

大腸菌二成分制御系因子の包括的発現解析

渡邊, 宏樹 / WATANABE, Hiroki

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学・工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編 / 法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

55

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2014-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00010398>

大腸菌二成分制御系因子の包括的発現解析

COMPREHENSIVE ANALYSIS OF EXPRESSION OF TWO-COMPONENT SYSTEM FACTORS IN *ESCHERICHIA COLI*.

渡邊 宏樹

Hiroki WATANABE

指導教員 山本兼由

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

Single-cell bacteria, like *Escherichia coli*, adapts to various diverse change of environments for survival in nature. *E. coli* is exposed to acidic conditions in stomach and then to anaerobic conditions within intestine and survives by changes of the expression pattern of its genome. The selective expression of genes in a total of about 4,500 genes on its genome takes place by controlling the promoter recognition properties of RNA polymerase modulated by transcription factors. Response regulators (RR) are widely distributed among bacteria and belong to bacterial signal transduction systems, two-component system (TCS). In this system, a sensor kinase protein senses environmental signal, phosphorylate itself, and then transfer the phosphate to a RR to regulate gene expression. *E. coli* K-12 genome sequence predicted that a total of 30 sensor kinases and a total of 32 response regulators. To gain insight of the expression profile for TCS factors under several conditions, the strength of whole transcription factor gene-associated promoters was examined in vivo by using *gfp* reporter assay. First, we constructed a collection of reporter plasmid of *E. coli* promoters for transcription factors. In this study, we reported the expression profile for TCS factors at logarithmic and stationary phases under both aerobic and anaerobic conditions.

Key Words : *Escherichia coli* two-component system; response regulator

1. 序論

細菌は単純な単細胞生物であるが様々な環境に適応することができる。多様な環境適応のほとんどは遺伝子発現における転写レベルで調節されている。ほとんどの転写調節は、DNA 結合ドメインをもつ転写因子 (TF: Transcription factor) が DNA 上で RNA ポリメラーゼ (RNAP: RNA polymerase) と相互作用をして転写を制御していると考えられている。転写因子は、低分子化合物であるリガンドの結合や化学修飾により活性化する。細菌情報伝達機構である二成分制御系 (TCS: Two-component system) に属するレスポンスレギュレーター (RR: Response regulator) は、細胞外シグナルを感知するヒスチジンキナーゼ (HK: Histidine kinase) によりリン酸化され、転写を調節する転写因子である。大腸菌 K-12 ゲノム上には、30 種類の HK と 32 種類の RR が推定され、31 種類の TCS が存在する。本研究では、大腸菌 K-12 株のゲノム上に推定される全転写因子および全 TCS 因子の発現を包括的に解析するため、*gfp* 融合プラスミドのセットを構築し、様々な培養条件下

で生育する大腸菌細胞中の発現量を測定した。

2. 実験方法

(1) *gfp* 融合プラスミドの作製

各 TF 遺伝子の開始コドン上流 500 bp と下流 150 bp の計 650 bp を PCR で増幅し、*gfp* 遺伝子上流に融合させた GFP レポータープラスミドを構築した。また、各 TCS 因子遺伝子では、開始コドン上流約 700 bp を *gfp* 遺伝子上流に融合させた。

(2) Promoter Chip による RNAP 結合強度の測定

約 1,000 種類の大腸菌プロモーター領域 (約 700 bp) の GFP レポータープラスミドセットである PPT クローンを鋳型として、各プロモーター領域を PCR で増幅し、それらの DNA 断片をスライドガラスに固定した Promoter Chip を作製した。Promoter Chip 上で精製 RNAP を反応させ、各スポット上の DNA 断片との結合を、抗 β' サブユニット抗体と蛍光標識二次抗体を用いて網羅的に検出した。

(3) フローサイトメーターによる大腸菌細胞内プロモーター強度の測定

TF および TCS の GFP レポータープラスミドセットを大腸菌に導入し、得られた形質転換体を LB 培地により好気条件および嫌気条件 (窒素環境下) でそれぞれ誘導期、増殖期、定常期まで培養した。FACS を用いて培養液中の 100,000 細胞をピックアップし、1 つ 1 つの細胞の GFP 蛍光強度を測定した。100,000 細胞のうち最も多くの細胞で検出された GFP 蛍光強度をプロモーター強度とした。

3. 結果と考察

(1) TF プロモーターの活性

FACS により、97 種類の DNA 結合性 TF のプロモーター強度を調べた。その結果、93 種類の TF 遺伝子上流にプロモーター活性が確認され、好気条件および嫌気条件の誘導期―増殖期―定常期におけるプロモーター活性の変動から、プロモーターの分類を行った。

6 条件全てで活性化しているものが 19 種類見つかり、これらのプロモーターは恒常的に発現しているものと考えられた。また、好気条件および嫌気条件で活性の変動パターンが同一であったものが 37 種類確認された。両条件の定常期特異的に活性が見られたものが 6 種類、増殖期特異的に活性が見られたものが 3 種類、誘導期・増殖期と比較して定常期に最も活性化するのが 25 種類、増殖期と定常期で同程度活性化したものが 3 種類見られ、これらのプロモーターは増殖相に応じて発現することが考えられた。

