

様 式 F - 7 - 1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成 26 年度）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 基盤研究(C) 4. 補助事業期間 平成 26 年度～平成 28 年度

5. 課題番号

2	6	4	5	0	0	9	0
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題名 細菌の核様体構造を介した転写制御機構の解析

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
5 0 3 4 6 3 1 8	オオシマ タク 大島 拓	バイオサイエンス研究科	助教

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

今年度は、HUおよびH-NSの、浸透圧および温度を変化させた培養条件における結合プロファイルをGeF-seqを用いて、詳細に解析する計画であったが、HUおよびH-NSの結合プロファイルの決定に際し、通常のGeF-seq法のプロトコルを改変する必要が生じたため、その解析プロトコルの開発が中心となった。具体的には、ライブラリー作成時に、ゲノム断片のサイズによる精製工程を省き、シーケンシングを行った後、DNA断片のサイズを考慮した解析を行うことにした。その結果、H-NSの結合プロファイルが、個々の細胞内で、ダイナミックに変化している可能性が示唆された。今後、改良型GeF-seq法を確立し、確立した方法を用い、外界ストレスにตอบสนองした、H-NSおよびHUのダイナミックな結合プロファイルの変化を解析する予定である。同時に、本年度は、HUのホモログであるIHFおよび、H-NSと協調的に機能することが知られているFisに対するGeF-seq解析を進めた結果、FisとIHFは、他の核様体タンパク質と相互作用し、転写あるいは核様体構造を制御指定可能性があることが示唆された。これまでの解析から、H-NSは、複数のH-NSホモログと相互作用し、その相互作用に依存して、多量体を作ることが示されていることから、これらの相互作用は、H-NSのダイナミックな結合プロファイルの制御にも関連している可能性が高いと考えられた。これらの結果を元に、核様体間の相互作用を介した核様体構造の変化に関しても解析を進める予定である。また、GeF-seq解析手法の改良に伴い、GeF-seq解析プログラムおよびデータの解釈手法の改良を進めている。

10. キーワード

(1) 大腸菌	(2) 核様体	(3) H-NS	(4) HU
(5) IHF	(6) Fis	(7) GeF-seq	(8)

11. 現在までの達成度

(区分)(3) やや遅れている。

(理由)

本年度は、GeF-seqに用いて、外界ストレス応答によるH-NSおよびHUの結合プロファイルの変化、および、その変化に伴う転写制御を解析する予定であった。しかしながら、GeF-seqにより得られたH-NSおよびHUの結合プロファイルが、ライブラリーの調整方法により予想以上に変化することが明らかになったため、その情報を含めて結合プロファイルを解析する手法を開発する必要が生じ、その結果、H-NSのダイナミックな結合プロファイルの解析には成功したものの、外界の刺激に応答した結合の変化を解析できなかった。一方で、今後は構築した方法を用いて、ダイナミックな結合プロファイルの解析を行う体制が確立できたことから、やや遅れていると判断した。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

次年度は、新たに構築した改良型GeF-seqを用い、ダイナミックな核様体構造変化を介した外界ストレス応答機構を解析していく。同時に、改良型GeF-seqから得られるデータについて、出来る限り早くバイオインフォマティクスによる解釈手法を確立する。これまでの解析から、HUおよびH-NSを介したストレス応答機構には、IHFおよびFis等の、他の核様体タンパク質との相互作用も重要な可能性が示唆されたことから、IHFおよびFisのGeF-seq解析に関しても、同時に進展させ、出来るだけ早い論文発表を目指す。また、H-NSおよびHU、あるいは、H-NSと相互作用する核様体タンパク質の欠損株を用いたH-NSおよびHUのGeF-seq解析を実施し、核様体構造と核様体タンパク質の相互作用についても、解析を進める予定である。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

次世代シーケンシングを用いた解析を行ったところ、重要な解析対象である核様体タンパク質の解析結果が、多くの一般的なDNA結合タンパク質と大きく異なり、これまで用いてきたGeF-seq解析システムを改良する必要が生じた結果、次世代シーケンシングを用いた解析の一部が、実施出来なかったため。

(使用計画)

平成26年度に計画していた、GeF-seq解析を、改良したGeF-seq解析システムを用いて、次年度に行う予定である。そのために必要な、次世代シーケンス解析費用として使用する予定である。

13.研究発表(平成26年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(2)件 うち査読付論文 計(2)件

著者名		論文標題					
Yamanaka Y., Oshima T., Ishihama A., Yamamoto K		Characterization of the YdeO Regulon in Escherichia coli					
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁		
PLoS One	有	9	2	0	1	4	e111962
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)							
10.1371/journal.pone.0111962							

著者名		論文標題					
Kasho, K., Fujimitsu K., Matoba T., Oshima T., Katayama T		Timely binding of IHF and Fis to DARS2 regulates ATP–DnaA production and replication initiation					
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁		
Nucleic Acids Res.	有	42	2	0	1	4	13134-13149
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)							
10.1093/nar/gku1051							

(学会発表) 計(3)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名		発表標題	
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	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第11回 21世紀大腸菌研究会	2014年06月05日～2014年06月06日	ホテル大観 (岩手県盛岡市)	

発表者名	発表標題	
Taku Oshima, Onuma Chumsakul, Shu Ishikawa	High resolution mapping of nucleoid protein binding sites on E. coli chromosome using DNaseI footprinting followed by high-throughput sequencing	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 9th Symposium	2014年11月17日～2014年11月21日	御殿場高原ホテル（静岡県御殿場市）

発表者名	発表標題	
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	
学会等名	発表年月日	発表場所
第37回日本分子生物学会年回	2014年11月25日～2014年11月27日	パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

(図書) 計(1)件

著者名	出版社		
大島 拓、石川 周、Chumsakul Onuma、中村 健介	羊土社		
書名	発行年	総ページ数	
高精度で結合領域を決定するGeF-seq、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すWET&DRY	2014	401 (131-142)	

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

--