

大腸菌核様体タンパク質 H-NSとDNAの複合体の解析

Nakamura, Seigo / 中村, 聖吾

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学・工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編 / 法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

58

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2017-03-31

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00014371>

大腸菌核様体タンパク質 H-NS と DNA の複合体の解析

NUCLEOID FORMATION MECHANISM BY NUCLEOID ASSOCIATED PROTEIN H-NS

中村聖吾

Seigo NAKAMURA

指導教員 山本兼由

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻生命機能学領域修士課程

The bacterial chromosome is associated with a number of nucleoid proteins, most of which are a bifunctional DNA-binding protein playing roles in both DNA compaction and gene regulation. The *E. coli* genome is associated with at least six DNA-binding proteins, Dps, Fis, H-NS, HU, IHF, and StpA. During the transition of *E. coli* cells from logarithmic phase to stationary phase, the morphology of the nucleoid changes from a fibrous state to a rod form with change in the cellular composition of associated nucleoid proteins. Among six nucleoid proteins of *E. coli*, the level of HU and H-NS are almost constant while the level of others dramatically changed in the cell. Reporter analysis showed that *hns* promoter dramatically increased at stationary phase, suggested that H-NS play an important role to form nucleoid in logarithmic phase cell. First, I examined to observe single complex of linear DNA with H-NS with atomic force microscope. In the absence of protein, the linear DNA in the length of 1 kbp was found to be 300 nm microfibril. In the presence of H-NS, the DNA-protein complexes formed thick filaments in the half length of intact DNA. These observations indicate that H-NS were capable of forming shortened DNA filament.

Key Words : *Escherichia coli*, nucleoid associated protein, H-NS

1. 序論

大腸菌ゲノムは、細胞内でタンパク質や RNA との複合体である核様体を形成する(1)。大腸菌核様体を構成する主なタンパク質は HU、IHF、Fis、Dps、H-NS、StpA の 6 種類であり、核様体タンパク質と称される(2)。これら核様体タンパク質は DNA 結合能をもち、核様体形成に加え、転写制御を行うことが知られている。H-NS は大腸菌細胞内で常に一定量存在し、ゲノム上の全遺伝子の 1/4 を制御する(3, 4)。本研究では核様体タンパク質遺伝子プロモーターを包括的に解析するとともに、H-NS の DNA 結合による複合体への影響を原子間力顕微鏡で観察した。

2. 実験方法

(1) レポータープラスミド pLux を用いたプロモーター活性の測定

ルシフェラーゼレポータープラスミド pLux ベクターに適切なプロモーターを挿入したレポータープラスミドを構築した。このプラスミドを大腸菌に導入し、M9 最少培地にて 2、3.5、5、6.5、8 時間まで培養した細胞の発光強度を測定した。

(2) ゲルシフトアッセイ

FITC でラベルした DNA 断片を PCR により増幅させ、調製した。FITC ラベル DNA と精製 H-NS を混合し、ポリア

クリルアミドゲル電気泳動によって分析した。

(3) 原子間力顕微鏡による 1 分子観察

精製した DNA を H-NS と混合し、石英サンプル台に供与後、原子間力顕微鏡によってイメージングを行った。得られた画像の DNA もしくは H-NS-DNA 複合体の長さは実測をし、ヒストグラムでまとめた。

3. 結果と考察

(1) 大腸菌の核様体タンパク質遺伝子プロモーター活性の測定

大腸菌の 6 種類の核様体タンパク質をコードする 8 種類の遺伝子プロモーター (*dpsp*, *fisp*, *hns*, *hupAp*, *hupBp*, *ihfAp*, *ihfBp*, *stpAp*) を pLux に挿入し、レポータープラスミドを構築した。これらのレポータープラスミドを大腸菌 BW25113 に導入し、M9 最少培地の培養にて継時的に培養液をサンプリングし、発光強度を測定した。発光強度は OD 600 nm の割合として算出し、OD 600 nm に対してプロットした結果、*ihfBp* と *stpAp* は細胞密度に関わらず低い活性を示し、*fisp*, *hns*, *hupAp*, *hupBp*, *ihfAp* は細胞密度依存的に活性を増加させた。さらに、大腸菌細胞内で常に一定量存在する H-NS の発現を担う *hns* は細胞密度の増加に伴い劇的

