

# 大腸菌での遺伝子発現における静磁場の影響

松永是 梶原寛子 池畑政輝 川原祥子 竹山春子

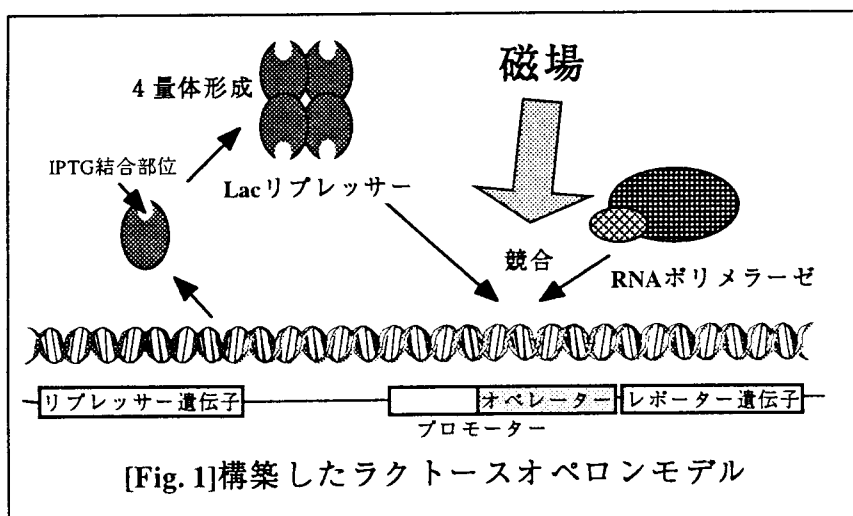
東京農工大学 工学部 生命工学科

## 1. はじめに

近年、10T ほどの強磁場が簡単に利用できるようになり、安全性も含め、磁場の生体作用が注目されている。これまでに、主に物理、化学分野での研究により、このような高磁場下ではほとんどが反磁性である生体物質においてさえ、磁場による様々な影響が観察されることが明らかにされている。0.4T の静磁場がヘモグロビンの構造に影響を与えることにより、酸素との結合能を 10-17%減少させる現象や<sup>1)</sup>、他にフィブリンやコラーゲンのような反磁性体物質のポリマーが、その磁気異方性により強磁場中で配向することが報告<sup>2)</sup>されている。そのため、磁場の生体影響として、生体内の弱い物質相互作用、例えば遺伝子発現におけるタンパクと DNA の相互作用等において、各々の物質の磁化率の差に起因する磁気力を介して、磁場が作用する可能性が考えられる。

しかしながら、一般に磁場の影響は非常に微弱であると考えられているため、鋭敏で再現性の良い実験系を用いる必要がある。実験材料として微生物を用いた場合、高等生物個体や培養細胞よりも格段に扱いやすく、実験条件をより厳密にコントロールできるという利点がある。これまでに、7T の磁場曝露により大腸菌の生育における死滅期の遅延<sup>3)</sup>や 0.16T の磁場での乳酸菌における酸形成能の増加<sup>4)</sup>が報告されている。一方で 3 T の磁場で遺伝子修復機能欠損した大腸菌の生育への影響はないといった報告<sup>5)</sup>もある。また、サルモネラ 4 株と大腸菌 1 株で変異原性試験をした結果、5 T、48 時間迄の定常磁場曝露において変異原性は見られなかったが、

