

植物性配糖体の取り込み系を制御する大腸菌 転写因子AscG の機能解明

石田, 雄士 / ISHIDA, Yuji

(発行年 / Year)

2009-03-24

(学位授与年月日 / Date of Granted)

2009-03-24

(学位名 / Degree Name)

修士(工学)

(学位授与機関 / Degree Grantor)

法政大学 (Hosei University)

2008 年度 修士論文

植物性配糖体の取り込み系を制御する
大腸菌転写因子 AscG の機能解明

Regulation Targets and Regulatory Mode of
Transcription Factor AscG 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 07R2101

石田 雄士

目次	2
略語	3
第1章 緒言	5
第2章 実験材料	
2-1. 培地	8
2-2. 抗生物質	9
2-3. 作製試薬	10
2-4. 試薬とキット	23
2-5. 菌株	24
2-6. プラスミド	24
2-7. プライマー	24
第3章 実験方法	
3-1. genomic SELEX	25
3-2. Gel shift assay	30
3-3. DNase-I footprint	32
3-4. Promoter assay	33
3-5. Western blotting	34
3-6. Northern blotting	35
3-7. Phenotype Microarray	38
3-8. Primer extension	39
第4章 結果と考察	
4-1. genomic SELEX	41
4-2. Gel shift assay	42
4-3. DNase-I footprint	44
4-4. Competition of AscG and CRP	46
4-5. Western blotting of AscG	48
4-6. Promoter assay	48
4-7. Primer extension of <i>ascF</i>	50
4-8. Northern blotting	51
4-9. Phenotype microarray	52
第5章 結言	54
第6章 参考文献	56
第7章 謝辞	59

略語

Amp	ampicillin
APS	ammonium peroxodisulfate
ATP	adenosine triphosphate
bp	base pair(s)
BPB	Bromophenol Blue
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
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
Glu	Glucose
LB	Luria-Bertani
MeOH	methanol
MW	molecular weight
O.D.	optical density
O/N	over night
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS(-)	phosphate buffer saline minus
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
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
XC	Xylene Cyanol
X-gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside

第1章：緒言

大腸菌ゲノムには約 4,500 の遺伝子が存在し、転写は RNA ポリメラーゼによって行われている。RNA ポリメラーゼは、RNA 合成を触媒するコア酵素と、転写開始部位シグナル・プロモーターを認識するシグマサブユニットから構成されている。コア酵素は、一細胞中に 2,000 分子しか存在しないので、遺伝子総数より少ない (Ishihama, 2000)。このことから、大腸菌は環境変化に応じて RNA ポリメラーゼのゲノム上の分配を変化させ、その環境で生育するために必要な遺伝子だけを選択的に発現させていることが推測される (図 1)。

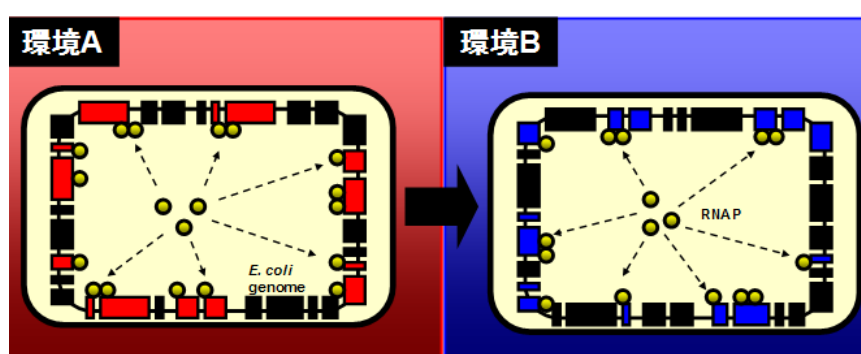


図 1 大腸菌転写の環境応答

大腸菌には RpoD(σ^D), RpoN(σ^N), RpoS(σ^S), RpoH(σ^H), RpoF(σ^F), RpoE(σ^E), FecI(σ^{FecI}) の 7 種類のシグマ因子が存在することが知られている。それぞれのシグマ因子は異なるプロモーターを認識し、異なる遺伝子群の転写を担当している (図 2)。従って、RNA ポリメラーゼの特異性変換の主要な要因は、シグマ因子の交換である。しかし同じシグマ因子を結合したホロ酵素で転写される遺伝子間の発現レベルは、環境変化に伴い変動する。この段階での転写装置の分配制御は、ホロ酵素に作用する第 2 段階目の「転写因子」によって行われる (図 2)。

大腸菌には約 300 種類の転写因子が存在するが、およそ 100 種類に関しては機能未知である。大腸菌はモデル生物として広く深く解析され、現在最も良く理解された生物である。その大腸菌でさえこのような現状である。よって生命現象を理解するうえで、転写因子の機能・役割を解明することは非常に重要であると言える。そこで我々は、およそ 100 種類の機能未知のものを含めた大腸菌全転写因子の調節機能解明を目的として、制御標的遺伝子群の網羅的同定と調節機構解析を行なって来た。今回、糖の輸送を調節する遺伝子を制御する転写因子に注目し、解析を行ってきた。本論文ではそのうちの一つ、AscG について報告する。

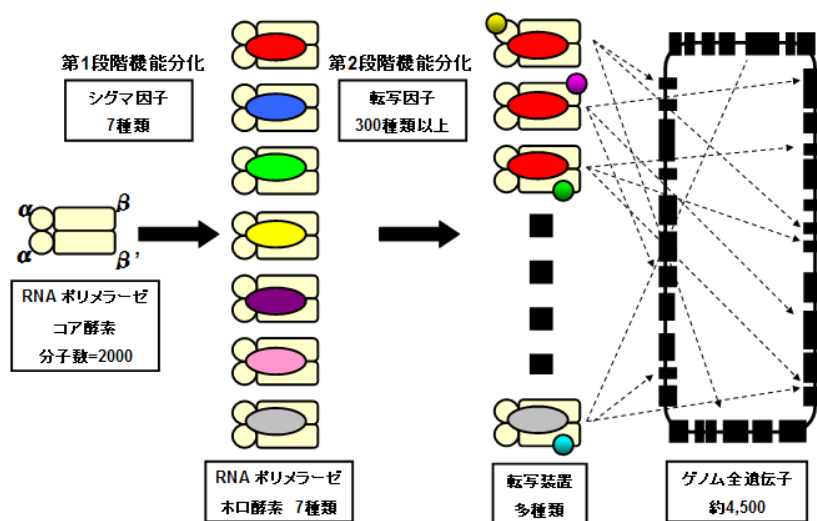


図 2 転写装置の遺伝子選択能の変化

転写因子 AscG は、アルブチン(Arbutin)、サリシン(Salicin)、セロビオース(Cellobiose)の菌体内への取り込みと利用の遺伝的制御関わっていることが示唆され、その名称が付けられた。337 アミノ酸残基から成り、GalR のヘリックス-ターン-ヘリックス構造と 17 残基中 14 残基が一致する HTH ドメインをもっている。その制御標的遺伝子としては、これまでに、*ascG* と *ascFB* の遺伝子間領域に結合してこれらの遺伝子を調節すると推測されている (Hall *et al*, 1992, Parker *et al*, 1988)。AscF はアルブチン、サリシン、セロビオースを菌体内への取り込む PTS(Phosphotransferase System)を形成し、それぞれアルブチン-6P、サリシン-6P、セロビオース-6P へとリン酸化し、これらは、AscB によって β -D-グルコース-6P へと転換され、中心代謝系に組み込まれる。

アルブチンはコケモモや梨、ウワウルシなどの植物に含まれている天然型フェノール性配糖体、サリシンはヤナギの樹皮で産生する非炎症性の配糖体である(図 4)。配糖体(グリコシド)とは、糖以外の物質と糖が結合した成分群であるが、糖が直接結合する原子団の種類によりいくつかに分類することができる。O-グリコシド(糖鎖が酸素原子に結合)は植物界に広く分布し、種々の生理活性をもつ重要な糖誘導体である。S-グリコシド(糖鎖が硫黄原子に結合)は動物界に広く分布し、ヌクレオチドとして核酸の構造の構成単位、糖タンパク質などに見出され、生体内で重要な役割をしている。その他に N-グリコシド(糖鎖が窒素原子に結合)、C-グリコシド(糖鎖が炭素原子に結合)がある。

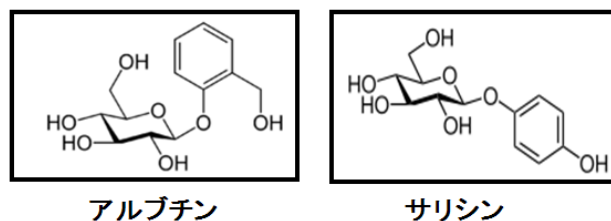


図 3 配糖体の例

今回、AscG の生理機能の本質的理解を目指し、当研究室で開発された Genomic SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)を用いて支配下標的遺伝子群の系統的探索と制御機能の解析を行った。Genomic SELEX の特徴として、転写因子の認識結合 DNA 塩基配列を同定することで、制御下遺伝子の直接的の同定が可能であること、転写因子の制御するネットワークの網羅的な同定が可能であることが挙げられる。実験の結果、AscG の主要な標的遺伝子として *ascG-ascFB*、*prpR-prpBCDE* 二ヶ所の遺伝子間領域を同定することができた。いずれの DNA 断片についても、Gel shift assay で AscG との複合体形成を確認した。DNase-I footprint を用いて、AscG の結合認識配列を同定することができた。これら遺伝子プロモーターへは、cAMA receptor protein (CRP)が結合することが推測されていたので、Gel shift assay で解析した結果、AscG と同様に、CRP との複合体形成を確認した。興味深いことに、*asc* プロモーターにおいて AscG と CRP の結合領域が重なっていた。そこで Gel shift assay を用いて AscG と CRP の競合実験を行った。

AscG がどのような環境条件で生産されているのかを確かめるため、Western blot を用いて解析を行った。また、大腸菌体内における AscG による制御を調べるため、各標的遺伝子プロモーターを GFP/RFP 二色蛍光蛋白をレポーターとする TFP (Two Fluorescent Protein) ベクターに挿入し、プロモーター活性測定を行ったところ、*ascF* プロモーターにおいて AscG の影響を確認することができた。しかしそれ以外のプロモーターは発現が弱く、AscG の影響を確認することができなかった。そこで次に、Northern blot を用いて各標的遺伝子の mRNA の量を直接測定したところ、プロモーター活性測定では確認できなかった遺伝子でも AscG の影響を確認することができた。なお、アルブチン(Arbutin)、サリシン(Salicin)、セロビオース(Cellobiose)AscG の利用以外の生理的な役割を決定する目的として、BIOLOG 社(米)が開発した Phenotype microarray をもちいて AscG のエフェクターの探索を行ったが、今回の条件では確認することができなかった。

これらの研究のまとめとして、AscG の転写制御様式、環境応答における生理的役割を推察する。

第2章：実験材料

2-1. 培地

LB 液体培地

Yeast extract	1.0 g
NaCl	1.0 g
Polypeptone	2.0 g
D.W.	200 ml
<hr/>	
Total	200 ml

↓

auto crave (121°C、20 min)で滅菌処理

LB 寒天培地

Yeast extract	1.0 g
NaCl	1.0 g
Polypeptone	2.0 g
Agar	3.0 g
D.W.	200 ml
<hr/>	
Total	200 ml

↓

auto crave (121°C、20 min)で滅菌処理

プレートに 20ml ずつ注ぐ。(10 枚分)

M9 培地

Na ₂ HPO ₄	6.0 g
KH ₂ PO ₄	3.0 g
NH ₄ Cl	1.0g
NaCl	0.5 g
D.W.	↓ fill up
<hr/>	
Total	1000 ml

↓

auto crave (121°C、20 min)で滅菌処理

clean bench 内で 0.1 M CaCl₂ : 1.0 ml, 1 M MgSO₄ : 1.0 ml, 40% D-glucose : 10 ml 加える。

M9 寒天培地

(1)

Na ₂ HPO ₄	1.2 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g
NH ₄ Cl	0.2 g
NaCl	0.1 g
D.W.	↓ fill up
<hr/>	
Total	100 ml

↓

auto crave (121°C、20 min)で滅菌処理

clean bench 内で 0.1 M CaCl₂ : 200 μl , 1 M MgSO₄ : 200 μl, 40% D-glucose :
2.0 ml 加える。

(2)

Agar	3.0 g
D.W.	100 ml
<hr/>	
Total	100 ml

↓

auto crave (121°C、20 min)で滅菌処理

(1), (2)を混ぜる。

↓

プレート 10 枚分

2-2. 抗生物質

Ampicillin (100 μg/ml)

アンピシリンナトリウム	0.1 mg
D.D.W	1.0 ml
<hr/>	
Total	1.0 ml

↓

滅菌フィルター (0.2 μm)で濾過滅菌 (4°Cで遮光保存)

Kanamycin

Kanamycin Sulfate	0.1 mg
D.D.W.	1.0 ml
<hr/>	
Total	1.0 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. 作成試薬

<u>Elution buffer</u>		final
4M NH ₄ OAc (MW:77.08)	38.54 g	0.5 M
1M Mg(OAc) ₂ ·4H ₂ O (MW:214.96)	2.14 g	10 mM
0.5M EDTA (pH 8.0)	2.0 ml	1 mM
10% SDS	10 ml	0.1%
D.D.W.	↓ fill up	
<hr/>		
Total	1000 ml	

<u>10× Binding buffer</u>		final
1M Tris-HCl (pH 7.8)	10 ml	100 mM
1M Mg(OAc) ₂	3.0 ml	30 mM
5M NaCl	30 ml	1.5 M
10% BSA	250 μl	250 μg/ml
D.D.W.	53 ml	
<hr/>		
Total	100 ml	

5mM imidazole buffer

10× binding buffer	5.0 ml
2 M imidazole	100 μl
D.D.W.	44.9 ml
<hr/>	
Total	50 ml

10mM imidazole buffer

10× binding buffer	5.0 ml
2 M imidazole	200 μl
D.D.W.	44.8 ml
<hr/>	
Total	50 ml

200mM imidazole buffer

10 × binding buffer	5.0 ml
2 M imidazole	5.0 ml
D.D.W.	40 ml
<hr/>	
Total	50 ml

10 × TBE buffer

Trizma base	108 g
Boric acid	55 g
0.5M EDTA (pH8.0)	40 ml
D.D.W.	↓ fill up
<hr/>	
Total	1.0 l

0.5 × TBE buffer

10 × TBE buffer	50 ml
D.D.W.	950 ml
<hr/>	
Total	1.0 l

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

Acrylamide	290 g
N,N'-methylene bisacrylamide	10 g
D.D.W.	↓ fill up
<hr/>	
Total	1.0 l

5% Polyacrylamide gel

30% Acrylamide (AA:B = 29:1)	1.7 ml
10 × TBE buffer	0.5 ml
D.D.W.	7.8 ml
10% APS	100 µl
TEMED	10 µl
<hr/>	
Total	10 ml

