

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(A)一般

研究期間：2008～2010

課題番号：20241045

研究課題名(和文) ChIP-chipによる3種の大腸菌を用いた転写因子結合部位の多様性の解析

研究課題名(英文) ChIP-chip analysis of diversity of binding sites of transcriptional factors in three *E. coli* strains

研究代表者

小笠原 直毅 (OGASAWARA NAOTAKE)

奈良先端科学技術大学院大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：10110553

研究成果の概要(和文)： ChIP-chipおよびChAP-seqを用いて、複数の大腸菌種におけるグローバルレギュレーターの結合領域を比較することで、大腸菌のゲノム多様性の獲得と転写ネットワークの変化がどのように関係するかを検討した。その結果、今回検討した転写因子では、大腸菌株間における結合プロファイルの保存性が極めて高く、転写因子が制御する遺伝子に変異が生じた場合でも、その結合プロファイルは維持されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： We performed ChIP-chip and ChAP-seq analysis to determine the diversity of binding profiles of transcriptional regulators and transcriptional networks among different *E. coli* strains. Our analysis revealed that the binding profiles are highly conserved in different *E. coli* strains, suggesting strongly that the binding profile of a transcriptional regulator is kept even in different *E. coli* strains which have highly diverse genome structures.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	19,900,000	5,970,000	25,870,000
2009年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
2010年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
年度			
年度			
総計	38,800,000	11,640,000	50,440,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：ゲノム進化・再編, ChIP-chip, 転写制御ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

(1) 600種を越す細菌ゲノムの配列決定を背景として、遺伝子構成の比較から、細菌ゲノムの進化が議論され、細菌の持つ高度な環境適応能力の一部は、様々な遺伝子の獲得と破壊を伴う、ゲノムの再編であることが明らかになりつつあった。他方、ゲノム機能の変化・多様化は、転写制御ネットワークの変化によっても生ずると考えられる。しかしながら、転写制御は、複数の転写因子が協調して働く場合も多く、ゲノム上の転写制御配列は

高度に維持され、同時に、転写因子の結合部位も、基本的に保存されている可能性が高いと考えられていた。しかしながら、酵母近縁種を用いた、転写因子Tec1とSte12のゲノムレベルでの結合部位の同定と、その比較により、実際には、それらの転写因子の結合プロファイルは、酵母間において異なっており、実際には転写制御ネットワークが変化していることが明らかにされた。このことは、遺伝子領域に加え、転写制御領域の変異も、ゲノム機能の変化に、大きな影響を与えうるこ

とを示している。しかしながら、研究開始時においては、酵母以外の生物に関する、同様の情報はなく、当然、細菌に関する情報は得られていなかった。

(2) 既に様々な角度から、ゲノムの変化が検討されている大腸菌は、細菌の持つ高度な環境適応能力と、転写ネットワークの適応変化との関係性を調べる上で、恰好の材料といえた。大腸菌は、様々な宿主生物の腸内に生育し、かつ腸管外の様々な環境からも分離されることが知られている。様々な生育環境に適応し、生育域を広めていく上で、大腸菌は多様な遺伝子を外部から獲得し、あるいは、既に持っている遺伝子を欠失させ、ゲノムを多様に変化させて適応し、新たなニッチを獲得したと考えられる。したがって、生育スタイルが様々な異なる、病原性大腸菌、非病原性大腸菌、あるいは実験室で継代、維持されてきた研究室株大腸菌の転写制御ネットワークが、本当に組み換えられているのかどうか、そして変化が生じているのであれば、どのような仕組みで転写ネットワークに変化が起きているのかについて、転写因子結合プロファイルを比較検討することで、考察できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1) 研究開始直後は、3種の大腸菌株、実験室株である大腸菌K12株、腸管出血性大腸菌O157 Sakai株、および腸管病原性大腸菌E2348/69株について、グローバルな転写制御因子の結合部位をゲノムワイドに決定し、比較することを出発点として、3株における転写制御ネットワーク構造の変化を解明し、細菌ゲノム機能の変化・多様化について、新たな視点からの研究の展開を図った。

(2) 一方で、近年、ゲノム解析技術が急速に進展し、当初、我々の用いていたタイリングアレイとは異なる、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析が、世界的に行われ始めた。そこで、次世代シーケンサーとChIP解析を組み合わせた、より汎用性の高い解析手法を確立し、それを用いて転写制御因子結合領域の比較解析することも目標に加えた。

