

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02097

研究課題名（和文）宿主にとってよそ者であるプラスミド自身が外来遺伝子のサイレンサーを持つ理由の解明

研究課題名（英文）Why are xenogeneic silencers encoded on plasmids, which are xenogeneic DNA for host bacteria?

研究代表者

水口 千穂（鈴木千穂）（Suzuki-Minakuchi, Chiho）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：10733032

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,000,000円

研究成果の概要（和文）：細菌のプラスミド上には薬剤耐性や難分解性物質分解に関わる遺伝子など人間社会と関係の深い遺伝子がしばしば存在する。これらの遺伝子が宿主細胞内で発現するためには、プラスミドと宿主染色体由来の因子による適切な制御が必要である。本研究では、細菌の核様体タンパク質（真核生物のヒストンのようにDNAの折り畳みと遺伝子の転写制御に関与する）の一種であるH-NSファミリータンパク質に着目し、プラスミド由来と染色体由来のH-NSファミリータンパク質の相性がどのようにして決まるのかを解明するため、その背景に存在するメカニズムの解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラスミドとその宿主となる細菌の染色体には、同じ種類のH-NSファミリータンパク質がコードされている傾向があることが知られている。本研究ではPseudomonas属細菌のMvaTホモログを対象に、プラスミド安定性への寄与の評価、プラスミド由来の新規H-NSファミリータンパク質の探索、二量体・多量体化ドメインの構造解析を行うことで、MvaTホモログと他の種類のH-NSファミリータンパク質との共通点と相違点を明らかにした。本研究の成果はプラスミドと染色体由来のH-NSファミリータンパク質の相性を決めるメカニズムの一端を明らかにしたものであり、プラスミドと宿主の相性を考える足掛かりとなるものである。

研究成果の概要（英文）：Plasmids are mobile genetic elements that confer new phenotypes to host bacteria, such as antibiotic resistance or the ability to degrade xenobiotic compounds. Host bacteria that can properly control the expression of genes on plasmids can take advantage of the benefits of plasmid carriage. H-NS family proteins, one of the nucleoid-associated proteins, are candidate effectors of the plasmid-chromosome cross-talks. Here, we focused on the MvaT homologs conserved among Pseudomonas strains and evaluated their contribution to the plasmid stability and host survivability, determined the structure of the dimerization/oligomerization domain, and searched for uncharacterized plasmid-encoded H-NS family proteins. Our findings shed light on the similarities and diversity of H-NS family proteins.

研究分野：環境微生物学

キーワード：プラスミド 核様体タンパク質 H-NS Pseudomonas

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外来遺伝子は細菌の形質を大きく変化させることで進化を促す反面、遺伝子の複製、転写、翻訳に余分なエネルギーが必要となることから、多くの場合、細菌の生育にとって負荷となる。外来遺伝子のサイレンサーとして知られる H-NS ファミリータンパク質は、低 GC 含量を特徴とする外来遺伝子に優先的に結合して転写を抑制することで、当該領域が転写、翻訳されることによる宿主への負荷を軽減する作用を持つ。H-NS ファミリータンパク質の中で最もよく研究されてきたのは腸内細菌に保存される H-NS ホモログであり、C 末端側の DNA 結合ドメインで低 GC 含量領域を認識して結合し、N 末端側の二量体・多量体化ドメインを用いて DNA 上で多量体を形成することで、RNA ポリメラーゼの結合や進行を妨げることが知られている。一方で、アミノ酸配列の保存性は低いものの、大腸菌 *hns* 破壊株の表現型を相補できることを理由として同定された「機能的ホモログ」も H-NS ファミリータンパク質に含まれており、主な例としては *Pseudomonas* 属細菌に保存される MvaT ホモログや、*Mycobacterium* 属細菌等に保存される Lsr2 ホモログが知られている (Qin *et al.*, 2019, *Open Biol.*, 9:190223)。

H-NS ファミリータンパク質は染色体だけでなく可動性遺伝子であるプラスミドにもコードされている。我々が過去に調査した結果では、プラスミドとその宿主となる細菌の染色体には同じ種類の H-NS ファミリータンパク質がコードされている傾向が見られた (Shintani *et al.*, 2015, *Plasmid*, 80:32-44)。これはプラスミドと宿主染色体に同じ種類の H-NS ファミリータンパク質がコードされている方がプラスミドの維持に有利であることを示唆している。しかし、本研究開始当初はプラスミドにコードされる H-NS ファミリータンパク質の研究例が極めて限定的であったために、プラスミド由来の H-NS ファミリータンパク質と染色体由来の同因子がどのように協同し合って機能するのか、なぜ他の種類の H-NS ファミリータンパク質とは上手く機能しないのかが不明であった。

