

深海由来好圧・好冷性細菌 *Shewanella violacea* strain DSS12 の NtrB 及び NtrC 遺伝子 (*ntrBC*) の構造解析

池上 昭彦*^{1,2} 仲宗根 薫*¹ 宇佐美 論*²
加藤 千明*¹ 掘越 弘毅*^{1,2}

深海由来好圧・好冷性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株の NtrB 及び NtrC 遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定した。本菌株の NtrB は 347 アミノ酸、推定分子量 38,542Da のタンパクであり、NtrC は 469 アミノ酸、推定分子量 52,108Da のタンパクであることを確認した。本菌株の NtrB 及び NtrC のアミノ酸配列は他の細菌のそれらの配列と高い相同性が見られた。また、本菌株においても既知の NtrB 及び NtrC と同様に因子としての機能特徴づける領域がよく保存されていた。

キーワード：好圧性細菌、シグマ 54 因子、転写

Cloning and sequence analysis of NtrB and NtrC genes (*ntrBC*) of deep-sea barophilic *Shewanella violacea* strain DSS12

Akihiko IKEGAMI *^{3,4} Kaoru NAKASONE *³ Ron USAMI *⁴
Chiaki KATO *³ Koki HORIKOSHI *^{3,4}

The *ntrBC* gene encoding for the bacterial signal-transducing protein NtrB and the bacterial enhancer-binding protein NtrC of barophilic *Shewanella violacea* strain DSS12 was cloned and its nucleotide sequence was determined. The *ntrB* and *ntrC* genes were found to encode putative proteins consisting of 347 and 469 amino acid residues with predicted molecular masses of 38,542 and 52,108 Da respectively. The deduced amino acid sequences of the *ntrBC* products are highly homologous to sequences of NtrB and NtrC proteins of other microorganisms. The functional domains of NtrB and NtrC are well conserved in the case of the *S. violacea ntrBC* gene products.

Keywords : barophilic bacteria, sigma-54, transcription

* 1 深海環境フロンティア、深海微生物研究グループ

* 2 東洋大学工学部

* 3 The DEEPSTAR Group, Frontier Research Program for Deep-sea Extremophiles

* 4 Toyo University

1. はじめに

深海は高水圧と低温の極限的な環境である。このような場所にも種々の微生物が生息していることが知られており、なかでも好圧性微生物（高圧下を好んで生育する微生物）という深海の特徴の一つである高圧力に適応した微生物が存在し、本研究室においても、これまでに深海底泥サンプルから好圧性細菌などの深海環境に適応した微生物が分離されてきた¹⁾。

琉球海溝深度 5,110m の深海底泥より分離された好圧・好冷性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株は、生育至適圧力を 30MPa に持ち、0.1 ~ 70MPa の圧力下では生育に圧力の影響があまり見られないという特徴を有すると同時に、生育至適温度を 8℃ に持ち、15℃ 以上では生育できない典型的な好冷性細菌としての特徴も有する。高圧力と低温の深海環境に適応した微生物の一つである²⁾。

深海微生物が高圧下において常圧下と同様に増殖できるということは、高圧下において効率良く遺伝子発現を行いうる制御機構が存在するからであると我々は考え、高圧条件下での遺伝子発現に着目し、現在、その解析を進めている。これまでに DSS12 株が転写レベルにおいて圧力の影響を受ける遺伝子（圧力応答オペロン）を有していること³⁾、そのプロモーター上に見出された σ^H コンセンサス配列に *Escherichia coli*（大腸菌） σ^H 因子が作用すること⁴⁾、DSS12 株が σ^H 因子を有し、それが生育条件によらず常に一定に発現していること⁵⁾ をこれまでに報告してきた。

圧力に関わる因子として注目した σ^H 因子は、圧力条件によらず構造的に発現されていたが、 σ^H 因子を持つ RNA ポリメラーゼによる転写は、転写調節因子である NtrC とその NtrC を活性化する因子である NtrB により転写調節されていることが他の細菌において報告されており⁶⁾、本菌株においても同様に σ^H 因子を介する転写に作用する因子として、これら NtrB 及び NtrC が重要であると考えた。また、先に行われた DSS12 株のグルタミン合成酵素遺伝子 (*glnA*) の解析から、大腸菌などと同様に *glnA* の下流に NtrB 遺伝子が見いだされ、*glnA* が転写レベルで圧力に応答しており⁷⁾、*glnA* の転写調節因子である NtrB 及び NtrC が圧力応答に関わる因子であることを推測した。

