

名古屋大学大学院理学研究科博士課程学位論文

主論文

大腸菌グルコース応答の分子機構

名古屋大学 大学院理学研究科 生命理学専攻

学籍番号 469703083 木全 恵子

①

報告番号	甲第	4256	号
------	----	------	---

名古屋大学大学院理学研究科博士課程学位論文

主論文

大腸菌グルコース応答の分子機構

名古屋大学 大学院理学研究科 生命理学専攻

学籍番号 469703083 木全 恵子

## 目次

概略	3
序章	6
1) グルコース効果とカタボライト抑制	7
2) PTS 系と inducer exclusion	10
3) cAMP receptor protein (CRP)	12
4) グルコース効果における問題点と本研究の目的	13
Figures	16
第 I 章 大腸菌グルコース効果における CRP-cAMP の役割	19
1. 要旨	20
2. 序論	21
3. 実験材料、方法	23
4. 結果	26
5. 考察	31
Figures, Tables	34
第 II 章 大腸菌グルコーストランスポーター遺伝子 <i>ptsG</i> の転写制御における グルコース誘導性転写制御因子 Mlc の役割	44
1. 要旨	45
2. 序論	46
3. 実験材料、方法	48
4. 結果	54
5. 考察	61
Figures, Tables	64
終章 今後の課題と展望	77
Figures	81
参考文献	82
副論文、及び、参考論文	95
謝辞	96

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

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

概略

大腸菌は外界にグルコースが存在する場合、グルコースを優先的に代謝し、他の糖の代謝を抑制する。この現象はグルコース効果と呼ばれている。グルコース・ラクトース共存下におけるグルコースの *lac operon* 発現抑制は、グルコース効果の典型である。

従来、グルコース・ラクトース系のグルコース効果は、グルコースによる細胞内 CRP-cAMP 低下作用が主因であるとされていた(cAMP モデル)。しかし、本研究室において CRP-cAMP の定量等の解析を行った結果、グルコース・ラクトース系ではグルコースによる CRP-cAMP 低下作用は殆ど無いこと、グルコースによる PTS 系を介したラクトース取り込み阻害(inducer exclusion)によってグルコース効果が生じることが判明した。以上から、cAMP モデルが成立しないことが証明された。

しかし新たに、CRP-cAMP はグルコースによる低下作用以外にグルコース効果制御機構にどのような役割を果たしているのかという問題が提起された。

そこで、本研究では CRP-cAMP 非依存性の転写活性を有する *lac promoter* 変異 *lac L8UV5* を利用し、inducer exclusion における CRP-cAMP の寄与を解析した。*lac L8UV5* 変異株をグルコース・ラクトース培地で培養した場合、*lac L8UV5* 変異株はグルコースによる強い *lac operon* の発現抑制と二段階生育(ジオーキシー)を示した。しかし、inducer exclusion 作用機構を不活性化した場合、このグルコース効果は解除された。これらの結果は上述した本研究室の解析と一致する。さらに、*crp* や cAMP 合成酵素遺伝子 *cya* を破壊した場合、*lac L8UV5* 変異株ではグルコース効果が解除された。Northern blotting による解析から、*crp* または *cya* 欠損下においてグルコース主要取り込みタンパク質遺伝子 *ptsG* の発現が低下していることが判明した。また、*ptsG* を有するマルチコピープラスミドを導入した場合、CRP-cAMP 欠損によって解除されていたグルコース効果が相補された。以上から、CRP-cAMP は、*ptsG* の発現制御を介して、グルコース・ラクトース系のグルコース効果の主因である inducer exclusion に必須な役割を果たしていることが判明した。

さらに、本研究ではグルコース効果における *ptsG* 発現制御系の重要性に着目し、*ptsG* 発現におけるグルコースの寄与を解析した。その結果、northern blotting による解析から、グルコースによる *ptsG* 転写誘導が見出された。さらに、*ptsG* promoter 領域をマルチコピープラスミドで導入した場合、*ptsG* 転写誘導の解除が観察され、*ptsG* 転写制御系において CRP-cAMP 以外のグルコース誘導性転写制御因子の関与が示唆された。そこで、本研究では mini Tn10 挿入変異を用いてグルコース誘導解除変異株の screening を行った。得た変異株の解析から、このグルコース誘導性転写制御因子が Mlc であることが判明した。Mlc は NagC とホモロジーの高い転写制御因子であることが近年明らかにされている。分離精製した Mlc を用いて *ptsG* の *in vitro* 転写を行った結果、*ptsG* の転写は CRP-cAMP によって活性化され、Mlc によって抑制されることが判明した。また、DNase I footprinting による解析から、*ptsG* promoter における CRP-cAMP の結合領域(結合中心、-40.5bp、-95bp)と Mlc の結合領域(結合中心、-8bp、-175bp)を同定した。同時に、Mlc は-8bp に存在する Mlc operator に結合し、*ptsG* promoter における RNA polymerase の結合を阻害することが判明した。

以上から、本研究によって、グルコース効果に重要な役割を果たす *ptsG* の転写は、CRP-cAMP による正の制御とグルコース誘導性転写制御因子 Mlc による負の制御を受けることが明らかとなった。

## 序章

### 1) グルコース効果とカタボライト抑制

多くの微生物は環境変化に対して、発現する遺伝子パターンを変化させることによって速やかに対応している。この微生物の環境応答の代表例として、大腸菌のグルコース効果(または、グルコース抑制)が挙げられる。大腸菌は、外界にグルコースとそれ以外の炭素源が存在した場合、グルコースを優先的に利用し、他の炭素源の代謝系遺伝子の発現を抑制する。このようなグルコースによる抑制現象をグルコース効果(または、グルコース抑制)と総称している。大腸菌におけるグルコース効果の研究は主に *lac operon* 発現系を中心に行われた。

このグルコース効果の最も典型的な例として、大腸菌の二段階生育(ジオーキシ)が知られている。この現象は1940年代に Monod らによって報告された(Epstein et al., 1966; Saier and Reizer, 1994)。グルコース・ラクトースの2つの炭素源を含む培地で大腸菌を培養した場合、培地中のグルコースは  $\beta$ -galactosidase 等のラクトース代謝酵素をコードする *lac operon* の発現を抑制する。この抑制は、培地中に存在するグルコースが全て代謝されるまで行われる。そして、培地中のグルコースが全て代謝されると、大腸菌の生育は一時的に停止する。その間に *lac operon* が発現し、大腸菌はラクトース代謝により再び増殖を開始する。その結果、大腸菌の生育は、グルコースをエネルギー源とする生育とラクトースをエネルギー源とする生育からなる二段階生育(ジオーキシ)を示す(Figure 0-1.(A); Epstein et al., 1966; Loomis, Jr. and Magasanik, 1967; Inada et al., 1996)。

また、ジオーキシ以外のグルコース効果に関する現象として transient 抑制とカタボライト抑制が知られていた(Saier, JR. et al., 1996)。Lac repressor を不活性化した大腸菌にグルコースを添加した場合、グルコース添加後20分から30分間(約0.5世代)に一時的な *lac operon* の発現抑制が観察される(Figure 0-1.(B)(Ishizuka et al., 1993))。このグルコースによる一過的な *lac operon* の発現抑制は transient 抑制と呼ばれる。

transient 抑制後、*lac operon* の発現はグルコースが消費されるまで比較的緩やかな抑制を受ける(Figure 0-1.(B)(Ishizuka et al., 1993))。この抑制は permanent 抑制と名付けられた。permanent 抑制は、グルコース-6-リン酸、グルコン酸添加によっても引き起こされることが報告されている(Tyler et al., 1969)。また、permanent 抑制に関しては、グルコース代謝系酵素の一つであるグルコース-6-リン酸脱水素酵素の欠損株において抑制が解除されることが判明した(Hsie and Rickenberg, 1967; Tyler et al., 1969)。以上から、permanent 抑制にはグルコース代謝産物(カタボライト)が関与していると考えられ、これ以降、permanent 抑制はカタボライト抑制と称されるようになった。(このカタボライトの実体は未だに明らかにされていない。)これら2つの *lac operon* の発現抑制はいずれも *lac operon* 転写段階に作用することが明らかにされている(Moses and Prevost, 1966; Perlman and Pastan, 1968; Tyler and Magasanik, 1969)。

初期のグルコース効果の解析は、主にカタボライト抑制の機構解析を中心に展開した。1965年にそれまで脊椎動物のホルモン仲介物質として知られていた cyclic 3'5'-AMP(cAMP)が大腸菌に存在することが Makman と Sutherland らによって報告された(Makman and Sutherland, 1965)。併せて、大腸菌において、細胞内 cAMP 濃度がグルコースによって低下することが判明した(Makman and Sutherland, 1965; Epstein et al., 1975; Ullman and Monod, 1968)。また、1969年に Perlman と Pastan らによって、transient 抑制、カタボライト抑制が cAMP 添加によって解除されることが報告された(Perlman et al., 1969)。これらの報告から、カタボライト抑制が細胞内 cAMP 濃度低下作用を介した抑制であることが判明した。

さらに、このカタボライト抑制の解析過程において、cAMP と結合し、転写制御を行うタンパク質、cAMP receptor protein (CRP)が1970年 Perlman と Pastan らのグループ(Emmer et al., 1970)と Zubay と Beckwith らのグループ(Zubay et al., 1970)によって同定された。生化学的、遺伝学的解析から、CRP は cAMP と結合し、*lac operon* を始めとする多くの糖代謝系遺伝子の転写を正に制御することが明らかとなった

(Saier, JR. et al., 1996)。また、1993年に Ishizuka らによって、カタボライト抑制は cAMP 添加のみによって完全には解除されず(Figure 0-1.(B); Wanner et al., 1978)、さらに CRP 発現量を増加することによって完全に解除されることが報告された(Ishizuka et al., 1993)。この結果から、CRP 自身も cAMP と同様にグルコースによる細胞内濃度低下作用を受けることが明らかとなった(3)参照、Ishizuka et al., 1993; Tagami et al., 1995; Saier, JR. et al., 1996)。

以上から、カタボライト抑制機構は、グルコースによる細胞内 CRP、cAMP 濃度の低下によって、正の転写制御因子 CRP-cAMP の量的低下を引き起こし、*lac operon* 等の発現を抑制すると考えられた(Saier, JR. et al., 1996)。尚、transient 抑制に関しては、cAMP 添加のみで完全に解除されること(Perlman and Pastan, 1968)、PTS系(序章2)参照)によって取り込まれるグルコース代謝性アナログ  $\alpha$ -methylglucoside の添加によって誘導される(Perlman and Pastan, 1968; Yang et al., 1979)ことから PTS 系の関与が示唆されている。Saier らのグループはグルコース添加による大腸菌の急激な cAMP 細胞外放出を報告しており(Saier, Jr. et al., 1975)、transient 抑制との関連性が示唆されている。

一方先述したグルコース・ラクトース系のジオーキシーについて、グルコース・ラクトース培地に cAMP を添加した場合、大腸菌の生育パターンはジオーキシーを示さないことが1968年に Ullmann & Monod らによって報告された(Ullman and Monod, 1968)。これは、上述したカタボライト抑制機構がグルコース・ラクトース系のグルコース効果に関与する証拠として位置づけられた。

このように、初期のグルコース効果の解析は、*lac operon* の発現に必須な正の転写制御因子である CRP-cAMP の発見や CRP-cAMP 濃度低下作用の発見を導いた。これらの経緯から、グルコース・ラクトース系のグルコース効果はグルコースによる細胞内 CRP-cAMP 濃度低下作用による現象であるという cAMP モデルが提唱されるようになった。



## 2) PTS系と inducer exclusion

グルコースによる *lac operon* の発現抑制機構として、細胞内 CRP-cAMP 濃度低下作用の解析が行われる一方、細胞内へのグルコース取り込み機構や *lac operon* の inducer であるラクトースの細胞内取り込みについて遺伝学的な解析が行われていた。その結果、phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system (PTS) を介したラクトースの細胞内取り込み阻害(inducer exclusion)が、グルコースによる *lac operon* の発現抑制に関与することが判明した(Saier, Jr. et al., 1996)。

PTS系はリン酸基の転移と糖の取り込みが共役した機構であり、1964年に Kundigらによって初めて報告された(kundig et al., 1964)。このPTS系の概略図を Figure 0-2. に示す(Roseman and Meadow, 1990; Saier and Reizer, 1994; Postma et al., 1996)。

このPTS系において最初のリン酸基供与体となるのは、細胞内に存在する phosphoenolpyruvate (PEP)である。まず、PEPからリン酸基がPTS酵素の一つである enzyme I (EI)に転移される。次に、リン酸化された EI-P から、リン酸基がPTS酵素 histidine-phosphorylatable protein (HPr)に転移される。この EI、HPr はPTS系を介して取り込まれるグルコース、マンノース、マニトールなどの糖(PTS sugar)に共通したタンパク質である。尚、PTS sugar であるフルクトースはフルクトース特異的な HPr タンパク質 fructose-specific histidine-phosphorylatable protein (FPr)に伸介される。さらに、リン酸化された HPr-P は各PTS sugar 特異的なPTS酵素 enzyme II (EII)にリン酸基を転移する。EII はPTS sugar 特異的な permease 成分とリン酸基供与成分を有しており、ドメイン若しくは複数の酵素から形成されている。PTS sugar は、各EIIの permease 成分を介して細胞内へ取り込まれ、同時に各EIIのリン酸基供与成分からリン酸基を供与される。これらのEIIは、各機能間の相同性から順に、HPr-P から最初にリン酸基を供与される成分を有する親水性ドメイン(若しくは酵素)IIA、二番目にリン酸基を転移される親水性ドメイン(若しくは酵素)IIB、膜チャネルや糖結合に関与する

疎水性ドメイン(若しくは酵素)IICと分類される。

例えばグルコースの場合、EII は  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ 、 $\text{IICB}^{\text{Glc}}$  から形成される。グルコースは permease である  $\text{IICB}^{\text{Glc}}$  から細胞内に取り込まれる。HPr-P は  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  にリン酸基を供与する。生じた  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  は取り込まれたグルコースにリン酸基を供与し、グルコース-6-リン酸を形成させる。尚、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  は多くのPTS sugar の取り込みに関してEIIのリン酸基供与成分として機能することが判明している。

HPr、EI は *ptsHI* 遺伝子にコードされる。*ptsHI* 変異株は殆どの糖において生育しないことが知られていた。しかし、*ptsHI* 変異株にさらに  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  をコードする遺伝子 *crr* (carbohydrate repression resistance)変異を導入した場合、ラクトース、グリセロール、マルトース、メリビオースなどの一部の糖において、生育が回復することが報告された。以上から、上述したこれらの糖は、その取り込みがPTS系非依存的に行われること、また、 $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  によって細胞内への取り込みが阻害されることが判明し、class I non-PTS sugar として分類された。class I non-PTS sugar の細胞内への取り込みは非リン酸化型  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  によって阻害される。この阻害機構に関しては、生化学的解析や遺伝学的解析から、ラクトースの場合は lactose permease LacY に、グリセロールの場合は glycerol kinase GlpK(Lin, 1987)にそれぞれ  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  が結合し、活性を阻害することが明らかとなっている(Hoischen et al., 1996; Osumi and Saier, 1982; Novotny et al., 1985)。このようにグルコースを始めとするPTS sugar は、その取り込みによって生じた非リン酸化型  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  によって class I non-PTS sugar の細胞内への取り込み、資化を阻害する。この機構は inducer exclusion と称されるようになった。

しかし、一方で、class I non-PTS sugar と異なり、*ptsHI crr* 変異株においても生育が回復しない炭素源(キシロース、ガラクトース等)が存在した。これらは class II non-PTS sugar と分類されている。class II non-PTS sugar における *ptsHI* 変異株の生育は cAMP を添加することによって回復することが報告された。さらに、*ptsH* 変異株や *crr* 変異株において細胞内cAMP濃度の低下が観察された(Levy et al., 1990; Feucht and Saier, Jr.,

1980)。これはリン酸化型  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  が cAMP 合成酵素の活性化因子であることを示唆している。以上から、PTS sugar 存在下ではその取り込みによって細胞内のリン酸化型  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$  濃度を減少させ、cAMP 合成酵素の活性を低下させると解釈された。これは、グルコース等の PTS sugar 存在下では細胞内 cAMP 濃度が低下することと一致している。

### 3) cAMP receptor protein (CRP)

cAMP receptor protein (CRP)は大腸菌の代表的な転写制御因子であり、最も生化学的な解析が進んだタンパク質の一つである(Aiba et al., 1982; Kolb et al., 1993)。

CRP は、209 アミノ酸からなる分子量 23,619 のサブユニット 2 個によって形成される。この CRP の機能は、protease 部分分解による解析(Krakow and Pastan, 1973; Eilen et al., 1976; Aiba and Krakow, 1981)や三次元結晶解析(Mckay and Steitz, 1981)から、N 末端ドメインに cAMP 結合部位と 2 量体形成部位、C 末端ドメインに helix-turn-helix モチーフからなる DNA 結合部位を有することが判明している(Figure 0-3.(A); Aiba and Krakow, 1981; Mckay and Steitz, 1981; Müller-Hill, B., 1996)。

CRP は、1 分子につき 1 個の cAMP が結合することによって、アロステリックな構造変化を起こす。この CRP-cAMP 複合体は *lacP1*、*galP1*、*malT* promoter 等の標的 promoter DNA に結合し、各遺伝子の転写活性制御を行う(Tagami and Aiba, 1998; Busby and Ebright, 1994)。CRP-cAMP は promoter における CRP-cAMP 結合配列に関しては、多くの CRP-cAMP 制御 promoter の CRP-cAMP 結合配列から解析が行われた(Morita et al., 1988; Müller-Hill, B., 1996)。その結果、consensus CRP-cAMP 結合配列として、11bp の配列をユニットとする 22bp の palindrome 配列が見出された(Figure 0-3.(B))。

CRP 遺伝子 *crp* は大腸菌ゲノムの 74 分に位置している。*crp* の転写は CRP-cAMP autoregulation による転写制御を受けている。

まず、CRP-cAMP は *crp* の転写を抑制する(Botsford and Dexler, 1978; Aiba, 1983)。この負の autoregulation の機構を以下に示す(Figure 0-3.(C))。*crp* promoter の CRP-cAMP 結合部位、CRP site I に CRP-cAMP が結合する。この CRP site I と CRP-cAMP の結合によって、*crp* promoter と重複する逆向きの promoter、divergent promoter が活性化される(Okamoto et al., 1988; Hanamura and Aiba, 1992)。このため、*crp* promoter における RNA polymerase の結合が阻害され、*crp* の転写が抑制される。また、Hanamura らの *in vitro* の解析から、CRP、cAMP 濃度がさらに上昇すると、負の autoregulation が解除され、正の autoregulation が機能することが明らかにされた(Hanamura and Aiba, 1992)。この正の autoregulation において、CRP-cAMP は、*crp* promoter の上流に存在する CRP site II に結合し、*crp* promoter を活性化させる(Figure 0-3.(C))。さらに、Ishizuka らの *in vivo* の解析から、グルコースは、CRP site II を介した正の autoregulation を解除し、細胞内 CRP 量を低下させることが判明した(Ishizuka et al., 1994; Ishizuka et al., 1993; Tagami et al., 1995)。

このように細胞内 CRP 量は CRP-cAMP による負の autoregulation と正の autoregulation によって複雑に制御されている。

### 4) グルコース効果における問題点と本研究の目的

現在までの研究により、グルコース効果は上述した 2 つの作用機構、即ち、グルコースによる細胞内 CRP-cAMP 濃度の低下作用(カタボライト抑制)(Epstein et al., 1975; Saier, JR. et al., 1996)、及び、グルコースによる inducer exclusion 作用によって引き起こされることが明らかとなった(Postma et al., 1996)。

しかし、1)で述べたように、グルコース・ラクトース系のグルコース効果の制御機構については、*lac* operon の正の転写制御因子である CRP-cAMP の同定やカタボライト抑制の発見から提唱された cAMP モデルが現在常識化している(Saier, JR. et al.,

1996)。このため、グルコース・ラクトース系のグルコース効果における inducer exclusion 作用の寄与は殆ど検討されていなかった。

しかし近年、本研究室の Inada らのグループが、グルコース・ラクトース培地におけるグルコース効果について、グルコースによる cAMP 低下作用と inducer exclusion 作用の統合的な解析を行った。その結果、以下のことが新たに判明した(Inada et al., 1996)。

- 1) グルコース・ラクトース系において大腸菌の細胞内 cAMP 濃度はほぼ一定である。
- 2) Ullmann & Monod らの cAMP 添加実験(1)参照、Ullman and Monod, 1968)を追試した結果、cAMP 添加は二段階生育(ジオキシー)を見かけ上解除するが、グルコースによる *lac operon* の発現抑制は解除することは出来なかった。
- 3) 細胞内に cAMP が存在せず、cAMP 非依存性の活性型 CRP を有する  $\Delta cya crp^*$  変異株においてもグルコース・ラクトース共存下におけるグルコースの *lac operon* の発現抑制は存在する。
- 4) inducer exclusion 機能欠損株においては、グルコース・ラクトース共存下におけるグルコースの優先的代謝と *lac operon* の発現抑制は解除される。

従って、グルコース・ラクトース共存下におけるグルコース効果において、グルコースによる cAMP 低下作用は殆ど寄与しておらず、inducer exclusion 作用が中心的な役割を果たすことが明らかとなった(Inada et al., 1996)。

以上の結果から、従来の cAMP モデルは成立しないことが証明された。しかし、グルコースによる濃度低下作用以外に、CRP-cAMP がグルコース効果の情報伝達系・制御系においてどのような役割を果たすのか、あるいは全く寄与していないのかという問題が新たに提起される。

そこで、本研究では、グルコース効果に果たす CRP-cAMP の役割を明らかにするため、CRP-cAMP 非依存的な *lac operon* の転写を行う *lac L8UV5* 変異株を利用し、グルコースによる *lac operon* の発現抑制機構の解析を行った。その結果、CRP-cAMP

は IICB<sup>Glc</sup> の転写制御を介して inducer exclusion 作用に必須な役割を果たしていることが判明した(第 I 章)。さらに、本研究では、グルコース効果に関与する新しい因子としてグルコース誘導性転写制御因子 Mlc を見出した。本研究によって、Mlc は IICB<sup>Glc</sup> をコードする遺伝子 *ptsG* の repressor として機能することが明らかとなった(第 II 章)。

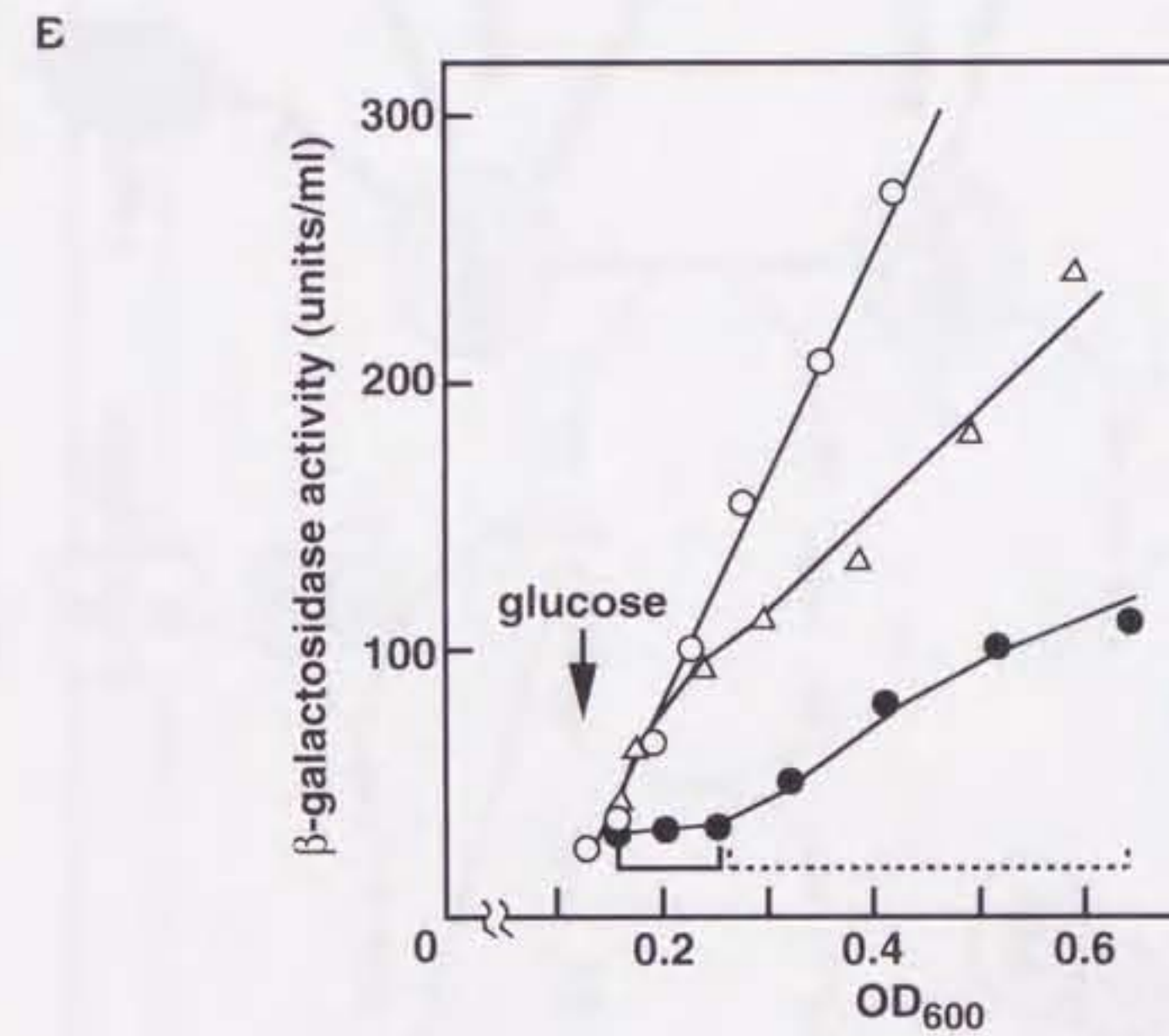
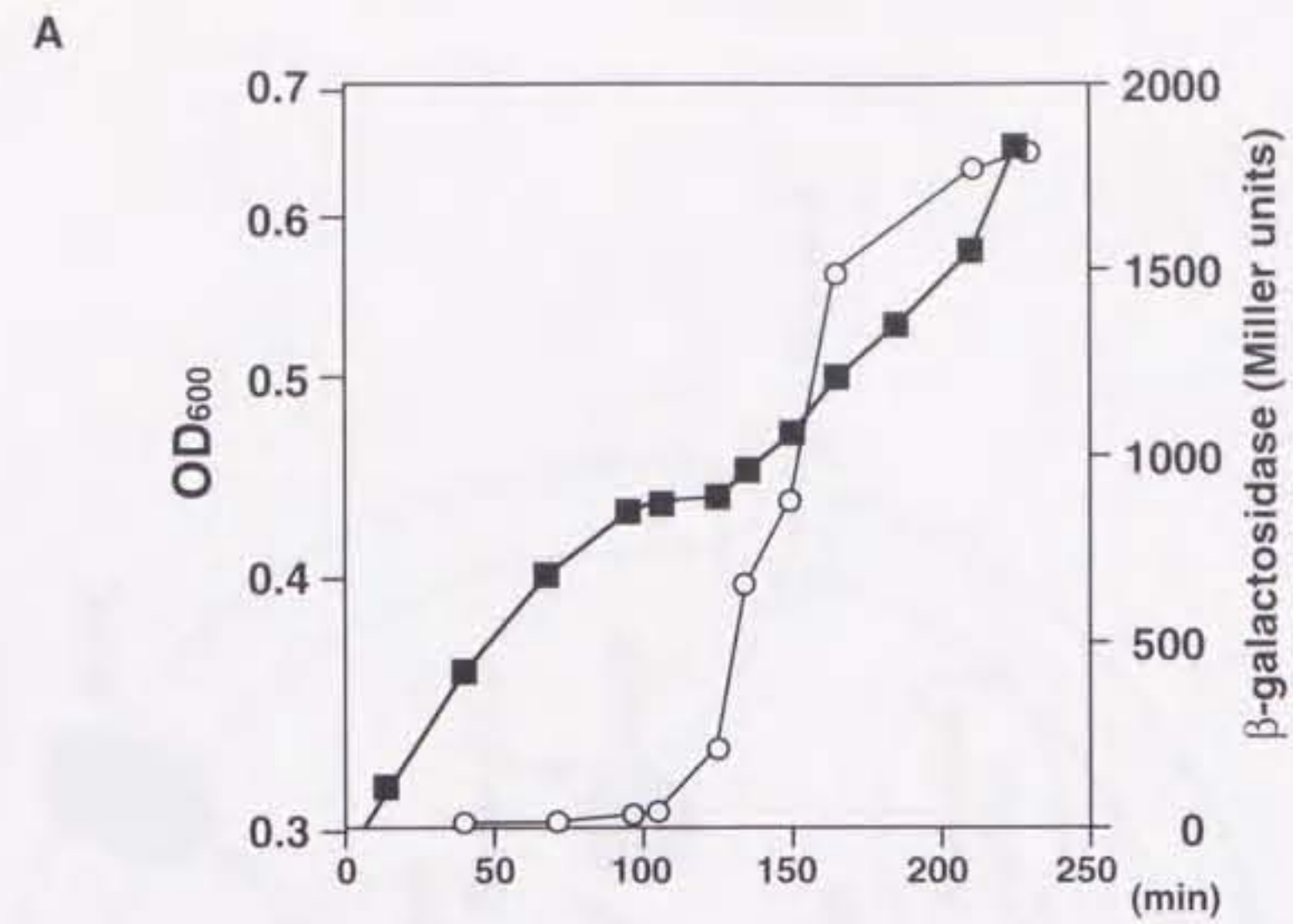


