

# 大腸菌増殖の誘導期から対数増殖期への変遷 における核様体タンパク質Fisの機能解析

眞木, 良美 / MAKI, Yoshimi

---

(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)

64

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2023-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00026451>

# 大腸菌増殖の誘導期から対数増殖期への変遷における核様体タンパク質 Fis の機能解析

THE ROLE OF FIS NUCLEOID-ASSOCIATED PROTEIN ON TRANSITION  
FROM LAG PHASE TO LOG PHASE OF ESCHERICHIA COLI

眞木良美

Yoshimi MAKI

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

The growth of *E. coli* consists of three phases: lag phase, log phase, and stationary phase. When stationary phase cell is transferred to a fresh medium, it is able to start to grow as similar growth process. *E. coli* has six major nucleoid-associated proteins (NAPs), Dps, Fis, H-NS, HU, IHF, and StpA, and their intracellular level changes with the growth phases. The detailed roles of these NAPs, however, remain unclear in lag phase. In this study, I showed the role of Fis in the restart of *E. coli* growth. I found that the level of Fis was maximal immediately before first cell division but the level of *fis* mRNA was constantly high in all phases. In addition, Western Blotting showed the significant detected level of Fis in *AclpAXP* at stationary phase. Fis is known to increase mRNAs of total 53 tRNA genes. Luciferase reporter assay indicated that *thrW* and *pheU* promoter were decreased whereas *pheV* and *proK* promoter were increased in *Afis*. Taken these results together, the intracellular level of Fis is mainly regulated by Clp protease and reach maximum immediately before log phase, which induces tRNA gene promoters to accelerate translation for proliferation.

**Key Words** : *Escherichia coli*, nucleoid-associated proteins, Fis, lag phase, log phase

## 1. 緒言

大腸菌の増殖は誘導期、対数増殖期、定常期の 3 つの相から成り、定常期細胞を新しい培地に移すと再び同じ過程を繰り返す。誘導期は増殖の準備期間で、ここでの細胞内分子機構がその後の増殖に重要である。しかし、誘導期での増殖準備に関わる詳細な分子メカニズムは不明である。大腸菌核様体タンパク質は主に Dps、Fis、H-NS、HU、IHF、StpA の 6 種類が同定されており、増殖相に伴って細胞内量が変化する [1]。そのうち、対数増殖期で細胞内量が優占的な Fis は DNA に結合し DNA を屈曲することで、DNA 複製開始を阻害 [2] したり、多くの遺伝子の発現を制御することが知られている [3]。そこで本研究では大腸菌の増殖再開時における核様体タンパク質 Fis の特徴的な発現パターン及び役割について調査した。

## 2. 実験方法

### (1) 使用した大腸菌株

本研究では親株 MG1655、*fis* 欠失株、*cIcpAXP* 欠失株を使用した。欠失株は HoSeI 法により目的遺伝子内に終止コドンを導入することで作製された。

### (2) RT-qPCR による mRNA の定量

大腸菌の培養再開後 1.5, 6, 24 時間経過時の細胞から RNA を抽出し、mRNA 量は RT-qPCR で検出した。

### (3) Western Blotting によるタンパク質の定量

(2) と同様の大腸菌細胞からタンパク質の抽出を行い、Western Blotting で検出した。

### (4) 大腸菌 1 細胞の Fis タンパク質の蛍光観察

大腸菌ゲノム上の *rpsM* プロモーター領域とそのターミネーター領域の間に pmCherry-N1 上の *mcherry* 領域を連結させた。この断片を *fis-gfp* 発現プラスミド上に導入した。このプラスミドを pYmfis とし、親株 MG1655 に導入し、固体培地上で培養し、明視野および蛍光の観察を行った。ImageJ を用いて 1 細胞あたりの GFP と mCherry の蛍光強度を測定し、GFP の値を mCherry で標準化することで Fis 発現量を算出した。

### (5) *lux* レポーター解析

各 tRNA 遺伝子の転写開始点上流 190 bp と下流 10 bp までをプロモーター領域とし、pLUX にクローニングした。これらの *lux* レポータープラスミドを用いたプロモーター活性測定は以前の方法に従い、行った [4]。

### 3. 結果と考察

#### (1) 増殖相における Fis 発現に関わる定量分析

大腸菌の対数増殖期での細胞内 Fis 量は一過的に増加する。そこで定常期細胞を新たな培地に移し、培養開始後 1.5, 6, 24 時間経過時の細胞から RNA を抽出し、*fis* 遺伝子の mRNA 量の変化を RT-qPCR により調べた(図 1A)。その結果、*fis* の転写量は増殖相に関わらず比較的高いレベルを維持していた。次に、同様の培養時間細胞からタンパク質を抽出し、Western Blotting を用いて Fis 量の検出を行った(図 1B)。その結果、Fis は対数増殖期初期において最大を示し、対数増殖期後期から定常期では著しく減少していた。従って、細胞内 Fis 量は翻訳もしくは翻訳後に制御を受けていることが明らかとなった。

