

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

☒ 成果報告  
☐ 期中進度報告

大腸桿菌 cAMP 與 CRP 蛋白質對 ompA 基因 mRNA  
穩定性之調控研究

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：NSC 98-2311-B-009-003-MY2

執行期間：2009 年 8 月 1 日至 2011 年 7 月 31 日

執行機構及系所：交通大學生物科技學系

計畫主持人：曾慶平

共同主持人：

計畫參與人員：陳煜沛、楊冀冬、朱翊維、林威志等

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：☐ 精簡報告 ☒ 完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

- ☐ 赴國外出差或研習心得報告
- ☐ 赴大陸地區出差或研習心得報告
- ☐ 出席國際學術會議心得報告
- ☐ 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

☐ 涉及專利或其他智慧財產權，☐ 一年 ☒ 二年後可公開查詢

中 華 民 國 100 年 10 月 31 日

## 中文摘要

大腸桿菌的 OmpA (outer membrane protein A) 蛋白質是組成外膜結構重要成份，它會參與大腸桿菌貼附能力(adhesion)與生物膜(biofilm)組成，也會作為一些噬菌體的受體(receptor)，提供致病機制研究。OmpA 蛋白質除了在細菌中扮演重要角色，科學家研究 *ompA* 基因 mRNA 降解的機制從 1980 年代就開始，目前發現 *ompA* 與大部分調控 mRNA 降解的因子相同，包括有 RNase E、Hfq 與 sRNA 等都會參與 *ompA* mRNA 降解，因此 *ompA* mRNA 降解方式也成為研究大腸桿菌與分子生物學上 mRNA 降解的重要模式之一。先前研究指出大腸桿菌內，cAMP 與 CRP 可藉由結合目標基因上啟動子區域，來調控基因表現，透過在培養基中添加葡萄糖或用 *cya* 基因突變株(合成 cAMP 之酵素, adenylate cyclase)，已證實當細胞內 cAMP 減少時，*ompA* 基因的 mRNA transcription 會減少。根據我們的實驗結果顯示 cAMP 並不會直接調控 RNaseE 而影響 *ompA* mRNA 的降解。此外藉由 Real-time PCR 確認 *gcvB* 及 *dsrA* sRNA 皆會受 cAMP 影響其表現量，但其突變並不會增加 *ompA* mRNA 的穩定性。然而，當 *cya* 基因突變則會增加 *hfq* 基因的表現。利用 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 及 footprinting 亦確認 *hfq* 基因啟動子受 CRP 蛋白的調控，顯示當 *cya* 基因突變或添加葡萄糖情況下，*ompA* mRNA 的穩定性會明顯下降，相反地，*hfq* 基因突變則會增加 *ompA* mRNA 的穩定性。同樣地，*fur* 基因如 *ompA* 基因受到 *cya* 及 *hfq* 基因影響 mRNA 的穩定性，即 cAMP-CRP 對 *hfq* 基因扮演抑制者的角色間接影響其他 mRNA 的穩定性。

## Abstract

In *Escherichia coli*, the OmpA outer membrane protein is a multifaceted protein. OmpA can function as an adhesin and biofilm formation. It also displays a receptor to several bacteriophage, which acts as the model for studying pathogenesis. The *ompA* mRNA degradation research started from early 1980's, Scientists discovered that some important regulatory factors - RNase E, Hfq and sRNAs involved in *ompA* mRNA degradation. Therefore, the research of *ompA* mRNA degeneration becomes the significant model for the mRNA degradation study. Previous studies have reported that cAMP-CRP manages genes expression by modifying promoter activity. The result of cAMP concentration and *ompA* mRNA level was synchronized in *cya* mutant cultured with glucose supply. In this study, the expression of *rne*, known to participate in *ompA* mRNA degradation was not affected in the cAMP-deficient mutant. Also, *ompA* mRNA stability was not increased in the sRNA mutants by real-time PCR analysis. However, Northern blot and Western blot analyses revealed that host factor I (*hfq*) levels were downregulated in the presence of cAMP. The cAMP-CRP DNA binding site was further confirmed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and footprinting analysis. These results demonstrated that expression of *hfq* was repressed by the cAMP-CRP complex. An additional experiment showed that cAMP also increased the stability of *fur* mRNA. Taken together, these results suggested that the repression of Hfq by cAMP may contribute to the stability of other mRNA in *E. coli*.

## 前言

早期研究發現大腸桿菌有雙期發育(diauxie)與 glucose catabolic repression 現象，其後有 *lac* operon 之分子調控機制模式建立，這些都是分子生物學上極重要的研究結果。在上述的研究中，cAMP 與 cAMP Receptor Protein (CRP) 會形成 cAMP-CRP 複合體，以轉錄調控子 (transcription factor) 的角色來調控這些基因。時至今日，研究結果顯示，cAMP-CRP 複合體以轉錄調控子的方式調控大腸桿菌體內超過數百個基因的表現，其調控作用主要是在 transcription 層面，如 *ompA* 基因(Gibert and Barbe, 1990)。

*ompA* 基因表現產物為 OmpA 蛋白質，是外膜蛋白的一種，屬於 OmpA-OmpF Porin (OOP) family 之一員。OmpA 蛋白質由 346 個胺基酸組成，以同源雙倍子 (homodimer) 的型態表現於外膜上，主要負責小分子的通透作用。OmpA 蛋白質除了物質輸送之外，也有支持菌體形狀的功能。亦有相關文獻報導 OmpA 蛋白質與噬菌體感染、接合作用 (F-factor dependent conjugation) 等現象有關(Smith et al., 2007)。

*ompA* 基因表現量高，因此一直是傳統上研究 RNA 的最佳典例(Smith et al., 2007)。在 1990 年，Gibert 等人利用建構 *ompA-lacZ* 融合基因，發現以葡萄糖為碳源培養的大腸桿菌中，*ompA* mRNA 表現量降低；在 *cya*、*crp* 雙突變的情況下也降低了 *ompA* mRNA 的表現量。若在大腸桿菌野生株的培養中添加 cAMP 則會增強 *ompA* mRNA 的表現，此種現象在 *cya* 突變株中也觀察得到，但在 *crp* 突變株中則不然。由上述結果可知 cAMP-CRP 複合體可正向調控 *ompA* 基因的表現量(Gibert and Barbe, 1990)。另外在 Ecocyc 大腸桿菌資料庫中也登錄了 *ompA* 基因的啟動子區域具有 CRP 的結合區(<http://ecocyc.org/>)。因此 cAMP-CRP 複合體對 *ompA* 基因的調控主要作用於轉錄層次。

## 研究目的

最近我們對 *ompA* 基因的研究發現到一個有趣現象，是大腸桿菌 *ompA* 基因之 mRNA 穩定性也會受葡萄糖濃度與 *cya* 基因所調控，這樣的結果顯示，cAMP 與 CRP 其調控除了在轉錄層次，也可能在後轉錄作用（post-transcription）層面有影響。

因此在本計劃中我們將以大腸桿菌 *ompA* 基因之 mRNA 降解為對象，探討 cAMP 與 CRP 如何在後轉錄作用（post-transcription）層面對 *ompA* 基因進行調控。目前已知會影響 *ompA* 之 mRNA 降解的三個因子分別為 RNase E、Hfq、small RNA，而它們是否會受 cAMP 與 CRP 調控現今仍未知。因此本計畫也將研究 cAMP 與 CRP 對 *ompA* 基因與其他三個已知會調控 *ompA* mRNA 穩定性因子 RNase E、Hfq、small RNA 等之影響結果，此研究計畫可進而瞭解 cAMP 對 *ompA* mRNA 在 post-transcription 調控機制是直接或間接，研究結果將對研究大腸桿菌基因表現與調控提供一個重要的新模式。

## 文獻探討

cAMP 是大腸桿菌胞內訊息傳遞者，影響菌體生長、分裂及許多基因表現，相關的研究從1970年以來不斷被提出，這些研究結果指出cAMP會和CRP結合一起作用，在大腸桿菌內扮演轉錄調控子角色。我們之前研究發現隨生長速率變快，cAMP表現量下降 (Kuo et al., 2003)，同時大腸桿菌內*ompA* mRNA的半衰期也會隨生長速率變快而變長 (Nilsson et al., 1984)。由上面的結果，我們認為 cAMP 除了作用在transcription層面，亦有可能在post-transcription層面上有作用，進一步利用培養基有無添加葡萄糖進行測試，發現*ompA* 之mRNA穩定性會因葡萄糖的存在而下降，表示當細胞內cAMP量下降時，*ompA* mRNA穩定性會下降。為了確認這樣結果，我們也構築*cya*基因缺損突變株，當*cya*基因缺損時，大腸桿菌無法生成adenylate cyclase，使得cAMP無法產生。實驗結果顯示，在與野生株相較下，突變株的*ompA* mRNA半衰期變短，穩定性下降，因此證實cAMP確實會影響*ompA* mRNA穩定性，同時也證實我們先前推測cAMP會影響post-transcription調控。

在大腸桿菌眾多mRNA降解研究中，*ompA* mRNA降解模式為目前研究最透徹的基因之一，從最早發現*ompA* mRNA 的5'untranslated region (5'UTR)是調控穩定性的重要片段 (Emory et al., 1992)，經由5'UTR可調控不同生長速率下*ompA* mRNA的穩定性(Emory and Belasco, 1990)。接著研究也證實了大腸桿菌中最主要核糖核酸內切酶—RNase E 會截切*ompA* mRNA的5'UTR片段，導致*ompA* mRNA被降解(Carpousis et al., 1994)。近年來的研究，更發現Hfq與*micA*、*rseX* 兩個sRNA會與*ompA* mRNA的5'UTR結合，使得*ompA* mRNA穩定性受到改變(Vytvytska et al., 1998, Udekwu et al., 2005)。從這些文獻我們瞭解*ompA* 基因mRNA的5'UTR與其穩定性有密切關係，而且是透過RNase E、Hfq、sRNA這三個不同因子作用在5'UTR片段上來調控*ompA* mRNA的降解。由於*ompA* mRNA降解模式提供了一個研究post-transcription調控機制的典範，加上已知的cAMP與CRP 結合後被認為以transcription factor結合在基因的啟動子附近進行調控，因此在本計畫中我們將研究cAMP是否扮演transcription factor角色，而經由影響RNaseE、Hfq、sRNA這三個調控因子，然後再由這三者間接影響*ompA* mRNA穩定性，亦或由cAMP與CRP結合直接作用在*ompA* 基因的mRNA而進行調控。

### 一、大腸桿菌 *ompA* mRNA 的降解機制

## 1 OmpA 蛋白質特性：

在大腸桿菌外膜蛋白質家族(outer membrane proteins family)中，outer membrane protein A (ompA)為主要外膜蛋白，大量出現在細胞外膜結構上。*ompA* 基因序列長度 1041b.p，*ompA* 基因上游包含兩個 promoters，分別為 ompAp1 和 ompAp2，ompAp1 的活化需要 cAMP-CRP complex 的協助 (Gibert and Barbe, 1990)。OmpA 蛋白質共由 325 個胺基酸所構成 (Sugawara et al., 1994)，主要區分成三部分；N 端曝露細胞外親水性區域、8 次穿膜反向平行  $\beta$ -barrel、靠近內膜 C 端 peptidoglycan (Wang, 2002)。OmpA 穿膜蛋白允許離子通過，結構上屬於通道蛋白，非專一性也允許一些小物質通過 (Sugawara et al., 1992)。而 OmpA 蛋白質曝露在細胞外親水性的區域為 phage receptor，對於 phage 的感染敏感 (Datta et al., 1977)。其 OmpA 蛋白質主要功能為維持細胞外膜穩定性，以適應各種環境的變化。先前研究指出大腸桿菌 *ompA* 基因突變的菌株對高滲透壓、酸性環境敏感，證實 OmpA 蛋白在細胞中扮演維持外膜結構的功能 (Wang, 2002)。

