

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

碳源、供氧量及生長速率調控大腸桿菌能量狀態與 RNase E
基因表現之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2311-B-009-003-

執行期間：93年08月01日至94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：鄭惠文 許慧珊

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 31 日

一、摘要

微生物利用不同受質獲取能量，大腸桿菌代謝碳源產生能量的途徑與生長速率亦隨受質不同而改變。本研究以醋酸、葡萄糖、甘油與琥珀酸四種碳源作為大腸桿菌生長基質，結果發現碳源改變細胞生長速率與細胞內高能磷酸物質 ATP 與 ADP 含量。另外也發現 DNA 超螺旋結構受 ATP/ADP 比例調控，因此細胞內 ATP 與 ADP 含量以及 ATP/ADP 比例會隨碳源不同而上升或下降，當生長速率加快時，因 ATP/ADP 比例上升，促使 DNA 超螺旋結構變得緊密。另外因細胞內能量狀態與 RNA 表現及降解息息相關，因此調控 RNA 降解之 *rne* 基因為另一研究方向，結果藉由偵測 *rne-lacZ* operon fusion 之 β -galactosidase 活性得知 *rne* 基因在轉錄層次之表現情形，發現碳源、氧氣、酸鹼值、溫度以及滲透壓等環境因子皆影響了 *rne* 基因轉錄活性。另外也藉由突變株之構築以釐清其間調控關係，發現當 *cya*、*crp* 突變後 *rne* 基因表現上升，而 *fnr*、*arcA* 突變後並不影響 *rne* 基因轉錄作用，故推測 cAMP、CRP 為 *rne* 基因表現之調控因子

綜合上述，結果可歸納環境因子中碳源、供氧量與生長速率會對大腸桿菌體內能量狀態影響，以及代謝途徑中與 ATP 合成之基因可隨細菌生理需求而調整，並經由探討 RNase E 基因 (*rne*) 在 transcription 層次調控機制，使我們對微生物在不同環境中基因表現與生理相互關係有更深一層的認識，並了解細胞內能量狀態在基因表現上所扮演的角色。

關鍵詞：大腸桿菌、能量狀態、DNA 超螺旋、ATP 合成、生長速率、*rne* 基因

Abstract

To understand the intracellular energy state and gene expression in different carbon sources, we used acetate, glucose, glycerol or succinate as carbons for energy source. The results of this study showed that the energy state (ATP/ADP ratio) varied with carbon sources and ATP concentration increased with cell growth rate. Furthermore, DNA supercoiling was regulated by ATP/ADP ratio.

Because the degradation of bulk mRNA in *E. coli* is initiated by RNase E cleavage, we examined the *rne* gene expression under different conditions in order to understand the gene expression. The results suggested that the expressions of *rne-lacZ* were varied by oxygen and carbon sources, and it was also regulated by pH value, osmolarity and temperature. Moreover, we constructed *cya*, *crp*, *arcA*, *fnr* mutants to show that *rne-lacZ* expression was increased in *cya* and *crp* mutant strains, but was not in *fnr* and *arcA* mutants. Therefore, cAMP and CRP were involved in regulation of *rne* expression in different environmental conditions.

Thus, in this study we demonstrated that the energy state, DNA supercoiling related genes and RNase E gene expression were changed at different growth conditions. It provides a useful information to understand the role of energy state on gene expression.

key words : *E. coli*, growth rate, energy state, DNA supercoiling, RNase E, ATP synthesis

二、研究目的與方向

隨著生物技術之精進，以大腸桿菌為表現系統的蛋白重組技術日趨重要。先前文獻指出大腸桿菌生長狀態受環境因子調控，在許多影響層面中，細胞內能量狀態（ATP/ADP ratio）與 RNA 降解機制是決定蛋白表現的重要環節。

在環境因子方面，當大腸桿菌量化培養時，營養源的使用直接影響大腸桿菌生長狀態，為此我們挑選不同碳源（葡萄糖、醋酸）以及飢餓培養作為試驗變因。另外因生長條件不同而造成生長速率之差異，故利用連續式培養調控菌體生長速度，藉以觀察菌體生理變化。接續為了釐清環境因子對大腸桿菌能量狀態及 RNA 降解機制之關係，研究方向分為以下兩部分：

