

Subcellular dynamics of a chromosome partition factor CrfC protein in *Escherichia coli*

谷口, 紗輝

<https://hdl.handle.net/2324/2236161>

出版情報 : Kyushu University, 2018, 博士 (創薬科学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

Subcellular dynamics of a chromosome partition factor CrfC protein in *Escherichia coli*

(大腸菌の染色体分配制御因子 CrfC の細胞内動態)

分子生物薬学分野 3PS16004T 谷口 紗輝

【序論】

細胞性生物が増殖するためには、遺伝情報の本体である染色体 DNA を正確に複製し、娘細胞へ均等に分配することが必須である。染色体の分配過程は、原核生物、真核生物を問わず厳密に制御される。しかし、そのメカニズムは十分に解明されていない。染色体分配の異常は、染色体の異数化などの染色体異常を引き起こし、細胞死やがんなどの重篤な病気の原因となる。そのため、染色体分配機構をより詳細に解明することは、生物学および薬学的に高い意義をもつ。

本研究では、比較的単純なモデル生物である大腸菌を解析に用いた。大腸菌などの原核生物の染色体 DNA は、超らせん構造や多数の DNA 結合タンパク質の結合により凝集し核様体と呼ばれる高次構造体を形成する[1]。核様体の構造形成には、H-NS や HU、Dps などの核様体タンパク質や染色体コンデンシン MukB、染色体構造形成因子 MatP が主に寄与する。核様体の構造形成は、染色体分配だけでなく、細胞分裂の制御にも重要である。核様体に局在する SlmA は、細胞分裂因子 FtsZ との相互作用を介して、核様体領域での分裂装置の形成を阻害する[2]。これにより、染色体分配完了後の適切なタイミングで細胞が分裂する。

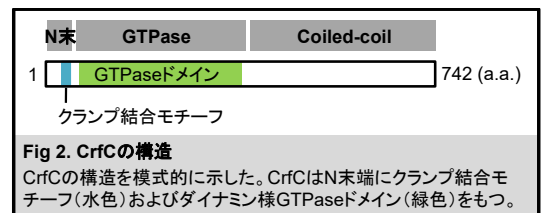
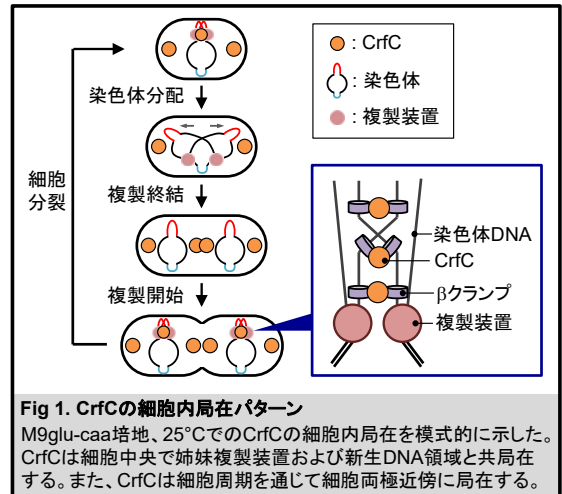
大腸菌では、染色体 DNA の複製と並行して姉妹染色体の分配が行われる (Fig. 1)。染色体 DNA の複製は、唯一の複製開始点 *oriC* で複製開始因子 DnaA と DNA 屈曲をもたらす核様体タンパク質 IHF が高次複合体を形成することによって進められる[3]。複製開始後、形成された姉妹レプリソーム (複製装置) および新生 DNA 領域は、細胞中央で一過的に共局在する[4]。新生 DNA 領域の共局在に寄与する因子の 1 つとして、SeqA が知られている。SeqA は複製直後の染色体 DNA に一過的に結合することで、新生 DNA 領域の共局在を支える。また、*oriC* 領域に結合した SeqA は、過剰な複製開始が起こるのを妨げる[5]。DNA 合成時には、レプリソームの DNA 結合因子である βクランプが新生 DNA 上に装着され、DNA 合成の後もしばらく新生 DNA 上に残留する。

尾崎らは、新規のβクランプ結合タンパク質 CrfC が、核様体の配置および分配の制御因子であることを明らかにした[6]。CrfC はダイナミンタンパク質のホモログであり、N 末端領域にダイナミン様 GTPase ドメインおよびβクランプ結合モチーフをもつ (Fig. 2)。

