

大腸菌外膜タンパク質の生合成調節  
機構の分子遺伝学的解析

松山伸一

|         |         |
|---------|---------|
| 名古屋大学図書 |         |
| 和       | 1003107 |

|      |            |
|------|------------|
| 報告番号 | 2 第 3316 号 |
|------|------------|

## 目次

### 序論

1

|     |  |   |
|-----|--|---|
| 第1部 | <i>ompF</i> , <i>ompC</i> 遺伝子の発現調節<br>とその生理的意義 : 融合<br>遺伝子を用いた解析 | 9 |
|-----|--|---|

|     |      |    |
|-----|------|----|
| 第1章 | 実験方法 | 11 |
| 第2章 | 実験結果 | 18 |
| 第3章 | 考察   | 29 |

|     |                                 |    |
|-----|---------------------------------|----|
| 第2部 | <i>micF</i> RNA - アンチセンス<br>RNA | 33 |
|-----|---------------------------------|----|

|     |      |    |
|-----|------|----|
| 第1章 | 実験方法 | 37 |
| 第2章 | 実験結果 | 38 |
| 第3章 | 考察   | 47 |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 第3部 | <i>OmpR</i> と <i>EnvZ</i> タンパク質の相<br>互作用 | 51 |
|-----|--|----|

|     |      |    |
|-----|------|----|
| 第1章 | 実験方法 | 55 |
| 第2章 | 実験結果 | 57 |
| 第3章 | 考察   | 64 |

|     |   |  |
|-----|---|--|
| 第4部 | <i>ompF</i> , <i>ompC</i> 遺伝子の発現に影<br>響を及ぼす RNA ポリメラー |  |
|-----|---|--|

|          |     |
|----------|-----|
| ぜの変異     | 67  |
| 第1章 実験方法 | 69  |
| 第2章 実験結果 | 70  |
| 第3章 考察   | 75  |
| 総括       | 79  |
| 引用文献     | 88  |
| 謝辞       | 128 |
| 報文目録     | 129 |

本論文では以下の略語を用いた。

DNA            デオキシリボ核酸

RNA            リボ核酸

mRNA          伝令リボ核酸

bp            base pairs

kb            kilobase pairs

Tris           Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane

SDS           ラウリル硫酸ナトリウム

EDTA          ethylenediaminetetraacetate

## 序論

大腸菌をはじめとするグラム陰性細菌の外膜の研究は、MiuraとMizushima(1)による大腸菌外膜の分離、精製法の確立に端を発し、その構成成分や構造、機能の解析が進展した。大腸菌の細胞表層は、外側より外膜、ペプチドグリカン層、細胞質膜という3層より形成されている。外膜と細胞質膜の間には、各種分解酵素やアミノ酸結合タンパク質などの可溶性タンパク質が局在するペリプラズム空間がある。外膜は、外葉がリポ多糖、内葉がリン脂質から成る非対称的二重層にタンパク質が組み込まれた構造をとっている。内毒素であるリポ多糖は、最近化学構造が確定したリピドA(2)、オリゴ糖および側鎖から成る両親媒性の物質である。また、外膜のリン脂質の主成分は、細胞質膜と同様にホスファチジルエタノールアミンとホスファチジルグリセロールである(3)。外膜に含まれるタンパク質は、細胞質膜に較べて種類が少なく、主要外膜タンパ

物質と呼ばれる *OmpA*, *OmpC*, *OmpF* および主要リポタンパク質が細胞あたり  $10^5 \sim 10^6$  分子も存在する(3)。

外膜は、ペプチドグリカンと相互作用して細胞表層の構造維持に寄与している。YamadaとMizushima(4)は細胞表層の再構成系を開発し、

*OmpF*, *OmpC* タンパク質およびリポ多糖から成る膜状のヘキサゴナル格子構造が結合型リポタンパク質を介してペプチドグリカン層上に保持されており、これが表層の基本構造であることを示した。そして、*OmpF*, *OmpC* タンパク質が表層構造の維持に寄与していることが生細胞レベルでも明らかにされた(5)。

また、外膜は抗生物質や界面活性剤に対する透過障壁となっており、この障壁としての機能に重要な役割を果たしているのがリポ多糖である。このことは、リポ多糖のO側鎖やオリゴ糖の一部を欠いた *rough* 株や EDTA 処理でリポ多糖を遊離した細胞では、抗生物質や界面活性剤に対して感受性が高まること

から示唆された(6)。

外膜は透過障壁として機能している一方、外膜には糖やアミノ酸などの有用な親水性低分子物質のための透過孔が存在する(7)。OmpF, OmpCタンパク質は、この透過孔を形成する代表的なタンパク質である。また、外膜に存在するタンパク質やリポ多糖は、種々のバクテリオファージやコリシンのリセプターとなっている。T4ファージの感染機構は、上述の細胞表層の再構成系を用いて詳細に解析され、感染過程と表層成分の役割が分子レベルで明らかにされた(8)。

生物界には種々の生体膜が存在するが、その構造と機能が明らかにされているものは少ない。その中で大腸菌外膜は、最も深く理解されている生体膜のひとつとすることができる。しかしながら、膜構成成分の生合成の調節機構に関しては、大腸菌外膜の場合でも研究の歴史が浅く、筆者がこの研究に参入した頃はまだ緒に付いたばかりであった。

生体膜は細胞と外部環境との生理的、境界であると同時に、細胞内にあっては機能と異にする多くのオルガネラの構造および機能を決定している基本的構造体である。したがって、膜構成成分の生合成が量的にも質的にもかつ時間的にも厳密な制御の下に置かれていることは想像に難くない。

膜タンパク質の生合成の調節機構の研究を行う上で、大腸菌外膜は格好の材料である。それは外膜のタンパク質組成が比較的単純であり、ごく少ない種類の安定なタンパク質を大量に含んでいるからである。

筆者は、膜タンパク質合成の調節機構の研究材料として *OmpF*, *OmpC* タンパク質を選んだ。分子量約 37000 の *OmpF*, *OmpC* タンパク質は、ともに三量体を形成し(9)、上述したように細胞表層構造の維持や物質の透過孔としての機能をもっている。

また、アミノ酸配列の相同性から、この二つのタンパク質をコードする遺伝子は共通の祖先遺伝子に由来した

ものであると考えられている(10)。

OmpF, OmpCタンパク質はその構造や機能が極めて類似している(厳密には、OmpFの形成する透過孔がOmpCのそれよりもやや大きく、透過物質に対する親和性も異なっている(11)。また、バクテリオファージやコリシントに対するリセプター活性にも特異性がある(3。))にもかかわらず、この2つのタンパク質の合成は培地浸透圧変化によって全く逆の影響を受けることがKawajiri(12)や van Alphenら(13)によって見出された。浸透圧の低い培地で生育させた菌の外膜にはOmpFタンパク質のみが存在しているが、ショ糖や食塩を加えて培地浸透圧を高めるとOmpFの合成は抑制され、OmpCの合成が促進される。このように培地浸透圧変化によって外膜中にみられるタンパク質の量が変化する現象は、浸透圧変化による遺伝子発現の調節という意味で *osmoregulation* と呼ばれている。

この現象の解明は膜タンパク質遺伝子の発現調節機構という観点からだけではなく、外

界からの刺激に応答した遺伝子発現の機構、およびタンパク質の膜透過の過程に関する制御機構の研究対象としても興味深い。

*OmpF*, *OmpC* タンパク質の合成に関する遺伝学的研究は、1970年代中頃から Fouldsら(14)や Reevesら(15)を中心として、まず *OmpF*, *OmpC* タンパク質をリセプターとするバクテリオファージやコリシンを用いた変異株の分離から始められた。*OmpF*, *OmpC* タンパク質の合成に関する複数の遺伝子が見出されたが、それぞれの遺伝子の機能が明らかにされたのは1980年頃であった。HallとSilhavy(16,17,18)はこれらの遺伝子のプロモーター領域と $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を遺伝学的手法により融合させ、それらのプロモーター活性を $\beta$ -ガラクトシダーゼを測定することによって解析できる系を作成した。この解析から、*OmpF*, *OmpC* タンパク質の構造遺伝子として、それぞれ *ompF* (大腸菌染色体地図上72分), *ompC* (47分) 遺伝子が同定された。また、*ompB* 領域 (74分) には *ompR* と *envZ*

の2つの遺伝子がオペロンを形成し、ompF、ompC 遺伝子の発現を転写段階で正に調節していることが明らかにされた。そして、筆者が研究を始めた時点では、これらの遺伝子のうち ompF、ompR、および envZ 遺伝子はクローン化され(19,20)、DNAの全塩基配列が決定されていた(21,22,23) (筆者は ompF の塩基配列決定に参加した)。

このような背景のもとに、筆者は、ompF、ompC 遺伝子の発現調節機構の研究を始めた。第1部では、ompF と ompC 遺伝子のプロモーター領域を相互に入れ換えた融合遺伝子を用いた解析から、ompF、ompC 遺伝子の発現調節機構、および培地浸透圧変化に応答した両遺伝子の発現の生理的意義について論じる。第2部では、ompF 遺伝子に対するアンチセンス RNA をコードする micF 遺伝子の欠失変異株の解析から、micF RNA の生理的機能について考察する。第3部では、envZ 変異を ompR 変異が抑制した結果をもとに、OmpR と EnvZ タンパク質が相互

作用して ompF, ompC 遺伝子の発現を調節していることについて述べる。第4部では、ompR 変異による envZ 変異の抑制が RNA ポリメラーゼの変異によって妨げられた結果を通して、OmpR, EnvZ, および RNA ポリメラーゼの相互作用と、転写の際における RNA ポリメラーゼの分子の方向性について考察する。

## 第1部

ompF, ompC 遺伝子の発現調節とその生理的意義 : 融合遺伝子を用いての解析

<sup>5</sup> OmpF, OmpC シンパツ質は構造や機能が極めて類似しているが、その合成は培地浸透圧変化によって全く逆の影響を受ける。低浸透圧下では OmpF が、高浸透圧下では OmpC がそれぞれ優先的に合成される<sup>(12,13)</sup>。このような合成の切

<sup>10</sup> 換えがいかなる生理的意義をもっているのかを調べるために、ompF と ompC 遺伝子のプロモーター領域を相互に交換した融合遺伝子を作成した。ompF, ompC 遺伝子の発現がプロモーター依存性であるならば、作成した融合遺伝子によって、低浸透圧下では OmpC が、高浸透

<sup>15</sup> 圧下では OmpF がそれぞれ優先的に合成されるはずである。実際、作成した融合遺伝子からは、培地浸透圧変化に対する応答が野生型遺伝子の場合とは全く逆に OmpF, OmpC シンパツ質が合成された。しかしながら、この融合遺

伝子を保持する菌の生育は野生株と較べて全く正常であったことから、通常用いられている試験管内培養条件下では、*OmpF*, *OmpC* 合成の培地浸透圧変化に応答する切換えは大腸菌にとって必須のものではないことが示唆された。

また、遺伝子発現の調節機構の面からは、培地浸透圧変化に応答した *ompF*, *ompC* 遺伝子の発現調節にはプロモーター領域が重要であり、かつ、両遺伝子間には発現を相互に調節し合う機構が存在していることが示唆された。

## 第1章 実験方法

### (1) 細菌, バクテリオファージおよび既存のプラスミド

本研究で用いられた大腸菌 K-12 株, バクテリオファージおよび既存のプラスミドを Table 1-1 に示した。形質転換実験に用いられた K-12 株は野生株を除いてすべて recA 株である。Y0160 recA と CE1036 recA は thyA<sup>+</sup> をマーカーに、SM1005, SM1006 および SM1007 は srl<sup>+</sup> をマーカーにして KL16-99 Nal<sup>r</sup> を供与菌とした接合によって recA 変異が導入された。recA 変異は紫外線感受性によって調べられた。thyA 変異株はトリメソプリームを用いて Staceyら<sup>(24)</sup>の方法で分離された。後述する融合遺伝子の発現に関する実験に用いられた SM1005, SM1006 および SM1007 は ompR と envZ 遺伝子を除いてすべて遺伝子組成が同じである。

### (2) 培地

ompC, ompF および融合遺伝子の発現に関する実験には medium A<sub>(12)</sub> (7g Nutrient broth (Difco), 1g Yeast

extract (Difco), 3.7g  $K_2HPO_4$ , 1.3g  $KH_2PO_4$ , 2g グリセリン/l) を使用し、ショ糖の添加により浸透圧を調整した。形質転換実験にはTYブロス (10g Bacto-Trypton (Difco), 5g Yeast extract (Difco) / l) を用いた。最小培地としてM9培地 (15.1g  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ , 3g  $KH_2PO_4$ , 0.5g NaCl, 1.0g  $NH_4Cl$ , 0.1g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1g グルコース / l) を用いた。必要に応じて、ナリジキシン酸, アンピシリン, クロラムフェニコール, ストレプトマイシン, およびテトラサイクリンがそれぞれ 5, 50, 25, 100 および 10  $\mu g/ml$  の濃度で添加された。

### (3) P1形質導入

バクテリオファージ P1kc による形質導入実験は Miller<sup>(25)</sup> の方法により行なった。

### (4) 接合

Hfr株を用いて接合実験は Miller<sup>(25)</sup> の方法により行なった。

### (5) バクテリオファージ TuIa と TuIb に対する感受性テスト

バクテリオファージ TuIa と TuIb に対する感

受性は medium A 寒天培地および 15% (w/v) ショ糖を含んだ medium A 寒天培地上でのクロスストリークテストによって調べた。

#### (6) インベロープの調製と Triton X-100 による可溶化

10ml の medium A あるいは ショ糖の添加された medium A で対数増殖期後期まで生育させた菌を集菌後、0.5ml ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.2) に懸濁した。大岳ソニケータ-5201型を用いて 20W, 2分間超音波破碎を行なった。1400×g, 10分間の遠心分離により未破碎細胞を除いた後、100000×g, 30分間の遠心分離によって得られる画分をインベロープとして用いた。このインベロープ画分を 4ml の 2% Triton X-100 - 10mM ナトリウム-リン酸緩衝液に懸濁し 37°C, 15分間インキュベートした。Triton X-100 不溶性画分は 100000×g, 30分間の遠心分離により得られ、2ml の 10mM ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.2) で洗淨したものを外膜タンパク質として用いた。タンパク質は Lowry らの

方法により定量された。

### (7) 尿素 - SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

尿素 - SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Uemura と Mizushima(26)の方法によった。ゲルの組成は 8% アクリルアミド, 0.13% N,N'-メチレンビスアクリルアミド, 8M 尿素, 0.5% SDS 0.1M ナトリウム - リン酸緩衝液 (pH 7.2) である。泳動緩衝液は 0.1M ナトリウム - リン酸緩衝液 (pH 7.2), 0.1% SDS である。泳動後, ゲルを 20% (w/v) スルホサリチル酸中に一晩浸してタンパク質を固定し, 0.25% フォーマルシブリアントアル - R-250 で 37°C, 2 時間染色した。脱染色には 7.5% 酢酸を用いた。

(8) 遺伝子組換え技術のために用いた試薬制限酵素 RsaI は New England Biolabs の製品より購入した。その他の制限酵素と T4 リガーゼは宝酒造より購入した。バクテリアアルカリフォスファターゼは Worthington Biochemical Corp. の製品が、また、T4 ポリヌクレオチド

キナーゼは P.L. Biochemicals の製品が用いられた。[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP は [ $^{32}\text{P}$ ]オルトリン酸 (Amersham Intl.) と ADP (Sigma) より Johnson と Walseth<sup>(27)</sup> の方法で合成した。

#### (9) 大腸菌染色体 DNA の調製

大腸菌染色体 DNA の調製は Nakamura<sup>(28)</sup> の方法に基づいて調製され、100 ml TY ブロスで培養した菌体より 2 mg の染色体 DNA が得られた。

#### (10) プラスミド DNA の調製

プラスミド DNA は Birnboim と Doly<sup>(29)</sup> のアルカリ変性法に基づいて行なわれた。

#### (11) DNA のためのゲル電気泳動

500 bp 以上の DNA 断片は 0.8% アガロースゲルで、500 bp 以下の DNA 断片は 5% アクリルアミドゲルで電気泳動を行なった。泳動緩衝液には TBE 緩衝液 (50 mM Tris-borate (pH 8.3) - 1 mM EDTA) を用いた。分子量マーカーとして  $\lambda$  ファージ DNA の HindIII 断片と PstI 断片を用いた。泳動後、0.5  $\mu\text{g/ml}$  のエチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射により DNA を検出した。

## (11) DNA断片の調製

DNA断片はエレクトロエレーション法<sup>(30)</sup>によりゲルから溶出し、調製した。

## (12) フィルターハイブリダイゼーション

*ompC* 遺伝子のクローニングのため、Fig. 1 A に示された 540 bp の RsaI-PvuII断片は pLF 11 より得て、MaxamとGilbert<sup>(31)</sup>の方法に従って 5'末端を <sup>32</sup>Pでラベルした。この DNA断片をハイブリダイゼーションのプローブとして用いた。

制限酵素で切断された MH70, MH118 の染色体 DNA を 1 レーン 10  $\mu$ g ずつのせて 0.8% アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後、Southern<sup>(30)</sup>の方法に従ってニトロセルロースフィルター (HAWP304FO, Millipore Corp.) に DNA を移行させ、80°C, 3 時間真空中で固定した。ニトロセルロースフィルターを 50% ホルムアルミド - 5 $\times$ SSC (0.15M NaCl - 0.015M グイン酸ナトリウム, pH 7.0) 存在下で  $6 \times 10^6$  cpm/ml のプローブと 4°C, 3 日間ハイブリタイズさせた。ニトロセルロースフィルターは 50% ホルムアルミド - 5 $\times$ SSC と 2 $\times$ SSC で

洗淨後、オートラジオグラフィーを行なった。

### (13) DNA の塩基配列の決定

DNA の塩基配列の決定は Maxam と Gilbert<sup>(31)</sup> の方法により行なった。

### (14) バクテリアアルカリフォスファターゼ処理

ベクター DNA を単一の制限酵素で切断したとき、セルフライゲーションを防ぐためにバクテリアアルカリフォスファターゼ処理を行なった。

### (15) T4 DNA リガーゼによる DNA 断片の連結

T4 DNA リガーゼによる DNA 断片の連結は Weiss と Richardson<sup>(32)</sup> の方法により行なった。

### (16) 形質転換

プラスミドによる形質転換は Dagert と Ehrlich の方法により行なった。

## 第2章 実験結果

### (1) ompC 遺伝子のクローニング。

ompC と ompF 遺伝子のプロモーター領域を相互に置換した融合遺伝子を作成するためには ompC と ompF 遺伝子のクローンが必要である。ompF 遺伝子のクローニングは Mutoh ら(19)によって行われ、その全塩基配列は Inokuchi ら(21)によって決定された。そこで筆者は ompC 遺伝子のクローニングを試みた。

Ichihara らによって決定された OmpC と OmpF タンパク質のアミノ酸組成およびN末端のアミノ酸配列の結果より(10), ompC と ompF 遺伝子との間には広範囲にわたってDNA塩基配列上高い相同性が存在することが予想された。従って Fig.1-1 に示されているように、ompF の構造遺伝子の一部をコードしているDNA断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行なうことにより ompC 遺伝子を検索した。しかし ompF 遺伝子をプローブとした場合、ompC 遺伝子の他に ompF 遺伝子ほもとより

Lugtenbergら<sup>(34)</sup>によつて ompF 遺伝子と高い相同性のあることが証明されていた phoE 遺伝子、その他未知の遺伝子が検出されることになり ompC 遺伝子の同定が困難になると考えられた。そこで次のような方法をとった。染色体DNAはMH70とMH118より調製され、それぞれ EcoRI, HindIII, BamHI および SalI で切断されハイブリダイゼーション解析が行なわれた。MH118は ompC 遺伝子にMuファージが挿入されていることを除いてMH70と遺伝子組成が同じである<sup>(16)</sup> のでハイブリダイゼーション解析の結果、MH70の場合には出現するがMH118の場合には出現しないバンドが ompC 遺伝子を含むものであると考えられた。

このような予測に一致するDNA断片として2.7kb HindIII断片が得られた。この断片はアガロースゲル電気泳動により精製され、クローニングベクター pACYC184 の HindIII 部位にクローン化された。宿主菌として ompC 変異株であるCE1036 recA を用い、クロラムフェニコ

