

10. キーワード

(1) 核様体	(2) 大腸菌	(3) 枯草菌	(4) シュードモナス
(5) GeF-seq	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

昨年度までに、次世代シーケンサーを用いた新たなDNAタンパク質の結合プロファイルの解析手法を構築し、それを用いて、まず枯草菌のHUタンパク質のゲノム上の結合プロファイルの解析を行った。GeF-seq法により、DNA-HU複合体の精製、ライブラリーの作成、シーケンシングを終了し、そのデータを用いて、システムティックな解析に対応するための結合プロファイル解析手法を構築中である。また、大腸菌、枯草菌の核様体タンパク質に関するGeF-seq解析用のHisタグおよびFlagタグ付加株の作成は、多くの核様体タンパク質について完了しており、順次、サンプルの調整と次世代シーケンシングを行う予定である。新規な核様体タンパク質の解析に関しては、大腸菌のDNA結合ドメインを持たないタンパク質である、HhaおよびYdgTに関して、ChAP-chipによって、その機能を解析した。その結果、DNA結合ドメインを持たないこれらのタンパク質は、DNA結合ドメインを持つ核様体タンパク質であるH-NSおよびStpAと相互作用して、核様体に局在することが明らかとなった。このことから、DNA結合ドメインを持たないタンパク質に関しても、核様体タンパク質の候補となりうることが分かった。さらに、シュードモナスに関しては、Spo0J欠失株を作製した。現在、この株を用いて表現系の解析を行っている。大腸菌のHU、IHFおよびFisタンパク質に関しては、2重欠失株を作成し、表現系を確認した。その結果、HUとIHFの欠失株の変異は、枯草菌のHU欠失株と同様、ほとんど生育ができなかった。FisとHUおよびFisとIHFの2重欠失株の顕微鏡観察では、核様体構造が野生型株に比べ、大きく変化し、さらに、染色体分配も正常に起こっていないことが明らかとなった。これらを総合し、おおむね順調に進んでいるとした。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

1) 核様体タンパク質結合プロファイルの体系的解析：現在行っている枯草菌HUタンパク質の解析を速やかに終了させ、GeF-seq法による、DNA結合タンパク質のマッピング手法を確立させ、枯草菌・大腸菌に関しては、核様体タンパク質とゲノムDNAとの詳細な結合マップをシステムティックに行い、マップを完成させることを大きな目標とする。大腸菌においては、HU、H-NS、IHF、Fis、SlmA、MukBおよびDnaA等を、枯草菌においてはHU、Noc、SMCおよびDnaA等について、マッピングを進め、両者の比較を行う。2) シュードモナスの核様体タンパク質欠失株の構築とタグタンパク質発現株の構築：シュードモナスに関しては、現在行っている方法でも核様体タンパク質の欠損株が構築でき始めたことから、それを続行する。同時に、タグタンパク質発現株の迅速な構築のために、確実な遺伝子破壊とHis-tag付加の新たな方法の構築を試みる。3) シュードモナスの核様体タンパク質のマッピング：タグが付加された核様体タンパク質の発現株が確立でき次第、GeF-seq法によるマッピングを行う。特に、HU、Spo0J、DnaA等、複製および染色体分配に関するものを特に重視して解析を進める。4) シュードモナスの核様体タンパク質欠損株を用いた表現系の解析：シュードモナスの核様体タンパク質の欠失株の表現系について、詳しく解析する。特に、核様体構造の変化、染色体分配の異常、細胞分裂の異常等、核様体構造の異常と生育阻害に関係する表現系について確認する。5) 核様体構造変化に付随したトランスクリプトームの変化の解析：特に核様体構造の変化が大きい変異株に関しては、RNA-seqによりトランスクリプトーム解析を行う。

13.研究発表(平成24年度の研究成果)

〔雑誌論文〕計(1)件 うち査読付論文 計(1)件

著者名		論文標題【掲載確定】			
Ueda T, Takahashi H, Uyar E, Ishikawa S, Ogasawara N, Oshima T.		Functions of the Hha and YdgT Proteins in Transcriptional Silencing by the Nucleoid Proteins, H-NS and StpA, in Escherichia coli.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
DNA Res.	有	Epub ahead of print	2 0 1 3	印刷中	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1093/dnares/dst008					

〔学会発表〕計(2)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名		発表標題【発表確定】	
大島 拓		バクテリアのサイレンシングの多様性と共通性	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第35回日本分子生物学会年会、ワークショップ:遺伝子サイレンシング:その進化的普遍性と多様性	2012年12月14日	福岡県福岡市	

発表者名		発表標題【発表確定】	
上田剛士、高橋弘喜、石川周、小笠原直毅、大島拓		大腸菌Hha, YdgTタンパク質による外来性遺伝子の転写抑制	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第7回日本ゲノム微生物学会年会	2013年03月08日	滋賀県長浜バイオ大学	

(図書) 計(0)件

著者名	出版社			
書名			発行年	総ページ数

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

(出願) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

(取得) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 備考

--