

Cell cycle regulation and molecular mechanism of DARS2-dependent DnaA activation system in *Escherichia coli*

三善, 賢弥

<https://hdl.handle.net/2324/6787548>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 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)



Cell cycle regulation and molecular mechanism of *DARS2*-dependent

DnaA activation system in *Escherichia coli*

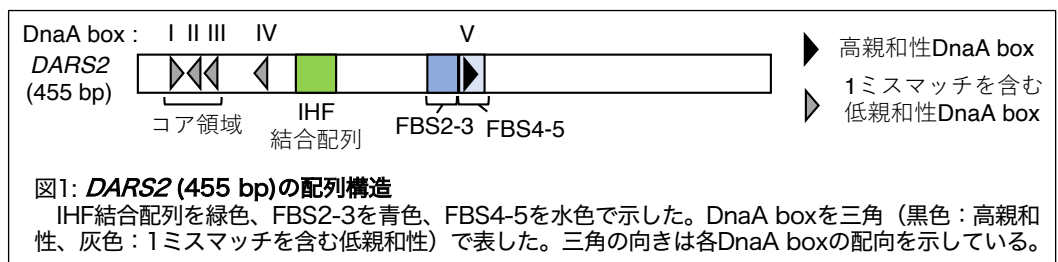
大腸菌における複製開始促進因子 *DARS2* に依存した DnaA 活性化の細胞周期制御および分子機構の解析

分子生物薬学分野 3PS20008R 三善 賢弥

【序論】

細胞性生物では、染色体複製は細胞周期の特異的な時期に1度のみ開始するように厳密に制御されている。この複製開始制御の破綻は、染色体コピー数の異常をもたらし、遺伝子発現の異常を誘起するだけでなく、細胞のがん化や細胞死に至ることもある。そのため、染色体複製開始を制御する分子機構の解明は、生物学および薬学的に高い意義を持つ。

私は、大腸菌をモデル生物として、生化学的および遺伝学的アプローチにより複製開始制御機構の解明を目指した。大腸菌染色体の複製開始は、ATP 結合型 DnaA 蛋白質 (ATP-DnaA) が複製起点で形成する高次複合体によって進められる (1)。また、細胞内の ATP-DnaA レベルが複製開始時をピークとして変動することが、適時的な複製開始を保証している。すなわち、複製開始が遂行されると、ATP-DnaA が主として DNA 複製装置と共役した系により、複製開始に不活性な ADP 結合型 DnaA (ADP-DnaA) に変換される (2)。その後、次の細胞周期の複製開始のため、ADP-DnaA は染色体上に存在する DNA 因子 *DARS2* においてヌクレオチド交換反応が促進され、ATP-DnaA に変換される (3、4、5)。*DARS2* には3つの DnaA 結合配列 (DnaA box) を含むコア領域に加え、核様体蛋白質 Fis の結合配列 (FBS2-3、FBS4-5) および核様体蛋白質 IHF の結合配列が存在する (図1)。コア領域では、少なくとも3分子の ADP-DnaA が結合し、特異的な DnaA-DnaA 相互作用を促す (4)。さらに、DnaA からの ADP 解離には、IHF の特異的結合および Fis の FBS2-3 への結合が必須である (5)。特に、IHF は複製開始の直前期に特異的に *DARS2* に結合し、ADP 解離機能を活性化する (5)。一方で、Fis の FBS2-3 への結合が細胞周期に応じて制御されるかは不明であった。さらに、細胞周期に応じてこれらの核様体蛋白質と *DARS2* の結合を制御する分子機構も不明であった。また各蛋白質が *DARS2* に依存した ADP の解離とヌクレオチド交換を促進する分子機構についても不明である。



【方法】

細胞周期に応じた *DARS2*-Fis 結合変動の解析: 高温感受性株である *dnaC2*細胞を許容温度の 30℃で培養後、制限温度の 38℃で 90 分間培養し、細胞周期を複製開始期に同調した。培養液を再び 30℃に移し、細胞をリリースした。指示する時間で回収した細胞に対して、抗 Fis 抗体を用いた免疫沈降を行い、*DARS2*領域を増幅するプローブを用いてリアルタイム qPCR を行うことで、*DARS2* と Fis の結合量を決定した (Fis-ChIP/qPCR 解析)。

複製開始能の解析: 対数増殖期の細胞に対して、複製開始阻害剤リファンピシンと細胞分裂阻害剤セファレキシンを加えて 4 時間培養した。各細胞の染色体 DNA 量をフローサイトメーターで解析し、細胞体積をコールターカウンターで測定した。得られた測定値から、複製開始能の指標となる染色体 DNA 量/細胞体積

