

計劃名稱：DNA 超螺旋結構對大腸桿菌四種呼吸鏈基因 (*cyoABCDE*, *cydAB*, *narGHJI*, *dmsABC*) 調控之研究  
計劃編號：NSC 87-2311-B-009-001  
主持人：曾慶平副教授  
服務機關：國立交通大學生物科技研究所  
關鍵字：大腸桿菌、DNA 超螺旋結構、呼吸鏈基因

#### 中文摘要

大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 為兼性厭氧細菌，在有氧環境下細胞可將葡萄糖經 glycolysis pathway 及 TCA cycle 代謝分解，並將產生的 NADH 經有氧呼吸鏈酵素 cytochrome *o* oxidase (*cyoABCDE*) 與 cytochrome *d* oxidase (*cydABC*) 傳遞電子給最終接收者氧而產生能量。無氧環境下，厭氧呼吸酵素基因包括 nitrate reductase (*narGHJI*)，DMSO/TMAO reductase (*dmsABC*) 及 fumarate reductase (*frdABCD*) 會被活化，而上述好氧呼吸基因則被抑制。ArcA-ArcB 與 Fnr 為目前已知大腸桿菌體內兩組重要轉錄調控子，它們會將外界是否有氧的訊息傳入細胞內而調控上述基因的表現。以前的研究瞭解在無氧環境下，這些厭氧呼吸酵素基因的表現會被 Fnr 活化，但不受 ArcA-ArcB 所調控。雖然 ArcA 與 Fnr 在無氧環境下可調控這些厭氧呼吸酵素的基因表現，但在無氧及有氧環境下這些厭氧呼吸酵素基因之表現於  $\Delta arcA$  及  $\Delta fnr$  突變株中仍有 2~5 倍的差距，由此可知除 ArcA 與 Fnr 外尚有其它因子也參與厭氧呼吸酵素基因表現的調控。因為不同含氧環境已證實會改變 DNA 超螺旋結構，所以我們認為 DNA 超螺旋結構可能會參與調控厭氧呼吸基因的表現。大腸桿菌內 DNA 超螺旋結構主要是由會增加和減少 negative supercoils 的 DNA gyrase 和 topoisomerase I，經彼此互相協調以達到一個 topology 的平衡。本研究中我們利用不同的 gyrase 抑制劑，及構築 topoisomerase I 與 gyrase B subunit 的突變株，分別使菌體內 DNA 超螺旋結構變得鬆散與捲緊，以觀察厭氧呼吸基因在 *in vivo* 中受其調控及表現，結果發現在無氧環境下當 DNA 超螺旋結構較鬆散時四種呼吸鏈基因表現均下降，在 topoisomerase I 突變株中當 DNA 超螺旋結構捲緊時四種基因之 *lacZ* fusion 的表現均被活化。這些呼吸鏈基因受 DNA 超螺旋結構改變之影響在無氧環境下都較有氧環境下明顯，而對  $\Delta arcA$  與  $\Delta fnr$  突變株之厭氧呼吸基因的影響又較野生株為顯著。因此我們認為 ArcA 與 Fnr 在細胞中可能扮演避免 DNA 超螺旋結構變化過大而影響細胞正常生理功能的角色。DNA 超螺旋結構對四種呼吸鏈基因表現之影響，也可能是先經由影響 Fnr 或 ArcA 後再去調控該基因之表現。從本研究中發現 DNA 超螺旋結構在 *in vivo* 中確實是除了 ArcA-ArcB 與 Fnr 外，影響呼吸鏈基因表現的另一調控因子。

