法政大学学術機関リポジトリ
HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

PDF issue: 2025-07-12

大腸菌二成分制御系情報伝達ネットワークの研究

吉多, 美祐 / YOSHIDA, Myu

(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)
57
(開始ページ / Start Page)
1
(終了ページ / End Page)
4
(発行年 / Year)
2016-03-24

大腸菌二成分制御系情報伝達ネットワークの研究

STUDIES ON THE SIGNAL TRANSDUCTION NETWORK
OF TWO COMPONENT SYSTEMS IN *ESCHERICHIA COLI*

吉多美祐
Myu YOSHIDA
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博士後期課程

Bacterial two-component system (TCS) is composed of the sensor kinase (SK) and the response regulator (RR). After monitoring an environmental signal or condition, SK activates RR through phosphorylation, ultimately leading to the signal-dependent regulation of genome transcription. In *Escherichia coli*, a total of more than 30 SK-RR pairs and a few orphan RRs exist. Cross talk of the signal transduction takes place at three stages: signal recognition by SK (stage 1); RR phosphorylation by SK (stage 2); and target recognition by RR (stage 3). For the elucidation of the entire signal transduction network of *E. coli*, I performed the comprehensive analysis of the stage-3 cross talk between six NarL-family RRs and between fourteen OmpR-family RRs. In addition, I investigated the role of uncharacterized RR YgeK. Results of both of *in vivo* and in *vitro* studies suggested that the stage-3 cross talk takes place through the not ambiguous but specific promoter recognition by RRs. Furthermore, I show that YgeK plays the important role for the biofilm formation and the acetate metabolism. These findings provide the insight into the perspective of TCS signal transduction network and contribute for understand the mechanism of the bacterial adaptation and survival against to environment change.
***Key Words**: Two-component regulation system, Escherichia coli, cross talk, transcription factor*

1. 序論

数千の遺伝子しか持たない細菌などの単純な単細胞生物も多様な環境変化に適応し生存している。このような生物内では、限られた数の環境応答システム間でネットワークを形成し、複雑化することで、多様な環境応答を可能にしている。

細菌の主な細胞情報伝達機構は二成分制御系（TCS：Two Component System）として知られている。典型的な TCS は、センサーキナーゼ（SK）と、レスポンスレギュレーターで（RR）で構成されている。SK は外界のシグナルを感知し自身の His 残基をリン酸化させ、そのリン酸基を同属レスポンスレギュレーター（RR）のレシーバードメイン上にある Asp 残基へ転移させる。リン酸化した RR は活性化し、遺伝子発現や生理活性などの制御を行う。多くの場合、SK と RR はオペロンを形成している。その遺伝子構成に加え、遺伝的・生化学的実験データから、大腸菌 K-12 株では約 30 種類の SK-RR ペアが予想されており、ペアとなる SK が見つかっていないオーファン RR が 4 つ存在している [1]。TCS の情報伝達は特異的であるが、SK のシグナル感知（Stage 1）、SK による RR のリン酸化（Stage 2）、RR の標的認識（Stage 3）の各段階で、交差した情報伝達（クロストーク）が報告されている（図 1）。

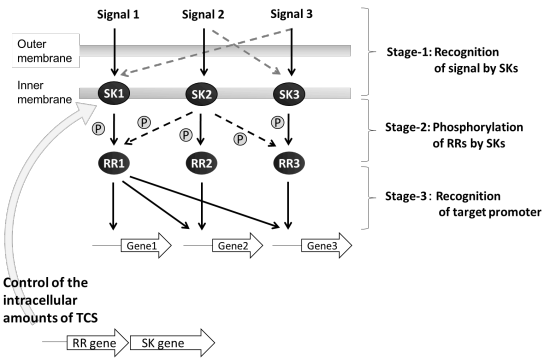

図 1　二成分制御系による情報伝達の概要

これまでに Stage 1 では金属感知におけるクロストークが報告されている。Stage 2 については、*in vivo* の実験ではペアとなる SK 欠損株で RR が他の TCS SK からリン酸転移を受けるようなクロストークが複数報告されている。これに加え、*in vitro* では精製 SK、RR タンパク質を用いた全 TCS 間での網羅的なリン酸基転移実験も行われており、多くのクロストークが観察されている[1]。Stage 3 の

