大腸菌外膜タンパク質遺伝子の転写活性化機構

前田 純夫

大腸菌外膜タンパク質遺伝子の
転写活性化機構

前田　純夫

略語表

本論文では以下の略語を用いた。

DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
mRNA	messenger RNA
bp	base pair
A	Adenine
G	Guanine
C	Cytosine
T	Thymine
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
dCTP	Dedoxycytidine 5'-triphosphate
dNTP	Deoxyribonucleoside 5'-triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
SDS	Sodium dodecyl sulfate
DTT	Dithiothreitol
BSA	Bovine serum albumine
M	mol／l

目次

第一章　序論

大腸菌を中心とする原核生物を対象とした基礎研究は、長期間にわたって分子生物学の発展に先導的な役割を果たしてきた。大腸菌を対象として得られてきた分子生物学の知識は、より高等な生物における複雑な生理現象を分子レベルで理解していく上での土台となっている。また、大腸菌で始められた組み換えDNA実験技術は、多くの生物科学の基礎研究の分野から微生物による物質生産等の応用研究の分野にいたる幅広い領域において革新的な進歩をもたらしてきた。今では多種多様な真核生物を用いた分子生物学、細胞生物学の研究が、より高次の生理現象の解明を目指して急速にかつ多面的に展開されつつある。しかし、今日でもなお大腸菌は最も解析の進んだ生物のモデル系として極めて重要な研究対象であることには変わりはない。なかでも遺伝子発現の調節のような全生物に共通して存在する細胞内の基本的プロセスの分子機構を解明していくためには、蓄積した情報量が豊富で取り扱いの易しい大腸菌の系は今だに格好の系であると言ってよい。また、応用的見地から見ても、既に遺伝子工学的手法を用いた物質生産の開始されている大腸菌での遺伝子調節系をより詳細に明らかにしていくことは、今後のより高度な物質生産技術の開発にもつながる重要な研究課題であるといえよう。

遺伝子の発現調節機構の研究は、1960年代初頭にJacobとMonodが提唱した「オペロン説」[1]によって本格的な幕開けを迎えた。以来、分子遺伝学的成果を中心にして数多くの重要な発見が相次ぎ、1970年代までには遺伝子発現調節の基本

概念が確立されるに至った [2,3] 。すなわち、遺伝子の発現制御は主として遺伝子発現の最初の段階である転写開始の段階で行われており、その調節には細胞内外の環境変化に応答して調節を行うDNA結合性の転写調節タンパク質が重要な働きをしている、という概念である。この転写開始段階での調節はエネルギー的に見てもmRNA合成の際に多量に必要となるATP等の高エネルギー物質の浪費を防ぐという利点を有する合目的的な機構であると考えられた。その後、転写開始以外の段階での調節機構も数多く見つかってはきたが [4,5] 、現在においてもこの転写開始の調節が遺伝子調節の主流を占める様式であることには変わりはない。また、原核生物のみならず真核生物においても、この様式が広く使われていることも近年明かとなってきた [6] 。

さて、このような転写開始の調節は、転写抑制と転写活性化という二種類の様式に大別できることが現在までに明かとなっている。このうち転写抑制については、先駆的な研究が成された大腸菌ラクトースオペロンの系 [7,2] やバクテリオファージλの系 [8,9,14] 等において、転写抑制因子の結合するオペレーターDNA部位が主として転写開始点付近に存在していたことから、次のような機構が考えられた。すなわち、転写開始点付近に結合した転写抑制因子が、転写酵素RNAポリメラーゼのプロモーターへの結合を物理的に阻害するという機構である。この仮説はその後のin vitroでの生化学的解析の結果 [10,11] 等によってその正当性が確認されると共に、他の系でのオペレーター部位の位置に関する同様の事例 [2,12] から、転写抑制機構の一般的な説明のモデルとして広く受け入れられるに至って

いる。一方、転写活性化に関しても、同じくラクトースオペロンの系やバクテリオファージλの系等でその解析が始められ、転写活性化因子の結合部位等を含むプロモーター領域DNA構造が明らかにされた［7,13］。しかしそれらのプロモーター領域構造には転写活性化因子結合部位がプロモーターの上流に存在するという共通点以外の目立った特徴は認められず、その作用メカニズムの説明も複数考えられることがわかった［13］。その後他の転写活性化系でも同様の解析が成されたがやはり全ての例に共通するような規則等を見い出すことはできなかった［13］。現在ではいくつかの間接的データから次の二つの説がそのメカニズムとして有力と考えられるに至っている。その一つは転写活性化因子が転写酵素RNAポリメラーゼとのタンパク質-タンパク質相互作用によってRNAポリメラーゼの転写活性を高めるとする説［15,16］、もう一つは転写活性化因子がDNA結合によりプロモーターDNA構造を転写に有利な形に変形させるとする説［7,16］、である。ごく最近になってこれらの説のうち特に前者を支持するデータ［18,19,20］がいくつか得られてきてはいるものの未だ最終的な結論は出ていないと言ってよい。また最近真核生物の系を含めたより多様な転写調節系での解析が進められた結果、転写開始点からの位置に関して驚くべき許容性を示すエンハンサー配列の発見［21］やDNAのスーパーコイリング（super coiling）［22］、ループピング（looping）［23,24］、あるいはベンディング（bending）［25,26,27］といったDNA高次構造の転写調節への関与、等が明らかになるなど、分子レベルでの転写調節機構の多様性あるいは複合性という観点が新たな研究課題として注目を集めつつある。

さて、このような遺伝子発現調節機構の基本原理を追究する還元論的研究の流れの一方で、個々の遺伝子調節系における環境への応答の諸過程から遺伝子調節の結果としての細胞機能あるいは細胞構造の変化といったものまでを、総合的に理解していくこともまた、生物機能の全体的把握のために重要な研究の一方向である。本論文で研究の対象とした大腸菌外膜タンパク質遺伝子の系も、そうした観点から古くから精力的な研究が行われてきた系の一つである。

大腸菌外膜の研究は、MiuraとMizushimaによる外膜の分離と精製法の確立 [28] に端を発し、まずはその構成成分や膜構造の研究へと進展していった [29] 。グラム陰性細菌である大腸菌には、細胞質膜の外側にペプチドグリカン層と外膜が存在する (Fig.1) 。細胞質膜と外膜との間には、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形成されている。外膜は外側がリポ多糖内側がリン脂質から成る非対称的二重層構造をとっており、外膜主要タンパク質と呼ばれる数種のタンパク質が多量に組み込まれている。これらのタンパク質はOmpA,OmpC,OmpF,主要リポタンパク質などが代表的なものである。これらは皆、細胞当り10^5-10^6分子存在し、大腸菌中で最も多く発現している部類に属する。これらのうちOmpCとOmpFは構造的、機能的に非常に類似しており、各々三量体を形成して外膜における低分子物質の透過孔となっている。また、細胞表層構造の安定化に寄与しており、種々のファージ、コリシンに対するリセプターとしての機能も有する [29] 。

このようなOmpC,OmpFの構造及び機能を解析していく過程で、これら二つのタン

パク質の合成が培地の浸透圧変化によって全く逆の影響を受けるという興味深い現象が発見された [30,31] 。これは培地が低浸透圧の時にはOmpFが、高浸透圧の時にはOmpCが、それぞれ優先的に合成されるというものだった (Fig.2-A) 。その後この調節が転写のレベルで行われていることが示され [32-35] 、浸透圧に応答した遺伝子発現調節機構の存在が明かとなった。この浸透圧による遺伝子発現調節機構の発見は次のようないくつかの観点からその重要性が注目された。まず第一に、浸透圧への応答は、細胞構造をとるすべての生物において普遍的重要性を持つと考えられる点である。第二に、それまでに解析されていた他の遺伝子調節系の多くがアミノ酸や糖のような「物質」に応答した調節系であったのに対し、浸透圧という物理的な「力」に応答した調節系であった点である。第三に、一つの刺激に対して二つの遺伝子が全く逆のパターンで調節される、というユニークな調節系であったという点である。そこで、このような興味に基づいてompC, ompF両遺伝子の発現調節系の解析が筆者の所属する研究室を含めた複数の研究グループによって活発に展開されることとなった。

ompC,ompF遺伝子の発現調節系の解析はまず遺伝学的手法によって始められた。ompC,ompF両遺伝子は大腸菌染色体上で各々47分、21分という全く別の場所に同定された(Fig.2-B) [32-35] 。また、これらの発現調節に直接関与すると考えられる二つの遺伝子ompRとenvZが共に染色体上75分に同定された(Fig.2-B) [32-35] 。さらにこれらの遺伝子の各種変異株が作成され解析が進められた結果、次ぎのような浸透圧応答のモデルが提唱された [35-38] 。すなわち、OmpRタンパク質は

ompC,ompF両遺伝子の転写を活性化する転写活性化因子であり、EnvZタンパク質は浸透圧の変化を感知し細胞内にシグナルを発する膜タンパク質である、というものである（Fig.3）。その後生化学的手法等によってこのモデルが確認されるとともに［39-42］、EnvZタンパク質からOmpRタンパク質へのシグナルの実体がEnvZタンパク質の自己リン酸化とリン酸化型EnvZからOmpRタンパク質へのリン酸基転移（OmpRのリン酸化）であることが近年明かとなってきた(Fig.4)［43-47］。

