



大腸菌環境応答ネットワークに関する包括的研究

法政大学生命科学部生命機能学科 准教授 山本 兼由

はじめに

環境に直接接触して生活する単細胞の細菌は、さまざまな環境変化に適応する優れた能力をもっている。環境適応応答はゲノム遺伝子発現の厳密な制御で行われるが、とくに遺伝情報発現の初反応である転写は最も重要な制御過程である。細菌の転写装置RNAポリメラーゼ (RNAP) は  $\alpha\alpha\beta\beta'$  から構成されるコア酵素複合体に  $\sigma$  因子が会合して、プロモーターを認識できるホロ酵素となる。さらに、転写因子と称される分子がRNAPに直接相互作用することでRNAPの機能が変化する。つまり、細菌ゲノム上の選択的遺伝子発現をRNAPの転写機能変換としてとらえる「2段階RNAP機能分化モデル」が提唱されている(図1)。著者らは大腸菌K株をモデルとして、2段階目の転写因子による転写活性化の分子機構モデルの確立に貢献し、転写抑制化の分子機構モデルを提唱した。これらを基盤とし、大腸菌K株ゲノム上に推定される約300種の転写因子を軸としたゲノム転写制御系の全体像の解明を目指し、包括的解析による研究を行った。

1. 細菌転写制御機構

転写活性を担うDNA結合性転写因子は、プロモーター上の転写開始点からの結合位置によりClass IとClass IIに分類され、RNAPとのタンパク質-タンパク質相互作用によってRNAPの機能を制御する。プロモーター上流域に結合するClass I転写因子は、RNAP  $\alpha$  サブユニットC末端領域 ( $\alpha$ CTD) が転写活性化に必要である。一方、プロモーターの-35エレメント上に結合するClass II転写因子については、SdiAとPhoPの再構成系転写反応実験から、RNAP  $\sigma$  サブユニットのC末端領域 ( $\sigma$ CTD) を欠如したRNAPでは転写を活性化できないことを見いだした。これらの知見に基づいて、転写因子による転写活性機構として、Class I因子の  $\alpha$ 、Class II因子の  $\sigma$  との直接相互作用によるRNAPの機能制御モデルの実証に寄与した(図1)。

一方、転写抑制機構については、転写因子がRNAPのプロモーターに競合的に結合することで抑制されると考えられていた。しかし、転写因子PhoPの *treR* プロモーター抑制では、PhoPがRNAPの *treR* プロモーターへの結合を妨げず、RNAP  $\alpha$ CTDとの強い相互作用によって、プロモーター上でRNAPが繫留されるとする新たなモデルを提唱した。最近、原子間力顕微鏡を用いた1分子解析によりこのモデルの確証を得ている。加えて、グリオキシル酸経路酵素群遺伝子のリプレッサー IclRによる *aceB* 転写抑制については、 $\alpha$ CTDとの強力な相互作用のため、プロモーターからRNAPを乖離させていることを示唆した。これらの知見に基づき、転写抑制の分子機構が四つの様式に大別されることを提案した。つまり、[Mode I] 転写因子とRNAPのプロモーター競合結合、[Mode II] プロモーター下流の転写因子結合によるRNAP繫留、[Mode III] プロモーター上流の転写因子結合によるRNAP繫留、[Mode IV] プロモーター上流の転写因子結合によるプロモーターからのRNAPの乖離である(図1)。

2. 細菌ゲノム転写制御の解明

2.1 研究戦略と研究方法の開発

モデル細菌の大腸菌K-12ゲノムには約300種類のDNA結合性転写因子が推定され、環境要因ごとに応答する全転写因子を網羅的に解析し、大腸菌環境応答の全体像を理解することを目指した。このために、個々の転写因子の機能をゲノムワイドに解析する転写因子欠損株のトランスクリプトーム解析を行ってきたが、転写因子の直接支配下の遺伝子特定することは困難であった。そこで、新たな研究方法や研究資材を開発した。まず、全転写因子の精製し、転写因子が結合するゲノムDNA配列を迅速に同定する“Genomic SELEX”法を開発し、各転写因子のゲノム上の結合部位を同定することで、制御支配下遺伝子群を特定した。また、精製転写因子を利用して特異的抗体を作