Figure 0-1. 大腸菌におけるグルコース効果

(A) グルコース・ラクトース共存下における大腸菌の二段階生育(ジオーキシー)と  $\beta$ -galactosidaseの発現抑制

野生型大腸菌を0.04%グルコース+0.2%ラクトース M9最小培地で培養した。大腸菌の生育を  $OD_{600}$  でモニタリングし(■)、 $\beta$ -galactosidaseの活性を測定した(○)。(Inada et al., 1996)

(B)  $\beta$ -galactosidase発現におけるtransient抑制とカタボライト抑制

野生型大腸菌pp6をLB培地で培養し、 $OD_{600}=0.1$ でIPTGを加えた(最終濃度0.5mM)。IPTG添加により *lac* repressorを不活性化した30分後に、菌体を3つに分け、LB培地(○)、LB+0.8%グルコース培地(●)、LB+0.8%グルコース+5mM cAMP培地( $\Delta$ )で培養した。大腸菌の生育を  $OD_{600}$  でモニターし、 $\beta$ -galactosidaseの活性を測定した。┌はtransient抑制、...はカタボライト抑制を示す。(Ishizuka et al., 1993)

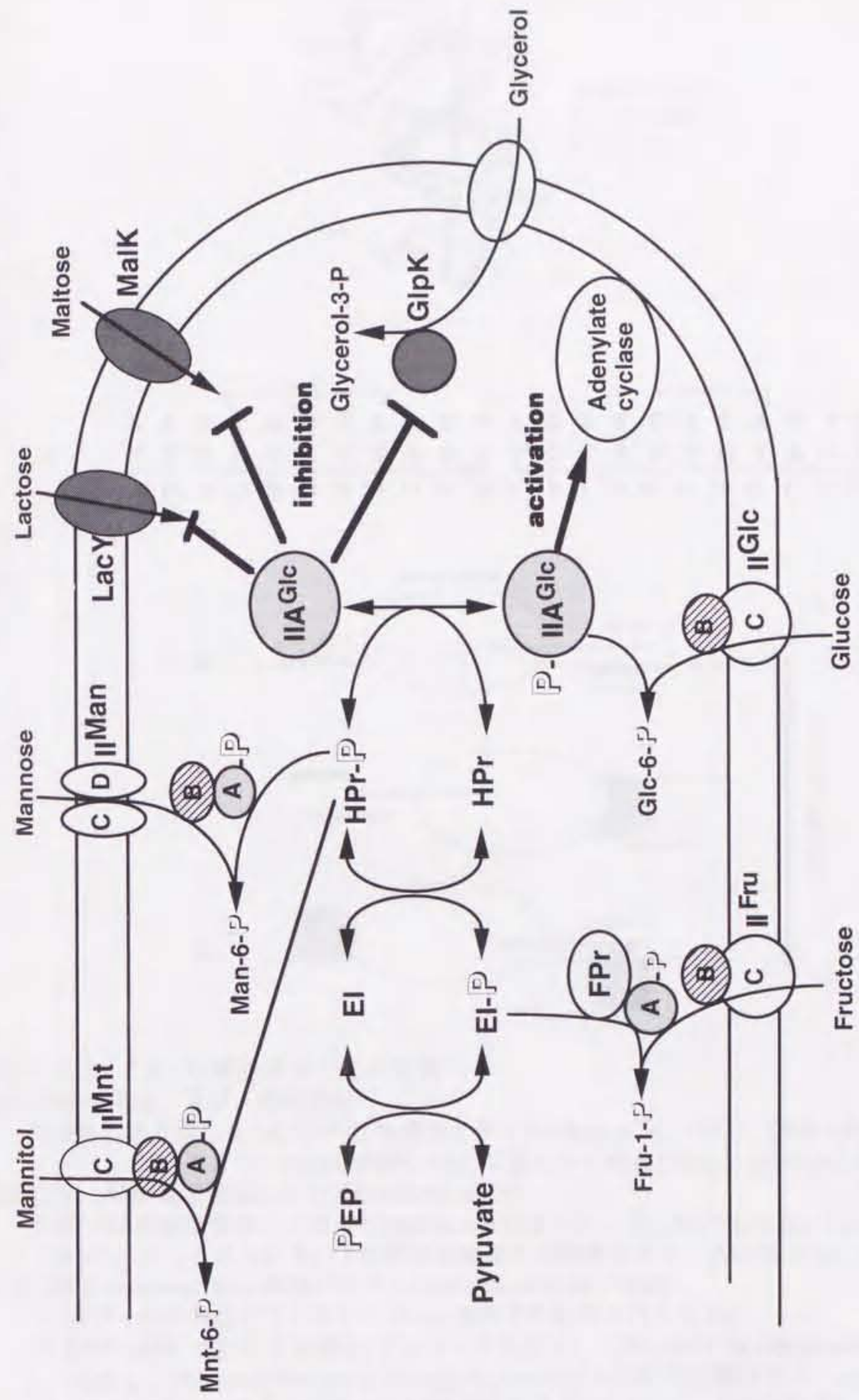
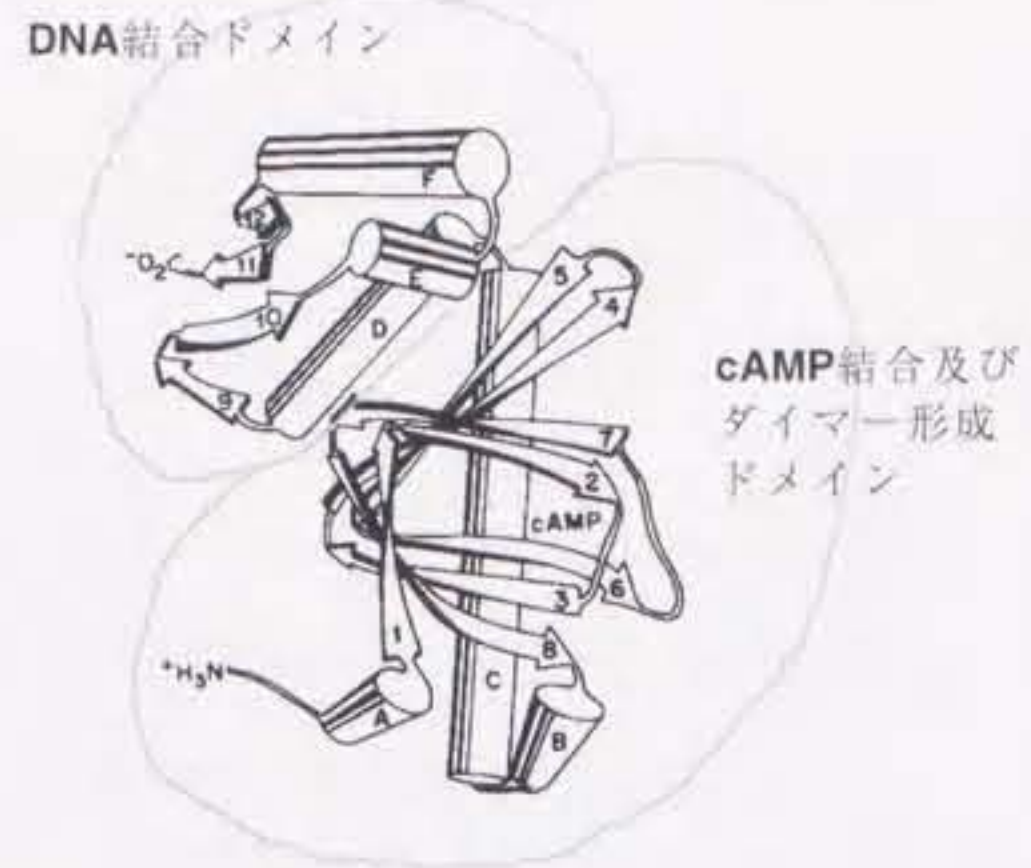
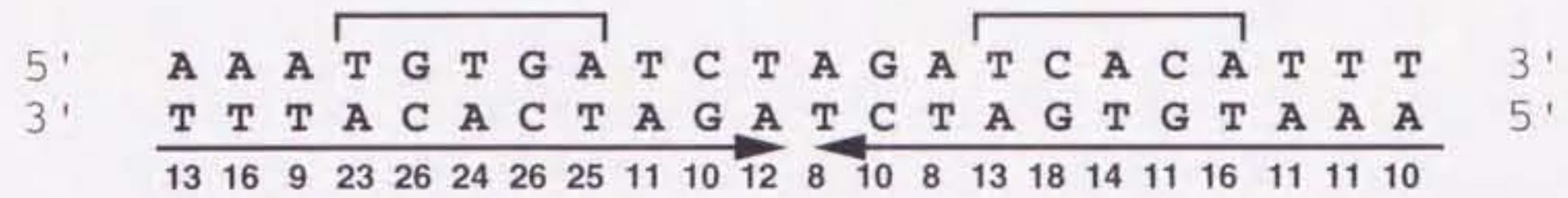


Figure 0-2. PTS系  
 Postmaらの総説(1996)を基に改変したPTS機構図を掲載する。太字のPはPTS系を介して転移されるリン酸基を示す。糖とリン酸基の転移は矢印→で表した。また、inducer exclusionによるラクトース等の取り込み阻害は太線で示した。リン酸化型IIA<sup>Glc</sup>によるcAMP合成酵素の活性化は太い矢印→で示した。(詳しくは序章2)参照)

A



B



C

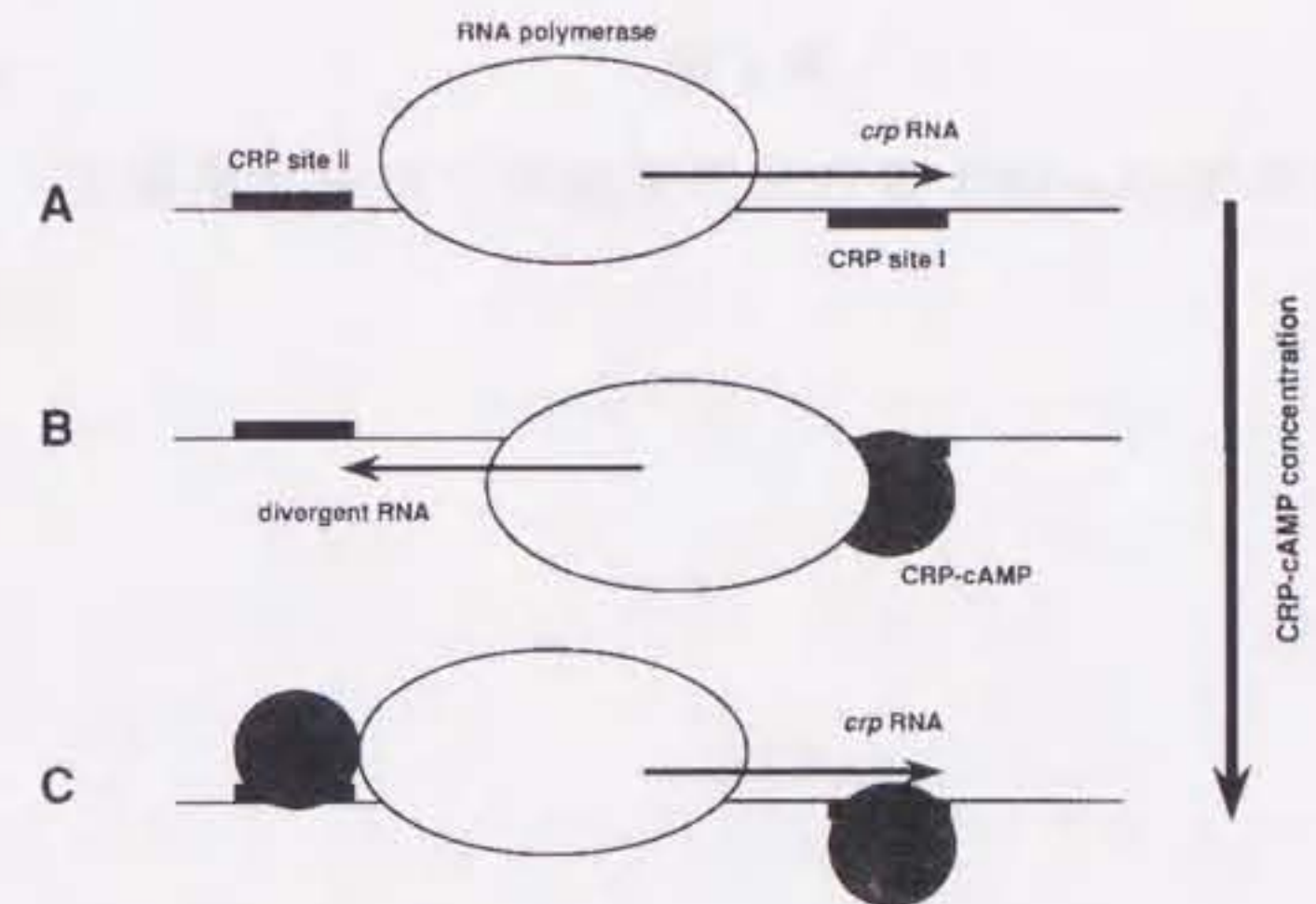


Figure 0-3. CRPの機能構造とその発現

(A) CRPの構造、及び、機能部位

X線解析等で得られたCRPの立体構造を示す(McKay et al., 1981)。CRP-cAMPのDNA結合ドメインのE、F 2つのhelixが標的DNAの二重らせん構造のmajor grooveに入り込む。

(B) CRP-cAMP結合部位におけるconsensus配列

CRP-cAMP結合部位におけるconsensus配列を示す。特に保存性の高いTGTGA(□)を含んだ11bpのユニットからなる。下の数字は塩基の出現数を示す。(Morita et al., 1988)

(C) CRPのautoregulation機構のモデル(Hanamura et al., 1992)

A; CRP-cAMP非存在下においては *crp* 遺伝子の転写が行われる。

B; CRP-cAMPが存在する場合(グルコース存在下)、CRP-cAMPは *crp* promoterのCRP site IIに結合し、RNA polymeraseはdivergent promoterから転写を開始する。*crp* 転写は抑制される。

C; Bよりもさらに多量のCRP-cAMPが存在する場合(グルコース非存在下)、CRP-cAMPはCRP site I、site IIに結合し、*crp* 転写を活性化させる。(本章3)参照



Figure 1.1: Schematic representation of the CRP-cAMP complex binding to DNA. The diagram shows a double-stranded DNA molecule with a CRP-cAMP complex bound to a specific site. The complex is represented by a shaded area, and the DNA is shown as two parallel lines. The binding site is indicated by a specific sequence of bases on the DNA.



The CRP-cAMP complex is a heterodimeric protein that binds to a specific DNA sequence, known as the CRP site. This binding is essential for the activation of the CRP-dependent promoter. The complex is formed by the binding of CRP to cAMP, which in turn binds to the CRP site on the DNA. The binding of CRP-cAMP to the DNA site is a reversible process, and the complex can be displaced by other proteins or by changes in the concentration of cAMP. The binding of CRP-cAMP to the DNA site is a key step in the regulation of gene expression in many bacterial species, including *E. coli*.

## 第 1 章

### 大腸菌グルコース効果における CRP-cAMP の役割

The CRP-cAMP complex is a heterodimeric protein that binds to a specific DNA sequence, known as the CRP site. This binding is essential for the activation of the CRP-dependent promoter. The complex is formed by the binding of CRP to cAMP, which in turn binds to the CRP site on the DNA. The binding of CRP-cAMP to the DNA site is a reversible process, and the complex can be displaced by other proteins or by changes in the concentration of cAMP. The binding of CRP-cAMP to the DNA site is a key step in the regulation of gene expression in many bacterial species, including *E. coli*.

The CRP-cAMP complex is a heterodimeric protein that binds to a specific DNA sequence, known as the CRP site. This binding is essential for the activation of the CRP-dependent promoter. The complex is formed by the binding of CRP to cAMP, which in turn binds to the CRP site on the DNA. The binding of CRP-cAMP to the DNA site is a reversible process, and the complex can be displaced by other proteins or by changes in the concentration of cAMP. The binding of CRP-cAMP to the DNA site is a key step in the regulation of gene expression in many bacterial species, including *E. coli*.

The CRP-cAMP complex is a heterodimeric protein that binds to a specific DNA sequence, known as the CRP site. This binding is essential for the activation of the CRP-dependent promoter. The complex is formed by the binding of CRP to cAMP, which in turn binds to the CRP site on the DNA. The binding of CRP-cAMP to the DNA site is a reversible process, and the complex can be displaced by other proteins or by changes in the concentration of cAMP. The binding of CRP-cAMP to the DNA site is a key step in the regulation of gene expression in many bacterial species, including *E. coli*.

## 1. 要旨

グルコース・ラクトース共存下における大腸菌の  $\beta$ -galactosidase の発現抑制はグルコース効果の典型例である。本研究では cAMP 受容タンパク質(CRP)-cAMP 複合体(CRP-cAMP)に非依存的な *lac operon* の転写を行う *lac L8UV5 promoter* 変異株のグルコース効果を解析した。

*lac L8UV5* 変異株をグルコース・ラクトース培地で培養した場合、*lac L8UV5* 変異株は、グルコース効果による強い  $\beta$ -galactosidase 発現抑制と二段階生育(ジオーキシー)を示した。しかし、このグルコース効果は、IPTG の添加や *crr* 遺伝子の破壊、*lactose permease* の大量発現などにより解除された。これらの結果は、既に野生型大腸菌について我々が明らかにしたように、グルコース・ラクトース共存下におけるグルコース効果が CRP-cAMP の細胞内濃度低下作用による現象ではなく、inducer exclusion による現象であることを示している。

さらに、*crp*、cAMP 合成酵素遺伝子 *cya* を破壊した場合、*lac L8UV5* 変異株のグルコース効果は解除された。Northern blotting による解析から、*crp* または *cya* 欠損下においてグルコースの主要な取り込みタンパク質遺伝子 *ptsG* の mRNA 量が低下していることが判明した。また、*ptsG* を有するマルチコピープラスミドを、*crp* または *cya* を欠損した *lac L8UV5* 変異株に導入した場合、グルコース効果の回復が観察された。

以上の結果から、CRP-cAMP は *ptsG* 転写制御を介して、グルコース・ラクトース系のジオーキシーの主因である inducer exclusion に必須な役割を果たしていることが明らかとなった。



## 2. 序論

多くの腸内細菌は、外界にグルコースと他の糖が複数存在する場合、グルコースを優先的に代謝し、他の糖の代謝を抑制する。この現象はグルコース効果と呼ばれ、微生物の環境応答の代表例である。

グルコース効果における他糖の代謝抑制は、多くの場合、その代謝酵素の転写制御因子を介して行われる。例えば大腸菌の *lac operon* の場合、グルコースは *lac operon* の負の制御因子 Lac repressor と正の制御因子 CRP-cAMP に転写抑制シグナルを伝える。現在までに明らかになったその抑制機構を以下に述べる。

第一に、グルコースは inducer であるラクトースの取り込みを阻害する。この結果、inducer 非結合型 Lac repressor の細胞内濃度が上昇し、*lac operon* の発現が抑制される。このグルコースによるラクトース取り込み阻害は inducer exclusion と呼ばれている。現在までの研究から、inducer exclusion は phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system (PTS) を介して行われることが判明している。グルコースは PTS を介して細胞内に取り込まれる。同時にグルコースは、PTS を構成する細胞内在性タンパク質、リン酸化型  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  からリン酸基を供与される。この時生じた非リン酸化型  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  は lactose permease に結合し、その活性を阻害する (Hoischen et al., 1996; Osumi and Saier, 1982)。この結果、inducer exclusion が行われる (Saier and Reizer, 1994; Postma et al., 1996)。

第二に、グルコースは細胞内 CRP、cAMP 濃度を低下させる。この現象は、グリセロール、コハク酸等で培養した大腸菌にグルコースを添加した場合に観察された (Perlman et al., 1969)。リン酸化型  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  は cAMP 合成酵素を活性化させることが報告されている (Levy et al., 1990; Feucht and Saier, Jr., 1980)。しかし、上述したようにグルコースはその取り込みの際にリン酸化型  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  の細胞内濃度を減少させる (Saier, Jr. and Reizer, J., 1994)。この結果、細胞内 cAMP 濃度は減少する (Saier and Reizer, 1994; Postma et al., 1996)。また、グルコースは *crp* 遺伝子の autoregulation を介して細胞内

CRP を減少させることが明らかにされている (Ishizuka et al., 1994; Ishizuka et al., 1993; Tagami et al., 1995)。

大腸菌をグルコース・ラクトース共存下で培養した場合、培地中のグルコースは *lac operon* の発現を抑制する。その結果、大腸菌の生育は、グルコースをエネルギー源とする生育と、ラクトースをエネルギー源とする生育からなる二段階生育 (ジオーキシー) を示す。グルコース効果の解析が *lac operon* の正の転写制御因子 CRP-cAMP の発見 (Perlman et al., 1969) と、グルコースによる細胞内 CRP-cAMP 低下作用の発見 (Makman and Sutherland, 1965; Ishizuka et al., 1993; Tagami et al., 1995; Saier, Jr. et al., 1996) につながった経緯から、このジオーキシーにおけるグルコース効果は、グルコースによる細胞内 CRP-cAMP の低下作用が主因であると考えられていた (cAMP モデル) (Ullman and Monod, 1968)。

しかし近年、本研究室において CRP、cAMP の定量を行い、このモデルの検証を行った結果、グルコース・ラクトース系における大腸菌の CRP-cAMP 濃度はグルコースによって低下しないことが明らかとなった。また、inducer exclusion 機能欠損株ではグルコース効果の解除が観察された。従って、グルコース・ラクトース共存下における大腸菌のグルコース効果は、グルコースによる細胞内 CRP-cAMP の低下作用によって引き起こされるのではなく、inducer exclusion 作用が主因であることが判明した (Inada et al., 1996)。

しかし、依然として、CRP-cAMP が、グルコースによる低下作用以外の機構によって、グルコース・ラクトース系におけるグルコース効果に何らかの役割を果たしている可能性は存在する。例えば、Lac repressor の抑制作用や PTS タンパク質の発現制御などに CRP-cAMP が関与している可能性が挙げられる。そこで、本研究では CRP-cAMP 非依存性 *lac promoter* 変異 (L8UV5) を用いて、inducer exclusion を介した *lac operon* の負の転写抑制機構における CRP-cAMP の寄与を解析した。

### 3. 実験材料、方法

#### 3-1. 本実験で用いた培地と培養条件

本実験では、培地は 0.001%チアミンを加えた M9 最小培地、または LB 培地を用いた。また、必要に応じて ampicillin (最終濃度 50  $\mu$ g/ml)、kanamycin (最終濃度 50  $\mu$ g/ml)、tetracycline (最終濃度 15  $\mu$ g/ml)を加えた。菌体は好氣的条件下において 37°Cで培養した。菌体の生育は波長 600 nmにおける吸光度でモニタリングした。

#### 3-2. 本実験で用いた大腸菌株とプラスミド

本実験で用いた大腸菌 K12 株、及びプラスミドは Table I-1.に示した。

KK8 は HT28 を donor とする P1 transduction によって作成した。KK15、KK17 は IT1409 を donor に用いて同様に作成した。KK20、KK21 はそれぞれ、IT1168、IT1199 を donor とする P1 transduction によって作成した。

pIT302 は以下のように構築した。pIT228(Inada et al., 1996)の *cya* 遺伝子を含む 3.6kb の BamHI-SalI 断片を pSTV28 にクローニングし、pIT298 を作成した。この pIT298 の BamHI-XhoI 断片と *bla* promoter と *cya* を有する pSE3 の BamHI-BamHI 断片を pACYC184 にクローニングした。また、Kohara のライブラリーから *ptsH*、*ptsI* を含む 4.8kb の HindIII-AccI 断片を pBR322 にクローニングし、pST51 を構築した。同様に、Kohara のライブラリーから *ptsG* を含む 3.2kb の SalI-SalI 断片を pSTV28 にクローニングし、pTSG-2 を構築した。pTH111 は、*ptsG* 遺伝子を含む 2.5kb の MluI-EcoRI 断片を pBR322 HindIII-EcoRI にクローニングした。*lacYA* を含む 6kb の EcoRI-PstI 断片を pBR322 にクローニングし、pIT539 を構築した。

#### 3-3. $\beta$ -galactosidase assay

$\beta$ -galactosidase の活性は Miller ら(Miller, 1972)の方法により測定し、Miller units で示した。培養液の OD<sub>600</sub> を測定し、その培養液 100  $\mu$ l を反応液(60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、40mM

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10mM KCl、1mM MgSO<sub>4</sub>、50mM  $\beta$ -mercaptoethanol、0.001%SDS、5%chloroform、pH7.0) 1ml に加え、攪拌した。この試料に基質(4mg/ml *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside、0.1N Na/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH7.5) 200  $\mu$ l を加え、28°Cで保温した。試料が黄色の呈色反応を示した時点で 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 500  $\mu$ l 加え、反応を停止させた。遠心(2.5krpm、5分、室温)後、上清の OD<sub>420</sub> を測定し、次式により Miller units を算出した。

$$\text{Miller units} = 10000 \times \text{OD}_{420} / \text{反応時間}(\text{min}) / \text{OD}_{600}$$

#### 3-4. 大腸菌 RNA の抽出

培養液を急冷し、直ちに遠心(3.5krpm、5分、4°C)により菌体を分画した。菌体を RNA buffer (0.5% SDS、20mM CH<sub>3</sub>COONa、10mM EDTA、pH5.5) 400  $\mu$ l に懸濁した。この懸濁液に RNA buffer 飽和フェノールを等量加え、65°Cで5分振蕩した。懸濁液を遠心(12krpm、5分、室温)後、上清にエタノールを加え遠心(12krpm、10分、4°C)し、RNA の沈殿を得た。この沈殿を 70%エタノールで洗浄した後、RNA buffer 400  $\mu$ l に溶解させ、再びエタノール沈殿を行った。この作業を二回行った後、沈殿を風乾させ、適量の RNA buffer に溶解した。

#### 3-5. DNA プローブの作成

プラスミド pTSG-2 を KpnI で切断し、低融点アガロースによって *ptsG* 構造遺伝子の一部を含む 574bp の KpnI-KpnI DNA 断片を分離、抽出した。この断片を鋳型として Random Primer DNA Labeling Kit (TaKaRa)を用いてインターナルラベルを行った。尚、標識に用いた dCTP は Amersham 社の [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (3000Ci/mmol)である。

#### 3-6. Northern Blotting

抽出した RNA 適量を deionized formamide 溶液(1×MOPS buffer、6.0% formaldehyde) に溶解した後、65°Cで5分間保温し、RNA を変性させた。このサンプルを急冷し、

色素混合液(50% glycerol, 0.1mg/ml B.P.B.)を加え、formaldehyde-MOPS-1% agarose gel(1×MOPS buffer, 6.0% formaldehyde)で電気泳動した。尚、泳動緩衝液には1×MOPS buffer を使用し、180V で電気泳動を行った。

泳動後、ゲル中の RNA をキャピラリーブロッティングによりナイロンメンブレン (Amersham 社, Hybond™-N<sub>+</sub>)に転写し、0.05M NaOHによる固定処理を行った。Blotting buffer には 20×SSC (3M NaCl, 0.3M sodium citrate)を用いた。

次に、100℃で変性させた Salmon Testis DNA (最終濃度 40 μg/ml)を含む hybridization 溶液 (0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, 0.1% BSA, 0.1% Ficoll™, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.5% SDS)に、RNA をブロッティングしたメンブレンを加え、65℃で1時間インキュベーションした。さらに、DNA プローブを加え、一晚メンブレンの hybridization を行った。

hybridization 後、メンブレンを 2×SSC-0.1%SDS (65℃、15分)、0.1×SSC-0.1%SDS (室温、5分)、0.1×SSC (室温、5分)で洗った。最後にメンブレンをサララップで包み、オートラジオグラフィーを行った。

## 4. 結果

### 4-1. *lac* L8UV5 変異株におけるジオ-キシーとグルコース効果

これまでの研究から、グルコース・ラクトース共存下におけるグルコース効果は、グルコースによる細胞内 CRP-cAMP 濃度低下による現象ではなく、グルコースによるラクトース(inducer)の取り込み阻害(inducer exclusion)による現象であることが明らかとなった。そこで、グルコース効果における inducer exclusion 作用をさらに分析するため、*lac* L8UV5 変異株 PR166 (Rockwell, P. and Gottesman, M.E., 1991)を利用した。

PR166 は *lacZYA* 欠損株に F'プラスミドにより *lac* L8UV5 promoter と *lacZYA* を導入した株である。L8 変異は *lac* promoter の CRP-cAMP 結合部位の変異であり、正の転写制御因子である CRP-cAMP の promoter 結合を阻害する。UV5 変異は *lac* promoter の-10領域の変異であり、L8 変異を suppress する (Figure I-1.; Müller-Hill, B., 1996; Wanner et al., 1977)。そのため、*lac* L8UV5 promoter は CRP-cAMP 非依存的な活性を有している (Silverstone et al., 1970; Dickson et al., 1977; Malan and McClure, 1984; Hudson and Fried, 1990)。この結果、*lac* L8UV5 promoter は、ラクトース取り込み阻害(inducer exclusion)を介した負の転写制御のみを受け (Figure I-2., 5., 6.)。

この *lac* L8UV5 変異を持つ大腸菌株 PR166 を用い、グルコース・ラクトース共存下における inducer exclusion 単独の作用を観察した。