一方、ompC,ompF両遺伝子の発現,調節に必要なプロモーター領域の解析も、クローン化DNAを用いて進められた［48,49］。その結果ompC,ompFのプロモーター領域は共に転写開始点から上流の約100塩基対の領域であることが判明した(Fig.4)［48,49］。また、これらの領域は大腸菌における通常のプロモーター（-35,-10領域）とその上流領域（約70塩基対）から成ることがわかった(Fig.4)［48-50］。この上流領域はその後の遺伝学的及び生化学的解析から、OmpRタンパク質が特異的に結合するcis-actingな転写活性化DNA領域であると確認された(Fig.4)［51,52］。

以上のような解析から、ompC、ompF遺伝子調節系においては主として二つのプロセスが重要な役割を果たしていることが現在までに明かとなってきた。まず一つは、EnvZタンパク質が細胞内外の浸透圧差を感知しOmpRをリン酸化することによって、浸透圧変化という物理的情報を細胞内の遺伝子発現調節のシグナルへと変換していく、刺激の受容から情報伝達のプロセスである。また、もう一つは、EnvZからシグナルを受け取ったOmpRタンパク質がompC、ompFのプロモーター上流

領域に結合し転写の活性化を行うという転写活性化のプロセスである。

本論文においてはこのような大腸菌外膜タンパク質遺伝子の調節機構解明という研究の流れを踏まえつつ、さらに本章前半に述べたような転写調節の分子機構解明という、より普遍的現象の解明を目指すために、上記二つのプロセスのうち特に後者のOmpRによる転写活性化という問題に焦点を当ててその解析を行ったものである。特に本研究においては、従来から行われているプロモーター領域DNAの一次構造の解析のみならず、DNAの立体構造に着目して一連の解析を行った点に大きな特徴がある。以下、第二章では、ompCプロモーター領域における二つの機能領域であるプロモーター（-35,-10領域）とその上流のOmpR結合領域との間に挿入変異を導入し、これら二つの領域の立体配位の重要性を示すことにより、OmpRとRNAポリメラーゼとのタンパク質-タンパク質相互作用の重要性を示唆した。第三章では、OmpR結合領域のプロモーターに対する逆位変異を作成し、この場合でも十分に機能すること及び順向きの時と同様の立体配位の重要性を示した。第四章では、ompCプロモーターのOmpR結合領域におけるOmpRの結合様式を解析し、この領域がおそらく三つのOmpR結合部位から構成されていること及び単一のOmpR結合部位のみで活性化機能を有することを示した。第五章では、第四章の結果に基づいて20merのOmpR結合部位DNAを合成し、これが実際にin vitroでOmpRと特異的に結合し、in vivoでも転写活性化ドメインとして機能しうることを示した。最後に、第六章では、第二章から第五章までの結果を基にしてOmpRのDNAへの結合様式及びOmpRによる転写活性化の分子機構の全体像について総合的な考察を試み、それぞ

れについて新たなモデルを提示した。

第二章　ompCプロモーターとその上流領域との相互作用の解析（1）：挿入変異の作成とその解析

【緒言】

遺伝子の発現とその調節の過程においては、遺伝子の転写開始点近傍のDNA構造が重要である。DNAの一次構造、即ち塩基配列が転写酵素（RNAポリメラーゼ）及び各種の転写調節因子のDNAの特異的結合に重要であることに関しては既に多くの報告があり、現在も様々な系で新たな配列の同定がなされつつある。一方、そのような特異的塩基配列が同一のプロモーター領域中に複数存在する場合は、そうした複数の特異的塩基配列間の距離関係がまた遺伝子の発現及び調節のプロセスにおいて重要な役割を果たしているという例も、近年いくつか見つかってきている。例えば、大腸菌のプロモーター-35,-10領域は各々6塩基対からなっているが、これらの間の距離は17bp±1bpであることがプロモーター活性を発現するために必須である［53］。また、大腸菌の糖の代謝系に置ける転写調節因子であるCRP（cAMP receptor proten）の結合部位は、その制御する遺伝子ごとにプロモーターとの距離関係が様々であり、その位置によっては通常の転写活性化因子としてではなく、転写抑制因子として働くことが知られている［16,17］。そうしたいくつかの例の中で、近年大腸菌のアラビノース代謝系の遺伝子群であるaraBADオペロン制御系において興味深い報告がなされた［23］。araBADオペロンには、転写抑制機構が働いている。この転写抑制には、互いに約200bpという、かなり長い距

離を隔てた二つのオペレーター部位が重要であることがわかった。そして、この二つの部位の間に様々な長さの塩基対を挿入したところ興味深いことに転写抑制は、挿入塩基対の長さが10の整数倍に相当するときのみ働いたのである。ここで、この10の整数倍という数字が、DNAらせん構造における10.5bpで一回転という周期性と一致することから、この２つの部位のDNAらせん上での適正な立体配位が転写抑制機構に重要であることが示唆された。また、この結果から、転写抑制がDNAのループピング（looping）を介する二つの転写抑制タンパク質間の相互作用によって行われる、というモデルが提示された。このaraBADオペロンにおける実験結果は、新たな転写抑制機構の発見という意味と同時に、DNA分子上での特異的塩基配列間の距離と立体配位の密接な関係及び重要性を示したという点で注目すべき結果であった。

本章では、以上のような例で示した特異的塩基配列間のDNA分子上での距離と立体配位の重要性が、OmpRによる転写活性化機構においても存在するかどうかを試みたものである。こうした解析によって、いまだ不明の部分の多い転写活性化プロセスの解明という点で、従来からのDNA一次構造のレベルでの解析を中心とするアプローチでは得ることのできなかった新たな視点からの知見を得ることを期待した。以下本章では、まずompCプロモーターの上流領域の構造と機能について、いくつかの解析を行った。次いで、上に述べた観点からompCの-35,-10領域とその上流領域の間に種々の長さの塩基対を挿入し、プロモーター活性への影響を調べた。そして、このような解析の結果（1）ompCプロモーター領域においては、-35

,-10領域とその上流領域がDNAらせん上で特異的立体配位をとることが転写活性化に重要であること、(2) この二つの領域の相互作用は (1) で述べた立体配位の条件さえ満たされればある程度変化しても維持されうること、という二つの重要な結論を導くことができた。

また以上の結果に基づいて、転写活性化プロセスにおけるOmpRとRNAポリメラーゼとのタンパク質ータンパク質相互作用の重要性について考察を試みた。

【実験材料・方法】

(a) 使用菌株

E.coli K-12株由来の次の菌株 [54] を本章の実験に用いた。

MC4100 recA (Δ lacU169,araDB,rpsL,relA,flbB,thiA,gyrA,recA1)、

MH1160recA (Δ lacU169,araDB,rpsL,relA,flbB,thiA,gyrA,recA1,ompR101)

(b) 実験材料・試薬

制限酵素、T4リガーゼ、DNAポリメラーゼⅠのklenow fragment、ジデオキシDNAシークエンシングキット、合成XbaIリンカー (dCTCTAGAG)、BamHIリンカー (dCCGGATCCGG)、XhoIリンカー (dCCTCGAGG)、BglⅡリンカー (dCAGATCTG)、オリゴヌクレオチドプライマー (dGTTTTCCCAGTCACGAC)、逆転写酵素 (RAV-2) は、すべて宝酒造より購入した。これらの使用条件は製品マニュアルに従った。DNaseIはWorthington Co.から、ONPG (o-nitrophenyl-β-D-garactopyranoside) はSigma Chemical.Co.から、〔α-^{32}P〕dCTP (3000Ci／mmol) と〔γ-^{32}P〕dATP (5000Ci／mmol) はAmersham International.からそれぞれ購入した。

(c) 組換えDNA技術

DNA塩基配列の決定はジデオキシ・チェイン・ターミネイション法 [55] で行った。他の組換えDNA技術の多くは文献 [56] に従った。

(d) β-ガラクトシダーゼ活性測定

β-ガラクトシダーゼ活性の測定は基本的にMillerらの方法 [57] にしたがった。MediumA [31] にシュクロースを15% (wt.／vol.) になるように添加し、対数増

殖期中期（ADS30）まで菌を増殖させた。培養液1mlを遠心分離により集菌し、250mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.1）1mlに懸濁した。菌懸濁液から10～200μlをβ-ガラクトシダーゼ活性測定に用いた。残りの菌懸濁液を使ってOD_{600nm}を測定し菌密度を求めた。

また、大まかなβ-ガラクトシダーゼ活性の有無はマッコンキー・ラクトースプレート上でのコロニーの色から判断した。

(e) プラスミドの作成

本章で用いたプラスミドの作成の詳細はFig.5及びFig.8に示した。なお、本章のプラスミド作成に使用したpOMPC-X219,pOMPC-X49,pOMPC-A5,pOMPC-B70,pOMPC-B98は文献［48］、pOY-009,pOYL-101Wは文献［50］を参照。

(f) OmpRタンパク質の精製

OmpRタンパク質の精製はJoらの方法［51］に従った。ただしハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーのステップは省略した。

(g) DNaseIフットプリント実験

DNaseIフットプリント実験はGalasとSchmitzらの方法［58］に基づいて行った。

5’末端を^{32}Pラベルした DNA断片（10^5cpm）を精製OmpR（1～6 μg）と混合し、10mMTris-HCl（pH7.4）、50mMKCl、1mMEDTA、1mMDTT、5%グリセロール、0.005%BSAの条件で全量15μlにして、37℃で30分インキュベーションを行った。その後、その混合液を10mM$MgCl_2$、5mM$CaCl_2$ の存在下でDNaseIを0.5μg／mlになるように加え、25℃で60秒反応を行った。反応は5M酢酸アンモニウムの添加により停

