

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710214

研究課題名(和文)代謝制御ネットワークにおける転写因子CRPのアセチル化の役割の解析

研究課題名(英文)Role of acetylation of transcription factor CRP in network of metabolic regulation

研究代表者

島田 友裕 (Shimada, Tomohiro)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：10535230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌を用いて、代謝状態や生育の変化における炭素源代謝グローバルレギュレーターCRPのアセチル化修飾状態の変化およびアセチル化が、CRP支配下遺伝子プロモーターの転写制御に与える影響を観察した。CRPおよび転写装置であるRNA polymeraseのゲノム上の結合領域の同定に成功し、ゲノム転写制御の分子機構を理解するための基盤を築いた。また、CRPがrmfを転写制御する事により、リボソームの100S形成が促進されることを明らかとした。この分子機構は代謝と翻訳の活性をリンクさせる分子機構となることを提案した。

研究成果の概要(英文)：It was observed that the variation of acetylation level of CRP (cAMP receptor protein) along growth phase and examined the effect of acetylated CRP for promoter activity of under regulated genes in Escherichia coli. We succeeded the identification of the genome distribution of CRP and RNA polymerase. It is useful to understand the molecular mechanism of transcriptional regulation of E.coli genome. It is also revealed that CRP enhanced formation of 100S ribosome by transcriptional activation of rmf (ribosome modulation factor).

研究分野：ゲノム転写制御

キーワード：CRP アセチル化 RMF 100Sリボソーム Genomic SELEX RNAポリメラーゼ ゲノム転写制御 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

本研究は、ゲノム転写制御、アセチル化制御、代謝・翻訳制御に密接に関連した研究である。それぞれの背景について以下に述べる。

(1) 研究開始当初までに 2000 種類を超える生物のゲノム配列が決定され、生物の持つ遺伝子の全体像が明らかとなってきた。しかし、ゲノム上にはなお、生理機能未知の遺伝子が多い。加えて、発現され利用される遺伝子の選択の仕組みについては殆ど知られていない。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。

(2) アセチル化による活性制御は、真核生物での解析が進んできたが、原核生物では殆ど解析されていなかった。最近、大腸菌においてもアセチル化タンパク質の網羅的な同定が行われ、また、近縁種のサルモネラ菌において解糖系や TCA 回路の中心代謝経路酵素群の活性がアセチル化によって調節されている事が報告された。その中で、転写因子 CRP の 101 番目のリジン残基がアセチル化されることが報告された。これまでに研究代表者は炭素源代謝グローバルレギュレーターである転写因子 CRP によるゲノム転写制御機構の解析を行ってきており、炭素源代謝における遺伝子発現制御の新規ネットワークを提案してきた。

(3) 研究代表者が行ってきた CRP のゲノム転写制御の解析により、*rmf* (Ribosome Modulation Factor) およびリボソームタンパク質の一部が CRP の標的である事が提案されていた。リボソームはタンパク質を合成する装置であり、その活性は代謝や増殖の状態によって制御されているが、その制御の分子機構はまだ不明な点が多い。RMF は 100S リボソームを形成する因子で定常的に細胞内濃度が上昇することが分かっていたが、代謝とのつながりは不明であった。そのため、CRP が *rmf* を制御する事が、代謝活性制御と翻訳活性制御をつなぐ分子機構である可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では CRP を中心として、そのアセチル化によるゲノム転写制御における役割、および、*rmf* の転写制御の解析による代謝活性制御と翻訳活性制御をつなぐ分子機構について研究することとした。