## 2 OmpA mRNA 降解模式：

*ompA* mRNA 的降解研究從 1980 年代開始，Nilsson 等人於 1984 年，利用不同培養基培養大腸桿菌，會有不同生長速率，結果發現 *ompA* mRNA 穩定性隨生長速率上升而上升，*ompA* mRNA 的降解現象，後來被證實與 *ompA* mRNA 的 5'UTR 有關 (Emory and Belasco, 1990)，進一步的研究後發現，*ompA* mRNA 的 5'UTR 與其降解有重要的相關性，因為 *ompA* mRNA 的 5'UTR 會形成兩個 hairpin loop 的二級結構，使得核酸內切酶 RNase E 能對 5'UTR 上的 AU-rich 序列區進行切割 (Carpousis et al., 1994)。5'UTR 除了作為大腸桿菌最主要的核酸內切酶 RNase E 作用片段外，近年來更發現 Hfq 會作用在 5'UTR 上，Hfq 會與 5'UTR 結合，調控了 *ompA* mRNA 穩定性隨生長速率上升而上升的現象 (Vytvytska et al., 1998)。除了上述 RNase E、Hfq 作用於 5'UTR，目前發現 sRNA 也會作用在 *ompA* mRNA 的 5'UTR，sRNA 可以調控大腸桿菌的 transcription、post-transcription、translation，與 *ompA* mRNA 降解有關的 sRNA 目前發現有 micA 與 rseX，它們利用與 5'UTR 形成 base pair 方式，調控其降解 (Udekwa et al., 2005)。綜合目前已知的研究，我們可以瞭解 *ompA* mRNA 的降解與其 5'UTR 有密切關係，而且分別有 RNase E、Hfq、sRNAs 作用在 5'UTR

上，以調控 *ompA* mRNA 降解。

## 二、cAMP 與 CRP 蛋白質

### 1 cAMP 的特性

在許多調控機制中，扮演訊息傳遞者的 cAMP 是經由 adenylylase 催化 ATP 所形成的。產生 adenylylase 的 *cya* 基因位於 *E. coli* 基因圖譜中 85.7 分鐘的位置。目前研究中指出，adenylylase 活性主要可經由轉錄及轉譯後兩階段來調控 (transcriptional、post-translational regulation) (Botsford and Harman, 1992)。其中轉錄調控是限制 *cya* 表現的主要層次，當 *E. coli* 細胞中 *cya* 基因表現增加六倍表現時便會導致菌體的死亡 (Reddy et al., 1985)，因此菌體必須嚴格地控制 *cya* 基因的表現量以確保生存。

*cya* 基因本身含有 3 個起動子(promoter)，控制能力最強的為 *cya* P2，它所包含的操縱子區域同時也是 cAMP-CRP 複合物結合的位置，cAMP-CRP 複合物對 *cya* 基因扮演著抑制者的角色，結合後會阻礙 RNA 聚合酶的接觸，降低表現量可達 4 ~ 5 倍之多 (Botsford and Harman, 1992, Mova et al., 1981)。在細胞中 *cya* 基因表現量的變動遠不如 cAMP 的變化量來得大 (Botsford and Drexler, 1978)，因此 adenylylase 的活性大部分是由轉譯後調控所影響。經由 PTS (phosphoenolpyruvate phosphotransferase system) 所傳遞的糖類，與 adenylylase 都是 PEP (phosphoenolpyruvate) 磷酸根的受質。以葡萄糖為例，當葡萄糖存在時，葡萄糖較 adenylylase 易接受 PEP 所釋放出的磷酸根，未被磷酸化的 adenylylase 會沒有活性而無法發揮作用；反之，缺乏葡萄糖時 adenylylase 可充分被磷酸化並提昇活性以增加 cAMP 合成速率 (Botsford and Harman, 1992)。

### 2 cAMP receptor protein (CRP) 特性

大腸桿菌體內的 CRP 是由二個位於基因圖譜 73.5 分鐘處的 *crp* 基因轉譯出的次單元體組合而成的，分子量為 47238 Da。由 cAMP-CRP 晶體分析，CRP 的每一個次單元體中，5' 端區域 (amino-proximal domain) 擁有豐富的  $\beta$ -sheet 結構，形成 cAMP 結合的口袋 (pocket)。碳端區域 (carboxy-proximal domain) 則為負責與 DNA 結合的 helix-turn-helix 結構 (Adhya et al., 1990)。在缺乏 cAMP 時，CRP 會增加對蛋白酶的耐受性並存在對非特定序列



DNA 的親和性。當 cAMP 存在情形下，CRP 被蛋白酵素降解的速率提升，而與 cAMP 結合的 CRP 經由三級結構的修飾，使 cAMP-CRP 複合物可與特定序列的 DNA 相互結合。CRP 在細胞內可以三種形態存在，分別是自由態 CRP、(cAMP)<sub>1</sub>-CRP 及 (cAMP)<sub>2</sub>-CRP。研究顯示在細胞 cAMP 濃度介於 0 ~ 200 μM 時，CRP 多以(cAMP)<sub>1</sub>-CRP 的構形存在；若 cAMP 濃度達到 200 μM ~ 15 mM 時則以(cAMP)<sub>2</sub>-CRP 的構形為主(Botsford and Harman, 1992)。雖然實驗證實 (cAMP)<sub>1</sub>-CRP 對 DNA 的親和力較高，但擁有控制轉錄能力與特定序列結合的仍是 (cAMP)<sub>2</sub>-CRP。目前就 CRP 晶體研究的證據來解釋，這可能是因為二分子 cAMP 結合後對 CRP 造成的構形改變遠大於一分子 cAMP 所造成。

CRP 在 DNA 上所結合的保留序列 (consensus sequences) 有 22 個鹼基對為 AAATGTGATCT\*AGATCACATTT (\* 為任何六個鹼基對)，這段序列具反轉重覆 (palindrome) 的特性，並多位於轉錄起始點之後(Berg et al., 1988)。除了序列的一致性之外，對 CRP 有需求之起動子 (CRP-dependent promoter) 的活性與 CRP 結合位置至轉錄起始點距離成反比。因此，CRP 與 DNA 結合處的位置及序列都對基因表現有重要影響(Botsford and Harman, 1992)。

細胞中 CRP 的表現量亦有 catabolic repression 的現象，當培養液中加入葡萄糖之後會使細胞內 CRP 含量快速下降，並導致 cAMP-CRP 複合物也隨之減少(Li and DeMoss, 1988)。而葡萄糖對 CRP 表現的抑制現象，目前認為可在轉錄及轉譯步驟調控，研究結果顯示，葡萄糖除可刺激 CRP 蛋白質的分解速率使穩定率下降，也會減低 *crp* 的 mRNA 的表現。除此之外，實驗發現在 *crp*<sup>-</sup> 突變株中 cAMP 的含量遠高於 (大於 100 倍) *crp*<sup>+</sup> 的野生株(Botsford and Harman, 1992)，而大量表現 CRP 蛋白質亦使細胞內 cAMP 含量大幅降低，基於這些現象可得知 CRP 對 cAMP 存在明顯地負調節 (negative regulation) 作用。

### 3 cAMP-CRP complex 調控例子

當微生物處於兩種不同的碳源環境下時會有雙期發育的 (diauxie) 的情形，它們會先分解較易利用的受質來作為能源而抑制另一受質的利用，這種現象即稱 catabolic repression。當較易利用的受質完全被分解後，會有一段生長休止期，在這段期間內，菌體誘導出利用另一受質所需的酵素而得以另一段生長期的開始 (Narang and Pilyugin, 2007)。

此類的相關研究初期多以葡萄糖 (glucose) 及乳糖 (lactose) 為碳源來進行。大腸桿菌將葡

葡萄糖優先作為能量的來源，此時乳糖酵素等相關基因被抑制不表現，因此又稱這種 glucose catabolic repression 的現象為葡萄糖效應。進一步探討細胞如何得知何時該誘發乳糖酵素的產生，後來的研究發現 glucose catabolic repression 反應與細胞內 cAMP 濃度有密切的相關。在葡萄糖漸漸耗盡的同時，細胞內 cAMP 濃度會逐漸增高，cAMP 與其調節蛋白質 CRP (cAMP receptor protein) 形成複合物，結合在乳糖操縱子 (*lac operon*) 的調控子 (operator) 區域，cAMP-CRP 複合物可增加 RNA 聚合酵素與 DNA 結合的親和力，使得乳糖酵素大量表現。反之在葡萄糖充裕的環境之下，低濃度的 cAMP 無法形成足夠的 cAMP-CRP 複合物，使乳糖操縱子上 RNA 聚合酵素結合處被乳糖抑制子 (LacI) 所佔據，導致下游一連串的乳糖酵素基因無法表現。

### cAMP 與 CRP 對 *ompA* 基因表現之調控

過去文獻發現cAMP-CRP 複合物在大腸桿菌中扮演著轉錄調控子角色，cAMP-CRP會與 *ompA*基因的啟動區域結合，來調控*ompA*基因的表現，但是cAMP-CRP調控*ompA* mRNA穩定性之現象沒有相關發現。近年來發現cAMP-CRP 複合物對sRNA的transcription有影響 (Wassarman et al., 2001)，所以cAMP-CRP 複合物可能經由sRNA間接調控*ompA* mRNA的穩定性。

### 三、RNase E (*rne*)

RNase E 為含有 1061 個氨基酸，分子量為 118 kDa 的蛋白質，但在蛋白質膠體電泳上卻移動至 180 kDa 位置，可能是因為在 RNase E 的 C' 端含有一段 proline-rich 的序列 (Casaregola et al., 1992)。RNase E 是一種多功能性的酵素，對很多 RNA 都有切割活性 (Ono and Kuwano, 1979)，包括可以起始許多 mRNA 的降解，移去 mRNA 3' 端的 poly(A) tail (Huang et al., 1998)，也參與了 rRNA 與 tRNA 成熟過程 (Ghora and Apirion, 1978; Li and Deutscher, 2002)。

RNase E 作用位置為單股 RNA 且 AU-rich 的序列區，RNase E 會從 mRNA 的 5' 端往 3' 端搜尋適合的切割位置 (Cohen and McDowall, 1997)。此外 RNase E 會切割自己的 mRNA，具有自我調節 (autoregulation) 能力 (Jain and Belasco, 1995)。其調節機制為 *rne* 之

5'-UTR(untranslated region)有髮夾結構(hairpin)(hp2),當 RNase E 濃度升高,過多的 RNase E 蛋白質會結合上 hp2,且由 5' 端往 3' 端搜尋適合的切割位置並進行切割,導致 *rne* mRNA 快速被降解,以防止 RNase E 過度表現 (Diwa *et al.*, 2000)。

當細胞缺乏 *rne* 基因會造成大部分的 mRNA 降解不完全進而導致菌體死亡 (Belasco and Brawerman, 1993), RNase E 在 mRNA 上的切割作用為 mRNA 降解過程的速率決定步驟 (Bouvet and Belasco, 1992), 研究顯示細胞要生存至少需要正常 RNase E 濃度的 10-20% (Jain *et al.*, 2002), 由此證明 RNase E 在維持 mRNA 的穩定性以及菌體生存上,有著極重要的角色。但因為 RNase E 也參與了 rRNA 與 tRNA 的成熟過程,所以也有科學家推測 *rne* 缺失後導致 rRNA 成熟不完全才會造成菌體死亡。此外有研究指出 tRNA 成熟不完全才是主因 (Ow and Kushner, 2002)。

#### **RNase E 對 *ompA* mRNA 穩定性之調控：**

最早發現 *ompA* mRNA 的降解會與生長速率相關,在觀察到這現象的同時,也發現 *ompA* mRNA 會形成不同片段的 mRNA,經由進一步的研究發現,不同片段的 *ompA* mRNA 會有不同的降解速率,其中一個主要片段,決定了 *ompA* mRNA 降解的主要因素,這一個片段就是 *ompA* mRNA 的 5' UTR,透過 *in vivo* 與 *in vitro* 的研究,比較 RNase III、RNase E、RNase P 三個不同的核酸酶,發現 RNase E 作用於 *ompA* mRNA 的 5' UTR(Nilsson *et al.*, 1988),最後經由研究 5' UTR 二級結構,確認在 5'UTR 上形成雙 hairpin loop,使得 RNase E 能結合至 5' UTR 上 AU-rich 區域進行降解 (Carpousis *et al.*, 1994)。

#### **四、Host factor Q (*Hfq*)**

Hfq 蛋白質由 102 各胺基酸所組成,分子量約為 11.2 kDa,在大腸桿菌中含有大量 Hfq,約有 50000~60000 copies,早期認為 Hfq 只是幫助噬菌體在細菌宿主內複製噬菌體 Q $\beta$  RNA 的一個蛋白質,Hfq 會與宿主細胞的 ribosomes 結合(Su *et al.*, 1997),經研究證實,Hfq 可以將噬菌體 plus strand RNA 的 3'端打開,促使 Q $\beta$  replicase 與 plus strand RNA 接合(Miranda *et al.*, 1997)。但是在正常未受噬菌體感染的細菌體內,其功能未知。然而近幾年來發現在 *hfq* 缺失的突變株中,*ompA* 的 mRNA 半衰期會延長,證實 Hfq 在正常菌體內,其功能會降低 mRNA 的