6×Dye solution

1% XC	1.0 ml
1% BPB	1.0 ml
60% glycerol	2.0 ml
<hr/>	
Total	4.0 ml

0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA·Na ₂ ·2H ₂ O (MW:372.24)	186.1 g
D.D.W.	800 ml
<hr/>	

↓

10N NaOHを加え室温でpHを8.0に合わせる。

1.0 lにfill up

3 M S.A.

NaOAc (MW:82)	123 g
D.D.W.	↓ fill up
<hr/>	
Total	500 ml

Solution I

D-glucose	9.0g	50 mM
1M Tris-HCl (pH 7.8)	25 ml	25 mM
0.5M EDTA (pH8.0)	20 ml	10 mM
D.D.W.	↓ fill up	
<hr/>		
Total	1.0 l	

↓

auto crave (121°C、20 min) で滅菌処理

Solution II

10% SDS	3.0 ml
10 M NaOH	600 µl
D.W.	26.4 ml
<hr/>	
Total	30 ml

10% SDS

SDS (CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Na) (MW:288.38)	20 g
D.W.	150 ml
<hr/>	
↓	
200 ml に fill up	

Solution III

KOAc	294.5 g	final
Acetic acid	120 ml	3M
D.D.W.	↓ fill up	2M
<hr/>		
Total	1.0 l	

50×TAE buffer

Trizma base	242 g
Acetic acid	57.1 ml
0.5M EDTA (pH8.0)	100 ml
D.D.W.	↓ fill up
<hr/>	
Total	1.0 l

1×TAE buffer

50×TAE buffer	20 ml
D.D.W.	980 ml
<hr/>	
Total	1.0 l

0.8% Agarose gel

Agarose	0.8 g
1×TAE buffer	100 ml
<hr/>	
Total	100 ml
↓	
電子レンジで加熱	

100% Formamide Dye

Formamide	10 ml
BPB	5 mg
XC	5 mg
EDTA	20 μ l
<hr/>	
Total	10 ml

50mM CaCl₂

CaCl ₂ (MW:110.98)	1.11 g
D.W.	200 ml
<hr/>	
Total	200 ml
↓	
auto crave (121°C、20 min) で滅菌処理	

Tris-HCl (pH8.0) – 25% sucrose

Tris-HCl (pH8.0)	50 ml
Sucrose	25 g
<hr/>	
↓	
100 ml に fill up	

50 mg/ml lysozyme

Lysozyme	1.0 g
1M Tris-HCl (pH 8.0)	0.2 ml
D.D.W.	18.8 ml
<hr/>	
Total	20 ml

5% Brij - 58

Brij – 58	0.5 g
D.D.W.	10 ml
<hr/>	
Total	10 ml

2M MgCl₂

MgCl ₂ ·6H ₂ O (MW : 203.3)	406.6 g
D.W.	500 ml

↓

1000 ml に fill up

Auto crave (121°C、20 min)で滅菌処理

2M KCl

KCl (MW : 74.55)	149.1 g
D.W.	500 ml

↓

100 ml に fill up

auto crave (121°C、20 min) で滅菌処理

100mM PMSF

PMSF (MW : 174.2)	0.871 g
D.D.W.	50 ml
Total	50 ml

10×Laemmli Running buffer

Trizama base	151.4 g
Glycine	720.7 g
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	50 g

↓

5.0 l に fill up

Blotting buffer

Methanol	200 ml
10×Laemmli Running buffere	100 ml
D.W.	700 ml
Total	1000 ml

10×PBS(-)

NaCl	80.02 g
KCl	2.0 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	28.97g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
D.W.	600 ml

↓

10N NaOHを加え室温でpHを7.4に合わせる。

1.0 lにfill up

auto crave (121°C、20 min) で滅菌処理

3% BSA / PBS(-)

BSA	4.502 g
10×PBS(-)	15 ml

↓

150 ml に fill up

0.5 % tween 20 / PBS(-)

Tween 20	15 ml
10×PBS(-)	300 ml

↓

3.0 l に fill up

5% gelation / PBS(-)

10×PBS(-)	50 ml
D.W.	450 ml

↓

メディウム瓶に入れる。

Gelatin を 2.5 g 加える。

auto crave (121°C、20 min) で滅菌処理

5% slimmilk / PBS(-)

Skimmilk	20 g
10×PBS	40 ml

↓

400 ml に fill up

PBS(promoter assay 用)

Phosphate Buffered Salts (TaKaRa)	1 tablet
D.W.	100 ml
<hr/>	
Total	100 ml

DEPC (diethylpyrocarbonate) treated water

DEPC	100 μ l
D.D.W.	1000 ml
<hr/>	
Total	1000 ml

↓

37°Cで 1-2 時間放置する。

autoclave (121°C, 20 min)で滅菌処理。

DEPEC の臭いがするなら、もう一度 autoclave (121°C, 20 min)で滅菌処理。

1M NaOAc (Sodium acetate) (pH 5.5)

NaOAc	16.406 g
DEPC Water	150 ml
<hr/>	

↓

酢酸を加え、pH 5.5 に調整する。

200 ml に fill up

autoclave (121°C, 20 min)で滅菌処理。

0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA ₂ Na(2H ₂ O)	37.224 g
DEPC Water	150 ml
<hr/>	

↓

水酸化ナトリウムを加え、pH 8.0 に調整する。

200 ml に fill up

autoclave (121°C, 20 min)で滅菌処理。

0.5 M MgSO₄

MgSO ₄ (7H ₂ O)	6.162 g
DEPC Water	40 ml
<hr/>	

↓

50 ml に fill up

autoclave (121°C, 20 min)で滅菌処理。

<u>Solution A</u>		final conc.
10% SDS	25 ml	0.5 %
1M NaOAc	10 ml	20 mM
0.5M EDTA	10 ml	10 mM
DEPC Water	↓ fill up	
<hr/>		
Total	500 ml	

H₂O saturated phenol

Phenol (granule)	40 g
DEPC Water	↓ fill up
<hr/>	
Total	50 ml

↓

60°Cで温め、vortex をかけ、その後遮光して 4°Cで保存。

10×MOPS (pH 7.0)

		final conc.
MOPS (MW : 209.26)	41.852 g	200mM
Sodium Acetate (MW : 82.03)	4.1015 g	50 mM
EDTA (MW : 372.24)	7.448 g	20 mM
D.W.	800 ml	
<hr/>		

↓

NaOH で pH 7.0 に調整する。

1000 ml に fill up

autoclave (121°C, 20 min)で滅菌処理。

2.5% BPB

BPB	1.25 g
DEPC Water	50 ml
<hr/>	
Total	50 ml

↓

滅菌フィルター(0.2µm)で濾過滅菌。

20×SSC

NaCl	350.6 g
Trisodium citrate dehydrate	176.4 g
D.W.	1500 ml

↓

HCl で pH 7.0 に調節する。

2000 ml に fill up

autoclave (121°C, 20 min) で滅菌処理。

2×SSC

20×SSC	100 ml
D.W.	900 ml

Total	1000 ml
-------	---------

1×MOPS(要時作成)

10×MOPS	100 ml
D.W.	900 ml

Total	1000 ml
-------	---------

Loading buffer (要時作成)

Formamide	0.25 ml
Formaldehyde	0.083 ml
10×MOPS	0.05 ml
Glycerol	0.05 ml
2.5% BPB	0.01 ml
DEPC Water	0.057 ml

Total	0.5 ml
-------	--------

10×DIG-dNTP mix

		final conc.
1mM (25nmol) DIG-11-dUTP	25 μ l	0.7 mM
100 mM dATP	0.71 μ l	2.0 mM
100 mM dGTP	0.71 μ l	2.0 mM
100 mM dCTP	0.71 μ l	2.0 mM
100 mM dTTP	0.46 μ l	1.3 mM
D.W.	8.11 μ l	

Total	35.7 μ l	
-------	--------------	--

<u>10×dNTP mix</u>		final conc.
100 mM dATP	0.71 μl	2.0 mM
100 mM dGTP	0.71 μl	2.0 mM
100 mM dCTP	0.71 μl	2.0 mM
100 mM dTTP	0.71 μl	2.0 mM
D.W.	32.86 μl	
<hr/>		
Total	35.7 μl	

1% Agarose gel / 5% Formaldehyde

Agarose	2.7 g
10× MOPS	8.0 ml
DEPC Water	138 ml
<hr/>	

↓

電子レンジで加熱

冷えた後に、Formaldehyde を 24.45 ml 加える。

2×SSC / 0.1% SDS

20×SSC	100 ml
10% SDS	10 ml
D.W.	↓ fill up
<hr/>	
Total	1000 ml

0.1×SSC / 0.1% SDS

20×SSC	5.0 ml
10% SDS	10 ml
D.W.	↓ fill up
<hr/>	
Total	1000 ml

1×washing buffer(要時作成)

washing buffer (10×)	10 ml
D.W.	90 ml
<hr/>	
Total	100 ml

1×maleic acid buffer(要時作成)

maleic acid buffer (10×)	8.0 ml
D.W.	72 ml
<hr/>	
Total	80 ml

1×blocking solution(要時作成)

brocking solution (10×)	8.0 ml
1× maleic acid buffer	72 ml
<hr/>	
Total	80 ml

1×detection buffer

detection buffer (10×)	2.0 ml
D.W.	18 ml
<hr/>	
Total	20 ml

Rebrobing buffer

10% SDS	10 ml
Formamide	10 ml
1M Tris-HCl (pH7.5)	1.0 ml
<hr/>	
Total	21 ml

1.2×IF-0

NaCl	6.0 g
Pluronic F68	0.36 g
D.W.	900 ml
<hr/>	

↓

0.1 N 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)	12.92 g
D.W.	70 ml

↓

HCl で pH 7.1 に合わせる。
滅菌フィルター(0.2 μ m)で濾過滅菌。

2M Sodium Succinate / 200 μ M Ferric Citrate

Sodium Succinate (MW : 270.14)	54 g
Ferric Citrate (MW : 244.95)	4.9 mg
D.W.	↓ fill up

Total 100 ml

↓

滅菌フィルター(0.2 μ m)で濾過滅菌。

1 \times IF-0 (+dye) for PM1,2

1.2 \times IF-0	10 ml
Biolog Redox Dye Mix A (100 \times)	120 μ l
D.W.	1.88 ml

Total 12 ml

1 \times IF-0 (+dye) for PM3-8

1.2 \times IF-0	10 ml
2M S.S. / 200 μ M Fe.C.	120 μ l
Biolog Redox Dye Mix A (100 \times)	120 μ l
D.W.	1.76 ml

Total 12 ml

2-4. 試薬とキット

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

Brij®58 / Wako

2-Mercaptrthanol / Wako

Immobilon™ Western HRP Substrate Peroxide Solution / MILLIPORE

Immobilon™ Western HRP Substrate Luminol Reagent / MILLIPORE

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/μl) / Roche

CDP-Star, ready-to-use / Roche

RNA Size Marker / TOYOBO

IF-0a GN/GP Base (1.2×) / BIOLOG

IF-10a GN Base (1.2×) / BIOLOG

Biolog Redox Dye Mix A (100×) / 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

RNase inhibitor / TaKaRa

AMV Reverse Transcriptase / Life Sciences

2-5. 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 hsdR17</i> (rk-, mk+) <i>phoA supE44 - thi-1 gyrA96 relA1</i>	TaKaRa
KP7600	W3110 (A) <i>lacIq lacZ</i> Δ M15 <i>galK2 galK22</i>	Miki
JD27135	KP7600 <i>ascG::Km</i>	Miki

2-6. プラスミド

Plasmid	source
pT7Blue	Novagen
pBR322	TaKaRa
H024	A. Ishihama
K259	A. Ishihama
K559	A. Ishihama

2-7. プライマー

Primer	Sequence (5' to 3')	mer
EcoRV-F	CTTGGTTATGCCGGTACTGC	20
EcoRV-R	GCGATGCTGTCGGAATGGAC	20
T7 proprimer	TAATACGACTCACTATAGGG	20
FITC T7 proprimer	TAATACGACTCACTATAGGG	20
T7-R primer	GGTTTTCCAGTCACACGACG	21
EGFP-anti	AGGGTCAGCTTGCCGTAGG	19
<i>ascG</i> -F	CAGTTTTAACGCCGTGGCAGAGTTG	25
<i>ascG</i> -R	AAGGAGCAATGAGTGAGTCGCG	22
<i>ascF</i> -F	ATGCACCGCGTCTTTACGCCAAC	23
<i>ascF</i> -R	AAGACTTACTTCTTTGGCGACGGTC	25
<i>ascB</i> -F	TTTCAGCTATTACGCCTCGCGCT	23
<i>ascB</i> -R	TAAATCTTCCCCATTACTGGCAATCACTT	29
<i>prpR</i> -F	GGCATCAGCCTGTTCCGGTAGAT	23
<i>prpR</i> -R	TTTCAGCCGCCGCCAGAACG	21
<i>prpB</i> -F	GTCATCGTCCGAATAAAGCGATCGT	25
<i>prpB</i> -R	ACGGGCAAACAGGTTGTCGAGC	22
<i>prpE</i> -F	GTGTATTGACACCATCTGGGGCGA	24
<i>prpE</i> -R	TGGCGGATCTGATCCAACGACG	22
FITC <i>ascF</i> primer	CCATCGGATTTTATCCTGTTATCAGTAG	28

第3章：実験方法

3-1. genomic SELEX

genomic SELEX とは大腸菌転写因子と DNA 断片を実際に結合させ、単離する方法である。まず、大腸菌 K-12 W3110 株のゲノムを超音波によって DNA 断片の長さが 250~350 bp になるように破碎し、その DNA 断片をプラスミドに組み込んだ「大腸菌 W3110 クローンライブラリー」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。次に増幅させた DNA 断片を実際に His-tag 付加転写因子と結合させた。転写因子と結合した DNA 断片を Ni-NTA アガロースを用いて回収し、再び PCR を用いて DNA 断片を増幅する。その後再び転写因子と結合させる。以上の工程を繰り返すことで、転写因子と実際に結合する DNA 断片を濃縮することができる。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) を用いて PCR 産物を視覚的に確認する。特異的な DNA 断片が得られた時の泳動結果は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 断片を発見できるという方法である。

