

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14685

研究課題名(和文) RNAポリメラーゼのアセチル化を介した新規転写誘導機構の解明

研究課題名(英文) Exploring of an impact of lysine acetylation in RNA polymerase on transcription

研究代表者

古園 さおり (Kosono, Saori)

東京大学・生物生産工学研究センター・特任准教授

研究者番号：90321760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：枯草菌ECFシグマ因子であるSigX依存的な転写がグルコース添加により誘導される現象(GI)に着目して、RNAポリメラーゼ(RNAP)のアセチル化を介した新規転写誘導機構の解明を目指した。グルコース添加・非添加条件で精製したRNAPでは前者の方がよりアセチル化されていた。また、SigXは前者のRNAP精製画分にもみ検出され、SigX依存転写活性も高いことがin vitro転写実験より示された。アセチル化模倣変異によりGIが増強されるリジン残基をbetaサブユニットに見出した。RNAPアセチル化が特定のシグマ因子とのホロ酵素形成に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A possible impact of lysine acetylation in RNA polymerase (RNAP) on transcription was explored. ECF-type SigX-dependent transcription is induced by glucose in *Bacillus subtilis*. We found that addition of glucose increased lysine acetylation in RNAP and its holoenzyme formation with SigX. Scanning mutagenesis found that acetylation mimic (KQ) mutation of an acetylation site in the beta subunit enhanced glucose induction (GI) of SigX-dependent transcription. Non-acetylation mimic (KR) mutation of the same lysine residue did not affect GI, suggesting that acetylation at the lysine residue was likely involved in GI. This research raised a possibility that lysine acetylation may impact on transcription via modulating holoenzyme formation of RNAP with specific sigma factors.

研究分野：応用微生物学、微生物遺伝学

キーワード：リジンアセチル化 RNAポリメラーゼ ECFシグマ因子 転写 *Bacillus subtilis*

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリジン残基に起こるアシル化修飾は、生物に普遍的な翻訳後修飾として知られている。申請者は、代表的なアシル化修飾であるアセチル化とスクシニル化が栄養環境や培養フェーズによって動的に入れ替わることを見出し、アセチル化およびスクシニル化修飾のプロテオミクス解析を実施していた。アシル化修飾は RNA ポリメラーゼ (以下、RNAP) やリボソームなど転写や翻訳の基本装置にも見出され、アシル化修飾の違いが転写や翻訳に与える影響に興味を持たれた。

枯草菌 SigX は ECF シグマ因子の 1 つである。SigX 依存転写活性がグルコースにより誘導される現象 (以下、GI) が見いだされた。ECF シグマ因子は細胞表層ストレスに応答した遺伝子発現制御を司るが、これまでにグルコースのような栄養基質が ECF シグマ因子を活性化する例は知られていなかった。グルコース以外に SigX を活性化する炭素源を検討したところ、ピルビン酸やグリセロールに効果が認められ、コハク酸に誘導効果はなかった。また、アセチル化の基質となるアセチル CoA の主要供給経路であるピルビン酸デヒドロゲナーゼの欠損で、GI は消失した。SigX 依存転写活性を誘導する炭素基質の傾向は、タンパク質アセチル化を誘導する炭素基質と良く一致しており、GI にアセチル化が関与する可能性が示唆された。申請者のアシローム解析で SigX 自身にアシル化修飾は検出されていなかったが、RNAP のコアサブユニットに複数のアセチル化部位が検出されており、RNAP のアセチル化がシグマ因子との親和性を制御することにより GI を引き起こすのではないかとこの着想を得た。

2. 研究の目的

本研究では、グルコースによる SigX 依存転写活性の誘導 (GI) を材料に、RNAP のアセチル化を介した新規な転写誘導機構の解明に挑戦することを目指した。

3. 研究の方法

GI に対する RNAP アセチル化の関与を調べるために、主にシグマ因子と相互作用する β (RpoB) と β' (RpoC) サブユニットについてアセチル化部位の変異体を作製した。*rpoBC* は必須遺伝子であるため、*amyE* 領域から野生型 *rpoBC* を条件的に発現させる系を構築し、目的変異以外の影響をなるべく排除するためにゲノム上の original locus に変異を導入した。各アセチル化部位に対して、KR (非アシル化模倣) 変異および KQ (アセチル化模倣) 変異体を作成した。SigX 依存転写活性は、*thrC* 領域に挿入した *sigX-lacZ* により評価した。枯草菌からの RNAP 精製は、*rpoC* 下流に His₁₀ タグ配列を挿入し、Ni-NTA レジンを用いて行った。アセチル化の検出は、抗アセチルリジン抗体を用いたウェスタンブ