2. 研究の目的

本研究では *Pseudomonas* 属細菌を宿主とする芳香族化合物分解プラスミド pCAR1 をモデルとし、pCAR1 と宿主染色体にコードされる MvaT ホモログが協調的に機能するメカニズムを明らかにすること、また MvaT ホモログを中心に他の種類の H-NS ファミリータンパク質との共通点と相違点を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

pCAR1 には MvaT ホモログ Pmr がコードされており、本研究で使用した宿主である *Pseudomonas putida* KT2440 株染色体には 5 つの MvaT ホモログ (TurA~E) が、*Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株染色体には 1 つの MvaT ホモログ (MvaT) がコードされている。本研究では以下の(1)~(3)の各項目について研究を実施した。

(1) H-NS ファミリータンパク質とプラスミドの安定性

腸内細菌の H-NS では、プラスミド上の *hns* 遺伝子を破壊することにより、プラスミド保持株の集団内での生残性が低下する例が報告されている (Doyle *et al.*, 2007, *Science*, 315:251-2)。本研究では、pCAR1 上の *pmr* 遺伝子を破壊することにより同様の現象が見られるか評価した。また同時に、染色体上の MvaT ホモログをコードする遺伝子を破壊した場合についても評価を行った。

KT2440 株と CA10dm4 株を宿主として、*pmr* 遺伝子を破壊した pCAR1 Δ *pmr* 保持株をコハク酸を唯一の炭素源とする培地で培養し、プラスミド保持率を経時的に比較する stability assay を行った。また、pCAR1 Δ *pmr* 保持株をプラスミド非保持株と等量混合し、上述の培地で 24 時間ごとに継代培養を行うことで細菌集団内のプラスミド保持率を経時的に比較する competition assay も行った。染色体側の遺伝子破壊株については、MvaT ホモログをコードする遺伝子を 1 つのみ持つ CA10dm4 株を用いて相同組換えにより作製した。

(2) H-NS ファミリータンパク質の多量体形成様式の比較

我々は過去に KT2440 株染色体にコードされる MvaT ホモログ TurB の二量体・多量体化ドメインの結晶構造を報告している (Suzuki-Minakuchi *et al.*, 2016, *FEBS Lett.*, 590:3583-94)。当時は多量体形成に必要な二箇所の二量体化部位のうち、terminal dimerization site (TDS) にアラニン置換を導入したタンパク質 (TurB_{nt61}-R8A) を使用していた。本研究では central dimerization site (CDS) の一部を除去したタンパク質 (TurB_{nt50}) を用いることで、アラニン置換を含まない TDS の結晶構造解析を行った。また、過去の構造と併せることで明らかとなった TurB の多量体形成機構を他の種類の H-NS ファミリータンパク質と比較した。

(3) プラスミドにコードされる新規 H-NS ファミリータンパク質の探索

過去に実施した結晶構造解析から、MvaT ホモログの CDS は腸内細菌の H-NS ホモログの構

造と類似していることが明らかとなっている (Suzuki-Minakuchi *et al.*, 2016, *FEBS Lett.*, 590:3583-94)。このことから、タンパク質の類似構造の検索により、アミノ酸配列の相同性検索では見つけることのできなかった H-NS ファミリータンパク質を見出すことができるのではないかと考えた。そこで本研究では、*Pseudomonas* 属細菌を宿主とするプラスミドを集めたデータベースに対し、MvaT ホモログの構造をクエリとして、類似構造を持つタンパク質をコードする遺伝子を探索した。

4. 研究成果

(1) H-NS ファミリータンパク質とプラスミドの安定性

Stability assay の結果、pCAR1 Δ pmr は KT2440 株と CA10dm4 株の両宿主で安定に保持された。また competition assay の結果、KT2440 株では pmr 遺伝子の有無にかかわらずプラスミド保持株は集団中から淘汰され、CA10dm4 株では pmr 遺伝子の有無にかかわらずプラスミド保持株の割合は変化しなかった。この結果は、腸内細菌のプラスミドの場合とは異なり、Pmr は pCAR1 の安定性や pCAR1 保持株の生残性には寄与しないことを示している。一方、CA10dm4 株染色体上の mvaT 遺伝子の破壊株では、stability assay の結果、pCAR1 の安定性が低下していることが示唆された。以上より、腸内細菌と *Pseudomonas* 属細菌では H-NS ファミリータンパク質の機能に何らかの違いが存在することが明らかとなった (国内学会発表、国際学会発表)。

