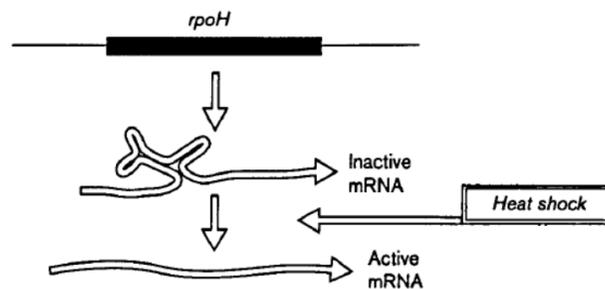


過酷な熱ストレスからの回復過程における大腸菌遺伝子発現の系統的な解析

Systematic Analysis of Gene Expressions during Recovery from Severe Heat Shock in *Escherichia coli*

BI 黄沐陽

➤ 通常温度下では *rpoH* mRNAの量はタンパク質より多い

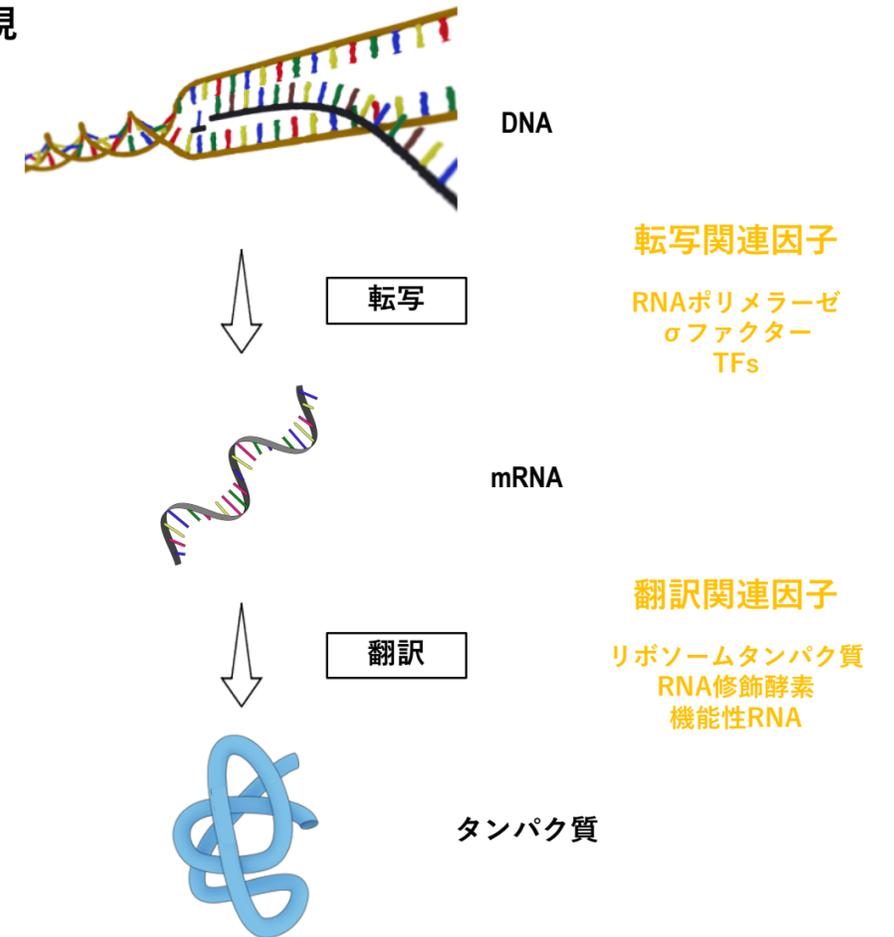


➤ **本研究の目的:**
 バクテリアの**転写と翻訳**に摂動を与えた時の細かい挙動に興味があり、今回は正に転写と翻訳が一致しない例である大腸菌の熱ストレスというモデルの、未だに解明されていない**大腸菌の熱ショックからの修復するメカニズム**について、**回復に寄与している因子の探索**と熱ショックからの**回復のモデル**をマルチ階層で確立することを目指す

