

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05408

研究課題名（和文）翻訳後修飾に伴うヒストン様因子の機能変化がプラスミド保持細菌に与える影響の解明

研究課題名（英文）Post-translational modification of nucleoid-associated proteins encoded on the catabolic plasmid pCAR1 and its host chromosome

研究代表者

水口 千穂（鈴木千穂）（Suzuki-Minakuchi, Chiho）

東京大学・生物生産工学研究センター・助教

研究者番号：10733032

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：プラスミドは細胞間を水平伝播（親子関係による遺伝ではなく、遺伝子が細胞から細胞へと移動すること）する遺伝因子である。細菌のプラスミド上には薬剤耐性遺伝子や難分解性物質分解遺伝子など人間社会にとっても重要な遺伝子がしばしば存在するが、これらの遺伝子が宿主細菌内で発現するためには、宿主染色体由来の因子による適切な制御が必要である。本研究では、プラスミドを制御する因子として細菌の核様体タンパク質（真核生物のヒストンのようにDNAの折り畳みと遺伝子の転写制御に関与する）に着目し、核様体タンパク質の翻訳後修飾、特にアセチル化がタンパク質の機能に及ぼす影響を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物では翻訳後修飾の研究が進んでおり、例えばヒストンが修飾を受けることによりクロマチンの構造変化やそれに伴う遺伝子の転写調節が起こることはよく知られている。一方、細菌においては二成分制御系におけるリン酸化など、ごく一部のタンパク質を除いて研究例が乏しい状態であった。本研究の成果は、細菌の「ヒストン様因子」である核様体タンパク質が翻訳後修飾により機能が変化すること、翻訳後修飾がプラスミドの制御に重要な役割を果たす可能性を示唆するものであり、プラスミド上遺伝子の発現制御を考える上で新たな知見をもたらすものである。

研究成果の概要（英文）：Plasmids are mobile genetic elements conferring new phenotypes to host bacteria such as antibiotic resistance or the degradation ability of xenobiotic compounds. Host bacteria capable of properly controlling the expression of genes on plasmids can take advantage of the benefits brought by plasmid carriage. Nucleoid-associated proteins (NAPs) are candidate effectors of the interaction between plasmids and host chromosome. Here we identified acetylated lysine residues of the NAPs encoded on the catabolic plasmid pCAR1 and its host *Pseudomonas putida* KT2440 chromosome. We also found that acetylation could modulate oligomerization ability of the NAPs, which could affect the transcriptional regulatory network of the plasmid and the host chromosome.

研究分野：環境微生物学

キーワード：核様体タンパク質 翻訳後修飾 アセチル化 プラスミド *Pseudomonas*

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物の DNA がヒストンに折り畳まれて存在するように、細菌の DNA は核様体タンパク質 (nucleoid-associated proteins, NAPs) に折り畳まれて存在する。NAPs は種類により大きさ、会合度、標的塩基配列、DNA の折り畳み方などが大きく異なり、通常一つの細胞内に複数種の NAPs が存在する。NAPs は細菌の染色体のみならず可動性遺伝子であるプラスミドにもコードされており、細菌がこのようなプラスミドを獲得した場合には、宿主染色体由来の NAPs とプラスミド由来の NAPs が一つの細胞内で協調的に機能するようになる。

原油中の含窒素芳香族化合物カルバゾールの分解プラスミドである pCAR1 には、3 種の NAPs [Pmr (MvaT ホモログ、腸内細菌における H-NS の機能的ホモログ)、Pnd (NdpA ホモログ)、Phu (HU ホモログ)] がコードされている。研究代表者はこれまで、pCAR1 が土壌細菌 *Pseudomonas putida* KT2440 株に接合した場合をモデルとして、pCAR1 由来の NAPs が、接合前に宿主内で形成されていた染色体由来 NAPs による転写制御ネットワークを再構築するメカニズムについて研究を進めてきた。その一環として、本研究開始前に pCAR1 保持株と非保持株を用いたプロテオーム解析、およびアセチローム・スクシニローム解析 (タンパク質のリジン残基側鎖におけるアセチル化・スクシニル化の網羅的検出) を実施したところ、Pmr, Pnd, Phu がアセチル化やスクシニル化を受けること、これらのタンパク質と対を成す KT2440 株染色体由来のホモログも同様に修飾を受けることが明らかとなった [Vasileva *et al.*, 2018, *Environ. Microbiol. Rep.*, 10: 299-309]。しかし NAPs の翻訳後修飾に関する研究は先例が無いに等しく、これらの修飾が各 NAPs の機能にどのような影響を及ぼすのかについては不明であった。