止させた。反応停止後、エタノール沈澱によりDNAを回収し、8M尿素-8Mポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析した。マーカーは、Maxam-Gilbertの方法［59］により、G特異的切断反応を行って作成した。

（h）逆転写酵素マッピング（プライマー伸長法）

菌体内全RNAは、Aibaらの熱フェノール法［60］によってMediumA-15％sucroseで培養した菌から調製した。

約250μgのRNAと3.3pmolの合成オリゴヌクレオチドプライマー（dGTTTTCCCAGTCACGAC）を混合し、凍結乾燥した。乾燥サンプルを100μlのハイブリダイゼイション緩衝液（80％ホルムアミド、40mMpiperagine-N,N'-bis(2-ethane-sulfonic acid)(pH6.4)、1mMEDTA、0.4MNaCl）に溶かし、80℃で15分加熱後、44℃で3時間保温した。その後、RNA、DNAを3倍量のエタノールで沈澱回収し、20μlの逆転写酵素反応用緩衝液（50mMTris-HCl(pH8.3,at42℃）、8mM$MgCl_2$、30mMKCl、各75μM4dNTP、10μCi〔α-^{32}P〕dCTP(3000Ci／mmol)）に溶かした。この溶液に逆転写酵素10unit（1μl）を添加し、42℃で1時間反応させた。フェノールの添加により反応を停止させ、フェノール抽出後エタノール沈澱によりDNAを回収した。回収サンプルは、8M尿素-8Mポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析した。

【結果】

(a) ompCプロモーター上流領域の構造と機能

ompCプロモーター領域の塩基配列をFig.6に示した。以前のMizunoらの研究[48]により、-35領域から上流の61bpが、ompCプロモーターの発現に必要であることがわかっている。この上流領域には、二つの完全に一致した10bpの配列（TGAAACATCT,-89～-80と-68～-59、Fig.6-(a)矢印aとb）と一つのそれらに類似した配列（aGtAtCATaT,-48～-39,Fig.6-(a)矢印c；繰り返し配列a及びbと一致する塩基を大文字で、一致しない塩基を小文字で各々示した）が、11bpあるいは10bpの間隔でタンデムに並んで存在している。この三つの繰り返し配列は10.5bpで一回転するB型DNAらせん構造においては、同じ側を向くことが予想される。

本章ではまずこの上流領域の構造と機能をより詳しく解析するため、この上流領域を部分的に持つ三つのプラスミドpCD-94,pCD-78,pCD-35を作成した（Fig.6-(b)）。pCD-94は、プロモーター領域を含むompC遺伝子の-94～+95の領域をlacZ遺伝子につないだ低コピープラスミドである。pCD-78は、pCD-94の-94～-79の領域を欠失したものである。pCD-35は、ompCプロモーター上流領域中の-58～-35の24bpを23bpの合成ヌクレオチドによって置換したものである。これらプラスミドの作成の詳細はFig.5に示した。

これらプラスミドをompR$^+$あるいはompR$^-$の菌に導入してプロモーター活性をβ-ガラクトシダーゼ活性によって測定した（Fig.6-(b)）。pCD-94とpCD-78の結果は、以前Mizunoらが高コピープラスミドで行った結果と同じ傾向を示した[48]

。即ち、-94より下流領域があれば、OmpRに依存したプロモーター活性が保たれるのに対して-78まで削ってしまうとその活性が急減する、という結果であった。pCD-35の結果からは、-58～-35の領域もOmpRに依存したプロモーター活性に必要であることがわかった。これらの結果を先に述べた三つの繰り返し配列a,b,cとの関連で見てみると、a,b,cが三つとも存在するときに十分なOmpR依存性のプロモーター活性が得られることがわかった。以上の結果は、この三つの繰り返し配列全部を含む領域が、OmpRタンパク質によるompCプロモーターの活性化に重要であることを示唆していると考えられる。

(b)転写活性化タンパク質OmpRのompCプロモーター上流領域への結合

ompCプロモーター領域におけるOmpRタンパク質の結合領域をより詳細に決定するため、精製OmpRを用いてDNaseIフットプリント実験を行った（Fig.7）。OmpRは、ompCプロモーター上流領域の-103～-79（bottom strand、以下の数字も同じ）の領域を顕著にDNaseI消化からプロテクトした（lane2）。さらに、OmpR濃度を上げるに従って-74～-41の領域もプロテクトするようになった（lane3.4）。これらの結果からOmpRはompCプロモーター上流領域の-103～-41という幅広い領域に結合部位を持つことが示された。また、この場合OmpRは親和性の異なる複数の結合部位に結合することが示唆された。一方、-77と-76の領域にはOmpR結合によるDNaseI感受性の増大が見られた。このことはこの領域のDNAのOmpR結合による構造変化を示唆していると考えられた。

(c)ompCプロモーター領域における一連の挿入変異の作成

ompCプロモーター領域における二つの機能ドメイン、即ち、-35,-10領域（RNAポリメラーゼ結合部位）とその上流領域（OmpR結合領域）との相互作用の性質を解析するため、これら二つの領域の間に種々の長さの合成ヌクレオチドを導入した（Fig.9）。合成ヌクレオチドの挿入は、まず、-35領域の直前にXbaIリンカーを導入し、そのXbaI部位を利用して順次合成リンカーを導入して行った。プラスミド作成の詳細は、Fig.8に示した。挿入塩基対の長さは、11bp,21bp,31bpの三つがB型DNAらせんの一回転10.5bpのほぼ整数倍になるように設定した（pCI-11, pCI-21,pCI-31）。これら一連の挿入変異を持つプロモーター領域を（a）の実験と同様に低コピープラスミド上でlacZ遺伝子と融合し、プロモーター活性を測定した。

（d）挿入変異プロモーターの活性

一連の挿入変異プロモーターを持ったプラスミドを、ompR$^+$あるいはompR$^-$の菌に導入してβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した（Fig.10）。その結果、ompR$^+$の菌において、挿入された塩基対の長さによってβ-ガラクトシダーゼ活性に興味深い変化が現れることがわかった。11bp,21bp,31bpのようにDNAらせんの一回転10.5bpのほぼ整数倍に当たる場合はある程度活性が維持されるに対し、それ以外の場合、即ち7bp,15bp,25bp,35bpの場合は活性の減少が著しかった。しかも、これらの変異プロモーターにおいて維持された活性は依然としてOmpRに依存したものであった。そこでこれらの結果から次の二つの結論が示唆された。すなわち

（1）OmpRがプロモーターを活性化する際には、OmpR結合領域と-35,-10領域とが

DNAらせん上で特異的な立体配位を保つことが重要であること、(2) そのような立体配位さえ保たれればOmpR結合領域と-35,-10領域との距離はある程度変化してもかまわないこと、の二つである。そこでこのような結論を導く上での鍵となる二つのポイントー挿入変異によって人工的なプロモーター配列ができていないかどうか、および挿入変異によってOmpR結合領域が変化していないかどうかーについて以下でその確認を行った。

(e) 挿入変異プロモーターの転写開始点の決定

(d) で述べた挿入変異プロモーターにおける活性が野生型と同じ-35,-10領域を使ったものであるかどうかを確認するため、逆転写酵素マッピング（プライマー伸長法）によって、それらの転写開始点を決定した（Fig.11）。野生型（pCI-0）の転写開始点は、以前に、Mizunoら [61] がS1ヌクレアーゼマッピングによって決定した位置と同じであった（lane1）。挿入変異プロモーター、pCI-7,pCI-11,pCI-21,pCI-31における転写開始点も、すべて、野生型と同じであることがわかった（lane2,3,4,5）。さらに、現れたバンドの濃さは各々のβ-ガラクトシダーゼ活性ともよく対応していた。また、バンドが現れるかどうかはOmpRに依存していた。これらの結果から、挿入変異プロモーター,pCI-11,pCI-21,pCI-31におけるプロモーター活性は、塩基対挿入による新たなプロモーター配列の生成によるものではなく、野生型と同じ-35,-10領域によるものであることがわかった。

(f) 挿入変異プロモーター領域へのOmpRタンパク質の結合

次に、挿入変異プロモーター領域においても、OmpRが野生型と同じ塩基配列に

結合しているかどうかを確認するため、DNaseIフットプリント実験を行った（Fig.12）。その結果、OmpRは挿入した塩基対の長さに対応して-35,-10領域から遠ざかって結合することがわかった。即ち、OmpRは塩基対の挿入の有無にかかわらず、同じ塩基配列に結合することがわかった。さらに、有意なプロモーター活性を示さなかったpCI-7にもOmpRが結合することが示された。このことは、挿入変異プロモーターにおけるプロモーター活性の変化が、OmpRの結合の有無によるものではないことを示唆していると考えられた。

以上（e）（f）の結果から挿入変異によって転写開始点及びOmpR結合領域に変化がないことを示すことができた。このことはFig.10で見られた興味深い現象が、挿入変異の結果として予想されるDNAらせん上におけるOmpR結合領域とRNAポリメラーゼ結合部位との相対的位置関係の変化を忠実に反映した結果であることを示していると考えられた。

