

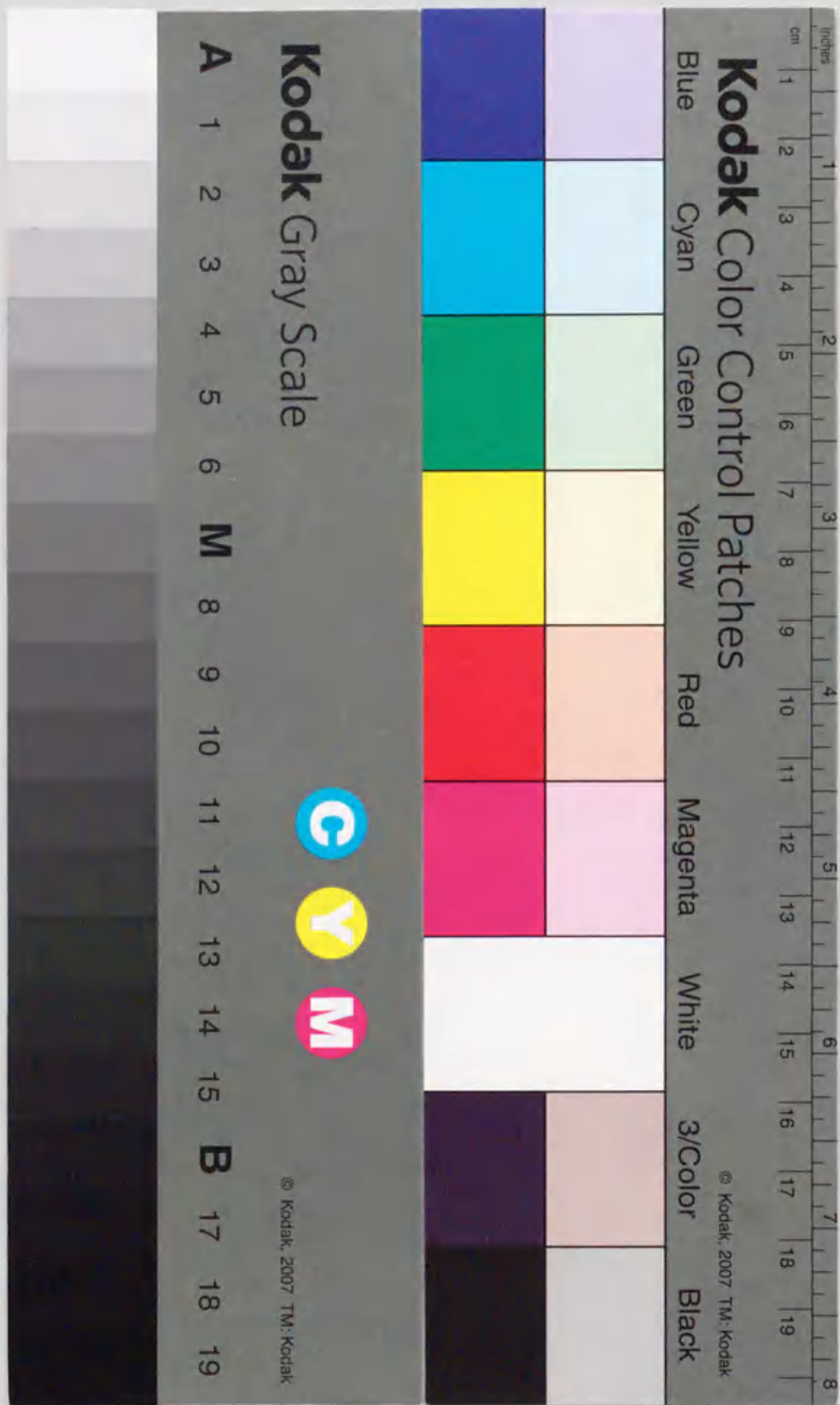
名古屋大学大学院理学研究科博士論文

主論文

大腸菌CRP-CAMP系における
アデニル酸シクラーゼの自己制御機構の解析

分子生物学専攻

学籍番号 935455 高橋 英之



①

報告番号 甲第 4131

名古屋大学大学院理学研究科博士論文
主論文

大腸菌 CRP-cAMP 系における
アデニル酸シクラーゼの自己制御機構の解析

分子生物学専攻
学籍番号 935455 高橋英之
平成10年5月

目次

概要	1
序章	5
第一章 CRP-cAMP 系の自己制御機構における	
<u>アデニル酸シクラーゼの転写抑制機構の役割</u>	17
要旨	18
序論	19
実験方法	21
結果	30
考察	41
第二章 CRP-cAMP によるアデニル酸シクラーゼの活性抑制機構の解析	46
要旨	47
序論	49
実験方法	51
結果	57
考察	81
終章	93
参考文献	96
謝辞	106
副論文及び参考論文	107

大腸菌をはじめとするバクテリアはグルコースを他の糖源に対して優先的に代謝する。この現象はグルコース効果、もしくはカタボライトリプレッションと呼ばれ、代謝的に有利な糖源を優先的に資化する細菌の環境応答機構の典型例として知られる。

また、代謝的に優利な糖源ほど cAMP 濃度が低いという解析結果からカタボライトリプレッションは cAMP 濃度の変化により引き起こされる現象であると一般的に推測されている。

このように大腸菌の環境応答機構に深く関与する cAMP はその重要性の故、cAMP 合成酵素であるアデニル酸シクラーゼにおいては、その発現及び活性を非常に厳密に制御する自己抑制（フィードバック）機構が存在している。それは cAMP 受容蛋白である CRP の遺伝子を欠損した *crp* 欠損株において野生株に比べ、cAMP が約 100 倍に上昇することからも示唆されていた。また、アデニル酸シクラーゼをコードする遺伝子 *cya* の発現も *crp* 欠損株において野生株の約 5 倍増加することから、その発現も cAMP-CRP に抑制されていることが我々の研究室により明らかにされてきた。しかし、cAMP 合成抑制における *cya* の転写抑制機構の寄与、さらには転写抑制以外のアデニル酸シクラーゼに対する制御機構の存在の有無とその機構に関しても、現在に至るまで不明な点が多く残されたままであった。

本研究においては、アデニル酸シクラーゼの自己制御機構の分子遺伝学的、生化学的解析を試みた。

第一章では、アデニル酸シクラーゼの自己制御機構において、転写抑制がそれ以外の抑制機構と合わせて如何に機能しているのかを解析する目的で、*cya* のプロモーター、C 末ドメインを改変した *cya* 変異体を構築し、解析を試みた。そのためにアデニル酸シクラーゼの解析を進めるうえで不可欠な cAMP 濃度の測定法に関して再検討し、従来の方法に比べ、簡便かつ鋭敏である、CRP とその結合配列を保持する DNA フラグメントを用いた gel shift assay による cAMP 測定法を確立した。さらに分子数が極端に少ないことに起因して現在まで成功することのなかった抗アデニル酸シクラーゼ抗体を作製し、蛋白レベルでの解析を可能にした。そして S1 nuclease assay を用いた *cya* mRNA の定量、

Western blotting 法による *cya* 蛋白産物の定量、確立した cAMP 濃度の測定法を用いた cAMP 濃度測定を行なった結果、以下のようなことが明らかとなった。1) プロモーターを cAMP-CRP に依存しないプロモーターと置換した *cya* 変異体 (Pindep) では、*crp* 欠損株において *cya* mRNA、*cya* 蛋白産物の増加は認められないにもかかわらず、まだ 50 倍ほどの cAMP の増加が見られた。2) C 末 48 アミノ酸残基を欠失させた *cya* 変異体では、*crp* 欠損株において *cya* mRNA、*cya* 蛋白産物は約 4 倍の増加が見られたが、cAMP は 5 倍程度しか増加しなかった。3) Pindep と C 末 48 アミノ酸残基を欠失させた *cya* 変異体では *crp* 欠損株における cAMP の overproduction が認められなくなった。以上の結果から、cAMP-CRP によるアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成抑制は転写段階だけでなく活性段階にまで及び、各段階で独立に抑制されることが明らかとなった。また、その活性段階の制御に *cya* の C 末 48 アミノ酸残基の領域が重要であることが示唆された。

以上の結果から、アデニル酸シクラーゼの自己制御機構において、cAMP-CRP によるアデニル酸シクラーゼの活性抑制は非常に重要な役割を担っていることが推測されたため、この活性抑制機構に関してさらに解析を進めた。

cAMP-CRP がアデニル酸シクラーゼの活性を抑制する機構は二通り考えられる。一つはアデニル酸シクラーゼに直接作用することによりその活性を抑制する機構、もう一つはアデニル酸シクラーゼの活性化因子と推測されているリン酸化型 IIA^{Glc} (以下 $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$) の量を調節することにより間接的に抑制する機構である。前者はアデニル酸シクラーゼを取り巻く制御系の複雑さも手伝ってその解析は殆ど皆無である。また後者のモデルに関しても $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ の量を即時的に観察する困難さと cAMP の定量性の限界の為、今まで統合的に $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ 量と cAMP 量の関係を解析した研究はない。

第二章では後者のモデルを検討した。まず従来から困難とされてきた IIA^{Glc} のリン酸化レベルを即時的に観察する方法を模索し、菌をアルカリにより瞬時に破壊し、ウエスタンブロットティングにより IIA^{Glc} のリン酸化型を非リン酸化型と分離、可視化し、*in vivo* における IIA^{Glc} のリン酸化レベルの観察方法を確立した。このアッセイ法をもとに IIA^{Glc} のリン酸化と cAMP 量の関係を遺伝学的に単離した変異株を用いて解析を行なった。そ

の結果、以下のことが明らかとなった。1) Δcrp 株においてほとんどの PIA^{Glc} がリン酸化型であったが、 crp^+ 株においてはほとんどの PIA^{Glc} が非リン酸化型であった。2) $ptsG$ プラスミドとグルコースの存在下で、人為的に Δcrp 株における PIA^{Glc} のリン酸化レベルを低下させると cAMP 量の低下が観察された。3) *in vitro* において crp^+ 細胞抽出液において Δcrp 細胞抽出液に認められない $\text{PIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ を脱リン酸化する活性が検出された。4) 転写促進活性のみを欠失した crp H159L 変異体において野生型に比べ cAMP の増加が認められ、 $\text{PIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ の増加も認められた。以上の結果により、cAMP 合成は $\text{PIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ の量の制御により調節され、cAMP-CRP は未同定の $\text{PIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ 脱リン酸化因子 (群) の発現調節を介して PIA^{Glc} のリン酸化レベルを制御することにより、間接的にアデニル酸シクラーゼの活性を抑制している可能性が示唆された。

(1) カタボライトリプレッションとグルコース効果、inducer exclusion

大腸菌はその遺伝子の発現パターンを変化させることにより環境に対応している。その代表例として、グルコース効果と呼ばれる、グルコースによる他の糖代謝系遺伝子の発現抑制が良く知られており、ラクトースオペロンを中心にその解析が進められてきた (reviewed by Magasanik 1970 ; Pastan & Adhya 1976 ; Ulmann & Danchin 1983 ; Saier *et al.* 1995)。この現象はグルコースのみならず、他の同種の糖源においても認められ、より一般的にカタボライトリプレッションと呼ばれるようになった (Emmer *et al.* 1970 ; reviewed by Saier *et al.* 1995)。

グルコースによる他の炭素源の代謝抑制は二十世紀初めに既に報告されていた (reviewed by Meadow *et al.* 1990)。大腸菌の増殖は炭素源の組み合わせでジオキシーと呼ばれる二段階のパターンを示す (Monod 1942)。