2. 研究の目的

本研究では翻訳後修飾が NAPs の機能に及ぼす影響を調べることで、それが pCAR1 と宿主染色体由来の各 NAPs で形成される転写制御ネットワークに与える影響を明らかにすることを目的とした。この目的達成のため、本研究では翻訳後修飾の中でもアセチル化のみに焦点を当てて研究を実施した。

3. 研究の方法

本研究では pCAR1 と宿主 KT2440 株をモデルとして使用し、以下の(1)で各 NAPs のアセチル化部位の網羅的同定を行い、(2)でアセチル化が NAPs の転写制御能に与える影響 (*in vivo*) を、(3)でアセチル化が各 NAPs の基本的性質に与える変化 (*in vitro*) を解析することで、KT2440 株が pCAR1 を受け取った前後で生じる転写制御ネットワークの変化をエビジェネティクスの観点から再評価することとした。

(1) NAPs のアセチル化部位の網羅的同定

先行研究 [Vasileva *et al.*, 2018, *Environ. Microbiol. Rep.*, 10: 299-309] では全タンパク質を対象としていたために、細胞内量が相対的に少ないタンパク質では検出されるアセチル化部位が少なくなる傾向にあった。このため本研究では、対象タンパク質についてなるべく多くのアセチル化部位を検出するため、全タンパク質抽出後に対象とする NAPs を精製し、LC-MS/MS によりアセチル化部位を同定した。

(2) 疑似アセチル化・脱アセチル化が引き起こす NAPs の機能変化の *in vivo* における解析

現在の技術ではアセチル基を *in vivo* で部位特異的に導入することは困難であるため、本研究ではアルギニン置換株 (脱アセチル化状態を模したもの) およびグルタミン置換株 (アセチル化状態を模したもの) を作製し、トランスクリプトーム解析 (RNA-Seq 解析) およびクロマチン免疫沈降法による DNA 結合部位の網羅的同定 (ChIP-Seq 解析) を行うことを考えた。その前提として、野生型株と各 NAPs 遺伝子破壊株の RNA-Seq 解析と ChIP-Seq 解析を実施した。

(3) アセチル化が引き起こす NAPs の機能変化の *in vitro* における解析

(2)と同様のアミノ酸置換を導入することにより、疑似アセチル化・疑似脱アセチル化状態の NAPs を作製し、タンパク質としての性質の変化を評価した。並行して、タンパク質の目的の部位にアンバーコドン挿入した発現用プラスミドと、アンバーコドンを「アセチル化リジンをコードする」と再定義するための tRNA 発現用プラスミドで大腸菌を形質転換することにより、*in vitro* でのアセチル基の部位特異的導入も行った。また、各 NAPs のどのような性質に変化が生じるかを正しく評価するため、各 NAPs のタンパク質としての機能解析も行った。

4. 研究成果

(1) NAPs のアセチル化部位の網羅的同定

KT2440 株の染色体には、pCAR1 由来の Pmr の対となる主要な MvaT ホモログとして TurA、TurB がコードされており、これらのタンパク質については過去に特異性の高い抗体が得られて

