

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)

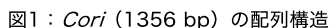


真正細菌カウロバクターの染色体分配と細胞分裂とを連係する複合体の機能構造解析、および、
染色体 DNA 複製開始点の配列特性と開始複合体のメカニズムの解析

【序論】

モデル生物大腸菌染色体 DNA の複製起点は開始タンパク質 DnaA の多量体形成領域 (DnaA oligomerization region, DOR) と AT に富む二重鎖開裂領域 (DNA unwinding element, DUE) から構成される (1)。DOR 上では ATP 結合型 DnaA や DNA 屈曲因子 IHF からなる高次複合体の形成が促される。この複合体は DUE を開裂させ、生じた一本鎖化 DUE と直接結合する。これにより開裂構造が安定化され、複製装置の一本鎖 DNA 上への装着が促される。他方、モデル生物のカウロバクター菌において、複製起点領域 *Cori* は染色体上の *dnaA* 遺伝子から 5.6 kb 上流に存在し、DUE は未同定である。*Cori* 内部には 2 種類の DnaA 結合配列 (G-box: 高親和性、W-box: 低親和性) や IHF 結合配列からなる DOR の他に、ポルフィリン生合成遺伝子 *hemE* の二つの転写プロモータ Pw、Ps がコードされる (図 1)。先行研究より、これらプロモータを含む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 (2)。*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 (3)。しかし、これらの転写プロモータが複製開始において果たす具体的な役割は不明である。さらに、プロモータ下流の転写領域における必須配列の同定が不十分であったこと

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



DnaAの集合領域(DOR)を白色、転写プロモータPwをオレンジ色、Psを黄色の四角、および*hemE* ORFを灰色の矢印で表した。DnaA boxを三角(黒色:高親和性、灰色:低親和性)で示した。三角の向きは各DnaA boxの配向を示している。

これらの問題を解決するために私は、ZapT によって駆動される複製終結点-分裂装置の連係メカニズム、および、*hemE*-DOR 内部に存在する複製開始に必須な配列の探索を目的として研究を行った。

【方法】

細胞内 ZapT-DNA 相互作用の解析: カウロバクター菌の野生株、 $\Delta zauP$ 株、 $\Delta zapA$ 株をそれぞれ液体培養し、ホルムアルデヒドにより ZapT-DNA 複合体をクロスリンクさせた。溶菌後、免疫沈降法により ZapT-DNA 複合体を回収し、DNA 量をリアルタイム qPCR により定量した。

細胞内 ZapT 局在解析: 蛍光タンパク質融合型 ZapT (ZapT-mNG) を発現するプラスミドを用いて野生株、 $\Delta zauP$ 株、または $\Delta zapA$ 株を形質転換した。形質転換体を培養し、対数増殖期の細胞中の輝点形成を蛍光顕微鏡で観察した。ZapT-mNG の発現量はウェスタンブロットにより定量した。

ZapT-ZauP-ZapA 複合体の再構成: C 末 His タグ付き ZapT タンパク質 (ZapT-His)、および C 末端欠損 ZapT (ZapT Δ C-His) を大腸菌内で過剰発現し、複数カラムを用いて精製した。N 末端 His タグ付きの ZauP、ZapA (His-ZapA) の精製標品はラボストックを用いた。これら精製標品をそれぞれ単独、または、混合した後にゲル濾過クロマトグラフィーによりサイズ分画した。分画後の画分を SDS-PAGE により解析した。

プルダウン法を利用した ZauP 依存的 ZapT 高次複合体形成能の解析: His-ZapA 存在下、または非存在下で ZapT-His、タグなし ZapT を混合し Ni 結合ビーズによって ZapT-His を回収した。共回収されたタンパク質を SDS-PAGE により解析した。コントロールとして ZapT Δ C-His を用いた。

ミニ染色体の複製開始能の測定: カウロバクター菌染色体の複製起点 *Cori* 配列をプラスミドに導入し、*Cori* 依存的に複製するミニ染色体を構築した。ミニ染色体を用いてカウロバクター菌を形質転換し、30℃ で三日間培養したのちに得られたコロニー数から、ミニ染色体の *Cori* に依存した自律複製能を算出した。

一本鎖 DNA の二次構造解析: 5'末端を ^{32}P 標識した一本鎖 Pw 領域 DNA を 100 mM KCl 存在下で 95℃ で 5 分間保温した後に、ゆっくりと室温まで冷却した。得られた産物を 12% native PAGE および 12% urea-PAGE で解析した。

