

大腸菌単一細胞観測系の構築とプロモーター強度測定

長谷川, 明子 / HASEGAWA, Akiko

(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

大腸菌単一細胞観測系の構築とプロモーター強度測定

Construction of Single-cell Observation Device and Determination of

Promoter Strength within a Single *E. coli* Cell

指導教授 石浜 明

法政大学大学院工学研究科

物質化学専攻修士課程

06R2116

ハセガワ アキコ

長谷川 明子

目次

第一章 序論	4
第二章 材料・実験方法	8
大腸菌株と培地	8
プラスミドの構築	8
Genomic SELEX 法	9
プラスミド抽出(アルカリ溶菌法)	11
塩基配列の決定	12
ゲルシフトアッセイ	13
DNase-I フットプリンティングアッセイ	13
プロモーター活性の測定	14
Total RNA の抽出	15
プライマー伸長法	15
細胞チップ(マイクロチップ)	15
細胞チップの局所固定法	17
細胞チップでの大腸菌の単一細胞観察	17
第三章 結果	20
Genomic SELEX による AIIR 結合配列の単離	20
SELEX の DNA 断片と AIIR の結合親和性の同定	24
標的配列の AIIR 結合のアラントインとグリオキシル酸の影響	26
<i>alls-allA, gcl, leuO</i> プロモーター領域における AIIR 結合部位の同定	28
AIIR 依存の <i>csrA</i> の転写の影響	31
細胞内における <i>gcl</i> プロモーターにおけるグリオキシル酸の影響	32
細胞チップによる大腸菌の固定と検察	34

大腸菌の単一細胞のプロモーター測定35
第四章 総括39
第五章 参考文献40
第六章 謝辞42

第一章 序論

大腸菌(*Escherichia coli*) ゲノムは約 464 万塩基対 DNA であり、遺伝子総数は約 4,500 である。機能既知あるいは機能が予測できる遺伝子は約半分にしか過ぎず、半分は機能予測さえ出来ない遺伝子である。一方で遺伝子からメッセンジャーRNA (mRNA)をつくる RNA ポリメラーゼは細胞当り遺伝子総数 4500 の半分以下の 2000 分子しか存在しない。どの遺伝子が働くかは、ゲノム上のどの遺伝子に RNA ポリメラーゼが分配されるかによって決まり、その分配は環境によって変化する。RNA ポリメラーゼは、DNA の塩基配列を写し取りながら RNA を転写するコア酵素と、DNA の転写開始シグナル・プロモーターを認識するシグマ因子からなり、シグマ因子がついた酵素をホロ酵素と呼ばれる。大腸菌では 7 種類のシグマ因子があるため、このホロ酵素は 7 種類存在する。ホロ酵素は、さらに多数の転写因子と呼ばれるタンパク質と相互作用をして、転写をする遺伝子を選択する。転写特異性変換の主要な要因は、RNA ポリメラーゼに結合し、その構造機能変換をするのが転写因子群である。大腸菌の環境の変化に応じた遺伝子発現の制御は、主として転写因子が行なっている。転写因子は、制御対象遺伝子周辺に結合し、転写の亢進または抑制をすることが知られている。大腸菌には、転写因子が 300 種類ほど存在するが、そのうち 100 種類以上は機能が明らかとされていない。

大腸菌は、プリン分解物であるアラントイン(allantoin)を窒素源として再利用する。アラントインは最初に ureidoglucolate に変換され、さらにカルバモイルリン酸(carbamoylphosphate)を生成するが、この過程で、3 つの NH(+)が生じる。これはグルタミン酸を経てアミノ酸を合成する。アラントインのこの分解経路には、AIB (alantoinase)、AIC (allantoate aminohydrolase)、AID (ureidoglycolate dehydrogenase) を含めて 5 種類の酵素が関与している (Fig 1)。カルバモイルリン酸は

ピリミジンとアルギニン合成の開始物質である。

一方、炭素源が制限されている条件において、**ureidoglycolate** はグリオキシル酸(**glyoxylic acid**)にも変換される。グリオキシル酸は **ATP** を産出するためのグリセリン酸経路を経て中心代謝系に組み込まれる。この回路はグリオキシル酸回路と呼ばれ、**2-オキソグルタル酸**と**スクシニル CoA** の経路を迂回して、イソクエン酸からリンゴ酸とコハク酸を生成するため、炭素数の減少を伴わないでオキサロ酢酸に至ることができる。従って、グリオキシル酸回路(グリオキシル酸バイパス)は異化代謝経路ではなく、特殊化した同化代謝経路として利用される。大腸菌はこの回路を利用して **C₄** 化合物をつくれるので、酢酸だけを炭素源として生育することができる。**allA, gcl, glxR, glxK** 遺伝子をコードしている 4 つの酵素は **3-phosphoglycerate** の合成に参与している。アラントイン窒素の再利用と、炭素源としての利用のふたつの経路に関わる酵素群の遺伝子は、5 つの転写ユニット **allS, allA, allR, gcl-hyi-glxR-ybbV-allB-ybbY-glxK, allD-allC-ylbA** に編成されている。

アラントイン分解系遺伝子群の制御には、2 つの制御因子 **AIIR, AIIS** が関与していることが知られている。**allS, allA, gcl** オペロンは **AIIR** により負の制御を受け、嫌気性条件、好気条件のいずれでも発現される。**AIIR (GclR** とも呼ばれる)は転写制御因子の **IclR** ファミリーに所属し、このメンバーの代表的因子 **IclR**(イソクエン酸リアーゼ遺伝子制御因子)と配列が 42%一致している。大腸菌 **K12** ゲノムは **IclR** ファミリーの転写因子を 8 つ持つ。合計約 450 種のメンバーの遺伝子が細菌と古細菌中で同定されている (Walker et al., 2006)。**allA** と **gcl** オペロンの発現は、嫌気条件においても、好気条件下においてもグリオキシル酸の存在によって誘導されることから、グリオキシル酸が誘因因子(**inducer**)ではないかと予測されている。しかし、2 つの制御因子の支配標的遺伝子や、制御メカニズムの全体像は分かっていない。アラントイン(開始代謝物質)とグリオキシル酸、他の代謝物質が、これら転写因子の活性制御にどの

ように関わっているかは未解決である。

本研究において私は、転写因子 **AIIR** の支配下遺伝子の網羅的探索を目的として、まず、ゲノム上の転写因子結合部位の同定を目指した。そこで、当研究室において開発された **Genomic SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)** を行い新規標的遺伝子の探索を行った。**AIIR** 認識結合 DNA 配列から、支配下遺伝子を予測し、その上で **AIIR** の標的 DNA 結合に及ぼすアラントイン、グリオキシ酸の影響を観察し、アラントインが **AIIR** の抑制機能促進因子(**co-repressor**)であり、グリオキシ酸が、**AIIR** を不活化する転写脱抑制因子(**inducer**)であると結論した。

Purine Metabolism

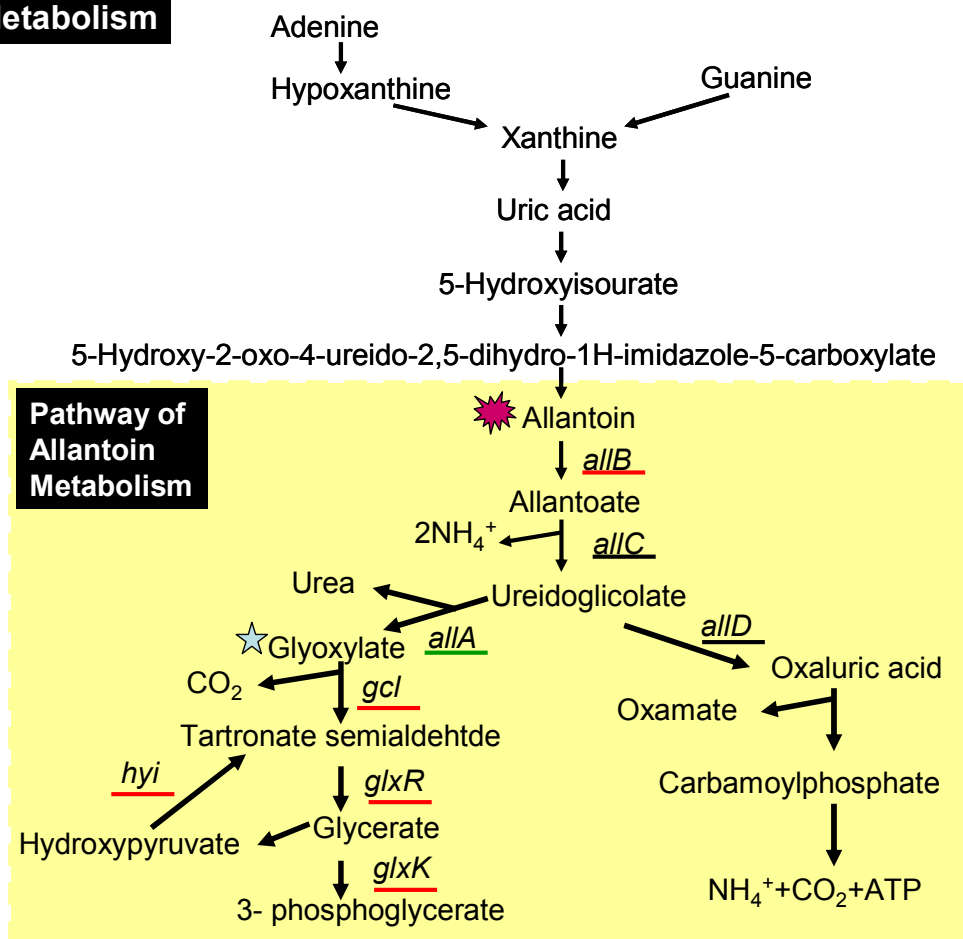


Fig 1 プリン代謝経路とアラントイン分解経路

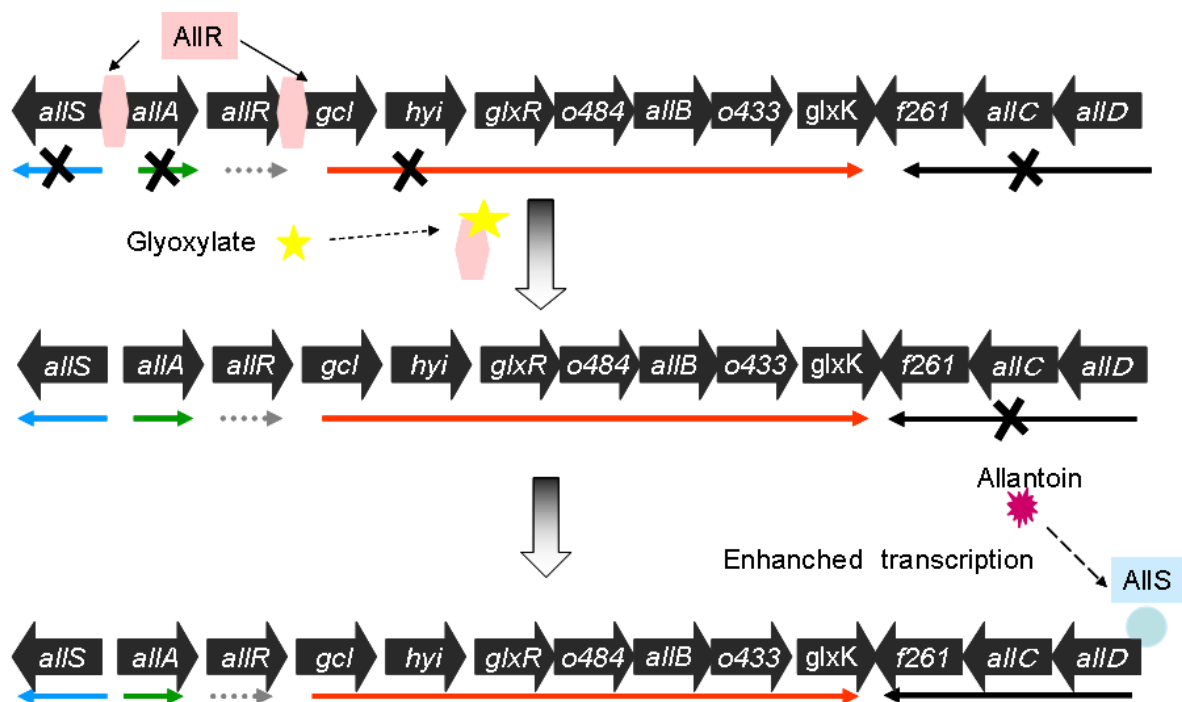


Fig 2 アラントイン制御系

細菌の環境応答では、細菌集団中の細胞間に役割分担があることが示唆されて以来、単一細胞でのゲノム発現の解析が求められている。大腸菌単一細胞でのプロモーター活性測定系の開発を試みた。その目的のために、本研究ではまた、自作の細胞チップを用いて、大腸菌培養局所固定法を開発し、大腸菌単一細胞観察系を構築した。これを用いて、単一細胞での大腸菌アラントイン代謝経路の制御する転写因子 AIIR の支配下プロモーター活性への影響の動態解析を実施した。

第二章 材料・実験方法

大腸菌株と培地

AllR タンパク精製には発現プラスミド pHM118 を BL21(DE3) [F- *ompT hsdSB (rB-mB-) dcm gal -(DE3)*] に形質転換し、LB 培地に 100 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリンを加えたものを培地とし 37°C、140min⁻¹にて振騰培養した。

