

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：13101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K08823
研究課題名(和文)細菌における天然変性蛋白質のヒストンコード機構による形質制御の証明

研究課題名(英文) Regulation of bacterial phenotypes through histone code of intrinsically-disordered protein

研究代表者
西山 晃史(Nishiyama, Akihito)
新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：80452069
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗酸菌HUはヒストン様天然変性領域を有する。本研究では天然変性領域を介した、抗酸菌独自のHU制御機構の解明を目指した。天然変性領域は抗酸菌HUの機能発現に必須であり、各種変異体の解析を通じ、天然変性領域等の構造と機能の関係を明らかにした。また、天然変性領域機能の調節機構の同定を目指した。さらに、複数の抗酸菌種のtranscriptome解析により、HU依存的遺伝子制御を網羅的に決定した。今後更に、抗酸菌HUによるDNA凝集を介した染色体制御とその調節機構の全容解明に勤め、病原性における意義を明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核細胞のヒストンとは異なり、原核細胞である細菌では天然変性領域を持つヒストン様蛋白質は希であり、その翻訳後修飾を介したエピジェネティクス制御もほとんど報告されていない。本研究において解析した、従来の細菌HUとは全く異なる抗酸菌HU独自の天然変性領域を介したDNA凝集過程、及びその制御機構は、細菌ヒストン様蛋白質による染色体制御に全く新しい概念をもたらすものであり、学術的意義が高い。また、HUは結核菌の必須蛋白質で、重要な病原性の一つである菌の休眠に関与しており、本研究成果は社会的重要度の高い結核(及びその他の抗酸菌症)の創薬など、新規制御法開発に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Mycobacterial HU has a histone-like intrinsically-disordered region (C-IDR). In this study, we aimed to elucidate the regulatory mechanism of mycobacterial HU functions through the modulation of C-IDR function. C-IDR is essential for mycobacterial HU functions. In this study, we elucidated C-IDR structure/function relationship, employing various HU mutants. We also investigated the regulatory mechanism of C-IDR functions. Furthermore, HU-dependent gene regulation in mycobacterial species was comprehensively determined by transcriptome analysis of HU-knockout or -knockdown mutants. Our data and future investigation contribute to reveal the regulation of chromosome functions through HU-mediated DNA compaction in mycobacteria and its significance in mycobacterial virulence.

研究分野：細菌学

キーワード：結核 抗酸菌 ヒストン様蛋白質 天然変性領域

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒストンは、真核細胞のヌクレオソームの主要な成分である。ヒストンは、分子内に二次構造など典型的な高次構造を持たない天然変性領域を持つ。天然変性領域はその柔軟な構造により、様々なパートナー分子と結合する。ヒストン H1 の C 末端側に存在する Lys 残基に富んだ天然変性領域 (intrinsically-disordered region) は、DNA と結合することにより二次構造が誘導され、クロマチン凝集に関与する。一方、細菌はヒストンも典型的なクロマチン構造も持っていない。代わりに、細菌はヒストン様蛋白質やその他の一連の DNA 結合蛋白質を持ち、核様体と呼ばれる染色体の高次構造を制御している。しかしながら、細菌の DNA 結合蛋白質にはヒストンのような天然変性領域は希である。

細菌の主要なヒストン様蛋白質の 1 つ、HU (大腸菌 U93 株の a heat stable DNA-binding protein として最初に報告された) は通常 10 kDa 前後の蛋白質であり、広く真正細菌に保存されている (Grove, 2011)。菌種間で HU の一次構造の相同性はそれほど高くないものの、これまでに実施された結晶構造解析では、どれも類似した二量体構造と報告された (例: 大腸菌の HU $\alpha\alpha$ および HU $\alpha\beta$)。これに対し、抗酸菌の HU は 22 kDa と大きい (図 1)。抗酸菌 HU の N 末側 (NTD) は他の細菌 HU と相同な領域であり、他の HU と同様にホモ二量体と報告されている (Bhowmick *et al*, 2014)。一方、その C 末側にはヒストン H1 の C 末側天然変性領域に類似した、100 残基以上に及ぶ Lys 残基に富んだ天然変性領域 (C-IDR) が付加されている。C-IDR は、結核菌を含む抗酸菌 (現在は *Mycobacterium* 属、*Mycobacteroides* 属、*Mycolicibacterium* 属、*Mycolicibacter* 属、*Mycolicibacillus* 属に分かれている) など、一部の細菌の HU でしか確認されていない。

