

法政大学学術機関リポジトリ

HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

PDF issue: 2025-01-03

大腸菌走化性受容体の遺伝子発現調節と細胞側面膜領域におけるクラスター形成

INOUE, Ayano / 井上, 綾乃

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学研究科編

(巻 / Volume)

63

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2022-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00025412>

大腸菌走化性受容体の遺伝子発現調節と細胞側面膜領域におけるクラスター形成

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF THE CHEMORECEPTOR GENES AND FORMATION OF RECEPTOR CLUSTERS IN LATERAL MEMBRANE REGIONS OF *ESCHERICHIA COLI* CELLS

井上綾乃
Ayano INOUE
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修士課程

In *Escherichia coli*, the genes encoding chemoreceptors, including Tsr for serine and Tar for aspartate, belong to the flagellar regulon, and their transcription is under the control of the sigma factor FliA. Previous studies identified the pyruvate-responding global transcription factor PdhR binds to the *tsr* and *tar* promoters. In this study, I examined how PdhR regulates these promoters using strains expressing Tar and Tsr fused to fluorescent proteins from the native promoters and found that PdhR acts as a positive regulator for both of the promoters. I also intended to unravel cluster formations of the chemoreceptors before they form a huge cluster at a cell pole. Single molecule imaging revealed that the Tar and Tsr form mixed clusters of variable sizes together with low-abundance chemoreceptors in the lateral region of the cytoplasmic membrane.

Key Words : gene expression, promoter, protein assembly, single molecule imaging

1. 緒言

大腸菌走化性において刺激を受容するのは走化性受容体(MCP) Tsr, Tar, Trg, Tap, Aer である。MCP 遺伝子はすべて σ^{28} 依存的プロモーターから転写され、べん毛の構築や回転に関与する遺伝子とともに一つのレギュロンを形成する。当研究室で、*tar* プロモーター領域に特異的な結合を示すレギュロン外転写因子として 9 種類の候補を見出した。このうち、PdhR の遺伝子を欠失させると走化性に影響した[1]。PdhR は、ピルビン酸依存的に好気呼吸にかかる *ndh*, *cyoABCDE* および細胞分裂関連遺伝子の転写を調節するグローバル調節因子である[2, 3]。本研究では、PdhR による *tsr*, *tar* 遺伝子発現調節機構を解析した。

また、走化性受容体はアダプター CheW, ヒスチジンキナーゼ CheA と複合体を形成し[4, 5]、細胞の極で巨大クラスターを形成する[6, 7]。このクラスターは、シグナルの增幅や適応に重要な役割を果たす。アスパラギン酸走化性受容体 Tar と緑色蛍光タンパク質 GFP との融合体 (Tar-GFP) を用いた研究から、走化性受容体は細胞側面膜領域の膜に挿入されてから膜内を移動し、細胞の極に局在することが示唆されている[8]。そこで、本研究では細胞側面膜領域における分子イメージングを行い、クラスター形成に

対する他の受容体やシグナル伝達因子の影響を解析した。

2. 実験方法

プラスミドや菌株の構築は標準的な手法で行った。染色体上遺伝子から Tar と Tsr 融合タンパク質を発現する菌株を用いて、Tar と Tsr 存在量、膜内挙動を解析した。蛍光強度はプレートリーダーで測定した。また、Tar の挙動は、GFP を融合させ、全反射蛍光顕微鏡(TIRF)で観察した。

3. 実験結果と考察

(1) 蛍光蛋白質の種類の *tar*, *tsr* 発現量に対する影響

tar, *tsr* 遺伝子に染色体上で蛍光蛋白質遺伝子を融合させた株を用いて PdhR の受容体遺伝子発現への関与を *in vivo* で検証した。さらに、*pdhR* 欠失株、*pdhR* 欠失株にプラスミドから *pdhR* を相補させた株、*tar*, *tsr* 遺伝子に融合させる蛍光蛋白質を入れ替えた株も作製した。さらに、蛍光プレートリーダーを用いて Tsr と Tar の存在量を測定した。その結果、*pdhR* 欠失により *tsr* と *tar* の発現量は低下

し、プラスミドから PdhR を発現させると発現量は回復した。蛍光蛋白質が違っても傾向は変わらなかつたが *tar-gfp* と *tsr-gfp* の比較から、*tsr* のほうが *tar* に比べて PdhR により強く制御を受けると考えられた（図 1）。

