

令和元年5月23日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07195

研究課題名(和文)大腸菌ゲノム転写制御における全シグマ因子の支配下全プロモーターの決定

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

研究代表者

島田 友裕 (Shimada, Tomohiro)

明治大学・農学部・専任講師

研究者番号：10535230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：1つの生物の遺伝子発現の仕組みの全体像を本質的に理解する目的で、大腸菌をモデル生物としてRNAポリメラーゼが単独で認識できるプロモーターをゲノムレベルで同定する事を目指した。大腸菌のRNAポリメラーゼのホロ酵素は、コア酵素に全7種類のシグマ因子のいずれかが会合して形成される。そこで、それぞれのホロ酵素を精製し、genomic SELEX法を用いてゲノム上標的遺伝子の同定を試みた。その結果、RpoD, RpoS, RpoH, RpoF, RpoEの5つのシグマ因子について、ゲノム上結合領域を同定する事に成功した。また、各シグマ因子の細胞内濃度を測定し、細胞内における活性を併せて検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸菌の持つ全7種類のシグマ因子のうち、RpoD, RpoS, RpoH, RpoF, RpoEの5つのシグマ因子について、RNAポリメラーゼホロ酵素単独で認識されるプロモーターの同定に成功した。また、それらの結果を統合し、ゲノム転写制御機構の全体像のモデルを提案した。そして、その成果を原著論文として発表した。これらの成果は、生物がゲノムにある遺伝子を利用する仕組みの本質的な理解に役立つと考えられる。また、本成果の情報は、モデル生物である大腸菌の研究コミュニティでも活用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The promoter selectivity of Escherichia coli RNA polymerase (RNAP) is determined by the sigma subunit. The model prokaryote Escherichia coli K-12 contains seven species of the sigma subunit, each recognizing a specific set of promoters. For identification of the “constitutive promoters” that are recognized by each RNAP holoenzyme alone in the absence of other supporting factors, we have performed the genomic SELEX screening in vitro for their binding sites along the E. coli K-12 W3110 genome using each of the reconstituted RNAP holoenzymes and a collection of genome DNA segments of E. coli K-12. The whole set of constitutive promoters for each RNAP holoenzyme was then estimated based on the location of RNAP-binding sites. Five sigma factors, RpoD, RpoS, RpoH, RpoF, RpoE were succeeded to identify the constitutive promoters, and the list was published in original article. The list of constitutive promoters provides the fundamental catalogs for the promoter recognized in E.coli.

研究分野：ゲノム転写制御

キーワード：ゲノム 転写制御 RNAポリメラーゼ シグマ因子 Genomic SELEX 遺伝子発現 大腸菌 constitutive promoter

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに 30,000 種類を超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、発現され利用される遺伝子の選択システムにおいて、ゲノムレベルにおける分子機構については殆ど分かっていない。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。

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、SELEX-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。本手法の特徴は、精製した純化タンパク質を用いることで純化タンパク質単独で結合可能な標的配列が得られること、また、細胞内では拮抗因子が存在する場合はその影響を受けないこと、が挙げられる。そこで本研究では、ゲノムを対象としたプロモーター認識システムを理解するために、転写装置本体である RNA ポリメラーゼの全プロモーターの決定を試みた。

2. 研究の目的

本研究は、大腸菌の持つ全シグマ因子の支配下全プロモーターの決定を目的として実施された。大腸菌はプロモーターを認識するためのシグマ因子を全 7 種類持っており、それらは生育に関する遺伝子群の主な転写を行う Major sigma factor である RpoD に加え、Minor sigma factor として、RpoN (窒素同化シグマ因子)、RpoS (定常期適応シグマ因子)、RpoH (熱ストレス応答シグマ因子)、RpoF (鞭毛形成シグマ因子)、RpoE (外膜ストレス応答シグマ因子)、Fecl (鉄取り込みシグマ因子) である。これらのシグマ因子の支配下プロモーターについての知見は、生体内における実験結果によるものがほとんどであった。そこで、これら全シグマ因子について SELEX-chip 法を用いて、ホ口酵素単独で結合する constitutive promoter を同定し、さらに、これまでの知見と比較解析することで、何らかの補助因子が必要な inducible promoter と区別する事を目指した。