(3) 上記のゲノム解析手法を用い、様々な転写因子のChIP解析を、異なる大腸菌株を用いてゲノムワイドに行い、生育環境の違い、あるいは病原性の有無に応じて、転写制御ネットワークがどのように変化し、その際、それぞれの菌株の転写ネットワークの変化に重大な影響を与えたゲノム変化(変異)がどのようなものであったかを、様々な情報解析

手法を用いて明らかにすることを目標にした。本解析に伴い必要となる様々な情報解析技術の新たな構築や、次世代シーケンサーを用いた、安定したChAP-seq解析システムの構築など、ベースとなる技術は研究当初、ほとんど確立していなかったため、解析の進展に伴い新たなゲノム解析技術を構築した。

3. 研究の方法

(1) 本研究で解析することを計画した転写制御因子H-NS, Fur, Zur, Lrp, ArcAを、それぞれのタンパク質のC末端側に、FlagおよびHis-12 タグが付加された形で発現させた。そのために、タグ付加型タンパク質の発現量が、転写制御因子のオリジナルの発現量と同様になるように、ゲノム上の遺伝子の3'末端にタグをコードするDNA断片を、one-step法を用いて組み込んだ。タグ付加型転写制御因子が正常な活性を有することは、*lacZ*レポーターアッセイあるいはリアルタイムPCRにより確認した。RNAポリメラーゼに関しては、RpoCのC末端にHis-12 タグを付加した株を作成し、生育が野生型株と同様であることからRpoC-His-12が、正常な機能を有すると判断した。

(2) 上記のようにして作成した株が、実際にChIP-chipあるいはChAP-chip解析に用いることができるかどうかを、K-12株を用いて確認した。それぞれの転写因子に関し、タグ付加株を対数増殖期まで培養し、ホルムアルデヒドにより処理することで、DNA-タンパク質複合体を固定した。その後、菌体を超音波破碎した後、それぞれのタンパク質に付加したタグを用いて目的のタンパク質とそれに結合したDNAを精製した。精製したDNAを標識し、ChIP-chipあるいはChAP-seq解析により転写制御因子のDNA結合プロファイルを決定した。

(3) K12株で解析を行った転写制御因子のうち、ChAP-seqおよびChIP(ChAP)-chip解析結果が良好であったH-NS, Fur, Zur, Lrp, RpoCに関して、O157sakai株あるいはE2348/69株を用いて、それぞれの転写制御因子のC末端にK12株と同様の方法で、エピトープタグを導入した。H-NSに関しては、O157 Sakai株に加え、SE11およびSE15株のH-NSのC末端にエピトープタグを導入した。なお、これらの株は、K12株に比べ、one-step法を用いたエピトープタグの導入が、難しいことから、適宜、イギリス・パーミンガム大学のDavid LeeとJon Hobman博士が開発したGene doctoring法を適用し、エピトープタグ導入の効率化を図った。

(4) Furに関してはC末端に 3 x Flagタグを付加した病原性大腸菌 0157 Sakai 株, E2348/69 株を用いてChIP-chip解析を行った。H-NSに関しては、0157 Sakai株を用いたChIP-chip解析およびSE11 およびSE15を用いたChAP-seq解析を行った。

(6) Furレギュロンのトランスクリプトーム解析: K12 株, 0157 Sakai 株, E2348/69 株を用い、野生型株および*fur*欠損株のトランスクリプトーム解析を行った。

(7) H-NS および Fur の ChAP-seq および ChIP-chipデータを用いた比較解析: 上記の解析によって、特にH-NSおよびFurに関しては、情報学的手法を用いた解析に必要とされるデータを十分に取得できたことから、H-NSの場合はK12 株, SE11 株, SE15 株, Furに関してはK12 株, 0157 Sakai 株, E2348/69 株から得られた結合プロファイルを用いて比較解析を行った。

