

# バチルス属と大腸菌のプロモーター配列の解析

——大腸菌内で機能する強力に制御可能なプロモーターの構築——

久保 幹  
山田 正幸  
三宅 俊男  
竹本 久雄

## Promoter Sequence Analysis in *Bacillus* and *Escherichia*; Construction of Strong and Controllable Promoters in *E. coli*

Motoki KUBO

Masayuki YAMADA

Toshio MIYAKE

Hisao TAKEMOTO

Many derivatives of the *nprM* promoter from *Bacillus stearothermophilus* and the strong early promoter *A3* from coliphage T3 were designed and chemically synthesized. These promoters consisted of some or all of the AT box, consensus sequence, *tac* promoter sequence, spacer, and *lac* operator. The promoter activities were assessed by their ability to express the *cat* gene in *Escherichia coli*. One of the derivatives of the *A3* promoter, which contained the *lac* operator, was much stronger (about 3.5 times) than the *tac* promoter. This promoter was correctly induced by IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside). The promoter activities in *E. coli* were considerably modified by the substitutions in the -43 (AT box) and -35 regions.

### 1. 緒 言

プロモーター配列は、遺伝子発現のために必須の領域である。異種遺伝子発現のための宿主としてしばしば利用されている大腸菌からは数百ものプロモーターが分離され、その配列が決められてきた。特に、-35や-10領域におけるコンセンサス配列は、良く知られている<sup>1)</sup>。これらの転写開始反応にはシグマ因子が必要で、大腸菌の場合  $\sigma^{70}$  と  $\sigma^{32}$  が報告されている<sup>1)</sup> が、最近新しいシグマ因子も発見されている<sup>2)</sup>。一方、グラム陽性菌である *Bacillus subtilis* には9種類のシグマ因子が知られており ( $\sigma^A$ ,  $\sigma^B$ ,  $\sigma^C$ ,  $\sigma^D$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^G$ ,  $\sigma^H$ , 及び  $\sigma^K$ )<sup>1), 3)</sup>、それぞれ特異的な時期での発現に関与している<sup>4)</sup>。バチルス属細菌及び大腸菌由来プロモーターについて種々の

解析が進んではいるが、いまだ不明の点も多々ある<sup>5, 6)</sup>。

そこで *B. subtilis*, *B. stearothermophilus* の両宿主間で効率良く発現し、大腸菌中でも発現可能な *nprM* 遺伝子の有するプロモーターの解析を行い、さらにこのプロモーターを利用し大腸菌中で効率良く働くプロモーター配列の構築を試みた。またこれらの知見を基とし、大腸菌で働く強力かつ制御可能なプロモーター配列の構築を目指した。

### 2. 実験材料及び方法

#### (1) 使用菌株, ファージ, 及びプラスミド

使用した菌株, ファージ, 及びプラスミドを Table 1 に示した。

#### (2) 培 地

Table 1 Bacterial strain, phage, and plasmid

| 菌株                                    | 特性   | 由来 |
|---------------------------------------|--|----|
| <i>B. subtilis</i> MT-2               | <i>trpC2 leuC7 hsrM</i><br><i>hsmM NprM<sup>-</sup></i>  | 7) |
| <i>Escherichia coli</i><br>K-12 JM109 | <i>recA1 Δ (lac pro)</i><br><i>endA1 thi-1 i strA</i><br><i>gryA97 hsdR17 supE44</i><br>F <sup>-</sup> : <i>traD36</i><br><i>proA<sup>+</sup> B<sup>+</sup> lacI<sup>a</sup></i><br><i>ZΔM15</i> | 8) |
| phage                                 |  | 由来 |
| phage M13 mp18<br>mp19                |  | 8) |
| plasmid                               | 特性   | 由来 |
| pMK1                                  | Km <sup>r</sup> <i>nprM<sup>+</sup></i>  | 8) |
| pKK232-8                              | Ap <sup>r</sup>  | 9) |
| pUC19                                 | Ap <sup>r</sup>  | 8) |

Km<sup>r</sup>:カナマイシン耐性, Ap<sup>r</sup>:アンピシリン耐性

L 培地 (tryptone:1%, yeast extract:0.5%, NaCl:0.5%), L 寒天培地 (L 培地に 2% 寒天を加えたもの), および LC 寒天培地 (L 寒天培地に 1% カゼインを加えたもの) を用いた。抗生物質としてカナマイシンは 5 μg/ml, アンピシリンは 50 μg/ml の濃度を用いた。

