

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580114

研究課題名(和文)細菌の脱サイレンシング機構の解析

研究課題名(英文)The analysis of the de-silencing mechanism in E. coli

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、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、トランスクリプトーム解析により、大腸菌のサイレンサーであるH-NSが、その相同タンパク質である、HhaおよびYdgTと相互作用し、多くの遺伝子の発現を抑制していることを示した。加えて、レポーター遺伝子を用いた解析により、H-NSの転写抑制には、プロモーターの上流、および下流の広い領域が必要であることを示した。同時に、H-NSとHhaによる協調的な転写抑制が、Pchタンパク質により脱抑制されることを示した。これらの結果は、H-NSによる転写抑制には、H-NSが複数のタンパク質と複合体を形成し、遺伝子コード領域を含む広範な領域に結合する必要があることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The transcriptome analysis with the deletion mutants of hha, ydgT, stpA and hns genes indicated that Hha and YdgT are the proteins which assist H-NS to repress the expression over 100 genes. In addition, lux and lacZ reporter analysis to elucidate the mechanisms of the transcriptional regulations in ybd0 and ler promoters indicated that the wide areas in up and downstream of the ybd0 promoter is essential for the transcriptional repression of ybd0 which depends on H-NS and the derepression of ler promoter with Pch protein observed when the repression of ler genes was cooperatively regulated by H-NS and Hha.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物遺伝・育種 転写制御 核様体 大腸菌 サイレンシング

1. 研究開始当初の背景

(1) 真核生物には、遺伝子サイレンシングと呼ばれ、様々な遺伝子を不活性化するシステムが存在する。例えば、細胞外から侵入した外来遺伝子が発現した場合に生じる悪影響を最小限に保つため、あるいは細胞分化に応じた遺伝子の使い分けをコントロールするため等、真核生物は、多様な細胞機能の制御に、このシステムを利用している。一方、細菌(原核生物)の持つ、サイレンシングシステムの研究は、ほとんどなされていなかった。

(2) 近年、我々も含めた複数のグループから、大腸菌、サルモネラ菌が有する H-NS と呼ばれるタンパク質が、ゲノム DNA 中に存在する外来遺伝子に結合し、その転写を抑制していることが報告された。この転写抑制活性は、外来遺伝子の機能や、プロモーター構造に制限を受けないことから、真核生物のサイレンシングと同様の機能を持つと考えられた。

(3) H-NS は、ゲノム DNA 中のアデニン(A)およびチミン(T)含量が高い領域に結合する。外来遺伝子も、A, T 含量が高く、そのため H-NS が結合できると考えられている。H-NS が、特に強く結合する認識(塩基)配列が見いだされており、H-NS は、まず、その配列に結合し、その後、多量体を形成して、認識配列の周りの DNA と非特異的に結合すると考えられている。同様に、H-NS による転写抑制にも、多量体形成が必要であることが遺伝学的な解析から示唆されている。しかしながら、見いだされた H-NS の認識配列は、大腸菌およびサルモネラ菌のゲノム上に存在する H-NS 結合領域の一部にのみ存在し、加えて、H-NS の配列非依存的な DNA との結合活性が非常に弱いことから、H-NS による転写抑制が細胞内で、どのように実行されているのかは、説明できていない。

(4) H-NS による遺伝子サイレンシングは、環境ストレスやタンパク質により解除されることが知られている。例えば、培地に塩を加えると、*proU* 遺伝子の H-NS による転写抑制は浸透圧ストレスによって解除される。また、H-NS により通常抑制されている *ler* 遺伝子の発現は、Ler や Pch といったタンパク質が H-NS の機能を阻害することによって誘導されると考えられているが、詳しいメカニズムは明らかになっていない。

(5) 精製した H-NS を用いた試験管内転写解析が、すでに報告されているが、細胞内で起きている現象を完全には再現できていない可能性が指摘されている。例えば、*proU* 遺伝子の H-NS による転写抑制は、試験管内でも観察されるが、この試験管内転写系では、カリウムイオンの濃度上昇(浸透圧ストレスを再現)による *proU* 遺伝子特異的な転写誘導が観察されないことが報告されている。

