

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850057

研究課題名(和文)アーキアの染色体構造と遺伝子発現を制御するタンパク質群の新展開

研究課題名(英文) Novel insights into proteins controlling chromosome structure and gene expression in Archaea

研究代表者

円山 由郷 (MARUYAMA, Hugo)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90610296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アーキアとは、細菌・真核生物とならぶ生命の第三のドメインを構成する生物の種類であり、この研究であつかう超好熱性菌もその仲間である。アーキアの染色体システムは、複雑な真核生物型の原型であると考えられているが、アーキアの遺伝子発現調節の仕組みはまだ単純な転写因子によるものしか理解されていない。アーキアの染色体高次構造を維持するタンパク質が知られ始めており、この研究では、これらのタンパク質の機能を理解することで、染色体構造と遺伝子発現を協調して制御する仕組みを解明することを目指し、各染色体タンパク質の性質を解析した。

研究成果の概要(英文)：Archaea constitutes the third domain of life. Although chromosome architecture of Archaea is believed to be a primitive version of eukaryotic chromosome system, control of gene expression is currently only understood as activation and repression by transcription factors. Archaeal proteins that control both chromosome architecture and gene expression are starting to be understood. In this research, I tried to elucidate the mechanism underlying this coordinated control of chromosome structure and function.

研究分野：微生物学

キーワード：アーキア 染色体タンパク質 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

真核生物や細菌にはすべての種に共通な染色体タンパク質が存在する(ヒストンやHU)のに対して、アーキアの染色体構築には、種によって異なるDNA結合タンパク質の組合せが用いられる。従来、これらのタンパク質の性質が個別に研究されてきたが、アーキアの染色体構築・制御機構についての研究は進んでいなかった。また、アーキアの遺伝子発現はこれまで、転写因子による単純なON/OFFで制御されているだけであると考えられてきたが、近年になって様々なDNA結合タンパク質による染色体上の特殊構造の形成や染色体タンパク質の翻訳後修飾が、アーキアの遺伝子発現制御に関わることが報告されるようになった。研究代表者も、独自に開発した手法を用いて染色体タンパク質を研究する過程で、ヒストン・TrmBL2・Albaの3つのDNA結合タンパク質が、広範囲のアーキアに保存され、染色体上の存在量の多い、染色体制御に関わるタンパク質であることを突き止めた(Maruyama *et al.* 2011, 2013)。アーキアは極限環境に生息するだけでなく、さまざまな通常環境や人体にも存在することが知られるようになってきた。また、アーキアと人間の疾患(歯周病・炎症性腸疾患など)の関連が示唆されるなど、アーキアが周囲の環境とどのように相互作用するのかを理解する必要が高まっていた。アーキアが環境に応答して、どのように遺伝子発現を調節するかを知るためには、これらの染色体タンパク質による染色体構造と遺伝子発現の制御機構を理解する必要が高まっていた。

2. 研究の目的

本研究では特に、TrmBL2による染色体構造と転写の協調的制御に重点をおいた。転写因子様タンパク質TrmBL2(30kDa)は、*Thermococcales*目を中心とするアーキアと一

部の細菌に保存されているが、その機能は謎であった。申請者は、染色体高次構造の濃縮法を開発し、原子間力顕微鏡(AFM)解析と組み合わせることで、超好熱性アーキア*Thermococcus kodakarensis*のTrmBL2が、染色体上に多量に存在して特殊な線維構造をつくり、染色体を凝縮させるタンパク質であると同時に、約100個の遺伝子の転写調節を行なうグローバル転写因子であることを示した(Maruyama *et al.* 2011)。この結果は、アーキアにおいて染色体構造と遺伝子発現とを協調的に制御する仕組みが存在することを示唆する。本研究計画では、このタンパク質の機能をさらに掘り下げ、アーキア染色体制御研究を新たに展開することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TrmBL2がDNAに結合することが、染色体構造に与える効果を測定するために、シンガポール大学・Jie Yan博士との共同研究により磁気ピンセットを用いた一分子測定を行った。

(2) TrmBL2破壊株の表現型がTrmBL2遺伝子で相補されることを示すために、pLC70プラスミドを元にして、TrmBL2を*T. kodakarensis*で発現させるためのプラスミドを作成し、TrmBL2破壊株に導入した。

4. 研究成果

(1) 磁気ピンセットを用いた一分子計測により、TrmBL2がDNAに結合するとDNAの剛性が増し、DNAをねじる力に対してコイル形成が起こりにくくなる一方、二本鎖の開裂が起こりやすくなることを示した。またヒストンとTrmBL2は競合してDNAに結合するが細胞内のカリウムイオン濃度によって、結合のバランスが変化する可能性を示した。これらの結果を得て論文発表した(Efremov AK

et al. 2015)

