

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

計畫主持人：曾慶平

共同主持人：

計畫參與人員：陳煜沛、林校賢、徐其正

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

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
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

執行單位：國立交通大學生物科技學系（所）

中華民國 99 年 5 月 30 日

中文摘要

大腸桿菌之 small RNA(sRNA)藉由序列互補的方式，與 Hfq 協同結合到 messenger RNA 上，可調控 messenger RNAs 穩定性與轉譯。先前研究指出 cAMP-CRP 活化一些 sRNA 基因表現，例如 Spot42 與 RyeE，並藉由結合到 sRNA promoter 區域來調控。cAMP-CRP 在大腸桿菌又扮演 transcriptional activator 角色，藉由結合到 promoter，增加與 RNA polymerase 之間的交互作用，活化基因的表現。

本研究將大腸桿菌野生菌株與 *cya* 基因突變菌株，分別培養在 LB 與 LB 加 glucose 培養液，結果發現當 glucose 存在或 *cya* 基因突變下，*ompA* mRNA 的表現量明顯下降，結果顯示 cAMP 可調控 *ompA* 基因的表現，我們更進一步分析 *ompA* mRNA 在 early log-phase 與 log-phase 的穩定性，發現當 cAMP 不存在時，*ompA* mRNA 穩定性下降快速，結果說明了 cAMP 可增加 *ompA* mRNA 的穩定性。

迄今 cAMP 影響 mRNA 穩定性的機制並不清楚，我們推測 *ompA* mRNA 在 post transcription 層次上的穩定性並非藉由 cAMP 直接的影響。根據 northern 實驗分析野生菌株與 *cya* 突變菌株，結果顯示 *gcvB*、*ryhA*、*dsrA*、*hfq* 基因表現受 cAMP 所影響。但是 *rne* 基因的表現卻不受 cAMP 的影響。經由這樣的實驗結果，排除了 cAMP-CRP 是透過 Rnase E 調控 *ompA* mRNA 穩定性，未來一年的研究，我們將釐清 cAMP-CRP 是如何經由 Hfq 與 sRNA 去調控 *ompA* mRNA 穩定性。

關鍵詞: *ompA* mRNA、cAMP、CRP 蛋白質、mRNA 穩定性

ABSTRACT

In *E. coli*, small RNAs primarily serve as regulators with Hfq to modulate messenger RNA stability and translation efficiency by base-pairing with target messenger RNAs. Previous studies have reported that cAMP-CRP regulates small RNA expression by modifying promoter activity, such as *spot42* and *ryeE* gene. As far as we know, the cAMP-CRP acts as a transcriptional activator in *E. coli*, by binding to promoters and enhancing the interaction with RNA polymerase.

In this research, *E. coli* wild-type and *cya* mutant strains were grown in LB and LB+Glc, respectively. We found that the amount of *ompA* mRNA was down-regulated when glucose was added or *cya* was mutated. These results suggested that cAMP played a regulatory role on *ompA* expression. Furthermore, we analyzed *ompA* mRNA stability in early log-phase and log-phase. When cAMP was absent, the *ompA* mRNA was degraded rapidly. This result indicated that the stability of *ompA* mRNA was elevated by cAMP.

So far, the mechanism of cAMP regulation of RNA stability is not clear. In this study, we propose that post-transcription of *ompA* mRNA was not directly affected by cAMP. According to the northern blot analysis of wild type and *cya* mutant, the results showed that the expression of *gcvB*, *ryhA*, *dsrA* and *hfq* was affected by *cya*. However, *rne* was not found to regulate by cAMP. Based on these results, We'll examine Hfq and sRNAs targeting to *ompA* mRNA and discovered which might indirectly participate in the regulation.