(6) 大腸菌には、H-NS の相同タンパク質が複数存在する(StpA, Hha, YdgT)。これらの因子は、H-NS が細胞内で転写を抑制する際に、H-NS を補助する役割があると推測され

ている。

(7) 以上述べてきたように、H-NS は大腸菌、サルモネラ菌におけるサイレンシングの制御因子、サイレンサーとして機能すると考えられるが、H-NS による転写の抑制および、その脱抑制のメカニズムは、全く解明されていない。したがって、真核生物と細菌の遺伝子サイレンシングのメカニズムに関する比較検討はできていない。

2. 研究の目的

本研究では、試験管内転写解析、トランスクリプトーム解析、レポーター遺伝子を用いた遺伝子発現解析により、大腸菌における遺伝子サイレンシングに必要な要素、タンパク質、遺伝子発現制御に必要なゲノム領域(シスエレメント)を明らかにし、さらに、遺伝子サイレンシングの解除(脱抑制)が起こるメカニズムの解明をめざす。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子サイレンシングの試験管内再構成：H-NS は、N 末端にヒスチジンタグを付加した形で大腸菌を用いて発現させ、ニックルレジンを用いて精製した。RNA ポリメラーゼは Epicentre 社から購入した。*ler* 遺伝子のプロモーター領域あるいは *ybdO* 遺伝子のプロモーター領域は PCR により増幅し、これまでも試験管内転写反応の鋳型プラスミドとして用いられている pSR プラスミドにクローニングした。精製 H-NS, RNA ポリメラーゼ、構築したプラスミドを用いて、試験管内転写系を構築し、H-NS の転写抑制能を検討した。加えて、大阪大学の戸邊教授より精製 Ler および Pch タンパク質を分与していただき、構築した試験管内転写系に加え、脱抑制因子である Ler および Pch による転写の活性化が試験管内で再現できるかどうかを検討した。

(2) H-NS の相同タンパク質 Hha, YdgT の機能解析：すでに述べたように、大腸菌には、3 種類の H-NS 相同タンパク質(StpA, Hha, YdgT)が存在する。我々は、これまでに StpA の解析を行い、StpA が H-NS と相互作用し、転写抑制活性に貢献していることを明らかにしている。本研究では、Hha と YdgT の機能を調べるために、Hha および YdgT をコードする *hha* および *ydgT* 遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析を行った。*hha* および *ydgT* 遺伝子は、大腸菌の遺伝子破壊に一般的に用いられている one-step 法により破壊した。作成した *hha*, *ydgT* 破壊株、および、すでに作成済みであった *hns*, *stpA* 破壊株を用い、*hha*, *ydgT*, *hns*, *stpA* 遺伝子破壊を P1 トランスダクション法により、W3110 株に導入し、*hha*, *ydgT*, *stpA*, *hns* の単独破壊株、*hns/stpA* あるいは *hha/ydgT* の 2 重破壊株を、遺伝的なバックグラウンドを W3110 株にそろえた形で作成した。菌株を対数増殖期まで培養し、mRNA をそれぞれの株から精製し、

Affymetrix 社のジーンチップを用いて、トランスクリプトーム解析を行った。

(3) *lux* レポータープラスミドを用いた *ler* 遺伝子の転写抑制機構の解析: H-NS による転写抑制を受ける *ler* 遺伝子のプロモーター領域を細菌ルシフェラーゼ遺伝子のの上流に挿入したプラスミドを作成した。同時に、*hha*, *ydgT*, *stpA*, *hns* の単独破壊株、2 遺伝子破壊株、3 遺伝子破壊株、4 遺伝子(すべての遺伝子)破壊株を構築し、作成したプラスミドを導入した。得られた株を用いて、*ler* 遺伝子の発現が、株ごとに、どのように変化するかを、発光強度を指標に確認した。さらに、それらの株において、Pch を発現させ、*ler* 遺伝子の発現が Pch の発現によって、どのように変化するかを観察した。

