

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310131

研究課題名(和文)核様体タンパク質結合部位解析に基づく染色体多様化機構の解明

研究課題名(英文)Comparative analysis of H-NS binding profiles of three E.coli strains suggests H-NS binding contributes to sequence diversification of E.coli genome

研究代表者

黒川 顕 (Kurokawa, Ken)

東京工業大学・地球生命研究所・教授

研究者番号：20343246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円、(間接経費) 4,170,000円

研究成果の概要(和文)：ChIP-seq解析および比較ゲノム解析により3株の大腸菌においてH-NSの結合位置を高精度に決定した。その結果、3株の共有ゲノム領域におけるH-NSの結合は高度に維持されており、ゲノム配列の多様化がH-NS結合位置には影響を与えない事が明らかとなった。また、大腸菌46株の比較ゲノム解析により、配列多様化が極端に進んだ領域には高頻度にH-NSが結合する傾向があり、その領域には哺乳類腸内環境において重要な遺伝子が存在する事がわかった。H-NSは単に遺伝子の発現抑制のみならず、遺伝子の変異蓄積を許容することによる大腸菌ゲノムの多様化さらには生息環境への適応をもたらしている事を示唆している。

研究成果の概要(英文)：The nucleoid protein, H-NS, binds hundreds of regions on the E. coli genome and consequently silences the expression of many genes. Interestingly, many of the genes silenced by H-NS are horizontally acquired, some that are integrated into host transcriptional regulatory networks contribute to stress response, virulence and pathogenicity of the host E. coli strains. Here, we report a comparative evaluation of H-NS binding profiles, determined using the ChAP-seq method, to conserved common segments in the genome sequences of three E.coli strains, K-12, SE11, and SE15. We observed that the H-NS binding profiles are highly conserved in common segments among the strains, and sequence diversity within these regions in the different strains does not affect H-NS interactions. Rather, sequence-diverse regions of the common segments in the E. coli genome tend to bind H-NS, and the encoded genes in these regions seem to play important roles in growth during intestinal environment.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学、ゲノム生物学

キーワード：微生物ゲノム ゲノム構造多様性 核様体

### 1. 研究開始当初の背景

1,000 種を越す細菌ゲノムの配列決定を背景として、遺伝子構成の比較から、細菌ゲノムの進化が議論されている。なかでも大腸菌などはファージやトランスポゾンにより積極的に外界から遺伝子を導入し、ゲノムの進化ならびに種の多様化を実現している。しかし、これら外来遺伝子群がゲノムに取り込まれることで、これまでに無い機能が獲得され、より環境に適した生存戦略を実現することができる一方で、無作為な遺伝子群の取り込みは、安定した個体の生命システムを破壊し、もはや生存することができなくなる可能性も高い。したがって、積極的に外来遺伝子群を取り込む細菌群は、取り込んだ遺伝子群をコントロールする柔軟なシステムを有している必要がある。大腸菌 K-12 株では、核様体タンパク質である H-NS があり、外来性遺伝子群そのもの、またはその周辺のゲノム領域で核様体構造を形成することで、取り込んだ遺伝子群の発現を高度に制御していると考えられる。細菌の核様体は、ダイナミックに変化する高次構造を形成し、外来性遺伝子群の制御のみならず、転写・翻訳・複製や環境ストレスからのゲノム DNA 保護といった機構と密接に関連していることが明らかとなりつつある。さらに、病原性大腸菌においては、H-NS などにより構成される核様体構造を基盤とし、温度による DNA の局所的な構造変化を感知し、ゲノムに散在している外来性の病原性調節遺伝子の転写を直接制御していることが明らかとなった。

大腸菌、枯草菌や *Pseudomonas* 属菌などで核様体タンパク質およびそれらタンパク質のゲノム上での局在化領域が明らかとなりつつあり、核様体の形態・動態は種を超えて保存されている一方、それを構成するタンパク質群は細菌間で多様化していることが考えられる。ゲノム進化や病原性の獲得などに大きく関わる核様体タンパク質の進化過程の解明は、核様体タンパク質の配列比較だけから類推することは困難で、認識配列やゲノム上での位置、外来性遺伝子群との関連性などを含め、ゲノムレベルでの解析が要求される課題であり、細菌ゲノム機能の変化・多様化を理解する上で、重要かつ興味深い、未解明の研究課題である。

ChIP-seq 解析は、転写制御因子と共沈降するゲノム DNA 断片を高速シーケンサーにより直接読み取り、得られた配列断片をゲノム上にマッピングすることにより、核様体タンパク質などの細胞内でのゲノム上の結合部位を網羅的に検出できる強力な実験手法である。研究代表者および研究協力者は、ChIP-chip 解析を細菌のゲノム機能研究にいち早く応用し、K12 株の核様体タンパク質 H-NS の分布を明らかにし、その生物学的意義を報告しており、その ChIP-chip 解析の精度は世界を先導している。さらに ChIP-seq 解析についても予備検討は終了しており、細

