

Mechanism of chromosome DNA replication initiation by highly conserved initiator proteins among bacterial species

吉田, 竜星

<https://hdl.handle.net/2324/7182411>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 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)

Mechanism of chromosome DNA replication initiation

by highly conserved initiator proteins among bacterial species

(細菌種間に高度に保存された開始因子による染色体 DNA 複製開始の仕組み)

分子生物薬学分野 3PS21005N 吉田 竜星

【序論】

細菌は染色体 DNA 複製と細胞伸長を行い、適切に染色体を分配し、細胞が分裂することで増殖する。細菌感染症の治療においては、これらの過程のそれぞれを標的とした抗生物質が使われる。しかし、近年薬剤耐性菌の問題が深刻化しており、新規抗生物質の創出は急務である。染色体 DNA 複製開始は抗生物質の有望な新規作用点であり、その分子機構の解明は、薬学的に高い意義を持つ。

細菌染色体 DNA の複製開始においては、複製起点 *oriC* に形成される開始因子 DnaA の複合体がまず *oriC* を部分的に一本鎖化(開裂)する。さらに DnaA 複合体は開裂 DNA 部位の両鎖にそれぞれ複製ヘリカーゼを装着することで両方向に複製を開始させる。大腸菌は染色体 DNA 複製開始の分子機構が最も理解されているモデル生物の 1 つである。大腸菌 *oriC* は AT-rich な開裂領域 DUE(Duplex unwinding element)に DnaA 結合配列(DnaA box)のクラスター領域 DOR(DnaA-oligomerization region)が隣接した構造を持つ。大腸菌 *oriC* には逆向き配列となる二つの DOR(左側/右側 DOR)が存在する(1)。左側 DOR には DNA 屈曲因子 IHF の結合領域も存在する。複製開始時には、IHF が結合した左側 DOR に形成された DnaA 複合体(左側 DnaA サブ複合体)が DUE を開裂させる。このとき、IHF による DNA 屈曲を介して、左側 DnaA サブ複合体が開裂 DNA 部位と直接相互作用することで DUE 開裂を安定化する(2)。次のステップでは、2 分子の複製ヘリカーゼ DnaB が開裂 DNA 部位へ装着される。この過程には、左側 DnaA サブ複合体に加え右側 DOR に形成される右側 DnaA サブ複合体も重要である。それぞれの DnaA サブ複合体は 1 分子の DnaB と相互作用し、それぞれの DnaB 分子が開裂 DNA 部位のそれぞれの鎖にほぼ同時に装着されると考えられる(3)。

次なる課題は大腸菌の染色体 DNA 複製開始機構が他の細菌種においても保存されているかである。DnaA は細菌種間に高度に保存されるが、IHF は主としてプロテオバクテリアにしか保存されていない。細菌種間に高度に保存された IHF の構造ホモログ HU も DnaA とともに DUE を開裂できる(4)。しかし、配列特異的に DNA に結合する IHF とは異なり、HU は DNA 結合に配列特異性がなく屈曲 DNA に高い結合親和性をもつ。よって、DnaA と HU による DUE 開裂機構は未解明であった。また、DOR の配置は細菌種間で多様であり、DOR が遺伝子により分断された細菌種や DUE の両側に DOR が存在する細菌種も存在する。このため、大腸菌と同様の染色体 DNA 複製開始機構が細菌種間に原理的に保存されているかは不明である。そこで、本研究は細菌種間に高度に保存された染色体 DNA 複製開始の共通原理の解明を目的とする。第一章では DnaA と HU による DUE 開裂機構を複数の細菌 *oriC* を用い生化学的および遺伝学的に解析し、細菌種間に高度に保存される DUE 開裂機構を解明した。第二章では他の細菌種の *oriC* 構造を模倣した変異大腸菌 *oriC* を生化学的に解析することで、大腸菌の DnaB 装着機構がこれらの変異 *oriC* においても機能するか検討した。

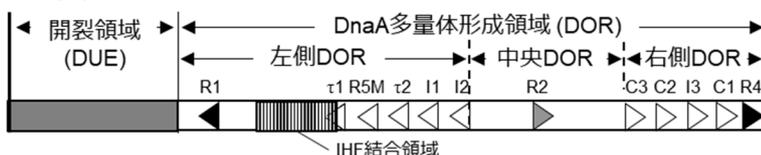


図 1. *oriC* の構造

DUE を灰色四角、IHF 結合領域を縦縞四角、DnaA box を三角(黒色:高親和性、灰色:中親和性、白色:低親和性)で表した。

【方法】

DUE 開裂活性の評価: ATP-DnaA、HU、*oriC* プラスミドを 38°C で 3 分間保温した後、P1 ヌクレアーゼを加えて、さらに 38°C で 200 秒反応させた(DUE 開裂再構成系)。DUE が開裂した場合、P1 ヌクレアーゼによって一本鎖 DUE が消化を受けることを指標として、DUE 開裂活性を評価した。