Figure I-2.(A)に示すように0.04%グルコース・0.2%ラクトース培地における PR166 の生育と β-galactosidase 活性をモニタリングした結果、PR166 の生育は典型的な二段階生育(ジオキシー)と β-galactosidase 発現抑制パターンを示した。これは、CRP-cAMP 低下作用による *lac* operon の転写制御は、グルコース効果の主因ではないことを示している。

さらに、IPTG を添加して inducer exclusion 作用を解除した場合、グルコース・ラクトース共存下における典型的なジオキシーと β-galactosidase 発現パターンは観察

されなかった(Figure I-2.(B))。同様に、IIA<sup>Glc</sup>をコードする遺伝子 *err* の遺伝子破壊株 (Figure I-2.(C))や、lactose permease の大量発現株(Figure I-2.(D))の場合も、グルコース・ラクトース系におけるグルコース効果は解除されていた。

これらの結果、グルコース・ラクトース共存下における大腸菌のグルコース効果は inducer exclusion によって引き起こされることが確認され、グルコースによる CRP-cAMP 低下作用はグルコース効果に寄与しないことが明らかとなった。

#### 4-2. *lac* L8UV5 変異株のグルコース効果には CRP-cAMP が必須である。

次に、inducer exclusion を介した *lac* operon 発現抑制機構において CRP-cAMP が果たす役割を解析するため、PR166 の *crp*、*cya* の遺伝子破壊株を作成した。この PR166 *crp* 破壊株 KK17 のグルコース・ラクトース培地における生育と  $\beta$ -galactosidase 活性をモニタリングした結果、KK17 ではグルコース抑制の解除が観察された(Figure I-3.(A))。しかし、*crp* を保持するプラスミド pHA7 を KK17 に形質転換させたところ、グルコース効果は回復していた(Figure I-3.(B))。また、この現象は PR166 *cya* 破壊株においても観察された(Figure I-6.(B))。これらの結果から、inducer exclusion を介した *lac* operon の負の転写抑制機構において CRP-cAMP が必須な役割を果たしていることが明らかとなった。

#### 4-3. CRP-cAMP は直接 *lac* repressor 抑制作用を促進するのか？

4-2 に示したグルコース・ラクトース共存下における *lac* operon 転写抑制機構として、1)CRP-cAMP が直接 *lac* operator 上の Lac repressor 抑制作用に関与する場合、2)CRP-cAMP が inducer exclusion 機構を構成する PTS タンパク質(HPr、EI、IIA<sup>Glc</sup>、IICB<sup>Glc</sup>)の発現制御を介して間接的に寄与する場合が考えられた。

前者 1)については、既に、*in vitro* 系において CRP-cAMP 存在下では Lac repressor-*lac* operator の結合が促進されることが報告されていた(Hudson and Fried, 1990)。また、Lac repressor-*lac* operator を中心とする DNA loop 形成にも CRP-cAMP が関与するこ

とが知られていた。そこで、本研究では CRP-cAMP 存在下、非存在下における *lac* L8UV5 変異株の *lac* operon の発現抑制について検討を行った(Table I-2)。その結果、*crp* 破壊株 KK17 の  $\beta$ -galactosidase 活性は PR166 の場合よりも低いことが判明した。また、野生型 *lac* promoter を有する PR158 とその *crp* 破壊株 KK15 の場合も同様であった。これらは、*in vivo* においては野生型 *lac* promoter、L8UV5 *lac* promoter に関わらず、CRP-cAMP による Lac repressor 抑制作用が促進されることは無いことを示している。

#### 4-4. *ptsHI* の発現における CRP-cAMP の寄与はグルコース効果に影響しない。

次に後者 2)の仮説に基づき、inducer exclusion 機構を構成する PTS タンパク質(HPr、EI、IIA<sup>Glc</sup>、IICB<sup>Glc</sup>)の発現における CRP-cAMP の寄与に着目し、解析を行った。

これまでの研究から、いくつかの PTS タンパク質の発現に CRP-cAMP が関与することが知られていた。特にグルコースの取り込みとリン酸化に関与する PTS タンパク質、HPr、EI、IIA<sup>Glc</sup>について、それらの遺伝子である *ptsH*、*ptsI*、*err* が一つの operon (*pts* operon)を形成しており、*ptsH*、*ptsI* の転写は、CRP-cAMP によって数倍程度、促進されることが報告されていた(De Reuse and Danchin, 1991; De Reuse and Danchin, 1988; Ryu and Garges, 1994)。

また、*err* は *pts* operon 内に CRP-cAMP 非依存的に発現するプロモーターを有することが判明していた(De Reuse and Danchin, 1988)。本研究室においても western blotting 等によって、CRP-cAMP の有無に関わらず細胞内の IIA<sup>Glc</sup>量はほぼ一定であることが確認されている(データは示していない)。

そこで、PR166、PR166 *crp* 破壊株 KK17、PR166 *cya* 破壊株 KK8 について *ptsHI* の発現を northern blotting によって解析した(Figure I-4.(A)、Figure I-5.(A))。その結果、CRP-cAMP 非存在下では *ptsHI* mRNA 量の若干の減少が観察された。しかし、これ

らの遺伝子破壊株にプラスミド pST51 によって *ptsHI* をマルチコピーで導入した場合、多量の *ptsHI* mRNA が存在するにも関わらず、これらの株でのグルコース効果は回復しなかった(Figure I-5.)。

この結果から、CRP-cAMP は *ptsHI* の転写制御を介してグルコース効果を制御しているのではないことが判明した。

#### 4-5. CRP-cAMP は *ptsG* の発現に必須である。

*ptsG* は大腸菌の主要なグルコーストランスポーターである IICB<sup>Glc</sup> をコードする(Erni and Zanolari, 1986; Bouma et al., 1987)。この IICB<sup>Glc</sup> は IIA<sup>Glc</sup> と複合体を形成し、グルコースの選択的取り込みを行う。また、IICB<sup>Glc</sup>/IIA<sup>Glc</sup> のグルコース取り込み活性は、*crp*<sup>-</sup>、*cya*<sup>-</sup> 変異株では野生株に比べて低いことが報告されている(Rephaeli and Saier, 1980)。これは、*ptsG* の発現が CRP-cAMP によって制御されることを示唆している。しかし、その転写レベルにおける CRP-cAMP の寄与は全く解析されていなかった。

そこで本実験では、CRP-cAMP 存在下と非存在下における *ptsG* mRNA 量を northern blotting によって定量した(Figure I-4.(B)、 Figure I-6.(A))。その結果、*ptsG* mRNA は野生株では多量に発現していたが、*crp*、*cya* 欠損株では殆ど検出されなかった。また、これらの欠損株ではプラスミド pHA7、pIT302 による *crp*、*cya* の相補によって *ptsG* の発現を回復することができた。

以上のことから、*ptsG* の転写に CRP-cAMP が必須であることが明らかとなった。

#### 4-6. CRP-cAMP 非存在下における *ptsG* の発現低下は、

グルコース効果を解除する。

4-5 より CRP-cAMP 非存在下における L8UV5 変異株のグルコース効果の解除は *ptsG* の発現低下によるのではないかと考えられた。そこで、本実験ではそれぞれ *crp*、

*cya*、*ptsG* 欠損を有する KK17、KK8、KK20 におけるグルコース効果と *ptsG* 発現を比較した(Figure I-6.(A)、 Figure I-6.(B))。

0.5%グルコース・0.5%ラクトースを含む M9 最小培地で各菌体を培養し、OD<sub>600</sub>=0.6 で RNA 抽出と  $\beta$ -galactosidase assay のサンプリングを行った。その結果、northern blotting による解析では、*crp*、*cya*、*ptsG* 欠損株における *ptsG* mRNA が検出されなかった。同時に、グルコースによる *lac operon* 抑制は解除されていた。しかし、プラスミド pTH111 により *ptsG* をマルチコピーでこれらの遺伝子破壊株に導入した場合、多量の *ptsG* mRNA が検出され、グルコース効果も観察された。さらに、KK17 に pTH111 を形質転換した場合、0.04%グルコース・0.2%ラクトース培地における生育と  $\beta$ -galactosidase 活性をモニタリングした結果、典型的なジオーキシーとグルコースによる *lac operon* 抑制パターンの回復が観察された(Figure I-6.(C))。

以上の結果から、CRP-cAMP は *ptsG* の転写制御を介し、グルコース効果に必須な役割を果たしていることが明らかとなった。

## 5. 考察

グルコース・ラクトース共存下における大腸菌の *lac operon* の発現はグルコースによって抑制される。このため、グルコース・ラクトース培地では大腸菌の生育はジオキシーを示し、*lac operon* の発現は強い抑制パターンを示す(グルコース効果)。このグルコース効果は、従来、*lac operon* の正の転写因子である CRP-cAMP の細胞内濃度がグルコースによって低下するために生じると考えられていた(Ullman et al., 1968; Saier, JR. et al., 1996)。しかし、本研究室の Inada らの解析により、グルコース・ラクトース共存下では細胞内 CRP-cAMP 濃度の低下は殆どないことが明らかとなった。同時に、グルコースによる *lac operon* の強い抑制は inducer exclusion を介した Lac repressor の抑制作用が主因であることが判明した(Inada et al., 1996)。

本研究では CRP-cAMP 非依存性 *lac promoter* 変異(*lac L8UV5*)株を用い、この inducer exclusion を介したグルコース抑制機構において、CRP-cAMP が果たす新たな役割を解析した。

*lac L8UV5* 変異株は、グルコース・ラクトース共存下において典型的な *lac operon* 発現抑制パターンとジオキシーを示す(Figure I-2.(A))。しかし、IPTG 添加、*crr* 遺伝子の破壊、lactose permease の大量発現等によって inducer exclusion が解除された場合、グルコース効果は解除された(Figure I-2.)。これは上述した本研究室のこれまでの解析と一致している。さらに CRP-cAMP 非存在下においては、*lac L8UV5* 変異株の *lac operon* 発現抑制の解除が観察された(Figure I-3.(A)、Figure I-6.(B))。この結果から、グルコース・ラクトース共存下において、CRP-cAMP は inducer exclusion を介した Lac repressor の負の転写抑制機構に必須な役割を果たしていることが明らかとなった。

本研究で用いた培養条件では、CRP-cAMP が直接 *lac operator* における Lac repressor の抑制作用を促進する(Hudson and Fried, 1990)という *in vivo* でのデータは得られなかった。しかし、*in vivo* における CRP-cAMP と Lac repressor 間の作用によって、

CRP-cAMP と Lac repressor が互いに *lac operator* への結合を促進する可能性は存在する。これによって *in vivo* では、より速やかに *lac operon* 転写の開始/抑制が行われているのかもしれない。

さらに本研究では inducer exclusion を構成する PTS タンパク質の発現と CRP-cAMP の寄与に着目した。CRP-cAMP 依存性の発現を行う PTS タンパク質 HPr, EI, IICB<sup>Glc</sup> の遺伝子 *ptsH*, *ptsI*, *ptsG* についてそれぞれ解析を行った。

*ptsH*, *ptsI* は 1 つの operon (*pts operon*) を構成し、その転写は CRP-cAMP によって 2-3 倍程度しか増加しない(De Reuse and Danchin, 1991; De Reuse and Danchin, 1988)。従って、CRP-cAMP 欠損による *ptsHI* の発現低下が *lac L8UV5* 変異株のグルコース効果に及ぼす影響は小さいと推測された。これは *ptsHI* を有する pST51 による相補実験により確認された(Figure I-5.)。

*ptsG* の発現に関しては、CRP-cAMP がその転写に必須であることが本研究において明らかにされた(Figure I-6.(A))。 *ptsG* を有する pTH111 による相補実験から、この CRP-cAMP による *ptsG* 転写制御は *lac L8UV5* 変異株のグルコース効果に必須であることが判明した(Figure I-6.(B), (C))。

以上の結果から、CRP-cAMP は *ptsG* 発現を介し、inducer exclusion を制御することによって、グルコース効果に必須な役割を果たしていることが明らかとなった。この CRP-cAMP 制御モデルを Figure I-7. に示した。尚、IICB<sup>Glc</sup> 欠損下においてもグルコースは細胞内に取り込まれる。これはおそらく、IICB<sup>Glc</sup>/IIA<sup>Glc</sup> を介さない glucokinase 系(Fraenkel, 1993)など、グルコースとの親和性の低い取り込み系からわずかにグルコースを細胞内に取り込んでいると考えられる。(この系ではグルコースによる inducer exclusion は起こらないことが確認されている。)

*ptsG* 転写の正の転写制御因子 CRP-cAMP の細胞内濃度は、IICB<sup>Glc</sup> の基質であるグルコース非存在下では増加し、グルコース存在下では低下する。しかし、グルコース存在下、グルコース非存在下における大腸菌の *ptsG* mRNA 量を northern blotting

によって定量したところ、グルコース存在下ではグルコース非存在下に比べて多量の *ptsG* mRNA が検出された(第II章、Figure II-3.)。 *ptsHI* の発現においても同様にグルコース誘導があることが知られている(De Reuse and Danchin, 1991; De Reuse and Danchin, 1988; Ryu and Garges, 1994; Ryu, S. et al., 1995)。

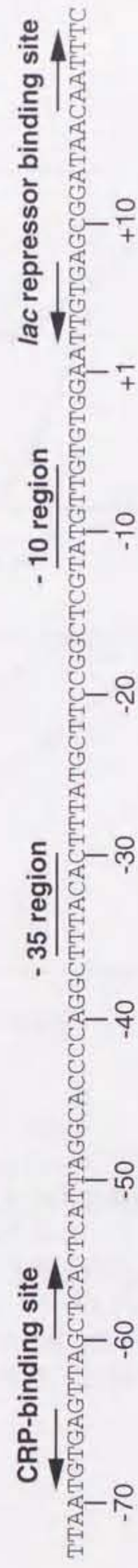
また、グルコースと同じ PTS-sugar に分類されるマンノース、Nag(N-acetylglucosamine)の permease は CRP-cAMP による転写制御の他にリプレッサー NagC による転写制御も受けることが知られている。このように permease の基質が inducer として発現制御に関与する例は非常に多い(Plumbridge and Kolb, 1991; Plumbridge, 1990; Postma et al., 1996)。

以上から、*ptsG* 転写制御機構について、CRP-cAMP による制御機構とは独立したグルコースによる誘導系転写制御機構の存在が推察された。このグルコース誘導性転写制御因子の検索は、inducer exclusion、総じてグルコース効果とその情報伝達機構の解明に重要であると考えられる。この転写制御因子の単離、解析は次章で行う。

Strain/ plasmid	Relevant genotype and property	Source
strain		
W3110	wild type	Laboratory stick
HT28	W3110 $\Delta cya::Kan$	This study
IT1409	W3110 $\Delta crp::Tet$	This study
IT1168	W3110 <i>ptsG::Tn5</i>	This study
IT1199	W3110 $\Delta crr::Kan$	This study
PR158	<i>galK2 str<sup>r</sup> sup<sup>0</sup> lacZYA21 F'plac<sup>+</sup></i>	Rockwell et al. (1991)
PR166	<i>galK2 str<sup>r</sup> sup<sup>0</sup> lacZYA21 F'placL8UV5LacZ</i>	Rockwell et al. (1991)
KK8	PR166 $\Delta cya::kan^r$	This study
KK15	PR158 $\Delta crp::kan^r$	This study
KK17	PR166 $\Delta crp::tet^r$	This study
KK20	PR166 <i>ptsG::Tn5</i>	This study
KK21	PR166 $\Delta crr::Kan$	This study
plasmid		
pHA7	Derivative of pBR322 containing a 4.3kb <i>HindIII</i> - <i>EcoRI</i> fragment carrying the <i>crp</i> gene	Aiba et al. (1982)
pIT228	Derivative of pBR322 containing a 4.3kb <i>EcoRI</i> - <i>SalI</i> fragment that carries the <i>cya</i> gene	Takahashi et al. (1996)
pIT298	Derivative of pSTV28 containing a 3.6kb <i>BamHI</i> - <i>SalI</i> fragment of pIT228	This study
pSE3	Derivative of pIT228 containing 5' portion of <i>cya</i> under the control of the <i>bla</i> promoter	Takahashi et al. (1996)
pIT302	Derivative of pACYC184 containing a 4.1kb <i>BamHI</i> - <i>XhoI</i> fragment of pIT298 and a 762bp <i>BamHI</i> - <i>BamHI</i> fragment of pSE3	This study
pST51	Derivative of pBR322 containing a 4.8kb <i>HindIII</i> - <i>AccI</i> fragment that carries the <i>ptsHI</i> gene	This study
pTSG-2	Derivative of pSTV28 containing a 3.2kb <i>SalI</i> - <i>SalI</i> fragment that carries the <i>ptsG</i> gene	This study
PTH111	Derivative of pBR322 containing a 2.5kb <i>MluI</i> - <i>EcoRI</i> fragment carrying the <i>ptsG</i> gene	This study
pIT539	Derivative of pBR322 containing a 6kb <i>EcoRI</i> - <i>PstI</i> fragment carrying the <i>lacY</i> gene	This study

Table 1-1. 本実験で用いた大腸菌とプラスミド

A. wild type *lac* promoter



B. *lac* L8UV5 mutant promoter



Figure 1-1. *lac* L8UV5 promoterの構造  
 野生型 *lac* promoter と *lac* L8UV5 promoter の構造を示す。*lac* L8UV5 promoter は CRP 結合領域に L8 変異を、  
 -10 領域に UV5 変異を有しており (矢印で示す)。CRP-cAMP 非依存性の転写活性を有する。



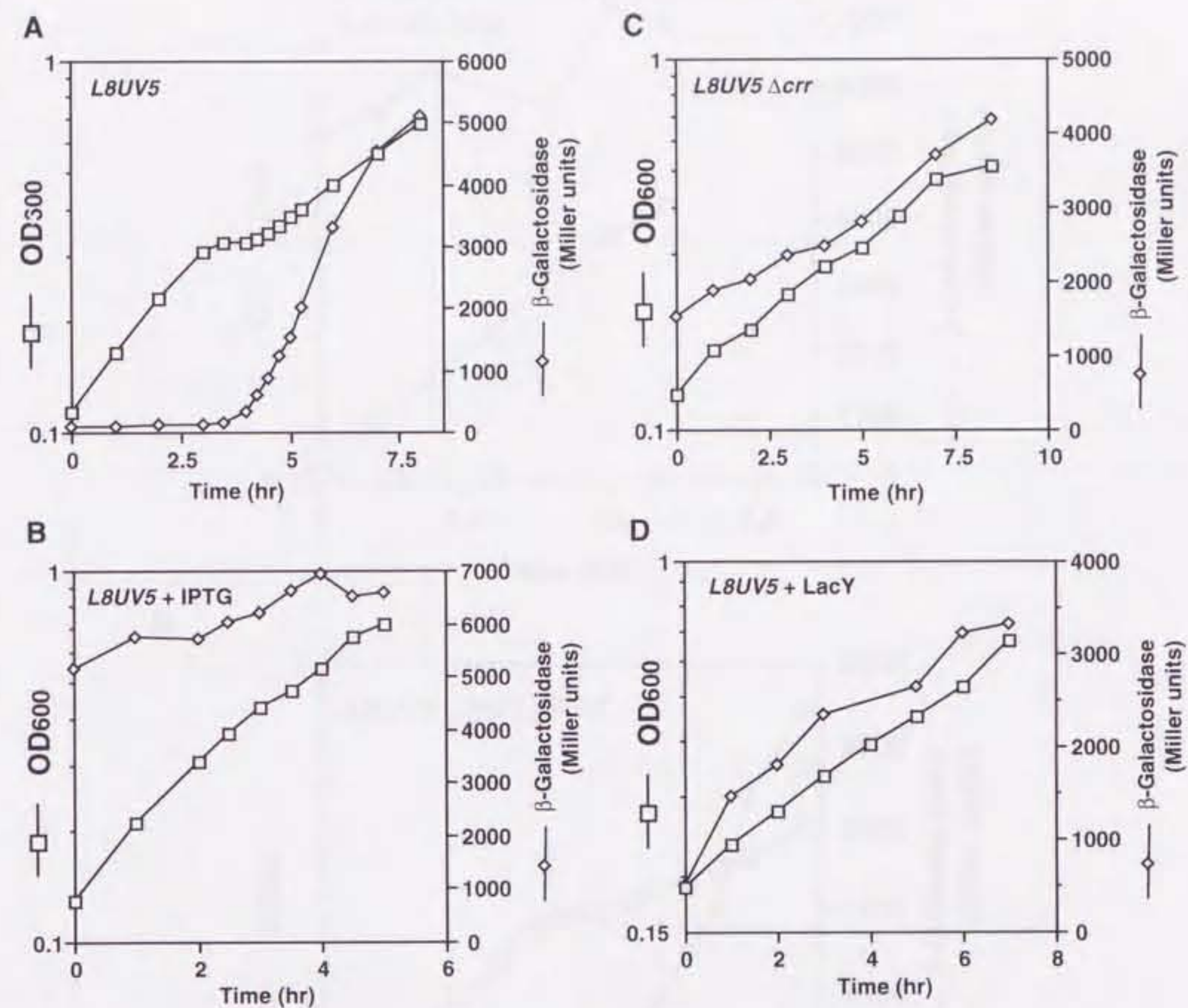


Figure 1-2. グルコース・ラクトース培地における *lac* L8UV5変異株の生育とβ-galactosidase 活性  
 0.04%グルコースと0.2%ラクトースを含むM9最小培地で菌体を培養した。菌体の生育をOD<sub>600</sub>でモニタリングした(□)。また、β-galactosidase 活性のモニタリングも行った(◇)。  
 (A) PR166; (B) PR166 (0.5mM isopropyl-β-D-thiogalactoside存在下で培養); (C) KK21; (D) pIT539を導入したPR166

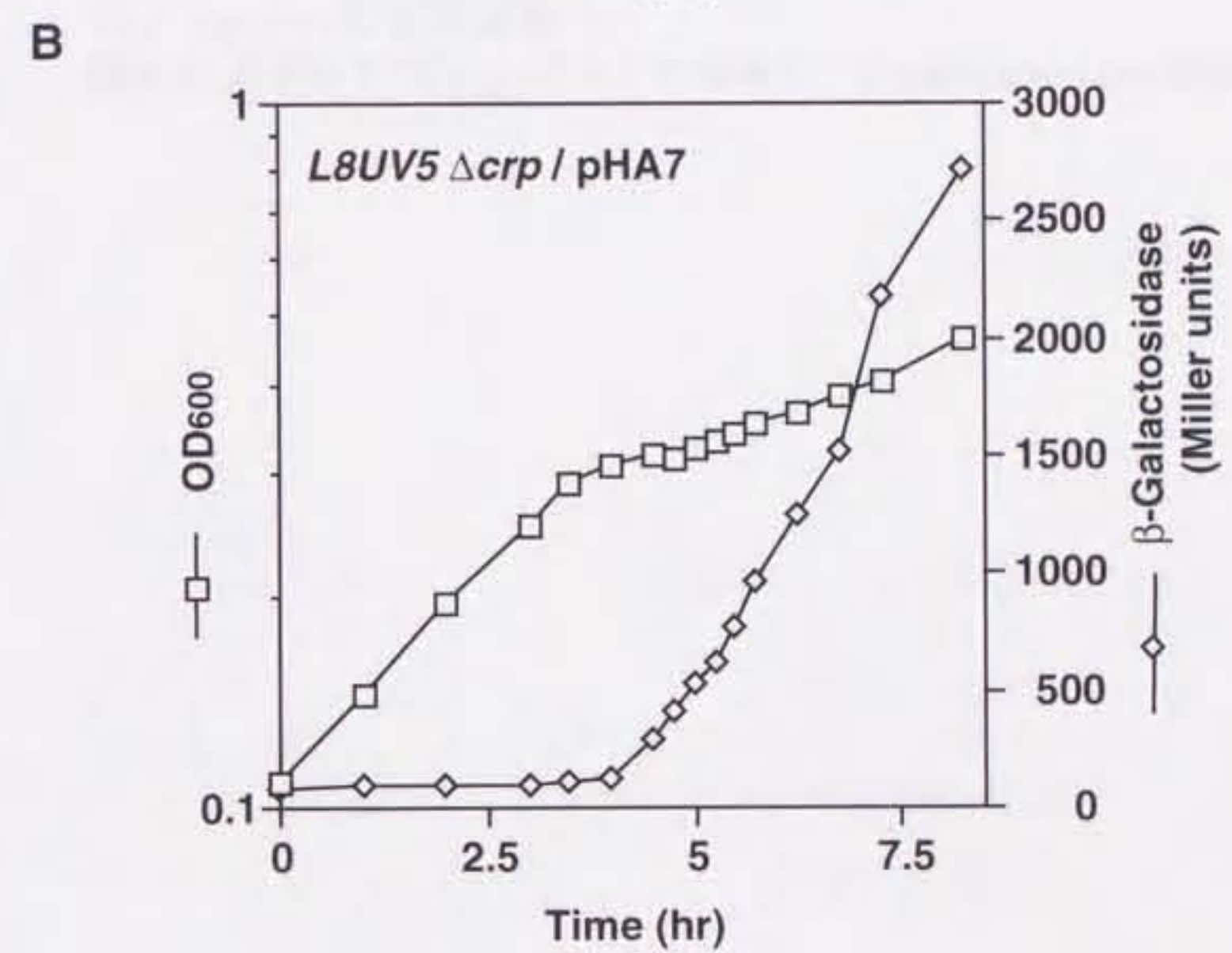
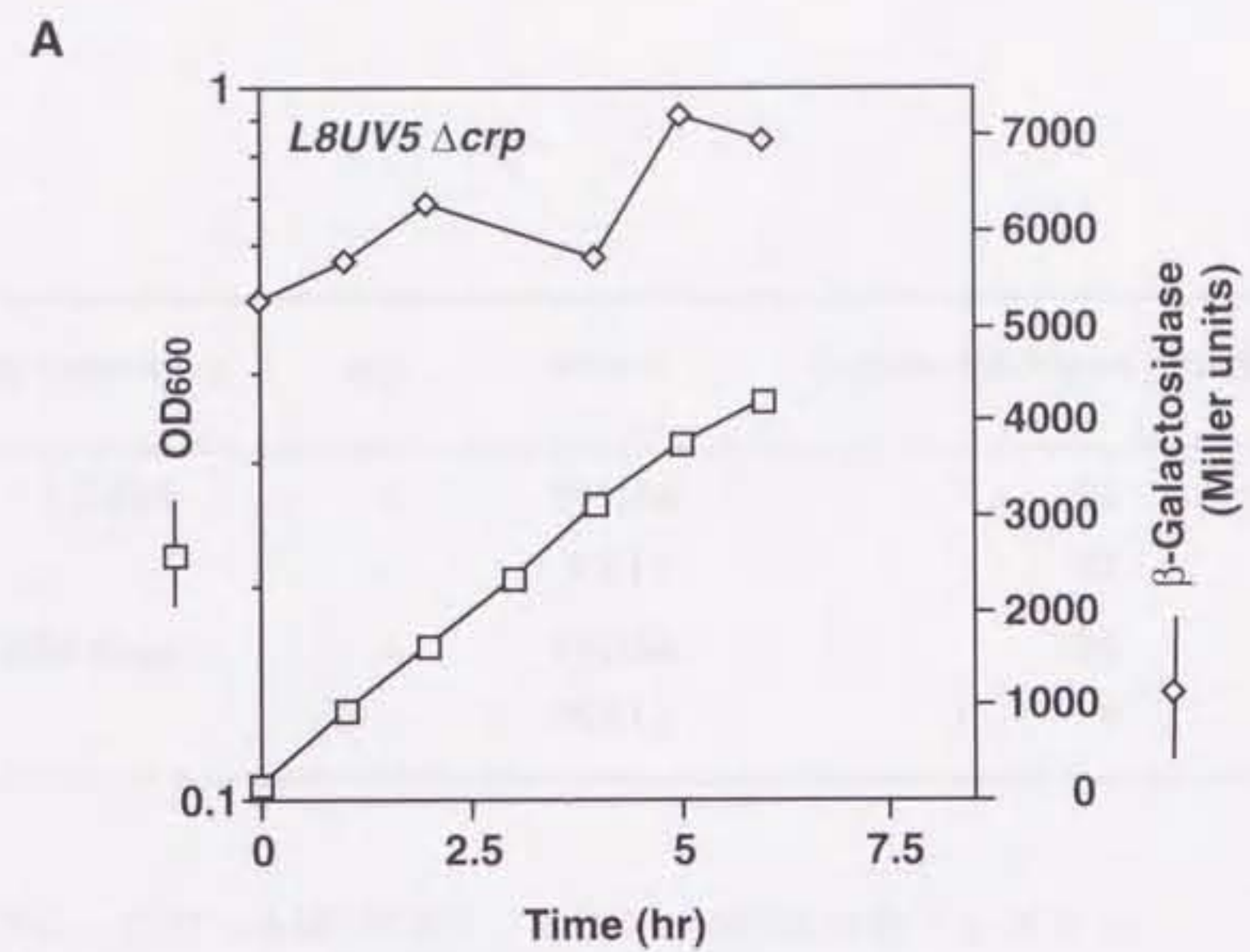


Figure 1-3. *lac L8UV5 Δcrp*変異株におけるグルコース効果  
 (A) KK17; (B) pHA7を導入したKK17  
 0.04%グルコースと0.2%ラクトースを含むM9最小培地で菌体を培養し、  
 OD<sub>600</sub>(□)、β-galactosidase 活性(◇)のモニタリングを行った。