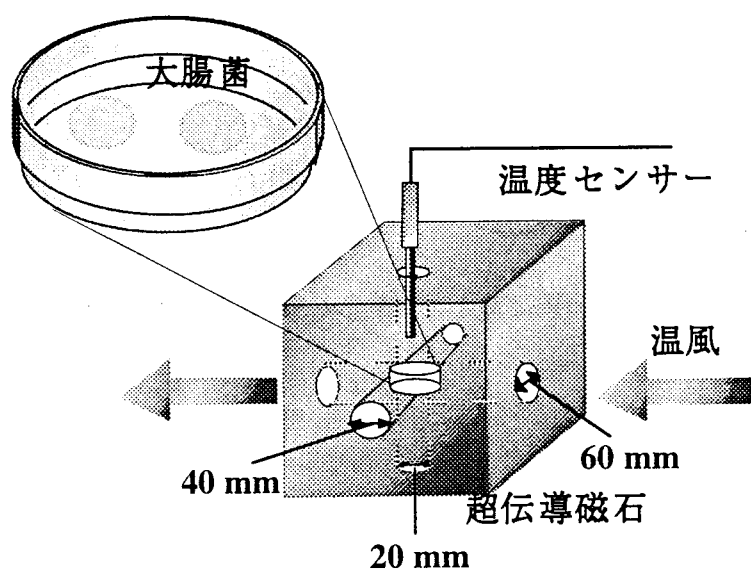
既知の変異原物質と複合曝露をおこなうと、DNA 反応性物質の変異原性の頻度が約 2 倍上昇したという報告<sup>6)</sup>もある。しかしながら磁場の生体への影響についてこれまで多くの報告があるが共通の見解が得られていない。



そこで本研究では、遺伝子発現制御系の中でも最も解明が進んでいるラクトースオペロンの制御系に注目し、大腸菌を用いた遺伝子発現制御モデル[Fig. 1]を構築し、*in vivo* アッセイにおいてプロモーター活性への静磁場の影響について解析した。さらに、それらの結果をもとに、遺伝子転写開始時のタンパク質と DNA の相互作用に対する磁場の影響を調べ、遺伝子発現における静磁場の影響について解析した。

## 2. 大腸菌のプロモーターの活性に対する静磁場の影響

Lac リプレッサーがプロモーター配列内の *lac* オペレーター部位に結合し、遺伝子発現が抑制されるモデルを構築した[Fig. 1]。プロモーターの活性は、レポーター遺伝子 Chloramphenicol acetyltransferase (CAT)の発現量により評価した。用いたプロモーターは *lac*、*trc* であり、共に強いプロモーターとして一般に知られている。特に、*trc* プロモーターは、*trp* プロモーターの-35 部位と *lac* プロモーターの-10 部位の配列を合成したプロモーターであり、*lac* プロモーターより強いプロモーターとして、強発現系の構築に使用される。一方、リプレッサーには、*lacI<sup>q</sup>*を用いた。*lacI<sup>q</sup>*は *lacI* の 10 倍の *lac* リプレッサーを発現するリプレッサー遺伝子である。通常 *lac* プロモーターは *lacI* で抑制され、*trc* プロモーターは *lacI<sup>q</sup>* で抑制される。[Fig. 3]に示した組み合わせのリプレッサーおよびプロモーターをもつプラスミド pTrcCAT、pLacI<sup>q</sup>CAT、pTrcPCAT をそれぞれ構築した。*trc* プロモーターと *lacI<sup>q</sup>* 遺伝子をプラスミド pKK232-8 (アマシャム ファルマシア バイオテック株式会社) の CAT 遺伝子の上流にクローニングし、pTrcCAT とした。*lac* プロモーターと *lacI<sup>q</sup>* を CAT 遺伝子の上流にクローニングした pLacI<sup>q</sup>CAT を構築した。pTrcCAT の *lacI<sup>q</sup>* 配列の一部を欠損させることにより、不活性化した *lacI<sup>q</sup>* を保有する pTrcPCAT を構築した。作製したこれらの各プラスミドはプロモーターと RNA ポリメラーゼの結合能、及び Lac リプレッサーの発現量が互いに異なり、遺伝子発現の制御に若干の差異がある。

