

ビフィズス菌との相互作用で誘導される大腸菌遺伝子の同定と発現制御

小島, 湊晃 / KOJIMA, Taniaki

(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

(巻 / Volume)

56

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2015-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00011431>

ビフィズス菌との相互作用で誘導される大腸菌遺伝子の 同定と発現制御

TRANSCRIPTION REGULATION OF *ESCHERICHIA COLI* GENES INDUCED AFTER CELL-CELL
INTERACTION WITH *BIFIDOBACTERIUM LONGUM*.

小島 溪晃

Taniaki KOJIMA

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生命機能学領域修士課程

Quorum sensing (QS) is a bacterial cell-cell communication process by which bacteria communicate using extracellular signals called autoinducers. *Escherichia coli* and *Bifidobacterium longum* are member of the normal microflora of human intestine. In this study, we characterize novel QS between *E. coli* and *B. longum*. Transcriptome analyses showed that condition medium from *B. longum* culture (BLCM) induced more than 125 genes of *E. coli*, including *uhpT* gene. Northern blotting and reporter analyses confirmed that signal(s) in BLCM, which is stable at between 37 °C to 25 °C, induced *uhpT* promoter in the dependent manner of UhpAB two-component system.

Key Words: *Escherichia coli*, *Bifidobacterium longum*, quorum sensing, UhpAB two component system

1. 序論

自然環境においては、微生物は他の生物種と相互作用し、協調と競合を図りながら秩序をもつ社会を構成していると考えられている。細菌では、低分子化合物シグナルを介した細胞間交信 Quorum Sensing (QS) が知られている[1]。動物腸内には、数百種の細菌が生息し、動物の成長過程で腸内の細菌叢が大きく変動する[2]。これらの過程では、特異な細菌-細菌間および細菌-宿主動物間の相互作用が推測される。ビフィズス菌はヒト腸内細菌叢での占有率が高く、ヒトの加齢とともに腸内存在種が変移することでヒトの健康の適正を図っていると考えられている。本研究では、動物の腸内細菌であるビフィズス菌と大腸菌の細菌間相互作用の分子機構の解明を目的とした。

2. 実験方法

(1) 培養上清の調製

ビフィズス菌の *B. longum* を ABCM 培地で一晩した培養液を新しい ABCM 培地で 100 倍希釈し、CO₂ 嫌気条件下、

37°C で定常期まで培養した。培養液は遠心分離後、上清を回収し、5N NaOH で pH を 7.2 に調整し、フィルター滅菌を行なった。得られた上清は、等量の新しい ABCM 培地混合させ、培養に使用する *B. longum* 培養上清 (BLCM) とした。

(2) トランスクリプトーム解析

大腸菌を BLCM と ABCM 培地で対数期まで培養させ、全 RNA を調製した。全 RNA を鋳型に Cy3 もしくは Cy5 で標識した cDNA を調製し、DNA アレイにハイブリダイゼーションさせた。その後、アレイスキャナーでスライド上の各スポットの蛍光強度を測定し、全蛍光強度に対する割合を算出した。

(3) ノーザンブロッティング解析

uhpT 遺伝子を含む全 RNA をアガロース電気泳動で分画後、ナイロンメンブレンに転写した。*uhpT* 遺伝子を含む 750 bp DNA を DIG で標識し、プローブとした。全 RNA を転写したメンブレンに DIG 標識プローブを供与し、ハイブリダーゼーションさせた。その後、メンブレン上の

DIG 標識プローブを検出するために、DIG 抗体を反応させ、CDP-Star による化学発光を LAS で検出し、メンブレン上の *uhpT* 転写産物を確認した。

(4) *lux* 融合遺伝子による遺伝子発現解析

uhpT プロモーター領域を *lux* レポーター遺伝子上流に組み込んだプラスミドを作製した (*puhpT-luxL1*)。*puhpT-luxL1* を大腸菌株に導入し、ABCM 培地、BLCM、大腸菌培養上清 (ECCM) で対数期まで培養後、OD₆₀₀ と化学発光を測定し、化学発光/OD₆₀₀ としてプロモーター活性を算出した。

3. 結果と考察

(1) BLCM により発現が変動する大腸菌遺伝子

BLCM による大腸菌ゲノム上の全遺伝子発現の変化を網羅的に調べるためにトランスクリプトーム解析を行った。その結果、BLCM により 125 種類の遺伝子発現が増加し、82 種類の遺伝子発現が減少することを確認した。

