

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450090

研究課題名(和文)細菌の核様体構造を介した転写制御機構の解析

研究課題名(英文)The role of nucleoid structure in bacterial transcriptional regulation

研究代表者

大島 拓(Oshima, Taku)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50346318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌核様体タンパク質HU, IHF, H-NS, Fisのゲノム上の結合領域を詳細に解析した結果、HU, H-NSに関しては特定の結合配列を見いだせなかった一方、IHFとFisは、3000bp以上の領域で、配列特異的にゲノムDNAと相互作用していることが明らかになった。同時に、遺伝学的、生化学的な解析によって、個々の核様体タンパク質は独立してゲノムDNAと結合するが、それぞれの結合が他の核様体タンパク質の機能に影響することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed the modified high resolution ChIP-seq analysis of E. coli nucleoid proteins to identify the binding regions of nucleoid proteins in base pair resolution. The results indicated that some nucleoid proteins recognize specific sequences at over 3000 regions in E. coli genome, while we could not find the specific recognition sequences of H-NS and HU. Our results also suggested that each nucleoid protein may independently interact with genomic DNA. However, because the independent interaction of each nucleoid protein affects to the functions of other nucleoid proteins, there is the inter-relation of nucleoid proteins to form functional nucleoid structure in E. coli cells.

研究分野：ゲノム微生物学

キーワード：ChIP-seq GeF-seq 大腸菌 核様体 H-NS HU Fis IHF

1. 研究開始当初の背景

(1) 原核生物はヒストンや核を持たず、細胞長に比べると長大なゲノム DNA を、超らせん構造の導入と核様体タンパク質群との相互作用とでコンパクトに折りたたみ、核様体という形にして細胞内に格納している。興味深いことに、大腸菌の多くの遺伝子が、通常の生育条件では発現せず、ストレス条件でのみ発現している。その中の数百の遺伝子の発現は、核様体タンパク質 H-NS がゲノム DNA と、なんらかの凝集構造を取ることで抑制されていると想像されている。生化学および遺伝学的な解析により、この凝集構造が解除されることが、抑制されている遺伝子の発現活性化に重要であると推定されているが、ストレスが、どのように核様体構造を変化させ、転写を活性化するかはわかっていない。

(2) 大腸菌には、H-NS に加え、HU, IHF, Fis という細胞内量が非常に豊富な DNA 結合タンパク質が存在し、核様体構造の形成に寄与していると考えられている。しかしながら、様々な細菌に広く保存されている核様体タンパク質は HU のみであり、H-NS と機能的に相同性を持つタンパク質が多くの細菌に保存されていることを考慮したとしても、大腸菌に特異的に存在する IHF, Fis 等のタンパク質が、核様体構造形成と核様体構造を介した転写制御に、どのように関わるかは明確に示されていない。

(3) HU に関して、HU を欠損すると複製に異常が起き、低温感受性になることや、ゲノム DNA の超らせん構造に異常が生じることが知られていたが、実際に、核様体タンパク質として、核様体構造維持にどの程度寄与し、どのような役割を担っているかはわかっていなかった。

(4) HU の ChIP-chip を行ったグループから、HU はアデニン (A)、チミン (T) の豊富なゲノム領域に好んで結合することが報告されていた。一方、我々のこれまでの研究から、そのような領域には H-NS と H-NS ホモログによる複合体が強く結合し、強固な転写抑制領域が形成されることが明らかになっていた。異なる核様体タンパク質が特定のゲノム領域に近接して結合する場合、それらの核様体タンパク質が相互作用しているのか、あるいは、独立に異なる性質を持ってゲノム DNA と相互作用しているのかは、検討されていなかった。

(5) すでに述べたとうり、H-NS により抑制されている遺伝子の一部は、浸透圧ストレスや温度ストレスといった外界ストレスにより発現が増加する。しかしながら、我々のプレリミナリーな ChIP-chip およびトランスクリプトーム解析の結果からは、それらの外界ストレスにより、H-NS により抑制されている遺伝子の転写活性は高まるが、H-NS の結合は大きく変化しないことが示唆されていた。このことは、H-NS がゲノム DNA から解離することにより、転写が活性化されるわ

けではないことを示していた。

(6) これまで、行われてきた ChIP-chip(seq) 解析では、結合シグナルの非常に高い(すなわち、統計的に信頼度の高い)領域のみを抽出し、議論がなされてきた。その結果、シグナル強度が低い結合領域は無視されてきた。一方、核様体タンパク質がゲノム DNA とどのように相互作用し、ゲノム全体をどのように折りたたむか? を考慮するためには、結合強度の強い領域から弱い領域までを包括的に議論し、ゲノム全体での結合パターンを議論できた方がよい。近年、我々は、ChIP-seq のバックグラウンドを大幅に低下させることができる改良型の ChIP-seq である、GeF-seq を開発した。この方法を用いると、これまで無視してきたような結合シグナルが弱いピークに関して結合領域として検出でき、核様体タンパク質が特異的な結合 (DNA) 配列を認識し結合しているかどうかを検討できる。

