

平成22年5月10日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17076016

研究課題名（和文）単一細胞における全遺伝子の発現計測と環境応答制御の解析

研究課題名（英文）Global regulation of genome expression:

Single cell analysis of environmental stress response

研究代表者

石浜 明 (ISHIHAMA Akira)

法政大学・企画・戦略本部・特任教授

研究者番号：80019869

研究成果の概要（和文）：環境中の細菌は、細胞間で交信し、集団として環境悪化に対応する。異なった役割を果たしている細菌細胞の個性解明を目標に、「単一細胞観測装置」を開発し、単一細胞での転写の動態観測に初めて成功した。一方、環境に応じたゲノム転写パターン決定機構解明を目標に、大腸菌の300種類転写因子の全てについて、制御支配下遺伝子群の同定と調節機能の解析を実施した。本研究の成果を基盤に、新分野『細胞個性学』の確立を目指す。

研究成果の概要（英文）：The model bacterium, *Escherichia coli*, is able to survive under various stressful conditions in nature by forming the bacterial community, in which each cell plays a different physiological role. For search of the role each plays, single-live cell observation systems were developed using newly constructed cell chips, and transcription in individual cells was analyzed. Towards understanding the regulation mechanism of genome transcription, we also performed the systematic analysis of regulatory roles of a total of 300 transcription factors from *E. coli*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	19,900,000	0	19,900,000
2006年度	19,900,000	0	19,900,000
2007年度	19,700,000	0	19,700,000
2008年度	19,600,000	0	19,600,000
2009年度	17,800,000	0	17,800,000
総計	96,900,000	0	96,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：ナノバイオロジー、システム生物学、ゲノム、転写制御、一細胞観察、プロモーター、転写因子、大腸菌

## 1. 研究開始当初の背景

分子生物学は、ゲノム遺伝子数が少なく、純粋細胞集団が得られるとの理由から、大腸菌をモデル生物として勃興し興隆した。多くの研究室が、実験室培養の対数増殖期の大腸菌を共通の素材として実験を行い、現代生命

科学の基盤概念、特に遺伝情報伝達に関する基礎知識は、大腸菌の研究で得られた。ゲノム全構造の解析と平行して、大腸菌の自然界での生存様式とりわけ環境応答への関心が高まると、自然界では、単細胞の細菌も集団を形成し、個々の細胞が種の生存のために、

異なる役割を果たしている可能性が示唆され始めた。我々は、実験室培養の大腸菌も、培養条件の悪化に伴い、異質細胞が生まれ、環境適応を行っていることを示唆し、細胞集団を、密度勾配遠心法で物理的に分画することに成功した。この初歩的成功を基盤に、細菌単一細胞での、ゲノム転写を観測することを目標に、本特定領域研究を提案した。

## 2. 研究の目的

ゲノム全遺伝子の転写包括制御は、転写装置の遺伝子間での配分制御で行われることを、石浜は提唱してきた(図1)。モデル実証を目標に、大腸菌の「均質細胞集団」や「単一細胞」を対象に、ゲノム全遺伝子の転写の動態を定量的に計測する技術及び装置を開発し、開発装置を利用して、細菌細胞ごとの局所環境の変動に伴うゲノム転写応答の包括制御機構を解明することを目的とした研究を展開し、新たに『細胞個性学』の確立を目指す。

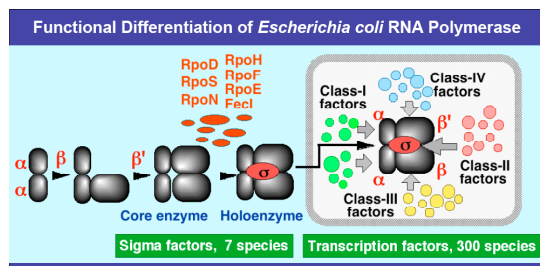


図1 転写装置の機能分化モデル

## 3. 研究の方法

- (1) 大腸菌転写因子の制御標的遺伝子同定の Genomic SELEX 法： 大腸菌全 300 種転写因子を精製し、純化転写因子とゲノム DNA 断片混合物から複合体を単離し、転写因子認識配列の分析から制御標的遺伝子を予測する実験システムを開発した(図2)。
- (2) 転写プロモーター活性測定の TFP ベクターの開発： 試験プロモーターを GFP (緑色蛍光蛋白)、標準プロモーターを RFP (赤色蛍光蛋白) に結合し、同一プラスミドに挿入し、GFP/RFP 比からプロモーターの活性と制御を定量する TFP ベクターを構築した(図3)。大腸菌凡そ 2,000 種プロモーターをこれに挿入し、大腸菌プロモーターコレクションを構築した。
- (3) 単一細胞観察装置の開発： 細菌培養液に感熱性アクリルアミドを加え、自作微小細胞チップに還流し、局所を加熱してゲル化する