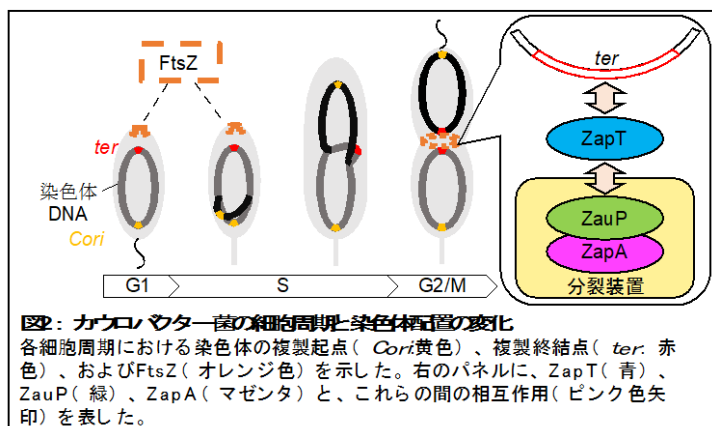
ssDNA-DnaA-DOR 複合体の再構成: カウロバクター菌由来の N 末端 His タグ付 DnaA タンパク質 (His-ccDnaA) を大腸菌内部で過剰発現し、複数カラムを用いて精製した。精製した His-ccDnaA と DOR 配列を混合し 5 分間氷上で静置したのち、5'末端を ^{32}P 標識した一本鎖 Ps 領域 DNA を加えて 30℃ で 10 分間保温した。反応後のサンプルをゲル電気泳動にかけ、形成された複合体を分離した。複合体の泳動位置を EtBr 染色、および ^{32}P 由来の放射活性の測定により定量した。

DnaA-DOR 複合体と相互作用する Ps 領域の解析: 5'末端をビオチン標識した DOR 配列と His-ccDnaA を氷上で 5 分間静置した後、5'末端を ^{32}P 標識した一本鎖 Ps 領域 DNA を加え 30℃ で 10 分間保温した。ストレプトアビジンビーズにより DOR 配列を回収し、 ^{32}P 由来の放射活性を測定することで、共回収された一本鎖 DNA 量を定量した。

【結果】

ZapT は ZauP および ZapA 依存的に細胞内で局在した。: ZapT を介した複製終結点と分裂装置との連係原理を明らかにするため、ZapT の細胞内局在が分裂装置に依存するか否かを検討した。野生株、 $\Delta zauP$ 株または $\Delta zapA$ 株における ZapT-mNG 局在活性を蛍光顕微鏡で解析した。結果、野生株と異なり、それぞれの変異株は ZapT 局在性を欠損した (8)。これらの変異は蛍光融合 ZapT の細胞内発現量に影響を与えなかった (8)。ゆえに、ZapT の局在には正常な分裂装置が必要であることが示唆された。次に、分裂装置が ZapT の複製終結点結合能に与える影響を評価するため免疫沈降実験を行った。結果、 $\Delta zauP$ 株および $\Delta zapA$ 株は野生株と同程度の活性を保持した (8)。これらの結果より、細胞内ではまず *ter* 領域と ZapT との複合体が形成され、次にこの複合体と分裂装置との相互作用が起こる、という複製終結点と分裂装置との連係メカニズムが明らかとなった。

ZapT は C 末端領域を介して ZauP と直接結合し、ZauP と複合体を形成した。: ZapT と ZauP、ZapA の間の直接相互作用の有無、および複合体形成の様式を解析するために精製タンパク質を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。溶出位置から予想される平均分子量を求めたところ、ZapT-His は二量体、His-ZapA は六量体を形成しうる



分かった(8)。さらに両者を混合するとそれぞれ単独の時よりも明らかに高分子量の位置に共溶出された(8)。一方、ZapT-His と ZapA-His を混合すると、それぞれ単独の時と同じ位置に溶出された(8)。ゆえに、ZapT が ZauP と直接結合することが示唆された。また、ZapT Δ C-His を用いて同様の解析を行うと、ZapT Δ C-His は His-ZauP との相互作用能を欠損した(8)。したがって、ZapT の C 末端ドメインが ZauP との相互作用に重要だと分かった。さらに、プルダウンの結果から、His-ZauP オリゴマー上に複数の ZapT-His 二量体が結合することが分かった(8)。これらの結果から、複数の ZapT 分子が ZauP オリゴマー上に結合することで ZapT-ZauP-ZapA の三者複合体が形成されることが明らかになった(図3)。細胞分裂期には、*ter* 領域に結合した ZapT が ZauP, ZapA と高次複合体を形成することで、*ter* 領域内部の複数の領域と分裂装置とを相互作用させ、*ter* 領域の折り畳みを促進するかもしれない(図3)。