(4) *lacZ* レポータープラスミドを用いた *ybdO* 遺伝子の発現抑制に関わるシス領域の解析: H-NS による転写抑制が、*ybdO* 遺伝子近傍の、どの領域に依存しているかを確認するため、*ybdO* 遺伝子のスタートコドンの上流、および下流を様々な長さで持つ DNA 断片を、*lacZ* 遺伝子のの上流に挿入したプラスミドを作成した。このプラスミドを用いて、大腸菌 MC4100 株 (*lacZ* 遺伝子を欠損しており *lacZ* 解析に用いられる) および、その *hns* 遺伝子欠損株を形質転換した。得られた菌株を用いて、 β -ガラクトシダーゼアッセイを行い、酵素活性を指標にして、*ybdO* 遺伝子の転写制御に重要な役割を持つ領域を決定した。

4. 研究成果

(1) H-NS による転写抑制の試験管内再構成: 研究の方法で述べたように、精製 H-NS, RNA ポリメラーゼ、鋳型となる *ler* 遺伝子プロモーターあるいは *ybdO* プロモーター領域を挿入したプラスミドを用いて、試験管内転写系を再構成した。その結果、H-NS を加えることにより、どちらのプロモーターの活性も強く抑制された。次に、構築した試験管内再構成系に、H-NS の転写抑制活性を阻害するタンパク質である、Ler および Pch 加え、再度、試験管内転写を試みた。その結果、Ler、Pch ともに、H-NS の転写抑制活性に影響を与えなかった。再構成系に加えた、Ler および Pch の量が不十分であることも考えられたが、加える Ler および Pch の量を増加させたところ、転写はさらに抑制された。背景にも述べたとおり、*proU* 遺伝子の H-NS による転写抑制は、試験管内で観察できるものの、細胞内で観察される浸透圧ストレスによる抑制の解除が、試験管内では再現できないことが報告されている。*proU* プロモーターの解析同様、我々の試験管内転写系では、細胞内で実際に起こっている H-NS による転写抑制を完全には再現できていない可能性があると考えられた。そこで、細胞内における H-NS の転写抑制活性に必要な、H-NS と協調して働く因子および、プロモーター近傍に存在し、転写制御に

重要な役割を果たすシス領域をトランスクリプトームおよびレポーター遺伝子を用いた転写解析により探索した。

(2) トランスクリプトーム解析: Hha および YdgT は H-NS の相同タンパク質であるが、DNA 結合ドメインを持たず、直接 DNA に結合することはできないと考えられた。そこで、Hha および YdgT が、H-NS の転写抑制に、どのように寄与しているかを調べるために、トランスクリプトーム解析を行った(図 1)。*hns/stpA* 2 重欠失株は、H-NS に加え、H-NS のバックアップタンパク質である StpA も失っており、H-NS による転写抑制機構が全く機能していない大腸菌株である。この株では、583 遺伝子の発現が、野生型に比べ上昇していた。すなわち、野生型の大腸菌では、583 の遺伝子が、H-NS により転写抑制されていること示していた。興味深いことに、*hha/ydgT* 2 重欠失株では、134 遺伝子の発現が、野生型に比べて上昇していたが、そのうちの 131 遺伝子は *hns/stpA* 2 重欠失株でも発現の上昇が観察された遺伝子であった(図 1B)。このことは、Hha および YdgT が H-NS と協調して転写を抑制をしていることを示している。Hha と YdgT は、H-NS と相互作用することが他の研究結果で示されていることから、Hha

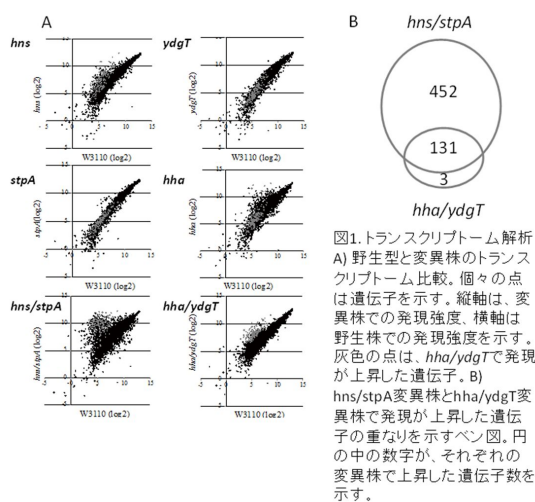


図1.トランスクリプトーム解析
A) 野生型と変異株のトランスクリプトーム比較。個々の点は遺伝子を示す。縦軸は、変異株での発現強度、横軸は野生株での発現強度を示す。灰色の点は、*hha/ydgT*で発現が上昇した遺伝子。B) *hns/stpA*変異株と*hha/ydgT*変異株で発現が上昇した遺伝子の重なりを示すベン図。円の中の数字が、それぞれの変異株で上昇した遺伝子数を示す。