- (I) 細胞內能量狀態：研究環境因子（包括碳源、生長速率、供氧量）對細胞內能量狀態及DNA 超螺旋結構的改變情形
- (II) RNA降解模式：針對負責RNA降解之核酸內切酶RNase E在transcription 層次，探討各種環境因子對*rne-lacZ* 的表現之影響。

希望藉由兩部分實驗之結合建立碳源、生長速率與迫切反應對能量狀態變化與 RNase E 基因表現之關係模式，進而明瞭在蛋白重組技術中基因表現之調控作用。

三、結果

(I) 細胞內能量狀態

1. 不同碳源下，細胞內ATP、ADP 與AMP 含量的變化以及對細胞內energy charge之影響

我們使用基礎培養基分別添加2.25 mM 醋酸、葡萄糖、甘油及琥珀酸為碳源限制條件進行批次培養。在OD 600 到達0.4~0.45 時收集細胞，以luciferase 反應法測得細胞內ATP含量。並利用pyruvate kinase 將ADP 及AMP 轉換成ATP 後，測量所得結果扣除同一樣本之ATP 含量而得到ADP 含量。

綜觀所得結果（table 1），比較醋酸、葡萄糖、甘油與琥珀酸四種不同碳源下大腸桿菌細胞內之能量狀態，結果顯示在不同碳源下大腸桿菌體內ATP、ADP 含量及ATP/ADP 比例皆隨之改變。以葡萄糖為碳源時菌體中ATP 含量為最高（64.8 pmol/10⁷ cell），而以醋酸為碳源時ATP 含量為最低（7.4 pmol/10⁷cell）。

2. 利用不同碳源時，細胞內ATP/ADP 比例與生長速率之關係

若將上述菌體的倍增時間與細胞內ATP 含量合併作圖可觀察到生長速率與細胞內ATP含量具有線性關係（fig.1），得知大腸桿菌體內ATP 的含量會隨生

長速率上升而增加。此外以葡萄糖為碳源時菌體中ADP 含量最高(17.1 pmol/107 cell)，而以醋酸與琥珀酸為碳源時ADP 含量最低(3.1pmol/107 cell)。ATP 與ADP 含量的不同使得這四種不同碳源下所生長之菌體有不同ATP/ADP 比例，以琥珀酸為碳源時ATP/ADP 比例最高，以醋酸為碳源時最低為，所得結果分別為7.3 與2.4 。此結果顯示出不同碳源會對菌體中的能量狀態產生明顯影響。

3. 碳源對DNA 超螺旋結構之影響

以醋酸、葡萄糖、甘油及琥珀酸分別加入基礎培養基中作為碳源，使其最終濃度為2.25 mM，在OD 600 到達0.4~0.45 時收取菌體內的質體pBR322，其超螺旋結構的分布狀態可由電泳圖 (fig.2) 中得知。我們在批次培養下，於不同碳源培養基觀察大腸桿菌超螺旋結構分布狀態，由電泳圖發現以琥珀酸為碳源時質體DNA 的拓撲異構物較少，甘油次之、葡萄糖再次之，而以醋酸為碳源時質體DNA 的拓撲異構物相對地較多，證明DNA 超螺旋結構會受碳源改變。對照細胞內ATP/ADP 比例變化，可看出ATP/ADP 比例上升時DNA 超螺旋結構旋緊的程度也愈大，以琥珀酸為碳源時ATP/ADP 比例較高，其DNA 超螺旋結構也較為緊密；而以醋酸為碳源時ATP/ADP 比例最低，DNA 超螺旋結構也較為鬆散。證實細胞內能量狀態變動時，細胞會改變其DNA超螺旋結構。

(II) RNA 降解模式

1. 環境因子（酸鹼度、溫度與滲透壓）對*rne-lacZ* 表現之影響

大腸桿菌為嗜中性菌 (neutrophilic bacteria)，可生長的 pH 值範圍介於 5~9 之間，最適宜的 pH 值為 6~8，超過此範圍大腸桿菌的生長變得非常緩慢並影響菌體內的代謝。為了瞭解 *rne* 基因於不同酸鹼值時的表現情形，我們利用 0.1 M potassium phosphate buffer (Sambrook and Russell, 1989) 將基礎培養液的酸鹼值調整至 5.8、7 及 8，並以 40 mM 葡萄糖為碳源。結果 (fig.3) 顯示在有氧環境中培養基的酸鹼值改變時所測得 β -galactosidase 活性皆相同，即 *rne-lacZ* 的表現量在氧氣存在時並不隨酸鹼值改變而有所變化。但在厭氧環境中，*rne-lacZ* 的表現會隨著酸鹼值上升而上升，即 pH 5.8 時，*rne* 基因表現量最低，pH 7 時次之，而 pH 8 時表現量最高，且增加約 1.8 倍，所以酸鹼值的改變在厭氧環境下對 *rne* 基因有較明顯的影響。