形質発現のときは M9mE 培地を用いた (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O:12.8 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:3 g, NaCl:0.5 g, NH<sub>4</sub>Cl:1 g, yeast extract:0.2%, MgCl<sub>2</sub>:1 mM, CaCl<sub>2</sub>:0.1 mM, thiamin:2 μg/ml)。lac オペレーターの誘導剤として IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) を 0.5 mM の濃度で用いた。

### (3) DNA 操作

DNA は, TE 緩衝液 (10 mM トリス塩酸塩, 0.1 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA), pH 7.5) に溶解した。また DNA の染色には, 臭化エチジウム (EtBr) 1% 溶液を使用した。

プラスミドを大量調製する場合には, アルカリ抽出法をスケールアップし, 得られた DNA 画分を塩化セシウム-臭化エチジウム平衡密度勾配遠心分離にかけて精製した後, TE 緩衝液に懸濁し 4°C で保存した。

プラスミド pKK232-8 (プロモーターを有しないクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT 遺伝子を持つ) は Pharmacia Co., Ltd. (Uppsala, Sweden) から購入した。オリゴヌクレオチドは

DNA 合成機 (Model 380B, Applied Biosystems Co., Ltd. California, USA) を用い合成した。DNA 塩基配列決定はファージ M13mp18 及び mp19 を用いてジデオキシ法<sup>10), 11)</sup> で行った。

### (4) DNA の電気泳動および回収法

DNA の解析には, アガロースゲル電気泳動およびポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた<sup>12)</sup>。アガロースゲルからの DNA の回収は, Gene clean (Bio 101 Inc. CA U. S. A.) を使用し行った。ポリアクリルアミドゲルからの DNA の回収は, Maniatis 等<sup>13)</sup> の方法に従い回収した。

### (5) 形質転換

大腸菌の形質転換は Imanaka 等の方法<sup>14)</sup> に従った。

CaCl<sub>2</sub> 処理したコンピテント細胞はグリセロール (終濃度 20%V/V) を加え, -80°C で凍結保存したものを使用した。形質転換株の選択には, アンピシリン (50 μg/ml) を用いた。

*B. subtilis* のコンピテント細胞は Anagnostopoulos と Spizizen の方法<sup>14)</sup> に従って調製した。5 ml の L 培地中で 37°C, 一夜培養した培養液 1 ml を TFI 培地 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g, クエン酸ナトリウム 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g, L-ロイシン 50 mg, L-トリプトファン 50 mg, カザミノ酸 0.2 g/l) 20 ml に植菌し, 37°C で培養した。対数増殖期からは

ずれて約1時間後(植菌後3.5-3.75時間)にその4mlをTFII培地(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g, L-ロイシン 5mg, L-トリプトファン 5mg, カザミノ酸 0.1g/l) 36mlに植菌し, 1.5時間培養することによりコンピテント細胞を得た。コンピテント細胞1mlとDNA(約1μg)を混合し, 37°C, 30分, 振とう培養した後, 5,000×g, 5分間遠心し集菌した。

これに3mlのL培地を加え, 37°Cでさらに2時間培養することにより, プラスミドの遺伝子発現を行わせた。

この培養液を薬剤を含むLCまたはL寒天培地に塗布し37°C, 一夜培養することにより形質転換株を得た。

#### 〔6〕CAT活性測定法

CAT(クロラムフェニコール・アセチル・トランスフェラーゼ)活性はShaw<sup>15)</sup>の方法に従った。酵素活性1unitは1分間に1nMのクロラムフェニコールをアセチル化する酵素量と定義した。

#### 〔7〕タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度はPierce BCA Protein Assay Reagent(Pierce Chemical Company Illinois USA)を用いて測定した。標準タンパク質として, 結晶牛血清アルブミンを用いた。

#### 〔8〕プロテアーゼ活性の測定法

プロテアーゼ活性測定は, Hagihara<sup>18)</sup>等の方法に基づいてカゼイン加水分解活性により検定した。酵素緩衝液(50mM トリス塩酸塩, 5mM 塩化カルシウム, pH7.5)に酵素を適当に希釈後, 基質(酵素緩衝液に溶かした2%カゼイン)1mlとを混合攪拌後, 37°C, 20分間保温した。その後2mlの反応停止液(0.1M トリクロロ酢酸, 0.22M 酢酸ナトリウム, 0.33M 酢酸)を加え激しく攪拌し, さらに室温にて30分間静置後, Watman Filter paper No. 1(直径7.0cm)で濾過して, 波長275nmにおけるろ液の吸収を測定した。