ロットまたは nano LC-MS/MS 解析により行った。

4. 研究成果

1×S 胞子形成培地に 2%グルコースを添加・非添加の培養条件から、RNAP を精製し、nano LC-MS/MS 解析によるアセチル化の検出を行った。その結果、 β サブユニットにアセチル化部位が検出され、グルコース添加によるアセチル化部位数とアセチル化レベルの増加が認められた。また、MS データを元に RNAP 精製画分に含まれるシグマ因子の半定量解析を行ったところ、SigA や SigB タンパク質レベルはグルコース添加・非添加条件で差がない一方で、SigX と SigM はグルコース添加条件でのみ検出された。このことから、グルコース添加条件では、SigX を含むホロ酵素形成が促進されている可能性が示唆された。さらに、この精製画分を用いて *in vitro* 転写アッセイを行ったところ、SigA 依存転写活性はグルコース添加・非添加条件で精製した RNAP 間で差が見られなかったのに対し、SigX 依存転写活性はグルコース添加条件の RNAP でより高いという傾向が見られた。以上の結果から、RNAP のアセチル化が SigX とのホロ酵素形成を促進し、SigX 依存転写を誘導している可能性が示唆された。

SigX とのホロ酵素形成を促進すると考えられるアセチル化部位を特定するために、RNAP サブユニットに見出されたアセチル化部位に対して、変異スキャン解析を行った。シグマ因子と主に相互作用すると考えられる β (RpoB) および β' (RpoC) サブユニットのアセチル化部位を対象とし、変異導入はゲノム上の original locus にて行った。また、RNAP サブユニット変異は致死となる可能性が考えられたため、*amyE* 領域から野生型 *rpoBC* をキシロース依存的に発現させた条件で変異導入を行い、キシロース非存在下で変異の評価を行った。合計で 35 の変異株を作成した。*sigX-lacZ* 活性を指標に GI に与える影響を検討したところ、あるリジン残基のアセチル化模倣変異が GI を増強することを見出した。対応する非アセチル化模倣変異では増強の効果は認められなかったことから、アセチル化の関与が示唆された。また、当該リジン残基のアセチル化レベルはグルコース添加条件下で増加していることが MS 解析で確認された。ホモロジーモデル構造を用いて構造マッピングを行ったところ、当該リジン残基はホロ酵素形成時に大きく変化することが知られている G-flap 領域内に位置しており、この部位のアセチル化が SigX とのホロ酵素形成に影響を及ぼす可能性が考えられた。また、35 の RNAP 変異株のうち多くは野生型株と同等の増殖を示したが、いくつかの変異株について増殖阻害が認められた。

分担者の小倉は、並行して ectopic locus での変異解析を進めており、上記の変異は

ectopic locus では GI には影響しないことが明らかとなった。そこで、GI に関与する因子を同定するためにトランスポゾン変異体の探索を行った。その結果、CshA を含む 5 つの候補因子が得られた。CshA は RNA ヘリカーゼであり RNAP に会合することが知られている。CshA の非アセチル化模倣変異で GI が消失したことから、CshA のアセチル化が GI に関与することが示唆された。

本研究により、GI に関与する可能性のある RNAP アセチル化部位を見出すことができた。original locus と ectopic locus の変異導入系で結果が一致しなかった原因については今後検討する必要がある。また、様々なアセチル化関連遺伝子変異株より RNAP を精製する系が得られたので、GI 以外の転写活性への影響を調べることにより、RNAP アセチル化が転写に与えるインパクトが明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

