

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成23年度博士課程進学  
氏名 鈴木 千穂  
指導教員名 野尻 秀昭

### 論文題目

プラスミド由来の核様体タンパク質が宿主の機能を調節する分子機構の解明

細菌の可動性遺伝因子であるプラスミドは宿主の新規遺伝子の獲得を補助し、宿主の環境適応（進化）に大きな役割を担う。プラスミド上の遺伝子が宿主染色体由来の因子の制御を受けることは以前から知られていたが、当研究室の最近の研究から宿主染色体上の遺伝子もプラスミド由来の因子の制御を受けることが示されている。このようなプラスミド-宿主染色体間相互作用の鍵因子として、本研究では核様体タンパク質 (nucleoid-associated proteins; NAPs) に着目した。NAPs は DNA に結合し、DNA の構造を変化させることで多くの遺伝子の転写を制御する。当研究室で研究が進められてきたプラスミド pCAR1 (*Pseudomonas* 属細菌を主な宿主とする) には MvaT ホモログ Pmr, NdpA ホモログ Pnd, HU ホモログ Phu の 3 種の NAPs がコードされており、これまでに当研究室で行われた *P. putida* KT2440 株を宿主とした解析から、単独破壊株及び *pnd/phu* の二重破壊株では顕著な表現型は見られないものの、*pmr/pnd* 及び *pmr/phu* の 2 つの二重破壊株では pCAR1 の安定性や接合伝達頻度が顕著に低下すること、各破壊株では染色体上と pCAR1 上の両方で多くの遺伝子の転写が変動することから、Pmr, Pnd, Phu は両ゲノムの転写制御を行うことで宿主の pCAR1 保持・伝達を協調的に制御することが明らかとなった[1]。

本研究では表現型が変化した二重破壊株に *pmr* が共通していたことに着目し、三者の協調的機能には Pmr が主要な役割を果たすと考えた。Pmr を含む

*Pseudomonas* 属細菌の MvaT ホモログは腸内細菌の H-NS とアミノ酸配列の保存性は無いものの、大腸菌の *hns* 破壊株の表現型を相補できることから「H-NS ファミリータンパク質」に含まれる。H-NS は C 末端側の DNA 結合ドメインで標的塩基配列に結合した後、その分子を「足場」にして N 末端側の二量体/多量体化ドメインにより DNA 上で多量体化することで外来遺伝子領域の転写を抑制する。そこで本研究では Pmr の多量体形成様式と塩基配列認識機構を調べることで、Pmr が遺伝子の転写を制御する分子機構の解明を目的とした。

### **Pmr のホモ多量体形成機構の解明**

MvaT ホモログは H-NS と同様の機能を持つと考えられていた一方で、その二量体・多量体形成機構はほとんど調べられておらず、両者間で機能発現に重要な分子機構が共通なのか異なるのかは不明であった。そこでまず Pmr が H-NS と同様にホモ多量体を形成することをタンパク質間クロスリンク法やゲルろ過クロマトグラフィーを用いて確認した[2]。その上で Pmr の二量体/多量体化ドメインが N 末端側 61 残基 (Pmr\_nt<sub>61</sub>) であることを同定し、Pmr\_nt<sub>61</sub> のモデル構造を作製してホモ多量体形成に重要な 22 残基を予測した。これらのアラニン置換体を作製し各々のホモ多量体形成能をクロスリンク法で評価したところ、7 つのアラニン置換体でホモ多量体の割合が顕著に減少し、代わりに二量体の割合が増加した。これらの 7 残基 (E6, R8, K15, Q18, R20, N27, K49) の分布を Pmr\_nt<sub>61</sub> のモデル構造上で調べたところ、3 つの  $\alpha$ -ヘリックスを N 末端側から  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  と名付けた場合、K49 を除く 6 残基が  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  及び隣接するループ上に存在したことから、Pmr\_nt<sub>61</sub> は主に N 末端側を用いてホモ多量体を形成することが示唆された。一方 H-NS では N 末端側に加えて、二量体/多量体化ドメインと DNA 結合ドメインを繋ぐリンカー近傍領域もホモ多量体形成に重要であることが示されている。しかし Pmr\_nt<sub>61</sub> の C 末端側 (リンカー近傍領域) を削った Pmr\_nt<sub>55</sub> のホモ多量体形成能は Pmr\_nt<sub>61</sub> と変わらず、二量体/多量体化ドメインに加えて推定リンカー領域を持つ Pmr\_nt<sub>73</sub> や全長の Pmr でも上述のアラニン置換の一つ (R8A) を行うと Pmr\_nt<sub>61</sub> と同様にホモ多量体形成能が低下したことから、Pmr では H-NS とは異なり二量体/多量体化ドメインの N 末端側のみがホモ多量体形成に主要な役割を担う (図 1) ことが示唆された[3]。