Key words: *ompA*, cAMP, CRP, post-transcription regulation

前言與研究目的

在大腸桿菌外膜蛋白質家族中，OmpA 為主要蛋白質，功能是維持大腸桿菌外膜的穩定性(Wang, 2002)。先前研究指出 *ompA* 基因的表現受大腸桿菌轉錄因子 cAMP-CRP 所活化(Gibert and Barbe, 1990)，而 cAMP-CRP 已知在大腸桿菌基因轉錄層次上扮演重要角色，可調控超過百餘基因，藉由結合到基因啟動子鄰近的區域，來增強或抑制該基因的表現(Busby *et al.*, 1999)。

Small noncoding RNA(sRNA)分子發現在微生物中，由一段很短的 RNA 序列所組成，它不會轉譯任何蛋白質，主要功能為調控 mRNA 的轉譯與穩定性(Gottesman, 2004)。目前在大腸桿菌中已經有超過 50 個以上的 sRNA 被發現與鑑定，大多數的 small RNA 藉由序列互補的方式與標定的 mRNA 作結合，影響該 mRNA 的轉譯或穩定性。先前已有文獻報導 small RNA 可調控基因，例如在細胞內 Fe 缺乏時，sRNA RyhB 會降低 Fe 儲存蛋白質基因的表現(Mass'e and Gottesman, 2002)。當細胞內葡萄糖增加時，Spot 42 sRNA 序列與 *galK* mRNA 互補，阻擋核糖體結合位置，間接增加 GalE 與 GalK 蛋白質的比例(Moller *et al.*, 2002)。而 sRNA 基因表現本身也受到調控，在不同環境條件下，sRNA 在細胞中的量也會有所不同，例如當大腸桿菌生長到穩定後期(stationary phase)時，sRNA MicA 會大量的被表現，影響 OmpA 蛋白質的表現(Rasmussen *et al.*, 2005)。

以往研究結果認為 cAMP 為細胞內轉錄因子 CRP 蛋白的輔因子(cofactor)，與 CRP 形成 cAMP-CRP 複合物，在轉錄的層次上，可活化或抑制基因的表現，此外 cAMP-CRP 複合物藉由結合到 sRNA 啟動子區域活化一些 sRNA 基因表現，例如：Spot42、RyeE(Johansen *et al.*, 2008)。而 sRNA 在細胞內又與 Hfq 共同作用，扮演著調控 post-transcription 層次上 mRNA 的穩定性或是轉譯。所以我們認為 cAMP 在 mRNA post-transcription 層次上也具有間接調控的功能，作用機制可能是藉由影響 sRNA 或是 Hfq 所造成。此研究中我們將焦點擺在探討 post-transcription 層次上 *ompA* mRNA 的穩定性，我們發現 cAMP 存在下，提升 *ompA* mRNA 的穩定性，但此現象可能不是 cAMP 直接調控 *ompA* mRNA 的穩定性，而是 cAMP 間接影響 sRNA 或是 Hfq 而造成。因此希望能建立模式以了解 cAMP 影響 *ompA* mRNA 穩定性相關的機制，進一步了解大腸桿菌生理與基因調控的關係。

研究方法

a. 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 λ 噬菌體來進行大腸桿菌內基因體重組。

b. β -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 μ L/mL β -mercaptoethanol，50 μ L chloroform 及 25 μ 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 Na_2CO_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 OD_{420} 及 OD_{550} 吸光值。經由公式計算即可得 β -galactosidase 的酵素活性。

c. 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°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°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°C 冰箱保存。

d. 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°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°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。

e. 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。

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 (Δcya)，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 (見圖一與圖二)。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 β -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 Δcya 突變株及 Δcrp 突變株來探討 *rne* 基因表現是否受 cAMP 和 CRP 所調控。結果顯示， Δcya 突變株受葡萄糖抑制現象消失，而 Δcrp 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)。

三. 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(Δcya)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(見圖四)。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。

四. 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。

參考文獻

1. Busby, S. and R.H. Ebright, *Transcription activation by catabolite activator protein (CAP)*. J Mol Biol, 1999. **293**(2): p. 199-213.
2. Gibert, I. and J. Barbe, *Cyclic AMP stimulates transcription of the structural gene of the outer-membrane protein OmpA of Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 1990. **56**(3): p. 307-11.
3. Johansen, J., et al., *Down-regulation of outer membrane proteins by noncoding RNAs: unraveling the cAMP-CRP- and sigmaE-dependent CyaR-ompX regulatory case*. J Mol Biol, 2008. **383**(1): p. 1-9.
4. Masse, E. and S. Gottesman, *A small RNA regulates the expression of genes involved in iron*

