

①

博 士 論 文

サルモネラ鞭毛レギュロンに特異的なシグマ因子と
アンチ・シグマ因子の相互作用による転写制御機構に関する研究

平成 9 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科
生物機能科学専攻

伊 豫 田 淳

目 次

	頁
目 次 -----	i
略 号 -----	v
要 旨 -----	vi
序 論 -----	1
材料と方法 -----	6
1. 試薬と培地 -----	6
(1)試薬 -----	6
(2)培地 -----	6
2. 菌株、プラスミド及びファージ -----	6
3. DNA操作法 -----	7
(1)プラスミドDNAの小量調製 -----	7
(i)ボーリング法 -----	7
(ii)アルカリ法 -----	7
(2)プラスミドDNAの大量調製 -----	8
(3)DNAの酵素処理 -----	9
(i)制限酵素処理 -----	9
(ii)phenol-chloroform処理、ethanol沈殿 -----	9
(iii)ライゲーション反応 -----	9
(4)欠失体の作成 -----	9
(5)アガロースゲル電気泳動 -----	10

(i) サンプルの調製	10
(ii) 電気泳動	10
(6) アガロースゲルからのDNA断片の精製	10
(7) 形質転換	11
(i) コンピテントセルの作成	11
(ii) 形質転換	11
(8) DNAシーケンシング	12
(i) 一本鎖DNAの調製	12
(ii) シーケンス反応	12
(9) プラスミドの構築方法	13
(10) <i>rflB</i> 突然変異 <i>flgM</i> 遺伝子のクローニング	13
4. β -ガラクトシダーゼ活性の測定	14
5. SDS-PAGE	14
(i) サンプルの調製	14
(ii) 電気泳動	14
6. ウェスタンブロッティング	15
7. <i>in vitro</i> におけるFliA-FlgM蛋白質間相互作用の解析	16
(i) <i>in vitro</i> 転写-翻訳共役系	16
(ii) 蛋白質間の架橋と免疫沈殿	16
(iii) フルオログラフィー	16
8. FlgMの細胞外輸送の解析	17
9. 蛋白質の精製	17
(1) DEAEイオン交換クロマトグラフィー	17
(2) 硫酸塩析による蛋白質の濃縮	17
(3) Heparinアフィニティークロマトグラフィー	18
(4) 蛋白質の定量	18
10. <i>in vitro</i> 転写再構成系	18
11. FliAの精製と活性測定	19
(1) FliAの精製	19
(2) FliAの活性測定	20
12. FlhD/FlhCの精製と活性測定	20

(1)FlhD/FlhCの精製	-----	20
(2)FlhD/FlhCの活性測定	-----	21
13. 転写開始点の同定	-----	22
(1)RNAの調製	-----	22
(2)プライマー伸長法	-----	22
(i)プライマー	-----	22
(ii)プライマーの標識と精製	-----	22
(iii)プライマー伸長反応	-----	23
結 果	-----	24
第1章. FliAとFlgMの機能構造	-----	24
1. FlgMタイトレーション法によるFliAのFlgM結合ドメインの解析	-----	24
(1)解析方法	-----	24
(2)野生型または欠失型FliAの大量生産系の構築	-----	25
(3)コントロール実験	-----	25
(4)FlgMタイトレーションアッセイ	-----	27
(5)FlgM非感受性FliAによるタイトレーションアッセイ	-----	28
2. FliA阻害検定によるFlgMのFliA結合ドメインの解析	-----	29
(1) <i>flgM</i> 突然変異体	-----	29
(2)欠失解析	-----	30
(i)解析方法	-----	30
(ii)野生型または欠失型FlgMの大量発現系の構築	-----	30
(iii)FliA阻害アッセイ	-----	30
3. 化学架橋による解析	-----	32
(1)解析方法	-----	32
(2)欠失型FliAによる解析	-----	32
(3)欠失型FlgMによる解析	-----	33
4. FlgMの細胞外輸送ドメインの解析	-----	33
(1)解析方法	-----	33
(2)欠失型FlgMの輸送	-----	34

第2章. クラス2オペロンのFliA-FlgM制御	35
1. <i>flgA</i> オペロンの <i>in vitro</i> 転写系	35
(1) 鋳型の作成	35
(2) <i>in vitro</i> 転写系	35
2. <i>fliA</i> オペロンの <i>in vitro</i> 転写系	36
(1) 鋳型の作成	36
(2) <i>in vitro</i> 転写系	36
3. <i>fliA</i> オペロンの <i>in vivo</i> における転写調節機構	37
第3章. クラス1オペロンのFliA-FlgM制御	38
1. プライマー伸長法による解析	38
(1) CRP、H-NS依存性の転写	38
(2) FlgM非存在下における転写	39
2. <i>in vitro</i> 転写系における解析	40
考 察	41
1. FliAとFlgMの機能構造	41
(1) FliAのFlgM結合ドメイン	41
(2) FliAの σ 活性ドメイン	44
(3) FlgMのFliA結合ドメインと細胞外輸送ドメイン	45
2. クラス1とクラス2オペロンのFliA制御	46
3. クラス1オペロンのグローバル制御	49
参考文献	51
表	56
図	67
謝 辞	80

略号

本論文では以下のような略号を用いることにする。

a. a. : amino acids
APS: ammonium peroxodisulfate
ATP: adenosine triphosphate
b: bases
bp: base pairs
BPB: bromophenol blue
BSA: bovine serum albumin
CA: casamino acids
cAMP: cyclic adenosine monophosphate
cat: chloramphenicol acetyltransferase
CRP: cAMP receptor protein
CTP: cytidine triphosphate
dCTP: deoxycytidine triphosphate
ddNTP: dideoxynucleoside triphosphate
dNTP: deoxyribonucleoside triphosphate
DEAE: diethylaminoethyl
△: deletion
DMSO: dimethyl sulfoxide
DSP: dithiobis-(succinimidyl propionate)
DTT: dithiothreitol
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
GTP: guanosine triphosphate
IPTG: isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kbp: kilobase pairs
2-ME: 2-mercaptoethanol
ONPG: *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside
PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis
PEG: polyethylene glycol
pfu: plaque forming units
rpm: revolutions per minute
SD: Shine-Dalgarno
SDS: sodium dodecyl sulfate
TCA: trichloroacetic acid
TEMED: *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine
Tn: transposon
Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane
UTP: uridine triphosphate

要 旨

サルモネラの運動器官である鞭毛は、10 数種類の蛋白質から構成される高次構造体で、菌体外に伸び出たらせん状の繊維、膜構造中に埋め込まれた基体、及び両者をつなぐフックから構成されている。これまでの研究により、鞭毛の形態形成や機能発現には、約 50 個の遺伝子の機能が必要であることが明らかにされている。これらの鞭毛遺伝子は染色体上でいくつかのオペロンを形成しており、3 つの階層性（クラス 1 - 3）からなる鞭毛レギュロンとして統合された転写調節を受けていることが明らかとなっている。鞭毛レギュロンの最上位に位置するクラス 1 には *flhD* オペロンだけが属し、その機能は他のすべての鞭毛遺伝子の発現に必須である。クラス 2 オペロンには、鞭毛の基体-フック構造の形成に関与する遺伝子と、クラス 3 オペロン群の転写を司る σ 因子をコードする *fliA* 遺伝子が属する。最下位に位置するクラス 3 オペロン群の発現には、*fliA* 遺伝子だけでなく、他のすべてのクラス 2 鞭毛遺伝子の発現が必須である。つまり、鞭毛遺伝子の転写発現の順序は鞭毛の形態形成の過程と共役しており、クラス 2 の遺伝子の機能によって鞭毛の基部構造が完成してからでなければ、それより上に形成される繊維や完成した鞭毛の機能発現に関与する遺伝子の転写は起こらない。この転写と形態形成の共役因子として、*flgM* 遺伝子が同定されている。FlgM 蛋白質は、FliA 蛋白質に結合して FliA の RNA ポリメラーゼ・コア酵素への結合を阻害するアンチ σ 因子である。FlgM は、鞭毛基部構造の完成後にこの構造を介して細胞外へ輸送される。そのため、FlgM の細胞内濃度は基部構造の完成とともに低下することになり、その結果 FliA が脱抑制され、クラス 3 の転写が活性化される。このように、クラス 3 の転写発現は、鞭毛の基部構造の形成過程と共役した FliA-FlgM の活性制御によって調節されている。一方、最

近の研究から、*flgM* 欠損下では、*flhD* オペロンと *fliA* オペロンの機能に依存してクラス 1 とクラス 2 オペロン群も活性化されることが明らかとなった。したがって、すべての鞭毛オペロンは FliA-FlgM 相互作用によって制御されていることになる。本研究は、鞭毛レギュロンの転写制御において中心的な役割を果たしている FliA-FlgM 相互作用の分子機構を解明するとともに、*flgM* 欠損下におけるクラス 1 とクラス 2 オペロン群の転写活性化の分子機構について解明することを目的とした。

1. FliA と FlgM の機能構造

(1) FliA の FlgM 相互作用ドメインの解析

鞭毛遺伝子に特異的な σ 因子である FliA には、RNA ポリメラーゼに転写開始能を付与するための機能ドメインに加え、アンチ σ 因子との結合ドメインが存在する。

σ 因子の活性を持たない種々の *fliA* 遺伝子断片を強力な転写活性を持ち IPTG 誘導可能な *tac* プロモーターにつないで、細胞内で FliA の一部に相当するポリペプチドを大量に発現させる系を確立した。このポリペプチドを細胞内で大量発現させた際の、クラス 3 鞭毛遺伝子の転写への影響を解析したところ、FliA の C 末端側を大量発現させたときに FliA 依存性の転写の脱抑制が起こることが判明した。このことは、FliA の C 末端側には FlgM に対する結合ドメインが含まれており、この部分が大量発現されると細胞内の FlgM をタイトレーションすることを示唆している。このタイトレーション活性に必須な領域は FliA (全 239 アミノ酸) の Gly¹⁵⁴-Gln²²⁷ の領域に存在していた。この領域は FlgM に対する感受性が著しく低下した *fliA* 突然変異がマップされる位置と一致していた。大腸菌の細胞抽出液 S30 を用いて *in vitro* で転写-翻訳させた FliA ポリペプチドについて、架橋剤と特異抗体を用いて FlgM との相互作用を解析した。その結果、N 末を半分以上欠失させたポリペプチドでも FlgM との結合能は存在していたが、C 末をわずかに欠失させたポリペプチドでは結合能が失われることが判明し、上の仮説が支持された。

(2) FlgM の FliA 相互作用ドメイン

クラス 3 鞭毛遺伝子の活性を指標に、上と同様にして *flgM* 遺伝子の様々な領域を細胞内で大量発現させた場合の FliA の転写活性に対する影響について検定を行った。その結果、FlgM の C 末端側のポリペプチドを大量発現させた場合にクラス 3 鞭毛遺伝子の活性が阻害されることが明かとなった。この阻害活性は FlgM (全 97 アミノ酸) の Glu⁶⁴-Arg⁸⁸ の領域に存在していることから、この領域に FliA に対する結合ドメインが存在しているものと考えられる。*in vitro* において FliA と欠失型 FlgM の蛋白質間相互作用の検定を行ったところ、N 末端側の欠失体では FliA との結合能が存在していたが、C 末端側の欠失体では結合能が失われていることが判明した。この結果は上の仮説を支持するものである。

(3) FlgM の細胞外輸送ドメイン

FlgM には FliA の活性を阻害する機能に加え、鞭毛の基部構造を介して細胞外へ輸送される機能が存在する。N 末端側の 50 アミノ酸からなる FlgM ポリペプチドは野生型の FlgM と同様に効率よく細胞外に輸送されていた。また、N 末端の 6 アミノ酸を欠失した FlgM ポリペプチド、および N 末端の 25 アミノ酸と C 末端の 34 アミノ酸からなる FlgM ポリペプチドでも細胞外への輸送が確認されたことから、FlgM の細胞外輸送に必須のドメインは Ser⁷-Val²⁵ までの領域に存在するものと結論された。

2. クラス 2 オペロンの FliA-FlgM 制御

flgM 欠損下におけるクラス 2 オペロンの FliA による転写活性化の機構としては、転写階層性の上位に位置する *flhD* オペロンの活性化を介して行われる場合と、クラス 2 プロモーターを直接活性化する場合の 2 つが考えられる。ここでは後者の可能性について検討するため、クラス 2 オペロンの *in vitro* 転写系を用いて、精製 FliA 蛋白質の転写への影響を解析した。

(1) *flgA* オペロンの *in vitro* 転写系

flgA オペロンには、FlhD/FlhC 蛋白質複合体に依存した転写が存在する。本研究では、

FliA, FlhD および FlhC 蛋白質を精製し、これらを用いた *in vitro* での転写再構成系を構築して *flgA* オペロンの転写制御機構を解析した。その結果、*flgA* オペロンには σ^{70} を含む RNA ポリメラーゼが FlhD/FlhC 依存的に活性化する転写が存在することが明らかとなった。しかし、この転写は FliA によって活性化されなかった。また、FliA によって新たに活性化される転写も検出されなかった。

(2) *fliA* オペロンの *in vitro* 転写系

fliA オペロンには、FlhD/FlhC 蛋白質複合体に依存した転写と、*flhD* と *fliA* の両オペロンの機能に依存した転写の 2 つが存在する。*in vitro* 転写系において *fliA* オペロンの転写調節機構を解析した結果、 σ^{70} を含む RNA ポリメラーゼが FlhD/FlhC 依存的に活性化する転写と FliA を含む RNA ポリメラーゼが単独で活性化する転写の 2 つが存在することが明らかとなった。しかし、FliA, FlhD/FlhC の両者によって活性化される転写は検出されなかった。

(3) *fliA* オペロンの *in vivo* における転写調節機構

これまでの研究では、*in vivo* において *fliA* オペロンは FlhD/FlhC 非依存的には発現しないとされている。しかし、上で得られた結果は、*fliA* オペロンは FlhD/FlhC 非依存的にも発現しうることを示している。この矛盾は、これまでの研究が、FlgM の存在する条件下で行われていたためと考えられる。そこで本研究では、*flgM* 欠損下における *fliA* オペロンの転写について詳細に解析した。その結果、*fliA* オペロンの転写は、*flgM* 欠損下では、*flhD* オペロンに非依存的に活性化されることが示され、*in vitro* での結果が支持された。

3. クラス 1 オペロンの FliA-FlgM 制御

(1) プライマー伸長法による解析

flhD オペロンは、カタボライトアクチベーター蛋白質である CRP や、ヌクレオイド蛋白質である H-NS に依存して転写が活性化されることが知られている。そこで、まず、*in vivo* でこれらによって活性化される転写を同定し、これらの転写と FliA-FlgM 制御系

との関係を解析した。野生株、*crp* 突然変異株、及び *hns* 突然変異株からそれぞれ総 RNA を調製し、プライマー伸長法による転写開始点の同定を行った。その結果、合計 6 つの転写開始点が存在することが判明し、CRP 依存性の転写開始点や CRP によって抑制される転写が存在することが明らかとなったが、H-NS 依存性の転写は確認されなかった。FlgM 非存在下で *flhD* および *fliA* の両オペロンの機能に依存して活性化される転写がどの転写の活性化によるものかを解析するために、野生株及び *flgM* 突然変異株から総 RNA を調製し、プライマー伸長法によって転写開始点の同定を行った。その結果、CRP に依存的な転写が *flgM* 突然変異によって活性化されることが明らかとなった。

(2) *in vitro* 転写系における解析

精製した CRP, FliA, 及び FlhD/FlhC を用いて、*in vitro* 転写再構成系により *flhD* オペロンの転写を解析した。その結果、CRP 依存性の転写が再現されたが、その転写は、FliA と FlhD/FlhC を加えても活性化されなかった。従って、*flgM* 欠損下で *fliA*、および *flhD* の両オペロンに依存して活性化される転写には、*flhD* オペロン制御下に発現される未同定の因子が必要であることが予想された。

序 論

DNA の遺伝情報を転写する RNA ポリメラーゼは、原核生物では少なくとも 4 種類のサブユニット蛋白質からなる 5 分子($\alpha_2\beta\beta'\sigma$)から構成されている。大腸菌(*Escherichia coli*)を中心とした細菌における遺伝学的、生化学的解析によって RNA ポリメラーゼの分子解剖が進められ、各サブユニットの機能構造が明らかになりつつある。 $\alpha_2\beta\beta'$ からなるコア酵素には DNA 鎖を鋳型とした RNA 鎖合成の伸長反応を行う活性はあるが、転写開始反応を行う活性はない。遺伝子の転写開始シグナルであるプロモーター配列を認識して特異的な転写開始反応を行うのは、コア酵素に σ 因子が結合したホロ酵素である。すなわち、 σ 因子が特異的な転写開始反応を行う活性をコア酵素に付与する(Travers and Burgess, 1969)。 σ 因子は、同一の細菌内においても様々な分子種が存在し、それぞれ特異的なプロモーター配列を認識する。例えば大腸菌においては、対数増殖期に発現する多くの遺伝子の転写を司る σ^{70} 以外に、熱ショックレギュロンに特異的な σ^{32} 、第二の熱ショック σ 因子である σ^{24} 、窒素飢餓時に誘導される遺伝子群に特異的な σ^{54} 、定常期に発現される遺伝子群に特異的な σ^{38} など、様々な分子種の存在が明らかとなっており、 σ^{70} を主要 σ 因子と呼ぶのに対し、これらは置換型 σ 因子と呼ばれている(Helmann and Chamberlin, 1988; Lonetto *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1993; Raina *et al.*, 1995; Rouviere *et al.*, 1995)。種々の σ 因子のアミノ酸配列の相同性の解析から、 σ 因子には相同性の高い 4 つの領域が存在することが明らかになっている(Gribkov and Burgess, 1986)。さらに各領域内の詳細な配列相同性の検討から、領域 1 には 2 つ、領域 2 には 4 つ、領域 3 には 2 つ、領域 4 には 2 つのサブ領域が存在するものと考えられており、突然変異体の解析からこれらのサブ領域に σ 因

子の各素機能が位置付けられている。領域 1.1 は大腸菌の σ^{70} をはじめとした各細菌の主要 σ 因子と σ^{38} にのみ存在し (Lonetto *et al.*, 1992)、大腸菌の σ^{70} の場合には C 末端側の特異的な DNA 結合能を阻害することが *in vitro* の実験において報告されている (Dombroski *et al.*, 1992, 1993)。また、領域 2.1 はコア酵素との結合、領域 2.3 は DNA 鎖の開裂、領域 2.4 と領域 4.2 はそれぞれプロモーターの -10 配列と -35 配列の認識に関与するものと推定されている (Lesley and Burgess, 1989; Helmann and Chamberlin, 1988; Zuber *et al.*, 1989; Siegele *et al.*, 1989)。領域 3.1 と 4.2 には、DNA 結合モチーフである helix-turn-helix の存在が示唆されている (Helmann and Chamberlin, 1988; Lonetto *et al.*, 1992)。

サルモネラ (*Salmonella typhimurium*) の σ 因子の一つである σ^{28} は、一群の鞭毛オペロンの転写に特異的な置換型の σ 因子として同定されたものである (Ohnishi *et al.*, 1990)。運動器官である鞭毛は 10 数種類の蛋白質から構成される高次構造体で、膜構造に埋め込まれた基体と菌体外に長く突出したらせん型の繊維、及び両者をつなぐフックから構成されている。鞭毛突然変異体の遺伝学的解析により、鞭毛の形成や完成した鞭毛の機能(運動性や走化性)発現に関与する遺伝子として、現在までに約 50 個の遺伝子が同定されている。これらの鞭毛遺伝子の大部分は染色体上でクラスターをなして存在しており、さらにそれらの多くは複数の遺伝子からなるオペロンを形成している。これらの鞭毛オペロンは、それぞれの先頭の遺伝子名をとって呼ばれている (Kutsukake *et al.*, 1988)。鞭毛オペロン間の転写順位の解析から、鞭毛オペロン群は鞭毛レギュロンとして統合された転写調節を受けていることが明らかにされ、鞭毛レギュロンのカスケードモデルが提出されている (Kutsukake *et al.*, 1990; Kutsukake and Iino, 1994)。それによれば、鞭毛オペロンは転写発現の階層性から 3 つのクラス(クラス 1, クラス 2, クラス 3)にわけられる。クラス 1 は 2 つの遺伝子 (*flhD* と *flhC*) から構成される *flhD* オペロンのみからなる。クラス 2 は 7 つのオペロン (*flgA*, *flgB*, *flhB*, *fliA*, *fliE*, *fliF*, *fliL* オペロン)、クラス 3 は少なくとも 6 つのオペロン (*flgK*, *flgM*, *fliC*, *fliD*, *motA*, *tar* オペロン) からなる。 σ^{28}

はクラス 2 に属する *fliA* 遺伝子の産物であり、クラス 3 オペロン群の転写を司る σ 因子である。遺伝子の塩基配列から予想される蛋白質の一次構造によれば、FliA にも σ 因子間で保存されている領域 2 から領域 4 までの領域が存在し、それぞれの領域に σ 因子としての機能が存在するものと推定されている (Ohnishi *et al.*, 1990)。

鞭毛レギュロンのカスケードモデルの重要な特徴は、鞭毛遺伝子の発現順序が鞭毛形態形成の階層性と一致している点である (Kutsukake *et al.*, 1990)。すなわち、鞭毛基部構造(フック-基体複合体)の形成に関与する遺伝子群はすべてクラス 2 に属し、基部構造上に形成される繊維や完成した鞭毛の機能(運動性や走化性)発現に関与する遺伝子群はすべてクラス 3 に属している。このことは、クラス 1 とクラス 2 の遺伝子群の機能によって鞭毛の基部構造が完成してからでなければ、それより後期の過程で機能する遺伝子群であるクラス 3 は発現されないことを意味している。この構造形成と遺伝子発現の共役因子として、*flgM* 遺伝子が同定されている (Gillen and Hughes, 1991)。*flgM* 遺伝子欠損下では、基部構造形成の有無にかかわらずクラス 3 オペロン群の転写が行われることから、FlgM は鞭毛基部構造形成と共役してクラス 3 遺伝子の発現を制御する負の調節因子と考えられた。*flgM* 遺伝子はクラス 3 に属し、主に FliA の転写制御下にあるが、上流に存在する *flgA* 遺伝子のクラス 2 型のプロモーターからの転写による発現も存在する (Gillen and Hughes, 1993; Kutsukake, 1994)。精製蛋白質を用いた *in vitro* での研究から、FlgM は FliA に結合し、FliA の RNA ポリメラーゼ・コア酵素への結合を阻害することが示されており、この作用機構からアンチ σ 因子と呼ばれている (Ohnishi *et al.*, 1992)。FlgM が鞭毛遺伝子発現と形態形成を共役させる機構は、FlgM の鞭毛構造を介した細胞外輸送によると考えられている。すなわち、FlgM は鞭毛の基部構造が完成するとその構造を介して細胞外に輸送されることでその細胞内濃度が低下し、その結果 FliA が脱抑制を受け、クラス 3 遺伝子群の転写が活性化される (Hughes *et al.*, 1993; Kutsukake, 1994)。したがって、クラス 2 に属する鞭毛基部構造形成に関

与する遺伝子に突然変異が起こり基部構造形成が阻害されると、FlgM の輸送経路が形成されないためにその細胞外輸送が行われず、その結果 FlgM によって FliA が阻害され、クラス 3 の転写が抑制されることになる。つまり、FlgM には FliA に結合してその活性を阻害する機能に加え、細胞外に輸送されるために必要な情報も存在することになる。

基部構造形成の欠損下においてクラス 3 オペロンの発現が脱抑制される突然変異体が多数単離されており、*rflB*, *C*, *D*, ... と呼ばれている (Kutsukake *et al.*, 1990; Kutsukake *et al.*, 1994)。このうち、*rflB* 突然変異は *flgM* に位置付けられ、FlgM がアンチ σ 活性を失ったものと考えられている (Kutsukake *et al.*, 1994)。また、*rflD* 突然変異は *fliA* に位置付けられ、FliA の FlgM に対する感受性が低下した突然変異と考えられている (Kutsukake *et al.*, 1994)。しかし、これらの突然変異が FliA-FlgM 相互作用に及ぼす影響の分子機構についてはまだ解明されていない。

