

大腸菌の染色体複製開始を活性化する非コードDNA配列

井上, 祐希江

<https://hdl.handle.net/2324/1931861>

出版情報：九州大学, 2017, 博士（臨床薬学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



大腸菌の染色体複製開始を活性化する非コード DNA 配列(*DARS2*)における
染色体位置の重要性、及び核酸結合蛋白質による新たな制御機構の解析

分子生物薬学分野 3PS14020P 井上祐希江

【序論】

モデル生物である大腸菌の染色体複製は複製開始点 *oriC* 上で核様体蛋白質 IHF や複製開始蛋白質 DnaA 等が複合体を形成することによって開始される(Fig. 1)。複製開始活性には DnaA のヌクレオチドフォームが重要である。DnaA は ATP、ADP と親和性を持つが、ATP 結合型の時に活性化される(Fig. 1)。複製開始後、DnaA に結合している ATP は加水分解によって速やかに ADP へと変換され不活性型となる。この DnaA 不活化機構には現在、RIDA (regulatory inactivation of DnaA) と DDAH (*datA*-dependent DnaA-ATP hydrolysis)の二種類が知られている(Fig. 1) (Katayama *et al.*, 1998; Kasho and Katayama, 2013)。RIDA 機構は、DNA ポリメラーゼのサブユニットであるクランプと Hda 蛋白質との複合体による DnaA-ATP 加水分解機構であり、染色体複製のフィードバック制御を担っている(Kato and Katayama, 2001)。RIDA とは独立した機構である DDAH 機構は、染色体上の非コード配列 *datA* と IHF の複合体による DnaA-ATP 加水分解機構であり、RIDA 機構の補助的な役割を担う(Kasho and Katayama, 2013)。

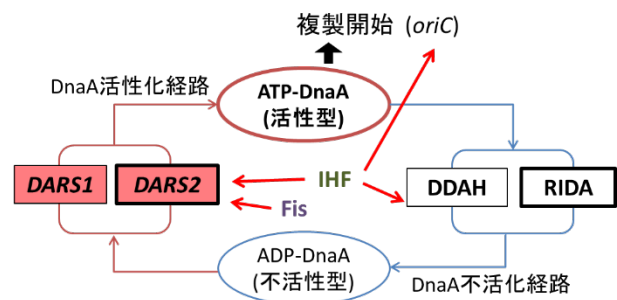


Fig. 1 複製開始蛋白質DnaAの制御サイクル
複製開始蛋白質DnaAの活性化経路と不活化経路を示す。
これらの経路は核様体蛋白質IHF、Fisによって活性化される。

さらに、不活性型の ADP 結合型 DnaA を再活性化する経路として *DARS* (DnaA-reactivating sequence) 機構が知られている(Fujimitsu *et al.*, 2009)。染色体上には DnaA 結合領域を持つ非コード配列 *DARS1* と *DARS2* が見出されている(Fig. 1)。これらの配列上で ADP 結合型 DnaA が特異的な複合体を形成し、ヌクレオチド交換反応を進めることによって活性型の ATP 結合型 DnaA となる(Fig. 1)。 *DARS1*、 *DARS2* 共に染色体上からその領域を欠失させると複製開始活性が阻害される(Fujimitsu *et al.*, 2009)。また、 *DARS* の活性に必須である DnaA 結合領域の相同配列は多くの細菌種に保存されている。このことから *DARS* の機能動態解明は幅広い細菌種における染色体複製の制御機構解明に重要であると言える。

複製開始制御において *DARS2* は *DARS1* より重要な役割を担っていると考えられる(Fujimitsu *et al.*, 2009)。 *DARS1* に関しては制御因子の存在は報告されておらず、現在は単独で活性を持つと考えられている。一方、 *DARS2* は核様体蛋白質である IHF、Fis の結合配列を含み、これらが適時的に結合することによって *DARS2* の活性化が起こる(Kasho *et al.*, 2014)。しかし IHF、Fis のみでは *DARS2* の制御全体を説明できないため、更なる *DARS2* 制御因子の探索が必要とされる。

大腸菌は macro domain (MD) と呼ばれる染色体の部分構造を取ることが分かっている(Niki *et al.*, 2000)。四か所の MD (Ori、Ter、Right、Left) と二か所の non-structured (NS) 領域(R-NS、L-NS) (Fig. 2A) が存在しており、 *DARS2* は L-NS 領域に位置する。当研究室の藤光らは *DARS2* の染色体位置に着目し、Ter MD に移動させることによって *DARS2* の機能が減弱することを見出した。私はさらに様々な位置に *DARS2* を移動させた変異株を解析し、 *DARS2* の染色体位置による制御機構を解明することとした(Fig. 2B) (発表論文 Inoue *et al.*, 2016)。