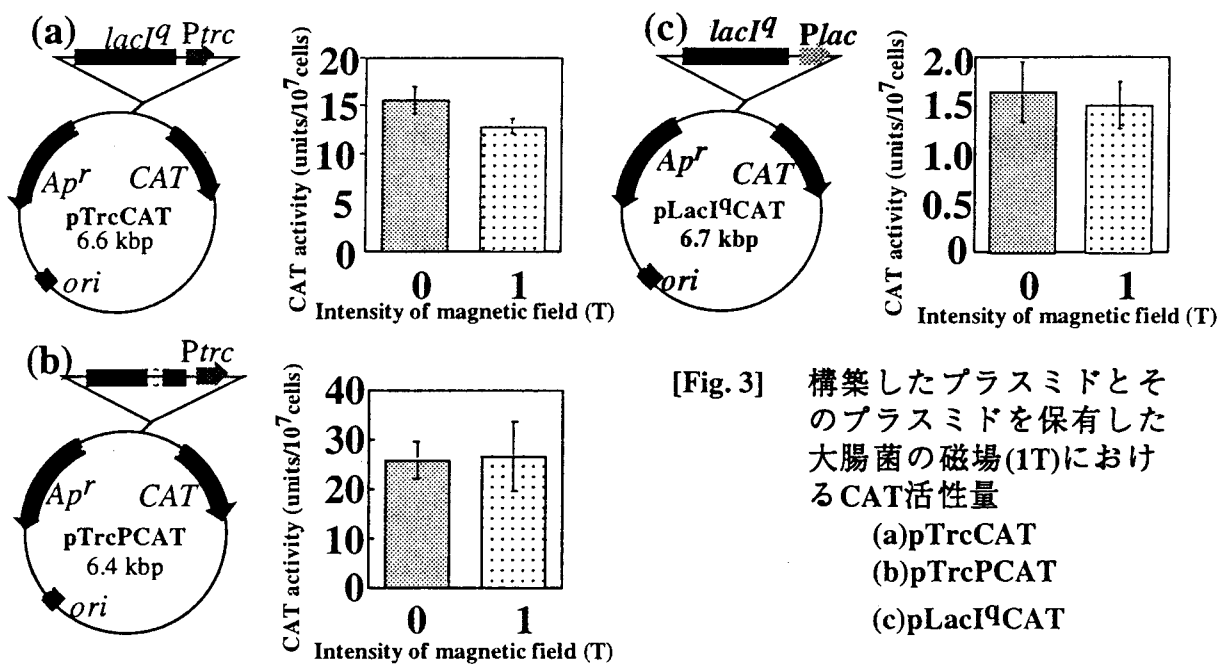


[Fig. 2]磁場曝露装置

Cm(25  $\mu$ g/l)を添加した LB 培地で前培養した各プラスミドを保有する大腸菌を、LB 寒天プレートにスポットとした後、磁場強度 0.4T の TDK 製ヨーク永久磁石内に静置した。3 時間後、CAT 遺伝子の発現量を Molecular Probe 社製の Fast CAT Green (deoxy) Chloramphenicol Acetyltransferase Assay Kit を用いて測定した。その結果、

pTrcCAT を保有する大腸菌の CAT の発現量が減少する傾向がみられた。しかし、IPTG を添加した場合、この傾向は見られなかった。このことから、Lac リプレッサーの遺伝子発現制御に影響があることが示唆された。また、液体培養では、磁場を曝露した場合でも CAT 発現量に変化は見られなかった。これは、液体で培養した場合、酸素供給量が寒天上の培養に比べ高くなることと、大腸菌が運動することにより一定の静磁場がかかり難かったためと考えられる。