タンパク質の DNA 結合領域の評価: *oriC* プラスミドと ATP-DnaA を、HU 存在下または非存在下において 38°C で 5 分間保温した後、DMS によるグアニン残基のメチル化修飾パターンの変化を調べた(DMS フットプリント)。また、末端を ³²P で標識した *oriC* 断片と ATP-DnaA を、HU の存在下または非存在下において 30°C で 10 分間保温した後、DNase I による切断パターンの変化を調べた(DNase I フットプリント)。

DnaB 装着活性の解析: *oriC* プラスミドに ATP-DnaA、IHF、DnaB、DnaC(ヘリカーゼローダー)、SSB(一本鎖 DNA 結合タンパク質)、ジャイレース(超らせん調節酵素)を 30°C で 15 分間反応させた。このとき、開裂によって生じた一本鎖 DUE 上に DnaB が装着される。DnaB の装着・進行に伴い、ジャイレースが *oriC* プラスミドに負の超らせんを蓄積させる。超らせんの蓄積した *oriC* プラスミドをゲル電気泳動により未反応の *oriC* プラスミドから分離してそれぞれ定量し、DnaB 装着活性を評価した。

大腸菌細胞のコロニー形成能の解析: 段階希釈した定常期の細胞を LB プレート上において 30°C で 14 時間培養した後、生菌数を測定した。

【結果】

左側 DnaA サブ複合体中の DnaA 分子は一本鎖 DUE と直接相互作用することで DUE を開裂した。

まず、HU と DnaA による DUE 開裂 (HU 系) に必須な DOR 領域を解析するために、DUE 開裂再構成系を用いて部分領域欠失 *oriC* プラスミドを解析した(5)。その結果、左側 DOR 中の 5 つの DnaA box(R1,τ1,R5M,τ2,I1)を含む領域が HU 系に必須であった。次に必須領域内のそれぞれの DnaA box に置換変異を持つ *oriC* プラスミドを DUE 開裂再構成系により解析したところ、R1 box と R5M box の 2 つが必須であった。さらに、R1 box と R5M box に結合した DnaA 分子が一本鎖 DUE と結合することが DUE 開裂に重要かを解析した。このために、それぞれの DnaA box 上に一本鎖 DNA 結合能を欠損した変異 DnaA を特異的に導入した時の DUE 開裂能を評価した。その結果、どちらの DnaA box に一本鎖 DNA 結合欠損変異 DnaA を導入した場合も DUE 開裂は促進されなかった。また、DnaA 間相互作用能を欠損した DnaA を特異的に導入した際にも DUE 開裂は促進されなかった。以上の結果から、IHF 存在下のときと同様に、HU 存在下においても DnaA 複合体が一本鎖 DUE と直接相互作用することで DUE を開裂することが示唆された。

生育を HU に依存する大腸菌細胞において R1 box と R5M box に結合した DnaA は増殖に重要であった。

上記の結果が大腸菌細胞内でも当てはまるのかを遺伝学的に検証した(5)。本解析では、HU に依存した染色体 DNA 複製開始の影響を特異的に評価するために、IHF を欠損した細胞を用いた。IHF 欠損細胞の染色体 *oriC* の R1 box と R5M box に置換変異を導入すると細胞のコロニー形成能が著しく低下した。さらに、染色体 *oriC* の R1 box と R5M box にそれぞれ一本鎖 DNA 結合欠損変異 DnaA を特異的に導入した際にもコロニー形成能が著しく低下した。コロニー形成能の低下は DnaA 間相互作用能を欠損した変異 DnaA を導入した際にも見られた。これらの結果は、生化学的解析の結果と一致する。

HU は ATP-DnaA 複合体の形成に依存して R1 box と R5M box の間の領域に特異的に結合した。

ATP-DnaA-*oriC* 複合体中に HU が取り込まれているかを解析するために、DMS フットプリントを用いて HU の *oriC* 結合を解析した。その結果、ATP-DnaA の存在下において、HU は R1 box と R5M box の間の領域のグアニン残基のメチル化の感受性を低下させた(5)。このことは、HU が ATP-DnaA 複合体の形成に依

