

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380043

研究課題名(和文) 染色体機能調節因子としてのプラスミドの機能メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mode of functions of plasmid as the modulator of host chromosomal functions

研究代表者

野尻 秀昭 (NOJIRI, Hideaki)

東京大学・生物生産工学研究センター・教授

研究者番号：90272468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：プラスミドによる宿主染色体の機能調節のメカニズムを解明するため、“プラスミドを保持すること”の浸透圧ストレスへの影響や特定の遺伝子群の転写誘導/転写抑制について機構解明を行った。また、この現象において重要な役割を果たすプラスミド由来の核様体タンパク質(特に中心的役割を果たすH-NS familyタンパク質)の二量体化・多量体化機構をタンパク質間相互作用の解析と結晶構造を元に解析した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the modulation mechanism of host chromosomal functions by plasmid, the reduction of osmotic stress tolerance and the induction/reduction of the specific genes by plasmid carriage were investigated. In addition, mechanisms of dimerization/multimerization of plasmid-borne H-NS family proteins were investigated by protein-protein cross-linking assays and protein structure determined by X-ray crystallography.

研究分野：環境微生物学

キーワード：プラスミド 染色体 遺伝子発現 転写制御 核様体

1. 研究開始当初の背景

環境中の微生物は、変異、組換えによる遺伝子・ゲノムの変容に加えて、遺伝子の水平伝播によりゲノム構成を変化させている。これらは細菌の形質の多様化をもたらす“場”がもたらす選択圧によって適当な形質を示す宿主が生残する。これが、環境細菌の進化の実体である。プラスミドはサイズ(含まれる遺伝子の数)・接合伝達頻度・受容菌域から考えて、ゲノム構成の変容原因として重要な進化装置である。プラスミドによる一連の進化プロセスの中で、外来のプラスミドを保持した場合の形質の多様化の程度とメカニズムについては知見が十分とは言えない。それは、プラスミドは宿主に“共通の機能(形質)を与える”と盲目的に考えられてきたことによる。しかし、近年、薬剤耐性プラスミド pB10 の安定性や接合伝達域が宿主ごとに変わることが報告された。研究代表者らも、カルバゾール分解 IncP-7 群プラスミド pCAR1 (200 kb) の存在が染色体上の遺伝子発現様式を大規模に変化させて染色体由来の新形質を発現させること、複数の宿主に鉄欠乏や緊縮応答の遅延等を共通に誘導したり、宿主特異的に特定の染色体遺伝子の転写を変動させたりすることを明らかにした。さらに、pCAR1 上の遺伝子の一部は異なる宿主内では転写量が大きく変動する。また、pCAR1 の接合伝達能や、pCAR1 保持菌が示す分解力/pCAR1 の構造安定性も、宿主ごとに変わることが明らかにしている。これら情報に基づくと、プラスミドが宿主形質を変化させる機構は、(1)プラスミド上の遺伝子が発現することによる直接的な形質変化、(2)染色体に比べて無視できない量の遺伝子が細胞内に入り複製・発現することによる間接的影響、(3)プラスミド由来酵素の発現に伴う生体内物質変動による間接的影響の他、(4)プラスミド由来の因子による染色体遺伝子の直接的な転写制御の4つであると考えられる。しかし、4番目の機構の解析は極めて不十分である。

この4番目の機構の主要な役割として、プラスミド上にコードされる核様体タンパク質(NAPs)がある。研究代表者の以前の研究でも、pCAR1 にコードされる H-NS family タンパク質 Pmr、NdpA 様因子 Pnd、HU ホモログ Phu といった NAPs が重要な役割を果たしていることが明らかにされていた。このような背景から、プラスミドの染色体機能への影響を考える上で、プラスミドにコードされる NAPs の機能を、宿主染色体にコードされる NAPs との協調的働きという観点で理解することが重要であるとの認識に至った。

