

oxyR の転写開始点上流に存在するプロモーター

——過酸化水素は逆向きの転写を誘導する

吉田 あや, 武部 聡

Divergent promoter, existed in *oxyR* promoter region, is hydrogen peroxide-inducible

Aya Yoshida and So Takebe

I. はじめに

酸素は呼吸のような効率の良いエネルギー生産を行うために有用な物質であるが、酸素分子から生じた活性酸素（スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカルや種々の酸素ラジカルなど）は概して反応性が高く、生物に様々な障害をもたらすことが知られている。そのため好氣的条件下で成育する生物には、活性酸素に対する様々な防御機構が存在している¹⁻⁴⁾。その中のひとつとしてよく知られているものに、大腸菌における活性酸素適応応答がある。適応応答とは生体を害のない程度の低濃度の毒性物質にさらすと、この物質の変異原性や毒性に対し抵抗性を示すようになることであり⁵⁾、大腸菌では致死効果を示さない程度の低濃度（通常 30 μ M）の過酸化水素で処理しておく、その致死作用（mM オーダー）に対して抵抗性を獲得するようになる⁶⁾。この耐性の獲得には前処理中にある種のタンパク質が誘導合成されることが必要で、過酸化水素を消去する酵素カタラーゼや DNA 修復に関与する酵素などが含まれる⁷⁾。

過酸化水素による前処理の間に合成されるタンパク質としては30種が検出されており、この中には前述のカタラーゼや DNA 修復酵素のほか、スーパーオキシドを消去する酵素スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、アルキルヒドロペルオキシド還元酵素、グルタチオン (GSH) 還元酵素など過酸化水素の消去に直接関与しないと思われる消去系酵素も含まれている。このことから活性酸素適応応答のシ

ステムを考えると、細胞が刺激を受けた後、消去系酵素や修復系酵素の遺伝子発現を誘導する因子の存在が必要になる。このような調節因子の遺伝子として Ames らによって大腸菌から *oxyR* が単離された⁸⁾。OxyR は活性酸素消去酵素群の正の発現制御因子であり、カタラーゼの遺伝子 (*katG*)、Mn-SOD の遺伝子 (*sodA*)、アルキルヒドロペルオキシド還元酵素の遺伝子 (*ahpC, F*)、GSH 還元酵素の構造遺伝子 (*gor*) などは *oxyR* の支配下にある。つまり、これらの遺伝子のプロモーター領域の上流に存在する OxyR 結合部位に活性化された OxyR が結合すると、転写量が増加する。一方 OxyR は、自身をコードする遺伝子 *oxyR* に対しては転写の抑制因子として働いている⁸⁾。OxyR の結合部位は *oxyR* の転写開始点付近にあり、ここに OxyR が結合することにより RNA ポリメラーゼによる転写をブロックすると考えられている。実際に、*in vitro* 転写系においては、OxyR の添加により *oxyR* の転写が行われなくなることが観察されている⁹⁾。しかし、細胞内の OxyR 濃度は過酸化水素の有無にかかわらずほぼ一定に保たれており¹⁰⁾、OxyR の *oxyR* プロモーター領域への結合力は活性型、不活性型でほとんど変化しない¹¹⁾ ことから、*in vivo* では複雑な転写制御機構が働いていると考えられる。

本研究室において、プロモーターを持たない *lacZ* の上流に *oxyR* を *lacZ* の転写方向とは逆向きに挿入すると、*lacZ* の産物である β -ガラクトシダーゼが過酸化水素によって誘導される現象が観察された。これは、OxyR にはその転写を行うプロモーター (PoxyR) の他に逆方向の転写を行うプロモーター (Pd) が存在することを示唆しており、Pd の過酸化水素による活性変動は、*oxyR* の自己発現制御機構

を考える上で興味深く思われた。そこで、*in vivo* における *PoxyR* と *Pd* の転写活性が、過酸化水素によりどのように変化するのかを検討した。

II. 実験材料・方法

1. 実験材料

大腸菌 MC1061 (*hsdR mcrBaraD 139Δ (araABC-leu) 7679 Δ lacX74 galU galK rpsL thi*) は、 β -ガラクト

