

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06618

研究課題名(和文) 大腸菌全シグマ因子の制御標的全プロモーター同定の完成を目指して

研究課題名(英文) Identification of the whole set of the constitutive promoters in Escherichia coli

研究代表者

島田 友裕 (Shimada, Tomohiro)

明治大学・農学部・専任准教授

研究者番号：10535230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子発現はRNA合成酵素(RNAポリメラーゼ)がゲノム上にある遺伝子の転写開始部位であるプロモーターと呼ばれる特定の配列を認識することで開始される。ゲノム転写制御機構の全体像を理解する一環で、大腸菌の窒素欠乏に応答するためのシグマ因子RpoNのRNAポリメラーゼホロ酵素およびその補助因子であるNtrCのゲノム上の標的配列を網羅的に解析し、RpoNホロ酵素のプロモーターの同定に成功した。また、本来は遺伝子発現を行うためのRNAポリメラーゼがRpoNとホロ酵素を形成することで、遺伝子発現に抑制的に作用するところを見出し、Repressive promoterとして提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAポリメラーゼRpoNホロ酵素が遺伝子発現に抑制的に作用することが明らかとなり、このプロモーターを「repressive promoter (抑制的プロモーター)」と命名することを提案した。これまでにも、プロモーターの認識がRNAポリメラーゼホロ酵素単体で可能なものを「constitutive promoter (構成的プロモーター)」、何らかの補助因子が必要なものを「inducible promoter (誘導的プロモーター)」と呼ぶことを提案してきており、RNAポリメラーゼによりゲノムから利用される遺伝子が選択される仕組み、また、抑圧される仕組みの本質的な理解に役立つ成果となった。

研究成果の概要(英文)：Gene expression is initiated when RNA synthetase (RNA polymerase) recognizes a specific sequence called a promoter, which is the transcription initiation site of a gene on the genome. For the RNA polymerase core enzyme in prokaryotes to recognize the promoter, it must bind to a subunit called the sigma factor to form a holoenzyme. As part of overall understanding of the mechanism of genome transcriptional regulation, we comprehensively analyzed the genomic promoter of the sigma factor RpoN holoenzyme and its enhancer NtrC to respond to nitrogen deprivation in E. coli and found that RNA polymerase, originally intended for gene expression, has a repressive effect on gene expression. Based on our findings, we propose a dual function for the RNAP RpoN holoenzyme, as a repressor (in the absence of NtrC) and as a NtrC-activated transcriptase. This repressor type of promoter was termed as a repressive promoter.

研究分野：ゲノム微生物学

キーワード：RNAポリメラーゼ プロモーター ゲノム転写制御 シグマ因子RpoN Repressive promoter gSELEX法
大腸菌

1. 研究開始当初の背景

現在までに数万種類を越える微生物のゲノム配列が決定され、1つの生物を構築する遺伝子の全体像が明らかとなった。しかし、ゲノム上にはなお、生理機能未知の遺伝子が多く、加えて、発現され利用される遺伝子の選択システムについては不明な点が多い。全遺伝子の機能情報とゲノムの選択的発現の包括制御機構の解明は、21世紀生命科学の重要課題であるといえる。ゲノム機能の発現制御機構の全体像を理解する目的では、個別遺伝子の情報が最も多く、ゲノム遺伝子数が現在の解析手法でも解析に耐えられる程度に少ない大腸菌は、この段階でもモデル生物に相応しい。

ゲノムからの遺伝子発現は、転写装置であるRNAポリメラーゼのコア酵素に2種類の分子が相互作用することによって行われる。まずプロモーターを認識するためのシグマ因子が結合してホロ酵素を形成することでゲノム上のプロモーターの認識が可能となり、転写開始点が決定される。次に転写因子との相互作用によりその強度が決定される。大腸菌ゲノムにおいてはシグマ因子が全7種類、転写因子が約300種類あり、これら全転写制御因子の制御機構および機能の解明が、ゲノム転写包括制御機構を理解するために必要とされる。

