

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840002

研究課題名(和文)核様体に局在する酸化ストレス消去タンパク質群によるゲノムDNA維持システムの解明

研究課題名(英文)Bacterial genomic DNA protection mechanism against oxidative stresses

研究代表者

大庭 良介(Ohniwa, Ryosuke)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：30447883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスからのゲノムDNA保護は、細胞生命の維持にとって重要である。ヒトに共生または感染する細菌にとって、免疫細胞や呼吸などによって生じる酸化ストレスから、自身を守ることに繋がる。本研究では、細菌の核様体(ゲノムDNA・タンパク質などの複合体)中に存在する抗酸化ストレスタンパク質に着目し、ゲノムDNA保護の具体的な仕組みを調べた。10種類程度の抗酸化ストレスタンパク質を対象とした細菌遺伝学的を用いた一連の研究のうち、特にヒト日和見感染体である黄色ブドウ球菌Dpsタンパク質が、ゲノム上への装備では不十分で、酸化ストレス発生を阻止する機能が必須であることなどを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The protection of genomic DNA against oxidative stresses is essential to sustain the living cells including symbiotic/pathogenic bacteria inhabiting human. Here, I studied the molecular mechanisms to protect bacterial genomic DNA. I focused on about ten proteins which I have shown to be equipped on the bacterial nucleoid which is the complex of genomic DNA, protein, etc. Among the proteins examined by techniques of bacterial molecular genetics, Dps protein in an opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus* exhibited that its DNA binding and nucleoid clogging abilities are not sufficient to protect genomic DNA and cells, and that its ferroxidase activity (ferric iron chelating ability) is essential.

研究分野：分子生物学・細菌遺伝学

キーワード：核様体 酸化ストレス 細菌 染色体

1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA は、呼吸、紫外線、酸化ストレス誘因物質などによって発生する活性酸素による攻撃に曝され、変異や DNA 断片化によって生じる細胞の機能障害や細胞死の危険を常に伴う。従来、ゲノム DNA の維持は、変異した塩基や切断された部位の修復といった観点で多くの研究が進められてきた。これに対し、申請者は細菌核様体（染色体）タンパク質の解析から、核様体が環境の変化に応じて様々な酸化ストレス消去タンパク質を着脱し、活性酸素がゲノム DNA に到達する直前にその効果を消したりその発生を防ぐシステムが存在する可能性を見出した。

2. 研究の目的

上記に示した解析結果から、様々な酸化ストレス消去タンパク質を環境の変化に応じて着脱し、ゲノム DNA を保護するという作業仮説“Armor Hypothesis”を立てている。本研究では、本作業仮説に基づき、大腸菌、黄色ブドウ球菌の酸化ストレス消去タンパク質 SodA&B, TrxA&B, AhpC, Dps をモデル系として DNA 保護システムの詳細を解明するとともに、他生物種における解析をとおして、酸化ストレス消去タンパク質によるゲノム DNA 保護機構の一般性を問う。

3. 研究の方法

(1) 酸化ストレスタンパク質の細胞内局在の解析

大腸菌の GFP 融合 SodA&B, TrxA&B, AhpC, Dps を大腸菌で強制発現させ、酸化ストレスなどの環境に応じた局在の変化を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

(2) DNA ダメージリスクの評価

大腸菌の SodA&B, TrxA&B, AhpC, Dps の欠損株を用い、細胞内の一本鎖 DNA の暴露という DNA ダメージリスクへのリスクを AID アッセイによって評価した。

(3) Armor Hypothesis 検証

黄色ブドウ球菌 Dps タンパク質 (MrgA) のフェロドキシダーゼ活性部位へ変異を入れ、ラジカル発生発生阻止能力 ($Fe^{2+} + H_2O_2 \Rightarrow \cdot OH + Fe^{3+}$ という反応の阻止) の欠如が細胞および DNA 保護能に直結するかどうかを検証した。加えて、大腸菌 Dps の DNA 結合部位を除いた変異タンパク質を Dps 欠損黄色ブドウ球菌内で発現させ、抗酸化能力を維持できるか検証した。

