法政大学学術機関リポジトリ
HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

PDF issue: 2025-07-04

ひとつの生物のすべての転写因子の制御機能の解明

石浜, 明 / ISHIHAMA, Akira

(雑誌名 / Journal or Publication Title)
科学研究費助成事業 研究成果報告書
(開始ページ / Start Page)
1
(終了ページ / End Page)
6
(発行年 / Year)
2016-05

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ５ 月 ２５ 日現在

機関番号：３２６７５
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５４３０１７３

研究課題名（和文）ひとつの生物のすべての転写因子の制御機能の解明

研究課題名（英文）Identification of Regulatory Roles of All Transcription Factors from a Single Organism

研究代表者
石浜　明（ISHIHAMA, Akira）

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：８００１９８６９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,100,000円

研究成果の概要（和文）：細菌ゲノムに含まれる数千遺伝子から、転写遺伝子の選択と転写レベル決定は、転写酵素RNAポリメラーゼが、２段階での転写調節因子（シグマ因子と転写因子）との相互作用で決定される。大腸菌の7種類シグマ因子と約300種転写因子の全てに関して、独自に開発したSELEX法を利用し、認識し制御する遺伝子セットを同定し、その基盤で、制御標的遺伝子セットを個別に同定した。これは、『ひとつの生物のすべての転写因子の制御機能解明』を同定した、ゲノム新時代最初の画期的成果である。成果は、TEC データベースとして、国立遺伝学研究所から公開した。

研究成果の概要（英文）：The genome of the model prokaryote Escherichia coli contains approximately 4,500 genes. Expression pattern of the genome is determined through selective transcription by the RNA polymerase. Its gene selectivity is controlled at two steps through interaction with seven sigma factors and about 300 transcription factors. For identification of regulatory targets by transcription regulators, we identified their binding sites on the E. coli genome using Genomic SELEX system. We have so far identified the regulatory targets for all seven sigma factors and for more then 250 transcription factors. The results altogether are assembled into a single database TEC (Transcription Profile of Escherichia coli) (www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/tec/), which is now open to public through NIG (National Institute of Genetics). Noteworthy is that this is the first success of identification of the regulatory roles of the whole set of transcription regulators form a single organism.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写因子　RNAポリメラーゼ　シグマ因子　ゲノム制御　転写調節　大腸菌　SELEX

１．研究開始当初の背景

ゲノム全構造解明で幕を開けた 21 世紀の生命科学研究のひとつの標的は、ゲノムにある遺伝子セットから、生物生存環境に応じて、特定の遺伝子セットを選択的に発現利用する仕組みの解明である。この目的の研究では、遺伝子総数約 4,500 で、個別遺伝子の機能や制御の知見が最も豊富なモデル生物大腸菌が格好の対象となる。我々は、大腸菌ゲノムの転写は、2,000 分子の転写酵素 RNA ポリメラーゼの２段階での転写調節蛋白との相互作用で、転写対象標的を変換することでなされるモデルを提唱して来た（図１）。このモデルを実証する目的で、大腸菌の転写調節因子全ての制御機能解明の壮大な目標を設定し、過去基盤研究(B)「大腸菌の全ての機能未知転写因子の支配下遺伝子群の同定と制御様式の解明」(平成 18-20)、基盤研究(A)「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」(平成 21-23)で研究を継続して来た。本研究を最終局面の仕上の研究として実施した。

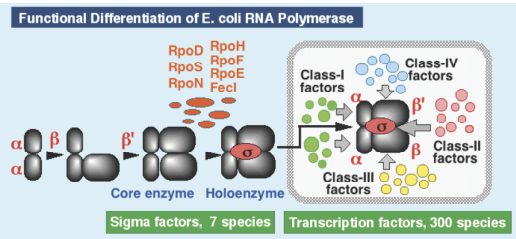

図１. RNA ポリメラーゼの機能分化モデル

２．研究の目的

大腸菌の RNA ポリメラーゼの転写標的選択性は、7 種類のシグマ因子と全 300 種類の転写因子で制御されている（図１）。これら全ての転写調節蛋白の制御標的同定を目標とし、これまでに、20 年以上に亘って、全てのシグマ因子、全ての転写因子を精製して来た。10 年前からは、新たに開発した Genomic SELEX 法（図２）を利用し、これら転写調節蛋白の制御支配下遺伝子群の同定を開始した。本研究では、(1)全シグマ因子、全転写因子の制御支配下遺伝子群の同定。(2)全シグマ因子、全転写因子の制御機能の解明を目指し、(3)成果を論文として公表すると伴に、大腸菌転写データベースを構築し、広く情報を共有するシステムを構築し、これらを総合して(4)**『ひとつの生物のすべての転写因子の制御機能解明』**を初めて達成した記念碑として完成させたい。