上述のように、FliA-FlgM 制御系はクラス 3 オペロン群の転写制御の研究から見出されたものであるが、最近の研究から、FlgM 欠損下では *flhD* と *fliA* オペロンの機能に依存してクラス 1 とクラス 2 オペロン群も活性化されることが明らかとなった (Kutsukake and Iino, 1994; K. Kutsukake, 私信)。したがって、すべてのクラスの鞭毛オペロンが FliA-FlgM 相互作用によって制御されていることになる。精製蛋白質を用いた *in vitro* での転写解析により (Liu and Matsumura, 1994)、クラス 2 の転写は σ^{70} を含む RNA ポリメラーゼによって行われ、FlhD と FlhC は複合体 (FlhD/FlhC) を形成して必須のアクチベーターとして機能することが明らかとなっている。最近当研究室においてクラス 2 オペロンの転写開始点が同定され、多くのクラス 2 オペロンには FlhD/FlhC に依存した転写が一つだけ存在し、その転写が *flgM* 突然変異によって促進されることが明らかとなっている (T. Ikebe, and K. Kutsukake, 私信)。ただし、*fliA* オペロンだけは FlhD/FlhC に依存した転写に加えて FliA 自身によって活性化される転写も存在し、後者が *flgM* 突然変異によって促進される (T. Ikebe, and K. Kutsukake, 私信)。一方、最上位に位置する *flhD* オペロンは、

他の制御系からの様々なシグナルに応答して鞭毛レギュロン全体の転写活性を制御するマスターオペロンとして機能している。例えば、カタボライトアクチベーター蛋白質である CRP やヌクレオイド蛋白質である H-NS などのグローバルな転写因子によって正の制御を受ける (Kutsukake *et al.*, 1990; K. Kutsukake, 私信)。しかし、*flhD* オペロンの転写の分子レベルでの解析はまだ行われておらず、FliA-FlgM 制御のターゲットとなる転写の同定も行われていない。

本研究は、鞭毛レギュロンの転写制御において中心的な役割を果たしている FliA-FlgM 相互作用の分子機構を解明するとともに、クラス 1 とクラス 2 オペロン群の FliA による転写活性化の分子機構を解明することを目的として行った。その結果、FliA と FlgM はそれぞれの C 末端領域で相互作用することが明らかとなり、さらに、FlgM の N 末端側は細胞外への輸送に必須な領域であることが判明した。一方、精製 FliA を用いた *in vitro* 転写系から、FliA はクラス 3 型の転写は促進するが、クラス 1 とクラス 2 型の転写は促進しないことが判明した。これらの結果から、鞭毛レギュロンの転写制御について考察する。

材料と方法

1. 試薬と培地

(1) 試薬

本研究では、特に断らない限りすべてナカライテスク製の特級試薬を用いた。

(2) 培地

液体培地の組成は次の通りである; LB:H₂O 1000ml, peptone S(極東) 10g, yeast extract(極東) 5g, NaCl 5g, 5N NaOH 0.4ml; 2YT:H₂O 1000ml, peptone S 16g, yeast extract 10g, NaCl 5g, 5N NaOH 0.8ml; M9 minimal: × 10 M9 salts(H₂O 1000ml, Na₂HPO₄·12H₂O 85.48g, KH₂PO₄ 15g, NaCl 2.5g, NH₄Cl 5g) 100ml, 20%(W/V) glucose 20ml, thiamine 1mg; M9 minimal + CA: H₂O 829ml, × 10 M9 salts 100ml, 10%(W/V) glycerol 20ml, 20%(W/V) Casamino acids(Difco) 50ml, 1M MgSO₄ 1ml。

寒天培地の組成は次の通りである; LA:LB 1000ml, agar(松栄) 12g; LB soft agar: LB 1000ml, agar 5g; motility agar:H₂O 1000ml, peptone S 15g, NaCl 5g, agar 2.5g。

培地に入れる抗生物質の終濃度は、特に断らない限り以下の通りである; ampicillin(Sigma), 50 μg/ml; methicillin(Sigma), 250 μg/ml; tetracycline(和光純薬), 20 μg/ml; kanamycin(明治製菓), 50 μg/ml; chloramphenicol(三共), 25 μg/ml。

2. 菌株、プラスミド及びファージ

本研究で用いた大腸菌及びサルモネラ菌株を表 1 に、プラスミドとファージを表 2 にまとめた。

3. DNA 操作法

DNA の一般的な取扱いについては、Sambrook *et al.*(1989)の方法に従った。なお、以下で用いたバッファーのうち、TE(pH8.0)は 10mM Tris·HCl(pH8.0), 1mM EDTA を、TE(pH7.5)は 10mM Tris·HCl(pH7.5), 1mM EDTA を示す。

(1)プラスミド DNA の少量調製

大腸菌から調製する場合はボーリング法で、サルモネラから調製する場合はアルカリ法で行った。

(i)ボーリング法

組換え体選抜用の抗生物質を添加した 2ml の LB にプラスミド保持菌の単一集落を接種し、37 °Cで対数増殖後期まで振とう培養する。培養液 1ml をサンプリングチューブに取り、微量高速遠心機 MC-15A(トミー精工)を用いて 10krpm, 室温で 1 分間遠心後、上清を取り除く。菌体に 350 μ l の 100mM Tris·HCl(pH8.0), 1mM EDTA, 5%(W/V) Triton X-100 を加えてボルテックスで懸濁後、ただちに 25 μ l の lysozyme(生化学工業)溶液(10mg/ml in TE(pH8.0))を加え、ボルテックスで 10 秒間攪拌する。100 °Cで 60 秒間加熱した後、12krpm, 室温で 10 分間遠心する。沈澱を取り除いた上清に 40 μ l の 2.5M Na-acetate(pH5.2)と 420 μ l の isopropanol を加えてよく混合し、室温で 5 分間放置する。微量高速冷却遠心機 MRX-150(トミー精工)を用いて 15krpm, 4 °Cで 20 分間遠心後、沈澱を 70%(V/V) ethanol で洗い、真空乾燥させる。50 μ l の TE(pH8.0)に溶解し、-20 °Cで保存する。

(ii)アルカリ法

ボーリング法と同様に培養を行い、遠心集菌する。菌体を 100 μ l の氷冷した 50mM glucose, 25mM Tris·HCl(pH8.0), 10mM EDTA に懸濁する。1%(W/V) SDS, 0.2N NaOH を 200 μ l 加えてチューブを緩やかに反転させて混合し、水中におく。11.5%(V/V) acetate, 3M K-acetate を 150 μ l 加えてよく混合し、氷上に 5 分間放置する。12krpm, 4 °Cで 5 分間遠心し、上清を別のチューブに移す。900 μ l の ethanol を加えてよく混合後、室温で 5 分間放置する。12krpm, 4 °Cで 5 分間遠心後、沈澱

を 70%(V/V) ethanol で洗い、真空乾燥させる。以下、ボーリング法の場合と同様にして保存する。

(2)プラスミド DNA の大量調製

組換え体選抜用の抗生物質が入った 250ml の LB にプラスミド保持菌の単一集落を接種し、37 °Cで一晩振とう培養する。培養液を氷冷し、250ml 容遠心管に移す。RA-6 ロータ(久保田)を用いて 8krpm, 4 °Cで 5 分間遠心する。上清を捨て、菌体を 40ml の 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl(pH7.8), 1mM EDTA に懸濁し、40ml 容遠心管に移す。RA-3R ロータ(久保田)を用いて 6krpm, 4 °Cで 5 分間遠心し、上清を捨てる。5ml の 50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl(pH8.0)と 20mg の lysozyme を加えて攪拌し、10 分間室温に放置する。10ml の 0.2N NaOH と 0.1g の SDS を加えて緩やかに混合し、水中で 10 分間放置する。K-acetate 溶液(acetate 11.5ml, 3M Na-acetate 88.5ml)を 7.5ml 加えてよく混合し、水中で 15 分間放置する。14.5krpm, 4 °Cで 20 分間遠心し、上清を別の 40ml 容遠心管に移す。13.5ml の isopropanol を加えてよく混合し、20 分間室温に放置する。3krpm, 4 °Cで 10 分間遠心して上清を捨て、沈澱を 2ml の ethanol で洗い、真空乾燥させる。10ml の TE(pH8.0)に溶解後、250 μ l の RNase(Boehringer Mannheim)溶液(10mg/ml in 0.1M NaCl, 10mM acetate(pH5.2))を加え、37 °Cで 60 分間保温する。10ml の TE(pH8.0)-saturated phenol(和光純薬)を加えてボルテックスでよく攪拌し、10krpm で 10 分間遠心して上清を別の 40ml 容遠心管に移す。20ml の ethanol を加え、-30 °Cで 2 時間放置する。10krpm, 4 °Cで 10 分間遠心し、沈澱を 70%(V/V) ethanol で洗い、真空乾燥させる。4ml の TE(pH7.5)に溶解し、4.2g の CsCl(Boehringer Mannheim)を入れたチューブに移す。400 μ l の EtBr 溶液(10mg/ml)を加えてクイックシールチューブ(Seton)に移し、シールする。VTi65.2 ロータ(Beckman)を用いて 45krpm, 20 °Cで 12 時間遠心する。遠心後、紫外線照射下でプラスミド DNA のバンドを注射器で抜き取り、1ml の CsCl-saturated TE(pH7.5)-saturated isopropanol 溶液の入ったチューブに移す。同溶液で数回抽出して EtBr を取り除く。溶液を透析チューブ(和光純薬)に移し、TE(pH7.5)に対して 2 回透析後、

4℃で保存する。

(3)DNA の酵素処理

(i)制限酵素処理

制限酵素は、東洋紡、宝酒造、ニッポンジーンまたは Boehringer Mannheim から購入し、各製品の使用方法に従って使用する。

(ii)phenol-chloroform 処理、ethanol 沈澱

制限酵素処理液と等量の TE(pH8.0)-saturated phenol を加え、ボルテックスで約 30 秒間攪拌する。微量高速遠心機を用いて 12krpm, 室温で 1 分間遠心後、上清を別のサンプリングチューブに移す。等量の chloroform/isoamylalcohol 混液(24:1(V/V)) を加えてボルテックスで攪拌後、遠心して上清を別のサンプリングチューブに移す。1/10 容の 2.5M Na-acetate(pH5.2)と 2.5 倍容の ethanol を加えてボルテックスで混合し、-30℃で 2 時間放置する。微量高速冷却遠心機を用いて 15krpm, 4℃で 30 分間遠心後、沈澱を 70%(V/V) ethanol で洗い、真空乾燥させる。

(iii)ライゲーション反応

66mM Tris-HCl(pH7.6), 6.6mM MgCl₂, 10mM DTT, 0.1mM ATP(宝酒造)溶液中で、T4 DNA ligase(ニッポンジーン)を粘着末端の場合には 5units、平滑末端の場合には 500units 使用して 16℃で反応を行う。

(4)欠失体の作成

目的の DNA を含むプラスミド(5-10 μg)の欠失させる側を 5'突出末端または平滑末端が生じるような制限酵素で切断し、欠失させない側を 3'突出末端が生じるような制限酵素で切断する。phenol-chloroform 処理と ethanol 沈澱で DNA を精製した後、100 μl の 50mM Tris-HCl(pH8.0), 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 10mM 2-ME に溶解させる。180units の Exonuclease III(東洋紡)を加え、ピペットマンでよく攪拌する。目的に応じて一定時間毎にサンプリングし、あらかじめ別のサンプリングチューブに用意しておいた 100 μl の 40mM Na-acetate(pH4.5), 100mM NaCl, 2mM ZnCl₂, 10%(W/V) glycerol 中に入れていく。65℃で 5 分間処理して Exonuclease III を失活さ

せ、水中におく。50units の Mung bean nuclease(東洋紡)を加え、37 °Cで 30 分間保温する。phenol-chloroform 処理と ethanol 沈澱を行った後、50 μ l の 7mM Tris-HCl(pH7.5), 0.1mM EDTA, 20mM NaCl, 7mM MgCl₂, 0.1mM dNTP(宝酒造)に溶解させる。2units の Klenow fragment(東洋紡)を加え、37 °Cで 15 分間保温する。ethanol 沈澱を行った後、40 μ l の TE(pH8.0)に溶解する。適量をライゲーション反応に用いる。

(5)アガロースゲル電気泳動

(i)サンプルの調製

DNA 溶液の 1/6 容の反応停止液(50%(W/V) glycerol, 1%(W/V) SDS, 0.02%(W/V) BPB)を加えて電気泳動用のサンプルとする。

(ii)電気泳動

Agarose S(ニッポンジーン)を用いて TBE(90mM Tris-borate, 2mM EDTA)中で 1%(W/V)ゲルを作成し、サブマリン型電気泳動装置 Mupid(アドバンス)を用いて 100Vで泳動を行う。泳動終了後、ゲルを EtBr 溶液(0.5 μ g/ml in TBE)に約 30 分間浸漬する。軽く水洗した後、トランスイルミネーター上で DNA-EtBr 複合体の蛍光を検出し、Polaroid 665 あるいは 667 フィルムに撮影する。

(6)アガロースゲルからの DNA 断片の精製

Ultra PURE Agarose(Gibco BRL)を用いて、TAE(40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)中で 1%(W/V)ゲルを作製し、TAE をバッファーとして電気泳動を行う。ゲルを EtBr 溶液で染色後、目的の DNA のバンドを含むゲル断片を切り出し、サンプリングチューブに入れる。Gene Clean II kit(Bio101)を用いて以下の手順で DNA 断片の精製を行う。ゲルの 3 倍量の NaI 溶液を加え、45-50 °Cで加温してゲルを溶解させる。溶解後氷上におき、5 μ l の Glass milk を加え、1 分おきにチューブを反転させて攪拌する。微量高速冷却遠心機を用いて 10krpm, 4 °Cで 1 分間遠心し、沈澱を集める。氷冷した 1ml の New wash で沈澱を 3 回洗浄し、真空乾燥させる。滅菌水を 10 μ l 加え、37 °Cで 5 分間保温する。微量高速遠心機を用いて 12krpm, 室温で

1 分間遠心し、水層を抽出する。この抽出操作を再度繰り返し、水層をプールする。

(7)形質転換

(i)コンピテントセルの作成

単一集落から作成した前培養液を 100 倍希釈となるように LB 培地に接種し、37 °C で振とう培養する。対数増殖中期になったところで培養液を氷冷する。培養液を 40ml 容遠心管に移し、RA-3R ロータ(久保田)を用いて 6krpm, 4 °C で 5 分間遠心し、上清を捨てる。培養液と等量の氷冷した 0.1M MgCl₂ を加え、菌体をボルテックスで懸濁する。6krpm, 4 °C で 5 分間遠心し、上清を捨てる。培養液の 1/2 容の氷冷した 0.1M CaCl₂ を加え、ボルテックスで菌体を懸濁する。氷上に 30 分以上放置後、6krpm, 4 °C で 5 分間遠心集菌し、菌体を適量の氷冷した 0.1M CaCl₂ で懸濁してコンピテントセルとする。

(ii)形質転換

サンプリングチューブに DNA 溶液と TEN(20mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA, 20mM NaCl)を加えて全量を 100 μl とし、氷上におく。コンピテントセル 200 μl を加えて緩やかに混合し、氷上に 30 分以上放置する。42 °C で 2 分間熱ショックを与えた後、ただちに氷上に戻して 5 分間放置する。加温融解させた 2.5ml の LB soft agar に加えてボルテックスで軽く混合後、抗生物質を含む LA 上に重層する。なお、ファージの場合は LB soft agar に宿主となる菌体の培養液を 200-300 μl 加える。また、β - ガラクトシダーゼの α - 相補性を利用して組換え体を選抜する際は、5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside 溶液(20mg/ml in dimethylformamide(米山薬品))を 50 μl と 100mM IPTG を 10 μl 加える。宿主としてアンピシリン耐性遺伝子を持つ KK1107, KK1107GM, KK1108, KK1108GMHD, KK1505HB, KK1505IA, KK1512HB を使い、ampicillin 耐性遺伝子を持つプラスミドで形質転換する場合は、ampicillin と methicillin をそれぞれ通常の 5 倍量含む LA を用いる。

(8)DNA シークエンシング

(i)一本鎖 DNA の調製

M13mp18/19 からの調製: 単一ブランクを 50 μ l の JM109 前培養液が入った 2ml の LB に接種する。37 °C で 6 時間振とう培養した後、1ml をサンプリングチューブに取る。微量高速遠心機を用いて 12krpm, 室温で 5 分間遠心し、上清を別のサンプリングチューブに移す。上清に 200 μ l の PEG 溶液(20%(W/V) PEG8000 in 2.5M NaCl)を加えてよく混合後、室温で 15 分間放置する。微量高速冷却遠心機を用いて 12krpm, 4 °C で 10 分間遠心して沈澱を集めた後、上清を完全に取り除く。100 μ l の TE(pH8.0)を加え、沈澱を懸濁する。50 μ l の TE(pH8.0)-saturated phenol を加え、ボルテックスで約 30 秒間攪拌する。12krpm で 1 分間室温で遠心し、上清を別のサンプリングチューブに移す。300 μ l の ethanol/3M Na-acetate 混液(25:1)を加えてよく攪拌し、15 分間室温に放置する。12krpm, 4 °C で 10 分間遠心後、沈澱を 70%(V/V) ethanol で洗い、真空乾燥させる。20 μ l の TE(pH8.0)に溶解させ、-20 °C で保存する。

pUC118/119 からの調製: 目的のプラスミド保持菌の単一集落を、ampicillin を含んだ 2ml の 2YT に接種する。ヘルパーファージ M13K07 を 2×10^7 pfu/ml となるように加え、37 °C で激しく振とう培養を行う。培地がわずかに濁ってきたところで kanamycin を最終濃度が 70 μ g/ml となるように加え、さらに 15 時間培養を続ける。培養終了後、M13mp18/19 からの調製法と同様にして一本鎖 DNA を調製する。

(ii)シーケンス反応

Sanger et al.(1977)のジデオキシ法に従って、以下の通り反応を行う。

Sequenase ver2.0(USB)による反応: キットに添付されている試薬を用いて、以下の通り反応を行う。鋳型 DNA- プライマー混液(10 μ l 中に primer 0.5pmol, \times 5 Reaction buffer 2 μ l, template DNA 0.5pmol を含む)を作成して 65 °C で 2 分間加熱した後、室温で約 30 分間放置する。0.1M DTT 1 μ l、滅菌水で 5 倍に希釈した Labeling mix 2 μ l、 $[\alpha$ -³²P]dCTP(3,000Ci/mmol)(ICN) 0.5 μ l、Enzyme dilution buffer

で9倍に希釈した Sequenase 2 μ l を加える。室温で2-5分放置後、予め分注しておいた2.5 μ l の Termination mix に3.5 μ l ずつ加える。37°Cで5分間保温後、4 μ l の反応停止液(95%(V/V) formamide, 20mM EDTA, 0.05%(W/V) BPB, 0.05%(W/V) xylene cyanol FF)を加える。90°Cで2分間加熱後、ただちに水中に移す。2-3 μ l を20cm \times 50cm の urea-denatured-polyacrilamide gel [6%ゲル: H₂O 11ml, \times 5 TBE 7ml, 30% acrylamide mix(29%(W/V) acrylamide, 1%(W/V) N, N'-methylenebisacrylamide) 7ml, urea 16.1g, 10mg/ml APS 120 μ l, TEMED 40 μ l] に重層し、ゲル1枚当たり20mAで泳動を行う。泳動終了後、X線フィルム(FUJI RX)に-80°Cで一晩オートラジオグラフィを行う。

BcaBEST(宝酒造)による反応: キットに添付されている試薬を用いて、以下の通り反応を行う。鋳型 DNA- プライマー混液(13.5 μ l 中に、 \times 10 buffer 1.5 μ l, template DNA 0.5pmol, primer 0.5pmol を含む)に[α -³²P]dCTP(3,000Ci/mmol) 0.5 μ l と *BcaBEST* DNA polymerase 1 μ l を加える。これを滅菌水で2倍に希釈した4種類の dNTP-ddNTP mix 2 μ l に3.5 μ l ずつ加える。65°Cで3分間保温した後、Chase mixture を1 μ l ずつ加えて混合し、さらに65°Cで3分間保温する。反応停止液を3 μ l ずつ加えて95°Cで3分間加熱後、ただちに水中に移す。以下、上と同様に電気泳動を行い、オートラジオグラフィを行う。

(9) プラスミドの構築方法

本研究で新たに構築したプラスミドの構築方法について、表3にまとめた。

(10) *rflB* 突然変異 *flgM* 遺伝子のクローニング

rflB 突然変異体の染色体 DNA とクローニングベクター pBR322 を *EcoRI* で切断後、ライゲーション反応を行う。ライゲーション混液を用いて、*flgM* 遺伝子の近くに位置する *flgB* 遺伝子の欠損株である EKK21 株を形質転換する。ampicillin を添加した motility agar に接種して37°Cで培養し、運動性を回復した形質転換体を選択する。

4. β -ガラクトシダーゼ活性の測定

Miller(1972)の方法に従って、以下の通り測定する。IPTG 誘導型プラスミド保持菌の単一集落から作成した前培養液を 1mM の IPTG と抗生物質を含んだ 2ml の LB に 100 倍希釈となるように接種し、OD₆₀₀値が 0.3-0.5 となるまで振とう培養する。培養液を氷冷後、0.1ml または 0.5ml を Z buffer(60mM Na₂HPO₄·7H₂O, 40mM NaH₂PO₄·H₂O, 10mM KCl, 1mM MgSO₄·7H₂O, 50mM 2-ME, pH7.0)に加え、全量を 1ml とする。ただちにトルエン 10 μ l を加え、ボルテックスで約 10 秒間攪拌する。37 °Cで緩やかに振とうしてトルエンを揮発させた後、試験管を 28 °Cに移し、5 分間放置する。ONPG(Sigma)溶液(4mg/ml)を 200 μ l 加えてよく混合し、28 °Cで反応させる。十分反応させたところで 0.5ml の 1M Na₂CO₃を加え、反応を停止させる。OD₄₂₀と OD₅₅₀を測定した後、以下の式に従って β -ガラクトシダーゼ活性を算出する。

$$\text{Units} = 1000 \times (\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}) / t \times v \times \text{OD}_{600}$$

t, 反応時間(min); v, 測定に用いた培養液の容量(ml)

5. SDS-PAGE

Laemmli et al.(1970)の方法に従って以下の通り行う。

(i) サンプルの調製

目的のサンプルに 18 μ l の SDS gel loading buffer(50mM Tris·HCl(pH6.8), 2%(W/V) SDS, 0.1%(W/V) BPB, 10%(W/V) glycerol)と 2 μ l の 1M DTT を加え、100 °Cで 3 分間加熱する。

(ii) 電気泳動

10cm \times 10cm の SDS-polyacrylamide gel(15% resolving gel: H₂O 2.3ml, 30%(W/V) acrylamide mix 5.0ml, 1.5M Tris·HCl(pH8.8) 2.5ml, 10%(W/V) SDS 0.1ml, 10%(W/V) APS 0.1ml, TEMED 4 μ l; 12% resolving gel:H₂O 3.3ml, 30%(W/V) acrylamide mix 4.0ml, 1.5M Tris·HCl(pH8.8) 2.5ml, 10%(W/V) SDS 0.1ml, 10%(W/V) APS 0.1ml, TEMED 4 μ l; 5%

stacking gel:H₂O 3.4ml, 30%(W/V) acrylamide mix 0.83ml, 1.0M Tris-HCl(pH6.8)0.63ml, 10%(W/V) SDS 0.05ml, 10%(W/V) APS 0.05ml, TEMED 5 μ l)にサンプルを 10-15 μ l アプライし、Tris-glycine バッファー(25mM Tris base, 250mM glycine, 0.1%(W/V)SDS)でゲル 1 枚あたり 18mA で泳動を行う。泳動終了後ゲルを Coomassie 染色液 (Coomassie brilliant blue R250 0.25g, methanol 45ml, H₂O 45ml, acetate 10ml)に浸し、約 1 時間緩やかに振とうする。ゲルを脱色液(methanol 45ml, H₂O 45ml, acetate 10ml)に浸し、バンドがはっきり現れるまで脱色を行う。ゲルを水洗した後、濾紙にのせ、ゲルドライヤーで吸引、加温して乾燥させる。