穩定性(Vytvytska et al., 1998)。

#### **Hfq 對 *ompA* mRNA 穩定性之調控：**

Hfq 降低 mRNA 的穩定性的方式目前有兩種說法，一種為說法為促使 poly (A) tail 延長，已知在細菌體內 poly (A) tail 會增加 mRNA 的降解速率(Cohen, 1995)，而 Hfq 具有 poly A binding protein (PABP) 的活性，可以和 poly (A) tail 結合，一方面避免 poly (A) tail 被 RNase II 或 PNPase 所分解，另一方面促使 poly (A) 聚合酶繼續合成 poly (A) tail (Hajnsdorf and Regnier, 2000)，因此使 mRNA 穩定性下降。另一種說法是由研究 Hfq 如何調控 *ompA* mRNA 穩定性所得知，*ompA* mRNA 的穩定性會受生長速率影響，這樣現象目前被認為是經由 Hfq 去調控(Vytvytska et al., 1998)。因 Hfq 會干擾核糖體與 mRNA 的結合，Hfq 和核糖體競爭 *ompA* 的 mRNA 上 5'-UTR 的結合區，當生長速率快時，30S 核糖體多於 Hfq，30S 核糖體會和 *ompA* 的 mRNA 上的 5'-UTR 結合，進行轉譯作用，保護 mRNA 不被分解，當生長速率慢時，Hfq 多於 30S 核糖體，5'-UTR 改與 Hfq 結合而轉譯作用停止，因此 *ompA* mRNA 穩定性降低(Vytvytska et al., 1998)。

#### **五、small RNA (sRNA)**

有一類型的 RNA 並不被轉譯成蛋白質，統稱為 non-coding RNA (ncRNA)，除了 tRNA、rRNA 之外，還有一些小片段 RNA，稱為 small RNA，這些 small RNA 在真核、原核生物及古生菌中皆有其蹤跡。在真核生物中，small RNA 又因功能、來源等特性不同分為六大類，分別為 microRNA (miRNA)、tiny noncoding RNA (tncRNA)、short interfering RNA (siRNA)、repeat-associated small interfering RNA (rasiRNA)、small modulatory RNA (smRNA) 以及 Piwi-interacting RNA (piRNA) (Yin and Zhao, 2007)。在原核生物中，small RNA 特異性較高而無法歸類，但因具有調控功能，所以又稱為 small regulatory RNA，或是 sRNA。

在大腸桿菌中最早的 sRNA 在 1970 年代被發現，但因為片段短、偵測不易，難以研究其功能及生理特性，直到近來系統基因體學 (systematic genome) 蓬勃發展，sRNA 之功能研究才應運而生 (Vogel et al., 2003)。

至 2003 年前，在大腸桿菌中已知的 sRNA 共計 55 個，其長度大多為 50-250 nt，多數座落於基因間區 (intergenic region)，且平均分佈於雙股中 (Hershberg et al., 2003)。除此之

外，大部分的 sRNA 擁有自己的啟動子及終結子 (attenuator)，而這樣的特性也用來預測新的 sRNA (Argaman et al., 2001)。大腸桿菌中，sRNA 因應外在環境變化而有不同的調控作用。在諸多作用中，利用序列配對 (base-pairing) 與標的 mRNA (target mRNA) 結合的方式最為廣泛。在此種機制中，標的 mRNA 因 sRNA 結合，進而改變轉譯效率或影響 mRNA 穩定性。

#### sRNA 對 *ompA* mRNA 穩定性之調控：

大腸桿菌內與 *ompA* mRNA 降解有關的 sRNA 有 *micA* 與 *rseX*，當 *micA* sRNA 被大量表現時，經由 2D 電泳得知 *OmpA* 蛋白質表現量劇烈下降，因此預測 *ompA* 之 mRNA 為 *micA* sRNA 的標的基因 (Udekwa et al., 2005)。另外也發現 *micA* 之 sRNA 在細胞進入生長平原期時會大量累積 (Argaman et al., 2001)，因此導致 *OmpA* 表現量下降，但當 *micA* 的 sRNA 基因缺失時，平原時期對 *OmpA* 的負調控也相應消失。另外文獻也指出 *micA* sRNA 可藉序列結合與 *ompA* mRNA 的前導序列 (leader sequence) 結合，進而影響核糖體 (ribosome) 的結合。綜合以上所述，當細胞處於對數生長期時，*micA* sRNA 表現量少，核糖體蛋白可大量與 *ompA* mRNA 結合，並執行轉譯作用；當進入平原生長期時，*micA* sRNA 表現量上升，與核糖體蛋白競爭 *ompA* mRNA 的 5' UTR，並藉由 Hfq/RNase E 複合體的共同作用快速降解 *ompA* mRNA 序列 (Udekwa et al., 2005)，影響 *ompA* mRNA 在細胞中的穩定性除了之前研究的 *micA* sRNA 外，*rseX* sRNA 也是類似 *micA* sRNA 作用的方式，利用序列互補到 *ompA* mRNA，增加其 mRNA 的降解，但是 *rseX* gene 表現的環境還是未知 (Véronique et al., 2006)。

由上述背景文獻，可推測 cAMP 對 *ompA* mRNA 之調控，可能是間接經由影響 RNase E、Hfq 與 sRNA 表現而造成，當然也可能是直接與 cAMP-CRP 結合而調控，我們在此計畫中都將分別測試其可能性，其研究成果不僅對 *ompA* 基因之 mRNA 穩定性調控更為清楚，也對 cAMP 與 CRP 在分子生物學上的作用更為明瞭及認識。

## 研究方法

### 一、製備 *rne-lacZ* operon fusion 菌株

根據 Chauhan, A. K. 等人所選殖 (cloning) 出的 *rne* 基因序列，利用 PCR 方法得到 *rne* 啟動子 (promoter)，將其構築到 pRS415 質體，將構築好的質體轉型入 *E. coli* MC4100 菌株。挑取藍色菌落，利用  $\lambda$  噬菌體來進行大腸桿菌內基因體重組。

### 二、基因剔除 (knock out)

利用質體 pKD13 上設計一對引子序列 FRT (FLP recognition target) 帶有 kanamycin 抗生素基因，並分別在 Forward 與 Reverse 引子 5' 端再額外加入一段 50mer 的序列，此段額外的序列必須與目標要敲除的基因上下游 50b.p. 序列相同，以 PCR 方式放大目標產物，將含有電穿孔勝任細胞 (Electrocompetent Cells) 的微量離心管與純化後的 PCR 產物帶有抗生素 kanamycin 基因的同源序列 DNA 片段混合進行 DNA 片段的轉殖，之後再利用抗生素篩選轉殖株，並以 PCR 方式確認目標基因是否已被剔除。

### 三、 $\beta$ -galactosidase 酵素活性分析

離心收集來的菌體加入緩衝液，將細胞震盪混合均勻。測定細胞內蛋白質含量，再取適當的細胞懸浮液加含有 3.5  $\mu$ L/mL  $\beta$ -mercaptoethanol，50  $\mu$ L chloroform 及 25  $\mu$ L 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate) 的緩衝液 (稀釋倍數可依酵素活性大小調整，但最後反應體積為 1 mL)。震盪混和後置於 28  $^{\circ}$ C 水浴槽中進行實驗，加入 0.25 mL ONPG 後即開始反應。當反應至呈現淡黃色時，利用 2 mL 1 M 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  終止反應。終止反應後取 1.5 mL 酵素呈色反應液以 11000 rpm 離心 17 分鐘。儘量吸取上層之液體測定  $\text{OD}_{420}$  及  $\text{OD}_{550}$  吸光值。經由公式計算即可得  $\beta$ -galactosidase 的酵素活性。

### 四、大腸桿菌 total mRNA 製備

將大腸桿菌野生株，與突變株分別培養在 LB 或含有 40 mM 葡萄糖的培養液中，培養至對數生長期，收集菌液樣本，樣本收集後需迅速置於  $-80^{\circ}\text{C}$  的酒精浴冷卻 10 秒鐘，然後置於冰上，立刻進行離心收取大腸桿菌菌體。所得菌體加入 TRI reagent，打破菌體，然後以

chloroform 進行萃取，接著 sodium acetate， $-20^{\circ}\text{C}$  下進行沉澱，離心收取沉澱的 mRNA，再以 DEPC 處理過的水溶解 mRNA，置於  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

## 五、大腸桿菌 mRNA 穩定性測定

將大腸桿菌如上述培養後，收集少量菌液樣本以做為 rifampin 未加入時，時間為 0 分鐘的樣本。然後再收集 150 ml 菌液，立刻加入 1 ml 的 rifampin 溶液 (含 0.1 g rifampin)，並將菌液置於  $37^{\circ}\text{C}$  返復式循環水浴槽繼續震盪培養，之後分別於不同時間點收取菌液樣本。每次取完樣本後必需立刻置於  $-80^{\circ}\text{C}$  酒精浴冷卻 10 秒鐘，之後置於冰上。之後 mRNA 萃取方法如同大腸桿菌 total mRNA 製備的步驟。

## 六、Northern blotting analysis

將所萃取的 mRNA 樣品，定量後進行 mRNA 的 formaldehyde agarose gel 電泳，接著將電泳後的 mRNA 轉漬到 nylon membrane，然後以 PCR DIG probe synthesis kit (Roche)，所得的 *ompA* DIG probe 和轉漬過的 nylon membrane 進行雜交反應，接著再加入 anti-DIG-AP 與 *ompA* DIG probe 形成專一性結合，然後以 CSPD chemiluminescence (Roche) 進行免疫偵測。

## 七、Real-time PCR

將萃取出 RNA 進行反轉錄反應，之後定量加入 cDNA、引子及緩衝液等試劑，於 ABI PRISM 7000 Real-time PCR 系統分析，將各種不同條件所產生的 CT 值減去對應於各種不同條件下對照組 (Internal control, 16S rDNA) 的 CT 值，產生  $\Delta\text{CT}$  值。樣品之間基因表現比較，可以一個樣品  $\Delta\text{CT}$  值為標準值，將其他要比較的樣品  $\Delta\text{CT}$  值減去此標準值即可產生  $\Delta\Delta\text{CT}$  值，帶入公式  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  即可換算出相對比較值 (Relative Fold)，比較不同樣品間基因表現差異。

## 八、CRP 蛋白質表現及純化

根據 Peekhaus 及 Conway (1998) 所建立方法構築 CRP 蛋白表現質體，將 *crp* 基因剪切至 pQE30 質體中，獲得可表現 CRP 蛋白質體 pCRP，之後再將質體 pCRP 轉殖入 *E. coli* BL21(DE3)，待 *E. coli* BL21(DE3) 生長至 O.D. 值 0.4-0.6 時，加入誘導試劑 IPTG 培養 3 小時，之後收取細胞以高壓破菌收集粗萃取蛋白，粗蛋白再進一步利用鎳樹酯純化出 CRP 蛋白質。

## 九、Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

將純化後的CRP蛋白質混合DNA片段(20 nM)、cAMP (100  $\mu$ M)及緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, and 100 mM KCl)，在37°C反應15分，將反應物以novel juice (GeneDireX, Las Vegas, NV, USA)呈色於6% nondenaturing polyacrylamide gel分析。

## 十、Footprinting 分析

根據 Zianni, *et al.* (2006)所建立的方法，以 FAM 標的 DNA 片段，探討 CRP 保護區域。首先將設計的引子一端標的 FAM，再利用 PCR 方式擴增預研究的區域，將 CRP 蛋白混合 cAMP 及緩衝液，於 37°C 反應 15 分後利用 DNaseI (0.05 U; New England Biolabs, MA, USA)在室溫反應 2 分鐘，迅速於 75°C10 分鐘進行終止反應，最終產物利用定序儀 3730 DNA Analyzer 分析 (Applied Biosystems, CA, USA)。



## 結果與討論

### 一、轉錄後層次上 cAMP 影響 *ompA* mRNA 穩定性

本實驗觀察菌體生長至早期對數生長期與進入對數生長期(O.D 0.3 & 0.5)時，cAMP 在轉錄後層次上是否影響 *ompA* mRNA 穩定性。

將 *E. coli* BW25113 野生株(w.t)與 *cya* 基因突變的菌株( $\Delta cya$ )，分別培養於 LB 培養液與 LB 加入 40mM 葡萄糖培養液中，在菌液生長至早期對數生長期(O.D 0.3)時，依據 8 個時間點(0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 26min)分別取菌液樣品，然後抽取總 RNA 並進行北方墨點法。另外在分別測定對數生長期(O.D 0.5)條件下，*ompA* mRNA 穩定性，相同以上作法敘述。

