

## 第六章 総合考察

本章では第二章から第五章までに筆者が明らかにしてきた結果を中心に、現在までに明らかとなっている他のデータをも含めて、OmpRタンパク質のDNAへの結合様式及びOmpRタンパク質による転写活性化機構の全体像について総合的な考察を行ってみたい。

### (a) OmpRタンパク質のDNAへの結合様式

本論文では主としてompCプロモーター上流領域におけるOmpRの結合様式について解析を行い以下の点について明らかにしてきた。

(1) ompCプロモーター上流領域には各々約20bpから成る三つのOmpR結合部位があること(第四章)。

(2) これらOmpRの結合に関与する基本的な塩基配列は三つの10bpから成る繰り返し配列であるが、最上流の最も親和性の高い結合部位では繰り返し配列に加えてさらに上流の10bpの配列も結合に関与していること(第四章、第五章)。

(3) OmpRはこれら三つの結合部位に協同的(cooperative)に結合すると同時に結合部位間のDNAに一部コンフォメーション(conformation)変化をもたらすこと(第四章)。

またこれら本論文でのデータをサポートすると同時に本節での考察に重要なデータとしてTsongら[79]のin vivoメチレイション-プロテクション実験の結果



をここで取り上げておきたい。Fig.28にそれらのデータを本論文でのDNaseIフットプリント実験のデータのまとめと共に示した。彼らのデータは本論文で明らかにした結果と非常によく一致していた。すなわちOmpRによって*in vivo*でメチレーションのプロテクションを受けるG塩基はすべて本論文で明らかにしたDNaseIフットプリントでのプロテクション領域内に含まれ、しかも本論文でOmpRの認識塩基配列として指摘した三つの繰り返し配列及び最上流の補助配列内にマップされるのである。

さて本節では以上の結果を基にしてさらにもう一步考察を進めてみたい。それは、OmpRが実際のDNA二重らせん構造というものにどのように結合しているのかという問題についてである。この問題を考える上で有用なデータが三つある。

まず第一に、OmpRの結合する基本配列と考えられる三つの繰り返し配列の距離関係である。これら三つの繰り返し配列は互いに21bpあるいは20bpごとにタンデムに並んで存在している (Fig.28)。この21bpあるいは20bpという数字は10.5bpで一回転するDNAらせん構造においてはちょうど二回転分に相当する。したがってOmpRはDNAらせんの二回転ごとに、らせんの一つの側に集中して結合していると予想することができる。第二に、第四章で指摘したDNaseI消化のエンハンスのバンドである (Fig.28)。このエンハンスのバンドは最上流のOmpR結合部位と中間のOmpR結合部位との間のDNAが、これら二つの部位に結合した二つのOmpR間の相互作用によってコンフォメーション変化を起こすことの反映であると考えられる (第四章)。このようなDNAコンフォメーション変化としては、以前スリプレッサーの



系 [63,64] で詳細に解析された二つの結合部位に結合したタンパク質間の相互作用によるDNAのベンディング (bending) が最も可能性が高い。このモデルによれば、DNaseI消化のエンハンスのバンドはDNAらせん上で二つのタンパク質が相互作用している側に対してちょうど正反対の側に現れることになる。したがってDNAらせん上でのOmpRの位置は、このエンハンスのバンドのある側からちょうど180°回転した位置にあると推定することができる。さらに第三として前述の *in vivo* メチレシヨン-プロテクシヨン実験のデータである (Fig.28)。一般にG塩基のメチレシヨンのプロテクシヨンはDNAのメジャーグループ (major groove) 側からのタンパク質のコンタクトを示すものと解釈されている [81,82]。したがってOmpRは、Fig.28で示したG塩基のある位置でメジャーグループ側からDNAに結合していると考えられる。

以上のデータを基にOmpRのDNA立体構造 (らせん構造) への結合様式をモデル化したのがFig.29である。すなわちOmpRは三つの繰り返し配列にメジャーグループ側から結合しDNAらせん上ですべて同一の側に並ぶ。これらのOmpRは互いに相互作用し最上流の結合部位と中間の結合部位との間のDNAをわずかに曲げる。そしてこのDNAの変形はちょうどOmpRの結合する側と正反対の側にあるDNaseIの標的部マイナーグループ (minor groove) [83] を溶液中に露出させることとなる。このモデルにおいて注目すべきことは上記の三つの推論からそれぞれ予想されるOmpRのDNA上でのトポロジーがすべて互いに矛盾なく一致するという事実である。このことは上記三つの推論が共に正当性を持つことを示している。ここでDNaseI



消化のエンハンスのバンドが最上流の結合部位と中間の結合部位との間でしか見られないのは最上流の結合部位でのOmpRの結合様式が他のものとは若干異なるため(後述)か、あるいは最上流の結合部位と中間の結合部位との間の距離が中間の結合部位と最下流の結合部位との距離よりも1bp長いからか(Fig.28参照)、のいずれかによるものだろう。

さてFig.29のモデルにおいてはさらにもう一つの仮説を同時に表してみた。それはOmpRが二つのDNA結合ドメインを有するという仮説である。OmpRの機能ドメインとしてはN末端側半分がリン酸化を受けるドメインでありC末端側半分がDNA結合ドメインであることが既に同定されているが[74,75]、これ以上のより詳細な構造については未だ解析が進んでいない。このような以前からのデータに対して、本論文でのOmpRのDNA結合様式の解析はOmpRが二種類の異なった塩基配列を認識している可能性を示唆した。二種類の配列とは、OmpRが認識する基本配列と目される10bpの繰り返し配列と最上流のOmpR結合部位での補助配列と目される10bpの配列のことである(第五章)。この二つの配列は正方向及び逆方向の両アライメント共に有意な類似性を示さない(Fig.23塩基配列参照)。したがってこれら二つの配列は各々別のドメインで認識されている可能性が高い。そこでFig.29では最上流の結合部位ではOmpRが二つのDNA結合ドメインで結合し、中間の結合部位と最下流の結合部位では繰り返し配列を認識するドメインのみで結合するというモデルを示した。このようなモデルはTsongらの*in vivo*メチレーション-プロテクションのパターンともよく一致する(Fig.29 ●の位置参照)。このようなモデルが



本当に正しいかどうかは今後のより直接的な情報を得られる解析の結果によって判定されねばならないが、今までに見つかっているある種の現象などはこのモデルによつてうまく説明できる可能性がある。それは例えば ompR2 [36,37,38] と呼ばれる OmpR 変異の示す表現型である。 ompR2 は ompC<sup>-</sup>, ompF<sup>+</sup> の表現型を示す変異として単離されてきた変異であるが、この変異が ompC 及び ompF のプロモーター領域への OmpR の結合様式を変化させることによつて上記の表現型を示している可能性が、精製 OmpR2 タンパク質を用いた解析から示唆された [52]。すなわち OmpR2 は ompF のプロモーター上流領域には結合できるが ompC プロモーター上流領域には結合できないことが示されたのである。ここで注目すべきことは OmpR2 における変異の位置 (203番目の Val→Met) [37] が先に述べた C 末端側の DNA 結合ドメイン [74] に属するという事実である。そこで、例えばこの OmpR2 変異のある位置が上記の二つの DNA 結合ドメインモデルにおける繰り返し配列に特異的な DNA 結合ドメイン中に当たっていると仮定してみると、OmpR2 の DNA への結合様式が比較的合理的に説明できることになる。すなわち補助配列に相当する部分の配列が全ての OmpR 結合部位において比較的良好に保存されている ompF では (Fig. 27 参照) OmpR の繰り返し配列結合へのダメージがある程度カバーされるが、この補助配列が最上流の結合部位以外ではあまりよく保存されていない ompC では (同じく Fig. 27 参照) OmpR の DNA 結合に重大なダメージを受けることになる、という説明である。また、ここでこの仮説をより発展させて考えてみれば、浸透圧に応答した ompC と ompF の発現の使い分けにこの OmpR の二つの DNA 結合ドメインの使い分けの機構が関与して



いるという可能性までも十分考えることが可能である。

さて最後に以上に述べたようなOmpRのDNAへの結合様式が遺伝子発現調節機構においていかなる役割を果たしているかという生理的側面についても若干触れておきたい。まず第四章-考察でも述べたように、複数のOmpR結合部位存在の意味についてであるが、この複数のOmpRが転写の活性化というプロセス自体に直接関与している可能性はあまり考えられない。なぜならば第四章、第五章で述べたように単一のOmpR結合部位のみでも十分な活性化が可能だからである。したがって複数のOmpR結合部位存在の生理的な意味はむしろそうした活性化の調節のプロセスへの関与という点にあると考えられる。この観点からみると本節のはじめにも述べたOmpRのDNA結合の際の協同性 (cooperativity) という現象はそうした調節の感受性を高めるという点で合目的的なものであると解釈できる。実際まだ予備的な実験結果ではあるがこうした考えを間接的に支持するデータとして、第五章で作成した単一の合成OmpR結合部位を持つプロモーターでは野生型のプロモーターでは活性を示さないようなompRあるいはenvZの変異株中でも有意なプロモーター活性を示す場合があるという結果を得ている (data not shown)。さて次に三つのOmpRがDNAらせん上で同一の側に並んで結合するというFig. 29のモデルについてであるが、このような興味深いトポロジーにどのような意味があると考えられるであろうか。真っ先に考えられる可能性としてOmpR同士のDNAへの協同的結合に重要であるという説明がある。これはごく単純に考えてOmpR-OmpR間の相互作用にはOmpR同士がDNAらせん上で同一の側に並ぶことが有利であろうという解釈である。



また、もう少しマクロな視点から見ればFig.29のモデルで同時に示したDNAのコンフォメーション変化ともあいまって、次節で若干触れるompC上流からnicFプロモーターまでを含むより高次の遺伝子調節複合体の形成に関与しているという可能性も考えられる。最後にOmpRによる二種類の塩基配列認識の遺伝子調節プロセスへの関与の可能性については、先の二つのDNA結合ドメインモデルの説明の際に若干触れたようにompCのOmpR結合領域とompFのOmpR結合領域の使い分けにおいて何等かの役割を果たしている可能性が考えられる。

以上、OmpRのDNAへの結合様式について様々な考察を加えてきたが今後さらにこの点を明らかにしていくためには、本論文におけるような生化学的及び遺伝学的手法と平行してX線回折及びNMR等の物理化学的手法による解析も必要であろう。このような解析も現在筆者の所属する研究室と他の研究室との共同研究によって進められつつある。本論文で述べてきたようにOmpRのDNAへの結合様式には様々な興味深い側面がある。また第四章-緒言でも述べたようにOmpRのDNAへの結合は未知のDNA結合モチーフによっている可能性も大いにある。したがってOmpRのDNAへの結合様式の解明は、序論で述べたような遺伝子発現調節機構の解明の一環という意味合いのみならずより普遍的な意味でのタンパク質-DNA相互作用の新たなモデル系確立という意味合いにおいても、大きな発展性を秘めた研究課題であると考えられる。



(b) OmpRタンパク質による転写活性化機構の全体像

本論文ではompCプロモーターにおけるOmpRの転写活性化機構について以下のようないくつかの重要な知見を明らかにした。

(1) OmpRによる転写の活性化にはDNA上のOmpR結合領域と-35,-10領域 (RNAポリメラーゼ結合部位) が、ある特定の立体配位をとることが必要であること (第二章)。

(2) OmpR結合領域は (1) で示した立体配位の条件さえ満たされれば-35,-10領域との距離がある程度変化しても機能しうること (第二章)。

(3) OmpR結合領域はその転写活性化機能において両方向性を示すこと。またこの場合でも (1) で示した立体特異性を示すこと (第三章)。

(4) OmpRによる転写活性化には、天然のOmpR結合領域に存在するような複数のOmpR結合部位は必ずしも必要ではなく、単一のOmpR結合部位のみでも十分機能しうること (第四章、第五章)。

(5) 単一のOmpR結合部位による転写活性化の場合も (1) (3) で示した立体特異性及び両方向性を示すこと (第五章)。

これらの結果のうち、まずOmpRによる転写活性化の基本メカニズムを考える上で重要なデータが (1) である。この結果はOmpRによる転写活性化が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ことを示唆している (第二章-考察)。転写活性化機構において転写活性化因子がいかなる作用を及ぼしているかについてはこの機構の発見の当初から



多くの可能性が考えられてきた。その中で最も有力と考えられたのが次の二つである。1) 転写活性化因子と転写装置 (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るとする説 [15,16]、2) 転写活性化因子のDNA結合によるDNA構造の変化によるとする説 [7,16]、である。本論文の結果はこれらのうち前者すなわちタンパク質-タンパク質相互作用の説を示唆するものと考えられた。最近の大腸菌の他の系での解析でもこの説を支持するデータが相次いでおり [17,84,92]、この機構が転写活性化の主たる機構であることが明かとなってきた。本論文の結果はこのような例の中でも特にDNAらせん上での立体配位の重要性という観点からこの結論を示したという点で注目すべき結果であったと考えられる。さて、このような転写活性化の基本メカニズムの内容をさらに具体化する上で重要と考えられるのが (4) の単一のOmpR結合部位による転写活性化の結果である。すなわちこの結果はOmpRとRNAポリメラーゼのコンタクトが基本的に単一のOmpRのみで十分であることを示唆している。野生型のompCプロモーターにおいてはおそらく三つのOmpR結合部位のうち最下流の部位に結合したOmpRが主としてRNAポリメラーゼとのコンタクトを担っていると考えられる (第四章-考察)。

次に以上で指摘したOmpRとRNAポリメラーゼのDNA上での相互作用に必要な立体配位というものを現時点で利用可能なデータから具体的に特定できるかどうかを検討してみたい。まずOmpRのみの場合のDNAらせん上での配位については既に前節でモデルを提示している。そこで今度はRNAポリメラーゼのDNAらせん上での配位について以下のいくつかのデータから推定してみた。はじめにRNAポリメラーゼが



DNA上で占める範囲についてであるが、これは多くのDNaseIフットプリンティング実験の結果から平均して+20から-50当りの領域を占めることがわかっている [10, 11, 85, 86,]。筆者の予備的な実験結果からも、この範囲がompCプロモーターにおいてもほぼ当てはまることが示された (data not shown)。したがってDNA一次構造上では、OmpR結合領域とRNAポリメラーゼ結合領域とは約10bp前後互いにオーバーラップすることになる。さらにRNAポリメラーゼのDNAらせん上でのトポロジーを推定する上で重要なデータがRNAポリメラーゼの認識結合部位である-35,-10配列のDNAらせん上での位置である (Fig.30-A)。最近この-35,-10配列がRNAポリメラーゼの $\sigma$ サブユニット分子内のヘリックス-ターン-ヘリックス構造及びそれと類似した $\alpha$ -ヘリックス構造によってそれぞれ認識されることが示唆された [87-89]。これらは共にDNAのメジャーグループへの結合が予想されることからRNAポリメラーゼは-35,-10配列に対してそれぞれのメジャーグループ側から結合することが推定された。同様の配位は以前の化学修飾法を用いた解析からも示唆されている [90]。以上のデータから推定されるRNAポリメラーゼの位置をFig. 29のOmpRの配位のモデルと併せてモデル化したのがFig.30-Bである。ompCの-35,-10配列のメジャーグループはOmpRの結合する側から見るとそれぞれ約86°あるいは約154°回転した位置に存在する (Fig.30-A参照)。したがってRNAポリメラーゼはOmpRのある側からはほぼ正反対の側にある-10配列のメジャーグループ上から-35配列の方に向かって徐々にOmpRに近づいて行き、最下流のOmpR結合部位のところでOmpRとすれ違うような形でDNA上に配位していると予想できる (Fig.30-B)。



このモデルにおいて注目すべきことは転写の活性化に直接関与していると考えられる最下流のOmpRがRNAポリメラーゼと互いの側面を向かい合わせるように配位するという点である。このことはOmpRとRNAポリメラーゼがこの側面同士でコンタクトを行う可能性が高いことを示唆する。以上に述べてきたモデルはまだ直接の証拠が十分ではないが現時点で考えられる最も具体的なモデルであり、今後の研究を進めていく上での作業モデルとしても大いに興味深いものであることにはまちがいない。

さて以上のような転写活性化の基本メカニズムに関するデータとは別に本論文ではOmpRによる転写活性化の際に示されるいくつかの興味深い現象を見出している。まずその一つとして本節の始めにあげた(2)の現象すなわちOmpR結合領域とプロモーターとの距離の許容性が挙げられる。この距離の許容性という性質については真核生物におけるエンハンサー [21] あるいはYeastのUAS [73] などがよく知られているが、これらは本論文で示したOmpR結合領域の示すものとはやや違ったタイプのものと考えられる。なぜならばエンハンサーやUASが数百から数千bpにも及ぶ許容性を示すのに対しOmpR結合領域の場合はたかだか30bp程度の許容性でしかないからである (Fig.10)。したがってOmpR結合領域の場合はエンハンサーやUASで考えられているDNAルーピング (looping) の機構 [24,91] と言うよりもむしろもう少し局所的なDNAのベンディング (bending) あるいはOmpRタンパク質自身のフレキシビリティ (flexibility) 等の機構によってなされている現象である可能性が高い。現在のところこうした可能性のうちいずれであるの



かは明確でないが他の系で同様のタイプに属すると考えられる転写活性化DNA領域がいくつか見つかってきているので（例えば、同じ大腸菌のCRP結合部位 [17,84] や真核生物のGC-box [69,70], CAAT-box [71,72] 等）、今後の展開によってはそうした例に共通する新たな転写調節メカニズムの発見へとつながる可能性も十分にある。

次にもう一つの興味深い現象として本節はじめに挙げた (3) の現象すなわち OmpR結合領域の活性化機能の両方向性が挙げられる。この現象は特に (5) に示したように単一のOmpR結合部位のみの場合でも再現できたということで一層興味深いものとなった。なぜならば本論文で用いた単一のOmpR結合部位はDNA一次構造上有意な対称性を示さないからである (Fig.23,27参照)。この結果はOmpRがある一定の方向性をもってDNAに結合しているにもかかわらず転写活性化作用は両方向に対して行うことができるという興味深い内容を示唆している。もちろん可能性としてはこのOmpR結合部位には一次構造上に明確に反映しない高次構造上の対称性が存在し、OmpRはその構造を認識して対称な様式で結合しているという説明も考えられる。しかしそうした可能性は他の多くの転写調節タンパク質においてそのようなDNA認識の様式が見つかっていないという点から考えにくい。また仮にそうであったとすれば今度は新たなDNA結合様式という別の観点から興味深いものであることになる。現時点では確率的に考えてOmpRタンパク質の構造自体に両方向機能を可能にするような機構が内包されているとするのが最も妥当な説明だろうと考えられる。こうした機構については既に第三章-考察において触れておいた。す



なわちOmpR分子内に二ヶ所の転写活性化ドメインがあるという説明か、あるいはOmpRの転写活性化ドメインがフレキシブルな構造をとっていて結合部位の上流と下流の両方向に対してそれを向けることができるという説明である。どのような説明が正しいのかは今後の解析を待つ必要があるがいずれにしても将来的に転写活性化タンパク質の構造と機能について新たな概念を提示できる可能性は十分にある。

さて次にこの両方向性機能についてはompCプロモーター上流のOmpR結合領域が実際に天然の状態でも両方向性を持って働いているという最近明らかとなった事実についても触れておきたい。これは天然でompCプロモーターの約180bp程上流に存在するmicFプロモーターの解析から見つかった現象である。この現象については以前のMizunoら [61] の解析によって既にある程度は示唆されていたが最近のTakayanagiら [93] のより詳細な遺伝学的解析により改めて確認がなされた。そしてこの解析からは単純な転写活性化機構というよりももっと複雑なイベントが起こっていることも同時に示唆された。すなわちompCのOmpR結合領域の欠失によってmicFプロモーターにおけるOmpR依存性の活性は失われるがさらなる欠失によってmicFプロモーターはOmpR非依存性の活性が回復するという興味深い現象が観察されたのである。このことはmicFプロモーターの発現に現在まだ知られていないなんらかの機構が関与していることを示唆していた。またこのことを裏付けるかのようにこのmicFプロモーターとompCのOmpR結合領域との間にはDNAベンディングタンパク質であるIHFタンパク質の結合部位が最近同定された [94]。以上の



結果はompCプロモーターから上流のOmpR結合領域、IHF結合部位そしてmicFプロモーターまでを含むより高次なDNA-タンパク質複合体構造が存在している可能性を示唆している。このようにOmpR結合領域の両方向性機能は実際に天然の状態でも発揮されていることが確認されたがその際にはまた新たな複雑な機構が関与しているものと考えられた。この点において本論文で明らかにした複数のOmpR結合部位の存在とそれらによるDNAコンフォメーションの変化というものは前節で述べたような役割以外にもこうした高次構造の形成に寄与する役割をも果たしている可能性は十分に考えられる。この点についても今後の更なる解析が大いに期待されることである。

以上に述べてきたようにOmpRタンパク質による転写活性化機構の解析は多くの側面において興味深い問題にあふれた優れたモデル系であることはまちがいない。本論文での解析の延長線上にもまだ未解決の重要な問題が残されている。例えばOmpRがRNAポリメラーゼへのコンタクトによって及ぼす活性化の内容とは何であるのか、OmpR-RNAポリメラーゼ間のコンタクトの様式はいかなるものであるのか、OmpR-OmpR間の相互作用の詳細はどうなっているのか、等々である。また本論文で明らかにしてきたOmpRによる転写活性化の際の距離の許容性及び両方向性機能等の問題は既に本論中でも述べてきたように、原核生物から高等真核生物の系までを含めた転写調節研究における共通の課題でもある。このような諸性質は転写調節に関与する様々なメカニズムの具体的内容を推定させるばかりでなく、生物機能に備わる独特の潜在的な多機能性あるいは複雑な遺伝子調節ネットワークの存在



... (faint, illegible text) ...