シダーゼ活性の測定および RNA の調製に用いた。大腸菌 JM109 (*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ (lac-proAB F' [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15])*) はプローブ DNA の調製に用いた。プラスミド pMS437C は *lacZ* のプロモーター領域を欠いた部分を持ち、この上流に制限酵素 *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* の切断部位をそれぞれ一か所ずつ持つ (図1)。これらの部位を利用して *oxyR* のプロ

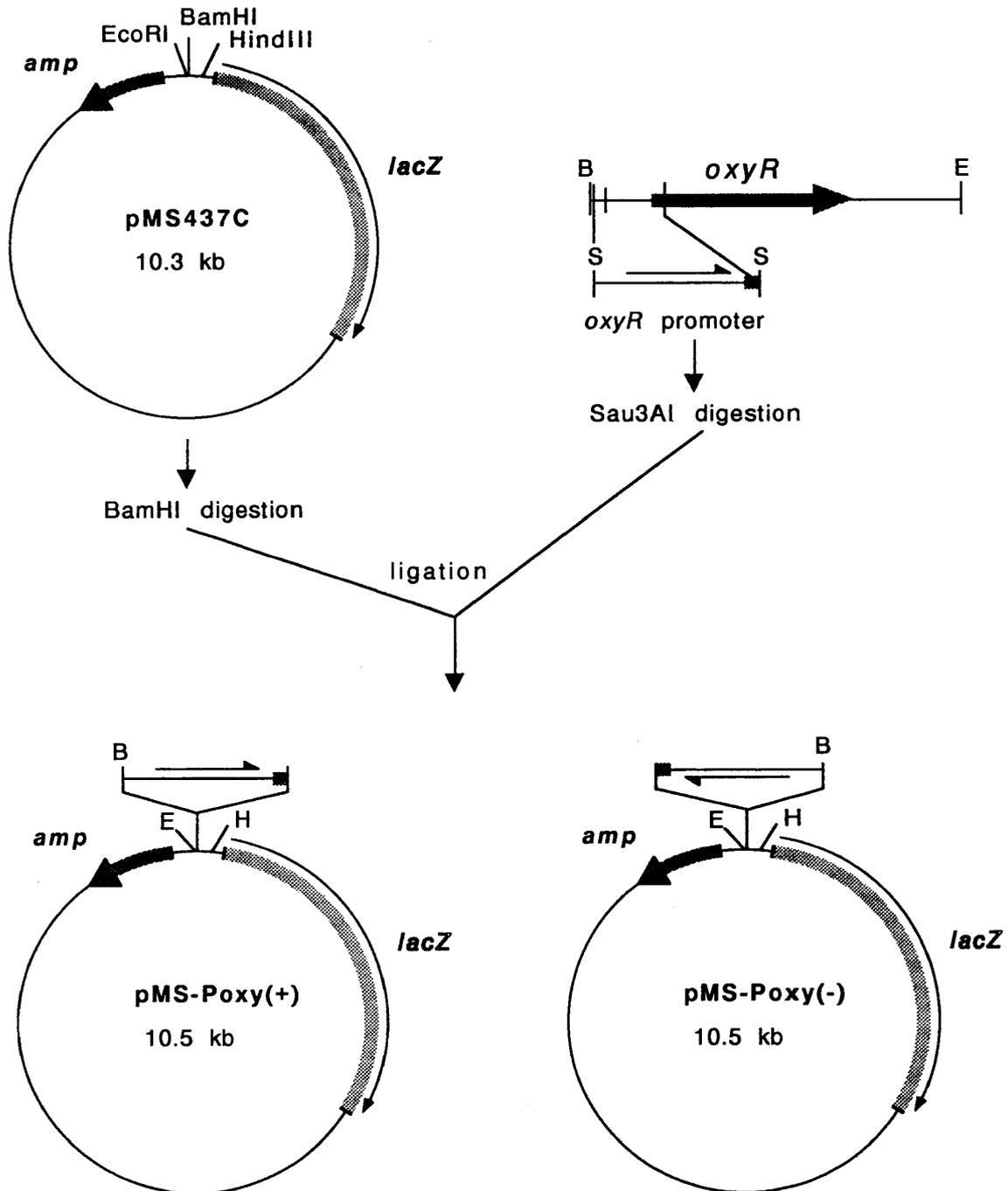


図1 pMS-Poxy(+), pMS-Poxy(-) の構築
B, *BamHI*; E, *EcoRI*
S, *Sau3AI*; H, *HindIII*

モーター領域を挿入し、プロモーター活性測定のためのプラスミドを構築した。pUC118はpUC18から開発されたフェージミドベクター¹²⁾で、プライマー伸長法によるプローブDNAの調製に用いた。

