

過酸化水素で誘導されるプロモーターの探索

武部 聡, 荒武まき子, 黒田 奈里, 山本 章子, 吉田 あや

Isolation of DNA fragments containing promoter function inducible by hydrogen peroxide

So Takebe, Makiko Aratake, Nari Kuroda, Akiko Yamamoto, and Aya Yoshida

I. はじめに

大腸菌を60 μ M 程度の低濃度の過酸化水素に晒すと約30種のタンパク質の合成が誘導され^{1,2)}, 結果として過酸化水素に対する抵抗性を獲得するようになる^{3,4)}。この現象は適応応答と呼ばれ, このとき多くの遺伝子が協調的にその発現量を変化させることがわかっている。このような多数の遺伝子の発現制御は調節因子と呼ばれる DNA 結合能をもつタンパク質によって行われることが多く, 大腸菌では調節因子の一つとして OxyR が見いだされている⁵⁾。OxyR は過酸化水素で誘導されるタンパク質のうちの約10種類の発現を調節しており, そのうちのいくつかは遺伝子も同定されている。カタラーゼ, アルキルヒドロペルオキシダーゼ, グルタチオンレダクターゼはともに OxyR によって誘導され²⁾, 有害な活性酸素の消去や酸化分子の還元を行うことで過酸化水素に対する防御に役立っていると考えられている。OxyR による発現制御を直接または間接的に受ける遺伝子はこのほかにも存在し, その中には未同定のものも多い。また, 過酸化水素で誘導されるタンパク質の中には OxyR に依存しないものもあり, OxoR レギュロン⁶⁾ など他の発現制御機構の存在も示唆されている。

大腸菌の過酸化水素に対する防御機構は OxyR や OxoR 等の複数のレギュロンが関与するグローバルレスポンスであり, この全体像を明らかにするためには関与する遺伝子を数多く見つける必要がある。

そこで, 大腸菌染色体において過酸化水素によって活性が変動するプロモーターの探索を行った。大腸菌の遺伝子発現は転写と翻訳を連続的に行うことが可能なため発現制御を転写段階で行う遺伝子が多い。このような遺伝子では発現量とプロモーター活性はよい相関をもつことになるので, 本研究ではプロモーター活性の変動を *lacZ* の発現量, すなわち β -ガラクトシダーゼ活性の変化からとらえることのできるプロモーター検索性ベクターを用い, 過酸化水素によって活性が変動するプロモーターの収集を試みた。この方法は, ①プロモーターおよびその制御領域のみを対象とするため, 必要な DNA の長さが500 bp 程度と短く扱いが容易であること。②プロモーター活性を酵素活性によって検出するため, 感度が高いこと。③宿主大腸菌の染色体には手を加えないため, 生育に必須な遺伝子でも単離が可能なこと。等の点で優れている。

II. 実験材料・方法

1. 菌株およびベクター

大腸菌 MC1061 (*hsdR mcrB ara Δ 139 Δ (*araABC-leu*)7679 Δ *lacX74 galU galK rspL thi*) は, プラスミド pMS437C およびその誘導体の宿主として用いた。*

プロモーター検索性ベクター pMS437C は, プロモーター領域を欠いた *lacZ* をもち, その転写方向に対して上流に制限酵素 BamHI の切断部位が一カ所だけ存在する。この部位を利用して外来プロモーターを *lacZ* の転写方向と同じ向きに挿入すると, プロモーター活性を *lacZ* 産物である β -ガラクトシダーゼの酵素活性から求めることができる。