實驗結果發現，在 O.D 0.3 與 0.5 條件下，野生菌株培養在 LB 培養液與 *cya* 突變菌株培養在 LB 培養液比較下，*cya* 突變菌株之 *ompA* mRNA 穩定性明顯下降(圖一與圖二)。尤其是在 O.D 0.3 更為明顯，半衰期由 13.6 分鐘下降至 3.8 分鐘。而在 O.D 0.5，半衰期由 12.3 分鐘下降至 5.5 分鐘。但是比較野生菌株培養在 LB 培養液與野生菌株培養在 LB 外加葡萄糖培養液下，*ompA* mRNA 穩定性卻沒有明顯的變化。在 O.D 0.3，半衰期也大約分別為 13 分鐘與 11 分鐘左右。而另外 *cya* 突變菌株培養在 LB 外加葡萄糖培養液，相較於 *cya* 突變菌株培養在 LB 培養液，由 *ompA* mRNA 穩定性變化可看出葡萄糖對 cAMP 影響的現象消失了。

所以由以上結果可知在大腸桿菌生長至早期對數生長期(OD 0.3)與對數生長期(O.D 0.5)時，cAMP 明顯會影響 *ompA* mRNA 轉錄後的穩定性，而 cAMP 的存在下明顯增加 *ompA* mRNA 穩定性。

### 二、cAMP 對 *rne* 基因表現的影響

為瞭解 cAMP 與 CRP 對 *rne* 基因表現之影響，將有 *rne-lacZ* operon fusion 的大腸桿菌培養於 LB 培養液及含有 40 mM 葡萄糖的 LB 培養液中，當菌生長到對數生長期前期，測其  $\beta$ -galactosidase 活性，結果發現在加入葡萄糖後 *rne-lacZ* 的表現量則下降 30% 左右。進一步使用  $\Delta cya$  突變株及  $\Delta crp$  突變株來探討 *rne* 基因表現是否受 cAMP 和 CRP 所調控。結果顯示， $\Delta cya$  突變株受葡萄糖抑制現象消失，而  $\Delta crp$  突變株亦具有相同的情形，因此我們認為在 cAMP 與 CRP 影響 *rne* 基因表現不明顯(圖三)。同樣地，利用 real-time PCR 觀察野生株及 *cya* 突變株 *rne* 的基因表現，結果亦顯示 *cya* 突變株並不會影響 *rne* 的表現 (圖四)。

### 三、cAMP 影響 small RNA 的表現

藉由生物資訊預測與相關文獻蒐集，篩選出可能會受 cAMP-CRP 複合體影響的 small RNA，分別為 *gcvB*、*ryhA*、*dsrA* 三個 small RNA。經由圖五的 Real-time quantitative PCR 實驗確認是否受 cAMP 影響，結果在對數生長期時，*cya* 基因突變的菌株之 *gcvB* sRNA 的量小於野生株 *gcvB* sRNA 的量而 *ryhA* 與 *dsrA* sRNA 的量反而是大於野生株 *ryhA* sRNA 的量，經由 Real-time PCR 確認三個 sRNA 皆會受 cAMP 的影響，但是分別為 cAMP 的存在增加了 *gcvB* sRNA 基因的表現，及降低 *ryhA* 與 *dsrA* sRNA 的表現。

### 四、轉錄後層次上 sRNA 影響 *ompA* mRNA 穩定性

進一步探討 sRNA 對 *ompA* mRNA 穩定性的影響，將 *gcvB* 及 *dsrA* 兩個 sRNA 進行基因剔除，由圖六及圖七 PCR 結果可確認成功獲得 *gcvB* 及 *dsrA* sRNA 剔除菌株，之後將野生株及突變株培養至對數生長期(O.D 0.3)時，利用北方墨點法探討 *gcvB* 及 *dsrA* sRNA 是否影響 *ompA* mRNA 穩定性。菌株培養於 LB 培養液至對數生長期(O.D 0.3)後，依據 8 個時間點(0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 26min)利用北方墨點法分析 *ompA* mRNA 穩定性。

實驗結果比較野生菌株培養於 LB 培養液與  $\Delta dsrA$  基因突變株培養於 LB 培養液觀察 *ompA* mRNA 穩定性，發現  $\Delta dsrA$  基因突變株培養於 LB 培養液 *ompA* mRNA 穩定性明顯下降，半衰期大約為 4.1 分鐘(圖八)。因此 *dsrA* sRNA 確實影響 *ompA* mRNA 穩定性，在對數生長期時，*dsrA* sRNA 存在下增加了 *ompA* mRNA 穩定性。然而，野生菌株與 *gcvB* 基因突變菌株培養於 LB 培養液中，*ompA* mRNA 穩定性則並無明顯改變，亦即 *gcvB* sRNA 並不會對增加 *ompA* mRNA 之穩定性(圖九)。

### 五、cAMP 影響 *hfq* 基因的表現

本實驗在菌體生長至對數生長期時，利用 Northern blot 觀察 cAMP 影響 *hfq* 基因的表現。將 *E. coli* BW25113 野生株(w.t)與 *cya* 基因突變的菌株( $\Delta cya$ )分別培養於 LB 培養液與 LB 外加葡萄糖培養液，實驗結果在對數生長期時，野生株培養於 LB 培養液 *hfq* 基因表現量換算成一倍，野生株培養於 LB 外加葡萄糖培養液明顯上升約 3 倍，*cya* 基因突變的菌株培養於 LB

培養液上升約 2 倍，而 *cya* 基因突變的菌株培養於 LB 外加葡萄糖培養液上升約 2 倍(圖十)。所以在菌株生長至對數生長期時，cAMP 的存在明顯降低 *hfq* 基因的表現量，所以 cAMP 會阻礙 *hfq* 基因的表現。同樣地，利用 real-time PCR 觀察野生株及 *cya* 突變株 *hfq* 的基因表現，結果顯示在 *cya* 突變株情況下，*hfq* 的表現量約為野生株的 2.5 倍 (圖十一)。以西方墨點法觀察野生株及 *cya* 突變株之 *hfq* 蛋白表現量，從結果可看出轉譯表現因轉錄表現增加而大量增加，因此 *hfq* 的蛋白量在 *cya* 突變株亦相對較野生株高 (圖十二)。

## 六、CRP 蛋白鍵結 *hfq* 啟動子之分析

根據 *cya* 基因的突變會造成 *hfq* 基因的大量表現，推測 CRP 可能對 *hfq* 扮演抑制者(repressor)的腳色，因此利用 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)分析 *hfq* 啟動子上是否包含 CRP 蛋白的鍵結區域，以 PCR 方式增幅出 *hfq* 四段不同啟動子的區域(-429 至+68)，將 CRP 與 DNA 片段混合反應後，以 nondenaturing polyacrylamide gel 進行分析，結果顯示在 *hfq* 基因上游-151 至-32 具有 CRP 鍵結區域(圖十三)，之後我們利用 MATCH 軟體再進一步精準預測實際 CRP 鍵結的序列，經由預測及 EMSA 的分析顯示在 *hfq* 基因上游-104 至-89 (TGGGA AGGGGT TCACT)包含 CRP 的保留區域，將此序列置換成不同的序列 CRP 鍵結現象即消失。同樣地，利用 footprinting 分析 CRP 蛋白保護區域，結果發現在 *hfq* 基因上游-113 至-89 有明顯受到 CRP 蛋白鍵結的現象(圖十四)。

## 七、轉錄後層次上 *hfq* 影響 *ompA* mRNA 穩定性

已知 *hfq* 的表現會造成 *ompA* mRNA 的穩定性下降，因此將 *hfq* 基因突變後，*ompA* mRNA 的穩定性相對增加(圖十五)，同時將 *cya* 突變後其穩定性同樣存在。之後我們利用基因互補實驗，了解在 *hfq* 突變情況下，不同基因啟動子及葡萄糖對 *ompA* mRNA 穩定性的影響，將菌株培養於 LB 培養液及含有 40mM 葡萄糖中至對數生長期(O.D 0.3)後，依據 8 個時間點(0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 26min)利用北方墨點法分析 *ompA* mRNA 穩定性。

實驗結果比較野生菌株培養於 LB 培養液與 40 mM 葡萄糖中觀察 *ompA* mRNA 穩定性，發現以 *hfq* 啟動子表現的 *hfq* 基因株培養於 LB 含葡萄糖培養液中，*ompA* mRNA 穩定性明顯下降，半衰期大約為 7 分鐘(圖十六)。當置換成突變的啟動子序列(即不受 CRP 調控)，其穩定

性下降現象即消失。此外，以西方墨點法觀察野生株在 LB 及含有葡萄糖培養液中 *hfq* 蛋白表現量，從結果可看出 *hfq* 轉譯表現與 *ompA* mRNA 轉錄表現的穩定性呈相反關係。

#### 八、轉錄後層次上 *hfq* 影響 *fur* mRNA 穩定性

為確認 *hfq* 所扮演的角色在其他 mRNA 也如同 *ompA* mRNA 受到 CRP 調控，我們進一步以 *fur* mRNA 的穩定性進行探討，比較野生株、*cya* 突變株及  $\Delta cya \Delta hfq$  雙基因突變下，*fur* mRNA 穩定性的變化(圖十七)，結果如同 *ompA* mRNA 的表現，在 *cya* 基因突變下(亦即 CRP 活性較低的情況下)，*fur* mRNA 穩定性較野生株明顯下降( $T_{1/2}=33.9$  s)，然而當 *hfq* 基因亦突變下，*fur* mRNA 穩定性則大幅上升( $T_{1/2}=104.2$  s)，這些結果很明確了解 *hfq* 基因受到 CRP 調控，同時亦間接受到葡萄糖及 *cya* 基因的影響(圖十八)。

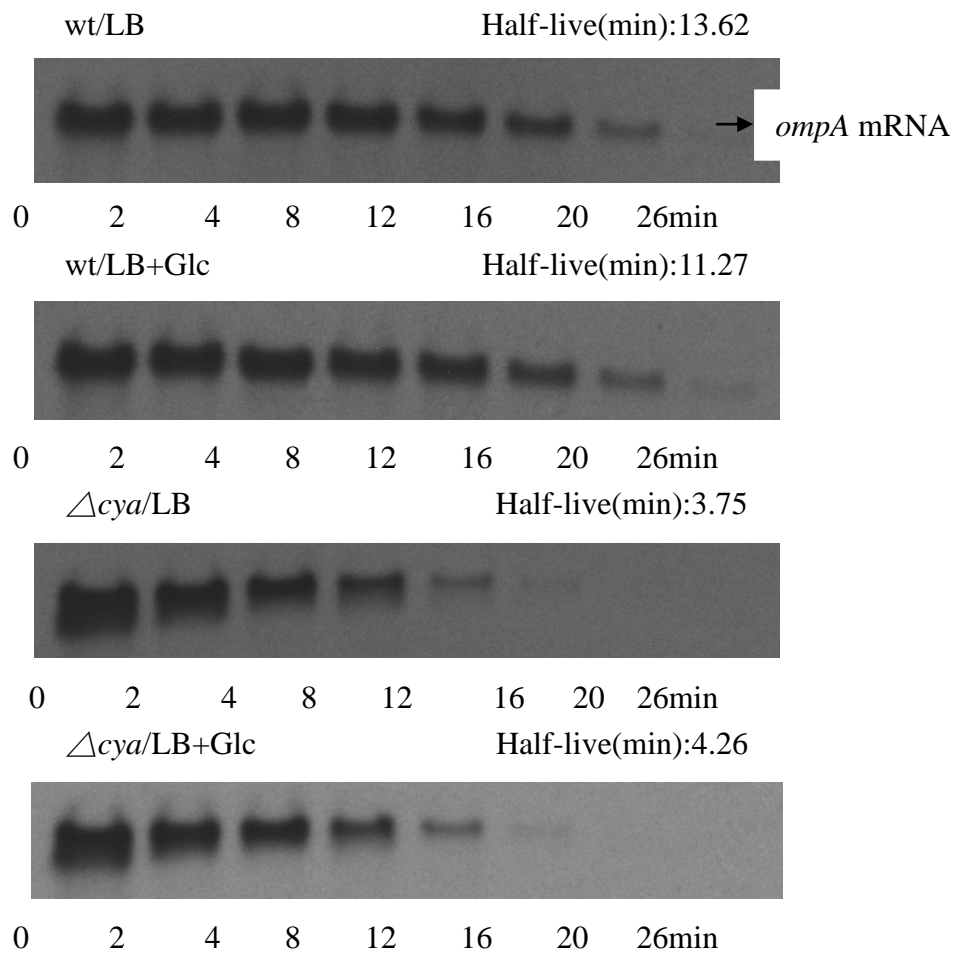
## 結論

第一年我們完成以改變大腸桿菌內葡萄糖的量與 *cya* 突變株兩種研究方式，來探討 cAMP 是否會對 *rne*、*hfq* 基因與 sRNA 這三者之影響。明確釐清 cAMP-CRP complex 對 *rne*、*hfq* 與 sRNA 基因表現對 *ompA* mRNA 穩定性之探討。完成研究成果如下：

