

大腸菌二成分制御系因子の包括的発現解析

渡邊, 宏樹 / WATANABE, Hiroki

(発行年 / Year)

2014-03-24

(学位授与年月日 / Date of Granted)

2014-03-24

(学位名 / Degree Name)

修士(理工学)

(学位授与機関 / Degree Grantor)

法政大学 (Hosei University)

2013 年度 修士論文

大腸菌二成分制御系因子の包括的発現解析

COMPREHENSIVE ANALYSIS OF EXPRESSION OF TWO-COMPONENT
SYSTEM FACTORS IN *ESCHERICHIA COLI*

指導教官 山本兼由

法政大学大学院工学研究科

生命機能学専攻修士課程

学生証番号 12R7105

渡邊 宏樹

<略称>

A	adenine
Ap	ampicilin
Asp	aspartic acid
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
C	cytosine
ddH ₂ O	double distilled water
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleoside triphosphate
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	ethanol
FCM	flow cytometry
G	guanine
gfp	green fluorescent protein
His	histidine
HTH	helix-turn-helix
LB	Luria-Bertani
OAc	acetate ion
OD	optical density
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
T	thymine
Tris	tris (hydroxymethyl) amino methane

<目次>

第1章 序論	1
第2章 実験材料と方法.....	6
2-1. 培地と試薬	10
2-2. 大腸菌株	10
2-3. プラスミドとオリゴヌクレオチド	10
2-4. 大腸菌の培養.....	10
2-5. 大腸菌生育曲線の測定	10
2-6. PCR による特異的 DNA 断片の増幅と精製	10
2-7. 制限酵素による DNA の切断	11
2-8. DNA リガーゼによる DNA の連結.....	11
2-9. CaCl ₂ 法による大腸菌細胞への形質転換.....	11
2-10. コロニーPCR による特異的 DNA 断片の増幅.....	12
2-11. 大腸菌細胞からのプラスミド DNA 調製.....	12
2-12. DNA 塩基配列の決定.....	12
2-13. アガロースゲル電気泳動.....	13
2-14. FCM を用いた大腸菌細胞内 GFP 蛍光強度の測定	13
2-15. Promoter Chip 解析	13
第3章 結果	15
3-1. Promoter Chip を用いた大腸菌ゲノムの機能的プロモーターの同定	15
3-2. 大腸菌全転写因子プロモーターの発現解析	16
3-2-1. 全 DNA 結合性転写因子遺伝子のオペロン構成	16
3-2-2. 全 DNA 結合性転写因子プロモーターの <i>gfp</i> レポータープラスミド の構築	18
3-2-3. 大腸菌細胞における DNA 結合性転写因子プロモーター活性の測定 法	19
3-2-4. 好気条件で培養した大腸菌細胞における DNA 結合性転写因子プロ モーター活性.....	21
3-2-5. 嫌気条件で培養した大腸菌細胞における DNA 結合性転写因子プロ モーター活性.....	24
3-3. 大腸菌全二成分制御系因子プロモーターの同定	27

3-3-1. 全二成分制御系因子遺伝子のゲノム上の配置	27
3-3-2. 全二成分制御系因子プロモーターの <i>gfp</i> レポータープラスミドの構築	28
3-3-3. 好気条件で培養した大腸菌細胞における全二成分制御系因子プロモーター活性.....	31
3-3-4. 嫌気条件で培養した大腸菌細胞における全二成分制御系因子プロモーター活性.....	33
3-3-5. 全二成分制御系因子プロモーターの制御	36
第4章 考察	40
4-1. 大腸菌全二成分制御系因子のプロモーター活性	40
4-2. 大腸菌二成分制御系因子の自己プロモーター制御	40
第5章 参考文献	44
第6章 謝辞	48

第1章 序論

細菌は単純な単細胞生物であるが、様々な環境に適応することができる。多様な環境適応は、ゲノム上に搭載される遺伝子群の選択的発現に起因する。これらの遺伝子発現制御の多くはRNAポリメラーゼによるDNA依存的RNA合成反応である転写レベルで調節されている。細菌は一種類のRNAポリメラーゼをもち、そのRNA合成を担うコア酵素は、2つの α サブユニット、 β サブユニット、 β' サブユニットからなる4量体で構成される。コア酵素は、ゲノム上の各プロモーターを特異的に認識することができないが、 σ サブユニットが会合することでホロ酵素を形成し、特異的プロモーター認識が可能となる(図1)。細菌は複数種の σ サブユニットをもち、多様な環境適応能力の一端を担っていると考えられる。例えば、モデル細菌である大腸菌K12株には7種類の σ サブユニット(RpoD、RpoN、RpoS、RpoH、RpoF、RpoE、FecI)が確認されている(図1)。ホロ酵素の分子機能は、さらに転写因子によって制御される。多くの転写因子はRNAポリメラーゼとの特異的相互作用を示し、RNA合成活性を変化させている。このような転写因子は、相互作用するRNAポリメラーゼのサブユニットによって、 α と相互作用するClass-I、 σ と相互作用するClass-II、 β と相互作用するClass-III、 β' と相互作用するClass-IVの4つに分類できることが提唱されている(Ishihama, 2012)。このうちClass-IとClass-II転写因子はDNA結合ドメインを持ち、RNAポリメラーゼのプロモーター認識を制御する。

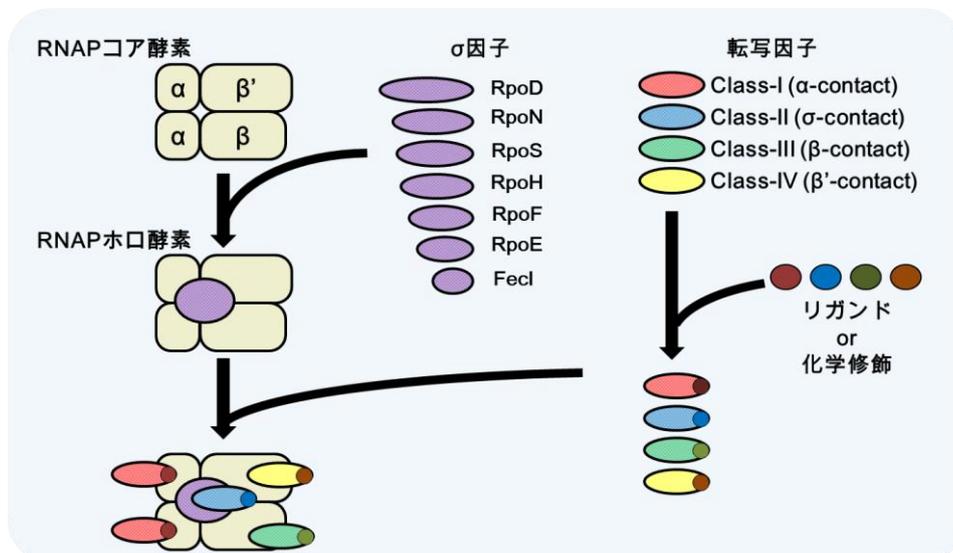


図1. RNAポリメラーゼの二段階機能分化

DNAに結合するタンパク質には、いくつかの特徴的な機能ドメインをもつことが知られる。例えば、2つの α ヘリックスと短いペプチドからなるHTHドメイン(図2)、2本の平行 α ヘリックスを各ヘリックス中のロイシン残基で閉じることでDNAに結合するロイシンジッパードメイン(Landschulz *et al.*, 1988)、2つの逆平行 β シートと1つの α ヘリックスからなり亜鉛イオンが入り込むことで機能するジンクフィンガードメイン(Pado *et al.*, 2001)などが知られている。細菌を含む原核生物は、複数のDNA結合タンパク質をもつが、それらの殆どはHTHドメインをもち、それ以外のDNA結合ドメインをもつタンパク質は極めて少数である。大腸菌K12株においては、HTHドメインをもつタンパク質は306種類が推定されており、26のファミリーに分類される(表1)。これらの転写因子は、HTHドメインに加え、そのDNA結合機能を制御するドメインをもつことが多い。この制御ドメインは、特異的な化学修飾や低分子化合物の結合を担い、それらの結果から転写因子の構造変化が生じ、HTHドメインによるDNA結合が制御されると考えられている。

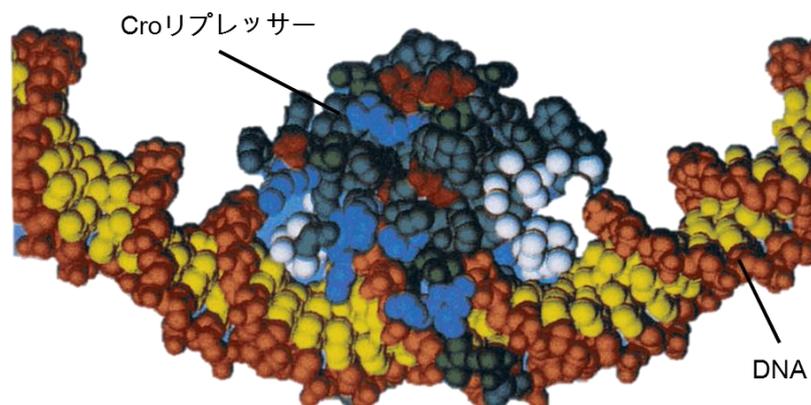


図2. Cro リプレッサーにおける HTH ドメインの DNA との結合 (Brennan & Matthews, 1989)

大腸菌のラクトースの取り込みや代謝に関わる *lacZYA* より構成される *lac* オペロンの転写は LacI と CRP という 2 種類の転写因子により制御されることが知られている。LacI は常にオペレーターに結合することで転写の抑制を行っているが、生体内にアロラクトースが取り込まれるとアロラクトースと結合することで構造変化が起こり DNA から解離し転写抑制が解除される。CRP は cAMP と結合することで転写の活性化を行う転写因子である。生体内にグルコースが存在すると ATP から cAMP を合成するアデニル酸シクラーゼが不活性化し細胞内 cAMP 量が低濃度となる。一方、グルコースが減少するとアデニル酸シクラーゼが活性型となり cAMP 量が高濃度になるため活性化することが知られてい

る。このシステムのおかげで、環境中にグルコースとラクトースが同時に存在する際にもエネルギー効率の良いグルコースを優先して細胞内に取り込み、消費することができる (Wong *et al.*, 1997)。

一方、アセチル化、メチル化、リン酸化などの化学修飾により酵素などのタンパク質機能が制御されることが知られている。細菌の転写因子では、リン酸化による化学修飾による機能変換が、広く保存されたシステムであることが明らかである。このシステムは二成分制御系と呼ばれ、二つのタンパク質因子からなる原核生物に特徴的な細胞情報伝達機構である。細菌において、センサーキナーゼと細胞質レスポンスレギュレーターから成る二成分制御系では、リン酸基リレー反応によって情報伝達する。センサーは、自己リン酸化能を持ち、ATP 依存的に保存されるヒスチジン残基をリン酸化することから、ヒスチジンキナーゼとも総称される。殆どのセンサーキナーゼは膜状に局在し、細胞外の特異的な環境シグナルを検知する機能を担い、自己リン酸化という生物的シグナルに情報を変換する。一方、レギュレーターは様々な生体反応に関わる活性を持つが、一般的には転写制御因子であることが多く、代謝酵素遺伝子群、呼吸遺伝子群、金属イオン恒常性遺伝子群、ストレス応答遺伝子群などの生命活動に重要となるゲノム機能発現を制御していることが明らかになっている。この二成分制御系の重要な特徴は、センサーキナーゼの ATP 依存的なヒスチジン残基への自己リン酸化を起し、そのリン酸基をレスポンスレギュレーターのアスパラギン酸残基へ転移することにより、レスポンスレギュレーターの機能的な活性化を引き起こすことである。この情報伝達機構は、センサーの His での自己リン酸化反応の後、対をなすレギュレーターのアsp へのリン酸転移反応により行われる。レギュレーターは Asp を含む N 末端レシーバードメインとその機能を支配する C 末端アウトプットドメインより構成され、C 末端領域の相同性より 5 つのサブファミリーに分けることができる。センサーのほとんどは、N 末端側にシグナルを受容すると思われるドメインをもち、C 末端側にトランスミッターをもつ典型的な構造をしている。このように二成分制御系にみられる情報伝達機構の基本反応は His - Asp リン酸基転移である。

大腸菌ではゲノム解析より 30 種類のセンサーキナーゼと 32 種類のレスポンスレギュレーターが存在が確認されている。しかし、それぞれのセンサーとレギュレーター遺伝子群の発現について包括的な研究はなされていない。本研究では、大腸菌 K12 株全二成分制御系因子のプロモーター活性を網羅的に測定し、大腸菌細胞内で機能すべく二成分制御系因子の細胞内発現量を解明することで、様々な環境変化に対する大腸菌の多様な生存戦略を理解する事を目標とした。

表 1. 大腸菌 K12 株の転写因子ファミリー

Family	No.	Trancscription Factor
AraC	28	Ada, AdiY, AppY, AraC, ChbR, EnvY, EutR, FeaR, GadW, GadX, MarA, MelR, RhaR, RhaS, Rob, SoxS, XylR, YbcM, YdeO, YdiP, YeaM, YidL, YijO, YkgA, YkgD, YneL, YpdC, YqhC
Ars	2	ArsR, YgaV
AsnC	3	AsnC, Lrp, YbaO
CriR	2	CitB, DcuR
Crp	3	Crp, FnR, YeiL
DeoR	11	AgaR, DeoR, FucR, GatR, GlpR, SgcR, SrlR, UlaR, YdjF, YgbI, YihW
Fur	2	Fur, Zur
GntR	29	BirA, CohE, CsiR, DeoT, DgoR, ExuR, FadR, FrlR, GlcC, LexA, LldR, McbR, MngR, MntR, NanR, PdhR, PhnF, UmuD, UxuR, YafY, YdcR, YdfH, YegW, YfjR, YidP, YieP, YihL, YjiR, YjjM
HU	4	HupA, HupB, IhfA, IhfB
IclR	9	AllR, DosP, IclR, KdgR, MhpR, RhmR, YagI, YiaJ, YjhI
IscR	2	IscR, NsrR
LacI	14	AscG, Cra, CytR, EbgR, GalR, GalS, GntR, IdnR, LacI, Mall, PurR, RbsR, TreR, YcjW
LysR	49	AaeR, AbgR, AllS, ArgP, Cbl, CynR, CysB, DmlR, DsdC, GcvA, HcaR, HdfR, IlvY, LeuO, LrhA, LysR, MetR, ModE, Nac, NhaR, OxyR, PerR, QseD, TdcA, TtdR, XapR, YafC, YagP, YahB, YbdO, YbeF, YbhD, YcaN, YcjZ, YdcI, YdhB, YeeY, YeiE, YfaH, YfeR, YfiE, YgfI, YhaJ, YhjC, YiaU, YidZ, YneJ, YnfL, YqfE
LytR	2	YehT, YpdB
MarR	10	AlsK, MarR, Mlc, MprA, NagC, NanK, SlyA, YajF, YcfX, YphH
MerR	5	CueR, MlrA, SoxR, YcgE, ZntR
MtlR	2	MtlR, YggD
NarL	21	BglJ, CsgD, DctR, EvgA, FimZ, GadE, MalT, MatA, NarL, NarP, RcsA, RcsB, SdiA, UhpA, UvrY, YahA, YeiI, YgeK, YhjB, YjjQ, YqeH
NikR	5	NikR, RelB, YbfE, YiiE, YiiF
NtrC	13	AtoC, DhaR, FhlA, Fis, GlnG, GlrR, HyfR, NorR, PrpR, PspF, RtcR, YgeV, ZraR

表1 続き

Family	No.	Trancscription Factor
OmpR	18	ArcA, BaeR, BasR, CadC, CpxR, CreB, CusR, KdpE, OmpR, PhoB, PhoP, QseB, RstA, TorR, YbfH, YedW, YgeH, YqeI
PinR	5	PinE, PinQ, PinR, YagL, YheO
RpiR	4	MurR, RpiR, YebK, YfhH
TetR	13	AcrR, BetI, EnvR, FabR, NemR, RutR, SlmA, UidR, YbiH, YbjK, YcfQ, YjdC, YtfA
Xre	12	DicA, HicB, HigA, HipB, MqsA, NadR, PuuR, RodZ, YbaQ, YdcN, YddM, YiaG
Others	38	AlpA, ArgR, BdcR, CaiF, CdaR, Crl, CroE, DicC, DnaA, FlhC, FlhD, FrvR, GutM, IbaG, IleR, LsrR, MetJ, MqsR, OgrK, PaaX, PspC, PutA, RacR, RecX, RfaH, SfsB, TdcR, TrpR, TyrR, YdaS, YdaW, YdfK, YjhU, YmfL, YmfN, YnaE, YqjI, YtfH

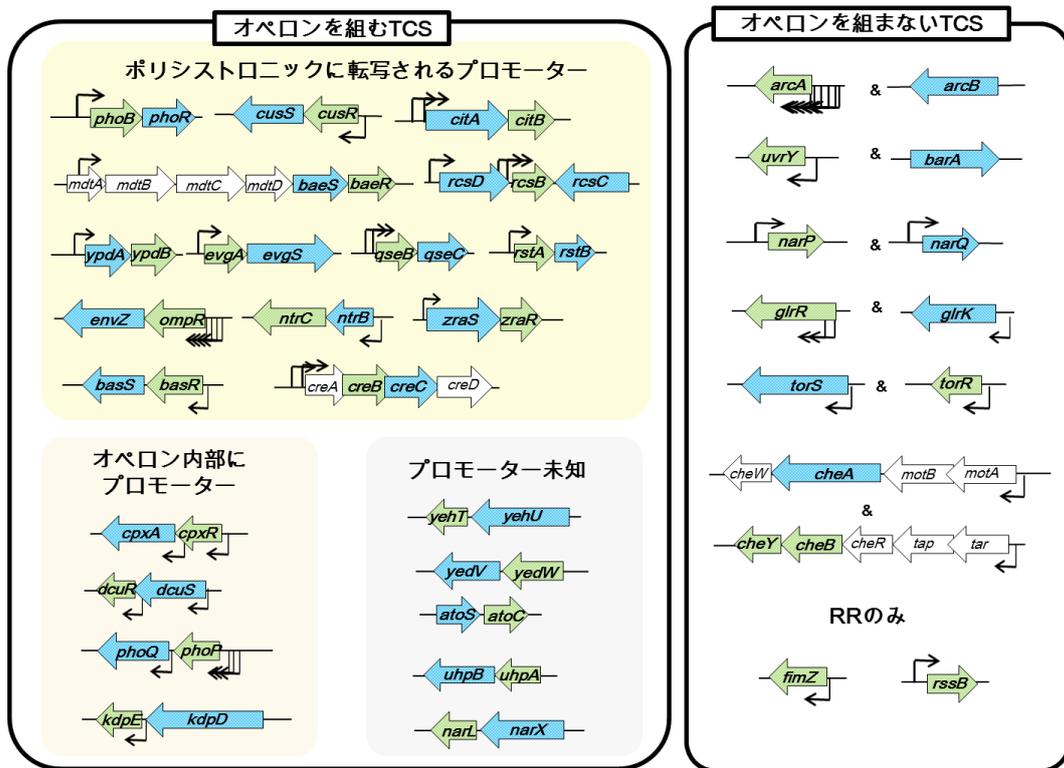


図3. 大腸菌二成分制御系機能的プロモーター

青い矢印はヒスチジンキナーゼ遺伝子、緑の矢印はレスポンスレギュレーター遺伝子、白い矢印は二成分制御系とは関与しない遺伝子、黒い細矢印は転写開始点を示している。

第 2 章 実験材料と方法

2-1. 培地と試薬

2-1-1. LB 液体培地

10 g の BACTO TRYPTON (Difco) 、 5 g の BACTO YEAST EXTRACT (Difco) 、 10 g の NaCl (Nacalai) 、 0.75 ml の 5N NaOH (Nacalai) を ddH₂O に溶解し全容量を 1 L まで Fill Up し、ガラスのメジューム瓶に入れ、オートクレーブにて 121°C で 21 分滅菌し、常温で保存した。必要に応じて 100 mg/ml Ampicilin を終濃度 100 µg/ml で添加して使用した。抗生物質を添加した際の培地の使用期限は 1 ヶ月とし、4°C で保存した。

2-1-2. LB 寒天培地

10 g の BACTO TRYPTON、5 g の BACTO YEAST EXTRACT 、10 g の NaCl、15 g の BACTO AGAR (Difco) 、 0.75 ml の 5N NaOH を 1 L の ddH₂O の入ったフラスコに加え混合し、オートクレーブにて 121°C で 21 分滅菌し、60°C 程度まで冷却した。ここで必要に合わせて 100 mg/ml Ampicilin 溶液を終濃度 100 µg/ml で添加した。冷却後、シャーレに 20 ml 程度ずつ分注して冷却した。培地が固化したら、シャーレ内の結露を乾燥させてから袋に入れ 4°C で保存した。抗生物質を添加した際の培地の使用期限は 1 ヶ月とした。

2-1-3. 100 mg/ml Ampicilin

15 ml のチューブに Ampicilin Sodium Salt (Nacalai) を 1 g 計り入れ、そこに ddH₂O をチューブの目盛の 10 ml まで入れて完全に溶解する。次に溶解液を 10 ml のシリンジと Φ0.22 mm の Cellulose Acetate フィルター (Advantec) を使いフィルター滅菌して新しい 15 ml チューブに移し、4°C で保存した。使用期限は 1 ヶ月とした。

2-1-4. 0.1 M CaCl₂

1.47 g の CaCl₂ · 2H₂O (Nacalai) を 100 ml の ddH₂O に加え混合し、ガラスのメジューム瓶に入れ、オートクレーブにて 121°C で 21 分滅菌し、4°C で保存した。

2-1-5. 60% Glycerol

メスシリンダーに 60 ml の Glycerol を入れ、ddH₂O を加え全容量を 100 ml にした。その後、ガラス瓶に移しオートクレーブにて 121°C、21 分の滅菌を行

い、その後 4°C で保存した。

2-1-6. EDTA/Sodium Acetate buffer

50 ml チューブに 3 M Sodium Acetate (pH8.0) と 0.5 M EDTA (pH8.0) を 25 ml ずつ混合し、1.5 ml チューブに 1 ml ずつ分注し、-30°C で保存した。

2-1-7. 0.5 M Tris-HCl (pH8.0)

181.65 g の Tris (Nacalai) を 2 L の ddH₂O で溶解し、HCl (Nacalai) で pH8.0 に合わせて 4°C になるまで冷却する。再び HCl で pH8.0 に合わせ ddH₂O を加えて 3 L まで Fill Up し、1 L のガラスの瓶 3 本に分注し、オートクレーブにて 121°C、21 分の滅菌を行い、4°C で保存した。

2-1-8. 0.1 M Tris-HCl (pH8.0)

36.33 g の Tris を 2 L の ddH₂O で溶解し、HCl で pH8.0 に合わせて 4°C になるまで冷却する。再び HCl で pH8.0 に合わせ ddH₂O を加えて 3 L まで Fill Up し、1 L のガラスの瓶 3 本に分注し、オートクレーブにて 121°C、21 分の滅菌を行い、4°C で保存した。

2-1-9. TE 飽和 Phenol

1000 g の Phenol (Nacalai) と 1 g の 8-Quinololinol (Nacalai) と 1 L の 0.5 M Tris-HCl (pH8.0) をビーカーに加え、湯せんで溶解する。よく混合してフェノール層と水層に分離させるため静置し、水層を除去する。0.5 M Tris-HCl (pH8.0) を 1 L 加え、再びよく混合し、フェノール層と水層に分離させるため静置して水層を除去する。次に、0.1 M Tris-HCl (pH8.0) を 1 L 加え、よく混合してから静置し、フェノール層と水層に分離させて水層を除去する。ここで pH が 7.8 以上であることを確認し、0.1 M Tris-HCl (pH8.0) をフェノール層を覆うまで加える。0.5 M EDTA (pH8.0) を終濃度 1 mM になるように加えて軽く混合し、遮光して 4°C で保存した。

2-1-10. 3 M Sodium Acetate (pH8.0)

ddH₂O 100 ml に 24.8 g の Sodium Acetate (Nacalai) を溶解し、Acetic Acid (Nacalai) で pH8.0 に調整してガラスのメジューム瓶に入れ、オートクレーブにて 121°C で 21 分滅菌し、常温で保存した。

2-1-11. 70% EtOH

70 ml の 100% Ethanol (Nacalai) を ddH₂O 30 ml と混合し、常温で保存し

た。

2-1-12. 50x TAE buffer

242 g の Tris を 57.1 ml の Acetic Acid と 100 ml の 0.5 M EDTA (pH8.0) を加え、ddH₂O で 1 L まで Fill Up して常温で保存した。

2-1-13. 1x TAE buffer

ポリタンクに 20 ml の 50x TAE buffer、4.98 L の ddH₂O を加え、混合して常温で保存した。

2-1-14. 0.5 M EDTA (pH8.0)

700 ml の ddH₂O に 186.1 g の EDTA・2Na (Wako) を混合し、NaOH を加えて pH8.0 に調整し、ddH₂O で 1 L まで Fill Up し、ガラスのメジューム瓶に入れ、オートクレーブにて 121°C で 21 分滅菌し、4°C で保存した。

2-1-15. TE buffer

10 ml の 0.1 M Tris-HCl (pH8.0) 、2 ml の 0.5 M EDTA (pH8.0) 、988 ml の ddH₂O を加えて混合し、常温で保存する。

2-1-16. 1x PBS

20 mL の 10x PBS (Nacalai) に 180 ml の ddH₂O で全量を 200 ml にし、室温に保存した。

2-1-17. 2.8 M グリシン

210.19 g の Glycine (Nacalai) を ddH₂O で溶解し全量を 1 L にし、室温に保存した。

2-1-18. 3% BSA/1x PBS

6 g の Bovine Serum Albumin fraction V (Roche) を 100 ml の ddH₂O に溶解させて 20 ml の 10x PBS を加え、ddH₂O で全量を 200 ml にした。20 ml ずつ 50 ml チューブに分注し、-30°C で保存した。

2-1-19. 0.5% Tween20/1x PBS

1 ml の Tween20 (Nacalai) を 100 ml の ddH₂O に溶解させて 20 ml の 10x PBS と混和して ddH₂O で全量を 200 ml にし、室温に保存した。

2-1-20. 0.5% Gelatin/1x PBS

1 g の Gelatin (Nacalai) を 100 ml の ddH₂O に溶解させて 20 ml の 10x PBS を加え、ddH₂O で全量を 200 ml にした。20 ml ずつ 50 ml チューブに分注し、-30°C で保存した。

2-1-21. 1 M Tris-HCl (pH7.8, 37°C)

60.7 g の Tris を 400 ml の ddH₂O で溶かし、37°C の湯に浸しながら pH が 7.8 になるように 5 N HCl を加えた。その後 ddH₂O で全量を 500 ml にしてオートクレーブにより 121°C で 20 分滅菌後、37°C で保存した。

2-1-22. 5 M NaCl

29.22 g の NaCl を ddH₂O で溶解し全量を 100 ml にし、室温で保存した。

2-1-23. 1 M Mg (OAc)₂

21.45 g の Magnesium Acetate Hydrated (Nacalai) を ddH₂O で溶解し全量を 100 ml にし、室温で保存した。

2-1-24. 1 M DTT

1.54 g の DTT (Nacalai) を ddH₂O で溶解し全量を 10 ml にし、-30°C で保存した。

2-1-25. 10 mg/ml BSA

0.1 g の Bovine Serum Albumin fraction V を 10 ml の ddH₂O に溶かし、-30°C で保存した。

2-1-26. 5 N HCl

41.7 ml の HCl を ddH₂O の入ったビーカーに加えていき全量を 100 ml にし、ガラス瓶に入れて常温で保存した。

2-1-27. 5 N NaOH

100 g の Sodium Hydroxide (Nacalai) を 500 ml の ddH₂O に溶解し、プラスチック容器に移して室温で保存した。

2-1-28, 10x Transcription buffer

100 ml の 1 M Tris-HCl (pH7.8, 37°C)、20 ml の 5 M NaCl、6 ml の 1 M Mg (OAc)₂、0.4 ml の 0.5 M EDTA (pH8.0)、0.2 ml の 1 M DTT、5 µl の 10 mg/ml

BSA を混和し、ddH₂O で全量を 200 ml にした。2 ml ずつ 2 ml チューブに分注し、-30°C で保存した。

2-2. 大腸菌株

本研究で使用した大腸菌株を補足表 1 に示した。

2-3. プラスミドとオリゴヌクレオチド

本研究で使用したプラスミドを補足表 2 に、オリゴヌクレオチドを補足表 3 に示した。

2-4. 大腸菌の培養

本研究では大腸菌の培養方法として、LB 寒天培地と LB 液体培地を用いた。LB 寒天培地を用いる場合は白金耳やコンラージ棒を用いて菌を培地へ塗布し、37°C で静置培養した。LB 液体培地を用いる場合は LB 寒天培地からコロニーを爪楊枝でとり、液体培地へ浸した。もしくは一晩培養液から液体培地の 100 分の 1 の量を加えて 37°C で培養した。

2-5. 大腸菌生育曲線の測定

液体培地 5 ml に、サンプルとなる株の一晩培養液 50 µl を加え培養した。好気条件では L 字型試験管で振とうしながら培養し、比色計 (Advantec 製 TVS062CA) を用いて OD₆₀₀ の値を測定した。嫌気条件では COY 嫌気性チャンパー (Coy Laboratory Products) 内で静置培養し、増殖曲線は比色計 Mini photo 518R (Taitec) を用いて OD₆₆₀ によって培養液濁度を測定した。

2-6. PCR による特異的 DNA 断片の増幅と精製

0.2 ml PCR チューブに 10x Ex Taq buffer (Takara) を 10 µl、2.5 mM dNTP を 8 µl、5 units/µl Ex Taq DNA polymerase (Takara) を 0.5 µl、ddH₂O を 79.5 µl、50 ng/µl W3110 TypeA genomicDNA を 1 µl、さらに Forward primer 0.5 µl、Reverse primer 0.5 µl を加えて計 100 µl にし、95°C 5 分加熱後、95°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 30 秒を 30 サイクル行い、その後 72°C で 5 分おいて PCR 反応を行った。PCR 後、溶液を 1.5 ml チューブに移し替え、TE 飽和 Phenol を 50 µl、クロロホルム 50 µl を加え、vortex で 20 秒ほど攪拌した後 4°C、12000 rpm で 10 分間遠心する。上層の溶液を新しい 1.5 ml チューブに移し、クロロホルムを 100 µl 加えて 4°C、12000 rpm で 10 分間遠心した。再び上層を新しい 1.5 ml チューブに移し 3 M Sodium Acetate を 10 µl 加え、100% Ethanol を 250 µl 加えて vortex で 20 秒ほど攪拌した後 4°C、14000 rpm で 15 分間遠

心した。その後上清を丁寧に除去し、70% Ethanol を 100 μ l 加えて 4°C、14000 rpm で 5 分間遠心した。次に上清を完全に取り除いて遠心減圧乾燥器で乾燥させてから滅菌した ddH₂O を 50 μ l 加えて沈殿を溶解させ、アガロースゲル電気泳動を用いて特定 DNA の増幅を確認した。

2-7. 制限酵素による DNA の切断

1 μ g の DNA に対し、任意の制限酵素を 2 units 程度加え、制限酵素に添付されている buffer を 1 倍となるように加えた。その後、37°C で 1 時間反応させ、TE 飽和 Phenol を 50 μ l、クロロホルム 50 μ l を加え、vortex で 20 秒ほど攪拌した後 4°C、12000 rpm で 10 分間遠心した。上層の溶液を新しい 1.5 ml チューブに移し、クロロホルムを 100 μ l 加えて 4°C、12000 rpm で 10 分間遠心した。再び上層を新しい 1.5 ml チューブに移し 3 M Sodium Acetate を 10 μ l 加え、100% Ethanol を 250 μ l 加えて vortex で 20 秒ほど攪拌した後 4°C、14000 rpm で 15 分間遠心した。その後上清を丁寧に除去し、70% Ethanol を 100 μ l 加えて 4°C、14000 rpm で 5 分間遠心した。次に上清を完全に取り除いて遠心減圧乾燥器で乾燥させてから滅菌した ddH₂O を 50 μ l 加えて沈殿を溶解させ、アガロースゲル電気泳動を用いて DNA 断片を確認し、濃度を測定した。

2-8. DNA リガーゼによる DNA の連結

DNA Ligation kit Ver 2 (Takara) を用いて行った。0.004 pmol のプラスミドベクターに対し、挿入 DNA 断片を 0.04 pmol、Kit に添付されている Solution I を 5 μ l 加え、ddH₂O で全量を 10 μ l にした。16°C で 1 時間反応させ、反応溶液の内 5 μ l で大腸菌 DH5 α を形質転換した。

2-9. CaCl₂ 法による大腸菌細胞への形質転換

LB 液体培地が 50 ml 入ったガラスの三角フラスコに大腸菌一晚培養液を 500 μ l 加え、37°C で振とう培養し、OD₆₀₀ の値が 0.3 になるまで培養した。培養液を 50 ml チューブに移して 4°C、3000 rpm で 15 分遠心し、上清を除去し 0.1 M CaCl₂ を 10 ml 加えて丁寧に懸濁し、氷上で 10 分置く。4°C、3000 rpm で 15 分遠心し、上清を除去し 0.1 M CaCl₂ を 2.5 ml と 60% Glycerol を 0.8 ml 加えて丁寧に懸濁して大腸菌コンピテント細胞を作製し、1.5 ml チューブに 100 μ l ずつ分注して -80°C で保管した。大腸菌コンピテント細胞 100 μ l に 1 μ l のプラスミドを加え、氷上に 10 分置き、42°C で 45 秒間ヒートショックを与えた後、氷上に戻し、抗生物質入りの LB 寒天培地に全量を塗布して、37°C で一晚培養した。

2-10. コロニーPCRによる特異的 DNA 断片の増幅

ベクタープラスミドへの DNA 連結を確認するために、プラスミドを含む形質転換体の寒天平板培地上でのコロニーを鋳型として PCR を行った。1.5 ml チューブに、5 units/ μ l Ex Taq DNA polymerase を 0.5 μ l、10x Ex Taq buffer 10 μ l、2.5 mM dNTP 8 μ l、Forward primer 50 pmol、Reverse primer 50 pmol を加え、全量が 100 μ l になるように ddH₂O で調製した。ただし、プライマー対は確認される DNA 連結反応により異なるが、原則はベクタープラスミド上の配列とした。次に 0.2 ml PCR 用チューブに溶液を 11 μ l ずつ 8 本分注した。寒天平板培地上から 8 つのコロニーを選抜し、滅菌された爪楊枝で拾い、その後に PCR 溶液に懸濁した。懸濁後すぐに、適当な抗生物質を含む LB 寒天培地にそれぞれを植菌した。植菌された LB 寒天培地は 37°C で一晩培養した。コロニーを懸濁した PCR 溶液は、95°C 5 分加熱後、95°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 30 秒を 30 サイクルし、その後 72°C で 5 分おいて PCR 反応を行った。反応終了後に、6x Dye 2.5 μ l をそれぞれ加え、アガロース電気泳動で目的 DNA 断片の増幅またはそのサイズを確認し、組み換えプラスミドを選抜した

2-11. 大腸菌細胞からのプラスミド DNA 調製

QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) を用いた。適切な抗生物質を含む LB 培地 5 ml で一晩振とう培養した大腸菌培養液から大腸菌細胞を集菌した。その後、計 1 ml の ddH₂O で 3 本の 2 ml チューブに沈殿した細胞を懸濁し、溶液をひとつの 2 ml エッペンに移し遠心分離 (12000 rpm、4°C、5 分間) し、アスピレーターを用いて上清を取り除いた。次に、250 μ l の P1 buffer で沈殿を懸濁し、250 μ l の P2 buffer を加え反転し、350 μ l の N3 buffer を加え穏やかに懸濁し、遠心分離 (14000 rpm、4°C、10 分間) した。上清を QIAprep Spin Column に移し、遠心分離 (14000 rpm、4°C、1 分間) し下側のカラムの溶液を捨てた。0.5 ml の PB buffer を加え、遠心分離 (14000 rpm、4°C、1 分間) し下側のカラムの溶液を捨てた。0.75 mL の PE buffer を加え、遠心分離 (15000 rpm、4°C、1 分間) し下側のカラムの溶液を捨てた。そして、上側の QIAprep Spin Column を 1.5 ml エッペンに差し、50 μ l の EB buffer を加え 1 分静置し、遠心分離 (15000 rpm、4°C、1 分間) した。DNA 溶液について 260 nm の吸光度を測定し、濃度 $1 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$ より算出した。DNA 溶液は -30°C で保存した。

2-12. DNA 塩基配列の決定

塩基配列決定にはサンガー法を用い、実際の反応は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) により行った。0.2 ml チューブに、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 添付の Premix 0.5 μ l、BigDye

Termionator v1.1/v3.1 Sequencing Buffer (5x) 3.75 μ l、プラスミド DNA を終農度が 15 ng/ μ l、適当な 5 pmol/ μ l Primer を 3.2 pmol になるように加え、全量が 20 μ l になるように ddH₂O で調製した。これについて PCR 反応を行った。反応サイクルは 96°C 1 分で加熱後、96°C 10 秒、50°C 5 秒、60°C 4 分を 25 サイクルした。反応終了後、反応液は 1.5 ml エッペンに移し、Sodium Acetate/EDTA buffer 1 μ l、EtOH 75 μ l を加え、激しく攪拌させた。その後、遠心分離 (14000 rpm、4°C、20 分) し、上清をきれいに除いた。さらに、70% EtOH 50 μ l を添加して、遠心分離 (14000 rpm、4°C、5 分) し、上清を完全に除いて乾燥させた。沈殿は Hi Di Formamide (Amersham) 15 μ l に溶かし激しく攪拌させた後、溶液を解析用チューブに移した。塩基配列決定試料溶液は、オートシーケンサー (Applied biosystems 3100 Genetic Analyzer) により解析を行った。Applied biosystems 3100 Genetic Analyzer 取り扱い法に従って操作を行い、塩基配列データを取得した。

