

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

碳源、生長速率及迫切反應對大腸桿菌內能量狀態與 RNase  
E 基因表現之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2311-B-009-004-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：國立交通大學生物科技學系(所)

計畫主持人：曾慶平

計畫參與人員：楊冀冬 朱翊維

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 13 日

## 一、摘要

不同環境下大腸桿菌利用碳源代謝產生能量途徑與生長速率將隨之改變，本計畫中發現，在不同碳源時，細胞生長速率改變，相對地代謝途徑上與 ATP 合成相關基因的表現量也發生變化 (*pgk*、*pyk*、*ackA*、*sucCD*、*atpI*)。由於 DNA 超螺旋結構受 ATP/ADP 比例所調控，進一步的研究發現，因 ATP/ADP 比例與 *gyrase* 表現量受到調控而上升，因此促使 DNA 超螺旋結構較生長速率緩慢時來得緊密。此外在貧瘠培養中大腸桿菌亦透過迫切反應來調控細胞生長速率，而 ppGpp 為大腸桿菌在貧瘠環境下的重要調控因子，實驗結果顯示 ppGpp 並不影響大腸桿菌體內 ATP/ADP 比例。

另外因細胞內能量狀態與 RNA 表現及降解息息相關，改變碳源、生長速率以及貧瘠培養以觀察外在營養源對 *rne* 基因的調控行為，結果發現在相同碳源條件下，生長速率快之菌體表現較多 RNase E。而經由貧瘠培養亦可觀察到 ppGpp 對 RNase E 也有影響。

**關鍵詞：**大腸桿菌、碳源、生長速率、迫切反應、ppGpp、ATP 合成、*rne* 基因

## Abstract

Cellular energy state and gene expression in *Escherichia coli* vary with nutrient, starvation and cell growth rate. To understand the expression of ATP generating genes in different carbon sources, we individually used acetate, glucose, glycerol or succinate as a sole carbon and energy source. These results showed that the expression of ATP generating genes in metabolic pathway varied with carbon sources and the ATP concentrations increased with cell growth rate. Compared with the wild-type strain and *relA spoT* double mutant, the growth rate and ATP yields were changed, but ATP/ADP ratio remained at the same level and DNA supercoiling was dependent on the ATP/ADP ratio.

In this study, we examined the effects of carbon sources, growth rate and starvation on *rne* gene expression. The results reveal that carbon source and growth rate participate in modulating *rne* transcripts. The *rne* mRNA was increased in minimal medium with the same carbon source when the growth rate was fast.

Under starvation conditions, we observed that *rne* transcripts dramatically degraded. Moreover, nutrient deprivation down-regulated RNase E concentration by global regulator (p)ppGpp. Indirect evidence suggests that the elongation of mRNA half-life resulted from starvation adjust the cell in response to the environment changes.

**Key words :** *E. coli*, growth rate, ppGpp, ATP synthesis, RNase E,

## 二、研究目的與方向

大腸桿菌生長會受環境所影響，當在養分充足及適宜的環境中生長快速且旺盛，相反地當生長在營養源較貧乏或不適宜的環境中，生長則變得遲緩。過去的研究發現不同碳源（包含碳源缺乏所引起的迫切反應）、生長速率會改變細胞內能量狀態、DNA 超螺旋結構及 mRNA 穩定性。為了適應較貧乏的環境，大腸桿菌會利用迫切反應啟動 ppGpp 來調控基因的表現，同時細胞內的供能者 (ATP)，亦隨之改變。因此，我們將研究碳源、生長速率、迫切反應如何調控大腸桿菌細胞內與能量狀態、DNA 結構及 ATP 合成相關基因表現，並進一步探討與 RNA 降解有關之 *rne* 基因如何受上述相關因子調控。研究方向將分為下面部分：

1. 碳源與生長速率對能量之關係：分別偵測不同碳源下，所導致不同生長速率對五種ATP合成酵素基因 (*pgk*、*pyk*、*ack*、*sucCD*、*atp*) 表現及變化。
2. 迫切反應對細胞內能量之關係：不同碳源下，迫切反應透過ppGpp 對能量狀態的影響。
3. 碳源與生長速率對大腸桿菌DNA 超螺旋結構之影響：探討碳源、生長速率對DNA 超螺旋結構相關基因 (*gyrA*、*gyrB*、*topA*) 的影響。
4. 環境因子與迫切反應對RNase E 基因表現與調控之影響：偵測不同碳源、生長速率以及飢餓狀態對RNase E 蛋白質表現量與*rne* 基因表現之影響，

### 三、結果

#### 1. 碳源與生長速率對能量之關係

微生物可利用不同的受質來獲取能量，在不同的環境下大腸桿菌利用碳源的代謝產能途徑也會改變，同時亦造成不同的生長速率。本實驗以四種不同碳源（醋酸、葡萄糖、甘油與琥珀酸）為培養基，探討大腸桿菌分別在 2.25 mM 與 40 mM 不同碳源濃度下代謝途徑上與 ATP 生合成相關酵素之基因表現。

比較高低不同濃度為碳源時，在高濃度葡萄糖(40 mM)為碳源下，觀察到圖一中 *pgk*、*pyk* 與 *ackA* 等基因具有降解物阻遏 (catabolic repression) 現象。同時也觀察到糖解作用中 *pgk* 與 *pyk* 基因以及發酵作用中 *ackA* 基因，其表現量皆以甘油為碳源時最高。以醋酸為生長基質時 *sucCD* 基因大量表現，推測以醋酸為碳源時是經由 TCA cycle 與電子傳遞鏈代謝途徑而獲得 ATP；以琥珀酸為碳源時，低濃度培養下的 *sucCD* 基因表現則遠高於高濃度培養，推測高濃度琥珀酸會抑制 TCA cycle 內相關代謝基因，使得在高濃度琥珀酸的供應下菌體 ATP 來源以糖解作用為主，可由圖一中 *pgk* 與 *pyk* 基因表現大於低濃度琥珀酸得知，而低濃度琥珀酸的培養環境下 *sucCD* 表現則不受抑制，推測此時 ATP 的主要來源也是經由 TCA cycle 與電子傳遞鏈獲得。

