

令和元年6月18日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07367

研究課題名(和文) アセチル化によるRNAポリメラーゼの機能分化とその全体像解明

研究課題名(英文) Whole analysis of Functional differentiation of RNA polymerase by protein acetylation

研究代表者

小倉 光雄 (Ogura, Mitsuo)

東海大学・海洋研究所・教授

研究者番号：80204163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：枯草菌の細胞表面機能を制御するシグマ因子SigX(遺伝子転写を行なうRNAポリメラーゼ[RNAP]の構成因子の一つ)の遺伝子転写が、培地へのグルコース添加で数倍増加するという現象のメカニズム解明を目指した。種々の証拠から、RNAPのリジン残基がアセチル化され、RNAPとSigXの親和性が強化されるとの仮説を立てたが、これは実証できなかった。そこで、SigXのグルコース誘導に関わる遺伝子を網羅的に探す実験で、CshAというタンパク質とそのアセチル化がこの現象に重要だとわかった。CshAはRNAPに弱く結合しているため、そのアセチル化がRNAPとSigXの親和性を変化させると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物は多様な機能を持ち、自然界での生態系や人体の健康にも密接な関わりがあるので、その生命活動を詳細に理解することは、微生物機能の人間生活や産業への応用を考える上で大切である。本研究では、枯草菌という昔からよく研究されてきた細菌を用いて、グルコースという栄養分が枯草菌の生理活動にどのように影響するのかという古くて新しい疑問の一端を遺伝子とタンパク質の相互作用という観点から解明した。

研究成果の概要(英文)：Sigma factor is a component of RNA polymerase (RNAP), which is a central machinery for gene transcription. In bacillus subtilis we observed that transcription of one of the extracellular function sigma factor gene, sigX, is several-fold induced by glucose. We took the hypothesis that acetylation of lysine residues in RNAP may lead to change the affinity of RNAP to SigX. However, this was not verified. Instead, the experiments to search all genes required for glucose induction of sigX revealed the cshA gene and its acetylation is important for this phenomenon. CshA is known to be associated with RNAP, and thus, acetylation of CshA would change affinity of RNAP to SigX.

研究分野：微生物遺伝学

キーワード：RNA ポリメラーゼ シグマ因子 グルコース効果 枯草菌 遺伝子転写 タンパク質アセチル化

## 1. 研究開始当初の背景

*degS-degU* は、2成分制御系 DegS-DegU をコードするオペロンで、*degSU* 全体を転写する PdegSU と DegU-P で活性化される PdegU により転写されており、PdegSU のグルコース誘導 (GI) が観察された。また、PdegSU は、CipXP により分解される何らかの転写因子により制御されている事を見いだした。この転写因子を同定するため、サブレッサー取得とその次世代シーケンサーによる解析を行った所、CipXP の基質である Spx が同定された。Spx は、酸化ストレスに対応するための転写制御因子であるが、一般に転写制御因子が DNA 結合タンパク質であるのに対し、それ自身では DNA 結合できない。その代わりに、RNA ポリメラーゼ (RNAP) のサブユニットの C 末端に結合して、RNAP の性質をかえる

事で転写制御を行うと考えられているが、その詳細は明らかでない。グルコース誘導と Spx の作用点を PdegSU の欠失解析で調べると、双方の作用点とも PdegSU のコアプロモーター領域に map された。つまり、Spx による制御と GI は、何らかの関係がある可能性が高い。実際、PdegSU のグルコース誘導は、*spx* 破壊株で顕著に弱まり、さらに *yjbc-spx* オペロンの発現自体がグルコースで強く誘導された。Spx は、5つのプロモーターを持ち、SigA 以外に、SigB/W/X/M で転写されている。SigB は熱ストレス等で誘導される遺伝子を特異的に転写するシグマ因子であり、SigM/X はいわゆる ECF

