

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18667

研究課題名(和文)細菌のヒストン様因子による転写制御ネットワークがプラスミドと宿主に与える影響

研究課題名(英文)Plasmid-host interactions mediated by nucleoid-associated proteins

研究代表者

水口 千穂(鈴木千穂)(SUZUKI-MINAKUCHI, Chiho)

東京大学・生物生産工学研究センター・助教

研究者番号：10733032

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文): 宿主細菌がプラスミドを獲得すると、プラスミド上の遺伝子が染色体由来の因子の制御を受けると同時に、染色体上の遺伝子もプラスミド由来の因子の制御を受けることになる。この過程の鍵因子の一つが、プラスミドと染色体の両方にコードされる核様体タンパク質(ヒストン様因子)である。本研究では分解プラスミドpCAR1とその宿主である*Pseudomonas putida* KT2440株において、pCAR1にコードされるHUホモログとNdpAホモログが宿主のバイオフィーム形態に関与することを見出した。また、pCAR1と染色体にコードされるNdpAホモログがpCAR1保持に伴う宿主への負荷に関与する可能性を提示した。

研究成果の概要(英文): Nucleoid-associated proteins (NAPs), which fold bacterial DNA and influence gene transcription, are global transcriptional regulators of genes on both plasmids and the host chromosome. The catabolic plasmid pCAR1 carries three genes encoding NAPs: MvaT homologue (H-NS family protein) Pmr, NdpA homologue Pnd, and HU homologue Phu. In this study, we used *Pseudomonas putida* KT2440 as a host of pCAR1 and clarified the functions of HU and NdpA homologues. KT2440 (pCAR1) forms flat and filamentous biofilms, while enhanced filamentous morphology was observed when pmr and pnd, or pmr and phu, were simultaneously disrupted. Three genes on the chromosome (PP_0308, PP_0309, and PP_2193) were suggested to be related with the biofilm morphology. Furthermore, we found that car gene cluster, which is responsible for degradation of carbazole, were always lost in the double mutant of pnd and PP_0973 (encoding an NdpA homologue), suggesting that NdpA homologues affect fitness of the host.

研究分野：環境微生物学

キーワード：核様体タンパク質 プラスミド 遺伝子発現 転写制御 バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

プラスミドは、染色体とは独立に複製される細胞内 DNA であり、接合等によって細菌間を水平伝播する可動性遺伝子である。従来、プラスミドは宿主細菌に抗生物質耐性能や難分解性物質分解能など新規形質を付与するだけの因子と捉えられてきたが、最近の研究からは、プラスミド由来の形質が宿主染色体由来因子の制御を受けるだけでなく、宿主染色体の機能そのものもプラスミド由来因子に制御されることが明らかとなっている [Nojiri, 2013, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 24:423-30]。我々はこのようなプラスミド-宿主染色体間相互作用について、含窒素芳香族化合物カルバゾールの分解プラスミド pCAR1 と、土壌細菌 *Pseudomonas putida* KT2440 株をモデルとして、pCAR1 と宿主染色体の両方にコードされる核様体タンパク質 (NAPs) に着目して研究を進めてきた。

NAPs は DNA に結合し、その構造を変化させることで多数の遺伝子の転写を制御することから「細菌のヒストン様因子」とも言われるタンパク質である。上述の pCAR1 には MvaT ホモログ Pmr (H-NS ファミリータンパク質群に属する) NdpA ホモログ Pnd、HU ホモログ Phu の異なる 3 種の NAPs がコードされている。本研究開始前に、我々は *pmr*、*pnd*、*phu* の各単独破壊株のトランスクリプトーム解析から各タンパク質の標的遺伝子群を明らかにすると共に、*pmr* と *pnd*、および *pmr* と *phu* の各二重破壊株 (以下、それぞれ *pmr pnd* 株、*pmr phu* 株と表記) では pCAR1 の安定性や接合伝達頻度が顕著に低下することを見出していた [Suzuki-Minakuchi *et al.*, 2015, *Appl. Environ. Microbiol.*, 81:2869-80]。また別の研究から、Pmr は KT2440 株染色体由来の MvaT ホモログとヘテロ多量体を形成し協調的に機能することが明らかとなっていた [Yun *et al.*, 2016, *Appl. Environ. Microbiol.*, 82:832-42; Suzuki *et al.*, 2014, *PLoS ONE*, 9:e105656]。