といったものまでを暗示するものであるといえよう。今後の0mpRの系での解析が転写調節に関わる様々な分子レベルでの相互作用の実体を明らかにしていくと同時に、上記のようなより高次な生物機能解明の一つの糸口となっていくことを期待している。



## 要約

本論文では大腸菌外膜タンパク質遺伝子 ompC における転写活性化因子 OmpR による転写活性化機構について遺伝学的及び生化学的解析を行い、OmpR の DNA への結合様式及び OmpR による転写活性化機構について以下の点を明らかにすることができた。

(1) ompC プロモーター上流領域には各々約 20bp から成る三つの OmpR 結合部位があること (第四章)。

(2) これら OmpR の結合に関与する基本的な塩基配列は三つの 10bp から成る繰り返し配列であるが、最上流の最も親和性の高い結合部位では繰り返し配列に加えてさらに上流の 10bp の配列も結合に関与していること (第四章、第五章)。

(3) OmpR はこれら三つの結合部位に協同的 (cooperative) に結合すると同時に結合部位間の DNA に一部コンフォメーション (conformation) 変化をもたらすこと (第四章)。

(4) OmpR による転写の活性化には DNA 上の OmpR 結合領域と -35, -10 領域 (RNA ポリメラーゼ結合部位) が、ある特定の立体配位をとることが必要であること (第二章)。

(5) OmpR 結合部位は (4) で示した立体配位の条件さえ満たされれば -35, -10 領域との距離がある程度変化しても機能しうること (第二章)。

(6) OmpR 結合領域はその転写活性化機能において両方向性を示すこと。またこの



場合でも(4)で示した立体特異性を示すこと(第三章)。

(7) OmpRによる転写活性化には、天然のOmpR結合領域に存在するような複数のOmpR結合部位は必ずしも必要ではなく、単一のOmpR結合部位のみでも十分機能しうること(第四章、第五章)。

(8) 単一のOmpR結合部位による転写活性化の場合も(4)(6)で示した立体特異性及び両方向性を示すこと(第五章)。

また以上の結果を基にOmpRタンパク質のDNAへの結合様式及び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る転写活性化機構についてそれぞれ新たなモデルを提示した(第六章)。



引用文献

1. Jacob, F. and Monod, J. 1961. J. Mol. Biol. 3, 318
2. Miller, J. H. and Reznikoff, W. S. 1978. "The Operon" Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory.
3. Neidhardt, F. C., Ingraham, K., Low, B., Schaechter, M., and Umberger, H. E. 1987. "Escherichia coli and Salmonella typhimurium : Cellular and Molecellar Biology" vol. 2, part IV, 1439-1443, 1231-1240.
4. Becwith, J., Davis, J. and Gallant, J. 1983. "Gene Function In Prokaryotes" Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory.
5. Neidhardt, F. C., Ingraham, K., Low, B., Schaechter, M., and Umberger, H. E. 1987. "Escherichia coli and Salmonella typhimurium : Cellular and Molecellar Biology" vol. 2, part IV, 1241-1312.
6. Serfling, E., Jastin, M., and Schaffner, W. 1985. Trends in Genetics 1, 224
7. Dickson, R. C., Abelson, J., Barnes, W. M. and Reznikoff, W. S. 1975. Science. 187, 27
8. Maniatis, T., Ptashne, M., Backman, K., Kleid, D., Flashman, S., Jeffrey, A., and Maurer, R. 1975. Cell 5, 109
9. Waltz, A. and Pirrotta, V. 1975. Nature 254, 118
10. Schmitz, A. and Galas, D. J. 1979. Nucleic Acid Res. 6, 111
11. Hawley, D. K., Johnson, A. D., and McClure, W. R. 1985. J. Biol. Chem. 260, 8618
12. Neidhardt, F. C., Ingraham, K., Low, B., Schaechter, M., and Umberger, H. E. 1987. "Escherichia coli and Salmonella typhimurium : Cellular and Molecellar Biology" vol. 2, part IV, 1231-1240
13. Raibaud, O. and Schwartz, M. 1984. Annu. Rev. Genet. 1984. 18, 173
14. Ptashne, M. 1986. "A Genetic Switch - Gene Control and Phage  $\lambda$ " Cell Press & Blackwell Scientific Publications.
15. Gilbert, W. 1976. "RNA polymerase" 193. Losick, R. and Chambelin, M.



Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory.

16. 饗場弘二 1985 細胞工学. 4,1122
17. 饗場弘二 1989 シリーズ分子生物学の進歩 4, 遺伝子の発現と制御 I  
第二章 cAMP-CRP系の転写制御 43-70
18. Hochschild, A., Irwin, N., and Ptashne, M. 1983. Cell 32, 319
19. Irwin, N. and Ptashne, M. 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 8315
20. Li, X. and Krakow, J. 1988. J. Biol. Chem. 263, 3448
21. Khoury, G. and Gruss, P. 1983. Cell 33, 313
22. Gellert, M. 1981. Annu. Rev. Biochem. 50, 879
23. Dunn, T.M., Hahn, S., Odgan, S., and Schlieff, R.F. 1984.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 5017
24. Ptashne, M. 1986. Nature 322, 697
25. Wu, H.K. and Crothers, D.M. 1984. Nature 308, 509
26. Achtberger, C.F. and McAllister, E.C. 1989. J. Biol. Chem. 264, 10451
27. Bracco, L., Kotlarz, D., Kolb, A., Diekmann, S., and Buc, H. 1989. EMBO J.  
8, 4289
28. Miura, T. and Mizushima, S. 1969. Biochem. Biophys. Acta. 193, 268
29. Inouye, M. 1979. "Bacterial Outer Membrane : Biogenesis and Function"  
John Wiley and Sons, New York
30. van Alphen, W. and Lugtenberg, B. 1977. J. Bacteriol. 131, 623
31. Kawaji, H., Mizuno, T., and Mizushima, S. 1979. J. Bacteriol. 140, 843
32. Hall, M.N. and Silhavy, T.J. 1979. J. Bacteriol. 140, 342
33. Hall, M.N. and Silhavy, T.J. 1981. J. Mol. Biol. 146, 23
34. Hall, M.N. and Silhavy, T.J. 1981. J. Mol. Biol. 151, 1
35. Hall, M.N. and Silhavy, T.J. 1981. Annu. Rev. Genet. 15, 91
36. Nara, F., Inokuchi, K., Matsuyama, S. and Mizushima, S. 1984. J. Bacteriol.  
159, 688
37. Nara, F., Matsuyama, S., Mizuno, T., and Mizushima, S. 1986. Mol. Gen. Genet.  
202, 194
38. Nara, F., Mizuno, T., and Mizushima, S. 1986. Mol. Gen. Genet. 205, 51



39. Liljestrom, P. 1986. FEMS Microbiology Letters. 36,145
40. Forst, S., Comeau, D., Norioka, S., and Inouye, M. 1987. J. Biol. Chem. 262,16433
41. Matsuyama, S., Mizuno, T., and Mizushima, S. 1986. J. Bacteriol. 168,1309
42. Mizuno, T. and Mizushima, S. 1987. J. Biochem. 101,387
43. Igo, M. M. and Silhavy, T. J. 1988. J. Bacteriol. 170,5971
44. Forst, S., Delgado, J., and Inouye, M. 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86,6052
45. Aiba, H., Mizuno, T., and Mizushima, S. 1989. J. Biol. Chem. 264,8563
46. Aiba, H., Nakasai, F., Mizushima, S., and Mizuno, T. 1989. J. Biol. Chem. 264,14090
47. Aiba, H., Nakasai, F., Mizushima, S., and Mizuno, T. 1989. J. Biochem. 106,5
48. Mizuno, T. and Mizushima, S. 1986. J. Bacteriol. 168,86
49. Inokuchi, K., Furukawa, H., Nakamura, K., and Mizushima, S. 1984. J. Mol. Biol. 178,653
50. Ozawa, Y., Mizuno, T., and Mizushima, S. 1987. J. Bacteriol. 169,1331
51. Jo, Y.-L., Nara, F., Ichihara, S., Mizuno, T., and Mizushima, S. 1986. J. Biol. Chem. 261,15252
52. Mizuno, T., Kato, M., Jo, Y.-L., and Mizushima, S. 1988. J. Biol. Chem. 263,1008
53. McClure, W. R. 1985. Annu. Rev. Biochem. 54,171
54. Casadaban, M. J. 1976. J. Mol. Biol. 104,541
55. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74,5463
56. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. 1982. "Molecular Cloning : A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory.
57. Miller, J. H. 1972. "Experiments In Molecular Genetics" 201-205 Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory.
58. Galas, D. J. and Schmitz, A. 1978. Nucleic Acid Res. 5,3157



59. Maxam, A.M. and Gilbert, W. 1980. Meth. Enzymol. 65, 499
60. Aiba, H., Adhya, S., and de Crombrughe, B. 1981. J. Biol. Chem. 256, 11905
61. Mizuno, T., Chou, M.Y., and Inouye, M. 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 1966
62. Matsuyama, S. and Mizushima, S. 1987. J. Mol. Biol. 195, 847
63. Hochschild, A., and Ptashne, M. 1986. Cell 44, 681
64. Griffith, J., Hochschild, A., and Ptashne, M. 1986. Nature 322, 750
65. Takahashi, K., Vigneron, M., Matthes, H., Wildman, A., Zenke, M., and Chambon, P. Nature 319, 121
66. Schule, R., Muller, M., Otuka-Murakami, H., and Renkawitz, R. 1988. Nature 332, 87
67. Cohen, R.S. and Meselson, M. 1988. Nature 332, 856
68. Gralla, J.D. 1989. Cell 57, 193
69. Kadonaga, J.T., Jones, K.A., and Tjian, R. 1986. Trends Biochem. Sci. 11, 20
70. Everett, R.D., Baty, D., and Chambon, P. 1983. Nucleic Acid Res. 11, 2447
71. McKnight, S.L. 1982. Cell 31, 355
72. McKnight, S.L., Kingsbury, R.C., Spence, A., and Smith, M. 1984. Cell 37, 253
73. Struhl, K. 1987. Cell 49, 295
74. Tate, S., Kato, M., Nishimura, Y., Arata, Y., and Mizuno, T. 1988. FEBS lett. 242, 27
75. Kato, M., Tate, S., Nishimura, Y., and Mizuno, T. 1989. FEBS lett. 249, 168
76. Brennan, R.G. and Matthews, B.W. 1989. J. Biol. Chem. 264, 1903
77. Klug, A. and Rhodes, D. 1987. Trends Biochem. Sci. 12, 464
78. Aiba, H. and Mizuno, T. 1990. FEBS lett. 261, 19
79. Tsung, K., Brissette, R.E., and Inouye, M. 1989. J. Biol. Chem. 264, 10104
80. Kato, M., Aiba, H., and Mizuno, T. 1989. J. Biochem. 105, 341
81. Johnson, A., Meyer, B.J., and Ptashne, M. 1978. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 1783



82. Jordan, S.R. and Pabo, C.O. 1988. Science 242, 893
83. Suck, D., Lahm, A., and Oefner, C. 1988. Nature 332, 464
84. Gaston, K., Bell, A., Kolb, A., Buc, H., and Busby, S. 1990. Cell 62, 733
85. Spassky, A., Kirkegaard, K., and Buc, H. 1985. Biochemistry 24, 2723
86. O'Halloran, T.V., Frantz, B., Shin, M.K., Ralston, D.M., and Wright, J.G. Cell 56, 119
87. Gardella, T., Moyle, H., and Susskind, M.M. 1989. J.Mol.Biol. 206, 579
88. Siegele, D.A., Hu, J.C., Walter, W.A., and Gross, C.A. 1989 J.Mol.Biol. 206, 591
89. Waldburger, C., Gardella, T., Wong, R., and Susskind, M.M. 1990. J.Mol.Biol. 215, 267
90. Siebenlist, U., Simpson, R.B., and Gilbert, W. 1980. Cell 20, 269
91. Guarente, L. 1988. Cell 52, 303
92. Adhya, S. and Garg, S. 1990. J.Biol.Chem. 265, 10797
93. 高柳勝彦 1990. 名古屋大学農学部 修士論文
94. Huang, L., Tsui, P., and Freundlich, M. 1990. J.Bacteriol. 172, 5293
95. Samorook, Fritsch, E.F., and Samorook, J. 1989. "Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Second Edition" Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory.



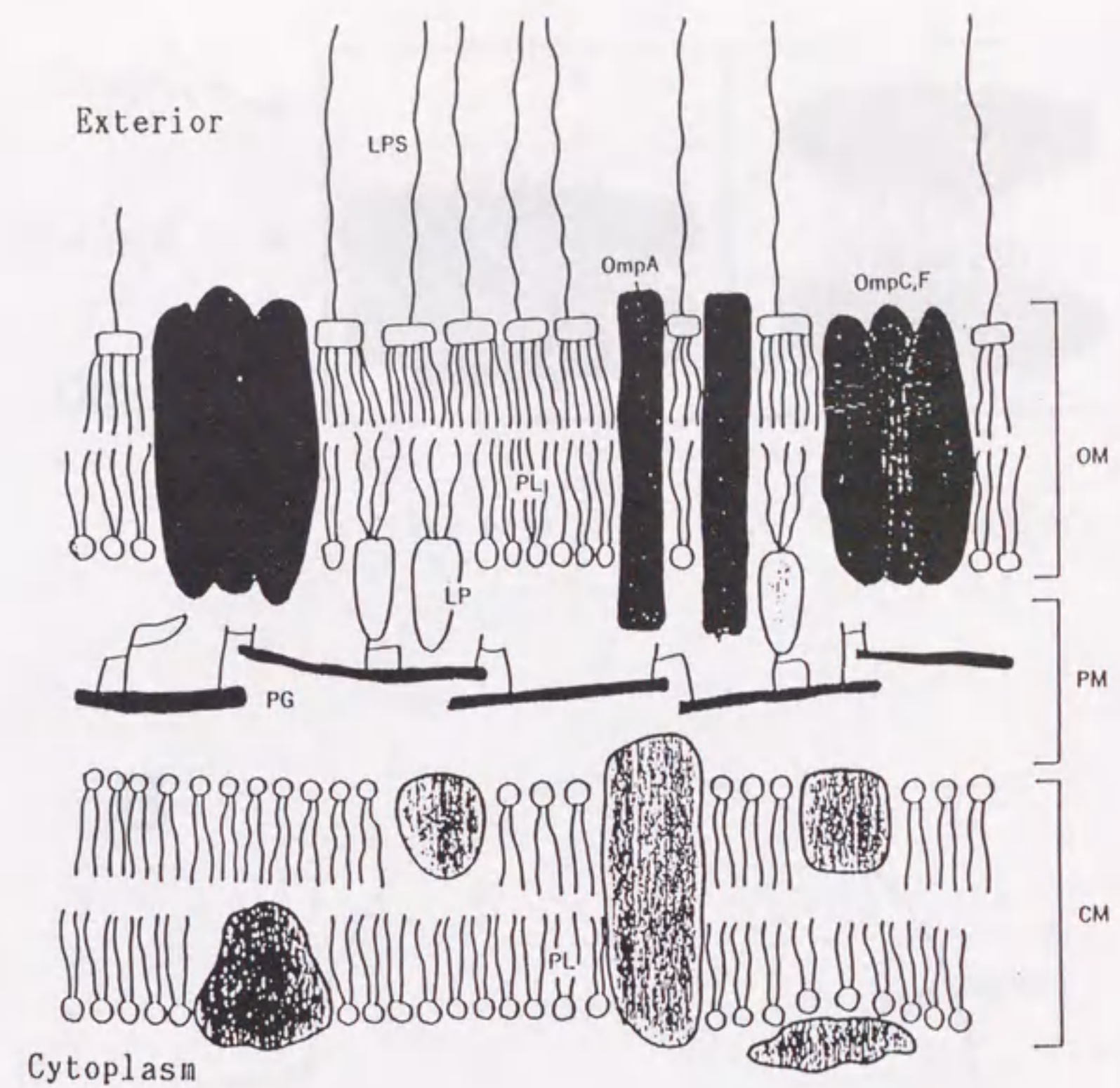


Fig.1

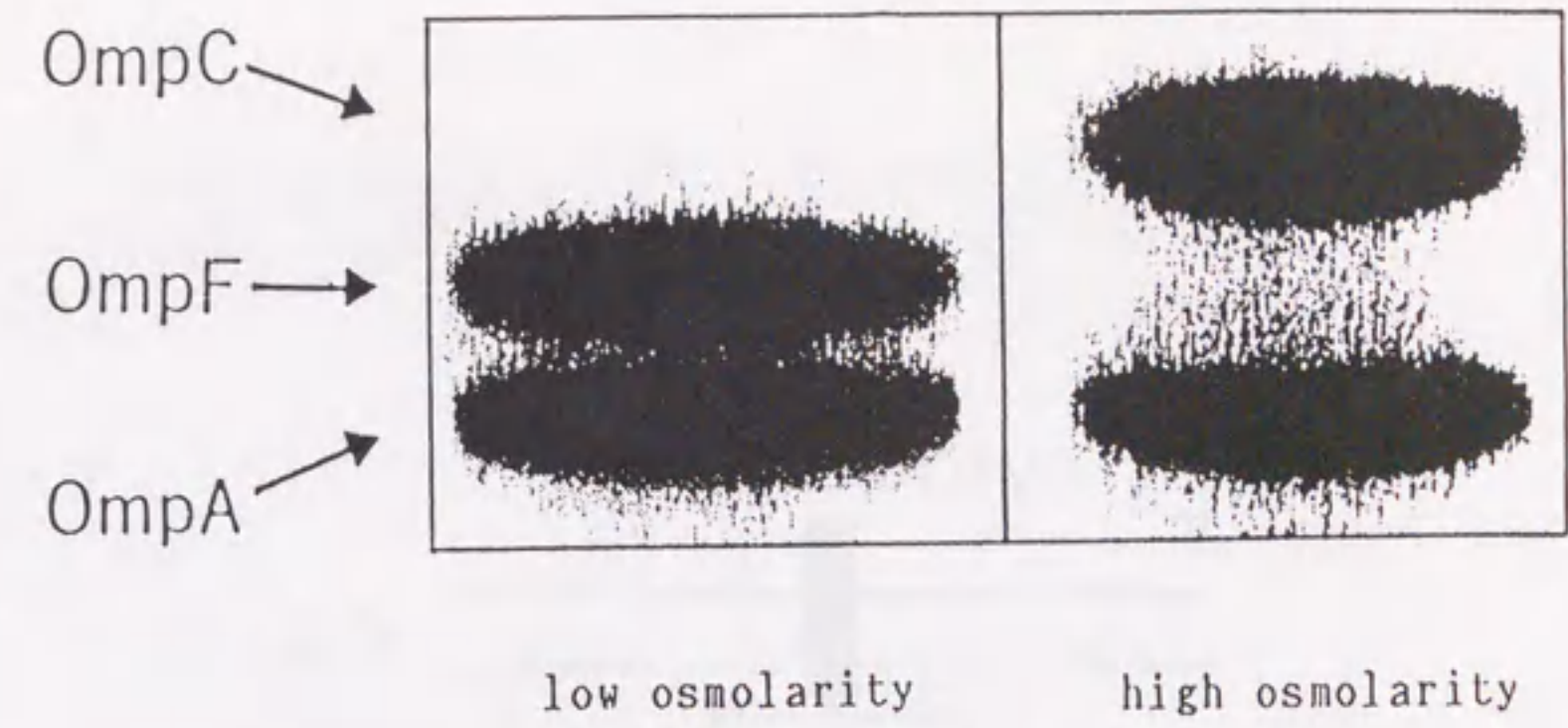
Schematic presentation of the molecular structure of the *Escherichia coli* cell surface.

