

大腸菌機能未知転写因子YdhMの転写調節機能
の解明

梅澤, 喜正 / UMEZAWA, Yoshimasa

(発行年 / Year)

2008-03-24

(学位授与年月日 / Date of Granted)

2008-03-24

(学位名 / Degree Name)

修士(工学)

(学位授与機関 / Degree Grantor)

法政大学 (Hosei University)

2007 年度 修士論文

大腸菌機能未知転写因子 YdhM の
転写調節機能の解明

Regulatory role of undescribed transcription factor
YdhM from *Escherichia coli*.

指導教員 石浜 明 教授

法政大学大学院工学研究科物質化学専攻修士課程
分子生物学研究室

学籍番号 06R2103

ウメザワ ヨシマサ
梅澤 喜正

目次	
略語2
第1章 序論3
第2章 実験試薬	
2-1. 作製培地5
2-2. 抗生物質6
2-3. 作製試薬7
2-4. 試薬と kit17
第3章 実験方法	
3-1. 使用したプライマーと大腸菌株、プラスミド18
3-2. Genomic SELEX 法20
3-3. Gel Shift Assay25
3-4. DNase-I Footprinting Assay26
3-5. Promoter Assay27
3-6. Northern Blotting29
3-7. Phenotype Microarray31
3-8. Primer Extension Assay33
第4章 結果と考察	
4-1. Genomic SELEX34
4-2. Gel Shift Assay35
4-3. DNase-I Footprinting Assay35
4-4. Promoter Assay38
4-5. Primer Extension Assay39
4-6. Phenotype Microarray40
4-7. Gel shift assay in the presence of RutR41
4-8. Gel shift assay in the presence of NEM42
4-9. Role of ydhM on NEM resistance43
4-10. Northern Blotting44
第5章 結言45
第6章 参考文献46
第7章 謝辞47

略語

Amp	ampicillin
APS	ammonium peroxodisulfate
ATP	adenosine triphosphate
bp	base pair(s)
ddH ₂ O	double distilled water
dH ₂ O	distilled water
DEPC	diethylpyrocarbonate
DIG	digoxigenin
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	deoxyribonuclease
dNTP	deoxynucleoside triphosphate
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	ethanol
FITC	fluorescein-4-isothiocyanate
GFP	green fluorescent protein
LB	Luria-Bertani
MW	molecular weight
NEM	<i>N</i> -ethylmaleimide
O.D.	optical density
O/N	over night
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS(-)	phosphate buffer saline minus
PCR	polymerase chain reaction
RFP	red fluorescent protein
RNA	ribonucleic acid
RNAP	RNA polymerase
RNase	ribonuclease
rpm	revolution per minute
S.A.	sodium acetate
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
Tris	tris(hydroxymethyl) amino methane
X-gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside

第1章 序論

大腸菌ゲノムには約 4,500 の遺伝子が存在し、転写装置 RNA ポリメラーゼ(RNAP)は一細胞中約 2,000 分子存在する(Karp *et al.*, 2007; Ishihama, 2000)。つまり環境に応じて RNA ポリメラーゼのゲノム上の分配が変化し、それによって生育に必要な遺伝子が選択されている(図 1)。発現する遺伝子の種類とその発現レベルは RNA ポリメラーゼが 7 種類のシグマ因子および約 300 種類の転写因子との相互作用によって転写対象遺伝子の選択を変化させることで調節されているが、モデル生物である大腸菌でさえ 1/3 の転写因子の調節機構が解明されていない(Maeda *et al.*, 2000; Pérez-Rueda and Collado-Vides, 2000)。これは DNA 結合ドメインまたは他の既知転写因子の類似モチーフより構造が予想されているものの実験的な機能証明が無いためである。機能未知転写因子は一般的な培養条件下では発現しない場合が多く、転写調節機能を解明する手段の確立が求められている。

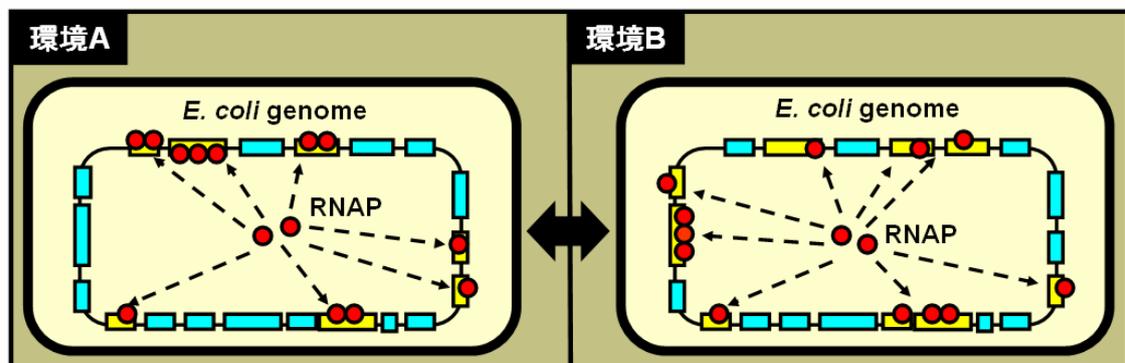


図 1. 環境変化と転写装置(RNAP)の分配の変化

本研究では機能未知転写因子の一つ YdhM に注目しその転写調節機能解明を試みた。Genobase (<http://ecoli.naist.jp/GB6/search.jsp>)によると YdhM は 171 アミノ酸残基から成る TetR (tetracycline repressor protein) ファミリーに属する転写因子で、N 末端に DNA 結合のための HTH モチーフの存在が予想されている。

実験ではまず genomic SELEX 法 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) を利用して制御標的遺伝子群の同定を試みた。転写因子の制御標的遺伝子の探索はこれまでそれぞれの転写因子の欠損株を用いた microarray による解析が行われてきた。しかし、この方法ではある遺伝子の制御が複数の転写因子によって行われた場合、研究対象転写因子が直接その遺伝子を制御しているのかあるいは間接的に他の転写因子を制御することによってその遺伝子を制御しているのかが区別できない(例: Ogasawara *et al.*, 2007)。また、遺伝子が microarray の培養条件で発現しない場合も制御が確認できないと考えられる。したがって、まず genomic SELEX 法を用いて転写因子が結合する DNA 断片の探索を行い、その後転写因子の制御を確認した。

Genomic SELEX の結果、YdhM の結合が予想された DNA 断片について YdhM との複合体形成を Gel shift assay で確認し、さらに DNase-I footprinting assay で結合部位の同定

を行った。その結果、*ydhM*のプロモーター領域に結合が確認できたので、*ydhM* 遺伝子の上流約 500bp を GFP に融合した TFP (Two Fluorescence Protein) プラスミドを作成し、*ydhM* プロモーターの強度と特性を調べた。*ydhM* プロモーター活性は野生株では検出されなかったが、*ydhM* 欠損株においては定常期において強い活性上昇が見られたので、YdhM の自己制御が示唆された。その後 Primer extension assay で自己制御の確認と転写開始点の決定を行った。YdhM の結合配列と自己制御が確認されたので、次に YdhM の生理的役割決定を目的として、BIOLOG 社(米)が開発した Phenotype microarray で YdhM が感知するエフェクター分子の探索を行ったが今回の条件では確認できなかった。また最近ピリミジン代謝の包括的な転写因子 RutR が *ydhM* の開始コドン上流に結合することが示された(Shimada *et al.*, unpublished)。YdhM と RutR の結合認識配列も似ているため、まず RutR と YdhM を競合させた Gel shift assay で結合の強さの比較を行ったところ、YdhM の結合が強いことが判明した。*rutR* 欠損株においても *ydhM* の活性に変化が見られなかったため、*ydhM* の下流に存在する遺伝子 *nemA* が *N*-ethylmaleimide reductase であることに注目し、gel shift assay により *N*-ethylmaleimide (NEM) が YdhM のエフェクター分子であるかを確認した。その結果、NEM 添加によって YdhM の結合が外れ、NEM が YdhM のエフェクター分子である可能性が考えられた。

NEM とは広く一般的に使われるタンパク質修飾試薬の一つでシステイン残基(-SH 基)を修飾する求電子試薬である。NEM は細胞内に入ると素早くグルタチオン(GSH)と付加物を形成し、*N*-ethylmaleamic acid (NEMA)に変換して解毒化するモデルが提案されている(McLaggan *et al.*, 2000)。NEMA 蓄積による細胞内 pH の低下を防止するために、大腸菌は K⁺排出ポンプである KefB, KefC を誘導することが報告されている(Ferguson *et al.*, 1997)。GSH, KefB, KefC を介した解毒機構とは別に、RpoS と Dps を介したストレス応答機構も NEM 耐性に関わっていると提案されている(Ferguson *et al.*, 1998)。相互の独立した、複数の NEM 耐性システムが存在し、大腸菌対数増殖期と定常期の両方の生存能力に寄与していることが示唆されているが、その全貌は、まだ解明されていない。

本研究において私は、転写因子 YdhM が *ydhM-nemA* オペロンを抑制し、NEM 存在下でその抑制を解除することによって NemA (*N*-ethylmaleimide reductase)を発現させていることを発見し、NEM 耐性の獲得の新たな機構を提案する。

第2章 実験材料

2-1. 作製培地

LB液体培地

Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
Polypeptone	10 g
dH ₂ O	1 l
<hr/>	
Total	1 l

↓

Autoclave (121°C, 20 min)で滅菌処理。

LB寒天プレート

Yeast extract	1 g
NaCl	1 g
Polypeptone	2 g
Agar	2.8 g
dH ₂ O	200 ml
<hr/>	
Total	200 ml

↓

Autoclave (121°C, 20 min)で滅菌処理。

↓

Plate ×10

M9 液体培地

KH ₂ PO ₄	0.6 g
Na ₂ HPO ₄	2.56 g
NH ₄ Cl	0.2 g
NaCl	0.1 g
dH ₂ O	200 ml
<hr/>	
Total	200 ml

↓

Autoclave (121°C, 20 min)で滅菌処理。

↓

0.1 M CaCl₂ : 200 μl, 1 M MgSO₄ : 200 μl, 40% D-glucose : 2 ml 加える。

M9 寒天プレート

KH ₂ PO ₄	0.6 g
Na ₂ HPO ₄	2.56 g
NH ₄ Cl	0.2 g
NaCl	0.1 g
dH ₂ O	100 ml
<hr/>	
Total	100 ml

↓

Autoclave (121°C, 20 min)で滅菌処理。

↓

0.1 M CaCl₂ : 200 μl, 1 M MgSO₄ : 200 μl, 40% D-glucose : 2 ml 加える。①

Agar	2.8 g
dH ₂ O	100 ml
<hr/>	
Total	100 ml

↓

Autoclave (121°C, 20 min)で滅菌処理。②

①と②を混ぜる。

↓

Plate ×10

2-2. 抗生物質

Ampicillin (100 mg/ml)

Ampicillin sodium salt	0.1 g
ddH ₂ O	1 ml
<hr/>	
Total	1 ml

↓

滅菌フィルター(0.2 μm)で濾過滅菌(4°Cで遮光保存)

2-3. 作製試薬

Elution buffer

		final
NH ₄ OAc (MW : 77.08)	38.54 g	0.5 M
Mg(OAc) ₂ ·4H ₂ O (MW : 214.96)	2.14 g	10 mM
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2 ml	1 mM
10% SDS	10 ml	0.1%
ddH ₂ O	↓fill up	
<hr/>		
Total	1000 ml	

10× Binding buffer

		final
1 M Tris-HCl (pH 7.8)	10 ml	100 mM
1 M Mg(OAc) ₂	3 ml	30 mM
5 M NaCl	30 ml	1.5 M
10% BSA	250 μl	250 μg/ml
ddH ₂ O	53 ml	
<hr/>		
Total	100 ml	

5 mM imidazole buffer

10× binding buffer	5 ml
2 M imidazole	0.1 ml
ddH ₂ O	44.9 ml
<hr/>	
Total	50 ml

10 mM imidazole buffer

10× binding buffer	5 ml
2 M imidazole	0.2 ml
ddH ₂ O	44.8 ml
<hr/>	
Total	50 ml

200 mM imidazole buffer

10× binding buffer	5 ml
2 M imidazole	5 ml
ddH ₂ O	40 ml
<hr/>	
Total	50 ml

10× TBE buffer

Trizma base	108 g
Boric acid	55 g
0.5 M EDTA (pH8.0)	40 ml
ddH ₂ O	↓fill up
<hr/>	
Total	1 l

0.5× TBE buffer

10× TBE buffer	50 ml
dH ₂ O	950 ml
<hr/>	
Total	1 l

30% Acrylamide (AA : B=29 : 1)

Acrylamide	290 g
N,N'-methylene bisacrylamide	10 g
ddH ₂ O	↓fill up
<hr/>	
Total	1 l