3. 研究の方法

全シグマ因子について各 RNA ポリメラーゼホ口酵素のゲノム上の標的配列を決定するために、SELEX-chip 法を用いてゲノム上結合配列の同定を実施した。その結果を基盤として、ホ口酵素単独で認識可能な constitutive promoter と補助因子の必要な inducible promoter のリストの作成を行った。さらに細胞内における各シグマ因子の活性を検討した。本研究では、以下に示す実験を実施した。

各シグマ因子の ORF をタンパク質の高発現ベクター pET21 にクローニングしてそれぞれラムクロマトグラフィーを用いて精製した。RNA ポリメラーゼコア酵素を大腸菌細胞から精製した。精製したコア酵素は各シグマ因子の抗体を用いて、シグマ因子が含まれていないことを確認した。精製したコア酵素と各シグマ因子を試験管内で混合させ、単一シグマ因子を含むホ口酵素として再構築したものを Genomic SELEX 法に用いた。既に構築されているゲノム DNA のライブラリーから PCR で 200bp から 300bp のゲノム DNA 断片を増幅させ、ホ口酵素と反応させて、結合した DNA 断片を精製した。精製は RNA ポリメラーゼコア酵素のサブユニットである RpoC の抗体および A/G ビーズを用いて行った。Genomic SELEX 法により精製した DNA 断片、および元のゲノムライブラリー DNA をそれぞれ Cy3, Cy5 を用いて蛍光標識した後、タイリングアレイ (chip) 上で拮抗させながらハイブリダイズさせたものを、定量分析して、ゲノム上の結合領域を決定した。同定されたゲノム上の結合領域を元に、標的遺伝子を同定した。それらの情報から、それぞれのシグマ因子についてホ口酵素単独で認識可能なプロモーターである constitutive promoter のリストを作製した。また、これまでの知見と比較し、本実験で得られなかったプロモーター、すなわち何らかの補助因子が必要な inducible promoter のリストを作製した。それぞれのシグマ因子の情報を比較解析し、ゲノム上の結合領域の特徴を分析した。細胞内における活性を検証するために、ウェスタンブロットティング法を用いて、増殖期および定常期の細胞におけるシグマ因子の細胞内濃度を測定した。

4. 研究成果

大腸菌の全 7 種類のシグマ因子について、gSELEX 法を用いて Constitutive promoter の同定を試みたところ、RpoD, RpoN, RpoS, RpoH, RpoF, RpoE について、それぞれの主要な既知標的のプロモーターを含むゲノム上の標的領域を同定する事に成功した (図 1)。また、その結果を基盤として各シグマ因子のプロモーターリストを作成した (表 2)。さらにそれぞれのシグマ因子の細胞内濃度を測定し、細胞の増殖相に応じた細胞内濃度変化を比較した (図 2)。そのうち、RpoD, RpoS, RpoH, RpoF, RpoE については、ゲノム制御機構および新規な役割を議論し、学術論文として公開・発表した (発表論文)。また、それらの情報は、研究代表者が運営してい