4. 研究成果

(1) 酸化ストレスタンパク質の細胞内局在の解析

核様体への局在は認められたものの、細胞質内への局在も認められた。強制発現タンパク質のゲノム埋め込みによるコピー数削減や、GFP タグとは異なる形での判別といった改善

が必要である。GFP タグの改善のため、大腸菌の SodA&B, TrxA&B, AhpC, Dps についてはポリクローナル抗体を作成した。

(2) DNA ダメージリスクの評価

TrxA&B について、一本鎖 DNA 暴露が向上し、DNA ダメージリスクが高まることが分かった。

(3) Armor Hypothesis の検証

黄色ブドウ球菌 Dps (MrgA) のフェロドキシダーゼ活性部位に変異を入れたタンパク質 (MrgA*) は、フェロドキシダーゼ活性が落ちるが (図 1) DNA 結合能 (図 2) および核様体凝集能を維持するものであった (図 3)。

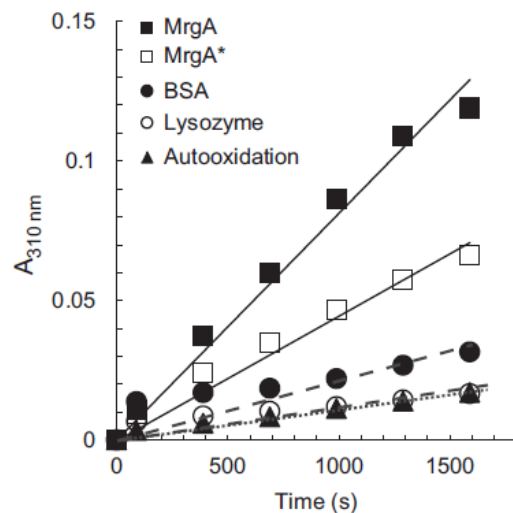


図 1: MrgA* のフェロドキシダーゼ活性

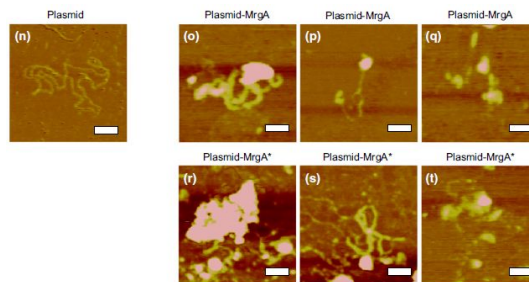


図 2: MrgA* の DNA 結合能

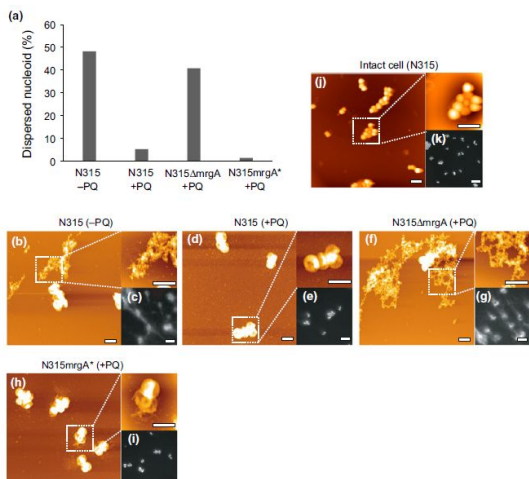


図 3 : MrgA* の核様体凝集能力 (PQ : 9,10-phenanthrenquinone で酸化ストレス)

MrgA*変異株では、酸化ストレス(H₂O₂) に対しての抵抗力が、MrgA 欠損株と同様まで減少するとともに (図 4) 貪食細胞 (マクロファージ) に対する抵抗力も減少した (図 5)。

