

報 文

ウェルシュ菌 ϵ 毒素遺伝子の新規 bent DNA と温度依存的発現野寺菜美子¹⁾, 宮田 茂^{1,2)}¹⁾中部大学大学院応用生物学研究科, ²⁾中部大学応用生物学部

要 旨

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) の産生する ϵ 毒素は, 家畜の腸性毒素血症の原因毒素であり, ボツリヌス毒素, 破傷風毒素に次ぐ強い致死活性を有するタンパク質毒素である. 本研究で, ϵ 毒素の発現に及ぼす温度の影響について調べた結果, ϵ 毒素は, 動物体内に相当する 37°C で高発現し, 環境中に相当する 25°C では, ほとんど発現しなかった. ϵ 毒素遺伝子 (*etx*) の転写開始点を調べた結果, その周辺と下流に新規の bent DNA を見出した. そこで, 各温度における mRNA 量を, 他の bent DNA をもつプロモーターによって調節される既知の遺伝子と比較した結果, 他の遺伝子は 25°C または広い温度範囲で高い発現量を示すのに対して, *etx* は 37°C で高く, その温度依存的発現は転写レベルで調節されていることが明らかとなった. これらの結果は, プロモーター周辺領域に存在する bent DNA が, 原核細胞における cis-element として働き, その位置により遺伝子の最適な発現温度を調節していることを示唆している.

1. はじめに

Clostridium perfringens はグラム陽性芽胞形成性の偏性嫌気性桿菌で, 菌株によって産生する毒素が異なり, メジャー毒素である α 毒素, β 毒素, ϵ 毒素, ι 毒素の産生性から, A 型菌, B 型菌, C 型菌, D 型菌, E 型菌に分類されてきた (McDonel, 1986). そのなかでも, B 型菌や D 型菌は, 家畜類の腸性毒素血症 (致死率 100%) の原因毒素である ϵ 毒素を産生する. ϵ 毒素は, ヒトの多発性硬化症に関与していることが示唆されている (Wagley, et al., 2019). ボツリヌス毒素, 破傷風毒素に次ぐ強力な致死活性を有し, マウスに対する半数致死量は, 1~2 ng/mouse である (Minami, et al., 1997).

放射性同位体ラベルした ϵ 毒素を用いた実験から, ϵ 毒素は脳と腎に蓄積することが示され, また, 脳と腎に組織障害が認められることから, ϵ 毒素の標的組織は脳と腎であることが示唆されている (Tamai, et al., 2003). 主に羊では, 腎にいわゆる pulpy kidney disease を引き起こすが, 腎全摘マウスによる ϵ 毒素感受性試験から, むしろ腎は脳に対する障害を保護していると考えられている. また, ϵ 毒素により神経症状を呈することや海馬からグルタミン酸の過剰放出を促しグルタミン酸作動性ニュー

ーロンの異常興奮を介して神経細胞に直接障害を与えることから (Miyamoto, et al., 1998, Miyamoto, et al., 2000), ϵ 毒素の致死活性は主に脳の神経細胞が傷害されることが原因と考えられている. 一方で, blood-brain barrier 透過機構が不明なことから脳血管上皮細胞障害説も有力である.

ϵ 毒素遺伝子 (*etx*) は, プラスミド上にコードされており, その構造遺伝子は 987 塩基対からなる. 生合成後, 分泌に伴い N 末端シグナル配列が除去され, 分子量約 33,000 (296 残基) のプロトキシンとして産生される. その後, トリプシンやキモトリプシン, 本菌が産生する λ 毒素等のタンパク質分解酵素でプロセシングされると活性化され, 活性化された毒素は, 致死活性だけでなく壊死活性や細胞毒性などの毒素活性も示す. タンパク質分解酵素により N 末端領域もプロセシングされるが, 本毒素の活性化には C 末端領域のプロセシングが必須であり (Miyata, et al., 2001), 活性化された毒素は標的細胞膜の lipid rafts で 7 両体形成し, 細胞膜に膜孔を形成する (Miyata, et al., 2002). 培養細胞を用いた研究から, lipid rafts の脂質組成の変化が毒素の感受性に大きな影響を与えることが報告されている (Shimamoto, et al., 2005).