OM: outer membrane, PM: periplasmic space,  
 CM: cytoplasmic membrane, PG: peptidoglycan layer,  
 LPS: lipopolysaccharide, PL: phospholipid,  
 LP: lipoprotein.





A



B

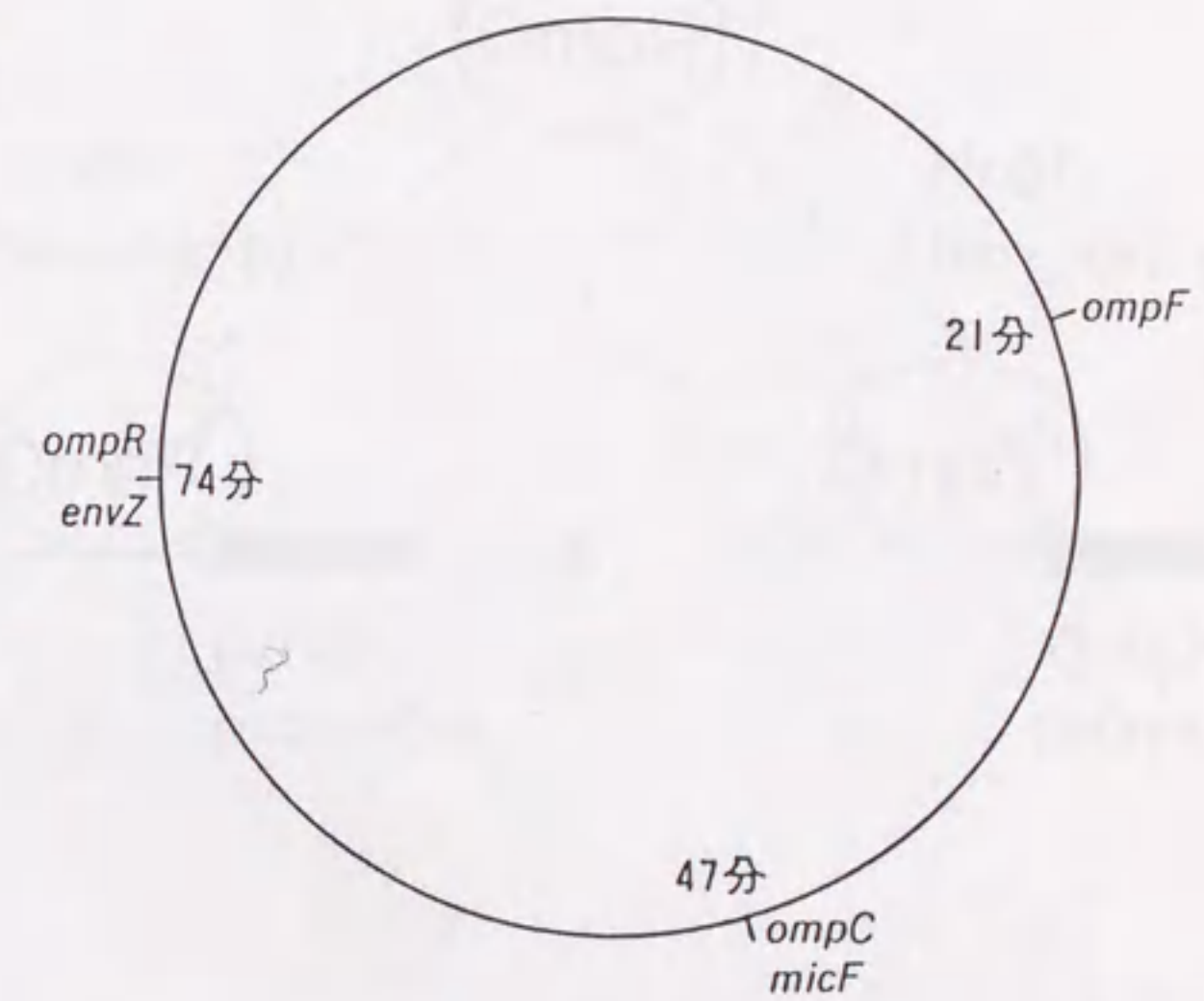


Fig.2

Characteristics as to osmoregulation

A. Gel electrophoretic profiles of outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12.

Outer membrane protein fractions were prepared from cells grown either in medium of low or high osmolarity.

B. Location of the genes involved in osmoregulation on the *Escherichia coli* genetic map.



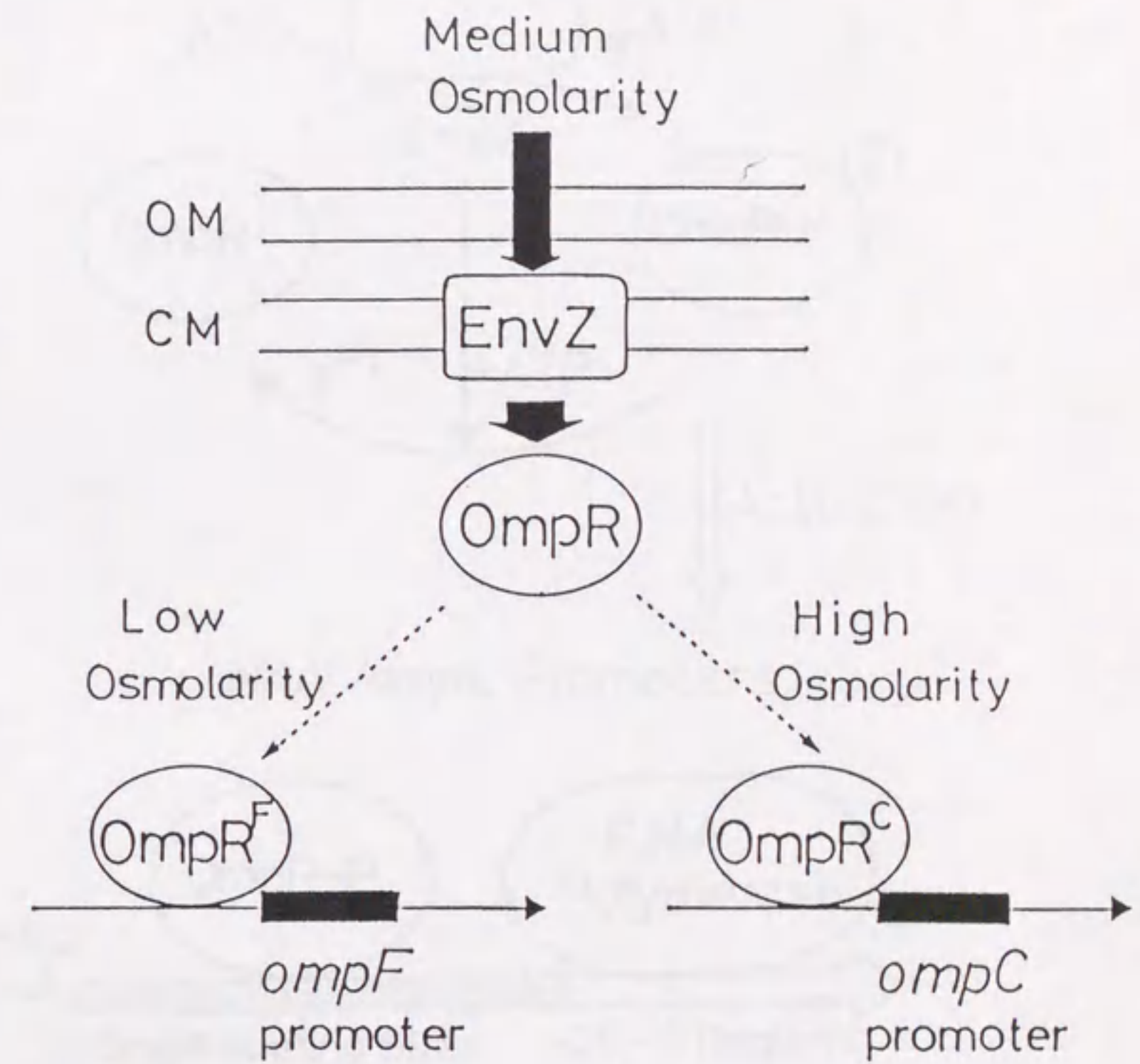


Fig.3

A model for osmoregulation mediated by the two regulatory components, EnvZ and OmpR.

OM:outer membrane ; CM:cytoplasmic membrane

OmpR<sup>C</sup> and OmpR<sup>F</sup> represent putative two distinct forms of the OmpR, which respectively activate the *ompC* and *ompF* genes.



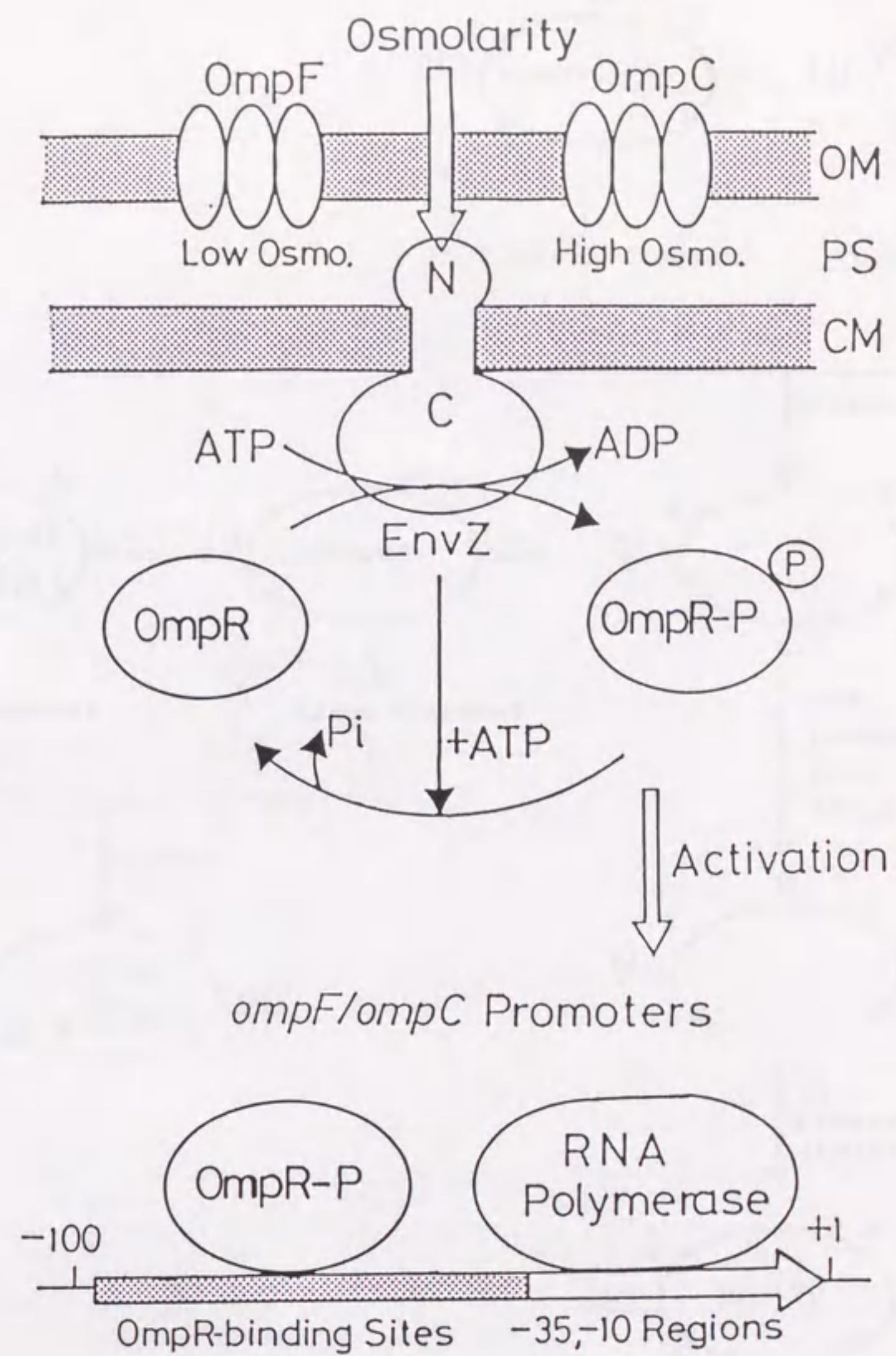


Fig.4  
Scheme showing signal transduction and activation of the *ompF* and *ompC* promoters.



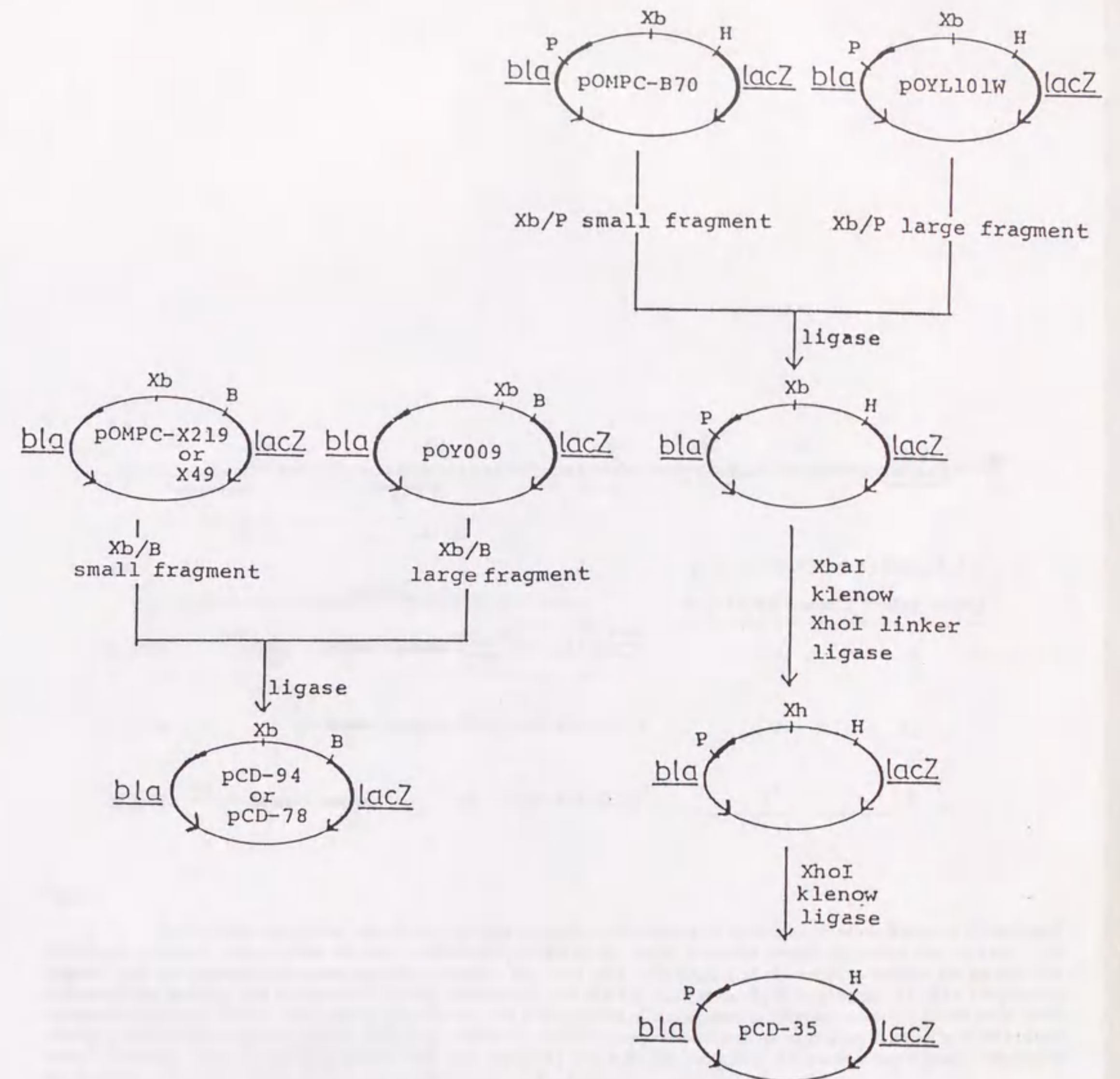


Fig.5 Construction of the upstream deletion mutants of the *ompC* promoter. Restriction endonuclease cleavage sites are shown by the following abbreviations : Xb, XbaI ; B, BamHI ; P, PstI ; Xh, XhoI ; H, HindIII. XhoI linker used in this construction is a 8-mer (dCCTCGAGG).



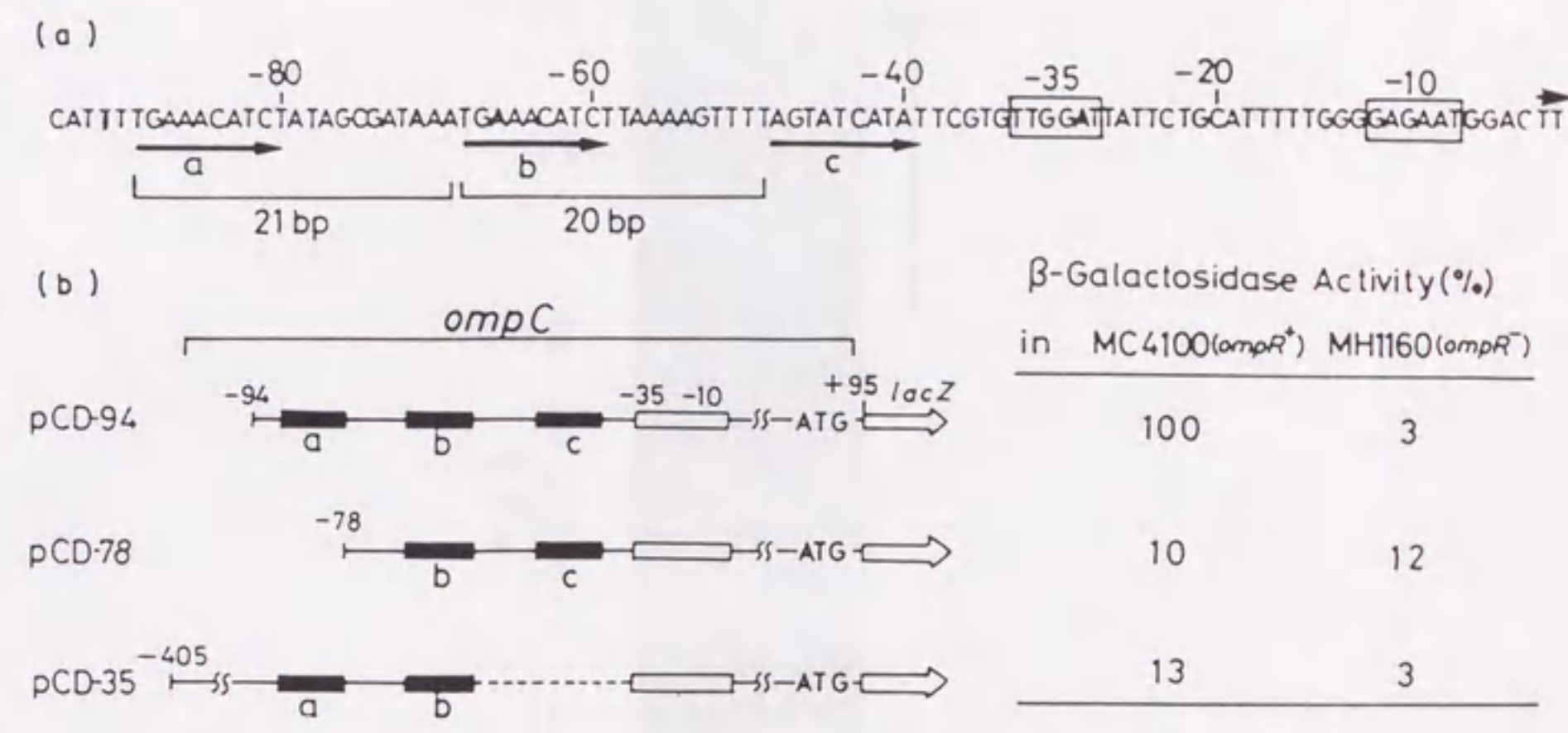


Fig.6

Nucleotide sequence of the *ompC* promoter region and influence of upstream deletion mutants of the *ompC* promoter on *ompC* transcription. (a) The nucleotide sequence of the *ompC* promoter region, including the -35 and -10 regions and the transcription starting site, is shown. The -35 and -10 regions of the *ompC* promoter are boxed. The transcription starting site is indicated by the arrowhead, and the 1st nucleotide (T) is numbered +1. The 3 repetitive sequences (a, b and c) are indicated by arrows. (b) DNA structures of the upstream deletion mutants of the *ompC-lacZ* fusion gene are shown schematically. The β-galactosidase activities expressed by these upstream deletion mutants of the *ompC* promoter were measured in strains MC4100 (*ompR*<sup>+</sup>) and MH1160 (*ompR*<sup>-</sup>). β-Galactosidase activity expressed by pCD-94 in MC4100 was taken as 100% (990 units of β-galactosidase activity).