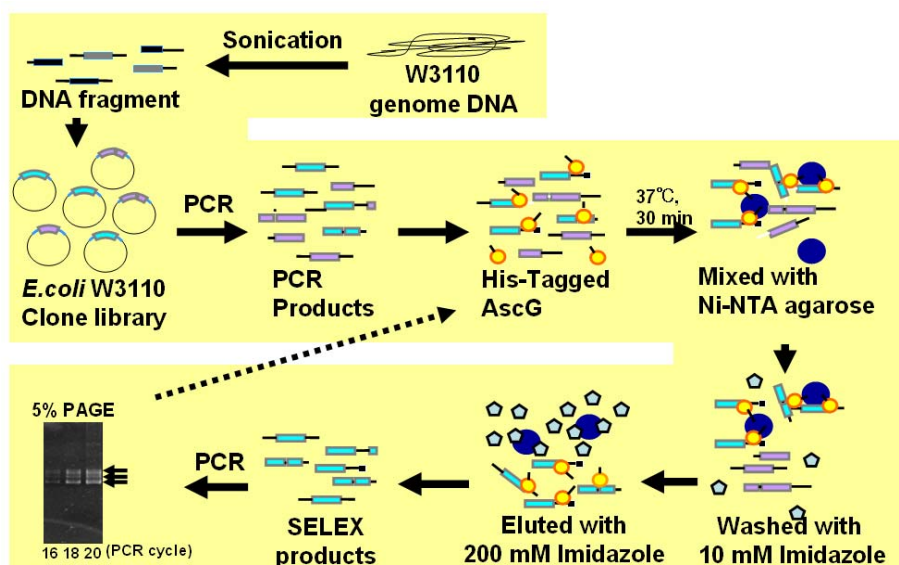


図 4 genomic SELEX

3-1-1. ライブラリーからの増幅

まず大腸菌 W3110 株 Clone library (pW3110F 2Y28) を鋳型として PCR を行い DNA 断片 (250~350bp) を増幅させる。

PCR

DNA (pW3110F 2Y28) (1.0 ng/μl)	3.0 μl
Primer EcoRV-F (100 pmol/μl)	1.0 μl
Primer EcoRV-R (100 pmol/μl)	1.0 μl
10× Ex buffer	10 μl
2.5 mM dNTP mixture	8.0 μl
Ex taq polymerase	0.5 μl
D.D.W	76.5 μl
<hr/>	
Total	100 μl

94°C 5 min	} × 20 cycles
94°C 30 sec	
50°C 1 min	
70°C 1 min	
<hr/>	
70°C 7 min	

PCR 後のサンプル溶液 100 μl に 1.5× Dye solution を 20 μl 加え、5% PAGE (150 V, 1.5 hr) で泳動し、その後 EtBr で染色して 250 ~ 350 bp の DNA 断片を切り出した。切り出した断片を 2 ml tube に回収後、ゲルを潰し Elution buffer を 600 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 (15000 rpm, 10 min, 4°C) した。上清 400 μl を回収し SUPREC™-01 tube (TaKaRa) に入れ、遠心 (10000 rpm, 5 min, 4°C) した。濾液を 400 μl 回収し、3M S.A. を 40 μl、100% EtOH を 1000 μl 加えて vortex し、遠心 (15000 rpm, 15 min, 4°C) した。その後、上清を除き 70% EtOH を 100 μl 加えて遠心 (15000 rpm, 5 min, 4°C) した。ピペットで上清を除き乾燥させ、ペレットに 20 μl の ddH₂O を加え vortex してペレットを溶かした。その内の 1.0 μl を 100 倍希釈して O.D.260 を測定して回収した DNA 断片の濃度を計算した。

3-1-2. DNA断片とタンパク質(転写制御因子)の結合(1st)

10×Binding buffer	10 μ l
DNA断片(回収したDNA)	final 5.0 pmol
Protein (20pmol)	1.0 μ l
D.W.	↓fill up
<hr/>	
Total	100 μ l

インキュベーターを用いて37°Cで30分間、DNA断片とタンパク質(転写因子)を反応させた。

3-1-3. Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィー(1st)

Ni-NTA Agarose 400 μ l (gel volume 200 μ l) をカラム (Muromac COLUMNS S size 5×50mm) に穏やかに充填した。次に5 mM imidazole bufferをカラムに注ぎ平衡化させ (1.0 ml×2)、3-1-2で反応させたサンプルをカラムに添加させた。その後、10 mM imidazole bufferを200 μ l×5、1000 μ l×1注ぎ、200 mM imidazole bufferを200 μ l×2注ぎ、200 mM imidazole bufferの2回目に溶出してきたフラクションを1.5 ml tubeに回収した。その後3M S.A.を20 μ l、100% EtOHを500 μ l加えvortexして遠心 (15000rpm, 15 min, 4°C) した。その後、上清を除き70% EtOHを100 μ l加えて遠心(15000rpm, 5 min, 4°C) した。ピペットで上清を除き乾燥させ、ペレットに30 μ lのddH₂Oを加えてvortexしてペレットを溶かした。

3-1-4. PCR(1st)

Ni-NTA Agarose カラムで回収したDNA断片を鋳型としてPCRを行い、DNA断片を増幅させる。

DNA (3-1-3で回収したサンプル)	2.0 μ l
Primer EcoRV-F (100 pmol/ μ l)	1.0 μ l
Primer EcoRV-R (100 pmol/ μ l)	1.0 μ l
10×Ex buffer	10 μ l
2.5 mM dNTP mixture	8.0 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	} × 16,18,20 cycles
94°C 30 sec	
50°C 1 min	
70°C 1 min	
70°C 7 min	

反応液 100 μ l のうち 5.0 μ l に 1.5× Dye solution を 3.0 μ l 加えたものを 5% PAGE (150 V, 30min) で泳動し、増幅した PCR 産物の確認を行った。増幅が確認できなかったサンプルは再び PCR を行った。DNA 断片の増幅を確認した後、残りのサンプル全量に 1.5× Dye solution を 15 μ l 加え、5% PAGE (150 V, 1.5 hr) で泳動し、EtBr で染色後、250 ~ 350 bp の DNA 断片を切り出した。切り出した DNA 断片を 2 ml tube に回収後、ゲルを潰し Elution buffer を 800 μ l 加え、O/N で回転振盪させた。

3-1-5. DNA 断片の回収(1st)

溶出させたゲルの入ったtubeを遠心 (15000 rpm, 10 min, 4°C) した。上清400 μ l を回収しSUPREC™-01 tube (TaKaRa) に入れて遠心 (10000 rpm, 5 min, 4°C) した。濾液を400 μ l回収し、3M S.A.を40 μ l、100% EtOHを1000 μ l加えvortexして遠心 (15000 rpm, 15 min, 4°C) した。その後、上清を除き70% EtOHを100 μ l加えて遠心 (15000 rpm, 5 min, 4°C) した。ピペットで上清を除き乾燥させ、ペレットに10 μ l の ddH₂Oを加えvortexしてペレットを溶かした。その内の1.0 μ l を100倍希釈して O.D.260を測定して回収したDNA断片の濃度を計算した。

※ 3-1-2.~3-1-5.を繰り返し(最高 8 回まで) 5% PAGE で泳動後、増幅した PCR 産物がバンド化したことを確認できたサンプルは DNA 断片を回収し、Ligation を行った。

3-1-6. Ligation

pT7 Blue T-vector (0.013 pmol/ μ l)	1.0 μ l
DNA (回収したDNA)(vectorの5倍量)	1.0 μ l
ddH ₂ O	2.0 μ l
Ligation mix	4.0 μ l
<hr/>	
Total	8.0 μ l

インキュベーターを用い、16°Cで3時間反応させた。

3-1-7. 形質転換(ヒートショック法)

1.5 ml tubeにDH5 α 100 μ lとLigation産物8.0 μ lを加えピペッティングし、氷上で30分間静置した。その後42°Cで45秒間ヒートショックをし、再び氷上で5分間静置した。そしてnon drugのLB培地を1.0 ml加え、37°Cで1 時間静置した。その後遠心 (10000 rpm, 5 min, 4°C)し、上清100 μ lを残すようにして上清を捨て、ペレットを溶かしLBプレート (Amp, X - gal) に撒き、37°Cで一晩静置した。

3-1-8. プラスミド抽出

5.0 mlのLB培地にプレートからシングルコロニーを植菌し、一晩振盪培養(37 °C ,140 rmin⁻¹)した。

2 ml tubeに培養液を2.0 ml加え遠心 (10000 rpm, 5 min, 4°C)し上清を捨て、再び培養液を2.0 ml加え遠心 (10000 rpm, 5 min, 4°C)し上清を捨てる。次に、Solution I を200 μ l加えてvortexし、Solution II を400 μ l加えて軽くインバートし、Solution IIIを300 μ l加えて軽くインバートした後、氷上で5分間静置した。その後、遠心 (15000 rpm, 15 min, 4°C)し、上清800 μ lを新しい1.5 ml tubeに加え、イソプロパノールを800 μ l加えvortexした後、遠心 (15000 rpm, 15 min, 4°C)した。その後、上清を除き70% EtOHを100 μ l加えて遠心(14000 rpm, 5 min, 4°C)し、ピペットで上清を除き乾燥させた。次に、ペレットを100 μ lのddH₂Oに溶かし、RNase-I (50 mg/ml)を1.0 μ l加えてよく混ぜてから37°Cで2 時間静置した。

その後フェノールを100 μ l 加えしっかりvortexをして遠心 (15000 rpm, 2 min, 4°C)した。次に上清100 μ lを回収し、クロロホルムを100 μ l 加えvortexして遠心 (15000 rpm, 2 min, 4°C)した。上清100 μ lを回収し3M S.A.を10 μ l 、100% EtOHを250 μ l加えvortexして遠心 (15000 rpm, 15 min, 4°C)した。その後、上清を除き70% EtOHを100 μ l加えて遠心 (14000 rpm, 5 min, 4°C)し、ピペットで上清を除き乾燥させた。最後に20 μ lのddH₂Oを加え溶かした。

3-1-9. 制限酵素反応

plasmid (3-1-8で回収)	2.0 μ l
Hind III	0.2 μ l
EcoR I	0.2 μ l
10×M buffer	1.0 μ l
ddH ₂ O	6.6 μ l
<hr/>	
Total	10 μ l

インキュベーターを用い、37°Cで2時間反応させた。その後全量に1.5× Dye solutionを3.0 μ l加え、0.8% アガロースで電気泳動(100V, 30min)した。そしてLigationが成功

していたプラスミドだけシーケンス解析を行った。

3-1-10. シーケンス解析

Premix (Big Dye [®] Terminator ver.3.1 kit)	0.5 μ l
5 \times buffer (Big Dye [®] Terminator ver.3.1 kit)	3.75 μ l
pT7 primer(0.3 pmol / μ l)	1.0 μ l
plasmid (Template DNA)	final 500 ng
ddH ₂ O	↓fill up
<hr/>	
Total	20 μ l

95°C 5 min	} × 25 cycles
95°C 20 sec	
50°C 15 sec	
60°C 1 min	
10°C ∞	

PCR産物を1.5 ml tubeに移し、1.5M S.A./125 mM EDTAを2.0 μ l、100% EtOHを66 μ l加えvortexして遠心 (15000 rpm, 20 min, 4°C)した。その後、上清を除き70% EtOHを100 μ l加えて遠心 (14000 rpm, 5 min, 4°C)した。ピペットで上清を除き乾燥させた。ペレットに12 μ lのHiDi formamideを加え溶かし、3130 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)で塩基配列決定した。その後、Bioscinet (<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。

3-2. Gel shift assay

Gel shift assay とは、タンパク質(転写因子)が DNA に結合すると、分子サイズが大きくなり電気泳動における DNA の移動度が低下することを利用した検出法である。転写因子と結合すると思われる DNA 断片を反応させる。その混合物を 5% PAGE で泳動した時、転写因子と複合体を形成した DNA 断片は転写因子と結合しない 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。したがって、その泳動パターンを見ることで転写因子がその DNA 断片に結合したかどうかを確認することができる。

3-2-1. FITC プローブの作成

plasmid (Template DNA) (50 ng / μ l)	1.0 μ l
FITC T7 proprimer (100 pmol / μ l)	1.0 μ l
T7-R primer (100 pmol / μ l)	1.0 μ l
10 \times Ex buffer	10 μ l
2.5 mM dNTP mixture	8.0 μ l
Ex taq polymerase	0.5 μ l
D.D.W.	78.5 μ l
<hr/>	
Total	100 μ l

95 $^{\circ}$ C 5 min	} \times 25 cycles
95 $^{\circ}$ C 30 sec	
55 $^{\circ}$ C 30 sec	
74 $^{\circ}$ C 30 sec	
<hr/>	
74 $^{\circ}$ C 7 min	

PCR産物に等量のフェノールを加えvortexして遠心(15000 rpm, 2 min, 4 $^{\circ}$ C)した。上清 (100 μ l)に3M S.A.を10 μ l、100% EtOHを250 μ l加えvortexして遠心 (15000 rpm, 15 min, 4 $^{\circ}$ C)した。その後、上清を除き70% EtOHを100 μ l加えて遠心 (14000 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C)した。ピペットで上清を除き乾燥させた。ペレットに30 μ lのddH₂Oを加え溶かした。その内の1.0 μ l を100倍希釈してO.D.260を測定して回収したDNA断片の濃度を計算した。

3-2-2. Gel shift assay

10 \times binding buffer	1.3 μ l
FITC-labeled DNA	1.0 μ l
ddH ₂ O	9.7 μ l
<hr/>	
Total	12 μ l \times 5

溶液作成後、storage buffer 1.0 μ l、または段階的に濃度を希釈した転写因子を 1.0 μ l ずつ加えた。それぞれ 37 $^{\circ}$ Cで 30 分間反応させ、その後すぐに 40% formamide dye solution を 1.8 μ l 加え、5% PAGE (150 V, 45min)で電気泳動を行った。その後、蛍光イメージング装置 LAS4000 (FUJIFILM)で解析し、泳動パターンの確認を行った。

3-3. DNase-I footprint

DNase-I footprint とは、DNA 分解酵素の一種である DNase-I (デオキシリボヌクレアーゼ I)を用いて転写因子が結合する DNA の領域を決定する方法である。DNase-I は DNA を分解する酵素だが、タンパク質と結合した領域の DNA は分解できない。この性質を利用して、転写制御因子が結合する DNA の領域を決定する。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 をランダムに切断させる。ランダムに切断した DNA 断片を 7.0 M Urea 8.0 % PAGE で電気泳動した時、転写制御因子が結合したと考えられる領域だけバンドが確認できず白く抜け、それが足跡のように見える。DNA 断片のシークエ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することができる。

3-1.1. A,G,T,C sequence 反応

Thermo Sequence Labelled Primer Cycle Sequencing kit(Amersham Biosciences) と FITC でラベル化されたプライマーを用いて DNA 断片のシークエンス反応を行った。

plsmid (Template DNA)	2.0 μ l
premix (A,G,T,C)	2.0 μ l
FITC T7 proprimer (1.0 pmol / μ l)	2.0 μ l
<hr/>	
Total	6.0 μ l \times 4

95°C 5 min	} \times 30 cycles
95°C 30 sec	
50°C 30 sec	
72°C 1 min	
<hr/>	
10°C 7 min	

3.0 μ lのformamide loading dyeを加えた。合計9.0 μ lのうち1回の泳動に2.0 μ l使用する。90°Cで3 分間静置して熱変性させ、1本鎖DNAにした後7.0 M Urea 8.0% PAGE (DSQ-500L, SHIMADZU)で5時間電気泳動した。