C. perfringens は、土壤中に一般的にみられる細菌であるが、その一方でヒトを含む動物の下部消化管内にも普遍的に存在している。各種リソースの有効利用のため、土壤中に存在している場合と、動物体内に存在している場合では、*etx* の発現に変化が起こるものと推察される。*etx* の発現調節機構に関する知見を得ることは、病原細菌の病原性に関して新たな理解を深めるとともに、新たな治療薬剤の標的としての可能性を示唆するものと考えられるため、本研究では *etx* の発現調節の有無やプロモーター領域の解析を行った。

2. 材料と方法

2-1. 供試菌株及び培養

GAM 寒天培地上の *C. perfringens* type B NCIB 10691 のシングルコロニーを、ねじ口試験管中の TYG 培地 (10 ml) に植菌した。37°C で終夜静置培養した培養液を新たな TYG 培地 (100 ml) に 1% 接種し、25°C、37°C または 42°C で、OD₆₀₀ を随時モニターリングしながら静置培養した。

2-2. ϵ 毒素産生量の測定

各温度の培養液から、OD₆₀₀ = 約 0.8 (25°C で 13 時間、37°C 及び 42°C で 3.5 時間) 及び約 1.9 (25°C で 24 時間、37°C 及び 42°C で 6 時間) でサンプリングし、遠心分離後 (15 krpm, 4°C, 10 min) の上清中の ϵ 毒素量を ELISA により測定した。各温度の培養上清を 0.1M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.6) で希釈し、それぞれの希釈液 100 μ l を 96 穴 ELISA プレートのウェルに入れ、4°C で一晩インキュベートすることで抗原を吸着させた。Blocking buffer (2% polyvinylpyrrolidone を含む PBS-tween) でブロッキング後、ウサギ抗 ϵ 毒素抗体 (Tamai, et al., 2003) を一次抗体、horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG, A, M を二次抗体として反応させ、ペルオキシダーゼ用発色キット T (ML-1120T, 住友ベークライト) で発色させた。マイクロプレート・リーダーで 450 nm の吸光度を測定し、ブランクの値を引いた後、培養上清の希釈倍率を乗じた値を arbitrary unit とした。なお、ブランクは培養上清の代わりに Blocking buffer を用いた。

2-3. primer extension 及び northern blot 解析

各温度で培養し、それぞれ OD₆₀₀ = 約 0.8 に達した時点で培養液 20 ml をサンプリングし、既報 (Fujinaga, et al., 1999) に従い total RNA を調製し、primer extension 及び northern blot 解析を行った。primer extension による転写開始部位の決定では、+80 から +109 の位置の塩基配列に相補的なプライマー (図 3A 参照) を [γ -³²P]ATP と T4 polynucleotide kinase で 5'-³²P 標識して用いた。Total RNA とハイブリダイズさせた後に逆転写酵素 (Superscript RT; Life Technologies) で伸長反応し、RNase 処理後、伸長産物をシーケンス・ゲルで電気泳動した。ゲノム・ライブラリーよりクローニングした *etx* を有するプラスミド pEX2 のシーケンス反応を、同じプライマーで Sequenase for labeled dATP kit (TOYOBO) を用いて行い、同時に電気泳動した。northern blot 解析は、total RNA 5 μ g を用い、PCR 増幅した遺伝子断片を Digoxigenin-11-dUTP で標識した DNA プローブを 60°C でハイブリダイズし、既報 (Fujinaga, et al., 1999) に従って検出した。

2-4. bent DNA の推定構造の解析

bent center の位置と折れ曲がりの角度は、Shpigelman らの CURVATURE プログラム (Shpigelman, et al., 1993) により計算しコンピューター解析により推定した。

2-5. bent center 決定のための DNA 断片の調製と PAGE による解析

160 bp になるように、図 3A に示す 5 組のプライマー・セットを用いて PCR により 5 種類の DNA 断片を増幅した。PCR 産物を精製後、各 DNA 断片の塩基配列を増幅に用いたプライマーで両ストランドとも決定し、塩基配列の正確性と DNA 断片が 160 bp であることを確認した。これらの DNA 断片を 10% ポリアクリルアミド・ゲルにアプライし、TBE 緩衝液系で 4°C 及び 60°C で電気泳動を行い、EtBr 染色により DNA 断片を検出した。bent center の解析は既報 (Kaji, et al., 2003) に従い 4°C での最も移動度の遅い断片を決定する方法により行った。

