

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02485

研究課題名(和文) バクテリアコンデンシンの一本鎖DNAローディング機構の遺伝生化学的研究

研究課題名(英文) SSDNA

研究代表者

仁木 宏典 (NIKI, Hironori)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・教授

研究者番号：70208122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：バクテリアでは染色体複製起点の近傍にrDNAが散在しており、rDNAへのコンデンシンの結合が起こっていることが示唆されていた。rDNAへのコンデンシンの結合の分子メカニズムとして、大腸菌のコンデンシンMukBの一本鎖DNAへのトポロジカル結合性について、生化学的な実験を行い、MukBには一本鎖DNA結合に特異的なアミノ酸残基があり、このアミノ酸残基が一本鎖DNAをトポロジカル結合した際には、より安定な一本鎖DNAドメインと機能することを明らかにした。また、rDNAは転写中にそのプロモーターの下流に一本鎖DNA領域を形成し、そこがバクテリアコンデンシンのトポロジカル結合の促進に関係していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コンデンシンは染色体DNAの安定な保持に関わる因子としてバクテリアからヒトまで保存されており、生命の基本因子の一つである。コンデンシンは特に長鎖DNAの凝縮を担っているが、その分子メカニズムについてはまだ全容が解明されていない。バクテリアのコンデンシンも基本的な性質はヒトのものと共通している。バクテリアコンデンシンの研究を通じて、コンデンシンが持つ一本鎖DNA結合能の生理的な役割が明らかになり、コンデンシンがどのようなDNA領域に結合しやすく、またどのような分子メカニズムでDNA凝縮を行なっているのかその解明に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Bacterial condensin localizes in the vicinity of the origin of chromosome replication. To investigate the molecular mechanism of condensin binding to rDNA, we conducted biochemical experiments on the topological binding of the *E. coli* condensin MukB to single-stranded DNA. The biochemical investigations revealed that MukB contains specific amino acid residues for binding to single-stranded DNA. These residues function as more stable single-stranded DNA domains when they are topologically bound to single-stranded DNA. Furthermore, during transcription, rDNA forms a single-stranded DNA domain downstream of its promoter, which facilitates the topological binding of bacterial condensin.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：核様体 染色体 凝縮 核 SMC

1. 研究開始当初の背景

コンデンシン複合体のコアサブユニットは SMC (Structure Maintenance of Chromosome) ファミリーと呼ばれるタンパク質の仲間である。SMC タンパク質は両端に球状ドメインを持つ棒状タンパク質で、その中央で折れ曲がる。この折れ曲がり部分で、SMC タンパク同士が結びつきリング構造の二量体を形成する。そして、このリングの内部に DNA を保持する、いわゆる「トポロジカルな DNA 結合活性」があると考えられている。さらに 2 種類のサブユニットが加わることにより、トポロジカルな DNA 結合の安定化やトポロジカル DNA 結合したコンデンシン複合体同士の会合が起こり、その結果、DNA が凝縮すると考えられている。

バクテリアのコンデンシンには MukB をコア、MukE と MukF をサブユニットとする大腸菌型の MukBEF 複合体と、Smc をコア、ScpA、ScpB をサブユニットとする枯草菌型の Smc-ScpAB の 2 種類がある。両複合体の欠損株は無核細胞の放出など類似した表現型を示すことから、同じ分子機能を持っていることが伺え知れる。しかし、相互のユニット間に構造的な違いがあり、また機能でも Smc ではコアの折れ曲がり部分に DNA 結合能があるなどの違いが見られる。概して枯草菌 Smc は真核生物の Smc タンパク質により近い構造と機能している。したがって、枯草菌と大腸菌を比較することでコンデンシンの基本的な機能が浮き彫りになり、コンデンシンの生物共通の性状を解き明かすことが期待できる。また、この 2 つを比較することでコンデンシンの根本的な機能を明らかにすると同時に、双方の実験を補完的に進めることにもなる。

MukBEF 複合体の精製タンパク質をすでに持っており、トポロジカルローディングアッセイの実験系も確立している。また、細胞内でのトポロジカル DNA 結合として rDNA 領域を見出し、この領域のさまざま変異体を構築しており、これら rDNA 領域を使った生化学的な研究を実施する。

2. 研究の目的

大腸菌の MukB コンデンシンタンパク質が、二本鎖よりも一本鎖 DNA (ssDNA) に選択的にトポロジカル DNA 結合していることが生化学的に明らかになった (Niki & Yano. Sci. Rep., 2016)。また枯草菌 Smc コンデンシンタンパク質がバクテリア細胞内で、転写の盛んな rDNA 領域 (すなわち一本鎖 DNA 形成領域) に結合し染色体の分離に寄与していることも明らかにした (Yano and Niki., Cell Rep, 2017)。一本鎖 DNA 選択的にトポロジカル DNA 結合するバクテリアコンデンシンの分子機構を明らかにすることで、SMC タンパク質ファミリーに見られる一本鎖 DNA 結合特性の生理的な意味を解き明かすことができれば、コンデンシンタンパク質の凝縮機構の第一段階である特異的な染色体領域へのコンデンシンの局在化を説明できると考えられる。