2. 研究の目的

本研究では、カルバゾール分解プラスミド pCAR1 の存在がどのように染色体上の多数の

遺伝子の転写変動を引き起こすのか、また種々基質への生育(呼吸)量変化をどのように引き起こすのかについて解明することで、“pCAR1 を持つ”というシグナルが転写制御を経て染色体機能を制御する機構を解明する。また、これらの現象の鍵因子である pCAR1 由来の複数の NAPs を対象に、機能構造解析と、NAPs 間での協調的な相互作用の解析を行うことで、上記シグナル伝達経路での NAPs の機能メカニズムを解明する。

具体的には、(1)pCAR1 による宿主への影響の機構解明、(2)プラスミド機能発現の鍵因子 NAPs の作用メカニズムの解明の2つを推進することで、プラスミドによる染色体機能制御の機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)pCAR1 による宿主への影響の機構解明

宿主の生育への影響の原因解明：pCAR1 を保持しても 4% [v/v] KCl 感受性とならない *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 のゲノムライブラリーを構築し、pCAR1 を保持する *Pseudomonas putida* KT2440 株(pCAR1 保持により高濃度 KCl 感受性となる)に導入して、非感受性となるショットガンクローン取得を目指した。

また、pCAR1 を保持する KT2440 株の自然耐性変異株の取得を試みた。

転写プロファイルの変動への影響の原因解明：以前の研究で明らかにされていた pCAR1 保持により転写変動する遺伝子群は、生育に伴う転写プロファイルの違いによっていくつかのグループに分けられる。

本研究では、転写プロファイルが類似したグループに特徴的なプロモータ領域の特徴を調べるため、まず高精度な転写開始点の決定を dRNAseq 法(5'末端に 3 リン酸をもった mRNA を濃縮したサンプルを濃縮していないサンプルと比較することで転写開始点を決定する手法)により行った。転写開始点上流に因子などの転写に関わり得る因子の結合の有無を推定し、転写変動が起こる原因を考察した。

さらに、プロモータ部分に結合する因子の違いが pCAR1 保持特異的な転写変動の原因であると推定されるため、プロモータ領域に結合するタンパク質の網羅的同定手法である DNA サンプリング法を用いた解析を試みた。

(2)プラスミド機能発現の鍵因子 NAPs の作用メカニズムの解明

H-NS family protein のタンパク質科学的解析：H-NS family protein は、一般に N 末端側に二量体化・多量体化ドメインを、リンカーを挟んで C 末端側に DNA 結合ドメインを有する。本研究では、pCAR1 由来の Pmr に加えて KT2440 株染色体にコードされている相同タンパク質である TurA と TurB の

N 末端側の二量体化・多量体化ドメインの機能を明らかにするため、Pmr, TurA, TurB の各ドメイン (Pmr_nt61, TurA_nt61, TurB_nt61) と同ドメインを含む長さの異なるタンパク質とをモル比を変えて混合し、タンパク質間クロスリンク法によってホモ・ヘテロ二量体の検出を行った。

さらに、以前の研究から、Pmr_nt61 では N 末端側から 6, 8, 15, 18, 20, 27, 49 番目の残基を各々アラニンで置換した場合にホモ多量体形成能が低下することが明らかとなっていた。これらの残基は TurA では 6 つが保存されているのに対し、TurB では 3 つしか保存されていない。そこで TurB_nt61 において上述の 7 残基のアラニン置換体を作製し、タンパク質間クロスリンク法によりホモ多量体形成能を調べた。

H-NS family protein の機能 - 構造解析 : N 末端側の二量体化・多量体化ドメインの機能をタンパク質構造から理解するために、上記で得られた Pmr_nt61 と TurB_nt61 のアミノ酸置換体の結晶化と X 線結晶構造解析を行った。

pCAR1 上の NAPs の機能的相互作用の解析 : 以前の解析で、pCAR1 を保持した KT2440 株は、コハク酸を唯一の炭素源とした液体培地を用いた静置培養において、器壁内面の気液界面付近に flat なバイオフィームを作ることが知られていた。この flat なバイオフィーム中では、細胞は繊維状化していることも明らかになっていた。これは、pCAR1 を保持しない KT2440 株が通常の桿菌の状態でマッシュルーム状のバイオフィームを形成するのとは対象的である。また、pCAR1 上の NAPs をコードする遺伝子を *pmr/pnd*, *pmr/phu* の組み合わせで二重破壊すると、上で述べた繊維状化が激しく亢進することも明らかになっていた。