5% Polyacrylamide gel

30% Acrylamide (AA : B=29 : 1)	1.7 ml
10× TBE buffer	0.5 ml
dH ₂ O	7.8 ml
10% APS	0.1 ml
TEMED	0.01 ml
<hr/>	
Total	10 ml

6× Dye

1% xylene cyanol	1 ml
1% bromophenol blue	1 ml
60% glycerol	2 ml
<hr/>	
Total	4 ml

10% BSA

Bovine serum albumin	0.1 g
ddH ₂ O	1 ml
<hr/>	
Total	1 ml

2 M imidazole

imidazole (MW : 68.08)	13.616 g
ddH ₂ O	↓fill up
<hr/>	
Total	100 ml

0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA·2Na·2H ₂ O	186.1 g
ddH ₂ O	800 ml
<hr/>	

↓

10N NaOH を加え室温で pH を 8.0 に合わせる。

1 l に fill up

3 M S.A.

Sodium acetate (MW : 82)	123 g
ddH ₂ O	↓fill up
<hr/>	
Total	500 ml

Solution I

D-glucose	9 g	final
1 M Tris-HCl (pH 7.8)	25 ml	50 mM
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20 ml	25 mM
ddH ₂ O	↓fill up	10 mM
<hr/>		
Total	1 l	

↓

Autoclave (121°C, 20 min) で滅菌処理。

Solution II

10% SDS	3 ml
10 M NaOH	0.6 ml
dH ₂ O	26.4 ml
<hr/>	
Total	30 ml

Solution III

Potassium acetate (MW : 98.15)	294.5 g	final
Acetic acid	120 ml	3M
ddH ₂ O	↓fill up	2M
<hr/>		
Total	1 l	

50× TAE buffer

Trizma base	242 g
Acetic acid	57.1 ml
0.5 M EDTA (pH8.0)	100 ml
ddH ₂ O	↓fill up
<hr/>	
Total	1 l

1× TAE buffer

50× TAE buffer	20 ml
dH ₂ O	980 ml
<hr/>	
Total	1 l

0.8% Agarose gel

GTG Agarose	0.8 g
1× TAE buffer	100 ml
<hr/>	
Total	100 ml

↓

電子レンジで agarose を溶かした後 40～50℃に冷やし、型に注ぎ込み固まるのを待つ。

DEPC (diethylpyrocarbonate) treated water

ddH ₂ O	1 l
DEPC (1/1000 vol.)	1 ml
<hr/>	
Total	1 l

↓

ふたをきつく閉め、よく混ぜた後 37℃で 1-2 hr 置く。
Autoclave (121℃, 20 min)で滅菌処理。

1 M NaOAc (pH 5.5) /DEPC

NaOAc	16.406 g
DEPC H ₂ O	160 ml
<hr/>	

↓

acetate で pH 5.5 に合わせる。
200 ml に fill up し、DEPC を 200 ml 加える。
ふたをきつく閉め、よく混ぜた後 37℃で 1-2 hr 置く。
Autoclave (121℃, 20 min)で滅菌処理。

0.5 M EDTA (pH8.0) /DEPC

EDTA·2Na·2H ₂ O	37.224 g
DEPC H ₂ O	150 ml

↓

NaOH で pH 8.0 に合わせる。

200 ml に fill up。

Autoclave (121°C, 20 min)で滅菌処理。

10% SDS

SDS	20 g
ddH ₂ O	↓fill up
Total	200 ml

↓

滅菌フィルター(0.2 μm)で濾過滅菌。

0.5 M MgSO₄

MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.162 g
DEPC H ₂ O	↓fill up
Total	50 ml

↓

DEPC を 50 μl 加える。

ふたをきつく閉め、よく混ぜた後 37°C で 1-2 hr 置く。

Autoclave (121°C, 20 min)で滅菌処理。

Solution A

10% SDS	25 ml	final
1 M NaOAc	10 ml	0.5%
0.5 M EDTA (pH 8.0)	10 ml	20 mM
DEPC H ₂ O	↓fill up	10 mM
Total	500 ml	

Acid phenol

phenol	30 g
DEPC H ₂ O	↓fill up
Total	50 ml

↓

60°Cで保温し、vortex によく混ぜ、4°Cで遮光保存。

<u>10× MOPS (pH 7.0)</u>		final
MOPS (MW: 209.26)	41.852 g	200 mM
Sodium acetate (MW: 82.03)	4.1015 g	50 mM
EDTA (MW: 372.24)	7.448 g	20 mM
ddH ₂ O	800 ml	

↓

NaOH で pH 7.0 に合わせる。

1 l に fill up。

Autoclave (121°C, 20 min)で滅菌処理。

2.5% BPB

Bromophenol blue	1.25 g
DEPC H ₂ O	50 ml

↓

滅菌フィルター(0.2 μm)で濾過滅菌。

20× SSC

NaCl	525.9 g
Trisodium citrate dihydrate	264.6 g
ddH ₂ O	↓fill up
Total	2.9 l

↓

HCl で pH 7.0 に合わせる。

3 l に fill up。

Autoclave (121°C, 20 min)で滅菌処理。

2× SSC

20× SSC	100 ml
ddH ₂ O	↓fill up
Total	1 l

1× MOPS(要時調整)

10× MOPS	100 ml
ddH ₂ O	↓fill up
Total	1 l

Loading buffer(要時調整)

Formamide	250 μ l
Formaldehyde	83 μ l
10 \times MOPS	50 μ l
Glycerol	50 μ l
2.5% BPB	10 μ l
DEPC H ₂ O	57 μ l
<hr/>	
Total	500 μ l

1% agarose gel(要時調整)

GTG agarose	1 g
10 \times MOPS	10 ml
DEPC H ₂ O	76.4 ml
<hr/>	
Total	86.4 ml

↓

電子レンジで agarose を溶かした後 40~50°Cに冷やす。

13.6 ml の formaldehyde を加えよく混ぜ、型に注ぎ込み固まるのを待つ。

10 \times DIG-dNTP mix

		final
1 mM (25 nmol) DIG-11-dUTP	25 μ l	0.7 mM
100 mM dATP	0.71 μ l	2 mM
100 mM dGTP	0.71 μ l	2 mM
100 mM dCTP	0.71 μ l	2 mM
100 mM dTTP	0.46 μ l	1.3 mM
ddH ₂ O	8.11 μ l	
<hr/>		
Total	35.7 μ l	

10 \times dNTP mix

		final
100 mM dATP	0.71 μ l	2 mM
100 mM dGTP	0.71 μ l	2 mM
100 mM dCTP	0.71 μ l	2 mM
100 mM dTTP	0.71 μ l	2 mM
ddH ₂ O	32.86 μ l	
<hr/>		
Total	35.7 μ l	

2× SSC/0.1% SDS

20× SSC	300 ml
10% SDS	30 ml
ddH ₂ O	↓fill up
<hr/>	
Total	3 l

0.1× SSC/0.1% SDS

20× SSC	15 ml
10% SDS	30 ml
ddH ₂ O	↓fill up
<hr/>	
Total	3 l

1× washing buffer(要時調整)

10× washing buffer	20 ml
dH ₂ O	180 ml
<hr/>	
Total	200 ml

1× maleic acid buffer(要時調整)

10× washing buffer	8 ml
dH ₂ O	72 ml
<hr/>	
Total	80 ml

1× blocking solution(要時調整)

10× blocking solution	8 ml
1× maleic acid buffer	72 ml
<hr/>	
Total	80 ml

1× detection buffer(要時調整)

10× detection buffer	2 ml
dH ₂ O	18 ml
<hr/>	
Total	20 ml

Reprobing buffer

10% SDS	10 ml
Formamide	10 ml
1 M Tris (pH 8.0)	1 ml
<hr/>	
Total	21 ml

1.2× IF-0

NaCl	6 g
Pluronic F68	0.36 g
dH ₂ O	900 ml

↓

0.1N NaOH で pH 7.1 に合わせる。

Phytigel を 0.12 g 加え、電子レンジで溶かす。

988 ml に fill up。

Autoclave (121°C, 20 min) で滅菌処理。

十分に冷えた後で 1M TEA-HCl (pH 7.1) を 12 ml 加える。

1M TEA-HCl (pH 7.1)

Triethanolamine (MW: 149.2)	14.92 g
dH ₂ O	70 ml

↓

HCl で pH 7.1 に合わせる。

100 ml に fill up。

滅菌フィルター(0.2 μm)で濾過滅菌。

2 M Sodium Succinate/200 μM Ferric Citrate

Sodium Succinate (MW: 270.14)	54 g
Ferric Citrate (MW: 244.95)	4.9 mg
dH ₂ O	↓fill up

Total 100 ml

↓

滅菌フィルター(0.2 μm)で濾過滅菌。

1× IF-0 (+dye) for PM1,2

1.2× IF-0	10 ml
Biolog Redox Dye Mix A (100×)	120 μl
dH ₂ O	1.88 ml

Total 12 ml

1× IF-0 (+dye) for PM3~8

1.2× IF-0	10 ml
2 M S.S. /200 μM Fe.C.	120 μl
Biolog Redox Dye Mix A (100×)	120 μl
dH ₂ O	1.76 ml
<hr/>	
Total	12 ml

2-4. 試薬とKit

TaKaRa Ex Taq [®]	/ TaKaRa
Ni-NTA Agarose	/ QIAGEN
DNA Ligation Kit <Mighty Mix>	/ TaKaRa
Big Dye [®] Terminator ver.3.1 kit	/ Applied biosystems
Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit	/ GE Healthcare Bio-Sciences
dNTP set (100 mM each)	/ GE Healthcare Bio-Sciences
DIG-11-dUTP (25 nmol)	/ Roche
Nylon membrane, positively charged	/ Roche
DIG Easy Hyb	/ Roche
DIG Wash and Block Buffer Set	/ Roche
Anti-DIG-AP, Fab fragments (0.75 units/ μ l)	/ Roche
CDP-Star, ready-to-use	/ Roche
RNA Size Marker	/ TOYOBO
IF-0a GN/GP Base (1.2 \times)	/ BIOLOG
IF-10a GN Base (1.2 \times)	/ BIOLOG
Biolog Redox Dye Mix A (100 \times)	/ BIOLOG
PM1 (96 Carbon utilization assays)	/ BIOLOG
PM2 (96 Carbon utilization assays)	/ BIOLOG
PM3 (96 Nitrogen utilization assays)	/ BIOLOG
PM4 (96 Phosphorus – Sulfur utilization assays)	/ BIOLOG
PM5 (96 Biosynthetic pathway/nutrient stimulation)	/ BIOLOG
PM6 (96 Nitrogen utilization assays)	/ BIOLOG
PM7 (96 Nitrogen utilization assays)	/ BIOLOG
PM8 (96 Nitrogen utilization assays)	/ BIOLOG
PM9 (96 Osmotic/Ionic response assays)	/ BIOLOG
PM10 (96 pH response assays)	/ BIOLOG
RNase inhibitor	/ TaKaRa
AMV Reverse Transcriptase	/ Life Sciences

第3章 実験方法

3-1. 使用したプライマーと大腸菌株、プラスミド

表 1. プライマー

Primer	Sequence (5' to 3')	mer
EcoRV-F	CTTGGTTATGCCGGTACTGC	20
EcoRV-R	GCGATGCTGTCCGAATGGAC	20
T7-F	TAATACGACTCACTATAGGG	20
T7-R	GGTTTTCCAGTCACACGACG	21
H043-S	ACGCTGATGCATAATCGCTTCCTCTTATCA	30
H043-T	TTTTAGATCTTCGCTTAGCCCCATCCCGGT	30
H044-S	TTGCTCATGCATTTTCGCCCTCCTCAGATAA	30
H044-T	GAGCAGATCTATCCATGCGCCTGCGCATAT	30
H045-S	GCAATAGATCTACGCTGAACCATAATCGCT	30
H045-T	CGCTTAGATGCATCCCGGTGAATCCACGTT	30
H046-S	CTGTAGATCTCCAAAGTAGCAACTTTGCTT	30
H046-T	TTTTCAGAATGCATAAAGGCTCCCGGTCGT	30
EGFP-anti	AGGGTCAGCTTGCCGTAGG	19
ydhLfull-F	GTGGCGGAGCAATTAGAGTTCTT	23
ydhLfull-R	TCAAAAGAGTGATGGTTGCTCCG	23
ydhMfull-F	ATGGGGCTAAGCGAATTACTAAAAAC	26
ydhM-5-R	GCAATAATGTTTTTTACATGGGCCAG	26
sapA-3-F	TGCCACACGTTCCGCAGG	18
sapA-3-R	TCATGGTTTTTTTACCTCATCCTGTTT	27
yeaS-3-F	CCTGCGGTGTATTTATTGGCGAT	23
yeaS-3-R	TCAGGATTGCAGCGTCGCCA	20
yeaT-3-F	TCGATCTCGATATTCGCATTGGC	23
yeaT-3-R	TCAGGCATGCTCCAGTGAAAAATTC	25
yeaT-5-F	ATGAATAATTTACCGCTGCTGAATGATTTG	30
yeaT-5-R	ATACGGTAATTGGTCGCCAGTTTG	24
yeaU-3-F	CCATCAGCATGCCGTACTGG	20
yeaU-3-R	TTAACGCAAATAATTTTGCAAATCGCGTC	30
yhgE-3-F	GACGTGCTGCGCTTGAGTC	19
yhgE-3-R	TCACTCATTGAGATTACATTGAGCC	26
pck-3-F	CTGCCGATCAAACCCAGTATCA	22
pck-3-R	TTACAGTTTCGGACCAGCCGC	21