另外，我們以 40 mM 葡萄糖為碳源，在有氧及厭氧的基礎培養液內，將含 *rne-lacZ* operon fusion 的大腸桿菌分別培養於 30 °C、37 °C 及 42 °C 的環境中。結果顯示在有氧及厭氧環境下，*rne-lacZ* 皆會隨著溫度上升而增加其表現量 (fig.5)，即溫度 30 °C 時表現量最低，其次為 37 °C，溫度為 42 °C 時最高。另外在有氧環境中，溫度 30 °C 時，*rne-lacZ* 表現量比 37 °C 減少約 1.3 倍，當溫度上升至 42 °C 時，*rne-lacZ* 表現量則比 37 °C 增加 1.7 倍。而在厭氧環境中，溫度 30 °C 時，*rne-lacZ* 表現量比 37 °C 減少約 1.3 倍；溫度 42 °C 時，則增加 1.4 倍。由此可知溫度改變會影響 *rne* 基因的表現。

在滲透壓探討方面，我們利用 1 % ~ 5 % NaCl 調整基礎培養液的滲透壓，利用 40 mM 葡萄糖為碳源並將含 *rne-lacZ* operon fusion 的大腸桿菌分別培養在有氧與厭氧環境中，藉由偵測 β -galactosidase 活性以瞭解滲透壓改變對 *rne* 基因表現之影響。發現 (fig.4) 在有氧環境中，培養液無添加 NaCl 時，*rne-lacZ* 表現量最低；隨著滲透壓逐漸增加，*rne-lacZ* 表現量會緩慢增加，當培養液中 NaCl 濃度達 5 % 時，*rne-lacZ* 表現量最高，增加 2.1 倍。在厭氧環境也有類似的結果，即培養液中無添加 NaCl 時，*rne-lacZ* 表現量最低，且 *rne* 基因亦隨著滲透壓增加而增加其表現量。與有氧環境相異的是 *rne-lacZ* 表現量於 NaCl 濃度為 3 % 時最高，約增加 2 倍，若 NaCl 濃度超過 3 %，其表現量反而下降，此時菌體生長得非常緩慢，推測可能是因為高 NaCl 抑制生長所造成的結果。

2. *rne-lacZ* 在 *cya* 與 *crp* 突變株中的表現與 catabolic repression 之相關性

由本實驗室先前研究可知 *rne-lacZ* 的表現具有 catabolic repression 的現象，即微生物處於兩種不同碳源的環境下時，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。由於已知 catabolic repression 反應其調控方式是 cAMP 與其調節蛋白質 CRP (cAMP receptor protein) 形成複合物，再藉由此複合物來調控不同基因的表現。因此我們分別構築 *cya* 與 *crp* 突變株，於有氧及厭氧環境下以終濃度 40 mM 葡萄糖為碳源，測量突變株 β -galactosidase 活性以得知 *rne* 基因的表現情形。結果顯示無論在有氧或厭氧環境下，*cya* 突變或 *crp* 突變後 *rne-lacZ* 表現量皆比野生株高。在有氧環境下，*cya* 突變後 *rne-lacZ* 表現量比野生株增加 2 倍，*crp* 突變株則增加 1.4 倍；厭氧環境下 *cya* 突變株增加 1.5 倍，而 *crp* 突變株則增加 1.4 倍 (fig.6)。因此推測當 cAMP 及 CRP 蛋白存在時會抑制 *rne* 基因表現，所以 cAMP 及 CRP 無論在有氧或無氧的環境中皆扮演抑制者 (repressor) 的角色。