の比を算出した（フローサイトメトリー解析）。

DnaA 複合体形成能の評価：FBS2-5 領域、またはこの領域における DnaA box V の変異を含む DNA 断片と ATP/ADP-DnaA を 30℃で 5 分間保温した後、ゲル電気泳動により形成された複合体を分離した（ゲルシフト解析）。

ATP-DnaA による Fis 結合阻害能の評価：5'末端をビオチン標識した FBS2-5 を含む DNA と Fis 蛋白質を氷上で 10 分間静置し、DNA-Fis 複合体をストレプトアビジンビーズで回収した。回収した DNA-Fis 複合体と ATP/ADP-DnaA を混合し、30℃で 20 分間保温した。再度、DNA をストレプトアビジンで回収し、結合した蛋白質を SDS-15% PAGE で分離し、銀染色で検出した（DNA プルダウン法）。

DARS2 に依存した DnaA-ADP 解離活性の評価：[³H]ADP-DnaA、DARS2 を含むプラスミド、IHF および、Fis を 30℃で 15 分間、または指示する時間保温した。DnaA 蛋白質をニトロセルロース膜で回収し、膜上の [³H]ADP 量を液体シンチレーションカウンターで計測した（試験管内 DARS2 機能再構成系）。

【結果】

Fis は DnaA box V に依存して、複製開始前特異的に DARS2 に結合した

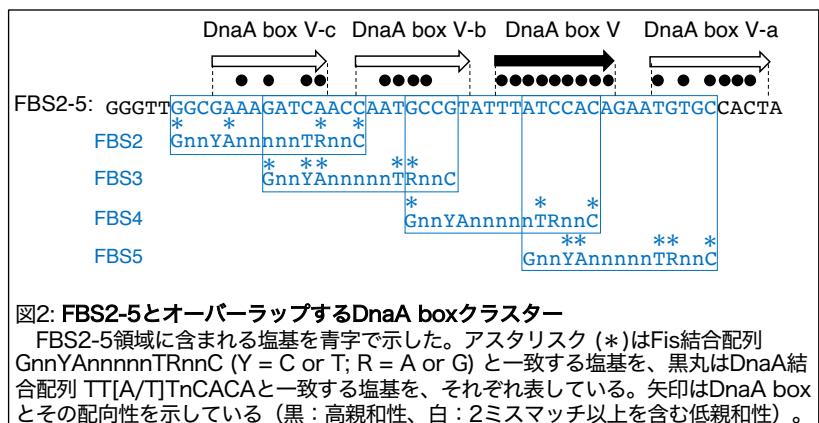
Fis と DARS2 の結合が細胞周期に依存して制御されるかを知るために、同調細胞を用いた Fis-ChIP および qPCR 解析を行った。その結果、IHF 同様に、Fis が複製開始の直前に特異的に FBS2-5 に結合し、複製開始時および開始後には解離することを見出した（6）。さらに、FBS2-3 の直下に存在する高親和性 DnaA box（DnaA box V；図 1）を DnaA 非結合配列に置換した変異株では、Fis が細胞周期を通じて FBS2-5 に結合した状態になることも明らかにした（6）。これらの結果から、Fis が複製開始直前にのみ DARS2 FBS2-5 に結合すること、さらに、この結合制御が DnaA box V に依存していることが示された。

DnaA box V 変異株では、複製開始が促進された

細胞周期に応じた DARS2 への Fis の結合制御の破綻が複製開始制御に及ぼす影響を解析するため、DnaA box V 変異株を用いてフローサイトメトリー解析を行った。その結果、この変異株では、IHF を過剰供給した条件において、野生株よりも複製開始頻度が上昇することを見出した（6）。これは、IHF 同様に、細胞周期に依存した DARS2 への Fis の結合・解離が、複製開始制御に重要であることを示唆している。

ATP-DnaA は DnaA box V に依存して、FBS2-5 でホモ多量体を形成した

DARS2 の配列解析から、FBS2-5 とオーバーラップするように DnaA box V に隣接した、新規な低親和性 DnaA box クラスターが存在することを見出した（図 2；DnaA box V-a, b, c）。ゲルシフト解析によって、3 ～4 分子の ATP-DnaA がこの領域に結合し、ホモ多量体を形成することを明らかにした（6）。一方、ADP-DnaA では、DnaA box V のみへの結合が見られ、ホモ多量体の形成が阻害された（6）。さらに、DnaA box V に変異を持つ DNA においては、ATP-DnaA の結合、およびホモ多量体の形成が顕著に阻害された（6）。以上の結果から、Fis 結合領域において、ATP-DnaA が DnaA box V への結合を契機に共同結合することで、ホモ多量体を形成することが示された。



