微生物間コミュニケーションによる大腸菌ゲノム発現機構

山本　兼由
（法政大学 生命科学部）

研究の目的

自然界の生態環境は複数種の生物で構成されている。特に微生物が占める割合は大きいがその実態は不明な点が多い。最近、自然環境における微生物間での有機的相互作用が明らかとなり、微生物が、自然環境中で高度に秩序化された微生物社会を構築していることが認識されつつある。自然環境中の微生物が示す多様な生理機能を考える上で、このような微生物社会構造の分子基盤およびその中で生存するために、各構成微生物が進化させてきた適応機構を理解することは重要である。本研究では、大腸菌ゲノム解析から得られる情報を活用し、大腸菌を取り巻く微生物間情報伝達の分子機構を解明することを目標とした。最近、大腸菌の細胞壁構成成分である*N*-アセチルムラミン酸を代謝する特異的なPTSシステム遺伝子*murQP*が同定された[1)]。 このオペロンは、大腸菌を含めた細菌の菌体由来成分の存在の有無によって、機能発現が制御される細菌間コミュニケーションシステムの一つであると考えられた。そこで、本研究では、大腸菌*murQP*発現制御システムの解明を行った[2)]。さらに、異種細菌間コミュニケーションの解明を目指し、腸内細菌であるビフィズス菌との共培養時における大腸菌ゲノム機能発現を解析する実験系の構築を行い、ビフィズス菌の存在に依存して活性化する大腸菌プロモーターを見出した。

方法

大腸菌ゲノム上では、*N*-アセチルムラミン酸PTSシステム*murQP*オペロンに隣接して転写因子をコードすると予想される*yfeT*が存在する。これらの発現を調べるために、*murQ-lacZ*タンパク質融合遺伝子および*yfeT-lacZ*タンパク質融合遺伝子を作成し、野生型と*yfeT*欠失株のゲノムに導入した大腸菌株を作成した。それぞれの大腸菌は各種条件下で培養し、Millerらの方法によりβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した[2)]。一方、緑色蛍光タンパク質をレポーターとした大腸菌全プロモータークローンセット（PPTクローンセット）を利用して、異種細菌共存時における大腸菌遺伝子発現を測定した。ABCM液体培地でビフィズス菌（*Bifidobacterium longum*）とPPTクローンをもつ約 1,000種類の大腸菌形質転換体を嫌気チャンバー内で一晩培養後、各大腸菌株（5×10^4細胞）とビフィズス菌（4.95×10^6細胞）を、96 ウェルプレート上のウェルに分注したABCM培地に植菌し、37℃、20 時間、嫌気条件で共培養を行った。共培養後、蛍光プレートリーダーFL600（BioTek社製）を用いて、それぞれの緑色蛍光強度を測定した。大腸菌形質転換体単独培養時の蛍光強度に対して、ビフィズス菌共培養時の蛍光強度を評価することにより、共培養時に発現が誘導される大腸菌プロモーターを探索した。

結果

１．大腸菌における*N*-アセチルムラミン酸代謝制御機構[2)]

lacZ 融合遺伝子を導入した大腸菌 DI0101（λ*murQ*-*lacZ*）、DI0201（Δ*yfeT*, λ*murQ*-*lacZ*）、DI0102（λ*yfeT*-*lacZ*）、および DI0202（Δ*yfeT*, λ*yfeT*-*lacZ*）を最少培地 M9 で、37℃で振とう培養し、OD 600 nm が 1.4 の定常期におけるβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。その結果、野生株と比較して *yfeT* 欠失株において *murQ* 発現が約 4 倍に、*yfeT* 発現は約 10 倍に増加した（図 1A）。野生型の DI0101 と DI0102 について、*N*-アセチルムラミン酸（MurNAc）、ムラミン酸（MurN）、*N*-アセチルガラクトサミン（GalNAc）、またはガラクトサミン（GalN）をそれぞれ終濃度 1 mM 添加した M9 培地で、定常期まで培養後、β-galactosidase 活性を測定した。その結果、MurNAc の添加によって *murQ* 遺伝子の発現は 4 倍に、*yfeT* 遺伝子の発現は 12 倍に上昇した（図 1B）。また、MurN 添加では、*murQ* 遺伝子の発現は 2 倍に、*yfeT* 遺伝子の発現は 8 倍に上昇した（図 1B）。

２．ビフィズス菌との共培養時に発現する大腸菌プロモーターの探索

大腸菌の全プロモーター配列と緑色蛍光タンパク質遺伝子を連結した融合遺伝子を保持する約 1000 種のプラスミド（PPT クローンコレクションプラスミド）を導入した大腸菌形質転換株約 1000 株について、単独培養およびビフィズス菌との共培養を行った。各大腸菌株について、単独培養液とビフィズス菌との共培養液の蛍光強度をそれぞれ測定し、スキャッタープロットに表した（図２）。約 28 プロモーターが共培養時に発現が促進されることが確認された。さらに、これらのプロモーターのうち、定常期共培養液中のビフィズス菌占有度に比例して発現が変化する 4 つのプロモーター（*lysC*, *macA*, *proX*, *ygaU*）を同定した。単独培養時に比べて、*lysC* プロモーターは約 3 倍, *macA* プロモーターは約 3.5 倍, *proX* プロモーターは約 4 倍, *ygaU* プロモーターは約 3 倍、それぞれ発現が増加した。