研究代表者はゲノムに存在する全遺伝子から転写される遺伝子がどのような仕組みで選択され、それらの転写水準はどのような仕組みで決まるかを理解する目的で、ゲノム転写包括制御機構の研究を展開してきた。特に、*in vitro*において転写因子のゲノム上認識結合領域を直接的に同定する Genomic SELEX (gSELEX) 法を開発し、タイリングアレイ分析と併用することで、転写因子の直接的な支配下遺伝子群を網羅的に同定する新規実験システム、gSELEX-chip 法を確立し、多くの転写因子の新規機能解析に成功してきた。シグマ因子については、大腸菌の持つ全7種類のうち5種類(RpoD, RpoS, RpoH, RpoF, RpoE)それぞれについて、ゲノム上結合領域を同定し、RNAP ホロ酵素が単独で認識できるプロモーター(constitutive promoter)と補助因子が必要なプロモーター(inducible promoter) とを識別する重要性を提案し、ゲノムレベルでのプロモーター選択システムの実証を推進してきており、残すシグマ因子の解析が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究では上述の成果を基盤として、残す2種類のシグマ因子のうち、窒素関連遺伝子群のプロモーター認識に必要な RpoN の制御標的全プロモーターの同定、および、ゲノム転写制御機構の理解を目指した。RpoN はホロ酵素単独でプロモーターの認識が可能であり、RNAP と DNA の閉鎖複合体の形成までは行われるが、転写の伸長反応を開始するための開鎖複合体への移行には、ATP の加水分解をエネルギーとする転写因子の補助が必要である。この転写因子は NtrC ファミリーに属し、エンハンサーとも呼ばれている。そのため、これまでに研究代表者が gSELEX-chip 法を用いて解析してきたシグマ因子とは性質が異なり、RpoN のゲノム転写制御の分子機構の本質を理解するためには、RpoN ホロ酵素に加え、エンハンサーの標的プロモーターについても個別に解析する必要がある。これらの制御ネットワーク解析結果を併せて考察し、RpoN によるゲノム転写制御機構の全体像を再構築し、理解することを目的とした。

3. 研究の方法

gSELEX 法を用いて RpoN ホロ酵素を解析するにあたり、ホロ酵素単独の条件に加えて、その活性に関与する NtrC の単独条件、および NtrC 存在下における RpoN ホロ酵素についても解析を行った。本研究では以下の研究項目を実施した。

RNA ポリメラーゼ コア酵素、シグマ因子 RpoN、エンハンサー NtrC をそれぞれ精製した。gSELEX-chip 解析を用いてゲノム上結合領域を同定した。その際、RpoN ホロ酵素単独、NtrC 単独、そして、NtrC 存在下における RpoN ホロ酵素の結合領域をそれぞれ同定した。

2で同定された RpoN ホロ酵素単独および NtrC 単独のゲノム上の結合領域を基に、それぞれの標的遺伝子群および RpoN ホロ酵素の constitutive promoter を同定した。同様に、NtrC 存在下の RpoN ホロ酵素の結果を基に、inducible promoter を同定した。3で得られた結果を基に、RpoN ホロ酵素のプロモーター配列および NtrC のコンセンサス配列を検証した。RpoN ホロ酵素の新規標的遺伝子群に対し、ゲルシフトアッセイを用いて結合を確認し、その親和性における NtrC の依存性を検証した。NtrC 依存型 RpoN プロモーターを持つ新規標的遺伝子群に対し、窒素欠乏条件下における RpoN および NtrC による標的 mRNA レベルへの影響を、RT-qPCR 法を用いて観察した。RpoN ホロ酵素および NtrC が抑制的に作用した標的遺伝子群について、ゲルシフトアッセイを用いて RpoD ホロ酵素との拮抗作用を検証した。