プロテアーゼ活性単位の定義は, 37°Cにおいて, 1分間に1μgのチロシンに相当する可溶性物質を生成させる酵素量を1unitとした。

#### 〔9〕試薬

制限酵素, T4DNAリガーゼ, ポリヌクレオチドキナーゼ, アルカリフォスファターゼ, M13シークエンスキットは宝酒造(株)より購入した。(α-<sup>32</sup>P)-CTPはAmersham Co.より購入した。バクトトリプトン, 酵母エキスは, Difco Laboratoriesより, リゾチーム, トリス塩基は, Sigma Chemicalsより, Filter paper No. 1は, Watmanよりそれぞれ購入した。その他の試薬は, 和

光純薬工業(株), およびナカライテスク(株)よりそれぞれ購入した。

### 3. 結 果

#### 〔1〕大腸菌中での *nprM* 遺伝子の発現

耐熱性中性プロテアーゼ遺伝子をコードする *nprM* 遺伝子は, *B. stearothermophilus* 中のみならず *B. subtilis* 中でも効率良く発現する。このことよりこの遺伝子はバチルス属細菌中で効率良く発現するプロモーター配列を有しているものと推測された。また最近, グラム陽性菌である枯草菌のあるプロモーターがグラム陰性菌である大腸菌中でも機能するという報告があった<sup>6)</sup>。

さらにPeschke等<sup>6)</sup>はグラム陰性菌由来のあるプロモーターがバチルス属細菌中で, σ<sup>A</sup> 因子を利用して機能することが可能であることを示した。そこでまず *B. stearothermophilus* 由来 *nprM* プロモーターが大腸菌内で機能するか否かを調べるため, *nprM* 遺伝子をpUC19にサブクローン化し, 大腸菌内で複製するプラスミドを得た(Fig. 1)。 *nprM* 遺伝子が大腸菌内で発現しているかを見るため, 得られたプラスミド, pMK4, を大腸菌JM109に導入し, LC培地上でハローの形成を見た。その結果pMK4を保持するJM109株は明瞭なハローを形成し, プロテアーゼを生産していることが明らかとなった(Fig. 2)。

この株をApを含むL培地で37°C, 24時間培養したところ, 培養液上清に約120U/mlのプロテアーゼ活性が認められた。またこのプロテアーゼは耐熱性中性プロテアーゼであり, *nprM* であることが確認された。これらのことより, *nprM* 遺伝子は大腸菌内でも発現し, *nprM* プロモーターはいずれかのシグマ因子を利用して大腸菌内でも機能するものと思われた。

#### 〔2〕改変 *nprM* プロモーターの構築とその強度の比較

バチルス属細菌と大腸菌由来プロモーター配列の違いを解析するため, *nprM* プロモーターを基本として種々の改変プロモーターをデザインし, 化学的に合成した(Fig. 3)。 *nprM* プロモーターは-35領域に5'-TTT-TCC, -10領域に5'-TATTGTの配列を持ち, さらに-75領域付近にATに富む配列を有しているという特徴を持っている(Fig. 3a)。またバチルス属細菌由来の *nprT*<sup>17)</sup>, *sdh*<sup>18)</sup>, 及び *spoOA*<sup>19)</sup> のプロモーター配列同様, -75領域付近においてもATに富む配列を有している。これら-75領域付近のATに富む配列はバチルス属細菌において, ある活性化因子によって認識される