表 2. 大腸菌株

<i>E. coli</i> strain	Relevant genotype	Source
DH5 α	F ⁻ 80d <i>lacZ</i> M15 (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44</i> ⁻ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	TaKaRa
KP7600	W3110 (A) <i>lacI</i> ^f <i>lacZ</i> ΔM15 <i>galK2 galK22</i>	T. Miki
JD22799	KP7600 <i>ydhM::Km</i>	T. Miki
BW25113	<i>lacI</i> ^f <i>rrnB</i> _{T14} Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} <i>hsdR514</i> Δ <i>araBAD</i> _{AH33} Δ <i>rhaBAD</i> _{LD78}	Keio collection
JW5874	BW25113 Δ <i>ydhM</i>	Keio collection

表 3. プラスミド

Plasmid	Source
pT7Blue	Novagen
pBR322	TaKaRa
pGRH043	This study
pGRH044	This study
pGRH045	This study
pGRH046	This study
pGRN170	A. Ishihama

3-2. Genomic SELEX

Genomic SELEXとは大腸菌転写因子の認識配列を持つ DNA 断片を実際に転写因子と結合させ単離する方法である(図 2)。まず大腸菌 K-12 W3110 株のゲノムを超音波によって破碎した長さ 100~300 bp の DNA 断片をプラスミドに組み込んだプラスミドライブラリーをもとに、PCR を用いて大腸菌ゲノム由来の DNA 断片を増幅する。次に増幅した DNA 断片を実際に His タグした転写因子と結合させ、転写因子と結合した DNA 断片を Ni-NTA アガロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して回収し再び PCR を用いて DNA 断片を増幅する。そして再び転写因子と結合させるといった工程を踏むことで転写因子と実際に結合する DNA 断片を増幅する方法である。転写因子と結合する DNA 断片が特異的に増幅できているかは 5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(5% PAGE)で PCR 産物を泳動したときにバンド化として視覚化される。つまり、Genomic SELEX を行い 5% PAGE でバンド化したものを DNA シークエンス解析すれば転写因子が結合する DNA 断片を発見できる。

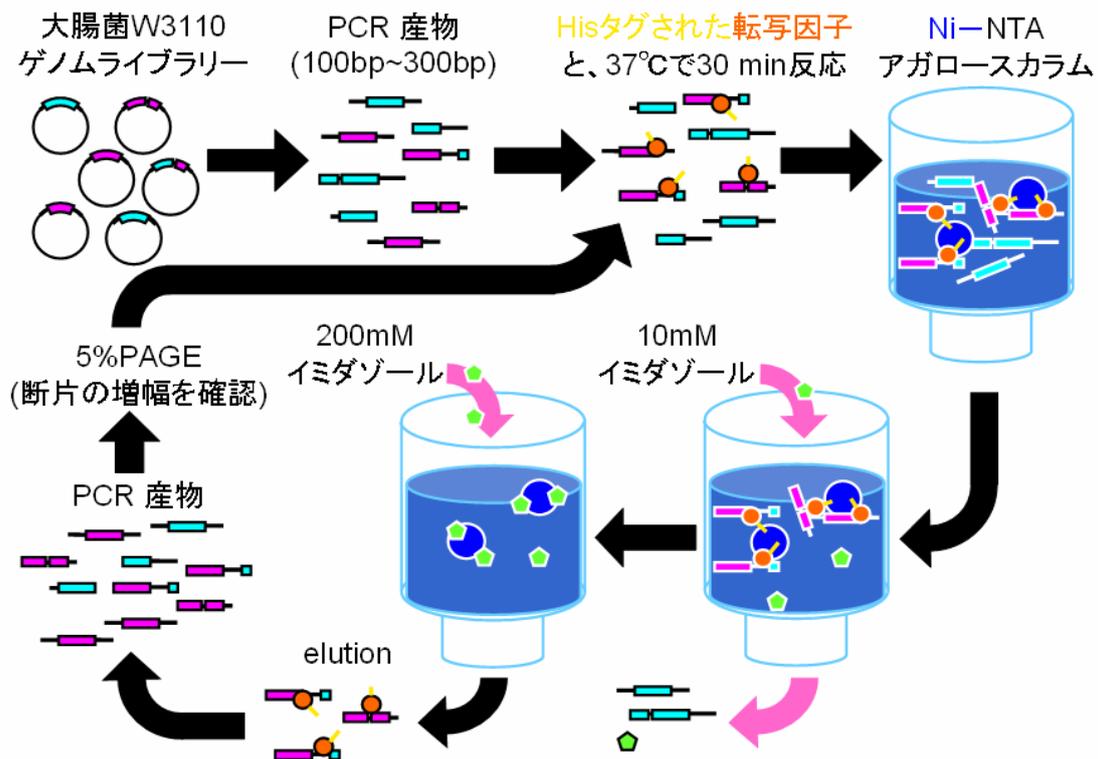


図 2. Genomic SELEX の概略

3-2-1. ライブラリーからの増幅

まず大腸菌 K-12 W3110 株 genome library (pW3110F)を PCR によって増幅させた。

PCR

DNA (pW3110F) (1 ng/μl)	3 μl
Primer EcoRV-F (100 pmol/μl)	1 μl
Primer EcoRV-R (100 pmol/μl)	1 μl
10× Ex taq buffer	10 μl
2.5 mM dNTP mixture	8 μl
Ex taq polymerase	0.5 μl
ddH ₂ O	76.5 μl
<hr/>	
Total	100 μl

94°C 5 min
94°C 30 sec } ×20 cycles
50°C 1 min }
70°C 1 min }
70°C 7 min

PCR 反応後の DNA 溶液 100 μl に 1.5× Dye を 16 μl 加え、5% PAGE で泳動し、EtBr で染色後、200~300 bp の断片を切り出した。断片を 2 ml tube に回収後、ゲルをつぶし、Elution buffer を 400 μl 加え、O/N で回転振盪させた。

溶出させたゲルの入った tube を遠心(15 krpm, 10 min, 4°C)した後、上清 400 μl を回収し、SUPRECTM-01 tube (TaKaRa)に入れ、遠心(10 krpm, 5 min, 4°C)をし、濾液 400 μl を 1.5 ml tube に回収した。

DNA 溶液 400 μl に対して 2.5 倍量の EtOH : 1 ml、1/10 量の 3M S.A. : 40 μl 加え、vortex し、遠心(15 krpm, 15 min, 4°C)した後、上清を除き、70% EtOH を 100 μl 加え、遠心(14 krpm, 1 min, 4°C)した(EtOH 沈殿)。ピペットで上清を除き、乾燥させた。ペレットを 12 μl の ddH₂O に溶かし、O.D.₂₆₀ を測定した。

3-2-2. DNA 断片とタンパク(転写因子)の結合

YdhM (20 pmol/μl)	1 μl
10 × Binding buffer	10 μl
DNA (回収した DNA)	Final 5.0 pmol
ddH ₂ O	↓ fill up
<hr/>	
Total	100 μl

37°C、30 min で反応させた。

3-2-3. Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィー

Ni-NTA Agarose 400 μ l (gel volume 200 μ l)をカラム(Muromac COLUMNS S size 5 \times 50mm)に穏やかに充填した。5 mM imidazole buffer をカラムに注ぎ平衡化させ(1 ml \times 2)、DNA-protein のサンプルをカラムに添加させた。10 mM imidazole buffer を 200 μ l \times 3、700 μ l \times 2、200 mM imidazole buffer を 200 μ l \times 2 注ぎ、200 mM imidazole buffer の 2 回目に溶出してきたフラクション(elution2)を 1.5 ml tube に回収した。elution2 (200 μ l)を EtOH 沈殿し、DNA を乾燥させ、ペレットを 30 μ l の ddH₂O に溶かした。

3-2-4. PCR

Ni-NTA Agarose カラムで回収した DNA 断片を PCR で増幅させた。

PCR

DNA (elution2 EtOH 沈殿後)	2 μ l
Primer EcoRV-F (100 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer EcoRV-R (100 pmol/ μ l)	1 μ l
10 \times Ex taq buffer	10 μ l
2.5 mM dNTP mixture	8 μ l
Ex taq polymerase	0.5 μ l
ddH ₂ O	77.5 μ l
<hr/>	
Total	100 μ l

94°C 5 min

94°C 30 sec

50°C 1 min

70°C 1 min

} \times 16,18,20 cycles

70°C 7 min

反応液 100 μ l のうち 5 μ l に 1.5 \times Dye を 2 μ l 加えたものを 5% PAGE で泳動し、増幅した産物を確認した。増幅が確認できなかったサンプルは再び PCR を行った。断片の増幅を確認した後、残りのサンプル全量に 1.5 \times Dye を 16 μ l 加え、5% PAGE で泳動し、EtBr で染色後、200~300 bp の断片を切り出した。断片を 2 ml tube に回収後、ゲルをつぶし、Elution buffer を 400 μ l 加え、O/N で回転振盪させた。

3-2-5. DNA 断片の回収

“ 3-2-1. ライブラリーからの増幅 ”と同じ方法でゲルから DNA を回収した。

*3-2-2.~3-2-5.を繰り返し(最高 8 回まで)、5% PAGE で泳動後、PCR 産物のバンド化(特異的な増幅)を確認した DNA 断片は EtOH 沈殿より DNA を回収しライゲーションを行った。

3-2-6. ライゲーション

pT7Blue T-vector (0.013 pmol/ μ l)	1 μ l
DNA (vector の 5 倍量)	1 μ l
ddH ₂ O	2 μ l
Ligation kit (TaKaRa)	4 μ l
<hr/>	
Total	8 μ l

16°Cで、2 hr 反応させた。

3-2-7. 形質転換(ヒートショック法)

1.5 ml tube にコンピテントセル 100 μ l とライゲーション産物 8 μ l を加え、タッピングし、on ice で 30 min 静置した。42°Cで、45 sec ヒートショックを与え、再び on ice で 5 min 静置した。そして no-drug の LB 培地を 1 ml 加え、インバートし、37°Cで 10 min 静置した。遠心(5 krpm, 5 min, 4°C)後に、上清を捨て LB プレート(Amp, X-gal 入り)に撒き、37°Cで一晩静置した。

3-2-8. プラスミド抽出(アルカリ溶菌法)

β -ガラクトシダーゼ活性のみられない白色コロニーを選択(Blue/White selection)し、2 ml の LB 培地に植菌し、37°C, 140 min⁻¹で一晩培養した。1.5 ml tube に培養液を 1.5 ml 加え、遠心(10 krpm, 5 min, 4°C)し上清を捨て、Solution I を 100 μ l 加え vortex し、Solution II を 200 μ l 加え軽くインバートし、Solution III を 150 μ l 加えインバートし、クロロホルムを 50 μ l 加えインバートした。

遠心(15 krpm, 5 min, 4°C)した後、上清 400 μ l を新しい 1.5 ml tube に加え、イソプロパノールを等量加え vortex し、遠心(15 krpm, 10 min, 4°C)した。上清を除き、70% EtOH を 100 μ l 加え、遠心(14 krpm, 1 min, 4°C)し、ピペットで上清を除き乾燥させた。

ペレットを 100 μ l の RNaseA solution (0.05 mg/ml)に溶かし 37°Cで 1 hr 静置した後、フェノール/クロロホルムを等量加え、しっかり vortex をかけ、遠心(14 krpm, 2 min, 4°C)した。上清 100 μ l を 1.5 ml tube に回収し、EtOH 沈殿した。乾燥させたペレットを 12 μ l の ddH₂O に溶かし、0.8%アガロース電気泳動でその濃度を確認した。

3-2-9. シークエンス解析

PCR

Premix (Big Dye [®] Terminator ver.3.1 kit)	0.5 μ l
5 \times buffer	3.75 μ l
pT7 primer (0.3 pmol/ μ l)	1 μ l
pSLX (Template DNA)	final 500 ng
ddH ₂ O	↓fill up
<hr/>	
Total	20 μ l