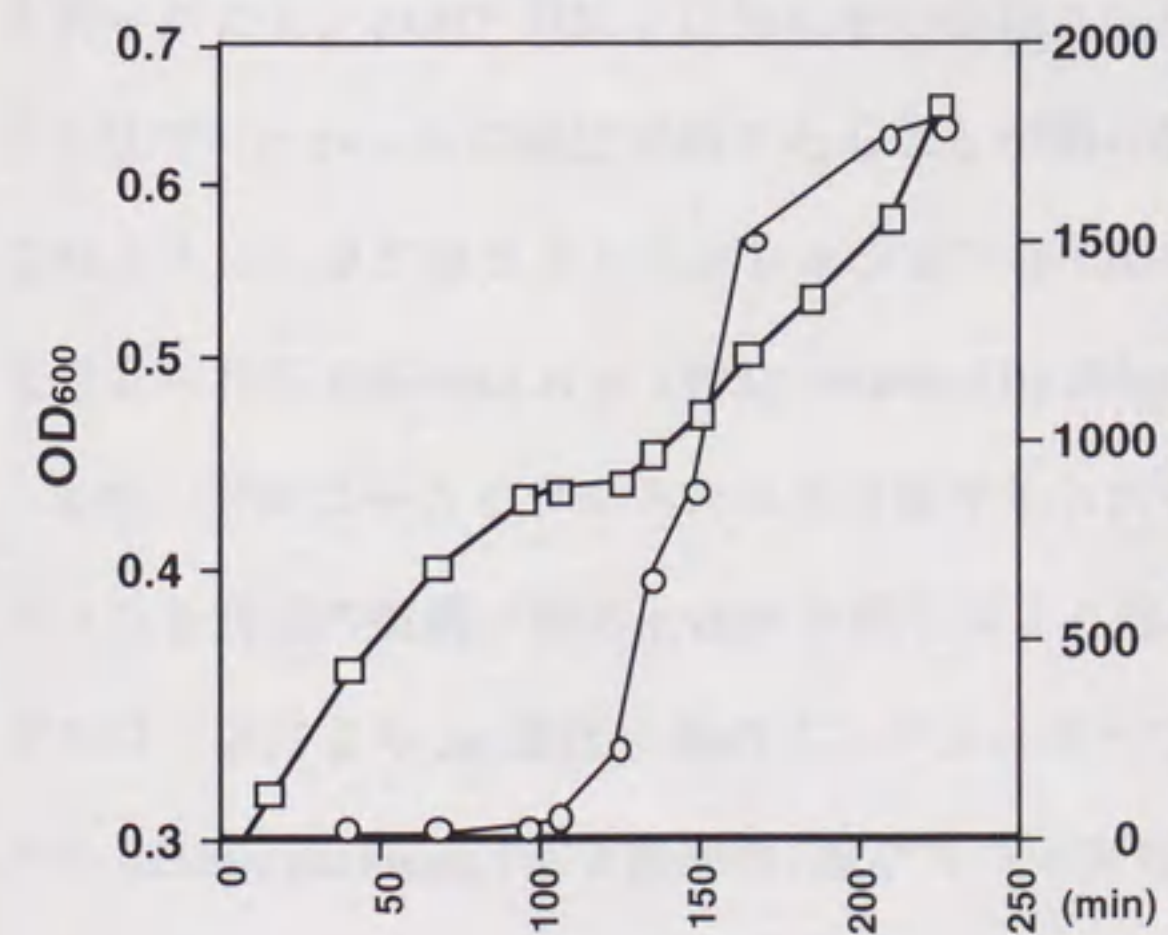


Fig. 1-1 Diauxic growth and expression of β-galactosidase

大腸菌を 0.04% Glucose -0.2% Lactose M9 最小培地にて生育させ、β-galactosidase をモニターした。□は培養液の 600nm における吸光度、○は β-galactosidase 活性を示す。(Inada *et al.* 1996a から引用)

グルコースとラクトースの2つの炭素源を含む培地で培養するとグルコースが消費されている間はラクトースを代謝する酵素、 β -ガラクトシダーゼの発現は抑えられ、グルコースが消費尽くされた後、ラクトースを代謝するための β -ガラクトシダーゼの発現が上昇する (Fig.1-1)。このようにジオキシシーはグルコースをラクトースより優先的に消費するために起こる現象である。

一方、1965年に Makman & Sutherland により、大腸菌中に cAMP が存在することが初めて発見され、培地中におけるグルコースの存在により細胞内の cAMP 濃度が低下すると報告された (Makman & Sutherland 1965)。また、1970年には Pastan & Perlman により *lac* オペロンのリプレッサーを不活化した条件においてグルコースによる β -ガラクトシダーゼの抑制 (*lac* オペロンの発現抑制) は cAMP の添加により完全に解除されたと報告された (Pastan & Perlman 1970)。さらに、その後、コハク酸やグリセロールといった代謝的に不利な糖源の培地における cAMP 産生量はグルコース培地よりも高いことが示された (Peterkofsky, A. & Gazdar, C. 1971 ; Buettner *et al.* 1973)。これらの解析結果より、カタボライトリプレッションは cAMP の低下によって起こると考えられてきた (Pastan & Perlman 1970 ; reviewed by Postma *et al.* 1993)。しかし、1993年に Ishizuka らは cAMP の添加のみではグルコースによる β -ガラクトシダーゼの抑制は完全には解除されないことを明らかにし、cAMP の低下以外にその受容タンパク質である CRP 量の低下もカタボライトリプレッションの決定要因であることが明らかとなった (Ishizuka *et al.* 1993)。また、このように、カタボライトリプレッションは CRP-cAMP の量的低下が主要な要因であると考えられる (Ishizuka *et al.* 1993 ; reviewed by Saier *et al.* 1995)。

また、グルコースとラクトースの培地で見られるジオキシシーもカタボライトリプレッションと同様の機構、即ち cAMP の低下により起こると考えられていた。また、一方でグルコースにより *lac* 遺伝子群のインデューサーであるラクトースの取り込みが阻害される inducer exclusion (第2節参照) もグルコースによる *lac* 遺伝子の発現抑制に関与していることが知られていた (reviewed by Saier, Jr. 1989 ; Postma *et al.* 1993)。そのため、グルコースとラクトースの培地でのジオキシシーは cAMP レベルの低下と inducer exclusion

によって引き起こされる現象であると考えられてきた (reviewed by Saier, Jr. 1989; Postma *et al.* 1993)。しかし、1997年に Inada らによりグルコースを消費する細菌の細胞内の CRP 量と cAMP 量はラクトースを消費する場合と変わらないことが確認され、グルコースとラクトースの培地でのジオキシ-は inducer exclusion のみによって引き起こされる現象であることが明らかにされた (Inada *et al.* 1996a)。

このように、現象とその要因の解明が不十分であったため、各語意の定義が不明瞭であった。しかし、現在においてはグルコースによる他の糖代謝遺伝子の発現抑制を一般的にカタボライトリプレッションと総称し、そのカテゴリーの中で、その要因となる機構に関して、cAMP や CRP の低下やリプレッサーが関与する inducer exclusion が分類された形で包含されるように定義されつつある。

(2) PTS と Inducer exclusion、アデニル酸シクラーゼの関与

PTS とはリン酸基の転移反応と共役して細胞内に糖を取り込む機構 (Phosphoenolpyruvate : Carbohydrate Phosphotransferase System) である (Fig.1-2)。この機構は 1964年の Kundig らによって初めて報告された (Kundig *et al.* 1964)。

PTS においてはリン酸基の donor はホスホエノールピルビン酸であり、そのリン酸基は Enzyme I, HPr (Histidine-phosphorylatable protein) に転移される。この二つの酵素はグルコース、マニトールなどの全ての PTS 依存的に取り込まれる糖 (PTS sugar) に共通である。唯一例外なのはフルクトースであり、フルクトースの場合は HPr に相当する FPr が存在し、HPr 非依存的に細胞内に取り込まれ、リン酸化される (Fig. 1-2)。HPr に転移されたリン酸基は各 PTS sugar に特異的な酵素 (あるいはドメイン)、IIA、IIB に転移され、最後に各 PTS sugar に特異的な permease, IIC を介した糖の細胞内に取り込みに共役してリン酸基が糖に転移される。IIA、IIB、IIC は一つずつ酵素として独立しているわけではなく各 PTS sugar によってその構成は異なる。例えば、グルコースの場合は IIA^{Glc} は独立しているが、IIB と IIC は一つの酵素、Glucose permease (IICB^{Glc}) を構成する

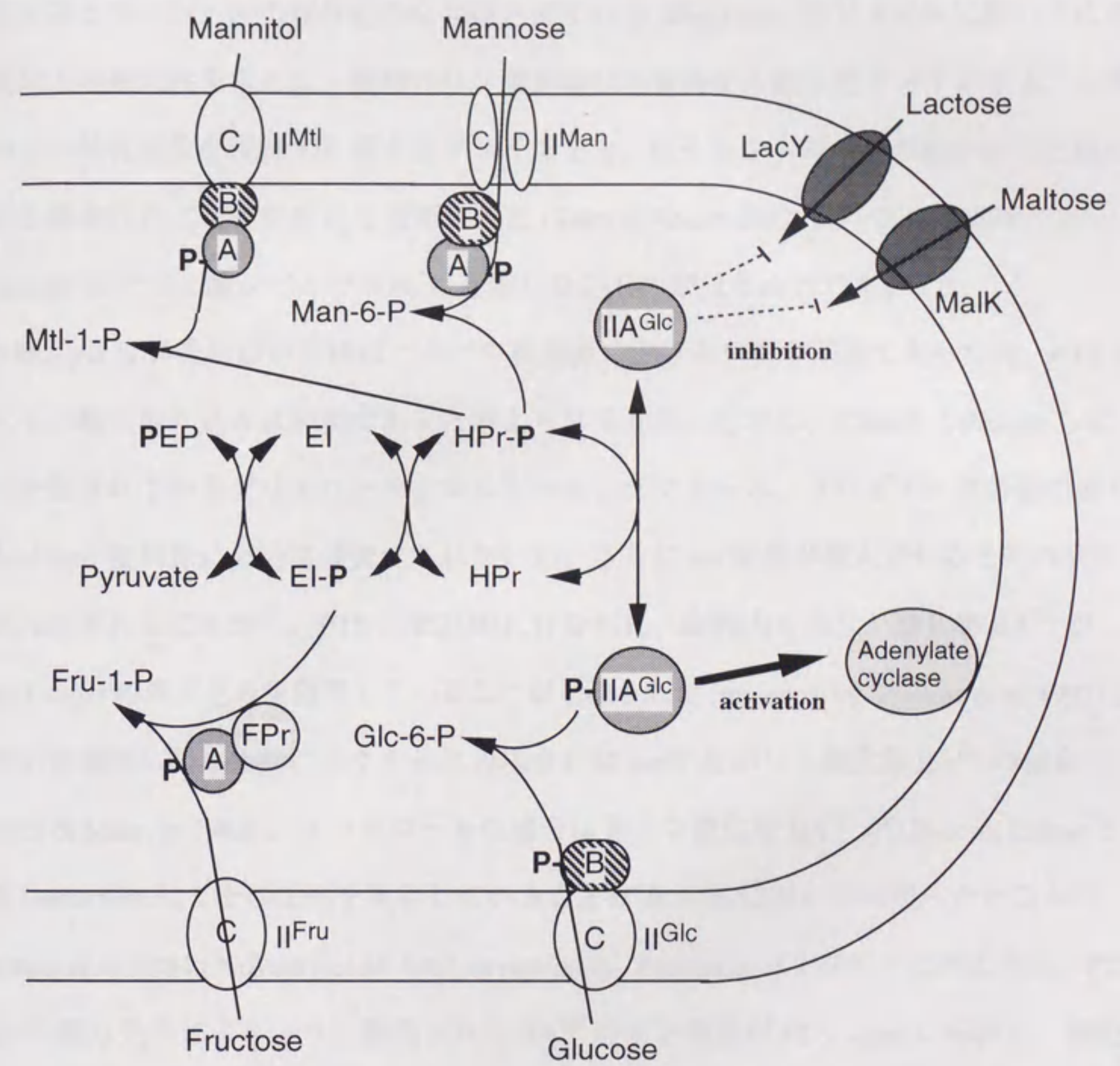


Fig.1-2 Diagram of PTS

Postma *et al.* (1993) から引用した図を改変して示した。
 各矢印は糖及びリン酸基の転移反応を表わす。太字の矢印はリン酸化型 IIA^{Glc} によるアデニル酸シクラーゼの活性化を、点線は非リン酸化型 IIA^{Glc} による Lactose、Maltose などの糖の取り込み阻害 (Inducer exclusion) を表わす。詳細は本文を参照されたい。



のに対し、マニトールの場合は IIA、IIB、IIC が一つの酵素として存在し、分子内でリン酸転移とマニトールの取り込みを共役させている (Fig.1-2)。各ドメインに関してはその機能上の相同性をもとに、最初のリン酸化部位を保持する親水性ドメインを A、二番目のリン酸化部位を保持する親水性ドメインを B、膜チャンネルや糖の結合部位と想定される疎水性のドメインを C と分類された (Saier & Reizer 1992) もので、実際の homology はアミノ酸レベルで 50% にも満たないものがほとんどである。

当初、*pts* 変異株においてはほとんどの炭素源における生育が不能であった為、PTS はすべての糖の取り込みに必要であると考えられてきた。しかし、Class I と Postma らにより分類されているグリセロール、マルトース、ラクトース、メリビオースの糖の取り込みは *ptsI* 変異株においては資化されないが、さらに *crr* 変異が導入されるとその表現型が抑圧されることから、PTS 非依存的に行なわれ、細胞内の非リン酸化型 IIA^{Glc} が Class I sugar の取り込みを阻害していることが示唆された (reviewed by Postma *et al.* 1993)。その阻害機構に関しては、ラクトースの場合には LacY と非リン酸化型 IIA^{Glc} の結合 (Osumi & Saier, Jr 1982)、グリセロールの場合は非リン酸化型 IIA^{Glc} が Glycerol kinase と直接 interaction してその活性を阻害していることが *in vitro* においても明らかとなった (Postma *et al.* 1984 ; Novotny *et al.* 1984, reviewed by Postma *et al.* 1993)。このように、PTS sugar の取り込みにより、リン酸化された IIA^{Glc} のリン酸基が PTS sugar に転移し、細胞内の非リン酸化型 IIA^{Glc} が各糖に特異的な permease (グリセロールの場合は inducer を合成する glycerol kinase) と直接結合して、inducer となる糖の取り込み、資化が阻害されることが明らかとなり、一般にこの現象は inducer exclusion と呼ばれている (Fig.1-2 ; reviewed by Postma *et al.* 1993)。