存して R1 box と R5M box の間の領域に特異的に結合することを示唆する。次に、DUE が開裂した状態が DnaA 複合体の形成に依存した HU の *oriC* 結合に重要な役割を DNAase I フットプリントにより解析した。この解析では DUE を二本鎖または開裂を模倣した一本鎖として持つ二つの左側 *oriC* 断片に対して HU 結合を評価した。その結果、HU は ATP-DnaA と一本鎖 DUE の両方の存在に依存して、R1 box と R5M box の間の領域に高い親和性で結合した(5)。以上の結果から、HU は開裂複合体中に特異的に取り込まれることが示唆された。さらなる DMS フットプリント解析から、始原生物に近縁な好熱性細菌 *Thermotoga maritima* の *oriC* と DnaA を用いても、HU が DnaA 複合体の形成に依存して DnaA box 間領域に特異的に結合することを見出している(3)。

右側 DOR の位置や方向は試験管内再構成系における DnaB 装着に重要でなかった。

次に、*oriC* 構造が多様である細菌種間において、大腸菌と同様の DnaB 装着機構が原理的に保存されるかを検討した。このために、右側 DOR の配向性を変化させることで他の細菌種の *oriC* 構造を模倣した変異大腸菌 *oriC* の複製開始活性を生化学的に解析した。その結果、右側 DOR は反転させたり、DUE 上流または元の位置より下流に移動させたりしても DnaB 装着を促進できた (図 2)。以上の結果は、右側 DnaA サブ複合体は空間的に DUE へ近接できれば右側 DOR の配向性に依存せずに DnaB を装着できることを示唆する。

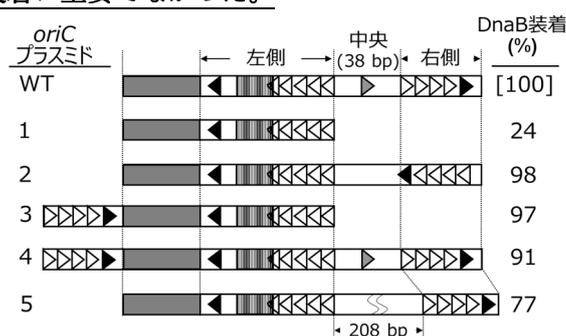


図 2. 変異 *oriC* プラスミドの構造と機能
変異 *oriC* プラスミドを図 1 と同様を示した。構造の右側にはその DnaB 装着活性を示した。

左側 DnaA サブ複合体の位置は試験管内再構成系における DnaB 装着に重要であった。

DOR を DUE 上流に転移させても DnaB 装着が促進されることを踏まえて、DUE 上流に形成される DnaA 複合体が左側 DnaA サブ複合体の DnaB 装着活性を代替できるかを検証した。この解析のために大腸菌 *oriC* の DUE 上流にさらに DOR を挿入した変異 *oriC* を作成した(図 2 *oriC* plasmid 4)。この変異 *oriC* の左側 DOR に DnaB と結合できない変異 DnaA を特異的に導入した。この条件では右側 DOR と DUE 上流の DOR に形成された二つの DnaA サブ複合体のみが DnaB と相互作用できる。この条件において DnaB 装着が起こるか解析したところ、DnaB は装着されなかった。よって、左側 DnaA サブ複合体による DnaB 装着には複合体の位置が重要であることが示唆された。

【考察】

細菌染色体 DNA 複製開始における複製起点開裂の共通原理

本研究では、細菌種間に高度に保存される DnaA と HU が複製起点を開裂する分子機構について解析した。結果から、HU は DnaA が *oriC* 上に複合体を形成することに依存して R1 box-R5M box 間領域に特異的に結合し、これらの DnaA 分子が開裂 DNA 部位と相互作用すると HU の DNA 結合がより強固になって開裂複合体を安定化することが見出された(図 3I)。本研究から R1 box に結合する DnaA の DnaA 間相互作用残基は HU 系に必須であった。HU が屈曲 DNA に高い結合親和性をもつことを考慮すると、HU が DnaA 複合体の形成に依存して DnaA box 間領域に結合するのは、DnaA 同士の相互作用を介して間の領域が屈曲するためであると考えられる。*Thermotoga maritima oriC* においても DnaA 依存的に HU が DnaA box 間領域に結合することも同様の機構によるものだと考えられる。さらに、多くの細菌種の *oriC* にも HU が結合しうる長さの DnaA box 間領域が存在している。ゆえに、本研究が明らかにした DnaA と HU による複製起点開裂機構は細菌種間において原理的に保存されている可能性がある。