CrfC はホモ多量体を形成し、その多量体は複数のβクランプと結合することができる。核様体を 1 つ持つ細胞では、CrfC は細胞中央と両極近傍に局在する場合がある (Fig. 1)。細胞中央において、CrfC はβクランプとの結合を介して新生 DNA 領域と共局在し、一過的な姉妹レプリソームの共局在を支える (Fig. 1)。これが姉妹染色体の均等分配に必要となる。一方で、細胞両極近傍の CrfC は細胞周期によらず安定に局在するが、その局在メカニズムおよび CrfC の機能は不明である。本研究は、細胞両極近傍への CrfC の局在メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】

CrfC および核様体の細胞内局在解析: まず、蛍光タンパク質融合型 CrfC (*crfC-venus*) および HU (*hupA-cfp*) 発現細



胞を作成した。HU は核様体全体に分布し、核様体と共局在する[7]。対数増殖期 ($A_{660}=0.1-0.2$) まで培養した生細胞を蛍光顕微鏡で観察した。細胞長に対する CrfC および核様体の位置について、Microbe Tracker (解析ソフトウェア) を用いて解析を行った。

DNA 結合タンパク質変異株の解析: 種々の DNA 結合タンパク質の欠失または高温感受性変異を、P1 ファージにより *crfC-venus hupA-cfp* 株に形質導入した。作成した変異株での CrfC と核様体の細胞内局在を、上記のように解析した。

crfC mRNA 量の測定: 対数増殖期 ($A_{660}=0.1-0.2$) まで培養した細胞から、細胞内総 RNA を精製した。精製した RNA を鋳型として定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) を行い、細胞内 *crfC* mRNA 量を解析した。

【結果】

1. 細胞両極近傍の CrfC は核様体の両端に局在した

まず、「細胞両極近傍の CrfC は核様体の両端に局在している」という作業仮説をたてた。これを検証するため、CrfC と核様体の細胞内局在を観察した。その結果、核様体を 1 つ持つ細胞の約 9 割で、CrfC は核様体両端の近傍に局在した (Fig. 3A)。また、核様体を 2 つ持つ細胞の約 8 割で、CrfC が各核様体の両端近傍に局在した (Fig. 3B)。

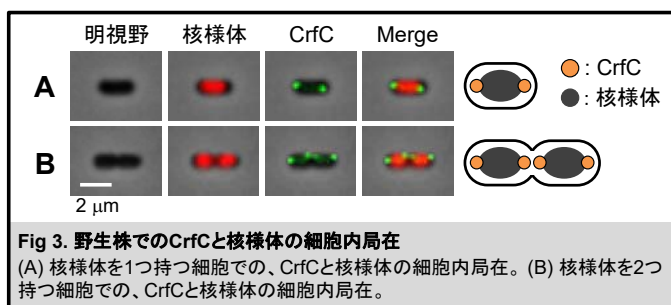


Fig 3. 野生株でのCrfCと核様体の細胞内局在
(A) 核様体を1つ持つ細胞での、CrfCと核様体の細胞内局在。(B) 核様体を2つ持つ細胞での、CrfCと核様体の細胞内局在。

次に、CrfC の局在が『細胞内の核様体の位置』と『細胞極からの距離』のどちらに依存するか検証するため、変異や薬剤で生じた伸長細胞での CrfC の細胞内局在を調べた。細胞を伸長させると、細胞極と核様体との距離が離れる。CrfC の局在が核様体に依存するなら、伸長細胞でも CrfC は核様体の端近傍に局在すると予想した。そこで、*dnaA46* 細胞および *dnaC2* 細胞を用いた解析を行った。*dnaA46* は DnaA の、*dnaC2* は複製ヘリカーゼ装着因子 DnaC の高温感受性変異である。これらの変異株では、高温 (42°C) 条件下で複製開始および細胞分裂が阻害される。その結果、細胞中央に核様体を 1 つ持つ伸長細胞が生じる (Fig. 4A)。*dnaA46* 伸長細胞において、CrfC は野生型細胞と同程度の割合 (約 8 割) で核様体の端近傍に局在した (Fig. 4B)。また、*dnaC2* 伸長細胞においても同様に、CrfC は核様体の端近傍に局在した (Fig. 4B)。さらに、細胞分裂阻害剤で処理した野生株においても、同様の CrfC 局在が見られた。これらの結果から、CrfC は核様体を認識してその端近傍に局在していることが示唆された。

