

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 20 日現在

機関番号： 32675  
 研究種目： 基盤研究(A)  
 研究期間： 2009 ～ 2011  
 課題番号： 21241047  
 研究課題名（和文） 大腸菌の全ての転写因子の調節機能とネットワーク全体像の解明  
 研究課題名（英文） Regulatory Roles and Networks of the Whole Set of  
 Transcription Factors in *Escherichia coli*

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）： ゲノム転写パターンの決定制御機構の理解を目指し、大腸菌 RNA ポリメラーゼの転写対象遺伝子選択能を制御する、転写因子全 300 種の制御機能の解明を目標とした先端研究を実施し、以下の研究成果を得た。

- 1) Genomic SELEX 法を開発し、転写因子 300 種のノム上の結合部位を解析し、制御支配下遺伝子群を同定した。
- 2) NIP-chip 法を開発し、菌体内での転写因子作動遺伝子領域を解析した。
- 3) 転写因子遺伝子欠損システムを利用し、転写因子支配下遺伝子群の転写制御を実証した。
- 4) 特異抗体を作製し、転写因子細胞内濃度を決定した。
- 5) 転写因子の制御ネットワーク全体像を提案した。
- 6) ひとつの生物の全転写因子の制御機能を解明した、最初の成果となった。

研究成果の概要（英文）： The genome expression is determined by controlling the distribution of a limited number of RNA polymerase within the genome through interaction with transcription factors. The aim of this research was to identify the regulatory role of all 300 transcription factors in the model prokaryote, *Escherichia coli*.

- 1) We developed the *in vitro* Genomic SELEX screening system and determined the regulation target genes for all 300 transcription factors.
- 2) We also developed the *in vivo* NIP-chip system and determined the intracellular distribution of transcription factors within the *E. coli* genome.
- 3) The regulation targets thus predicted were examined by measuring their expression in the presence and absence of transcription factors.
- 4) We determined the intracellular levels of all 300 transcription factors by using quantitative immune-blot analysis.
- 5) Taking all the results together, I have proposed: (1) the list of regulation targets for all 300 transcription factors; and (2) the interaction network of 300 transcription factors, altogether forming complex hierarchic regulation networks.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2010年度	12,600,000	3,780,000	16,380,000
2011年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
年度			
年度			
総計	34,600,000	10,380,000	44,980,000

研究分野： 複合新領域

科研費の分科・細目： ゲノム科学・ゲノム調節・基礎ゲノム科学

キーワード： ゲノム制御、転写制御、転写因子、大腸菌

## 1. 研究開始当初の背景

転写酵素RNAポリメラーゼは、転写因子との相互作用で、ゲノムから転写対象遺伝子を選択し、転写因子の交換でゲノムの遺伝子発現パターンが変化する。我々は、大腸菌RNAポリメラーゼの細胞内濃度を測定し、ゲノムの約4,400遺伝子の転写パターンは、2,000分子のRNAポリメラーゼのゲノム全遺伝子間での分配制御で決定されるとの理論を提唱した (Ishihama, A.: *Ann. Rev. Microbiol.* **54**, 499-518, 2000)。RNAポリメラーゼの分配は、約300の転写因子との相互作用で決定される (図1)。

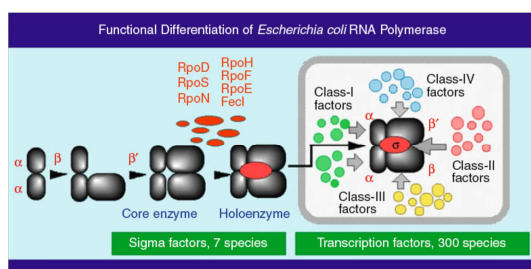


図1 RNAポリメラーゼの分配制御によるゲノム転写制御モデル (石浜)

従って、300転写因子すべての支配下遺伝子セットを同定し、その上で、300転写因子の機能的活性分子の細胞内濃度を測定できれば、ゲノムの4,400遺伝子の発現パターンの理論的予測が可能となる。転写装置の実体解析から、ゲノム発現パターンを理解する、新時代の生命科学研究の先端を目指した研究を展開し、全体像の解明への展望が開けて来た。その完成を目指した最終段階の研究として、本課題研究を提案した。

