

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19770145
 研究課題名 (和文) RNA の関与する原核生物ゲノム折りたたみ構造の解明
 研究課題名 (英文) Nucleoid architecture related to RNA molecules

研究代表者
 大庭 良介 (OHNIWA RYOSUKE)
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教
 研究者番号：30447883

研究成果の概要 (和文)：細菌の転写・翻訳・複製の制御は、核様体と呼ばれるゲノム DNA・タンパク質・RNA から構成される高次複合体の構造・動態と密接に関係している。申請者は、核様体の構造・機能制御に関し焦点を当てて研究を進め、一本鎖 RNA の新規合成が構造維持に決定的な働きをすることを明らかにした。さらに、共役して働く核様体の構成タンパク質の網羅的探索から、生育環境や種の違いによってタンパク質が大きく異なることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：The genomic DNA in bacteria is packed into cells as nucleoid, which is composed of genomic DNA, RNAs and proteins. I focused on the regulatory mechanism of the nucleoid structure because its dynamics is closely related to the essential biological processes such as transcription, translation, replication etc. In the present study, I found i) nucleoid structures are sustained by nascent single stranded RNA, ii) the proteins involved in the nucleoid is highly varied in species-specific and environmental-specific manners.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,300,000 | 0 | 1,300,000 |
| 2008 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2009 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 600,000 | 3,900,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：染色体構築・機能・分配

1. 研究開始当初の背景

真核生物・原核生物を問わず、cm～m スケールのゲノムが階層的に折りたたまれて μm スケールの細胞 (または核) 内に収まっている。この階層的な折りたたみ構造の制御が、転写・複製の調節、さらには、ゲノム

DNA の分配やストレス因子からの保護に重要な役割を果たしていると考えられている。

申請者は、原子間力顕微鏡用の生体資料観察法を確立し、細菌ゲノム (核様体) の構造・動態の解析を行ってきた。その結果、核様体が一般的に DNA \rightarrow 30nm 幅のファイバー構

造→80nm 幅のファイバー構造→300nm 径のループ構造 ~ 高次凝集体という階層性を持ち、環境に応じて変化することを明らかにした。

大腸菌において、単離核様体には RNA ポリメラーゼ、リボソームに加え、Hu、IHF、H-NS、Fis、Hfq、Dps、StpA といった核様体タンパク質と RNA が主に含まれており、これらの因子が大腸菌核様体の高次構造構築に関与していると考えられるが、ほとんどの因子についての詳細は不明であった。

また、Hu を除くこれら核様体タンパク質は細菌間で保存されておらず、細菌間で共通な核様体構造制御タンパク質は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝学・構造生物学・生化学・プロテオミクス的手法を主に使用し、①10nm を構成するタンパク質の同定、②30nm ファイバーの構造維持に関わる RNA・タンパク質の同定を行う。③さらに同定された因子を用い、*In vitro* 転写系と再構成系によって DNA~10nm ファイバー~30nm ファイバーの再構成を行い、DNA から 30nm ファイバーにいたる階層的核様体構造の構築機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 原子間力顕微鏡による構造構築因子の探索

①転写活性や各種 RNA の関与の検証：抗生物質による転写阻害、RNase による RNA 分解後、原子間力顕微鏡により核様体を解析した。

②核様体タンパク質欠損株の解析：Hu、IHF、H-NS、Fis、StpA の欠損株の核様体を原子間力顕微鏡により解析する。その際、RNase 処理前後での変化を検証した。

(2) 質量分析機を用いた新規核様体構成タンパク質の探索：LC-MS/MS を用いて、大腸菌・緑膿菌・枯草菌・黄色ブドウ球菌の核様体構成タンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1) 新生合成一本鎖 RNA による高次構造維持様式を発見した (図 1。発表論文⑤)。具体的には、