また、*DARS*の制御メカニズムを解明するために、私は大腸菌の複製制御において IHF、Fis をはじめとする多くの核様体蛋白質が関わっていることに着目した。まだ報告されていない *DARS2* 機能制御因子が核様体蛋白質の中にあるかもしれない。そこで私は複製開始制御への関連が報告されていない核様体蛋白質や核酸結合蛋白質を解析し、*DARS2* 機能を制御しうるものがないか探索を行った。

【方法】

大腸菌変異株の構築

・λRed 法によるゲノム編集

ゲノム上の特定部位二か所の配列の間に抗生物質耐性遺伝子及び必要に応じ *DARS2* 領域や *frit* 配列を持たせた断片を PCR によって増幅し、λRed 組換え酵素を発現する pKD46 プラスミドをもった株に形質転換した。これによりゲノムと PCR 産物の特定配列間で部位特異的組換えが起こる。その後、pKD46 を除いた。さらに抗生物質耐性遺伝子を欠失させる場合は、その両端の *frit* 配列間で組換えを起こさせた。

・P1 形質導入

受容菌を培養し、5mM CaCl₂を加えた LB 培地に懸濁した。ここに DNA 供与菌で増殖させた P1 ファージを加えて静置した後、抗生物質を含む寒天培地で一晚培養した。得られたコロニーを新しい培地に塗り広げて P1 ファージを除いた。

フローサイトメトリーと multisizer を用いた染色体の複製開始活性解析

対数増殖期まで培養した菌液をサンプリングし、multisizer を用いて細胞体積(mass)を測定した。残りの菌液に複製開始阻害剤と細胞分裂阻害剤を添加して 4 時間培養した後、得られた染色体を SYTOX green で染色し、フローサイトメトリーにより細胞あたりの染色体数を解析した。これらのデータをもとに複製開始活性の指標として細胞体積あたりの *oriC* コピー数を示す *ori*/mass、細胞周期中での複製開始タイミングを示す initiation age、また複製開始タイミング制御の異常を示す Asynchrony index を算出した。

ChAP (chromatin affinity precipitation)を用いた *DARS2* への IHF、Fis 結合量解析

His-Tag 標識した IHF または Fis 蛋白質を発現する変異株から 3%ホルムアルデヒドで架橋された蛋白質と DNA をプルダウン法で回収した。脱架橋し、共回収された DNA を分離した後に、*DARS2* 領域、バックグラウンドコントロールの *ylcC* 領域とポジティブコントロール *oriC* 領域を qPCR 法によって定量した。

野生株と *hfq* 欠失株における細胞内 DnaA レベルの定量解析

対数増殖期まで培養した大腸菌の蛋白質を 10% SDS-PAGE にて分離し、ウェスタンブロット法を用いて DnaA 量を定量した。

【結果】

1、*DARS2* 位置移動変異株の解析

DARS2 位置移動変異株では複製開始活性の減弱が見られた

DARS2 の位置による活性制御を検討するため、ゲノム編集法によって *DARS2* 上の必須 DnaA 結合領域を欠失した変異株の様々な染色体位置に *DARS2* を導入した株(*DARS2* 位置移動変異株)を用いた。*DARS2*

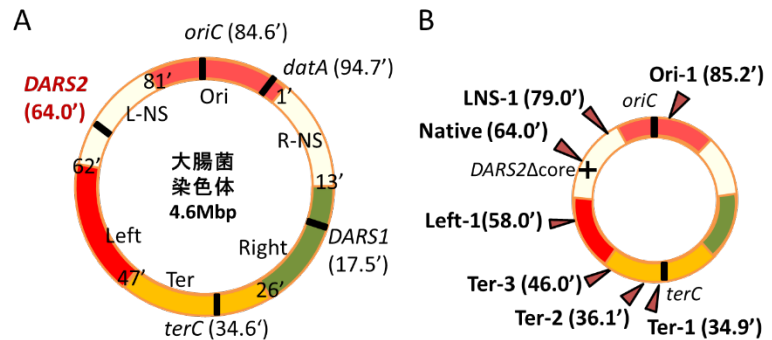


Fig. 2 大腸菌染色体の部分構造と*DARS2*位置移動変異株の変異導入部位 (A)、四つのMDと二つのNS領域、複製に関わる主要な因子の位置を示す。(B)、*DARS2* core欠失株の矢印で示した位置に*DARS2*移動変異を導入した。