装置を開発し、ゲル中に固定された細菌単細胞を長時間観察する装置を開発した(図4)。

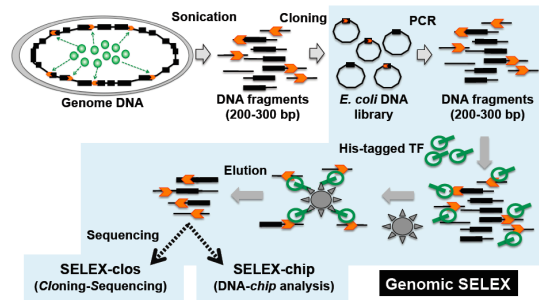


図2 Genomic SELEX 法

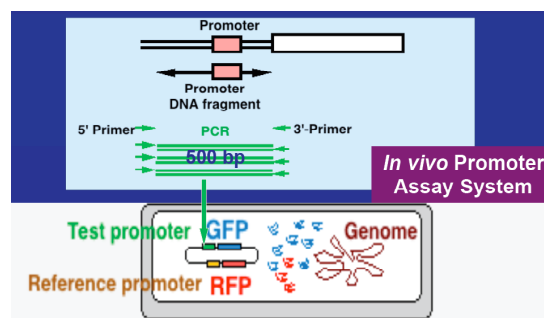


図3 プロモーター強度測定ベクター

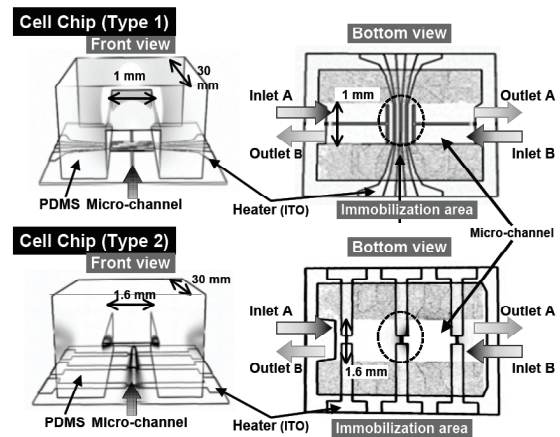


図4 大腸菌単一細胞観察装置

## 4. 研究成果

大腸菌単一細胞でのゲノム全遺伝子の転写包括制御機構の解明を目指し、下記の研究成果を得た。

- (1) 大腸菌ゲノム全プロモーターの強度の定量的計測： 大腸菌約 2,000 種プロモーターの強度測定 TFP ベクターコレクションを作

製し (図 3)、大腸菌各種培養条件、各種増殖相での、プロモーター活性の実測に成功した。また、環境変動に伴うプロモーター活性変化の系統的解析を実施した。

(2) 大腸菌全転写因子の支配下遺伝子群の同定: 本研究で開発したGenomic SELEX法 (図 2) を利用し、大腸菌転写因子約300種の支配下遺伝子群の同定と転写制御機構の解析を実施した。研究期間中に機能未知転写因子100種を含め、約200種転写因子について制御標的遺伝子群を同定した (表 1)。

(3) 大腸菌機能未知転写因子群の制御機能の同定: Genomic SELEX解析で、YcdC (RutRと命名)、YdhM (NemRと命名)、YgiP (Danと命名) など、多くの機能未知転写因子の制御標的遺伝子群を同定し、制御機能を発見した (図 5)。

(4) 多因子制御プロモーターの発見: 多数転写因子の制御標的の同定によって、多種類の転写因子で支配されるプロモーターの存在を発見した。多因子支配プロモーターは、バイオフィーム形成統合制御遺伝子や、べん毛形成の統合制御遺伝子など、多種類環境要素・要因に応答する遺伝子群の転写制御に関わっていた (図 6)。

(5) 多遺伝子制御転写因子の同定: 多数遺伝子・多数オペロンの転写制御に関わる、Cra, Crp, RutRなどの包括制御転写因子 (Global Regulator) 群の同定に成功した。