94°C 5 min

94°C 20 sec }
50°C 15 sec } ×25 cycles
60°C 1 min }

10°C ∞

PCR産物を 1.5 ml tubeに移し 1.5 M S.A./125 mM EDTAを 2 μ l、EtOHを 66 μ lを加え、vortexし、遠心(15 krpm, 10 min, 4°C)した。上清を除き、70% EtOHを 100 μ l加え、遠心(14 krpm, 1 min, 4°C)した。ピペットで上清を除き、乾燥させた。ペレットを 12 μ lのHiDiに溶かし、Applied Biosystems 3130 xl Genetic Analyzerで塩基配列決定後、インターネットデータベース<http://www.bioscinet.org/tools/tfbinding.html>にてDNA断片のゲノム上の位置を確認した。

3-3. Gel Shift Assay

Genomic SELEX 実験によって転写因子と結合することが予想された DNA 断片は、次に Gel Shift Assay によって転写因子と複合体を形成するかを確認した。Gel Shift Assay において 5% PAGE で転写因子と DNA 断片の混合物を泳動した時、転写因子と複合体を形成した DNA 断片は転写因子と複合体を形成していない DNA 断片と比較して分子量が増大するため泳動の速度が遅くなるはずである。したがって、その泳動パターンを見ることで複合体形成を確認できる。

3-3-1. FITC でラベルされた DNA プローブの作成

まず FITC で蛍光ラベルされた DNA 断片を作成した。

PCR

pSLX (Template DNA) (50 ng/μl)	1 μl
FITC T7 proprimer (100 pmol/μl)	1 μl
T7R primer (100 pmol/μl)	1 μl
10× Ex taq buffer	5 μl
2.5 mM dNTP mixture	8 μl
Ex taq polymerase	0.5 μl
ddH ₂ O	33.5 μl
<hr/>	
Total	50 μl ×2

95°C 5 min

95°C 30 sec }
55°C 30 sec } ×25 cycles
74°C 30 sec }

74°C 7 min

PCR 産物(100 μl)を EtOH 沈殿し、ペレットを 30 μl の ddH₂O に溶かし、濃度を測定した。

3-3-2. Gel Shift Assay

10× binding buffer	1.3 μl
FITC labeled DNA	final 0.3 pmol
ddH ₂ O	↓fill up
<hr/>	
Total	12 μl ×5

溶液作成後濃度を変えた転写因子 1 μl を加え、それぞれ恒温機で 37°C, 30 min 静置し、その後すぐに 1.8 μl の 40% formamide dye を加え、5% PAGE で電気泳動を行った。蛍光イメージング装置 Pharos FX Molecular Imager System で解析を行った。

3-4. DNase-I Footprinting Assay

複合体形成が確認された DNA 断片に関しては、デオキシリボヌクレアーゼ I (DNase-I)を用いた DNase-I Footprinting Assay を行うことで転写因子の結合配列を決定した。Gel Shift Assay と同様に転写因子と DNA 断片を結合させた後、DNase-I で 2 本鎖 DNA をランダムに切断する。しかし転写因子が結合している DNA 部分は DNase-I によって切断できないため、ランダムに切断した DNA 断片を 7 M Urea 8% PAGE で泳動した時、転写因子が結合したと考えられる領域に穴が開いたように見える。したがって、DNA 断片のシーケンスラダーも同時に泳動することで転写因子の結合部位とその配列を決定できる。

3-4-1. A, G, T, C sequence 反応

Amersham Biosciences の Thermo Sequence Labeled Primer Cycle Sequencing kit を用いて footprinting を行う DNA 断片のシーケンス反応を行った。

PCR

pSLX (Template DNA) (200 ng/ μ l)	1 μ l
premix (A, G, T, C)	1 μ l
FITC T7 proprimer (1 pmol/ μ l)	1 μ l
<hr/>	
Total	3 μ l \times 4

95°C 5 min

95°C 30 sec }
50°C 30 sec } \times 30 cycles
72°C 1 min }

10°C ∞

1.5 μ l の formamide loading dye を加えた。合計 4.5 μ l のうち1回の泳動に 1.5 μ l 使用し、90°C で 3 min 静置後、7 M Urea 8% PAGE で 5 hr 電気泳動した。

3-4-2. DNase-I Footprinting Assay

10 \times binding buffer	2.5 μ l
50 mM CaCl ₂	2.5 μ l
FITC labeled DNA	final 0.5 pmol
ddH ₂ O	\downarrow fill up
<hr/>	
Total	25 μ l \times 5

溶液作成後転写因子 1 μ l を加え、それぞれ恒温機で 37°C, 30 min 静置し、すぐに 25°C で 5 min 静置した。DNase-I (10 ng/ μ l)加え、ピペッティングでよく混合した後すぐに 25°C、30 sec 静置し、フェノールを 25 μ l 加え vortex し、氷上に静置した。遠心(14 krpm, 2 min, 4°C)

し、上清 25 μ l を 1.5 ml tube に回収し、EtOH を 65 μ l と 3M S.A. を 10 μ l 加え、vortex し、遠心(14 krpm, 15 min, 4°C)した。上清を除き、70% EtOH を 100 μ l 加え、遠心(14 krpm, 1 min, 4°C)した。ピペットで上清を除き、乾燥させた。ペレットを 5 μ l の 80% formamide dye に溶かした。

5 μ l のうち 2.5 μ l を 90°C、3 min 静置し、7 M Urea 8% PAGE で 5 hr 電気泳動した。

3-5. Promoter Assay

転写因子の結合を確認後、支配下予測遺伝子プロモーターへの転写因子の作用解明を目指し Promoter Assay を行った。この方法ではテストプロモーターを図 2 のように TFP (Two fluorescent protein) プラスミドに組み込み、それを大腸菌にクローニングすることで、常に発現が一定のコントロールプロモーター(lacUV5 プロモーター)依存の RFP に対する、テストプロモーター依存の GFP の蛍光を測定する方法で、野生株と遺伝子欠損株における GFP/RFP の値を比較することで転写因子の作用機構解明を目指した。

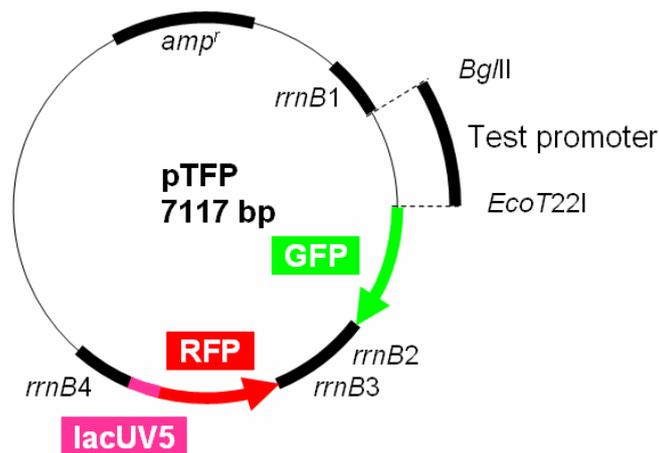


図 3. pTFP ベクター

3-5-1. pTFP の作製

PCR を用いて pTFP に挿入する DNA 断片を作製した。

PCR

KP7600 genome DNA	1 μ l
Primer S (100 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer T (100 pmol/ μ l)	1 μ l
10 \times Ex taq buffer	5 μ l
2.5 mM dNTP mixture	8 μ l
Ex taq polymerase	0.5 μ l
ddH ₂ O	78.5 μ l
Total	100 μ l

95°C 5 min
 95°C 30 sec } ×25 cycles
 55°C 30 sec }
 74°C 30 sec }
 74°C 7 min

PCR 産物を 1.5 ml tube に回収し、phenol 処理を行った後 EtOH 沈殿をした。DNA は乾燥後 88 μ l の ddH₂O に溶かし、10× H buffer を 10 μ l、*Bgl*II を 2 μ l 加え、37°C で 3 hr 処理した。その後 phenol 処理を行い、EtOH 沈殿をした。DNA は乾燥後 88 μ l の ddH₂O に溶かし、10× H buffer を 10 μ l、*Eco*T22I を 2 μ l 加え、37°C で 3 hr 処理した。その後 phenol 処理を行い、EtOH 沈殿をした。DNA は乾燥後 12 μ l の ddH₂O に溶かした。

同様に *Bgl*II と *Eco*T22I で処理した pTFP ベクター(図 3)を用いてクローニングを行い、構築したプラスミドを pGRH043, pGRH044, pGRH045, pGRH046 と名づけた。pGRH043, pGRH044, pGRH045 はそれぞれ、*ydhF*, *ydhL*, *ydhM* の開始コドンの上流 500 bp を含み、pGRH046 は *nemA* の開始コドンの上流 700 bp を含む(図 4)。また、シーケンス解析には *Bgl*II 側に設計したプライマーと、pGRP の ATG コドンの後ろに設計した EGFP-anti プライマーを用いた。

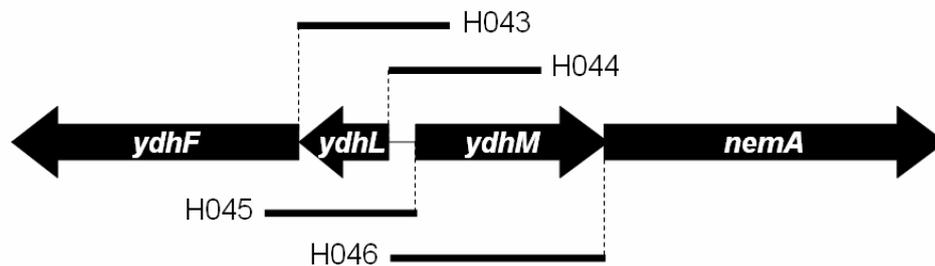


図 4. pGRP 作成用の DNA 断片

3-5-2. Promoter Assay

野生株 KP7600 と *ydhM* 欠損株 JD22799 の両方を pGRH043 (*ydhF*), pGRH044 (*ydhL*), pGRH045 (*ydhM*), pGRH046 (*nemA*) で形質転換させた株、KP7600 を pBR322 と pGRN170 (*lacUV5*) で形質転換させた株を作成した。

これら菌株のコロニーを LB 寒天プレート(+Amp)または M9 寒天プレート(+Amp)上に作成し、液体培地 5 ml で前培養(37°C, 140min⁻¹, O/N)し、25 ml で本培養(37°C, 140min⁻¹)を開始した。本培養開始時の O.D.₆₀₀ は 0.05 に統一した。O.D.₆₀₀ を 1 hr ごとに測定し、その時の培養液 200 μ l の O.D.₆₀₀ が 0.6 になるように集菌し、PBS(-)で懸濁後 96 穴のマイクロプレートに移し、FL600 Bio-Tek microplate reader (Bio-Tek Instruments, USA)で、O.D.₆₀₀, GFP, RFP の強度を測定した。GFP は励起波長 485 nm, 蛍光波長 530 nm で測定し、RFP は励起波長 530 nm, 蛍光波長 590 nm で測定した。解析は KC 4 PC software を用いて行った。

3-6. Northern Blotting

Promoter assay では遺伝子プロモーター領域に転写因子が結合した場合にのみ、転写因子の支配下予測遺伝子への影響が確認できる。つまり、遺伝子の ORF 内に転写因子の結合が予測された場合は promoter assay では転写因子の制御が確認できないため、mRNA の量と大きさを直接見ることで転写因子の制御を確認したいと考え northern blotting を利用した。

3-6-1. RNA の抽出 (hot phenol 法)

LB 寒天プレート(no drug)上の野生株 KP7600 と *ydhM* 欠損株 JD22799 のコロニーより 5 ml の LB 培地で前培養(37°C, 140 min⁻¹, O/N)し、15 ml の LB 培地で本培養(37°C, 140 min⁻¹)を開始した。目的の O.D.₆₀₀ になったら、50 ml の遠心チューブに入れ遠心(5 krpm, 5 min, 4°C)して集菌し、上清を捨て、Solution A を 1 ml 加えピペティングでペレットを懸濁した。細胞懸濁液に acid phenol を 1 ml 加え vortex し、60°C で 5 分間よく振って混ぜた後、2 ml チューブに移し遠心(14 krpm, 2 min, 4°C)した。上清 400 µl を 1.5 ml チューブに移し、1 ml の EtOH を加え vortex し遠心(14 krpm, 3 min, 4°C)し、上清を捨て 70% EtOH を 1 ml 加え遠心(14 krpm, 1 min, 4°C)し上清を捨て、400 µl の Solution A を加えペレットを懸濁した。再度 EtOH を 1 ml 加え、上記と同様に EtOH 沈殿を行った。ペレットは乾燥後、100 µl の DEPC H₂O で懸濁し、10 ml の 1 M NaOAc (pH 5.5)/DEPC と 10ml の 0.5 M MgSO₄/DEPC、1 ml の DNase-I (RNase-free)を加えよく混ぜた後 37°C で 30 分静置した。Acid phenol を 100 µl 加え vortex し遠心(14 krpm, 2 min, 4°C)し上清を 100 µl を 1.5 ml チューブに移した後 EtOH 沈殿を 3 回繰り返し、ペレットを乾燥後 30 µl の DEPC H₂O に溶かした。