次に、超伝導磁石を用い、温風装置で 37℃ に保ったボア内に、各大腸菌培養液をスポットしたプレートを 17 時間静置し、磁場を曝露した [Fig. 2]。pTrcCAT を保有する大腸菌について 0.2T、1T、5T の静磁場を曝露した結果、CAT 発現量の減少が観察された。最も減少する傾向がみられたのは、1T へ曝露した場合であった。一方、pTrcPCAT を保有する大腸菌では CAT 発現量に有意な差は観察されなかった。pTrcPCAT ではリプレッサーによって遺伝子発現が抑制されないため、プロモーターの活性が高い。プロモーターの活性が高い場合、非曝露群の CAT 発現量が高く、バックグラウンドが高くなるため、磁場による微量の変化を検出できなかった可能性が考えられる。また、pLacI<sup>q</sup>CAT を保有する大腸菌についても 1T の静磁場を曝露したところ、わずかに CAT 発現が減少する傾向が見られた。しかし誤差も考慮すると有意な差は見られなかった [Fig. 3]。trc、lac プロモーターはともに高発現プロモーターとして知られているが、Lac リプレッサーによって制御されている場合を比較すると、trc プロモーターの方が約 10 倍活性が高い。このため、Lac リプレッサーで遺伝子発現が完全に抑制されず、CAT が若干発現している場合に磁場の影響が検出されたものと考えられる。



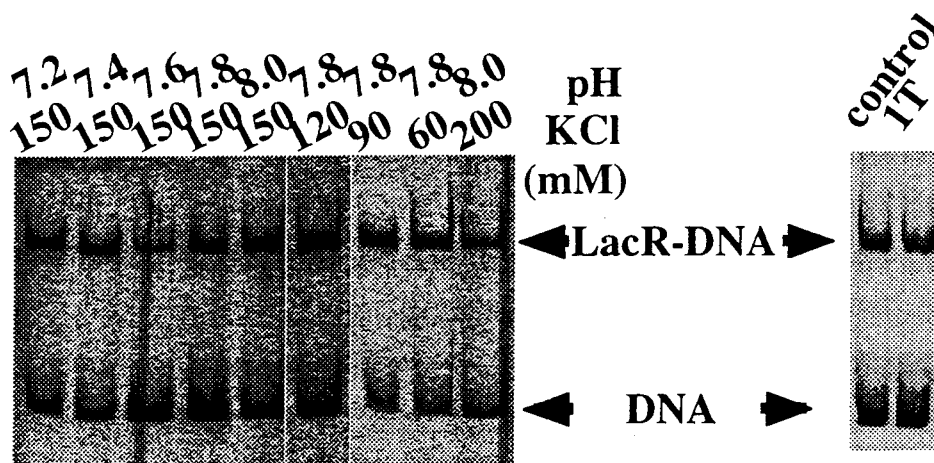
[Fig. 3] 構築したプラスミドとそのプラスミドを保有した大腸菌の磁場(1T)におけるCAT活性量  
 (a)pTrcCAT  
 (b)pTrcPCAT  
 (c)pLacI<sup>q</sup>CAT

### 3. RNA ポリメラーゼとプロモーターおよびリプレッサーとプロモーターの相互作用に対する静磁場の影響

上記の結果をさらに詳細に解析するため、*trc* プロモーターと Lac リプレッサー及び RNA ポリメラーゼの分子間の相互作用について、*trc* プロモーターと Lac リプレッサー、*trc* プロモーターと RNA ポリメラーゼの各々の 2 分子間相互作用における磁場の影響を、ゲルシフトアッセイを用いて評価した。

末端側に FITC 標識したプライマーをデザインして、*trc* プロモーターを含む領域(150bp)を PCR を用いて増幅し、FITC 標識 DNA を調整した。標識 DNA と Lac リプレッサー、または RNA ポリメラーゼを反応バッファーに添加し、超電導磁石のポア内で 20 分間インキュベートし、磁場を曝露しながら複合体形成反応を行った。曝露後、反応溶液を 5%ポリアクリルアミドゲルに充填し TBE バッファー中で 35A の定電流で 35 分間、電気泳動を行った。その後、FluorImager 575 (Molecular Dynamics 社製)で標識 DNA の蛍光量を測定し、ゲル上のタンパク-DNA 複合体のバンドの蛍光量を結合量の指標として相互作用を評価した。