【考察】

(a) ompCプロモーター領域の構造とOmpRタンパク質の結合

最近のMizunoら［48］によるompCプロモーター領域の欠失変異の解析により、ompCのプロモーター活性には少なくとも二つの領域が必要であることが示された。一つは通常のプロモーター配列、-35,-10領域であり、もう一つはその上流領域である。この上流領域には、10bpからなる三つの繰り返し配列がDNAらせん上で同じ側を向くようにタンデムに並んでいることが予想された。Mizunoら［48］は同時に、上流領域中での塩基対置換変異のなかで、プロモーター活性に影響するものはほとんどこの三つの繰り返し配列内に存在するものであることを見い出した。

そこで本論文ではまず、これら三つの繰り返し配列を含む領域のompCプロモーター活性における重要性をさらに詳しく解析するため、本章前半に述べたような実験を行った。その結果、三つの配列のうちaまたはcの配列を含む領域を失うとOmpR依存性のプロモーター活性が大幅に減少することがわかった。本論文の結果とMizunoら［48］の結果を総合して考えると、ompCプロモーター活性化機能においてこれら三つの繰り返し配列が重要であることが示唆される。

また、最近Joら［51］によって精製されたOmpRがompCプロモーター上流領域に特異的に結合することがゲルーシフトアッセイ（gel-shift assay）によって確認されたが、本章ではOmpRタンパク質がompCプロモーター上流領域へ結合する場合の位置について、DNaseIフットプリント法によってより明確に特定することができた。すなわちDNAのbottom strandにおいて-103～-41という領域がOmpR結合領域

であることがわかった。さらにこの領域は親和性の異なった複数のOmpR結合部位から構成されていることも同時に示唆された。この複数のOmpR結合部位の存在は前述の三つの繰り返し配列がOmpRによってフットプリントされる領域中に存在することを考えると興味深い。それはこの三つの繰り返し配列がOmpRによる特異的認識部位である可能性が高いと考えられるからである。このOmpRのompCプロモーター上流領域への結合様式については、第四章と第五章でさらに詳しい解析を行った。

(b) OmpRタンパク質によるompCプロモーター活性化の機構

次に本章で行ったompCプロモーター領域における挿入変異の実験は非常に興味深いものとなった。すなわちOmpR結合領域と-35,-10領域との間への様々な長さの挿入変異によってOmpRに依存したプロモーター活性が周期的に変動するという現象が見い出されたのである（Fig.10）。ここで、このプロモーター活性変動の周期がちょうどDNAらせんの回転の周期10.5bpで一回転という周期と一致したことから次のような二つの結論が導き出された。それは（1）OmpRがプロモーターを活性化するにはOmpR結合領域と-35,-10領域がDNAらせん上である特異的な立体配位を保つ必要があるということ、そして（2）そのような立体配位さえ保たれればOmpR結合領域と-35,-10領域との距離はある程度変化しても構わないということ、の二つである。これらの結論はさらに次の四つの実験結果によってより確実なものとされた。まず第一に活性のあった挿入変異プロモーターにおいてそのプロモーター活性がOmpR依存性のものであったこと、第二に挿入変異があっても転写開

始点は野生型と同じであったこと、第三に挿入変異があっても、OmpRは、野生型と同じ領域（塩基配列）に結合したこと、第四にOmpRはプロモーター活性の有無に関わらず同様にOmpR結合領域に結合したこと、の四つである。これらのうち第一と第二の結果は、挿入変異プロモーターにおけるプロモーター活性が人工的なプロモーター配列に由来するものではなく、天然の-35,-10領域が使われたものであることを示している。また第三と第四の結果は、挿入変異がOmpRのDNAへの結合様式に変化をもたらしてはいないことを示している。したがってFig.10でみられた挿入変異による周期的なプロモーター活性の回復という現象は予想どうりOmpR結合領域と-35,-10領域のDNAらせん上における相対的位置関係の変化を忠実に反映した結果であることが明確となった。さてそれでは上記のような特異的立体配位を必要とし、かつある程度の距離の変化を許容する転写活性化のメカニズムとしていかなるものが考えられるであろうか。現時点で最も可能性が高くまた合理的な説明は次のような説明であると考えられる。すなわちOmpRによる転写活性化はOmpRとRNAポリメラーゼとが互いのある特定の分子表面同士をコンタクトさせること（タンパク質-タンパク質相互作用）によって行われており、このコンタクトのためにはOmpRとRNAポリメラーゼがDNAらせん上で特異的な立体的位置関係をとることが必須の条件となるという説明である（Fig.13）。このモデルにおいてOmpRとRNAポリメラーゼとの一次元的な距離の許容性は、DNAのベンダビリティ（bendability）あるいはOmpRタンパク質のフレキシビリティ（flexibility）によって可能となると考えることができる。以前から転写活性化のメカニズムとし

て考えられてきた説明のうちこのタンパク質-タンパク質相互作用と並んで有力であった転写活性化因子によるDNA構造の変化の説 [7,16] は、立体特異的な転写活性化作用という今回見い出した性質を説明する上で大きな難点がある。したがってOmpRによる転写活性化はRNAポリメラーゼとのタンパク質-タンパク質相互作用によって行われているということはほぼ間違いないと考えられる。最近大腸菌の他の系でもこのような転写活性化におけるタンパク質-タンパク質相互作用を示唆する間接的データがいくつか出され始めているが [18-20,17,84,92] 本実験のデータはそのような中でも先駆的なものの一つであったと言ってよい。特に転写活性化因子結合部位と-35,-10領域との立体配位の重要性という観点からこのことを示唆したという点は大いに注目すべき結果であったといえる。OmpRとRNAポリメラーゼとの物理的な相互作用の存在を示す直接的な証拠は残念ながらまだ得られていないが、有力な遺伝学的データがMatsuyamaら [62] によって既に得られている。それはある種の変異envZと変異ompR間で起こるサプレッションをRNAポリメラーゼのαサブユニットにおける変異が妨げるという現象である。この結果はOmpRとRNAポリメラーゼとの直接的相互作用を示す間接的なデータであると同時にOmpRとのコンタクトを行うのはRNAポリメラーゼの中のαサブユニットであるということをも示唆している。今後はこのような点についてin vitroでの生化学的及び物理化学的な解析によってより確かな直接的証明を行っていくことが必要であると考えられる。

(d) 遺伝子活性化機構におけるタンパク質－タンパク質相互作用の役割

近年遺伝子の調節機構においてDNAに結合する複数のタンパク質間の相互作用が重要な役割を果たしているという概念を支持する実験結果が、原核生物から真核生物にいたる多くの系で報告されている。たとえば、λリプレッサーの系では、天然では隣接して存在する二つのオペレーター部位間への塩基対挿入実験［63］、電子顕微鏡観察［64］、及びDNaseIフットプリント実験［63］によって、リプレッサー間の協同的結合（cooperative binding）と二つの結合部位間のDNAのループピングが証明された。また、SV40の系では、初期遺伝子プロモーター領域において、エンハンサー、GC-box,TATA-boxらの間への種々の長さの塩基対挿入実験によってプロモーター活性の周期的変化が観察された［65］。この結果から、プロモーター領域において特異的な立体配位をとる一連のタンパク質間の相互作用の重要性が示唆された。本章で得られた結果はこれらの例と同様にDNAらせん上での複数のタンパク質間の相互作用が遺伝子発現の調節のメカニズムにおいて重要な役割を果たしている、という考えを支持するものであった。したがって本論文で用いたOmpRによる転写活性化の系は単に大腸菌での転写活性化機構のモデル系としてだけではなく、真核生物の系をも含めたより普遍的なタンパク質-タンパク質相互作用による遺伝子調節のモデル系としても大いに魅力的な系となったといえよう。次章以降ではそのことを実際に示すような興味深い事実をいくつか提示することができたと考える。

第三章　ompCプロモーターとその上流領域との相互作用の解析（2）：プロモーター上流領域の逆位変異の作成とその解析

【緒言】

近年、真核生物の系で転写活性化に関与するDNA領域が、基本的なプロモーター配列に対して天然で保持されている方向性とは逆向きの方向性でも十分に機能することが多くの系で見つかってきている（例えば、エンハンサー［21］、GC-box［69,70］,CAAT-box［71,72］,UAS［73］など）。これらの中にはDNA一次構造上明かな対称的配列を含まないものも多く、その転写活性化の機構及びその領域に結合する転写因子の構造と機能について大きな興味が持たれている。しかし現在のところこの現象を説明する機構についてはほとんど明かにはされていない。

ところでompC遺伝子の上流にはmicFという遺伝子がompCとは逆方向を向いて存在することがわかっている［61］。このmicFはompF遺伝子の発現を翻訳レベルで抑制するアンチセンスRNAの遺伝子である［61］。興味深いことにこのmicF遺伝子の発現がompC遺伝子と同様にOmpRによって制御されていることが示唆された［61］。このことはompCプロモーター上流のOmpR結合領域がmicFプロモーターにも作用している可能性があることを意味した。つまり、ompCプロモーター上流のOmpR結合領域が両方向性を持って機能する可能性があることが示唆された。そこで本章では、ompCプロモーター上流のOmpR結合領域が両方向性を持って機能するか否かを確かめるため、この領域をompCプロモーターに対して逆向きにつなぎその解析

を行った。その結果、このOmpR結合領域が実際に両方向性を示すことが見いだされ、OmpRによる転写活性化機構及びOmpRの構造と機能について新たな興味深い示唆を得ることができた。

【実験材料・方法】

(a) 実験材料・試薬

第二章で用いたものに加え、BAL31ヌクレアーゼ及びSmaIリンカーを宝酒造より購入した。

(b) プラスミドの作成

本章で用いたプラスミドの作成の詳細はFig.14に示した。ただし、pOMPC-pは以下の方法で作成した。まずpOMPC-B98のXbaI部位をklenow処理後ligationした。このプラスミドからHindⅢ-EcoRIの約400bpのフラグメントを調製し、pBR322のHindⅢ-EcoRI部位に組み込んだ。