➤ **学部時:**
 現象のプロファイリング
結果:
 タンパク質が機能毎に固まって順番を追って発現する

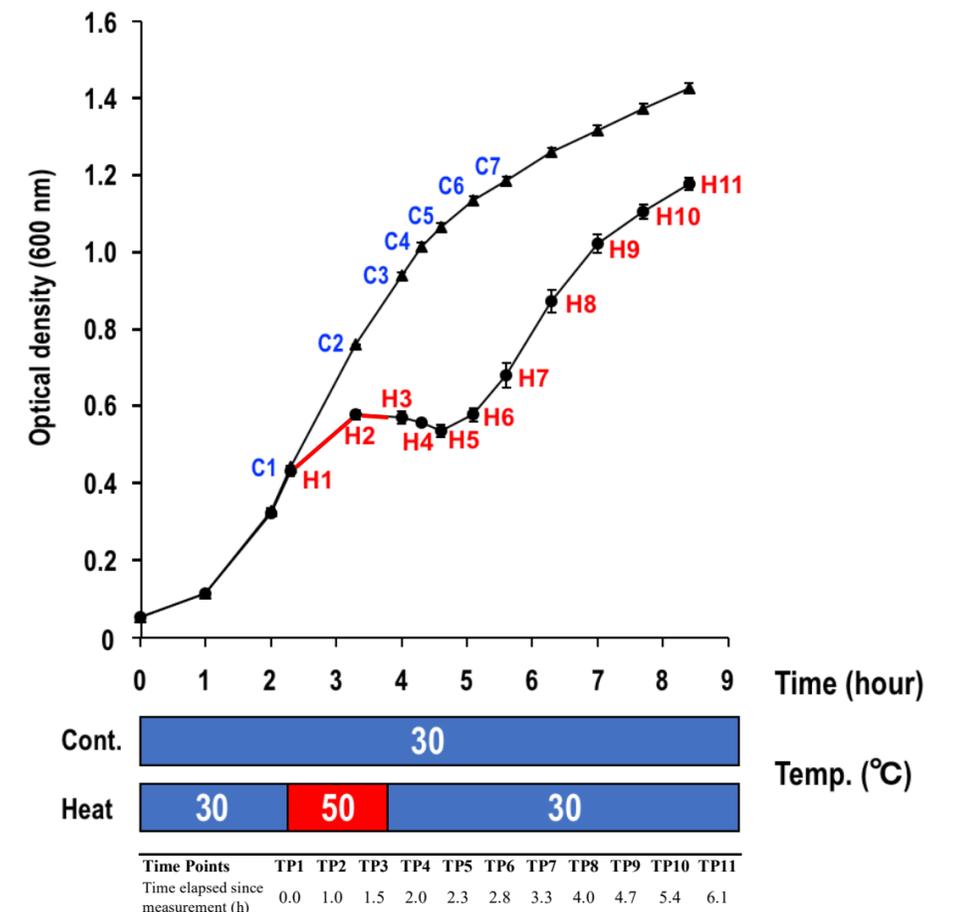
➤ **大学院:**
 メカニズムの理解/説明
手法:
 こういったタンパク質のまとまった発現がどう制御されているのかより高感度の計測機械から取得したデータを使って解析

