

9328 Na<sup>+</sup>イオン存在下の電気パルスに応答する新しい遺伝子の探索

助成研究者:阿野 貴司(東京工業大学 資源化学研究所)

共同研究者:正田 誠(東京工業大学)

研究目的

生物は、環境の変化に対し様々な応答を示す。特に、外部環境の急激な変化、すなわちストレスに対して、生物が積極的に応答することが近年明らかにされつつある。例えば、急激な温度変化をとまなう熱ショックや重金属、殺菌剤等の化学物質の添加が、ストレス因子として遺伝子レベルで研究されている。我々は、電磁場環境因子として超高磁場(地球磁場の10万倍以上)に注目し超高磁場環境下における種々の生物反応の研究を行っている。例えば、微生物の増殖が超高磁場の影響により顕著に変化することを既に見いだしている。本研究においては、Na<sup>+</sup>イオン存在下における電気パルスを与え、このストレス因子に応答する遺伝子を探索することを目的とした。

研究方法

遺伝子の応答をβ-galactosidaseの活性により測定するために、遺伝子ライブラリーをMu(Ap<sup>r</sup>, lac)ファージを用いて作製した。Mu(Ap<sup>r</sup>, lac)ファージの染色体ランダム挿入株をそれぞれ対数増殖中期まで培養を行い、電気パルスを印加した。37℃、2時間の培養後、β-galactosidaseの活性を測定した。電気パルスを印加しない培養液の活性に対する比を活性誘導比とした。また、既知のストレスレギュロンとの関係を調べるために、紫外線、熱処理に対する応答も調べた。

研究結果と考察

得られた200株について、電気パルスに対する応答を調べた結果、誘導比が2.0を越えたものが9株得られた。安定性の高い一株について、他のストレス因子に対する応答を調べたが、紫外線や熱ショックに対しては応答が認められなかった。また、SOS応答を示す菌株に電気パルスを与えたが全く活性の上昇は認められなかった。このことから、電気パルスにより、SOS応答を引き起こすDNAの損傷は生じないことが示唆された。また、培地中のNa<sup>+</sup>イオンを除くと応答は認められなかった。

活性の誘導は、パルス印加後30分後には認められ、その後2時間までは顕著な変化は認められなかった。また、この間、菌の増殖はコントロールと同程度であった。Na<sup>+</sup>イオンを、Ca<sup>2+</sup>やMg<sup>2+</sup>イオンと置き換えると酵素活性の誘導は認められなかったが、K<sup>+</sup>イオンを含む場合は同程度の誘導比の上昇が認められた。

今後は、さらなるスクリーニングと誘導活性の高い菌株における応答遺伝子の異同を遺伝子レベルにおいて明らかにすることと、誘導機構の解明とその遺伝子発現制御系への応用が興味ある検討課題である。



9328 Na<sup>+</sup>イオン存在下の電気パルスに应答する新しい遺伝子の探索

助成研究者:阿野 貴司(東京工業大学 資源化学研究所)

共同研究者:正田 誠(東京工業大学)

## ◇研究の目的

様々な環境の変化、特に外部環境の急激な変化すなわちストレスに対して、生物が積極的に应答することが近年明らかにされつつある。例えば、急激な温度変化をともなう熱ショックや重金属、殺菌剤等の化学物質の添加が、ストレス因子として遺伝子レベルで研究されている。特に、熱ショックタンパク質は、誘導される温度などは生物種により異なるが、細菌、酵母からショウジョウバエ、ヒトにいたるほとんどすべての生物で認められている(1)。

我々は、電磁場環境因子として超高磁場(地球磁場の10万倍以上)に注目し超高磁場環境下における種々の生物反応の研究を行っている。例えば、微生物の増殖速度が超高磁場の影響により顕著に変化することをすでに発表している(2)。

本研究においては、ストレス因子として電気パルスに注目した。特に、大腸菌は現在その全遺伝情報の50%に相当する2,000kbpに亘る塩基配列が決定されており、DNAレベルにおける解析が最も進行している生物であるといえる(3)。そこで、Na<sup>+</sup>イオン存在下における電気パルスを与え、このストレス因子に应答する遺伝子の探索とその解析を行うことを目的とした。

現在までに知られているストレスタンパク質は、通常同一の因子により多数誘導されることが知られている(4)。従って、複数の遺伝子が発見されると、これらの遺伝子の应答機能の解析と、その制御機構を従来の遺伝子群と比較することに興味を持たれる。また、誘導比の高い遺伝子が発見されると、遺伝子の発現制御が可能となり応用面における期待を持たれる。

## ◇1. 研究方法

1.1 本研究で用いた菌株およびファージを Table 1 に示す。Muファージの溶原菌である *Escherichia coli* MAL103 (5) は、Mu (Ap<sup>r</sup>, lac) ファージ液調製のために使用した。この菌には、野生型Muファージと Mu (Ap<sup>r</sup>, lac) ファージの2種類が挿入されており、リプレッサータンパクが温度感受性で42~44℃の熱処理でファージの誘発が起こり溶菌する。

宿主菌としては、*E. coli* GW1000 (6) を使用した。この菌は抗生物質アンピシリン (Ap) 感受性であり、ラクトースオペロンの構造遺伝子を欠損している。SOS 应答遺伝