<i>lac</i> promoter	<i>crp</i>	strain	$\beta$ -galactosidase activity
L8UV5	+	PR166	55
	-	KK17	37
wild-type	+	PR158	26
	-	KK15	6

Table 1-2. CRP-cAMP存在下、CRP-cAMP非存在下における *lac* operonの発現抑制  
菌体をLB培地でOD<sub>600</sub>=0.6まで培養し、 $\beta$ -galactosidase活性を測定した。

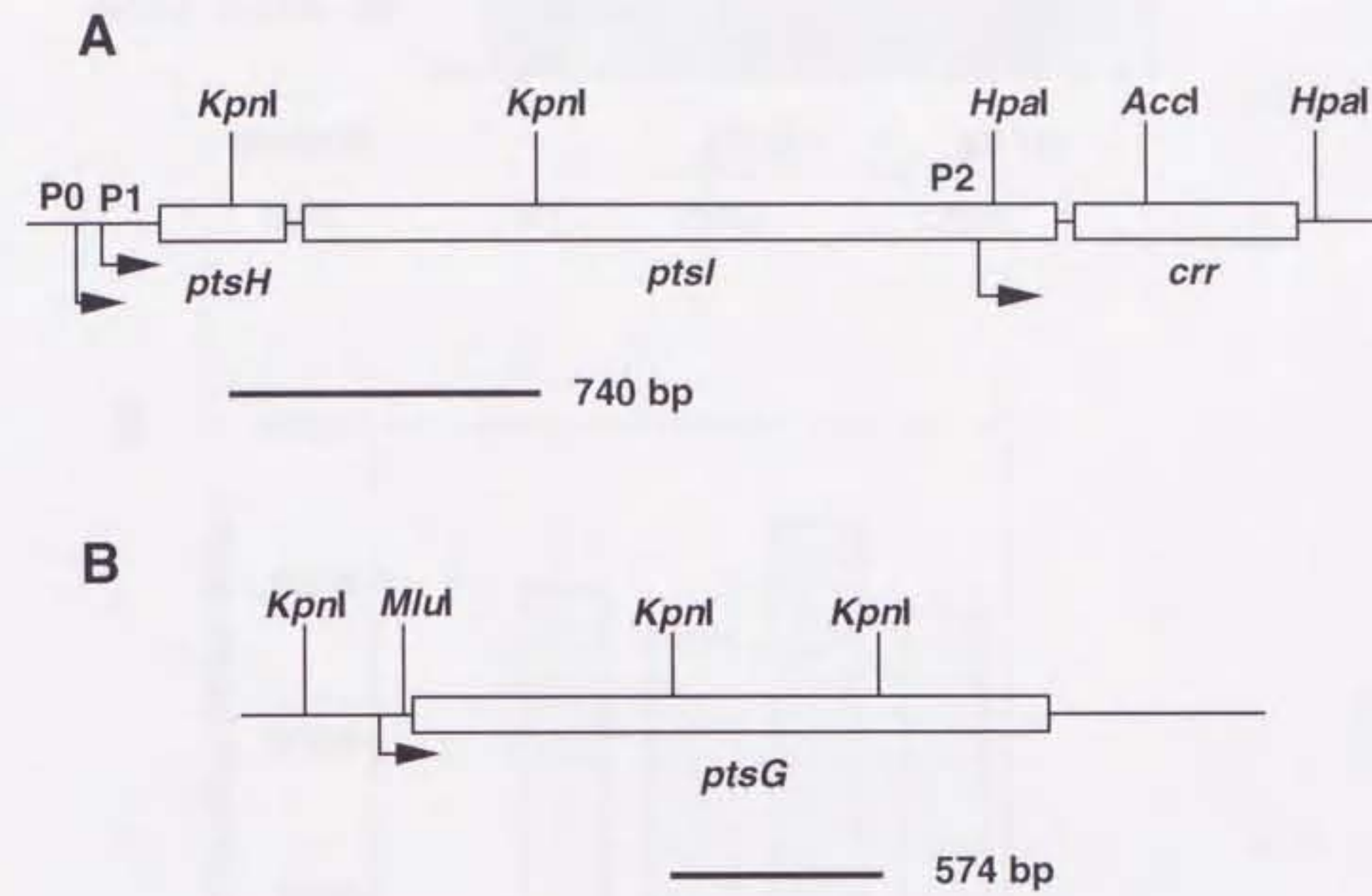


Figure 1-4. Northern blottingに用いたDNAプローブ  
*ptsH*、*crr*遺伝子(A)、及び*ptsG*遺伝子(B)の制限酵素切断部位と  
 Northern blottingに用いたDNAプローブ領域を示した。遺伝子  
 コード領域を□で、DNAプローブ領域を—で示した。尚、各  
 promoterの位置と転写方向を矢印で示した。promoterが複数存在  
 する*ptsH*、*crr*については各promoterの名称も併せて表記した。

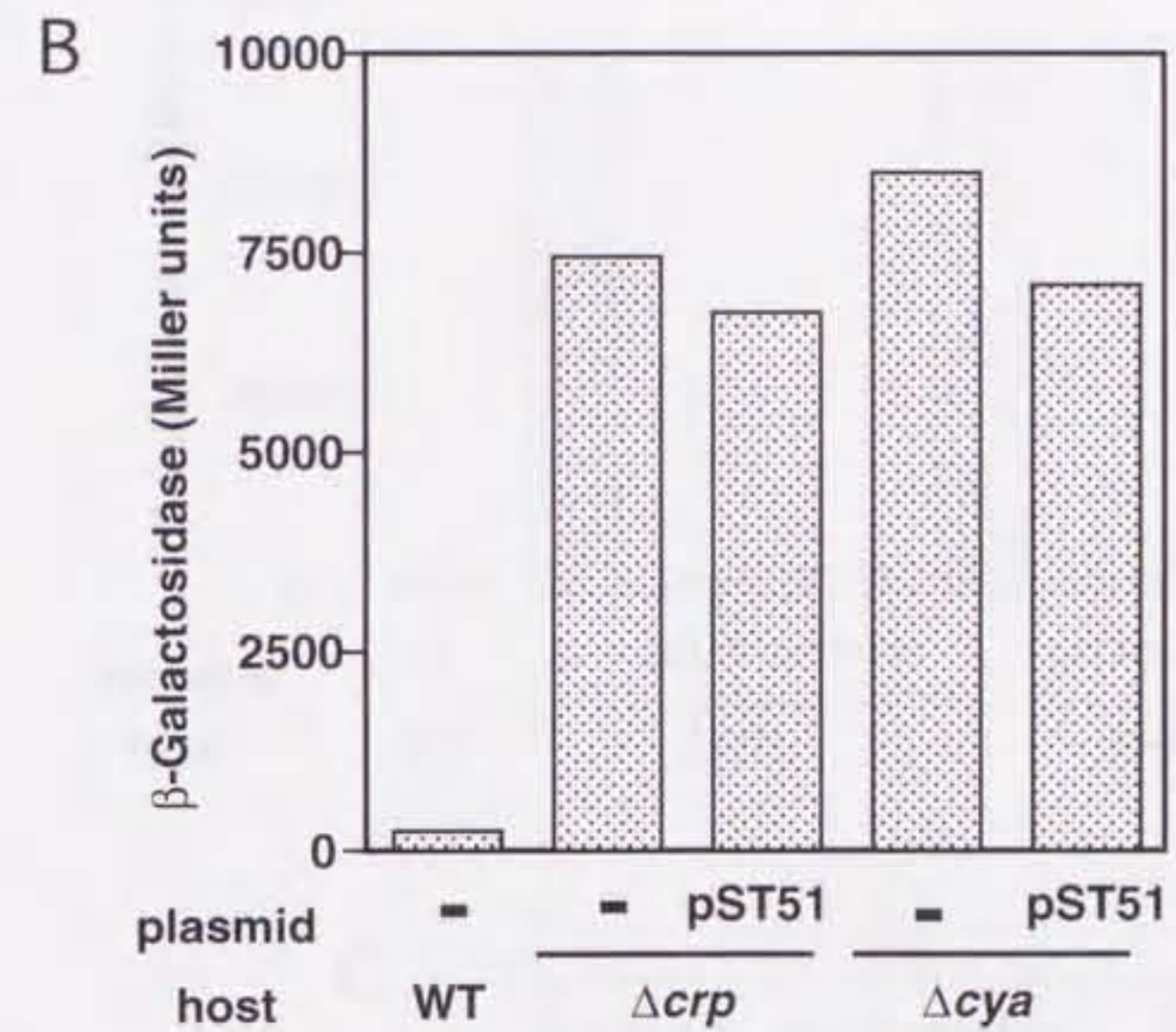
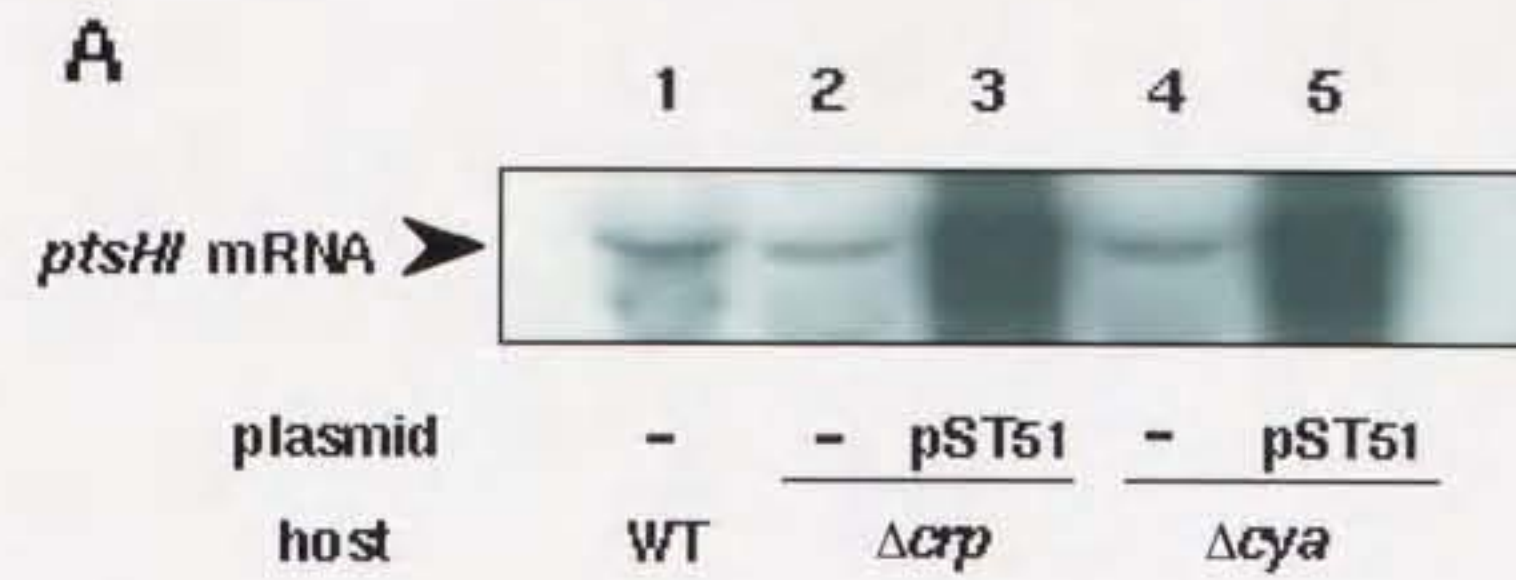


Figure 1-5. *lac* L8UV5変異株における*ptsHI*の発現とグルコース効果

(A) 各変異株、形質転換株における*ptsHI*の発現

0.5%グルコース・0.5%ラクトースを含むM9最小培地で菌体を $OD_{600}=0.6$ まで培養し、mRNAを抽出した。Northernblottingに用いたRNAは、総量50 $\mu$ g (lane 1、2、4)、総量5 $\mu$ g (lane3、5)である。lane1はPR166、lane2はKK17、lane3はKK17のpST51形質転換株、lane4はKK8、lane5はKK8にpTS51を形質転換した株である。

(B) 各変異株、形質転換株におけるグルコース効果

(A)のRNA抽出と同時に $\beta$ -galactosidase活性の測定を行った。

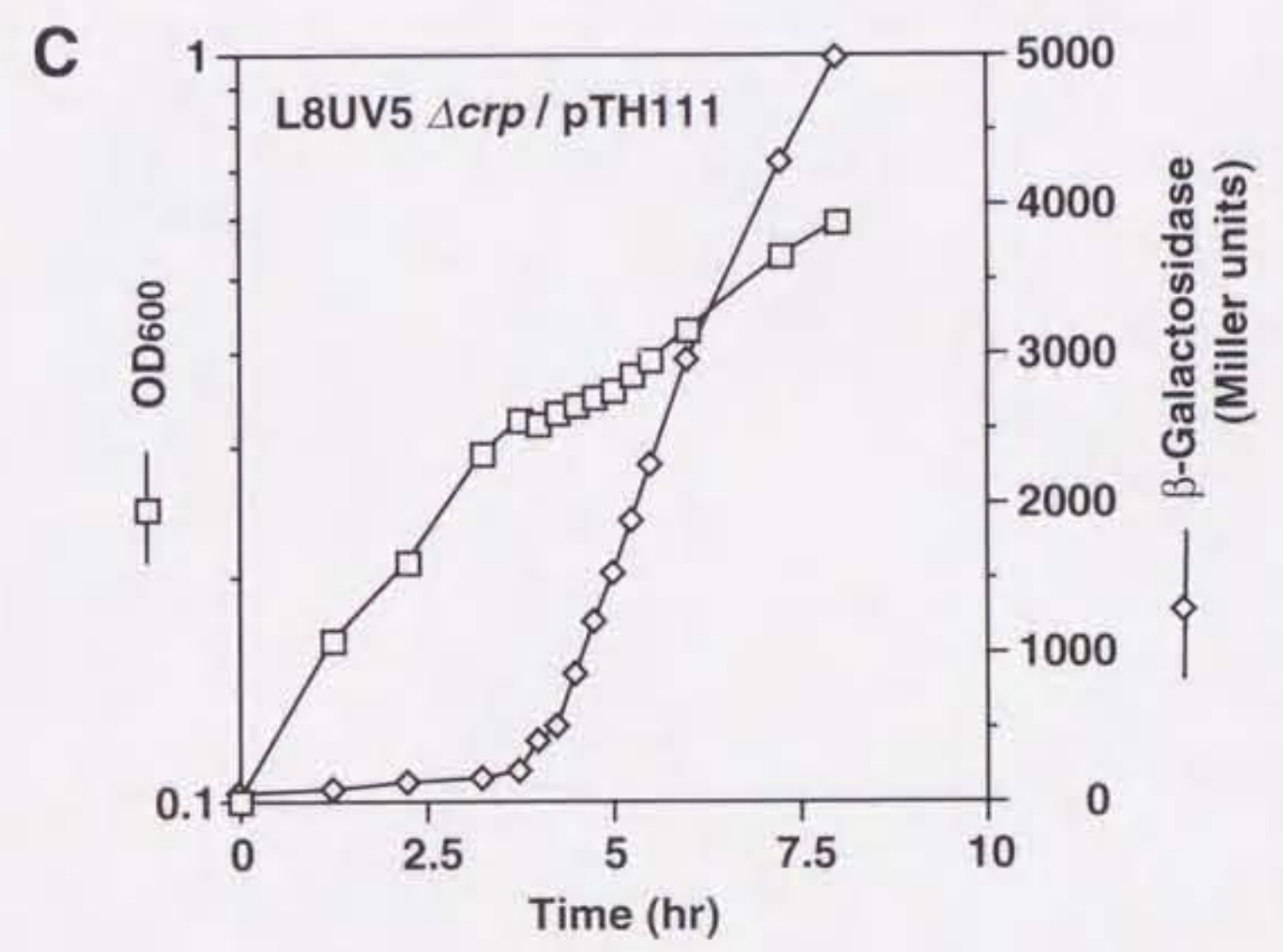
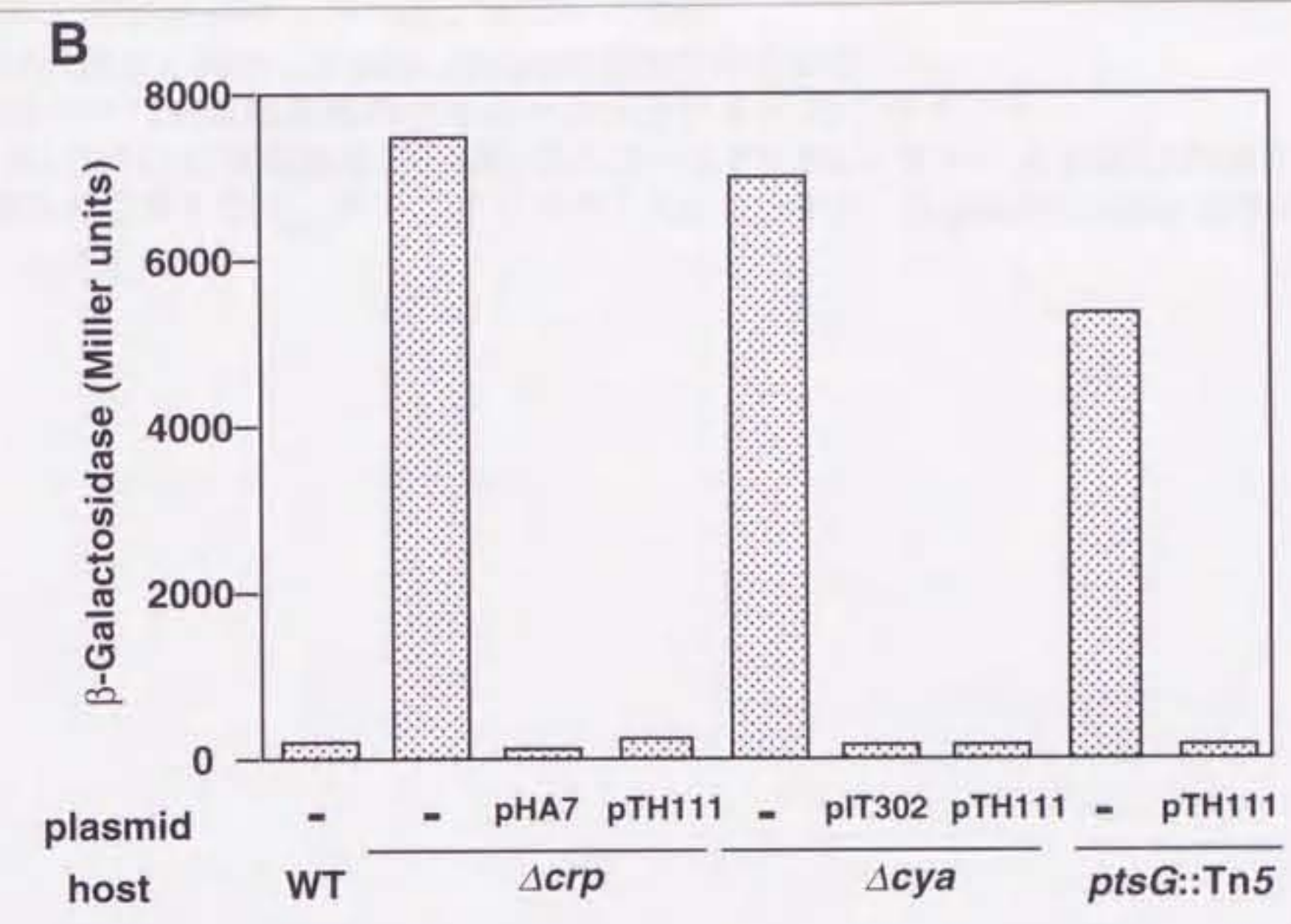
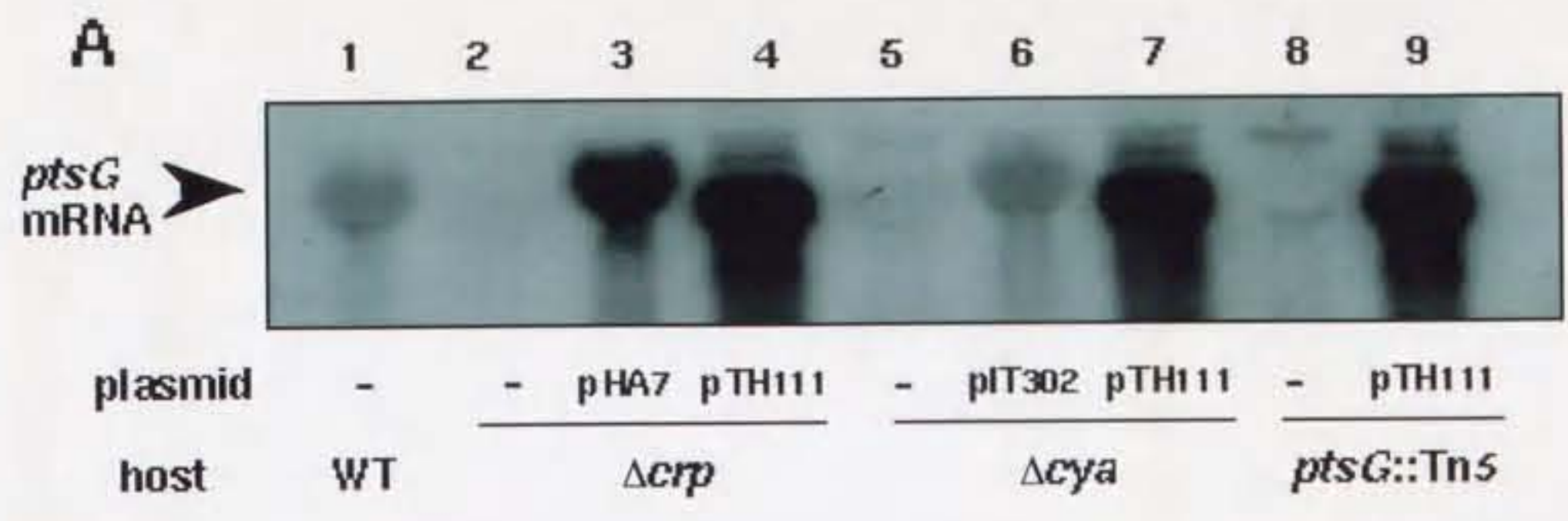


Figure 1-6. *lac* L8UV5変異株における*ptsG*の発現とグルコース効果

(A) 各変異株、形質転換株における*ptsG*の発現

0.5%グルコース・0.5%ラクトースを含むM9最小培地で菌体をOD<sub>600</sub>=0.6まで培養し、

mRNAを抽出した。Northern blottingに用いたRNAは、総量50 $\mu$ g (lane 1、2、3、5、6、8)、総量5 $\mu$ g (lane 4、7、9)である。lane1はPR166、lane2はKK17、lane3はKK17のpHA7形質転換株、lane4はKK17のpTH111を形質転換した株である。lane5はKK8、lane6はKK8のpIT302形質転換株、lane7はKK8のpTH111を形質転換した株である。lane8はKK20、lane9はKK20のpTH111形質転換株である。

(B) 各変異株、形質転換株におけるグルコース効果

(A)のRNA抽出と同時に $\beta$ -galactosidase活性の測定を行った。

(C) KK17のpTH111形質転換株のグルコース・ラクトース/ジオキシー

KK17のpTH111形質転換株を0.04%グルコースと0.2%ラクトースを含むM9最小培地で培養した。菌体の生育をOD<sub>600</sub>でモニタリングした( $\square$ )。また、 $\beta$ -galactosidase活性のモニタリングも行った( $\diamond$ )。

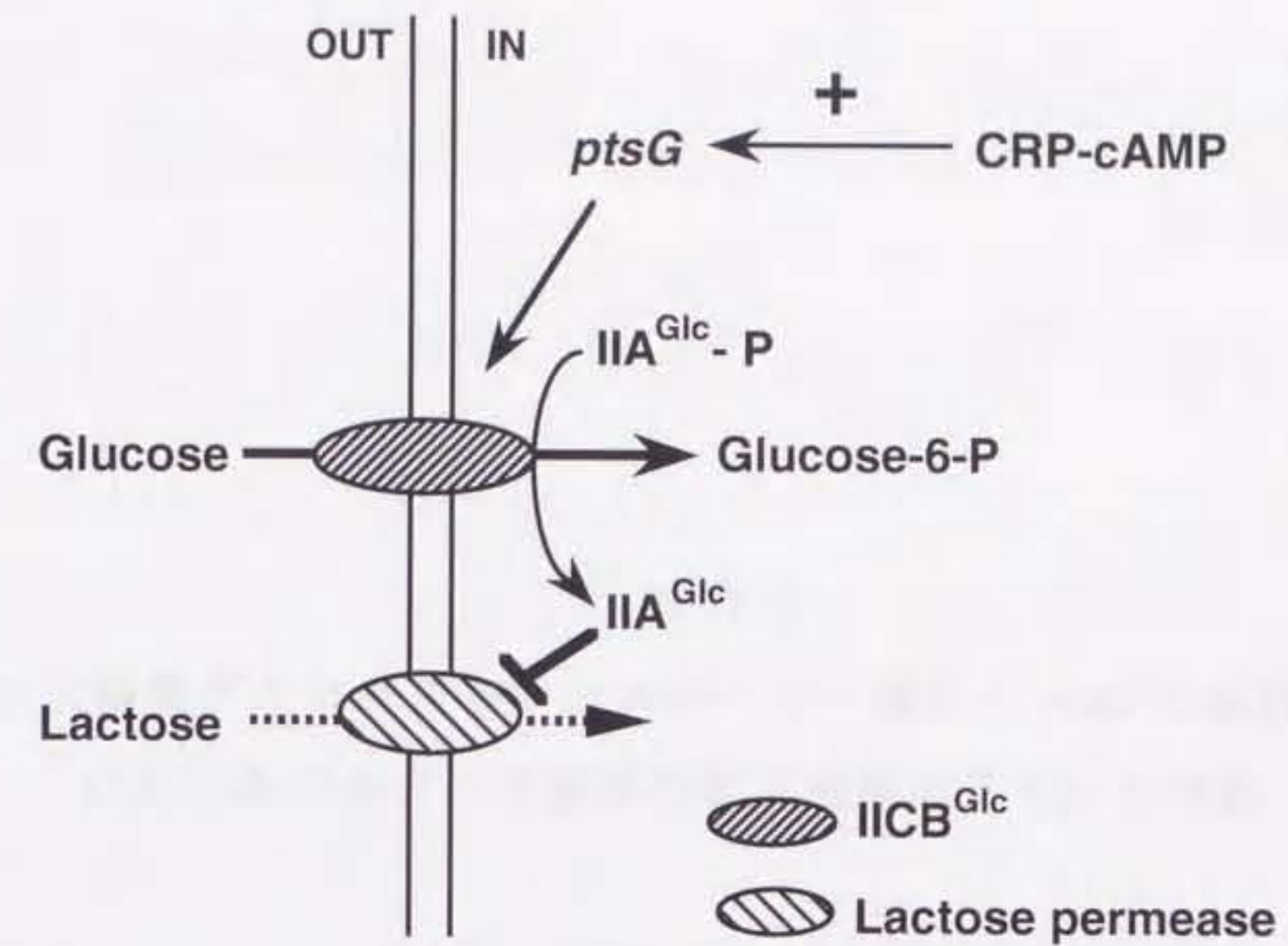


Figure 1-7. グルコース・ラクトース共存下におけるグルコース効果のCRP-cAMP制御モデル  
 PTS系 (IIA<sup>Glc</sup> / IICB<sup>Glc</sup>) を介したグルコースの取り込みは非リン酸化型 IIA<sup>Glc</sup> を増加させる。この非リン酸化型 IIA<sup>Glc</sup> は、lactose permease のラクトース取り込みを阻害する (inducer exclusion)。CRP-cAMP は、*ptsG* の転写を正に制御することによって、inducer exclusion に必要な役割を果たしている。CRP-cAMP 非存在下では、inducer exclusion は解除される。(本章参照)





第 II 章  
 大腸菌グルコーストランスポーター遺伝子 ptsG の転写制御  
 におけるグルコース誘導性転写制御因子 Mlc の役割

## 1. 要旨

大腸菌の *ptsG* 遺伝子は、グルコースの主要取り込みタンパク質 IICB<sup>Glc</sup> をコードしている。IICB<sup>Glc</sup> は、phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system (PTS) を構成する膜タンパク質である。本章では、この大腸菌の *ptsG* mRNA の転写がグルコースによる誘導を受けることを見出した。さらに、この *ptsG* 転写におけるグルコース誘導は、*ptsG* promoter 領域のみを有するマルチコピープラスミドを導入した場合において解除された。これは *ptsG* 転写に負の転写制御因子が存在することを示唆している。そこで本章では Tn10 挿入変異によって、グルコース非誘導性の恒常的な *ptsG* 転写を行う変異株の screening を試みた。得た変異株は *mlc* 遺伝子に挿入変異を有していた。( *mlc* は *manXYZ*、*malT*、*mlc* 自体の負の転写制御因子である。)次に我々は分離精製した Mlc タンパク質を用いて *ptsG* の *in vitro* 転写を行った。その結果、*ptsG* promoter は正の転写制御因子 CRP-cAMP によって転写活性化されるが、Mlc 存在下ではその転写活性化が完全に抑制されることが明らかとなった。また、DNase I footprinting による解析から、*ptsG* promoter における2つの CRP-cAMP 結合部位が -40.5bp、-95bp にあることが判明した。さらに、-8bp、-175bp にある2つの Mlc 結合部位が同定された。同時に、CRP-cAMP は *ptsG* promoter と RNA polymerase の結合を促進すること、Mlc は CRP-cAMP と *ptsG* promoter の結合を阻害せず、RNA polymerase と *ptsG* promoter の結合を阻害することが判明した。以上から、*ptsG* の転写は CRP-cAMP、Mlc によってそれぞれ正、負の制御を受けることが明らかとなった。さらに以上の本研究から、Mlc の活性はグルコースによる未知の機構によって制御されていることが示唆された。