#### 2. 迫切反應對細胞內能量之關係

ppGpp 為細菌體內重要調控因子 (global regulator)，在營養貧乏時會引發細胞一連串迫切反應，包括抑制 DNA、tRNA 與 rRNA 的合成，並減少蛋白質生成與多肽鏈延長。ppGpp 含量在大腸桿菌體內隨生長速率下降而上升 (Cashel *et al.*, 1996)，為了研究 ppGpp 是否會影響細胞體內的能量狀態，首先構築  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株，並與野生株分別同時培養於 2.25 mM 醋酸與葡萄糖為碳源之基礎培養基中，當 OD<sub>600</sub> 到達 0.4~0.45 時，以 5,000 rpm 轉速離心 10 分鐘收集細胞，去除上清液後立即進行碳源貧乏 (starvation) 培養，只添加 5 ml 不含任何碳源之基礎培養基，於 37°C 培養 30 分鐘後，再以 luciferase 反應法測得細胞內 ATP 與 ADP 含量 (Ohlsen and Gralla, 1992)。

由表一中以醋酸與葡萄糖分別為碳源時，比較大腸桿菌野生株與  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株細胞內能量狀態之變化，結果顯示兩者細胞內 ATP/ADP 比例並無明顯差異，在以葡萄糖為碳源時 ATP/ADP 比例分別為 5.4 與 5.3，而以醋酸為碳源時 ATP/ADP 比例分別為 3.5 與 3.8，結果可推測 ppGpp 對大腸桿菌 ATP/ADP 比例並無顯著影響。此外野生株菌體中 ATP 含量在進行碳源貧乏培養時，以醋酸與葡萄糖為碳源時的 ATP 含量分別為 7.1 與 68.3 pmol/10<sup>7</sup> cell，相差約 10 倍，此結果與表一中野生株以醋酸與葡萄糖為生長基質未進行碳源貧乏培養時的數值相似。值得注意的是  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株在醋酸與葡萄糖為碳源時，ATP 含量分別為 47.3 與 49.3 pmol/10<sup>7</sup> cell，此結果顯示當缺乏 ppGpp

時 ATP/ADP 比例雖無明顯變化，但會使得ATP 與 ADP含量改變，表示同時缺乏碳源與 ppGpp 對菌體生合成反應之間有關。

### 3. 碳源與生長速率對大腸桿菌 DNA 超螺旋結構之影響

由於 topoisomerase (*gyrA*、*gyrB*、*topA*) 會改變 DNA 超螺旋結構，本論文進一步探討在連續式培養下，不同生長速率與碳源對大腸桿菌 topoisomerase 基因的影響，由圖二 A 北方墨點結果經定量軟體分析數值化得圖二 B。由圖二可知在生長速率較快時，以醋酸與葡萄糖為碳源時 *gyrA*、*gyrB* 與 *topA* 基因的表現都較高，證明生長速率較快會使 topoisomerase 基因表現上升，此結果也符合在連續式培養下生長速率較快時，有較高的 ATP/ADP 比例與較緊密的 DNA 超螺旋結構。由這些結果可推論碳源與生長速率會影響 topoisomerase 基因的表現，因 topoisomerase 為調控 DNA 超螺旋結構所需，使得 DNA 超螺旋結構在不同的碳源與生長速率下也有所差異。

### 4. 環境因子與迫切反應對 RNase E 基因表現與調控之影響

#### (a) 生長速率對於含5' -UTR *rne-lacZ*表現之影響

過去的研究顯示了生長速率對 *rne* 基因表現有所影響。然而以 Northern blot 觀察到 *rne* mRNA 量的變化，是由調控 *rne* 啟動子以及 RNA 穩定度兩者綜合呈現的結果。為區別環境因子對 *rne* 啟動子的調控關係，構築含 5'-UTR 的 *rne-lacZ* reporter fusion 以偵測 *rne* 啟動子的活性。為了確定生長速率對 *rne-lacZ* 表現的影響，我們進一步利用化學恆定連續式培養法培養大腸桿菌。以 2.25 mM 葡萄糖為碳源，在 2、4、8、12、16 及 20 mL/min 的速率添加培養液，此時菌體所對應的生長速率分別為 0.12、0.24、0.48、0.72、0.96 及 1.2 ( $\mu$ )，待菌體達到穩定狀態後收取菌液並測其  $\beta$ -galactosidase 活性。由圖三可看出於生長速率為 0.12 ( $\mu$ ) 時 *rne-lacZ* 表現量最高，隨著生長速率的增加，*rne-lacZ* 表現量則快速減少，當生長速率為 0.72、0.96 及 1.2 ( $\mu$ ) 時 *rne-lacZ* 表現量達到最低且不再隨生長速率增加而減少，*rne-lacZ* 表現量高低之間相差約 3 倍。由此可知 *rne-lacZ* 表現量隨生長速率上升而下降，此結果與圖二相符，因此可知 *rne* 基因的表現是會受生長速率所調控。

#### (b) 不同碳源、生長速率對RNase E 蛋白質表現量之影響

將大腸桿菌野生株N3433以基礎培養液進行連續式培養，利用2.25 mM葡萄糖或醋酸作為限制性碳源，過程中藉著控制培養液流速(即限制性碳源供給之多寡)4 ml/min以及16 ml/min，使菌體以生長速率 ( $\mu$ ) 為0.24 h<sup>-1</sup>與0.96 h<sup>-1</sup>進行培養。待菌穩定生長至所需速率時，收取菌體。在取得蛋白質樣品後，各取15 $\mu$ g蛋白質以中研院林淑端教授所提供之單株抗體，進行西方墨點分析。如圖四A所示，在相同碳源條件下，生長速率快之菌體表現較多RNase E，以葡萄糖培養時兩者相差20%，利用醋酸培養時則存在著30%的差異(圖四B)。若以相同生長速率為討論基點，發現利用醋酸為碳源的菌體表現略高的RNase E蛋白，生長速率低時相差約20%，生長速率高時相差約30%。