そこで、pCAR1 上の NAPs 遺伝子の単独破壊株、二重破壊株のトランスクリプトームを、野生型株や振とう培養条件 (バイオフィーム非生成条件) でのトランスクリプトームと比較することで、繊維状化の原因因子の洗い出しを行った。

さらに、原因因子と推定された遺伝子の過剰発現株を作成し、そのバイオフィーム生成への影響を評価した。

4. 研究成果

(1)pCAR1 による宿主への影響の機構解明

宿主の生育への影響の原因解明 : 以前の解析で Biolog 社の Phenotype Microarray を用いた解析で、各種栄養塩の資化性やストレス条件への感受性が pCAR1 保持により変化することが明らかにされていた。本研究では、*Pseudomonas putida* KT2440 細胞特異的に、浸透圧ストレス (4% [v/v] KCl) 暴露への感受性が上がる (生育が遅くなる) 現象に注目

し、この pCAR1 の影響の原因を探ることにした。

まず、pCAR1 保持が KT2440 特異的に浸透圧ストレス耐性を低下させる機構解明を目指し、浸透圧耐性が強い PAO1 株のゲノムライブラリーを KT2440(pCAR1) 株に導入して耐性回復株の取得を試みた。スクリーニングの結果、目的とするクローンの取得には至らなかったが、この過程で極めて高い頻度で自然耐性変異株が出現することが明らかになった。そこで、4% [v/v] KCl 含有寒天培地上で、明らかに大きなコロニーを形成する株を取得し (数百株のスクリーニングの結果、約 10 株分離)、4% [v/v] KCl 含有液体培地での生育も回復していることを確認した。現在、それらの全ゲノムシーケンスにより、変異遺伝子の同定を行っている。

転写プロファイルの変動への影響の原因解明 : dRNAseq 法による解析の結果、pCAR1 上に合計 116 個の転写開始点を同定することができた。このうち 92 個の上流配列には ⁷⁰ 依存的プロモータと予測される配列が、4 個には ⁵⁴ 依存的プロモータと考えられる配列が見出された。また、以前のタイリングアレイを用いた転写解析の結果から pCAR1 上で 74 個の転写単位が特定されていたが、これと相当する 43 箇所に転写開始点が見出された。これに加え、新たに 37 個の転写単位の存在が示唆された。現在、染色体側の転写開始点を明らかにすると共に、プロモータ領域の解析を行っている。また、DNA サンプリング法による pCAR1 保持時に特異的な転写変動する遺伝子のプロモータ領域に結合する因子の同定のため、必要なプラスミドの作成を終了した。

(2) プラスミド機能発現の鍵因子 NAPs の作用メカニズムの解明

H-NS family protein のタンパク質科学的解析 : 腸内細菌の H-NS はホモ二量体や自身のホモログとのヘテロ二量体を形成することが知られている。一方、Pmr, TurA, TurB では以前の研究でホモ二量体の形成は示されていたものの、ヘテロ二量体の有無については確認されていなかった。そこで Pmr, TurA, TurB の二量体化・多量体化ドメインと同ドメインを含むが長さの異なるタンパク質とをモル比を変えて混合し、タンパク質間クロスリンク法によってホモ・ヘテロ二量体の検出を行った。その結果、いずれの組み合わせでもヘテロ二量体が確認された。また、この時 Pmr-TurA 間、Pmr-TurB 間ではモル比がそれぞれ 1:7, 1:10 でも Pmr のホモ二量体が検出された一方で、TurA-TurB 間ではモル比 1:3 で TurA のホモ二量体が見られなくなった。これは、他の組み合わせよりも TurA-TurB 間の方がヘテロ二量体を形成しやすいことを示唆している。以上より菌体内の各 MvaT ホモログの存在量がホモ・ヘテロ