## 2. 序論

グルコースによる代謝抑制機構は、微生物の環境応答における細胞内情報伝達機構の典型例である。このグルコースによる代謝抑制はグルコース効果、またはグルコース抑制と呼ばれ、その機構の解析は大腸菌の糖代謝制御系を中心として行われてきた。

phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system (PTS)は、グルコースを始めとする PTS sugar の細胞内への取り込みとリン酸化を行う機構である。大腸菌のグルコースへの応答は主に PTS 系を介して行われる(Roseman and Meadow, 1990; Saier and Reizer, 1994; Saier, JR. et al., 1996)。この PTS 系の機構を以下に述べる。

まず、細胞内に存在する phosphoenolpyruvate (PEP)から、PTS 酵素である enzyme I (EI)、HPr にリン酸基が転移される。さらに、リン酸基は HPr から糖特異的な PTS 酵素 enzyme II に転移される。多くの enzyme II は糖特異的な取り込みタンパク質を形成している。グルコースの enzyme II である IICB<sup>Glc</sup>/IIA<sup>Glc</sup> は、HPr からのリン酸基を IIA<sup>Glc</sup> に転移する。リン酸化型 IIA<sup>Glc</sup> のリン酸基は、IICB<sup>Glc</sup> によるグルコース取り込みと共役して、細胞内に取り込まれたグルコースに転移する。生じた非リン酸化型 IIA<sup>Glc</sup> はグルコース効果において重要な役割を果たす。

第一に、非リン酸化型 IIA<sup>Glc</sup> は、ラクトース等の non-PTS sugar の取り込みを阻害する。この作用は inducer exclusion と呼ばれる(Hoischen et al., 1996; Osumi and Saier, 1982)。前章に述べたように、この inducer exclusion 作用はグルコース・ラクトース系におけるグルコース効果の主因である。

第二に、グルコース取り込みに伴う非リン酸化型 IIA<sup>Glc</sup> の増加は、細胞内 cAMP 濃度を低下させる。これは、cAMP 合成酵素を活性化させるリン酸化型 IIA<sup>Glc</sup> の細胞内濃度が非リン酸化型 IIA<sup>Glc</sup> の増加によって低下するために生じる(Levy et al., 1990; Feucht and Saier, Jr., 1980)。さらにグルコースは、cAMP 受容タンパク質(CRP)遺伝子

*crp* の転写における autoregulation を介して、細胞内 CRP 濃度を減少させる(Hanamura and Aiba, 1992; Ishizuka et al., 1994; Ishizuka et al., 1993; Tagami et al., 1995)。

以上の結果、多くの糖代謝遺伝子の正の転写制御因子である CRP-cAMP の細胞内濃度がグルコースによって低下し、CRP-cAMP 制御下にあるこれらの遺伝子の発現が低下する。しかし逆に、グルコース存在下において発現が増加する遺伝子が幾つか報告されていた。HPr、EI、IIA<sup>Glc</sup> をコードする遺伝子 *ptsH*、*ptsI*、*crr* からなる *pts* operon は、CRP-cAMP 制御下にあるにも関わらず、グルコースによって発現が誘導されることが報告されている(De Reuse and Danchin, 1991; De Reuse and Danchin, 1988; Ryu and Garges, 1994; Ryu, S. et al., 1995)。

前章で明らかにしたように、IICB<sup>Glc</sup> をコードする遺伝子 *ptsG* の転写には CRP-cAMP が必須である。しかし、IICB<sup>Glc</sup> の基質であるグルコース存在下では CRP-cAMP の細胞内濃度は低下する。多くの permease の発現がその基質によって誘導されることを考慮すると(Plumbridge, 1990; Postma et al., 1996)、*ptsG* においても、CRP-cAMP による転写制御以外に、グルコースによる発現誘導機構が存在する可能性がある。そこで、本章では *ptsG* におけるグルコース発現誘導機構の存在について解析を行った。

### 3. 実験材料、方法

#### 3-1. 本実験で用いた大腸菌株と培養条件

本実験で用いた大腸菌 K12 株は Table II-1. に示した。

KK13 は、*lac* の 5' 領域欠失変異を有するプラスミド pKK296 と K12 株 pp6 との homologous recombination によって作成した (Suzuki et al., 1987)。この KK13 に *ptsG-lacZ* operon fusion を持つ  $\lambda$  phage、 $\lambda$  IT500 を溶原化させ、KK29 を構築した。

$\lambda$  1098 によるトランスポゾン Tn10 のランダム挿入変異を KK29 に導入し (Way et al., 1984)、*mle::Tn10* 変異株である KK30、KK31 を得た。KK32、KK33 は、KK30 を donor とする P1 transduction により構築した。

本実験では、培地は LB 培地を用い、菌体は好氣的条件下において 37°C で培養した。菌体の生育は波長 600 nm における吸光度で測定した。また必要に応じて、ampicillin (最終濃度 50  $\mu$ g/ml)、kanamycin (最終濃度 50  $\mu$ g/ml)、tetracycline (最終濃度 15  $\mu$ g/ml)、chloramphenicol (最終濃度 15  $\mu$ g/ml) を加えた。

#### 3-2. 本実験で用いたプラスミド、及び、 $\lambda$ phage

本実験で用いたプラスミド、及び、 $\lambda$  phage は Table II-2. に示した。

pKK296 は以下のように構築した。pXX701 の *lac* operon を含む 13.5kb の *PstI-PstI* 断片を pSI029 (Suzuki et al., 1987) にクローニングし、pKK295 を作成した。この pKK295 の *lacZ* の 5' 領域とその上流を含む 1.7kb の *EcoRV-EcoRV* 領域を欠失させ、pKK296 を構築した。

*ptsG* promoter を含む 1.1kb の *SalI-EcoT22I* 領域を pSTV28 (Takara Shuzo) にクローニングし、pIT501 を作成した。pIT501 の *ptsG* promoter を含む *EcoRI-HindIII* 断片を pMS437C (Kawamukai et al., 1985) にクローニングし、*ptsG-lacZ* operon fusion を有するプラスミド pIT500 を構築した。 $\lambda$  IT500 は  $\lambda$  BDC と pIT500 との homologous

recombination によって作成された。

P1 *EcoRI-mle* : GGAATTCCCATTTCAGAGAGTGGACGC と P2 *EcoRI-mle* : GGAATTCTGCATCAGGGTGAAGCG の 2 つの primer を用いた PCR により pp6 ゲノムから *mle* 遺伝子を含む 2.5kb の断片を単離した。この断片を pSTV28 にクローニングし、pMlc3 を構築した。また、P4 *BamHI-mle* : CCGGATCCAGAAGTGTCTGTACC と P5 *NdeI-mle* : CCCTACATATGGTTGCTGAAAACCAG の 2 つの primer を用いた PCR により *mle* の翻訳開始コドンに *NdeI* 部位を導入した 1.2kb の *NdeI-BamHI* 断片を作成した。この断片を pET3a にクローニングし、Mlc 大量発現プラスミドである pETMlc3 を構築した。

#### 3-3. *in vitro* 系に用いた DNA fragment の調製

SI mapping, gel shift assay, DNA footprinting 等の DNA プローブに用いた DNA fragment は以下のように調製した。

プラスミド pTSG7 を *PvuII*、*MluI* で切断した後、6% アクリルアミドゲル電気泳動により *PvuII-MluI* 断片を分離した。Gilbert buffer (0.5M  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 、10mM  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 、1mM EDTA、0.1% SDS) によりゲルから DNA fragment を抽出し、エタノール沈殿で精製した。得られた DNA fragment は TE buffer に溶解し、保存した。

この断片を BAP 処理し、5' 末端の脱リン酸化を行った。次に、T4 polynucleotide kinase により [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP (Amersham 社、3000Ci/mmol) で標識した。さらに、*KpnI* で切断した後、6% アクリルアミドゲル電気泳動により *KpnI-MluI* 断片を分離した。得られた片端ラベル断片を Gilbert buffer により抽出し、精製した。

*in vitro* 転写の鋳型 DNA は、pTSG7 を *KpnI*、*MluI* で切断し、6% アクリルアミドゲル電気泳動により断片を抽出し、精製した。尚、*ptsG* promoter 領域における *KpnI*、*MluI* 切断部位については Figure II-3. を参照にされたい。

### 3-4. SI mapping

RNA は前章 3-4 に述べた方法で抽出した。RNA buffer に溶解した RNA100  $\mu$ g に *KpnI-MluI* DNA プローブ 60fmol を加え、エタノール沈殿処理を行った。生じた沈殿を 70%エタノールで洗い、風乾した後、hybridization buffer (80% formamide, 0.4 M NaCl, 20mM HEPES, pH6.5) に溶解した。このサンプルを 75°C で 10 分間加熱した後、37°C まで自然冷却し、一晚保温した(hybridization)。

hybridization 後、サンプルに SI buffer (30mM CH<sub>3</sub>COONa, 1mM ZnSO<sub>4</sub>, 50mM NaCl, 5% glycerol, pH4.6) を加えた(総量 300  $\mu$ l)。これを 37°C で 5 分間保温し、SI nuclease 40 units を加え、37°C で反応させた。一定時間反応させた後、同量のフェノールを加え反応を停止させた。遠心 (12krpm, 5 分、室温) 後、水層を回収し、エタノール沈殿処理した。得られた沈殿を 70%エタノールで洗い、風乾した後、60  $\mu$ l ホルムアミド色素混合液(80% formaldehyde, 10mM NaOH, 1mM EDTA, 0.025% B.P.B., 0.025% X.C.)10  $\mu$ l に溶解した。

DNA プローブを Maxam-Gilbert 処理したものと共に、サンプルを 90°C で 1 分間加熱した後、急冷し、8M 尿素-8% アクリルアミドゲル電気泳動にかけた。泳動後、ゲルをオートラジオグラフィにかけ、転写開始点を決定した。

### 3-5. Northern blotting

Northern blotting 及び DNA プローブの作成は、前章 3-5、3-6 に述べた方法で行った。尚、Northern blotting の internal control として、pKEN125 の *lpp* 遺伝子を有する 330bp の *XbaI-MluI* 断片を DNA プローブに用い、*lpp* mRNA の検出を行った(Nakamura et al, 1982)。

### 3-6. $\beta$ -galactosidase assay

$\beta$ -galactosidase assay は前章 3-3 と同様に行った(Miller, 1972)。

### 3-7. *in vitro* 系に用いた各タンパクの精製

Mlc タンパクの精製は以下のように行った。T7 phage promoter を有する Mlc 大量発現プラスミド pETMlc3 を大腸菌株 BL21(DE3) に導入した。この形質転換株を LB 培地において 37°C で培養した。OD<sub>600</sub> ~ 0.5 で IPTG を加え(最終濃度 1mM)、2 時間 Mlc の大量発現を誘導した。集菌によって得た 5.4g の菌体を 5 倍量の sonication buffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 5mM EDTA, 0.1mM DTT) に懸濁し、さらに 20mg lysozyme, 0.01M MgSO<sub>4</sub>, 0.05% Brij58 を加えた。この懸濁液を sonication 処理にかけ、遠心 (8krpm, 38 分, 4°C) した。核酸を除去するため、得られた上清画分に 0.1% polyethyleneimine を加えた。遠心 (8krpm, 15 分, 4°C) 後、その上清を Bio-Rex70 カラム(Bio-Rad) にかけ、1M KCl の直線濃度勾配によって溶出を行った。尚、カラム緩衝液には bufferA (50mM K/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1mM EDTA) を用いた。Mlc は 0.15M KCl の時点で溶出した。さらに、溶出した Mlc を含む画分を DEAE-sephacel column (Pharmacia Biotech) にかけた。溶出条件、カラム緩衝液は Bio-Rex70 カラムによる溶出と同様である。Mlc は 0.28M KCl の時点で溶出した。得られた Mlc 画分を Mlc 精製画分として以後の実験に使用した(Figure II-1.)。

尚、CRP, RNA polymerase は、それぞれ、Eilen ら(Eilen et al., 1978)、Fukuda ら(Fukuda et al., 1974)の方法に従い、本研究室で精製されたものを使用した。

### 3-8. *in vitro* 転写

反応液(5nM template DNA fragment, 50  $\mu$ M cAMP, 20mM Tris-HCl pH7.9, 0.1M NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM EDTA, 0.1mM DTT, 5% glycerol, 50  $\mu$ g/ml BSA)30  $\mu$ l を 37°C で 5 分間保温した後、CRP (0 または 20ng)、Mlc (0-120ng) を加え、さらに 37°C で 5 分間保温した。次に、RNA polymerase 200ng を加え、37°C で 30 分間保温し、binding 反応を行わせた後、300  $\mu$ g/ml heparin を 2  $\mu$ l 加えた。

この反応液に基質(0.5mM 各 GTP、ATP、CTP、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  UTP 約5  $\mu\text{Ci}$ ) 3  $\mu\text{l}$ を加え、37°Cで20分間保温し、転写反応を行った。フェノール 60  $\mu\text{l}$ 、stop buffer (0.6M  $\text{CH}_3\text{COONa}$  pH5.5、20mM EDTA、200  $\mu\text{g/ml}$  tRNA) 30  $\mu\text{l}$ を加え、反応を停止させた後、遠心(12krpm、5分、室温)によって水層を回収し、エタノール沈殿処理を行った。得られた沈殿を風乾後、尿素色素混合液(8M urea、0.025% B.P.B.、0.025% X.C.、TBE)18  $\mu\text{l}$ に溶解させた。95°Cで2分加熱し、急冷後、8M 尿素-8%アクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後、ゲルをオートラジオグラフィーにかけた。

尚、転写の internal control として、*lac* L8UV5 promoter を有する 205bp の *Eco*RI DNA fragment を template として用い、同時に *in vitro* 転写を行った。

### 3-9. DNase I footprinting

反応液(10nM 5'末端標識 DNA fragment、50  $\mu\text{M}$  cAMP、20mM Tris-HCl pH7.9、0.1M NaCl、3mM  $\text{MgCl}_2$ 、5mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.1mM EDTA、0.1mM DTT、5% glycerol、50  $\mu\text{g/ml}$  BSA) 100  $\mu\text{l}$ に、CRP (0または400ng)、Mlc (0または500ng)を加え、37°Cで5分間保温した。次に、RNA polymerase (0または2  $\mu\text{g}$ )を加え、37°Cで20分間保温し、binding 反応を行わせた。サンプルを25°Cで5分間保温した後、DNase I 10ngを加え、25°Cで1分間保温し、部分消化を行った。フェノール 100  $\mu\text{l}$ を加えて消化反応を停止させ、遠心(12krpm、5分、室温)した。分離した水層に stop buffer (1.5M  $\text{CH}_3\text{COONa}$  pH5.5、20mM EDTA、100  $\mu\text{g/ml}$  tRNA) 25  $\mu\text{l}$ とエタノール 300  $\mu\text{l}$ を加えて混合した。遠心(12krpm、15分、4°C)にかけ、生じた沈殿を70%エタノールで洗い、風乾した後に、尿素色素混合液 10  $\mu\text{l}$ に溶解させた。

95°Cで2分加熱し、急冷後、8M 尿素-8%アクリルアミドゲル電気泳動にかけた。泳動後、ゲルをオートラジオグラフィーにかけた。

### 3-10. Gel shift assay

反応液(1nM DNA fragment、20mM Tris-HCl pH7.9、0.1M NaCl、3mM  $\text{MgCl}_2$ 、5mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.1mM EDTA、0.1mM DTT、5% glycerol、50  $\mu\text{g/ml}$  BSA、各糖 1mM) 30  $\mu\text{l}$ に、Mlc (0または30ng)を加え、37°Cで5分間保温した。このサンプルに40% glycerol dye(40% glycerol、0.025% B.P.B.、0.025% X.C.) 3  $\mu\text{l}$ を加え、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析した(泳動用緩衝液には0.5×TBEを用いた)。

## 4. 結果

### 4-1. *ptsG* promoter における転写開始点と promoter 配列の決定

*ptsG* は大腸菌ゲノムの 25 分に存在し、グルコース取り込みタンパク質 IICB<sup>Glc</sup> をコードする(Erni and Zanolari, 1986)。前章に述べたように *ptsG* の転写は CRP-cAMP を必須とするが、*ptsG* promoter の転写制御についての解析は全く行われていなかった。そこで本研究では、S1 mapping による *ptsG* の転写開始点の決定と promoter 配列の同定を行った。

野生型大腸菌 pp6 とその cAMP 合成酵素機能欠損変異株 pp48 を LB 培地で培養し、RNA を抽出した。この RNA と DNA プローブ(Figure II-3., 3-3 参照)を用いて S1 mapping を行った。その結果、*ptsG* 翻訳開始コドンの 103bp 上流から転写が開始されることが判明した(Figure II-2. lane 1~3)。この近傍の DNA 配列から promoter 配列として [-35 領域 CAAACA~17bp~-10 領域 TTTACT] を同定した(Figure II-3.)。

また、pp48 の RNA を用いた S1 mapping において *ptsG* の転写は観察されなかった(Figure II-2. lane 4)。これは *ptsG* の転写に CRP-cAMP が必須であるという前章の結果と一致している。

### 4-2. グルコースは *ptsG* の発現を誘導する。

*ptsG* にコードされる IICB<sup>Glc</sup> は大腸菌の主要なグルコーストランスポーターである(Bouma et al., 1987)。その *ptsG* 転写に必須な CRP-cAMP の細胞内濃度は、IICB<sup>Glc</sup> の基質であるグルコースによって低下する。しかし、多くの permease は、その基質によって発現誘導を受けることが知られており、IICB<sup>Glc</sup> の場合もグルコースによる発現誘導を受ける可能性が挙げられる(Erni and Zanolari, 1986; Rephaeli and Saier, 1980)。そこで本研究では、northern blotting によりグルコース存在下、非存在下における *ptsG* mRNA の定量を行った。

LB 培地、LB+1%グルコース培地で野生型大腸菌 pp6 を培養し、その RNA を northern blotting により解析した。その結果、グルコース存在下では、グルコース非存在下に比べて多量の *ptsG* mRNA が検出された(Figure II-4.(A))。これは、グルコースが *ptsG* の転写を誘導することを示している。このグルコースによる *ptsG* 転写誘導は、*crp* または cAMP 合成酵素遺伝子 *cya* 欠損株では観察されなかった(データは示していない)。

以上から、*ptsG* の発現において、CRP-cAMP による制御の他にグルコース誘導性転写制御因子による制御の存在が示唆された。このグルコース誘導性転写制御が、グルコースを inducer とする 1)負の転写制御である可能性、2)正の転写制御である可能性をそれぞれ検討するために、*ptsG* promoter 領域のみを有するマルチコピープラスミド pIT501 を pp6 に形質転換し、その形質転換株のグルコース存在下、グルコース非存在下での *ptsG* mRNA 量を northern blotting により解析した。

前者 1)の場合、このグルコース誘導性転写制御因子は repressor として機能する。従って、*ptsG* promoter 領域のみをマルチコピーで導入した場合、ゲノム上の *ptsG* promoter に結合する repressor の細胞内濃度は、pIT501 上の *ptsG* promoter による titration を受けて減少する。そのため、*ptsG* はグルコース非存在下においても転写誘導されると予測される。一方、後者 2)の場合、1)の場合とは逆に pIT501 上の *ptsG* promoter による titration によって、グルコース存在下における *ptsG* の発現は減少すると考えられる。

Figure II-4.(B)に示したように、pIT501 形質転換株の *ptsG* 発現はグルコース非存在下において誘導された(Figure II-4.(B), lane1, 3)。しかし、グルコース存在下において、その *ptsG* mRNA 量に差は検出されなかった(Figure II-4.(B), lane2, 4)。

以上の結果から、*ptsG* はグルコース誘導性転写制御因子による負の転写制御を受けることが判明した。

#### 4-3. グルコース非誘導性 *ptsG* 発現変異株の screening

上述した *ptsG* の負の転写制御因子を単離するため、本研究では *ptsG-lacZ* operon fusion をゲノム上に有する大腸菌株 KK29 を作成した。KK29 は、LB+0.016%X-gal 寒天培地上では *ptsG-lacZ* fusion が転写誘導されないため、白色コロニーを形成する。この KK29 において *ptsG* の負の転写制御因子を破壊した場合、*ptsG-lacZ* fusion は恒常的に発現するため、上述した寒天培地上ではコロニーは青色を呈色すると予測される。

そこで、トランスポゾン mini Tn10Tet を用いて、挿入変異を KK29 に導入し(Way et al., 1984)、*ptsG* の負の転写制御因子破壊株の screening を行った。トランスポゾン mini Tn10Tet 挿入変異によって得た 44000 個の tetracycline 耐性コロニーのうち、LB+0.016%X-gal 寒天培地上で青色を呈色するコロニー 18 個を単離した。この 18 個のコロニーについて  $\beta$ -galactosidase assay と northern blotting による解析を行い、グルコース非存在下においても恒常的に *ptsG* が発現している 2 つの変異株 KK30、KK31 を単離した。KK30、KK31 は、グルコース非存在下において KK29 の約 8 倍の *ptsG-lacZ* fusion が発現していた(Figure II-5.(A))。また、ゲノム上の *ptsG* 発現についても、KK30、KK31 は、グルコース非存在下で多量の *ptsG* mRNA を発現していた(Figure II-5.(B))。尚、この 2 変異株の発現型は P1 transduction によって KK29 に導入することができた。これは、1 つの miniTn10 挿入変異によって *ptsG* の恒常的発現が引き起こされたことを示唆している。

#### 4-4. Mlc は *ptsG* の repressor である。

*ptsG* の負の転写制御因子を同定するため、得られた転写制御因子破壊株 KK30、KK31 の mini Tn10 挿入変異の解析を行った(Aiba et al., 1996; Oshima et al., 1996; Blattner et al. 1997)。その結果、KK30、KK31 の mini Tn10 挿入変異は、全て *mlc* 遺伝子(Hosono et al., 1995)の 3'端にあることが判明した(Figure II-6.(A))。*mlc* は大腸菌ゲノ

ムの 36 分に存在する遺伝子であり、Mlc タンパク質は *manXYZ* や *malT* の負の転写制御因子であることが近年明らかにされている(Decker et al., 1998; Plumbridge, 1998)。また、Mlc は、*nagE-nagBACD* operon や *manXYZ* operon の転写制御因子 NagC と 40% 相同性がある(Hosono et al., 1995)(Plumbridge and Kolb, 1995; Plumbridge, 1990; Postma et al., 1996)。以上から、Mlc が *ptsG* の負の転写制御因子として機能している可能性が示唆された。

そこで、*mlc* 遺伝子をクローニングしたプラスミド pMlc3 を用いて、グルコース非存在下における KK30、KK31 の *ptsG* 発現抑制の相補実験を試みた。その結果、northern blotting による解析から、pMlc3 を有する KK30、KK31 の形質転換株はグルコース非存在下における *ptsG* 発現を抑制していることが判明した(Figure II-6.(B))。以上から、Mlc が *ptsG* の負の転写制御因子であることが明らかとなった。

#### 4-5. グルコースは Mlc、CRP-cAMP を介して *ptsG* 発現に影響を及ぼす。

本研究により、*ptsG* の転写は負の転写制御因子である Mlc によって制御されていることが明らかとなった。また前章で述べたように、*ptsG* の転写は正の転写制御因子である CRP-cAMP によっても制御されている。そこで、*ptsG* の転写におけるこれらの転写制御因子の関係を明らかにするために、野生型大腸菌 pp6、pp6*mlc*<sup>-</sup>変異株 KK32、pp6*crp*<sup>-</sup>変異株 IT1382、pp6*crp*<sup>-</sup>*mlc*<sup>-</sup>変異株 KK33 について、グルコース存在下、グルコース非存在下での *ptsG* mRNA の定量を行った。

Northern blotting による解析から、以下のことが判明した。まず、KK33 において、*ptsG* mRNA は、グルコースの有無に関わらず、検出されなかった(Figure II-7. lane5、6)。これは、*ptsG* の転写に必須な CRP-cAMP が欠損しているためであると考察される。

KK32 の場合、グルコース存在下、グルコース非存在下に関わらず、*ptsG* は恒常的に発現している。しかし、その *ptsG* mRNA 量は、グルコース存在下ではグルコース



非存在下に比べて若干減少している(Figure II-7. lane3, 4)。これは、グルコースによって細胞内の CRP-cAMP 濃度が減少し、*ptsG* の発現がカタボライト抑制を受けたためであると考えられる。また、グルコース存在下においては、pp6 と KK32 における *ptsG* mRNA 量はほぼ同量であった(Figure II-7. lane2, 4)。これは、グルコース添加によって Mlc による転写抑制は完全に解除されることを示している。

従って、これらの結果から、グルコースは Mlc による *ptsG* 転写抑制制御と CRP-cAMP による *ptsG* 転写活性化制御の双方に影響を及ぼしていることが判明した。

#### 4-6. *in vitro* 転写において Mlc は *ptsG* の転写を阻害する。

*ptsG* promoter におけるこれらの転写制御因子の制御機構をさらに詳細に解析するために、精製した Mlc、CRP を用いて *in vitro* 転写実験を行った。

鋳型 DNA と RNA polymerase のみで転写反応を行わせた場合、internal control として用いた *lacL8UV5* promoter DNA からは 65base の転写産物が検出されたが、*ptsG* 鋳型 DNA(3-3 参照)からは *ptsG* 転写産物は検出されなかった(Figure II-8. lane1)。しかし、CRP-cAMP 存在下で転写反応を行わせた場合、*ptsG* 鋳型 DNA から 54base の *ptsG* 転写産物が検出された(Figure II-8. lane2)。これは *ptsG* promoter の転写活性が CRP-cAMP に強く依存していることを示している。さらに Mlc 存在下で転写反応を行わせた場合、*ptsG* 鋳型 DNA からの転写は強く抑制された(Figure II-8. lane3~5)。これは Mlc が repressor として *ptsG* の転写抑制を行うことを示しており、*in vivo* のデータと一致している。また、Mlc 存在下では *lac L8UV5* promoter DNA の転写も弱い抑制を受けていた(Figure II-8. lane3~5)。これは Mlc が非特異的に *lacL8UV5* promoter DNA に結合したためであると考えられる。

#### 4-7. Mlc と CRP-cAMP は別個に *ptsG* promoter に結合する。

*ptsG* promoter における CRP-cAMP、Mlc 及び、RNA polymerase の結合部位の同定

するため、DNase I footprinting を行った。

その結果、CRP-cAMP は転写開始点から-40.5bp に強い結合部位をもつことが判明した(Figure II-9. lane4)。また、-95bp にも弱い CRP-cAMP 結合部位が存在した(Figure II-9. lane4)。この-95bp における CRP-cAMP の結合は、高濃度の CRP-cAMP 存在下においてのみ観察された。しかし、*in vitro* 転写実験では高濃度の CRP-cAMP による転写への影響は検出されなかった(データは示していない)。

また、RNA polymerase 単独では-100bp 付近にやや弱く結合しており、転写開始点近傍には結合していないことが示された(Figure II-9. lane6)。しかし、CRP-cAMP 存在下においては、RNA polymerase は-40.5bp に結合した CRP-cAMP と共に転写開始点付近に ternary complex を形成していた(Figure II-9. lane7)。

Mlc は-20bp から+5bp の領域に強く結合していた(Figure II-9. lane3)。また、-175bp にも Mlc の結合部位が存在した(Figure II-9. lane3)。

さらに、本研究では Mlc による CRP-cAMP、RNA polymerase の *ptsG* promoter 結合への影響を検討した。Mlc と CRP-cAMP が共存する場合、両者の結合パターンに変化はみられなかった(Figure II-9. lane5)。これは Mlc が CRP-cAMP の *ptsG* promoter への結合を阻害しないことを示している。しかし、CRP-cAMP 存在下における *ptsG* promoter への RNA polymerase の結合は Mlc によって阻害された(Figure II-9. lane8)。

これらの結果から、Mlc は *ptsG* promoter への RNA polymerase の結合を阻害することによって *ptsG* の転写を抑制することが判明した。また、*ptsG* promoter は、その CRP-cAMP 結合部位の位置から、*gal P1* promoter、pBR322 P4 promoter と同様、class II CRP promoter であることが示された(Busby and Ebright, 1994)。

#### 4-8. グルコースは Mlc の *ptsG* promoter 結合に関与しない。

さらに本研究ではグルコース以外の糖源を用いて *ptsG* 発現誘導を試みた。その結果、グルコース以外にマンノース、ラクトース、キシロースによって *ptsG* 発現誘導

が起こることが確認された(データは示していない)。そこで、グルコースやこれらの糖が Mlc の活性に与える影響を gel shift assay によって解析した。

その結果、Mlc タンパク質と *ptsG* promoter DNA 断片のみの場合、Mlc-*ptsG* promoter DNA の複合体は一段階シフトとして検出された(Figure II-10. lane2)。しかし、*in vivo* において *ptsG* 発現誘導を引き起こした糖源を添加し、gel shift assay を行った場合、Mlc と *ptsG* promoter の結合を解除することはできなかった(Figure II-10. lane3~5)。

これは、グルコースが直接 Mlc に作用し、Mlc の活性を制御しているのではないことを示している。

## 5. 考察

グルコース取り込みタンパク質 IICB<sup>Glc</sup> をコードする遺伝子 *ptsG* は、CRP-cAMP による正の転写制御を受ける(Figure II-2.)ほかに、グルコースによる転写誘導を受ける(Figure II-4.(A))。恒常的に *ptsG* を発現する変異株 KK30、KK31 の解析から、このグルコースによる転写誘導は負の転写制御因子 Mlc を介して行われることが明らかとなった(Figure II-6.)。