(6) 転写因子制御ネットワークの解明: 多因子制御プロモーター、多遺伝子制御転写因子を同定した結果、転写因子の支配・被支配の壮大ネットワークが形成されていることが判明した。

(7) 大腸菌ゲノム上の転写因子作動部位の同定: 大腸菌菌体中のDNA-蛋白質共有結合形成処理をし、細胞破碎後、転写因子抗体を利用して、転写因子-DNA複合体を回収し、DNA塩基配列から、転写因子作動部位 (制御遺伝子) を推定するNIP法を開発し、主要転写因子についてのゲノム作動部位を系統的に同定した (図 7)。

Search for Regulation Targets (current state)	
Predicted transcription factors	295
Expressed transcription factors	285
Purified transcription factors	260
Factors subjected to Genomic SELEX	185

表 1 大腸菌転写因子の機能分析

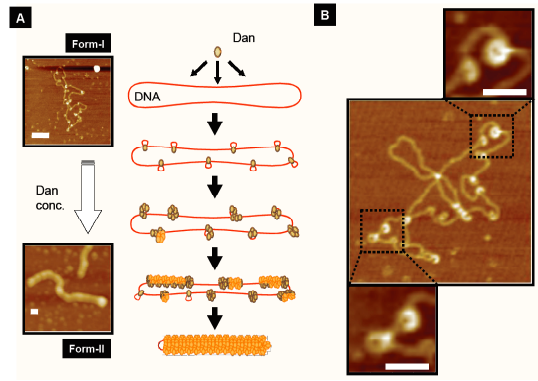


図 5 新規核様体蛋白 Dan の発見

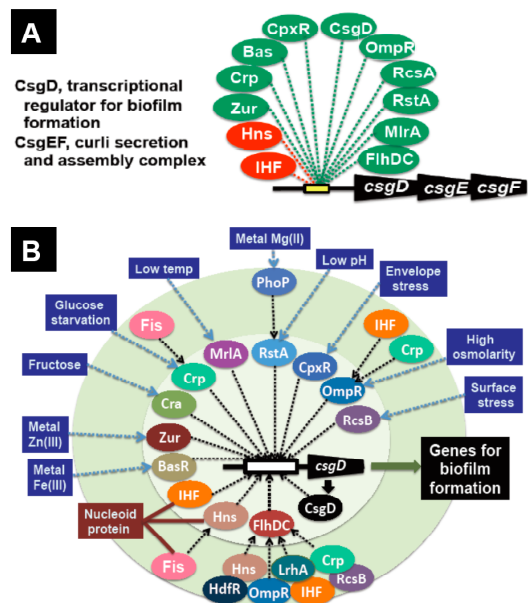


図 6 バイオフィーム形成マスター制御因子 CsgD を巡るネットワーク

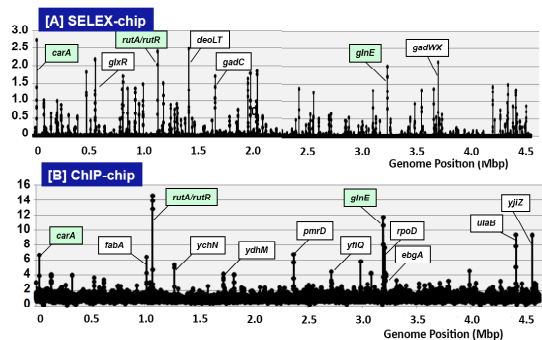


図 7 ピリミジン合成・分解遺伝子群転写因子 RutR の支配標的遺伝子 (A) と対数増殖期細胞内制御遺伝子 (B)

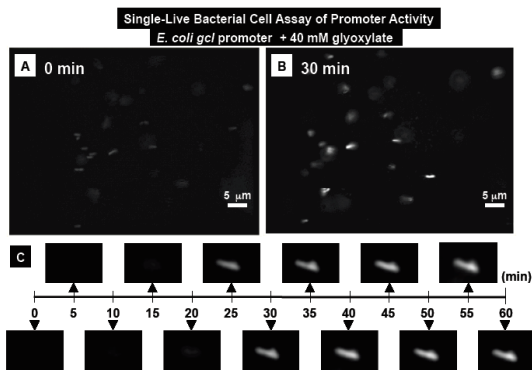


図8 細菌単一細胞観察装置による大腸菌 *gcl* プロモーター発現誘導の実測

(8) 大腸菌転写因子の細胞内濃度と活性制御の解析： 転写因子特異抗体を作製し、定量的ウエスタン法を利用して、転写因子約150種に関して細胞内濃度を計測した。一方、形質分析アレイ (Phenotype Microarray) を利用し、転写因子の活性を調節するエフェクターまたは環境要因の網羅的探索を行った。