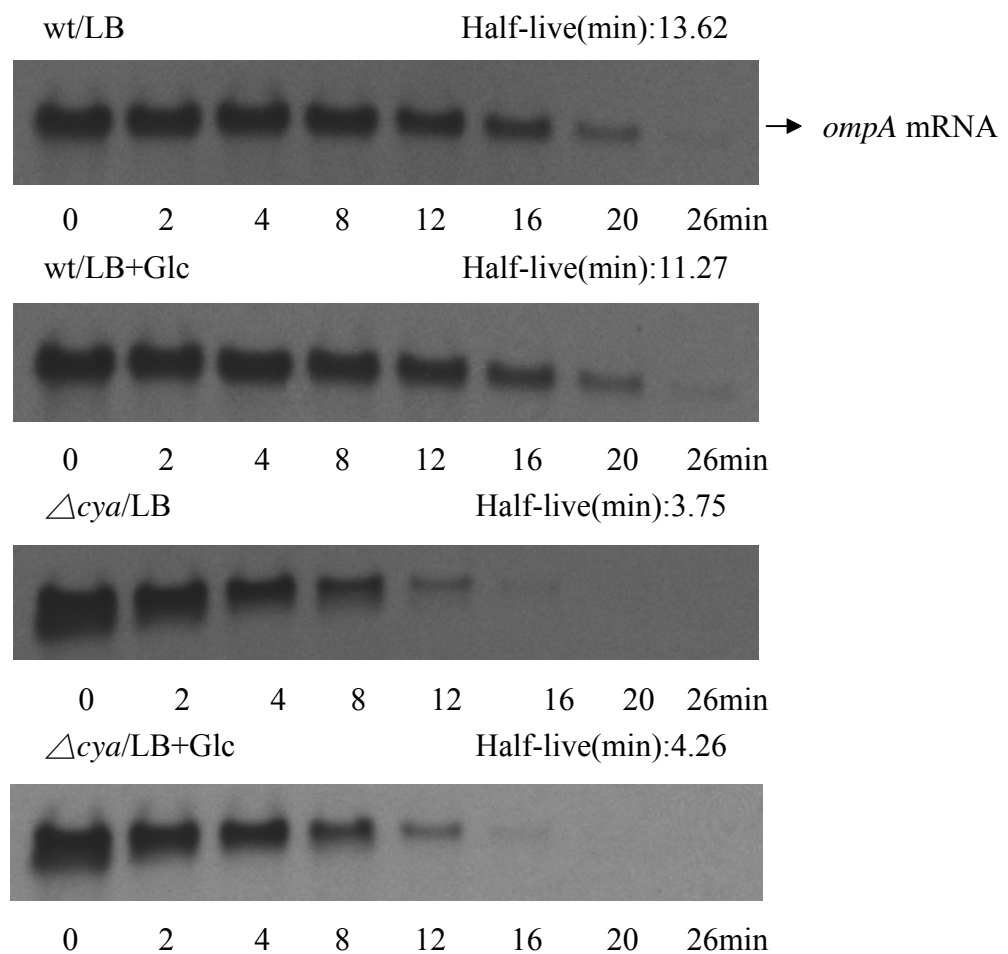
metabolism in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4620-5.

5. Moller, T., et al., *Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the E. coli galactose operon*. Genes Dev, 2002. **16**(13): p. 1696-706.