4. 研究成果

gSELEX 法を用いて RpoN ホロ酵素、NtrC、および、NtrC 存在下における RpoN ホロ酵素の大腸菌ゲノム上結合領域の同定を試みたところ、それぞれの主要な既知標的遺伝子を含む標的領域を同定することに成功した(図1)。また、その結果を基盤として、それぞれの標的遺伝子リストを作成した(表1)。ここから、NtrC 依存性の RpoN ホロ酵素の標的転写単位数は約10個で

あることが示唆された。続いて、gSELEX で同定された NtrC 依存性 RpoN プロモーター配列を解析したところ、-12 領域に TGC、-24 領域に TGG の配列が保存されていることがわかった。過去に同定されていた RpoN 認識プロモーターの知見と比較したところ、NtrC 依存性 RpoN プロモーターは-12 領域の TGC の保存性が低く、この性質が NtrC により補助されていることが示唆された (図 2)。

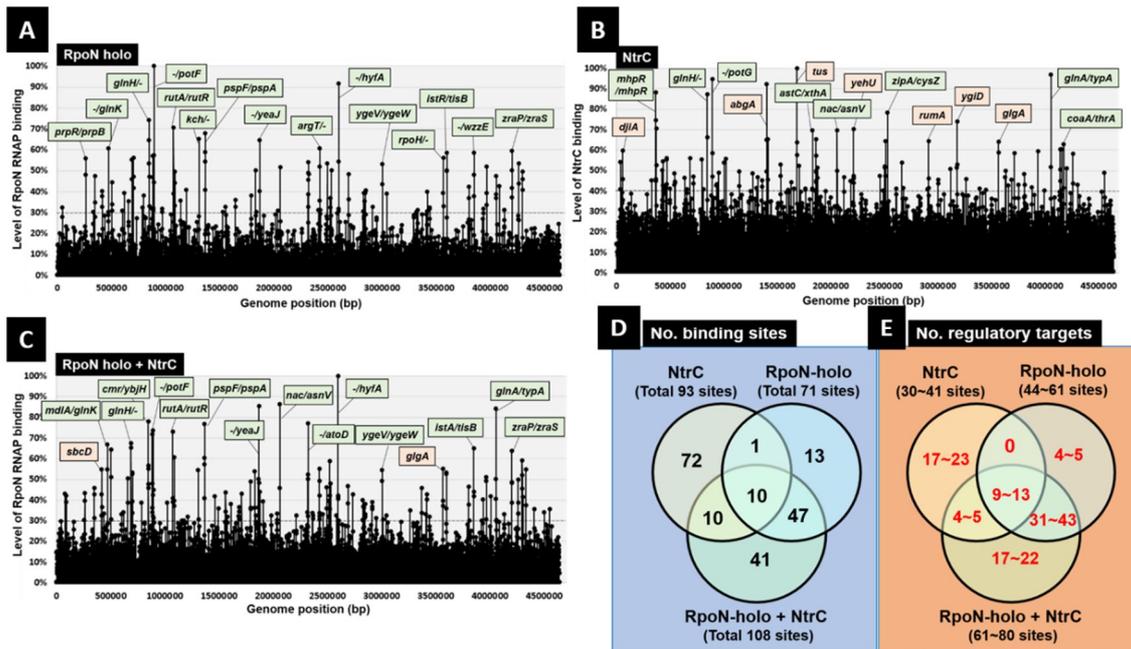


図 1、gSELEX-chip 法により観察された RpoN ホロ酵素および NtrC の大腸菌ゲノム上結合領域。縦軸は結合強度、横軸は大腸菌ゲノムの位置情報を示す。(A)RpoN ホロ酵素、(B)NtrC、(C)NtrC 存在下における RpoN ホロ酵素、(D)A、B、C の結果から各因子の結合領域数とその関係性を比較した解析結果、および、(E)結合領域から推測された標的遺伝子数とその関係性を比較した解析結果。