プロモーターアッセイのための TFP (two-fluorescent protein) プロモーターアッセイベクターは大腸菌 KP7600(W3110 *lacIq lacZ Δ M15 galK2 galT22*)、JW0494(KP7600 *allR* 欠損株) に形質転換した。それを、LB 培地または 0.4% グルコース M9 培地に 100 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリンを加えたものを培地とし 37°C、140min⁻¹にて振騰培養し、GFP プロモーターアッセイ、単一細胞観察に用いた。

プラスミドの構築

プロモーターアッセイベクター pGRP は二つの蛍光タンパク(GFP、RFP)遺伝子を持つ (Fig 3)。一つは red fluorescent protein (RFP) であり、対照プロモーター *lacUV5* の制御下にあり、もう一方の green fluorescent protein (GFP) はテストプロモーターの制御下にある構造をしている (Makinoshima. et al., 2002, Shimada et al., 2005)。開始コドンから *gcl* プロモーター上流約 500 塩基の配列を大腸菌 KP7600 由来の染色体 DNA を鋳型として、2 つのプライマー H026S (5'-TGGGCAGAGATCTGCCACTGCATGCTTCCGGT-3') ,H026T (5'-TCATTTTATGCATTTTATTCCTACCCTA-3') と H029S(5'-TCAGAATATGCATTCTTTGCTCCTTGAAA-3')、H029T (5'-AATTATAGATCTGGCAACGGTAGTCGAA-3') を用いて PCR(94°C 30 sec、55°C 30 sec、74°C 30 sec 25 サイクル)で増幅した。これらのプライマーはクローニングのための EcoT22I, BglIII 制限酵素サイトをそれぞれ含んでいる。PCR 産物を制限酵素処理し、pGRF の

EcoT22I,と BglIII サイトと連結した。構築したプラスミドはプロモーターアッセイに
用い、それぞれ pTFgcl、pTFcsrA と名づけた。

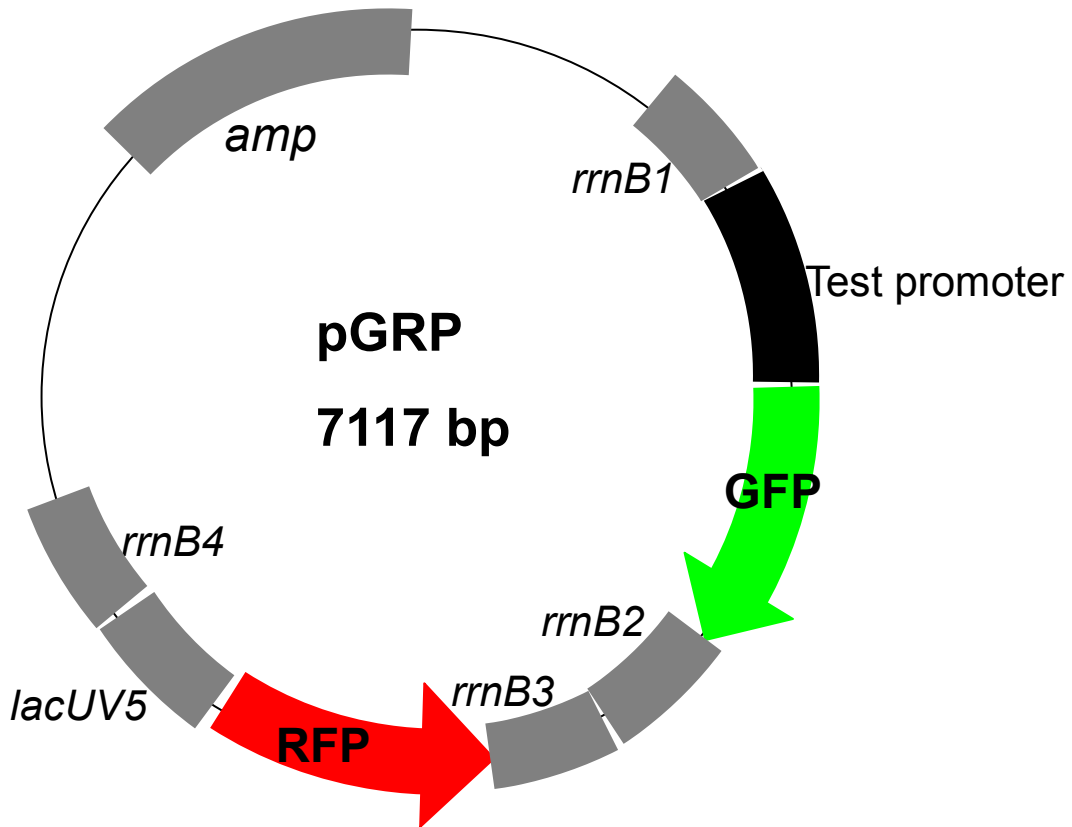


Fig 3 DFP Vector for Promoter Assay

Genomic SELEX 法

大腸菌 W3110 株のゲノム DNA を超音波で 150~300 bp の長さに破碎した。これをプラスミド pBR322 の EcoRV サイトでクローニングし、大腸菌 DNA ライブラリーを作成した。この大腸菌 DNA プラスミドライブラリーを鋳型として 150~300 bp の DNA 断片を PCR にて増幅した。反応条件は 94°C 30 sec, 50°C 1 min, 70°C 1 min を 20 サイクルで行った。プライマーは EcoRV-F (5' - CTTGGTTATGCCGGTACTGC - 3')、EcoRV-R (5' - GCGATGCTGTCGGAATGGAC-3') の二種類を用いた。この PCR 産物を 5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色

を行った。それを紫外線検出器 TOYOBO FASIIIでバンドを確認して、150~350 bp のバンドをゲルから切り出しチューブに回収し、粉碎した後 Elution buffer (Gilbert Buffer) を加えて、一晚回転振盪した。

AllR 結合配列のスクリーニングのために genomic SELEX を行った。必要であれば以下の(1)~(7)を何回か繰り返し行った。(1) 一晚回転振盪し溶出させた DNA の回収を行った。まず、チューブを遠心分離 (15000 rpm、15 分間、4°C) し、上清を SUPERECTM-01 チューブに移し、遠心分離 (10000 rpm、5 分間、4°C) 後、回収し、エタノールと酢酸ナトリウムを加え、遠心分離 (15000 rpm、15 分間、4°C) し、エタノール沈殿し、減圧乾燥した。乾燥後、沈殿物を DDW に懸濁した。(2) 回収した 5pmol/ μ l の DNA 断片と 20pmol/ μ l のヒスチジンタグを融合させた転写因子 AllR と binding buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8 at 4°C, 3 mM Mg acetate, 150 mM NaCl, 1.25 μ g/ml bovine serum albumin [BSA])を混ぜ、37°Cにて 30 分間結合反応を行った。(3) 結合反応後 Ni アフィニティークロマトグラフィーにより、ヒスチジンタグ融合たんぱく質を回収した。その方法は、Ni-NTA アガロースをカラム(Muromac COLUMNS S size5x50 mm)に充填し、5 mM イミダゾールバッファーをカラムに注ぎ平衡化させた。その後 DNA とヒスチジンタグを融合させた転写因子の結合反応液をカラムに添加した。カラム中の蛋白質と結合していない DNA 断片を除去するために 10 mM イミダゾールバッファーをカラムに注いだ。そして、蛋白質に結合した DNA 断片を回収するために 200 mM イミダゾールバッファーをカラムに注いだ。そして 200 mM イミダゾールバッファーを加えて溶出してきたバッファーを 1.5ml チューブに回収した。(4) 溶出してきたバッファーにエタノール、酢酸ナトリウムを加えて、遠心分離 (15000 rpm、15 分間、4°C) し、エタノール沈殿し、減圧乾燥した。乾燥後、沈殿物を滅菌水に懸濁した。(5) 回収した DNA 断片を鋳型として PCR(94°C 30sec,50°C 1min,70°C 1min)にて増幅させた。16,18,20 サイクルという

3種類のサイクルのサンプルを得た。(6) そのサンプルを5%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、増幅加減を確認した。(7) 確認後、5%ポリアクリルアミドゲルにてサンプルをゲル回収した。AIIRに結合したDNA断片の塩基配列の決定には、PCRで増幅によってDNA-AIIR複合体から単離したDNA断片をポリアクリルアミドゲルにてゲル回収し、用いた。PCR産物はpT7 Blue-T vector(Novagen)にDNA Ligation Kit<Mighty Mix>(Takara)を用いてクローニングした。そして大腸菌DH5 α に形質転換した。これを、アンピシリン、X-galを含んだLB寒天培地にまいて、37°Cで一晩培養した。LB寒天培地に出現したコロニーのうち白色コロニーをLB寒天培地に100個ポイント打ちし、プラスミド抽出を行った。

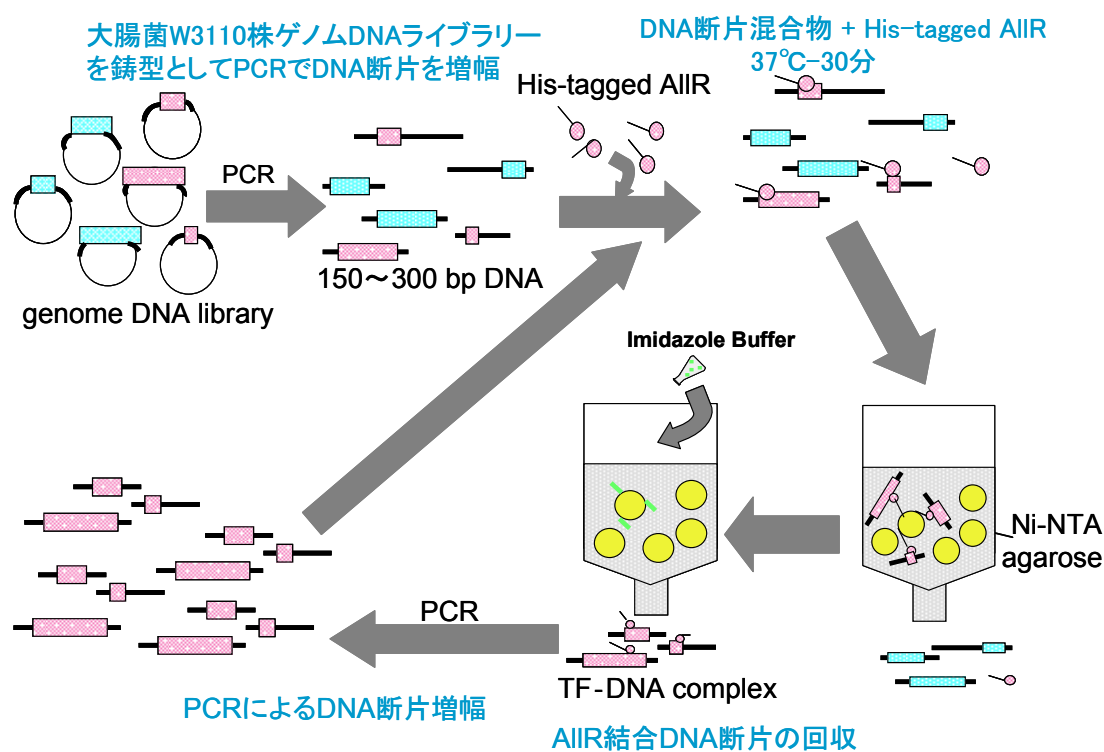


Fig 4 Genomic SELEX 法

プラスミド抽出(アルカリ溶菌法)

アンピシリンを含む5 ml LB培地にプレートの白色コロニーをそれぞれ溶菌し、

37°C、140min⁻¹にて、一晚培養したプラスミド DNA を含む大腸菌培養液をエッペンドルフチューブに取り、遠心分離（10000 rpm、5 分間、4°C）して上清を除去する。これを二度繰り返す。そして、Solution I を加え、懸濁する。さらに Solution II を加え穏やかに混合後、すぐに Solution III を加え混合させた後、遠心分離（15000 rpm、15 分間、4°C）して上清を新しい 1.5 ml エッペンドルフチューブに移した。上清に等量のイソプロパノールを加え vortex 後、遠心分離（15000 rpm、15 分間、4°C）して上清を除去し、減圧乾燥した。乾燥後、沈殿物を滅菌水に懸濁した。そこに 1M MgCl₂ を加え、氷上に 5 分間、静置し、遠心分離（15000 rpm、5 分間、4°C）して上清を新しい 1.5 ml エッペンドルフチューブに移した。上清に等量のイソプロパノールを加え vortex 後、遠心分離（15000 rpm、15 分間、4°C）して上清を除去し、減圧乾燥した。乾燥後、沈殿物を滅菌水に懸濁した。50 ng/ml RNase 1 μl を加え 37°C で 2 時間放置後、等量のフェノールを加え、vortex を 30 秒行い、遠心分離（14000 rpm、2 分間、4°C）後、上層のみを注意深く回収し、1.5 ml エッペンドルフチューブに移した。さらに、等量のクロロホルムを加え、vortex を行い、遠心分離（14000 rpm、2 分間、4°C）後、上清を回収した。得られた上層にエタノールと 3M 酢酸ナトリウムを加え、遠心分離（14000 rpm、15 分間、4°C）を行い、エタノール沈殿し上清を除去し、減圧乾燥した沈殿物を滅菌水に溶解させ、-30°C で保存した。