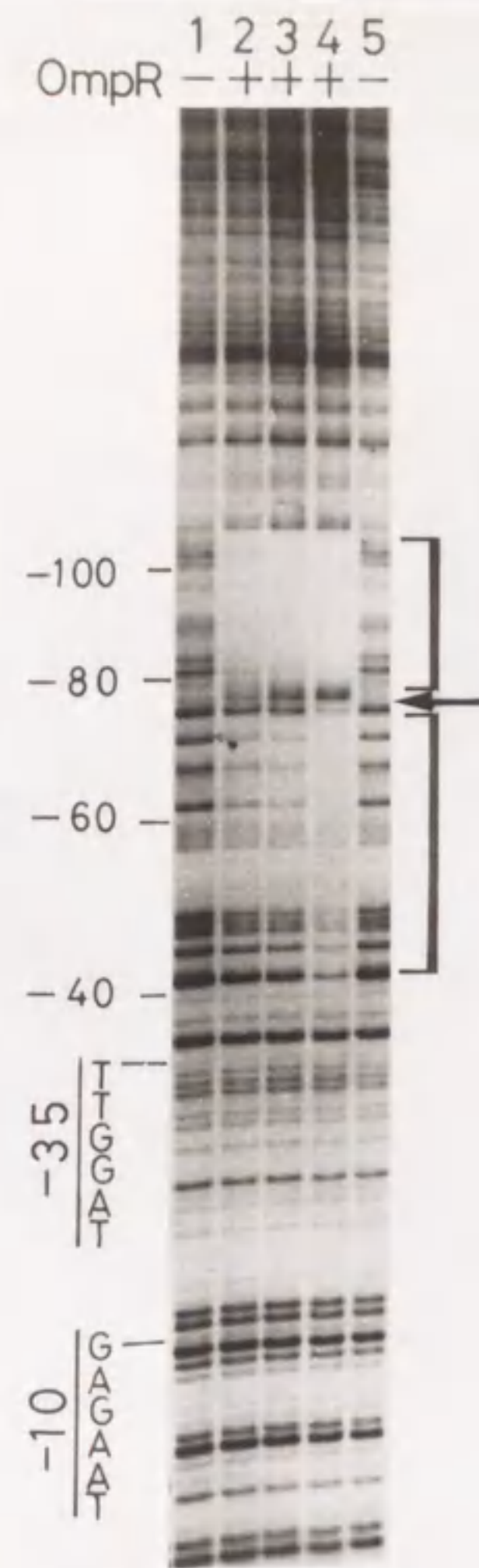


Fig. 7

DNase I footprinting of the *ompC* promoter region with the OmpR protein. A *Hind*III fragment encompassing the *ompC* promoter region was isolated from plasmid pCI-0 (see Fig. 9) and labeled with  $^{32}\text{P}$ . After digestion of the  $^{32}\text{P}$ -labeled fragment with *Hap*II, a large *Hap*II-*Hind*III fragment was isolated. The  $^{32}\text{P}$ -labeled fragment (about 0.3 pmol,  $10^5$  cts/min) was incubated with various amounts of the OmpR protein, followed by DNase I digestion. The amounts of the OmpR protein used were: none (lanes 1 and 5), 30 pmol (lane 2), 90 pmol (lane 3) and 180 pmol (lane 4). After brief digestion with DNase I, the samples were subjected to electrophoresis on 8% polyacrylamide sequencing gels, followed by autoradiography. The numbers on the left-hand side of the gel correspond to those for the nucleotide sequence of the *ompC* promoter (see Fig. 6); +1 represents the *ompC* transcription starting site. Products of the Maxam-Gilbert "G" cleavage reaction with the *Hap*II-*Hind*III fragment were also electrophoresed adjacent to lane 1 (data not shown) to determine precisely the positions of nucleotides. The regions protected by the OmpR protein are indicated by brackets on the right hand side of the gel. The enhanced region is indicated by the arrow.



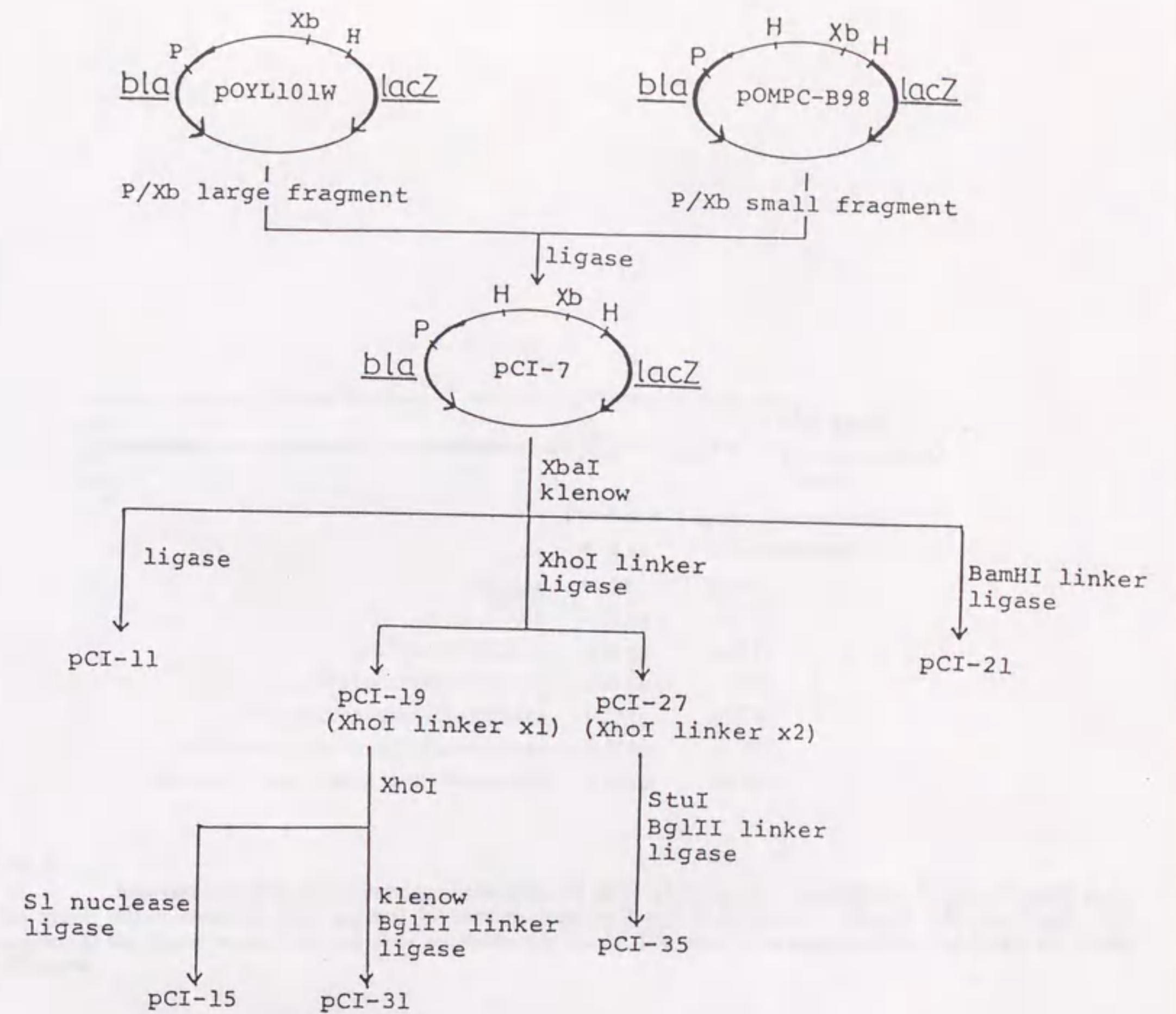


Fig.8 Construction of the spacing-mutants of the *ompC* promoter. Restriction endonuclease cleavage sites are shown by the following abbreviations : P, PstI ; Xb, XbaI ; H, HindIII. Synthetic linkers used in this construction are XhoI linker (dCCTCGAGG), BglIII linker (dCAGATCTG), and BamHI linker (dCCGGATCCGG). pCI-0 was constructed from pOMPC-A5 and pOY009 with the same strategy as pCD-94 or pCD-78 (see Fig.2).



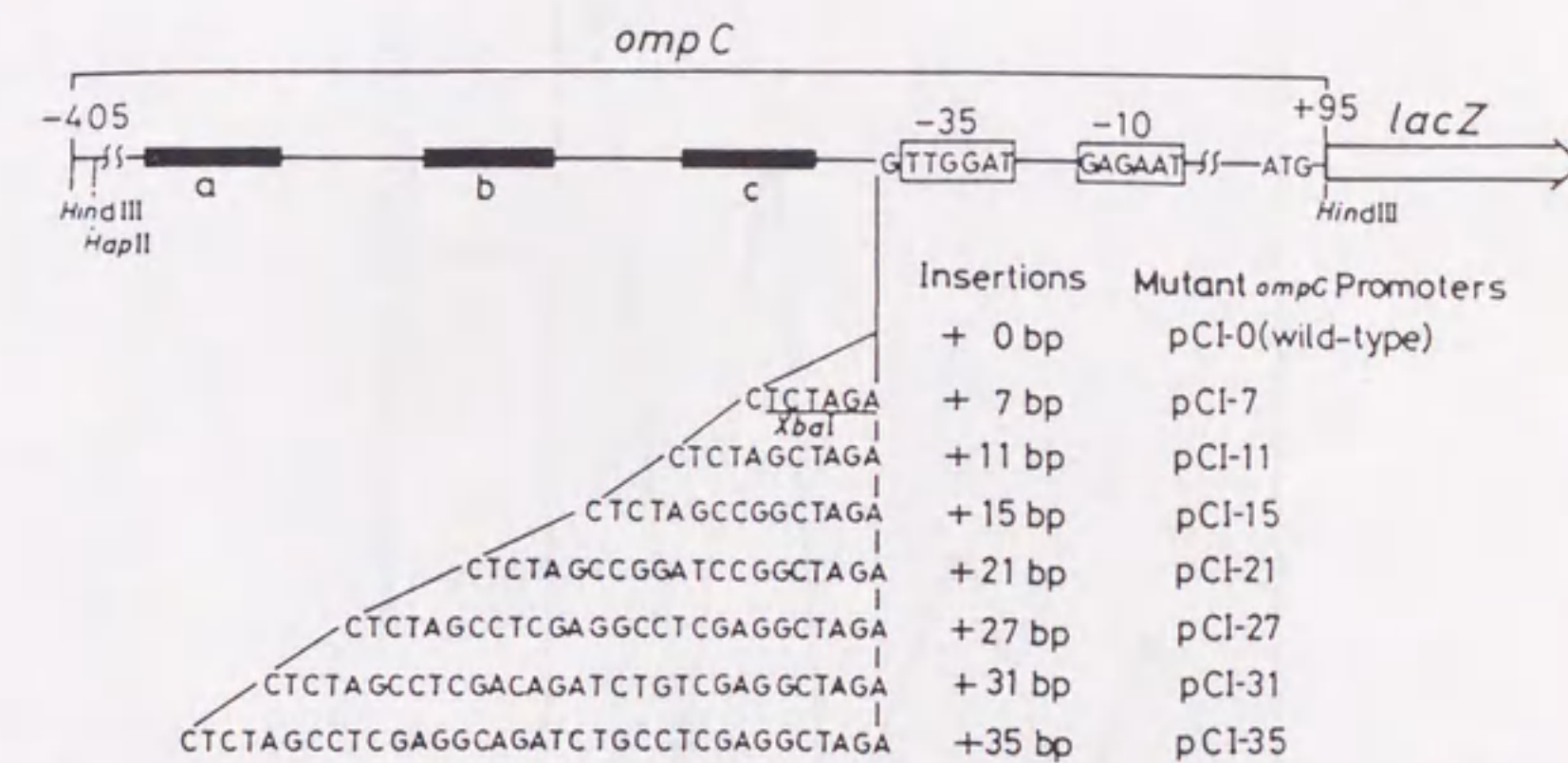


Fig.9

Representation of the structures of the series of *ompC* promoter spacing-mutants fused to the *lacZ* gene. The spacer oligonucleotides were inserted between nucleotides T and G (positions -35 and -34, see Fig. 6). The numbers of the spacer nucleotides and their sequences are shown. The series of spacing-mutants was designated as the pCI series.



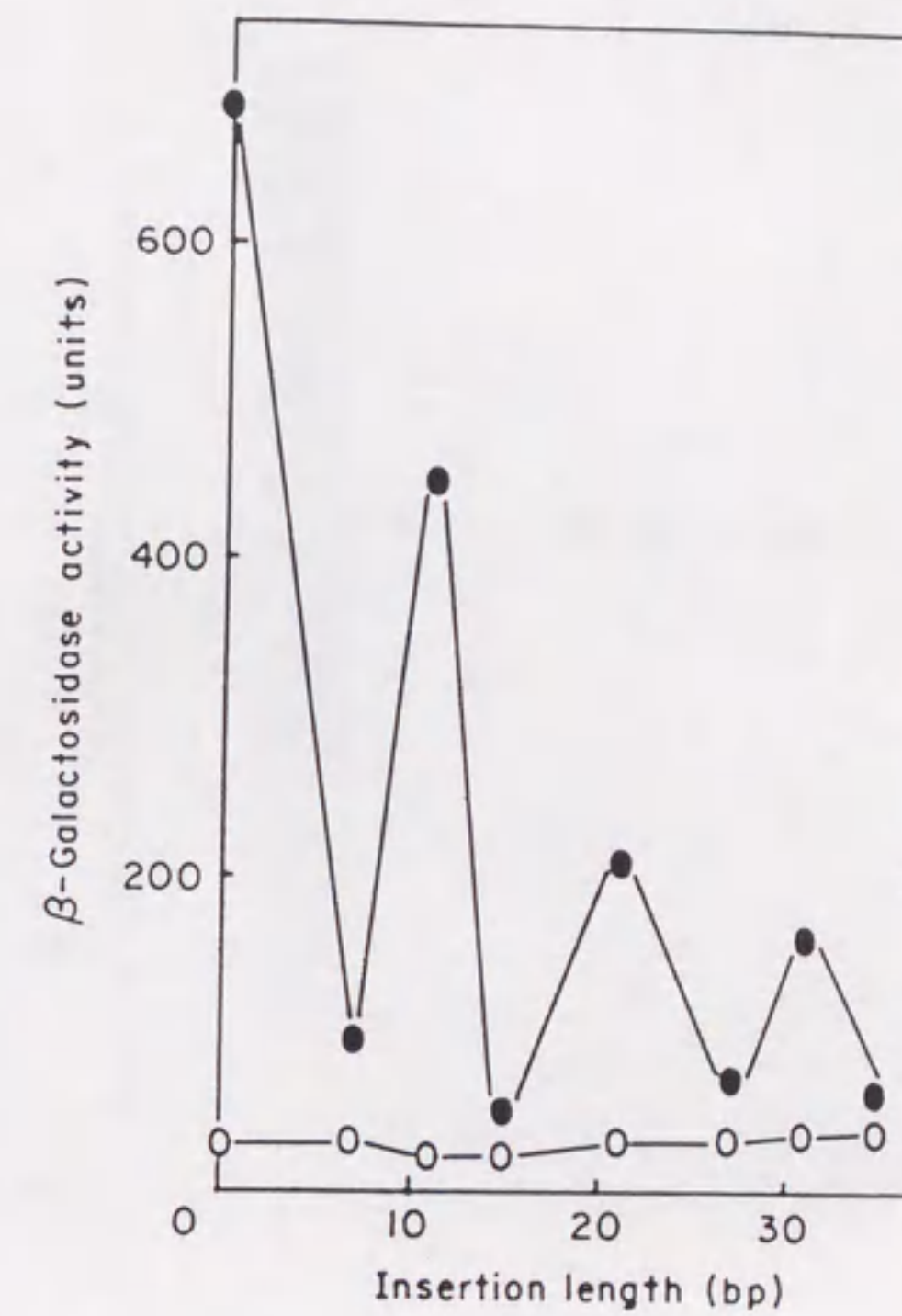


Fig.10

Influence of the spacing-mutants on the *ompC* promoter activity. The  $\beta$ -galactosidase activities expressed by the spacing-mutants of the *ompC* promoter were determined in strains MC4100 (*ompR*<sup>+</sup>) (filled circles) and MH1160 (*ompR*<sup>-</sup>) (open circles).



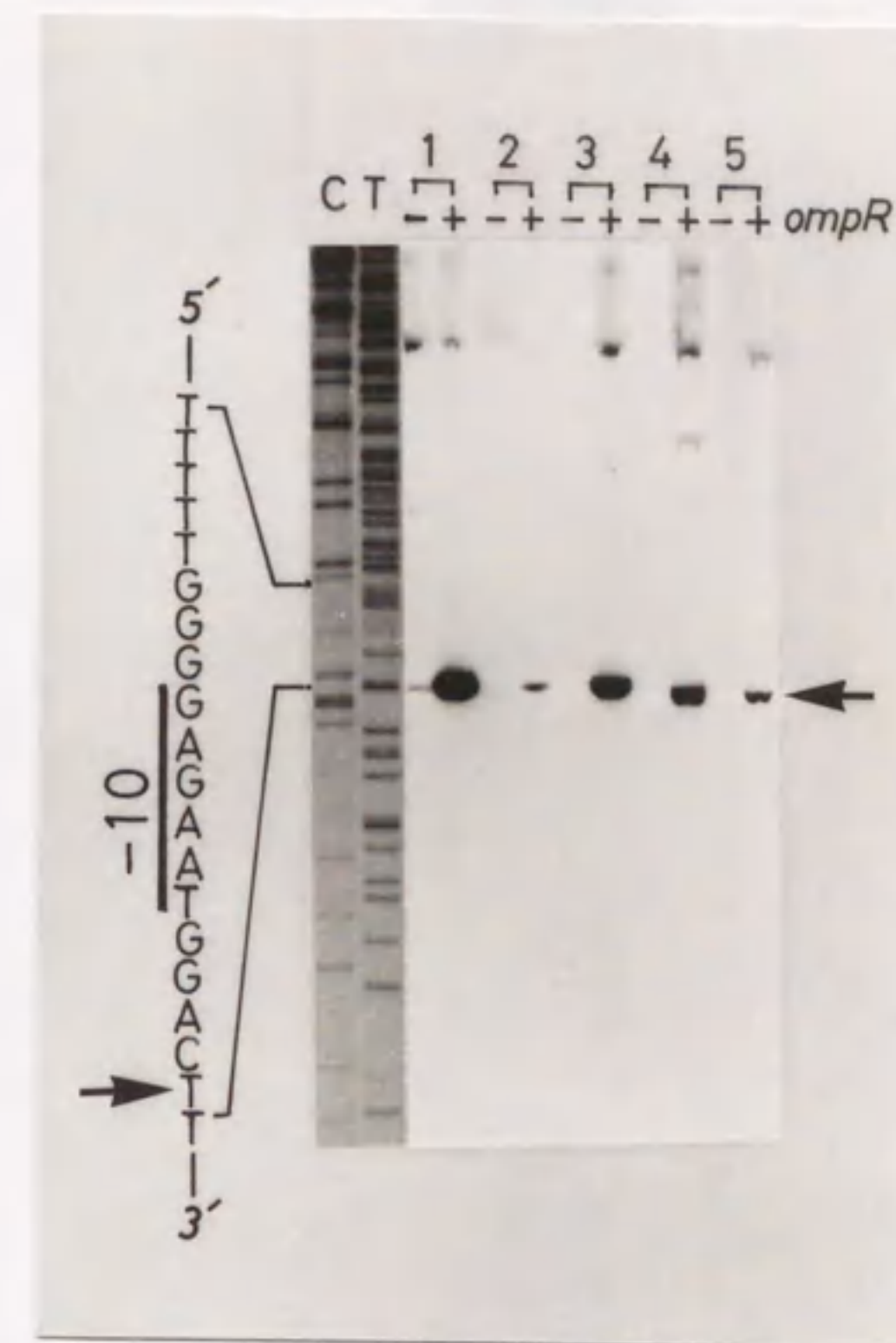


Fig.11 Quantitative reverse transcriptase mapping of the transcription starting sites in the spacing-mutants of the *ompC* promoter. RNA fractions were prepared from cells harboring plasmids carrying the spacing-mutants: pCI-0 (lane 1), pCI-7 (lane 2), pCI-11 (lane 3), pCI-21 (lane 4) and pCI-31 (lane 5). RNA fractions were prepared from the *ompR*<sup>-</sup> mutant cells (lanes denoted by -) and the *ompR*<sup>+</sup> cells (lanes denoted by +). Reverse transcriptase mapping was carried out as described in Materials and Methods. A synthetic oligonucleotide (dGTTTTCCAGTCAGAC) was used as a primer that hybridizes with the 5' portion of the *lacZ* mRNA. Using the same primer, nucleotide sequencing of the plasmid DNA (pCI-0) by the dideoxy chain termination method was also carried out. The samples of the nucleotide sequencing were electrophoresed adjacent to lane 1; C, "C"-reaction; T, "T"-reaction.



