大腸菌外膜タンパク質の合成調節

—Osmoregulation—

(昭和 62 年度農芸化学奨励賞受賞)

水 野 猛†

(名古屋大学農学部)

はじめに

近年の分子生物学の発展は、比較的単純な生命体である微生物、とくに大腸菌を対象とした基礎研究の蓄積によっているところが多い。大腸菌を研究対象として得られてきた遺伝の仕組み、遺伝子の発現やその調節の仕組みに関する分子生物学的知識が、より高等な生物におけるより複雑な仕組みを分子レベルで理解していくうえでの出発点となっている。とくに近年、大腸菌分子遺伝学から創り出されてきた組換え DNA 技術が、多くの研究分野で驚くほどの威力を発揮していることも繰り返し述べる必要もないほどである。これらを背景として、高等生物の細胞内で起こっている複雑な現象をも分子レベルで理解しようとするアプローチが可能となり、膨大なデータが報告されるに至っている。しかし時として、それらを有機的に総合して統一的な概念を導き出していくのに困難を感じるほどである。細胞内諸プロセスの複雑さと巧妙さがわかってくると、そこに垣間見えるプリンスiplは大腸菌などの単純な生物の細胞内プロセスに類似している場合が多いことが、改めて認識されてくることもある。本稿で扱おうとしている遺伝子発現の調節機構に関しても、筆者らは最近あらためてその感を強くしている。高等生物に固有な生命現象はともかくとして、遺伝子発現の調節機構といったすべての生物に共通な細胞内プロセスの分子機構を理解していくうえで、原核細胞は今後も一般的知見を得るための研究材料として格好のモデル系になると考えられる。また微生物そのものを理解していくことは、農芸化学の基礎分野の発展にとって欠かせないこともあらためて述べるまでもない。筆者

らは、このような2つの大きな観点に基づいて、大腸菌をはじめとするグラム陰性細菌の細胞表層の構造と機能に関する一連の研究を進めてきた。本稿においては、とくに外膜タンパク質の合成と調節に関して、遺伝子発現調節という側面にのみ焦点を絞って紹介したい。

I. 大腸菌細胞表層の分子構造⁽¹⁾

すべての生物の生命単位が一つの細胞であるように、大腸菌も典型的な細胞構造をとっている。しかし大腸菌は単細胞生物であり、高等生物にみられるような高度に分化した膜構造は持たない。したがって細胞表層に存在する膜構造には多くの機能が集中している。環境との応答、物質の細胞内外への透過、エネルギーの生産系、細胞分裂にかかわる諸機能などを大腸菌細胞表層は一挙に果たしている。大腸菌に代表されるようなグラム陰性細菌は、細胞表層構造体として、細胞質膜および外膜として区別される2つの異なった生体膜系を持っている。細胞質膜は高等生物におけるプラズマメンブランに相当するが、外膜はグラム陰性細菌に固有の膜構造である。外膜は直接外界と接する構造体なので、環境との応答などに関する重要な機能を果たしていることは容易に想像される。1970年代に入り細胞質膜と外膜を物理的に分離精製する方法が開発され、外膜に特徴的な構造や機能が明らかにされてきた(図1)。

細胞質膜には、エネルギー生産系、低分子物質の能動輸送系、多くの高分子合成系、タンパク質の膜透過機構などの諸機能が集中している。一方、外膜はそのような機能を持たない。細胞質膜と外膜の間にはペリプラズムと呼ばれる空間が形成されており、多くの可溶性タンパク質が存在している。細胞の形態を維持するための構造体として、ペプチドグリカン層も存在している。その外側に、最外層構造体としての外膜が存在している。外膜は基本的にはリン脂質二重層からなる典型的な生体膜構

† Osmoregulation of the Outer Membrane Proteins in *Escherichia coli*.

Takeshi MIZUNO (Laboratory of Microbiology, School of Agriculture, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464)

図1 大腸菌の細胞表面分子モデル
OM: 外膜, PM: ペリプラズム空間, CM: 細胞質膜, PG: ペプチドグリカン層, LPS: リポ多糖体, PL: リン脂質, LP: リポタンパク質, 文献(41)より引用した。

造をとっている。ただ、リポ多糖体 (LPS) と呼ばれる特殊な高分子を多く含んでいる点が特徴的である。外膜中に見出されるタンパク質の組成は比較的単純であり、特殊な条件下で外膜中に誘導合成されてくるいくつかのタンパク質を除けば、通常は OmpA, OmpC, OmpF および主要リポタンパク質と呼ばれる数種のタンパク質がそのほとんどを占める。後者を一般に外膜主要構成タンパク質と呼んでいる。その細胞当りの分子数は膨大であり、おのおのがリボソームタンパク質の 10 倍近く、すなわち 10 万分子のオーダーで存在している。本稿における話の中心になるのが、この OmpC, OmpF と呼ばれる外膜タンパク質である。

