



Title	Dual Regulation of the <i>ugp</i> Operon by Phosphate and Carbon Starvation at Two Interspaced Promoters
Author(s)	笠原, 恵
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38010
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	笠原 恵
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 10144 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 生理系専攻
学位論文名	Dual Regulation of the <i>ugp</i> Operon by Phosphate and Carbon Starvation at Two Interspaced Promoters (大腸菌の <i>ugp</i> オペロンの発現調節機構：リン酸および炭素原の欠乏により発現誘導される二つのプロモーターについて)
論文審査委員	(主査) 教授 中田 篤男 (副査) 教授 吉川 寛 教授 本田 武司

論文内容の要旨

(目 的)

大腸菌では培地中のリン酸濃度が一定以下に低下すると、20個以上の遺伝子の発現誘発が起こる。そのうち、*phoB* 遺伝子に依存して発現する遺伝子（あるいはオペロン）群はリン酸レギュロンと呼ばれている。*ugp* オペロンもリン酸レギュロンの一つで *sn*-グリセロール-3-リン酸 (G3P) の能動輸送系とその代謝酵素をコードする 5 個の遺伝子 (*ugpBAECQ*) で構成されている。本研究は、*ugp* オペロンのプロモーター領域の解析およびその発現調節機構を明らかにしようとしたものである。

(方法および結果)

1) *ugp* オペロンの転写開始点の決定

ugp オペロンのプロモーター解析の第一段階として、SI マッピング法によって転写開始点を決定し、2箇所 (*ugp1* と *ugp2*) から転写が開始していることを発見した。リン酸レギュロンを構成的に高いレベルで発現している突然変異株 (*pstS* 株) では、*ugp1* からの高いレベルの転写が見られた。*ugp1* の上流には -10 配列とさらにその上流には 3 個の *pho* box (リン酸レギュロン遺伝子群のプロモーターに見られる 18塩基対のコンセンサス配列) が存在していた。野性型株を高リン酸培地で培養すると、*ugp2* (*ugp1* から 48塩基対上流) からの低レベルの転写のみが見られ、*ugp2* の上流には -10 配列と -35 配列とが存在していた。以上のことは、*ugp* オペロンには 2 個のプロモーターが存在して、リン酸欠乏状態では高レベルで発現し、高リン酸条件下では低レベルで発現することを示している。

2) PhoB 蛋白による転写の活性化と PhoB 蛋白の *pho* box 領域への結合

リン酸レギュロン遺伝子の発現は、リン酸化 PhoB 蛋白が *pho* box 領域に結合して転写酵素によ

る転写を活性化すると考えられている。*ugp* 1 からの転写がこの仕組みによることを確かめるため、まずプロモーター領域を含む DNA 断片を鋳型として *in vitro* の転写実験を行った。PhoB 蛋白は PhoR 蛋白によってリン酸化されるので、この転写実験には PhoR 蛋白と ATP も加えた。その結果、精製した PhoB 蛋白を加えた場合は *ugp* 1 からの強い転写のみが見られ、PhoB 蛋白を加えない場合には *ugp* 2 からの弱い転写のみが見られた。これらのことは、リン酸化 PhoB 蛋白が *ugp* 1 からの転写を促進し、*ugp* 2 からの転写を抑制していることを示唆している。

次に、リン酸化 PhoB 蛋白の *pho* box 領域への結合をフットプリンティング法によって調べた。プロモーター領域を含む DNA 断片と精製した PhoB 蛋白（リン酸レギュロンを構成的に発現している株から分離した）とを混合し、DNase I の部分的処理による切断部位とジメチル硫酸によってメチル化したプリン塩基を調べ、PhoB 蛋白が 3 個の *pho* box を含む約 100 塩基対の領域に結合することを証明した。以上のことから、*ugp* 1 からの転写はリン酸レギュロン遺伝子の発現機構によると結論した。

3) *ugp* オペロン発現の二重調節機構

ugp 2 転写開始点の上流の -35 領域の塩基配列は *pho* box 3（最上流の *pho* box）の中に含まれ、*pho* box 3 の中には部分的に CRP 部位（cAMP/CRP 複合体の結合部位）のコンセンサス配列と考えられる塩基配列が含まれている。この塩基配列が実際に cAMP/CRP 複合体による発現調節に機能しているかどうか調べるため、また、*ugp* 1 からの転写が *in vivo* で *phoB* 遺伝子の機能に依存していることを確かめるために、調節領域を含む DNA 断片を上流と下流から段階的に欠失させて、*cat*（クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ）遺伝子上流につないだ組換え体プラズミッドを作成し、各種の突然変異株に導入してプロモーター活性を測定した。その結果、下流のプロモーター（*Pugp* 1）はリン酸欠乏によって *phoB* 遺伝子の機能に依存した強い発現誘導が起こり、最上流の *pho* box 3 を欠失させると発現はさらに高まり、上流から *pho* box 2 までを欠失させても発現は低下するが、なおリン酸欠乏による発現誘導は起こり、*pho* box 1（-10 に最も近接した *pho* box）までを欠失させるとプロモーター活性は全く消失した。一方、*Pugp* 2（上流のプロモーター）による発現はグルコース欠乏によって誘導が起こり、下流から *Pugp* 1 の -10 領域を欠失させるとさらに顕著な発現誘導が起こった。その発現は活性化 PhoB 蛋白が存在するとやや低下し、活性化 PhoB 蛋白が *Pugp* 2 のレプレッサーとして働くことを示唆している。さらに、この発現誘導は *crp*⁻（CRP 蛋白欠損）あるいは *cya*⁻（アデニールシクラーゼ欠損）突然変異株では全く起こらないことから、*Pugp* 2 プロモーターは cAMP/CRP に依存して発現するものと結論した。

（総括）

大腸菌の *ugp* オペロンは、G 3 P の能動輸送系とその代謝酵素をコードしており、2 個のプロモーターによって発現が調節されている。その 1 個は無機リン酸の欠乏によって、他の 1 個は、グルコースの欠乏によって発現誘導が起こる。G 3 P はリン原としても炭素原としても利用することができ、どちらが欠乏しても G 3 P を効率よく利用するための系を構成するように発現が調節されているものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

大腸菌の *ugp* オペロン (*sn*-グリセロール-3-リン酸の能動輸送系とその代謝酵素をコードする遺伝子群) は、リン酸レギュロン遺伝子群の一つで、培地中のリン酸濃度が低下すると発現誘導が起こることが、遺伝子学的解析から知られていた。本研究では、*ugp* オペロンの調節領域を分子生物学的に解析し、プロモーターが2個存在しており、その1個は無機リン酸の欠乏によってPhoB 蛋白 (PhoR 蛋白によってリン酸化した) に依存した転写の活性化が起こり、他の1個のプロモーターからの発現は、cAMP/CRP システムに依存しており、グルコースの欠乏によって発現が増大することを明らかにした。大腸菌の遺伝子で、プロモーターが2個以上存在している例は、いくつか知られているが、それぞれの発現機構を明確に解析した例は少ない。従って、本論文は学位論文として価値あるものと認める。