#### (C) ppGpp 對 *rne* 基因與 RNase E 蛋白質表現量之影響

為探討在貧瘠培養中(p)ppGpp與*rne* transcripts之關係，利用P1嗜菌體以大腸桿菌野生株N3433作為研究背景株，構築出(p)ppGpp<sup>0</sup>之菌株NAT，藉此觀察(p)ppGpp在貧瘠反

應中對 *rne* transcripts 的影響。

菌株 NAT 因調控生長之 *relA*、*spoT* 基因突變不具作用，因此幾乎無法在基礎培養液中生長。在此利用 LB 培養液培養 N3433 與 NAT，待對數生長期時各取出部份菌液進行飢餓培養。30 分鐘後，收取細胞總 RNA，進行北方墨點分析。

在圖五A可發現，以LB為培養液時，野生株 (N3433) 在正常生長與飢餓培養之下，*rne* 之 mRNA 表現與突變株有相同的趨勢，但是在飢餓培養 30 分鐘後，菌體中所偵測到的 *rne* mRNA 僅存原來的 15%，兩者相差約 7 倍；在正常生長條件下，(p)ppGpp<sup>0</sup> 突變株之 *rne* mRNA 為野生株的 50%，經飢餓培養後約只有 7%，兩者皆存在 7 倍的差異。

以同樣的培養條件與菌株。在收取菌體後，進行西方墨點分析偵測菌體內 RNase E 濃度。由圖五 B 發現當野生株經過飢餓培養後，菌體內 RNase E 蛋白質濃度劇烈下降，只存在原有的 9%；正常生長的突變株 NAT 表現原有的 75%，經貧瘠培養後 RNase E 濃度上升至 102%。

這之間的差異可能是在野生株中大量累積的 ppGpp 減緩或停止了蛋白質的合成，並活化蛋白水解酶將部份蛋白質水解以供胺基酸之回收再利用。而在突變株中，因 ppGpp 缺乏，並不發生迫切反應以求生存，在飢餓培養狀態下仍消耗能量將 *rne* 之 mRNA 轉譯成蛋白。

#### 四、討論

##### 1. 碳源與生長速率對能量之關係

以醋酸為生長基質時，醋酸進入細胞後轉變成 acetyl-Co A，接著進入 glyoxylate shunt 與 TCA cycle 等代謝途徑 (Cozzone, 1998)，本實驗觀察到 *sucCD* 表現量在以醋酸為碳源時最高 (圖一)，可知以醋酸為碳源時是以 TCA cycle 為主要產能之代謝途徑。與醋酸代謝有關的基因通常會受葡萄糖抑制，這是因為醋酸與葡萄糖兩種碳源會進行不同的代謝路徑，使得不同代謝路徑的基因被活化，特別是與脂肪酸代謝相關的基因，這些基因大部分會被醋酸活化而受葡萄糖抑制 (Cozzone, 1998)。反之與生化合成有關之基因，例如胺基酸與核酸合成相關基因表現則在醋酸培養時降低，此外與細胞結構、DNA 複製、轉錄及轉譯之基因也以醋酸為碳源時表現量較低 (Oh *et al.*, 2002)，因此醋酸培養時菌體之生長速率降低。本實驗也指出以醋酸為碳源時，在代謝途徑上與 ATP 合成有關酵素之基因以 *pgk*、*pyk*、*sucCD* 及 *atpI* 等基因表現量都比以葡萄糖為碳源時高 (圖一)。以葡萄糖作為生長基質時，觀察到 *pgk*、*pyk* 與 *ackA* 等基因皆有降解物阻遏的現象，尤其在高濃度的葡萄糖供應培養下，*pyk* 與 *ackA* 等基因受葡萄糖抑制的程度最大。葡萄糖所引起的降解物阻遏現象是指該代謝物降低了細胞中 cAMP 含量，cAMP 透過與 CRP (cAMP receptor protein) 結合形成 cAMP-CRP 複合物，進而影響 RNA 聚合酶的活性以阻止基因的轉錄 (Ishizuka *et al.*, 1994)。

甘油除了被利用為合成細胞的基本成分外，有氧環境下可進行氧化作用生成能量。當以甘油為碳源時，利用 glycerol facilitator 經由 glycerol kinase 將甘油磷酸化轉換為 glycerol-3-phosphate 進入細胞內代謝循環 (Voegelé *et al.*, 1993)，當甘油濃度較低時，細胞會限制甘油的被動運輸而較不利細胞生長 (Richey and Lin, 1972)，若生長基質含有葡萄糖時會抑制 glycerol facilitator (Sanno *et al.*, 1968)。glycerol-3-phosphate 進入細胞後，可作為磷脂類合成之前驅物，或是形成 glyceraldehyde-3-phosphate 進入糖解作用。由圖一可知

*pgk* 與 *pyk* 基因的表現在以甘油為生長基質時表現量最高，尤其當甘油濃度較高時表現更為上升，表示以甘油為碳源進入細胞後會進行糖解作用，接著進入 TCA cycle 與電子傳遞鏈，因此觀察到在這些代謝途徑上產生 ATP 基因都明顯上升，此外也發現發酵作用中 *ackA* 基因表現也以甘油為碳源時表現量較高，推測是因甘油為碳源時進入糖解作用後大量生成 pyruvate，造成 pyruvate 累積，使得 pyruvate 除了轉變成 acetyl-CoA 進入 TCA cycle 代謝外，另外會進行混合酸發酵 (mixed acid fermentation)，將 acetyl-CoA 轉變成 acetyl-phosphate，接著由 acetate kinase (*ackA*) 生成醋酸，所合成的醋酸在有氧狀況下又再次轉變為 acetyl-CoA 進入 TCA cycle 中繼續代謝，因此 *ackA* 基因在甘油為碳源時表現量上升 (Cashel *et al.*, 1996)。