一方、Class I sugars とは異なり、*ptsI crr* 二重変異株においても資化不能の表現型は抑圧されない炭素源も存在し、Class II compounds と分類されている (reviewed by Postma *et al.* 1993)。これらの PTS 変異による non-PTS sugar の資化不能は *crr* 変異の導入では抑圧されず、cAMP 添加により抑圧された (reviewed by Postma *et al.* 1993)。また、Enzyme I, HPr の変異株において cAMP の減少が認められ、同様のことが PTS の酵素のうちリン

酸基の最終的な受け取り手である IIA^{Glc} (*crr*) の欠損株においても観察されたことから、 IIA^{Glc} のリン酸化型はアデニル酸シクラーゼの活性化因子であることが示唆された (Feucht & Saier, Jr. 1980; Levy *et al.* 1990; reviewed by Postma *et al.* 1993)。また、PTS-sugar の存在下では非存在下に比べて cAMP 濃度、アデニル酸シクラーゼの活性が共に低下することが報告されており (Saier, Jr. *et al.* 1980; Nelson *et al.* 1982)、これらの遺伝学的な解析の結果から、グルコースの添加に伴う cAMP 量の低下は PTS sugar の取り込みに共役したリン酸化型 IIA^{Glc} からのリン酸化の転移により、非リン酸化型 IIA^{Glc} が増加し、アデニル酸シクラーゼの cAMP 合成活性が低下することによると解釈された (Nelson *et al.* 1982; reviewed by Postma *et al.* 1993)。

(3) CRP の機能、構造

CRP は最も生化学的解析がすすめられてきた転写調節因子の一つである (reviewed by 饗場, 1989)。

CRP は単量体が分子量約 23,619 であり、二つのサブユニットに対して一つの cAMP 分子を結合する $\text{pI}=9.12$ の弱塩基性蛋白質である。その遺伝子 *crp* は染色体上の 74 分に位置する。

CRP は cAMP 結合活性と DNA 結合活性を保持し、プロテアーゼを用いた部分消化の実験から、サブユニットの N 末端側約 2/3 の領域に cAMP 結合ドメインを、残りの C 末端に DNA 結合ドメインを保持することが報告された (Kraddock & Pastan 1973; Eilen *et al.* 1978; Aiba & Krakow 1981)。現在までに CRP の三次元結晶構造解析がなされており、6 つの α -helix と 7 つの β -sheet 構造からなるサブユニットが 2 分子会合したダイマーとして存在する (Mckay & Steitz 1981)。

CRP は cAMP と結合するとアロステリックな構造変化を起こし、転写活性化能をもつようになる (Kraddock & Pastan 1973; Eilen *et al.* 1978)。構造変化を起こした CRP の DNA ドメインの E と F の二つの helix が DNA の二重らせん構造の主溝にはまり込む構造をと

る (Weber & Steiz 1984 ; Ebright *et al.* 1984)。

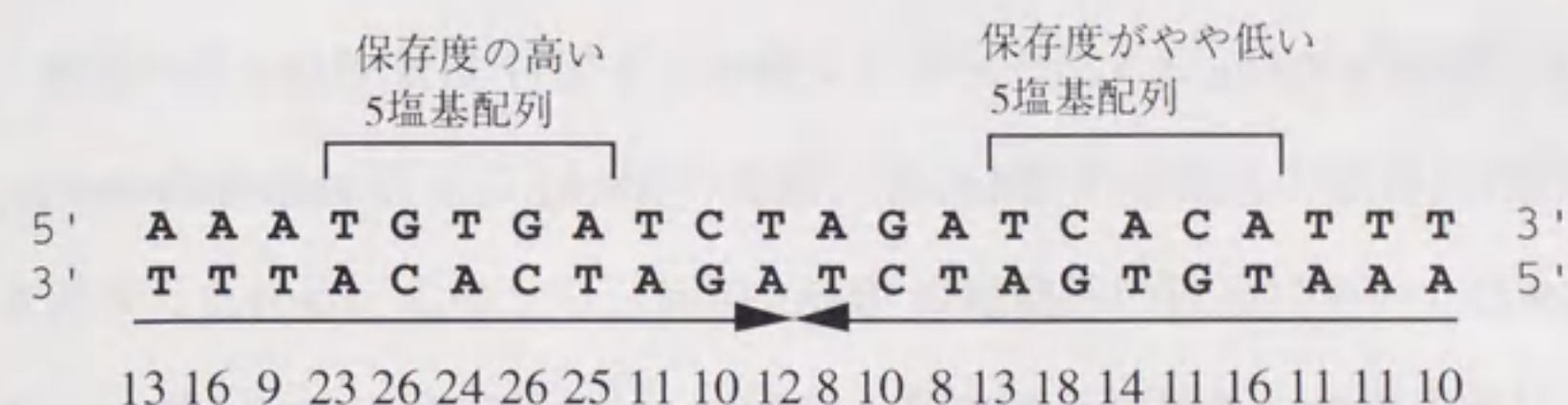


Fig.1-3 Consensus sequence of CRP binding site (Morita *et al.* 1988)

26のCRP結合領域のDNA配列の解析をもとにして得られたコンセンサス配列であり、保存度の高い5塩基配列TGTGAを含む11bpのユニットとその逆繰り返し配列からなる22bpの塩基配列である。下の数字は塩基の出現数である。

cAMP-CRP制御下の遺伝子群のプロモーター配列の比較より、Fig.1-3のようなコンセンサス配列が見い出されてきた。11bpを一つのユニットとする22bpの繰り返し配列を有し、5'側に保存度の高いTGTGA配列を有する (Morita *et al.* 1988)。

CRPはこのようなプロモーター付近の配列を認識してDNAに結合し、転写の調節を行なうと考えられている。

(4) cAMP量の制御

cAMPは細菌のみならず動物、菌類、植物などにおいてもその存在が明らかにされており、多くの生物に存在していると考えられている。大腸菌においては1965年にMarkman & Sutherlandにより初めてその存在が報告された (Markman & Sutherland 1965)。

cAMPはcAMP合成酵素、アデニル酸シクラーゼにより合成され、アデニル酸シクラーゼをコードする遺伝子、*cya*は大腸菌染色体の85.7分に位置する。分子量は塩基配列から推定されるアミノ酸配列より97,542と計算され、*cya*の3'末端に存在する未知の

遺伝子 *cya X* と共にオペロンを形成していると考えられている (Aiba *et al.* 1984)。cAMP はその受容タンパク質 CRP と複合体を形成することにより、遺伝子発現調節因子として機能する。

細胞内の cAMP 量は 1) アデニル酸シクラーゼによる cAMP の合成、2) cAMP 分解酵素、phosphodiesterase による cAMP の分解、3) cAMP の細胞外の放出、の三段階で調節されると考えられる。このうち、3) の cAMP の細胞外の放出についてはあまり解析がなされていないが、Epstein らによれば、cAMP の放出速度は培地中の炭素源によらず一定である (Epstein *et al.* 1975) という結果から cAMP の放出は cAMP 濃度の調節機構には関与していないと推測されている。2) の cAMP 分解に関しても、phosphodiesterase (*cpd*) 欠損株においてはグルコース枯渇時には野生株に比べ、その差が約 5 倍にまで cAMP レベルが上昇するものの、定常状態においては野生型に比べ約 2 倍にしか上昇していない (Botsford 1984; Imamura *et al.* 1996)。また、*cpd* 欠損株においても cAMP 濃度が培地中の炭素源が代謝的に不利になるほど高くなる現象は観察され、野生株の表現型と有為な差は認められなく (Muettner *et al.* 1973; Kier *et al.* 1977)、さらにその細胞粗抽出液中の CPDase 活性は 2 倍以上の変動は観察されなかった (Botsford 1984)。以上の結果から、cAMP phosphodiesterase はほぼ構成的に機能しており、cAMP の分解系は CRP による cAMP 抑制機構に直接的な関与はないと推測されている。結局、cAMP レベルの制御で最も重要であると考えられているのは 1) のアデニル酸シクラーゼによる cAMP の合成であると考えられる (reviewed by Botsford & Harman 1992; Postma *et al.* 1993; 第一章考察参照)。

cAMP の合成はアデニル酸シクラーゼによって行なわれており、アデニル酸シクラーゼはその発現、活性を厳密に制御されている (reviewed by Botsford & Harman 1992)。例えば、*cya* は典型的な開始コドン AUG ではなく、翻訳効率がその 1/6 である UUG により翻訳が開始されており、*cya* は翻訳段階でその発現が抑制されている (Reddy *et al.* 1985)。この翻訳制御は大腸菌のみならず、サルモネラ (Thorner *et al.* 1990)、エルシニア (Mock *et al.* 1991)、ヘモフィルス (Dorocicz *et al.* 1993) といった他種のグラム陰性細菌でも存在

し、系統的にも翻訳効率の抑制の重要性が認められる。

crp 欠損株において cAMP 量が overproduce されることは 1978 年に既に Potter らと Wayne らの別々のグループにより同時に報告されており (Potter *et al.* 1974; Wayne & Rosen 1974)、cAMP の合成は CRP により負に制御されていることが示唆され (Botsford & Drexler 1978)、現在に至るまで cAMP 合成制御機構の解明の主な解析材料となっている。1981 年、*crp* 欠損株の細胞粗抽出液は野生株のものに比べ、アデニル酸シクラーゼの活性が 2~3 倍高いこと、さらには 2mM cAMP が添加された培養液で培養した野生株の細胞粗抽出液は cAMP 非添加の培養液で培養した菌体の細胞粗抽出液と比較してそのアデニル酸シクラーゼの活性が低下していることが報告された (Majerfeld *et al.* 1981)。彼らはその活性の違いをアデニル酸シクラーゼの量的な相違であると解釈し、アデニル酸シクラーゼの発現は CRP により抑制されていることが示唆された (Majerfeld *et al.* 1981)。その後、Aiba らにより *cya* 遺伝子の cloning、sequence が行なわれ、そのプロモーター領域に cAMP-CRP 結合配列の存在が示唆された (Aiba *et al.* 1983; Aiba *et al.* 1984)。1985 年には CRP-cAMP が *cya* の主要なプロモーターである P2 に結合し、RNA ポリメラーゼの機能的な結合を阻害することで *cya* の発現を抑制していることが Aiba により *in vitro* において証明された (Aiba 1985)。さらに同年に Mori らにより *in vivo* においても *crp* 欠損株では野生株に比べ、*cya* mRNA は約 5 倍に増加していることが定量的に明らかにされた (Mori & Aiba 1985)。この cAMP-CRP による *cya* の発現抑制の解析結果から、*crp* 欠損株での 100 倍の cAMP の増加の一部は説明されたが、*cya* mRNA の増加量はわずか 5 倍であることから *cya* の発現制御機構だけでは cAMP 調節機構の全てを説明するには十分でないと考えられてきた (reviewed by 饗場 1989; Botsford & Harman 1992; Postma *et al.* 1993; reviewed by Saier, Jr. *et al.* 1995)。

一方、*crp* 欠損株での cAMP の増加においても PTS の関与についても解析がすすめられた。Daniel により *crp* 欠損株での cAMP の増加は PTS component の一つである IIA^{Glc} (*cr*) と *crp* の二重変異株においては認められないことが報告され、初めて *crp* 欠損株での cAMP の増加においても PTS が活性化因子として作用していることを示唆した (Daniel

1984)。しかし、この論文では同時に *crr* 変異ではなく *ptsI* 変異では Δcrp background で cAMP の過剰生産が認められると報告しており、非リン酸化型 IIA^{Glc} がアデニル酸シクラーゼの活性化因子であるという、既に提出されていた Fig.1-2 のモデルと矛盾した結論を出した。しかし、これに関しては Blauauwen らにより追試され、完全な *ptsI* 変異株においては *crr* 変異と同様、 Δcrp background で cAMP の過剰生産が認められなく、Daniel は不完全な *ptsI* 変異株 (*leaky ptsI*) を用いたため、矛盾した結果を導いたと報告した (Blauauwen & Postma 1985)。さらに 1990 年にも Crasnier らにより Blauauwen らと同様の結果を得たと報告している (Crasnier & Danchin 1990)。

以上の遺伝学的な解析結果から、*crp* 欠損株での cAMP の増加においてリン酸化型 IIA^{Glc} が活性化因子として作用しており、リン酸化型 IIA^{Glc} はアデニル酸シクラーゼを活性化する正の制御因子であることが示唆された (reviewed by Botsford & Harman 1992; Postma et al. 1993)。

crp 欠損株における 100 倍の cAMP の上昇は CRP-cAMP 系の自己抑制を反映していると考えられる以外にその生理学的意義は不明である。しかし、その現象を利用した前述の解析の結果から、cAMP の量は主にアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成を制御することにより調節されており、負の制御因子として CRP、正の制御因子として PTS がその発現、活性を制御していると考えられている (reviewed by Botsford & Harman 1992; Postma et al. 1993)。