塩基配列の決定

回収したプラスミドに挿入された DNA 断片の塩基配列を確認するために、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit と T7-primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG -3') を用いて、シーケンス反応を行った。PCR(95°C 20sec, 55°C 15sec, 74°C 1min 25 サイクル)にて反応を行った。PCR 産物

は125mM EDTAと1.5M 酢酸ナトリウムを1 μ lずつ、66 μ lのエタノールを加え、vortexし、遠心分離(150 rpm 20 min 4 $^{\circ}$ C)を行った。その後70% エタノールでリンスし、減圧乾燥した。乾燥の後、Big Diで溶解した。これを96穴プレートに分注し、ABI DNA sequencer 3130xにセットし、解析を行った。この塩基配列を用いて、DNA断片の大腸菌ゲノム上の位置を同定にはインターネット上のWeb サイト map sequence (<http://www.bioscinet.org/tools/tfbinding.html>)を利用した (Shimada et al., 2005)。

ゲルシフトアッセイ

プローブとして用いる DNA断片は、SELEX 実験において得られたプラスミドはそれぞれ AIIR 認識配列をもつので、これを鋳型として5' 末端に蛍光色素イソチオシアネート (FITC) にてラベルした T7 FITC primer (5'-GGTTTTCCAGTCACACGACG-3') と T7-R primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')を用いて PCR(94 $^{\circ}$ C 30sec, 55 $^{\circ}$ C 30sec, 74 $^{\circ}$ C 30sec 25 サイクル)を行い、DNA断片を増幅させた。FITC でラベルされた PCR 産物はアクリルアミドゲルにて回収を行った。ゲルシフトアッセイに 0.3pmol/ μ l で FITC 標識した DNA断片を用いた。反応は転写因子 AIIR を反応溶液 12 μ l に加え 37 $^{\circ}$ Cにて 30 分間反応させた。用いた gel shift buffer は 10 mM Tris-HCl, pH 7.8 at 4 $^{\circ}$ C, 150 mM NaCl, 3 mM Mg acetate を含んでいる。反応後 40%ホルムアミドダイを加えた後、アクリルアミドゲルで泳動して、BIO-RAD Molecular Imager FXPにて確認した。

DNase-I フットプリンティングアッセイ

ゲルシフトアッセイと同様に FITC で標識 DNA断片を用いた。それぞれ 0.5 pmol

の FITC 標識プローブと転写因子 AllR と混ぜて、37°Cにて 30 分間反応させた。反応溶液は 25 μ l 中に 10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 150 mM NaCl, 3 mM magnesium acetate, 5 mM CaCl₂, 25 μ g/ml BSA を含んでいる。30 分の反応後、25 度に移し、5 ng of DNase I (Takara)を添加して DNA の切断を行った。そして、25°Cにて 30 秒反応し、25 μ l のフェノールを加えて反応を停止した。反応溶液を遠心分離 (14000 rpm、2 分、4°C) し、上清を回収し、そこにエタノールと 3 M 酢酸ナトリウムを加えて、遠心分離 (15000 rpm、20 分間、4°C) して、エタノール沈殿を行い、減圧乾燥した。これを 80%ホルムアミドゲルに懸濁した。これを SHIMADZU の DSQ-500L DNA SEQUENCER を利用して 7 M Urea 8% アクリルアミドゲルで泳動し、解析を行った(Ogasawara et al., 2007)。

プロモーター活性の測定

GFP はテストプロモーターの制御下の発現、RFP は対象プロモーターの支配下の発現を示している。RFP と GFP の発現強度は大腸菌での発現を測定した。LB または M9-0.4%グルコース培地中で OD₆₀₀ が 0.3~2.0 になるまで培養した。それを集菌し、PBS(-)で懸濁し、すべてのサンプルの OD₆₀₀ が 0.6 になるように調整する。それを 0.4ml の 96 穴の flat-bottom プレートに 0.2ml サンプルを加え、蛍光強度を Wallac 1420 ARVosx (Perkin-Elmer Life Sciences)にて測定する。GFP は励起波長を 485-nm 、放射波長を 535-nm、RFP は励起波長を 544-nm 、放射波長を 590-nm として測定した。テストプロモーターの GFP の蛍光強度は方程式(X/Y)/(A/B)で標準化した。X と Y は GFP (test promoter)と RFP (test promoter)の蛍光強度にそれぞれ相当し、A と B は GFP (lacUV5 promoter) と RFP (lacUV5 promoter)の蛍光強度に相当する。(Shimada et al., 2004, Ogasawara et al., 2007).それぞれの必要時間ごとに集菌をし、OD₆₀₀ が 0.6 になるように調整したものをサンプルとし、時間ごとに測定した。

Total RNA の抽出

プライマー伸長法のための RNA の抽出は一晩培養した培地を新しい LB 培地 100 ml に対して 1ml 加え、培養を行った。OD₆₀₀ が 0.3~0.5 の細胞を集菌し、SolutionA (0.5% SDS、20mM NaOAc、10mM EDTA)を加え懸濁し、酸性フェノールを加え Vortex し、60°Cにて 5 分間反応し、遠心分離(5000rpm 5min 4°C)し、上清にエタノールを加え、エタノール沈殿し、沈殿物にさらに SolutionA を加え懸濁し、エタノール沈殿を行い、沈殿物を自然乾燥した。そして滅菌水に懸濁し、-30°Cに保存した (Yamamoto. et al., 2002.)。

プライマー伸長法

プライマー伸長法は Yamada et al 1998 のプロトコールに沿って蛍光標識したプローブを用いる。40 μ g の total RNA と 1pmol の 5'-FITC- 標識プライマーを混合し 20 μ l の反応溶液を作る。この溶液には 10 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 37°C), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM each of dATP, dTTP, dGTP, and dCTP, と 20 U of RNase inhibitor を含んでいる。実験に用いた 5'-FITC- 標識プライマーの配列は (5'-AGGGTCAGCTTGCCGTAGG-3') である。プライマー伸長反応は、5 U の avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Takara)を加えて開始した。50°Cにて 1 時間反応後、DNA はフェノール抽出し、エタノール沈殿を行った。乾燥し、ホルムアミドダイで懸濁し、8M 尿酸 - 6%アクリルアミドシーケンシングゲルで電気泳動を行った。ゲルの中で蛍光標識した DNA は slab gel DNA sequencer DSQ-500L (Shimadzu)で検出した。

細胞チップ(マイクロチップ)

単一細胞観察に用いたチップは名古屋大学大学院工学研究科福田敏男研究室の協

力を得て作成していただいた。細胞チップの写真と模式図を Fig5 に示した。

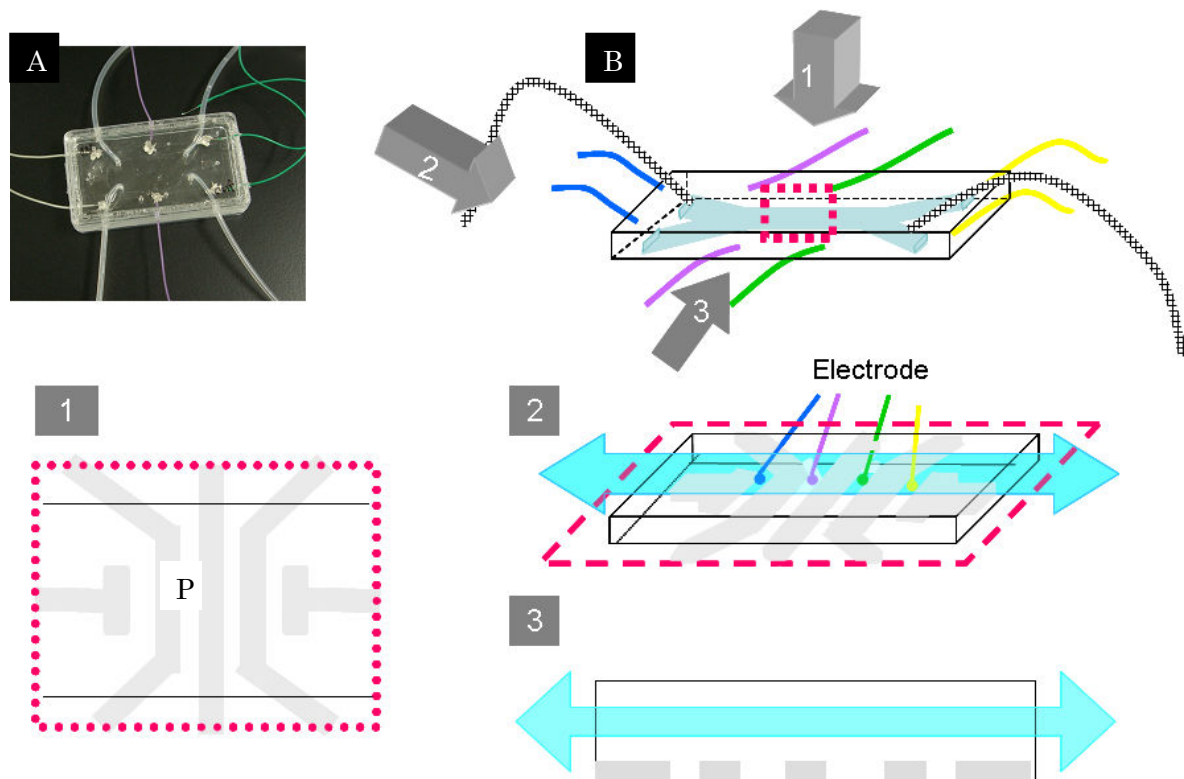


Fig 5 細胞チップの構造

Fig5 の 1 は細胞チップの中心(A のピンクで囲んだ部分)を拡大した図で、2 は斜め上から中心を拡大した図、3 は横から見たものを拡大した図である。2,3 の水色の大きな矢印は、流路があることを示している。B の黒い線は流路となるシリコンチューブである。そして青色、紫色、緑色、黄色はそれぞれ電線で、それぞれの電極につながっている。たとえば、紫色のラインに電圧を加えると、1 の P 部分に電圧がかかるというふうにこの細胞チップには 4 種類の電極が存在している。実際の細胞チップの電極の様子を Fig 6 (i) に示した。そして Fig 6 (ii)には実際に紫色のラインのみに電極をかけた時の様子を示した。

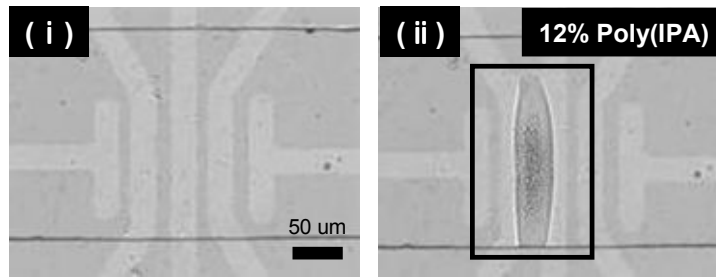


Fig6 細胞チップの電極の写真

細胞チップの局所固定法

今回単一細胞観察に感熱ゲルとして用いた Poly(*N*-isopropylacrylamide) は 32°C 以上でゲル状になり、32°C 未満ではゾル状であるという性質を持つ。これを利用し単一細胞観察系には局所固定法を用いた。(Fig 7) 単一細胞観察系では電圧を加えることで、電極付近の温度が局所的に上昇する。そこでその電極付近で、Poly がゲル状になる。しかし、電極から遠い場所においては、32°C 以上にはならないので Poly はゾル状のままである(Fig 7B)。単一細胞観察系においては、顕微鏡付近の温度を、23°C に保つように制御しているため (Fig 8)、局所での固定は可能である。また Poly は温度が 32°C 未満になるとゾル状に戻るという性質も持つ(Fig 7C)。

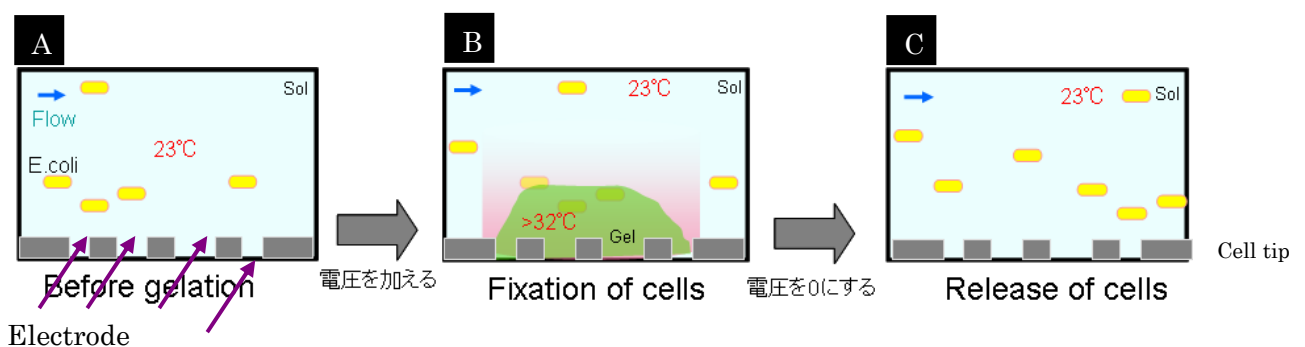


Fig 7 局所固定法

細胞チップでの大腸菌の単一細胞観察

単一細胞観察系の模式図を Fig8 B に示した。この系においては電圧と流速はコン

コンピューターによって制御されている。また顕微鏡付近は 23°C に保つように制御している (Fig8A、B)。流路はペリスタポンプによる吸引によって溶液を導入している。