(9) 大腸菌「均質細胞集団」の分離とプロモーター強度と制御の観測： Percoll密度勾配遠心法で、大腸菌増殖相の異なる細胞集団への分離法を開発し、均質細胞集団のゲノム発現パターンの差を解析した。

(10) 大腸菌「単一細胞観察装置」の開発とプロモーター強度と制御の観測： 本研究で開発した大腸菌「単一細胞」観察装置 (図4) を利用して、大腸菌生細胞をゲル中に固定し、大腸菌各種プロモーターの活性を連続長時間観測する画期的成果を得た (図8)。

ひとつの大腸菌細胞のすべての遺伝子の転写制御機構の解明を目指した本研究で得られた成果を基盤に、細菌細胞にも個性があることが実証された。研究成果を基盤に、新たに『細胞個性学』分野の確立の展望が得られた。

##### 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 56 件)

- 1) Ishihama, A.: Prokaryotic genome regulation: Multi-factor promoters, multi-target regulators and hierarchic networks. *FEMS Microbial Reviews*, in press (2010) (査読有)
- 2) Ogasawara, H., Kori, A., Yamada, K., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Regulation of the *Escherichia coli* *csgD*

promoter: Interplay between five transcription factors. *Microbiology*, in press (2010) (査読有)

- 3) Teramoto, J., Yoshimura, S.H., Takeyasu, K. and Ishihama, A.: A novel nucleoid protein of *Escherichia coli* induced under anaerobic growth conditions. *Nucleic Acids Res.* in press (2010) (査読有)
- 4) Ishida, Y., Kori, A. and Ishihama, A.: Participation of regulator AscG of the  $\beta$ -glucoside utilization operon in regulation of the propionate catabolism operon. *J. Bacteriol.* **191**(19), 6136-6144 (2009) (査読有)
- 5) Mitobe, J., Morita-Ishihara, T., Ishihama, A. and Watanabe, H.: Involvement of RNA-binding protein Hfq in the osmotic-response regulation of *invE* gene expression in *Shigella sonnei*. *BMC Microbiol.* **9**:110 (2009) (査読有)
- 6) Shimada, T., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Involvement of leucine-response transcription factor Leu0 in regulation of the genes for sulfa-drug efflux. *J. Bacteriol.* **191**(14), 4562-4571 (2009) (査読有)
- 7) Terui, Y., Higashi, K., Tabei, Y., Tomitori, H., Yamamoto, K., Ishihama, A., Igarashi, K. and Kashiwagi, K.: Enhancement of the synthesis of RpoE and StpA by polyamines at the level of translation in *Escherichia coli* under heat shock conditions. *J. Bacteriol.* **191**(17), 5348-5357 (2009) (査読有)
- 8) Hasegawa, A., Ogasawara, H., Kori, A. and Ishihama, A.: AllR is the allantoin/glyoxylate sensing master regulator of the genes for degradation and reutilization of purines. *Microbiology* **154**, 3366-3378 (2008) (査読有)
- 9) Mitobe, J., Ishihara, T., Ishihama, A. and Watanabe, H.: Involvement of RNA binding protein Hfq in the post-transcriptional regulation of *invE* gene expression in *Shigella sonnei*. *J. Biol. Chem.* **283**, 5738-5747 (2008) (査読有)
- 10) Shimada, T., Ishihama, A., Busby, S.J.W. and Grainger, D.C.: The *Escherichia coli* RutR transcription factor binds at targets within genes as well as intergenic regions. *Nucleic Acids Res.* **36**(12), 3950-3955 (2008) (査読有)