①一本鎖 RNA 分解酵素 (RNase A) により、30nm ファイバー以上の構造体が崩壊し、10nm ファイバーとなった。

②二本鎖 RNA 分解酵素 (RNase III)・DNA-

RNA ヘテロ二本鎖分解酵素 (RNase H) では、30nm ファイバー構造は維持された。

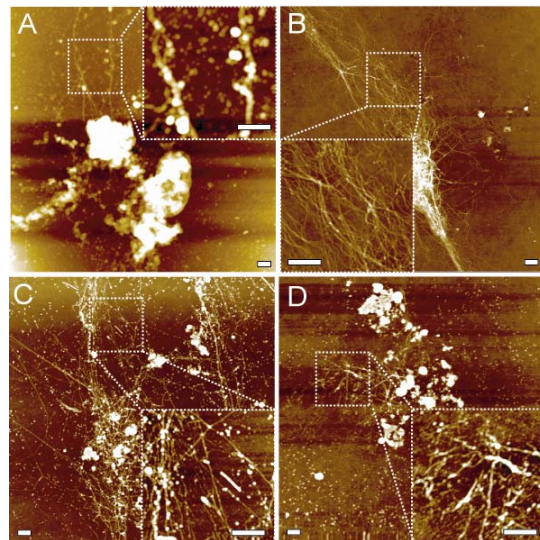


図1; 大腸菌核様体の原子間力顕微鏡像。(A) 増殖期の核様体構造 (B) RNase A処理した増殖期の核様体構造 (C) リファンピシン処理後の核様体構造 (D) RNase H処理による核様体構造。

③転写を不活化するリファンピシンによる処理で、30nm ファイバー以上の構造体が崩壊した。

④一本鎖 RNA の 30nm ファイバー構造維持への関与はグラム陰性菌・陽性菌に関わらず共通した。

(2) 既知核様体タンパク質は構造維持に決定的には働かない (学会発表③)。具体的には、

①大腸菌において、Hu、IHF、H-NS、Fis、StpA の遺伝子欠損により、細胞内の 30nm、80nm ファイバー構造体の量的な変化が観察されるものの、構造体全体の DNA・10nm ファイバーへの崩壊や、高次凝集体の誘導といった劇的な変化は見られなかった。

②10nm ファイバー構造体は、これら核様体タンパク質の欠損株でも維持された。

(3) 核様体タンパク質は種・環境によって大きく異なるものの、グローバルレギュレーターと酸化・還元酵素が豊富であるという共通性が存在する (学会発表①②)。具体的には、

①対数増殖期における核様体特異的タンパク質として、大腸菌で 157 種類、緑膿菌で 64 種類、枯草菌で 89 種類、黄色ブドウ球菌で 83 種類のタンパク質を同定した。定常期では、大腸菌で 74 種類、黄色ブドウ球菌で 139 種類を同定した (表 1)。

表1: 質量分析器によって決定したタンパク質

| | タンパク質の種類数 | | | |
|---------------------------|-----------|-------|-------|-------------|
| | 単離核様体 | 膜・壁分画 | 可溶化分画 | 核様体特異的タンパク質 |
| 対数期 | | | | |
| <i>E. coli</i> W3110 | 558 | 784 | 511 | 157 |
| <i>P. aeruginosa</i> PAO1 | 231 | 232 | 148 | 64 |
| <i>B. subtilis</i> 168 | 282 | 453 | 486 | 89 |
| <i>S. aureus</i> N315 | 228 | 277 | 150 | 83 |
| 定常期 | | | | |
| <i>E. coli</i> W3110 | 215 | 300 | 276 | 74 |
| <i>S. aureus</i> N315 | 392 | 250 | 222 | 139 |

(注) 単離核様体には細胞膜・壁・細胞質酵素が多数コンタミしていたため、各分画のタンパク質を別々にLC-MS/MSによって決定し、単離核様体で同定されたタンパク質から差し引いた(核様体特異的タンパク質)。

