

# cAMP-CRP 制御系の *sodA* プロモーター活性に与える影響

武部 聡, 東 恵実, 吉田 恵, 吉田 あや

Effect of cAMP-CRP regulation on *sodA* promoter activity

So Takebe, Megumi Azuma, Megumi Yoshida and Aya Yoshida

## I. はじめに

酸素分子から水分子までの還元過程で生じる中間体は活性酸素と総称され、概して反応性が高いため、細胞に対し強い毒性をもつ<sup>1)</sup>。活性酸素は、紫外線、電離放射線の照射や化学発ガン剤などの環境要因によって生成するばかりでなく、好気性生物の通常酸素利用の過程でも細胞内に生じている。したがって、酸素毒性に対する防御は好气的条件下で生育する生物にとって必須の機構であり、酸素ストレス適応応答は原核生物から高等真核生物まで普遍的に見られる現象である。

酸素の一電子還元によって生じる活性酸素はスーパーオキシドと呼ばれ、この消去酵素としてスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) が知られている<sup>2)</sup>。SOD は、酸素にさらされる環境にある生物のほとんど全てがもっていることから、好气的環境下で生育するために必須の酵素と考えられている<sup>3)</sup>。大腸菌には、マンガンをもつ Mn-SOD<sup>4)</sup> と鉄をもつ Fe-SOD<sup>5)</sup> の2種類の SOD が存在しており、それぞれの遺伝子 *sodA* (Mn-SOD)<sup>6,7)</sup> と *sodB* (Fe-SOD)<sup>8,9)</sup> も単離されている。2つの酵素の役割の違いははっきりしていないが、Fe-SOD が常に一定のレベルで合成されているのに対し、Mn-SOD は嫌气的条件下では合成されず酸素存在下で誘導され<sup>10,11)</sup>、パラコートなどのスーパーオキシド増産剤によって誘導はさらに増強される<sup>12)</sup> ため、酸素ストレス適応応答の一環を担う酵素の一つになって

いる。

Mn-SOD の発現制御は転写段階において行われるほか、翻訳後にも金属依存的に行われる<sup>13,14)</sup>。転写段階における調節は、SoxRS を含む6種類の転写制御因子が関与しており、それらの作用部位は *sodA* のプロモーター領域に位置している<sup>15)</sup>。SoxRS は酸素ストレス適応応答の制御因子の一つで、スーパーオキシドによって誘導される遺伝子の発現を転写段階で調節している<sup>16,17)</sup>。SoxRS は細胞内のスーパーオキシド濃度の上昇により活性化され<sup>18)</sup>、*sodA* に対しては転写活性を上昇させるはたらきをもつ。

cAMP-CRP は大腸菌における糖代謝系遺伝子の転写制御因子であり、糖利用に関与する遺伝子の多くがこの制御下にある<sup>19)</sup>。cAMP-CRP 欠損変異株は好气的条件下においても増殖できるので、cAMP-CRP 制御系の酸素ストレス適応応答への直接の関与は考えられていない。しかしながら、糖代謝の過程には多くの酸化還元反応が含まれており、好气的条件下における糖代謝により細胞内の活性酸素濃度が上昇すると予想できるため、cAMP-CRP 制御系が間接的に *sodA* の転写活性に影響を与える可能性がある。そこで、好气的または嫌气的条件下における *sodA* のプロモーター活性と cAMP-CRP 制御系の関係を検討した。

## II. 実験材料・方法

### 1. 菌株およびベクター

本研究に用いた大腸菌は、表1にあげてある。MC1061は、プラスミド DNA の調製と  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定に用い、TP2010と TP2139は

表1 菌株

Strains	Genotype	Source
MC1061	<i>hsdR mcrB araΔ139 Δ(araABC-leu) 7679 ΔlacX74 galU galK rspL thi</i>	M. J. Casadaban
TP2010	<i>xyl Δcya argH ΔlacX74 recA ilv srl::Tn10</i>	A. Danchin
TP2139	<i>xyl ilvA argH ΔlacX74 Δcrp</i>	A. Danchin