4. 研究成果

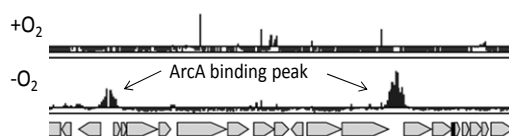
1) one-step法およびgene doctoring法を用い、K12, 0157 Sakai, E2348/69, SE11, SE15株を用いたエピトープタギングは、安定して機能し、特に取得が難しいとされる、K12 株以外の病原性あるいは非病原性大腸菌のエピトープタギングに関しても、H-NS, RpoC-His12 あるいはFur, Zur, Lrp-3xFlag株を作成できた。この内、0157 Sakai, E2348/69, SE11, SE15 株を用いて作成したH-NS-His12, Fur-3xFlagおよびLrp-3xFlag株については、ChAP-seqおよびChIP-chip解析による結合プロファイルの明確な決定が可能であった。一方、Zur-3xFlagは発現量が低いことが原因で、十分なDNA-転写因子複合体の回収量が得られず、RpoC-His12 に関しては精製中のタンパク質の安定性が極端に低いことから、K12 株を用いた解析には使用可能であったが、病原性大腸菌を用いた解析できなかった。今後、ChIP-chip解析可能なタンパク質の種類を増やしていくためにも、DNA-タンパク質複合体の精製条件を広げられるよう、タグの選択肢を、今以上に増やしていく必要がある。現在、キチン結合タンパク質、ストレプトアビジンあるいはGFPをタグとして枯草菌、大腸菌のChIP-chip解析に使用できるかどうかを検討中である。

2) K12 株を用いたChIP-chipあるいはChAP-chip解析により、ArcA, Fur, Zur, Lrpそれぞれの結合プロファイルを決定した。それぞれの転写因子について同定された結合

部位の中には、既に標的遺伝子として知られている多くの遺伝子を含んでおり、解析が正確に行われていることを示していた

①ArcAのChIP-chip解析は、嫌気状態では、ArcAが様々な遺伝子の上流に結合していることを示した。一方、好気条件では、嫌気条件で検出したArcAのほぼ全ての結合ピークが検出できなくなった。ArcAは酸素の有無を感知して、活性化するレスポンスレギュレーターであることが知られている。嫌気、好気、それぞれの条件で、細胞内のArcAの存在量がほぼ変わらないことから、今回の結果は、ほぼ全てのArcAが好気条件においてDNAから離れることを意味している(図1)。また、ChIP-chip解析と同時に、トランスクリプトーム解析を行うことで、多様な酸化還元酵素遺伝子の転写をArcAが直接抑制し、また様々な遺伝子を直接、活性化していることも明らかにした。

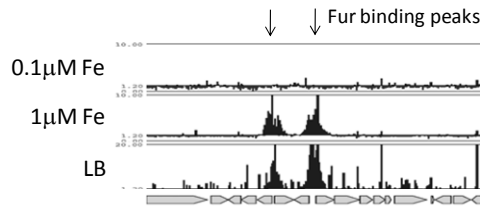
図1. 好気および嫌気条件におけるArcAの結合プロファイル



② FurのChIP-chip解析は、Furが、その制御化にあることが知られている多くの遺伝子上流に結合することを示した。この結合は、培地中の鉄の濃度により変化し、鉄が少ない培地中では、ほぼ全てのFurの結合は検出できなくなった(図2)。また、ChIP-chip解析と同時に、トランスクリプトーム解析を行うことで、これまで、主に、RhyBと呼ばれるsmall RNAを介して制御されているとされていた、Furにより正に制御される遺伝子のうち、いくつかの遺伝子に関しては、Furが直接、正に制御していることが明らかとなった。加えて、これまでFurレギュロンに属するとされていた遺伝子に関しては、ほぼ全ての遺伝子のプロモーターでFurの結合を確認できたものの、いくつかの遺伝子に関しては、Furのプロモーター領域への結合を確認できなかった。Fur欠失株では、鉄取り込みポンプをコードする遺伝子の転写が、Furの欠失により脱抑制されることに伴い、細胞内の鉄イオンの量が大きく増加する可能性がある。今回観察された、*fur*遺伝子の欠失により生じた転写の変化の中には、細胞内の鉄濃度の変化によって、Furに直接制御されている遺伝子以外にも、多くの遺伝子の発現の制御がなされることを示しており、Feモジュロンとも呼ぶべき、鉄応答グローバル転写ネットワーク