と YdgT は H-NS の転写抑制の補助因子であることが強く示唆された。

(3) 細胞内の *ler* 遺伝子の H-NS による抑制と Pch による脱抑制: 研究の方法(3)で述べたように、細菌ルシフェラーゼによる発光を指標として、大腸菌細胞内における、H-NS, StpA, Hha および YdgT による *ler* 遺伝子の転写抑制と、Pch の発現による脱抑制効果を解析した。その結果、*ler* 遺伝子の抑制は、*hha* 欠失株あるいは、*hha/ydgT* 2 重欠失株で、大きく低下した。さらに、Pch の発現による脱抑制効果は、*hns* あるいは *hha* を欠損した場合に大きく低下することから、細胞内における *ler* 遺伝子の抑制および脱抑制には、H-NS に加え、H-NS の補助因子である Hha, YdgT が寄与することが示唆された。

(4) 細胞内の *ybdO* 遺伝子の H-NS による抑制と脱抑制: 研究の方法(4)で述べたように、 β -

ガラクトシダーゼ活性を指標とし、*ybdO* 遺伝子の転写抑制に必要なシス配列を決定した。*ybdO* 遺伝子は、定常期に誘導され、野生型に比べ、*hns* 欠損株において発現が大きく上昇した。加えて、H-NS による転写の抑制には、プロモーター活性を有する領域は必要とされず、プロモーター上流、あるいは下流の、200~300bp にわたる領域が必要であった。以前に行った ChIP-seq 解析により、この領域には、H-NS が結合していることが示されており、H-NS が、これらの領域に結合して転写を抑制していることが強く示唆された。加えて、H-NS による転写抑制活性に必要な領域は、プロモーターとは重ならないことから、H-NS による転写抑制は、H-NS がプロモーターに直接結合し、RNA ポリメラーゼのプロモーターへの結合を阻害するというよりも、プロモーターの上流、および下流に結合した H-NS によるプロモーター近傍の DNA の立体構造の変化を介した間接的な影響であることが示唆された。

(5) 以上の解析結果を総合すると、H-NS による転写抑制の試験管内再構成のためには、H-NS と H-NS 相同タンパク質群による転写抑制複合体と DNA との相互作用を試験管内に再構成すること、その際には、間接的な転写制御を再現できるように、細胞内のゲノム DNA の立体構造を再現するような工夫をすること(たとえば、HU などの核様体タンパク質を試験管内再構成系に加えること)が必要であると考えられた。今後、それらの点を考慮して、細胞内の反応をより反映した試験管内転写抑制系を構築し、生化学的なアプローチによる H-NS の転写抑制および、その脱抑制メカニズムの解明につなげたい。

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 1 件)

1. Functions of the Hha and YdgT Proteins in Transcriptional Silencing by the Nucleoid Proteins, H-NS and StpA, in *Escherichia coli*. Takeshi Ueda, Hiroki Takahashi, Ebru Uyar, Ishikawa S, Ogasawara N, Oshima T. (2013) DNA Res. 20:263-271. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 大島 拓, 細菌における外来遺伝子発現抑制機構, 日本農芸化学会, シンポジウム「微生物ゲノム設計の時代に塩基組成の機能と進化を再考する」, 2014 年 3 月 30 日, 川崎

2. 大島 拓, ゲノムワイドな解析手法により明らかになった核様体タンパク質の機能, 日本遺伝学会第 85 回大会, 2013 年 9 月 19 日 横浜

3. 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, 第 7 回日本ゲノム微生物学会年会, 2013 年 3 月 08 日, 長浜

4. 大島 拓, Comparative analysis of H-NS binding profiles suggests a role of H-NS in sequence diversification of bacterial genome, 2012 年 06 月 20 日, ライデン オランダ

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