

大腸菌のリン酸レギュロンに属する *phoH* 遺伝子の 分子生物学的解析

金守 基*、牧野耕三*、雨村光子*、品川日出夫*、中田篤男

J. Bacteriol., 175 (5):1316-1324 (1993)

Molecular Analysis of the *phoH* Gene, Belonging to the Phosphate Regulon in *Escherichia coli*

Soo-Ki Kim*, Kozo Makino*, Mitsuko Amemura*,
Hideo Shinagawa*, and Atsuo Nakata

ABSTRACT By making operon fusions with λ *placMu53*, we identified, cloned, and analyzed the *phoH* gene belonging to the phosphate (*pho*) regulon. We mapped the *phoH* gene at 23.6 min in the *Escherichia coli* genomic library (Y. Kohara, K. Akiyama, and K. Isono, *Cell* 50:495-508, 1987). Its nucleotide sequence revealed an open reading frame of 354 amino acids which contains sequences for nucleotide-binding motifs. From comparison of the DNA sequences, *phoH* was found to be identical to *psiH*, which had been identified as a phosphate starvation-inducible gene (W. W. Metcalf, P. M. Metcalf, P. M. Steed, and B. L. Wanner, *J. Bacteriol.* 172:3191-3200, 1990). The PhoH protein was overproduced by the T7 promoter system, identified as a protein of about 39 kDa, and purified. The amino-terminal amino acid sequence of the PhoH protein agreed with the one deduced from the DNA sequence. We demonstrated that PhoH has an ATP-binding activity by a photoaffinity labeling experiment. Two transcriptional initiation sites (P1 and P2) were identified by S1 nuclease mapping. The upstream P1 promoter contains *pho* box, the conserved sequence shared by the *pho* regulon genes. The region containing the *pho* box was bound by PhoB protein, the transcriptional activator of the *pho* regulon, as revealed by footprinting. Regulation of *phoH* expression in vivo was studied by constructing plasmids containing transcriptional fusions of the *phoH* promoters with a promoterless gene for chloramphenicol acetyltransferase. Transcription from the P1 promoter required the *phoB* function

and was induced by phosphate limitation, while transcription from the P2 promoter was independent of *phoB* and constitutive under tested conditions.

λ *placMu53* ファジージの挿入によるオペロン融合の作成によって、リン酸レギュロンに属する *phoH* 遺伝子をクローニングして解析した。*phoH* 遺伝子は大腸菌ゲノム・ライブラリーの23.6分にマップされた。塩基配列から、この遺伝子は354個のアミノ酸からできたタンパクをコードし、その中にはヌクレオチド結合モチーフが見つかった。この遺伝子は、リン酸欠乏で誘導される遺伝子として固定された *psiH* と同じものであった。T7 ファジージのプロモーター系を用いて多量発現させ、39KDaのPhoHタンパクを精製した。アミノ末端のアミノ酸は、塩基配列から推定したものと一致した。PhoHタンパクはATPと結合することを光親和性標識法によって証明した。SIマッピング法によって転写開始点が二箇所存在することを明らかにした。第一のプロモーターの上流には、リン酸レギュロン遺伝子に共通に存在するリン酸ボックスがあり、この領域に、転写のアクチベーターであるPhoBタンパクが結合することを、フットプリンティング法によって証明した。*phoH* 遺伝子のプロモーター領域を、プロモーターをもたないクロラムフェニコール・アシル基転移酵素の遺伝子に連結し、酵素活性を測定することによってin vivoでの*phoH* 遺伝子の発現調節を調べた。第一のプロモーターからの転写にはPhoBタンパクが必須で、リン酸の欠乏によって発現誘導がおこり、一方、第二のプロモーターからの転写は、PhoBタンパクに依存せず、テストしたすべての条件下で構成的に発現した。

* Osaka University 大阪大学