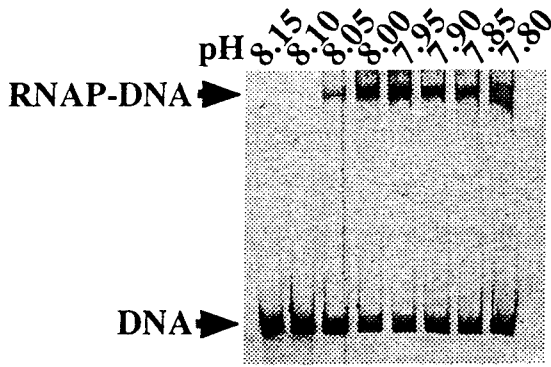
Lac リプレッサーと *trc* プロモーターの複合体形成時における、反応バッファーの pH 及び、塩濃度を検討したところ pH(7.2-8.0)、塩濃度(60mM-200mM)では複合体形成能に大きな変化は見られなかった[Fig. 4]。そこで、pH7.8、塩濃度 150mM の反応バッファーを用いて、1T の静磁場が与える複合体形成に対する影響を調べた。その結果、Lac リプレッサーと *lac* オペレーターとの結合量に大きな変化は観察されなかった[Fig. 5]。



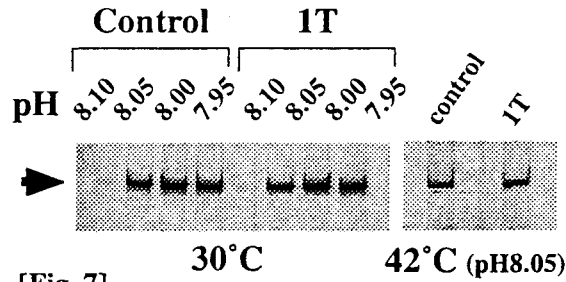
[Fig. 4] 各pH、塩濃度におけるDNA-Lacリプレッサー複合体のゲルシフトアッセイ結果

[Fig. 5] 静磁場下でのDNA-Lacリプレッサー複合体形成のゲルシフトアッセイ結果

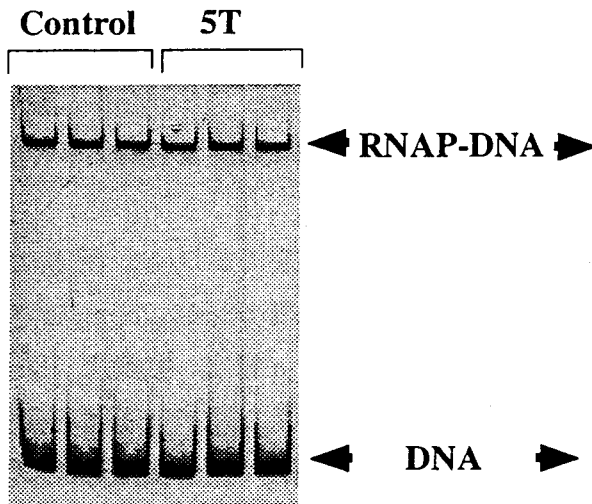
次に、RNA ポリメラーゼと *trc* プロモーターの複合体形成反応について、pH(7.8-8.2) [Fig. 6]、温度(30-44°C)の条件で検討したところ、RNA ポリメラーゼと *trc*



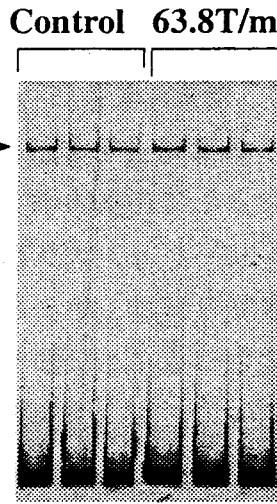
[Fig. 6] 各pH(7.80-8.15)におけるDNA-RNAポリメラーゼ複合体のゲルシフトアッセイ結果