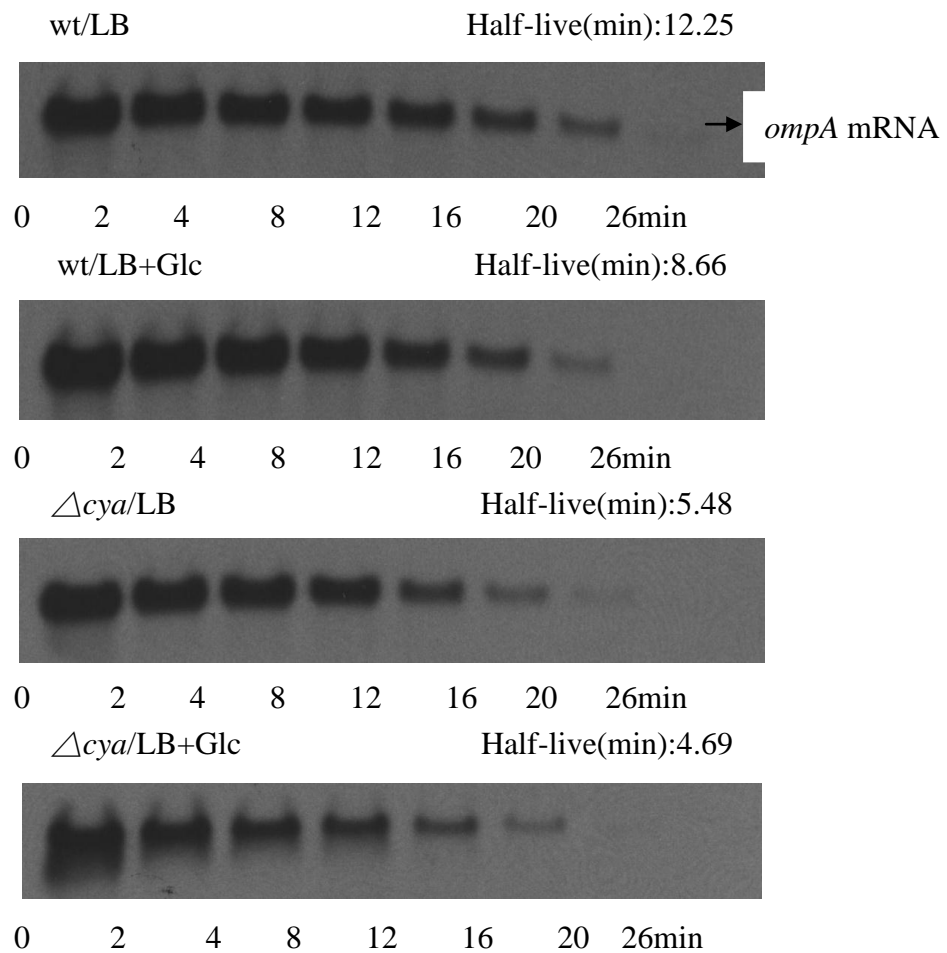
1. cAMP 並不會直接調控 *ompA* mRNA 的穩定性。
2. cAMP 並不會直接調控 RNaseE 而間接影響 *ompA* mRNA 的降解。
3. 在 *cya* 基因突變及添加葡萄糖情況下，會造成 *ompA* mRNA 穩定性的下降。
4. 藉由 Real-time PCR 確認 *gcvB* 及 *dsrA* sRNA 皆會受 cAMP 影響其表現量，但其突變並不會增加 *ompA* mRNA 的穩定性。

第二度我們完成 *cya* 突變與受 *cya* 影響因子(*hfq* 基因)的雙突變株，瞭解雙突變下 *ompA* mRNA 的穩定性改變情形。並且透過 *cya* 突變株，以外加不同啟動子的表現質體方式，完成受 CRP 影響因子的表現量與 *ompA* mRNA 的穩定性之間相互關係，釐清 cAMP-CRP complex 以 transcription factor 方式調控 *hfq* 基因表現，再經由它們來改變 *ompA* mRNA 穩定性。完成研究成果如下：

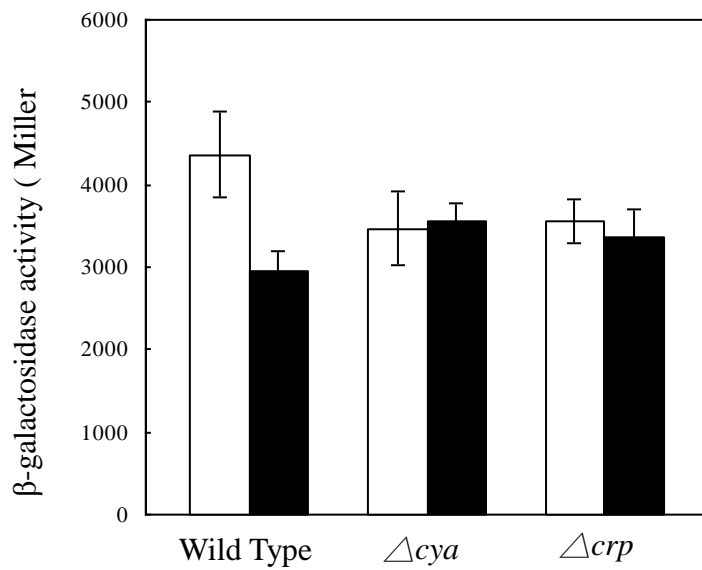
1. 完成確認 *cya* 基因會影響 *hfq* 基因的表現，當 *cya* 基因突變會增加 *hfq* 基因的表現。
2. 利用 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)及 footprinting 完成分析 *hfq* 基因啟動子受 CRP 鍵結之區域。
3. 完成 *cya* 基因與 *hfq* 基因的雙突變情況下，*ompA* mRNA 的穩定性調控影響。
4. 完成以不同啟動子的表現質體方式及葡萄糖的添加，探討 *ompA* mRNA 的穩定性，確認 *ompA* mRNA 間接受到 cAMP-CRP 調控 *hfq* 基因而影響其穩定性。
5. 完成確認 *fur* 基因如同 *ompA* 基因受到 *cya* 及 *hfq* 基因影響 mRNA 的穩定性。



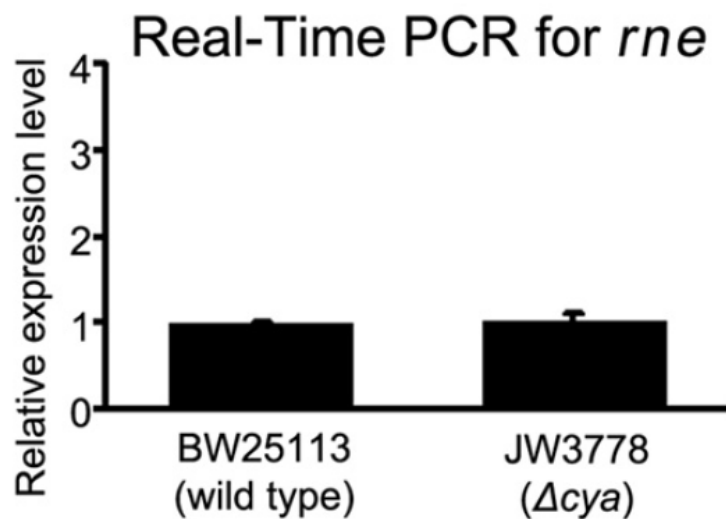
圖一、大腸桿菌野生株(wt)與 *cya* 突變菌( $\Delta cya$ )分別培養在 LB 與 LB 外加 40mM 葡萄糖下，生長至早期對數生長期時(O.D 0.3)，加入 Rifampin 停止培養，並在往後 8 個時間點(0、2、4、8、12、16、20、26 分鐘)分別抽取總 RNA 進行 Northern blot 分析 *ompA* mRNA 穩定性變化。



圖二、大腸桿菌野生株(wt)與 *cya* 突變菌( $\Delta cya$ )分別培養在 LB 與 LB 外加 40mM 葡萄糖下，生長至對數生長期時(O.D 0.5)，加入 Rifampin 停止培養，並在往後 8 個時間點(0、2、4、8、12、16、20、26 分鐘)分別抽取總 RNA 進行 Northern blot 分析 *ompA* mRNA 穩定性變化。

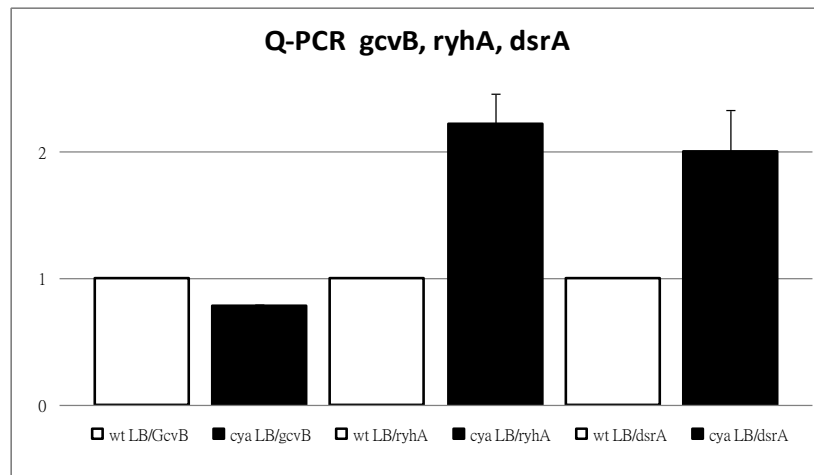


圖三、有氧環境下葡萄糖對大腸桿菌*rne-lacZ*表現之影響。將具有*rne-lacZ*的野生株與突變株分別培養於LB或含40mM葡萄糖的LB培養液中，進行批次培養，當菌體生長達對數生長期前期測其 *rne-lacZ* 的 $\beta$  - galactosidase 活性。□ LB；■ LB+40mM 葡萄糖。

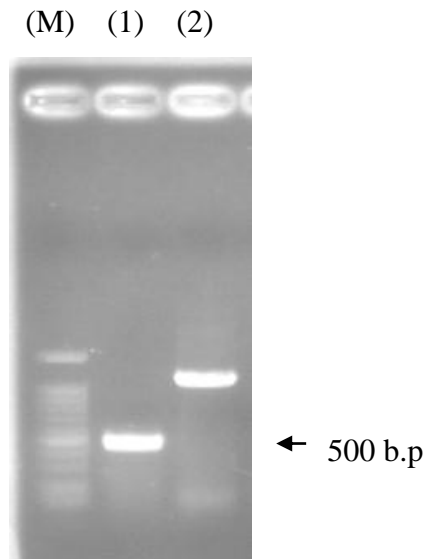


圖四、real-time PCR 分析野生株及 *cya* 突變株 *rne* 基因表現量。

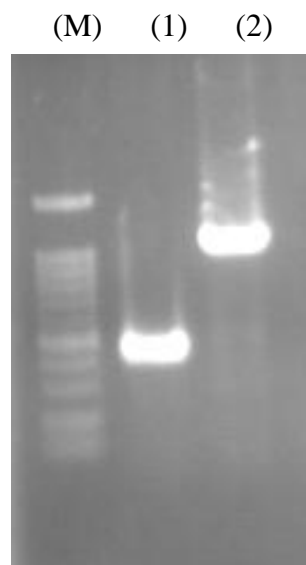




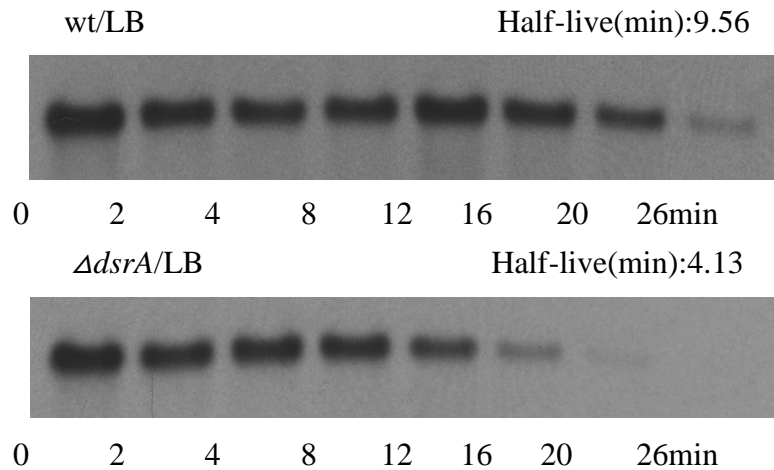
圖五、Real-time PCR(Q-PCR) *gcvB*、*ryhA*、*dsrA* sRNA 表現。大腸桿菌野生株(wt)與 *cya* 突變菌培養在 LB 培養液，抽取總 RNA 並進行反轉錄成總 cDNA，Q-PCR *gcvB*、*ryhA*、*dsrA* sRNA 基因表現量。野生株(wt)培養在 LB 培養液 *gcvB*、*ryhA*、*dsrA* sRNA 量換算成一倍。縱軸為相對比較數值(relative fold)。



