

2019 年度若手研究者共同研究プロジェクト実施報告書

法政大学総長 殿

以下のとおり研究実施報告書を提出します。

基 本 情 報	研究課題名：酸性ストレスにおける大腸菌増殖と不均一性の解析
	研究代表者 氏名：山中 幸
	(在籍者) 研究科・専攻・学年： (修了者) 所属・職種：マイクロ・ナノテクノロジー研究センター・客員研究員
	指導教員(所属・職・氏名)： (※在籍者のみ記入)
	共同研究者(所属・職・氏名)：生命科学部・教授・山本 兼由 (※指導教員と同人の場合は記入不要)
	その他 研究分担者：
	研究期間： 2019 年度 ～ 2021 年度 (※研究修了年度を記載)
年 間 の 研 究 実 施 概 要	増殖阻害は、細菌において薬剤耐性を増加させる要因の一つである。本研究では、酸性ストレスにおける大腸菌増殖を理解することを目指し、酸性ストレスによる「1. 増殖への影響」、「2. 増殖不均一性への影響」および「3. 増殖不均一性を与える大腸菌薬剤耐性への効果」をテーマとした。そのうち、2019 年度は「1. 酸性ストレスによる大腸菌増殖への影響」の(1) 酸性ストレスにおける大腸菌増殖の比較、「2. 酸性ストレスによる大腸菌の増殖不均一性の解析」の(1) 増殖不均一性の割合、および(2) 増殖不均一性を制御する遺伝子の網羅的同定を実施した。それらの詳細と今後の展望を以下に記す。 1. 酸性ストレスによる大腸菌増殖への影響 (山中、山本) (1) 酸性ストレスにおける大腸菌増殖の比較 酸性ストレスによる大腸菌増殖を調べるため、様々な酸性 pH 培地における増殖速度を測定した。pH 4.7、pH 5.1、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5、pH 7.3 の各緩衝型最小培地で 6 コロニーの独立する大腸菌を 24 時間培養し、15 分毎の OD₆₀₀ 値を測定した。その後、山本研究室で手法確立された増殖速度解析を行い、「初速度と減速度」を用いて大腸菌増殖を評価した。その結果、pH 4.7 では OD₆₀₀ の上昇が見られず、初速度と減速度を求めることができなかった。そのため、pH 4.7 最小培地では大腸菌は増殖が阻害されると考える。pH 5.1、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5 では、初速度・減速度共に pH 7.3 と同程度であった。つまり、最小培地において pH 5.1、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5 の酸性条件は、大腸菌増殖に影響を及ぼさないと見える。酸性条件と同様にして pH 7.3 の各緩衝型最小培地で温度を 27°C、37°C、42°C と変化させると初速度・減速度は異なる値を示した。特に、27°C では 37°C に比べ速度が 25% 以上減少した。つまり、増殖遅延が生じていると考えられる。以上の結果より、最小培地における大腸菌増殖には、少なくとも pH 5.0 以上が必要であることが示された。さらに、pH 5.0 以上では酸性条件は、平均的な大腸菌増殖に影響を及ぼさないことが示された。今後は、(2) 酸性 pH による細胞分裂への影響について一細胞観察により証明していく予定である。

2. 酸性ストレスによる大腸菌の増殖不均一性の解析 (山中)

(1) 増殖不均一性の割合

レポータープラスミドの構築

細菌における増殖の不均一性は、全体のわずかな割合で生じる現象であることが知られており、詳細に調べるには一細胞系を用いることが望まれる。まず初めに、大腸菌をラベル化し、増殖レベルの違いを区別することが可能なレポータープラスミドを構築した。アラビノース添加により人工的に発現可能なプラスミド pBAD24 vector を用いて、eGFP DNA をクローニングした。得られたプラスミドは、シーケンス解析を行い、クローニング領域およびシーケンスが正しいことを確認した。このプラスミドを peGFP とした。次に、大腸菌内で発現しているのか蛍光顕微鏡を用いて調べた。大腸菌 MG1655・野生株に peGFP を形質転換し、pH 7.3 の緩衝型最小培地に 0.2%アラビノースを添加し、37°C で終夜培養した。その結果、0.2%アラビノース添加にて蛍光観察可能であることが確認された。さらに、フローサイトメーターを用いて、同様に GFP 発現大腸菌検出が可能かを調べた。0%、0.02%、および 0.2%アラビノース添加の GFP 蛍光シグナルを比較したところ、各 10 倍程度の違いで蛍光シグナルが変化することが確認され、構築されたプラスミド peGFP は今後の実験に使用可能であると言える。