制限酵素など遺伝子操作用酵素類は東洋紡社製を使用した。RNAを吸着させるナイロンメンブレンはポール社製BIODYNEを用い、プローブDNAの標識および核酸の検出にはペーリンガーマンハイム社製のDIG核酸検出キットを使用した。過酸化水素は三徳科学工業社製を、o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG)、および、その他試薬はナカライテスク社製を用いて調製した。

2. プロモーター活性の測定

pMS437Cの*lacZ*の上流に挿入されたDNA断片の大腸菌内におけるプロモーター活性は、*lacZ*の発現量すなわちβ-ガラクトシダーゼ活性の測定とプロモーター領域からの転写産物量の変化を調べることにより求めた。

a) β-ガラクトシダーゼ活性値の測定¹³⁾

目的のプラスミドを含む大腸菌を対数増殖期まで培養し、培養液の600 nmにおける吸光度を記録した(OD₆₀₀)。培養液0.1 ml (v)にβ-メルカプトエタノールを含むリン酸緩衝液(pH 7.0)を加え全量を1 mlにした。これと少量のクロロホルムとを激しく攪拌することにより菌体を破壊し、ONPG (4 mg/ml, リン酸緩衝液に溶解)200 μlを基質として37°Cで反応させた。反応は1 M炭酸ナトリウム500 μlを加えることで停止し、遠心分離して菌体破砕物を除いた後溶液の420 nmにおける吸光度を測定した(OD₄₂₀)。単位時間における活性値は次式により算出した。

$$\text{活性値 (units)} = 1000 \times \frac{\text{OD}_{420}}{t \times v \times \text{OD}_{600}}$$

t = 反応時間 (min)

v = 反応液 1 ml 中の培養液量 (ml)

b) 転写量変化の観察

転写量変化は、RNAのスロットプロットハイブリダイゼーション法により観察した。目的のプラスミドを含む大腸菌を対数増殖期まで培養し、フェノール-SDS法¹⁴⁾により全RNAを調製したものを試料として用いた。試料中のRNA量は、吸光度(1 OD₂₆₀ = 40 μg/ml)より求め、一定量のRNAをスロット(BioRad社製スロットプロットSF)を通してナイロンメンブレンに吸着させ、80°Cで2時間加熱することにより固定した。プローブDNAの

標識はプライマー伸長法によりジゴキシンゲン標識デオキシウリジン三リン酸の新鎖中への取り込みで行った。DNA-RNAハイブリッドの形成は、プローブDNA存在下、メンブレンを68°Cで一晩保温することにより行い、目的RNAへのハイブリッド形成の確認は、抗ジゴキシンゲンアルカリ性ホスファターゼ標識を使用したELISA法により、5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (X-リン酸)とnitroblue tetrazorium salt (NBT)の発色反応によって行った。

III. 実験結果

1. pMS-Poxy(+), pMS-Poxy(-)の構築

大腸菌の遺伝子発現は、RNAポリメラーゼのプロモーター認識から始まる。RNAポリメラーゼがDNAのプロモーター領域に結合し、複合体が形成されると転写が始まり、mRNAが合成される。合成されたmRNAには、ただちにリボゾームがその認識部位に結合してタンパク質合成を開始するため、遺伝子の発現量とプロモーター活性はよい相関を持つことが多い。そこで、*oxyR*のプロモーター領域を*lacZ*のアミノ酸コード領域の上流に挿入し、プロモーター活性を*lacZ*の発現量、すなわちβ-ガラクトシダーゼ活性によって定量するためのプラスミドの構築を行った。

プロモーター検索用ベクターpMS437Cは、プロモーター領域を欠いた*lacZ*を持ち、その転写方向に対して上流に*Bam*HI切断部位が一か所だけ存在する(図1)。また*oxyR*のプロモーター領域は、*Sau*3AIにより204 bpの断片(PoxyR断片)として切り出すことが可能である(図2)。また、*Sau*3AIの切り口は*Bam*HIの切り口と相補的な塩基配列を有するので、それぞれの制限酵素で消化したDNA断片は、DNAリガーゼによる連結が可能である。