そこで、今回、我々は本菌株より NtrB 及び NtrC 遺伝子 (*ntrBC*) をクローニングし、それらの塩基配列を決定してその特徴を調べたので、その結果について報告する。

2. 実験方法

2.1 サザンハイブリダイゼーション

好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株のグルタミン合成酵素 (*glnA*) の解析から、*glnA* の下流に NtrB 遺伝子 (*ntrB*) の存在が確認されていたので、この *ntrB* の全領域とその下流の領域をクローニングするために、既知にされた *ntrB* 部分をもとにハイブリダイゼーション

用のプローブをジゴキシゲニン (Roche) で標識を行うことにより作製した。

サザンハイブリダイゼーションは、DSS12 株の染色体 DNA を制限酵素 (*KpnI*) で消化後、1% のアガロースゲルで電気泳動を行い、これを Hybond-N+ メンブレン (Amersham) にブロットングした。ブロットング後のメンブレンは用意したハイブリダイゼーション用のプローブを用い、68℃ で一晩ハイブリダイゼーションを行った後、ジゴキシゲニン検出キット (Roche) を使用し検出した。

2.2 クローニング及びシーケンス

サザンハイブリダイゼーションにより明らかになった、約 9kb の *KpnI* 断片は pUC18 にクローニングし、これをコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングを行った。なお、ハイブリダイゼーション用のプローブ及びハイブリダイゼーションの条件はサザンハイブリダイゼーションと同様に行った。クローニングされた *ntrB* を含む DNA 断片は、塩基配列決定のために pUC18 を用いてサブクローニングし、シーケンスサンプルとした。シーケンスサンプルはダイターミネーター法によりシーケンス反応後、ABI-Prism 377 オートシーケンサー (Applied Biosystems) を使用して塩基配列を決定した。

3. 結果と考察

3.1 NtrB 及び NtrC 遺伝子 (*ntrBC*) のクローニング

DSS12 株の *glnA* の解析から、*glnA* の下流に *ntrB* の存在が確認されていたので、*ntrB* の既知部分をもとにハイブリダイゼーション用のプローブを作製し、サザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、約 9kb の *KpnI* 断片に *ntrB* が含まれることが確認された (図 1)。そこで、この *KpnI* 断片をクローニングし、目的

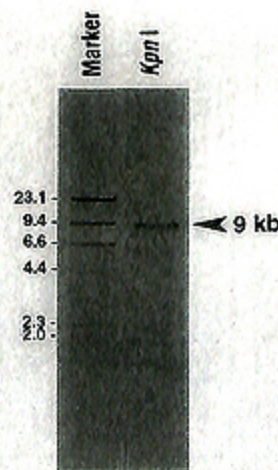


図 1 サザンハイブリダイゼーション (*ntrB* の部分配列をプローブに用いた)

Fig. 1 Southern hybridization analysis of *Shewanella violacea* strain DSS12.

の断片を含むクローンをコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた断片はさらにサブクローニングした後に塩基配列の決定を行った。

決定された *ntrB* を含む *KpnI* 断片の全塩基配列は 8,594bp であった。また、その配列からグルタミン合成酵素遺伝子 (*glnA*)、ORF1、ORF2、NtrB 遺伝子 (*ntrB*)、NtrC 遺伝子 (*ntrC*) の 5 つのオープンリーディングフレーム (ORF) が見出された (図 2)。*glnA* は加藤らにより報告されたものと同じの部分配列であり、*glnA* の下流に見出された 2 つの ORF1 と ORF2 も報告されていたものと同じであったが、今回の結果から新たに *ntrB* の全塩基配列とその下流の *ntrC* の存在が明らかとなった。DSS12 株における遺伝子構造は、*glnA*-ORF1-ORF2-*ntrB*-*ntrC* となっており、*glnA* と *ntrBC* の間に 2 つの ORF が存在し、大腸菌^{9,10)} や *Klebsiella pneumoniae*¹¹⁾ などの細菌において報告されている *glnA*-*ntrBC* オペロンとは違いが見られたが (図 3)、*glnA* の下流に *ntrBC* が存在するという点では同様であった。*ntrBC* の上流域に存在する ORF としては、*nifH* に類似の遺伝子が *Azospirillum brasilense*¹²⁾ などの細菌より見出されているが、DSS12 株より見出された 2 つの ORF はともに *nifH* と相同性が見出されず、また、データベース上からも有意な相同性を有するアミノ酸配列が見出されなかったことから、新しい機能未知の ORF であり、本菌株においてどのような機能を果たしているのかに興味を持たれた。