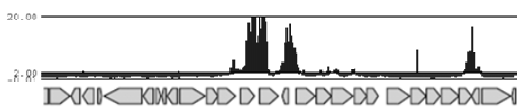
の存在を示している。

図2. 低Fe, 高FeおよびLB培地でのFurの結合プロファイル



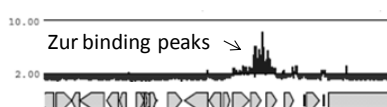
③ Lrpはこれまで、H-NSやFisといった核様体タンパク質と呼ばれる一群のDNA結合タンパク質と同様、DNAに比較的緩やかな特異性を持ち結合し、核様体タンパク質として機能するとされていた。しかしながら、今回、行った解析からは、H-NSやFisといった核様体タンパク質の結合部位と比較して、Lrpの結合部位の検出数は著しく少なく、加えて、Lrpの結合する遺伝子の多くの機能は、アミノ酸の合成、輸送及び代謝に関係するものであることが分かった。このことから、本質的には、Lrpは核様体タンパク質というよりも、特定の認識配列に依存して、アミノ酸代謝を制御する転写制御因子である可能性が極めて高いことが示唆された。

図3. LB培地でのLrpの結合プロファイル



④ ZurはFurに極めてよく似た構造を有する転写因子であるが、Furが鉄存在下でDNAから解離するのに対し、Zurは亜鉛非存在下でDNAと結合し、高濃度の亜鉛存在下でDNAから解離することが知られている。これまで、Zur遺伝子の標的とされている遺伝子は、4 遺伝子 *znuA*, *znuC*, *zinT* および *ykgM* であり、今回のChIP-chip解析からは、これらの遺伝子のプロモーターに、確かにZurが結合していることが証明された。興味深いことに、今回のChIP-chip解析から、上記以外に6個の標的候補遺伝子が見出された。このうちのいくつかの遺伝子に関しては、宿主への感染を助ける機能を持つ可能性がある遺伝子も含まれており、亜鉛飢餓応答のみならず、感染に関連した機能をZurが持つ可能性が示された。

図4. LB培地でのZurの結合プロファイル



2) 近年、次世代シーケンシング技術が急速

に発展し、タイリングアレイを用いた解析以上に、ゲノムワイドかつ高精度なChIP解析を可能にする状況が現れつつある。幸い、大腸菌の核様体タンパク質H-NSに関しては、申請者らの研究室において、ChIP-chip解析を用いた様々な解析が、これまでもなされており、多くの情報を有していることから、次世代シーケンスを用いたゲノム比較解析を行う題材としては最適であった。次世代シーケンシング技術を用いたChAP-seq解析は、解析精度が、タイリングアレイ時には数十bp単位であったものが数bp単位になる。まず、既に解析を進めていたK12株を用い、タイリングアレイと次世代シーケンシングにより決定されたH-NS-His12の結合領域が、基本的に同一かどうかを検討した。ChAP-chip解析と全く同じ方法でDNA-H-NS複合体を精製し、この複合体から回収されたDNA断片を元にして、次世代シーケンシング用DNAライブラリーを作成した。このライブラリーを用いて、Illumina GAシーケンサーを用い、36bpのDNA配列を800-1000万リード決定した。このうち、既に報告されている、K12株のゲノム配列上に、約600万リードがアラインメントでき、その結果、約1000か所のH-NS結合ピークを決定した。この結果を、既に得られているChAP-chipデータと比較したところ、どちらの方法で決定した結合部位も、基本的に一致することが明らかとなった。

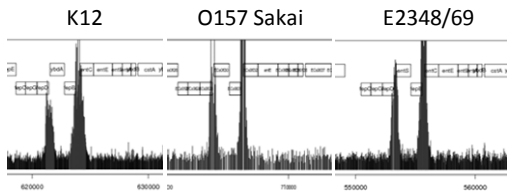
3) K12株で行った解析を元に、O157 Sakai, E2348/69, SE11, SE15株に解析を拡張する転写制御因子を選び、解析を行った。前述したように、RNAポリメラーゼ、ArcAおよびZurはO157 Sakai株およびE2348/69株を用いた株を作成し、解析を行ったが、タグの付加により生育阻害が観察されたり、精製時にタンパク質の分解が激しく解析に利用できなかつたり、精製によるタンパク質の回収率が低い等の理由で、解析を断念した。他方、H-NSとFurに関しては、株の作成、精製およびChIP-chip, ChAP-seq解析は順調に進行し、比較解析を行った。