一方で、変動パターンが好気条件と嫌気条件で異なるものが 37 種類確認された。好気条件の定常期特異的に活性が見られたものが 6 種類、好気条件では増殖期に活性化するが嫌気条件では定常期に活性化するのが 6 種類、好気条件における定常期で活性化し嫌気条件では変動しなかった 19 種類、好気条件における増殖期で活性化し嫌気条件では変動しなかった 2 種類、そして好気条件では変動しなかったものの嫌気条件における定常期において活性化した 4 種類が見られた。これらのプロモーターは酸素にตอบสนองして発現が変動することが判明した。

(2) TCS プロモーターの活性

Promoter Chip と FACS により、全 TCS 因子遺伝子 (28 種類の HK と 32 種類の RR) 上流におけるプロモーター活性の有無を調べた。47 種類の TCS 因子遺伝子上流には、大腸菌細胞内で有意なプロモーター活性を確認した。さらに、Promoter Chip 解析の結果、これらのプロモーターへの RNAP 結合強度と細胞内プロモーター活性にある程度の相関を確認することができた。

一方、細胞内プロモーター活性が高い 9 種類 (*arcAp*, *cpxRp*, *evgAp*, *narPp*, *phoPp*, *qseBp*, *rcsBp*, *uvrYp*, *yedWp*) の遺伝子上流への RNAP 結合は弱く、また細胞内プロモーター活性が低い 4 種類 (*barAp*, *cusRp*, *torRp*, *torSp*) の遺伝子上流への RNAP 結合は強いことが確認された。

さらに、FACS を用いて TCS プロモーターについてプロモーターの分類を行った。6 条件全てで活性化しているものが 3 種類見つかり、これらのプロモーターは恒常的に発

現しているものと考えられた。また、好気条件および嫌気条件で活性の変動パターンが同一であったものが 30 種類確認された。両条件の定常期特異的に活性が見られたものが 23 種類、誘導期・増殖期と比較して定常期に活性化するのが 7 種類見られ、これらのプロモーターは増殖相に応じて発現することが考えられた。

一方で、変動パターンが好気条件と嫌気条件で異なるものは 27 種類確認された。好気条件の定常期特異的に活性が見られたものが 19 種類、好気条件の増殖期および定常期で同程度活性が見られたものが 4 種類、好気条件における定常期で活性化し嫌気条件では増殖期で活性化したものが 1 種類、そして好気条件では変動しなかったものの嫌気条件における定常期において活性化した 3 種類が見られた。これらのプロモーターは酸素にตอบสนองして発現が変動することが判明した。

(3) TCS プロモーターの自己制御

多くの TF 遺伝子は自己制御することが知られている。そこで、全 TCS 因子遺伝子の GFP レポータープラスミドを親株 (BW25113) および各 TCS 遺伝子欠失株に導入し、それらの形質転換体におけるプロモーター活性を測定した結果、8 種類 (*narPp*, *phoPp*, *evgAp*, *basRp*, *cheYp*, *rcsDp*, *rcsBp*, *rcsCp*) のプロモーター活性が、それぞれの TCS 遺伝子欠失株で親株と比較して顕著に低下していることが確認できた。一方、2 種類 (*arcAp*, *ntrBp*) のプロモーター活性は、それぞれの TCS 遺伝子欠失株で親株と比較して顕著に増加した。これらの結果より、*narP*, *evgA*, *basR*, *rcsD*, *rcsB*, *rcsC*, *cheY*, *phoP* は自己プロモーターを活性化、*arcA*, *ntrB* は自己プロモーターを抑制する TCS 因子であることが示唆された。これらの現象は、主に好気条件の定常期において確認された。

4. 結言

大腸菌全 TF および全 TCS 因子のうち、157 種類の遺伝子上流におけるプロモーター活性を包括的に測定するシステムを構築した。これらを用い大腸菌細胞内におけるプロモーター活性を測定した結果、153 種類の TF および TCS 因子遺伝子上流に有意なプロモーター活性を見出した。さらに、TCS 因子ではオペロンを形成する全ての HK 遺伝子と RR 遺伝子それぞれの上流に機能的なプロモーターを確認し、環境条件によって発現量が異なることが判明した。したがって、同族の HK と RR が細胞中に異なる量で存在することが示唆された。

謝辞: 本研究は、山本兼由准教授のご指導を始め、石浜明教授の有意義なご助言、法政大学・B4 小川綾乃さんのご協力のもとで行われました。心より感謝を申し上げます。

参考文献

- 1) Yamamoto, K *et al* (2005) *J Biol Chem.* 280, 1448-1456
- 2) Ishihama, A (2010) *FEMS Microbiol Rev.* 34, 628-645