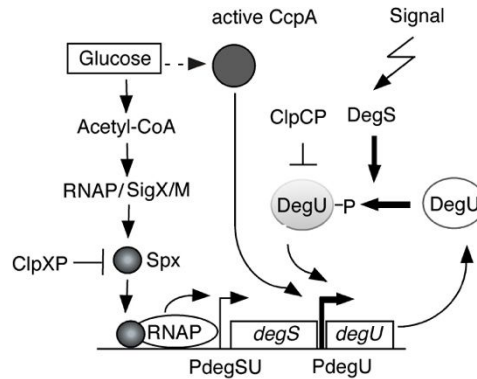


図1 *degS-degU* オペロンの制御

(Extracytoplasmic function)シグマ因子である。これらは、細胞膜や細胞壁にかかる種々のストレスに応答するシグマ因子で、非ストレス環境では細胞膜貫通型のアンチシグマ因子の細胞内部分にトラップされ、不活性型である。特異的ストレスにアンチシグマ因子の細胞外部分が反応すると、細胞内ドメインからシグマ因子が解放され、活性を持つようになる事が知られている。*yjbc-spx* オペロンの発現に関して、*sigB/W*破壊では GI は正常に起きたが、*sigX/M* 単独破壊では顕著に弱まり、*sigXM2* 重破壊で消失した。さらに、*sigX/M* の遺伝子は自身のシグマ因子で活性化されるプロモーターを持つが、これらのプロモーターはグルコースで誘導された。つまり、グルコースは SigX/M を活性化していることがわかった。この活性化は、それぞれのアンチシグマ因子に依存しておらず、多くの遺伝子のグルコース誘導に関わる転写因子 CcpA にも無関係であった。かわりに、*sigX/M* のグルコース誘導は、ピルビン酸脱水素酵素遺伝子 *pdhC* 破壊株で消失した。さらに、SigX の活性化はピルビン酸やグリセリンの添加で起きたが、コハク酸添加では非常に弱くなった。これらの事から、SigX/M の活性化、すなわち *sigM/X* 発現の GI は、細胞内でアセチル CoA 濃度が上昇する事で起きている事が強く示唆された。ECF シグマ因子のうち、*sigM/X* は GI を受け、それ以外の *sigW/V/Y/Z* は受けなかった。すなわち、アセチル CoA 濃度の上昇は、ECF シグマ因子を選択的に活性化している事を示唆した。グルコース添加はアセチル CoA 濃度を上昇させ、RNAP を含む各種タンパク質のアセチル化を亢進する事が、枯草菌や大腸菌で示されている。従って、RNAP のアセチル化が SigM/X との親和性を強めている事が想像された。枯草菌の RNA ポリメラーゼのシグマ因子と接触するサブユニット と ' のいくつかのリジン残基は、アセチル化されることが知られている。

## 2. 研究の目的

2成分制御系オペロン *degS-degU* の発現研究から、グルコース添加が ECF シグマ因子 SigX と SigM の活性化をもたらしている事を見いだした。シグマ因子と RNA ポリメラーゼの親和性が、RNAP のアセチル化修飾により高まっているというシナリオを遺伝学的に証明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ガラクトシダーゼの活性測定： 枯草菌での常法に従って実行した。*sigX-lacZ*活性の2%グルコースによる誘導は、胞子形成培地を用いて測定した。

変異RNAPの作製と検定： RNAPの  $\sigma^{70}$  サブユニットは *rpoBC* オペロンにコードされている。これらの変異体を持つ枯草菌株を樹立するために、まずxylose誘導性プロモーターと抑制因子XylIRを持つplasmid pXに *rpoBC* オペロン全体をPCRエラーなしにクローン化した。このpX-*rpoBC* に非PCR的なオリゴ依存的方法で、アセチル化されるリジン残基をアルギニン残基に置換する塩基変異を導入した。pX-*rpoBC*はKpnIで1カ所だけ切断されるので、これを用いて直線状にし、*thrC*部に *sigX-lacZ*を持つ枯草菌に形質転換して、*amyE*部にdouble-crossoverで導入した。しかるのち、*rpoBC*の大部分を欠失させNeomycin耐性遺伝子で置き換えた *rpoBC::Neo*カセットをこの株に導入して、*rpoB*もしくは *rpoC*に変異を持ち、*sigX-lacZ*に対する効果を測定できる株を樹立した。

