

この反応は、細胞の成長や分化に重要な役割を果たしている。また、この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。

この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。

この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。

この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。

この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。

この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。

この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。

この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の生存や死に重要な役割を果たしている。

## 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



## 要旨

CRP によりアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成は転写段階と活性段階で独立に抑制を受けており、CRP による cAMP 抑制機構において活性抑制機構がより重要な役割を担っていることを第一章において明らかにした。

本章においては CRP によるアデニル酸シクラーゼの活性抑制機構についてさらに解析を行なった。アデニル酸シクラーゼがその活性化因子と推定されているリン酸化型  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  (以下  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ ) による活性化を受けている機構において、CRP がその活性化を抑制する機構としては主に二つの可能性が考えられる。一つは  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  またはアデニル酸シクラーゼに対する CRP (もしくはその制御下の因子) の相互作用による  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  のアデニル酸シクラーゼの活性化経路の直接的な阻害であり、もう一つは CRP による  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルの低下を介した、間接的なアデニル酸シクラーゼの活性化阻害である。本研究では後者の可能性について解析を試みた。

まず、*in vivo* における  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルを測定する方法を改良した。そのアッセイ法を用いて解析を行なった結果、*crp*<sup>+</sup> 株においてはほとんどの  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  が非リン酸化型であり、 $\Delta\text{crp}$  株、 $\Delta\text{cya}$  株においては *crp*<sup>+</sup> 株とは逆にほとんどの  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  がリン酸化型であり、CRP-cAMP の非存在下ではアデニル酸シクラーゼの活性化因子である  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  が増加していることが明らかとなった。その  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルの上昇は、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  と相互作用すると考えられ、CRP-cAMP 依存的に発現される  $\text{IICB}^{\text{Glc}}$  (*ptsG*)、 $\text{FPr}$  (*fruF*) 等の影響ではないことも明らかとなった。さらに  $\Delta\text{crp}$  株に *ptsG* を多コピーで導入し、グルコースを培地中に添加することにより、人為的に  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルを低下させるとそれに伴い、cAMP 量の低下が観察され、cAMP レベルと  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルとの間に一定の量的な相関性が認められた。また、site-directed mutagenesis により *crr* H90Q 変異体を構築し、解析した結果、*in vivo* において 90 番目のヒスチジン残基のリン酸化が CRP によるアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成制御に重要であることが示された。



細胞粗抽出液を用いた *in vitro* の解析においても、*crp*<sup>+</sup> 細胞粗抽出液には  $\Delta crp$  細胞粗抽出液中には存在しない、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の脱リン酸化反応を促進する活性が認められた。さらに、CRP が保持する各活性を欠失した *crp* 変異体を用いた解析から、転写促進活性が欠失した Positive control (pc) 変異体、*crp* H159L において cAMP の増加、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルの増加が認められ、*in vitro* dephosphorylation 反応においても野生型 CRP に比べ、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の脱リン酸化の促進活性が低下しており、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  を介したアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成活性抑制に CRP の転写促進活性が重要であることが明らかとなった。これらの結果から、CRP が positive に制御する未同定の因子 (群) が  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  を脱リン酸化型に変換し、アデニル酸シクラーゼの cAMP 合成活性抑制する機構が示唆された。



## 序論

1965年に Makman と Sutherland によって大腸菌において初めて cAMP の存在が報告された論文において、彼らは培地中のグルコースが欠乏した状態 (glucose starvation) において顕著な cAMP の増加を観察している (Markman & Sutherland 1965)。1974 年には Peterkofsky により、トルエン処理した細胞を用いて、グルコースの取り込みとアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成についての関係が解析され、グルコースを添加するとアデニル酸シクラーゼの活性が低下するということが明らかとなった (Peterkofsky & Gazdar 1974)。また、Peterkofsky らはそのアデニル酸シクラーゼの活性の低下はその他の PTS sugar においても同様の効果を確認している (Peterkofsky *et al.* 1972)。これらの結果から、Peterkofsky らは PTS と アデニル酸シクラーゼの cAMP 合成の関連性を初めて予見し、*ptsI* 変異株においては cAMP の顕著な低下が観察されたことから、リン酸化された Enzyme I がアデニル酸シクラーゼと相互作用してその活性を正に制御していることを示唆した (Peterkofsky *et al.* 1975)。しかし、1980 年の Feucht らにより、*crr* 変異株においても *ptsI*、*ptsH* 変異株同様、cAMP の低下が認められることが確認され (Feucht *et al.* 1980)、リン酸化された Enzyme I ではなく、リン酸化された  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  (以下  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ ) の cAMP 合成への関与が推測された (reviewed by Botsford & Harman 1992; Postma *et al.* 1993)。このように、主に遺伝学的な解析からアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成における  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の関与が示唆されてきた (reviewed by Botsford & Harman 1992; Postma *et al.* 1993)。

一方、*crp* 欠損株での cAMP の増加においても PTS の関与に関して解析されている。Daniel、Blauauwen らは *crp* 欠損株での cAMP の増加は *crr* 変異により認められなくなることを見出し、初めて *crp* 欠損株での cAMP の増加においても  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  が活性化因子として作用していることを示唆した (Daniel 1984; Blauauwen & Postma 1985)。さらに 1990 年にも Crasnier らにより完全 *crr* 欠失変異株が構築され、その変異株においても Blauauwen らと同様に *crp* 欠損による cAMP の増加が認められないと報告している



(Crasnier & Danchin 1990)。

それらの遺伝学的な解析が先行する一方で、生化学的な解析に関しては 1985 年に Reddy らによって精製 PTS components と *cya* を多コピーで発現させた菌体の細胞粗抽出液を用いて  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  によるアデニル酸シクラーゼの活性化を *in vitro* において検証する実験が報告されている (Reddy *et al.* 1985)。しかし、彼らの実験においては  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  によるアデニル酸シクラーゼの活性化は認められなく、現在に至るまで *in vitro* において  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  によるアデニル酸シクラーゼの活性化を証明した研究はない (Botsford & Harman 1992; Postma *et al.* 1993)。同様に CRP によるアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成の制御機構に関しては、*cya* の転写抑制の cAMP 合成抑制における役割が不明確であったこともあり、*in vitro* における解析は皆無である。

こうした主に遺伝学的な解析から、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  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り、*crp* 欠損株における cAMP の増加には  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  によるアデニル酸シクラーゼの活性化が関与していることが推測された (reviewed by Botsford & Harman 1992; Postma *et al.* 1993)。しかし、CRP によるアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成抑制機構に関してもその存在が明確化されていなかったこと、さらに生化学的解析が困難であったことも手伝って積極的な解析はなされてこなかった。また、CRP による負の制御と PTS による正の制御の相関関係に関してもその解析は全くされていない。

本章においては、第一章において *cya* の転写抑制以外の 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明らかになったことを踏まえ、CRP によるアデニル酸シクラーゼの negative regulation と  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  によるアデニル酸シクラーゼの positive regulation との関連を中心に、アデニル酸シクラーゼの活性抑制機構について解析を行なった。



## 実験方法

### 1. 大腸菌株

|        |   |                       |
|--------|---|-----------------------|
| W3110  | prototoroph   | laboratory stock      |
| HT27   | W3110 $\Delta$ <i>cya</i> : <i>Bam</i> HI- <i>Bam</i> HI: <i>Kan</i> <sup>r</sup>   | 本研究                   |
| HT28   | W3110 $\Delta$ <i>cya</i> : <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III: <i>Kan</i> <sup>r</sup>   | 本研究                   |
| HT5177 | W3110 $\Delta$ <i>crp</i> :: <i>Tet</i> <sup>r</sup>  | 本研究                   |
| IT1186 | W3110 <i>pts</i> I3:: <i>Tn</i> 5   | 本研究                   |
| HT5192 | IT1186 $\Delta$ <i>crp</i> :: <i>Tet</i> <sup>r</sup>   | 本研究                   |
| IT1199 | W3110 $\Delta$ <i>crp</i> :: <i>Kan</i> <sup>r</sup>  | 本研究                   |
| HT5188 | IT1199 $\Delta$ <i>crp</i> :: <i>Tet</i> <sup>r</sup>   | 本研究                   |
| HT5245 | HT5238 <i>pts</i> G:: <i>Tn</i> 5   | 本研究                   |
| IT1142 | W3110 <i>cya</i> $\Delta$ C:: <i>Cam</i> <sup>r</sup>   | 本研究                   |
| HT5190 | IT1142 $\Delta$ <i>crp</i> :: <i>Tet</i> <sup>r</sup>   | 本研究                   |
| JC7623 | <i>rec</i> B21 <i>rec</i> C22 <i>sb</i> cB15 <i>thr</i> <i>thi</i> <i>leu</i> <i>his</i> <i>arg</i> <i>pro</i> <i>rps</i> L | Winans et al. (1985)  |
| DPB271 | <i>rec</i> D1913:: <i>Tn</i> 10   | Russell et al. (1989) |
| IT1168 | W3110 <i>pts</i> G:: <i>Tn</i> 5  | 本研究                   |
| HT5226 | IT1168 $\Delta$ <i>crp</i> :: <i>Tet</i> <sup>r</sup>   | 本研究                   |
| HK1621 | <i>his</i> <i>arg</i> <i>HBCE</i> <i>thr</i> <i>leu</i> $\Delta$ <i>fru</i> <i>FKA</i> <i>zeg</i> :: <i>Tn</i> 10           | Kornberg              |
| HT5238 | W3110 $\Delta$ <i>fru</i> <i>FKA</i> <i>zeg</i> :: <i>Tn</i> 10   | 本研究                   |
| HT5245 | IT1168 $\Delta$ <i>fru</i> <i>FKA</i> <i>zeg</i> :: <i>Tn</i> 10  | 本研究                   |
| JE7925 | W3110 $\Delta$ <i>prc</i> -7304 ( $\Delta$ <i>man</i> X)  | Hara et al. (1991)    |
| HT5205 | W3110 <i>cya</i> <i>PM3</i>   | 本研究                   |
| HT5206 | W3110 <i>cya</i> <i>PM3</i> $\Delta$ <i>crp</i> :: <i>Tet</i> <sup>r</sup>  | 本研究                   |



2. プラスミド

|            |  |                             |
|------------|--|-----------------------------|
| pSI029     | Amp <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup> ori <sup>ts</sup>  | Suzuki <i>et al.</i> (1987) |
| pTH114     | Amp <sup>r</sup> 529bp <i>cya</i> PM3 <i>Bam</i> HI- <i>Bam</i> HI in pUC118                 | 本研究                         |
| pTH118     | Amp <sup>r</sup> Δ(529bp <i>cya</i> <i>Bam</i> HI- <i>Bam</i> HI) in pIT228                  | 本研究                         |
| pTH124     | Amp <sup>r</sup> 4.3kb <i>cya</i> PM3 <i>Eco</i> RI- <i>Sal</i> I in pBR322                  | 本研究                         |
| pTH22      | Amp <sup>r</sup> 6.5kb <i>cya</i> <i>Sal</i> I- <i>Sal</i> I in pBR322                       | 本研究                         |
| pTH129     | Amp <sup>r</sup> 6.5kb <i>cya</i> PM3 <i>Sal</i> I- <i>Sal</i> I in pBR322                   | 本研究                         |
| pTH132     | Amp <sup>r</sup> 6.5kb <i>cya</i> PM3 <i>Sal</i> I- <i>Sal</i> I in pSI029                   | 本研究                         |
| pTH242     | Amp <sup>r</sup> <i>fruF</i> <sup>+</sup>  | 本研究                         |
| pIT499     | Cam <sup>r</sup> <i>ptsG</i> <sup>+</sup>  | 本研究                         |
| pTH110     | pIT499 but replaced <i>Mlu</i> I site with <i>Hind</i> III site                              | 本研究                         |
| pTH111     | Amp <sup>r</sup> 2kb <i>Hind</i> III- <i>Eco</i> RI in pBR322 <i>Hind</i> III, <i>Eco</i> RI | 本研究                         |
| pTH219     | Amp <sup>r</sup> <i>pcrr-crr</i> <sup>+</sup>  | 本研究                         |
| pTH172     | Amp <sup>r</sup> <i>pcrr-crr</i> H90Q  | 本研究                         |
| pHA7       | Amp <sup>r</sup> <i>pbla-crp</i> <sup>+</sup>  | Aiba <i>et al.</i> (1982)   |
| pHA7 H159L | Amp <sup>r</sup> <i>pbla-crp</i> H159L   | 本研究                         |
| pHA7 CD142 | Amp <sup>r</sup> <i>pbla-crp</i> CD142   | laboratory stock            |
| pTH179     | Amp <sup>r</sup> <i>pbla-manXYZ</i> <sup>+</sup>   | 本研究                         |

3. 大腸菌の培養条件

LB 培地の培養条件は第一章と同様に行なった。M9 培地は Miller に従って調製し (Miller 1972)、各炭素源は 0.2% になるように加えた。Ampicillin は 50 μg/ml、Kanamycin、Chloramphenicol、Tetracyclin は各々 50、10、15 μg/ml の濃度で培地に添加した。



#### 4. 遺伝子破壊株及び置換変異株の作成

各遺伝子破壊株は Linear transformation 法 (Winans *et al.* 1985 ; Russell *et al.* 1989) により構築した。薬剤耐性マーカーを目的遺伝子と置換したプラスミド 1 $\mu$ g を制限酵素による切断で線状にし、electroporation 法により DPB271 または JC7623 に導入した。選択培地で生えてきたコロニーを選択し、P1 transduction により、目的の遺伝子型のみを保持する菌株を構築した。各菌株は Southern blotting により、目的遺伝子が破壊されていることを確認した。

HT5206 (W3110 *cyaPM3*  $\Delta$ *crp::Tet<sup>r</sup>*) は Suzuki らの方法 (Suzuki *et al.* 1987) に従って、以下の手順で構築した。pIT228 を鋳型にして oligonucleotide と PCR 法による site-directed mutagenesis を行ない、その 529bp *Bam*HI-*Bam*HI の DNA 断片を pUC118 の *Bam*HI 部位に cloning し、pTH114 を構築した。Sequence によって目的以外の部位に変異が存在しないことを確認した後、pTH114 の 529bp *Bam*HI-*Bam*HI の DNA 断片を pTH124 の *Bam*HI 部位に cloning し、pTH114 を得た。その 3kp *Eco*RI-*Hind*III の DNA 断片を pTH22 の *Eco*RI-*Hind*III 部位に cloning し、pTH129 を得た。pTH124 の 6.5kb *Sal*I-*Sal*I 断片を pSI029 の *Sal*I 部位に導入し、最終的に用いたプラスミド、pTH132 を構築した。そのプラスミドを HT27 (W3110  $\Delta$ *cya*: *Bam*HI-*Bam*HI: *Kan<sup>r</sup>*) に導入し、30 $^{\circ}$ C で培養し、Ampicillin を含む選択プレート上でコロニーを形成させた。コロニーの大きさが $\sim$ 1mm 程度になった時に LB 培地 5ml に植菌し、30 $^{\circ}$ C で 40 分間培養した。その培地を 100 倍に希釈し、MacConkey-Lactose プレートに広げ、42 $^{\circ}$ C で一晩培養した。現れたコロニーは Amp<sup>s</sup>、Kan<sup>s</sup>、Lac<sup>+</sup> の表現型を指標に三代継代培養を行ない、*cya* PM3 変異株、HT5205 を得た。その株に HT5177 の  $\Delta$ *crp::Tet<sup>r</sup>* 遺伝子座を P1 transduction によって導入し、HT5206 を構築した。



#### 4. cAMP assay

cAMP 測定方法は第一章と同様に行なった。なお、サンプリングは 600nm における吸光度が 0.8 の時において行なった。

#### 5. Western blotting

Western blotting 法に関しては第一章とほぼ同様に行なった。

IIA<sup>Glc</sup> を解析するためのサンプルは以下の方法により調製した。600nm における吸光度が 0.8 の時に LB 培養液 200 $\mu$ l をサンプリングし、10N NaOH 20 $\mu$ l を加えて 10 秒間 vortex を行ない、細胞を即時的に破壊した。100% EtOH 1 ml を加えた後、3M Sodium acetate (pH5.3) 180 $\mu$ l を加えて -70 $^{\circ}$ C で 10 分間静置し、遠心 (4 $^{\circ}$ C, 10,000g, 10分) により、蛋白を濃縮し、1 $\times$ SDS buffer 100 $\mu$ l に溶解した。サンプルは熱処理を施さずに 15% SDS-PAGE によって分離した。なお、電気泳動時に発生する熱による IIA<sup>Glc</sup>-P のリン酸基の遊離を回避するため、低電流 (1.1 mA / cm) で電気泳動した。また、抗 IIA<sup>Glc</sup> 抗体 (一次抗体) は 5000 倍に希釈し、解析に用いた。

CRP を解析するためのサンプルは第一章とほぼ同様の方法で調製した。また、抗 CRP 抗体 (一次抗体) は 1000 倍に希釈し、解析に用いた。

#### 6. Northern blotting

Total RNA のサンプリングに関しては第一章と同様に行なった。

Northern blotting は Sambrook らの方法に従って行なった (Sambrook *et al.* 1989)。RNA 20 $\mu$ g を 20mM MOPS (pH7.0), 50% formamide, 6% formaldehyde, 5% Glycerol, 0.001% BPB 溶液に溶解し、65 $^{\circ}$ C で 5 分間処理する。氷冷後、0.8% Agarose-6% formaldehyde gel により分離し、Hybond-N+ (Amersham) にキャピラリーで 6 時間以上転写した。50 mM NaOH



で5分間処理し、20×SSCでリンスしたメンブレンを乾燥させ、メンブレンにRNAを固定した。メンブレンをHybridization buffer (5×SSC, 5×Denhart's, 0.5% SDS) 中に入れ、95℃×5分間処理した10 mg/mlのsalmon testis DNA 50μlを加えて65℃で1時間処理した後、random labelling kit (Takara shuzo)により<sup>32</sup>Pで標識したDNA probeを5μlを加えて65℃で一晩処理した。メンブレンを取り出し、室温で15分間、2×SSPE, 0.1% SDS中で二回、65℃で15分間、1×SSPE, 0.1% SDS中で一回、さらに65℃で15分間、0.1×SSPE, 0.1% SDS中で一回洗った。その後、メンブレンを取り出し、オートラジオグラフィによりバンドを検出した。

#### 7. *in vitro* IIA<sup>Glc</sup>-P dephosphorylation assay

##### a) 細胞粗抽出液の調製

LBで培養し、600nmにおける吸光度が0.8の時に1 ml サンプルングし、遠心(4℃, 12,000g, 5分)したペレットを氷冷した1 ml STEに懸濁する。さらに遠心(4℃, 12,000g, 5分)し、ペレットを0.4 mlのsonication buffer (50mM Tris-HCl (pH8.0), 5 mM EDTA, 0.1 mM DTT)に懸濁した。この懸濁液を氷中で30秒間隔で5秒間×3回超音波破碎した後、遠心(4℃, 12,000g, 5分)し、上清を細胞粗抽出液とした。

##### b) *in vitro* IIA<sup>Glc</sup>-P dephosphorylation assay

調製直後の細胞粗抽出液を10 μlとり、等量の2×SDS bufferと混合して0分のサンプルとした。*Δcrp*細胞粗抽出液50 μlを基質として各種の細胞粗抽出液50 μlを加え、37℃でインキュベートした。一定の時間毎に10 μl取り、10 μlの2×SDS bufferと混合して反応を停止させた。サンプルはWestern blottingにより解析した。







## 実験結果

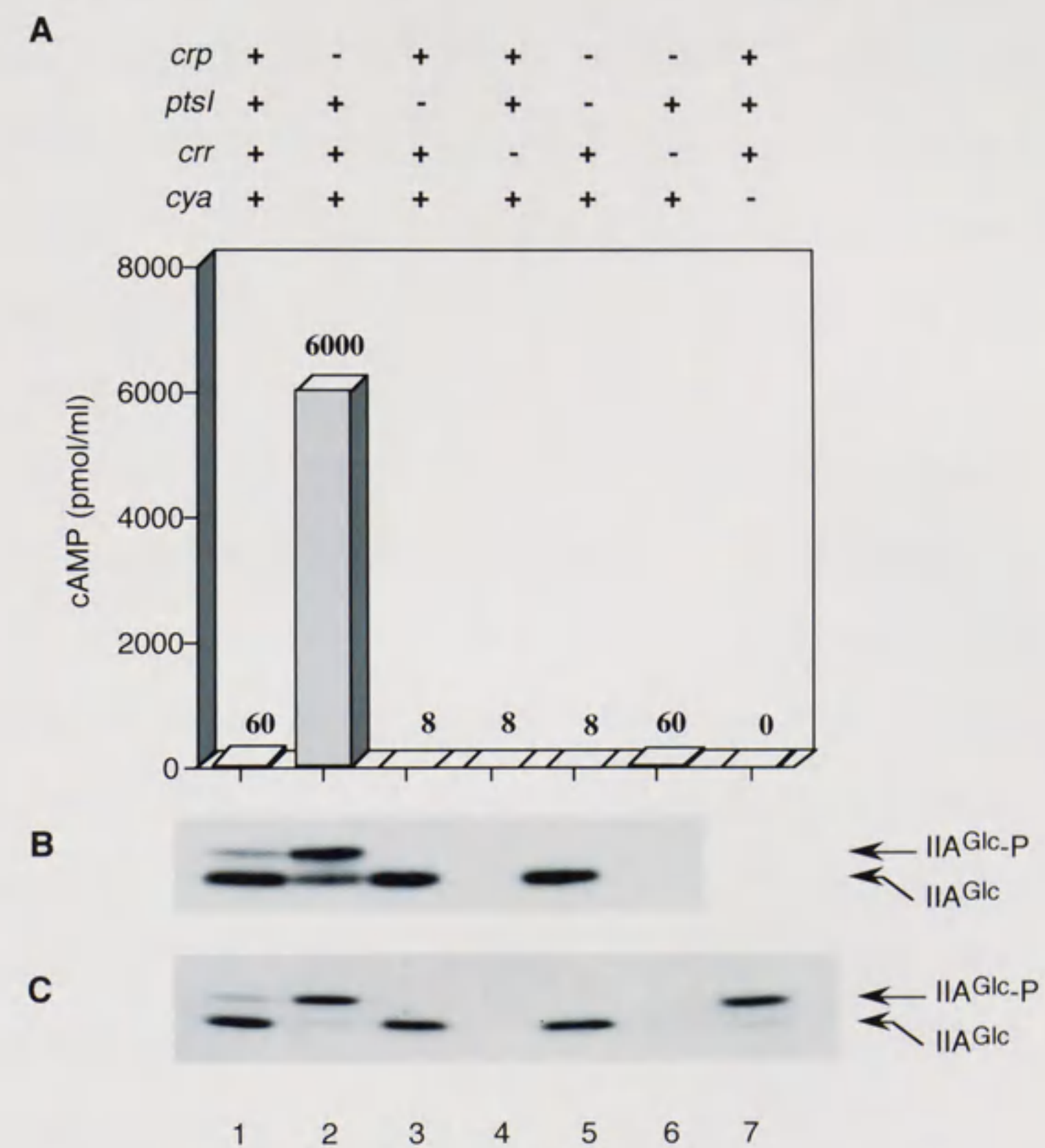
### 1. *crp*、*pts* 遺伝子の変異による cAMP 合成量の影響

cAMP と  $\text{PIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルの相関関係を調べるために、W3110 を親株とした一連の *crp* 及び *pts* 変異株を作製した。まず、その変異株について cAMP 量を測定した。野生株が約 60 (pmol/ml) であるのに対し、 $\Delta crp$  株においては約 6000 (pmol/ml) であり、*crp* 欠損により、cAMP が約 100 倍増加していた (Fig.3-1, A lane 1, 2)。また、*ptsI*、*crr* 変異株においては約 8 (pmol/ml) であった (Fig.3-1, A lane 3, 4)。これらの結果から、 $\text{PIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化型が存在しない条件下においてはアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成量は低下するという、過去の解析結果と矛盾しない結果が得られた。さらにそれら *pts* 変異株に *crp* 欠損変異を導入した二重変異株においては、*ptsI*  $\Delta crp$  株では約 8 (pmol/ml)、 $\Delta crr$   $\Delta crp$  株では約 60 (pmol/ml) となり、 $\Delta crp$  株で認められた約 6000 (pmol/ml) に至る 100 倍の cAMP の増加は観察されなかった (Fig.3-1, A lane 5, 6)。これらの結果も、ほぼ過去の解析結果を支持するものと考えられる。しかし、 $\Delta crr$   $\Delta crp$  株では *ptsI*  $\Delta crp$  株に比べ、約 8 倍もの cAMP の増加が観察された。この結果は他の  $\text{PIA}$  蛋白因子群のリン酸化型が潜在的にアデニル酸シクラーゼの活性化因子として機能していることと、非リン酸化型  $\text{PIA}^{\text{Glc}}$  がアデニル酸シクラーゼに対して阻害的な効果を示す二つの要因を合わせた結果であろうと推測される (考察参照)。