3. 結果と考察

3-1. ϵ 毒素発現に及ぼす培養温度の影響

C. perfringens type B 株を 25°C, 37°C 及び 42°C で培養し, 培地中に分泌された ϵ 毒素の相対量を, 抗 ϵ 毒素抗体を用いた ELISA により求めた. 図 1 に示したように, 37°C 及び 42°C と比較して, 25°C では極端に ϵ 毒素産生量が低かった. また, OD₆₀₀ が対数増殖期中期である約 0.8 まで培養した場合と対数増殖期後期である約 1.9 まで培養した場合で, 毒素生産量に大きな差がみられなかったことから, ϵ 毒素は対数増殖期に発現することが明らかとなった.

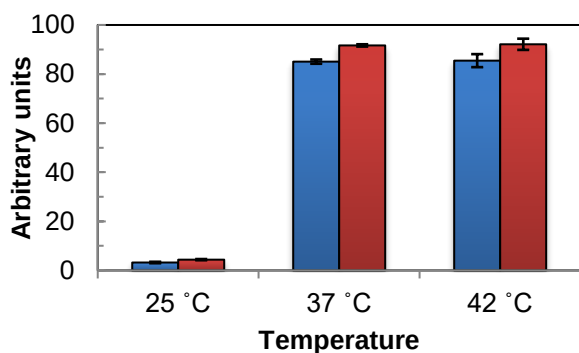


図1. 各培養温度における ϵ 毒素の産生量

C. perfringens NCIB 10691 の終夜培養液を TYG 培地に 1% 接種し, 各温度で OD₆₀₀ が約 0.8 (青) 及び約 1.9 (赤) まで培養した. 遠心分離後の上清を希釈し, ELISA により ϵ 毒素量を見積もった. 実験は 3 連で行い, mean $\pm$ SD で示した.

3-2. プロモーター領域の決定と bent DNA

etx の発現が 25°C で極端に低いことから, 何らかの転写調節の可能性が考えられたため, プロモーター領域の決定のために primer extension により転写開始点を決定した(図 2). 図 3A に示したように, 転写開始点から予想されるプロモーター配列は, -10 領域が TATAGT とコンセンサス配列(TAtAaT)と比較して 6 塩基中 5 塩基とよく一致したが, -35 領域が ATTATT とコンセンサス配列(TTGACa)と比較して 6 塩基中 2 塩基と一致率が低かった. *C. perfringens* では -35 領域が明瞭でない遺伝子プロモーターが多々あり, そのようなプロモーターの場合, 多くの細菌と同様にいわゆる extended -10 box である -14/-15 に TG motif を有する場合が多い(図 3B). しかし, *etx*

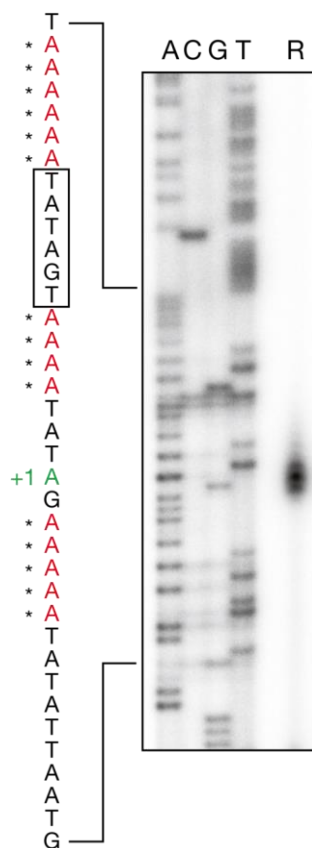


図 2. primer extension による *etx* の転写開始点の決定

C. perfringens NCIB 10691 の終夜培養液を TYG 培地に 1% 接種し, 37°C で OD₆₀₀ が約 0.8 まで培養した. 菌体から total RNA を調製し, ³²P ラベルしたプライマーを用いて primer extension を行った(R). また, 同じプライマーを用いて pEX2 のシーケンス反応を行い(A, C, G 及び T), PAGE 後, オートラジオグラフィーにて検出した. 転写開始点を緑字(+1)で, phased A-tracts を赤字で, 推定 of -10 領域を四角で囲って示した.