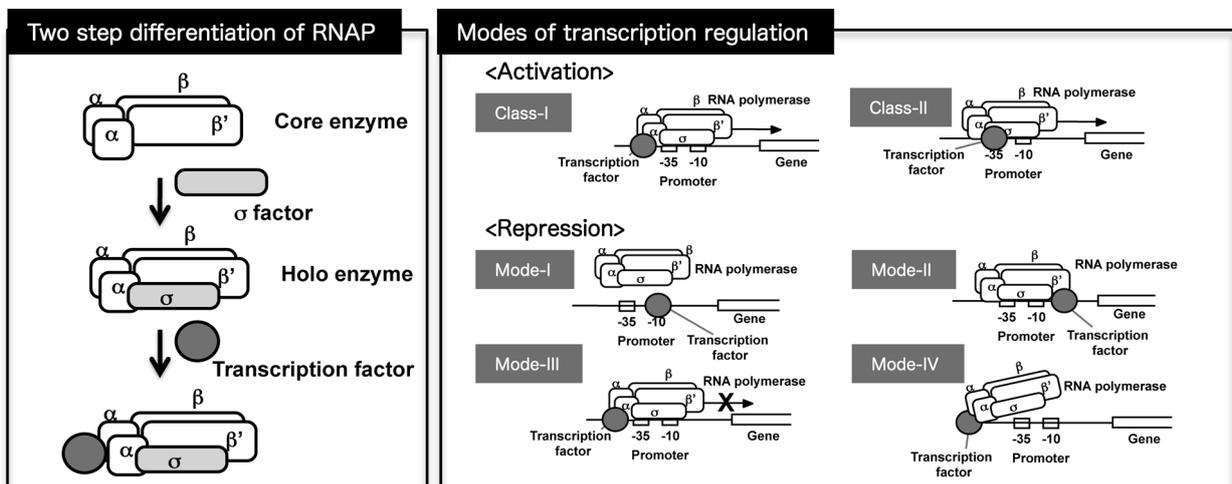


図1 細菌RNAポリメラーゼの2段階機能分化モデルと転写因子による転写制御メカニズム

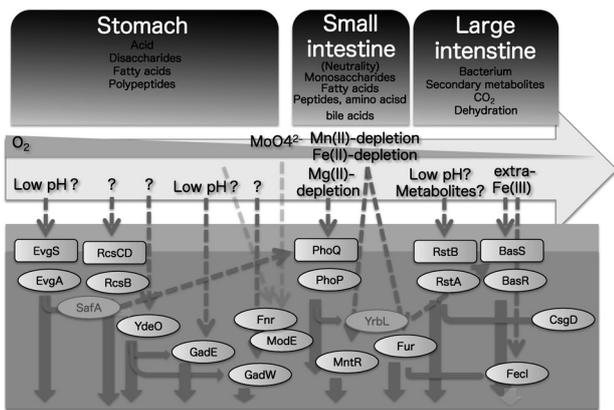


図2 大腸菌の転写因子による生存戦略の主幹ネットワーク

製し、細胞内ゲノム上の転写因子結合部位の包括的解析 (ChIP-chip) を実施した。さらに、転写因子が結合するプロモーターを網羅的に同定する“Promoter Chip”法を開発した。

## 2.2 細胞外金属応答のゲノム制御の全体像

大腸菌のゲノム転写制御の全体像解明の一環として、細胞外金属変化に対する適応応答の全容解明を目指した。大腸菌ゲノムには14種類の金属感知転写因子が知られているが、Genomic SELEX および ChIP-chip を行って、10種類の金属感知転写因子 (PhoP, KdpE, MntR, BasR, CueR, CusR, ZntR, Zur, ZraR, ModE) について、それらの制御支配下にあるプロモーターを同定した。残りの4種類の金属転写因子の知見と合わせ、数プロモーターしか制御しないローカルレギュレーターと30プロモーター以上を制御するグローバルレギュレーターに大別されることを見いだした。ローカルレギュレーターは感知する金属の細胞内恒常性に必要な輸送システム遺伝子などを制御しており、高い特異性をもつ適応機構と理解される。これに対して、グローバルレギュレーターのマグネシウムを感知する PhoP、鉄を感知する Fur と BasR は、それぞれの金属恒常性維持の制御以外で機能する遺伝子群の制御が予想された。つまり、これらの金属適応応答の転写因子間では、制御におけるシステムネットワークが形成されることを確認した。