細菌染色体DNA複製開始における両方向性 DnaB 装着機構の共通原理

本研究から、大腸菌 *oriC* の右側 DOR の位置や方向は複製開始活性を維持したまま変化させることができることが生化学的に示された。また、左側 DnaA サブ複合体による DnaB 装着には位置が重要で、右側 DnaA サブ複合体による DnaB 装着の前提条件になっていることが示唆された。これらのことから、大腸菌の染色体 DNA 複製開始においては、まず左側 DnaA サブ複合体が開裂 DNA の特定の鎖に DnaB を装着し、それに応じて、空間的に DUE に近接した右側 DnaA サブ複合体が逆側鎖へもう 1 分子の DnaB を装着すると考えられる。また、右側 DOR 構造の可変性は多様な *oriC* 構造をもつ細菌種間で大腸菌様の DnaB 装着原理が保存されることを支持する。

抗生物質の新規標的としての染色体 DNA 複製開始

本研究は細菌種間に高度に保存されうる大腸菌の染色体 DNA 複製開始機構を提案した。この機構では複製起点開裂と両方向性 DnaB 装着の両反応において左側 DOR が必須である。左側 DOR の機能はその配向性への要求性が厳密であるとともに、DNA を屈曲させるためにある程度の長さを持った DnaA box 間領域を持つ必要がある。よって、左側 DnaA サブ複合体の構造は細菌種間で原則的に保存されている可能性がある。このため、左側 DnaA サブ複合体を標的とした抗生物質は多くの細菌に有効であるかもしれない。

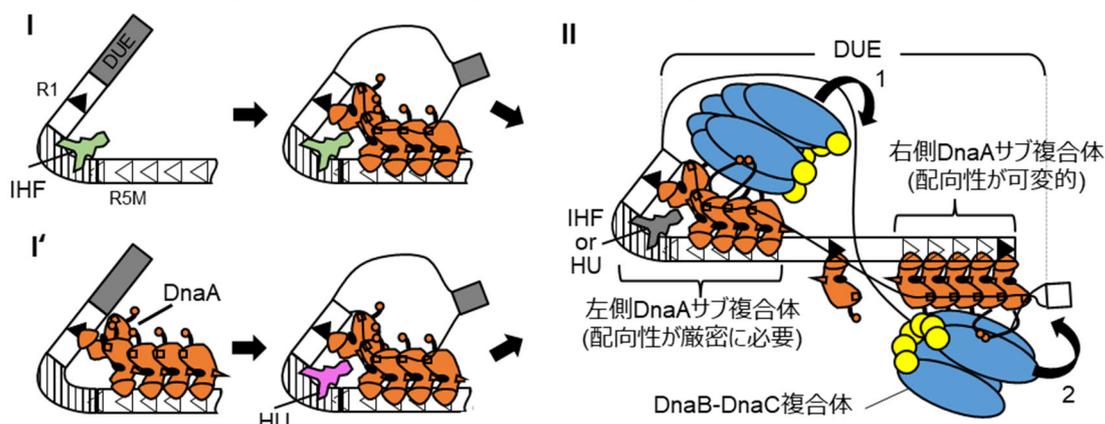


図 3.大腸菌の染色体 DNA 複製開始機構

IHF(緑色)と DnaA(赤)による DUE 開裂においては IHF が結合した左側 DOR に DnaA が集合し、この DnaA 分子が開裂 DNA 部位と直接相互作用することで DUE が開裂する(I)。HU(桃色)と DnaA による DUE 開裂においては、まず DnaA が左側 DOR に集合する。HU は DnaA 同士の相互作用により屈曲した領域に特異的に結合し屈曲構造を安定化することで DnaA と一本鎖 DUE との相互作用を促進する(I')。DnaB 装着時には、まず左側 DnaA サブ複合体が DnaB を開裂 DNA 部位へ導く。その際、空間的に DUE に近接した右側 DnaA サブ複合体が逆側鎖へと 2 つ目の DnaB を装着する(II)。

【発表論文と引用文献】

1. Shimizu, M., Noguchi, Y., Sakiyama, Y., Kawakami, H., Katayama, T. and Takada, S. (2016), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **113**, E8021–E8030.
2. Sakiyama, Y., Kasho, K., Noguchi, Y., Kawakami, H. and Katayama, T. (2017), *Nucleic Acids Res.*, **45**, 12354–12373.
3. Sakiyama, Y., Nagata, M., Yoshida, R., Kasho, K., Ozaki, S. and Katayama, T. (2022), *J. Biol. Chem.*, **298**, 102051.
4. Lu, C., Yoshida, R., Katayama, T. and Ozaki, S. (2023), *J. Biol. Chem.*, **299**, 104888.
5. Yoshida, R., Ozaki, S., Kawakami, H. and Katayama, T. (2023), *Nucleic Acids Res.*, **51**, 6286–6306.