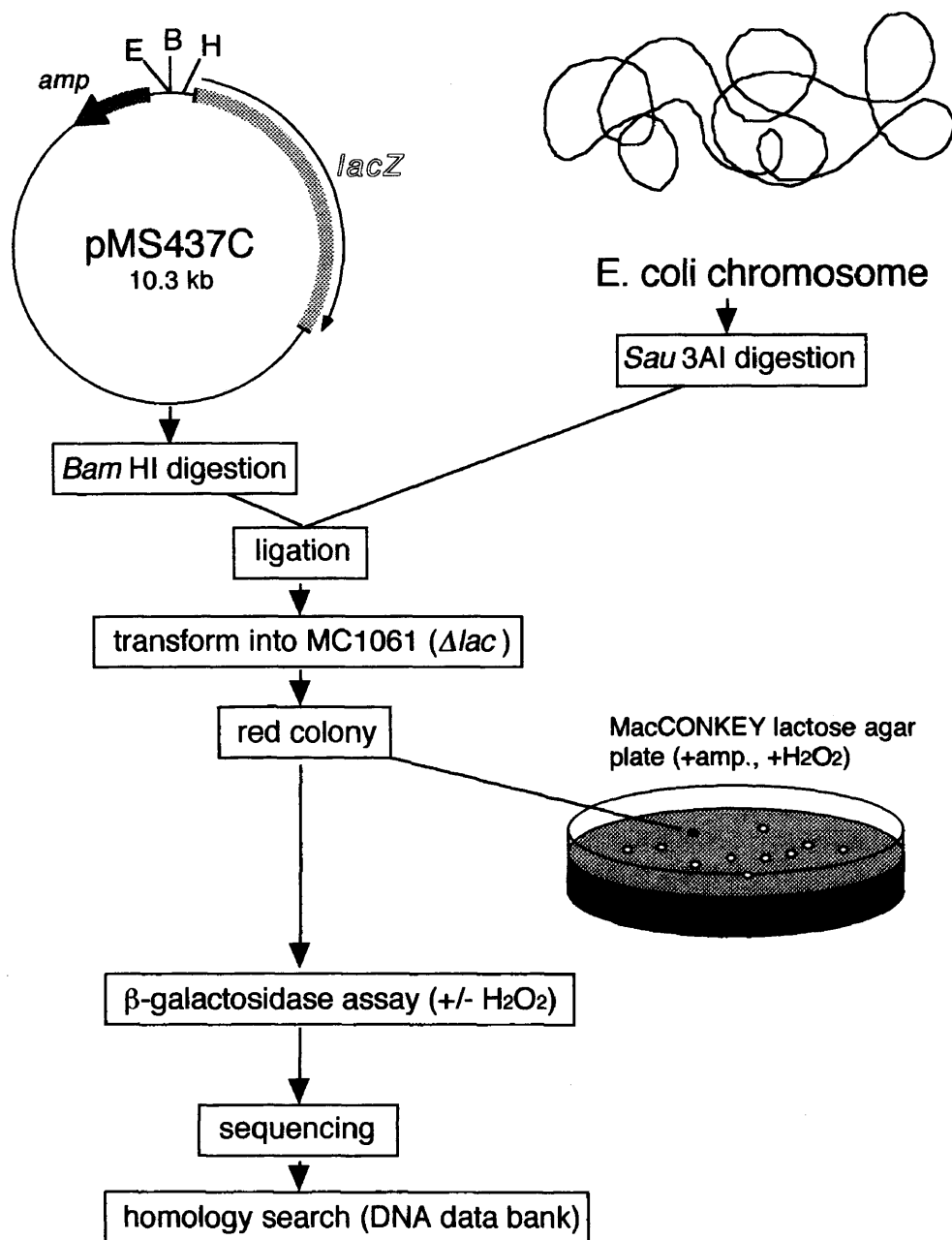


図1 過酸化水素で誘導されるプロモーターの収集法。

2. 試薬・酵素類

培地用試薬 Bacto tryptone と yeast extract は DIFCO 社製を用いた。過酸化水素は三徳化学工業社製を用いた。o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG), ampicillin, その他試薬はナカライテスク社製を用いた。制限酵素など遺伝子操作用酵素類は東洋紡社製を用いた。

3. 大腸菌染色体からのプロモーター断片の収集

大腸菌のもつ遺伝子のプロモーター領域の長さは制御領域を含めておよそ100~200 bp と考えられる。そこで、染色体 DNA を適当な制限酵素で消化

して250~500 bp の長さの DNA を回収し、その中からプロモーター活性をもつものを収集した (図1)。大腸菌 K-12株 (W3110) の染色体 DNA を制限酵素 Sau3AI で完全消化し、アガロースゲル電気泳動法によって250~500 bp 断片を回収した。この DNA 断片を pMS437C の BamHI 部位にランダムクローニングし、大腸菌 MC1061 に導入した。pMS437C にプロモーター活性をもつ DNA 断片が挿入され lacZ が発現するようになった組換え体は、糖源を乳糖にしたマッコンキー寒天培地上で培養すると赤色コロニーを形成する。このような組換え体