6. ウェスタンブロッティング

スマイライト・ウェスタンブロッティングシステム(住友金属)を用いる。

5 の方法に従って電気泳動したゲルと、Nitrocellulose メンブレン、パッド、ろ紙をブロッティング用バッファー(25mM Tris-HCl(pH8.3), 250mM glycine, 20%(V/V) methanol)に 5 分以上浸した後、ブロッティング装置にセットし、180mA の定電流で 1 時間ブロッティングする。このとき、装置は氷水で冷却する。ブロッティングされたメンブレンを取り出し、10ml のブロッキングバッファー(TBS-tween (20mM Tris-HCl(pH7.5), 150mM NaCl, 0.05%(W/V) tween 20(和光純薬))10ml, ブロッキング試薬(住友金属) 0.2g)に浸し、室温で 1 時間振とうする。25ml の TBS-tween 中で 5 分間振とうした後、10ml の一次抗体溶液(洗浄溶液(TBS-tween 165ml, ブロッキング試薬 0.33g)10ml, ウサギ抗血清 1 μ l)に浸し、2 時間振とうする。25ml の洗浄液中で 10 分間ずつ 3 回洗浄して未反応抗体を取り除いた後、10ml の二次抗体溶液(洗浄溶液 10ml, 抗ウサギ IgG-アルカリフォスファターゼ試薬(住友金属)1 μ l)に浸し、1 時間振とうする。25ml の洗浄液中で 10 分間ずつ 3 回振とうし、未反応二次抗体を取り除く。25ml の TBM(100mM Tris-HCl(pH9.5), 150mM NaCl, 50mM MgCl₂)に浸し、5 分間ずつ 2 回振とうしてメンブレンを平衡化させる。150 μ l の ルミスチン(住友金属)を滴下したサララップ上にメンブレンをのせ、カセッ

トに入れ X 線フィルムに一晩感光させる。

7. *in vitro* における FliA-FlgM 蛋白質間相互作用の解析

Ohnishi *et al.*(1992)の方法に従って、以下の通り行う。

(i) *in vitro* 転写-翻訳共役系

E. coli S30 Extract Prokaryotic Translation System(Promega)を用いて以下の通り反応を行う。template DNA(*fliA* または *flgM* 遺伝子を運ぶプラスミドのスーパーコイル型 DNA)1 μ g, 100mM IPTG 0.5 μ l, premix(-Met) 20 μ l, [³⁵S]methionine(1,000Ci/mmol)(HAS)1 μ l, S30 15 μ l の混液を作成して全量を 50 μ l とし、37 °C で 60 分間加温する。

(ii) 蛋白質間の架橋と免疫沈澱

上の混液に DSP(Sigma)溶液(100mg/ml in DMSO)を 1 μ l 加え、氷上に 1 時間おく。50 μ l の coupling buffer I(50mM sodium phosphate(pH7.2), 150mM NaCl)、10 μ l の 20%(W/V) Triton X-100、10 μ l の 15%(W/V) SDS を加え、90 °C で 2 分間加熱する。370 μ l の coupling buffer I、5 μ l の trypsin inhibitor(1mg/ml)、2.5 μ l の抗 FliA ポリクローナル抗体と 2.5 μ l の抗 FlgM ポリクローナル抗体(いずれも大西浩平博士より分譲されたもの)を加え、4 °C で一晩緩やかに混合する。5mg の Protein A-Sepharose CL-4B(Sigma)を加え、1 時間緩やかに混合する。500 μ l の coupling buffer II(1%(W/V) Triton X-100 を含んだ coupling buffer I)を加え、微量高速遠心機を用いて 15krpm で 1 分間遠心して沈澱を集める。沈澱を coupling buffer II で 2 回、coupling buffer I で 2 回洗った後、50 μ l の TDG(33mM Tris-HCl(pH8.5), 1%(W/V) SDS, 12.5%(W/V) glycerol, 0.01%(W/V) BPB)を加え、90 °C で 5 分間加熱する。10 μ l のサンプルを 15%の SDS-polyacrylamide gel で泳動する。

(iii) フルオログラフィー

ゲルを固定液(10%(V/V) acetate, 30%(V/V) methanol)に浸し、約 1 時間穏やかに振とうする。50ml の Enlightning(Du Pont)に浸し、30 分間緩やかに振とうする。ゲ

ルドライヤーでゲルを乾燥させ、-80℃でオートラジオグラフィーを行う。

8. FlgM の細胞外輸送の解析

単一集落から作成した前培養を 100 倍希釈となるように 2ml の M9 minimal + CA に接種し、37℃で振とう培養する。OD₆₀₀値が 0.4 となったところで IPTG を終濃度が 1mM となるように添加し、さらに 5 時間培養を続ける。氷冷後細胞数が等しくなるように培養液をとってサンプリングチューブに移す。微量高速冷却遠心機を用いて 12krpm, 4℃で 5 分間遠心し、上清を別のサンプリングチューブに移す。再度遠心して上清 900 μl を別のチューブに取り、100 μl の 100% TCA(和光純薬)を加え、氷上に 1 時間おく。15krpm, 4℃で 30 分間遠心し、沈澱を Tris-SDS-gel loading buffer(Tris-saturated H₂O/SDS-gel loading buffer(1:9))18 μl と 1M DTT 2 μl に溶解して 100℃で 3 分間加熱する。10 μl のサンプルを 15%-25% polyacrylamide gel (バイオクラフト)に重層し、6 の方法に従って解析する。

9. 蛋白質の精製

4℃のクロマトチャンバー内で Econo System(Bio-Rad)を用いて蛋白質の精製を行う。各フラクションに含まれる蛋白質は SDS-PAGE によってモニターする。

(1)DEAE イオン交換クロマトグラフィー

カラム(内径 1cm ×長さ 20cm)に担体ベッドの高さが 10cm となるように DEAE 樹脂(DEAE-TOYOPEARL 650M)をつめる。0.1M NaCl-TGED(10mM Tris·HCl(pH7.8), 5%(W/V) glycerol, 0.1mM EDTA, 0.1mM DTT)をベッド容量の 2 倍量流し、カラムを平衡化させる。サンプルをアプライし、流速 0.5ml/min で 10ml 溶出させた後、0.1M-0.5M または 0M-1M の NaCl 直線濃度勾配で 75ml 溶出させる。

(2)硫安塩析による蛋白質の濃縮

100%の飽和硫安溶液を最終濃度が 40%(V/V)または 60%(V/V)となるように加え、蛋白質の塩析を行う。4℃で一晩静置した後、RA-3R ロータを用いて 14.5krpm,

4 °Cで 30 分間遠心する。生じた沈殿を次の段階で使用するバッファーに溶解し、このバッファーに対して一晚透析する。バッファーの交換は 3 回行う。

(3)Heparin アフィニティークロマトグラフィー

5ml 容量の HiTrap Heparin プレパックカラム (Pharmacia) を溶出バッファー (0.1M NaCl-TGED) で平衡化させる。サンプルをアプライし、流速 0.5ml/min. で 10ml 溶出させた後、0M-1M NaCl 直線濃度勾配で 75ml 溶出させる。

(4)蛋白質の定量

Protein assay 試薬 (Bio-Rad) を用いてタンパク質の定量を行う。1-25 μ g/ml の濃度に希釈したタンパク質溶液 800 μ l に、アッセイ用試薬 200 μ l を加えてよく攪拌した後、室温で 5 分間以上放置し、595nm の吸光度を測定する。BSA 標準溶液 (0, 125, 250, 500 μ g/ml) を用いて検量線を作成し、この検量線から目的のタンパク質濃度を求める。

10. *in vitro* 転写再構成系

鑄型となる 1 μ g のスーパーコイル状プラスミド DNA と σ^{70} を含む RNA polymerase (Boehringer Mannheim) あるいは FliA と RNA polymerase, core (Epicentre Technologies) を転写緩衝液中 (50mM Tris-HCl (pH7.8), 50mM NaCl, 3mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 0.1mM DTT, 3mM Mg-acetate, 25mg/ml BSA) で 37 °C、30 分間加温し、転写開始複合体を形成させる (このとき、条件に応じて、アクチベーター蛋白質 CRP (饗場弘二博士から分譲されたもの) と FlhD/FlhC を加えておく)。別のチューブに RNA 鎖合成の基質となるヌクレオチド混合液 (1.5mM GTP, ATP, CTP, 500 μ M UTP (Boehringer Mannheim)) 1.5 μ l と [α -³²P]UTP (3,000Ci/mmol) (ICN) 1 μ l を含む転写緩衝液 15 μ l を作成し、37 °C で 30 分間加温する。両者を混合し、37 °C で 10 分間保温して転写反応を行った後、反応停止溶液 (0.6M Na-acetate (pH5.5), 20mM EDTA, 200 μ g/ml tRNA (Sigma)) を 50 μ l 加える。フェノール処理と ethanol 沈殿によって RNA 生成物を回収し、DNA シークエンスゲルで泳動して X 線フィルムにオート

ラジオグラフィーをとる。

11. FliA の精製と活性測定

(1) FliA の精製

FliA を大量発現するプラスミド pSIIA1 で形質転換させた大腸菌 EKK22 株を IPTG によって誘導培養した場合、FliA 蛋白質は封入体を形成し、不溶性画分から回収される。そこで、大腸菌の σ^{70} の封入体からの精製方法 (Igarashi and Ishihama, 1991) に従って、FliA を精製した。

pSIIA1 で形質転換させた EKK22 株を ampicillin が含まれる 5ml の LB 培地に接種し、37 °C で越夜培養する。この前培養液 2.5ml を ampicillin を添加した 250ml の LB に接種し、37 °C で培養する。Klett 値が 40 となったところで IPTG を最終濃度が 1mM となるように加え、さらに 4 時間培養を続ける。培養液を氷冷した後、RA-6 ロータを用いて 6krpm, 4 °C で 5 分間遠心し、集菌する。40ml の氷冷した 10mM Tris-HCl (pH7.9) を加え、菌体を駒込ピペットで懸濁する。RA-3R ロータを用いて 6krpm, 4 °C で 5 分間遠心し、上清を捨てる。4ml の buffer 1 (50mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA, 100mM NaCl) に懸濁した後、16 μ l の 100mM PMSF 溶液 (isopropanol 溶液) と 80 μ l の lysozyme 溶液 (10mg/ml in TE (pH8.0)) を加えてよく攪拌する。時々攪拌しながら 20 分間水中に置いた後、80 μ l の 8% (W/V) deoxycholate 溶液を加えてさらに 20 分間水中に置く。超音波破碎装置 SONIFIER 250 (Branson) で粘性がなくなるまで細胞を破碎した後、12krpm, 4 °C で 10 分間遠心する。上清を捨て、FliA を含む不溶性画分を Triton X-100 を 0.5% (W/V) 添加した 4ml の buffer 1 に懸濁し、再び 12krpm, 4 °C で 10 分間遠心する。この操作を再度繰り返した後、6M の guanidine-HCl を含む TGED を 2ml 加えて可溶化する。0.1M の NaCl-TGED に対して透析し、guanidine-HCl を取り除く。透析中に生じた沈殿を 6krpm, 4 °C で 5 分間遠心して取り除き、得られた FliA の粗抽出液を DEAE-TOYOPEARL 650 による陰イオン交換クロマトグラフィーで分離する。0.1M-0.5M NaCl 直線濃度勾配で 75ml 溶出さ

せ、各画分に含まれる蛋白質を 12%ゲルによる SDS-PAGE でモニターする。FliA に相当する分子量 28,000 の蛋白質が含まれる画分を 60%(V/V)飽和硫酸で沈殿させる。これを 0.1M NaCl-TGED に対して透析し、精製 FliA 画分とする。

(2)FliA の活性測定

精製した FliA 蛋白質の活性は、FliA-RNA ポリメラーゼによって転写される *fliC* 遺伝子を鋳型とした *in vitro* 転写系で確認した。

fliC のプロモーター領域を運ぶプラスミド pSIIC100 を作成し(表 3)、このプラスミドのスーパーコイル状 DNA を鋳型として *in vitro* 転写系を構築した。pSIIC100 は、*fliC* の転写開始点(N. Ide, and K. Kutsukake, 私信)から約 420b 下流に *rrnB* 遺伝子のターミネーターが位置するように構築してある。精製した FliA 蛋白質と RNA ポリメラーゼ・コア酵素による pSIIC100 を鋳型にした *in vitro* 転写反応により、約 420b の RNA が合成されることが示され、活性のある FliA 標品であることが確認された。

12. FlhD/FlhC の精製と活性測定

(1)FlhD/FlhC の精製

FlhD と FlhC を大量発現させるため、ベクターとして pET17b、宿主として大腸菌 BL21 株からなる T7 発現系を用いた。pET17b は、T7 ファージの RNA ポリメラーゼによって特異的に転写され、かつ強力な転写活性を持つ T7 プロモーターを持つ。一方、BL21 株は染色体上に IPTG による誘導が可能な T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を持つ大腸菌である。したがって、pET17b の T7 プロモーター下流に目的の遺伝子をクローニングして BL21 株に導入すれば、IPTG の添加によって目的の遺伝子産物を特異的に大量発現することができる(Seed, 1987)。

FlhD と FlhC を大量発現できるプラスミド、pSIHD1 と pSIHC2 を構築した(表 3)。これらのプラスミドで大腸菌 BL21 株をそれぞれ形質転換し、得られた形質転換体を IPTG 誘導下で培養した。FlhD に相当する分子量 13,000 の蛋白質は可溶性画

分から回収されたが、FlhC に相当する分子量 22,000 の蛋白質は不溶性画分から回収された。そこで、複合体を形成して機能している両蛋白質を同一細胞内で発現させ、両者を可溶性複合体として精製することを試みた。pSIHD1 と同一細胞内で共存可能な FlhC の大量発現プラスミド pSIHC2 を構築した(表 3)。これらのプラスミドで形質転換した BL21 株を IPTG 存在下で培養した場合には、FlhD と FlhC 蛋白質は共に可溶性画分から回収された。

pSIHD1 と pSIHC2 の両方を持つ大腸菌 BL21 株を ampicillin と chloramphenicol を添加した 10ml の LB で 37 °C で越夜培養し、この前培養液を 1000ml の LB に接種して 37 °C で培養する。Klett 値が 40 となったところで IPTG を最終濃度が 1mM となるように加え、さらに 4 時間培養を続ける。培養液を氷冷後、RA-6 ロータを用いて 6krpm, 4 °C で 5 分間遠心し、菌体を集める。40ml の氷冷した 10mM Tris-HCl(pH7.9) を加え、菌体を駒込ピペットで懸濁する。RA-3R ロータを用いて 6krpm, 4 °C で 5 分間遠心して上清を捨てた後、菌体を 5ml の 10mM Tris-HCl(pH7.9) に懸濁する。菌体を超音波破碎後、12krpm, 4 °C で 10 分間遠心し、上清を集める。No.65 ロータ (Beckman) を用いて 35krpm, 4 °C で 1 時間遠心し、得られた上清を DEAE-TOYOPEARL650 による陰イオン交換クロマトグラフィーにかける。0M-1M の直線濃度勾配で 75ml 溶出させ、各画分中の蛋白質を 15%ゲルによる SDS-PAGE でモニターする。FlhC と FlhD に相当する蛋白質が同時に溶出されているピーク画分を 40%(V/V)の飽和硫酸で沈殿させる。0.1M NaCl-TGED に対して透析後、Heparin アフィニティークロマトグラフィーで分離し、各画分中の蛋白質を SDS-PAGE でモニターする。FlhD と FlhC が含まれる画分を 40%(V/V)の飽和硫酸で沈殿させた後透析し、精製 FlhD/FlhC 画分とする。

(2)FlhD/FlhC の活性測定

FlhD/FlhC は σ^{70} -RNA ポリメラーゼの転写活性化因子として機能する (Liu and Matsumura, 1994)。そこで、精製した蛋白質が活性のある FlhD/FlhC 複合体であることを、クラス 2 に属する *flgA* オペロンの *in vitro* 転写系を用いて確認する。方法の

詳細は第 2 章に記述する。

13. 転写開始点の同定

(1) RNA の調製

細菌からの総 RNA の調製は、TRIzol Reagent(Gibco BRL)を用いて、以下に述べる方法で行う。5ml の LB に目的のサルモネラ菌株を接種し、37 °C で対数増殖後期まで振とう培養する。培養終了後ただちに 40ml 容遠心管に移し、RA-3R ロータを用いて 6krpm, 室温で 5 分間遠心集菌する。菌体に 1ml の TRIzol Reagent を加えてよく攪拌し、ネジ付きのサンプリングチューブに移す。室温で 5 分間放置した後、200 μ l の chloroform を加えて激しく攪拌し、室温で 3 分間放置する。微量高速冷却遠心機を用いて 12,000rpm, 4 °C で 15 分間遠心し、得られた上清を新しいチューブに移す。この上清に 500 μ l の ethanol を加えてよく攪拌し、室温で 10 分間放置する。12krpm, 4 °C で 10 分間遠心後、沈殿を 70%(V/V) ethanol で洗う。沈殿を軽く乾燥させて滅菌水に溶解し、-85 °C で保存する。抽出した RNA の濃度は 260nm の吸光度から求める。

(2) プライマー伸長法

以下の操作中の酵素反応は、各酵素の製品に添付されているバッファーを用いて行った。

(i) プライマー

本研究で用いたプライマーを図 10 に示した。

(ii) プライマーの標識と精製

10pmol のプライマーに 10 \times Protruding end kinase buffer を 1 μ l、 $[\gamma$ -³²P]ATP (4500mCi/mmol)(ICN)を 4.5 μ l、T4 polynucleotide kinase(東洋紡)を 10units 加え、滅菌水を加えて 10 μ l とし、37 °C で 1 時間反応させる。95 °C で 2 分間加熱して酵素を失活させた後、5M ammonium acetate(pH4.5) 240 μ l と ethanol 750 μ l を加えてよく攪拌し、水中で 30 分間放置する。微量高速冷却遠心機を用いて 15krpm, 4 °C で

20 分間遠心し、得られた沈殿を 80%(V/V) ethanol で洗浄する。65 °C で 3 分間乾燥させた沈殿を滅菌水に溶解したものを標識プライマーとして用いる。

(iii) プライマー伸長反応

40 μ g の RNA に 5pmol の標識プライマー、10 μ l の $\times 2$ Annealing buffer (20mM Tris-HCl (pH8.3), 2mM EDTA, 0.5M KCl) を加え、滅菌水で総量を 20 μ l とする。65 °C で 1 時間加温した後、約 1.5 時間かけて 37 °C まで冷却する。60 μ l の Extension mix (13.3mM KCl, 63.3mM Tris-HCl (pH8.3), 1.33mM DTT, 2.66mM dNTPs) と 20units の M-MLV Reverse transcriptase (東洋紡) を加え、37 °C で 1 時間反応させる。8 μ l の 3M Na-acetate (pH5.2) と 200 μ l の ethanol を加えて -80 °C で 30 分間放置した後、15krpm, 4 °C で 20 分間遠心する。生じた沈殿を 1ml の 80%(V/V) ethanol で洗浄後、65 °C で乾燥させる。10 μ l の DNA シークエンス用サンプル泳動バッファーに溶解して 90 °C で 5 分間加熱後水中で急冷したものをサンプルとし、3(8)の方法に従って電気泳動する。このとき、同じプライマーで DNA シークエンス反応を行ったサンプルを同時に泳動し、マーカーとする。泳動終了後、ゲルをオートラジオグラフィーにかけ、転写開始点を示す DNA のバンドを検出する。

結 果

第 1 章. FliA と FlgM の機能構造

FliA と FlgM の欠失体を用い、両蛋白質のそれぞれに対する結合ドメインと FlgM の細胞外輸送ドメインの解析を行った。

1. FlgM タイトレーション法による FliA の FlgM 結合ドメインの解析

(1) 解析方法

FliA の FlgM 結合ドメインを含むポリペプチドを細胞内で大量発現させれば FlgM はこれに結合し、その細胞内有効濃度が減少すると考えられる。これを FlgM のタイトレーションと呼ぶ。細胞内の FlgM がタイトレーションされると、FliA は FlgM による活性阻害から解除されるので、FliA 依存性の転写を行う鞭毛遺伝子の発現量は上昇するはずである(図 1)。そこで本研究では、*fliA* 遺伝子断片を強力な転写活性を持つ *tac* プロモーターに結合させ、FliA の種々の領域に由来するポリペプチドを IPTG の添加によって細胞内で大量発現させるプラスミドを作成し、これを持つ検定株で FlgM のタイトレーション活性を定量化する系を構築した。検定株として用いた KK1505HB 株は、FliA によって転写が活性化されるクラス 3 オペロンの 1 つである *tar* オペロンのプロモーターとラクトースオペロンを融合させた *tar-lac* 融合遺伝子を持っており、*lacZ* 遺伝子産物である β - ガラクトシダーゼの酵素活性を指標として *tar* オペロンの転写量を定量化することが出来る。また、この株では *flhB* 遺伝子が欠損しているため、鞭毛形態形成が阻害されている。したがって、FlgM は分泌を阻害されるので細胞内に蓄積し、FliA の活性

を阻害する。その結果、*tar-lac* の転写は抑制され、低い β -ガラクトシダーゼ活性を示す。この株内で FlgM 結合ドメインを含む FliA 由来のポリペプチドを大量発現させた場合、細胞内の FlgM がタイトレーションされることで FlgM による FliA の阻害が解除され、 β -ガラクトシダーゼの酵素活性は高い値を示すものと期待される。

(2)野生型または欠失型 FliA の大量生産系の構築

FliA の種々のポリペプチドを大量発現させるためのベクターとして、pTrc99 シリーズのプラスミド(pTrc99A, B, C)を用いた。これらのプラスミドは、*tac* プロモーターと *lacZ* 遺伝子由来のリボソーム結合部位を持つとともに、3つの異なる翻訳枠を挿入したポリリンカーサイトを持つ遺伝子融合型の発現プラスミドである。さらに、*lacI*^q 遺伝子を持つことから、挿入遺伝子が IPTG の添加によって誘導できる。表 3 に示した構築方法により、pKK1064-2、pKK1064-2Z または pKK1064-2X' (図 2A) にクローニングされている *fliA* 遺伝子について、その内部に存在する制限酵素切断点を利用して種々の領域をそれぞれ翻訳枠が合うように pTrc99A, B または C に挿入した。各ポリペプチドの N 末端、あるいは C 末端には発現ベクターに由来するアミノ酸が付加される場合がある。これらの付加されるアミノ酸については表 4 に示した。これらの野生型または欠失型 FliA が実際に細胞内で発現されていることを確認するため、各プラスミドでサルモネラの *fliA* 遺伝子欠損株である KK1361 を形質転換した。得られた形質転換体を IPTG 存在下で培養後、一定数の細胞(10⁹cells)に含まれる全蛋白質を SDS-PAGE で分離し、抗 FliA 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った(図 3)。その結果、pSIIA5 と pSIIA10 を除くプラスミドから、各 FliA ポリペプチドが合成されていることが確認された。

(3)コントロール実験

FlgM のタイトレーションアッセイを行う前に、2つのコントロール実験を行った。

1つ目の実験は、細胞内で大量発現させる FliA ポリペプチドの σ 活性の有無を

検定するものである。KK1505HB 株における FlgM のタイトレーションアッセイは、FliA による *tar* オペロンの転写の活性化を指標にして行うため、細胞内で大量発現させる FliA ポリペプチドに σ 因子としての活性が残存していた場合、細胞内の FlgM をタイトレーションしなくとも *tar-lac* 融合遺伝子の転写が促進されると考えられる。そこで、これらのポリペプチドが σ 因子として機能しないことを確認するため、上で構築したプラスミドで KK1505IA 株を形質転換し、得られた形質転換体の β - ガラクトシダーゼ活性を測定した(表 5)。この株は *tar-lac* 融合遺伝子を持つが、*fliA* 遺伝子に突然変異を持つので低い β - ガラクトシダーゼ活性しか示さない。プラスミド由来のポリペプチドに σ 活性があれば *fliA* 突然変異が相補され、この活性値は高くなるはずである。実際、*fliA* 遺伝子全体を運ぶプラスミド pSIIA1 で形質転換した株では高い β - ガラクトシダーゼ活性を示す。一方、pSIIA2-pSIIA10 で形質転換した株ではいずれも低い値しか示さず、これらのプラスミドに由来する FliA ポリペプチドには σ 因子としての活性は存在しないことが確認された。