OmpC, OmpF はお互いに性質のよく似た分子量 37,000 近くのタンパク質であり、アミノ酸一次配列においても約 70% の相同性がある。OmpC, OmpF は細胞全体を覆うがごときに存在しており、安定な細胞構造を維持するうえで重要な働きをしている。しかし、それにも増して重要な生理的機能を果たしている。おのおのは、三量体を形成し外膜を貫通した存在様式をとっている。この三量体は中央に孔を形成しており、親水性の低分子物質 (分子量約 700 以下) を自由に通過させることができる。細胞にとって必須なアミノ酸や糖類などは、外膜という透過障壁があるにもかかわらず、OmpC,

図2 培地浸透圧に応答した外膜タンパク質 OmpC, OmpF の合成調節

OmpF によって形成された透過孔を通して細胞質膜にまで到達することができる。付け加えれば、T2 や T4 などのバクテリオファージの細胞感染にとって必須な受容体の一部を形成しているのも OmpC, OmpF である。

II. 培地浸透圧に応答した膜タンパク質の合成調節 (osmoregulation)^(2,3)

外膜は、前にも述べたように外界の環境変化に直接さらされる構造体である。そこで筆者らは以前、大腸菌の培養条件 (環境) をさまざまに変化させ、外膜タンパク質組成に及ぼす影響を観察した。そこで見出された興味ある現象の一つが、培地浸透圧が OmpC, OmpF 合成量に及ぼす影響であった。食塩や砂糖を添加して浸透圧を高めた培地で大腸菌を生育させ、浸透圧の低い培地で生育させた場合と比較して外膜タンパク質組成をみてもみると、OmpC, OmpF の合成量が顕著に変化する (図2)。高浸透圧条件下では OmpF はほとんど合成されず、OmpC のみが多量に合成される。逆に低浸透圧条件下では OmpC は合成されず、OmpF のみが合成される。さらに中程度の浸透圧では両タンパク質が同じくらいの量で合成されるという奇妙な現象であった。この OmpC, OmpF 合成量の相対的变化を引き起こす物質は、食塩や砂糖に限らず培地の浸透圧を高める物質ならなんでもよく、培地の物理的条件である浸透圧そのものが調節因子となっていると考えられる。このシーソーバランスのような巧妙な調節系を osmoregulation と呼ぶ。われわれは、浸透圧という物理的要因がタンパク質合成に影響を与えるという点や、OmpC, OmpF が膜タンパク質であり、転写、翻訳といった過程に加えて膜透過というプロセスを経て合成されるという点に着目した。膜タンパク質の遺伝子発現調節機構や膜透過の分子機構を解析するうえで、osmoregulation は格好の研究対象となると考え、分子生物学的アプローチを開始した。

III. Osmoregulation の遺伝学的解析⁽⁴⁻⁶⁾

OmpC, OmpF 合成調節系の解析のために、まず遺伝

学的手法がとられた(図3). *OmpC*, *OmpF* の合成調節が変化した多くの変異株が分離され, *OmpC*, *OmpF* の構造遺伝子 (*ompC*, *ompF*) が同定された. *ompC*, *ompF* 各遺伝子は大腸菌染色体地区上全く別の場所に存在し, *ompC* は 47 分に, *ompF* は 21 分に位置する. *OmpC*, *OmpF* は非常に性質の似たタンパク質であるが, 別々の遺伝子から合成されることが明らかとなった. *OmpC*, *OmpF* の合成に影響を与える *ompC*, *ompF* 構造遺伝子以外の変異も数多く分離された. そのなかで osmoregulation に直接関与すると考えられる遺伝子が染色体地区上 75 分近傍に見出され, *ompR*, *envZ* という2つのシストロンが遺伝学的に同定された. また同じく遺伝学的解析から, *ompC*, *ompF* 遺伝子の発現は培地浸透圧に应答して, 主に転写のレベルで調節されていることが明らかになり, *ompR*, *envZ* 両遺伝子はこの転写レベルでの調節に直接関与していることも示唆された. そこで *ompR*, *envZ* という調節遺伝子の働きを明らかにするために, 両遺伝子のクローン化がなされた. 両遺伝子はきわめて隣接して存在することが予想されたが, 事実約 8-kb の DNA 断片上に *ompR*, *envZ* 遺伝子ともにクローン化された. DNA 上での遺伝子の位置を決めた後, 全塩基配列が決定された. *ompR* 遺伝子は分子量約 27,000 の, *envZ* 遺伝子は分子量約 50,000 のタンパク質をコードしていることが塩基配列より推定され, 両遺伝子は一つの転写単位, すなわちオペロンを形成していることも明らかになった. DNA の塩基配列から予想された *ompR*, *envZ* 遺伝子産物は, クローン DNA を利用して生化学的にも同定された. *OmpR* は可溶性のタンパク質であるが, *EnvZ* はそのアミノ酸一次配列から膜タンパク質であると予想された.