β-ガラクトシダーゼ活性の測定に用いた。

プロモーター検索用ベクター pMS437C は、プロモーター領域を欠いた *lacZ* をもち、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。本研究で用いた *sodA* のプロモーター-DNA 断片は、大腸菌染色体の整列クローンライブラリーである“小原バンク”<sup>20)</sup>より調製した。

## 2. 試薬・酵素類

培地用試薬 Bacto tryptone と yeast extract は DIFCO 社製を用いた。adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) は SIGMA 社製を用いた。methyl viologen trihydrate (PQ), *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG), ampicillin, および、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. 培養方法

大腸菌の培養には、2×YT 培地<sup>21)</sup>を用いた。プラスミドをもつ大腸菌の培養には培地に ampicillin を終濃度 50 μg/ml になるように加えて用いた。培地 10 ml に pMS437C またはその誘導体をもつ大腸菌の一晩培養液を 1/100 量加え、37℃で 2 時間嫌氣的に静置した。その後、この液 1 ml を培地 9 ml に植菌して好氣的または嫌氣的に 37℃で振盪培養し、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。

嫌気培養は、あらかじめ 5 分間窒素ガスを吹き込んだ培地を密閉できる 50 ml 容チューブに入れ、窒素ガスを充填した状態で行った。また、誘導剤は培養開始時に、パラコートは 40 μM, cAMP は 1 mM になるように添加した。

## 4. β-ガラクトシダーゼ活性の測定

β-ガラクトシダーゼ活性の測定は、J. H. Miller の方法<sup>22)</sup>に若干の変更を加えて行った<sup>23)</sup>。

## III. 結 果

### 1. *PsodA-lacZ* 融合遺伝子の構築

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く、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。*sodA* も転写調節を受ける遺伝子で、現在までに明らかとなっている制御因子の作用部位はプロモーター領域に存在している<sup>15)</sup>。そこで、*sodA* プロモーター (P *sodA*) を *lacZ* 構造遺伝子と連結し、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融合遺伝子 *PsodA-lacZ* の構築を行った。

*sodA* は大腸菌染色体上 88 分に位置しており、この領域は染色体ライブラリー“小原バンク”では λB6 が相当する。λB6 DNA を制限酵素 EcoRI と BamHI で消化すると *sodA* を含む 4.9 kbp の DNA 断片が生じ、4.9 kbp 断片を Sau3AI で消化すると *sodA* のプロモーター領域を含む 496 bp 断片が得られる。この 496 bp 断片を pMS437C の BamHI 部位に挿入し、融合遺伝子 *PsodA-lacZ* をもつプラスミド pMS-*PsodA-lacZ* を構築した (図 1)。このプラスミドを *lacZ* を欠失した大腸菌に導入すれば、β-ガラクトシダーゼ活性から *sodA* のプロモーター活性を求めることができる。

### 2. 好氣的および嫌氣的条件下における *PsodA* 活性

融合遺伝子 *PsodA-lacZ* の大腸菌内での発現誘導を調べるため、pMS-*PsodA-lacZ* を *lacZ* 欠損株である MC1061 に導入し、好氣または嫌気培養における β-ガラクトシダーゼ活性を測定した (図 2)。好気培養では β-ガラクトシダーゼ活性は培養時間に依存して上昇したが、嫌気培養では活性値に変化が見られなかった。この結果から、*PsodA-lacZ* は好氣的培養によって誘導されたことがわかった。