いた [Sun *et al.*, 2017, *BMC Microbiol.*, 17: 188]。このため、TurA、TurB についてはこれらの抗体を利用して抗体カラムを作製し、アフィニティー精製を行った。一方、Pmr については本項目の実施時までには力価の高い抗体が得られなかったため、pCAR1 上の *pmr* 遺伝子末端に His-tag 配列を挿入した株 [Yun *et al.*, 2010, *J. Bacteriol.*, 192: 4720-31] を使用し、His-tag を利用したアフィニティー精製を行った。これらのサンプルについて LC-MS/MS 解析を行ったところ、ウェスタン解析では各抗体に交差反応が認められなかったにもかかわらず、各サンプルに対象外の MvaT ホモログの混入を示唆するデータが得られた。このため、比較的多くのタンパク質量を確保することができた TurA について、SDS-PAGE で泳動後にバンドを切り出してゲル内トリプシン消化を行い、再度 LC-MS/MS 解析を行った。その結果、図 1 に示す 6 つの残基がアセチル化されていることが明らかとなった。このうち K39 と K49 は TurB や Pmr でも保存されており、先行研究でも TurA と TurB で K39 の、TurA と Pmr で K49 のアセチル化が検出されていた [Vasileva *et al.*, 2018, *Environ. Microbiol. Rep.*, 10: 299-309]。以前実施した TurB の結晶構造解析の結果 [Suzuki-Minakuchi *et al.*, 2016, *FEBS Lett.*, 590: 3583-94] から、K39 と K49 は MvaT ホモログの多量体形成に寄与することが明らかとなっている。また K15 は Pmr で保存されており、Pmr においてアラニン置換を導入すると多量体形成能が低下することも知られている [Suzuki *et al.*, 2014, *PLoS One*, 9: e105656.]。一般に MvaT ホモログは、DNA 上で多量体を形成することにより RNA ポリメラーゼの接近や進行を妨げる転写制御様式を持つと考えられている。以上より、K15、K39、K49 のアセチル化が TurA の多量体形成能を変化させ、結果として制御する遺伝子群を変化させる可能性が示唆された(国内学会発表)。

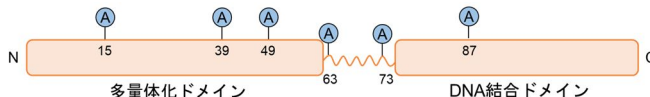


図 1. TurA においてアセチル化が検出されたりジン残基。

(2) 疑似アセチル化・脱アセチル化が引き起こす NAPs の機能変化の *in vivo* における解析
 pCAR1 非保持株 (KT2440 株、KT2440Δ*turA* 株、KT2440Δ*turB* 株) と pCAR1 保持株 [KT2440(pCAR1)株、KT2440Δ*turA*(pCAR1)株、KT2440Δ*turB*(pCAR1)株、KT2440(pCAR1Δ*pmr*) 株] を用いて、対数増殖期と定常期にサンプリングを行い RNA-Seq 解析を実施した。*turA* 破壊および *turB* 破壊のそれぞれにより転写変動した遺伝子について、pCAR1 保持株での転写変動遺伝子数と非保持株での結果を比較すると、どちらの遺伝子破壊についても、転写変動した遺伝子数は pCAR1 保持株の方が非保持株に比べて多かった(図 2)。また転写変動した遺伝子の中身も大きく変化しており、*turA*、*turB* それぞれを破壊した時の pCAR1 保持株と非保持株での重複はいずれも半分未満であった(図 2)。これは KT2440 株が pCAR1 を保持することにより、染色体上に結合していた TurA、TurB が解離して pCAR1 上に結合すること、また pCAR1 由来の Pmr が、TurA、TurB が染色体上に形成している多量体に割り込み DNA に結合することで、TurA、TurB の染色体上の結合箇所が変化することを意味しており、プラスミドの水平伝播が宿主の核様体を再編成する可能性を示唆していると考えられた(論文発表、国内学会発表、東京農業大学生物資源ゲノム解析拠点との共同研究)。