大腸菌の転写因子データベース [Transcription Profile of Escherichia coli (TEC)]を通じて情報公開した。

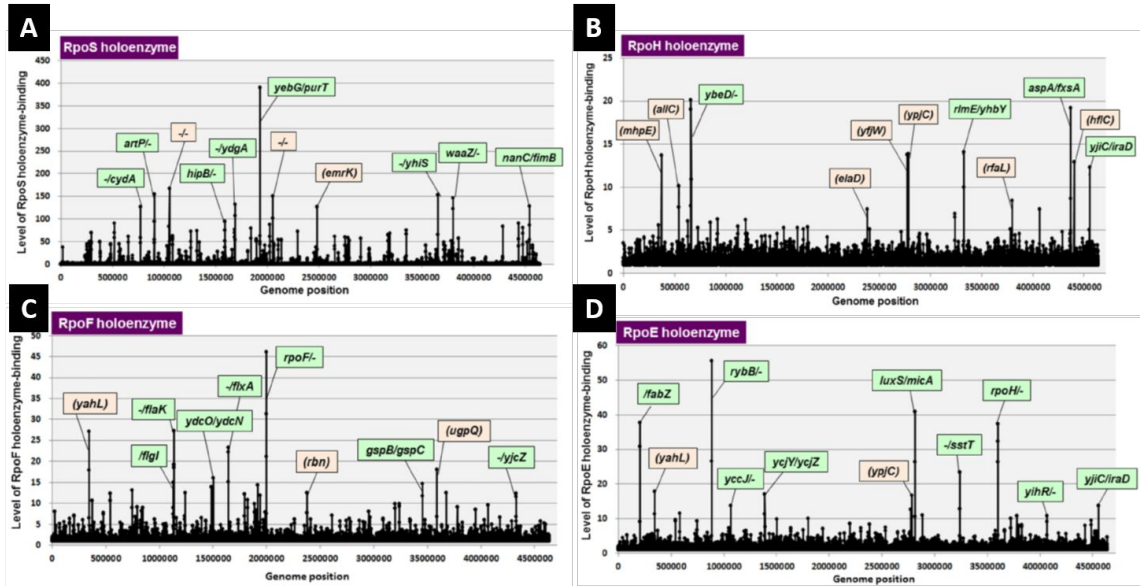


図1、SELEX-chip法により観察された、シグマ因子によるRNAポリメラーゼホロ酵素の大腸菌ゲノム上結合領域の変化。縦軸は結合強度、横軸は大腸菌ゲノムの位置情報を示す。(A)RpoS：定常期適応シグマ因子 (B)RpoH：熱ストレス応答シグマ因子, (C)RpoF：鞭毛形成シグマ因子, (D)RpoE：外膜ストレス応答シグマ因子。

No	Type	Map	Gene Function	Left	D	RpoS	D	Right	Gene Function	Intensity
1	D	17732		<i>sokC</i>	>	<i>nhaA</i>	>	<i>nhaR</i>	transcriptional activator	5.3
2	A	41946	predicted transporter	<i>caiT</i>	<		<	<i>fixA</i>	electron transfer flavoprotein	3.6
3	B	63256	RNAP-associated helicase	<i>hepA</i>	<		<	<i>polB</i>		3.8
4	D	238050		<i>aspV</i>	>	<i>yafT</i>	<	<i>ykfM</i>		19.0
5	B	251970		<i>dinB</i>	>		>	<i>yafN</i>	YafO-YafN toxin-antitoxin system	45.1
6	B	289870	ornithine carbamoyltransferase 2	<i>argF</i>	<		<	<i>insB</i>		25.0
7	D	296234	CP4-6 prophage protein	<i>yagN</i>	<	<i>intF</i>	>	<i>ptwF</i>	Xaa tRNA	70.4
8	A	296336	CP4-6 prophage integrase	<i>intF</i>	<		<	<i>ptwF</i>	Xaa tRNA	45.5
9	A	328672	transcriptional repressor	<i>betI</i>	<		>	<i>betT</i>	choline transporter	3.8
10	B	379186	frmRAB operon regulator	<i>frmR</i>	<		<	<i>yafO</i>		50.8
11	A	383968	conserved protein	<i>yafS</i>	<		>	<i>tauA</i>	taurine transporter	24.1
12	D	451740	cytochrome o ubiquinol oxidase	<i>cyoA</i>	<	<i>ampG</i>	<	<i>yajG</i>		5.9
13	B	455746		<i>tig</i>	>		>	<i>cipP</i>	ATP-dependent serine protease	7.4
14	B	467530		<i>cof</i>	>		>	<i>ybaO</i>	DNA-binding transcriptional regulator	11.5
15	D	479868	modulator of gene expression with H-NS	<i>hha</i>	<	<i>tomB</i>	<	<i>acrB</i>		45.1
16	B	480454	predicted protein	<i>tomB</i>	<		<	<i>acrB</i>		22.6
17	A	515034	membrane anchored protease	<i>qmcA</i>	<		>	<i>ybbL</i>	ABC superfamily transporter	70.3
18	D	532860		<i>allA</i>	>	<i>allR</i>	>	<i>gcl</i>	glyoxylate carboligase	3.5
19	D	562966		<i>sfmH</i>	>	<i>sfmF</i>	>	<i>flmZ</i>		45.3
20	D	569366		<i>emrE</i>	>	<i>ybcK</i>	>	<i>ybcL</i>	DLP12 prophage kinase inhibitor	6.8