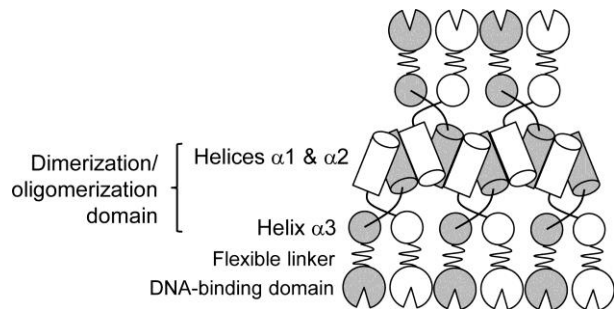


図 1. Pmr のホモ多量体形成機構の模式図。

### **Pmr のヘテロ多量体形成機構の解析**

*P. putida* KT2440 株染色体には 5 つの MvaT ホモログがコードされているが、こ

のうち遺伝子の転写量が多い *TurA*, *TurB* については *Pmr* と共に KT2440(pCAR1) 株における遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析及び改変クロマチン免疫沈降 (ChAP-chip) 法による結合箇所の同定が行われており, 各因子は独自のレギュロンを持つにも拘わらず結合箇所は一致するという一見矛盾する結果が得られていた [尹ら, 未発表データ]. 一方, 本研究で *Pmr*, *TurA*, *TurB* のホモ・ヘテロ多量体形成について調べたところ, ゲルろ過クロマトグラフィー及びクロスリンク法により *TurA*, *TurB* も *Pmr* と同様にホモ多量体を形成すること [2], プルダウン法により *Pmr* が *TurA*, *TurB* とヘテロ多量体を形成すること [4] が明らかとなり, ChAP-chip 法によって検出された各因子の結合箇所は *Pmr*, *TurA*, *TurB* のヘテロ多量体の結合箇所であると予想された. もし DNA 上に生じた各ヘテロ多量体の組成が異なるなら各遺伝子破壊株で転写変動した遺伝子が異なる理由も説明できるのではないかと考え, 表面プラズモン共鳴法を用い, 等量固定化した *Pmr*, *TurA*, *TurB* に対して *Pmr* を結合させたところ, *TurB*-*Pmr* 間の結合比は *TurA*-*Pmr*, *Pmr*-*Pmr* 間の結合比の約半分であることが示唆された [3]. この結果は, DNA 上に *Pmr*, *TurA*, *TurB* のホモ二量体が存在し, そこに *Pmr* が結合する時, 最初に「足場」となるタンパク質によって次に生じるホモ・ヘテロ多量体の組成が変化することを示唆している (図 2). これが *turB* 破壊株において *Pmr*, *TurA* が *TurB* の機能を相補できなかった理由の一つであると考えられた.

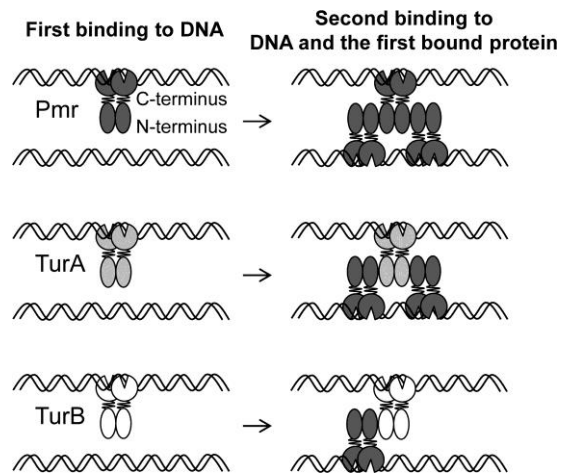


図 2. ヘテロ多量体の組成は「足場」となる因子によって変化する.