本章のプラスミド作成に使用したpOMPC-B98は文献［48］、pOYL-101Wは文献［50］を参照。

(c) DNaseIフットプリント実験

DNAの末端標識を3'側に行ったこと及びDNaseI反応の際にキャリアーDNAとしてcalf-thymusDNAを0.1μg 加えたこと以外は第二章に準じた。

その他の使用菌株、組換えDNA技術、β-ガラクトシダーゼ活性測定、及び逆転写酵素マッピング等はすべて第二章に準じた。

【結果】

(a) ompCプロモーター上流領域の逆位変異の作成

ompCプロモーター上流領域の逆位変異の作成の詳細をFig.14-Cに示した。以下にその概要を示す。まず、ompC遺伝子のOmpR結合領域を含む-405～-35の領域をpOMPC-B98 [48] から調製し、pBR322のHindⅢ-EcoRI部位に組み込んだ。そのプラスミド（pOMPC-p）をHindⅢで切断後、Bal31ヌクレアーゼによる消化によって様々な長さのompCプロモーター上流領域の上流からの欠失変異を作成し、両末端を再結合する際にXbaIリンカーを導入した。これらのプラスミドからPstI-XbaI断片の混合物を調製し、ompCの-35領域の下流にlacZ遺伝子を融合したプラスミドpOYL-101W [50] のPstI-XbaI領域に組み込んだ。以上の操作によって、ompCプロモーター上流領域がompC-35,-10領域に対して逆向きになり、かつプロモーターから様々な距離を持ったプラスミドが作成できた。このような複数のプラスミドを作成した理由は、第二章で示したような特異的立体配位の必要性を考慮したからである。以上のようにして作成したプラスミドの混合物を、MC4100（ompR$^+$）に導入し、マッコンキー-ラクトースプレート上で形質転換株のβ-ガラクトシダーゼ活性を観察した。その結果、β-ガラクトシダーゼ活性を示す株一つを見いだすことができた。この株からプラスミドを単離し、pCR-0と名付け更なる解析を行った。

(b) 逆位変異プロモーターの解析

まず、pCR-0のプロモーター領域のDNA塩基配列を決定した（Fig.14-B、及びFig.18）。その結果、pCR-0はompCプロモーター上流領域の-35～-107までの領域

が、ompCの-35領域に対して野生型（pCI-0）とは逆方向につながったものであることが判明した。Table1にはpCR-0のompR$^+$（MC4100）及びompR$^-$（MH1160）の菌中におけるβ-ガラクトシダーゼ活性を示した。ここでpCR-0は、野生型（pCI-0）と同等のプロモーター活性を示すことがわかった。しかもこの活性は野生型と同様にOmpRに依存したものであった。以上の結果から、ompCプロモーター上流領域は、両方向性をもって機能しうることが示された。

（c）逆位変異プロモーター領域における挿入変異の作成とそのプロモーター活性

上流領域が逆向きになったプロモーター領域においても、第二章で示したような上流領域と-35,-10領域との間での立体特異性を示しうるか否かを調べるため、第二章と同様の挿入変異を作成して（Fig.14-B）それらのプロモーター活性を測定した（Table1）。挿入変異の作成の詳細は、Fig.15に示した。その結果、上流領域が逆向きになった場合でも順向きの時と同様の立体特異性を示すことが明かとなった（Table1、pCR-0, pCR-4, pCR-10, pCR-14）。この結果は、この上流領域すなわちOmpR結合領域が逆向きになっても-35,-10領域との間で立体特異的相互作用が成り立っていることを示唆している。以上、（b）（c）で得られた示唆を確認するため、以下の二つの実験を行った。

（d）逆位変異プロモーターの転写開始点の決定

逆位変異プロモーターにおける活性が、野生型と同じ-35,-10領域を使っているかどうかを確認するため逆転写酵素マッピング法によってそれらの転写開始点を決定した（Fig.16）。その結果、活性のあったpCR-0、pCR-10共に、転写開始点は、

野生型（pCI-0）と一致し、現れたバンドの濃さも各々のβ-ガラクトシダーゼ活性と対応したものであった。したがって、これらの結果から、逆位変異プロモーターにおいても野生型と同じ-35,-10領域が使われていることが確認された。

（e）逆位変異プロモーター領域へのOmpRタンパク質の結合

次に、逆位変異プロモーター領域においても、OmpRが野生型と同じ塩基配列に結合しているかどうかを確認するため、DNaseIフットプリント実験を行った（Fig.17）。その結果、OmpRの結合する領域は、順向き（野生型）の時と同じ塩基配列であることが確認された。したがって、OmpRは、この場合、-35,-10領域に対して野生型とは逆の方向性で結合していることが示唆された。以上の結果から、ompCのプロモーター上流のOmpR結合領域は、プロモーターに対して逆向きにつないでも機能しうること、そして、この場合でも、順向きの場合と同様の立体特異性を示すことが明かとなった。

【考察】

本章での結果から、ompCプロモーター上流のOmpR結合領域が両方向性を持って機能しうることが明かとなった。しかも、この逆向きの場合でも順向きの場合と同様に、OmpR結合領域と-35,-10領域との間には、立体特異的な相互作用が成り立っていることが示された。これらの結果は、第二章で考察したように、OmpR結合領域が逆向きの場合でも転写の活性化がOmpRとRNAポリメラーゼとのタンパク質－タンパク質相互作用によって行われていることを示唆している。このような両方向性を示すタンパク質－タンパク質相互作用を可能とするメカニズムとしては、どのようなものが考えられるであろうか。以下にいくつかの可能性を考えてみたい。

まず第一に、ompCのプロモーター上流領域DNAには対称な構造が存在し、OmpRは、そのような構造を認識して上流及び下流に対して等価な様式で結合している可能性である。この可能性に対しては、Fig.18に示したように実際にOmpR結合領域中に不完全ではあるが逆方向反復配列をとることができる（太い二つの矢印）。しかし、第二章の結果及び以前のMizunoら［48］のデータからは、Fig.18に同様に示した三つの繰り返し配列（細い三つの矢印）がOmpRの結合に重要であることが示唆されている。さらに後述の第四章、第五章の解析により、このOmpR結合領域にはおそらく三つのOmpR結合部位が存在することが示唆された。したがって、OmpRの認識する塩基配列としてはやはり逆方向反復配列というよりもこの三つの繰り返し配列である可能性が高い。このOmpRの認識する塩基配列と両方向性の間

題についてはさらに第五章においてより詳細な解析を行った。

次に、OmpRが結合部位の上流と下流に対して対称的ではないとした場合には、以下の二つの説明が考えられる。まず一つめはOmpRタンパク質が二ヶ所の転写活性化ドメインを有している可能性である。この点に関してはOmpRの転写活性化ドメインがまだ明かではないので明確なことは言えない。ただし、少なくともOmpRのアミノ酸配列中には、同一の機能を有する部分が分子内に二ヶ所に存在することを象徴するような明確な分子内相同領域は存在しないことはわかっている [37]。次にもう一つの説明はOmpRタンパク質がフレキシブルなステム構造につながれた転写活性化ドメインを有している可能性である。このような構造によって、OmpRが結合領域の上流と下流の両方向に対して転写活性化ドメインを向けることができると考えられる。この点に関してもまだ明確なことは言えないが、OmpRがN末端側とC末端側でそれぞれドメイン構造を有しており、それらをつなぐ領域がプロテアーゼによって消化されやすいことは確認されている [74,75]。したがって、OmpR内の転写活性化ドメインの位置によってはこの可能性も十分考えられる。

以上、三つの可能性について述べたが、現時点ではいずれが正しいのか、あるいは全く別の機構によるものなのかは確定できない。しかし、いずれにしろ本章で得られた結果がOmpRの構造と機能、及びOmpRによる転写活性化機構を考えていく上で興味深いものであることにはまちがいない。特に本章-緒論でも述べたような真核生物のいくつかの転写活性化DNA領域との両方向性に関する共通性は注目すべきものがある。なかでもGC-box（Sp1結合部位）とは、その両方向機能 [69,70]

に加えて他のプロモーター配列との相互作用において特異的な立体配位を必要とする［65］という点においても類似している。したがって、今後このOmpRの系の解析がそうした真核生物の系とも共通する転写調節における興味深い現象を解明していくための一つの糸口となる可能性は高い。そのためにはおそらくOmpRのDNAへの結合様式、及びOmpR分子内の転写活性化ドメイン等をさらに明らかにしていくことが重要であろう。

第四章　OmpRタンパク質のDNAへの結合様式の解析（1）：OmpR結合領域の欠失変異の作成とその解析

【緒言】

第二章、第三章においてはompCプロモーター領域中のOmpR結合領域がその転写活性化機能を現す上でいくつかの興味深い性質を示すことを明らかにしてきた。このような諸性質を可能とする機構を解明していくためにはOmpRのDNAへの結合様式を明らかにしていくことが必要不可欠である。また、OmpRタンパク質には現在までに見つかっているいくつかのDNA結合モチーフ（ヘリックス-ターン-ヘリックス［76］、Znフィンガー［77］、等）と明かな相同性を示すアミノ酸配列が見つかっていない［37］。したがって、OmpRのDNAへの結合は現在まだ知られていないタイプの結合モチーフが使われている可能性がある。こうした意味においてもOmpRのDNAへの結合様式を明らかにしていくことは大いに興味深い。