子 *su1A* に Mu (Ap<sup>r</sup>, *lac*) ファージが挿入された *E. coli* PQ37株（7）は、電気パルスと SOS 応答の関連の有無を調べる際に、ポジティブコントロールとして用いた。本菌のアルカリフォスファターゼは、構成的に発現するためタンパク質合成阻害の指標として使用した。

## 1.2 培地組成

L培地組成：ポリペプトン10g，酵母エキス，NaCl 5g，を蒸留水1リットル（pH=7.0）に溶解した。

L寒天培地：L培地に15gの寒天を添加した。

L (Ca, Mg)：L培地にオートクレーブ終了後、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>それぞれを終濃度5mMおよび10mMとなるように添加した。

L (Ca, Mg) - 軟寒天：重層用のL (Ca, Mg) - 軟寒天培地は、L (Ca, Mg) に寒天を0.4%添加することにより調製した。

抗生物質アンピシリン (Ap) は25μg/mlの濃度で培地に添加した。

## 1.3 Mu (Ap<sup>r</sup>, *lac*) ファージ液の調製

*E. coli* MAL103 をL (Ap) 培地で前培養し（30℃，overnight）、これをL培地で50倍に希釈した。次いで、30℃で60分培養後、44℃で30分の熱誘発処理を行い、続いて37℃で約30分培養する事により溶菌液を得た。これを3000rpmで5分遠心し、0.45μmニトロセルローズフィルター（Advantec社製）でろ過除菌してファージ液とした。ファージ濃度は次に述べる方法により測定し、1.4~1.7×10<sup>8</sup>ml<sup>-1</sup>の値を得た。

## 1.4 ファージ濃度の測定

1.3 で調製したファージ液をL (Ca, Mg) 培地で適当に希釈した液0.1mlと約1×10<sup>9</sup>ml<sup>-1</sup>（OD600 = 約1）の菌濃度に調製した *E. coli* GW1000 の菌液0.2mlを混合し、30℃で30分静置した。これに3mlのL (Ca, Mg) 培地トップアガーを加えLプレート上にまいた。42℃でovernight培養後プラーク数を測定した。

## 1.5 Mu (Ap<sup>r</sup>, *lac*) ファージ挿入ライブラリの取得

*E. coli* GW1000 をL培地で前培養し（30℃，overnight）、これをL (Ca, Mg) 培地でOD600=約0.4に希釈した。30℃でOD600 = 約1（菌濃度約1×10<sup>9</sup>ml<sup>-1</sup>）となるまで培養した後、この菌液1mlと Mu (Ap<sup>r</sup>, *lac*) ファージ液 20~100μlを混合し（m.o.i.：感染効率<0.02）、30℃で30分静置した。その後、L培地で10倍希釈し、0.1mlをL (Ap) プレートに塗抹して30℃でovernight培養した。出現したAp耐性コロニーを Mu (Ap<sup>r</sup>, *lac*) ファージランダム挿入株として、合計200株得た。

## 1.6 パルス電場の印加

1.5 で取得したライブラリ200株に1個ずつ *E. coli* ES1~ES200 と番号を付し、それらをプレートから2mlのL (Ap) 培地に植菌した。12時間培養後、前培養液を2.4mlのL培地に1%植菌して、約2時間、OD600 = 0.2~0.3程度まで培養した。この菌体培養液1.4mlを

BRL社製 Disposable Electroporation Chamber（電極間距離 4 mm）に入れ、パルスを印加した。パルス印加に用いた装置は、我々が枯草菌の形質転換に用いているもので、BRL社製 Cell Porator Systemに同社の Voltage Boosterを接続して使用した（8）。本装置は、Voltage Booster使用時に Power Supplyの抵抗はlow、コンデンサの値は330  $\mu$ Fにセットした。この場合内部の電気容量は2  $\mu$ Fに設定され、本研究ではこの条件下で使用した。また、Voltage Boosterの抵抗値は4k $\Omega$ 、電圧設定値は400Vとした。このとき、菌体培養液に印加された電圧パルス強度は、約6kV/cmであった。

## 1.7 $\beta$ -galactosidase活性測定による遺伝子発現の間接測定

### 1.7.1 $\beta$ -galactosidase 活性測定

1.5 で得られたライブラリには、ラクトースオペロンの構造遺伝子 *lac* を持った Mu フェージが組み込まれており、*lac* は Mu フェージが挿入された宿主染色体遺伝子のプロモーターの支配を受けると考えられる。従って、 $\beta$ -galactosidase 活性を測定する事により、宿主菌遺伝子の Mu フェージ挿入部位の発現の程度を推定する事ができる。

$\beta$ -galactosidase 活性の測定には、Miller の方法に準じ、以下の様に一部改変した方法を用いた（9）。パルスを印加した菌体培養液 1.0 ml と、コントロールとしてパルスを印加しない菌体培養液 1.0 ml を 37 $^{\circ}$ C、2時間の培養により、遺伝子を発現させた後 OD600 で菌体濃度を測定した。

