



| | |
|--------------|--|
| Title | Mode of promoter recognition by the Escherichia coli RNA polymerase holoenzyme containing the σ_70 subunit : identification of the recognition sequence of the fic promoter. |
| Author(s) | 平津, 圭一郎 |
| Citation | 大阪大学, 1996, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/39905 |
| 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 | 平 津 圭一郎 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (医 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 1 2 3 5 6 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 8 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 | Mode of promoter recognition by the <i>Escherichia coli</i> RNA polymerase holoenzyme containing the σ^s subunit : identification of the recognition sequence of the <i>fic</i> promoter. (大腸菌の増殖定常期特異的RNAポリメラーゼE σ^s のプロモーター認識機構) |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 品川日出夫 |
| | (副査) 教 授 松田 守弘 教 授 本多 武司 |

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

大腸菌のRNAポリメラーゼホロ酵素 ($2\alpha, \beta, \beta', \sigma$) はシグマ因子 (σ) 変換により認識するプロモーターの種類を変え、環境の変化に適応するための遺伝子群を発現調節する。増殖定常期に特異的なシグマ因子 σ^s (*rpoS* の遺伝子産物) はコアRNAポリメラーゼと結合し (E σ^s)、定常期に発現する約30の遺伝子群を転写することが知られているが、E σ^s が認識する塩基配列は分かっていない。我々はこれを明らかにするために、in vivo, in vitro 双方で σ^s 依存性が確認されている *fic* 遺伝子のプロモーター (*ficp*) を用いて解析を行なった。

[方法ならびに成績]

ficp 領域DNAにPCRによりランダムに変異を導入し、これをプラスミド上の *lacZ* 遺伝子と連結し、野生株中でプロモーター活性が低下する変異体をX-galを含むLBプレート上で、白または薄青のコロニーを選択する方法で多数分離した。変異体の塩基配列を調べた結果、変異はすべて主要シグマ因子 σ^{70} に対する -10 認識共通配列 ('TATAAT 3') に良く似た 5 'TATACT 3' のいずれかの塩基に起きていた。また、*rpoS* 遺伝子をクローニングして σ^s を大量発現、精製をし、再構成した E σ^s によりこれらの変異 *ficp* で in vitro 転写実験を行なったところ、そのプロモーター活性は in vivo の結果と良く一致した。更に、 σ^{70} の -10 認識共通配列を持つ他のいくつかのプロモーターも in vitro 転写系で E σ^s に転写されたので E σ^s のプロモーター認識には -10 共通配列が必要である事が解かった。 σ^s のアミノ酸配列は σ^{70} と相同性が高い為、その認識配列も類似していることが予想されていた。-10 領域に関しては上記の通り類似性が見られたが、-35 領域の変異体は得られなかったので、更に -35 領域を含む -10 領域周辺に PCR 変異では得られない 5 塩基の連続変異を導入したが、 σ^s 依存的な発現に変化は見られなかった。*ficp* と E σ^s を用いた DNaseI フットプリントアッセイでも、-10 領域は保護されたが、-35 領域には保護は見られなかった。また、 σ^{70} において -35 領域を直接認識することが証明されている部位 region4.2 は σ^s でも良く保存されているが、この部位を欠失した変異体 ($\sigma^s \Delta C$) を用いた in vitro 転写実験で E $\sigma^s \Delta$ でも *ficp* を転写することを確認した。これらの結果は -10 領域以外の塩基配列は E σ^s の認識に関与していないことを示唆した。

[総括]

以上の結果から、大腸菌の増殖定常期特異的RNAポリメラーゼE σ^s のプロモーター認識には、主要シグマ因子 σ^{70} の -10 認識共通配列またはそれに非常に類似した -10 配列が必須であると同時に、-10 領域以外の塩基配列は関

与しないことが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、大腸菌の定常期に特異的なシグマ因子 σ^s をふくむRNAポリメラーゼホロ酵素が認識するプロモーターの塩基配列を、in vivo および in vitro 実験で解析したものである。このホロ酵素は定常期に約30個の遺伝子を転写することが知られているが、その認識配列は不明であった。本研究によって、その認識配列が主要シグマ因子 σ^{70} の-10認識共通配列またはそれに非常に類似した-10配列の6塩基のみで必要十分であることが明らかになり、-35配列が必要無い特異な性質を示すシグマ因子であることが証明された。本研究によって定常期特異的なシグマ因子の認識するプロモーター配列が初めて明らかにされ、よって本研究は学位に値すると考えられる。