な活性増加を示した。このことから H-NS は対数増殖期細胞で一定量保持されるように転写が活発に起きていることが分かった。

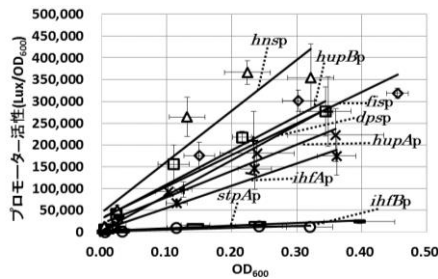


図 1. 大腸菌における核様体遺伝子プロモーター活性

(2) H-NS の GAD クラスター遺伝子プロモーターへの結合

9 つの遺伝子で構成される大腸菌の GAD クラスターは H-NS によりサイレンシングされる。既知の転写開始点やポリシストロニックな転写単位を考慮すると、*gadA*、*gadE*、*gadW*、*hdeA*、*slp* 遺伝子の上流に存在する 6 つのプロモーター領域が存在する。このうち、*slp* プロンプ、*hdeA* プロンプ、*gadW* プロンプ、*gadA* プロンプ、*gadE* プロンプを含む約 500 bp および *gadE* プロンプ S とその上流にある別の *gadE* プロンプを含む *gadE* プロンプ L、約 1 kbp の DNA を PCR で増幅し、FITC ラベル DNA を調製した。さまざまな濃度の H-NS でゲルシフトアッセイを行った結果、全てのプロモーター DNA に対して 1.0 μ M 以上の H-NS 存在下でバンドのシフトを確認した。

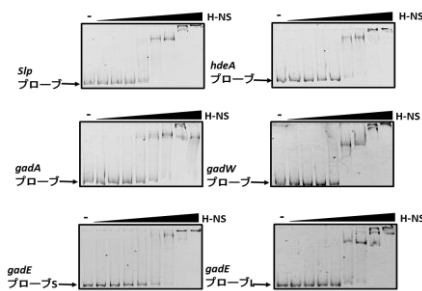


図 2. GAD クラスター遺伝子プロモーターへの H-NS 結合能の確認

(3) 原子間力顕微鏡による H-NS-DNA 複合体の 1 分子解析

まず、*slp* プロンプ、*hdeA* プロンプ、*gadW* プロンプ、*gadA* プロンプ、*gadE* プロンプ S、*gadE* プロンプ L の DNA を PCR で増幅後、精製し、原子間力顕微鏡で観察したところ、細い繊維状の分子として確認できた。確認した分子長を測定し、その平均を求めた。その結果、500 bp の *slp* プロンプは約 160 nm、646bp の *hdeA* プロンプは約 186 nm、631 bp の *gadW* プロンプは約 252 nm、646 bp の *gadA* プロンプは約 180 nm、513 bp の *gadE* プロンプ S は約 154 nm、1036 bp の *gadE* プロンプ L は約 362 nm となり、概

ね理論値と同じ長さを示した。つぎに、H-NS と DNA を混合し、原子間力顕微鏡で観察したところ、厚みのある繊維状の分子として確認できた。

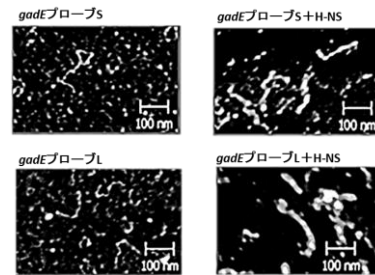


図 3. H-NS-DNA 複合体の 1 分子解析

確認した分子の長さを測定し、その平均を求めた。その結果、*slp* プロンプでは約 180 nm、*hdeA* プロンプでは約 207 nm、*gadW* プロンプでは約 210 nm、*gadA* プロンプでは約 234nm、*gadE* では約 178 nm、概ねそれぞれの DNA 長の理論値と同じ長さを示した。一方、1036 bp の *gadE* プロンプ L における H-NS 複合体では約 196 nm となり、DNA 長の理論値の約半分の長さを示した。

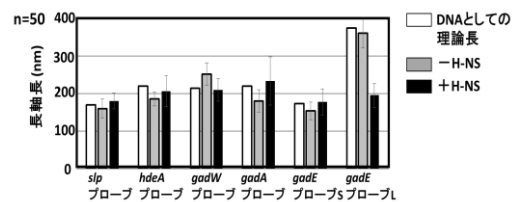


図 4. DNA と H-NS-DNA 複合体分子の実測

4. 結言

大腸菌の核様体タンパク質 H-NS は増殖相に関わらず細胞内で一定量を示すことが知られるが、その遺伝子プロモーターの活性は対数増殖期で高くなることが明らかとなった。これは、増殖する大腸菌細胞に常に一定量保つため積極的な H-NS 供給を行う必要があるためと考えられる。また、H-NS は 1 kbp 程度の DNA との複合体ではコンパクトな繊維状分子を形成することを確認した。このことより、ある程度の長さの DNA を十分に占有した H-NS によって核様体構造の凝集が起こることが示唆された。

参考文献

- (1) Ohniwa, RL. et al. 12, e72954, PLoS One, 2013
- (2) Reid, C. et al. :Major Nucleoid Proteins in the Structure and Function of the Escherichia coli Chromosome, In the bacterial chromosome, pp.66-69, ASM Press, Washington, D.C., 2005
- (3) Hommais, F. et al. 40, 20-36, Mol. Microbiol., 2001
- (4) Oshima, T. et al. 31, 141-53, DNA Res., 2006