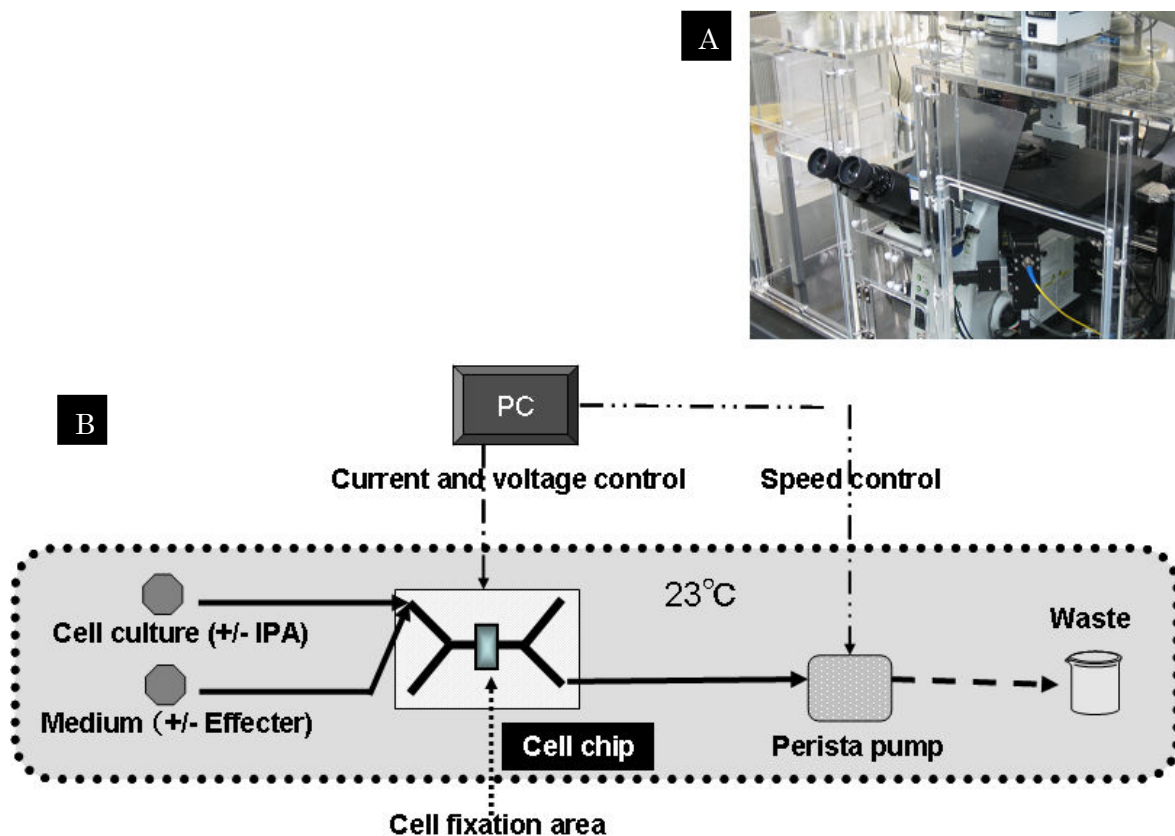


Fig 8 単一細胞観察系の写真と模式図

観察用の大腸菌の準備として LB で 37°C 一晩培養した KP7600 (pGR gcl) 培養液を新しい培地に 1/50 量加えて 37°C で 3h 培養し、OD₆₀₀ が 0.3~0.5 に到達した時に 10mM glyoxylic acid を加え、37°C で一時間培養する。その培養液と 1/10 量の 2×LB を使い終濃度 12%Poly(*N*-isopropylacrylamide) と 2×LB で一細胞観察用の細胞培養溶液をつくる。(また、Effector+medium 溶液は最小培地に、40mM の glyoxylic acid を加えて作成。) 観察には、まず、観察用溶液を Cell chip (ITO Heater chip) (Fig 7) に流し入れる。10.1 V の電圧をかけ細胞チップ内のゲルを固定する。10 分間ゲルを静置後、effector 溶液を 10 μ l/min で流入しながら (Fig 9)、時間経過にともなう個々の細

胞の GFP 蛍光観察(Olympus: IX-81)を行った。ImageJ による画像解析を行った。

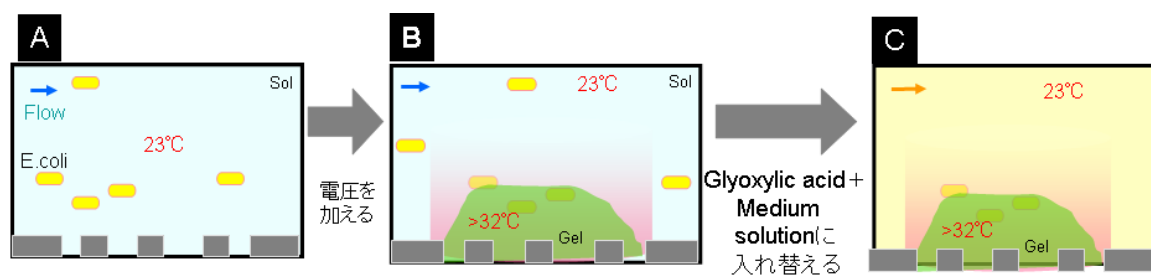


Fig 9 単一細胞観察における細胞の固定法の模式図

第三章 結果

Genomic SELEX による AIIR 結合配列の単離

大腸菌転写因子 AIIR が認識する DNA 配列の同定のために、Genomic SELEX 法 (Shimada et al., 2005) を利用した、AIIR 蛋白が認識結合する DNA 配列の探索を行なった。この方法は原型となる SELEX 方法 (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990; Singer et al., 1997) において使用する合成オリゴヌクレオチドの代わりに大腸菌ゲノム DNA 断片のライブラリーを用いて行った。最初に、超音波破碎した大腸菌 W3110 ゲノム DNA のプールからなる 150~300 bp の大きさの DNA 断片を持つプラスミドライブラリーを構築した。それぞれの実験において、DNA 断片の混合物は、PCR によって挿入した DNA 断片の増幅の後、作製した。これらの DNA 断片の混合物と、4 倍の濃度のヒスタグがついた AIIR タンパク質からできた AIIR-DNA 複合体をアフィニティー精製した。Genomic SELEX サイクルの最初の段階 (1 サイクル目) では、AIIR に結合した DNA 断片は、元のゲノム断片の混合物と同様に、PAGE 上でスメアなバンドを示した。SELEX の 2 サイクル目、3 サイクル目では、いくつかの分離した明確なバンドが現れた。(Fig 10)

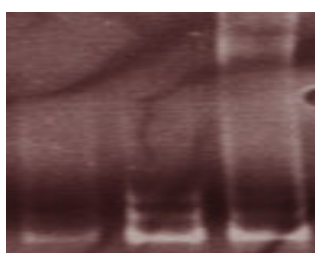


Fig 10 AIIR の SELEX2 サイクル目の泳動結果

AIIR と親和性の高いいくつかの DNA 断片が濃縮された。これらの DNA 断片はゲルから回収し、塩基配列を確かめるため、pT7 Blue-T ベクター (Novagen) にクローニングした。2 サイクルの結果と 3 サイクルの結果の合計で 163 クローンを単離した。

各クローンの塩基配列を分析し、大腸菌ゲノム全シーケンス情報を利用して、DNA断片のゲノム上の位置を同定した（表1）。

Table1 AIIR SELEX 結果

Left gene		SELEX fragment		Right gene	No.fragments
<i>allR</i>	(-->)	(532575) S		(532845) (-->)	<i>gcl</i> 48
<i>allS</i>	(<--)	(531193) S		(531397) (-->)	<i>allA</i> 24
<i>cueO</i>	(-->)	(140176) S	(<i>gcd</i>)	(140347) (-->)	<i>hpt</i> 4
<i>ugpQ</i>	(<--)	(3588140) S	(<i>ugpC</i>)	(3588367) (<--)	<i>ugpE</i> 3
<i>lepA</i>	(<--)	(2706603) S		(2706770) (<--)	<i>rseC</i> 3
<i>ynjI</i>	(<--)	(1849084) S	(<i>topB</i>)	(1849297) (<--)	<i>selD</i> 2
<i>yjeB</i>	(-->)	(4407779) S	(<i>rnr</i>)	(4407981) (-->)	<i>yjfH</i> 2
<i>ygiV</i>	(<--)	(3241854) S	(<i>uxaA</i>)	(3242039) (<--)	<i>uxaC</i> 2
<i>yfbF</i>	(-->)	(2373855) S	(<i>yfbG</i>)	(2374052) (-->)	<i>yfbH</i> 2
<i>yadI</i>	(-->)	(145514) S	(<i>yadE</i>)	(145751) (<--)	<i>panD</i> 2
<i>wcaL</i>	(<--)	(2120403) S	(<i>wcaK</i>)	(2120648) (<--)	<i>wzxC</i> 2
<i>surA</i>	(<--)	(55315) S	(<i>imp</i>)	(55509) (-->)	<i>djlA</i> 2
<i>recN</i>	(-->)	(2753135) S	(<i>smpA</i>)	(2753303) (<--)	<i>yjfF</i> 2
<i>ompC</i>	(<--)	(2317853) S		(2318097) (-->)	<i>yojN</i> 2
<i>nadB</i>	(-->)	(2711867) S	(<i>yfiC</i>)	(2712030) (-->)	<i>srnB</i> 2
<i>mntH</i>	(<--)	(2520137) S	(<i>nupC</i>)	(2520350) (-->)	<i>insL</i> 2
<i>lpxA</i>	(-->)	(203499) S	(<i>lpxB</i>)	(203697) (-->)	<i>mhB</i> 2

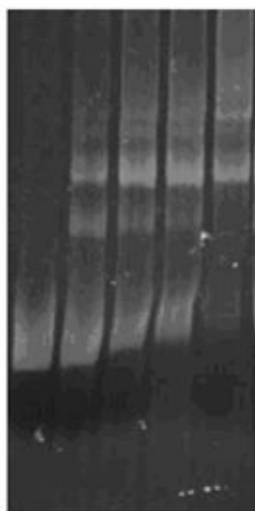
<i>hyaA</i>	(-->)	(1034345) S	(<i>hyaB</i>)	(1034565)(-->)	<i>hyaC</i>	2
<i>hns</i>	(<--)	(1295922) S	(<i>tdk</i>)	(1296142)(<--)	<i>ychG</i>	2
<i>gppA</i>	(<--)	(3964643) S	(<i>rhIB</i>)	(3964829)(-->)	<i>trxA</i>	2
<i>glmS</i>	(<--)	(3914110) S	(<i>glmU</i>)	(3914259)(<--)	<i>atpC</i>	2
<i>cydD</i>	(<--)	(931444) S	(<i>trxB</i>)	(931676) (-->)	<i>lrp</i>	2
<i>cycA</i>	(-->)	(4430666) S		(4430889)(<--)	<i>ytfE</i>	2
<i>cutA</i>	(<--)	(4365619) S	(<i>dcuA</i>)	(4365880)(<--)	<i>aspA</i>	2
<i>btuB</i>	(-->)	(4164841) S		(4165061)(-->)	<i>murI</i>	2
<i>aqpZ</i>	(<--)	(916729) S	(<i>ybjD</i>)	(916939) (<--)	<i>ybjX</i>	2

SELEX 断片を S で示した。矢印により遺伝子の向きを示した。

Table1 の結果をみると既知遺伝子と *gcl-allA* 間の断片がデータの約 30%を占め、*allS* - *allR* 間の断片が約 15%と、既知遺伝子間の DNA 断片が結果の約半分を占めていた。そして 2 個のクローンが得られたものが 21 種類、1 個のクローンが得られたものが、39 種類存在した。このようにデータのばらつきがあった。また原核生物において、一般に転写因子の認識配列はプロモーター付近に位置する。もし、*AIIR* がこのように DNA に結合する転写因子であれば、制御の標的は *AIIR* が結合する部分が遺伝子上流に位置するものになる。しかし、Table 1 に示したように遺伝子のプロモーター付近に存在している DNA 断片もほとんどなかった（遺伝子のプロモーター付近に存在する遺伝子については太字で示した）。遺伝子上に転写因子の結合部位が存在することは、Genomic SELEX 解析で明らかになって来たことである。このような転写因子の生理的役割は、今後の課題である。

AIIR の転写調節機能の制御については、グリオキシ酸が *AIIR* の DNA 結合能を弱め、

転写脱抑制に関わっていることが知られているが、出発物質アラントインの影響については、解析されていない。そこで、次に私が注目したのは **AIIR** がアラントイン分解経路を制御する転写因子であるということから、アラントインが **AIIR** になんかの影響を与えているのではないかと考え、**AIIR** 標的であることを同定した *allS-allR* DNA をプローブとして、アラントインを加えてゲルシフト実験を行った。



AIIR - + + + +
Allantoin - - 30 60 90 pM

Fig 11 アラントインの影響

ゲルシフトの結果アラントインの添加によって結合が強くなることが確認できた。この新たな発見により、アラントインが、**co-repressor** であると推測した。そこで、アラントインを加えて **AIIR** の **genomic SELEX** を再度行った。その結果 **SELEX** の 2 サイクル目でバンドに収束が見られたので、それを回収し、クローニング、シーケンス解析を行った。

