 2009. Characterization of the Cpx regulon in *Escherichia*

- coli* strain MC4100. *J Bacteriol* **191**: 1798-815.
- Qi, H., R. Menzel, Y. C. Tse-Dinh. 1996. Effect of the deletion of the  $\sigma^{32}$ -dependent promoter (P1) of the *Escherichia coli* topoisomerase I gene on thermotolerance. *Mol Microbiol* **21**: 703-11.
- Raina, S., and C. Georgopoulos. 1990. A new *Escherichia coli* heat shock gene, *htrC*, whose product is essential for viability only at high temperatures. *J Bacteriol* **172**: 3417-26.
- Raina, S., and C. Georgopoulos. 1991. The *htrM* gene, whose product is essential for *Escherichia coli* viability only at elevated temperatures, is identical to the *rfaD* gene. *Nucleic Acids Res* **19**: 3811-9.
- Rasouly, A., M. Schonbrun, Y. Shenhar, E. Z. Ron. 2009. YbeY, a heat shock protein involved in translation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **191**: 2649-55.
- Reitzer, L. J., R. Bueno, W. D. Cheng, S. A. Abrams, D. M. Rothstein, T. P. Hunt, B. Tyler, B. Magasanik. 1987. Mutations that create new promoters suppress the  $\sigma^{54}$  dependence of *glnA* transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**: 4279-84.
- Rezuchova, B., H. Miticka, D. Homerova, M. Roberts, J. Kormanec. 2003. New members of the *Escherichia coli*  $\sigma^E$  regulon identified by a two-plasmid system. *FEMS Microbiol Lett* **225**: 1-7.
- Rhodium, V., T. K. Van Dyk, C. Gross, R. A. LaRossa. 2002. Impact of genomic technologies on studies of bacterial gene expression. *Annu Rev Microbiol* **56**: 599-624.
- Rhodium, V. A., W. C. Suh, G. Nonaka, J. West, C. A. Gross. 2006. Conserved and variable functions of the  $\sigma^E$  stress response in related genomes. *PLoS Biol* **4**: e2.
- Rhodium, V. A., V. K. Mutalik, C. A. Gross. 2012. Predicting the strength of UP-elements and full-length *E. coli*  $\sigma^E$  promoters. *Nucleic Acids Res* **40**: 2907-24.
- Richmond, C. S., J. D. Glasner, R. Mau, H. Jin, F. R. Blattner. 1999. Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* **27**: 3821-35.
- Ritossa, F. 1963. New puffs induced by temperature shock, DNP and salicylate in salivary chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Inf. Service* **37**: 122-3.
- Ross, W., K. K. Gosink, J. Salomon, K. Igarashi, C. Zou, A. Ishihama, K. Severinov, R. L. Gourse. 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* **262**: 1407-13.
- Rouviere, P. E., A. De Las Penas, J. Mecsas, C. Z. Lu, K. E. Rudd, C. A. Gross. 1995. *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock  $\sigma$  factor,  $\sigma^E$ , in *Escherichia coli*. *EMBO J* **14**: 1032-42.

- Rowley, G., M. Spector, J. Kormanec, M. Roberts. 2006. Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* **4**: 383-94.
- Ryu, S. 1998. CRP.cAMP-dependent transcription activation of the *Escherichia coli* *pts* Po promoter by the heat shock RNA polymerase ( $E\sigma^{32}$ ) in vitro. *Mol Cells* **8**: 614-7.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schindler, D., and T. Waldminghaus. 2013. "Non-canonical protein-DNA interactions identified by ChIP are not artifacts": response. *BMC Genomics* **14**: 638.
- Schneider, T. D., G. D. Stormo, L. Gold, A. Ehrenfeucht. 1986. Information content of binding sites on nucleotide sequences. *J Mol Biol* **188**: 415-31.
- Schroeder, L. A., T. J. Gries, R. M. Saecker, M. T. Record, M. E. Jr, Harris, P. L. deHaseth. 2009. Evidence for a tyrosine-adenine stacking interaction and for a short-lived open intermediate subsequent to initial binding of *Escherichia coli* RNA polymerase to promoter DNA. *J Mol Biol* **385**: 339-49.
- Serizawa, M., H. Yamamoto, H. Yamaguchi, Y. Fujita, K. Kobayashi, N. Ogasawara, J. Sekiguchi. 2004. Systematic analysis of SigD-regulated genes in *Bacillus subtilis* by DNA microarray and northern blotting analyses. *Gene* **329**: 125-36.
- Serres, M. H., S. Goswami, M. Riley. 2004. GenProtEC: an updated and improved analysis of functions of *Escherichia coli* K-12 proteins. *Nucleic Acids Res* **32**: D300-2.
- Sharp, M. M., C. L. Chan, C. Z. Lu, M. T. Marr, S. Nechaev, E. W. Merritt, K. Severinov, J. W. Roberts, C. A. Gross. 1999. The interface of  $\sigma$  with core RNA polymerase is extensive, conserved, and functionally specialized. *Genes Dev* **13**: 3015-26.
- Siegele, D. A., J. C. Hu, W. A. Walter, C. A. Gross. 1989. Altered promoter recognition by mutant forms of the  $\sigma^{70}$  subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Mol Biol* **206**: 591-03.
- Shimada, T., H. Makinoshima, Y. Ogawa, T. Miki, M. Maeda, A. Ishihama. 2004. Classification and strength measurement of stationary-phase promoters by use of a newly developed promoter cloning vector. *J Bacteriol* **186**: 7112-22.
- Shin, D., S. Lim, Y. J. Seok, S. Ryu. 2001. Heat shock RNA polymerase ( $E\sigma^{32}$ ) is involved in the transcription of *mhc* and crucial for induction of the Mlc regulon by glucose in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**: 25871-5.
- Shultzaberger, R. K., Z. Chen, K. A. Lewis, T. D. Schneider. 2007. Anatomy of *Escherichia coli*  $\sigma^{70}$  promoters. *Nucleic Acids Res* **35**: 771-88.