2-13. アガロースゲル電気泳動

Agarose (Nacalai) を 1x TAE buffer に任意の濃度になるように加え、電子レンジで溶解した。溶解したゲル溶液を電気泳動装置 Mupid-2 (Cosmo Bio) の付属ゲル鋳型に流し込み、コームをさした。完全にゲルが固化したらコームを抜き取った。ゲルは使用する前に随時作製した。作製したゲルを支持板ごと電気泳動槽におき、これに 1x TAE buffer をゲル表面上 5 mm 程度の高さまで注いだ。ウェルに 6x Dye と混合させた泳動試料とマーカーを添加し、100 V で泳動を行った。泳動後、ゲルを支持板からはずし EtBr 溶液に 5 分浸した後、紫外線照射することによって DNA を検出した。

2-14. FCM を用いた大腸菌細胞内 GFP 蛍光強度の測定

大腸菌を培養し、任意の増殖相になったら培養液 1ml に対して BD FACS caliber (BD) を用いて GFP 蛍光強度の測定を行った。100000 の細胞について測定し、光源として 488 nm アルゴンレーザーにより励起させることで 530 nm の蛍光の検出を行った。また、GFP は発色団形成時に酸素を必要とするため、嫌気条件で培養したものは研究室内で氷上に 30 分置いた後に測定を行った。

2-15. Promoter Chip 解析

シャーレに 2 ml の 10x Transcription Buffer と 18 ml の ddH₂O を加え Promoter chip を入れて DNA 結合性蛋白質を加え、37°C で 30 分振とうした。0.6 mL の 37%ホルムアルデヒド (Nacalai) を加え、37°C で 10 分振とうした。2.08 mL の 2.8 M グリシンを加え、37°C で 5 分振とうした。シャーレ内の溶液

を捨て、20 ml の 1x PBS で洗浄し、室温で 5 分振とうし、この過程を 3 回繰り返した。20 ml の 3% BSA/1x PBS を加え、室温で 30 分振とうした。シャーレ内の溶液を捨て、20 ml の 0.5% Tween20/1x PBS で洗浄し、室温で 5 分振とうし、この過程を 3 回繰り返した。20 ml の 0.5% Gelatin/1x PBS、80 μ l の 0.5 M EDTA、適当な一次抗体を加え、室温で 60 分振とうした。シャーレ内の溶液を捨て、20 ml の 0.5% Tween20/1x PBS で洗浄し、室温で 3 分振とうし、この過程を 3 回繰り返した。20 mL の 0.5% Gelatin/1x PBS、80 μ l の 0.5 M EDTA、適当な二次抗体を加え、室温で 60 分振とうした（以降は遮光して行った）。シャーレ内の溶液を捨て、20 ml の 0.5% Tween20/1x PBS で洗浄し、室温で 3 分振とうし、この過程を 3 回繰り返した。Promoter chip を 1500 rpm で 1 分遠心分離し、マイクロアレイスキャナ（Agilent Technologies）を用いてスキャンを行った。

第3章 結果

3-1. Promoter Chip を用いた大腸菌ゲノムの機能的プロモーターの同定

約 1000 種類の大腸菌プロモーター領域 (約 700 塩基対) を pGRP プラスミドの *gfp* 遺伝子上流に組み込み、GFP をレポーターとして遺伝子発現をモニターすることができる PPT クローンが当研究室で構築された。PPT クローンを鋳型として、5'末端にアミノ基を導入した *gfp* 遺伝子上に相補するプライマーとクローン化されているプロモーター上流に特異的なプライマーを用いて、PCR によりプロモーター領域と *gfp* 遺伝子の開始コドン下流 134 bp を伸長し、一方の鎖がアミノ化された約 1000 種類のプロモーターDNA を作製した (図 4)。

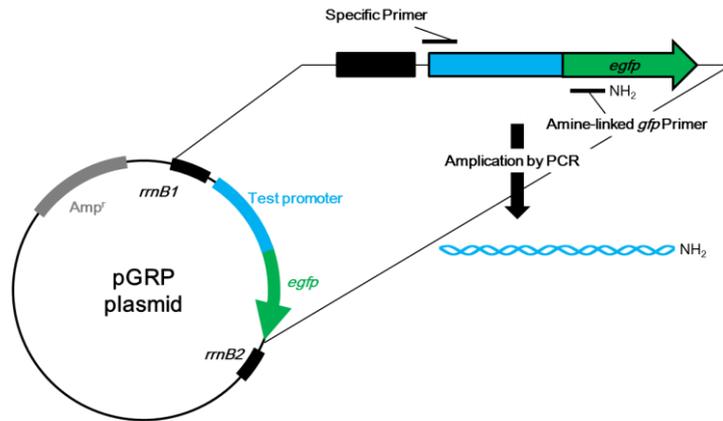


図 4. アミノ基融合プロモーターDNA の作製 (Yamamoto *et al.*, 2008)

作製したプロモーターDNA をエステル反応基でカバーしたスライドガラス (Takara) と反応させることでアミノ基とエステル反応基間に共有結合を形成させ、プロモーターDNA をスライドガラスに固定し、約 1000 種類プロモーターが 2 スポットずつ並べられたプロモーターチップを作製された (図 5) (Yamamoto & Ishihama, 2007 ; Yamamoto *et al.*, 2008)。

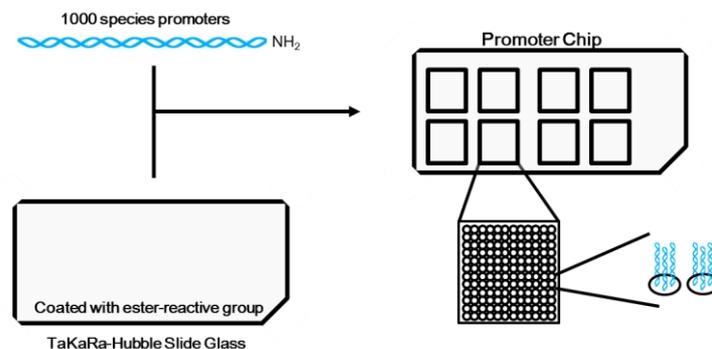


図 5. プロモーターチップの作製

プロモーターチップ上で RNA ポリメラーゼのプロモーターDNA への結合を検出するため、RNA ポリメラーゼの α 、 β 、 β' 、 σ の 4 種類の各サブユニットに対する抗体を用いて検出に最適な抗体を選別した (鈴木、2012)。その結果 anti- β' 抗体を用いた際に最も高感度に RNA ポリメラーゼの結合を確認することができた系を基に次の実験を行った。本研究では RNA Polymerase Holoenzyme (σ^{70} saturated) (Epicentre) をプロモーターチップと反応させ、一次抗体に Anti- β' 抗体 (Neo Clone)、二次抗体に Cy3-IgG 抗体 (GE Healthcare) を用いて解析を行った。Promoter Chip 上のプロモーターに対する RNA ポリメラーゼの結合を Cy3 の蛍光強度により調べ、2 スポットの平均値を RNA ポリメラーゼ結合強度として算出した。

959 プロモーターのうち 668 プロモーターにおいて結合が確認された。結合が見られたプロモーターは結合強度により 3 つのグループ (グループ A、グループ B、グループ C) に分類した。グループ A は検出した結合強度が 100 より大きいものとして、289 種類含まれた。グループ B は中程度の活性を持つものとして結合強度が 10 より大きく 100 以下のプロモーターが 260 種類存在した。グループ C は低活性なものとして結合強度が 0 より大きく 10 以下のプロモーターが 119 種類見つかった (図 6)。また、プロモーターチップ上の二成分制御系の 60 プロモーター (ヒスチジンキナーゼ : 28 種、レスポンスレギュレーター : 32 種) のうちヒスチジンキナーゼ 27 種とレスポンスレギュレーター 27 種の計 54 種のプロモーターに対して RNA ポリメラーゼの結合が確認できた。一方 6 種 (*atoC*、*creB*、*narX*、*qseB*、*rscB*、*yedW*) からは結合が確認できなかった。二成分制御系プロモーターについても同様に分類することができ、グループ A に 37 種 (*barA*、*torS*、*cusR*、*narQ*、*ompR*、*torR*、*uhpA*、*rssB*、*kdpD*、*yehT*、*atoS*、*ypdA*、*cheY*、*qseC*、*baeR*、*ntrB*、*arcA*、*rscD*、*arcB*、*rstA*、*cusS*、*basS*、*fimZ*、*rscC*、*creC*、*phoP*、*basR*、*evgS*、*narP*、*zraS*、*envZ*、*glrK*、*dcuS*、*baeS*、*ypdB*、*citA*、*uhpB*、*cpxR*)、グループ B に 14 種 (*cheB*、*narL*、*ntrC*、*zraR*、*uvrY*、*yehU*、*phoQ*、*cpxA*、*yedV*、*phoB*、*glrR*、*dcuR*、*citB*、*phoR*)、グループ C に 3 種 (*evgA*、*kdpE*、*cpxR*) のプロモーターが確認できた (図 7)。

3-2. 大腸菌全転写因子プロモーターの発現解析

3-2-1. 全 DNA 結合性転写因子遺伝子のオペロン構成

大腸菌ゲノム上の 306 種類の DNA 結合性転写因子遺伝子のうち 125 種類がオペロンを構成しており、ポリシストロニックな転写がされていることが判明した。一方、181 種類はオペロンを構成しないため、1 つの遺伝子が単独で転写される構成となっていることが考えられた。(補足表 4)。

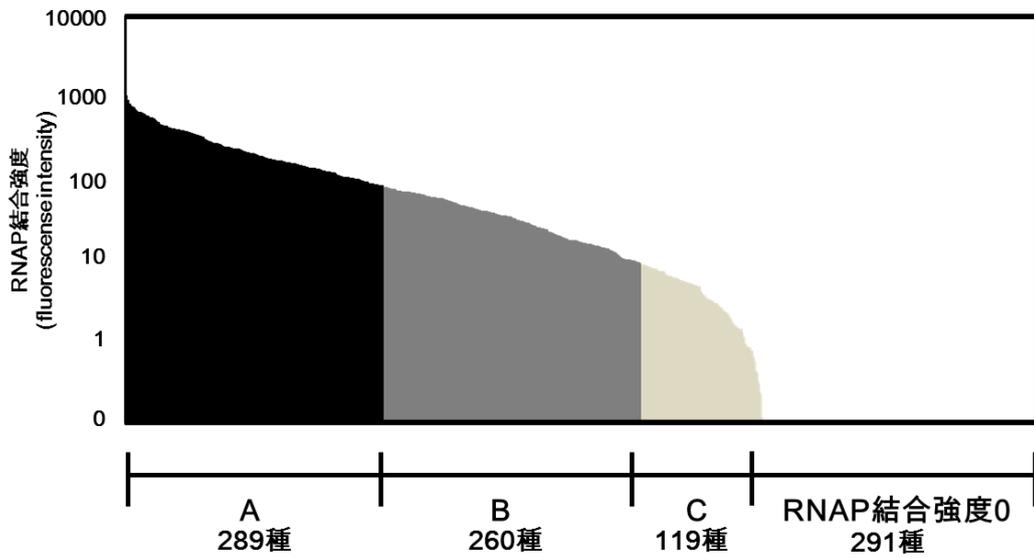


図 6. 大腸菌遺伝子プロモーターに対する RNA ポリメラーゼ結合強度の測定

グループ A (黒)：結合強度が 101 以上のプロモーター

グループ B (灰)：結合強度が 11~100 のプロモーター

グループ C (白)：結合強度が 10 以下のプロモーター

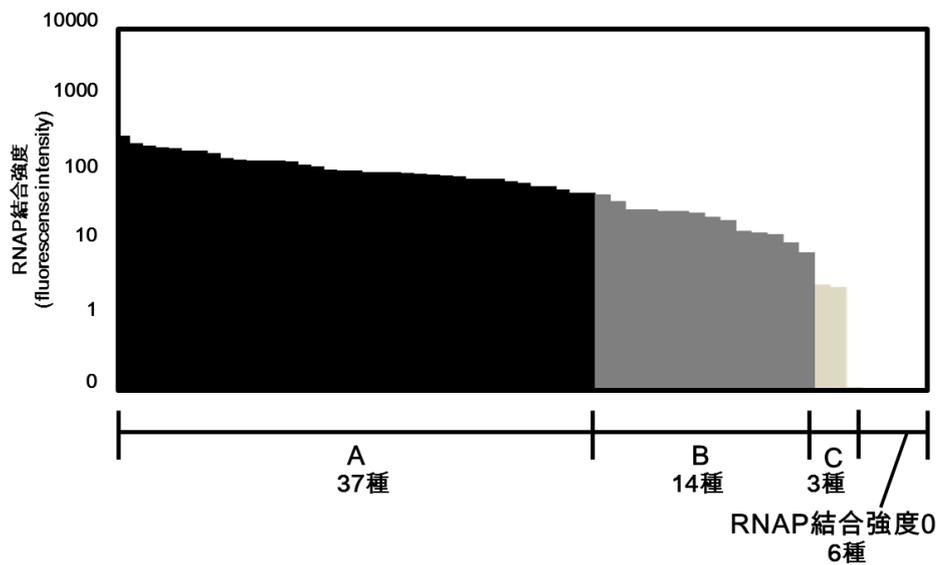


図 7. 大腸菌二成分制御系遺伝子プロモーターに対する RNA ポリメラーゼ結合強度の測定

グループ A (黒)：結合強度が 101 以上のプロモーター

グループ B (灰)：結合強度が 11~100 のプロモーター

グループ C (白)：結合強度が 10 以下のプロモーター

3-2-2. 全 DNA 結合性転写因子プロモーターの *gfp* レポータープラスミドの構築

大腸菌 DNA 結合性転写因子の発現をモニターするプラスミドセットを構築した。各転写因子遺伝子の開始コドン上流のプロモーター領域を含む約 500 bp と下流 150 bp の領域を PCR で増幅させるため、プロモーター上流側には *Bgl*II 制限酵素部位 6 bp (5'-AGATCT-3') を持つプライマーを設計し、下流側には *Eco*T22I 制限酵素部位 6 bp (5'-ATGCAT-3') を持つプライマーを設計した。この設計で 97 種類の転写因子遺伝子 (*aaeR*, *ada*, *agaR*, *allR*, *allS*, *birA*, *cbI*, *chbR*, *csiR*, *cynR*, *cysB*, *deoT*, *dicA*, *dmlR*, *envY*, *eutR*, *exuR*, *fadR*, *feaR*, *frlR*, *fucR*, *gadW*, *gadX*, *gcvA*, *glcC*, *glpR*, *hcaR*, *hdfR*, *hicA*, *hicB*, *iclR*, *lexA*, *lldR*, *lysR*, *marA*, *mcbR*, *metR*, *mngR*, *mntR*, *mqsA*, *mqsR*, *nadR*, *nanR*, *nhaR*, *perR*, *puuD*, *puuR*, *qseD*, *radA*, *rhaS*, *rhmR*, *rob*, *rodZ*, *soxS*, *tdcA*, *ttdR*, *uxuR*, *xylR*, *yafC*, *yafY*, *yahB*, *ybaQ*, *ybdO*, *ybeF*, *ybhD*, *ycaN*, *ycjZ*, *ydcI*, *ydcN*, *ydcR*, *yddM*, *ydfH*, *ydhB*, *ydiP*, *yeaM*, *yeeY*, *yegW*, *yeiE*, *yfeR*, *yfiE*, *yfjR*, *ygbI*, *ygfI*, *yhaJ*, *yhjC*, *yiaU*, *yidL*, *yidZ*, *yihL*, *yihW*, *yijO*, *yjhI*, *ykgD*, *ymfN*, *yneJ*, *ynfL*, *yqhC*) のプロモーターの増幅を計画し、*gfp* プラスミド pGRPH376 (*aaeRp-gfp*)、pGRPH337 (*adap-gfp*)、pGRPH417 (*agaRp-gfp*)、pGRPH320 (*allRp-gfp*)、pGRPH389 (*allSp-gfp*)、pGRPH418 (*birAp-gfp*)、pGRPH398 (*cbIp-gfp*)、pGRPH339 (*chbRp-gfp*)、pGRPH419 (*csiRp-gfp*)、pGRPH381 (*cynRp-gfp*)、pGRPH392 (*cysBp-gfp*)、pGRPH327 (*deoTp-gfp*)、pGRPH304 (*dicAp-gfp*)、pGRPH397 (*dmlRp-gfp*)、pGRPH346 (*envYp-gfp*)、pGRPH351 (*eutRp-gfp*)、pGRPH420 (*exuRp-gfp*)、pGRPH421 (*fadRp-gfp*)、pGRPH347 (*feaRp-gfp*)、pGRPH422 (*frlRp-gfp*)、pGRPH423 (*fucRp-gfp*)、pGRPH353 (*gadWp-gfp*)、pGRPH345 (*gadXp-gfp*)、pGRPH407 (*gcvAp-gfp*)、pGRPH424 (*glcCp-gfp*)、pGRPH425 (*glpRp-gfp*)、pGRPH405 (*hcaRp-gfp*)、pGRPH416 (*hdfRp-gfp*)、pGRPH318 (*hicAp-gfp*)、pGRPH310 (*hicBp-gfp*)、pGRPH322 (*iclRp-gfp*)、pGRPH426 (*lexAp-gfp*)、pGRPH427 (*lldRp-gfp*)、pGRPH408 (*lysRp-gfp*)、pGRPH349 (*marAp-gfp*)、pGRPH428 (*mcbRp-gfp*)、pGRPH414 (*metRp-gfp*)、pGRPH429 (*mngRp-gfp*)、pGRPH325 (*mntRp-gfp*)、pGRPH313 (*mqsAp-gfp*)、pGRPH319 (*mqsRp-gfp*)、pGRPH306 (*nadRp-gfp*)、pGRPH430 (*nanRp-gfp*)、pGRPH378 (*nhaRp-gfp*)、pGRPH358 (*perRp-gfp*)、pGRPH317 (*puuDp-gfp*)、pGRPH307 (*puuRp-gfp*)、pGRPH415 (*qseDp-gfp*)、pGRPH316 (*radAp-gfp*)、pGRPH342 (*rhaSp-gfp*)、pGRPH328 (*rhmRp-gfp*)、pGRPH344 (*robp-gfp*)、pGRPH312 (*rodZp-gfp*)、pGRPH356 (*soxSp-gfp*)、pGRPH383 (*tdcAp-gfp*)、pGRPH373 (*ttdRp-gfp*)、pGRPH433 (*uxuRp-gfp*)、pGRPH343 (*xylRp-gfp*)、pGRPH379

(*yafCp-gfp*)、pGRPH359 (*yafYp-gfp*)、pGRPH380 (*yahBp-gfp*)、pGRPH308 (*ybaQp-gfp*)、pGRPH387 (*ybdOp-gfp*)、pGRPH390 (*ybeFp-gfp*)、pGRPH391 (*ybhDp-gfp*)、pGRPH388 (*ycaNp-gfp*)、pGRPH377 (*ycjZp-gfp*)、pGRPH393 (*ydcIp-gfp*)、pGRPH309 (*ydcNp-gfp*)、pGRPH434 (*ydcRp-gfp*)、pGRPH311 (*yddMp-gfp*)、pGRPH435 (*ydfHp-gfp*)、pGRPH396 (*ydhBp-gfp*)、pGRPH334 (*ydiPp-gfp*)、pGRPH331 (*yeaMp-gfp*)、pGRPH400 (*yeeYp-gfp*)、pGRPH436 (*yegWp-gfp*)、pGRPH401 (*yeiEp-gfp*)、pGRPH404 (*yfeRp-gfp*)、pGRPH406 (*yfiEp-gfp*)、pGRPH362 (*yfjRp-gfp*)、pGRPH437 (*ygbIp-gfp*)、pGRPH410 (*yglIp-gfp*)、pGRPH374 (*yhaJp-gfp*)、pGRPH411 (*yhjCp-gfp*)、pGRPH412 (*viaUp-gfp*)、pGRPH354 (*ydLp-gfp*)、pGRPH413 (*ydZp-gfp*)、pGRPH439 (*yihLp-gfp*)、pGRPH440 (*yihWp-gfp*)、pGRPH355 (*yijOp-gfp*)、pGRPH330 (*yjhIp-gfp*)、pGRPH335 (*ykgDp-gfp*)、pGRPH365 (*ymfNp-gfp*)、pGRPH394 (*yneJp-gfp*)、pGRPH395 (*ynfLp-gfp*)、pGRPH352 (*yqhCp-gfp*) の構築を行った。使用したプライマー及び伸長した領域は補足表 5 に示した。

3-2-3. 大腸菌細胞における DNA 結合性転写因子プロモーター活性の測定法

始めに、それぞれの *gfp* レポータープラスミドを導入した大腸菌において、各プロモーター活性を蛍光プレートリーダーで測定した。しかし、培養液中に潜在する蛍光強度により、正確な測定が困難であった。そこで、フローサイトメーターBD FACS Calibur により、培養液中の細胞個々の蛍光強度を測定し、各プロモーター活性の評価を試みた。BD FACS Calibur を用いて大腸菌培養液中の 100,000 細胞について GFP 蛍光強度を測定したところ、20%~30%は細菌細胞より小さな粒子を検出してしまい、結果として 70,000 から 80,000 細胞の蛍光強度を検出することが可能であった。この細胞集団中で検出した蛍光強度から、相加平均 (Mean)、相乗平均 (GeoMean)、中央値 (Median)、極大値 (PeakCh) が、集団の特徴的な値として算出される (図 8)。*gfp* レポータープラスミドをもたない大腸菌で BD FACS Calibur を用いて蛍光強度を測定した結果、Mean が 8.69、GeoMean が 6.96 であった (図 8A)。Median が 7.5 で Mean 値と GeoMean 値の間であり、PeakCh 値の 10 もほぼ平均値付近であり、相加平均の標準偏差 (6.59) 内に収まっていた (図 8A)。このように、*gfp* 遺伝子をもたない大腸菌からでも、GFP タンパク質と同じ波長の蛍光強度が弱いながら検出されることが明らかとなり、各プロモーター活性を評価すべく蛍光強度測定において、バックグラウンドとなる *gfp* レポータープラスミドをもたない大腸菌における蛍光強度の決定が必要であることが分かった (後述)。同様な実験を、比較的プロモーター活性が強い *uvrY*プロモーター *gfp* 融合遺伝子プラスミド pGRK179 をもつ大腸菌で BD FACS Calibur を用いて行った。その

結果、Mean が 332.8、GeoMean が 155.07 で大きく異なった (図 8B)。さらに、Median が 273.84 であり、Mean 値と GeoMean 値の間に存在していたが、集団中の最もな特徴を示す PeakCh 値は 465 といずれの平均値とも大きなずれを生じた。これらの要因は、細胞集団における蛍光強度分布が非正規分布であることに影響だと考えられる (図 8B)。しかし、PeakCh 値の 465 は相加平均 (332.8) の標準偏差 (303.65) 内に収まっていた (図 8B)。つまり、大腸菌細胞集団中の正確な蛍光強度の特徴を示すためには、平均値 (Mean と GeoMean) ではなく、極大値 (PeakCh) が有効であることが示唆された。そこで、適当な 60 種類のプロモーター *gfp* 融合プラスミドを保有する大腸菌株を、好気条件における誘導期、増殖期、定常期と嫌気条件における誘導期、増殖期、定常期の 6 つの条件それぞれで 2 回ずつ計 720 回測定し、それぞれの Mean と PeakCh の値を得た。これらの値を比較するために、それぞれのプロモーターにおける相加平均値 (Mean) と極大値 (PeakCh) をグラフ上でプロットした (図 9)。その結果、両者には切片を持たない直線的な関係を持ち、極大値は相加平均値の約 1.5 倍を示した。これらの結果より、本実験において測定するプロモーター活性の蛍光強度は PeakCh 値を用いることで正確に評価できると判断できた。

次に、BD FACS Calibur での PeakCh 値測定による大腸菌プロモーター活性蛍光強度測定のバックグラウンドを決定した。*gfp* レポータープラスミドをもたない大腸菌で、予定する培養の 6 条件 (後述) で各々 24 回ずつの計 144 回の蛍光強度を測定した結果、平均 PeakCh 値が 8.69 (標準偏差 2.59) であった。したがって、今後は BD FACS Calibur を用いた GFP 蛍光強度による大腸菌プロモーター活性測定でのバックグラウンド値を 11.28 (8.69+2.59) と定め、各々の正味のプロモーター活性を算出するために用いた。

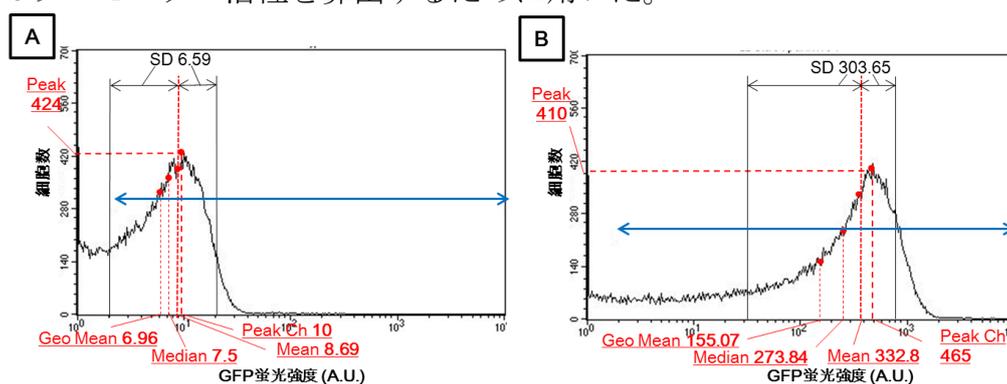


図 8. フローサイトメトリーによる GFP 蛍光強度の測定

- A: 大腸菌 W3110 TypeA 株の GFP 蛍光強度測定値 (GFP 蛍光強度が 1 より高いもののみ注目 : 青矢印)
- B: 大腸菌 W3110 TypeA/pGRK179 株の好気条件定常期における GFP 蛍光強度測定値 (GFP 蛍光強度が 1 より高いもののみ注目 : 青矢印)

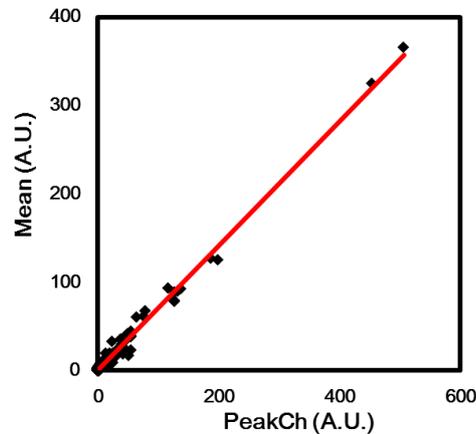


図 9. 各形質転換体 GFP 蛍光強度の Mean (相加平均値) と PeakCh (極大値) の比較

3-2-4. 好気条件で培養した大腸菌細胞における DNA 結合性転写因子プロモーター活性

LB 液体培地を 6 ml 加えた L 字型試験管に W3110 TypeA 株の一晩培養液から 60 μ l 植菌して 37°C で振とう培養し、増殖曲線を作成し、OD₆₀₀ 値が 0.05 を誘導期、0.3 を増殖期、2.0 を定常期とした (図 10)。各プロモーターと *gfp* の融合遺伝子プラスミドを持つ大腸菌を Ap を含む LB 培地を加えた L 字管で同様に培養し、OD₆₀₀ 値が誘導期、増殖期、定常期の値となった際に GFP 蛍光強度の測定を行いプロモーター活性を算出した。誘導期、増殖期、定常期におけるプロモーター活性の総和を潜在的なプロモーター活性とし、機能的なプロモーターを探索した。プロモーター活性の数値が 0 より大きいものを活性化の条件とした。

LB 培地で L 字型試験管による好気培養では 97 プロモーターのうち 93 プロモーターにおいて活性化が見られた。活性化が見られたプロモーターはそれぞれプロモーター活性が異なっていた。そこでプロモーター活性により 3 つのグループ (グループ A、グループ B、グループ C) に分類した (図 11)。グループ A は検出したプロモーター活性が 100 より大きいものとして 23 種類 (*mqsAp*, *soxSp*, *hicBp*, *marAp*, *rodZp*, *gadXp*, *yqhCp*, *yddMp*, *nadRp*, *robp*, *gadWp*, *puuRp*, *feaRp*, *yijOp*, *chbRp*, *envYp*, *yidLp*, *eutRp*, *xylRp*, *rhaSp*, *ybaQp*, *dmlRp*, *dicAp*, *mcbRp*, *exuRp*) 含まれた。グループ B は中程度の活性をもつものとしてプロモーター活性が 10 より大きく 100 以下のものが 60 種類 (*ykgDp*, *ydcNp*, *hdfRp*, *ydiPp*, *qseDp*, *ydcIp*, *yeaMp*, *adap*, *glcCp*, *ygbIp*, *cysBp*, *mngRp*, *allRp*, *lexAp*, *ycjZp*, *nhaRp*, *yfjRp*, *yihLp*, *ybdOp*, *glpRp*, *agaRp*, *yhaJp*, *ynfLp*, *puuDp*, *ycaNp*, *yeeYp*, *ybhDp*, *yiaUp*, *yneJp*,

yihWp, *aaeRp*, *ydhBp*, *yeiEp*, *nanRp*, *allSp*, *tttRp*, *cblp*, *uxuRp*, *ybeFp*, *perRp*, *yfeRp*, *csiRp*, *yafCp*, *deoTp*, *lldRp*, *mntRp*, *yafYp*, *birAp*, *frlRp*, *fadRp*, *fucRp*, *ydcRp*, *yegWp*, *metRp*, *tdcAp*, *radAp*, *yahBp*, *ydfHp*, *yidZp*, *cynRp*) 含まれた。グループ C は低活性なものとしてプロモーター活性が 0 より大きく 10 以下のものが 8 種類 (*mqsRp*, *hicAp*, *yjhIp*, *iclRp*, *ymfNp*, *rhmRp*, *hcaRp*, *lysRp*) 含まれた。

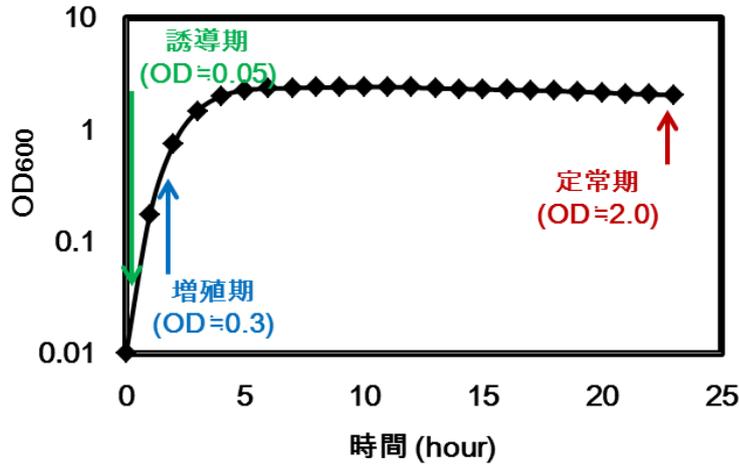


図 10. 好気条件における大腸菌 W3110 TypeA の増殖曲線

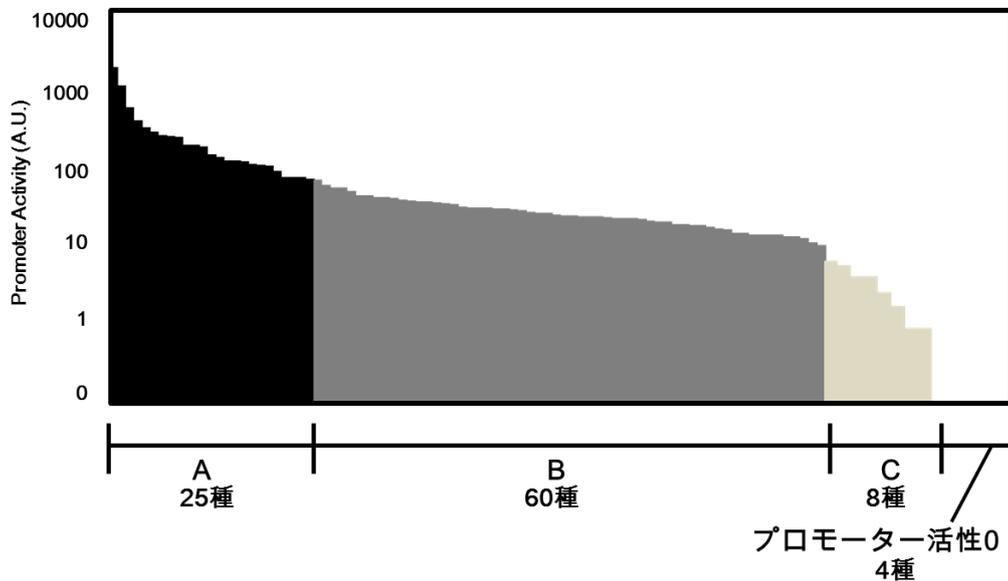


図 11. 好気条件における大腸菌転写因子のプロモーター活性
 グループ A (黒)：結合強度が 101 以上のプロモーター
 グループ B (灰)：結合強度が 11~100 のプロモーター
 グループ C (白)：結合強度が 10 以下のプロモーター

さらに、同じ形質転換体においても誘導期、増殖期、定常期の3つの条件でプロモーター活性が異なることが判明した。そこで、誘導期と増殖期、および増殖期と定常期におけるプロモーター活性の差がバックグラウンド値 (11.28) を超えたプロモーターを増殖相に応じて活性が変動するプロモーターとして分類を行った。誘導期、増殖期、定常期で構成的に活性化したプロモーターは *friRp*, *fadRp*, *ydcRp*, *yegWp* の4種であった (図 12A)。増殖期と定常期で同程度活性化が見られたプロモーターは *rodZp*, *yqhCp*, *yddMp*, *dicAp*, *nanRp*, *deoTp* の6種であった (図 12B)。特定の条件で活性が増加したプロモーターが83種見つかった。そのうち増殖期でのみ活性化したプロモーターが *yahBp*, *tdcAp*, *cynRp* の3種 (図 13A)、増殖期で活性が増加したプロモーターが *mqsAp*, *soxSp*, *hicBp*, *marAp*, *yijOp*, *chbRp*, *envYp*, *yidLp*, *eutRp*, *xylRp*, *rhaSp* の11種 (図 13B) であった。一方定常期でのみ活性化したプロモーターが *puuDp*, *yiaUp*, *aaeRp*, *metRp*, *yidZp*, *mqsRp*, *hicAp*, *iclRp*, *yjhIp*, *ymfNp*, *rhmRp*, *hcaRp*, *lysRp* の13種 (図 14A)、定常期で活性が増加したプロモーターが *gadXp*, *nadRp*, *robp*, *gadWp*, *puuRp*, *feaRp*, *ybaQp*, *dmlRp*, *mcbRp*, *exuRp*, *ykgDp*, *ydcNp*, *hdfRp*, *ydiPp*, *qseDp*, *ydcIp*, *yeaMp*, *adap*, *glcCp*, *ygbIp*, *cysBp*, *mngRp*, *allRp*, *lexAp*, *ycjZp*, *nhaRp*, *yfjRp*, *yihLp*, *ybdOp*, *glpRp*, *agaRp*, *yhaJp*, *ynfLp*, *ycaNp*, *yeeYp*, *ybhDp*, *yneJp*, *yihWp*, *ydhBp*, *yeiEp*, *allSp*, *cblp*, *ttdRp*, *uxuRp*, *ybeFp*, *perRp*, *yfeRp*, *csiRp*, *yafCp*, *lldRp*, *mntRp*, *yafYp*, *birAp*, *fucRp*, *radAp*, *ydfHp* の56種 (図 14B) となった。

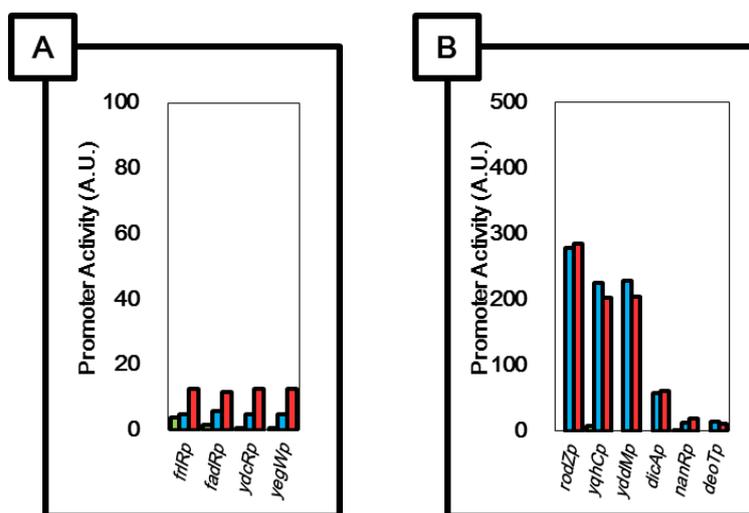


図 12. 好気条件の各増殖相で同程度活性化した転写因子プロモーター

A: 誘導期、増殖期、定常期で構成的に活性化

B: 増殖期、定常期で同程度活性化

緑は誘導期、青は増殖期、赤は定常期でのプロモーター活性

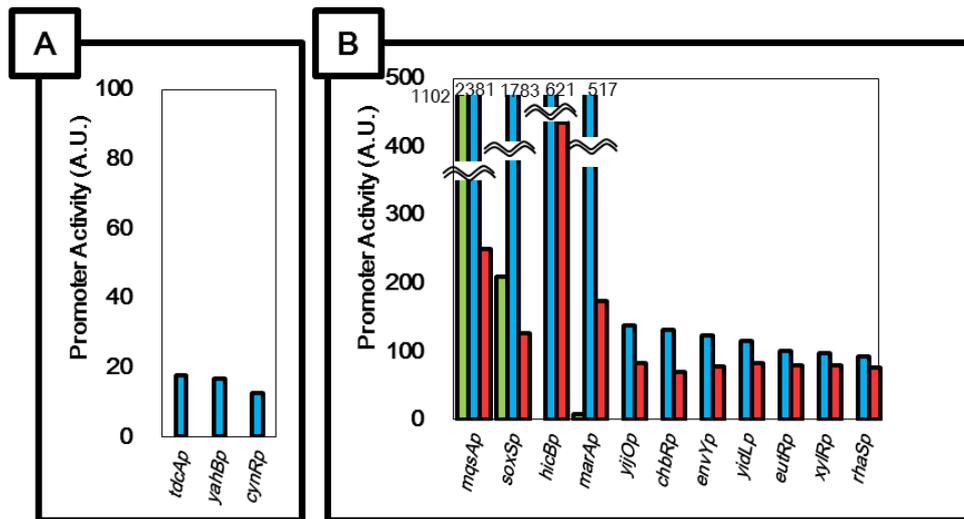


図 13. 好気条件増殖期で活性化した転写因子プロモーター
 A: 増殖期でのみ活性化
 B: 増殖期で活性増加
 緑は誘導期、青は増殖期、赤は定常期でのプロモーター活性

