

機関番号：32675

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21710198

研究課題名(和文) 病原性遺伝子制御因子 LeuO によるゲノム転写包括制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of Transcriptional Regulation of Genome by Pathogenicity Transcription Factor LeuO.

研究代表者

島田 友裕 (SHIMADA TOMOHIRO)

法政大学・マイクロ・ナノテクノロジー研究センター・研究員

研究者番号：10535230

研究成果の概要(和文)：大腸菌病原性遺伝子制御因子と推定されている転写因子 LeuO については、先に我々はサルファ剤をはじめとする多剤耐性遺伝子群の制御を発見した。今回、LeuO によるゲノム発現制御機構の全体像の解明を目的とし、LeuO 支配下遺伝子群を網羅するために Genomic SELEX 実験を実施したところ、ゲノム上 140 カ所以上の LeuO 認識結合配列を同定し、125 の新規支配下遺伝子群の同定に成功した。その結果、LeuO が繊毛遺伝子群などのバイオフィーム形成遺伝子群の発現を制御していることが明らかとなり、病原性発揮に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To get insights into the regulatory role(s) of LeuO, attempts were made to identify the whole set of regulation targets using Genomic SELEX system. A total of 140 LeuO-binding sites were identified on the *E.coli* genome, 125 of which were newly identified. Taken together with our previous finding of the involvement of LeuO in multi-drug efflux, it was revealed that LeuO regulates a number of genes for biofilm formation including the genes for fimbriae formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：ゲノム発現制御、転写、病原性細菌、転写因子 LeuO、Genomic SELEX、薬剤耐性、サルファ剤耐性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

LeuO はロイシンの生合成遺伝子群の制御因子として同定された転写因子であるが、細胞内量が少なく、その作用機構は、殆ど分かっていなかった。近年になって、ゲノム上の数カ所でゲノム広域の転写サイレンシングに関与する核様体蛋白 H-NS との拮抗作用が提案されはじめた。H-NS サイレンシングは病原性細菌において病原性遺伝子群を制御す

ることが報告されているため、病原性遺伝子群の発現制御機構の理解には、LeuO のゲノム転写包括制御機構の解明が必要であった。

2. 研究の目的

申請者・島田は、転写因子のゲノム上認識結合領域を直接同定する Genomic SELEX 法を開発し、ゲノム転写包括制御機構の研究に従事して来た。その一環で LeuO についてもゲ

ノム発現制御機構の解明を目的に Genomic SELEX 実験を行っていたところ、Leu0 が薬剤耐性やバイオフィーム形成に関与する遺伝子群のプロモーター領域に結合することが分かってきた。また、それらのプロモーターは H-NS によってサイレンシングされていることが同定されていた。そこで、細菌における薬剤耐性獲得やバイオフィーム形成などの病原性発現機構の普遍的分子メカニズムの理解を目指して、Leu0 のゲノム転写包括制御機構の解明のための研究を提案した。

3. 研究の方法

本研究では、病原性遺伝子制御因子 Leu0 の支配下遺伝子群の同定による転写制御様式の解明を目指して、以下の研究を行った。

(1) Genomic SELEX 法により得られた Leu0 が認識結合する DNA 塩基配列をクローニング、シーケンシング(SELEX-clos 法)によって決定する。

(2) 純化 Leu0 を用いて、ゲルシフト実験を行い、結合を確認する。

(3) Leu0 の細胞内濃度を定量的 Western 法で計測する。

(4) 推定された支配下遺伝子群の mRNA レベルを Northern 法により解析し、転写への影響を確認する。

(5) 薬剤耐性への影響を Phenotype Microarray システムを用いて検証する。

(6) Genomic SELEX 法により得られたターゲット DNA の解析にタイリングマイクロアレイ(SELEX-chip 法)を用いる網羅的な解析法を確立する。