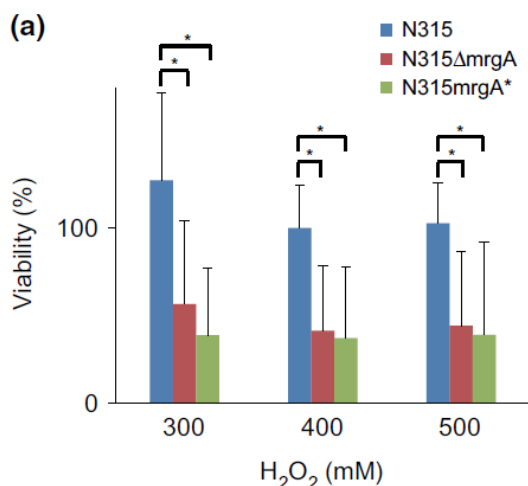


図 4 : MrgA*変異株の抗酸化ストレス能

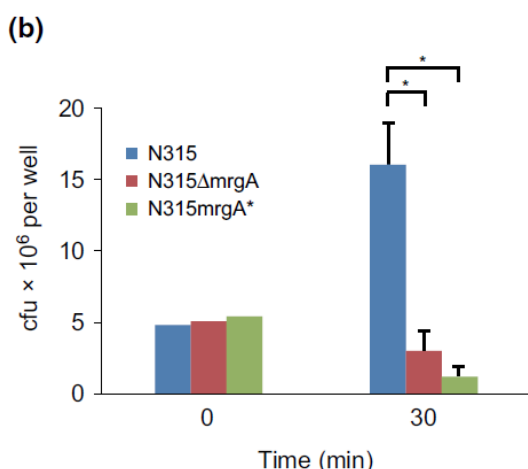


図 5 : マクロファージ貪食に対する抵抗力

MrgA*の DNA 保護能力の低下
MrgA*では、野生型 MrgA に比べて、酸化ストレス (H₂O₂) に対する DNA 保護能力が低下した。データ未発表。

DNA 結合能力欠損の大腸菌 Dps タンパク質は、核様体凝集能力を失ったが、フェロドキシダーゼ活性は維持された。論文投稿中。

DNA 結合能力欠損の大腸菌 Dps タンパク質を発現させた黄色ブドウ球菌株 (野生型 Dps 欠損株) では、野生型大腸菌 Dps を発現させた黄色ブドウ球菌株 (野生型 Dps 欠損株) と同レベルの酸化ストレス抵抗能力を維持した。論文投稿中。

まとめ:

以上の結果より、黄色ブドウ球菌において、Dps による細胞の酸化ストレス耐性および DNA 保護は、Dps の酸化ストレスを未然に防ぐ能力 (フェロドキシダーゼ活性) が必須であり、DNA 結合および核様体凝集能は必要ないことが明らかとなった。この結果は、申請者が提唱した Armor Hypothesis と矛盾するものであり、Armor Hypothesis は必ずしも成立しないことが明らかとなった。同時に Dps による DNA 結合および核様体凝集の役割がなんであるかという新たな疑問点が浮かび上がった。現在、凝集細胞と非凝集細胞のトランスクリプトーム解析を進めており、凝集によって特定の遺伝子の発現が制御されるという結果を得ている。今後は、このゲノム機能の制御という観点で、核様体タンパク質および核様体構造動態の役割を探索していきたい。

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 8 件)

1. Ushijima Y, Ohniwa RL, and Morikawa K. "In vitro DNA Protection Assay Using Oxidative Stress," *Bio-protocol*, **5(14)**, e1538. (2015)、査読有。
2. Mori K, Murano K, Ohniwa RL, Kawaguchi A and Nagata K. "Tamiflu Expands Quasispecies of Influenza Virus through Cell-to-cell Transmission." *Scientific Report*, **16(5)**, 9163 (2015)、査読有。
3. Maudsdotter L, Imai S, Ohniwa RL, Saito S and Morikawa K. "Staphylococcus aureus dry stress survivors have a heritable fitness advantage in subsequent dry exposure." *Microbes and Infection*, pii: S1286-4579(15)00038-6 (2015)、査読有。
4. Suwastika NI, Denawa M, Yomogihara S, Im CH, Bang WY, Ohniwa RL, Bahk JD, Takeyasu K and Shiina T. "Evidence for Lateral gene Transfer (LGT) in the evolution of eubacteria-derived small GTPases in plant organelles." *Frontiers in Plant Science*, **5678**, doi: 10.3389/fpls.2014.00678 (2014)、査読有。
5. Ushijima Y, Ohniwa RL, Maruyama A, Saito S, Tanaka Y and Morikawa K. "Nucleoid compaction by MrgA^{Asp56Ala/Glu60Ala} does not contribute to staphylococcal cell survival against