(2) 疑似アセチル化・脱アセチル化が引き起こす NAPs の機能変化の *in vivo* における解析

そこで上述の pCAR1 非保持株 3 株と pCAR1 保持株 4 株について、TurA、TurB、Pmr の抗体を用いた ChIP-Seq 解析を実施した。TurA と TurB の抗体については、(1)と同様に過去に作製した特異性の高い抗体 [Sun *et al.*, 2017, *BMC Microbiol.*, 17: 188] を使用した。一方 Pmr の抗体については、高い特異性が期待されるペプチド抗原では力価の高い抗体が得られなかったため、大腸菌を宿主として異種発現させた Pmr を抗原として使用した。対数増殖期と定常期にサンプリングを行い、各抗体で免疫沈降後にシーケンスデータを取得しており、現在解析を進めている(新学術領域研究「先進ゲノム支援」採択課題、東京農業大学生物資源ゲノム解析拠点との共同研究)。

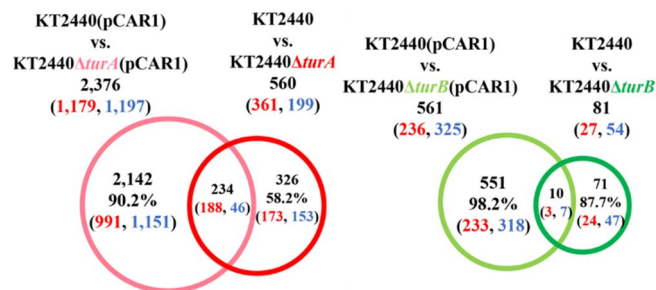


図 2. pCAR1 保持株と非保持株において *turA* 破壊、*turB* 破壊により転写が変動した遺伝子数。対数増殖期の結果を示した。転写量が増加した遺伝子数を赤字で、減少した遺伝子数を青字で示した。[Nakamura *et al.*, 2020, *Front. Microbiol.*, 11: 1099 より改変して引用]

(3) アセチル化が引き起こす NAPs の機能変化の *in vitro* における解析

(1)の実験で同定された TurA の K15、K39、K49 のアセチル化の影響を評価するため、TurA の多量体化ドメイン (TurA_{nt61}) に対して、K15、K39、K49 それぞれのグルタミン置換体(アセチル化状態を模したもの)、アルギニン置換体(脱アセチル化状態を模したもの)、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多量体形成能を評価した。その結果、K49 のアミノ酸置換体ではいずれの残基に置換した場合も多量体形成能の低下が認められたが、中でもアルギニン置換体の多量体形成能が特に低下していた。同様の傾向は、Pmr の多量体化ドメイン

(Pmr_nt₆₁) を用いた場合にも確認された。以前の研究より、MvaT ホモログは二箇所の二量体形成部位(図 3A)を用いて多量体を形成することが明らかとなっており、上述の 3 残基のうち K15 は terminal dimerization site に、K39 と K49 は central dimerization site に含まれる [Suzuki-Minakuchi *et al.*, 2016, *FEBS Lett.*, 590: 3583-94]。K39 と K49 は central dimerization site 内の水素結合の形成に関与しているため(図 3B)、K49 のアセチル化・脱アセチル化が TurA の central dimerization site の結合力に影響を与えている可能性が強く示唆された。また、本研究実施期間中に Pmr の K49 に特異的にアセチル基を導入することにも成功したため、現在、他の残基についても部位特異的にアセチル基を導入し多量体形成能を評価する実験を進めている。一方、図 3 に示した結晶構造は、8 番目のアルギニン残基をアラニンに置換することにより多量体形成を阻害して取得したものである。すなわち、K15 が含まれる terminal dimerization site については図 3 の構造では不活化されており、K15 が terminal dimerization site で果たす役割を明らかにするためには当該部位がネイティブな構造を持つ