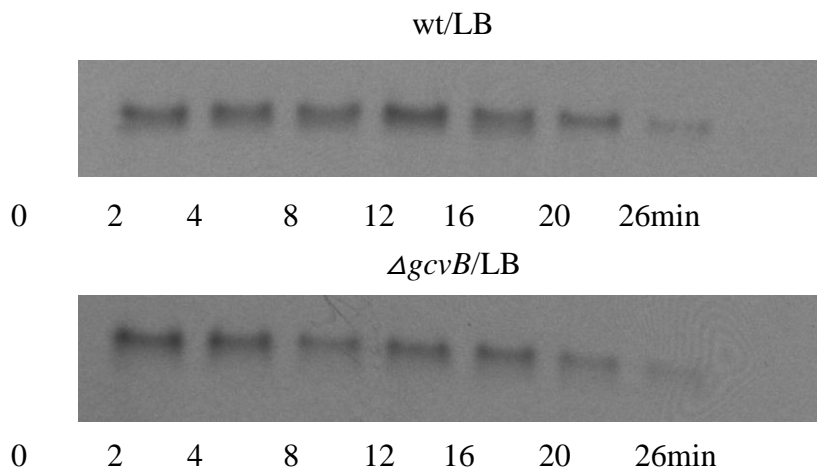
圖六、確認 *dsrA* sRAN 基因剷除與剷除位置。(1)利用 KT forwark 和 K2 reverse 引子，PCR Anti-Kanamycin(*kan*) gene marker 的電泳圖，共 486b.p。(2)利用基因外所設計的引子與 KT 引子形成一對 Reverse 和 Forward 引子，PCR 的電泳圖，約 1.2Kb。(M)為 100b.p marker。



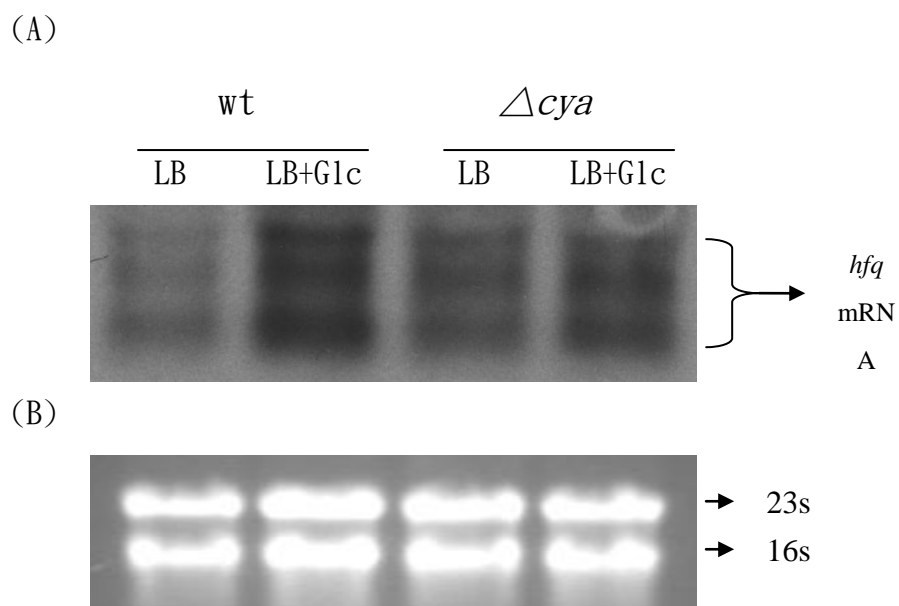
圖七、確認 *gcvB* sRAN 基因剷除與剷除位置。(1)利用 KT forwark 和 K2 reverse 引子，PCR Anti-Kanamycin(*kan*) gene marker 的電泳圖，共 486b.p。(2)利用基因外所設計的引子與 KT 引子形成一對 Reverse 和 Forward 引子，PCR 的電泳圖，約 1.2Kb。(M)為 100b.p marker。



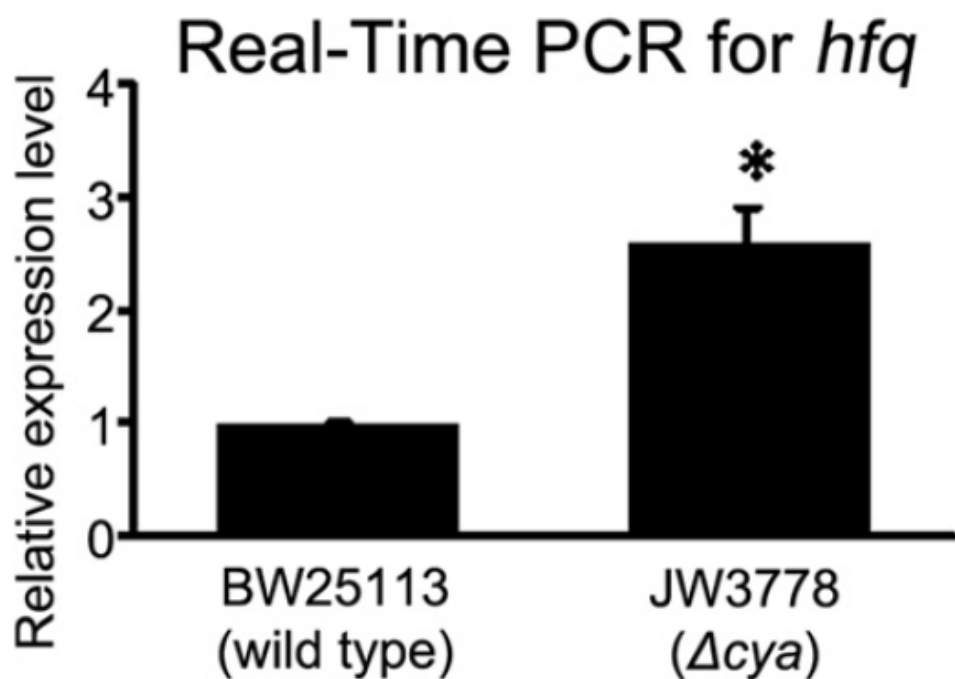
圖八、比較野生株與 *dsrA* 突變株中 *ompA* mRNA 穩定性之北方墨點分析圖。將大腸桿菌野生株(wt)與 *dsrA* 突變菌( $\Delta dsrA$ )培養在 LB 培養液，生長至對數生長期時(O.D 0.3)，加入 Rifampin 停止培養，並在往後 8 個時間點(0、2、4、8、12、16、20、26 分鐘)分別抽取總 RNA 進行 Northern blot 分析 *ompA* mRNA 穩定性變化。



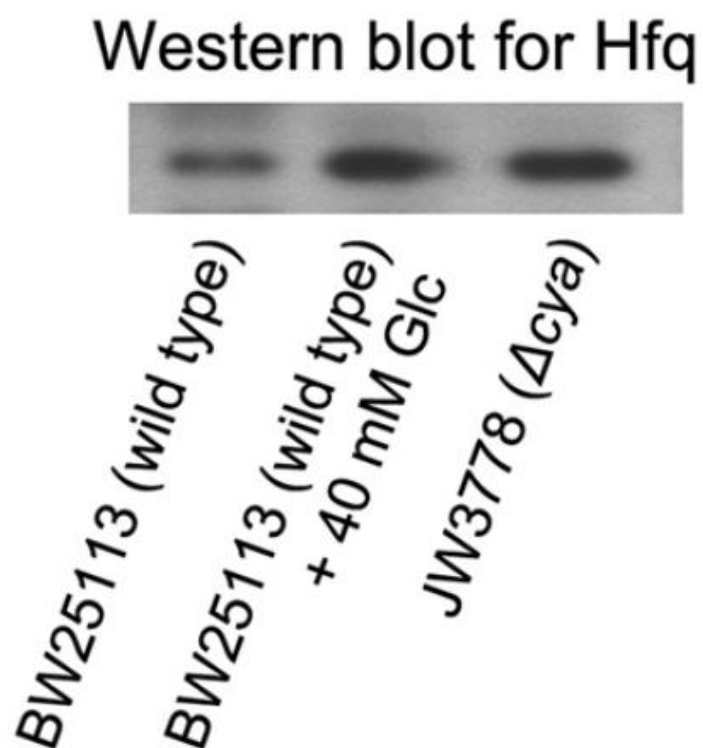
圖九、如同 *dsrA* 對 *ompA* mRNA 穩定性研究之方法，將大腸桿菌野生株(wt)與 *gcvB* 突變菌培養在 LB 培養液，生長至對數生長期時(O.D 0.3)，加入 Rifampin 停止培養，並在往後 8 個時間點(0、2、4、8、12、16、20、26 分鐘)分別抽取總 RNA 進行 Northern blot 分析 *ompA* mRNA 穩定性變化。



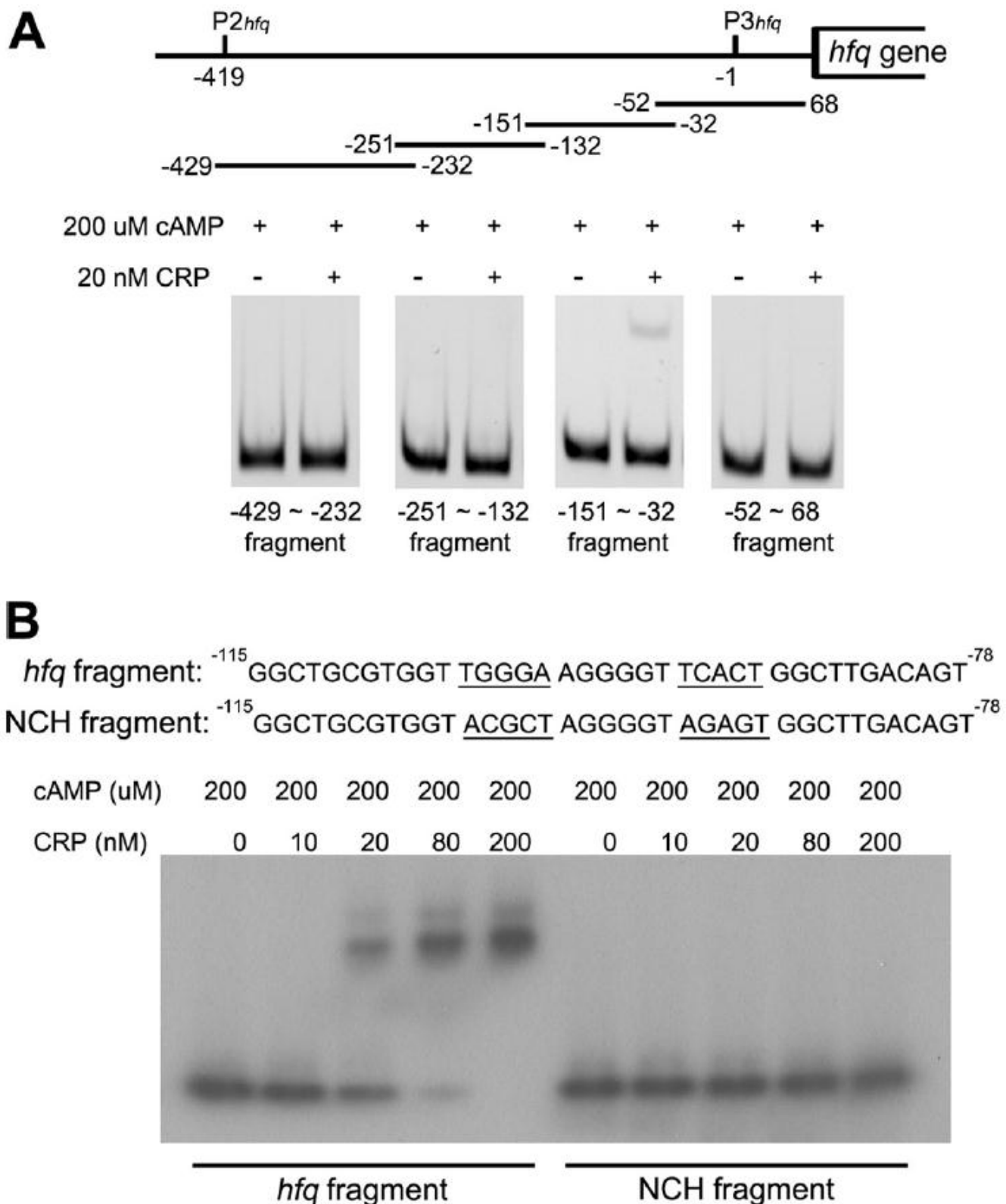
圖十、(A)大腸桿菌野生株(wt)與 *cya* 突變菌( $\Delta cya$ )分別培養在 LB 與 LB 外加 40mM 葡萄糖下，生長至早期對數生長期時(O.D 0.3)，停止培養並抽取總 RNA 進行 Northern blot，觀察 *hfq* mRNA 基因表現的變化。(B)internal control 23S 與 16S 電泳圖。