なお、比較解析を行うに当たり、情報学的な解析手法を、いくつか整備した。具体的には、1:異なる株を用いたChIP-chip解析結果を比較するための平均化の手法、2:ピークの検出感度を均一化するための、ピーク検出の自動化の手法、3:データを異なるゲノム間で比較するためのゲノム比較の手法である。これらの手法は、当研究室で行われた大腸菌、枯草菌等の解析の様々な場面に適用し、解析

の精度を高めることを確認した(発表論文1-4)。

① Furの比較解析: 0157 Sakai, E2348/69株を用いて、ChIP-chip解析によりFurの結合部位を決定した。K12株を用いて決定した結合プロファイルと共に、3株での結合プロファイルと比較した(図5)。以下に比較解析により明らかになったことを列挙する。

図5. LB培地でのFurの結合プロファイルの比較



● 3つの株に保存されている結合部位は、約30であり、直接、転写を正、負に制御していた。

● 0157 SakaiとE2348/69株に共通して見出され、K12株に存在しない結合部位は、ヘム鉄のトランスポーター遺伝子および詳細な解析が行われていない鉄トランスポーターホモログであった。

● 0157 Sakai株には、十数個の特異的なFur結合部位が観察された。それらのほぼ全ては、0157 Sakaiゲノム中に特異的に存在するプロフェージ配列に代表される外来遺伝子配列中に存在し、0157 Sakai株を含む一群の大腸菌が、特異的に獲得した遺伝子である。他方、K12株のみで見出される結合部位は、クエン酸鉄のトランスポーターである*fec*遺伝子群であり、これもファージ由来の配列である。

● K12株には、0157 SakaiあるいはE2348/69株に存在するFur結合部位が存在するものの、その下流に存在する遺伝子が、欠失している、あるいはフレームシフトにより機能していない2つの例が存在する。

最近、ショウジョウバエ近縁種におけるChIP-seqを用いた比較解析でも、転写因子結合プロファイルが、高度に保存されているという報告がなされた。我々のFurに関する解析結果は、細菌においても、転写因子結合部位を高度に保存することを示しており、細菌における転写ネットワークの再編成は、主に、外来遺伝子の獲得と、内在性の遺伝子の破壊による影響が大きく、転写因子認識配列の変化の貢献は低いことが示された。これらの解析については、第32回日本分子生物学会で発表した(学会発表3, 投稿準備中)。

② H-NSの比較解析: SE11およびSE15株を用

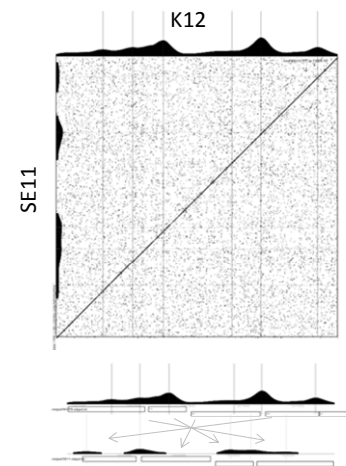
いて、ChAP-seq解析によりH-NSの結合部位を決定した。K12株を用いて決定した結合プロファイルと共に、3株での結合プロファイルと比較した。以下に比較解析により明らかになったことを列挙する。

● 次世代シーケンスデータを、それぞれのゲノム配列上にアラインメントし、比較解析する様々な方法論を構築した。

● これまでの解析からH-NSは外来遺伝子を強く認識し、結合することが分かっているが、実際に、それぞれの株に特異的な領域(外来遺伝子であることが強く疑われる領域)を、H-NSは高頻度で認識し結合している。

● 来遺伝子に強く結合すると同時に、H-NSは3株共通に存在する、ゲノム領域(コア領域)にも、多くの結合部位を有している。これらの結合領域の保存性は高く、例えば逆位の領域では、結合プロファイルも逆になる。H-NSのDNA認識機構に関しては、これまでAT含量のみに依存して、配列特異性は、ほとんど無いという説と、特異的な認識配列を有しているという2つの全く異なる説が提唱されていたが、我々の結果は、H-NSが配列特異的に結合部位を認識している可能性を示している(図6)。

図6. ゲノム配列に逆位が生じている部分のH-NSの結合プロファイルも逆位になる



● コア領域に存在する、3株中で極めて保存性の高いH-NS結合領域の中には、配列の保存性が著しく低い領域が、存在する。しかしながら、これらの領域では、AT含量が豊富であること、ATが連続した短い配列が保存されていることから、H-NSがこれらの短いAT配列を認識し、結合している可能性が高い。