遺伝子発現制御においては、RR はそれぞれプロモーター上の異なる配列を特異的に認識している。一方で、同一配列を複数の RR が認識するクロストークの報告もある。しかし、Stage 3 クロストークの全体的な解析はされていないため、どの程度曖昧な配列認識が起こるのかはわからない。

本研究では、Stage 3 クロストークの網羅的な解析を行った。さらに、機能未知 RR YgeK の機能解析も行い、大腸菌情報伝達ネットワークの全体像を解明することで、細菌環境応答の仕組みの理解を目指した。

2. 実験方法

(1)使用した大腸菌株

断りがない限り、遺伝子プロモーターや遺伝子のクローニングには大腸菌 K-12 W3110 type A 株の genome DNA を用いた。大腸菌 O157:H7 Sakai 株の *ygeK* のクローニングには大腸菌 O157:H7 Sakai 株の genome DNA を用いた。また、レポーターアッセイやグロース測定には大腸菌 K-12 BW25113 株を使用した。

(2)大腸菌の培養条件

大腸菌の培地には LB または M9 を用い、必要に応じて、0.4%の Glucose、0.4%の Glycerol、50 mM の Potassium acetate、0.2%の Casamino acid、50 mM の Potassium chloride、100 μg/ml の Ampicillin、25 μg/ml の Kanamycin、20μg/ml の Chloramphenicol を添加した。RR 活性誘導の際には、M9 培地を使用し、大腸菌を対数増殖期まで培養後、誘導物質を添加した。バイオフィルム形成の確認は、大腸菌を 0.004%の Congo red を含む寒天培地に接種することで行った。

(3)レポーターシステムによる遺伝子発現解析

遺伝子発現は LacZ または Lux の活性として測定した。LacZ レポーター株の作製と LacZ の活性測定は、Simon らの方法[4]に従った。標的遺伝子プロモーター領域と *lacZ* の融合遺伝子はプラスミド pRS552 上からλファージを用いて大腸菌染色体上に導入し、LacZ の活性は Miller unit として算出した。Lux レポーター株は、標的遺伝子プロモーター領域をプラスミド pLUX 上の *lux* と融合させ、そのプラスミドで大腸菌を形質転換することで作成した。Lux の活性は、この株の培養液の発光を Plate reader MTP-800 (Corona)を用いて検出することで測定した。

(4)RR 発現プラスミドの構築

RR をコードする遺伝子の 5'末端側にリボソーム認識 SD 配列を付加し、3'末端側に FLAG タグをコードする配列を付加したものを、プラスミド pBAD33 に組み込むことで、アラビノースにより RR 発現を誘導し、その発現を抗 FLAG 抗体で検出できるシステムを構築した。

(5)Zn^{2+}Phos-tag SDS-PAGE によるリン酸化タンパク質の検出

Zn^{2+}Phos-tag SDS-PAGE は Kinoshita ら[5]の方法に従った。大腸菌細胞を sample buffer (585 mM Tris、9.16% w/v SDS、30% Glycerol、0.10% BPB、15% 2-mercaptethanol)で溶かし、30mA、4°C で泳動を行った。その後ウェスタンブロッティングにより、目的のタンパク質を検出した。

(5)ゲルシフトアッセイ

レポーターシステムの作製に使用した遺伝子プロモーター領域を PCR で増幅し、FITC で蛍光標識した。この DNA 断片 0.1 pmol と、1 μg のサケの DNA、0~1000 pmol のタンパク質を 37℃で 30 分反応させ、PAGE を行った。場合によって、反応時に 10 mM のアセチルリン酸を加えた。

3. 結果

(1)NarL ファミリーRR 間での Stage 3 クロストーク

大腸菌に存在する 34 の RR のうち、31 の RR が DNA 結合ドメインを持ち、遺伝子発現制御を行う。これらはその相同性により、5 つのファミリー(OmpR、NarL、NtrC、CriR、LytT)に分類される。類似した RR 間でのクロストークを観察するために、モデルシステムとして 6 つの NarL ファミリーRR (EvgA、NarL、NarP、RcsB、UhpA、UvrY)による各既知標的遺伝子 (*ydeP*、*nirB*、*wza*、*uhpT*、*csrB*) 発現への影響を観察した。