5) 問題点と本研究の目的

前節で述べたように、アデニル酸シクラーゼによる cAMP 合成は CRP によって負に、PTS によって正に制御されていることが明らかになっている。しかし、CRP によるアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成機構において、CRP が *cya* の転写抑制によってアデニル酸シクラーゼの発現を抑制している以外に関してはその分子メカニズムがどうなっているのかは不明である。また、その *cya* の転写抑制機構に関しても、どの程度 cAMP 調節

機構に対して寄与しているかは明らかではない。さらに CRP による負の制御と PTS による正の制御の相互関係についても明確な答えは与えられていない。以上のようにアデニル酸シクラーゼの制御機構に関しては未解決な問題が多く残されている。そのアデニル酸シクラーゼによる cAMP 合成の制御機構の詳細な分子メカニズムを解析することは、CRP-cAMP 系の自己抑制機構を解明するのみならず、最終的にカタボライトレプレションやその他の cAMP を介した生命現象の機構を解明する糸口になりうると考えられる。また、現在のところ、*crp* 欠損株における cAMP の 100 倍の増加もその生理学的な意義は不明であるが、何らかの生理反応を反映した結果であることが考えられ、その機構を解析することは cAMP 合成制御機構の解明する近道であると考えられる。

そこで、本研究においてはさらに cAMP 合成制御の分子機構を解明する目的で、第一章においては、CRP によるアデニル酸シクラーゼの自己制御機構における *cya* の転写抑制の寄与とその役割について、第二章では転写制御以外の機構の分子メカニズムについて生化学的、分子遺伝学的解析を行なった。

この論文の目的は、CRP-cAMP系の自己制御機構における、
アデニル酸シクラーゼの転写抑制機構の役割を明らかにすることである。
CRP-cAMP系は、細菌の栄養不足時に活性化され、
特定の遺伝子の転写を促進する。一方、CRP-cAMP系は、
細菌の増殖を抑制する。この論文では、CRP-cAMP系が、
アデニル酸シクラーゼの転写を抑制することを示す。
CRP-cAMP系は、細菌の増殖を抑制する。この論文では、
CRP-cAMP系が、アデニル酸シクラーゼの転写を抑制することを示す。
CRP-cAMP系は、細菌の増殖を抑制する。この論文では、
CRP-cAMP系が、アデニル酸シクラーゼの転写を抑制することを示す。

この論文の目的は、CRP-cAMP系の自己制御機構における、
アデニル酸シクラーゼの転写抑制機構の役割を明らかにすることである。
CRP-cAMP系は、細菌の栄養不足時に活性化され、
特定の遺伝子の転写を促進する。一方、CRP-cAMP系は、
細菌の増殖を抑制する。この論文では、CRP-cAMP系が、
アデニル酸シクラーゼの転写を抑制することを示す。
CRP-cAMP系は、細菌の増殖を抑制する。この論文では、
CRP-cAMP系が、アデニル酸シクラーゼの転写を抑制することを示す。
CRP-cAMP系は、細菌の増殖を抑制する。この論文では、
CRP-cAMP系が、アデニル酸シクラーゼの転写を抑制することを示す。

第一章 CRP-cAMP系の自己制御機構における アデニル酸シクラーゼの転写抑制機構の役割

この論文の目的は、CRP-cAMP系の自己制御機構における、
アデニル酸シクラーゼの転写抑制機構の役割を明らかにすることである。
CRP-cAMP系は、細菌の栄養不足時に活性化され、
特定の遺伝子の転写を促進する。一方、CRP-cAMP系は、
細菌の増殖を抑制する。この論文では、CRP-cAMP系が、
アデニル酸シクラーゼの転写を抑制することを示す。
CRP-cAMP系は、細菌の増殖を抑制する。この論文では、
CRP-cAMP系が、アデニル酸シクラーゼの転写を抑制することを示す。
CRP-cAMP系は、細菌の増殖を抑制する。この論文では、
CRP-cAMP系が、アデニル酸シクラーゼの転写を抑制することを示す。

要旨

crp 欠損株において cAMP が約 100 倍に増加することからアデニル酸シクラーゼによる cAMP 合成は CRP により抑制されていることが示唆されていた。アデニル酸シクラーゼ遺伝子 *cya* の発現も *crp* 欠損株において約 5 倍に増加することから CRP による *cya* mRNA の発現抑制機構も明らかにされていた。しかし、その *cya* 発現抑制が cAMP 合成抑制に十分であるか、また如何ほどの寄与が存在するかに関しては不明のままであった。本章では CRP による *cya* の転写抑制の cAMP 合成制御における寄与と役割、さらにはその機構に必要な *cya* のシスのドメインも同定する目的で *cya* 変異体を構築し、解析した。

cya プロモーターを CRP-cAMP に非依存的な *bla* プロモーターに置換した *cya* 変異体は *crp*⁺ 株に比べ、*crp* 株において *cya* mRNA、アデニル酸シクラーゼの量的増加は認められないにもかかわらず、約 50 倍の cAMP の増加が認められた。また、*cya* C 末の 48 アミノ酸で構成されるドメイン (C 末ドメイン) を欠失した *cya* 変異体は *crp*⁻ 株において *cya* mRNA、アデニル酸シクラーゼの約 4 倍の量的増加は認められたが、cAMP は 5 倍程度の増加しか認められなかった。さらに両変異を導入した *cya* 二重変異体は *crp*⁻ 株において *cya* mRNA、アデニル酸シクラーゼ、cAMP のすべてに関してその量的増加は認められなかった。

以上の結果から、アデニル酸シクラーゼの cAMP 合成は CRP により転写段階と翻訳後段階で独立に抑制されていることが明らかとなった。さらにアデニル酸シクラーゼの *cya* C 末ドメインが *crp* 欠損株における cAMP の増加に必須であることが明らかとなった。

序論

1974年にPotterらとWayneらは *crp* 欠損株において cAMP の overproduction が起きていることを報告した (Potter *et al.* 1974; Wayne & Rosen 1974)。これを契機に cAMP-CRP によるアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成抑制機構の存在が示唆され、解析がすすめられてきた。1981年にMajerfeldらは細胞粗抽出液を用いた *in vitro* での解析において、*crp* 株の細胞粗抽出液中には *crp*⁺ 株に比べて約2倍のアデニル酸シクラーゼ活性を見い出し、その活性の差をアデニル酸シクラーゼの量的な差であると考察した (Majerfeld *et al.* 1981)。また、2 mM の cAMP を添加した培地中で培養した野生株の細胞粗抽出液中には cAMP 未添加のものに比べ、アデニル酸シクラーゼ活性が約 1/2 しか存在しないことを観察しており、以上の結果から、CRP によってアデニル酸シクラーゼの発現は抑制されていると結論した (Majerfeld *et al.* 1981)。これはアデニル酸シクラーゼの発現抑制機構に関する初めての解析であった。しかし、一方で、Bankaitisらにより Mu phage、 λ phage を用いた遺伝学的手法で *cya-lacZ* fusion strain が構築され、それを用いた解析から *cya* の発現は CRP 存在下で約2倍程度減少するが、その変動は少なく、彼らはCRPによるアデニル酸シクラーゼの発現制御はないと結論した (Bankaitis & Bassford, Jr. 1982)。このように、その定量的解析が困難であったことも手伝って、定量性に関しては不十分であり、CRPによるアデニル酸シクラーゼの発現制御機構に関してはその存在の有無も含めて不明であった。しかし、1983、1984年にAibaらにより *cya* 遺伝子の cloning、そしてその promoter 領域の sequence が報告され、-15 ~+3、+107 ~+124 の二ヶ所に CRP-cAMP の結合配列が存在していることが明らかとなった (Aiba *et al.* 1983; Aiba *et al.* 1984)。さらに、その二つの cAMP-CRP の結合配列のうち、実際に主要なプロモーターである *cya* P2 と overlap している -15 ~+3 の領域に CRP-cAMP が結合することによりその転写が抑制されることが *in vitro* において証明された (Aiba 1985)。また、*crp* 欠損株においては野生株の約5倍の *cya* mRNA が検出されたことから、*in vivo* においても *in*

Faint, illegible text on the left page, likely bleed-through from the reverse side.

vitro 同様、CRP-cAMP による *cya* の発現抑制が証明された (Aiba 1985 ; Mori & Aiba 1985)。

以上の我々の研究室における解析から、CRP による *cya* の転写制御の存在とその量的変化が明らかとなった。しかし、*crp* 欠損株における cAMP の増加は約 100 倍であるのに対し、*cya* mRNA の増加は 5 倍であることから、CRP による cAMP 調節機構は *cya* 転写抑制のみでは説明できないと考えられてきた (reviewed by Botsford & Harman 1992 ; Postma *et al.* 1993 ; Saier, Jr. *et al.* 1995)。

本研究においては *cya* 変異体を構築し、CRP による *cya* の転写抑制の cAMP における寄与と役割を中心として解析を行なった。

Faint, illegible text on the right page, likely bleed-through from the reverse side.

実験方法

1.大腸菌株

W3110		laboratory stock
HT28	W3110 $\Delta cya::Kan^r$	本研究
TP7860	<i>F xyl araH1 his $\lambda \Delta cya$</i>	laboratory stock
HY100	<i>F xyl araH1 his $\lambda \Delta cya crp710::Tn5$</i>	laboratory stock
IT1001	W3110 Δcya <i>sphI::Cam^r</i>	T.Inada
HT5163	<i>F xyl araH1 his $\lambda cya^+ sphI::Cam^r$</i>	本研究
HT5164	<i>F xyl araH1 his $\lambda \Delta cya sphI::Cam^r$</i>	本研究
HT5166	<i>F xyl araH1 his $\lambda \Delta cya sphI::Cam^r crp710::Tn5$</i>	本研究
MC4100	<i>araD139 $\Delta lac(IPOZYA) rpsL thi$</i>	Casadaban <i>et al.</i> (1980)
IT1194	MC4100 <i>crp710::Tn5</i>	本研究

2.プラスミド

pTH190	Amp^r [(His) ⁶ -tagged] <i>cya</i> ⁻	本研究
pTTQ18	Amp^r	Stark (1987)
pTH191	Amp^r pTH190 <i>cya EcoRI-SalI</i> in pTTQ18 <i>EcoRI, SalI</i>	本研究
pTH53	Amp^r <i>crp</i> consensus binding site	本研究
pIT228	Amp^r <i>pcya-cya</i>	本研究
pSE3	Amp^r <i>pbla-cya</i>	本研究
pIT465	Amp^r <i>pcya-cya ΔC</i>	本研究

pIT272	Amp ^r <i>pbla-cya ΔC</i>	本研究
pIT296	Amp ^r <i>pcya-cya-lacZ</i>	本研究

なお、*cya* 変異体プラスミドに関してはその模式図を Fig.2-1 に示す。

3. 大腸菌の培養条件

LB 培地を用いて 37 °C で振とう培養した。Ampicillin は 50 μg/ml、Kanamycin、Chloramphenicol が必要な場合においては各々 50 μg/ml、15 μg/ml の濃度で培地に添加した。菌体の生育は分光光度計を用いて、600 nm の波長でモニターした。

4. P1 transduction

P1 transduction は Miller の方法に従って行なった (Miller 1972)。Donor の菌体を 37°C で一晩培養した 5 mM CaCl₂ を含む LB 2 ml を 1 × 10⁷ pfu の titer をもつ P1 ファージを 100 μl 加え、37 °C で 15 分間静置培養した。その後、液状化した 5 mM CaCl₂ を含む LB Top を 3 ml 加え、LB プレートにまいた。5~8 時間 37 °C で培養し、P1 ファージによる溶菌を確認後、LB 3ml を加え、LB Top をスプレッターでかき集め、さらに 1 ml CHCl₃ を加え、緩やかに攪拌する。遠心 (4°C、4000g で 10分) 後、上清をとり、100 μl の CHCl₃ を加え、室温で 30 分間から 1 時間置いた。それを P1 lysate として用いた。Recipient 菌株を 30 ml LB に培養する。OD₆₀₀ = ~0.4 において集菌し、5 mM CaCl₂ を含む LB 1 ml に懸濁する。pfu ~ = 1 × 10⁷ の P1 lysate を加え、37 °C で 15 分間静置培養後、集菌し、LB 10 ml に懸濁し、30 分間 37 °C で振とう培養した。その後、集菌、1 ml の LB に懸濁し、100 μl を選択プレートで培養し、現われたコロニーを transductants として用いた。