3-1.2. DNase- I Footprinting

10 \times binding buffer	2.5 μ l
50 mM CaCl ₂	2.5 μ l
FITC-labeled DNA	1.0 μ l
ddH ₂ O	19 μ l
<hr/>	
Total	25 μ l \times 5

溶液作成後、storage buffer 1.0 μl 、または段階的に濃度を希釈した転写因子を 1.0 μl ずつ加えた。それぞれ 37°C で 30 分間反応させ、その後すぐに 25°C に移し 5 分間静置した。その後、DNase-I (12.5 ng / μl) を加え、ピペティングでよく混合した後すぐに 25°C で 30 秒間反応させ、フェノールを 25 μl 加え攪拌し、氷上で静置した。全てのサンプルの反応が終わった後、遠心 (15000 rpm, 2 min, 4°C) した。上清 25 μl を新しい 1.5 ml tube に回収し、3M S.A. を 10 μl 、100% EtOH を 65 μl 加え攪拌し、遠心 (15000 rpm, 15 min, 4°C) した。その後、上清を除き 70% EtOH を 100 μl 加えて遠心 (14000 rpm, 5 min, 4°C) し、ピペットで上清を除き乾燥させた。ペレットに 3.0 μl の 80% formamide dye solution を加え vortex をして溶かした。2 本鎖 DNA を 90°C で 3 分間静置することにより熱変性させ 1 本鎖 DNA にした後、7.0 M Urea 8.0% PAGE (DSQ-500L, SHIMADZU) で 5 時間電気泳動した。

3-4. Promoter assay

Promoter assay とは、標的遺伝子のプロモーター領域を GFP (Green Fluorescent Protein) に融合したプラスミドを大腸菌野生株と目的の転写因子変異株に形質転換し、その発現量を比較することで、転写因子の作用機構を解明する方法である。テストプロモーターを図 5 のように GFP と融合させ、*lacUV5* をレファレンスプロモーターとして採用して RFP (Red Fluorescent Protein) と融合させた TFP (Two fluorescent protein) プラスミドを作成し、それを大腸菌にクローニングする。常に発現が一定のレファレンスプロモーター (*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、大腸菌野生株と転写制御因子変異株における GFP/RFP の値を比較する。

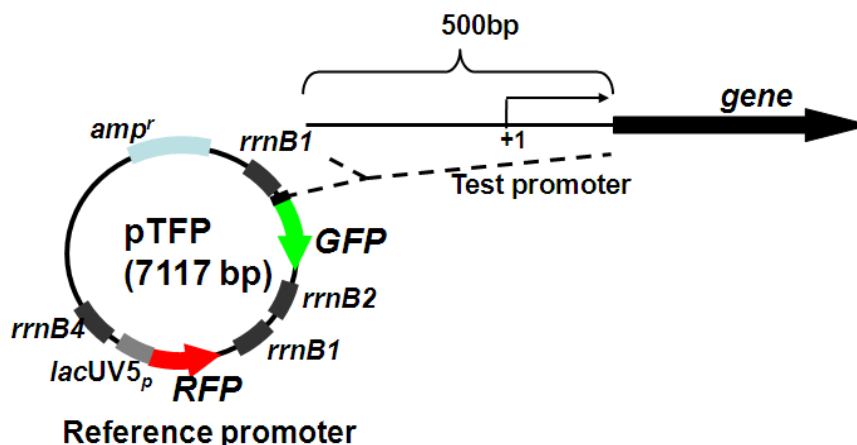


図 5 TFP プラスミド

3-4-1. 形質転換

大腸菌野生株 KP7600 と *ascG* 変異株 JD27135 それぞれに、pGRK259(*ascF*),

pGRK559 (*ascG*), pGRH024(*prpB*)を形質転換した(3-1-7 参照)。また大腸菌野生株 KP7600 だけに pGRN170(lacUV5), pBR322(control plasmid)を形質転換した(3-1-7 参照)。

3-4-2. Promoter assay

これらの菌株を LB プレート(Amp)または M9 プレート(Amp)上でシングルコロニーを作成するため、白金耳で画線し、37°Cで静置培養した。

10ml の液体培地にシングルコロニーを植菌し、前培養(37°C, 140min⁻¹, O/N)を行った。20ml で本培養(37°C, 140min⁻¹)を行なった。本培養開始のための植菌は、前培養液を 200 μ l (1/100 量)加えて行なった。O.D.₆₀₀ は各時間 Ultrospec 1100pro(Amersham Biosciences)で測定した。その時の培養液を適量回収し、遠心(10000rpm, 5min, 4°C)して集菌した。上清を除き PBS(-)で懸濁し、再び遠心(10000rpm, 5min, 4°C)した。その後 200 μ l を 96 穴のマイクロプレートに移し、FL600 Bio-Tek microplate reader (Bio-Tek Instruments)の O.D.₆₀₀ が 0.6 になるように PBS(-)で調整し、その後それぞれの 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。

3-5. Western blotting

Western blotting とは、電気泳動の優れた分離能と抗原抗体反応の高い特異性を組み合わせて、タンパク質混合物から特定のタンパク質を検出する方法である。タンパク質混合物を電気泳動により分離した後、メンブレンに転写・固定化してブロットを作製する。続いてブロットを目的タンパク質に対する抗体(一次抗体)に反応させる。Horse Radish Peroxidase(HRP)などの酵素で標識した二次抗体を一次抗体に反応させて、発光や蛍光を発する基質を加えて検出する。

3-5-1. 細胞破碎液作成

大腸菌野生株 KP7600 と *ascG*変異株 JD27135 を LB プレート(no drug)上でシングルコロニーを作成するため、白金耳で画線し、37°Cで静置培養した。

10ml の液体培地にシングルコロニーを植菌して前培養(37°C, 140min⁻¹, O/N)を行った。150 ml で本培養(37°C, 140min⁻¹)を行なった。本培養開始のための植菌は前培養液を 1.5 ml (1/100 量)加えて行なった。一定の時間ごとに培養液を採取し、-80°Cで凍結保存した。

保存した培養液に40 mM Tris-HCl(pH 8.0)-25% sucroseを5.0 ml加え懸濁した。そこに0.5 M EDTA (pH8.0)を10 μ lと50 mg/ml lysozymeを50 μ l加え、15分間氷上で静置した。その後5% Brij-58を500 μ l加え、Digital Sonifier(BRANSON)を用いて超音波破

碎(0°C, level 4, 1 min)を行なった。その破砕液に2 M MgCl₂を25 µl ,2 M KClを500 µl ,10mg/ml RNaseAを10 µl ,DNase-Iを2.0 µl ,100mM PMSFを50 µl加え、37°Cで10分間静置した。その後10% SDSを310 µl ,2-mercaptethanolを160 µl加え、90°Cで5分間静置し、-30°Cで保存した。

3-5-2. Wertsern blot

検出したいタンパク質の既に濃度が分かっているものをスタンダードとして 5 段階に濃度を希釈し、それと同時に細胞破砕液を SDS-PAGE で電気泳動(30mA, 1.0 hr)した。その後 Mini Trans-Blot®(BIO RAD)を用いて電気泳動(100V, 1.0 hr)をしてメンブレン(MEMBRANE W, Pall Florotrans)に転写した。その後、メンブレンに 3%BSA/PBS(-)を 20 ml 加えて 4°Cで一晩静置した。

上清を除去し、0.5 %Tween /PBS(-)を 40 ml 加え 10 分間振盪しながら wash し、その後上清を除去した。この工程を 3 回繰り返した。次に一次抗体を適量、5% geratin/PBS(-)を 20 ml 加え 2 時間振盪した。その後上清を除去し、0.5 %Tween /PBS(-)を 40 ml 加え 10 分間振盪しながら wash し、上清を除去した。この工程を 3 回繰り返した。次に二次抗体(anti rabbit IgG)を 6.0 µl、5% skim milk/PBS(-)を 20 ml 加え 1 時間振盪した。その後上清を除去し、0.5 %Tween /PBS(-)を 40 ml 加え 10 分間振盪しながら wash し、上清を除去した。この工程を 3 回繰り返した。最後に Immobilon™ Western をそれぞれ 1.0 ml ずつメンブレンに垂らし、LAS4000(FUJIFILM)で解析した。

3-6. Northern blotting

Northern blotting とは、RNA の量を検出する手法である。Promoter assay では遺伝子プロモーター領域に転写制御因子が結合した場合にのみ転写制御因子の支配下予測遺伝子への影響が確認できる。しかし、プロモーターの強度が弱い場合や、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、Northern blotting を行う。細胞からフェノール試薬などを用いて核酸を抽出した後、RNase フリーの DNase によって DNA のみを消化し、アガロース電気泳動などによってゲル上に展開する。このゲルを吸引によってメンブレンに転写し、検出したい RNA 配列に相補的な核酸を標識した核酸プローブをハイブリさせることで標的 RNA の量、サイズを検出する。

3-6-1. RNA 抽出(Hot Phenol 法)

LB プレート(no drug)または M9 プレート(no drug)上で KP7600 と *ascG* 変異株 JD27135 のシングルコロニーを作成するため、白金耳で画線し、37°Cで静置培養した。

10 ml の液体培地にシングルコロニーを植菌して前培養(37°C, 140min⁻¹, O/N)を行なった。20 ml で本培養(37°C, 140min⁻¹,)を行なった。本培養開始のための植菌は前培養

液を 200 μl (1/100 量)加えて行なった。目的の O.D.₆₀₀ になったら、50 ml の遠心チューブに移し遠心(5000rpm, 5min, 4°C)して集菌した。上清を捨て、Solution A を 1.0 ml 加えペレットを完全に溶かすようにピペッティングした。懸濁液に酸性フェノールを 1.0 ml 加え vortex し、60°C で 10 分間よく振って混ぜた(約 1 分間おきに vortex した)。その後 2.0 ml チューブに移し、遠心(12000rpm, 10min, 4°C)した。上清 400 μl ×2 を 1.5 ml チューブに移し、100% EtOH を 1.0 ml 加えた後チューブを反転させてよく混ぜた後、遠心(12000rpm, 5min, 4°C)した。その後、上清を除き 70% EtOH を 100 μl 加えて遠心(12000rpm, 3min, 4°C)し、上清を除いた後、Slution A を 400 μl 加えタッピングをしてペレットを溶かした。再度 100% EtOH を加え、70% EtOH を加えるといった上記の工程を 3 回繰り返した。ペレットを乾燥させた後、DEPC Water を 400 μl 加えタッピングをしてペレットを溶かした。1.0 M NaOAc(pH 5.5)/DEPC を 40 μl 、0.5 M MgSO₄/DEPC を 40 μl 、DNase-I(RNase-free)を 1.0 μl 加えよく混ぜた後、37°C で 1.0 時間静置した。

その後、酸性フェノールを 400 μl 加えてチューブを反転させてよく混ぜた後、遠心(12000rpm, 2min, 4°C)した。上清 400 μl を 1.5 ml チューブに移した後、100% EtOH を 1.0 ml 加え遠心(12000rpm, 10min, 4°C)した。その後、上清を捨て 70% EtOH を 100 μl 加えて遠心(12000rpm, 5min, 4°C)した。ピペットで上清を捨て乾燥させた。最後に DEPC Water を 30 μl 加えて溶かした。その内の 1.0 μl を 100 倍希釈して O.D.₂₆₀ を測定して回収した RNA の濃度を計算し、RNA の濃度を 3000ng に調整して 0.8%アガロース電気泳動(100V, 30min)できれいに精製できたかを確認した。

3-6-2. DIG でラベル化された DNA 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。

KP7600 genome DNA (50 ng / μl)	1.0 μl
Primer F (100 pmol / μl)	1.0 μl
Primer R (100 pmol / μl)	1.0 μl
10× Ex taq buffer	5.0 μl
10× DIG-dNTP mix (10× dNTP mix)	5.0 μl
Ex taq polymerase	1.0 μl
ddH ₂ O	37 μl
<hr/>	
Total	50 μl

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

72°C 7 min

DNA プローブが DIG でラベルされて分子量が大きくなったかを調べるために DIG-11-dUTP を加えていない 10×dNTP を用いた PCR も行った。PCR 後 0.8% アガロース電気泳動(100V, 30min)し、DIG でラベルされた DNA の泳動の遅延を確認した。

3-6-3. Northern blotting

1 日目

1.5 % Agarose gel / 5.0 % Formaldehyde を作成した(Northern blotting 用(必要枚数)と確認用(1 枚)準備)。サンプル RNA は 4000 ng (3.0 μ l)に loading buffer(要時調整)を 6.0 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、電気泳動(100 V, 10 min→50 V, 80 min)した。確認用ゲルは泳動後、EtBr で染色して泳動パターンを確認した。Northern blotting 用のゲルは図 6 のように、Blotting chamber に合わせてフィルターペーパーを切り、20×SSC を約 1.5 L 加えフィルターペーパーを湿らせ、ゲル上部を下にして乗せてメンブレンを 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、最後に蓋をして一晚静置した。

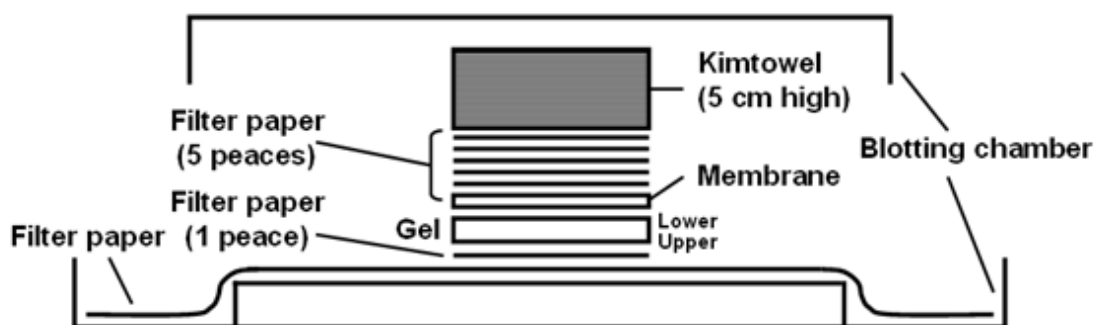


図 6 Transfer unit

2 日目

一晚静置したゲルとメンブレンを 2×SSC で湿らせたフィルターペーパーの上に置き、UV-LINKER (フナコシ)を用いてメンブレン上に RNA を固定した。その後、RNA を泳動したウェルの位置を示すためボールペンでメンブレンに印を付けた。印の付け終わったゲルは EtBr で染色してプロットニングが成功しているかを確認し、メンブレンは ddH₂O で 10 分間振盪した。

その後、メンブレンを Hybri bag (COSMO BIO)に入れ、50°C であらかじめ温めておいた DIG Easy Hyb を 2.0 ml 加え、気泡が入らないように Hybri bag の口をとめ、50°C, 30 min⁻¹で 30 分間振盪した。振盪している間に DIG でラベルした DNA プローブ 5.0 μ l