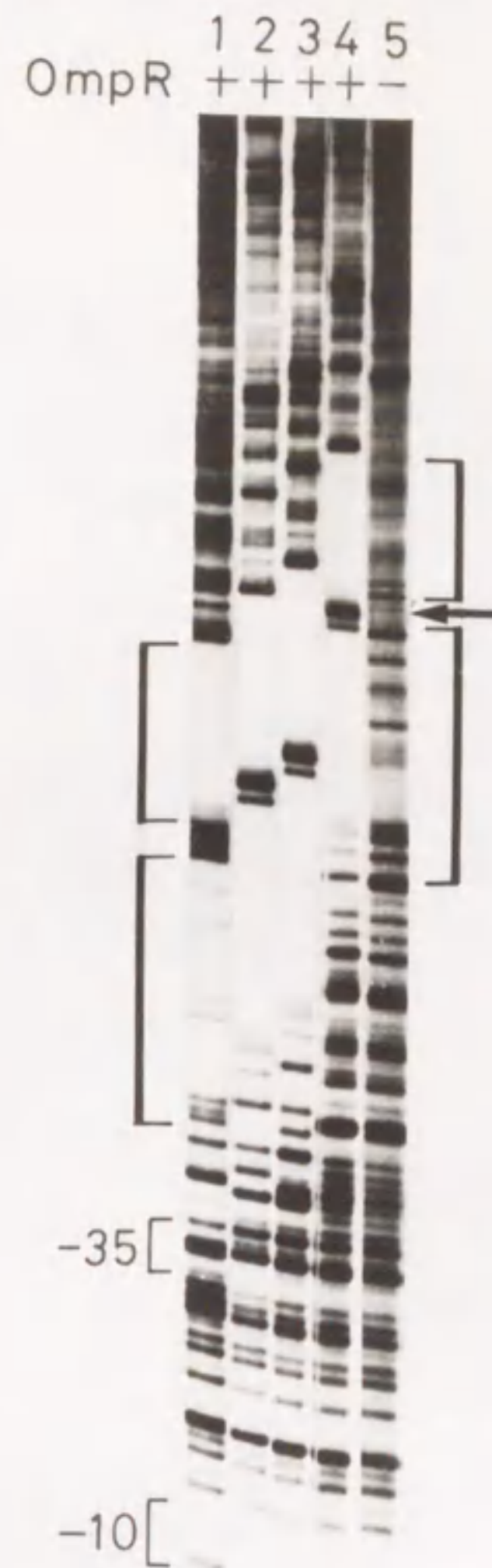


Fig.12

DNase I footprinting of the spacing-mutants of the *ompC* promoter with the OmpR protein. *Hind*III fragments encompassing the wild-type *ompC* promoter (pCI-0) and the spacing-mutants (pCI-7, pCI-11 and pCI-35) were isolated and labeled with  $^{32}\text{P}$  (see Fig. 9). After digestion of the  $^{32}\text{P}$ -labeled fragment with *Hap*II, the large *Hap*II-*Hind*III fragments were isolated. The  $^{32}\text{P}$ -labeled fragments (about 0.3 pmol,  $10^5$  cts/min) isolated from pCI-0 (lane 1), pCI-7 (lane 2), pCI-11 (lane 3) and pCI-35 (lane 4) were incubated with the OmpR protein (50 pmol), followed by DNase I digestion. DNase I digestion of the fragment from pCI-35 in the absence of the OmpR protein was also carried out (lane 5). Other details were the same as in the legend to Fig. 7



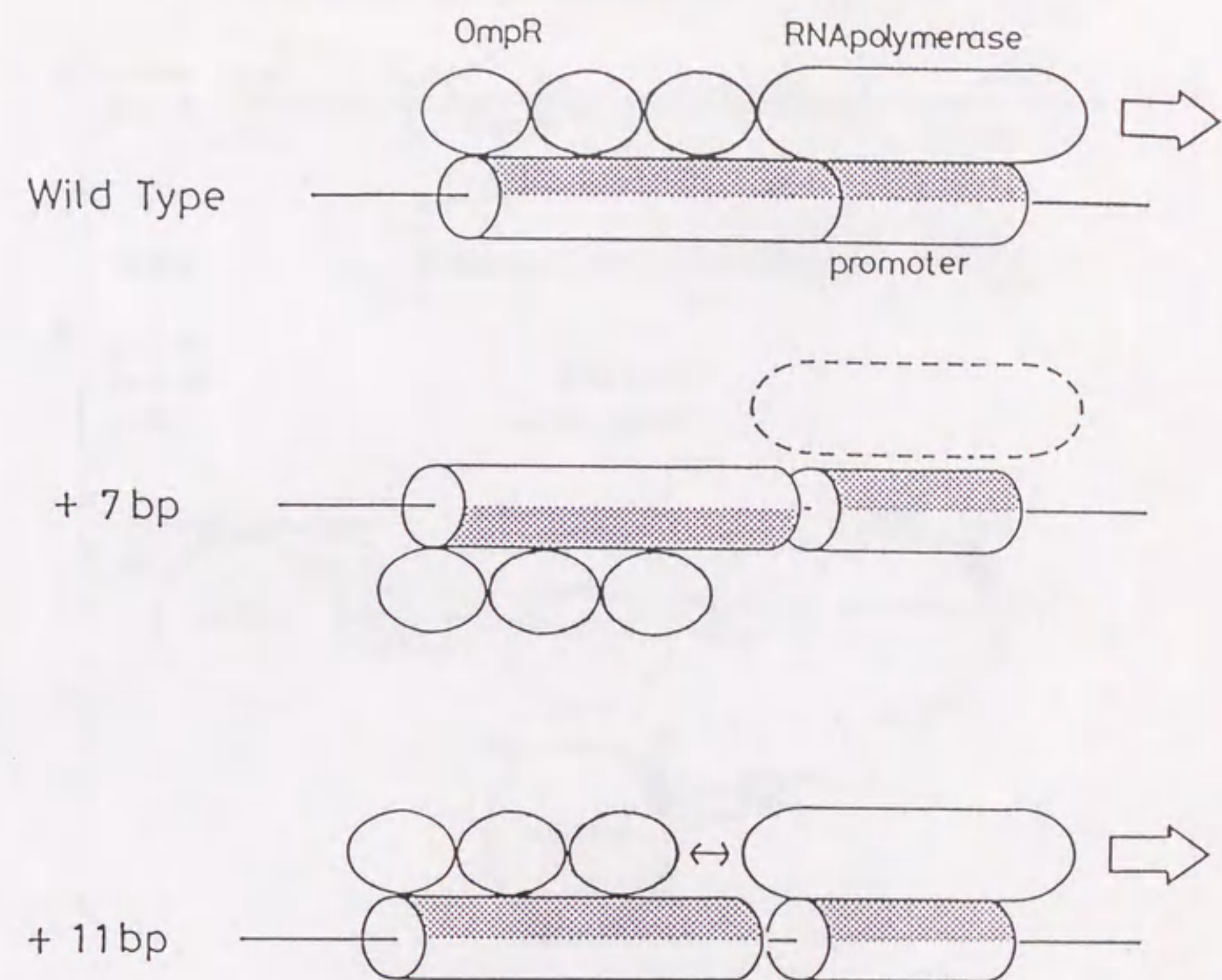


Fig.13 Model for the stereospecific interaction between the upstream sequence and the -35 and -10 regions of the ompC promoter on the DNA helix.



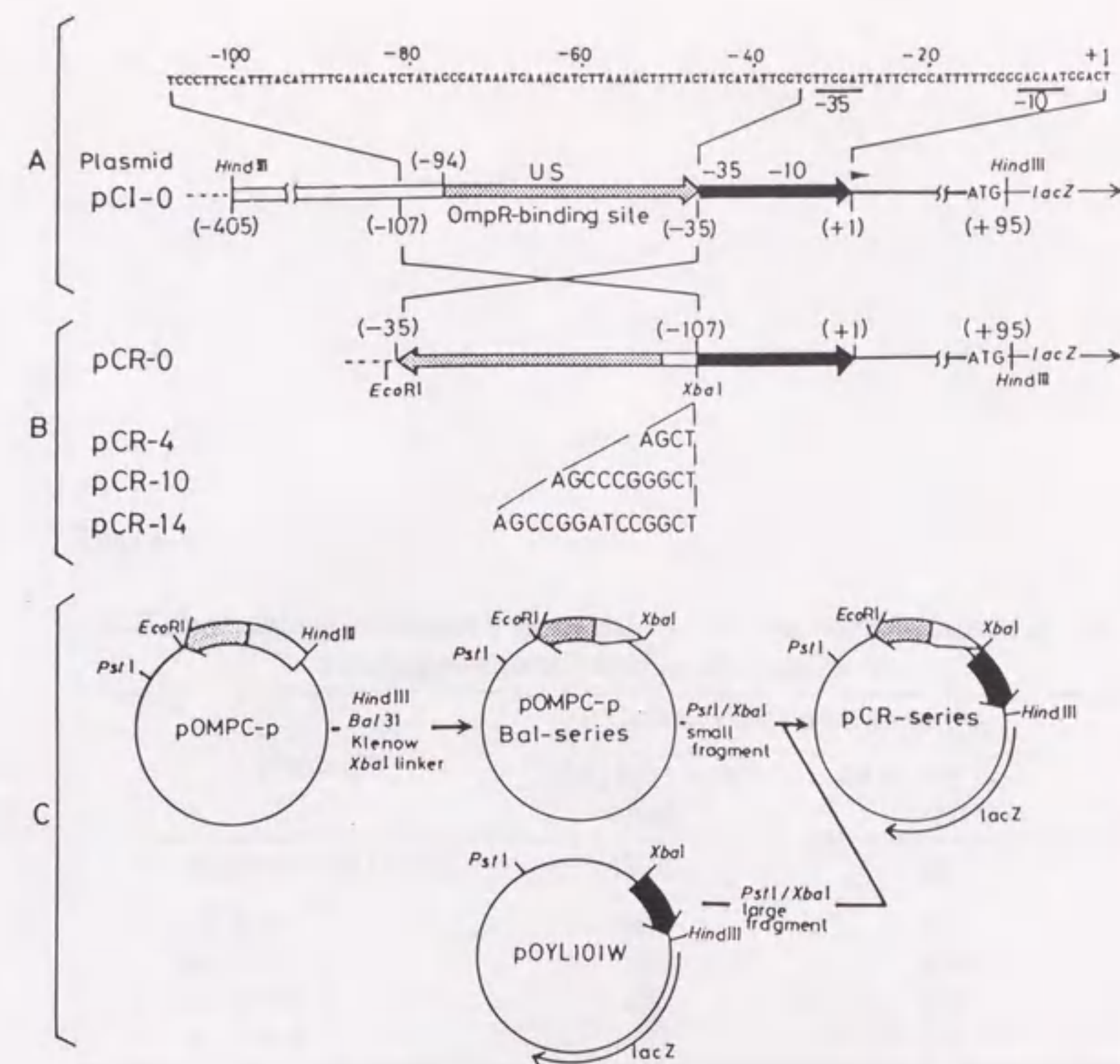


Fig. 14

Schematic representation of the structures of the wild-type and mutant *ompC* promoters, and the strategy used for construction of inversion mutants of the *ompC* promoter. A, schematic representation of the wild-type *ompC* promoter fused to the *lacZ* gene, which is carried on plasmid pCI-0. The numbers in parentheses denote the positions of nucleotides (the *ompC* transcription starting site was taken as +1). The *ompC* transcription starting site, the canonical -35 and -10 regions, and the essential upstream sequence (US) are denoted by ►, ►►, ⇔, respectively. The nucleotide sequence extending from position -107 to +1 is shown above the diagram. B, schematic representation of the inversion mutant of the *ompC* promoter, which is carried on plasmid pCR-0. Note that the upstream sequence extending from position -35 to position -107 is linked to the -35 and -10 regions via an *Xba*I linker (dCTCTAGAG) in the reverse orientation, as compared with the wild-type *ompC* promoter. Plasmids pCR-4, pCR-10, and pCR-14 are derivatives of pCR-0. Plasmid pCR-0 was digested with *Xba*I and then treated with the Klenow fragment. The blunt-ended fragment was religated to construct pCR-4. The same fragment was religated in the presence of a *Sma*I linker (dCCCGGG) and a *Bam*HI linker (dCCGGATCCGG) to construct pCR-10 and pCR-14, respectively. C, strategy used for construction of inversion mutants of the *ompC* promoter. The *Eco*RI-*Hind*III fragment encompassing the upstream sequence of the *ompC* promoter (◀◀), which extends from position -35 to -405, was cloned into pBR322 (plasmid pOMPC-p).





The *ompC* promoter region is located on the chromosome of *E. coli* strain MC4100. The promoter is composed of several regulatory elements, including the *ompC* promoter, the *ompC* gene, and the *ompC* operator. The *ompC* promoter is located upstream of the *ompC* gene and is regulated by the *ompR* protein. The *ompC* gene encodes the *ompC* protein, which is a major outer membrane protein of *E. coli*. The *ompC* operator is located downstream of the *ompC* gene and is recognized by the *ompR* protein. The *ompC* promoter region is also regulated by the *ompR* protein. The *ompC* promoter region is located on the chromosome of *E. coli* strain MC4100. The promoter is composed of several regulatory elements, including the *ompC* promoter, the *ompC* gene, and the *ompC* operator. The *ompC* promoter is located upstream of the *ompC* gene and is regulated by the *ompR* protein. The *ompC* gene encodes the *ompC* protein, which is a major outer membrane protein of *E. coli*. The *ompC* operator is located downstream of the *ompC* gene and is recognized by the *ompR* protein. The *ompC* promoter region is also regulated by the *ompR* protein.

Table.1

*β*-Galactosidase activities expressed by the inversion mutants of the *ompC* promoter fused to the *lacZ* gene

Plasmid <sup>a</sup>	<i>β</i> -Galactosidase activity (units) <sup>b</sup>	
	MC4100 <i>recA</i> ( <i>ompR</i> <sup>+</sup> )	MH1160 <i>recA</i> ( <i>ompR</i> <sup>-</sup> )
pCI-0 (wild type)	816	44
pCR-0	899	33
pCR-4	58	19
pCR-10	235	20
pCR-14	61	21

<sup>a</sup>The plasmid was transferred into strains MC4100 *recA* and MH1160 *recA*.

<sup>b</sup>The cells were grown in medium A containing 15% (w/v) sucrose.



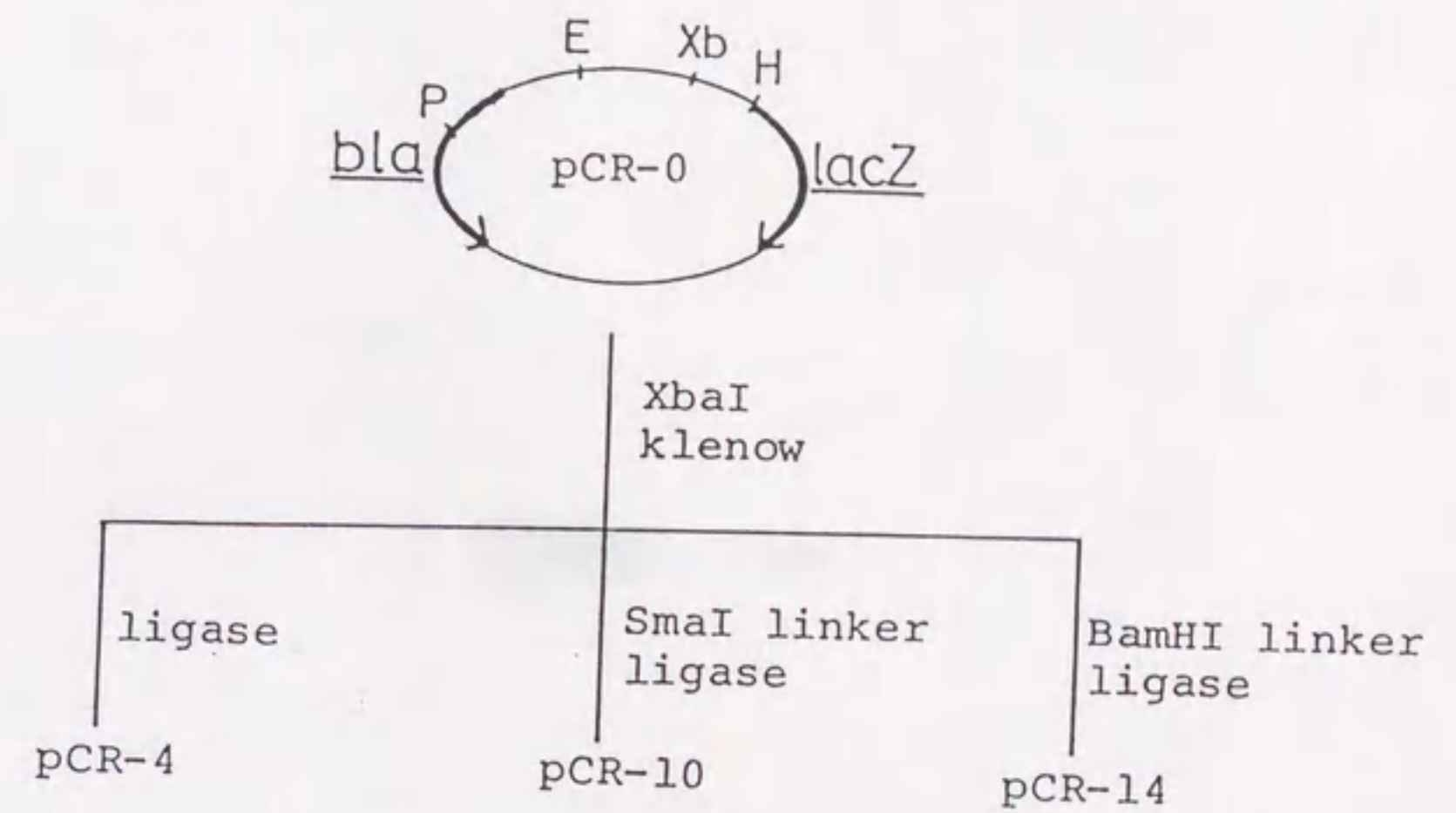


Fig.15 Construction of the spacing-mutants of the inversion mutant of the ompC promoter. Restriction endonuclease cleavage sites are shown by the following abbreviations : P,PstI ; Xb,XbaI ; E,EcoRI ; H,HindIII. Synthetic linkers used in this construction are SmaI linker(dCCCGGG) and BamHI linker(dCCGGATCCGG).



