

Analyses on functional structures of the specific protein complex coordinating chromosome segregation and cell division, and mechanistic basis for the origin of chromosome replication and the initiation complex in the eubacterium *Caulobacter crescentus*.

若杉, 泰敬

<https://hdl.handle.net/2324/7182412>

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)



氏 名 : 若杉 泰敬

論文題名 :

Analyses on functional structures of the specific protein complex coordinating chromosome segregation and cell division, and mechanistic basis for the origin of chromosome replication and the initiation complex in the eubacterium *Caulobacter crescentus*.

(真正細菌カウロバクターの染色体分配と細胞分裂とを連係する複合体の機能構造解析、および、染色体 DNA 複製開始点の配列特性と開始複合体のメカニズムの解析)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

細胞は、細胞周期進行に応じて染色体 DNA の複製・分配、細胞分裂を起こすことで遺伝情報を適切に継承する。染色体複製は染色体 DNA 上の特定の領域から開始される。高等生物では、染色体に点在する開始領域の大部分は転写プロモーターに含まれる。また、細胞内で染色体を高度に折り畳み、核内に適切に収納することは、転写や複製開始の適時性を保証している。同様に、細菌も遺伝情報継承のために、転写や染色体の高次構造を利用することが示唆されている。しかしながら、転写や染色体の高次構造が染色体複製や細胞分裂に及ぼす原理については、十分理解が進んでいない。この原理の破綻は染色体 DNA の不均等な分配や細胞死を引き起こすため、転写や染色体構造と複製システムとの連係原理を明らかにすることは、分子生物学的および薬学的に極めて重要である。

細菌の環状染色体 DNA は唯一の複製起点から両方向に複製され、複製起点の反対側にあたる終結点で複製が完了する。大腸菌の場合、開始タンパク質 DnaA は複製起点内部の多量体形成領域 DOR と結合し、ATP-DnaA-DOR 高次複合体の形成を促す。この複合体は隣接する二重鎖開裂領域 DUE を開裂させる。生じた 1 本鎖化 DUE は ATP-DnaA-DOR 複合体と直接結合することにより、開裂構造を安定化させ、複製装置の一本鎖 DNA 上への装着を促す。他方、カウロバクターでは、DUE が未同定であり、DOR にはポルフィリン生合成遺伝子 *hemE* とその二つの転写プロモータ Pw、Ps がコードされる。先行研究より、これらのプロモータ領域が細胞周期に依存した複製開始に必須であることが示唆されていた。*hemE*-DOR 領域はアルファプロテオバクテリアに広く保存されていることから、プロモータと連係した複製開始は共通原理であると考えられるが、その具体的なメカニズムは不明である。

カウロバクターの複製起点と複製終結点はそれぞれ異なる細胞極に配置されている。染色体複製が始まると、姉妹複製起点の一つは別の細胞極へと移動し、また、複製終結点は細胞中央へと移動し、そこで局在化する。この時、チュブリンホモログ FtsZ、ZapA、ZauP などのタンパク質

高次複合体を核とする分裂装置は複製終結点と共局在している。この共局在は細胞中央での細胞分裂を保証すると考えられるが、細胞分裂装置と染色体複製終結点とを直接連結する分子とそのメカニズムは不明である。

本論文において、まず私は、当分野で新規に見出された複製終結点結合蛋白質 ZapT に着目し、ZapT を介した複製終結と細胞分裂との関係メカニズムの解明を目的とした。精製蛋白質を用いた生化学的解析より、ZapT は ZauP-ZapA 複合体と相互作用した。この相互作用は ZapT の特異的な C 末ドメインと ZauP との直接結合に依存した。さらなる蛍光顕微鏡解析や ChIP 解析などから、この ZauP-ZapT 高次複合体が細胞中央における複製終結点の局在化を促すことが分かった。複製終結点領域には複数の ZapT 結合部位が点在しており、私の結果は ZapT-DNA 複合体が ZauP 多量体を介して分裂装置と高次の複合体形成することが、複製終結点のコンパクトな折り畳みを促進するというモデルを強く示唆する (図右上)。この働きにより、ZapT は分裂装置の適切な局在性を保証していると考えられる。

次に私はプロモータと関係した複製開始メカニズムを明らかにするために、DOR-*hemE* 領域の機能モチーフを同定した。まず DOR-*hemE* 領域をプラスミドベクターに連結させることで、私はカウロバクター野生株の中で自律複製能を保持したミニ染色体を構築した。次にミニ染色体の変異体解析より、*hemE* ORF 内部のサブ領域 (E1, 2A, 2B 図下) が自律複製に必要であった。さらなる解析より、Pw, Ps 両方のプロモータ領域が自律複製能に必須であった。このうち、Pw の転写開始活性はミニ染色体複製を促進する一方、Ps の転写開始活性は複製に必要なことが示唆された。そこで、Ps 領域が複製を促進する機能を調べるために生化学的な解析を進めた結果、1 本鎖化された Ps 領域が ATP-DnaA-DOR 複合体と直接結合しうることがわかった。ゆえに、Ps 領域はカウロバクター *Cori* における DUE としての役割をもち、ATP-DnaA-DOR 複合体は開裂した Ps 領域を安定化する働きを担う可能性が考えられる。

本研究により、私は真正細菌において複製終結点と細胞分裂とを直接連結させる新規メカニズム、および、複製開始における複製起点近傍の転写領域の役割を明らかにした。配列比較などから、同様のメカニズムは病原微生物など多くのバクテリアに保存された共通原理を含むと考えられる。染色体構造や転写は真核生物の複製開始においても役割を担っているため、本研究で明らかにされた共通原理は真核生物の複製メカニズムの解明にも貢献するかもしれない。