- 1) Komine-Abe A., Nagano-Shoji M., Kubo S., Kawasaki H., Yoshida M., Nishiyama M., Kosono S. Effect of lysine succinylation on the regulation of 2-oxoglutarate dehydrogenase inhibitor, OdhI, involved in glutamate production in *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 81:2130-2138 (2017). doi: 10.1080/09168451.2017.1372182. 査読有
- 2) Nagano-Shoji M., Hamamoto Y., Mizuno Y., Yamada, A., Kikuchi, M., Shirouzu, M., Umehara T., Yoshida M., Nishiyama M., Kosono S. Characterization of lysine acetylation of a phosphoenolpyruvate carboxylase involved in glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol.* 104:677-689 (2017). doi: 10.1111/mmi.13658. 査読有
- 3) Tomita T., Yin L., Nakamura S., Kosono S., Kuzuyama T., Nishiyama M. Crystal structure of the 2-iminoglutarate-bound complex of glutamate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*. *FEBS Lett.* 591:1611-1622 (2017). doi: 10.1002/1873-3468.12667. 査読有
- 4) Ishigaki Y., Akanuma G., Yoshida M., Horinouchi S., Kosono S., Ohnishi Y. Protein acetylation involved in streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J Proteomics.* 155:63-72 (2017). doi: 10.1016/j.jprot.2016.12.006. 査読有
- 5) Kubota T., Matsushita H., Tomita T., Kosono S., Yoshida M., Kuzuyama T., Nishiyama M. Novel stand-alone RAM domain protein-mediated catalytic control of anthranilate phosphoribosyltransferase in tryptophan biosynthesis in *Thermus thermophilus*. *Extremophiles.* 21:73-83 (2017). doi:10.1007/s00792-016-0884-0. 査読有
- 6) Mizuno Y., Nagano-Shoji M., Kubo S., Kawamura Y., Yoshida A., Kawasaki H., Nishiyama M., Yoshida M., Kosono S. Altered acetylation and succinylation profiles in *Corynebacterium glutamicum* in response to conditions inducing glutamate overproduction. *MicrobiologyOpen.* 5:152-173 (2016). doi:10.1002/mbo3.320. 査読有
- 7) Kosono S., Tamura M., Suzuki S., Kawamura Y., Yoshida A., Nishiyama M., Yoshida M. Changes in the acetylome and succinylome of *Bacillus subtilis* in response to carbon source. *PLoS One.* 10:e0131169 (2015). doi: 10.1371/journal.pone.0131169. 査読有

[学会発表](計 30 件)

- 1) 古園さおり, *Corynebacterium glutamicum* におけるタンパク質アシル化修飾研究の現状と展望、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月
- 2) 衣川寛和、小峰(阿部)理乃、西山真、古園さおり, *Corynebacterium glutamicum* 由来 PDH-ODH 超複合体のサブユニット構造解析、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月
- 3) 山崎史、村井恵一、吉田稔、西山真、古園さおり, *Corynebacterium glutamicum* 中央代謝酵素間におけるメタボロン形成の探索と解析、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月
- 4) 近藤直子、鈴木祥太、吉田稔、西山真、古園さおり, 枯草菌 EF-Tu におけるアシル化修飾制御機構の解析、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月
- 5) 衣川寛和、小峰(阿部)理乃、西山真、古園さおり, *Corynebacterium glutamicum* 由来 PDH-ODH 超複合体のサブユニット構造解析、第 10 回北陸合同バイオシンポジウム、2017 年 11 月
- 6) 山崎史、村井恵一、吉田稔、西山真、古園さおり, *Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸生産に関わるメタボロンの探索と解析、第 32 回(2017 年度)日本放線菌学会大会、2017 年 9 月
- 7) Kosono S. Protein acylation involved in the regulation biological function and metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. Italy-Japan Joint Symposium. New Trends in Enzyme and Microbial Science in the Translational Biology Era. October 2017.
- 8) Kosono S. Exploring the impact of protein acylation on the biology of *Corynebacterium glutamicum*. US-Japan Joint Seminar on

