



|              |  |
|--------------|--|
| Title        | 大腸菌におけるリン酸レギュロン遺伝子群の調節：<br>pstS遺伝子のプロモーターの特徴   |
| Author(s)    | 木村, 重信   |
| Citation     | 大阪大学, 1989, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/36599">https://hdl.handle.net/11094/36599</a>  |
| rights       |  |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|         |   |       |    |       |
|---------|---|-------|----|-------|
| 氏名・(本籍) | 木   | 村     | 重  | 信     |
| 学位の種類   | 医   | 学     | 博  | 士     |
| 学位記番号   | 第   | 8470  | 号  |       |
| 学位授与の日付 | 平成元年  | 3月    | 2日 |       |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当                                      |       |    |       |
| 学位論文題目  | 大腸菌におけるリン酸レギュロン遺伝子群の調節： <i>pstS</i> 遺伝子のプロモーターの特徴 |       |    |       |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教授  | 中田 篤男 |    |       |
|         | (副査)<br>教授  | 吉川 寛  | 教授 | 三輪谷俊夫 |

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

大腸菌では、培地中のリン酸の欠乏によって1群の遺伝子発現がめられる。これはリン酸の有効利用に働く適応応答反応と考えられている。これらの遺伝子群の中、*pohB* 遺伝子の機能に依存して発現する遺伝子群はリン酸レギュロンと呼ばれ、*pohA* (アルカリ性ホスファターゼ)、*phoE* (外膜ポリンeタンパク)、*pstS* (リン酸結合タンパク)、*ugpB* (グリセロリン酸結合タンパク) 等が知られている。これらのプロモーター領域にはリン酸ボックスと呼ばれる18塩基対の共通配列が存在している。リン酸レギュロンの発現におけるリン酸ボックスの役割を解明する目的で、*pstS* 遺伝子 (プロモーター領域にリン酸ボックスがタンデムに2個存在する) のプロモーター領域での欠失DNA断片を作製して *in vivo* でのプロモーター活性を調べ、*pstS* 遺伝子発現に必要な領域を明らかにした。

#### 〔方法ならびに成績〕

*pstS* 遺伝子のプロモーター領域を含む959塩基対のDNA断片を、プロモーター活性測定用ベクターpKK232-8の*cat* 遺伝子 (プロモーター領域を欠く) の上流に繋いで大腸菌に導入し、高濃度リン酸培地と低濃度リン酸培地で培養して、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ (CAT) の活性を測定することによりプロモーター活性を確かめた。この*pstS* 遺伝子DNA断片を反対方向に含む一对のクローンを用いて、穏やかにDNase I処理し、リンカー付加によって上流側と下流側とから欠失したDNA断片を作製した。上流側が欠失した32クローンと下流側が欠失した46クローンの塩基を決定し、それぞれのDNA断片をpKK232-8に再クローニングし、大腸菌に導入し、同様の方法でプロモーター活性を調べた。上流側の欠失クローンでは、2個のリン酸ボックスまで残っていると、欠失のないクローンと同

様、高いCAT活性がみられた。欠失が上流のリン酸ボックスにかかると、リン酸の欠乏によって誘導されるCAT活性は大きく低下したが、高濃度リン酸による抑制は明らかにみられた。下流のリン酸ボックスまで欠失するとリン酸欠乏による誘導はみられなくなった。これらのこととは、リン酸欠乏時に $pstS$ 遺伝子が発現するためには、少なくとも下流側の1個のリン酸ボックスが必要であり、リン酸ボックスが2個になるとさらに強い発現が起こることを示している。下流側の欠失クローンでは、転写開始点から+36塩基下流までの欠失では高いプロモーター活性がみられ、+3塩基までの欠失では誘導はみられるが活性は減少し、-8塩基（-10配列の第5塩基）ないしそれ以上にわたっての欠失では、プロモーター活性は全くみられなくなった。このことは、+36塩基以下の配列はプロモーター活性とは関係ないが、-10配列はプロモーターの機能に必須であることを示している。