二量体の存在量を変え、これが転写制御にも影響する可能性が示唆された。

また、TurB_nt61 の 7 つの残基について作成したアラニン置換体を使って、タンパク質間クロスリンク法によりホモ多量体形成能を調べた。その結果、8 番目の残基の置換体 (TurB_nt61-R8A) ではホモ多量体形成能が大きく低下し、ホモ二量体で安定に存在することが明らかとなった。一方、その他の残基はホモ多量体形成能への影響が少なかったことから、Pmr と TurB ではホモ多量体形成に重要な残基が異なることが示唆された。

H-NS family protein の機能 - 構造解析：ホモ多量体・ヘテロ二量体形成機構について興味深い知見が得られたものの、本研究開始当初は H-NS family protein ホモログのうち *Pseudomonas* 属が持つ MvaT 様因子の構造が未解明であったため、各現象に重要な残基の議論が困難であった。

そこで Pmr_nt61-R8A と TurB_nt61-R8A の結晶化を試みた。Pmr 由来タンパク質はうまく行かなかった一方で、TurB 由来タンパク質は酢酸アンモニウムを沈澱剤とする条件で結晶は成長した。X 線回折実験の結果、Photon Factory にて分解能約 2.3 の回折データの取得に成功した。当初は H-NS の結晶構造を用いた分子置換法で立体構造の解明を試みたが、TurB との相同性の低さから構造決定には至らなかった。そのため、セレノメチオニン置換タンパク質の結晶化を行い、単波長異常分散 (SAD) 法によって位相を決定した。これを分子置換の鋳型としてモデルの修正と精密化を行い、分解能 2.3 で最終構造を決定した。得られた構造は MvaT 様因子として世界初のもので、大腸菌やサルモネラ菌で解析が進んでいる H-NS とは異なる新規な二量体化・多量体化ドメインを有していた。現在、この構造を基に Pmr_nt61、TurA_nt61 のモデル構造の作製を進めており、これらの構造と上述の実験結果から MvaT ホモログのホモ多量体・ヘテロ二量体形成機構について議論を行う予定である。

pCAR1 上の NAPs の機能的相互作用の解析：KT2440 株が pCAR1 を持ったときに特異的に繊維状化し flat なバイオフィームを作る原因を探り、この現象への pCAR1 由来の NAPs の関与の仕方を探る観点で、各種の NAPs について一重、二重破壊株を作成し、トランスクリプトーム比較を行った。その結果、繊維状化に関係する遺伝子として 32 個の染色体上の遺伝子 (いずれも繊維状化するか、繊維状化が亢進する際に転写レベルが上昇する) を抽出した。これらの遺伝子の一つずつ KT2440 株、KT2440(pCAR1) 株に導入して高発現させた。KT2440 株での後発現株では、PP_2193 (TonB-dependent siderophore receptor) を高発現させたときに、菌体が繊維状化する現象が観察された。また、

KT2440(pCAR1) 株を用いた後発現株では、PP_0308 (membrane dipeptidase) と PP_0309 (hypothetical protein) を高発現させた株で繊維状化の亢進が観察された。これらによる繊維状化とその亢進のレベルは低いいため、KT2440 株が pCAR1 を保持した場合に繊維状化するの、複数の遺伝子の発現が誘導されることが協調的に作用した結果であると考えられた。

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 8 件)