(7) (6) で述べた GeF-seq の確立は、それぞれの核様体タンパク質が、ゲノム上の決まった位置に結合するかどうか?、他の核様体タンパク質と相互作用しているかどうか(あるいは競合しているかどうか?) に関する包括的な検討を可能にする。その結果に、遺伝学的な核様体タンパク質間の相互作用の解析や、生化学的な DNA との複合体形成の解析を加えることで、大腸菌の核様体構造の形成に際して、複数の核様体タンパク質がどのように機能するかを検討できる状態になっていた。

2. 研究の目的

本研究では、GeF-seq を用い、大腸菌の核様体タンパク質、HU, H-NS, IHF および Fis の結合領域をゲノムワイドかつ塩基レベルの高精度で決定し、遺伝学、分子生物学、生化学的な解析を組み合わせ、複数の核様体タンパク質が、どのように核様体構造を形成し、核様体構造を介した外界ストレスによる転写制御に、どのように関与するかの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) すでに研究代表者が構築していた核様体タンパク質の欠失株を用い、P1 トランスダクションにより大腸菌の核様体タンパク質多重欠損株を作成する。それらの株が、外界ストレス(主に温度変化)により、どのような表現型を示すか観察する。その結果を元に、核様体タンパク質間に協調的な働きがあるかどうかを検討した。

(2) GeF-seq 法の実験プロトコル、解析プログラムをペアエンドシーケンスに対応可能な形にし、DNA 結合タンパク質が結合し、DNaseI による切断が阻害されている DNA 領域を直接シーケンスし、決定できるよう改良した。改良した GeF-seq 法と H-NS-His, HU-His, IHF-His, Fis-His 株を用いて、核様

体タンパク質結合領域を塩基レベルの解像度で決定した。特に、これまで ChIP-seq 解析で結合領域とされてきた、シグナル強度が比較的強いピークだけでなく、シグナル強度の低いピークも含めて結合領域として(できればゲノム上の全ての結合領域を検出できるように)抽出し、MEME および BiPad を用いてピークに共通して保存されている塩基配列を抽出し、それぞれの核様体タンパク質とゲノム DNA との結合が配列特異的かどうかを検討した。

(3) (2)の結果をコントロールとして、核様体タンパク質変異株における、核様体タンパク質の結合領域のゲノム上の分布について検討した。本研究では、特に、H-NS の結合プロフィールが、他の核様体タンパク質欠損株で変化するかどうかに注目した。

(4) H-NS, HU, IHF および Fis の結合領域が、ゲノムの特定の領域(転写制御領域あるいは遺伝子コード領域)に集中するかどうかを検討すると同時に、結合領域が重なっているかどうかを検討した。それを元に、ゲノム上の結合領域の中で、H-NS, HU および IHF が近接して結合しているゲノム領域を選び出し、まず最初に、それぞれのタンパク質の結合様式を検討した。具体的には、大腸菌ゲノム中の約 3kbp の DNA 断片を PCR により増幅し、精製後、精製 H-NS, HU および IHF と複合体を形成させ、その構造を原子間力顕微鏡により観察、比較した。さらに、IHF と H-NS が相互作用し、両者が同時に DNA と結合した場合に、単独での結合時とは異なる DNA-核様体タンパク質複合体を作るかどうかを検討した。

(5) 核様体タンパク質が、転写制御領域に結合していないが、遺伝子コード領域に結合する場合、本当に、転写制御に関与できるかどうかは明確には示されていない。H-NS が、プロモーター下流の、遺伝子コード領域を含む広い領域にわたって結合している *ybdO* 遺伝子について、発現活性の異なる *ybdO* 遺伝子を持つ大腸菌 SE11 および SE15 の *ybdO* プロモーターの上流および下流のキメラを持つ *lacZ* レポータープラスミドを構築し、実際に転写制御にプロモーターの下流の配列が関与しているかどうかをガラクトシダーゼ活性により検討した。

4. 研究成果

(1) 核様体タンパク質の多重欠失株を構築し、その表現型を調べたところ、特に HU 欠損株に、他の核様体タンパク質の変異を掛け合わせると、大腸菌の生育に重篤な影響を与えることが明らかになった。特に 37 以上の温度での生育に大きな影響が出た。これは、HU とゲノム DNA との結合を基盤とした構造の上で、核様体タンパク質(あるいは、その他の DNA 結合タンパク質)が、それぞれの特異的な機能を果たしていることを示しているのかもしれない。同時に、そのような機能