菌における ChIP-seq 解析においても、世界に先駆けて、その成果を報告することができると考えている。

### 2. 研究の目的

本研究では、こうした研究実績を発展させ、既に取り組んでいる大腸菌の ChIP-seq 解析において核様体タンパク質の細胞内でのゲノム上の結合部位を高精度に検出する実験系および情報解析系を確立し、大腸菌に近縁な腸内細菌科 3 種の H-NS に対して適用する。そして、すでにゲノム全配列が公開されている代表的な細菌種を対象とし、ゲノム進化に密接に関わる核様体タンパク質を同定する。そして、その結合部位をゲノムワイドに比較解析することを出発点として、核様体タンパク質の進化とゲノム進化の関係性を明らかにすることにより、細菌ゲノム機能の変化・多様化の機構について、新たな視点からの研究の展開を図ることを目指す。

### 3. 研究の方法

細菌における核様体タンパク質は種を超えて保存しているものの、進化の過程で種ごとに重複を繰り返すなど多様化している。さらに、大腸菌とは異なり研究が進められていない細菌種においては、核様体タンパク質やその結合部位に関する情報がほとんど無い。そこで、はじめに大腸菌 3 株 (K-12, SE11, SE15) と近縁種である病原細菌の H-NS の結合部位について ChIP-seq 解析を行い、株間、近縁種間比較ゲノム解析と合わせることで、これらの細菌種の病原性獲得、ゲノム多様化との関わりを明らかにする。そして、すでに明らかとなっている細菌の核様体タンパク質のデータを可能な限り収集し、比較ゲノム解析により核様体タンパク質候補を抽出しデータベース化する。次にこれらの中から進化の途上で重要だと考えられる種を 10~15 種選び、かつ大腸菌の H-NS オートログ遺伝子を慎重に抽出し、これらに関して ChIP-seq 解析にて結合領域の特定を行う。得られた結合領域のゲノム上での分布・配列や、周辺に位置する遺伝子群を細菌種ごとに、または細菌種間で比較することで、種の進化と核様体タンパク質および結合部位配列の進化にどのような関連性があるのかを検討する。

### 4. 研究成果

すでにゲノム完成配列が公開されている大腸菌実験株 K-12(subgroup A)、ヒト腸内常在菌 SE11 株(subgroup B1)、SE15 株(subgroup B2)の大腸菌 3 株において、ChIP-seq 解析および比較ゲノム解析により H-NS の結合位置を高精度に決定した。その結果、3 株のゲノム配列間で良く保存されている共有ゲノム領域 (Fig.1) における H-NS の結合は、しばしばその領域の配列多様性が大きいにも関わらず高度に維持されており、ゲノム配列の多様化が H-NS 結合位置に対して影響を与えない事が明らかとなった (Fig.2)。また、すでにゲノム全配列が公開されている大腸菌 46 株の比較ゲノム解析により、大腸菌ゲノム

で多様化が極端に進んだ領域には高頻度に H-NS が結合する傾向があり (Fig.3) その領域には宿主である哺乳類腸内環境において重要な役割を果たしている遺伝子が存在する事がわかった。また、H-NS の結合領域は、遺伝子領域、遺伝子間領域の区別無く、ニュートラルな進化が起きている事も明らかになった (Fig.4)。これらの結果から、H-NS は単に遺伝子の発現抑制のみならず、遺伝子の変異蓄積を許容することによる大腸菌ゲノムの多様化さらには生息環境への適応をもたらしている事を示唆している。