ATP-DnaA ホモ多量体の形成に依存して、FBS2-5 への Fis の結合が阻害された

FBS2-5 での ATP-DnaA のホモ多量体の形成が、この領域への Fis の結合を阻害しうるかを DNA プルダウン法で解析した。その結果、Fis-*DARS2* 複合体に対し ATP-DnaA を添加してゆくと、DnaA の回収量が増加し、Fis の回収量が低下することが観察された (6)。一方、ADP-DnaA を添加した場合、添加量によらず Fis の回収量は低下せず一定だった (6)。さらに、ATP-DnaA と ADP-DnaA が共存する条件においては、ADP-DnaA の濃度上昇に従って、DnaA ホモ多量体の形成が阻害され、再び Fis が FBS2-5 に結合できるようになることを見出した (6)。

Fis Q68A 変異体では、*DARS2* に依存した ADP 解離能が低下した

DARS2 複合体動態における Fis の機能の解明に向けて、Fis が複数の蛋白質と相互作用し機能を促進する性質に着目した。すなわち Fis と DnaA が直接相互作用する可能性を想定し、その相互作用部位を類推し、複数の Fis 変異蛋白質を構築した。これらについて、*DARS2* の機能促進能を試験管内 *DARS2* 機能再構成系で評価した。その結果、Fis Q68A において、*DARS2* に依存した DnaA からの ADP 解離能が低下することを見出した。また、ゲルシフト解析から、Fis Q68A では、野生型の Fis と同程度の FBS2-3 結合能を保持していることが分かった。以上から、Fis Gln68 残基は、*DARS2* の機能促進に重要であることが示唆された。

DnaA F239A 変異体では、*DARS2* に依存した ADP 解離能が低下した

DARS2 での DnaA と Fis の相互作用において、DnaA 側の Fis 相互作用残基を決定するために、DnaA 変異体を用いた試験管内 *DARS2* 再構成系を行った。その結果、DnaA のヌクレオチド結合ポケットの周辺に存在する DnaA Phe239 のアラニン置換変異体において、*DARS2* に依存した ADP 解離能が顕著に低下することが示された。

【考察】

細胞周期に応じた *DARS2*-Fis 結合制御の分子機構および生物学的意義

本研究により、複製開始時に細胞内でピークに達した ATP-DnaA が FBS2-5 領域でホモ多量体を形成することで、Fis の結合を阻害し、*DARS2* の機能を抑制するという新規な制御メカニズムを明らかにした (図 3)。

ATP-DnaA は低親和性 DnaA box クラスター上で共同結合するが、ADP-DnaA は共同結合しにくい性質を持つため、このようなメカニズムが成り立つと考えられる。この *DARS2* に対する負のフィードバック制御は、適時的な複製開始を保証するために極めて重要なシステムであると予想される。このシステムを介した *DARS2* の機能抑制は、複製開始直後の効率的な ATP-DnaA レベルの低下を助け、過剰な複製開始を阻害すること

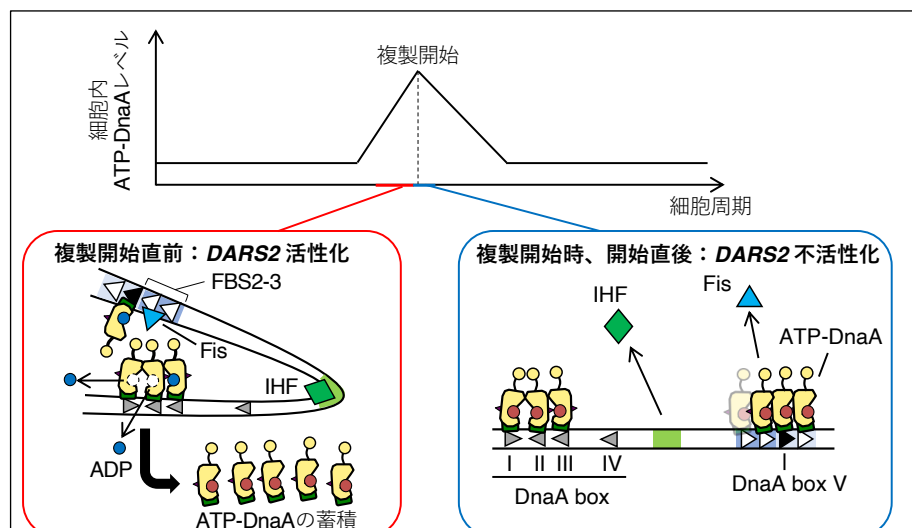


図3: 細胞周期に依存した*DARS2*制御メカニズム

複製開始直前に、Fisは*DARS2*の機能に必要なFBS2-3に結合し、*DARS2*を活性化する。複製開始時にATP-DnaAが細胞内に十分蓄積すると、DnaA box VIに結合したATP-DnaAから共同結合を介して、ATP-DnaAのホモ多量体が形成される。このホモ多量体の形成に依存して、Fisの結合が阻害され、*DARS2*を不活性化する。