ntrBC の転写は、他の細菌において 2 つの転写を受けていることが確認されている。一つは *glnA* のプロモーターからのリードスルーであり、もう一方は *ntrBC* の上流に位置する *ntrBC* のプロモーターからの転写である^{9,11,13,14)}。本菌株における *ntrBC* プロモーターからの転写はまだ解析されていないが、*glnA* からの転写が圧力応答していることはすでに報告されており⁹⁾、*glnA* からのリードスルーによる *ntrBC* の転写も同様に圧力応答していることが示唆された。このことから、*ntrBC*

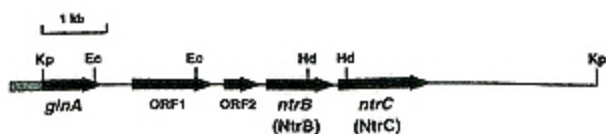


図 2 *Shewanella violacea* DSS12 株の *ntrB* 及びその周辺領域の制限酵素地図
オープンリーディングフレームの位置と方向を矢印に、その下に遺伝子名を示した。制限酵素切断部位は Kp, *KpnI*; Ec, *EcoRI*; Hd, *HindIII* と表した。

Fig. 2 Restriction map showing the location of the *ntrB*, and the flanking regions on the chromosome of *Shewanella violacea* strain DSS12. The coding regions and their direction of transcription are indicated by arrows. Gene names are given under the corresponding coding region. Restriction sites are shown as follows: Kp, *KpnI*; Ec, *EcoRI*; Hd, *HindIII*.



図 3 *S. violacea*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. brasilense* の *ntrBC* 及びその周辺領域の遺伝子構造の比較

Fig. 3 Comparison of the organization around the *ntrBC* among *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. brasilense* and *S. violacea*.

が高圧力下でより強い転写を受け、その産物である NtrB 及び NtrC が高圧力下でより多く発現して作用し、 σ^{54} -RNA ポリメラーゼによる転写を活性化していることが推測された。

3.2 NtrB 及び NtrC のアミノ酸配列の解析

好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株の *ntrB* は 1,041 塩基からなり、本菌株の NtrB は 347 アミノ酸、推定分子量 38,542Da のタンパクであること、*ntrC* は 1,407 塩基からなり、NtrC は 469 アミノ酸、推定分子量 52,108Da のタンパクであることを確認した。DSS12 株の NtrB 及び NtrC のアミノ酸配列を他の細菌 (*Escherichia coli*¹⁰⁾, *Klebsiella pneumoniae*^{11,15)}, *Azospirillum brasilense*¹²⁾) におけるそれらのものと比較した結果、NtrB はそれぞれ 48.5, 48.5, 32.7% の相同性を、NtrC はそれぞれ 70.2, 69.8, 44.9% の相同性を有していることが確認された。

次に、それぞれの機能を有する領域に注目して比較を行った。NtrB は、一般に保存性の低い N 末端ドメインと保存性の高い部位が存在する C 末端側のキナーゼ・ホスファターゼドメインの 2 つのドメインからなり¹⁶⁾、また、キナーゼ・ホスファターゼドメインからは ATP に依存した自動リン酸化に関わる部位 (His-139, C-terminal 59 amino acids) が見出されている¹⁷⁾、本菌株の NtrB においてもそれらの部位が高く保存されており、既知の NtrB と同様のキナーゼ・ホスファターゼ活性を有することが示唆された (図 4)。一方の NtrC は、NtrB によりリン酸化を受ける部位を持つ N 末端ドメイン、 σ^{54} による転写の活性化に関わるセントラルドメイン、DNA 認識と結合に関わる C 末端ドメインの 3 つのドメインからなり、N 末端ドメインにはリン酸化部位 (Asp-54)、セントラルドメインには ATP binding モチーフ (G-G-GK)、C 末端ドメインには Helix-Turn-Helix DNA 結合モチーフ (AL-X9-AA-X2-LG) がそれぞれ存在することが報告されている^{16,18)}。本菌株の NtrC においてもそれら機能に関わる部位が高く保存されており、既知の NtrC と同様に転写因子としての機能 (プロモーター領域に作用して転写レベルで遺伝子発現を調節する) を有していることが示唆され