トランスポゾン挿入： Km耐性遺伝子デリバリーベクターpMarAを *thrC*部位に *sigX-lacZ*を持つ株へ導入して行った。この株を10  $\mu$ g/mlのカナマイシンを含む1ml LB培地に接種したのち30度Cで一夜培養し、培養液を適宜希釈し2%グルコース、10  $\mu$ g/mlのカナマイシンとエリスロマイシン、100  $\mu$ g/mlのX-galを含むLB寒天平板培地に塗布した。42度Cで一夜培養し、多くの青いコロニーに混じって白もしくは薄い青色を呈するコロニーが観察されたので、それらを選抜した。次に全染色体を抽出し、*sigX-lacZ*を持つ野生株へ導入した後、液体培養にてGIを測定した。有望株の染色体DNAをSauIII A1で分解し、ライゲース反応で断片を環状化し、トランスポゾン両端の塩基配列を利用してinvers PCRを行なった。得られたPCR産物のトランスポゾン両端の塩基配列をプライマーに使う挿入部位周辺の塩基配列を決定し、トランスポゾン挿入部位を決定した。

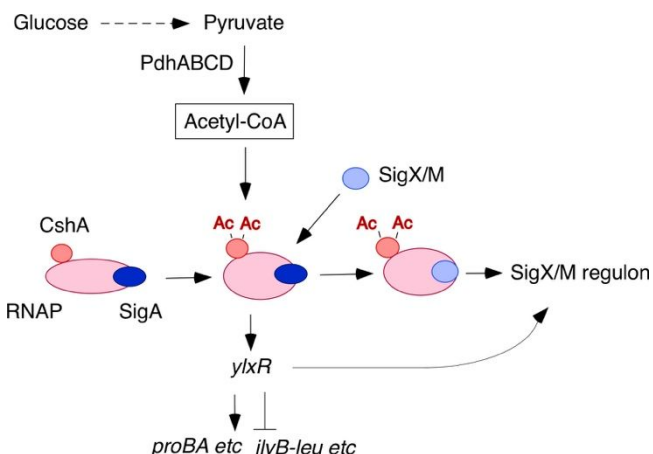
### 4. 研究成果

すでに論文で公表されているRNAPでアセチル化されるリジン残基の機能を探るため、 $\sigma^{70}$ のリジン残基をアルギニン残基に変換したプラスミドを計26種作製した。このプラスミドを、*thrC::sigX-lacZ*を持つ枯草菌に導入し、オリジナルの *rpoBC*を破壊した。変異 *rpoBC*はキシロース誘導性プロモーターにより発現する。各変異の *sigX*のGIに対する効果を検討したところ、いくつかの変異株では、50%程度のGIの減少が認められた。しかし、決定的に重要と思われる残基は認められなかった。これらの変異の効果は、アセチル化が起きなかったことによる減少ではなく、変異導入でおきたRNAポリメラーゼの構造変化による可能性もある。そこで、まだ試していないリジン残基もあったのだが、これ以上の変異導入は諦めざるを得なかった。上記の実験では、2015年の論文で同定されたリジン残基に基づいて計画を実行したが、2016年の別グループでの論文同定されたリジン残基はかなり異なっていた点も、さらに変異株を構築する計画実行をためらわせた。

RNAPをアセチル化するアセチル転移酵素を同定するため、アセチル転移酵素モチーフを持つタンパク質をコードする遺伝子42個について破壊株（同時に *sigX-lacZ*を持つ）を作製した。これら変異株のうち、RNAPをアセチル化する酵素をコードする遺伝子破壊株では、*sigX-lacZ*活性が顕著に低下すると考えられる。全株について、GIを測定したところ、40%程度の誘導効果減少が観察された株を5株同定したが、決定的に効果が減少した株は見いだせなかった。

そこで、方針を変更し、*sigX-lacZ*遺伝子のGIが起きなくなるトランスポゾン(Tn)変異株を検索した。この試みで、明確なアセチル転移酵素モチーフを持たないアセチル転移酵素を同定で