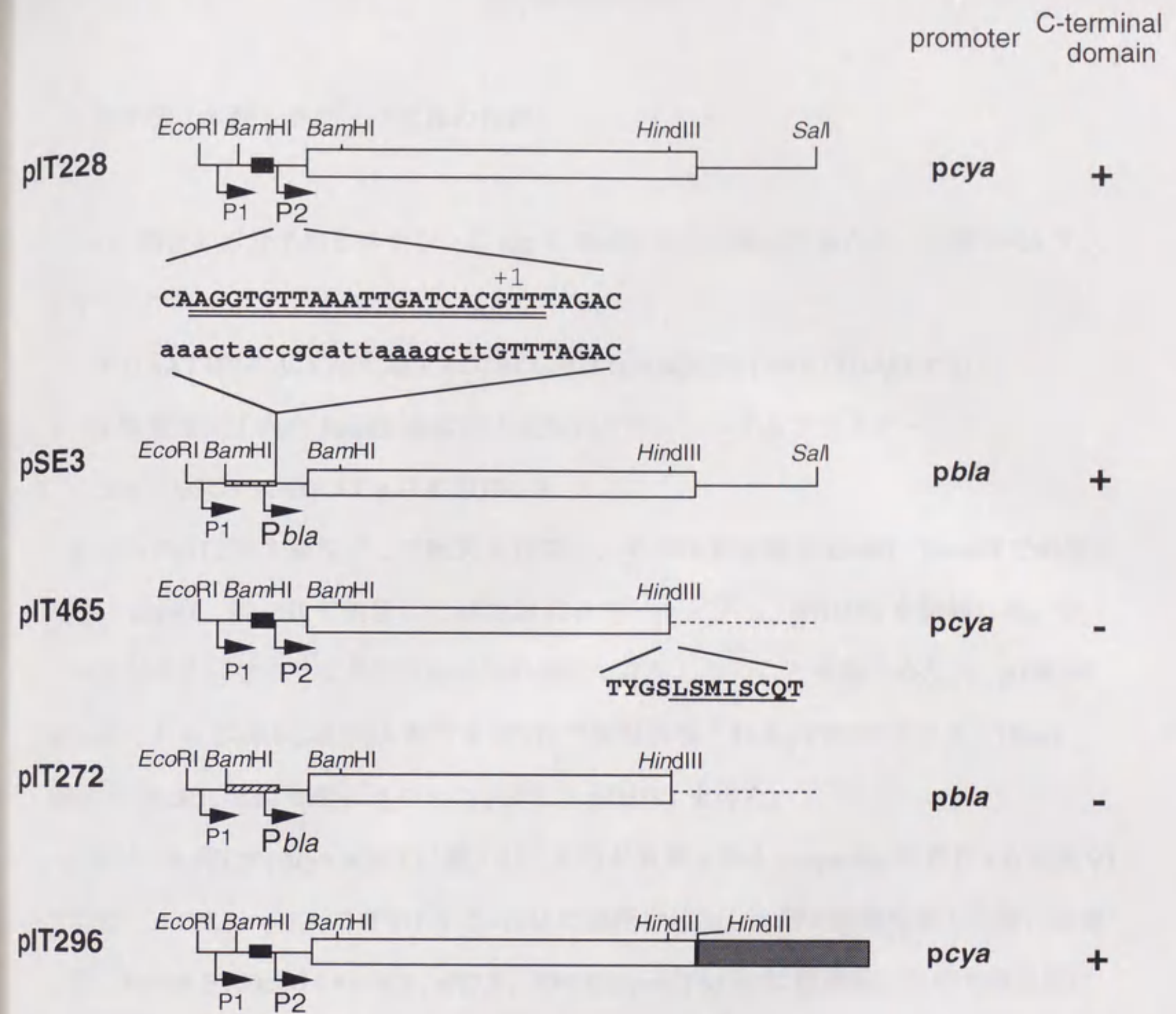


Fig.2 Diagrams of *cya* plasmids used in this study

野生型 *cya* 遺伝子 *EcoRI-SalI* DNA 断片を保持する pIT228 をもとにして各種変異体を構築した。白抜き四角は *cya* の構造遺伝子を示す。*cya* プロモーターを CRP-cAMP 非依存プロモーターに置換した pSE3, pIT272 においては pIT228 と転写開始点が一致するように構築した。二重の下線部は *cya* 遺伝子の CRP 結合部位を示す。下線部は *HindIII* 部位を示す。また、*cya* C 末48アミノ酸を欠失するように構築した pIT465、pIT272 においては下線部に示す vector 由来の8つのアミノ酸が付加されている。点線は vector DNA 部分を示す。pIT296 における網かけの部分は *LacZ* 遺伝子を示す。

5. 抗アデニル酸シクラーゼ抗体の作製

cya 5' 部位に 6 分子のヒスチジンの tag と *Eco*RI 部位を導入するため、合成 DNA プライマー、

5'-GAATTCGCACCACCACCACCACCTTGTACCTCTATATTGAGACTC-3'

と *cya* 構造遺伝子内の *Bam*HI 部位の下流配列とアニールするプライマー、

5'-CGAGGTGCTGCCCATGGTGTG-3'

を用いて pIT228 を鋳型にして PCR を行ない、その PCR 産物を *Eco*RI、*Bam*HI で処理した後、*Eco*RI、*Bam*HI で処理した pIT228 にクローニングし、pTH190 を構築した。シーケンスを行なって変異が目的以外の部位に存在しないことを確かめた後、pTH190 から得られる *Eco*RI-*Sal*I DNA 断片を IPTG で発現誘導される pTTQ18 ベクター (Stark 1987) の *Eco*RI、*Sal*I 部位にクローニングし、pTH191 を得た。

pTH191 を HT28 ($\Delta cya::Kan^r$) に導入し、その形質導入株を Ampicillin を含む LB 培地 9 l で培養し、 $OD_{600} \sim 0.5$ で IPTG を 0.4 mM の濃度で添加し、約 3 時間培養した後、集菌した。Buffer F (50mM Tris-HCl, pH7.8、10% Glycerol) 80 ml に懸濁後、水中で超音波により菌体を破碎し、遠心 (4 °C, 8,000 g, 20分) して不溶画分を除去した。さらに超遠心 (4 °C, 10,000 g, 1時間) してリボソーム等の高分子タンパクを除去し、その上清画分を DEAE-Sepacel (ϕ 14 mm \times 180 mm) に吸着させた後、0 M-0.4 M NaCl 400 ml で溶出した。アデニル酸シクラーゼ画分を集めた後、非特異的吸着を阻害するために 0.1% Brij 58 を添加し、 Ni^{2+} -Agarose column (ϕ 7 mm \times 97 mm) により、His-tagged アデニル酸シクラーゼを分離した。最終的に不純物を除く為、SDS-PAGE によりタンパクを精製し、約 3 mg の最終標品を得た (Fig.2-2)。これを用いて、抗アデニル酸シクラーゼウサギポリクローナル抗体を作製した。

6. S1 nuclease assay

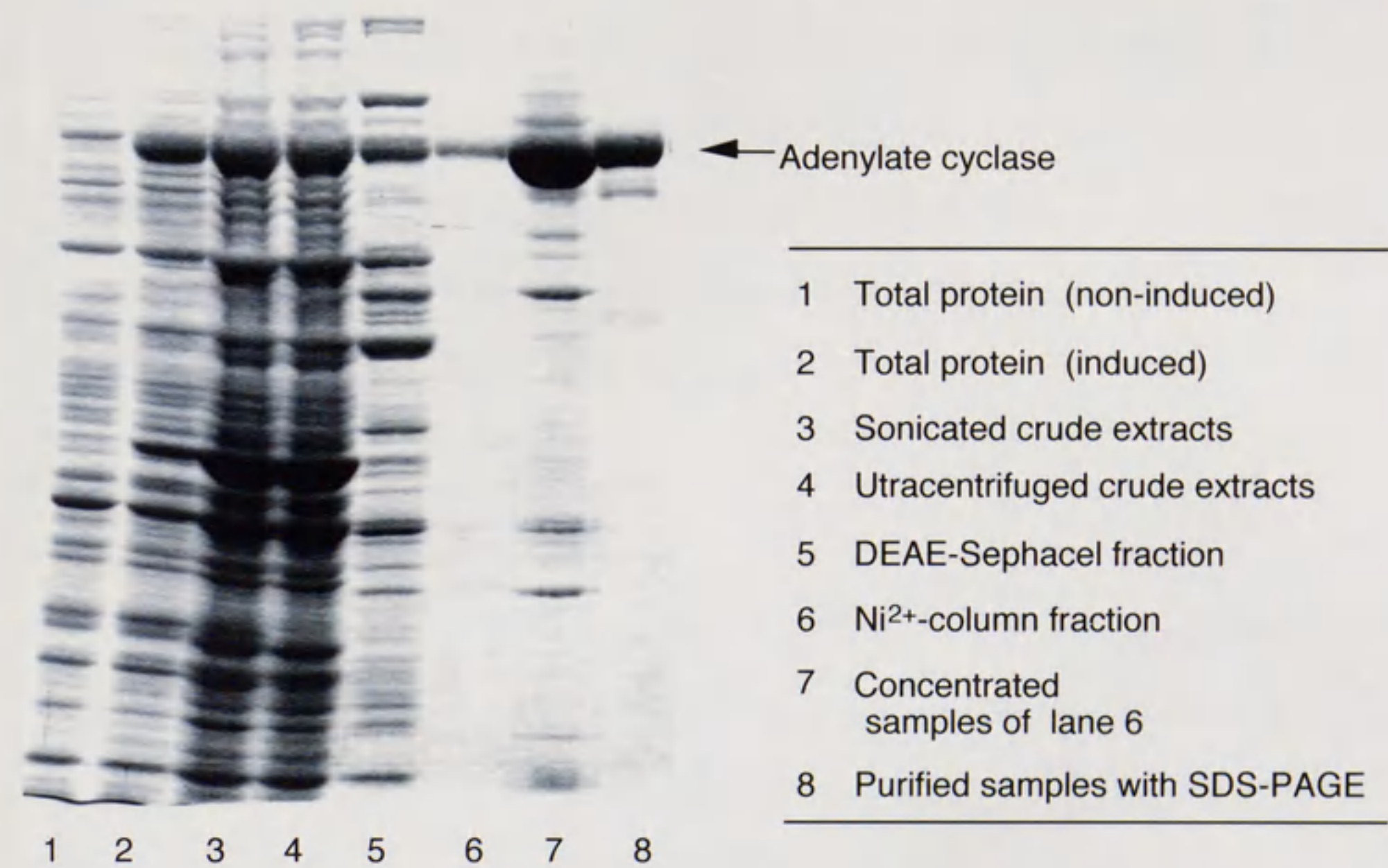


Fig. 2-2 Purification of adenylate cyclase

抗アデニル酸シクラーゼ抗体を作成するための抗原蛋白の精製行程を表す。lane 1 は IPTG で誘導前、lane 2 は IPTG で誘導後の全蛋白、lane 3 は超音波破碎後に低速遠心処理した上清、lane 4 は超遠心処理した上清、lane 5 は DEAE-Sephacel で分離した画分、lane 6 はさらに Ni²⁺-Agarose で分離した画分、lane 7 は濃縮した lane 6 のサンプル、lane 8 は SDS-PAGE によって精製したサンプルで、最終標品である。これを用いて抗アデニル酸シクラーゼウサギ抗体を作成した。

a) RNA の抽出

RNA の抽出方法は Aiba らの方法に従った (Aiba 1981 *et al.*)。LB 培地 30 ml で培養した大腸菌を $OD_{600} = \sim 0.6$ で、培養液に氷を加えて直ちに 4℃ で集菌した。菌体を 400 μ l の RNA 抽出緩衝液 (0.5% SDS, 20 mM sodium acetate, 10mM EDTA) に懸濁し、400 μ l のフェノール (pH5.2) を加え、60℃ で 5 分間穏やかに振とうし、RNA を抽出した。エタノール沈殿を 3 回繰り返した後、400 μ l の RNA 抽出緩衝液に溶解し、RNA 標品を得た。260 nm における吸光度が 1 の時 400 μ g/ml として、濃度の計算をした。

b) プローブの調製

cya mRNA の転写開始点を含む *Bam*HI-*Bam*HI DNA 断片 (529bp) を alkaline phosphatase で 5' 末端を脱リン酸化した後、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP と T4 polynucleotide kinase で 5' 末端を標識した。標識した DNA 断片をエタノール沈殿で濃縮し、40 μ l の DMSO dye (30% DMSO, 1mM EDTA, 0.05% Xylene Cyanol, 0.05% BPB) に溶解する。その溶液を 5 分間 boil した後、10% PAGE を 4℃ で 80V の低電圧で一晩泳動後、*cya* mRNA に相補的な一本鎖 DNA を単離し、プローブとして用いた。

c) *cya* mRNA の検出

S1 nuclease assay は Mori らの方法に従って行なった (Mori & Aiba 1985)。20 ng の DNA probe と RNA 20 μ g を 50 μ l の hybridization buffer (50% formamide, 20 mM HEPES pH6.5, 0.4 M NaCl) に溶解して 75℃ で 10 分間処理した後、徐冷して 37℃ になってから 2 時間以上放置する。10 \times S1 nuclease buffer (0.3M sodium acetate, pH4.6, 0.5M NaCl, 10mM ZnSO₄, 50% Glycerol) 30 μ l、H₂O 220 μ l を加えた後、その混合液を 50 units の S1 nuclease で 37℃、10 分間処理し、等量のフェノールを加えて反応を止める。エタノール沈殿に