ール耐性となつた形質転換菌 900 株を得た。これらのうち 3 株が *OmpC* タンパク質をリセプターとするバクテリオファージ TuIb に対して感受性であった。これら 3 株の外膜タンパク質を尿素-SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べた結果、3 株とも *OmpC* タンパク質と同じ移動度を示す外膜タンパク質を合成していた。また、*ompC* 遺伝子は Mizuno<sup>(35)</sup>によつてもクローン化された。*SalI*, *BamHI*, *EcoRI*, *BglII*, *HincII*, *PvuII* および *PstI* を用いて作成された 2.7kb *HindIII* 断片の制限酵素の切断地図は、Mizuno<sup>(36)</sup>のものとは一致した。以上の結果より筆者はこれら 3 株が保持しているプラスミドには無傷の *ompC* 遺伝子がクローン化されていると結論した。これら 3 株が保持していたプラスミドのうちの 1 つを pMAN002 と命名し、以下の実験に用いた。

(2) *ompC*, *ompF* 遺伝子のプロモーター領域を相互に置換した融合遺伝子の作成。

*ompC*, *ompF* 遺伝子において成熟タンパク質

のN末端付近をコードする部分の相同性は極めて高く<sup>(36)</sup>、成熟タンパク質のN末端から12番目のアミノ酸残基をコードする部分にはともにBglII部位が存在する。このBglII部位とそれぞれの遺伝子のプロモーターのかなり上流に存在するSalI部位を利用して、pMAN002とompF遺伝子がクローン化されているpLF4の間でSalI-BglII断片を相互に入れ換えた(Fig.1-1AとFig.1-2)。このようにして作成したプラスミドのひとつであるpMAN003にはompCのプロモーター、シグナルペプチドおよび成熟タンパク質のN末端から11番目までのアミノ酸残基をコードする領域とN末端から11番目までのアミノ酸残基が欠けたOmpFタンパク質をコードする領域から成る融合遺伝子がクローン化されている。他方、pMAN004にはpMAN003のものとは逆の構造の融合遺伝子がクローン化されている。この論文では以下これらの融合遺伝子をそれぞれ[Cp-F]および[Fp-C]と略して表わす。これに準じてompC、ompF遺伝子を

それぞれ  $[C_p - C]$  ,  $[F_p - F]$  と表わすことがある。  
 OmpC と OmpF タンパク質の N 末端から 11 番目までのアミノ酸残基のうち 9 個のアミノ酸残基が同じである。異なっている 3 番目 (OmpC では Val , OmpF では Ile ) と 11 番目 (OmpC では Leu , OmpF では Val ) のアミノ酸残基でもその特性は類似している。これらのことより、  
 $[C_p - F]$  および  $[F_p - C]$  遺伝子において ompC と ompF プロモーターの支配下に合成されるタンパク質はそれぞれ本質的には OmpF と OmpC タンパク質であると考えられる。

pMAN003 と pMAN004 にそれぞれクローン化された融合遺伝子の一次構造は制限酵素 EcoRI , SalI , HindIII , BglII , PvuII , PstI および HincII を用いた解析により調べた。その結果は ompC と ompF の制限酵素の切断地図より予測される結果と一致した<sup>(21,36)</sup>。融合遺伝子の融合点 ( BglII 部位 ) 前後の塩基配列は Fig. 1-1B に示された DNA 断片について Maxam と Gilbert<sup>(31)</sup> の方法により確かめた。

Fig.1-2と Table1-2に示されているように、pLF4 pMAN002, pMAN003 および pMAN004 を用いて一連のプラスミドが作成された。ベクターとして少コピー数プラスミドである pSC101 由来の pKEN403 を用いた。各プラスミドの一次構造は上述した制限酵素を用いて解析により確認した。pMAN010 にクローン化された融合遺伝子 [Fp-C] は pMAN004 にクローン化された [Fp-C] とは独立に作られたので、融合点前後の塩基配列を Fig.1-1B に示された断片について確認した。

### (3) 融合遺伝子の発現。

融合遺伝子の発現は SM1005 (ompC ompF) を用いて行なった。対照実験として pKEN403 にそれぞれ独立にクローン化された ompC と ompF 遺伝子の発現を調べた。単独にクローン化された ompC と ompF 遺伝子の発現はともに培地浸透圧変化に対してほぼ構成的であり、ompF 遺伝子の場合わずかに浸透圧変化に応答しているにすぎなかった (Fig.1-3 A, lane 1~4)。

[F<sub>p</sub>-C]のみがクローン化された pMAN010 によって形質転換された SM1005 では OmpC タンパク質と同じ移動度を示すタンパク質が合成された。一方、[C<sub>p</sub>-F]のみがクローン化された pMAN009 の場合には OmpF タンパク質と同じ移動度を示すタンパク質が合成された。両融合遺伝子とも浸透圧変化に対してほとんど構成的に発現し、[F<sub>p</sub>-C]の場合わずかに浸透圧変化に応答しているにすぎなかった。これら融合遺伝子によって合成される OmpC や OmpF タンパク質と同じ移動度を示すタンパク質は Triton X-100 に不溶性であったことから外膜に存在することが示唆された<sup>(37)</sup>。またそれらのタンパク質が発現した菌はそれぞれバクテリオファージ TuIb と TuIa に感受性となった。TuIb と TuIa はそれぞれ OmpC と OmpF タンパク質をリセプターとするバクテリオファージである<sup>(38)</sup>。以上の結果より、[F<sub>p</sub>-C] と [C<sub>p</sub>-F] 遺伝子によって合成されたタンパク質はシグナルペプチドが正常に切断され、分泌され、機能でまうる形で

外膜に組み込まれたと結論した。以下、[Fp-C]と[Cp-F]遺伝子によって合成されるタンパク質をそれぞれ  $OmpC^*$ ,  $OmpF^*$  と略す。先に述べたように、 $OmpC^*$ ,  $OmpF^*$  タンパク質は  $OmpC$ ,  $OmpF$  タンパク質とN末端付近の2個のアミノ酸残基が異なっているものである。

[Cp-C] と [Fp-F] 遺伝子が同時にクローン化された pMAN008 によって形質転換された菌では  $OmpC$  と  $OmpF$  タンパク質の発現は浸透圧変化に対して極めて正常に応答した。つまり高浸透圧下では  $OmpC$  タンパク質が、低浸透圧下では  $OmpF$  タンパク質がそれぞれ優先的に合成された (Fig. 1-3 A, lane 5, 6)。対照的に [Fp-C] と [Cp-F] 遺伝子が同時にクローン化された pMAN011 を保持した菌では  $OmpC^*$  と  $OmpF^*$  タンパク質が浸透圧変化に対して全く逆に応答して合成された。つまり低浸透圧下で  $OmpC^*$  が、高浸透圧下では  $OmpF^*$  がそれぞれ優先的に合成された (Fig. 1-3 A, lane 11, 12)。これらの結果より、プロモーター領域が浸透圧変化に応答した遺伝子発現

に重要な役割を担っており、それに続く構造遺伝子領域は無関係であるということがわかった。しかし  $OmpC^*$  は  $OmpF$  のシグナルペプチドを、 $OmpF^*$  は  $OmpC$  のシグナルペプチドを持った前駆体として合成される。従ってシグナルペプチドおよびそれをコードする DNA 領域が浸透圧に応答した発現の調節に関与している可能性は否定できなかった。

#### (4) ompR2 および envZ 株における融合遺伝子の発現。

ompR2 変異を有する菌と envZ 変異を有する菌はそれぞれ  $OmpC^- OmpF^+$  および  $OmpC^+ OmpF^-$  の表現型を示す(18)。ompR2 変異株である SM1007 (ompC ompF ompR2) が先に述べた一連のプラスミドによって形質転換された場合、プロモーターに続く遺伝子の種類や浸透圧変化とは無関係に ompF プロモーター支配の遺伝子発現が強く、ompC プロモーター支配の遺伝子発現は極めて弱かった (Fig.1-3B)。一方、envZ 変異株である SM1006 (ompC ompF envZ) においては ompC プロモーター

一支配の遺伝子が強く発現し、ompF プロモーター支配の遺伝子発現は弱かった (Fig. 1-3 C)。これらの結果より ompR2 変異や envZ 変異の影響はプロモーター領域に作用することがわかった。

ここで指摘しておかなければならないことがある。それは ompR2 および envZ 株ではそれぞれ ompC と ompF プロモーター支配の遺伝子発現が抑制されてもなおその残存活性はプロモーターに依存して浸透圧変化に応答したということである (Fig. 1-3 B & C)。

なお、envZ 株においては [C<sub>p</sub>-F] がクローニングされた pMAN009 による形質転換菌が得られなかった。

(5) 融合遺伝子を有する菌の生育。

OmpC, OmpF タンパク質の発現は培地浸透圧変化によって切り換えられる。この生理的意義を調べるために [C<sub>p</sub>-C] [F<sub>p</sub>-F] を持つ pMAN008 と, [C<sub>p</sub>-F] と [F<sub>p</sub>-C] をもつ pMAN011 によって形質転換された SM1005 (ompC ompF ompR2<sup>+</sup>

envZ<sup>+</sup>)の生育を比較した。用いた培地は medium A および medium A に 20% (w/v) ショ糖が含まれたものである。これら2つの菌では浸透圧変化に応答して合成されるタンパク質が全く逆であるにもかかわらず (Fig. 1-3A, lane 5, 6 と lane 11, 12), 生育に関しては全く差が見られなかった。このことは、少なくとも本実験の行なわれた条件下では *OmpC*, *OmpF* タンパク質の合成の切り換えが菌の生育にとって必ずしも重要ではないことを示した。

### 第3章 考察

大腸菌外膜タンパク質 *OmpC*, *OmpF* は構造的・機能的に極めて類似している(3)。しかしその合成は培地浸透圧変化によって全く逆の影響を受ける。つまり高浸透圧下では *OmpC* が、低浸透圧下では *OmpF* が優先的に合成される(12)。両タンパク質は親水性低分子の透過小孔(?)としてあるいは細胞表層構造の安定性に寄与する構造体(5)としてその生理的重要性が指摘されている。それにもかかわらず、なぜ浸透圧に応答して両タンパク質の合成が切り換わるのか、その生理的意義は明らかにされていない。

本研究において遺伝子組換え技術を用いて融合遺伝子を作成し、*OmpC*, *OmpF* タンパク質を通常の場合とは全く逆に浸透圧に応答して合成させることに成功した。つまり融合遺伝子により低浸透圧下で *OmpC*<sup>\*</sup> が、高浸透圧下で *OmpF*<sup>\*</sup> が優先的に合成された (Fig. 1-3A)。しかし通常用いられている試験管内培養条件下では菌の生育に関して浸透圧に応答した合成の切

り換えの重要性は見出せなかった。当研究室の Nara<sup>ら</sup>(39)が分離した K-12株の変異株では *OmpC* タンパク質が合成されず、*OmpF* タンパク質は高浸透圧下でのみ合成された。この変異株は親株と較べて生育に関して全く正常であった。また *E. coli* B株には *OmpF* タンパク質だけしか存在せず、その合成は浸透圧の影響をあまり受けない(40)。これらの事実は筆者の得た結果を支持するものである。

しかしこれらのことは K-12株における両タンパク質合成の切り換えの重要性を否定するものではない。筆者は pMAN009 ([C<sub>p</sub>-F]) による SM1006 (*ompC ompF envZ*) の形質転換株を得ることができなかった。pMAN006 ([C<sub>p</sub>-C]) や pMAN007 ([F<sub>p</sub>-F]) による形質転換株は容易に得られたことから考えて、この事実は *envZ* 変異株において *ompC* プロモーター支配下に行なわれる *OmpF* タンパク質の合成が菌の生育にとって不都合であることを示していると思われる。[C<sub>p</sub>-C] と [F<sub>p</sub>-F] がクローン化され

に pMAN008 および [Cp-F] と [Fp-C] がクローン化された pMAN 011 を保持する 2 種類の菌を共存させ、いろいろな条件下で培養することによりその生理的意義を明らかにすることができるとも思えない。

[Cp-C] , [Fp-F] , [Cp-F] , [Fp-C] がそれぞれ単独でクローン化された場合、それぞれの遺伝子は浸透圧変化とほとんど無関係に高いレベルで発現した (Fig. 1-3A) 。これとは対照的に [Cp-C] と [Fp-F] が 1 つのプラスミドにクローン化された場合、*OmpC* , *OmpF* シンパク質は浸透圧に応答して合成された。このことは *ompC* と *ompF* 遺伝子の間には相互に発現を調節し合う機構が存在する可能性を示唆した。また、[Cp-F] と [Fp-C] が 1 つのプラスミドにクローン化された場合にも遺伝子発現は浸透圧変化に応答したことから、この相互調節にはプロモーター領域が重要な役割を担っていることが示された。

ompR2 および envZ 変異は、それぞれ *ompC* プ

ロモーターおよび ompF プロモーター支配の遺伝子発現を抑制する<sup>(18)</sup>。しかし、プロモーター活性が抑制されてもなおその残存活性は浸透圧変化に対して応答することが見出された<sup>5</sup> (Fig. 1-3 BとC)。この研究を行なった当時、筆者は、この結果より ompR および envZ 遺伝子が浸透圧変化に応答した ompF, ompC 遺伝子の発現調節に第一義的には関与していないことが示唆されたと考えた。しかし、その後、<sup>10</sup> Inokuchiら<sup>(41)</sup>や Ramakrishnanら<sup>(42)</sup> によって見出された翻訳以降の段階での調節の結果、上述の現象が観察されたと考えるに至った。

## 第2部

micF RNA - アンチセンス RNA

Watson と Crick(43)の DNA の二重らせんモデルを基礎に、1961年、Jacob と Monod(44)によってオペロン説が提唱されて以来、遺伝子発現の調節機構を分子レベルで理解しようとする試みが30年近くにわたってなされてきた。その間、明らかにされてきた代表的な遺伝子発現の調節機構として、アミノ酸合成系におけるアテニュエーションモデル(45)やリボソームタンパク質合成におけるフィードバック制御(46)などがある。遺伝子発現の調節機構の研究において、膜タンパク質遺伝子は新しい研究対象であり、今までに知られていない新奇な調節機構の存在が期待された。

筆者は第1部の研究の過程で、ompC プロモーターおよびその上流領域を含む約1kbのDNA断片がクローン化された多くのコピー数プラスミドを保持する菌において、ompF 遺伝子の発

現が完全に抑制されることを見出していった(47)。  
Mizunoら(48)は、この抑制因子が ompC プロモーター  
の上流にコードされている約170塩基のRNA  
分子であることを明らかにした。驚くべきこ  
5 とに、この低分子RNAは ompF mRNAの5'末端部  
分と相補的配列をもっており、この低分子RNA  
と ompF mRNAは安定な二本鎖構造を形成する  
と考えられた。その結果、ompF mRNAの翻訳開  
始に必要なリボソーム結合部位と開始コドン  
10 を含む領域が低分子RNAによって完全に覆わ  
れてしまい、ompF mRNAの翻訳が阻害されると  
考えられた。この低分子RNAは micF (mRNA -  
interfering complementary) RNAと呼ばれ、その遺  
伝子は micF 遺伝子と名付けられた。さらに興  
15 味深いことに、micF 遺伝子の発現は ompF 遺伝  
子の発現が抑制される高浸透圧下で誘導され、  
ompR、envZ 遺伝子によって調節されていた。  
これらの結果をもとに、micF 遺伝子が osmo-  
regulation において中心的な役割を担っている  
というモデルが提唱された(49)。これは遺伝子

発現の調節機構を考える上で全く新しい概念であり、大きな反響を呼んだ。

筆者は、*osmoregulation* に関して新しく見出された第三の調節遺伝子である *micF* の機能を詳しく調べるために、染色体上に存在する *micF* 遺伝子の欠失変異株を作成し、解析した。その結果、培地浸透圧を低浸透圧状態から高浸透圧状態にシフトさせた直後における *OmpF* タンパク質の合成の抑制には *micF* RNA がわずかながらの寄与をしているが、浸透圧変化における定常状態では *micF* 欠失変異株における *ompF* の発現は野生株と同じであった。このことから、染色体上に存在する1コピーの *micF* 遺伝子は *osmoregulation* において中心的な役割をもっているいと結論された。また、多コピー数プラスミドにクローン化された *micF* 遺伝子は *ompF* 遺伝子の発現を抑制することができたが、少コピー数プラスミドにクローン化された *micF* では *ompF* の発現を抑制できなかったことから、*micF* による *ompF* の発現の抑制は、遺

伝子量に依存していることが明らかになった。

5

10

15

## 第1章 実験方法

(1) 菌株, バクテリオファージ, プラスミド  
本研究で用いられた大腸菌 K-12 株, バク  
テリオファージおよびプラスミドを Table 2-1  
5 に示した。

### (2) その他の方法

培地, PI 形質導入, バクテリオファージ  
TuIb に対する感受性テスト, インベロープの  
調製と Triton X-100 による可溶化, 尿素-SDS  
10 ポリアクリルアミドゲル電気泳動, 遺伝子操  
作技術は、第1部と同じである。なお、HindIII  
リンカー (dCAAGTTG) と BamHI リンカー (dC  
GGATCCG) は、宝酒造から購入した。

## 第2章 実験結果

### (1) プラスミド pMANO36の作成

染色体上の micF 遺伝子は次の方法で欠失させた。まず、micF 遺伝子自身は欠き、その前後の隣接領域の DNA 断片がクローン化されたプラスミドを作成した。次に、プラスミドにクローン化された DNA 断片とこの断片に相当する染色体上の領域を置換させた。この目的のために、pMANO36が作成され、その詳しい方法は Fig. 2-1 に示した。個々のプラスミドの構造は制限酵素の切断によって解析した。

pMANO05 および pMANO18 をエキソヌクレアーゼ Bal31 で処理し、それぞれ pMANO24 および pMANO28 を作成した。pMANO24 の場合、micF の転写終結領域の 550bp 下流に存在する SalI 部位から micF プロモーターまでを Bal31 で消化した。

pMANO28 の場合、ompC 遺伝子に存在する BglII 部位から micF の転写終結領域近くまでを Bal31 で消化した。

pMANO24 と pMANO28 をもとにして pMANO29 を作成

した。pMAN029は micF 遺伝子の前後の隣接領域を運んでいるが、micF 遺伝子の代わりにカナマイシン耐性 ( $Km^r$ ) 遺伝子がクローン化されている。この pMAN029, pKM004, および pEL3から pMAN036が作成された。pMAN036は、micF 遺伝子が  $Km^r$  遺伝子に置換された ompC-micF 領域と温度感受性の複製開始点、および lpp プロモーターによって発現する lacZ-lacY 遺伝子群を運んでいる。

## (2) 染色体 micF 遺伝子の欠失

micF 欠失変異株は、染色体上の micF-ompC 領域と pMAN036の  $Km^r$ -ompC 領域との相同的組換えによる置換を利用して作成した (Fig. 2-2)。温度感受性複製開始点をもつプラスミドを利用したことによって、プラスミドを染色体に組み込めることができた。また、 $Km^r$  遺伝子と lac 遺伝子を利用することによって、micF 欠失変異株の選択が容易になった。

まず、MC4100 ( $\Delta lac$ ) を pMAN036 で形質転換させ、 $30^\circ C$  で2時間生育させた。次いで、カナ

マイシン  $30 \mu\text{g/ml}$  を含む乳糖-マッコニー培地上で  $42^\circ\text{C}$  で一晩培養した。pMANO36の複製開始点は温度感受性なので、pMANO36が染色体に組み込まれた形質転換株のみが  $42^\circ\text{C}$  でも生育できるはずである。大部分の形質転換株は赤色を呈した ( $\text{Km}^r \text{Lac}^+$ )。これは、pMANO36が領域AあるいはB (Fig. 2-2) のどちらか1点の組換えで染色体に組み込まれたことを示した。しかし、形質転換株の約1%が白色を呈した ( $\text{Km}^r \text{Lac}^-$ )。もし、Fig. 2-2で示した理論とありのことが形質転換株で起こっているならば、 $\text{Km}^r \text{Lac}^-$  形質転換株は micF 欠失変異株である。