2 つ目の実験は、細胞内で大量発現させる FliA ポリペプチドの *tar-lac* 融合遺伝子の転写に対する阻害能の有無を検定するものである。FliA ポリペプチドの中には、 σ 因子の機能であるプロモーターへの結合能や RNA ポリメラーゼ・コア酵素への結合能などが部分的に保持されているものが存在する可能性がある。そこで、上で構築したプラスミドで KK1505GM 株を形質転換し、得られた形質転換体の β - ガラクトシダーゼ活性を測定した。この株は、*tar-lac* 融合遺伝子を持ち、さらに、*flgM* 遺伝子に突然変異が導入されている。したがって、*tar-lac* 融合遺伝子は脱抑制されており、高い β - ガラクトシダーゼ活性を示す。プラスミド由来のポリペプチドにプロモーターあるいは RNA ポリメラーゼ・コア酵素への結合能などが部分的に保持されていれば、これが野生型 FliA と競合するためにその作用を阻害すると考えられるので、この値は低下するはずである。しかし、pSIIA2-pSIIA10 の各プラスミドで形質転換した株では、いずれも活性の低下は確認されず(表 5)、こ

これらのポリペプチドには *tar-lac* 融合遺伝子の発現を低下させる活性は存在しないと結論された。

(4) FlgM タイトレーションアッセイ

pSIIA2-pSIIA10 で KK1505HB 株を形質転換し、得られた形質転換体における FlgM のタイトレーションアッセイを行った(表 5)。pSIIA2 と pSIIA3 の場合には、pTrc99A, B, C の場合よりも 100 倍以上高い β -ガラクトシダーゼ活性が検出され、細胞内の FlgM がタイトレーションされていることが示唆された。さらに、pSIIA4 の場合には、pSIIA2 や pSIIA3 の場合より弱いものの、依然として高い β -ガラクトシダーゼ活性が検出され、細胞内の FlgM をタイトレーションしていることが示唆された。pSIIA2, pSIIA3, pSIIA4 はそれぞれ、Leu³¹, Val⁵⁶, Gly¹⁵⁴ から C 末側の FliA ポリペプチドをコードするプラスミドである。したがって、FlgM タイトレーションに必須な N 末側の境界は、Gly¹⁵⁴以降のアミノ酸領域に存在するものと考えられる。一方、Thr¹⁹⁸から C 末側の FliA ポリペプチドに相当する *fliA* 領域を運ぶプラスミド pSIIA5 の場合には、コントロール値と同程度の低い β -ガラクトシダーゼ活性しか検出されなかった。しかし、この FliA ポリペプチドの細胞内での合成は確認されておらず、この領域に FlgM タイトレーション能が残存しているかどうかは不明である。

pSIIA6 の場合には、pSIIA2 または pSIIA3 の場合の 9 分の 1 以下の β -ガラクトシダーゼ活性しか検出されなかったが、この値はコントロール値より 10 倍高いことから、この FliA ポリペプチドには依然として FlgM タイトレーション能が存在するものと考えられる。一方、pSIIA7 と pSIIA8 の場合には、低い β -ガラクトシダーゼ活性しか検出されなかった。したがって、これらの FliA ポリペプチドは FlgM タイトレーション能を失っているものと考えられる。pSIIA6, pSIIA7, pSIIA8 は、C 末側をそれぞれ Gln²²⁷, Leu²⁰⁵, Leu¹⁹⁷まで持つ FliA ポリペプチドをコードしている。したがって、FlgM タイトレーションに必須な C 末側の境界は Gln²²⁷より N 末側の領域に存在すると考えられる。また、Ala²²⁸以降の 12 アミ

ノ酸領域は、FlgM タイトレーション機能に必須ではないが、その機能の発現に重要な役割を果たしているものと考えられる。pSIIA9 の場合には、コントロール値と同程度の低い β -ガラクトシダーゼ活性しか検出されなかった。pSIIA9 は Pro²²-Val²¹³間を持つ FliA ポリペプチドをコードしている。上述のように、N 末端のアミノ酸は FlgM タイトレーション活性に不要であることがわかっているため、この結果は Leu²¹⁴以降のアミノ酸が FlgM タイトレーション活性に必須であることを示している。pSIIA10 は、pSIIA4 の C 末端側を pSIIA6 と同じく 12 アミノ酸欠失した FliA ポリペプチドをコードしている。この場合、ウエスタンブロットングにより細胞内での合成が確認されなかったが、コントロール値よりも 5 倍高い β -ガラクトシダーゼ活性が検出され、FlgM タイトレーション能が残存していることが示唆される。したがって、このポリペプチドは欠失の結果、抗 FlgM 抗体とは反応しないが細胞内では合成されているものと考えられる。以上の結果を総合すると、FlgM のタイトレーション能に必須な C 末端の境界は FliA の Leu²¹⁴-Gln²²⁷に存在するものと推定される。

(5) FlgM 非感受性 FliA によるタイトレーションアッセイ

FlgM に対して非感受性となった FliA の突然変異体 (*rflD* 突然変異体) が多数単離されており、その突然変異点が図 2B の通り決定されている (Kutsukake *et al.*, 1994)。pKK1064-101, -102, -103, -104, -105, -106, -107, -108 は、これらの *rflD* 突然変異型 *fliA* を含むプラスミドである (Kutsukake *et al.*, 1994)。これらのプラスミドに由来する各ポリペプチドの σ 活性を除去するため、pSIIA6 及び pSIIA3 と同じ領域を持つように pTrc99C に挿入したプラスミドを構築した。これらを用いて KK1505HB 株を形質転換し、IPTG の添加によってそれぞれの欠失 FliA ポリペプチドを細胞内で大量発現させたところ、すべての突然変異体で野生型と同レベルで合成されていることが確認された (図 4A, B)。これらのプラスミドで形質転換した KK1505HB 株で FlgM のタイトレーションアッセイを行った結果 (表 6)、FlgM に対する感受性が特に低い *rflD*533, 102, 244 ではタイトレーションの活性も低く、逆に FlgM に対する

感受性がそれほど低くない *rflD*128, 320, 325 ではタイトレーションの活性も残存しており、FlgM 感受性と FlgM タイトレーション能とは一致していることがわかった。したがって、これらの *rflD* 突然変異体は FlgM との結合能を欠損した突然変異体であると考えられる。ただし、*rflD*504 では、Asn²-Gln²²⁷間を持つ FliA ポリペプチドにはタイトレーション活性は存在しないが、Val⁵⁶から C 末端側を持つ FliA ポリペプチドにはタイトレーション活性が存在するという矛盾した結果が得られた。この違いについては考察で述べることにする。

2. FliA 阻害検定による FlgM の FliA 結合ドメインの解析

(1) *flgM* 突然変異体の解析

rflB 突然変異体は、FliA に対する阻害能が失われた FlgM の突然変異体である (Kutsukake *et al.*, 1994)。これらのうち任意に選んだ 5 株 (KK1004B1, B2, B3, B7, B10) について *flgM* 遺伝子をクローニングし、その突然変異点を DNA の塩基配列の解析により決定した。材料と方法 3(10)に従って、pBR322 の *EcoRI* サイトにこれらの突然変異 *flgM* 遺伝子を含む約 9.5kb の *EcoRI* 断片をクローニングした。これから、KK1004B1, B2, B7 については約 5.7kb の *SmaI-NruI* 断片 (図 5A) を、KK1004B3, B10 については約 2kb の *PvuII-HindIII* 断片 (図 5A) をそれぞれ M13mp18 にサブクローニングし、*flgM* 遺伝子の塩基配列を決定した (図 5B)。その結果、いずれの突然変異体においても *flgM* 遺伝子内で 1 ないし 11 塩基対の欠失が起こり、それ以降の読み枠にフレームシフトが生じていることがわかった。このうち、C 末端に最も近い位置で変異が生じていたのは KK1004B10 (図 5B, #110) で 82 番目以降のアミノ酸が置換されていた。この突然変異体においても FliA 阻害能が完全に失われていることから、フレームシフトによって失われた 82 番目以降の C 末端領域には FlgM の FliA に対する阻害機能に必須のアミノ酸が存在するものと考えられる。

(2)欠失解析

(i)解析方法

FliA 阻害活性が欠損した *flgM* 突然変異に対する *flgM* 遺伝子断片による相補性を利用し、FlgM の FliA 結合ドメインを解析する系を構築した。まず、*flgM* 遺伝子断片由来の種々の FlgM ポリペプチドを大量発現させるプラスミドを作成し、これらのプラスミドで検定株 KK1512HB 株を形質転換した株で FliA 阻害能を測定した。この株は *tar-lac* 融合遺伝子を持ち、さらに、*flgM* と *flhB* に突然変異を持っている。*flhB* 突然変異は FlgM の細胞外への分泌を阻害するので、細胞内での FlgM の FliA に対する抑制活性が効率よく検定できる。*tar-lac* 融合遺伝子の活性は *flgM* 突然変異によって脱抑制されているので、この株は高い β - ガラクトシダーゼ活性を示す。この株内で FliA 阻害活性を持つポリペプチドを大量発現させれば、*tar-lac* の発現は阻害され、 β - ガラクトシダーゼ活性は低い値しか示さないはずである。

(ii)野生型または欠失型 FlgM の大量発現系の構築

表 3 に示した構築方法により、pKK1430, pKK1430NP, pKK1430MB, pTOBO43 または pTOB44(図 5A)にクローニングされている *flgM* 遺伝子の種々の領域を、翻訳枠が合うように pTrc99A, B または C に挿入し、*flgM* の種々の領域に由来する FlgM ポリペプチドを大量発現させる系を構築した。これらのプラスミドがコードする FlgM ポリペプチドの N 末端あるいは C 末端には発現ベクター由来のアミノ酸が付加される場合がある。これらの付加されるアミノ酸について、表 7 に示した。作製したプラスミド由来の FlgM ポリペプチドの細胞内での合成を抗 FlgM 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により確認した(図 6A)。その結果、pSIGM13, 14, 15 の場合を除いて、各 FlgM ポリペプチドの細胞内での合成が確認された。

(iii)FliA 阻害アッセイ

上で構築したプラスミドを用いて FliA 阻害能の検定を行った(表 8)。KK1512HB 株を pTrc99A, B または C で形質転換した場合は高い β - ガラクトシダーゼ活性を示し、*tar-lac* の発現は脱抑制されたままである。一方、野生型の *flgM* を持つ

pSIGM1 で形質転換した株では活性値が 40 分の 1 に低下し、FliA の活性が阻害されることが示された。pSIGM2 で形質転換した株は、低い β - ガラクトシダーゼの活性値を示した。pSIGM2 は Arg⁸⁸ から C 末端側を欠失した FlgM ポリペプチドをコードするので、C 末端の 9 アミノ酸は FliA の活性阻害に必須でないことが示唆される。pSIGM3, 4, 5, 6, 7, 8 で形質転換した株は、いずれも高い β - ガラクトシダーゼ活性を示した。これらのプラスミドは FlgM の N 末端からそれぞれ Lys⁷⁶, Glu⁷⁴, Asn⁷², Met⁶⁰, Ser⁵⁶, Leu⁵⁰ までのアミノ酸を持つポリペプチドをコードしている。したがって、FliA の活性阻害に必須なドメインの C 末端側の境界は Met⁷⁷ - Arg⁸⁸ 間に存在するものと考えられる。一方、FlgM の Ile³, Ser⁷, Arg¹⁸, Gln²⁶ から C 末端までをコードする pSIGM9, 10, 11, 12 で形質転換した株では、いずれの場合も低い β - ガラクトシダーゼ活性を示した。したがって、FliA の活性阻害に必須な N 末端側の境界は、Gln²⁶ 以降に存在するものと示唆される。さらに、Val²⁵ までの N 末端側と Glu⁶⁴ から C 末端側を in-frame でつなげた FlgM ポリペプチドをコードする pSIGM16 で形質転換した株も低い β - ガラクトシダーゼ活性を示し、FliA の活性阻害能を保持していた。このことは、Gln²⁶ - Val⁶³ 間のアミノ酸は、FliA の活性阻害に必須でないことを示している。以上の結果を総合すると、FlgM の FliA 活性阻害ドメインは FlgM の C 末側の Glu⁶⁴ - Arg⁸⁸ 間の領域に存在するものと結論される。

Arg⁶² から C 末端及び Arg⁶² - Arg⁸⁸ 間をコードする *flgM* 領域を運ぶプラスミド pSIGM13 と pSIGM14 で形質転換した株は高い β - ガラクトシダーゼ活性を示した。しかし、上述のように、これらのポリペプチドは細胞内での合成が確認されていないので、FliA の阻害活性の有無は不明である。一方、Leu⁵⁰ - Arg⁸⁸ 間をコードする *flgM* 領域を運ぶプラスミド pSIGM15 で形質転換した株は、低い β - ガラクトシダーゼ活性を示した。この場合にもポリペプチドの細胞内での合成は確認されなかったが、FliA 阻害活性が見られることから、実際は細胞内で合成されているものと推定される。ウエスタンブロッティングで合成が確認できなかったのは、

欠失によりこのポリペプチドの抗 FlgM 抗体との反応性が低下しているためと考えられる。

3. 化学架橋による解析

上の結果から、FliA の FlgM 結合ドメインは FliA の C 末端側に存在し、一方、FlgM の FliA 結合ドメインは FlgM の C 末端側に存在するものと推論された。これらの結果を確認するため、*in vitro* における化学架橋実験により蛋白質間の相互作用を解析した。

(1) 解析方法

大腸菌の細胞抽出液 S30 を用い、上で構築した各プラスミド DNA を鋳型にした転写-翻訳を ^{35}S -Methionine 存在下で行わせ、 ^{35}S で標識された FlgM と FliA の種々のポリペプチドを *in vitro* で合成する。合成したポリペプチドを架橋剤(DSP)で処理し、FliA と FlgM の特異抗体で免疫沈澱した後、これを SDS-PAGE で分離し、フルオログラフィーによって架橋産物を検出する。DSP は 1.2nm 以内の距離に位置する蛋白質間を架橋することができるので、この試薬によって架橋されるのは、相互作用している蛋白質間に限られる。実際、野生型 FliA(分子量 28,000)と野生型 FlgM(分子量 10,000)では、両者の複合体に相当する分子量 38,000 の位置にバンドが検出される(図 7A, レーン 1、図 7B, レーン 3)。一方、FliA あるいは FlgM のみを DSP で処理したものでは、複合体のバンドは検出されない(図 7B、レーン 1, 2)。

(2) 欠失型 FliA による解析

欠失型 FliA と野生型 FlgM との相互作用を解析した結果を図 7A に示した。FliA の C 末端側の欠失体である pSIIA7 に由来する FliA ポリペプチド(分子量 26,000)と野生型の FlgM とでは、両者の複合体に相当するバンドは検出されず(図 7A、レーン 2)、この FliA ポリペプチドには FlgM との結合能は存在しないものと考えられる。FliA の N 末端側が欠失した pSIIA4 に由来するポリペプチド(分子量 11,000)と

野生型の FlgM とでは、両者の複合体に相当する分子量 21,000 の位置にバンドが確認され(図 7A、レーン 3)、この FliA ポリペプチドには野生型 FlgM との結合能が存在することが示唆された。以上の結果は、FlgM タイトレーションアッセイの結果と一致するものであり、FliA の FlgM 結合ドメインは C 末端側に存在することが確認された。

(3)欠失型 FlgM による解析

欠失型 FlgM と野生型 FliA との相互作用を図 7B に示した。FlgM の C 末端側の欠失体である pSIGM2 由来のポリペプチド(分子量 9,800)と野生型 FliA とでは、両者の複合体に相当する分子量 38,000 の位置にバンドが確認され(図 7B, レーン 4)、この FlgM ポリペプチドには FliA との結合能が存在することが示された。しかし、これより欠失が進んだ pSIGM3 由来のポリペプチド(分子量 10,000)では、両者の複合体に相当するバンドは検出されず(図 7B, レーン 5)、この FlgM ポリペプチドには FliA との結合能は存在しないものと考えられる。一方、N 末端側の欠失体である pSIGM11 由来のポリペプチド(分子量 9,000)と野生型 FliA とでは両者の複合体に相当する分子量 37,000 の位置にバンドが確認され(図 7B, レーン 6)、この FlgM ポリペプチドには FliA との結合能が存在すると考えられる。これらの結果は、いずれも *in vivo* で得られた結果と一致しており、FlgM の FliA 結合ドメインは C 末端側に存在することが確認された。

4. FlgM の細胞外輸送ドメインの解析

本項では FlgM の細胞外輸送に参与するドメインの解析を行った。

(1)解析方法

2 で構築した *flgM* の各領域を運ぶプラスミドで形質転換した KK1312 株を IPTG 存在下で培養後、材料と方法 8 に従ってその培養上清を濃縮し、その中に含まれるタンパク質を 15%-25%のポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離して抗 FlgM 抗体によるウエスタンブロッティングによって解析した。KK1312 株は、

fliC, *fliD*, *flgM* の 3 つの遺伝子に突然変異を持つ。*fliD* 突然変異体では FlgM の輸送が促進されるので (Kutsukake, 1994)、*fliD* 突然変異を用いることにより各 FlgM ポリペプチドの輸送を効率よく解析することができる。*flgM* 突然変異はプラスミド由来の FlgM ポリペプチドだけの輸送を解析するために導入してある。*fliC* は繊維構成蛋白質であるフラジェリンの構造遺伝子である。フラジェリンは細胞外に大量に輸送されるので、*fliC* 突然変異体を用いることで培地上清中へのフラジェリンの輸送を阻害し、FlgM 蛋白質の検出感度を高めることが出来る。

(2) 欠失型 FlgM の輸送

各プラスミドによって形質転換した KK1312 株の細胞外蛋白質をウェスタンブロットティングにより解析した結果を、図 6B に示した。N 末端側の 50 アミノ酸だけからなる pSIGM8 由来の FlgM ポリペプチドでも、野生型と同様に細胞外に輸送される(図 6B、レーン 8)。一方、N 末端側の欠失体では、pSIGM9, pSIGM10 由来の FlgM ポリペプチドは細胞外への輸送は確認されたが(図 6B、レーン 9, 10)、これより欠失が進んだ pSIGM11, pSIGM12 由来の FlgM ポリペプチドは細胞外へは輸送されなかった(図 6B、レーン 11, 12)。また、N 末端から Val²⁵までと Glu⁶⁴から C 末端までを in-frame で結合させた pSIGM16 由来の FlgM ポリペプチドは、細胞外へ輸送された(図 6B、レーン 16)。pSIGM2-pSIGM8 の結果から Glu⁶⁴以降のアミノ酸領域は FlgM の細胞外輸送に必須でないことが示されているので、pSIGM16 由来の FlgM ポリペプチドの細胞外輸送に必須なアミノ酸は、N 末端側の Val²⁵までの領域に存在するものと考えられる。一方、pSIGM10 がコードする Ser⁷から C 末端までを持つ FlgM ポリペプチドでは細胞外への輸送能は保持されていることから、Ser⁷-Val²⁵間に FlgM の細胞外への輸送に必須の情報が存在するものと推論される。

第2章 クラス2オペロンの FliA-FlgM 制御

FlgM 欠損下におけるクラス2オペロンの FliA による転写活性化の機構としては、(1)転写階層性の上位に位置する *flhD* オペロンの活性化を介して行われる場合と、(2)クラス2プロモーターを直接活性化する場合の2つが考えられる。本章では(2)の可能性について検討するため、クラス2オペロンの *in vitro* 転写系を用いて、精製 FliA 蛋白質の転写への影響を解析した。クラス2オペロンの *in vivo* における転写解析によれば(T. Ikebe and K. Kutsukake, 私信)、クラス2オペロンには2つのタイプが存在することが明らかとなっている。第1のタイプには *fliA* オペロンのみが属し、FlhD/FlhC に依存して活性化される転写と FlhD/FlhC 及び FliA の両者に依存して活性化される転写の2つを独立に持つ。第2のタイプにはその他のオペロンが属し、FlhD/FlhC に依存して活性化される転写をただ1つだけ持つ。そこで本研究では、それぞれのタイプの代表として *fliA* と *flgA* オペロンを例に取り、それぞれの *in vitro* 転写再構成系を構築した。

1. *flgA* オペロンの *in vitro* 転写系

(1) 鋳型の作成

flgA オペロンのプロモーター領域を含むプラスミド pSIGA100 を構築した(表3)。このプラスミドは、*flgA* オペロンの FlhD/FlhC 依存性の転写開始点(T. Ikebe and K. Kutsukake, 私信)から約 390b 下流に *rrnB* 遺伝子のターミネーターが位置するように構築してある。したがって、この転写が再現されれば、約 390b の RNA が合成される。

(2) *in vitro* 転写系

σ^{70} -RNA ポリメラーゼだけでは転写シグナルは観察されない(図8A、レーン1)。一方、FlhD/FlhC を σ^{70} -RNA ポリメラーゼに加えたときには約 390b の転写産

物が観察される(図 8A、レーン 2)。これがクラス 2 型の転写に相当するものと考えられる(図 9)。しかし、ここに FliA を加えても、この転写の活性化は観察されず、逆にこのシグナルは弱くなることが観察された(図 8A、レーン 3)。また、FliA によって活性化される新たな転写産物のシグナルも検出されなかった(図 8A、レーン 3)。なお、FlhD/FlhC 非存在下で FliA を σ^{70} -RNA ポリメラーゼに加えた際に活性化される転写も検出されなかった(図 8A、レーン 4)。

2. *fliA* オペロンの *in vitro* 転写系

(1) 鋳型の作成

fliA オペロンのプロモーター領域を含むプラスミド pSIIA100 を構築した(表 3)。このプラスミドは、*fliA* オペロンのクラス 3 型の転写開始点(T. Ikebe and K. Kutsukake, 私信)から約 350b 下流に *rrnB* 遺伝子のターミネーター構造が位置するように構築してある。したがって、この転写が再現されれば、約 350b の RNA が合成される。

(2) *in vitro* 転写系

RNA ポリメラーゼ・コア酵素に FliA のみを加えた場合、約 350b の転写産物の合成が観察された(図 8B、レーン 5)。これはクラス 3 型の転写であり(図 9)、*fliA* オペロンは FliA 自身の σ 因子の機能によって FlhD/FlhC には非依存的に自己活性化されることが明らかとなった。一方、 σ^{70} -RNA ポリメラーゼに FlhD/FlhC を加えた場合には上述のシグナルは検出されず、それよりわずかに長い転写産物が観察された(図 8B、レーン 4)。この転写は、FlhD/FlhC をコア酵素と混合した際には観察されない(図 8B、レーン 3)。したがって、これがクラス 2 型の転写に相当する(図 9)。FliA と FlhD/FlhC を σ^{70} -RNA ポリメラーゼに加えた場合には、上述の 2 つの転写が同時に確認された(図 8B、レーン 7)。しかし、クラス 2 型の転写は FlhD/FlhC を単独で加えた場合(図 8B、レーン 4)よりも減少していた。FliA の量を減少させると、クラス 3 型の転写が減少する一方で、クラス 2 型の転写は増加す

ることから(図 8B、レーン 8)、クラス 2 型の転写はクラス 3 型の転写が活性化することによって抑制されることが明らかとなった。

3. *fliA* オペロンの *in vivo* における転写調節機構

上の解析で *fliA* オペロンには FliA を σ 因子とする自己活性化機構が存在することが事実となった。このことは、*fliA* オペロンが *flhD* オペロンの機能には非依存的に発現しうることを示唆している。しかし、これまでの *in vivo* における転写発現の研究では、*flhD* 突然変異体において FliA 蛋白質を鞭毛レギュロンとは独立に発現させても、*fliA* オペロンのプロモーターは活性化されないことが示されており、*fliA* オペロンの転写発現は *flhD* オペロンに完全に依存するとされてきた(Kutsukake and Iino, 1994)。この矛盾は、これまでの研究が FlgM 存在下で解析されていたため、FliA による転写が FlgM によって抑制される条件であったことに起因するものと考えられる。そこで本研究では、*flgM* 欠損下における *fliA* オペロンの転写について、次の 2 つの方法を用いて解析した。