菌体培養液 0.1 ml を Z buffer（Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 60 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 mM; KCl, 10 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1 mM; pH, 7.0）、0.9 ml に加え、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム溶液 50  $\mu$ l とクロロホルム 50  $\mu$ l を添加してすぐに強く攪拌し、菌体細胞膜の透過障壁を破壊した。28 $^{\circ}$ C、10分間放置後 Z buffer に 4mg $\cdot$ ml<sup>-1</sup> の濃度で溶かした *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside（以下 ONPG と略称）溶液を 0.2 ml 加えて 28 $^{\circ}$ C で約 50~60 分間、酵素反応を行い、1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 ml を加えて反応を停止させた。ONPG は  $\beta$ -galactosidase の基質であり、分解によって黄色に呈色するので、吸光度測定により酵素活性を測定できる。Miller の方法では、 $\beta$ -galactosidase 活性の測定に OD420 と OD550 の 2 波長で吸光度を測定しているが、本研究では 3,000rpm、10 分間の遠心処理を行い、反応停止液中の懸濁物を沈澱させることにより、OD420 1 波長のみでの吸光度測定により  $\beta$ -galactosidase 活性を測定した。

$\beta$ -galactosidase 活性（OD420）と菌体濃度（OD600）より、菌体量あたりの酵素活性の単位（unit）を次式で算出した。

酵素活性の単位の算出

$$\text{unit} = \frac{\text{OD}(420 \text{ nm})}{\text{OD}(600 \text{ nm}) \times v \times t} \times 1000$$

ただし、*v* : 菌液量 (ml) ; *t* : 酵素反応時間 (min.)

取得した大腸菌 GW1000 への Mu フェージ挿入株ライブラリ ES1~ES200 の 200 株について上記の式を用い酵素活性を算出した。

### 1.7.2 Alkaline phosphatase 活性の測定

*E. coli* PQ37株を用いたときは、 $\beta$ -galactosidase活性測定他に、構成型の遺伝子発現を行う alkaline phosphatase 活性の測定も行った。酵素活性測定の方法は、基本的に  $\beta$ -galactosidase活性測定の方法に従い、以下の方法で測定した。

菌体に電気パルスを印加し、遺伝子発現させた後、菌体培養液0.1mlを 1M Tris-HCl buffer (2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol) pH=8.8, 0.9ml に加え、 $\beta$ -galactosidaseの場合と同様の操作を行った。この際、基質としては、前述の 1M Tris-HCl buffer に $4\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ の濃度で溶かしたp-nitro-phenyl phosphate（以下PNPPと略称）溶液を用いた。PNPPは alkaline phosphataseの基質であり、分解によって黄色に呈色する。反応時間を50～60分間として、2M HCl 0.5mlを加えて反応を停止させた。この場合、酸性側で黄色の呈色反応が消えるので、5分後さらに、2M Tris 溶液 0.5mlを添加しpHを調製後、上述の方法で酵素活性を算出した。

### 1.8 Mu ( $\text{Ap}^r$ , *lac*) ファージ挿入株の電気パルス応答

電気パルスを印加する実験群と印加しない対照群の酵素活性の単位を算出し、それぞれの活性比を電気パルス応答の指標として用いた。

電圧パルス応答の指標

$$\text{活性比} = \frac{\text{実験群の酵素活性}}{\text{対照群の酵素活性}}$$

以後、単に活性比とある場合はこの式の値を指す。

### 1.9 SOS修復応答

ストレス応答の一つである SOS 修復応答と電圧パルス応答に関わりがあるかどうかを検討するために、SOS 修復応答が  $\beta$ -galactosidase活性測定により検出できる *E. coli* PQ37株を用いた。L ( $\text{Ap}$ ) 培地にグリセリン保存液から植菌して12時間前培養後、L培地に1%植菌を行い30℃、2時間、本培養した菌体に以下の処理を行った。

#### 1.9.1 紫外線処理

SOS 修復系を応答させるために、菌体に紫外線処理を行った。電圧パルス応答株とポジティブコントロールとして SOS 応答株 PQ37株を用いた。紫外線照射は、クリーンベンチ内の殺菌灯を利用した。殺菌灯は殺菌ランプ GL 15（東芝社製）で、主に253.7nmの波長の紫外線を放射する。クリーンベンチ内には2本の殺菌灯が平行に配置してあり、それぞれの殺菌灯から水平方向に15cm及び115cm、鉛直方向に 50cmの位置にプラスチックシャーレを置き、このプラスチックシャーレに菌体培養液3mlを一面に広げ、紫外線を30秒照射した。この後、通常通り、菌体 1 ml を37℃、2時間培養し、遺伝子の発現を行った後、 $\beta$ -galactosidase活性の測定を行った。

逆に SOS 修復応答遺伝子が電圧パルスに応答するかを調べる場合は、SOS応答株 PQ37株と、ポジティブコントロールとして電圧パルス応答株を用いた。

菌体培養液に電圧パルスを印加した。印加条件は、約6kV/cmの電圧パルスを連続して2回印加した。これは、1回印加の時よりも、2回印加した方が高い活性比が得られたためである。この後、37℃、2時間の培養により遺伝子を発現させた後、 $\beta$ -galactosidase活性を測定した。この二つの実験を行う事により、電気パルス応答遺伝子とSOS応答との関係をそれぞれのストレスの両面から検討した。