(3) micF 欠失変異候補株の染色体構造の解析  
micF 欠失変異候補株 SM300/1 における micF - ompC 領域の解析は、次の3つの方法で行なった。まず、SM300/1を供与菌、H020/ompCを受容菌としてP1形質導入を行なった。300の  $\text{Km}^r$  形質導入株はすべて  $\text{OmpC}^+$  になっていた。このことは、染色体上で  $\text{Km}^r$  遺伝子が ompC 遺伝子の極めて近傍に存在していることを示した。

次に、SM3001の染色体上に micF 遺伝子が存在していることを証明するために、サザンハイブリダイゼーションを行なった。pMAN002にクローニングされている micF - ompC 領域を含む 2.7 kb HindIII 断片をプローブにした場合、HindIII で切断した野生株の染色体DNAでは予想通り 2.7 kb の位置にバンドが見られた (Fig. 2-3A, lane 2)。一方、HindIII で切断した SM3001 の染色体DNAでは 4.2 kb の位置にバンドが見られた (Fig. 2-3A, lane 3)。このバンドの位置は、micF の代わりに  $Km^r$  遺伝子を運んでいる ompC 領域がクローニングされた pMAN033 の HindIII 断片と同じであった。サザンハイブリダイゼーションは、さらに micF 遺伝子の大部分を含む 120 bp 断片を用いて行なわれた。HindIII で切断した野生株の染色体DNAでは 2.7 kb の位置にバンドが見られたが、SM3001 では注目すべきバンドが見られなかった (Fig. 2-3B)。ただし、極めて薄いバンドが 4.2 kb の位置に見られた。これは、SM3001 の 4.2 kb 断片の中にプローブとして

用いた120bp断片と同じ部分が17bp含まれていたためである。このことは、後述するDNAの塩基配列の解析で明らかになった。

最後に、SM3001の染色体DNAから micF-ompC 領域を再度クローン化し、DNAの塩基配列を決定した。SM3001の染色体DNAを HindIII で切断して、4.2 kb断片を pACYC184の HindIII 部位にクローン化した。このプラスミドで CE1036 recA (ompC変異株) を形質転換し、 $Cm^r$   $Km^r$  で選択した。次いで、この形質転換株すべてが、OmpC タンパク質をリセプターとするバクテリオファージ T4Jb に対して感受性になったことを確認した。また、クローン化された4.2 kb断片が pMAN036 のそれと全く同じであることを制限酵素による切断解析で確かめた。この結果より、SM3001の染色体は pMAN036 由来の4.2 kb HindIII 断片を運んでいると結論した。4.2 kb断片を再度クローン化したプラスミド pMAN042 を用いて、micF 遺伝子が欠失していることをDNAの塩基配列を決定することによって直接確かめ

た。DNAの塩基配列を決定した領域は Fig. 2-4A に示した。この結果、micF 遺伝子はプロモーター領域とほぼ大部分のコード領域(micF RNA の3'末端をコードするごく一部分は欠失していない)が欠失していることが明らかになった。以上3つの実験から、micF 遺伝子は染色体上に1コピーだけしか存在せず、そのmicF 遺伝子がほぼ完全に欠失していた SM3001 は確かに micF 欠失変異株であると結論された。

(4) micF 欠失変異株における ompF, ompC の発現  
micF 遺伝子は、ompF mRNA の3'末端側と相補的な配列をもつ低分子 RNA をコードしている。そして、micF RNA は、ompF mRNA の翻訳を阻害する。この micF RNA による阻害が、浸透圧変化に応答した ompF の発現にとって重要な役割を果たしていると提唱されていた(49)。従って、micF 欠失変異株では ompF 発現の抑制が解除されると期待された。しかしながら期待に反して、micF 欠失変異株における ompF の発現は浸透圧変化に応答し、しかも強くなっているか

った。また、予想とは逆に、ompF の発現がわずかに抑制され、ompC の発現が強くなっていた (Fig. 2-5)。この現象は第3章で考察する。とにかく、ompF の発現は強くなりず、浸透圧変化に応答したのは事実である。このことは、micF 遺伝子が野生株における ompF の発現に重要な役割を果たしていないことを示唆した。

(5) ompF 発現における micF のコピー数の影響  
多コピー数プラスミドにクローン化された micF 遺伝子は、ompF 遺伝子の発現を抑制した(48)。一方、上述の結果より明らかになったように、染色体上の1コピーの micF 遺伝子は ompF の発現を抑制できなかった。そこで、micF 遺伝子をコピー数の異なるプラスミドにクローン化し、ompF 遺伝子の発現に及ぼす影響について調べた。多コピー数プラスミドとして pBR322、少コピー数プラスミドとして pKEN403 を用いた。micF 遺伝子を含む DNA 断片は、plasmid III (49) から調製し、pBR322 と pKEN403 にクローニ化し、それぞれ pMAN055 と pMAN056 を作成した (Fig.

2-6)。pMANO55とpMANO56のコピー数の比は、MC4001を宿主とした場合5:1であった。

pMANO55でMC4100を形質転換させた場合、ompFの発現が完全に抑制された(Fig. 2-7, lane 1)。

一方、pMANO56の場合、ompFの発現の抑制は見られなかった(Fig. 2-7, lane 2)。この結果は、培地浸透圧とは無関係に観察された。pMANO56の複製開始点はpSC101由来なので、染色体あたりのコピー数は6と考えられた(57)。したがって、染色体上の1コピーのmicF遺伝子が、ompF遺伝子の発現に影響を与えなかったのは当然であると思われる。

(6) ompFの発現に対する染色体micFの機能

染色体上の1コピーのmicF遺伝子が、ompF遺伝子の発現に対して本当に機能をもっているのかをより詳細に検討した。低浸透圧培地から高浸透圧培地に移した後、経時的に1分間のパルスラベルを行なってOmpFタンパク質合成の減衰の度合いを調べた。MC4100(野生株)の場合、高浸透圧培地に移して10分後には、

*OmpF* の合成はほぼ完全に抑えられた。これに対して SM3001( $\Delta micF$ ) の場合には、*OmpF* の合成が抑制されるのに 15分以上の時間を要し、かつ、その抑制は完全ではなかった (Fig. 2-8 A,B,C,D)。これらの結果は、*micF* 遺伝子は osmoregulation において中心的な役割を果たしているが、*OmpF* タンパク質の合成を鋭く、しかも完全に浸透圧変化に応答させる役割をもっていると考えられた。なお、この(6)の成果は饗場浩文氏との共同研究によるものである。

### 第3章 考察

プラスミド上の遺伝子を染色体上の遺伝子と置換する方法は、いくつかすでに開発されていた(58,59,60)。これらの方法の基本条件は、プラスミド自身に複製能力がないこと、染色体にプラスミドが組み込まれただけのものと組み込まれた後に離脱したものとを区別できることの二つである。筆者が開発した方法の特徴的な点は、まず、 $Km^r$ 遺伝子と lac 遺伝子を用いたことによつて、置換後の表現型が予測できなくてもマッコンキー培地上で  $Km^r Lac^-$  の1回の選択で効率よく目的のものが得られることである。また、温度感受性の複製開始点をもつプラスミドを用いることによつて、宿主に制限がなくなつたことも特徴である。この方法は、染色体上の遺伝子を欠失するのに極めて有用であり、micF 遺伝子以外にもすでにいくつかの遺伝子で成果をあげている(61,62)。

この方法で得られた micF 欠失変異株は、いくつかの解析によつて確認された。また、こ

の過程で、micF 遺伝子は染色体上にひとつしか存在しないことも確かめられた。以前に提唱された micF の機能から予測された結果に反して、micF 欠失変異株における ompF の発現は浸透圧変化に反応し、しかも強くなるなか、たことから、染色体上の1コピーの micF 遺伝子は ompF 遺伝子に対して重要な役割を担っていると考えられる。

Fig. 2-5 において、低浸透圧下で ompC の発現がわずかに強くなり、ompF の発現がわずかに抑制された。染色体上で micF と ompC のプロモーターは互いに隣接している(49)。したがって、RNA ポリメラーゼを奪い合っていると考えられる。micF のプロモーターが欠失すると、奪い合っていた RNA ポリメラーゼが一方的に ompC の発現に寄与することになり、ompC の発現が強くなると考えられる。ompF の発現の抑制はこの ompC 発現の増強のためであろう。

多コピー数プラスミドに micF がクローン化された場合は ompF の発現は完全に抑制された

が、少コピー数プラスミドの場合には抑制されなかった。このことは、micF による ompF 発現の抑制が遺伝子量に依存していることを示唆しているとともに、染色体上の1コピーの micF では *osmoregulation* において中心的な役割をもつことが不十分であることも物語っている。また、プラスミドは遺伝学的な解析を行なうために広く用いられているが、プラスミド上での解析は生理的条件を反映していると考え難い場合もある。micF の解析で得られた結果は、この危険性を端的に示している。

micF は潜在的には ompF の発現を抑制する能力をもっている。詳細な解析の結果、低浸透圧から高浸透圧へシフトした直後における ompF 合成の抑制に micF が寄与していることが明らかにされた (Fig. 2-8)。micF は、浸透圧変化に応答した ompF の発現の抑制をすばやく、完全に行なわせるために機能していると考えられる。

浸透圧変化に応答した ompF, ompC 遺伝子の

発現調節の第一の機構は、ompR と envZ による転写段階での調節である。次いで、micF による翻訳段階での調節である。また、*OmpF*, *OmpC* シンパク質のコード領域における調節も知られている(41,42)。このように、*OmpF*, *OmpC* シンパク質の合成は幾重にも厳密な制御のもとに行なわれているのである。

## 第3部

OmpRとEnvZタンパク質の相互作用

HallとSilhavy(16,17,18)は、ompF-lacZ、ompC-lacZの融合遺伝子を用いた一連の研究から、ompF、ompC遺伝子の発現調節機構に関してモデルを提唱した。それによると、まず培地浸透圧変化を細胞表層に存在するEnvZタンパク質が感知し、細胞質に存在するOmpRタンパク質の単量体-多量体の変換を調節する信号を発する。OmpR単量体はompF遺伝子の発現を、OmpR多量体はompC遺伝子の発現を転写段階で促進させる。このモデルは、当時の研究レベルから考えて驚くべきほど洞察力に富んでいた。その後の研究で確かにEnvZタンパク質は細胞質膜に存在し(67)、OmpRタンパク質はompF、ompC上流領域と相互作用する正の調節因子であることが明らかにされた(63,68,69)。しかし、OmpRタンパク質が単量体-多量体の構造変換をするという点に関しては、生化学的解析から否定的結果が

得られている(70)。

Naraを中心に筆者も参加して種々の ompR 変異株が単離し(39,71)、その変異部位も DNA の塩基レベルで同定した(71)。その結果、OmpRタンパク質のN末端側には ompC の発現を調節するドメインが、C末端側には ompC の発現に必要なドメインが存在すると考えられた。

また、ompF、ompC 遺伝子の発現調節における両遺伝子のプロモーター、およびその上流領域の重要性は詳細に調べられた。ompF、ompC プロモーターは、ともに十分な機能をもつためにその上流約 70bp の領域を必要とし(63,69)、この領域には両遺伝子間で高い相同性が見出された(69)。この上流領域は、OmpRとの相互作用に重要であろうと考えられていたが、事実、精製されたOmpRタンパク質は特異的に両遺伝子のプロモーターの上流領域に結合することが証明された(70)。また、ompF の OmpR結合領域では、DNA が折れ曲がった構造をとっていることが見出され、遺伝子発現の調節との関係が注目

されている(72)。

EnvZ シンパフ質は osmosensor であろうと考えられている。しかし、その実験的証拠はなく、EnvZ の機能はほとんど明らかにされていないかった。また、浸地浸透圧変化という刺激がいかに認識され、どのような信号に変換されて遺伝子発現に影響を与えているのかという情報伝達の機構も全く未知であった。

筆者は、envZ 変異株の抑制変異株の取得によりこれらの問題に取り組んだ。envZ11 変異株は  $OmpF^- OmpC$  constitutive の表現型を示す。この変異株の中から  $OmpF^+ OmpC^+$  の表現型を示すようになった株を取得し、解析した結果、envZ11 変異は保存されたままに抑制変異が ompR 遺伝子に生じていたことを明らかにした。そして、この ompR 変異だけでは野生株と同じ表現型を示すこと、この変異型 ompR の機能は envZ 依存性であること、および、この変異型 ompR は envZ11 以外の envZ 変異を抑制しないことから、OmpR と EnvZ シンパフ質は直接相互作用

用して ompF, ompC 遺伝子の発現を調節していることが強く示唆された。

## 第1章 実験方法

(1) 菌株, バクテリオファージ, プラスミド。

本研究で用いられた大腸菌 K-12 株, バクテリオファージおよびプラスミドを Table 3-1 に示した。

(2) プラスミドの作成

ompB 領域のフローニングは次のように行なった。ompB 領域を含む 5.3kb BamHI-SalI フラグメントを SM6001 と Y0160 の染色体 DNA から単離し、pMAN043 にフローニングして、それぞれ pMAN057 と pMAN115 を得た。種々の変異をもつ ompB 領域のフローニングは、Fig. 3-1 に示した方法で行なった。HpaI 部位の BamHI 部位への変換は、HpaI 部位に BamHI リンカー (dCGGATCCG) を挿入することによって行なった。

pMAN102 と pMAN103 における envZ11 変異は、変異の結果生じた HaeIII 部位が実際に HaeIII で切断されることによって確認した。

(3) アルカリ性ホスファターゼの活性測定

アルカリ性ホスファターゼの活性測定は、

Brickman と Beckwith (78) の方法に従った。

#### (4) その他の方法

培地, PI形質導入, バクテリオファージ  
TuIa と TuIb に対する感受性テスト, エンベロープ調製と Triton X-100 による可溶化, 尿素-  
SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動, 遺伝子操作技術は, 第1部と同じである。なお、  
DNA の塩基配列の決定は Sanger (79) の方法で行なった。

## 第2章 実験結果

### (1) envZ11 抑制変異株の単離

MH1461 は envZ11 変異株であり、 $OmpF^- OmpC^-$  constitutive ( $OmpC^c$ ) の表現型を示す(17)。この菌の古い培養液から、 $OmpF$  と  $OmpC$  の合成が培地浸透圧変化に正常に応答するようになった復帰変異株が高頻度で単離された(Fig.3-2)。これらのうちの1株を SM6001 と命名し、以下の研究に用いた。

SM6001 が真の復帰変異株なのか、あるいは envZ11 変異とは別の所に新たな変異が生じた偽似復帰変異株なのかを調べるために、PI 形質導入実験を行なった。SM6001 を供与菌として、MH19aroB を受容菌として用いたとき、aroB<sup>+</sup> になった形質導入株のうち5%が EnvZ11 の表現型 ( $OmpF^- OmpC^c$ ) を示した。これらの株を envZ 遺伝子がフローン化された pAT2004 で形質転換すると、野生型の表現型 ( $OmpF^+ OmpC^+$ ) と示した。また、MH1461 (envZ11 変異株) を供与菌として、MH19aroB を受容菌として形質導入

を行なったとき、50%以上の $\text{aroB}^+$ 形質導入株が  $\text{EnvZ}^{II}$  の表現型を示した。これらの結果は、SM6001 が  $\text{envZ}^{II}$  変異を保持したままであり、かつ  $\text{aroB}-\text{envZ}$  領域に存在する第2の変異によって  $\text{envZ}^{II}$  変異が抑制されていることを示唆した。この抑制変異は  $\text{sez}$  (suppressor of  $\text{envZ}$ ) と命名された。

## (2) 染色体上における $\text{sez}$ 変異と $\text{envZ}^{II}$ 変異の同定

まず、 $\text{sez}$  変異が  $\text{ompR}$  と  $\text{envZ}$  遺伝子から成る  $\text{ompB}$  領域に存在するの否かを検討した。SM6001 の染色体 DNA を  $\text{BamHI}$  と  $\text{SalI}$  で切断し、 $\text{ompB}$  領域を含む 5.3kb 断片を pMAN043 にクローニングした (Fig. 3-1, Fig. 3-3)。このとき宿主として  $\text{OmpF}^C \text{OmpC}^-$  の表現型を示す  $\text{ompR2}$  変異株である MH760  $\text{recA}$  を用い、 $\text{OmpC}^+$  になる形質転換株を選択した。 $\text{ompB}$  領域を運んでいることは、制限酵素による切断解析で確かめた。このようにして得た pMAN057 と野生型  $\text{ompB}$  領域を運ぶ pMAN059 を用いて、Fig. 3-3 に示したように断片

Aを相互に交換して、キメラ ompB を作成した。  
さらに、これら4種類の ompB 領域は miniF プラスミド pMF21 にクローニングされ、SG480476 ( $\Delta ompB$ ) を形質転換するのに用いられた。

野生型 ompB 領域を運ぶ pMAN104 によって形質転換された  $\Delta ompB$  株は、浸透圧変化に反応して正常に OmpF, OmpC を合成した (Fig. 3-4, lane 7 & 8)。一方、野生型の断片 A と SM6001 由来の断片 B から成るキメラ ompB を運ぶ pMAN103 の場合には、EnvZ<sup>11</sup> (OmpF<sup>-</sup>OmpC<sup>c</sup>) の表現型を示した (Fig. 3-4, lane 5 & 6)。これらの結果は、envZ11 変異が断片 B に存在することを示唆した。SM6001 由来の ompB を運ぶ pMAN101 の場合には、断片 B に envZ11 変異が存在しているにもかかわらず OmpF<sup>+</sup>OmpC<sup>+</sup> の表現型を示した (Fig. 3-4, lane 1 & 2)。このことから、sez 変異は断片 A に存在すると結論された。なお、envZ11 変異は存在せず、sez 変異のみが存在する ompB を運ぶ pMAN102 の場合には、野生型と同じ表現型を示したことから、sez 変異単独ではなんら特別な表現型をもちえ

ないことが明らかに became した。

また、Fig. 3-3 に示した断片 C に sez 変異が存在していることは、次の実験により確認された。sez, envZ11 の両変異を運ぶ pMAN057 由来の断片 C を、envZ11 変異のみを運ぶ pMAN097 の断片 C と置換した。このようにして作成した pMAN125 で SG480476 ( $\Delta ompB$ ) を形質転換したら、野生型の表現型を示した。この結果より、断片 C に sez 変異が存在していることが明らかに became した。

sez 変異と envZ11 変異の正確な位置を決定するために、SM6001 (envZ11 sez), MH1461 (envZ11), および野生株由来の 2.7kb AvaI-HpaI 領域の塩基配列を解析した。SM6001 と MH1461 では、ともに EnvZ タンパク質の N 末端から 247 番目のアミノ酸残基が Thr から Arg に変わるミスセンス変異が生じていた (Fig. 3-5)。この変異が envZ11 変異である。一方、sez 変異は ompR 遺伝子内に存在していた。そこで、sez 変異をもつ ompR 遺伝子を ompR77 と名付けた。もし

て、この変異は *OmpR* タンパク質の N 末端から 16 番目のアミノ酸残基を Leu から Gln に変えるミスセンス変異であることが明らかになった。なお、変異点に関しては、両 DNA 鎖の塩基配列を決定することによって確認した。

(3) *ompR77* は *envZ11* 変異によって生じる多面表現型を抑制する

*envZ11* 変異は *OmpF* *OmpC*<sup>c</sup> の表現型を引き起こすだけでなく、*LamB*<sup>-</sup> や *PhoA*<sup>-</sup> の表現型も引き起こす(80,81)。SM6001 (*envZ11 ompR77*) は、野生株と同様に、マルトース存在下で *LamB* タンパク質を合成した (Fig. 3-6)。しかし、MH1461 (*envZ11*) は *LamB* を合成しなかった。また、同じ結果は *PhoA* タンパク質についても得られた。これらの結果から、*ompR77* は、*envZ11* 変異によって引き起こされる種々の表現型を抑制することが示唆された。