## 2. 研究の目的

大腸菌には約300の転写因子が存在する。しかし、最も良く解析されたモデル生物・大腸菌でも、約100の転写因子は、転写調節に関わると予測されているが、生理機能未知である。推定転写因子遺伝子の欠損株を作製し、ゲノムの発現変化の Transcriptome 及び Proteome 分析を試みたが、転写因子の直接の支配下遺伝子の10倍程の遺伝子群が間接的

に影響を受け、直接の支配下遺伝子の同定は困難であった。そこで我々は、転写因子が、認識し結合するDNA部位を網羅的に分析することで、支配下遺伝子群を同定する、新たな方法を開発し、大腸菌全転写因子の支配下遺伝子群を同定する戦略研究を実施する。この網羅的研究から得られる結果を統合し、大腸菌ゲノム転写制御の本質を解明する。この研究が成功すれば、「ひとつの生物の、すべての転写因子の制御機能の解明」した、歴史的な研究として位置づけられるであろう。

## 3. 研究の方法

(1) 転写因子の直接支配下遺伝子群を同定するために、「転写因子支配下遺伝子群の迅速網羅的同定法」(Genomic SELEX法)を開発した。Genomic SELEX法で得られた転写因子結合DNA断片のゲノム上の位置は、Cloning-Sequence法 (SELEX-clos) で塩基配列を決定して同定するか、DNA tiling array を用いて一挙に同定した (SELEX-chip)。

(2) 細菌菌体内での転写因子のゲノム上結合部位を同定するために、菌体を予めDNA-蛋白質を共有結合で固定した後、ゲノムDNAを単離分断し、転写因子特異的抗体を利用して転写因子が固定されたDNAを分離分析する NIP-chip (Nucleoid Immunoprecipitation) 法を開発した。

## 4. 研究成果

(1) Genomic SELEX法による大腸菌全転写因子の制御支配下遺伝子群の同定

大腸菌に予測した約300種の転写因子のうち、280種を単離精製し、260種については、Genomic SELEXを行い、支配下遺伝子群の推定に成功した (図2)。SELEX-chipで得られた260の転写因子認識結合部位のパターンの比較から、転写因子には、単一の制御標的をもつ特異性の高いものから、大腸菌ゲノムの約4,500遺伝子のうち、1,000以上の多数の遺伝子を制御する包括制御因子まで、幅が広いことが判明した (図3)。

大腸菌転写因子の活性は、低分子エフェクターとの相互作用か、蛋白リン酸化で制御さ

れる。Genomic SELEXをエフェクターの有無または、リン酸化有無で行うことで、ゲノム上の結合部位を比較し、支配下遺伝子群の制御の様相を予測することが出来た。

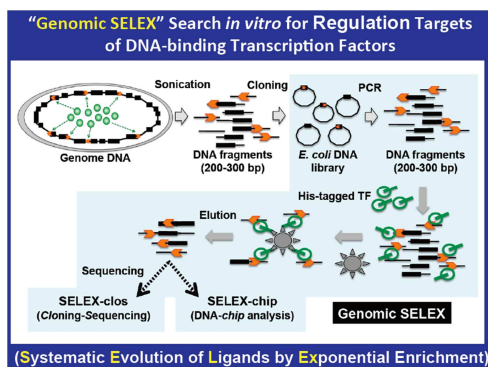


図2 転写因子標的探索のGenomix SELEX

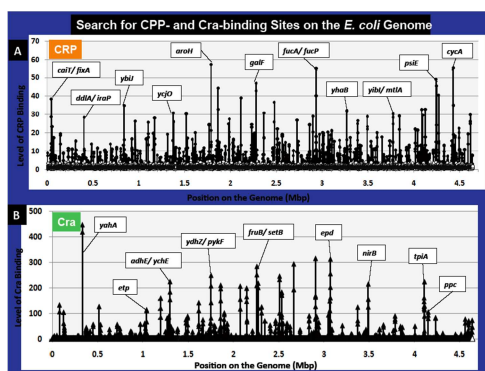


図3 転写因子CRP, Craの制御標的

(2) NIP-chip法による菌体内での転写因子の制御支配下遺伝子群の同定

Genomix SELEXで同定した転写因子結合部位は、純化転写因子と純化ゲノムDNAだけを混合した時に、転写因子が結合できる潜在的結合部位である。その中で、菌体内で実際に結合している部位を同定する目的で、ChIP-chip法を細菌にも適用できるように改良したNIP-chip法を利用した。細菌培養条件を変えることで、転写因子が制御する標的遺伝子が増える様相を明らかにできた。