に ddH₂O を 45 μ l 加え、90°C で 5 分間静置後、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 プローブにあらかじめ温めておいた DIG Easy Hyb を 1.0 ml 加え混ぜたものを Hybri bag に入れ、気泡が入らないように再び口を閉じ、50°C, $\sim 30 \text{ min}^{-1}$ で一晩振盪した。

3 日目

plastic box に 2 \times SSC / 0.1 % SDS を適量加え、Hybri bag からメンブレンを移し 5 分間振盪して wash した。2 \times SSC / 0.1 % SDS を除き、再び 2 \times SSC / 0.1 % SDS を加え 5 分間振盪して wash し、あらかじめ 50°C で温めておいた 0.1 \times SSC / 0.1 % SDS を加え 50°C で 15 分間振盪して wash した。0.1 \times SSC / 0.1 % SDS を除き、再び 0.1 \times SSC / 0.1 % SDS を加え室温で 15 分間振盪して wash した。

別の plastic box に 1 \times washing buffer を適量加え、メンブレンを 1 枚ずつ移し 2 分間振盪して wash した。1 \times washing buffer を捨て(最後はピペットを使用)、1 \times blocking solution を適量加え室温で 30 分から 3 時間振盪した。その後 1 \times blocking solution を捨て(最後はピペットを使用)、もう一度 1 \times blocking solution を加え、Anti-DIG-AP を 1.0 μ l 加え、室温で 30 分間振盪した。その後 Antibody solution を捨て(最後はピペットを使用)、1 \times washing buffer を適量加え 15 分間振盪して wash した。1 \times washing buffer を捨て(最後はピペットを使用)、1 \times 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 μ l 程メンブレンの上に垂らし、遮光で 5 分間静置した後、LAS4000 (FUJIFILM) で検出した。

※同じメンブレンを用いてもう一度 Northern blotting を行なう場合。

検出が終わったメンブレンは ddH₂O で wash し、Hybri bag に入れた後、reprobing buffer を 2.0 ml 加え口をとめ、80°C で 1 時間静置した。その後 reprobing buffer を捨て、もう一度 reprobing buffer を 2.0 ml 加え口をとめ、80°C で 1 時間静置する。その後、2 日目の途中に戻る。

3-7. Phenotype microarray

Phenotype Microarray とは、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変異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 7)。つまり、あるウェルにおいて成育に差があれば、その差が遺伝子変異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) の発色の差を測定する。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 (炭素源), PM2 (炭素源), PM3 (窒素源), PM4 (リン/硫黄源), PM5 (栄養素補給), PM6 (窒素源), PM7 (窒素源), PM8 (窒素源), PM9 (浸透圧), PM10 (pH) といったプレートで、全部で 30 枚ある。

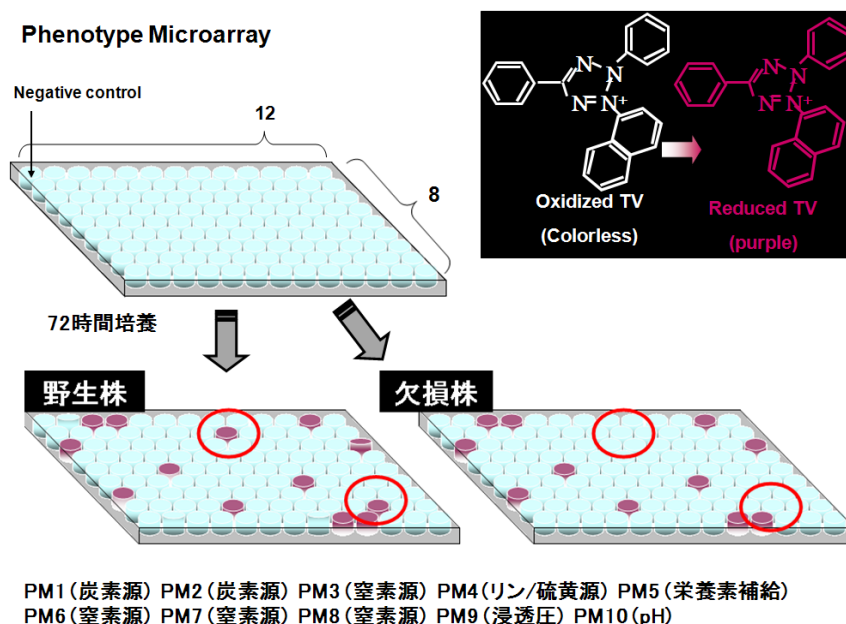


図 7 Phenotype microarray の原理

M9 プレート(no drug)上で KP7600 と *ascG* 変異株 JD27135 のシングルコロニーを作成するため、白金耳で画線し、37°Cで静置培養した。

10 ml の M9 培地(+Glucose)にシングルコロニーを植菌して前培養(37°C, 140min-1, O/N)を行った。培養液の濁度を測定し、本培養開始時の O.D.600 の値が 0.05 になるように、1.5 ml tube に培養液を加え集菌(5000 rpm, 5min, 4°C)し、上清を捨て 1.0 ml の 1× IF-0 (+dye)で細胞を wash し、再び遠心(5000 rpm, 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 OmniLog (BIOLOG) で 72 時間測定した。培養後のプレートを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で培養を開始する。

3-8. Primer extension

Primer extension とは、遺伝子内に由来するプローブを FITC で標識し相補的 RNA とハイブリダイズさせた後、逆転写酵素で伸長させることにより、mRNA の転写開始点の決定や、転写活性の定量を行うために用いられる方法である。DNA 断片のシーケン斯拉ダーも同時に泳動することで転写開始点を決定することができる。

3-8-1.A,G,T,C sequence 反応

Thermo Sequence Labelled Primer Cycle Sequencing kit(Amercham Biosciences) と FITC でラベル化されたプライマーを用いてシーケンス反応を行った。

plasmid DNA (200 ng / μ l)	2.0 μ l
premix (A,G,T,C)	2.0 μ l
FITC anti-GFP primer (1.0 pmol / μ l)	2.0 μ l
<hr/>	
Total	6.0 μ l \times 4

95°C 5 min	} \times 30 cycles
95°C 30 sec	
50°C 30 sec	
72°C 1 min	
<hr/>	
10°C 7 min	

3.0 μ lのformamide loading dyeを加えた。合計9.0 μ lのうち1回の泳動に2.0 μ l使用する。90°Cで3 分間静置して熱変性させ、1本鎖DNAにした後7M Urea 8.0% PAGE(DSQ-500L, SHIMADZU)で5時間電気泳動した。

3-8-2. primer extension

200 mM Tris-HCl	1.0 μ l
1.0 M KCl	1.0 μ l
100 mM MgCl ₂	1.0 μ l
2.5 mM dNTP mixture	8.0 μ l
RNase Inhibitor (40 U / μ l ,TaKaRa)	0.5 μ l
FITC anti-GFP primer (1.0 pmol / μ l)	1.0 μ l
Total RNA (~20 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時間反応させ、その後 phenol を 20 μ l 加え vortex し、遠心(15000 rpm, 2 min, 4°C)した。上清 20 μ l を 1.5 ml tube に移し、ddH₂O を 30 μ l, 3M SA を 5.0 μ l, 100% EtOH を 125 μ l 加え、遠心(15000 rpm, 15 min, 4°C)し、上清を捨て 70% EtOH を 100 μ l 加え遠心(12000rpm, 5min, 4°C)し、上清を捨て乾燥させた。最後に ddH₂O を 2.0 μ l 溶かし、Formamide loading 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(DSQ-500L, SHIMADZU)で 5 時間泳動した。

第 4 章：実験結果と考察

4-1. genomic SELEX

AscG のさらなる機能解明を目的として、genomic SELEX (Shimada *et al*, 2005) を用いた標的遺伝子の探索を行った。その結果、2 サイクル目の 5%PAGE において特定の DNA 断片の濃縮(ゲル電気泳動でバンド化)が確認できた(図 8)。これらの DNA 断片の塩基配列を確かめるため、pT7 Blue-T vector にクローニングし、合計で 100 クローンを単離し、塩基配列の解析を行った。

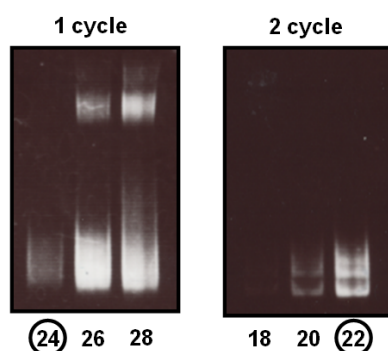


図 8 SELEX の泳動結果

図の上部は genomic SELEX のサイクル数、下部には PCR のサイクル数、回収した DNA 断片を○で示す

全部で 79 クローンを解析することができた(表 1)。表 1 は DNA 断片のゲノム上の位置を示す。その際矢印は遺伝子の向きを示す。その結果、AscG がこれまでに結合すると推測されていた *ascG* と *ascFB* の遺伝子間領域を含む DNA 断片が全体のおよそ半分に当たる 36 クローン得ることができた。よって Genomic SELEX 実験によって、AscG 認識結合配列が単離されたことが示唆された。*ascG-ascFB* 領域に加えて、*prpR* と *prpBCDE* の遺伝子間領域を含む DNA 断片が全体の 1/4 に当たる 22 クローン得ることができた。これら 2 領域以外は、すべて 1 クローンずつしか得ることができなかった(表 1)。従って、まず多数クローンが単離できた 2 領域に注目して研究を進めることにした。

表 1 genomic SELEX の結果

Left gene(s) (direction)	SELEX fragment (size; coding frame)	Right gene(s) (direction)	No. of fragments
<i>ascG</i> (←)	S (184-277bp)	<i>ascF-ascB</i> (→)	36
<i>prpR</i> (←)	S (167-204bp)	<i>prpB-prpC-prpD-prpE</i> (→)	22
	other genes		21
Total			79

ascG, *ascFB*は、上記の通り、アルブチン、サリシンを取り込み、 β -D-グルコース-6Pへと代謝する遺伝子群である(図9)。一方、*prpBCDE* オペロンはプロピオン酸をピルビン酸とコハク酸へと代謝する酵素群をコードし、プロピオン酸の存在下においてこのオペロンは誘導される(図9)。*prp* オペロンを調節する転写因子として PrpR が報告されている(Brock *et al*, 2002)。*prpR*の発現は、グルコース、グリセロールの非存在下において誘導される。PrpR はシグマ 54 依存転写に関与する転写因子の一つで、CGGG AAC-GTTCCCG の 14 塩基の回文配列を認識して結合する。プロピオン酸の代謝の過程で生じる(2S,3S)-2-メチルクエン酸をエフェクターとして *prpR* 自身には抑制因子をして、*prpBCDE*には活性化因子として機能する(Lee *et al*, 2005)。

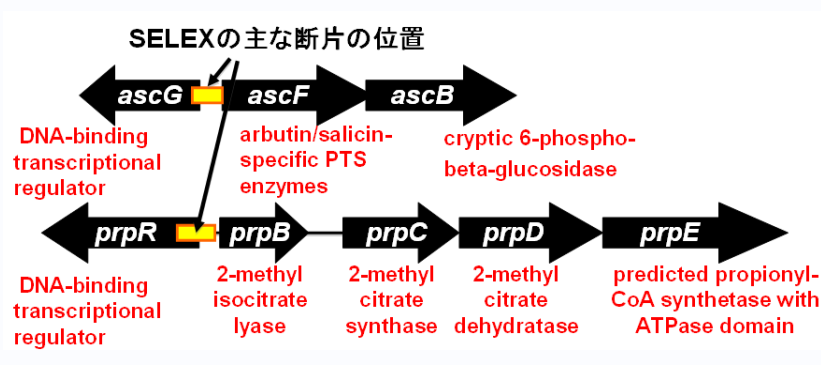


図 9 genomic SELEX で得られた DNA 断片の位置とその周辺の遺伝子の機能
赤字は各遺伝子の機能を示す。

4-2. Gel shift assay

4-2-1. Gel shift assay of AscG

AscG が、genomic SELEX で単離された DNA 断片に結合するかどうかを確認するために Gel shift assay を行った。その結果、*ascG-ascFB*、*prpR-prpBCDE*の遺伝子間領域を含む DNA 断片のいずれについても、AscG との複合体形成を示すバンドを複数確認することが出来た(図 10)。それぞれの結合の強さは異なり、*ascG-ascFB*の DNA 断片の方が AscG の結合が強いことが確認できた。

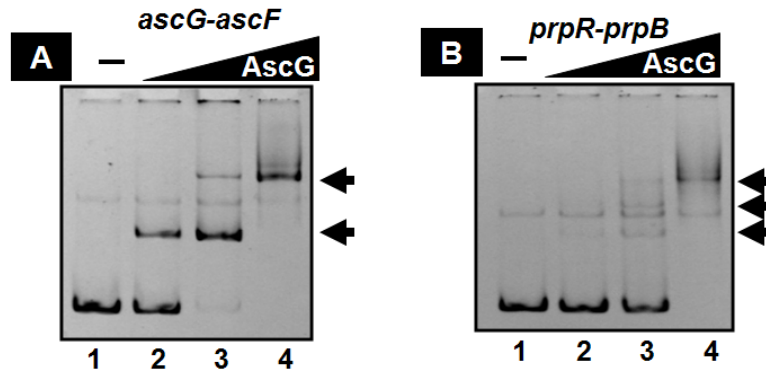


図 10 AscG の Gel shift assay

DNA conc. 1.0pM / AscG conc. 0, 2.5, 5.0, 10pM

矢印は DNA-転写因子の複合体を示す。

4-2-2. Gel shift assay of CRP

最近、*ascG-ascFB* 領域および *prpR-prpBCDE* 領域への CRP の結合が示唆され、*asc* オペロン、*prp* オペロンいずれも CRP 支配下にあることが示唆された (Grainger *et al*, 2005 ; Lee *et al*, 2005)。そこで CRP がこれらの遺伝子間領域に対して結合するかどうかを確認するため、再び Gel shift assay を行った (図 11)。CRP は cAMP 存在下において活性化することが知られているので、cAMP の終濃度 50 μ M で Gel shift assay を行った (Seoh *et al*, 1999)。その結果、両方の DNA 断片において CRP との複合体形成を示すバンドを確認することが出来た。結合の強さを比較すると、*ascG-ascFB* の DNA 断片の方が CRP の結合が強いことが確認できた。