本解析では、H-NSが3株それぞれに特異的な配列を認識し結合していることを示し、実際にH-NSが外来遺伝子の獲得に強く寄与していることを示した。興味深いことに、H-NSは、保存性の高い領域でも、特異的に結合す

る領域を有しており、その配列の一部は、株ごとに大きく変化していることから、H-NSは、それらの領域に含まれる遺伝子の発現を抑制することで、遺伝子の変異による負の影響を抑え、細菌ゲノムの多様性を維持しているのかもしれない(投稿準備中)。これらの解析については、第5回ゲノム微生物学会で発表した(学会発表5)。

③ Lrpに関しても0157 Sakai株を用いて解析を行っており、特に病原性遺伝子のプロモーター領域にLrpが結合していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件、全て査読あり)

1. Genome-wide binding profiles of the *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB and its homolog Abh reveals their interactive role in transcriptional regulation. Chumsakul O, Takahashi H, Oshima T, Hishimoto T, Kanaya S, Ogasawara N, Ishikawa S. (2011) **Nucleic Acids Res** 39:414-428.
2. Tobe T, Nakanishi N, Sugimoto N. (2011) Activation of Motility by Sensing Short-Chain Fatty Acids via Two Steps in a Flagellar Gene Regulatory Cascade in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect Immun** 79:1016-1024.
3. RNA polymerase trafficking in *Bacillus subtilis* cells. Ishikawa S, Oshima T, Kurokawa K, Kusuya Y, Ogasawara N. (2010) **J Bacteriol** 192:5778-5787.
4. Differential binding profiles of StpA in wild-type and h-ns mutant cells: a comparative analysis of cooperative partners by chromatin immunoprecipitation-microarray analysis. Uyar E, Kurokawa K, Yoshimura M, Ishikawa S, Ogasawara N, Oshima T. (2009) **J Bacteriol** 191:2388-2391.
5. Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. Wu LJ, Ishikawa S, Kawai Y, Oshima T, Ogasawara N, Errington J. (2009) **EMBO J** 28:1940-1952.
[学会発表] (計6件)
1. 核様体タンパク質H-NS 結合位置の大腸菌株間比較解析 東光一, 戸邊亨, 鈴木穰, 菅野純夫, 石川周, 小笠原直毅, 黒川顕, 大島拓 第5回日本ゲノム微生物学会年会, 2011年3月16日、仙台(地震により中止)
2. 病原性大腸菌ゲノム解析から探る病原性の全体像 戸邊亨 第5回日本ゲノム微生物学会年会、2011年3月16日、仙台(地震により中止)
3. ChIP(ChAP) method revealed many aspects of DNA binding proteins in Bacteria. Taku Oshima UK RNA polymerase workshop, 2010年4月12日、Nottingham, UK
4. Search of nucleoid proteins in *Bacillus subtilis*: comparative analysis using ChAP(ChIP)-chip analysis between *B. subtilis* and *E. coli*. Onuma Chumsakul, Ebru Uyar, Shu Ishikawa, Taku Oshima, Naotake Ogasawara 第32回日本分子生物学会、2009年12月10日、横浜、
5. Comparative analysis of Fur binding sites across *Escherichia coli* strains. Yoko Kagayama, Taku Oshima, Toru Tobe, Naotake Ogasawara 第32回日本分子生物学会、2009年12月10日、横浜
6. ChIP- and ChAP-chip analysis: Methods of the analysis of a DNA-protein interaction in vivo. Taku Oshima 4th International *E. coli* Alliance、2008年9月25日、Hinxtion, UK

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小笠原 直毅 (OGASAWARA NAOTAKE)

奈良先端科学技術大学院大学・情報科学研究科・教授

研究者番号: 10110553

(2) 研究分担者

大島 拓 (OSHIMA TAKU)

奈良先端科学技術大学院大学・情報科学研究科・助教

研究者番号: 50346318

(3) 研究分担者

黒川 顕 (KUROKAWA KEN)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号: 20343246

(4) 研究分担者

戸邊 亨 (TOBE TORU)

大阪大学大学院・医学研究科・准教授

研究者番号: 70207596

(5) 研究分担者

鈴木 穰 (SUZUKI YUTAKA)

東京大学大学院・新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号: 40323746

(6) 連携研究者

饗場 浩文 (AIBA HIROFUMI)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号: 60211687