

氏 名 草 野 秀 一

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大甲第 2 1 2 号

学位授与の日付 平成 8 年 3 月 2 1 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第 4 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目 Comparison of the Promoter Selectivity between
Two Sigma Factors, σ and σ of Escherichia
coli RNA Polymerase

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 堀 内 賢 介

教 授 廣 瀬 進

助教授 嶋 本 伸 雄

教 授 高 橋 秀 夫（東京大学）

教 授 吉 川 寛

（奈良先端技術大学院）

論文内容の要旨

RNA polymerase core enzyme with the subunit structure of $\alpha_2\beta\beta'$ (E) is functionally differentiated into different forms of holoenzyme by interaction with one of multiple molecular species of σ subunit, the promoter recognition subunit. Up to now, six species of σ subunit have been identified in *Escherichia coli*. In order to understand the switching mechanism(s) of transcription by σ replacement in response to changes in growth conditions, such as those during growth phase change or under various stress responses, I compared the functional specificity between two sigma factors, σ^{70} (the major σ at exponentially growing phase) and σ^{38} (the essential σ at stationary growth phase).

At first, I compared the core enzyme-binding affinity and the promoter-binding activity between two σ subunits by gel filtration column chromatography or by titration of the concentration of σ required for the maximum transcription in the presence of a fixed amount of core enzyme. The core enzyme-binding affinity of σ^{38} was found to be less than half the level of σ^{70} . In addition, the holoenzyme concentration required for the maximum transcription of a fixed amount of templates was higher for $E\sigma^{38}$ than for $E\sigma^{70}$. Because the intracellular concentration of σ^{38} is not higher than that of σ^{70} even after prolonged starvation in the stationary phase, these results suggest that the selective transcription of stationary-specific genes by $E\sigma^{38}$ holoenzyme may require either a specific reaction condition(s) or a specific factor(s) which enhances either σ^{38} binding to core enzyme or $E\sigma^{38}$ binding to promoters.

Next, I carried out a systematic analysis of the effect of cellular factors, which vary depending on the cell growth conditions, including salt species, salt concentration, trehalose concentration, and DNA superhelicity, on the promoter recognition by $E\sigma^{70}$ and $E\sigma^{38}$ holoenzymes. The effects of potassium acetate and potassium glutamate, the natural solutes which accumulate in *E. coli* in response to the increased extracellular osmolarity, were examined in *in vitro* transcription directed by osmo-regulated promoters (*osmB* and *osmY*). The *osmB* and *osmY* transcription level increased gradually up to 300 to 400 mM of potassium glutamate but only when they were transcribed by $E\sigma^{38}$. In contrast, transcription at these promoters by $E\sigma^{70}$ decreased with increase in potassium

glutamate concentration, indicating that $E\sigma^{38}$ RNA polymerase itself monitors the intracellular salt concentration and changes its promoter recognition properties.

In the stationary growth-phase and under high osmolarity stress conditions, the intracellular concentration of trehalose increases. I then examined the effect of trehalose concentration on *in vitro* transcription by $E\sigma^{70}$ and $E\sigma^{38}$ holoenzymes. The optimum trehalose concentration for maximum transcription by $E\sigma^{38}$ was high, *i.e.*, around 0.7 to 1.2 M. In contrast, the optimum trehalose concentration for maximum transcription by $E\sigma^{70}$ was lower, *i.e.*, around 0.5 to 0.7 M. This enhancement of $E\sigma^{38}$ activity by high concentrations of trehalose was found to be due to the stimulation or stabilization of $E\sigma^{38}$ holoenzyme formation.

The superhelicity of chromosomal DNA in bacterial cells decreases in the stationary growth-phase and/or under the nutrient starvation conditions. I then examined the effect of DNA superhelicity on *in vitro* transcription by $E\sigma^{70}$ and $E\sigma^{38}$ holoenzymes. The optimum superhelical density for maximum transcription by $E\sigma^{38}$ was low, *i.e.*, around 0 to -0.03, whereas, $E\sigma^{70}$ required high levels of the DNA superhelicity. Moreover, the optimum superhelical density for maximum transcription *in vitro* by $E\sigma^{38}$ was almost same as that of plasmids prepared from stationary-phase *E. coli* cells. The enhancing effects of high potassium glutamate concentration and low DNA superhelicity, and of high trehalose concentration and low DNA superhelicity on transcription by $E\sigma^{38}$ were additive, but those of potassium glutamate and trehalose were not additive.

Taken all these results together, I propose the switching mechanism of RNA polymerase specificities as follows: i) transcription by $E\sigma^{38}$ is specifically enhanced under high concentrations of potassium glutamate or high concentrations of trehalose; ii) the low superhelicity of chromosomal DNA provides templates suitable for $E\sigma^{38}$. These specific conditions that enhance $E\sigma^{38}$ activities are in good agreement with the intracellular situation in *E. coli* cells growing under high osmolarity or starved conditions.

転写酵素 RNA ポリメラーゼは、コア酵素 (E) に結合する σ (シグマ) 因子の種類によって増殖条件の変化に応じたプロモーター選択を行っている。本研究ではこの機構を解明する目的で、対数増殖期の主要 σ である σ^{70} と増殖停止期に不可欠になる σ^{38} の機能特異性を *in vitro* で比較検討した。先ずコア酵素への結合親和性と、いくつかのプロモーターへの結合活性を測定した結果、いずれも σ^{38} の方が σ^{70} よりも弱いことが解った。 σ^{38} の細胞内濃度は増殖停止期においても σ^{70} より低いので、停止期特異的遺伝子の $E\sigma^{38}$ による転写には何らかの細胞内因子が関与していると考えられた。そこで、増殖条件によって変動するいくつかの細胞内因子について、 $E\sigma^{70}$ 及び $E\sigma^{38}$ の転写活性に対する影響を調べ、次の結果を得た。1) 高浸透圧条件下で発現するプロモーターからの *in vitro* の転写に対して、高浸透圧下で菌体内に蓄積することが知られているグルタミン酸カリの影響を調べた結果、 $E\sigma^{38}$ による場合には著しく促進されるが、 $E\sigma^{70}$ による場合には逆に阻害された。2) 増殖停止期及び高浸透圧下で菌体内にトレハロースが蓄積するが、*in vitro* の転写におけるトレハロースの至適濃度を測定した結果、 $E\sigma^{38}$ では極めて高いのに対し $E\sigma^{70}$ ではより低いことが解った。また、トレハロースによる $E\sigma^{38}$ 活性の促進は、 σ^{38} の E への結合の促進または安定化によることが示された。3) 増殖停止期においては菌体内 DNA の負超螺旋度が減少するが、*in vitro* の転写における至適負超螺旋度は、 $E\sigma^{38}$ では $E\sigma^{70}$ の場合よりはるかに低かった。4) グルタミン酸カリと負超螺旋度の影響も、トレハロースと負超螺旋度の影響も、それぞれ付加的であったが、グルタミン酸カリとトレハロースの影響は付加的でなかった。これらの結果から、 $E\sigma^{38}$ 型への転写特異性の転換に、グルタミン酸カリやトレハロースの濃度、および DNA の負超螺旋度の変化が直接関与していることが結論された。環境条件の変動に伴って、異なる σ 因子に依存した転写パターンへの転換を行うことは、細胞の最も基本的な機能であるが、この論文はその機構の解明に向けての重要な一步を印したものと見える。よって博士論文としての条件を十分に満たすものと認めた。