以上の結果より、AscG, CRP の 2 つの転写因子が *ascG-ascFB*, *prpR-prpBCDE* の遺伝子間領域に結合することが確認できた。

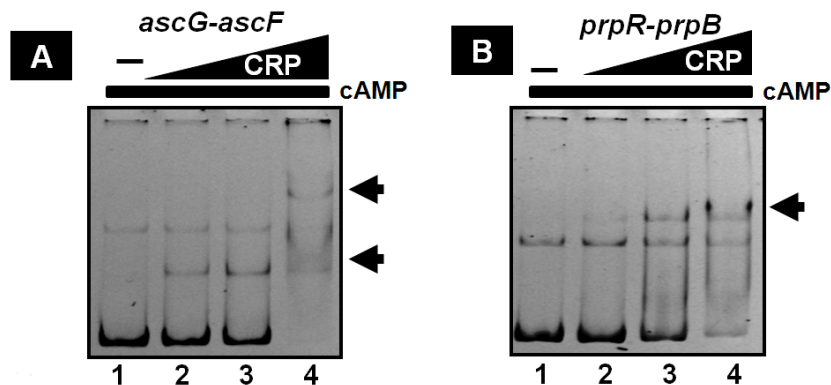


図 11 CRP の Gel shift assay

DNA conc. 1.0pM / cAMP conc. 50 μ M、CRP conc. 0, 0.3, 0.6, 1.25pM / cAMP conc. 50 μ M、矢印は DNA-転写因子の複合体を示す。

4-3. DNase-I footprint

Gel shift assay において AscG と CRP の結合が確認できたので、次にそれらの結合領域を同定するために DNase-I footprint を行った(図 12、図 13)。

4-3-1. DNase-I footprint of *asc* operon

asc オペロンでは、AscG、CRP 共に二カ所の結合領域を確認することができた(図 12A,B)。AscG では site2 の方が結合は強く、CRP では site1 の方が結合は強いことが確認できた。CRP の結合領域はこれまで推測されていた領域を含んでいた。興味深いことに、*asc* オペロンでは AscG と CRP の結合領域が重なっていた(図 12C)。このことより、大腸菌体内において AscG と CRP が拮抗し合い *asc* オペロンの転写を調節していることが推測された。

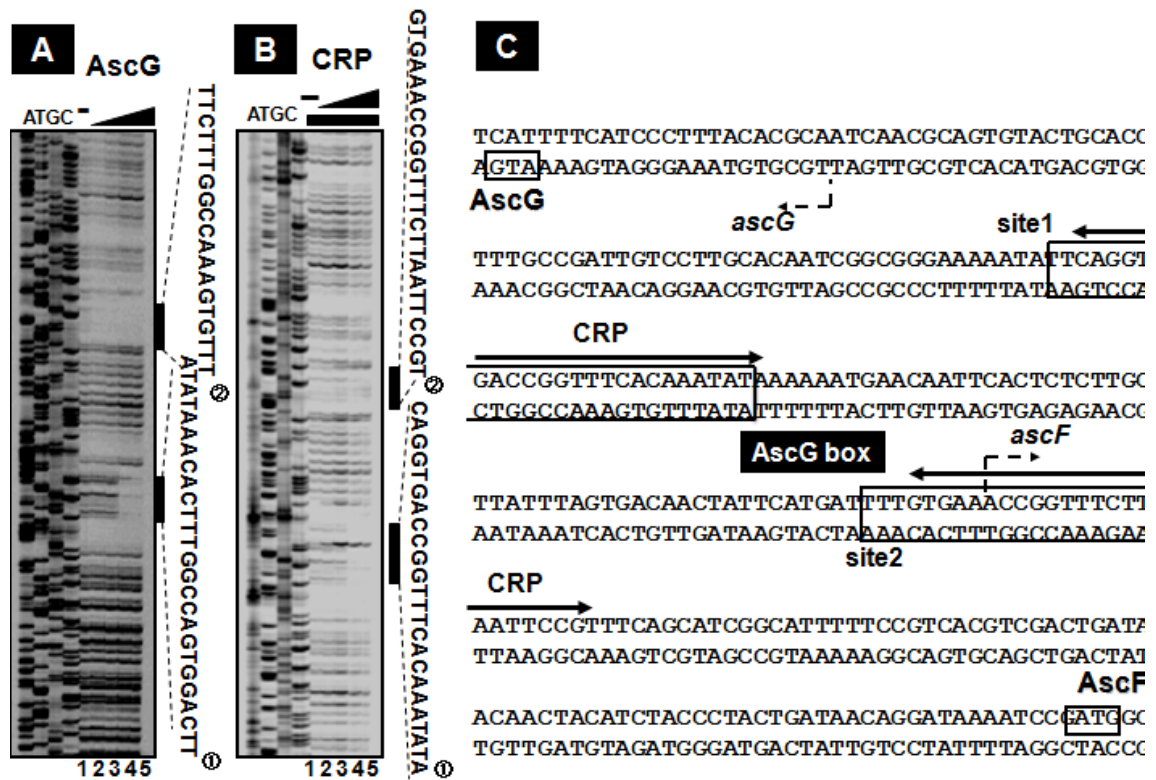


図 12 *asc* オペロンの DNase-I footprint

DNA conc. 1.0pM / cAMP conc. 50 μ M

AscG conc. 0, 2.5, 5.0, 10, 20pM / CRP conc. 0, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5pM

実線で囲まれた枠が AscG の結合領域、実線の矢印が CRP の結合領域を示す。

四角で囲まれた ATG はその遺伝子の開始コドンを示す。

点線の折れた矢印はその遺伝子の推測の転写開始点を示す。

4-3-2. DNase-I footprint of *prp* operon

prp オペロンでは、AscG は強い結合部位と、隣接した弱い結合部位が示唆された (図

13A)。一方、CRPは一カ所の結合領域を確認することができ、その領域は推測されていた領域を含んでいた(図 13B)。それぞれの結合領域をゲノム上で示したものが図 13C である。*asc* オペロンと同様に、*prp* オペロンでも AscG と PrpR、CRP と PrpR の結合領域がほぼ重なっていた(図 13C)。やはり *prp* オペロンでもこれら 2 組の転写因子が拮抗し合い *prp* オペロンの転写を調節していることが推測された。

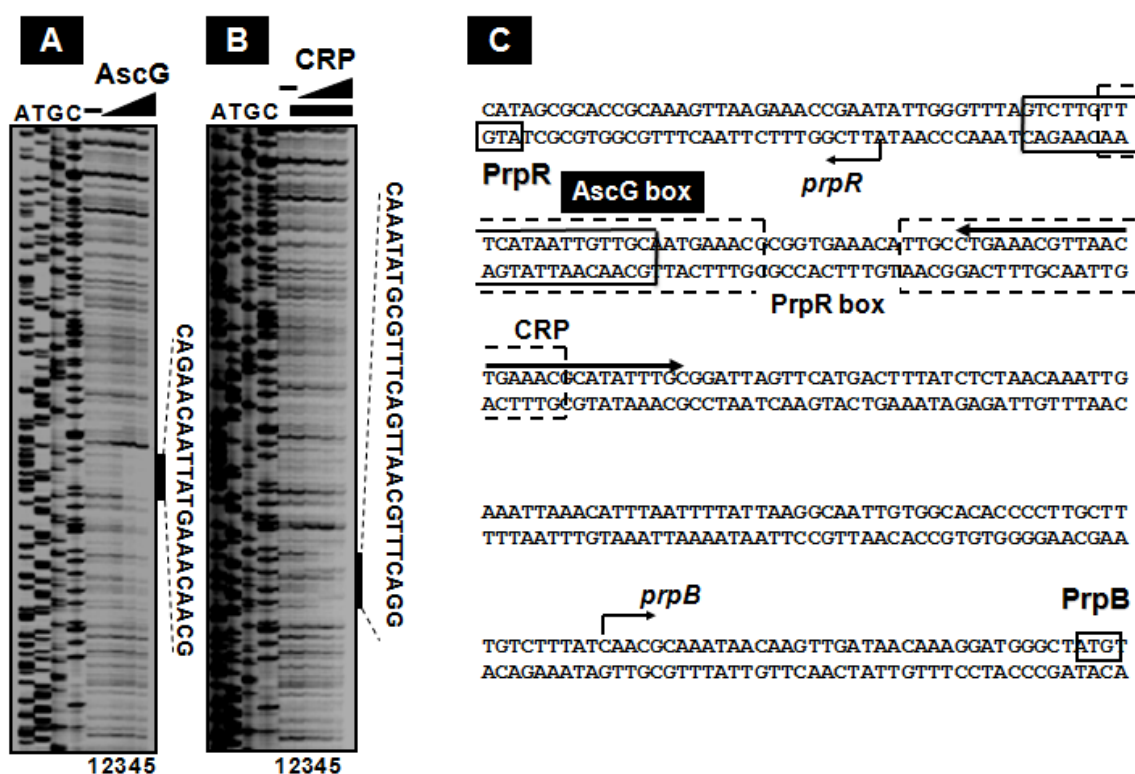


図 13 *prp* オペロンの DNase-I footprint

DNA conc. 1.0pM / cAMP conc. 50 μ M

AscG conc. 0, 2.5, 5.0, 10, 20pM / CRP conc. 0, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5pM

実線で囲まれた枠が AscG の結合領域、実線の矢印が CRP の結合領域、

点線で囲まれた枠が PrpR の結合領域を示す。

四角で囲まれた ATG はその遺伝子の開始コドンを示す。

実線の折れた矢印はその遺伝子の転写開始点を示す。

4-3-3. Identifid consensus sequence of AscG and CRP

DNase-I footprint で得られた AscG の結合配列を比較すると、GAAACC-GGTTTC の 12 塩基の回文配列を確認され(図 14)、AscG はこの塩基配列を認識して結合することが示唆された。*prp* オペロンにおいて認められた、弱い部分の配列を確認したところ、AscG の認識結合配列の一部(GAAAC)が三つ存在することが確認できた。従って、AscG の認識結合配列に似た配列が存在したため結合したのではないかと推測された。しかし、

その領域には PrpR と CRP が結合することが報告されている、加えて AscG もその領域に結合するとすれば、3 転写因子間の相互作用は興味深い。

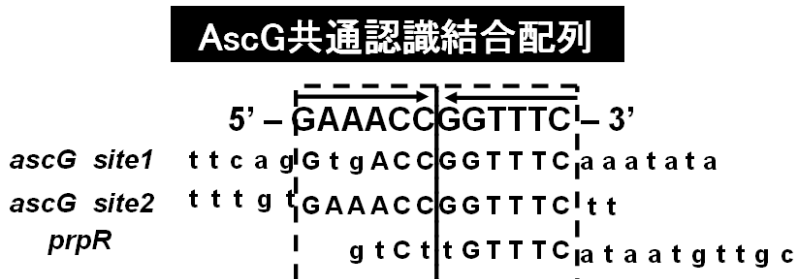


図 14 AscG の共通認識結合配列

CRP は代表的な包括制御転写因子であり、認識結合配列が多くの支配下遺伝子で解析され、共通配列(TGTGA-N₆-TCACA)が同定されている(Lindemose *et al*, 2008)。そこで、今回の DNase-I footprint で確認した CRP 結合領域を調べたところ、三つ標的全てについて、完全一致ではないが、CRP の認識共通結合配列を確認することができた(図 15)。したがって、CRP はこの領域に結合することが明らかとなった。

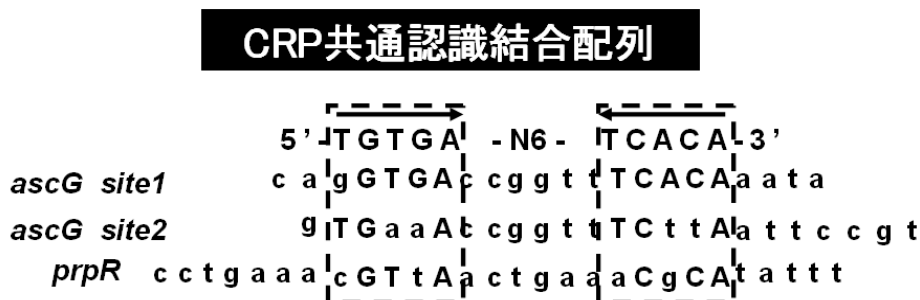


図 15 CRP の共通認識結合配列

4-4. Competition of AscG and CRP

DNase-I footprint によって、*asc* プロモーター領域で AscG と CRP が拮抗し合い、*asc* オペロンの発現を調節していることが推測された。そこで AscG と CRP のどちらがこのオペロンに対して結合が強いのかを、Gel shift assay を用いて確かめることにした。その結果が図 16 である。AscG、CRP、それぞれ単独で Gel shift assay を行った結果 (lanes 2-5)を、両者共存の gel shift パターンを比較した。AscG を先に反応させ、その後 CRP を反応させると、新たなシフトバンドを確認することができた (lanes 6, 7)。各バンドに結合したタンパク質を Western blot で分析すると、AscG、CRP 両方の存在が確認できた。このことより、新たなシフトバンドは AscG と CRP が一つずつ結合し

たものと考えることができる。これは DNase-I footprint の結果からも、AscG は site2 の方が強く結合し、CRP は site1 の方が強く結合するという結果と一致する。CRP が DNA に結合すると、DNA は大きく折れ曲がることが知られている (Emma *et al*, 1999)。そのために、CRP 二分子が結合した複合体のゲル電気泳動での移動度が速い。AscG 二分子結合した複合体も同様な移動度を示したので、AscG も DNA に湾曲を誘導することが推測された。しかし、AscG と CRP が一カ所ずつ結合した時は、電気泳動移動度の加速が認められず、転写因子同士が反発し合うためか DNA を曲げられないことが推測された。さらに、lane5 と lane7 の Western blotting を比較すると、CRP 単独に二カ所に結合したバンド(lane 5)より、AscG と CRP が結合したバンド(lane 7)の方が濃いことが確認できる。AscG と CRP が一カ所ずつ結合した状態からさらに過剰の CRP が存在すると、AscG の結合を外して CRP が結合していることが推測される。逆に CRP を先に反応させ、その後 AscG を反応させる(lanes 8 and 9)と、lane3 の AscG が二カ所結合したバンドより lane 9 のバンドの方が濃いことが確認できる。このことより、こちらも上記と同様の推測ができる。