②種・環境を超えて存在した核様体タンパク質はHuのみであった。

③大腸菌では8種類、黄色ブドウ球菌では32種類のタンパク質のみが対数期・定常期間で共通していた。

④菌・生育条件に関わらず、DNA・RNAに結合し、環境変化に応じてゲノム全体の転写・翻訳・複製を制御する因子、すなわちグローバルレギュレーター(大腸菌・緑膿菌のFisやHfq、黄色ブドウ球菌のSarAなど)が豊富であった。

⑤従来、細胞質タンパク質として報告されている酸化・還元酵素(SodXやTrxA/TrxBなどの活性酸素から細胞を守る酵素)が核様体特異的なタンパク質として多数同定された。酸化ストレスからゲノムDNAを直接保護する可能性を示唆する。

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6件) (すべて査読あり)

- ①Niwa R, Hada K, Moliyama K, Ohniwa RL, Tan Y, Cather KO, Chi W, Reinke W and Slack FJ, "C. elegans sym-1 is a downstream target of the Hunchback-like-1 developmental timing transcription factor." *Cell Cycle*, 15;8(24):4147-54 (2009)
- ②Morikawa K, Ohniwa RL, Kumano M, Okamura H, Saito S and Ohta T, "The sigH gene sequence can subspeciate staphylococci." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 61, 373-380 (2008)
- ③Shindo E, Kubo K, Ohniwa RL, Takeyasu K and Yoshikawa K. "In situ analysis of the higher-order genome structure in a single *Escherichia coli* cell." *J Biotech*,

133, 172-176 (2008)

- ④Ueta M, Ohniwa RL, Yoshida H, Maki Y, Wada C and Wada A. "Role of HPF (Hibernation promoting factor) on translational activity in *Escherichia coli*" *J Biochem*, 143, 425-433 (2008)
- ⑤Ohniwa RL, Morikawa K, Takeshita SL, Kim J, Ohta T, Wada C and Takeyasu K "Transcription-coupled Nucleoid Architecture in Bacteria." *Genes Cells*, 12, 1141-52 (2007)
- ⑥Ohniwa RL, Hibino A and Takeyasu K. "Perspective Factor; Past, Present and Future of Life Sciences." PROCEEDINGS OF International Society for Scientometrics and Infometrics 2007, II, 908-909 (2007)

[学会発表] (計25件)

- ①大庭良介、牛島由理、森川一也、斉藤慎二。核様体タンパク質の多様性；核様体タンパク質の比較プロテオミクス解析(第32回日本分子生物学会年会、2009年、12月9日、神奈川県横浜市)
 - ②Ohniwa RL, Ushijima Y, Morikawa K, Saito S. "Diversification of nucleoid associated proteins in bacteria revealed by comparative proteomic analysis." (BioMicroWorld、2009年12月4日ポルトガル、リスボン)
 - ③Ohniwa RL, Muchaku H, Morikawa K, Ohta T, Satio S, Wada C and Takeyasu K. "Escherichia coli mutants deficient in nucleoid proteins exhibit distinct genome folding." (48th American Society of Cell Biology Annual Meeting, 米国、サンフランシスコ、2008年12月6日)
 - ④Ohniwa RL, Morikawa K, Kim J, Ohta T, Ishihama A, Wada C, Takeyasu K. Involvement of Topoisomerase I and nascent single-stranded RNA in the bacterial chromosome architecture and dynamics. (16th International Chromosome Conference, オランダ、アムステルダム、2007年8月8日) 「ポスター」
- [図書] (計3件)
- ① Ohniwa RL, Morikawa K, Wada C, Ohta T and Takeyasu T. "Nucleoid Architecture and Dynamics in bacteria" *Bacterial DNA*,

DNA Polymerase and DNA Helicases, Nova Science Publishers, Inc. (2010) 456 ページ

- ② Kobori T, Hizume K, Ohniwa RL, Yoshimura SH and Takeyasu K. “Biochemical and Biophysical Basis of Genome Folding Mechanisms” *Progress in Biopolymer Research*, 107-135 Nova Science Publishers, Inc. (2008)

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infectionbiology/microbiology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大庭 良介 (OHNIWA RYOSUKE)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教

研究者番号：30447883