第 1 の方法では、検定菌として *fliA* 遺伝子とラクトースオペロンを融合させた *fliA-lac* 融合遺伝子を持つ株 KK1108GM を用いた。この株では、*fliA* オペロンの転写活性を β -ガラクトシダーゼの酵素活性によって定量化できる。野生型の FliA を大量発現するプラスミド pSIIA1 で形質転換した検定菌の *fliA* オペロンの転写活性は、*flhD*⁺ *flhC*⁺ 条件下では、*flgM* 突然変異の有無に関わらず pTrc99C で形質転換した株より高い β -ガラクトシダーゼ活性を示し、FliA によって *fliA* オペロンの転写が活性化されることが示された(表 9)。一方、*flhD::Tn10* 突然変異下では *flgM* 欠損下でのみ高い β -ガラクトシダーゼ活性を示した。したがって、*fliA* オペロンは、FlhD/FlhC 非存在下では、FlgM 非存在下でのみ自己活性化されることになる。

第 2 の方法では、*fliA* オペロンのプロモーター領域をプロモーター検索ベクター pRL124 に挿入したプラスミド pRLIA1 を用い、*fliA* オペロンの転写活性を測定した。pRL124 はプロモーターを欠くラクトースオペロンを持っているため、この

上流領域にプロモーターを含む DNA 領域が挿入されれば、ラクトースオペロンがこのプロモーターから転写される (Malo and Loughlin, 1988)。したがって、その遺伝子産物である β -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定することで挿入 DNA 断片の持つプロモーター活性を定量化できる。このプラスミドで形質転換した野生株 (KK1004), *flhDC* 突然変異株 (KK2040), *fliA* 突然変異株 (KK2091), *flgM* 突然変異株 (KK1004B1), および *flhDC flgM* 二重突然変異株 (KK2040GM) について β -ガラクトシダーゼ活性を測定した結果 (表 10)、*flhDC* 欠損下では活性が失われること、*fliA* 欠損下では野生株とほとんど変化しないこと、*flgM* 欠損下では活性が著しく上昇することが示され、*in vivo* でこれまで明らかとなっている *fliA* オペロンの転写発現の特徴が確認された。一方、*flhDC flgM* 二重欠損下では、*flhDC* のみの欠損下より高い β -ガラクトシダーゼ活性を示した。このことは、*fliA* オペロンが *flgM* 欠損下で *flhD* オペロンの機能に非依存的に活性化されることを示している。

第 3 章 クラス 1 オペロンの FliA-FlgM 制御

本章では、FliA-FlgM 制御系を中心としたクラス 1 オペロン (*flhD* オペロン) の発現制御機構を解析した。これまでの研究から、*flhD* オペロンは CRP、H-NS などのグローバルな調節因子によって転写が活性化されることが知られている (Kutsukake *et al.*, 1990; K. Kutsukake, 私信)。そこで、まず *in vivo* でこれらによって活性化される転写を同定し、これらの転写と FliA-FlgM 制御系の関係を解析した。

1. プライマー伸長法による解析

(1) CRP、H-NS 依存性の転写

flhD オペロンの転写開始点をプライマー伸長法により同定した。*flhD* オペロン上流領域を運ぶプラスミド pKK1211MBB (表 3、図 10A) で形質転換した野生株

(KK1004)から総 RNA を調製し、PHD1, PHD2 または PHD3 プライマーを用いてプライマー伸長法による転写開始点の同定を行った。これらのプライマーは *flhD* 遺伝子の翻訳開始点の最初の塩基から 142b-161b, 483b-502b 上流領域、または 9b-28b 下流領域にそれぞれ位置する。PHD2 プライマーを用いた場合(図 11A、レーン 1)、FlhD の翻訳開始点から 203, 255, 296, 358, 530b 上流に転写開始点を示すシグナルが得られた。これらのシグナルを翻訳開始点に近い順に P1-P5 と呼ぶことにする(図 10B, 11A)。PHD1 と PHD3 プライマーを用いてもこれ以外の転写は確認されなかった。したがって、以降の解析には PHD2 プライマーを用いた。CRP と H-NS によって制御を受ける転写を同定するため、同じプラスミドで形質転換した *crp* 突然変異株(KK1603)、*hns* 突然変異株(KK1601)または *crp hns* 二重突然変異株(KK1605)から調製した RNA でプライマー伸長法を行った。その結果、*crp* 欠損下では P1 シグナルが非常に弱くなることが判明し、P1 が CRP に依存した転写開始点であると結論された。しかし、P1 を除くその他のシグナルは逆に強くなることが判明した。また、*crp* 欠損下では野生株では観察されなかったシグナルが新たに出現することが判明した(図 11A、レーン 2)。この転写開始点は FlhD の翻訳開始点から 277b 上流に位置付けられた。これを P6 と命名した。P6 は、CRP によって抑制される転写の開始点であると考えられる。一方、*hns* 突然変異によって強度が変化するシグナルは観察されなかった(図 11A、レーン 2, 3)。

(2) FlgM 非存在下における転写

FlgM 非存在下で活性化される転写をプライマー伸長法によって解析した。RNA の調製には、*flhD* オペロンとラクトースオペロンの融合遺伝子 *flhD-lacZ* を持つ KK1107 と、KK1107 に *flgM* 突然変異が導入された KK1107GM を *flhD* オペロン全体を運ぶプラスミド pKK1211(図 10A)で形質転換した株を用い、これから RNA を調製してプライマー伸長法を行った。その結果、KK1107GM 株では KK1107 株の場合と比較して P1 シグナルが著しく増加していることが判明した(図 11B、レーン 1, 2)。このことから、*flgM* 突然変異によって P1 の転写が活性化されることが明らか

となった。

2. *in vitro* 転写系における解析

上の結果から、FliA で活性化される *flhD* オペロンの転写は P1 であると考えられる。そこで、P1 の転写について、精製した CRP, FliA 及び FlhD/FlhC を用いた *in vitro* 転写再構成系を用いて解析した。鋳型として、FlhD の翻訳開始点上流 1225bp から 153bp までを運ぶプラスミド pKY5(表 2)を用いた。このプラスミドは、P1 シグナルから約 350b 下流に *rrnB* 遺伝子のターミネーター構造が位置するように構築されている。したがって、この転写が再現されれば、約 350b の RNA が合成される。

in vitro 転写実験の結果、 σ^{70} -RNA ポリメラーゼのみを用いた *in vitro* 転写実験では、約 420b の RNA の合成が確認された(図 12A、レーン 2)。ここに CRP を加えるとこのシグナルは消失することから(図 12A、レーン 3)、この転写が *crp* によって抑制される P6 の転写であると考えられる。一方、この時、約 350b の転写産物が出現した(図 12A、レーン 3)。この転写は P1 シグナルが再現されたものである。次に、P1 の転写に対する FliA と FlhD/FlhC の効果を解析した結果、*fliA* オペロンが活性化される場合と同量の FliA と FlhD/FlhC を加えても、この転写産物の増加は観察されず(図 12B、レーン 2, 3, 4)、FliA を加えた場合にはこの転写産物は逆に減少することが観察された(図 12B、レーン 3, 4)。

考 察

1. FliA と FlgM の機能構造

大腸菌の σ^{70} を中心とした研究から、すべての σ 因子に共通な RNA ポリメラーゼ・コア酵素への会合、プロモーター領域への特異的な結合、DNA 鎖の開裂などの転写開始の各素反応に関わる機能ドメインが明らかとなってきた(図 13) (Helmann and Chamberlin, 1988; Lonetto *et al.*, 1994)。一方、特異的な転写活性化因子(アクチベーター)が必要とされるプロモーターの転写開始反応の解析から、特異的な DNA 領域へ結合したアクチベーターと RNA ポリメラーゼ間の相互作用が転写開始に重要であることが明らかにされ、いくつかの場合にはこの相互作用はアクチベーターと σ 因子との間で起こっていることが示されている(Kolb *et al.*, 1993; Makino *et al.*, 1993; Moyle and Susskind, 1994)。鞭毛レギュロンのクラス 3 鞭毛オペロン群では、置換型の σ 因子として FliA を含んだ RNA ポリメラーゼが転写開始に必須の役割を果たしているが、この系では FliA に結合してその活性を阻害する機能を持つアンチ σ 因子(FlgM)の存在が明らかとなり(Ohnishi *et al.*, 1990, 1992)、 σ 因子と相互作用する負の転写因子として注目されている。

(1) FliA の FlgM 結合ドメイン

Ohnishi *et al.* (1992) は、精製蛋白質を用いた化学架橋実験により、FlgM は FliA に結合して FliA の RNA ポリメラーゼ・コア酵素との相互作用を阻害することを示し、FlgM が FliA の活性を阻害する機構は、FliA への結合によって FliA の RNA ポリメラーゼへの会合を阻害することによるとする仮説を提唱した。 σ 因子のコア酵素との相互作用部位は領域 2.1 に位置付けられていることから(Lesley and Burgess, 1989)、FlgM は FliA の領域 2.1 に結合すると考えれば、上述の結果はよく説明でき

る。一方、Kutsukake *et al.*, (1994)は FlgM に対する感受性が低下した FliA の突然変異体(*rfID* 突然変異体)の解析から、これらの突然変異点が領域 2, 3 および 4 に位置付けられることを示した。特にその大部分が領域 4 に集中しており、これらでは FlgM に対する感受性が著しく低下している(図 2)。この結果は FlgM が領域 4 に結合することを強く示唆するものである。この両者の矛盾を解決するため、本研究では 2 つの異なるアプローチにより、FliA の FlgM 結合ドメインの同定を試みた。

第 1 の方法は *in vivo* における解析であり、FliA の種々の領域に相当するポリペプチドによる FlgM タイトレーション能をモニターする方法である(図 1)。この方法により、Gly¹⁵⁴-Gln²²⁷間に FlgM タイトレーション能が存在することが判明し、この領域に FlgM 結合部位が存在するものと推定される。これは領域 3 から領域 4 に相当している(図 13)。さらに、*rfID* 突然変異 FliA ポリペプチドを用いた FlgM のタイトレーションアッセイから、*rfID102* と *rfID244* 突然変異体ではタイトレーション能が著しく低下していることが示された。*rfID102* は Leu¹⁹⁹、*rfID244* は Val²¹³のミスセンス突然変異であることから(Kutsukake *et al.*, 1994)、この 2 つのアミノ酸が FlgM との結合に重要な役割を果たしているものと考えられる。これらのアミノ酸はそれぞれ領域 4.1 と 4.2 に位置している。

第 2 の方法は、化学架橋により FliA-FlgM 間の相互作用を *in vitro* で直接解析するものである(図 7)。領域 2 を欠いている Gly¹⁵⁴-Lys²³⁹では FlgM との架橋産物が生成されるが、領域 4 を欠くが領域 2 は保持している N 末から Leu²⁰⁵までを持つポリペプチドでは架橋産物が生成されないことが示された。以上の結果はいずれも FlgM の結合部位が領域 2 ではなく、領域 4 に位置することを示すものである。したがって、FlgM は FliA の領域 4 を含む C 末端側に結合することによって FliA の立体構造を変化させ、領域 2.1 に存在する RNA ポリメラーゼ・コア酵素への結合能を阻害するものと推論される。

ところで、領域 4 はプロモーターの認識部位として知られおり、特に領域 4.2

に存在する helix-turn-helix モチーフはプロモーターの -35 配列への結合部位と考えられている (Siegele *et al.*, 1989)。したがって、本研究で得られた結果は、FlgM の FliA 阻害効果の機構として、もう一つの可能性を示唆している。すなわち、FlgM は FliA の領域 4 に結合することによって FliA の鞭毛特異的プロモーターの認識能を阻害するというものである。-35 配列と直接結合するのは第 2 の helix であり、第 1 の helix はその結合に対して促進的に作用すると考えられている (Lonetto *et al.*, 1992)。*rflD* 突然変異の多くは 1 番目の helix の中あるいはそのすぐ上流に位置しているため、FlgM の第 1 の helix 周辺への結合は第 2 の helix の -35 配列結合能を変化させる可能性が高い。ただし、このことは必ずしも上述した FlgM による FliA のコア酵素への結合阻害の可能性を否定するものではない。

大腸菌のリン酸レギュロンに属する遺伝子群の転写開始には、 σ^{70} -RNA ポリメラーゼ・ホロ酵素に加えて、特異的なアクチベーター蛋白質である PhoB がプロモーター領域に結合することが必要である (Makino *et al.*, 1986)。この転写活性化のメカニズムは、PhoB が σ^{70} と相互作用することで RNA ポリメラーゼのプロモーター領域への結合を促進することによると考えられている (Makino *et al.*, 1993)。PhoB との相互作用能が失われた σ^{70} 突然変異体のうちの 1 つ (*rpoD75*) は、領域 4.2 の helix-turn-helix モチーフの 1 番目の helix 構造に存在する Gln⁵⁷⁵ が Lys に置換している (Makino *et al.*, 1993)。 σ^{70} の Gln⁵⁷⁵ は主要 σ 因子だけでなく置換型 σ 子間でも保存性が高く、FliA では Gln²⁰⁹ がこれに相当する (Lonetto *et al.*, 1992)。*rflD* 突然変異体のうち、*rflD256* は Gln²⁰⁹ が Lys に置換したものである (Kutsukake *et al.*, 1994)。したがって、 σ 因子の領域 4.2 に存在する helix-turn-helix モチーフの 1 番目の helix に存在する Gln は、様々な転写因子との結合に関与し、 σ 因子の活性制御に重要な役割を果たしているものと推測される。

FlgM と同様に σ 因子に結合してその活性を阻害する機能を持つアンチシグマ因子の一例として、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の孢子形成時に特異的な σ 因子 (σ^F と σ^G) に対するアンチシグマ因子 SpoIIAB が知られており (Benson and Haldenwang,

1993)、この系でも σ^F の SpoIIAB 結合ドメインが解析されている (Decatur and Losick, 1996)。それによれば、SpoIIAB に対して非感受性を示す σ^F の突然変異点は、領域 2.1, 3.1 及び 4.1 にマップされ、さらに、 σ^F の N 末端側あるいは C 末端側のいずれか一方だけを持つ σ^F の欠失体でも SpoIIAB との結合能が存在することが示されている。以上の知見に基づいて、SpoIIAB は σ^F の領域 2.1, 3.1 及び 4.1 の 3 つの領域で相互作用しているというモデルが提案されている (Decatur and Losick, 1996)。FliA の場合も、FlgM に対して非感受性となった突然変異体が領域 2.1, 3.1, 4.1 及び 4.2 に位置付けられているが、本研究で C 末端側の 33 アミノ酸だけを欠失させた FliA ポリペプチドは FlgM との結合能を失うことが示されたことから、FliA の場合は σ^F とは異なり、領域 4 を含む C 末端側が FlgM との相互作用に必須であり、領域 2 と領域 3 だけでは FlgM との結合能はないものと考えられる。

(2) FliA の σ 活性ドメイン

本研究で構築した FliA 欠失体による解析の結果は、FliA の σ 活性ドメインについての情報も与えてくれる。N 末 30 アミノ酸の欠失体は σ 活性を失っている(表 5)。この失われた領域には領域 2.1 が存在することから、この欠失体は RNA ポリメラーゼ・コア酵素との結合能を失っているために σ 活性を示さないものと考えられる。*rflD* 突然変異体を用いたタイトレーションアッセイにおいて、*rflD504* 突然変異体では、Val⁵⁶-Leu²³⁹の領域を持つポリペプチドではタイトレーション能は存在したものの、Asn²-Gln²²⁷の領域を持つポリペプチドではタイトレーション能は存在せず、むしろ *tar-lac* の発現に対して抑制効果があることが示された(表 6)。Asn²-Gln²²⁷に存在し、Val⁵⁶-Leu²³⁹には存在しないのは領域 2.1 である。したがって、*rflD504* 突然変異体の Asn²-Gln²²⁷の領域をもつポリペプチドでは RNA ポリメラーゼ・コア酵素への結合能が上昇し、野生型 FliA との間でコア酵素への結合の競合が起こっているものと考えれば、この矛盾した結果がよく説明される。

FliA は RNA ポリメラーゼ・コア酵素との結合なしに単独でクラス 3 プロモータ

ーに結合するとされている(Dombroski *et al.*, 1993)。本研究で構築した N 末 30 アミノ酸の欠失体は、プロモーターへの特異的な結合に必須なドメインである領域 2.4 と領域 4.2 は保持している。したがって、この欠失体を細胞内で大量発現させれば、これがプロモーター領域に結合することで野生型 FliA との間でプロモーターへの結合の競合が起こると考えられ、FliA 依存性の転写を示すオペロンの転写活性に阻害効果を及ぼすことが期待される。しかし、この欠失体を細胞内で大量に発現させても *tar* オペロンの転写活性は抑制されなかった(表 5)。したがって、この欠失体はそれ単独ではプロモーターへの結合能を示さないものと考えられる。この欠失体では、領域 2.1 を欠失したことでコンフォメーションの変換が生じ、プロモーターへの結合活性が失われているものと考えられる。

一方、C 末端の 12 アミノ酸の欠失体でも σ 活性が失われる。この欠失体では領域 4.2 に存在する helix-turn-helix モチーフの一部が欠失しているため、プロモーターの -35 配列の認識能が低下しているものと考えられる。

(3) FlgM の FliA 結合ドメインと細胞外輸送ドメイン

flgM 遺伝子に *cat* 遺伝子を挿入する遺伝子破壊実験の結果から、FliA に対する活性阻害能には *flgM* の 88 アミノ酸から C 末側領域は不要であると予想されていた(Kutsukake, 1994)。本研究では FlgM の欠失変異体による FliA の活性阻害能の検定により、FliA の活性を阻害する領域は Glu⁶⁴-Arg⁸⁸間に存在することが明らかとなった。この結果は、この領域に FliA との結合部位が存在することを示唆するものである。このことは、実際に *in vitro* における蛋白質間の化学架橋剤実験により確認された。

鞭毛遺伝子発現の鞭毛形態形成過程との共役においては、FlgM の鞭毛構造を介した細胞外輸送が重要な役割を果たしている。本研究で、FlgM の種々のポリペプチドについてその細胞外輸送能を解析した結果(図 6)、N 末端側の Ser⁷-Val²⁵間の領域に細胞外輸送に必須のドメインが存在することが明らかになった(図 13)。鞭毛は膜構造を貫通して菌体外に突出した構造体であり、その構築過程は基体部

から先端部へと順次進行する。鞭毛繊維の電子顕微鏡像及び X 線回折像の解析から、繊維は管状構造であることが示されている (O'Brien and Bennett, 1972; Namba *et al.*, 1989)。基部構造もこれと同様な管状構造と考えられ、細胞内で合成された各鞭毛蛋白質はこの内腔を通過して輸送されるものと推定されている。したがって、各鞭毛蛋白質間には鞭毛構造を介して輸送されるために必須な共通アミノ酸配列が存在することが予想される。大腸菌の鞭毛繊維を構成する FliC では、輸送に必要な情報は N 末端側の 183 アミノ酸の中に含まれる (Kuwajima *et al.*, 1989)。一方、*Caurobacter crescentus* のフック蛋白質では、38-58 番目のアミノ酸領域が細胞外輸送に必要な領域であることが示されている (Kornacker and Newton, 1994)。そこで、これらの領域のアミノ酸配列を FlgM の細胞外輸送に必要なアミノ酸配列と比較したが、相同性を示すアミノ酸配列は見いだせなかった。したがって、この輸送系の基質として作用するための蛋白質の情報はその一次構造ではなく、高次構造によって担われているものと推定される。

2. クラス 1 とクラス 2 オペロンの FliA 制御

FliA-FlgM 制御系はクラス 3 オペロンの転写解析の結果見いだされたものであり、クラス 3 に特異的な制御系であると考えられてきた (Gillen and Hughes, 1991)。ところが、我々の研究室における解析の結果、*flgM* 欠損下ではクラス 3 オペロンだけでなく、クラス 1 とクラス 2 オペロンも FliA に依存して活性化されることが見いだされ、FliA は鞭毛レギュロン全体の活性化に関与していることが明らかとなった (Kutsukake and Iino, 1994; K. Kutsukake, 私信)。クラス 3 オペロンにおいては FliA が σ 因子として機能し、転写を活性化することが証明されているが (Ohnishi *et al.*, 1990)、クラス 1 およびクラス 2 については、その上流領域に FliA によって認識されるプロモーター構造と明確な相同性を示す配列の存在は確認されておらず、FliA による活性化の分子機構は不明のままであった。本研究では、鞭毛レギュロンの転写活性化因子を精製し、それらを用いた *in vitro* 転写系によって FliA による

クラス 1 とクラス 2 オペロンの転写活性化機構を解析した。

クラス 2 オペロンである *flgA* オペロンの転写調節機構について *in vitro* 転写系で解析を行った結果、*flgA* オペロンには FliA の添加によって新たに出現するクラス 3 型の転写は確認されなかった。また、FlhD/FlhC に依存したクラス 2 型の転写は FliA によって活性化されず、逆に抑制されることが観察された。*flgA* オペロンの *in vivo* での転写解析から、クラス 2 型の転写は *flgM* 突然変異体で活性化されることが示されている (T. Ikebe and K. Kutsukake, 私信)。したがって、本研究で観察された結果は、これとは全く逆の効果を示すものである。

一方、もう一つのクラス 2 オペロンである *fliA* オペロンには、FlhD/FlhC によって活性化されるクラス 2 型の転写に加え、FlhD/FlhC 非依存的に FliA 自身の σ 活性に依存して活性化されるクラス 3 型の転写が存在することが判明した。さらに、*in vivo* においてこの転写は、FlhD/FlhC 非存在下では FlgM 欠損下でのみ活性化されることが判明した。クラス 3 プロモーターのコンセンサス配列は TAAA と GCCGATAA である (Kutsukake *et al.*, 1990)。*fliA* オペロンのクラス 3 型の転写開始点の上流 -35 と -10 領域には、TGTA と GCCGATAA という配列が存在している (図 9)。この配列は -10 領域ではコンセンサス配列と完全に一致しているものの、-35 領域での保存性は 50% に過ぎない。現在までに同定されているクラス 3 プロモーターは、-35 領域での保存性が非常に高く、このようにコンセンサスから大きく逸脱している例は皆無である。したがって、*fliA* オペロンのこのプロモーターは *in vivo* ではそれほど高い転写活性を持っていないものと推定される。*fliA* オペロンの *in vitro* 転写実験から、FliA 添加によりクラス 3 型の転写が活性化されるとクラス 2 型の転写は抑制を受けることが明らかとなった。*fliA* オペロンの転写開始点を同定した実験結果によれば、*fliA* オペロンに存在するクラス 2 型の転写は *flgM* 突然変異によってクラス 3 型の転写が活性化されると抑制されることが明らかとなっている (T. Ikebe and K. Kutsukake, 私信)。したがって、本研究で観察された *in vitro* での結果は、この結果と一致するものである。しかし、*in vitro* でのこの現象が

flgA オペロンで見られた FliA によるクラス 2 型の転写の阻害効果と同一の現象である可能性は否定できない。

後で詳しく論じる様に、*flhD* オペロンの転写開始点をプライマー伸長法によって解析した結果、*in vivo* での転写開始点は少なくとも 6 つ (P1-P6) 存在することが明らかとなった。このうち、*flgM* 欠損下で活性化されるのは P1 の転写である。P1 は CRP 依存性の転写開始点であり、その上流には CRP 結合配列と σ^{70} 型のプロモーター構造を持つ (図 10B)。精製した CRP と RNA ポリメラーゼホロ酵素で P1 の転写が再現されることが確認されたので、この転写について FliA 添加の効果を解析した。その結果、この転写は FliA の添加によって活性化されず、むしろ抑制されることが判明した。