## ◇2. 研究結果

### 2.1 Mu (Ap<sup>r</sup>, lac) ファージ挿入株の取得

電気パルスに応答する遺伝子（群）の探索を行うために、プロモーターを持たず、 $\beta$ -galactosidaseの構造遺伝子のみを有するMu (Ap<sup>r</sup>, lac) ファージのランダム挿入株のライブラリーの構築を行った。このファージは大腸菌の染色体に組み込まれる際に、特に片寄りが認められずランダムに組み込まれることが知られている(10)。従って、ある遺伝子内に挿入されると、本来の遺伝子と融合された状態で発現され、その誘導状態を、 $\beta$ -galactosidaseの活性として検出することが可能である。同時に複数のファージが感染することをさけるために、生菌数1匹当たりの感染ファージ粒子数の数(m.o.i.)が0.02以下となるように実験条件を設定した(1.5)。

大腸菌の遺伝子総数は、約3,000個であると推定されている。そこでその約15分の1に相当する200株のランダム挿入体について、個別に酵素活性を測定することにより、電気パルス応答遺伝子存在の可能性を調べた。

### 2.1 Mu (Ap<sup>r</sup>, lac) ファージ挿入株の $\beta$ -galactosidase 活性の分布

1.5に示した200株の液体培養液について、パルスの有無による $\beta$ -galactosidase活性の比をそれぞれ求めた。酵素活性比の分布は、Fig.1に示した通りであり、電気パルスにより酵素活性が上昇する株が大部分であり、誘導比が1.3を越えたものは、40%であった。また、酵素活性が2倍程度上昇した株が9株得られたのに対し、活性が半分ほどに減少した株は得られなかった。最も高い活性比を示した株は、ES185株の活性比=2.83であった。一方最も低い活性比を示した株は、ES162株の活性比=0.71であった。また、活性比分布のモードは、活性比=1.2であった。高い誘導活性を示した菌株の内、その安定性の高さから、以後の実験にはES122株を主に用いた。

### 2.2 SOS応答と電気パルス応答

大腸菌の染色体が紫外線や化学変異剤により傷つけられると、SOS応答と呼ばれる一連のタンパク質合成が認められる(4)。高電圧パルスは、酵母の形質転換に有効である反面、*in vitro*においてDNAを切断することが示されている(11)。従って、本研究で得られた電気パルス応答株もSOS応答を示している可能性が示唆される。そこでSOS応答遺伝子の一つ*sulA*内に $\beta$ -galactosidase遺伝子が組み込まれたPQ37株とES122株の比較を行った(Table 2)。

菌体に紫外線を照射すると、PQ37株の活性が10倍程度上昇し、SOS修復系が応答している事が認められる。しかし、この時 ES122株の活性に変化はみられず、電気パルスに応答する遺伝子はSOS応答を示さないと考えられる。次に、菌体に電気パルスを印加したところ、逆に ES122株の活性が2倍程度上昇するのに対し、PQ37株の活性に変化は認められず、SOS応答遺伝子は電気パルスに対し応答しないことが示された。また、電気パルスにより alkaline phosphatase 活性の変化も認められないことが別途確認されたので、タンパク質合成の非特異的な合成阻害も生じていないと考えられる。

### 2.3 ヒートショックと電気パルス応答

大腸菌のストレス応答の中でも、ヒートショック応答は、SOS応答と同様に解析が進んでいる系であり、同様にレギュロンを形成していることが知られている。そこで、ヒートショックと電気パルスの関係を調べるために、30℃で培養を行った ES122株に45℃、5分間のヒートショックを与えた。β-galactosidase の活性を測定したが、ヒートショックによる活性の誘導は全く認められなかった（データ示さず）。また、高温以外にもエタノールや遷移類金属などの添加によってもストレスタンパク質が誘導されることが知られている。そこで、電気パルスの代わりにエタノールの添加を終濃度1%、2%の条件で行った。しかし、いずれの場合も増殖阻害は認められなかったが、活性の誘導も認められなかった。従って、ES122株の電気パルス応答遺伝子とヒートショックレギュロンは遺伝的に異なるものと考えられる。

### 2.4 定常超高磁場の電気パルス応答株への影響

電磁場の観点から、電気パルスに応答する株の超高磁場に対する応答を調べた。我々は、地球磁場の10万倍以上に相当するテスラレベルの高磁場が、大腸菌の増殖に顕著な影響を示すことを報告している(2)。そこで、この方法に準じてES122株を、対数増殖期まで培養後、培養液の1mlをNMRチューブに入れ、37℃、2時間、11.75テスラ高磁場を印加した。Fig. 2 に示す様に、ES122の活性は、磁場により上昇しなかった。しかし、L培地中における増殖促進効果が本菌株においても認められた。

### 2.5 増殖曲線と酵素活性の誘導

L培地における培養液にパルス印加を行いその後、経時的にサンプリングを行い増殖曲線を描き、またそれぞれのサンプリングタイムにおける酵素活性を測定した(Fig. 3,4)。電気パルスの有無により増殖は、ほとんど影響を受けていないことから、この条件下では菌体増殖への阻害効果は認められないと考えられる。従って、電気パルスは細胞増殖を阻害するタイプのストレス因子ではないと考えられる。