No.	gSELEX peak type	Map position (bp)	RpoN holo	Left gene function	Operon	Left gene	D	RpoN holo	D	Right gene	Operon	Right gene function
1	A	347964	47%	DNA-binding transcriptional activator	<i>ppfB</i>	<i>ppfB</i>	<	<i>ppfB</i>	<i>ppfB</i>	<i>ppfB</i>	<i>ppfB</i>	2-Methylcrotonic lyase
2	B	471886	61%			<i>nutB</i>	>	<i>nutB</i>	<i>nutB</i>	<i>nutB</i>	<i>nutB</i>	Nitrogen assimilation regulatory protein for <i>Clu1</i> , <i>Clu2</i> and <i>nutB</i>
3	B	619432	19%	Iron-sulfur cluster transporter subunit	<i>hycC</i>	<i>hycC</i>	<	<i>hycC</i>	<i>hycC</i>	<i>hycC</i>	<i>hycC</i>	
4	A	455768	15%	Aspartate C4-diacylphosphate transport	<i>asuC</i>	<i>asuC</i>	<	<i>asuC</i>	<i>asuC</i>	<i>asuC</i>	<i>asuC</i>	Fabryin transporter for lipid A
5	B	688560	57%	IS transposase and transactivator	<i>int1</i>	<i>int1</i>	<	<i>int1</i>	<i>int1</i>	<i>int1</i>	<i>int1</i>	
6	A	788056	32%	Conserved protein	<i>ylpF</i>	<i>ylpF</i>	<	<i>ylpF</i>	<i>ylpF</i>	<i>ylpF</i>	<i>ylpF</i>	3-Deoxy-D-arabino-heptulosate 7-phosphate synthase
7	B	847362	56%	Glutamine transporter subunit	<i>gluTQ</i>	<i>gluTQ</i>	<	<i>gluTQ</i>	<i>gluTQ</i>	<i>gluTQ</i>	<i>gluTQ</i>	
8	B	874568	12%			<i>ylpI</i>	>	<i>ylpI</i>	<i>ylpI</i>	<i>ylpI</i>	<i>ylpI</i>	Predicted lipopolysaccharide cyclase
9	A	882859	17%	Undecapentyl pyrophosphate phosphatase	<i>ylpG</i>	<i>ylpG</i>	<	<i>ylpG</i>	<i>ylpG</i>	<i>ylpG</i>	<i>ylpG</i>	Multidrug efflux system protein
10	B	891170	64%			<i>nutA</i>	>	<i>nutA</i>	<i>nutA</i>	<i>nutA</i>	<i>nutA</i>	Bifunctional protein 56 modification protein
11	B	902632	100%			<i>ylpN</i>	>	<i>ylpN</i>	<i>ylpN</i>	<i>ylpN</i>	<i>ylpN</i>	Patrolin transporter subunit <i>ompR</i> -binding component of ABC superfamily
12	A	973268	71%	Predicted monooxygenase	<i>nutARDEFG</i>	<i>nutA</i>	<	<i>nutA</i>	<i>nutA</i>	<i>nutA</i>	<i>nutA</i>	Predicted DNA-binding transcriptional regulator
13	B	1191232	43%	Adenosine deaminase	<i>adaB</i>	<i>adaB</i>	<	<i>adaB</i>	<i>adaB</i>	<i>adaB</i>	<i>adaB</i>	
14	B	1380556	67%	Yidg-pilQ pilQin channel	<i>ilb</i>	<i>ilb</i>	<	<i>ilb</i>	<i>ilb</i>	<i>ilb</i>	<i>ilb</i>	
15	A	1366878	68%	DNA-binding transcriptional activator	<i>ppf</i>	<i>ppf</i>	<	<i>ppf</i>	<i>ppf</i>	<i>ppf</i>	<i>ppf</i>	Regulatory protein for <i>phgA</i> - <i>shcA</i> protein system
16	B	1527334	30%			<i>nutH</i>	>	<i>nutH</i>	<i>nutH</i>	<i>nutH</i>	<i>nutH</i>	Predicted protein