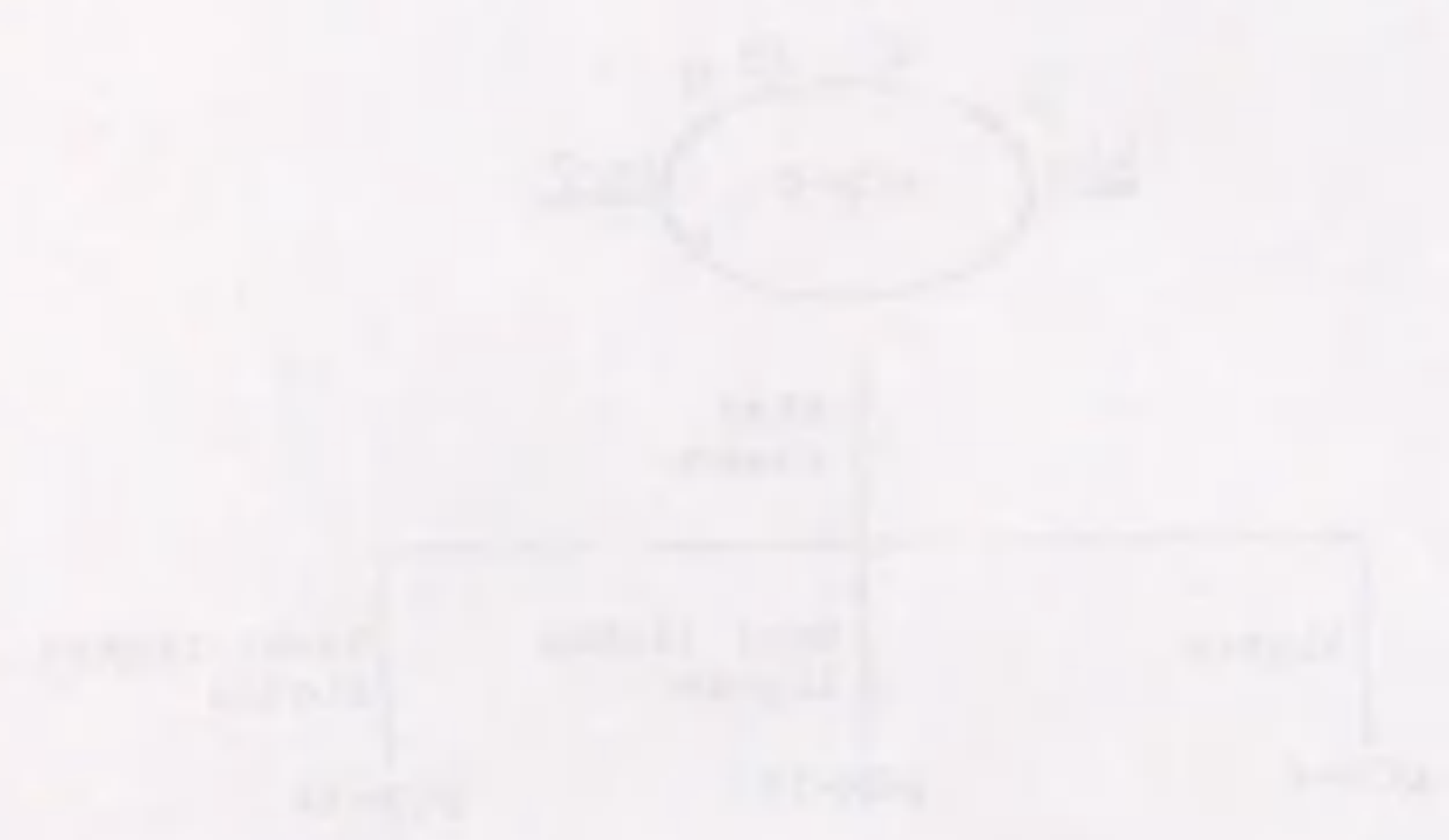
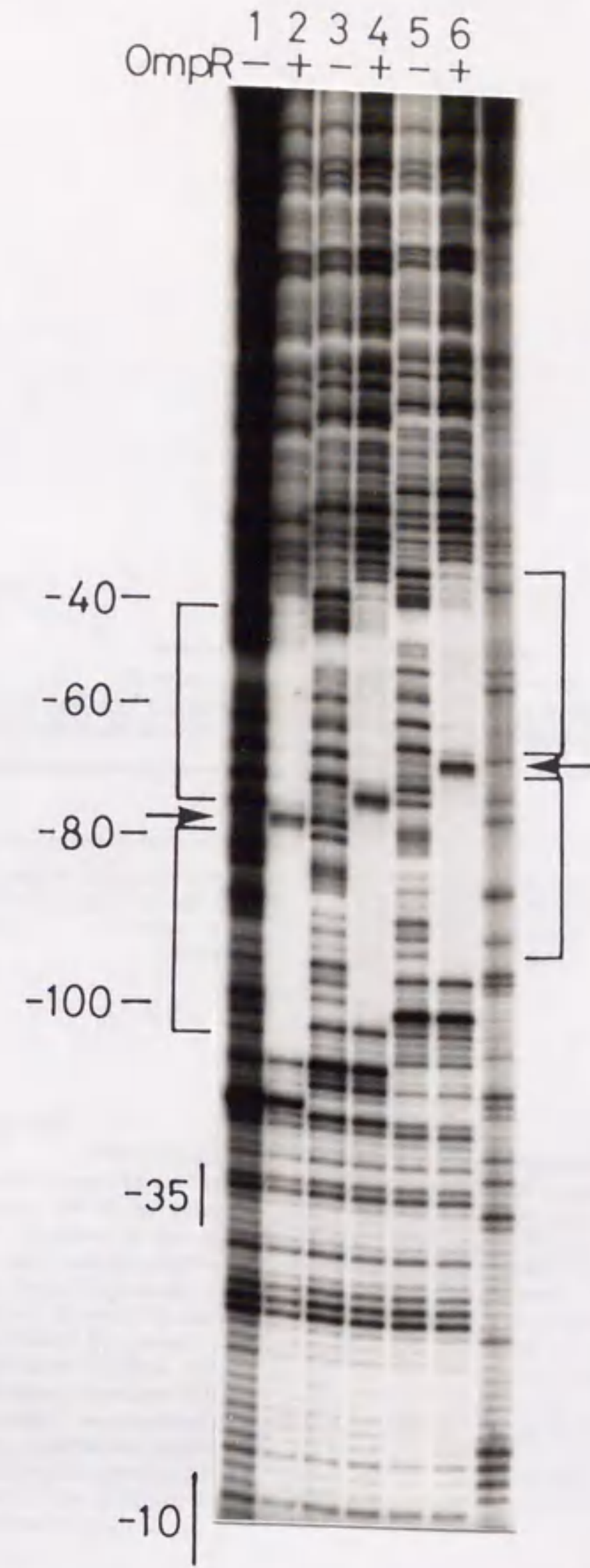


Fig.16  
 Quantitative reverse transcriptase mapping of the transcription starting sites in the inversion mutants of the *ompC* promoter. RNA fractions were prepared from cells harboring plasmids carrying the wild-type *ompC* promoter, pCI-0 (lane 1), and the inversion mutants; pCR-0 (lane 2), pCR-4 (lane 3), pCR-10 (lane 4), and pCR-14 (lane 5). A synthetic oligonucleotide (dGTTTCCAGTCACGAC), which hybridizes with the 5'-portion of the *lacZ* mRNA, was used as a primer for reverse transcriptase mapping. Using the same primer, nucleotide sequencing of the plasmid DNA (pCI-0) was also carried out by the dideoxy chain termination method (data not shown).





**Fig. 17** DNase I footprinting of the inversion mutants of the *ompC* promoter with the OmpR protein. The small *EcoRI-HindIII* fragment encompassing the *ompC* promoter was isolated from plasmids pCR-0 (lanes 1 and 2), pCR-4 (lanes 3 and 4), and pCR-10 (lanes 5 and 6) (see Fig. 14) and then labeled at the 3'-end of its *HindIII* site with <sup>32</sup>P. The <sup>32</sup>P-labeled fragment (10<sup>5</sup> cpm, about 0.6 pmol) was incubated with or without the OmpR protein (50 pmol), followed by DNase I digestion. The samples were subjected to 8% polyacrylamide sequencing gel electrophoresis. The numbers on the left-hand side of the gel correspond to the nucleotide numbers of the wild-type *ompC* promoter (see Fig. 14); +1 represents the *ompC* transcription starting site. The products of the Maxam-Gilbert G cleavage reaction for the *EcoRI-HindIII* fragment from pCR-10 were also electrophoresed adjacent to lane 6 to determine precisely the positions of nucleotides. The regions protected by the OmpR protein are indicated by brackets. The enhanced regions are indicated by arrows.



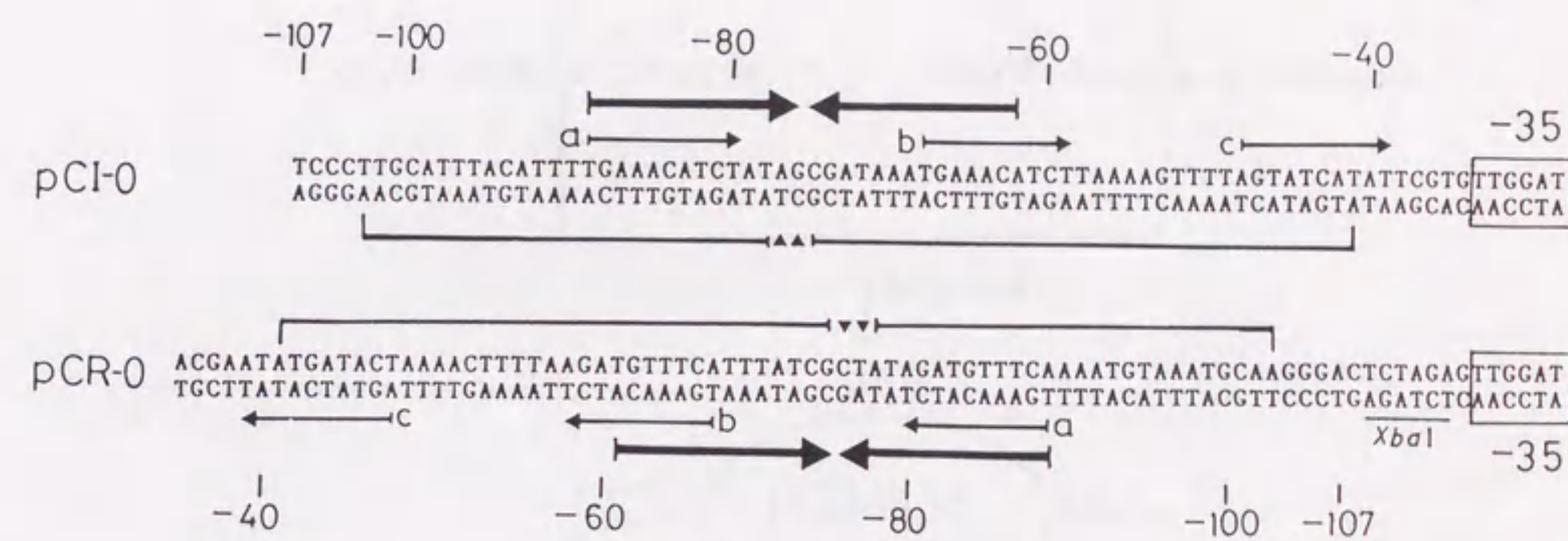


Fig. 18

Characterization of nucleotide sequences of the wild-type and an inversion mutant of the *ompC* promoter. The upper part is the nucleotide sequence of the wild-type promoter (pCI-0), the lower is that of an inversion-mutant promoter (pCR-0). The regions protected by the OmpR protein against DNase I digestion are indicated by brackets either under or above the sequences. The nucleotides, at which enhancement of DNase I digestion was observed, are indicated by closed triangles. The three repetitive sequences are indicated by thin arrows with letters, a, b, and c. The sequence showing imperfect 2-fold symmetry is indicated by thick convergent arrows. The canonical -35 sequence for the *ompC* promoter is boxed. The nucleotide numbers of the wild-type sequence are indicated (the nucleotide corresponding to the transcription starting site is taken as +1). Note that the same nucleotide numbers are adopted for the inversion mutant.



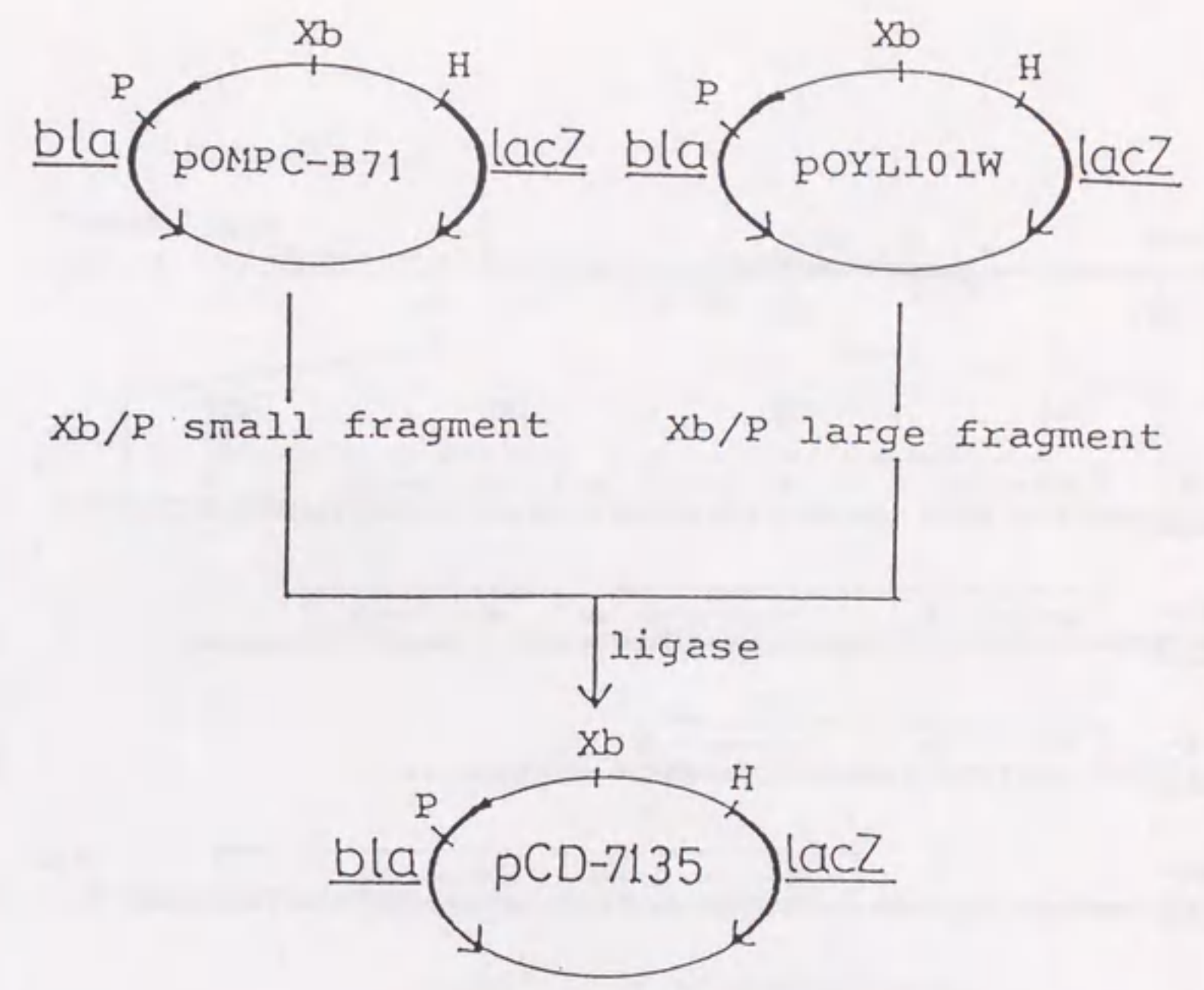


Fig.19  
 Construction of the pCD-7135. Restriction endonuclease cleavage sites are shown by the following abbreviations : Xb, XbaI; P, PstI; H, HindIII.



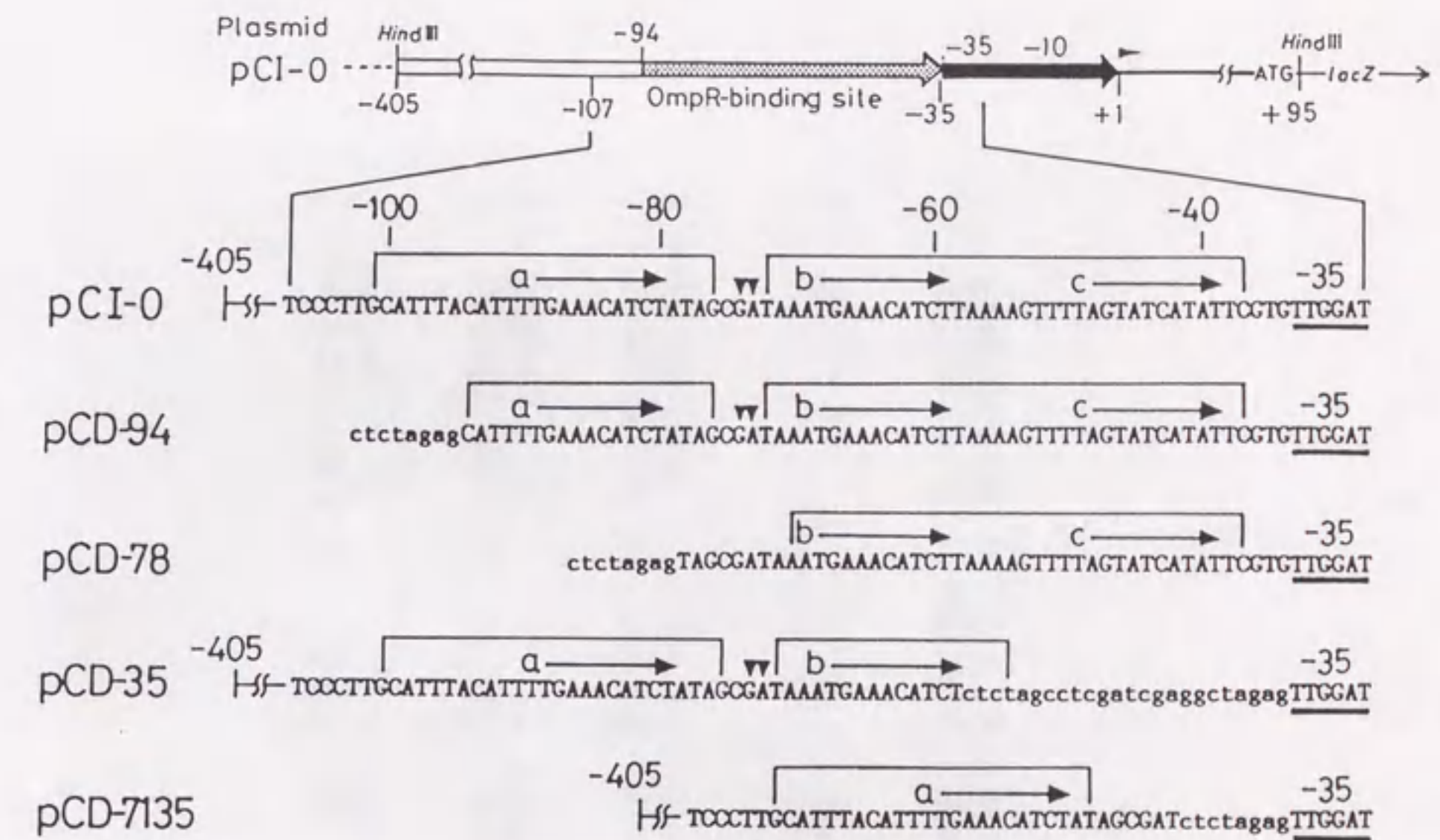


Fig. 20

Schematic representation of the structures of the wild-type and deletion mutants of the *ompC* promoter region. The structure of the wild-type *ompC* promoter fused to the *lacZ* gene, which is carried on plasmid pCI-0, is schematically presented. The *ompC* transcription starting site (▶), the canonical -35 and -10 regions (▶▶), and the essential upstream sequence (◀) are shown. The numbers denote the positions of the nucleotides (the *ompC* transcription start site was taken as +1). The nucleotide sequences of a series of deletion mutants are presented. The three repetitive sequences are indicated by thin arrows preceded by the large lowercase letters a, b, and c. Nucleotides derived from linkers are indicated by small lowercase letters. Note that the same nucleotide numbers as those shown in the wild-type sequence are adopted for the deletion mutants in the text. The regions protected by the OmpR protein against DNase I digestion are indicated by brackets above the sequences (Fig. 20). The nucleotides at which enhancement of DNase I digestion was observed (▼) are also indicated.