Table 2 アラントインを加えた **SELEX** の結果

Left gene	SELEX fragment	Right gene	No.fragments
-----------	----------------	------------	--------------

allS	(<--)	(531191) S		(531393) (-->)	allA	16
allR	(-->)	(532645) S		(532802) (-->)	gcl	5
ycsF	(-->)	(1174932) S	(<i>mfd</i>)	(1175100) (<--)	ycfT	4
deoD	(-->)	(4621241) S	(<i>yjjJ</i>)	(4621421) (<--)	lplA	3
artP	(<--)	(903829) S		(904028) (<--)	ybjP	2
entA	(-->)	(628273) S	(<i>ybdB</i>)	(628457) (<--)	cstA	2
frdB	(<--)	(4380243) S	(<i>frdA</i>)	(4380411) (<--)	poxA	2
hisM	(<--)	(2431860) S	(<i>hisQ</i>)	(2432038) (<--)	hisJ	2
leuL	(<--)	(83698) S		(83873) (-->)	leuO	2
nanA	(-->)	(3373372) S	(<i>nanR</i>)	(3373577) (<--)	dcuD	2
rscC	(-->)	(2326385) S	(<i>atoS</i>)	(2326591) (<--)	atoC	2
yahB	(<--)	(333547) S	(<i>yahC</i>)	(333684) (<--)	yahD	2
yqcD	(-->)	(2925614) S		(2925794) (-->)	ygdH	2
csrA	(<--)	(2818713) S		(2818917) (<--)	alaS	1

合計で 86 クローンを単離した(表 2)。このうちクローン数が 2 個のものは 8 種類、1 個のものは 39 種類という結果が得られた。この結果からアラントインを添加することにより、2 個のクローンが得られた種類が減り、遺伝子のプロモーター付近に存在するクローンが添加しないときよりも数が増えたので、特異的結合配列の改修が増加したと結論した。

SELEX の DNA 断片と AIIR の結合親和性の同定

AIIRにAllantoin を加えて行ったSELEXの結果 (Table 2) の中で、7個を選んで次のステップとしてゲルシフトアッセイを行った。今回実験に用いたDNA断片は7種類で、既知遺伝子群の *allS-allA*、*gcl-allR* と新規標的遺伝子群 *csrA-alaS*、*yqcD-ydgH*、*leuL-leuO*、*yjjJ,mfD,artP-ybjP* である。その結果Allantoinを60 mM加えたレーン6~8及び14~16は、加えていないレーン2~4、10~12と比較して、AIIRとDNAの複合体の結合が強くなることが確認できた。また、*allS-allA*、*gcl-allR*はAIIRの最も薄い濃度でも結合して、DNAとの複合体を形成している。この結果から、ほかのプローブよりもこの二つのDNA断片がAIIRと高い親和性を示すとわかった。

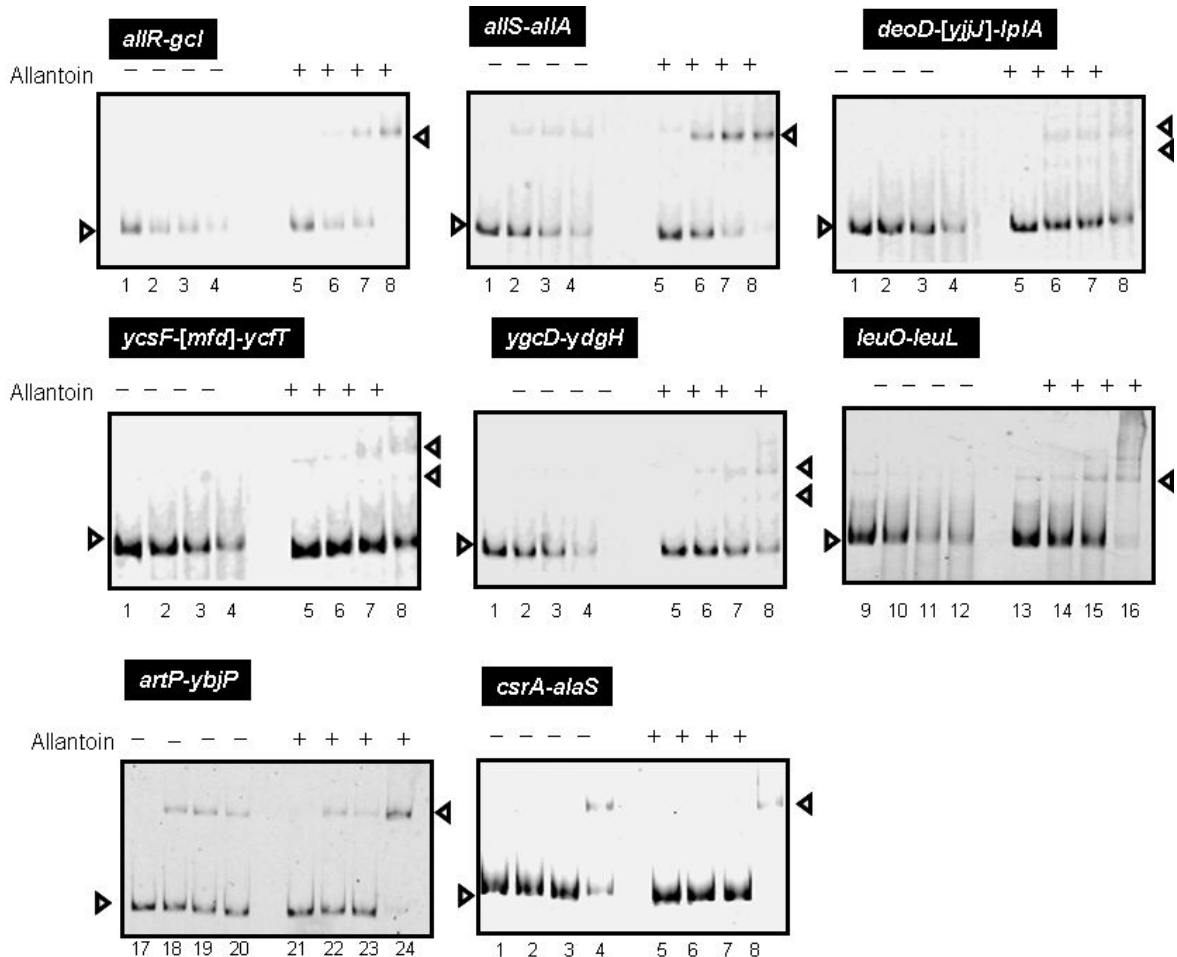


Fig 12 アラントインの添加による影響

AIIRの濃度は lane 1, 0; lane 2, 0.18 pmol; lane 3, 0.36 pmol; lane 4, 0.72 pmol; lane 5, 0 pmol; lane 6, 0.18 pmol; lane 7, 0.36 pmol; lane 8, 0.72 pmol; lane 9, 0

pmol; lane 10 ,1.4 pmol; lane 11, 2.8 pmol; lane 12 ,5.6 pmol; lane 13 ,0 pmol; lane 14 , 1.4 pmol; lane 15, 2.8 pmol; lane 16 ,5.6 pmol; lane 17, 0 pmol; lane 18, 0.36 pmol; lane 19, 0.72pmol; lane 20, 1.4pmol; lane 21, 0 pmol; lane 22, 0.36 pmol; lane 23, 0.72pmol; lane 24, 1.4pmol であり、アラントインはlane 1-4、9-12,17-20 には添加なし、lane 5-8、13-16, 21-24 には60 mM アラントインを添加した。

標的配列のAIIR結合のアラントインとグリオキシル酸の影響

アラントインはAIIRのエフェクターとしてこれまでにまだ示されていない。アラントイン(60 mM) が存在することによって、SELEXによって得られたDNAが断片すべてにおいて、AIIRとDNAの相互作用が高まることを確認した。(Fig. 12, lane1-4、9-12とlane 5-8、13-16 を比較) このことから、アラントインはAIIRのco-repressorとして働いていると推測した。その役割は標的へのリプレッサーAIIRの結合を強めることである。アラントイン分解経路中の中間代謝物であるグリオキシル酸の予想されている影響も確かめるためにゲルシフトアッセイ (Fig 13) とDNase-Iフットプリントアッセイ (Fig 14) を行った。

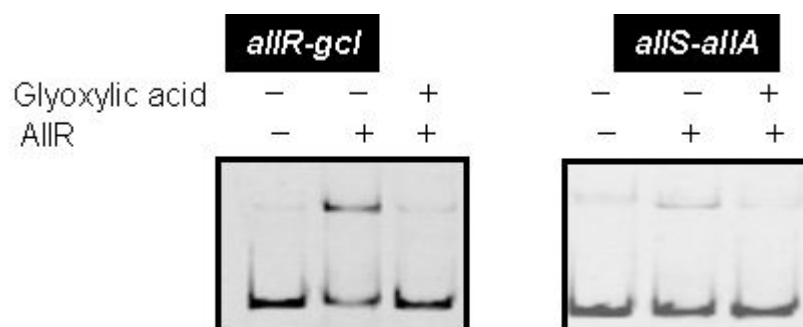


Fig 13 ゲルシフトアッセイによるグリオキシル酸の影響の確認

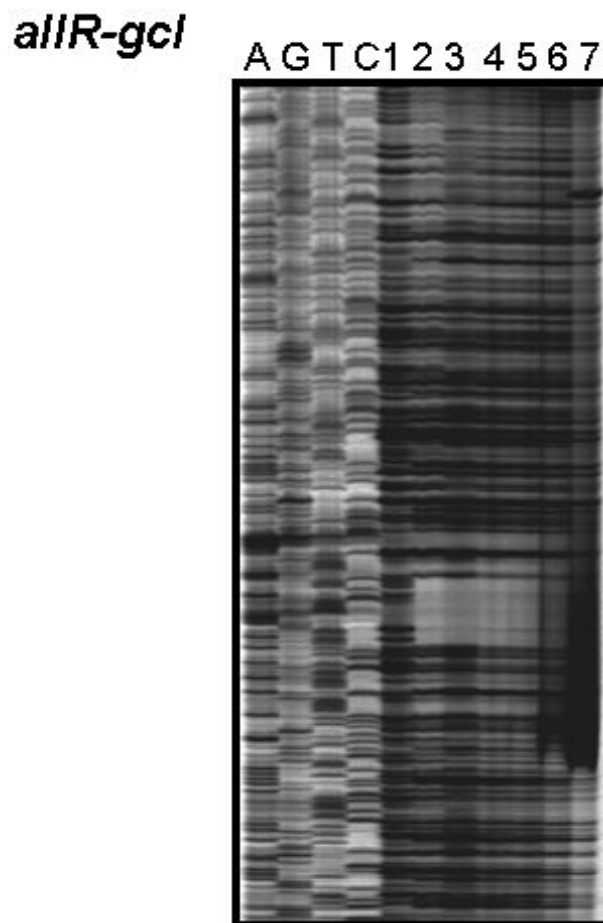


Fig 14 フットプリントアッセイによるアラントインとグリオキシル酸
の影響の確認

0 pmol (lane 1) or 28 pmol (lane 2~7) AIIR、lane 1, 2, エフェクターの添加なし; lane 3, 60 mM Allantoin; lane 4, 5 mM glyoxylic acid and 60 mM Allantoin; lane 5, 6 mM glyoxylic acid and 60 mM Allantoin; lane 6, 8 mM glyoxylic acid and 60 mM Allantoin; lane 7, 10 mM glyoxylic acid and 60 mM Allantoin.