a) NarL ファミリーRR の細胞内レベルの調節

まず、これまでに報告されている誘導シグナルにより RR を活性化させ、標的プロモーター発現への影響を観察した。EvgA は pH5.5 ・ KCl [6] で、UhpA は Glucose-6-phosphate [7]によりそれぞれ活性化した。しかし、NarL、NarP、RcsB、UvrY は既知のシグナル [8、9、10]では十分に活性化できなかった。一般的に RR の過剰発現は RR のリン酸化にかかわらず、遺伝子の発現を誘導することが知られているため、NarL、NarP、RcsB、UvrY をプラスミド上から過剰発現させたところ、全ての標的遺伝子の発現誘導が確認できた。また、Zn^{2+}Phos-tag SDS-PAGE 解析の結果から、過剰発現させた NarL の約半分はリン酸化しており、NarP、RcsB、UvrY はほとんどリン酸化していないことが示された。

b) レポーターアッセイによる NarL ファミリーRR 間でのクロストークの解析

標的遺伝子発現が最も高く観察できた条件において、NarL ファミリーRR による各標的遺伝子の発現制御を全 30 通りの組み合わせで観察した。*ydeP* の発現は EvgA 以外に、NarL、RcsB、UvrY にも誘導され、*uhpT* の発現は UhpA 以外に UvrY によっても誘導された。したがって、NarL ファミリーRR 間では限定的な組み合わせでクロストークが起きていることが明らかとなった。

c) ゲルシフトアッセイによる NarL ファミリーRR 間でのクロストークの解析

ゲルシフトアッセイにより、6 つの NarL ファミリーRR タンパク質と、5 つの各標的プロモーターDNA との結合を全 30 通りの組み合わせで観察した。既知の組み合わせでは、EvgA、NarL、UhpA、UvrY のプロモーターへの親

和性はアセチルリン酸の添加により上昇した。一方で、NarP、RcsB の既知標的プロモーターへの親和性はアセチルリン酸の影響を受けなかった。既知の組み合わせ以外でも、NarL-*ydeP*、NarP-*ydeP*、RcsB-*ydeP*、UvrY-*ydeP*、UvrY-*uhpT* の結合が観察され、NarL-*ydeP* の親和性はアセチルリン酸の添加により上昇したが、そのほかはアセチルリン酸の影響を受けなかった。また、レポーターアッセイでは、NarP による *ydeP* の発現誘導は見られていない。NarP による *ydeP* 発現の活性化には今回行った実験とは異なる条件が必要なのかもしれない。

d) NarL ファミリーRR 間でのクロストークの特異性

in vivo の実験から EvgA、NarL、RcsB、UvrY による *ydeP* の発現誘導が観察され、*in vitro* でもこれら RR のタンパク質が *ydeP* プロモーターに結合することを確認した。結果として、NarL ファミリーRR 間での Stage 3 クロストークは限定的な組み合わせで起きていることが示された（図 2）。さらに、*ydeP* プロモーター配列上を探したところ、EvgA のほかに NarL、RcsB、UvrY の認識配列が見つかった。

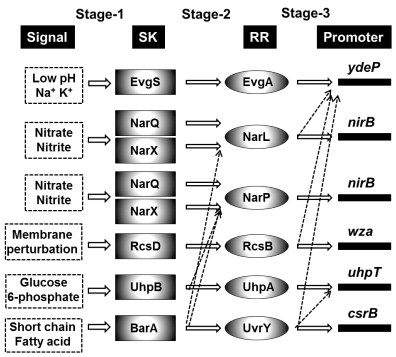

図 2．NarL ファミリーRR 間のクロストーク

（2）OmpR ファミリーRR 間での Stage 3 クロストーク

NarL ファミリー間でのクロストークの解析と同様に 14 つの OmpR ファミリーRR（ArcA、BaeR、BasR、CpxR、CreB、CusR、KdpE、OmpR、PhoB、PhoP、QseB、RstA、TorR、YedW）によるその標的遺伝子（*icd*、*spy*、*ais*、*yibD*、*cpxP*、*creD*、*cusC*、*kdpA*、*ompC*、*phoA*、*mgtA*、*ygiW*、*asr*、*torC*、*yedX*）の交差した制御を全 210 通りの組み合わせで観察した。

a) レポーターアッセイによる OmpR ファミリーRR 間でのクロストークの解析

NarL ファミリーRR 間でのクロストークの解析では、既知の誘導シグナルによっては RR の活性化が観察できない場合があった。一方 RR の過剰発現によっては、シグナルがなくても全ての標的遺伝子の発現が誘導された。そのため、OmpR ファミリーRR 間のクロストークは、RR の過剰発現を用いて観察した。