A

	N-terminal	
S. viol.	-----N-DLKHLLNLTAVVIVDGLRLSYANAAEQGLGVSTKRLTSLADNF	50
E. coli	-----NATGTPDAGQILNSLINSILLIDENLAHYANPAQQQLAQSSKLFPTPLPELL	56
K. pne.	-----NATGTPDAGQILNSLINSILLIDENLAHYANPAQQQLAQSSKLFPTPLPELL	56
A. bra.	NARASAAAPLRPRAPRAPSSVPRVPCIDPSVNLNLPDPLVWDGSGDIRVNLQAQEFFQLSAAAEGLMPLAELL	80
S. viol.	QVLGVSTQILSCAIRDNQLTISTAPLVTLNQHTVDITLPLEHEQGLALLLSQVDDQRRINQ-QLTDAQQAAQY	129
E. coli	SYFSLNIELMQLSBAQGFPTNEVTLVIDGRS-NILSVTAQRSPDGNIL--LEAPMNDQRLSQQEQQLK-AQVVAARD	132
K. pne.	SYFSLNIELMQLSBAQGFPTNEVTLVIDGRS-NILSVTAQRSPDGNIL--LEAPMNDQRLSQQEQQLK-AQVVAARD	132
A. bra.	PPNSPVSLIEQVQQGRKASQGVVITDTPRIGPHRTVTVTALGEPADIVLTVNERTLARKINDSLTHAAASVTA-	159
S. viol.	LVRNLAEIKNPLGRLGAAQLSRELKDFELHEFTDNIIEQADRLSNLVDRLGFP--QKPTNTQNNINIEQVRLKLV	207
E. coli	LVRNLAEIKNPLGRLGAAQLSRELKDFELHEFTDNIIEQADRLSNLVDRLGFP--QKPTNTQNNINIEQVRLKLV	210
K. pne.	LVRNLAEIKNPLGRLGAAQLSRELKDFELHEFTDNIIEQADRLSNLVDRLGFP--QKPTNTQNNINIEQVRLKLV	210
A. bra.	HASMLQEVNPLSGIRGAAQLSEKNSDSRVL-TRLICDEADRTVALVNRSEVFSQDRPLERDAVNHTVLSRVKVA	238
S. viol.	THALPENTQKQYDPSIPDINDEPEIQQAVLNIVQNAVQALGQVGGNIIKTRAQKQITGTQKIKVIALSVI----	283
E. coli	SHLPLNVLIRYDPSLPDLADPDQIEQVLLNIVRQALQALGPDGCEIILRTAFQTLHGCRYLAARIDVE----	286
K. pne.	SHLPLNVLIRYDPSLPDLADPDQIEQVLLNIVRQALQALGPDGCEIILRTAFQTLHGCRYLAARIDVE----	286
A. bra.	QSGPARVIRPIRYDPSLPDVPYQNRDQLIQFNLIKQAAAPESGCEIILSTSYQGVNPLPGGDTLHLPLLSVQ	318
S. viol.	DNGGCIKPELMDLFPYPTGRCDSGLSISQVWRLHGGRIQDQSTPGTEFTILLPIKTA	347
E. coli	DNGGCIKPELMDLFPYPTGRCDSGLSISQVWRLHGGRIQDQSTPGTEFTILLPIKTA	349
K. pne.	DNGGCIKPELMDLFPYPTGRCDSGLSISQVWRLHGGRIQDQSTPGTEFTILLPIKTA	349
A. bra.	DNGGCIKPELMDLFPYPTGRCDSGLSISQVWRLHGGRIQDQSTPGTEFTILLPIKTA	400