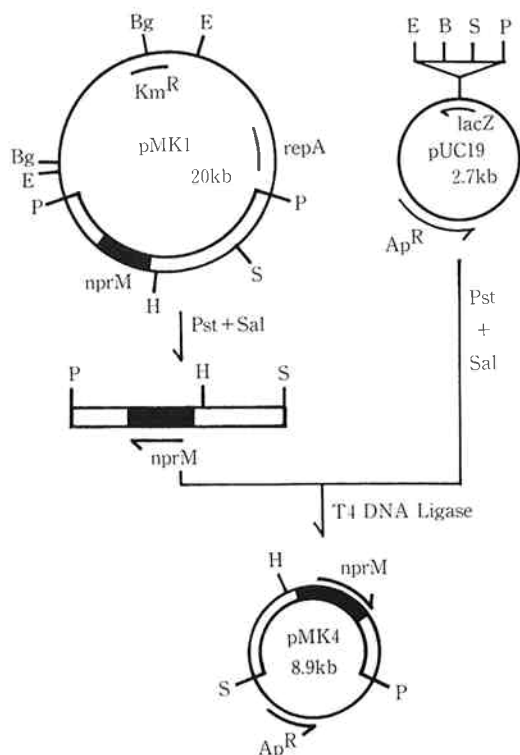
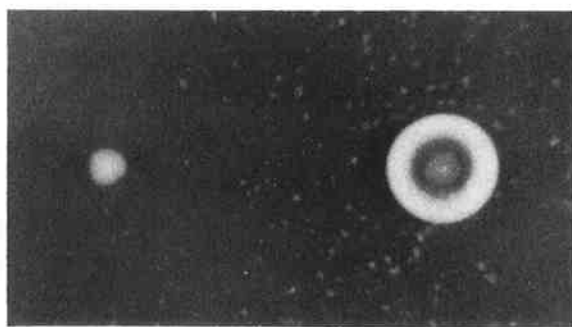


Fig. 1 Construction of pMK1. Open and blackened segments represent *B. stearootherophilus* MK232 DNA. Blackened segments indicate the *nprM* gene. Solid lines indicate plasmid DNA. The position and direction of transcription of the *nprM* gene are indicated by arrows. Restriction sites: B, *Bam*H I; E, *Eco*R I; H, *Hind*III; P, *Pst* I; S, *Sal* I.



JM109/pUC19 JM109/pMK4  
Fig. 2 Protease assay on LC agar plate.

共通の領域であるかもしれないと予測される。

No. 09-1 は-75領域の AT box を欠失した野生型の *nprM* プロモーターである。No. 09-2 は No. 09-1 の-35領域と *lac* 遺伝子の-10領域とオペレーターを結合させたものである。No. 09-1 の-35領域と-10領域を

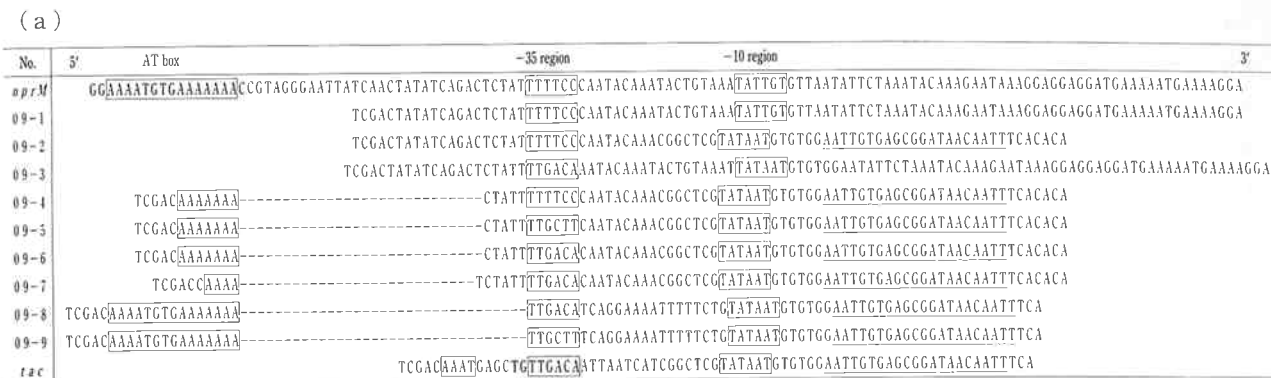
大腸菌のコンセンサス配列に変えたものを No. 09-3 とした。

No. 09-4 から No. 09-7 は *nprM* プロモーターの AT box を-43領域に付加したものであり、No. 09-4, 09-5, 09-6, 及び09-7の-35領域はそれぞれ *nprM* プロモーター、T5 プロモーター<sup>6)</sup>、大腸菌のコンセンサス配列、及び同じコンセンサス配列に置換したものである。No. 09-8 と09-9は *nprM* プロモーターの AT box を-43領域に付加し、スペーサーとしてT5 プロモーターのもの、さらに *lac* オペレーターを結合させたものである。また-35領域はそれぞれコンセンサス配列とT5 プロモーターのものを用いた。