## 2.3 ゲノム転写制御の二成分制御系の全体像

細菌ではセンサーとレギュレーターからなる二成分制御系が細胞情報伝達機構として広く保存されている。たとえば、金属適応の転写因子群では、PhoP, KdpE, BasR, CusR, ZraR が二成分制御系を形成し、推定されるそれぞれに特異的な自己リン酸化センサーキナーゼからのリン酸基転移により活性化する。大腸菌 K-12 ゲノムの27種類のセンサーキナーゼと34種類のレギュレーターのすべての因子を精製し、すべての組み合わせで、試験管内でリン酸化およびリン酸基転移反応を包括的に解析した。その結果、特異的なリン酸基転移反応に加え、19の非同特異的ペア間でのリン酸基転移反応を認めた。このうち、五つのリン酸基転移反応は金属応答レギュレーター KdpE, CusR, ZraR で確認され、グルコース-6-リン酸を感知するセンサーキナーゼ UhpB からの転移反応が共通していた。このことから、大腸菌の炭素源の適応においてカリウム、銅、亜鉛の応答システムが関与することを示唆した。

## 2.4 大腸菌生存戦略の主幹ネットワーク

筆者らの金属適応応答ネットワークと、これまでに明らかとされてきた制御ネットワークと合わせ、連続した制御の階層性

を示すことができた。六つの金属適応応答システムに加え、EvgAS, YdeO, GadE, GadW, Fnr, RstAB, CsgD が連続した階層型制御ネットワークを構成し、これらが認識する環境変化は動物の経口から腸管に至る変化とほぼ一致していた。さらに、機能未知な転写因子 YdeO は嫌気条件において細胞内で安定化し、酸性条件適応に加え、嫌気呼吸鎖遺伝子群を制御することから、このネットワークの生理的機能が裏づけられた。これらの結果から、大腸菌ゲノム発現制御は単純な制御機構の総和ではなく、固有の生息域に応じる主幹階層型ネットワークが存在することが示された (図2)。この主幹ネットワークの概念は他の細菌ゲノムの制御ネットワークのモデルとなり、また大腸菌近縁種に保存される主幹ネットワークは、病原性を示す近縁菌の研究への応用が期待できる。

おわりに

細菌ゲノムのサイズと転写因子の総数には比例相関があり、ゲノムサイズが小さいほど転写因子数も少ない。ほとんどの DNA 結合性転写因子が類似ドメインをもつことから、ゲノムサイズの増加に伴い転写因子の遺伝子が重複し、生存する環境に応じた制御ネットワークが構築されたと考えられる。システム構築の過程で、転写因子がどのように広範囲な制御機能を獲得し、ネットワークを形成したかは興味深い。一方、細菌も真核生物のクロマチンと同様に核様体と呼ばれる高次ゲノム構造が形成され、環境変化に応じたゲノム高次構造変化がゲノム発現制御に重要であることが認められている。この分子機構の解明は、細菌の環境応答ネットワークを理解するうえで重要な課題であろう。

謝辞 本研究は、国立遺伝学研究所分子遺伝研究系、近畿大学農学部農芸化学科生物化学研究室 (現 バイオサイエンス学科分子生物学研究室)、そして法政大学生命科学部生命機能学科において行われてものです。本研究を行う機会を与えていただき、これまで終始ご指導、ご鞭撻をいただきました国立遺伝学研究所名誉教授・石浜明先生に心より感謝を申し上げます。また、学部時代から一貫してご指導とご激励をいただきました近畿大学農学部教授・内海龍太郎先生に心から感謝いたします。国立遺伝学研究所では藤田信之先生 (現 独立行政法人製品評価基盤機構) から生化学的解析を中心としたご指導を、大島拓博士 (奈良先端大学院大学)、饗場浩文博士 (名古屋大学大学院)、Steve Busby 先生 (パーミンガム大学)、は長期にわたる共同研究で多くの激励と暖かいご助言をいただきました。すべてのお名前を挙げることはできませんが、非常に多くの先生方と共同研究者のご協力に心から御礼を申し上げます。また、学生時から研究の基本についてご指導を賜った近畿大学農学部農芸化学科とバイオサイエンス学科の諸先生方にも深謝申し上げます。さらに、法政大学赴任後の研究では、関東地区の微生物研究者フォーラムである微生物研究会に関係する諸先生方から有益なご助言と励ましをいただきました。心から感謝を申し上げます。本研究の成果は、近畿大学農学部農芸化学科生物化学研究室内の大学院生、学部学生諸氏および法政大学生命科学部生命機能学科の博士研究員、大学院生、学部学生諸氏の努力による賜物であり、改めて感謝の意を表します。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました法政大学生命科学部教授・高月昭先生に厚く御礼を申し上げます。