また、いずれの培養条件下でもパラコート添加と

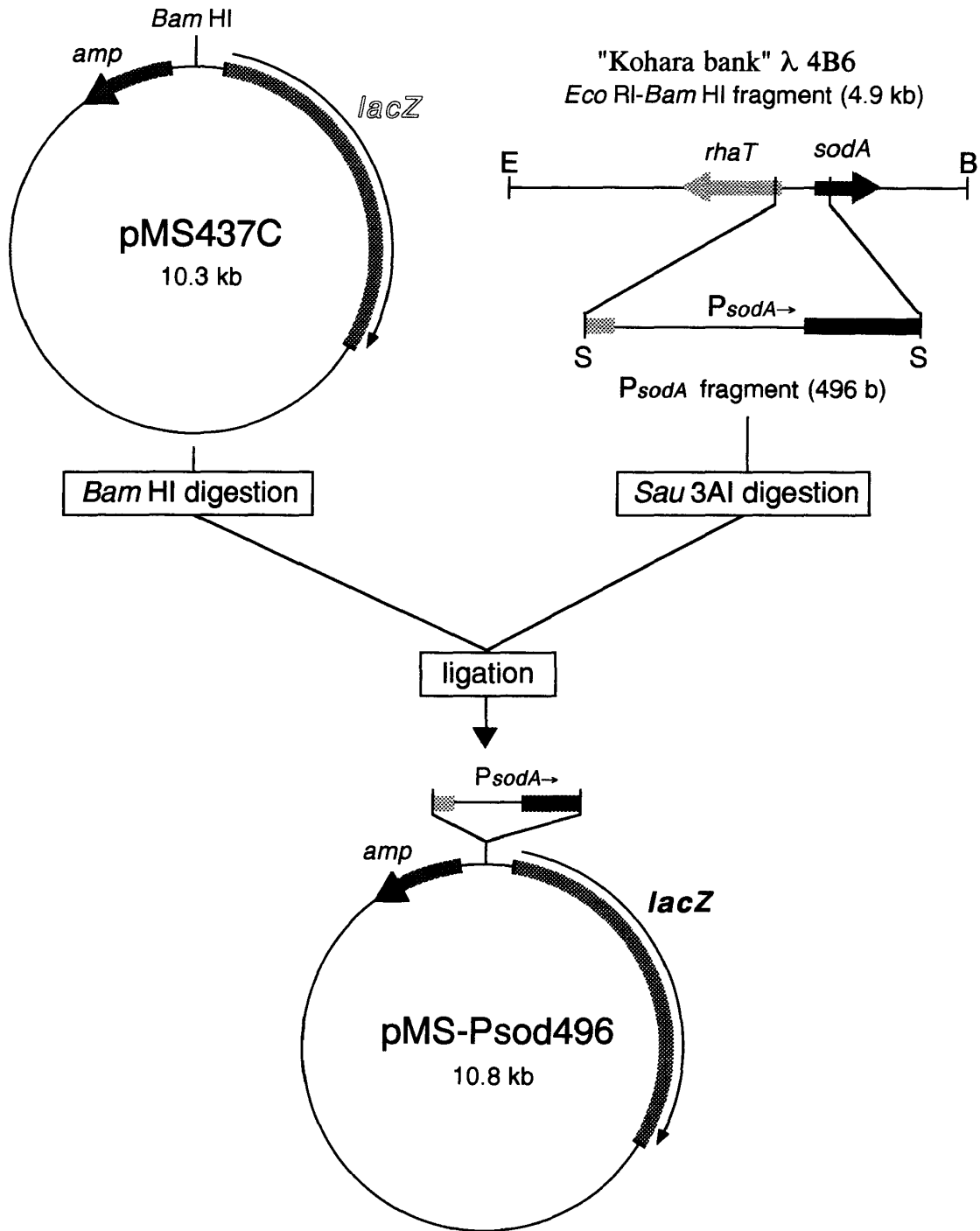


図1 pMS-Psod496の構築。PsodAはsodAのプロモーター領域、矢印はその転写方向を表す。  
*amp*<sup>r</sup>, アンピシリン耐性遺伝子; *rhaT*, ラムノーストランスポーター遺伝子。  
 B, BamHI; E, EcoRI; S, Sau3AI

無添加のものとの間にβ-ガラクトシダーゼ活性の有意な差は見られなかった。パラコートは溶存酸素を還元してスーパーオキシドを生成する試薬であるので、嫌気培養では還元できる酸素が存在しなかったことになる。一方、好気培養で活性値に変化がなかったのは、通常の酸素利用によって菌体内に生じ