既に第二章で示したように、ompCのOmpR結合領域は-103～-41（bottom strand）の約60bpにわたっており、同じ大腸菌の転写活性化タンパク質であるCRPなどと比べると（CRPは二十数bp）［16,17］かなり広いことがわかる。このような広い結合領域は、ompF遺伝子のOmpR結合領域においても同様に認められる［80］。このことはompC及びompFの両OmpR結合領域においてOmpR分子が複数個結合していることを暗示している。実際、ompCのOmpR結合領域においてOmpR濃度を様々に変えて行ったDNaseIフットプリント実験の結果（第二章、Fig.7）からは、少なくとも二

つのOmpR結合部位が存在することが示唆される。そこで本章では、まずompCプロモーター上流のOmpR結合領域におけるOmpR結合部位の個数を明らかにすることを目的とした。また、そうした個々の結合部位のみでも転写活性化機能を示すことができるのかを確かめようと試みた。その結果、ompCのOmpR結合領域にはおそらく三つのOmpR結合部位が存在すること、そして、その中の単一の結合部位のみでも-35,-10領域に対して近接させ、かつ特異的な立体配位に配置してやれば転写活性化機能を示しうることを明らかにした。

なお本章以降ではOmpRのDNA結合様式をより正確に表現するため、OmpRがDNAへ結合する際の基本単位と考えられる領域の一つ一つのことを“OmpR結合部位”と呼び、それらが集まった総体としての領域のことを“OmpR結合領域”と呼ぶことにした。

【実験材料・方法】

(a) プラスミドの作成

本章で用いたプラスミドのうちpCI-0、pCD-94、pCD-78、pCD-35は第二章で用いたものと同一のものである。pCD-7135の作成の詳細はFig.15に示した。なおpCD-7135の作成に用いたpOMPC-B71は文献［48］、pOYL-101Wは文献［50］を参照。

(b) DNaseIフットプリント実験

DNAの末端標識を3'側に行ったこと及びDNaseI反応の際にキャリアーDNAとしてPoly〔dG〕・Poly〔dC〕を0.2μg 加えたこと以外は第二章に準じた。

その他の使用菌株、組換えDNA技術、β-ガラクトシダーゼ活性測定、及び逆転写酵素マッピング等はすべて第二章に準じた。

【結果】

(a) ompCプロモーター上流のOmpR結合領域の各種欠失変異のOmpR結合への影響

第二章でも述べたようにompCプロモーターの上流領域には三つの10bpから成る繰り返し配列が存在し、これらが11bpあるいは10bp の間隔をおいてタンデムに並んでいる。これらの繰り返し配列はOmpRタンパク質によるDNAの特異的認識に関与していることが示唆されている。そこで本章ではこのompCプロモーター上流領域における各種の欠失変異がこの領域へのOmpRの結合にいかなる影響を及ぼすかを、DNaseIフットプリント法によって解析した。ここで用いた各種欠失変異の構造はFig.20に示した。なお、DNaseIフットプリント実験にはtop strandを解析に用いた。

実験結果をFig.21に示した。まず、野生型のpCI-0 (lane1,2) では、既に得られていたbottom strandでのプロテクションのパターン (Fig.7,18) とよく対応したものであった。すなわち、-101～-37までの領域が顕著にプロテクトされ、-74と-73にエンハンスのバンドがでるというパターンであった (bottom strandでは、-103～-41のプロテクションと、-77と-76 にエンハンスのバンド) 。次いで、上流から-95までの領域を欠失したpCD-94 (lane3,4) では、-94～-37までの領域がプロテクトされた。これは若干上流の境界に野生型 (pCI-0) との違いがあるものの、基本的なプロテクションのパターンは野生型と同じであり、エンハンスのバンドも共通していた。一方、上流から-79までを欠失したpCD-78 (lane5,6) でも依然として-70～-37の領域がプロテクトされたが、-48あたりから下流のプロテク

ションが弱くなり-74,-73のエンハンスのバンドも出なくなった。さらに、-58～-35までの24bpを23bpのリンカー配列に置換したpCD-35（lane7,8）では、-101～-55までがプロテクトされエンハンスのバンドも変化なかった。そして、-71～-35までの領域を欠失させ-72から上流の領域を8bpのリンカーで-35領域につなげたpCD-7135（lane9,10）では、-101～-78の領域がプロテクトされたが、エンハンスのバンドはなくなった。

以上の結果を各々DNA一次構造上に表したのが、Fig.20である。これらのデータを総合すると、以下の三つの点が示唆される。

まず第一に、このOmpR結合領域は少なくとも三つのOmpR結合部位から成っているということである。現時点においては各々の正確な境界を決定することはできないが、Fig.20のデータからおそらく-94～-75辺りと-74～-55辺りと-54～-35辺りという三つのOmpR結合部位があると考えるのが、最も合理的かつシンプルな解釈であろう。ここで注目すべきことは、予想されるこれら三つの結合部位がそれぞれ前述の三つの繰り返し配列を一つづつ含んでいるという点である。このことは、この三つの配列がOmpRによる認識配列である、という以前からの示唆をさらに裏付けるものである。ただし、最上流の結合部位においては-94からさらに数塩基対上流の領域もある程度OmpRに結合に関与している可能性がある。それは、野生型（pCI-0）ではこの領域もOmpRによるプロテクションの領域に含まれているからである（Fig.20）。

次ぎに二番目に示唆されることは、この領域へのOmpRの結合が協同的（co-

operative）であるということである。このことは、最下流のOmpR結合部位と目される部分のプロテクションが、最下流の結合部位がなくなることによって、弱くなってしまうことから示唆される。

また三番目として、最上流のOmpR結合部位と中間のOmpR結合部位の間のDNAが、これら二つの部位に結合したOmpR間の相互作用によってコンフォメーション（conformation）が変化するということである。このことは、最上流の結合部位と中間の結合部位の両方にOmpRが結合した場合に限って、DNaseI消化のエンハンスのバンドが現れることから示唆される。

(b) 各種欠失変異のプロモーター活性への影響

次ぎに、これらの欠失変異がプロモーター活性にいかなる影響を及ぼしているかをlacZ遺伝子との融合によって測定した（Table2）。まず、OmpRの結合パターンが野生型とほぼ同じであったpCD-94では、予想どうりプロモーター活性にも極端な変化はなかった。それに対して、最上流のOmpR結合部位を欠失し最下流の部位へのOmpRの結合も弱くなったpCD-78ではプロモーター活性の急減が見られた。同様に、最下流のOmpR結合部位のみを欠失したpCD-35でもプロモーター活性は急減した。これらの結果は最上流及び最下流のOmpR結合部位のプロモーター活性化における重要性を示すものと考えられる。

次ぎに、興味深い結果となったのがpCD-7135である。このプラスミドでは最上流のOmpR結合部位のみしか存在しないが、この結合部位をプロモーターに対して近づけてやると有意なOmpRに依存したプロモーター活性を示すようになることが

判明した。このことはプロモーターの活性化には単一のOmpR結合部位のみで十分であることを示唆している。この可能性をさらに裏付けるために、逆転写酵素マッピングによってpCD-7135における転写開始点の確認を行った（Fig.22）。その結果、pCD-7135においても野生型（pCI-0）と同じ位置から転写が行われていることが確認できた。また、現れたバンドは、β-ガラクトシダーゼ活性と対応した濃さであり、かつOmpRに依存性のものであった。したがって、pCD-7135におけるプロモーター活性は野生型と同じ-35,-10領域を使っているものと結論できた。

【考察】

本章で得られた結果からは、次のような点が示唆された。

(1) ompCプロモーター上流のOmpR結合領域は、おそらく、三つのOmpR結合部位から成っている。

(2) OmpRは、これらの部位に協同的 (cooperative) に結合すると同時に、DNAに一部コンフォメーション (conformation) 変化をもたらす。

(3) 単一のOmpR結合部位でも、-35,-10領域に対して適当な位置に配置すれば、プロモーターを活性化できる。

まず (1) の点は、以前から示唆されていた仮説、即ちOmpRはompCプロモーター上流領域に存在する三つの繰り返し配列を認識して結合している、という考え方をさらに裏付けるものであったといえる。なぜならば本章において同定した三つのOmpR結合部位はその個数及び存在する位置において三つの繰り返し配列とよく一致したからである (Fig.20) 。このOmpRによる認識塩基配列の問題は、ompFプロモーター上流のOmpR結合部位の点も含めて、第五章でさらに検討を加える。

次にここで、OmpRの結合部位が三つあるということの遺伝子調節機構における意味について考えてみたい。この際に注目すべき点は (3) で示した単一のOmpR結合部位でもプロモーターの活性化はできるという事実である。これは、OmpR結合部位が複数存在することがプロモーターの活性化自体に必要なのではないということを示唆している。したがって、複数のOmpR結合部位の存在理由として最も考えられるのは、複数のOmpRの結合がプロモーター活性化の調節機構に関与してい

る可能性である。実際、最近のAibaら［78］のデータからは、浸透圧変化に応答したompC、ompF遺伝子の転写活性化のON,OFFがOmpRのリン酸化によるDNA結合能の変化のレベルでなされる、というモデルが提出されている。この意味において、複数のOmpR結合部位の存在は（2）で述べたOmpRの協同的結合とあいまって合目的的に働いていると考えられる。なぜならば、複数の結合部位における協同的結合は、そうしたDNA結合能の変化による調節の感受性を高める役割を果たすと考えられるからである［11,14］。