が、外界ストレスへの適応に重要であることも示唆している。

(2) GeF-seq を改良し、ペアエンドシーケンスによる解析を可能にした。現在、改良型 GeF-seq に関する論文を準備中である。

(3) 詳細な GeF-seq 解析から、H-NS, HU, IHF, Fis の結合プロフィールが明らかになった。HU は H-NS の強い結合領域を除く、ゲノム全体に広く結合し、このことは(1)で推察される、HU がゲノムの基盤構造を形成しているという仮説とよく一致した。HU および H-NS が認識する特異的な配列は検出できなかった。

(4) 一方、IHF および Fis は、結合強度の強弱によらず、ゲノム上の 3000-7000 力所に及ぶ領域に、配列特異的に結合していることが分かった。IHF および Fis 結合領域は、遺伝子コード領域に比べ、遺伝子間領域に好んで存在しているが、これは遺伝子間領域がアデニン(A)、チミン(T)が豊富であり、IHF, Fis の認識する配列に AT が豊富なためであると考えられた。加えて、それぞれの核様体タンパク質の結合領域は、独立して存在し、ごくわずかな重なりしか見いだせなかった。

(5) H-NS の結合プロフィールは、IHF あるいは、H-NS ホモログの欠損では変化しなかった。IHF の結合領域の中には H-NS 結合領域に近接しているものが、また、H-NS ホモログの結合領域と H-NS の結合領域は完全に一致していることから、直接 H-NS の結合に影響を及ぼしている可能性も考えられたが、本研究から、他の核様体タンパク質は、H-NS の結合には強い影響を与えず、核様体構造全体を変化(例えば、凝集性や、核様体内部における局在の変化)させることで、転写に影響を与えている可能性が高まった。他方、HU 欠損株に関しては、生育が安定せず、信頼性の高い解析を実施できないと判断し、GeF-seq を行わなかった。解析手法を改良や、新たな菌株を構築する等、HU 欠損株の解析ができるような形への実験系の改良が求められる。

(6) (5)で示された、遺伝子コード領域への核様体タンパク質の結合が、転写制御に関与するかどうかに関して *ybdO-lacZ* レポーター系を用いて解析を行った。*ybdO* 遺伝子は、大腸菌株ごとに、プロモーター下流の DNA 配列が大きく異なっており、遺伝子発現活性が異なる。キメラレポーター遺伝子は、*ybdO* のプロモーター下流の配列の変化によって、大きく転写活性を変化させた。このことは、*ybdO* 遺伝子の転写制御には、転写伸長制御が重要であることを示している。同時に、RNA ポリメラーゼの伸長阻害領域を観察する RNET-seq によって、大腸菌の野生株においても、*ybdO* 遺伝子における転写伸長阻害が起こっていることが確認された。この結果は、*ybdO* 遺伝子コード領域内の H-NS の結合により転写伸長が阻害される可能性があらことを示唆している。

(7) GeF-seq による詳細なマッピングから、HU, IHF, H-NS, Fis の結合領域は、重ならないことが示唆された。そこで、IHF, H-NS, HU の結合が近接して存在する領域を PCR により増幅し、精製後、精製 IHF, H-NS, HU を試験管内で混合し、DNA 核様体タンパク質複合体の形体がどのように変化するかを原子間力顕微鏡(AFM)により確認した。その結果、HU は、DNA を伸長するように、逆に H-NS は DNA を強く凝集するように、IHF は折り曲げるように機能した。加えて、IHF と H-NS を同時に DNA 断片に結合させると、H-NS 単独よりも強い凝集活性を示した。これまで、AFM を用いた核様体タンパク質と DNA との相互作用の解析は、非特異的な DNA を用いて行われてきたが、今回は真の結合領域を用いて行ったことから、より実際の結合様式を反映したものであると考えられる。以上の結果を総合すると、それぞれのタンパク質が独立にゲノム DNA と結合するが、それぞれの結合が影響しあい、より高次の核様体構造の形成に影響を与えていると推察された。残念ながら、DNA 断片中の IHF の結合領域が AFM から明確に示せず、細胞内と同じ位置かどうかは確定できなかったため、今後信頼性を高めるためにも、他の核様体タンパク質結合領域を用いて同様の解析を行う必要がある。

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 7 件)