また、酵素活性は Fig. 4 に示す様に、30分後には最高活性の80%以上が誘導されており、少なくとも2時間までは顕著な変化は認められなかった。大腸菌のヒートショックタンパク質の場合、高温にシフトした後、約5分後にピークに達し、約30分で温度上昇前の約2~3倍に落ち着くことが知られている(12, 13)。従って、このES122の酵



素誘導の挙動も類似のパターンを示している可能性がある。

## 2.6 印加電圧強度依存性

ヒートショックの場合温度とその温度に保つ時間に、それぞれ誘導の最適値が存在する。電気パルスの場合、コンデンサーの放電に依存しているため、印加時間の調節が困難である。そこで、パルスの強度を変化させることにより、印加電圧の強度依存性を調べた。

Fig. 5 に示す様に、0.75 kV から 6.0 kV までほぼ直線的に酵素活性は増大した。パルスは2回までは、活性の上昇に寄与したがそれ以上は効果が認められなかった。

## 2.7 Na<sup>+</sup>以外のイオン存在下の電気パルスの影響

本研究において電気パルスを印加する際に用いたL培地は、ポリペプトン、酵母エキス、NaClの3成分からなる(1,2)。各成分を除いた状態で電気パルスを印加したところ、ポリペプトン、酵母エキスを除いても影響は、認められなかったがNaClを除くと活性の上昇は認められなかった。そこで、NaClをKCl、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>に置き換えて同様の実験を行ったところ、NaClと同等の活性上昇がKClにおいてのみ認められ、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>においては、それぞれ1.02、1.05と上昇が認められなかった。

## ◇3. 考察

Mu (Ap<sup>r</sup>, lac) ファージ挿入株を用い、電気パルスに対する応答株を探索した。その結果、パルス印加に対して酵素活性が上昇、低下した株がいくつか得られた。このことより、電気パルスがストレスとして菌体に何らかの作用を及ぼしていると考えられる。

本研究では、電圧パルス印加に対し、活性が上昇した株が大部分であった。活性が上昇するという事は、即ち宿主染色体遺伝子の発現レベルが上昇したという事であるので、電気パルス印加に対し、発現が抑制される遺伝子よりも、発現が促進される遺伝子の方が多いと考えられる。これは、菌体がストレスに対応する場合、既存のタンパク発現量を減らすより、新たにタンパク発現量を増やす方がストレスにより生じた新たな状態に対応しやすいと考えられる。実際に、ストレス応答系の一つであるSOS修復系でもリプレッサーの解離により、遺伝子発現の活性化を行っている(4)事から、実験結果のように活性上昇株が大部分である事の説明ができる。

SOS修復応答について調べた結果、SOS遺伝子が応答する条件下においても電気パルス応答遺伝子は応答せず、また逆に電気パルス応答遺伝子が応答する条件では、SOS遺伝子は応答しない事が確認された。この2点より電気パルス応答遺伝子はSOS応答をすする遺伝子群(SOSレギュロン)には、属していないと考えられる。代表的なストレス応答として、SOS応答以外に、ヒートショック、エタノール添加について検討したが、応答は認められなかった。また、超高磁場中においても、既報(2)のように増殖促進は認められたが、酵素活性の誘導は認められなかった。従って、電気パルス応答遺伝子は既知のストレスレギュロンには属していない可能性が高いと考えられる。今後は、遺伝子レベ

ルでの解析を行うことにより、応答遺伝子と既知の遺伝子との異同を明らかにすることが重要である。この場合、染色体に挿入したMuファージには、アンピシリンに対する耐性も組み込まれているので、この薬剤マーカーを指標にして遺伝子のクローニングを行うことが効率的であると考えられる。

再現性の良い事と、Muファージ挿入により増殖阻害を受けていないと考えられる事より、活性上昇株 *E. coli* ES122株を主に用い、電気パルス応答の特性について検討した。応答機構の遺伝子レベルでの詳細は今後の検討課題であるが、電気パルスにより引き起こされると考えられる細胞表層レベル（細胞質膜）での損傷に対して、積極的に細胞を保護するための遺伝子等の可能性が考えられ、細胞の損傷に対する修復機能の解析という観点からも興味を持たれる。

また、PQ37株において構成型になっている alkaline phosphatase の活性を測定したが、電気パルスによる遺伝子発現レベルの阻害あるいは上昇は観察されなかった。 $\beta$ -galactosidase活性が上昇した場合も、菌全体の遺伝子発現レベルが上昇しているならば、特異的に遺伝子が応答したとは言えない。従って、alkaline phosphatase 活性に変化が認められないことは、活性の上昇がタンパク質合成の全体的な上昇によるものではないことが示されたといえる。

大腸菌は現在その全遺伝情報の50%に相当する2,000kbpに亘る塩基配列が決定されており、DNAレベルにおける解析が最も進行している生物であるといえる(3)。従って、電気パルスに応答を示す菌株の遺伝子部位とその配列を決定することは、超高磁場に応答する遺伝子部位の解析とともに、生物の電磁場環境への応答という意味からも興味を持たれる。

