

大腸菌定常期細胞の増殖開始における不可逆性

堀野, 寛佑輝 / HORINO, Hiroyuki

(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)

65

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2024-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00030793>

大腸菌定常期細胞の増殖開始における不可逆性

IRREVERSIBLE DIFFERENTIATION OF *ESHERICHIA COLI* STATIONARY PHASE CELL DURING RE-GROWTH.

堀野寛佑輝

Hiroyuki HORINO

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 or broth, it prepares to start to grow at lag phase. To start re-growth, an intracellular proteins profile has to be optimized. ATP-dependent protease Clp, which is known as ClpXP and ClpAP in *E. coli*, organizes intracellular functional proteins. To understand cellular localization of Clp protease in living *E. coli* cells, ClpP fused to a green fluorescent protein (GFP) was observed with microscope. Clp diffused in logarithmic growth phase cells but localized at either of cell pole of stationary phase cells. And I found that Clp diffused in areas that whole cell in logarithmic growth phase cells. Single cell growth was observed by timelapse imaging, resulting that Clp maintained the localization in only a stationary phase cell whereas no Clp was found in daughter cells. Taken together, Clp protease irreversibly localizes in stationary phase cell, which could contribute to produce new daughter cell.

Key Words : *Escherichia coli*, Clp, Intracellular dynamics, GFP

1. 緒言

大腸菌の増殖は、誘導期、対数増殖期、定常期に大別される。増殖が停止した定常期細胞は、二分裂による増殖が可能な環境に出会うまでの休眠状態と考えられている。この休眠状態の定常期細胞を新しい培地に移すと、誘導期を経て、開始する二分裂を繰り返し対数増殖期に至る。誘導期細胞では、増殖を開始するための細胞内タンパク質プロファイルを適正にすると考えられるが、分子メカニズムは不明である[1]。また、休眠状態の定常期細胞が、誘導期においてそれ自体の生理機能をリフレッシュさせ娘細胞を生み出すのか、細胞自体の生理機能をリフレッシュさせず娘細胞を生み出すのかは明らかではない。Clpは細菌で広く保存されるATP依存性プロテアーゼであり、アンフォールダーゼとプロテアーゼで構成され、大腸菌ではClpAP、ClpXPとして知られている[2]。先行研究において、*clp* 遺伝子欠失株の増殖遅延が観察された[3]。

2. 実験操作

(1) ゲノム編集大腸菌株の単離

大腸菌ゲノム編集株はHoSeI (Homologous Sequence Integration) 法[1]によって作成した。

(2) プロテオーム解析

大腸菌細胞から全タンパク質を抽出し、nano-LC MS/MSを行った。得たデータからセミ定量解析を行った。

(3) プラスミドの作製

clpP-gfp 融合遺伝子発現プラスミド (pWHclpPgfp) を作製し、サンガー法により配列を確認した。

(4) ウェスタンブロッティング

大腸菌の定常期細胞及び対数増殖期細胞から、タンパク質を抽出しSDS-PAGE実施後、任意の抗体を反応させて検出した。

(5) 細胞内の蛍光タンパク質の観察

前培養した $\Delta clpP/pWHclpPgfp$ を新しい液体培地もしくは固体培地に播種した。細胞を明視野及び蛍光観察をした。

3. 結果と考察

(1) 大腸菌再増殖におけるClpプロテアーゼの必要性

ATP依存性プロテアーゼを欠失させた株 ($\Delta clpAXP$, $\Delta hslUV$) を作製し、それらの増殖をLB液体培地におけるOD₆₀₀を経時測定した(図1)。*clp* 遺伝子の欠失により、増殖遅延が確認された。

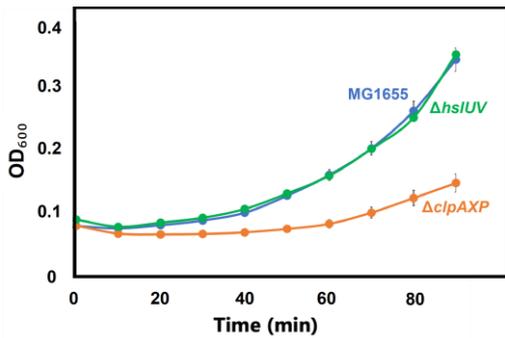


図 1 ATP 依存性プロテアーゼ遺伝子欠失株の増殖

(2) Clp に依存する定常期細胞のタンパク質群

親株 (KG1655) 及び $\Delta clpAXP$ 、 $\Delta hslUV$ の定常期細胞のプロテオーム解析を行った。MG1655 と $\Delta hslUV$ のプロファイルは似通っていたが、 $\Delta clpAXP$ のプロファイルは MG1655 及び $\Delta hslUV$ とは異なっており、 $\Delta clpAXP$ で特徴的に増加する 205 タンパク質を同定した。