(7) SELEX-chip 法を用いて Leu0 の認識結合配列を網羅的に解析する。また H-NS についてもを行い、それらの結合領域を比較解析する。

(8) 新規支配下遺伝子群への制御機構を in vivo および in vitro の両面で解析する。

(9) Leu0 と H-NS の拮抗作用をゲルシフト実験により検証する。

(10) Leu0 の発現による細胞の接着性を Sand Column assay を用いて検証する。

(11) バイオフィーム形成を Confocal Scanning Laser Microscope を用いて観察する。

(12) これらを統合して、病原性遺伝子制御因子 Leu0 のゲノム転写包括制御機構による病原性遺伝子群の発現制御モデルを提唱する。

4. 研究成果

上記の研究計画で、2 年間の研究を実施し、以下の成果を得た。

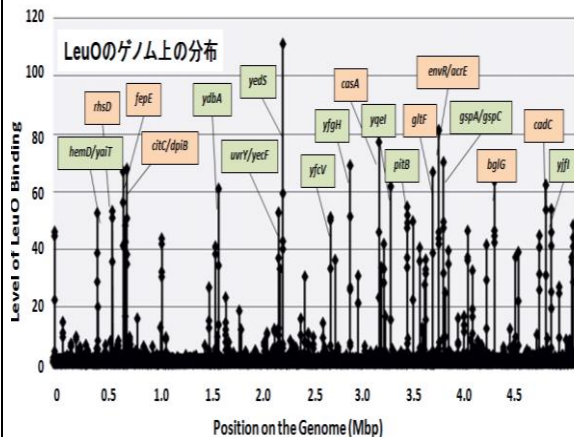
(1) 純化 Leu0 と、大腸菌ゲノム DNA 断片混合物を利用して、SELEX-clos 法により Leu0 が認識結合する配列を 12 カ所同定した。

(2) 12 カ所の結合領域に対して、ゲルシフト実験により特異的な結合を確認し、推定された支配下遺伝子群への転写制御の影響を同定した。特にいくつかの多剤耐性遺伝子群が Leu0 により直接的に活性化されることが示唆された。

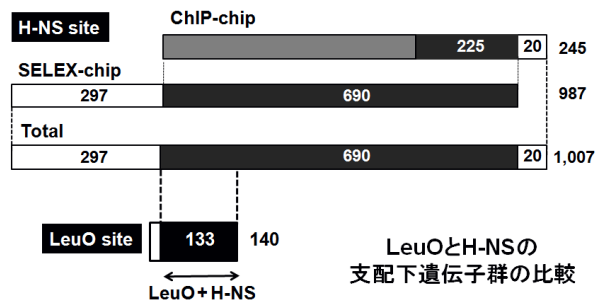
(3) Phenotype Microarray 解析により、Leu0 が多くの生育阻害剤に対する感受性を変化させる事が分かった。また、機能未知遺伝子をコードする *yjcRQP* オペロンがサルファ剤耐性に関与する事が分かり、*sdsRQP* (sulfa drug sensitivity determinant) と改名する事を提案した。

(4) 転写因子 CRP および Cra を用いてタイリングマイクロアレイを用いた SELEX-chip 法を確立し、親和性の低い Genomic SELEX DNA の解析を可能とした。

(5) SELEX-chip 法を用いて Leu0 の解析を行い、新規ターゲット 125 カ所を含む 140 カ所の結合領域を同定することに成功した。



(6) Leu0 の結合領域を解析したところ、そのほとんどが H-NS と重複している事が分かり、Leu0 が H-NS サイレncing に対してグローバルに拮抗し、支配下遺伝子群の発現調節を行う転写因子である事が示唆された。



(7) 細胞内濃度測定実験から、Leu0 と H-NS の細胞内濃度比が対数増殖期から定常期に移行するに従い、低下する事が分かった。このことから、Leu0 支配下遺伝子群は定常期になるに従い、発現が上昇すると考えられる。

(8) 支配下遺伝子群への制御機構を解析し、多くの絨毛遺伝子群および外膜たんぱく質が Leu0 により制御されている事が分かった。

(9) バイオフィーム形成能に与える影響を観察し、*Leu0*がバイオフィーム形成を促進させている事が分かった。

本研究により、*Leu0*の支配下遺伝子群が網羅的に同定され、*Leu0*によるゲノム転写包括制御機構の全体像が見えてきた。また、*Leu0*の病原性遺伝子群などの発現制御に関与する H-NS サイレンシングの大規模な解除様式が提案された。