次ぎに（2）で述べたOmpR結合によるDNAのコンフォメーション変化について考えてみたい。この変化がompCプロモーターの活性化自体に何らかの役割を果たしている可能性はあまり考えられない。なぜならば、こうした変化が現れないpCD-7135においても十分な活性化機能があること、さらにpCD-35においてはこの変化が現れるにもかかわらずほとんど活性化機能を示さないという事実があるからである（Fig.20、Table2）。しかし、第六章で若干考察するompCプロモーターからmicFプロモーターまでを含むよりマクロなDNA高次構造の形成に寄与している可能性は十分考えられる。また別の観点から見れば、このDNAコンフォメーション変化を示すDNaseI消化のエンハンスのバンドはOmpR分子のDNAらせん上でのトポロジーを推定する上での大きな手がかりとなる。この点に関しては第六章において改めて考察を試みる。

最後に（3）で述べた単一のOmpR結合部位による転写活性化について考察する。まず最も重要と考えられる点は先にも述べたように単一のOmpR結合部位のみで十

分な転写活性化作用が得られるという事実である。このことは第二章で示唆した転写活性化プロセスにおけるOmpRとRNAポリメラーゼとの相互作用が基本的に単一のOmpRのみで十分行われることを示唆している。したがって天然のOmpR結合領域においても、結合する複数のOmpRのうち転写活性化のプロセスに直接的に関わっているものは一つだけである可能性が十分考えられる。このような視点から天然のompCプロモーターを眺めた場合、そうした働きを担っているOmpRの候補として最下流の結合部位のOmpRを第一に挙げることができる。それはこの部位へのOmpR結合能が低下あるいは欠失したpCD-78やpCD-35では転写活性化機能が顕著に低下してしまうからである（Fig.20、Table2）。特にpCD-35においては最下流の結合部位のみが欠失し、上流の二つの結合部位へのOmpRの結合には変化が見られなかったことから、より明確にこの推論を支持していると考えられる。またDNAらせん上での予想される位置関係から単純に考えてもこの最下流の結合部位のOmpRがRNAポリメラーゼとのコンタクトに最も有利な位置にあることは容易に想像される。

次にpCD-7135におけるOmpR結合部位の-35,-10領域との立体的な位置関係についても言及しておきたい。第二章においては野生型のOmpR結合領域と-35,-10領域との特異的な立体配位が転写活性化に重要であることを指摘したが、そのような特異的な立体配位がこのpCD-7135においても同様に保たれているということが塩基配列の比較から判明した。すなわち、pCD-7135における単一のOmpR結合部位は、野生型（pCI-0）での位置から見て、ちょうどDNAらせんの三回転分（30bp）近づいていることになるのである（Fig.20参照）。ちなみに、このpCD-7135のOmpR結

合部位と-35領域との間に4bpの挿入変異を導入すると、予想どうりプロモーター活性はなくなるというデータも既に得られている（data not shown）。したがってこのpCD-7135においても野生型のプロモーターと同様のタンパク質-タンパク質相互作用で転写活性化が行われていることはほぼ間違いないだろう。

以上の結果を考え合わせると、第二章で提示した野生型ompCプロモーターにおける転写活性化のモデルにさらに次のような新たな点を付け加えることができる。すなわち、OmpRによる転写活性化は、OmpRとRNAポリメラーゼとの直接のコンタクト（タンパク質-タンパク質相互作用）によって行われているが、そのコンタクトは基本的にはプロモーターに最も近い単一のOmpR分子のみでなされている、というモデルである。今後、このモデルの正当性を確認していくためには、DNAらせん上でのOmpRとRNAポリメラーゼのトポロジーやOmpRやRNAポリメラーゼのタンパク質-タンパク質相互作用に関与する分子上の部位、等についてさらに明らかにしていく必要があるだろう。

第五章　OmpRタンパク質のDNAへの結合様式（2）：合成OmpR結合部位の作成とそれを用いた解析

【緒言】

本章では、前章に引き続いてOmpRのDNAへの結合様式をさらに明らかにすることを目的とした。前章までの解析によって、（1）ompCプロモーター上流領域には、親和性の異なる複数のOmpR結合部位が存在すること、（2）それらのOmpR結合部位の数はおそらく三つであり、各々約20bpから成っていること、（3）OmpRの認識する塩基配列として、各々10bpから成る三つの繰り返し配列が考えられること、等の点を明らかにすることができた。そこで本章では、これらの結果に基づいて、OmpR結合部位の基本単位を塩基配列のレベルでより明確に特定するため、上記の解析の結果からOmpRの結合配列として予想されるいくつかの塩基配列のDNAを合成し、OmpRによる結合能を調べようと試みた。

以下、本章では、まず4種類の合成DNA20merを作成し、それらのin vitroでのOmpR結合能を見た。次いで、それらのうちOmpRと特異的に結合した二つの塩基配列について、実際にin vivoでもOmpR結合部位として機能しうることをその転写活性化機能を指標として確認した。また同時に、これらの挿入変異及び逆位変異を作成し、第二章及び第三章で示した転写活性化における立体特異性及び両方向性が、これらの20bpの配列のみで基本的に再現できることを示した。最後にこれらの結果を基にして、OmpRによる認識塩基配列とその結合の様式及びOmpRによる転

写活性化機構について考察を試みた。

【実験材料・方法】

(a) 合成DNA20merの作成

本章の共同研究者である横浜市立大学の西村善文氏らがβ-シアノエチルホスフォアミダイト法により作成したものを供与して頂いた。

(b) プラスミドの作成

本章で用いたプラスミドの作成の詳細はFig.25に示した。なお本章のプラスミド作成に使用したBluescript M13+(KS polylinker)は文献［95］、pCX-0は文献［93］を参照。

(c) ゲルーシフトアッセイ

まずDNA-OmpR複合体の形成に先だってOmpRのリン酸化をAibaらの方法［45］に従って行った。OmpRのリン酸化は室温で20分EnvZ11*［46］4pmolの存在下で20μlの反応液中で行った。反応溶液の組成は50mMTris-HCl(pH8.0),75mMKCl,0.5mM EDTA,2mMDTT,35%grycerol,5mM$MgCl_2$,0.1mMATPである。なお、上に述べたようにOmpRのリン酸化には野生型のEnvZではなく変異型のEnvZ11を用いた。これは野生型のEnvZが脱リン酸化能をも有しているため［45］、この脱リン酸化能を特異的に欠失したEnvZ11［46］を用いることによってより効率的にリン酸化型OmpRを生成するためである。また以上の処理はEnvZ11* を加えることを除いては、非リン酸化型OmpR及びコントロールに対してもすべて同様に行った。このような処理の後、あらかじめ5'末端を^{32}Pでラベルしておいた合成DNA20mer0.06pmolと非ラベルのキャリアーDNAPoly〔dG〕・Poly〔dC〕0.1μgを加え、室温で5分インキュベー

トした。その後各反応液に5μlのdyeを加え、早やかに7%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。電気泳動は4℃で行い泳動終了後ゲルを乾燥しオートラジオグラフィーをとった。

その他の使用菌株、組換えDNA技術、β-ガラクトシダーゼ活性測定、及び実験材料・試薬、等はすべて第二章に準じた。

【結果】

(a) 合成OmpR結合部位の作成とそれらへのOmpRの結合

前章までの結果を参考にして、OmpRの結合する可能性の考えられる4種類の20merDNAを合成した（Fig.23、①②③④）。まず、①の配列は、ompCのOmpR結合領域中で最も親和性の高い最上流のOmpR結合部位のほぼ全域を含む-99～-80の配列である（第二章結果(b)、Fig.7及びFig.20参照）。②の配列は、①の配列と-94～-80の15bpを共有しつつ5bp下流にずらした-94～-75の配列である。この配列は前章での欠失変異プラスミドpCD-94における最上流のOmpR結合部位に相当している（Fig.20参照）。次ぎに③の配列は、ompCのOmpR結合領域中で中間のOmpR結合部位に相当する-78～-59の配列である（Fig.20参照）。これら①②③の配列は、すべてOmpRによる認識配列と目される10bpから成る同一の繰り返し配列を含んでいる（Fig.23、TGAAACATCT）。また④の配列は、ompFのOmpR結合領域［80］中でompCの①の配列と位置的にも配列の類似性からも等価と考えられる-101～-82の部分を持った配列である。

これら4種類の合成DNAに対して、まずin vitroでのゲルーシフトアッセイ（gel-shift assey）によってOmpRの結合の有無を確かめた（Fig.24）。非リン酸化型OmpRを用いた場合には①から④のいずれの配列においても有意なバンドのシフトを見いだすことはできなかった（lane2,3,6,7,10,11,14,15）。しかし、非リン酸化型OmpRに比べて少なくとも10倍のDNA親和性を有すると考えられているリン酸化型OmpR［47］を用いた場合には、①と④の配列が有意にシフトすることが確

認された（lane4,16）。②と③の配列では、この場合でも有意なシフトのバンドは検出されなかった。これらの結果は、①と④の配列がリン酸化型OmpRによる特異的認識・結合配列として機能することを示している。ここで、DNAとの結合能の高いリン酸化型OmpRでしか合成DNAとの結合が見られなかったのは、おそらく本実験で用いた合成DNAが20bpという短さのためそのDNAらせん構造が不安定であったためと考えられる。