3-2-5. 嫌気条件で培養した大腸菌細胞における DNA 結合性転写因子プロモーター活性

LB 液体培地を 6 ml 加えた試験管に W3110 TypeA 株の一晩培養液から 60 μ l 植菌して嫌気チャンパー内で 37°C で静置培養し、増殖曲線を作成し、OD₆₀₀ 値が 0.05 を誘導期、0.3 を増殖期、1.0 を定常期とした (図 15)。各プロモーターと *gfp* の融合遺伝子プラスミドを持つ大腸菌を Ap を含む LB 培地を加えた試験管で同様に培養し、OD₆₀₀ 値が誘導期、増殖期、定常期の値となった際に GFP 蛍光強度の測定を行いプロモーター活性を算出した。誘導期、増殖期、定常期におけるプロモーター活性の総和を潜在的なプロモーター活性とし、機能的なプロモーターを探索した。プロモーター活性の数値が 0 より大きいものを活性化の条件とした。

LB 培地で試験管による嫌気培養では 97 プロモーターのうち 87 プロモーターにおいて活性化が見られた。活性化が見られたプロモーターはそれぞれプロモーター活性が異なっていた。そこでプロモーター活性により 3 つのグループ (グループ A、グループ B、グループ C) に分類した (図 16)。グループ A は検出したプロモーター活性が 100 より大きいものとして 21 種類 (*soxSp*, *mqsAp*, *hicBp*, *gadXp*, *marAp*, *rodZp*, *yqhCp*, *robp*, *puuRp*, *yddMp*, *xylRp*, *chbRp*, *rhaSp*, *envYp*, *feaRp*, *gadWp*, *yijOp*, *eutRp*, *yidLp*, *nadRp*, *dicAp*) 含まれた。グループ B は中程度の活性をもつものとしてプロモーター活性が 10 より大きく 100 以下のものが 55 種類 (*ybaQp*, *ykgDp*, *hdfRp*, *ydcNp*, *ydcIp*,

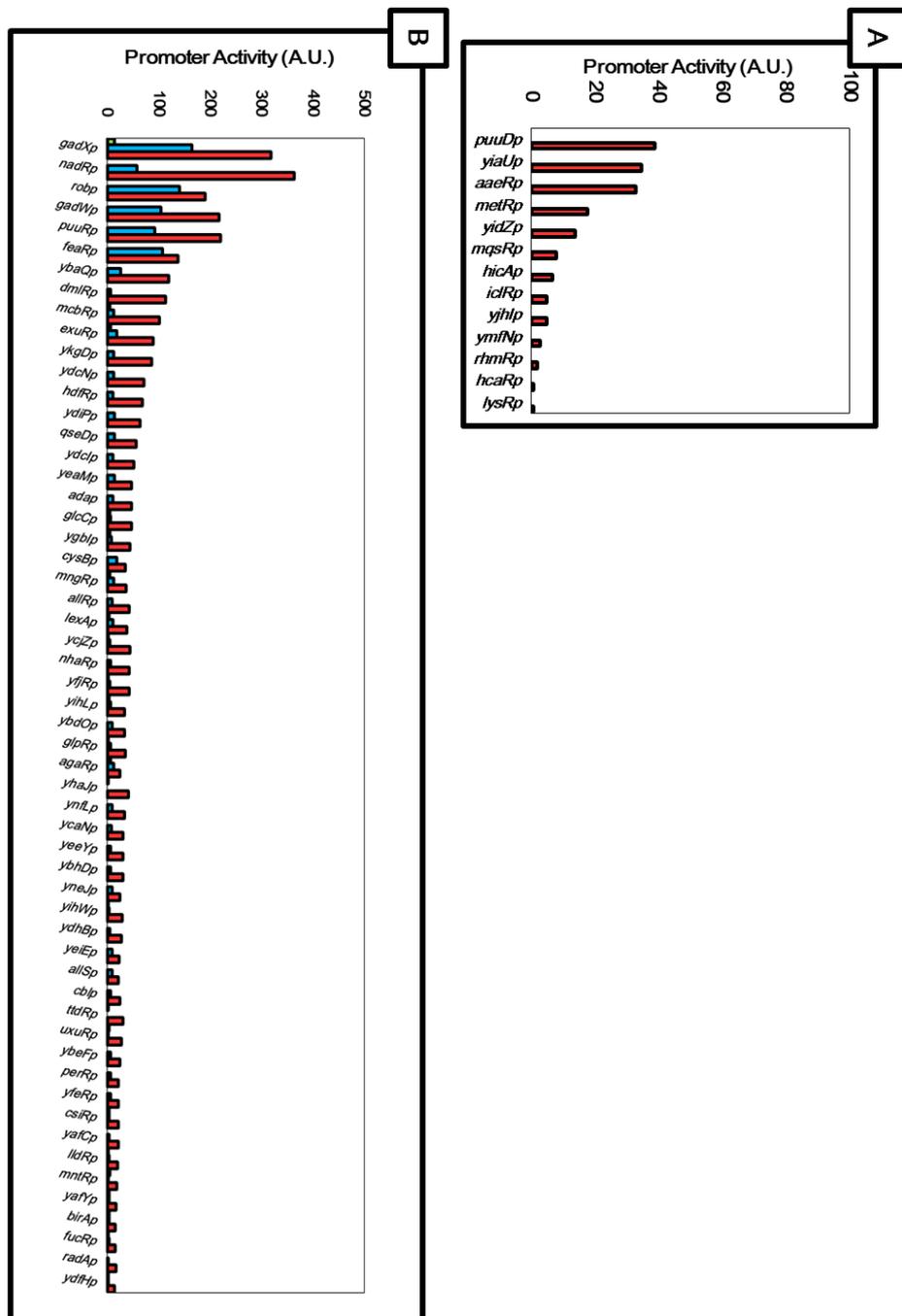


図 14. 好気条件定常期で活性化した転写因子プロモーター

A: 定常期でのみ活性化

B: 定常期で活性増加

緑は誘導期、青は増殖期、赤は定常期でのプロモーター活性

qseDp, *adap*, *mngRp*, *ydiPp*, *allRp*, *exuRp*, *yeaMp*, *yihLp*, *yhaJp*, *mcbRp*, *cysBp*, *lexAp*, *deoTp*, *ttdRp*, *glpRp*, *nanRp*, *glcCp*, *ycjZp*, *nhaRp*, *aaeRp*, *ygbIp*, *puuDp*, *ybdOp*, *perRp*, *fadRp*, *ynfLp*, *ycaNp*, *dmlRp*, *yfeRp*, *yiaUp*, *ybhDp*, *yeeYp*, *agaRp*, *cbIp*, *yafCp*, *yeiEp*, *allSp*, *uxuRp*, *yahBp*, *metRp*, *yidZp*, *ydhBp*, *yneJp*, *ybeFp*, *radAp*, *mntRp*, *tdcAp*, *fucRp*, *yfjRp*, *cynRp*) 含まれた。グループ C は低活性なものとしてプロモーター活性が 0 より大きく 10 以下のものが 11 種類 (*friRp*, *yihWp*, *lldRp*, *ydcRp*, *ydfHp*, *yegWp*, *csiRp*, *yafYp*, *yjhIp*, *birAp*, *iclRp*) 含まれた。

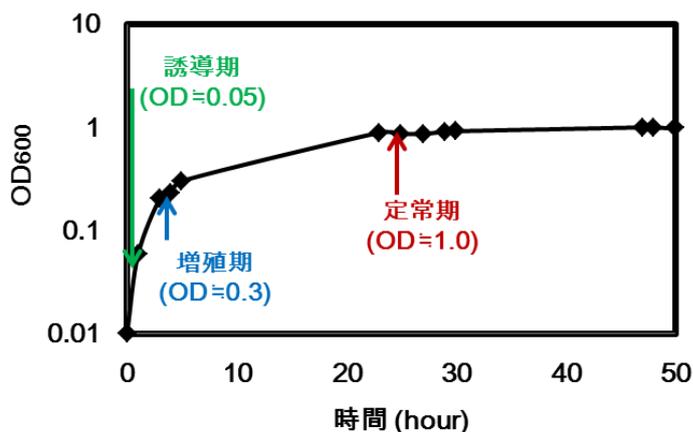


図 15. 嫌気条件における大腸菌 W3110 TypeA 株の増殖曲線

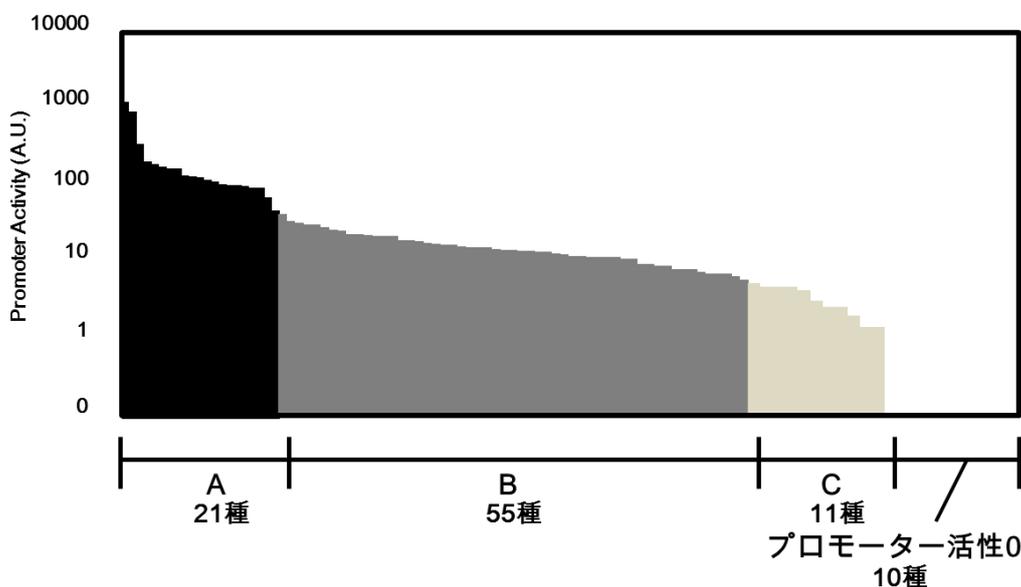


図 16. 嫌気条件定常期における大腸菌転写因子のプロモーター活性

- グループ A (黒)：結合強度が 101 以上のプロモーター
- グループ B (灰)：結合強度が 11~100 のプロモーター
- グループ C (白)：結合強度が 10 以下のプロモーター

さらに、同じ形質転換体においても誘導期、増殖期、定常期の3つの条件でプロモーター活性が異なることが判明した。そこで、誘導期と増殖期、および増殖期と定常期におけるプロモーター活性の差がバックグラウンド値 (11.28) を超えたプロモーターを増殖相に応じて活性が変動するプロモーターとして分類を行った。誘導期、増殖期、定常期で構成的に活性化したプロモーターは *uxuRp*, *mntRp*, *yfjRp*, *yafYp*, *birAp* の5種であった (図 17A)。誘導期と定常期で構成的に活性化が見られたプロモーターは *ydfHp* の1種 (図 17B) で、増殖期と定常期で構成的に活性化が見られたプロモーターは *marAp*, *envYp*, *yijOp*, *ttdRp*, *aaeRp*, *perRp*, *ycaNp*, *dmlRp*, *yfeRp*, *ybhDp*, *cblp*, *yafCp*, *yeeYp*, *allSp*, *yeiEp*, *ybeFp*, *ydhBp*, *yneJp*, *fucRp*, *frlRp*, *lldRp*, *ydcRp*, *yegWp*, *csiRp* の24種 (図 17C) であった。特定の条件で活性が増加するプロモーターが57種見つかった。そのうち増殖期にのみ活性化するプロモーターが *yahBp*, *tdcAp*, *cynRp* の3種 (図 18A)、増殖期で活性が増加したプロモーターが *mqsAp*, *soxSp* の2種 (図 18B) であった。一方定常期にのみ活性化したプロモーターが *deoTp*, *puuDp*, *yiaUp*, *metRp*, *yidZp*, *radAp*, *yihWp*, *yjhIp*, *iclRp* の9種 (図 19A)、定常期で活性が増加したプロモーターが *hicBp*, *gadXp*, *rodZp*, *yqhCp*, *robp*, *puuRp*, *yddMp*, *xylRp*, *chbRp*, *rhaSp*, *feaRp*, *gadWp*, *eutRp*, *yidLp*, *nadRp*, *dicAp*, *ybaQp*, *ykgDp*, *hdfRp*, *ydcIp*, *ydcNp*, *qseDp*, *adap*, *mngRp*, *ydiPp*, *allRp*, *exuRp*, *yihLp*, *yeaMp*, *yhaJp*, *cysBp*, *mcbRp*, *lexAp*, *glpRp*, *nanRp*, *glcCp*, *nhaRp*, *ycjZp*, *ygbIp*, *ybdOp*, *fadRp*, *ynfLp*, *agaRp* の43種 (図 19B) となった。

3-3. 大腸菌全二成分制御系因子プロモーターの同定

3-3-1. 全二成分制御系因子遺伝子のゲノム上の配置

62種類の大腸菌二成分制御系遺伝子のうち、49種類はゲノム上で25のオペロン単位を構成する。残り6種類のヒスチジinkinナーゼ遺伝子 (*arcB*, *barA*, *glrK*, *narQ*, *rscC*, *torS*) と7種類のレスポンスレギュレーター遺伝子 (*arcA*, *fimZ*, *glrR*, *narP*, *rssB*, *torR*, *uvrY*) は他の遺伝子とオペロンを構成しない (図 20)。25のオペロン単位では10種類のヒスチジinkinナーゼ遺伝子 (*atoS*, *citA*, *dcuS*, *kdpD*, *rscD*, *narX*, *ntrB*, *yehU*, *ypdA*, *zraS*) と11種類のレスポンスレギュレーター遺伝子 (*basR*, *cpxR*, *cusR*, *evgA*, *ompR*, *phoB*, *phoP*, *qseB*, *rstA*, *uhpA*, *yedW*) が最上流に位置する (図 20)。従って、14種類のヒスチジinkinナーゼ遺伝子 (*baeS*, *baeR*, *cheA*, *creC*, *cpxA*, *cusS*, *envZ*, *evgA*, *phoQ*, *phoR*, *qseC*, *rstB*, *uhpB*, *yedV*) と14種類のレスポンスレギュレーター遺伝子 (*atoC*, *baeR*, *cheB*, *cheY*, *citB*, *creC*, *dcuR*, *kdpE*, *narL*, *ntrC*, *rscB*, *yehT*, *ypdB*, *zraR*) の転写開始シグナルはオペロ

ン最上流遺伝子プロモーターに加え、すぐ上流の構造遺伝子内に存在する可能性がある。本研究では 62 種類全ての大腸菌二成分制御系因子遺伝子の発現シグナルをそれらのすぐ上流域に存在すると考え、各プロモーター活性の測定を試みた。

3-3-2. 全二成分制御系因子プロモーターの *gfp* レポータープラスミドの構築

大腸菌二成分制御系因子の発現をモニターするプラスミドセットを構築した。各二成分制御系因子遺伝子の開始コドン上流のプロモーター領域を含む約 700 bp の領域を PCR で増幅させるため、プロモーター上流側には *Bgl*III 制限酵素部位 6 bp (5'-AGATCT-3') を持つプライマーを設計し、下流側には *Eco*T22I 制限酵素部位 6 bp (5'-ATGCAT-3') を持つプライマーを設計した。この設計で 60 種類の二成分制御系因子のプロモーター (*arcAp*, *arcBp*, *atoCp*, *atoSp*, *baeRp*, *baeSp*, *barAp*, *basRp*, *basSp*, *cheBp*, *cheYp*, *citAp*, *citBp*, *cpxAp*, *cpxRp*, *creBp*, *creCp*, *cusRp*, *cusSp*, *dcuRp*, *dcuSp*, *envZp*, *evgAp*, *evgSp*, *glrKp*, *glrRp*, *iimZp*, *kdpDp*, *kdpEp*, *narLp*, *narPp*, *narQp*, *narXp*, *ntrBp*, *ntrCp*, *ompRp*, *phoBp*, *phoPp*, *phoQp*, *phoRp*, *qseBp*, *qseCp*, *rcsBp*, *rcsCp*, *rcsDp*, *rssBp*, *rstAp*, *torRp*, *torSp*, *uhpAp*, *uhpBp*, *uvrYp*, *yedVp*, *yedWp*, *yehTp*, *yehUp*, *ypdAp*, *ypdBp*, *zraRp*, *zraSp*) の増幅を計画し、プラスミド pGRK421 (*arcAp-gfp*)、pGRK293 (*arcBp-gfp*)、pGRK470 (*atoCp-gfp*)、pGRK213 (*atoSp-gfp*)、pGRK189 (*baeSp-gfp*)、pGRK262 (*barAp-gfp*)、pGRK190 (*barRp-gfp*)、pGRK389 (*basRp-gfp*)、pGRK439 (*basSp-gfp*)、pGRK173 (*cheBp-gfp*)、pGRK428 (*cheYp-gfp*)、pGRK062 (*citAp-gfp*)、pGRK424 (*citBp-gfp*)、pGRK437 (*cpxAp-gfp*)、pGRK365 (*cpxRp-gfp*)、pGRK420 (*creBp-gfp*)、pGRK441 (*creCp-gfp*)、pGRK052 (*cusRp-gfp*)、pGRK423 (*cusSp-gfp*)、pGRK440 (*dcuRp-gfp*)、pGRK392 (*dcuSp-gfp*)、pGRK434 (*envZp-gfp*)、pGRK227 (*evgAp-gfp*)、pGRK431 (*evgSp-gfp*)、pGRK049 (*fimZp-gfp*)、pGRK068 (*kdpDp-gfp*)、pGRK425 (*kdpEp-gfp*)、pGRK427 (*narLp-gfp*)、pGRK204 (*narPp-gfp*)、pGRK238 (*narQp-gfp*)、pGRK114 (*narXp-gfp*)、pGRK360 (*ntrBp-gfp*)、pGRK436 (*ntrCp-gfp*)、pGRK306 (*ompRp-gfp*)、pGRK030 (*phoBp-gfp*)、pGRK107 (*phoPp-gfp*)、pGRK426 (*phoQp-gfp*)、pGRK031 (*phoRp-gfp*)、pGRK283 (*qseBp-gfp*)、pGRK433 (*qseCp-gfp*)、pGRK211 (*rcsBp-gfp*)、pGRK212 (*rcsCp-gfp*)、pGRK210 (*rcsDp-gfp*)、pGRK116 (*rssBp-gfp*)、pGRK143 (*rstAp-gfp*)、pGRK097 (*torRp-gfp*)、pGRK096 (*torSp-gfp*)、pGRK334 (*uhpAp-gfp*)、pGRK435 (*uhpBp-gfp*)、pGRK179 (*uvrYp-gfp*)、pGRK429 (*yedVp-gfp*)、pGRK182 (*yedWp-gfp*)、pGRK430 (*yehTp-gfp*)、pGRK193 (*yehUp-gfp*)、

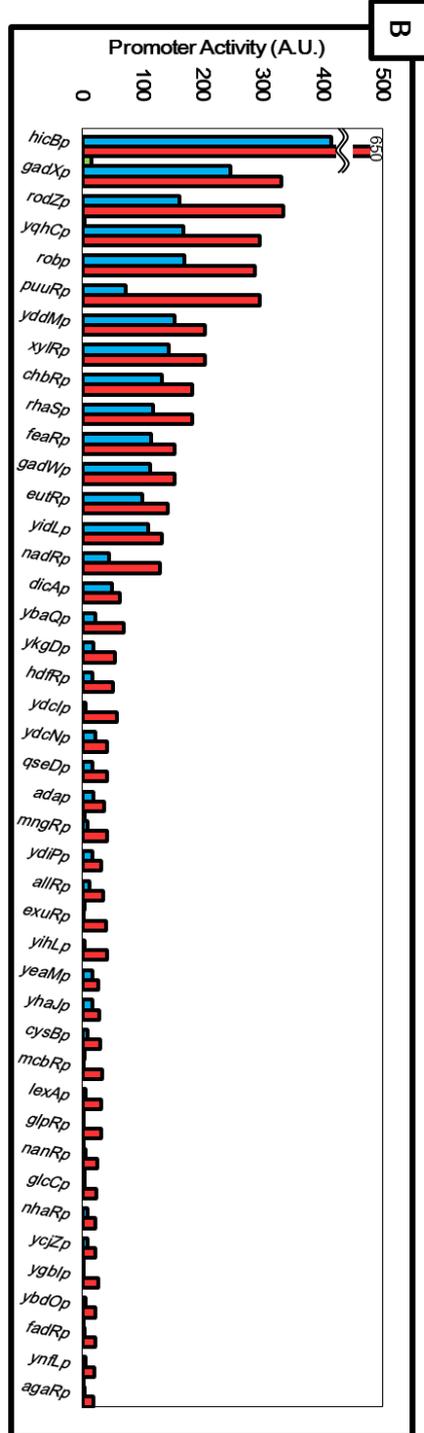
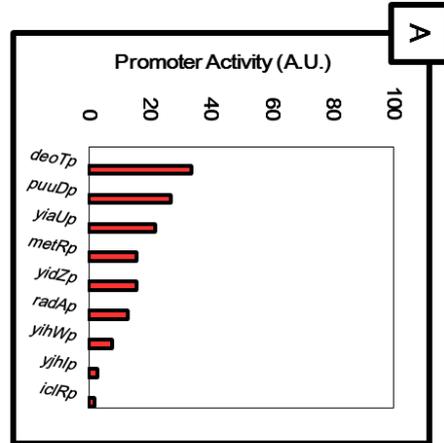


図 19. 嫌気条件定常期で活性化した転写因子プロモーター

A : 定常期でのみ活性化

B : 定常期で活性増加

緑は誘導期、青は増殖期、赤は定常期でのプロモーター活性

pGRK244 (*yfhAp-gfp*)、pGRK245 (*glrKp-gfp*)、pGRK320 (*yhjBp-gfp*)、pGRK228 (*ypdAp-gfp*)、pGRK432 (*ypdBp-gfp*)、pGRK438 (*zraRp-gfp*)、pGRK373 (*zraSp-gfp*) の構築を行った。使用したプライマー及び伸長した領域は補足図 1 に示した。

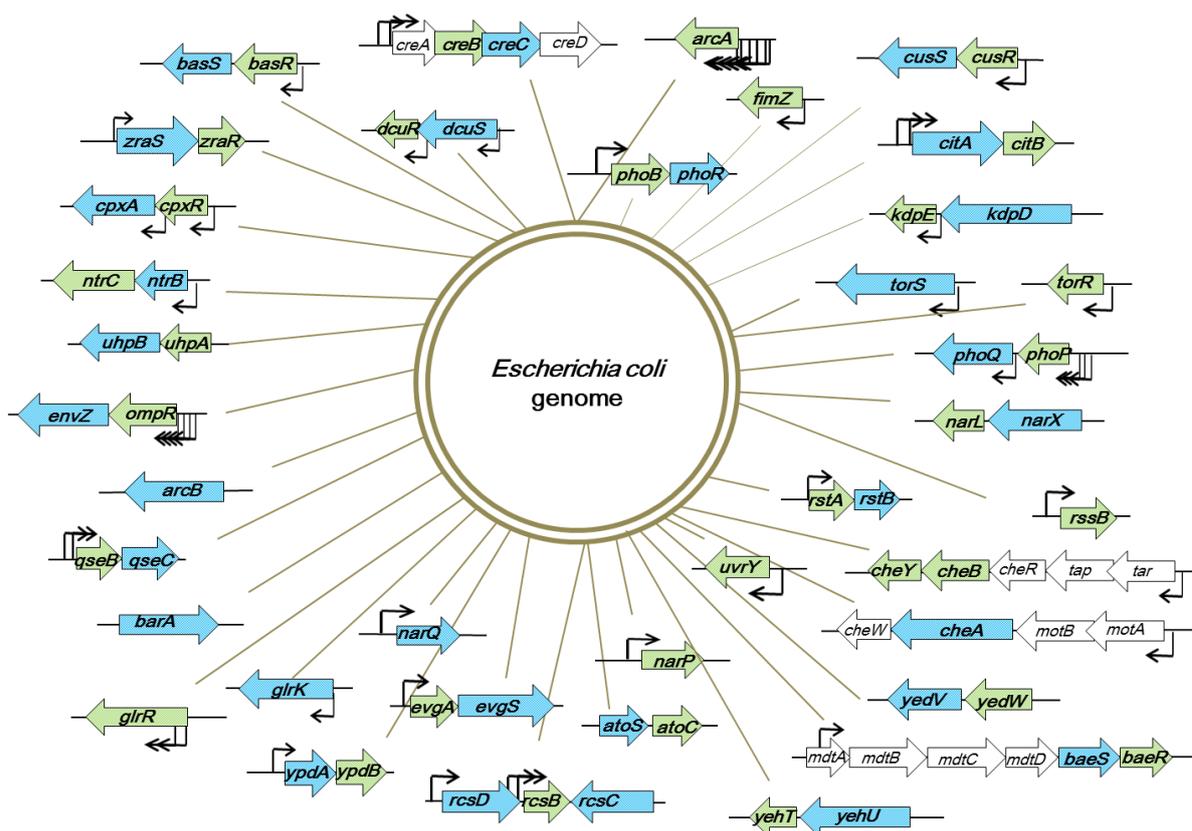


図 20. 二成分制御系のゲノム上配置と機能的プロモーター

青矢印はヒスチジinkinナーゼ遺伝子、緑矢印はレスポンスレギュレーター遺伝子、白矢印は二成分制御系とは関与しない遺伝子、黒細矢印は転写開始点を示している。

3-3-3 好気条件で培養した大腸菌細胞における全二成分制御系因子プロモーター活性

好気条件における増殖曲線 (図 10) より OD₆₀₀ 値が 0.05 を誘導期、0.3 を増殖期、2.0 を定常期とした。各プロモーターと *gfp* の融合遺伝子プラスミドを持つ大腸菌を Ap を含む LB 培地を加えた L 字型試験管で同様に培養し、OD₆₀₀ 値が誘導期、増殖期、定常期の値となった際に GFP 蛍光強度の測定を行いプロモーター活性を算出した。誘導期、増殖期、定常期におけるプロモーター活性の総和を潜在的なプロモーター活性とし、機能的なプロモーターを探索した。プロモーター活性の数値が 0 より大きいものを活性化の条件とした。

LB 培地で L 字型試験管による好気培養では 60 プロモーター全てにおいて活性化が見られた。活性化が見られたプロモーターはそれぞれプロモーター活性が異なっていた。そこでプロモーター活性により 3 つのグループ (グループ A、グループ B、グループ C) に分類した (図 21)。グループ A は検出したプロモーター活性が 100 より大きいものとして 5 種類 (*uvrYp*, *arcAp*, *narPp*, *ompRp*, *phoPp*) 含まれた。グループ B は中程度の活性をもつものとしてプロモーター活性が 10 より大きく 100 以下のものが 20 種類 (*narQp*, *cpxRp*, *ntrBp*, *evgAp*, *rcsCp*, *ypdAp*, *atoSp*, *rcsBp*, *rssBp*, *qseBp*, *arcBp*, *rstAp*, *uhpAp*, *yedWp*, *baeSp*, *basRp*, *cheBp*, *cusSp*, *baeRp*, *yehUp*) 含まれた。グループ C は低活性なものとしてプロモーター活性が 0 より大きく 10 以下のものが 35 種類 (*cheYp*, *kdpDp*, *glrRp*, *creCp*, *citBp*, *narLp*, *phoBp*, *zraRp*, *rcsDp*, *torRp*, *basSp*, *ntrCp*, *dcuSp*, *evgSp*, *phoQp*, *phoRp*, *qseCp*, *ypdBp*, *dcuRp*, *kdpEp*, *narXp*, *yehTp*, *cpxAp*, *envZp*, *glrKp*, *yedVp*, *atoCp*, *barAp*, *cusRp*, *iimZp*, *torSp*, *uhpBp*, *zraSp*, *creBp*, *citAp*) 含まれた。

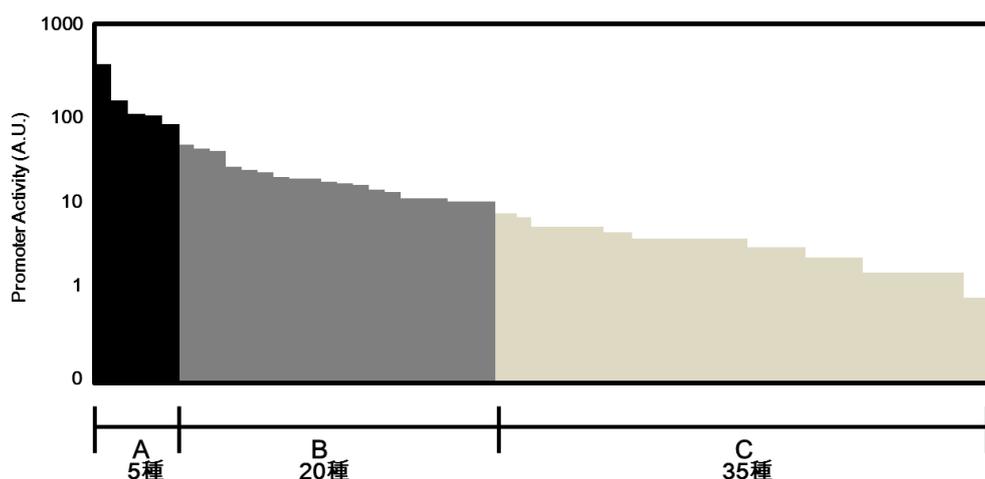


図 21. 好気条件定常期における大腸菌二成分制御系因子のプロモーター活性
 グループ A (黒)：結合強度が 101 以上のプロモーター
 グループ B (灰)：結合強度が 11~100 のプロモーター
 グループ C (白)：結合強度が 10 以下のプロモーター

さらに、同じ形質転換体においても誘導期、増殖期、定常期の 3 つの条件でプロモーター活性が異なることが判明した。そこで、誘導期と増殖期、および増殖期と定常期におけるプロモーター活性の差がバックグラウンド値 (11.28) を超えたプロモーターを増殖相に応じて活性が変動するプロモーターとして分類を行った。増殖期と定常期で同程度活性化したプロモーターは *cusSp*, *glrRp*, *creCp*, *basSp*, *ntrCp*, *atoCp*, *creBp* の 7 種であった (図 22A)。特定の条件

で活性が増加したプロモーターが 53 種見つかり、定常期でのみ活性化したプロモーターが *nrpBp*, *evgAp*, *ypdAp*, *atoSp*, *rssBp*, *qseBp*, *rstAp*, *uhpAp*, *yedWp*, *baeSp*, *basRp*, *cheBp*, *baeRp*, *yehUp*, *cheYp*, *kdpDp*, *citBp*, *narLp*, *phoBp*, *zraRp*, *rcsDp*, *torRp*, *dcuSp*, *evgSp*, *phoQp*, *phoRp*, *qseCp*, *ypdBp*, *dcuRp*, *kdpEp*, *narXp*, *yehTp*, *cpxAp*, *envZp*, *glrKp*, *yedVp*, *barAp*, *cusRp*, *iimZp*, *torSp*, *uhpBp*, *zraSp*, *citAp* の 43 種 (図 22B)、定常期で活性が増加したプロモーターが *uvrYp*, *arcAp*, *narPp*, *ompRp*, *phoPp*, *narQp*, *cpxRp*, *rcsCp*, *rcsBp*, *arcBp* の 10 種 (図 22C) となった。

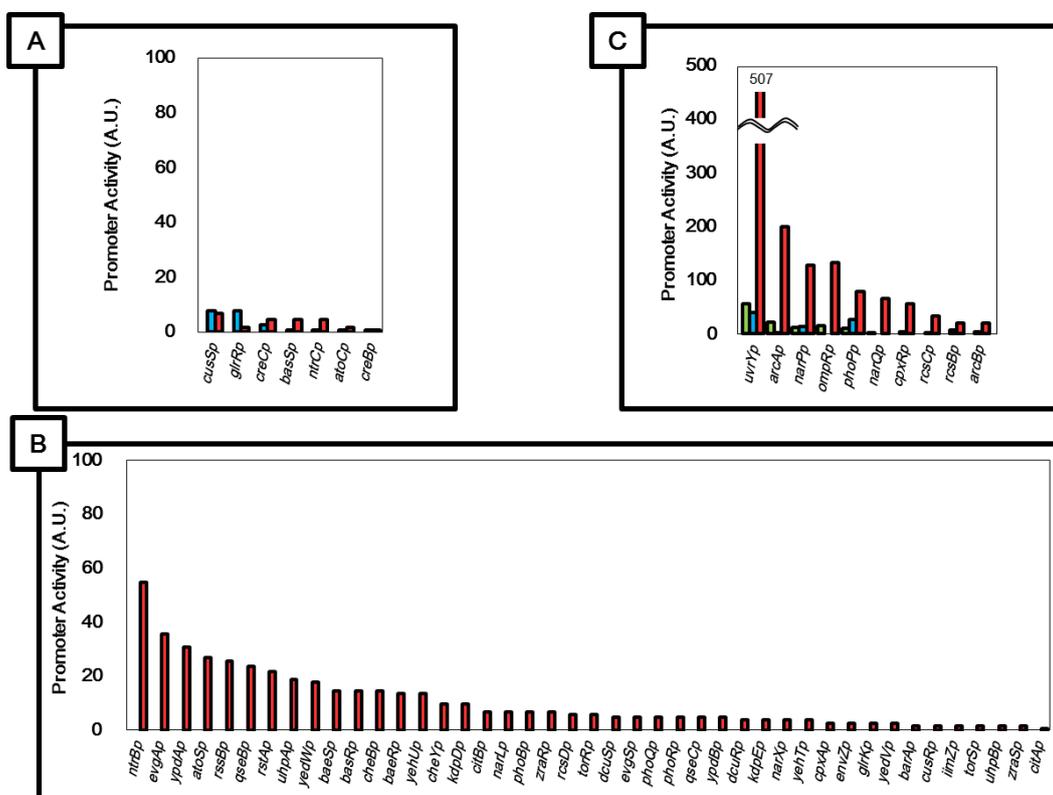


図 22. 好気条件で活性化した二成分制御系プロモーター

A: 増殖期と定常期で同程度活性化

B: 定常期でのみ活性化

C: 定常期で活性増加

緑は誘導期、青は増殖期、赤は定常期でのプロモーター活性

3-3-4. 嫌気条件で培養した大腸菌細胞における全二成分制御系因子プロモーター活性

嫌気条件における増殖曲線 (図 15) より OD₆₀₀ 値が 0.05 を誘導期、0.3 を増殖期、1.0 を定常期とした。各プロモーターと *gfp* の融合遺伝子プラスミドを持

つ大腸菌を Ap を含む LB 培地を加えた試験管で同様に培養し、OD₆₀₀ 値が誘導期、増殖期、定常期の値となった際に GFP 蛍光強度の測定を行いプロモーター活性を算出した。誘導期、増殖期、定常期におけるプロモーター活性の総和を潜在的なプロモーター活性とし、機能的なプロモーターを探索した。プロモーター活性の数値が 0 より大きいものを活性化の条件とした。

LB 培地で試験管による嫌気培養では 60 プロモーターのうち 37 プロモーターにおいて活性化が見られた。活性化が見られたプロモーターはそれぞれプロモーター活性が異なっていた。そこでプロモーター活性により 3 つのグループ (グループ A、グループ B、グループ C) に分類した (図 23)。グループ A は検出したプロモーター活性が 100 より大きいものとして 1 種類 (*uvrYp*) 含まれた。グループ B は中程度の活性をもつものとしてプロモーター活性が 10 より大きく 100 以下のものが 9 種類 (*arcAp*, *ompRp*, *narPp*, *narQp*, *phoPp*, *cpxRp*, *cheYp*, *evgAp*, *ntrBp*) 含まれた。グループ C は低活性なものとしてプロモーター活性が 0 より大きく 10 以下のものが 27 種類 (*atoSp*, *ypdAp*, *kdpDp*, *phoBp*, *rcsBp*, *arcBp*, *phoRp*, *yehTp*, *baeSp*, *yedVp*, *ypdBp*, *baeRp*, *barAp*, *basRp*, *basSp*, *cusSp*, *dcuSp*, *envZp*, *glrRp*, *phoQp*, *qseCp*, *rcsCp*, *rstAp*, *torRp*, *torSp*, *uhpBp*, *yehUp*) 含まれた (図 23)。