(4) *ompR77* の機能は *envZ* 依存性である

*ompR77* は、*envZ*<sup>+</sup> のもとではなんら表現型を示さなかった (Fig. 3-4, lane 3 と 4)。言いか

えると, ompR77 envZ<sup>+</sup>, ompR77 envZ11, および ompR<sup>+</sup> envZ<sup>+</sup>はいずれも OmpF<sup>+</sup>OmpC<sup>+</sup>の表現型を示した。これらのことから, ompR77は envZの機能とは無関係に独立して OmpF<sup>+</sup>OmpC<sup>+</sup>の表現型を示す可能性が考えられた。この可能性を検討するために, ompR77 ΔenvZ株を作成した(Fig. 3-1A)。pMAN057(ompR77 envZ11)由来の断片Aを miniFプラスミド pMF21 にクローン化した。このプラスミド pMAN099によって形質転換された SG480Δ76 (ΔompB)は、本質的に ompR77 ΔenvZであり、ompR<sup>+</sup> ΔenvZ株と同じ表現型を示した(Fig. 3-4, lane 9-14)。この結果は、ompR77が機能するためには envZが必要であることを示唆した。

(5) ompR77は envZ遺伝子に生じた特定の変異しか抑制しない

envZ160変異株である Y0160は、envZ11変異株と同じ表現型 (OmpF<sup>-</sup>OmpC<sup>c</sup>)を示す。Y0160の ompB領域をクローン化した pMAN115を用いて envZ160変異を同定した。この変異は、EnvZの

ンパ7質のN末端から35番目のアミノ酸残基をLeuからGlnに変えるミスセンス変異であり (Fig. 3-5), envZ11 変異とは異なっていた。ompR77 と envZ160 変異をもつ ompB 領域を pMF21 にクローニングし (Fig. 1C)、このプラスミド pMAN 215 で SG480Δ76 ( $\Delta ompB$ ) を形質転換した。この形質転換株の表現型は  $OmpF^- OmpC^+$  であり、envZ160 変異株と同じであった。この結果より、ompR77 は envZ160 変異によって引き起こされる表現型を抑制しない、言いかえると、ompR77 は特定の envZ 変異しか抑制しないことが示唆された。

### 第3章 考察

OmpR タンパク質は細胞質に存在し、ompF, ompC プロモーターの上流領域に結合する正の調節タンパク質である(63,70)。一方、EnvZ タンパク質は細胞質膜に存在するが(67)、その機能はあまり理解されていない。この研究によって、これら2つのタンパク質が直接相互作用していることが強く示唆された。その根拠は次の4つである。(i) envZ11 変異によって生じる表現型が ompR 遺伝子の変異 (ompR77) によって抑制された。(ii) envZ<sup>+</sup> の場合には、ompR77 変異によってなんら特別な表現型は引き起こされなかった。(iii) ompR77 の機能は envZ 依存性だった。(iv) ompR77 変異は、envZ11 変異と異なる envZ 変異 (envZ160) を抑制しなかった。

ompR77 変異は、OmpR タンパク質のN末端から16番目のアミノ酸残基が Leu から Gln に変わるミスセンス変異だった。Naraを中心として筆者も参加して取得した ompR3 変異(71)は、envZ11 変異と同じ OmpF<sup>-</sup>OmpC<sup>c</sup> の表現型を引き起こし

た。しかも、その変異は *OmpR* タンパク質の *N* 末端から 15 番目のアミノ酸残基を Arg から Cys に変える変異だった(71)。これらの結果は、*ompR77* や *ompR3* 変異が生じた *OmpR* タンパク質の *N* 末端側の領域が、*EnvZ* タンパク質と相互作用する領域であり、この相互作用を阻む変異が *ompR* あるいは *envZ* のどちらに生じた場合にも、その表現型が *OmpF<sup>-</sup>OmpC<sup>C</sup>* になることを示唆した。*OmpR* と *EnvZ* の相互作用は、培地の浸透圧変化という情報を遺伝子発現の場に伝えるのに重要な役割を果たしていると考えられる。

*EnvZ* タンパク質の機能は何か。細胞あたりの *EnvZ* タンパク質の分子数は、*OmpR* タンパク質のそれと較べてかなり少ない(82)。このことは、*EnvZ* タンパク質が触媒的な機能をもっていることを示唆している。たとえば、*EnvZ* が *OmpR* を修飾し、修飾の様式によって *ompF* や *ompC* の発現を調節するのかもしれない。また、他の可能性としては、*EnvZ* が *OmpR* 依存性の転写を促進することと考えられる。たとえば、低浸

透圧の場合、EnvZタンパク質は ompF プロモーターの上流に結合している OmpRタンパク質と相互作用し、RNAポリメラーゼが EnvZ - OmpR 複合体と ompF プロモーターを認識して転写を開始するのかもしれない。これらの可能性を検討するには *in vitro* 系の開発が必要である。

## 第4部

ompF, ompC 遺伝子の発現に影響を及ぼす  
RNAポリメラーゼの変異

5 遺伝子の転写は、RNAポリメラーゼとDNA  
上のプロモーターの相互作用で始まる。この  
相互作用はプロモーターの一次構造や高次構  
造、RNAポリメラーゼの構造変換、あるいは  
DNAの塩基配列を特異的に認識しDNAに結合  
10 する転写調節タンパク質によって支配されて  
いる(85)。転写調節タンパク質がRNAポリメラー  
ゼとプロモーターの相互作用を増大させる機  
構については、2つのモデルが考えられてい  
る。ひとつは、転写調節タンパク質がDNA上  
15 でRNAポリメラーゼと直接相互作用して、  
RNAポリメラーゼのプロモーターへの親和性  
が高まるというモデルである。第2は、転写  
調節タンパク質がDNAに結合することによ  
てDNAの構造が変化し、RNAポリメラーゼの  
20 プロモーターへの親和性が高まるというモデ

ルである。しかし、これらのモデルは広く受け入れられてゐるわけには実験的裏付けが稀薄であった。

筆者は、第3部の研究の過程で ompR 変異による envZ 変異の抑制を妨げる変異を見出し、その変異が RNA ポリメラーゼの  $\alpha$  サブユニットをコードする spoA 遺伝子に存在することと明らかにした。このことは、転写調節タンパク質と RNA ポリメラーゼが相互作用していることを示唆した。また、RNA ポリメラーゼは分子構造が詳しく解析されていたにもかかわらず (86, 87, 88)、その分子構造と転写の際の進行方向の関係が明らかにされていなかったが、筆者の得た結果から、進行方向に対して  $\alpha$  サブユニットは RNA ポリメラーゼの後部に位置していることが示唆された。

## 第1章 実験方法

(1) 菌株, バクテリオファージ, プラスミド  
本研究で用いられた大腸菌 K-12 株, バクテリオファージおよびプラスミドを Table 4-1 に示した。

### (2) その他の方法

培地, PI 形質導入, バクテリオファージ TuIa と TuIb に対する感受性テスト, インベロープの調製と Triton X-100 による可溶化, 尿素 - SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動, 遺伝子操作技術は, 第1部と同じである。アルカリ性ホスファターゼの活性測定は, 第3部と同じである。なお, DNA の塩基配列の決定は Sanger ら(79)の方法で行なった。

## 第2章 実験結果

(1) AB2847 において ompR77 変異は envZ11 変異を抑制しない

envZ11 変異株は  $OmpF^- OmpC^+$  の表現型を示す。第3部の研究で、この envZ11 変異を抑制する ompR77 変異を見出した。ompR77 による envZ11 の抑制を確認するために、第3部の研究で用いた MC4100 系統以外の菌に両変異を導入した。SM6503 を受容菌とした場合には、確かに ompR77 による envZ11 の抑制が観察された (Fig. 4-1, lane 1-6)。しかし、受容菌として AB2847 を用いた場合には、ompR77 envZ11 形質導入株は、envZ11 形質導入株 (Fig. 4-1, lane 9 と 10) と同じ  $OmpF^- OmpC^+$  の表現型を示した (Fig. 4-1, lane 11 と 12)。ompR, envZ 遺伝子に関して野生型である H0201 や MH19 aroB を受容菌として用いた場合には、ompR77 envZ11 形質導入株は  $OmpF^+ OmpC^+$  の表現型を示した。これらの結果は、AB2847 には ompR77 による envZ11 の抑制を妨げる変異が存在することと示唆した。この変異を SZR と命名した。

## (2) szr 変異の同定

szr 変異の染色体上での位置を決定するために、遺伝子マーカーがほとんどない szr 変異株 SM7002 に遺伝子マーカーを導入することを試みた。まず、ストレプトマイシン耐性( $Sm^r$ )となる変異型 rpsL 遺伝子を、SM6001 から形質導入した。驚くべきことに、 $Sm^r$  形質導入株の 70% が  $OmpF^+ OmpC^+$  の表現型を示した (Fig. 4-1, lane 13 と 14)。もちろん、これらの形質導入株は ompR77, envZ11 変異を保持していた。この結果は、szr 変異が rpsL 遺伝子の近傍に存在していることを示唆した。

形質導入によつて、aroE, rpsL, および szr 遺伝子間の配列順序を解析した。その結果は Fig. 4-2 に示した。szr は rpsL と aroE の間に存在した。この領域には、詳しく解析された 4 つのリボソームタンパク質遺伝子群がある。str オペロンから aroE 領域までのいろいろな長さの DNA を運ぶ特殊形質導入ファージが、Jaskunas (89) らによつて単離されていた。これらの

中から  $\lambda_{fus2}$  と  $\lambda_{spc2}$  を SM7002 ( $szr$ ) に導入することによって、相補解析を行った。 $\lambda_{fus2}$  は  $str$  オペロンから  $aroE$  までを運んでおり、 $\lambda_{spc2}$  は  $spc$  オペロンから  $aroE$  までを運んでいる。いずれのファージが導入された場合でも、形質導入株における  $OmpF$  タンパク質の合成は部分的に回復した。このことは、 $szr$  変異が  $spc$  オペロンから  $aroE$  遺伝子の間に存在し、変異型  $szr$  遺伝子は野生型  $szr$  遺伝子に対して半優性であることを示唆した。

$szr$  変異の正確な位置を決定するために、 $spc$  オペロンから  $aroE$  遺伝子の間のいろいろに異なった領域を運ぶプラスミドを作成した (Fig. 4-3, Fig. 4-4)。これらのプラスミドによって SM7002 ( $envZ11$   $ompR77$   $szr$ ) を形質転換した。その結果は Fig. 4-4 と Fig. 4-5 に示した。

$spc$  および  $\alpha$  オペロンと  $\alpha$  オペロンの下流領域を運ぶ pMAN145 によって、 $szr$  変異は相補された。一方、全  $spc$  オペロンと  $\alpha$  オペロンの中の  $rpsM$  から  $rpsD$  までを運ぶ pMAN160 や、プロモ

ーターのない rplQ と  $\alpha$  オペロンの下流領域と運ぶ pMAN165 では、szt 変異を相補できなかった。これらの結果は、szt 変異が rpoA 遺伝子か rplQ 遺伝子のどちらかに存在することと示唆した。このことは、発現可能な rpoA と rplQ を運ぶ pMAN170 によって szt 変異が相補されたことによって確認できた。

szt 変異が rpoA あるいは rplQ のどちらに存在しているのかを決定するために、pMAN170 上にクローン化されている rplQ 遺伝子の中に HindIII リンカーを挿入した。このプラスミド pMAN215 は szt 変異を相補した。この結果は、szt が rplQ 遺伝子内に生じた変異ではないことを示唆した。さらに、rpoA 遺伝子のみを含む 1.3kb HindIII 断片を pINIII-A1 にクローン化し、lpp-lac プロモーターの支配下に rpoA 遺伝子が発現するプラスミド pMAN225 を作成した。pMAN225 を保持する SM7002 (envZII ompR77 szt) は OmpF を合成した。つまり、szt 変異は野生型 rpoA 遺伝子によって相補された。この結果より、

szr 変異は rpoA 遺伝子内に存在していると結論された。したがって、この変異は rpoA77 と命名された。

### (3) rpoA77 変異株の解析

envZ11 変異株は、 $OmpF^- OmpC^+$  の表現型を示すと同時に、 $LamB^-$  や  $PhoA^-$  の表現型も示す(80,81)。envZ11 変異によって生じるこのような多面表現型は、ompR77 によってすべて抑制される(90)。 $OmpF$ ,  $OmpC$  の発現に関して、ompR77 による envZ11 の抑制を rpoA77 は妨げた。そこで、 $LamB$  や  $PhoA$  の発現に関して調べてみた (Table 4-2)。菌株によって多少度合いは異なるが、rpoA77 変異は ompR77 envZ11 変異株において  $LamB$  や  $PhoA$  の発現を妨げた。つまり、rpoA77 は ompR77 による envZ11 の抑制によって生じたすべての表現型を envZ11 の表現型にした。ompR<sup>+</sup> envZ<sup>+</sup> 株において、rpoA77 変異は  $LamB$  や  $PhoA$  の発現に影響を与えなかった。また、rpoA 遺伝子は本来、菌の生育にとって必須であるが、rpoA77 変異は菌の生育に関して全く影響を与えなかった。

### 第3章 考察

#### (1) 転写調節タンパク質とRNAポリメラーゼの相互作用

*OmpR*, *EnvZ* タンパク質は、浸透圧変化に応答して *ompF*, *ompC* 遺伝子の発現を正に調節している。*OmpR* タンパク質は細胞質に存在し、*ompF*, *ompC* プロモーターの上流領域に結合する(70)。*OmpR* は RNA ポリメラーゼと相互作用して、転写開始に寄与しているのだろう。一方、*EnvZ* は細胞質膜に存在する osmosensor であろうと考えられているが、その機能はあまり理解されていない。第3部の研究で、この2つのタンパク質が互いに相互作用して、*ompF*, *ompC* の発現を調節していることが強く示唆された。

第4部での研究で、*ompR77* による *envZ11* の抑制を *rpoA77* が妨げることを見出した。つまり、*envZ11 ompR77 rpoA77* 株では *envZ11* 変異株と同じ表現型 (*OmpF*<sup>-</sup> *OmpC*<sup>c</sup>) を示した。この結果は、転写開始のとまに転写調節タンパク質と RNA ポリメラーゼが相互作用していることを

示唆した。OmpR と EnvZ は相互作用する。OmpR と RNA ポリメラーゼは相互作用すると考えている。EnvZ と RNA ポリメラーゼが相互作用するかどうかはわからないが、xpoA77 変異は *ompR* が EnvZ と相互作用することに対して影響を与えていると考えられる。別の可能性としては、cAMP リセプタータンパク質において提唱されているように(93)、OmpR-EnvZ と RNA ポリメラーゼが DNA 分子を介して相互作用していると考えられる。いずれにしても、転写開始のある段階において、ompF プロモーター上で EnvZ, OmpR, RNA ポリメラーゼが複合体を形成していると思われる。

この複合体は、DNA, EnvZ, OmpR, および RNA ポリメラーゼがどのような順序で集合し形成されていくのだろうか。OmpR-EnvZ と RNA ポリメラーゼの相互作用, EnvZ と OmpR の相互作用(90), OmpR と プロモーター-DNA との相互作用(70), および RNA ポリメラーゼと プロモーター-DNA の相互作用(85)が示唆されている。どのような順

序でこれらの相互作用が起こり、遺伝子発現を調節するのかという興味深い新たな研究対象が生まれた。

また、EnvZタンパク質は細胞質膜に局在するので(67)、上述の複合体は細胞質膜上に形成されると考えられる(Fig. 4-6)。膜を舞台とする新奇な遺伝子発現の調節機構も興味深い。

(2) 転写方向と RNA ポリメラーゼの分子配向

RNA ポリメラーゼは、 $\alpha$  (2分子),  $\beta$ ,  $\beta'$  および  $\sigma$  と呼ばれるサブユニットから成る(91)。そして、三次元的な各サブユニットの配向は詳しく解析された(86, 87, 88)。しかしながら、転写の際に RNA ポリメラーゼが進む方向と各サブユニットの位置関係については、全くといってよいほど知見がなかった。上述した結果より、RNA ポリメラーゼの  $\alpha$  サブユニットが、プロモーターの上流領域に位置する *OmpR-EnvZ* と相互作用することが示唆された。また、RNA ポリメラーゼは、プロモーターの  $-10$  領域を中心に結合し、その結合には  $\beta$ ,  $\beta'$  サブユニッ

トが関与している(92)。これらのことから、転写方向に対して、 $\beta$ ,  $\beta'$ サブユニットが前方に、 $\alpha$ サブユニットが後方に位置する状態で RNA ポリメラーゼは進むということが強く示唆された (Fig. 4-6)。

## 総括

筆者が *osmoregulation* の研究に取り組んだとき、所属していた名古屋大学農学部醗酵化学研究室では、Inokuchi ら (63) により ompF プロモーター領域の解析が行われていた。筆者も *osmoregulation* の生理的意義の研究と合わせて、ompR, envZ による *osmoregulation* には ompF, ompC のプロモーター領域が重要な役割を担っていることを明らかにした (47)。その後、両遺伝子のプロモーター領域の解析は、Dairi ら (68) や Mizuno ら (69) によって発展的に進められていった。これらの研究で明らかになったことは、ompF, ompC プロモーターが十分機能を果たすためにはその上流約 70 bp の領域を必要とし、この領域と *OmpR* タンパク質が相互作用するということである。実際に、この領域に *OmpR* タンパク質が結合するということは Jo ら (70) や Norioka ら (94) によって確かめられた。また、Mizuno (72) は、ompF プロモーターの上流領域に DNA の折れ曲がり構造が存在し、その構造を認識して *OmpR* タンパク質が

結合することを明らかにした。しかし、ompCの場合には、折れ曲がり構造がないにもかかわらず、OmpRタンパク質が結合した。ompF, ompC 遺伝子の発現は培地浸透圧変化に対して全く逆に応答することから、OmpRタンパク質による両プロモーターの活性化機構が異なっていることは予想できる。両プロモーターへの OmpR の結合様式が異なっているという Mizuno の結果は、プロモーターの活性化機構を考える上でたいへん興味深い。

ompF, ompC 遺伝子のプロモーター領域に結合する OmpR タンパク質に、培地浸透圧変化という情報がどのようにして伝達されるのだろうか。環境変化に応答する遺伝子発現は、全生物に見られる共通の現象である。近年、原核生物において、環境変化に応答した遺伝子発現の調節機構の研究が広く行なわれている。大腸菌においては、ompF, ompC 遺伝子をはじめ、リン酸欠乏時に発現する phoA, phoE 遺伝子、色素などの有害物質に応答して発現が調節され

る膜タンパク質などがあげられる(95)。また、Agrobacterium tumefaciens における virB, virC 遺伝子(傷ついた植物により合成されるフェノール誘導体に応答して発現する)や Klebsiella pneumoniae における glnA, nifLA 遺伝子(窒素源欠乏時に発現する)なども詳しく研究されている(95)。

遺伝学的解析によって、これらの遺伝子の発現は、2つのタンパク質によって調節されていることが明らかになった。そして、この2つのタンパク質は転写調節タンパク質と、環境変化を感知し、その情報を転写調節タンパク質に伝えるセンサーであると考えられた(95)。驚くべきことに、各発現調節系の間で、転写調節タンパク質ではN末端側の領域に、センサーの場合にはC末端側の領域にアミノ酸配列の上で高い相同性が見出された。このことは、環境変化の情報伝達に関与する遺伝子が共通の祖先遺伝子から由来し、その基本的機構が保存されていることを示唆している。そして、その機構は次のように考えられて

いる(95)。センサーは膜貫通型タンパク質で(EnvZとVirAタンパク質は細胞質膜に存在することが確認されている)、ペリプラズム空間に露出しているN末端側領域は相同性が低く、各々異なった刺激に対するリセプターである。その情報を転写調節タンパク質に伝えるのが、細胞質側に露出している相同性の高いC末端側領域である。転写調節タンパク質は相同性の高いN末端側の領域で情報を受け取り、相同性の低いC末端側領域がもつ転写調節機能を制御している。

このモデルに関する実験的根拠はまだ不十分である。しかし、筆者は、EnvZ(センサー)のC末端側領域に生じた変異をOmpR(転写調節タンパク質)のN末端側領域に生じた変異が抑制することから、EnvZのC末端側領域とOmpRのN末端側領域が直接相互作用することを見出した(90)。このことは、センサーと転写調節タンパク質の相互作用が、環境変化という情報を遺伝子発現の場に伝達するために必要である