図3 Osmoregulation に関する遺伝子

ompR, *envZ* 遺伝子がクローン化されたので, いわゆる reverse-genetics が可能になり, これら遺伝子の染色体上での欠失変異株が作成された. *ompR* 遺伝子が欠失すると *OmpC*, *OmpF* 共に全く合成されなくなり, *OmpR* タンパク質は *ompC*, *ompF* 両遺伝子の活性化に必須であることがわかった. 一方, *envZ* 遺伝子が欠失すると *OmpC* はほとんど合成されず, *OmpF* の合成量は低下して浸透圧の影響を受けなくなった. このことから, *OmpR* は *ompC*, *ompF* 両遺伝子の活性化タンパク質, *EnvZ* は浸透圧に应答した調節に関与する一種のモジュレータータンパク質であると推定された.

IV. *ompC*, *ompF* 遺伝子の単離と構造解析^(7,8)

ompC, *ompF* 遺伝子がクローン化され, その塩基配列が決定された. *OmpC* は 346 個の, *OmpF* は 340 個のアミノ酸からなるペプチドであることが塩基配列より推定され, その N-末端アミノ酸配列は精製タンパク質より以前に決定されていたものと一致した. 同時にその塩基配列から推定された興味あることは, 両タンパク質共にその N-末端に二十数個のアミノ酸からなる成熟ペプチドにはみられない余分の配列を持ったかたちで合成されるという点である. この余分なアミノ酸配列は, タンパク質の膜透過に必須な役割を担っている, いわゆるシグナル配列であると考えられた. 現在では数多くの分泌タンパク質のシグナル配列が見つかってきているが, これら2つは原核細胞系では最も初期に決定されたシグナル配列の例である. 決定された *ompC*, *ompF* 両遺伝子の塩基配列を比較してみると, タンパク質をコードしている領域内では 70% という高い相同性が認められ, したがってアミノ酸一次配列のうえでも *OmpC*, *OmpF* はよく似ている. 一方, 転写の開始点や終止点付近の調節領域には, 一見これとわかる高い相同性は認められなかった. *ompC*, *ompF* 両遺伝子は共通の祖先遺伝子から由来し, 進化の過程で染色体上全く別の場所に位置し, 多くの塩基置換, 欠失, 挿入が起きたものと考えられる. 加えて, それらの調節領域の DNA には大幅な変化が生じて, 現在のように培地浸透圧により全く逆の発現調節を受けるようになったものと考えられる. いずれにしろ, *ompC*, *ompF* 遺伝子のクローニングとその構造解析から, osmoregulation における特異的な発現調節には転写の開始点を含む DNA 領域の違いが重要であることが示唆された. また遺伝子 DNA が手に入

ったので、組換え DNA 技術を駆使した分子レベルでのアプローチが可能となった。

V. *ompC*, *ompF* のプロモーター構造と 発現調節⁽⁹⁻¹¹⁾

いままでの解析から、osmoregulation が転写レベルの調節であること、OmpR タンパク質がその転写を調節している因子であることが明らかになった。そこで分子レベルでの詳細なメカニズムを知るためには、まず調節される側の遺伝子である *ompC*, *ompF* の構造を、とくに転写の開始に重要なプロモーター領域に着目して解析する必要があると判断した(図4)。*ompC*-mRNA, *ompF*-mRNA の転写開始点を決定したところ、一般的な大腸菌遺伝子と比較して、その転写開始点は AUG 翻訳開始コドンのかかなり上流にあり長い非翻訳領域を持つことがわかった。転写開始点の上流には、細菌遺伝子のプロモーター構造に特徴的な -35 領域、-10 領域がコンセンサス配列との相同性はかなり低いと認められた。*ompC*, *ompF* プロモーター領域の DNA をさまざまな長さ欠失させることにより、活性のあるプロモーター構造としての最小領域を決定した。その結果、*ompC*, *ompF* プロモーター共に、通常のプロモーターの最小単位である -35, -10 領域のみでは十分なプロモーター活性を持たず、さらにその上流の塩基配列(60~70 塩基対)が必須であることが明らかになった。この領域は、プロモーターの活性化に必須な cis-acting な機能を担っていると考えられた。おそらくは trans-acting な因子である OmpR タンパク質の作用する部位であると推定した。

このようにして見出されたプロモーター上流の遺伝子活性化領域の機能を知るために、この領域を含む *ompF* プロモーター DNA をプラスミド上でテトラサイクリン遺伝子に融合した。この融合遺伝子は予想されたように OmpR 依存性であり、*ompR* 1 変異株中では発現せず、したがって菌はテトラサイクリン感受性となった。このような菌からプラスミド上の変異によりテトラサイクリン耐性になったものをスクリーニングした。変異 *ompF* プロモーターの塩基配列を決定したところ、すべ