表 1、RNA ポリメラーゼ RpoN ホロ酵素の各結合領域および近傍遺伝子の機能情報リストの一部抜粋。RpoN ホロ酵素は 71 カ所、NtrC は 93 カ所、NtrC 存在下の RpoN ホロ酵素は 108 カ所のゲノム上結合部位が同定された。それぞれの因子について、各結合領域に対するリストを作成し、制御機構の全体像を解析した。

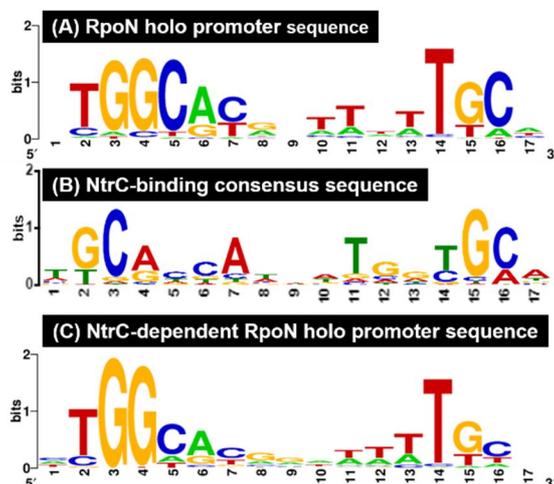


図 2、gSELEX-chip 法により観察された RpoN ホロ酵素および NtrC の直接的な大腸菌ゲノム上結合領域から検出された RpoN プロモーター配列および NtrC コンセンサス配列。(A)RpoN ホロ酵素単独で認識するプロモーター配列、(B)NtrC のコンセンサス配列、(C)NtrC 存在下で RpoN ホロ酵素が認識するプロモーター配列。

次に、RpoN ホロ酵素および NtrC の NtrC 依存性 RpoN プロモーターの転写制御への影響を検証した。gSELEX 法により新規に同定された NtrC 依存性 RpoN プロモーター 8 個について、ゲルシフトアッセイを用いて、RpoN ホロ酵素および NtrC の親和性を個別に検証した。その結果、いずれの標的プロモーターにおいても、NtrC 存在下で RpoN ホロ酵素の結合親和性が上昇することが確認された (図 3)。

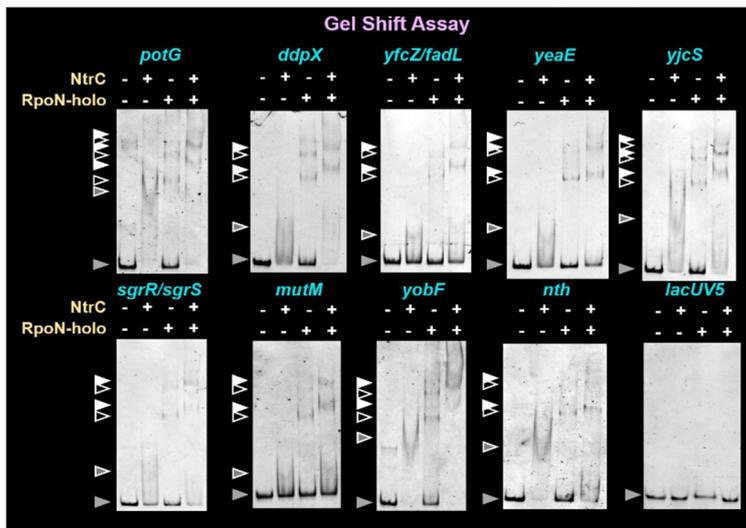


図 3、ゲルシフトアッセイによる NtrC 依存性 RpoN プロモーターと、RpoN ホロ酵素、NtrC、NtrC 存在下の RpoN ホロ酵素との複合体形成の観察結果。

