

プロモーター特異的転写因子(PS-TF)探索法の開発と大腸菌細胞分裂制御因子 SdiA 遺伝子調節転写因子の探索

島田, 佳織 / SHIMADA, Kaori

(発行年 / Year)

2013-03-24

(学位授与年月日 / Date of Granted)

2013-03-24

(学位名 / Degree Name)

修士(理工学)

(学位授与機関 / Degree Grantor)

法政大学 (Hosei University)

2012 年度 修士論文

プロモーター特異的転写因子 (PS-TF) 探索法の開発と
大腸菌細胞分裂制御因子 SdiA 遺伝子調節転写因子の探索

Promoter-Specific Transcription Factor (PS-TF) Screening
for Regulators of the *sdiA* Gene that Controls
Cell Division and Quorum Sensing

指導教員 石浜 明 教授
 山本 兼由 准教授

法政大学大学院工学研究科生命機能学専攻 修士課程 2 年

分子生物学・ゲノム生物学的研究室

学籍番号 11R7109

島田 佳織

目次	1
略語	3
緒言	4

第一章：細胞分裂制御因子 SdiA の感知 QS シグナルの探索と標的遺伝子群の探索

1. 序論	6
2. 実験材料・実験方法	
2-1 合成 AHL 類似体コレクション	6
2-2 菌株・培養	6
2-3 プラスミド	7
2-4 SdiA 蛋白質の精製	7
2-5 SdiA 結合配列の Genomic SELEX Screening	7
2-6 SdiA-DNA 複合体ゲルシフトアッセイ	7
2-7 Northern blot 解析	7
3. 結果	
3-1 SdiA の機能に影響する effector の探索	8
3-2 Genomic SELEX 法を用いた DNA 上 SdiA 結合位置の同定と Effector の影響	9
3-3 SdiA の DNA 親和性に対する HSL 類似体の影響 <i>in vitro</i> SELEX-chip 解析	13
3-4 シグナルにより変動する SdiA 制御機能 Northern blot 解析	14
4. 考察	15

第二章 プロモーター特異的転写因子(PS-TF)探索法の開発と大腸菌細胞分裂制御因子 SdiA 遺伝子調節転写因子の探索

1. 序論	17
2. 実験材料・実験方法	
2-1 菌株・培養	18
2-2 プラスミド	19
2-3 精製転写因子	19
2-4 PS-TF Screening・濃度依存結合の確認	19
2-5 転写因子結合領域の同定	20
2-6 β -galactosidase activity assay	20
2-7 Luciferase reporter assay	20
2-8 Western blot 解析	21
2-9 Northern blot 解析	21
3. 結果	
3-1 <i>sdiA</i> プロモーターを認識結合する転写因子群の網羅的探索	21

3-2	転写因子濃度に依存した <i>sdiA</i> プロモーターへの結合	・ ・ ・ ・ ・ 23
3-3	転写因子の <i>sdiA</i> プロモーター上の結合領域の同定	・ ・ ・ ・ ・ 23
3-4	細胞内での転写因子の <i>sdiA</i> プロモーター制御の解析	・ ・ ・ ・ ・ 24
3-5	転写因子発現レベルの解析	・ ・ ・ ・ ・ 26
3-6	<i>In vivo sdiA</i> プロモーター活性制御	・ ・ ・ ・ ・ 26
3-7	転写因子発現による相補	・ ・ ・ ・ ・ 27
3-8	転写因子欠損による <i>sdiA</i> mRNA 量の変化	・ ・ ・ ・ ・ 26
3-9	環境変化による <i>sdiA</i> mRNA レベルの違い	・ ・ ・ ・ ・ 28
4.	考察	・ ・ ・ ・ ・ 30

	謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 31
	補足データ	・ ・ ・ ・ ・ 32
	引用文献	・ ・ ・ ・ ・ 37

略語

Amp	ampicillin
APS	ammonium peroxodisulfate
ATP	adenosine triphosphate
bp	base pair
DIG	digoxigenin
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleoside triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FITC	fluorescein-4-isothiocyanate
Glu	Glucose
LB	Luria-Bertani
O.D.	optical density
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
RFP	red fluorescent protein
RNA	ribonucleic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
Tris	tris(hydroxymethyl) amino methane

緒言

大腸菌ゲノムには約 4500 の遺伝子が存在し、環境変化に応じて必要な遺伝子が発現し細胞の環境適応が起こる。遺伝子の転写は RNA ポリメラーゼによって進行する。RNA 合成機能を備えた RNA ポリメラーゼ・コア酵素は、2 つの α サブユニットと、 β 、 β' 、 ω サブユニットより構成されるが、プロモーターからの転写には、 σ サブユニットが必要である。大腸菌は 7 種類の σ 因子をもち、7 種類の RNA ポリメラーゼホロ酵素が形成される。ホロ酵素の遺伝子選択機能は、さらに転写因子で制御されるが、大腸菌には、およそ 300 種類の転写因子の存在が知られている (Fig. 1) (Ishihama, 2010; 2012)。コア酵素は一細胞中に 2000 分子と遺伝子数 4,500 より少なく、ゲノム遺伝子間での RNA ポリメラーゼの選択的分配は、7 種類の σ 因子と 300 種類の転写因子の組み合わせにより決まる。大腸菌に存在する 300 種類の転写因子のうち 100 種類は機能が明らかとなっておらず、大腸菌の遺伝子発現の全体像を理解する上で全転写因子の機能を明らかにすることは不可欠である。

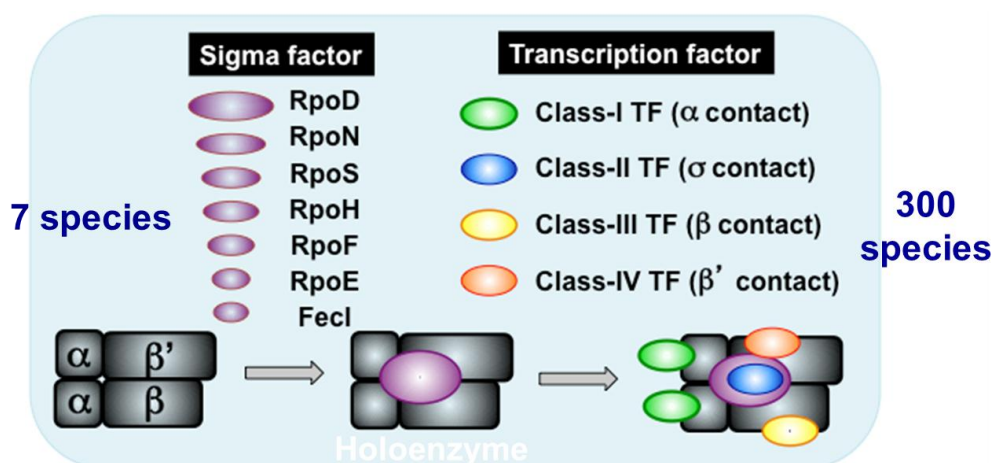


Fig. 1. 大腸菌 RNA ポリメラーゼの機能特異性分化

全転写因子の制御対象遺伝子の同定と制御機能解明の一環として、本研究では細菌のクオラムセンシング (QS: Quorum sensing) に関連する転写因子に注目した。

細菌は、常に外界の環境変化に適応しながら生育している。この環境変化の一つに周囲の細菌密度の変化がある。細菌はこの変化をオートインデューサー (AI: Autoinducer) と呼ばれる特定の低分子化合物 (シグナル) を介した情報伝達機構により感知していると考えられている (Fuqua et al., 1996)。この細菌間情報伝達機構は QS と呼ばれ、同種細菌間、異種細菌間、宿主-細菌間の 3 つに分類され、それぞれで交わされるシグナルも異なる。同種細菌間 QS 機構のシグナルは AI-1 と呼ばれ、多くのグラム陰性菌では AHL (acyl-homoserine lactone) を使用している。多くのグラム陰性菌にはそれぞれ AHL 合成酵素が存在し、細菌種により側鎖の長さや修飾が異なる AHL を合成し分泌している。グラム陰性菌グラム陽性菌に共通し異種細菌間での QS 機構では AI-2 (DPD)、宿主-細菌間では AI-3 と呼ばれるエ

ピネフリンなどのホルモンが QS シグナルとして同定されてきた (Fuqua *et al.*, 1996; Bassler, 2002; Sprandio *et al.*, 2003)。

大腸菌転写因子 SdiA は、細胞隔壁形成因子 *ftsQAZ* の発現制御因子であることが示唆されてきた (Wang *et al.*, 1991)。SdiA は、AHL を感知する LuxR レスポンスレギュレーター のホモログであることから、大腸菌の QS を担うレスポンスレギュレーター の可能性が示唆された。ところが、大腸菌には AHL の合成酵素である LuxI family のタンパク質が保存されていない。つまり、本来同種細菌間で交わされるシグナル AHL が合成できないにも関わらず、AHL を感知する機構のみ存在している事になる (Michael *et al.*, 2001)。SdiA は他細菌の合成する AHL など数種類の AHL を感知できる事が示唆され、環境中の異種細菌の感知に関わっている可能性が示唆されている (Hughes *et al.*, 2010)。こうした背景で、大腸菌 SdiA は細胞隔壁形成制御に加えて、バイオフィーム形成、病原性発現、細胞間交信など、多様な機能が注目されるようになった。しかし、SdiA の大腸菌における機能の実態は未だ明らかではない。

私は、SdiA の機能解明の一步として、SdiA が感知する AHL 種の解明を目的に、合成 AHL 類似体 500 種を用いた effector 探索と、Genomic SELEX 法を用いた支配下遺伝子の探索を行ってきた。SdiA が感知するシグナル物質が数種類同定できたことで、それらの存在下で Genomic SELEX を行ってところ、effector 種に応じて SdiA が認識する標的遺伝子が異なることが判明し、転写因子が effector に応じて制御標的が変化する、新たな可能性が示唆された。第一章では SdiA の転写因子としての機能解析についてまとめる。

SdiA の機能解析が進む一方で、SdiA の機能全体像が明らかとならない理由として、SdiA 自体の発現が明らかでないことが問題視される。SdiA に関するこれまでの研究は過剰発現プラスミドを用いたものが多く、ゲノムから発現した SdiA の機能を示した研究は数少ない。大腸菌 SdiA は 4 つの転写開始地点を持ち、翻訳開始地点下流に、mRNA 結合蛋白質 CsrA の結合サイトが存在する事がわかっている (Yaknin *et al.*, 2011)。しかし、その他の SdiA 発現制御に関する情報は無い。SdiA の機能解明の為に SdiA 自体の発現条件を掴むことは重要課題であると考え、第二章では SdiA の発現制御機構に関して行った解析結果をまとめる。

第一章：細胞分裂制御因子 SdiA の感知 QS シグナルの探索と標的遺伝子群の探索

1：序論

我々はこれまでに、機能が明らかとなっていない転写因子に注目し、当研究室で開発した Genomic SELEX 法を用いて支配下遺伝子の網羅的探索を行い、遺伝子制御機能の解明を目指してきた。Genomic SELEX 法は 200 bp 程度に超音波破碎したゲノム DNA に His-tag で精製した転写因子を *in vitro* で結合させ、Ni-NTA と His-tag の親和性で転写因子-DNA 複合体を回収し、シーケンス (SELEX-clos) またはタイリングアレイ (SELEX-chip) により結合配列を同定する方法である。これにより、転写因子の支配下遺伝子の同定が可能となる (Shimada *et al.*, 2011)。

本研究ではまず、精製した SdiA を用いた *in vitro* の実験で SdiA の感知シグナル分子を同定した。約 500 種の合成 AHL を用い、精製 SdiA の *ftsQ* プロモーター親和性に影響があるものを 3 つ同定した。これらのシグナルは Genomic SELEX screening system (Shimada *et al.*, 2005) により SdiA が結合するゲノム上の配列に影響があるか解析した。解析の結果シグナルにより SdiA の制御遺伝子に違いがあることが分かった。これら結果を統合し、SdiA は多様なシグナルを感知し、シグナルにより制御遺伝子を変える、大腸菌で未だ同定されていない極めて稀な転写因子であると提案する。

2：方法・試薬

2-1 合成 AHL 類似体コレクション

500 種の AHL 類似体は Igarashi and Suga, 2011 に従って合成され、本研究ではこのコレクションから 244 種の AHL 類似体を使用した。

2-2 菌株・培養

SdiA の精製には *Escherichia coli* BL21(DE3) [F⁻ *ompT* *hsd*(rB⁻ mB⁻) *dcm* *gal* λ(DE3)] (Studier and Moffatt, 1986) を用いた。SELEX 断片のクローニングには *E. coli* DH5α [F⁺ *lacZ* M15 *recA* *endA* *hsdR* *phoA* *supE44* *thi* *gyrA* *relA*] を用いた。*E. coli* K-12 BW25113 [*lacI*^q *rrnB* *lacZ* *hsdR* *araBAD* *rhaBAD*] の *sdiA* 欠損株 JW1901 は Keio コレクション (Baba *et al.*, 2003) を用いた。細胞は LB 培地で培養した。抗生物質は 100 ng/ml アンピシリンと 50 ng/ml カナマイシンを培地に加えた。

2-3 プラスミド

SdiA 精製のために SdiA 発現プラスミドを作成した。*sdiA* コーディング領域は *NdeI* と *NotI* 制限酵素サイトを付加したプライマーにより PCR により大腸菌 K-12 W3350 株ゲノム DNA を鋳型に伸長し、pET21a(+) (Novagen) に組み込んだ。

2-4 SdiA 蛋白質の精製

pSdiA 形質転換体大腸菌 BL21(DE3)株で His-tag 付加 SdiA を発現させアフィニティー精製を行った (Yamamoto *et al.*, 2005; Shimada *et al.*, 2005)。

2-5 SdiA 結合配列の Genomic SELEX Screening

まず、超音波破碎し精製した大腸菌 K-12 W3110 株のゲノム DNA をマルチコピープラスミド pBR322 にクローンしゲノムライブラリーを作成した。そして、SELEX screening ではこのライブラリーから PCR により DNA 断片を作成した。5 pmol の DNA 断片と 10 pmol の His-tagged SdiA を binding buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8 at 4°C, 3 mM magnesium acetate, 150 mM NaCl, and 1.25 mg/ml bovine serum albumin)中で混合し 37°Cで 30 分加温した。その後、Ni-NTA カラムに通し、10 mM imidazole で free DNA を流出し、200 mM imidazole で DNA-SdiA 複合体を回収した。回収した DNA 断片は SELEX-clos 法または SELEX-chip 法によりシーケンスを確認した (Shimada *et al.*, 2011)。

SELEX-clos (cloning-sequencing)解析は PCR により濃縮した SdiA 複合体形成した断片を pT7 Blue-T vector(Novagen)にクローンし、大腸菌 DH5α 株に導入し、T7 primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')を用いてシーケンス解析をした(Shimada *et al.*, 2005; 2011)。

SELEX-chip 解析は、PCR で増幅した SELEX-DNA 断片と DNA ライブラリーを Cy3 と Cy5 で標識し、105 bp 間隔で設計された 43,450 種 60 b 長の DNA プローブの DNA マイクロアレイ (Oxford Gene Technology, Oxford, UK)にハイブリダイズさせ解析した (Shimada *et al.*, 2008)。解析結果は、DNA ライブラリーの発光高度を差し引き正規化した後、Cy5/Cy3 比を測定し大腸菌ゲノムに沿って値をプロットした。