のプロモーター領域には TG motif はみられず, -10 領域 ~ +1 にオーバーラップするように phased A-tracts が存在し, 開始コドン下流にも phased A-tracts がみられたので, それぞれ, 上流から Bent 1 及び Bent 2 と命名した.

二重らせん構造をとる DNA は 10~11 塩基で 1 回転するが, 10~11 塩基ごとに連続した A 塩基からなる A-tract が存在すると(phased A-tracts), AT 塩基対が DNA 軸の直交面に対して少し傾いているため, DNA 全体ではその領域が大きく湾曲する(bent DNA). コンピュータプログラムを用いて, *etx* のプロモーター上流領域からコーディング領域の 5'側までの領域の bending を解析し



図 3. *etx* の 5' 側領域の塩基配列と推定アミノ酸配列と bent DNA を有するプロモーター領域

(A) *etx* の 5' 側領域とその上流領域の塩基配列を示すと同時に推定アミノ酸配列をその下に示した。primer extension で決定した転写開始点を濃緑色で、推定される -35 及び -10 領域を下線で、A-tract を赤色で示した。推定アミノ酸配列中のシグナル配列を淡緑色で、prototoxin の配列を黒色で示した。primer extension で用いたプライマーを黒色矢印で、bent center を決定するための DNA 断片 (160 bp) 作製用のプライマー・セットをそれぞれ各色で塩基配列の下に示した。

(B) *plc* (-67~+10), *fdx* (-67~+10), 及び *etx* (-67~+60) の塩基配列を multiple alignment で示した。phased A-tracts は赤字で、転写開始点 (+1) は緑色で示した。推定の -35 及び -10 領域は下線で、-14/-15 の TG-motif は二重下線で示した。

た結果、図 4 に示したように Bent 1 及び Bent 2 は、それぞれ約 63° 及び約 42° 湾曲していることが予測された。図 3A に示すプライマーを用いて 5 種類の 160 bp の DNA 断片を PCR で作成し、4°C 及び 60°C で電気泳動した。図 5A には 4°C の泳動パターンを、図 5B には見かけの DNA 断片の長さを実際の長さ (160 bp) で除した R_L 値を計算しプロットした。一般に、湾曲部位が中心にある遺伝子断片は低温下での PAGE で移動度が大きく遅れ、温度を上げることにより折れ曲がり構造が解消され移動度が実際の長さに近づいていく。*etx* では、Bent 1 及び Bent 2 を有する断片 3 で最も移動度が遅く、また Bent 1 を中心にした断片 2 及び Bent 2 を中心にした断片 4 でも R_L 値は 1.2 以上の値を示した (図 5B)。これらの結果から、図 4 で予測した位置に bent center が存在することが示唆

された。なお、結果は示していないが、折れ曲がり構造が解消される 60°C で電気泳動した場合は、明瞭なバンドは検出されなかった。断片 5 以外は GC 含量が 20% 以下であり、おそらく一本鎖に解離したかあるいは AT が連続する領域が存在するために部分的な解離・再結合を繰り返したために、バンドが収束しなかった可能性が考えられた。

3-3. 各種 bending したプロモーター領域を有する遺伝子の mRNA 量

細菌の転写調節の *cis*-element としては、UP-element や bent DNA が知られている。UP-element はその配列が、bent DNA は DNA 構造そのものが転写活性化に重要で

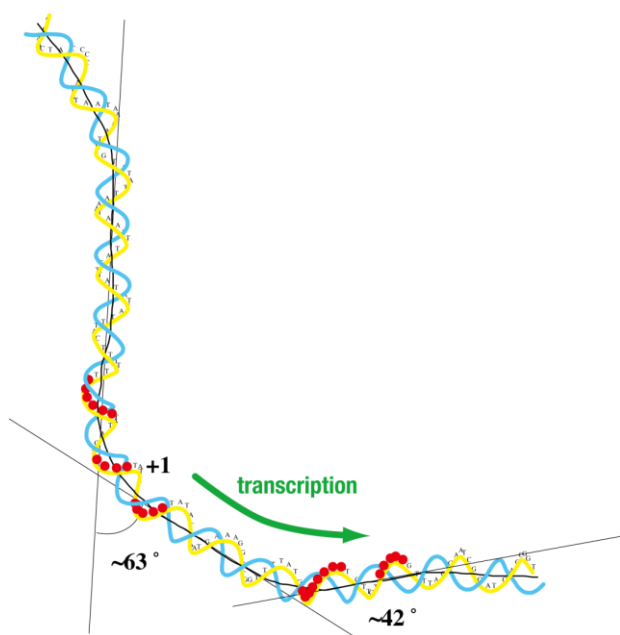


図 4. *etx* の bent DNA の推定構造

CURVATURE プログラムで計算した *etx* の推定 bent 構造を示した. mRNA 様ストランドを黄色で, phased A-tracts の A 塩基を赤丸で示した.