蛍光レポーターを用いた大腸菌増殖変化の一細胞観察

次に、peGFP プラスミドを用いて大腸菌増殖の不均一性を検出できるか調べた。pH 7.3 の緩衝型最小培地に 0.02%または 0.2%アラビノースを添加し、37°C で終夜培養した。その後、アラビノース無添加の新しい pH 7.3 緩衝型最小培地に 100 倍希釈で培養液を添加し、再び培養した。培養開始時 (0 h)、6 h、および 24 h の培養液をサンプリングし、フローサイトメーターにて蛍光シグナルの変化を観察した。各サンプルは $n=5$ 万細胞になるように蛍光測定を行なった。0.2%アラビノース添加の終夜培養液では、蛍光シグナルが $10^2 \sim 10^3$ の間にピークが出たのに対し、0 h では $10^1 \sim 10^2$ と 10 倍程度減少した。0.02%アラビノース添加の場合では、さらに 10 倍減少してしまい、6 h、および 24 h ではほとんどシグナルを検出できなかった。そのため、0.2%アラビノースを最終アラビノース濃度とし、今後の解析に用いることとした。0.2%アラビノース添加時の大腸菌に対し、時間経過に伴う蛍光シグナルの変化を調べた。その結果、0 h では $10^1 \sim 10^2$ 、6 h では 10^1 、24 h では 10^1 未満にシグナルピークが出た。さらに、一細胞ごとの蛍光シグナルをプロットし、詳細にシグナルパターンを確かめた。その結果、初期 (終夜培養時) の蛍光ピークである 10^2 程度のシグナルを持つ大腸菌が複数存在することが示された。これは、一部の大腸菌で増殖に伴う GFP タンパク質の分散が生じていない可能性を示している。つまり、蛍光シグナル強度差によって増殖の違いを分けられる可能性を示唆している。今後は、蛍光シグナルの異なる大腸菌をセルソーター (FACS) で分離し、酸性ストレスによる増殖の違いを一細胞レベルで評価していく予定である。

(2) 増殖不均一性を制御する遺伝子の網羅的同定

上記タイトルの予備実験として、酸性条件で発現誘導が報告されている遺伝子群 *atpB*、*atpI* についてプロモーター解析を行なった。まず、ルシフェラーゼ量でプロモーター活性が測定可能なレポータープラスミドを構築した。pLUX vector に *atpB* または *atpI* プロモーターをクローニングし、シーケンス解析により挿入 DNA が正しいことを確認し、pLUX-*atpB*、pLUX-*atpI* とした。クローニング領域には、スタートコドンから上流 500 bp を設定した。これらのプラスミドを大腸菌 MG1655・野生株に形質転換し、pH 7.3 の緩衝型最小培地で 3 コロニーの独立する大腸菌を終夜培養した。その後、pH 5.1、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5、pH 7.3 の各緩衝型最小培地で再び培養し、3 h、6 h、および 24 h におけるプロモーター活性を比較した。その結果、6 h の *atpB* プロモーター活性において pH 5.1~pH 5.5 で緩やかな上昇が見られ、pH 6.0 以降では差が見られなくなることが示された。この結果は、*atpI* プロモーター活性でも同様であることが示された。一方で、3 h および 24 h ではプロモーター活性の差は見られなかった。以上のことから、対数増殖期においてのみ pH 依存的に *atpB* および *atpI* プロモーターが制御されることが示唆される。*atpB* と *atpI* は、プロトン駆動型 ATPase の遺伝子オペロンを担っており、ATPase 発現の変化が大腸菌増殖の不均一性を誘導する要因である可能性が示唆された。そのため、今後予定している「増殖の不均一性を制御する遺伝子の網羅的同定」のための遺伝子スクリーニング解析における指標として用いる予定である。

研 究 業 績	成果発表（学会・論文・研究会等）		
	学会・論文・研究会等の別	タイトル	発行または発表年月
	論文	Measurement of the Promoter Activity in <i>Escherichia coli</i> by Using a Luciferase Reporter	2020 年 1 月