たスーパーオキシドによりPsodA-lacZが十分に誘導されていたためと考えられる。

### 3. cAMP-CRP 欠損株を用いたPsodA活性の測定

cAMP-CRPは大腸菌における糖代謝系遺伝子の転写制御因子であり、糖利用に関与する多くの遺伝

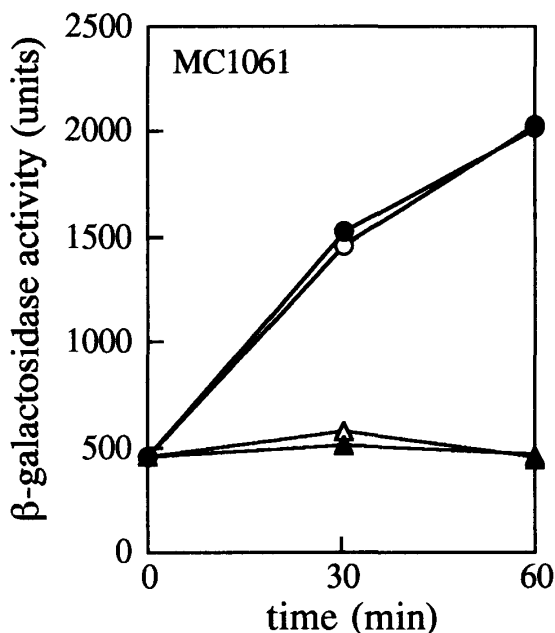


図2 好気または嫌気培養による *PsodA-lacZ* 融合遺伝子の発現誘導。pMS-*Psod496* を MC1061 ( $\Delta lac$ ) に導入して好気または嫌気培養を行い、一定時間ごとに培養液を一部とり  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。横軸は培養時間を表し、パラコートの添加は培養開始と同時にを行った。○, 好気培養; ●, 好気培養+パラコート添加; △, 嫌気培養; ▲, 嫌気培養+パラコート添加

子の発現がこの因子の調節を受けている。cAMP-CRP 制御系の欠損株は糖代謝が制限されているため、酸素利用も減少することになる。つまり、好気培養を行っても菌体内での活性酸素の発生を低く抑えることができると考えられる。

TP2010は cAMP 合成酵素アデニレートシクラーゼの遺伝子 *cya* の欠失変異株、TP2139は cAMP 受容タンパク質 CRP の遺伝子 *crp* の欠失変異株で、ともに cAMP-CRP 制御系をもたない。これらの大腸菌に pMS-*Psod496* を導入し、好気および嫌気培養における  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の変動を調べた (図3)。どちらの菌株を宿主として用いた場合も、好气的条件下において培養時間に依存した酵素活性値の上昇が見られた。このことから、*PsodA-lacZ* は cAMP-CRP 欠損株を宿主として用いても好気培養で誘導されることがわかった。嫌気培養ではどちらの菌株を用いても誘導されなかった。

好気培養で、培地にパラコートを添加したものは無添加のものに比べて高い活性値を示した (図3)。嫌気培養では添加と無添加で活性値に差が見られなかったことから、好気培養において活性値が高くなったのはパラコート添加により培地中に生じたスーパーオキシドが *PsodA-lacZ* を誘導したため