以上の結果は、リン酸化型  $\text{PIA}^{\text{Glc}}$  がアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成活性を活性化していることを強く支持するものと考えられ、また、CRP の阻害機構としてその活性化経路を阻害する可能性を示唆するものと考えられる。

### 2. *crp* 欠損株において $\text{PIA}^{\text{Glc}}$ はほとんどリン酸化されている





**Fig.3-1 cAMP and phosphorylation level of IIA<sup>Glc</sup> in *crp* and *pts* mutants**

各 *crp* 及び *pts* 変異株を LB 培地で培養し、600nm における吸光度が 0.8 の時にサンプリングをした。

A. 各菌体における細胞外 cAMP 濃度を測定した。

B, C. 細胞中の IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化レベルを測定した。B においては 400 $\mu$ l の培養液を超音波で処理した後、等量の 2 $\times$ SDS buffer を添加して調製したサンプルを 20 $\mu$ l を 15% SDS-PAGE で分離後、抗 IIA<sup>Glc</sup> 抗体を用いた western blotting により、解析した。C においては 200 $\mu$ l の培養液を強アルカリで処理し、エタノールで濃縮した蛋白質を 100 $\mu$ l の 1 $\times$ SDS buffer に懸濁して調製したサンプルを 20 $\mu$ l を 15% SDS-PAGE で分離後、抗 IIA<sup>Glc</sup> 抗体を用いた western blotting により、解析した。IIA<sup>Glc</sup> はリン酸化されると見かけ上の分子量が大きくなり、非リン酸化型と分離される為、上のバンドがリン酸化型 IIA<sup>Glc</sup>-P、下のバンドが非リン酸化型 IIA<sup>Glc</sup> に対応する。



アデニル酸シクラーゼの活性化因子である  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の *in vivo* における量を測定するにあたり、その方法を検討し、培養液を直接 a) 超音波、b) 強アルカリ処理することにより、物理的（超音波）、化学的（強アルカリ）に菌体を破壊し、即時的にその生体内反応を停止させる方法を改良した。そのアッセイ法を用いて *crp* 欠損株を含む各種遺伝的欠損をもつ菌体における  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベル及び cAMP について測定した。その結果、野生株においては  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  はほとんど非リン酸化型であるのに対し、約 100 倍もの cAMP の増加が認められる  $\Delta crp$  株においては  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  はほとんどリン酸化型であった (Fig.3-1, B, C lane 1,2)。この現象は上記の異なる二つのアッセイ法によって調製したサンプルにおいて共通して認められることから、調製法に由来する人為的なものではないと考えられる。また、リン酸転移のカスケードにおいて上流に位置する *ptsI* の変異株においては  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化型は検出されない (Fig.3-1, B, C lane 3) ことから、予測されるリン酸化状態を観察していると考えられる。また、*ptsI*、 $\Delta crp$  の各変異株に  $\Delta crp$  変異を導入した二重変異株においては  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化型が共に存在し得ず、cAMP の overproduction も認められなかった (Fig.3-1, B, C lane 5, 6)。以上の結果から、 $\Delta crp$  株においては  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化型が増加していることが明らかとなり、CRP は  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルを制御することによりアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成活性を抑制している機構が示唆された。

なお、以下の解析においては強アルカリを用いた化学的処理（アルカリ法）により、サンプルを調製した。

### 3. $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ のリン酸化型の増加抑制には CRP-cAMP 複合体が必要である

$\Delta crp$  株においては  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化型が増加していることが明らかとなったが、CRP のみで  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルの制御に関与しているのかを検討する目的で、 $\Delta cya$  株において  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化状態を観察した。その結果、 $\Delta cya$  株においても  $\Delta crp$  株同様、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  はほとんどリン酸化型であることが明らかとなった (Fig.3-1, B lane 7)。リン酸化型



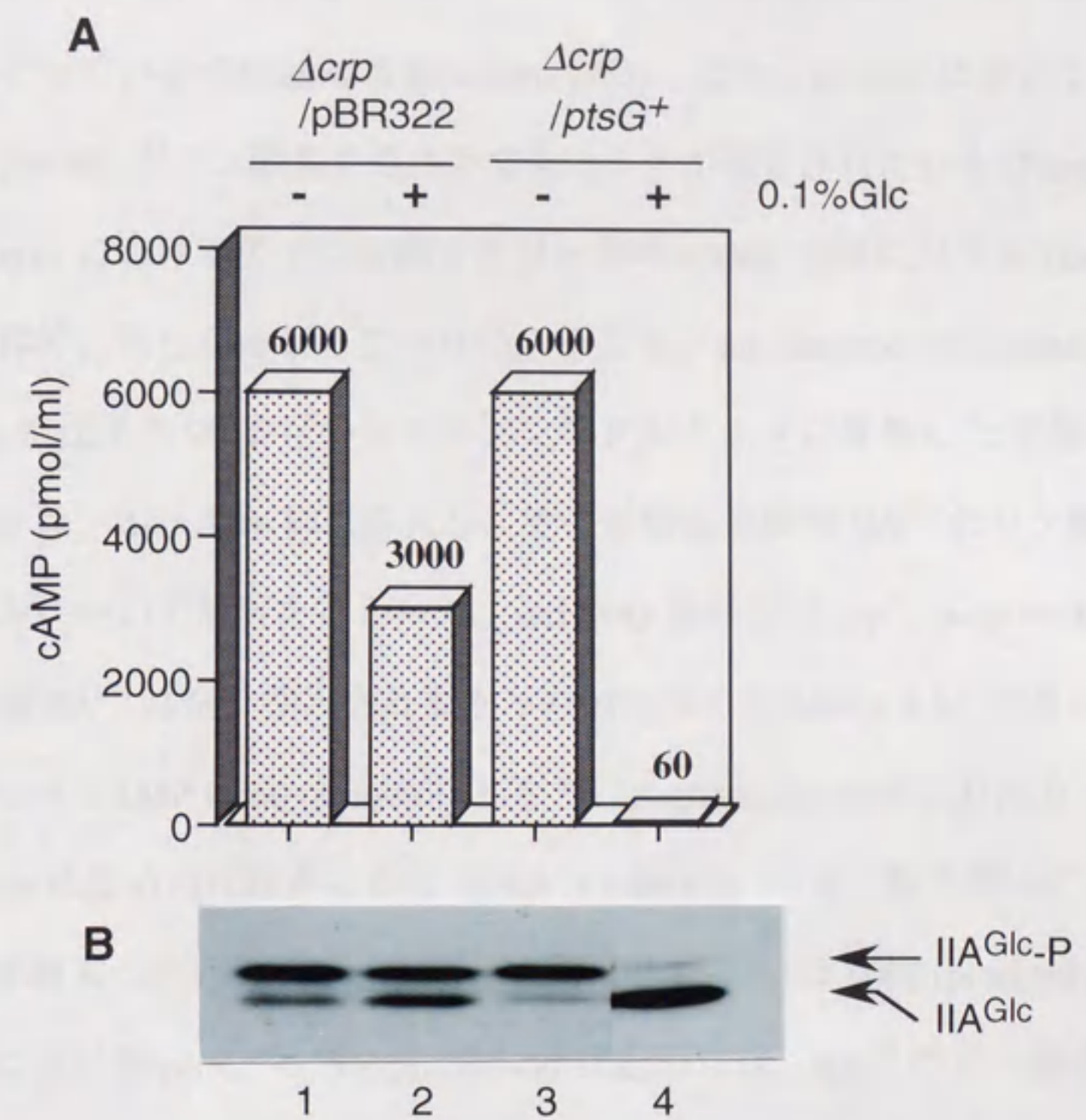
IIA<sup>Glc</sup>が増加した条件下においても  $\Delta cya$  株においては cAMP の変動は当然認められない (Fig.3-1, A lane 7) が、CRP-cAMP 複合体が形成されない場合に IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化型が増加することから、CRP-cAMP 複合体により IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化が抑制されていることが明らかとなった。

#### 4. IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化量の低下に伴い、cAMP の合成量も低下する

*crp* 欠損による cAMP overproduction において IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化量が増加していることが第一節において示されたが、さらに IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化と cAMP の量的な相関関係を解析した。*ptsG* を構成的に発現する多コピープラスミド、pTH111 を導入した  $\Delta crp$  株を 0.1% グルコースを含む LB 培地で培養することにより、IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化量が変動する条件下において IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化レベル及び cAMP 量を解析した。ベクターを導入した  $\Delta crp$  株においては 0.1% グルコースの添加により、若干の IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化の低下が認められ、それに伴い、cAMP も 6000 (pmol/ml) から 3000 (pmol/ml) への若干の低下が観察された (Fig.3-2, lane1, 2)。しかし、pTH111 を導入した  $\Delta crp$  株においてはリン酸化レベルは  $\Delta crp$  株と同レベルであり、cAMP も 6000 (pmol/ml) と変化しなかったが、0.1% グルコースの添加により、IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化量がほぼ野生株と同程度までに低下し、そのリン酸化レベルの低下に伴い、cAMP レベルも 60 (pmol/ml) と野生型と同レベルまで低下した (Fig.3-2, lane3, 4)。この結果から、IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化量と cAMP 量には一定の相関関係が存在することが明らかとなり、CRP は IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化状態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制御することを示唆するものと考えられた。

#### 5. IIA<sup>Glc</sup> の 90 番目のヒスチジンのリン酸化が *crp* 欠損株における cAMP の overproduction に必須である





**Fig. 3-2 Effect of overexpression of IICB<sup>Glc</sup> on the cAMP level and phosphorylation state of IIA<sup>Glc</sup> in *crp* mutants**

HT5177 ( $\Delta crp::Tet^r$ ) に pBR322 及び pTH111 (*pbla-ptsG*) を導入した菌株を 50 $\mu$ 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 の時にサンプリングした。グルコースは 0.1% の濃度になるように培地に添加した。

A. cAMP の値を示す。

B. 細胞中の IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化レベルを Fig.3-1 と同様の方法を用いて解析した。

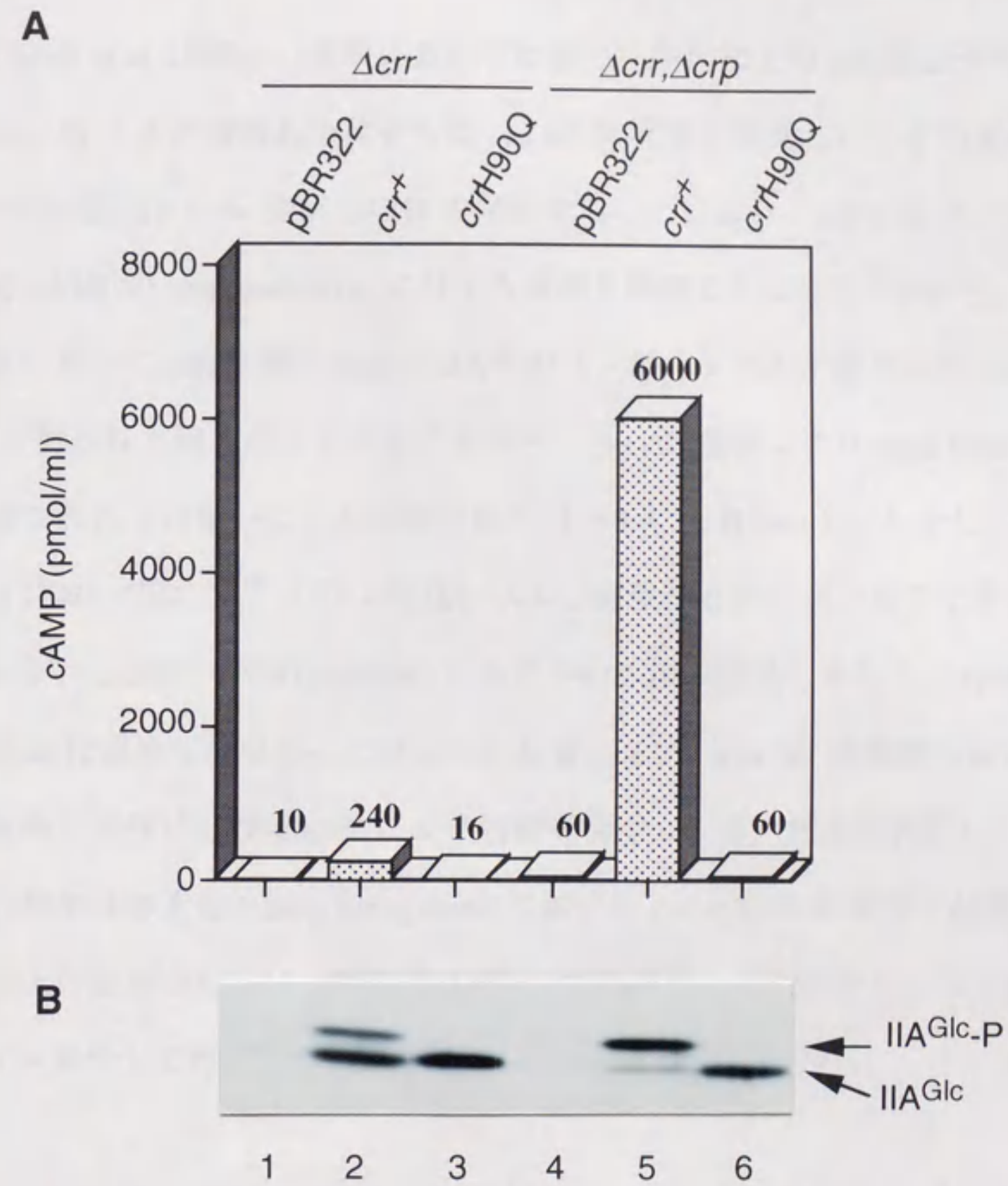


過去の解析から、PTS を介して  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  はヒスチジン残基においてリン酸化されることが明らかとなっている (Meadow & Roseman 1982)。また、*in vitro* において90番目のヒスチジン残基 (His90) がリン酸基の受け手であることが報告されている (Presper *et al.* 1989)。しかし、*in vivo* におけるアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成に対する His90 のリン酸化の役割は具体的に明らかとなっていない。そこで、site-directed mutagenesis によりプラスミド上の *crr* 遺伝子の90番目のヒスチジンをグルタミンに置換した変異体 (*crrH90Q*) を構築し、 $\Delta crr$  株、 $\Delta crr \Delta crp$  株に導入し、その形質転換株の  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベル及び cAMP レベルについて解析を行なった。*crrH90Q* 変異体は *crp*<sup>+</sup>、 $\Delta crp$  background においてリン酸化型  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  は全く検出されなかった (Fig.3-3, B lane 3, 6)。それに対応して  $\Delta crr \Delta crp$  株において cAMP は 60 (pmol/ml) となり、 $\Delta crp$  background における cAMP の overproduction は認められなかった (Fig.3-3, A lane 6)。一方、野生型 *crr*<sup>+</sup> 遺伝子を保持する pTH219 を導入した場合は  $\Delta crr \Delta crp$  株において cAMP は 6000 (pmol/ml) であり、 $\Delta crp$  background における cAMP の overproduction は認められ、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベル及び cAMP 量も染色体上の *crr* 遺伝子と同様に上昇していた (Fig.3-3, A, B lane 5)。*crp*<sup>+</sup> background においては cAMP レベルが約 240 (pmol/ml) となり、W3110 (*crr*<sup>+</sup> *crp*<sup>+</sup>) に比べて約 4 倍高かった (Fig.3-3, A lane 2)。しかし、これは  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルも若干上昇している (Fig.3-5, B lane 2) ことと、*crr* 遺伝子を多コピーで導入していることにより、アデニル酸シクラーゼの cAMP 合成活性が増加したためであると考えられる。以上の結果から、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  の90番目のヒスチジンのリン酸化が *crp* 欠損株における cAMP の overproduction に重要であることが明らかとなった。

6. *cya C* 末欠損変異株においては  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルが上昇しているにもかかわらず  $\Delta crp$  background における cAMP の overproduction は認められない

第一章において、プラスミド上の *cya* 遺伝子に C 末欠損変異を導入した *cya* 変異体、pIT465 は  $\Delta crp$  株において cAMP の overproduction が認められないことを明らかにした





**Fig. 3-3 Effect of H90Q mutation of IIA<sup>Glc</sup> on the cAMP level and phosphorylation state of IIA<sup>Glc</sup> in *crp* mutants**

IT1199 ( $\Delta crp::Kan^r$ )、HT5188 ( $\Delta crp::Kan^r, \Delta crp::Tet^r$ ) に pBR322、pTH219、pTH172 を導入した菌株を 50 $\mu$ 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 の時にサンプリングした。

A. cAMP の値を示す。

B. 細胞中の IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化レベルを測定した。200 $\mu$ l の培養液を強アルカリで処理し、エタノールで濃縮した蛋白質を 1000 $\mu$ l の 1 $\times$ SDS buffer に懸濁して調製したサンプル、20 $\mu$ l を 15% SDS-PAGE で分離後、抗 IIA<sup>Glc</sup> 抗体を用いた western blotting により、解析した。上のバンドがリン酸化型 IIA<sup>Glc</sup>、下のバンドが非リン酸化型 IIA<sup>Glc</sup> に対応する。

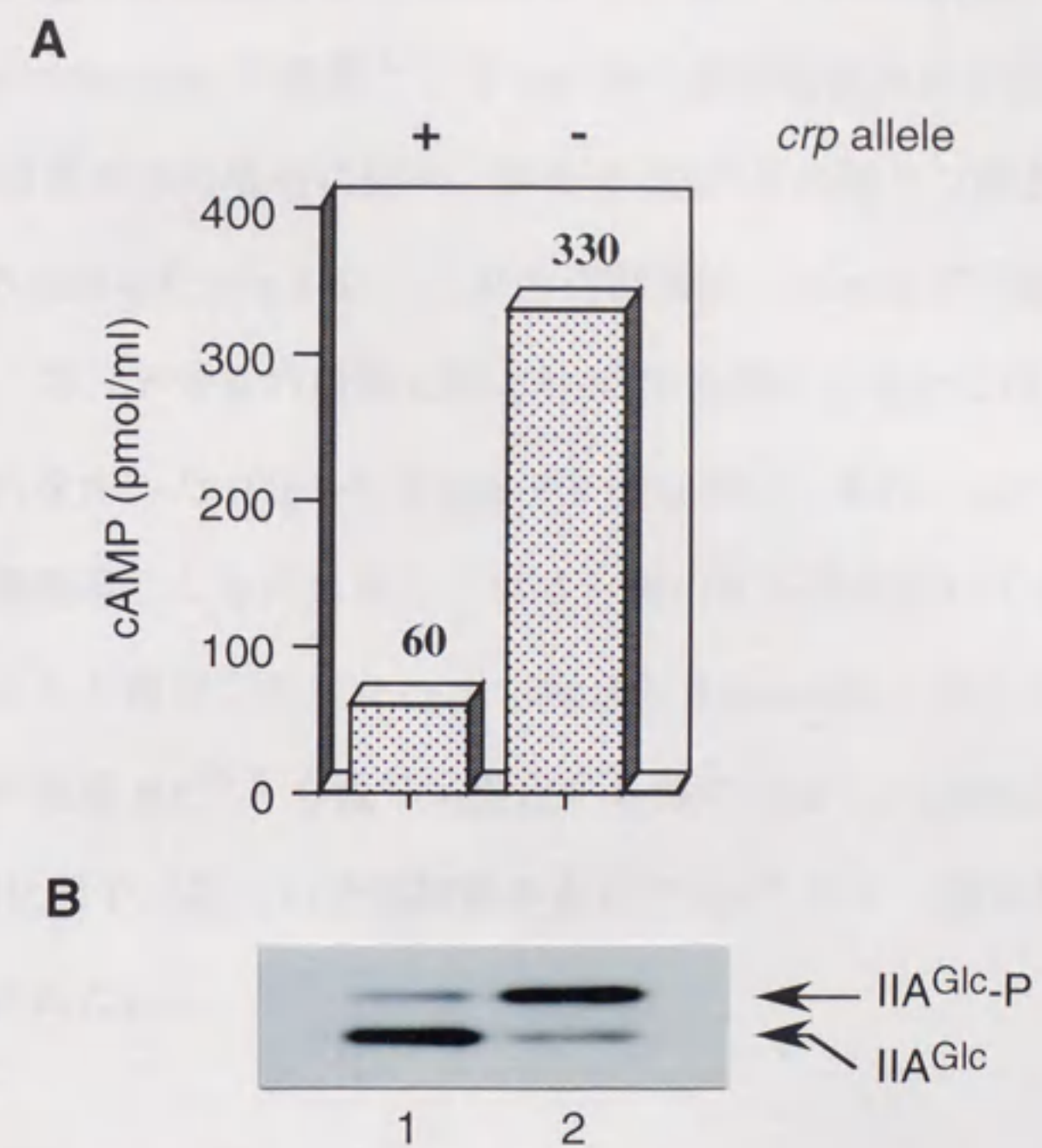


(Table 2-1; Inada et al. 1996b)。本章においては新たに染色体上の *cya* 遺伝子内に ochre 変異を導入し、48 アミノ酸残基を欠失した *cya*  $\Delta C$  変異株を構築した。その変異株における  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベル及び cAMP を解析することにより、*cya* C 末ドメインの *crp* 変異による cAMP の overproduction に対する役割を明確にすることを試みた。*crp*<sup>+</sup> background においては野生株と同様の  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルが認められ、cAMP も 60 (pmol/ml) と野生株と同レベルであることから、*cya*  $\Delta C$  変異により basal level の cAMP 合成能は損なわれていないことが確認された (Fig.3-4, A, B lane 1)。しかし、 $\Delta crp$  background においては  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルは野生株と同レベルまで上昇しているにもかかわらず、cAMP は 330 (pmol/ml) とわずか約 5 倍の増加しかなく、cAMP の overproduction は認められなかった (Fig.3-4, A, B lane 2)。*cya*  $\Delta C$  変異株においても *cya* の発現は野生株と同様に CRP-cAMP により制御を受けている (結果未掲載) ことから、この cAMP の増加はおそらく  $\Delta crp$  background における *cya* mRNA の増加に起因すると考えられる。以上の結果から、リン酸化型  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  によるアデニル酸シクラーゼの活性化は *cya* C 末ドメインを介して行なわれていることが明らかとなった。

