

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07279

研究課題名(和文)核様体凝集をトリガーとする複合ストレス環境への適応システムの解明

研究課題名(英文)Adaptation to multiple stress environments by nucleoid compaction

研究代表者

大庭 良介 (Ryosuke, Ohniwa)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：30447883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、「核様体凝集をトリガーとした複合ストレス環境への適応」という新たな応答戦略の実証である。黄色ブドウ球菌のMrgAタンパク質による核様体凝集を通じた遺伝子発現制御の実態(ゲノム位置依存性など)の解明、を中心に研究を進め、以下の点を明らかにした。酸化ストレスがない場合、MrgAの核様体への結合により、ゲノム全体の非タンパク質コード遺伝子の発現を亢進させる、酸化ストレス下では、MrgAはOri近傍のタンパク質コード遺伝子の発現を亢進または抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、複合的なストレス環境に対する適応システムは、個別の環境因子を感知して応答する独立した遺伝子発現系の総体という考え方であった。本研究により、核様体凝集という現象を介した複数のストレス環境への適応、という従来と異なる環境適応進化戦略を提案した。また、染色体(核様体)全体の構造変化が、ゲノム位置依存的な遺伝子発現を制御するという、新しい見解を提案できた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the adaptation mechanism of bacteria against multiple stress environments by nucleoid compaction. Through the analysis of Staphylococcal nucleoid condensation by MrgA, we showed that 1)MrgA binding to the nucleoid without oxidative stresses up-regulated the gene expression of non-coding genes distributed genome-widely, and 2) MrgA binding to the nucleoid with oxidative stresses up-regulated and/or down-regulated the gene expression of coding-genes distributed only around ori-region (replication initiation region).

研究分野：分子生物学、細菌学、バイオインフォマティクス、サイエントメトリクス

キーワード：核様体 全遺伝子発現解析 黄色ブドウ球菌 細菌遺伝学 環境ストレス 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌はヒトの鼻腔・表皮・腸などに存在する。近年、食細胞ファゴソーム内での長期生存が複数報告され、日和見感染菌としての重要な特徴として注目されている。ファゴソームでは酸化ストレス、酸、抗菌ペプチドなど複数の抗菌因子に曝されるため、本菌の環境適応戦略が発揮される重要な局面である。研究代表者は核様体(染色体)ダイナミクスに着目した研究から、本菌が酸化ストレス下で MrgA タンパク質を発現し核様体全体を凝集させることを見出した。MrgA は、核様体の凝集能とともに、酸化ストレス消去能を持つ。酸化ストレス消去能は酸化ストレス耐性に必須である一方、核様体の凝集能は酸化ストレス耐性に寄与しない。研究代表者独自のプレ研究から、酸化ストレスで誘導された核様体全体の凝集が、酸化ストレス耐性に直接寄与するのではなく、(i)一連の遺伝子の発現を制御することで、(ii)酸ストレスなど二次的なストレス環境下での生存に寄与する、という新たな適応の仕組みが存在することを示唆されていた。

#### 2. 研究の目的

(i) 本応答が複合ストレス環境への適応を実現していることの立証、(ii) 核様体凝集を通じた遺伝子発現制御の実態(ゲノム位置依存性など)の解明、を目的とする。

#### 3. 研究の方法

(1) 核様体凝集能を持たない MrgA 変異タンパク質と mrgA 変異株の作成; DNA との接触が期待されるタンパク質表面のプラスチャージのアミノ酸を対象に、アラニンスキャンによって DNA 結合能を欠損した MrgA 変異体を作成する。

(2) マイクロアレイによる遺伝子発現解析; MrgA の凝集有無などによる遺伝子発現プロファイルを解明する。

(3) 核様体凝集によって複合ストレスへの耐性が向上するか否かの検証; 複合ストレス下での菌の生存を検証する。

(4) 数十キロ bp のゲノム DNA 領域がゲノム位置依存的に発現制御を受けるかの検証; SCCmec type II など数十 kbp に渡るゲノム DNA 断片を黄色ブドウ球菌に自然形質転換しゲノム内に挿入して、遺伝子発現に変化があるかを検証する。

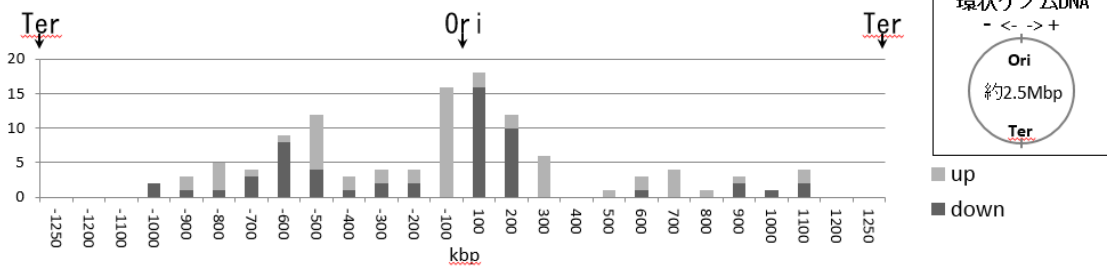
#### 4. 研究成果

(1) 核様体凝集能を持たない MrgA 変異タンパク質と mrgA 変異株の作成; アラニンスキャンにより変異株を作成したが、凝集能を持たない MrgA 変異タンパク質を得ることができなかった。