ゲルシフトアッセイにより、*allS-allR* と *gcl* プロモーターとの AIIR の結合はグリオキシル酸が存在すると AIIR と DNA の複合体を形成できなくなることが確認できた。

(Fig 13) この結果からグリオキシル酸は AIIR の活性の抑制を解除するための inducer

として作用しているのではないかと推測した。またDNase-I フットプリントアッセイでは、co-repressorのアラントイン存在下において、グリオキシル酸を添加の濃度を高くしていったとき、DNAとAIIRの結合は弱くなることが確認できた。(Fig. 14, lanes 4-7)

***allS-allA, gcl, leuO* プロモーター領域におけるAIIR結合部位の同定**

*allS-allA, gcl, leuO*のプロモーター領域における、AIIRの結合部位の同定のため、DNase I footprinting assayを行った (Fig 15)。AIIRとDNAの複合体を形成後、DNase-Iで短時間処理し、DNAを切断し、その産物をPAGEによって分析した。実験を行った3つのプローブについてはAIIRの結合部位がそれぞれ1箇所ずつ存在していた。(Fig. 15A, 15B, 15C) まず、最初に、*allS-allA*のプロモーター領域においては、既に発表 (Maria. et al., 2002.)されているAIIRのコンセンサス配列TTGGAAAAATTTTCCAAを含む33bpにAIIRが結合することが確認した (Fig 15A)。

A *allS-allA*

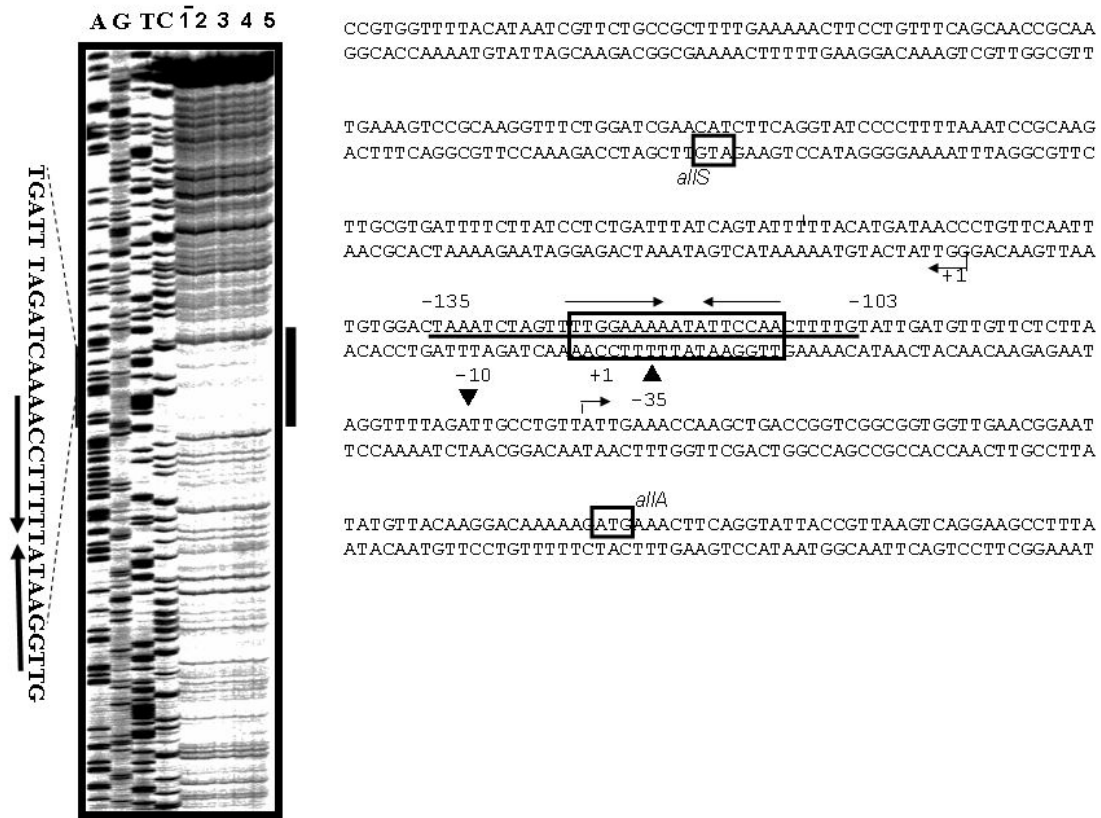


Fig 15 [A] *allS-allA* 領域DNAへのAIIR結合部位同定のためのDNase-I footprint

AIIR結合部位は、*allA*の開始コドンの上流-103から-135 bpの領域と結論した。また *gcl*のプロモーター領域においても同様に、AIIRは開始コドンの上流-13から-62の50 bp領域に結合することを確認した。(Fig 15B) この50bp内にも、AIIRのコンセンサス配列が含まれていた。一方、新規標的の遺伝子群の代表の*leuO*においても、AIIRは開始コドンの上流の - 175から-224 bpの50 bp領域に結合した (Fig 15C)。3つのプロローブのうち*allS-allA*と*gcl-allR* へのAIIRの結合部位は低濃度においても確認できる。一方で*leuL-leuO*へのAIIRの結合部位は最高濃度でしか確認できないことから、*allS-allA*と*gcl-allR*の方が*leuL-leuO*よりAIIRとの結合が強いと推測できた。

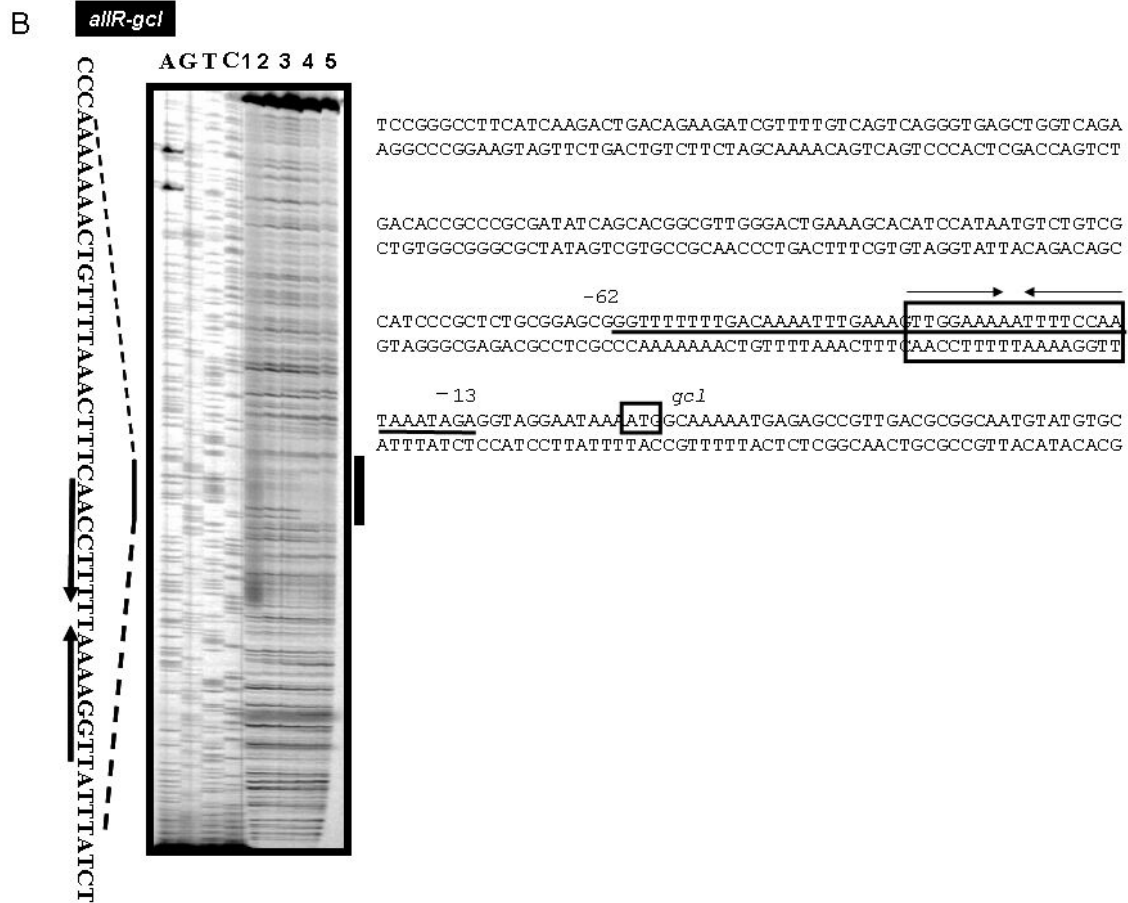


Fig 15 [B] *allS-allA* 領域DNAへのAIIR結合部位同定のためのDNase- I footprint

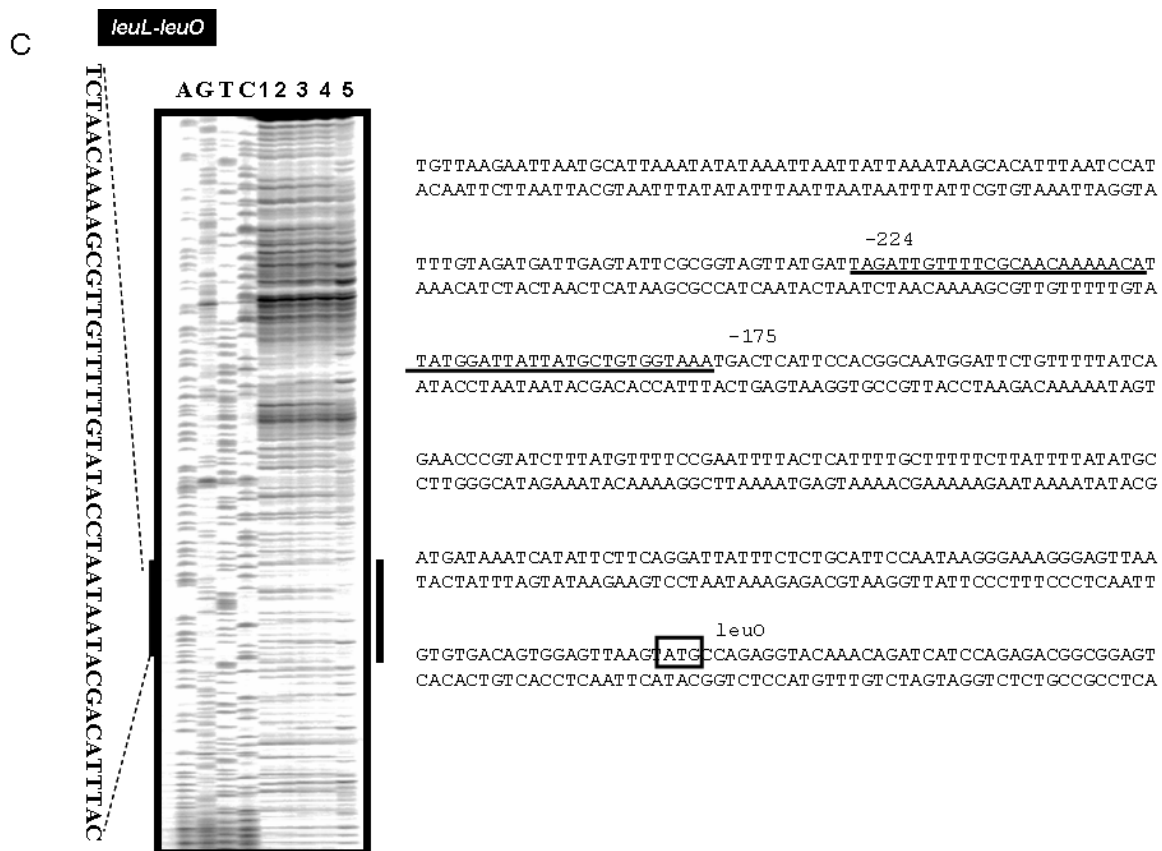


Fig 15 [C] *leuL-leuO* 領域DNAへのAIIR結合部位同定のための
DNase- I footprint

AIIR依存の*csrA*の転写の影響

CsrA(carbon storage regulator)は、グリコーゲンの合成酵素mRNAなど、炭素飢餓環境で、一群のmRNAに結合し、その安定性を制御する、新しいタイプの遺伝子発現制御因子として注目されている。*csrA*プロモーターのAIIR依存の転写開始点の同定のためにprimer extension assayを行った(Fig 16)。その結果、AIIR欠損株において転写が開始され、その開始点は*csrA*の上流131 bpであることが確認できた。つまり、AIIRがないとき*csrA*は転写を開始すると考えられ、AIIR存在下では、*csrA*の転写は抑制されていることが判明し、AIIRを介した窒素代謝と炭素代謝の相関が示唆された。

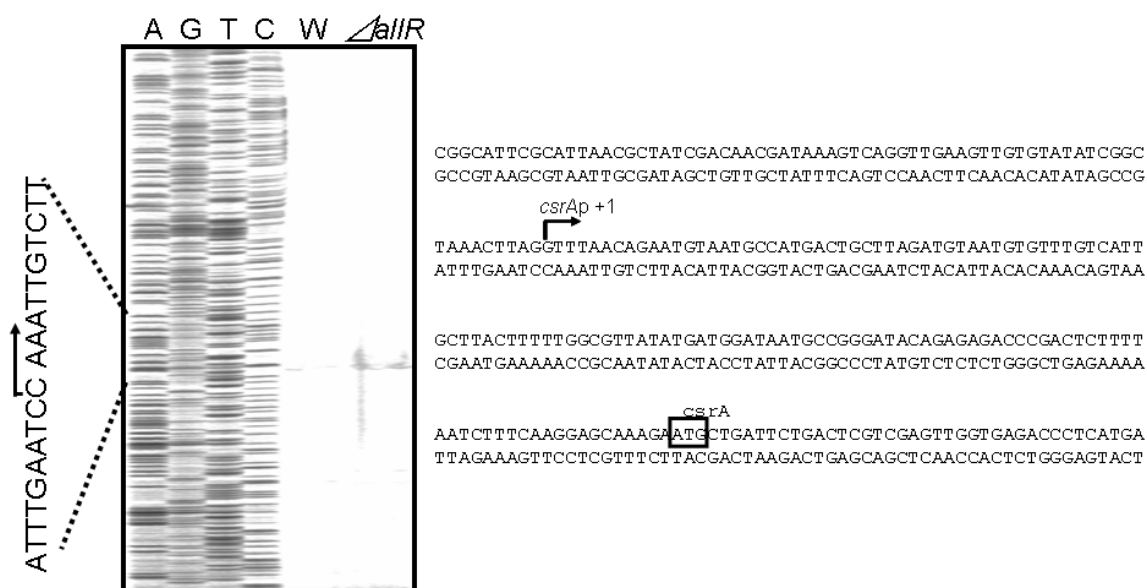


Fig 16 *csrA*転写のAIIRの影響

KP7600 (lane 1), *allR* mutant JW0494 (lane 2)