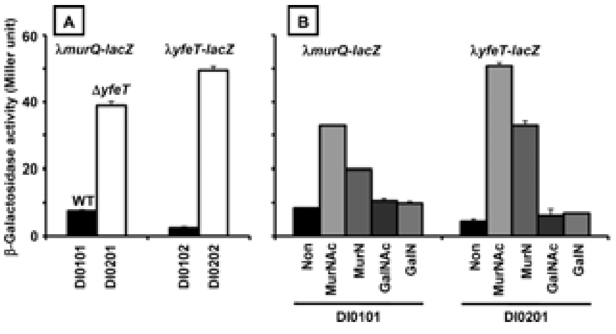

図１．(A) 大腸菌野生株（黒棒）と *yfeT* 欠損株（白棒）における *murQ*（左）と *yfeT*（右）の発現。（B）大腸菌野生株での *murQ*（左）と *yfeT*（右）発現における MurNAc、Mur、GalNAc、GalN 添加（1 mM）による影響

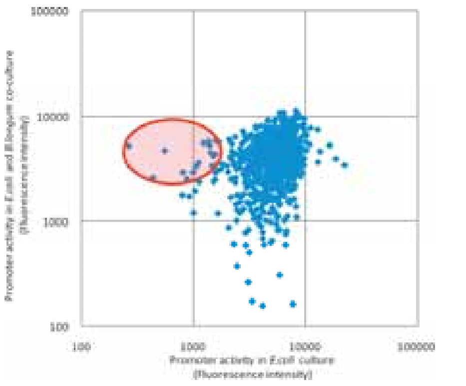

図２．PPT クローン大腸菌形質転換体における単独培養と B. longum 共培養の発現量。赤で示されたサークルは B. longum 共培養に発現誘導されたプロモーター群。

３．ビフィズス菌存在下に特異的に発現する大腸菌プロモーター

ビフィズス菌共存時に発現誘導される大腸菌 4 プロモーターに対し、ビフィズス菌の培養上清の発現に対する影響を調べた。ビフィズス菌を ABCM 培地で 20 時間培養後に、遠心分離を行い、上清を回収した。上清は NaOH を用いて pH7.2 に調整し、10×LB 培地（NaCl を含まない）を終濃度 0.25×LB になるように加えた。最終的に、0.20 mm メンブレンフィルターによって滅菌を行い、大腸菌形質転換体の培地として用いた。このビフィズス菌培養上清を含んだ培地で 37℃、20 時間培養後、4 プロモーターの発現を調べたところ、*ygaU* プロモーターは発現誘導されたが、*lysC, macA, proX* プロモーターの発現には影響を及ぼさなかった。この結果は、ビフィズス菌との共培養による大腸菌 *lysC, macA, proX* プロモーターの発現誘導には、ビフィズス菌の菌体の存在が必要であることを示唆している。

結論

１．大腸菌-大腸菌コミュニケーションの分子機構

大腸菌細胞膜構成成分であるMurNAcが、その代謝酵素の発現を誘導し、その結果、大腸菌生細胞内で代謝される仕組みが示された[2)]。最近、*murQP*オペロンの発現を抑制している転写因子YfeT(MurRと改名)が*N*-アセチルムラミン酸 6 リン酸と結合すると、そのDNA結合活性が弱まり、その結果、*murQP*オペロンの脱抑制を引き起こすことが明らかにされた[3)]。YfeTによる大腸菌*murQP*オペロンの発現制御機構は、大腸菌の死細胞由来成分を周囲の生大腸菌細胞が積極的に異化するための大腸菌-大腸菌コミュニケーションの一つ仕組みであると考えられる[4)]。

２．大腸菌-ビフィズス菌コミュニケーションの分子機構

異種細菌であるビフィズス菌と共培養した場合に、発現する大腸菌プロモーターを同定した。それらのうち、3 プロモーターの発現誘導には、既知のクオラムセンシングシステムによる発現誘導の場合とは異なり、ビフィズス菌の存在が必要であることを見出した。これらの結果は、大腸菌-ビフィズス菌間のコミュニケーションには、新規な分子機構が関与していることを示唆した。

文献

1. Jaeger, T., M. Arsic, and C. Mayer. 2005. Scission of the lactyl ether bond of *N*-acetylmuramic acid by *Escherichia coli* “etherase.” J. Biol. Chem. **280**: 30100–30106.
2. Ishii, D., Ishihama, A., and Yamamoto, K. 2009. Two Modes of Autoregulation of the *murR* Repressor in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **73**:2528-2530.
3. Jaeger, T., and C. Mayer. 2008. The transcriptional factors MurR and catabolite activator protein regulate *N*-acetylmuramic acid catabolism in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **190**: 6598-6608.

4. Goodell, E. W. 1985. Recycling of murein by *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **163**:305–310.