あるとされている. UP-element は, プロモーターの-35 領域の上流に存在すると RNA ポリメラーゼの C-末端ドメインと相互作用し, 転写を何十倍も活性化させる (Estrem, et al., 1998). *C. perfringens* の α 毒素 (ホスホリパーゼ C) 遺伝子 (*plc*) のプロモーター上流には 3 つの Phased A-tracts があり (図 3 B), 強い折れ曲がり構造をとり, 下流のプロモーター活性を増強し, 折れ曲がりが強まる低温ほどその効果が強いと報告されている (Katayama, et al., 1999). その転写増強効果は, RNA ポリメラーゼの α サブユニットの C-末端ドメインとの結合を介するものであり, 一般に見られるプロモーターの直上流の bent DNA の機能と分子機構が明らかにされている (Katayama, et al., 2001). 一方, 本菌の特性である顕著な糖発酵と水素ガス産生に electron carrier タンパク質として関与し, 菌体内含有量の高いフェレドキシンの遺伝子 (*fdx*) には, プロモーターの-35 領域上流からプロモーター内部にかけて 5 つの Phased A-tracts が存在するため (図 3 B), 顕著な bent DNA の構造をとり, プロモーター上流の 3 つの A-tracts とプロモーター内部の 2 つの A-tracts の共同作用で転写を著しく増強している (Kaji, et al., 2003).

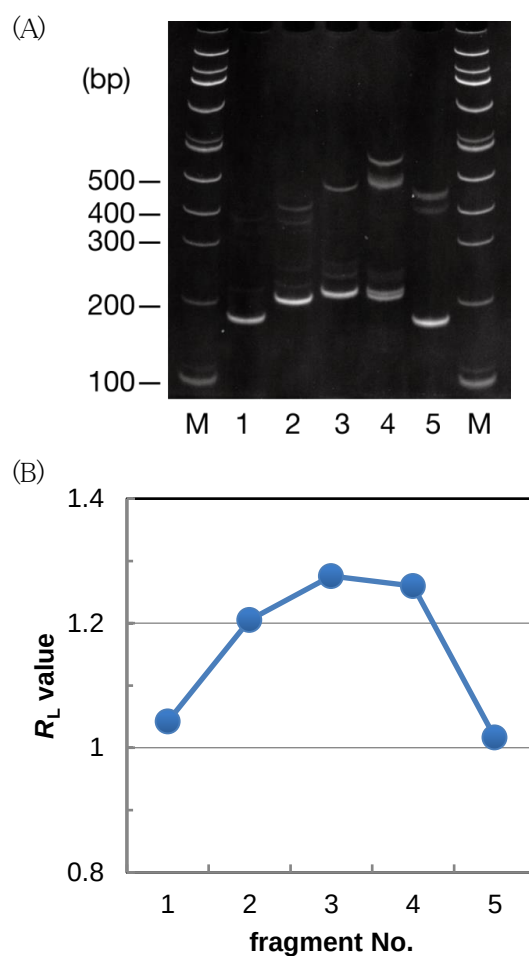


図 5. *etx* の bent center の解析

(A) 図 3 A で示したプライマー・セット (lane 1, 1F-1R; lane 2, 2F-2R; lane 3, 3F-3R; lane 4, 4F-4R; lane 5, 5F-5R) を用いてそれぞれ 160 bp の DNA 断片を増幅した. 10%ポリアクリルアミド・ゲルを用いてそれぞれの PCR 産物の電気泳動を 4℃で行った.

(B) 見かけの DNA 断片の長さを実際の長さ (160 bp) で除して R_L 値を計算し, プロットした.