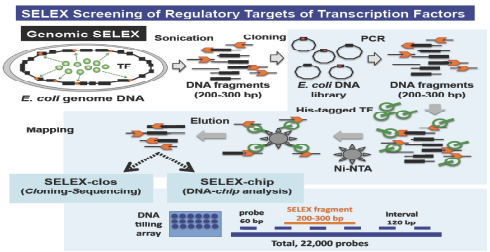

図２. 転写因子制御標的同定の SELEX 法

３．研究の方法

大腸菌全７種シグマ因子、全 300 種転写因子の発現系を構築して大量発現し精製した。それらの制御支配下遺伝子群は、新たに構築した Genomic SELEX 法（図２）で同定した。SELEX 法で推定した制御標的に関しては、個別に、*in vitro* 転写、*in vivo* 転写を解析することで確認した。

４．研究成果

モデル生物大腸菌のゲノム転写パターンは、転写酵素 RNA ポリメラーゼが、２段階での転写調節因子（シグマ因子と転写因子）との相互作用で決定される。その制御機構を解明する目的で、大腸菌全７種類シグマ因子と約 300 種の転写因子が、認識し制御する遺伝子群を同定した。『ひとつの生物のすべての転写因子の制御機能解明』達成の成果は、世界最初の記念碑となった。以下は、主な成果である。

1) 全シグマ因子、全転写因子の支配下制御標的遺伝子の同定：　大腸菌全７種類、全 300 種類の転写因子を単離精製した。純化蛋白を利用し、それぞれの認識結合遺伝子を、Genomic SELEX 法を利用して同定した。主要シグマ因子 RpoD の標的プロモーター約 700 を同定したが（図３）、遺伝子内部にも多くの RpoD 認識部位が同定された。その生理的意味は、今後の課題である。転写因子については、制御標的が、単一遺伝子である場合は少なく、大多数の転写因子は、多数遺伝子を制御していることが一般的であり、教科書の概念の修正を迫ることとなった（図４）。

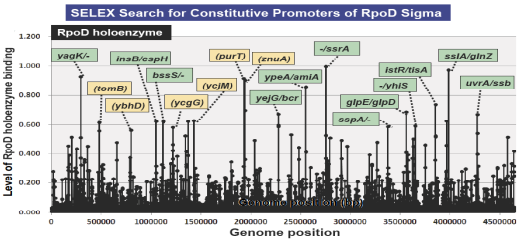

図 3. RpoD シグマ因子の標的プロモーター

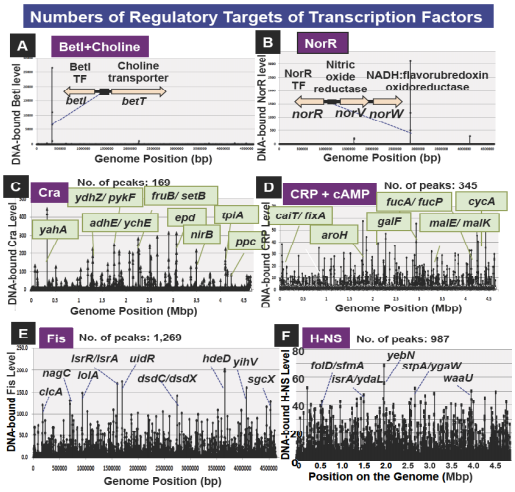

図４. 転写因子の制御標的遺伝子

２）シグマ因子・転写因子の新たな機能：SELEX 法を駆使した転写因子のゲノム上の認識結合部位の網羅的探索から、シグマ因子・転写因子が遺伝子内部にも結合することが判明した（図３、図５）。その結果、シグマ因子・転写因子に、新たな制御機能があることが予測された。今後の新たな課題である。