ミニ染色体複製には *hemE* ORF 内部のサブ領域が必須だった。: *hemE* ORF が複製開始を促進するか否かについては十分解析されていない。そこで *Cori* 内部の転写領域における必須配列を明らかにするために、*hemE* ORF 配列の複製開始への寄与を解析した。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するミニ染色体を構築した。次に、*hemE* ORF 領域の欠損変異体を作成し、ミニ染色体複製への影響をコロニー形成能から観察した。その結果、*hemE* ORF がミニ染色体の自律複製に必須であることを見出した。さらに、*hemE* ORF 部分欠損変異体を複数解析することで、*hemE* 内部の複数のサブ領域 (E1, E2A-B) がミニ染色体の複製複製に必須であることが明らかになった(図4)。

Pw, Ps のうち、Pw の転写活性のみがミニ染色体複製に必須だった。: *hemE* 遺伝子の二つの転写プロモータ Pw, Ps それぞれの複製開始における役割を明らかにするために、ミニ染色体における Ps, Pw 領域変異体の複製活性を観察した。その結果、Ps, Pw 欠損変異体はそれぞれ複製開始活性を失っていた。さらに、Ps, Pw の転写プロモータ活性がミニ染色体複製に与える影響を観察するために、Pw, Ps 内部の σ サブユニット結合配列 (-10, -35) の置換変異体の複製開始活性を測定した。その結果、Pw の -10, -35 置換変異体のみが複製活性を失っていた。これらの結果から、Pw プロモータからの転写が特異的に複製開始を促進することが示唆された。

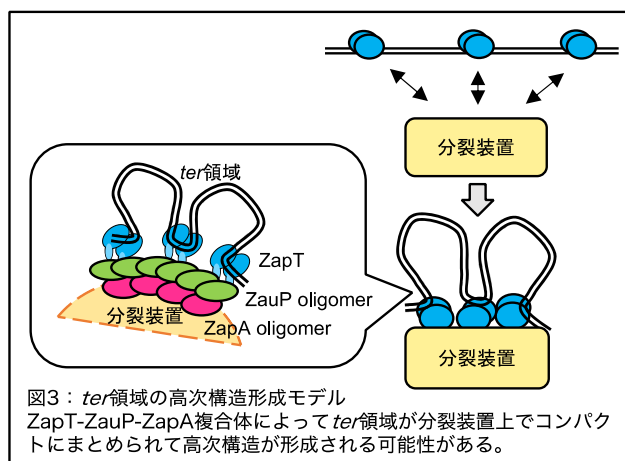
Pw 領域は二次構造を形成した。: Pw 内部には二次構造を形成しうるグアニンリッチな配列 (GGG) が存在する。Pw 領域における GGG 配列が複製に及ぼす影響を知るために、Pw 内部の GGG 配列の置換変異体の複製開始活性を解析した。その結果、一部の GGG 置換変異の複製開始活性は大幅に減弱された。また、*in vitro* での解析から、一本鎖の Pw 領域は複数のグアニン残基依存的に二次構造を形成した。転写に伴う Pw 領域内部の二次構造形成は複製開始に寄与するかもしれない。

Ps 領域は DnaA-DOR 複合体と相互作用した。: 複製開始における Ps 領域の機能解明に向けて、Ps 領域の高い AT 含量に着目した。すなわち、複製開始期の細胞では Ps 領域が DUE として機能し、ATP-DnaA-DOR 複合体と相互作用することで開裂構造が安定化されると考えた。そこで、一本鎖の Ps 領域が ATP-DnaA-DOR 複合体と相互作用するかを調べるために、His-*cc*DnaA を用いたプルダウン解析を行った。その結果、一本鎖化された 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。また、Ps 領域の upper 鎖および lower 鎖上のサブ領域がそれぞれ ATP-DnaA-DOR 複合体との相互作用に重要だった。同様に、His-*cc*DnaA を用いた EMSA においても、一本鎖 Ps 領域と ATP-DnaA-DOR 複合体の相互作用が観察された。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。

【考察】

細胞分裂と染色体複製とを連係させる複合体の分子メカニズムおよび生物学的意義

本研究は *ter* 領域結合タンパク質 ZapT が ZauP と高次複合体を形成することを初めて明らかにした。この複合体は *ter* 領域をコンパクトに折り畳みながら、分裂装置との共局在を促すと示唆される。*ter* 領域は DNA 複製進行と共役して細胞極から細胞中央へと移動するので、ZapT は *ter* 領域の移動と連動した分裂装置の局在性制御機構と考えられる(図 3)。



ZauP-ZapT 複合体を介した *ter* 領域の局所構造は遺伝子発現制御にも重要かもしれない。近年、染色体の局所的な高次構造は遺伝子発現にも影響すると報告されている。ZapT-ZauP による *ter* 高次構造の形成は遺伝子発現制御を介して細胞分裂を促進するかもしれない。