以琥珀酸為碳源時，大腸桿菌利用 C4-dicarboxylate transporter 將琥珀酸運送進入細胞內，可直接進入 TCA cycle 進行代謝利用，而 TCA cycle 進行速率會受 acetyl-CoA 與 oxaloacetate 結合產生 citrate 此步驟所調控，意指 acetyl-CoA 與 oxaloacetate 濃度會影響 TCA cycle 的速率 (Cozzone, 1998)。當高濃度琥珀酸為碳源時，*sucCD* 基因並沒有預期中表現量上升，反而受到抑制而表現下降，推測琥珀酸進入在 TCA cycle 後，造成 oxaloacetate 累積，使得 TCA cycle 進行速率下降，而過多的 oxaloacetate 會由 PEP carboxylase 轉換成 PEP，接著由 pyruvate kinase (*pyk*) 轉變為 pyruvate，因此在此培養條件下 *pyk* 基因表現上升，使得在高濃度琥珀酸的供應下菌體 ATP 也以糖解作用為來源；而低濃度琥珀酸培養環境下 *sucCD* 表現則不受抑制，也不會造成過多 oxaloacetate 累積轉變成 PEP，因此並沒有觀察到 *pyk* 基因表現上升，推測此時 ATP 的主要來源是經由 TCA cycle 與電子傳遞鏈而獲得。

由實驗結果可知以不同碳源作為生長基質時，會明顯改變代謝途徑與中間代謝產物，這些產生 ATP 分子之途徑會隨著環境中不同碳源而改變，因此碳源是產能機制十分重要的影響因子。

## 2. 迫切反應對細胞內能量之關係

由表一結果指出大腸桿菌野生株與  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株在碳源貧乏時，ATP/ADP 比例並無明顯變化，顯示野生株體內 ppGpp 對其能量狀態的改變並無明顯變化，但  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株無法合成 ppGpp，發現以醋酸及葡萄糖為碳源時突變株細胞內 ATP 含量皆明顯變動，由於 ppGpp 合成需要 ATP 參與 (Cashel *et al.*, 1996)，推測  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株由於缺乏 RelA 與 SpoT 等蛋白質，因此無法利用 ATP 與 GDP 來合成 ppGpp 而造成細胞內 ATP 與 ADP 含量差異。此外碳源貧乏對細菌而言是極大的逆境， $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株中無法合成 ppGpp，導致菌體無法誘發  $\sigma^S$  合成，使得細胞內生合成路徑上之蛋白質及酵素等無法因應迫切反應 (Cashel *et al.*, 1996)，同時 ATP 與 ADP 含量也因細胞內這些生合成反應無法進行而有所改變，但 ATP 與 ADP 含量之比例關係卻不受影響。

## 3. 碳源與生長速率對大腸桿菌 DNA 超螺旋結構之影響

在不同的 topoisomerases 中，gyrase B 需要水解 ATP 來獲得能量以旋緊 DNA，若 ATP 缺乏時會使 DNA 超螺旋結構變得較為鬆散 (Cozzarelli, 1980)。體外實驗也證實純化的 gyrase B 活性會受 ATP/ADP 比例影響 (Drlica, 1992)。而由圖二可知生長速率加快時 topoisomerase 等基因表現量上升，因此推測在生長速率增加時 ATP/ADP 比例與 gyrase 表現量受到調控而上升，促使 DNA 超螺旋結構較生長速率緩慢時來得緊密。

由於 topoisomerases 會改變 DNA 超螺旋結構，探討在連續式培養下，生長速率與碳源對大腸桿菌 topoisomerases 基因的影響。由圖二可知在生長速率較快時，*gyrA*、*gyrB* 與 *topA* 基因的表現都較生長速率低時來得高，此結果與先前在連續式培養下之 DNA 超螺旋結構相一致，觀察到生長速率較快時 DNA 超螺旋結構較為緊密，因此各 topoisomerases 基因表現量上升。而先前研究也發現 *pgyr-lacZ* 基因在低生長速率變動時表現變化量明顯地較高生長速率變動時多，分析這些結果可推論在高生長速率變化時各 topoisomerases 基因之啟動子產生了 autoregulation 的現象。因此對於 DNA 超螺旋結構而言，我們認為在低生長速率時細胞內有較強的 thermodynamic control，而在高 ATP/ADP 比例時，homeostatic control 上升會減弱了 thermodynamic control 的效應，造成生長速率快時 *gyrA*、*gyrB* 與 *topA* 基因的表現量較高，證明 topoisomerase 基因受 growth rate-dependent 調控，使得 DNA 超螺旋結構隨碳源與生長速率不同而改變。

總而言之，不同的生長速率可經由改變細胞內 DNA 超螺旋結構來調控許多基因的表現，而細胞內 ATP/ADP 比例則是調控 DNA 超螺旋結構的重要因子。細胞內 ATP 缺乏時 DNA 超螺旋結構會變得較為鬆散，若 ATP/ADP 比例增加時 DNA 超螺旋結構也隨之旋緊 (Workum *et al.*, 1996)。批次培養下不同碳源使得菌體進行不同的代謝路徑與生理反應而造成 ATP/ADP 比例改變，藉由 ATP/ADP 比例調控 DNA gyrase 活性，進而控制 DNA 的超螺旋結構，而 DNA 超螺旋結構可調控其他基因的表現 (Dorman *et al.*, 1988)，造成細胞內生理反應產生變化並影響生長速率。

#### 4. 環境因子與迫切反應對 RNase E 基因表現與調控之影響

##### (a) 生長速率對於含 5' -UTR *rne-lacZ* 表現之影響

大腸桿菌可在不同的環境下生長，為了適應環境的改變，需要快速地調控基因表現，目前已知大部分基因表現是藉由改變轉錄層次 (transcription level) 來達成 (Barlow *et al.*, 1998)。由過去文獻發現當環境改變時，大腸桿菌體內 RNase E 濃度及活性可能會隨之改變，為了瞭解不同環境因子如何影響 RNase E，我們利用 PCR 技術夾取 *rne* 基因啟動子、5'-UTR 及前五十三個氨基酸序列，送入 pRS415 質體中產生 *rne-lacZ* operon fusion，並以  $\lambda$  phage 將 *rne-lacZ* fusion 插入染色體 (chromosome) 中，再藉由偵測  $\beta$ -galactosidase 的活性推測不同生長環境下 *rne* 基因於轉錄層次的表現情形。由結果發現 *rne* 基因轉錄層次的確會隨著生長環境不同而改變，而這樣結果易受生長速率調控 (圖三)。