➤ 原核生物における遺伝子発現



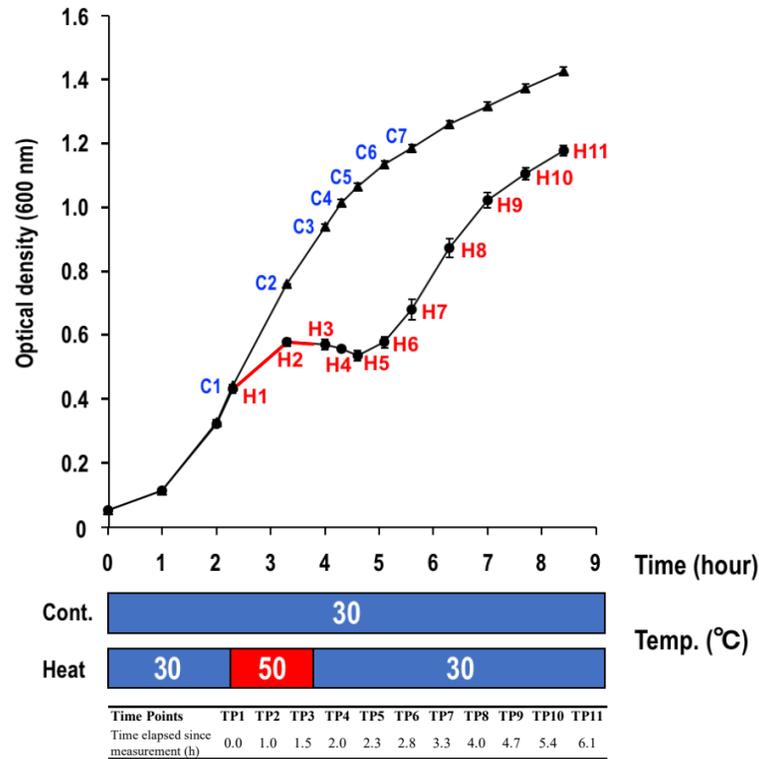
➤ 本研究で用いた大腸菌の増殖曲線

シングルコロニーを形成した *Escherichia coli* BW25113 株を対象に実施
 N=3



➤ 本研究で用いた大腸菌の増殖曲線

シングルコロニーを形成した *Escherichia coli* BW25113 株を対象に実施
N=3



➤ データの取得



飛行時間型質量分析計
timsTOF Proを用いて
**網羅的な翻訳産物（タンパク質）を
3,313種類**測定した

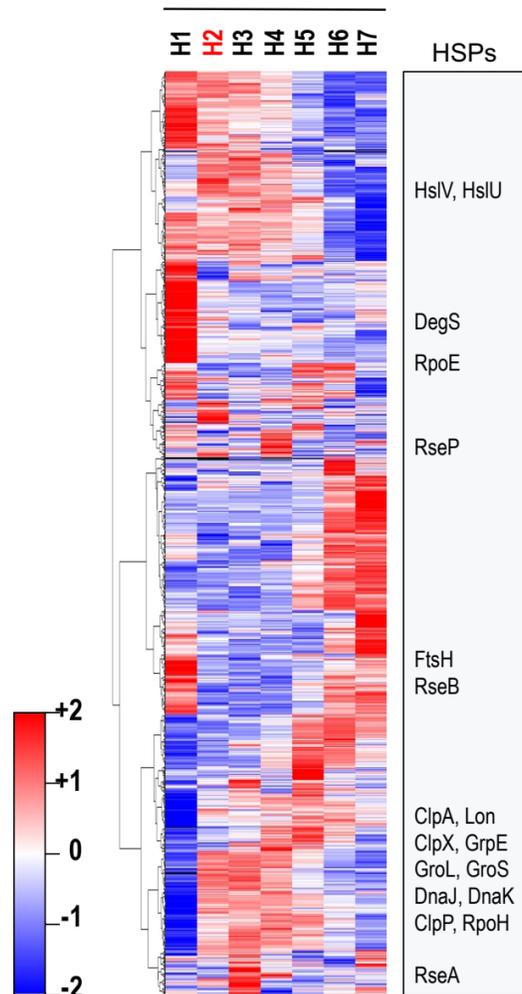


Illumina社のNovaSeq 6000シー
ケンシングシステムを用いて
**網羅的な転写産物（RNA）を
4,157種類**同定した

	旧プロテオームデータ	現在
やったこと	現象のプロファイリング	メカニズムの説明
サンプルTP	7	11
測定したタンパク質	1,425	3,133
測定したTFs	69 (21.23%) †	270 (83.08) †

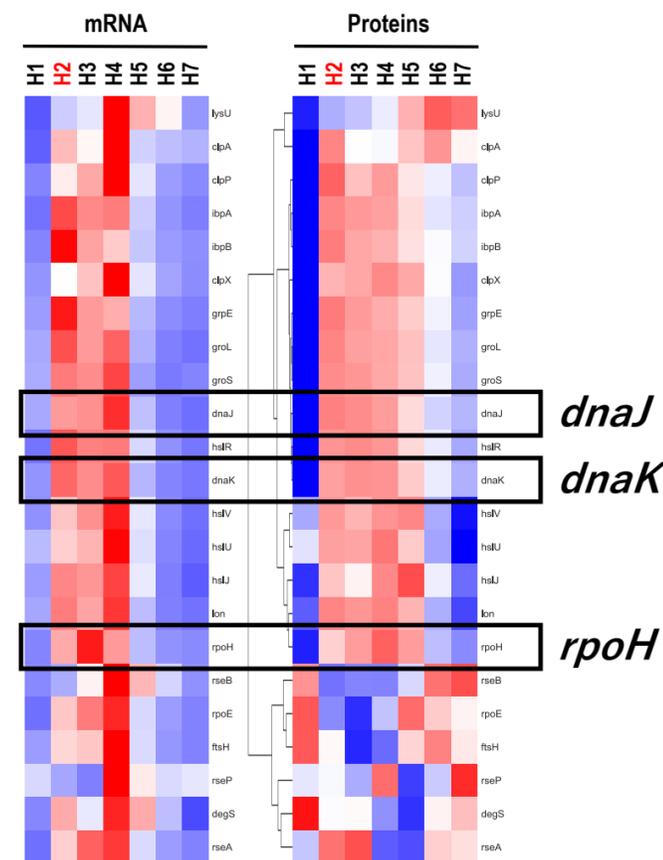
† 括弧内の割合は、RNAポリメラーゼのサブユニットやDNAにバイディングすると転写が抑制されるようなタンパク質をコードする遺伝子も含めた**325種類の転写関連遺伝子に対する割合**