ことを強く示唆している。

*OmpR* と *EnvZ* タンパク質の相互作用が、*ompF*, *ompC* 遺伝子の発現をどのようにして調節しているのだろうか。ひとつの可能性としては、*OmpR* が *EnvZ* によってリン酸化などの修飾を受けるということが考えられる。実際、窒素源の欠乏に応答して発現する遺伝子群を調節する *NtrC* (転写調節タンパク質) は、*NtrB* (センサー) によってリン酸化、脱リン酸化され、リン酸化された *NtrC* は転写を促進する (96)。*OmpR* タンパク質に関しては、今のところリン酸化などの修飾は見出されていない。

もし、*OmpR* タンパク質が *EnvZ* タンパク質から修飾などを通して情報を受け取った後、*EnvZ* から離れて存在しているとすれば、培地浸透圧変化直後の転写段階での応答は、すみやかに進行していくと想像される。Fig. 2-8A の結果が示すように、浸透圧変化直後に *OmpF* タンパク質の合成が急速に抑制されていることから、転写段階での応答は浸透圧変化

直後に行なわれていると考えられる。

このことを説明できるモデルとしては、EnvZ と OmpR が複合体を形成した状態で転写を調節しているというモデルが考えられる。たとえば、低浸透圧下では細胞質膜上で EnvZ - OmpR - ompF プロモーター領域の複合体が形成され、この複合体を RNA ポリメラーゼが認識して転写が開始される。浸透圧が高くなると EnvZ の高次構造が変化し、活性のある複合体の形成ができなくなる。ompR 変異による envZ 変異の抑制を rpoA 変異が妨げるという筆者の実験結果(97)、および envZ 変異を  $\alpha$  オペロン内の遺伝子(おそらく rpoA 遺伝子)の変異が抑制するという Garrett と Silhavy の実験結果(98)は、このモデルを支持するものである。しかし、現在のところ、確固たる証拠が得られているわけでもなく、また、他の可能性も考えられる。今後は、*in vitro* での生化学的解析を進めていかなければならないだろう。

ompF, ompC 遺伝子の発現は、才一義的には、

*OmpR*, *EnvZ* タンパク質によって転写段階で調節されている。しかし、転写段階における調節だけでなく、*micF* RNA によって翻訳段階でも調節されている。*micF* RNA による調節は、*osmoregulation* において中心的な役割をはたしているわけではないが、浸透圧変化に対する *ompF* 遺伝子の発現応答とすみやかに、かつ完全に行なわせる役割を担っている。

ところで、*micF* RNA - アンチセンス RNA の発見は、遺伝子発現の調節機構を考える上で新しい概念をもたらした。その後、アンチセンス RNA は、*Tn10* の *transposase* 遺伝子や大腸菌の *crp* 遺伝子の発現、あるいは *ColE1* プラスミドの複製などに関与していることが見出された(99)。また、人工的にアンチセンス RNA を作成し、人為的に遺伝子発現を調節する道を開き、原核生物だけにとどまらず、真核生物でも成果をあげている(99)。

*ompF*, *ompC* 遺伝子の発現は、*OmpR*, *EnvZ* タンパク質による転写段階での調節、および *micF* RNA

による翻訳段階での調節を受けているだけでなく、Inokuchiら(41)やRamakishnanら(42)によって見出された翻訳段階以降での調節も受けている。また、cya, crp (100), cpxA, cpxB (101), および tolC (102) 遺伝子などの変異も ompF, ompC の発現に影響を与えることが知られている。特に、cya, crp に関する解析は、OmpF, OmpC タンパク質によって形成される透過孔が糖と高い親和性をもつことから、ompF, ompC の発現調節のみならず、糖の代謝と関連した発現調節の生理的意義にひとつの解答を与えてくれるかもしれない。

大腸菌外膜タンパク質遺伝子 ompF, ompC は上述したように、幾重にも厳重な調節のもとに発現していることが明らかになりつつある。筆者がこの研究に取り組んだ頃は、まだ、構造遺伝子 ompF, ompC, および調節遺伝子 ompR, envZ の DNA の塩基配列が決定されていたにすぎず、調節機構の研究がまさにこれから始まろうとしていたとまだだった。それから5年ほどの間に、omp regulon は大腸菌を代表する遺

伝子発現調節系としての地位を築いたばかりでなく、そこからいくつかの普遍的概念も見出されてきた。このような時期に研究に携わることができ、幾ばくかの貢献ができたことは望外の喜びである。

## 引用文献

1. Miura, T., and Mizushima, S. (1969)  
Biochem. Biophys. Acta 193 : 268.
2. Takayama, K., Qureshi, N., Mascagni, P., Nashed, M.A., Anderson, L.,  
and Raetz, C.R.H. (1983)  
J. Biol. Chem. 258 : 7379.
3. 水島昭二, 三浦謹一郎 (1979)  
細菌の解剖 講談社サイエンス7.
4. Yamada, H., and Mizushima, S. (1978)  
J. Bacteriol. 135 : 1024.
5. Nogami, T., and Mizushima, S. (1983)  
J. Bacteriol. 156 : 402.
6. 本間 遜 (1983)  
内毒素 医歯薬出版.
7. Nikaido, H., and Nakae, T. (1979)  
Adv. Microb. Physiol. 20 : 163.
8. Furukawa, H., Kuroiwa, T., and Mizushima, S. (1983)  
J. Bacteriol. 154 : 938.
9. Yu. F., Ichihara, S., and Mizushima, S. (1979)  
FEBS Letters 100 : 71.

10. Ichihara, S., and Mizushima, S. (1978)

J. Biochem. 83 : 1095.

11. Nikaïdo, H., and Vaara, M. (1985)

Microbiol. Rev. 49 : 1.

12. Kawaji, H., Mizuno, T., and Mizushima, S. (1979)

J. Bacteriol. 140 : 843.

13. van Alphen, W., and Lugtenberg, B. (1977)

J. Bacteriol. 131 : 623.

14. Chai, T., and Foulds, J. (1977)

J. Bacteriol. 130 : 781.

15. Bassford, P.J., Jr., Diedrich, D.L., Schnaitman, C.A., and  
Reeves, P. (1977)

J. Bacteriol. 131 : 608.

16. Hall, M.N., and Silhavy, T.J. (1979)

J. Bacteriol. 140 : 342.

17. Hall, M.N., and Silhavy, T.J. (1981)

J. Mol. Biol. 146 : 23.

18. Hall, M.N., and Silhavy, T.J. (1981)

J. Mol. Biol. 151 : 1.

19. Mutoh, N., Nagasawa, T., and Mizushima, S. (1981)

J. Bacteriol. 145 : 1085.

20. Mizuno, T., Wurtzel, E.T., and Inouye, M. (1982)

J. Bacteriol. 150 : 1462.

21. Inokuchi, K., Mutoh, N., Matsuyama, S., and Mizushima, S.  
(1982)

Nucleic Acids Res. 10 : 6957.

22. Eleanore, T.W., Chou, M.-Y., and Inouye, M. (1982)

J. Biol. Chem. 257 : 13685.

23. Mizuno, T., Eleanore, T.W., and Inouye, M. (1982)

J. Biol. Chem. 257 : 13692.

24. Stacey, K.A., and Simson, E. (1965)

J. Bacteriol. 90 : 554.

25. Miller, J.H. (1972)

Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab.

26. Uemura, J., and Mizushima, S. (1975)

Biochem. Biophys. Acta 413 : 163.

27. Johnson, R.A., and Walseth, T.F. (1979)

Adv. Cyclic Nucl. Res. 10 : 135.

28. Nakamura, K., Pirtle, R.M., and Inouye, M. (1979)  
J. Bacteriol. 137 : 595.
29. Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979)  
Nucleic Acids Res. 7 : 1513.
30. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982)  
Molecular Cloning . Cold Spring Harbor.
31. Maxam, A.M., and Gilbert, W. (1980)  
Methods Enzymol. 65 : 499.
32. Weiss, B., and Richardson, C.C. (1967)  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57 : 1021.
33. Dagert, M., and Ehrlich, S.D. (1979)  
Gene 6 : 23.
34. Lugtenberg, B. (1982)  
Mol. Gen. Genet. 185 : 105.
35. Mizuno, T., Chou, M.-Y., and Inouye, M. (1983)  
FEBS Letters 151 : 159.
36. Mizuno, T., Chou, M.-Y., and Inouye, M. (1983)  
J. Biol. Chem. 258 : 6932.
37. Schnaitman, C.A. (1971)  
J. Bacteriol. 108 : 545.

38. Datta, D.B., Arden, B., and Henning, U. (1977)  
J. Bacteriol. 131 : 821.
39. Nara, F., Inokuchi, K., Matsuyama, S., and Mizushima, S. (1984)  
J. Bacteriol. 159 : 688.
40. Lugtenberg, B., Peters, R., Bernheimer, H., and Berendson, E. (1976)  
Mol. Gen. Genet. 147 : 251.
41. Inokuchi, K., Itoh, M., and Mizushima, S. (1985)  
J. Bacteriol. 164 : 585.
42. Ramakrishnan, G., Ikenaka, K., and Inouye, M. (1985)  
J. Bacteriol. 163 : 82.
43. Watson, J.D., and Crick, F.H.C. (1953)  
Nature 171 : 737.
44. Jacob, F., and Monod, J. (1961)  
J. Mol. Biol. 3 : 313.
45. Yanofsky, C. (1981)  
Nature 289 : 751.
46. Donnis, P.P., and Nomura, M. (1975)  
Nature 255 : 460.
47. Matsuyama, S., Inokuchi, K., and Mizushima, S. (1984)  
J. Bacteriol. 158 : 1041.

48. Mizuno, T., Chou, M.-Y., and Inouye, M. (1983)  
Proc. Jpn. Acad. 59 : 335.
49. Mizuno, T., Chou, M.-Y., and Inouye, M. (1984)  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81 : 1966.
50. Casadaban, M. J. (1976)  
J. Mol. Biol. 104 : 541.
51. Taylor, R. K., Hall, M. N., and Silhavy, T. J. (1983)  
J. Mol. Biol. 166 : 273.
52. Yamamoto, M., Nonura, M., Ohsawa, H., and Maruo, B. (1977)  
J. Bacteriol. 132 : 127.
53. Ozawa, Y., and Mizushima, S. (1983)  
J. Bacteriol. 154 : 669.
54. Yamagata, H., Dombou, M., Sato, T., Mizushima, S., and  
Uchida, H. (1980)  
J. Bacteriol. 143 : 661.
55. Csonka, L. N., and Clark, A. J. (1980)  
J. Bacteriol. 143 : 529.
56. Chang, A. C. Y., and Cohen, S. N. (1978)  
J. Bacteriol. 134 : 1141.

57. Cabello, F., Timmis, K., and Cohen, S. N. (1976)  
Nature 259 : 285.
58. Guttererson, N. I., and Koshland, D. E. (1983)  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80 : 4894.
59. Jasín, M., and Schimmel, P. (1984)  
J. Bacteriol. 159 : 783.
60. Ruvkun, G. B., and Ausubel, F. M. (1981)  
Nature 289 : 85.
61. Mizuno, T., and Mizushima, S. (1987)  
J. Biochem. 101 : 387.
62. Suzuki, T., Itoh, A., Ichihara, S., and Mizushima, S. (1987)  
J. Bacteriol. 169 : 2523.
63. Inokuchi, K., Furukawa, H., Nakamura, K., and Mizushima, S. (1984)  
J. Mol. Biol. 178 : 653.
64. Yasuda, S., and Takagi, T. (1983)  
J. Bacteriol. 154 : 1153.
65. Armstrong, K. A., Acosta, R., Ledner, E., Machida, Y.,  
Pancotto, M., McCormick, M., Ohtsubo, H., and Ohtsubo, E.  
(1984)  
J. Mol. Biol. 175 : 331.

66. Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.B.,  
Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., and Falkow, S.  
(1977)  
Gene 2: 95.
67. Liljeström, P. (1986)  
FEMS Microb. Lett. 36: 145.
68. Dairi, T., Inokuchi, K., Mizuno, T., and Mizushima, S. (1985)  
J. Mol. Biol. 184: 1
69. Mizuno, T., and Mizushima, S. (1986)  
J. Bacteriol. 168: 86.
70. Jo, Y.-L., Nara, F., Ichihara, S., Mizuno, T., and Mizushima, S.  
(1986)  
J. Biol. Chem. 261: 15252.
71. Nara, F., Matsuyama, S., Mizuno, T., and Mizushima, S. (1986)  
Mol. Gen. Genet. 202: 194.
72. Mizuno, T. (1987)  
Gene 54: 57.
73. Garrett, S., Taylor, R.K., Silhavy, T.J., and Berman, M.L.  
(1985)  
J. Bacteriol. 162: 840.

74. Vieira, J., and Messing, J. (1982)  
Gene 19 : 259.
75. Matsuyama, S., and Mizushima, S. (1985)  
J. Bacteriol. 162 : 1196.
76. Manis, J.J., and Kline, B.C. (1977)  
Mol. Gen. Genet. 152 : 175.
77. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985)  
Gene 23 : 103.
78. Brickman, E., and Beckwith, J. (1975)  
J. Mol. Biol. 96 : 307.
79. Sanger, F., Nicklen, F., and Coulson, A.R. (1977)  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 : 5463.
80. Wandersman, C., Moreno, F., and Schwartz, M. (1980)  
J. Bacteriol. 143 : 1374.
81. Wanner, B.L., Sarthy, A., and Beckwith, J. (1979)  
J. Bacteriol. 140 : 229.
82. Masui, Y., Mizuno, T., and Inouye, M. (1984)  
Bio-technology 2 : 81.
83. Pittard, J., and Wallace, B.J. (1966)  
J. Bacteriol. 91 : 1494.

84. Miyoshi, Y., and Yamagata, H. (1976)

J. Bacteriol. 125 : 142.

85. Raibaud, O., and Schwartz, M. (1984)

Annu. Rev. Genet. 18 : 173.

86. Meisenberger, O., Heumann, H., and Pilz, I. (1981)

FEBS Letters. 123 : 22

87. Stöckel, P., May, R., Strell, I., Cejka, Z., Hoppe, W.,

Heumann, H., Zillig, W., and Crespi, H. L. (1980)

Eur. J. Biochem. 112 : 419.

88. Tichelaar, W., Schutter, W. G., Arnberg, A.C., van Bruggen,

E. F. J., and Stender, W. (1983)

Eur. J. Biochem. 135 : 263.

89. Jaskunas, S. R., Fallon, A. M., and Nomura, M. (1977)

J. Biol. Chem. 252 : 7323.

90. Matsuyama, S., Mizuno, T., and Mizushima, S. (1986)

J. Bacteriol. 168 : 1309.

91. Burgess, R. R. (1976)

RNA Polymerase, Cold Spring Harbor.

92. 長沢治子, 石浜明. (1985)

核酸の化学と分子生物学, 学会出版センター.

93. Wu, H.-M., and Crothers, D.M. (1984)  
Nature 308 : 509.
94. Norioka, S., Ramakrishnan, G., Ikenaka, K., and Inouye, M. (1986)  
J. Biol. Chem. 261 : 17113.
95. Ronson, C.W., Nixon, B.T., and Ansel, F.M. (1987)  
Cell 49 : 579.
96. Ninfa, and Magasanik, (1986)  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83 : 5909
97. Matsuyama, S., and Mizushima, S. (1987)  
J. Mol. Biol. 195 : 847.
98. Garrett, S., and Silhavy, T.J. (1987)  
J. Bacteriol. 169 : 1379.
99. Green, P.J., Pines, O., and Inouye, M. (1986)  
Ann. Rev. Biochem. 55 : 569.
100. Scott, N.W., and Harwood, C.R. (1980)  
FEMS Microb. Letters 9 : 95.
101. McEwen, J., and Silverman, P.M. (1982)  
J. Bacteriol. 151 : 1553.
102. Morona, R., and Reeves, P. (1982)  
J. Bacteriol. 150 : 1016.

Table 1-1

## Bacteria, bacteriophages, and plasmids

| Strain                        | Relevant properties <sup>a</sup>   | Reference/source     |
|-------------------------------|--|----------------------|
| <i>E. coli</i> K-12           |  |                      |
| MC4100                        | F <sup>-</sup> ; $\Delta$ lacU169 araD139 rpsL relA thiA fibB                    | 50                   |
| MH70                          | MC4100 malQ7   | 16                   |
| MH118                         | MH70 ompC::Mu cts18  | 16                   |
| MH760                         | MC4100 ompR472 (ompR2)   | 51                   |
| SM131                         | F <sup>-</sup> ; $\Delta$ lacU169 rpsL relA thiA fibB malQ7 ompF14               | K. Inokuchi          |
| SM1000                        | gyrA ompC transductant of SM131; donor: YO170                                    | This study           |
| SM1001                        | srl::Tn10 conjugant of SM1000; donor: JC10240                                    | This study           |
| SM1002                        | malQ <sup>+</sup> transductant of SM1001; donor: HO201 ompF                      | This study           |
| SM1003                        | malQ <sup>+</sup> envZ transductant of SM1001; donor: HO201 ompF                 | This study           |
| SM1004                        | malQ <sup>+</sup> ompR472 transductant of SM1001; donor: MH760                   | This study           |
| SM1005                        | srl <sup>+</sup> recA conjugant of SM1002; donor: KL16-99 Nal <sup>r</sup>       | This study           |
| SM1006                        | srl <sup>+</sup> recA conjugant of SM1003; donor: KL16-99 Nal <sup>r</sup>       | This study           |
| SM1007                        | srl <sup>+</sup> recA conjugant of SM1004; donor: KL16-99 Nal <sup>r</sup>       | This study           |
| CE1036                        | F <sup>-</sup> ; thi lacY galK mtl xyl ara rpsL supE ompC T6 <sup>r</sup>        | 40                   |
| CE1036 thyA                   | thyA mutant of CE1036  | This study           |
| CE1036 recA                   | recA thyA <sup>+</sup> conjugant of CE1036 thyA; donor: KL16-99 Nal <sup>r</sup> | This study           |
| HO201                         | F <sup>-</sup> ; thi rel rpsL mal $\lambda$ <sup>r</sup>                         | 52                   |
| HO201 ompF <sup>b</sup>       | ompF14 envZ derivative of HO201; spontaneous Tula-resistant mutant               | 53                   |
| HO201 ompC                    | ompC derivative of HO201; spontaneous Tulb-resistant mutant                      | 53                   |
| YO160 <sup>b</sup>            | F <sup>-</sup> ; thi rel rpsL ompC envZ $\Phi$ (ompC-lacZ)                       | 53                   |
| YO160 thyA                    | thyA mutant of YO160   | This study           |
| YO160 recA                    | recA thyA <sup>+</sup> conjugant of YO160 thyA; donor: KL16-99 Nal <sup>r</sup>  | This study           |
| YO170                         | gyrA conjugant of HO201 ompC; donor: KL98 nala                                   | This study           |
| KL16-99 Nal <sup>r</sup>      | Hfr; thi recA Nal <sup>r</sup>   | 54                   |
| KL98 nala                     | Hfr; gyrA  | B. Lugtenberg        |
| JC10240                       | Hfr; thr-300 recA56 srl-300::Tn10 relA1 ilv-318 spoT1 thi-1 rpsE2300             | 55                   |
| Bacteriophages                |  |                      |
| Tula                          | Receptor; OmpF and lipopolysaccharide  | 38                   |
| Tulb                          | Receptor; OmpC and lipopolysaccharide  | 38                   |
| Plkc                          | Used for generalized transduction  | Our laboratory stock |
| Previously described plasmids |  |                      |
| pACYC184                      | Cm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>  | 56                   |
| pKEN403                       | Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>  | K. Nakamura          |
| pLF4                          | Ap <sup>r</sup> ; vector: pBR322; cloned genes: ompF asnS                        | 21                   |
| pLF11                         | Ap <sup>r</sup> ; vector: pBR322; cloned gene: 5'-terminal half of ompF          | 21                   |

<sup>a</sup> Cm, Chloramphenicol; Tc, tetracycline; Ap, ampicillin; Km, kanamycin.<sup>b</sup> These strains were reported to be envZ<sup>+</sup>

Table 1 - 2

## Plasmids constructed in this study

| Plasmid | Cloned gene(s) <sup>a</sup> | Amt (kb) of foreign DNA (source) | Vector DNA | Selection markers used            | Length (kilobase pairs) |
|---------|-----------------------------|----------------------------------|------------|-----------------------------------|-------------------------|
| pMAN002 | <i>ompC</i> ([Cp-C])        | 2.7 (MH70)                       | pACYC184   | Cm <sup>r</sup> Tula <sup>s</sup> | 6.6                     |
| pMAN003 | [Cp-F]                      | 1.1 (pMAN002)                    | pLF4       | Ap <sup>r</sup> Tula <sup>s</sup> | 9.1                     |
| pMAN004 | [Fp-C]                      | 3.0 (pLF4)                       | pMAN002    | Cm <sup>r</sup> Tula <sup>s</sup> | 7.6                     |
| pMAN006 | <i>ompC</i>                 | 2.7 (pMAN002)                    | pKEN403    | Ap <sup>r</sup> Tula <sup>s</sup> | 7.2                     |
| pMAN007 | <i>ompF</i> ([Fp-F])        | 5.9 (pLF4)                       | pKEN403    | Ap <sup>r</sup> Tula <sup>s</sup> | 10.4                    |
| pMAN008 | <i>ompC ompF</i>            | 2.7 (pMAN002)                    | pMAN007    | Ap <sup>r</sup> Tula <sup>s</sup> | 13.1                    |
| pMAN009 | [Cp-F]                      | 6.4 (pMAN011)                    | pKEN403    | Ap <sup>r</sup> Tula <sup>s</sup> | 10.9                    |
| pMAN010 | [Fp-C]                      | 1.4 (pLF4);<br>1.1 (pMAN002)     | pKEN403    | Ap <sup>r</sup> Tula <sup>s</sup> | 7.0                     |
| pMAN011 | [Cp-F] [Fp-C]               | 5.6 (pMAN003);<br>4.1 (pMAN004)  | pKEN403    | Ap <sup>r</sup> Tula <sup>s</sup> | 14.2                    |

<sup>a</sup> [Cp-F] represents a chimera gene that includes the *ompC* promoter region, the coding region for the signal peptide and NH<sub>2</sub>-terminal 11-amino-acid residues of the OmpC protein, and the coding region of the OmpF protein devoid of the NH<sub>2</sub>-terminal 11-amino-acid residues. [Fp-C] represents a chimera gene in which opposite domains of the *ompF* gene and the *ompC* gene were included. The *ompC* and *ompF* genes can be expressed as [Cp-C] and [Fp-F], respectively.