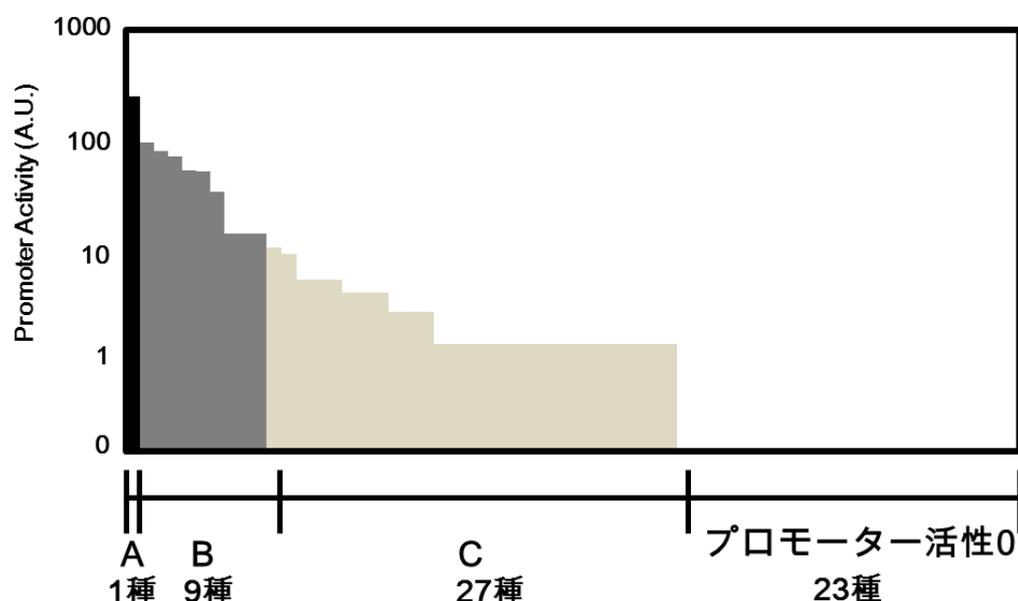


図 23. 嫌気条件定常期における大腸菌二成分制御系因子のプロモーター活性

グループ A (黒)：結合強度が 101 以上のプロモーター
 グループ B (灰)：結合強度が 11~100 のプロモーター
 グループ C (白)：結合強度が 10 以下のプロモーター

さらに、同じ形質転換体においても誘導期、増殖期、定常期の3つの条件でプロモーター活性が異なることが判明した。そこで、誘導期と増殖期、および増殖期と定常期におけるプロモーター活性の差がバックグラウンド値(11.28)を超えたプロモーターを増殖相に応じて活性が変動するプロモーターとして分類を行った。増殖期でのみ活性化したプロモーターが *torSp* の1種(図24A)、定常期でのみ活性化したプロモーターが *cheYp*, *evgAp*, *ntrBp*, *atoSp*, *ypdAp*, *kdpDp*, *phoBp*, *rcsBp*, *arcBp*, *phoRp*, *yehTp*, *baeSp*, *yedVp*, *ypdBp*, *baeRp*, *barAp*, *basRp*, *basSp*, *cusSp*, *dcuSp*, *envZp*, *glrRp*, *phoQp*, *qseCp*, *rcsCp*, *rstAp*, *torRp*, *uhpBp*, *yehUp* の29種(図24B)、定常期で活性が増加したプロモーターが *uvrYp*, *arcAp*, *ompRp*, *narPp*, *narQp*, *phoPp*, *cpxRp* の7種(図24C)となった。

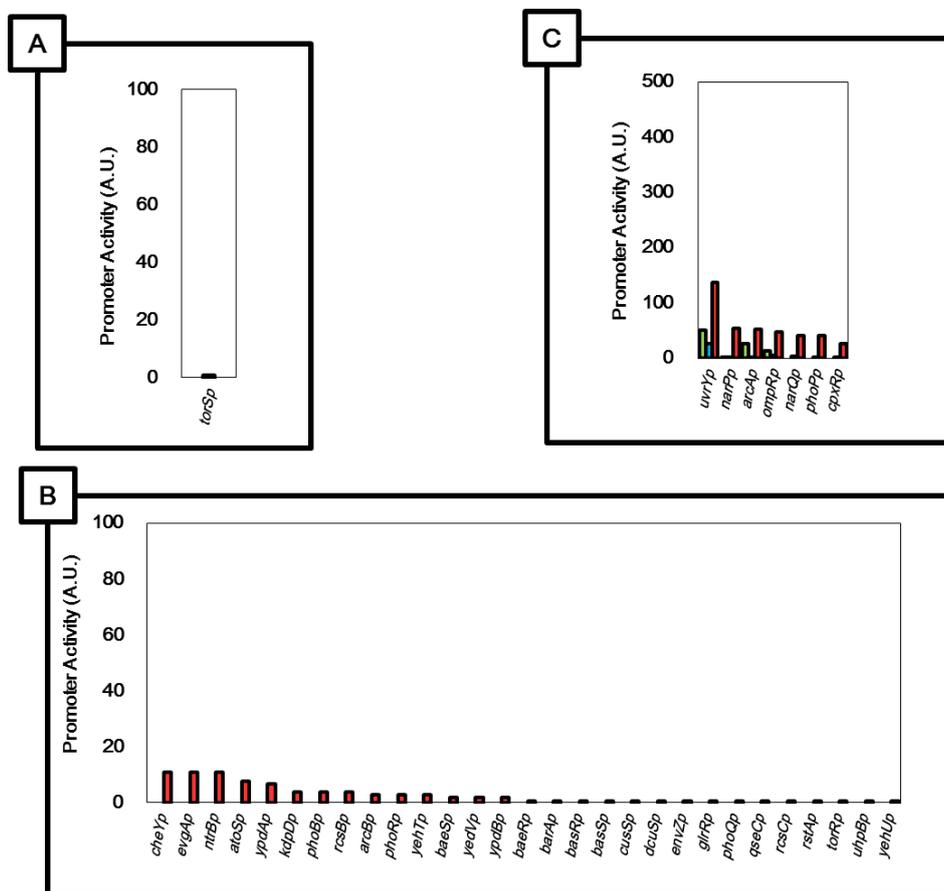


図 24. 嫌気条件で活性化した二成分制御系プロモーター

A: 増殖期でのみ活性化

B: 定常期でのみ活性化

C: 定常期で活性増加

緑は誘導期、青は増殖期、赤は定常期でのプロモーター活性

3-3-5. 全二成分制御系因子プロモーターの制御

いくつかの二成分制御系因子遺伝子は自己制御することが知られている。そこで、大腸菌の全二成分制御系因子遺伝子について自己制御するかを検討した。まず、ヒスチジンキナーゼ遺伝子とレスポンスレギュレーター遺伝子が連続してゲノム上に存在する 21 つのオペロン (*atoSC*, *baeSR*, *basSR*, *citAB*, *cpxRA*, *creBC*, *cusRS*, *dcuSR*, *evgAS*, *kdpDE*, *narXL*, *ntrBC*, *ompR-envZ*, *phoBR*, *phoPQ*, *rstAB*, *uhpAB*, *yedWV*, *yehUT*, *ypdAB*, *zraSR*) について、ヒスチジンキナーゼ遺伝子プロモータープラスミドとレスポンスレギュレーター遺伝子プロモータープラスミドをそれらの遺伝子オペロンを欠失させた株にそれぞれ導入した (補足表 6)。一方、次いで機能するヒスチジンキナーゼ遺伝子とレスポンスレギュレーター遺伝子がオペロンを構成しないものについては、次のような形質転換体を作成した。*arcA* 欠失株の *arcA* プロモータープラスミドと *arcB* プロモータープラスミドによる形質転換、*arcB* 欠失株の *arcA* プロモータープラスミドと *arcB* プロモータープラスミドによる形質転換、*cheABY* 欠失株の *cheB* プロモータープラスミドと *cheY* プロモータープラスミドによる形質転換、*barA* 欠失株の *barA* プロモータープラスミドと *uvrY* プロモータープラスミドによる形質転換、*uvrY* 欠失株の *barA* プロモータープラスミドと *uvrY* プロモータープラスミドによる形質転換、*fimZ* 欠失株の *fimZ* プロモータープラスミドによる形質転換、*glrK* 欠失株の *glrK* プロモータープラスミドと *glrR* プロモータープラスミドによる形質転換、*glrR* 欠失株の *glrK* プロモータープラスミドと *glrR* プロモータープラスミドによる形質転換、*narP* 欠失株の *narP* プロモータープラスミドと *narQ* プロモータープラスミドによる形質転換、*narQ* 欠失株の *narP* プロモータープラスミドと *narQ* プロモータープラスミドによる形質転換、*rcsB* 欠失株の *rcsB* プロモータープラスミドと *rcsC* プロモータープラスミドと *rcsD* プロモータープラスミドによる形質転換、*rcsD* 欠失株の *rcsB* プロモータープラスミドと *rcsC* プロモータープラスミドと *rcsD* プロモータープラスミドによる形質転換、*rssB* 欠失株の *rssB* プロモータープラスミドによる形質転換、*torSR* 欠失株の *torS* プロモータープラスミドと *torR* プロモータープラスミドによる形質転換 (補足表 6)。

好気条件では増殖曲線 (図 10) より OD₆₀₀ 値が 0.05 を誘導期、0.3 を増殖期、2.0 を定常期とした。各プロモーターと *gfp* の融合遺伝子プラスミドを持つ大腸菌を Ap を含む LB 培地を加えた L 字型試験管で同様に培養し、OD₆₀₀ 値が誘導期、増殖期、定常期の値となった際に GFP 蛍光強度の測定を行いプロモーター活性を算出した。一方、嫌気条件では増殖曲線 (図 15) より OD₆₀₀ 値が 0.05 を誘導期、0.3 を増殖期、1.0 を定常期とした。各プロモーターと *gfp* の融合遺伝子プラスミドを持つ大腸菌を Ap を含む LB 培地を加えた試験管で同様に培養し、

OD₆₀₀ 値が誘導期、増殖期、定常期の値となった際に GFP 蛍光強度の測定を行いプロモーター活性を算出した。

6 条件より検出されたプロモーター活性を比較したところ、15 種類のプロモーターにおいて親株の形質転換体と欠失株の形質転換体とで活性が異なるプロモーターがあることが判明した。親株でのプロモーター活性より欠失株でのプロモーター活性がバックグラウンド値 (11.28) 以上減少したものは自己活性化を行うもの、逆に増加したものは自己抑制を行うもの、そして増殖相に応じて活性化と抑制の両方が見られたものの 3 グループに分類することができた。

自己活性化が見られたものは *basRp*, *cheYp*, *evgAp*, *narPp*, *phoPp*, *rcsBp*, *rcsCp*, *rcsDp* の 8 種類であった (図 25)。*basRp* は好気条件定常期、*cheYp* は嫌気条件定常期、*evgAp* は好気条件及び嫌気条件の定常期、*narPp* は *narP* 欠失下及び *narQ* 欠失下における好気条件及び嫌気条件の定常期、*phoPp* は好気条件の増殖期と定常期及び嫌気条件の誘導期と定常期、*rcsBp* は好気条件定常期、*rcsCp* は好気条件定常期、*rcsDp* は好気条件定常期において自己活性化が確認できた。自己抑制が見られたものは *arcAp*, *ntrBp*, *phoBp* の 3 種であった (図 26)。*arcAp* は *arcA* 欠失下では 6 条件全てで、*arcB* 欠失下では嫌気条件定常期で、*ntrBp* は好気条件の増殖期と定常期及び嫌気条件の誘導期と増殖期で、*phoBp* は嫌気条件定常期において自己抑制が見られた。活性化と抑制の両方を行うものは *cpxRp*, *narQp*, *ompRp*, *uvrYp* の 4 種であった (図 27)。*cpxRp* は嫌気条件の誘導期には活性化を行うが、好気条件の増殖期と定常期及び嫌気条件定常期に抑制を行う。*narQp* は *narP* 欠失下と *narQ* 欠失下の好気条件定常期には活性化をするが、*narP* 欠失下の誘導期には抑制を行う。*ompRp* は好気条件の誘導期と定常期及び嫌気条件誘導期には活性化を行うが、好気条件増殖期及び嫌気条件の増殖期と定常期には抑制を行う。*uvrYp* は *uvrY* 欠失下では好気条件定常期及び嫌気条件誘導期に活性化を行うが、*barA* 欠失下では好気条件誘導期と嫌気条件定常期に抑制を行うことが判明した。また、45 種 (*arcB*, *atoC*, *atoS*, *baeR*, *baeS*, *barA*, *basS*, *cheB*, *citA*, *citB*, *cpxA*, *creB*, *creC*, *cusR*, *cusS*, *dcuR*, *dcuS*, *envZ*, *evgS*, *fimZ*, *glrK*, *glrR*, *kdpD*, *kdpE*, *narL*, *narX*, *ntrC*, *phoB*, *phoQ*, *phoR*, *qseB*, *qseC*, *rssB*, *rstA*, *torR*, *torS*, *uhpA*, *uhpB*, *yedV*, *yedW*, *yehT*, *yehU*, *ypdA*, *zraR*, *zraS*) のプロモーターからは親株と欠失株とのプロモーター活性に差が見られなかった (補足図 2)。

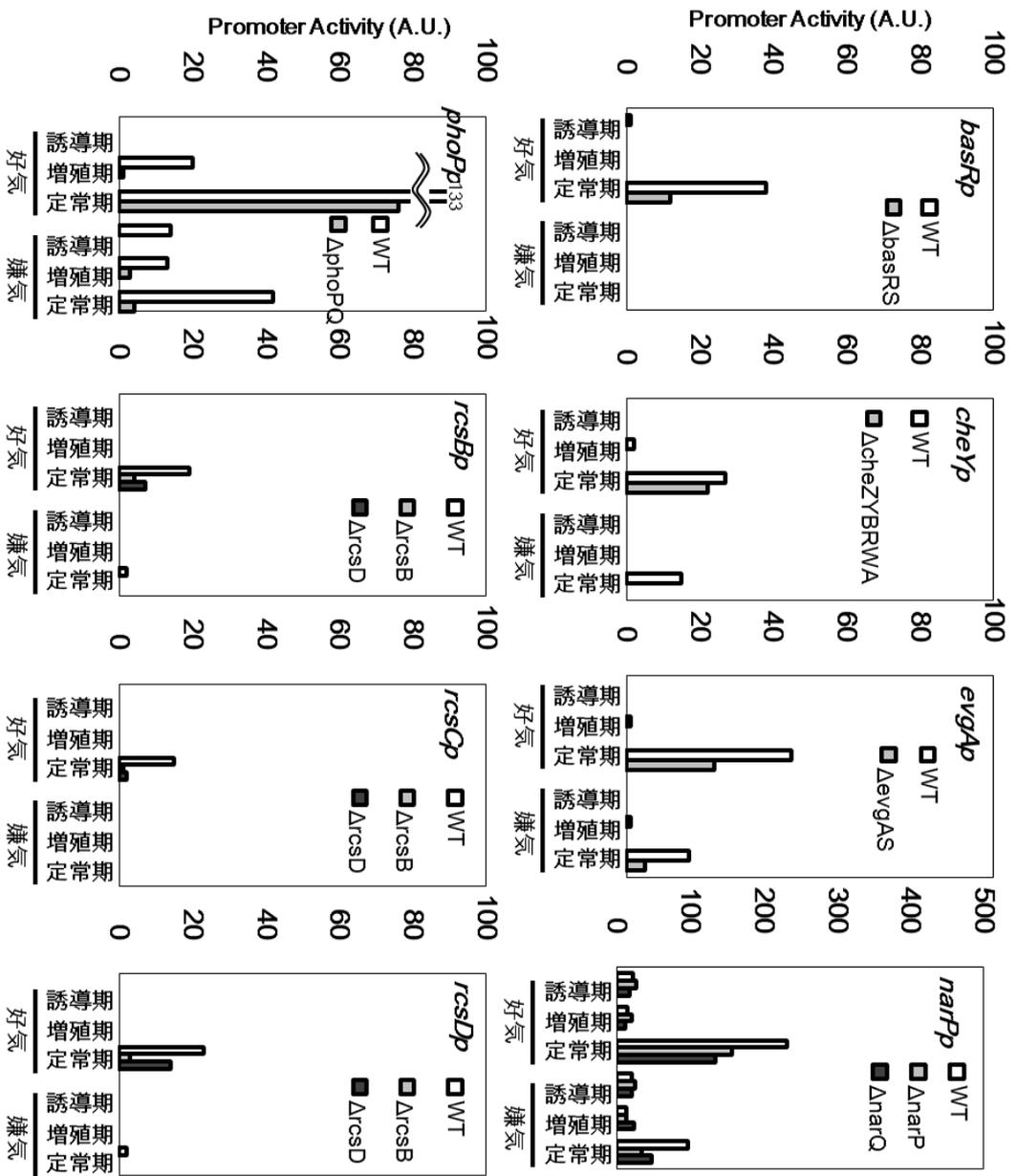


図 25. 自己活性化を行う二成分制御系因子遺伝子プロモーター

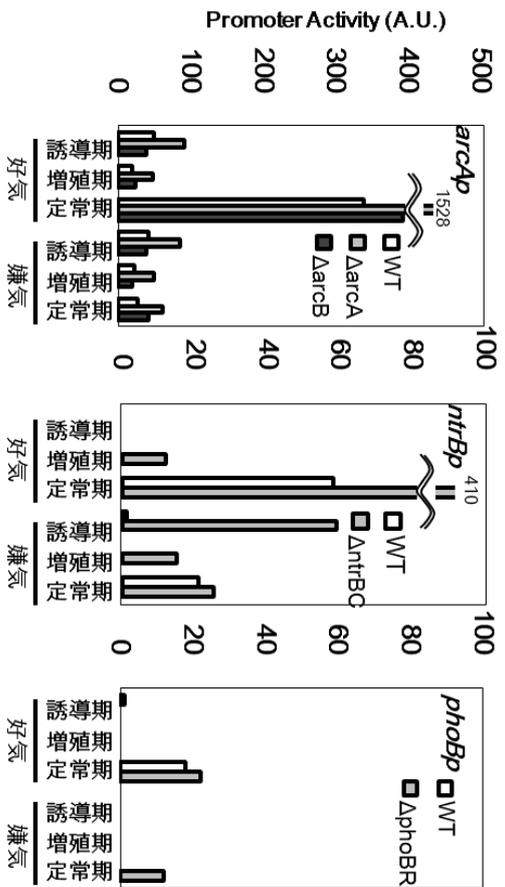


図 26. 自己抑制を行う二成分制御系因子遺伝子プロモーター

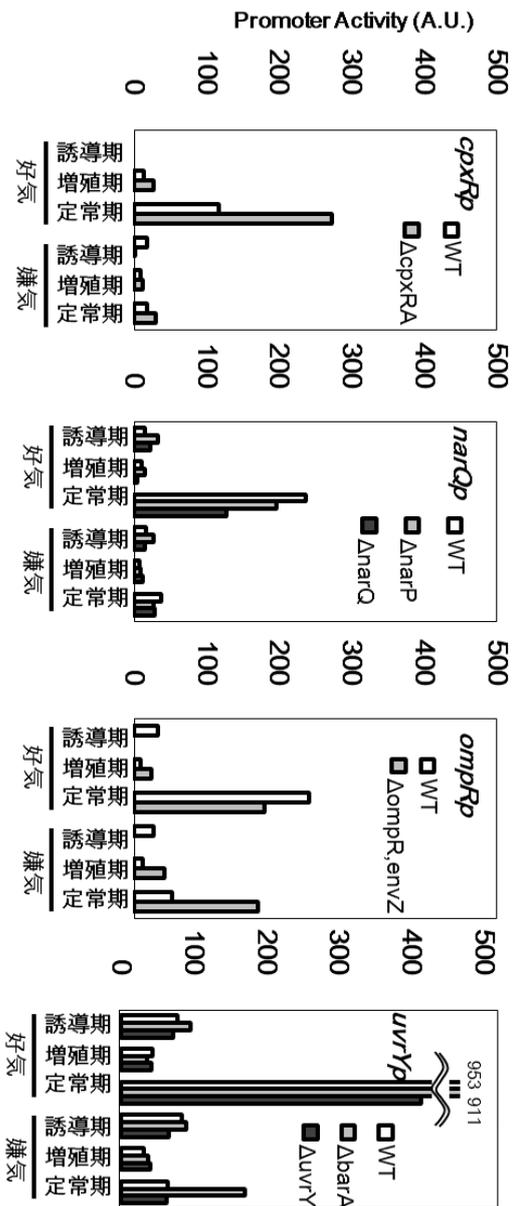


図 27. 自己活性化と自己抑制の両方を行う二成分制御系因子遺伝子プロモーター

第4章 考察

4-1. 大腸菌全二成分制御系因子のプロモーター活性

二成分制御系因子遺伝子のプロモーターに対する RNA ポリメラーゼ結合強度と、全てのプロモーターから活性が見られた好気条件定常期における細胞内プロモーター活性の比較を行ったところ、47種(*narQ*, *ompR*, *uhpA*, *rssB*, *kdpD*, *yehT*, *atoS*, *ypdA*, *cheY*, *qseC*, *baeR*, *ntrB*, *rscD*, *arcB*, *rstA*, *cusS*, *basS*, *fimZ*, *rscC*, *creC*, *basR*, *evgS*, *hydH*, *envZ*, *glrK*, *dcuS*, *baeS*, *ypdB*, *citA*, *uhpB*, *cheB*, *narL*, *ntrC*, *hydG*, *yehU*, *phoQ*, *cpxA*, *yedV*, *phoB*, *glrR*, *dcuR*, *citB*, *phoR*, *kdpE*, *narX*, *atoC*, *creB*) のプロモーターにおいて RNA ポリメラーゼ結合強度が高くなるにつれ細胞内プロモーター活性も強まっていくという相関性があることが判明した (図 28)。

一方、RNA ポリメラーゼの結合と細胞内プロモーター活性に相関が確認できなかった 13 種類のうち、4 種類 (*barAp*, *torSp*, *cusRp*, *torRp*) は高い RNA ポリメラーゼとの結合活性を確認したものの、細胞内プロモーター活性が低かった。これらの細胞内におけるプロモーター活性は、他の因子やゲノム構造上などから RNA ポリメラーゼが結合できず、結果として抑制されていることが示唆される。一方、高い細胞内プロモーター活性を示すが、RNA ポリメラーゼの親和性が極めて低い 9 種類のプロモーター (*arcAp*, *cpxRp*, *evgAp*, *narPp*, *phoPp*, *qseBp*, *rscBp*, *uvrYp*, *yedWp*) も確認した。これらのプロモーターが細胞内で活性化しているのは、RNA ポリメラーゼのプロモーター結合を積極的にサポートする因子の存在が考えられる。例えば、*narPp* の細胞内活性には NarP が、*phoPp* の細胞内活性には PhoP が、*evgAp* の細胞内活性には EvgA が、*rscBp* の細胞内活性には RcsB が RNA ポリメラーゼのそれぞれのプロモーター認識をサポートするかもしれない。

4-2. 大腸菌二成分制御系因子の自己プロモーター制御

basRp, *cheYp*, *evgAp*, *narPp*, *phoPp*, *rscBp*, *rscCp*, *rscDp* の 8 種類のプロモーターは各々の遺伝子 (群) が欠失した株で活性の減少を確認した (図 25)。したがって、BasSR は *basRp* を、CheABY は *cheYp* を、EvgSA は *evgAp* を、NarQP は *narPp* を、PhoQP は *phoPp* を、RcsD と RcsB は *rscB*, *rscCp*, *rscDp* を活性化すると考えられる。このうち、EvgSA による *evgAS* オペロンの最上流プロモーター *evgAp* の活性化 (Tanabe *et al.*, 1998) と PhoQP による *phoPQ* オペロンの最上流プロモーター *phoPp* の活性化 (Kato *et al.*, 1999) は、

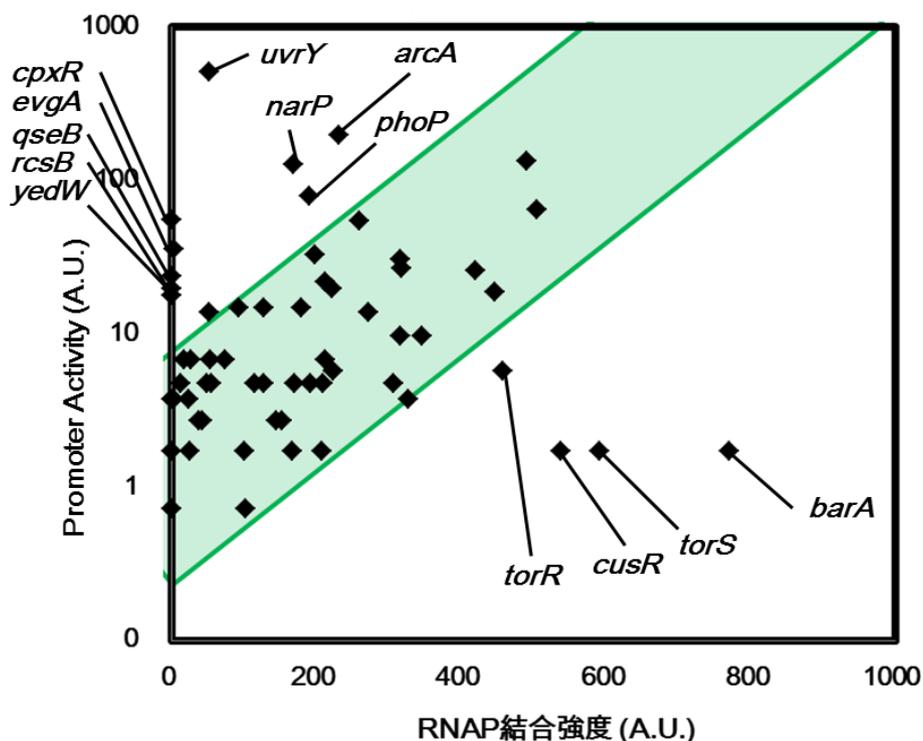


図 28. 二成分制御系プロモーターに対する RNA ポリメラーゼ結合強度と転写強度の比較

これまでの報告と一致する結果となった。EvgSA の制御にある SafA は PhoQ のリン酸化活性を促進させ (Eguchi *et al.*, 2007)、EvgSA > PhoQP の階層的制御カスケードの存在が知られている。さらに、PhoQP の制御にある YrbL はリン酸化 PhoP の安定性を促進させ (Zwir *et al.*, 2005)、PhoQP > BasSR カスケードを形成する。つまり、EvgSA > PhoQP > BasSR の階層的制御カスケードの全ての制御システムが自己活性化していることとなる。この自己制御は、EvgSA 以降に機能発現するこれらのカスケードの不可逆性を担っている可能性を示唆する。一方、RcsCDB は複雑なリン酸反応を示す二成分制御系として知られる (Chen *et al.*, 2001)。細胞外の様々なストレスシグナルを感知した RcsC は自己リン酸化し、ヒスチジンキナーゼ活性ドメインをもたないセンサーキナーゼ RcsD の Hpt ドメイン上の His 残基にリン酸転移を行う。その後、リン酸化した RcsD は、そのリン酸基を RcsB に転移し、結果としてリン酸化 RcsB が様々な遺伝子群の発現を調節する。さらに、近年サルモネラ菌における RcsCDB の研究から、RcsC は RcsD を介さず RcsB に直接リン酸転移することも確認された (Pescaretti Mde *et al.*, 2013)。本研究では、RcsCDB は各々の 3 つの遺伝子プロモーターが自己活性化することを見出した。この自己活性化により、細胞外シグナルにより一旦活性化した RcsCDB は、それらの因子群を細胞内で安定的に供給することができ、RcsCDB に特徴的な 2 つのセンサーキナーゼと 1

つのレスポンスレギュレーターにおける複雑なリン酸反応による細胞内情報伝達によって、多様な環境適応を示すと考えられた。NarQP 二成分制御系のレスポンスレギュレーター遺伝子プロモーターである *narPp* は *narP* 欠失株においてプロモーター活性の減少を確認した (図 25)。この NarQP による *narPp* 活性化では、NarP の NarQ 依存的なリン酸化が必要だと考えられるが、*narPp* の活性は *narQ* 欠失株でも同様に減少を確認した。これまでに、NarQ のパラログである NarX からもリン酸転移が行われるクロストークが知られている (Rabin & Stewart, 1993)。つまり、*narQ* 欠失株においては NarX により NarP がリン酸化されると予想できる。したがって、NarQP における *narP* プロモーター活性には NarP のリン酸化が必要であろう。*cheYp* は複数の遺伝子群で構成される *che* オペロンの *cheB* 遺伝子中に初めて観測できた (図 20)。*cheYp* は *cheABY* 欠失株で活性が減少した (図 25)。この株の欠失する遺伝子群のうち、*flhDC* は大腸菌のべん毛形成におけるマスターアクチベーターとして機能する転写因子である。FlhD と FlhC はヘテロ 4 量体 (FlhD₂C₂) を形成し、べん毛合成や走化性関連の遺伝子発現の調節を行う (Stafford *et al.*, 2005)。本研究で新規に見出した *cheYp* 活性もマスターアクチベーター FlhD₂C₂ の制御下にあるかもしれない。

arcAp、*ntrBp*、*phoBp* の 3 種類のプロモーターは各々の遺伝子 (群) が欠失した株で活性の増加を確認した (図 26)。したがって、ArcBA は *arcAp* を、NtrBC は *ntrBp* を、PhoRB は *phoBp* を抑制すると考えられる。ArcBA は細胞外の嫌気状態を感知し、センサーキナーゼ ArcB 依存的にリン酸化される ArcA はクエン酸回路やグリオキシル酸回路の酵素などをコードする遺伝子の発現を抑制することが知られている (Lynch & Lin, 1996)。しかし、*arcAp* の活性は *arcB* 欠失株では野生株と同程度検出した。これらの結果は、ArcA の自己遺伝子プロモーターの抑制は、ArcB 以外のヒスチジンキナーゼからのクロストークによるリン酸化、もしくは ArcA の非リン酸型が発現制御を行うことが予想される。好気条件における *phoBp* 活性は *phoRB* 欠失株で野生株と比較して変化はなかった (図 26)。一方、*phoBp* 活性が、嫌気条件で培養した定常期 *phoRB* 欠失株のみで観察できた (図 26)。これらの結果は、PhoRB は嫌気条件で培養された定常期細胞で特異的に *phoBp* 活性を抑制すると考えられる。NtrBC のセンサーキナーゼ遺伝子プロモーター *ntrBp* は好気条件培養の増殖期と定常期の *ntrBC* 欠失株において野生株より顕著に活性が増加した (図 26)。しかし、嫌気培養では、増殖期と定常期でそのような *ntrBC* 欠失株における *ntrBp* 活性の増加は認められず、誘導期でのみ好気条件と同様な効果を確認した。これらの結果は、NtrBC が好気条件と嫌気条件で培養された細胞では機能活性状態が異なることが予想される。嫌気条件での誘導期には溶存酸素量が比較的高いと考

えると、NtrBC が活性化する条件は酸素に大きく依存するかもしれない。

興味深いことに、*cpxRp*、*narQp*、*ompRp*、*uvrYp* の 4 種類のプロモーターは各々の遺伝子 (群) が欠失した株における活性の変化が培養条件で全く異なっていた (図 27)。つまり、CpxAR は *cpxAp* を、NarQP は *narQp* を、EnvZ/OpmR は *ompRp* を、BarA/UvrY は *uvrYp* を細胞外変化に応じて活性化したり、抑制したりすると考えられる。これらの制御は、二成分制御系が培養時に生じる微細な環境変化を認識し、的確に細胞情報伝達を行っていると考えられる。一方、それぞれのプロモーター活性を制御するトランス因子が複数存在し、それらの制御機能が合わさり、複雑な発現システムを持つ可能性も考えられた。

第 5 章 参考文献

- **Brennan, R. G., Matthews, B. W.** The helix-turn-helix DNA binding motif. (1989) *J. Biol. Chem.* **264** (4) 1903-1906
- **Chen, M. H., Takeda, S., Yamada, H., Ishii, Y., Yamashino, T., Mizuno, T.** Characterization of the RcsC-->YojN-->RcsB phosphorelay signaling pathway involved in capsular synthesis in *Escherichia coli*. (2001) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65** (10) 2364-2367
- **Eguchi, Y., Itou, J., Yamane, M., Demizu, R., Yamato, F., Okada, A., Mori, H., Kato, A., Utsumi, R.** B1500, a small membrane protein, connects the two-component systems EvgS/EvgA and PhoQ/PhoP in *Escherichia coli*. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** (47) 18712-18717
- **Falke, J. J., Bass, R. B., Butler S. L., Chervitz, S. A., Danielson, M. A.** The two component signaling pathway of bacterial chemotaxis : A molecular view of signaling transduction by receptors, kinases, and adaptation enzyme. (1997) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **13** 457-512
- **Haldimann, A., Wanner, B. L.** Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 6384-6393.
- **Ishihama, A.** Prokaryotic genome regulation multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks. (2010) *FEMS Microbiol. Rev.* **34** 628-645
- **Ishihama A.** Prokaryotic genomic regulation: A revolutionary paradigm. (2012) *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **88**, 485–508.
- **Jishage, M., Ishihama, A.** Variation in RNA polymerase sigma subunit composition within different stocks of *Escherichia coli* W3110. (1997) *J. Bacteriol.* **179** (3) 959-963

- **Kasahara, M., Nakata, A., Shinagawa, H.** Molecular analysis of the *Escherichia coli* *phoP-phoQ* Operon. (2012) *J. Bacteriol.* **174** (2) 492-498
- **Kato, A., Tanabe, H., Utsumi, R.** Molecular characterization of the PhoP-PhoQ two-component system in *Escherichia coli* K-12: identification of extracellular Mg²⁺-responsive promoters. (1999) *J. Bacteriol.* **181** (17) 5516-5520
- **Landschulz, W. H., Johnson, P. F., McKnight, S. L.** The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. (1988) *Science* **240** (4860) 1759-1764
- **Lynch, A. S., Lin, E. C.** Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli* : characterization of DNA binding at target promoters. (1996) *J. bacterial.* **178** (21) 6238-6249
- **Makinoshima, H., Nishimura, A., Ishihama, A.** Fractionation of *Escherichia coli* cell populations at different stages during growth transition to stationary phase. (2002) *Mol. Microbiol.* **43** (2) 269-279
- **Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Suqiura, M., Wanner, B. L., Mori, H., Mizuno, T.** Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. (2002) *Mol. Microbiol.* **46** (1) 281-291
- **Pabo, C. O., Peisach, E., Grant, R. A.** Design and selection of novel Cys₂His₂ zinc finger proteins. (2001) *Annu. Rev. Biochem.* **70** 313-340
- **Pescaretti Mde, L., Farizano, J. V., Morero, R., Delgado, M. A.** A novel insight on signal transduction mechanism of RcsCDB system in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (2013) *PLoS One* **8** (9) e72527
- **Punta, M., Coggill, P. C., Eberhardt, R. Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K., Ceric, G., Clements, J., Hager, A., Holm, L., Sonnhammer, E. L. L., Eddy, S. R., Bateman, A., Finn, R. D.** The Pfam

protein families database. (2011) *Nucleic Acids Res.* **40** 290-301

- **Rabin, R. S., Stewart, V.** Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12. (1993) *J. bacterial.* **175** (11) 3259-3268
- **Stafford, G. P., Ogi, T., Hughes, C.** Binding and transcriptional activation of non-flagellar genes by the *Escherichia coli* flagellar master regulator FlhD₂C₂. (2005) *Microbiology* **151** (Pt 6), 1779-1788.
- **Tanabe, H., Yamazaki, K., Katoh A., Yoshioka, S., Utsumi, R.** Identification of the promoter region and the transcriptional regulatory sequence of the *evgAS* operon of *Escherichia coli*. (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62** (2) 286-290
- **Tatusov, R. L., Fedorova, N. D., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Kiryutin, B., Koonin, E. V., Krylov, D. M., Mazumder, R., Mekhedov, S. L., Nikolskaya, A. N., Rao, B. S., Smimov, S., Sverdlov, A. V., Vasudevan, S., Wolf, Y. I., Yin, J. J., Natale, D. A.** The COG database: an updated version includes eukaryotes. (2003) *BMC Bioinformatics* **4**:41
- **Wong, P., Gladney, S., Keasling, D. J.** Mathematical model of the lac operon: inducer exclusion, catabolite repression, and diauxic growth on glucose and lactose. (1997) *Biotechnol.* **13** (2) 132-143
- **Yamamoto, K., Hirao, K., Oshima, T., Aiba, H., Utsumi, R., Ishihama, A.** Functional characterization *in vitro* of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. (2005) *J. Biol. Chem.* **280** (2) 1448-1456
- **Yamamoto, K., Ishihama, A.** Construction of 'Promoter Chip' for microarray analysis of regulation targets of transcription Factors. (2007) *IEEE Trans Image Process* 130-132
- **Yamamoto, K., Shimada, T., Ishihama, A.** Comprehensive analysis for

the recognition sequences of DNA-binding transcription factors within the *E. coli* genome using the newly developed "Promoter Chip". (2008) *IEEE Trans Image Process* 307-310

- **Zwir, I., Shin, D., Kato, A., Nishino, K., Latifi, T., Solomon, F., Hare, J. M., Huanq, H., Groisman, E. A.** Dissecting the PhoP regulatory network of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102 (8)** 2862-2867
- 鈴木、プロモーターチップを用いた網羅的転写因子レギュロンの同定 (2012) 法政大学生命科学部生命機能学科卒業論文