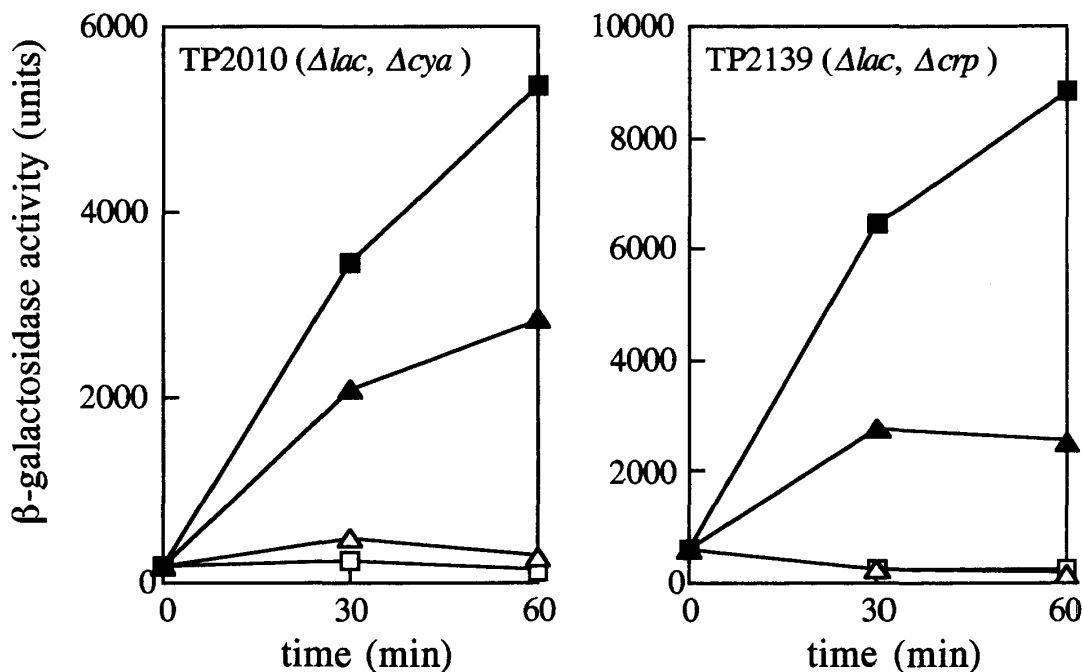


図3 cAMP-CRP 欠損変異株における *PsodA-lacZ* 融合遺伝子の発現誘導。pMS-*Psod496* を TP2010 ( $\Delta cya$ ) または TP2139 ( $\Delta crp$ ) に導入し、培養条件およびパラコート添加による  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の変化を調べた。横軸は培養時間を表し、パラコートの添加は培養開始と同時にを行った。▲, 好気培養; ■, 好気培養+パラコート添加; △, 嫌気培養; □, 嫌気培養+パラコート添加

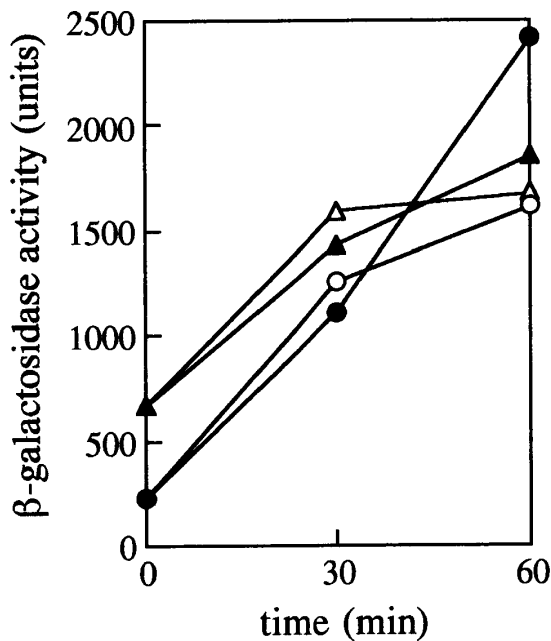


図4 cAMP-CRP 欠損変異株内での *PsodA-lacZ* 融合遺伝子の発現誘導に対する cAMP 添加の効果。pMS-*Psod496* を TP2010 ( $\Delta$ *cya*) または TP2139 ( $\Delta$ *crp*) に導入し、好気培養における cAMP 添加の効果調べた。○, TP2010; ●, TP2010+cAMP 添加; △, TP2139; ▲, TP2139+cAMP 添加