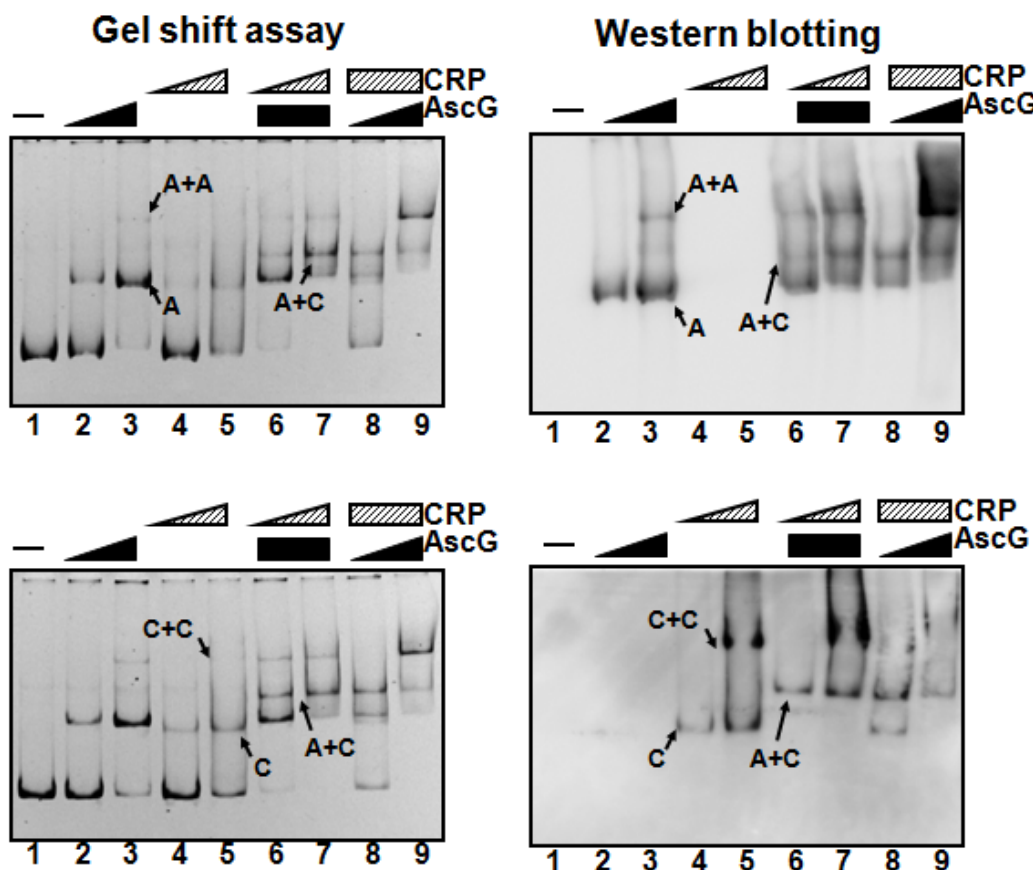


図 16 Gel shift assay による AscG と CRP の競合実験

DNA conc. 1.0pM / cAMP conc. 50 μ M

AscG conc. lanes 1,4,5 : 0pM, lanes 2,8 : 2.5pM, lanes : 3,6,7,9 : 5.0pM

CRP conc. lanes 1,2,3 : 0pM, lanes 4,6 : 0.3pM, lanes 5,7,8,9 : 0.6pM
 Anti-body / upside : AscG, underpart : CRP

以上の結果より、AscG と CRP のどちらか一方の結合が強いというわけではなかった。しかしどちらか一方の転写因子が多量に存在した時は、たとえ片方に別の転写因子が結合していたとしても、その結合を外して自分自身が結合することが示唆された。このことより大腸菌体内において、通常時は AscG と CRP が一カ所ずつ結合し不安な状態であるが、ある環境条件また刺激に応答して AscG または CRP が多量に発現すると、片方の結合を外して二カ所とも同じ転写因子が結合することにより *asc* オペロンの発現を調節することが示唆された。

4-5. Western blotting of AscG

次に実際に大腸菌体内でどの時期に一番 AscG が発現しているのかを Western blotting を用いて調べることにした。また同時に *ascG* 変異株である JD27135 株が完全に変異しているかも確認した(図 17)。今回は LB 培地、37°C で培養し、サンプルは 3.0, 6.0, 9.0, 12, 24 時間のものを回収した。

その結果、AscG の発現量はどの時期でもほぼ一定で、一細胞あたり約 400 分子とあまり変化がないことが判明した。また、*ascG* 欠損変異 JD27135 株では、AscG が検出されず、*ascG* が完全に変異していることが確認できた。

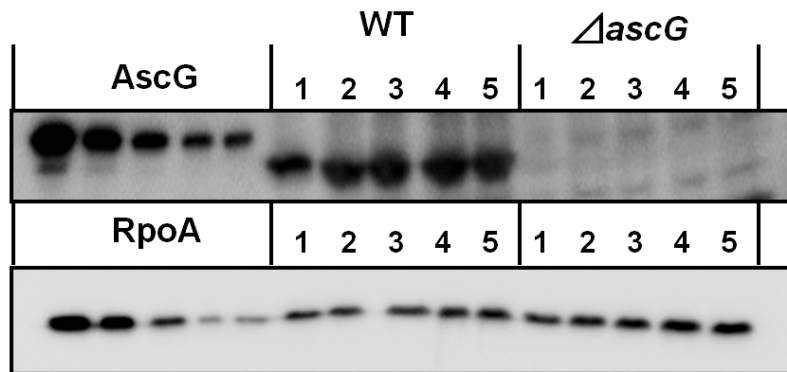


図 17 Western blotting の結果

lane1:3.0hr, lane2:6.0hr, lane3:9.0hr, lane4:12hr, lane5:24hr

4-6. Promoter assay

ここまでの実験で、*ascG-ascFB*、*prpR-prpBCDE* の遺伝子間領域に AscG と CRP が結合することは明らかとなった。しかしこれらの転写制御因子が転写にどう影響しているかはまだ不明であった。そこで次に実際の大腸菌体内において AscG と CRP の制

御機構を明らかにするため、それぞれのプロモーター領域を GFP (Green Fluorescent Protein)に融合した TFP(Two Fluorecsent Protein)プラスミドを利用して、Promoter assay を行った。

LB 培地での培養条件において、*ascF*プロモーター (pGRK259) の活性は、野生株より *ascG* 欠損変異株の方が常に高いことが確認できた(図 18)。特に対数期においては野生株の方が約 3 倍活性が高かった。この結果より、*ascFB* オペロンに対して AscG は抑制化因子として機能していることが明らかとなった。また、本研究によって、このプロモーター領域には CRP が結合することが明らかになった。グルコース存在下において、アデニル酸シクラーゼ活性が低下するために、cAMP の細胞内濃度が低下する。そこで LB 培地にグルコースを添加して同様にプロモーターの活性を測ったところ、野生株、*ascG* 変異株の両方ともその活性が著しく失われたことが確認できた(図 18)。この結果から、CRP が *ascFB* オペロン転写の活性化因子として機能していることが示唆された。以上の結果より、*ascFB* オペロンに対して AscG は抑制化因子として、CRP は活性化因子として機能していることが明らかとなった。

一方、pRGK559 (*ascG*)、pGRN024(*prpR*)はプロモーターの活性が弱く、野生株と *ascG* 変異株で影響を確認することができなかった。

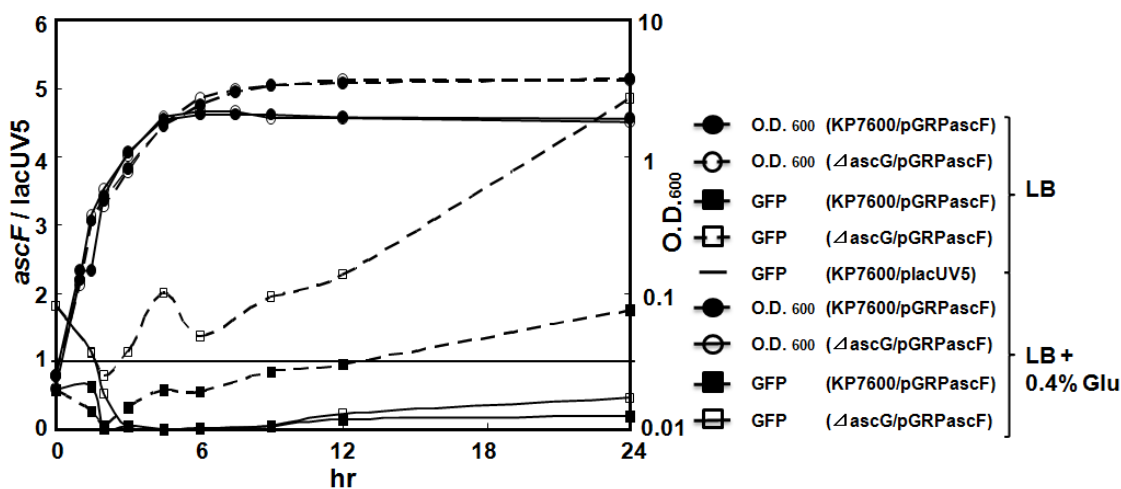


図 18 *ascF*プロモーター活性の測定結果

実線に●は LB 培地での野生株の増殖曲線、実線に○は LB 培地での *ascG* 変異株の増殖曲線

実線に■は LB 培地での野生株の GFP、実線に□は LB 培地での *ascG* 変異株の GFP

実線はコントロールの lacUV5 の GFP

点線に●は LB 培地にグルコースを加えた時の野生株の増殖曲線、

点線に○は LB 培地にグルコースを加えた時の *ascG* 変異株の増殖曲線

点線に■は LB 培地にグルコースを加えた時の野生株の GFP

点線に□は LB 培地にグルコースを加えた時の *ascG* 変異株の GFP

4-7. Primer extension of *ascF*

*ascF*の転写開始点はこれまで *ascF*の開始コドンから-94の位置に推定されていたが、それはneural network program というものを用いたものだった(O'Neill, 1991; Hall *et al*, 1992)。そこで、実験的に *ascF*の転写開始点を同定するために Primer extension を行った(図 19)。その結果、*ascG*変異株において転写産物が確認でき、転写開始点を調べたところこれまでに推測されている箇所とは若干違っていた。その転写開始点を重なるように AscG の結合領域があることより、AscG は *ascFB* オペロンを抑制していることが示唆された。しかし、その領域には CRP も結合することが今回の実験により明らかとなっている。一般的に、転写開始点と転写因子の結合領域が重なっている場合、RNA ポリメラーゼの結合を阻害するため、それらは抑制化因子として機能することが知られている。今回の場合は、AscG は転写開始点がある site 2 の結合の方が強い。一方 CRP はさらに上流にある site 1 の結合が強い。このことより、今回の条件では CRP は site 1 の方にしか結合しておらず、そのため *ascFB*を活性化していたのではないかということが示唆される。

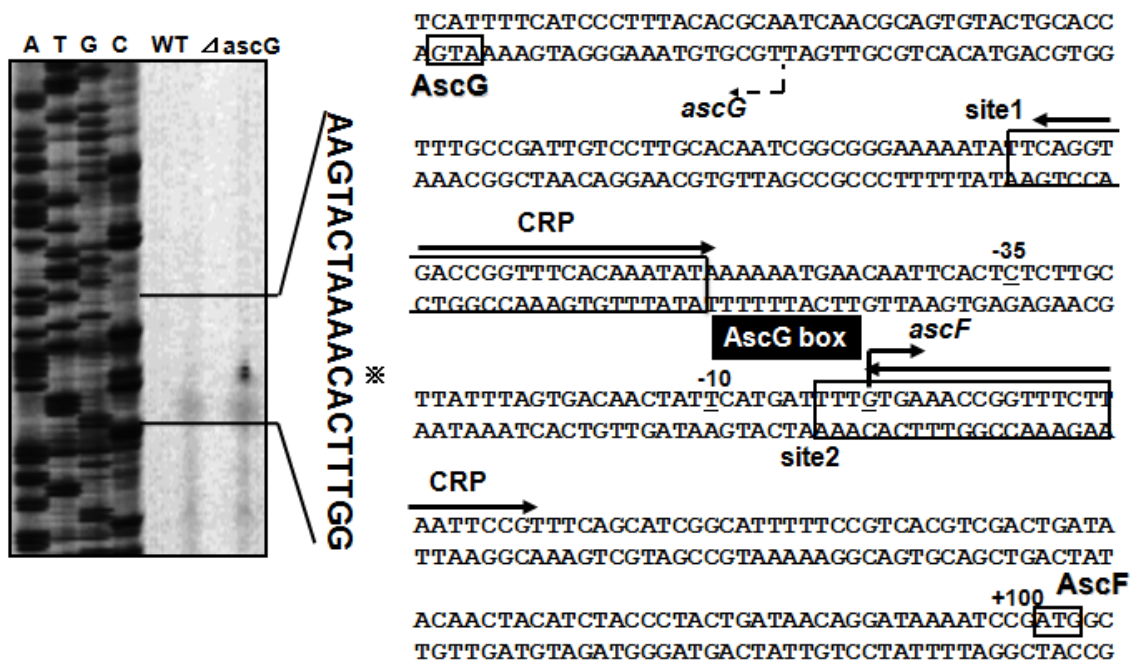


図 19 *ascF*の転写開始点の同定

実線の折れた矢印は転写開始点、 -10, -35 は推定のプロモーター部位を示す。

4-8. Northern blotting

Promoter assay ではプロモーターの発現が弱く、AscG の影響を確認できなかったものがあるので、次に Northern blotting を用いて直接 mRNA の量を測定することにした (図 21)。用いたサンプル RNA は O.D.₆₀₀ が 0.6 の時の RNA を用いた。また、LB 培地以外の条件として、最小培地(M9+glucose)を用いた。その結果 LB 培地での培養条件において、*ascF*, *ascB* は Promoter assay でも確認できた通り野生株ではほとんど発現を確認することができなかったが、*ascG* 変異株では強い発現を確認することができた。また M9 培地ではやはりグルコースが存在するため、野生株でも *ascG* 変異株でも発現を確認することはできなかった。

一方 Promoter assay で活性が検出できなかった *prpR* プロモーターに関しては、感度の高い Northern blot 解析では、mRNA が検出できた。LB 培地においては、野生株よりも *ascG* 変異株の方が *prpR* mRNA レベルが高かった (図 20)。また M9 培地でも、*ascG* 変異株においてのみ、若干の発現を確認することができた。このことより AscG が *prpR* に対して抑制化因子として機能していることが示唆され、CRP が活性化因子として機能していることが示唆された。なお、*prpBCDE* オペロンの最初の遺伝子 *prpB* と最後の遺伝子 *prpE* のプローブを用いた結果を比較すると、*prpB* mRNA は *ascG* 変異株で少量検出できたが、*prpE* mRNA は今回の条件では全く確認することができなかった。*prpBCDE* オペロンの転写は、プロピオン酸が存在する時に、PrpR が活性化因子として、転写が亢進することが知られている (Lee *et al*, 2005)。今回、AscG が *prpR* の転写を抑制する、AscG-PrpR の転写カスケードが判明したので、*ascG* 変異株では PrpR が増産され、*prpBCDE* オペロンの転写上昇が期待されたが、PrpR のインデューサーが存在しないので、転写亢進が認められなかったと推測される。