このようにして、pMS437Cの*Bam*HI部位に*oxyR*のプロモーター領域を挿入して組み換え体を作成し、*lacZ*の転写方向と同じ向きに*oxyR*のプロモーター(PoxyR)が挿入されたものをpMS-Poxy(+), 逆向きに挿入されたものをpMS-Poxy(-)と名付けた(図1)。

2. PoxyR断片に存在するプロモーターとその性質

PoxyR断片に存在するプロモーターとその活性を調べるために、pMS-Poxy(+), pMS-Poxy(-)を大腸菌MC1061に導入し、*lacZ*の発現量、すな

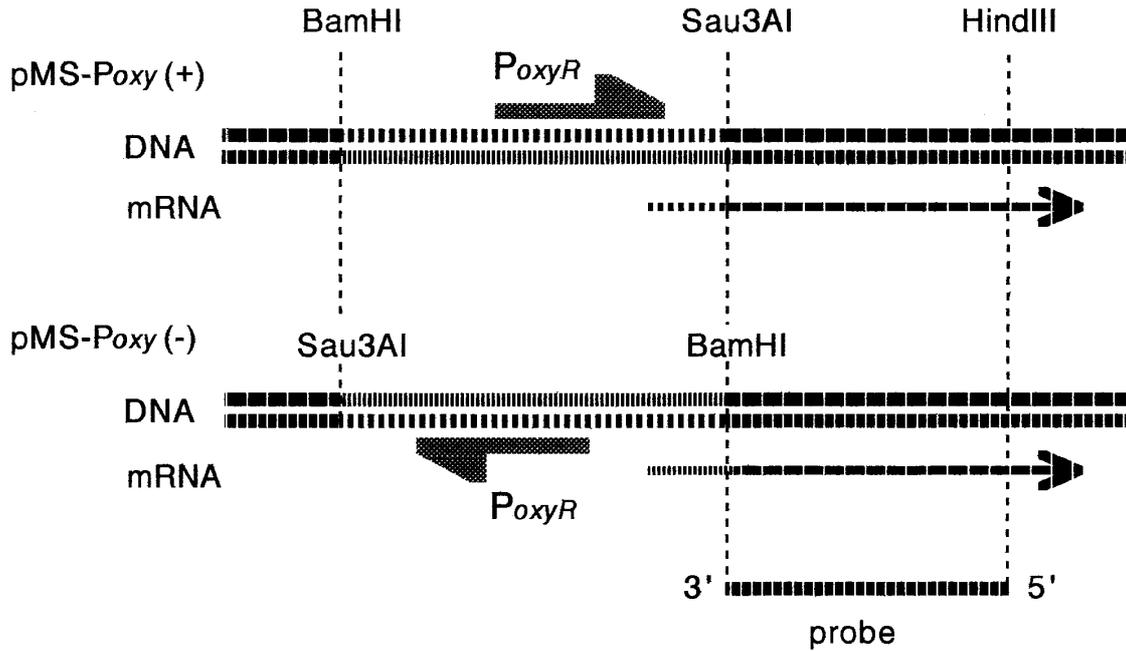


図3 PoxyR 断片からの転写産物とプローブの位置

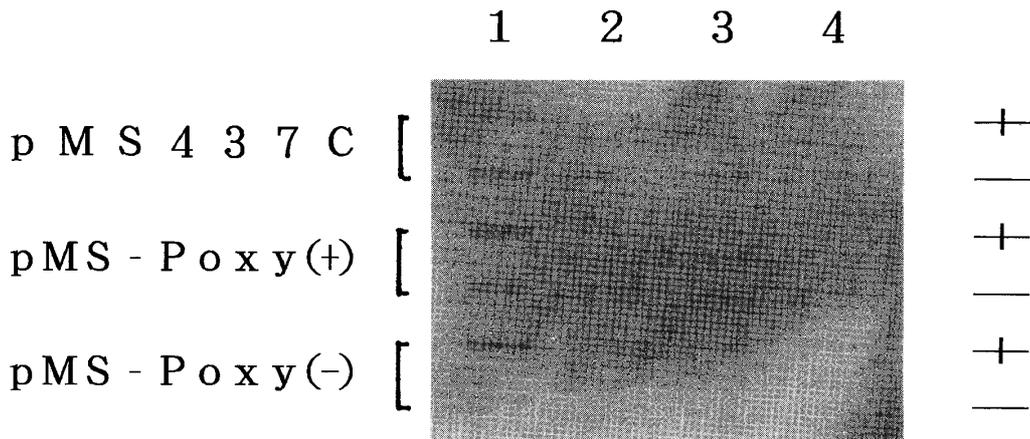


図4 過酸化水素が *oxyR* プロモーター領域からの転写量に与える影響

pMS437C, pMS-Poxy(+), pMS-Poxy(-) を持つ MC1061 を、それぞれ 1 mM 過酸化水素存在下(+), 非存在下(-) で、対数増殖期まで培養し、全 RNA を調製した。このうち、20 μ g (1), 2 μ g (2), 0.2 μ g (3), 0.02 μ g (4) をナイロンメンブレン上に固定して、プローブと DNA-RNA ハイブリッドを形成させ、検出した。

の *Bam*HI-*Hind*III 断片の下側の鎖 140b を用いると、pMS-Poxy(+) における *PoxyR* からの転写産物と、pMS-Poxy(-) における *Pd* からの転写産物はともにプローブ DNA とハイブリッドを形成するため、検出することが可能である (図3)。

図4より pMS-Poxy(-) を持つ MC1061 から調製した RNA を用いると、培地中に過酸化水素を添加した時の試料では mRNA が検出されたが、無添加の試料では検出されなかった。このことから、*Pd* は過酸化水素によって転写活性が誘導されるプロ

モーターであることが確認できた。また、pMS437C または pMS-Poxy(+) を持つ MC1061 から調製した RNA を用いると、過酸化水素添加、無添加による転写量の著しい変化は見られなかった。