Heat Shock

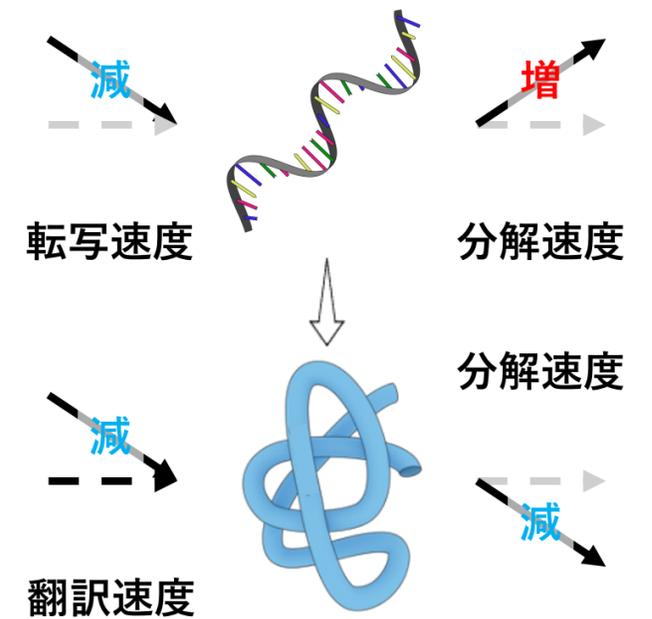


➤ 熱ショックの先行研究で示唆されて来たタンパク質の挙動は確認された

Heat Shock Proteins in the Heat Shock Samples



➤ mRNA・タンパク質の量が**増減**する簡単な例



➤ mRNA量が減少するからといってタンパク質量も同じくらい少なくなるとは限らない

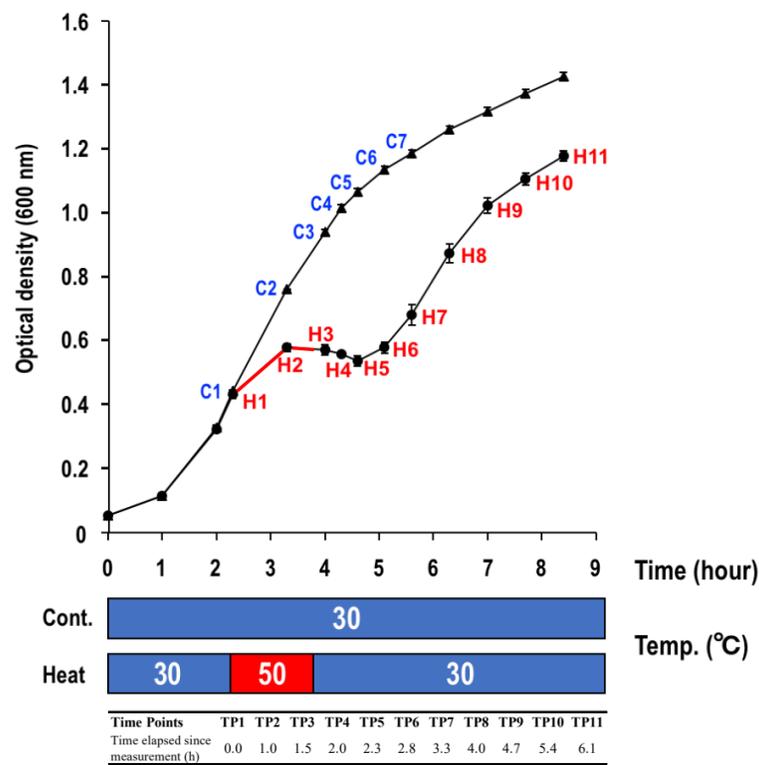
➤ リボソームはDnaK/DnaJ/GrpE等のシャペロンによって保護されている可能性がある

(Zhao, L., et al., 2019, Cell Reports.)

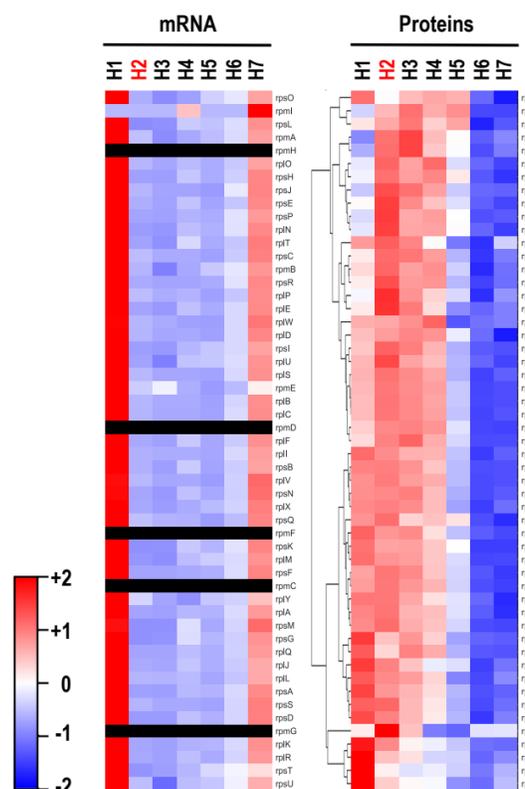
➤ アミノアシルtRNA合成酵素は翻訳が抑制される

➤ 本研究で用いた大腸菌の増殖曲線

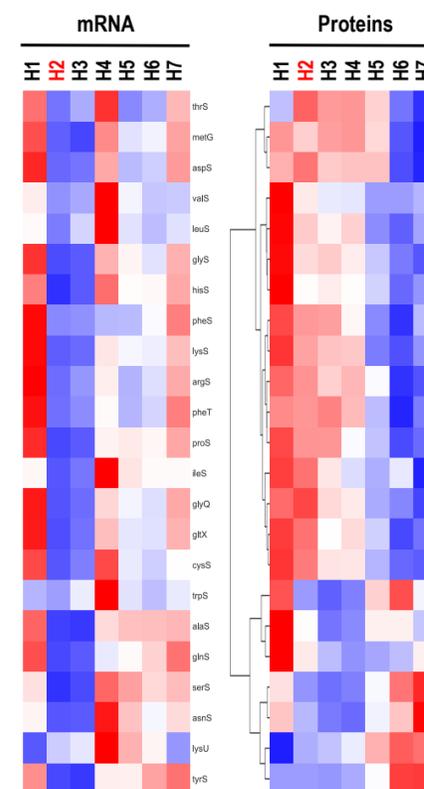
シングルコロニーを形成した *Escherichia coli* BW25113 株を対象に実施
N=3