プロモーター活性は、CAT 活性を指標として次のように測定した。プロモーター検索プラスミド (pKK232-8) は *CAT* 遺伝子上流のプロモーター配列を欠くため、外部よりプロモーター活性を有する断片を組み込むことにより *CAT* 遺伝子を発現することができる。そこで Fig. 3a に示す合成 DNA を、pKK232-8 の *Sal* I と *Hind*III 部位にクローン化した。得られたプラスミドをそれぞれ pKK09-1~pKK09-9 及び pK-Ktac とした。これらのプロモーターを有するプラスミドの特性を Fig. 3b にまとめた。そしてこれらの各プラスミドを大腸菌 JM109 株に導入し、さらに M9mE 培地を用いて 37°C、4 時間培養し、IPTG で誘導後さらに 2 時間培養し CAT 活性を測定した (Fig. 3b)。

その結果、pKK09-1 と pKK09-2 は低いプロモーター活性を示し、pKK09-3, pKK09-4, 及び pKK09-5 は中程度のプロモーター活性を示した。これに対し pKK09-6, pKK09-7, pKK09-8, 及び pKK09-9 は高いプロモーター活性を示した。この高プロモーター活性は大腸菌中で強力と言われている *tac* プロモーターとほぼ同程度のプロモーター活性であった<sup>20)</sup>。pKK09-2 のプロモーター活性は、pKK09-1 と比べると際立った活性上昇は認められなかった。一方、pKK09-1 において、-35と-10領域の両方に、大腸菌のコンセンサス配列を用いると (pKK09-3)、数倍の活性上昇が確認された。

これらの結果から、大腸菌のコンセンサス配列において-35領域のほうが、-10領域よりもプロモーター活性により強い影響を与えることが示唆された。*nprM* プロモーターの AT box を-75領域から-43領域に置き換えたときも、CAT 活性の上昇が認められた (pKK09-2 と pKK09-4 の場合)。また-43領域の連続A配列を減少させた pKK09-7 は pKK09-8 に比べ約70%のプロモーター活性であった。連続A配列をさらに延長させた



(b)

| Plasmid | Number of A   | -35 region | Spacer Length | AT content    | -10 region | (100 u/ml prot.) |
|---------|---------------|------------|---------------|---------------|------------|------------------|
|         | at -43 region |            |               | of spacer (%) |            | Activity         |
| pKK09-1 | 0             | TTTTCC     | 18            | 78            | TATTGT     | 9 ( 3%)          |
| pKK09-2 | 0             | TTTTCC     | 16            | 50            | TATAAT     | 11 ( 4%)         |
| pKK09-3 | 0             | TTGACA     | 18            | 83            | TATAAT     | 54 ( 21%)        |
| pKK09-4 | 7             | TTTTCC     | 16            | 50            | TATAAT     | 37 ( 14%)        |
| pKK09-5 | 7             | TTGCTT     | 16            | 50            | TATAAT     | 50 ( 19%)        |
| pKK09-6 | 7             | TTGACA     | 16            | 50            | TATAAT     | 269 (103%)       |
| pKK09-7 | 4             | TTGACA     | 16            | 50            | TATAAT     | 179 ( 68%)       |
| pKK09-8 | 4+7           | TTGACA     | 17            | 71            | TATAAT     | 201 ( 77%)       |
| pKK09-9 | 4+7           | TTGCTT     | 17            | 71            | TATAAT     | 274 (105%)       |
| pKKtac  | 3             | TTGACA     | 16            | 56            | TATAAT     | 262 (100%)       |

Fig. 3 Sequences and analysis of the *nprM* promoter and its derivatives.

(a) The *nprM* promoter (Nos. *nprM* and 09-1), its derivatives (Nos. 09-2, 09-3, 09-4, 09-5, 09-6, 09-7, 09-8, and 09-9) and the *tac* promoter (No. *tac*) sequences. The AT box, -35 region and -10 region are boxed. Deleted sequences are indicated by dashed lines. The *lac* operator is underlined.