である。

次に、cAMP-CRP 制御系を回復させることにより *PsodA-lacZ* の誘導がどのように変化するかを調べた (図4)。TP2010は  $\Delta$ *cya* のため cAMP を合成できないが、培地中に cAMP を添加すると菌体内に取り込み cAMP-CRP 系が回復する。一方、TP2139は  $\Delta$ *crp* のため cAMP を添加しても cAMP-CRP 系は回復しない。培地に cAMP を添加して好気培養を行ったところ、TP2010を宿主としたものでは cAMP 無添加のものに比べ高い活性値を示したが、TP2139では活性値に有意な差は見られなかった。したがって、TP2010で cAMP 添加により  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が高くなったのは cAMP-CRP 系が回復したためであり、この結果より糖代謝系遺伝子の調節因子である cAMP-CRP 欠損株では好気培養でも *PsodA-lacZ* の誘導が不完全に起こると考えられる。

#### IV. 考 察

大腸菌は通性嫌気性菌なので、酸素を利用しなくても発酵によりエネルギーを獲得して生育することができる。酸素が存在する時はこれを利用してエネルギー産生を行うが、その酸化還元反応の過程で

スーパーオキシドなどの活性酸素が生成する。したがって、好気培養では菌体内で発生した活性酸素の除去のために酸素ストレス適応応答がはたらくと考えられる。pMS-*Psod496* を大腸菌 MC1061 に導入して好気培養すると *PsodA-lacZ* の発現が誘導されたのは、この酸素ストレス適応応答がはたらいたためであり、嫌気培養ではこの誘導は観察されなかった。また、パラコート添加によりスーパーオキシド濃度を上昇させても *PsodA-lacZ* の発現には効果を示さなかったことから、*PsodA-lacZ* は通常の酸素利用により十分に発現誘導されていたことになる。この強い誘導の理由としては、*PsodA-lacZ* をプラスミドに組み込んだことによるコピー数の増加と、融合遺伝子のため産物によるフィードバック阻害の回避が考えられる。また、*sodA* の発現制御には *soxRS* 以外に少なくとも5種類以上の転写調節因子が存在することがわかっており<sup>15)</sup>、これらの因子が関与している可能性もある。

糖代謝系遺伝子の調節因子である cAMP-CRP の欠損変異株 TP2010 ( $\Delta$ *cya*) と TP2139 ( $\Delta$ *crp*) を宿主として用いると、好気培養でも *PsodA-lacZ* の発現は低く抑えられ、パラコート添加の効果を観察することができた。これらの変異株は糖代謝に際し大きな制限を受けているため、好気培養における活性酸素の生成が低く抑えられ、*PsodA-lacZ* の発現が不十分に誘導されたと考えられる。しかしながら、cAMP-CRP 制御下には熱ショックタンパク質など糖代謝系以外の遺伝子もあり、*sodA* の転写制御機構も複雑であることから、cAMP-CRP が間接的に *sodA* の転写制御を行っている可能性もある。また、染色体上の *sodA* の上流にはラムノーストランスポーターの遺伝子 *rhaT* が逆向きに存在しており<sup>24)</sup>、その cAMP-CRP 結合部位が *sodA* とのちょうど中間に位置していることから、*sodA* の発現に cAMP-CRP が直接関与している可能性も考えられる。

スーパーオキシドで誘導される遺伝子の単離や解析には、Mud (Ap *lac*) フェージを用いた方法が知られており、いくつかの新しい遺伝子が単離されている<sup>25,26)</sup>。しかし、この方法は染色体上の遺伝子内に *lacZ* を挿入するため、遺伝子本来の機能を失わせることがあり、好气的条件下での生育に必須な遺伝子の単離はできないなどの欠点がある。本研究では、プラスミドベクターに目的遺伝子のプロモーターを乗せているため、宿主大腸菌の遺伝子構成には影響を与えない。したがって、この方法を用いれ

ば好氣的条件下での必須遺伝子の単離が行える。また、宿主に cAMP-CRP 変異株を用いれば誘導物質の濃度に依存したプロモーター活性の変化を検出できるため、本実験系の酸素ストレス誘導遺伝子の単離および解析への応用が期待できる。