#### ◇結論と今後の課題

1. Mu ( $Ap^r$ , *lac*) ファージ挿入株を用い、電気パルスに対する応答株を探索した結果、誘導比が2を越えるものが9株認められた。
2. 電気パルスに応答したES122株は、紫外線、ヒートショック、エタノール添加等の既知のストレス因子には応答しなかった。
3. SOS 応答を示すPQ37株は、電気パルスにまったく応答しなかった。従って、電気パルスによるDNA損傷は生じていないと考えられた。
4. 超高磁場(11.75テスラ)中において増殖促進は認められたが、活性上昇は認められなかった。
5. 電気パルスによる増殖阻害は認められず、誘導活性は印加電圧に応じて増大した。今後は、電気パルスに応答を示す菌株の応答遺伝子の遺伝子レベルでの解析、誘導活性のより高い菌株のスクリーニングと発現制御可能なシステムへの応用が重要な課題である。

◇引用文献

1. Schlesinger, M. J., Ashburner, M., and Tissieres, A. (1982) Heat Shock from bacteria to Man, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
2. Okuno, K., Ano, T., and Shoda, M. (1991) Biotechnol. Lett., 13, 745-750.
3. Bachman, B. J. (1990) Microbiol. Rev., 54, 130-197.
4. Gottesman, S. (1984) Ann. Rev. Genet., 18, 415-441.
5. Casadaban, M. J. and Cohen, S. N. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76, 4530-4533.
6. Bagg, A., Kenyon, C. J., and Walker, G. C. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 5749-5753.
7. Quillardet, P., Huisman, O., D'ari, R., and Hofnung, M. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 5971-5975.
8. Matsuno, Y., Ano, T., and Shoda, M. (1992). J. Ferment. Bioeng., 73, 261-264.
9. Miller, J. H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
10. Bukhari, A. (1976) Ann. Rev. Genet., 10, 389-412.
11. Tamiya, E., Nakajima, Y., Kamioka, H., Suzuki, M., and Karube, I. (1988) FEBS Lett., 234, 357-361.
12. Yamamori, T., Ito, K., Nakamura, Y., and Yura, T (1978) J. Bacteriol., 134, 1133-1140.
13. Lemaux, P. G., Herendeen, S. L., Bloch, P. L., and Neidhardt, F. C. (1978) Cell 13, 427-434.

Table 1. Bacterial strains used.

Strain	Genotype
<i>E. coli</i> MAL103	F <sup>-</sup> Mucls dl(Ap <sup>r</sup> , <i>lac</i> ) Mucls Δ( <i>proAB lacIPOZYA</i> )XIII <i>strA</i>
GW1000	<i>lac</i> Δ <i>UI69 tif-1 sfiA11 his-4</i>
PQ37	<i>sulA::Mud(Ap<sup>r</sup> lac)cts trp::MuC<sup>+</sup></i> Pho <sup>c</sup> <i>lacUI69</i>

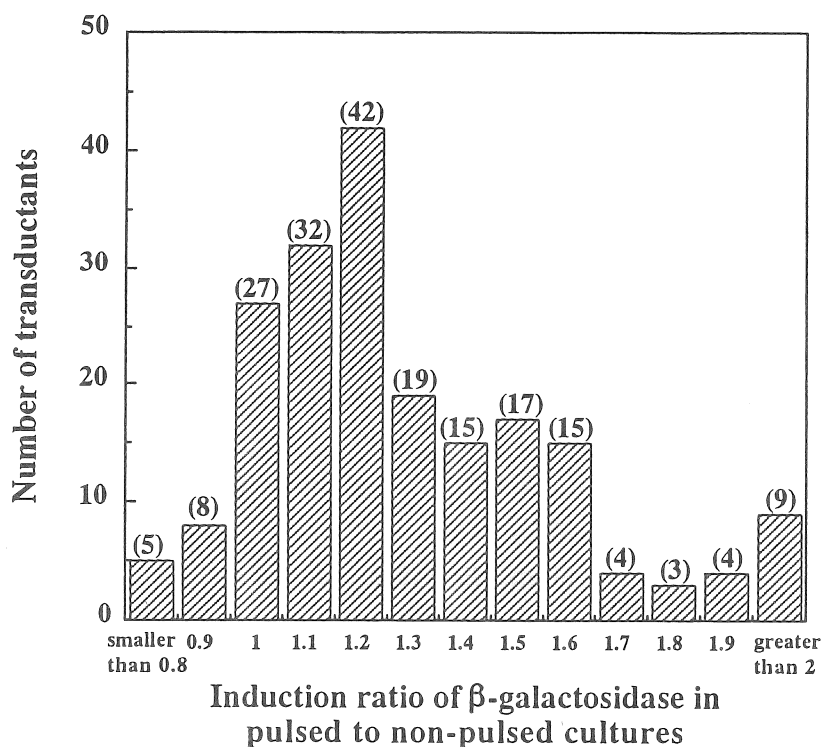


Fig. 1 Distribution of number of pulse-induced transductants. The ordinate indicates the number of transductants that belong to the ranges represented by their mean values on the abscissa.

Table 2. Induction of  $\beta$ -galactosidase in fusion strains.