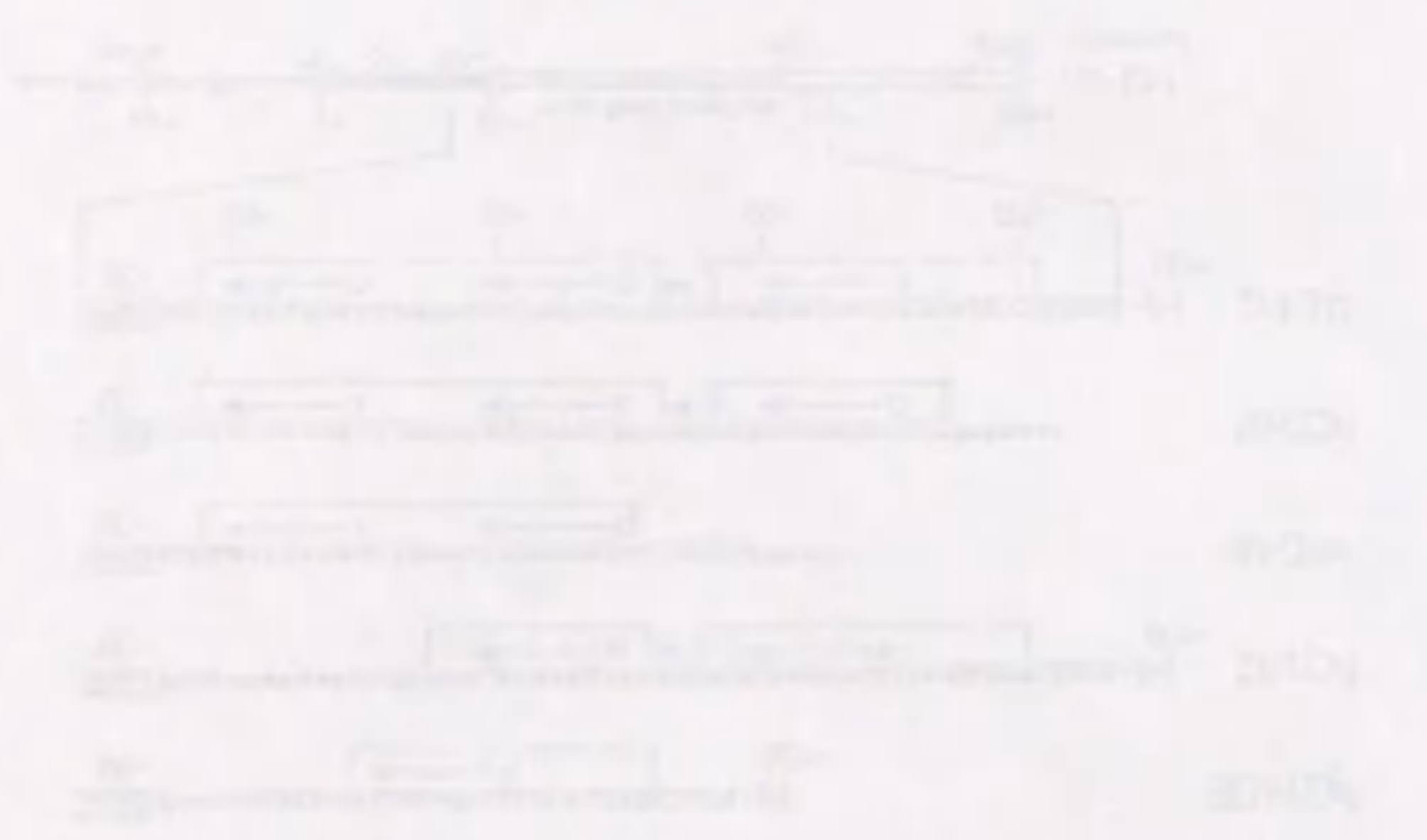


Fig. 20  
 A schematic diagram of the *ompC* promoter region. The horizontal line at the top represents the DNA sequence. The boxes below represent different deletion constructs. Brackets and arrows indicate specific regions of interest, such as the -35 region and other protected/enhanced sites.

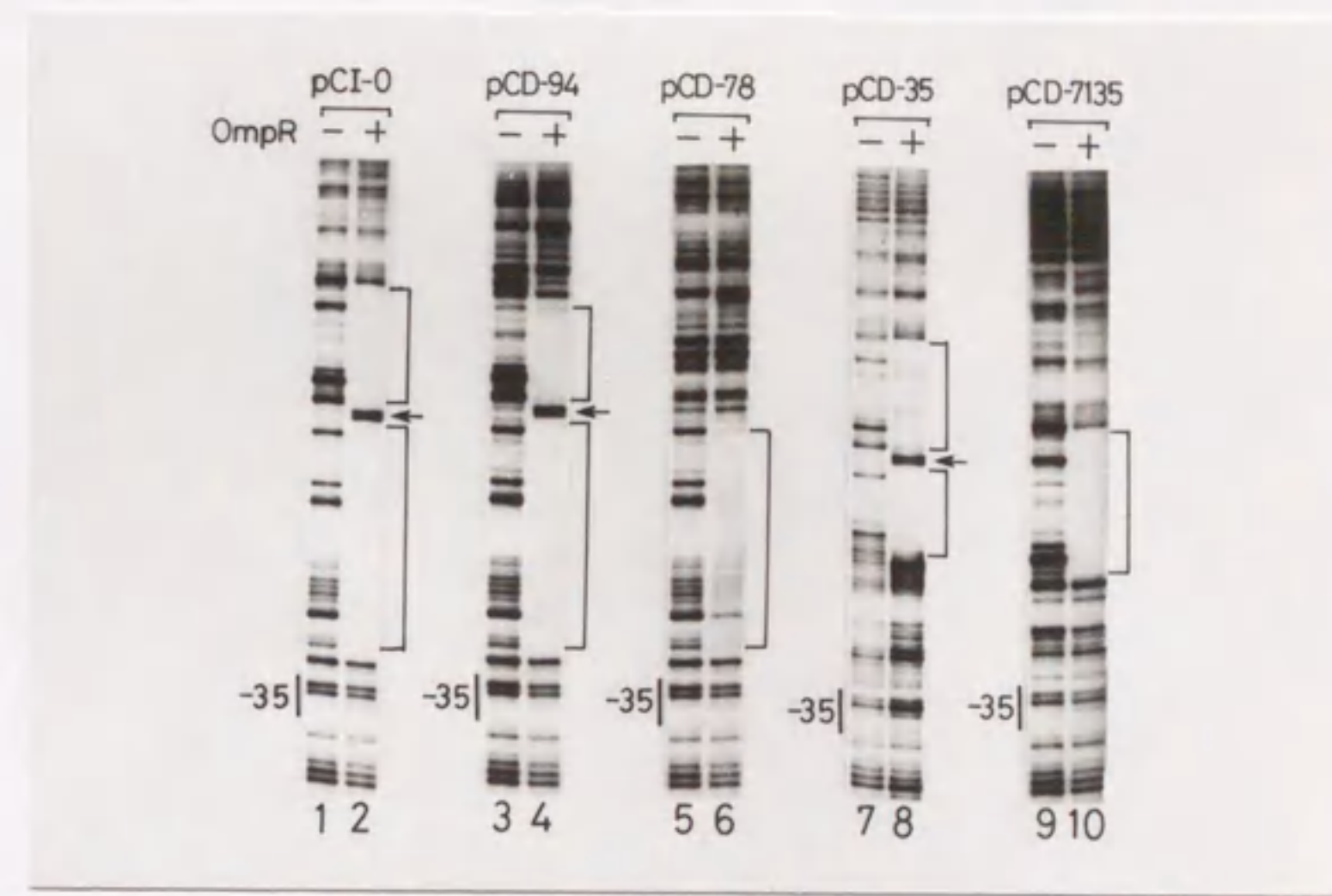


Fig. 21  
 DNase I footprint of the deletion mutants of the *ompC* promoter with the OmpR protein. The regions protected by the OmpR protein (700 pmol) are indicated by brackets. The enhanced regions are indicated by arrows. The precise positions of the protected nucleotides, which are summarized in Fig. 20, were determined by means of the Maxam-Gilbert G cleavage reaction (data not shown).



Table.2

$\beta$ -Galactosidase activities expressed by the deletion mutants of the *ompC* promoter fused to the *lacZ* gene

Plasmid	$\beta$ -Galactosidase activity (U) of:	
	MC4100 <i>recA</i> ( <i>ompR</i> <sup>+</sup> )	MH1160 <i>recA</i> ( <i>ompR</i> )
pCI-0 (wild type)	826	32
pCD-94	515	108
pCD-78	90	128
pCD-35	137	31
pCD-7135	589	39



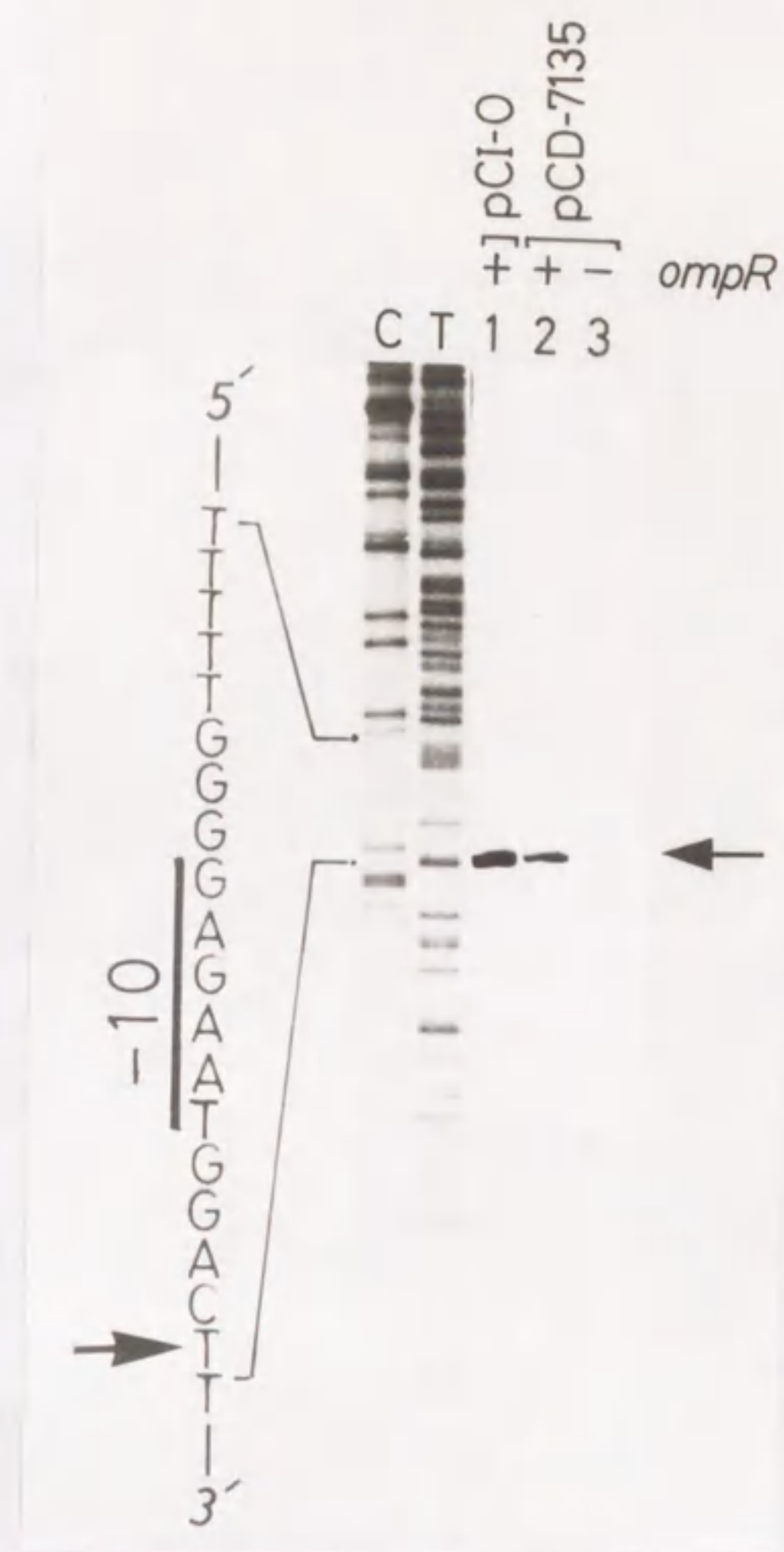
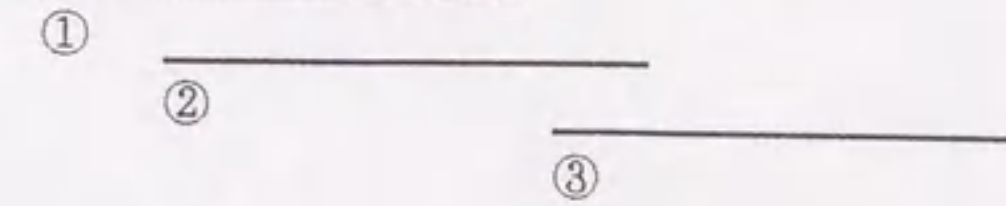


Fig.22

Reverse transcriptase mapping of the transcription start site in the deletion mutant of the *ompC* promoter. RNA fractions were prepared from MC4100 *recA* (*ompR*<sup>+</sup>; lanes denoted by +) and MH1160 *recA* (*ompR*; lane denoted by -) harboring either plasmid pCI-0 or pCD-7135. A synthetic oligonucleotide (dGTTTTCCCAGTCACGAC), which hybridized with the 5'-portion of the *lacZ* mRNA, was used as a primer for reverse transcriptase mapping. By using the same primer, nucleotide sequencing of the plasmid DNA (pCI-0) was also carried out by the dideoxy-chain termination method. Samples of the sequencing were electrophoresed adjacent to lane 1. C, C reaction; T, T reaction.



ompC -100 -80 -60 -40  
 \* \* \* \*  
 TCCCTTGCATTTACATTTGAAACATCTATAGCGATAAAATGAAACATCTTAAAAGTTTATAGTATCATATTCGTGTTGGAT  
 a b c -35



ompF -100 -80 -60 -40  
 \* \* \* \*  
 TCCTTAAATTTACTTTTGGTTACATATTTTTTCTTTTGAACCAAAATCTTATCTTTGTAGCACTTTCACGGTAGCGA  
 -35



- ①: 5' ATTTACATTTTGAAACATCT 3'  
 3' TAAATGTAAAACTTTGTAGA 5'
- ②: 5' CATTTTGAAACATCTATAGC 3'  
 3' GTAAAACTTTGTAGATATCG 5'
- ③: 5' TAGCGATAAAATGAAACATCT 3'  
 3' ATCGCTATTTACTTTGTAGA 5'
- ④: 5' TTTTACTTTTGGTTACATAT 3'  
 3' AAAATGAAAACCAATGTATA 5'

Fig.23  
 Structures of the synthetic 20mers,①②③④.



DNA 20mer	①				②				③				④			
lane No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
EnvZ11*(pmol)	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4
OmpR (pmol)	0	4	200	4	0	4	200	4	0	4	200	4	0	4	200	4

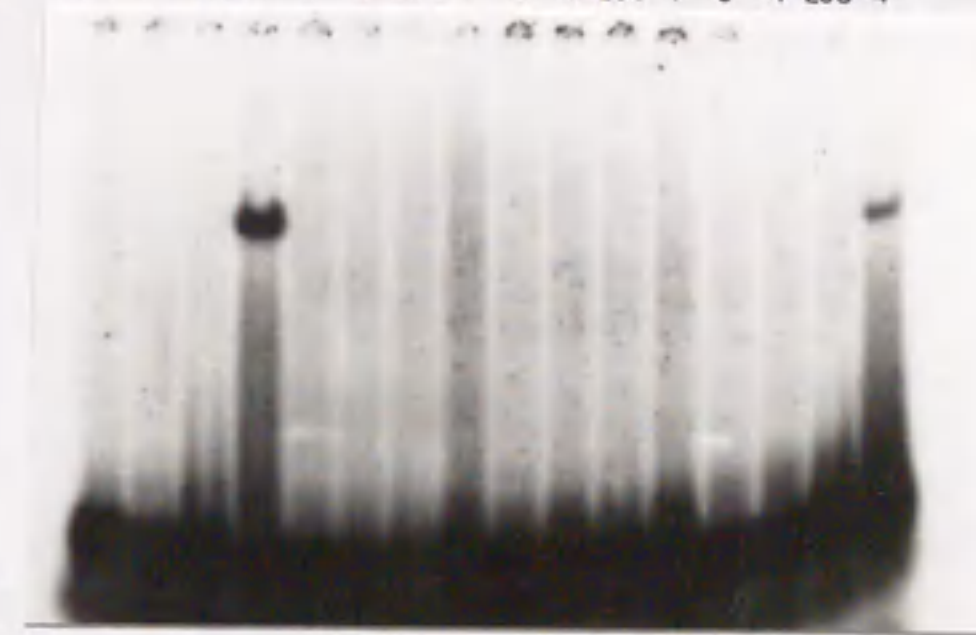


Fig.24  
Gel-shift assay of the synthetic DNA 20mers  
by OmpR or phosphorylated OmpR. Synthetic DNA 20mers  
used in this assay was 0.06pmol/lane. Other details are  
described in Materials and Methods.



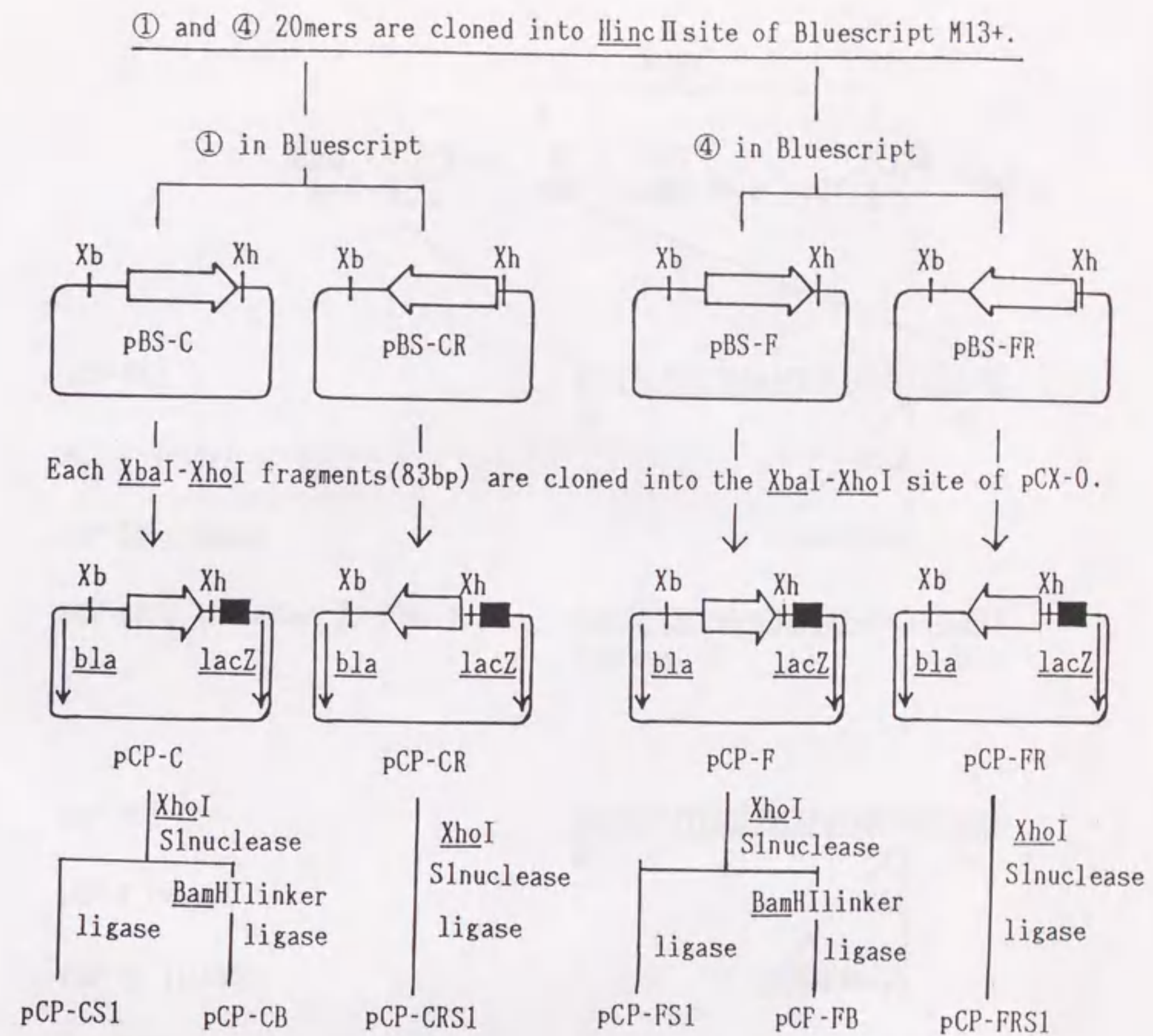
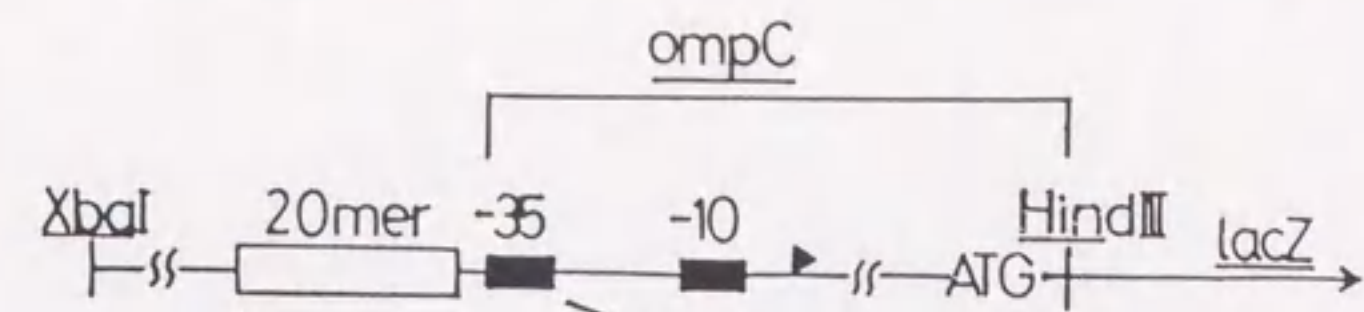


Fig. 25

Construction of pCP-series' plasmids.  $\square$  denotes the synthetic 20mer ① or ④. The orientation of this arrow represents the orientation of 20mers, which are from upstream to downstream in their natural position on the ompC or ompF promoter region.  $\blacksquare$  denotes the -35, -10 regions of the ompC gene. Restriction endonuclease cleavage sites are shown by the following abbreviations: Xb, XbaI; Xh, XhoI. BamHI linker used in this construction is a 10mer (dCCGGATCCGG).





pCP-CS1	<u>ATTACATTTTGAAACATCTGACCGTTGGAT</u> ①	-35
pCP-C (+4bp)	TCGA	
pCP-CB (+10bp)	CCGGATCCGG	
pCP-CRS1 (inverted ① 20mer)	<u>AGATGTTTCAAAAATGTAATGACCGTTGGAT</u> inverted ①	-35
pCP-FS1	<u>TTTACTTTTGGTTACATAIGACCGTTGGAT</u> ④	-35
pCP-F (+4bp)	TCGA	
pCP-FB (+10bp)	CCGGATCCGG	
pCP-FRS1 (inverted ④ 20mer)	<u>ATATGTAACCAAAAAGTAAAAGACCGTTGGAT</u> inverted ④	-35

Fig.26

Structure of pCP-series' plasmids. Each plasmid has part of the *ompC* gene from -33 to +95 including -35, -10 regions, SD sequence and ATG codon. This part of the *ompC* is fused to *lacZ* gene.