ZapT の機能ホモログである大腸菌の MatP タンパク質は分裂装置非依存的に *ter* 高次構造を形成する(9)。対してカウロバクターの *ter* 領域の構造は ZapT-ZauP によって形成され、大腸菌よりも柔軟になると考えられる。*ter* 領域上には複数の必須遺伝子が存在するため、*ter* 高次構造を柔軟することで遺伝子発現を適切に制御しているのかもしれない。また、MatP が大腸菌近縁種にのみ保存されるのに対して、ZapT は真正細菌に広く保存される。本研究から、よりユニバーサルな染色体 *ter* 領域の高次構造形成機構が明らかになった。

複製起点内部の転写配列と DnaA 複合体とが連係して促進する複製開始機構および生物学的意義

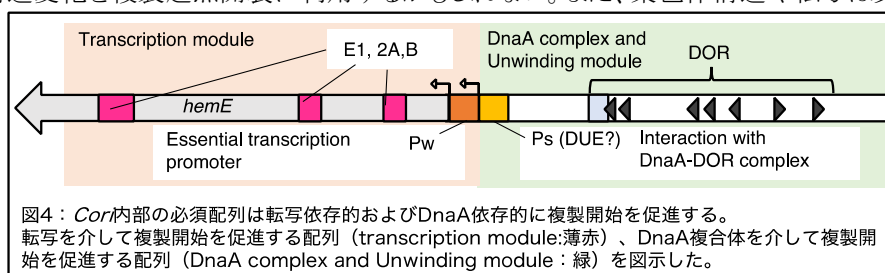
本研究において、私は複製開始を促進する複製起点近傍の転写プロモータの役割を明らかにした(図4)。細胞内では、*hemE* 遺伝子の二つのプロモータのうち、Pw 領域からの転写によって複製開始が促進されると予想される。また、今回の解析から、ATP-DnaA-DOR 複合体が Ps 領域の upper, lower 鎖のそれぞれと相互作用することが明らかになった。複製開始時には、複製ヘリカーゼ DnaB が一本鎖に開裂した複製起点上に両方向的に装着されることが必要である(10)。Ps 領域がそれぞれの鎖上に一つずつの相互作用領域を持つことは、DnaB の両方向的複製を担保するために重要かもしれない。

本研究によって、*hemE* ORF 内部のサブ領域(E1, E2A-B)が複製開始に必須であることが明らかになった(図4)。複製開始時には、Pw プロモータからの転写によって E1, E2A-B 上での二次構造形成が促進されると考えられる。一部の核様体タンパク質は *hemE* ORF に特異的に結合することから、E1, E2A-B は複製開始時に特異的な複合体を形成することで、開裂構造を安定化するかもしれない。

カウロバクター菌と他の細菌種の複製起点配列の比較などから、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。カウロバクター菌の様な比較的低温で生息する細菌においては、熱エネルギーだけでなく、転写に伴う構造変化を複製起点開裂に利用するかもしれない。また、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。

本研究の薬学的意義

本研究では染色体の複製開始および分配を促進するタンパク質複合体の理解を目指した。本研究で明らかになった分子メカニズムは病原性細菌を含む多くの真正細菌に保存される可能性が示唆されている。病原性細菌の毒性発揮メカニズムには細胞周期に伴う転写や染色体構造の変化が寄与する。すなわち、本研究のさらなる発展は、細菌 DNA の継承メカニズムの理解を通して、細菌の病原性獲得機構の解明に貢献するかもしれない。



【発表論文と引用文献】

- (1) Katayama, T., et al., (2010). *Nat Rev Microbiol.* 8(3):163-70.
- (2) Marczyński, G. T., et al., (1995). *Genes and Dev.* 9(12), 1543-1557.
- (3) Ioannidis, P., et al., (2007). *BMC Genomics.* 20(8):182.
- (4) Lori, C., Ozaki, S., et al., (2015). *Nature.* 523(7559):236-9.
- (5) Ozaki S. (2019) *Genes Genet Syst.* 94(5):183-196.
- (6) Woldemeskel, S. A., et al., (2017) *Mol. Microbiol.* 105(5):721-740.
- (7) Ozaki, S., et al., (2020) *mBio* 11(2):e00487-20.
- (8) Ozaki, S., Wakasugi, Y. (co-first authors), et al., (2021) *mBio* 26(1), e02196-20.
- (9) Lioy, V. S., et al., (2018) *Cell* 172(4):771-783.e18.
- (10) Ozaki, S., Wang, D., Wakasugi, Y., et al., (2022). *Nucleic acids res.* 50(22), 12896-12912.