- Sklar, J. G., T. Wu, L. S. Gronenberg, J. C. Malinverni, D. Kahne, T. J. Silhavy. 2007. Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 6400-5.
- Skowrya, D., C. Georgopoulos, M. Zylicz. 1990. The *E. coli dnaK* gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell* **62**: 939-44.
- Sohn, J., R. A. Grant, R. T. Sauer. 2007. Allosteric activation of DegS, a stress sensor PDZ protease. *Cell* **131**: 572-83.
- Sohn, J., and R. T. Sauer. 2009. OMP peptides modulate the activity of DegS protease by differential binding to active and inactive conformations. *Mol Cell* **33**: 64-74.
- Soo, V. W., P. Hanson-Manful, W. M. Patrick. 2011. Artificial gene amplification reveals an abundance of promiscuous resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 1484-9.
- Straus, D. B., W. A. Walter, C. A. Gross. 1987. The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of  $\sigma^{32}$ . *Nature* **329**: 348-51.
- Straus, D. B., W. A. Walter, C. A. Gross. 1989. The activity of  $\sigma^{32}$  is reduced under conditions of excess heat shock protein production in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **3**: 2003-10.
- Studholme, D. J., and M. Buck. 2000. The biology of enhancer-dependent transcriptional regulation in bacteria: insights from genome sequences. *FEMS Microbiol Lett* **186**: 1-9.
- Sukhodolets, M. V., J. E. Cabrera, H. Zhi, D. J. Jin. 2001. RapA, a bacterial homolog of SWI2/SNF2, stimulates RNA polymerase recycling in transcription. *Genes Dev* **15**: 3330-41.
- Tatsuta, T., T. Tomoyasu, B. Bukau, M. Kitagawa, H. Mori, K. Karata, T. Ogura. 1998. Heat shock regulation in the *ftsH* null mutant of *Escherichia coli*: dissection of stability and activity control mechanisms of  $\sigma^{32}$  in vivo. *Mol Microbiol* **30**: 583-93.
- Taura, T., N. Kusukawa, T. Yura, K. Ito. 1989. Transient shut off of *Escherichia coli* heat shock protein synthesis upon temperature shift down. *Biochem Biophys Res Commun* **163**: 438-43.
- Thouvenot, B., B. Charpentier, C. Branlant. 2004. The strong efficiency of the *Escherichia coli gapA* P1 promoter depends on a complex combination of functional determinants. *Biochem J* **383**: 371-82.
- Tissieres, A., H. K. Mitchell, U. M. Tracy. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* **84**: 389-98.