(b) Analysis of the *nprM* promoter (pKK09-1), its derivatives (pKK09-2, pKK09-3, pKK09-4, pKK09-5, pKK09-6, pKK09-7, pKK09-8, and pKK09-9), and the *tac* promoter (pKK *tac*).

pKK09-8 と pKK09-9 はさほどプロモーター活性の上昇は認められなかった。これらの結果から、大腸菌において-43領域の AT box はプロモーター活性を増強する因子であると思われた。逆に-75領域における AT box は、バチルス属細菌のプロモーター活性に何らかの影響を与えているのかもしれないことが予測される。

〔3〕 改変 A3 プロモーターの構築とその強度の比較

一連の *nprM* プロモーターの改良において得られた知見を基とし、大腸菌中でさらに強力かつ制御可能なプロモーター配列の構築を目指し、T3ファージ由来 A3 プロモーター<sup>21)</sup>を用い、種々の改良を行った。この A3 プロモーターは、-43領域に AT box を有し、-35 と -10 領域はそれぞれ 5'-TTGACA と 5'-TACGAT という配列から構成されている。このプロモーターは-35領域に大腸菌のコンセンサス配列を有しており、*nprM* プロモーターの改良において得られた知見から、大腸菌中で機能するプロモーターとしては理

想的なものと思われた。

Fig. 4a に A3 プロモーターを基本とした、一連の改良型プロモーターを示した。No. 10-1 は野生型の A3 プロモーターである。No. 10-2 は-10領域下流に *lac* オペレーターを組み込んだものである。No. 10-3 は No. 10-2 の-10領域を大腸菌のコンセンサス配列に変えたものである。No. 10-4 は-10領域下流に *lac* オペレーターの最小機能領域を組み込んだものである。No. 10-2 と10-4の AT box を取り除いたものをそれぞれ No. 10-5 と10-6とした。

次に、これらの合成 DNA を pKK232-8 にクローン化し、得られたプラスミドをそれぞれ pKK10-1, pKK10-2, pKK10-3, pKK10-4, pKK10-5, 及び pKK10-6 と命名した。これらのプラスミドが保持するプロモーターの特性を Fig. 4b にまとめた。これらの各プラスミドを大腸菌 JM109 株に導入し、同様の方法で CAT 活性を調べた (Fig. 4b)。pKK10-1 は予想どう

(a)

| No.        | 5'    | AT box          | -35 region    | -10 region        | 3'                |                                   |                                   |
|------------|-------|-----------------|---------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 10-1       | TCGAC | <u>TAAACAAA</u> | GTGG          | <u>TTGACA</u>     | ACATGAAGTAAGCACGG | <u>TACGAT</u>                     | GTACCACA                          |
| 10-2       | TCGAC | <u>TAAACAAA</u> | GTGG          | <u>TTGACA</u>     | ACATGAAGTAAGCACGG | <u>TACGAT</u>                     | GTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACA |
| 10-3       | TCGAC | <u>TAAACAAA</u> | GTGG          | <u>TTGACA</u>     | ACATGAAGTAAGGCTCG | <u>TATAAT</u>                     | GTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACA |
| 10-4       | TCGAC | <u>TAAACAAA</u> | GTGG          | <u>TTGACA</u>     | ACATGAAGTAAGCACGG | <u>TACGAT</u>                     | GAATTGTGAGCGGATAACAATTCA          |
| 10-5       | TCGAC | -----           | <u>TTGACA</u> | ACATGAAGTAAGCACGG | <u>TACGAT</u>     | GTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACA |                                   |
| 10-6       | TCGAC | -----           | <u>TTGACA</u> | ACATGAAGTAAGCACGG | <u>TACGAT</u>     | GAATTGTGAGCGGATAACAATTCA          |                                   |
| <i>lac</i> | TCGAC | <u>AAAT</u>     | GAGCTG        | <u>TTGACA</u>     | ATTAATCATCGGCTCG  | <u>TATAAT</u>                     | GTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCA    |

(b)

| Plasmid        | Number of A   | -35 region | Spacer length | AT content    | -10 region | Activity (100 u/ml prot.) |            |
|----------------|---------------|------------|---------------|---------------|------------|---------------------------|------------|
|                | at -43 region |            |               | of spacer (%) |            | IPTG(-)                   | IPTG(+)    |
| pKK10-1        | 3+3           | TTGACA     | 17            | 53            | TACGAT     | 470 (179%)                | 475 (181%) |
| pKK10-2        | 3+3           | TTGACA     | 17            | 53            | TACGAT     | 93 (35%)                  | 900 (344%) |
| pKK10-3        | 3+3           | TTGACA     | 17            | 53            | TATAAT     | 33 (13%)                  | 485 (185%) |
| pKK10-4        | 3+3           | TTGACA     | 17            | 53            | TACGAT     | 28 (11%)                  | 410 (156%) |
| pKK10-5        | 0             | TTGACA     | 17            | 53            | TACGAT     | 37 (14%)                  | 310 (118%) |
| pKK10-6        | 0             | TTGACA     | 17            | 53            | TACGAT     | 22 (8%)                   | 240 (92%)  |
| pKK <i>tac</i> | 3             | TTGACA     | 16            | 56            | TATAAT     | 44 (17%)                  | 262 (100%) |