以上のように、クラス 2 型の転写とクラス 1 の P1 の転写は *in vitro* の精製蛋白質による転写再構成系において、いずれも FliA によって抑制されることが明らかとなった。本研究で用いた精製 FliA 標品はクラス 3 型の転写を著しく促進することが確認されており、上述の抑制効果はこの FliA 標品中に混入する微量物質による非特異的な転写阻害ではないと考えられる。おそらく、FliA の添加によって σ^{70} との間でコア酵素との結合の競合が起こるために、 σ^{70} 型ホロ酵素によって転写されるクラス 2 型またはクラス 1 の P1 の転写が阻害されるものと推定される。ただし、*fliA* オペロンについては、クラス 2 型の転写開始点がクラス 3 型プロモーターの -10 配列中に存在するために (図 10)、FliA によりクラス 3 型のプロモーターが活性化されるとクラス 2 型のプロモーターへの σ^{70} 型ホロ酵素の転写が阻害され、その転写が低下するという機構も考えられる。同様な転写制御機構は、*fliD* オペロンのオーバーラップして存在しているクラス 2 型とクラス 3 型のプロモーターからの転写でも報告されている (Kutsukake and Ide, 1995)。

in vivo での解析では、*flgM* 突然変異によって *flgA* オペロンのクラス 2 型の転写や *flhD* オペロンの P1 の転写が上昇することが示されている (T. Ikebe and K. Kutsukake, 私信; 本研究)。*flgM* 突然変異によるこれらのオペロンの転写活性化は

FliA 依存性を示すことから (Kutsukake and Iino, 1994; K. Kutsukake, 私信)、この活性化は FliA の作用を介しているはずである。それにも関わらず、本研究におけるこれらのオペロンの *in vitro* の転写実験では、FliA によって促進されなかった。したがって、これらの転写の活性化には未同定因子の共存が必要であり、この因子が FliA に何らかの修飾を加えることにより、FliA をこれらの転写の促進因子に変換するものと推定される。

3. クラス 1 オペロンのグローバル制御

鞭毛レギュロンの転写は、環境変化に応答して複数のオペロン群の転写を調節するグローバルレギュレーターによって制御を受けることが知られている (Silverman and Simon, 1974; Shi *et al.*, 1992; Bertin *et al.*, 1994; Mizushima *et al.*, 1994; Shin and Park, 1995)。このうち、カタボライト活性化因子である CRP とヌクレオイド蛋白質である H-NS は、鞭毛レギュロンのマスターオペロンである *flhD* オペロンの活性化を介して鞭毛レギュロン全体の転写を活性化することが知られている (Kutsukake *et al.*, 1990; Bertin *et al.*, 1994; K. Kutsukake, 私信)。上述のように *flhD* オペロンには 6 つの転写開始点が存在することから、このそれぞれが種々のグローバルレギュレーターによる制御に関与しているものと推定される。実際、CRP によって P1 の転写が活性化されることが示され、CRP による制御は P1 のプロモーターを介して行われることが明らかとなった。一方、P6 の転写は CRP 非存在下でのみ出現する。P6 プロモーターは CRP 結合部位と考えられる翻訳開始点から上流 266bp から 285bp の中に存在するので (図 10B)、CRP 存在下では抑制されるものと考えられる。一方、本研究のプライマー伸長法の結果では、H-NS によって正の制御を受ける転写は確認されなかった。したがって、H-NS による *flhD* オペロンの活性化は転写開始段階以降で制御されている可能性が示唆される。P2-P5 のプロモーターに相当する配列には σ^{70} 型プロモーターの -10 配列あるいは -35 配列と -10 配列の両方に相同性の高い配列が存在しており (図 10B)、これらも σ^{70} -RNA ポリメ

ラーゼによって転写されるものと推定される。*in vitro* 転写系では σ^{70} を含むホロ酵素のみによる転写産物は P6 以外には再現されておらず、P2-P5 のプロモーターの活性化にはそれぞれに特異的なアクチベーター蛋白質が必要とされる可能性が示唆される。

参考文献

- Amann, E., Ochs, B. and Abel, K.-J. (1988).
Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*.
Gene **69**:301-315.
- Benson, A.K. and Haldenwang, W.G. (1993).
Bacillus subtilis σ^B is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**:2330-2334.
- Bertin, P., Terao, E., Lee, E.H., Lejeune, P., Colson, C., Danchin, A. and Collatz, E. (1994).
The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **176**:5537-5540.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. and Falkow, S. (1977).
Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.
Gene **2**:95-113.
- Burgess, R.R., Travers, A.A., Dunn, J.J. and Bautz, K.F. (1969).
Factor stimulating transcription by RNA polymerase.
Nature **221**:43-46.
- Chang, A.C.Y. and Cohen, S.N. (1978).
Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid.
J. Bacteriol. **134**:1141-1156.
- Decatur, A.L. and Losick, R. (1996).
Three sites of contact between the *Bacillus subtilis* transcription factor σ^F and its antisigma factor SpoIIAB.
Genes & Dev. **10**:2348-2358.
- Dombroski, A.J., Walter, W.A., Record, M.T.Jr., Siegele, D.A. and Gross, C.A. (1992).
Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor σ^{70} exhibit specificity of binding to promoter DNA.
Cell **70**:501-512.
- Dombroski, A.J., Walter, W.A. and Gross, C.A. (1993).
Amino-terminal amino acids modulate σ -factor DNA-binding activity.
Genes & Dev. **7**:2446-2455.

- Duncan, L. and Losick, R. (1993).
SpoIIAB is an anti- σ factor that binds to and inhibits transcription by regulatory protein σ^F from *Bacillus subtilis*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**:2325-2329.
- Gillen, K.L. and Hughes, K.T. (1991).
Molecular characterization of *flgM*, a gene encoding a negative regulator of flagellin synthesis in *Salmonella typhimurium*.
J. Bacteriol. **173**:6453-6459.
- Gillen, K.L. and Hughes, K.T. (1993).
Transcription from two promoters and autoregulation contribute to the control of expression of the *Salmonella typhimurium* flagellar regulatory gene *flgM*.
J. Bacteriol. **175**:7006-7015.
- Gribskov, M. and Burgess, R.R. (1986).
Sigma factors from *E. coli*, *B. subtilis*, phage SP01, and phage T4 are homologous proteins.
Nucleic Acids Res. **14**:6745-6763.
- Helmann, J.D. and Chamberlin, M.J. (1988).
Structure and function of bacterial sigma factors.
Ann. Rev. Biochem. **57**:839-872.
- Hughes, K.T., Gillen, K.L., Semon, M.J. and Karlinsey, J.E. (1993).
Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator.
Science **262**:1277-1280.
- Igarashi, K. and Ishihama, A. (1991).
Bipartite functional map of the *E. coli* RNA polymerase α subunit: involvement of the C-terminal region in transcription activation by cAMP-CRP.
Cell **65**:1015-1022.
- Kolb, A., Igarashi, K., Ishihama, A., Lavigne, M., Buckle, M. and Buc, H. (1993).
E. coli RNA polymerase, deleted in the C-terminal part of its α -subunit, interacts differently with the cAMP-CRP complex at the lacP1 and at the galP1 promoter.
Nucleic Acids Res. **21**:319-326.
- Kornacker, M.G. and Newton, A. (1994).
Information essential for cell-cycle-dependent secretion of the 591-residue *Caulobacter* hook protein is confined to a 21-amino-acid sequence near the N-terminus.
Mol. Microbiol. **14**:73-85.
- Kutsukake, K. (1994).
Excretion of the anti-sigma factor through flagellar substructure which couples the flagellar gene expression with flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*.
Mol. Gen. Genet. **243**:605-612.

- Kutsukake, K., Ohya, Y., Yamaguchi, S. and Iino, T. (1988).
Operon structure of flagellar genes in *Salmonella typhimurium*.
Mol. Gen. Genet. **214**:11-15.
- Kutsukake, K., Ohya, Y. and Iino, T. (1990).
Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*.
J. Bacteriol. **172**:741-747.
- Kutsukake, K. and Iino, T. (1994).
Role of the FliA-FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in *Salmonella typhimurium*.
J. Bacteriol. **176**:3598-3605.
- Kutsukake, K., Iyoda, S., Ohnishi, K. and Iino, T. (1994).
Genetic and molecular analyses of the interaction between the flagellum-specific sigma and anti-sigma factors in *Salmonella typhimurium*.
EMBO J. **13**:4568-4576.
- Kuwajima, G., Kawagishi, I., Homma, M., Asaka, J.-I., Kondo, E., and Macnab, R.M. (1989).
Export of an N-terminal fragment of *Escherichia coli* flagellin by a flagellum-specific pathway.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**:4953-4957.
- Laemmli, U.K. (1970).
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**:680-685.
- Lesley, S.A. and Burgess, R.R. (1989).
Characterization of the *Escherichia coli* transcription factor σ^{70} : localization of a region involved in the interaction with core RNA polymerase.
Biochemistry **28**:7728-7734.
- Li, M., Moyle, H. and Susskind, M.M. (1994).
Target of the transcriptional activation function of phage λ cI protein.
Science **263**:75-77.
- Liu, X. and Matsumura, P. (1994).
The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons.
J. Bacteriol. **176**:7345-7351.
- Lonetto, M., Gribskov, M. and Gross, C.A. (1992).
The σ^{70} family: sequence conservation and evolutionary relationships.
J. Bacteriol. **174**:3843-3849.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M. and Nakata, A. (1986).
Nucleotide sequence of the *phoB* gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol. **190**:37-44.

- Makino, K., Amemura, M., Kim, S.-K., Nakata, A. and Shinagawa, H. (1993).
Role of the σ^{70} subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*.
Genes & Dev. **7**:149-160.
- Miller, J.H. (1972).
Experiments in molecular genetics.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mizushima, T., Tomura, A., Shinpuku, T., Miki, T. and Sekimizu, K. (1994).
Loss of flagellation in *dnaA* mutants of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **176**:5544-5546.
- Mytelka, D.S. and Chamberlin, M. (1996).
Escherichia coli *fliAZY* operon.
J. Bacteriol. **178**:24-34.
- Namba, K., Yamashita, I. and Vonderviszt, F. (1989).
Structure of the core and central channel of bacterial flagella.
Nature **342**:648-654.
- O'Brien, E.J. and Bennett, P.M. (1972).
Structure of straight flagella from a mutant *Salmonella*.
J. Mol. Biol. **70**:133-152.
- Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H. and Iino, T. (1990).
Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*.
Mol. Gen. Genet. **221**:139-147.
- Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H. and Iino, T. (1992).
A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an anti-sigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, σ^F .
Mol. Microbiol. **6**:3149-3157.
- Raina, S., Missiakas, D. and Georgopoulos, C. (1995).
The *rpoE* gene encoding the σ^E (σ^{24}) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*.
EMBO J. **14**:1043-1045.
- Rouviere, P., Penas, A.D.L., Mecsas, J., Lu, C.Z., Rudd, K.E. and Gross, C.A. (1995).
rpoE, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, σ^E , in *Escherichia coli*.
EMBO J. **14**:1032-1042.
- Sanger, F., Nicolson, S. and Coulson, A.R. (1977).
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**:5463-5467.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989).
Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed.
Cold Spring Harbor Laboratory press., Cold Spring Harbor, N.Y.

Seed, B. (1987).

An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid-linked membrane protein homologous to its receptor CD2.
Nature **329**: 840-842.

Shin, S. and Park, C. (1995).

Modulation of flagellar expression in *Escherichia coli* by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR.
J. Bacteriol. **177**:4696-4702.

Shi, W., Zhou, Y., Wild, J., Adler, J. and Gross, C.A. (1992).

DnaK, DnaJ, and GrpE are required for flagellum synthesis in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **174**:6256-6263.

Siegele, D.A., Hu, J.C., Walter, W.A. and Gross, C.A. (1989).

Altered promoter recognition by mutant forms of the sigma 70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase.
J. Mol. Biol. **206**:591-603.

Silverman, M. and Simon, M. (1974).

Characterization of *Escherichia coli* flagellar mutants that are insensitive to catabolite repression.
J. Bacteriol. **120**:1196-1203.

Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986).

Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.
J. Mol. Biol. **189**:113-130.

Tanaka, K., Takayanagi, Y., Fujita, N., Ishihama, A. and Takahashi, H. (1993).

Heterogeneity of the principal σ factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, σ^{38} , is a second principal σ factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**:3511-3515.

Vieira, J. and Messing, J. (1987).

Production of single-stranded plasmid DNA.
Methods Enzymol. **153**:3-11.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985).

Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.
Gene **33**:103-119.

Zhou, W.S., Wild, J., Adler, J. and Gross, C.A. (1992).

DnaK, DnaJ, and GrpE are required for flagellum synthesis in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **174**:6256-6263.

Zuber, P., Healy, J., Carter III, H.L., Cutting, S., Moran, Jr.C.P. and Losick, R. (1989).

Mutation changing the specificity of an RNA polymerase sigma factor.
J. Mol. Biol. **206**:605-614.

表 1. 本研究で用いた菌株

Strain	Genotype	Source/Reference
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 λ⁻ Δ(lac-proAB) / F' [proAB⁺ lacI^s lacZ Δ M15 traD3]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , (1985)
EKK21	<i>hsd flgB</i>	Ohnishi <i>et al.</i> , (1990)
EKK22	<i>hsd flhD</i>	K. Kutsukake
BL21	F ⁻ <i>ompT</i> rB ⁻ mB ⁻ λ DE3	Studier and Moffatt (1986)
<i>Salmonella typhimurium</i>		
KK1004	Wild type	Kutsukake <i>et al.</i> , (1988)
KK1004B1	KK1004 <i>flgM101</i>	K. Kutsukake
KK1004B2	KK1004 <i>flgM102</i>	K. Kutsukake
KK1004B3	KK1004 <i>flgM103</i>	K. Kutsukake
KK1004B7	KK1004 <i>flgM107</i>	K. Kutsukake
KK1004B10	KK1004 <i>flgM110</i>	K. Kutsukake
KK1004B1HD	KK1004B1 <i>flhD::Tn10</i>	K. Kutsukake
KK1107	KK1004 <i>flhD-lac</i>	Kutsukake and Iino (1994)
KK1107GM	KK1004B1 <i>flhD-lac</i>	K. Kutsukake
KK1108	KK1004 <i>fliA-lac</i>	Kutsukake and Iino (1994)
KK1108GM	KK1004B1 <i>fliA-lac</i>	K. Kutsukake
KK1108HD	KK1004 <i>flhD::Tn10 fliA-lac</i>	K. Kutsukake
KK1108GMHD	KK1108GM <i>flhD::Tn10</i>	K. Kutsukake
KK1312	KK1004 <i>fliC1101 flhD::Tn10 flgM::cat</i>	K. Kutsukake
KK1361	KK1004 Δ (<i>fliA</i>)	
KK1501	<i>hsdSA29 hsdSBI21 hsdL6 metA22 metE551 trpC2 ibv-452 rpsL120 xyl-404 galE719 flhB</i>	Kutsukake <i>et al.</i> , (1994)
KK1505GM	KK1501 <i>tar-lac flgM::cat</i>	Kutsukake <i>et al.</i> , (1994)
KK1505HB	KK1501 <i>tar-lac flhB::Tn10</i>	Kutsukake <i>et al.</i> , (1994)
KK1505IA	KK1501 <i>tar-lac fliA::Tn10</i>	Kutsukake <i>et al.</i> , (1994)
KK1512HB	KK1501 <i>tar-lac flgM::cat flhB::Tn10</i>	Kutsukake <i>et al.</i> , (1994)
KK1601	KK1004 <i>hns105 zde::Tn10</i>	K. Kutsukake
KK1603	KK1004 <i>crp::Tn10</i>	K. Kutsukake
KK2040	KK1004 <i>flhD::Tn10</i>	K. Kutsukake
KK2091	KK1004 <i>fliA::Tn10</i>	Kutsukake <i>et al.</i> , (1988)

表 2. 本研究で用いたプラスミドとファージ

Plasmid/Phage	Features	Source/Reference
Plasmid		
pBR322	Cloning vector	Bolivar <i>et al.</i> , (1987)
pUC118/119	Cloning vector for DNA sequencing	Vieira and Messing (1987)
pACYC184	Cloning vector	Chang and Cohen (1978)
pTrc97A	p- <i>tac</i> expression vector	Amann <i>et al.</i> , (1988)
pTrc99A, B, C	p- <i>tac</i> expression vector, <i>lacI</i> ^s	Amann <i>et al.</i> , (1988)
pET17b	p-T7 expression vector	Seed (1987)
pRL124	Promotor detection vector	Malo and Loughlin (1988)
pRLIA1	pRL124 p- <i>fliA</i>	T. Ikebe
pRLGA1	pRL124 p- <i>flgA</i>	S. Iyoda
pKK1064-2	pBR322 <i>fliA</i> ⁺	Ohnishi <i>et al.</i> , (1990)
pKK1064-101	pBR322 <i>fliA</i> (<i>rflD128</i>)	Kutsukake, <i>et al.</i> , (1994)
pKK1064-102	pBR322 <i>fliA</i> (<i>rflD320</i>)	Kutsukake, <i>et al.</i> , (1994)
pKK1064-103	pBR322 <i>fliA</i> (<i>rflD325</i>)	Kutsukake, <i>et al.</i> , (1994)
pKK1064-104	pBR322 <i>fliA</i> (<i>rflD533</i>)	Kutsukake, <i>et al.</i> , (1994)
pKK1064-105	pBR322 <i>fliA</i> (<i>rflD102</i>)	Kutsukake, <i>et al.</i> , (1994)
pKK1064-106	pBR322 <i>fliA</i> (<i>rflD504</i>)	Kutsukake, <i>et al.</i> , (1994)
pKK1064-107	pBR322 <i>fliA</i> (<i>rflD256</i>)	Kutsukake, <i>et al.</i> , (1994)
pKK1064-108	pBR322 <i>fliA</i> (<i>rflD244</i>)	Kutsukake, <i>et al.</i> , (1994)
pKK1430	pBR322 <i>flgM</i> ⁺ <i>flgN</i> ⁺	Ohnishi <i>et al.</i> , (1992)
pKK1430MB	pKK1430, <i>MluI</i> → <i>Bam</i> HI	Kutsukake (1994)
pTBO43	pUC118 <i>flgM</i> ⁺	T. Okada
pTBO44	pUC118 <i>flgM</i> ⁺	T. Okada
pKY5		S. Yanagihara
Phage		
M13mp18/19	Cloning vector for DNA sequencing	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , (1985)
M13mp18- <i>fliC</i>	M13mp18 p- <i>fliC</i>	K. Kutsukake

表 3. プラスミドの構築方法

Plasmid	Construction procedure
<i>fliA</i> plasmid	
pKK1064-2X	pKK1064-2 was digested with <i>SmaI</i> and ligated with a <i>BglII</i> linker (pCAGATCTG).
pKK1064-2X'	pKK1064-2X was digested with <i>PvuII</i> and ligated with a <i>BamHI</i> linker (pCGGATCCG).
pKK1064-2Z	pKK1064-2 was digested with <i>PvuII</i> and ligated with a <i>HindIII</i> linker (pCAAGCTTG).
pSIIA1	<i>EcoRI-PvuII</i> fragment of pKK1064-2 was inserted into <i>EcoRI-SmaI</i> site of pTrc99C.
pSIIA2	<i>PstI-HindIII</i> fragment of pKK1064-2Z was inserted into <i>PstI-HindIII</i> site of pTrc99C.
pSIIA3	pSIIA1 was digested with <i>SaII</i> and self-ligated.
pSIIA4	pSIIA3 was digested with <i>KpnI</i> and <i>SaII</i> and treated with Exonuclease III. After treatment with Mung bean nuclease and Klenow enzyme, the DNA was self-ligated.
pSIIA5	<i>HpaI-HindIII</i> fragment of pKK1064-2Z was inserted into <i>SmaI-HindIII</i> site of pTrc99B.
pSIIA6	<i>EcoRI-HaeIII</i> fragment of pKK1064-2X' was inserted into <i>EcoRI-SmaI</i> site of pTrc99C.
pSIIA7	<i>EcoRI-SacI</i> fragment of pKK1064-2 was inserted into <i>EcoRI-SacI</i> site of pTrc99C.
pSIIA8	<i>EcoRI-HpaI</i> fragment of pKK1064-2 was inserted into <i>EcoRI-SmaI</i> site of pTrc99C.
pSIIA9	<i>RsaI</i> fragment of pKK1064-2 was inserted into <i>SmaI</i> site of pTrc99C.
pSIIA10	<i>EcoRI-HaeIII</i> fragment of pSIIA4 was inserted into pTrc99A.
<i>flgM</i> plasmid	
pKK1430NP	pKK1430 was digested with <i>NruI</i> and ligated with a <i>PstI</i> linker (pGCTGCAGC).
pSIGM1	<i>EcoRI-BamHI</i> fragment of pUC118RO44 was inserted into <i>EcoRI-BamHI</i> site of pTrc99B.

pSIGM2 *EcoRI-NruI* fragment of pUC118RO44 was inserted into *EcoRI-SmaI* site of pTrc99B.

pSIGM3- pTOB44 was digested with *PstI* and *BamHI* and treated with Exonuclease III. After treatment with Mung bean nuclease and Klenow
pSIGM8 enzyme, the DNA was ligated with a *SmaI* linker (pCCCGGG). After treatment with Mung bean nuclease and Klenow enzyme, the DNA
was self-ligated. After the end point of each deletion was determined by DNA sequencing, the *EcoRI-SmaI* fragment of each plasmid was
inserted into the *EcoRI-SmaI* site of pTrc99B.

pSIGM9- pTOB43 was digested with *SmaI* and *KpnI*, and treated with Exonuclease III. After the end point of each deletion was determined by
pSIGM11 DNA sequencing, *EcoRI-SmaI* fragment of each plasmid was inserted into *EcoRI-BamHI* site of pTrc99B (pSIGM9, pSIGM11) or
pTrc99C (pSIGM10).

pSIGM12 *RsaI-SalI* fragment of pSIGM1 was inserted into pTrc99B .

pSIGM13 *BamHI-HindIII* fragment of pKK1430MB was inserted into *BamHI-HindIII* site of pTrc99A.

pSIGM14 *NruI-StuI* fragment of pSIIA13 was deleted.

pSIGM15 *AluI-PstI* fragment of pKK1430NP was inserted into *SmaI-PstI* site of pTrc99C.

pSIGM16 pTOB44 was digested with *MluI*, treated with Mung bean nuclease, and self-ligated. After the end point of each deletion was determined
by DNA sequencing, *EcoRI-BamHI* fragment of resulting plasmid was inserted into *EcoRI-BamHI* site of pTrc99B.

flhDC plasmid

pK1211MB pKK1211 was digested with *MluI*, filled-in with T4 DNA polymerase, and ligated with a *BamHI* linker (pCGGGGATCCGGC).

pKK1211MBB pKK1211MB was digested with *BamHI* and self-ligated.

pSIHD1 *NruI* fragment of pKK1211 was inserted into *HaeIII* site of pET17b.

pSIHC1 *BamHI-HincII* fragment of pKK1211MB was inserted into *BamHI-EcoRV* site of pET17b.

pSIHC2 *BglII-ScaI* fragment of pSIHC1 was inserted into *BamHI-EcoRV* site of pACYC184.

Template plasmid for *in vitro* transcription

pSIIC100 *EcoRI-BamHI* fragment of M13mp18-*flhC* was inserted into *EcoRI-BglII* site of pTrc97A.

pSIIA100 *EcoRI-BamHI* fragment of pRLJA1 was inserted into *EcoRI-BglII* site of pTrc97A.

pSIGA100 *BamHI-SalI* fragment of pRLGA1 was inserted into *BglII-SalI* site of pTrc97A.

