

# 大腸菌増殖に不要な二成分制御系センサーキナーゼ

矢ヶ崎, 優 / YAGASAKI, Yu

---

(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/10.15002/00030794>

# 大腸菌増殖に不要な二成分制御系センサーキナーゼ

ALL SENSOR HISTIDINE KINASES ARE  
NOT ESSENTIAL FOR *ESCHERICHIA COLI* GROWTH

矢ヶ崎優  
Yu YAGASAKI  
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

Two-component system (TCS) is a conserved stress response systems among prokaryotes. TCS consists of sensor kinase (SK) and response regulator (RR) and mainly regulates genome expression pattern. The all TCS gene-defective *Escherichia coli* strains, all 30 SK gene-defective  $\Delta$ SK and all 34 RR gene-defective  $\Delta$ RR strain, are isolated. Phenotype microarray showed that  $\Delta$ SK was able to grow under several stress conditions but  $\Delta$ RR was not. Metabolome showed that  $\Delta$ SK significantly increases intracellular level of amino acids, such as branched chain amino acids (BCAA), in comparison to the parent. I performed transcriptome and proteome measured the promoter activity of BCAA metabolic gene in  $\Delta$ SK, resulting that the promoter activity and mRNA level of all BCAA genes were similar to the parent strain whereas all proteins level increased in  $\Delta$ SK. To identify the gene involved in the amino acid increase of  $\Delta$ SK, transposon directed insertion site sequencing (TraDIS) was done using  $\lambda$  phage including mini-Tn10. As a result, more than 400 genes were detected as no essential genes for  $\Delta$ SK growth.

**Key Words** : *Escherichia coli*, two-component system, stress, growth, metabolic, essential gene

## 1. 緒言

細菌は、環境に応答し、生存する。生存した個体の中で、環境に適応できた個体のみが増殖を開始する。細菌の環境応答システムは、広く保存される二成分制御系 (TCS) がある。センサーキナーゼ (SK) とレスポンスレギュレーター (RR) の 2 種類のタンパク質からなり、SK から RR へのリン酸基転移反応を介した情報伝達により、遺伝子発現制御で応答する [1]。TCS は細菌の生存に必要なシステムであるが、いくつかの細菌種において増殖に必須な TCS の存在が報告されている [2]。最近の研究から、大腸菌の増殖には、主要な 3 つの TCS のうち任意の 2 つが必要であることも報告され [3,4]、大腸菌の増殖においても TCS は重要な役割を担っている可能性が示唆された。しかし、TCS が大腸菌の適応増殖に寄与するメカニズムは不明である。そこで本研究では、大腸菌の適応増殖に重要な TCS の機能を調べた。

## 2. 実験操作

### (1) 使用した大腸菌株

HoSeI 法を用い、親株 W3110 typeA に、30 の SK の遺伝子機能をすべて欠失させた株 ( $\Delta$ SK 株) と 34 の RR の遺伝子機能をすべて欠失させた株 ( $\Delta$ RR 株) を使用した [5,6]。

### (2) フェノタイプマイクロアレイ解析

親株、 $\Delta$ SK 株、 $\Delta$ RR 株を PM09-PM20 (BIOLOG) に植菌し、オムニログシステム (BIOLOG) で 96 時間の増殖を 15 分ごとに測定した。PM 増殖曲線を取得し、それぞれの培養条件における定常期の最大細胞密度と対数増殖期の比増殖速度 (/h) を算出した。

### (3) トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、メタボローム解析

親株、 $\Delta$ SK 株、 $\Delta$ RR 株から、mRNA、タンパク質、代謝産物をそれぞれ抽出し、株内における細胞内量を測定した。

### (4) Lux レポーター解析

目的のプロモーターを *lux* 遺伝子上流に相補したプラスミドを親株、 $\Delta$ SK 株にクローニングした。マイクロプレートリーダーを用いて LUX と OD<sub>600</sub> 値を測定した。

### (5) $\Delta$ SK 株の増殖関連遺伝子の探索

$\lambda$ NK1316 感染により得たカナマイシン耐性  $\Delta$ SK 株の約 260 万コロニーを掻き取り、ゲノム DNA を抽出した。DNBseq シーケンサーを用いて配列を解析し、Geneious Prime を用い mini-Tn10 が挿入されたゲノム上の位置を特定した。

### 3. 結果と考察

#### (1) ストレス条件下での $\Delta SK$ 株と $\Delta RR$ 株の増殖能

フェノタイプマイクロアレイ解析から、親株、 $\Delta SK$  株、 $\Delta RR$  株の 1152 ストレス条件における最大細胞密度と比増殖速度を算出し、それぞれをプロットした。親株の最大細胞密度と比増殖速度は概ね指数関数でフィッティングした。 $\Delta SK$  株と  $\Delta RR$  株も親株と同じような最大細胞密度と比増殖速度の相関があった。スポットの分布では、 $\Delta SK$  株は親株と同じであったが、 $\Delta RR$  株は親株と比較して最大細胞密度と比増殖速度とも小さい値に集合していた(図 1)。