一般に, タンパク質の発現量は転写, 翻訳, 分泌の総和の結果であり, 必ずしも転写活性のみを反映するものではないが, *C. perfringens* type B の *etx*, *fdx* 及び *plc* の mRNA 量を northern blot により調べた結果 (図 6), プロモーターの直上流に bent DNA を有する *plc* は 25℃で培養した場合に最も mRNA 量が多く, type A 株である *C. perfringens* ATCC 13124 で報告 (Katayama, et al., 1999) があるように, 折れ曲がりの強くなる低温ほど転写活性が増強していることが示唆された. プロモーターの上流からプロモーター内部にかけて強い折れ曲がり示すハウ

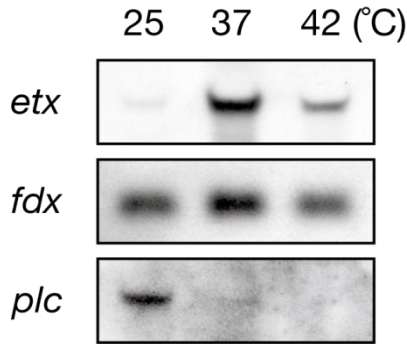


図 6. 各温度における *etx*, *fdx* 及び *plc* の mRNA 量

C. perfringens NCIB 10691 の終夜培養液を TYG 培地に 1%接種し、各温度で OD₆₀₀ が約 0.8 まで培養した。各温度で培養した菌体から total RNA を調製し、変性アガロースゲル電気泳動後、それぞれの遺伝子に特異的なプローブを用いて northern blot を行った。

スキープング遺伝子である *fdx* は、type A 株の *C. perfringens* 13 で報告 (Kaji, et al., 2003) があるように、いずれの温度においても mRNA 量に大きな差は見られなかった。一方、*etx* の mRNA 量は、環境中に相当する 25°C で培養した場合よりも、動物の体温に相当する高温の方が高く、かつ 37°C で培養したほうが 45°C で培養した場合よりも高かった。これらの結果から、培養温度による ϵ 毒素の発現量の変化は、転写活性の変化によることが示唆された。*C. perfringens* type B の生存戦略として、環境中では芽胞の形で生残し、動物に感染した際には、免疫により排除される前に ϵ 毒素生産量を増やし、死に至らしめた後、各種プロテアーゼやマトリックス分解酵素により死体を分解・資化し、体温の低下とともに ϵ 毒素の転写を抑制し、最後は α 毒素により脂質を分解し栄養源として用いていると推察された。

4. おわりに

本研究では、 ϵ 毒素のプロモーター領域に 2 つの bent DNA (Bent 1 及び Bent 2) が存在することを見出した。これらの bent DNA により、これらの領域は大きく湾曲し (図 4)、その相対位置から今まで報告されていない新規 bent DNA であることが明らかとなった (図 3)。Bent 1 の折れ曲がり構造は、 σ 因子とプロモーターの結合または σ 因子と RNA ポリメラーゼの結合、すなわち Closed

complex の形成に影響を与えられ、Bent 2 での折れ曲がり構造は Open complex 形成時の安定化に寄与する可能性が推測されるが、いずれにせよその転写における役割は不明である。また、Bent 1 にオーバーラップするように、direct repeat が存在しており、しばしば指摘されているように、bent DNA の領域は DNA 結合タンパク質が結合しやすい領域である可能性もある。これらの点も含めて、bent DNA が ϵ 毒素の発現に及ぼす影響について、今後、検討を進める予定である。

5. 謝辞

本研究は JSPS 科研費 JP 21K12341 の助成を受けたものです。また、谷口有紀氏の技術的補助に感謝します。

引用文献

- Estrem ST, Gaal T, Ross W, Gourse RL. (1998) Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 9761-9766.
- Fujinaga K, Taniguchi Y, Sun Y, Katayama S, Minami J, Matsushita O, and Okabe A. (1999) Analysis of genes involved in nitrate reduction in *Clostridium perfringens*. *Microbiology* 145, 3377-3387.
- Kaji M, Matsushita O, Tamai E, Miyata S, Taniguchi Y, Shimamoto S, Katayama S, Morita S, Okabe A. (2003) A novel type of DNA curvature present in a *Clostridium perfringens* ferredoxin gene: characterization and role in gene expression. *Microbiology*. 149, 3083-3091.
- Katayama S, Matsushita O, Jung CM, Minami J, Okabe A. (1999) Promoter upstream bent DNA activates the transcription of the *Clostridium perfringens* phospholipase C gene in a low temperature-dependent manner. *EMBO J*. 18, 3442-3450.
- Katayama S, Matsushita O, Tamai E, Miyata S, Okabe A. (2001) Phased A-tracts bind to the alpha subunit of RNA polymerase with increased affinity at low

temperature. FEBS Lett. 509, 235-238.