Fig. 4 Sequences and analysis of the *A3* promoter and its derivatives.

(a) The *A3* (No. 10-1), its derivatives (Nos. 10-2, 10-3, 10-4, 10-5, and 10-6), and the *lac* promoter (No. *lac*) sequences. The AT box region and -10 region are boxed. Deleted sequences are indicated by dashedclines. The *lac* operator is underlined.

(b) Analysis of the *A3* promoter (pKK10-1), its derivatives (pKK10-2, pKK10-3, pKK10-4, pKK10-5, and pKK10-6), and the *lac* promoter (pKK *lac*).

り、IPTG 添加、無添加にかかわらず強力であり、pKK *lac* より約 2 倍高い活性を示した。一方、pKK10-2, pKK10-3, 及び pKK10-4 は IPTG 存在下において、pKK *lac* より、約 3.5 から 1.5 倍高い活性を示した。-43 領域に AT box を欠いた pKK10-5 と pKK10-6 は、AT box を有する pKK10-2 と pKK10-4 に比べ、活性の低下が顕著に認められた。これらの結果、-43 領域に AT box をもち、*A3* プロモーターの下流に *lac* オペレーターを接続した pKK10-2 が IPTG 存在下で最も効率良く形質発現することが示された。

#### 4. 考 察

好熱菌由来 *nprM* プロモーターは中温菌の *B. subtilis* 中でも効率良く発現し、またグラム陰性菌である大腸菌中でも機能することが確認できた。この *nprM* プロモーターを化学合成し、CAT 活性を指標としてプロモーターの強度を測定したところ、かなり低いプロモーター活性であった。これは種や属が異なることによるため低プロモーター活性であったものと思われた。次

にこの *nprM* プロモーターを基本とし、種々の改良型プロモーターを設計し、発現を見たところ、大腸菌中で働くプロモーターの中で強力といわれている *lac* プロモーターとほぼ同程度の強いプロモーターを構築することができた。これら一連の改良において、-35 領域の大腸菌コンセンサス配列 (TTGACA) が大腸菌のプロモーター活性と特に深く関連していることが示された。また -43 領域に AT box を付加することにより、さらにプロモーター活性を増強することが可能であった。*nprM* プロモーターにおいて -75 領域に連続 A 配列が見出されたが、この配列は大腸菌内での -43 領域と同様、バチルス属細菌由来プロモーターの強化に重要な役割を果たす領域かもしれない。

次に、大腸菌中で機能する強力かつ制御可能なプロモーターの構築を行った。基本となるプロモーターとしては T3 フェージ由来 *A3* プロモーターを用いたところ、従来強力なプロモーターとして知られていた *lac* プロモーターよりもかなり強力なプロモーターを構築することができた。さらに *lac* オペレーターを -10 領域下流に連結することにより、IPTG により誘導可能なプロ

モーターを構築することができた。これら一連の改良において *lac* オペレーターを連結することにより、プロモーター活性の低下は見られなかった<sup>22)</sup>。

これらのプロモーターを利用し、大腸菌中で異種遺伝子を発現させることにより、従来の *tac* プロモーターを用いた発現よりもかなりの高発現が期待できる。またバチルス属細菌のプロモーターにおいて、-75領域等で改良を加えることによりバチルス属細菌内で機能する、強力なプロモーターを構築できるものと考えられる。