(1) 炭素源代謝グローバルレギュレーター CRP は RNA polymerase (RPase) との相互作用部位から、同じ転写活性化に働いていても、プロモーター上流に結合して RPase のプロモーターへのリクルートを促進する ClassI 型制御と、プロモーター領域に結合して RPase の開鎖複合体形成を促進する ClassII 型制御に分類される事が報告されており、CRP の 101 番目のリジン残基をアラニンに置換すると ClassII 型制御の転写活性が著しく減少するが、ClassI 型制御の転写活性には影響が無いとの報告があった。すなわちこれらの報告から、CRP はそのアセチル化レベルに応じて ClassI 型と ClassII 型の支配下プロモーター群を特異的に調節していることが推測される。このような転写因子のアセチル化による支配下プロモーター群の使い分け機構はこれまでに報告が無く、この機構を実証できれば、ゲノム転写制御機構解明の新たな突破口になるであろう。また、この事は蛋白のアセチル化が、代謝制御ネットワークにおいてアセチル化制御が、酵素活性調節による代謝制御ネットワークと転写因子の修飾による遺伝子発現調節ネットワークを結ぶ重要なリンクを提案できる可能性が生まれる。そこで、炭素源代謝のグローバルレギュレーターである CRP のアセチル化による支配下プロモーター群の使い分け機構、およびゲノム包括転写制御機構の解析を開始した。

(2) 代謝活性と翻訳活性は細胞に必須の機構であり、協調して制御されていると考えられているが、その分子機構は不明な点が多い。研究代表者のこれまでの研究から、代謝制御のグローバルレギュレーターである CRP がリボソーム活性調節因子の *rmf* およびリボソームタンパク質を転写制御している可能性が示唆されていた。これは代謝と翻訳の活性を協調制御する分子機構と考えられる。そこで、CRP による *rmf* およびリボソームタンパク質の転写制御を実証することを目的とした。

3. 研究の方法

具体的に以下の研究内容を実施した。

(1) CRP による *rmf* およびリボソームタンパク質の転写制御の解析を目標に以下の実験を実施した。ゲルシフトアッセイを用いて CRP と *rmf* およびリボソームタンパク質のプロモーター断片の結合を検証した。DNaseI フットプリンティングアッセイを用いて結合領域を同定した。また CRP のコンセンサス配列を確認した。プロモーター活性への影響を、LacZ をレポーターに用いて検証した。ウェスタンブロットング法を用いて、細胞内の RMF の発現量を検証した。また、cAMP による影響を観察した。100S リボソームの形成を検証した。また cAMP、および cAMP 合成酵素をコードする *cyaA* 遺

伝子の影響も検証した。

(2) 代謝制御ネットワークにおける CRP のアセチル化の役割の解析を目標に以下の実験を実施した。アセチル化リジン抗体を用いて、アセチル化および脱アセチル化酵素による CRP のアセチル化レベルの変化を検証した。さらにアセチル化および脱アセチル化酵素をコードする遺伝子破壊株や過剰発現株を作製し、アセチル化レベルをコントロールできる条件を検証した。生育環境の変化や異なる炭素源代謝における細胞内 CRP のアセチル化レベルの変化を観察した。CRP のアセチル化部位を LC-MS/MS 解析を用いて観察した。CRP のアセチル化部位に変異を導入した際の、アセチル化レベルの変化を観察した。LacZ をレポーター遺伝子として、支配下プロモーターへの CRP のアセチル化の影響を観察した。ノーザンブロットング法を用いて、転写制御への CRP のアセチル化の影響を観察した。

4. 研究成果

(1) 炭素源代謝グローバルレギュレーター CRP による 100S リボソーム形成因子 *rmf* およびリボソームタンパク質の転写制御の解析から以下のことが提案された。

ゲルシフトアッセイの結果、*rmf* およびリボソームタンパク質のプロモーターへ CRP が結合する事が実証された。またその結合が cAMP 依存的であることが実証された。DNaseI フットプリンティングアッセイの結果から、プロモーターの結合領域が同定された。また結合領域には CRP のコンセンサス配列と一致する配列が存在していた。CRP は *rmf* およびリボソームタンパク質のプロモーターに対して、活性化因子として働いていることが同定された (図 1)。