きるかもしれないと考えた。3000株程度のTn変異株について、*sigX-lacZ*活性の低下した株を検索した。その結果、26種類の挿入変異を同定した。ECFシグマ因子のGIは*sigX*のみでなく*sigM*にも観察されたので、得られた変異のうちさらに*sigM*のGIも阻害する変異が、GIの本質に関わる遺伝子の破壊であると予想された。言い換えれば*sigX*発現のみを特異的に低下させる遺伝子の破壊と*sigX*のGIそのものに関わる遺伝子の破壊を区別することが重要で、*sigM*にも作用を有する遺伝子破壊が後者であると考えられる。その結果、*cshA*, *ptsH*, *tsaD*, *ylxR*, *yqf0*の5種類の候補遺伝子を得た。まず、*cshA*という遺伝子破壊株に注目した。この遺伝子は、RNAヘリカーゼをコードしているが、RNAPに会合している事も知られている。*cshA*破壊株に、キシロース誘導性プロモーターにつないだ*cshA*を導入して発現させると、*sigX-lacZ*のGIの回復が観察された。このことは、*cshA*が*sigX-lacZ*のGIに必要な事を示している。CshAは2箇所のリジン残基がアセチル化される。そこで、この系を使いアセチル化されるリジン残基をアルギニン残基に置換した変異型CshAの機能を調べたところ、*sigX-lacZ*のGIが失われた。つまり、CshAのアセチル化が重要であることがわかった。さらにCshA-Hisを持つ枯草菌株を作製、そこからCshA-Hisを精製し、アセチル化リジン抗体によってアセチル化の程度を調べたところ、グルコース添加によりCshAのアセチル化は促進されていた。以上の事から、グルコース添加でCshAがアセチル化されるとRNAPに会合し、RNAPをSigmaAよりSigmaXとの会合を優先するようにシフトさせるメカニズムが推察された。これについて、論文として報告した (Ogura and Asai, 2016)。



PtsHはグルコースの細胞内輸送に必要であるため*sigX*のGIを阻害していると考えられた。YlxRとYqf0はそれぞれ細菌での保存性が極めて高いのだがその機能は未だ明らかでなかった。TsaDは細菌での保存性が極めて高く多くの種類では生存に必須な遺伝子である。枯草菌でも当初は破壊不可能とされてきたが、破壊の方法が異なるためTnによる変異導入が可能だったと思われる。*ylxR*, *yqf0*, *tsaD*を含む転写単位の発現を調べると、前2者がCshA依存性GIを受けていた。すなわち、*cshA*, *tsaD*, *ylxR*, *yqf0*の間には何らかの連関が存在する可能性があること、アセチル化CshAがRNAPに会合し、そのSigXへの親和性を高める現象の背後に*tsaD*, *ylxR*, *yqf0*が働くことが示唆された。

種々の試行錯誤を行なった結果、CshAが*ylxR*を含むオペロンの転写を正に制御していること、YlxRはDNAに結合して*tsaD*を含むオペロンの転写を正に制御していることが判明した。また、YlxRは単なる転写因子というよりも、染色体会合性のDNA結合性タンパク質であり、そのためアミノ酸合成系の遺伝子を含む400近くの遺伝子発現を正または負に制御していることが判明した (Ogura and Kanesaki, 2018)。

*tsaD*遺伝子産物はTsaE, TsaBと複合体をなし、ANNコドンを読み取るtRNAのアンチコードループの37位アデニンにthreonylcarbamoyl基を転移させる。つまり、*tsaD*はtRNA修飾を通じて何らかのタンパク質の翻訳プロセスを制御し、*sigX/M*遺伝子のGIに重要な何らかの過程への関与が予想される。大腸菌で*tsaD*が、ピルビン酸からアセチルCoAを生成するピルビン酸脱水素酵素複合体のアセンブリーに関わるという報告がある。すなわち、枯草菌の*tsaD*はこ

の酵素の翻訳や複合体形成を通して細胞内のアセチル CoA 生産を制御し、CshA のアセチル化に関係しているという仮説が最も有力であると思われる (Ogura et al., 2019)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