表 4. 欠失体 FliA ポリペプチドの N 末端と C 末端のアミノ酸

Plasimid	N and C terminal residues ^a
pSIIA1	MGNSL··QSK
pSIIA2	MEFELGTRGSSRVLDLQV··QSK
pSIIA3	MEFELGTRGSSSVDR··QSK
pSIIA4	MEFELDPGDS··QSK
pSIIA5	MGIRARYPTLY··QSK
pSIIA6	MGNSL··HSQGGSSRVLDLQACKLGCKLGCFGG
pSIIA7	MGNSL··EELGYRGSSRVLDLQACKLGCFGG
pSIIA8	MGNSL··LVLGIL
pSIIA9	MGIRARYPPLV··GAVGIL
pSIIA10	MEFELDGDS··HSQGGSSRVLDLQACKLGCFGG

^a ■■■ で示したアミノ酸は FliA 由来であることを示す。

表 5. FliA ポリペプチドによる FlgM タイトレーション活性

Plasmid	Amino acid residues of FliA	β -Galactosidase activity ^a		
		KK1505IA ^b	KK1505GM ^c	KK1505HB ^d
pTrc99A	None	6	239	2
pTrc99B	None	6	ND	3
pTrc99C	None	6	ND	2
pSIIA1	2-239	673	ND	ND
pSIIA2	31-239	7	245	202
pSIIA3	56-239	6	211	212
pSIIA4	154-239	6	248	166
pSIIA5	198-239	6	266	2
pSIIA6	2-227	6	276	22
pSIIA7	2-205	6	277	2
pSIIA8	2-197	6	218	2
pSIIA9	22-213	6	210	2
pSIIA10	154-227	5	244	10

^a表中の値は Miller units を示す。ND:not done.

^b各ポリペプチドの σ 因子としての活性を示す。

^c各ポリペプチドの転写阻害能を示す

^d各プラスミドの FlgM タイトレーション能を示す。

表 6. *rflD* 突然変異体 FliA による FlgM タイトレーション活性

Mutation	Amino acid substitution	FlgM-sensitivity ^a	β -Galactosidase activity ^b	
			2-227	56-239
<i>rflD</i> ⁺	None	72	22	212
<i>rflD</i> 128	H14N	44	13	ND
<i>rflD</i> 320	T138I	23	11	193
<i>rflD</i> 325	Q142P	22	12	184
<i>rflD</i> 533	L199N	3.7	2	10
<i>rflD</i> 102	L199R	0.6	2	2
<i>rflD</i> 504	Q202R	13	<1	81
<i>rflD</i> 256	E209K	4.3	12	101
<i>rflD</i> 244	V213E	1.6	2	5

^a FlgM 感受性は Kutsukake *et al.*, (1994) に従った。数値が高いほど FlgM 感受性が高いことを示す。

^b FliA の 2-227 または 56-239 アミノ酸領域に相当するポリペプチドを発現できるプラスミドで KK1505HB 株を形質転換し、FlgM タイトレーション活性を測定した。表中の数値は Miller units を示す。ND: not done.

表 7. FlgM ポリペプチドの N 末端と C 末端のアミノ酸

Plasmid	N and C terminal residues ^a
pSIGM1	MSI··QSK
pSIGM2	MSI··LIRGII
pSIGM3	MSI··ELKTRGSSRVLDLQACKLGCFGG
pSIGM4	MSI··NGEPGDPLESTCRHASLAVLADERRFSA
pSIGM5	MSI··IRNPGDPLESTCRHASLAVLADERRFSA
pSIGM6	MSI··INMPGDPLESTCRHASLAVLADERRFSA
pSIGM7	MSI··GVSPGII
pSIGM8	MSI··AKLPGDPLESTCRHASLAVLADERRFSA
pSIGM9	MGIRARIDR··QSK
pSIGM10	MGNSSSPL··QSK
pSIGM11	MGIRARRET··QSK
pSIGM12	MGIRARYPPQKT··QSK
pSIGM13	MEFELGTRGSARVE··QSK
pSIGM14	MEFELGTRGSARVE··LIRGII
pSIGM15	MGNSSSVPLMQ··LIRLQACKLGCFGG
pSIGM16	MSI··TPVHEAL··QSK

^a ■で示したアミノ酸は FlgM 由来であることを示す。

表 8. FlgM ポリペプチドによる FliA 阻害活性の検定

Plasmid	Vector ^a	Amino acid residues ^b	β -Galactosidase activity ^c	Inhibition rate ^d
pTrc99A		None	220	—
pTrc99B		None	210	—
pTrc99C		None	240	—
pSIGM1	B	1-97	5	42
pSIGM2	B	1-88	9	23
pSIGM3	B	1-76	210	1
pSIGM4	B	1-74	220	1
pSIGM5	B	1-72	200	1
pSIGM6	B	1-60	210	1
pSIGM7	B	1-56	220	1
pSIGM8	B	1-50	210	1
pSIGM9	B	3-97	4	53
pSIGM10	C	7-97	6	40
pSIGM11	B	18-97	15	14
pSIGM12	B	26-97	12	18
pSIGM13	A	62-97	220	1
pSIGM14	A	62-88	200	1
pSIGM15	C	50-88	54	4
pSIGM16	B	1-25, 64-97	46	5

^a A, B, C はそれぞれ pTrc99A, pTrc99B, pTrc99C を示す。

^b 表中の数字は各プラスミドから合成される FlgM ポリペプチドのアミノ酸領域を示す。

^c 各プラスミドを KK1512HB 株に形質転換し、FliA 活性阻害能を検定した。表中の値は Miller units を示す。

^d pTrc99 プラスミドで KK1512HB 株を形質転換した株における活性値を pSIGM プラスミドで形質転換した株における活性で割った値を示す。

表 9. 染色体上の *fliA* オペロンの転写調節機構

<i>flgM</i> allele ^b	β -Galactosidase activity ^a			
	<i>flhDC</i> ⁺		<i>flhDC</i> ⁻	
	pTrc99C	pSIIA1	pTrc99c	pSIIA1
<i>flgM</i> ⁺	8.3	29.7	1.6	1.5
<i>flgM</i> ⁻	7.4	96.1	1.5	21.8

^a pTrc99C または pSIIA1 で形質転換した株における *fliA-lac* 融合遺伝子の転写活性を示す。表中の値は Miller units を示す。*flhDC*⁺ は野生型 *flhD* オペロンを持ち、*flhDC*⁻ は *flhD::Tn10* 突然変異を持つ。

^b *flgM*⁺ 株は野生型 *flgM* 遺伝子を、*flgM*⁻ 株は KK1004B1 由来の *flgM101* 突然変異を持つ。使用した菌株: *flgM*⁺ *flhDC*⁺, KK1108; *flgM*⁺ *flhDC*⁻, KK1108HD; *flgM*⁻ *flhDC*⁺, KK1108GM; *flgM*⁻ *flhDC*⁻, KK1108GMHD。

表 10. プラスミド上の *fliA* プロモーターの活性

Mutation ^b	β -Galactosidase activity ^a	
	pRL124	pRLIA1
None	24	679
<i>flhDC</i>	19	17
<i>fliA</i>	26	617
<i>flgM</i>	17	10279
<i>flhDC flgM</i>	21	43

^a表中の値は Miller units を示す。

^b使用した菌株; None, KK1004; *flhDC*, KK2040; *fliA*, KK2091; *flgM*, KK1104B1; *flhD flgM*, KK1004B1HD。

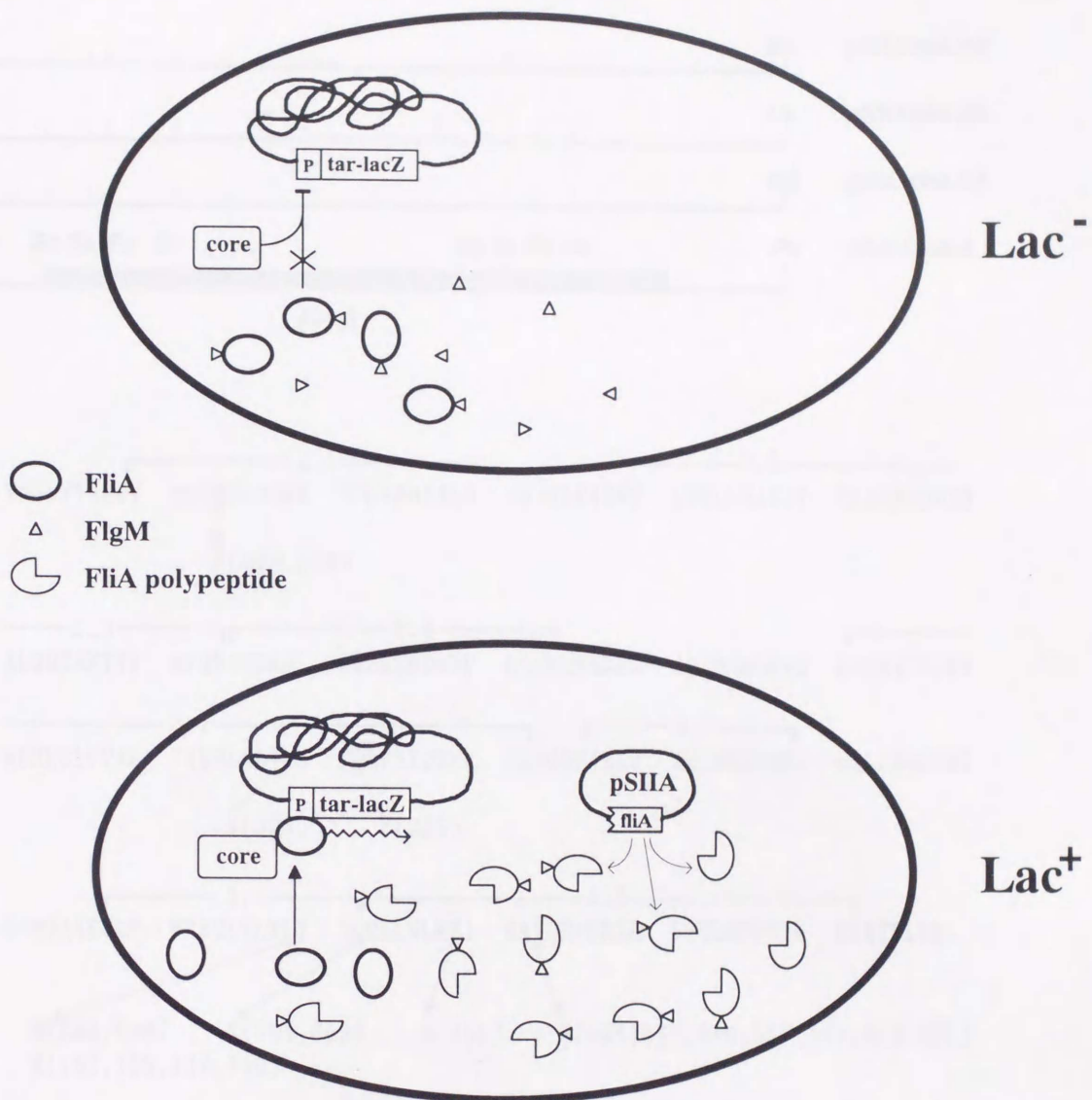


図 1. FlgM タイトレーションアッセイの概念図。上図: FlgM が FliA に結合し、FliA の RNA ポリメラーゼ・コア酵素への会合が阻害されるため、*tar-lacZ* 融合遺伝子の転写が抑制される。下図: FlgM への結合能を保持した FliA ポリペプチドを大量発現させると、細胞内の FlgM がタイトレーションされ、染色体由来の野生型 FliA が *tar-lacZ* 融合遺伝子の転写を行う。

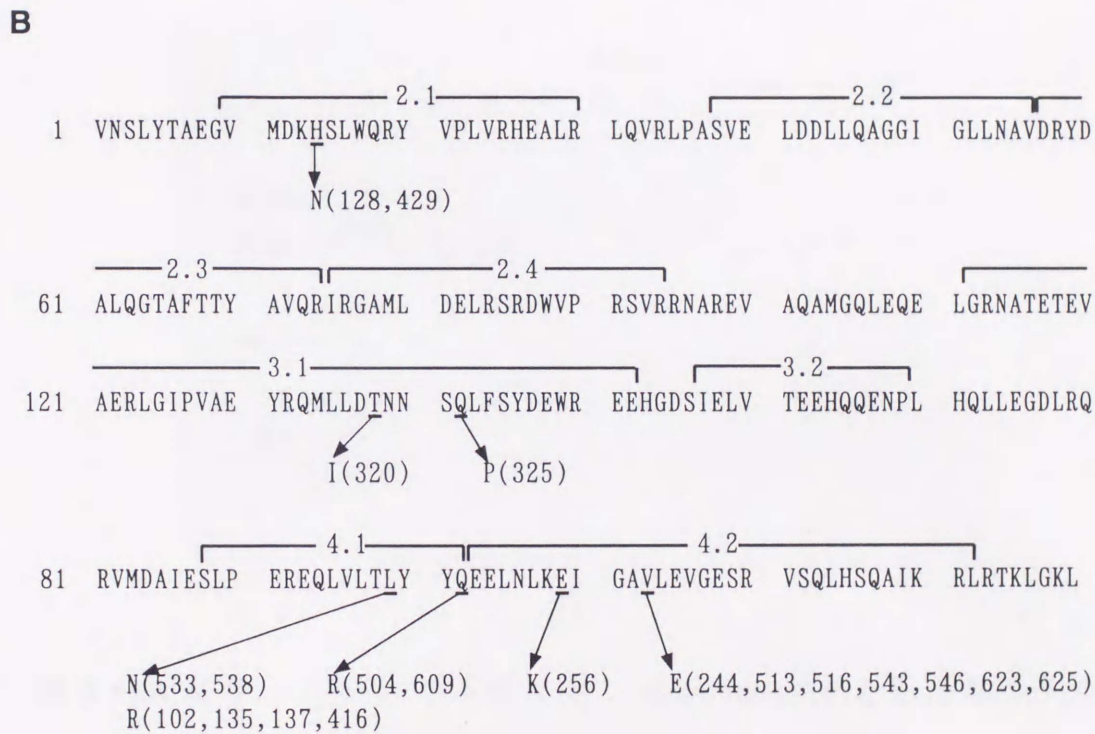
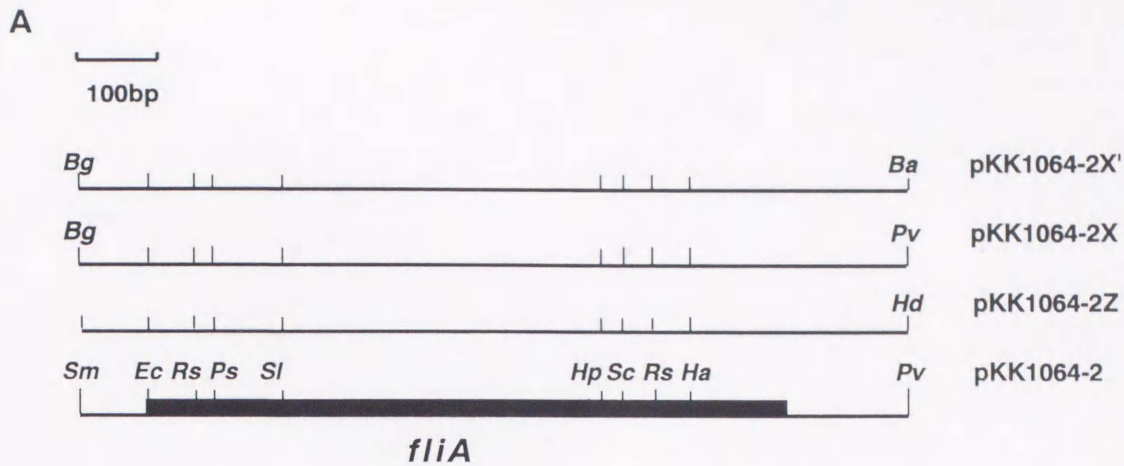


図2. 本研究で用いたプラスミド上の *fliA* 遺伝子の構造 (A) と FliA のアミノ酸配列 (B)。 (A) 本研究で用いた制限酵素切断点を次の略号で示す: Ba, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; Ec, *Eco*RI; Ha, *Hae*III; Hp, *Hpa*I; Ps, *Pst*I; Pv, *Pvu*II; Rs, *Rsa*I; Sc, *Sac*I; Sl, *Sal*I; Sm, *Sma*I。太線で示した領域は *fliA* 遺伝子の翻訳領域を示す。 (B) アミノ酸配列は、Ohnishi *et al.*, (1990) に従った。アミノ酸配列上に記したカギ線と数字は σ 因子間で保存されている領域名とその範囲を示す (Lonetto *et al.*, 1992)。 *rflD* 突然変異体でのアミノ酸置換を矢印で示す。アミノ酸の右側に記した () 内の数字は、*rflD* 突然変異番号を示す (Kutsukake *et al.*, 1994)。

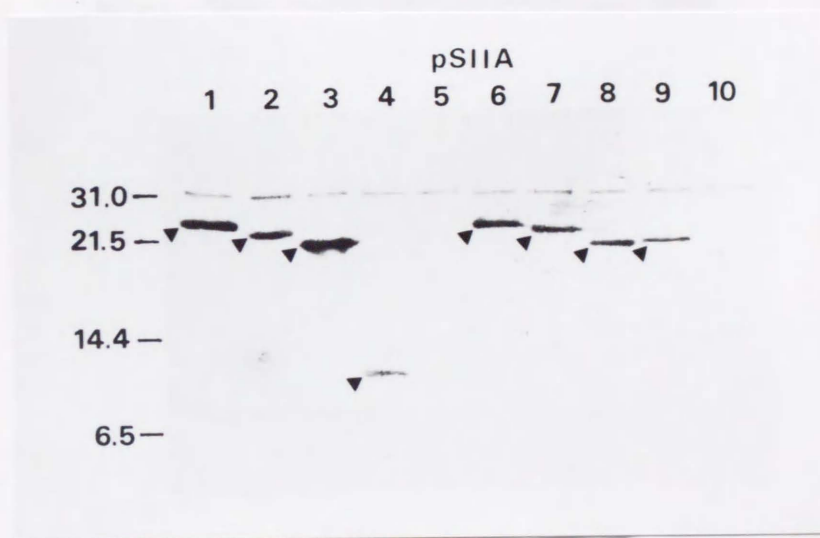


図 3. FliA ポリペプチドの大量発現。pSIIA1-pSIIA10 で形質転換した KK1361 株を IPTG 存在下で培養後、細胞内の全蛋白質を 15%ゲルによる SDS-PAGE で分離し、抗 FliA 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。黒三角はそれぞれの FliA ポリペプチドを示す。

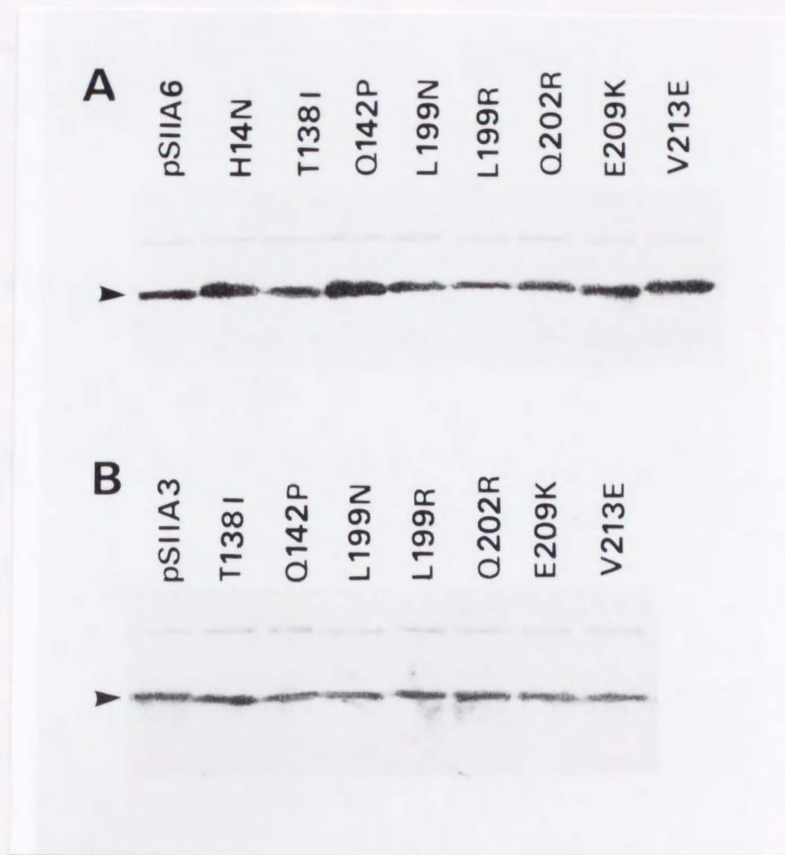
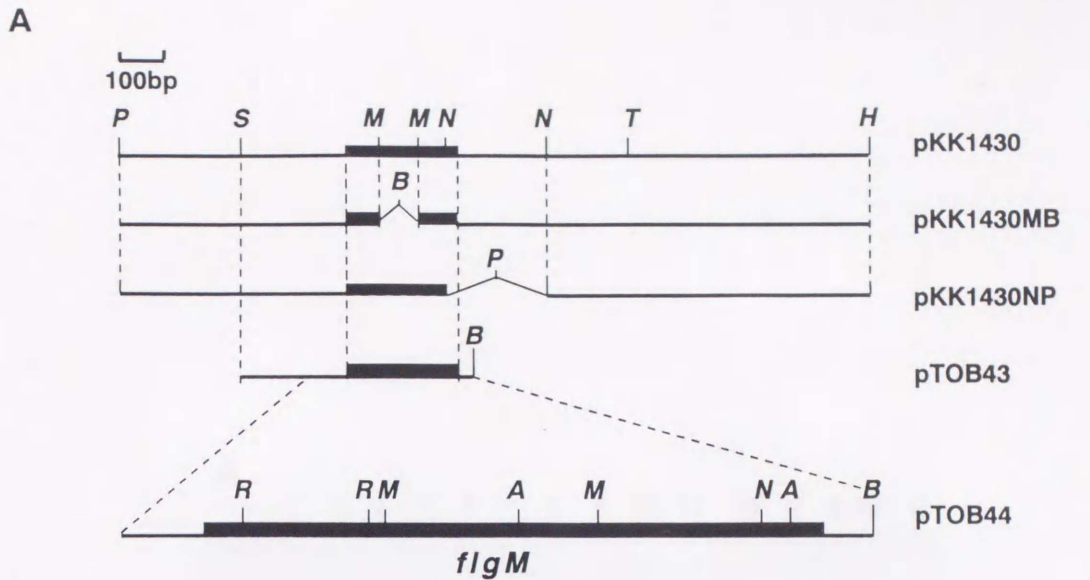


図 4. *rflD* 突然変異を持つ FliA ポリペプチドの大量発現。(A) *rflD* 突然変異を持つ pSIIA6 型ポリペプチドの大量発現。(B) *rflD* 突然変異を持つ pSIIA3 型ポリペプチドの大量発現。方法は図 3 と同じ。黒三角はそれぞれの突然変異体のポリペプチドを示す。



B

```

1  ATGAGCATTGACCGTACCTCACCTTTGAAACCCGTTAGCACTGTCCAGACGCGCGAAACC
1  M S I D R T S P L K P V S T V Q T R E T

61  AGCGACACGCCGGTACAAAAACGCGTCAGGAAAAACGTCCGCCGCGACGAGCGCCAGC
21  S D T P V Q K T R Q E K T S A A T S A S

          # 102, # 103          # 101 # 107
121  GTAACGTTAAGCGA CGCGCAAGCGA AGCTCAT GCAGCC AGGCGTCAGCGACATTAATATG
41  V T L S D A Q A K L M Q P G V S D I N M

181  GAACGCGTCGAAGCATTAAAAACGGCTATCCGTAACGGTGAGTTAAAAATGGATACGGGA
61  E R V E A L K T A I R N G E L K M D T G

# 110
241  AAA A TAGCAGACTCGCTCATTTCGCGAGGCGCAGAGCTACTTACAGAGTAAA
81  K I A D S L I R E A Q S Y L Q S K