2-6 SdiA-DNA 複合体ゲルシフトアッセイ

標的プロモーター領域は、プライマー (5'-FITC-labeled Lac30R-FITC と 551SQ-F) を用いて PCR により伸長し、プローブを作成した。DNA の FITC 標識はポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認した (Ogasawara *et al.*, 2007a; 2007b)。

2-7 Northern blot 解析

LB 培地で OD₆₀₀=0.7-0.8 まで培養した後、effector を添加し 3 時間培養し RNA を採取した。Northern blot 解析では 1.5%アガロースゲルで分画した後メンブレンに転写し ORF 下流 500 bp 程度のプローブを用いて目的 mRNA を検出した。

3: 結果

3-1 SdiA が感知するシグナル物質の探索

転写因子 SdiA が感知する HSL 類似物質を同定するため、Igarashi and Suga (2011) により合成された HSL 類似体ライブラリーを使用し、SdiA に結合する物質を探索した。今回は、180 種類の 3oxoC12 AHL と 180 種類の C4 AHL の全 360 種類の AHL を用いた。SdiA に影響する物質を *in vitro* で探索するために、既に SdiA が結合することが知られている *ftsQAZ* プロモーターへの親和性への影響を調べた。精製した SdiA と蛍光標識した *ftsQ* プロモーター-300bp を混合し、AHL を加えた後 37°C で 15 分反応させた。反応後は 5% PAGE で DNA - SdiA の複合体を泳動分離した。360 種類の AHL を添加した結果、A4-3OC12 (以後 A4 と表記する)、F12S-C12 (F12)、K12-C12 (K12) (Fig. 2) の添加により SdiA の *ftsQ* 親和性に影響がみられた。

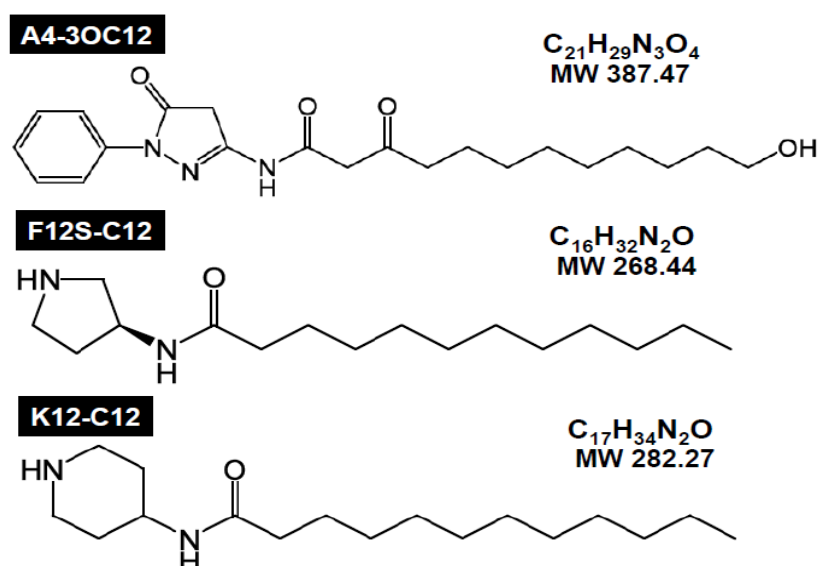


Fig. 2. 合成 AHL 類似体の構造

ゲルシフトアッセイの結果から、SdiA-*ftsQ* プロモーター複合体 (SdiA-DNA complex-1) は A4 を添加すると複合体バンドが同じ位置で濃くなり、SdiA の DNA 結合活性が増強した。一方、F12 と K12 を添加した場合、SdiA-*ftsQ* プロモーター複合体は effector 非添加時と異なる位置に、複合体バンドがみられた (Fig. 3A-C)。また、effector 非添加状態、または、A4 の添加状態の complex-1 に、F12 や K12 をさらに添加すると、ゲルシフトでの複合体バンドは complex-2 の位置に変化した (Fig. 3D-E)。SdiA に結合していた A4 が、F12 や K12 で置換されたと判断した。F12 や K12 が結合した complex-2 に、過剰の A4 を添加した時も、complex-1 に移行し、effector の種類に応じて、SdiA-DNA の結合様式が変換することが示唆された。これら 3 種類の AHL 類似体が SdiA の DNA 結合特異性に

どのように影響しているか、Genomic SELEX スクリーニングで標的遺伝子群の探索を試みた。

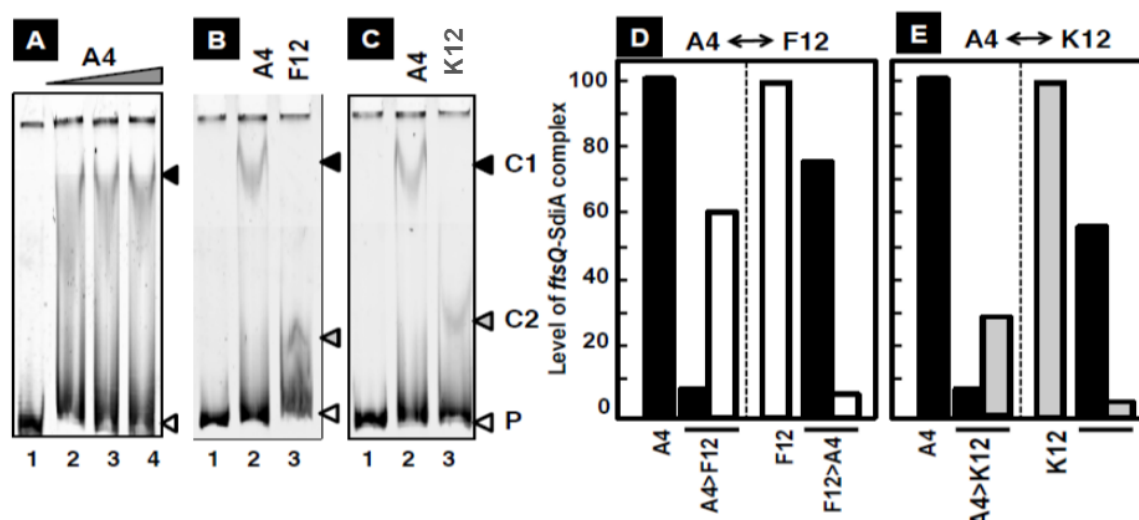


Fig. 3. SdiA-ftsQ 複合体に影響する合成 AHL 類似体

3-2 Genomic SELEX 法を用いた SdiA 認識結合 DNA 配列の同定

Genomic SELEX 法は、大腸菌転写因子の制御標的遺伝子を同定する目的のために当研究室で開発された実験システムで、純化転写因子に結合するゲノム DNA を単離し、得られた DNA の塩基配列を決めることで、転写因子のゲノム上の結合部位を同定し、支配下遺伝子群を予測するものである (Shimada *et al.*, 2005)。大腸菌 SdiA の Genomic SELEX 法では、過去に RcdA 結合領域の同定で用いた 200-300 bp に超音波破碎した大腸菌ゲノム DNA 断片を使用した (Shimada *et al.*, 2011)。精製した His-tagged SdiA とその 2 倍から 4 倍濃度の大腸菌 DNA ゲノム断片を混合し、形成された His-SdiA-DNA 複合体は Ni-NTA との親和性で単離し、PAGE で確認した。Genomic SELEX の初めの段階では、SdiA-DNA 複合体は泳動でバンドとならずスメアの状態を検出される。しかし、数回 SELEX サイクルを繰り返す事で SdiA の結合親和性の強い DNA 断片のみが濃縮され泳動でバンドとして検出できるようになる。SdiA が結合した DNA 断片配列の同定のために、まず、SELEX-clos (cloning-sequencing)法で、個別にクローニングし、DNA 配列を分析した (Table 1)。

Table 1. SdiA-binding Sites Identified by SELEX-clos

Left gene	Genome position	SdiA site	Genome position	Right gene
<i>ybgD</i> <	753,217		753,607	< <i>gltA</i>
<i>minC</i> <	1,227,657		1,228,177	> <i>ycgJ</i>
<i>rnb</i> <	1,350,626	<i>yciW</i>	1,351,065	< <i>fabI</i>
<i>uvrY</i> <	1,997,496		1,997,955	> <i>yecF</i>
<i>ygeR</i> <	2,998,547		2,999,001	> <i>xdhA</i>
<i>envR</i> <	3,412,658		3,414,876	> <i>acrE</i>
<i>gspC</i> <	4,184,838		4,185,018	> <i>gspA</i>

SdiA 結合配列として同定された配列の殆どが遺伝子間領域に位置していたが、一つだけ、酸化還元酵素と考えられている *yciW* 遺伝子の ORF 上領域に位置していた (Table 1)。この結果から、SdiA は *ybgD* (絨毛上接着蛋白質)、*minC* (細胞分裂抑制因子)、*ycgJ* (予測蛋白質)、*uvrY* (Two-component system 転写因子)、*yecF* (予想蛋白質)、*ygeR* (細胞分裂制御因子)、*xdhA* (キサンチン脱水素酶)、*envR* (薬剤排出ポンプ遺伝子の制御因子)、*acrE* (薬剤排出ポンプ) や *gspC*、*gspA* (分泌系蛋白質) などを含む遺伝子が新たな SdiA の標的遺伝子として候補にあがった。今回上がった数少ない標的遺伝子の中に、二つの環境ストレス耐性遺伝子、UvrY/BarR-EnvR 二成分制御系の *uvrY* と *EnvR* が含まれていた。さらに、YgeR は細胞分裂に関与する転写因子であると予測されている。

SdiA がゲノム全体のどの位置に結合しているかを調べるために SELEX-chip 解析を行った。SELEX-chip 法は、Genomic SELEX screening で得られた転写因子結合 DNA 混合物を、ゲノム DNA 断片を配列したチップを利用して、一挙に結合部位を同定する方法である (Teramoto *et al.*, 2010; Shimada *et al.*, 2008; 2011)。SdiA の SELEX-chip では、Cy5 で標識した SELEX サンプルと Cy3 で標識した DNA ライブラリーを DNA タイリングマイクロアレイでハイブリダイズさせた。タイリングアレイのチップ上には 60 b の長さのプローブが 105 b ごとに並んでおり、SELEX 断片 300 bp は 2 つ以上隣接した領域にハイブリダイズする。従って、SELEX 試料が、隣接した 2 点でピークを示すことを指標に SdiA 認識結合部配列を同定した。大腸菌転写因子は、一般に、プロモーター周辺に結合し、転写を制御するので、SdiA 結合部位から、制御標的を予測した。SELEX サンプルを SELEX-clos、SELEX-chip 解析の両方を行い、共通して得られた配列を SdiA 結合配列として同定し、制御標的を推定した。

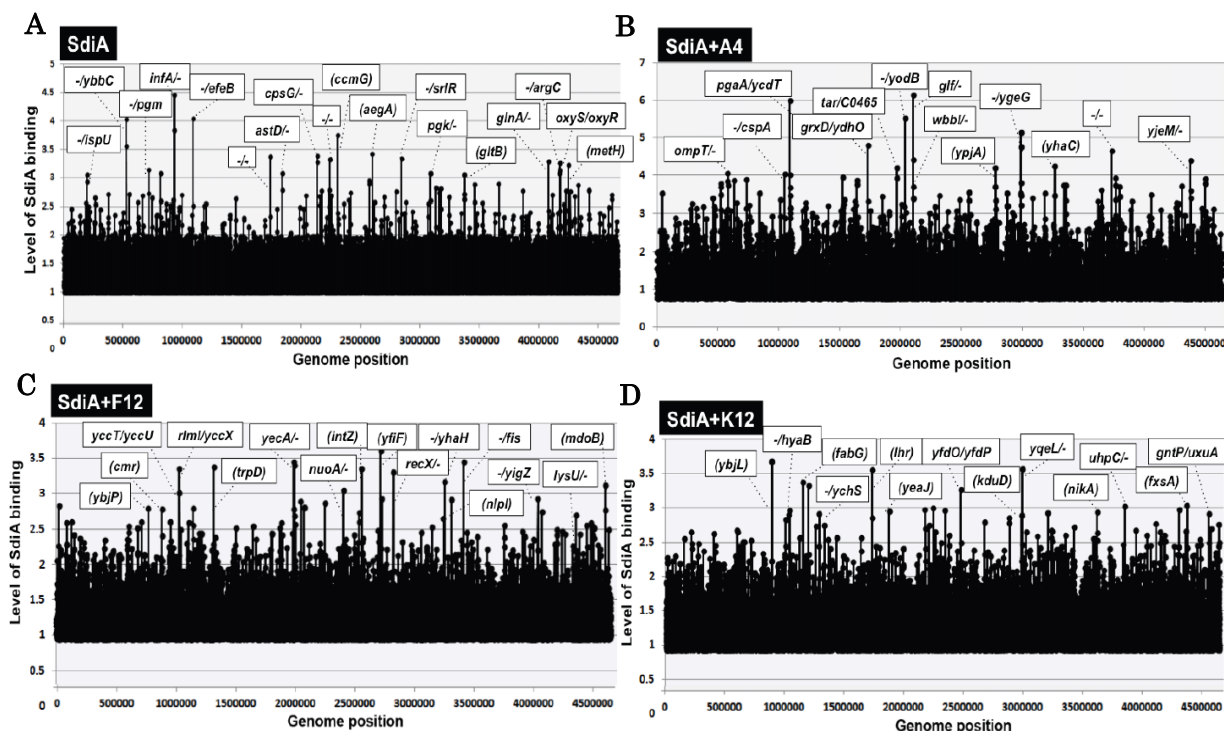


Fig. 4. SELEX-chip 法による SdiA のゲノム上結合部位の同定

まず、我々は SdiA に effector を添加せずに行った SELEX サンプルで SELEX-chip 解析を行った。解析の検出レベルは 3 以上に設定したところ、19 のピークを得ることができ、そのうち、15 つが遺伝子間領域で、4 つが ORF 上に位置していた (Fig. 4A)。中には SELEX-clos で同定した遺伝子も含まれていた (Table 2A)。今回の結果には炭素や窒素代謝系の *pgm* (ホスホグルコムターゼ) や *cpsG* (ホスホマンノムターゼ)、*pgk* (ホスホグリセリドキナーゼ)、*glnA* (グルタミンシンターゼ)、*argC* (*N*-アセチルグルタミルホスフェイリダクターゼ) などの酵素が多く含まれていた。また、SdiA は SrlR(GutR) と OxyS/OxyR の二つの転写因子を制御する事も示された。グルシトールオペロンのリプレッサーである GutR は同オペロンの活性因子である GutM とオペロンを形成し、グルシトールの代謝を制御している。OxyS/OxyR システムは細菌の酸化ストレスに重要な役割を果たす。続いて我々は、新しく同定した A4, F12, K12 の存在下での SdiA 結合位置の同定を試みた。

Table 2A
SdiA target list (SELEX-chip)