- Microbial Biotechnology. August 2017.
- 9) Kosono S., Suzuki S., Kondo N., Nishiyama M. Exploring the impact of protein acylation in elongation factor Tu in *Bacillus subtilis*. 19th International Conference on Bacilli and Gram-positive bacteria. June 2017.
 - 10) 阿部理乃、西山真、古園さおり、*Corynebacterium glutamicum* における2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ制御因子 OdhI のアシル化部位の機能解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月
 - 11) 濱本勇磨、永野愛、西山真、古園さおり、*Corynebacterium glutamicum* 由来 Phosphoenolpyruvate carboxylase における Pup 化修飾の機能解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月
 - 12) 吉田彩子、吉田稔、古園さおり、西山真、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来 isopropylmalate synthase のアシル化修飾による活性制御機構の解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月
 - 13) 古園さおり、微生物代謝に関わるタンパク質アシル化修飾研究の現状と展望、第 11 回日本ゲノム微生物学会年会シンポジウム「微生物および代謝のフロンティア研究」、2017 年 3 月
 - 14) Nagano M., Mizuno Y., Yamada A., Kikuchi M., Shirouzu M., Umehara T., Yoshida M., Nishiyama M., Kosono S. Characterization of lysine acetylation in phosphoenolpyruvate carboxylase involved in glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. 2nd Conference on Post-translational Modifications in Bacteria. October 2016.
 - 15) 古園さおり、細菌におけるタンパク質アシル化修飾研究の現状と展望、日本農芸化学会中部支部第 177 回例会ミニシンポジウム「触媒機能の活用に向けた微生物研究の新展開」、2016 年 9 月
 - 16) Yoshida A., Nishiyama M., Yoshida M., Kosono S. Analysis of protein acylation on enzymes involved in branched-chain amino acid biosynthesis in *Thermus thermophilus*. 11th International Congress on Extremophiles, September 2016.
 - 17) 近藤直子、鈴木祥太、西山真、古園さおり、翻訳因子 EF-Tu におけるアシル化修飾の機能解析、2016 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、2016 年 8 月
 - 18) 阿部理乃、久保翔世、永野愛、川崎寿、吉田稔、西山真、古園さおり、*Corynebacterium glutamicum* 由来 ODH/PDH-E2 サブユニットのアセチル化部位の機能解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月
 - 19) 永野愛、山田鮎果、水野裕太、菊地正樹、白水美香子、梅原崇史、吉田彩子、吉田稔、西山真、古園さおり、*Corynebacterium glutamicum* 由来ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) のアセチル化制御はグルタミン酸生産に重要である、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月
 - 20) 鈴木祥太、吉田稔、西山真、古園さおり、枯草菌 EF-Tu のアシル化修飾機構および制御機構の解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月
 - 21) 米沢祐大、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、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月
 - 22) 山本寛之、吉田彩子、富田武郎、古園さおり、葛山智久、西山真、*Thermus thermophilus* においてアセチル化を受ける CoA トランスフェラーゼの機能と制御機構の解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月
 - 23) ヴァシレヴァ・デリアナ、水口千穂、古園さおり、吉田稔、岡田憲典、野尻秀昭、Protein lysine acetylation profile of a plasmid-free and pCAR1-harboursing *Pseudomonas putida* KT2440. 日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月
 - 24) Kosono S. Protein acylation: a post-translational modification in response to nutrient and metabolism. 異分野融合ワークショップ「微生物生命システム研究と合成生物学の融合」、2016 年 3 月
 - 25) Kosono S. Change of protein acylation in response to glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. 東京大学生物生産工学研究センター国際シンポジウム「微生物の環境への応答と適応、そして進化」、2015 年 10 月
 - 26) 永野愛、水野裕太、西山真、古園さおり、*Corynebacterium glutamicum* における短鎖アシル化修飾を介したホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) の機能調節、日本農芸化学会関東支部 2015 年度大会、2015 年 9 月
 - 27) 鈴木祥太、古園さおり、枯草菌 EF-Tu のアシル化修飾による翻訳制御機構の解析、日本農芸化学会関東支部 2015 年度大会、2015 年 9 月
 - 28) Kosono S., Mizuno Y., Nagano-Shoji M., Kubo S., Kawamura Y., Yoshida A., Kawasaki H., Nishiyama M., Yoshida M. Altered protein acetylation and succinylation profiles in *Corynebacterium glutamicum* in response to L-glutamate overproduction. 第 18 回日本ドイツ酵素工学ワークショップ、2015 年 9 月
 - 29) 永野愛、水野裕太、西山真、古園さおり、*Corynebacterium glutamicum* における短鎖アシル化修飾を介したホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) の機能調節、2015 年度グラム陽性菌ゲノム機

- 能会議、2015年8月
- 30) 鈴木祥太、古園さおり、枯草菌 EF-Tu の
アシル化修飾による翻訳制御機構の解析、
2015年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、
2015年8月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古園 さおり (KOSONO, Saori)
東京大学・生物生産工学研究センター・特
任准教授
研究者番号：90321760

(2) 研究分担者

小倉 光雄 (OGURA, Mitsuo)
東海大学・海洋研究所・教授
研究者番号：80204163

(3) 連携研究者

吉川 博文 (YOSHIKAWA, Hirofumi)
東京農業大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：50175676