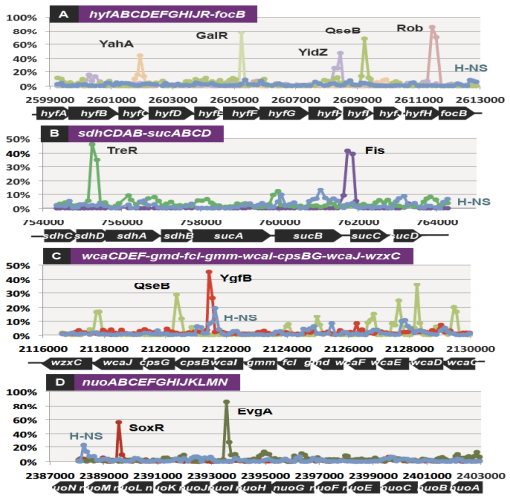

図５．遺伝子内部に結合する転写因子

SELEX に依って、多数の転写因子の制御標的が同定できたことに依って、多くの転写因子は、多数の標的遺伝子を制御し、また、多くの遺伝子は、多数転写因子で制御されていることが一般であることが判明した（図 6）。例えば、炭素源の取り込みと代謝系に関わる数百の遺伝子群の統括制御転写因子 CRP や Cra は、その支配下に数十の遺伝子が編成されていることが判明した（図６）。

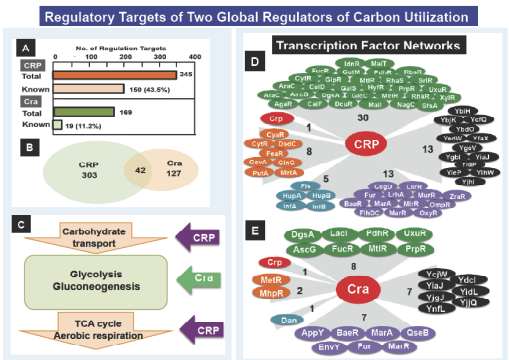

図６．炭素源利用遺伝子群の包括制御転写因子 CRP と Cra の制御と役割分担

多種転写因子による転写制御は、とりわけ、環境応答による生態変換で、主要な役割を果たす制御因子の遺伝子で顕著である。バイフィルム形成統括制御因子 CsgD や、遊泳に関わるべん毛形成統括制御因子 FlhDC の遺伝子プロモーターは、20 種以上の転写因子で制御されている（図７）。これらプロモーターでは、多数転写因子間の拮抗、協業で制御される、複雑な様相が明らかになった。多種多様な環境要因を感知して、発現レベルを調節していることが予想された。

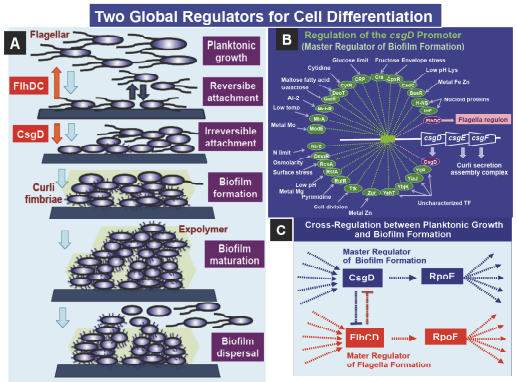

図 7．多数転写因子で制御されるバイオフィルム形成包括制御因子 *csgD* 遺伝子

３）特定遺伝子の転写制御に関わる全シグマ因子、全転写因子の同定：上記研究と平行して、逆の方向の研究、即ち、ある遺伝子の転写制御に関わる全因子を同定する PS-TF (promoter-specific transcription factor) 探索法を開発した。純化転写制御因子コレクションを利用し、大腸菌生存様式決定に重要な役割を果たす遺伝子群プロモーターに結合する因子を同定した（図８）。その結果、ひとつのプロモーターの制御には、多種多種類の転写因子が関わっていることが判明し、ここでも教科書の修正を迫ることとなった。