Table 2-1

Bacteria, bacteriophages, and plasmids

| Strain, phage, or plasmid | Relevant properties   | Reference or source  |
|---------------------------|---|----------------------|
| <i>E. coli</i> K-12       |   |                      |
| MC4100                    | F <sup>-</sup> $\Delta$ <i>lacU169 araD rpsL relA thi fibB</i>  | 50                   |
| MH760 <i>recA</i>         | F <sup>-</sup> $\Delta$ <i>lacU169 araD rpsL relA thi fibB ompR472 gyrA recA</i>                      | 63                   |
| HO201                     | F <sup>-</sup> <i>thi rel rpsL mal</i> $\lambda^+$  | 52                   |
| HO201 <i>ompC</i>         | <i>ompC</i> derivative of HO201   | 53                   |
| YO160 <i>recA</i>         | F <sup>-</sup> <i>thi rel rpsL ompC envZ</i><br>$\Phi$ ( <i>ompC-lacZ</i> ) <i>recA</i>               | 47                   |
| CE1036 <i>recA</i>        | F <sup>-</sup> <i>thi lacY galK mtl xyl ara rpsL supE ompC T6<sup>r</sup> recA</i>                    | 47                   |
| SM3001                    | MC4100 $\Delta$ <i>micF1</i>  | This study           |
| SM3002                    | $\Delta$ <i>micF1</i> transductant of HO201; donor, SM3001  | This study           |
| Bacteriophages            |   |                      |
| Tu1b                      | Receptor; OmpC and lipopolysaccharide   | 38                   |
| Plk <sup>c</sup>          | Used for generalized transduction   | Our laboratory stock |
| Plasmids                  |   |                      |
| pMAN002                   | Cm <sup>r</sup> ; vector, pACYC184; cloned gene, <i>ompC micF</i>                                     | 47                   |
| pMAN006                   | Ap <sup>r</sup> ; vector, pKEN403; cloned gene, <i>ompC micF</i>                                      | 47                   |
| pMAN005                   | Same as pMAN006 except for direction of the cloned fragment   | This study           |
| pSY343                    | Km <sup>r</sup>   | 64                   |
| pEL3                      | Ap <sup>r</sup> ; temperature-sensitive replicon  | 65                   |
| pKM004                    | Ap <sup>r</sup> ; vector, pBR322; cloned gene, <i>lpp</i> promoter-controlled <i>lacZ-lacY</i> operon | 48                   |
| Plasmid III               | Ap <sup>r</sup> ; vector, pKM005; cloned gene, <i>micF</i>  | 49                   |
| pKEN403                   | Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> ; replication origin derived from pSC101                              | K. Nakamura          |
| pACYC184                  | Cm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>   | 56                   |
| pBR322                    | Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>   | 66                   |

Table 3-1

| Bacteria, bacteriophages, and plasmids |   |                        |
|--|---|------------------------|
| Strain                                 | Relevant properties <sup>a</sup>  | Reference or source    |
| <i>E. coli</i> K-12                    |   |                        |
| MC4100                                 | F <sup>-</sup> , $\Delta$ lacU169 araD rpsL relA thi flbB                   | 50                     |
| MH1461                                 | MC4100 envZ11   | 17                     |
| MH760                                  | MC4100 ompR2 gyrA recA1   | 63                     |
| recA                                   |   |                        |
| MH19                                   | MC4100 malQ pyrD  | 17                     |
| MH19 aroB                              | molQ <sup>+</sup> aroB transductant of MH19; donor; AB2847 mal <sup>+</sup> | This study             |
| SG480 $\Delta$ 76                      | MC4100 $\Delta$ (malT-ompB)   | 73                     |
| AT142                                  | MC4100 $\Delta$ envZ  | T. Mizuno <sup>b</sup> |
| AB2847                                 | aroB tsx supE   | 39                     |
| mal <sup>+</sup>                       |   |                        |
| YO160                                  | F <sup>-</sup> , thi rel rpsL ompC envZ160 $\Phi$ (ompC-lacZ)               | 47                     |
| JM83                                   | ara $\Delta$ lac pro rpsL thi $\phi$ 80d $\Delta$ lacZ15                    | 74                     |
| Bacteriophage                          |   |                        |
| Tula                                   | Receptors, OmpF and lipopolysaccharide                                      | 38                     |
| Tulb                                   | Receptors, OmpC and lipopolysaccharide                                      | 38                     |
| P1 kc                                  | Used for generalized transduction   | Our laboratory stock   |
| Previously described plasmid           |   |                        |
| pBR322                                 | Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>   | 66                     |
| pKEN403                                | Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>   | 75                     |
| pMF21                                  | Km <sup>r</sup>   | 76                     |
| pUC19                                  | Ap <sup>r</sup>   | 77                     |
| pAT224                                 | Ap <sup>r</sup> ; vector, pBR322; cloned genes, ompR and envZ               | 20                     |
| pAT2004                                | Ap <sup>r</sup> ; vector, pIN-III; cloned gene, envZ                        | T. Mizuno <sup>b</sup> |
| pMAN043                                | Ap <sup>r</sup>   | 71                     |

<sup>a</sup> Ap, Ampicillin; Tc, tetracycline; Km, kanamycin.<sup>b</sup> Construction and characterization will be published elsewhere.

Table 4-1

*Bacteria, bacteriophages and plasmids*

| Strain                                | Relevant properties  | Reference/source               |
|---------------------------------------|--|--------------------------------|
| <i>A. E. coli K12</i>                 |  |                                |
| MC4100                                | F <sup>-</sup> ; $\Delta$ lacU169 araD rpsL relA thi flbB  | Casadaban (1976)               |
| MH1461                                | MC4100 <i>envZ11</i>   | Hall & Silhavy (1981a)         |
| SM6001                                | MH1461 <i>ompR77</i>   | Matsuyama <i>et al.</i> (1986) |
| SM6501                                | <i>rpsL</i> <sup>+</sup> <i>rpsE</i> <i>aroE</i> transductant of SM6001; donor, AB312 Sm <sup>s</sup> <i>spc aroE</i>          | This study                     |
| SM6502                                | <i>rpsL rpsE</i> <sup>+</sup> transductant of SM6501; donor, SM6001  | This study                     |
| SM7010                                | <i>aroE</i> <sup>+</sup> <i>rpoA77</i> transductant of SM6502; donor, SM7002   | This study                     |
| SM7013                                | <i>rpsE aroE</i> transductant of MC4100; donor, AB312 Sm <sup>s</sup> <i>spc aroE</i>  | This study                     |
| SM7014                                | <i>rpsL</i> <sup>+</sup> <i>rpsE</i> <sup>+</sup> <i>aroE</i> <sup>+</sup> <i>rpoA77</i> transductant of SM7013; donor, AB2847 | This study                     |
| MH19 <i>aroB</i>                      | MC4100 <i>aroB pyrD</i>  | Matsuyama <i>et al.</i> (1986) |
| AB2847                                | F <sup>-</sup> ; <i>aroB tsx malA (rpoA77)</i>   | Pittard & Wallace (1966)       |
| AB2847 <i>mal</i> <sup>+</sup>        | AB2847 <i>malA</i> <sup>+</sup>  | Nara <i>et al.</i> (1984)      |
| SM7000                                | <i>malA</i> <sup>+</sup> <i>aroB</i> <sup>+</sup> transductant of AB2847; donor, MC4100  | This study                     |
| SM7001                                | <i>malA</i> <sup>+</sup> <i>aroB</i> <sup>+</sup> <i>envZ11</i> transductant of AB2847; donor, MH1461                          | This study                     |
| SM7002                                | <i>malA</i> <sup>+</sup> <i>aroB</i> <sup>+</sup> <i>envZ11 ompR77</i> transductant of AB2847; donor, SM6001                   | This study                     |
| SM7003                                | <i>rpsL rpoA</i> <sup>+</sup> transductant of SM7002; donor, SM6001  | This study                     |
| SM7011                                | <i>rpsL rpoA</i> <sup>+</sup> transductant of SM7000; donor, MC4100  | This study                     |
| SM7012                                | <i>rpsL rpoA</i> <sup>+</sup> transductant of SM7001; donor, MH1461  | This study                     |
| W4626Phe                              | F <sup>-</sup> ; <i>purE pheA trp lac-85 gal-2 malA mtl xyl-2 ara rpsL</i>   | Miyoshi & Yamagata (1976)      |
| SM6503                                | <i>malA</i> <sup>+</sup> <i>aroB</i> transductant of W4626Phe; donor, AB2847 <i>mal</i> <sup>+</sup>                           | This study                     |
| SM7004                                | <i>aroB</i> <sup>+</sup> transductant of SM6503; donor, MC4100   | This study                     |
| SM7005                                | <i>aroB</i> <sup>+</sup> <i>envZ11</i> transductant of SM6503; donor, MH1461   | This study                     |
| SM7006                                | <i>aroB</i> <sup>+</sup> <i>envZ11 ompR77</i> transductant of SM6503; donor, SM6001  | This study                     |
| HO201                                 | F <sup>-</sup> ; <i>thi rel rpsL malA</i>  | Yamamoto <i>et al.</i> (1977)  |
| AB312 Sm <sup>s</sup> <i>spc aroE</i> | Hfr; <i>thr leu rpsE aroE</i>  | Yamagata (unpublished)         |
| <i>B. Bacteriophages</i>              |  |                                |
| Tu1a                                  | Receptor; OmpF and lipopolysaccharide  | Datta <i>et al.</i> (1977)     |
| Tu1b                                  | Receptor; OmpC and lipopolysaccharide  | Datta <i>et al.</i> (1977)     |
| P1ke                                  | Used for generalized transduction  | Laboratory stock               |
| $\lambda$ fus2                        | Specialized transducing bacteriophage $\lambda$ carrying the <i>str</i> operon- <i>aroE</i> gene region                        | Jaskunas <i>et al.</i> (1977)  |
| $\lambda$ spc1                        | Specialized transducing bacteriophage $\lambda$ carrying the <i>spc</i> operon- <i>aroE</i> gene region                        | Jaskunas <i>et al.</i> (1977)  |
| $\lambda$ spc2                        | Specialized transducing bacteriophage $\lambda$ carrying the <i>spc</i> operon- <i>aroE</i> gene region                        | Jaskunas <i>et al.</i> (1977)  |
| <i>C. Plasmids</i>                    |  |                                |
| pMF21                                 | Km <sup>r</sup>  | Manis & Kline (1977)           |
| pMAN043                               | Ap <sup>r</sup>  | Nara <i>et al.</i> (1986)      |
| pKEN403                               | Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>  | Matsuyama & Mizushima (1985)   |
| pIN111-A1                             | Ap <sup>r</sup>  | Masui <i>et al.</i> (1984)     |

Km, kanamycin; Ap, ampicillin.

Table 4-2

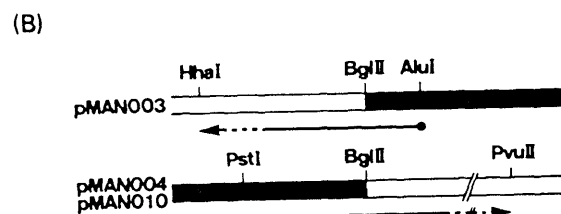
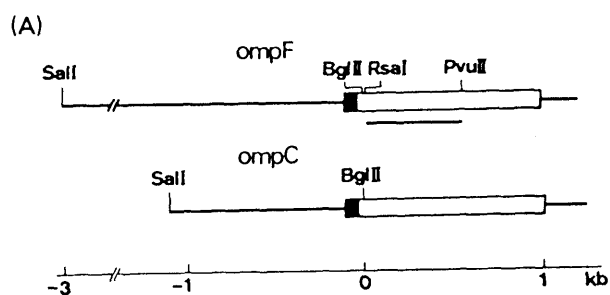
*Effect of the rpoA77 mutation on the synthesis of the LamB protein and alkaline phosphatase*

| Strain | Genotype      |               |               | LamB protein† | Alkaline phosphatase‡ |
|--------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------|
|        | <i>envZ</i>   | <i>ompR</i>   | <i>rpoA</i>   |               |                       |
| SM7011 | +             | +             | +             | 100           | 821                   |
| SM7012 | <i>envZ11</i> | +             | +             | 0             | 83                    |
| SM7003 | <i>envZ11</i> | <i>ompR77</i> | +             | 22            | 775                   |
| SM7002 | <i>envZ11</i> | <i>ompR77</i> | <i>rpoA77</i> | 6             | 200                   |
| SM7000 | +             | +             | <i>rpoA77</i> | 88            | 802                   |
| MC4100 | +             | +             | +             | 100           | 661                   |
| MH1461 | <i>envZ11</i> | +             | +             | 10            | 117                   |
| SM6001 | <i>envZ11</i> | <i>ompR77</i> | +             | 92            | 333                   |
| SM7010 | <i>envZ11</i> | <i>ompR77</i> | <i>rpoA77</i> | 0             | 152                   |
| SM7014 | +             | +             | <i>rpoA77</i> | 109           | 508                   |

† Cells were grown at 30°C in M9 minimal medium containing 2% (w/v) glycerol, 0.1% (w/v) Casamino acids and 0.2% (w/v) maltose. Outer-membrane fractions were analyzed on polyacrylamide gels. The gels were then scanned with a Toyo digital densitometer DMU-33C, and the relative amounts of the LamB protein were determined. The amounts were normalized for the total amounts of the major outer-membrane proteins; OmpA, OmpF and OmpC.

‡ The alkaline phosphatase assay was carried out as described (Brickman & Beckwith, 1975).

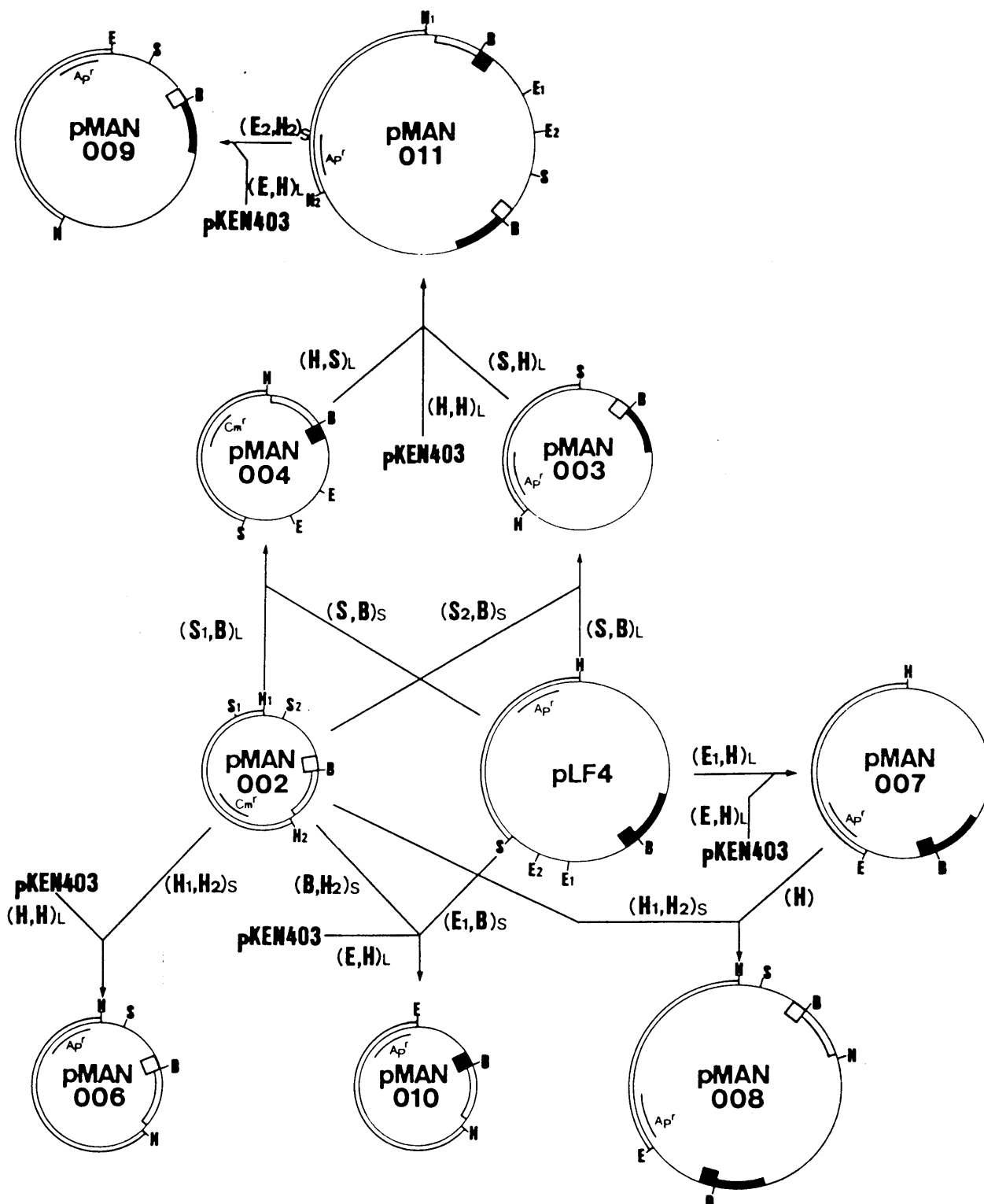
Fig. 1-1



Cloned *ompF* and *ompC* genes used for chimera gene construction (A) and strategy for nucleotide sequencing of chimera genes (B). (A) Solid and open bars represent the signal peptide region and mature protein region, respectively. The line below the *ompF* gene represents the DNA fragment used for hybridization experiments for the *ompC* gene cloning. (B) Bars indicate the *Bgl*III junction regions of the chimera genes. Solid and open bars represent regions derived from the *ompF* and *ompC* genes, respectively. Arrows indicate nucleotide fragments used for sequencing; ● indicates the position of the  $^{32}\text{P}$ -labeled 5' end. Broken regions of the arrows indicate that the sequences of these regions were not determined.

