

ビフィズス菌と乳酸菌の分泌化合物による 大腸菌 uhpT 遺伝子の発現誘導機構

新野, つばさ / Niino, Tsubasa

(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)

58

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2017-03-31

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00014372>

ビフィズス菌と乳酸菌の分泌化合物による 大腸菌 *uhpT* 遺伝子の発現誘導機構

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF *UHPT* IN *ESCHERICHIA COLI* INDUCED BY
BIFIDOBACTERIUM AND *LACTOBACILLUS*.

新野つばさ

Tsubasa NIINO

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

Variety of microorganisms inhabit in the human intestine. More than 1,000 species of bacteria exist in the intestinal tract. Among these bacteria, each bacterial cell communicates to others, forming community to survive in the human intestine. Recently we found that supernatant of *Bifidobacterium longum* culture specifically induces the expression of *Escherichia coli uhpT* gene, encoding hexose-6-phosphate transporter. I analyzed the induction of *E. coli uhpT* gene by other bacteria, indicating that the *uhpT* promoter was induced by supernatant from culture of 7 species of *Bifidobacterium*, including *B. longum* and *Lactobacillus rhmnosus* but not *E. coli*. Heat-treatment and dialysis experiments showed signal(s) in supernatant of *B. longum* was heat-stable and small molecule. The *uhpT* promoter is known to be activated by UhpABC and Crp regulatory systems. I found that the *uhpT* promoter was not induced by supernatant of *B. longum* in all of the *uhpA*, *uhpB*, *uhpC*, and *crp* deleted mutants. Taken all results together, I suggest that *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* secrete signal small molecule(s), which specifically induce the hexose-6-phosphate transporter gene of *E. coli*.

Key Words : *Escherichia coli*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *uhpT*, cell-cell communication

1. 緒言

哺乳類の腸管内に在住する微生物は複雑な生態系を形成しており、これらは腸内細菌叢と呼ばれている[1]。ヒトの腸内には 957 種の細菌が生息するが、その腸内細菌叢はヒトの加齢に伴い腸内占有細菌種が変化する[2]。

生後すぐの新生児では *Escherichia* 属、*Streptococcus* 属が優勢であるが、その後 *Bifidobacterium* 属と *Lactobacillus* 属の増加に従い、*Escherichia* 属と *Streptococcus* 属は減少する。このように、哺乳類の腸内細菌叢では、細菌-宿主間のみではなく細菌-細菌間で相互作用していると推測される。当研究室の成果により、*B. longum* 培養液から調製した培養上清が大腸菌の六炭糖リン酸輸送システムをコードする *uhpT* 遺伝子の発現を特異的に誘導することを見出した。本研究では、細菌-細菌間相互作用で誘導される大腸菌 *uhpT* 遺伝子発現について調べた。

2. 実験方法

(1) 細菌培養上清の調製

嫌気性細菌培養培地 ABCM 培地に細菌を植菌し、嫌気状態 (CO₂ 存在) にて、終夜 37°C で静置培養させた。その後、新しい ABCM 培地に終夜培養液を植菌し、嫌気状態、37°C で約 15 時間培養したのち、遠心分離を行い、その上清を回収した。回収した上清の pH を 7.2 に合わせ、フィルター滅菌後、室温にて保存した。

(2) レポータープラスミド pLUX を用いたプロモーター活性の測定

レポータープラスミド pLUX をベクターとし、*lux* オペロンの上流に *uhpT* 遺伝子のプロモーター領域 180 bp を挿入したプラスミド (pLUX-uhpTL1) とプロモーター領域 130bp を挿入したプラスミド (pLUX-uhpTS2) を構築した。これらのプラスミドを大腸菌株に導入し、培養後、発光強度を測定し、OD 600 nm に対するプロモーター活性を算出した。

3. 結果と考察

(1) 細菌培養上清による大腸菌 *uhpT* の発現誘導

B. longum を含む 7 種の *Bifidobacterium* 属、*L. rhmnosus*、*Escherichia* 属 3 株の培養上清を調製し、それらの培養上清による大腸菌 *uhpT* 遺伝子の発現誘導を調べた。pLUX-*uhpTL1* を大腸菌野生株に導入し、得られた形質転換体を ABCM 培地と培養上清培地で培養し、発光強度を測定した。その結果、*B. longum* 以外の 6 種の *Bifidobacterium* 属および *L. rhmnosus* の培養上清依存的に *uhpT* 遺伝子の発現が誘導された (図 1AB)。しかし *Escherichia* 属の 3 株の培養上清では *uhpT* 遺伝子の発現は誘導されなかった (図 1C)。