#### 7. *crp*<sup>+</sup> 細胞粗抽出液は *in vitro* において $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ の脱リン酸化を促進する

CRP-cAMP はどのような機構で  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルを制御しているのだろうか？ CRP-cAMP 複合体が  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルを制御する機構としては、1) CRP-cAMP 複合体が  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の脱リン酸化因子として機能している、2) CRP-cAMP が  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の脱リン酸化因子 (群) の発現制御を介して  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  のリン酸化レベルを制御している、の二つの可能性が考えられる。前者の可能性を解析する目的で、細胞粗抽出液を用いた *in vitro* における  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  dephosphorylation assay を行なった。調製直後においては  $\Delta crp$  株及び  $\Delta cya$  株の細胞粗抽出液は約 50% の  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  がリン酸化型として存在しているが、野生株の細胞粗抽出液には全くリン酸化型は存在していなかった (Fig.3-5, A lane 1-3)。それらの細胞粗抽出液を用いて *in vitro* における  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の脱リン酸化反応を観察した。 $\Delta crp$





**Fig.3-4 cAMP and IIA<sup>Glc</sup> phosphorylation level in strains carrying the C-terminal truncated adenylate cyclase**

IT1142 (*cyaΔC*, *crp*<sup>+</sup>)、HT5190 (*cyaΔC*, *Δcrp*) を LB 培地で培養し、600nm における吸光度が 0.8 の時にサンプリングした。

A. cAMP の値を示す。

B. 細胞中の IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化レベルを Fig.3-1 と同様の方法を用いて解析した。

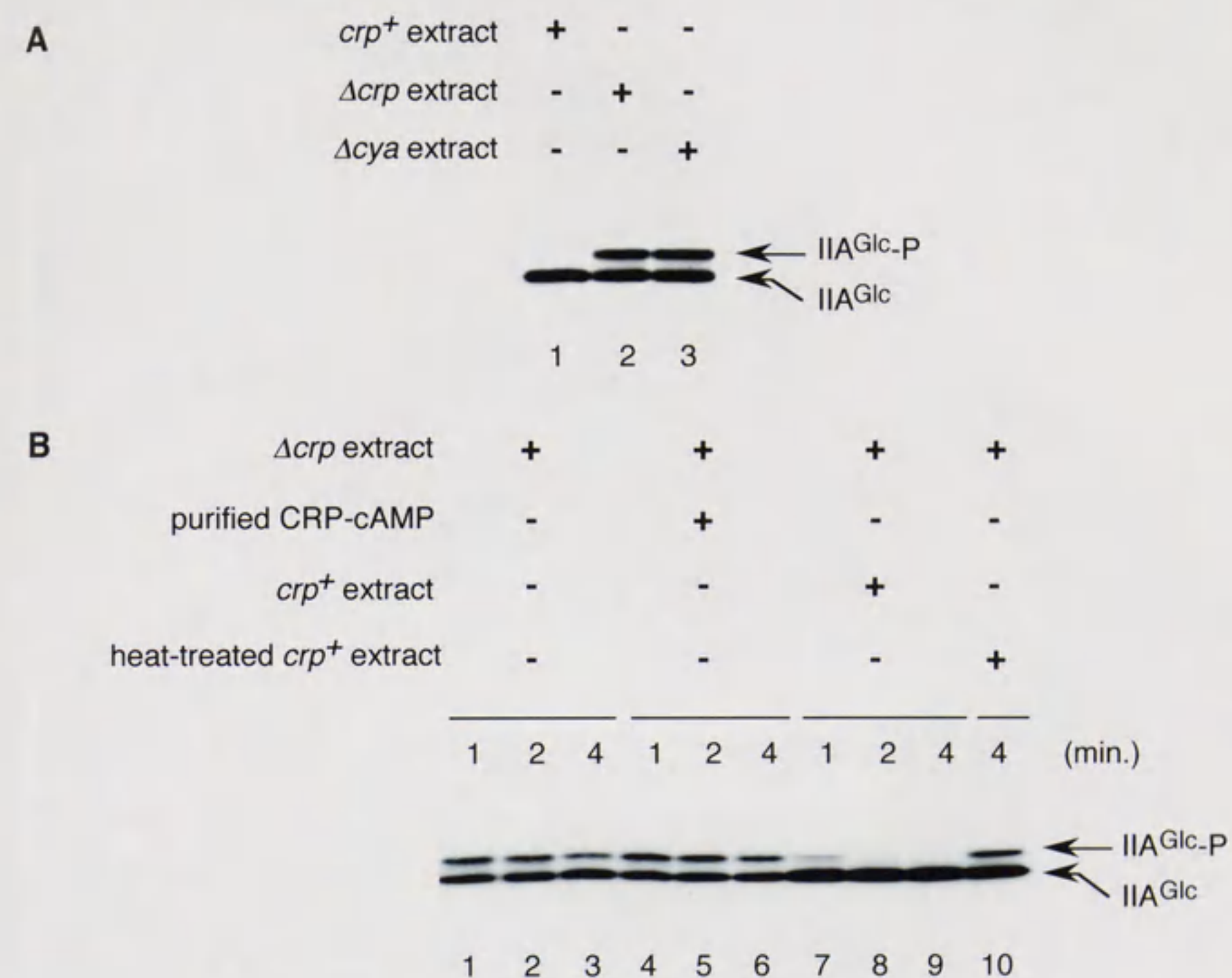


株の細胞粗抽出液のみを 37°C でインキュベートした場合には  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の脱リン酸反応は緩やかに進行した (Fig.3-5, B lane 1-3; Fig.3-6)。しかし、その  $\Delta\text{crp}$  株の細胞粗抽出液を  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  dephosphorylation assay の基質として  $\text{crp}^+$  株の細胞粗抽出液を添加した場合には  $\Delta\text{crp}$  株の細胞粗抽出液のみの場合に比べ、顕著な  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の脱リン酸化反応の促進が認められた (Fig.3-5, B lane 4-6; Fig.3-6)。これらの結果は、*in vivo* での結果とよく一致すると考えられる。一方、十分量の精製 CRP-cAMP を添加した場合にはその脱リン酸化反応の促進は認められなかった (Fig.3-5, B lane 7-9; Fig.3-6)。また、 $\text{crp}^+$  株の細胞粗抽出液を 100°C で 5 分間処理したものに関しては 4 分間の反応後においても  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の脱リン酸化の促進はほとんど観察されなかった (Fig.3-5, B lane 10)。以上の結果から、CRP-cAMP 複合体が直接  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  を脱リン酸化するのではなく、CRP-cAMP 複合体は  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の脱リン酸化因子 (群) の発現制御を介して  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルを制御している可能性が示唆された。

8.  $\text{IICB}^{\text{Glc}}$ 、 $\text{FPr}$ 、 $\text{IIA}^{\text{Man}}$  単独欠損変異は  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化状態及び cAMP に影響しない

CRP-cAMP により  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化が抑制される機構として、PEP から始まるリン酸基の転移反応において  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  と相互作用しうる蛋白因子の発現が CRP-cAMP により正に制御されており、CRP-cAMP 存在下ではその蛋白因子に  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  のリン酸基が転移される結果として  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化状態が低下する可能性が考えられる。具体的には  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  と直接的に相互作用しうる蛋白因子として  $\text{IICB}^{\text{Glc}}$  (*ptsG*)、 $\text{FPr}$  (*fruF*) が考えられる。*ptsG* はグルコースの取り込みに際し、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  と直接相互作用してグルコースのリン酸転移をし、その発現は CRP-cAMP に大きく依存しており、*crp* 欠損株では *ptsG* の発現はほとんど認められない (Kimata *et al.* 1997)。*fruF* はフルクトース特異的な HPr 様の活性及び  $\text{IIA}^{\text{Fru}}$  ドメインをもつ蛋白であり、*in vitro* において PEP からのリン酸転移反応における HPr の役割を代替できることが示されている (Saier, Jr. *et al.* 1970; Geerse *et al.* 1986





**Fig. 3-5** *in vitro* dephosphorylation assay with cell extracts

A. 各変異株における調製直後の細胞粗抽出液のリン酸化レベルを示す。野生株 W3110 (lane1)、*crp* 欠損株 HT5177 (lane2)、*cya* 欠損株 HT28 (lane3)の調製直後の細胞粗抽出液 10  $\mu$ l を等量の 2 $\times$ SDS buffer に懸濁し、そのサンプルを抗 IIA<sup>Glc</sup> 抗体を用いた western blotting により、解析した。上のバンドがリン酸化型 IIA<sup>Glc</sup>-P、下のバンドが非リン酸化型 IIA<sup>Glc</sup> に対応する。

B. HT5177 ( $\Delta$ *crp*:Tet<sup>r</sup>) から調製した細胞粗抽出液 50  $\mu$ l に対して、同種の細胞粗抽出液 50  $\mu$ l (lane1~3)、精製したCRP 200ng 及び 2 mM cAMP を含む sonication buffer 50  $\mu$ l (lane4~6)、野生株 W3110 細胞粗抽出液 50  $\mu$ l (lane7~9)、100 $^{\circ}$ C で5分間処理した野生株 W3110 細胞粗抽出液 50  $\mu$ l (lane10) を添加して 37  $^{\circ}$ C で反応させた。各時間毎に10  $\mu$ l ずつサンプリングし、等量の 2 $\times$ SDS buffer に懸濁して反応を停止させた。そのサンプルを抗 IIA<sup>Glc</sup> 抗体を用いた western blotting により解析した。



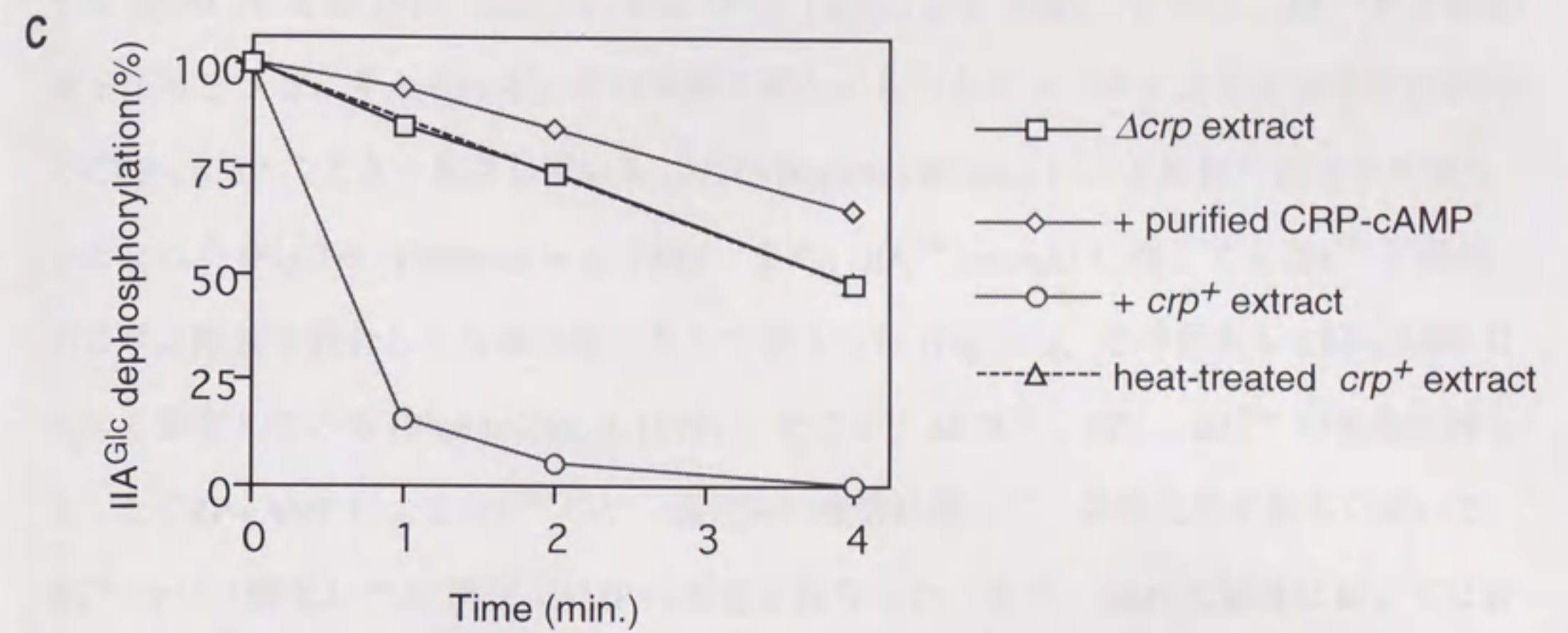


Fig. 3-6 *in vitro* dephosphorylation assay with cell extracts

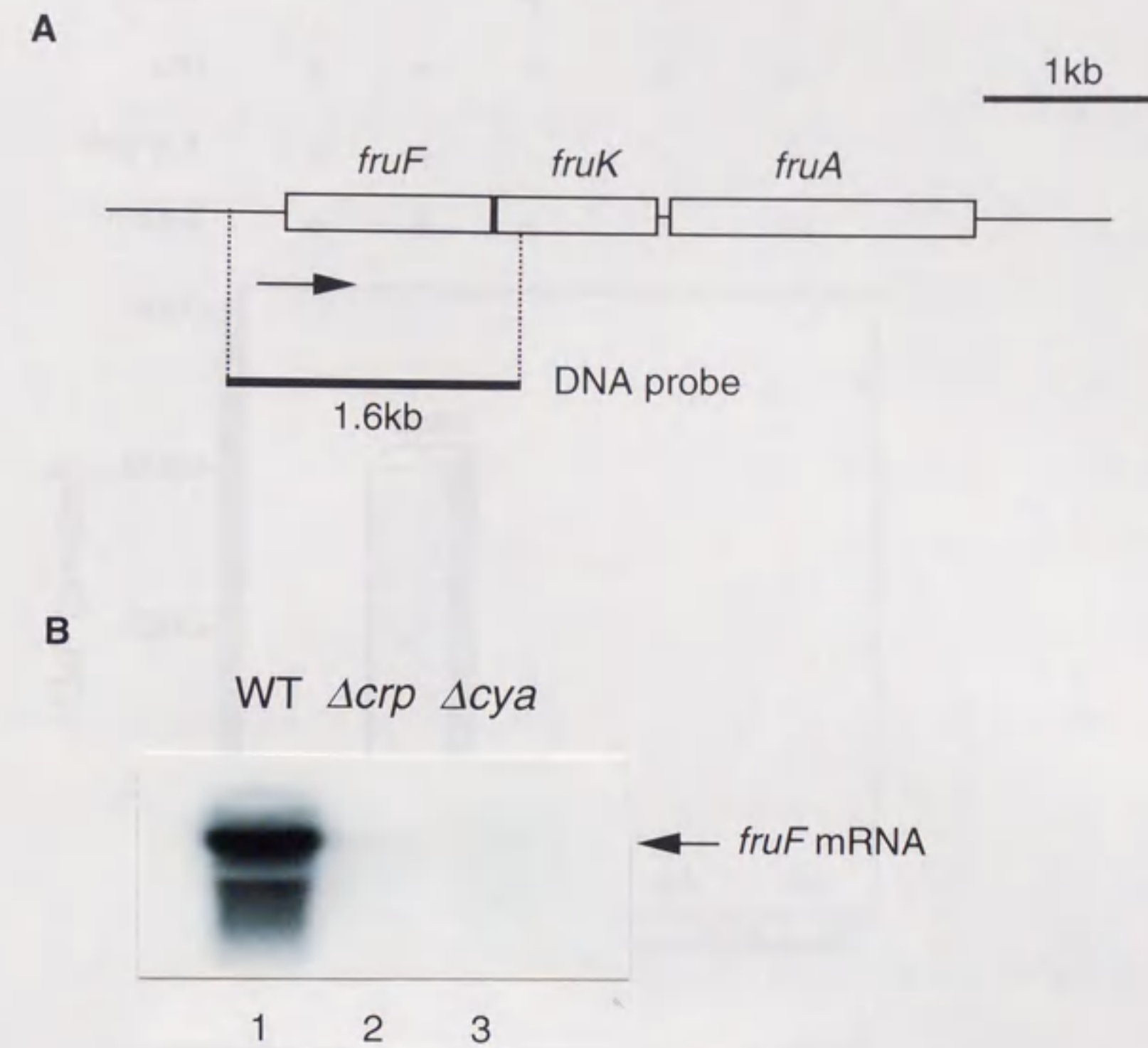
C. B で得られたオートラジオグラムを NIH image により、各バンドを定量した。その際、A で得られた *crp* 欠損株の IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化レベル（下のバンドに対する上のバンドの量比）を 100% とし、各レーン毎の下のバンドに対する上のバンドの量比を算出し、時間毎にプロットした。□ は  $\Delta crp$  株、◇ は精製 CRP-cAMP、○ は  $crp^+$  株、△ は熱処理した  $crp^+$  株の各調製液を反応させた結果を示す。



; Sutrina et al. 1988)。in vivo においてもフルクトースによる誘導がかかり、FPr が多く存在する条件下においては *ptsH* 欠損株の PTS sugar における生育不能を弱いながらも抑圧する (Saier, Jr. et al. 1970; Saier, Jr. et al. 1976; Geerse et al. 1986) ことから、IIA<sup>Glc</sup>-P と直接相互作用しうると考えられる。その発現に関してもフルクトースによる非誘導下において CRP-cAMP に大きく依存していることが Northern blotting による解析の結果から明らかとなった (Fig.3-9; Feldheim et al. 1990)。また、IIA<sup>Man</sup> (*manX*) に関しても IIA<sup>Glc</sup> と間接的にリン酸基を競合しうる蛋白因子として考えられ (Fig.1-2)、その発現も CRP-cAMP に大きく依存している (Plumbridge, J. 1998)。そこで、IICB<sup>Glc</sup>、FPr、IIA<sup>Man</sup> の発現制御を介した CRP-cAMP による IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化抑制機構に関して、各種欠失変異体を用いて、IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化レベル及び cAMP の測定を行なった。まず、*ptsG* 欠損株においては野生株とほぼ同じ IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化及び cAMP レベルが認められた (Fig.3-8, lane 1)。さらに、*crp* 欠損変異を導入してもその IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化及び cAMP レベルの変動は *ptsG* 株と同じであった。この結果から、IICB<sup>Glc</sup> 単独の欠損変異は IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化及び cAMP レベルに影響を及ぼさないことが明らかとなった。さらに、*fruF*、*fruF ptsG*、*manX* を欠損した変異株についても解析したが、IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化状態及び cAMP に関して野生株と有為な差は認められないことが明らかとなった (Fig.3-8, A, B lane 3-5; Fig.3-9)。以上の結果から、少なくとも CRP-cAMP は IICB<sup>Glc</sup>、FPr、IIA<sup>Man</sup> の単一もしくは複数の遺伝子のみの発現制御を介して IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化レベルを制御しているのではないことが明らかとなった。また、*ptsG* background においても IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化及び cAMP レベルは *ptsG* background の場合と差が認められなかった (Fig.3-8, A, B lane 1,2) ことから、*crp* 欠損株に見られる IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化レベルの上昇は培地中に潜在するグルコースの取り込み因子の発現の減少によるものではないことが結論付けられた。

9. 転写促進のみを欠失した *crp* 変異体においてはアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成抑制が認められない