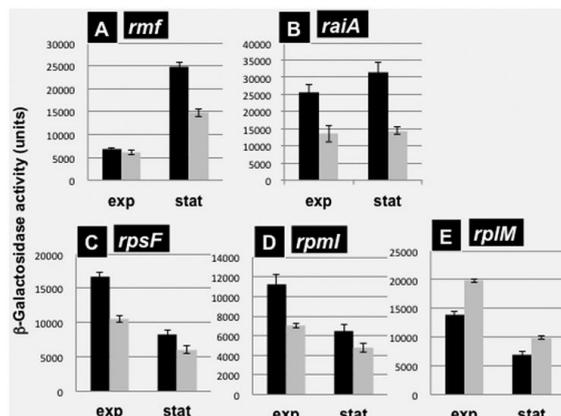


図 1、対数増殖期および定常期における、*rmf* およびリボソームタンパク質遺伝子のプロモーター活性に与える *crp* 欠損の影響の観察結果。

二次元電気泳動解析により、CRP により RMF の細胞内の発現が誘導されていることが同定された。また、cAMP や *cyaA* に依存し

ている事が示された。100S リボソーム形成の観察により、100S リボソーム形成が CRP および cAMP により促進されていることが同定された (図 2)。

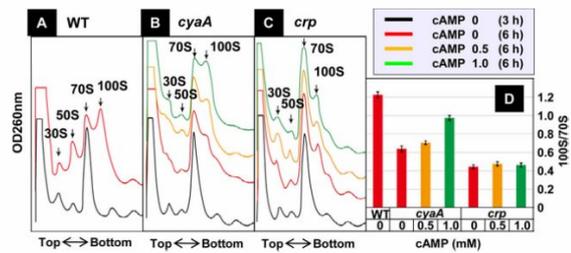


図 2、炭素源代謝グローバルレギュレーター *crp*、cAMP および cAMP 合成酵素 *cyaA* が 100S リボソーム形成に与える影響の観察結果。

これらの結果を総合し、炭素源代謝のグローバルレギュレーター CRP が転写制御を介して 100S リボソームの形成因子 RMF の発現を活性化し、100S リボソームの形成を促進していることが同定された。これにより、代謝制御と翻訳活性制御を結ぶ新規な分子機構が提案され、原著論文として報告した。(Shimada et al., 2013. 発表論文の 2 を参照)

(2) 代謝制御ネットワークにおける CRP のアセチル化の役割の解析から以下のことが提案された。

CRP のアセチル化レベルの変動を観察するために、アセチル化ターゲット部位候補のリジン残基をアラニンに置換した発現ベクターを構築し、*crp* 欠損株に形質転換し、細胞の生育を観察したところ、53 番目のリジン残基をアラニン残基に置換した CRP は、酢酸を単一炭素源とした培地において生育を著しく遅延させることが分かった。また、脱アセチル化酵素の *cobB* 欠損株では 102 番目のリジン残基をアラニン残基に置換した株でも生育が低下した。解糖系が活性化しているグルコース存在下で CRP のアセチル化レベルが高かったが、TCA 回路が活性化するグルコース非存在下ではアセチル化レベルが低かった (図 3)。

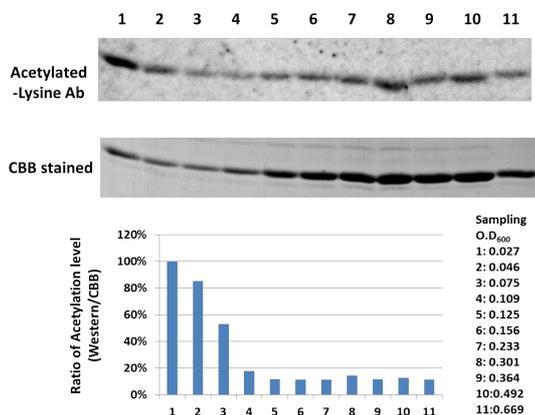


図 3、炭素源の切り替えに応じた CRP のアセチル化レベルの変化の観察結果。

島田友裕。大腸菌炭素源代謝グローバルレギュレーターCRPの新規機能。国立遺伝学研究所 2013 年度研究集会、2013 年 10 月 24 日、国立遺伝学研究所(静岡県)。

島田友裕、斎藤菜摘、田中 寛。大腸菌をモデル生物とした細胞の代謝・増殖制御機構の解明。第七回メタボロームシンポジウム、2012 年 10 月 11 日、慶應義塾大学鶴岡キャンパス(山形県)。

島田友裕、山崎由紀子、石浜 明。大腸菌ゲノムのサイレンシング機構。第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、福岡国際会議場(福岡県)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 友裕 (SHIMADA, Tomohiro)
東京工業大学・資源化学研究所・助教
研究者番号：10535230