より DNA probe を回収し、formamide dye (80% formamide, 10mM NaOH, 1mM EDTA, 0.025% XC, 0.025%BPB) 30 μ l に溶解する。95°Cで1分間加熱後、急冷し、6% acrylamide-8M Urea gel で電気泳動を行なった。終了後、オートラジオグラフィによりバンドを検出した。定量するに際しては Fujix Bioimage Analyzer BAS1000 を用いて行なった。

6. Western blotting

Western blotting は Ishizuka らの方法に従って行なった (Ishizuka *et al.* 1993)。LB 培養液を $OD_{600} = \sim 0.6$ でサンプリングし、遠心 (4°C, 12,000g, 5分) する。ペレットを OD_{600} における吸光度が5に相当するように SDS buffer (625 mM Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 10% Glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol Blue) に懸濁し、100°Cで10分間熱処理し、可溶化した。0.1 OD_{600} に相当するサンプルを10% SDS-PAGE で分離し、終了後、ゲルを Milli-Blot SDE system (Millipore) を用いてメンブレン (immobilon P) に転写した (2.5 mA/cm² \times 30分間)。メンブレンは0.1% Tween 20 を含む PBS (10 mM sodium phosphate (pH7.5), 0.9% NaCl) (=TPBS) に5%になるように溶かしたスキムミルク (雪印乳業) を100 ml に浸し、室温で振とうする。1時間後、TPBS で2回すすぎ、TPBS で1000倍に希釈した一次抗体 (抗アデニル酸シクラーゼウサギ血清) に浸して室温で1時間静置する。メンブレンをTPBSで洗浄後、TPBSで2000倍に希釈した二次抗体 (Amersham; Anti-rabbit Ig, horsersdish peroxidase linked apcies-specific whole antibody from donkey) に移し、1時間室温で静置した。TPBSで洗浄後、蛍光物質を用いて反応させ、X線フィルムに感光させて *cya* 蛋白産物を検出した。得られたオートラジオグラムをスキャナーを用いてコンピューターに取り込み、NIH Image により、各バンドの定量を行なった。

7. β -galactosidase assay

β -galactosidase assay は Miller らの方法 (Miller 1972) を改変して行なった。IPTG を含まない LB 培地で培養した大腸菌を $OD_{600} = \sim 0.6$ で 100 μ l サンプルングし、反応液に加え、10秒間激しく攪拌する。反応液は 50 μ l 0.02 % SDS、50 μ l $CHCl_3$ 、900 μ l Z-buffer (60 mM Na_2HPO_4 、40 mM NaH_2PO_4 、10 mM KCl、1 mM $MgSO_4$ 、50 mM β -mercaptoethanol) の混合液を用いた。反応液は氷中で保存し、反応直前に 28 $^{\circ}C$ で 3 分間 preincubation した。反応は 4 mg/ml ONPG 200 μ l を加え、28 $^{\circ}C$ で反応させた。呈色後、1M Na_2CO_3 500 μ l で反応を停止し、遠心分離 (2krpm \times 5 min.) 後、420 nm の吸光度を測定した。酵素活性は次式に従って求めた。

$$\text{Units} = \frac{10000 \times OD_{420}}{t \times OD_{600}}$$

OD₄₂₀: 反応液の 420 nm の吸光度

OD₆₀₀: サンプルング時の OD₆₀₀ の吸光度

t: 反応時間 (min.)

8. cAMP の測定

LB で培養した菌体が $OD_{600} = \sim 0.6$ の時に 1 ml サンプルングし、12k rpm で 2 分間遠心分離後、上清を取り、細胞外 cAMP レベルの測定に用いた。

cAMP 測定は gel shift assay を応用した方法を新たに開発し、それを用いた (Inada *et al.* 1996b)。プラスミド pPxSL04 (Morita *et al.* 1988) から調製した CRP コンセンス結合配列を保持する 135 bp の DNA 断片 (*Bam*HI-*Hpa*II) を pUC119 の *Bam*HI、*Acc*I 部位に subcloning し、pTH53 を得た。pTH53 を *Eco*RI、*Pst*I で切断し、 ~ 140 bp の DNA 断片を ^{32}P で標識し、プローブとして用いた。適量のサンプルを 10 μ l の Binding buffer (10mM Tris-HCl pH7.9, 50mM KCl, 0.5mM EDTA, 2% Glycerol) 中に標識した DNA、精製 CRP を

それぞれ最終濃度が 1 nM, 200nM になるように加えた。37℃で 5 分間反応させた後、TE で飽和した 5% acrylamide gel で電気泳動した。終了後、オートラジオグラフィーによりバンドを検出し、また、定量するに際しては Fujix Bioimage Analyzer BAS1000 を用いて行なった。サンプル中の cAMP 濃度は既知濃度の cAMP を用いて作製した検量線をもとに決定した。

実験結果

1. 多コピー *cya* 遺伝子の cAMP-CRP による negative regulation

染色体上の *cya* 遺伝子の発現が *crp* 欠損株において約 5 倍に増加することを我々の研究室で明らかにしている (Aiba 1985; Mori & Aiba 1985)。しかし、多コピープラスミド上の *cya* 遺伝子が染色体上のものと同様に CRP による制御を受けているかについては明らかではなかった。

まず、多コピープラスミド上の *cya* の発現量を染色体上のものと比較する目的でベクターもしくは野生型 *cya* 遺伝子を保持する pIT228 (Fig.2-2) を導入した HT5163 (*cya*⁺, *crp*⁺) から抽出した RNA を用いて S1 nuclease assay を試みた。その結果、*crp*⁺ において多コピー *cya* はシングルコピー *cya* の約 4 倍ほどの *cya* mRNA を発現していることが明らかとなった (Fig.2-3)。

その発現量を保持する pIT228 を導入した HT5164 (Δcya , *crp*⁺)、HT5166 (Δcya , *crp*⁻) から RNA を抽出し、S1 nuclease assay により *cya* mRNA を定量した。その結果、HT5164 形質転換株に比べ、HT5166 形質転換株においては約 4 倍の *cya* mRNA が検出され (Fig.2-4 lane 2, 3; Table 2-1)、多コピープラスミド上の *cya* 遺伝子の発現が染色体上のものと同様に cAMP-CRP により制御されていることが明らかとなった。

さらに、pIT228 形質転換株において cAMP は *crp*⁺ 株の 56 (pmol/ml) に比べて *crp*⁻ 株では 10,800 (pmol/ml) と約 200 倍増加しており (Table 2-1)、cAMP 合成量も染色体上の *cya* 遺伝子と同様の抑制を受けることが明らかとなった。

以上の結果から、多コピー *cya* は染色体上の *cya* と同様に CRP-cAMP に制御されることが明らかとなったため、以下の実験においては多コピープラスミド上の *cya* を改変して *cya* 変異体を構築し、解析を行なった。

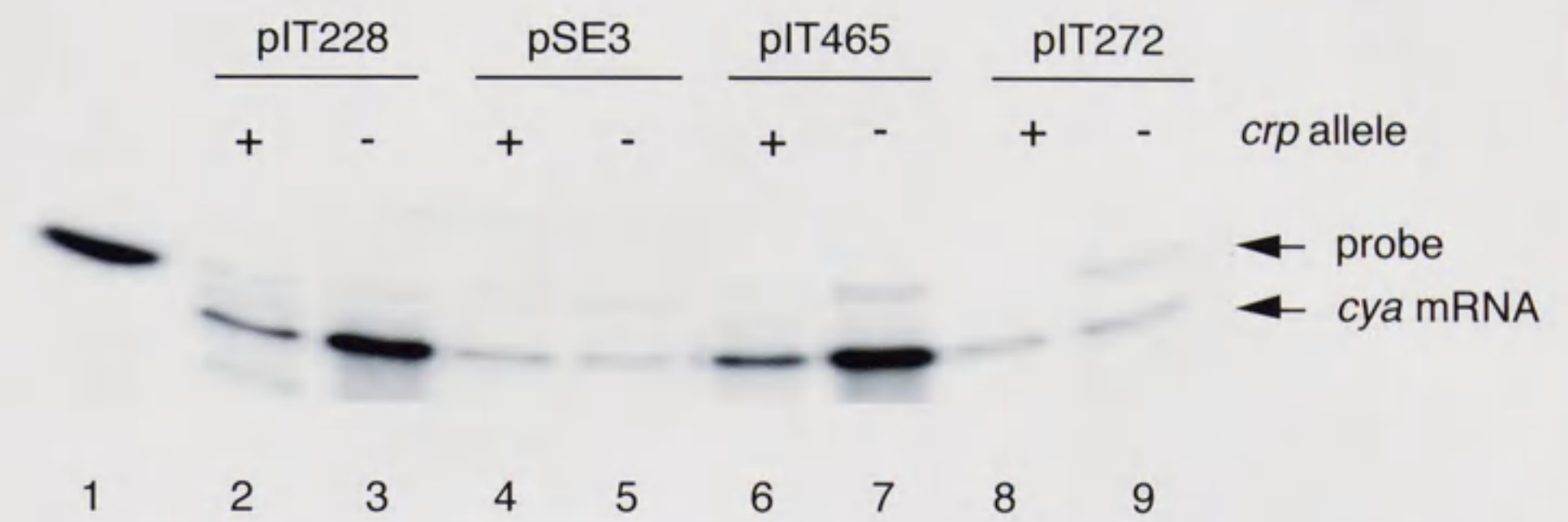
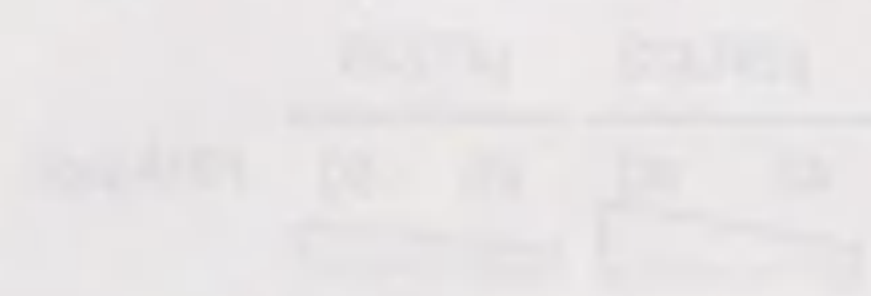
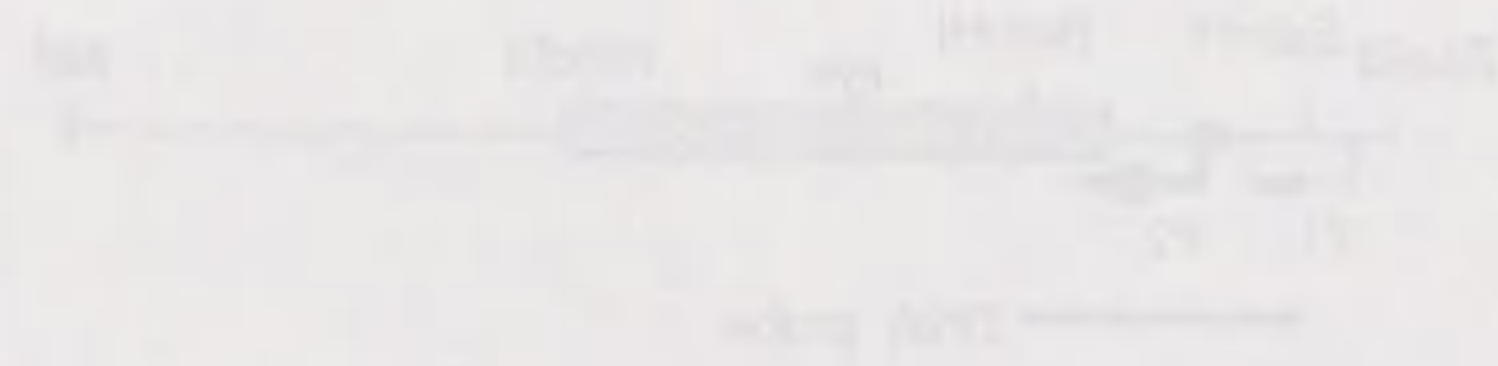


Fig.2-4 Measurement of *cya* mRNA

各種 *cya* 変異体を導入した HT5164 (Δcya , *crp*⁺)、HT5166 (Δcya , *crp*⁻) を 50 μ g/ml の ampicillin を含む LB 培地で培養し、600nm における吸光度が 0.6 の時においてサンプリングを行ない、Total RNA を抽出した。20 μ g の RNA を用いて S1 nuclease assay を行ない、*cya* mRNA の定量を行なった。lane 1 は S1 nuclease で処理していない DNA probe である。

plasmid	<i>crp</i> allele	cAMP (pmol/ml)	$\frac{crp^-}{crp^+}$	relative mRNA	$\frac{crp^-}{crp^+}$	relative adenylate cyclase	$\frac{crp^-}{crp^+}$
pIT228	+	56	200	1.00	4.2	1.00	3.9
	-	10800		4.16		3.85	
pSE3	+	40	50	0.40	0.9	0.24	1.2
	-	2000		0.36		0.29	
pIT465	+	36	5.3	1.21	4.5	0.48	4.0
	-	190		5.44		1.92	
pIT272	+	16	1.2	0.41	1.1	0.16	1.0
	-	20		0.45		0.15	
pIT296	+	52	85	1.21	4.2	n.d.	
	-	4400		5.08		n.d.	