以上の背景から、宿主内でのプラスミドの挙動を明らかにするためには、上記 3 種類の NAPs の機能について、KT2440 株染色体由来のホモログも含めてより詳細な解析を進める必要が考えられた。しかし本研究開始当初、我々は MvaT ホモログに焦点を当てて研究を展開しており、NdpA ホモログや HU ホモログについての知見は少なく、特に NdpA ホモログについては世界的に見てもほとんど研究が行われていない状況であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、これまで MvaT ホモログを中心に研究を展開してきたプラスミド-宿主染色体間の相互作用について、MvaT ホモログ以外の NAPs を染色体由来のものも含めて対象とし、宿主細菌の生理状態やプラスミドの機能に及ぼす影響を評価することを目的とした。

(1) Pnd と Phu が宿主のバイオフィーム形態に及ぼす影響とそのメカニズムの解析

本研究開始前に我々は、KT2440 株が pCAR1 を保持すると元々マッシュルーム状だったバイオフィームが繊維状に変化すること、*pmr pnd* 株、*pmr phu* 株の各二重破壊株ではさらに繊維状化したバイオフィームが形成されることを見出していた (図 1)。本研究ではこの現象を引き起こすメカニズムの解明を行った。

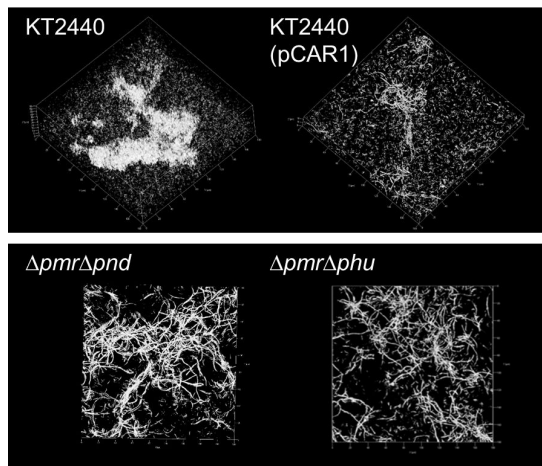


図 1. KT2440 株が形成するバイオフィーム

上段に KT2440 株とその pCAR1 保持株の結果を、下段に KT2440(pCAR1)株の二重破壊株の結果を示した。いずれも図の四角 (xy 軸) が 180 × 180 μm である。発表論文の Fig. 1 を改変・引用した。

(2) NdpA ホモログ (Pnd と染色体由来の PP_0973 遺伝子産物) が宿主のカルバゾール資化能に及ぼす影響の解析

本研究を進める中で、KT2440 株染色体上の NdpA ホモログをコードする遺伝子 (PP_0973) と *pnd* との二重破壊株を作製しようとしたところ、pCAR1 由来のカルバゾール資化能を失った株しか取得できなかった。このため本研究では、この現象が起こるメカニズムの解明を目指して研究を行った。

3. 研究の方法

(1) KT2440 株、KT2440(pCAR1)株、*pmr pnd* 株、*pmr phu* 株をそれぞれバイオフィーム形成条件下で培養後に RNA を抽出し、タイリングアレイに供した。まず KT2440 株と KT2440(pCAR1)株の結果を、過去に取得した浮遊条件下での結果 [Shintani *et al.*, 2010, *Environ. Microbiol.*, 12:1413-26] と比較することでバイオフィーム状態特異的に転写変動する遺伝子を選抜した。これらの遺伝子のうち、*pmr pnd* 株、*pmr phu* 株でも共通して転写が変動していた遺伝子を、バイオフィームの繊維状化を引き起こす (または繊維状化を亢進する) 遺伝子の候補として選抜した。これらの遺伝子を KT2440 株および KT2440(pCAR1)株において pBBad18K ベクタ

— [Sukchawalit *et al.*, 1999, *FEMS Microbiol. Lett.*, 181:217-23] から過剰発現させることにより、導入遺伝子の発現がバイオフィルムの形態に及ぼす影響を評価した。

(2) PP_0973 と *pnd* の二重破壊株を作製する過程で得られた候補株について、pCAR1 上の 7 箇所の領域を対象に PCR を行った結果、二重破壊株はカルバゾール分解遺伝子群 (*car* 遺伝子群) を特異的に欠失していることが明らかとなった。過去の研究から、このような現象は相同組換えにより起こることが示唆されていたため [Takahashi *et al.*, 2009, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75:3920-9]、二重破壊株における相同組換え頻度の定量を Rodríguez-Beltrán らの手法 [2015, *Mol. Biol. Evol.*, 32:1708-16] を参考に行った。相同組換えが起こるとカナマイシン (Km) 耐性を持つようになる遺伝子カセットを、トランスポゾン Tn7 により染色体上に組み込んだ株を用いて実験を行った (図 2)。