第6章 謝辞

本論文は筆者が法政大学大学院工学研究科生命機能学専攻に在籍中に行った研究成果をまとめたものである。本研究を行うにあたり終始適切なお助言を賜り、また丁寧に指導して下さった法政大学生命科学部山本兼由准教授に深く感謝の意を表す。法政大学生命科学部常重アントニオ教授には副査としてご助言を賜った。ここに深く感謝の意を表す。法政大学教育技術嘱託の山田佳代子氏には各種研究機器の使用法、ならびに実験試薬の調製法などの指導を賜った。ここに深く感謝の意を表す。2013年度法政大学生命科学部生命機能学科生命機能学専修4年の小川綾乃氏には実験データを提供して戴いた。ここに深く感謝の意を表す。法政大学生命科学部石浜明教授、ならびにゲノム生物学研究室の各位には研究遂行の為、日頃より実験機器などの使用に際し協力して戴いた。ここに深く感謝の意を表す。最後に、これまでの研究生活を支えてくださった家族に深く感謝の意を表す。

＜補足＞

補足表 1. 本研究で使用した大腸菌株

Strain	Characterization	Sources & References
	F ⁻ , ϕ 80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>deoR</i> ,	
DH5α	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁺), <i>phsA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi⁻ thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Takara
W3110 TypeA	wild type, complete σ set (σ ²⁸ , σ ³⁸ , σ ⁷⁰ , σ ⁵⁴)	Jishage & Ishihama, 1997
BW25113	<i>F-lacIq rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514Δ (araBAD)567</i>	Haldimann & Wanner, 2001
BW24476	<i>BW25113, Δ(phoB-phoR)580</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW26422	<i>BW25113, Δ(arcB41(del-ins,::FRT))</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW26423	<i>BW25113, Δ(torS-torD)518(::FRT)</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW26424	<i>BW25113, Δ(envZ-ompR)520(::FRT)</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW26983	<i>BW25113, Δ(creA-creD)154</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27422	<i>BW25113, ΔarcA43</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27550	<i>BW25113, Δ(yedV-yedW)1298</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27551	<i>BW25113, Δ(qseB-qseC)1304</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27552	<i>BW25113, Δ(rstA-rstB)1278</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27553	<i>BW25113, Δ(baeS-baeR)579</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27555	<i>BW25113, ΔrssB1273</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27558	<i>BW25113, Δ(phoQ-phoP)1244</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27559	<i>BW25113, Δ(cpxA-cpxR)623</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27564	<i>BW25113, Δ(kdpABCDE)1224</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27848	<i>BW25113, Δ(basS-basR)1287</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27864	<i>BW25113, Δ(narL-narX)1316</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27865	<i>BW25113, ΔnarQ1314</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27866	<i>BW25113, ΔrcsD1332</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27867	<i>BW25113, Δ(zraS-zraR)1336</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27869	<i>BW25113, Δ(evgA-evgS)1291</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27870	<i>BW25113, ΔrcsB1320</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27870	<i>BW25113, ΔrcsB1320</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27871	<i>BW25113, Δ(uhpB-uhpA)</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27872	<i>BW25113, ΔglrK1328</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002

補足表 1. 続き

Strain	Characterization	Sources & References
BW27873	<i>BW25113, ΔnarP1312</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27874	<i>BW25113, ΔuvrY1296</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27875	<i>BW25113, Δ(ypdA-ypdB)1334</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27876	<i>BW25113, Δ(citA-citB)</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27877	<i>BW25113, Δ(yehT-yehU)1324</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27878	<i>BW25113, Δ(dcuR-dcuS)1330</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW27880	<i>BW25113, Δ(glnG-glnL)</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW28077	<i>BW25113, Δ(cusS-cusR)1204</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW28078	<i>BW25113, ΔfimZ1214</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW28079	<i>BW25113, Δ(flhEAB, cheZYBR, tap, tar, cheWA, motBA, flhCD, IS1)1218</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW28878	<i>BW25113, Δ(atoS-atoC)569</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW29430	<i>BW25113, ΔglnR1326</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002
BW29434	<i>BW25113, ΔbarA1358</i>	Oshima <i>et al.</i> , 2002

補足表 2. 本研究で使用したプラスミド

Plasmid	Characterization	Sources & References
pGRP	<i>gfp</i> reporter vector	Makinoshima <i>et al.</i> , 2002
pGRPH304	<i>dicAp-gfp</i>	This Study
pGRPH306	<i>nadRp-gfp</i>	This Study
pGRPH307	<i>puuRp-gfp</i>	This Study
pGRPH308	<i>ybaQp-gfp</i>	This Study
pGRPH309	<i>ydcNp-gfp</i>	This Study
pGRPH310	<i>hicBp-gfp</i>	This Study
pGRPH311	<i>yddMp-gfp</i>	This Study
pGRPH312	<i>rodZp-gfp</i>	This Study
pGRPH313	<i>mqsAp-gfp</i>	This Study
pGRPH316	<i>radAp-gfp</i>	This Study
pGRPH317	<i>puuDp-gfp</i>	This Study
pGRPH318	<i>hicAp-gfp</i>	This Study
pGRPH319	<i>mqsRp-gfp</i>	This Study
pGRPH320	<i>allRp-gfp</i>	This Study
pGRPH322	<i>iclRp-gfp</i>	This Study
pGRPH325	<i>mntRp-gfp</i>	This Study
pGRPH327	<i>deoTp-gfp</i>	This Study
pGRPH328	<i>rhmRp-gfp</i>	This Study
pGRPH330	<i>yjhIp-gfp</i>	This Study
pGRPH331	<i>yeaMp-gfp</i>	This Study
pGRPH334	<i>ydiPp-gfp</i>	This Study
pGRPH335	<i>ykgDp-gfp</i>	This Study
pGRPH337	<i>adap-gfp</i>	This Study
pGRPH339	<i>chbRp-gfp</i>	This Study
pGRPH342	<i>rhmSp-gfp</i>	This Study
pGRPH343	<i>xylRp-gfp</i>	This Study
pGRPH344	<i>robp-gfp</i>	This Study
pGRPH345	<i>gadXp-gfp</i>	This Study
pGRPH346	<i>envYp-gfp</i>	This Study
pGRPH347	<i>feaRp-gfp</i>	This Study
pGRPH349	<i>marAp-gfp</i>	This Study
pGRPH351	<i>eutRp-gfp</i>	This Study

補足表 2. 続き

Plasmid	Characterization	Sources & References
pGRPH352	<i>yqhCp-gfp</i>	This Study
pGRPH353	<i>gadWp-gfp</i>	This Study
pGRPH354	<i>yidLp-gfp</i>	This Study
pGRPH355	<i>yjiOp-gfp</i>	This Study
pGRPH356	<i>soxSp-gfp</i>	This Study
pGRPH358	<i>perRp-gfp</i>	This Study
pGRPH359	<i>yafYp-gfp</i>	This Study
pGRPH362	<i>yfjRp-gfp</i>	This Study
pGRPH365	<i>ymfNp-gfp</i>	This Study
pGRPH373	<i>ttdRp-gfp</i>	This Study
pGRPH374	<i>yhaJp-gfp</i>	This Study
pGRPH376	<i>aaeRp-gfp</i>	This Study
pGRPH377	<i>ycjZp-gfp</i>	This Study
pGRPH378	<i>nhaRp-gfp</i>	This Study
pGRPH379	<i>yafCp-gfp</i>	This Study
pGRPH380	<i>yahBp-gfp</i>	This Study
pGRPH381	<i>cynRp-gfp</i>	This Study
pGRPH383	<i>tdcAp-gfp</i>	This Study
pGRPH387	<i>ybdOp-gfp</i>	This Study
pGRPH388	<i>ycaNp-gfp</i>	This Study
pGRPH389	<i>allSp-gfp</i>	This Study
pGRPH390	<i>ybeFp-gfp</i>	This Study
pGRPH391	<i>ybhDp-gfp</i>	This Study
pGRPH392	<i>cysBp-gfp</i>	This Study
pGRPH393	<i>ydcIp-gfp</i>	This Study
pGRPH394	<i>yneJp-gfp</i>	This Study
pGRPH395	<i>ynfLp-gfp</i>	This Study
pGRPH396	<i>ydhBp-gfp</i>	This Study
pGRPH397	<i>dmlRp-gfp</i>	This Study
pGRPH398	<i>cblp-gfp</i>	This Study
pGRPH400	<i>yeeYp-gfp</i>	This Study
pGRPH401	<i>yeiEp-gfp</i>	This Study
pGRPH404	<i>yfeRp-gfp</i>	This Study

補足表 2. 続き

Plasmid	Characterization	Sources & References
pGRPH405	<i>hcaRp-gfp</i>	This Study
pGRPH406	<i>yfiEp-gfp</i>	This Study
pGRPH407	<i>gcvAp-gfp</i>	This Study
pGRPH408	<i>lysRp-gfp</i>	This Study
pGRPH410	<i>yglfp-gfp</i>	This Study
pGRPH411	<i>yhjCp-gfp</i>	This Study
pGRPH412	<i>yiaUp-gfp</i>	This Study
pGRPH413	<i>yidZp-gfp</i>	This Study
pGRPH414	<i>metRp-gfp</i>	This Study
pGRPH415	<i>qseDp-gfp</i>	This Study
pGRPH416	<i>hdfRp-gfp</i>	This Study
pGRPH417	<i>agaRp-gfp</i>	This Study
pGRPH418	<i>birAp-gfp</i>	This Study
pGRPH419	<i>csiRp-gfp</i>	This Study
pGRPH420	<i>exuRp-gfp</i>	This Study
pGRPH421	<i>fadRp-gfp</i>	This Study
pGRPH422	<i>frlRp-gfp</i>	This Study
pGRPH423	<i>fucRp-gfp</i>	This Study
pGRPH424	<i>glcCp-gfp</i>	This Study
pGRPH425	<i>glpRp-gfp</i>	This Study
pGRPH426	<i>lexAp-gfp</i>	This Study
pGRPH427	<i>lldRp-gfp</i>	This Study
pGRPH428	<i>mcbRp-gfp</i>	This Study
pGRPH429	<i>mngRp-gfp</i>	This Study
pGRPH430	<i>nanRp-gfp</i>	This Study
pGRPH433	<i>uxuRp-gfp</i>	This Study
pGRPH434	<i>ydcRp-gfp</i>	This Study
pGRPH435	<i>ydfHp-gfp</i>	This Study
pGRPH436	<i>yegWp-gfp</i>	This Study
pGRPH437	<i>ygbIp-gfp</i>	This Study
pGRPH439	<i>yihLp-gfp</i>	This Study
pGRPH440	<i>yihWp-gfp</i>	This Study
pGRK030	<i>phoBp-gfp</i>	This Study

補足表 2. 続き

Plasmid	Characterization	Sources & References
pGRK049	<i>fimZp-gfp</i>	This Study
pGRK052	<i>cusRp-gfp</i>	This Study
pGRK062	<i>citAp-gfp</i>	This Study
pGRK068	<i>kdpDp-gfp</i>	This Study
pGRK096	<i>torSp-gfp</i>	This Study
pGRK097	<i>torRp-gfp</i>	This Study
pGRK107	<i>phoPp-gfp</i>	This Study
pGRK114	<i>narXp-gfp</i>	This Study
pGRK116	<i>rssBp-gfp</i>	This Study
pGRK143	<i>rstAp-gfp</i>	This Study
pGRK173	<i>cheBp-gfp</i>	This Study
pGRK179	<i>uvrYp-gfp</i>	This Study
pGRK182	<i>yedWp-gfp</i>	This Study
pGRK189	<i>baeSp-gfp</i>	This Study
pGRK190	<i>barRp-gfp</i>	This Study
pGRK193	<i>yehUp-gfp</i>	This Study
pGRK204	<i>narPp-gfp</i>	This Study
pGRK210	<i>rcsDp-gfp</i>	This Study
pGRK211	<i>rcsBp-gfp</i>	This Study
pGRK212	<i>rcsCp-gfp</i>	This Study
pGRK213	<i>atoSp-gfp</i>	This Study
pGRK227	<i>evgAp-gfp</i>	This Study
pGRK228	<i>ypdAp-gfp</i>	This Study
pGRK238	<i>narQp-gfp</i>	This Study
pGRK244	<i>glrRp-gfp</i>	This Study
pGRK245	<i>glrKp-gfp</i>	This Study
pGRK262	<i>barAp-gfp</i>	This Study
pGRK283	<i>qseBp-gfp</i>	This Study
pGRK293	<i>arcBp-gfp</i>	This Study
pGRK306	<i>ompRp-gfp</i>	This Study
pGRK334	<i>uhpAp-gfp</i>	This Study
pGRK365	<i>cpXRp-gfp</i>	This Study
pGRK389	<i>basRp-gfp</i>	This Study

補足表 2. 続き

Plasmid	Characterization	Sources & References
pGRK392	<i>dcuSp-gfp</i>	This Study
pGRK420	<i>creBp-gfp</i>	This Study
pGRK421	<i>arcAp-gfp</i>	This Study
pGRK423	<i>cusSp-gfp</i>	This Study
pGRK424	<i>citBp-gfp</i>	This Study
pGRK425	<i>kdpEp-gfp</i>	This Study
pGRK426	<i>phoQp-gfp</i>	This Study
pGRK427	<i>narLp-gfp</i>	This Study
pGRK428	<i>cheYp-gfp</i>	This Study
pGRK429	<i>yedVp-gfp</i>	This Study
pGRK430	<i>yehTp-gfp</i>	This Study
pGRK431	<i>evgSp-gfp</i>	This Study
pGRK432	<i>ypdBp-gfp</i>	This Study
pGRK433	<i>qseCp-gfp</i>	This Study
pGRK434	<i>envZp-gfp</i>	This Study
pGRK435	<i>uhpBp-gfp</i>	This Study
pGRK436	<i>ntrCp-gfp</i>	This Study
pGRK437	<i>cpxAp-gfp</i>	This Study
pGRK438	<i>hydGp-gfp</i>	This Study
pGRK439	<i>basSp-gfp</i>	This Study
pGRK440	<i>dcuRp-gfp</i>	This Study
pGRK441	<i>creCp-gfp</i>	This Study
pGRK470	<i>atoCp-gfp</i>	This Study

補足表 3. 本研究で使用したオリゴヌクレオチド

Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')	Source
Anti GFP primer	AGGGTCAGCTTGCCGTAGG	This study
H304S	GAAGATCTAATATCTTCACTCGATTAACGCCAAGC	This study
H304T	CGATGCATCTTCCCTGTAGGTTCACTATCACCCCG	This study
H305S	CGATGCATGTCAGGGTTGTTTTCGAAATTGGAAAT	This study
H305T	GAAGATCTCCTACCTGAACAGCCATCACCAGCGTG	This study
H306S	GAAGATCTGTGGTATGGGAAGGAACGCGTCCACTG	This study
H306T	CGATGCATCGCCTCCAGCTTTTTCGCGCTGGGGCT	This study
H307S	GAAGATCTGCGATAATTAATGCCGCACTCGAAAGG	This study
H307T	CGATGCATACTGATGGCAGGGCTGACTTTTATCTTG	This study
H308S	GAAGATCTCGCGATTTGCCACAGCGGTTGGGTAGA	This study
H308T	CGATGCATTTTACGATTGTTATTGATCAGTGCACT	This study
H309S	GAAGATCTCAAAGCGTAATAAAAATCCCGGCAAGCA	This study
H309T	CGATGCATCGCGACCGTCGGACTGGACTCATTACG	This study
H310S	GAAGATCTTCCTTTGTGCCCTGCCATGAGTTGTCC	This study
H310T	CGATGCATTAAAGCATCTTTTGCCGCTTCCATCGC	This study
H311S	CGATGCATCAGGCTGACATTAAGTTTCGTCCAGTGA	This study
H311T	GAAGATCTTGTCAATGATGAGCAGTTAAAACCTGGC	This study
H312S	CGATGCATATCTTCTTCAATGTCGCGTACCGTGGA	This study
H312T	GAAGATCTTTCCCGGGTGCGCCGTATGGACGCAGC	This study
H313S	CGATGCATTGACTCTTCTTTATTTCATGATGCTCTC	This study
H313T	GAAGATCTCCTGACTCCAGCTTCCCTTATAAATTC	This study
H314S	CGATGCATCAGCAAGGGGTTTTTCAGGATCGTTGAG	This study
H314T2	GAAGATCTATTCTTCCGTACACAGATAAATTCAT	This study
H315S	CGATGCATATCGATTTTTAATCCTGTCCCTTTTCG	This study
H315T	GAAGATCTGGCTAACTACCATTAATAACGCCGCAA	This study
H316S	GAAGATCTTGCAACAGGTGCGTGAAAATCTGCCGC	This study
H316T	CGATGCATACGCTCGTTACGCGCCACCATTGGCGA	This study
H317S	GAAGATCTCCGGCTCGCCATTTTCTGACCCAGAC	This study
H317T	CGATGCATCGCCAGCGCATGTGGTAGCGCAATAGG	This study
H318S	GAAGATCTATATTGCTGCGGGTAAGGCGTTACG	This study
H318T	CGATGCATTGCTTTACGCAATGGTTCTTTAATCTC	This study
H319S	CGATGCATTGATAATCCAATGATAACATTACACAT	This study
H319T	GAAGATCTCCACCACCGCACCGGAAGCGTTTCGCT	This study

補足表 3. 続き

Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')	Source
H320S	GAAGATCTGAAACGCAGCAACGGGATTTTTTCCAT	This study
H320T	CGATGCATCAGATTGAGAGAAATATCGCTAACCGA	This study
H322S	CGATGCATCGCCAGTTCCGTGAGTGCCACACTGCC	This study
H322T	GAAGATCTCCGACAGGGATTCCATCTGGTAATCCG	This study
H324S	CGATGCATCACGGTTTTGTATTCCGTCTGCTCATT	This study
H324T2	GAAGATCTCCAGCCAAATTCATCGGTCATTGGCTG	This study
H325S	TGGAAAGATCTCCGCATCCGCGAGCCGCAA	This study
H325T	TCCCCATGCATCCTGATCAAGTCAGAAATC	This study
H327S	CGATGCATTGCACGGCGGAGGTAACACTCAGTTTTTC	This study
H327T	GAAGATCTATCAATGAGCGGCAAGGATTTTTGT	This study
H328S	CGATGCATCCTGAGTTCATTAAGCAGCAAATAGGC	This study
H328T	GAAGATCTCTGCGCACTGGATTACAGAACGGCGGG	This study
H330S	CGATGCATATCCACCATTACATTCAATAAATTAAG	This study
H330T	GAAGATCTAAAACACGGATTATTCAACGCTCGCGT	This study
H331S	CGATGCATTGCACCATGTAGCGCCAGTATCAGCTG	This study
H331T2	GAAGATCTAAGGCGAAGGGAGAGAGCGAATTGCGA	This study
H334S	CGATGCATCTTGACGTAATCAACTCGGTTTCATT	This study
H334T	GAAGATCTGAGCCGCCAACGGTCAGCGCGGCTATC	This study
H335S	GAAGATCTATATTGGGCATATCCGCAAGATTATGA	This study
H335T	CGATGCATCTTCGCGCTCCTTGCGTTAACGCATG	This study
H336S	CGATGCATCAAAGGCACATGCATGAAATTTCCGAA	This study
H336T	GAAGATCTCAGAGTGAAGATCAATATCACTCCCTG	This study
H337S	CGATGCATTTCCCGCAAAGCATGTCTGGCGCGGCA	This study
H337T	GAAGATCTGGTGGGCGGCGCTGAACAGCCGTGG	This study
H338S2	GAAGATCTCAGTCCACCGCCAAAGCTCGCACAGAA	This study
H338T	CGATGCATGGTGAGATTGAGAAATAACCTTTCAT	This study
H339S	CGATGCATTACCAGAGTAAATTCATAATAGTCGTG	This study
H339T2	GAAGATCTGGTACGGGTAATCGTGCCGGTAAGAAA	This study
H340S	CGATGCATATTCACCTTCGACCTGACCATGCCAGTG	This study
H340T	GAAGATCTTTCTGTTGGGTGTGGCAGGTGATTTTG	This study
H341S	CGATGCATGACTGCCTGCTGGTCGCTGGCAAAAAA	This study
H341T	GAAGATCTTGGGCAGTATCCGTCTCACTGGCGCGT	This study

補足表 3. 続き

Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')	Source
H342S	CGATGCATAAACACATGAATACCCGTGCCATGTTC	This study
H342T	GAAGATCTCCCTTCCTCGCACACCTTGTTTAATCC	This study
H343S	CGATGCATATCAATGCGGGCGGGAAATCTTCTTC	This study
H343T	GAAGATCTGGCGGAATGTTTATGGCAACGCGGACG	This study
H344S	CGATGCATAATAGCATGGCCAGTGACATCTTTAAA	This study
H344T2	GAAGATCTCACCGTTTTTCGCCCGGCTCACATAAC	This study
H345S	GAAGATCTTGTGTCGTCGCGGCTTCGAAATGGACT	This study
H345T	CGATGCATATTTTCAACACACTTATCTACTCGAAT	This study
H346S	CGATGCATTAACGTTGAGAGTTCAATGACGTTATT	This study
H346T	GAAGATCTGGCTATCGCCAACTGCTGGAACACGTT	This study
H347S	CGATGCATTGTACGCGTACTCAGCTTTAGTCCTTT	This study
H347T	GAAGATCTGTAGCAGAATACGTTTACGCTCTGCGG	This study
H348S	CGATGCATCTCTTTAAAATGCCGCTCATAAGGTTT	This study
H348T	GAAGATCTTGCTGTCATCCGCACAGCAGAAGAATT	This study
H349S	GAAGATCTGGGCAATATTATCCCCTGCAACTAATT	This study
H349T	CGATGCATGGTTTTCTTTTTTAAACATCCGTTGCAG	This study
H350S	GAAGATCTGGAAAGAACATGCGGTAGAAGCGTTTG	This study
H350T	CGATGCATACGGGGAAAAATCAATACATAAACTGCC	This study
H351S	CGATGCATCCAGGCGGTAATCGTTAAAGCATGTTC	This study
H351T	GAAGATCTCGATAGATGCAGCGGATGCCATGCTCA	This study
H352S	CGATGCATCACATCGGGCAACAGTCTGACAAACT	This study
H352T2	GAAGATCTGAAAGTCACTTTCTGTTTCGCGAACCAG	This study
H353S	GAAGATCTTTATGGGATGACGCCACAGAGTATCA	This study
H353T	CGATGCATTCGTCGCGTATCCGGTGAACAAAACGC	This study
H354S	CGATGCATGTAGGTATGCCAGAGCGAGATCAGAGA	This study
H354T2	GAAGATCTGAAGATCAGCGTACCGCTGAAGTCAC	This study
H355S	GAAGATCTGCGTCATATGTACACCATTCCGTTCCCT	This study
H355T	CGATGCATCTCACCTTCCAGCACAATTTCCAGCCG	This study
H356S	CGATGCATAAGCGTCTGATGCGTCACCGTGCGGAA	This study
H356T	GAAGATCTAGCGGTCGCCCGGTTACGCAACGGGG	This study
H357S	CGATGCATAAGAGAGGAGACGTCGATAATATTATT	This study
H357T	GAAGATCTCGCCAGGAATCCCGATGCTGCTGTCTG	This study

補足表 3. 続き

Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')	Source
H358S	CGATGCATATCAAGCAAGTTTTCCAGTTTGC GGAT	This study
H358T	GAAGATCTGCTATTTCACTGAAGCCTGTTCCGTTT	This study
H359S	TCGCTATGCATATCCTGGTGGCTGACCACA	This study
H359T	ATGAAAGATCTTTTCTGTGGTGTCCATAACC	This study
H362S	GCCACAGATCTAGCAGGCACTGGCAAAAGC	This study
H362T	TACATATGCATTTTCACGAAAATCACGCCGC	This study
H365S	GAAGATCTAACGACGAGCTGTATCTCTCAATTTCCG	This study
H365T	CGATGCATAATCTGACGGCAATGGTTTCAATTGA	This study
H373S	CGATGCATTTGTTGCCAGCGTATTTTCAAGGATTTG	This study
H373T	GAAGATCTTTTGAGTATGCTTTGCAGCTCGCCAAG	This study
H374S	CGATGCATATCCAGCTCTTCTTCCAGTTTTTGCAT	This study
H374T	GAAGATCTCTTTTGAATCAGCGGATTCTCTCGCTG	This study
H375S2	GAAGATCTGAATTCGCGTTGTAGAGTGAATTCATC	This study
H375T	CGATGCATTTGCGCCGCTAACCCCTTCTTCTAGCTC	This study
H376S	GAAGATCTGGGGATTCGGTGTAAATAGACCCAGGCA	This study
H376T	CGATGCATGTTTAAACAGCTTTTACCTGCAACTCATC	This study
H377S	GAAGATCTTCCTGCACCGGCACAAATTTCCATCGC	This study
H377T	CGATGCATAAGCCGCAATCCCAATCGTTCTTCTAT	This study
H378S	GAAGATCTCATGGGCGTTCTCCAGCGAAGCGACTG	This study
H378T	CGATGCATGCCTTTCAGGCGCTCTTCCAGCGCTCG	This study
H379S	CGATGCATAAGCAGGCTAACGCCAAGTTTCATCTC	This study
H379T	GAAGATCTAACTGTACTAACTCTGGCGTTGTCTGC	This study
H380S	CGATGCATCACCACATCCAGCCCCGTCTCCATACG	This study
H380T	GAAGATCTATGGGAATTATTAGGAACCATTGGCTT	This study
H381S	CGATGCATACGGTCAAACAGCGGCACGCCTAAACT	This study
H381T	GAAGATCTACGCGGCTGAATCGGCATAACGCAGC	This study
H382S	CGATGCATGATACGGTGACTTACCGCACTGGGGCT	This study
H382T	GAAGATCTGTTGAAGTGTGACACCAATTTCTTCTG	This study
H383S	CGATGCATACCAAATAATCTTCAATATCGTTAAT	This study
H383T	GAAGATCTCCTGTCAGAAGAGAAAAAGTTGACGTT	This study
H384S	GAAGATCTGGTGC GCACTACATCAGAGTGCTGCTT	This study
H384T	CGATGCATGCGCACAACAGCGGCTGACCGAGATC	This study
H385S	GAAGATCTGCTTAACTACCGACGCTTTTCATCGGT	This study

補足表 3. 続き

Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')	Source
H385T	CGATGCATTTGCGACATTTCCAGAACATGAGCGGC	This study
H386S	CGATGCATCCGCTCCAGCAACATCACGCCAGCTC	This study
H386T	GAAGATCTTTCCGCGAGGCGCACCATATTGTTGGT	This study
H387S	CGATGCATCGCACGTAAGCGTTGTAACGACTGGCT	This study
H387T	GAAGATCTTGGGGTTATCAAGCCAGAAAGCCCGGC	This study
H388S	CGATGCATGAATAAGCGAATTTTAAGACGTTGTTC	This study
H388T	GAAGATCTTCTTTGTCTCCTCCAACCAGCGCCACC	This study
H389S	CGATGCATGAAAAACAGCGTACTCCGGTATTCTC	This study
H389T	GAAGATCTCCACAAACACCTCACCTTTCATCGGGA	This study
H390S	CGATGCATCGCTGCATTAACGATCCCTTTATGTAC	This study
H390T	GAAGATCTAGAAAAATTTGCTCACTGGGTTTACGTA	This study
H391S	CGATGCATAATATTGAGTAATTTAGCGGCATTGTT	This study
H391T	GAAGATCTCCCGTATTGACGTTGCGGATACGTACG	This study
H392S	GAAGATCTTTCTGTGCTGCGTGACGGTGCTGCCGGT	This study
H392T	CGATGCATGGAAAAATTTGAATGCCTAGCTCGTC	This study
H393S	CGATGCATCTCCAGTTCATTCAATGTCTTAGAGAG	This study
H393T2	GAAGATCTGCGCCAGCTCGTCTGCATTTACCATTT	This study
H394S	GAAGATCTTAATCGCCAGAATCGTCCCAACGGTC	This study
H394T	CGATGCATGCGAATAAACAGATCAACCCCCAGTTC	This study
H395S	CGATGCATCAGCAGTCGGGCACCAATTTGTTGCTC	This study
H395T	GAAGATCTCGCGCATAATCAAAATGCCGTGCCAGC	This study
H396S	CGATGCATTTCAAAGAGCGGCACCGCCAGCCACTC	This study
H396T2	GAAGATCTCGTAGCGGCGTTTTCTACCCACAGCAT	This study
H397S	CGATGCATCACCACGTTTTAGCGTTTGCTCCAGCAA	This study
H397T	GAAGATCTCTGACCACGTA AAAATCGATGTCCGCA	This study
H398S	CGATGCATAACAAATATTTTCGATGCCAAGTTCATC	This study
H398T	GAAGATCTTGCCCGGGCAAAGCGTTGATGTGAAT	This study
H399S	CGATGCATACGGATCAAAAGTTGTTGATTTAACTC	This study
H399T	GAAGATCTAATGCCTGTGCAAATTAGTTCTGGTTC	This study
H400S	CGATGCATAAGCAATTGAATATTAAGGTCGCTTTC	This study
H400T	GAAGATCTAAGAAACCACCCCGGTAATCCAGTAA	This study
H401S	CGATGCATAAACAGTTGCACGCCAAGCTGCCCTTC	This study
H401T	GAAGATCTGCTGGTGTGCTTATCCAGACCAAACAC	This study

補足表 3. 続き

Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')	Source
H402S	CGATGCATTTCCAGACGCTGCATTTGCTGACTTAC	This study
H402T	GAAGATCTCAGCGCTGGCTGTTTTACGCGTATGAC	This study
H403S	CGATGCATGCCGAGTTGATTTTCCAGCTCTTTAAT	This study
H403T	GAAGATCTGTTGATTCCAGCATTTCGTGCCAGCGCG	This study
H404S	CGATGCATCAGCAGGCCGAACACCAGTATGATTTTC	This study
H404T	GAAGATCTGCTGGATGCCGACGCAGAACAAACCGC	This study
H405S	CGATGCATCCTCACCAGTAACGGAACACCGACACA	This study
H405T	GAAGATCTGGTACATCGATCAACTCGCCGTTAATG	This study
H406S	CGATGCATTTTCTCAAATAACTGGACTGAAAATC	This study
H406T	GAAGATCTAGAACAAACGTCGACAGTGCCGTAACA	This study
H407S	CGATGCATTAGCCCCAAAAATCCTCAAGAGACTT	This study
H407T	GAAGATCTATGCACACCAATGACGGACGTACCATC	This study
H408S	GAAGATCTGCATATCAACAGAACCCGCATTACCG	This study
H408T	CGATGCATCAATTTACGCCGATCACCTTCTCAA	This study
H409S	GAAGATCTCAACAATGGTGCCGGGCTGAACATACT	This study
H409T	CGATGCATCAGCGGCTGCCCGAACATATTTTCCAG	This study
H410S	CGATGCATTAGCGTATAGCCAATTTGTTCTTCCAG	This study
H410T	GAAGATCTTCTTAAACGAAATTCGTTCTGTGTGCT	This study
H411S	CGATGCATAAAGAAATCCGCTGCGCGGGAAAAACT	This study
H411T2	GAAGATCTGGTATTACCCGCGAGAAAAATAAGAA	This study
H412S	CGATGCATTAAACCCACTTTTGTATTCAAATCAGC	This study
H412T	GAAGATCTGCAGAGGCTTTCACGGTTCCTCAACGC	This study
H413S	CGATGCATAAACACGCTCTTAACTTTGCCAGCGA	This study
H413T	GAAGATCTGATCCTCACTTTCGTCAACACGTCACC	This study
H414S	GAAGATCTATCTTTGTTCTGATGACGCGCCGGAAC	This study
H414T	CGATGCATCACAATAGCCGGAAGCCAAGGCGTTG	This study
H415S	CGATGCATTTCCAGCGCACGGATGCGGCGGCTGAA	This study
H415T	GAAGATCTCAAAGGCGGCACCATCGATATCACCAG	This study
H416S2	GAAGATCTAAGGGTGTGAAAACGTTTTGGACGCTT	This study
H416T	CGATGCATGCGGGTGAAGGTTTCACACCCAGTTG	This study
H417S	AACGCATGCATGTTGCGGATCGTCACAGTA	This study
H417T	CCCAGAGATCTCGCATCCTGCGGGAAATTC	This study

補足表 3. 続き

Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')	Source
H418S	CTATTAGATCTGTAGGTCTGCGTCTGCCAA	This study
H418T	GGAACATGCATGACATCAACGCCCCAGTCA	This study
H419S	CGCTGAGATCTGCGTCAAGGATGCTCTACT	This study
H419T	CGTTCATGCATCAGTTGCGAAAGAGCTTCC	This study
H420S	AACGCAGATCTCAGTGCTGATGATTGGCCC	This study
H420T	ATGATATGCATACGAACCTACCGTACGGCTG	This study
H421S	CCTTAAGATCTAAATAATCAATGATGTTTT	This study
H421T	CGCTGATGCATTTTCACGTAACGTAGTACGC	This study
H422S	TGCGGAGATCTCATTTCCACAGCTGCACGC	This study
H422T	TTGCGATGCATAATGCGGCTGACGTTATAT	This study
H423S	ACTGAAGATCTATTTATAGAGGAAGTGTGA	This study
H423T	CGTCCATGCATGCGCAGAATTTTACCCTGC	This study
H424S	TGCACAGATCTTACCACCGGTACACGCAG	This study
H424T	ACGGTATGCATTTTCACGCAGTGCGGAGCGT	This study
H425S	GTGTTATGCATACTGGAAGGCAGCGCCGCA	This study
H425T	TATCAAGATCTTGTTAAGCGGCTATGTGCA	This study
H426S	TATTGAGATCTATAATGTAAAAAGGTTCTT	This study
H426T	CCTTTATGCATCAGCGCCTTCAGATGTTCT	This study
H427S	CTCGGAGATCTGGGGGTATTCCTGACCGGG	This study
H427T	TTTGCATGCATCTCGCGCAGTGAATTACGT	This study
H428S	CGCGCAGATCTGTCTGCGGATTAGTGAGCA	This study
H428T	GCTTCATGCATAGGTGTAATACTCATACCT	This study
H429S	ACTAGATGCATCAAAGCCTGACGCACCGTA	This study
H429T	GCGTAAGATCTGCTTCATTTGGGGGAATCG	This study
H430S	TGTTTCATGCATGCCAAATTCACGACGGCGG	This study
H430T	GAACCAGATCTAGACACCGCACATCATCAG	This study
H431S	CTCAAAGATCTGAATGAATTTAAATTCGTT	This study
H431T	GCCTCATGCATGGAGGGACGGGAGACGTCA	This study
H432S	CGGCGATGCATGTGGCGATTACCTCAAAG	This study
H432T	CCGTGAGATCTTTACCAGCCCGTTCGCCGC	This study
H433S	CACCTAGATCTCGGCGGCAGCTGGCGTCAC	This study
H433T	AGCGCATGCATTACCACCGTCCGCGTGACA	This study

補足表 3. 続き

Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')	Source
H434S	AGAGAAGATCTAAATTATGCGTTATCCCGT	This study
H434T	CCCTGATGCATGAGCAACTGATAGGCATGG	This study
H435S	GGCCTAGATCTTATGACGCGCGCCGCTTA	This study
H435T	TCACGATGCATCTGGCGTGACACATTGAAA	This study
H436S	CTTAAATGCATCTCACCGGGCAAAATATTG	This study
H436T	CGAAAAGATCTTGCTGCGTGGGGCGTATCA	This study
H437S	CCGGAATGCATCACAACGGCTCCCTGCTGC	This study
H437T	CACTAAGATCTGTGGAAGAAACCATTACTG	This study
H439S	GTTCCAGATCTACGGTGCAGAAGTTTACGA	This study
H439T	AGGTTATGCATCGCCTGGCGCAGCGTCATA	This study
H440S	CGACGAGATCTAAAAAGCCTTCACCCTGGC	This study
H440T	ATCAGATGCATCTCGCTTAATTTACGAATA	This study
H441S	TTCATATGCATCAGCGTCTGATACGCCTGC	This study
H441T	CAAGTAGATCTTGTGCGTTTTTTGACCGTT	This study
H442S	TCGCGATGCATGCTGAGAATATGACGCACT	This study
H442T	TCAAAAGATCTCTAAAACCGCCATCCTGAT	This study
K030S	GAGGCAAGATCTGCGGCGCATGTCCGGCGC	This study
K030T	CGTCTATGCATGATTTGCCCTGTTGTAATA	This study
K031S	GGCTTAGATCTGGTCAAGCGGAAGATTAT	This study
K031T	CGTTCATGCATGTAAGATACTCCAGTTAAG	This study
K049S	CGTTGGATGCATAGTTACCAGTCTCATAGG	This study
K049T	GTGATAGATCTGGCAAGCATCACAAATGGG	This study
K052S	CAACAGATGCATATTTCCCTCCGCATGTTGC	This study
K052T	GCGCATAGATCTGTTGCTGATTGAAATAGC	This study
K062S	AGATGAGATCTGTGCCGCTCATAGGCGAGG	This study
K062T	AAGCTGATGCATTGTTTTCTTGCGGGTTG	This study
K068S	TCGTTATGCATCAAGTTTATCCAGCGCCAG	This study
K068T	GCGTGAGATCTAAACCGCTTACCGCTTCTG	This study
K096S	GGCAAAATGCATCCAGAGTCTTCGGGTCAG	This study
K096T	CCGGCAGATCTTGCGCGAAAACCTTCGACC	This study
K097S	GTGATGATGCATCAGAGGGTTTTACTCATT	This study
K097T	ACTGCAGATCTAAGCCGCTACTCATATCCG	This study