Table 2-1 Level of cAMP, *cya* mRNA and adenylate cyclase in cells carrying various *cya* plasmids

各種 *cya* 変異体を導入した HT5164 (Δcya , *crp*⁺)、HT5166 (Δcya , *crp*⁻) を 50 μ g/ml の ampicillin を含む LB 培地で培養し、600nm における吸光度が 0.6 の時においてサンプリングを行った。cAMP は実験方法に記載している通りに測定した。*cya* mRNA は Fig.2-4 の S1 nuclease assay のバンドを Bioimage Analyzing System 100 (Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いて定量した。アデニル酸シクラーゼは Fig.2-5 の western blotting の結果をスキヤナーを用いてコンピュータに取り込み、NIH image によって各バンドを定量した。なお、*cya* mRNA、アデニル酸シクラーゼのレベルは HT5164/pIT228 におけるレベルを1とした。

2. cAMP-CRP による *cya* の転写抑制も cAMP 合成制御に関与するが、それだけでは不十分である

cya プロモーター領域に存在する CRP 結合部位に CRP-cAMP が結合することにより、*cya* の転写が抑制されることが Aiba らによって明らかとなっている (Aiba 1985; Mori & Aiba 1985)。CRP-cAMP による *cya* の抑制を排除する目的で、主要な *cya* プロモーターを CRP-cAMP 非依存プロモーター、*bla* に組み替えた *cya* 変異体、pSE3 を構築した (Fig. 2-1)。HT5164、HT5166 に導入し、*cya* mRNA を定量した結果、pSE3 は pIT228 に対してその mRNA は約半分ではあるが、構成的に発現されていることが確認された (Fig. 2-4 lane 4, 5)。このときの cAMP 量を測定すると *crp*⁺ 株においては 40 (pmol/ml) であるのに対し、*crp*⁻ 株においては 2,000 (pmol/ml) と約 50 倍の増加が見られた (Table 2-1)。これは pIT228 形質転換株における cAMP の増加量に比べ、約 1/4 減少している (Table 2-1)。この結果から、CRP-cAMP による *cya* の転写制御は cAMP 合成制御に重要な役割を担っていることが明らかとなった。また、転写制御を排除した条件においても cAMP は *crp*⁻ 株において約 50 倍増加することから、主要な cAMP 合成の制御は転写後段階で行なわれていることが明らかとなった。

3. cAMP-CRP により *cya* mRNA の翻訳は制御されていない

2. の結果より転写後制御の存在が明らかとなったが、転写後制御はさらに 1) 翻訳制御、2) 翻訳後制御 (活性制御) の二つの可能性が考えられる。*cya* mRNA の翻訳制御である可能性を検討する目的で pIT228、pSE3 形質転換株より抽出した全蛋白質をウエスタンブロッティングによりアデニル酸シクラーゼの蛋白レベルを解析した。その結果、pIT228 形質転換株においては *crp*⁺ に対して *crp*⁻ 株では約 4 倍のアデニル酸シクラーゼが発現していた (Fig. 2-5 lane 1, 2; Table 2-1)。また、pSE3 形質転換株においては *crp*⁺ 株と *crp*⁻ 株で同量のアデニル酸シクラーゼの発現が確認された (Fig. 2-5 lane 3, 4; Table 2-1)。

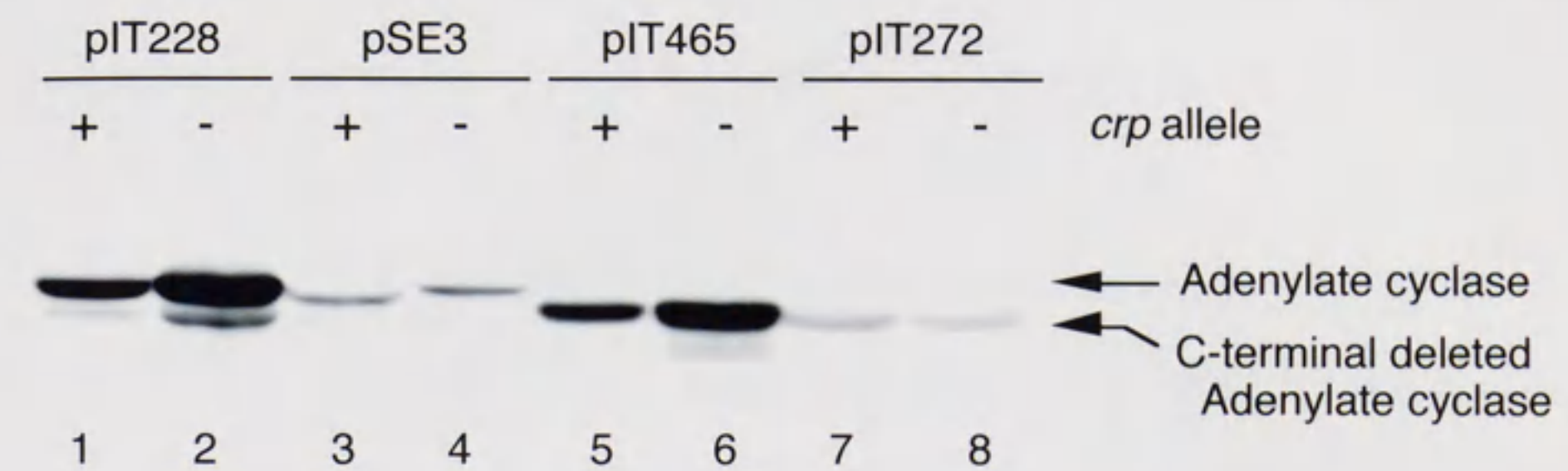


Fig.2-5 Measurement of adenylate cyclase

各種 *cya* 変異体を導入した HT5164 (Δcya , *crp*⁺)、HT5166 (Δcya , *crp*⁻) を 50 μ g/ml の ampicillin を含む LB 培地で培養し、600nm における吸光度が 0.8 の時においてサンプリングを行なった。1 ml あたりの菌体数が 5 OD₆₀₀ になるように調製し、Total protein を得た。15 μ l のサンプルを 10% SDS-PAGE により分離し、抗アデニル酸シクラーゼ抗体を用いた western blotting によりアデニル酸シクラーゼの発現量を検出した。検出したバンドの定量に際してはスキャナーを用いてコンピューターに取り込み、NIH image によって各バンドを定量した。

即ち、アデニル酸シクラーゼの crp^-/crp^+ 比は *cya* mRNA の存在比と一致していることが明らかとなった。

さらに定量的にアデニル酸シクラーゼの存在量を比較するために *cya-lacZ* 融合体、pIT296 を構築し (Fig.2-1)、MC4100 ($\Delta lac, crp^+$)、IT1194 ($\Delta lac, crp^-$)、HT5164 (lac^+, crp^+)、HT5166 (lac^+, crp^-) に形質転換して、その形質転換株に関して β -galactosidase assay を行なった。その結果、MC4100 形質転換株では 240 units、IT1194 では 1120 units の値を示し、 β -galactosidase assay の crp^-/crp^+ 比は約 4.7 であった (Table.2-2)。また、IPTG 非存在下では、HT5164 形質転換株では 260 units、HT5166 株では 1240 units、その crp^-/crp^+ 比は約 4.8 となり (Table.2-2)、異なる菌株の genetic background による特異的な現象でないことが確かめられた。pIT296 における *cya* mRNA の発現量も pIT228 同様、その crp^-/crp^+ 比は約 4 となっており (Fig.2-6)、アデニル酸シクラーゼと *cya* mRNA における crp^-/crp^+ 比が一致した。また、pIT296 は pIT228 とほぼ同等の cAMP 合成能を保持し、かつ、CRP による制御を受けていた (Table.2-1)。

以上の結果より、CRP-cAMP により *cya* mRNA の翻訳は制御されないことが明らかになり、おそらく CRP-cAMP はアデニル酸シクラーゼの活性を制御していると推測される (次項及び考察参照)。

4. アデニル酸シクラーゼの C 末 48 アミノ酸領域が *crp* 欠損株における cAMP の overproduction に重要である

アデニル酸シクラーゼは N 末部分に触媒活性ドメイン、C 末部分に活性調節ドメインであることが推測されており、C 末部分を欠損した *cya* 変異体でも cAMP 合成活性を保持することが知られている (Roy *et al.* 1983)。また、ほぼ全長の半分を欠失した *cya* 変異体においては *crp* 欠損株において cAMP の overproduction が認められないことが報告されている (Crasnier *et al.* 1994)。

そこで、アデニル酸シクラーゼの C 末 48 アミノ酸領域の cAMP の overproduction への

Host	<i>crp</i> allele	β -galactosidase (Miller units)	$\frac{crp^-}{crp^+}$
MC4100	+	240	4.7
IT1194	-	1120	
HT5164	+	260	4.8
HT5166	-	1240	

Table 2-2 Expression of *cya-lacZ* fusion protein in *crp*⁺ and *crp*⁻ backgrounds

cya-lacZ 融合体、pIT296 を MC4100 (*crp*⁺, Δ *lac*)、IT1194 (*crp*⁻, Δ *lac*)、HT5164 (*crp*⁺, *lac*⁺)、HT5164 (*crp*⁻, *lac*⁺) に導入し、IPTG を添加していない、50 μ g/ml の ampicillin を含む LB 培地で培養し、600nm における吸光度が 0.6 の時ににおいてサンプリングを行ない、*cya-lacZ* 融合体の発現量を β -galactosidase assay により測定した。 β -galactosidase assay は Miller の方法に従って行なった。

Strain	Genotype	Crp	lacZ
HT5164	$\Delta cya, crp^+$	+	+
HT5166	$\Delta cya, crp^-$	-	-

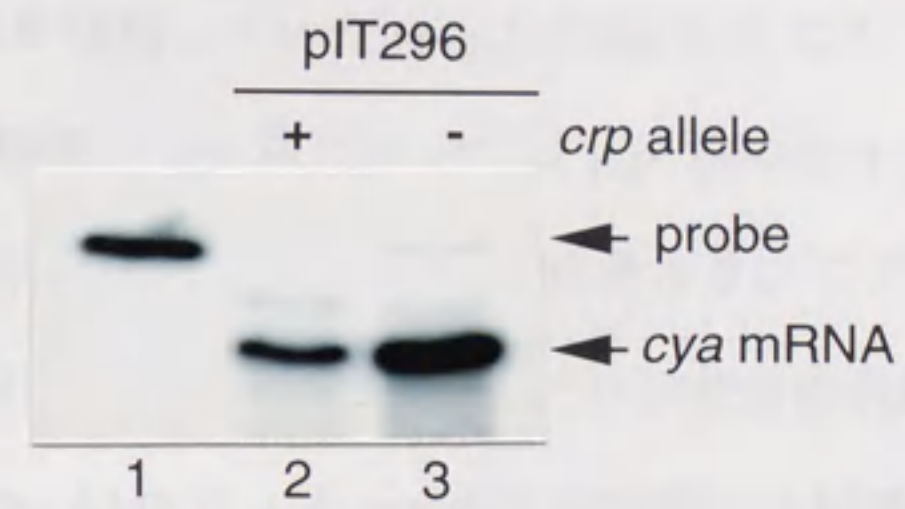


Fig.2-6 Measurement of *cya* mRNA

cya-lacZ 融合体、pIT296 を導入した HT5164 ($\Delta cya, crp^+$)、HT5166 ($\Delta cya, crp^-$) を 50 $\mu\text{g/ml}$ の ampicillin を含む LB 培地で培養し、600nm における吸光度が 0.6 の時に於いてサンプリングを行ない、Total RNA を抽出した。20 μg の RNA を用いて S1 nuclease assay を行ない、*cya* mRNA の定量を行なった。lane 1 は S1 nuclease で処理していない DNA probe である。

関与を解析した。*cya* EcoRI-HindIII 領域のみをベクターに組み込み、アデニル酸シクラーゼのC末48アミノ酸領域を欠失した *cya* 変異体、pIT465 を構築した (Fig.2-1)。S1 nuclease assay の結果、*cya* mRNA の発現は *crp*⁻ 株においては *crp*⁺ 株の約4倍増加していることが確認され (Fig.2-4 lane 6, 7; Table 2-1)、また、全長を保持する pIT228 とほぼ同程度の mRNA 量を発現していた (Fig.2-4 lane 1, 2, 6, 7; Table 2-1)。さらに、ウエスタンブローディングの結果、*crp*⁻ 株においては *crp*⁺ 株の約4倍増加していることが確認された (Fig.2-5 lane 5, 6; Table 2-1)。以上の結果より、アデニル酸シクラーゼのC末領域の欠損により若干のアデニル酸シクラーゼの不安定化が起こっている可能性はあるが (考察参照)、CRP-cAMP による *cya* の発現制御には影響しないことが明らかとなった。さらに pIT465 を導入した菌株における cAMP を測定した結果、*crp*⁺ 株では 36 (pmol/ml)、*crp*⁻ 株では 190 (pmol/ml)、その *crp*⁻/*crp*⁺ 比は約 5.3 となり、cAMP の overproduction が認められなくなった (Table 2-1)。この結果から、アデニル酸シクラーゼのC末48アミノ酸領域が *crp* 欠損株における cAMP の overproduction に重要であることが明らかになった。