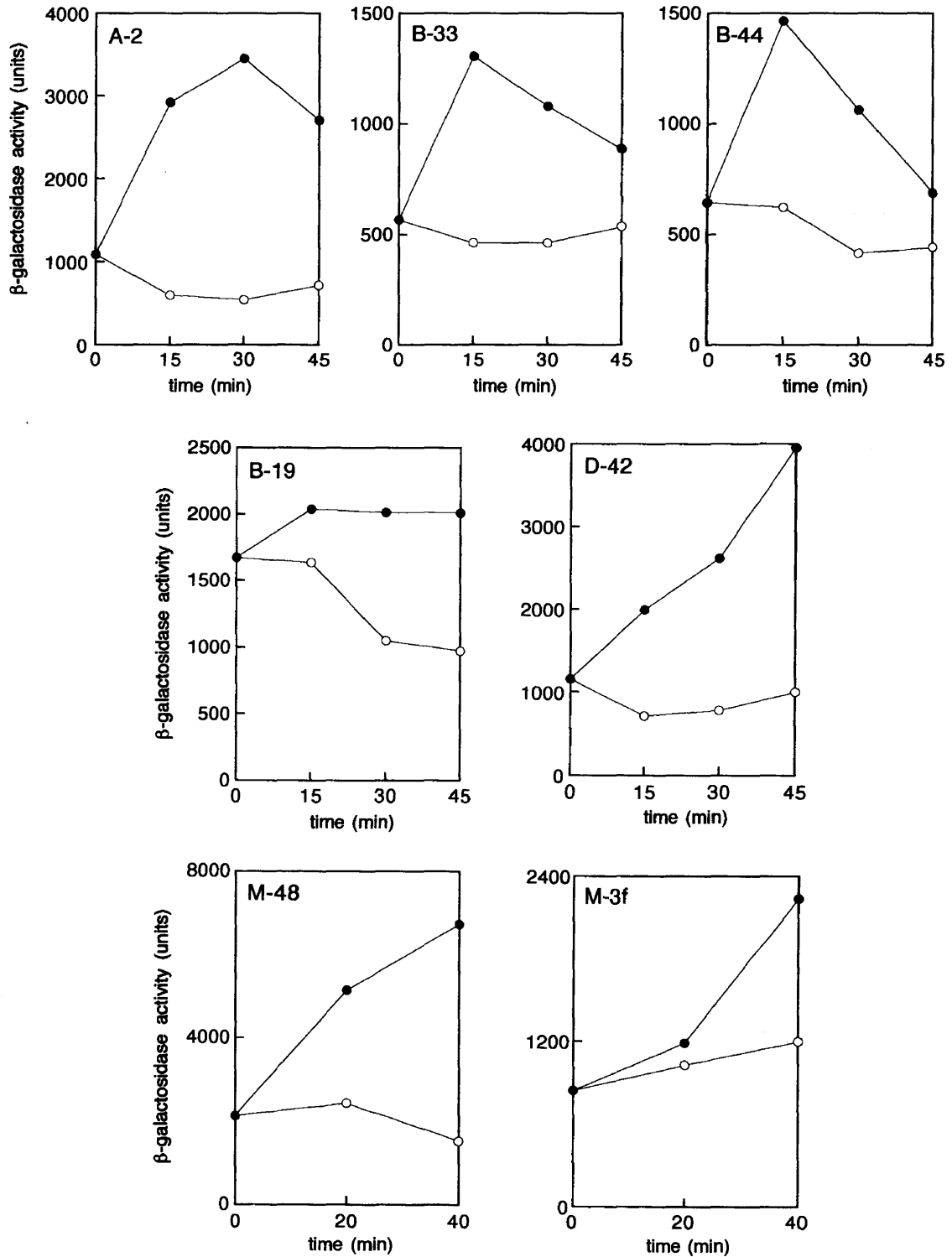


図2 7個の組換え体のプロモーター活性に対する過酸化水素添加の効果. 初期の対数増殖期にある組換え体の培養液に過酸化水素を1 mMになるように加え(●), または無添加のまま(○), 培養を続けた. その後, 一定時間ごとに培養液を一部とり, β-ガラクトシダーゼ活性の測定を行った. グラフ縦軸の数値は酵素活性(ミラーユニット)を表し, 横軸は過酸化水素による誘導時間を表す.