(2) H-NS ファミリータンパク質の多量体形成様式の比較

TurB_{nt50} は大腸菌で発現させ、C 末端側に融合させた His-tag によりアフィニティー精製を行った。タンパク質間クロスリンク法により、TurB_{nt50} は二量体を形成するが多量体を形成しないことが示されたため、TurB_{nt50} は TDS で二量体を形成すると考えられた。そこで TurB_{nt50} の結晶化条件のスクリーニングを行い、native-SAD 法で得られたモデルを用いて、分子置換法により分解能 2.7 Å で結晶構造を決定した (図 1、PDB ID: 8H8H)。TurB_{nt50} は 2 本のヘリックスから成り、非対称単位中には 8 分子の単量体が含まれていた。いずれも N 末端側で他の単量体と疎水性相互作用や水素結合を形成しており、これが TDS の二量体形成様式であると考えられた。また、以前の研究で結晶構造を明らかにした TurB_{nt61-R8A} では 1 本のヘリックスであった領域が、TurB_{nt50} では D27 で曲がり 2 本のヘリックスとなっていた (図 1)。これにより一方の単量体の R8 ともう一方の単量体の E37 が塩橋を形成しており、TurB_{nt61-R8A} ではこのイオン相互作用が働かないことで TDS の二量体形成能が失われていたことが明らかとなった。また、X 線溶液散乱の結果から求めた慣性半径は結晶構造から計算した値に比べて大きく、TDS は溶液中では伸びた構造になっていることも示唆された。

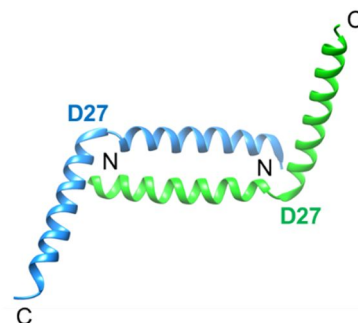


図 1. TurB_{nt50} の結晶構造

TurB_{nt50} 由来の TDS と TurB_{nt61-R8A} 由来の CDS を用いて得られた二量体・多量体化ドメイン全体のモデル構造 (図 2) から、MvaT ホモログの二量体・多量体化ドメインは、腸内細菌の H-NS の同ドメインの結晶構造 (Arold *et al.*, 2010, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107:15728-32) と比べて TDS が大きく異なっていることが明らかとなった。これは H-NS ホモログが腸内細菌の、MvaT ホモログが *Pseudomonas* 属細菌の核様体形成に特化した進化を遂げた可能性を示唆していると考えられた (国内学会発表、国内シンポジウム発表 [招待講演]、国際シンポジウム発表 [招待講演]、創薬等先端技術支援基盤プラットフォームの支援を受けて実施)。