*mlc* (making large colonies)遺伝子は、グルコース存在下における大腸菌の酢酸生育阻害に影響する遺伝子として単離された。大腸菌を LB+0.4%グルコース培地で培養した場合、グルコースによって酢酸代謝系が阻害され(Fraenkel, 1996; EL-Mansi and Holms, 1989)、代謝産物である酢酸が蓄積する。このため、培地中の pH は 5.0 以下となり、大腸菌の生育はグルコースを全て消費する前に停止する(Kakuda et al., 1994)。この酢酸蓄積による生育阻害は *mlc* マルチコピープラスミドによって解除される。*mlc* マルチコピープラスミドを有する大腸菌はグルコースを全て消費するまで生育を促進し、通常の大腸菌コロニーよりも大きなコロニーを形成する(Hosono et al., 1995)。この酢酸生育阻害解除における Mlc の作用機構は解明されていない。また、*mlc* 欠損株は野生株と比較するとその生育が遅いことが本研究室で明らかとなっている。以上のことから、Mlc は大腸菌の代謝系に関与する遺伝子の制御に広く関与する可能性が示唆される。

Mlc は NagC に 40% identity を持つ 44kDa のタンパク質である(Hosono et al., 1995)。NagC は、N-acetylglucosamine の取り込み系・代謝系に関与する一連の酵素遺伝子群から構成された *nagE-nagBACD* operon や、マンノースの PTS 酵素である IIA<sup>Man</sup>、IIC<sup>Man</sup>、IID<sup>Man</sup> をコードする *manXYZ* operon の転写抑制を行う(Erni et al., 1987; Plumbridge and Kolb, 1991; Plumbridge, 1990; Postma et al., 1996)ほか、glucosamine 合成酵素遺伝子(*glmU*)と UDP-N-acetylglucosamine 合成酵素遺伝子(*glmS*)から構成される

*glmUS* operon の activator (Plumbridge, 1995)として機能する。さらに、以前から *manXYZ* operon の発現を活性化する変異として単離されていた *dgsA*(Roehl and Vinopal, 1980; Morris et al., 1985)も *mle* と一致することが報告されている(Plumbridge, 1998)。Mlc 自身も *manXYZ* operon、*malT*(Richet and Sogaard-andersen, 1994; Schleif, 1996)、*mle* の転写を負に制御することが近年明らかとなった(Decker et al., 1998; Plumbridge, 1998)。また本研究室の解析から、Mlc は *ptsG* の他に *pts* operon のグルコースによる発現誘導を行うことが判明している(Tanaka et al., submitted for publication)。これらの5つの Mlc regulon はすべて Mlc による負の制御を受けるが、同時に CRP-cAMP による正の制御も受けている(Figure II-11.(A))(Decker et al., 1998; Plumbridge, 1998)。先述したように、Mlc は多くの代謝系、生合成系の遺伝子発現に寄与していると考えられる。また、Mlc と identity の高い NagC は repressor のみならず、*glmUS* 等の activator としても機能する(Plumbridge, 1990)。以上から、Mlc が activator として機能する Mlc regulon が存在する可能性がある。これらの可能性を含め、Mlc 制御の標的遺伝子をさらに screening し、解析を行うことによって、Mlc 制御機構を解明したいと考えている。

*ptsG* promoter における Mlc の結合領域は約 25bp であるが、その配列は、中心部を除いて A+T に非常に富んだ領域となっている(Figure II-11.(B))。また、他の Mlc regulon との比較から示した consensus 配列は A+T からなる palindrome 配列であった(Figure II-11.(B))。in vitro における解析から、*ptsG* promoter において CRP-cAMP と Mlc の結合はそれぞれ互いに阻害しないことが明らかとなった(Figure II-9. lane5)。*ptsG* promoter は、-8bp に Mlc operator を有しており、この-8bp の Mlc operator への Mlc の結合は RNA polymerase の結合を阻害する(Figure II-9. lane8)。この RNA polymerase 結合阻害において、*ptsG* promoter のさらに上流-175bp に存在する Mlc operator がどのように寄与するのかはまだ解明されていない。しかし、NagC や *lac* repressor が operator 間の結合によって DNA loop を形成し、転写を阻害するように、Mlc が dimer、若しくは tetramer を形成して、このような DNA loop を形成する可能性が存在する

(Plumbridge and Kolb, 1991; Plumbridge and Kolb, 1995; Oehler et al., 1990)。

*mle* 破壊株において *ptsG* は恒常的に発現している。これはグルコースが Mlc を介して *ptsG* の転写制御を行うことを示している。グルコースによる Mlc の活性制御機構は今後解明すべき課題である。in vitro における gel shift assay から、Mlc はグルコース等によって直接活性を制御されていないことが示唆された(Figure II-10.(Decker et al., 1998))。しかし、in vivo においては何らかの未知の糖代謝産物(カタボライト)が inducer として機能する可能性が挙げられる。また、グルコースを感知した signal が何らかの mediator を介して Mlc に作用する可能性も示唆される。例えば、大腸菌における情報伝達系として中心的な役割を果たす two-component system の酵素として IICB<sup>Glc</sup> や Mlc が機能しているのかもしれない(Parkinson, 1993; Kofoid and Parkinson, 1988)。これらは、遺伝学的、生化学的な Mlc の機能解析を行うことによって明らかにされると考えられる。

*ptsG* はグルコースによる強い発現誘導を受ける。この誘導は Mlc を介して行われることが本研究によって明らかにされた。しかし、同じ Mlc regulon である *manXYZ* operon における Mlc 転写抑制は、*manX-lacZ* fusion の解析から約3倍程度であることが報告されている(Plumbridge, 1998)。これは、先述したように *ptsG* における Mlc 転写抑制が8倍~10倍であることと比較すると、明らかに *manXYZ* operon における Mlc 転写抑制の寄与は小さいと考えられる。これは *malT*、*mle* の場合も同様であった(Decker et al., 1998)。おそらく、これらの違いは正の転写制御因子 CRP-cAMP と負の転写制御因子 Mlc の各 operator への結合親和性や operator の位置関係によって生じる差異の影響であると考えられる。また、*manXYZ* operon は、グルコースによる発現誘導を受けず、むしろグルコースによる強い発現抑制を受けていた(データは示していない)。一方で、*manXYZ* operon はマンノースによる発現誘導を受けていた。これは *manXYZ* operon が Mlc 以外に NagC やその他の未知の制御因子による転写制御を受けることを示唆している。以上から、これらの既知の Mlc regulon について、Mlc

の寄与と糖源による発現誘導性、その発現制御機構についての解析と比較を行い、さらに糖代謝と遺伝子発現制御について理解を深めたいと考えている。

Strain	Relevant genotype	Source
PP6	wild type	Laboratory stock
PP48	PP6 <i>cya</i> <sup>-</sup>	Laboratory stock
KK13	PP6 $\Delta$ <i>plac EcoRV-EcoRV</i>	This study
KK29	KK13 / $\lambda$ IT500	This study
KK30	KK29 <i>mlc1157::Tn10</i>	This study
KK31	KK29 <i>mlc1135::Tn10</i>	This study
KK32	PP6 <i>mlc1157::Tn10</i>	This study
KK33	PP6 <i>mlc1157::Tn10 crp::Tn5</i>	This study
IT1382	PP6 <i>crp::Tn5</i>	This study

Table II-1. 本実験で用いた大腸菌株

Plasmid and Phage	Relevant property	Source
<u>Plasmid</u>		
pXX701	Derivative of pUC13 containing a 23kb <i>HindIII</i> fragment that carries the <i>lac</i> operon	Niki <i>et al.</i> (1988)
pSI029	Vector containing the temperature-sensitive <i>ori</i>	Suzuki <i>et al.</i> (1987)
pKK295	Derivative of pSI029 containing a 13.5kb <i>PstI</i> fragment that carries the <i>lac</i> operon	This study
pKK296	Derivative of pKK295 lacking a 1.7kb <i>EcoRV-EcoRV</i> region that carries the <i>lac</i> operator region	This study
pTSG-2	Derivative of pSTV28 containing a 3.2kb <i>SalI</i> fragment that carries the <i>ptsG</i> gene	This study
pIT501	Derivative of pSTV28 containing a 1.1kb <i>SalI-EcoT22I</i> fragment carrying the <i>ptsG</i> promoter region	This study
pMS437C	Vector for <i>lacZ</i> operon fusion	Kawamukai <i>et al.</i> (1985)
pIT500	Derivative of pMS437C carrying the <i>ptsG-lacZ</i> operon fusion	This study
pKEN125	Derivative of pBR322 containing a <i>KpnI-KpnI</i> region that carries the <i>lpp</i> gene	Nakamura <i>et al.</i> (1982)
pMlc3	Derivative of pSTV28 containing a 2.5kb <i>EcoRI-EcoRI</i> region that carries the <i>mlc</i> gene	This study
pETMlc3	Derivative of pET-3a containing a 1.2kb <i>NdeI-BamHI</i> fragment that carries the <i>mlc</i> gene	This study
<u>Phage</u>		
λBDC	λ phage for <i>lacZ</i> operon fusion	Laboratory stock
λIT500	Derivative of λBDC carrying the <i>ptsG-lacZ</i> operon fusion	This study
λ1098	λ phage containing Tn10	Way <i>et al.</i> (1982)

Table II-2. 本実験で用いたプラスミド、及び、λ phage

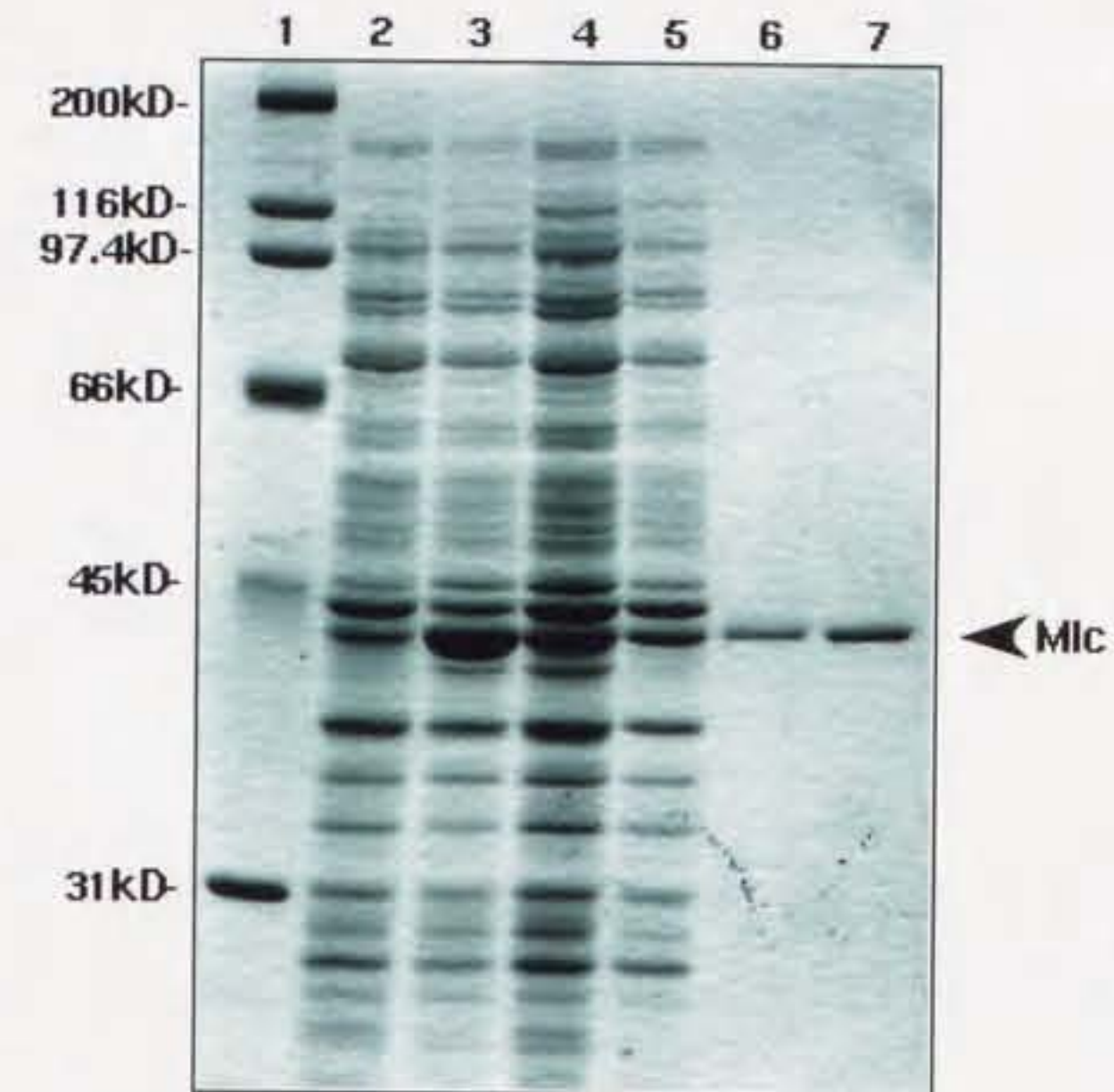


Figure II-1. Mlcの精製

*in vitro*系で用いたMlcの精製過程を示す。各laneのサンプルはそれぞれ、以下の通りである。Marker (lane1); IPTGによる誘導前の全タンパク質(lane2); IPTGによる誘導後の全タンパク質(lane3); 超音波破碎後に遠心処理をして得た細胞粗抽出液(lane4); 0.1%polyethyleneimine処理、遠心処理によって得た上清(lane5); Bio-Rex70カラムによって分画したMlc画分(lane6); DEAE-Sephacelカラムによって得たMlcの最終精製画分。

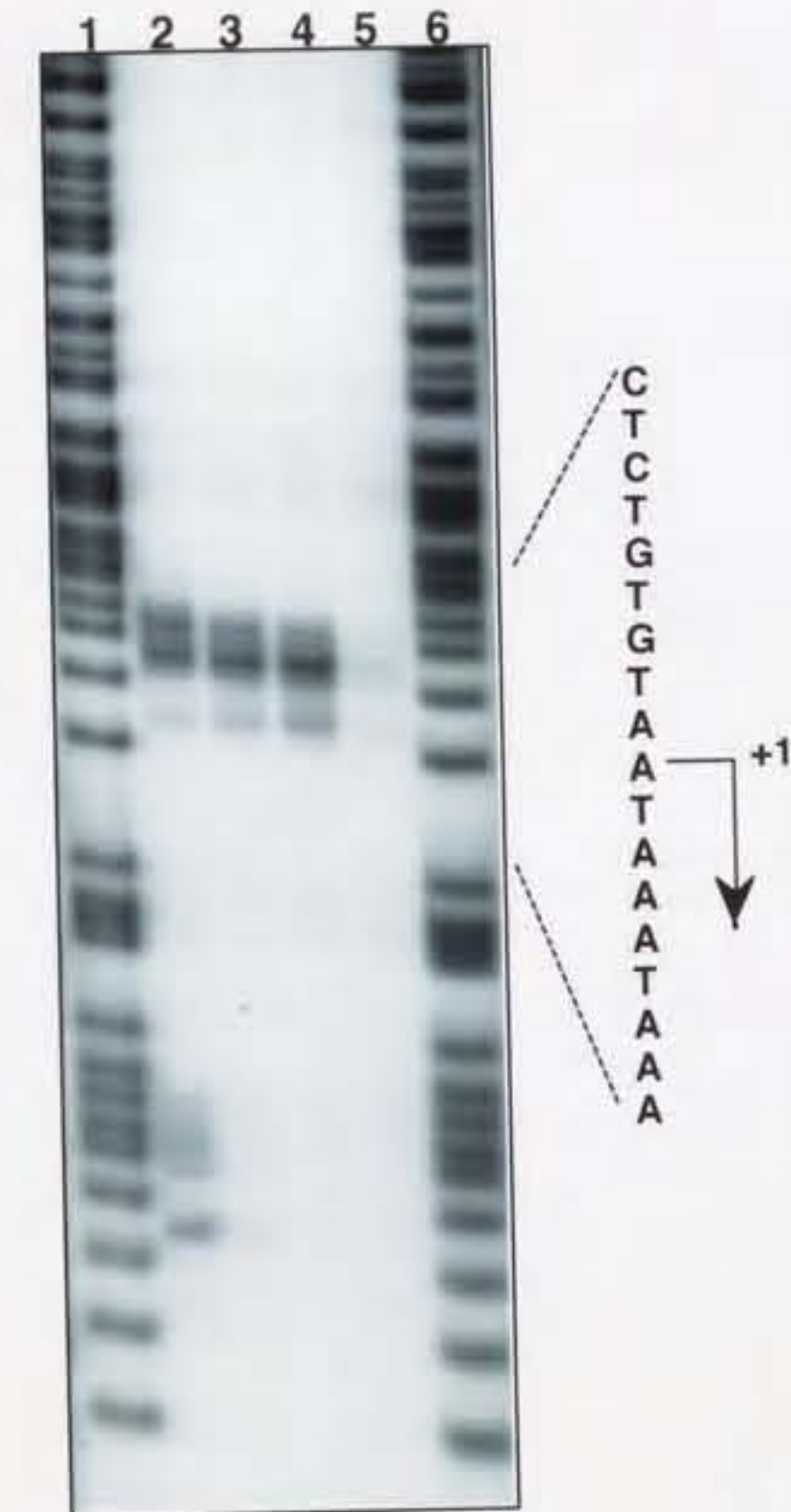


Figure II-2. S1 mappingによる*ptsG*転写開始点の決定  
 RNA 100 $\mu$ gを用いて本章3-4に従い、S1 mappingを行った。lane2、3、4はpp6 RNA(100 $\mu$ g)をDNAプローブとhybridizationさせた後、S1 nuclease処理を5分(lane2)、10分(lane3)、15分(lane4)を行った。pp48 RNAは同様にhybridizationさせた後、S1 nuclease処理を15分(lane5)を行った。A+G Maxam Gilbert 反応産物 (lane1、6)をmarkerとして転写開始点の決定を行った。

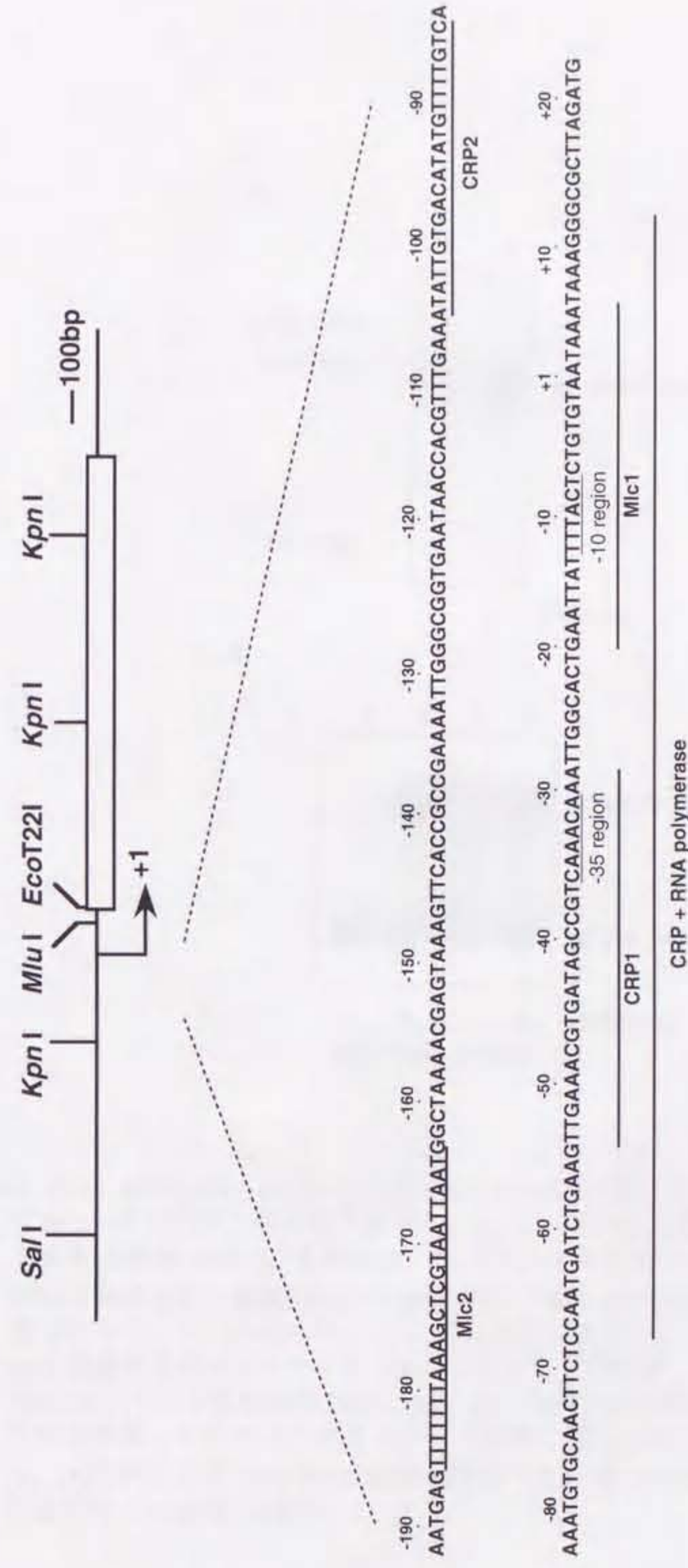


Figure II-3. *ptsG* promoter領域におけるDNA配列とタンパク質結合部位  
*ptsG*及び、その近傍における制限酵素切断部位と*ptsG*コード領域(□)を示した(上図)。尚、矢印は転写開始点、転写方向を  
 表している。*ptsG* promoter領域のDNA配列(-192bpから+22bp)をタンパク質結合部位と共に示した(下図)。-10配列、-35配  
 列をDNA配列の下に下線で表した。また、DNase I footprinting(Figure II-9)より同定したCRP-cAMP、Micの結合部位を下線  
 で示した。



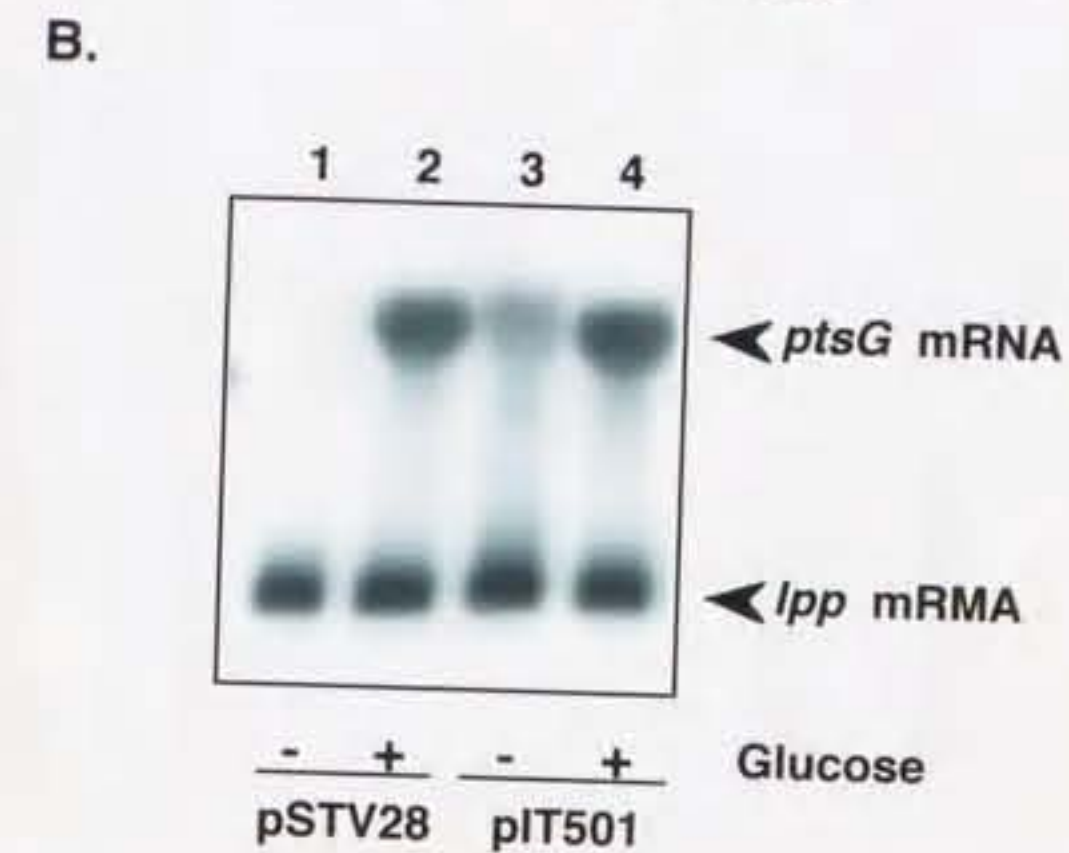
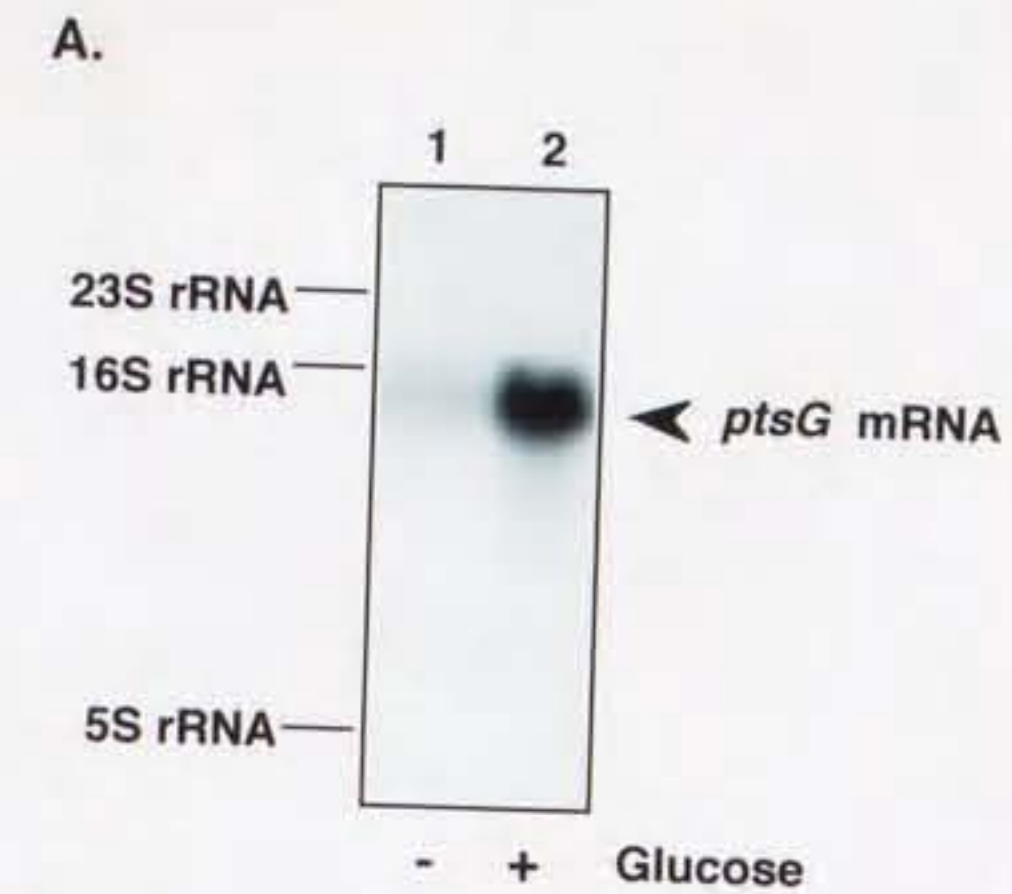


Figure II-4. Northern blottingによる*ptsG* mRNA量の定量

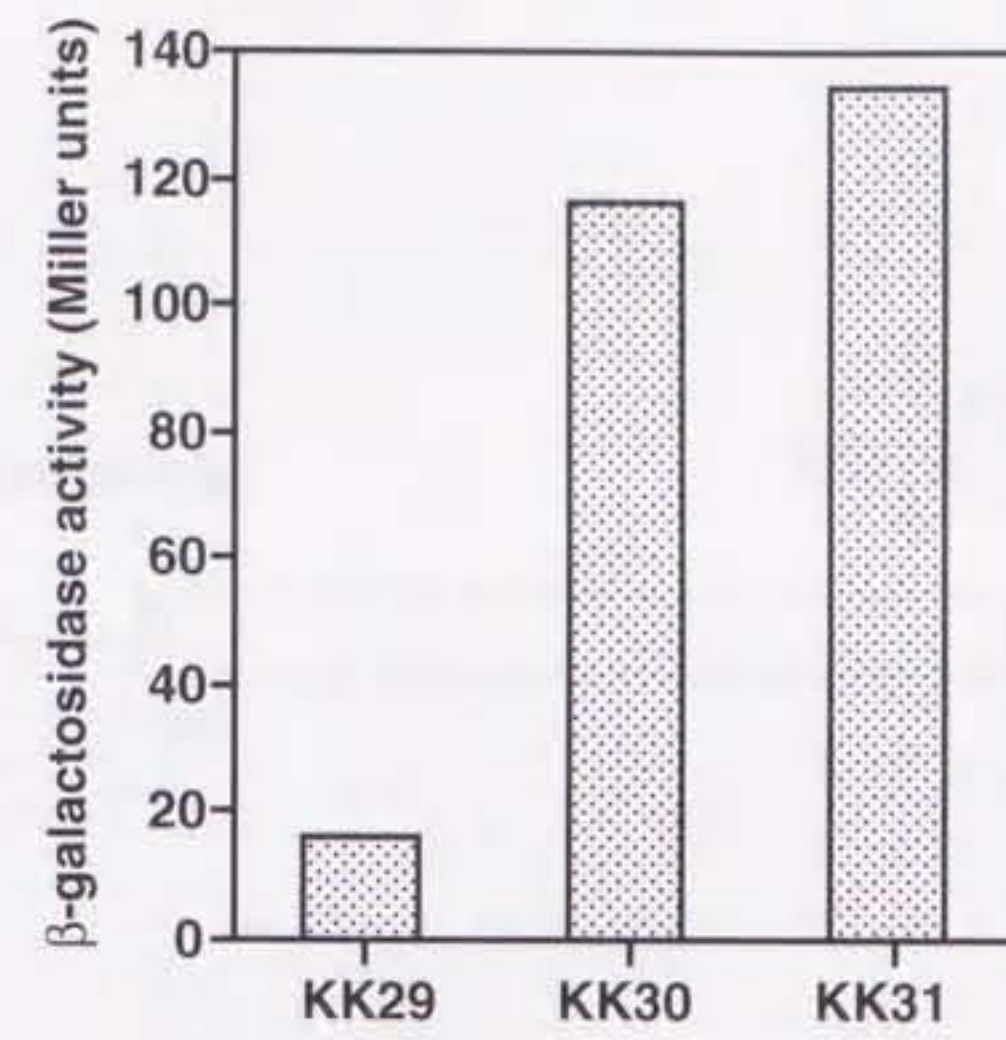
(A) グルコース存在下、非存在下における*ptsG* mRNA量の定量

pp6をLB培地(lane1)、またはLB+1%グルコース培地(lane2)で $OD_{600}=0.6$ まで培養し、RNAを抽出した。総量 $50\mu\text{g}$ のRNAを用いてnorthern blottingによる*ptsG* mRNA量の定量を行った。尚、*ptsG* DNAプローブは前章と同じものを用いた。

(B) *ptsG*発現誘導におけるマルチコピープラスミドの影響

pp6のpSTV28形質転換株(lane1、2)、pp6のpIT501形質転換株(lane3、4)についてそれぞれLB培地、またはLB+1%グルコース培地で $OD_{600}=0.6$ まで培養し、RNAを抽出した。(A)と同じ条件でnorthern blottingを行った。尚、internal controlとして*lpp* mRNAの定量を行った(本章3-3参照)。

A.