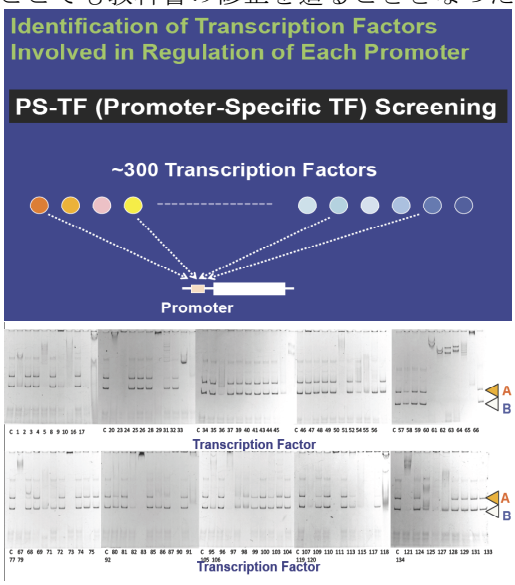

図８. 特定プロモーター-制御転写因子探索

４）全シグマ因子、全転写因子の細胞内濃度の計測と機能制御機構の解析：　ゲノム制御の提案モデルでは、転写制御因子群の活性成分の細胞内濃度が、重要な役割を果たす。そこで、各制御因子の特異抗体を作製し、免疫定量法で、大腸菌細胞内の濃度を、培養条件・培養時間を変えて計測した（図９）。全転写因子の細胞内濃度の実測は、過去に例がない。加えて、転写因子の活性制御に関わるエフェクターの系統的探索及びリン酸化など、蛋白修飾による活性制御の系統的解析を実施した。

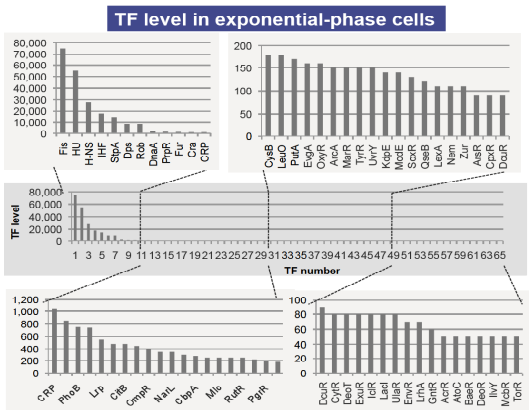

図９．転写因子の細胞内濃度の実測

５）転写制御ネットワーク：ゲノム転写の実測データが、データベースに蓄積され始めた。それらのデータを利用して、全体を見据えた転写制御を論じたシステムバイオロジーが盛んになって来た。しかし、大腸菌の同一名称の菌株間でも、研究室毎に保管状況の違いで、変異が蓄積し、ゲノム発現様相が異なる。従って、データベースの多種多様な細菌で、異なる培養条件で、異なる実験室で生産されたデータを寄せ集めた解析は意味がない。本研究の一番の特徴は、同一大腸菌株で、同一方法で、同一研究室で生産された実測データで論理が構築できる点である。転写制御ネットワークの解析を開始した。

６）TEC データベースの構築と公開：こうした貴重な実験データの情報を研究社会で共有し、正しい理論構築を支援する目的で、論文で公表することと平行して、データベース TEC（Transcription Profile of *Escherichia coli*）を構築した（図１０）。TEC は、国立遺伝学研究所を介して、公表を開始した。加えて、本研究で構築した多種多様な研究資材を研究社会に広く提供し、小規模研究室で苦闘する研究者を支援することとした。

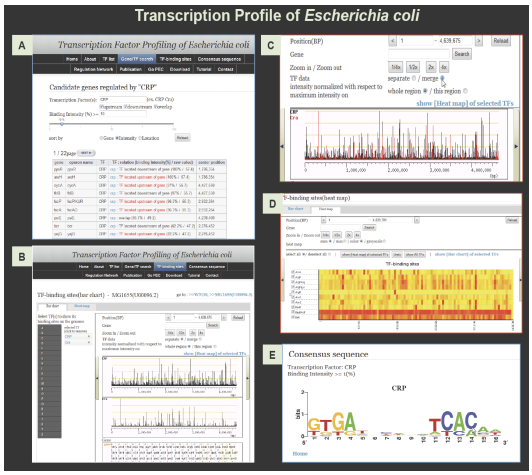

図１０．TEC データベース
（国立遺伝学研究所を介して公開）

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　35　件）

1. Yamanaka, Y., Shimada, T., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Transcription factor CecR (YbiH) regulates a set of genes affecting the sensitivity of Escherichia coli against cefoperazone and chloramphenicol. Microbiology, in press (2016) DOI: 10.set/mic.0.0000292. [査読有]

2. Ishihama, A., Shimada, T. and Yamazaki, Y.: Transcription profile of *Escherichia coli:* Genomic SELEX search for regulatory targets of transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **44**, 2058-2074 (2016) DOI: 10.1093/nar/gkw051. [査読有]