Ribosomal Proteins in the Heat Shock Samples



aaRS in the Heat Shock Samples

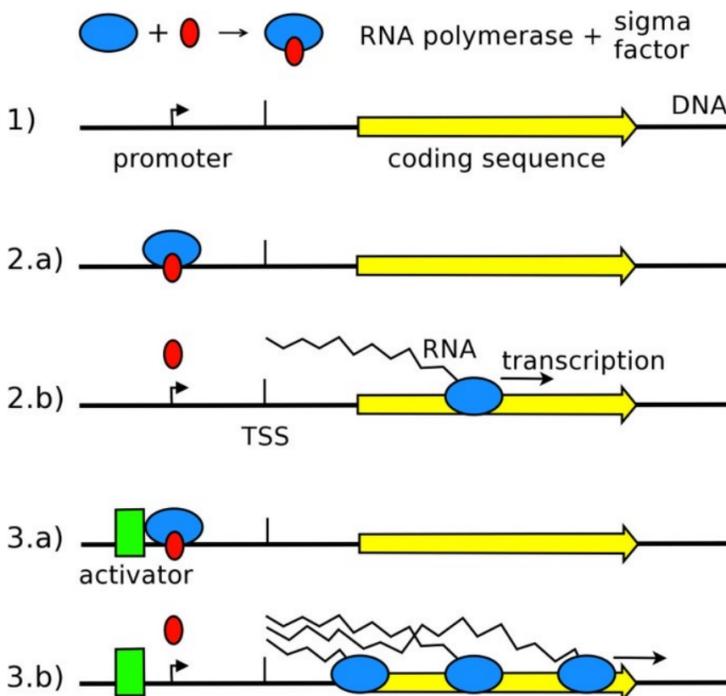


では転写に最も肝心の転写因子ではどうなの

SerS, AsnS, LysU, TyrS (TrpS, AlaS, GlnS) は翻訳制御を切り替えるためのスイッチである可能性がある

➤ バクテリアのσ因子・転写因子とRNAポリメラーゼ

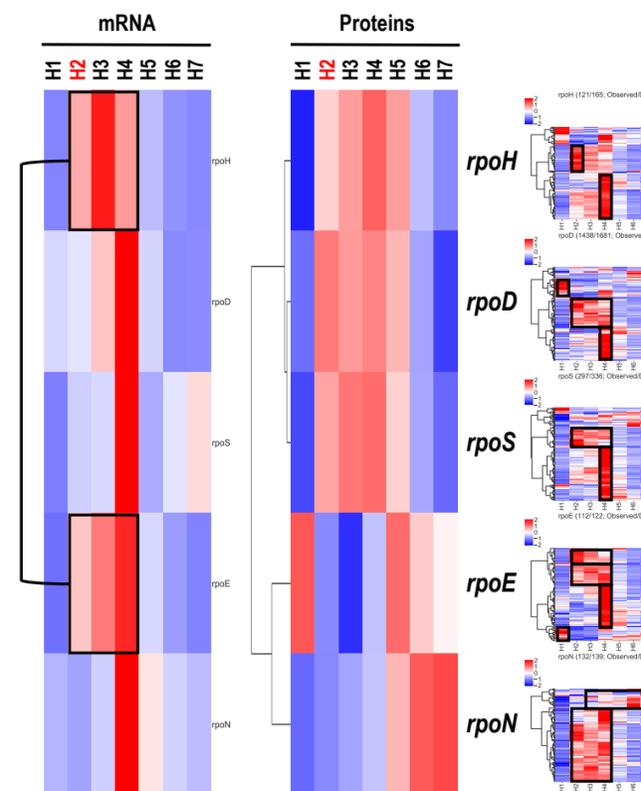
(Robert, B., et al., 2015, BMC Bioinformatics.)



➤ 各σ因子の機能と標的遺伝子数

σ因子	機能	標的遺伝子数
Sigma 70 <i>rpoD</i>	増殖細胞の成長と増殖に影響するハウスキーピング遺伝子を制御	1,681
Sigma 32 <i>rpoH</i>	ヒートショック応答	165
Sigma E <i>rpoE</i>	第2のヒートショックσ因子	122
<i>rpoN</i>	多種のストレス応答・代謝経路やバイオフィーム形成等の表現形質	139
<i>rpoS</i>	定常期のσ因子	336