B.

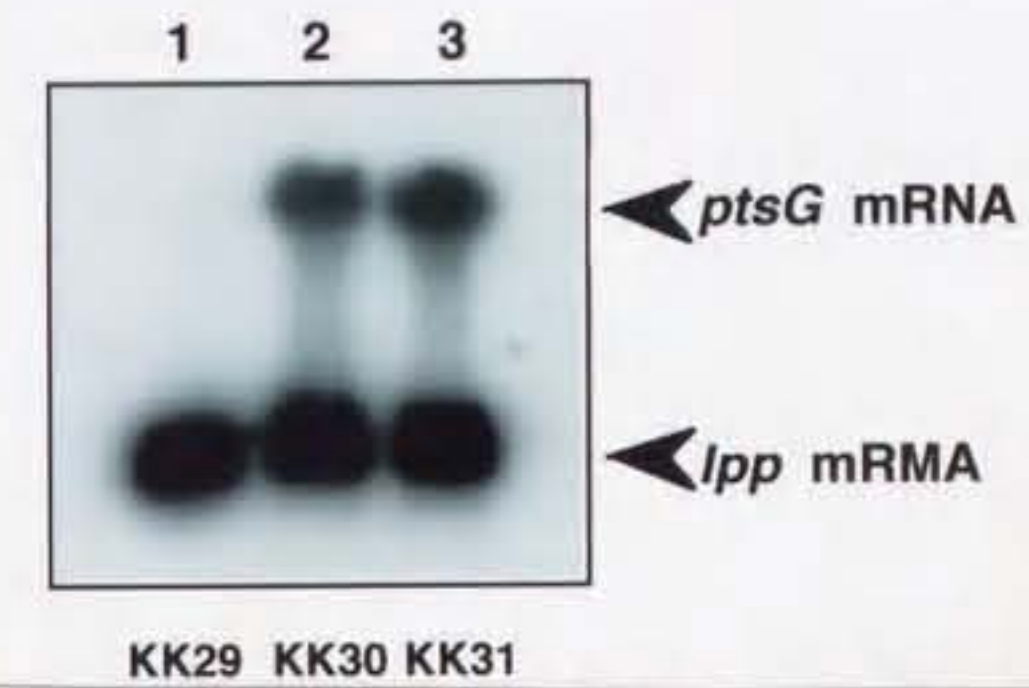
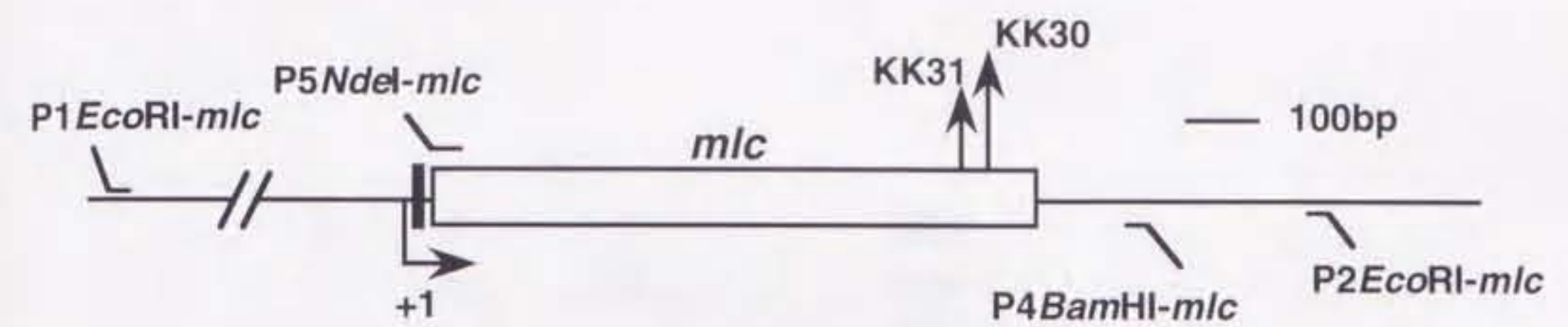


Figure II-5. miniTn10挿入変異株KK30、KK31における*ptsG*発現  
(A) KK29、KK30、KK31の*ptsG-lacZ* fusionの発現  
KK29、KK30、KK31をLB培地でOD<sub>600</sub>=0.6まで培養し、 $\beta$ -galactosidase assayを行った。  
(B) KK29、KK30、KK31における*ptsG* mRNA量の定量  
(A)と同時にRNAのサンプリングを行い、northern blottingによる解析を行った。  
尚、northern blottingの条件はFigure II-4.と同様である。

A.



B.

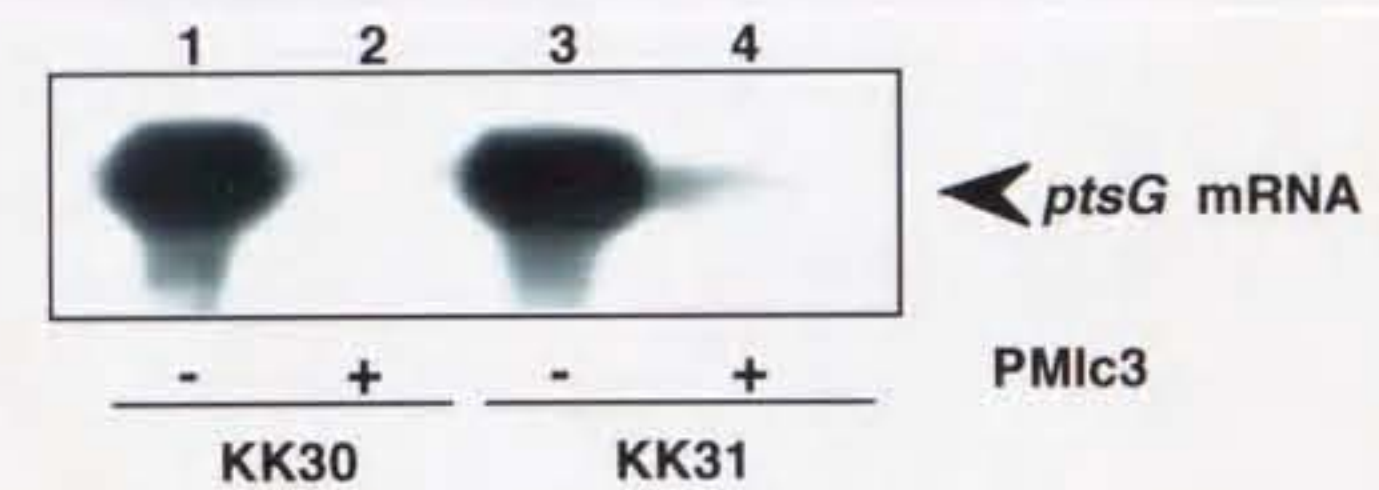


Figure II-6. *mlc* プラスミド導入による相補実験

(A) KK30、KK31のminiTn10挿入部位

*mlc*遺伝子近傍付近を示した(Hosono et al., 1995; Aiba et al., 1996; Decker et al., 1998)。

それぞれ、*mlc*コード領域(□)、*mlc*転写開始点と転写方向(→)、Mlc結合部位(■)も併せて示す。miniTn10挿入部位はKK30では*mlc*コード領域の1157bp、KK31は*mlc*コード領域の1135bpの位置である(↑)。尚、PCRに用いたprimerの位置も記した。

(B) KK30、KK31の*mlc*プラスミドpMlc3形質転換株における*ptsG*の発現

KK30、KK31にそれぞれ、vector(pSTV28)とpMlc3を導入し、northern blottingによって*ptsG* mRNA量の定量を行った。KK30のvector(pSTV28)形質転換株、lane1; KK30のpMlc3形質転換株、lane2; pSTV28を導入したKK31、lane3; pMlc3を導入したKK31、lane4である。尚、northern blottingの条件はFigure II-4.と同様である。

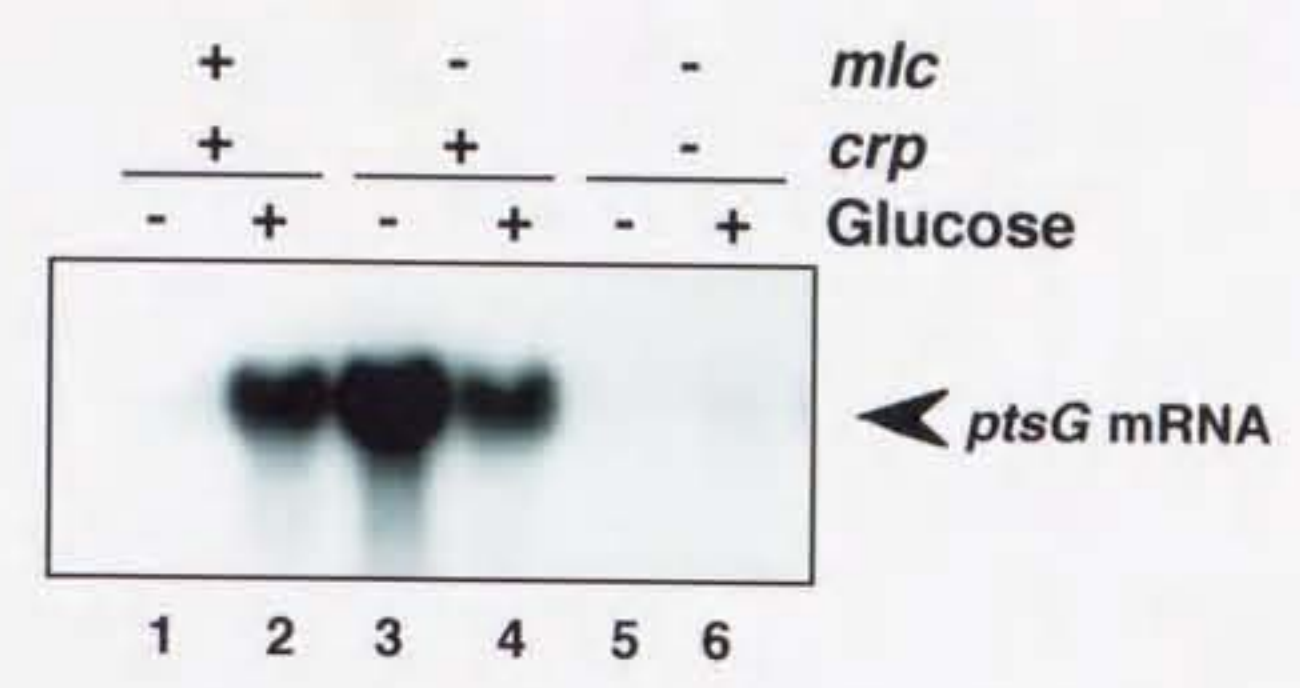


Figure II-7. *mlc*、*crp* 変異株の*ptsG*の発現におけるグルコースの影響  
 各変異株の*ptsG*発現について、グルコース存在下、非存在下における*ptsG* mRNA量の定量をnorthern blottingによって行った。pp6 (lane1、2)、KK32 (lane3、4)、KK33 (lane5、6)をそれぞれ、LB培地、またはLB+1%グルコース培地でOD<sub>600</sub>=0.6まで培養し、RNAを抽出した。尚、northern blottingの条件はFigure II-4.と同様である。

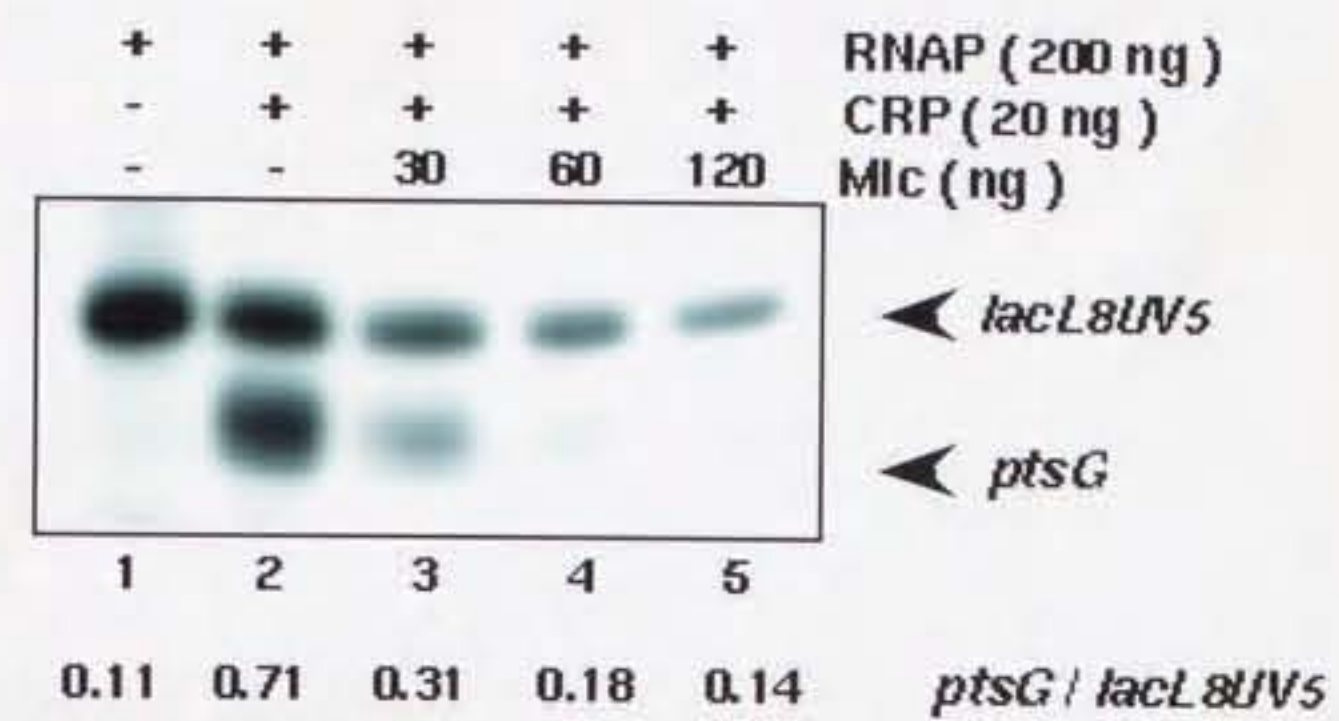
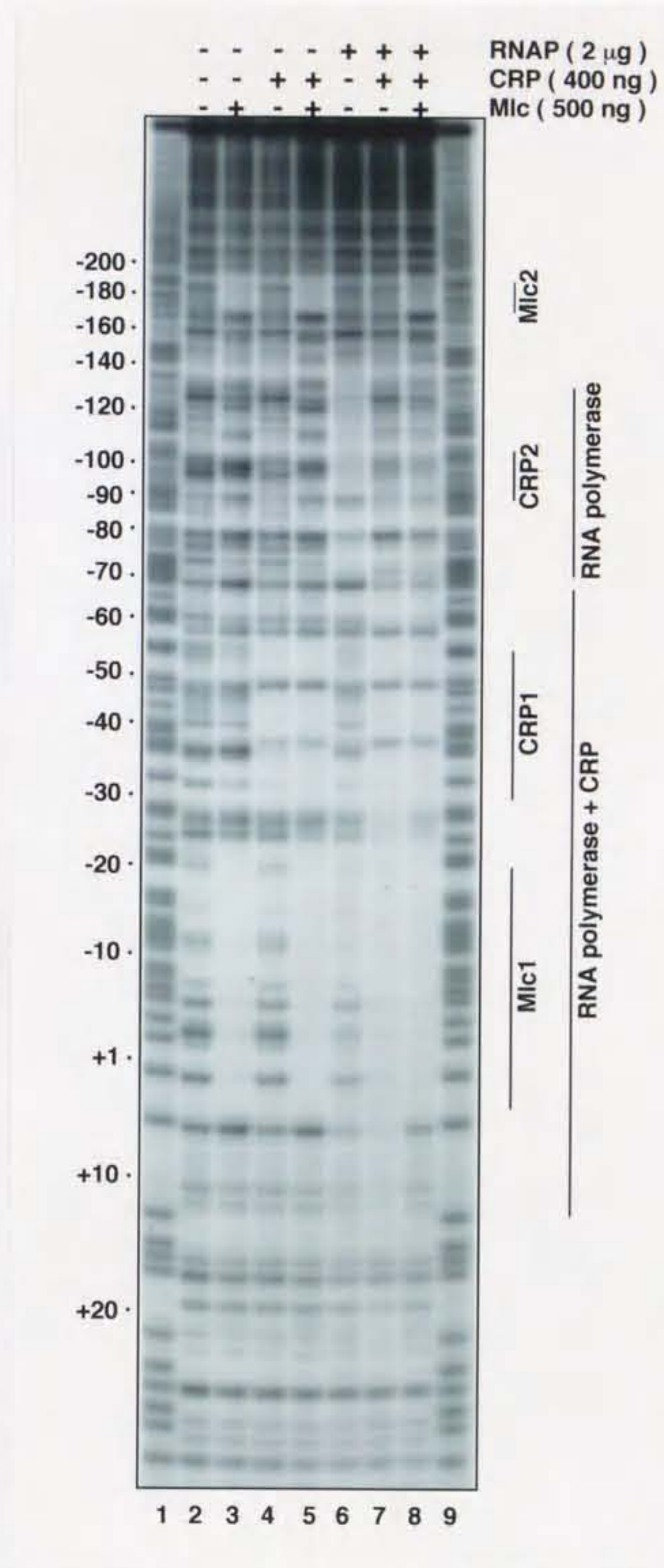


Figure II-8. *in vitro*系での*ptsG*転写におけるCRP-cAMP、Mlcの影響  
 本章3-8に従い、*in vitro*転写を行った。それぞれ、*ptsG*鋳型DNA、*lacL8UV5*鋳型DNAに上記の量のCRP、Mlcを加えた。*in vitro*転写はcAMP、RNAPolymerase存在下で( $\alpha$ - $^{32}$ P)UTPを加えた基質を用いて転写反応を行わせた。転写産物は8M尿素-8%ポリアクリルアミドゲルによって分離、解析した。また、*lacL8UV5*転写産物に対する*ptsG*転写産物の量比を下に示した。

Figure II-9. *ptsG* promoterの DNase I footprintingによる解析  
 本章3-9に従い、*ptsG* promoter領域の DNase I footprintingを行った。右記の量のCRP、Mlc、RNA polymeraseを加え、cAMP存在下で、*ptsG* promoter領域を含むDNAプローブに結合させた。このサンプルをDNase Iで部分分解し、生じた反応産物を8M尿素-8%ポリアクリルアミドゲルによって分離させ、オートラジオグラフィーにかけた。A+G Maxam Gilbert 反応産物 (lane1、9)をmarkerとして各タンパク質の結合部位を同定した(一)。尚、lane1の左記の数値は*ptsG* 転写開始点からの距離 (bp)を示す。



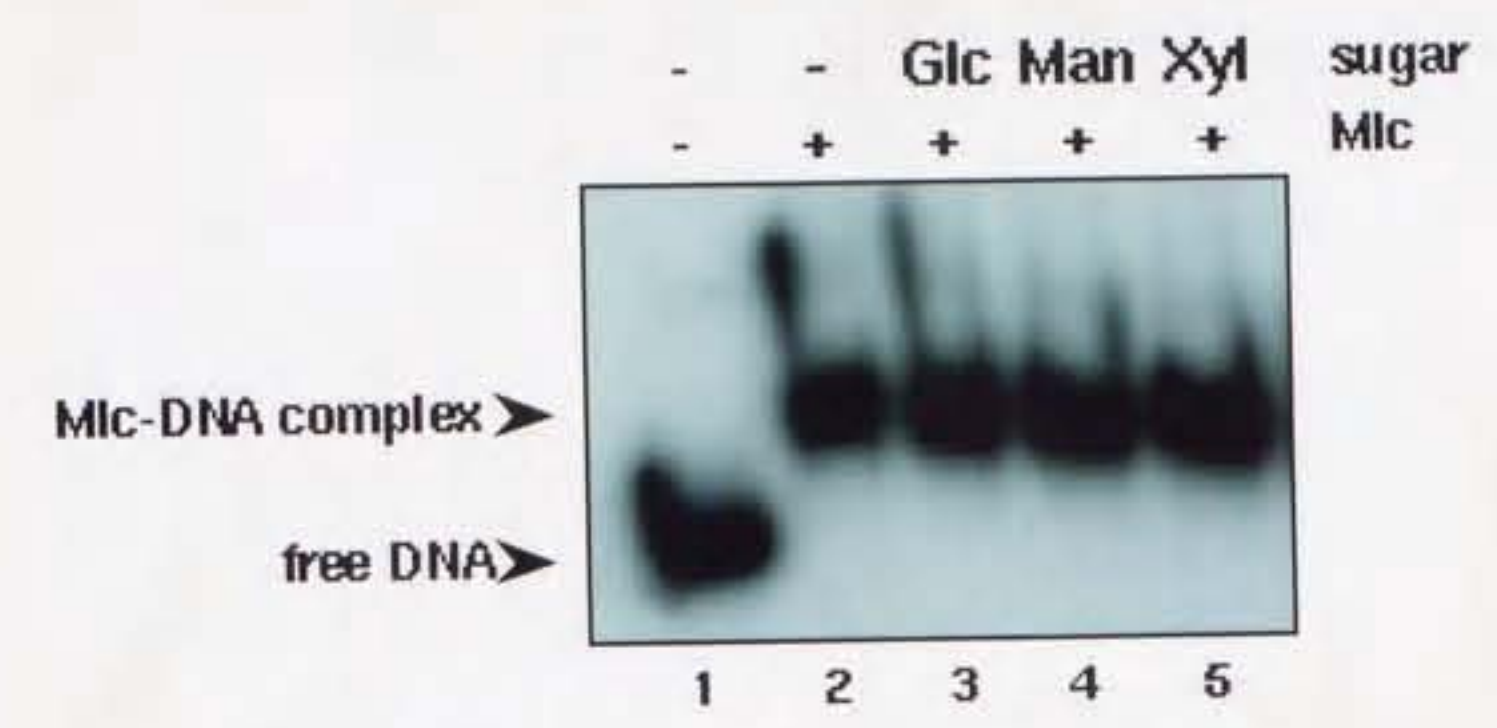


Figure II-10. *ptsG* promoterにおけるMlcの結合

本章3-10に従い、gel shift assayを行った。各糖1mM存在下で、*ptsG* promoter領域を含むDNAプローブにMlcを30ng加え、結合反応を行わせた。Mlcと*ptsG* promoterの結合は5%ポリアクリルアミドゲルによって分離、検出した。また、用いた糖源は、グルコース(lane3)、マンノース(lane4)、キシロース(lane5)である。







## 今後の課題と展望

大腸菌のグルコースによる他の糖代謝系遺伝子の発現抑制は、グルコース効果と呼ばれ、生物における環境応答の最も基本的な例である。この現象は、*lac operon* 発現系を中心とした解析によって、グルコースによる CRP-cAMP 低下作用(カタボライト抑制; Saier, JR. et al., 1996)、グルコースによる inducer となる糖の取り込み阻害作用 (inducer exclusion)(Roseman and Meadow, 1990; Saier and Reizer, 1994)という、2つの制御機構によって制御されていることが明らかとなっている。

しかし、グルコース・ラクトース共存下における *lac operon* の発現抑制に関して上述した2つの制御機構の統合的解析は行われていなかった。初期のグルコース効果の解析において、グルコースによる細胞内 cAMP 濃度低下作用と *lac repressor* 不活性条件下におけるカタボライト抑制の発見は、cAMP を介する転写制御因子 CRP の同定を導いた(Emmer, M. et al., 1970; Zubay, G., 1970)。この経緯から、グルコース・ラクトース系における *lac operon* の発現抑制は、グルコースによる CRP-cAMP 低下作用と結びつけられ、その制御機構に関して cAMP モデルが提唱された(Makman and Sutherland, 1965; Ullman and Monod, 1968)。

この cAMP モデルに対して、Inada, Kimata らは、グルコース・ラクトース系における *lac operon* の発現抑制に関して、これらの2つの制御機構の統合的解析を行った。その結果、グルコース・ラクトース共存下での *lac operon* の発現抑制は、グルコースによる CRP-cAMP 低下作用によって引き起こされるのではなく、グルコースによる inducer exclusion 作用が主因であることが明らかとなった(Inada et al., 1996)。

そこで、次に、*lac operon* におけるグルコース抑制効果に関して、CRP-cAMP はどのように寄与しているのかという問題が生じた。

この問題に関して、*lac* L8UV5 変異株を用いた本研究により、CRP-cAMP が、inducer exclusion 機構を構成するタンパク質 IICB<sup>Glc</sup> をコードする遺伝子 *ptsG* の転写制

御を介して、グルコース効果に必須な役割を果たしていることが判明した(第1章参照)。

さらに、グルコース効果における *ptsG* 発現制御の重要性に着目し、*ptsG* 発現制御でのグルコースの寄与を解析した。その結果、*ptsG* の転写が、グルコース誘導性の負の転写制御因子 Mlc によって制御されることが明らかとなった(第II章参照)。

Mlc は近年、転写制御因子としての機能が明らかになりつつあるタンパク質である。Mlc は *ptsG* の他に *manXYZ* operon(Plumbridge, 1998)、*malT*、*mlc*(Decker et al., 1998)、*pts* operon(Tanaka et al., submitted for publication)の転写制御を行うことが明らかとなっている。これらの殆どの遺伝子が糖代謝系に関与することから、他の糖代謝、または生合成系のタンパク質遺伝子が Mlc の制御を受ける可能性が挙げられる。これらの遺伝子については、*Mud* phage 等を利用した screening を計画している。

また、Mlc の機能構造の解析についても明らかにしたいと考えている。生化学的な手法を用いて、Mlc が *in vivo* において dimer 若しくは tetramer 以上の多量体で機能するのかどうかという問題や、各ドメインにおける DNA 結合能等について解析を行う必要がある。さらに、Mlc 変異の screening を行い、Mlc の DNA 結合領域やグルコース活性制御領域を同定したいと考えている。特に、グルコースによる Mlc の活性制御機構について他の介在因子等の寄与も含め、解析を行う予定である。この解析によって、従来のグルコースによる遺伝子発現低下作用と異なる新たなグルコースによる制御機構が明らかになると考えられる。現在までの研究から、*in vitro* において、Mlc が直接グルコースまたはその代謝産物(カタボライト)(Fraenkel, 1996)によって活性を制御されるというデータは得られていない。しかし、本研究では、解糖系の代謝酵素である phosphofructokinase(*pfk*)や phosphoglucose isomerase (*pgi*)欠損株(Fraenkel, 1996)においてはグルコース存在下における *ptsG* 発現誘導がみられないことが判明しており、何らかのカタボライトが Mlc の活性制御機構に関与することが示唆されている(データは示していない)。