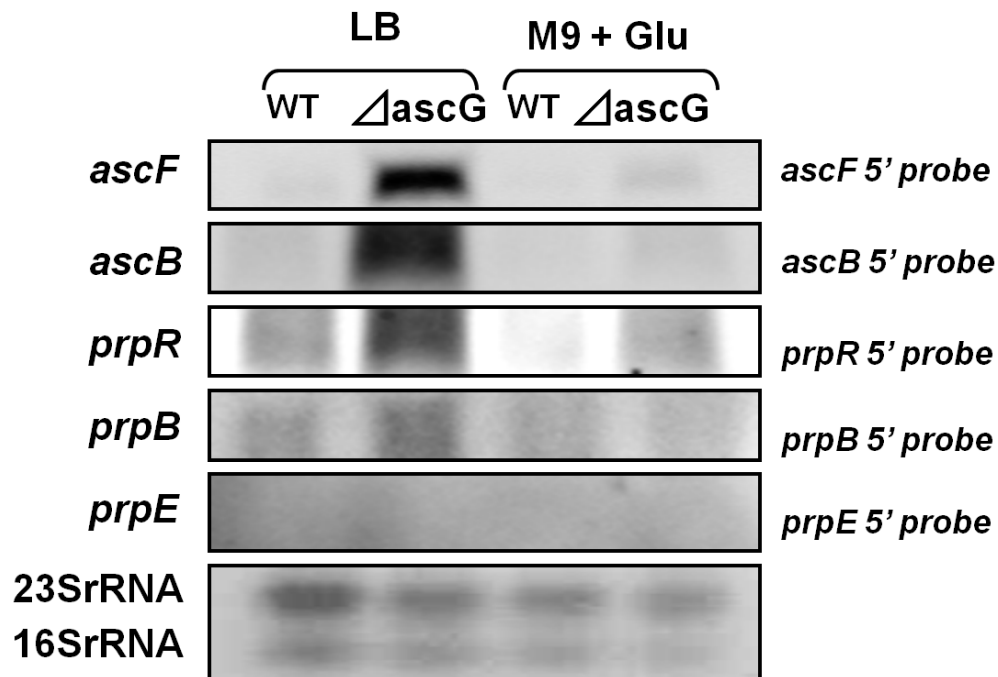


図 20 Northern blotting の結果

プローブは *ascF*、*ascB*、*prpR*、*prpB*、*prpE* 5つ全て 5'側に設計し、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 RNA maker で確認をした。

4-9. Phenotype microarray

Promoter assay と Northern blotting によって AscG が *asc* オペロン、*prp* オペロンの抑制化因子であることが示唆された。しかし野生株では *asc* プロモーター、*prp* プロモーター活性はほとんど見られなかった。つまり、通常の培養条件ではこれらプロモーターは作動していない可能性がある。AscG による抑制が解除される条件を調べるために Phenotype microarray を行った(図 21)。図の緑色が野生株の成長を示し、赤色が変異株の成長を示し、両者が同じように増殖した場合は、黄色い表示となる。

糖の代謝に注目して研究を進めてきたため、1~4 のプレートを用いることにした。いくつかのサンプルにおいて野生株と *ascG* 変異株で成育に差を見ることができた。しかし、差が認められた物質を個別に詳細に調べたが再現性をとることができなかった。つまり、AscG の抑制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可能性があり、他の条件を検討する必要があることが推測された。

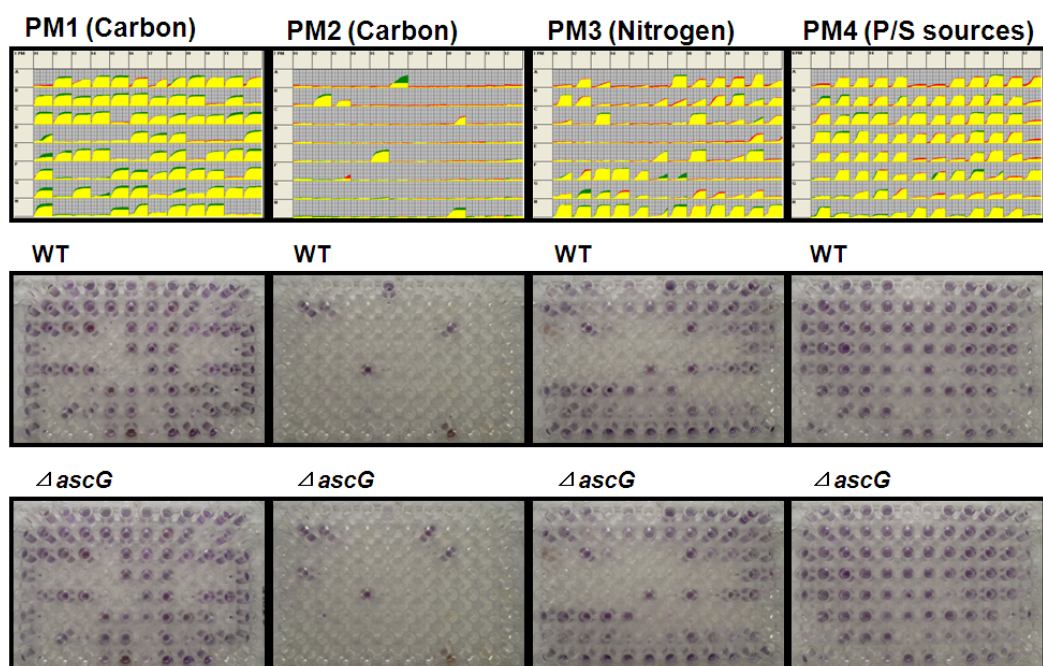


図 21 Phenotype microarray の結果

WT は野生株を示し、 $\Delta ascG$ は *ascG* 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)

第 5 章：結言

本研究において転写因子 AscG が 5'-GAAACC-GGTTTC-3' という 12 塩基からなる回文配列を認識し、*ascFB* オペロンの上流、*prpR* の上流に結合し、それらの発現を抑制していることを明らかとした。また、これらの遺伝子上流には CRP が結合することが推測されていた。そこで確認したところ、これまでに報告されている CRP の結合認識配列 5'-TGTGA-N₆-TCACA-3' を含むそれぞれの遺伝子上流領域に結合し、CRP はこれらの遺伝子の発現を活性化していることを明らかとした。ここで注目すべき点として、*ascFB* のプロモーター領域で AscG と CRP の二カ所の結合領域が重なっていた。そしてそれぞれの結合力は AscG では site2 の方が強く、CRP では site1 の方が強かった。そこで AscG と CRP の競合実験を行ったところ、興味深いことにどちらか一方の結合が強いというわけではなく、どちらか一方が多量に存在した場合、例えもう一方が結合していたとしてもその結合を外して結合するといった結果が得られた。このことから大腸菌体内において、普段はそれぞれが一つずつ結合しているが、ある環境・刺激を認識してどちらかが多量に生産された場合のみ *ascFB* の転写が活性化・抑制化されていることが示唆された。

次に AscG の生理的な意味を考えてみる。AscF は PTS の一つでアルブチン、サリシン、セロビオースを取り込む。アルブチンはコケモモや梨、ウワウルシなどの植物に含まれている天然型フェノール性配糖体、サリシンはヤナギの樹皮で産生する非炎症性の配糖体、セロビースはセルロースを分解したときに生じる。一方 AscG の二次的支配下遺伝子にあたる PrpBCDE はプロピオン酸をピルビン酸とコハク酸へと代謝する酵素群である。プロピオン酸は哺乳類の大腸において、細菌が食物の中のセルロースやヘミセルロースを嫌気発酵することにより生成し、植食性動物の体内では重要なエネルギー源となっている。以上より、AscG は植物に関連した物質の調節に関わっている転写因子であることが示唆された。

また、アルブチン-6P、サリシン-6P、セロビオース-6P は AscB によって β -D-グルコース-6P へと分解される。この β -D-グルコース-6P は細胞化学において中心的な物質であるため、その後さまざまな経路へと利用される。まずは解糖系(glycolytic pathway) またはペントースリン酸系路(pentosephosphate cycle)へと代謝される。この解糖系はグルコースに含まれる高い結合エネルギーを生物が使いやすい形に変換していくための代謝過程であり、ほとんど全ての生物が解糖系を持っているほど重要な代謝経路である。その終着物質としてピルビン酸がある。一方、PrpBCDE のプロピオン酸代謝も終着物質がピルビン酸である。ピルビン酸は TCA 回路(TCA cycle)などへ利用され、エネルギー源とされる。以上のことより、AscG は植物に関連する物質の取り込み、または代謝に関する遺伝子群を調節することで、栄養源を獲得し生存しているのではないかと推測された。これまでの結果をまとめたものが図 22 である。

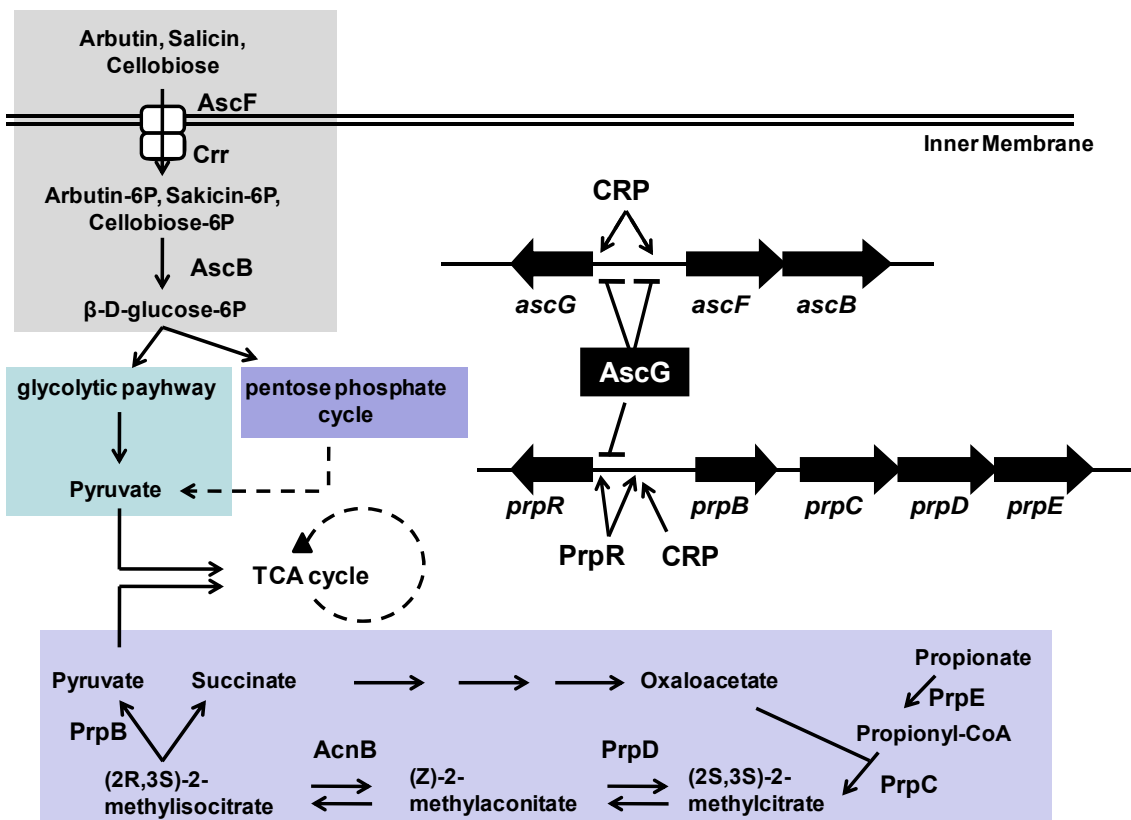


図 22 今回の実験結果のまとめ

しかし今回の結果において、野生株で *ascFB* は発現していない。おそらく何らかの刺激を受けた時にだけ AscG の抑制が解除され、AscFB が発現することが推測される。エフェクターの探索として Phenotype microarray を行ったが、今回の条件では見つけることができなかった。しかし AscG と CRP が制御する遺伝子が重なっている点に注目してみると、CRP は糖代謝に関わる遺伝子群を制御していることから、AscG のエフェクターは糖に関連した物質であると考えている。今後はエフェクターの探索を行い、AscG のさらなる生理的な意義を見出していきたい。

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.

Brock M, Maerker C, Schütz A, Völker U, Buckel W. (2002) Oxidation of propionate to pyruvate in *Escherichia coli*. Involvement of methylcitrate dehydratase and aconitase. *Eur J Biochem.* Dec;269(24):6184-94.

Emma C. LAW, Nigel J. SAVERY and Stephen J. W. BUSBY. (1999) Interactions between the *Escherichia coli* cAMP receptor protein and the Cterminal domain of the α subunit of RNA polymerase at Class I promoters. *Biochem. J.* 337, 415±423

Grainger DC, Hurd D, Harrison M, Holdstock J, Busby SJ. (2005) Studies of the distribution of *Escherichia coli* cAMP-receptor protein and RNA polymerase along the *E. coli* chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 6;102(49):17693-8.

Hall BG, Xu L. (1992) Nucleotide sequence, function, activation, and evolution of the cryptic asc operon of *Escherichia coli* K12. *Mol Biol Evol.* 1992 Jul;9(4):688-706.

Hasegawa A, Ogasawara H, Kori A, Teramoto J, Ishihama A. (2008) The transcription regulator AllR senses both allantoin and glyoxylate and controls a set of genes for degradation and reutilization of purines. *Microbiology.* 154(Pt 11):3366-78.

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

Lee SK, Newman JD, Keasling JD. (2005) Catabolite repression of the propionate catabolic genes in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: evidence for involvement of the cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol.* 187(8):2793-800.

Lindemose S, Nielsen PE, Møllegaard NE. (2008) Dissecting direct and indirect readout of cAMP receptor protein DNA binding using an inosine and 2,6-diaminopurine in vitro selection system. *Nucleic Acids Res.* 36(14):4797-807.

Ogasawara H, Hasegawa A, Kanda E, Miki T, Yamamoto K, Ishihama A. (2007) Genomic SELEX search for target promoters under the control of the PhoQP-RstBA signal relay cascade. *J Bacteriol.* 189(13):4791-9.

Ogasawara H, Ishida Y, Yamada K, Yamamoto K, Ishihama A. (2007) PdhR (pyruvate dehydrogenase complex regulator) controls the respiratory electron transport system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 189(15):5534-41.

O'Neill MC. (1991) Training back-propagation neural networks to define and detect DNA-binding sites. *Nucleic Acids Res.* 25;19(2):313-8

Parker LL, Hall BG. (1988) A fourth *Escherichia coli* gene system with the potential to evolve beta-glucoside utilization. *Genetics.* 119(3):485-90

Seoh HK, Tai PC. (1999) Catabolic repression of *secB* expression is positively controlled by cyclic AMP (cAMP) receptor protein-cAMP complexes at the transcriptional level. *J Bacteriol.* 1999 Mar;181(6):1892-9

Shimada T, Fujita N, Maeda M, Ishihama A. (2005) Systematic search for the Cra-binding promoters using genomic SELEX system. *Genes Cells.*10(9):907-18.

Shimada T, Hirao K, Kori A, Yamamoto K, Ishihama A. (2007) RutR is the uracil/thymine-sensing master regulator of a set of genes for synthesis and degradation of pyrimidines. *Mol Microbiol.* 66(3):744-57.

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.

Umezawa Y, Shimada T, Kori A, Yamada K, Ishihama A. (2008) The uncharacterized transcription factor YdhM is the regulator of the *nemA* gene, encoding N-ethylmaleimide reductase. *J Bacteriol.* 190(17):5890-7.

Yamamoto K, Ogasawara H, Fujita N, Utsumi R, Ishihama A. (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(2):423-38.

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生命科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、および Northern blotting における指導を賜った法政大学工学部島田友裕博士、AscG 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寺本潤博士、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内の皆様に感謝申し上げます。