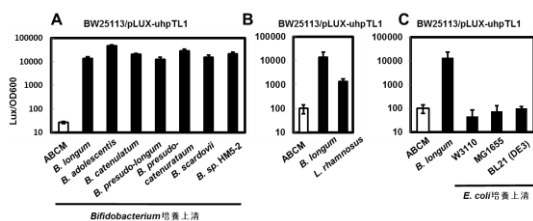


図 1. *Bifidobacterium* 属、*Lactobacillus* 属、*Escherichia* 属の培養上清による大腸菌 *uhpT* 発現誘導 ABC はそれぞれ A: *Bifidobacterium* 属、B: *Lactobacillus* 属、C: *Escherichia* 属の培養上清による大腸菌 *uhpT* 発現誘導を示している。縦軸は *uhpT* のプロモーター活性、横軸は細菌名を表している。

(2) *B. longum* 培養上清中に含まれる大腸菌 *uhpT* 発現誘導シグナルの特性

まず、シグナル分子の熱安定性を調べた。*B. longum* 培養上清を 100°C で 10 分処理し、その培養上清による大腸菌 *uhpT* 遺伝子の発現誘導を調べた。その結果、100°C で 10 分処理 *B. longum* 培養上清でも大腸菌 *uhpT* 遺伝子の発現を誘導することを確認した。

つぎに、*B. longum* 培養上清を、分子量約 10,000 Da を通過させる透析膜で処理し、透析膜を通過した成分を含む溶液による大腸菌 *uhpT* 遺伝子の発現誘導を調べた。その結果、*B. longum* 培養上清の透析膜を通過した成分を含む溶液でも大腸菌 *uhpT* 遺伝子の発現を誘導することを確認した。

(3) *B. longum* 培養上清による大腸菌 *uhpT* 遺伝子の発現誘導機構

大腸菌 *uhpT* 遺伝子は UhpABC と Crp システムによってプロモーター発現が誘導される [3]。

まず、pLUX-*uhpTL1* を大腸菌野生株と *crp* 欠失株に導入し、得られた形質転換体を ABCM 培地と *B. longum* 培養上清培地で培養し、発光強度を測定した。その結果、野生株の *uhpT* 遺伝子発現は *B. longum* 培養上清で誘導したが、*crp* 欠失株では誘導しなかった。つぎに、*uhpT* プロモーター上の Crp 結合領域を含まないレポータープラスミド pLUX-*uhpTS2* を大腸菌野生株に導入し、得ら

れた形質転換体を ABCM 培地と *B. longum* 培養上清培地で培養し、発光強度を測定した。その結果、*B. longum* 培養上清にも関わらず pLUX-*uhpTS2* からの *uhpT* 遺伝子の発現を誘導しなかった。

同様に、pLUX-*uhpTL1* を大腸菌野生株、*uhpA* 欠失株、*uhpB* 欠失株、*uhpC* 欠失株、*uhpAB* 欠失株に導入し、得られた形質転換体を ABCM 培地と *B. longum* 培養上清培地で培養し、発光強度を測定した。その結果、野生株の *uhpT* 遺伝子発現は *B. longum* 培養上清で誘導したが、*uhpA* 欠失株、*uhpB* 欠失株、*uhpC* 欠失株、*uhpAB* 欠失株では誘導しなかった。

4. 結言

大腸菌 *uhpT* 遺伝子は、*Bifidobacterium* 属と *Lactobacillus* 属の培養上清で誘導されるが、*Escherichia* 属の培養上清で誘導されなかった。また、*uhpT* 遺伝子発現誘導する *Bifidobacterium* 属、*Lactobacillus* 属から分泌されるシグナルは 10,000 Da 以下の熱安定性の分子であった。大腸菌は、このシグナル分子を UhpABC システムもしくは Crp システムにより感知し、結果として *uhpT* 遺伝子のプロモーター発現を誘導することが示唆された。以上の結果を踏まえ以下のモデルを提唱する (図 2)。*Bifidobacterium* 属、*Lactobacillus* 属培養上清内において炭素源が不足し、その結果シグナル分子を大腸菌が感知し、UhpABC システムを介して *uhpT* の発現が誘導され、積極的に細胞外の炭素源を細胞内に取り込む。また、大腸菌細胞外の炭素源不足を大腸菌が感知することで CRP と cAMP の複合体が *uhpT* プロモーター領域の CRP 結合領域に結合し、その結果 *uhpT* の発現が誘導されるということを考察する。

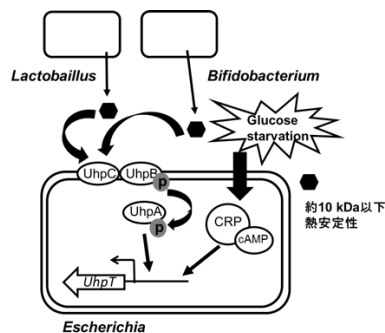


図 2. *Bifidobacterium* 属、*Lactobacillus* 属分泌シグナルを介した大腸菌 *uhpT* 発現誘導モデル

参考文献

- 1) 光岡 知足：腸内フローラと共生・認識，学会出版センター，2006
- 2) Rajilić-Stojanović M., de Vos WM. (2014) *FEMS Microbiol. Rev.*, **38**, 996–1047.
- 3) Olekhovich IN., Kadner RJ. (2002) *J. Bacteriol.*, **184**, 2682–2691.