## Abstract

*Escherichia coli* exhibits diverse respiratory abilities. It synthesizes at least two distinctive cytochrome oxidases (cytochrome *o* oxidase and cytochrome *d* oxidase) during aerobic growth and can produce an additional terminal oxidoreductase, nitrate reductase (*narGHJ*), DMSO/TMAO reductase (*dmsABC*), and fumarate reductase (*frdABCD*), for anaerobic respiration with the alternative electron acceptors. Although the respiratory genes are activated by the Fnr and ArcA-ArcB, they still have two to five folds induction during anaerobic growth in  $\Delta$ *fnr* and  $\Delta$ *arcA* mutants. Hence Fnr and ArcA-ArcB might not be the sole requirement for the anaerobic induction of anaerobic gene. A topological state of the bacterial chromosome is important for transcription, replication and recombination. To determine how the respiratory gene are regulated in response to a variety of DNA supercoiling, including inhibitors of gyrase and topoisomerase mutants, we examined their expression by using *lacZ* repoter fusions in wild-type,  $\Delta$ *fnr*  $\cdot$   $\Delta$ *arcA* and  $\Delta$ *fnr*  $\Delta$ *arcA* mutant strains. The effect of DNA supercoiling on expression of respiratory genes was more conspicuous when cells were growth under in aerobic condition and in  $\Delta$ *fnr*  $\Delta$ *arcA* mutants. These results infer that Fnr and ArcA-ArcB may be a factor for the balance of DNA superhelicity. When DNA supercoiling was relaxed, expression of *dmsA-lacZ*, *narG-lacZ*, *cyo-lacZ* and *cyd-lacZ* fusions were repressed under anaerobic growth. In contrast, the expression of all respiratory genes increased when DNA supercoiling became more negative. These findings suggest that in addition to Fnr and ArcA-ArcB, DNA supercoiling is another factor for the regulation of respiratory genes expression.

## 研究起緣

大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 為一兼性厭氧細菌 (facultative anaerobe)。在有氧環境下細胞可將葡萄糖經糖解作用 (glycolysis) 和 TCA cycle 代謝分解，並將產生的 NADH 經有氧呼吸鏈酵素 cytochrome *o* oxidase (由 *cyoABCDE* operon 表現) 與 cytochrome *d* oxidase (由 *cydAB* operon 表現) 傳遞電子給最終接受者氧而產生能量。此過程包括細胞呼吸代謝途徑中各基因被活化，並同時抑制厭氧呼吸或發酵代謝途徑中各基因之表現。在無氧環境下除已知的厭氧呼吸酵素基因，包括 nitrate reductase (*narGHJI*)，TMAO reductase (*torA*)，DMSO/TMAO reductase (*damsABC*) 及 fumarate reductase (*frdABCD*) 被活化外，上述各耗氧呼吸基因則被抑制 (6)。ArcA-ArcB 與 Fnr 為目前已知大腸桿菌體內兩組重要轉錄调控子 (global transcriptional regulators)，它們會將外界是否有氧的訊息傳入細胞內而调控上述代謝途徑基因的表現 (7)。

大腸桿菌中的呼吸鏈酵素在有氧及無氧環境下有極不同的基因表現。就以前的研究了解，在無氧環境下，厭氧呼吸酵素基因的表現會被 Fnr 活化，但不會受 ArcA-ArcB 所调控 (2, 3)。有氧呼吸酵素基因則會受 Fnr 與 ArcA-ArcB 所调控 (1, 9, 11)。雖然 Fnr 與 ArcA-ArcB 在無氧環境下可调控這些呼吸酵素基因的表現 (transcriptional level)，但是在 *fnr* 突變株 ( $\Delta fnr$ ) 與 *arca* 突變株 ( $\Delta arca$ ) 及兩者皆突變 ( $\Delta fnr \Delta arca$ ) 的情況下，在無氧或有氧環境時這些呼吸鏈酵素基因的表現仍有 2-5 倍的差距。由此可知，除了 Fnr 與 ArcA-ArcB 的调控外，還有其他因子參與调控呼吸酵素基因的表現。

一般認為 DNA 超螺旋結構為一廣泛性的调控因子。當細胞進行 replication、recombination 和 transcription 時，DNA 超螺旋結構的鬆散程度扮演著明顯而重要的角色 (5)。直接影響大腸桿菌內 DNA 超螺旋結構主要是由 DNA gyrase 和 topoisomerase I 分別增加和減少 negative supercoils，彼此互相協調以達一個 topology 的平衡 (10)。利用質體 DNA 測得不同的 linking number 指出，DNA 超螺旋結構除了直接受 topoisomerase 的影響外，亦可能會受環境因素，如溫度，碳源不同，滲透壓大小 (4)，及含氧量高低而改變 (8)。在此已知厭氧環境下 DNA 超螺旋結構的鬆緊程度比有氧環境下緊密 (8)。故本論文欲探討 DNA 超螺旋結構在有氧或無氧的環境下是否也會影響這些有氧呼吸酵素與厭氧呼吸酵素的基因表現。