3. *rne-lacZ* 在 *fnr* 與 *arcA* 突變株中的表現與氧氣效應之相關性

本實驗室先前發現 *rne* 基因的表現量受氧氣影響，而 Fnr 與 ArcA 為大腸桿菌體內兩組重要轉錄因子，可將外界是否有氧的訊息傳入細胞內進而調控不同代謝途徑基因之表現。為了瞭解 *rne* 基因是否受到此二蛋白質的調控，我們分別構築 *arcA* 與 *fnr* 突變株，在有氧及厭氧環境以終濃度 40 mM 葡萄糖為碳源來觀察 β -galactosidase 活性的變化。由結果可發現無論在有氧或厭氧環境下，*arcA* 與 *fnr* 突變後 *rne-lacZ* 表現量並無因此增加或減少 (fig.6)，而與野生株具有相同表現值，因此 Fnr 與 ArcA 這兩組轉錄因子並不參與調控 *rne* 基因於厭氧環境時之表現。

四、討論

(I) 細胞內能量狀態

1. 不同碳源下，細胞內ATP、ADP 與AMP 含量的變化以及對細胞內energy charge之影響

自然界之生物體需要自由能持續供應以維持生命系統，而微生物吸收並分解環境或培養基中的養分，產生能量後以ATP 的形式存在於細胞內。我們利用批次培養來探討細胞生長速率的研究發現，在不同碳源限制下，細胞內的ATP 含量會隨生長速率加快而上升。ATP 增加顯示生長速率快的細胞較生長速率慢的細胞有較高的能量，處於高生長速率下的細胞其分裂速率較快，因此消耗在細胞內容質的運送、單體與大分子合成等各種生化需能反應較低生長速率的細胞為多 (Gottschalk, 1988)。由於高生長速率的細胞與低生長速率細胞內ATP 的含量有明顯差異，而生長可說是生化反應的總體結果，這些生化反應所得到最終現象可以細胞質量改變代表，因此在加快生化反應的同時亦造成了細胞重量的增加。

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亦隨之改變。我們分析所使用之四種不同碳源其所依循的代謝途徑，當以葡萄糖為碳源時，大腸桿菌利用hosphoenopyruvate phosphotransferase system (PTS) 將細胞外葡萄糖磷酸化後帶入細胞中，經由糖解作用以acetyl-CoA 為主要分解代謝產物，進行完整的TCA cycle 後氧化成二氧化碳並獲得能量 (Furano, 1975)。當以甘油為碳源時，大腸桿菌可利用被動運輸系統(passive diffusion) 進入細胞中，在傳遞的過程中藉由glycerol facilitator 作為運送通道以通過細胞膜，再經由glycerol kinase將甘油磷酸化轉換為glycerol-3-phosphate進入細胞內代謝循環，因此細胞中並不存在自由態的甘油分子 (Voegelé *et al.*, 1993)。雖然glycerol kinase已證明可被PTS 與果fructose 1,6-bisphosphate所調控 (De Boer *et al.*, 1986)，但在僅以甘油為碳源時，細胞對甘油的攝入與代謝所受到的影響因子便可減少。以琥珀酸為碳源時大腸桿菌則是利用C4-dicarboxylate transporter 將琥珀酸運送進入細胞內，可直接進入TCA cycle 與電子傳遞鏈進行代謝利用，此時能量的產生便取決於氧化磷酸化反應 (Boogerd *et al.*, 1998)。若以醋酸為碳源供應者，此時醋酸可經由主動運輸傳送至細胞中，隨即藉由acetyl-CoA synthetase將醋酸轉換成acetyl-CoA後便可進入TCA cycle 代謝產能。然而為了生化合成的需要，在以醋酸為碳源的同時，大腸桿菌亦可能部分由glyoxylate cycle 來代謝acetyl-CoA (Furano, 1975)。由於這些複雜的生理機制使得利用不同碳源生長時菌體內的能量狀態也有所差異。

由本實驗可了解菌體於對數生長期時，細胞內ATP 與ADP 含量有明顯差異，這是由於不同碳源或生長速率變化導致ATP 與ADP以及ATP其相對比例隨之改變，因此ATP 與ADP 之間的轉換成為生物能量重要指標。同時，細胞所得的能量狀態也對碳源的傳輸造成不同的影響，由於葡萄糖的傳送系統為ATP-dependent，且PTS 系統亦需要高能的PEP 作用，因此處於高能量狀態下有助於細胞對葡萄糖的攝取。最近研究也發現大腸桿菌對於甘油正向趨化性