(3) プロモーター特異的転写因子の探索

転写因子支配下遺伝子の探索に加えて、純化転写因子コレクションを利用して、プロモーター混合物の各プロモーター特異的転写因子を探索する”mixed gel shift assay”系を開発した。バイオフィーム形成や、細胞間コミュニケーションに関わる制御因子遺伝子プロモーターの作用する転写因子の同定に成功した(図4)。

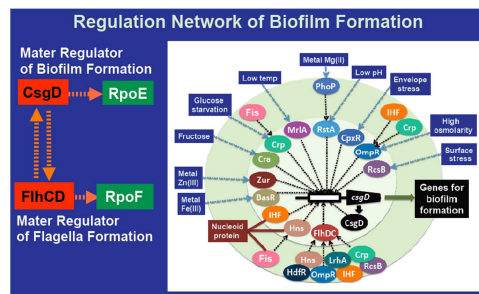


図4 バイオフィーム形成制御のネットワーク

(4) 転写因子支配下遺伝子の制御実態解析

Genomic SELEX, NIP-chipで推定した転写因子支配下遺伝子群の制御実態を、Northern blot法、RT-PCR法による標的遺伝子mRNAレベルの実測、蛍光蛋白やLacZをレポーターとしたプロモーター実測で確認した。

(5) 転写因子細胞内濃度の制御

大腸菌ゲノムの環境に応じた発現パターンの変化は、転写因子によるRNAポリメラーゼの遺伝子間分配制御で行われている。しかし、大腸菌300種の転写因子の細胞内濃度は、従来、殆ど解っていなかった。純化転写因子を利用して、特異抗体コレクションを作製した。抗体を利用したWestern blot法で、大腸菌転写因子の細胞内濃度と、その培養温度、培養液組成、増殖相による変動を網羅的測定に成功した。

(6) 転写因子ネットワーク全体像の解明

大腸菌300種転写因子の制御標的遺伝子の同定、プロモーター特異的転写因子の探索を通じて、遺伝子間相互作用の全体像を明らかにすることが出来た。

## 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 30 件)

研究課題関連主要論文

- ① Ishihama, A.: Prokaryotic genome regulation: Multi-factor promoters and multi-target regulators. *Proc. Jpn. Acad.* in press (2012) [査読有]
- ② Ogasawara, H., Shinohara, S. and Ishihama, A.: Regulation targets of metal-response BasS-BasR two-component system in *Escherichia coli*: Modification of cell membrane. *Microbiology* **158**, 1482-1492 (2012)