- 11) Umezawa, Y., Ogasawara, H., Shimada, T., Kori, A. and Ishihama, A.: The uncharacterized YdhM is the regulator of the *nemA* gene, coding for N-ethylmaleimide reductase. *J. Bacteriol.* **190**(17), 5890-5897 (2008) (査読有)
- 12) Yamamoto, K., Matsumoto, F., Oshima, T., Fujita, N., Ogasawara, N. and Ishihama, A.: Anaerobic regulation of citrate fermentation by CitAB in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**(11), 3011-3014 (2008) (査読有)
- 13) Yamamoto, K., Ogasawara, H. and Ishihama, A.: Involvement of multiple transcription factors for metal-induced *spy* gene expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, **133**(16), 6080-6084 (2008) (査読有)
- 14) Chatterji, D., Ozoline, O., Ogawa, Y., Shimada, T. and Ishihama, A.: The Role of omega subunit of RNA polymerase in expression of the *relA* Gene in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **267**(1), 51-55 (2007) (査読有)
- 15) Ogasawara, H., Hasegawa, A., Kanda, E., Miki, T., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Genomic SELEX search for target genes under the control of PhoQP-RstBA signal relay cascade. *J. Bacteriol.* **189**(13), 4791-4799 (2007) (査読有)
- 16) Ogasawara, H., Ishida, Y., Yamada, K., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: PdhR (pyruvate dehydrogenase complex regulator) controls the respiratory electron transport system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**(15), 5534-5541 (2007) (査読有)
- 17) Shimada, T., Hirao, K., Kori, A., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: RutR is the uracil/thymine-sensing master regulator of a set of genes for synthesis and degradation of pyrimidines. *Mol. Microbiol.* **66**(3), 744-779 (2007) (査読有)
- 18) Terui, Y., Higashi, K., Taniguchi, S., Shigemasa, A., Nishimura, K., Kashiwagi, K., Yamamoto, K., Ishihama, A. and Igarashi, K.: Enhancement of the synthesis of RpoN, Cra and H-NS by polyamines at the level of translation *Escherichia coli* cultured with glucose and glutamate. *J. Bacteriol.* **189**(6), 2359-2368 (2007) (査読有)
- 19) Yang, J., Ogawa, Y., Camakaris, H., Shimada, T., Ishihama, A. and Pittard, A. J.: *folA* a new member of the TyrR regulon in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **189**(16), 6080-6084 (2007) (査読有)
- 20) Higashi, K., Kashiwagi, K., Taniguchi, S., Terui, Y., Yamamoto, K., Ishihama, A. and Igarashi, K.: Enhancement of +1 frameshift by polyamines during translation of polypeptide release factor 2 in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **281**, 9527-9537 (2006) (査読有)
- 21) Ohniwa, R.L., Morikawa, K., Kim, J., Ohta, T., Ishihama, A., Wada, C. and Takeyasu, K.: The dynamic state of DNA topology is essential for genome condensation in bacteria. *EMBO J.* **25**, 5591-5602 (2006) (査読有)
- 22) Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Characterization of copper-inducible promoters regulated by CpxA/CpxR in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **70**, 1688-1695 (2006) (査読有)
- 23) Shimada, T., Fujita, N., Maeda, M. and Ishihama, A.: Systematic search for the Cra-binding promoters using genomic SELEX. *Genes Cells* **10**(9), 907-918 (2005) (査読有)
- 24) Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Mol. Microbiol.* **55**(1), 215-227 (2005) (査読有)
- 25) Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Transcriptional response of *Escherichia coli* to external zinc. *J. Bacteriol.*, **187**(18), 6333-6340 (2005) (査読有)
- 26) Yamamoto, K., Hirano, K., Ohshima, T., Aiba, H., Utsumi, R. and Ishihama, A.: Functional characterization *in vitro* of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**(2), 1448-1456 (2005) (査読有)
- [学会発表] (計 130 件)
- 1) Ishihama, A.: Prokaryotic genome regulation: Multi-factor promoters, multi-target regulators and multi-factor networks. Japan-India Collaborative Science Program Seminar, March 17, 2010. Centre for Cellular and Molecular Biology (CCMB), Hyderabad, India
- 2) Ishihama, A.: Genomic SELEX search for regulation targets by 100 species of uncharacterized transcription factors from *E. coli*. 12<sup>th</sup> Transcription Assembly, March 2-5, 2009. Chandigarh, India
- 3) 石浜 明: 細菌ゲノム制御全体像解明の