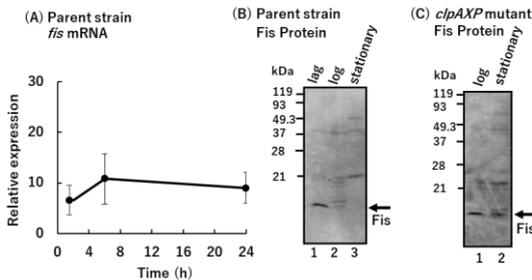


図 1 増殖相における相対転写量とタンパク質の変化

#### (2) 誘導期で増加する Fis タンパク質レベル

pYmfis を MG1655 に形質転換し、時間経過に伴う Fis 発現を観察したところ、細胞分裂に伴う GFP の輝度の変化がみられた(図 2A)。そこで、定常期細胞を新しい培地に移した直後(図 2A-a)、1 度目の細胞分裂直前(図 2A-b)、細胞分裂直後(図 2A-c)の細胞に着目し、大腸菌 1 細胞当たりの Fis 量を解析した。各々 1 細胞当たりの Fis 量を mCherry の蛍光強度で標準化し定量した結果(図 2B)、Fis レベルは 1 度目の細胞分裂直前で最大を示し、それは定常期細胞の 3 倍だった(図 2B)。また 細胞分裂直後の GFP の輝度は 1 度目の細胞分裂直前と比較して減少した。以上のことから、Fis は 1 度目の細胞分裂の直前に発現量が最大となることが明らかとなった。

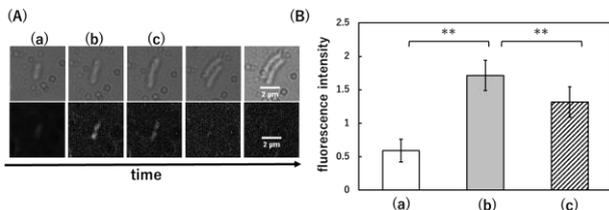


図 2 蛍光顕微鏡を用いた増殖初期における核様体タンパク質 Fis 発現

#### (3) Fis タンパク質を分解する Clp プロテアーゼ

大腸菌 Clp は主要なタンパク質分解装置である。そこで *clpAXP* 欠失株においても同様に Western Blotting を用いて Fis の検出を行ったところ、*clpAXP* 欠失株では親株と比較して約 10 倍の細胞内 Fis 量の増加がみられた

(図 1C)。これら結果より、Fis は対数増殖期以降で、Clp により積極的に分解されていることが明らかとなった。

#### (4) Fis による tRNA 遺伝子の発現調節

大腸菌の全 tRNA 遺伝子は 88 存在し、そのうち 53 の tRNA 遺伝子の転写量が Fis により増加する。タンパク質合成に必要な 20 種類のアミノ酸のうち、Ala、Gln、Glu、His、Phe、Pro、Thr、Tyr の翻訳に必要な tRNA 遺伝子は全ては Fis によって転写量が増加されている。そこで、これらの tRNA 遺伝子のうち *pheU*、*pheV*、*proK*、*proL*、*thrW* のプロモーター活性を調べた(図 3)。その結果、培養後 6 時間経過時の *fis* 欠失株において *thrW*、*pheU* のプロモーター活性は減少したが、*pheV*、*proK* のプロモーター活性は増加がみられた。このうち Phe の tRNA は *pheU* と *pheV* であるが、いずれのアンチコドンも 5' -GAA-3' と同じだった。したがって、これら *pheU* と *pheV* は、2 種類の Phe コドン、UUU と UUC を翻訳するアダプター分子であることが明らかとなった。

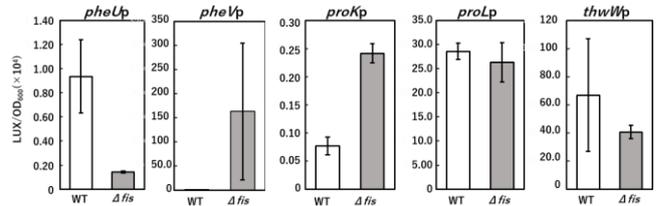


図 3 親株及び *fis* 欠失株における *pheU*、*pheV*、*proK*、*proL*、*thrW* プロモーター活性測定

### 4. 結言

大腸菌核様体タンパク質 Fis は 1 度目の細胞分裂直前に最大を示した。これは、一定程度の *fis* 遺伝子転写はどの増殖相においても行われているが、対数増殖期以降で Clp によって積極的に分解された結果であることが明らかとなった。また Fis レギュロンのうち、*pheU* と *pheV* のプロモーター活性は Fis によるそれぞれ誘導と抑制された。このことから Fis は特定の tRNA 遺伝子プロモーターを活性化し、細胞内 tRNA 量を増加させることで増殖のための翻訳反応を支えていることが推測される。

謝辞：本研究は山本兼由教授によるご指導のもと、吉村美歩氏、田島玖美子氏、比呂裕子氏らの協力により行われた。ここに深謝の意を表す。

#### 参考文献

- 1) Ishihama *et al.* (2014) *J. Bacteriol.*, 196 (15), 2718-2727.
- 2) Filutowicz *et al.* (1992) *J. Bacteriol.*, 174 (2), 398-407.
- 3) Verbeek *et al.* (1990) *Biochim Biophys Acta.*, 1050, 302-306.
- 4) Yamanaka *et al.* (2020) *Bio protoc.*, 10(2), e3500