B

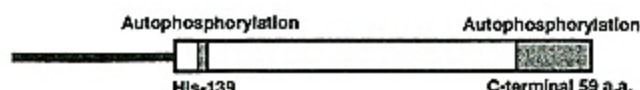


図4 NtrBのアミノ酸配列の比較とNtrBの模式図

(A) *S. violacea*のNtrBと*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium*のNtrBのアミノ酸配列の比較。N-terminal domainとkinase/phosphatase domainはアミノ酸配列の上に、自動リン酸化部位 (His-139, C-terminal 59 amino acids) は黒で表した。(B) NtrBのドメインの模式図。

Fig. 4 Alignment and diagrammatic representation of the *S. violacea* NtrB.

(A) Alignment of the deduced amino acid sequence of *S. violacea* NtrB with three other NtrB proteins. Amino acid sequence of NtrB from *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *A. brasiliense* are compared with that of *S. violacea*. The N-terminal domain and kinase/phosphatase domain are indicated upper the sequence. The autophosphorylation sites (His-139, C-terminal 59 amino acids) are presented with a black background. (B) Diagrammatic representation of the domain structure of the *S. violacea* NtrB.

A

	N-terminal	
C/S. viol.	MTETQ-VWLDGSSIRHVERALGAXISSAPAAESLNEALELQKQVITISIRHPTGDLGLLERLQIHYHPPIVIM	80
C/E. coli	HGRGIVAVDSSIRHVERALGAXISSAPAAESLNEALELQKQVITISIRHPTGDLGLLERLQIHYHPPIVIM	81
C/K. pne.	HGRGIVAVDSSIRHVERALGAXISSAPAAESLNEALELQKQVITISIRHPTGDLGLLERLQIHYHPPIVIM	81
C/A. bra.	MSAATLWADGSSIRHVERALGAXISSAPAAESLNEALELQKQVITISIRHPTGDLGLLERLQIHYHPPIVIM	81
C/S. viol.	TAHSDLSAVSAYQAGAFYLKPPFDIDEAVTLVDRALHSTQDQAVTVEEIQVAPET-IGEPANQGVFPAIGRLSRSS	160
C/E. coli	TAHSDLSAVSAYQAGAFYLKPPFDIDEAVTLVDRALHSTQDQAVTVEEIQVAPET-IGEPANQGVFPAIGRLSRSS	160
C/K. pne.	TAHSDLSAVSAYQAGAFYLKPPFDIDEAVTLVDRALHSTQDQAVTVEEIQVAPET-IGEPANQGVFPAIGRLSRSS	161
C/A. bra.	SAQNTLITANQAAERGAFFYLKPPFDIDEAVTLVDRALHSTQDQAVTVEEIQVAPET-IGEPANQGVFPAIGRLSRSS	162
C/S. viol.	ISVLIIGSGCTGSELWALHNSPRKAPFIALNSAIPKDLIESELPGHEWGAFQANTIRQCFEQADQDTFLDIEIG	241
C/E. coli	ISVLIIGSGCTGSELWALHNSPRKAPFIALNSAIPKDLIESELPGHEWGAFQANTIRQCFEQADQDTFLDIEIG	241
C/K. pne.	ISVLIIGSGCTGSELWALHNSPRKAPFIALNSAIPKDLIESELPGHEWGAFQANTIRQCFEQADQDTFLDIEIG	242
C/A. bra.	LTVTIGSGCTGSELWALHNSPRKAPFIALNSAIPKDLIESELPGHEWGAFQANTIRQCFEQADQDTFLDIEIG	243
C/S. viol.	EMPLDQVTLRLVLDGQFYKVGNSPFIQVDR/IAATHQGLQVQKGFREDCYHRLAVIKVGLPPLSGRRREDIPQLAR	322
C/E. coli	EMPLDQVTLRLVLDGQFYKVGNSPFIQVDR/IAATHQGLQVQKGFREDCYHRLAVIKVGLPPLSGRRREDIPQLAR	322
C/K. pne.	EMPLDQVTLRLVLDGQFYKVGNSPFIQVDR/IAATHQGLQVQKGFREDCYHRLAVIKVGLPPLSGRRREDIPQLAR	323
C/A. bra.	EMPLDQVTLRLVLDGQFYKVGNSPFIQVDR/IAATHQGLQVQKGFREDCYHRLAVIKVGLPPLSGRRREDIPQLAR	324
C/S. viol.	HPLSAAKEIAVEPKLTETAEKLSLPHGN/ROLENTCRHNVHAGQGLLPQGLPPE-LLEQNGQINQSAADFS-	402
C/E. coli	HPLSAAKEIAVEPKLTETAEKLSLPHGN/ROLENTCRHNVHAGQGLLPQGLPPE-LLEQNGQINQSAADFS-	402
C/K. pne.	HPLSAAKEIAVEPKLTETAEKLSLPHGN/ROLENTCRHNVHAGQGLLPQGLPPE-LLEQNGQINQSAADFS-	403
C/A. bra.	HPLSAAKEIAVEPKLTETAEKLSLPHGN/ROLENTCRHNVHAGQGLLPQGLPPE-LLEQNGQINQSAADFS-	402
C/S. viol.	INQESLXIMIDERSAGDNLITVOPAF--F--EKLLEALAMTHGKQAAKLLGGRNTLTHKLKELSHD-	669
C/E. coli	SHATLQKADRALRCHQNLSEAQPE--L--EKLLEALAMTHGKQAAKLLGGRNTLTHKLKELSHD-	668
C/K. pne.	SHATLQKADRALRCHQNLSEAQPE--L--EKLLEALAMTHGKQAAKLLGGRNTLTHKLKELSHD-	669
C/A. bra.	QLSAVERHLKDYPAKKGDSGLYDRVLEVERKLSGLSATAGSIAKQGLGGRNTLTHKLKELSHD-	681