次に、RpoN および NtrC が転写制御へ与える影響を解析したところ、標的遺伝子群の多くは定説通りに窒素欠乏により RpoN ホロ酵素および NtrC によって発現が誘導された。それに対して、いくつかの標的遺伝子は抑制されることが見出された (図 4)。さらに解析したところ、RpoN ホロ酵素および NtrC による抑制化は、細胞増殖のための遺伝子発現に必要な RpoD ホロ酵素と拮抗することにより引き起こされていることが示唆された (図 5)。

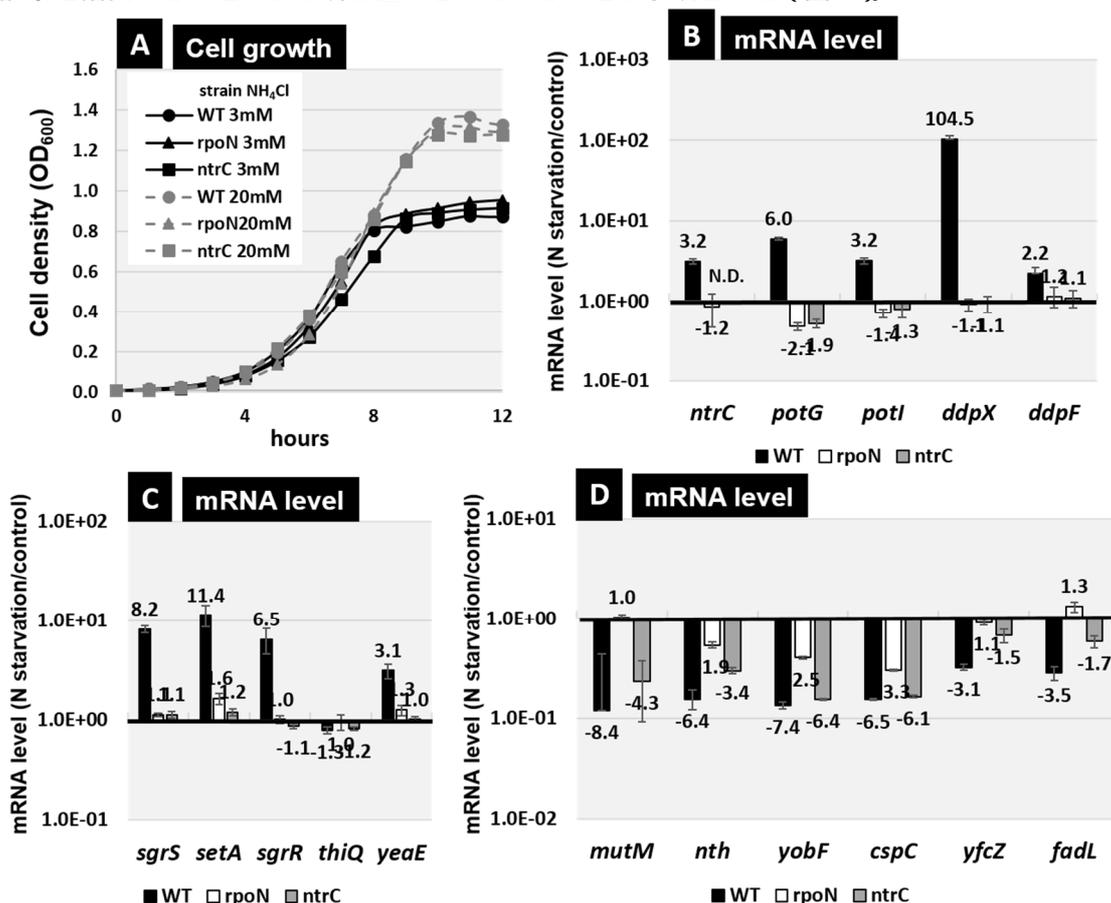


図 4、窒素欠乏時における NtrC 依存性 RpoN 標的遺伝子群の mRNA レベルの観察。