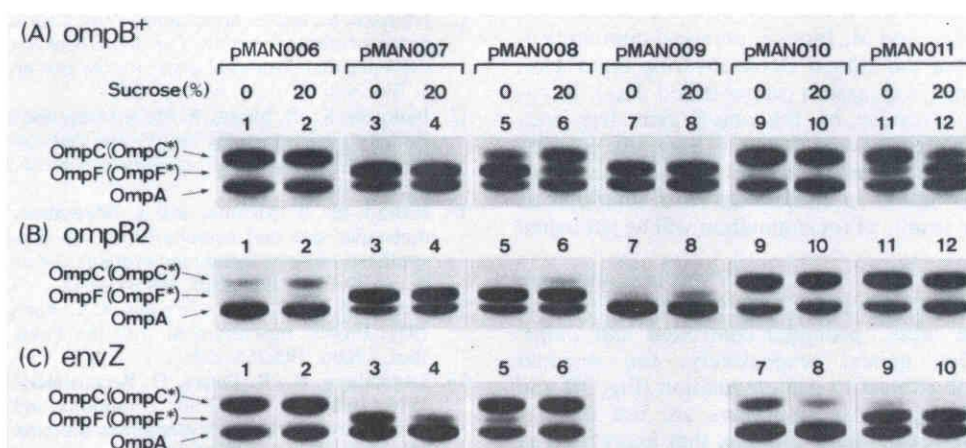
Fig. 1-2

106



Construction of plasmids.  $\square$  and  $\blacksquare$  represent [Cp] and [-C] regions of the *ompC* gene ([Cp-C]), respectively.  $\blacksquare$  and  $\blacksquare$  represent [Fp] and [-F], respectively. Detailed information is given in the footnote to Table 2. Thin lines represent cloned chromosomal DNA regions; thick lines represent DNA fragments from pBR322, pACYC184, and pKEN403. Restriction endonucleases used are shown in parentheses by the following abbreviations: H, *HindIII*; B, *BglIII*; S, *Sall*; and E, *EcoRI*. Cleavage sites are also shown on plasmids. When one enzyme cleaves more than one site of a plasmid, they are distinguished with suffixes, e.g., S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub>. S and L outside the parentheses represent smaller and larger fragments, respectively, formed as a result of an endonuclease digestion. For example, (S<sub>1</sub>, B)<sub>L</sub> in the middle of this figure indicates the larger fragment formed after digestion with *Sall* and *BglIII* of pMAN002. DNA fragments thus formed were ligated, and usually transformed into YO160 *recA*. Transformants were selected for the markers shown in Table 2. Although YO160 *recA* was *envZ* (see Table 1), it did not prevent the selection. Antibiotic resistance genes are also indicated.

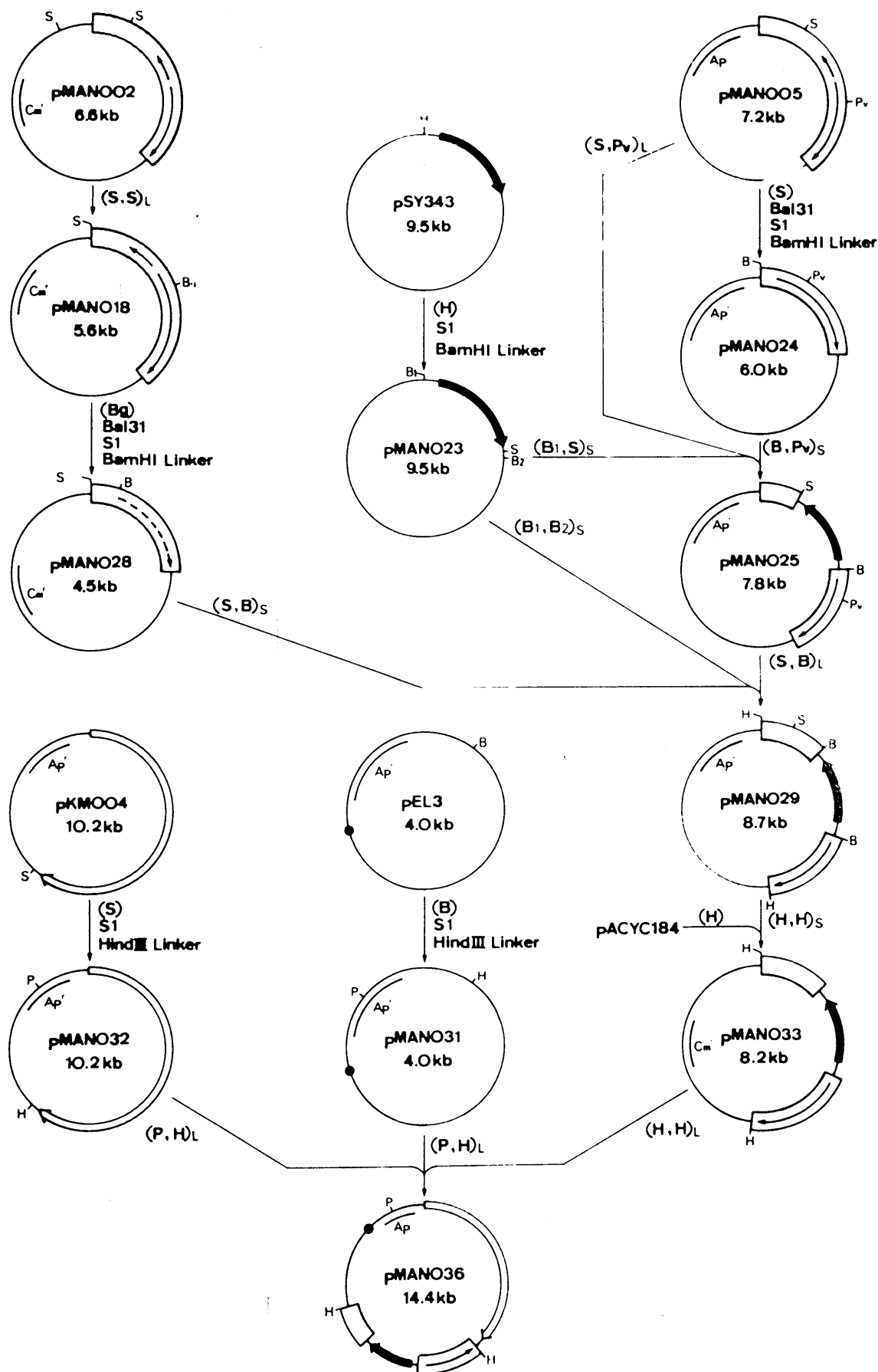
Fig. 1-3



Expression of *ompF*, *ompC*, and chimera genes. SM1005 (A), SM1007 (*ompR2*) (B), and SM1006 (*envZ*) (C) were transformed with the indicated plasmids and grown in the presence of the indicated concentrations of sucrose. Plasmids and the concentrations of sucrose used in (B) and (C) were the same as those for (A). Triton X-100-insoluble fractions (25  $\mu$ g of protein) were prepared and analyzed on polyacrylamide gel. The positions of OmpC, OmpF, OmpA, and chimera proteins are indicated. The data for pMAN009 are not shown in (C) because the transformant could not be obtained.

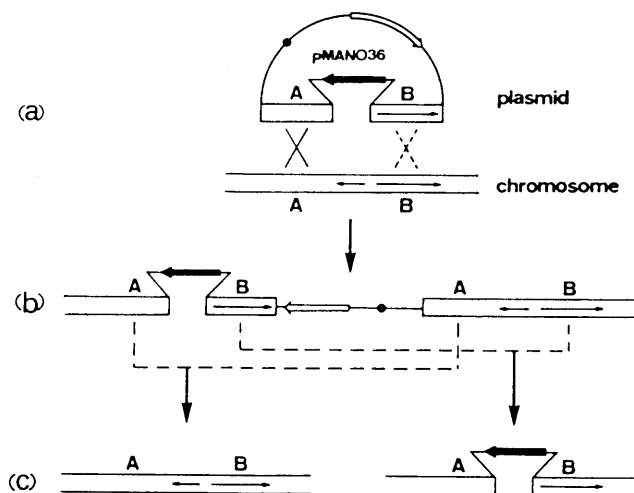
Fig. 2-1

108



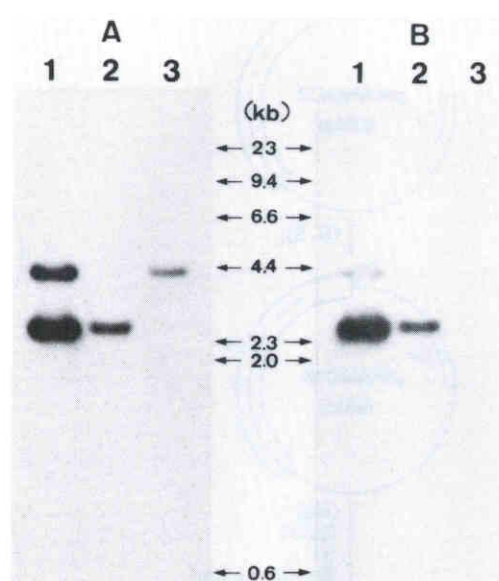
Construction of plasmid pMAN036. □, Chromosomal DNA of the *micF-ompC* region. The short and long arrows in the open boxes indicate the coding region and the direction of transcription of *micF* and *ompC*, respectively; broken arrow represents the nonfunctioning *ompC* gene, the upstream region of which has been deleted. ◇ and ●, Coding region and direction of transcription of *lacZ-lacY* and *Km<sup>r</sup>*, respectively; —, vector plasmid DNA; ●, temperature-sensitive replicon. The restriction endonucleases used are shown in parentheses (abbreviations: B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; H, *Hind*III; P, *Pst*I; Pv, *Pvu*II; S, *Sal*I). Cleavage sites are shown. When one enzyme cleaves at more than one site in a plasmid, the sites are distinguished with numbers, e.g., B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. S and L outside parentheses denote small and large fragments, respectively, formed as a result of digestion with the endonuclease. All plasmids were transferred into strain YO160 *recA*, except for pMAN032, pMAN035, and pMAN036, which were transferred into strain MH760 *recA*. Antibiotic resistance genes and plasmid sizes are also indicated.

Fig. 2-2



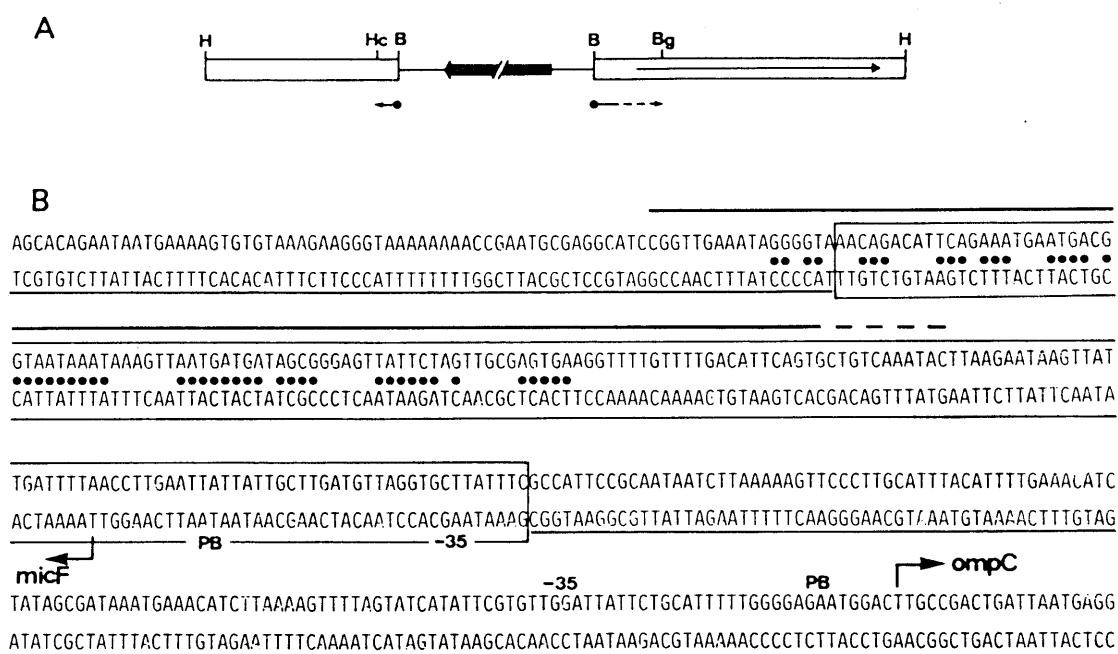
Replacement of the *micF-ompC* region of the chromosome with the *micF*-deleted corresponding region in pMAN036. Strain MC4100, a  $\Delta lac$  strain, was transformed with pMAN036 (Fig. 1) and incubated at 42°C on lactose-MacConkey plates containing kanamycin. Plasmid integration into the chromosome by homologous recombination takes place at either region A or region B (a). Transformants having the plasmid in the chromosome are *Km<sup>r</sup>* *Lac<sup>+</sup>*. In the case of recombination at region A, subsequent plasmid segregation from the chromosome by homologous recombination takes place at either of the regions indicated by dotted lines in (b). This results in one of the chromosomal structures shown in (c). The segregated plasmids are lost in the cells because of the inability to replicate autonomously at 42°C. Recombination for plasmid segregation at region A gives the same chromosomal structure as that of an untransformed cell, whereas recombination at region B results in replacement of the *micF* gene with the *Km<sup>r</sup>* gene. This *micF* deletion mutant is detected as a white colony (*Lac<sup>-</sup>*) on a lactose-MacConkey plate containing kanamycin. When recombination for plasmid integration takes place at region B (a), the subsequent process is principally the same. The symbols used are described in the legend to Fig. 1.

Fig. 2-3



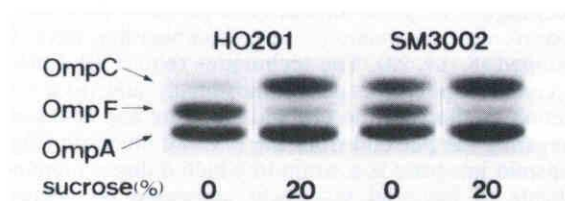
Southern blot analyses of the *micF* chromosomal deletion. A mixture of pMAN002 and pMAN033 (lanes 1) and chromosomal DNA from strains MC4100 (lanes 2) and SM3001 (lanes 3) was digested with *Hind*III and analyzed as described in the text. The 2.7-kb fragment containing the *micF-ompC* region from pMAN002 (A) and the 120-bp fragment containing a larger part of the *micF* gene (Fig. 4) (B) were used as probes. The *Hind*III fragments of bacteriophage  $\lambda$  DNA were used for standardization of the base length.

Fig. 2-4



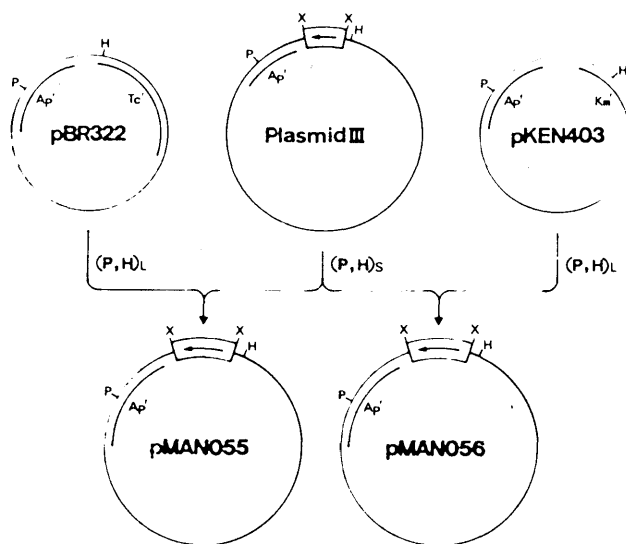
DNA sequence analysis of the chromosomal *micF* deletion. (A) Strategy for nucleotide sequencing. The *micF-ompC* region on the mutant chromosome which was cloned into pMAN042 is shown. The symbols and abbreviations used are described in the legend to Fig. 1. Hc, *HincII*. Small arrows outside the box indicate fragments used for sequencing, with the position of the  $^{32}\text{P}$ -labeled 5' end indicated (●). The broken region of an arrow indicates that the sequence of that region was not determined. (B) Nucleotide sequence around the *micF-ompC* region. The nucleotide sequences determined are underlined. The *micF* region that was deleted and replaced by the  $\text{Km}^r$  gene-carrying fragment is boxed. Dots between the two strands indicate sequences complementary to *ompF* mRNA. Arrows, Transcriptional initiation sites for *micF* and *ompC*. Pribnow boxes (PB) and -35 regions for the *micF* and *ompC* promoters are also indicated. A heavy line above the sequences indicates the 120-bp fragment used as a probe for the hybridization analysis (Fig. 3). This fragment was kindly prepared by T. Mizuno. The broken line indicates that the exact location of the terminus was not determined.

Fig. 2-5



Expression of *ompF* and *ompC* in the *micF* deletion mutant. Strains HO201 (wild-type) and SM3002 ( $\Delta micF1$ ) were grown with the indicated concentrations (wt/vol) of sucrose. Triton X-100-insoluble fractions (25  $\mu$ g of protein) were prepared from cell envelopes and analyzed on polyacrylamide gels. The positions of OmpC, OmpF, and OmpA are indicated.

Fig. 2-6




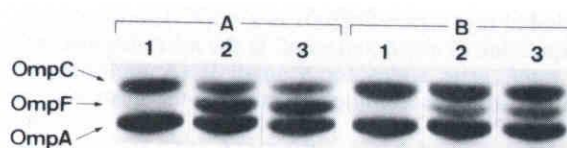
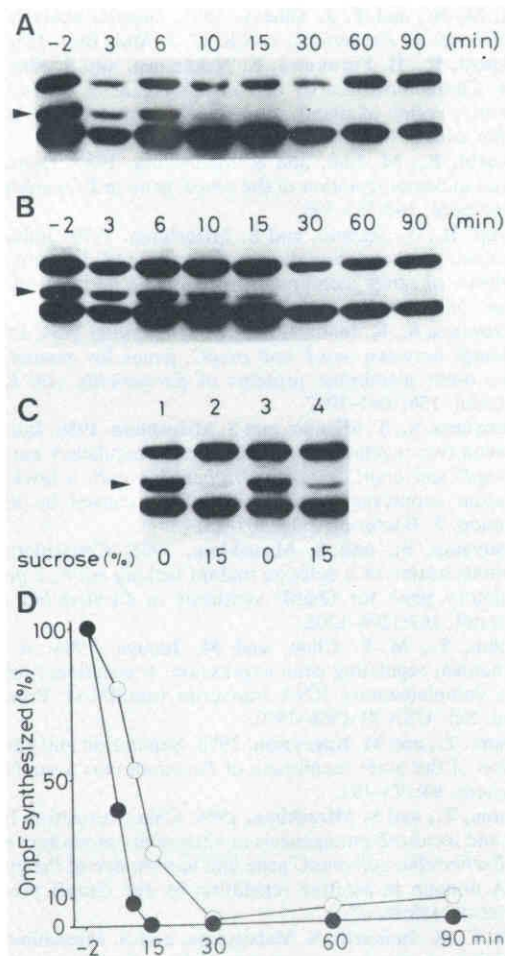
Construction of *micF* gene-carrying plasmids pMAN055 and pMAN056. In plasmid III, the *micF*-carrying CX28 fragment (300 bp ) is inserted between the *Xba*I sites (X). The arrow in the box represents *micF*. The 1.0-kb *Pst*I-*Hind*III fragment from plasmid III was ligated with the 3.6-kb *Pst*I-*Hind*III vector fragment from pBR322 or the 3.8-kb *Pst*I-*Hind*III vector fragment from pKEN403 to construct pMAN055 and pMAN056, respectively. The structures of the two plasmids thus constructed were confirmed by DNA restriction analysis. See the legend to Fig. 1 for other abbreviations.