**Fig.3-7 Northern blot analysis of *fruF* mRNA**

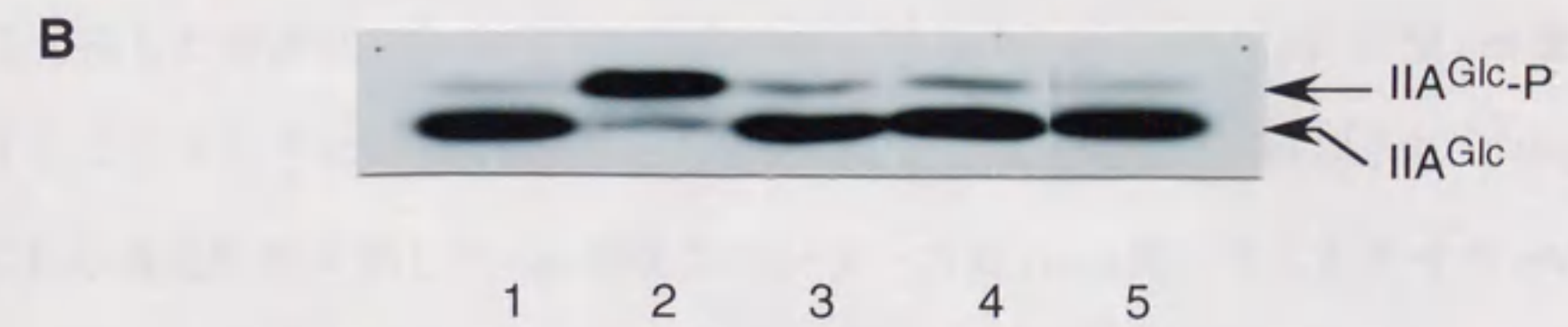
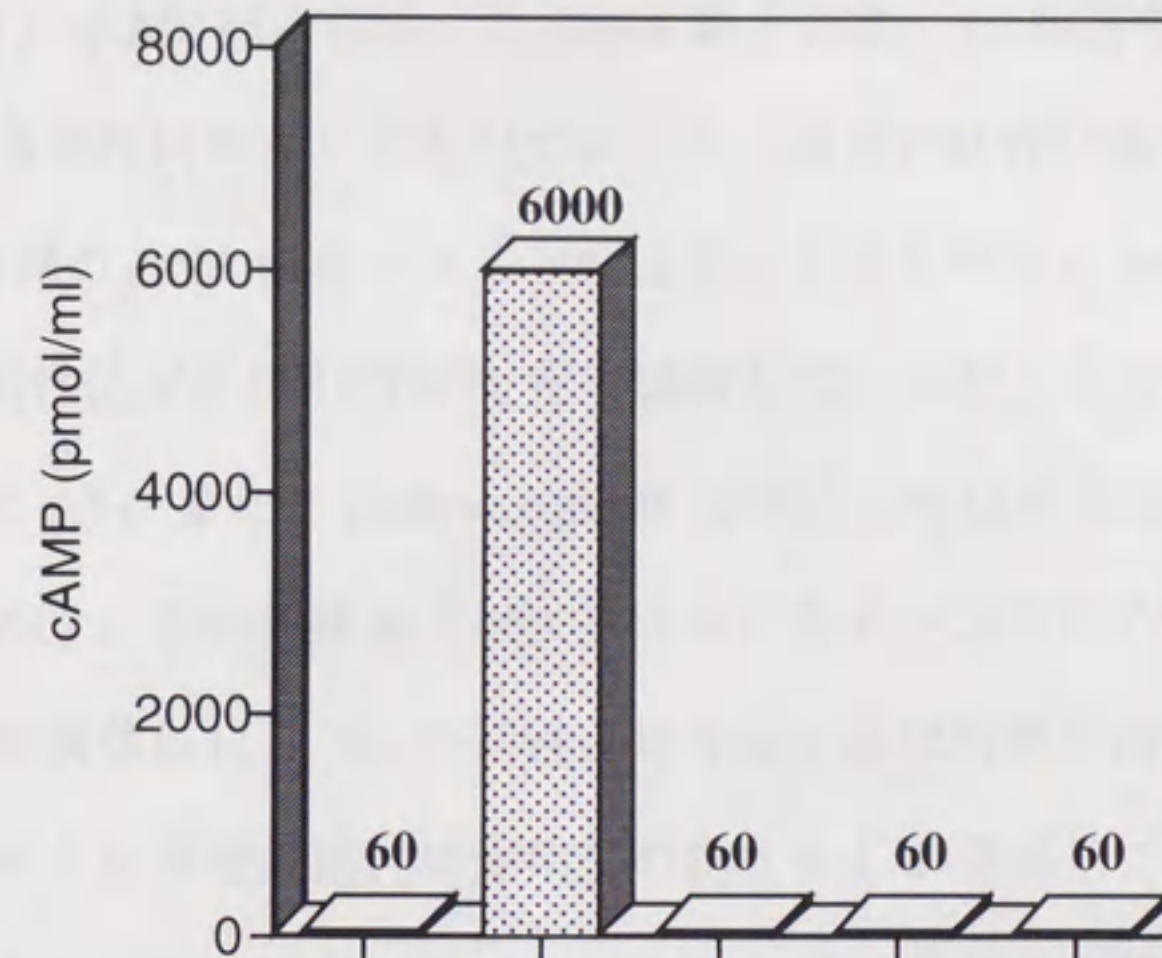
W3110 (wild type)、HT5177 ( $\Delta crp$ )、HT28 ( $\Delta cya$ ) に *fruF* 遺伝子を保持するプラスミド、pTH242 を導入した菌株を 50 $\mu$ g/ml の ampicillin を含む LB 培地で培養し、600nm における吸光度が 0.8 の時にサンプリングした。

A. 模式的な fructose operon の構造を示す。矢印は推測されている転写開始点を表している。pTH242 は太線で示した領域を含んでおり、*fruF*mRNA を検出する為の DNA プローブも同じ領域を保持する DNA 断片を用いた。

B. 調製した Total RNA 10 $\mu$ g を用いて Northern blotting による解析を行なった。lane 1 は W3110 / pTH242、lane 2 は HT5177 ( $\Delta crp$ ) / pTH242、lane 3 は HT28 ( $\Delta cya$ ) / pTH242 における *fruF* mRNA の発現を示す。



|          |               |   |   |   |   |   |
|----------|---------------|---|---|---|---|---|
| <b>A</b> | <i>ptsG</i>   | - | - | + | - | + |
|          | <i>crp</i>    | + | - | + | + | + |
|          | <i>fruFKA</i> | + | + | - | - | + |
|          | <i>manX</i>   | + | + | + | + | - |



**Fig.3-8 cAMP and IIA<sup>Glc</sup> phosphorylation in *ptsG*, *ΔfruF*, *ΔmanX* mutants**

IT1168 (*ptsG*<sup>-</sup>) (lane 1)、HT5190 (*ptsG*<sup>-</sup> *Δcrp*) (lane 2)、HT5238 (*ΔfruFKA*) (lane 3)、HT5238 (*ptsG*<sup>-</sup> *ΔfruFKA*) (lane 4)、JC7925 (*ΔmanX*) (lane 5)をLB培地で培養し、600nmにおける吸光度が0.8の時にサンプリングした。

A. cAMPの値を示す。

B. 細胞中の IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化レベルを Fig.3-1 と同様の方法を用いて解析した。



本節においては、*crp* 変異体を用いて、さらに CRP-cAMP が  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の脱リン酸化因子（群）の発現制御を介して  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルを制御することによりアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成活性を抑制している可能性について解析を試みた。

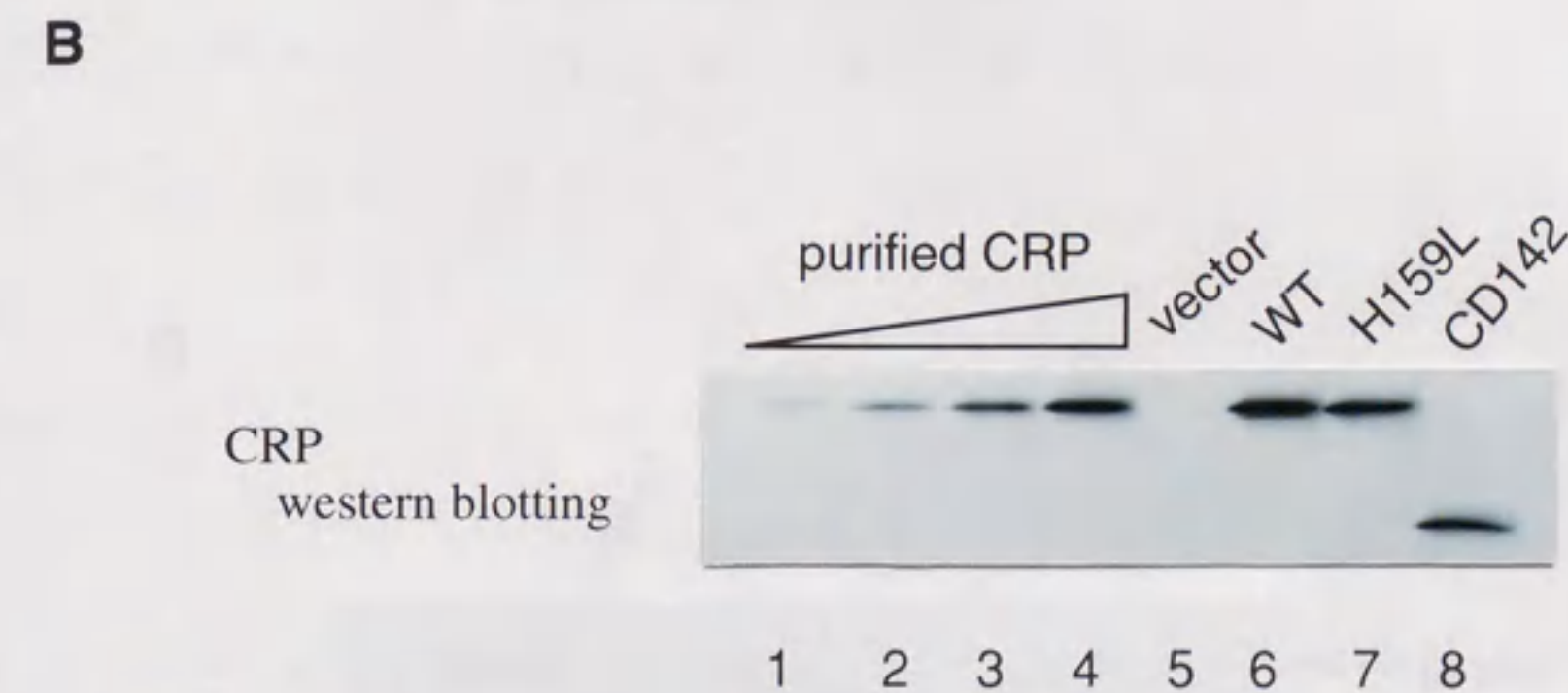
CRP は、1) cAMP 結合活性、2) DNA 結合活性、3) 転写促進活性、の三つの活性を保持する。各活性は独立したものではなく、後者の活性は前者の活性に依存している。CRP の N 末側の DNA 結合ドメインのほとんどを欠失した *crp* 変異体、*crp* CD142 は 1) cAMP 結合活性は野生株の約 80% 程度保持しているが、その他の活性は全く保持していない (Fig.3-9, A)。また、positive control 変異体と呼ばれる *crp* 変異体が単離されており (Bell *et al.* 1990)、この変異体は 159 番目のヒスチジンがロイシンに置換された変異体である。この変異体は 1)、2) の活性は野生型とほぼ同等の活性を有するが、*lacZ* の発現量で観察される転写促進活性は野生型の約 5% しか保持していなく (Fig.3-9, A)、また、前節で扱った *ptsG*、*manXYZ* 等の発現にも欠損を示し（結果未掲載）、転写促進活性のみを欠損した変異体である。また、各 *crp* 変異体の発現量はほぼ野生型 *crp* 遺伝子を保持するプラスミドと同程度であることが western blotting により確認された (Fig.3-9, B)。

これら各活性を欠損した *crp* 変異体のシリーズを  $\Delta crp$  株に導入してその cAMP、*cya* mRNA レベルを定量した。CD142 変異体においては cAMP 量はベクターを導入した株と同レベルの約 6000 (pmol/ml) であり、全く cAMP 合成の抑制が認められなかった (Fig.3-12, A lane 1, 4)。しかし、*crp* H159L 変異体においては約 130 (pmol/ml) であり、野生型 *crp* 導入株の約 10 (pmol/ml) に比べて約 13 倍の cAMP 量が検出されるが、ベクターを導入した株と比較すると約 50 倍の cAMP 合成の抑制が認められた (Fig.3-10, A lane 1-3)。一方、S1 nuclease assay の結果、*crp* H159L 変異体においては顕著な *cya* mRNA の発現抑制が認められた (Fig.3-10, B lane 5)。野生型においては染色体由来の *crp* より約 1.4 倍強い発現抑制が認められるが、*crp* H159L 変異体ほどの効果は認められなかった (Fig.3-10, lane 2-4)。CRP によるアデニル酸シクラーゼの転写抑制と活性抑制は独立に cAMP 合成抑制に寄与していることが第一章において明らかになったことを考慮すると、*crp* H159L 変異体の導入株における cAMP 量は *cya* mRNA の過剰な転写抑制分を含



**A**

| <i>crp</i> | Activity (%) |             |                             |
|------------|--------------|-------------|-----------------------------|
|            | cAMP binding | DNA binding | Transcriptional stimulation |
| vector     | 13           | -           | 1.5                         |
| WT         | 100          | +           | 100                         |
| H159L      | 94           | +           | 5                           |
| CD142      | 80           | -           | 1.6                         |

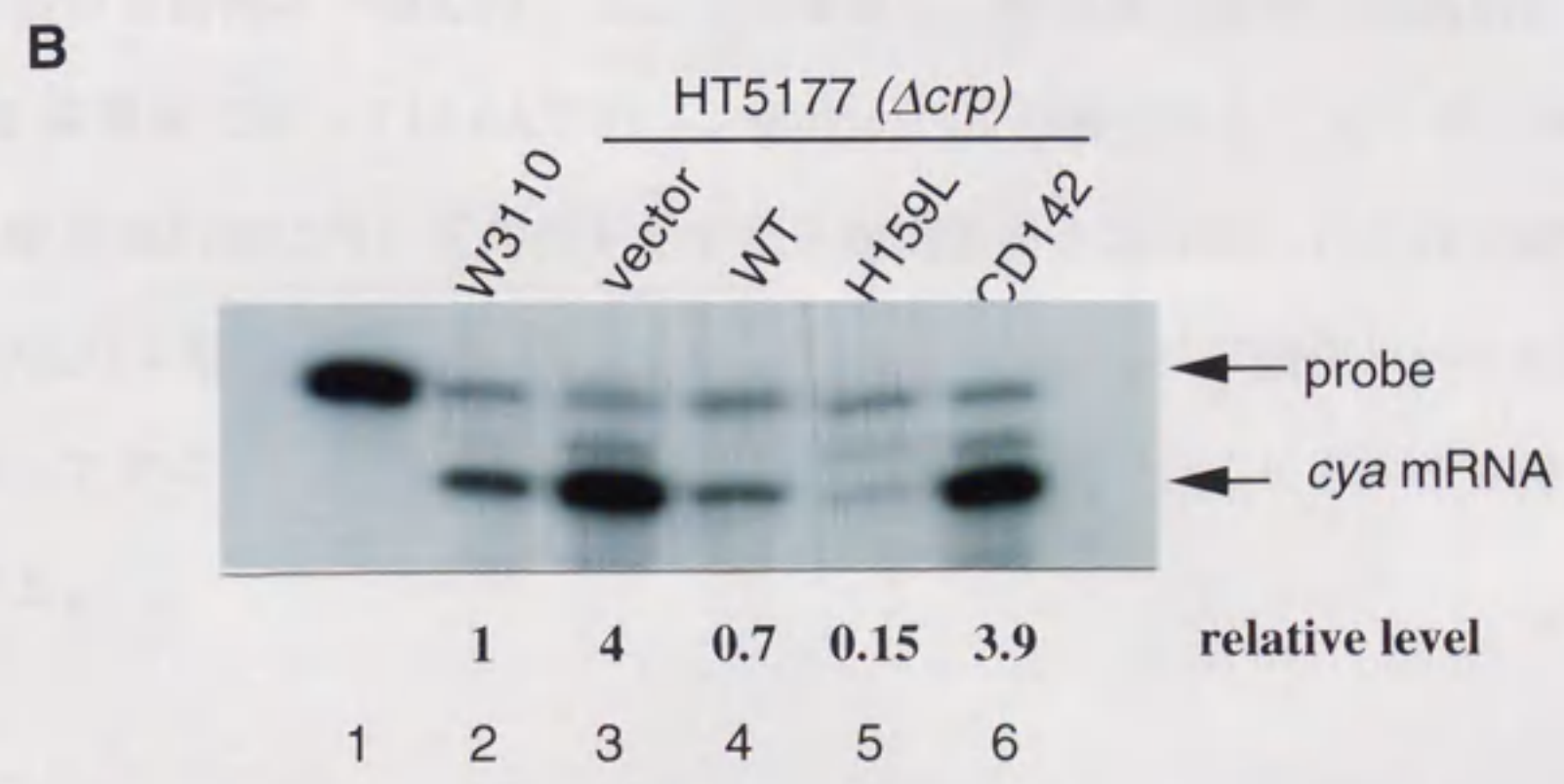
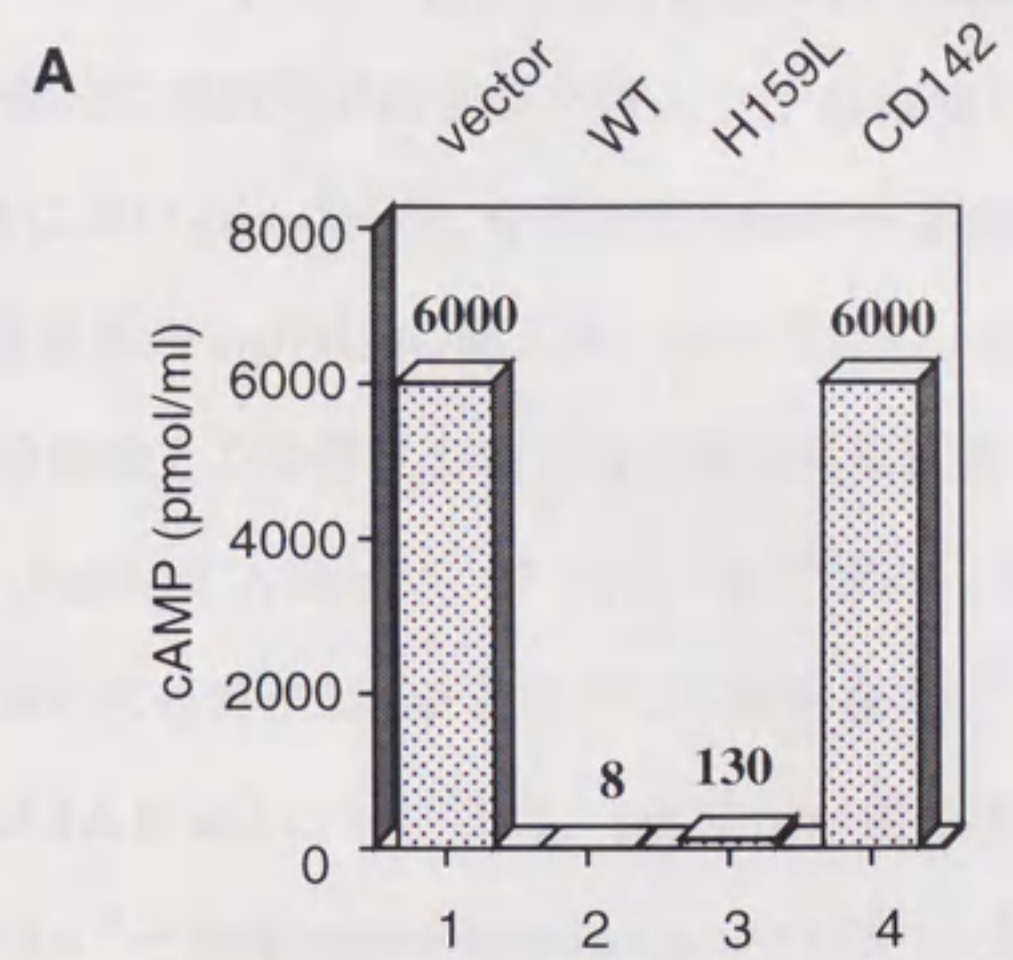


**Figure 3-9 Characterization of *crp* mutants**

A. 各 *crp* 変異体を HT5177 ( $\Delta crp$ ) に導入し、その形質転換株を用いて解析した。各々の値は野生型 *crp* の活性を 100% とした場合の相対的な活性を示す。DNA binding における "+" は gel shift assay により *cya* 529 bp *Bam*HI DNA 断片に対する結合能が認められ、 "-" は結合能を示さなかったことを示す。Transcriptional stimulation activity は  $\beta$ -galactosidase assay (Miller's units) によって測定した。

B. 各 *crp* 変異体を  $\Delta crp$  株に導入し、50 $\mu$ 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 の時にサンプリングした。lane 1-4 は 1.3ng、2.5 ng、5ng、10ng の精製した CRP であり、lane 5-8 は OD<sub>600</sub>=0.005 に対応するサンプル量を 12% SDS-PAGE により分離し、抗 CRP 抗体を用いた western blotting により解析した。





**Figure 3-10 Determination of cAMP level and *cya* mRNA level of *crp* mutants harbouring  $\Delta crp$  cells.**

各 *crp* 変異体を導入した  $\Delta crp$  株を 50 $\mu$ 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 の時にサンプリングした。

A. cAMP レベルを示す。cAMP の値は 3 回の測定の前平均値である。

B. 各形質転換株から抽出した total RNA 80 $\mu$ g を用いて S1 nuclease assay により *cya* mRNA を定量した。定量に際しては Bioimage Analyzer BAS 1000 (Fujix) を用いて行なった。W3110 における *cya* mRNA レベルを 1.0 とした相対的な値で示した。



むと考えられた。そこで、*cya* の転写抑制を除く目的で、*cya* プロモーターに存在する CRP 結合部位に部位特異的変異を導入した *cya* PM3 変異株を構築し (Fig.3-11, A)、その *crp* 欠損株における *crp* H159L 変異体の cAMP 合成抑制能を観察した。その結果、 $\Delta crp$  *cya* PM3 変異株の *crp* H159L 導入株においては約 1600 (pmol/ml) の cAMP 量が検出され、転写抑制を排除した条件においては合成活性抑制能をかなり欠損していることが明らかとなった (Fig.3-12, A lane 3)。さらに、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルを測定すると、*crp* H159L 変異体においては野生型 *crp* と比較して顕著な  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルの上昇が認められた (Fig.3-12, B lane 2, 3)。また、*crp* H159L 変異体の形質転換株の細胞粗抽出液を用いて *in vitro*  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ -P dephosphorylation assay を行なった結果、*crp* H159L 変異体は野生型に比べ、顕著に  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ -P の脱リン酸化促進活性が低下していることが明らかとなり (Fig.3-13)、*in vivo* における結果と一致した。以上の結果から、転写促進活性を特異的に欠損した *crp* H159L 変異体においては  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルの制御を介したアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成抑制に対して欠損を示すことが明らかとなった。これは CRP は未知の  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ -P の脱リン酸化因子群の発現制御を介して  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ -P のリン酸化レベルを調節することにより、アデニル酸シクラーゼの cAMP 合成を制御しているモデルを支持するものと考えられる。