を収集してプロモーターコレクションとした。

4. プロモーター活性の測定

プロモーターコレクションの中から, *lacZ* 産物

であるβ-ガラクトシダーゼの活性を指標として過酸化水素によって活性が変動するプロモーターの選抜を行った。50 μg/ml ampicillinを含む2×YT培

地⁷⁾にプロモーター活性を有する組換え体の一晩培養液を1/100量加え、37℃で1時間振盪培養した。その後、過酸化水素を1 mM になるように加えて振盪培養を続け、一定時間ごとに培養液のサンプリングを行いβ-ガラクトシダーゼ活性の測定に用いた。β-ガラクトシダーゼ活性の測定は、J. H. Millerの方法⁸⁾に若干の変更を加えて行った⁹⁾。過酸化水素添加時の酵素活性が無添加時のそれと比べて有意に上昇したものを、過酸化水素によって誘導されるプロモーターとした。

5. DNA シーケンス

得られたプロモーター断片の塩基配列の決定は、ABI 373A DNA シーケンサーシステム（パーキンエルマー社製）を用いて行い、既知遺伝子とのホモロジー検索はDNA データバンクを対象に行った。

III. 結果および考察

1. 過酸化水素によって誘導されるプロモーターの収集

制限酵素 Sau3AI で完全消化した大腸菌染色体をプロモーター検索用ベクター pMS437C へランダムクローニングし、ベクターのもつ *lacZ* が発現してβ-ガラクトシダーゼ活性をもつようになった組換え体を収集することによりプロモーターコレクションを作成した。この中から過酸化水素の添加（最終濃度1 mM）による酵素活性が無添加時に比べて有意に上昇するものを選抜したところ7個が得られ（図2）、それぞれ、A-2, B-33, B-44, B-19, D-42, M-48およびM-3fとした。

7個の組換え体におけるβ-ガラクトシダーゼ活性の過酸化水素による誘導パターンを比較すると、活性値にピークがあるもの（A-2, B-33, B-44）とないもの（B-19, D-42, M-48, M-3f）に大別できる。A-2, B-33, B-44にみられる活性値のピークはいずれも誘導開始後15分～30分間にあり、この活性値は誘導後1時間程度で過酸化水素無添加時の活性値まで低下した。この誘導パターンはOxyR 支配下の遺伝子 *katG*（大腸菌のカタラーゼ、HPI の遺伝子）の誘導パターンとよく似ており、さらに、OxyR 支配下の遺伝子は誘導後30分以内にその発現量が最大になる^{3,4)} という性質にも合う。このことから、これらのプロモーター活性はOxyR により制御されている可能性がある。一方、B-19, D-42, M-48, M-3f のプロモーター活性にはピークはみられなかったことから、OxyR 以外の調節因子が関与していると思われる。

2. 得られたプロモーター断片と既知遺伝子との相同性検索

本研究で用いた選抜方法で得られたプロモーターは、精確にはプロモーター活性を有するDNA断片なので、これらのプロモーター活性がどのような遺伝子の発現に関与しているのかを調べる必要がある。そこで、7個の組換え体においてベクターに挿入されたDNA断片の塩基配列を決定し、DNA データバンクを用いて染色体上の位置付けおよび既知遺伝子との相同性検索を行った（図3）。

A-2. 染色体上56分に位置する遺伝子 *ung*¹⁰⁾ の下流に、その転写方向と同じ向きに存在していた。A-2の下流には有望なORF(open reading frame, 塩基配列からタンパク質をコードすると予想されるが遺伝子として同定されていない領域)は見つからなかったが、*ung* と A-2の間には1260 base からなるORFがあり¹¹⁾、3'領域を*ung* と重複する形で存在している。A-2はこのORFの5'領域と重なっているため、A-2にあるプロモーターが*oxyR* プロモーター⁹⁾と同じように両方向の転写活性を有していれば、このORFは遺伝子の可能性がある。また、*ung* はDNA修復酵素の一つであるウラシルDNAグリコシラーゼをコードする遺伝子なので、この発現にA-2のプロモーター活性が関与している可能性もある。

B-33. 染色体上0分に位置する遺伝子 *thrC*¹²⁾ の約3000 base 下流にある、954 base からなるORF¹³⁾の後半の塩基配列に一致し、転写方向も同じであった。*thrC* と B-33の間にも777 base からなるORFが逆向きに存在している¹³⁾が、その5'末端とB-33は2000 base 以上離れているため、B-33がこれらのORFのプロモーターを含んでいる可能性は低い。