補足表 3. 続き

Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')	Source
K107S	AGTACATGCATTTTTATTTCTCCCTGTCTT	This study
K107T	CGCTGAGATCTTGACCTGACCGACTCTACC	This study
K114S	CGTTTATGCATGTAAACCTCTTCCTTCAGG	This study
K114T	GCCAGAGATCTGGAATAATCAGAATACCGG	This study
K116S	GATCGAGATCTGTTCCCGTCGCTTTGCGGC	This study
K116T	GGCTGATGCATGTTCTCTCCCCTGACTGGC	This study
K143S	CCAGTAGATCTGTCACCGGACGCAGTTTCC	This study
K143T	CATAACATGCATGGTAGATATAAAAAACGTC	This study
K173S	ATTTTATGCATCGTTAATCCTTACTTAGCG	This study
K173T	CCGACTAGATCTTCGTTTTCGTTTCGCTGGG	This study
K174S	TCCATATGCATGCTGTCACCTCGGTTTCGGC	This study
K174T	GGCGGAGATCTCATTTCTAATAGTGAAAGC	This study
K179S	ACGTTATGCATAGGAATATCTCCAGAAATA	This study
K179T	GCCGGAGATCTATTACTGACGGTAGGCTTG	This study
K182S	GCCTGATGCATTACAAAATTGTAATGCTGC	This study
K182T	TACATAGATCTGCATTAAGTCCACGATAG	This study
K189S-2	GTGCTAGATCTGCTGCACGCCAGAAATAAC	This study
K189T	CCAGAAATGCATTGCGCGCTCCTTTTTTCGC	This study
K190S	TGGGCAGATCTGCGCAAGACTTCAACCAGC	This study
K190T	AACTCATGCATACTTCTCTCTGTAAATCCC	This study
K193S	AAAATCATGCATACCCGCAAACCACACTTC	This study
K193T	CGTCGAAGATCTCCAGCAGCGCCTGGAGAG	This study
K210S	CATACAGATCTACCCTCATTAATCAGTCCG	This study
K210T	TTCTGATGCATTTCGTGTTTATGACCTGTTA	This study
K211S	CGGGAAGATCTTGGTACACGCTACTCTGTG	This study
K211T	ATATTATGCATGTAATAGGCTACCTTGCTA	This study
K212S	TGCTCTATGCATGTAGCGGAGGCTTTCAG	This study
K212T	CCGAGGAGATCTCCATTACGCTCAATGGGG	This study
K213S	GCATTTAGATCTTTATTGATGCGTTCATGC	This study
K213T	ATATAATGCATGCTGAAATCCACTAGTCTT	This study
K227S	GAGTGAGATCTTGGCATCAGTTTTATCCAG	This study
K227T	TATTGCATGCATAGATTATCCCTTTGCAA	This study

補足表 3. 続き

Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')	Source
K228S	GTCACCAAGATCTAGCGTCGCCAGCATCAG	This study
K228T	TATTTTCATGCATGGGTGACTCTGAATAAGG	This study
K238S	CACGGTAGATCTTCCTGACGCGCGGTGCGC	This study
K238T	TTAACATGCATACGCGTCTTCTCCACAAAA	This study
K244S-2	GCAAAAATGCATGCATTACCAGTTGTCGTA	This study
K244T-2	GGAACGAGATCTCCGTACTGTCAGCAACTC	This study
K245S	CAGATAATGCATAGCCGGGAATTACCCGGC	This study
K245T	TGGTGAGATCTCGCTATGTCGATAACTTCG	This study
K262S	ATCTGCAGATCTTAGCGGTGCGGTATGGCG	This study
K262T	GTAGTTATGCATGGAGTTCCGTTATGGGAC	This study
K283S	TTCGCAGATCTGTAGTTGAGCAATTCAGGG	This study
K283T	TAAAAATGCATTTTTTTCATCCCTGCGATA	This study
K293S	AATTTGATGCATTAGGGAATTCCTTCACGA	This study
K293T	GTGTGAGATCTCGCCCGACTGCGTGCCGG	This study
K306S	GTTCTCATGCATTGTTTGTACTCCCAAAGG	This study
K306T	CAGCCAGATCTAGGAGGTTAAGACTCTTCC	This study
K320S	ACTATATGCATAACTGAATCTCCACCTGAA	This study
K320T	TCATGAGATCTGGCGTGAGTTTGACCCGTC	This study
K334S	AACGGTATGCATGGTCTTGTCTTGCGGGT	This study
K334T	ATGATAGATCTTCAGGAGATGGCGACCGCC	This study
K360S	TGCCTGTATGCATAAAGCAGTCTCCTGAAC	This study
K360T	GTTTCCCAGATCTGGCAGCTAACCCGTACC	This study
K365S	ATTTTATGCATTGTTTAAATACCTCCGAGG	This study
K365T	CCCACAGATCTTGGGGGAAGACAGGGATGG	This study
K373S	TGGCAAGATCTGATTTCTGTCGCTGGCAAC	This study
K373T	CATAAAATGCATCTTCTTCTTTGCTGCTC	This study
K389S	AGAATATGCATTCACCTACTCTCCTGCAAG	This study
K389T	AGGCGAGATCTATATCATTCAGCGAGCGGG	This study
K392S	GAATGATGCATCAGCTTCCTTGTGTGACAA	This study
K392T	CCCATAGATCTCGAATATCATCATACTCCC	This study
K420S	GCACCAGATCTCAGGTAATTGGATAATAGC	This study
K420T	TCCCGATGCATAAATCGCCTCTGTTATTGC	This study

補足表 3. 続き

Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')	Source
K421S	CGGGGTATGCATGTTTGCTACCTAAATTGC	This study
K421T	CCATCGAGATCTTTGCCCGCGCCGCTGCC	This study
K422S	GGCCCCATGCATTCCACCTGCAAATTCTCC	This study
K422T	CCTGTAGATCTCCATATACCTACCAGTTTC	This study
K423S	GCTTACTATGCATCCGGCACCTCAAGCATG	This study
K423T	CCGGAGAGATCTTGACCAAAGGGTTAACCG	This study
K424S	TCAGGTGAAGATCTGCTGGGGGCCATTATC	This study
K424T	AATGGAGCATGCATTAGGTTTCACTTTCGG	This study
K425S	CAAAGACATGCATCCCGTCGCCCTCCAGCG	This study
K425T	TCAGGCAGAGATCTTAACGCTCGATCTGGC	This study
K426S	GTAATTTATGCATCAGCGCAATTCGAACAG	This study
K426T	GTTGTTGAAGATCTTGCGTTGTTACGTCAC	This study
K427S	CCTGATTATGCATGGGTATCTCCTTGGACG	This study
K427T	CGTAACGAAGATCTTGCATCCTGGGCGCAG	This study
K428S	CTTTATCATGCATTTTCACACTCCTGATTTA	This study
K428T	GTACGGCAGATCTGGCGAGCCTTGCAGCAC	This study
K429S	TAGTCTATGCATTATTTTTTTTACCGCTACG	This study
K429T	GCTGGCAGATCTTACAAACGTTAAGAACAG	This study
K430S	CTCGTCCATGCATGGTAGTCGTAACGTTAT	This study
K430T	CGGCGCAGATCTTTGCCGGCAATATGAGC	This study
K431S	CTTAGCAGATCTGACTGAAGGCGGAAGTGC	This study
K431T	GTAAAAAATGCATGTGGTTAGCCGATTTTG	This study
K432S	CTGTGCGCAGATCTTCTCCACGCAACTGGAG	This study
K432T	ATGATGACATGCATAATATCACTCCGGCTC	This study
K433S	GATAGAAGATCTCATGCTGATTGGCGACGG	This study
K433T	GGGTAAAATGCATTTCTCACCTAATGTGTA	This study
K434S	GCAATCGATGCATGCTTTAGAGCCGTCCGG	This study
K434T	TGCAAGAGATCTACAAGATTCTGGTGGTCG	This study
K435S	CAACGTATGCATCACCAGCCATCAAACATG	This study
K435T	TATAGAAGATCTCCTCATCGTCCGCTCCGG	This study
K436S	CCCTCGATGCATAAACGTACCTTTATTTTC	This study
K436T	GTCAGGAAGATCTACAGCACGCCAGCAGG	This study

補足表 3. 続き

Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')	Source
K437S	GCTGCCATGCATGAAGCAGAAACCATCAGA	This study
K437T	ATGACCGAGATCTGACTTCCCTATTAAGG	This study
K438S	CGCTGGGAGATCTTGCGGCAGGCGTTGCCC	This study
K438T	ATCGTGATGCATCCTTGTGGGTCCCTACGC	This study
K439S	CAGAAAATGCATCAGATTCAATTAGTTTTTC	This study
K439T	GGGACTAGATCTGGCGGCGCAAACCGAAGG	This study
K440S	TACATTATGCATCTGTTGACCTCTCCCCG	This study
K440T	GACTCGAAGATCTGGTCAACTATGCTGACG	This study
K441S	GGGAAAAGATCTGGTTAGTGGAAGATGAGC	This study
K441T	ATGCCGATATGCATTACAGGCCCTCAGGC	This study
K470S	AACCCAGATCTGCATGGCGCAAGCAGAACG	This study
K470T	ATAGCATGCATACAGTCTGATTTCCCTGCG	This study
K471S	GATGCAGATCTCGGTTCACTGATTGCCGCG	This study
K471T	CAGTTTATGCATCGCTTATTCCCATGCATG	This study

補足表 4. 大腸菌転写因子遺伝子のオペロン構成とプロモーターの有無

Gene	Transcription units	Identified promoter
<モノユニット>		
<i>aaeR</i>	<i>aaeR</i>	<i>aaeRp</i> , <i>aaeRp6</i> , <i>aaeRp7</i> , <i>aaeRp9</i> , <i>aaeRp10</i>
<i>abgR</i>	<i>abgR</i>	-
<i>acrR</i>	<i>acrR</i>	<i>acrRp</i>
<i>adiY</i>	<i>adiY</i>	<i>adiYp</i>
<i>agaR</i>	<i>agaR</i>	<i>agaRp</i>
<i>allR</i>	<i>allR</i>	-
<i>allS</i>	<i>allS</i>	<i>allSp</i>
<i>alpA</i>	<i>alpA</i>	-
<i>alsK</i>	<i>alsK</i>	<i>alsKp1</i>
<i>appY</i>	<i>appY</i>	<i>appYp</i> , <i>appYp2</i>
<i>araC</i>	<i>araC</i>	<i>araCp</i>
<i>arcA</i>	<i>arcA</i>	<i>arcAp1</i> , <i>arcAp2</i> , <i>arcAp3</i> , <i>arcAp4</i> , <i>arcAp5</i> , <i>arcAp6</i> , <i>arcAp7</i>
<i>argP</i>	<i>argP</i>	<i>arrGp</i>
<i>argR</i>	<i>argR</i>	<i>argRp1</i> , <i>argRp2</i>
<i>ascG</i>	<i>ascG</i>	<i>ascGp</i>
<i>bdcR</i>	<i>bdcR</i>	<i>bdcRp4</i>
<i>betI</i>	<i>betI</i>	<i>betIp</i> , <i>betAp5</i> , <i>betAp7</i>
<i>cadC</i>	<i>cadC</i>	<i>cadCp</i>
<i>caiF</i>	<i>caiF</i>	<i>caiFp</i>
<i>cbl</i>	<i>cbl</i>	<i>cblp</i>
<i>cdaR</i>	<i>cdaR</i>	<i>cdaRp</i>
<i>cohE</i>	<i>cohE</i>	<i>cohEp8</i> , <i>cohEp9</i> , <i>cohEp10</i>
<i>comR</i>	<i>comR</i>	<i>comRp</i> , <i>comRp3</i>
<i>cra</i>	<i>cra</i>	<i>fruRp8</i>
<i>crl</i>	<i>crl</i>	<i>crlp1</i> , <i>crlp2</i>
<i>crp</i>	<i>crp</i>	<i>crpp1</i> , <i>crpp2</i> , <i>crpp3</i>
<i>csiR</i>	<i>csiR</i>	<i>csiRp3</i> , <i>csiRp5</i>
<i>cueR</i>	<i>cueR</i>	<i>cueRp6</i>
<i>cynR</i>	<i>cynR</i>	<i>cynRp</i>
<i>cysB</i>	<i>cysB</i>	<i>cysBp</i>

補足表 4. 続き

Gene	Transcription units	Identified promoter
<i>cytR</i>	<i>cytR</i>	<i>cytRp</i>
<i>deoR</i>	<i>deoR</i>	-
<i>dhaR</i>	<i>dhaR</i>	<i>dhaRp</i>
<i>dicA</i>	<i>dicA</i>	-
<i>dmlR</i>	<i>dmlR</i>	<i>dmlRp</i>
<i>dsdC</i>	<i>dsdC</i>	<i>dsdCp</i>
<i>ebgR</i>	<i>ebgR</i>	<i>ebgRp</i>
<i>envR</i>	<i>envR</i>	<i>envRp9, envRp11, envRp12, envRp13,</i> <i>envRp14, envRp15</i>
<i>exuR</i>	<i>exuR</i>	<i>exuRp</i>
<i>fabR</i>	<i>fabR</i>	-
<i>fadR</i>	<i>fadR</i>	<i>fadRp, fadRp2</i>
<i>feaR</i>	<i>feaR</i>	<i>feaRp</i>
<i>fimZ</i>	<i>fimZ</i>	<i>fimZp3</i>
<i>fnr</i>	<i>fnr</i>	<i>fnrp</i>
<i>gadE</i>	<i>gadE</i>	<i>gadEp, gadEp1, gadEp2, gadEp3, gadEp4,</i> <i>mdtEp1, mdtEp2, mdtEp3</i>
<i>galR</i>	<i>galR</i>	<i>galRp</i>
<i>galS</i>	<i>galS</i>	<i>galSp</i>
<i>gatR</i>	<i>gatR</i>	-
<i>gcvA</i>	<i>gcvA</i>	<i>gcvAp</i>
<i>glcC</i>	<i>glcC</i>	<i>glcCp</i>
<i>hcaR</i>	<i>hcaR</i>	<i>hcaRp</i>
<i>hdfR</i>	<i>hdfR</i>	<i>hdfRp, hdfRp6</i>
<i>hupA</i>	<i>hupA</i>	<i>hupAp</i>
<i>hupB</i>	<i>hupB</i>	<i>hupBp1, hupBp2, hupBp3, hupBp4</i>
<i>ibaG</i>	<i>ibaG</i>	<i>ibaGp, ibaGp2, ibaGp4</i>
<i>iclR</i>	<i>iclR</i>	<i>iclRp</i>
<i>ileR</i>	<i>ileR</i>	<i>yzfAp2</i>
<i>ilvY</i>	<i>ilvY</i>	<i>ilvYp</i>
<i>kdgR</i>	<i>kdgR</i>	<i>kdgRp1, kdgRp8, kdgRp9</i>
<i>leuO</i>	<i>leuO</i>	<i>leuOp, leuOp1, leuOp2</i>

補足表 4. 続き

Gene	Transcription units	Identified promoter
<i>lrhA</i>	<i>lrhA</i>	<i>lrhAp</i>
<i>lrp</i>	<i>lrp</i>	<i>lrpp</i>
<i>lysR</i>	<i>lysR</i>	<i>lysRp</i>
<i>mak</i>	<i>mak</i>	<i>makp4</i>
<i>mall</i>	<i>mall</i>	<i>mallp</i>
<i>malT</i>	<i>malT</i>	<i>malTp</i>
<i>matA</i>	<i>matA</i>	<i>matAp1, matAp5, matAp7, matAp9, matAp10</i>
<i>mcbR</i>	<i>mcbR</i>	<i>mcbRp3</i>
<i>melR</i>	<i>melR</i>	<i>melRp</i>
<i>metJ</i>	<i>metJ</i>	<i>metJp1, metJp2, metJp3</i>
<i>metR</i>	<i>metR</i>	<i>metRp2</i>
<i>mlrA</i>	<i>mlrA</i>	<i>mlrAp, mlrAp6, mlrAp9</i>
<i>mngR</i>	<i>mngR</i>	<i>mngRp</i>
<i>murR</i>	<i>murR</i>	<i>murRp</i>
<i>nac</i>	<i>nac</i>	<i>nacp</i>
<i>nanR</i>	<i>nanR</i>	<i>nanRp9, nanRp10</i>
<i>narP</i>	<i>narP</i>	<i>narPp</i>
<i>nhaR</i>	<i>nhaR</i>	<i>nhaAp1, nhaAp2</i>
<i>norR</i>	<i>norR</i>	<i>norRp</i>
<i>ogrK</i>	<i>ogrK</i>	<i>ogrKp5</i>
<i>oxyR</i>	<i>oxyR</i>	<i>oxyRp</i>
<i>perR</i>	<i>perR</i>	-
<i>pgrR</i>	<i>pgrR</i>	<i>ycjZp7</i>
<i>pinE</i>	<i>pinE</i>	<i>pinEp1, pinEp3</i>
<i>pinQ</i>	<i>pinQ</i>	<i>pinQp1</i>
<i>pinR</i>	<i>pinR</i>	<i>pinRp1</i>
<i>prpR</i>	<i>prpR</i>	<i>prpRp</i>
<i>pspF</i>	<i>pspF</i>	<i>pspFp1, pspFp2, pspFp3</i>
<i>purR</i>	<i>purR</i>	<i>purRp</i>
<i>putA</i>	<i>putA</i>	<i>putAp</i>
<i>qseD</i>	<i>qseD</i>	<i>hypTp4</i>

補足表 4. 続き

Gene	Transcription units	Identified promoter
<i>racR</i>	<i>racR</i>	<i>racRp3</i> , <i>racRp4</i> , <i>racRp5</i>
<i>rcaA</i>	<i>rcaA</i>	<i>rcaAp</i>
<i>rfaH</i>	<i>rfaH</i>	<i>rfaHp4</i> , <i>rfaHp5</i>
<i>rob</i>	<i>rob</i>	<i>robp</i>
<i>rodZ</i>	<i>rodZ</i>	<i>rodZp1</i> , <i>rodZp2</i>
<i>rtcR</i>	<i>rtcR</i>	-
<i>rutR</i>	<i>rutR</i>	<i>rutRp</i> , <i>rutRp2</i>
<i>sdiA</i>	<i>sdiA</i>	<i>sdiAp1</i> , <i>sdiAp2</i> , <i>sdiAp3</i> , <i>sdiAp4</i> , <i>sdiAp6</i> , <i>sdiAp8</i>
<i>sfsB</i>	<i>sfsB</i>	<i>sfsBp2</i> , <i>sfsBp3</i>
<i>slyA</i>	<i>slyA</i>	<i>slyAp10</i> , <i>slyAp13</i> , <i>slyAp14</i>
<i>soxR</i>	<i>soxR</i>	<i>soxRp</i>
<i>soxS</i>	<i>soxS</i>	<i>soxSp</i>
<i>tdcR</i>	<i>tdcR</i>	<i>tdcRp4</i> , <i>tdcRp5</i> , <i>tdcRp6</i> , <i>tdcRp7</i> , <i>tdcRp8</i>
<i>torR</i>	<i>torR</i>	<i>torRp</i>
<i>treR</i>	<i>treR</i>	<i>treRp1</i> , <i>treRp2</i> , <i>treRp3</i>
<i>trpR</i>	<i>trpR</i>	<i>trpRp</i>
<i>ttdR</i>	<i>ttdR</i>	<i>ttdRp</i>
<i>uidR</i>	<i>uidR</i>	<i>uidRp</i>
<i>ulaR</i>	<i>ulaR</i>	<i>ulaRp5</i>
<i>uxuR</i>	<i>uxuR</i>	<i>uxurp</i>
<i>xapR</i>	<i>xapR</i>	<i>xapRp1</i> , <i>xapRp2</i>
<i>xylR</i>	<i>xylR</i>	<i>xylRp</i> , <i>xylFp</i>
<i>yafC</i>	<i>yafC</i>	<i>yafCp6</i>
<i>yagI</i>	<i>yagI</i>	<i>yagIp1</i>
<i>yagP</i>	<i>yagP</i>	-
<i>yahA</i>	<i>yahA</i>	<i>yahAp1</i> , <i>yahAp2</i>
<i>yahB</i>	<i>yahB</i>	-
<i>ybaO</i>	<i>ybaO</i>	<i>ybaOp</i>
<i>ybaQ</i>	<i>ybaQ</i>	<i>ybaQp</i> , <i>ybaQp3</i>
<i>ybdO</i>	<i>ybdO</i>	-
<i>ybeF</i>	<i>ybeF</i>	<i>ybeFp4</i> , <i>ybeFp5</i> , <i>ybeFp6</i> , <i>ybeFp7</i>

補足表 4. 続き

Gene	Transcription units	Identified promoter
<i>ybfE</i>	<i>ybfE</i>	<i>ybfEp</i>
<i>ybhD</i>	<i>ybhD</i>	<i>ybhDp2</i> , <i>ybhDp5</i>
<i>ybjK</i>	<i>ybjK</i>	-
<i>ycaN</i>	<i>ycaN</i>	-
<i>yegE</i>	<i>yegE</i>	<i>bluRp</i>
<i>ycjW</i>	<i>ycjW</i>	<i>ycjWp2</i>
<i>ydcI</i>	<i>ydcI</i>	<i>ydcIp</i> , <i>ydcIp4</i>
<i>ydcN</i>	<i>ydcN</i>	<i>ydcNp5</i>
<i>ydcR</i>	<i>ydcR</i>	<i>ydcRp</i>
<i>yddM</i>	<i>yddM</i>	-
<i>ydfH</i>	<i>ydfH</i>	<i>ydfHp</i>
<i>ydfK</i>	<i>ydfK</i>	<i>ydfKp</i> , <i>ydfKp5</i>
<i>ydhB</i>	<i>ydhB</i>	<i>ydhBp2</i>
<i>ydiP</i>	<i>ydiP</i>	<i>ydiPp</i>
<i>ydjF</i>	<i>ydjF</i>	<i>ydjFp1</i> , <i>ydjFp7</i>
<i>yeaM</i>	<i>yeaM</i>	<i>yeaMp1</i> , <i>yeaMp6</i>
<i>yebK</i>	<i>yebK</i>	<i>yebKp2</i>
<i>yeeY</i>	<i>yeeY</i>	-
<i>yegW</i>	<i>yegW</i>	-
<i>yeiE</i>	<i>yeiE</i>	<i>yeiEp5</i> , <i>yeiEp6</i> , <i>yeiEp7</i>
<i>yeiI</i>	<i>yeiI</i>	<i>yeiEp2</i>
<i>yeiL</i>	<i>yeiL</i>	<i>yeiLp</i>
<i>yfaH</i>	<i>yfaH</i>	-
<i>yfeR</i>	<i>yfeR</i>	<i>yfeRp1</i>
<i>yfhH</i>	<i>yfhH</i>	<i>yfhHp5</i>
<i>yfiE</i>	<i>yfiE</i>	<i>yfiEp7</i>
<i>ygbI</i>	<i>ygbI</i>	<i>ygbIp5</i> , <i>ygbIp6</i>
<i>ygeH</i>	<i>ygeH</i>	<i>ygeHp10</i>
<i>ygeV</i>	<i>ygeV</i>	<i>ygeVp</i>
<i>ygfI</i>	<i>ygfI</i>	-
<i>yhaJ</i>	<i>yhaJ</i>	<i>yhaJp4</i> , <i>yhaJp7</i>

補足表 4. 続き

Gene	Transcription units	Identified promoter
<i>yhjB</i>	<i>yhjB</i>	<i>yhjBp4</i>
<i>yhjC</i>	<i>yhjC</i>	<i>yhjCp</i>
<i>yiaG</i>	<i>yiaG</i>	<i>yiaGp</i>
<i>yiaJ</i>	<i>yiaJ</i>	<i>yiaJp</i>
<i>yiaU</i>	<i>yiaU</i>	<i>yiaUp8, yiaUp9, yiaUp11</i>
<i>yidL</i>	<i>yidL</i>	-
<i>yidP</i>	<i>yidP</i>	-
<i>yidZ</i>	<i>yidZ</i>	-
<i>yiiE</i>	<i>yiiE</i>	<i>yiiEp5, yiiEp7</i>
<i>yiiF</i>	<i>yiiF</i>	<i>yiiFp7, yiiFp8</i>
<i>yijO</i>	<i>yijO</i>	<i>yijOp5</i>
<i>yjhU</i>	<i>yjhU</i>	<i>yjhUp1, yjhUp8, yjhUp9</i>
<i>yjiR</i>	<i>yjiR</i>	-
<i>yjiM</i>	<i>yjiM</i>	<i>yjiMp4</i>
<i>ykgA</i>	<i>ykgA</i>	-
<i>ykgD</i>	<i>ykgD</i>	<i>ykgDp2, ykgDp3</i>
<i>ynaE</i>	<i>ynaE</i>	-
<i>yneJ</i>	<i>yneJ</i>	<i>yneJp5, yneJp6</i>
<i>yneL</i>	<i>yneL</i>	-
<i>ynfL</i>	<i>ynfL</i>	<i>ynfLp6</i>
<i>yphH</i>	<i>yphH</i>	-
<i>yqeH</i>	<i>yqeH</i>	<i>yqeHp4, yqeHp5</i>
<i>yqfE</i>	<i>yqfE</i>	-
<i>yqhC</i>	<i>yqhC</i>	<i>yqhCp1</i>
<i>yqiI</i>	<i>yqiI</i>	<i>yqiIp</i>
<i>ytfA</i>	<i>ytfA</i>	-
<i>ytfH</i>	<i>ytfH</i>	<i>ytfHp5, ytfHp6</i>
<i>zur</i>	<i>zur</i>	<i>zurp6, zurp7</i>
<ポリシストロニック>		
<i>ada</i>	<i>ada-alkB</i>	<i>adap, alkBp</i>
<i>arsR</i>	<i>arsRBC</i>	<i>arsRp</i>

補足表 4. 続き

Gene	Transcription units	Identified promoter
<i>asnC</i>	<i>asnC-mioC-mnmG-rsmG</i>	<i>asnCp</i> , <i>mloCp</i> , <i>mnmGp</i> , <i>rsmGp</i>
<i>atoC</i>	<i>atoSC</i>	-
<i>baeR</i>	<i>mdtABCD-baeSR</i>	<i>mdtAp</i>
<i>basR</i>	<i>basRS</i>	<i>basSp4</i>
<i>bglJ</i>	<i>yjiQ-bglJ</i>	<i>yjiQp</i>
<i>birA</i>	<i>murB-birA</i>	-
<i>chbR</i>	<i>chbBCARFG</i>	<i>chbRp</i>
<i>citB</i>	<i>dpiBA</i>	<i>dpiBp</i> , <i>dpiBp2</i>
<i>cpxR</i>	<i>cpxRA</i>	<i>cpxRp</i> , <i>cpxAp1</i>
<i>creB</i>	<i>creABCD</i>	<i>creAp</i> , <i>creAp2</i> , <i>creDp</i>
<i>croE</i>	<i>ymfTLMNROPQ-yefK-ymfS</i>	<i>croEp4</i> , <i>croEp5</i>
<i>csgD</i>	<i>csgDEFG</i>	<i>csgDp1</i> , <i>csgDp2</i>
<i>cusR</i>	<i>cusRS</i>	<i>cusRp</i>
<i>dctR</i>	<i>slp-dctR</i>	<i>slpp</i>
<i>dcuR</i>	<i>dcuSR</i>	<i>dcuRp</i> , <i>dcuSp</i>
<i>deoT</i>	<i>yciZT</i>	<i>yciTp</i> , <i>yciTp1</i> , <i>yciZp</i>
<i>dgoR</i>	<i>dgoRKADT</i>	-
<i>dicC</i>	<i>dicC-ydfXW</i>	<i>dicCp</i>
<i>dnaA</i>	<i>dnaAN-recF</i>	<i>dnaAp1</i> , <i>dnaAp2</i> , <i>dnaNp1</i> , <i>dnaNp2</i> , <i>dnaNp3</i> , <i>dnaNp4</i> , <i>recFp1</i> , <i>recFp2</i>
<i>envY</i>	<i>envYompT</i>	-
<i>evgA</i>	<i>evgAS</i>	<i>evgAp1</i> , <i>evgAp2</i>
<i>fhIA</i>	<i>hypABCDE-fhIA</i>	<i>hypAp</i> , <i>hypBp</i>
<i>fis</i>	<i>dusB-fis</i>	<i>dusBp</i>
<i>flhC</i>	<i>flhDC</i>	<i>flhDp</i> , <i>flhDp2</i> , <i>flhCp3</i>
<i>flhD</i>	<i>flhDC</i>	<i>flhDp</i> , <i>flhDp2</i> , <i>flhCp3</i>
<i>frlR</i>	<i>frlABCDR</i>	<i>frlAp5</i> , <i>frlAp13</i> , <i>frlAp17</i>
<i>frvR</i>	<i>frvABXR</i>	<i>frvRp4</i>
<i>fucR</i>	<i>fucPIKUR</i>	<i>fucPp</i>
<i>fur</i>	<i>fldA-uof-fur</i>	<i>fldAp</i> , <i>uofp</i> , <i>furpa</i> , <i>furpb</i>

補足表 4. 続き

Gene	Transcription units	Identified promoter
<i>gadW</i>	<i>gadAXW</i>	<i>gadAp</i> , <i>gadXp</i> , <i>gadWp1</i> , <i>gadWp1</i>
<i>gadX</i>	<i>gadAXW</i>	<i>gadAp</i> , <i>gadXp</i> , <i>gadWp1</i> , <i>gadWp2</i>
<i>glnG</i>	<i>glnALG</i>	<i>glnAp1</i> , <i>glnAp2</i> , <i>glnLp</i>
<i>glpR</i>	<i>glpEGR</i>	<i>glpEp</i> , <i>glpGp</i> , <i>glpRp1</i> , <i>glpRp2</i>
<i>glrR</i>	<i>glrR-glnB</i>	<i>glrBp1</i> , <i>glrBp2</i> , <i>glrBp3</i>
<i>gntR</i>	<i>gntRku</i>	<i>gntRp1</i> , <i>gntRp2</i> , <i>gntRp3</i> , <i>gntRp4</i> , <i>gntKp</i> , <i>gntUp2</i>
<i>gutM</i>	<i>srlAEBD-gutM-srlR-gutQ</i>	<i>srlAp</i> , <i>srlRp</i>
<i>hicB</i>	<i>hicAB</i>	<i>hicAp</i>
<i>higA</i>	<i>higBA</i>	<i>higBp</i> , <i>higAp8</i>
<i>hipB</i>	<i>hipBA</i>	<i>hipBp</i>
<i>hyfR</i>	<i>hyfABCDEFGHIJR-focB</i>	<i>hyfAp</i>
<i>idnR</i>	<i>idnDOTR</i>	<i>ideDp</i>
<i>ihfA</i>	<i>thrS-infC-rpmI-rplT-pheMST-ihfA</i>	<i>thrSp</i> , <i>infCp</i> , <i>infCp2</i> , <i>rpmIp</i> , <i>rplTp</i> , <i>pheMp</i> , <i>ihfAp4</i>
<i>ihfB</i>	<i>cmk-rpsA-ihfB</i>	<i>cmkp</i> , <i>rpsAp1</i> , <i>rpsA3</i> , <i>ihfBp</i>
<i>iscR</i>	<i>iscRSUA</i>	<i>iscRp</i>
<i>kdpE</i>	<i>kdpDE</i>	<i>kdpEp3</i>
<i>lacI</i>	<i>mhpR-lacI</i>	<i>mhpRp1</i> , <i>mhpRp2</i> , <i>lacIp</i>
<i>lexA</i>	<i>lexA-dinF</i>	<i>lexAp</i>
<i>lldR</i>	<i>lldPRD</i>	<i>lldPp</i>
<i>lsrR</i>	<i>lsrRK</i>	<i>lsrRp</i>
<i>marA</i>	<i>marRAB</i>	<i>marRp</i>
<i>marR</i>	<i>marRAB</i>	<i>marRp</i>
<i>mhpR</i>	<i>mhpR-lacI</i>	<i>mhpRp</i> , <i>mhpRp1</i> , <i>lacIp</i>
<i>mlc</i>	<i>mlc-ynfK</i>	<i>mlcp1</i> , <i>mlcp2</i> , <i>ynfKp5</i> , <i>ynfKp6</i>
<i>mntR</i>	<i>mntR-ybiR</i>	<i>mntRp</i> , <i>mntRp4</i> , <i>mntRp5</i> , <i>mntRp6</i>
<i>modE</i>	<i>modEF</i>	-
<i>mprA</i>	<i>mprA-emrAB</i>	<i>mprAp</i>
<i>mqsA</i>	<i>mqsRA</i>	<i>mqsRp</i> , <i>mqsRp2</i> , <i>mqsAp8</i> , <i>mqsAp8</i>

補足表 4. 続き

Gene	Transcription units	Identified promoter
<i>mqsR</i>	<i>mqsRA</i>	<i>mqsRp</i> , <i>mqsRp2</i> , <i>mqsAp8</i> , <i>mqsAp9</i>
<i>mtlR</i>	<i>mtlADR</i>	<i>mtlAp</i>
<i>nadR</i>	<i>serB-radA-nadR</i>	<i>serBp</i>
<i>nagC</i>	<i>nagBAC-umpH</i>	<i>nagBp</i> , <i>nagA</i> , <i>nagCp1</i> , <i>nagCp2</i> , <i>umpHp</i>
<i>nagK</i>	<i>nagK-cobB</i>	<i>nagKp3</i>
<i>nanK</i>	<i>nanATEK-yhcH</i>	<i>nanAp</i>
<i>narL</i>	<i>narXL</i>	<i>narXp</i>
<i>nemR</i>	<i>nemRA-gloA</i>	<i>nemRp</i> , <i>gloA</i>
<i>nikR</i>	<i>nikABCDE</i>	<i>nikAp1</i> , <i>nikAp2</i> , <i>nikRp</i>
<i>nsrR</i>	<i>nsrR-rnr-rlmB-yjflJ</i>	<i>nsrRp</i>
<i>ompR</i>	<i>ompR-envZ</i>	<i>ompRp1</i> , <i>ompRp2</i> , <i>ompRp3</i> , <i>ompRp4</i>
<i>paaX</i>	<i>paaXY</i>	<i>paaXp</i>
<i>pdhR</i>	<i>pdhR-aceEF-lpd</i>	<i>pdhRp</i> , <i>pdhEp</i> , <i>ipdAp</i>
<i>phnF</i>	<i>phnCDE_1E_2FGHIJKLMNOP</i>	<i>phnCp</i>
<i>phoB</i>	<i>phoBR</i>	<i>phoBp</i>
<i>phoP</i>	<i>phoPQ</i>	<i>phoPp1</i> , <i>phoPp2</i> , <i>phoPp3</i>
<i>pspC</i>	<i>pspABCDE</i>	<i>pspAp</i>
<i>puuR</i>	<i>puuDRCBE</i>	<i>puuDp</i> , <i>puuCp</i>
<i>qseB</i>	<i>qseBC</i>	<i>qseBp1</i> , <i>qseBp2</i>
<i>rbsR</i>	<i>rbsDACBKR</i>	<i>rbsDp</i>
<i>rcsB</i>	<i>rcsDB</i>	<i>rcsDp</i> , <i>rcsBp1</i> , <i>rcsBp2</i>
<i>recX</i>	<i>recAX</i>	<i>recA</i>
<i>relB</i>	<i>relBE-hokD</i>	<i>relBp</i>
<i>rhaR</i>	<i>rhaSR</i>	<i>rhaSp</i>
<i>rhaS</i>	<i>rhaSR</i>	<i>rhaSp</i>
<i>rhmR</i>	<i>yfaXWVU</i>	<i>rhmAp3</i>
<i>rpiR</i>	<i>rpiR-alsBACE</i>	<i>rpiRp1</i> , <i>rpiRp2</i> , <i>alsEp2</i> , <i>alsEp3</i>
<i>rstA</i>	<i>rstAB</i>	<i>rstAp</i>
<i>sgcR</i>	<i>sgcXBCQAER</i>	-
<i>slmA</i>	<i>dut-slmA</i>	<i>dutp</i>

補足表 4. 続き

Gene	Transcription units	Identified promoter
<i>srlR</i>	<i>srlAEBD-gutM-srlR-gutQ</i>	<i>srlAp, srlRp</i>
<i>tdcA</i>	<i>tdcABCDEFG</i>	<i>tdcAp</i>
<i>tyrR</i>	<i>ycjXF-tyrR</i>	<i>ycjXp, tyrRp</i>
<i>uhpA</i>	<i>ivbL-ilvBN-uhpABC</i>	<i>ivbLp</i>
<i>umuD</i>	<i>umuDC</i>	<i>umuDp</i>
<i>uvrY</i>	<i>uvrYC</i>	<i>uvrYp2, uvrCp3</i>
<i>yafY</i>	<i>yafY-ykfBF-yafX-ykfGH-yafW-ykfl</i>	<i>ykfBp1, ykfBp2</i>
<i>yagL</i>	<i>yagML</i>	<i>yagLp7</i>
<i>ybcM</i>	<i>ybcLM</i>	<i>ybcLp2, ybcLp7</i>
<i>ybfH</i>	<i>ybfHG</i>	<i>ybfHp</i>
<i>ybiH</i>	<i>ybiH-ybhGFSR</i>	-
<i>ydaS</i>	<i>ybaST</i>	<i>ydaSp2, ydaSp3, ydaSp4, ydaSp6</i>
<i>ydaW</i>	<i>ydaSTUVW-rzpR</i>	<i>ydaSp2, ydaSp3, ydaSp4, ydaSp6</i>
<i>yddU</i>	<i>dosCP</i>	<i>dosPp3</i>
<i>ydeO</i>	<i>safA-ydeO</i>	<i>safAp</i>
<i>yedW</i>	<i>yedWV</i>	<i>yedVp</i>
<i>yehT</i>	<i>yehUT</i>	-
<i>yfjR</i>	<i>yfjR-ypjK-yfjST</i>	-
<i>ygaV</i>	<i>ygaVP</i>	-
<i>ygeK</i>	<i>ygeLK</i>	-
<i>yggD</i>	<i>cmtBA-yggPFDC</i>	<i>yggCp1</i>
<i>yheO</i>	<i>yheO-tusDCB</i>	<i>yheOp1, yheOp2, tusBp</i>
<i>yjeP</i>	<i>yjeP-hsrA</i>	<i>hsrAp4, hsrAp6</i>
<i>yihL</i>	<i>yihLM</i>	<i>yihLp1, yihLp2, yihLp4, yihLp5</i>
<i>yihW</i>	<i>yihVW</i>	<i>yihVp3, yihVp4, yihVp6</i>
<i>yjdC</i>	<i>dipZ-yjdC</i>	<i>yjdCp</i>
<i>yjhI</i>	<i>yjhIHG</i>	<i>yjhGp3, yjhGp4</i>
<i>yjjQ</i>	<i>yjjQ-bglJ</i>	<i>yjjQp</i>
<i>ymfL</i>	<i>ymfTLMNROPQ-yefK-ymfS</i>	<i>croEp4, croEp5</i>
<i>ymfN</i>	<i>ymfTLMNROPQ-yefK-ymfS</i>	<i>croEp4, croEp5</i>
<i>ypdB</i>	<i>ypdABC</i>	-