##### (b) 不同碳源、生長速率對 RNase E 蛋白質表現量之影響

由圖四所示，在相同碳源條件下，生長速率快之菌體表現較多 RNase E，目前已知當生長速率快時，菌體中多數 mRNA 穩定性上升，意味 RNase E 作用於 mRNA 切位點效能降低，另外因切位點間具有競爭關係 (Baker and Mackie, 2003)，故推測 RNase E 回饋控制之目的在於利用酵素切割自身 mRNA 的特性，在生長速率快時產生大量的 *rne* mRNA 與其他 mRNA 相互競爭 RNase E，造成穩定性上升以應付菌體快速生長所需大量蛋白質表現。反之，當菌體生長緩慢 (胞內 ppGpp 濃度高) 時，菌體內 *rne* mRNA 表現量少，故對 RNase E 競爭力相形減弱，導致多數 mRNA 半衰期縮短，減少蛋白表現量。

##### (C) ppGpp 對 *rne* 基因與 RNase E 蛋白質表現量之影響

因 ppGpp 是貧瘠培養時主要的調控子，故構築 NAT 菌株，發現當 ppGpp 不表現時，飢餓培養時 *rne* transcripts 濃度只有原來的 7% (圖五 A)；以蛋白質層次來看，當 ppGpp 不存在時，RNase E 的蛋白質濃度不因生長壓力改變而下降 (圖五 B)，可能是因菌體不表現 ppGpp，蛋白質水解酶不活化所致，且原本菌體中 *rne* mRNA 仍繼續被轉譯，因此菌體中 RNase E 濃度呈現微幅上升的趨勢，這也可能是造成 NAT 菌體中 *rne* mRNA 快速降解的主因。

綜合上述可推測，飢餓培養影響 *rne* 基因表現的調控環節主要在於啟動子活性與蛋白質生命期 (protein ture over rate)。ppGpp 的存在促使 *rne* 啟動子不表現，也造成 ribosomal protein 大量水解而間接影響 *rne* mRNA 轉譯效率，因此當外界生長壓力不適菌體生存時，大腸桿菌可能會藉著他種核酸水解酶降解體內多數穩定性 RNA (tRNA 與 rRNA)，但卻因 RNase E 下降而延長了 mRNA 的穩定性，以期在環境許可生長情況下，快速回復正常生理狀態。