を元の位置に導入した Native 株と他の位置に *DARS2* を移動させた変異株 6 種 (Ori-1、LNS-1、Left-1、Ter-1、Ter-2、Ter-3) の複製開始活性を様々な生育条件で解析した (Fig. 2B)。その結果、Native 株を除く *DARS2* 位置移動変異株において *DARS2* の複製開始活性が減弱していた。特に Ter MD への移動変異株において顕著であった。ゆえに *DARS2* は元の染色体位置にあることがその機能制御に重要であることが分かった。

位置移動変異株の *DARS2* と *DARS2* 活性化因子 IHF、Fis との結合能に顕著な差は見られなかった

ChAP 解析の結果、Native 株と代表的な別の移動変異株間では、*DARS2* と IHF、Fis との結合能に顕著な差は見られなかった。ゆえに *DARS2* の染色体位置移動は二つの活性化因子の結合能に大きな影響を与えないことが示唆された。

染色体位置移動変異による *DARS2* の機能減弱は Ter MD 構造とは独立的に起こっていた

Ter MD への移動変異株において顕著な阻害が見られたため、Ter MD 形成が *DARS2* 機能制御に影響しているかもしれないと考えた。そこで Ter MD 形成に重要な MatP 蛋白質を各 *DARS2* 位置移動変異株から欠損させた株を作製しフローサイトメトリー等で解析したが、顕著な複製開始阻害の緩和は見られなかった。ゆえに Ter MD 構造形成は *DARS2* 機能制御において直接的な要因ではないと考えられる。

2、新たな *DARS2* 制御因子の探索

核様体蛋白質 Hfq は *DARS1*、*DARS2* 依存的に複製開始を抑制する

DARS2 の未知の制御因子があるか調べるため、IHF、Fis 以外の主な核様体蛋白質や DNA 結合蛋白質の欠損株をフローサイトメトリー等によって解析した。その結果、核様体蛋白質 Hfq のコード遺伝子 *hfq* の欠失株において複製開始が促進されていることが示唆された。*hfq* 欠失による複製開始促進は低栄養培地で生育した細胞において顕著になることが分かった。*hfq* 欠失と *DARS1* 欠失、*DARS2* 欠失を組み合わせた変異株を解析したところ、*hfq DARS1 DARS2* 三重欠失株において *hfq* 欠失による複製開始促進が見られなくなった。ゆえに Hfq は *DARS1*、*DARS2* 両方に依存して複製開始を抑制していることが示唆された。

Hfq による複製開始抑制は DnaA 発現量や既知の複製開始抑制機構とは独立的に起こる

Hfq による複製開始抑制が細胞内 DnaA 発現量の変化によるものか確認するために、野生株と *hfq* 欠失株の細胞内 DnaA レベルをウェスタンブロット法で検討したところ、顕著な差は見られなかった。そこで、既知の複製開始抑制機構と Hfq の関連を調べることにした。まず RIDA 機構を支える Hda 蛋白質との機能的関連を調べた。*hda* K185C 変異株は低温で過剰の複製開始を起こし、細胞増殖が阻害されることから、*hda* K185C 変異を *hfq* 欠失変異株に導入して増殖能解析を行った。その結果、*hda* K185C 単独変異株と比較して、*hfq* 欠失 *hda* K185C 二重変異株では低温感受性がより増強していた。次に DDAH 機構に必要な *datA* を *hfq* 欠失変異株から欠失させ、フローサイトメトリー等によって解析した。その結果、この二重欠失株ではそれぞれの単独欠失株より複製開始促進が強まっていることが示された。これらのことから、Hfq は既知の複製開始抑制機構とは独立して複製開始を抑制している可能性が示唆された。

Hfq は RNA を介して複製開始を抑制している

Hfq は DNA のみならず、RNA シャペロンとして RNA にも結合能を持つため、私は Hfq による複製開始抑制が DNA、RNA のどちらを介して行われているか検討することにした。そこで DNA と相互作用することが分かっている C 末端領域を欠失させた変異株をフローサイトメトリー等で解析した。その結果、Hfq C 末端欠失株の複製開始活性は野生型と同等であることが分かった。一方、Hfq が相互作用することが知られている 7 種の small RNA (大腸菌における非コード型制御 RNA) についてそれぞれ欠失変異株を作製して解析したところ、*dsrA* 欠失変異株において若干の複製開始促進が見られた。ゆえに Hfq の複製開始抑制に small RNA が関与している可能性が示唆された。