## 研究目的

由以前的研究了解呼吸鏈酵素基因在有氧及無氧狀態下是表現不同的得知，細胞對於氧的調控有兩個調節子(regulator)。其中 Fnr 它是在無氧的環境下，抑制了兩個有氧酵素基因 (*cyoABCD* 及 *cydAB*) 的表現而活化三個厭氧酵素基因 (*frdABCD*、*dmsABC* 及 *narGHJI*) 的表現；另一個 ArcA-ArcB，它是抑制了 *cyoABCD* 在無氧的環境下的表現，但活化 *cydAB* 在有氧及無氧狀態下的表現。當去除掉這兩個調控基因後，呼吸鏈基因在有氧及無氧狀態下表現仍有 2-5 倍的差距。這樣的差距讓我們認為還有其他的影響因素存在。而已知因氧含量不同會使 DNA 超螺旋結構狀態改變而影響基因表現。所以我們認為 DNA 超螺旋結構可能參與調控呼吸鏈基因的表現。本實驗利用 gyrase 抑制劑，topoisomerase I 突變株及滲透壓的改變來看 DNA 超螺旋結構的變化對於呼吸鏈基因在有氧無氧環境下所造成的改變。

## 研究結果

1. DNA 超螺旋結構在放鬆或轉緊的狀態下，皆能減低 *cyoABCDE* 在有氧無氧下的表現差距，這樣的在  $\Delta arcA$  及在  $\Delta fnr \Delta arcA$  的突變株中其影響更為明顯，同時 DNA 超螺旋結構改變而增加 *cyoABCDE* 的表現小於添加鹽類而增加 *cyoABCDE* 的表現。(Table 1.)。
2. DNA 超螺旋結構在放鬆或轉緊後，對於 *cydAB* 在厭氧環境下的表現有顯著的影響，並且添加鹽類使 DNA 超螺旋結構轉緊後，*cydAB* 表現增加。在 *ArcA* 去除後，影響了 DNA 超螺旋結構，讓 *cydAB* 在有氧無氧環境下的表現差距減少 (Table 2.)。
3. 當 DNA 超螺旋結構放鬆時使 *narGHIIJ* 和 *dmsABC* 在有氧無氧環境下的表現差異達最小。添加鹽類影響 DNA 超螺旋結構後，使 *narGHIIJ* 和 *dmsABC* 的表現增加。同時，DNA 超螺旋結構在厭氧環境下的影響皆較有氧下明顯，對  $\Delta fnr$  突變株之影響又較野生株明顯 (Table 3.) (Table 4.)。
4. 儘管 DNA 超螺旋結構的轉緊或放鬆，皆降低了 *frdABC D* 的表現，在厭氧狀態下更為顯著，但在有氧無氧下的表現差距仍然存在。同時 DNA 超螺旋結構對 *frdABCD* 的影響和添加鹽對 *frdABCD* 表現的影響並不一樣，顯示可能有其他的影響因子存在。(Table 5.)

Table 1. Effect of DNA supercoiling on *cyo-lacZ* expression in minimal medium

strain	<u>- galactosidase activity(unit)</u>		
	+O <sub>2</sub>	-O <sub>2</sub>	<b>fold</b>
<i>cyo-lacZ</i>			
w.t	145±5	6±1	24
+novobiocin	48±6	4±1	12
+nalidixic acid	63±1	3±1	21
+NaCl	161±16	7±1	23
NaCl+betaine	179±9	9±2	20
<i>cyo-lacZ</i> ( $\Delta top10$ )	188±11	22±3	8.7

strain	<u>- galactosidase activity(unit)</u>		
	+O <sub>2</sub>	-O <sub>2</sub>	<b>fold</b>
<i>cyo-lacZ</i> ( $\Delta fnr$ )			
w.t	135±5	39±4	3.5
+novobiocin	101±8	19±12	5.3
+nalidixic acid	44±1	26±1	1.7
+NaCl	148±12	21±2	7.0
NaCl+betaine	170±14	49±4	3.5
<i>cyo-lacZ</i> ( $\Delta fnr \Delta top10$ )	210±10	57±4	3.7

strain	<u>- galactosidase activity(unit)</u>		
	+O <sub>2</sub>	-O <sub>2</sub>	<b>fold</b>
<i>cyo-lacZ</i> ( $\Delta arcA$ )			
w.t	140±10	71±4	2.0
+novobiocin	72±6	61±7	1.2
+nalidixic acid	NG*	NG*	
+NaCl	113±7	94±17	1.2
NaCl+betaine	175±7	298±2	0.6
<i>cyo-lacZ</i> ( $\Delta arcA \Delta top10$ )	188±8	240±1	0.8

strain	<u>- galactosidase activity(unit)</u>		
	+O <sub>2</sub>	-O <sub>2</sub>	<b>fold</b>
<i>cyo-lacZ</i> ( $\Delta arcA \Delta fnr$ )			
w.t	135±5	86±3	1.6
+novobiocin	100±2	54±3	1.9
+nalidixic acid	NG*	NG*	
+NaCl	142±1	129±5	1.1
NaCl+betaine	223±7	384±5	0.6
<i>cyo-lacZ</i> ( $\Delta arcA \Delta fnr \Delta top10$ )	189±19	280±1	0.7

