

法政大学学術機関リポジトリ

HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

STUDIES ON THE GENOME REGULATORY NETWORK FOR SURVIVAL WITHIN HOST ANIMALS IN ESCHERICHIA COLI

著者	YAMANAKA Yuki
著者別名	山中 幸
その他のタイトル	宿主体内生存戦略のための大腸菌ゲノム制御ネットワークの研究
year	2015-03-24
学位授与番号	32675甲第356号
学位授与年月日	2015-03-24
学位名	博士(理工学)
学位授与機関	法政大学 (Hosei University)
URL	http://hdl.handle.net/10114/10360

博士学位論文
論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏名	山中 幸
学位の種類	博士（理工学）
学位記番号	第 572 号
学位授与の日付	2015 年 3 月 24 日
学位授与の要件	本学学位規則第 5 条第 1 項(1)該当者(甲)
論文審査委員	主査 教授 山本 兼由 副査 教授 佐藤 勉 副査 教授 川岸 郁朗 副査 東京工業大学教授 田中 寛

STUDIES ON THE GENOME REGULATORY NETWORK FOR
SURVIVAL WITHIN HOST ANIMALS IN *ESCHERICHIA COLI*

1. 論文内容の要旨

本論文は、動物腸内細菌である大腸菌が宿主動物の消化器系で巧く生存するためのゲノム発現ネットワークの存在を提唱している。大腸菌の宿主動物体内への侵入は、経口を介して、胃における強酸環境を経て、腸管へ至り、大腸菌が腸管上皮細胞上に定着すると考えられている。この過程において、大腸菌は連続する複合的な環境変化に巧く適応する必要があり、これらの機能発現はゲノムに搭載する遺伝情報を選択的に発現により可能となる。遺伝情報発現の制御は、初反応である転写が最も重要な制御過程であり、転写装置 RNA ポリメラーゼの転写因子による転写機能変換として捉えられる。本論文では、大腸菌の酸耐性システムを制御する転写因子 YdeO と GadE の包括的なゲノム発現制御の解明を通して、新しい階層的ゲノム発現ネットワークを明らかとしている。

YdeO タンパク質の合成は酸性条件および嫌気条件で誘導され、YdeO レギュロンがストレス応答転写因子遺伝子と呼吸鎖遺伝子を含む 7 つの遺伝子発現の活性化することを示した。さらに YdeO レギュロンには、YdeO > GadE と YdeO > YiiS > CadC の制御カスケードの存在を明らかとした。つぎに GadE のポストゲノム解析により、大腸菌ゲノムの 100 遺伝子群を活性化すると予想されていた GadE は、実際には大腸菌細胞内のゲノムには 2 ヶ所のみ結合し、*hdeA* 遺伝子と *hdeD* 遺伝子を直接の標的であることを明らかとした。さらに、GadE > HdeD > GadX と GadE > HdeD > LrhA > FlhDC の制御カスケードの存在を示した。また、転写因子 GadE の大腸菌細胞内での膜状の特定の位置でクラスター形成をしていることを発見した。これらの実験結果より明らかとなった YdeO から端を発する多段階な階層的ゲノム発現制御システムが、大腸菌の宿主動物の経口から侵入し、腸管に至る連続した環境変化に巧く適応できるゲノム発現ネットワークであることを提唱している。

本論文は、英文で記された全 6 章から構成される。各章の概要は以下に示す。

第 1 章では、本研究の背景と目的が述べられている。まず細菌ゲノム発現制御を示し、大腸菌の酸耐性システムの分子機能とその制御システムが記されている。さらに、病原性大腸菌の病原性の分子機能とその制御システム、そして酸耐性システムの関連性について論じ、最後に本研究の目的と主旨を述べている。