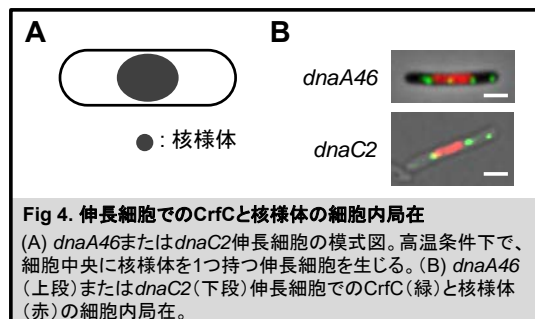
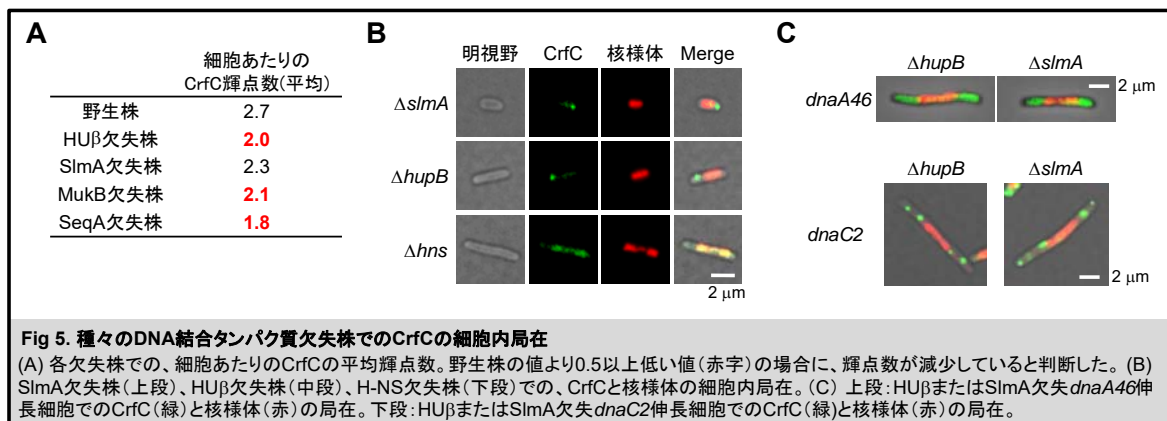


Fig 4. 伸長細胞でのCrfCと核様体の細胞内局在
(A) *dnaA46*または*dnaC2*伸長細胞の模式図。高温条件下で、細胞中央に核様体を1つ持つ伸長細胞を生じる。(B) *dnaA46* (上段)または*dnaC2*(下段)伸長細胞でのCrfC (緑)と核様体 (赤)の細胞内局在。

2. 特異的な DNA 結合タンパク質が CrfC の局在に重要であった

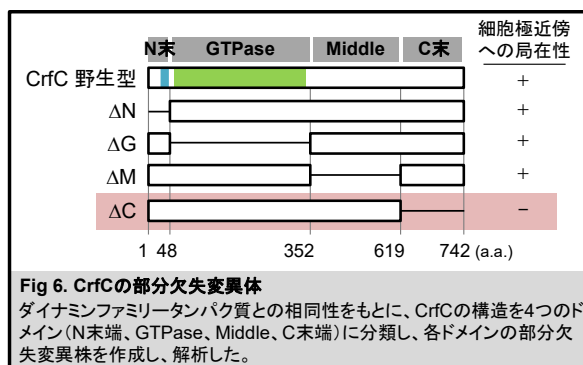
次に、「CrfC は核様体の高次構造を認識して核様体の端に局在する」という作業仮説をたてた。これを検証するため、核様体の構造形成に関わる DNA 結合タンパク質の欠失によって CrfC の局在に異常が生じるか調べた。今回、8 つの因子 (MukB、H-NS、HUβサブユニット、IHfαサブユニット、Dps、MatP、SlmA、SeqA) について、欠失変異体を作成・解析した。その結果、MukB、H-NS、HUβ、SlmA、または SeqA の欠失により、CrfC の局在異常が生じた。MukB、HUβ、または SeqA の欠失株では、細胞あたりの CrfC 輝点数が野生株より減少していた (Fig. 5A)。また、HUβまたは SlmA の欠失株では、CrfC と核様体の両方の局在位置にばらつきが見られた (Fig. 5B)。H-NS 欠失株では、CrfC が輝点を形成せずに核様体全体と共局在しており (Fig. 5B)、*crfC* mRNA 量が野生株の約 20 倍に増加していた。その他の欠失株での *crfC* mRNA 量は、野生株と同程度であった。