補足表 4. 続き

Gene	Transcription units	Identified promoter
<i>ypdC</i>	<i>ypdABC</i>	-
<i>yqeI</i>	<i>yqeIJ</i>	<i>ygeIp6</i> , <i>ygeIp7</i> , <i>ygeIp8</i>
<i>zntR</i>	<i>yhdN-zntR</i>	<i>yhdNp</i> , <i>zntRp2</i>
<i>zraR</i>	<i>zraSR</i>	<i>zraSp</i>

補足表 5. 大腸菌転写因子遺伝子プロモーターと *gfp* 融合プラスミドの作製

Plasmid	Characterization
pGRPH304	<i>dicA</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマー H304S と H304T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH306	<i>nadR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマー H306S と H306T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH307	<i>puuR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマー H307S と H307T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH308	<i>ybaQ</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマー H308S と H308T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH309	<i>ydeN</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマー H309S と H309T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH310	<i>hicB</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマー H310S と H310T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH311	<i>yddM</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマー H311S と H311T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH312	<i>rodZ</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマー H312S と H312T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH313	<i>mqsA</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマー H313S と H313T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH316	<i>radA</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマー H316S と H316T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH317	<i>puuD</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマー H317S と H317T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH318	<i>hicA</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマー H318S と H318T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH319	<i>mqsR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマー H319S と H319T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH320	<i>allR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマー H320S と H320T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH322	<i>iclR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマー H322S と H322T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH325	<i>mntR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマー H325S と H325T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ

補足表 5. 続き

Plasmid	Characterization
pGRPH327	<i>deoT</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH327S と H327T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH328	<i>rhmR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH328S と H328T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH330	<i>yjhI</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH330S と H330T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH331	<i>yeaM</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH331S と H331T2 で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH334	<i>ydiP</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH334S と H334T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH335	<i>ykgD</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH335S と H335T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH337	<i>ada</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH337S と H337T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH339	<i>chbR</i> の開始コドン上流 400 bp 及び下流 150 bp からなる 550 bp をプライマーH339S と H339T2 で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH342	<i>rhaS</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH342S と H342T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH343	<i>xyiR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH343S と H343T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH344	<i>rob</i> の開始コドン上流 400 bp 及び下流 150 bp からなる 550 bp をプライマーH344S と H344T2 で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH345	<i>gadX</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH345S と H345T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH346	<i>envY</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH346S と H346T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH347	<i>feaR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH347S と H347T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH349	<i>marA</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH349S と H349T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH351	<i>eutR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH351S と H351T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ

補足表 5. 続き

Plasmid	Characterization
pGRPH352	<i>yqhC</i> の開始コドン上流 400 bp 及び下流 150 bp からなる 550 bp をプライマーH352S と H352T2 で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH353	<i>gadW</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH353S と H353T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH354	<i>ydL</i> の開始コドン上流 400 bp 及び下流 150 bp からなる 550 bp をプライマーH354S と H354T2 で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH355	<i>yjiO</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH355S と H355T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH356	<i>soxS</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH356S と H356T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH358	<i>perR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH358S と H358T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH359	<i>yafY</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH359S と H359T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH362	<i>yfiR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH362S と H362T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH365	<i>ymfN</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH365S と H365T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH373	<i>tttR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH373S と H373T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH374	<i>yhaJ</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH374S と H374T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH376	<i>aaeR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH376S と H376T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH377	<i>ycjZ</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH377S と H377T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH378	<i>nhaR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH378S と H378T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH379	<i>yafC</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH379S と H379T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH380	<i>yahB</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH380S と H380T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ

補足表 5. 続き

Plasmid	Characterization
pGRPH381	<i>cynR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH381S と H381T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH383	<i>tdcA</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH383S と H383T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH387	<i>ybdO</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH387S と H387T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH388	<i>ycaN</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH388S と H388T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH389	<i>allS</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH389S と H389T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH390	<i>ybeF</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH390S と H390T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH391	<i>ybhD</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH391S と H391T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH392	<i>cysB</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH392S と H392T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH393	<i>rutE</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH393S と H393T2 で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH394	<i>yneJ</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH394S と H394T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH395	<i>ynfL</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH395S と H395T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH396	<i>ydhB</i> の開始コドン上流 400 bp 及び下流 150 bp からなる 550 bp をプライマーH396S と H396T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH397	<i>dmlR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH397S と H397T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH398	<i>cbl</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH398S と H398T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH400	<i>yeeY</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH400S と H400T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH401	<i>yeiE</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH401S と H401T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ

補足表 5. 続き

Plasmid	Characterization
pGRPH404	<i>yfeR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH404S と H404T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH405	<i>hcaR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH405S と H405T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH406	<i>yfiE</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH406S と H406T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH407	<i>gcvA</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH407S と H407T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH408	<i>lysR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH408S と H408T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH410	<i>ygfI</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH410S と H410T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH411	<i>yhjC</i> の開始コドン上流 400 bp 及び下流 150 bp からなる 550 bp をプライマーH411S と H411T2 で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH412	<i>yiaU</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH412S と H412T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH413	<i>yidZ</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH413S と H413T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH414	<i>metR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH414S と H414T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH415	<i>qseD</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH415S と H415T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH416	<i>hdfR</i> の開始コドン上流 400 bp 及び下流 150 bp からなる 550 bp をプライマーH416S と H416T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH417	<i>agaR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH417S と H417T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH418	<i>birA</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH418S と H418T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH419	<i>csiR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH419S と H419T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH420	<i>exuR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH420S と H420T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ

補足表 5. 続き

Plasmid	Characterization
pGRPH421	<i>fadR</i> の開始コドン上流 200 bp 及び下流 150 bp からなる 350 bp をプライマーH421S と H421T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH422	<i>ftrR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH422S と H422T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH423	<i>fulR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH423S と H423T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH424	<i>glcC</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH424S と H424T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH425	<i>glpR</i> の開始コドン上流 300 bp 及び下流 150 bp からなる 450 bp をプライマーH425S と H425T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH426	<i>lexA</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH426S と H426T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH427	<i>lldR</i> の開始コドン上流 300 bp 及び下流 150 bp からなる 450 bp をプライマーH427S と H427T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH428	<i>mcbR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH428S と H428T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH429	<i>mngR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH429S と H429T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH430	<i>nanR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH430S と H430T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH433	<i>uxuR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH433S と H433T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH434	<i>ycdR</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH435S と H434T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH435	<i>ydfH</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH434S と H435T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH436	<i>yegW</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH436S と H436T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH437	<i>ygbI</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH437S と H437T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH439	<i>yihL</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH439S と H439T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ
pGRPH440	<i>yihW</i> の開始コドン上流 500 bp 及び下流 150 bp からなる 650 bp をプライマーH440S と H440T で伸長し pGRP ベクターへ組み込んだ

補足表 6. pGRK プラスミドによる二成分制御系因子遺伝子欠失株の形質転換

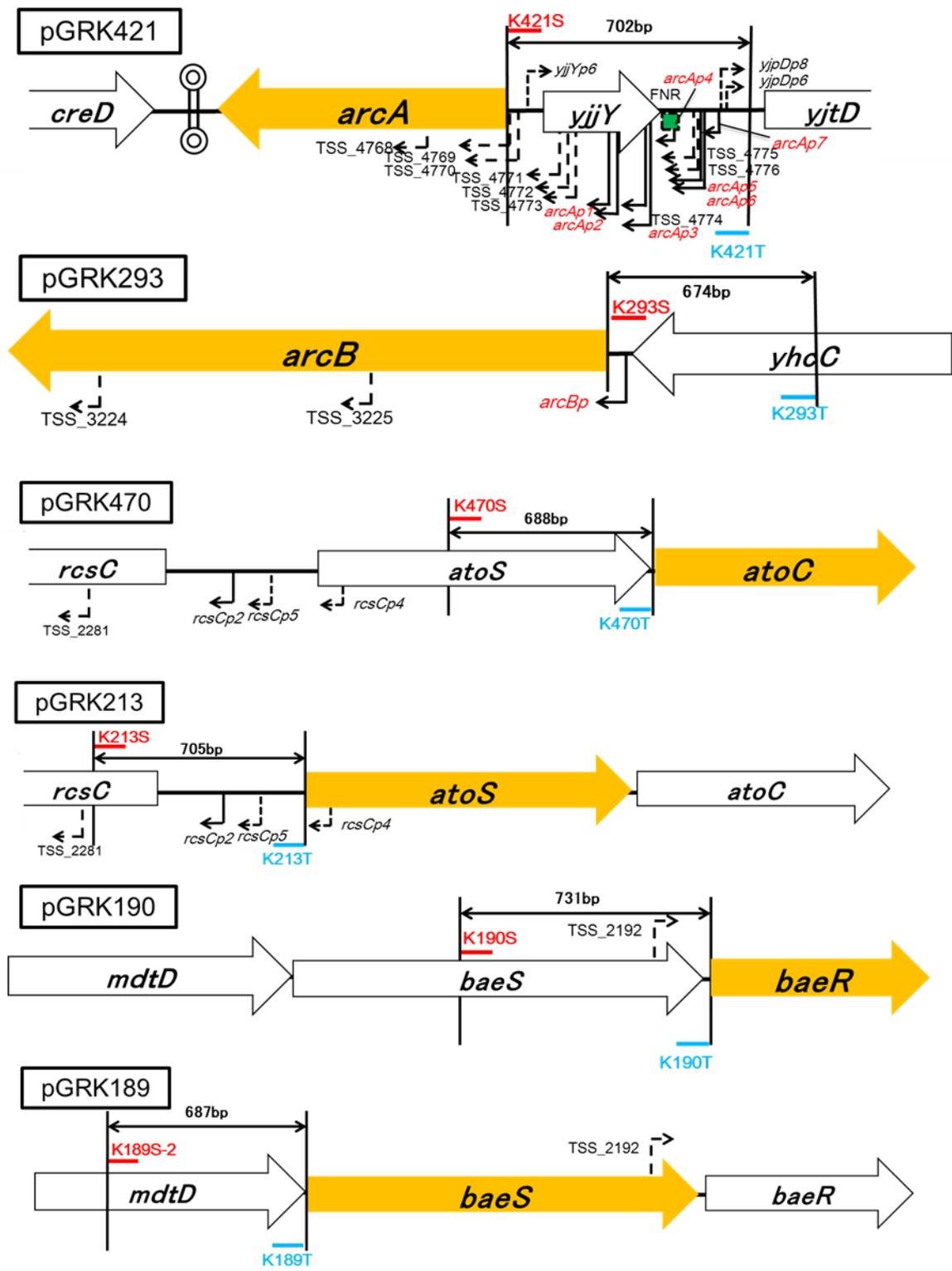
Transformant	Characterization
BW27422/pGRK421	pGRK421 (<i>arcAp-gfp</i>) で BW27422 (Δ <i>arcA</i>) を形質転換した
BW26422/pGRK421	pGRK421 (<i>arcAp-gfp</i>) で BW26422 (Δ <i>arcB</i>) を形質転換した
BW27422/pGRK293	pGRK293 (<i>arcBp-gfp</i>) で BW27422 (Δ <i>arcA</i>) を形質転換した
BW26422/pGRK421	pGRK293 (<i>arcBp-gfp</i>) で BW26422 (Δ <i>arcB</i>) を形質転換した
BW28878/pGRK470	pGRK470 (<i>atoCp-gfp</i>) で BW28878 (Δ <i>atoS-atoC</i>) を形質転換した
BW28878/pGRK213	pGRK213 (<i>atoSp-gfp</i>) で BW28878 (Δ <i>atoS-atoC</i>) を形質転換した
BW27553/pGRK190	pGRK190 (<i>baeRp-gfp</i>) で BW27553 (Δ <i>baeS-baeR</i>) を形質転換した
BW27553/pGRK189	pGRK189 (<i>baeSp-gfp</i>) で BW27553 (Δ <i>baeS-baeR</i>) を形質転換した
BW27874/pGRK262	pGRK262 (<i>barAp-gfp</i>) で BW27874 (Δ <i>uvrY</i>) を形質転換した
BW29434/pGRK262	pGRK262 (<i>barAp-gfp</i>) で BW29434 (Δ <i>barA</i>) を形質転換した
BW27848/pGRK389	pGRK389 (<i>basRp-gfp</i>) で BW27848 (Δ <i>basS-basR</i>) を形質転換した
BW27848/pGRK439	pGRK439 (<i>basSp-gfp</i>) で BW27848 (Δ <i>basS-basR</i>) を形質転換した
BW28078/pGRK173	pGRK173 (<i>cheBp-gfp</i>) で BW28078 (Δ <i>fimZ, cheZYBR, tap, tar, cheWA, motBA, flhCD, ISI</i>) を形質転換した
BW28078/pGRK428	pGRK428 (<i>cheYp-gfp</i>) で BW28078 (Δ <i>fimZ, cheZYBR, tap, tar, cheWA, motBA, flhCD, ISI</i>) を形質転換した
BW27876/pGRK062	pGRK062 (<i>citAp-gfp</i>) で BW27876 (Δ <i>citA-citB</i>) を形質転換した
BW27876/pGRK424	pGRK424 (<i>citBp-gfp</i>) で BW27876 (Δ <i>citA-citB</i>) を形質転換した
BW27559/pGRK437	pGRK437 (<i>cpxAp-gfp</i>) で BW27559 (Δ <i>cpxA-cpxR</i>) を形質転換した
BW27559/pGRK365	pGRK365 (<i>cpxRp-gfp</i>) で BW27559 (Δ <i>cpxA-cpxR</i>) を形質転換した
BW26983/pGRK420	pGRK420 (<i>creBp-gfp</i>) で BW26983 (Δ <i>creA-creD</i>) を形質転換した
BW26983/pGRK441	pGRK441 (<i>creCp-gfp</i>) で BW26983 (Δ <i>creA-creD</i>) を形質転換した
BW28077/pGRK052	pGRK052 (<i>cusRp-gfp</i>) で BW28077 (Δ <i>cusS-cusR</i>) を形質転換した
BW28077/pGRK423	pGRK423 (<i>cusSp-gfp</i>) で BW28077 (Δ <i>cusS-cusR</i>) を形質転換した
BW27878/pGRK440	pGRK440 (<i>dcuRp-gfp</i>) で BW27878 (Δ <i>dcuR-dcuS</i>) を形質転換した
BW27878/pGRK392	pGRK392 (<i>dcuSp-gfp</i>) で BW27878 (Δ <i>dcuR-dcuS</i>) を形質転換した
BW26424/pGRK434	pGRK434 (<i>envZp-gfp</i>) で BW26424 (Δ <i>envZ-ompR</i>) を形質転換した
BW27869/pGRK227	pGRK227 (<i>evgAp-gfp</i>) で BW27869 (Δ <i>evgA-evgS</i>) を形質転換した
BW27869/pGRK431	pGRK431 (<i>evgSp-gfp</i>) で BW27869 (Δ <i>evgA-evgS</i>) を形質転換した
BW28078/pGRK049	pGRK049 (<i>fimZp-gfp</i>) で BW28078 (Δ <i>fimZ</i>) を形質転換した
BW27872/pGRK244	pGRK244 (<i>glrRp-gfp</i>) で BW27872 (Δ <i>glrK</i>) を形質転換した
BW29430/pGRK244	pGRK244 (<i>glrRp-gfp</i>) で BW29430 (Δ <i>glrR</i>) を形質転換した

補足表 6. 続き

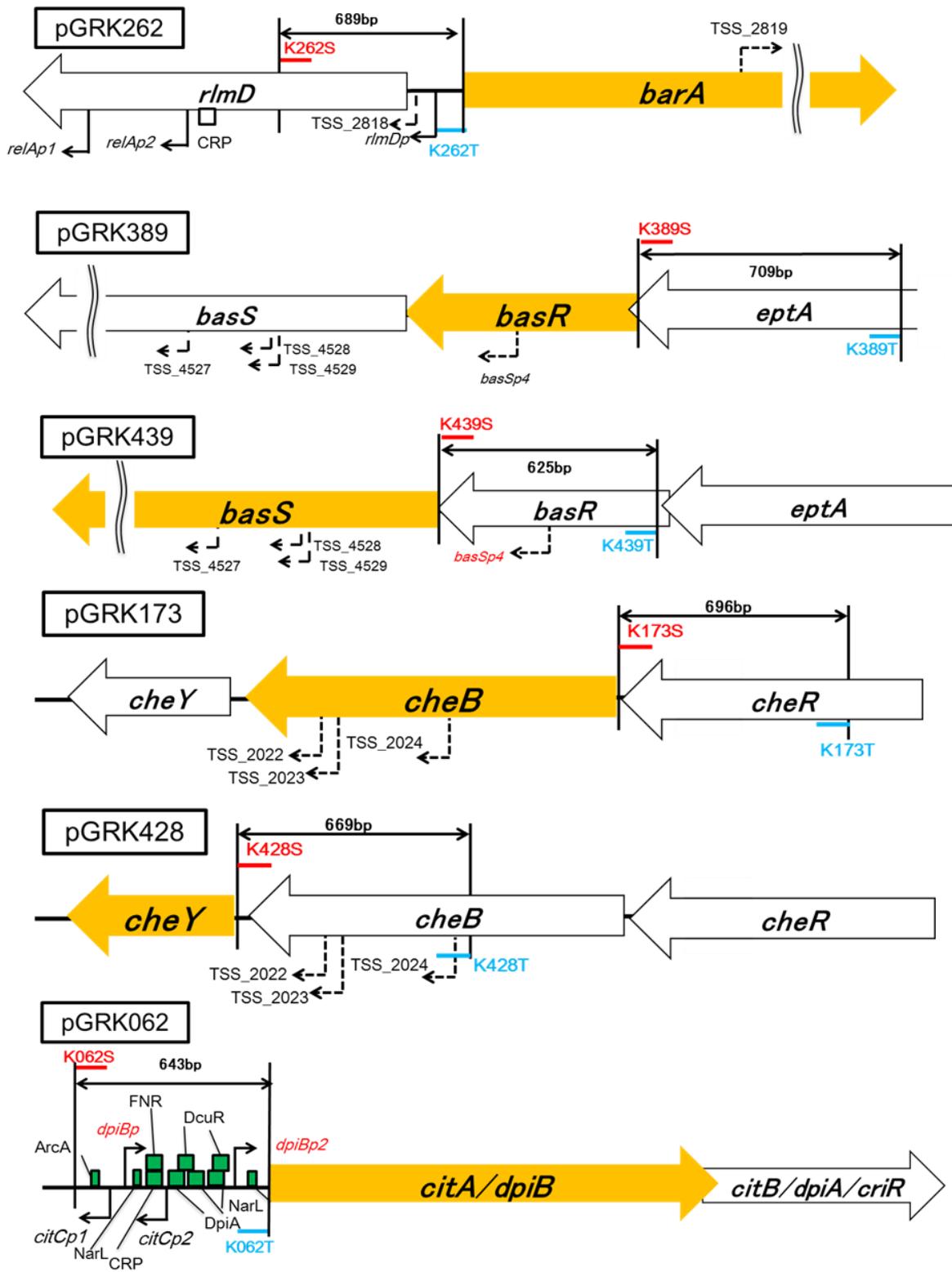
Transformant	Characterization
BW27872/pGRK245	pGRK245 (<i>glrKp-gfp</i>) で BW27872 (Δ <i>glrK</i>) を形質転換した
BW29430/pGRK245	pGRK245 (<i>glrKp-gfp</i>) で BW29430 (Δ <i>glrR</i>) を形質転換した
BW27564/pGRK068	pGRK068 (<i>kdpDp-gfp</i>) で BW27564 (Δ <i>kdpABCDE</i>) を形質転換した
BW27564/pGRK425	pGRK425 (<i>kdpEp-gfp</i>) で BW27564 (Δ <i>kdpABCDE</i>) を形質転換した
BW27864/pGRK427	pGRK427 (<i>narLp-gfp</i>) で BW27864 (Δ <i>narL-narX</i>) を形質転換した
BW27865/pGRK204	pGRK204 (<i>narPp-gfp</i>) で BW27865 (Δ <i>narQ</i>) を形質転換した
BW27873/pGRK204	pGRK204 (<i>narPp-gfp</i>) で BW27873 (Δ <i>narP</i>) を形質転換した
BW27865/pGRK238	pGRK238 (<i>narQp-gfp</i>) で BW27865 (Δ <i>narQ</i>) を形質転換した
BW27873/pGRK238	pGRK238 (<i>narQp-gfp</i>) で BW27873 (Δ <i>narP</i>) を形質転換した
BW27864/pGRK114	pGRK114 (<i>narXp-gfp</i>) で BW27864 (Δ <i>narL-narX</i>) を形質転換した
BW27880/pGRK360	pGRK360 (<i>ntrBp-gfp</i>) で BW27880 (Δ <i>glnG-glnL</i>) を形質転換した
BW27881/pGRK436	pGRK436 (<i>ntrCp-gfp</i>) で BW27881 (Δ <i>glnG-glnD</i>) を形質転換した
BW26424/pGRK306	pGRK306 (<i>ompRp-gfp</i>) で BW26424 (Δ <i>envZ-ompR</i>) を形質転換した
BW24476/pGRK030	pGRK030 (<i>phoBp-gfp</i>) で BW24476 (Δ <i>phoB-phoR</i>) を形質転換した
BW27558/pGRK107	pGRK107 (<i>phoPp-gfp</i>) で BW27558 (Δ <i>phoQ-phoP</i>) を形質転換した
BW27558/pGRK426	pGRK426 (<i>phoQp-gfp</i>) で BW27558 (Δ <i>phoQ-phoP</i>) を形質転換した
BW24476/pGRK031	pGRK031 (<i>phoRp-gfp</i>) で BW24476 (Δ <i>phoB-phoR</i>) を形質転換した
BW27551/pGRK283	pGRK283 (<i>qseBp-gfp</i>) で BW27551 (Δ <i>qseB-qseC</i>) を形質転換した
BW27551/pGRK433	pGRK433 (<i>qseCp-gfp</i>) で BW27551 (Δ <i>qseB-qseC</i>) を形質転換した
BW27870/pGRK211	pGRK211 (<i>rcsBp-gfp</i>) で BW27870 (Δ <i>rcsB</i>) を形質転換した
BW27866/pGRK211	pGRK211 (<i>rcsBp-gfp</i>) で BW27866 (Δ <i>rcsD</i>) を形質転換した
BW27870/pGRK212	pGRK212 (<i>rcsCp-gfp</i>) で BW27870 (Δ <i>rcsB</i>) を形質転換した
BW27866/pGRK212	pGRK212 (<i>rcsCp-gfp</i>) で BW27866 (Δ <i>rcsD</i>) を形質転換した
BW27870/pGRK210	pGRK210 (<i>rcsDp-gfp</i>) で BW27870 (Δ <i>rcsB</i>) を形質転換した
BW27866/pGRK210	pGRK210 (<i>rcsDp-gfp</i>) で BW27866 (Δ <i>rcsD</i>) を形質転換した
BW27555/pGRK116	pGRK116 (<i>rssBp-gfp</i>) で BW27555 (Δ <i>rssB</i>) を形質転換した
BW27552/pGRK143	pGRK143 (<i>rstAp-gfp</i>) で BW27552 (Δ <i>rstA-rstB</i>) を形質転換した
BW26423/pGRK097	pGRK097 (<i>torRp-gfp</i>) で BW26423 (Δ <i>torS-torD</i>) を形質転換した
BW26423/pGRK096	pGRK096 (<i>torSp-gfp</i>) で BW26423 (Δ <i>torS-torD</i>) を形質転換した
BW27871/pGRK334	pGRK334 (<i>uhpAp-gfp</i>) で BW27871 (Δ <i>uhpB-uhpA</i>) を形質転換した
BW27871/pGRK435	pGRK435 (<i>uhpBp-gfp</i>) で BW27871 (Δ <i>uhpB-uhpA</i>) を形質転換した
BW27874/pGRK179	pGRK179 (<i>uvrYp-gfp</i>) で BW27874 (Δ <i>uvrY</i>) を形質転換した
BW29434/pGRK179	pGRK179 (<i>uvrYp-gfp</i>) で BW29434 (Δ <i>barA</i>) を形質転換した

補足表 6. 続き

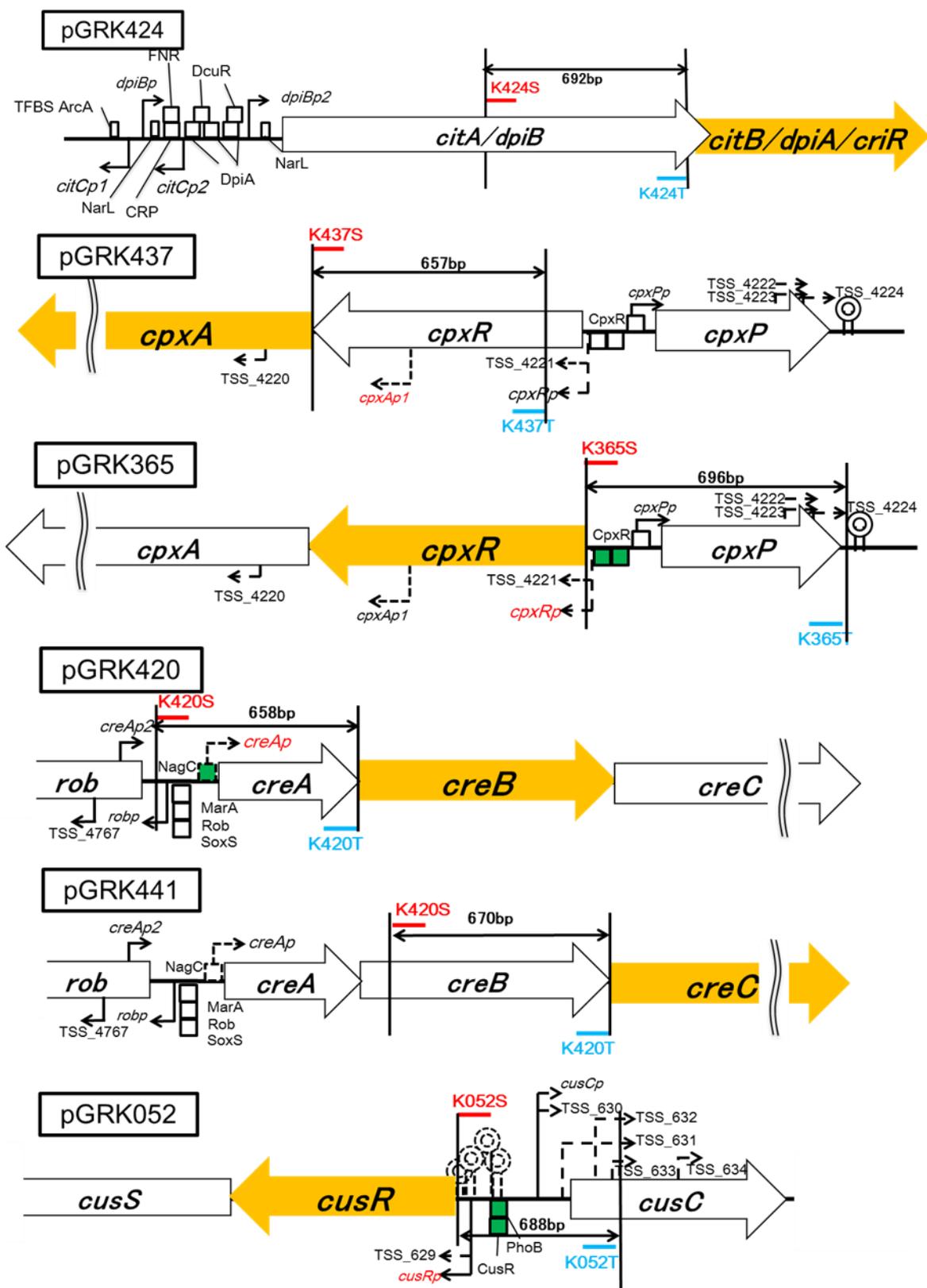
Transformant	Characterization
BW27550/pGRK429	pGRK429 (<i>yedVp-gfp</i>) で BW27550 ($\Delta yedV$ - <i>yedW</i>) を形質転換した
BW27550/pGRK182	pGRK182 (<i>yedWp-gfp</i>) で BW27550 ($\Delta yedV$ - <i>yedW</i>) を形質転換した
BW27877/pGRK430	pGRK430 (<i>yehTp-gfp</i>) で BW27877 ($\Delta yehT$ - <i>yehU</i>) を形質転換した
BW27877/pGRK193	pGRK193 (<i>yehUp-gfp</i>) で BW27877 ($\Delta yehT$ - <i>yehU</i>) を形質転換した
BW27875/pGRK228	pGRK228 (<i>ypdAp-gfp</i>) で BW27875 ($\Delta ypdA$ - <i>ypdB</i>) を形質転換した
BW27875/pGRK432	pGRK432 (<i>ypdBp-gfp</i>) で BW27875 ($\Delta ypdA$ - <i>ypdB</i>) を形質転換した
BW27867/pGRK438	pGRK438 (<i>zraRp-gfp</i>) で BW27867 ($\Delta zraS$ - <i>zraR</i>) を形質転換した
BW27867/pGRK373	pGRK373 (<i>zraSp-gfp</i>) で BW27867 ($\Delta zraS$ - <i>zraR</i>) を形質転換した



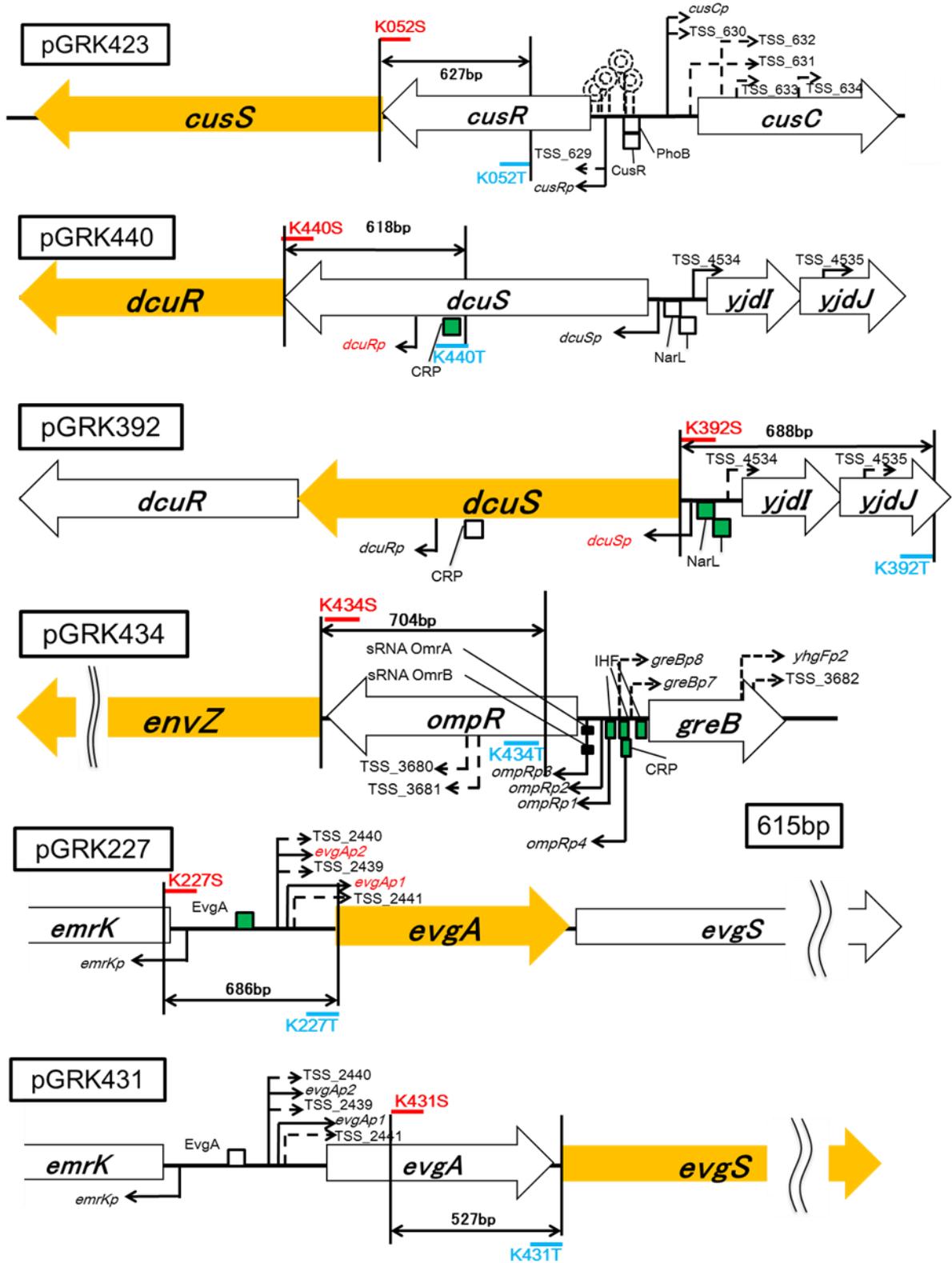
補足図 1. *gfp* 融合プラスミド上の大腸菌二成分制御系遺伝子プロモーター領域