- Tomoyasu, T., J. Gamer, B. Bukau, M. Kanemori, H. Mori, A. J. Rutma, A. B. Oppenheim, T. Yura, K. Yamanaka, H. Niki, S. Hiraga, T. Ogura. 1995. *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor  $\sigma^{32}$ . *EMBO J* **14**: 2551-60.
- Thompson, K. M., V. A. Rhodius, S. Gottesman. 2007.  $\sigma^E$  regulates and is regulated by a small RNA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**: 4243-56.
- Tomsic, M., L. Tsujikawa, G. Panaghie, Y. Wang, J. Azok, P. L. deHaseth. 2001. Different roles for basic and aromatic amino acids in conserved region 2 of *Escherichia coli*  $\sigma^{70}$  in the nucleation and maintenance of the single-stranded DNA bubble in open RNA polymerase-promoter complexes. *J Biol Chem* **276**: 31891-6.
- Torres, M., J. M. Balada, M. Zellars, C. Squires, C. L. Squires. 2004. In vivo effect of NusB and NusG on rRNA transcription antitermination. *J Bacteriol* **186**: 1304-10.
- Tseng, G. C., M. K. Oh, L. Rohlin, J. C. Liao, W. H. Wong. 2001. Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res* **29**: 2549-57.
- Tsui, H. C., G. Feng, M. E. Winkler. 1996. Transcription of the *mutL* repair, *miaA* tRNA modification, *hfq* pleiotropic regulator, and *hflA* region protease genes of *Escherichia coli* K-12 from clustered  $E\sigma^{32}$ -specific promoters during heat shock. *J Bacteriol* **178**: 5719-31.
- Tusher, V. G., R. Tibshirani, G. Chu. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 5116-21.
- Typas, A., and R. Hengge. 2005. Differential ability of  $\sigma^S$  and  $\sigma^{70}$  of *Escherichia coli* to utilize promoters containing half or full UP-element sites. *Mol Microbiol* **55**: 250-60.
- Udekwi, K. I., and E. G. Wagner. 2007.  $\sigma^E$  controls biogenesis of the antisense RNA MicA. *Nucleic Acids Res* **35**: 1279-88.
- Ueki, T., and S. Inouye. 2001. SigB, SigC, and SigE from *Myxococcus xanthus* homologous to  $\sigma^{32}$  are not required for heat shock response but for multicellular differentiation. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 287-93.
- VanBogelen, R. A., and F. C. Neidhardt. 1990. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5589-93.
- Visca, P., L. Leoni, M. J. Wilson, I. L. Lamont. 2002. Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol Microbiol* **45**: 1177-90.
- Wada, C., M. Imai, T. Yura. 1987. Host control of plasmid replication: requirement for

- the  $\sigma$  factor  $\sigma^{32}$  in transcription of mini-F replication initiator gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 8849-53.
- Wade, J. T., D. C. Roa, D. C. Grainger, D. Hurd, S. J. Busby, K. Struhl, E. Nudler. 2006. Extensive functional overlap between  $\sigma$  factors in *Escherichia coli*. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 806-14.
- Waldminghaus, T., and K. Skarstad. 2010. ChIP on Chip: surprising results are often artifacts. *BMC Genomics* **11**: 414.
- Walsh, N. P., B. M. Alba, B. Bose, C. A. Gross, R. T. Sauer. 2003. OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* **113**: 61-71.
- Wang, Y., and P. L. deHaseth. 2003.  $\sigma^{32}$ -dependent promoter activity in vivo: sequence determinants of the *groE* promoter. *J Bacteriol* **185**: 5800-6.
- Weber, H., T. Polen, J. Heuveling, V. F. Wendisch, R. Hengge. 2005. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*:  $\sigma^S$ -dependent genes, promoters, and  $\sigma$  factor selectivity. *J Bacteriol* **187**: 1591-603.
- Wilken, C., K. Kitzing, R. Kurzbauer, M. Ehrmann, T. Clausen. 2004. Crystal structure of the DegS stress sensor: How a PDZ domain recognizes misfolded protein and activates a protease. *Cell* **17**: 483-94.
- Wollmann, P., and K. Zeth. 2007. The structure of RseB: a sensor in periplasmic stress response of *E. coli*. *J Mol Biol* **372**: 927-41.
- Wu, H. 1996. Biosynthesis of Lipoproteins. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (ed. F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger), pp. 1005-1014. ASM Press, Washington, D.C.
- Wu, T., J. Malinverni, N. Ruiz, S. Kim, T. J. Silhavy, D. Kahne. 2005. Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* **121**: 235-45.
- Xiao, H., M. Kalman, K. Ikehara, S. Zemel, G. Glaser, M. Cashel. 1991. Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J Biol Chem* **266**: 5980-90.
- Yamamori, T., K. Ito, Y. Nakamura, T. Yura. 1978. Transient regulation of protein synthesis in *Escherichia coli* upon shift-up of growth temperature. *J Bacteriol* **134**: 1133-40.
- Yamamoto, A., Y. Mizukami, H. Sakurai. 2005. Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**: 11911-9.