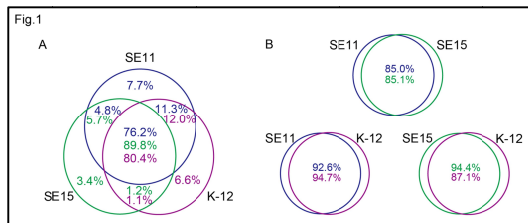


Fig.1: 大腸菌 3 株におけるオーソログ遺伝子および特異的遺伝子の割合

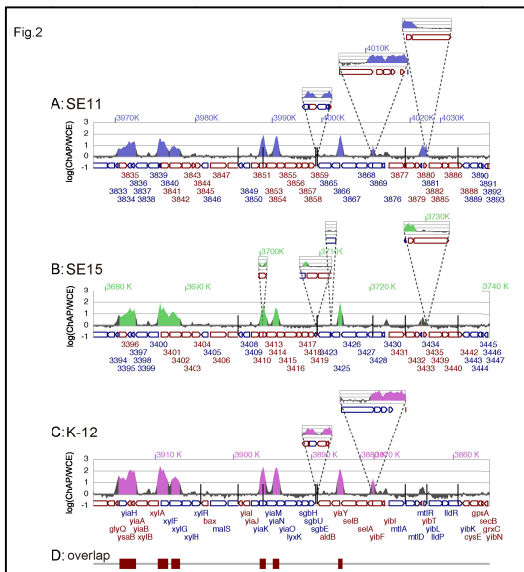


Fig.2: 大腸菌 3 株のゲノムバックボーンと株特異的領域における H-NS ChIP-seq プロファイル

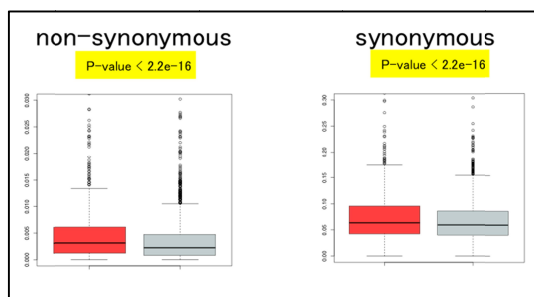


Fig.3: H-NS バインド領域における同義置換数と非同義置換数の割合

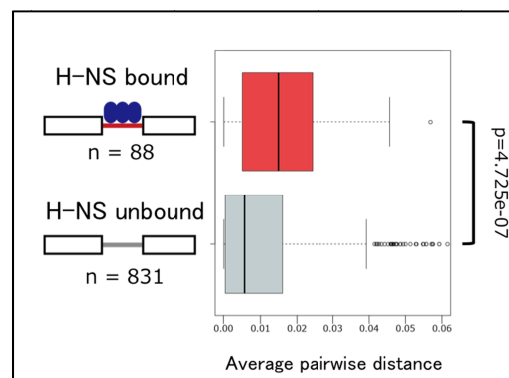


Fig.4: 非遺伝子領域における H-NS バインド領域における配列相違度

### 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7件)すべて査読有  
 1. Tajima N, Sato S, Maruyama F, Kurokawa K, Ohta H, Tabata S, Sekine K, Moriyama T, Sato N. (2014) Analysis of the complete plastid genome of the unicellular red alga *Porphyridium purpureum*. *J Plant Res.* 10.1007/s10265-014-0627-1

2. Sudo N, Soma A, Muto A, Iyoda S, Suh M, Kurihara N, Abe H, Tobe T, Ogura Y, Hayashi T, Kurokawa K, Ohinishi M, Sekine Y (2014) A novel small regulatory RNA accelerates cell motility in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 60(1): 44-50. 10.2323/jgam.60.44

3. Sawabe T, Ogura Y, Matsumura Y, Gao F, Amin A, Mino S, Nakagawa S, Sawabe T, Kumar R, Fukui Y, Satomi M, Matsushima R, Thompson F, Gomez-Gil B, Christen R, Maruyama F, Kurokawa K, Hayashi T (2013) Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: Proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov.. *Frontiers in Aquatic Microbiol.* 4:1-14. 10.3389/fmicb.2013.00414

4. Mori H, Maruyama F, Kato H, Toyoda A, Dozono A, Ohtsubo Y, Nagata Y, Fujiyama A, Tsuda M, Kurokawa K (2013) Design and experimental application of a novel non-degenerate universal primer set that amplifies prokaryotic 16S rRNA genes with a low possibility to amplify eukaryotic rRNA genes. *DNA Res.*, 10.1093/dnares/dst052.

5. Masuda M, Hori K, Maruyama F, Ren S, Sugimoto S, Yamamoto N, Mori H, Yamada T, Sato S, Tabata S, Ohta H, Kurokawa K. (2013) Whole-genome sequence of the purple

photosynthetic bacterium Rhodovulum  
sulfidophilum strain W4. *Genome Announc.*  
1(4):e00577-13. 10.1128/genomeA.00577-13.

6. Minegishi K, Aikawa C, Furukawa A,  
Watanabe T, Nakano T, Ogura Y, Ohtubo Y,  
Kurokawa K, Hayashi T, Maruyama F,  
Nakagawa I, Eishi Y. (2013) Complete Genome  
Sequence of *Propionibacterium acnes* Isolate  
from sarcoidosis patient. *Genome Announc.*  
1(1):e00016-12. 10.1128/genomeA.00016-12.

7. Suzuki S, Ishida T, Kurokawa K, Akiyama Y  
(2012) GHOSTM: A GPU-accelerated homology  
search tool for metagenomics. *PLoS one*,  
7(5):e36060., 10.1371/journal.pone.0036060.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Higashi K, Oshima T, Kurokawa K. (2012)  
Comparative analysis of H-NS binding profiles  
of three *E.coli* strains suggests H-NS binding  
contributes to sequence diversification of *E.coli*  
genome. ASM the 112th General Meeting, San  
Francisco, California (USA), 2012 年 6 月 16 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

黒川 顕 (KUROKAWA, Ken)

東京工業大学・地球生命研究所・教授

研究者番号 : 20343246

### (2)研究分担者

丸山 史人 (MARUYAMA, Fumito)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究  
科・准教授

研究者番号 : 30423122