[Fig. 7] pH(7.95-8.10)における静磁場下でのDNA-RNAポリメラーゼ複合体形成のゲルシフトアッセイ結果



[Fig. 8] pH7.0における5T静磁場下でのDNA-RNAポリメラーゼ複合体形成のゲルシフトアッセイ結果



[Fig. 9] pH7.0における63.8T/mの勾配静磁場下でのDNA-RNAポリメラーゼ複合体形成のゲルシフトアッセイ結果

プロモーターの複合体形成は Lac リプレッサーと *trc* プロモーター複合体形成と比較し弱く、バッファの pH 変化により結合量が変化することがわかった。

しかし RNA ポリメラーゼと *trc* プロモーター複合体形成反応を磁場下で行った結果、30°Cで1Tの静磁場を曝露した場合でも複合体形成能に変化は見られなかった[Fig. 7]。さらに42°Cまで反応温度を上げることで、分子の熱運動エネルギーを上げ、分子間の相互作用を減少させた状態で1Tの静磁場を曝露したが、複合体形成能に変化は見られなかった[Fig. 7]。さらに42°C、5Tの静磁場[Fig. 8]、42°C、63.8T/mの勾配磁場[Fig. 9]を曝露したが、やはり、複合体形成能に変化は見られなかった。

これらの結果を考察すると、生体内における磁場の影響はゲルシフトアッセイを用いた *in vitro* 実験では検出できない程度の微小な影響であることが考えられる。または、磁場の影響は Lac リプレッサー、RNA ポリメラーゼと DNA の結合という相互作用のみに及ぼすのではなく、遺伝子発現に関連する複数の因子、及び複合体に対して影響をもつ可能性も考えられる。

#### 4. 今後の方針

pTrcCAT を保有する大腸菌への 1T の静磁場曝露により、*trc* プロモーターで制御される CAT 遺伝子発現量が若干減少する傾向をより明確な変化として検出するため、*in vitro* アッセイを用い、特に *trc* プロモーターと Lac リプレッサー、*trc* プロモーターと RNA ポリメラーゼの個々の相互作用に着目し解析した。しかしながら、磁場による相互作用の変化は、ゲルシフトアッセイでは検出できなかった。これはタンパク質と DNA 間の相互作用に対する磁場の影響がなかったためであるか、ゲルシフトアッセイでは検出できないほどの小さな影響であったためであるかは、明らかになっていない。今後、*in vitro* で磁場曝露の影響を評価する際には、タンパク質と DNA 間の相互作用の微量な変化を磁場下で測定できる手法を新たに開発する必要がある。

#### 参考文献

- 1) Atef, M. M. et al. (1995) *Int. J. Biol. Micromol* 17:105-111
- 2) Torbet, J. et al. (1984) *Biochem. J.* May 219:1057-9
- 3) Tsuchiya, K. et al. (1996) *J. Ferment. Bioeng.* 81:343-346
- 4) Alaverdyan, Zh. R. et al. (1996) *Microbiol.* 65:213-216
- 5) Mahdi, A. et al. (1994) *Brit. J. Radiol.* 67:983-987
- 6) Ikehata, M. et al. (1999) *Mutat. Res.* 427:147-156

#### 学会発表

- ・ 第一回新磁気科学シンポジウム(浦和、平成 9 年 11 月)「大腸菌における遺伝子発現への影響」竹山春子、川原祥子、松永是
- ・ 第二回新磁気科学シンポジウム(浦和、平成 10 年 11 月)「大腸菌での遺伝子発現におけるプロモーター活性への静磁場の影響」竹山春子、川原祥子、梶原寛子 松永是
- ・ The Third Meeting of the International Symposium on New Magneto-Science(Omiya Japan, 1999. Nov) “Effect of a static magnetic field on gene expression in *Escherichia coli*.” Hiroko Kajiwara, Masateru Ikehata, Haruko Takeyama, Tadashi Mastunaga
- ・ 第十五回日本生体磁気学会(筑波、平成 12 年 5 月)「大腸菌における遺伝子発現への静磁場の影響」梶原寛子、池畑政輝、竹山春子、松永是