IV. 考 察

oxyR の自己発現制御機構を調べるため、プロモーター検索用ベクター pMS437C の持つ *lacZ* の上流に *oxyR* のプロモーター領域を含む 204 bp 断片を挿入したプラスミド pMS-Poxy(+), pMS-Poxy(-)

を構築し、過酸化水素が PoxyR および Pd のプロモーター活性に与える影響を検討した。

pMS-Poxy(+), pMS-Poxy(-) に存在する PoxyR および Pd の下流にある *lacZ* の発現量, すなわち β -ガラクトシダーゼの活性値を測定した結果, pMS-Poxy(+) では, pMS437C に比べて5倍以上もの活性値の上昇, つまり, PoxyR の働きにより β -ガラクトシダーゼの発現が見られた。さらに過酸化水素により活性値が約1.3倍に上昇したが有意な差ではなく, このことは, OxyR が細胞内で一定濃度を保つことと一致した。PoxyR 断片を逆向きに挿入した pMS-Poxy(-) は過酸化水素非存在下では, pMS347C と同程度の値であり *lacZ* の発現は見られないが, 過酸化水素により約3倍以上もの活性値の上昇が起こることが確認された。これにより,

PoxyR 断片に逆向きのプロモーター (Pd) が存在することと, このプロモーター活性が過酸化水素の存在によって誘導されるものであることが示された。さらに転写量の変動を観察し, 過酸化水素による Pd からの発現量の増加が転写レベルにより行われていることが明らかとなった。

OxyR タンパクは, 生体内環境の酸化還元に伴い活性型 (酸化型) と不活性型 (還元型) の二つの状態で存在しており, 支配下の遺伝子のプロモーターの上流に結合した OxyR タンパクが活性型であれば, その遺伝子の転写は促進される。しかし *oxyR* 自身の場合は, 結合するタンパクが活性型であっても不活性型であっても転写が抑制されることがわかっている¹¹⁾。さらに本研究で, 逆向きのプロモーターが存在し, 過酸化水素による酸素ストレスに適応し