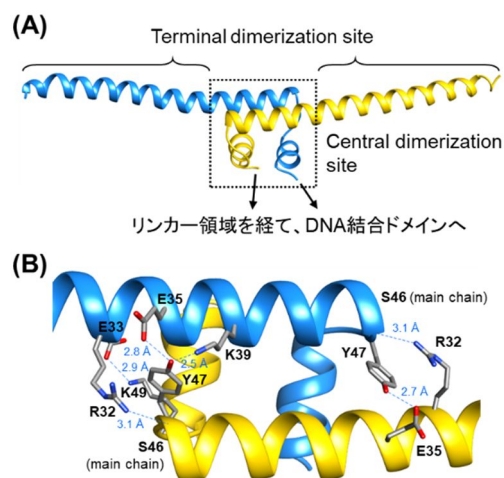


図 3. TurB の多量体化ドメインの結晶構造. (A) ドメイン全体の構造. (B) Central dimerization site での二量体化に重要な水素結合を形成する残基. [Suzuki-Minakuchi *et al.*, 2016, *FEBS Lett.*, 590: 3583-94 より改変して引用]

タンパク質を用いた解析が必要である。このため本研究では、terminal dimerization site のみを持つタンパク質を用いた多量体形成能の評価や構造解析も実施した(国際学会発表、国内学会発表、国際共同研究、創薬等先端技術支援基盤プラットフォームの支援を受けて実施)。

(1)の実験では TurA の DNA 結合ドメイン内のアミノ酸残基にもアセチル化が検出されていた(図 1)。MvaT ホモログの DNA 結合ドメインについては海外の研究グループから溶液構造が報告されており、AT-pincer と呼ばれる DNA 認識モチーフを DNA の副溝に挿入し、そのモチーフ周辺のリジン残基が DNA のリン酸骨格と相互作用することが知られている [Ding *et al.*, 2015, *PLoS Pathog.*, 11: e1004967]。この構造を鋳型として TurA の DNA 結合ドメインのモデル構造を作製したところ、アセチル化が検出された TurA の K87 は DNA の表面からは離れた位置に存在しており、DNA 結合に寄与している可能性は低いと考えられた。一方、DNA 結合ドメイン内に存在する他のリジン残基の中には、DNA 結合に関与すると予想され、かつ Pmr や TurB では保存されていないものも存在した。これらの残基についてはアミノ酸置換体を作製し、表面プラズモン共鳴法により DNA 結合能を評価することで、Pmr、TurA、TurB 間で DNA 結合能の違いが生じる原因を明らかにした(国内学会発表、創薬等先端技術支援基盤プラットフォームの支援を受けて実施)。