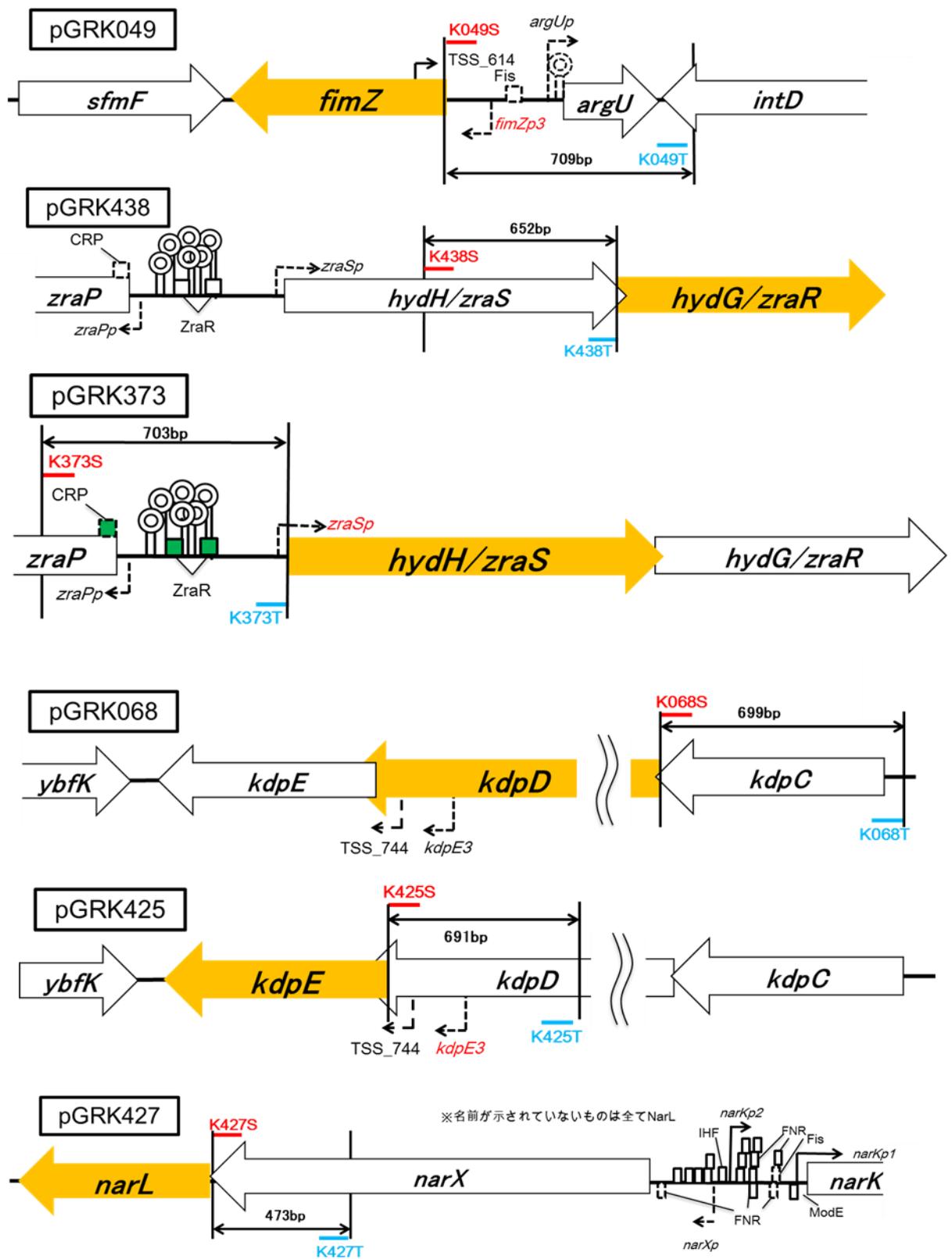
補足図 1. 続き



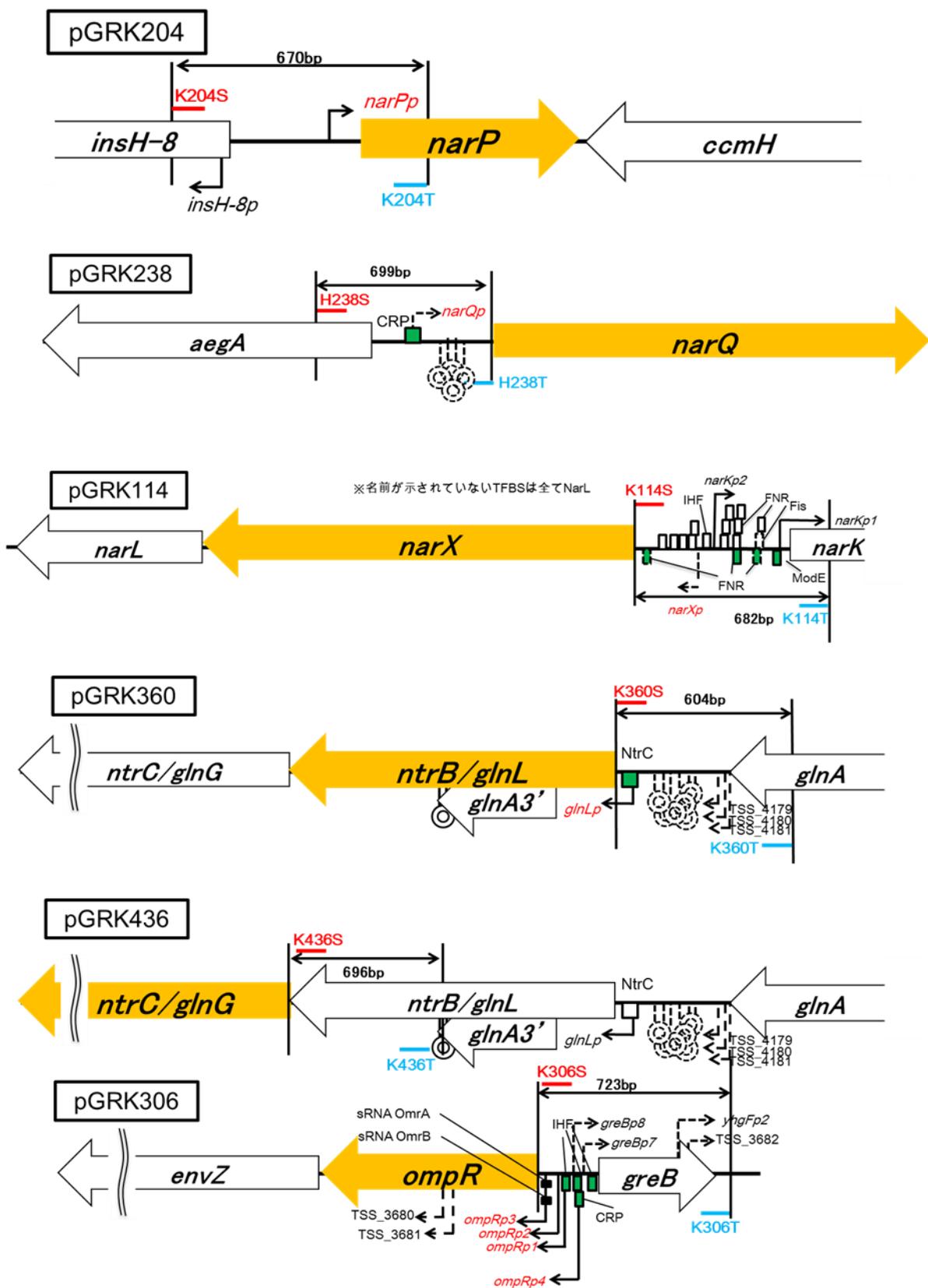
補足図 1 続き



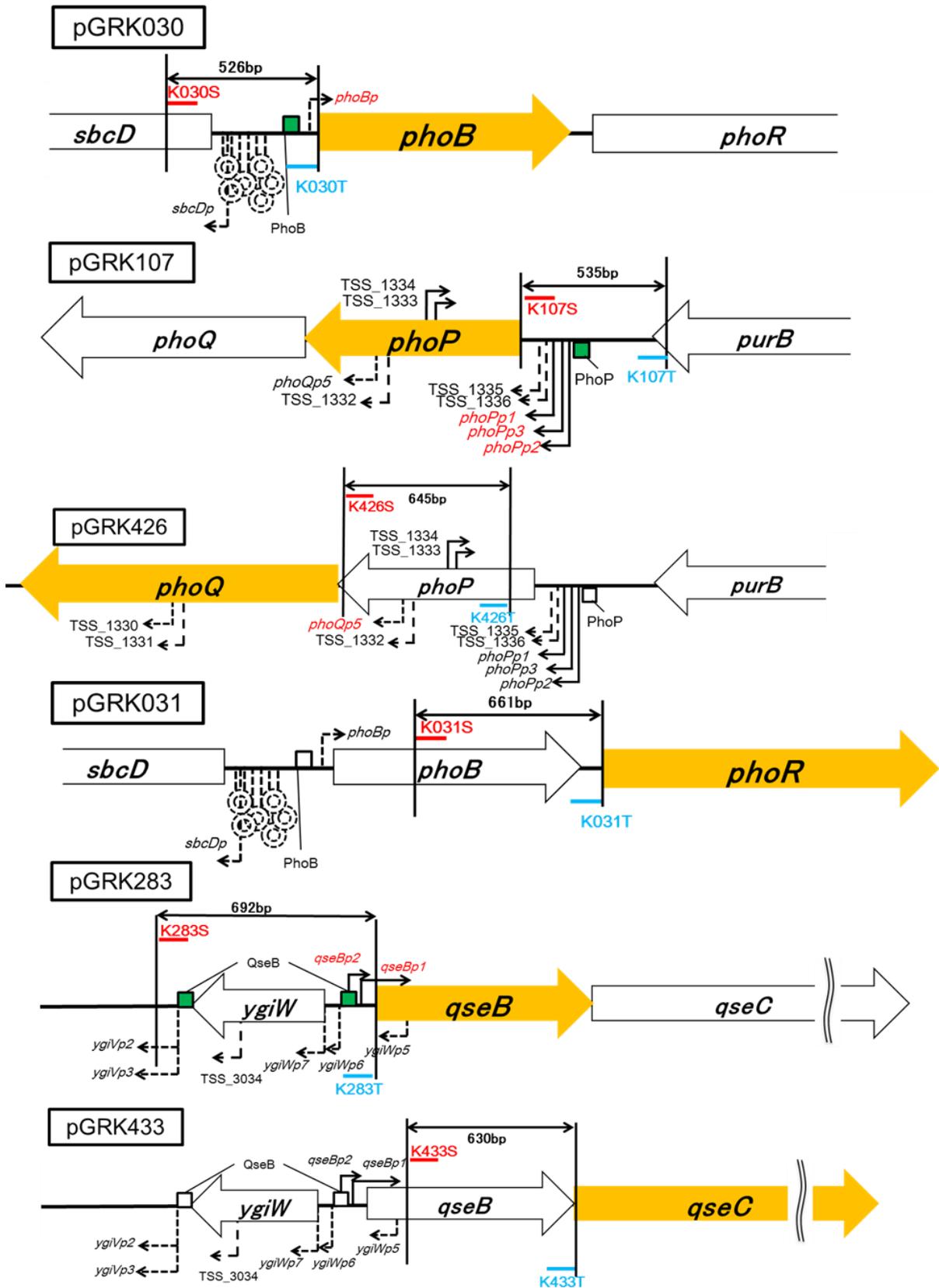
補足図 1 続き



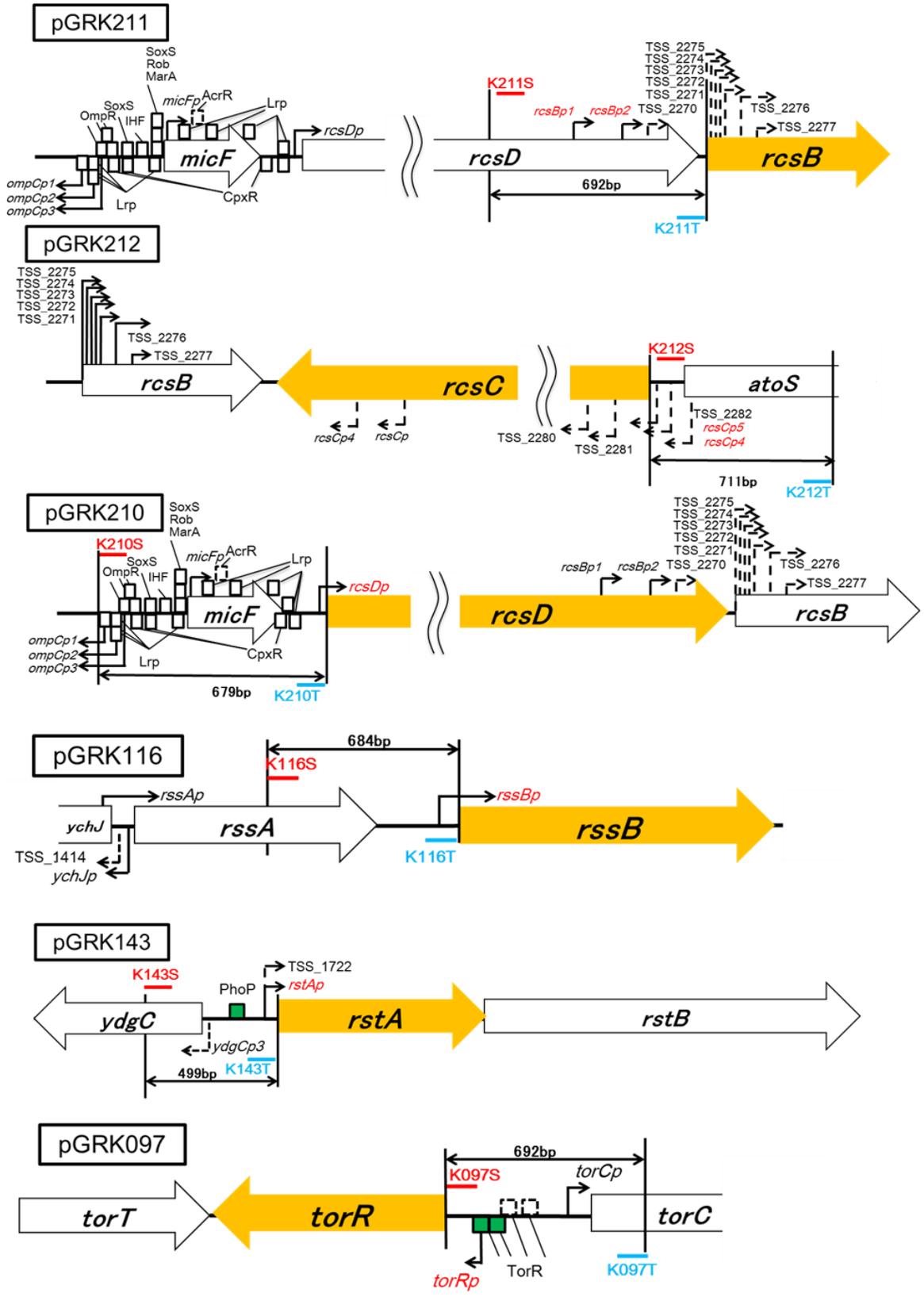
補足図 1 続き



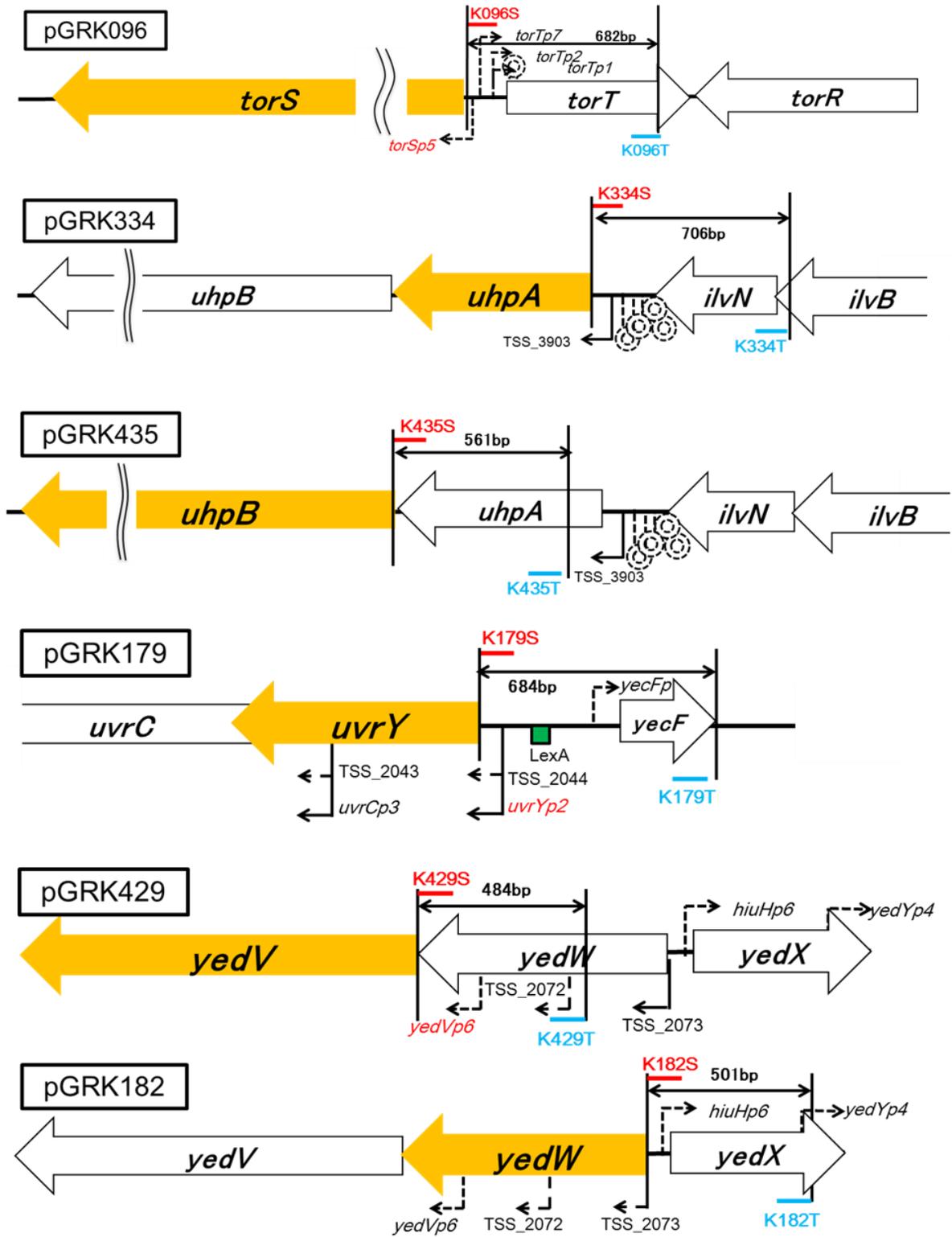
補足図 1 続き



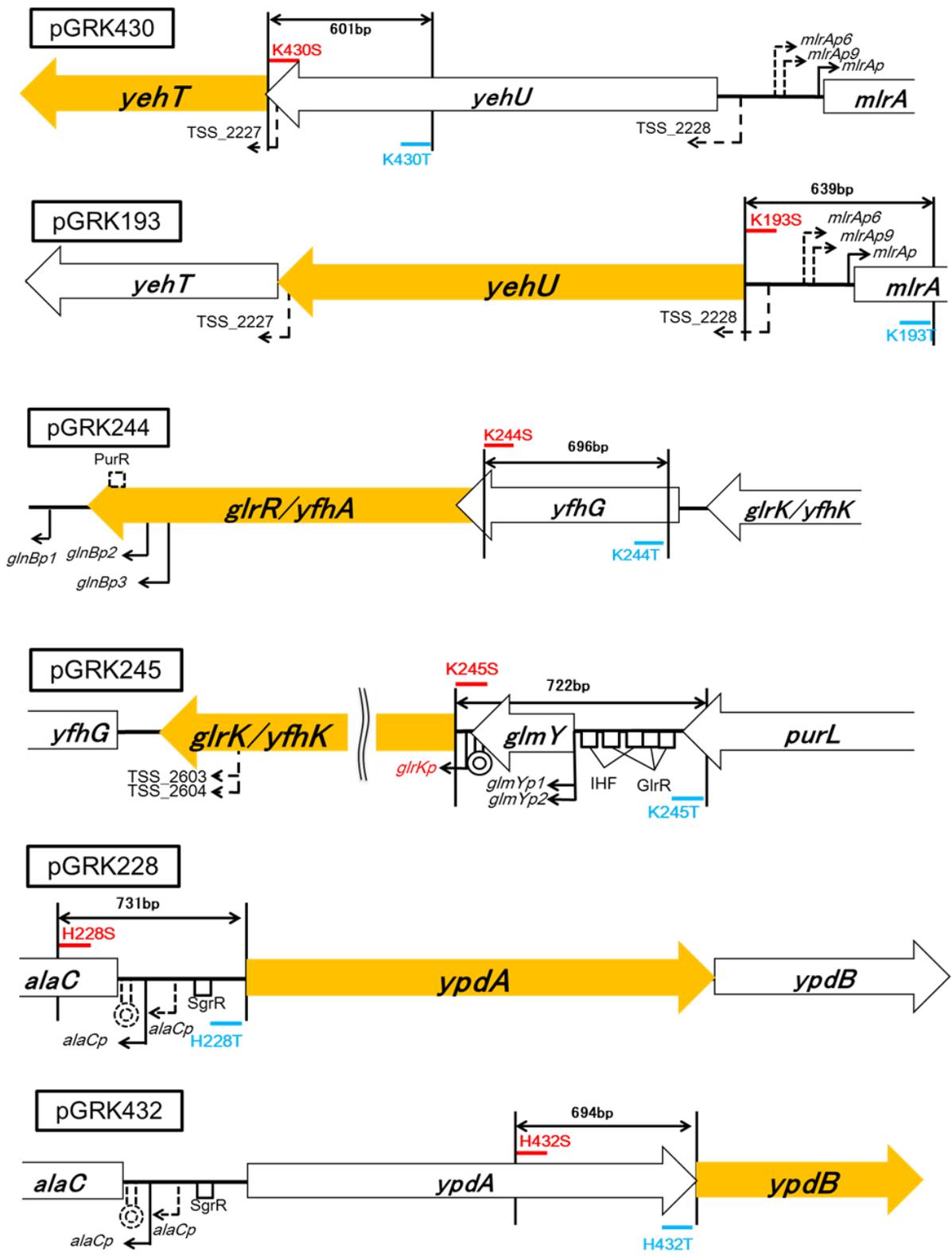
補足図 1 続き



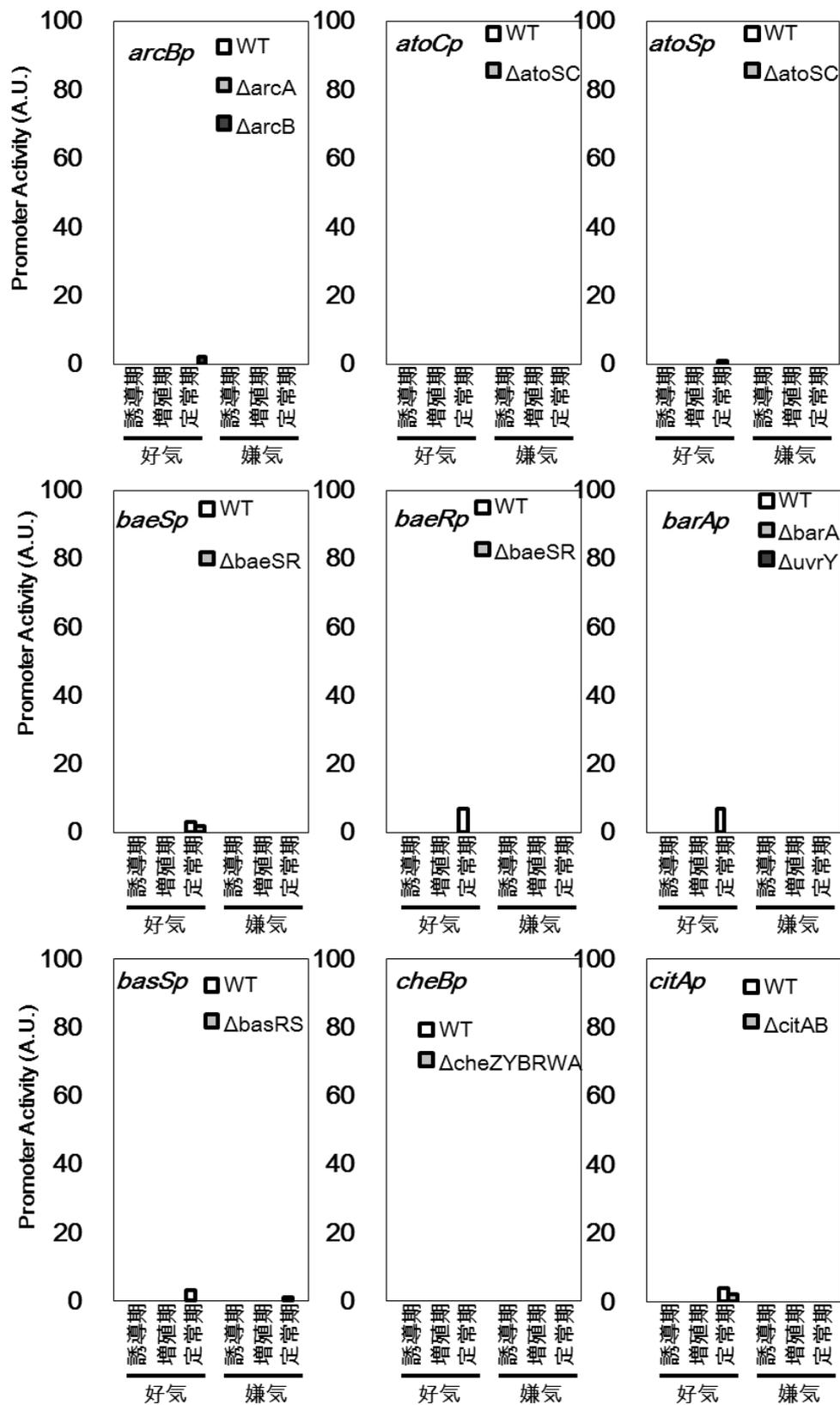
補足図 1 続き



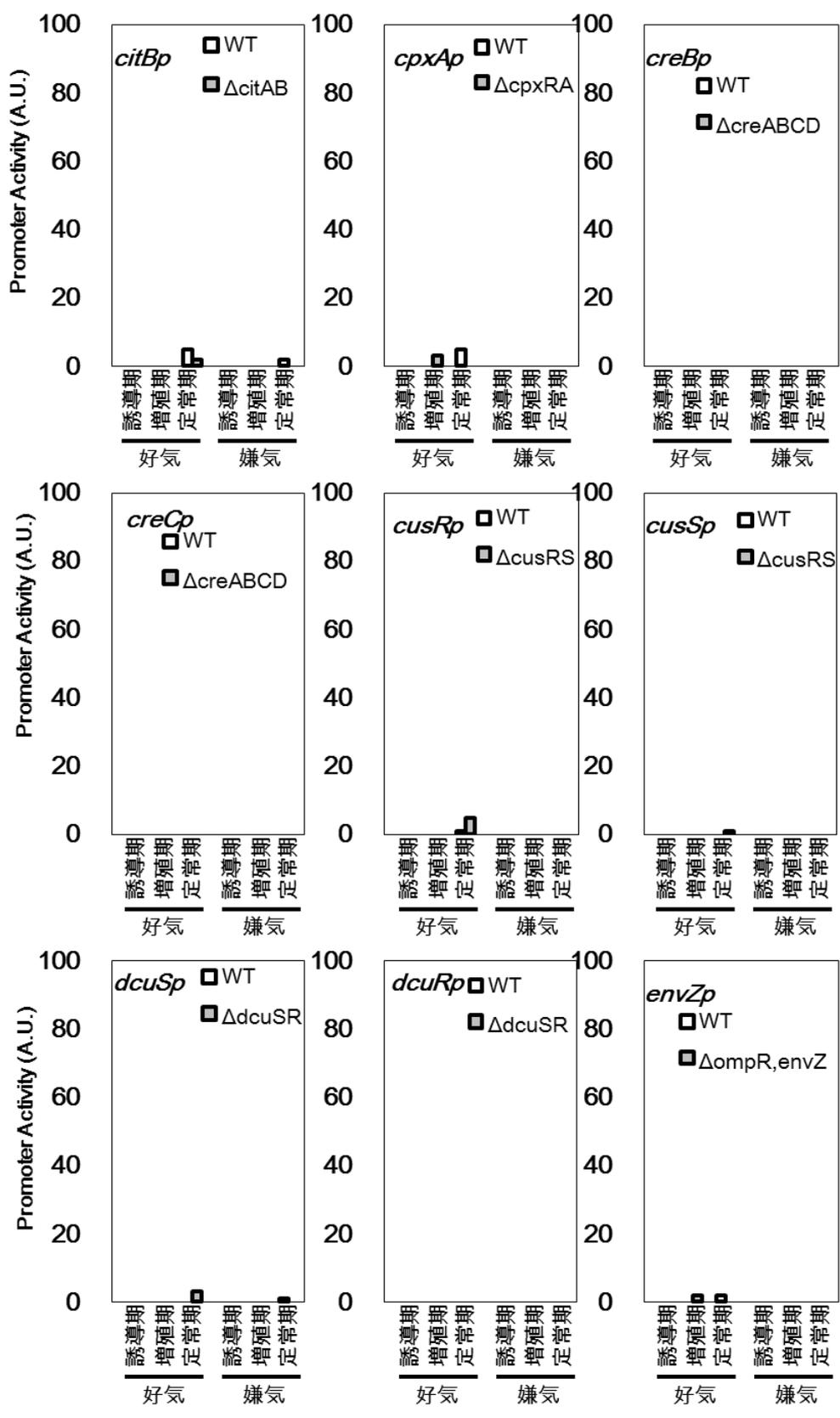
補足図1 続き



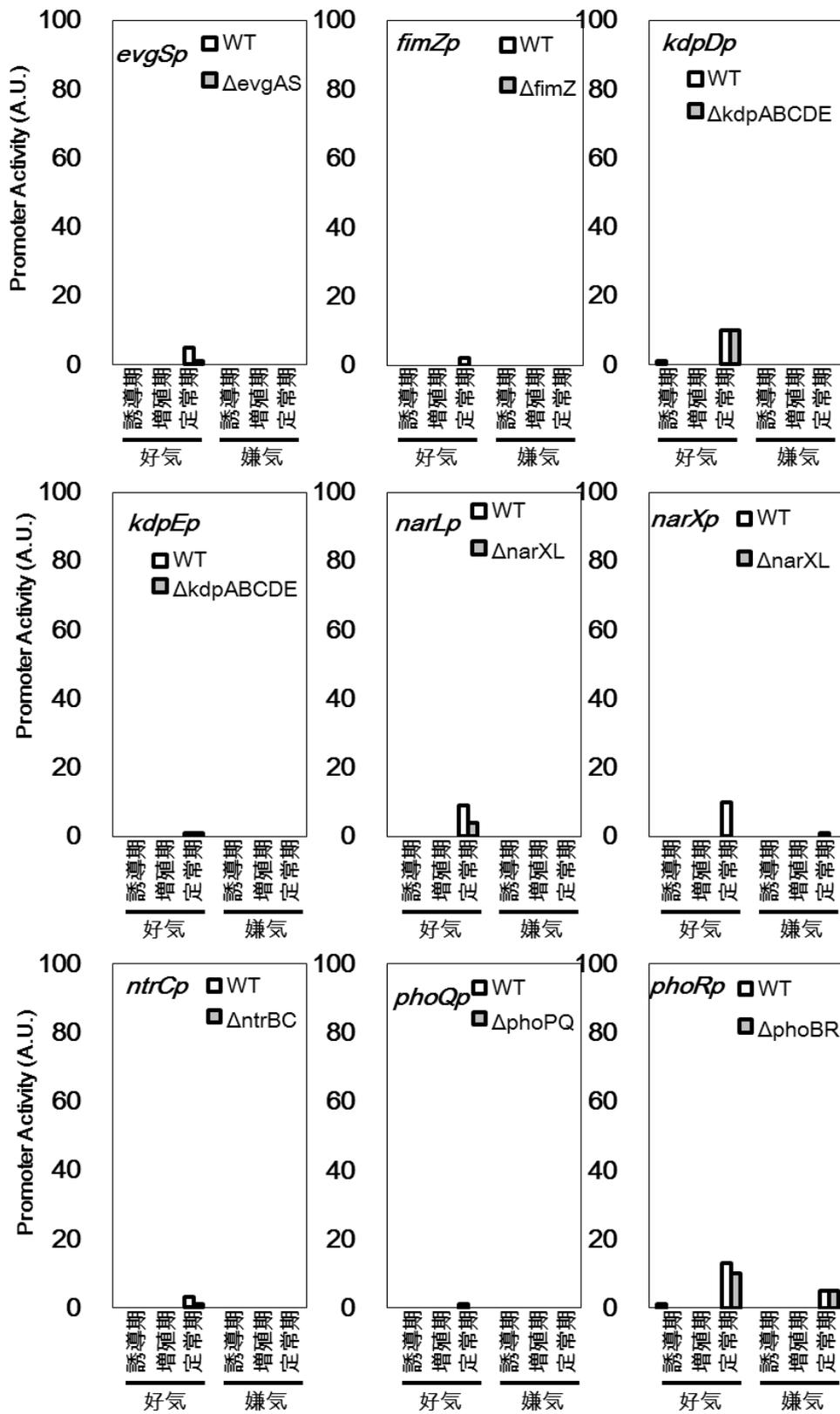
補足図1 続き



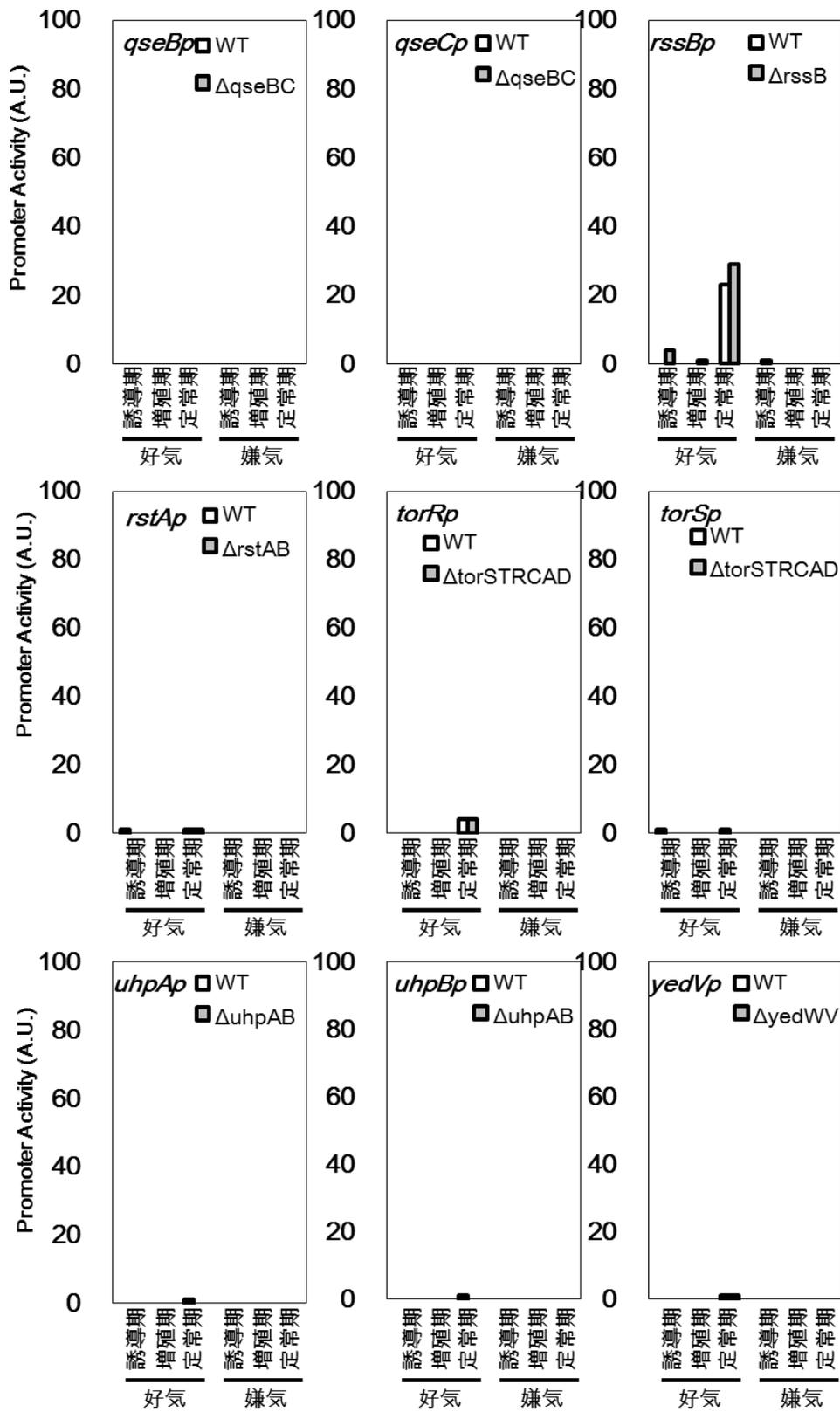
補足図 2. 自己制御が見られなかった二成分制御系プロモーター



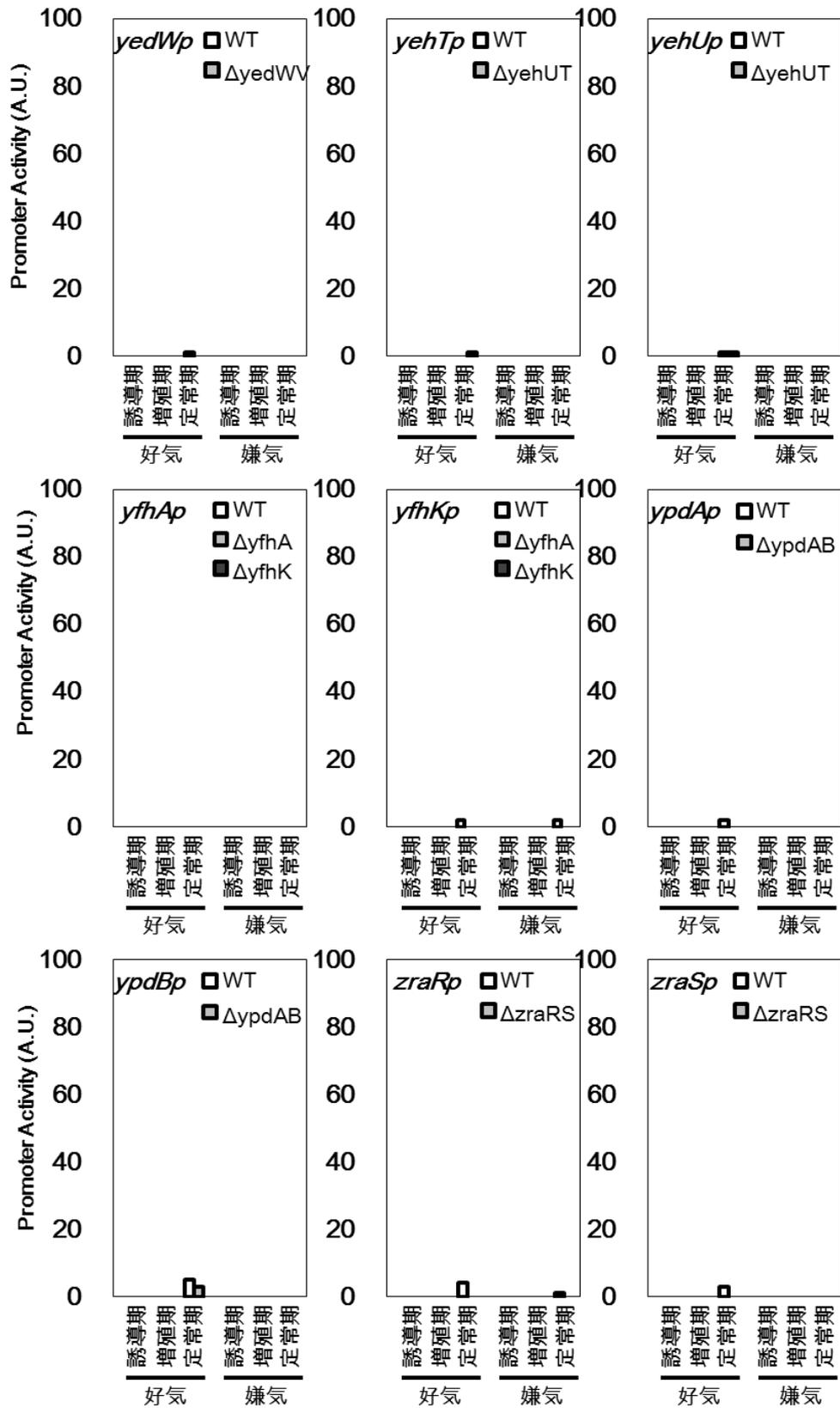
補足図 2. 続き



補足図 2. 続き



補足図 2. 続き



補足図 2. 続き