(2) マイクロアレイによる遺伝子発現解析; マイクロアレイ解析では発現が上昇または抑制される遺伝子がそれぞれ 50 種類程度検出された。発現が上昇する遺伝子には、酸耐性に寄与する *arcA,B,C,D*(arginine catabolic mobile elements)や *ureA,B,D,E,F,G* (urease metabolic enzymes)、一酸化窒素ストレス耐性に寄与する *narG,H,J* (respiratory nitrate reductases) や *SA0231* (nitric oxide dioxygenase)、浸透圧耐性に寄与する *proP* (osmoprotectant proline transporter) や *SA0678* (osmoprotectant ABC transporter permease) など、様々なストレス環境への適応に必要な遺伝子群が含まれていた。また、発現が変化した遺伝子は、多くが複製開始起点 (Ori) 領域近傍に存在した。遺伝子プロファイルの詳細な解析から、酸化ストレスがない場合 MrgA の核様体への結合により、ゲノム全体の非タンパク質コード遺伝子の発現を亢進させる、酸化ストレス下では MrgA は Ori

近傍のタンパク質コード遺伝子の発現を亢進させるか抑制することを解明した(図1)。

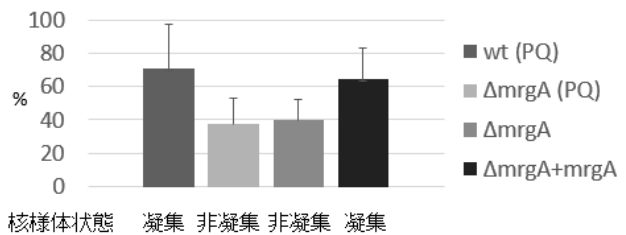
図1:凝集によって発現変化する遺伝子のゲノム上での位置



(3) 核様体凝集によって複合ストレスへの耐性が向上するか否かの検証；

菌体を殺さない酸化ストレス(フェナントキノン(PQ))に暴露して核様体を凝集させ、次いで酸ストレスに暴露したところ、核様体の凝集が菌の生存を向上させることが示唆された。

図2:酸化ストレス(PQ)⇒酸ストレス下(pH5.0, 15min)での生存率



核様体状態 凝集 非凝集 非凝集 凝集  
wt:野生株、ΔmrgA:mrgA欠損株、ΔmrgA+mrgA:mrgA欠損株でmrgAを強制発現。  
PQ:あらかじめフェナントキノンで殺菌することなく酸化ストレス負荷をかけたもの。

(4) 数十キロ bp のゲノム DNA 領域がゲノム位置依存的に発現制御を受けるかの検証； 作成中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Chuang Mei-Chun, Lin Shan-Shan, Ohniwa Ryosuke L., Lee Gang-Hui, Su You-An, Chang Yu-Chen, Tang Ming-Jer, Liu Ya-Wen	4. 巻 218
2. 論文標題 Tks5 and Dynamin-2 enhance actin bundle rigidity in invadosomes to promote myoblast fusion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1670 ~ 1685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1083/jcb.201809161	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Hsu Chih-Chieh, Hsu Ron-Bin, Ohniwa Ryosuke, Chen Jeng-Wei, Yuan Chang-Tsu, Chia Jean-San, Jung Chiau-Jing	4. 巻 119
2. 論文標題 Neutrophil Extracellular Traps Enhance Staphylococcus Aureus Vegetation Formation through Interaction with Platelets in Infective Endocarditis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 786 ~ 796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1055/s-0039-1678665	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ushijima Y, Ohniwa RL, Morikawa K	4. 巻 17
2. 論文標題 Identification of nucleoid associated proteins (NAPs) under oxidative stress in Staphylococcus aureus.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Microbiol.	6. 最初と最後の頁 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1186/s12866-017-1114-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nguyen LTT, Takemura AJ, Ohniwa RL, Saito S, Morikawa K	4. 巻 75
2. 論文標題 Sodium Polyanethol Sulfonate Modulates Natural Transformation of SigH-Expressing Staphylococcus aureus.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Curr Microbiol	6. 最初と最後の頁 499-504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s00284-017-1409-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Gor V, Takemura AJ, Nishitani M, Higashide M, Medrano VR, Ohniwa RL, Morikawa K	4. 巻 10
2. 論文標題 Finding of Agr Phase Variants in Staphylococcus aureus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mbio	6. 最初と最後の頁 e00796-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1128/mBio.00796-19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Generating process of Emerging Topics in the life sciences.	4. 巻 121
2. 論文標題 Generating process of Emerging Topics in the life sciences.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientometrics	6. 最初と最後の頁 1549-1561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI :10.1007/s11192-019-03248-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Naito Tadasuke, Shirai Kazumasa, Mori Kotaro, Muratsu Hidetaka, Ushirogawa Hiroshi, Ohniwa Ryosuke L., Hanada Kousuke, Saito Mineki	4. 巻 93
2. 論文標題 Tyr82 Amino Acid Mutation in PB1 Polymerase Induces an Influenza Virus Mutator Phenotype	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 pii: e00834-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1128/JVI.00834-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Naito T, Mori K, Ushirogawa H, Takizawa N, Nobusawa E, Odagiri T, Tashiro M, Ohniwa RL, Nagata K, Saito M.	4. 巻 91
2. 論文標題 Generation of a genetically stable high-fidelity influenza vaccine strain.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Virol.	6. 最初と最後の頁 e01073-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1128/JVI.01073-16.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