1. **Suzuki-Minakuchi C., R. Hirotani, M. Shintani, T. Takeda, Y. Takahashi, K. Matsui, D. Vasileva, C.-S. Yun, K. Okada, H. Yamane, and H. Nojiri**. Effects of three different nucleoid-associated proteins encoded on IncP-7 plasmid pCAR1 on host *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, 2869-2880 (2015). doi:10.1128/AEM.00023-15 (査読有)
2. **Takahashi, Y., M. Shintani, N. Takase, Y. Kazou, F. Kawamura, H. Hara, H. Nishida, K. Okada, H. Yamane, and H. Nojiri**. Modulation of primary cell functions of host *Pseudomonas* bacteria by conjugative plasmid pCAR1. *Environ. Microbiol.*, 17, 134-155 (2015). doi: 10.1111/1462-2920.12515. (査読有)
3. **Suzuki, C., K. Kawazuma, S. Horita, T. Terada, M. Tanokura, K. Okada, H. Yamane, and H. Nojiri**. Oligmerization mechanisms of an H-NS family protein, Pmr, encoded on the plasmid pCAR1 provide a molecular basis for functions of H-NS family members. *PLoS ONE*, 9, e105656 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0105656. (査読有)
4. **新谷政己, 松井一泰, 金原和秀, 野尻秀昭**. 環境中におけるプラスミドの挙動解析, *J. Environ. Biotechnol.*, 13, 125-134 (2013). (査読無)
5. **Nojiri, H.** Impact of catabolic plasmids on host cell physiology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 24, 423-430 (2013). doi:10.1016/j.copbio.2012.09.014 (査読有)
6. **Shintani, M., Y. Takahashi, and H. Nojiri**. Conjugative genetic element, a host chromosomal function modifier. In "Biodegradative bacteria", eds. H. Nojiri, M. Tsuda, M. Fukuda, and Y. Kamagata, Springer, Heidelberg, Germany, 129-152 (2013). (査読無)
7. **新谷政己, 李美英, 松井一泰, 大熊盛也, 岡田憲典, 野尻秀昭**. 異なる栄養条件下におけるプラスミドの接合伝達頻度

の比較解析 . *J. Environ. Biotechnol.*, **12**, 163-167 (2012). (査読有)

8. **能登優, 高瀬謙之, 高橋裕里香, 松本貴嗣, 吉川博文, 土金恵子, 細山哲, 藤田信之, 岡田憲典, 山根久和, 野尻秀昭**. プラスミド保持に伴う負荷を軽減化する宿主染色体因子, *J. Environ. Biotechnol.*, **12**, 135-139 (2012). (査読無)

[学会発表](計 32 件)

1. **Hideaki Nojiri**, Plasmid, a key determinant of the fate of xenobiotic-degrading bacteria in natural eco-system, Japan-Finland Biotechnology Symposium 2012, June 4-8, 2012, 東北学院大学押川記念ホール(宮城)
2. **野尻秀昭**, 宿主機能調節因子としてのプラスミドの機能の解明, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 13 日, 福岡国際会議場
3. **野尻秀昭**, 環境細菌の振る舞いと進化における接合伝達性プラスミドの役割, 日本遺伝学会, 2013 年 9 月 19 日~21 日, 慶応義塾大学(横浜)
4. **野尻秀昭**, 難分解性環境汚染物質の分解細菌が有する分解能の分子基盤の解明, 極限環境生物学会, 2013 年 10 月 26 日~27 日, 明治大学(川崎)
5. **Hideaki Nojiri**, Degradative Plasmid as the Agents for Bacterial Evolution, Thailand-Japan Collaboration Symposium on Microbial Resources for Environmental and Industrial Applications, June 3, 2014, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
6. **Hideaki Nojiri**, Bacterial Evolution in Environment via Plasmid Conjugation, 環境微生物系合同大会 2014, October 21-24, 2014, 浜松アクトシティコンgresセンター(浜松)
7. **Hideaki Nojiri**, Plasmid business: plasmid effect on the host cell physiology and plasmid fitness cost, International Society for Plasmid Biology Scientific Meeting 2014, October 27-November 1, 2014, Palm Cove, Australia.

[図書](計 1 件)

1. **Nojiri, H., M. Tsuda, M. Fukuda, and Y. Kamagata** (editors), "Biodegradative bacteria" Springer, Heidelberg, Germany (2013).

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野尻 秀昭 (NOJIRI, Hideaki)

東京大学・生物生産工学研究センター・教授

研究者番号: 90272468