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 3 件)

- ① Shimada, T., Yamamoto, K., Fujita, N. and Ishihama, A.: Novel Members of the cAMP Receptor Protein (CRP) Regulon for Transport and Metabolism of Carbon Sources. *PLoS ONE*. in press (2011). [査読有]
- ② Shimada, T., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Novel Members of the Cra Regulon Involved in Carbon Metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **193**, 649-59 (2011). [査読有]
<http://jb.asm.org/cgi/content/full/193/3/649?view=long&pmid=21115656>
- ③ Shimada, T., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Involvement of the leucine response transcription factor *LeuO* in regulation of the genes for sulfa drug efflux. *Journal of Bacteriology*. **191**, 4562-71 (2009). [査読有]
<http://jb.asm.org/cgi/content/full/191/14/4562?view=long&pmid=19429622>

[学会発表] (計 20 件)

- ① Shimada, T. *et al.*: Genome-wide Genomic-SELEX Search of Regulation Targets by Transcription Factors. Jacques Monod Commemorative Minisymposium. May 31. 2010. Paris. France.
- ② Shimada, T. *et al.*: Novel technologies for the genome-wide search of regulation targets by transcription factors: genomic SELEX and SELEX-chip. Micro- and Nano-Mechatronics and Human Science, 2009 IEEE International Symposium on IEEE Robotics and Automation Society, USA. Nov 9-11. 2009. Nagoya. Japan.

- ③ 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: Interplay between multiple transcription factors. 3rd Internatl. Conf. Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2009), 2009. Lisbon, Portugal.

- ④ Yamamoto, K., Shimada, T. and Ishihama, A.: Comprehensive analysis for the recognition sequences of DNA-binding transcription factors within the *E. coli* genome using the newly developed promoter chip. 21st RNA Polymerase Workshop, 2009. Bristol, UK

- ⑤ 島田友裕, 藤田信之, 山本兼由, 石浜明: ふたつの転写因子 CRP と Cra による大腸菌炭素源代謝遺伝子群の転写制御の全体像。2011 年度日本農芸化学会大会、2011 年 3 月。京都女子大学・京都。

- ⑥ 島田友裕, 藤田信之, 山本兼由, 石浜明: 大腸菌炭素源代謝制御のふたつの転写因子 CRP と Cra によるゲノム転写制御の全体像: Genomic SELEX 法を用いた解析。生化学・分子生物学会合同大会、2010 年 12 月。神戸ポートアイランド・兵庫。

- ⑦ 島田友裕, 藤田信之, 山本兼由, 石浜明: 大腸菌転写因子 CRP のゲノム上結合部位の全体像: Genomic SELEX 法を用いた解析。第四回日本ゲノム微生物学会年会、2010 年 3 月。九州大学・福岡県。

- ⑧ Tomohiro Shimada, Kaneyoshi Yamamoto, and Akira Ishihama: Involvement of the Leucine Response Transcription Factor *LeuO* in Regulation of the Genes for Sulfa Drug Efflux. 第 3 2 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月。パシフィコ横浜・神奈川。

- ⑨ 島田友裕, 山本兼由, 石浜明: Genomic SELEX を用いた大腸菌転写因子 *Leu0* の転写制御機構解析。第 6 回 2 1 世紀大腸菌研究会、2009 年 6 月。KKR ホテル熱海・静岡。

[図書] (計 2 件)

- ① Shimada, T. *et al.*: Genomic SELEX for the genome-wide search of regulation targets by transcription factors: SELEX-clos and SELEX-chip procedures. In: *Micro- and*

Nano-Mechatronics and Human Science
(Fukuda, T. eds.), pp. 259-261 (2009)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 友裕 (SHIMADA TOMOHIRO)

法政大学・マイクロ・ナノテクノロジー研究
センター・研究員

研究者番号：10535230