ての変異は *ompF* プロモーターの -10 領域の塩基配列 AAAGAT が TAAGAT となり、最初の塩基 A が T に置換していた。この変異は -10 領域のコンセンサス配列 TATAAT を考えると、その意味が容易に理解できる。すなわち分離した OmpR 非依存性のプロモーター変異は、その -10 領域の塩基配列がコンセンサス配列に近いものとして解釈できる。さらに重要な点は、このような変異が起きると *ompF* の発現が OmpR 非依存性になるのみでなく、-35 領域上流の cis-acting な活性化領域も必要なくなってしまう点である。すなわちこの変異プロモーターでは、上流の DNA を欠失させても十分なプロモーター活性が認められた。以上のことから、筆者らは次のように結論した。*ompF* のプロモーター領域は、その塩基配列がコンセンサス配列とはかなりかけ離れており、そのままでは RNA ポリメラーゼによる転写の開始が起こらない、しかしその上流に cis-acting な遺伝子活性化領域を持ち、そこに活性化因子(OmpR)が作用することにより初めて遺伝子が活性化される。*ompC* プロモーターの -10 領域の塩基配列を site-directed mutagenesis で変異させるという実験によっても同様の結論が得られた。

VI. 遺伝子活性化タンパク質: OmpR⁽¹²⁻¹⁵⁾

OmpR はプロモーターに作用する trans-acting な遺伝子活性化タンパク質であることが明らかになってきた(図4)。実は、原核細胞系においてもラクトースリプレッサーに代表されるような負の調節系に関しては分子生物学的研究の蓄積が数多くあるが、正の調節系の分子機構の解析は cAMP-CRP 系を除いてはあまり進んでいないのが現状である。一方、真核細胞系における多くの遺伝子発現調節系において、遺伝子の特異的活性化が重要な側面をなしていることが認識され始めてきており、いくつかの trans-acting なタンパク質の存在が想定されたり、実際に単離されたりし始めている。このような背景を考えると、OmpR による浸透圧に応答した特異的遺伝子の活性化機構の解析は、かつてラクトースリプレッサーの系が果たしたような原核細胞におけるよいモデル系になると考えられる。また最近、OmpR タンパク質の一般的重要性を示唆する興味深い事実が明らかになってきた。われわれが遺伝子発現調節因子としての OmpR のアミノ酸配列を DNA の塩基配列から推定して報告した後、OmpR とアミノ酸配列のよく似たタンパク

図4 *ompC*, *ompF* のプロモーター構造

質が続々と見つかってきた。それも大腸菌に限らず各種のバクテリアから見つかったのみでなく、一見何の類似性もない細胞内プロセスに関与しているタンパク質として見出されてきた。たとえば、*Klebsiella pneumoniae* の窒素固定に関与する NtrC, *Agrobacterium tumefaciens* における Ti-プラスミド DNA の植物への移行に関与する VirG, *Bacillus subtilis* の孢子形成に関与する SpoOA, 大腸菌においても、F-因子の移行に関与する SfrA, 細胞の運動性に関与する CheY などのタンパク質のアミノ酸配列の一部が OmpR と高い相同性を示す。おまけに OmpR が EnvZ とペアで機能していると同じように、上記の各タンパク質にもペアで働くタンパク質の存在が知られており、それらはなんと EnvZ のアミノ酸配列と高い相同性を示すことが明らかになってきた。加えてこれらのタンパク質の多くは、なんらかのかたちで遺伝子発現の調節に関与していることもわかっている。この意味でも、OmpR-EnvZ 系の解析からより一般的な知見が得られることが期待される。

このような観点も含め OmpR に関する詳細な解析を行った。われわれは異なった表現系を示す各種の *ompR* 変異株を分離し、それらをすべてクローン化しその変異点(置換アミノ酸)を決定した。これらの変異 *ompR* 遺伝子間での機能的相補テストを行うことにより、OmpR 分子内には明らかに異なる機能ドメインが存在することが示唆された。考えられる機能ドメインとして、一つは DNA との結合部位であり、もう一つは浸透圧に依存したプロモーター特異性変化に関与しているドメイン(モジュレータードメイン)から成り立っていると推定している。

ここまでは OmpR が遺伝子活性化タンパク質であり *ompC*, *ompF* プロモーターの上流に特異的に結合すると推定して話を進めてきた。次いでこのことを証明するために OmpR の精製を行った。クローン化 DNA を利用することにより、少量の培養菌体(1 l)より数 mg の単位で OmpR を精製する系を確立した。精製した OmpR のアミノ酸組成、N-末端の一部アミノ酸配列は、DNA の塩基配列より推定されたものと一致した。このようにして精製された OmpR は、*ompC*, *ompF* のプロモーターを含む DNA 断片に特異的に結合することがゲル電気泳動法により証明された。しかも各種の長さの DNA 断片を用いた解析から、OmpR の結合部位は *ompC*, *ompF* プロモーター上流の DNA 領域であるこ