B-44. 染色体上12分に位置する遺伝子 *nfrA*¹⁴⁾ の下流に、その転写方向とは逆向きに存在していた。B-44につながるORFは見つからないことから、このプロモーターの機能は不明である。

B-19. 染色体上3分に位置する、2322 base からなるORFの上流に、その転写方向と同じ向きに存在していた。このORFは *Mucor circinelloides* の遺伝子 *leuA*¹⁵⁾ と相同性が高いが、大腸菌では遺伝子として同定されていない。*leuA* はロイシン合成酵素の一つをコードしており、このORFも同様の機能を持つタンパク質をコードしていると推測される。B-19は、このORFのプロモーターを含んでいると考えられる。

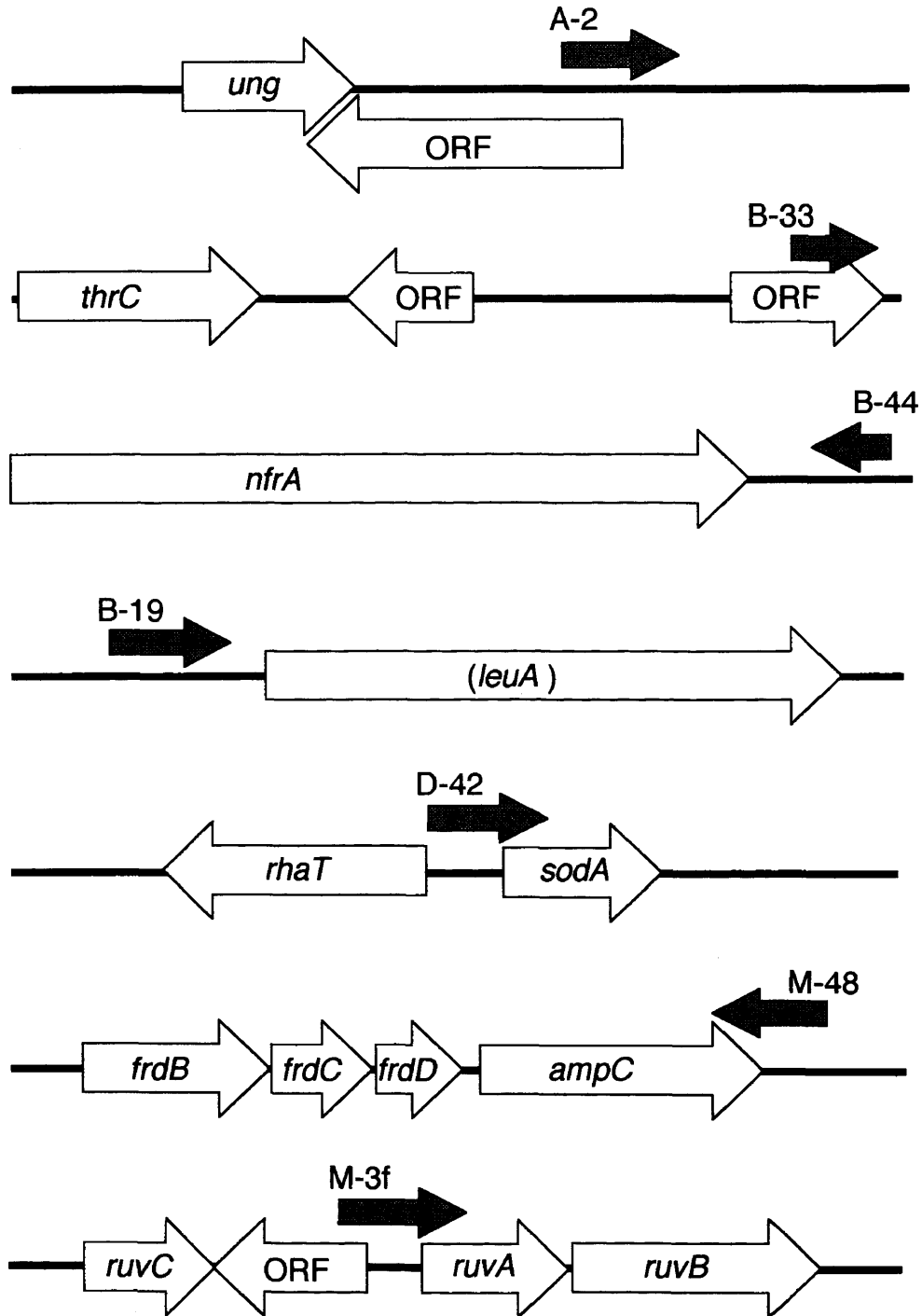


図 3 7個のプロモーター断片と近傍にある遺伝子の構成. 網掛けの矢印の長さはプロモーター断片の範囲を, 向きは検出されたプロモーター活性の向きを示す. 白抜き矢印は既知遺伝子または ORF の開始コドンから終止コドンまでと, 転写方向を表す.