### 参 考 文 献

- 1) D. J. Galas, M. Eggert and M. S. Waterman; Rigorous pattern-recognition methods for DNA sequences. Analysis of promoter sequences from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol., **186**, 117-128, (1985)
- 2) A. J. Ninfa, L. J. Reitzer and B. Magasanik; Initiation of transcription at the bacterial *glnAp2* promoter by purified *E. coli* components is facilitated by enhancers. Cell, **50**, 1039-1046, (1987)
- 3) Y. Fujita; Regulation of *Bacillus subtilis* sporulation Biseibutu (in Japanese), **5**, 301-312, (1989)
- 4) S.-L. Wang, C. W. Price, D. S. Goldfarb and R. H. Doi; The subtilisin E gene of *Bacillus subtilis* is transcribed from  $\sigma^{37}$  promoter *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **81**, 1184-1188, (1984)
- 5) C. P. Moran Jr., N. Lang, S. F. J. LeGrice, G. Lee, M. Stephens, A. L. Sonenshein, J. Pero and R. Losick; Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. Mol. Gen. Genet., **186**, 339-346, (1982)
- 6) U. Peschke, V. Beuck, H. Bujard, R. Gentz and S. LeGrice; Efficient utilization of *Escherichia coli* transcriptional signals in *Bacillus subtilis*. J. Mol. Biol., **186**, 547-555, (1985)
- 7) M. Fujii, M. Takagi, T. Imanaka and S. Aiba; Molecular cloning of a thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus* in a vector plasmid and its expression in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., **154**, 831-837, (1983)
- 8) M. Kubo and T. Imanaka; mRNA secondary structure in an open reading frame reduces translation efficiency in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., **171**, 4080-4082, (1989)
- 9) I. E. Bergman and G. Brawerman; Control of Breakdown of the polyadenylate sequence in mammalian polyribosomes: Role of poly (adenylic acid)-protein interactions. Biochemistry, **16**, 259-264, (1977)
- 10) J. Messing; New M13 vectors for cloning. Methods Enzymol., **101**, 20-78, (1983)
- 11) F. Sanger, S. Nicklen and A. R. Coulson; DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **74**, 5463-5467, (1977)
- 12) T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook; Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- 13) T. Imanaka, T. Tanaka, H. Tsunekawa and S. Aiba; Cloning of the genes for penicillinase, *penP* and *penI*, of *Bacillus licheniformis* in some vector plasmids and their expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus licheniformis*. J. Bacteriol., **147**, 776-786, (1981)
- 14) C. Anagnostopoulos and J. Spizizen; Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., **81**, 741-746, (1961)
- 15) W. V. Shaw; Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. Methods Enzymol., **43**, 737-755, (1975)
- 16) B. Hagihara, H. Matsubara, M. Nakai and K. Okuniki; Crystalline bacterial protease. I. Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis*. J. Biochem., **45**, 185-194. (1958)
- 17) M. Takagi, T. Imanaka and S. Aiba; Nucleotide sequence and promoter region for the neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*. J. Bacteriol., **163**, 824-831
- 18) L. Melin, K. Magnusson, and L. Rutberg; Identification of the promoter of the *Bacillus subtilis* *sdh* operon. J. Bacteriol., **169**, 3232-3236, (1987)
- 19) F. A. Ferrari, K. Trach, D. LeCoq, J. Spence, E. Ferrari and J. A. Hoch; Characterization of the *spoOA* locus and its deduced product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 2647-2651, (1985)
- 20) H. A. deBoer, L. J. Comstock and M. Vesser; The *tac* promoter: a functional hybrid derived

from the *trp* and *lac* promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 21-25, (1983)

- 21) J. E. Brown, J. N. Bailey and W. T. McAllister; Sequence of a region near the left end of bacteriophage T3 DNA that contains three promoters for the *E. coli* RNA polymerase. Nucleic

Acids Res., **14**, 4696, (1986)

- 22) M. Yamada, M. Kubo, T. Miyake, R. Sakaguchi and Y. Higo; Promoter sequence analysis in *Bacillus* and *Escherichia*: construction of strong promoters in *E. coli*. Gene, **99**, 109-114, (1991)



著 者

氏名 久保 幹  
Motoki KUBO

入社 昭和60年4月1日

所属 研究本部  
生物学研究所  
第4研究室  
副主任研究員



著 者

氏名 山田正幸  
Masayuki YAMADA

入社 昭和60年4月1日

所属 生物学研究所  
第2研究室  
副主任研究員



著 者

氏名 三宅俊男  
Toshio MIYAKE

入社 昭和56年4月1日

所属 生物学研究所  
第1研究室  
副主任研究員



著 者

氏名 竹本久雄  
Hisao TAKEMOTO

入社 昭和46年4月16日

所属 研究本部  
生物学研究所  
第4研究室  
第4研究室長