結核菌は細胞分裂に 15-24 時間を要する遅延発育菌であり、生体内の低酸素環境では増殖を止めて休眠する。HU は結核菌など抗酸菌の主要蛋白質であり、高発現させると著しい増殖抑制作用を示す。抗酸菌 HU は定常期や休眠中に高発現し、DNA 複製、遺伝子発現等を抑制し、代謝を下げることにより、定常期以降の生存率の向上、菌の長期生存に貢献している (Matsumoto *et al*, 2000)。抗酸菌 HU による遺伝子発現の抑制は、休眠時の薬剤低感受性化にも貢献していた (Niki *et al*, 2012)。申請者らは、菌の DNA 複製・増殖の抑制、及び薬剤への低感受性化といった HU 依存的な表現型の発現に、HU の C-IDR が必須であることを明らかにした。また、抗酸菌から分離した HU は翻訳後修飾を受けていた。大腸菌で発現させた組換え体は修飾を受けないことから、HU の翻訳後修飾が結核菌など抗酸菌に特異的な現象で、HU の機能調節を担っている可能性が高い。

2. 研究の目的

抗酸菌 HU は、④C-IDR を介して染色体を凝集させ、遺伝子発現を制御し、増殖遅延や薬剤低感受性化等の表現型を発現する、また⑤ その機能を翻訳後修飾によって調節されていると考えられ、その解析を目的とした。

3. 研究の方法

(一部非公開情報有り。後日再提出予定。)

3-1. 抗酸菌 HU 変異蛋白質、及びその発現株の構築

結核菌 HU (HU_{Mtb}) と *Mycolicibacterium smegmatis* HU (HU_{Msm}) の NTD と C-IDR の変異体を構築した。構築した遺伝子を acetamidase gene promoter/operator 系に連結し、HU ノックアウト (KO) 株 (Whiteford ら, 2011) に導入し、変異蛋白質の誘導発現系を構築した (Savitskaya ら, 2018)。導入遺伝子の発現は液体培地中に acetoamide を添加することで誘導した。*M. smegmatis* と *Mycobacterium tuberculosis* var. BCG (BCG) の HU (HU_{BCG}) ノックダウン株は抗酸菌用に改良されたテトラサイクリン (Tet) 誘導型 CRISPR interference (Bhowmick *et al*, 2014) を用いて構築した。

3-2. 抗酸菌表現型試験

3-1 で構築した変異 HU 発現株を用いて、増殖抑制作用 (致死性)、染色体凝集作用等の抗酸菌の表現型を試験した。増殖抑制作用は濁度 (OD₆₀₀)、生菌数 (cfu/ml) で、染色体凝集作用は DAPI 染色による蛍光顕微鏡解析によって試験した。

3-3. 無細胞系での抗酸菌 HU 活性試験

(一部非公開。後日再提出予定。)

野生型 HU 及び変異 HU 発現株で誘導発現した各 HU 蛋白質を His タグを利用して精製した。精製蛋白質の DNA 親和性は gel shift assay 等で試験した。また、精製蛋白質の分子形状はグルタルアルデヒドを用いた化学架橋実験、超遠心分析 (沈降速度法) 等によって決定した。

3-4. 抗酸菌 HU 制御下にある遺伝子発現の網羅的解析

M. smegmatis HU_{Msm}-KO 株、BCG HU_{BCG}-KD 株、およびそれぞれの対照株を用いて HU 制御下にあ

る遺伝子を網羅的に探索した。HU_{BCC}の発現抑制は培地中への anhydrotetracycline (aTC) の添加で誘導した。長期培養で菌の HU_{BCC} のノックダウン状態を維持するために aTC を 48 h おきに追加した。Total RNA を各菌株から分離し、RNA-seq により transcriptome を決定、比較解析した。