(A)窒素飢餓培地における大腸菌野生株、*rpoN* 欠損株、*ntrC* 欠損株の生育曲線、(B)RpoN ホロ酵素および NtrC の既知標的遺伝子群の mRNA 量の比較、(C) *rpoN* または *ntrC* の欠損により mRNA 量が低下した新規標的遺伝子群、(D) *rpoN* または *ntrC* の欠損により mRNA 量が上昇した新規標的遺伝子群。

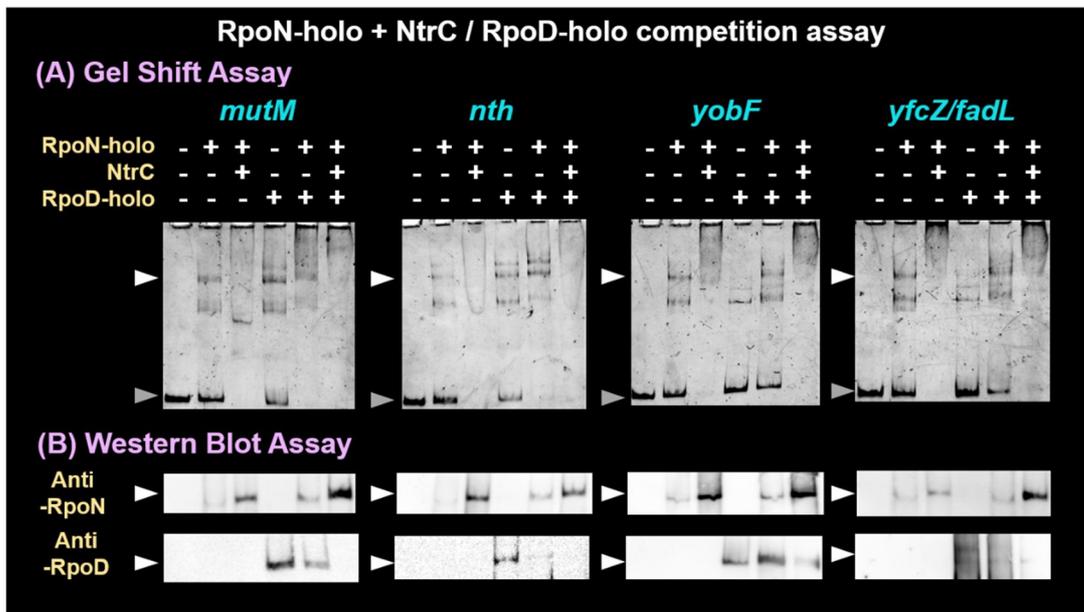


図5、ゲルシフトアッセイによる RpoN ホロ酵素と RpoD ホロ酵素の拮抗作用の観察結果。(A) プロモーター-DNA プローブの染色による観察、(B)A の結果を RpoN 抗体または RpoD 抗体を用いたウェスタンブロット解析により、複合体に含まれるホロ酵素を区別して観察した結果。