表1、RNAポリメラーゼホロ酵素の各結合領域および近傍遺伝子の機能情報のリストの一部抜粋。RpoDは1320カ所、RpoSは218カ所、RpoHは133カ所、RpoFは105カ所、RpoEは126カ所のゲノム上結合部位が同定された。それぞれのシグマ因子について、各結合領域に対するこの形式のリストを作成した。

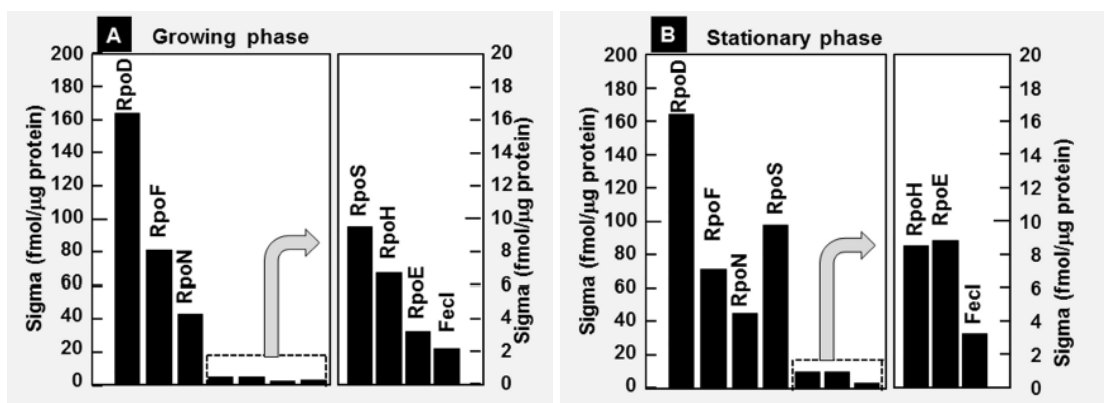


図2、大腸菌における7種類のシグマ因子の細胞内濃度の変化。(A)細胞の増殖期における細胞内濃度。(B)定常期における細胞内濃度。

これらの結果を統合し、大腸菌ゲノム転写制御機構について議論し、制御モデルを提案した(発表論文参照)。本研究成果は大腸菌のゲノム転写制御機構の本質を理解するために役立つ。またこれらの情報は、大腸菌を研究するコミュニティで活用されることが期待される。

RpoNに関しては Constitutive promoter の同定には成功した一方で、転写の開始には Enhancer と呼ばれるATP加水分解をエネルギーとした補助因子が必要である事が報告されている。また Fecl に関して、プロモーターへの結合には何らかの補因子が必要とされるとの報告

がある。そのため、RpoN や FecI のゲノム転写制御を理解するためには、補助因子群との関連性を含めたさらなる研究が必要であると考えている。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

Shimada Tomohiro, Yamamoto Kaneyoshi, Nakano Masahiro, Watanabe Hiroki, Schleheck David, Ishihama Akira. Regulatory role of CsqR (YihW) in transcription of the genes for catabolism of the anionic sugar sulfoquinovose (SQ) in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*. 165:78-89. 2019. 査読有.

DOI: 10.1099/mic.0.000740

Yoshida Hideji, Shimada Tomohiro, Ishihama Akira. Coordinated Hibernation of Transcriptional and Translational Apparatus during Growth Transition of *Escherichia coli* to Stationary Phase. *mSystems*. 3:1-22. 2018. 査読有.