3-5. 抗酸菌 HU の翻訳後修飾 (非公開。後日再提出予定。)

4. 研究成果

(一部非公開情報有り。後日再提出予定。)

4-1. 抗酸菌 HU 各ドメインの構造と機能の関係 (一部非公開。後日再提出予定。)

定常期以降の抗酸菌では染色体の凝集が観察された。CRISPRi 系を用いて抗酸菌 *M. smegmatis* の HU_{Msm} ノックダウン (KD) 株を構築し、解析した結果、endogenous HU_{Msm} が定常期の抗酸菌の染色体凝集に貢献していることを証明した。

この抗酸菌 HU による DNA 結合・凝集作用をより詳細に解析するため、NTD のみ、及び C-IDR のみからなるポリペプチドを抗酸菌に発現させ精製した。既報の通り、NTD の DNA 親和性は全長 HU_{Msm} よりも約 23 倍低いことを確認した。一方、C-IDR の DNA 親和性は約 2.7 倍低かった。全長 HU_{Msm} の DNA への結合はそれぞれの領域が異なる親和性で貢献していたが、主に C-IDR の活性であった (図 2A)。C-IDR において、DNA 親和性、DNA 凝集作用を担う責任領域 (配列) が存在するか、または単純にその長さ (Lys 残基の数) に依存するのか明らかにするため、C 末端側から HU_{Msm} の C-IDR の長さを削減した変異体を構築し、その機能を解析した。MDP1 の DNA 親和性は C-IDR の長さに依存した (図 2B)。抗酸菌染色体の凝集作用に関しても C-IDR の長さに依存する傾向があったが、その中で削減することで作用が著しく減衰する C-IDR 内領域を同定した。

一方、本研究における一部の解析結果から、NTD の構造が既報の結晶構造解析 (Bhowmick ら, 2014) とは異なる可能性が示唆され、独自に HU_{Mtb}、HU_{Msm}、大腸菌 HU の分子量の再解析を実施した。その結果、HU_{Mtb}、HU_{Msm} は水溶液中で大部分が単量体で存在することを明らかにした。一方、同一条件で精製した大腸菌 HU は分子の大部分が二量体を形成しており、この結果は精製法によって生じたアーティファクトとでは無いと考えている。また、C-IDR が NTD (HU 様領域) の二量体形成を抑制している可能性も合わせて示唆された。以上、本研究において、抗酸菌 HU の構造と C-IDR を介した DNA 凝集機序の詳細を明らかにした。

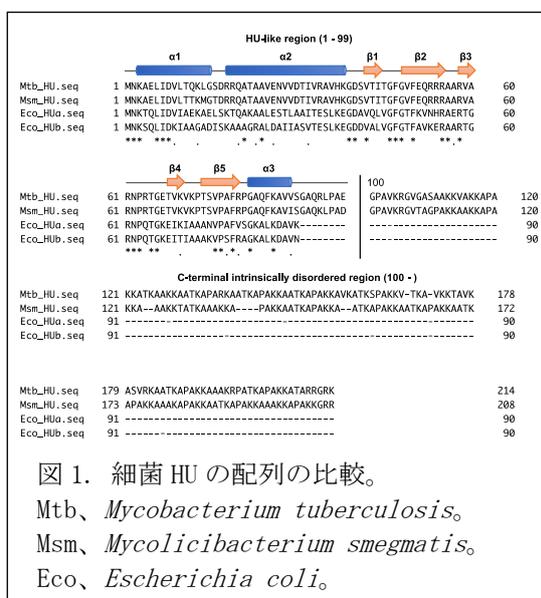


図 1. 細菌 HU の配列の比較。

Mtb, *Mycobacterium tuberculosis*.
Msm, *Mycobacterium smegmatis*.
Eco, *Escherichia coli*.