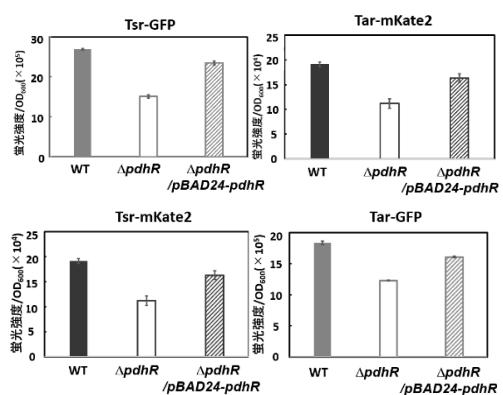


図 1. 2 色蛍光株の発現量

M9+Gluc 培地で OD₆₀₀ が約 0.5 に達するまで培養

(2) 培養条件の影響

つぎに、培養条件を変更してプレートリーダーを用いて *tsr* と *tar* の蛍光強度を測定し発現量を測定した。（1）では M9+Gluc 培地で OD₆₀₀ が約 0.5 に達するまで培養したが、培養していた培地を M9+Gluc 培地から M9+Glyc に変更し M9+Glyc 培地で OD₆₀₀ が約 0.5 に達するまで培養した。

M9+Glyc 培地に変更した結果、PdhR による発現制御が見られなくなった（図 2）。この原因は不明である。

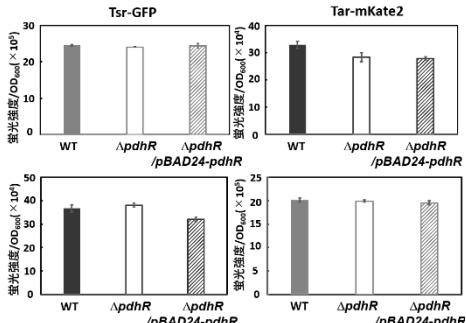


図 2. 培地変更後の 2 色蛍光株の発現量

(3) 細胞側面 Tar クラスター形成に対する低発現量受容体の影響

主要受容体 Tar のクラスター形成に対する低発現量受容体の影響を調べるために、Tar-GFP 発現株から、*tsr*, *trg*, *aer* を欠失させ、細胞側面における Tar-GFP 輝点の輝度を測定した。その結果、低発現受容体のうちでは Aer が存在するか否かが、Tar-GFP の輝度に最も影響した。さら

に、Aer をプラスミドから発現させると Tar-GFP の輝度が下がった。これは、Aer が Tar と共にクラスターを形成することを示唆するものである（図 3）。

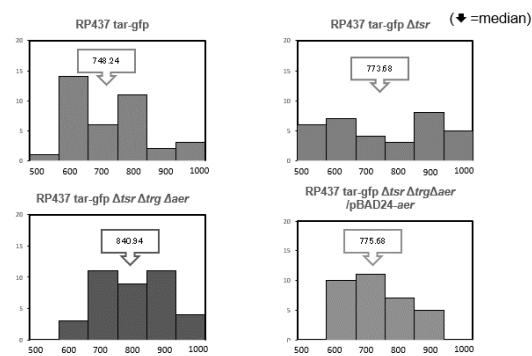


図 3. Tar-GFP の低発現受容体の影響

（下段右:Aer 相補株）

4. 結言

大腸菌グローバル転写因子 PdhR は走化性受容体 *tar*, *tsr* のプロモーターに結合し、それらの転写因子を正に制御する。しかし、その制御は培養条件の影響を受ける。また、低発現量受容体 Aer は、細胞側面膜領域で Tar や Tsr とともにクラスターを形成すると示唆された。

参考文献

- 1) 塩川 恵理：修士論文、法政大学大学院理工学研究科, 2016
- 2) Gagin, S.C., Kelly, T. H. : Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol. 64, pp. 694-708, 2000
- 3) Ogasawara, H. et al. : J. Bacteriol. Vol. 189, pp. 534-5541, 2007
- 4) Gegner, J.A. et al. : Cell, Vol. 70, pp. 975-982, 1992
- 5) Shimizu , T. S. et al. : Nat. Cell Biol. Vol. 2, pp. 792-796, 2000
- 6) Maddock, J. R., Shapiro, L. : Science, Vol. 259, pp. 17117-17123, 1993
- 7) Shiomi, D. et al. : Mol. Microbiol., Vol. 60, pp. 94-906., 2006
- 8) Banno, S. 博士論文、名古屋大学, 2007