

Title	Study of Promoter Activation via Single Cell Analysis
Author(s)	Ou, Jianhong
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27625
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【8】

氏名	オウ 欧	ジャン 劍	ホン 虹
博士の専攻分野の名称	博士(工学)		
学位記番号	第 23350 号		
学位授与年月日	平成21年9月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科生命先端工学専攻		
学位論文名	Study of Promoter Activation via Single Cell Analysis (一細胞解析によるプロモータ活性化の解析に関する研究)		
論文審査委員	(主査) 教授 清水 浩 (副査) 教授 大竹 久夫 教授 紀ノ岡正博 教授 原島 俊 教授 福崎英一郎 教授 福井 希一 教授 渡邊 肇 教授 金谷 茂則 教授 藤山 和仁		

論文内容の要旨

Systems biology is an approach to biology that seeks to understand and predict the quantitative features of a multicomponent biological system. However there is still lack of powerful technique for accurate comparable analysis of complex endogenous networks. In order to conduct a transition from a descriptive to a quantitative understanding in endogenous regulation network of *Escherichia coli*, I tried to perform the single-cellular analysis in lysine biosynthesis. The activation of promoters involved in the lysine biosynthesis was analyzed by single fluorescence experiments and dual-fluorescence system via flow cytometry. This thesis consists of 4 chapters.

In chapter 1, the background of this study is represented in areas of systems biology, biological noise and lysine biosynthesis, respectively. An overview of the thesis

objectives is provided.

In chapter 2, by constructing reporter strains expressing the green fluorescence protein gene(*gfp*) under the control of the promoter regions of those genes associated with lysine biosynthesis, time-dependent changes in gene expression in response to changes in l-lysine concentration in the medium were monitored by flow cytometry. The dynamic behavior of promoter activation was well visualized and quantitatively analyzed at single cell level. Time-dependent gene expression data were fitted to a simple dynamical model of gene expression to estimate the parameters of the gene regulatory system. The parameters in deterministic process gave us a quantitative answer in the maximal promoter activation and the sensitivity to the stimuli.

In chapter 3, a dual-fluorescence system for promoter strength analysis was developed to involve the biological noise information. This system includes two parts, the vector pGRFP and simulation tool. By fitting the expression and intrinsic noise getting from pGRFP vector, simulation tool can easily get appropriate transition rate of the activation/inactivation state for the target promoter based on a stochastic formulation of chemical kinetics. We applied this system to analyze the kinetics of promoters involved in lysine biosynthesis. We found that *LysAp* has slow transition rate which indicates the transcriptional bursting also could be a source of noise in prokaryotic cells.

Chapter 4 includes a summary of all the results and future perspectives.

論文審査の結果の要旨

本論文は大腸菌の一細胞レベルでの測定によるリジン合成経路のプロモータ活性の解析に関するものである。大腸菌は最も広く利用されている有用微生物のひとつであり、本研究においては、大腸菌のリジン合成経路に着目し、その合成反応を触媒している酵素の発現量を可視化、定量することが可能な菌株を構築した。フローサイトメトリ技術を用いて一細胞レベルで各遺伝子の遺伝子発現量を計測することのできるシステムを開発した。遺伝子の発現量を平均量、一細胞毎の測定により定量的に解析し、決定論的見地からと確率論的見地からなる数式モデルを用いて解析を行った。本論文は、序章と結論を含め4章からなっている。

1章においては緒言として、遺伝子のプロモータ活性を決定論的、確率論的両面から定量的にシステム解析することの研究背景と意義、および既存の研究成果について述べ、本研究の目的および構成について詳述している。

2章においては、大腸菌におけるリジン合成経路の酵素をコードしている遺伝子のプロモータ活性を一細胞レベルで計測できるシステムを開発している。遺伝子のプロモータ部位の下流に緑色蛍光タンパク質の遺伝子を持つプラスミドを導入した大腸菌を構築し、遺伝子発現量を定量解析している。遺伝子発現の平均量の変化を示すことのできる決定論的モデルを開発し、環境変動に対する変化を説明することが可能であることを示している。

3章においては、遺伝子発現量の確率論的変動を明らかにするために、リジン合成経路の遺伝子の各プロモータ活性を緑色蛍光タンパク質で可視化するとともに同じプラスミド上に構成的に発現するプロモータの下流に赤色蛍光タンパク質の遺伝子を挿入した二色蛍光システムを開発している。これにより、緑色蛍光と赤色蛍光の細胞分布から、リジン合成経路の遺伝子のプロモータ活性における内生的ノイズを、細胞全体にかかる外生的ノイズに対し

て区別して定量することが可能となり、それに基づき遺伝子毎のノイズの大きさの違いを議論している。原核生物においては従来注目されていなかった転写プロセスの確率的メカニズムが遺伝子発現量の内生的なノイズを議論するために必要であることが示唆されている。

4章においては、結言として本研究で得られた知見をまとめ、今後の展望について述べている。

以上のように、本論文は工業的に有用な大腸菌のシステムバイオテクノロジーの発展に大きく貢献することが期待される。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。