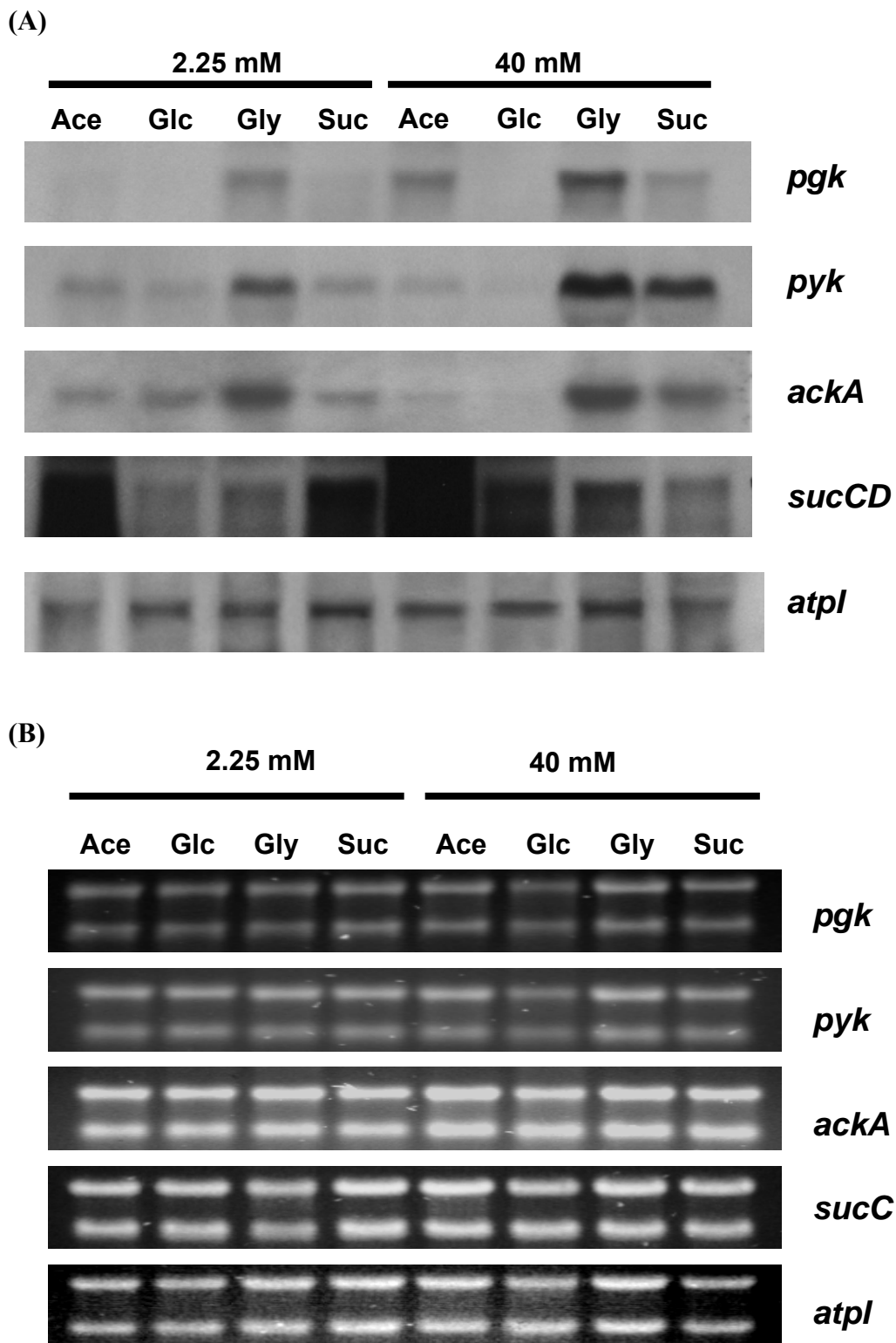
## 五、參考文獻

- Baker, K.E., and Mackie, G.A. (2003) Ectopic RNase E sites promote bypass of 5'-end-dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **47**: 75-88.
- Cashel, M., Gentry, D.R., Hernandez, V.J., Vinella, D. (1996) The stringent response. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F.C., Curtiss R., III, Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., et al. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 1458-1496.
- Cozzarelli, N. R. (1980) DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* **207**:953-960.
- Cozzone AJ. (1998) Regulation of acetate metabolism by protein phosphorylation in enteric bacteria. *Annu Rev Microbiol* **52**:127-164.
- Dorman, C. J., G. C. Barr, N. N. Bhriain, and C. F. Higgins. (1988) DNA supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of *tonB* gene expression. *J Bacteriol* **170**:2816-2826.
- Drlica, K. (1992) Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol Microbiol* **6**: 425-433
- Ishizuka, H., A. Hanamura, T. Inada and H. Aiba. (1994) Mechanism of the down-regulation of cAMP receptor protein by glucose in *Escherichia coli*: role of autoregulation of *crp* gene. *EMBO J* **13**: 3077-3082.
- Oh MK, Rohlin L, Kao KC, Liao JC. (2002) Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**:13175-13183.
- Ohlsen KL, Gralla JD. (1992) Interrelated effects of DNA supercoiling, ppGpp, and low salt on melting within the *Escherichia coli* ribosomal RNA *rrnB* P1 promoter. *Mol Microbiol* **6**: 2243-2251.
- Richey DP and Lin EC. (1972) Importance of facilitated diffusion for effective utilization of glycerol by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **112**: 784-790.
- Sanno Y, Wilson TH, Lin EC. (1968) Control of permeation to glycerol in cells of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **32**: 344-349.
- Voegelé, R. T., G. D. Sweet and W. Boos. (1993) Glycerol kinase of *Escherichia coli* is a activated by interaction with the glycerol facilitator. *J Bacteriol* **175**: 1087-1094.
- Workum, M., S. J. M. Dooren, N. Oldenburg, D. Molenaar, P. R. Jesen, J. L. Snoep and H. V.



Westerhoff. (1996) DNA supercoiling depends on the phosphorylation potential in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **20**: 351-360.

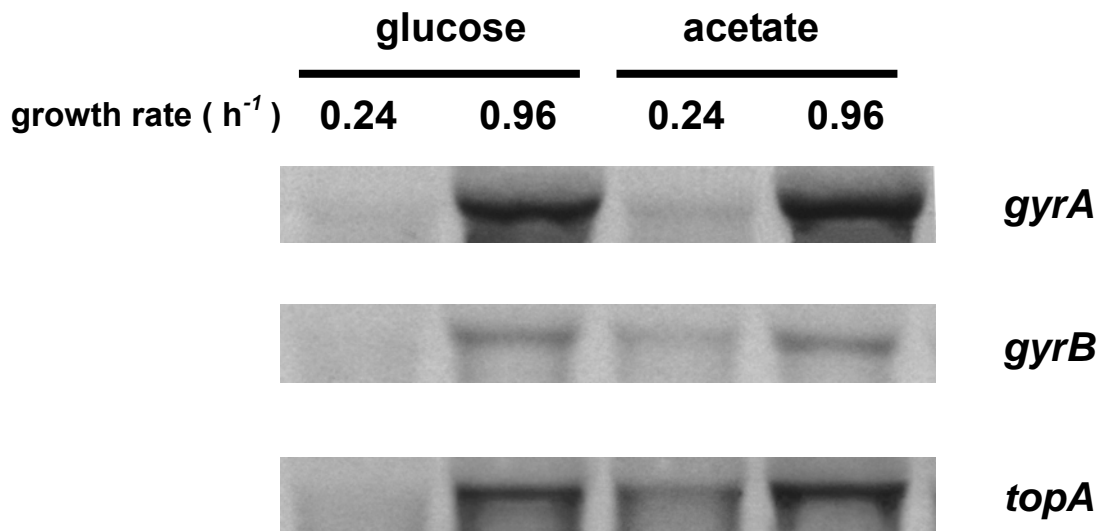
## 六、附圖表



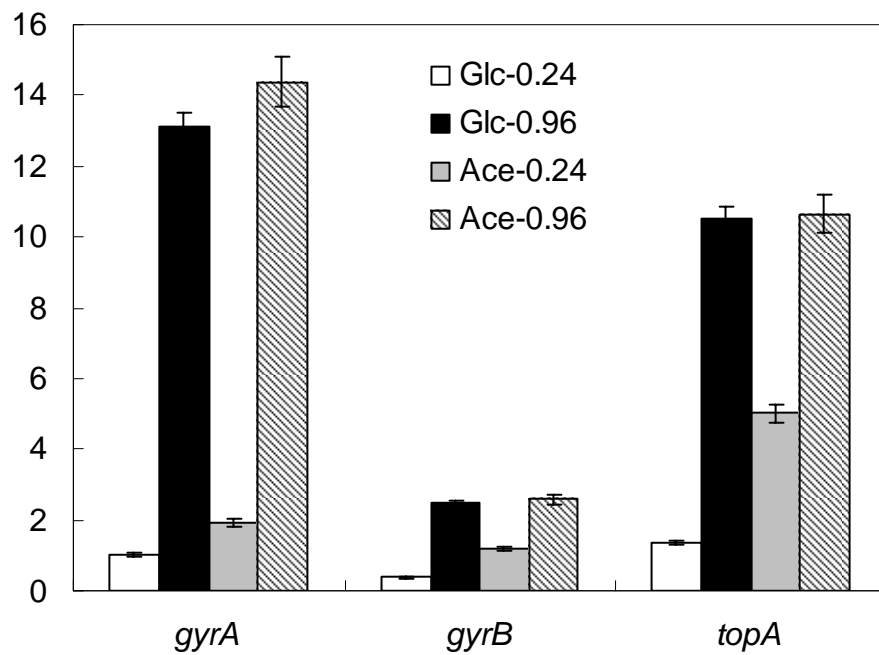
圖一、不同碳源的生長速率對五種 ATP 合成酵素基因 (*pgk*、*pyk*、*ack*、*sucCD*、*atp*) 表現及變化。