Strain	Treatment	$\beta$ -galactosidase activity (U)		Ratio of induction
		treated	not treated	
PQ37 <sup>a</sup>	Electric pulse	48.0	48.2	1.0
PQ37	UV	563.4	56.4	10.0
ES122 <sup>b</sup>	Electric pulse	63.0	26.9	2.4
ES122	UV	39.2	40.3	1.0

<sup>a</sup> PQ37 has Mud(Ap, lac) insertion in a SOS gene, *sulA*, which is involved in cell division inhibition.

<sup>b</sup> ES122 is a transductant isolated in this work exhibiting clear response to the electric pulse.

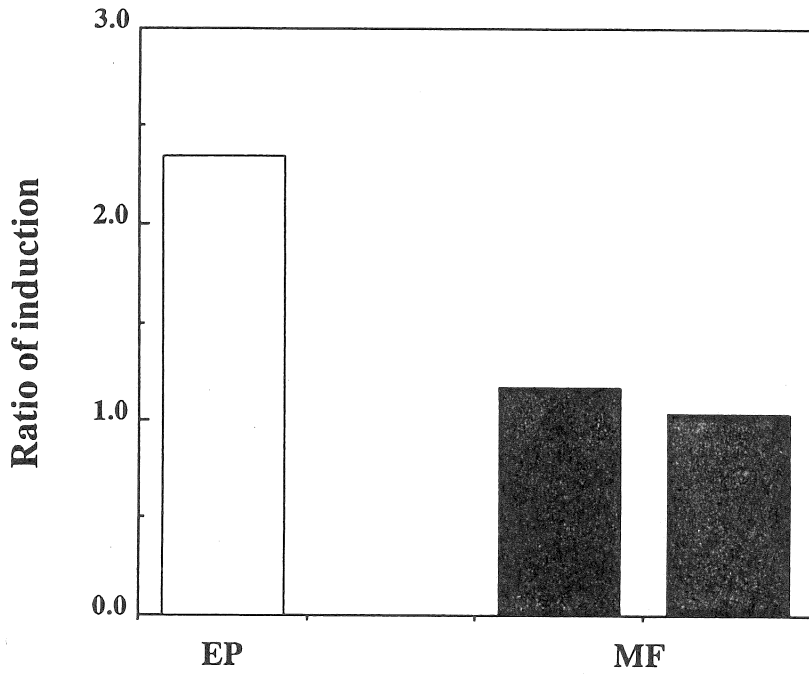


Fig. 2 Effect of magnetic field on the response of ES122. EP and MF denote electric pulse and magnetic field, respectively.

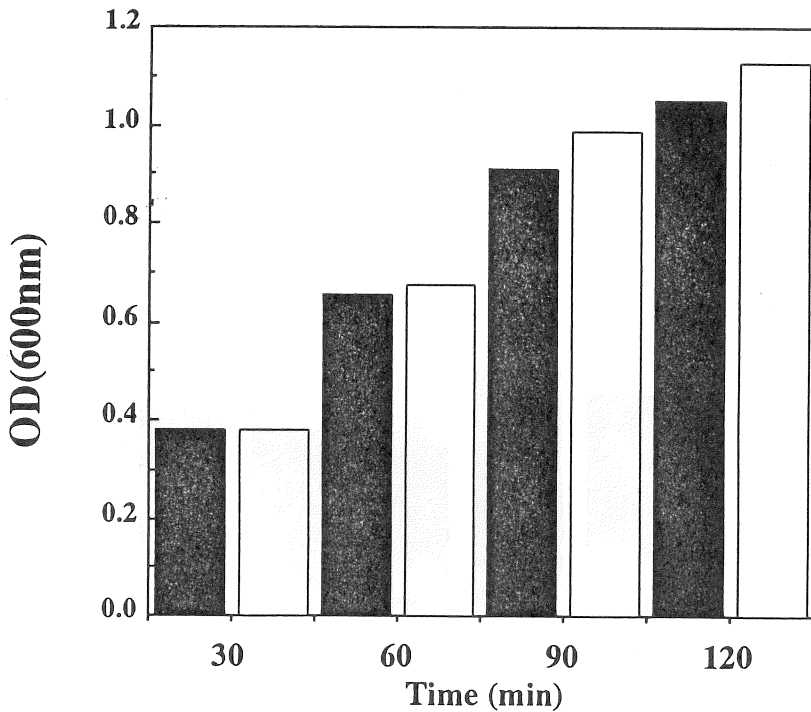


Fig. 3 Effect of electric pulse on the growth of ES122 after exposition. Closed and open boxes indicate samples with or without electric pulse treatments, respectively. Values on the abscissa represent the sampling time.