とが明らかになった。この領域は、先に遺伝学的解析から推定されていた部位とよく一致した。次いで、一般的手法として用いられている DNase I によるフットプリント法によって OmpR 結合部位の塩基配列も同定された。*ompC*, *ompF* 各プロモーター上流の OmpR 結合領域の塩基配列にはある程度の相同性が認められたが、この相同性が OmpR の特異的 DNA 認識に直接関与しているか否かは議論の余地があると思われる。いずれにしろ、精製した OmpR の *ompC*, *ompF* プロモーター DNA への結合能にはほとんど違いがなかった。他の因子(EnvZ?)の働きによって OmpR のプロモーター特異性が変化させられていると考えるのが妥当と思われる。*ompR* が特異的 DNA 結合タンパク質であることが明らかになり、また容易にかつ多量に精製できることから、DNA との結合様式を物理化学的に解析しようとするアプローチも取られ始めている。

VII. *ompC* プロモーターの活性化と DNA の立体構造⁽¹⁰⁾

ompC, *ompF* プロモーター上流の OmpR 結合部位と RNA ポリメラーゼ結合部位である -35 領域、-10 領域との構造的および機能的関係はどのようになっているのだろうか。最近、タンパク質による DNA の特異的認識や DNA 上でのタンパク質-タンパク質間の相互作用において、DNA の立体構造、立体配位の重要性が着目され始めている。OmpR の DNA 認識機構、プロモーターの活性化機構を DNA のトポロジーとの関係から理解しようと試みた。まず *ompC* プロモーターを、RNA ポリメラーゼ結合ドメイン(-35, -10 領域)とその上流の OmpR 結合ドメインの2つの機能単位に分離できると想定した(図5)。そこで-35 領域とその上流領域の間にいろいろな長さのリンカーを挿入することにより、両者の距離を変化させてプロモーター機能に及ぼす影響をみた。もちろん *ompC* プロモーター活性は *lacZ* 遺伝子の発現で定量化できるようにしてある。7塩基対のリンカーを挿入しただけでプロモーター活性は極端に低下した。しかし驚くべきことに11塩基の挿入では活性は維持されていた。いろいろな長さの塩基を挿入したところ、挿入した塩基の長さでプロモーター活性の維持(回復)の間には明らかな関係が認められた。11, 21, 31塩基(DNA ヘリックスの1ターンの倍数)を挿入したときのみ、周期的に活性の回復がみられた。さらに大切

図5 *ompC* プロモーターにおける OmpR 結合領域と RNA ポリメラーゼ結合領域の立体的配位の重要性を示すモデル

な事実は、回復した *ompC* プロモーター活性は依然として OmpR に依存したものであった。これら塩基挿入変異によるプロモーター活性の変化は、mRNA の量を直接定量することによっても確かめられた。また塩基挿入後も、転写の開始点は元と同じであることも確認された。同じく OmpR の結合部位にも変化がないこと、すなわち OmpR は塩基挿入に伴い -35 領域から相対的に遠い位置に結合していることがフットプリント法により確かめられた。これらの結果は OmpR の結合によるプロモーターの活性化には、OmpR 結合部位と RNA ポリメラーゼの結合部位との間における特定の立体的配位が重要であることを示している。それが維持されれば距離はある程度変化してもかまわないと考えられる。最近われわれの結果と類似した報告が、SV 40 のプロモーター領域における sp1 結合領域 (GC box) と TATA box との関係において同じような報告がなされた。これらを考え合わせると、trans-acting な因子による遺伝子活性化機構において、DNA 上での特定の立体配位を維持したタンパク質-タンパク質間の機能的相互作用が重要な意味を持っていると考えられる。この意味でも OmpR は興味深い遺伝子活性化因子である。

