

平成23年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）実績報告書（研究実績報告書）

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(A) 4. 研究期間 平成23年度～平成25年度
5. 課題番号

2	3	2	4	1	0	6	2
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 種間比較による細菌細胞機能のオーガナイザーとしての核様体の構築原理の解明
7. 研究代表者

研究者番号								研究代表者名		所属部局名		職名	
1	0	1	1	0	5	5	3	おがさわら 小笠原	なおたけ 直毅	バイオサイエンス研究科		教授	

8. 研究分担者(所属研究機関名については、研究代表者の所属研究機関と異なる場合のみ記入すること。)

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

下欄には、当該年度に実施した研究の成果について、その具体的内容、意義、重要性等を、交付申請書に記載した「研究の目的」、「研究実施計画」に照らし、600字～800字で、できるだけ分かりやすく記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

1) シュードモナスを用いた核様体タンパク質遺伝子欠失株の作成：接合を利用した遺伝子破壊システムを用いて欠失株を作成中であるが、標的遺伝子にマーカー遺伝子を挿入したプラスミドの作成および接合用大腸菌への導入は行える一方、変異株を得ることには成功していない。核様体遺伝子の破壊によって、シュードモナスの生育が極端に悪化した結果として、本方法では、破壊できていない可能性がある。実際、ミニトランスポゾン挿入法によりHU破壊株の取得に成功し、HU破壊株の生育が悪く、細胞長が伸長することが判明したことから、生育不全が大きな影響を与えないトランスポゾン法を含む他の遺伝子破壊方法を探索中である。

2) シュードモナス、枯草菌の新規核様体タンパク質の同定：① 細胞をホルムアルデヒド処理することにより核様体複合体を架橋した後、複合体をDNAを特異的に吸着するガラスビーズで精製し、そこに含まれるタンパク質を質量分析により決定する、② GFP融合タンパク質が核様体に局在するかを検証し、新規核様体タンパク質を決定する。このシステムを用いて、枯草菌の新規核様体タンパク質を探索したところ、①では既知の核様体タンパク質（Hbs、AbrB、Abh）、DNA結合タンパク質（RNA polymerase、トポイソメラーゼ、Rho因子、DNA複製タンパク質）に加え、31の核様体タンパク質候補を検出した。②では、既知の核様体タンパク質であるHbs、AbrB、Abhに加え、新たに2つのタンパク質が核様体候補として絞り込まれた。シュードモナスに関しては、GFP融合タンパク質の細胞内局在を調べるために必須となる、蛍光物質非生産株を作成した。

3) 新たなDNA結合プロファイル解析法の構築：細胞内DNaseI消化とChAP法を組み合わせることで、これまでの、ChAP-chip解析と比べ、飛躍的に解像度の上昇したGeF-seq法の構築に成功し、枯草菌の核様体タンパク質の結合プロファイルを詳細に決定した。

10. キーワード

- | | | | |
|------------|--------|--------|------------|
| (1)核様体 | (2)大腸菌 | (3)枯草菌 | (4)シュードモナス |
| (5)GeF-seq | (6) | (7) | (8) |

11. 現在までの達成度

下欄には、交付申請書に記載した「研究の目的」の達成度について、以下の区分により自己点検による評価を行い、その理由を簡潔に記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。
 <区分>①当初の計画以上に進展している。 ②おおむね順調に進展している。 ③やや遅れている。 ④遅れている。

(区分) ②おおむね順調に進展している。
(理由) 枯草菌の新規核様体タンパク質候補の探索および結合プロファイルの解析に関しては、新たな方法を構築し、それをを用いて解析を行った結果、新規核様体タンパク質候補を特定できた。また、GeF-seq法を開発し、高解像度で、核様体タンパク質の結合プロファイルを決定した。同時に、シュードモナスでタンパク質の細胞内局在を解析するための、蛍光物質非生産株を構築できた。これらの点から、次年度以降、3種のバクテリア間で、核様体構造を比較する基礎は出来上がったと言える。シュードモナスに関しては、おそらく、核様体遺伝子欠失株の生育不良が推測され、接合を用いた遺伝子破壊法では、効率的な遺伝子破壊ができない可能性が示唆された。そのため、体系的な解析に適した破壊法を、現在、探索中であり、少なくともトランスポゾン挿入で、遺伝子破壊が可能であることは確認できた。現在のところ、シュードモナスの核様体遺伝子の破壊に関する問題はあるものの、改善する点が見つかっており、それ以外の点については、順調に推移していることから、おおむね順調に進展しているとした。

12. 今後の研究の推進方策

本研究課題の今後の推進方策について簡潔に記述すること。研究計画の変更あるいは研究を遂行する上での問題点があれば、その対応策なども記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

1) 核様体タンパク質結合プロファイルの体系的解析: 枯草菌・大腸菌に関しては、順次 His-tag を付加し、GeF-seq法により核様体タンパク質の結合プロファイルを体系的に決定する。大腸菌においては、HU, H-NS, IHF, Fis, Muk および DnaA を、枯草菌においては HU, CcpA, SMC および新規核様体タンパク質を第一候補とし、解析を進めてゆく。2) シュードモナスの体系的欠失株の構築: シュードモナスに関しては、新たに大阪大学の戸邊亨博士に連携研究者として加わっていただき、簡便で、確実な遺伝子破壊と His-tag 付加の方法を確立し、核様体遺伝子の破壊株を作成すると同時に、His-tag 付加株を構築し、それをを用いて核様体タンパク質結合プロファイルの体系的解析を行う。3) RNA-seqを用いた核様体構造変化に付随したトランスクリプトームの変化の解析: 核様体構造の変化が与えるバクテリアのトランスクリプトームの解析を、次世代シーケンサによる RNA-seq を用いて開始する。4) 次世代シーケンサデータの統合解析: 次世代シーケンサで得られた GeF-seq およびトランスクリプトームデータの統合解析を行う技術の構築を開始する。新たに得られる様々な、次世代シーケンサデータを統合して解釈することで、核様体構造の違い、あるいはトランスクリプトームに与える影響などに関して、菌種間の相違あるいは類似性を見出したい。

13. 研究発表 (平成23年度の研究成果)

※ 「13. 研究発表」欄及び「14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況」欄において記入欄が不足する場合には、適宜記入欄を挿入し、それによりページ数が増加した場合は、左端を糊付けすること。

【雑誌論文】 計(1)件 うち査読付論文 計(1)件

著者名	論文標題				
奥村元	Regulation of chromosomal replication initiation by <i>oriC</i> proximal DnaA-box clusters in <i>Bacillus subtilis</i> .				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁
Nucleic Acids Res.	有	40	2	0	1 2 220-234
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子)					
10.1093/nar/gkr716					

【学会発表】 計(2)件 うち招待講演 計(2)件

発表者名	発表標題	
大島 拓	次世代シーケンサを用いた網羅解析の可能性	
学会等名	発表年月日	発表場所
第6回日本ゲノム微生物学会 (招待講演)	2012年3月12日	立教大学 (東京)

発表者名	発表標題		
大島 拓	細菌の転写サイレンシングによる外来遺伝子の発現制御		
学会等名	発表年月日	発表場所	
遺伝研研究会（単細胞生物における細胞構築と増殖制御の研究）（招待講演）	2012年3月21日	国立遺伝学研究所（三島）	

〔図書〕 計（0）件

著者名	出版社			
	書名	発行年	総ページ数	

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

※ 研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページがある場合は、URLを記載すること。

--