3-6-2. DIG でラベルされた DNA プローブの作成

PCR を用いて DIG でラベルされた DNA プローブを作成した。DNA プローブが DIG でラベルされ分子量が大きくなったかを調べるために DIG-11-dUTP を加えない 10× dNTP を用いた PCR も行い、PCR 後 0.8% agarose 電気泳動で DIG ラベルされた DNA の泳動の遅延を確認した。-30°C に保存。(DNA 5 µl に dye 2 µl を加え 100V で 25 分泳動)

PCR

KP7600 genome DNA (50 ng/µl)	1 µl
Primer F (100 pmol/µl)	0.5 µl
Primer R (100 pmol/µl)	0.5 µl
10× Ex taq buffer	5 µl
10× DIG-dNTP mix(10× dNTP mix)	5 µl
Ex taq polymerase	1 µl
ddH ₂ O	37 µl
<hr/>	
Total	50 µl

95°C 5 min
 95°C 30 sec }
 60°C 30 sec } ×30 cycles
 72°C 40 sec }
 72°C 7 min

3-6-3. Northern Blotting

DAY 1

1% agarose gel を作成した(100 ml 作成すると大ゲル 2 枚と小ゲル 1 枚作成できる)。サンプル RNA は 3 μ l (4 μ g) に loading buffer(要時調整)を 6 μ l 加えたものを泳動する本数+1 本分作成し、65°C で 10 min 熱変性を行い、氷上に移し急冷して室温に戻した後、泳動を開始した(100 V, 5 min→50 V, 55 min)。小ゲルには RNA marker (TOYOBO)も同時に泳動し、泳動後 EtBr で染色し、泳動パターンを確認した。大ゲルは図 5 のような 20× SSC を約 1 L 加えた transfer unit にゲル上部を下にして乗せ、メンブレンを 2× SSC でよく湿らせてからゲルとメンブレンの間に空気が入らないように乗せ、ゲルより少し大きめに切ったフィルターペーパーを 5 枚、キムタオルを 5 cm 分重ね、最後に蓋をして一晩静置した。

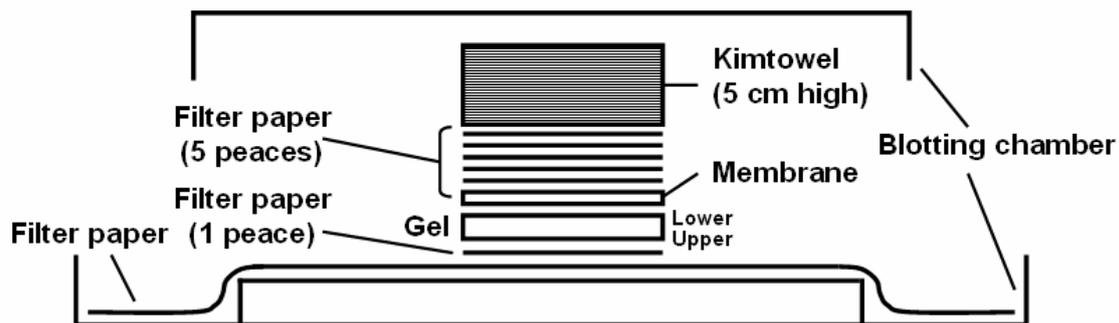


図 5. Transfer unit

DAY 2

ラップの上に置いた 2× SSC で湿らせたフィルターペーパーの上に一晩静置したゲルとフィルターペーパーを移し、ボールペンで RNA を泳動したウェルを通してメンブレンに印をつけ、UV cross linker でメンブレンに RNA を固定した。その後ゲルは EtBr で染色し、ブロッキングが成功しているかを確認した。メンブレンを ddH₂O で 10 分 wash した後、Hybri bag hard (COSMO BIO)に入れ、50°C であらかじめ暖めておいた Pre-warmed DIG Easy Hyb を 2 ml 加え、泡を入らないようにして Hybri bag の口をとめ、50°C, ~15 min⁻¹ で 30 分振盪した。振盪している間に DIG でラベルした DNA プローブ 5 μ l に ddH₂O を 20 μ l 加え、90°C で 5 分静置後、氷上で急冷した。Hybri bag の口を切り DIG Easy Hyb を捨て、室温に戻した DNA プローブに Pre-warmed DIG Easy Hyb を 600 μ l 加え混ぜたものを Hybri bag に入れ、泡が入らないように再び口を閉じた。この Hybri bag を 50°C, ~15 min⁻¹ で一晩振盪した。

DAY 3

Sealed box に 2× SSC/0.1% SDS を加え、一度 2× SSC/0.1% SDS で濯いだメンブレンを Hybri bag から移し 5 分間 wash した。2× SSC/0.1% SDS を除き、再び 2× SSC/0.1% SDS を加え 5 分間 wash し、50°C であらかじめ暖めておいた Pre-warmed 0.1× SSC/0.1% SDS を加え 50°C で 15 分間 wash した。0.1× SSC/0.1% SDS を除き、再び 0.1× SSC/0.1% SDS を加え室温で 15 分間 wash した。別の sealed box に 1× washing buffer を加え、メンブレンを 1 枚ずつ移し 2 分間 wash した後、buffer を捨て(最後はピペットを使用)、1× blocking solution を加え室温で 30 分間振盪した。1× blocking solution を捨て(最後はピペットを使用)、1× blocking solution を加え、1.8 μl(大ゲル 2 枚分)の Anti-DIG-AP を加え室温で 30 分間振盪した。Antibody solution を捨て(最後はピペットを使用)、1× washing buffer で 10 分間 wash を 2 回繰り返す 1× washing buffer を捨て(最後はピペットを使用)、1× detection buffer を加え 3 分間振盪した。メンブレンをラップの上に置き、CDP-Star を 100 μl 程メンブレンの上に垂らし、遮光で 5 分間静置した後 LAS-1000 で検出した。

検出が終わったメンブレンは 2× SSC で wash し、Hybri bag に入れた後で reprobing buffer を 2 ml 加え口を塞いでから 80°C で 1 時間静置した。その後 reprobing buffer を捨て、reprobing buffer を再び 2 ml 加え口を塞いでから 80°C で 1 時間静置した。その後 2× SSC で wash し、Hybri bag に入れ Pre-warmed DIG Easy Hyb を 2 ml 加え、口を塞ぎ 50°C, ~15 min⁻¹ で 30 分振盪することで再度 DNA プローブとハイブリさせた。→DAY2 に戻る。

3-7. Phenotype Microarray

YdhM の生理的な意義を発見するために phenotype microarray を行った。Phenotype microarray では、最低栄養条件下において一つの栄養源(炭素源、窒素源、リン・硫黄源)に対して異なる 95 の物質を用いたときの大腸菌野生株と遺伝子欠損株の成育速度の違いを見ることができる実験方法である(図 6)。つまり、あるウェルにおいて成育に差があれば、その差が遺伝子欠損による影響と考えられ、成育に差のあったウェルに入った化合物の代謝にその遺伝子が関わっていることが推測できる。成育速度の差は tetrazolium violet (TV) の発色の差を見て判断できる。これは、解糖系およびクエン酸回路より糖あるいは脂肪酸の酸化によって得られた還元物質 NADH が無色の酸化型 TV を酸化することによって紫色の還元型 TV に変化するためである(Bochner *et al.*, 2001)。Phenotype microarray のプレートは PM1 (carbon source), PM2 (carbon source), PM3 (nitrogen source), PM4 (phosphorus/sulfur source), PM5 (nutrient supplement), PM6 (nitrogen source), PM7 (nitrogen source), PM8 (nitrogen source), PM9 (osmotic/Ionic response), PM10 (pH response), PM11~12 (chemical sensitivity) といったプレートで、全部で 20 枚ある。今回は PM1~10 のプレートにおける大腸菌野生株 BW25113 と *ydhM* 欠損株 JW5874 の成育の差を観察した。

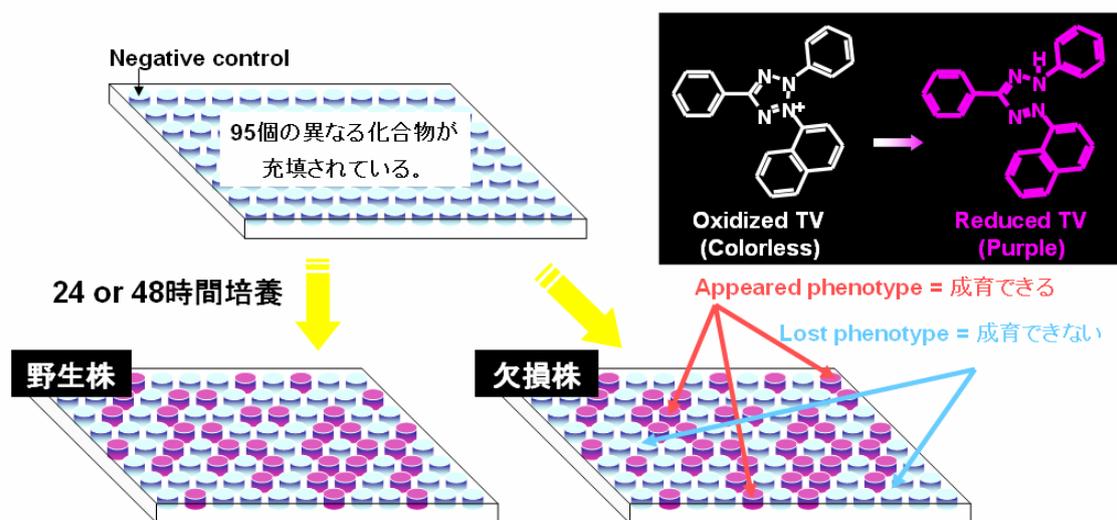


図 6. phenotype microarray の原理

まず、BW25113 株と JW5874 株を M9 プレートより 5 ml の M9 培地(+glucose)に植菌し、37°C、140 min⁻¹で一晩培養した。その後培養液の濁度を測定し、本培養開始時の O.D.₆₀₀ の値が 0.050 になるように、1.5 ml tube に培養液を加え集菌(5 krpm, 5min, 4°C)し、上清を捨て 1 ml の 1× IF-0 (+dye)で細胞を wash し、再び遠心(5 krpm, 5min, 4°C)した。上清を捨て 1× IF-0 (+dye)で懸濁した後、PM プレートに 100 μl ずつ分注し 37°Cで 24 時間、48 時間培養し、マイクロプレートリーダーで濁度を測定し、デジタルカメラで写真を撮り呈色の程度を観察した。※PM9, 10 プレートの場合、懸濁後の 1× IF-0 (+dye)を 1/100 量 IF-10 (+dye)に加え、PM プレートに 100 μl ずつ分注し 37°Cで培養を開始した。

3-8. Primer Extension Assay

RNA を鋳型にして逆転写酵素により伸長反応を行い、得られた産物の大きさや量を解析し、mRNA の 5' 末端(転写開始点)と大腸菌野生株と *ydhM* 欠損株の転写活性の違いを測定した。

PCR

200 mM Tris-HCl (pH 8.3)	1 μ l
1 M KCl	1 μ l
100 mM MgCl ₂	1 μ l
2.5 mM dNTP mixture	8 μ l
RNase inhibitor (40 U/ μ l, TaKaRa)	0.5 μ l
FITC anti-GFP primer (1 pmol/ μ l)	1 μ l
Total RNA (~40 μ g)	7.5 μ l
AMV Reverse Transcriptase (35 U/ μ l)	0.15 μ l
<hr/>	
Total	20 μ l

50°Cで1時間逆転写を行った後、phenolを20 μ l 加え vortex し、遠心(14 krpm, 2 min, 4°C)した。上清 20 μ l を 1.5 ml tube に移し、EtOH 沈殿を行った。ペレットは乾燥後 2 μ l ddH₂O に溶かし、formamide dye (GE Healthcare)を 1.5 μ l 加え、90°Cで3分静置した後、7 M Urea 8% PAGE で5時間泳動した。

第 4 章 結果と考察

4-1. Genomic SELEX

YdhM が認識結合する DNA 配列を含む DNA 断片の分離のために genomic SELEX を行った。その結果、genomic SELEX 2 サイクル目の 5% PAGE においてバンド化(図 7, 右)が見られたので SELEX 断片のシーケンス解析を行ったところ表 4 のような結果が得られた。得られた DNA 断片は大きく分けて 4 種類で、上位 3 種類の DNA 断片は長さが異なる複数の断片が得られた。図 8 に SELEX 断片の位置とその周辺遺伝子の詳細を示した。