【考察】

1、染色体位置情報による *DARS2* の機能制御

DARS2 位置移動変異株の解析によって、染色体位置による *DARS2* 機能制御機構が存在していることが示唆された。また、*DARS2* 機能の位置移動による減弱は増殖環境によって変動していたため、この系は増殖環境に応じた染色体複製制御にも関連しているかもしれない。*DARS2* 機能制御は Ter MD 形成とは独立的である可能性が見出

されたため、他の要因による制御機構がある可能性が考えられる。例えば、立体的な染色体構造による *DARS2* と *oriC* の共局在が位置による *DARS2* 機能制御に重要であるかもしれない(Fig. 3)。また、既知の *DARS2* 活性化因子の結合量に差がなかったことから、未知の *DARS2* 制御因子が存在している可能性が示唆される。

2、Hfq による複製開始抑制制御

本研究の核酸結合蛋白質欠失株の解析から、核様体蛋白質 Hfq が複製開始を抑制している可能性が初めて見出された。また *hfq*、*DARS1*、*DARS2* を組み合わせた欠失株の解析から、Hfq は *DARS* の機能を抑制することによって複製開始を負に制御している可能性が示唆された(Fig. 4)。Hfq の C 末端欠失株解析より、Hfq の複製開始抑制は DNA ではなく、RNA を介して行われている可能性が考えられる。さらに *dsrA* が複製開始抑制に関与している可能性が見出されたことから、small RNA を介した Hfq による複製開始抑制機構の存在が示唆された。

大腸菌染色体の複製開始制御に small RNA が関与している可能性があるという報告は今回が初めてである。*hfq* 欠失による複製開始促進は低栄養条件下でより顕著になるということから、Hfq による複製開始抑制機構は増殖環境に応じたものである可能性が示唆される。生育ストレス条件下では、RNA を介した制御系の方が蛋白質を発現させてから行われる複製開始抑制機構よりも迅速に対応できるため、細胞への負担が少ないのかもしれない。以上のように今回の研究によって新たな DnaA

活性制御メカニズムの可能性を見出した。このことは複製開始制御メカニズムの解明に貢献しうると考えられる。また、Hfq は多種の細菌に広く保存されていることから、この研究が環境による病原菌の増殖制御機構解明や感染症治療薬の開発に貢献できるかもしれない。

【引用文献】

- Fujimitsu K., Senriuchi T., Katayama T. Genes Dev. 2009, 23(10):1221-1233.
- Kasho K., Katayama T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2013, 110(3):936-941.
- Kasho K. et al., Nucleic Acids Res. 2014, 42(21):13134-13149.
- Katayama T., Kubota T., Kurokawa K., Crooke E., Sekimizu K. Cell 1998, 94(1):61-71.
- Kato J., Katayama T. EMBO J. 2001, 20(15):4253-4262.
- Niki H., Yamaichi Y., Hiraga S. Genes Dev. 2000, 14(2):212-223.

【発表論文】

- Inoue Y. et al., Genes Cells 2016, 21(9):1015-1023.

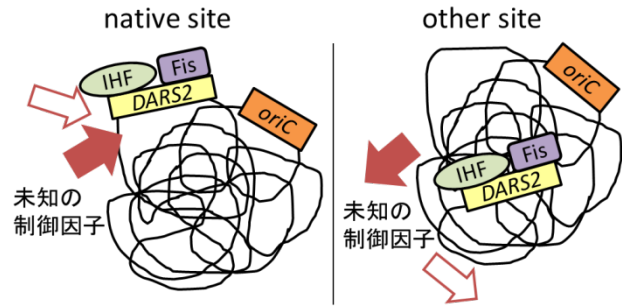


Fig. 3 染色体位置による*DARS2*機能制御モデル

染色体位置による*DARS2*機能制御は、*DARS2*と*oriC*との立体的な距離の変化や未知の*DARS2*制御因子との結合等が関与しているかもしれない。

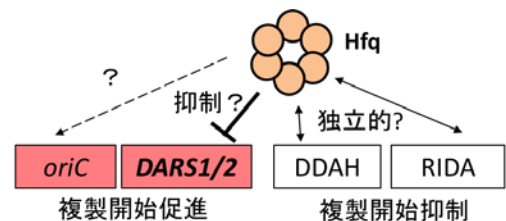


Fig. 4 想定されるHfqの相互作用因子

Hfqは既知の複製開始抑制経路とは独立的に、複製開始促進因子*DARS1*、2とは依存的に複製開始を抑制している可能性がある。