- ための戦略戦術。 日本大学学術研究高度化推進事業公開シンポジウム「病原体抑制遺伝子の解明と感染症の制御」、2010. 2. 26, 日大・オープンリサーチセンター, 東京。
- 4) 石浜 明: 細菌細胞の個性: その分子基盤。九州大学 G-COE「未来分子システム科学」公開セミナー、2010. 2. 9, 九州大学先導物質化学研究所、福岡。
- 5) Ishihama, A.: Growth phase-dependent regulation of *csgD*, the master regulator of biofilm formation: Interplay between multiple transcription factors. 3<sup>rd</sup> Internatl. Conf. Environ. Indust. Appl. Microbiol. (BioMicroWorld2009), Dec. 2-4, 2009. Lisbon, Portugal.
- 6) 石浜 明: 細菌の生存戦略としてのバイオフィルム形成: 遺伝子制御ネットワークと転写因子群。日本生化学会 第82回大会シンポジウム“細菌の生存戦略をめぐる新たな展開”, 2009. 10. 21-24, 神戸ポートアイランド、神戸。
- 7) 石浜 明: 大腸菌における環境金属応答のゲノム転写制御。メタルバイオサイエンス研究会2009、2009. 10. 16-17, 東京大学、東京。
- 8) Ishihama, A.: 20 years of progress with RNA polymerase. 20<sup>th</sup> RNA Polymerase Workshop. March 16-17, 2008. York, UK
- 9) Ishihama, A.: Multi-factor promoters and multi-factor networks. 20<sup>th</sup> RNA Polymerase Workshop. March 16-17, 2008. York, UK
- 10) Ishihama, A.: Multi-scale genetics towards understanding the regulatory roles of all transcription factors from a single organism *Escherichia coli*. Asian Conference on Transcription (ACT), 10<sup>th</sup> Meeting, Jan. 13-16, 2008. Bangalore, India
- 11) 石浜 明: ゲノムの転写制御: ひとつの生物のすべての転写因子の調節機能同定の試み。第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会マスターズレクチャー、2007. 12. パシフィコ横浜、横浜。
- 12) 石浜 明・山本兼由・小笠原 寛・島田友裕・寺本 潤: 細菌の環境金属応答の転写包括制御。第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会ワークショップ「金属イオンのChemical Biology」、2007. 12. パシフィコ横浜、横浜。
- 13) Ishihama, A.: Multi-scale genetics of transcription network: Understanding the regulatory roles of all 300 transcription factors from a single organism *Escherichia coli*. 2007 Micro-Nano Mechatronics and Human Science Symp. 2007. 11. Nagoya Univ., Nagoya.
- 14) 石浜 明: マルチスケール遺伝学: 大腸菌全転写因子の機能同定。シンポジウム「マルチスケール操作によるシステム細胞工学」、2006. 6. 30. 名古屋大学野依学術交流館。
- 15) Ishihama, A.: Transcription in *E. coli*: the big picture. UK Integrated Biology of *Escherichia coli* Meeting, Nov. 30-Dec. 2, 2005. Birmingham, UK
- 16) Ishihama, A.: Transcription factor-promoter interaction networks. 2005 Internatl. Symp. Micro-Nano Mechatronics & Human Science, Nov. 8-9, 2005. Nagoya, Japan.
- 17) 石浜 明: ゲノム転写包括制御研究の戦略と戦術。東京大学化学学生命工学セミナー、2005. 11. 東京大学、東京。
- 18) 石浜 明: ゲノム全遺伝子に対応する細菌の環境応答。特定領域研究「バイオ操作」第1回公開シンポジウム、2005. 10. 東京大学、東京。
- 19) Ishihama, A.: Genomic SELEX search for the genes and promoters under the control of *E. coli* transcription factors. Transcription Assembly, Sep. 17-19, 2005. Hyderabad, India

〔図書〕(計5件)

Ishihama, A.: Chapter 2.6, The Nucleoid: an Overview. In: *EcoSal-Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. (A. Běák, R. Curtiss III, J. B. Kaper, P. D. Karp, F. C. Neidhardt, T. Nyström, J. M. Slauch, C. L. Squires, and D. Ussery, eds.), <http://www.ecosal.org>. ASM Press, Washington, DC. (2009)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石浜 明 (ISHIHAMA AKIRA)  
法政大学・企画・戦略本部・特任教授  
研究者番号: 80019869

### (2) 研究分担者

曲山 幸生 (MAGARIYAMA YUKIO)  
農業食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・上席研究員  
研究者番号: 40343818

山本 兼由 (YAMAMOTO KANEYOSHI)  
法政大学・生命科学部・准教授  
研究者番号: 40351580