3. Maeda, M., Shimada, T. and Ishihama, A.: Strength and regulation of seven rRNA promoters in *Escherichia coli. PLoS ONE* **10**: e0144697 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0144697. [査読有]

4. Ogasawara, H., Ohe, S. and Ishihama, A.: Role of transcription factor NimR (YeaM) in sensitivity control of *Escherichia coli* to 2-nitroimidazole. *FEMS Microbiol. Lett.* **362**, 1-8 (2015) DOI: 10.1093/femsle/fnu013. [査読有]

5. Shimada, T., Saito, N., Maeda, M., Tanaka, K. and Ishihama, A.: Expanded roles of Lrp in transcription regulation of the *Escherichia coli* genome: Genomic SELEX screening of the regulation targets. *Microbial. Genomics* **1**: doi: 10.1099/mgen.0.000001 (2015). [査読有]

6. Shimada, T., Takada, H., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Expanded roles of the two-component response regulator OmpR in *Escherichia coli*: Genomic SELEX search for novel regulation targets. *Genes Cells* **20**, 915-931 (2015) DOI: 10.1111/gtc.12282. [査読有]

7. Urano, H., Yamamoto, Y., Ishihama, A. and Ogasawara, H.: Cooperative regulation of the common target genes between hydrogen peroxide-response YedVW and copper-response CusSR in *Escherichia coli. Microbiology* **161**, 729-738 (2015) DOI: 10.1099/mic.0.00002. [査読有]

8. Yamamoto, K., Nakano, M. and Ishihama, A.: Regulatory role of transcription factor

SutR (YdcN) in sulfur utilization in *Escherichia coli*. *Microbiology,* **161**, 99-111 (2015) DOI: 10.1099/mic.0.083550-0. [査読有]

9. Yoshida, M., Ishihama, A. and Yamamoto, K.: Cross-talk in promoter recognition between six NalL-family response regulators of *Escherichia coli* two-component system. *Genes Cells* **20**, 601-612 (2015) DOI: 10.1111/gtc.12251. [査読有]

10. Conway, T., Creecy, J.P., Maddox, S.M., Grissom, J.E., Conkle, T.L., Shadid, T.M., Teramoto, J., Miguet, P.S., Shimada, T., Ishihama, A., Mori, H. and Wanner, B.L.: Unprecedented high-resolution view of bacterial operon architecture revealed by RNA sequencing. *mBio* **5**: e01442-14 (2014) DOI: 10.1128/mBio.01442-14. [査読有]

11. Dudin, O., Geiselmann, J., Ogasawara, H., Ishihama, A. and Lacour, S.: Repression of flagella genes in exponential phase by CsgD and CpxR, two crucial modulators of *Escherichia coli* biofilm formation. *J. Bacteriol.* **196**, 707-715 (2014) DOI: 10.1128/JB.00938-13. [査読有]

12. Ishihama, A., Kori, A., Koshio, E., Yamada, K., Maeda, H., Shimada, T., Makinoshima, H., Iwata, A. and Fujita, N.: Intracellular concentrations of 65 species of transcription factors with known regulatory functions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **196**, 2718-2727 (2014) DOI: 10.1128/JB.01579-14. [査読有]

13. Nakano, M., Ogasawara, H., Shimada, T., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Involvement of cAMP-CRP in transcription activation and repression of the *pck* gene encoding PEP carboxykinase, the key enzyme of gluconeogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **355**, 93-99 (2014) DOI: 10.1111/1574-6968.12466. [査読有]

14. Shimada, T., Shimada, K., Matsui, M., Kitai, Y., Igarashi, J., Suga, H. and Ishihama, A.: Roles of cell division control factor SdiA: Recognition of quorum sensing signals and modulation of transcription regulation targets. *Genes Cells* **19**, 405-418 (2014) Doi: 10.1111/gtc.12139. [査読有]

15. Shimada, T., Yamazaki, Y., Tanaka, K. and Ishihama, A.: The whole set of constitutive promoters recognized by RNA polymerase RpoD holoenzyme in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* **9**: e90447 (2014) Doi: 10.1371/journal. Pone.0090447. [査読有]

16. Yamamoto, K., Watanabe, H. and Ishihama, A.: Expression levels of transcription factors in *Escherichia coli*: Growth phase-dependent variation of 90 regulators from six families. *Microbiology* **160**, 1903-1913 (2014) DOI: 10.1099/mic.0.079889-0. [査読有]