\*NG means no growth

Table 2. Effect of DNA supercoiling on *cyd-lacZ* expression in minimal medium

strain	<u>- galactosidase activity(unit)</u>		
	-O <sub>2</sub>	+O <sub>2</sub>	<b>fold</b>
<i>cyd-lacZ</i>			
w.t	955±105	210±20	4.5
+novobiocin	825±15	137±21	6.0
+nalidixic acid	883±13	133±7	6.6
+NaCl	2110±180	385±25	5.5
NaCl+betaine	1665±185	231±11	7.2
<i>cyd-lacZ</i> ( $\Delta top10$ )	3395±255	725±85	4.7

strain	<u>- galactosidase activity(unit)</u>		
	-O <sub>2</sub>	+O <sub>2</sub>	<b>fold</b>
<i>cyd-lacZ</i> ( $\Delta fnr$ )			
w.t	1390±80	198±12	7.0
+novobiocin	1323±33	165±5	8.0
+nalidixic acid	870±140	136±6	6.4
+NaCl	3457±237	385±25	9
NaCl+betaine	2695±75	227±31	12
<i>cyd-lacZ</i> ( $\Delta fnr \Delta top10$ )	2685±265	735±105	3.7

strain	<u>- galactosidase activity(unit)</u>		
	-O <sub>2</sub>	+O <sub>2</sub>	<b>fold</b>
<i>cyd-lacZ</i> ( $\Delta arcA$ )			
w.t	170±12	56±9	3.0
+novobiocin	157±16	97±5	1.6
+nalidixic acid	NG*	NG*	
+NaCl	508±23	205±13	2.8
NaCl+betaine	285±15	110±14	2.6
<i>cyd-lacZ</i> ( $\Delta arcA \Delta top10$ )	440±10	120±10	3.6

strain	<u>- galactosidase activity(unit)</u>		
	-O <sub>2</sub>	+O <sub>2</sub>	<b>fold</b>
<i>cyd-lacZ</i> ( $\Delta arcA \Delta fnr$ )			
w.t	142±10	52±7	2.7
+novobiocin	110±6	95±7	1.2
+nalidixic acid	NG*	NG*	
+NaCl	202±8	191±16	1.1
NaCl+Betaine	180±6	98±6	1.8
<i>cyd-lacZ</i> ( $\Delta arcA \Delta fnr \Delta top10$ )	328±18	149±11	2.2

\*NG means no growth

Table 3. Effect of DNA supercoiling on *narG-lacZ* expression

in minimal medium

strain	<u>- galactosidase activity(unit)</u>		<b>fold</b>
	-O <sub>2</sub>	+O <sub>2</sub>	
<i>narG-lacZ</i>			
w.t	1140±100	18±3	65
+novobiocin	920±60	18±1	51
+nalidixic acid	485±65	18±4	27
+NaCl	1820±100	137±13	13
NaCl+betaine	1625±115	107±18	15
<i>narG-lacZ</i> ( $\Delta$ <i>top10</i> )	2485±95	41±5	61

strain	<u>- galactosidase activity(unit)</u>		<b>fold</b>
	-O <sub>2</sub>	+O <sub>2</sub>	
<i>narG-lacZ</i> ( $\Delta$ <i>fnr</i> )			
w.t	28±2	17±2	1.6
+novobiocin	14±2	12±1	1.2
+nalidixic acid	14±1	11±1	1.2
+NaCl	43±3	31±2	1.4
NaCl+betaine	31±3	21±2	1.5
<i>narG-lacZ</i> ( $\Delta$ <i>fnr</i> $\Delta$ <i>top10</i> )	31±3	23±4	1.3