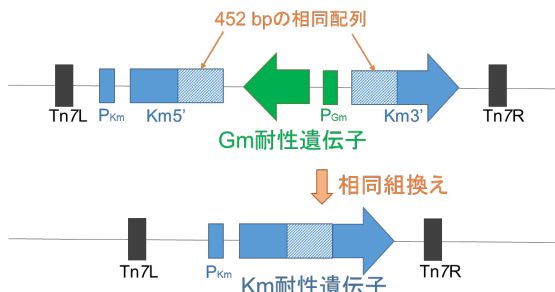


図 2. 相同組換え頻度定量のための遺伝子カセットの模式図

Km 耐性遺伝子を 2 つの領域に分け、両端に Km 耐性遺伝子内部の 452 bp の配列が存在するように設計した。2 つに分かれた Km 耐性遺伝子間にゲンタマイシン (Gm) 耐性遺伝子が存在するため、通常はこの遺伝子に由来する Gm 耐性が宿主に付与されるが、上述の相同配列で組換えが起こると宿主の Gm 耐性が消失し Km 耐性が付与される。

4. 研究成果

(1) トランスクリプトーム解析から、バイオフィルムの繊維状化を引き起こす (または繊維状化を亢進する) 遺伝子の候補として KT2440 株染色体上の 32 個の遺伝子が選抜された。これらの遺伝子を組み込んだ pBBad18K ベクターを KT2440 株と KT2440(pCAR1) 株の両方に導入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてバイオフィルムの形態を観察した。KT2440 株に遺伝子導入した株では、ほとんどの株が KT2440 株と同様のマッシュルーム状のバイオフィルムを形成していたのに対し、PP_2193 (TonB-dependent siderophore receptor をコードする) を過剰発現させた場合には、バイオフィルムが繊維状化する様子が確認された (図 3)。

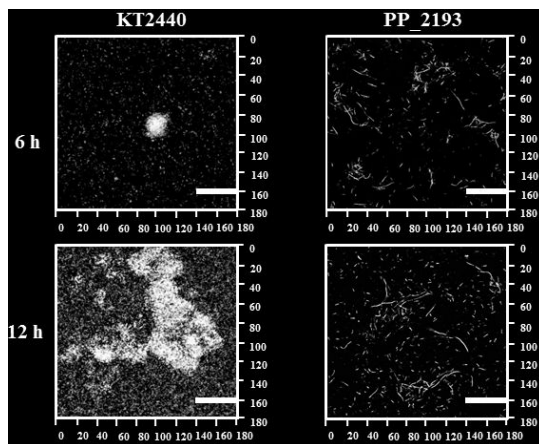


図 3. KT2440 株のバイオフィルム形態における PP_2193 過剰発現の影響

培養後 6 時間目 (上段) と 12 時間目 (下段) に KT2440 株のバイオフィルム (左) と PP_2193 を過剰発現させた KT2440 株のバイオフィルム (右) を観察した結果を示した。いずれも図の四角 (xy 軸) が 180 × 180 μm であり、白色のスケールバーは 40 μm を表す。発表論文 の Fig. 2 を引用した。

Pseudomonas 属細菌は、難溶性の 3 価の鉄を獲得するためシデロフォアと呼ばれる低分子化合物を細胞外に放出し、そのキレート作用によって鉄を細胞内に取り込む。PP_2193 はこの受容体をコードしていると推測される。過去の研究から、KT2440 株は pCAR1 保持に伴い鉄欠乏状態に陥ることが明らかとなっている [Shintani *et al.*, 2010, *Environ. Microbiol.*, 12:1413-26]。つまり KT2440 株は pCAR1 保持により欠乏した鉄を補うために PP_2193 を発現させるが、それが原因でバイオフィルムの形態が繊維状に変化するというメカニズムが推測される。

同様に、KT2440(pCAR1) 株に遺伝子導入した株では、PP_0308 と PP_0309 (いずれも機能未知) を過剰発現させた場合にバイオフィルムの繊維状化が亢進される様子が観察された (図 4)。