DOI:10.1128/mSystems.00057-18

Shimada Tomohiro, Ogasawara Hiroshi, Ishihama Akira. Genomic SELEX Screening of Regulatory Targets of *Escherichia coli* Transcription Factors. *Methods in Molecular Biology*. 1837:49-69. 2018. 査読有.

DOI:10.1007/978-1-4939-8675-0_4

Shimada Tomohiro, Ogasawara Hiroshi, Ishihama Akira. Single-target regulators form a minor group of transcription factors in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*. 46:3921-3936. 2018. 査読有.

DOI:10.1093/nar/gky138

Shimada Tomohiro, Tanaka Kan, Ishihama Akira. The whole set of the constitutive promoters recognized by four minor sigma subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase. *PLoS ONE*. 12. 2017. 査読有.

DOI:10.1371/journal.pone.0179181

Shimada Tomohiro, Momiyama Eri, Yamanaka Yuki, Watanabe Hiroki, Yamamoto Kaneyoshi, Ishihama Akira. Regulatory role of XynR (YagI) in catabolism of xylonate in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiology Letters*. 364. 2017. 査読有.

DOI:10.1093/femsle/fnx220

Yamamoto Kaneyoshi, Yamanaka Yuki, Shimada Tomohiro, Sarkar Paramita, Yoshida My, Bhardwaj Neerupma, Watanabe Hiroki, Taira Yuki, Chatterji Dipankar, Ishihama Akira. Altered Distribution of RNA Polymerase Lacking the Omega Subunit within the Prophages along the *Escherichia coli* K-12 Genome. *mSystems*. 3. 2018. 査読有.

DOI:10.1128/mSystems.00172-17

Shimada Tomohiro, Tanaka Kan, Ishihama Akira. Transcription factor DecR (Yba0) controls detoxification of L-cysteine in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 162:1698-1707. 2016. 査読有.

DOI:10.1099/mic.0.000337

[学会発表] (計 9 件)

島田友裕、小笠原寛、石浜 明. 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. 第 4 1 回日本分子生物学会年会. 2018 年.

吉田秀司、島田友裕、牧泰史、古池晶、上田雅美、和田千恵子、和田明、石浜明. 100S リボソームの形成に關する転写因子. 第 4 1 回日本分子生物学会年会. 2018 年.

堀田修平、島田友裕、平田 章、石浜 明、小笠原寛. TetR-family 大腸菌転写因子 RcdA による biofilm master regulator 遺伝子 *csgD* 発現活性化機構の解明. 第 4 1 回日本分子生物学会年会. 2018 年.

島田友裕. Genomic SELEX 法を用いた大腸菌転写制御ネットワークの解明. 第 1 7 回微生物研究会. 2018 年. (招待講演)

安西拓実、石浜明、島田友裕. 大腸菌におけるピルビン酸応答転写因子 PdhR によるゲノム転写制御ネットワークの解明. 第 1 7 回微生物研究会. 2018 年.

山内恭子、石浜明、島田友裕. 大腸菌における N-アセチルガラクトサミン応答転写因子 AgaR によるゲノム転写制御ネットワークの解明. 第 1 7 回微生物研究会. 2018 年.

島田友裕. Genomic SELEX 法を用いた大腸菌転写制御ネットワークの解明. 遺伝研研究会. 2018 年.

吉田秀司、島田友裕、牧泰史、古池晶、上田雅美、和田千恵子、和田明、石浜明. 100S リボソーム形成因子 RMF と抗シグマ因子 Rsd の発現制御. 第 4 0 回日本分子生物学会年会. 2017 年.

吉田秀司、島田友裕、牧泰史、古池晶、上田雅美、和田千恵子、和田明、石浜明. 抗シグマ因子 Rsd と 100S リボソーム形成因子 RMF の発現を制御する転写因子群. 第 3 9 回日本分子生物学会年会. 2016 年.

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：石浜 明

ローマ字氏名：Ishihama Akira

法政大学マイクロ・ナノテクノロジー研究所、特任教授

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。