大腸菌の糖代謝系や PTS 系に関与する転写制御因子として、本研究によって明らかにされた Mlc の他に CRP、cAMP、FruR が挙げられる(Figure III-1.)。FruR は FPr(序章2)参照)や *pts* operon を負に制御するほかに、TCA サイクルの酵素である isocitrate dehydrogenase、glyoxalate 経路酵素を正に制御することが知られている(Ramseier et al., 1993; Ryu et al., 1995; Saier, JR. and Ramseier, 1996; Saier, JR. et al., 1996)。この FruR はフルクトース-1-リン酸、フルクトース-1,6-2 リン酸によって活性制御を受ける (Rephaeli, A. W., and Saier, M. H., Jr., 1980; Ramseier et al., 1993)。今後は、これらのカタボライト誘導性糖代謝制御因子を含め、グルコース効果制御機構の統合的解析を行い、情報伝達機構としてのグルコース効果の新しいモデルの確立を行いたいと考えている。

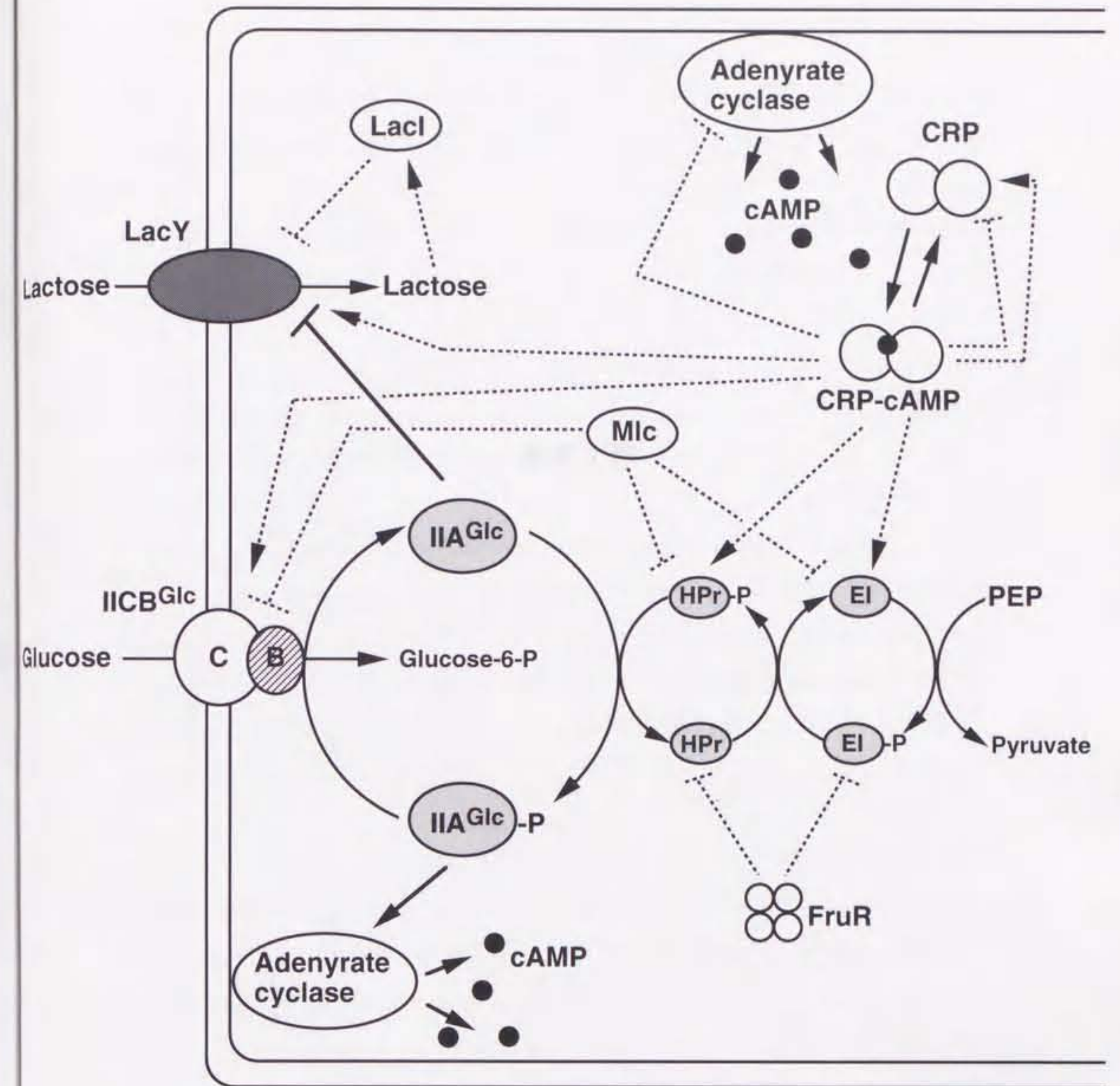


Figure III-1. PTS系構成タンパク質とその発現に関する転写制御因子  
 PTS系を構成するタンパク質とその発現に与ることが判明している転写制御因子を上図に示す。また、タンパク質の活性制御(—)、コードする遺伝子の転写制御(---)も併せて示した。詳しくは、本文、及び、review (Saier et al., 1996; Postma et al., 1996)及び参考論文(Takahashi et al., 1996)を参照されたい。

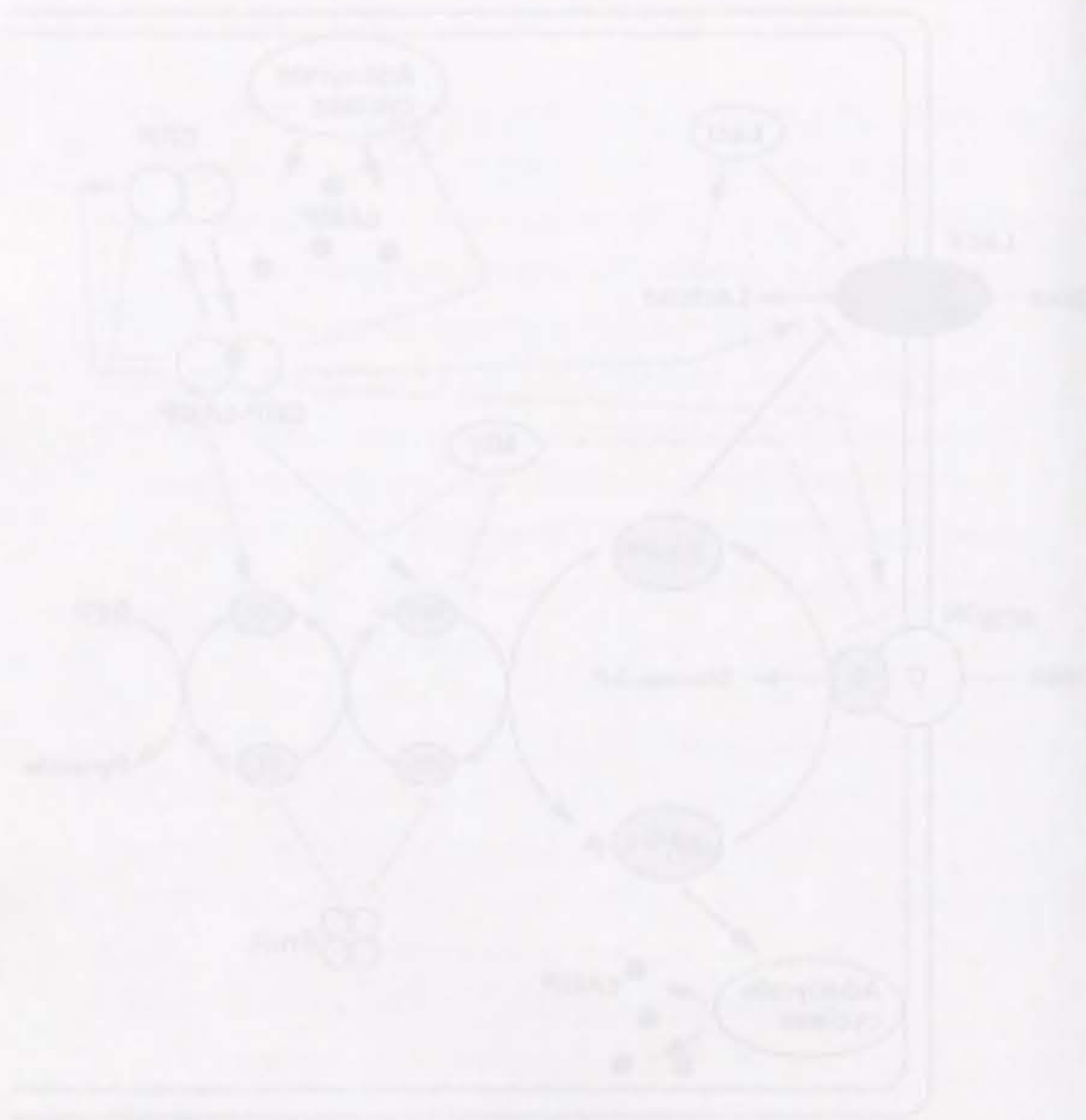


Figure 1: A complex flowchart diagram illustrating a system or process. The diagram shows a central node (2) connected to various other nodes, including 'System' nodes and smaller circles. The flowchart is enclosed in a rectangular border.

参考文献

1. [Faint, illegible text]

2. [Faint, illegible text]

3. [Faint, illegible text]

4. [Faint, illegible text]

5. [Faint, illegible text]

6. [Faint, illegible text]

7. [Faint, illegible text]

8. [Faint, illegible text]

9. [Faint, illegible text]

10. [Faint, illegible text]

11. [Faint, illegible text]

12. [Faint, illegible text]

13. [Faint, illegible text]

14. [Faint, illegible text]

15. [Faint, illegible text]

16. [Faint, illegible text]

17. [Faint, illegible text]

18. [Faint, illegible text]

19. [Faint, illegible text]

20. [Faint, illegible text]

21. [Faint, illegible text]

22. [Faint, illegible text]

23. [Faint, illegible text]

24. [Faint, illegible text]

25. [Faint, illegible text]

26. [Faint, illegible text]

27. [Faint, illegible text]

28. [Faint, illegible text]

29. [Faint, illegible text]

30. [Faint, illegible text]

31. [Faint, illegible text]

32. [Faint, illegible text]

33. [Faint, illegible text]

34. [Faint, illegible text]

35. [Faint, illegible text]

36. [Faint, illegible text]

37. [Faint, illegible text]

38. [Faint, illegible text]

39. [Faint, illegible text]

40. [Faint, illegible text]

41. [Faint, illegible text]

42. [Faint, illegible text]

43. [Faint, illegible text]

44. [Faint, illegible text]

45. [Faint, illegible text]

46. [Faint, illegible text]

47. [Faint, illegible text]

48. [Faint, illegible text]

49. [Faint, illegible text]

50. [Faint, illegible text]

51. [Faint, illegible text]

52. [Faint, illegible text]

53. [Faint, illegible text]

54. [Faint, illegible text]

55. [Faint, illegible text]

56. [Faint, illegible text]

57. [Faint, illegible text]

58. [Faint, illegible text]

59. [Faint, illegible text]

60. [Faint, illegible text]

61. [Faint, illegible text]

62. [Faint, illegible text]

63. [Faint, illegible text]

64. [Faint, illegible text]

65. [Faint, illegible text]

66. [Faint, illegible text]

67. [Faint, illegible text]

68. [Faint, illegible text]

69. [Faint, illegible text]

70. [Faint, illegible text]

71. [Faint, illegible text]

72. [Faint, illegible text]

73. [Faint, illegible text]

74. [Faint, illegible text]

75. [Faint, illegible text]

76. [Faint, illegible text]

77. [Faint, illegible text]

78. [Faint, illegible text]

79. [Faint, illegible text]

80. [Faint, illegible text]

81. [Faint, illegible text]

82. [Faint, illegible text]

83. [Faint, illegible text]

84. [Faint, illegible text]

85. [Faint, illegible text]

86. [Faint, illegible text]

87. [Faint, illegible text]

88. [Faint, illegible text]

89. [Faint, illegible text]

90. [Faint, illegible text]

91. [Faint, illegible text]

92. [Faint, illegible text]

93. [Faint, illegible text]

94. [Faint, illegible text]

95. [Faint, illegible text]

96. [Faint, illegible text]

97. [Faint, illegible text]

98. [Faint, illegible text]

99. [Faint, illegible text]

100. [Faint, illegible text]

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., Fujimoto, S., and Ozaki, N. (1982). Molecular cloning and nucleotide sequencing of the gene for *E. coli* cAMP receptor protein. *Nucleic Acids Res* 10, 1345-1361.

Aiba, H., and Krakow, J. S. (1981). Isolation and characterization of the amino and carboxyl proximal fragments of the adenosine cyclic 3',5'-phosphate receptor protein of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 20, 4774-4780.

Aiba, H., Baba, T., Hayashi, K., Inada, T., Isono, K., Itoh, T., Kasai, H., Kashimoto, K., Kimura, S., Kitakawa, M., Kitagawa, M., Makino, K., Miki, T., Mizobuchi, K., Mori, H., Mori, T., Motomura, K., Nakade, S., Nakamura, Y., Nashimoto, H., Nishio, Y., Oshima, T., Saito, N., Sampei, G., Horiuchi, T., et al. (1996). A 570-kb DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12 genome corresponding to the 28.0-40.1 min region on the linkage map. *DNA Research* 3,363-377.

Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277,1453-1462.

Botsford, J.L., and Drexler, M. (1978). The cyclic 3',5'-adenosine monophosphate receptor protein and regulation of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate synthesis in *Escherichia coli*. *Molec.gen.Genet.* 165,47-56.

Bouma, C.L., Meadow, N.D., Stover, E.W., and Roseman, S. (1987). II-B<sup>Glc</sup>, a glucose receptor of the bacterial phosphotransferase system: molecular cloning of *ptsG* and purification of the receptor from an over producing strain of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 84, 930-934.

Busby, S., and Ebright, R.H. (1994). Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. Cell. 79, 743-746.

De Reuse, H., and Danchin, A. (1991). Positive regulation of the *pts* operon of *Escherichia coli*: genetic evidence for a signal transduction mechanism. J Bacteriol 173, 727-733.

De Reuse, H., and Danchin, A. (1988). The *ptsH*, *ptsI*, and *crr* genes of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: a complex operon with several modes of transcription. J Bacteriol 170, 3827-3837.

Decker, K., Plumbridge, J., and Boos, W. (1998). Negative transcriptional regulation of a positive regulator: the expression of *maltT*, encoding the transcriptional activator of the maltose regulon of *Escherichia coli*, is negatively controlled by Mlc. Mol Microbiol 27, 381-390.

Dickson, R.C., Abelson, J., and Johnson, P. (1977). Nucleotide sequence changes produced by mutation in the *lac* promoter of *Escherichia coli*. J Mol Biol 111, 65-75.

Eilen, E., Pampeno, C., and Krakow, J.S. (1978). Production and properties of the  $\alpha$  core derived from the cyclic adenosine monophosphate receptor protein of *Escherichia coli*. Biochem 17, 2469-2473.

El-Mansi, E.M.T. and Holms, W.H. (1989). Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. J. Gen. Microbiol. 135, 2875-2883.

Emmer, M., de Crombrughe, 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 66, 480-487.

Epstein, W., Naono, S. and Gros, F. (1966). Synthesis of enzymes of the lactose operon during diauxic growth of *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Comm 24, 588-592.

Epstein, W., Rothman-Denes, L. B., and Hesse, J. (1975). Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate as mediator of catabolite repression in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 72, 2300-2304.

Erni, B., and Zanolari, B. (1986). Glucose-permease of the bacterial phosphotransferase system. Gene cloning, overproduction, and amino acid sequence of enzyme IIGlc. J Biol Chem 261, 16398-16403.

Erni, B., Zanolari, B., and Kocher, H.P. (1987). The mannose permease of *Escherichia coli* consists of three different proteins. J Biol Chem 262, 5238-5247.

Feucht, B. and Saier, M.H., Jr. (1980). Fine control of adenylate cyclase by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase systems in *Escherichia coli* and *Salmonella*. J. Bacteriol. 141, 603-610.

Fraenkel, D.G. (1996). Glycolysis. *Escherichia coli* and *Salmonella* 2nd ed., 189-198. (American Society for Microbiology Press, American Society for Microbiology, New York)

Fraenkel, D.G. (1987). Glycolysis, pentose phosphate pathway, and Entner-Doudoroff pathway. *Escherichia coli* and *Salmonella*, 142-147. (American Society for Microbiology Press, American Society for Microbiology, New York)

Hanamura, A., and Aiba, H. (1992). A new aspect of transcriptional control of the *Escherichia coli* *crp* gene: positive autoregulation. *Mol Microbiol* 6, 2489-2497.

Hoischen, C., Levin, J., Pitaknarongphorn, S., Reizer, J., and Saier, M. H., Jr. (1996). Involvement of the central loop of the lactose permease of *Escherichia coli* in its allosteric regulation by the glucose-specific enzyme IIA of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *J Bacteriol* 178, 6082-6086.

Hosono, K., Kakuda, H., and Ichihara, S. (1995). Decreasing accumulation of acetate in a rich medium by *Escherichia coli* on introduction of genes on a multicopy plasmid. *Biosci Biotechnol Biochem* 59, 256-261.

Hsie, A. W., and Rickenberg, H. V. (1967). Catabolite repression in *Escherichia coli*: the role of glucose 6-phosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 29, 303-310.

Hudson, J.M. & Fried M.G. (1990). Co-operative interactions between the catabolite gene activator and the *lac* repressor at the lactose promoter. *J Mol Biol* 214, 381-396.

Inada, T., Kimata, K., and Aiba, H. (1996). Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model. *Genes Cells* 1, 293-301.

Inada, T., Takahashi, H., Mizuno, T., and Aiba, H. (1996). Down regulation of cAMP production by cAMP receptor protein in *Escherichia coli*: an assessment of the contributions of transcriptional and posttranscriptional control of adenylate cyclase. *Mol Gen Genet* 253, 198-204.

Ishizuka, H., Hanamura, A., Inada, T., and Aiba, H. (1994). Mechanism of the down-regulation of cAMP receptor protein by glucose in *Escherichia coli*: role of autoregulation of the *crp* gene. *Embo J* 13, 3077-3082.

Ishizuka, H., Hanamura, A., Kunitura, 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.

Kakuda, H., Shiroishi, K., Hosono, K., and Ichihara, S. (1994). Construction of Pta-Ack pathway deletion mutants of *Escherichia coli* and characteristic growth profiles of the mutants in a rich medium. *Biosci Biotechnol Biochem* 58, 2232-2235.

Kawamukai, M., Kishimoto, J., Utsumi, R., Himeno, M., Komano, T., and Aiba, H. (1985). Negative regulation of adenylate cyclase gene (*cya*) expression by cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein in *Escherichia coli*: studies with *cya-lac* protein and operon fusion plasmids. *J Bacteriol* 164, 872-877.

Kofoid, E.C. and Parkinson, J.S. (1988). Transmitter and receiver modules in bacterial signaling proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4981-4985.

Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. and Adhya, S. (1993). Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem* 62, 749-795.



Krakow, 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 U S A* 70, 2529-2533.

Kundig, W., Ghosh, S., and Roseman, S. (1964). Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phospho-transferase system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 52, 1067-1074.

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

Lin, E.C.C. (1987). Dissimilatory pathways for sugars, polyols, and carboxylates *Escherichia coli* and *Salmonella*, 244-284. (American Society for Microbiology Press, American Society for Microbiology, New York)

Loomis, J.R., W.F. and Magasanik, B. (1967). Glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli* *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1397-1401.

Malan, T.P. and McClure, W.R. (1984). Dual promoter control of the *Escherichia coli* lactose operon. *Cell* 39, 173-180.

Makman, R.S. and Sutherland, E.W. (1964). Adenosine 3',5'-phosphate in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 240, 1309-1314.

Mckay, D.B. and Steitz, 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)

Morita, T., Shigesada, K., Kimizuka, F. and Aiba, H. (1988). Regulatory effect of a synthetic CRP recognition sequence placed downstream of a promoter. *Nucleic Acids Res* 16, 7315-7332.

Morris, P.W., Binkley, J.P., Henson, J.M., and Kuempel, P.L. (1985). Cloning and location of the *dgsA* gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 163, 785-786.

Moses, V., and Prevost, C. (1966). Catabolite repression of beta-galactosidase synthesis in *Escherichia coli*. *Biochem J* 100, 336-353.

Müller-Hill, B. (1996). *The lac operon* 129-195. (Walter de Gruyter, Berlin)

Nakamura, K., Masui, Y., and Inoue, M. (1982). Use of a lac promoter-operator fragment as a transcriptional control switch for expression of the constitutive *lpp* gene in *Escherichia coli*. *J Mol Appl Genet* 1, 289-299.

Novotny, M. J., Frederickson, W.L., Waygood, E.B. and Saier, M.H.JR. (1985). Allosteric regulation of glycerol kinase by enzyme III<sub>glc</sub> of the phosphotransferase system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 162, 810-816.

Oehler, S., Eismann, E.R., Krämer, H. and Müller-Hill, B. (1990). The three operators of the *lac* operon cooperate in repression. *EMBO J*, 9, 973-979.

Okamoto, K., Hara, S., Bhasin, R., and Freundlich, M. (1988). Evidence in vivo for autogenous control of the cyclic AMP receptor protein gene (*crp*) in *Escherichia coli* by divergent RNA. *J. Bacteriol.* 170, 5076-5079

Oshima, T., Aiba, H., Baba, T., Fujita, K., Hayashi, K., Honjo, A., Ikemoto, K., Inada, T., Itoh, T., Kajihara, M., Kanai, K., Kashimoto, K., Kimura, S., Kitagawa, M., Makino, K., Masuda, S., Miki, T., Mizobuchi, K., Mori, H., Motomura, K., Nakamura, Y., Nashimoto, H., Nishio, Y., Saito, N., Horiuchi, T. et al. (1996). A 718-kb DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12 genome corresponding to the 12.7-28.0 min region on the linkage map. *DNA Research* 3, 137-155.

Osumi, T., and Saier, M. H., Jr. (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 U S A* 79, 1457-1461.

Parkinson, J. S. (1993). Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* 73, 857-871.

Perlman, R. L., and Pastan, I. (1968). Regulation of  $\beta$ -galactosidase synthesis in *Escherichia coli* by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.* 243, 5420-5427.

Perlman, R. L., De Crombrughe, B., and Pastan, I. (1969). Cyclic AMP regulates catabolite and transient repression in *E. coli*. *Nature* 223, 810-812.

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, 369-380.

Plumbridge, J. (1995). Co-ordinated regulation of amino sugar biosynthesis and degradation: the NagC repressor acts as both an activator and a repressor for the transcription of the *glmUS* operon and requires two separated NagC binding sites. *EMBO J.* 14, 3958-3965.

Plumbridge, J., and Kolb, A. (1991). CAP and Nag repressor binding to the regulatory regions of the *nagE-B* and *manX* genes of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 217, 661-679.

Plumbridge, J., and Kolb, A. (1995). Nag repressor-operator interactions: protein-DNA contacts cover more than two turns of the DNA helix [published erratum appears in *J Mol Biol* 1995 Oct 13;253(1):219-20]. *J Mol Biol* 249, 890-902.

Plumbridge, J. A. (1990). Induction of the *nag* regulon of *Escherichia coli* by N-acetylglucosamine and glucosamine: role of the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in expression of the regulon. *J Bacteriol* 172, 2728-2735.

Postma, P. W., Lengeler, J. W. and Jacobson, G. R. (1996). Phosphoenolpyruvate :carbohydrate phosphotransferase systems. *Escherichia coli* and *Salmonella* 2nd ed., 1149-1174. (American Society for Microbiology Press, American Society for Microbiology, New York)

Ramseier, T. M., Negre, D., Cortay, J. C., Scarabel, M., Cozzone, A. J., and Saier, M. H., Jr. (1993). In vitro binding of the pleiotropic transcriptional regulatory protein, FruR, to the *fru*, *pps*, *ace*, *pts* and *icd* operons of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* 234, 28-44.

Rephaeli, A. W., and Saier, M. H., Jr. (1980). Regulation of genes coding for enzyme constituents of the bacterial phosphotransferase system. *J Bacteriol* 141, 658-663.

Richet, E. and Sogaard-Andersen, L. (1994). CRP induces the repositioning of MalT at the *Escherichia coli malKp* promoter primarily through DNA bending. *EMBO J* 13, 4558-4567.

Rockwell, P. and Gottesman, M.E. (1991). An *Escherichia coli rpoB* mutation that inhibits transcription of catabolite-sensitive operons. *J Mol Biol* 222, 189-196.

Roehl, R.A., and Vinopal, R.T. (1980). Genetic locus, distant from *ptsM*, affecting enzyme IIA/II B function in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 142, 120-130.

Roseman, S. and Meadow, N.D. (1990). Signal transduction by the bacterial phosphotransferase system. *J Biol Chem* 265, 2993-2996.

Ryu, S., and Garges, S. (1994). Promoter switch in the *Escherichia coli pts* operon. *J Biol Chem* 269, 4767-4772.

Ryu, S., Ramseier, T. M., Michotey, V., Saier, M. H., Jr., and Garges, S. (1995). Effect of the FruR regulator on transcription of the *pts* operon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270, 2489-2496.

Saier, M. H., Jr., and Feucht, B.U., and McCaman, M.T. (1975). Regulation of intracellular adenosine cyclic 3':5'-monophosphate levels in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 250, 7593-7601.

Saier, M. H., Jr., and Reizer, J. (1994). The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later. *Mol Microbiol* 13, 755-764.

Saier, M.H.JR. and Ramseier, T.M. (1996). The catabolite repressor / activator (Cra) protein of enteric bacteria. *J Bacteriol* 178, 3411-3417.

Saier, M.H.JR., Ramseier, T.M. and Reizer, J. (1996). Regulation of carbon utilization. *Escherichia coli* and *Salmonella* 2nd ed., 1325-1343. (American Society for Microbiology Press, American Society for Microbiology, New York)

Schleif, R. (1996). Two positively regulated systems, *ara* and *mal*. *Escherichia coli* and *Salmonella* 2nd ed., 1300-1309. (American Society for Microbiology Press, American Society for Microbiology, New York)

Silverstone, A. E., Arditti, R. R., and Magasanik, B. (1970). Catabolite-insensitive revertants of *lac* promoter mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 66, 773-779.

Suzuki, T., Itoh, A., Ichihara, S., and Mizushima, S. (1987). Characterization of the *sppA* gene coding for protease IV, a signal peptide peptidase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169, 2523-2528.

Tagami, H., Inada, T., Kunimura, T., and Aiba, H. (1995). Glucose lowers CRP\* levels resulting in repression of the *lac* operon in cells lacking cAMP. *Mol Microbiol* 17, 251-258.

Tagami, H., and Aiba, H. (1998). A common role of CRP in transcription activation: CRP acts transiently to stimulate events leading to open complex formation at a diverse set of promoters. *EMBO J* 17, 1759-1767.

Tanaka, Y., Kimata, K., Inada, T., Tagami, H., and Aiba, H. (1999). Negative regulation of the *pts* operon by Mlc in *Escherichia coli*: mechanism underlying glucose induction. submitted for publication.

Tyler, B., and Magasanik, B. (1969). Molecular basis of transient repression of beta-galactosidase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 97, 550-556.

Tyler, B., Wishnow, R., Loomis, W. F., Jr., and Magasanik, B. (1969). Catabolite repression gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 100, 809-816.

Ullmann, A. and Monod, J. (1968). Cyclic AMP as antagonist of catabolite repression in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 2, 57-60.

Wanner, B.L., Kodaira, R., and Neidhardt, F.C. (1977). Physiological regulation of a decontrolled *lac* operon. *J Bacteriol* 130, 212-222.

Wanner, B.L., Kodaira, R., and Neidhardt, F.C. (1978). Regulation of *lac* operon expression: reappraisal of the theory of catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 136, 947-954.

Way, J.C., Davis, M.A., Morisato, D., Roberts, D.E. and Kleckner, N. (1984). New *Tn10* derivatives for transposon mutagenesis and for construction of *lacZ* operon fusions by transposition. *Gene* 32, 369-379.

Yang, J. K., Bloom, R. W., and Epstein, W. (1979). Catabolite and transient repression in *Escherichia coli* do not require enzyme I of the phosphotransferase system. *J Bacteriol* 138, 275-279.

Zubay, G., Schwartz, D. and Beckwith, J. (1970). Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes: a positive control system. *Proc Natl Acad Sci* 66, 104-110.

## 参考論文副論文、及び、参考論文

### 副論文

cAMP receptor protein-cAMP plays a crucial role in glucose-lactose diauxie by activating the major glucose transporter gene in *Escherichia coli*

Keiko Kimata, Hideyuki Takahashi, Toshifumi Inada, Pieter Postma and Hiroji Aiba

Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.

vol.94, pp.12914-12919, November 1997

A global repressor (Mlc) is involved in glucose induction of the *ptsG* gene encoding major glucose transporter in *Escherichia coli*

Keiko Kimata, Toshifumi Inada, Hideaki Tagami and Hiroji Aiba

*Molecular Microbiology*, vol.29(6), pp.1509-1519, 1998

### 参考論文

Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model

Toshifumi Inada, Keiko Kimata and Hiroji Aiba

*Genes to Cells*, vol. 1, pp. 293-301, 1996

## 謝辞

本研究テーマを与えてくださり、実験や学位論文作成に関して丁寧に御指導をしてくださった理学研究科、生命理学専攻 情報機構学講座 (旧分子生物学科 第一講座)の饗場弘二教授、稲田利文助手、田上英明助手、阿保達彦助手に深く感謝致します。実験方法や結果について様々な助言、指摘をして頂き、相談に乗ってくださった高橋英之先輩、安倍裕順先輩、柳沢達男先輩に深く感謝致します。また、実験全般にわたり、細かな指導、助言を頂いた講座の皆様方にお礼を申し上げます。最後に、私を支えてくれた両親と妹に心から感謝致します。