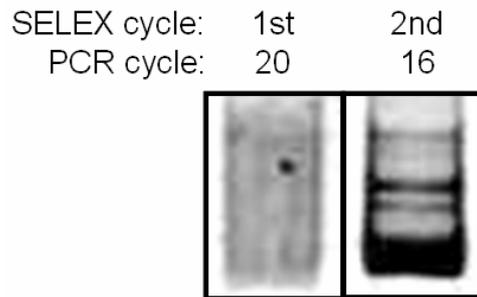


図 7. Genomic SELEX 5% PAGE における DNA 断片のバンド化

表 4. Genomic SELEX 結果

Location of SELEX fragments	Size (bp)	No. of clones
<i>ydhL</i> < s > <i>ydhM</i>	184 ~ 316	69
<i>sapB</i> < s, <i>sapA</i> < <i>ymjA</i>	200 ~ 257	14
<i>leuE</i> < s, <i>yeaT</i> > <i>yeaU</i>	233 ~ 288	5
<i>hslO</i> > s, <i>yhgE</i> > <i>pck</i>	184	3
Total		91

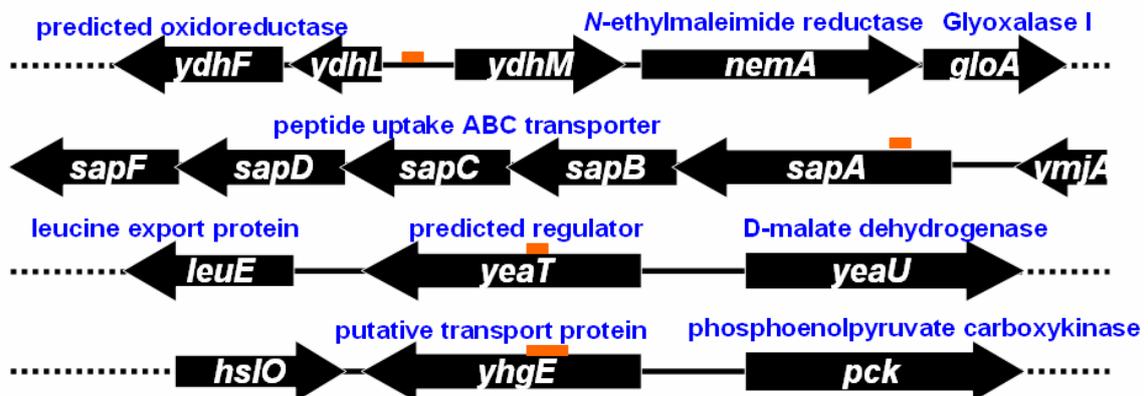


図 8. SELEX 断片の位置と周辺遺伝子 —: SELEX fragment →: gene

4-2. Gel Shift Assay

Genomic SELEXによって分離された DNA 断片への YdhM の結合を gel shift assay で確認した結果、4 種類全てにおいて YdhM と DNA 断片複合体形成が確認できた(図 9)。ただしそれぞれのへの結合の強さは異なり、*ydhL-ydhM* 間の領域を含む DNA 断片への結合が他の断片と比較して特に強いことがわかった。

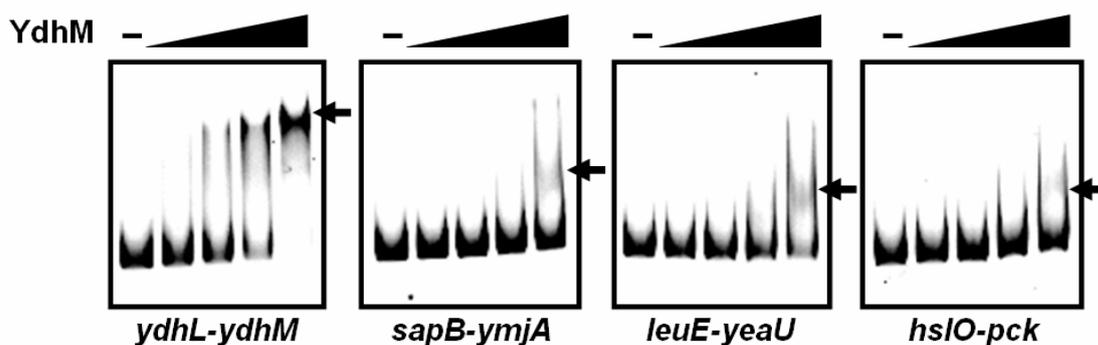


図 9. Gel shift assay 結果

DNA conc.: 1.0 pmol / YdhM conc.: 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 pmol

4-3. DNase-I Footprinting Assay

Gel shift assayによってYdhMが4種類全てのDNA断片に結合することが確認できたので、DNase-I footprinting assayによってその結合領域を調べた。その結果は図 10 に示した。Gel shift assayの結果と同様に*ydhL-ydhM*間の領域を含む断片への結合が強く確認された。結合配列を調べると、TAGACCGACTGGTCTAという回文配列の存在が確認され、この配列がYdhMの認識配列であることが推測された。また、*sapB-ymjA*間の*sapA*上のDNA断片と*leuE-yeaU*間の*yeaT*上のDNA断片においても、それぞれ類似した回文行列を含む領域への結合が確認され、YdhMの認識結合配列はAGACCNNNNGGTCTであると推測した(図 11)。このYdhMの認識結合配列はgenomic SELEXにおいて分離された長さの異なる複数のDNA断片の重なった領域に存在し、YdhMがgenomic SELEXにおいて多数のDNA断片存在下でこの配列を認識していたことが推測される。例として、*ydhL-ydhM*間領域におけるSELEX分離断片の詳細と全ての断片が重なった 22 bpの配列、YdhMの認識結合配列を示した(図 12)。

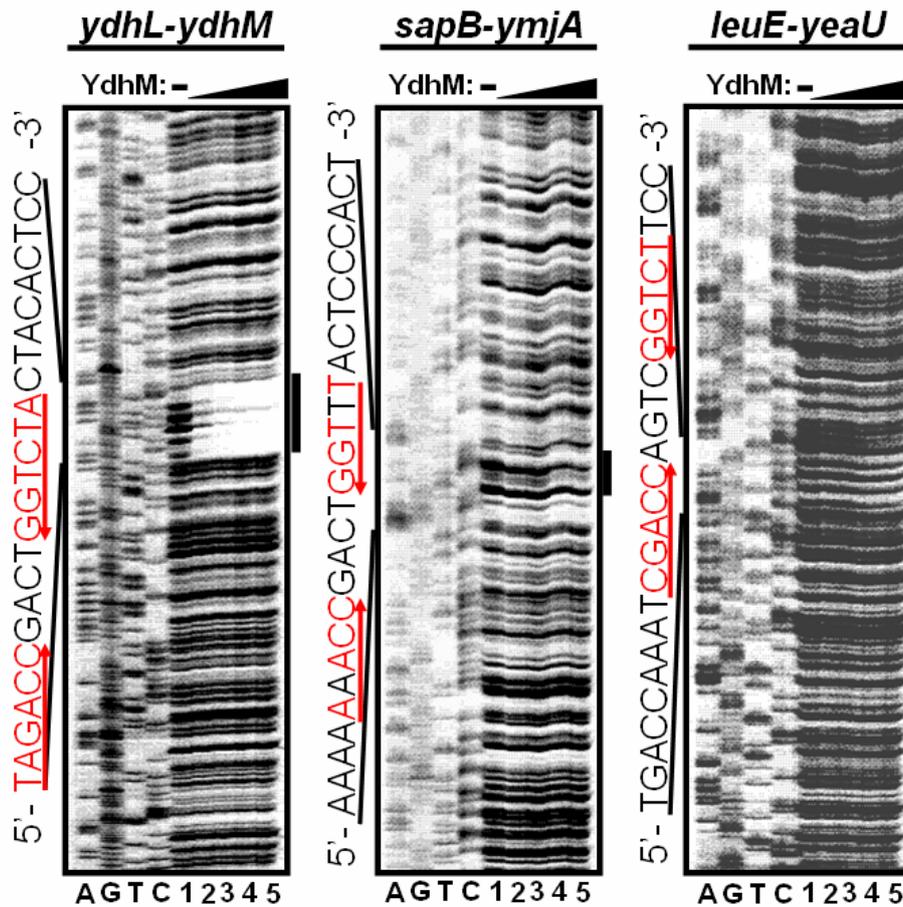


図 10. DNase-I footprinting assay 結果

DNA conc.: 1.0 pmol / YdhM conc.: 0, 1.25, 2.5, 5.0, 10 pmol

Predicted binding motif

5' - AGACCN NNNGTCT -3'

ydhL < s > *ydhM* ; AGACCGACTGGTCT
sapB < s, *sapA* < *ymjA* ; AAACCAGTCGGTTT
leuE < s, *yeaT* > *yeaU* ; CGACCAGTCGGTCT
hslO > s, *yhgE* > *pck* ; AAACCAGTCGGTTG

図 11. YdhM の認識結合配列

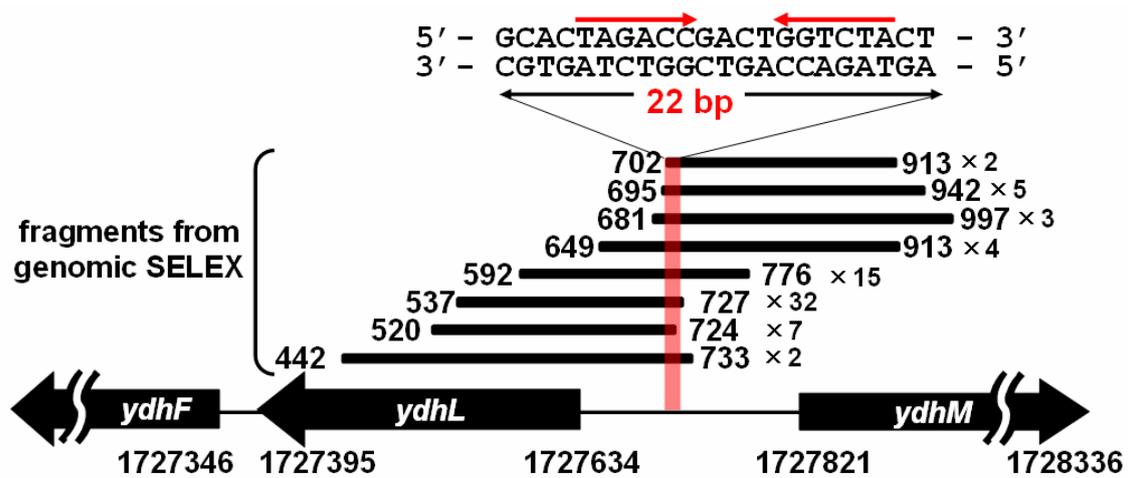


図 12. *ydhL*-*ydhM* 間領域における SELEX 分離断片と YdhM の認識結合配列

4-4. Promoter Assay

YdhM が *ydhL*-*ydhM* 間の領域へ結合することが確認されたので、YdhM の *ydhL* と *ydhM* に対する制御機構を解明するために TFP(Two fluorescent protein)ベクターを利用して、*ydhL*, *ydhM* プロモーターへの YdhM の影響を promoter assay を用いて調べた。*ydhL* プロモーター活性は弱く(*ydhF*も同様の活性)、YdhM の影響は確認されなかった。しかし、野生株において確認できないほど低い *ydhM* プロモーター活性が LB 培地で培養した *ydhM* 欠損株において、特に定常期後期において活性が著しく高まった(図 13)。また M9 培地では LB 培地より活性が低いものの、*ydhM* 欠損株の方が野生株よりもプロモーター活性が高かった(図 13)。以上の結果より、YdhM は自己制御によって自らを抑制していることが判明した。

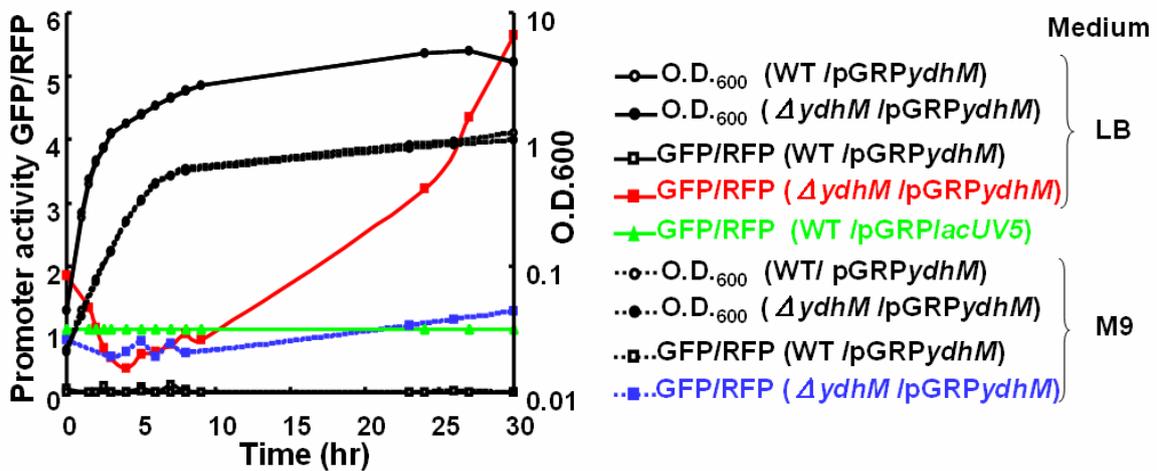


図 13. Promoter assay 結果

図上部の 4 本の曲線は野生株と *ydhM* 欠損株の増殖曲線を示し、赤線は LB 培地における *ydhM* 欠損株の *ydhM* プロモーター活性、青線は M9 培地における *ydhM* 欠損株の *ydhM* プロモーター活性、緑線はコントロールの *lacUV5* プロモーター活性、最下部の 2 本の線は LB, M9 培地における野生株の *ydhM* プロモーター活性を示す。