Sigma Factors in the Heat Shock Samples

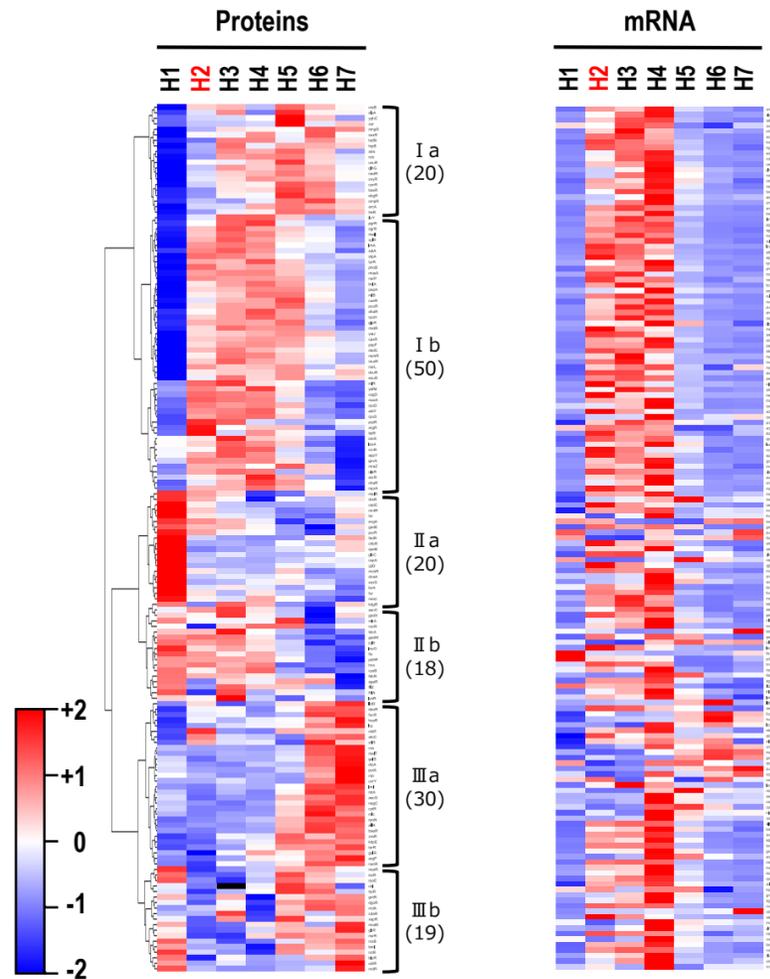


下流の標的遺伝子のmRNA発現量は異なるタイミングで発現している

RpoEのオペロンとその下流の標的からなる一部のグループでは熱応答時に発現していない

➤ 157個の転写関連因子のタンパク質発現量データを用いてHCAを行いデンドログラムより3(6)つのクラスターにパターン分けした

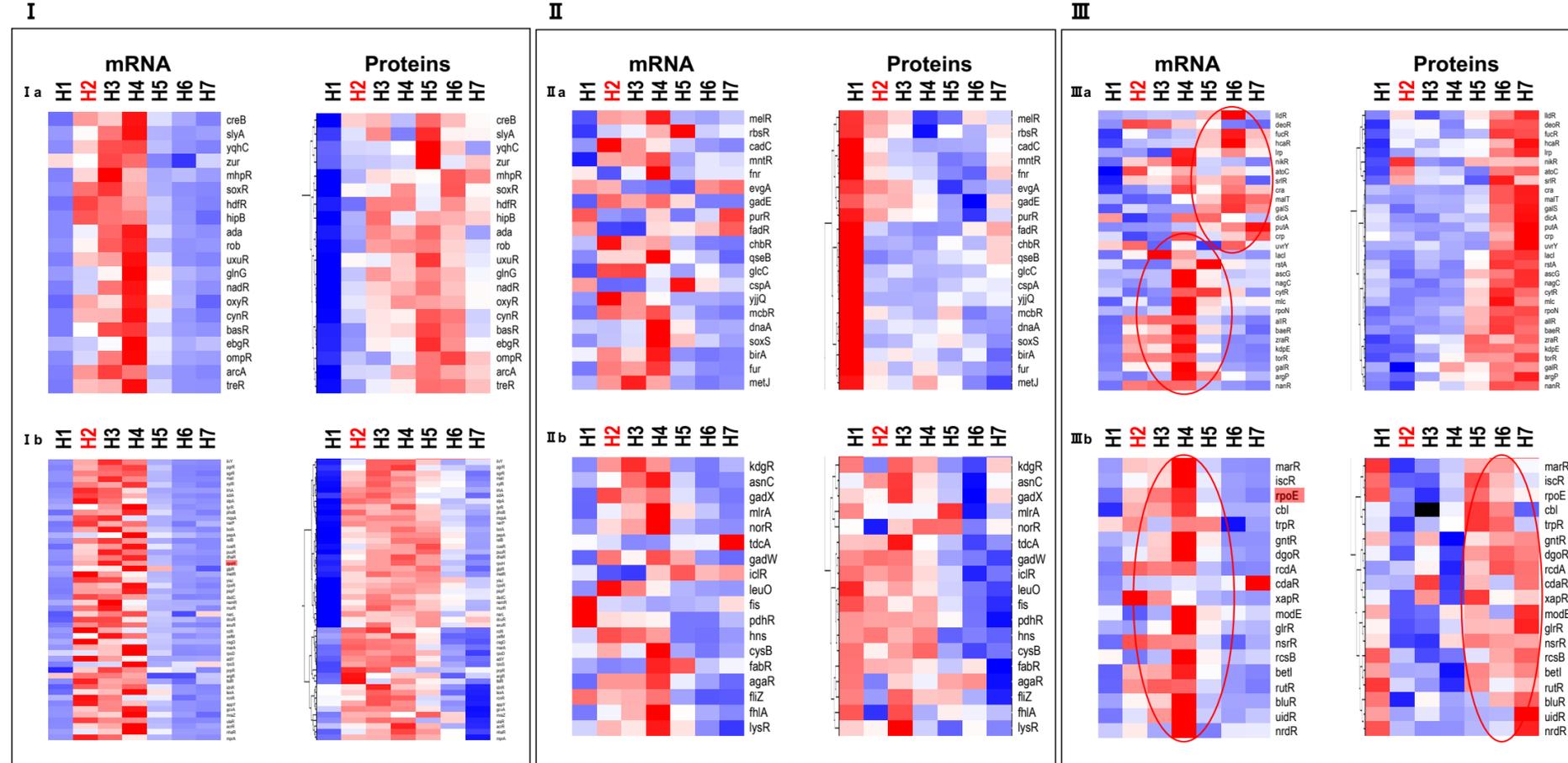
Transcription Related Genes in the Heat Shock Samples