```

図5. 本研究で用いたプラスミド上の *flgM* 遺伝子の構造(A)と *flgM* 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列(B)。(A)本研究で用いた制限酵素切断点を次の略号で示す: A, *AluI*; H, *HindIII*; M, *MluI*; N, *NruI*; P, *PvuII*; R, *RsaI*; S, *SmaI*; T, *StuI*。太線で示した領域は *flgM* 遺伝子の翻訳領域を示す。(B)塩基配列とアミノ酸配列は Gillen and Hughes (1991) に従った。左側に記した数値はそれぞれ開始コドンの1番目の塩基を1とした場合の塩基数とN末端からのアミノ酸番号を示す。*rfIB* 突然変異体では、□で囲んだ塩基がそれぞれ欠失している。#は *rfIB* 突然変異番号を示す。

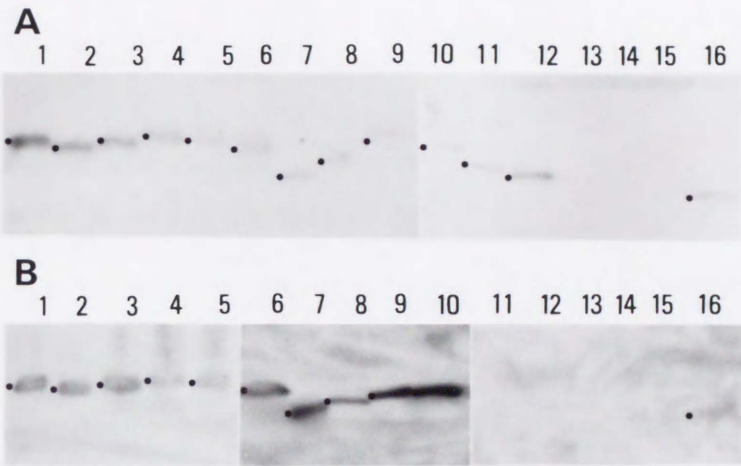
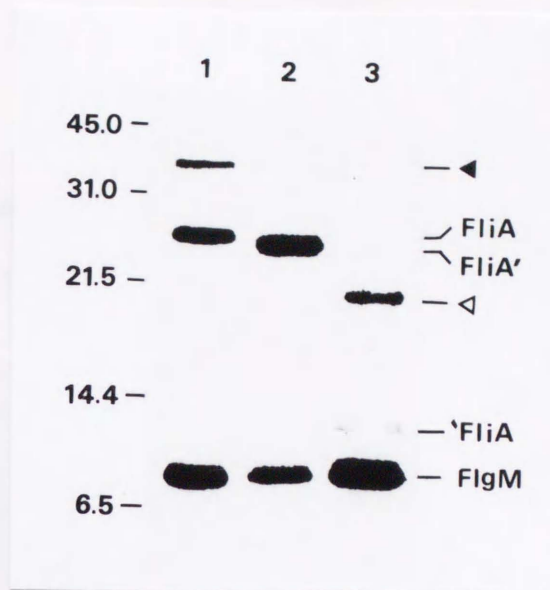


図 6. FlgM ポリペプチドの細胞内での合成と細胞外輸送。
 pSIGM1-pSIGM16 で形質転換した KK1312 株を IPTG 存在下で
 培養後、細胞内 (A) と細胞外 (B) にわけ、それぞれに含ま
 れる FlgM ポリペプチドを 15%ゲルによる SDS-PAGE で分離
 し、抗 FlgM 抗体でウエスタンブロッティングを行った。
 各ポリペプチドに相当するバンドを各レーンの左側にド
 ットで示した。図上の番号は pSIGM プラスミドの各番号
 を示す。

A



B

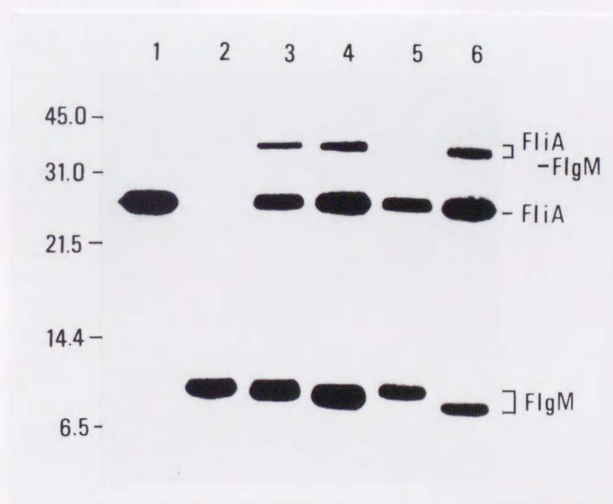
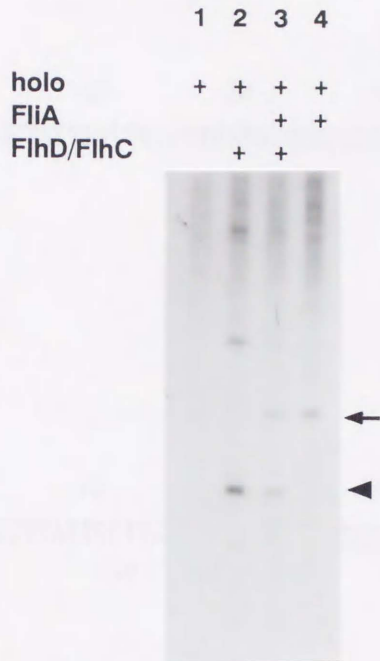


図 7. *in vitro* における蛋白質間相互作用の解析。(A)欠失型 FliA と野生型 FlgM の相互作用。白三角と黒三角は複合体を示す。

レーン :1, pSIIA1/pSIGM1; 2, pSIIA7/pSIGM1; 3, pSIIA4/pSIGM1。(B)野生型 FliA と欠失型 FlgM の相互作用。レーン :1, pSIIA1; 2, pSIGM1; 3, pSIIA1/pSIGM1; 4, pSIIA1/pSIGM2; 5, pSIIA1/pSIGM3; 6, pSIIA1/pSIGM10。

A



B

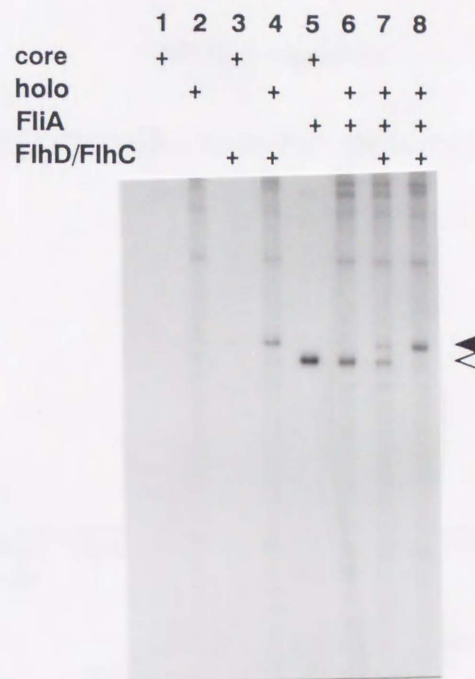


図8. *flgA*と*fliA*オペロンの*in vitro*転写再構成系。(A)pSIGA100を鋳型として*flgA*オペロンの*in vitro*転写実験を行った結果を示す。黒三角はFlhD/FlhC依存性の転写産物を示す。矢印はベクター上のFliA依存性プロモーターからの転写産物である。(B)pSIIA100を鋳型として*fliA*オペロンの*in vitro*転写実験を行った結果を示す。黒三角はFlhD/FlhC依存性の転写産物を示す。白三角はFliA依存性の転写産物を示す。holoは σ^{70} を含むRNAポリメラーゼを示す。FliA, FlhD/FlhCとも40pmolを使用した。ただし、Bのレーン7と8では、FliAをそれぞれ10pmolと4pmol使用した。

flgA

FlhD/FlhC dependent

-40 -30 -20 -10 +1

GTCGCTATTTATTGCGTTGATGCTTGCTTCACACGGGTAGAATCCTGTCAAGACATCAACCAGGGGAAGTACCATG

fliA

FlhD/FlhC dependent

-40 -30 -20 -10 +1

TAGCCTTATTCCTTCGATAGAACCTCTGTAGAAACGGATAATCATGCCGATAAACTCATTAACGCAGGGCTGTTTATCGTG

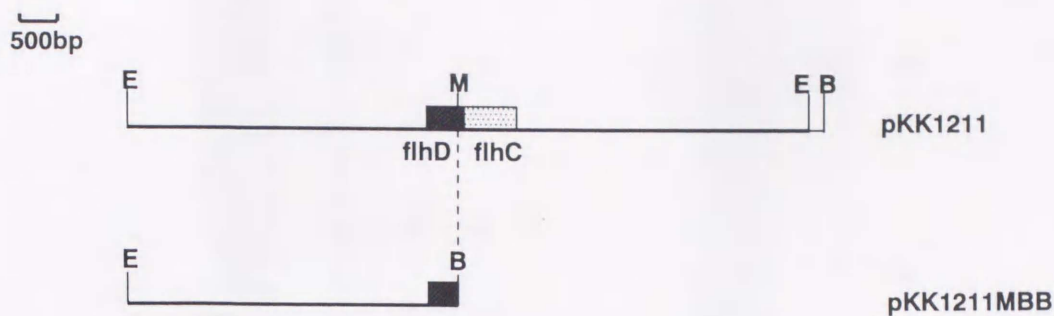
-50 -40 -30 -20 -10 +1

FliA dependent

TAAA N15 GCCGATAA

図 9. *flgA* オペロンと *fliA* オペロンの転写開始点とその周辺の塩基配列。
flgA オペロンと *fliA* オペロンの塩基配列はそれぞれ Kutsukake *et al.*, (1994)と Ohnishi *et al.*, (1990)にそれぞれ従った。塩基の上または下に記した数値は転写開始点を 1 とした場合の塩基数を示す。一重の四角で囲んだ塩基は FlhD/FlhC 依存性の転写開始点を示し、二重の四角で囲んだ塩基は FliA 依存性の転写開始点を示す。右端のトリプレット（中抜き文字で示した塩基）は翻訳開始点を示す。実線の下線を施した塩基は FlhD/FlhC 依存性プロモーターの -10 配列を示し、波線の下線を施した塩基は FliA 依存性プロモーターの -10, -35 配列を示す。TAAA N15 GCCGATAA は FliA 依存性プロモーターのコンセンサス配列を示す。

A



B

```

-585 AAAAGTTAAA TCAAATGAGC TTATTTTTAA CAGCGGAGGG CGTATGCTGT GACGAATTATA
                                         PHD3
                                         P5
-525 ATTAATAACG TTTAATATTT AAGCTACTGT TTACTAAAGG TAAAATAAAA GCGTTTCTAA
                                         PHD3
-465 AATAGAAATA ATAGCCTGTT ATCTATTATC CTGGCGTTAT TTTAACAGAG AGAAACAAAA
-405 AAGAATTTGG TGTGACGTA CCCCTATTCA GCAGTGTGGA ATAGAAAAG TGAACATTAG
                                         PHD3
                                         P4
-345 GTTATTAATT AAACAAAGTA AAAGCCATGC TGATGGTTTT ATCGTAAGT TTCCGTTAAA
                                         PHD3
                                         P3
CRP-binding site
-285 ATATGTGATC TGCATCACAT ATTTCTAAA ATCGCCGTCC CGCTCCGTTG TATGTCACGA
                                         PHD3
                                         P2
                                         P6
-225 AGCTGACGAG TAGAGTTCG TCAATTAGG AAAAACTTA GGCATTTGTA AAAATTGATG
                                         PHD3
                                         P1
-165 TAAACGTGTA AGGCGAATCT CAGTGGGAGG CTGCGTTATA CGTCACAATG TCCATAATGT
                                         PHD2
-105 CTGAGCGCTG CTATGCATTT GACCTTTTTG CTTCTTTTAC CGGGCCTTCC CGGCGACATC
-45 ACGGGGTGCG GCTACGTCGC AAAAAAATAA AGTTGGTTAT TCTGGATGGG AACAATGCAT
                                         PHD1
                                         P1
                                         +1
+16 ACATCCGAGT TGCTAAAACA CATTATGAC ATCAATTTGT CATATTTACT CCTTGCACAG
    T S E L L K H I Y D I N L S Y L L L A Q
  
```

図 10. プラスミド pKK1211 と pKK1211MBB の構造 (A) と *filhD* オペロンの転写開始点とその周辺の塩基配列 (B)。 (A) 制限酵素切断点を次の略号で示す: E, *EcoRI*; B, *BamHI*; M, *MluI*。 (B) P1-P6 までの転写開始点を四角で囲んだ。塩基配列の左側に記した数値は翻訳開始コドンの最初の塩基を 1 とした場合の塩基数を示す。各転写のプロモーターの -10 配列と考えられる塩基に下線を施した。二重下線を施した塩基はプライマー伸長法に用いたプライマーに対して相補的な塩基を示す。CRP 結合部位と考えられる塩基を ■ で示した。

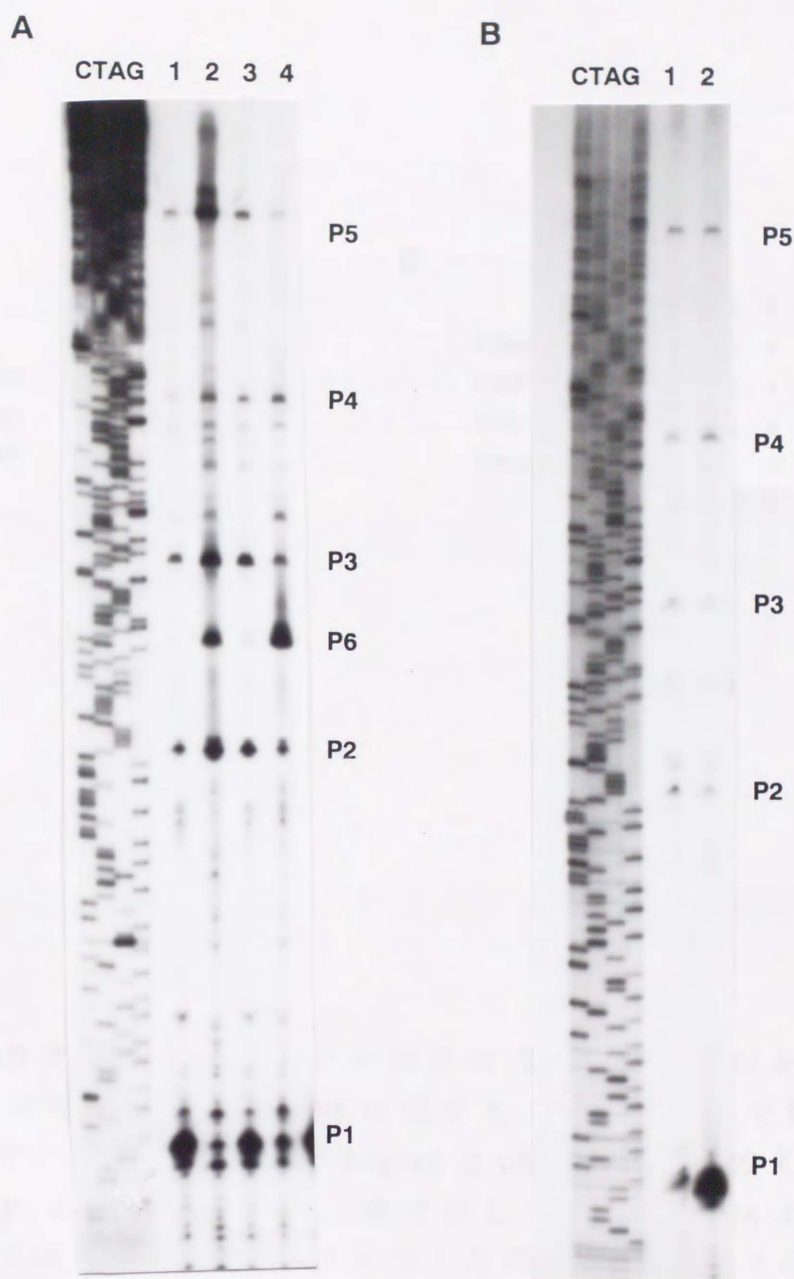


図 11. プライマー伸長法による *flhD* オペロンの転写開始点の同定。各形質転換体から調製した RNA と PHD2 プライマーを用いてプライマー伸長法を行った結果を示す。レーン C, T, A, G は同じプライマーを用いて行った DNA シーケンス反応のラダーを示す。右側にそれぞれの転写開始点 (P1-P6) を示す。(A) pKK1211MBB で形質転換した株から調製した RNA を用いた。使用した菌株: レーン 1, KK1004 (野生株); レーン 2, KK1603 (*crp* 突然変異株); レーン 3, KK1601 (*hns* 突然変異株); レーン 4, KK1605 (*crp hns* 二重突然変異株)。(B) pKK1211 で形質転換した株から調製した RNA を用いた。使用した菌株: レーン 1, KK1107 (*flgM*⁺株); レーン 2, KK1107GM (*flgM*⁻株)

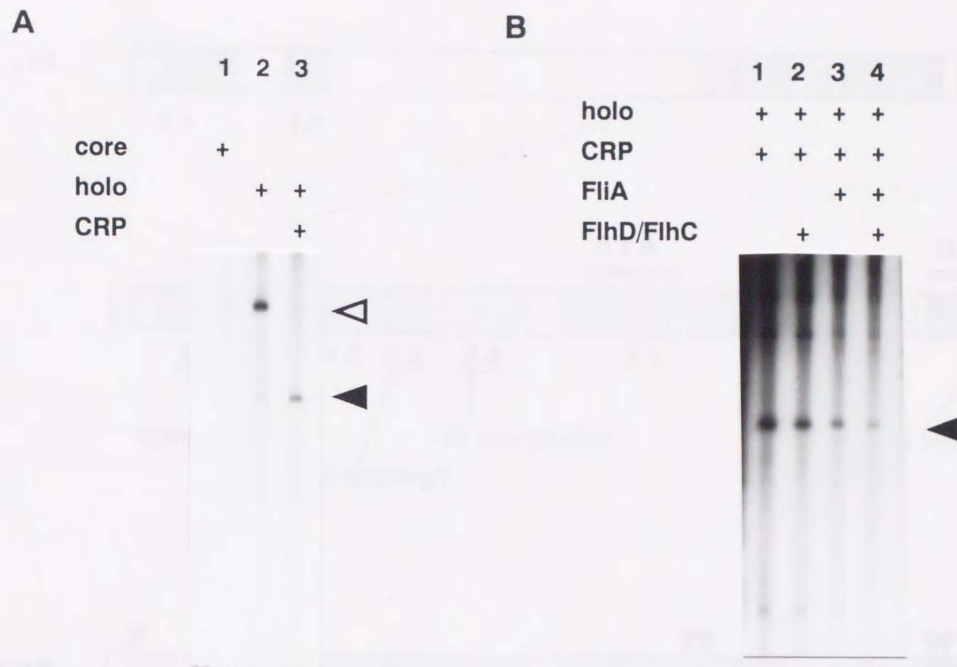


図 12. *flhD* オペロンの *in vitro* 転写再構成系。(A)pYK5 を鋳型として、P1 の転写に対する CRP の効果を *in vitro* 転写系で解析した結果を示す。CRP + は CRP を 2.5pmol と cAMP を 5nmol 加えたことを示す。P1 の転写産物を黒三角で示した。 σ^{70} -RNA ポリメラーゼだけで活性化され、CRP を加えた際に抑制される転写産物を白三角で示した。(B)pYK5 を鋳型として FliA と FlhD/FlhC の P1 の転写に対する効果を *in vitro* 転写系で解析した。CRP + は CRP を 2.5pmol と cAMP を 5nmol、FliA + と FlhD/FlhC + は FliA と FlhD/FlhC をともに 40pmol 加えたことを示す。P1 の転写産物を黒三角で示した。

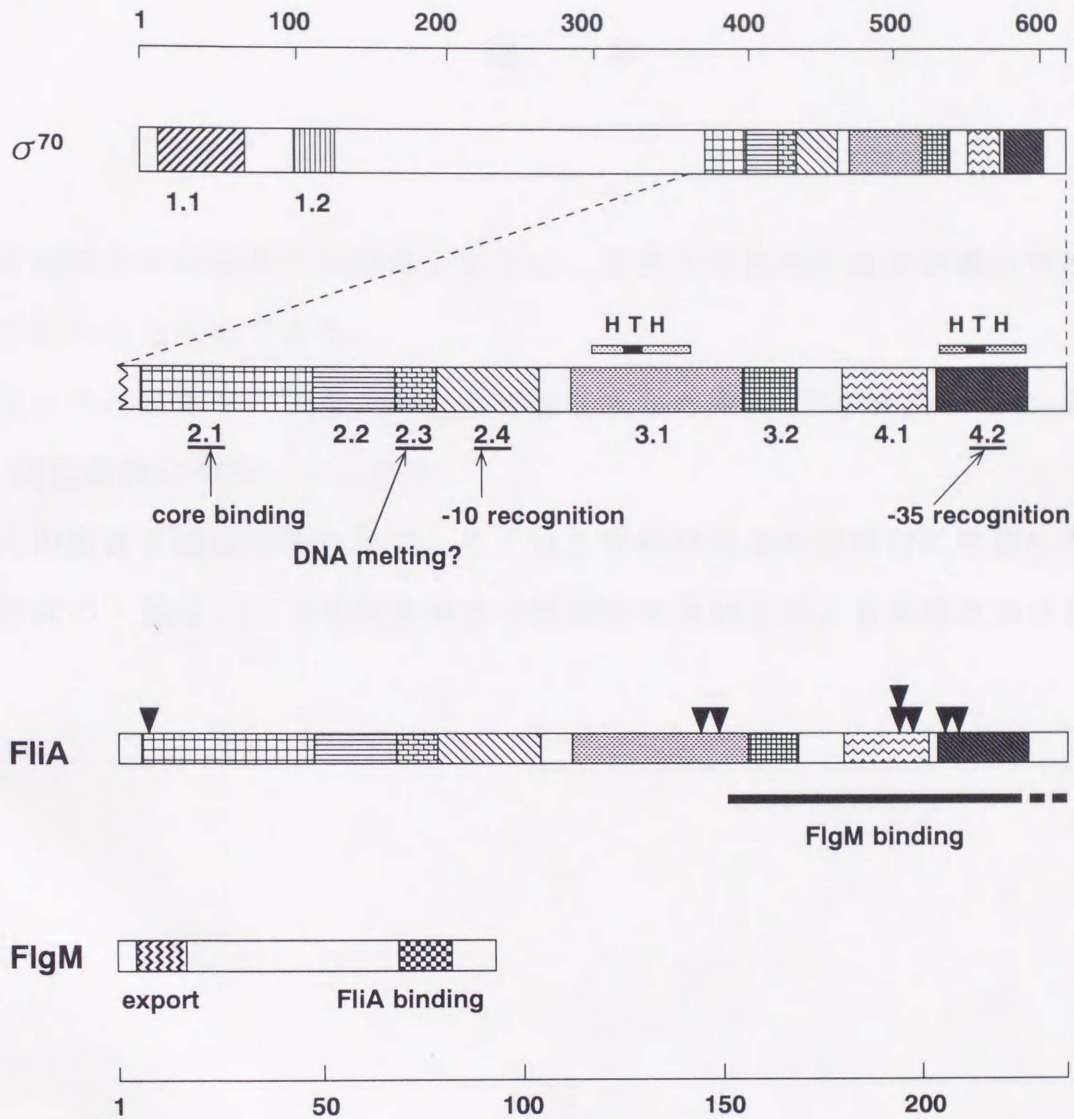


図 13. σ^{70} , FliA 及び FlgM の機能ドメイン。 σ^{70} の領域 3.1 と領域 4.2 上に記した HTH は helix-turn-helix モチーフを示す。 FliA の上に記した黒三角は *rfd* 突然変異点の位置 (図 2B) を示す。スケールはいずれもアミノ酸数を示す。

謝 辞

本研究は沓掛和弘博士の指導のもとに、広島大学生物生産学部微生物機能学研究室で行われたものである。

論文作成に当たり、多くの御助言を賜りました太田 欽幸教授、池上 晋教授、吉本 明弘教授に感謝いたします。

多くの助言と議論の場を提供してくれた沓掛研究室の皆様方に感謝いたします。

本研究の一部は、日本学術振興会の特別研究員制度による支援を受けました。