OmpR ファミリーRR 間では、既知の組み合わせ以外に、*spy* 発現を OmpR、YedW、*yibD* 発現を QseB、*creD* 発現を ArcA、BaeR、*cusC* 発現を OmpR、*kdpA* 発現を ArcA、BaeR、CpxR、OmpR、YedW、*phoA* 発現を QseB が活性化していることが明らかとなった。

b) OmpR ファミリーRR 間のクロストークの特異性

OmpR ファミリーRR 間においても、やはり Stage 3 クロストークは限定的な組み合わせで起きており、それらは非常に特異的であることが示された（図 3）。また、*ydeP* プロモーターと同様に、*kdpA*、*spy* のプロモーターも複数の RR によって制御されることが明らかとなった。さらに、*kdpA* プロモーター上には KdpE に加え、ArcA、BaeR、CpxR、OmpR、YedW の各認識配列が見つかり、*spy* プロモーター上には BaeR、CpxR に加え、OmpR、YedW の各認識配列が見つかった。

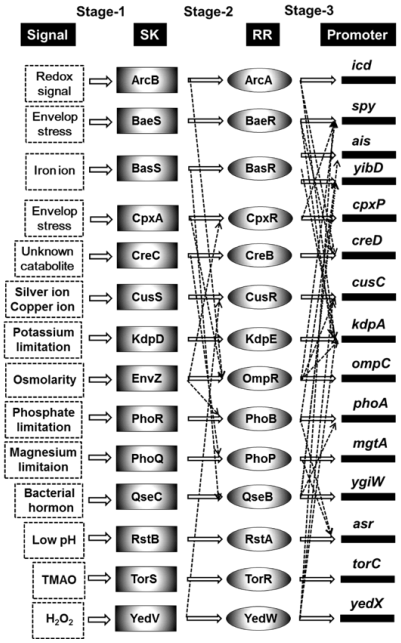

図 3．OmpR ファミリーRR 間のクロストーク

（3）機能未知 RR YgeK の機能解析

大腸菌 K-12 株の機能未知 RR YgeK は以前に *in vitro* で SK の BarA と UhpB にリン酸化されることが報告されている[1]。したがって、YgeK は機能未知ではあるが TCS 情報伝達ネットワークを構成する重要な因子であると予想される。

a) YgeK の保存性

YgeK の細菌間での保存性を詳しく調べたところ、YgeK には大腸菌 O157:H7 Sakai 株などに保存されるリン酸化 Asp 残基を持たない全長の YgeK（YgeK Sakai）と、大腸菌 K-12 株などに保存されるレシーバードメインを持たない短い YgeK（YgeK K-12）の大きく分けて 2 種類が存在した。

b) YgeK K-12 と YgeK Sakai の機能

K-12 株 BW25113 内で YgeK K-12、YgeK Sakai それぞれをプラスミド上から発現させたところ、YgeK Sakai 発現株のみで細胞の凝集と試験管表面への付着がみられた。

YgeK Sakai の働きにより線毛が形成された可能性を考え、Congo red を含む寒天培地に接種し、37℃で培養してコロニーの色を観察した。YgeK Sakai 発現株は、野生株と比較し、赤いラフなコロニーを形成し、YgeK Sakai は 37℃で線毛形成を促進することが示唆された。一方で YgeK K-12 発現株は野生株よりも色の薄いコロニーを形成した。

c) YgeK Sakai 活性に関わる因子

大腸菌線毛の祖先型であると予想される Mat 線毛は、温度に依存して形成する。そこで 28℃でも YgeK Sakai 発現株を Congo red を含む寒天培地上で培養したところ、37℃での条件とは逆に、白いコロニーを形成した。この結果から、YgeK Sakai は 28℃では線毛の形成を促進せず、バイオフィルム形成を抑制することが示唆された。しかし、アセチル CoA の合成に関わる *pta* や *acs*（図 4）を欠失した条件では、28℃で培養してもコロニーは白くならなかったため、YgeK Sakai の 28℃におけるバイオフィルム抑制にはアセチル化が関わっている可能性が示唆された。

d) YgeK K-12 の酢酸代謝への関与

大腸菌 K-12 株において、酢酸代謝の主要な経路 AckA、Pta（図 4）の遺伝子欠失株は、酢酸を炭素源とする培地ではほとんど生育しなかった。一方で同じく酢酸の代謝に関わる因子 Acs だけでなく、YfiQ（アセチル化酵素）、CobB（脱アセチル化酵素）に加え、YgeK、BarA、UhpB、の各遺伝子欠失株も酢酸を炭素源とする培地で同様の生育遅延を引き起こした。したがって、YgeK は酢酸代謝経路の因子（図 4）や BarA、UhpB とともに酢酸代謝に関与することが示唆された。