Function	Left		S		Right	Function
	<i>dxr</i>	>		>	<i>ispU</i>	undecaprenyl pyrophosphate synthase
	<i>rhsD</i>	>		>	<i>ybbC</i>	hypothetical protein
	<i>seqA</i>	>		>	<i>pgm</i>	phosphoglucomutase
	<i>bioB</i>	>		>	<i>bioF</i>	8-amino-7-oxononanoate synthase
translation initiation factor IF-1	<i>infA</i>	<		<	<i>aar</i>	
	<i>efeO</i>	>		>	<i>efeB</i>	deferrerochelate
acetylglutamic semialdehyde dehydrogenase	<i>astD</i>	<		<	<i>astA</i>	
phosphomannomutase	<i>cpsG</i>	<		<	<i>cpsB</i>	
	<i>dusC</i>	>		>	<i>yohJ</i>	conserved inner membrane protein
heme lyase	<i>ccmH</i>	<	<i>ccmG</i>	<	<i>ccmF</i>	
nucleotide-sugar hydrolase	<i>nudK</i>	<	<i>aegA</i>	>	<i>narQ</i>	NarQP TCS histidine kinase
	<i>gutM</i>	>		>	<i>srlR</i>	transcription factor
phosphoglycerate kinase	<i>pgk</i>	<		<	<i>epd</i>	
predicted Fe-S oxidoreductase	<i>yhcC</i>	<	<i>gltB</i>	<	<i>gltD</i>	
glutamine synthetase	<i>glnA</i>	<		<	<i>typA</i>	
	<i>argE</i>	>		>	<i>argC</i>	N-acetylglutamylphosphate reductase
oxidative stress regulator	<i>oxyS</i>	<		>	<i>oxyR</i>	transcription factor
IclR transcriptional repressor	<i>iclR</i>	<	<i>methH</i>	>	<i>yjbB</i>	predicted transporter

Table 2B
SdiA+A4-3-C12 target list (SELEX-chip)

Function	Left		S		Right	Function
OM protease VII	<i>ompT</i>	<		<	<i>envY</i>	
	<i>yiaG</i>	>		>	<i>cspA</i>	RNA chaperone
adhesin PGA exporter	<i>pgaA</i>	<	<i>yedT</i>	<	<i>insF</i>	
glutaredoxin-4	<i>grxD</i>	<		>	<i>ydhO</i>	putative lipoprotein
	<i>seqA</i>	>		>	<i>yodB</i>	phosphoglucomutase
β -1,6-galactofuranosyltransferase	<i>wbbI</i>	<		<	<i>rfa</i>	
UDP-galactopyranose mutase	<i>glf</i>	<		<	<i>rfaX</i>	
	<i>ypjF</i>	>	<i>ypjA</i>	<	<i>pinH</i>	
	<i>ygeF</i>	>		>	<i>ygeG</i>	predicted chaperon
	<i>yjeA</i>	>		>	<i>yjeM</i>	predicted transporter

Table 2C
SdiA+F12S-C12 target list (SELEX-chip)

Function	Left		S		Right	Function
	<i>ileS</i>	>		>	<i>lspA</i>	lipoprotein signal peptidase
arginine transporter	<i>artP</i>	<	<i>ybjP</i>	>	<i>ybjQ</i>	conserved protein
undecaprenyl-Pi phosphatase	<i>ybjG</i>	<	<i>cmr</i>	<	<i>ybjH</i>	
conserved protein	<i>yccT</i>	<		>	<i>yccU</i>	predicted CoA-binding protein
23S rRNA methyltransferase	<i>rlmI</i>	<		>	<i>yccX</i>	weak acylphosphatase
indole-3-glycerol phosphate synthase	<i>trpC</i>	<	<i>trpD</i>	<	<i>trpE</i>	
conserved protein	<i>yecA</i>	<		<	<i>leuZ</i>	
	<i>yeeS</i>	>		>	<i>yeeT</i>	prophage protein
predicted transporter subunit	<i>yecC</i>	<		<	<i>yecS</i>	
ubiquinone oxidoreductase	<i>nuoA</i>	<		<	<i>lrhA</i>	
	<i>intZ</i>	>		>	<i>yffL</i>	CPZ-55 prophage protein
	<i>eamB</i>	>	<i>yfiD</i>	>	<i>ung</i>	uracil-DNA glycosylase
inhibitor of RecA	<i>recX</i>	<	<i>recA</i>	<	<i>ygaD</i>	
	<i>yfiF</i>	>		>	<i>trxC</i>	reduced thioredoxin
	<i>yqiG</i>	>		>	<i>yhaH</i>	IM protein
	<i>dusB</i>	>		>	<i>fis</i>	nucleoid protein
prophage protein	<i>yigX</i>	<		>	<i>yigZ</i>	prophage protein
anti-RpoD sigma	<i>rsd</i>	<		>	<i>nudC</i>	NADH pyrophosphatase
Lys-tRNA synthase	<i>lysU</i>	<		<	<i>yjdL</i>	

Table 2D
SdiA+K12-C12 target list (SELEX-chip)

Function	Left		S		Right	Function
	<i>elfG</i>	>		>	<i>ycbU</i>	fimbrial-like adhesin
sRNA effector	<i>rybB</i>	<	<i>ybjL</i>	>	<i>ybjM</i>	predicted inner membrane protein
	<i>hyaA</i>	>		>	<i>hyaB</i>	hydrogenase-1
	<i>plsX</i>	>	<i>fabH</i>	>	<i>fabD</i>	malonylCoA transacylase
	<i>fabD</i>	>		>	<i>fabG</i>	3-oxo-acyl-[acyl-carrier-protein] reductase
	<i>icd</i>	>		>	<i>C0293</i>	sRNA
	<i>rnt</i>	>	<i>lhr</i>	<	<i>grxD</i>	
	<i>yeaI</i>	>	<i>yeaJ</i>	>	<i>yeaK</i>	conserved protein

3-3 HSL 結合 SdiA の DNA 認識結合配列の SELEX-chip 解析

HSL類似体により SdiA の制御標的遺伝子に違いがあるか調べるために、それぞれの HSL を添加して SELEX-chip 解析を行った。A4 を添加した結果、effector 非添加時とは異なる結果となった (Fig. 4B)。検出レベルを 4 に設定し解析を行った結果、2 つの ORF 上領域 *ypjA*, *yhaV* と、その他遺伝子間領域の計 12 の SdiA 結合領域を同定した (Table 2B)。ompT (OM プロテアーゼ VII)、pgaA (PGA トランスポーターOM 蛋白質)、tar (走化性受容体) などのストレス耐性膜蛋白質や、ydhO (リポ蛋白質)、ストレス耐性シャペロンとして、cspA (RNA シャペロン)、grxD (グルタレドキシシン 4) や ygeG (予想上シャペロン) などが含まれていた。

F12 の場合、検出レベル 3 で解析した結果、11 の SdiA 結合位置が同定された (Fig. 4C)。F12 を添加した結果も SdiA のみの場合 (Fig. 4A)、A4 を添加した場合 (Fig. 4B) と異なる結果となった。主な標的遺伝子は、エネルギー代謝に関与する遺伝子、nuoA (ユニキノンオキシドリダクターゼ) や rlmI (23S rRNA メチルトランスフェラーゼ) や、lysU (Lys-tRNA シンターゼ)、ゲノムの修復機能を持つ recX (RecA の抑制因子) や fis (核蛋白質) などであった。K12 添加の場合も effector 非添加時 (Fig. 4A)、A4 添加時 (Fig. 4B)、F12 添加時 (Fig. 4C) と異なる結果となった (Fig. 4D)。検出レベルを 3 に設定した時、8 つの SdiA 結合位置が同定され、第二グループとして 10 種の標的が得られた。そのうちの半分は ybjL, fabH, lhr, yeaJ, kduD, nikA, fxsA 遺伝子の ORF 上または遺伝子間領域に位置するものであり、遺伝子の下流に位置するものはなかった。hyaB (ヒドロゲナーゼ 1), uhpC (UhpBCA リン酸転移の G6P センサー) や gunP/uxuA (fructuronate transporter/mannonate hydrolase) などのエネルギー代謝に関連のある遺伝子であった。ycbU (繊毛様接着因子) や fabG (脂肪酸代謝酵素) などの膜の再利用に関連する遺伝子も含まれていた。

SdiA の標的遺伝子はリガンドの非存在下では炭素や窒素代謝が主であったのに対し、リガンド添加により膜の修復系など環境ストレスに応答する遺伝子へと標的を変えていた。Genomic SELEX による一連の解析から、SdiA はリガンドの種類により異なる標的遺伝子群を制御する可能性が示唆された。

3-4 シグナルにより変動する SdiA 制御機能： Northern blot 解析

SdiA のリガンドによる制御標的の違いを *in vivo* でも検証すべく Northern blot 解析で標的候補遺伝子の mRNA レベルを調べた。Genomic SELEX で同定した、各種リガンド結合 SdiA に特異的標的候補遺伝子の mRNA レベルを、野生株と *sdiA* 欠損株で、HSL 類似シグナル物質の有無で比較分析した。SdiA が、Indole を細胞間交信シグナルとして感知することを示唆する報告(Lee *et al.*, 2007)もあったので、併せて Indole の効果も解析した。Indole 効果を調べる目的では、大腸菌増殖後期に Indole で発現が誘導される *bhsA* の mRNA 発現量を確認した。*sdiA* 欠損株では *bhsA* 発現量が低下し、過去の事例と一致した。

Indole の効果も併せて解析する目的で、試みに、シグナル物質添加培養の増殖後期で全 RNA を調製し、Northern 解析を実施した。シグナル非存在下での標的遺伝子として *infA*、A4 存在下の標的遺伝子として *tar*、K12 存在下の標的遺伝子として *hyaB*、F12 存在下の標的遺伝子として *lysU* の発現量を調べた (Fig. 5)。多様なシグナルを感知すると仮定し全ての標的遺伝子で各シグナル存在下での mRNA 発現量の変化を調べたところ、SdiA が多様なシグナルを認識し多様な標的遺伝子を制御していることを示唆された。シグナル物質添加量、添加時期、試料調製時期を変えて、Northern 解析を継続している。

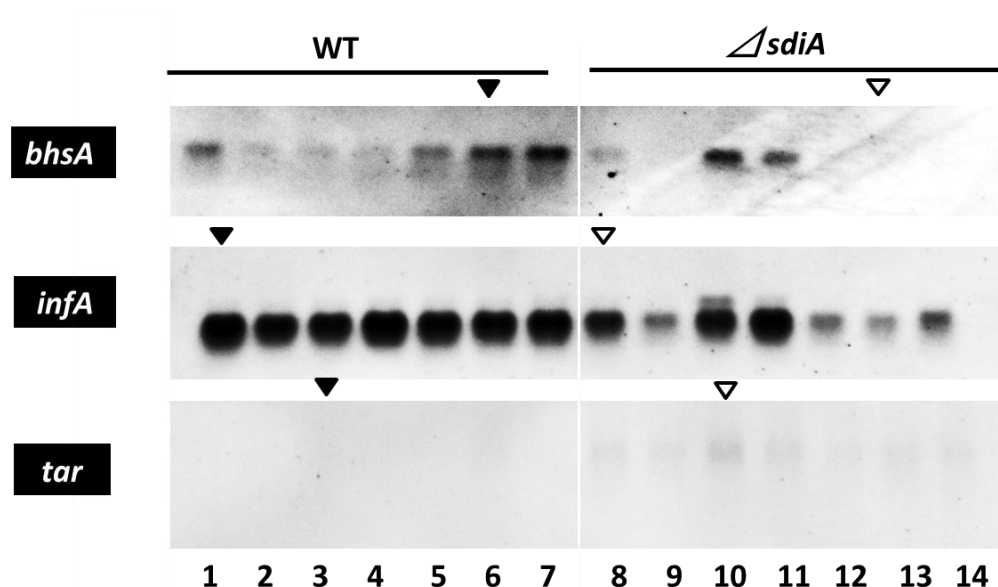


Fig. 5. Northern blot 解析：SdiA 標的遺伝子の mRNA 発現量の変化

Lane 1～7: 野生株; lane 8～14, *sdiA* 欠損株。培養条件：lane 1, 8, no signal; lane 2, 9, AI-1(3OC12); lane 3, 10, AI-1(A4-3OC12); lane 4, 11, AI-1(K12-C12); lane 5, 12, (F12-C12); lane 6, 13, Indole; lane 7, 14, AI-2。シグナル添加濃度: AHL, 0.01 mM; indole, 0.2 mM; A-2, 0.1 mM。

4: 考察

グラム陰性菌は同種細菌間の情報伝達に *N*-acyl homoserine lactone を利用する。

(Fuqua *et al.*, 1996)。LuxI ファミリー蛋白質は AHL を合成し、LuxR ファミリー蛋白質が AHL を感知する (Waters *et al.*, 2005)。しかし、大腸菌やサルモネラでは LuxR ホモログ蛋白質 SdiA は存在するにも関わらず、LuxI ホモログやそれに相応する AHL 合成酵素が存在しない (Ahmer, 2004)。SdiA (Suppressor of the cell division inhibitor) は細胞隔壁形成因子 *ftsQAZ* オペロンを転写制御する (Wang *et al.*, 1991; Garcia-Lara *et al.*, 1996; Sitnikov *et al.*, 1996)。本研究では、SdiA の機能に影響するエフェクターの同定と、それらの存在下での SdiA の転写制御機能の影響を調べた。

4-1. SdiA の機能に影響するエフェクターの同定

SdiA の研究初期、培地内の何らかの物質が SdiA の機能に影響している事が示唆されていた (Garcia-Lara *et al.*, 1996)。サルモネラでは、SdiA は他細菌により合成された AHLs を感知し (Michael *et al.*, 2001; Smith and Ahmer, 2003)、その結果、病原性プラスミドの *rck* (resistance to complement killing) オペロンや、機能未知の *srg* (SdiA-regulated gene) を活性化する (Ahmer *et al.*, 1998; Smith and Ahmer, 2003)。これらの研究結果から、大腸菌ではまだ知られていない他細菌により合成される AHL 様シグナルを感知すると考えられた。

グラム陰性菌の LuxR/LuxI ホモログは側鎖の長さや修飾などの異なる、様々な AHL をシグナルとして利用している。例えば、*Pseudomonas aeruginosa* は LuxR/LuxI と RasI/RhlR の二ペアのシステムを持っている。LuxI は *N*-(3-oxo-dodecanoyl)-L-homoserine lactone (oxo12) を合成し、LasR が認識する (Pearson *et al.*, 1994)。RasI は *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (C4) を合成し、RhlR が認識する (Pearson *et al.*, 1995; Pearson *et al.*, 1997)。LuxR-family 蛋白質が認識するシグナル分子の同定は、LuxR-family 蛋白質の支配下遺伝子の発現制御の変化を指標に行われている。実際に、Schaefer *et al.* (1996) は、化学合成された *N*-(3-oxohexanoyl)homoserine lactone で異なる長さのアシル基をもつ 25 種類のうち、*Vivrio fischeri* の生発光を最も誘導したものは *N*-3-oxododecanoyl-HSL (3OC12-HSL) であった。Passador *et al.* (1996) により、21 種類のアシル基が付加した L-homoserine lactone, L-homoserine thiolactone, lactam 類似体は、*Pseudomonas aeruginosa* でオートインデューサーとして働き、*in vivo* で LasR の標的遺伝子制御の影響と *in vitro* での LasR への結合が確認された。

SdiA は *in vivo* で AHL 類似体を認識する事がいくつか証明されている。大腸菌では *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) の添加により 6 つの遺伝子発現が増加し、9 つの遺伝子発現が減少した。これは 3-oxo-*N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (3-oxo-C6-HSL) でも同様の結果が得られた (Van Houdt *et al.*, 2006)。AHL に依存したこれらプロモーターの制御は *sdiA* の欠失により証明された。大腸菌 SdiA 変異体を用いた解析により、SdiA