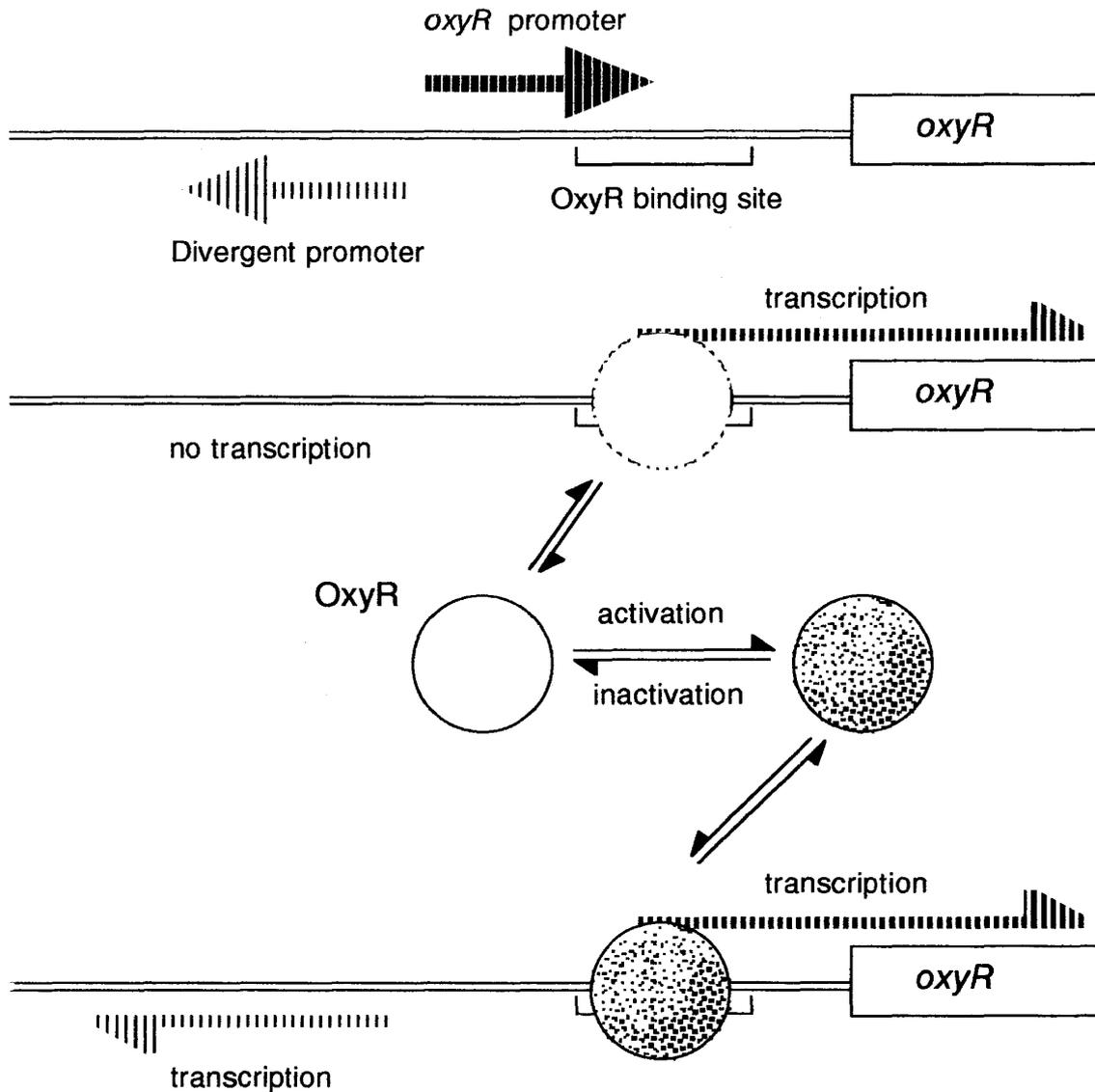


図 5 発現制御における逆向きの転写モデル

て転写レベルで応答することが認められたが、以上のことをまとめて図5のようなモデルを考えた。このモデルにおいては、PoxyRとPdが塩基配列上の一部を共有して存在している。順向きの転写量、つまりoxyRの発現量は、OxyRタンパクが不活性型であっても活性型であっても一定であるが、OxyRが活性化されたとき、すなわち過酸化水素の存在によりOxyRタンパクが酸化された時にのみPdからの転写が誘導される。