(A)五種 ATP 合成酵素基因北方墨點分析圖。(B) 五種 ATP 合成酵素基因的 internal control 電泳圖。

(A)

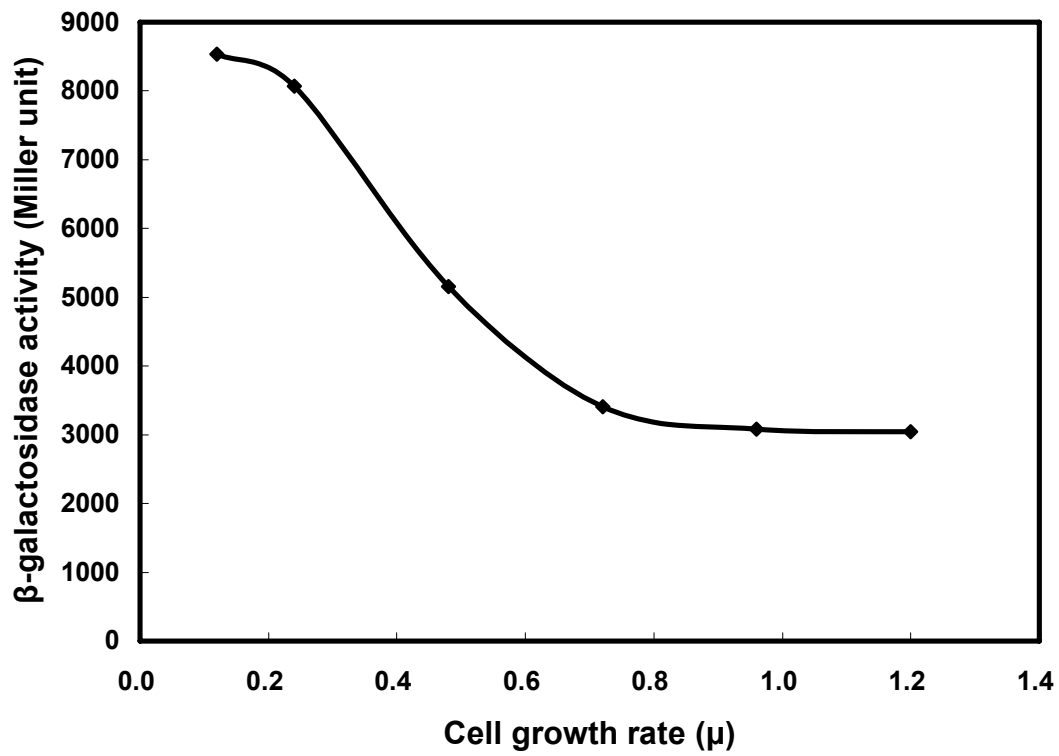


(B)



圖二、碳源與生長速率對大腸桿菌 DNA 超螺旋結構之影響

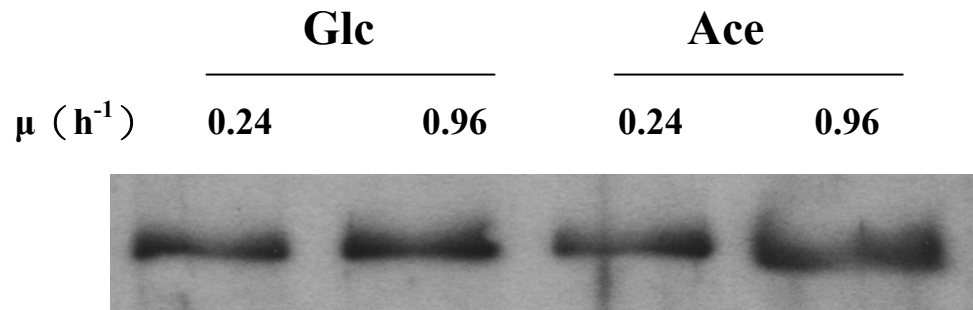
(A) *gyrA*、*gyrB*、*topA* 基因的北方墨點分析圖。(B) 北方墨點結果經定量軟體分析數值化