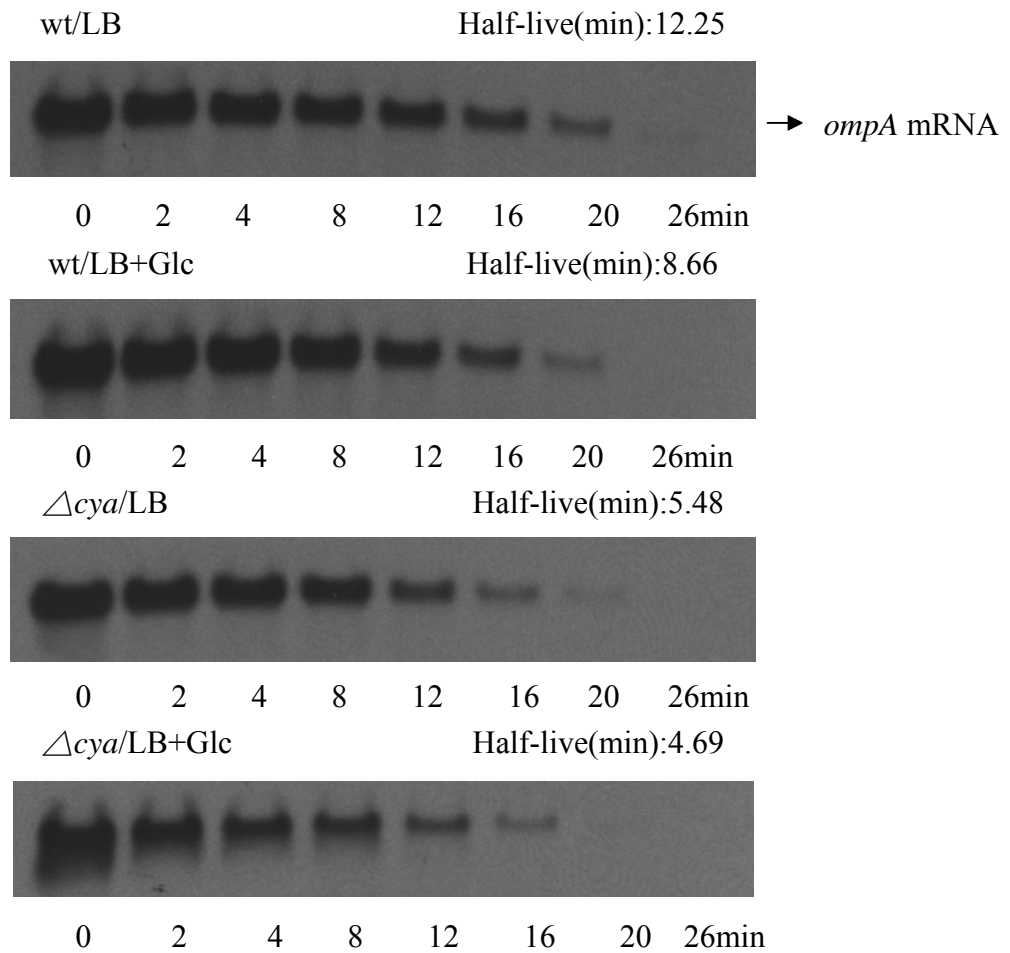
6. Rasmussen, A.A., et al., *Regulation of ompA mRNA stability: the role of a small regulatory RNA in growth phase-dependent control*. Mol Microbiol, 2005. **58**(5): p. 1421-9.

7. Wang, Y., *The function of OmpA in Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **292**(2): p. 396-401.

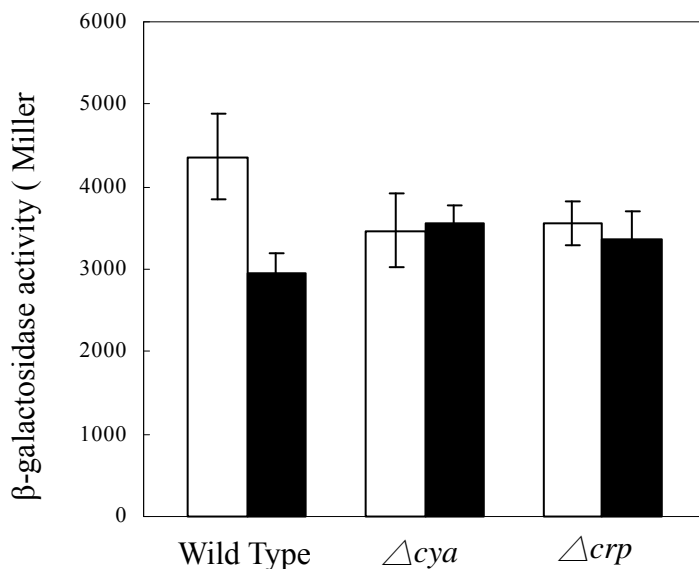
附圖：



圖一、大腸桿菌野生株(wt)與 *cya* 突變菌(Δcya)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。