D-42. 大腸菌染色体上88分に位置する遺伝子 *sodA*¹⁶⁾ の上流に, その転写方向と同じ向きに存在していた。*sodA* のプロモーター領域は制限酵素 Sau3AI で消化すると496 bp の断片として得られ¹⁷⁾, D-42の塩基配列はこの496 bp 断片と完全に一致した。*sodA* は Mn-SOD をコードする遺伝子

で¹⁸⁾, その発現は OxyR を含む複数の調節因子によって制御されている¹⁹⁾。今回得られた D-42の過酸化水素による誘導パターンに OxyR 支配下の遺伝子の特徴的なピークがみられなかったのは, 他の調節因子が関与したためと考えられる。

M-48. 大腸菌染色体上94分に位置する遺伝子

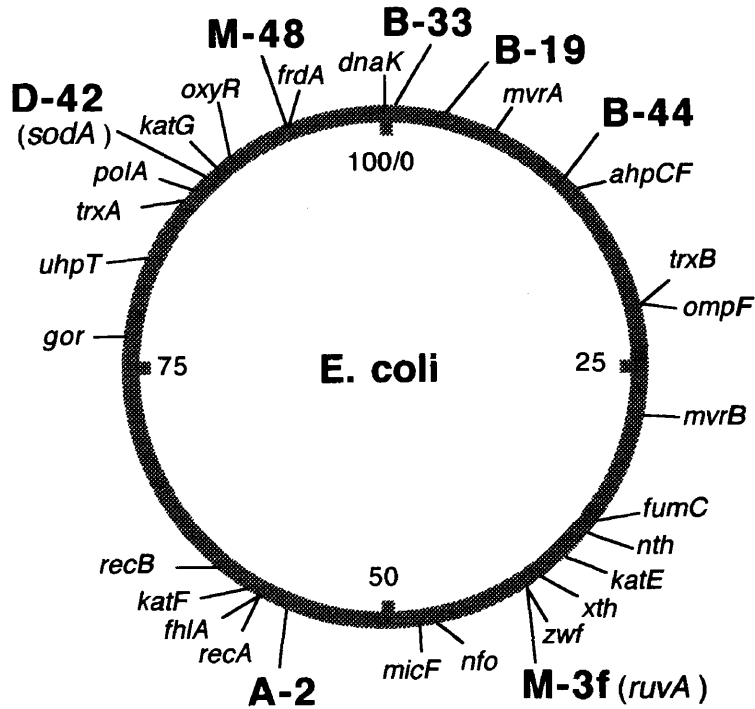


図4 7個のDNA断片の染色体地図。今回得られたプロモーター断片の染色体上の位置を外側に、これまでにわかっている活性酸素防御機構に関する遺伝子の位置をその内側に示した。

ampC^{20,21)}の下流に、その転写方向と逆向きに存在していた。*ampC*はβ-ラクタマーゼのうちセフェロスポリナーゼをコードする遺伝子であるが、通常は発現していないと考えられる。M-48は*ampC*の3'領域と重複しているので、この遺伝子の発現機構にM-48のプロモーター活性が関与している可能性がある。

M-3f. 大腸菌染色体上41分に位置するオペロン*ruvA*と*ruvB*²²⁾の上流に、その転写方向と同じ向きに存在しており、このオペロンのプロモーター領域とその上流約300 baseをカバーしていた。*ruvA*と*ruvB*はともにDNAの組換え修復に関する酵素をコードし、SOS応答で誘導されることがわかっている。本研究で用いた誘導条件(1 mM 過酸化水素)では、大腸菌がSOS状態に陥っている可能性があるため、低濃度(50~100 μM)の過酸化水素で誘導パターンを調べたところ1 mMのときと同様の結果が得られた。*ruvA*と*ruvB*はDNA修復酵素の遺伝子なので、過酸化水素によっても誘導されると考えられる。