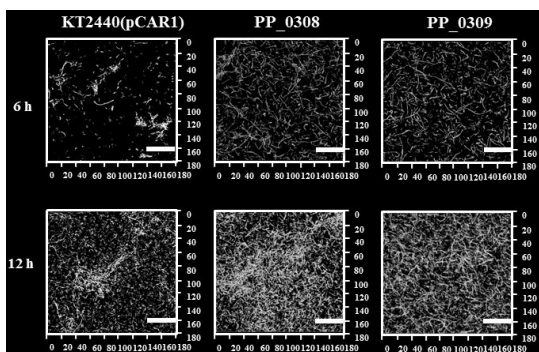


図 4. KT2440(pCAR1) 株のバイオフィルム形態における PP_0308 および PP_0309 過剰発現の影響

培養後 6 時間目 (上段) と 12 時間目 (下段) に KT2440(pCAR1) 株のバイオフィルム (左) と PP_0308 (中央) または PP_0309 (右) を過剰発現させた KT2440(pCAR1) 株のバイオフィルム

フィルムを観察した結果を示した。いずれも図の四角(xy軸)が180×180μmであり、白色のスケールバーは40μmを表す。発表論文のFig. 4を引用した。

以上の研究から、KT2440株がpCAR1を保持した際にバイオフィルムが繊維状化する現象にはPP_2193が、KT2440(pCAR1)株のバイオフィルムの繊維状化が*pmr pnd*株、*pmr phu*株において亢進する現象にはPP_0308とPP_0309が関係することが明らかとなった。少なくともPP_0308とPP_0309の発現にはPndとPhuが関与していると考えられるが、詳細なメカニズムについてはさらなる研究が必要である。以上の研究成果については発表論文にて報告した。

(2) 図2で示した遺伝子カセットを組み込んだKT2440(pCAR1)株について、染色体上のPP_0973とpCAR1上の*pnd*を単独破壊した株と二重破壊した株の相同組換え頻度を、全菌数に対するKm耐性菌数の割合で算出した(表1)。その結果、二重破壊株の相同組換え頻度はKT2440(pCAR1)株に比べて約2倍に上昇していることが明らかとなった。しかし、KT2440(pCAR1)株や、PP_0973または*pnd*の単独破壊株の*car*遺伝子群保持率がほぼ100%であるのに対し、二重破壊株では数百コロニーを調べても*car*遺伝子群を保持する株が見つからなかったことを考えると、上述の二重破壊株における相同組換え頻度の上昇が*car*遺伝子群の欠失に直接繋がっているとは考えにくい。

表1. KT2440(pCAR1)株と、その遺伝子破壊株における相同組換え頻度

使用した菌株	相同組換え頻度(×10 ⁻⁵)* (Km耐性菌数/全菌数)
KT2440(pCAR1)株	7.6±0.4
PP_0973破壊株	6.5±0.2
<i>pnd</i> 破壊株	6.9±0.2
PP_0973, <i>pnd</i> 二重破壊株	13±0.4

*3連の実験の平均値±標準誤差で算出した

我々は別の研究テーマにおいて、*car*遺伝子群の欠失がpCAR1保持株の生存に有利に働くことを見出している(未発表データ)。この事実と上記の結果を併せると、二重破壊株では宿主に何らかの負荷がかかるため、偶然生じた*car*遺伝子群を欠失した細胞が集団中で優占化し、結果として二重破壊株を培養すると大半が*car*遺伝子群欠失株になるという可能性が考えられた。以上の研究成果については学会発表にて報告した。

本研究では、NAPsがプラスミドと宿主に及ぼす影響について、特にNdpAホモログを中心に研究を展開してきた。NdpAホモログは、大腸菌におけるホモログ(YejK)が核様体

中から発見[Murphy *et al.*, 1999, *J. Bacteriol.*, 181:3842-4]されて以降、YejKの溶液中での会合度やDNA結合能の確認など基本的なタンパク質としての性質を調べた報告[Lee and Mariani, 2013, *J. Biol. Chem.*, 288:31503-16]以外に報告が無く、その機能は全くと言って良いほど分かっていない。本研究で得られた成果は、プラスミド-宿主染色体間の相互作用だけでなく、謎が多いNdpAホモログの機能解析においても足がかりになるものと言える。

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1件)

Lee S, Takahashi Y, Oura H, Suzuki-Minakuchi C, Okada K, Yamane H, Nomura N, Nojiri H. Effects of carbazole-degradative plasmid pCAR1 on biofilm morphology in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology Reports*, Vol. 8, No. 2, 2016, pp. 261-71. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12376>

[学会発表](計1件)

佐道 陽弘、角埜 裕基、水口 千穂、岡田 憲典、野尻 秀昭 「核様体タンパク質の一種NdpAホモログの相同組換え頻度に及ぼす影響の解析」日本農芸化学会2018年度大会(2018年)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水口 千穂(MINAKUCHI, Chiho)
東京大学・生物生産工学研究センター・助教
研究者番号：10733032