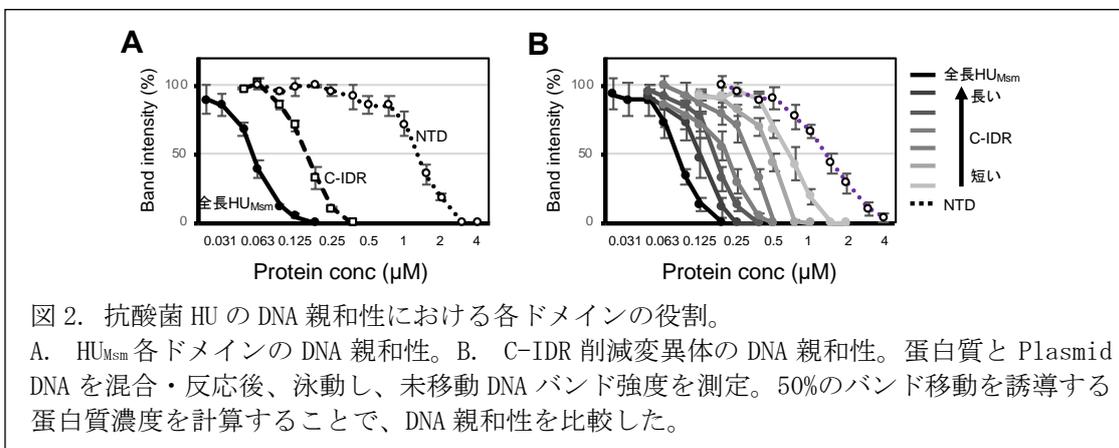


図 2. 抗酸菌 HU の DNA 親和性における各ドメインの役割。

A. HU_{Msm} 各ドメインの DNA 親和性。B. C-IDR 削減変異体の DNA 親和性。蛋白質と Plasmid DNA を混合・反応後、泳動し、未移動 DNA バンド強度を測定。50% のバンド移動を誘導する蛋白質濃度を計算することで、DNA 親和性を比較した。

4-2. 抗酸菌 HU の翻訳後修飾

(非公開。後日再提出予定。)

4-3. 抗酸菌 HU の制御下にある遺伝子群の網羅的探索 (一部非公開。後日再提出予定。)

先述の通り抗酸菌 HU は定常期の染色体凝集を制御している。これまでに HU による代謝・複製・増殖抑制作用など報告してきた。本研究では、抗酸菌 HU によるグローバルな染色体制御を網羅的に把握するため、HU に注目した transcriptome 解析を実施した。本解析では BCG、及び *M. smegmatis* を用いた。*M. smegmatis* では HU_{Msm} は KO 可能である (Whiteford ら, 2011)。一方、BCG では HU_{BCG} は必須遺伝子であり、CRISPRi 系を用いてノックダウン (KD) 株を構築した。様々な増殖期の HU-KO、HU-KD および対照株から total RNA を抽出し、次世代シーケンス解析 (RNA-seq) により、HU 欠損の影響を受けた遺伝子を網羅的に検出した。

本研究成果をもとに、抗酸菌 HU の C-IDR 依存的な DNA 凝集機序、染色体制御、及びその機能調節機構の解析を継続し、結核菌等の病原性のエピジェネティクス制御の全容解明に繋げていきたい。