1. Inoue, Y., Tanaka, H., Kasho, K., Fujimitsu, K., Oshima, T., and Katayama, T., Chromosomal location of the DnaA-reactivating sequence *DARS2* is important to regulate timely initiation of DNA replication in *E. coli*, *Genes to Cells* 21, 2016, 1015-1023. DOI 10.1111/gtc.12395 査読有
2. Akiyama, MT., Oshima, T., Chumsakul, O., Ishikawa, S., and Maki, H., Replication fork progression is paused in two large chromosomal zones flanking the DNA replication origin in *Escherichia coli*, *Genes to Cells* 21, 2016, 907-914. DOI 10.1111/gtc.12388 査読有
3. Fukui, N., Oshima, T., Ueda, T., Ogasawara, N., and Tobe, T., Gene Activation through the Modulation of Nucleoid Structures by a Horizontally Transferred Regulator, Pch, in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *PLoS One* 11, 2016, e0149718. DOI 10.1371/journal.pone.0149718 査読有
4. Higashi, K., Tobe, T., Kanai, A., Uyar, E., Ishikawa, S., Suzuki, Y., Ogasawara, N., Kurokawa, K., and Oshima, T., H-NS Facilitates

Sequence Diversification of Horizontally Transferred DNAs during Their Integration in Host Chromosomes, *PLoS Genetics* 12, 2016, e1005796. DOI 10.1371/journal.pgen.1005796 査読有

5. Imashimizu, M., Takahashi, H., Oshima, T., McIntosh, C., Bubunencko, M., Court, DL., and Kashlev, M., Visualizing translocation dynamics and nascent transcript errors in paused RNA polymerases in vivo, *Genome Biology* 16, 2015, 98. DOI 10.1186/s13059-015-0666-5 査読有

6. Kasho, K., Fujimitsu K., Matoba T., Oshima T., and Katayama T., Timely binding of IHF and Fis to *DARS2* regulates ATP-DnaA production and replication initiation, *Nucleic Acids Research* 42, 2014, 13134-13149. DOI 10.1093/nar/gku1051 査読有

7. Yamanaka, Y., Oshima, T., Ishihama, A., and Yamamoto, K., Characterization of the YdeO Regulon in *Escherichia coli*, *PLoS One* 9, 2014, e11962. DOI 10.1371/journal.pone.0111962 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

大島 拓, GeF-seq による大腸菌核様体タンパク質の結合配列のゲノムワイド解析, 第 11 回 21 世紀大腸菌研究会 2014 年 6 月 6 日, 岩手県盛岡市

Taku Oshima, Onuma Chumsakul, Shu Ishikawa, High resolution mapping of nucleoid proteins binding sites on *E. coli* chromosome using DNaseI footprinting followed by high-throughput sequencing, The 9th 3R symposium, 静岡県御殿場市

山本 兼良, 山中幸, 大島 拓, 石浜明, 細菌ヒストン様タンパク質 H-NS によるゲノム転写制御の機能解析, 日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日, パシフィコ横浜 神奈川県横浜市

大島 拓, 大腸菌は、H-NS タンパク質の働きにより水平伝搬遺伝子の変異を許容する, 第 13 回 21 世紀大腸菌研究会 2016 年 6 月 2 日, ホテルグリーンピア南阿蘇 熊本県阿蘇郡南阿蘇村

大島 拓, RNA ポリメラーゼの動きをゲノムワイドに解析する, 第 89 回日本細菌学会総会, 2016 年 3 月 23 日, 大阪国際交流センター 大阪府大阪市

東 光一, 戸邊 亨, 石川 周, 鈴木 穰, 小笠原 直毅, 黒川 顕, 大島 拓, H-NS による転写制御を介した大腸菌ゲノムの多様性獲得機構, 第 10 回日本ゲノム微生物学会,

2016年3月4日, 東京工業大学 東京都目黒区

Onuma Chumsakul, 中村 健介, 石川 周, 大島 拓, Genome Footprinting(GeF-seq)により明らかにされた IhfA, IhfB 特異的認識配列, 第12回21世紀大腸菌研究会, 2016年6月5日, 琵琶湖グランドホテル 滋賀県大津市

大島 拓, H-NS が促す外来 DNA の塩基配列の多様化, 第88回日本遺伝学会, 2016年9月9日, 日本大学国際関係学部 静岡県三島市

〔図書〕(計1件)

1. 大島 拓, 石川 周, Chumsakul Onuma, 中村 健介. (2014) 高精度で結合領域を決定する GeF-seq, 次世代シーケンス解析スタンダード:NGS のポテンシャルを活かしきる WET&DRY pp 131 - 142 羊土社 二階堂愛編集

6. 研究組織

(1)研究代表者

大島 拓 (OSHIMA Taku)

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 助教

研究者番号: 50346318

(2)連携研究者

山本 兼由 (YAMAMOTO Kaneyoshi)

法政大学 生命科学部 教授

研究者番号: 40351580

石川 周 (ISHIKAWA Shu)

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 助教

研究者番号: 30359872