10. 野生株における cAMP 変動の現象においても cAMP と  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルには相関関係が認められる

今までは主に *crp* 欠損株という特殊な genetic background における cAMP と  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルについて解析してきた。今度は翻って、野生株、即ち *crp*<sup>+</sup> background においては cAMP レベルと  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルの関係はどうなっているのかを解析した。野生株においても代謝的に不利な炭素源ほど多くの cAMP 量が認められる (Peterkofsky *et al.* 1971; Buettner *et al.* 1973; Epstein *et al.* 1975)。これは炭素源の変動という環境変化に対して cAMP 量を増加させ、その代謝遺伝子の発現を促進するという細菌の適応反応と



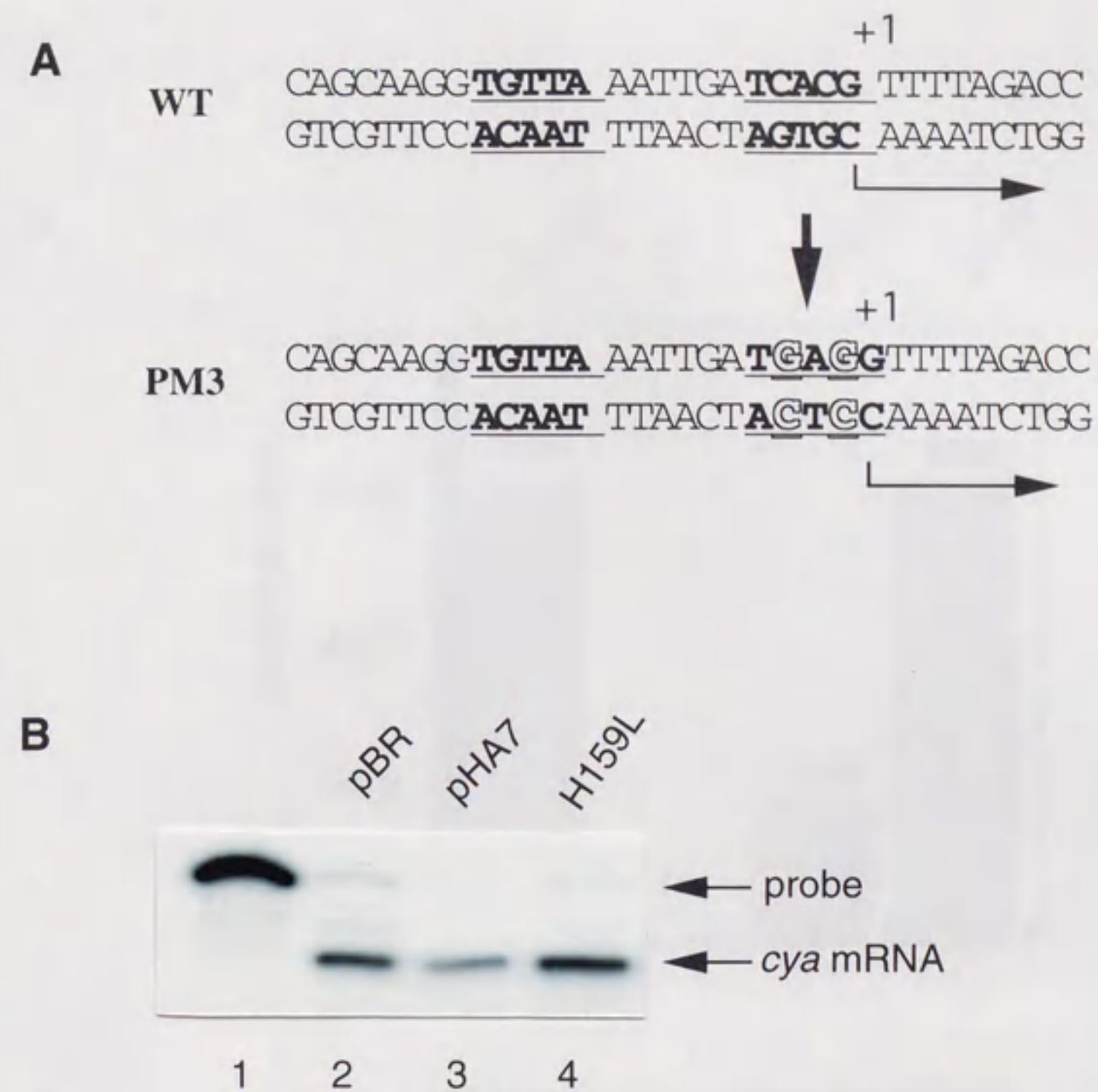


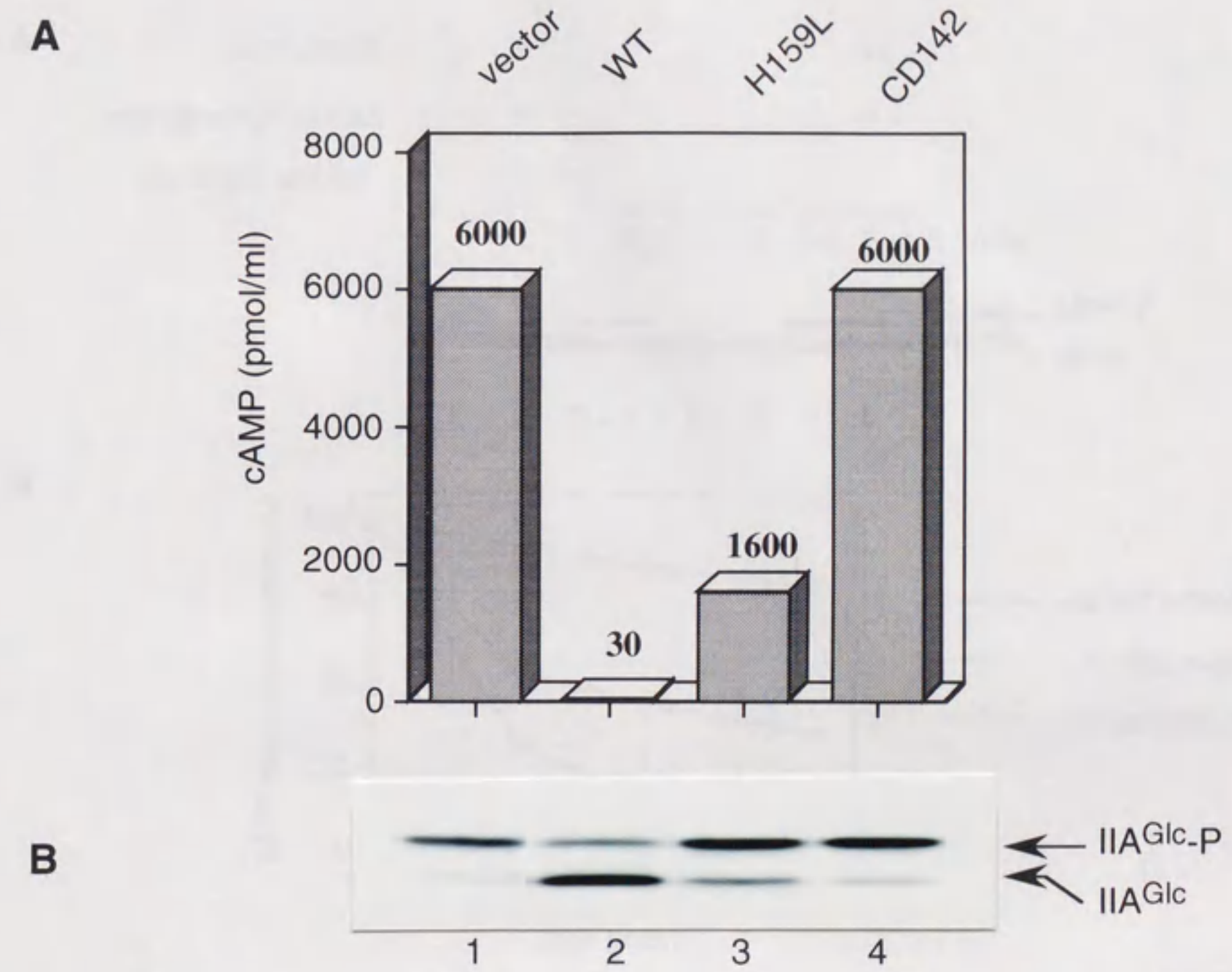
Fig. 3-11 Effect of *crp* H159L on the expression of *cya* mRNA in *cyaPM3 crp* mutants

HT5206 (*cya PM3 Δcrp::Tet<sup>r</sup>*) に pHA7 及びその derivatives を導入した菌株を 50μg/ml の ampicillin を含む LB 培地で培養し、600nm における吸光度が 0.8 の時にサンプリングした。

A. *cya PM3* の変異導入部位を示す。*cya* プロモーターに存在する CRP 結合領域を下線部の太字で示す。下流の保存領域に導入した 2bp の置換変異（白抜文字で示す）により、*cyaPM3* 変異株を構築した。

B. 各形質転換株から抽出した total RNA 80μg を用いて S1 nuclease assay により *cya* mRNA を定量した。





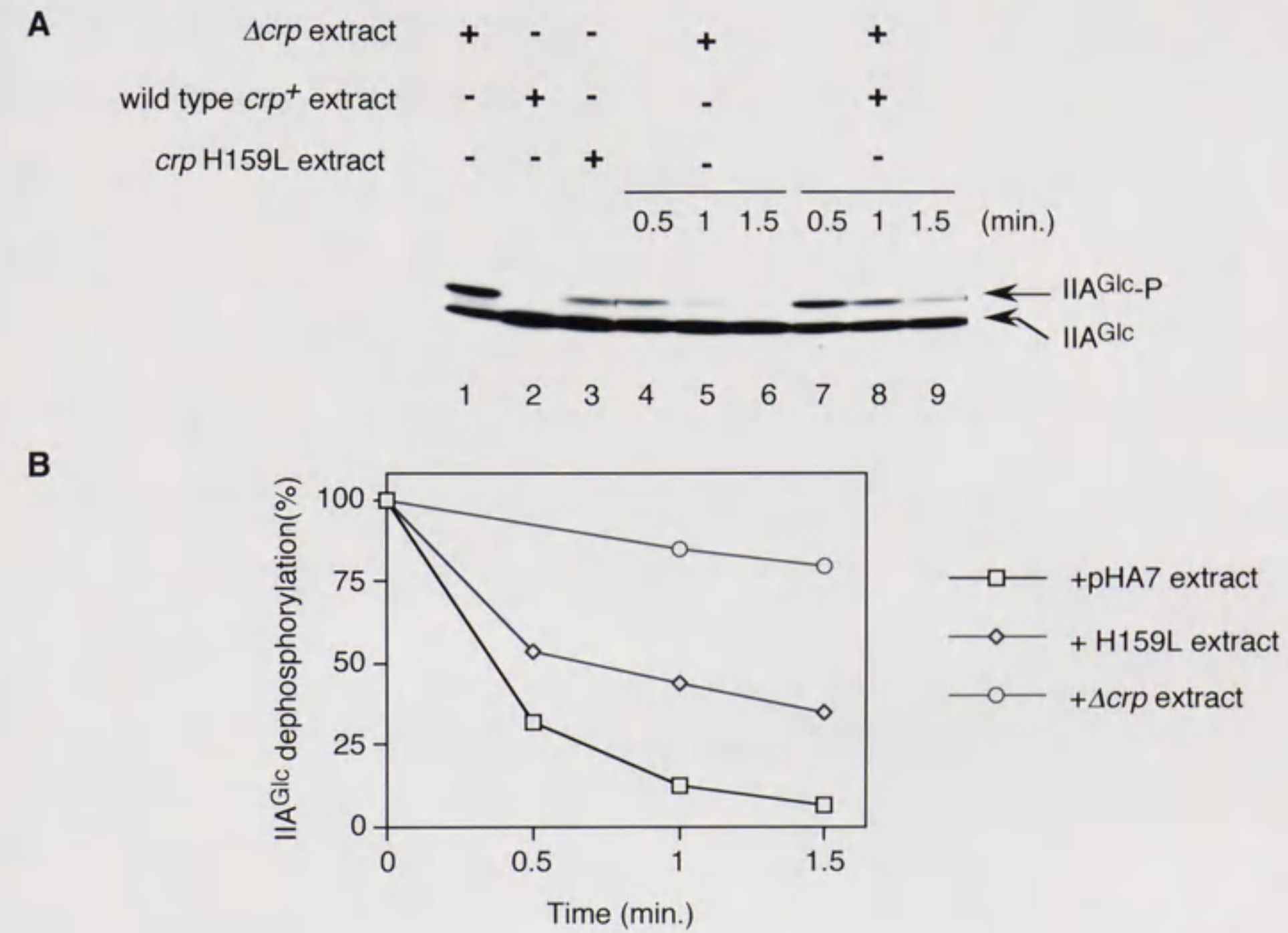
**Fig. 3-12 Effect of *crp* H159L on the cAMP level and phosphorylation state of IIA<sup>Glc</sup> in *cya* PM3 *crp* mutants**

HT5206 ( $\Delta crp::Tet^r$ ) に pHA7 及び *crp* を導入した菌株を 50 $\mu$ 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 の時にサンプリングした。

A. cAMP の値を示す。

B. 細胞中の IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化レベルを Fig.3-1 と同様の方法を用いて解析した。





**Fig. 3-13** *in vitro* dephosphorylation assay with *crp* H159L cell extracts

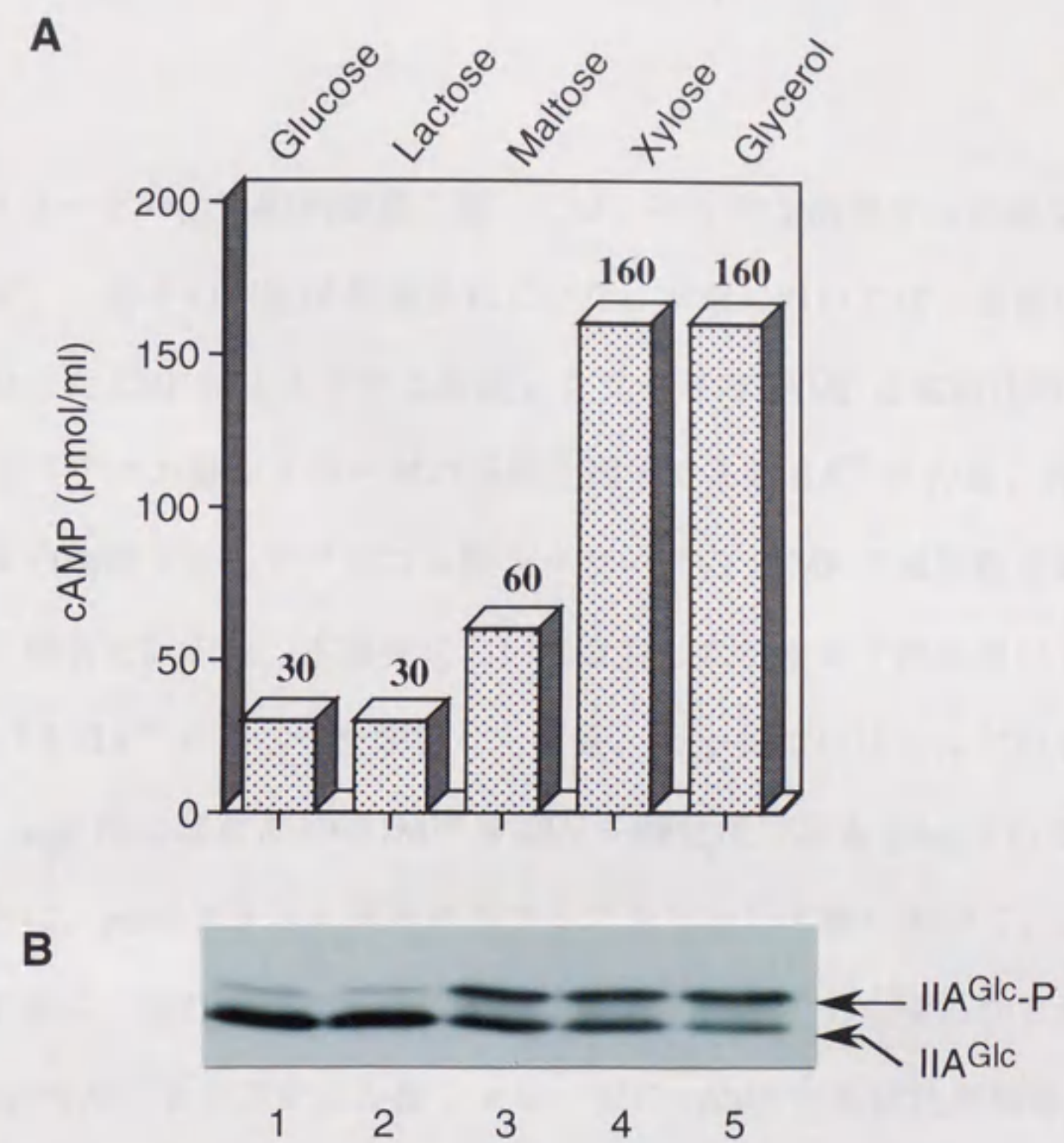
A. vector, pHA7 (wild type *crp*), *crp*H159L を導入した HT5177 ( $\Delta crp::Tet^r$ ) から調製した細胞粗抽出液を用いて *in vitro* dephosphorylation assay を行なった。lane 1~3 は各細胞粗抽出液の反応前のリン酸化レベルを示す。HT5177 / vector 細胞粗抽出液 50  $\mu$ l に対して、HT5177 / pHA7 細胞粗抽出液 50  $\mu$ l (lane4~6)、HT5177 / *crp* H159L 細胞粗抽出液 50  $\mu$ l (lane7~9) を添加して 37  $^{\circ}$ C で反応させた。各時間毎に 10  $\mu$ l ずつサンプリングし、等量の 2 $\times$ SDS buffer に懸濁して反応を停止させた。そのサンプルを抗 IIA<sup>Glc</sup> 抗体を用いた western blotting により解析した。

B. A. で得られたオートラジオグラムを NIH image により、各バンドを定量した。その際、A で得られた HT5177 / vector 株の IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化レベル (下のバンドに対する上のバンドの量比) を 100% とし、各レーン毎の下のバンドに対する上のバンドの量比を算出し、時間毎にプロットした。○は HT5177 / vector、□は HT5177 / pHA7、◇は HT5177 / *crp* H159L の各調製液を反応させた結果を示す。



考えられている (Buettner *et al.* 1973 ; Epstein *et al.* 1975 ; reviewed by Postma *et al.* 1993)。そこで、数種の各炭素源を含む最小培地で野生株を培養し、その培地における cAMP 量と  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルを測定した。その結果、グルコース、ラクトースの cAMP 産生量が約 30 (pmol/ml) と低い糖源においては  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルは LB 培地における  $\text{crp}^+$  株とほぼ同レベルの低さが観察された (Fig.3-14, A, B lane 1, 2)。マルトースにおいてはグルコースに比べて高い cAMP 量が観察され、その時には  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルもグルコースに比べて高くなっていた (Fig.3-14, A, B lane 3)。さらにキシロース、グリセロールにおいてはグルコースの約 5 倍もの cAMP 量が検出され、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルもマルトースに比べて高くなっていた (Fig.3-14, A, B lane 4, 5)。以上の結果から、野生株においても cAMP レベルと  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルにはある一定の相関関係が認められることが明らかとなり、生理的条件下でも  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルの調節機構を介したアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成機構が機能していることが示唆された。





**Fig. 3-14 cAMP level and phosphorylation state of IIA<sup>Glc</sup> of wild type cells grown in various carbon sources**

W3110 (wild type) を 0.2% glucose (lane 1)、lactose (lane 2)、maltose (lane 3)、xylose (lane 4)、glycerol (lane 5) を含む M9 最小培地で培養し、600nm における吸光度が 0.8 の時にサンプリングした。

A. cAMP の値を示す。

B. 細胞中の IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化レベルを Fig.3-1 と同様の方法を用いて解析した。



## 考察

アデニル酸シクラーゼの活性抑制機構に関しては、不十分な結果から正確な推論はされていなかったが、一応その存在は推測されていた。本章においては、前章においてその存在が明確となった CRP によるアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成活性抑制の機構について、CRP がアデニル酸シクラーゼの活性化因子である  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の量、即ち  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルの制御を介してアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成活性を調節している可能性について解析を試みた。本研究において改良したアルカリ法を用いて *crp* 欠損株の *in vivo* における  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  レベルを測定した結果、 $\Delta crp$  株ではほとんどの  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  がリン酸化型であり、*crp*<sup>+</sup> 株にほとんどの  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  が非リン酸化型である (Fig. 3-1) ことが明らかとなった。さらに、*ptsG* プラスミドとグルコースを用いた実験において、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化量と cAMP 量に一定の相関関係が認められる (Fig. 3-2) ことが明らかとなり、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルによりアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成活性が制御されることが示唆された。また、*in vitro* における  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  dephosphorylation assay において *crp*<sup>+</sup> 細胞粗抽出液には *crp*<sup>+</sup> 細胞粗抽出液中には存在しない  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  脱リン酸化促進活性が認められたが、精製 CRP-cAMP のみではその活性を示さなかった (Fig. 3-5)。また、転写促進活性を特異的に欠損した *crp* H159L 変異体は  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルの制御を介したアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成抑制に欠損を示すことが *in vitro*、*in vivo* において明らかとなった (Fig. 3-12; 3-13)。以上の結果から CRP が  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルの制御を介してアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成活性を調節している可能性が強く示唆されると考えられる。

### *in vivo* における $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ のリン酸化レベルの測定

本研究においては、*in vivo* における  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の定量法を改良した。*in vivo* における  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の定量に関しては Nelson らによりサルモネラ菌を用いてその解析結果が報告さ