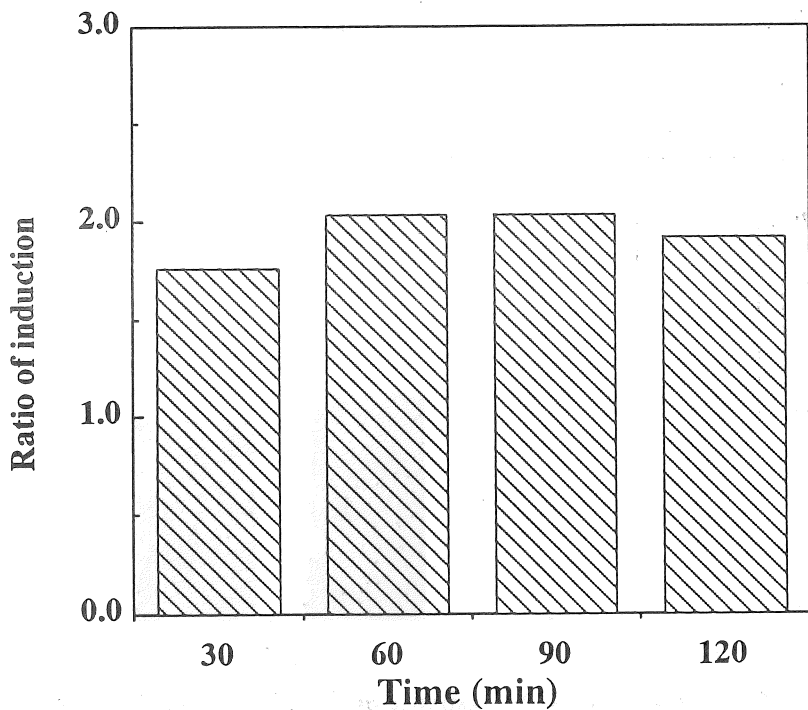


Fig. 4 Time course of the ratio of induction of the strain ES122 after electric pulse treatment.

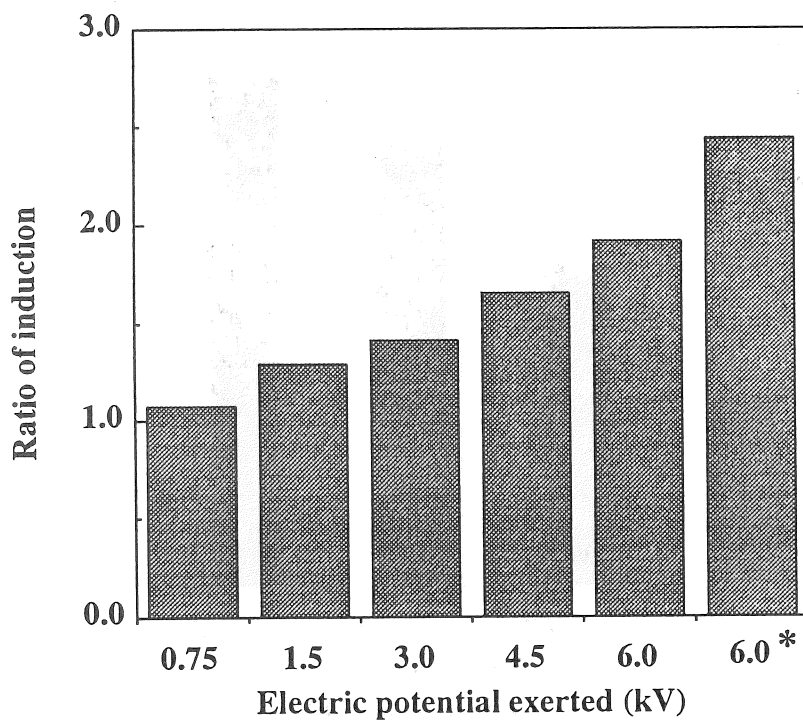


Fig. 5 Effect of the magnitude of electric potential on the ratio of induction of ES122. Asterisk indicates that electric pulse was exerted twice.

A trial on the isolation of electric pulse-induced *Escherichia coli* genes  
in the presence of Na<sup>+</sup>

TAKASHI ANO AND MAKOTO SHODA

Research Laboratory of Resources Utilization  
Tokyo Institute of Technology

Summary

According to the linkage map of *Escherichia coli*, the chromosome comprises 4,750 kilobase pairs and the genetic positions of 1,403 loci are now known. These results suggest that there may be over 1000 genes still waiting to be discovered.

Prokaryotic cells respond to environmental or chemical stresses by inducing specific sets of proteins characteristics to each stress. The proteins within each set and the genes that encode them constitute a regulon; well-characterized prokaryotic examples include heat shock, SOS response, and oxidation stress.

In this experiment, we employed an electric pulse in the presence of Na<sup>+</sup> ion as a stress on the *E. coli* and searched for the presence of a pulse-stimulated gene(s). The search of electric-pulse induced genes in *E. coli* was carried out by operon fusion techniques with a hybrid bacteriophage Mu, which creates transcriptional fusions of the structural gene of  $\beta$ -galactosidase to the host.

Among two hundred transductants tested, nine colonies showed higher expression of more than twofold when they were treated with electric pulses. An electric-pulse stimulated transductant was not stimulated by UV irradiation, which is known to induce an SOS response. Conversely, strain PQ37, which has an operon fusion in one of the SOS genes, did not respond to an electric pulse treatment. Alkaline phosphatase activities of pulsed and non-pulsed culture of PQ37 showed that no enhancement or reduction of protein synthesis occurred.

A possibility of the presence of the electric-pulse stimulated genes, which were not induced by DNA damages, was suggested. As the electric pulse did not damage DNA *in vivo*, a gene with an extremely higher induction ratio can be used as a new regulatory switch in the bio-industry.