は他細菌の合成したAHLと大腸菌自身のシグナルと考えられているindoleが異なる認識部位に結合にすることが示唆された (Lee *et al.*, 2009)。大腸菌 SdiA の N 末端と *N*-octanoyl-L-homoserine lactone(C8-HSL)の三次元構造は NMR により解析された (Yao *et al.*, 2006; 2007)。構造解析では、C8-HSL だけでなく xylose のような他の effector も結合することが示され、他の HSL や effector でも SdiA の folding switch になりうることが示唆された。このことから、SdiA の認識可能なシグナルは他にも多くあることが予測された。

大腸菌 SdiA が認識するシグナル分子を簡便に同定するために、精製した SdiA と DNA の結合親和性に影響する分子について、*in vitro* での探索を試みた。本研究で、我々は先ず、約 500 種類の合成 AHL 類似体を用いて SdiA の DNA 親和性について調べた。この実験で使用した試料は以前に SdiA を用いた Genomic SELEX スクリーニングで使用したものである。この実験では、SdiA は様々な HSL を認識し、認識するシグナルにより標的遺伝子が増加することを示す。このことから、自然環境中、宿主細胞や他の細菌など様々なシグナルが交わされる中で、SdiA がそのシグナルを認識し環境に適応するように遺伝子発現を変化させていることが予測された。*in vivo* での SdiA 遺伝子制御の変化は各 effector を添加した野生株と SdiA 欠失株での標的遺伝子の発現の差を観察することで確認した。

4-2. シグナルによる SdiA の機能変化

マイクロアレイの結果では SdiA の過剰発現により発現が上昇した遺伝子は、既知の標的である *ftsQAZ* 遺伝子を含む 75 遺伝子で、減少した遺伝子は、運動性や走化性に関係する遺伝子を含む 62 遺伝子であった (Wei *et al.*, 2001)。SdiA を過剰発現するとマイトマイシンの耐性になり (Wei *et al.*, 2001)、ほかにもフルオロキノロンやセフトジジムにも耐性を獲得した (Tavio *et al.*, 2010)。SdiA の過剰発現は AcrAB 薬剤排出ポンプの発現を活性化することでこれらの薬剤耐性を獲得したと考えられる (Rahmati *et al.*, 2002)。これらの研究の一方で、これら遺伝子発現パターンはプラスミド由来の SdiA を過剰に発現させたものであり、ゲノム由来の SdiA では異なる遺伝子発現パターンを示すと Dyszel らは主張している (2010)。シングルコピーであるゲノム由来の SdiA は、グルタミン酸依存性の酸耐性遺伝子 (*gadW*, *gadE*, *yhiD*, *hdeA*) を活性化し、鞭毛や繊毛をコードする遺伝子を抑制する。

AHL の感知機構の研究では SdiA は AHL と Indole を感知しバイオフィーム形成を活性化することが知られている (Lee *et al.*, 2009)。また、SdiA は *enterohemorrhagic E. coli* (EHEC)におけるコロニー形成に必要な因子である (Hughes *et al.*, 2010)。哺乳動物腸内では AHL が存在することが示唆されており、メタゲノム解析では多くの AHL 生産菌が生育していることが示唆された。SdiA の標的遺伝子である *ydiV* は EAL ドメイン蛋白質であり、QS シグナルでありバイオフィーム形成や生育を阻害する c-di-GMP を分解する (Jenal and Molone, 2006)。YdiV は AHL の添加により発現が誘導される (Zhou *et al.*, 2008)。し

かし、自然界で SdiA に作用するシグナルは未解明である。これらは SdiA が *ftsQAZ* オペロンを制御するだけでなく環境ストレスや宿主シグナルに応答し他の標的遺伝子を制御する可能性を示唆している。

本研究で、SdiA が感知するシグナルにより、制御する遺伝子の変動することを示した。合成 AHL 類似体非添加時は、SdiA は炭素、窒素代謝系を制御することで大腸菌の生育制御に従事している。しかし、AHL 類似体を添加することで、膜修復系や RNA や蛋白質のシャペロンを制御しストレスに適応ようになる。また、本研究での特徴的な発見は、同じ転写因子が、感知するシグナルにより多様な制御を示すことである。大腸菌転写因子は、従来、uracil と thymine による RutR (Shimada *et al.*, 2007), glyoxylate と puruvate による IclR (Lorca *et al.*, 2007), allantoin と glyoxalate による AllR (Hasegawa *et al.*, 2008), arginine と lysine による ArgP (Marbaniang and Gowrishankar, 2011) など、二種類のリガンドで機能特異性が制御される例が知られていたが、SdiA がそれ以上多種類のエフェクターで制御されているとすれば、初めての発見である。今後、更なる実証実験が必要である。

第二章：プロモーター特異的転写因子(PS-TF)探索法の開発と大腸菌細胞分裂制御因子 SdiA 遺伝子調節転写因子の探索

1：序論

大腸菌遺伝子の転写を制御する転写因子は、一般に、プロモーター領域に結合し、局所濃度を高めることで、プロモーターに結合した RNA ポリメラーゼと相互作用を行い、転写を制御している。今回、*sdiA* 遺伝子の転写を制御する転写因子を網羅的に探索する目的で、新たな手法として、一つのプロモーターに注目し、発現制御に関わる転写因子を網羅的に探索する PS-TF (Promoter Specific Transcription Factor) Screening 法を開発した。精製した約 200 種類の転写因子と目的のプロモーターDNA の親和性をゲルシフトアッセイで解析し、特異的な結合を示す転写因子をスクリーニングする方法である。今回、*sdiA* 遺伝子プロモーター領域 350 bp の DNA 断片を FITC 標識し、これまでに本研究室で精製保管してきた 193 種の転写因子を利用して、PS-TF 法で *sdiA* プロモーター転写因子複合体を、5% PAGE での移動度の違いにより解析した。その結果、一次スクリーニングで 24 種の転写因子について *sdiA* への特異的結合を確認した。これら転写因子の *sdiA* プロモーターへの結合を確認し、加えて、結合部位を同定する目的で、*sdiA* プロモーター領域を 4 領域に分けた DNA プローブを用いたゲルシフト実験を行った。その上で、候補転写因子の生体内での *sdiA* 制御を調べる目的で、転写因子の欠損株を用いて、*sdiA* の発現への影響を、レポーターを利用した発現効果と Northern 解析による mRNA 解析を行った。

2：方法・試薬

2-1 菌株・培養

転写因子精製には *E. coli* BL21 (DE3) (Studier and Mofatt, 1986) を用い、プラスミド作成には *E. coli* DH5α を用いた。大腸菌野生株は K-12 BW25113、転写因子欠失株は Keio コレクション (Baba *et al.*, 2003) を用いた (Table.1)。細胞は LB 培地で培養した。抗生物質は 100 ng/ml アンピシリンと 50 ng/ml カナマイシンを培地に加えた。

Table 1. 本研究で使した菌株

<i>Escherichia coli</i>	genotype
DH5a	F ⁻ , Φ80d <i>lacZ</i> Δ <i>M</i> 15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>hsdR</i> 17(rK ⁻ , mK ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE</i> 44, λ ⁻ , <i>thi</i> -1, <i>gyrA</i> 96, <i>relA</i> 1
BL21(DE3)	F- <i>ompT</i> <i>hsd</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm gal</i> λ (DE3)
BW25113	Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), <i>lambda</i> -, <i>rph</i> -1, Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514
JW4364	BW25113 <i>arcA</i> :: <i>Km</i>
JW3883	BW25113 <i>cpxR</i> :: <i>Km</i>
JW3368	BW25113 <i>ompR</i> :: <i>Km</i>
JW0980	BW25113 <i>torR</i> :: <i>Km</i>
JW0453	BW25113 <i>acrR</i> :: <i>Km</i>
JW1445	BW25113 <i>mcbR</i> :: <i>Km</i>
JW4290	BW25113 <i>qseD</i> :: <i>Km</i>
JW1901	BW25113 <i>sdiA</i> :: <i>Km</i>
JW1610	BW25113 <i>gusR</i> :: <i>Km</i>
JW5641	BW25113 <i>ttk</i> :: <i>Km</i>
JW5114	BW25113 <i>ybjK</i> :: <i>Km</i>
JW1587	BW25113 <i>ynfL</i> :: <i>Km</i>
JW5701	BW25113 <i>crp</i> :: <i>Km</i>
JW0075	BW25113 <i>leuO</i> :: <i>Km</i>
JW2205	BW25113 <i>rcsB</i> :: <i>Km</i>

2-2 プラスミド

転写因子精製のための発現プラスミドは pET21a(+) (Novagen) を使用した。
 β -galactosidase activity assay のために pRS551 (Fig. 1) (Simons *et al.*, 1987) 、
 lusiferase reporter assay のために pLux (Fig. 1) (Neil *et al.*, 2010) 、 Keio コレクション
 のカナマイシンカセットを抜くために pCP20 (Cherepanov *et al.*, 1995) を使用した。転写
 因子発現プラスミドは pCA24N Δ GFP (Kitagawa *et al.*, 2005) を使用した。

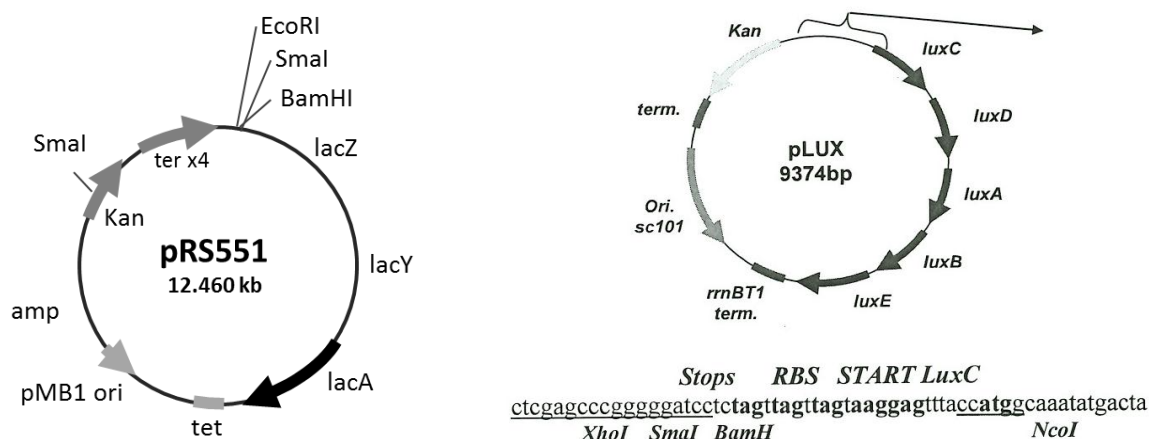


Fig. 1. 利用プラスミドの遺伝子地図

2-3 転写因子の精製

各転写因子の遺伝子を組み込んだプラスミドの形質転換体大腸菌 BL21(DE3)株で
 His-tag 付加転写因子を発現させアフィニティー精製を行った (Yamamoto *et al.*, 2005;
 Shimada *et al.*, 2005) 。なお、本研究で使用した転写因子は、所属した石浜研究室で、山
 田佳代子氏、郡 彩子氏を中心に多数の研究者の共同作業で精製されたものである。

2-4 PS-TF Screening ・ 濃度依存結合の確認

PS-TF Screening で使用したプロモーター断片は、*sdiA* 翻訳開始地点から 355 bp 上流
 をプライマー (*sdiA*-F; ATCTTTATGGACCAGGGGCGGATAGTCGA, 5'-FITC-*sdiA*-R;
 AGTAAACCGCAACGCCCTGAGAGTGAGTA) を用いて PCR で伸長した。コントロール
 DNA は *sdiA* 遺伝子上流にある遺伝子 *yecC* 遺伝子をプライマー (*yecC*-F;
 CGTTGGCGATATCACTATTGATACTGCACG, 5'-FITC-*yecC*-R;
 TAGCTGGTTTCTTTACCTGCCAGCCCAACT) を使用した。作成した断片 0.5 pmol/ μ l
 と storage buffer (20% glycerol, 10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 200 mM KCl,
 100mM EDTA (pH 8.0), 1 mM DTT) に溶解した転写因子 20 pmol/ μ l を binding buffer (10
 mM Tris-HCL(pH7.8) , 250 μ g/ml BSA) 中で混合し、37°C で 20 分加温し 5% PAGE で 40
 分泳動分離した (ゲルシフトアッセイ)。

2-5 転写因子結合領域の同定

sdiA プロモーター領域を、上流から 30 bp 重複するようにデザインした、4 分割した 115 bp 断片を PCR で調製した。これら *sdiA* プロモーター断片コレクションと転写因子との複合体形成を、ゲルシフトで解析した。PCR には、以下のプライマーを利用した。

sdiA-a (*sdiA*-a-F, AGCTTTGCCCCGGGATGTTGCGGAC; FITC-*sdiA*-a-R;

ACTGGCGGGTGCGAGGCTGCTCGC)

sdiA-b (*sdiA*-b-F; CCGACCCCGAGCAGCCTCGCACCC, FITC-*sdiA*-b-R;

TCAGGCTTGAAATGGCGTCCAGCCCCGA)

sdiA-c (*sdiA*-c-F; TGTCGGGGCTGGACGCCATTTCAAGCCTG, FITC-*sdiA*-c-R;

ATTATTCAGGCAATGAATTACTTTTGAAG)

sdiA-d (*sdiA*-d-F; CTTGCAAAAGTAATTCATTGCCTGAATAAT, FITC-*sdiA*-R;

AGTAAACCGCAACGCCCCTGAGAGTGAGTA)

2-6 β -galactosidase activity assay

プロモーター活性を測るために、プラスミドベクター pRS551 (Simons *et al.*, 1987) を用いた LacZ レポーターアッセイを行った。*sdiA* 遺伝子翻訳開始地点から 450 bp 上流領域をプライマー (*sdiA*-EcoRI-450, CGGAATTCGTGGGTGAAGTCCTGAACAC; *sdiA*-BamHI, CGGATCCAGTAAACCGCAACGCCCCTGAGA) を用いて PCR で伸長し、プラスミド pRS551 にクローニングした。制限酵素は *EcoRI* と *BamHI* を使用した。組み換えプラスミドはシーケンスによって確認した。プラスミドは大腸菌野生株、K-12 BW25113 と欠損株 JW4364、JW3883、JW3368、JW0980、JW0453、JW1445、JW4290、JW1901、JW1610、JW5641、JW5114、JW1587、JW5701、JW0075、JW2205 に形質転換した。前培養を OD₆₀₀=0.01 になるように新しい培地に加え 4 時間、8 時間、24 時間後に β -galactosidase 活性を Miller, J. H. 1972 に従って測定した。

2-7 Luciferase reporter assay

シングルコピーのレポーター系を利用したプロモーター活性の測定には、luciferase 発現プラスミド pLux を用いた。プラスミドは *XhoI* と *BamHI* を用いて制限酵素処理した。*sdiA* プロモーター領域はプラスミドの制限酵素処理後の末端領域 15 bp を含むプライマー (pLux-*sdiA*-F, TCGTCTTCACCTCGAGCGTCCTGAGGTGATTTTGTGTTGA; pLux-*sdiA*-R, ACTAACTAGAGGATCAGTAAACCGCAACGCCCCTGAGA) を用いて PCR で伸長し、In-Fusion[®] HD Cloning Kit を用いてクローニングした。完成したプラスミドの配列はベクター上のプライマー (pLux-R; GGCAGGTAAACACTATTATCACC) を用いてシーケンスを行い確認した。プラスミド pLux がカナマイシン耐性遺伝子を持つため、カナマイシン耐性遺伝子を持つ Keio コレクションの菌株 JW4364、JW3883、JW3368、JW0980、JW2205 は pCP20 を用いてカナマイシン耐性遺伝子を除去したものにプラスミドを形質転換した。前培養を OD₆₀₀=0.01 になるように新しい培地に加え 4 時間、8 時間、24 時間後にルシフェラーゼ活性を常法 (Neil *et al.*, 2010) に従って測定した。