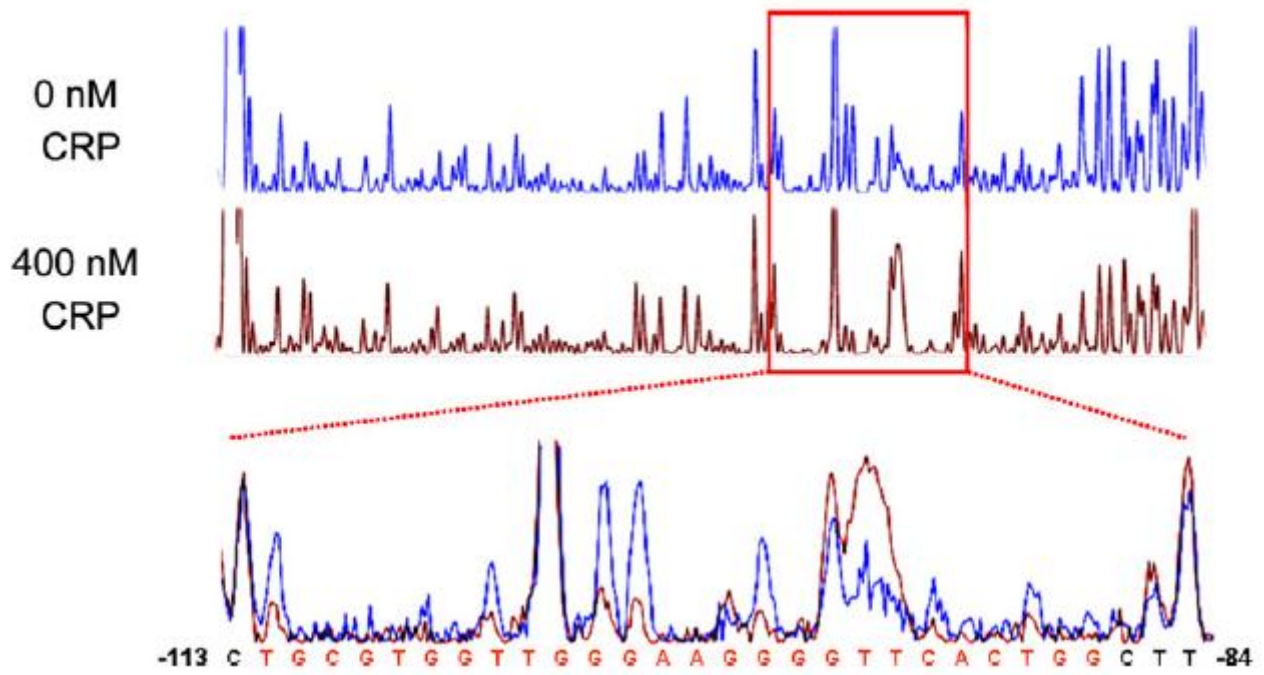
圖十一、real-time PCR 分析野生株及 *cya* 突變株 *hfq* 基因表現量。



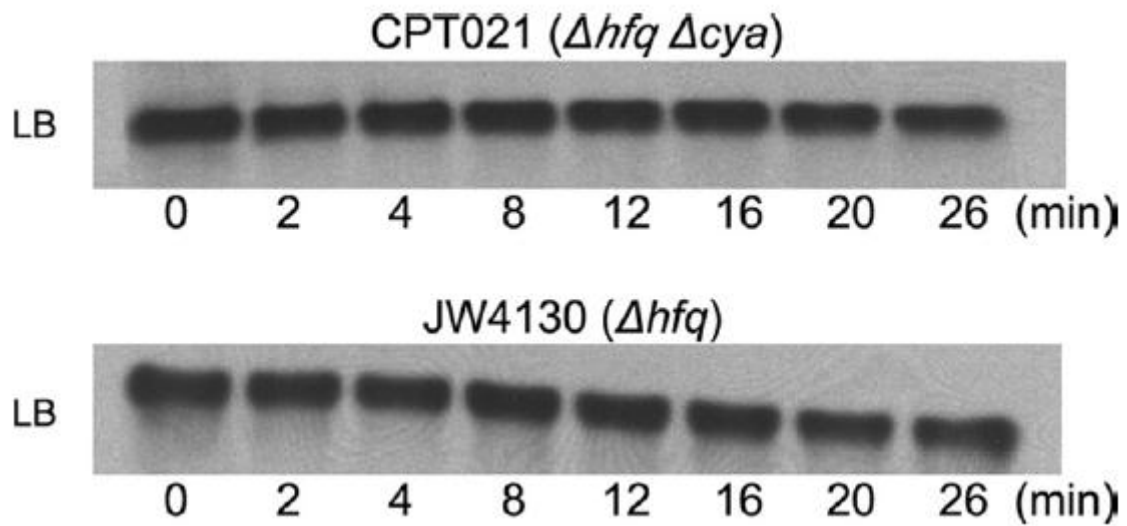
圖十二、以西方墨點法分析野生株、添加葡萄糖及 *cya* 突變株下 *hfq* 蛋白質表現量。



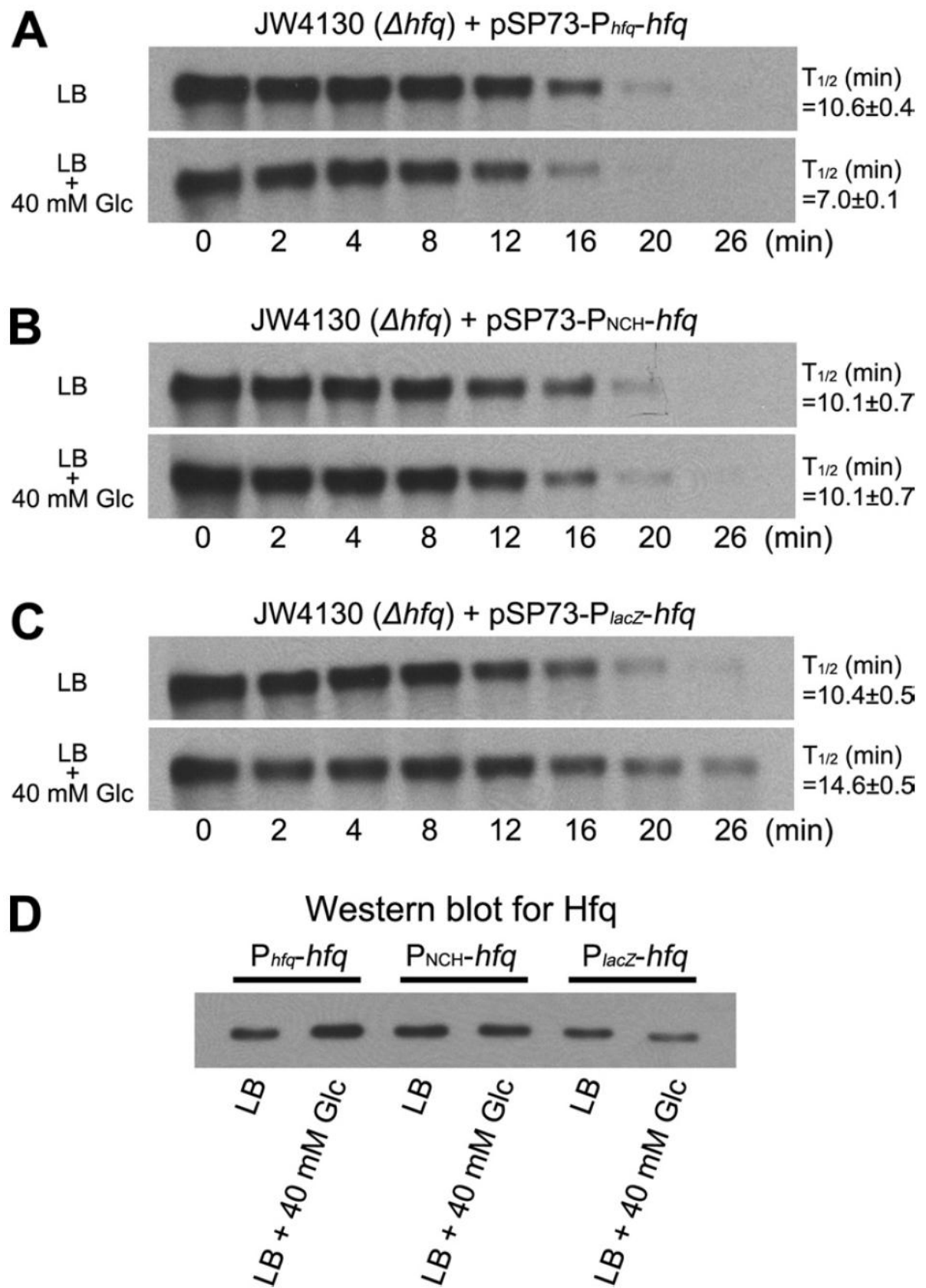
圖十三、利用 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 分析 *hfq* 啟動子是否包含 CRP 蛋白鍵結區域。NCH 為非 CRP 蛋白鍵結突變區域。



圖十四、利用 footprinting 分析 *hfq* 啟動子上 CRP 蛋白保護區域。



圖十五、在 *hfq* 基因及 *cya* 基因突變下，*ompA* mRNA 穩定性之分析。



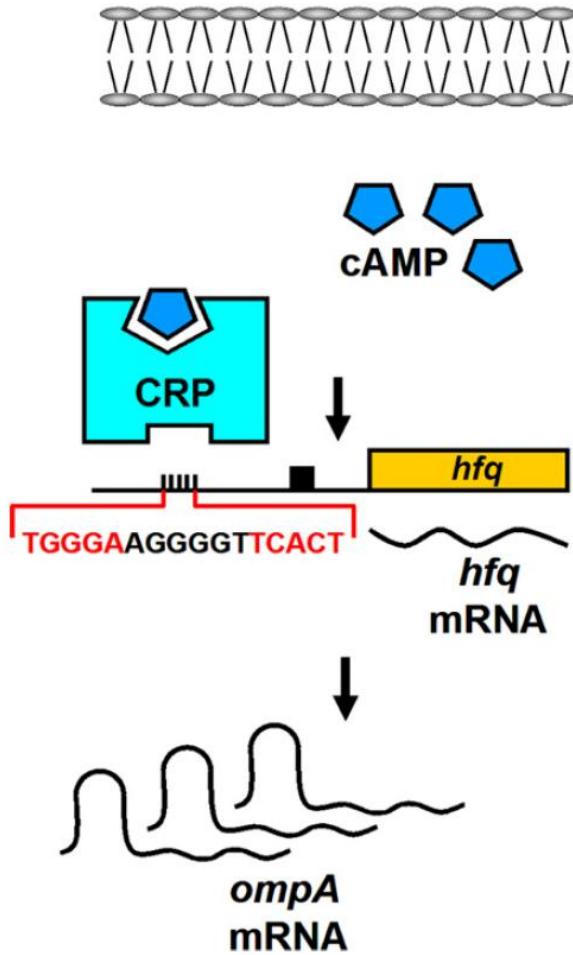
圖十六、*hfq* 基因在不同啟動子情況下(A)*hfq* 基因啟動子(B)非 CRP 蛋白鍵結啟動子(C)*lacZ* 基因啟動子對 *ompA* mRNA 穩定性之影響。(D)不同啟動子情況下 *hfq* 蛋白表現量。