17. Yamanaka, Y., Oshima, T., Ishihama, A. and Yamamoto, K.: Characterization of the YdeO regulon in *Escherichia coli*. *PLoS one* **9**: e111962 (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0111962. [査読有]

18. Shimada, K., Ogasawara, H., Yamada, K., Shimura, M., Kori, A., Shimada, T., Yamanaka,Y., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Screening of promoter-specific transcription factors: Multiple regulators for the *sdiA* gene involved in cell division control and quorum sensing. *Microbiology* **159**, 2501-2512 (2013) DOI: 10.1099/mic0.067538-0. [査読有]

19. Shimada, T., Yamazaki, K. and Ishihama, A.: Novel regulator PgrR for control of peptide glycan recycling in *Escherichia coli*. *Genes Cells* **18**, 123-134 (2013) DOI: 10.1111/gtc.12026. [査読有]

20. Shimada, T., Yoshida, H. and Ishihama, A.: Regulation of the *rmf* gene encoding ribosome modulation factor in *Escherichia coli*: Involvement of cAMP receptor protein. *J. Bacteriol.* **195**, 2212-2219 (2013) DOI: 10.1128/JB.02279-12. [査読有]

他 15 件

〔学会発表〕（計　32　件）

1. Ishihama, A.: Milestone toward Understanding Bacterial Genome Regulation. Asian Conference in Transcription (ACT), Nat. Univ. Singapore, Singapore, Singapore. Dec. 3-4, 2015.

2. Yoshida, M., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Cross-talk in transcriptional regulation between response regulators of *Escherichia coli* two-component system. Asian Conference in Transcription (ACT), Nat. Univ. Singapore, Singapore, Singapore. Dec. 3-4, 2015.

３．石塚俊行、石浜 明、小笠原 寛： 大腸菌バイオフィルム形成統括因子 CsgD の新規転写制御因子の同定と機能解明。第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同

大会、神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市。2015.12.1-4。

４．増井祥平、石塚俊行、Parul Singh、Aswin Sai Narain Seshasayee、石浜 明、小笠原寛： 大腸菌べん毛形成マスターレギュレーターFlhDC の新規転写調節因子の同定と機能解明。第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会、神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市。2015.12.1-4。

５．山中 幸、Yan Jie、Linda J Kenney、石浜 明、山本兼由：細菌ゲノムの段階的高次構造形成。日本農芸化学会 2015 関東支部大会、お茶の水女子大学、東京都文京区。2015.9.26

６．小笠原 寛、小口卓也、佐野晃太郎、島田友裕、石浜 明： CRP (cyclic AMP recepter protein)によるバイオフィルム形成調節因子 MlrA の発現制御機構の解明。第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜,神奈川県横浜市。2014.11.25-27。

７．山本兼由、山中 幸、大島 拓、石浜 明：細菌ヒストン様タンパク質 H-NS によるゲノム転写制御の機能解析。第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜,神奈川県横浜市。2014.11.25-27。

８．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 リボゾーム形成に関与するストレス応答因子群の探索。第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜,神奈川県横浜市。2014.11.25-27。

9. H. Yoshida, T. Shimada, Y. Maki, S. Furuike, M. Ueta, C. Wada, A. Wada, and A. Ishihama: Systematic search for stress-response factors influencing the 100S ribosome formation. 2014 FEBS-EMBO, Palais des Congres de Paris, Paris, France. 2014.8.30-9.4.

10. 小笠原寛、石塚俊行、石浜 明： 大腸菌バイオフィルム形成統括制御因子 CsgD の新規発現調節機構の探索と機能解析。第 11 回 21 世紀大腸菌研究会、ホテル大観,岩手県盛岡市。2014.6.5-6。

他 22 件

〔図書〕（計 1 件）

Ishihama, A.: A Revolutionary Paradigm of Bacterial Genome Regulation. In: *Stress and Environmental Control of Gene Expression in Bacteria*. Ed: Frans J. De Bruijin (John Wiley & Sons), Chapter 2-3 (2016)

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）
○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
○データベース
TEC (Transcription Profile of *Escherichia coli*) (www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/tec/)

６．研究組織
(1)研究代表者
石浜 明（ISHIHAMA, Akira）
法政大学・マイクロ・ナノテクノロジ-研究センター・研究員
研究者番号：80019869