これらの結果から、RNA ポリメラーゼ RpoN ホロ酵素が遺伝子発現に抑制的に作用する場合があることが明らかとなり、このプロモーターを [Repressive promoter (抑圧的プロモーター)] と命名することを提案した。この研究成果は、RNA 合成酵素 (RNA ポリメラーゼ) が遺伝子発現に抑制的に作用する場合があるという新規な機能を示すと共に、微生物が窒素欠乏に应答するための遺伝子群や発現させるための分子機構を理解・応用するために役立つと考えられる。これらの結果を統合し、RpoN ホロ酵素および NtrC による大腸菌ゲノム転写制御機構について議論し、制御モデルを原著論文にて提案した (Shimada et al. *Microbial Genomics* (2021))。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shimada Tomohiro, Furuhata Shun, Ishihama Akira	4. 巻 7
2. 論文標題 Whole set of constitutive promoters for RpoN sigma factor and the regulatory role of its enhancer protein NtrC in Escherichia coli K-12	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbial Genomics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/mgen.0.000653	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimada Tomohiro, Ogasawara Hiroshi, Kobayashi Ikki, Kobayashi Naoki, Ishihama Akira	4. 巻 12
2. 論文標題 Single-Target Regulators Constitute the Minority Group of Transcription Factors in Escherichia coli K-12	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.697803	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishihama Akira, Shimada Tomohiro	4. 巻 45
2. 論文標題 Hierarchy of transcription factor network in <i>Escherichia coli</i> K-12: H-NS-mediated silencing and Anti-silencing by global regulators	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Reviews	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsre/fuab032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Anzai Takumi, Imamura Sousuke, Ishihama Akira, Shimada Tomohiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Expanded roles of pyruvate-sensing PdhR in transcription regulation of the Escherichia coli K-12 genome: fatty acid catabolism and cell motility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbial Genomics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/mgen.0.000442	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimada Tomohiro, Yokoyama Yui, Anzai Takumi, Yamamoto Kaneyoshi, Ishihama Akira	4. 巻 9
2. 論文標題 Regulatory Role of PlaR (YiaJ) for Plant Utilization in Escherichia coli K-12	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56886-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 島田友裕、小笠原寛、小林一幾、小林尚貴、石浜明
2. 発表標題 大腸菌K-12株のゲノム転写制御ネットワークにおけるSingle-target regulatorsの機能解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古幡駿、石浜明、島田友裕
2. 発表標題 大腸菌K-12株におけるRpoN RNAポリメラーゼホロ酵素の " Constitutive promoter " および " Repressive promoter "
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林一幾、石浜明、島田友裕
2. 発表標題 大腸菌K-12株における新規定常期ストレス応答転写因子YgfIの機能解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真島友希、村山里枝、石浜明、島田友裕
2. 発表標題 大腸菌K-12株における機能未知転写因子YiaUの制御標的遺伝子群の同定と機能解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田秀司、島田友裕、牧泰史、石浜明
2. 発表標題 アンチシグマ因子(Rsd)とリボソーム二量体化因子(RMF)の発現を同時制御する金属応答転写因子
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安西拓実、今村壮輔、石浜明、島田友裕
2. 発表標題 Expanded roles of pyruvate-sensing PdhR in transcription regulation of Escherichia coli K-12 genome
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安西拓実、今村壮輔、石浜明、島田友裕
2. 発表標題 Expanded roles of pyruvate-sensing PdhR in transcription regulation of Escherichia coli K-12 genome: fatty acid catabolism and cell motility
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田友裕、安西拓実、石浜明
2. 発表標題 大腸菌における植物由来化合物を利用するためのグローバルレギュレーターPlaR(YiaJ)のゲノム転写制御ネットワークの解明
3. 学会等名 第14回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>以下、所属機関からのプレスリリース</p> <p>RNA合成酵素は遺伝子発現に抑制的にも作用することを発見 https://www.meiji.ac.jp/koho/press/6t5h7p00003dftir.html</p> <p>～微生物の物質生産能力の向上にも期待～ ビルビン酸応答転写因子の微生物における新規な役割を同定 https://www.meiji.ac.jp/koho/press/6t5h7p000039uiyc.html</p> <p>Novel functions of the Pyruvate-Sensing Protein https://www.meiji.ac.jp/cip/english/news/2020/enjsp3000000hjy2.html</p> <p>植物由来の化合物を効率的に利用し、植物に依存して生存するための微生物のグローバルレギュレーターを発見 https://13.114.194.133/koho/press/6t5h7p00002mwn8b.html</p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------