CrfC の核様体端への局在に対する DNA 複製の影響を調べるため、各因子の欠失と *dnaA46* との二重変異株を作成し、高温で生じた伸長細胞の CrfC 局在を観察した。その結果、HUβまたは SlmA を欠失した *dnaA46* 伸長細胞では CrfC が輝点を形成せずに細胞質中で拡散していた (Fig. 5C)。一方、同じ欠失変異を持つ *dnaC2* 伸長細胞では、CrfC は輝点を形成していた (Fig. 5C)。これらの結果から、DnaA タンパク質自体も CrfC の局在制御に重要であることが示唆された。



3. CrfC C 末端領域が細胞両極近傍への局在に重要かもしれない

核様体の端への局在に必要な CrfC の機能領域を同定するため、CrfC の各ドメインの部分欠失変異体を作成し、その局在を解析した (Fig. 6)。その結果、CrfC C 末端領域欠失株において、大部分の細胞で CrfC が片方の細胞極近傍のみに局在するなどの局在異常が見られた。



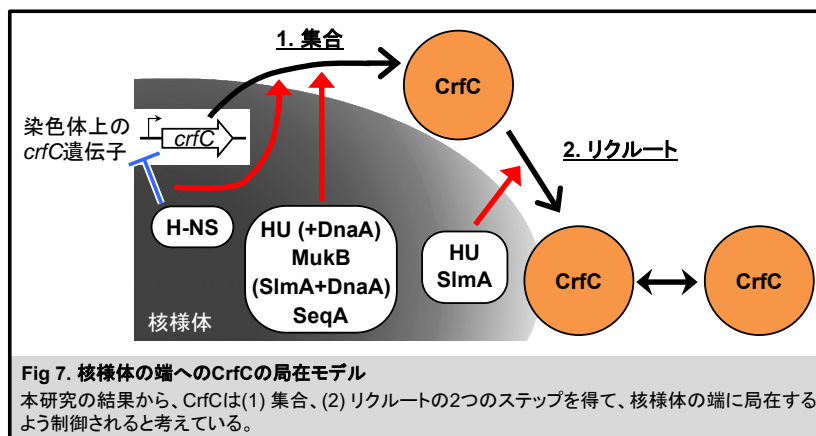
【考察】

本研究から、CrfC が細胞周期を通じて核様体の両端近傍に局在することを明らかにした。また、この CrfC の局在には、特異的な DNA 結合タンパク質が重要であることを見出した。現在のところ、CrfC の DNA 結合活性は確認されていない [6]。そのため、CrfC は特異的な DNA 結合タンパク質または DNA 高次構造との相互作用を介して、核様体の両端近傍に局在する可能性がある。

CrfC の細胞内局在モデル

今回の結果から、CrfC の細胞内局在が、(1) 集合、(2) 核様体の端へのリクルート、の2段階で制御されるモデルを提案する (Fig. 7)。

1. 集合: まず、H-NS が転写抑制因子として CrfC の発現を時空間的に制御する。次に、発現した CrfC が核様体表面の特異的な構造と相互作用することで集合する。その特異的な構造の形成には、HU



および MukB が重要かもしれない。HU と MukB は、両者が協調して染色体の長距離間の折りたたみ構造を形成することが報告されている [8]。この染色体構造が CrfC 分子の局所的な密集や多量体化を促進することで、CrfC の集合が促進されるのかもしれない。加えて、H-NS が形成する核様体の高次構造も、CrfC の集合に重要である可能性がある。

SeqA は新生 DNA 領域に局在する。この時、SeqA は CrfC の新生 DNA 領域での局在を安定化し、これが CrfC の集合に重要である可能性がある。また、SeqA が形成する核様体構造も CrfC 集合を促進するかもしれない。

さらに、DnaA も CrfC の集合に重要である。DnaA は、特に HUβ または SlmA 欠失時において CrfC の局在に必要であった。そのため、DnaA は直接または間接的に、HUβ や SlmA による CrfC の局在制御の過程を補助しているかもしれない。DnaA は HU と直接相互作用する [9] ことから、DnaA が相互作用を介して HU や SlmA の機能を直接的に制御している可能性がある。また、DnaA は特異的な DNA 配列に結合し、その配列は染色体全体に多数存在する。これらへ

の DnaA 結合により特定の核様体構造が形成され、CrfC 集合を促進するのかもしれない。さらに、DnaA は転写因子としても機能する。DnaA に依存した転写により形成される核様体構造や、CrfC の局在制御因子の発現制御などによって、DnaA が間接的に CrfC の局在を制御している可能性も考えられる。