4-5. Primer Extension Assay

Promoter assay によって YdhM が自己制御している可能性が示唆されたので、primer extension assay で自己制御の確認と転写開始点の同定を行った。その結果、図 14 のように *ydhM* 欠損株において転写産物が存在したので YdhM の自己制御が確認された。また *ydhM* の転写開始点のすぐ上流に YdhM の結合部位が存在したので、YdhM は RNA ポリメラーゼのプロモーター領域への結合を妨げることで自身の転写を抑制していることが示唆された。

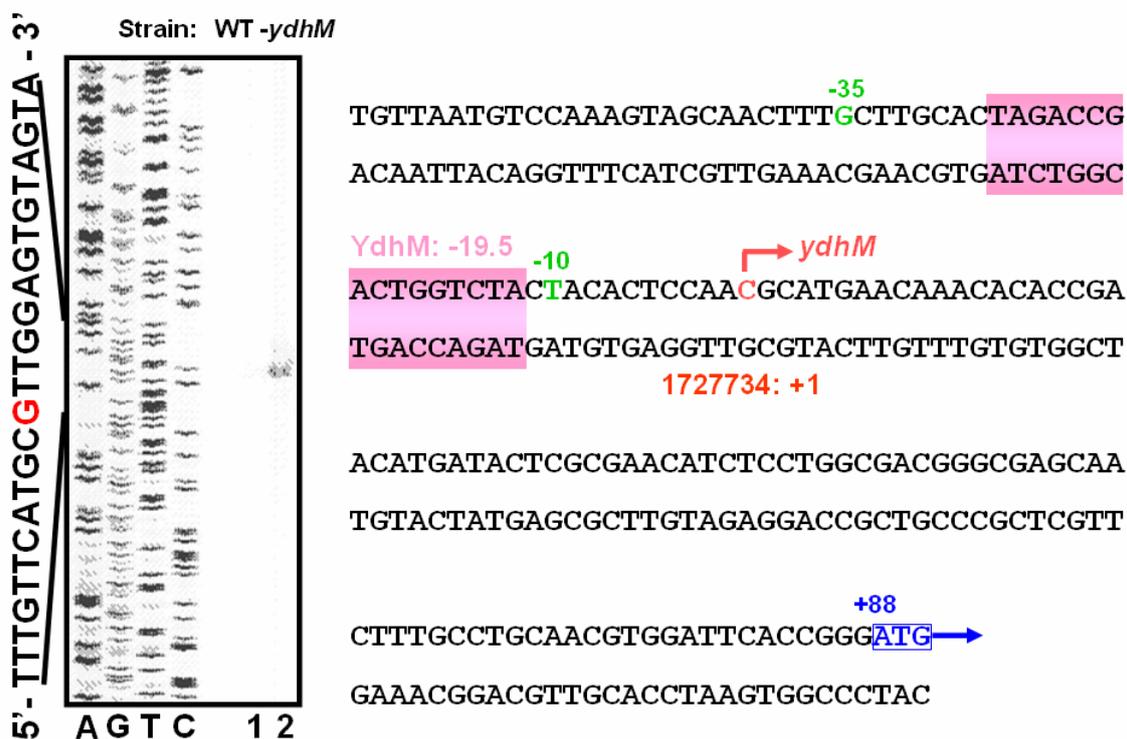


図 14. Primer extension assay 結果

図において、+1 が *ydhM* の転写開始点で、ピンクで示された領域が YdhM の認識結合部位。また、+88 は *ydhM* の開始コドンを示し、-10, -35 は予想プロモーター部位。

4-6. Phenotype Microarray

Promoter assay と primer extension assay によって YdhM の自己制御が確認されたが、野生株では *ydhM* の活性は見られなかった。つまり、通常の培養条件では必要とされない可能性が示唆されたため、YdhM が必要とされる条件を調べるために phenotype microarray を行った。しかし、10 枚のプレート全てで野生株と *ydhM* 欠損株の成育に差が見られなかったことから YdhM はこれら化合物の代謝に関わっていないことが示唆された(図 15)。つまり、YdhM の自己制御を解除するエフェクター分子は phenotype microarray のプレート内に存在しないことが予測された。

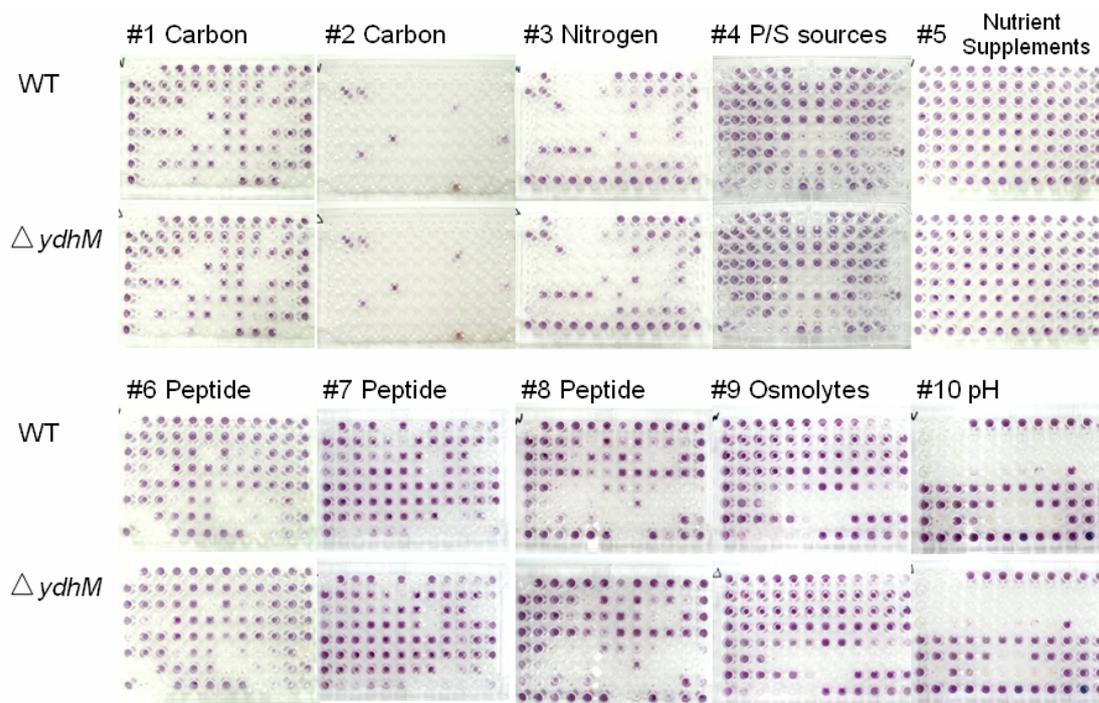


図 15. Phenotype microarray 結果

WT は野生株を示し、 $\Delta ydhM$ は *ydhM* 欠損株を示す。

PM1 (carbon source), PM2 (carbon source), PM3 (nitrogen source), PM4 (phosphorus/sulfur source), PM5 (nutrient supplement), PM6 (nitrogen source), PM7 (nitrogen source), PM8 (nitrogen source), PM9 (osmotic/ionic response), PM10 (pH response), PM11~12 (chemical sensitivity)

4-7. Gel shift assay in the presence of RutR

YdhMの生理的役割を考えるにあたって、YdhMとピリミジンの関連性を調べることにした。なぜなら、最近ピリミジン代謝にかかわる包括的転写因子RutR (Pyrimidine utilization, rut repressor)が*ydhM*の開始コドン上流に結合することが示されたからである(Shimada *et al.*, unpublished)。YdhM結合認識配列 TAGACNNNNGGTCTA と RutR結合認識配列 TTGACCANNTGGTCAA が類似しているため、2つの転写因子が一つの結合部位への結合を競合していることが予想された。したがって、RutRとYdhMを競合させたGel shift assayで結合の強さの比較を行った。その結果、YdhMとRutRは同時に結合できず、RutRよりYdhMの結合が強いことが判明した(図 16)。これはgel shift assayにおいてYdhMとRutRとDNA断片の複合体と考えられるバンド検出されず、図 16, lane 8~10のようにYdhMはRutRに置き換わることが出来るのに対してlane 11~13のようにRutRはYdhMに置き換わってDNAに結合できないからである。

以上より *ydhM* の転写開始点上流の領域に対して YdhM と RutR が競合して結合することが判明したので、*rutR* 欠損株における promoter assay を行ったが *ydhM* プロモーター活性に変化は見られなかった。したがって、YdhM の生理機能を理解する上で YdhM の自己制御を解除するエフェクター分子の発見が最優先と考えられた。

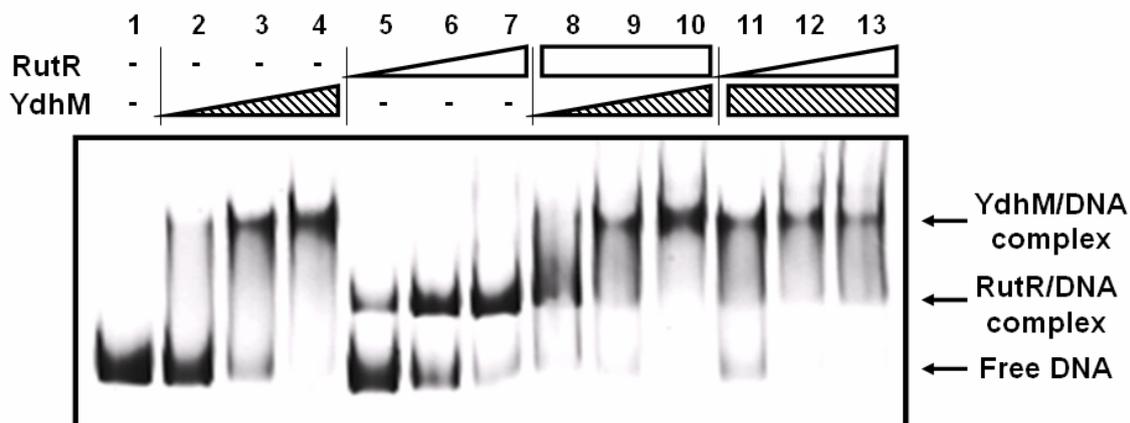


図 16. RutR 存在下における gel shift assay

DNA: 0.5 pmol / RutR: lanes 1-4, no protein; lanes 5 and 11, 1.0 pmol; lanes 6, 8, 9, 10 and 12, 2.0 pmol; lanes 7 and 13, 3.0 pmol / YdhM: lanes 1 and 5-7, no protein; lanes 2 and 8, 0.5 pmol; lanes 3, 9, 11, 12 and 13, 1.0 pmol; lanes 4 and 10, 2.0 pmol

4-8. Gel shift assay in the presence of NEM

YdhM の自己制御を解除するエフェクター分子を探索するにあたって、*ydhM* の下流に存在する遺伝子 *nemA* が *N*-ethylmaleimide reductase をコードする遺伝子であることに注目し、gel shift assay により *N*-ethylmaleimide (NEM) が YdhM のエフェクター分子であるかを確認した。実験では RutR と競合させ、NEM の濃度を高くするにつれて結合の強い YdhM と DNA の複合体から、RutR と DNA の複合体を示すバンドへシフトした(図 17 lane 4~7)。これは NEM が YdhM 特異的に作用していることを示している。したがって、NEM が YdhM のエフェクター分子であることが判明した。YdhM は NEM 存在下で結合がはずれ、自己制御が解除されることが予想された。