(chemotaxis) 為energy-dependent(Zhulin *et al.*, 1997)；而在 atp (H^+ -ATPase) 突變的大腸桿菌菌株中因缺乏C4-dicarboxylate transporter，所以無法在以琥珀酸為碳源的環境下生長(Boogerd *et al.*, 1998)。因此依據我們所得的結果可推論在批次培養下ATP/ADP 比例較高時，也增加了菌體對葡萄糖及琥珀酸的攝取以及對甘油的趨化性反應。

2. 利用不同碳源時，細胞內ATP/ADP 比例與生長速率之關係

我們以醋酸、葡萄糖、甘油與琥珀酸四種不同碳源作為大腸桿菌之生長基質，在批次培養下，這四種不同基質的細胞生長速率以葡萄糖最快，其次是甘油與琥珀酸，以醋酸為碳源時則最慢，碳源的不同造成細胞生長速率的變化，影響了細胞內的ATP 與ADP 含量之外，也調控了ATP/ADP 的比例。由結果可知生長速率愈快時細胞內ATP 含量愈高，此現象為growth rate-dependent，因此推論在較高的生長速率時，細胞內將ADP 轉換成ATP 的速率快了許多。

由最近的研究也發現糖解作用的效率並非由ATP/ADP 比例所調控，而是直接受ATP 含量所影響，當 H^+ -ATP 合成活性上升時，發現ATP 含量增加且糖解作用效率提高70%(Koebmann *et al.*, 2002)，我們也觀察到以葡萄糖為碳源時，ATP 含量最高且生長速率較其他碳源來得快速，可知ATP 含量較高使得生化代謝途徑加速進行，有利於細胞生長所需之巨分子合成，也證實能量的確會調控生化合成途徑並影響基質的吸收，也與生長速率有密切關係。

3. 碳源對DNA 超螺旋結構之影響

許多研究證明外界環境的刺激如：溫度、滲透壓、含氧量等所造成的ATP/ADP 比例改變與DNA 超螺旋結構的變化皆相互伴隨而生。除此之外，當uncoupler 化合物加入後細胞內ATP/ADP 比例迅速下降，同時DNA 超螺旋結構LK 值變化亦變得不明顯(Workum *et al.*, 1996)。本實驗探討批次培養條件下，就不同碳源下觀察大腸桿菌超螺旋結構分布狀態亦可看出在ATP/ADP 比例高時，pBR322 質體的拓撲異構物較少，當ATP/ADP 比例低時則pBR322 質體的拓撲異構物則較多。由這些結果分析可知細胞內能量狀態變動時細胞會改變其DNA 超螺旋結構。

(II) RNA 降解模式

1. 環境因子(酸鹼度、溫度與滲透壓)對 $rne-lacZ$ 表現之影響

多數細菌其生長的pH 值範圍為5~9，此類細菌稱為嗜中性菌(neutrophilic bacteria)。大腸桿菌為其典型代表，其適宜生長的pH 值範圍在6~8 之間，超過此範圍大腸桿菌的生長變得非常緩慢，並產生一些代謝上的問題。大部分生物活性(包括溶解、離子化及氧化還原反應)適宜中性範圍的pH 值，若無法維持其細胞內pH 值的恆定，將導致許多酵素在極酸或極鹼的環境下被破壞，無法行使

正常功能而降低了生長速率。大腸桿菌中演化出一些特殊的機制來保持細胞內 pH 值的恆定。研究發現大腸桿菌細胞內 pH 值變化與所存在的外在環境 pH 值變化有 0.07~0.11 的關係，亦即一般大腸桿菌 pH 值為 7.63，若外在環境 pH 提升至 8.63，則此時測得大腸桿菌細胞內 pH 值約為 7.74，其它細菌也同樣會有此機制來保持細胞內 pH 值恆定 (Ingraham, 1987)。過去於 *in vitro* 的研究發現 RNase E 在 pH 為 7.2 ~ 9.0 具有活性，其中在 pH 範圍介於 7.6 ~ 8.0 時活性最大 (Misra and Apirion, 1979)。在本實驗中發現在有氣環境中 *rne-lacZ* 表現量不隨著菌體外 pH 改變而有所變化，可能是因為大腸桿菌能維持菌體內酸鹼值恆定，所以在 *in vivo* 中對 *rne-lacZ* 表現影響不大。同樣的酸鹼值，在厭氧的環境下，*rne-lacZ* 卻會隨著 pH 值上升而增加其表現值，此現象可能是因為維持菌體內酸鹼值的主要機制 Na^+/H^+ antiporter 於厭氧環境中作用能力下降 (Trchounian and Kobayashi, 1999)，菌體內無法維持酸鹼值恆定，使得菌體內基因或酵素受到影響，間接或直接影響到 *rne* 啟動子的轉錄能力或 RNase E 的切割活性所造成。