第 2 章は YdeO レギュロンについて述べられている。まず大腸菌の転写因子 YdeO の機能が不明であること、また酸耐性システムに関与するなどが研究背景と示されている。つぎに本章で用いられた実験材料と方法が 14 項目として記されている。結果として 8 項目が示され、それらを踏まえ考察を 3 項目にまとめ論じられている。結果と考察の概要はつぎの通りである。ChIP-chip 解析により大腸菌細胞内での YdeO ゲノム分布を調べた結果、7 カ所に特異的に結合していることが明らかとなった。さらに Transcriptome 解析から、これら 7 カ所の YdeO 結合位置周辺に位置する *nhaR*, *hyaA*, *appC*, *gadE*, *gadW*, *slp*, *yjiS* の転写が YdeO により活性化されていた。これらのプロモーター活性についてレポーター解析を行った結果、*appC*を除く 6 つプロモーターが YdeO により活性化されることを確認した。また、DNaseI フットプリンティング解析により YdeO の特異的結合配列として特徴的なリピート配列 (YdeO-box) を見出し、全ての YdeO 結合領域に存在することを確認した。また、*ydeO* 遺伝子の発現は酸性条件だけでなく嫌気条件で誘導されるとともに、嫌気条件での対数増殖期細胞では細胞内 YdeO 量が増加した。これらの結果より、YdeO はグルタミン酸依存的酸耐性、Na⁺/H⁺対向輸送、嫌気呼吸鎖の遺伝子発現を活性化する嫌気条件で機能するアクチベーターであり、細胞内外のプロトンを利用して酸性と嫌気環境へ適応する生理機能を担っていることが示唆した。

第 3 章は YdeO > YjiS カスケード制御について述べられている。まず大腸菌 YdeO レギュロンと 3 種類の酸耐性システムとの関連性などが研究背景と示されている。つぎに本章で用いられた実験材料と方法が 7 項目として記されている。結果として 3 項目が示され、それらを踏まえ考察が論じられている。3 種類の酸耐性システムのうち、リジン依存的システムではリジン脱炭酸反応による細胞内プロトンの消費が行なわれる。そこで、リジン脱炭酸反応産物であるカダベリンの細胞内量を HPLC により親株と *ydeO* 欠失株で測定した結果、*ydeO* 欠失株で顕著な細胞内カダベリン量の増加を確認した。リジン依存的酸耐性システムに関与する *cad* 遺伝子群のプロモーター活性について *lux* レポーターシステムを用いた解析を行なった結果、リジン依存的システム遺伝子群のアクチベーター転写因子遺伝子である *cadC* のプロモーター活性が親株と比較して *ydeO* 欠失株および *yjiS* 欠失株で増加することを確認した。さらに RT-PCR によるリジン脱炭酸酵素ホモログ遺伝子の転写産物量を測定した結果、*adiA* 転写産物が親株と比較して *ydeO* 欠失株で有意に増加することを見出した。これらの結果より、YdeO レギュロンの唯一の機能未知タンパク質 YjiS を介した YdeO > YjiS > CadC カスケード制御の存在を明らかとした。さらにこのカスケード制御の標的としてアルギニン脱炭酸酵素 AdiA を推定し、YdeO > YjiS > CadC カスケード制御