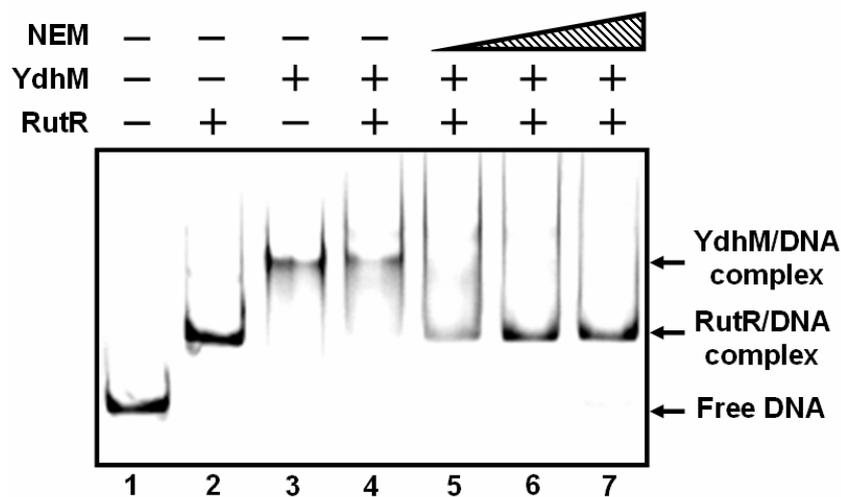


図 17. NEM 存在下における gel shift assay

DNA: 1.0 pmol / YdhM: lanes 3-7, 1.0 pmol / RutR: lanes 2 and 4-7, 2.5 pmol
 NEM: lane 5, 0.1 nmol; lane 6, 1 nmol; lane 7, 10 nmol

4-9. Role of *ydhM* on NEM resistance

YdhM のエフェクター分子が NEM であることが判明したので、*ydhM* の NEM に対する耐性における役割を確認した。図 18 は NEM を加えた LB 培地での野生株と *ydhM* 欠損株の増殖曲線を示している。NEM 濃度: 50 μ M, 0.1 mM において、*ydhM* 欠損株の増殖が野生株と比較して遅くなった。したがって、*ydhM* が NEM 耐性に関与することが示唆された。

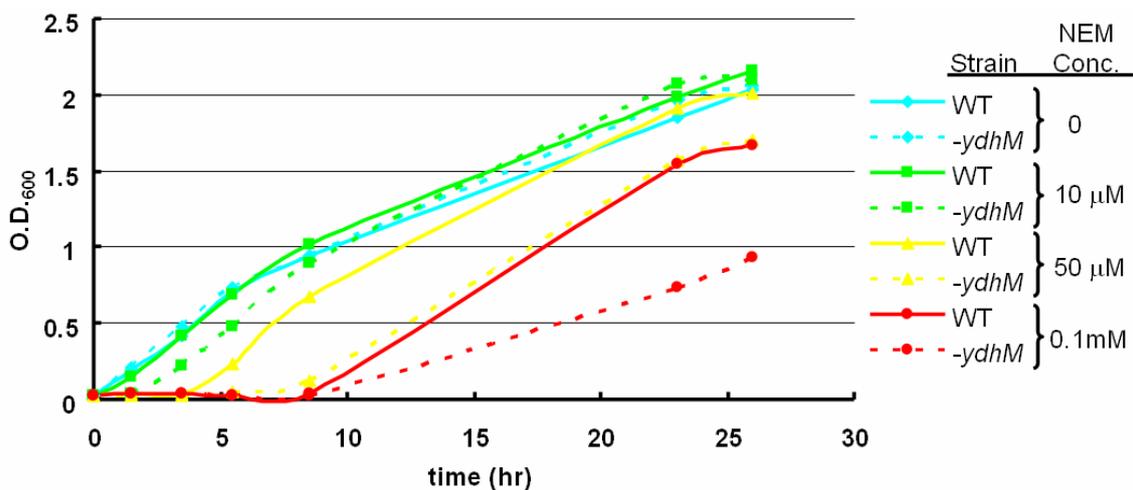


図 18. NEM 存在下における野生株と *ydhM* 欠損株の増殖曲線

青線は NEM を加えないとき、緑線は NEM を 10 μ M 添加したとき、黄線は NEM を 50 μ M 添加したとき、赤線は NEM を 0.1 mM 添加したときの野生株(実線)と *ydhM* 欠損株(破線)の増殖曲線を示す。

4-10. Northern Blotting

YdhM のエフェクター分子が NEM であること、NemA が *N*-ethylmaleimide reductase であることを踏まえ、*ydhM* と *nemA* がオペロンであると推測し northern blotting で *ydhM* と *nemA* の両方の DNA プローブを利用し、*ydhM-nemA* mRNA の検出を試みた。同時に YdhM のエフェクター分子 NEM と RutR のエフェクター分子 uracil を添加することによって *ydhM-nemA* mRNA の量が増加するかを確認した。LB で培養後、O.D.₆₀₀ の値が 3.4 になった時点で NEM と uracil を添加し、20 分培養後の RNA を検出した。その結果、図 19 のように野生株において NEM 添加により *ydhM-nemA* mRNA が増幅することが確認された。ただし、今回の条件下では uracil 添加による *ydhM-nemA* mRNA 量の変化は確認されなかった。また、*ydhM* 欠損株においては *ydhM-nemA* mRNA 自体が確認できなかった。これは図 20 に示すように *ydhM* 欠損株は *Km^r* によって正常な *ydhM-nemA* mRNA を作れないためと考えられる。

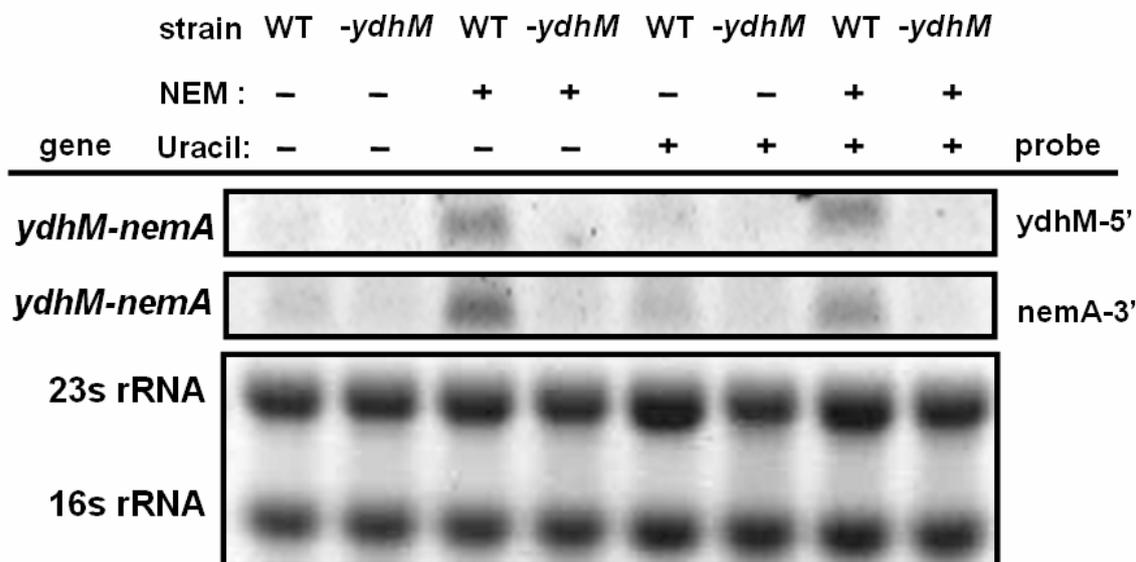


図 19. NEM, uracil 添加による *ydhM-nemA* mRNA 量の測定

添加した NEM は 10 μ M, uracil は 100 μ M。 *ydhM* は 5' 側、 *nemA* は 3' 側に設計した約 500 塩基の DNA プローブを RNA 検出に用いた。検出された RNA の大きさは約 1700~1800 塩基の大きさで、 *ydhM-nemA* mRNA であると確認した。

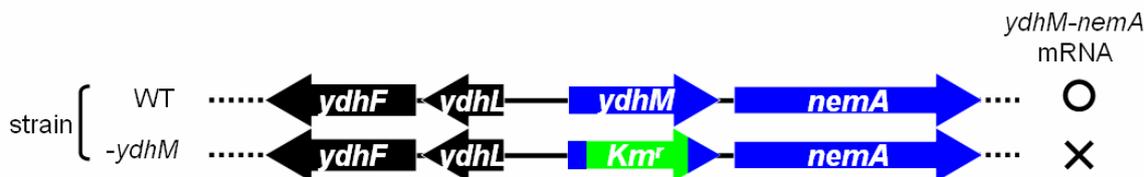


図 20. *ydhM* 欠損株における *Km^r* カセット

第5章 結言

本研究では機能未知転写因子YdhMが $ydhM$ の転写開始点上流、-19.5 に存在する回文配列 5'-TAGACCNNNNGGTCTA-3' に結合し、自己制御(抑制)していることを明らかにした。そして-SH基修飾試薬で求電子試薬でもある*N*-ethylmaleimide (NEM)がYdhMのエフェクター分子であることを同定した。 $ydhM$ は通常の培養条件では発現しないが、NEM存在下では $ydhM$ -*nemA*オペロンの抑制が解除され、NemA (*N*-ethylmaleimide reductase)の発現によりNEM耐性を獲得すると推測される。NEM耐性に関してKefB, KefC解毒機構、RpoSとDpsの関与が示唆されているが、 $ydhM$ 欠損株でのpromoter assayの結果よりYdhMとRpoSとDpsの関与が予想された。またgenomic SELEXよりYdhMは自己制御以外にも複数の制御遺伝子候補が存在したが、Northern blottingにおいて今回の実験条件ではYdhMの制御を確認することが出来なかった。

RutR と YdhM が転写開始点上流の結合部位に競合し結合できることから、YdhM とその支配下遺伝子はピリミジンの代謝と関係がある可能性がある。しかし、現在までに NEM とピリミジンの関連性は明らかになっていない。また、NEM は人工物で天然に存在しないことから、YdhM は NEM 以外の NEM と類似した化合物が真のエフェクター分子である可能性が高い。したがって、今後 NEM 以外のエフェクター分子の探索が必要と考えられる。RutR との関わりと合わせて今後解析する必要があると考えられる。

第 6 章 参考文献

Bochner, B. R., Peter Gadzinski and Eugenia Panomitros. (2001) Phenotype MicroArrays for High-Throughput Phenotypic Testing and Assay of Gene Function. *Genome Res.* **11**:1246-1255.

Ferguson, G. P., Y. Nikolaev, D. Mclaggan, M. Maclean, and I. R. Booth. (1997) Survival during Exposure to the Electrophilic Reagent *N*-Ethylmaleimide in *Escherichia coli*: Role of KefB and KefC Potassium Channels. *J. Bacteriol.* **179**: 1007-1012.

Ferguson, G. P., R. I. Creighton, Y. Nikolaev, and I. R. Booth. (1998) Importance of RpoS and Dps in Survival of Exposure of Both Exponential- and Stationary-Phase *Escherichia coli* Cells to the Electrophile *N*-Ethylmaleimide. *J. Bacteriol.* **180**:1030-1036.

Mclaggan, D., H. Rufino, M. Jaspars, and I. R. Booth. (2000) Glutathione-Dependent Conversion of *N*-Ethylmaleimide to the Maleamic Acid by *Escherichia coli*: an Intracellular Detoxification Process. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1393-1399.

Ishihama, A. (2000) Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol* **54**:499–518.

Karp, P. D., I. M. Keseler, A. Shearer, M. Latendresse, M. Krummenacker, S. M. Paley, I. Paulsen, J. Collado-Vides, S. Gama-Castro, M. Peralta-Gil, A. Santos-Zavaleta, M. I. Peñaloza-Spínola, C. Bonavides-Martinez and J. Ingraham. (2007) Multidimensional annotation of the *Escherichia coli* K-12 genome. *Nucleic Acids Res.* **35**:7577-7590.

Maeda, H., N. Fujita, and A. Ishihama. (2000) Competition among seven *Escherichia coli* sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **28**:3497-3503.

Ogasawara, H., A. Hasegawa, E. Kanda, T. Miki, K. Yamamoto, and A. Ishihama. (2007) Genomic SELEX search for target promoters under the control of PhoQP-RstBA cascade. *J. Bacteriol.* **189**:4791–4799.

Pérez-Rueda, E., and Collado-Vides, J. (2000) The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **28**:1838-1847.

第 7 章 謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの助言や丁寧なご指導を頂いた法政大学工学部生命機能学科石浜明教授に心より感謝申し上げます。

実験全般の指導を賜った法政大学工学部小笠原寛博士、RutR の実験データの提供および northern blotting における指導を賜った法政大学大学院工学研究科物質化学専攻博士課程 3 年島田友裕氏、YdhM の精製を行って頂いた石浜研究室山田佳代子氏、貴重なアドバイスを下さいました法政大学工学部生命機能学科山本兼由専任講師と法政大学大学院工学研究科物質化学専攻博士課程 3 年寺本潤氏、実験を様々な面からサポートして頂いた石浜研究室郡彩子氏と荻原美佐代氏に心より感謝申し上げます。そして最後に、実験の進行を支えていただいた石浜研究室の皆様に感謝申し上げます。