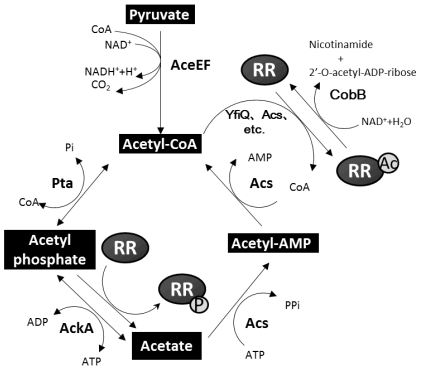

図 4. ピルビン酸・酢酸代謝経路に関与するタンパク質

4. 考察

RR による曖昧な遺伝子プロモーター認識はほとんど行われておらず、特異的な認識により行われる Stage 3 クロストークが明らかとなった。多くの RR の制御を受けた *ydeP* は、推定上ギ酸デヒドロゲナーゼ（酸化還元酵素）遺伝子であり、その発現が大腸菌酸耐性に必須であることが知られているだけでなく、嫌気呼吸への関与が予想される。この遺伝子は酸耐性のレギュレーターEvgA 以外に、様々な膜ストレスに応答する RcsB、酢酸に応答する UvrY による制御を通して酸に応答し、嫌気呼吸のレギュレーターNarL による制御を通して嫌気呼吸に働くと推測される。また、*kdpA* は K^+枯渇や浸透圧に応答して働く K^+取り込みシステムをコードしており、K^+枯渇に応答する KdpE だけでなく、浸透圧に応答する OmpR や、浸透圧ストレスと関連付けられる膜ストレスに応答する BaeR、CpxR、YedW などの制御も受けていた。タンパク質リフォールディングシャペロンをコードする *spy* も、同じく BaeR、CpxR だけでなく OmpR、YedW の制御を受けることで膜の破壊に応答していると推測される。以上のことから、特異的な Stage 3 のクロストークは、細菌の多様な環境応答を可能にする情報伝達経路であることが示唆された。

さらに、本研究では、リン酸化 Asp 残基を持たない機能未知 RR YgeK も大腸菌のバイオフィルム形成や酢酸代謝において重要な役割を担っていることを示した。RR の働きは SK によるリン酸化だけでなく、細胞内 RR 量によっても調節されている。それだけでなく、代謝状態、増殖相、炭素源、pH、温度などに依存して細胞内濃度が変化するアセチルリン酸による直接的なリン酸化や、アセチル CoA を基質としたアセチル化によっても活性が制御されることが報告されている（図 4）。したがって、Stage 3 におけるクロストークや YgeK の働きなどは、TCS 間のネットワーク形成だけでなく、代謝や細胞の増殖と遺伝子発現制御を繋ぐ、重要な経路であると言える。

これらの研究成果は TCS 情報伝達ネットワークの全体像をとらえるための足掛かりとなり、細菌が多様な環境変化に応答して生存する仕組みの解明に貢献すると考えられる。

5. 謝辞

本研究は、山本兼由教授のご指導を始め、法政大学・石浜明客員教授、広島大学・木下英司准教授、広島大学・木下恵美子助教のご協力のもとで行われました。深く感謝申し上げます。

参考文献

1) Yamamoto, K. et al. (2005) *J Biol Chem.* **280**, 1448-1456
2) Simon, R. W. *et al.* (1986) Gene, **53**, 85-96
3) Kinoshita, E. *et al*. (2014) *Proteomics*, **14**, 668-679
4) Eguchi, Y. & Utsumi, R. (2014) *J. Bacteriol.* **196**, 3140-3149
5) Weston, L.A. & Kadner, R. J. (1988) *J. Bacteriol*. **170**, 3375–3383
6) Constantindou, C. *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 4802–4815
7) Hagiwara, D. *et al.* (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 5735–5746
8) Chavez, R.G. *et al.* (2010) *J. Bacteriol*. **192**, 2009–2012