以上のように得られた7個のDNA断片の染色体上の位置(図4)および、それらの近傍の遺伝子構成が明らかとなった。これらのDNA断片は、活性酸素の消去酵素やDNA修復酵素の遺伝子プロモ-

ーターのほかに未知遺伝子のプロモーターや既知遺伝子の発現制御に関与すると考えられるもの、機能の不明なものなどがあるため、個々のDNA断片についてプロモーター領域や制御領域を明らかにし、発現調節機構の検討を行っている。

図4には活性酸素防御機構に関与する遺伝子の位置も示しているが、その配置に必然性や特徴はみられない。今後、これらの遺伝子の機能や発現調節機構の詳細が明らかになれば、特別な意味を持つことが明らかになるかもしれない。

IV. 要 約

活性酸素によって誘導されるプロモーターの探索を、大腸菌染色体のプロモーター検索用ベクターへのランダムクローニングにより作成したプロモーターコレクションを用いて行い、7個のクローンを得た。

得られたクローンの塩基配列を決定し、DNAデータベースを用いて相同性検索を行ったところ、活性酸素の消去酵素やDNA修復酵素の遺伝子プロモーターのほかに未知遺伝子のプロモーターや既知遺伝子の発現制御に関与すると考えられるもの、機能の不明なものなどがあつた。

参考文献

- 1) Greenberg, J. T., Monach, P., Chou, J. H., Josephy, P. D., and Demple, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6181-6185 (1990)
- 2) Morgan, R. W., Christman, M. F., Jacobson, F. S., Storz, G., and Ames, B. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8059-8063 (1986)
- 3) Demple, B., *Annu. Rev. Genet.*, **25**, 315-337 (1991)
- 4) Farr, S. B., and Kogoma, T., *Microbiol. Rev.*, **55**, 561-585 (1991)
- 5) Christman, M. F., Storz, G., and Ames, B. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3484-3488 (1989)
- 6) Gidrol, X., Farr, S. B., and Kogoma, T., *Encyclopedia of Microbiology*, **3**, 315-326 (1993)
- 7) Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., *Molecular Cloning* 2nd ed., p.A.3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. (1989)
- 8) Miller, J. H., *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. (1972)
- 9) 吉田 あや, 武部 聡, 本誌, **48**, 22-28 (1993)
- 10) Flachmann, R., Kunz, N., Seifert, J., Gutlich, M., Wientjes, F. J., Laufer, A., and Gassen, H. G., *Eur. J. Biochem.*, **175**, 221-228 (1988)
- 11) Nashimoto, H., Miura, A., Saito, H., and Uchida, H., *Mol. Gen. Genet.*, **199**, 381-387 (1985)
- 12) Parsot, C., Cossart, P., Saint-Girons, I., and Cohen, G. N., *Nucleic Acids Res.*, **11**, 7331-7345 (1983)
- 13) Yura, T., Mori, H., Nagai, H., Nagata, T., Ishihama, A., Fujita, N., Isono, K., Mizobuchi, K., and Nakata, A., *Nucleic Acids Res.*, **20**, 3305-3308 (1992)
- 14) Kiino, D. R., Singer, M. S., and Rothman-Denes, L. B., *J. Bacteriol.*, **175**, 7081-7085 (1993)
- 15) Roncero, M. I. G., Jepsen, L. P., Stroman, P., and van Heeswijck, R., *Gene*, **84**, 335-343 (1989)
- 16) Takeda, Y., and Avila, H., *Nucleic Acids Res.*, **11**, 4577-4589 (1986)
- 17) 武部 聡, 東 恵実, 吉田 恵, 吉田 あや, 本誌, **50**, 37-42 (1995)
- 18) Keele, B. B., Jr., McCord, J. M., and Fridovich, I., *J. Biol. Chem.*, **245**, 6176-6191 (1970)
- 19) Compan, I., and Touati, D., *J. Bacteriol.*, **175**, 1687-1696 (1993)
- 20) Jaurin, B., and Normark, S., *Cell*, **32**, 809-816 (1983)
- 21) Olsson, O., Bergstroem, S., Lindberg, F. P., and Normark, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7556-7560 (1983)
- 22) Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Kimura, S., Iwasaki, H., and Nakata, A., *J. Bacteriol.*, **170**, 4322-4329 (1988)