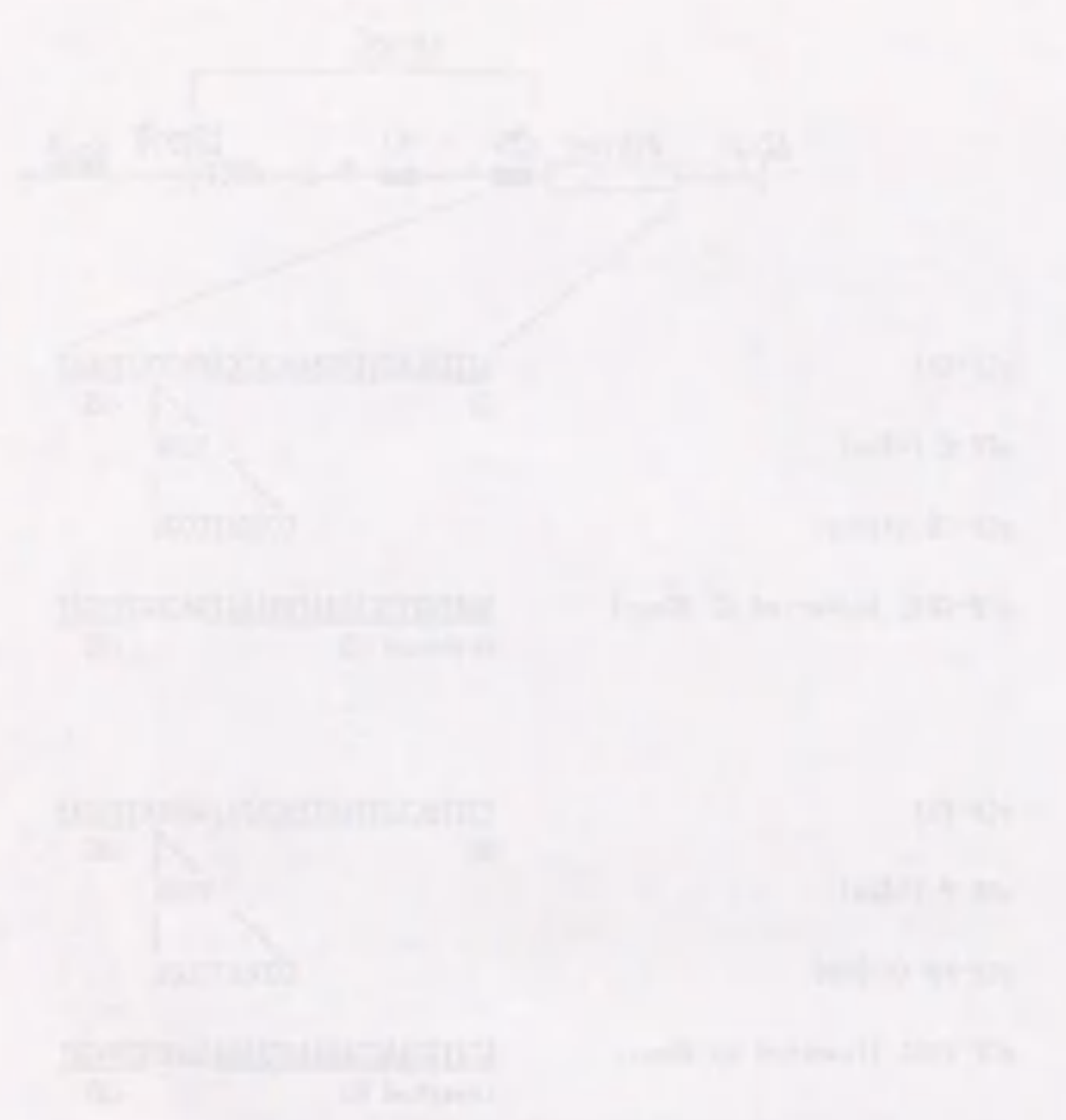


Table.3

$\beta$ -Galactosidase activities expressed by the *ompC* promoters with the synthetic OmpR-binding site fused to the *lacZ* gene.

	$\beta$ -Galactosidase Activity (U)	
	<i>ompR</i> <sup>+</sup>	<i>ompR</i> <sup>-</sup>
pCP-CS1	717	50
pCP-FS1	561	50
pCI-0 (wild <i>ompC</i> promoter)	523	15



Table 4  
 β-Galactosidase activities expressed by  
 the spacing mutants of the *ompC* promoters  
 with the synthetic OmpR-binding site  
 fused to the *lacZ* gene.

Plasmid	β-Galactosidase Activity (U)	
	<i>ompR</i> <sup>+</sup>	<i>ompR</i> <sup>-</sup>
pCP-CS1	717	50
pCP-C (+4bp)	27	20
pCP-CB (+10bp)	174	64
pCP-FS1	561	50
pCP-F (+4bp)	33	40
pCP-FB (+10bp)	145	63

Table.4

β-Galactosidase activities expressed by  
 the spacing mutants of the *ompC* promoters  
 with the synthetic OmpR-binding site  
 fused to the *lacZ* gene.

	β-Galactosidase Activity (U)	
	<i>ompR</i> <sup>+</sup>	<i>ompR</i> <sup>-</sup>
pCP-CS1	717	50
pCP-C (+4bp)	27	20
pCP-CB (+10bp)	174	64
pCP-FS1	561	50
pCP-F (+4bp)	33	40
pCP-FB (+10bp)	145	63



Table 4

β-Galactosidase activities expressed by the ompC promoters with the inverted synthetic OmpR-binding site fused to the lacZ gene.

Plasmid	β-Galactosidase Activity (U)	
	ompR <sup>+</sup>	ompR <sup>-</sup>
pCP-CS1	717	50
pCP-CRS1	205	68
pCP-FS1	561	50
pCP-FRS1	216	77

Table.5

β-Galactosidase activities expressed by the *ompC* promoters with the inverted synthetic OmpR-binding site fused to the *lacZ* gene.

	β-Galactosidase Activity (U)	
	<i>ompR</i> <sup>+</sup>	<i>ompR</i> <sup>-</sup>
pCP-CS1	717	50
pCP-CRS1	205	68
pCP-FS1	561	50
pCP-FRS1	216	77



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 position

ompC -99 ATTTACATTTTGAAACATCTA-79

①

-78 TAGCGATAAAATGAAACATCT-59

③

-58 TAAAAGTTTTAGTATCATAT-39

ompF -181 TTTTACTTTTGGTTACATAT-82

④

-81 TTTTCTTTTGGAAACCAA-62

-61 TCTTTATCTTTGTAGCACTT-42

A 1 2 1 1 3 2 1 1 1 1 1 0 3 5 4 0 5 1 3 1

G 0 0 1 0 1 1 0 0 0 0 1 6 0 0 1 0 0 0 0 0 frequency of

C 0 1 0 1 0 3 0 1 0 0 0 0 0 0 0 6 1 1 2 0 appearance of bases

T 5 3 4 4 2 0 5 4 5 5 4 0 3 1 1 0 0 4 1 5

5' TTTTACTTTTGG<sup>a</sup>TTAACATAT 3' consensus sequences  
3' AAAATGAAAAAC<sup>a</sup>TTGTATA 5'

Fig.27

Sequence analysis of the OmpR-binding sites of the ompC and ompF genes.

Consensus sequence deduced by this alignment is shown at the bottom.

Shaded bases are the ones agreeing with the consensus sequence.

Underlined sequences ①,④,③ are the synthetic 20mers used in this chapter.



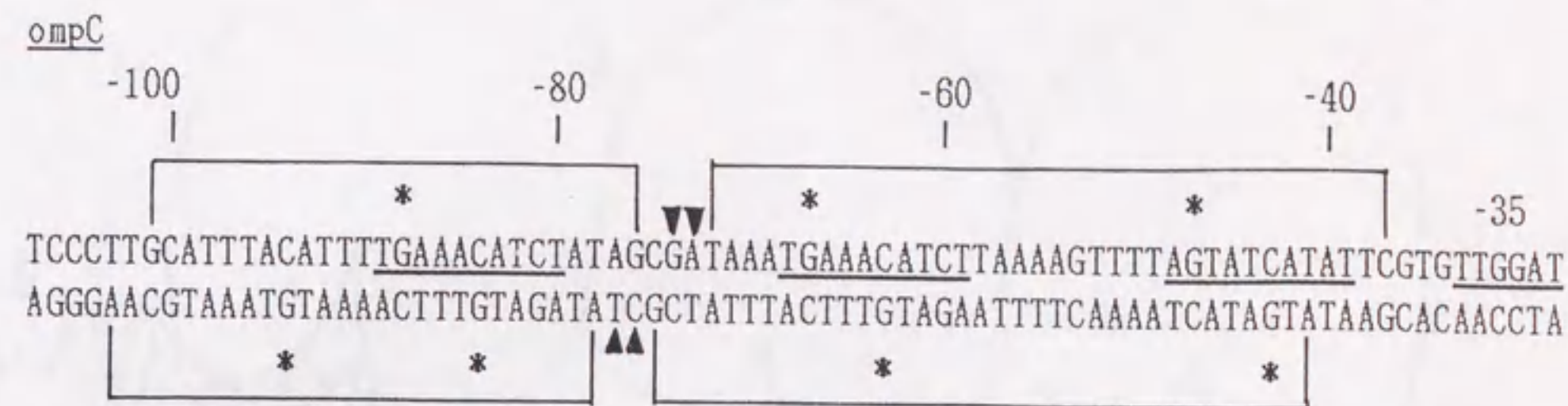


Fig. 28

Summary of the results of DNaseI footprint analysis. The data of *in vivo* methylation protection analysis from Tsung et al. [79] is also shown. The three repetitive sequences and -35 region are indicated by thick lines between the top and bottom strands. The regions protected by the OmpR protein against DNaseI digestion are indicated by brackets above or below the sequence. The nucleotides at which enhancement of DNaseI digestion was observed are indicated by ▼ or ▲. The G bases protected from methylation by OmpR *in vivo* are indicated by asterisks(\*).



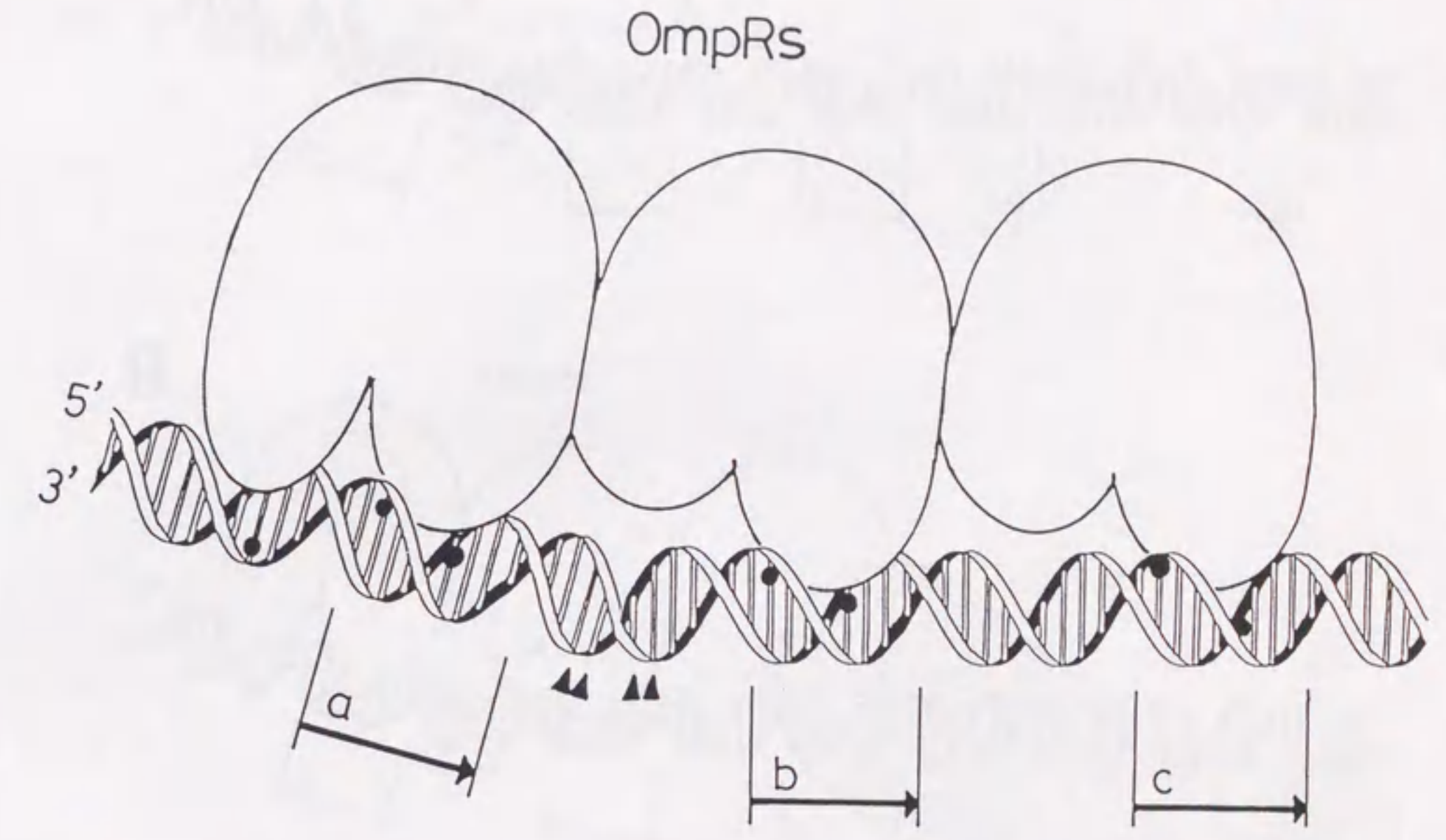


Fig.29

A model for the DNA binding of the OmpR on the upstream region of the *ompC* promoter. Duplex DNA is modeled as a canonical B-form with a helical repeat of 10.5bp per turn. Three repetitive sequences (arrows a,b,c) are indicated below the DNA helix. The enhanced cleavage sites (▲) by DNaseI and the methylation protection sites (●) are also shown.



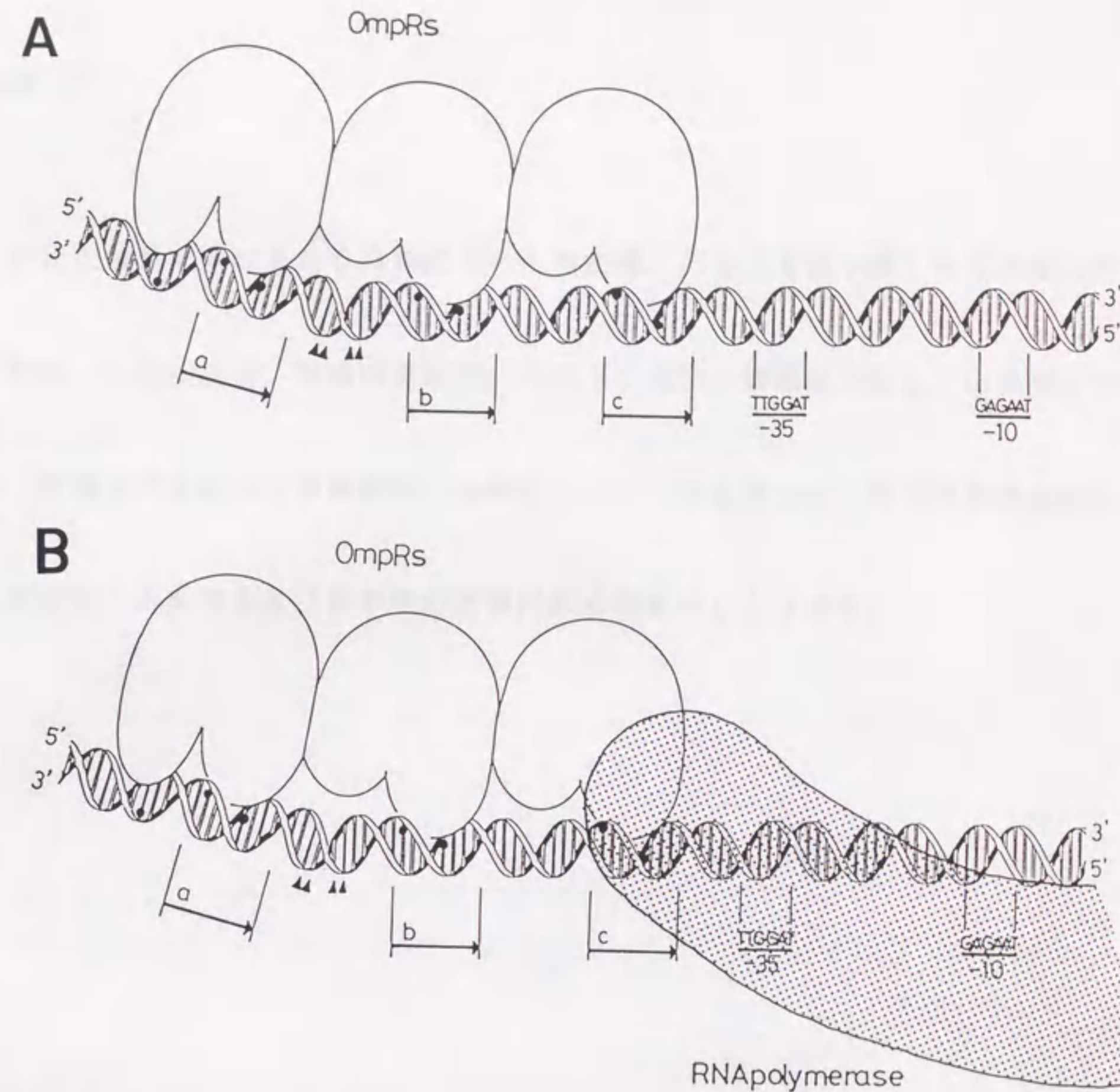


Fig.30

(A) The steric arrangement of -35,-10 regions with respect to the OmpR-binding sites.

(B) A model for the steric arrangement of OmpR and RNA polymerase on the DNA helix.

The -35,-10 regions are indicated below the DNA helix. Other details are the same as Fig.29.





Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

謝辞

本研究を遂行するにあたり終始変わらぬ御指導、御助力を賜りました名古屋大学  
農学部 水野猛先生、市原茂幸先生、内野不二先生、饗場浩文先生、山田寿美博  
士、東京大学応用微生物研究所 水島昭二先生、ならびに名古屋大学農学部醸酵  
化学研究室の卒業生及び在学中の皆様は厚く御礼申し上げます。



報文目録

1. Maeda, S., Ozawa, Y., Mizuno, T., and Mizushima, S. 1988. J. Mol. Biol. 202, 433-441  
"Stereospecific positioning of the cis-acting sequence with respect to the canonical promoter is required for activation of the ompC gene by a positive regulator, OmpR, in Escherichia coli"
2. Maeda, S. and Mizuno, T. 1988. J. Biol. Chem. 263, 14629-14633  
"Activation of the ompC gene by the OmpR protein in Escherichia coli : the cis-acting upstream sequence can function in both orientations with respect to the canonical promoter"
3. Maeda, S. and Mizuno, T. 1990. J. Bacteriol. 172, 501-503  
"Evidence for multiple OmpR-binding sites in the upstream activation sequence of the ompC promoter in Escherichia coli : a single OmpR-binding site is capable of activating the promoter"
4. Maeda, S., Nishimura, Y., and Mizuno, T. manuscript in preparation.  
"Synthetic 20mer DNA can function as OmpR-binding site in vitro and as OmpR-dependent transcriptional activation sequence in vivo"