VIII. *ompF* プロモーターにおける DNA の折れ曲がり構造⁽¹⁷⁾

DNA 構造におけるスーパーヘリシティなどのグロー

バルなトポロジーに加えて、Z 型 DNA や Bent (折れ曲がり) DNA などのマイクロな DNA 高次構造の多様性が、遺伝子の機能調節などの観点から注目されつつある。われわれは最近、*ompF* プロモーター上流の OmpR 結合領域が通常の B-型 DNA とは異なり、折れ曲がり構造をとっていることを明らかにした。通常の B-型 DNA は数十塩基からなる比較的短い領域内では、ほぼまっすぐな棒状構造と考えてよい。しかし最近、ある特殊な塩基配列からなる DNA はその軸がカーブしていること、すなわち DNA が折れ曲がっていることが知られるようになってきた。これは DNA へのタンパク質の結合などによって引き起こされる折れ曲がりとは区別して、DNA それ自体が折れ曲がっているという意味で static-bend と呼ばれている。トリパノゾームに見出されるキネトプラスト DNA がその最初の例として報告されている。最近では、 λ ファージの複製起点、SV 40 の T-抗原結合部位、酵母の染色体複製起点と考えられる ARS 配列など、機能的に重要な DNA 領域に折れ曲がり DNA が見出され注目されつつある。どのような塩基配列を持っているときに、どのような構造的機構で DNA が折れ曲がるのかは、現在議論の最中で確かな結論は得られていないので詳しい説明は省略するが、ある塩基配列 (A のクラスター) 内では各塩基対が B-型構造の場合とは異なった構造をとっており (tilt, roll と呼ばれ、塩基対が少し傾いている)、DNA ヘリックス軸に歪みを与えていると考えられている。いずれにしろ、折れ曲がり DNA 構造はタンパク質と DNA の相互作用などにおいて、塩基の一次配列と同様に重要な意味を持つことが予想される。折れ曲がり構造を持った DNA 断片はポリアクリルアミド電気泳動において異常にゆっくりとした泳動度を示すことが知られている。たとえば、200 塩基対からなることがわかっている DNA 断片が折れ曲がり構造を持っていることにより 300 塩基対と思われる泳動度を示したりする。

われわれは、精製 OmpR の *ompF* プロモーター DNA 断片への結合能を解析している過程で、*ompF* プロモーターを含む DNA 断片が異常な電気泳動度を示すことに気付いた (図6)。そこで認められた低温におけるゆっくりとした泳動度と、高温におけるその回復は、折れ曲がり DNA の特徴的な性質であることから、*ompF* プロモーターを含む 500 塩基対からなる DNA 断片内のどこかが折れ曲がり構造をとっていると考え

図 6 *ompF* プロモーター上流領域にみられる Bent DNA 構造

た。さらに詳しく解析することにより、折れ曲がり構造は *ompF* プロモーターの上流それも OmpR 結合領域内にあることが明らかとなった。その塩基配列の特徴を見ると、約 40 塩基からなる配列内に T 塩基のクラスターが存在し、しかもその T 塩基のクラスターは 21 塩基の間隔を隔てて規則的に並んでいた。また塩基挿入変異によりこの規則性を破壊すると折れ曲がり構造も消失することもあった。このような塩基配列上の特徴は、今まで報告されている折れ曲がり DNA のそれとよく似ていた。以上のことからわれわれは、*ompF* プロモーターの上流領域は特殊な折れ曲がり構造をとっていると結論した。OmpR の DNA 認識機構あるいはプロモーター活性化機構と DNA の折れ曲がり構造が直接関係しているという証拠は今のところ得られていないが、遺伝子活性化タンパク質の結合部位における DNA 折れ曲がり構造が示された最初の例である。現在、OmpR による *ompF* プロモーターの活性化や調節と直接関係があるのではないかと考え検討を加えている。

IX. アンチセンス RNA と osmoregulation⁽¹⁸⁻²²⁾

原核細胞、真核細胞を問わず、遺伝子発現の調節には多くの調節因子が関与している。それらは、リプレッサー、アクチベーターといった概念で表される。一見複雑な遺伝子発現調節も、これらの因子による遺伝子の ON-OFF という単純なパターンの組合せで達成されているといっても過言ではないかもしれない。過去においてもまた現在においても、調節因子という機能分担は主にタンパク質に求められている。しかしわれわれは、osmoregulation の分子機構の解析の過程で、RNA 分子が遺伝子発現調節におけるリプレッサーとして機能しているという新しい機構の存在を明らかにしてきた。このリプレッサー RNA の特徴は、標的となる RNA に対して相補的塩基配列を有している点にある。リプレッサー

図 7 Osmoregulation とアンチセンス RNA

RNA と標的 RNA 間の高い特異性は、RNA-RNA 間の塩基対形成によって保障される。その結果として、この RNA は標的 RNA の機能を特異的に阻害する。標的 RNA が mRNA ならば、mRNA からの翻訳の過程が阻害されることが予想される。これが osmoregulation の解析の過程で発見され、現在では一般にアンチセンス RNA と呼ばれるようになった RNA の新しい機能に関する概念である。