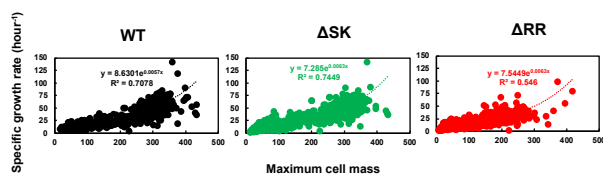


図 1 ストレス条件下における親株、 $\Delta SK$  株、 $\Delta RR$  株の最大細胞密度と比増殖速度の相関関係

#### (2) $\Delta SK$ 株で増加するアミノ酸

親株と  $\Delta SK$  株、 $\Delta RR$  株のメタボローム解析を実施し、407 種の代謝産物ピークの細胞内量を検出した。 $\Delta SK$  株で親株より 1.6 倍以上細胞内量が上昇していた代謝産物ピークが 242 種あり、そのうち 181 種がアミノ酸であった。また、その中に、タンパク質を合成するアミノ酸の 15 種が含まれていた(図 2)。

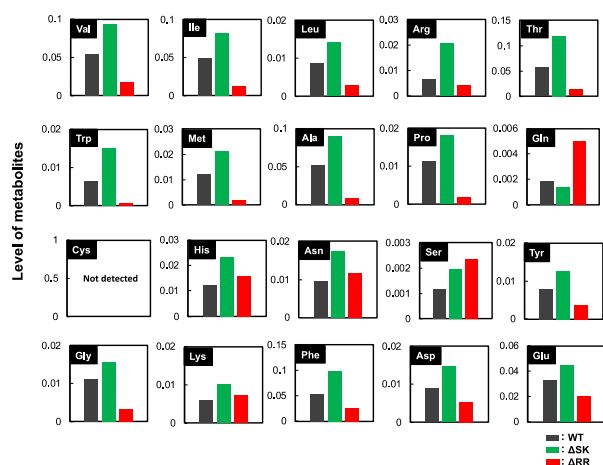


図 2  $\Delta SK$  株におけるタンパク質合成アミノ酸の細胞内量

#### (3) $\Delta SK$ 株の BCAA 増加に寄与する要因

親株と  $\Delta SK$  株について、トランスクリプトーム解析とプロテオーム解析、また BCAA 代謝酵素遺伝子プロモ

ーターの Lux レポーター解析を行った。その結果、BCAA 代謝酵素遺伝子のプロモーター活性や mRNA 量に大きな変化はなかったものの、 $\Delta SK$  株で酵素量が全体的に 2 倍以上上昇していた(図 3)。

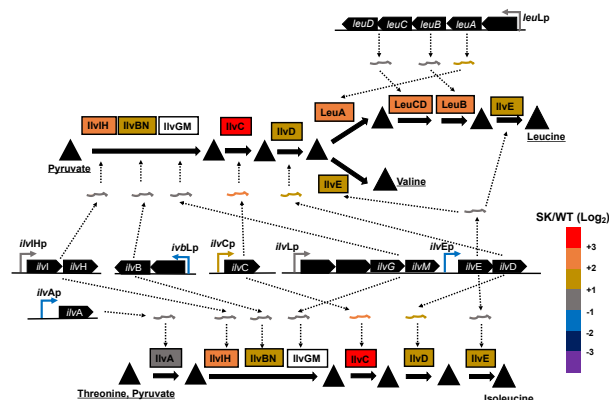


図 3  $\Delta SK$  株の BCAA 生合成経路の活性

#### (4) $\Delta SK$ 株に特異的な必須遺伝子の探索手法の検討

$\Delta SK$  株でのみ細胞内で増加するアミノ酸代謝に関連する新規遺伝子の同定を目指した。 $\lambda NK1316$  感染により  $mmin-Tn10$  をゲノム上に転移させた約 260 万コロニーのカナマイシン耐性株群のゲノム DNA を抽出した。DNBseq シーケンサーから得た約 3,200 万リードを分析し、782 の  $mini-Tn10$  挿入位置を、428 の遺伝子上に特定した。

### 4. 結言

大腸菌の環境応答システムである二成分制御系について、増殖にはレスポンスレギュレーターが必要であるが、センサーキナーゼは不要であった。 $\Delta SK$  株の細胞は高いアミノ酸レベルを示した。BCAA 代謝に関する分析の結果、 $\Delta SK$  株ではプロモーター活性および転写量に変化はなかったが、酵素量が増加していた。 $\Delta SK$  株の高いアミノ酸レベルには、細胞内の代謝酵素量を増加する特異的なシステムの存在が示唆された。

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、菅原慎吾氏、三宅裕可里氏、鈴木晴子氏、平野元暉氏、野本明里氏らの協力により行われた。

### 参考文献

- 1) Stock *et. al.*, (1990) Nature, 344, 395-400
- 2) Cardona *et. al.*, (2018) J. Membrane Biol., 251, 75-89
- 3) Masi *et. al.*, (2020), Antimicrob. Agents Chemother., 64, e00291-20
- 4) Hajj *et. al.*, (2022), J. Bacteriol., 204, e00449-21
- 5) Miyake *et. al.*, (2020) Sci. Rep., 10,3661
- 6) 菅原慎吾 (2021) 2021 年度法政大学修士論文