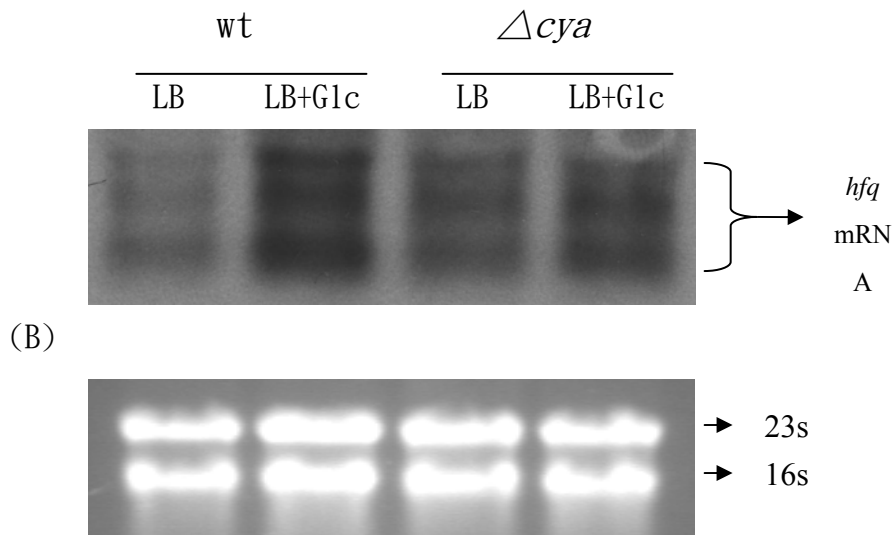


圖二、大腸桿菌野生株(wt)與 *cya* 突變菌(Δcya)分別培養在 LB 與 LB 外加 40mM 葡萄糖下，生長至對數生長期時(O.D 0.5)，加入 Rifampin 停止培養，並在往後 8 個時間點(0、2、4、8、12、16、20、26 分鐘)分別抽取總 RNA 進行 Northern blot 分析 *ompA* mRNA 穩定性變化。



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 β -galactosidase 活性。□ LB；■ LB+40mM 葡萄糖。

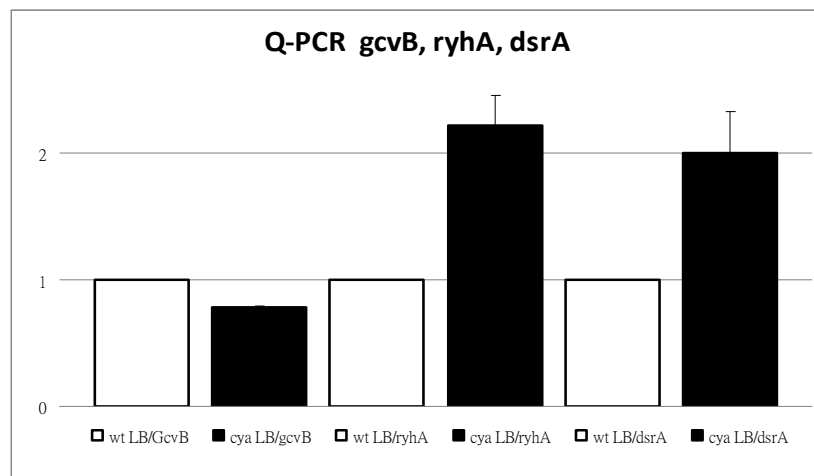
(A)



(B)



圖四、(A)大腸桿菌野生株(wt)與 *cya* 突變菌(Δcya)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)。