(2) 野生型株と比較して TrmBL2 破壊株の染色体は、試験管内で DNA 消化酵素の作用を受けやすくなる (Maruyama *et al.* 2011)。生菌において、TrmBL2 に染色体 DNA を保護する機能があるかどうかを調べるために、野生株と TrmBL2 破壊株に様々な DNA 損傷を与えた際の影響を検証した。この中で、TrmBL2 破壊株と野生株に熱ショックを与え、破壊株の感受性を野生株と比較する系を確立した。これらの成果の一部を 11th International Congress on Extremophiles にて発表した。

(3) *Thermococcus* 菌体内で TrmBL2 を相補するプラスミドを作成し、TrmBL2 破壊株への導入に成功した。また、このプラスミド導入により、TrmBL2 タンパク質を生菌内で発現させることに成功した。TrmBL2 発現には 2 種類の異なるプロモーター配列を使用し、両者とも機能することを確認した。これらのプロモーターは、他の遺伝子を発現する際にも使用できるものであり、有用な研究ツールを開発することができた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Nambu T, Tsuzukibashi O, Uchibori S, Yamane K, Yamanaka T, Maruyama H, Wang PL, Mugita N, Morioka H, Takahashi K, Komasa Y, Mashimo C. Complete Genome Sequence of *Rothia aeria* Type Strain JCM 11412, Isolated from Air in the Russian Space Laboratory Mir. *Genome Announc.* 2016 Dec 29;4(6). pii: e01444-16. doi:10.1128/genomeA.01444-16. 査読有

Mashimo C, Yamane K, Yamanaka T, Maruyama H, Wang PL, Komasa S,

Okazaki J, Nambu T. Genome Sequence of *Actinomyces naeslundii* Strain ATCC 27039, Isolated from an Abdominal Wound Abscess. *Genome Announc.* 2016 Dec 29;4(6). pii:e01443-16. doi: 10.1128/genomeA.01443-16. 査読有

Nambu T, Yamane K, Maruyama H, Mashimo C, Yamanaka T. Complete Genome Sequence of *Prevotella intermedia* Strain 17-2. *Genome Announc.* 2015 Aug 20;3(4). pii:e00951-15. doi: 10.1128/genomeA.00951-15. 査読有

Efremov AK, Qu Y, Maruyama H, Lim CJ, Takeyasu K, Yan J. Transcriptional Repressor TrmBL2 from *Thermococcus kodakarensis* Forms Filamentous Nucleoprotein Structures and Competes with Histones for DNA Binding in a Salt- and DNA Supercoiling-dependent Manner. *J Biol Chem.* 2015 Jun 9;290(25):15770-84. doi:10.1074/jbc.M114.626705. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

Maruyama H, Kushida T, Higashibata H, Efremov AK, Yan J, Atomi H, Takeyasu K (2016/8 Kyoto, Japan) The roles of TrmBL2 protein on chromosome architecture and protection in *Thermococcus kodakarensis*. **11th International Congress on Extremophiles**

Maruyama H, Efremov AK, Qu Y, Lim CJ, Takeyasu K, Yan J. (2015/7 Newry, Maine, USA) The role of Histone and TrmB-like protein in chromosome organization of *Thermococcus kodakarensis*. **Gordon Research Conference, Archaea: Ecology, Metabolism & Molecular Biology**

Maruyama H, Takeyasu K, Atomi H,

Fukushima H, Kent NA. (2014/9 Saint Petersburg, Russia) The role of Histone and TrmB-like proteins in chromosome organization of *Thermococcus kodakarensis*.
10th International Congress on Extremophiles

〔図書〕(計 2 件)

Maruyama H, Ohniwa RL, Prieto E, Hejna J, Takayasu K (2014) Genome folding mechanisms in the three domains of life revealed by AFM. **Atomic Force Microscopy in Nano Biology**. Pan Stanford Publishing. (ISBN 978-981-441-158-5) p. 275-310

円山由郷 (2014) 「口腔内細菌叢」「バイオフィルムと感染症」『環境と微生物の事典』朝倉書店 p. 248-251

6 . 研究組織

(1)研究代表者

円山 由郷 (MARUYAMA, Hugo)
大阪歯科大学・歯学部・助教
研究者番号 : 90610296

(4)研究協力者

跡見 晴幸 (ATOMI, Haruyuki)
京都大学・工学研究科・教授

東端 啓貴 (HIGASHIBATA, Hiroki)
東洋大学・准教授

Jie Yan (YAN, Jie)
シンガポール大学・教授