細胞内における*gcl* プロモーターにおけるグリオキシル酸の影響

試験管内でのゲルシフトアッセイとDNase-Iフットプリントアッセイで、*allS-allR*と*gcl*プロモーターとAIIRの結合は、グリオキシル酸の存在において弱められると示した。細胞内において、エフェクターのグリオキシル酸の濃度の影響を見るために、TFP vectorを用いたpromoter assayを行った (Fig 17A)。*gcl* promoterを含むpGRH026で測定した。グリオキシル酸の濃度依存性の影響を調べるために、まず前培養液をそれぞれの濃度のグリオキシル酸をLB培地に加えて振盪培養を行った。エフェクターのグリオキシル酸はAIIRと結合し*gcl*プロモーターを活性化すること、また50 mMで影響が見られると報告されている。(Rintoul *et al.*, 2002) 50 mMのグリオキシル酸で行ったプロモーターアッセイはβ-gal活性によって行われており、その影響は50 mMより十分に見られていたので、50 mMよりも低い濃度でも影響は見られるのではないかとこの予想のもと実験を行った。グリオキシル酸の濃度0, 0.5, 1, 2.5, 5 and 10 mMそれ

それぞれの影響を3, 4.5, 6 時間ごとに測定した。その結果、グリオキシル酸による影響は5 mM 以上で十分に見られることを確かめた。最低の濃度は確認できたが、その影響が現れるまでの時間がまだ知られていなかったののでそれについて調べた(Fig 17B)。

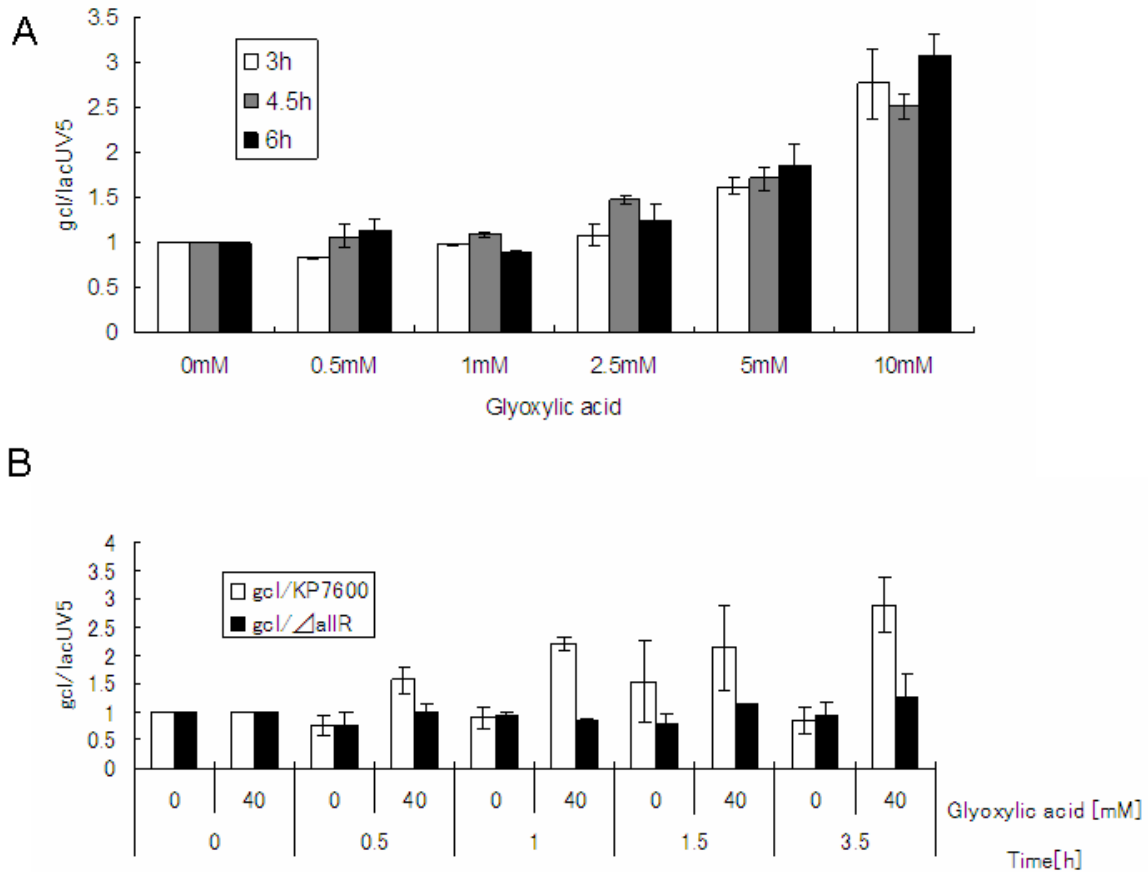


Fig 17 プロモーターアッセイによるグリオキシル酸の影響の確認

グリオキシル酸を入れてから発現に影響が見られるまでにどの程度時間がかかるのかを確かめるために、TFP vectorを用いたプロモーターアッセイを行った。グリオキシル酸の直接的な影響が現れるまでの時間を明らかにするために、まずM9-0.4% グルコースで、 140 min^{-1} にて振盪培養を行い、OD600が0.3から0.5になったところで、終濃度40 mMとなるようにグリオキシル酸を加えた。この時間を0時間とし、サ

ンプルを取り、GFP活性の測定を行った。さらに振盪培養を行い、30 minと1 h、1.5 h、3.5 h後にGFP活性の測定を行った。その結果1 h後には発現が2倍以上になることが確認できた。つまり、グリオキシル酸の影響を受けるまでの時間が1時間にかかることがわかった。

細胞チップによる大腸菌の固定と観察

自然環境中の細菌は、時に集合し、集団として生存を図ることがあることが、最近明らかになり、細胞間に役割分担があることが示唆されている。従って、環境応答のゲノム制御の研究では、単一細胞での解析が必要となってきた。そこで、今回、AIIR支配下プロモーターの制御を単一細胞で観測する試みに挑戦した。

Poly(N-isopropylacrylamide)を用いて大腸菌培養液の局所固定を行った (Fig 18)。pGRHH029を持つ大腸菌AIIR欠損株を用いて観察を行った。大腸菌は*csrA*のプロモーター領域-GFP融合プラスミドをAIIR欠損株に形質転換させ株を用いた。3時間本培養を行った培養液0.3 mlを12%感熱ゲルと混和させ合計1 mlとし、細胞チップ内流路に還流させ顕微鏡に設置し、電圧6.4 Vを掛け細胞培養液の局所固定を行った(Fig. 7参照)。倍率を40、60、100倍で、明視野は露光0.05秒 (B)、GFP (G)、RFP (R) は露光1秒で観察を行った。この結果、大腸菌は電極付近でゲルの中で固定され、生細胞中のプロモーター活性をリアルタイムで観測できることが確認できた。

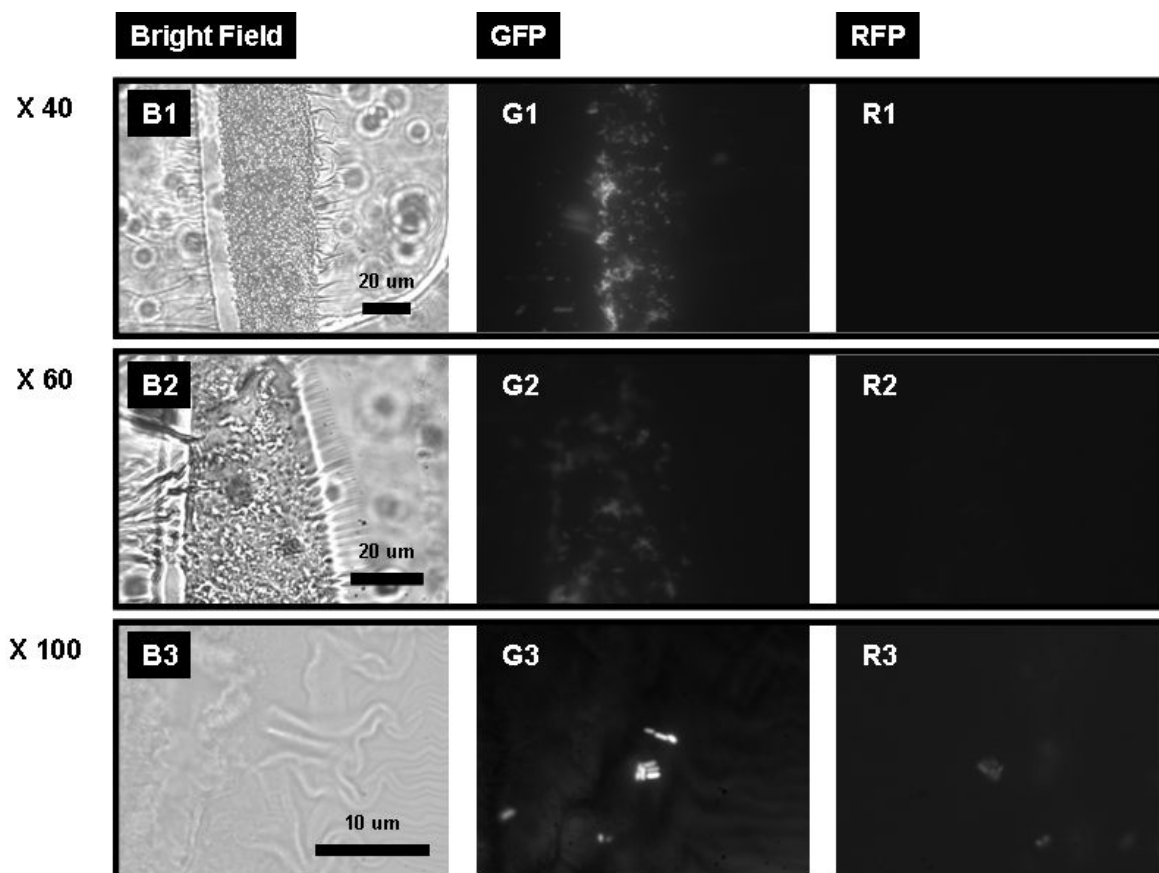


Fig 18 大腸菌の局所固定

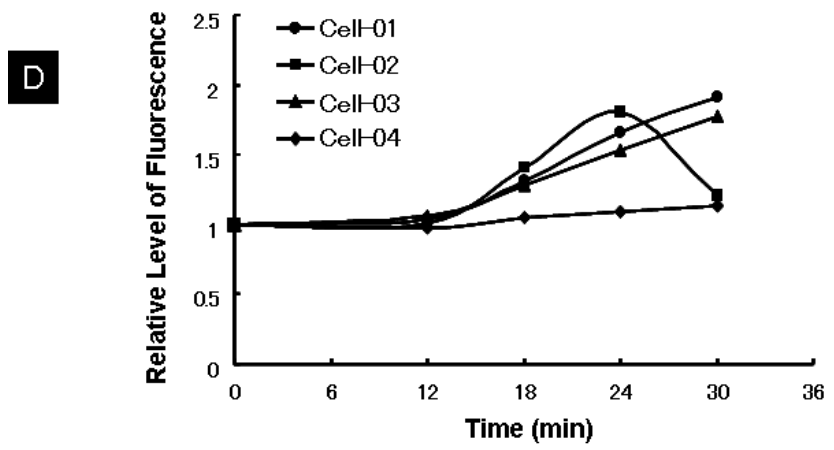
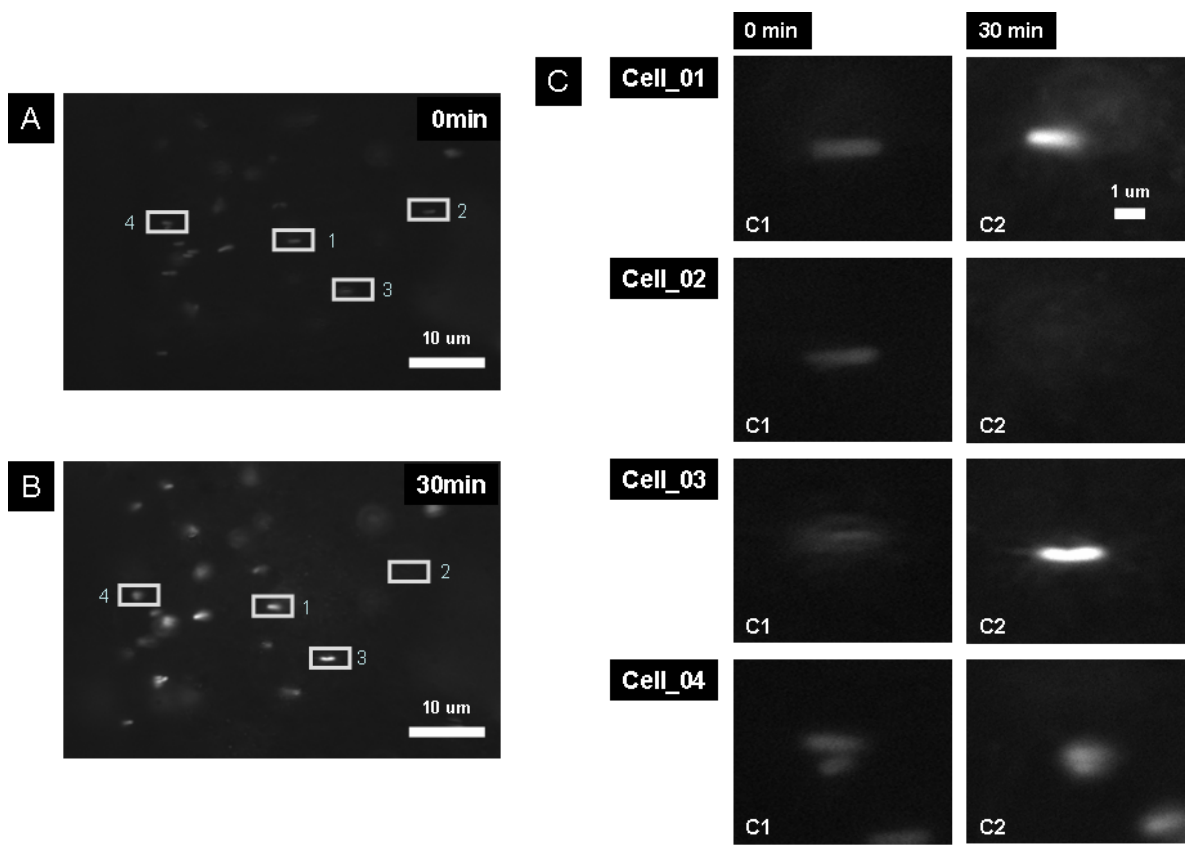
大腸菌の単一細胞のプロモーター測定