2-8 Western blotting

LB培地4時間、8時間、24時間培養した野生株株BW25113 と転写因子欠損株(JW4364、JW3883、JW3368、JW0980、JW2205) はリゾチーム処理した後に超音波破碎し、SDS PAGE(12%)で分画した。分画した蛋白質をメンブレンに転写し、各転写因子の抗体で修飾した。Western blotting を行った。抗体は各転写因子の抗体を用いた。蛍光標識した mouse anti-rabbit IgG 抗体をで二次抗体処理し、Immobilon™ Western を用いて LAS4000(Fuji Film, Tokyo, Japan)で解析した。

2-9 Northern blotting

RNA はホットフェノール法を用いて、対数増殖期初期の野生株と欠損株から抽出した。抽出した RNA の確認は 0.8% アガロースゲルで確認した。検出ようプローブは大腸菌 W3110 ゲノム DNA 50ng を鋳型にプライマー (*sdiA*-F; CAATTGATCCGGTGCTGAACCCT, *sdiA*-R; TTCAAATTAAGCCAGTAGCGGCCG) と DIG-11-dUTP を含んだ dNTP を用いて PCR により伸長した。RNA は (4 µg) を formaldehyde-MOPS(morpholinepropanesulfonic acid)gel-loading buffer 内で 65°C で 10 分加熱し変性させ、ホルムアルデヒドを含む 2%アガロースゲルで分画しナイロンメンブレンに転写した。DIG-Easy Hyb system(Roche)を用いて DIG 標識したプローブを 50°C でハイブリダイズした後、DIG-AP Fab fragment と CDP-Star で反応させ LAS-4000 IR multicolor(Fuji Film, Tokyo, Japan)で検出した。

3: 結果

3-1 *sdiA* プロモーターを認識結合する転写因子群の網羅的探索

特定のプロモーター領域に結合する転写因子を網羅的に探索する方法として、精製した転写因子 200 種類を用いた PS-TF screening 法を開発した。5'-FITC 標識をしたプライマーを用いて PCR により増幅した DNA 断片と精製した転写因子を *in vitro* で結合させ 5% PAGE で泳動分離し、DNA-転写因子複合体を検出する。今回、*sdiA* プロモーターを認識し結合する転写因子探索のために、*sdiA* 翻訳開始地点から - 350 bp 領域 DNA と転写因子を混合し、37°C で結合反応させた後 5%PAGE で泳動分離した。その際、特異的な結合か否かを判断するためのコントロール断片として、転写因子が結合する可能性が極めて低い *yecC* 遺伝子の ORF (open reading frame) 上の領域 250 bp を同じ反応液に加えた。いずれの DNA 断片も PCR で増幅して調製した。*sdiA* プロモーター断片とコントロール断片を等濃度になるように混合し、ゲル電気泳動の結果の判断基準は、*sdiA* プロモーター断片がシフトし、コントロール断片に変化がない転写因子を、*sdiA* プロモーター結合候補転写因子として同定した (Fig. 2)。この第一次スクリーニングの結果、*sdiA* プロモーター領域の結合が確認できたが、コントロール断片に結合がみられなかった 24 種類の転写因子をこの段階

での候補転写因子として同定した (Table 1)。なお、24 種類の転写因子群は、制御機能が僅かでも分かっているものが 14 種類、機能未知転写因子 10 種類であった。

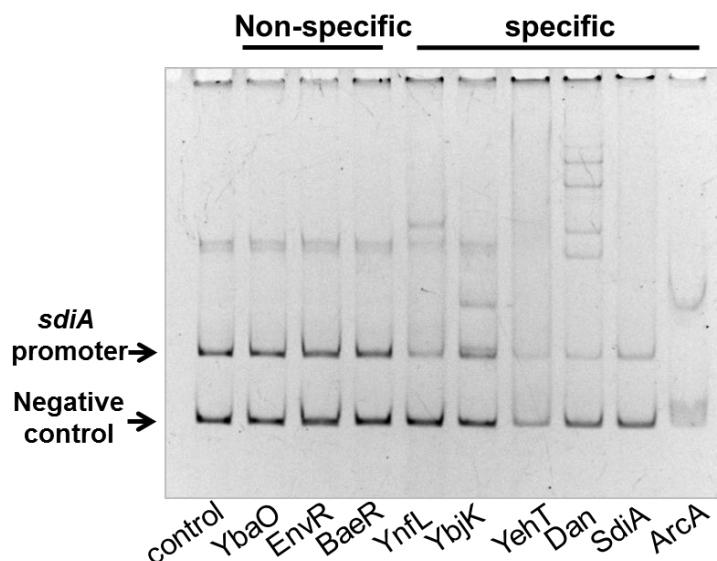


Fig. 2. PS-TF Screening. FITC 標識 *sdiA* プロモーター 0.5 pmol / μ l と等量の非標識 DNA を混合し、転写因子と混合保温後、ゲル電気泳動で解析した。Lane 1, storage buffer (20% glycerol) 2 μ l。Lane 2~10、表示の精製転写因子 (10 pmol/ μ l 濃度) 各 2 μ l。37°C 反応後、5%PAGE 150V で 40 分泳動した後、蛍光標識 DNA を LAS400 で 30 秒検出した。

Table 2. *sdiA* プロモーター結合転写因子の第一次スクリーニング

Protein	Function	Regulation targets	Effector	DNA binding site
ArcA	aerobic respiration control	<i>uvrA, ace, fad, gad, hyb, glc, nuo, glp, fum</i>	Acetyl P (ArcB-ArcA)	TACATACAN8TGTATGTA
CpxR	conjugative plasmid gene expression	<i>degP, csgD, csgB, ompF, rpoE, cpxR, tsr, ...</i>	Acetyl P (CpxA-CpxR)	GTAAAnnnnnGTAAA
OmpR	Response to osmolarity	<i>ompF, ompC, flhDC, micF, csgDEFG,</i>	Acetyl P (EnvZ-OmpR)	TAnnAATTTn6AAATTnnTA
RcsB	Regulator capsule synthesis B	<i>gadA, hdeD, hdeA, ydeP, safA, gadB, osmC, bdm, osmB, lolA, ftsA</i>	Acetyl P (RcsC-RcsB)	tagGAataaTCTTA
TorR	TMAO respiratory system	<i>torR, torC, tnaA, gadA, hdeA</i>	Acetyl P (TorS-TorR)	CTGTTCATAT
AcrR	acriflavine resistance regulator	<i>acrA, acrR, micF</i>	----	TACATACATTntgAATGTATGTA
Crp	catabolite gene activator protein	<i>calF, fixA, araB, nadC, pdjR, acnB, gcd, sfsA, lacZ, araJ, trg, lsrR, ...</i>	cAMP	AAATGTGAtcagaTCACATTT
McbR	biofilm Regulator	<i>mcbA, yciG, yciGF</i>	----	unknown
QseD	downregulates the flagellum regulon	<i>metN, cydA, cysH, metB, fecA,</i>	----	unknown
SdiA	soppressor of cell division inhibitor	<i>ftsQ, ftsQAZ, ydiV, gadW</i>	AHL	unknown
Ttk	cell division inhibitor	<i>dut</i>	----	unknown
DeoR	Deoxyribose Regulator	<i>tsx, nupG, deoC</i>	----	TGTTAGAATtC TaACA
GusR	β -d-glucuronides repressor	<i>uidA, uidR</i>	----	ACGcTCGaaCGAaCGT
YnfL	no information	unknown	----	unknown

3-2 転写因子濃度に依存した *sdiA* プロモーターへの結合

転写因子はそれぞれ DNA 結合親和性強度で異なる。その為、転写因子の濃度を統一して行った第一次 PS-TF Screening では、親和性の高い転写因子は既に飽和状態を超え、非特異的 DNA 断片にも結合している可能性がある。また、今回使用した転写因子は、精製純度が異なり、また試料中の不純物も異なる可能性があるなど、複数の要因の影響を考慮する必要がある。第一次スクリーニングでは、統一濃度の転写因子とプロモーター DNA を混合して結合を調べた。第二次スクリーニングとして、転写因子の濃度を 4 段階に振り、*sdiA* プロモーターとコントロール断片混合液と結合させることで、蛋白質濃度に依存した *sdiA*-DNA 複合体形成と親和性強度の変化を観察した。その結果、第一次スクリーニングで検出した 24 種類の転写因子のうち、14 種類の転写因子で濃度に依存した複合体バンド形成が観察された (Fig. 3)。中には転写因子の濃度を上げることでコントロール断片もシフトしてしまうものもあった。過剰な転写因子と DNA 断片を混合すると標的でない DNA 断片も全てシフトしてしまう事もあるが、今回使用した転写因子濃度はスクリーニングに使用した 2 倍量程度のため、過剰でないと判断し、この段階でコントロール断片のシフトが確認された転写因子については候補転写因子から排除した。また、*sdiA* プロモーター領域断片への結合がみられなかったものについても、再現性が取れなかったとし、候補から排除した。

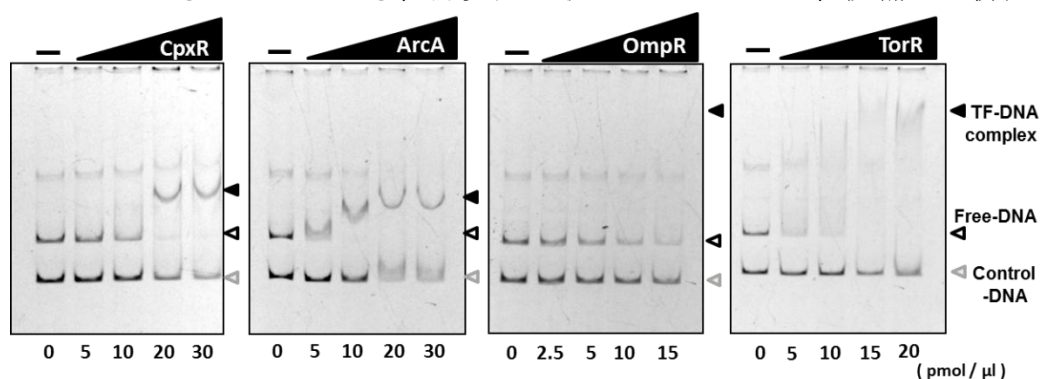


Fig. 3. 転写因子濃度に依存した *sdiA* プロモーター転写因子複合体形成。第一次スクリーニングと同じ DNA 断片を 0.5 pmol / μ l ずつ使用し、転写因子は 4 段階に濃度で、それぞれ添加量 2 μ l になるよう調製した。蛋白質濃度 0 pmol / μ l は storage buffer を 2 μ l 添加し 37°C で反応させた。5% PAGE 150V で 40 分泳動した後、LAS400 で 30 秒検出した。

3-3 転写因子の *sdiA* プロモーター上の結合領域の同定

2 段階の探索で同定した候補転写因子が *sdiA* プロモーター領域のどの位置に結合するか調べるために、スクリーニングで使用した *sdiA* プロモーター領域の 350 bp DNA を、30 bp ずつ重なるように 115 bp に分割し、上流から *sdiA*-a、*sdiA*-b、*sdiA*-c、*sdiA*-d の 4 断片を作成し、転写因子が結合するかをゲルシフトアッセイにより解析した。転写因子の濃度は 3-2 で結合がみられた段階的濃度を使用した (Fig. 4)。YnfL の場合、*sdiA*-d の断片にのみ

濃度依存的に *sdiA*-DNA 複合体バンドが確認できたので、翻訳開始地点から 115 bp 上流の間に YnfL の結合部位があることが分かった。また、OmpR、TorR、QseD、Ttk、は *sdiA-c* と *sdiA-d* の両断片に結合する事から、翻訳開始地点から 200 bp 上流の間に結合すると判断した。また、CpxR と GusR は、更に上流の *sdiA-b* への結合も確認できた事から、翻訳開始地点から 285 bp 上流の間に結合サイトを一つ又は複数持つ事が考えられた (Fig. 5)。

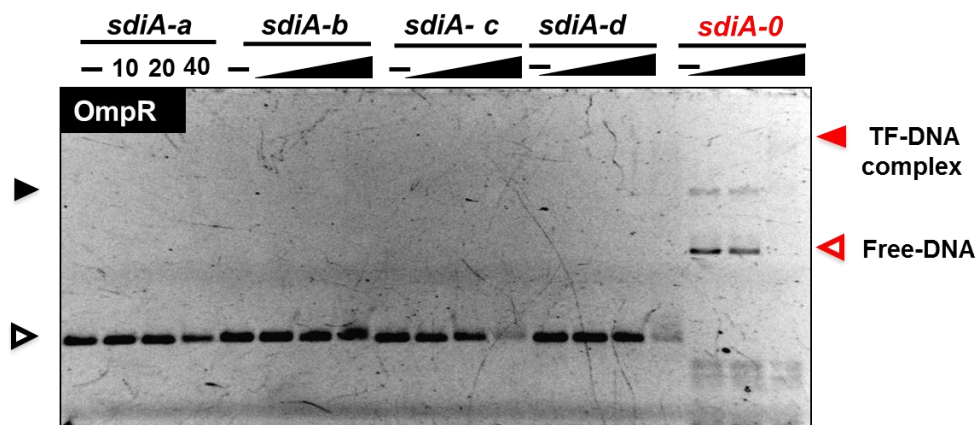


Fig. 4. 転写因子の *sdiA* プロモーター上結合領域の同定。PS-TF Screening で使用した断片 *sdiA-0* (0—355 bp) を 4 等分した、*sdiA-a* (-255—370 bp)、*sdiA-b* (-170—285 bp)、*sdiA-c* (-85—200 bp)、*sdiA-d* (0—115 bp) 断片と、4 段階濃度の転写因子を用いて gel-shift assay を行った。5%PAGE 150V で 40 分泳動した後、LAS400 で 30 秒検出した。

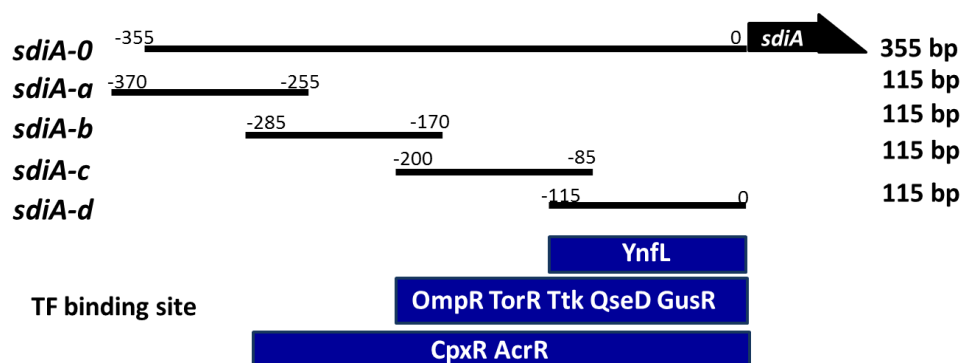


Fig. 5. 転写因子の結合領域の同定。*sdiA-0* はスクリーニングで使用した断片、*sdiA-a* ~ *d* は翻訳開始地点から 115 bp ずつ、隣接した断片と 30 bp ずつ重なるように設計した。