- [査読有]
- ③ Yamanaka, Y., Ishihama, A. and Yamamoto, K.: Induction of Yde0, a regulator for acid resistance gene, by ultraviolet irradiation in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 120041-1-2 (2012) [査読有]
- ④ Terui, Y., Akiyama, M., Sakamoto, A., Tomitori, H., Yamamoto, K., Ishihama, A., Igarashi, K. and Kashiwagi, K.: Increase in cell viability by polyamines through stimulation of the synthesis of ppGpp regulatory protein and  $\sigma^H$  protein in *Escherichia coli*. *J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 412-422 (2012) [査読有]
- ⑤ Mitobe, J., Yanagihara, I., Ohnishi, K., Ishihama, A. and Watanabe, H.: RodZ (YfgA), a bacterial cytoskeletal protein, regulates expression of type III secretion system in *Shigella sonnei* through post-transcriptional processing. *EMBO Reports* **12**, 911-916 (2011) [査読有]
- ⑥ Ogasawara, H., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Cross-regulation between biofilm formation and flagella synthesis: Role of biofilm master regulator CsgD. *J. Bacteriol.* **193** (10), 2587-2597 (2011) [査読有]
- ⑦ Shimada, T., Bridier, A., Briandet, R. and Ishihama, A.: Novel roles of LeuO in transcription regulation in *E. coli*: Antagonistic interplay with the universal silencer H-NS. *Mol. Microbiol.* **81**, (2011) [査読有]
- ⑧ Shimada, T., Fujita, N., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Novel roles of cAMP receptor protein (CRP) in regulation of transport and metabolism of carbon sources. *PLoS ONE* **6**(6): e20081 (2011) [査読有]
- ⑨ Shimada, T., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Novel members of the Cra regulon involved in carbon metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **193** (3), 649-659 (2011) [査読有]
- ⑩ Yamamoto, K., Ishihama, A., Busby, S. J. W. and Brainger, D. C.: The *Escherichia coli* K-12 MntR mini-regulon includes *dps* that encodes the major stationary phase DNA-binding protein. *J. Bacteriol.* **193** (6), 1477-1480 (2011) [査読有]
- ⑪ Ishihama, A.: Prokaryotic genome regulation: Multi-factor promoters, multi-target regulators and hierarchic networks. *FEMS Microbial Reviews*, **34**, 628-645 (2010) [査読有]
- ⑫ Ogasawara, H., Yamada, K., Kori, A., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: The *E. coli csgD* promoter: Interplay between eight transcription factors. *Microbiology* **156** (8), 2470-2483 (2010) [査読有]
- ⑬ Ogasawara, H., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Regulatory role of MlrA in transcription activation of *csgD*, the master regulator of biofilm formation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **312**, 160-168 (2010) [査読有]
- ⑭ Teramoto, J., Yamanishi, Y., Magdy, E-S.H., Hasegawa, A., Kori, A., Nakajima, M., Arai, F., Fukuda, T. and Ishihama, A.: Single live-bacterial cell assay of promoter activity and regulation. *Genes Cells* **15**, 1111-1112 (2010) [査読有]
- ⑮ 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.* **38**(11), 3605-3618 (2010) [査読有]
- ⑯ Terui, Y., Tabei, Y., Akiyama, M., Tomitori, H., Yamamoto, K., Ishihama, A., Igarashi, K. and Kashiwagi, K.: Ribosome modulation factor, an important protein for cell viability encoded by the polymulon modulon. *J. Biol. Chem.* **285**, 28698-28707 (2010) [査読有]
- ⑰ 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**, 6136-6144 (2009) [査読有]

- ⑬ Ishii, D., Ishihama, A. and Yamamoto, K.: Two modes of autoregulation of the *murR* repressor in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 90421-1-3 (2009)
- ⑭ 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]
- ⑮ Shimada, T., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Involvement of leucine-reponse transcription factor Leu0 in regulation of the genes for sulfa-drug efflux. *J. Bacteriol.* **191**, 4562-4571 (2009) [査読有]
- ⑯ 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**, 5348-5357 (2009) [査読有]
- ⑰ Yamamoto, K., Matsumoto, F., Minagawa, S., Oshima, T., Fujita, N., Ogasawara, N. and Ishihama, A.: Characterization of CitA-CitB signal transduction activating genes involved in anaerobic citrate catabolism in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 346-350 (2009) [査読有]

[学会発表] (計 120 件)

- ① Ishihama, A.: Global Regulation of Prokaryotic Genome Transcription. JN Centre for Advanced Scientific Research (JNCASR) Seminar, Bangalore, March 19, 2012
- ② 石浜 明: 「細菌ゲノム転写の包括制御機構」-ひとつの生物のすべての転写因子の制御機能の理解を目指して-。東北大学グローバル COE, Network Medicine 創生拠点、NM 高等教育セミナー、東北大