(3) 増殖相における大腸菌細胞内の Clp 動態

$\Delta clpP/pWHclpPgfp$ を LB 液体培地に播種し、培養液が任意の濁度に至るまで培養した。定常期細胞及び対数増殖期の細胞を集菌し、顕微鏡によって観察した (図 2)。定常期細胞における Clp は一方の細胞極付近に集合しており、対数増殖期細胞においては細胞全体に拡散した。

(4) 定常期細胞内で集合する Clp と共局在する RpoS $clpP-gfp$ 融合遺伝子発現プラスミドに $rpoS-mcherry$ 融合遺伝子を組み込んだ ($pKIclpPgfp_mcherry_rpoS$)。 $\Delta clpP/pKIclpPgfp_mcherry_rpoS$ を LB 液体培地で終夜培養し、細胞を集菌し、顕微鏡によって観察した (図 3)。定常期細胞において、細胞極に集合する Clp は RpoS と共局在することが確認された。

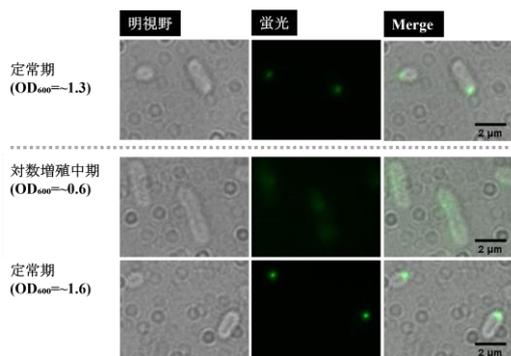


図 2 増殖相における大腸菌 Clp の細胞内動態

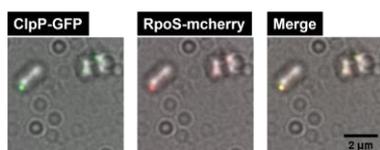


図 3 定常期細胞における大腸菌 Clp と RpoS の局在

(5) Clp 機能阻害による動態への影響

プロテアソーム阻害剤 Bortezomib を加えた LB 液体培地で増殖させた大腸菌細胞の Clp を蛍光顕微鏡で観察した結果、Clp の動態に影響は無かった。

(6) Clp 集合における CP と RP の会合の必要性

Clp プロテアーゼは、Core Particle (CP) の ClpP と Regulatory Particle (RP) の ClpA または ClpX が会合して形成する。RP と会合不可となる変異 (P4A, D18A) を加えた ClpP に GFP を融合させ、定常期細胞を観察した (図 4)。RP と会合できなくなった ClpP は、野生型の動態とは異なり、細胞全体に拡散した。

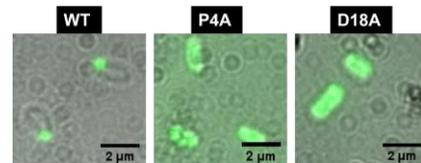


図 4 変異 ClpP の細胞内位置観察

(7) 定常期細胞で集合した Clp の再増殖における観察

$\Delta clpP/pWHclpPgfp$ の細胞分裂を LB 固体培地上でタイムラプス観察した (図 5)。母細胞に集合する Clp は細胞分裂が進行しても、常に母細胞に維持されていた。

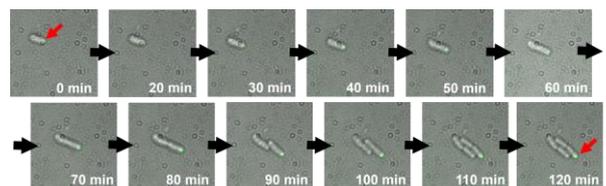


図 5 大腸菌 Clp の細胞内動態タイムラプス観察

4. 結言

大腸菌 Clp プロテアーゼは、増殖期で拡散しているが、定常期で集合する。定常期細胞における Clp の集合は、Core Particle と Regulatory Particle の会合に依存している。また、定常期細胞に集合した Clp は再増殖の際に拡散せず、常に母細胞に維持される。大腸菌の定常期細胞は、休眠状態から完全には脱分化しないことが示唆された。

謝辞：本研究は山本兼由教授によるご指導のもと、吉村美歩教務助手、保科真樹氏、眞木良美氏、伊藤佳歩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) Miyake Y. *et al.*, (2020) *Sci. Rep.*, 10, 3661
- 2) Sauer R. *et al.*, (2011) *Annu. Rev. Biochem.*, 80, 587-612.
- 3) Bewley C. *et al.*, (2005) *J. Struct. Biol.* 153, 113-128
- 4) 保科真樹 (2023) 2022 年度法政大学修士論文
- 5) 伊藤佳歩 (2023) 2022 年度法政大学卒業論文