れている(Nelson *et al.* 1986)。しかし、彼らは細胞を SDS 及び熱処理という従来の方法で処理することにより、その後の解析を行なっている。従来の方法では、まず細胞破壊までの lag time が非常に長いことが欠点であり、その間にも IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化/脱リン酸化反応が進行することにより、*in vivo* での状態をうまく反映しきれないと考えられる。一般に栄養素が枯渇した条件においては約 10 秒後には既に IIA<sup>Glc</sup> が最大限にリン酸化される状態が観察される(結果未掲載)。また、IIA<sup>Glc</sup> は 90 番目のヒスチジン残基の N-3 位において HPr からのリン酸基を受け取る(Worthylake *et al.* 1991)が、ヒスチジンを介したリン酸基の結合は熱、酸に対して非常に不安定であることが報告されており(Waygood *et al.* 1984; Nelson *et al.* 1986)、Nelson らの方法に従って測定を行なった場合、彼ら自身も指摘しているが、本来のリン酸化のレベルを過小的にしか観察できないと考えられる。以上のことから、Nelson らの結果は *in vivo* のリン酸化状態を正確に観察していないことが考えられた。本研究においては上述の問題点を回避する方法を模索し、sonication 法及びアルカリ法による細胞の即時的破壊法を改良した。両方法は細胞破壊までの lag time が 5~10 秒以内であり、また IIA<sup>Glc</sup>-P の化学的な不安定性を問題にすることがない(Ninfa *et al.* 1988; Wylie *et al.* 1988)ため、Nelson らの方法に比べ、より *in vivo* のリン酸化状態を観察しやすいと考えられる。また、両方法を比較すると、sonication 法においてはアルカリ法に比べ、 $\Delta crp$  株における IIA<sup>Glc</sup>-P 量の若干の減少が観察された。これは超音波による若干の熱の発生と物理的破壊の影響によるものと推測される。従って、アルカリ法の方がより *in vivo* のリン酸化状態を観察しやすいと考え、本研究においてはこの方法を用いて解析を行なった。しかし、これが最適であるか否かについては議論の余地があると思われ、さらなる改良法を考慮する必要は残されていると思われる。

#### CRP によるアデニル酸シクラーゼの活性抑制機構

本研究において、CRP がアデニル酸シクラーゼの活性化因子である IIA<sup>Glc</sup>-P の量、即ち IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化レベルの制御を介してアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成活性を調

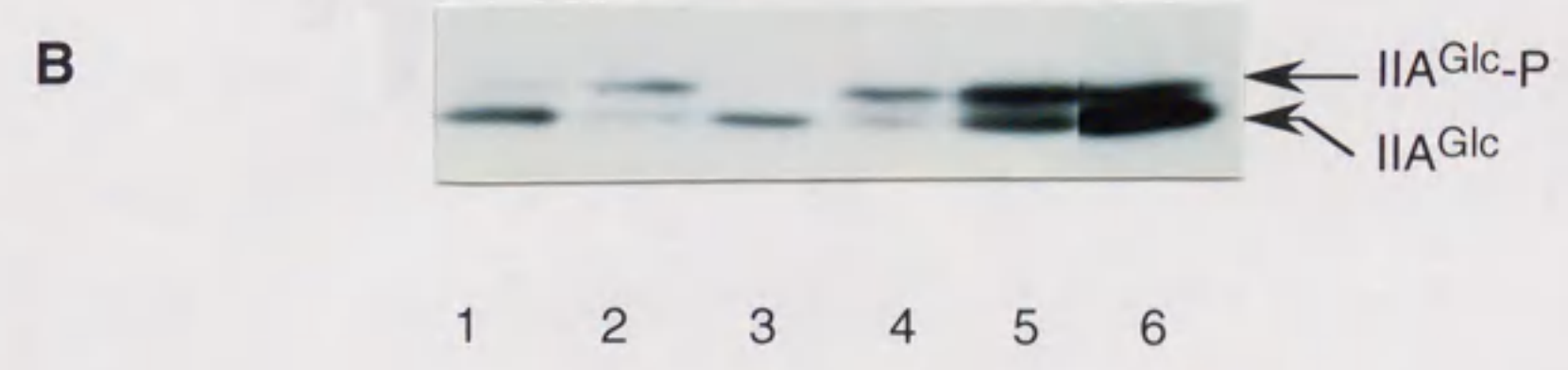
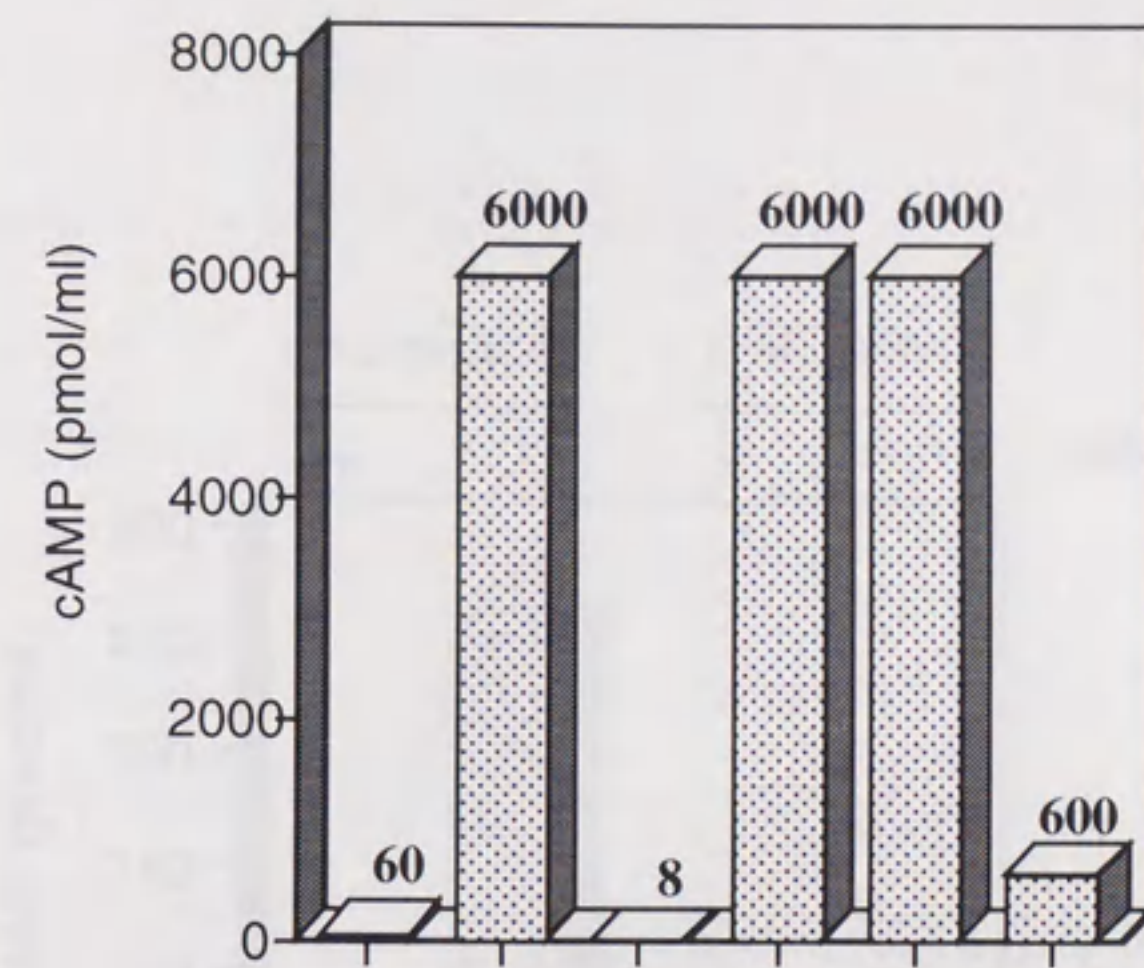


節している可能性が示唆された (Fig.3-18)。

しかし、一方で具体的なデータは全くないが、CRP (もしくはその制御下の因子) が  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ -P またはアデニル酸シクラーゼに対して直接 interaction して  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ -P によるアデニル酸シクラーゼの活性化経路を阻害する可能性も推測されており (Crasnier & Danchin 1990)、本研究の結果はその可能性を否定するものではない。この可能性についても実際に検討を試みている。まず、後者のアデニル酸シクラーゼの活性制御機構が存在するならば、CRP の  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ -P 及びアデニル酸シクラーゼに対する直接的な相互作用が存在することが考えられる。実際にそれら三つの因子の間の相互作用に関して免疫沈降法やタグを用いたアフィニティーカラムによる共精製等を指標に生化学的な解析を試みたが、*in vitro* における三つの因子の直接的な相互作用は全く認められなかった (結果未掲載)。三つの因子の相互作用が弱すぎて *in vitro* では検出できないことも考えられるため、*in vitro* の結果をそのまま *in vivo* に反映することはできないが、少なくとも *in vitro* の条件下で、後者の可能性を示唆する結果は得られていない。しかし、一方で Fig. 3-14 で明らかにされたように *crp*<sup>+</sup> 株においても cAMP レベルと  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルには一定の相関関係が認められたが、*crp* 欠損株で認められたものほど絶対的ではない。これは CRP 非存在下ではアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成活性を規定しているものは  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルのみであるが、CRP 存在下においては CRP-cAMP 制御下の他のアデニル酸シクラーゼの活性を制御する因子が存在し、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベル以外にもアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成に対して影響を及ぼしているため、絶対的な相関性が認められない可能性を示唆しているとも考えられる。また、転写促進能を特異的に欠損した *crp* H159L 変異体において cAMP の増加と  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルの上昇が認められた (Fig.3-14)。しかし、それに関しても *crp* H159L 変異体は約10% の転写促進能を残存活性として保持しているため (Fig.3-11) にその影響も含まれると思われるが、cAMP の増加量に対して  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルは上昇し過ぎていると考えられる。さらに、 $\Delta crp \Delta crp$  二重欠損株においては  $\Delta crp ptsI$  株に比べ、約8倍もの cAMP の増加が認められた (Fig.3-1 lane 5, 6) ことから、以下の二つの機構もアデニル酸シクラーゼの cAMP 合



|                 |   |   |   |   |    |    |
|-----------------|---|---|---|---|----|----|
| <i>crp</i>      | + | - | + | + | +  | +  |
| <i>ptsI</i>     | + | + | - | + | +  | +  |
| <i>crr</i>      | + | + | + | + | ++ | +  |
| <i>crr</i> H90Q | - | - | - | - | -  | ++ |

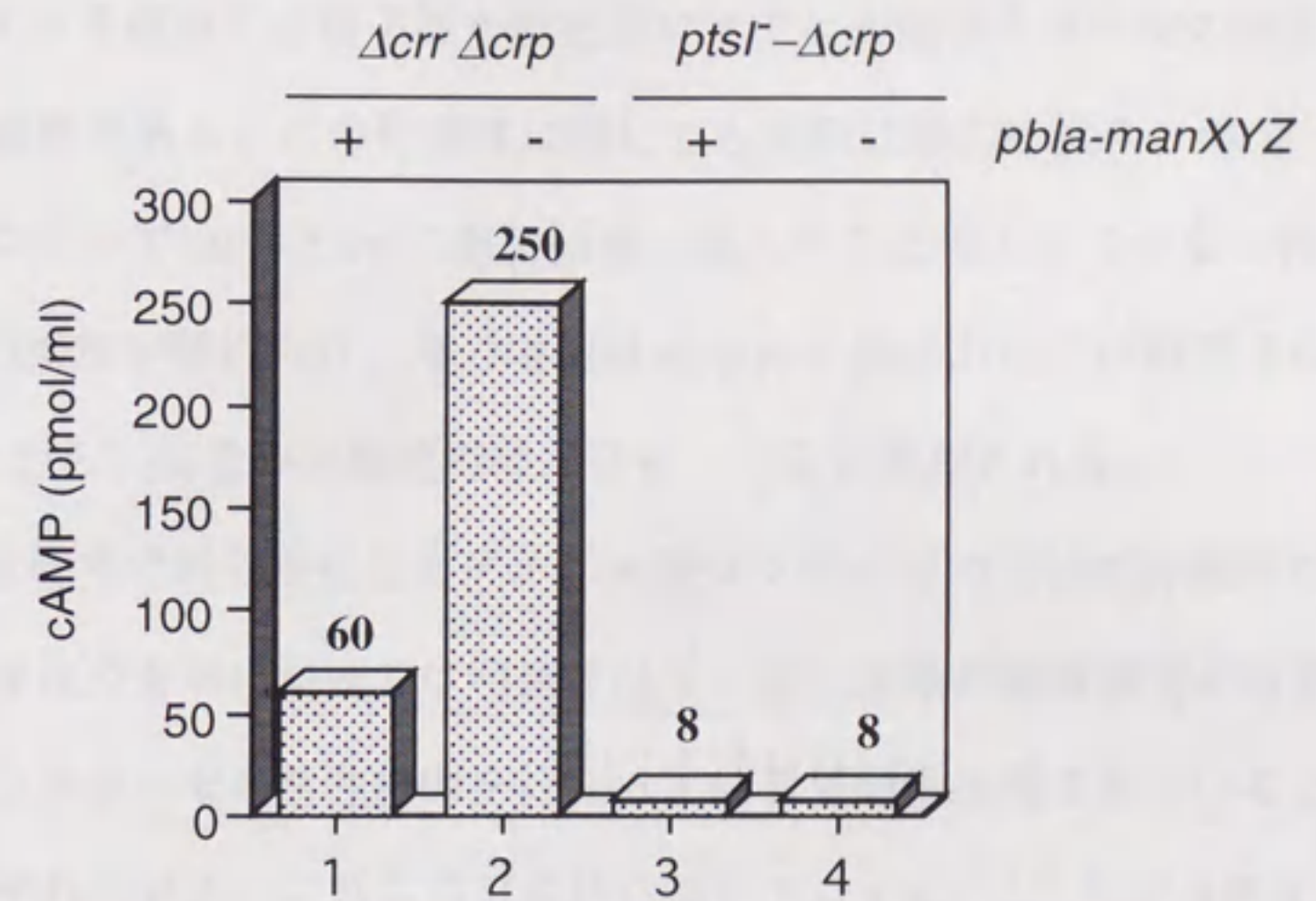


**Fig. 3-15 Effect of non-phosphorylated IIA<sup>Glc</sup> to cAMP production in  $\Delta crp$  cells**

W3110 (lane 1)、HT5177 (lane 2)、IT1186 (lane 3)、HT5177 に pBR322 (lane 4)、pTH219 (*crr*<sup>+</sup>) (lane 5)、pTH172 (lane 6)を導入した菌株を LB 培地で培養し、600nm における吸光度が0.8の時にサンプリングした。ampicillin はプラスミド導入株を培養するに際して 50 $\mu$ g/ml の濃度になるように培地に添加した。

- A. cAMP の値を示す。
- B. 細胞中の IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化レベルを Fig.3-1 と同様の方法を用いて解析した。





**Fig. 3-16** Effect of IIA<sup>man</sup> to cAMP production in  $\Delta crr \Delta crp$  and  $ptsI \Delta crp$  cells

HT5188 ( $\Delta crr \Delta crp$ ) に pBR322 (lane 1)、pTH179 (*pbla-manXYZ*) (lane 2)、HT5192 (*ptsI*  $\Delta crp$ ) に pBR322 (lane 3)、pTH179 (lane 4)を導入した菌株を 50 $\mu$ 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 の時にサンプリングし、cAMP を測定した。



成活性の制御に関与する可能性が考えられる。一つは、非リン酸化型  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  がアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成に対して阻害的に機能している可能性である。これは非リン酸化型である、*crr*H90Q 変異を多コピーで  $\Delta\text{crp}$  株に導入すると、導入していない株に比べ、約 1/10 までの cAMP の低下が認められた (Fig.3-15) ことから存在しうると推測される。もう一つは非リン酸化型  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  の阻害効果が存在しない場合にはグルコース以外の IIA ドメインを保持する因子群が潜在的にアデニル酸シクラーゼの活性化因子として機能する可能性である。この可能性についても実際に解析を試み、少なくとも  $\text{IIA}^{\text{Man}}$  に関しては多コピーで  $\Delta\text{crp} \Delta\text{crr}$  二重欠損株に導入すると導入していない株に比べ、約 4 倍の cAMP の増加が認められ、その増加は  $\Delta\text{crp} \text{ptsI}$  株においては観察されなかった (Fig.3-16) ことから、前者の可能性同様、存在しうると推測される。

このように本研究で明らかにしたアデニル酸シクラーゼの活性制御機構以外の機構に関してはその存在の有無については明確ではないが、複数の制御機構が存在し、共同してアデニル酸シクラーゼの活性制御を行なっている可能性は残されていると考えられる (Fig.3-18)。いずれにせよ、これらの可能性に関しては CRP によりリン酸化レベルが制御されない活性型の  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  (*crr*) 変異株を単離や *in vitro* の再構築系が確立できれば、さらに明らかになると考えられる。

#### CRP による $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ のリン酸化レベルの制御機構

CRP は未知の  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の脱リン酸化因子 (群) の発現制御を介して  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルを調節すると考えられた。では、どのような因子が  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の脱リン酸化因子として機能しているのだろうか。

本研究においては現在提出されている  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  へのリン酸転移のモデル (Postma *et al.* 1993; Fig.1-2) をもとに  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  と直接相互作用しうる、もしくはリン酸基を競合しうる因子で、なおかつその発現が CRP-cAMP に強く依存しているものとして  $\text{IICB}^{\text{Glc}}$  (Kimata *et al.* 1997)、FPr (Feldheim *et al.* 1970; Fig.3-9)、 $\text{IIA}^{\text{Man}}$  (Plumbridge, J. 1998) に注目し、その可能性について検討した。各欠損株 (Fig.3-10) や多コピープラスミドで発現させた場

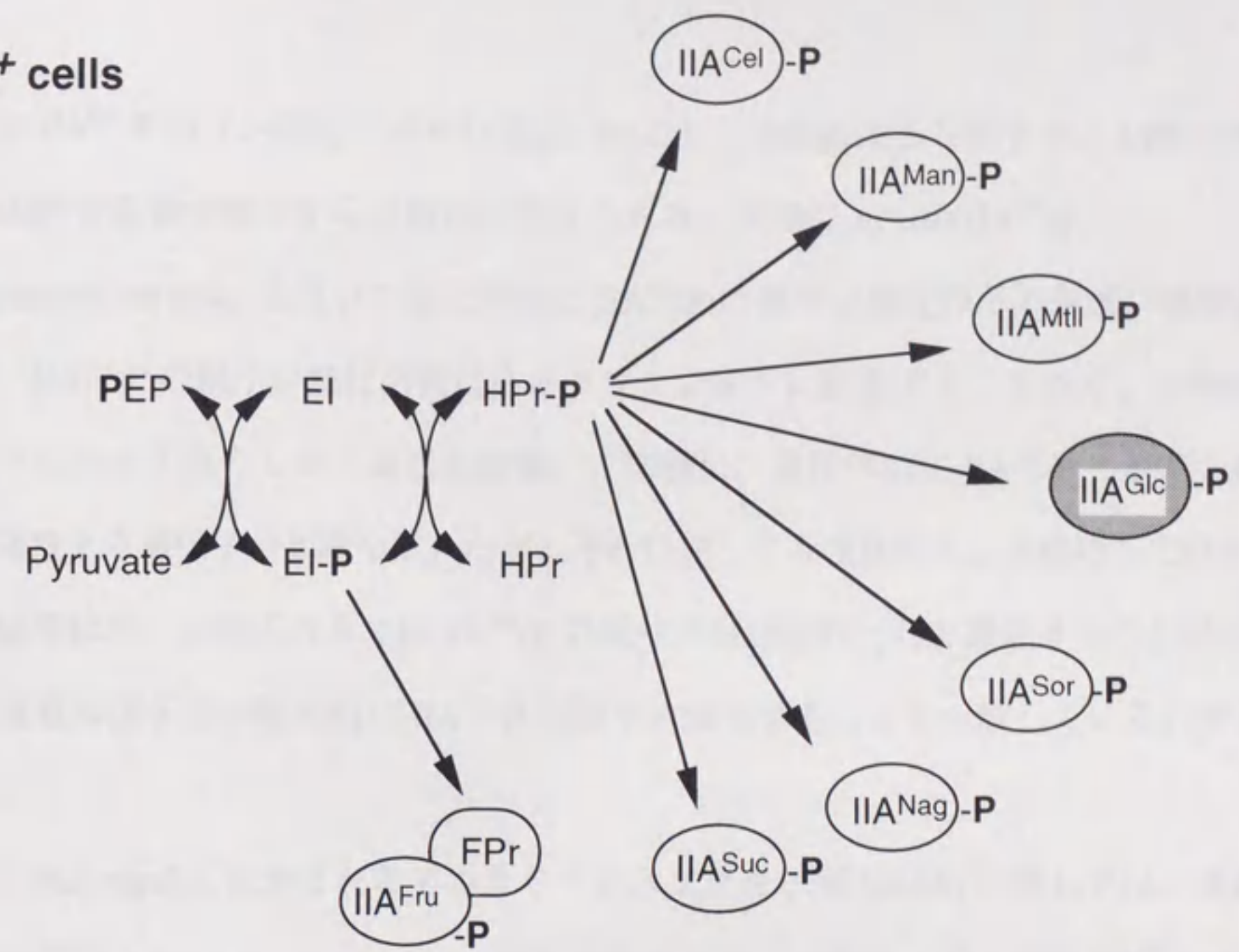


合（結果未掲載）、*in vivo*において  $\text{IICB}^{\text{Glc}}$ 、 $\text{FPr}$ 、 $\text{IIA}^{\text{Man}}$ の影響は観察されなかった。また、*in vitro*においても  $\text{IICB}^{\text{Glc}}$ 、 $\text{FPr}$ の欠損株もしくは多コピープラスミドで  $\Delta\text{crp}$ 株に導入した細胞の粗抽出液には  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ -P 脱リン酸化の促進活性が認められなかった（結果未掲載）。これらの結果から、各因子が単独で  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ -P の脱リン酸化因子として機能する可能性は低いと考えられる。

しかし、 $\text{IIA}^{\text{Man}}$ の場合、*in vitro*において、その欠損株の細胞粗抽出液では  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ -P の脱リン酸化反応の遅延が認められ、 $\text{IIA}^{\text{Man}}$ を  $\Delta\text{crp}$ 株において多コピープラスミドで発現させた細胞粗抽出液では  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ -P の脱リン酸化反応の促進が認められた（結果未掲載）。この *in vitro*で認められた  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ -P 脱リン酸化活性が *in vivo*をどの程度反映しているかに関しては議論を要すると思われるが、以下のことを想定すると説明可能であると考えられる。*in vivo*においては、PEPからのリン酸基の供給が細胞が生きているかぎり無限に供給される為に  $\text{IIA}^{\text{Man}}$ の欠損株もしくは多コピープラスミド導入  $\Delta\text{crp}$ 株のリン酸化レベルに影響が認められなかったと考えられる。しかし、*in vitro*においてはPEPからのリン酸基の供給は細胞が破壊されたために停止し、存在する  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ -P の脱リン酸化のみを観察していると考えられる。つまり、*in vivo*においては  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ のリン酸化および脱リン酸化反応による定常状態を観察しているが、*in vitro*においては脱リン酸化のみの粗反応のみを観察していると考えられる。このように考えると、 $\text{IIA}^{\text{Man}}$ は  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ -P の脱リン酸化反応に関与することが考えられる。実際にラクトース、マルトース等の non-PTS sugar のみならず、マニトール、ソルビトール等の PTS sugar においても細菌の生育が CRP-cAMP に大きく依存しており (Saier, Jr. et al. 1976)、また各 PTS sugar に特異的な IIA ドメインが存在している (Saier, Jr. & Reizer 1992; Postma et al. 1993) ことから、 $\text{crp}^+$ 株においては各 IIA 因子が  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  に対して絶対的に多いためにその平衡状態として  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルが低く保たれている可能性が考えられる (Fig.3-17)。一方、 $\Delta\text{crp}$ 株においては各 IIA ドメインを保持する因子の発現低下により、各 IIA 因子の  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  に対する相対的な量の減少が起こるために  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  にリン酸基の供給が集中し、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルが上昇すると考えられる (Fig.3-17)。このような機構により、 $\text{crp}$ 欠損株に