另外，大腸桿菌可生長於高滲透壓環境中，研究發現當環境中鈉離子濃度增加時會導致菌體內鈉離子濃度上升並抑制其生長。因此為了維持菌體內鈉離子的濃度，大腸桿菌會啟動許多機制包括排出鈉離子並累積菌體內的鉀離子濃度、產生 glutamate、合成 trehalose 及產生 glycine betaine (Trchounian and Kobayashi, 1999)。結果顯示 *rne* 基因會隨著滲透壓的上升而增加其表現量，特別是厭氧環境下，滲透壓增加對 *rne* 基因的影響更為明顯。另外在實驗過程中發現增加 NaCl 濃度會影響菌體生長，而在厭氧環境下使菌體生長得更加遲緩。經儀器測定含 40 mM 葡萄糖的培養液加入 0 ~ 5 % NaCl 後的溶液滲透壓分別為：310、632、951、1260、1581 及 1905 mOsm/Kg，由文獻得知大腸桿菌可生長的滲透壓範圍為 0 ~ 1,200 mOsm/Kg (Gowrishankar, 1985)，但是大腸桿菌在厭氧環境中對於細胞外鈉離子濃度會比在有氣環境下還敏感，且厭氧下滲透壓上升會抑制醱酵及厭氧呼吸途徑的酵素並減緩細菌的生長，這可能是因為厭氧時細菌排出鈉離子的能力下降及菌體內累積太多鉀離子所致 (Trchounian and Kobayashi, 1999)，因此厭氧環境下當 NaCl 濃度增加至 4 % 以上時，*rne-lacZ* 表現量會開始下降，推測可能是因為抑制細菌生長所造成的結果。

此外因細菌生長時其合成及代謝過程都仰賴化學反應，而化學反應速率係受溫度影響，因此細菌生長深受溫度影響。大腸桿菌是嗜中溫菌，其適宜生長的溫度範圍約 20 °C 至 44 °C。最高生長溫度約 49 °C，超過 49 °C 時大腸桿菌即無法生長 (Ingraham, 1987)。過去 *in vitro* 的研究發現 RNase E 在 25 °C ~ 50 °C 皆有活性，但以溫度為 30 °C 時活性最大 (Misra and Apirion, 1979; Roy and Apirion, 1983)，這與我們得到的結果相符合，所以溫度會影響 RNase E 的活性，進而調控 *rne* 基因的表現。

2. *rne-lacZ* 在 *cya* 與 *crp* 突變株中的表現與 catabolic repression 之相關性

rne-lacZ 的表現具有 catabolic repression 的現象，已知 catabolic repression 反

應與細胞內 cAMP 的濃度有密切相關，由結果發現當 *cya* 及 *crp* 突變後，無論在有氧或厭氧環境下，*rne-lacZ* 的表現皆會上升，因此 cAMP 與 CRP 對 *rne* 基因表現可能是扮演 repressor 的角色。但在過去文獻中提到，細菌在厭氧的情況下生長，其所產生的 cAMP 會較有氧的狀態多 (Botsford and Harman, 1992)，且本實驗室發現當 *cya* 突變後，細胞內 ATP 的含量會上升。另外已知 CRP 在 DNA 上所結合的保留序列 (consensus sequences) 約有 22 個鹼基對，其序列為 AAATGTGATCT [N₆] AGATCACATTT (N₆ 為任何六個鹼基對)，這段序列具反轉重覆 (palindrome) 的特性，並位於轉錄起始點之後 (Berg and von Hippel, 1988)，經過比對發現 *rne* 的 promoter 及 5'-UTR 處並沒有 CRP 的結合位，因此推測 cAMP 與 CRP 可能是間接影響 *rne-lacZ* 的表現，但詳細機制仍有待進一步研究。