次に $pstS$ 遺伝子の発現が $phoB$ 遺伝子に依存していることを確かめるために、リン酸ボックス2個あるいは1個を含むDNA断片をもつプラスミドを作製し、野生型株および各種 $phoB$ 遺伝子突然変異株に導入した。 $phoB62$ 株と $phoB63$ 株とはアルカリ性ホスファターゼは産出しないが、 $pstS$ 遺伝子産物であるリン酸結合タンパクは産生し、 $phoB$ - $phoR$ 欠失突然変異株はそのどちらも産生しないものである。リン酸ボックスを2個又は1個持つプラスミドを導入した野生株では、リン酸欠乏によって誘導されたCAT活性は前者が10倍以上高い値を示した。 $phoB62$ 株及び $phoB63$ 株ではリン酸ボックスの数及びリン酸結合タンパクの産生量に比例したCAT活性がみられた。 $phoB$ 欠失株では、どちらの場合もCAT活性がみられなかった。これらのこととは、 $pstS$ 遺伝子の発現が $phoB$ 遺伝子の機能に依存していることを示し、 $phoB62$ 株と $phoB63$ 株では $phoB$ 遺伝子の機能が漏れているものと考えられる。また、 $phoA$ 遺伝子がこれらの $phoB$ 突然変異体で発現しないのは、 $phoA$ 遺伝子の上流には1つのリン酸ボックスしかない為であろうと考えられる。

次に、各種欠失DNAの断片とPhoBタンパクとの結合をポリアクリルアミドゲル電気泳動によって調べた。このゲルシフトアッセイ法で、PhoBタンパクはリン酸ボックスを含む領域に結合し、その結合はプロモーター活性を失った上流側の1個のリン酸ボックスだけでもおこるという結果がえられた。

### 〔総括〕

大腸菌リン酸レギュロンは培地中のリン酸の欠乏によって発現が誘導される遺伝子群である。この遺伝子群の発現は、 $phoB$ タンパクがDNA上の特定の塩基配列（リン酸ボックス）を認識することによって促進される、という仮説を立証する為に、リン酸レギュロンの代表的遺伝子である $pstS$ 遺伝子（リン酸結合タンパクの構造遺伝子）のプロモーター領域を、5'側及び3'側から欠失をさせたクローンを *in vitro* で作製し、その下流に $cat$ 遺伝子を繋いで、*in vivo* でCAT活性を測定することによってプロモーターの活性をみた。その結果、プロモーター活性（培地中のリン酸濃度によって制御を受ける）に最少限必要な領域は1個のリン酸ボックスと-10配列を含む領域であり、リン酸ボックスが2個ある場合にはさらに高いプロモーター活性をしめすことを明らかにした。また、 $pstS$ 遺伝子の発現には $phoB$ 遺伝子の機能が必須であることも明らかにした。さらに、PhoBタンパクはリン酸ボックスと直接結合することも明らかにした。

## 論文の審査結果の要旨

大腸菌の遺伝子の中で、培地中のリン酸濃度が低下した時に *phoB* 遺伝子に依存して発現が誘導される遺伝子群はリン酸レギュロンと呼ばれる。これらのプロモーター領域には相同性の高い塩基配列（リン酸ボックス）が存在する。本論文は *in vivo* での発現誘導におけるリン酸ボックスの役割を解明するために、*pstS* 遺伝子のプロモーター領域（リン酸ボックスが 2 個存在する）を含む DNA 断片を、上流側あるいは下流側から欠失させてプロモーター活性アッセイ用ベクターに組み込み大腸菌に導入して、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼの活性を測定することによってプロモーター活性を調べた。その結果、下流側のリン酸ボックスと -10 配列を含む領域が、リン酸濃度によって制御を受けるプロモーター活性に必要な最小限の領域であり、リン酸ボックスが 2 個ある場合はさらに高い活性を示すことを明らかにした。また、PhoB タンパクは、上流側あるいは下流側のリン酸ボックスのいずれの 1 個をもつ DNA 断片とも結合することも明らかにした。以上のこととは、リン酸の欠乏時には PhoB タンパクがリン酸レギュロン遺伝子のプロモーター領域のリン酸ボックスを認識して、RNA ポリメラーゼによる転写開始を促進するという機構が *in vivo* においても働いていることを示している。