GFPプロモーターアッセイの結果から、転写因子AIIRの制御遺伝子*gcl*はグリオキシル酸の存在下においてグリオキシル酸の非存在下の時と比較して2倍以上のプロモーター活性の増加が認められた(Fig 17)。しかし、GFPプロモーターアッセイによって得られた結果は、細胞集団全体における*gcl*遺伝子の発現の平均値の解析結果である。そこで、私は個々の細胞における遺伝子発現を知るために、構築した一細胞観察系を利用し、転写因子AIIRの制御下遺伝子の一つである*gcl*遺伝子についてGFPプロモーター活性を指標とした*gcl*遺伝子の発現量の計測を行った。pGRH026を持つ大腸菌株を培養し細胞チップ内に感熱性ゲルによる固定を行い、一細胞ごとのGFPの発現量の変化

を蛍光観察による連続測定を行った。細胞固定後、AIIR活性調節因子グリオキシル酸を含むM9-0.4% glucose溶液を流入した。実験開始0分目においては、個々の細胞間にプロモーター活性に差が認められなかった。しかし、グリオキシル酸添加後に時間経過に伴い細胞間における*gcl*遺伝子の発現量の増加が見られた(Fig 19D)。Fig 19では観察した多数の大腸菌のうち、4つの大腸菌の1つ1つの菌体ごとの解析結果を示した。

Fig 19Aは40 mM のグリオキシル酸を添加直後のGFPの蛍光イメージであり、Bは30分後のGFPの蛍光イメージである。CではA,Bで選んで四角で囲んだ4つの大腸菌の拡大写真である。Fig 19Cより、グリオキシル酸添加後30分で細胞1,3はGFPの蛍光強度が増していることが視覚的に確認できた。しかし、細胞2では逆にGFPの蛍光強度が減少していた。このイメージを画像解析し、グラフ化したものがFig 19Dの上のグラフである。そしてそのグラフを作成したときに用いた数値をグラフの下に載せた。そして数値的に見ても、GFPの蛍光強度が細胞1,3で上昇していることが確認できた。

Fig 20ではイメージの中の大腸菌細胞を解析に用いた18個について印をつけた。Fig 20Bでは画像解析によるヒストグラム解析から、細胞間全体のプロモーター活性量は観察開始12分後では蛍光強度0.88~1.39間に分布することが明らかとなり、時間経過に伴い観察30分後においては蛍光強度1.08~2.9間の広域に分布する結果となった。さらに詳細に一細胞当たりのプロモーター活性量の蛍光強度について解析した結果、観察開始時と比較して30分目には個々の細胞において1.2~3 (After 30 min, Ave±S.D.; 1.61±0.43)倍の蛍光強度の増加が観察された。



Cell number	Culture time				
	0	12	18	24	30
Cell-01	1	1.04	1.32	1.66	1.91
Cell-02	1	1.00	1.41	1.81	1.21
Cell-03	1	1.06	1.28	1.53	1.78
Cell-04	1	0.98	1.05	1.10	1.13

Fig 19 個々の細胞ごとの単一細胞観察結果

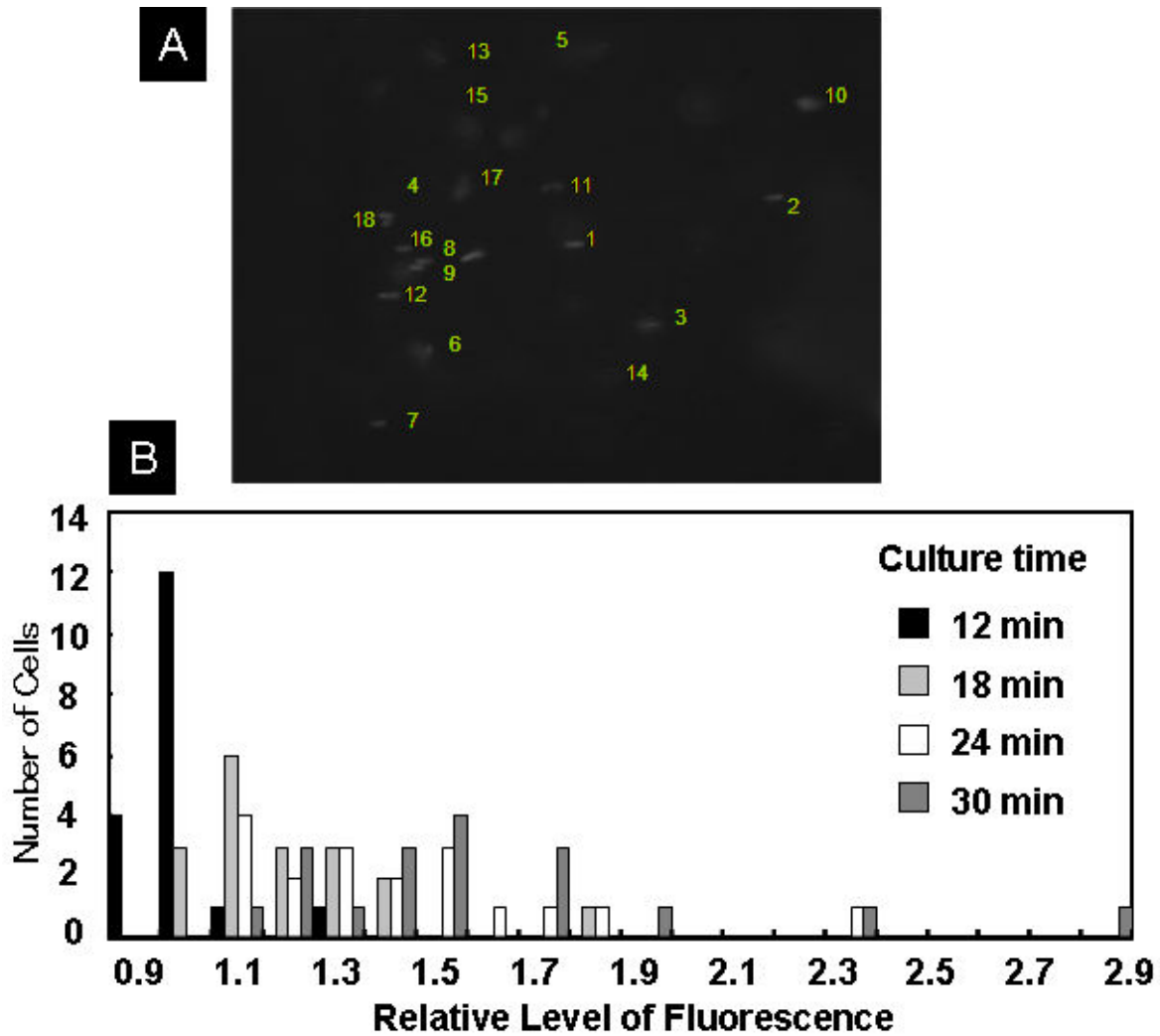


Fig 20 複数の細胞の単一細胞観察結果

新たに開発した大腸菌一細胞観察装置を利用して、今回、細胞毎の遺伝子発現を計測することに成功した。細胞間のプロモーター強度のばらつきが由来する原因については、細胞複製の時期の違い、細胞毎の局所環境の違いなどが推測されるが、その解明は今後の課題である。

第四章 総括

本研究では、転写因子AIIRについて、genomic SELEX解析を行った。SELEXで同定した標的遺伝子*allS*、*allA*、*gcl*のプロモーターへのAIIRの結合活性を指標に、AIIRの活性に影響するエフェクターの探索を行なった。その結果、転写因子AIIRにはどの結合を弱めるエフェクターとしてグリオキシル酸を確認し、加えて、AIIRの結合を強めるエフェクターとしてアラントインを発見した。新たに発見したエフェクター・アラントインを加えてSELEXを行った。その結果、既知制御標的遺伝子*alls*、*allA*、*gcl*に加えて新規の標的遺伝子を同定した。その結果から、7種類についてゲルシフトアッセイでAIIRとの結合の確認を行い、さらにアラントインの影響も確かめた。調べたすべてのDNA断片においてアラントインで結合が強まることが確認できた。このことによりアラントインがAIIRのcorepressorであること結論した。細胞内でのグリオキシル酸の影響を調べるために、GFPプロモーターアッセイを行った。その結果、グリオキシル酸が濃度依存的にAIIRを不活化し標的遺伝子プロモーター活性を促進すること認めた。これらの結果から、グリオキシル酸がAIIRのinducerであることを実証した。

GFPプロモーターアッセイでは大腸菌の菌全体での活性の平均値しか知ることができない。細菌細胞一つ一つの観察が必要となる時代が到来していると考え、「細胞チップ」を製作し、大腸菌培養局所固定法で細胞を捕捉し、単一細胞連続観察系を構築した。GFPをレポーターとするプロモーター強度測定系を利用し、pGRgclを用いて、グリオキシル酸を添加することで、細胞ごとのAIIR支配下のプロモーター*gcl*活性が経時的にどのように変化するかを観察した。この系を利用して観察を行ったところ、1個1個の細胞ごとのGFPの蛍光強度を経時的に計測することに成功した。その結果、細胞ごと発現の変化に違いがあることを観察できた。この系を利用することで、単一細胞の発現を経時的に観察することが可能になった。

第五章 参考文献

- Ellington, A.D., and Szostak, J.W.** 1990. *In vitro* selection of DNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**: 818-822.
- Makinoshima, H., A. Nishimura, and A. Ishihama.** 2002. Fractionation of *Escherichia coli* cell populations at different stages during growth transition to stationary phase. *Mol. Microbiol.* 43:269-279.
- Maria R. Rintoul, Eva Cusa, Laura Baldoma, Josefa Badia, Larry Reitzer, and Juan Aguilar.** 2002. Regulation of the *Escherichia coli* Allantoin Regulon: Coordinated Function of the Repressor AllR and the Activator AllS. *J. Mol. Biol.* 324, 599–610
- Ogasawara., H., A. Hasegawa, E. Kanda, T. Miki, K. Yamamoto, and A. Ishihama.** 2007a. Genomic SELEX search for target promoters under the control of the PhoQP-RstB signal cascade. *J. Bacteriol.* 187:4791-4799.
- Ogasawara, H., Y. Ishida, K. Yamada, K. Yamamoto, and A. Ishihama.** 2007b. PdhR (pyruvate dehydrogenase complex regulator) controls the respiratory electron transport system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 189:5534-5541.
- Shimada, T., N. Fujita, M. Maeda and A. Ishihama.** 2005. Systematic search for the Cra-binding promoters using genomic SELEX systems. *Genes Cells* 10:907-918.
- Singer, B. S., T. Shtatland, D. Brown, and L. Gold.** 1997. Libraries for genomic SELEX. *Nucleic Acids Res.* 25:781-786.
- Tuerk, C., and Gold, L.** (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**:505-510.

- Yamada, M., H. Izu, T. Nitta, K. Kurihara, and T. Sakurai.** 1998. Hightemperature, nonradioactive primer extension assay for determination of a transcription initiation site. *BioTechniques* 25:72–75.
- Yamamoto, K., H. Ogasawara, N. Fujita, R. Ustumi, and A. Ishihama.** 2002. Novel mode of transcription regulation of divergently overlapping promoters by PhoP, the regulator of two-component system sensing external magnesium availability. *Mol. Microbiol.* 45:423-438.
- Shimada T, Makinoshima H, Ogawa Y, Miki T, Maeda M, Ishihama A.**2004. Classification and strength measurement of stationary-phase promoters by use of a newly developed promoter cloning vector. *J Bacteriol.* 186(21):7112-22
- .Walker JR, Altamentova S, Ezersky A, Lorca G, Skarina T, Kudritska M, Ball LJ, Bochkarev A, Savchenko A.**2006. Structural and biochemical study of effector molecule recognition by the *E.coli* glyoxylate and allantoin utilization regulatory protein AllR. *J Mol Biol.*;358(3):810-28.

第六章 謝辞

本研究を行うに当り、終始ご指導ならびにご鞭撻を賜りました石浜 明教授に御礼申し上げます。転写因子は、郡 彩子氏により精製していただき、実験は、小笠原 寛博士、寺本 潤氏の指導していただきました。皆様に心から御礼申し上げます。細胞チップを提供していただいた名古屋大学大学院工学研究科福田敏男研究室の El-Shimy H. Magdy氏をはじめ研究室の皆様感謝いたします。