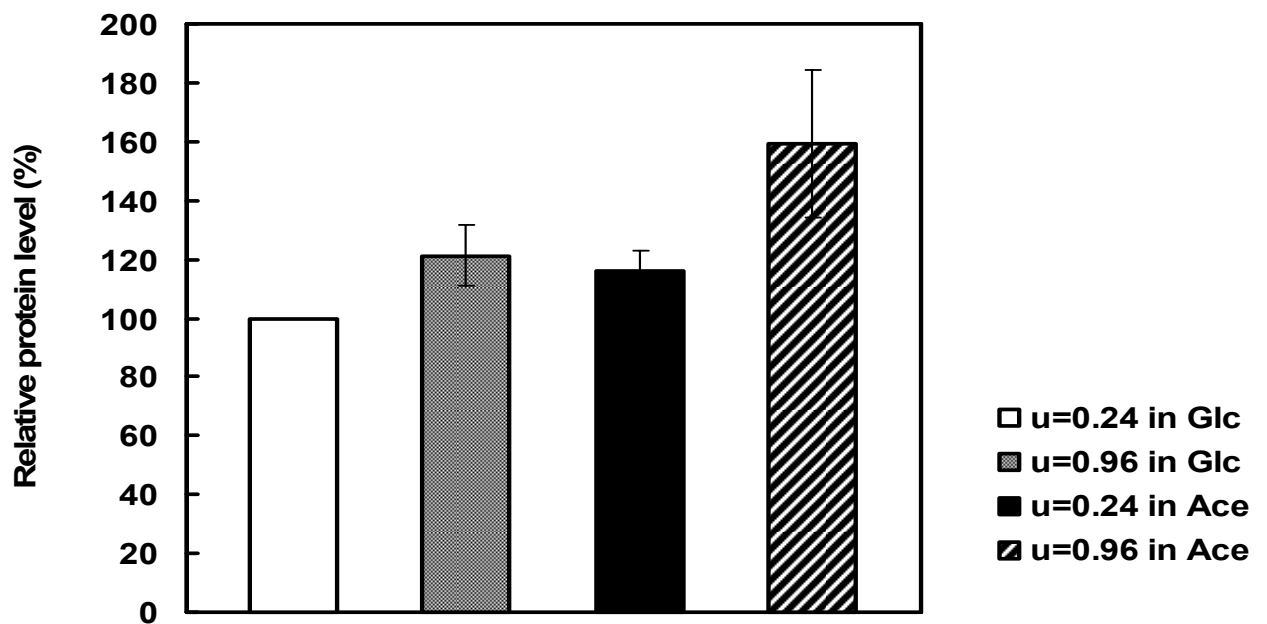
圖三、生長速率對於含5'-UTR *rne-lacZ*表現之影響

將大腸桿菌分別培養於不同生長速率下對 *rne-lacZ* 表現之影響，以 2.25 mM 葡萄糖為碳源。

(A)



(B)

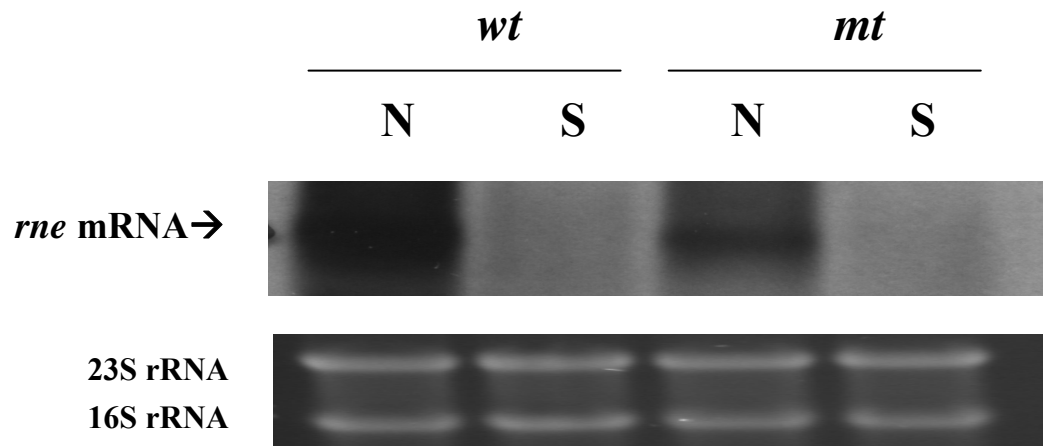


圖四、不同碳源及生長速率對 RNase E 蛋白質表現量之影響

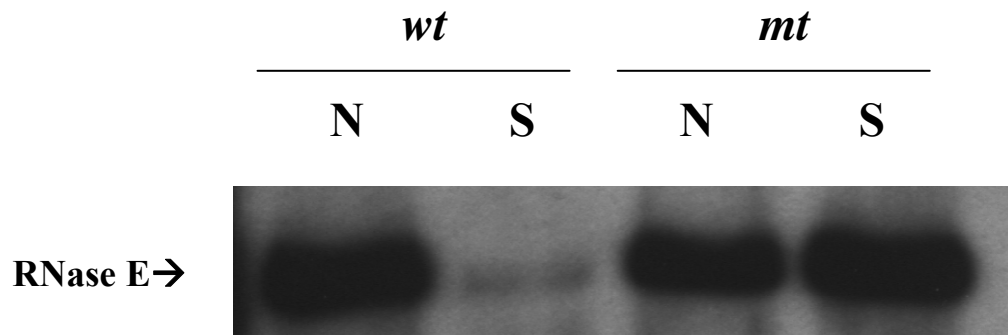
(A) RNase E 蛋白質西方墨點分析圖。(B) 西方墨點結果經定量軟體分析數值化

。

(A)



(B)



圖五、ppGpp 對 *rne* 基因與 RNase E 蛋白質表現量之影響

(A) *rne* 基因北方墨點分析圖與 internal control 電泳圖。(A) RNase E 蛋白質西方墨點分析圖。

表一、不同碳源下，迫切反應透過 ppGpp 對能量狀態的影響

Strains	carbon source (2.25 mM)	generation time (min)	ATP <sup>a</sup> (pmol/ 10 <sup>7</sup> cell)	ADP <sup>a</sup> (pmol/ 10 <sup>7</sup> cell)	ATP/ADP ratio <sup>a</sup>
K12	acetate	72 ± 3	7.1 ± 0.5	2.0 ± 0.5	3.5 ± 0.4
	glucose	50 ± 2	68.3 ± 0.8	12.6 ± 0.8	5.4 ± 0.6
K12 ( $\Delta relA$ $\Delta spoT$ )	acetate	57 ± 5	47.3 ± 1.1	12.4 ± 1.1	3.8 ± 0.7
	glucose	46 ± 3	49.3 ± 0.9	9.3 ± 0.9	5.3 ± 0.6

a. 將野生株 K12 與 *relA*、*spoT* 雙基因突變的 K12 菌株培養在分別含有醋酸鈉與葡萄糖的培養基中，當生長至 OD<sub>600</sub> 在 0.4~0.45 時,進行飢餓培養 30 分鐘，然後收集菌液，測量細胞內 ATP 和 ADP 濃度。