5. 參考文獻

- Berg, O.G., and von Hippel, P.H. (1988) Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. II. The binding specificity of cyclic AMP receptor protein to recognition sites. *J Mol Biol* **200**: 709-723.
- Boogerd, F. C., L. Boe, O. Michelsen and P. R. Jensen. (1998) *atp* mutants of *Escherichia coli* fail to grow on succinate due to a transport deficiency. *J Bacteriol* **180**: 5855-5859.
- Botsford, J.L., and Harman, J.G. (1992) Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev* **56**: 100-122.
- De Boer, M., C. P. Brodkhuizen and P. W. Postma. (1986) Regulation of glycerol kinase by enzyme III_{Glc} of the phosphoenopyruvate carbohydrate phosphotransferase system. *J Bacteriol* **167**: 393-395.
- Furano, A. V. (1975) Content of elongation factor Tu in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* **72**: 4780-4784.
- Gottschalk, G. (1988) Bacterial metabolism. New York. 2nd. Springer-Verlag.
- Gowrishankar, J. (1985) Identification of osmoreponsive genes in *Escherichia coli*: evidence for participation of potassium and proline transport systems in osmoregulation. *J Bacteriol* **164**: 434-445.
- Ingraham, J. (1987) Effect of temperature, pH, water activity, and pressure on growth. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. Vol. 2. In F. C. Neidhardt, J.L.I., K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed). American Society for Microbiology: Washington D. C., pp. 1543-1554.
- Koebmann BJ, Westerhoff HV, Snoep JL, Nilsson D, Jensen PR. (2002) The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J Bacteriol* **184**: 3909-3916.

- Misra, T.K., and Apirion, D. (1979) RNase E, an RNA processing enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 254: 11154-11159.
- Roy, M.K., and Apirion, D. (1983) Purification and properties of ribonuclease E, an RNA-processing enzyme from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 747: 200-208.
- Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.
- Trchounian, A., and Kobayashi, H. (1999) Fermenting *Escherichia coli* is able to grow in media of high osmolarity, but is sensitive to the presence of sodium ion. *Curr Microbiol* 39: 109-114.
- Voegele, R. T., G. D. Sweet and W. Boos. (1993) Glycerol kinase of *Escherichia coli* is 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.
- Zhulin, I. B., E. H. rowsell, M. S. Johnson and B. L. Taylor. (1997) Glyceol elicits energy taxis of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 179: 3196-3201.

6.附圖表

Table 1. Effect of carbon sources on energy state in *E. coli* in batch culture.

carbon source (2.25 mM)	generation time (min)	ATP (pmol/10 ⁷ cell)	ADP (pmol/10 ⁷ cell)	ATP/ADP ratio
acetate	72 ± 3	7.4 ± 1.1	3.1 ± 1.1	2.4 ± 0.3
glucose	50 ± 2	64.8 ± 1.7	17.1 ± 1.7	3.8 ± 0.6
glycerol	60 ± 4	31.7 ± 1.4	5.1 ± 1.4	6.2 ± 0.4
succinate	65 ± 3	22.5 ± 0.9	3.1 ± 0.9	7.3 ± 0.7

carbon sources : Ace Gic Gly Suc
ATP/ADP : 2.4 3.8 6.2 7.3

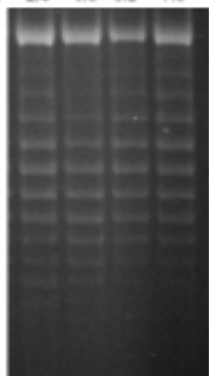


Fig 2. Effect of carbon sources on DNA supercoiling in *E. coli* in batch culture. Chloroquin-agarose gel electrophoresis showing differences in DNA supercoiling of pBR322 from strains grown in different carbon sources. The wild-type K12 strain were cultured in 2.25mM acetate (lane 1), glucose (lane 2), glycerol (lane 3) and succinate (lane 4) minimal medium.

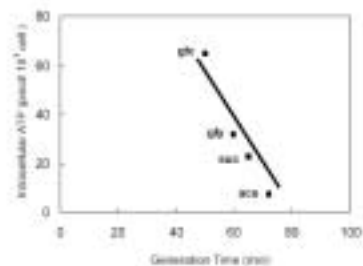


Fig 1. Effect of carbon sources on intracellular ATP in *E. coli* in batch culture. The *E. coli* cells were cultured in 2.25 mM minimal medium with different carbon sources at 37°C. ace: acetate, gic: glycerol, gly: glycerol, suc: succinate.