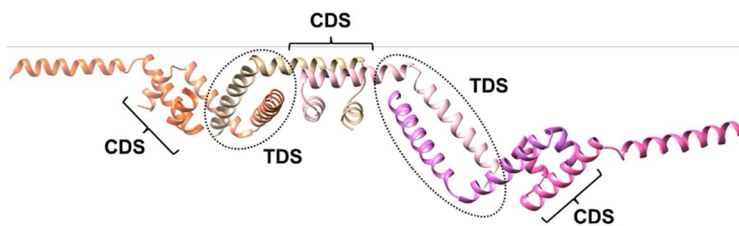


図 2. TurB の二量体・多量体化ドメインのモデル構造

結晶構造解析により決定された TDS, CDS の構造を図中に示した。

(3) プラスミドにコードされる新規 H-NS ファミリータンパク質の探索

Pseudomonas 属細菌を宿主とするプラスミドを集めたデータベースに対し、KT2440 株染色体由来の TurA の予測構造 (AlphaFold Protein Structure Database, UniProt ID: Q88N50)、および本研究で作製した TurB のモデル構造をクエリとして、類似構造を持つタンパク質をコードする遺伝子を探索した。その結果、7 つのタンパク質が新規 H-NS ファミリータンパク質の候補として見出された。現在、これらのタンパク質について H-NS 様機能の確認や、多量体形成能・DNA 結合能の解析を進めている。今後、これらの新規 H-NS ファミリータンパク質をコードするプラスミドの宿主を絞り込み、宿主細胞内でこれらの H-NS ファミリータンパク質がどのような役割を果たしているのか解析を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 水口 千穂、Vasileva Delyana、荒川 孝俊、米澤 健人、清水 伸隆、森脇 由隆、岡田 憲典、野尻 秀昭
2. 発表標題 Pseudomonas属細菌の核様体タンパク質TurBの多量体形成機構
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chiho Suzuki-Minakuchi
2. 発表標題 Xenogeneic silencing: its potential to control the function of mobile genetic elements
3. 学会等名 Thailand-Japan Collaboration Symposium: Microbial Biotechnology: Role in Environmental Sustainability (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水口 千穂
2. 発表標題 核様体タンパク質がプラスミドと宿主の相性を決める？
3. 学会等名 NIG-JOINT研究会「プラスミドの網羅的データベースの再整備に向けて」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 牛嶋勇貴、後藤拓海、江本光毅、宮澤佳甫、水口千穂、岡田憲典、福間剛士、野尻秀昭
2. 発表標題 ナノ内視鏡AFMによるバクテリア細胞内部構造の可視化
3. 学会等名 第21回微生物研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chiho Suzuki-Minakuchi
2. 発表標題 Universality and diversity of H-NS family proteins in their oligomerization manners
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水口 千穂、江本 光毅、森脇 由隆、Yang Miaoyan、佐道 陽弘、鈴木 研志、荷村（松根） かわり、松谷 峰之介、渡辺 智、岡田 憲典、野尻 秀昭
2. 発表標題 プラスミド 宿主染色体間相互作用の構築に重要な新規核様体タンパク質のDNA結合様式
3. 学会等名 第18回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 江本 光毅、水口 千穂、森脇 由隆、Yang Miaoyan、鈴木 研志、岡田 憲典、野尻 秀昭
2. 発表標題 AlphaFoldを用いた構造予測に基づく核様体タンパク質のDNA 結合様式の解明
3. 学会等名 第18回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 牛嶋勇貴、後藤拓海、江本光毅、宮澤佳甫、水口千穂、岡田憲典、福間剛士、野尻秀昭
2. 発表標題 ナノ内視鏡AFMによるバクテリア細胞内部の可視化
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Liangning Lu, Chiho Suzuki-Minakuchi, Kazunori Okada, Hideaki Nojiri
2. 発表標題 Function of the pCAR1-encoded MvaT homolog on the fitness of pCAR1-harboring pseudomonads
3. 学会等名 International Symposium on Plasmid Biology 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 盧 梁凝、水口 千穂、岡田 憲典、野尻 秀昭
2. 発表標題 Pseudomonas属細菌のMvaTホモログがプラスミドpCAR1保持に与える影響
3. 学会等名 第20回微生物研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 盧 梁凝、水口 千穂、岡田 憲典、野尻 秀昭
2. 発表標題 Pseudomonas resinovorans CA10株の染色体由来H-NS様タンパク質はプラスミドpCAR1の安定性に寄与する
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水口千穂、Vasileva Delyana、荒川孝俊、岡田憲典、野尻秀昭
2. 発表標題 Pseudomonas属細菌のH-NSファミリータンパク質TurBの末端二量体化部位の結晶構造
3. 学会等名 2022年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 盧 梁凝、高島 綾、杉山 京佳、水口 千穂、岡田 憲典、野尻 秀昭
2. 発表標題 プラスミドpCAR1にコードされるH-NS様タンパク質Pmrが宿主の細菌集団内での生残性に与える影響の評価
3. 学会等名 第19回微生物研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 盧 梁凝、高島 綾、杉山 京佳、水口 千穂、岡田 憲典、野尻 秀昭
2. 発表標題 プラスミド由来のH-NS様因子が宿主細菌の集団内での生残性に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yang Miaoyan, Suzuki-Minakuchi Chiho, Suzuki Kenshi, Vasileva Delyana, Nimura-Matsune Kaori, Matsutani Minenosuke, Watanabe Satoru, Okada Kazunori, Nojiri Hideaki
2. 発表標題 Binding manner of MvaT homologs in pCAR1-free and -harboring Pseudomonas putida KT2440
3. 学会等名 第21回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------