*crp*<sup>+</sup> cells



*crp*<sup>-</sup> cells

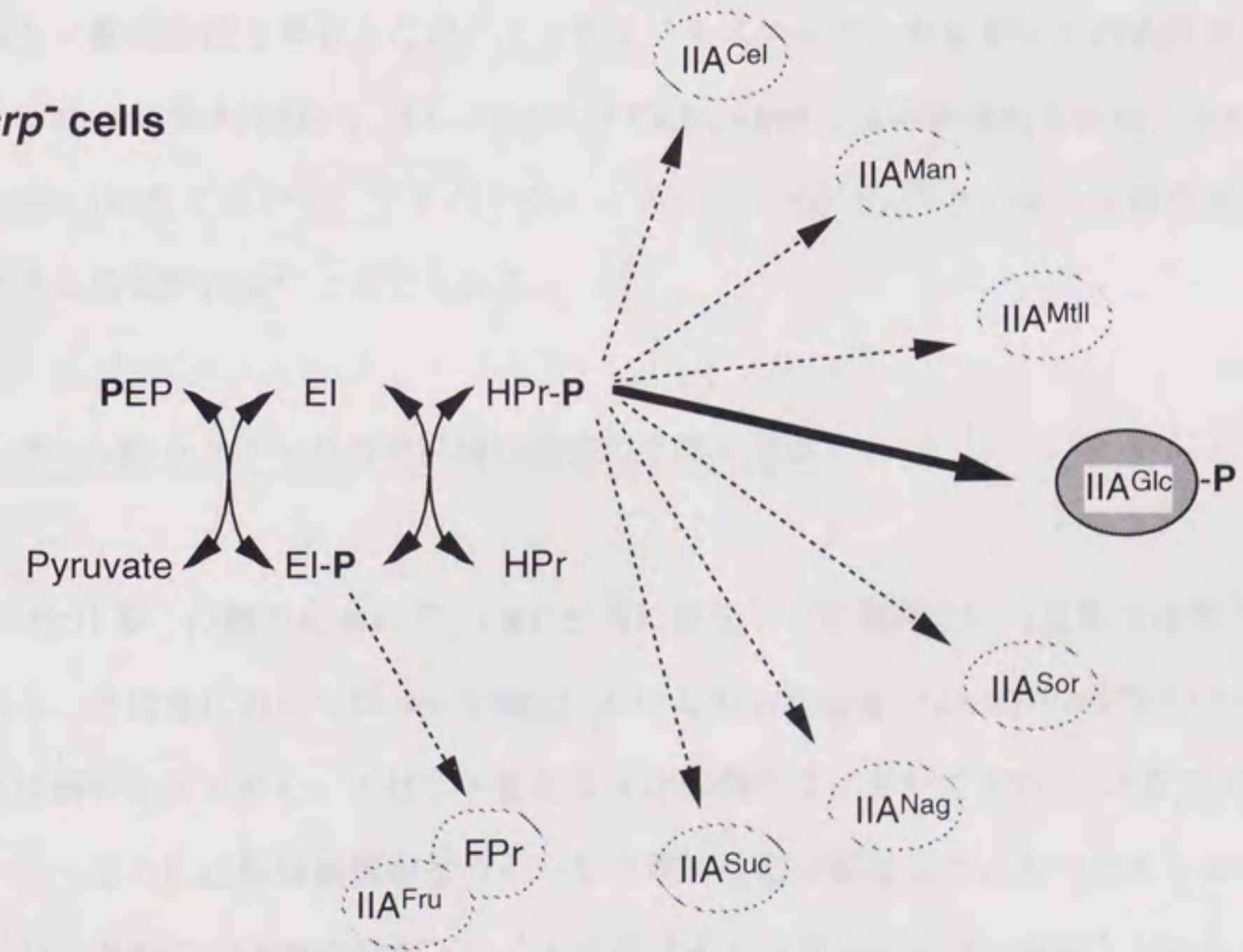


Fig. 3-17 Possible regulation of IIA<sup>Glc</sup> phosphorylation level by CRP-cAMP

一つの可能性として考えられる、CRP-cAMPによる IIA<sup>Glc</sup> のリン酸化レベルの制御機構を模式的に表す。なお、各 IIA ドメインは実際には一つの蛋白因子として独立したものではないが、ここでは簡単に表すために一つの因子として示した。矢印はリン酸基転移反応を示す。



おいては  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  のリン酸化レベルの増加が起こり、その結果としてアデニル酸シクラーゼの cAMP 合成量が増大する可能性が考えられる。実際に *in vitro*  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  dephosphorylation assay を用いて生化学的に  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の脱リン酸化因子の単離、精製を試みたが、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の脱リン酸化活性はあるフラクションに収束することなく、全体的にブロードになって存在した（結果未掲載）。同様に、遺伝学的に  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の脱リン酸化活性を保持する遺伝子の単離を試みたが、それに関しても現在のところ成功していない。以上の結果は単一の因子のみでは  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の脱リン酸化活性として機能することはなく、やはり複数の因子群が総和的に  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  を脱リン酸化することを示唆しているのかもしれない。

なお、Pho regulon に含まれるアルカリフォスファターゼ (*phoA*) に関しては、実際に *in vitro*  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  dephosphorylation assay の系でアルカリフォスファターゼの  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  に対する脱リン酸化活性を解析したが、アルカリフォスファターゼ自身はその活性を全く示さなかった（結果未掲載）。また、*phoA* は CRP-cAMP による発現制御を受けない (Wanner 1983) ことから、アルカリフォスファターゼが  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  の脱リン酸化因子として機能する可能性はないと考えられる。

#### アデニル酸シクラーゼの自己抑制機構の生理的意義

cAMP は多くの細菌において、CRP と共に遺伝子発現制御という重要な役割を果たしている。本研究においては *crp* 欠損株における約 100 倍もの cAMP の増加という現象をもとに解析をすすめた。では、一般的な生理的条件下において CRP によるアデニル酸シクラーゼの自己抑制機構がどのような生理的役割を果たしているのだろうか？

一般に過剰の cAMP の存在下では大腸菌はその生育が阻害されることが知られており (Robertis Jr. *et al.* 1973; Reddy *et al.* 1989; reviewed by Postma *et al.* 1993)、その意味においては CRP-cAMP によるアデニル酸シクラーゼの自己抑制機構の機能は cAMP 量が過剰にならないように常にその合成量を抑制しておくことである。CRP の発現に関しても



自己抑制がかかることが明らかとなっており (Aiba 1983; Cossart *et al.* 1985)、糖代謝系を中心とした遺伝子の発現を制御する転写因子として機能する一方で、細胞における CRP-cAMP 複合体が過剰に産生され、細胞にネガティブな影響を及ぼさぬように自己抑制システムが存在し、機能していると考えられる。

また、炭素源をグルコースにした場合に比べてコハク酸の場合は cAMP は約 5~10 倍増加することが観察されている (Peterkofsky & Gazdar 1971; Buettner *et al.* 1973; Botsford & Drexler 1978; Joseph *et al.* 1982)。一般に代謝的に不利な炭素源ほど多くの cAMP が認められ (Buettner *et al.* 1973; Botsford & Drexler 1978; Joseph *et al.* 1982; reviewed by Postma *et al.* 1993)、炭素源の変動という環境変化に対して細菌は cAMP 量の調節による遺伝子発現制御を行ない、適応を行なうと考えられている (Joseph *et al.* 1982; reviewed by Saier *et al.* 1995)。その現象においても CRP-cAMP によるアデニル酸シクラーゼの自己抑制機構が機能して cAMP の合成量を制御している可能性が考えられる。

さらに、グルコースが枯渇した場合 (glucose starvation)、細胞内において cAMP は約 10~20 倍程度増加することが報告されている (Makman & Sutherland 1965; Buettner *et al.* 1973)。また、グルコースとラクトース培地において認められる diauxic growth においても glucose phase と lactose phase の間に認められる growth の停滞期に細胞内の cAMP が約 20 倍程度増加することが観察されている (Inada *et al.* 1996a)。このように野生株でも生理的条件下において cAMP は *crp* 欠損株で認められた現象と同様に変動しうる。事実、上記 2 つの現象に関しては実際に我々の研究室でもさらに解析が進んでおり、その cAMP の増加にはアデニル酸シクラーゼの C 末ドメインが必須であること、さらにその条件下では  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  は *crp* 株と同レベルまでリン酸化されていることが明らかになっており (Inada, Takahashi, unpublished dates)、*crp* 株での cAMP overproduction と同様の機構を介した現象であると考えられる。アデニル酸シクラーゼの自己抑制機構はその場合のフィードバック機構として実際に機能していると考えられる。ただ、*crp*<sup>+</sup> background においても  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化及び cAMP の増加が起こるということは CRP による  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  のリン酸化レベルの制御が絶対的なものではなく、他の未知の機構によっても制御される可能



性も考えられる。  
 このように、生理的条件下における CRP-cAMP によるアデニル酸シクラーゼの自己抑制機構の役割についてはいくつか考察することができるが、実際に細胞における cAMP 量の調節に如何なる関与があるかに関してはさらなる解析が必要であろう。

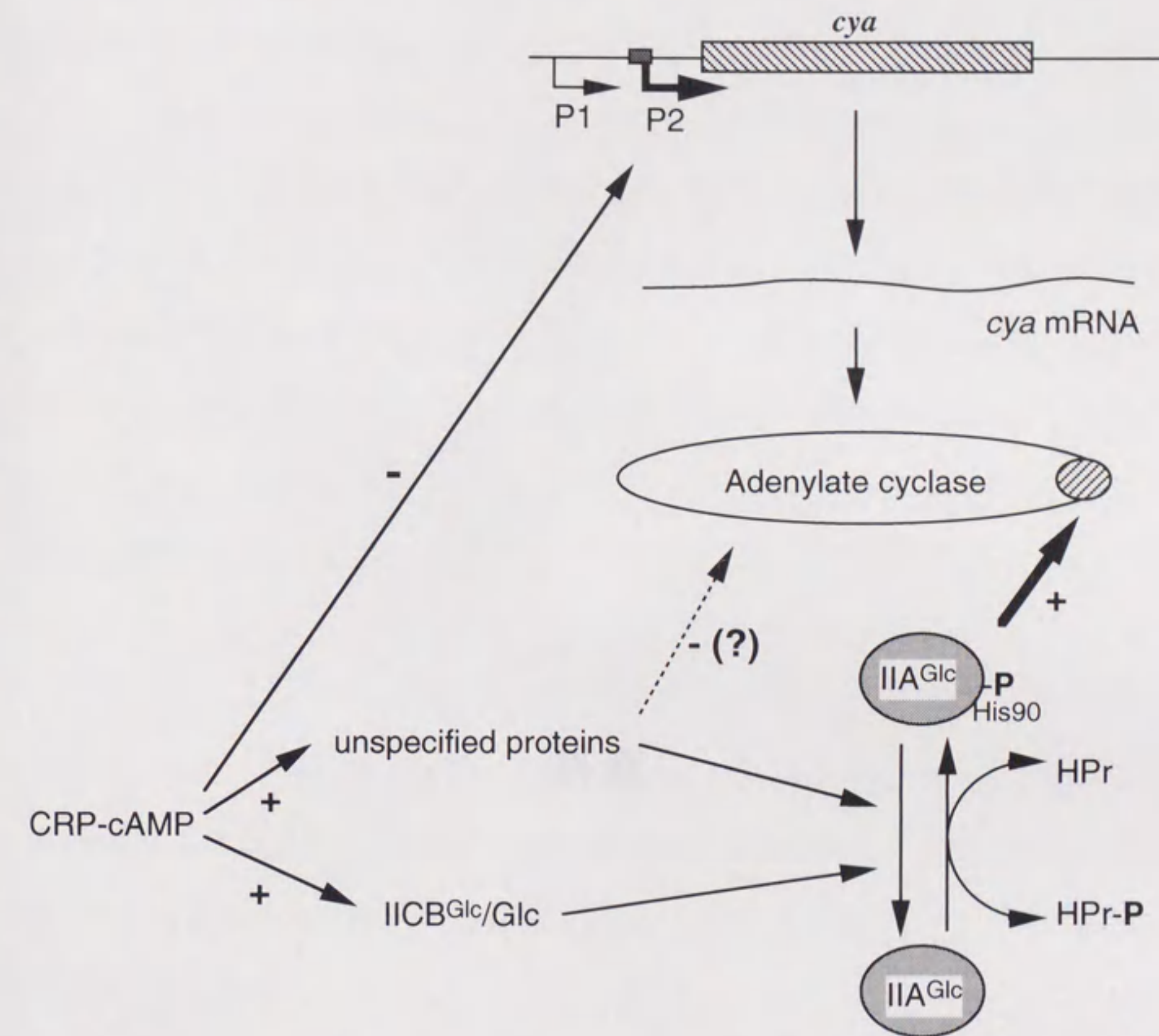
性も考えられる。

このように、生理的条件下における CRP-cAMP によるアデニル酸シクラーゼの自己抑制機構の役割についてはいくつか考察することができるが、実際に細胞における cAMP 量の調節に如何なる関与があるかに関してはさらなる解析が必要であろう。



Fig. 18. Model of cAMP regulation by CRP-cAMP.





**Fig.3-18 Model of cAMP regulation by CRP-cAMP**

CRP-cAMPによるアデニル酸シクラーゼの模式的な図を示す。  
 +はcAMP合成に対してpositiveに、-はnegativeに作用することを示す。  
 可能性として存在しうる制御経路は点線で示した。



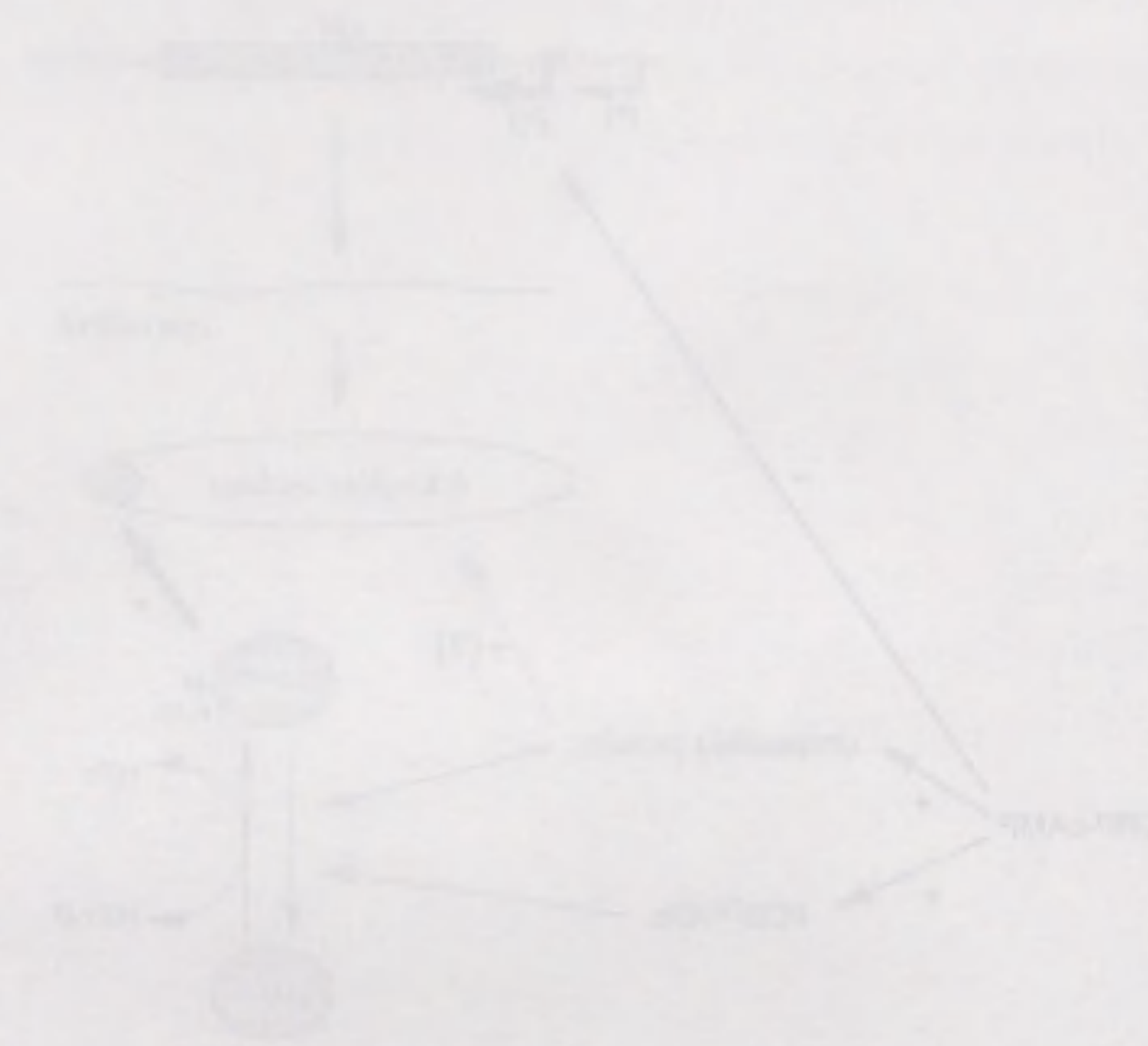


Fig. 1-1 Model of the...  
 ...  
 ...  
 ...

### 終章

本書が、その目的を達成するために、どのような方法を用いたかを、この終章で述べておきたい。本書の執筆は、1980年代後半から1990年代前半にかけて行われた。その間に、国内外の状況は大きく変化した。特に、1990年代前半には、日本経済が急激に成長した。この成長は、日本企業にとって大きなチャンスであった。しかし、同時に、日本企業は海外市場に進出するようになった。この海外市場への進出は、日本企業にとって大きな課題となった。本書は、この海外市場への進出に関する課題を、どのように解決するかを、述べておきたい。本書は、海外市場への進出に関する課題を、どのように解決するかを、述べておきたい。本書は、海外市場への進出に関する課題を、どのように解決するかを、述べておきたい。



カタボライトリプレッションと呼ばれる、グルコース等による他の糖代謝遺伝子の発現抑制が1900年代初期に既に発見され、1965年のMakman & Sutherlandにより、大腸菌におけるcAMPの存在が確認された。その後、カタボライトリプレッションが認められる条件下においてはcAMPの変動も同時に観察され、cAMPの役割とその重要性が徐々に明らかにされてきた。また、cAMPの調節機構についてもPTSとの関連性が注目され、PTSの一因子であるIIA<sup>Glc</sup>のリン酸化型(IIA<sup>Glc</sup>-P)がcAMP合成酵素であるアデニル酸シクラーゼの活性化因子であることが遺伝学的な解析から明らかとなった。また、*cya*遺伝子のcloning、sequenceにより、*cya*プロモーター部位のCRP結合部位の存在が明らかとなり、実際にCRP-cAMPによって*cya*の発現が約1/5まで抑制されることが明らかとなった。

このように、cAMPの合成調節機構については四半世紀以上に渡り、解析がすすめられてきた。しかし、主に生化学的な解析が遅れている為にCRPが*cya*の転写を抑制し、IIA<sup>Glc</sup>-Pがアデニル酸シクラーゼのcAMP合成活性を活性化していること以外には具体的なアデニル酸シクラーゼの制御機構の分子メカニズムについては十分な解析はなされてこなかった。

そこで、私は本研究においてさらなるアデニル酸シクラーゼの制御機構について解析を行ない、CRPによる*cya*の転写抑制がアデニル酸シクラーゼのcAMP合成抑制に寄与しているが、それだけでは不十分であり、アデニル酸シクラーゼの活性制御機構も存在していることを明確にした(第一章; Inada *et al.* 1996b)。さらに初めてIIA<sup>Glc</sup>のリン酸化レベルの生化学的解析に成功し、その活性制御機構はアデニル酸シクラーゼの活性化因子であるIIA<sup>Glc</sup>-Pの量をCRPが制御して間接的にアデニル酸シクラーゼのcAMP合成を抑制する機構が存在する可能性を見出した(第二章; Takahashi *et al.* 1998)。

しかし、例えば、IIA<sup>Glc</sup>-Pがどのようなアデニル酸シクラーゼのC末部分を介してアデニル酸シクラーゼのcAMP合成活性を活性化しているのか、第二章で示唆された機構以外の機構の有無など依然としてアデニル酸シクラーゼを中心とした制御機構に関して



は解明が必要とされる部分が多く残されている。その原因の一つはアデニル酸シクラーゼの生化学的解析、殊に *in vitro* におけるアデニル酸シクラーゼの解析が遅れていることであろう。アデニル酸シクラーゼは大腸菌中に約15分子程度しか存在しないと推定されており、特異な生化学的性質を保持しないためにその精製が非常に困難であった (Yang & Epstein 1983)。しかし、*in vitro* における解析に関しても第一章で構築したアデニル酸シクラーゼの大量発現系を用いて我々の研究室で解析がさらにすすめられており、その *in vitro* 系を用いて  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  のアデニル酸シクラーゼの活性化機構及びその活性化経路における CRP-cAMP の影響の検証、さらにはアデニル酸シクラーゼの制御に関与する因子の単離などの研究が可能となる。これらの解析により、今まで遺伝学的手法のみではその解析が限界な為に解析されなかったアデニル酸シクラーゼによる cAMP 合成の制御機構やカタボライトリプレッション等の cAMP 変化を伴う現象問題の解明につながる事が期待される。



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

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

参考文献

References listed on the right page, including titles and authors, though the text is mostly illegible.