3-4 細胞内での転写因子の *sdiA* プロモーター制御の解析

本研究開始時には、*sdiA* 遺伝子の発現制御因子は全く同定されていなかったため、*in vitro* の PS-TF 法で、*sdiA* プロモーター制御の候補転写因子を探索し、またそれらの *sdiA* プロモーター上の結合部位のマッピングを行った結果、*sdiA* プロモーター制御への直接的

関与が示唆された。そこで次に、実際に生体内でこれら候補転写因子が *sdiA* プロモーターの活性を制御しているのかを調べた。

SdiA の生体内の発現量も調べられていないことから、生体内でどの程度の発現が観察できるか予想ができなかった。その為、まず、弱いプロモーター活性でも比較的検出のしやすいマルチコピープラスミド pRS551 を用いた β -galactosidase activity assay を行った。プラスミドに挿入する断片は、スクリーニングにしようとしたプロモーター領域を十分に含む、*sdiA* の翻訳開始地点から 450 bp 上流間を使用した。活性はまず、野生株とこれまでに絞った候補転写因子 15 種類の各欠損株で行った。コントロールとして、ベクターのみを導入した株も同時に測定した。LB 培地で 4 時間、8 時間、24 時間で測定した結果、8 時間と 24 時間で野生株と *OmpR* 欠損株に大きな差がみられた (Fig. 6)。測定時間 4 時間でも多くの株で野生株と大きな差がみられるが、マルチコピープラスミドを用いていることから、培養初期に生じる個体差などの影響も考えられ、この時点で 4 時間の差は優位ではないと判断した。しかし、8 時間、24 時間では野生株と他の欠損株に比べ *OmpR* 欠損株の *sdiA* プロモーター活性が明らかに強いことから、*OmpR* は *sdiA* の抑制因子であることが示唆された。

OmpR を含め、今回候補にあがった 14 種転写因子には二成分制御系の転写因子が 5 つ (*OmpR*, *RcsB*, *CpxR*, *TorR*, *ArcA*) も含まれていた。その為、*sdiA* の発現は環境変化に強く依存するのではないかと考え、これら二成分制御系因子が *sdiA* の発現制御因子であることを推測し研究を進めた。

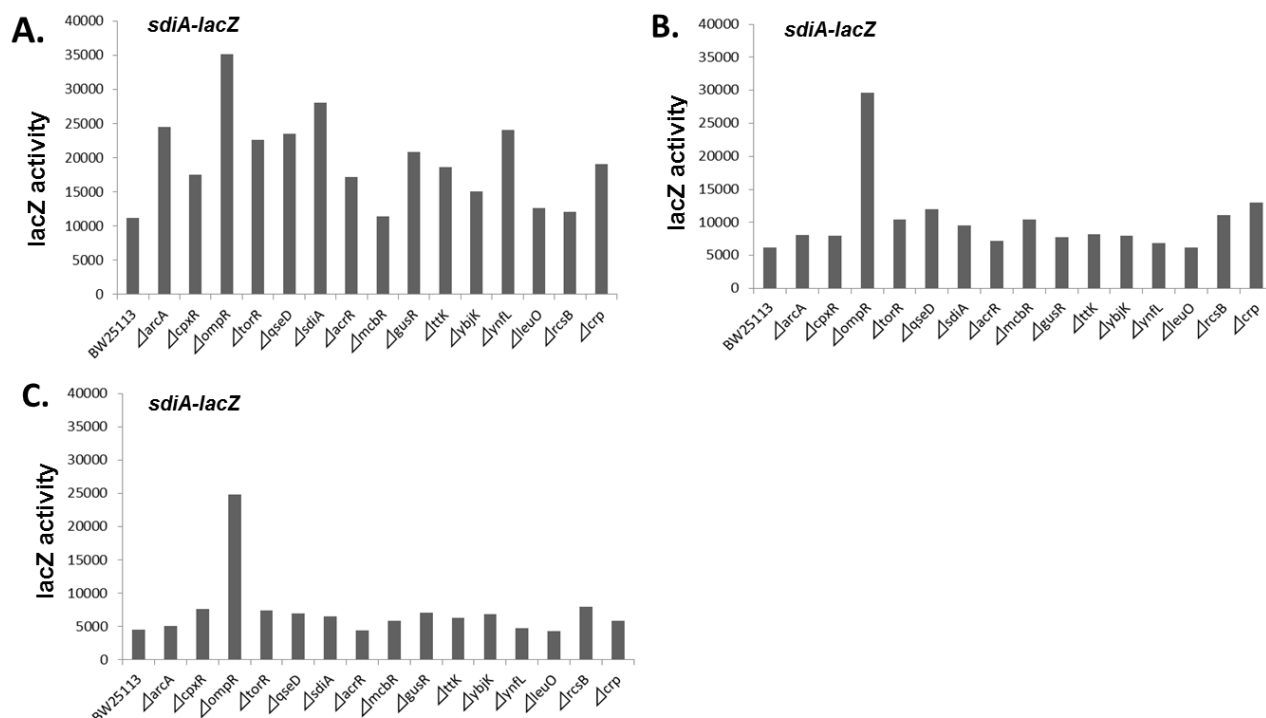


Fig. 6. β -galactosidase activity assay. *sdiA* プロモーター翻訳開始地点から 450 bp を *lacZ* と融合し、野生株と欠損株で β -galactosidase 活性を測定した。

3-5 転写因子発現レベルの解析

sdiA プロモーターの制御因子として候補にあがった二成分制御系転写因子が生体内で *sdiA* のプロモーターの活性を制御しているかを調べるにあたり、生体内でこれら転写因子が十分量発現しているか、発現レベルを Western blotting で確認した。野生株と *ompR*, *rscB*, *cpxR*, *torR*, *arcA* の欠損株を LB 培地で 4h、8h、24h 培養した後、細胞の破碎液を SDS-PAGE(12%)で分画し各転写因子の抗体で検出した (Fig. 7)。その結果、野生株では全ての時間でこれら転写因子の発現を確認できたが、欠損株ではいずれの転写因も検出できなかった。従って、これらの変異株を用いた実験の有効性が確認できた。

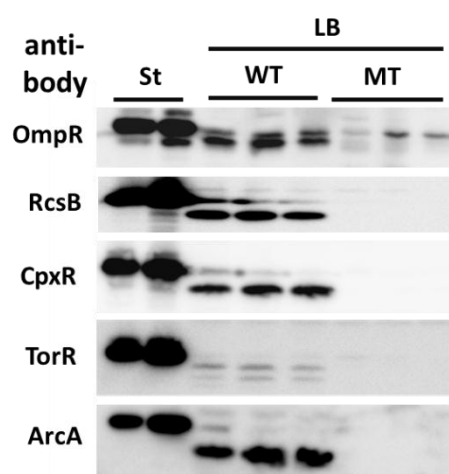


Fig. 7. Western blotting による転写因子発現レベルと欠損の確認。蛋白質の検出量の基準として精製蛋白質 20 ng、40 ng を使用した (St)。野生株(WT)と欠損株(MT)は LB 培地で 4h, 8h, 24h 培養した細胞の破碎液を SDS-PAGE(12%)で分画した。

3-6 *In vivo* *sdiA* プロモーター活性制御

β -galactosidase activity assay で *sdiA* のプロモーター活性は増殖期では強く、定常期に入り培養するにつれて弱くなることが分かった。また、二成分制御系転写因子が *sdiA* 遺伝子を制御する可能性が示唆された。より生体内の制御を明確に観察できるよう、シングルコピープラスミドで、且つ mRNA 発現量によく相関した結果を得ることができるルシフェラーゼをレポーターとしたアッセイを行った (Neil *et al.*, 2010)。野生株に比べて *ompR*, *rscB*, *cpxR* の欠損株で *sdiA* のプロモーターの活性が上昇した。このことから、*sdiA* 遺伝子の発現は OmpR, RcsB, CpxR により抑制されている事が考えられた。また、対数増殖期から定常期に移行する時期に最も *sdiA* プロモーターの活性が強くなることから、培養初期に RcsB に強く抑制を受け、培養時間が経過するにつれて OmpR が抑制因子として関わることを示唆された。RcsB や CpxR による制御は増殖に伴い弱くなるが、OmpR による抑制は相当期間継続した (Fig. 8)。

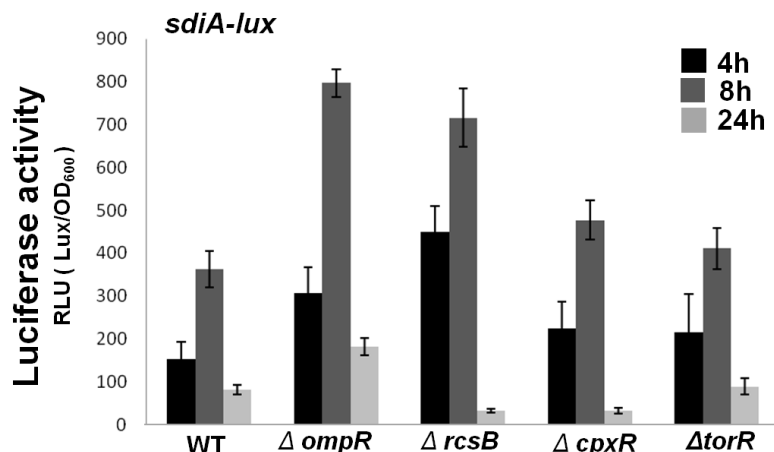


Fig. 8. 野生株と二成分制御系転写因子欠損株における *sdiA* プロモーター活性。試験転写因子の発現を確認した野生株と欠損株に *sdiA-lux* 融合プラスミドを導入し、96 穴プレートを用いて 1.2 ml の LB 培地で振とう培養をし、ルシフェラーゼの発現をプレートリーダーで測定した。

3-7 転写因子発現による相補

転写因子の欠損株を用いた実験で示唆された *sdiA* プロモーターの抑制が、欠損した転写因子によるものかを確認するために、転写因子過剰発現プラスミドを同株に導入し影響をみた。使用した過剰発現プラスミドは *lac* プロモーターをもち IPTG の添加により発現を誘導するシステムであるが、過去の使用経験から IPTG の非添加時にも十分量発現している事が確認されていたことから、本実験では転写因子発現の強制誘導を行わずに観察を行した (Fig. 9)。野生株に比べ転写因子 (*ompR*, *rcsB*) 欠損株では *sdiA* プロモーターの活性が上昇し、これまでの結果に一致した。同株にそれぞれ転写因子の発現プラスミドを導入した結果、野生株では *sdiA*-プロモーターの活性は抑制され、欠損株では、欠損により上昇していた *sdiA* プロモーターの活性が減少し、プロモーターの抑制が確認された。

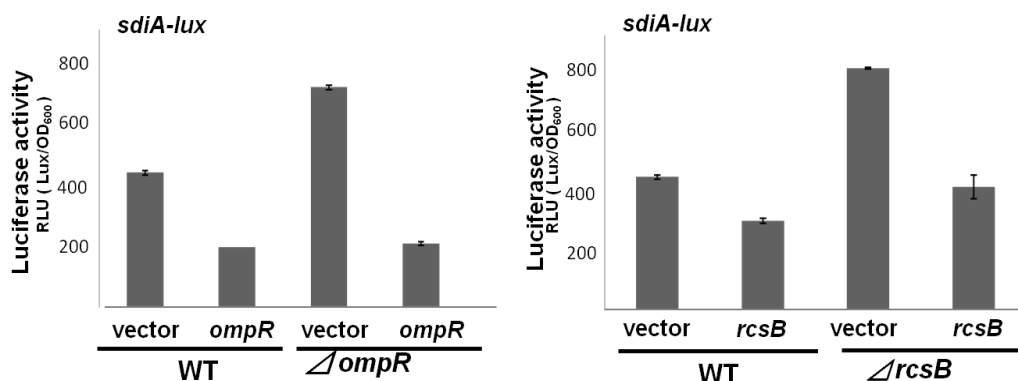


Fig. 9. 転写因子過剰発現による相補実験。野生株と欠損株に、欠損させた転写因子の過剰発現プラスミドを導入した。対照として過剰発現プラスミドのベクターを導入した。*sdiA* が一番強く発現し、OmpR, RcsB 共に強く影響を示した 8h 時の培養液を測定した。

3-8 転写因子欠損による *sdiA* mRNA 量の変化

レポーター アッセイで観測した *sdiA* プロモーター活性の変化が、細胞内の *sdiA* mRNA 量でも同様に変化するかより明瞭に確認するために Northern blotting assay を行った。mRNA が最も盛んに合成されていると考えられる対数増殖期の各株の mRNA を用い、*sdiA* プローブを用いて検出した (Fig. 10)。野生株と *ompR* の欠損株の結果を比較するとプロモーター活性と同様に *ompR* の欠損により *sdiA* mRNA の発現量が増加した。従って、OmpR は、*sdiA* プロモーターに作用し、*sdiA* 遺伝子の転写を制御していると結論した。

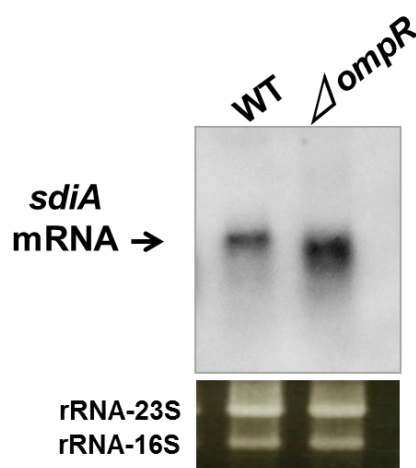


Fig. 10. Northern blotting assay. OmpR 欠損による *sdiA* mRNA 発現量の変化。野生株と欠損株の全 mRNA の量は濃度に加え rRNA-23S と rRNA-16S バンドが一定であることを 0.8 %アガロース電気泳動の結果で確認した。

3-9 環境変化による *sdiA* mRNA レベルの違い

二成分制御系は細胞内膜に存在するセンサーキナーゼが外界の環境変化を感知しペアとなるレスポンスレギュレーターをリン酸化、脱リン酸化する事で標的遺伝子の発現制御を行う環境応答システムである。そのため、二成分制御系転写因子に制御されると示唆された *sdiA* は培養環境変化により発現が大きく変動する事が推測される。本実験で、*sdiA* プロモーターの制御因子として同定された転写因子群が活性化する既知の条件で培養し *sdiA* プロモーターへの影響を観察した。まず、*sdiA-lux* レポーターアッセイで使用した野生株と各転写因子欠損株を用いて OmpR、RcsB 活性化条件である高塩濃度 LB 培地、CpxR の活性化条件である pH 9.0 に調製した LB 培地、TorR、ArcA の活性条件である嫌気条件で培養した培養液内の生発光強度を測定した。*sdiA-lux* レポーターアッセイでは高塩濃度培地で野生株、*rscB*, *cpxR*, *torR* 欠損株の *sdiA* プロモーターの活性が増加した (Fig. 11)。なお、*arcA* は野生株と同様の活性を示した。一方で、欠損により野生株に比べて *sdiA* プロモーター活性が増加した *ompR* 欠損株では、高塩濃度培地で培養した時、*sdiA* プロモーターの活性は