がりジン依存的酸耐性システムを抑制することを示唆した。

第4章は GadE > HdeD カスケード制御について述べられている。まず大腸菌転写因子 GadE の制御について研究背景として示されている。つぎに本章で用いられた実験材料と方法が7項目として記されている。結果として5項目が示され、それらを踏まえ考察が論じられている。はじめに GadE の推定標的プロモーター活性についてレポーター遺伝子を用いた遺伝的相補解析で、*trans*に *gadE* 遺伝子を相補させることで細胞内 GadE 依存的プロモーター活性が回復するものとし、ないものがあることを示した。そこで、ChIP-seq 解析により大腸菌細胞内での GadE ゲノム分布を調べた結果、2カ所のみの特異的に結合していることを明らかとした。GadE 結合付近に存在するプロモーター活性を調べた結果、*hdeA* と *hdeD* プロモーターが GadE により活性化されることを確認した。さらに Transcriptome 解析から、11 遺伝子の発現が *gadE* 欠失株および *hdeD* 欠失株で減少し、62 遺伝子の発現が *gadE* 欠失株および *hdeD* 欠失株で増加することを見出した。*gadE* 欠失株と *hdeD* 欠失株で発現が減少する 11 遺伝子には、転写因子 *lrhA* 遺伝子と *gadX* 遺伝子が含まれていた。また、*gadE* 欠失株と *hdeD* 欠失株で発現が増加する 62 遺伝子には、転写因子 *flhDC* 遺伝子および FlhDC による活性化されるべん毛合成遺伝子群が含まれていた。これらの結果と LrhA が *flhDC* 遺伝子を抑制することを踏まえ、GadE > HdeD > LrhA > FlhDC と GadE > HdeD > GadX カスケード制御の存在を明らかとした。また GadE > HdeD > LrhA > FlhDC カスケード制御は、その標的遺伝子群を考慮すると、べん毛合成および運動性を抑制することを示唆した。

第5章は GadE の大腸菌細胞における局在について述べられている。まず細菌の転写因子がシグナルを受容する分子機構について研究背景として示されている。つぎに本章で用いられた実験材料と方法が8項目として記されている。結果として3項目が示され、それらを踏まえ考察が論じられている。ウエスタンブロッティングにより GadE の大腸菌細胞内分布を調べた結果、細胞質画分に加え膜画分にも分離することを発見した。つぎに GFP (緑色蛍光タンパク質) と GadE 融合タンパク質発現系を構築し、蛍光顕微鏡による大腸菌細胞内局在を調べた結果、GadE は大腸菌細胞の特定位置にドット状で局在することを観察した。また、全反射照明蛍光顕微鏡を用いた観察から、大腸菌細胞のドット状 GadE は不動であることが示唆された。さらに、GadE の C 末端を欠如させたトランケート変異体でも大腸菌細胞の特定位置にドット状で局在することを観察した。これらの結果より、転写因子 GadE が大腸菌細胞膜上の特定位置に局在することを明らかとし、その局在には N 末端領域 (1-50 アミノ酸残基) で十分であることを示した。GadE 構造から膜に直接相互作用できないことから、GadE と特異的相互作用する膜タンパク質の存在を示唆した。

第6章は結論として、本研究で得られた成果を要約し、総括するとともに、今後の課題と展望について述べられている。

2. 審査結果の要旨

本学位請求論文は、自然界で多様な環境に応じて生存できる生物機能をゲノム全遺伝子機能発現動態の変化として捉えるゲノム科学研究の一つとして捉えることができる。論文は、モデル生物・大腸菌を対象に自然環境におけるゲノム制御の全体像の解明を目指し、大腸菌の主な生息域を研究背景として捉え、大腸菌酸耐性システムのゲノム制御転写因子の機能解析を行い、各転写因子の包括的ゲノム発現制御を解明することに加え、新たなカスケードネットワーク制御の同定に至った。さらに、転写因子が細菌細胞膜上の定点に局在する新しい分子機構を示した。これらの結果より、大腸菌の宿主動物体内への侵入から定着に至る連続的な複合環境変化に巧く適応できる新しい階層的ゲノム発現ネットワークを考察した。審査の結果、以下の点について、学術的な新規性が優れていることが認められた。

- (1) 大腸菌における機能未知転写因子 **YdeO** の包括的ゲノム発現制御システムを解明し、**YdeO** から始まる新たなカスケードネットワーク制御を同定した。
- (2) 大腸菌転写因子 **GadE** の包括的ゲノム発現制御システムを解明し、**GadE** から始まる新たなカスケードネットワーク制御を同定した。
- (3) 大腸菌転写因子 **GadE** が細胞膜状の特定位置に局在することを明らかとし、ゲノム発現制御ドメインとは独立する局在ドメインを特定した。

よって、本審査小委員会は全会一致をもって提出論文が博士（理工学）の学位に値するという結論に達した。

(報告様式Ⅲ)