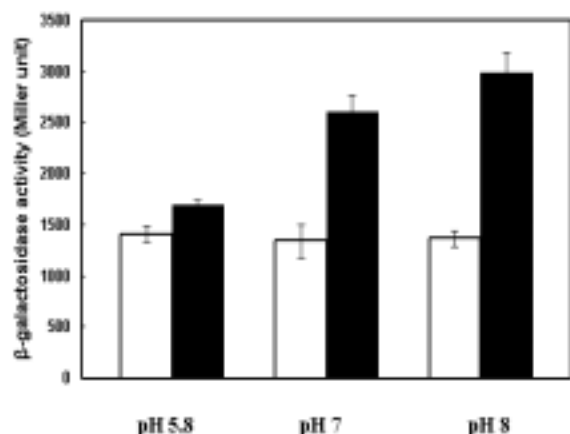


Fig 3 effect of pH on the *rna-lacZ* gene expression. A 40mg 0.1 M potassium phosphate buffer is medium to modify pH value, and culturing cells aerobically (□) and anaerobically (■).

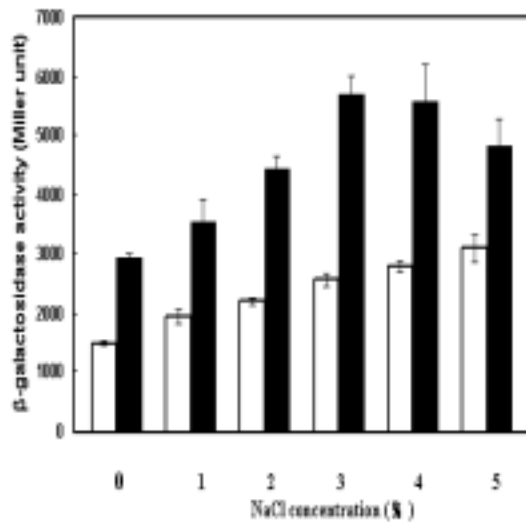


Fig 4 effect of osmolality on *rne-lacZ* expression. Culturing cells in medium with variable osmolality anaerobically (□) and anaerobically (■).

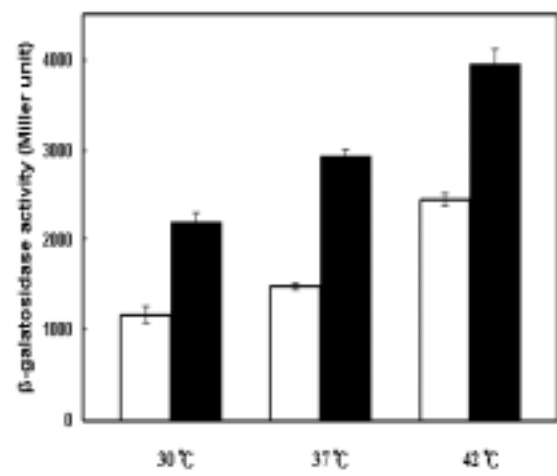


Fig 5 effect of temperature on *rne-lacZ* expression. Culturing cells in 40mM Glc-MM anaerobically (□) and anaerobically (■) at different temperatures.

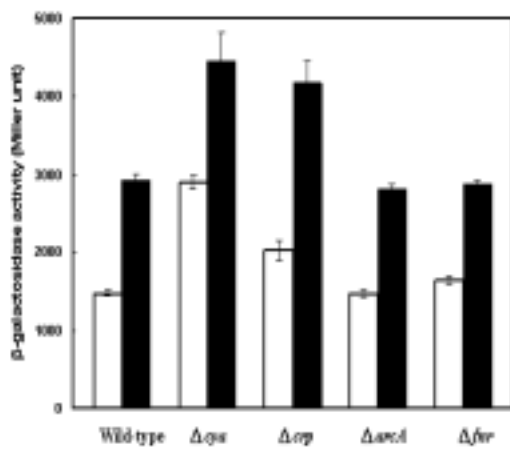


Fig 6 *rne-lacZ* expression in *gya*, *cyp*, *wcd* and *fer* mutants. Culturing cells (wild type or mutants) in 40 mM Glc-MM anaerobically (□) and anaerobically (■).