McDonel JL. (1986) Toxins of *Clostridium perfringens* types A, B, C, D and E. p. 477-517. In F. Dörner and J. Drews (ed.), Pharmacology of bacterial toxins. Pergamon Press, Oxford.

Minami J, Katayama S, Matsushita O, Matsushita C, Okabe A. (1997) Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides. Microbiol Immunol. 41, 527-535.

Miyamoto O, Minami J, Toyoshima T, Nakamura T, Masada T, Nagao S, Negi T, Itano T, Okabe A. (1998) Neurotoxicity of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin for the rat hippocampus via the glutamatergic system. Infect Immun. 66, 2501-2508.

Miyamoto O, Sumitani K, Nakamura T, Yamagami S, Miyata S, Itano T, Negi T, Okabe A. (2000) *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes excessive release of glutamate in the mouse hippocampus. FEMS Microbiol Lett. 189, 109-113.

Miyata S, Matsushita O, Minami J, Katayama S, Shimamoto S, Okabe A. (2001) Cleavage of a C-terminal peptide is essential for heptamerization of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the synaptosomal membrane. J Biol Chem. 276, 13778-13783.

Miyata S, Minami J, Tamai E, Matsushita O, Shimamoto S, Okabe A. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin forms a heptameric pore within the detergent-insoluble microdomains of Madin-Darby canine kidney cells and rat synaptosomes. J Biol Chem. 277, 39463-39468.

Shimamoto S, Tamai E, Matsushita O, Minami J, Okabe A, Miyata S. (2005) Changes in ganglioside content affect

the binding of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin to detergent-resistant membranes of Madin-Darby canine kidney cells. Microbiol Immunol. 49, 245-53.

Shpigelman ES, Trifonov EN, Bolshoy, A. (1993) CURVATURE: software for the analysis of curved DNA. Comput Appl Biosci. 9, 435-440.

Tamai E, Ishida T, Miyata S, Matsushita O, Suda H, Kobayashi S, Sonobe H, Okabe A. (2003) Accumulation of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the mouse kidney and its possible biological significance. Infect Immun. 71, 5371-5375.

Wagley S, Bokori-Brown M, Morcrette H, Malaspina A, D'Arcy C, Gnanapavan S, Lewis N, Popoff MR, Raciborska D, Nicholas R, Turner B, Titball RW. (2019) Evidence of *Clostridium perfringens* epsilon toxin associated with multiple sclerosis. Mult Scler. 25, 653-660

Title : A novel type of bent DNA and temperature-dependent expression of epsilon-toxin gene in *Clostridium perfringens*.

Authors : Namiko Nodera¹⁾, Shigeru Miyata^{1,2)}

Addresses : ¹⁾ Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.

²⁾ College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.

Keywords : bent DNA, *Clostridium perfringens*, curvature, epsilon toxin, phased A-tracts

Summary

A novel type of bent DNA and temperature-dependent expression of epsilon-toxin gene in *Clostridium perfringens*.

Namiko Nodera¹⁾, Shigeru Miyata^{1,2)}

1) Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.

2) College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.

Clostridium perfringens epsilon-toxin, the third most potent clostridial toxin after botulinum and tetanus toxins, is responsible for fatal enterotoxemia in domestic animals. In this study, we examined the expression of the toxin under various temperatures and analyzed the promoter region of epsilon-toxin gene, *etx*. Higher levels of the toxin were produced by *C. perfringens* type B at 37°C, but very little at 25°C. Analysis of the promoter region of *etx* revealed that it has a novel type of DNA curvature. Comparing the amount of mRNA from *etx* with those from two other genes regulated by promoters with different types of bent DNA, it was found that the *etx* promoter exhibited high levels of transcription at 37°C, while the other promoters at 25°C or over a wide range of temperature. These results suggest that bent DNA present in the region around the promoter acts as a *cis*-element in prokaryotic cells and regulates the optimum expression temperature of the gene depending on its position.