# 法政大学学術機関リポジトリ

### HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

PDF issue: 2024-12-21

## 大腸菌走化性受容体遺伝子を調節する新規転 写因子の探索

塩川, 恵理 / SHIOKAWA, Eri

(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)
2
(発行年 / Year)
2016-03-24
(URL)
https://doi.org/10.15002/00013457
```

## 大腸菌走化性受容体遺伝子を調節する新規転写因子の探索

## TRANSCRIPTION FACTORS REGULATING THE GENES ENCODING CHEMORECEPTORS OF ESCHERICHIA COLI

# 塩川恵理 Eri SHIOKAWA 指導教員 川岸郁朗

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻生命機能領域修士課程

In the chemotaxis of *Escherichia coli*, four methyl-accepting chemotaxis proteins (MCPs), *i.e.* Tsr, Tar, Trg and Tap, mediate attractant and repellent responses to various chemicals and other stimuli. The genes encoding these MCPS belong to the flagellar regulon whose transcription is under the control of the master regulator FlhDC as well as the alternative sigma factor FliA. However, factors that does not belong to the regulon are known to regulate the transcription of some genes encoding flagellar proteins and MCPs. In this study, I searched for transcription factors (TFs) that regulate *tar*. Promoter-specific transcription factor (PS-TF) screening of more than 200 purified TFs revealed that at least 9 TFs bind *in vitro* to the *tar* promoter region. Involvement of these TFs in regulation of *tar* was confirmed by Northern blotting and reverse transcription PCR analyses. Deletion of the genes encoding some of these TFs resulted in the defects in chemotaxis as judged from swarm and temporal stimulation assays. Taken together, it is concluded that the *tar* promoter is under the control of PdhR

Key Words: chemotaxis methyl-accepting chemotaxis protein, transcription factor, tar, PdhR

#### 1. 緒言

大腸菌を取り巻く環境は大きく変動するため、菌はそ れに応じて適切な遺伝子を発現させることで環境に適応 する. 一方, 環境変化に対する最も速い応答の一つが走 化性, すなわち, 刺激物質を感知してより好ましい環境 に移動する行動である. 走化性において刺激物質を受容 するのは膜貫通型受容体 methyl-accepting chemotaxis proteins (MCPs)である. MCP は刺激に応じて, ヒスチジ ンキナーゼ CheA の活性を制御する. その情報は最終的に べん毛へ伝わり,回転方向が制御される. MCP には Tsr, Tar, Trg, Tap の 4 種類がある. では, 走化性受容体遺伝 子の発現は、どのように調節されているのだろうか. MCP をコードする遺伝子は、べん毛の構築や回転に関与する 蛋白質をコードする遺伝子と共に一つのレギュロンを構 成している. べん毛レギュロンのプロモーターは class I, II, III に分類され、I→II→III という転写調節の階層性が べん毛構築・機能発現の段階とよく対応している. 走化 性シグナル伝達に関与する蛋白質の遺伝子群はすべて class III プロモーターから転写される. class III プロモー ターの転写には, class II オペロンにコードされる  $\sigma^{28}$  が 必須である.一方, べん毛レギュロン内の遺伝子でも, レギュロン外の転写因子による調節を受ける転写因子が 見つかっている [1]. また,増殖相により, tarと tsr の発現量比が逆転することが知られている. しかしながら,この転写調節のメカニズムは不明である[2].

このように、様々な面から転写調節がされていることに着目し、本研究では、べん毛レギュロン外からの未知の MCP 遺伝子発現調節経路があるのではないかと予測した. MCP 遺伝子発現調節機構の解明を目指し、MCP 遺伝子プロモーター領域への特異的な結合能示す転写因子を網羅的に探索した. さらに、細胞内における候補転写因子の MCP 遺伝子発現調節機構の解明を試みた.