1. Ogura M, Sato T, Abe K. (2019) *Bacillus subtilis* YlxR, which is involved in glucose-responsive metabolic changes, regulates expression of *tsaD* for protein quality control of pyruvate dehydrogenase. **Frontiers in Microbiology**, 10:923 査読有 doi:10.3389/fmicb.2019.00923
2. Ogura M, Kanesaki Y. (2018) Newly identified nucleoid-associated-like protein YlxR regulates metabolic gene expression in *Bacillus subtilis*. **mSphere**, 3:e00501-18 査読有 doi:10.1128/mSphere.00501-18
3. Fujita Y, Ogura M, Nii S, Hirooka K. (2017) Dual regulation of *Bacillus subtilis* *kinB* gene encoding a sporulation trigger by SinR through transcription repression and positive stringent transcription control. **Frontiers in Microbiology**, 8:2502 査読有 doi:10.3389/fmicb.2017.02502
4. Ogura M. (2016) Post-transcriptionary generated cell heterogeneity regulates biofilm formation in *Bacillus subtilis*. **Genes to Cells**, 21:335-349 査読有 doi: 10.1111/gtc.12343
5. Ogura M, Asai K. (2016) Glucose induces ECF sigma factor genes, *sigX* and *sigM*, independent of cognate anti-sigma factors through acetylation of CshA in *Bacillus subtilis*. **Frontiers in Microbiology**, 7:1918 査読有 doi:10.3389/fmicb.2016.01918
6. Shiwa Y, Yoshikawa H, Tanaka T, Ogura M. (2015) *Bacillus subtilis* *degSU* operon is regulated by the ClpXP-Spx regulated proteolysis system. **J Biochem**, 157:321-330 査読有 doi:10.1093/jb/mvu076

〔学会発表〕 (計 7 件)

1. 小倉光雄、兼崎友 Newly identified nucleoid-associated-like protein YlxR regulates metabolic gene expression in *Bacillus subtilis*. ISME (International symposium of microbial ecology) 2018.8. Leipzig Congress Center (Germany)
2. 小倉光雄 NaCl は枯草菌マクロコロニー形成を促進し、YfjD/E/F はそれに必要である. 第 36 回日本分子生物学会 2017.12.神戸ポートアイランド (兵庫県)
3. 藤田泰太郎、小倉光雄、仁井里美、広岡和丈 枯草菌のバイオフィーム形成のリプレッサー (SinR) による孢子形成トリガー遺伝子 (*kinB*) の転写制御. 第 40 回日本分子生物学会 2017.12.神戸ポートアイランド (兵庫県)
4. 小倉光雄、朝井計 枯草菌 ECF シグマ因子 *sigX* と *sigM* は CshA のアセチル化の結果としてグルコース誘導を受ける. 第 39 回日本分子生物学会 2016.12.パシフィコ横浜 (神奈川県)
5. 米沢拓大、小倉光雄、鈴木祥太、吉田彩子、朝井計、吉田稔、西山真、古園さおり 枯草菌 ECF シグマ因子 *SigX* のグルコース依存的な活性化に関わる RNA ポリメラーゼのアセチル化. 2016 年度日本農芸化学会 2016.3.札幌コンベンションセンター (北海道)
6. 小倉光雄 Post-transcriptionally generated cell heterogeneity regulates biofilm formation in *Bacillus subtilis*. BioMicroWorld2015 2015.10. Barcelona University (Spain)
7. 小倉光雄、米沢拓大、吉田稔、古園さおり 枯草菌 RNAP のアセチル化は *SigX* との結合を促進し、この現象に緊縮応答が関与する. 第 9 回日本ゲノム微生物学会 2015.3 神戸大学 (兵庫県)

〔その他〕ホームページ等 <http://www.scc.u-tokai.ac.jp/~289077/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：古園さおり (2015-16 年度のみ)

ローマ字氏名：Kosono Saori  
所属研究機関名：東京大学  
部局名：生物生産工学センター  
職名：特任准教授  
研究者番号：90321760