- Yang, Y. H., S. Dudoit, P. Luu, D. M. Lin, V. Peng, J. Ngai, T. P. Speed. 2002. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**: e15.
- Young, B. A., L. C. Anthony, T. M. Gruber, T. M. Arthur, E. Heyduk, C. Z. Lu, M. M. Sharp, T. Heyduk, R. R. Burgess, and C. A. Gross. 2001. A coiled-coil from the RNA polymerase  $\beta'$  subunit allosterically induces selective nontemplate strand binding by  $\sigma^{70}$ . *Cell* **29**: 935-44.
- Young, B. A., T. M. Gruber, C. A. Gross. 2004. Minimal machinery of RNA polymerase holoenzyme sufficient for promoter melting. *Science* **303**:1382-4.
- Yu, H. H., and M. Tan. 2003.  $\sigma^{28}$  RNA polymerase regulates *hctB*, a late developmental gene in *Chlamydia*. *Mol Microbiol* **50**: 577-84.
- Yura, T., and K. Nakahigashi. 1999. Regulation of the heat-shock response. *Curr Opin Microbiol* **2**: 153-8.
- Yura, T., E. Guisbert, M. Poritz, C. Z. Lu, E. Campbell, C. A. Gross. 2007. Analysis of  $\sigma^{32}$  mutants defective in chaperone-mediated feedback control reveals unexpected complexity of the heat shock response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 17638-43.
- Yuzawa, H., H. Nagai, H. Mori, T. Yura. 1993. Heat induction of  $\sigma^{32}$  synthesis mediated by mRNA secondary structure: a primary step of the heat shock response in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **21**: 5449-55.
- Zafar, M. A., V. J. Carabetta, M. J. Mandel, T. J. Silhavy. 2014. Transcriptional occlusion caused by overlapping promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 1557-61.
- Zaslaver, A., A. E. Mayo, R. Rosenberg, P. Bashkin, H. Sberro, M. Tsalyuk, M. G. Surette, U. Alon. 2004. Just-in-time transcription program in metabolic pathways. *Nat Genet* **36**: 486-91.
- Zellers, M., and C. L. Squires. 1999. Antiterminator-dependent modulation of transcription elongation rates by NusB and NusG. *Mol Microbiol* **32**: 1296-304.
- Zhao, K., M. Liu, R. R. Burgess. 2005. The global transcriptional response of *Escherichia coli* to induced  $\sigma^{32}$  protein involves  $\sigma^{32}$  regulon activation followed by inactivation and degradation of  $\sigma^{32}$  in vivo. *J Biol Chem* **280**: 17758-68.
- Zhao, K., M. Liu, R. R. Burgess. 2007. Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: From regulon members to 'foraging'-like behavior in *E. coli*. *Nucleic Acids Res* **35**: 4441-52.

## 發表論文一覽

1. Nonaka, G., M. Blankschien, C. Herman, C. A. Gross, W. A. Rhodius. Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor,  $\sigma^{32}$ , reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes Dev* 2006 **20**: 1776-89.
2. Mutalik, V. K., G. Nonaka, S. E. Ades, V. A. Rhodius, C. A. Gross. Promoter strength properties of the complete sigma E regulon of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 2009 **191**: 7279-87.
3. Koo, B. M., V. A. Rhodius, G. Nonaka, P. L. deHaseth, C. A. Gross. Reduced capacity of alternative  $\sigma$ s to melt promoters ensures stringent promoter recognition. *Genes Dev* 2009 **23**: 2426-36.
4. Rhodius, V. A., W. C. Suh, G. Nonaka, J. West, C. A. Gross. Conserved and variable functions of the  $\sigma^E$  stress response in related genomes. *PLoS Biol* 2006 **4**: e2.

## 謝辞

本研究の遂行に、また本論文を作成するにあたってご指導、ご示唆をいただいた東京大学大学院農学生命科学研究科 北本勝ひこ教授に厚く御礼申し上げます。東京大学に在学中指導教官として、また味の素株式会社に入社後にも公私にわたりご指導いただきました。

本研究の遂行と投稿論文の作成にあたりご指導、ご協力いただいた米 UCSF (University of California, San Francisco) Carol Gross 研究室のメンバーに厚く御礼申し上げます。同研究室の PI である Carol Gross 教授には、研究室在籍時の指導者として、また在籍後にも公私にわたり多大なご指導いただきました。Virgil Rhodius 博士、Byoung-Mo Koo 博士、Vivek Mutalik 博士、Christophe Herman 博士には共同研究者として多くのご助言、ご支援いただきました。京都大学名誉教授 由良隆 博士、Eric Guisbert 博士、Chi Zen Lu 研究員には研究室での実験推進でご支援いただきました。

共同研究者として本研究の遂行を支援していただいた Matthew Blankschien 博士、Sarah Ades 博士、Pieter deHaseth 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にご指導、ご助言いただいた味の素株式会社バイオ・ファイン研究所（旧発酵技術研究所）及びイノベーション研究所の皆様には厚く御礼申し上げます。バイオ・ファイン研究所プロセス開発研究所長 児島宏之 博士には素晴らしい研究環境を整えていただき、研究生活を支えていただきました。旧発酵技術研究所所長 宇多川隆 博士、伊藤久生 博士、安枝寿 博士、朝倉陽子 博士には多くのご助言をいただきました。