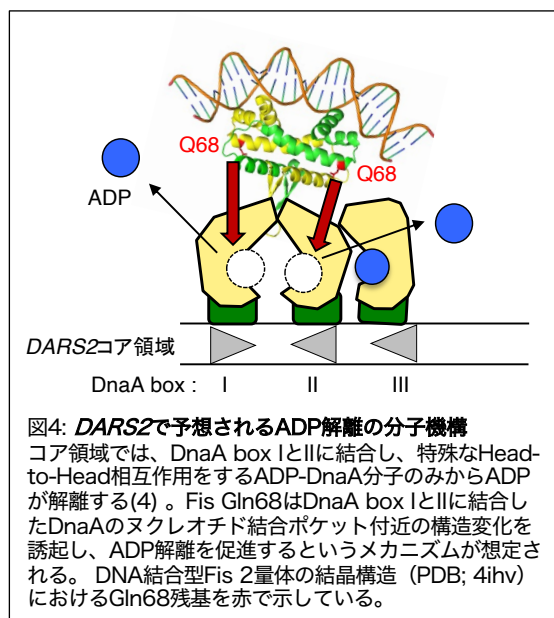
に寄与しているのかもしれない。

FBS2-5 とオーバーラップした低親和性 DnaA box クラスターは、大腸菌近縁種のペスト菌やコレラ菌などの病原菌にも存在することが示唆された (6)。ゆえに、今回明らかにした細胞周期に応じた *DARS2* の機能制御機構は、これらの病原性細菌にも保存されうると予想される。加えて、Fis は染色体構造の形成や病原性遺伝子を含む遺伝子の転写制御などにも寄与する蛋白質である。そのため、ATP-DnaA レベルに依存した Fis と DNA の結合制御は、細胞増殖に必要な種々のイベントを細胞周期依存的に制御する機構として広く利用されている可能性がある。以上のことから、この研究をさらに深めることで、新規な抗菌薬のターゲットの創出に繋がる可能性がある。

DARS2 に依存したヌクレオチド交換における Fis の機能促進機構および生物学的意義

さらに、本研究では、Fis および DnaA の変異体を解析した結果、*DARS2* に依存した ADP 解離において、Fis Gln68 および DnaA Phe239 が促進的に機能することが分かった。この結果から、*DARS2* では、IHF 結合による DNA 屈曲を介して Fis と DnaA が直接相互作用し、DnaA からの ADP 解離を促進するというメカニズムを想定することができる (図 3、4)。Fis は Gln68 を介した直接相互作用によって、DnaA のヌクレオチド結合部位周辺を構造変化させ、ADP の解離を促進するのかもしれない (図 4)。また、*DARS2* のコア領域は低親和性 DnaA box のみで構成されているため、各 DnaA box への ADP-DnaA 結合能が低い (図 1)。そのため、Fis-DnaA 相互作用は、コア領域への DnaA の集合促進にも寄与する可能性が考えられる。

真核生物の複製開始蛋白質においても、DnaA と同様に ATP/ADP との結合を介して活性が制御されうることが示唆されている (7)。そのため、ヌクレオチド結合制御を介した複製開始蛋白質の活性制御は真核生物にも保存されているのかもしれない。ゆえに、本研究をさらに深めることで、広い生物種に普遍的な複製開始蛋白質の活性制御機構の解明にも貢献する可能性がある。



【発表論文と引用文献】

- (1) Katayama, K., Kasho, K., and Kawakami, H. (2017). *Front. Microbiol.*, **8**, 2496.
- (2) Keyamura, K., and Katayama, T. (2011). *J. Biol. Chem.*, **33**, 29336-29436.
- (3) Fujimitsu, K., Senriuchi, T., and Katayama, T. (2009). *Genes Dev.*, **23**, 1221-1233.
- (4) Sugiyama, R., Kasho, K., **Miyoshi, K.**, Ozaki, S., Kagawa, W., Kurumizaka, H., and Katayama, T. (2019). *Nucleic Acids Res.*, **47**, 11209-11224.
- (5) Kasho, K., Fujimitsu, K., Matoba, T., Oshima, T., and Katayama, T. (2014). *Nucleic Acids Res.*, **42**, 13134-13149.
- (6) **Miyoshi, K.**, Tatsumoto, Y., Ozaki, S., and Katayama, T. (2021). *Nucleic Acids Res.*, **49**, 12820-12835
- (7) Kawakami, H., Muraoka, R., Ohashi, E., Kawabata, K., Kanamoto, S., Chichibu, T., Tsurimoto, T., and Katayama, T. (2019), *Genes Cells*, **9**, 608-618.