本研究では MvaT ホモログ以外の NAPs として、NdpA ホモログも研究対象とした。KT2440 株の染色体には NdpA ホモログが一つコードされており、pCAR1 にも NdpA ホモログ Pnd がコードされている。先行研究では Pnd の K279 にアセチル化が検出されていた [Vasileva *et al.*, 2018, *Environ. Microbiol. Rep.*, 10: 299-309]。NdpA ホモログの研究例は他の NAPs と比べると極端に少なく、現在もドメイン構造や標的塩基配列に関する情報は皆無に等しい状況である。そこで本研究ではタンパク質を切り縮めた派生体を作製し多量体形成能を評価することで、NdpA ホモログの多量体化ドメインの同定を試みた。タンパク質間クロスリンク法により各派生体の多量体形成能を評価したところ、少なくとも C 末端側に二量体化を担う部位が存在することが示唆された。これらの派生体を利用して DNA 結合ドメインも同定することを目指し、まずは標的塩基配列を明らかにするため ChIP-Seq 解析も実施した。Pnd の C 末端を構成するペプチドを抗原として特異性の高い抗体が得られたため、KT2440(pCAR1)株を対象として対数増殖期と定常期にサンプリングを行い、現在シーケンス解析を進めている。これらの解析から NdpA ホモログのドメイン構造や、多量体形成、DNA 結合に重要な残基を決定し、アセチル化が検出された残基がタンパク質の機能に果たす役割を明らかにしたいと考えている(国内学会発表、東京農業大学生物資源ゲノム解析拠点との共同研究)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Taisuke Nakamura, Chiho Suzuki-Minakuchi, Hibiki Kawano, Yu Kanesaki, Shinji Kawasaki, Kazunori Okada, Hideaki Nojiri	4. 巻 11
2. 論文標題 H-NS Family Proteins Drastically Change Their Targets in Response to the Horizontal Transfer of the Catabolic Plasmid pCAR1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.01099	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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中村泰輔、河野響、兼崎友、川崎信治、水口千穂、岡田憲典、野尻秀昭
2. 発表標題 H-NSファミリータンパク質が制御する遺伝子群はプラスミド保持に伴い劇的に変化する
3. 学会等名 第18回微生物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津島和生、角埜裕基、水口千穂、岡田憲典、野尻秀昭
2. 発表標題 H-NSファミリータンパク質の塩基配列嗜好性とそのメカニズムの解析
3. 学会等名 第18回微生物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村泰輔、河野響、兼崎友、川崎信治、水口千穂、岡田憲典、野尻秀昭
2. 発表標題 “Backup” だけではない-プラスミド由来H-NS様因子の機能-
3. 学会等名 第14回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐道陽弘、水口千穂、岡田憲典、野尻秀昭
2. 発表標題 Pseudomonas属細菌由来の核様体タンパク質NdpAにおける多量体化ドメインの探索
3. 学会等名 第14回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ヴァシレヴァデリアナ、水口千穂、孫悦、古園さおり、吉田稔、岡田憲典、野尻秀昭
2. 発表標題 Pseudomonas属細菌のH-NSファミリータンパク質における翻訳後修飾部位の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津島和生、角埜裕基、水口千穂、岡田憲典、野尻秀昭
2. 発表標題 プラスミド・宿主染色体由来のMvaTホモログのDNA結合能の評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村泰輔、河野響、兼崎友、川崎信治、水口千穂、岡田憲典、野尻秀昭
2. 発表標題 H-NSファミリータンパク質のレギュロンはプラスミド保持に伴い劇的に変化する
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐道 陽弘, 水口 千穂, 岡田 憲典, 野尻 秀昭
2. 発表標題 核様体タンパク質NdpAホモログの多量体形成能の解析
3. 学会等名 第17回微生物研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐道 陽弘, 水口 千穂, 岡田 憲典, 野尻 秀昭
2. 発表標題 新規核様体タンパク質NdpAホモログの多量体形成能
3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐道 陽弘, 水口 千穂, 岡田 憲典, 野尻 秀昭
2. 発表標題 核様体タンパク質の一種NdpAホモログの多量体形成能の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sun Yue, Sun Zongping, Vasileva Delyana, Suzuki-Minakuchi Chiho, Okada Kazunori, Nojiri Hideaki
2. 発表標題 Protein-protein binding affinities of H-NS family proteins encoded on the chromosome of Pseudomonas putida KT2440 and IncP-7 plasmid pCAR1
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Delyana Vasileva, Sun Zongping, Chiho Suzuki-Minakuchi, Kazunori Okada, Hideaki Nojiri
2. 発表標題 Differential interactions of H-NS family proteins encoded on the chromosome of <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 and IncP-7 plasmid pCAR1
3. 学会等名 ASM Microbe online (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村泰輔, 河野響, 兼崎友, 川崎信治, 水口千穂, 岡田憲典, 野尻秀昭
2. 発表標題 H-NSファミリータンパク質の転写制御対象遺伝子はプラスミド保持に伴い劇的に変化する
3. 学会等名 第20回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津島和生, 角埜裕基, 水口千穂, 尾花 望, 野村暢彦, 岡田憲典, 野尻秀昭
2. 発表標題 <i>Pseudomonas</i> 属細菌由来のMvaT ホモログが形成する核様体構造の解析
3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水口千穂, 野尻秀昭
2. 発表標題 細菌は接合伝達で獲得したプラスミドにどのように「順応」するのか?
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オランダ	ライデン大学			