参考文献：

- Bhowmick T et al. (2014) Targeting Mycobacterium tuberculosis nucleoid-associated protein HU with structure-based inhibitors. *Nat. Commun.* **5**: 4124.
- Grove A (2011) Functional evolution of bacterial histone-like HU proteins. *Curr. Issues Mol. Biol.* **13**: 1-12.
- Matsumoto S, Furugen M, Yukitake H & Yamada T (2000) The gene encoding mycobacterial DNA-binding protein I (MDPI) transformed rapidly growing bacteria to slowly growing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**: 297-301.
- Niki M et al. (2012) A novel mechanism of growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **287**: 27743-52.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hayashi M, Nishiyama A (共同筆頭著者), Kitamoto R, Tateishi Y, Osada-Oka M, Nishiuchi Y, Kaboso SA, Chen X, Fujiwara M, Inoue Y, Kawano Y, Kawasaki M, Abe T, Sato T, Kaneko K, Itoh K, Matsumoto S, Matsumoto M.	4. 巻 64
2. 論文標題 Adduct Formation of Delamanid with NAD in Mycobacteria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 01755-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.01755-19	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 該当する
1. 著者名 Tateishi Y, Minato Y, Baughn AD, Ohnishi H, Nishiyama A, Ozeki Y, Matsumoto S	4. 巻 10
2. 論文標題 Genome-wide identification of essential genes in Mycobacterium intracellulare by transposon sequencing - Implication for metabolic remodeling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-62287-2	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 1.Ohara Y, Ozeki Y, Tateishi Y, Mashima T, Arisaka F, Tsunaka Y, Fujiwara Y, Nishiyama A, Yoshida Y, Kitadokoro K, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawa I, Maekura R, Yamamoto S, Katahira M, Matsumoto S	4. 巻 13
2. 論文標題 Significance of a histone-like protein with its native structure for the diagnosis of asymptomatic tuberculosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0204160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0204160	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 2.Savitskaya A, Nishiyama A, Yamaguchi T, Tateishi Y, Ozeki Y, Nameta M, Kon T, Kaboso SA, Ohara N, Peryanova OV, Matsumoto S	4. 巻 8
2. 論文標題 C-terminal intrinsically disordered region-dependent organization of the mycobacterial genome by a histone-like protein	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26463-9	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 Shymaa Enany, Yutaka Yoshida, Yoshitaka Tateishi, Yuriko Ozeki, Akihito Nishiyama (共同責任著者), Anna Savitskaya, Takehiro Yamaguchi, Yukiko Ohara, Tadashi Yamamoto, Manabu Ato, Sohkiichi Matsumoto (共同責任著者)	4. 巻 7
2. 論文標題 Mycobacterial DNA-binding protein 1 is critical for long term survival of Mycobacterium smegmatis and simultaneously coordinates cellular functions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-06480-w	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

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 西山晃史、Anna Savitskaya、山口雄大、大原直也、尾関百合子、立石善隆、松本壮吉
2. 発表標題 抗酸菌ヒストン様タンパク質による染色体制御における天然変性領域の役割
3. 学会等名 第55回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Anna Savitskaya、西山晃史、松本壮吉
2. 発表標題 Conditional control of mycobacterial DNA-binding protein 1 expression in mycobacteria
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会 (福岡)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shymaa Enany, Yutaka Yoshida, Yoshitaka Tateishi, Yuriko Ozeki, Akihito Nishiyama, Anna Savitskaya, Takehiro Yamaguchi, Yukiko Ohara, Tadashi Yamamoto, Manabu Ato, Sohkiichi Matsumoto
2. 発表標題 Mycobacterial DNA-binding protein 1 is critical for long term survival of Mycobacterium smegmatis and simultaneously coordinates cellular functions
3. 学会等名 第52回日米医学抗酸菌専門部会 (The 52nd US-Japan Mycobacteria Panel Meeting 2018 in Niigata) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Anna Savitskaya、西山晃史、松本壮吉
2. 発表標題 The analysis of mycobacterial DNA-binding protein 1 function in mycobacteria using conditional expression system
3. 学会等名 第2回抗酸菌研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西山晃史、Shymaa Enany、Anna Savitskaya、吉田 豊、山本 格、阿戸 学、松本壮吉
2. 発表標題 抗酸菌の長期生存とヒストン様核様体結合タンパク質によるグローバルな細胞機能制御
3. 学会等名 第54回日本細菌学会中部支部総会（名古屋）
4. 発表年 2017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
研究 分担者	吉田 豊 (Yoshida Yutaka) (40182795)	新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (13101)	
連携 研究者	松本 壮吉 (Matsumoto Sohkiichi) (30244073)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	