#### 2. 実験方法

tarプロモーターに作用する転写因子群を同定する目的で、ゲルシフト法を応用した PS-TF (promoter specific transcription factor) Screening 法を用いて、精製大腸菌転写因子約200種から tarプロモーターへの親和性を示す転写因子の網羅的スクリーニングを行った。細胞内での機能を解析するため、スクリーニングにより候補に挙がった転写因子の欠失株を作製した。その欠失株を用いて、候補転写因子の欠失が及ぼす運動能への影響をスウォームアッセイ、アスパラギン酸応答への影響をテンポラルアッセイで検証した。ここで走化性に影響が出た欠失株に

おいて、tar、tsrの発現レベルを測定し、候補転写因子のtar、tsrの発現制御への関与を検証した.

#### 3. 実験結果と考察

#### (1) tar プロモーターに結合能を示す転写因子の探索

in vitro で精製転写因子がプロモーターDNA に結合し、 特異的複合体を形成する性質を利用し、複合体をゲル電 気泳動で分離する PS-TF screening 法を用いて、大腸菌転 写因子約 200 種の中から tarプロモーター領域に特異的結 合能を示す転写因子を探索した。その結果、9 種類の転写 因子が tarプロモーター領域に結合した(図 1). この転 写因子の特異結合は、転写因子濃度を4段階に変化させ、 再度ゲルシフトアッセイを行うことで検証した。これら を tar の発現調節に関与する候補転写因子とした。

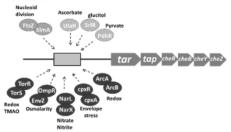


図1 tarプロモーターに結合した転写因子

#### (2) 候補転写因子遺伝子欠失による走化性への影響

PS-TF screening により、候補に挙がった転写因子遺伝子の欠失株 9 種を作製した。まず、候補転写因子遺伝子の欠失によって菌の運動能に影響がでるのか調べるため、スウォームアッセイを行った。その結果、 9 種のうち 5 種の候補転写因子 srlR、pdhR、arcA、ompR、cpxR の欠失株においてスウォーム能へ何らかの影響がみられた(図 2-A)。 さらに、走化性応答への影響をみるため、テンポラルアッセイを用いてアスパラギン酸応答を調べた。すると、応答については野生株との違いはみられなかった。しかし、興味深いことに、pdhR 欠失株では、刺激のない状態でのタンブル頻度が野生株に比べて有意に高くなっていた(図 2-B)。これらのことから、pdhR の欠失により Tar(または他の走化性受容体)の発現量比が崩れ、運動能に影響がでたと考えられた。

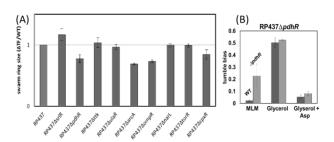


図2 候補転写因子遺伝子欠失による走化性への影響

#### (3) PdhR の tar, tsr 発現制御への関与

上述の結果から、転写因子 PdhR が tar の発現調節に関与

する可能性が考えられた. そこで, ノーザンブロッティ ング法, real time PCR 法を用いて pdhR 欠失株の tar の発 現レベルを測定し, in vivo での関与を検証した. その際, tap とオペロンを形成している tar と異なり、モノシスト ロニックな転写単位を形成し, べん毛クラスター外に位 置する tsr の発現への関与も同時に検証した. また, PdhR の活性条件として, 40 mM ピルビン酸の有無の環境で培 養した.その結果,*tar* の発現は,野生株ではピルビン酸 添加により増加した.一方,pdhR 欠失株における,tarの発現量はピルビン酸の有無に関わらずピルビン酸非存 在下の野生株より減少した. 故に、PdhRが tarを正に制 御している可能性があった. また, tsrの発現は, 野生株 ではピルビン酸添加により増加し、pdhR欠失株における tsr の発現量はピルビン酸の有無に関わらずピルビン酸 非存在下の野生株より増加した. 故に、PdhR は tsrを負 に制御している可能性があった.

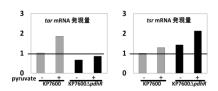


図3 pdhR 欠失による tar, tsr 発現量への影響

#### 4. 結言

大腸菌走化性受容体遺伝子発現調節機構について解析した.この目的で PS-TF screening を利用し、tarプロモーター領域に結合する転写因子を、約 200 種類の転写因子の中から 9 種類同定した.これらの候補転写因子の欠失株を用いた in vivo 解析の結果、tarの発現は PdhR とピルビン酸の複合体がプロモーター領域に結合して、正に制御されていると考えられた.一方、tsrの発現は PdhRがプロモーター領域に結合して、負に制御されていると考えられ、PdhRがtarとtsrの発現量の逆転に関与する可能性がある.PdhRがtarとtsrの発現量の逆転に関与する可能性がある.PdhRはクエン酸回路内のピルビン酸デヒドロゲナーゼの遺伝子発現調節をする転写因子である.このような転写因子がtarを制御することは、走化性受容体がクエン酸回路との密な関係性にあるのかもしれない.tarの発現調節は細胞内外のどちらのピルビン酸との関係性で起こっているのかなど明らかにしていきたい.

#### 引用文献

- Gagin. S, C. Kelly. T, H.: Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *salmonella enterica* serovar typhimurium and *escherichia coli*, Microbiol Mol Biol Rev, Vol. 64, pp. 694-708, 2000
- Hnna S. Albert L.: A concentration-dependent switch in the bacterial response to temperature, Nat Cell Biol, Vol. 9, pp. 1098-1100, 2007
- Shimada, K. et al.: Screening of promoter-specific transcription factors: multiple regulators for the *sdiA* gene indolved in cell division control and quorum sensing, Microbiology, Vol. 159, pp. 2501-2512, 2013