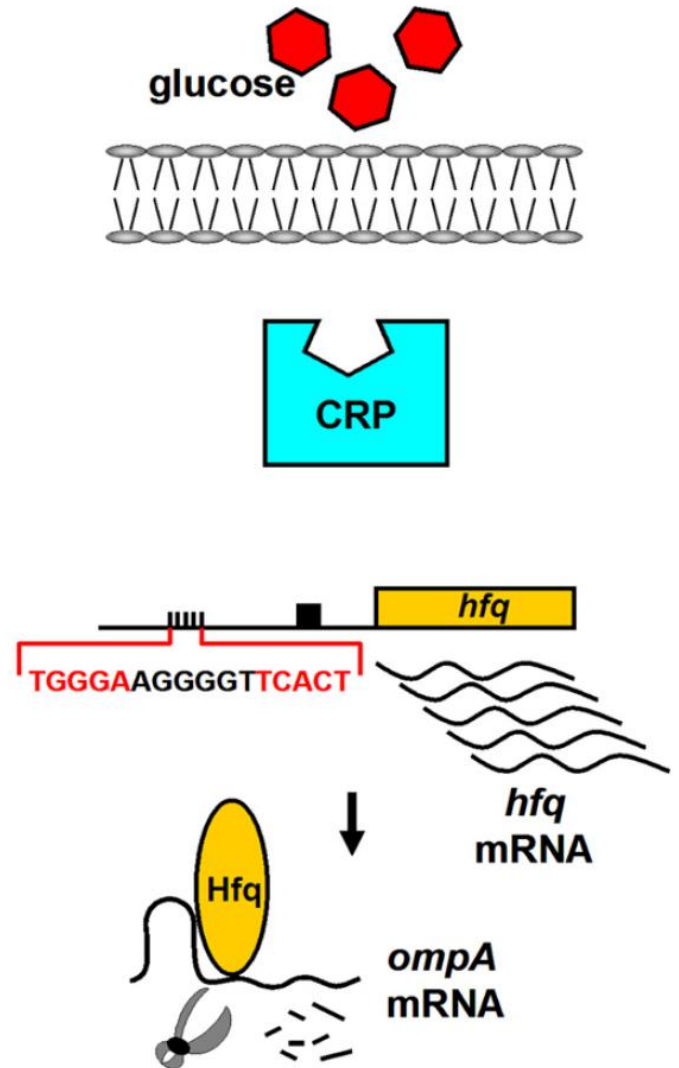


圖十七、在野生株、*hfq* 基因及 *cya* 基因突變下，*fur* mRNA 穩定性之分析。

**A Without glucose**



**B With glucose**



圖十八、cAMP 及 *hfq* 基因在葡萄糖存在與否情況下對 *ompA* mRNA 穩定性影響之模式。

## 参考文献

1. Adhya S. and S. Garges. (1990) Positive control. *J. Biol. Chem.* 265:10797-10800.
2. Argaman L., Hershberg R., Vogel J., Bejerano G., Wagner E. G., Margalit H., and Altuvia S. (2001) Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr. Biol.* 11:941-950
3. Belasco J. G. and G. Brawerman. 1993. Control of messenger RNA stability. p.53-70. Academic Press, Inc. The United States of America.
4. Berg O. G. and P. H. von Hippel. (1988) Selection of DNA binding site by regulatory proteins II. The binding specificity of cAMP receptor protein to recognition sites. *J. Mol. Biol.* 200:709-723.
5. Botsford J. L. and M. Drexler. (1978) CRP and the regulation of cAMP synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 165:47-56.
6. Botsford J. L. and J. G. Harman. (1992) Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol. Reviews.* 56:100-122.
7. Bouvet P. and Belasco J.G. (1992) Control of RNase E-mediated RNA degradation by 5'-terminal base pairing in *E. coli*. *Nature.* 360: 488-491.
8. Carpousis A.J., Van Houwe G., Ehretsmann C., Krisch H.M. (1994) Copurification of *E. coli* RNAase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell.* 76(5):889-900.
9. Casaregola S., Jacq A., Laoudj D., McGurk G., Margaron S., Tempete M., Norris V., and Holland I.B. (1992) Cloning and analysis of the entire *Escherichia coli* *ams* gene. *ams* is identical to *hmp1* and encodes a 114 kDa protein that migrates as a 180 kDa protein. *J. Mol. Biol.* 228: 30-40.
10. Cohen S. N.(1995) Surprises at the 3' end of prokaryotic RNA. *Cell.* 810: 829-832.
11. Cohen S.N. and McDowall K.J. (1997) RNase E: still a wonderfully mysterious enzyme. *Mol. Microbiol.* 23: 1099-1106.

12. Datta DB., Arden B., Henning U. ( 1977) Major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors. *J. Bacteriol.*131:821-9.
13. Diwa A., Bricker A.L., Jain C. and Belasco J.G. (2000) An evolutionarily conserved RNA stem-loop functions as a sensor that directs feedback regulation of RNase E gene expression. *Genes. Dev.* 14: 1249-1260.
14. Emory SA., Belasco JG. (1990) The ompA 5' untranslated RNA segment functions in *Escherichia coli* as a growth-rate-regulated mRNA stabilizer whose activity is unrelated to translational efficiency. *J. Bacteriol.*172:4472-81.
15. Emory SA., Bouvet P., Belasco JG. (1992) A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Genes. Dev.* 6:135-48.
16. Ghora B.K., and Apirion D. (1978) Structural analysis and *in vitro* processing to p5 rRNA of a 9S RNA molecule isolated from an *rne* mutant of *E. coli*. *Cell.* 15: 1055-1066.
17. Gibert I, Barbe J (1990). Cyclic AMP stimulates transcription of the structural gene of the outer-membrane protein OmpA of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 56:307-311.
18. Hajnsdorf E., and P. Regnier. (2000) Host factor Hfq of *Escherichia coli* stimulates elongation of poly(A) tails by poly(A) polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 : 1501-1505.
19. Hershberg R., Altuvia S., and Margalit H. (2003) A survey of small RNA- encoding genes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 31:1813-1820
20. Huang H., Liao J. and Cohen S.N. (1998) Poly(A)- and poly(U)-specific RNA 3' tail shortening by *E. coli* ribonuclease E. *Nature* 391: 99-102.
21. Jain, C. and Belasco J.G. (1995) RNase E autoregulates its synthesis by controlling the degradation rate of its own mRNA in *Escherichia coli*: unusual sensitivity of the *rne* transcript to RNase E activity. *Genes. Dev.* 9: 84-96.
22. Jain C., Deana A. and Belasco J.G. (2002) Consequences of RNase E scarcity in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 43: 1053-1064.

23. Kuo JT, Chang YJ, Tseng CP. (2003) Growth rate regulation of *lac* operon expression in *Escherichia coli* is cyclic AMP dependent. *FEBS Lett.* 553:397-402.
24. Li S. F., and J. A. DeMoss. (1988) Location of sequences in the *nar* promoter of *Escherichia coli* required for regulation by Fnr and NarL. *J. Biol. Chem.* 263: 13700-13705.
25. Li Z. and Deutscher M.P. (2002) RNase E plays an essential role in the maturation of *Escherichia coli* tRNA precursors. *RNA* 8: 97-109.
26. Miranda G, D. Schuppi I., Barrera, C. Hausherr, J.M. Sogo, H. Weber. (1997) Recognition of bacteriophage Q $\beta$  plus strand RNA as a template by Q $\beta$  replicase: Role of RNA interactions mediated by ribosomal proteins S1 and host factor. *J. Mol. Biol.* 267: 1089-1103.
27. Mova R. N., P. Green, K. Nakamuva, M. Inouye. (1981) Interaction of cAMP receptor protein with *ompA*, a gene for a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 128:186-192.
28. Narang A, Pilyugin SS. (2007) Bacterial gene regulation in diauxic and non-diauxic growth. *J Theor Biol.* 244:326-48.
29. Nilsson G, Belasco JG, Cohen SN, von Gabain A. (1984) Growth-rate dependent regulation of mRNA stability in *Escherichia coli*. *Nature.* 312:75-77.
30. Nilsson G, Lundberg U, von Gabain A. (1988) In vivo and in vitro identity of site specific cleavages in the 5' non-coding region of *ompA* and *bla* mRNA in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 7:2269-2275
31. Ono M. and Kuwano M. (1979) A conditional lethal mutation in an *Escherichia coli* strain with a longer chemical lifetime of messenger RNA. *J. Mol. Biol.* 129: 343-357.
32. Ow M.C. and Kushner S.R. (2002) Initiation of tRNA maturation by RNase E is essential for cell viability in *E. coli*. *Genes. Dev.* 16: 1102-1115.
33. Reddy P. S., A. Peterofsky, K. Mckenney. (1985) Translational efficiency of the *Escherichia coli* adenylate cyclase gene: mutating the UUG initiation codon to GUG or AUG results in increased gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:5656-5660.

34. Smith SG, Mahon V, Lambert MA, Fagan RP. (2007) A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol Lett.* 273:1-11.
35. Sugawara E, Nikaido H. (1992) Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267:2507-2511.
36. Sugawara E, Nikaido H. (1994) OmpA protein of *Escherichia coli* outer membrane occurs in open and closed channel forms. *J. Biol. Chem.* 269:17981-17987.
37. Su Q., D. Schuppli, H. C. T. Tsui, M.E. Winkler, H. Weber. (1997) Strongly reduced phage Q $\beta$  replication, but normal phage MS2 replication in an *Escherichia coli* K-12 mutant with inactivated Q $\beta$  host factor (*hfq*) gene. *Virology* 227: 211-214.
38. Udekwu KI, Darfeuille F, Vogel J, Reimegård J, Holmqvist E, Wagner EG. (2005) Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Genes. Dev.* 19:2355-2366
39. Ve ´ronique Douchin, Bohn C. and Bouloc P. (2006) Down-regulation of Porins by a Small RNA Bypasses the Essentiality of the Regulated Intramembrane Proteolysis Protease RseP in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 281: 12253–12259.
40. Vogel J., Bartels V., Tang T. H., Churakov G., Slagter-Jager, J. G., Huttenhofer A., and Wagner E. G. (2003) RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria. *Nucleic Acids Res.* 31: 6435-6443
41. Vytvytska O, Jakobsen JS, Balcunaite G, Andersen JS, Baccarini M, von Gabain A. (1998) Host factor I, Hfq, binds to *Escherichia coli ompA* mRNA in a growth rate-dependent fashion and regulates its stability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:14118-14123.
42. Wang Y. (2002) The Function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292:396–401
43. Wassarman K. M., Repoila F., Rosenow C., Storz G. and Gottesman S. (2001). Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes. Dev.* 15:1637–1651.
44. Yin J. Q. and Zhao R. C. (2007) Identifying expression of new small RNAs by microarrays. *Methods.* 43:123-130

45. Zianni M, Tessanne K, Merighi M, Laguna R, Tabita FR. (2006). Identification of the DNA bases of a DNase I footprint by the use of dye primer sequencing on an automated capillary DNA analysis instrument. *J Biomol Tech.* 17:103-113

## 國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

### 1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

#### ☒ 達成目標

☐ 未達成目標（請說明，以 100 字為限）

☐ 實驗失敗

☐ 因故實驗中斷

☐ 其他原因

說明：

### 2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：☒ 已發表 ☐ 未發表之文稿 ☐ 撰寫中 ☐ 無

專利：☐ 已獲得 ☐ 申請中 ☐ 無

技轉：☐ 已技轉 ☐ 洽談中 ☐ 無

其他：（以 100 字為限）

已發表一篇 SCI 文章，尚有兩篇文章投稿中。

### 3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

1. 此計畫成果於今年已發表一篇 SCI 期刊(Journal of Bacteriology, SCI 3.7)，尚有兩篇文章投稿中。

2. 大腸桿菌是蛋白質工程及藥物發展上最常使用的原核生物，其蛋白質及代謝產物表現量的多寡，則取決於轉錄及轉譯表現的效率，其中如何促進轉錄表現的穩定性是蛋白質表現量增加的因素之一，本計畫我們對基因轉錄表現穩定性提出更詳細的調控機制，此調控機制對於未來在發展蛋白質工程或藥物開發上可提升其表現量，並降低生產成本，達到最佳化的生產模式。