Fig. 2-7



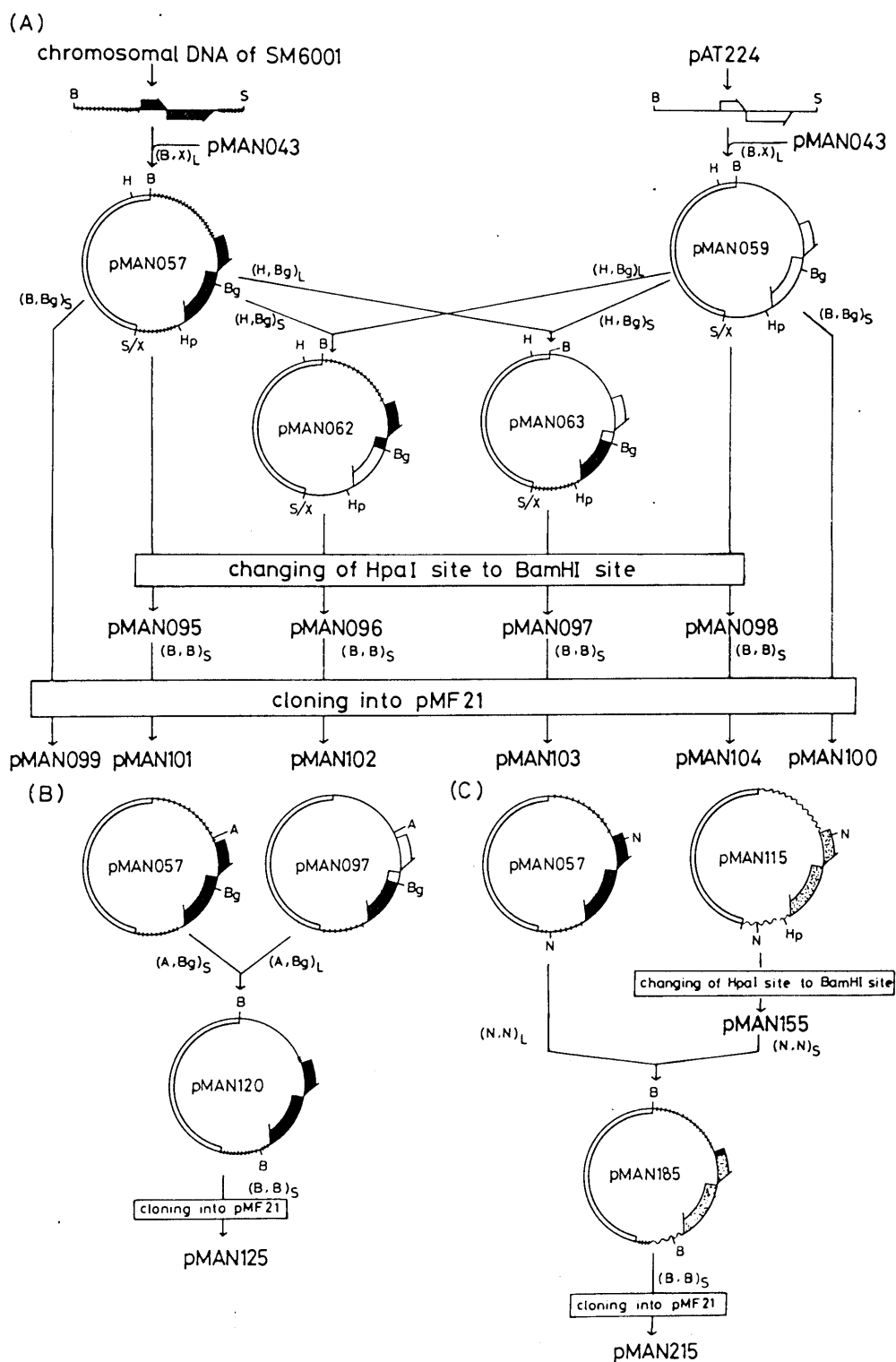
Effect of the copy number of *micF* on expression of *ompF*. Strains MC4100(pMAN055) (lanes 1), MC4100(pMAN056) (lanes 2), and MC4100 (lanes 3) were grown in (A) medium A and (B) medium A supplemented with 8% (wt/vol) sucrose. Triton X-100-insoluble fractions (25  $\mu$ g of protein) were prepared from cell envelopes and analyzed on polyacrylamide gels. The positions of OmpC, OmpF, and OmpA are indicated.

Fig. 2-8



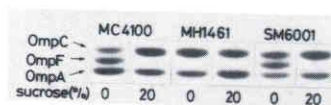
Pulse-labeling experiment. MC4100 (A) and SM3001 (B) were cultured at 37°C. At the logarithmic growth phase, sucrose was added to a final concentration of 15% (wt/vol), and then cells were labeled for 1 min at the indicated times with 10  $\mu$ Ci of [ $^{35}$ S]methionine. As a control, cells were labeled before the addition of sucrose. Outer membrane protein fractions were prepared from the labeled cells and analyzed on urea-SDS-polyacrylamide gels. The gels were then processed for fluorography. (C) MC4100 (lanes 1 and 2) and SM3001 (lanes 3 and 4) which had been cultured with the indicated concentrations of sucrose (wt/vol) were pulse-labeled with [ $^{35}$ S]methionine and then analyzed for outer membrane proteins as described for panels A and B. The arrowheads indicate the position of the OmpF protein. (D) The fluorograms shown in panels A and B were subjected to densitometric scanning to quantitate the amounts of the OmpF protein synthesized in 1 min at the indicated times. Symbols: ●, MC4100 (wild type); ○, SM3001 ( $\Delta micF$ ).

Fig. 3-1



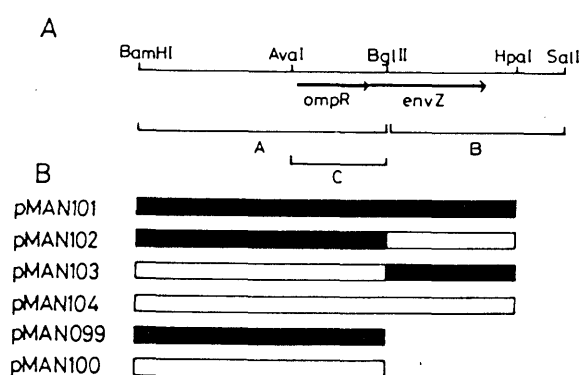
Construction of plasmids carrying the *ompB* region with various mutations. Symbols: and *ompR* and *envZ* genes derived from SM6001, respectively; and *ompR* and *envZ* genes derived from wild-type cells; and *ompR* and *envZ* genes derived from YO160; —, —, and —, —, chromosomal DNA derived from SM6001, the *ompB*<sup>+</sup> wild-type strain, and YO160, respectively; a DNA fragment from pMAN043. H, *Hind*III; B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; Hp, *Hpa*I; S, *Sal*I; X, *Xho*I; A, *Ava*I; N, *Nsp*V. Restriction sites are shown on plasmids. S and L outside the parentheses denote the smaller and larger fragments, respectively, formed on endonuclease digestion.

Fig. 3-2



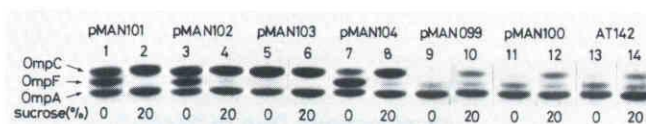
Expression of *ompF* and *ompC* in the *envZ* suppressor (*sez*) mutant. Strains MC4100 (wild type), MH1461 (*envZ11*), and SM6001 (*envZ11 sez*) were grown with the indicated concentrations (wt/vol) of sucrose. Outer membrane protein fractions (25  $\mu$ g of protein) were prepared from cell envelopes and analyzed on polyacrylamide gels. The positions of OmpC, OmpF, and OmpA are indicated.

Fig. 3 - 3



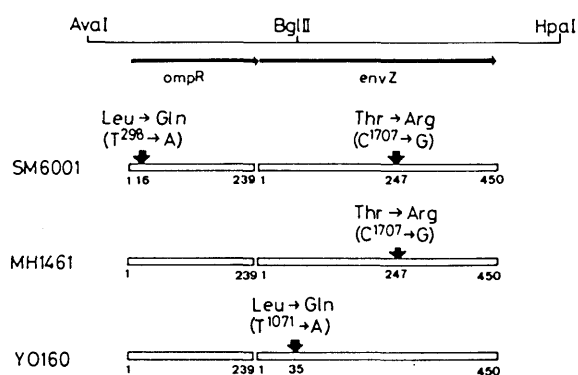
Restriction map around the *ompB* region cloned into pMF21. (A) The coding regions for the *ompR* and *envZ* genes are indicated by arrows. Fragment A is a 3.1-kb *Bam*HI-*Bgl*II fragment which contains the entire *ompR* gene, the coding region for the NH<sub>2</sub>-terminal portion of the EnvZ protein, and an unknown region located upstream from the *ompB* promoter. Fragment B is a 1.4-kb *Bgl*II-*Hpa*I fragment which contains the coding region for the EnvZ protein devoid of the NH<sub>2</sub>-terminal portion. Fragment C is a 1.2-kb *Ava*I-*Bgl*II fragment carrying the entire *ompR* gene and the coding region for the NH<sub>2</sub>-terminal portion of the EnvZ protein. (B) The *ompB* region cloned into pMAN101, pMAN102, pMAN103, pMAN104, pMAN099, and pMAN100 is indicated. The *Hpa*I site has been changed to a *Bam*HI site in all of these plasmids (cf. Fig. 1). ■ and □, Fragments derived from the *sez* mutant (SM6001) and the wild-type strain, respectively.

Fig. 3-4



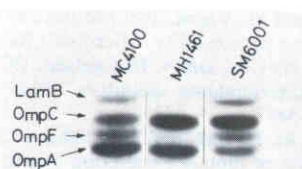
Expression of the *ompF* and *ompC* genes in SG480Δ76, a  $\Delta ompB$  strain harboring the indicated plasmids. The gene constructions for individual plasmids are shown in Fig. 3. These strains were grown with the indicated concentrations (wt/vol) of sucrose, and then the outer membrane proteins were analyzed on polyacrylamide gels. Lanes 13 and 14 contained the proteins from AT142, a  $\Delta envZ$  strain. The positions of OmpC, OmpF, and OmpA are indicated.

Fig. 3-5



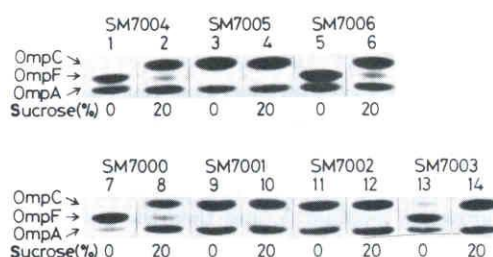
Summary of the base alterations and amino acid changes in the *ompB* regions of SM6001, MH1461, and YO160. Alterations in the nucleotide sequences and those in the deduced amino acid sequences are shown. The positions of the bases are shown as suffixed numbers, which were taken from the published nucleotide sequence for the *ompB* operon. The positions of amino acid residues in the OmpR and EnvZ portions are numbered from the respective NH<sub>2</sub> termini.

Fig. 3-6



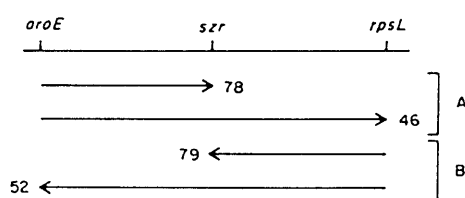
Expression of the LamB protein in MC4100, MH1461, and SM6001. MC4100 (wild type), MH1461 (*envZ11*), and SM6001 (*envZ11 ompR77*) were grown in M9 in the presence of 0.2% maltose (and 0.2% glycerol), and then the outer membrane proteins (25  $\mu$ g) were analyzed on polyacrylamide gels. The positions of LamB, OmpC, OmpF, and OmpA are indicated.

Fig. 4-1



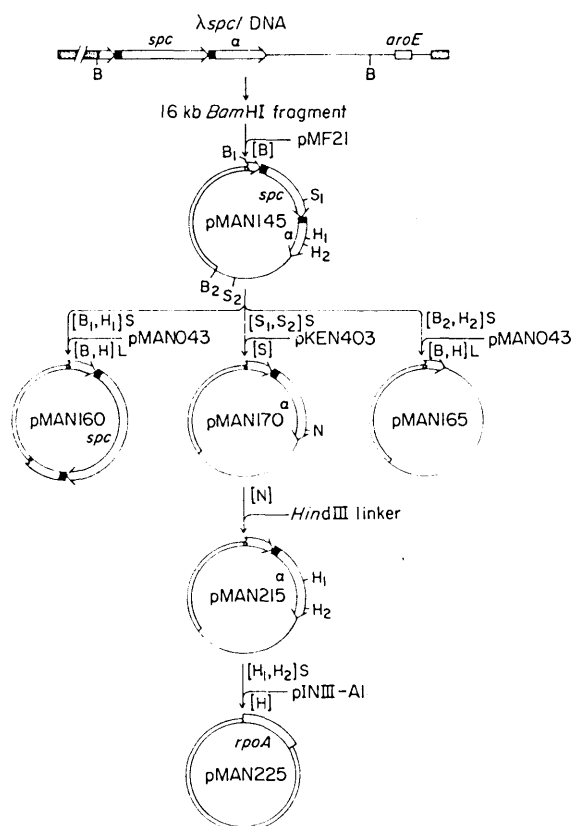
Effect of the *szr* mutation on expression of the *ompF* and *ompC* genes regulated by the *envZ11 ompR77* allele. SM7004 (*envZ<sup>+</sup> ompR<sup>+</sup>*), SM7005 (*envZ11 ompR<sup>+</sup>*) and SM7006 (*envZ11 ompR77*) were constructed by transduction using SM6503 as the recipient and MC4100, MH1461 and SM6001, respectively, as the donors. SM7000 (*envZ<sup>+</sup> ompR<sup>+</sup> szr*), SM7001 (*envZ11 ompR<sup>+</sup> szr*) and SM7002 (*envZ11 ompR77 szr*) were constructed similarly using AB2847 as the recipient. SM7003 (*envZ11 ompR77 szr<sup>+</sup>*) was constructed by transduction using SM7002 as the recipient and SM6001 as the donor (see the text). Cells were grown with the indicated concentrations (w/v) of sucrose. Outer-membrane protein fractions (25  $\mu$ g of protein) were analyzed on polyacrylamide gels. The positions of OmpC, OmpF and OmpA are indicated.

Fig. 4-2



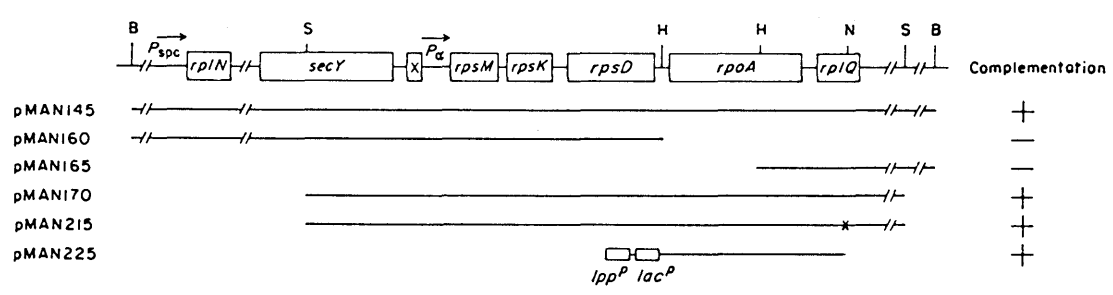
Chromosomal mapping of the *szr* mutation. The numbers represent the P1 cotransduction frequencies as percentages between the indicated markers. The selected and unselected markers are indicated by the arrow tails and the arrow heads, respectively. Lines A, SM7002 (*aroE*<sup>+</sup> *rpsL*<sup>+</sup> *envZ11* *ompR77* *szr*) and SM6502 (*aroE* *rpsL* *envZ11* *ompR77* *szr*<sup>+</sup>) were used as the donor and recipient, respectively. Lines B, SM6502 and SM7002 were used as the donor and recipient, respectively. In each case, at least 200 transductants were purified and scored.

Fig. 4-3



Construction of plasmids carrying various lengths of DNA in the *spc* operon-*aroE* gene region.  $\blacksquare \rightarrow$  denotes the ribosomal protein operons and the directions of transcription. The position of the promoter is indicated by  $\blacksquare$ .  $\square \rightarrow$  denotes truncated ribosomal protein operons devoid of the promoter. —,  $\square$  and  $\square$  denote DNA fragments derived from the chromosome, vector plasmid and bacteriophage  $\lambda$ , respectively. The restriction sites are shown on the plasmids: B, *Bam*HI; S, *Sma*I; H, *Hind*III; N, *Nru*I. When one enzyme cleaves more than one site of a plasmid, the sites are distinguished with suffixes, e.g. B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. S and L outside square brackets denote the smaller and larger fragments, respectively, formed on endonuclease digestion. kb, 10<sup>3</sup> base-pairs.

Fig. 4-4



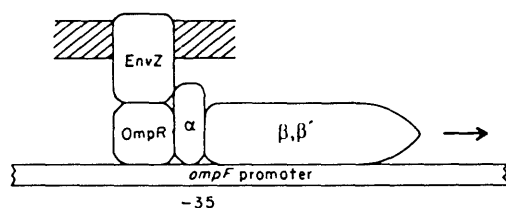
Plasmids carrying different portions of the DNA around the  $\alpha$  operon. Genetic restriction maps around the  $\alpha$  operon (Cerretti *et al.*, 1983; Meek & Hayward, 1984; Bedwell *et al.*, 1985) are shown. B, *Bam*HI; S, *Sma*I; H, *Hind*III; N, *Nru*I. The lines under the map represent DNA fragments cloned on the indicated plasmids. The X indicates the position of insertion of the *Hind*III linker. The lipoprotein promoter ( $lpp^P$ ) and the lactose promoter-operator ( $lac^P$ ) in pMAN225 were derived from pINIII-A1. The results of complementation tests as to the *szz* mutation are also shown. + and - indicate, respectively, that the respective plasmids did or did not complement the *szz* mutation.


Fig. 4-5



Expression of the *ompF* and *ompC* genes in SM7002 harboring the indicated plasmids. These strains were grown in medium A, and then the outer-membrane proteins were analyzed on polyacrylamide gels. The outer-membrane protein profiles of SM7002 (*envZ11 ompR77 rpoA77*) and SM7003 (*envZ11 ompR77 rpoA<sup>+</sup>*) are presented as a control.

Fig. 4-6



Proposed arrangement of molecules around the *ompF* promoter. The subunit structure of RNA polymerase was according to the model proposed by Meisenberger *et al.* (1981). The  $\sigma$  subunit is not shown. The direction of transcription ( $\rightarrow$ ) and the -35 region (-35) are indicated.  denotes the cytoplasmic membrane.

## 謝辞

本研究の機会を与えていただき、終始、変わらぬ御指導、御鞭撻を賜わりました名古屋大学農学部教授、東京大学応用微生物研究所教授、水島昭二先生に厚く御礼申し上げます。

日々の研究討論を通じ、有益な御助言、御教示をいただきました名古屋大学農学部、水野猛先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、貴重な御意見、御助力をいただきました名古屋大学農学部、市原茂幸先生、山形秀夫先生、中村研三先生に深く感謝致します。

山田寿美博士をはじめとします名古屋大学農学部醗酵化学研究室の皆様、東京大学応用微生物研究所第4研究部の皆様の暖かい御協力に對して御礼申し上げます。

## 報文目録

- 1 . Inokuchi, K., Mutoh, N., Matsuyama, S., and Mizushima, S. (1982)  
Nucleic Acids Res. 10 : 6957.
- 2 . Matsuyama, S., Inokuchi, K., and Mizushima, S. (1984)  
J. Bacteriol. 158 : 1041.
- 3 . Nara, F., Inokuchi, K., Matsuyama, S., and Mizushima, S. (1984)  
J. Bacteriol. 159 : 688.
- 4 . Matsuyama, S., and Mizushima, S. (1985)  
J. Bacteriol. 162 : 1196.
- 5 . Nara, F., Matsuyama, S., Mizuno, T., and Mizushima, S. (1986)  
Mol. Gen. Genet. 202 : 194
- 6 . Matsuyama, S., Mizuno, T., and Mizushima, S. (1986)  
J. Bacteriol. 168 : 1309.
- 7 . Matsuyama, S., and Mizushima, S. (1987)  
J. Mol. Biol. 195 : 847.
- 8 . Aiba, H., Matsuyama, S., Mizuno, T., and Mizushima, S. (1987)  
J. Bacteriol. 169 : 3007.