ompC プロモーター上流の DNA 構造を解析している過程で、プロモーターの上流領域由来の約 300 塩基対からなる DNA 断片を多コピープラスミドにクローン化して大腸菌に導入してやると、浸透圧のいかにかわらず OmpF の合成が完全に抑えられてしまうことに気付いた。この小さな DNA 断片の塩基配列をいろいろ検討しても、リプレッサー様のタンパク質をコードできると思われる配列はなく、この現象の解釈は難しかった。しかしあるとき、その塩基配列が *ompF*-mRNA の 5'-末端ときわめて高い相同性を示すことに気が付いた。そこでこの断片からの転写産物を調べてみると小さな RNA がつくられていることがわかった。その転写の方向を決定したところ、この RNA は *ompF*-mRNA と相補的な塩基配列を持つような方向に転写されていることがわかった。*ompF*-mRNA との相補的配列内には、翻訳の開始に必須なリボソーム結合部位、AUG 開始コドンが含まれていた。そこでわれわれは、この小さな RNA は相補的塩基配列により *ompF*-mRNA とハイブリッドを形成し、mRNA の翻訳に重要な領域を物理的に覆ってしまうことにより、結果的に OmpF タンパク質合成のリプレッサーとして機能するというモデルを提唱した(図 7)。この RNA を作る遺伝子を *micF* (mRNA interfering complementary RNA) と名付けた。さらに興味あることに、*micF* 遺伝子は *ompC* プロモーターのす

ぐ上流にあり, *ompC* 遺伝子とは逆の方向に転写され, しかもその発現は *ompC* と同様に高浸透圧条件化で OmpR により促進されることが示された. OmpC の合成が促進される条件下では OmpF の合成が抑制されるという osmoregulation の基本的特徴を考えると, *micF*-RNA の働きはきわめて合理的な意味を持っていることが理解できる.

筆者らのアンチセンス RNA の発見とあい前後して, 大腸菌の他の系においてもアンチセンス RNA が働いている例がいくつか報告されてきている. 現在アンチセンス RNA は以下に述べるようないくつかの理由から注目を集めている. 第一点として, 複雑な遺伝子発現系において, その調節機構を考えるうえでアンチセンス RNA という新しい機能を持った因子の関与を考慮するという視点が導入された. 現在までに主にバクテリアの系で, いくつかの遺伝子発現調節系やプラスミドの複製調節, トランスポゾンの転移調節などの諸過程にアンチセンス RNA が関与していることが証明されたり, 示唆されたりしている. 高等生物系ではアンチセンス RNA の存在が証明された例はないが, 高等生物の細胞内には機能不明の RNA が多種存在していることが知られており, 今後高等生物においてもアンチセンス RNA が見つかる可能性もある. 第二点として, 人工アンチセンス RNA による人為的遺伝子発現調節への可能性が開けた. 現在の組換え DNA 技術をもってすれば, 任意の標的 RNA に対する人工アンチセンス RNA を作成することは原理的には容易である. 人工アンチセンス RNA をなんらかの方法で細胞内に導入してやれば, 任意の遺伝子の発現を負に調節できる可能性がある. 事実, 大腸菌あるいは高等生物においても人工アンチセンス RNA を利用した実験の成功例が数多く報告されてきている.

おわりに

以上概観してきたように, 一見なんの変哲もない大腸菌の細胞表層の構造と機能の解析をするという目的に端を発した研究から, 遺伝子発現の調節機構という普遍的な細胞内プロセスに関する多くの新しい知見を得ることができたと自負している. しかし, まだ未解決の興味深い問題点も多く残されており, さらに多方面からの有機的な研究を発展させることができればと願っている.

なおこの拙文は, 農芸化学会奨励賞の受賞の対象となった〔グラム陰性細菌外膜の構造, 機能及び生合成に関

する研究〕の一部を紹介したものである. 上記の研究の一環として行ってきた〔外膜タンパク質の構造と機能〕⁽²³⁻²⁶⁾, 〔新しい外膜リポタンパク質の発見とその構造解析〕⁽²⁷⁻³¹⁾, 〔緑膿菌外膜の分離とその解析〕⁽³²⁻³⁴⁾, 〔外膜タンパク質と膜透過〕⁽³⁵⁻³⁷⁾, 〔膜構造とリボソームの相互作用〕⁽³⁸⁻⁴⁰⁾ などの研究の紹介は紙面の都合上, 割愛させていただきました. また, 参考文献も極力筆者らのもののみに限定したことをおことわりいたします.

本研究の多くは名古屋大学農学部発酵化学研究室で行われたものであり, 終始御指導, 御鞭撻いただいた水鳥昭二教授に深く感謝いたします. また研究に御協力いただいた多くの協同研究者の方々に厚くお礼申し上げます. また研究の一部は, 三菱化成生命科学研究所, ニューヨーク州立大学生化学部門で行われたものであり, 御指導いただいた景山真博士, 井上正順教授に深く感謝いたします.