また、PoxyRの塩基配列からも逆向きにプロモーター様の配列があることがわかるが、これが偶然に存在したために偶然に転写量が増したのか、必然に存在したために必然的に転写が起きたのかにより転写制御における意味付けが異なってくる。さらに、逆向きの転写産物が何らかの形で転写制御因子として関与することも考えられ、この逆向きのプロモーターの下流にタンパク質をコードする配列があれば、それは過酸化水素による誘導を受け、oxyR支配下にある遺伝子であるということになり、oxyRとプロモーターを共有する必然性も考えなくてはならない。そして、もしこれらが転写制御因子として関与するならば、未解明の部分が多い酸素ストレス適応応答におけるシグナル因子として位置付けすることも可能である。OxyRタンパク自身がストレスを感じるセンサーとして、酸化された自身がシグナルとして働くといわれているが¹⁰⁾、センサーやシグナルも複数存在すると考えられており、それらの可能性が広がったといえる。

このような逆向きのプロモーターを持つものに、cAMP receptor protein (CRP)の遺伝子crpがある。CRPにcAMPが結合したcAMP-CRPは、糖代謝系遺伝子の発現制御因子であり、プロモーターの上流に結合部位を持つ遺伝子の発現を正に制御している一方で、自身の遺伝子の結合部位は転写開始点より下流にあり、その発現は負に制御している^{15, 16)}。このcrpのプロモーター領域にcAMP-CRPが結合すると逆向きの転写量が増加する現象が観察されており、これが発現制御に関与するのではないかと考えられている。しかし、crpにおいても逆向きのプロモーターの働きはまだ不明のままであり、偶然であるとの見方もある。

以前としてoxyRレギュロンには未解明の部分が多く、oxyR自身の転写制御機構についても未知の部分が多い。しかし最近になって、AmesらによりOxyRの結合部位における塩基配列の相同性と、OxyRが二量体で結合する可能性とが見出ださ

れ¹¹⁾、TaoらによりOxyRとRNAポリメラーゼの相互作用が示された⁹⁾。またCRPにおいては、偶然性のほうが強調されていた逆向きへの転写も、今回異なる調節タンパクOxyRにおいても同様の現象が認められたことにより転写制御に関与する可能性が広がり、少しずつではあるがその実態を把握することができつつある。

文 献

- 1) 中野稔, 浅田浩二, 大柳善彦編: 活性酸素, 共立出版, 東京 (1988)
- 2) 浅田浩二: 続分子進化学入門 (今堀, 木村, 和田編), pp. 195-226, 培風館, 東京 (1986)
- 3) 浅田浩二, 松井健二: 実験医学, **4**, 1067-1074 (1986)
- 4) Sies, H. ed.: Oxidative Stress, 学会出版センター, 東京 (1987)
- 5) Samson, L., and Cairns, J.: *Nature*, **267**, 281-283 (1977)
- 6) Demple, B., and Halbrook, J.: *Nature*, **304**, 466-468 (1983)
- 7) Morgan, R. W., Christman, M. F., Jacobson, F. S., Storz, G., and Ames, B. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**, 8059-8063 (1986)
- 8) Christman, M. F., Storz, G., and Ames, B. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**, 3484-3488 (1989)
- 9) Tao, K., Fujita, N., and Ishihama, A.: *Mol. Microbiol.*, **7**, 859-864 (1993)
- 10) Storz, G., Tartaglia, L. A., and Ames, B. N.: *Science.*, **248**, 189-194 (1990)
- 11) Tartaglia, L. A., Gimeno, C. J., Storz, G., and Ames, B. N.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 2038-2045 (1992)
- 12) Vieira, J., and Messing, J.: *Methods Enzymol.*, **153**, 3-11 (1987)
- 13) Miller, J. H.: *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1972)
- 14) 饗場弘二: 遺伝子・タンパク質 実験操作プロトコル法 (口野, 飛来, 櫻林編), pp. 169-175, ソフトサイエンス社, 東京 (1987)
- 15) Aiba, H.: *Cell*, **32**, 141-149 (1983)
- 16) Straney, D. C., Straney, S. B., and Crothers, D. M.: *J. Mol. Biol.*, **206**, 41-57 (1989)