oxidative stress and phagocytic killing by macrophage.” *FEMS Microbiol Lett*, **360(2)**, 144-51 (2014) 、 査読有。

6. Ohniwa RL, Muchaku H, Saito S, Wada C and Morikawa K. “Atomic force microscopy analysis of the role of major DNA-binding proteins in organization of the nucleoid in *Escherichia coli*.” *PLoS ONE*, **8(8)**, e72954 (2013) 、 査読有。
7. Ueta M, Wada C, Daifuku T, Sako Y, Bessho Y, Kitamura A, Ohniwa RL, Morikawa K, Yoshida H, Kato T, Miyata T, Namba K and Wada A. “Conservation of two distinct types of 100S ribosome in bacteria.” *Genes Cells*, **18**, 554-574 (2013), doi: 10.1111/gtc.12057. 、 査読有。
8. Ohniwa RL, Kitabayashi K and Morikawa K. Alternative cardiolipin synthase Cls1 compensates for stalled Cls2 function in *Staphylococcus aureus* under conditions of acute acid stress. *FEMS Microbiol Lett*, **338**, 141-6, 2013, doi: 10.1111/1574-6968.12037. Epub 2012 Nov 22. 、 査読有。

[学会発表](計 5 件)

1. Ryosuke L. Ohniwa, Yuri Ushijima, Kazuya Morikawa. “A genomic DNA protection system”. 22-23 July 2013, Singapore. 1st Singapore-Japan-India Joint Symposium on Protein-DNA interactions in Prokaryotic nucleoid and Eukaryotic chromatin (招待講演)
2. Ryosuke L. Ohniwa, Kana Kibatayashi, Kazuya Morikawa. “Alternative cardiolipin synthase Cls1 compensates for stalled Cls2 function in *Staphylococcus aureus* under conditions of acute acid stress”, 7th International Conference on Gram-Positive Microorganisms, 23-27 June 2013, Italy (Tsucany).
3. Yuri Ushijima, Ryosuke L. Ohniwa, Atsushi Maruyama, Shinji Saito, Yoshikazu Tanaka, Kazuya Morikawa. “Oxidative stress resistance by nucleoid associated protein MrgA essentially requires its iron sequestering ability.” 15th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, August, 2012 Lyon, France
4. Kana Kibatayashi, Ryosuke L. Ohniwa, Kazuya Morikawa. “Alternative

cardiolipin synthase Cls1 compensates for stalled Cls2 function in *Staphylococcus aureus* under conditions of acute acid stress” The 3rd Leading Graduate Schools International Conference, 1-2 November, 2012, つくば国際会議場、茨城県つくば市

5. Chin-Yao Liu, Yun-Hsin Liang, Chen-Yu Wen, Yu-Chen Yang, Shu-Yu Huang, Ryosuke Ohniwa, Tsai-Kun Li. “Regulation of R-loop formation and chromatin-like structure: Nucleoid-associated proteins as potential regulators.” The 3rd Leading Graduate Schools International Conference, 1-2 November, 2012, つくば国際会議場、茨城県つくば市

[図書](計 2 件)

1. 大庭良介 表層常在細菌叢と病原体「環境と微生物の事典」朝倉書店, 448 (252-253) (2014)
2. 大庭良介 酸化ストレス耐性 「環境と微生物の事典」朝倉書店, 448 (260) (2014)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大庭 良介 (OHNIWA, Ryosuke)
筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号 : 30447883