## V. 要 約

酸素ストレス適応応答を構成する遺伝子の一つである *sodA* のプロモーターと *lacZ* との融合遺伝子 *PsodA-lacZ* を作成し、大腸菌内に導入して好気または嫌気培養における酸素ストレスの有無を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の変動から検討した。*PsodA-lacZ* は好気培養によって強く発現誘導されたが嫌気培養では誘導されず、酸素ストレスは通常の酸素利用によっても生じていることがわかった。また、糖代謝系遺伝子制御因子である cAMP-CRP の欠損株を用いて *PsodA-lacZ* の発現を調べたところ、好気培養条件下でも *PsodA-lacZ* の誘導は不十分であったが、パラコートの添加や cAMP-CRP 制御系の回復により誘導は強くなった。これらの結果より、酸素ストレスは好氣的条件下における糖代謝の過程で生じ、その過程には cAMP-CRP 制御下にある遺伝子の関与が示唆された。

## 参考文献

- 1) Sies, H., *Oxidative Stress; Oxidants and Antioxidants*, Academic Press, London (1991)
- 2) McCord, J. M., and Fridovich, I., *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055 (1969)
- 3) Fridovich, I., *Photochem. photobiol.*, **28**, 733-741 (1978)
- 4) Keele, B. B., Jr., McCord, J. M., and Fridovich, I., *J. Biol. Chem.*, **245**, 6176-6181 (1970)
- 5) Yost, F. J., and Fridovich, I., *J. Biol. Chem.*, **248**, 4905-4908 (1973)
- 6) Touati, D., *J. Bacteriol.*, **155**, 1078-1087 (1983)
- 7) Takeda, Y., and Avila, H., *Nucleic Acids Res.*, **14**, 4577-4589 (1986)
- 8) Carlioz, A., and Touati, D., *EMBO J.*, **5**, 623-630 (1986)
- 9) Nettleton, C. J., Bull, C., Baldwin, T. O., and Fee, J. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4970-4973 (1984)
- 10) Hassan, H. M., and Fridovich, I., *J. Biol. Chem.*, **252**, 7667-7672 (1977)
- 11) Hassan, H. M., and Fridovich, I., *J. Bacteriol.*, **129**, 1574-1583 (1977)
- 12) Hassan, H. M., and Fridovich, I., *Arch. Biochem. Biophys.*, **196**, 385-395 (1979)
- 13) Privalle, C. T., and Fridovich, I., *J. Biol. Chem.*, **267**, 9140-9145 (1992)
- 14) Touati, D., *J. Bacteriol.*, **170**, 2511-2520 (1988)
- 15) Compan, I., and Touati, D., *J. Bacteriol.*, **175**, 1687-1696 (1993)
- 16) Greenberg, J. T., Monach, P., Chou, J. H., Josephy, P. D., and Demple, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6181-6185 (1990)
- 17) Nunoshiba, T., Hidalgo, E., Amabile-Cuevas, C. F., and Demple, B., *J. Bacteriol.*, **174**, 6054-6060 (1992)
- 18) Hidalgo, E., and Demple, B., *EMBO J.*, **13**, 138-146 (1994)
- 19) Gottesman, S., *Annu. Rev. Genet.*, **18**, 415-441 (1984)
- 20) Kohara, Y., Akiyama, K., and Isono, K., *Cell*, **50**, 495-508 (1987)
- 21) Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., *Molecular Cloning 2nd ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. (1989)
- 22) Miller, J. H., *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. (1972)
- 23) 吉田あや, 武部 聡, 本誌, **48**, 22-28 (1993)
- 24) Tate, C. G., Muiry, J. A. R., and Henderson, P. J. F., *J. Biol. Chem.*, **267**, 6923-6932 (1992)
- 25) Kogoma, T., Farr, S. B., Joice, K. M., and Natvig, D. O., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4799-4803 (1988)
- 26) Mito, S., Zhang, Q. M., and Yonei, S., *J. Bacteriol.*, **175**, 2645-2651 (1993)