B

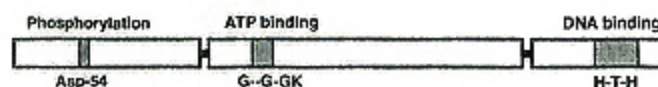


図5 NtrCのアミノ酸配列の比較とNtrCの模式図

(A) *S. violacea*のNtrCと*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium*のNtrCのアミノ酸配列の比較。N-terminal domain, Central domain, C-terminal domainはアミノ酸配列の上に、リン酸化部位 (Asp-54), ATP binding モチーフ (G-G-GK), Helix-Turn-Helix DNA 結合モチーフ (AL-X9-AA-X2-LG) は黒で表した。(B) NtrCのドメインの模式図。

Fig. 5 Alignment and diagrammatic representation of the *S. violacea* NtrC.

(A) Alignment of the deduced amino acid sequence of *S. violacea* NtrC with three other NtrC proteins. Amino acid sequence of NtrC from *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *A. brasiliense* are compared with that of *S. violacea*. The N-terminal domain, Central domain and C-terminal domain are indicated upper the sequence. The phosphorylation site (Asp-54), the ATP-binding motif (G-G-GK), and the helix-turn-helix (HTH) DNA binding motif (AL-X9-AA-X2-LG) in NtrC are presented with a black background. (B) Diagrammatic representation of the domain structure of the *S. violacea* NtrC.

た(図5)。

これらのことから、本菌株の NtrB 及び NtrC は既知のそれらと同様の機能を有していることが示され、本菌株の σ^H -RNA ポリメラーゼによる転写も既知の細菌と同様に、NtrB が NtrC のリン酸化(活性化)または脱リン酸化(抑制)を行い、その NtrC が転写因子として作用することにより転写を調節していることが示唆された。高圧力下での転写調節を解析するために、本菌株の NtrB 及び NtrC の発現量が圧力の影響によりどのように変化しているかを調べるとともに、これらの因子の高圧力下での転写に対する作用(NtrB 及び NtrC の DNA や RNA ポリメラーゼとの相互作用)についても解析することが重要である。

4. 謝辞

この研究で用いた好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 の取得にあたり、潜水調査船を運用して下さった「しんかい 6500」運航チーム及び研究母船「よこすか」の船乗員の皆様に、深く感謝致します。