(2) BLCM による大腸菌 *uhpT* 遺伝子の転写誘導

BLCM で特異的に発現が増加した 117 種類の大腸菌遺伝子の中から、顕著に発現が増加した、六炭糖リン酸輸送システムをコードする *uhpT* 遺伝子に着目した。大腸菌 *uhpT* 遺伝子が BLCM により特異的な発現誘導を確認するために、ノーザンブロッティングを行った。大腸菌 W3110 typeA を BLCM、ECCM、ABCM 培地により対数期まで培養させ、全 RNA を調製し、アガロース電気泳動後、その分画をメンブレンに転写させた。DIG で標識した *uhpT* 遺伝子プローブをメンブレン上の RNA とハイブリさせ、化学発光より *uhpT* 転写産物を検出した。その結果、ABCM 培地で培養した大腸菌では *uhpT* 転写量を十分に観測できなかったが、BLCM で培養した大腸菌では顕著に *uhpT* 転写産物が増加していた。さらに、ECCM で培養した大腸菌では、ABCM 培地で培養した大腸菌と同じように *uhpT* 転写量を十分に観測できなかった。これらの結果から、BLCM は大腸菌 *uhpT* 遺伝子の転写を特異的に誘導することが明らかとなった。

(3) BLCM による二成分制御系 UhpAB を介した大腸菌 *uhpT* 遺伝子の転写誘導

uhpT 遺伝子は、二成分制御系 UhpAB システムによって細胞外グルコース-6-リン酸に依存して発現誘導されることが知られている[3]。そこで、BLCM 特異的な *uhpT* 遺伝子発現誘導について、BLCM で培養した大腸菌の親株、*uhpAB* 欠失株、*uhpB* 欠失株を用いてノーザンブロッティングで検討した。その結果、親株では BLCM 特異的な *uhpT* 遺伝子発現誘導を確認できたが、*uhpAB* 欠失株および *uhpB* 欠失株では BLCM 特異的な *uhpT* 遺伝子発現誘導は確認されなかった (図)。これらの結果より、BLCM 特異的な *uhpT* 遺伝子発現誘導には、二成分制御系 UhpAB が必要であることが明らかとなった。また、UhpAB システムは BLCM に含まれるシグナルを感知すると予想された。

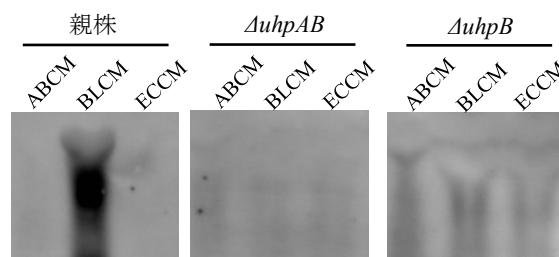


図. BLCM による大腸菌 *uhpT* 遺伝子の転写誘導

(4) BLCM による大腸菌 *uhpT* プロモーター活性

BLCM による特異的な *uhpT* 転写誘導がプロモーター活性誘導に起因しているかを確認するために、*lux* レポーターシステムを用いてプロモーター活性を測定した。その結果、BLCM で培養した大腸菌でのみ特異的な *uhpT* プロモーター活性が増加した。

(5) 大腸菌 *uhpT* 遺伝子の発現を誘導させる BLCM 中のシグナル分子の性質

BLCM には、大腸菌 *uhpT* 遺伝子の発現を誘導させる未同定のシグナル分子が存在すると考えられる。そこで、この未同定分子の温度に対する安定性を調べた。BLCM を 0℃、20℃、37℃、60℃で 3 時間処理し、それぞれの温度処理 BLCM で培養した大腸菌の *uhpT* 遺伝子転写量をノーザンブロッティングで測定した。その結果、20℃と 37℃で処理した BLCM で培養した大腸菌では *uhpT* 遺伝子の転写が誘導されたが、0℃と 60℃で処理した BLCM で培養した大腸菌では誘導が確認できなかった。これらの結果から、大腸菌 *uhpT* 遺伝子の発現を誘導させる BLCM 中のシグナル分子は低温と高温に感受性をもつことが示された。

4. 結言

B. longum 培養上清は二成分制御系 UhpAB を介して大腸菌の *uhpT* の発現を誘導することが示唆された。また、*B. longum* 培養上清は大腸菌 *uhpT* プロモーター活性を増加させることが明らかとなった。大腸菌 *uhpT* の発現を誘導する *B. longum* のシグナル分子は低温と高温に感受性をもつことが明らかになった。*uhpT* はグルコース 6 リン酸により発現が誘導されることから、大腸菌 *uhpT* の発現を誘導する *B. longum* のシグナル分子は糖の骨格を持っているのではないかと考えられる。

謝辞: 本研究は、山本兼由教授のご指導を始め、麻布大学の森田英利准教授、田村正典さん、山田佳代子さん、山中幸さん、平優季さん、新野つばささんのご協力のもとで行われました。深く感謝を申し上げます。

参考文献

- 1) Bassler BL *et al* (2006) Cell 125 (2):237-46.
- 2) 光岡知足: 腸内フローラと生活習慣病, 学会出版センター, 2001
- 3) Wright JS 3rd *et al* (2001) J Bacteriol 183(10):3149-59.