学医学部、2012 年 3 月 8 日

- ③ Lim, C. J., Lee, S. Y., Ishihama, A. and Yan, J.: Anaerobiosis-induced nucleoid associated protein Dan polymerizes along dsDNA to form rigid helical-like co-filament that is able to concatemalize. Biophys. Soc. Meet. "Dynamic DNA Packaging Across Kingdoms", Asilomar, California, USA, July 5-8, 2011
- ④ 石浜 明: 大腸菌環境応答におけるゲノム転写の包括制御。第 84 回日本生化学会大会、シンポジウム「再考 VNC: 細菌に学ぶ生存戦略」、京都・国際会議場, 2011 年 9 月 21-24 日
- ⑤ 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、九州大学先導物質化学研究所・福岡, 2011 年 2 月 9 日
- ⑥ Ishihama, A.: Prokaryotic Genome Regulation. Japan-India Collaborative Science Program Seminar, Centre for Cellular and Molecular Biology (CCMB), Hyderabad, India, March 17, 2010
- ⑦ Shimada, T., Fujita, N., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Genome-wide Genomic-SELEX Search of Regulation Targets by Transcription Factors. Jacques Monod Commemorative Minisymposium: Gene Expression and Signalling in Bacteria. Institut Pasteur, Paris, France. May 31, 2010
- ⑧ Ishihama, A.: Prokaryotic Genome Regulation: Multi-factor Promoters and Multi-target Regulators. 11<sup>th</sup> Asian Conference on Transcription (ACT), Nakijin Hall, Okinawa, Japan, July 1-5, 2010
- ⑨ Ishihama, A.: Prokaryotic Genome Regulation: Multi-factor Promoters and Multi-target Regulators. 2<sup>nd</sup> Florence Conference on Phenotype Microarray, Internatl. Conf. Hall, Pisa, Italy. Sept. 13-15, 2010
- ⑩ Ishihama, A., Ogasawara, H., Shimada, T., Teramoto, T., Kori, A., Yamada, K., Kobayashi, K., Katayama,

- T. and Yamamoto, K.: Multi-scale molecular genetics of prokaryotic genome regulation. 21st Internatl. Symp. Micro-NanoMechatronics Human Sci., Symp., Nagoya Univ., Nagoya, Japan, Nov. 7-10, 2010
- ⑪ 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」、日大・オープンリサーチセンター、2010年2月26日
- ⑫ 石浜 明: 大腸菌ゲノム転写制御の新发展。第9回微生物研究会、法政大学小金井キャンパス、2010年6月26日
- ⑬ Ishihama, A.: Genomic SELEX search for regulation targets by 100 species of uncharacterized transcription factors from *E. coli*. 12<sup>th</sup> Transcription Assembly, Chandigarh, India, March 2-5, 2009
- ⑭ Ishihama, A., Ogasawara, H., Shimada, T., Teramoto, J., Kori, A., Yamada, K., and Yamamoto, K.: Growth phase-dependent regulation of *csgD*, the master regulator of biofilm formation. 3<sup>rd</sup> Internatl. Conf. Environmental, Industrial and Applied Microbiology, BioMicroWorld, Lisbon, Portugal. Dec. 2-4, 2009
- ⑮ Ishihama, A., Teramoto, J., Ogasawara, H., Shimada, T. and Yamamoto, K.: Regulatory roles of nucleoid-associated proteins in *Escherichia coli*. 32<sup>nd</sup> Ann. Meet. Mol. Biol. Soc. Jpn, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan. Dec. 9-12, 2009
- ⑯ 石浜 明: 大腸菌ゲノム転写の包括制御。2008年度「べん毛研究交流会」、秋保グランドホテル、宮城、2009年3月9-11日
- ⑰ 石浜 明, 小笠原 寛、島田友祐、寺本潤: 細菌の環境金属応答のゲノム制御。メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会2009、東京大学・山上会館、2009年10月16-17日
- ⑱ 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、東京大学、東京、2009年10月16-17日
- ⑲ 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”、神戸ポートアイランド、神戸、2009年10月21-24日
- [図書] (計 10 件)
- ① Ishihama, A.: Detection of bacterial bahits: Single planktonic cells and assembled biofilm. In: *Nanomedicine in Diagnostics* (N. Rozlosnik, Ed.), Science Publishes, CRC Press, 2012, pp. 191-216.
- ② Ishihama, A.: Transcription factors and transcriptional apparatus in bacteria. In: *Encyclopedia of Systems Biology* (W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K-H. Cho and H. Yokota, Eds), Springer, 2012, In press
- ③ Ishihama, A.: Prokaryotic genome regulation: Multi-factor promoters, multi-target regulators and hierarchic networks. *FEMS Microbial Reviews*, **34**, 628-645 (2010)
- ④ 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.), ASM Press, Washington, DC., 2010. <http://www.ecosal.org>, 「インターネット出版」
- ⑤ 石浜 明: 原核生物 RNA ポリメラーゼ。「生化学事典」、花岡文雄、塩見晴彦 (編)、朝倉書店・東京、2010年、788

## 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