- Aiba, H. and Krakow, J.S. (1981) Isolation and characterization of the amino acid and carboxyl proximal fragments of the adenosine 3',5'-monophosphate in *Escherichia coli* *Biochemistry* **20**:4774-4780
- Aiba, H., Adhya, S. and Crombrughe, B. (1981) Evidence for two functional gal promoters in intact *Escherichia coli* cells *J. Biol. Chem.* **256**:11905-11910
- Aiba, H., Fujimoto, S. and Ozaki, N. (1982) Molecular cloning and nucleotide sequencing of the *E. coli* cAMP receptor protein *Nucl. Acids. Res.* **10**:1345-1361
- Aiba, H. (1983) Autoregulation of the *Escherichia coli* *crp* gene : CRP is a transcriptional repressor for its own gene *Cell* **32** : 141-149
- Aiba, H., Kawamukai, M. and Ishihama, A. (1983) Cloning and promoter analysis of the *Escherichia coli* adenylate cyclase gene *Nucl. Acids. Res.* **12**:9427-9439
- Aiba, H., Mori, K., Tanaka, M., Ooi, T., Roy, A. and Danchin, A. (1984) The complete nucleotide sequence of the adenylate cyclase gene of *Escherichia coli* *Nucl. Acids. Res.* **12**:9427-9439
- Aiba, H. (1985) Transcription of the *Escherichia coli* adenylate cyclase gene is negatively regulated by cAMP-cAMP receptor protein *J. Biol. Chem.* **260**:3063-3070
- 饗場弘二 シリーズ分子生物学の進歩4. 遺伝子制御の発現と制御 I 丸善、 pp.43-70 (1989)
- Bell, A., Gaston, R., Chapman, K., Kolb, A., Buc, H., Minchin, S., Williams, J. and Busby, S. (1990) Mutations that alter the ability of the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein to activate transcription *Nucl. Acids. Res.* **18**:7243-7250
- Blaauwen, J.L. and Postma, P.W. (1985) Regulation of cyclic AMP synthesis by enzyme III<sup>Glc</sup> of the phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system in *crp* strains of *Salmonella typhimurium* *J. Bacteriol.* **164**:477-478
- Botsford, J.L. and Drexler, M. (1978) The cyclic Adenosine 3',5'-monophosphate receptor protein and regulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate synthesis in *Escherichia coli* *Mol. Gen. Genet.* **165**:47-56



- Botsford, J.L. (1984) Cyclic AMP Phosphodiesterase in *Salmonella typhimurium* *J.Bacteriol.* **160**:826-830
- Botsford, J.L. and Harman, J.G. (1992) Cyclic AMP in prokaryotes *Microbiol.Rev.* **56**:100-122
- Buettner, M. J., Sitz, E. and Rickenberg, H.V. (1973) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in *Escherichia coli* *J.Bacteriol.* **14**:1068-1073
- Casadaban, M. (1978) Transcription and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu *J.Mol. Biol.* **226**:623-635
- Cossart, P. and Gicquel-Sanzey, B. (1985) Regulation of expression of the *crp* gene of *Escherichia coli* K-12 : *In vivo* study *J.Bacteriol.* **161**: 454-457
- Crasnier, M. and Danchin, A. (1990) Characterization of *Escherichia coli* adenylate cyclase mutants with modified regulation *J.Gen.Microbiol.* **136**:1825-1832
- Crasnier, M. Dumay, V. and Danchin, A. (1994) The catalytic domain of *Escherichia coli* K-12 adenylate cyclase as revealed by deletion analysis of the *cya* gene *Mol.Gen.Genet.* **243**:409-416
- Daniel J. (1984) Enzyme III stimulation of cyclic AMP synthesis in an *Escherichia coli* *crp* mutant *J.Bacteriol.* **157**:940-941
- Doroccicz, I.R., Williams, P.M. and Redfield, R.J. (1993) The *Haemophilus influenzae* adenylate cyclase gene : Cloning, sequence, and essential role in competence *J.Bacteriol.* **175**:7142-7149
- Bankaitis, V.A. and Bassford, Jr., P.J. (1982) Regulation of adenylate cyclase synthesis in *Escherichia coli* : Studies with *cya-lac* operon and protein fusion strains *J.Bacteriol.* **151**:1346-1357
- Ebright, R.H., Cossart, P., Gicquel-Stanzey, B., and Beckweth, J. (1984) Mutation that alter the DNA sequence specificity of the catabolite gene activator protein of *E.coli* *Nature* **311**:232-235
- Eilen, E., Pampero, C. and Krakow, J.S. (1978) Production and Properties of a core derived from the cyclic adenosine monophosphate receptor protein of *Escherichia coli* *Biochemistry*



- Emmer, M., deCrombrughe, B., Pastan, I. and Perlman, R. (1970) Cyclic AMP receptor protein of *E.coli* : Its role in the synthesis of inducible enzymes *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **66**: 480-487
- Epstein,W.,Pothman-Denes,L.B. and Hesse,J. (1975) Adenosine 3',5'-monophosphate as a mediator of catabolite repression in *Escherichia coli* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **72**:2300-2304
- Feldheim, D., Chin, A.M., Nierva, C.I., Feucht,B.U., Cao,Y.W., Xu, Y.F., Sutrina, S.,L. and Saier, Jr. M.H. (1990) Physiological consequence of the complete loss of phosphoryl-transfer proteeins HPr and FPr of the phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system and analysis of fructose (*fru*) operon expression in *Salmonella typhimurium* *J.Bacteriol.* **172**: 5459-5469
- Feucht,B.U. and Saier,M.H.,Jr. (1980) Fine control of adenylate cyclase by the phosphotransferase systems in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* *J.Bacteriol.* **141**:603-610
- Geerse, R. H., Ruig, C. R., Schuitema, A.,R.,J. and Postma, P.W. (1986) Relationship between pseudo-HPr and the PEP : fructose phosphprtransferase system in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* *Mol.Gen.Genet.* **203**:435-444
- Hara, H., Yamamoto, Y., Higashitani, A., Suzuki, H. and Nishimura, Y. (1991) Cloning, mapping, and characterization of the *Escherichia coli* *prc* gene, which is involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3 *J.Bacteriol.* **173**:4799-4813
- Imamura, R., Yamanaka, K., Ogura, T., Hiraga, S., Fujita, N., Ishihama, A. and Niki, H. (1996) Identification of the *cpdA* gene encoding cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterase in *Escherichia coli* *J.Biol.Chem.* **271**:25426-25429
- Inada,T., Kimata K. and Aiba, H. (1996a) Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli* : challenge to the cAMP model *Genes to Cells* **1** : 293-301
- Inada, T., Takahashi, H., Mizuno,T. and Aiba, H. (1996b) Down regulation of cAMP production



by cAMP receptor protein in *Escherichia coli* : an assesment of the contributions of transcriptional and posttranscriptional control of adenylate cyclase *Mol.Gen.Genet.* **253**:198-204

Ishizuka,H.,Hanamura,A.,Kunimura,T. and Aiba,H. (1993) A lowered concentration of cAMP receptor protein caused by glucose is an important determinant for catabolite repression in *Escherichia coli* *Mol.Microbiol.* **10**:341-350

Joseph,E.,Bernsley,C.,Guiso,N. and Ullman,A. (1982) Multiple regulation of the adenylate cyclase in *Escherichia coli* *Mol.Gen.Genet.* **185**:262-268

Kier, L.D., Weppelman, R. and Ames, B.N. (1977) Regulation of two phosphatases and a cyclic phosphodiesterase of *Salmonella typhimurium* *J.Bacteriol.* **130**:420-428

Kimata, K., Takahashi, H., Inada, T., Postma, P. and Aiba, H. (1997) cAMP receptor protein-cAMP plays a crucial role in glucose-lactose diauxie by activating the major glucose transporter gene in *Escherichia coli* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **94** : 12914-12919

Kraddow, J.S. and Pastan, I. (1973) Cyclic adenosine monophosphate receptor : loss of cAMP-dependent DNA binding activity after proteolysis in the presence of cyclic adenosine monophosphate *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **70**:2929-2533

Kundig,W.,Gosh,S.and Roseman,S. (1964) Phosphate bound to histidine in a protein as a protein as intermediate in a novel phosphotransferase system *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **52**:1064-1074

Levy,S.,Zeng,G. and Danchin,A. (1990) Cyclic AMP synthesis in *Escherichia coli* strains bearing known deletions in the *pts* phosphotransferase operon *Gene* **86**:27-33

Magasanik, B. (1970) Glucose effects : inducer exclusion and repression. In: *The Lactose Operon* (eds J. Beckwith & D.Zispeer), pp.189-220. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press

Majerfeld,I.H.,Miller,D.,Spiz,E. and Rickenberg,H.V.(1981) Regulation of the synthesis of adenylate cyclase in *Escherichia coli* by cAMP-cAMP receptor protein complex *Mol.Gen.Genet.* **181**:470-475



- Makman, R.S. and Sutherland, E.W. (1965) Adenosine 3',5'-monophosphate in *Escherichia coli*  
*J.Biol.Chem.* **240**:1309-1314
- Meadow, N. D. and Roseman, S. (1982) Sugar transport by the bacterial phosphotransferase  
system. Isolation and characterization of a glucose-specific phosphocarrier protein (III<sup>Glc</sup>) from  
*Salmonella typhimurium* *J.Biol.Chem.* **257**:14526-14537
- Meadow, N. D., Fox, D.K. and Roseman, S. (1990) The bacterial phosphoenolpyruvate : Glucose  
phosphotransferase system *Annu.Rev.Biochem.* **59**:497-542
- Mckay, D.B. and Steitz, T.A. (1981) Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å  
resolution suggests binding to left-handed B-DNA *Nature* **290**:744-749
- Miller, J. H. (1972) *Experiments in molecular genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory Press,  
Cold Spring Harbor, New York)
- Mock, M., Crasnier, M., Duflot, E., Dumay, V. and Danchin, A. (1991) Structural functional  
relationships between *Pasteurella multocida* and Enterobacterial adenylate cyclases *J.Bacteriol.*  
**173**:6265-6269
- Monod, J. (1942) *Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes* Hermann et Cie, Paris.
- Mori, K. and Aiba, H. (1985) Evidence for negative control of *cya* transcription by cAMP and  
cAMP receptor protein in intact *Escherichia coli* cells *J.Biol.Chem.* **260**:14838-14843
- Morita, T., Shigesada, K., Kimizuka, F. and Aiba, H. (1988) Regulatory effect of a synthetic CRP  
recognition sequence placed downstream of a promoter *Nucl.Acids.Res.* **16**:7315-7332
- Muettner, M.J., Spitz, E. and Rickenberg, H.V. (1973) Cyclic Adenosine 3',5'-monophosphate in  
*Escherichia coli* *J.Bacteriol.* **14**:1068-1073
- Nelson, S.O., Scholte, B.J. and Postma, P.W. (1982) phosphoenolpyruvate : Sugar  
phosphotransferase system-mediated regulation of carbohydrate metabolism in *Salmonella*  
*typhimurium* *J.Bacteriol.* **150**:604-615
- Nelson, S.O. Schuitema, R.J. and Postma, P.W. (1986) The phosphoenolpyruvate : glucose  
phosphotransferase system of *Salmonella typhimurium* *Eur.J.Biochem.* **154**:337-341



- Ninfa, A.J., Ninfa, E.G., Lupas, A.N., Stock, A., Magasanik, B. and Stock, J. (1988) Crosstalk between bacterial chemotaxis signal transduction proteins and regulators of transcription of the Ntr regulon : Evidence that nitrogen assimilation and chemotaxis are controlled by the common phosphotransfer mechanism *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **85**: 5492-5496
- Novotny, M.J., Frederickson, W.L., Waygood, E.B. and Saier, Jr.,M.H. (1985) Allosteric regulation of glycerol kinase by III<sup>glc</sup> of the phosphotransferase systems in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* *J.Bacteriol.* **162** : 810-816
- Osumi, T. and Saier, Jr., H. (1982) Regulation of lactose permease activity by the phosphoenolpyruvate : Sugar phosphotransferase system : Evidence for direct binding of the glucose-specific enzyme III to the lactose permease *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **79**:1457-1461
- Pastan, I. & Adhya, S. (1976) Cyclic adenosine 5'-monophosphate in *Escherichia coli* *Bacteriol.Rev.* **40**:527-551
- Perlman,R.L.,Crombrugghe,B.D. and Pastan,I. (1969) Cyclic adenosine monophosphate in bacteria *Nature* **223**:810-812
- Peterkofsky, A. and Gazdar, C. (1971) Glucose and the metabolism of adenosine 3',5'-monophosphate in *Escherichia coli* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **68**:2794-2798
- Peterkofsky, A. and Gazdar, C. (1972) Interaction of enzyme I of the phosphoenolpyruvate : Sugar phosphotransferase systems with adenylate cyclase of *Escherichia coli* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **72**:2920-2924
- Peterkofsky, A. and Gazdar, C. (1974) Glucose inhibition of adenylate cyclase in intact cells of *Escherichia coli* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **71**:2324-2328
- Peterkofsky, A. Harwood, J. and Gazdar, C. (1975) Inducibility of sugar sensitivity of adenylate cyclase of *E.coli* B *J.Cyclic.Nucl.Res.* **57**:379-386
- Plumbridge, J. (1998) Control of the expression of the *manXYZ* operon in *Escherichia coli* : Mlc is a negative regulator of the mannose PTS. *Mol.Microbiol.* **27**:000-000
- Potter, K., Chalonner-Larsson, G. and Yamazaki, H. (1974) Abnormally high rate of cyclic AMP



- excretion from an *Escherichia coli* mutant deficient in cyclic AMP receptor protein  
*Biochem.Biophys.Res.Commun.* **57**:379-385
- Postma, P.W., Epstein, W., Schuitema, A.R.J. and Nelson, S.O. (1984) Interaction between III<sup>glc</sup>  
of the phosphoenolpyruvate : Sugar phosphotransferase system and glycerol kinase of  
*Salmonella typhimurium* *J.Bacteriol.* **158** : 351-353
- Postma, P.W., Lengeler, J.W. and Jacobson, G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate : Carbohydrate  
phosphotransferase systems of bacteria *Microbiol.Rev.* **57**:543-594
- Presper, K.A., Wong, C.Y., Liu, L., Meadow, N.D. and Roseman, S. (1989) Site-directed  
mutagenesis of the phosphocarrier protein, III<sup>glc</sup>, a major signal-transducing protein in  
*Escherichia coli* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **86**: 4052-4055
- Reddy, P., Peterkofsky, A. and Mckenny, K. (1985) Translational efficiency of the *Escherichia coli*  
adenylate cyclase gene : mutating the UUG initiation codon to GUG or AUG results in  
increased gene expression *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **82**:5656-5660
- Reddy, P., Meadow, N. and Mckenny, K. (1985) Reconstitution of regulatory properties of adenylate  
cyclase in *Escherichia coli* extracts *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **82**:8300-8304
- Reddy, P., Peterkofsky, A. and Mckenny, K. (1989) Hyperexpression and purification of  
*Escherichia coli* adenylate cyclase using a vector designed for expression of lethal gene  
products *Nucl.Acids.Res.* **17**:10473-10488
- Robertis Jr., E.M.D., Judewicz, N.D. and Torres, H.N. (1973) On the control of bacterial growth  
by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate *Biochem.Biophys. Res. Commun.* **55** : 758-764
- Roy, A., Danchin, A., Joseph, E. and Ullman, A. (1983) Two functional domains in adenylate  
cyclase of *Escherichia coli* *J.Mol. Biol.* **165**:197-202
- Russell, C.B., Thaler, D.S. and Dahlquist, F.W. (1989) Chromosomal transformation of  
*Escherichia coli* *recD* strains with linear plasmids *J.Bacteriol.* **171**:2609-2613
- Saier, Jr. M. H., Simoni, R.D. and Roseman, S. (1970) The Physiological Behavior of Enzyme I  
and Heat-stable Protein Mutants of a Bacterial Phosphotransferase System *J.Biol.Chem.* **245** :



- Saier, Jr. M. H., Simoni, R.D. and Roseman, S. (1976) Sugar transport (Properties of mutant bacteria deficient in proteins of the phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system) *J.Biol.Chem.* **251**: 6584-6597
- Saier, Jr., H., Feucht, B.U. and Hofstadter, L.J. (1976) Regulation of carbohydrate uptake and adenylate cyclase activity by the enzyme II of the phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system in *Escherichia coli* *J.Biol.Chem.* **240**:1309-1314
- Saier, M.L., Jr. (1989) Protein phosphorylation and allosteric control of inducer exclusion and catabolite repression by the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar transferase system *Microbiol.Rev.* **53**:109-120
- Saier, Jr. M. H. and Reizer, J. (1992) Proposed uniform nomenclature for the proteins and protein domains of the bacterial phosphoenolpyruvate : Sugar phosphotransferase system *J.Bacteriol.* **174**:1433-1438
- Saier, M.L., Jr., Ramseier, T.M, & Reizer, J. (1995) in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : *Cellular and Molecular Biology* eds. F. Neidhardt, F., Curtis, R., III, Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K. et al. (Am. Soc. Microbiol., Washington, DC), pp.1325-1343.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*, Second edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)
- Stark, M.J.R. (1987) Multiple copy expression vectors carrying the *lac* repressor gene for regulated high-level expression genes in *Escherichia coli* *Gene* **51**:255-267
- Sutrina S. L., Cin, A. M., Esch, F. and Saier, Jr. M. (1988) Purification and Characterization of the Fructose-inducible HPr-like protein, FPr, and the fructose-specific enzyme III of the phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system of *Salmonella typhimurium* *J.Biol.Chem.* **263** : 5061-5069
- Suzuki, T., Ito, A., Ichihara, S. and Mizushima, S. (1987) Characterization of the *sppA* gene



- coding for protease IV, a signal peptidase of *Escherichia coli* *J.Bacteriol.* **169**:2523-2528
- Thorner, L.K., Fandl, J.P. and Artz, S.W. (1990) Analysis of sequence elements important for expression and regulation of the adenylate cyclase gene (*cya*) of *Salmonella typhimurium* *Genetics* **125**:709-717
- Wanner, B.L. (1983) Overlapping and separate controls on the phosphate regulon in *Escherichia coli* K-12 *J.Mol. Biol.* **166**:283-308
- Waygood, E.B., Mattoo, R.L., and Peri, K.G. (1984) Phosphoproteins and the phosphoenolpyruvate : Sugar phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* : Evidence for III<sup>Mannose</sup>, III<sup>Fructose</sup>, III<sup>Glucitol</sup>, and the phosphorylation of enzyme II<sup>Mannitol</sup> and enzyme II<sup>N-Acetylglucosamine</sup> *J. Cell. Biochem.* **25** : 139-159
- Wayne, P.K. and Rosen, O.M. (1974) Cyclic Adenosine 3',5'-monophosphate in *Escherichia coli* during transient and catabolite repression *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **71**:1436-1440
- Weber, I.T. and Steiz, T.A. (1984) Model of specific complex between catabolite gene activator protein and B-DNA suggested by electrostatic complementarity *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **81**:3973-3977
- Winans, S.C. Elledge, S.J., Krueger, J.H. and Walker, G.C. (1985) Site-directed insertion and deletion mutagenesis with cloned fragments in *Escherichia coli* *J.Bacteriol.* **161**:1219-1221
- Worthylake, D., Meadow, N.D., Roseman, S., Liao, D., Herzberg, O., and Remington, J. (1991) Three-dimensional structure of the *Escherichia coli* phosphocarrier protein III<sup>glc</sup> *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **88**: 10382-10386
- Wylie, D., Stock, A., Wong, C.-Y. and Stock, J. (1988) Sensory transduction in bacterial chemotaxis involves phosphotranfer between Che proteins *Biochem.Biophys. Res. Commun.* **151** : 891-896
- Yang, J.K. and Epstein, W. (1983) Purification and characterization of adenylate cyclase from *Escherichia coli* K-12 *J.Biol.Chem.* **258**:3750-3758



## 謝辞

本研究を行なうにあたり、実験及び論文作製に御指導をしていただきました名古屋大学理学部教授饗場弘二博士に感謝します。博士課程前期課程の時に御指導して頂き、後期課程においても常に活発に議論していただきました名古屋大学理学部助手の稲田利文博士に感謝します。有益な討論と御助言をしてくださいました名古屋大学理学部助手の田上英明先生に感謝します。研究室の環境維持に勤めてくださいました名古屋大学理学部技官の小川和子氏に感謝します。名古屋大学理学部第一講座の皆様にも感謝します。

抗IIA<sup>Glc</sup>抗体を御供与していただきました共同研究者のオランダ Amsterdam 大学教授 P.Postma 博士に感謝します。

常に活発な議論をしていただき、また、殊に研究室のコンピューター関連の環境維持に努めて頂き、酒にも付き合ってくださいました安倍裕順氏に感謝します。いろいろな実験手法を教えてください、相談にのって頂いた柳沢達男氏に感謝します。

最後に今まで温かく支えてきてくれた私の両親に深く感謝します。



## 副論文

Takahashi, H., Inada, T., Postma, P. and Aiba, H. (1998) CRP down-regulates adenylate cyclase activity via a reduction in the phosphorylation state of IIA<sup>Glc</sup> in *Escherichia coli*  
*Mol.Gen.Genet.* in press

## 参考論文

- 1) Inada, T., Takahashi, H., Mizuno, T. and Aiba, H. (1996) Down regulation of cAMP production by cAMP receptor protein in *Escherichia coli* : an assesment of the contributions of transcriptional and posttranscriptional control of adenylate cyclase *Mol.Gen.Genet.* **253**:198-204
- 2) Kimata, K., Takahashi, H., Inada, T., Postma, P. and Aiba, H. (1997) cAMP receptor protein-cAMP plays a crucial role in glucose-lactose diauxie by activating the major glucose transporter gene in *Escherichia coli* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **94** : 12914-12919
- 3) Y. Yamamoto, H. Aiba, T.Baba, K.Hayashi, T.Inada, K.Isono, T.Itoh, S.Kimura, M.Kitagawa, K.Makino, T.Miki, N.Mituhashi, H.Mori, S.Nakade, Y. Nakamura, H. Nashimoto, T.Oshima, S. Oyama, N. Saito, G. Sampei, Y.Saitoh, S.Sivasundaram, H.Tagami, H. Takahashi, J.Takeda, K.Takemoto, K.Uehara, C. Wada, S. Yamagata and T. Horiuchi : Construction of a Contiguous 874-kb Sequence of the *Escherichia coli* -K12 Genome Corresponding to 50.0-68.8 min on the Linkage Map and Analysis of Its Sequence Feature.*DNA RESEARCH* **4** : 91-113 (1997)