,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,

Table 4. Effect of DNA supercoiling on *dmsA-lacZ* expression



in minimal medium

strain	<u>- galactosidase acivity(unit)</u>		<b>fold</b>
	-O <sub>2</sub>	+O <sub>2</sub>	
<i>dmsA-lacZ</i>			
w.t	740±10	15±1	50
+novobiocin	542±22	16±1	35
+nalidixic acid	314±26	12±1	27
+NaCl	907±33	25±3	37
NaCl+betaine	1345±72	19±1	73
<i>dmsA-lacZ (Δtop10)</i>	800±20	41±3	29

strain	<u>- galactosidase acivity(unit)</u>		<b>fold</b>
	-O <sub>2</sub>	+O <sub>2</sub>	
<i>dmsA-lacZ (Δfnr )</i>			
w.t	31±2	17±1	1.8
+novobiocin	21±1	16±2	1.3
+nalidixic acid	27±3	19±4	1.4
+NaCl	40±4	22±2	1.8
NaCl+betaine	34±3	19±2	2.0
<i>dmsA-lacZ (Δfnr Δtop10)</i>	39±1	25±2	1.6

,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,

Table 5. Effect of DNA supercoiling on *frdA-lacZ* expression

in minimal medium

strain	<u>- galactosidase activity(unit)</u>		<b>fold</b>
	-O <sub>2</sub>	+O <sub>2</sub>	
<i>frdA-lacZ</i>	-O <sub>2</sub>	+O <sub>2</sub>	<b>fold</b>
w.t	1060±80	42±3	35
+novobiocin	748±67	49±6	15
+nalidixic acid	730±20	41±2	18
+NaCl	1395±75	136±1	10
NaCl+betaine	1360±75	94±9	15
<i>frdA-lacZ</i> ( $\Delta$ <i>top10</i> )	705±15	78±6	9

strain	<u>- galactosidase activity(unit)</u>		<b>fold</b>
	-O <sub>2</sub>	+O <sub>2</sub>	
<i>frdA-lacZ</i> ( $\Delta$ <i>fnr</i> )	-O <sub>2</sub>	+O <sub>2</sub>	<b>fold</b>
w.t	228±8	49±4	5.0
+novobiocin	196±16	46±4	4.2
+nalidixic acid	182±14	29±5	6.4
+NaCl	317±36	98±7	3.2
NaCl+betaine	310±20	56±2	5.5
<i>frdA-lacZ</i> ( $\Delta$ <i>fnr</i> $\Delta$ <i>top10</i> )	240±2	73±3	3.3

,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,  
,

討論



1. Cotter, P. A., and R. P. Gunsalus. 1989. Oxygen, nitrate and molybdenum regulation of *dmsABC* gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171: 3817-3823.
2. Cotter, P. A., and R. P. Gunsalus. 1992. Contribution of the *fnr* and *arcA* gene products in coordinate regulation of cytochrome o (*cyoABCDE*) and cytochrome d (*cydAB*) oxidase gene in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 91: 31-36.
3. Cotter, P. A., V. Chepuri., R. B. Gennis., and R. P. Gunsalus. 1990. Cytochrome o (*cyoABCDE*) and Cytochrome d (*cydAB*) oxidase gene expression in *Escherichia coli* are regulated by oxygen, pH, and the *fnr* gene product. *J. Bacteriol.* 172: 6333-6338.
4. Couesbet, G., H., Abaibou, L. F. Wu. 1993. Osmotic repression of anaerobic metabolic systems in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 214-221.
5. Drlica, K. 1992. Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* 6: 425-433.
6. Gunsalus, R. P. 1992. Control of electron flow in *Escherichia coli*: coordinated transcription of respiratory pathway genes. *J. Bacteriol.* 174: 7079-7074.
7. Gunsalus, R. P. And S. I. Park. 1994. Bacterial sensor kinase/response regulator systems. Electron transport regulation: aerobic- anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons. *Res. Microbiol.* 145: 437-450.
8. Hsieh, L., R. M. Burger, and K. Drlica, 1991. Bacterial DNA supercoiling and ATP / ADP: changes associated with a transition to anaerobic growth. *J. Mol. Biol.* 219: 443-450.
9. Jones, H. J., and R. P. Gunsalus. 1985. Transcription of *Escherichia coli* fumarate reductase gene (*frdABCD*) and their coordinate regulation by oxygen, nitrate, and fumarate. *J. Bacteriol.* 164: 1100-1109.
10. Pruss, G. J., H. Stephen., M. K. Drlica. 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell* 31: 35-42.
11. Schroder, I. S., Darie, and R. P. Gunsalus. 1993. Activation of the *Escherichia coli* nitrate reductase (*narGHJI*) operon by NarL and Fnr requires integration host factor. *J. Biol. Chem.* 268:771-774.

△

△