➤ 転写後すぐに翻訳される

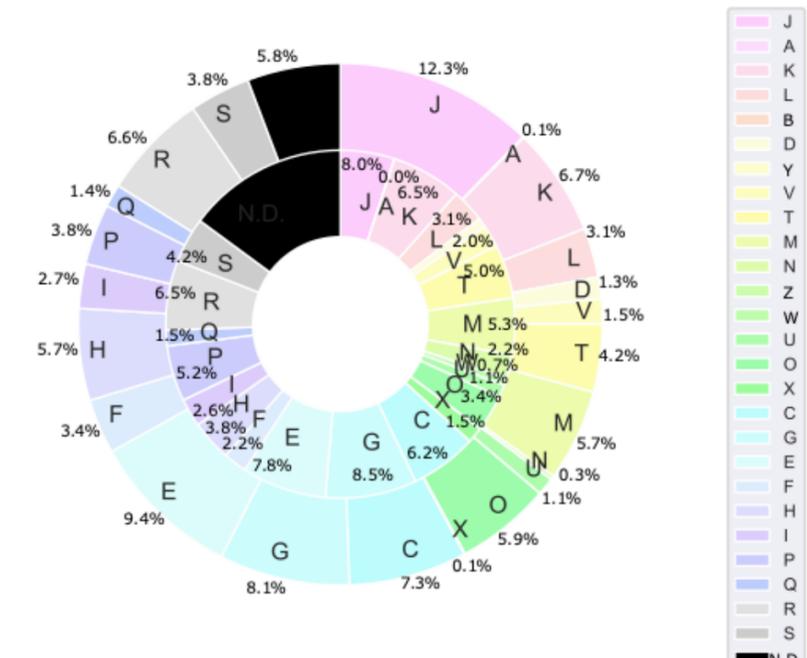
➤ 熱処理以前よりタンパク質が発現

➤ 翻訳まで遅延がある一群

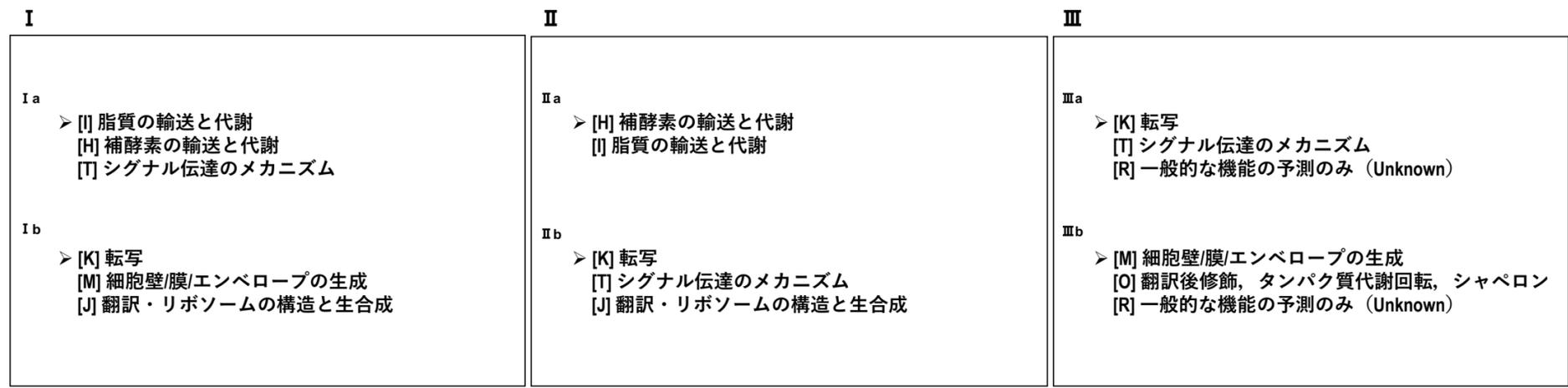


上位のCOG機能

➤ 大腸菌全体のタンパク質（内側）と測定されたタンパク質（外側）のCOGの割合



➤ 全般的に[C]エネルギーの生産と変換・[P]無機イオンの輸送と代謝（[G]炭水化物・[E]アミノ酸の輸送と代謝）が多く各クラスターで特異的に上位であった他の機能を下に示す



➤ 上流の制御タンパク質の発現傾向が異なっても下流の機能がほぼ変わらないこともある

総括

やったこと:

➤ 転写と翻訳が一致しない大腸菌の熱ストレス反応について、回復期に着目した

得られた結論:

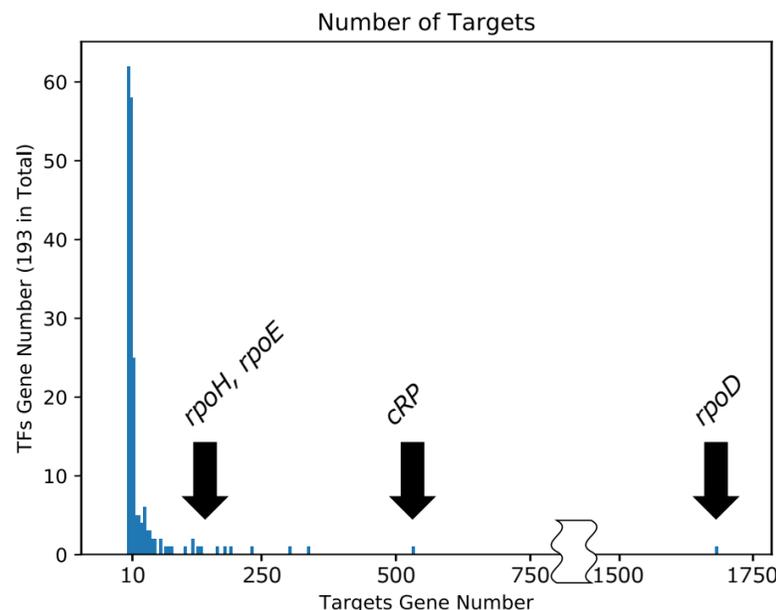
- ① 熱応答に関連するタンパク質の挙動を観察することで系を再現できたことが分かった
- ② リボソームタンパク質やaaRSは異なる制御を受けていることが示唆された
- ③ 一部のaaRSは翻訳制御を切り替えるためのスイッチである可能性がある
- ④ 転写は多階層によって制御が行われている
- ⑤ t/rRNA修飾酵素等が熱による最終ダメージから離脱するトリガーとして働くのに関連がある

残り半年の展望:

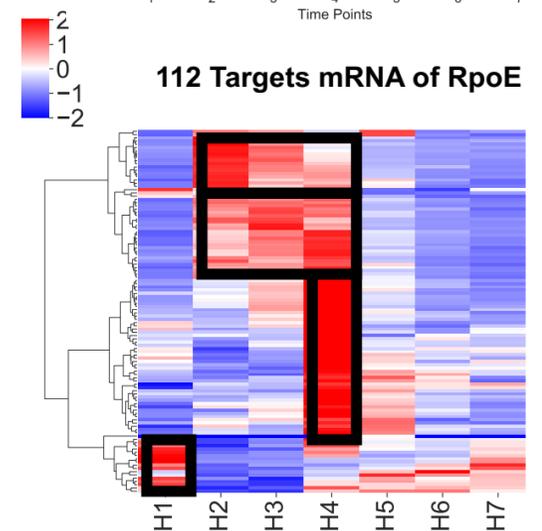
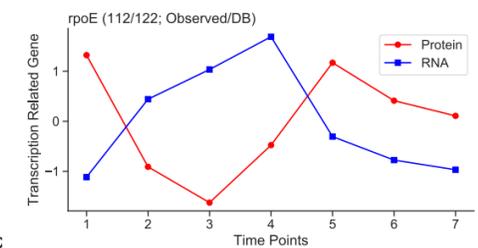
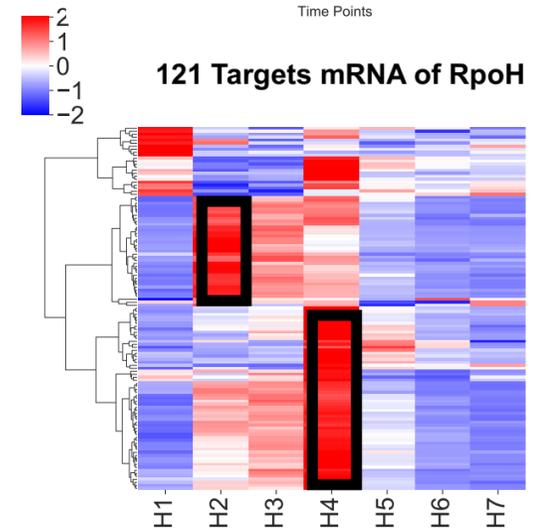
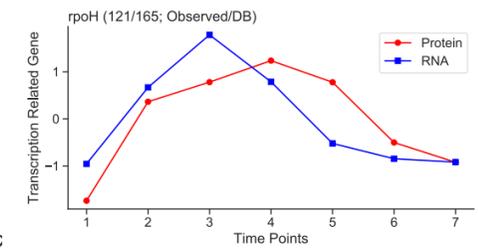
- RpoH, RpoEの下流遺伝子の発現ピーク毎に機能を見る
- RpoH, RpoEの下流にTFsが存在する…
 - 特異的な条件/環境下でのみ機能するのか
 - 実際に大腸菌のどの部位で機能するのか
 - そのさらに下流の制御を追う
- タンパク質の熱変性:
 - あまり変わらない…熱で変性し難い(守られている)のか
 - 一時的に下がるがすぐ戻る…頑張っ回復しようとする
- 最上流のσ因子から最下流の被制御因子のネットワーク図を作成する

補足

転写関連遺伝子の標的遺伝子の数の最頻値は10以下



- 最も多くターゲットを持つ転写関連因子:
RpoD (1,439/1,681; 測定/DB)
- 2番目に多くターゲットを持つ転写関連因子:
cRP (497/532; 測定/DB)
- 有名な熱ショックσ因子σ32:
RpoH (121/165; 測定/DB)
- 第2のヒートショックσ因子σE:
RpoE (112;122 測定/DB)



謝辞:

本研究にあたり、環境情報学部の金井 昭夫教授、荒川 和晴准教授、政策・メディア研究科の森 大特任助教、森田 鉄兵特任講師、富田 勝教授、およびRNA機能解析グループのメンバー、他本研究にご助言いただいた方に感謝申し上げます。