5. 参考文献

- 1) C.Kato, T.Sato, and K.Horikoshi, "Isolation and properties of barophilic and barotolerant bacteria from deep-sea mud samples." *Biodiv. Conserv.* 4, 1-9 (1995).
- 2) Y.Nogi, C.Kato, and K.Horikoshi, "Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov." *Arch. Microbiol.* 170, 331-338 (1998).
- 3) C.Kato, A.Ikegami, M.Smorawinska, R.Usami, and K.Horikoshi, "Structure of genes in a pressure-regulated operon and adjacent regions from a barotolerant bacterium strain DSS12." *J. Mar. Biotechnol.* 5, 210-218 (1997).
- 4) K.Nakasone, A.Ikegami, C.Kato, R.Usami, and K.Horikoshi, "Mechanisms of gene expression controlled by pressure in deep-sea microorganisms." *Extremophiles* 2, 149-154 (1998).
- 5) K.Nakasone, A.Ikegami, C.Kato, R.Usami, and K.Horikoshi, "Analysis of cis-elements upstream of the pressure-regulated operon in the deep-sea barophilic bacterium *Shewanella violacea* strain DSS12." *FEMS Microbiol. Lett.* 176, 351-356 (1999).
- 6) A.Ikegami, K.Nakasone, M.Fujita, C.Kato, R.Usami, and K.Horikoshi, "Cloning, sequence analysis and expression of the sigma factor σ^H ($rpoN$) of deep-sea barophilic *Shewanella violacea* strain DSS12." *JAMSTECR*, in press (1999).
- 7) M.Merrick, "In a class of its own - the RNA polymerase sigma factor σ^H (σ^N)." *Mol. Microbiol.* 10, 903-909 (1993).
- 8) Y.Nakamura, C.Kato, Y.Ohashi, K.Kimura, and K.Horikoshi, "Gene cloning of glutamine synthetases of high pressure adapted bacteria isolated from deep-sea, and their gene expressions controlled by high pressure." *JAMSTECR* 35, 23-30 (1997).
- 9) S.Ueno-Nishio, K.C.Backman, and B.Magasanik, "Regulation at the *glnL*-operator promoter of the complex *glnALG* operon of *Escherichia coli*." *J. Bacteriol.* 153, 1247-1251 (1983).
- 10) J.Miranda-Rios, R.Sanchez-Pescador, M.Urdea, and A.A.Covarrubias, "The complete nucleotide sequence of the *glnALG* operon of *Escherichia coli* K12." *Nucleic Acids Res.* 15, 2757-2770 (1987).
- 11) S.A.MacFarlane, and M.Merrick, "The nucleotide sequence of the nitrogen regulation gene *ntrB* and the *glnA-ntrBC* intergenic region of *Klebsiella pneumoniae*." *Nucleic Acids Res.* 13, 7591-7606 (1985).
- 12) H.B.Machado, M.G.Yates, S.Funayama, L.U.Rigo, M.B.Steffens, E.M.Souza, and F.O. Pedrosa, "The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nifH3*-like-*ntrB-ntrC* operon and are negatively regulated." *Can. J. Microbiol.* 41, 674-684 (1995).
- 13) R.Dixon, "Tandem promoters determine regulation of the *Klebsiella pneumoniae* glutamine synthetase (*glnA*) gene." *Nucleic Acids Res.* 12, 7811-7830 (1984).
- 14) L.J.Reitzer, and B.Magasanik, "Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 1979-1983 (1985).
- 15) W.J.Buikema, W.W.Szeto, P.V.Lemley, W.H.Orme-Johnson, and F.M.Ausubel, "Nitrogen fixation specific regulatory genes of *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* share homology with the general nitrogen regulatory gene *ntrC* of *K. pneumoniae*." *Nucleic Acids Res.* 13, 4539-4555 (1985).
- 16) M.J.Merrick, and R.A.Edwards, "Nitrogen Control in Bacteria." *Microbiol. Rev.* 59, 604-622 (1995).
- 17) E.G.Ninfa, M.R.Atkinson, E.S.Kamberov, and A.J.Ninfa, "Mechanism of autophosphorylation *Escherichia coli* of nitrogen regulator II (NR_{II} or NtrB): trans-phosphorylation between subunits." *J. Bacteriol.* 175, 7024-7032 (1993).
- 18) E.Morett, and L.Segovia, "The σ^H bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains." *J. Bacteriol.* 175, 6067-6074 (1993).

(原稿受理: 1999年8月18日)