- (1) 水野 猛, 井上正順: 蛋白質 核酸 酵素, **27**, 1907 (1982).
- (2) 井ノ口 馨, 水野 猛: 化学と生物, **23**, 181 (1985).
- (3) H. Kawaji, T. Mizuno and S. Mizushima: *J. Bacteriol.*, **140**, 834 (1979).
- (4) T. Mizuno, E. T. Wurtzel and M. Inouye: *J. Bacteriol.*, **150**, 1462 (1982).
- (5) T. Mizuno, E. T. Wurtzel and M. Inouye: *J. Biol. Chem.*, **257**, 13692 (1982).
- (6) T. Mizuno and S. Mizushima: *J. Biochem.*, **101**, 387 (1987).
- (7) T. Mizuno, M. Chou and M. Inouye: *FEBS Lett.*, **151**, 159 (1983).
- (8) T. Mizuno, M. Chou and M. Inouye: *J. Biol. Chem.*, **258**, 6932 (1983).
- (9) T. Mizuno and S. Mizushima: *J. Bacteriol.*, **168**, 86 (1986).
- (10) T. Dai, K. Inokuchi, T. Mizuno and S. Mizushima: *J. Mol. Biol.*, **184**, 1 (1985).
- (11) Y. Ozawa, T. Mizuno and S. Mizushima: *J. Bacteriol.*, **169**, 1331 (1987).
- (12) F. Nara, S. Matsuyama, T. Mizuno and S. Mizushima: *Mol. Gen. Genet.*, **202**, 194 (1986).
- (13) F. Nara, T. Mizuno and S. Mizushima: *Mol. Gen. Genet.*, **205**, 51 (1986).
- (14) S. Matsuyama, T. Mizuno and S. Mizushima: *J. Bacteriol.*, **168**, 1309 (1986).
- (15) Y.-L. Jo, F. Nara, S. Ichihara, T. Mizuno and S. Mizushima: *J. Biol. Chem.*, **261**, 15252 (1986).

- (16) 前田純夫, 水野 猛, 水島昭二: 日本農芸化学会昭和 62 年度大会講演要旨集, 1987, p.47.
- (17) T. Mizuno: *Gene*, **54**, 57 (1987).
- (18) T. Mizuno, M. Chou and M. Inouye: *Proc. Jpn. Acad.*, **59**, 335 (1983).
- (19) T. Mizuno, M. Chou and M. Inouye: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 1966 (1984).
- (20) 水野 猛: 蛋白質 核酸 酵素, **29**, 908(1984).
- (21) 水野 猛: 生化学, **56**, 113 (1984).
- (22) H. Aiba, S. Matsuyama, T. Mizuno and S. Mizushima: *J. Bacteriol.*, **169**, 3007(1987).
- (23) T. Nogami, T. Mizuno and S. Mizushima: *J. Bacteriol.*, **164**, 797 (1985).
- (24) D-S. Choi, H. Yamada, T. Mizuno and S. Mizushima: *J. Biol. Chem.*, **261**, 8953 (1986).
- (25) T. Mizuno, H. Kasai and S. Mizushima: *Mol. Gen. Genet.*, **207**, 217 (1987).
- (26) H. Yamada, N. Ohshima, T. Mizuno, H. Matsui, Y. Kai, N. Noguchi and S. Mizushima: *J. Biochem.*, in press (1987).
- (27) T. Mizuno: *J. Biochem.*, **86**, 991 (1979).
- (28) T. Mizuno: *J. Biochem.*, **89**, 1039 (1981).
- (29) T. Mizuno: *J. Biochem.*, **89**, 1051 (1981).
- (30) T. Mizuno: *J. Biochem.*, **89**, 1059 (1981).
- (31) T. Mizuno, R. Kagiya and M. Kageyama: *J. Biochem.*, **91**, 19 (1982).
- (32) T. Mizuno and M. Kageyama: *J. Biochem.*, **84**, 179 (1978).
- (33) T. Mizuno and M. Kageyama: *J. Biochem.*, **85**, 115 (1979).
- (34) T. Mizuno and M. Kageyama: *J. Biochem.*, **86**, 979 (1979).
- (35) M. Itoh, H. Aiba, K. Inokuchi, T. Mizuno, K. Nagahari, K. Munakata and S. Mizushima: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1295 (1986).
- (36) 水野 猛: 化学と工業, **33**, 574 (1980).
- (37) 水野 猛, 水島昭二: 生物物理, **27**, 22(1987).
- (38) T. Mizuno, H. Yamada and S. Mizushima: *J. Bacteriol.*, **125**, 524 (1976).
- (39) T. Mizuno, H. Yamagata and S. Mizushima: *J. Bacteriol.*, **129**, 326 (1977).
- (40) M. Dombou, T. Mizuno and S. Mizushima: *Mol. Gen. Genet.*, **155**, 53 (1977).
- (41) 松山伸一, 水島昭二: 細胞工学, **4**, 1150 (1985).