野生株と変わらなかった。このことから、高塩濃度により増加した *sdiA* プロモーターの活性制御は、OmpR が関与する可能性が示唆された。

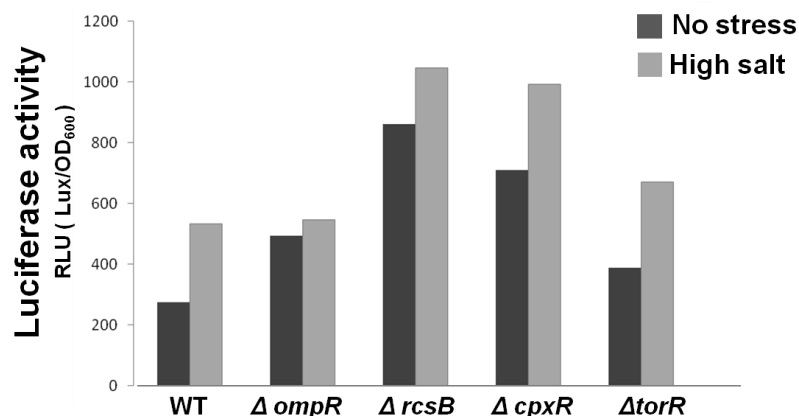


Fig. 11. 培地環境の変化による *sdiA* プロモーターの活性。LB 培地の 4 倍濃度の NaCl を含む LB 培地で野生株と各転写因子欠損株を培養し培養液中の生発光強度を測定した。

また、高塩濃度、高 pH、嫌気条件下で培養した野生株から採取した mRNA を用いて Northern blotting assay を行い *sdiA* mRNA の発現量の違いを観察した (Fig. 12)。その結果、高塩濃度培地のみで *sdiA* mRNA 量が顕著に変化する事が確認され、OmpR による制御の結果と良く一致した。

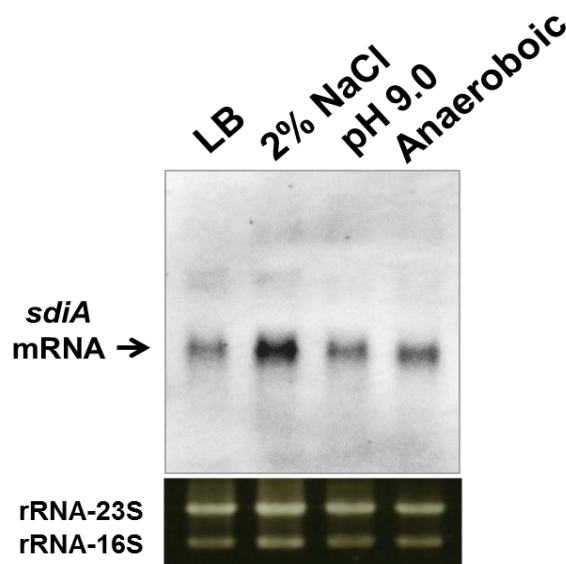


Fig. 12. 培地の変化による *sdiA* mRNA の発現量の変化。通常の 4 倍濃度の LB 培地で培養した大腸菌の *sdiA* mRNA 量を測定した。2% NaCl 培地、pH 9.0 に調製した LB 培地、LB 培地、嫌気条件下で培養した野生株から mRNA を採取し Northern blotting assay を行い、*sdiA* プローブで検出した。

4：考察

大腸菌転写因子 SdiA はグラム陰性菌で保存される QS 蛋白質 LuxR family の転写因子である。グラム陰性菌では LuxI family によって合成された AHL が細胞増殖に伴って環境中に増えると LuxR family のレスポンスレギュレーターが AHL を感知して病原性の発現やバイオフィーム形成の誘導など形質を変える。大腸菌では LuxR family 蛋白質のホモログ SdiA が保存されているにもかかわらず、LuxI family 蛋白質は保存されていないため、SdiA が生体内でどのような機能を持つか注目されてきた。SdiA の機能解析は、SdiA が感知するシグナルの探索、SdiA が転写制御する標的遺伝子群の探索の二つの視点から研究が進められてきた。近年の研究では SdiA は他種細菌が合成したシグナルを感知し (Hughes *et al.*, 2010)、細胞分裂やバイオフィーム形成、酸耐性、薬剤耐性などの遺伝子を制御する事が明らかとなった。これらの研究は SdiA の過剰発現株を用いて研究されてきたが、一方で、プラスミド由来の SdiA とゲノム由来の SdiA の機能の違いを示唆する報告も存在する (Dyszel *et al.*, 2010)。これら研究に共通して、SdiA の機能全体が明らかとならない理由の一つに、SdiA 自体の発現制御に関する情報が殆どない事が挙げられる。これまでに報告された SdiA 発現に関する情報は、4 つの σ^{70} 依存転写開始地点と翻訳領域に RNA 結合蛋白質である CsrA の結合サイトがあるというだけで、その制御因子に関しては明らかとなっていない (Yaknin *et al.*, 2011)。

今回、SdiA 遺伝子の発現制御因子を同定する目的で、当研究室で精製した全 200 種類の転写因子を用いた PS-TF Screening 法を開発し、SdiA 遺伝子のプロモーターに特異的結合を示す転写因子のスクリーニングを試みた。その結果、機能既知転写因子 14 種類と機能未知転写因子 10 種類の計 24 種類の転写因子が SdiA 遺伝子制御因子の候補として上がった。これら転写因子について、転写因子を 4 段階の濃度にふり、*sdiA* プロモーターに対する濃度依存的な結合を確認し、候補転写因子を 14 種類に絞った。SdiA プロモーターの生体内での活性強度は未知であったことから、マルチコピープラスミドを用いた β -galactosidase activity assay で、プロモーター活性強度と、候補転写因子欠損株でのプロモーター活性の影響を測定した。SdiA のプロモーター活性強度は弱かったが、培養時間が経つにつれて OmpR 欠損株でプロモーター強度の上昇が確認された。このことから、OmpR による抑制が確認された。

OmpR 浸透圧ストレスを感知し細胞外膜タンパク質を調整するは二成分制御系の転写因子である。今回同定した、*sdiA* プロモーターに特異的に結合する転写因子 14 種類の中には二成分制御系転写因子が 5 種類 (OmpR, RcsB, CpxR, TorR, ArcA) が含まれていたことから、SdiA 遺伝子の制御には二成分制御系転写因子が関与する可能性が高いと推測し、欠損株を用いてプロモーター活性や mRNA 発現量を観察した。ルシフェラーゼレポーターを用いて *sdiA* プロモーター活性の測定を行った結果、*ompR*, *rscB*, *cpxR* の欠損株で *sdiA* プロ

モーターの活性が顕著に上昇した。このことから、これら転写因子は *sdiA* プロモーターを抑制していると考えられる。また、興味深いことに、培養初期には *rscB*, *cpxR* 欠損株でプロモーターの活性が上昇していたのに対し、培養するにつれて *rscB* よりも *ompR* 欠損株でのプロモーターの活性が著しく上昇し、これら転写因子の役割が、増殖相で異なる事が示唆された。

一方、二成分制御系転写因子は外界の環境変化により、その活性が大きく変動することから、培養時の培地にストレスを加え、野生株大腸菌の *sdiA* プロモーター活性の変化を観察した。その結果、高塩濃度の培地で培養した時に *sdiA* プロモーターの活性が上昇することが示唆された。しかし、*ompR* 欠損株では、高塩濃度培地と通常培地での *sdiA* プロモーター活性の変化はみられないことから、高塩濃度による *sdiA* プロモーター活性の変動は OmpR が関与していることが示唆された。

これまで、SdiA は発現量が低く、その生理的機能を確認することは容易ではないと考えられ、殆ど研究がなかった。本研究で行った、*sdiA* プロモーターの活性に影響を与える転写因子群、環境要因の解析からだけでも、細胞分化で多様な制御機能をもつ SdiA の発現が、それぞれが異なる環境要素・要因を感知する多数の転写因子が支配下で制御されている様相が見えた。本研究で得られた SdiA 遺伝子制御因子の同定結果は、SdiA の制御機能の解明に新たな突破口を開く貢献に違いない。

謝辞

本研究にあたり懇切丁寧にご指導賜りました、石浜明教授、山本兼由准教授に深く感謝致します。本研究で用いた 200 種の精製転写因子は、石浜研究室で、長年に亘って、多くの研究者が協力して精製された資材である。とりわけ、山田佳代子氏、郡彩子氏に感謝したい。実験手法は、島田友裕博士（現東京工業大学資源科学研究所助教）、山田佳代子氏、山中幸氏に指導を仰いだ。

本研究に使用した合成 AHL 類似体は東京大学先端科学研究センター 菅裕明教授、五十嵐潤博士に提供頂いた。また、シグナル結合解析は松井誠氏、Genomic SELEX screening は鍛代悠一氏、SELEX-chip 解析は島田友裕博士に依って実施された。記して感謝します。また、Lusiferase reporter assay は山中幸氏が作成した pLux vector を提供頂いた。*sdiA* プロモーター結合転写因子の解析に関しては、学部 3 年志村美樹氏の支援を得た。

補足データ

Table 1. TF sample list
(Group-A) TF with known function (total, 151 samples)

TF no	TF name	Family	Mr	Effector
1	AcrR	TetR	24,767	
2	AdiY	AraC/XylS	29,007	
3	AgaR	DeoR/GlpR	29,572	
4	AIIR (YbbU)	IclR	29,270	
5	AppY	AraC/XylS	28,763	
6	ArcA	OmpR	27,292	Acetyl P
7	ArgR	ArgR	16,994	Arginine
8	ArsR	ArsR/SmtB	13,253	
9	AscG	GalR	36,944	
10	AsnC	AsnC	16,888	
11	AtoC	NtrC	52,176	Acetyl P
12	BaeR	OmpR	27,656	Acetyl P
13	BasR	OmpR	25,031	Acetyl P
14	BetI	TetR	21,815	Choline
15	BirA	BirA	35,312	Biotin
16	CadC	ToxR	57,813	
17	CbpA	DnaJ	34,455	
18	CitB (CriR,DpiA)	CitB	25,453	Acetyl P
19	CpxR	OmpR	26,312	Acetyl P
20	Cra (FruR)	LacI	37,999	
21	CreB	OmpR	26,125	Acetyl P
22	Crp	CRP	23,640	cAMP
23	CsgD	LuxR	24,935	
24	CsiR (YgaE)	GntR	24,991	
25	CueR (YbbI)	MerR	15,235	
26	CusR (YlcA)	OmpR	25,394	Acetyl P; Cu(II)
27	CynR	LysR	32,961	
28	CytR	LacI/GalR	37,820	
29	Dan (TtdR,YgiP)	LysR	35,315	
30	DcuR (YjdG)	CitB	27,488	Acetyl P
31	DeoR	DeoR/GlpR	28,548	

32	DeoT (YciT)	DeoR/GlpR	27,603	
33	DhaR	TyrR	70,562	
34	DicA	Cro	15,656	
35	DicC		8,578	
36	DmlR (YeaT)	LysR	34,631	
37	Dps		18,695	
38	DsdC	LysR	35,332	D-Serine
39	FeaR	AraC/XylS	36,210	
40	EmrR (MprA)	MarR	20,563	
41	EnvR (AcrS)	TetR	25,193	
42	EvgA	NarL	22,690	Acetyl P
43	ExuR	GntR	29,824	
44	FhlA	NtrC	78,449	
45	Fis	Fis	11,242	
46	FrIR (YhfR)	GntR	27,820	
47	FrvR	DeoR	65,987	
48	FucR	DeoR	27,363	
49	Fur	Fur	16,785	
50	GalR	LacI/GalR	37,085	
51	GatR (YhcK)	DeoR	16,721	
52	GlpR	DeoR	28,039	
53	GlrR (QseF, YfhA)	NtrC	49,148	Acetyl P
54	GusR (UidR)	TetR	21,794	
55	HcaR (PhdR)	LysR	32,835	
56	HdfR (PssR, YifA)	LysR	31,746	
57	HexR (YebK)	PriR	31,972	
58	Hha		8,628	
59	HigA (YgjM)	Cro	14,955	
60	HipB	Cro	10,016	
61	Hns	H-NS	15,537	
62	HupA	HU-IHF	9,539	
63	HupB	HU-IHF	9,197	
64	IciA (ArgP)	LysR	33,469	
65	IclR	IclR	29,740	
66	IdnR (YjgS)	LacI	37,563	
67	IHF-A (HimA)	HU-IHF	11,356	
68	IHF-B (HimD)	HU-IHF	10,665	

69	IlvY	LysR	33,169	
70	KdpE	OmpR	22,530	Acetyl P
71	LacI	LacI	38,556	
72	LctR (LidR)	GntR	29,163	
73	LeuO	LysR	35,685	
74	LrhA (GenR)	LysR	34,586	
75	Lrp (Liv)	AsnC	18,889	
76	LysR	LysR	34,363	Diaminopimelic acid
77	Mall	LacI	36,622	
78	MarA	AraC	16,065	Salicylate
79	MarR	MarR	13,901	
80	McbR (YncC)	GntR	25,151	
81	Mlc (DgsA)	NagC	44,316	
82	MlrA (YehV)	MerR	28,050	
83	MntR (YbiQ)	DtxR	17,640	
84	ModE	ModE	28,281	Molybdate (MoO ₄ ²⁻)
85	NadR	HipB	47,346	
86	NagC (NagR)	NagC/XylR	44,541	
87	NanR (Yhck)	GntR	29,524	
88	NarL (FrdR)	NarL	23,927	Acetyl P
89	NarP	NarL	23,564	Acetyl P
90	NemR (YdhM)	TetR	22,275	
91	NhaR	LysR	34,284	
92	NorR (YgaA)	NtrC	55,236	
93	NtrC (GlnG)	NtrC	52,246	Acetyl P
94	OmpR	OmpR	27,351	Acetyl P
95	OxyR (MomR)	LysR	34,276	
96	PaaX (YdbY)	GntR	35,294	
97	PdhR	GntR	29,420	
98	PepA		54,880	
99	PerR	LysR	33,634	
100	PhnF	GntR	27,624	
101	PhoB	OmpR	26,425	Acetyl P
102	PhoP	OmpR	25,525	Acetyl P
103	PrpR		58,651	
104	PspF		36,978	
105	PutA (PoaA)		143,820	

106	PuuR (YcjC)	AraC	20,092	
107	QseA (YhcS)	LysR	34,517	
108	QseB (YgiX)	OmpR	24,676	Acetyl P
109	QseD (YjiE)	LysR	34,711	
110	RbsR	LacI	36,584	
111	RcsA	LuxR	23,522	
112	RcsB	NarL	23,670	Acetyl P
113	RhaS (RhaC)	AraC	32,308	
114	RobA (CbpB)	AraC	33,145	Dipyridyl
115	RpiR	RpiR	32,359	
116	RstA	OmpR	27,048	Acetyl P
117	RtcR (YhgB)	OmpR	60,299	
118	RutR (YcdC)	TetR	23,688	
119	SdiA	LuxR	28,117	
120	SfsA	SfsA	26,299	
121	SlyA	MarR	16,353	
122	SoxR	MerR	17,150	Paraquat
123	SoxS	AraC	12,911	Salicylate
124	SrlR (GutR)	DeoR	28,236	
125	StpA	H-NS	15,347	
126	TorR	OmpR	26,233	Acetyl P
127	TreR	LacI	34,531	
128	Ttk (SlmA)	TetR	22,836	
129	TyrR	TyrR	57,656	
130	UhpA	NarL	20,889	Acetyl P
131	UlaR (YjfQ)	DeoR	27,602	
132	UvrY (YecB)	NarL	23,893	Acetyl P
133	UxuR	GntR	29,308	
134	ZntR (YhdM)	MerR	16,179	
135	ZraR (HydG)	NtrC	48,359	Acetyl P
136	Zur	Fur	19,245	Zn(II)