### Pmr の DNA 結合能の解析

ホモ・ヘテロ多量体形成の最初の「足場」が DNA 上のどこに形成されるのかを調べるため, *Pmr* の DNA 結合能の確認と *TurA*, *TurB* との塩基配列特異性の比較を試みた. *Pmr* を用いてゲルシフトアッセイや原子間力顕微鏡による *Pmr*-DNA 複合体の観察を行ったところ, *Pmr* の DNA 結合能・架橋能は確認されたものの, ホモ多量体を形成するために塩基配列特異性の評価は難しいことが明らかとなった [2]. そこで単量体で存在する *Pmr*, *TurA*, *TurB* の DNA 結合ドメイン (*Pmr*\_ct, *TurA*\_ct, *TurB*\_ct) と多様な塩基配列のライブラリーを用いて SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法による高親和性塩基配列の同定を試みたが, 標的塩基配列の濃縮は見られなかった. そこでゲルシフトアッセイにおいて, 競合核酸として加える poly[d(I-C)] の濃度を様々に変化させたところ,

poly[d(I-C)]の濃度が高くなるにつれて Pmr\_ct, TurA\_ct, TurB\_ct のいずれの場合も通常は結合が見られるプローブからの解離が観察された。以上より, Pmr\_ct, TurA\_ct, TurB\_ct は標的塩基配列への特異性が低く, 多様な塩基配列中から各タンパク質の高親和性塩基配列を同定することは難しいと判断された。

### **Pmr 及び Pmr-R8A の結晶化条件のスクリーニング**

H-NS では全長にわたり構造情報が得られている一方で MvaT ホモログの構造情報は未だ取得されておらず, 本研究で明らかとなった Pmr のホモ・ヘテロ多量体形成様式や塩基配列認識について構造情報を用いた議論を行うことはできなかつた。そこで Pmr の結晶構造解析を目的として, Pmr 及び Pmr-R8A (二量体で安定に存在する) を用いて計 1,728 条件で結晶化条件のスクリーニングを行ったところ, Pmr-R8A で微結晶が得られる条件が見出された。現在はマイクロシーディングにより結晶の成長を試みている。

### **総括と展望**

本研究から, ①機能が同じと考えられてきた H-NS と MvaT ホモログ (Pmr) では機能発揮の分子機構が異なること, ②Pmr, TurA, TurB の転写制御にはヘテロ多量体の組成が重要であること, が明らかとなった。Pmr, TurA, TurB の塩基配列認識が真に非特異的であれば, これらの転写制御機構はタンパク質間の結合比のみで議論できる。しかし共同研究者の ChAP-chip 法による解析からは DNA 上のヘテロ多量体の組成が塩基配列によって変化する可能性も示唆されているため [高橋ら, 未発表データ], 今後は特定の塩基配列に対する各因子の結合親和性を評価することで Pmr, TurA, TurB の高親和性塩基配列に差があるのか調べる必要があるだろう。また本研究では pCAR1 の 3 種の NAPs のうち Pmr に着目したが, Pnd, Phu でも同様に染色体由来のホモログが果たす役割を調べることにより, 染色体・プラスミド由来の NAPs が協調的に両ゲノムの転写制御を行う分子機構が明らかになると期待される。

### **発表論文**

- (1) [Suzuki C](#), Hirofumi R, Takahashi Y, Matsui K, Takeda T, Yun CS, Shintani M, Okada K, Yamane H, Nojiri H. *Environ. Microbiol.* submitted
- (2) [Suzuki C](#), Yun CS, Umeda T, Terabayashi T, Watanabe K, Yamane H, Nojiri H. (2011) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**:711-7
- (3) [Suzuki C](#), Horita S, Terada T, Tanokura M, Okada K, Yamane H, Nojiri H. *PLoS One* submitted
- (4) Yun CS, [Suzuki C](#), Naito K, Takeda T, Takahashi Y, Sai F, Terabayashi T, Miyakoshi M, Shintani M, Nishida H, Yamane H, Nojiri H. (2010) *J. Bacteriol.* **192**:4720-31