5. CRP-cAMP による *cya* の転写制御と翻訳後制御は独立して機能している

C末領域を欠損した *cya* 変異体は *crp* 欠損株における cAMP の overproduction が認められないが、*crp*⁻ 株においてまだ約5倍の cAMP の増加が認められた (Table 2-1)。第2項で明らかになったように、*cya* の転写制御も cAMP の合成制御に寄与していることから、この cAMP の増加が *cya* mRNA の増加分に相当する可能性が考えられる。

その可能性を検討する目的で、プロモーター及びC末欠損変異を導入した *cya* 二重変異体、pIT272 を構築した (Fig.4)。その *cya* 変異体を HT5164、HT5166 株に導入して cAMP を定量した。その結果、*crp*⁺ 株では 16 (pmol/ml)、*crp*⁻ 株では 20 (pmol/ml)、その *crp*⁻/*crp*⁺ 比は約 1.2 となり、*crp*⁻ 株における cAMP の増加が完全に欠失した (Table 2-1)。また、pIT272 形質転換株の *cya* mRNA 及び *cya* 蛋白産物は *crp*⁻ 株と *crp*⁺ 株でほとんど発

現量に変化がないことが確認された (Fig. 2-4 lane 8, 9; Fig. 2-5 lane 7, 8; Table 2-1)。これらの結果から、pIT465 形質転換株で認められた約 5 倍の cAMP の増加は *cya* の転写抑制が解除されたためであり、pIT272 は転写制御と翻訳後制御を受けないために *crp* 株における cAMP の増加が全く認められなくなったと考えられる。また、cAMP-CRP による cAMP 合成制御において *cya* プロモーターが転写制御に、*cya* C 末領域が翻訳後制御に重要な *cya* のシスの領域として同定された。さらに各々の領域を欠失させた *cya* 変異体は各々の cAMP-CRP による制御が欠失した分に相当した cAMP 量の変動が観察される (Table 2-1) ことから、cAMP の合成制御に関して CRP-cAMP による *cya* の転写制御と翻訳後制御は独立に寄与していることが明らかとなった。

考察

crp 欠損株における約 100 倍もの cAMP の増加という現象の発見から CRP による cAMP 合成抑制機構が示唆され、CRP による *cya* の転写抑制機構が明らかにされてきた。しかし、*cya* mRNA の増加量は *crp* 欠損株で約 5 倍程度であり、cAMP の 100 倍の増加を *cya* mRNA の 5 倍の増加で説明できるか、また、転写抑制機構が cAMP 抑制機構に寄与しているかについても不明であった (reviewed by 饗場 1989; Botsford & Harman 1992; Postma *et al.* 1993)。

本章においては、*cya* の転写抑制は cAMP 抑制機構に寄与しているが、そのみでは不十分であり、翻訳後段階においても cAMP 合成を抑制していることを明らかにした。

cya プロモーターを *bla* プロモーターに置換した *cya* 変異体、pSE3 においてはその cAMP の *crp*⁻/*crp*⁺ 比は約 50 倍となり、野生型 *cya*、pIT228 における *crp*⁻/*crp*⁺ 比に比べ、約 1/4 減少していた (Table 2-1)。これは転写抑制の排除によって cAMP の増加量が減少した結果であると考えられ、この結果から *cya* の転写制御は cAMP 合成抑制機構に寄与していることが明らかになった。また、転写抑制を解除した条件においても cAMP の *crp*⁻/*crp*⁺ 比が約 50 ある (Table 2-1) ということから、cAMP 合成抑制機構は転写抑制のみでは不十分であり、転写後制御機構が存在することを強く示唆するものと考えられる。さらにウエスタンブロッティング (Fig.2-5) や *cya-lacZ* 融合体 (Table 2-2) を用いた解析の結果、*cya* 蛋白産物の *crp*⁻/*crp*⁺ 比は *cya* mRNA の *crp*⁻/*crp*⁺ 比とほぼ一致していることから、CRP によるアデニル酸シクラーゼの転写後制御は翻訳段階ではなく、翻訳後段階で行なわれていることが明らかとなった。一方、アデニル酸シクラーゼの C 末 48 アミノ酸を欠失させた *cya* 変異体においては *crp*⁻ 株における cAMP の overproduction が認められなくなったことから、そのドメインが *crp*⁻ 株における cAMP の overproduction に重要な役割を担っていることが明らかとなった。さらに、プロモーター変異及び C 末欠損を導入した *cya* 二重変異体においては *cya* mRNA、*cya* 蛋白産物、cAMP の全てに関して CRP

による制御を全く受けないことから、転写制御と翻訳後制御のみでアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成が CRP-cAMP により抑制されていることが明らかとなった。

アデニル酸シクラーゼの cAMP 合成制御における転写抑制と翻訳後抑制の相互関係

アデニル酸シクラーゼは CRP-cAMP によって転写段階と翻訳後段階で抑制されており、アデニル酸シクラーゼの cAMP の合成制御が行なわれていると考えられる。では、転写制御と翻訳後制御は互いに影響し合うのであろうか？

pSE3 の cAMP の crp/crp^+ 比は約 50 倍であり、pIT228 の cAMP の crp/crp^+ 比、約 200 倍に対して約 1/4 の減少が認められた (Table 2-1)。pSE3 が CRP による転写抑制を受けない (Fig.2-4, lane 4,5) ことから、その減少分は転写抑制の排除分に相当すると考えられる。また、逆に pIT465 の cAMP の crp/crp^+ 比は約 5 倍であり、pIT465 が野生型と同様に CRP による転写抑制を受ける (Fig.2-4, lane 6,7) ことから、この cAMP の増加分は転写抑制の解除分に相当すると考えられた。さらに、pIT272 においては cAMP の crp/crp^+ 比は約 1 となり、pIT465 で認められた約 5 倍の cAMP の増加が認められなくなった。以上の結果から、CRP による *cya* の転写抑制が定量的に cAMP 合成抑制に寄与していることが考えられる。一方、pSE3 においてもまだ約 50 倍の cAMP の増加が観察されるが、それは pIT465 の cAMP の crp/crp^+ 比が pIT228 に対して約 1/50 に減少した分に相当し、ちょうど翻訳後抑制に相当する分が欠失したと考えられる。これらのことから、アデニル酸シクラーゼの転写抑制と翻訳後抑制は cAMP 合成抑制において独立に cAMP 合成抑制に寄与していることが考えられた。

アデニル酸シクラーゼの活性制御

アデニル酸シクラーゼの翻訳後制御には具体的に活性制御が考えられる。しかし、本研究においては cAMP の定量に留まり、アデニル酸シクラーゼの活性測定を行っていない点で、cAMP の分解や放出による cAMP 量の制御が行なわれている可能性も推測さ

れる。しかし、第4項で示したように、C末49アミノ酸領域の欠失という *cya* のシス変異により *crp* 欠損株における cAMP の overproduction が認められなくなる (Table 2-1) ことから、*crp* 欠損株における cAMP の増加はアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成活性の上昇を見ていると考えられる。また、少なくとも cAMP 分解酵素として同定されている大腸菌の CpdA (*cpdA*) に関してはその発現、活性において CRP による制御を受けないことを確認している (結果未掲載) ため、cAMP 分解系に依存した CRP による cAMP 量の制御は可能性として低いと考えられる。また、cAMP の放出に関しても、基本的に細胞内 cAMP の測定においても *crp* 欠損株における cAMP の増加は認められ (結果未掲載)、細胞内外 cAMP の変動は基本的に同一であるため、CRP が関与する可能性は低いと考えられる。従って、CRP によるアデニル酸シクラーゼの翻訳後制御は活性制御であると考えられる。

Majerfeld らは *crp*⁻ 株及び *crp*⁺ 株の細胞粗抽出液を用いた解析から、CRP によるアデニル酸シクラーゼの発現抑制を推測した (Majerfeld *et al.* 1981)。それと同時に、cAMP の増加量に対応していないことも指摘しており、CRP によるアデニル酸シクラーゼに活性抑制機構も予見している。また、Joseph らもトルエン処理した細胞において、多コピーで *crp* 遺伝子を *crp* 欠損株に導入した場合には野生株に比べ、アデニル酸シクラーゼの活性が低下していることを見出し、CRP によるアデニル酸シクラーゼに活性抑制機構を推測している (Joseph *et al.* 1982)。彼らの実験結果は現在明らかになっている知見とは定量的に正確ではないが、アデニル酸シクラーゼの活性抑制機構を推測している点においては重要であると思われる。本研究においては *cya* の転写制御を完全に排除した条件においても CRP により cAMP 合成抑制は起こることから、過去に推測された活性抑制機構をより定量的、具体的に示したと同時に、cAMP 合成抑制機構における *cya* の転写抑制機構の寄与を明確にした。

アデニル酸シクラーゼの C 末 48 アミノ酸領域

過去の遺伝学的解析、例えば、*crp* 欠損株での cAMP の増加は PTS component の一つ

である IIA^{Glc} (*crr*) と *crp* の二重変異株においては認められない (Daniel 1984; Blaauwen & Postma 1985; Crasnier & Danchin 1990) ことから、アデニル酸シクラーゼの活性は PTS によって制御され、 IIA^{Glc} のリン酸化型がアデニル酸シクラーゼの活性化因子であることが示唆されていた。一方で、*cya* の C 末領域が *crp* 欠損株における cAMP の overproduction に関与していることがいくつかの報告により示唆されていた (reviewed by 饗場 1989; Botsford & Harman 1992; Postma *et al.* 1993)。例えば、Roy らは *Hind*III 部位の 578 bp 上流の *Hpa*I 部位までの *cya* C 末欠損変異においても basal level の cAMP 合成活性は保持しているが、グルコースに対する cAMP の低下が観察されないと報告し、C 末部位が活性調節部位であると推測した (Roy *et al.* 1983)。また、Crasnier らは、414 番目のアスパラギン酸がアスパラギンに置換した *cya* D414N 変異体は *crp* 欠損株における cAMP の overproduction が認められないと報告し、全長が 848 アミノ酸で構成されるアデニル酸シクラーゼのうち、そのほぼ中心にあたる領域が $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ との相互作用部位であると推測した (Crasnier & Danchin 1990)。さらに、同グループは、*cya* D414N 変異体をもとに $\Delta\text{ptsHI-crr } \Delta\text{crp}$ の genetic background で cAMP が増加する *cya* の二重変異体の単離を試み、そのほとんどが野生型のアデニル酸シクラーゼの約半分を欠失した *cya* 変異体であったと報告した (Crasnier *et al.* 1994)。彼らの *cya* 変異体は *cya* D414N 変異を同時に保持しているため、C 末領域のみの影響を議論するのは難しく、また、C 末領域の機能についてどの程度議論できるかについては疑問が残るが、少なくとも約半分を欠失した *cya* 変異体においても *crp* 欠損株における cAMP の overproduction が認められない点で、C 末領域がアデニル酸シクラーゼの活性制御に重要であり、おそらく $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ との相互作用部位であろうということが示唆すると考えられる。本研究においては、C 末 48 アミノ酸という、全長の約 1/18 に相当する、さらに短い領域が cAMP の overproduction に重要であることを明らかにし、その 48 アミノ酸領域が $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ によるアデニル酸シクラーゼの活性化に関与することをより詳細に証明した。

なお、本研究で用いた、C 末 48 アミノ酸領域を欠損させた *cya* 変異体、pIT465、272 において、若干のアデニル酸シクラーゼの不安定化が起こっていることが観察された

(Fig.2-4 lane 6-9; Fig.2-5 lane 5-8)。また、それに伴い、cAMP のわずかな低下も観察された (Table 2-1)。この結果は *cya C* 末欠損変異の導入が アデニル酸シクラーゼの蛋白レベルを低下させたと考えられるが、ゲノム上でアデニル酸シクラーゼの 800 番目のコドンに ochre 変異を導入した *cya ΔC* 変異株においては *crp*⁺ background での *cya* mRNA、*cya* 蛋白産物、cAMP 全てにおいて野生株と量的な相違は認められなかった (結果未掲載; Fig. 3-6) ことから、pIT465 における *cya* 蛋白産物の減少は *cya EcoRI-HindIII* をベクターに組み込むことにより付加された、ベクター由来の 8 アミノ酸 (LSMISCQT) (Fig.2-1) に起因すると考えられる。

本章においてはアデニル酸シクラーゼは CRP-cAMP により転写段階と活性段階で独立に抑制を受け、翻訳段階では抑制を受けないことが明らかとなった。また、アデニル酸シクラーゼの自己制御機構において、CRP-cAMP によるアデニル酸シクラーゼの活性抑制は非常に重要な役割を担っていることが明らかになった。次章においてはその活性制御機構に関して解析をすすめた。