2. 核様体端へのリクルート: 次に、CrfC は核様体の端にリクルートされる。その場で、CrfC の核様体端からの一時的な解離と再リクルートが繰り返されることで、局在が安定化される。HU β と SlmA はこの過程に重要である。HU β と SlmA はともに核様体全体に局在する。核様体の端において、これら因子は特有の核様体構造を形成する、あるいは CrfC と直接相互作用することで、CrfC の核様体端へのリクルートに寄与しているのかもしれない。核様体の端領域は中央領域と比べて染色体 DNA の密度が低く、転写が活発に行われている場所である[10]。そのため、特有の DNA 構造や RNA が多く存在している可能性がある。HU は特異的な DNA 二次構造に高い結合親和性をもち[11]、RNA とも結合する[12]。HU や SlmA は特定の DNA や RNA と結合し構造変化することで、CrfC と相互作用できるようになるのかもしれない。また、ダイナミン多量体と同様に、CrfC 集合体は動的に構造変化を起こしており、それによって核様体の端から一過的に解離しているのかもしれない。

CrfC C 末端領域の役割

本研究から、CrfC の C 末端領域が、CrfC の細胞極近傍への局在に重要であることが示された。CrfC は C 末端領域を介して核様体の端を認識している可能性がある。CrfC はダイナミンタンパク質ファミリーに属する[6]。一般にダイナミンファミリータンパク質が C 末端領域にもつ膜結合ドメインは、CrfC には存在しない[6]。真核細胞の抗ウイルス因子である Mx タンパク質もダイナミンファミリーに属するが、膜結合ドメインがウイルス認識ドメインに置き換わっている[12]。同様に、CrfC も進化の過程で膜結合ドメインの変わりに核様体の端を認識するための機能領域を得たのかもしれない。CrfC が C 末端領域を介して HU β や SlmA と直接相互作用する可能性などの検証は、今後の課題である。

核様体の端での CrfC の機能

原核細胞で CrfC のような細胞内局在性を示す染色体分配制御因子は、現在のところ報告されていない。そのため、核様体の端に局在する CrfC は、染色体の制御において新規かつ特有の機能をもつ可能性が考えられる。核様体の端に局在する CrfC は、複製後の姉妹核様体の移動の方向を決めるマーカーとしての役割があるかもしれない。真核細胞の中心体は細胞の両極に局在し、その間にある染色体の分配を進めるが、この特徴は CrfC にも保存されているかもしれない。また、CrfC が染色体分配以外の染色体制御に関わる可能性もある。大腸菌では、染色体 DNA に二重鎖切断などの損傷が生じた際に、細胞極近傍に一本鎖 DNA が局在することが示唆されている[13]。この一本鎖 DNA 局在位置は CrfC の局在位置と似ていることから、CrfC は染色体の安定性に重要な反応を制御している可能性も考えられる。今後、核様体の端での CrfC の局在および機能の分子機構をより詳細に解明することで、新規かつ重要な染色体制御機構の発見が期待できる。さらに、生命の原理の理解を進めることに加え、染色体異常による重篤な疾患の治療法の開発にも貢献できると考えている。

【発表論文】

- [Taniguchi S, et al. \(2018\). *Front Microbiol.* in press.](#)
- [Zhang J, Taniguchi S, et al. \(2017\) *Biosci Biotechnol Biochem.* 81:1937-1940.](#)

【引用文献】

[1] Wang et al. (2013). *Nat Rev Genet.* 14:191-203. [2] Cho et al. (2011). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:3773-8. [3] Katayama et al. (2017). *Front Microbiol.* 8:2496. [4] Sunako et al. (2001). *Mol Microbiol.* 42:1233-41. [5] Waldminghaus and Skarstad. (2009) *Plasmid.* 61, 141-50. [6] Ozaki et al. (2013). *Cell Rep.* 4:985-95. [7] Wery et al. (2001). *Genes Dev.* 83:193-200. [8] Liroy et al. (2018). *Cell.* 172:771-783.e18. [9] Chodavarapu et al. (2008). *Mol Microbiol.* 67:781-92. [10] Stracy et al. (2015). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112:E4390-9. [11] Kamashev and Rouviere-Yaniv. (2000). *EMBO J.* 19:6527-35. [12] Macvanin et al. (2012) *J Bacteriol.* 194:6046-55. [13] Haller et al. (2015). *Trends Microbiol.* 14:305-19. [14] Kohiyama et al. (2013). *Mol Biol.* 425:4837-44.