Supplemental data Table.2.TF sample list

(Group-B) TF with unknown function (total, 55 samples)

TF no.	TF name	Family	Mr	Comments
1	YafC	LysR	33,776	
2	Yagl	IclR	27,838	
3	YahA	LuxR	40,725	EAL (c-di-GMP)
4	YahB	LysR	34,866	
5	YahD		21,687	ANK (ankyrin repeat)
6	YbaO	Lrp	17,347	
7	YbbO	AsnC	29,410	Oxidoreductase
8	YbdO	LysR	34,397	
9	YbeF	LysR	35,961	
10	YbiH	TetR	25,017	
11	YbjK	TetR	20,307	
12	YcaN	LysR	34,294	
13	YcfQ	TetR	23,362	
14	YcjZ	LysR	33,482	
15	Ydcl	LysR	33,402	
16	YdcN	LysR	19,731	
17	YdfH	GntR	26,565	
18	YdhB	LysR	35,250	
19	YeaM	AraC	30,533	
20	YedW	OmpR	25,018	YedVW TCS
21	YegW	GntR	28,277	
22	YehT	LytT	27,400	YehUT TCS
23	YeiE	LysR	32,724	
24	YfaX	IclR	28,904	
25	YfeR	LysR	33,903	
26	YfhH	NtrC	30,707	
27	YfiE	LysR	33,243	
28	YgaV	GntR	10,596	
29	YgeK	LuxR	16,577	
30	YgfB	TyrR	21,230	
31	Ygfl	LysR	34,674	
32	YhaJ	LysR	33,256	
33	YhjC	LysR	36,094	
34	YiaG	LysR	11,033	

35	YiaJ	IclR	31,067	
36	YiaU	LysR	37,274	
37	YidL	AraC	35,228	
38	YidP	GntR	27,328	
39	YidZ	LysR	36,882	
40	YieP	GntR	26,076	
41	YihW	DeoR	28,507	
42	YijO	AraC	32,149	
43	YjdC	TetR	21,931	
44	YjgJ	TetR	21,501	
45	YjiM	LysR	42,743	
46	YjiR	GntR	53,047	
47	YkgA	AraC	27,065	
48	YkgD	AraC	31,474	
49	YneJ	LysR	32,483	
50	YnfL	LysR	33,281	
51	YpdB	LytR	28,721	YpdAB TCS
52	YqhC	AraC	35,957	
53	YphH	NafC	9,513	
54	YdcR	GntR	52,793	Amino transferase
55	YciT	DeoR	27,603	

引用文献

- Ahmer, B.M. (2004) Cell-to-cell signaling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **52**, 933-945.
- Ahmer, B.M.M, Reeuwijk, J.V., Timmer, C.D., Valentine, P.J. and Heffron, F. (1998) *Salmonella typhimurium* encodes an SdiA homolog, a putative quorum sensor of the LuxR family, that regulates genes on the virulence plasmid. *J. Bacteriol.* **180**, 1185-1193.
- Ahmer, B.M., van Reeuwijk, M.J., Timmers, C.D., Valentine, P.J. and Heffron, F. (1998) *Salmonella typhimurium* encodes an SdiA homolog, a putative quorum sensor of the LuxR family, that regulates genes on the virulence plasmid. *J. Bacteriol.* **180**, 1185-1193.

- Asahi, Y., Noiri, Y., Igarashi, J., Asai, H., Suga, H. and Ebisu, S. (2010) Effects of N-acyl homoserine lactone analogues on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. *J. Periodont. Res.* **45**, 255-261.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* doi:10.1038/msb4100050.
- Bassler, B.L. (2002) Small talk: cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* **109**, 421-424.
- Casadaban, M. J. (1976) Transcription and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* **104**, 541-555
- Chai, H., Hazawa, M., Shirai, N., Igarashi, J., Takahashi, K., Hosokawa, Y., Suga, H. and Kashiwakura, I. (2010) Functional properties of synthetic N-acyl-L-homoserine lactone analogs of quorum-sensing gram-negative bacteria on the growth of human oral squamous carcinoma cells. *Invest. New Drugs* DOI 10.1007.
- Cherepanov PP, Wackernagel W. (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**, 9-14.
- Chu, W., Zere, T.Z., Weber, M.M., Wood, T.K., Whiteley, M., Hidalgo-Romano, B., Valenzuela, Jr., E., and McLean, R.J.C. (2011) Indole production promotes *Escherichia coli* mixed-culture growth with *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum sensing. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 411-419.
- Dyson, H.J. (2006) Structure of the *Escherichia coli* quorum sensing protein SdiA: activation of the folding switch by acyl homoserine lactones. *J. Mol. Biol.* **355**, 262-273.
- Dyszel, J.L., Soares, J.A., Swearingen, M.C., Lunsday, A., Smith, J.N. and Ahmer, B.M.M. (2010) *E. coli* K-12 and EHEC genes regulated by SdiA. *PLoS One* **5**: e8946.
- Ellington, A.D., and Szostak, J.W. (1990) *In vitro* selection of DNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818-822.
- Fuqua, W.C. and Winans, S.C. (1996) Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 727-751.
- Garcia-Lara, J., Shang, L.H. and Rothfield, L.I. (1996) An extracellular factor regulates expression of *sdiA*, a transcriptional activator of cell division genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 2742-2748.
- Ghosh, D., Roy, K., Williamson, K.E., Srinivasiah, S., Wommack, K.E. and Rodosevich, M. (2009) Acyl-homoserine lactones can induce virus production in lysogenic bacteria: an alternative paradigm for prophage induction. *Appl. Environ. Microbiol.*

75, 7142-7152.

- Hasegawa, A., Ogasawara, H., Kori, A. and Ishihama, A. (2008) AllR is the allantoin/glyoxylate-sensing master regulator of the genes for degradation and reutilization of purines. *Microbiology* **154**, 3366-3378.
- Hazawa, M., Kudo, M., Iwata, T., Saito, K., Takahashi, K., Igarashi, J., Suga, H. and Kashiwakura, I. (2011) Caspase-independent apoptosis induction of quorum-sensing autoinducer analogs against chronic myeloid leukemia K562. *Invest. New Drugs* DOI 10.1007.
- Hegde, M., Englert, D.L., Schrock, S., Cohn, W.B., Vogt, C., Wood, T.K., Manson, M.D. and Jayaraman, A. (2001) Chemotaxis to the quorum-sensing signal AI-2 requires the Tsr chemoreceptor and the periplasmic LsrB AI-2-binding protein. *J. Bacteriol.* **193**, 768-773.
- Houlberg, U. and Jensen, K.F. (1983) Role of hypoxanthine and guanine in regulation of *Salmonella typhimurium pur* gene expression. *J. Bacteriol.* **153**, 837-845.
- Hughes, K.T. and Roth, J.R. (1988) Transitory cis complementation; a method for providing transposition functions to defective transposons. *Genetics* **119**, 9-12.
- Hughes, D.T., Terakhova, D.A., Liou, L., Hovde, C.J., Sahl, J.W., Patankar, A.V., Gonzalez, J.E., Edrington, T.S., Rasko, D.A. and Sperandio, V. (2010) Chemical sensing in mammalian host-bacterial commensal associations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 9831-9836.
- Ishihama, A. (2010) Prokaryotic genome regulation: multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks. *FEMS Microbiol Rev.* **34**, 628-645.
- Ishihama, A. (2012) Prokaryotic genome regulation: a revolutionary paradigm. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B, Phys. Biol. Sci.* **88**, 485-508.
- Igarashi, J. and Suga, H. (2011) Custom synthesis of autoinducers and their analogs. *Meth. Mol. Biol.* **692**, 365-274.
- Jenal, U. and Malone, J. (2006) Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 385-407.
- Jishage, M. and Ishihama, A. (1995) Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: Intracellular levels of σ^{70} and σ^{38} . *J. Bacteriol.* **177**, 6832-6835.
- Kitagawa M, Ara T, Arifuzzaman M, Ioka-Nakamichi T, Inamoto E, Toyonaga H, Mori H. (2005) Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res.* **12**(5):291-9.
- Lee, J., Jayaraman, A. and Wood, T.K. (2007) Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol.* **7**: 42.

- Lee, J., Maeda, M., Hong, S.H. and Wood, T.K. (2009) Reconfiguring the quorum-sensing regulator SdiA of *Escherichia coli* to control biofilm formation via indole and N-acylhomoserine lactones. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 1703-1716.
- Lindsay, A. and Ahmer, M.M. (2005) Effect of *sdiA* on biosensors of N-acylhomoserine lactones. *J. Bacteriol.* **187**, 5054-5058.
- Lorca, G.L., Ezersky, A., Lunin, V.V., Walker, J.R., Altamentova, S., Evdokimova, E., Vedadi, M., Bochkarev, A. and Savchenko, A. (2007) Glyoxyle and pyruvate are antagonistic effectors of the *Escherichia coli* IclR transcriptional regulator. *J. Biol. Chem.* **282**, 16476-16491.
- Marbaniang, C.N. and Gowrishankar, J. (2011) Role of ArgP (IciA) in lysine-mediated repression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **193**, 5985-5996.
- Michael, B., Smith, J.N., Swift, N., Heffron, F. and Ahmer, B.M. (2001) SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J. Bacteriol.* **183**, 5733-5742.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Ogasawara, H., Hasegawa, A., Kanda, E., Miki, T., Yamamoto, K. and Ishihama, A. (2007) Genomic SELEX search for target genes under the control of PhoQP-RstBA signal relay cascade. *J. Bacteriol.* **189**, 4791-4799.
- Ogasawara, H., Ishida, Y., Yamada, K., Yamamoto, K. and Ishihama, A. (2007) PdhR (pyruvate dehydrogenase complex regulator) controls the respiratory electron transport system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**, 5534-5541.
- Ogasawara, H., Yamamoto, K. and A. Ishihama, A. (2010) Regulatory role of MlrA in transcription activation of *csgD*, the master regulator of biofilm formation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **312**, 160-168.
- Ogasawara, H., Yamada, K., Kori, A., Yamamoto, K. and Ishihama, A. (2010) Regulation of the *Escherichia coli csgD* promoter: interplay between five transcription factors. *J. Bacteriol.* **156**, 2470-2483.
- Passador, L., Tucker, K.D., Guertin, K.R., Journet, M.P., Kende, A.S. and Iglewski, B.H. (1996) Functional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer PAI. *J. Bacteriol.* **178**, 5995-6000.
- Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H. and Greenberg, E.P. (1994) Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 197-201.
- Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H. and Greenberg, E.P. (1995) A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1490-1494.

- Pearson, J.P., Pesci, E.C. and Iglewski, B.H. (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* **179**, 5756-5767.
- Rahmati, S., Yang, S., Davidson, A.L. and Zechiedrich, E.L. (2002) Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. *Mol. Microbiol.* **43**, 677-685.
- Schreiber, V. and Richet, E. (1999) Self-association of the *Escherichia coli* transcription activator MalT in the presence of maltotriose and ATP. *J. Biol. Chem.* **274**, 33220-33226.
- Sharma, V.K., Bearson, S.M.D. and Bearson, B.L. (2010) Evaluation of the effects of *sdiA*, a *luxR* homologue, on adherence and motility of *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* **156**, 1308-1312.
- Schaefer, A.L., Hanzelka, B.L., Eberhard, A. and Greenberg, E.P. (1996) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: Probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. *J. Bacteriol.* **178**, 2897-2901.
- Shimada, T., Fujita, N., Maeda, M. and Ishihama, A. (2005) Systematic search for the Cra-binding promoters using genomic SELEX system. *Genes Cells* **10**, 907-918.
- Shimada, T., Hirao, K., Kori, A., Yamamoto, K. and 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**, 744-779.
- Shimada, T., Ishihama, A., Busby, S.J.W. and Grainger, D.C. (2008) The *Escherichia coli* RutR transcription factor binds at targets within genes as well as intergenic regions. *Nucleic Acids Res.* **36**, 3950-3955.
- Simons, R.W., Houman, F. and Kleckner, N. (1987) Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**, 85-96.
- Singer, B.S., Shtatland, T., Brown, D. and Gold, L. (1997) Libraries for genomic SELEX. *Nucleic Acids Res.* **25**, 781-786.
- Sitnikov, D.M., Schineller, J.B. and Moses, R.E. (1996) Control of cell division in *Escherichia coli*: regulation of transcription of *ftsQA* involves both *rpoS* and SdiA-mediated autoinduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 336-341.
- Smith, J.N. and Ahmer, B.M. (2003) Detection of other microbial species by *Salmonella*: expression of the SdiA regulon. *J. Bacteriol.* **185**, 1357-1366.
- Sprandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P. and Kaper, J.B. (2003) Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8951-8956.
- Studier, F. W., and B. A. Mofatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.

- Tavio, M.M., Aquili, V.D., Poveda J.B., Antunes, N.T., Sanchez-Céspedes, J. and Vila, J. (2010) Quorum-sensing regulator *sdiA* and *marA* overexpression is involved in *in vitro*-selected multidrug resistance of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 1178-1186.
- Tuerk, C., and L. Gold. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505-510.
- Van Houdt, R., Aertsen, A., Moons, P., Vanoirbeek, K. and Michiels, C.W. (2006) N-acyl-L-homoserine lactone signal interception by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* **256**, 83-89.
- Yakhnin H, Baker CS, Berezin I, Evangelista MA, Rassin A, Romeo T, Babitzke P. (2011) CsrA represses translation of *sdiA*, which encodes the N-acylhomoserine-L-lactone receptor of *Escherichia coli*, by binding exclusively within the coding region of *sdiA* mRNA. *J Bacteriol.* **193**, 6162-70
- Yamamoto, K., Hirano, K., Ohshima, T., Aiba, H., Utsumi, R. and Ishihama, A. (2005) Functional characterization *in vitro* of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**, 1448-1456.
- Yamamoto, K., Yata, K., Fujita, N. and Ishihama, A. (2001) Novel mode of transcription regulation by SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulator. *Mol. Microbiol.* **41**, 1187-1198.
- Yao, Y., Dickerson, T.J., Hixon, M.S. and Dyson, H.J. (2007) NMR detection of adventitious xylose binding to the quorum-sensing protein SdiA of *Escherichia coli*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 6202-6205.
- Yao, Y., Martinez-Yamout, M.A., Dickenson, T.J., Brogan, A.P., Wright, P.E. and Schauder, S., Shokat, K., Surette, M.G. and Bassler, B.L. (2001) The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol. Microbiol.* **41**, 463-476.
- Wang, X.D., de Boer, P.A. and Rothfield, L.I. (1991) A factor that positively regulates cell division by activating transcription of the major cluster of essential cell division genes of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **10**, 3363-3372.
- Waters, C.M. and Bassler, B.L. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 319-346.
- Wei, Y., Vollmer, A.C. and LaRossa, R.A. (2001) *In vivo* titration of mytomycin C action by four *Escherichia coli* genomic regions on multicopy plasmids. *J. Bacteriol.* **183**, 2259-2264.
- Weiss, D.S. (2004) Bacterial cell division and the septal ring. *Mol. Microbiol.* **54**, 588-597.

- Wu, C., Lokanath, N.K., Kim, D.Y., Nguyen, L.D. and Kim, K.K. (2007) Crystallization and preliminary X-ray studies of SdiA from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr.* **64**,19-21.
- Zhou, X., Meng, X. and Sun, B. (2008) An EAL domain protein and cyclic AMP contribute to the interaction between the two quorum sensing systems in *Escherichia coli*. *Cell Res.* **18**, 937-948.