次ぎにこのOmpR結合活性のあった①と④の配列を用いて、さらにin vivoでのOmpRの結合を転写活性化機能を指標として確認することを試みた。

(b) 合成OmpR結合部位のin vivoでの活性

①④の配列のin vivoでのOmpR結合活性を見るために、これらの配列をompCプロモーターの直前に組み込んだプラスミドpCP-CS1とpCP-FS1を作成した（Fig.26）。これらのプラスミドのプロモーター活性はlacZ遺伝子との融合によりβ-ガラクトシダーゼ活性から測定した。これらのプラスミドを$ompR^+$及び$ompR^-$の菌に導入してβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した結果がTable3である。Table3の結果から、pCP-CS1とpCP-FS1は共に有意なOmpR依存性のプロモーター活性を示すことがわかった。したがって、①の配列と④の配列は共にin vivoでもOmpR結合配列として機能していることが示唆された。

(c) 合成OmpR結合部位を持つプロモーターでの挿入変異及び逆位変異の作成とその解析

野生型のOmpR結合領域は、その転写活性化機能において立体特異性及び両方向

性という興味深い性質を示すことが第二章及び第三章で明かとなっている。そこで、本章で作成した20bpという短いOmpR結合部位でも同様の性質を示すかどうかを、pCP-CS1とpCP-FS1の両プラスミドに同様の挿入変異及び逆位変異を導入してプロモーター活性への影響を見た。

まず挿入変異として、pCP-CS1とpCP-FS1における各々のOmpR結合部位とompC-35,-10領域との間に+4bpの挿入を持つプラスミドpCP-CとpCP-F、及び+10bpの挿入を持つプラスミドpCP-CBとpCP-FBの四つを作成した（Fig.26）。これらをompR$^+$及びompR$^-$の菌に導入して各々のβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した結果がTable4である。この結果、これらの挿入変異は第二章で示したものと同様のOmpRに依存した周期的活性変化をもたらすことが明かとなった。したがって、20bpの短いOmpR結合部位においても野生型のOmpR結合領域と同様の立体特異性を示すことが確認された。

次ぎに、逆位変異としてpCP-CS1とpCP-FS1の各々の合成OmpR結合部位を逆向きにプロモーターにつないだpCP-CRS1とpCP-FRS1を作成し（Fig.26）、上と同様にプロモーター活性を測定した（Table5）。その結果、pCP-CRS1、pCP-FRS1共に順向きの時ほど活性は高くはないものの明らかに有意なOmpR依存性のプロモーター活性を示すことがわかった。したがって、両方向性の性質も20bpの配列で十分再現できることが明かとなった。

【考察】

(a) OmpRによる認識塩基配列とDNAへの結合様式

本章で作成した4種類の合成DNA20merへのOmpR結合実験の結果（Fig.24）からは以下のことが示唆される。

まず第一に、単一のOmpR結合部位が十分に機能するためには、以前から指摘されていた10bpの繰り返し配列に加えて①の配列に存在する繰り返し配列のすぐ上流の10bpの塩基配列（-99～-90）が必要である、ということである（Fig.23参照）。このことは、10bpの繰り返し配列を共通して含んでいるompC遺伝子由来の①②③の三つの配列のうち①の配列のみがOmpRと結合したという事実から示唆される。第二章において指摘した、最上流のOmpR結合部位は他の二つの部位に比べて親和性が強いというデータ（Fig.7）も、繰り返し配列以外の塩基配列もOmpRのDNA結合に関与しているという上の結論を支持している。本章の実験では繰り返し配列のみでOmpRの結合を再現することはできなかったが、複数のOmpR結合部位の存在下では②③の配列に相当する部分へのOmpRの結合が既に確認されている（第四章Fig.20）。したがって以下のようなOmpR結合のモデルを考えることで今までのデータはすべて矛盾なく説明できると考えられる。すなわち、10bpの繰り返し配列はOmpRのDNAへの特異的な結合に必須の基本配列であるが、単独では十分なOmpR結合能を示すことができない。この配列にOmpRが結合するにはこの上流に10bpの補助配列が存在するか、複数のOmpR結合部位間での協同的結合によるか、のいずれかである必要があるというモデルである。このモデルにおいて新たに提示した

OmpR結合の基本配列と補助配列という概念は以下の状況証拠によっても支持される。まず第一に、DNaseIフットプリント実験の結果から最上流のOmpR結合部位は他の二つの結合部位に比べて若干広めであること（第四章Fig.20）。第二に、Tsungらの行った<u>in vivo</u> メチレイション－プロテクション実験の結果からOmpRのDNA結合に関与するG塩基として、三つの繰り返し配列内の二ヶ所づつと先ほどのモデルで指摘した補助配列内の一ヶ所が同定されていること（文献［79］及びFig.28参照）。第三に、<u>ompC</u>及び<u>ompF</u>における上流からの欠失変異に対するOmpRのDNaseIフットプリントの結果から、この補助配列に当たる領域はOmpRによってプロテクトはされるがOmpRの結合に必須ではないことが共に示されていること（第四章Fig.20及び文献［80］）。以上である。このモデルがどの程度正当性を持つかは今後の解析を待たねばならないが、もし正しいことが証明されれば他のDNA結合調節タンパク質にはほとんど例のないユニークなDNA結合様式として興味深いものであることは確かである。このモデルについては第六章においてより具体的なイメージを提示する。

さて、合成DNA20merへのOmpR結合実験の結果から示唆される第二の点は、<u>ompF</u>におけるOmpRの結合も少なくとも最上流の結合部位に関しては<u>ompC</u>のものと同じ様式によっているという点である。これは①の配列と④の配列が共にOmpR結合活性を示したという結果から示唆される。そこでさらに他の結合部位も①及び④と類似の結合配列のユニットから成っていると仮定して、<u>ompC</u>、<u>ompF</u>両プロモーター上流の約60bpのOmpR結合領域を20bpあるいは21bpづつの三つのユニットに分割

し各々の配列を比較してみたのがFig.27である。このような配置によってわかったことはこれらの配列は互いにかなり高い相同性を示すことである。特に、以前Mizunoら［48］がompCでの塩基置換実験から示唆したOmpRの結合に特に重要と考えられる繰り返し配列内のGとCの二つの塩基（position12と16）が、すべての配列で保存されているという点は興味深い。また、単独のOmpR結合部位として独立して機能しうることが示された①と④の配列がこれらの六つの配列から導き出されるコンセンサス配列とよく一致するという点、そして単独では結合能を示さなかった③の配列はコンセンサス配列との相同性が相対的に低いという点も注目される。これらの事実は、Fig.27で示したアライメント（alignment）とそこから得られたコンセンサス配列が有意なものであることを示唆している。今後はこのアライメントの正当性及び先に述べたOmpR結合の基本配列と補助配列の存在についてさらに確認していくことが必要であろう。

（b）合成OmpR結合部位による転写活性化機構

さて本章では、野生型のOmpR結合領域が示す二つの性質、すなわち立体特異性及び両方向性が20bpのOmpR結合部位のみで本質的に再現できることを明らかにした。このうち立体特異性に関しては、第二章で指摘した通りOmpRとRNAポリメラーゼとのタンパク質-タンパク質相互作用を示すものと解釈される。したがって本章での結果は、単一のOmpR結合部位のみの場合でもタンパク質-タンパク質相互作用という転写活性化の基本メカニズムは依然として保持されていることを示唆している。同様の示唆は既に前章でも行っているが、本章での解析が前章での解析と

は異なり天然の余分な配列を一切含まないわずか20bpの配列を用いてなされたものであるという点をここで改めて指摘しておきたい。また、ここでもう一つ指摘しておきたいことは本章で作成したプラスミドのうち有意なプロモーター活性を示したものはすべて野生型でのOmpR結合部位-プロモーター間の立体配位と同等の配位をしているという点である。すなわちpCP-CS1及びpCP-FS1のOmpR結合部位はそれぞれ天然での-35領域に対する位置からDNAらせんの約4回転分、pCP-CB及びpCP-FBでは約3回転分プロモーターに近づいていることになるのである（Fig.20とFig.26参照）。OmpR結合部位を逆向きにしたpCP-CRS1においても第三章で作成したpCR-0との間で上と同様のことがいえる（Fig.18とFig.26参照）。これらのことは先に述べた結論すなわち単一のOmpR結合部位と野生型のOmpR結合領域との転写活性化メカニズムの同一性というものをさらに裏打ちするデータであると考えられる。

さて一方、両方向性の点についても本章の結果は単に単一のOmpR結合部位のみで再現性があったという解釈にとどまらない大きな意味があった。それは第三章で指摘した野生型のOmpR結合領域とは違い、本章で用いたOmpR結合部位は明確な対称的一次構造を含まないからである（Fig.23参照）。このことは、第三章でも述べた最も単純な仮説すなわちOmpRは他の多くの転写調節タンパク質等と同様に対称的一次構造を認識してダイマーとしてDNAに結合するという仮説を否定するものであるといえよう。実際、本章で作成したOmpR結合部位にはその転写活性化機能においても明らかに方向性があるように見受けられる（順向きの時の方が逆向

きの時よりも転写活性化能が高い－Table5）。したがって、このOmpRによる転写活性化の両方向性が単純な対称的結合モデル以外の機構によって行われている可能性はさらに大きくなったといえる。今後この機能を解明していくためには第三章でも述べたように、より詳細なOmpRのDNA結合様式の解析及びOmpRの高次構造とその機能ドメイン等の解析を行っていくことが重要であろう。