他方、枯草菌では転写活性の高い *rrn* 遺伝子に Smc 複合体が蓄積していることが知られており、さらに転写としている *rrn* 遺伝子を持つプラスミドが Smc-ScpAB と効率よく共沈実験することから、Smc 複合体が転写中の *rrn* 遺伝子特異的に結合すると考えられた。また、様々な *rrn* 遺伝子内欠損変異体を使った実験から、*rrn* 遺伝子は転写活性とともに、オペロン全体の構成が効率良い共沈、すなわち、細胞内での Smc-ScpAB のローディングには必要であることが明らかとなった (Yano & Niki, 2017)。この理由として、転写だけでは、Smc-ScpAB がローディングできるだけ十分に安定な一本鎖 DNA 領域は細胞内では形成されず、転写産物である RNA がコードされる DNA と形成する R ループ構造がコンデンシンの結合に必要な安定な一本鎖 DNA 領域の形成に関与していると考えられた。実際に転写中の *rrn* 遺伝子で安定な一本鎖 DNA 領域が形成されているか、そしてバクテリアコンデンシンのローディング効率の相関について明らかにする。

3. 研究の方法

一本鎖 DNA 選択的にトポロジカル DNA 結合するバクテリアコンデンシンの分子機構として、MukB には ssDNA センサーとして機能するアミノ酸残基が存在すると予想される。このようなアミノ酸残基を実際に特定するため、MukB と Smc の N 末ヘッドドメイン内部に ssDNA と相互作用し、また他の SMC タンパク質ファミリーによく保存されている塩基性のアミノ酸残基を結晶構造から見出し、これらの置換変異体を作成する。結晶構造は高度高熱細菌の MukB を参考にし、MukB タンパク質の二量体のヘッド部分の球状ドメインのリング内部の箇所の塩基性アミノ酸残基について調べる。これらアミノ酸残基は、リング構造の内部に露出しており、トポロジカル結合時に ssDNA と相互作用することが可能である。これらの塩基性アミノ酸残基を、酸性アミノであるグルタミン酸、または非荷電アミノ酸残基であるグルタミン、にそれぞれ置換した変異体タンパク質を作成する。精製したこれらの変異体タンパク質を用いて一本鎖 DNA と二本鎖 DNA へのトポロジカルローディングアッセイを行い、その結合力を定量する。

転写中の *rrn* 遺伝子で安定な一本鎖 DNA 領域や R ループ構造の形成箇所を検出には、一本鎖領域の同定として Raghavan ら (2006) や Leela ら (2013) が報告している方法を用いる。この方法では、DNA が塩基対を形成していない時のシトシンが、すなわち一本鎖の DNA のシトシン、Sodium bisulfite により脱アミノ化され、ウラシルに変換されることを利用している。化学

修飾を受けウラシルに変換された塩基は、続いて PCR 増幅することで、チミンとなる。したがって、シトシンからチミンへの塩基の変換頻度から、二本鎖 DNA が開裂し一本鎖 DNA になっている領域を推定できる。さらに、相補的な DNA 鎖の領域でのシトシンからチミンへの塩基の変換頻度の偏りから、R ループ構造領域の推定が可能となる。

4. 研究成果

私たちはバクテリアコンデンシン複合体が一本鎖 DNA(ssDNA)特異的にトポロジカル DNA 結合する際に、なぜ ssDNA を特異的に認識し(ssDNA 認識)を大腸菌や枯草菌のコンデンシンの機能を比較しながら。まず、「ヘッドドメインのリング内部のアミノ酸残基が ssDNA と結合し、ヘッドの構造変化を誘起しリングの開閉を制御する」という「ssDNA センサー仮説」を立てこの実証に取り組んだ。そして、MukB のヘッドの結晶構造をもとに、ssDNA 結合に重要なポジティブチャージの残基を推定し、アミノ酸変異置換変異タンパク質を作成した。特にリングの内側にあるポジティブチャージの残基は、トポロジカル結合したときに、ssDNA と dsDNA を見分けるときに関与すると考え、正電荷を持つ Lys 及び Arg 残基に、負電荷を持つ Glu 及び中性電荷を持つ Gln への置換変異を導入し、それらの変異体の機能を解析した。そして、これらの変異タンパク質の表現型を解析し、機能的に重要なアミノ酸残基を決定した。まず、精製した変異型 MukB を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、K75E 変異体及び R112E 変異体は一本鎖 DNA 結合と二本鎖 DNA 結合が共に低下していたのに対し、K75Q 変異体及び R112Q 変異体は二本鎖 DNA 結合が特異的に低下していた。mukB 欠失株を用いた相補性試験から、K75Q 変異体と R112Q 変異体は MukB 機能を保持しているが、K75E 変異体と R112E 変異体は機能を失っていることがわかった。これらの結果は、K75 及び R112 が一本鎖 DNA 認識に関与し、その一本鎖 DNA 結合活性が MukB 機能に必須の役割を果たすことを示唆する。以上のように、「ヘッドドメインのリング内部のアミノ酸残基が ssDNA と結合する」という作業仮説を支持する結果を得られ、研究の方針の妥当性が実証された。

他方、枯草菌の rDNA 遺伝子領域へのバクテリアコンデンシンの細胞内でのローディング機構を明らかにするため、Sodium Bisulfate 処理による一本鎖の検出を進め、rDNA 遺伝子領域内での一本鎖 DNA 領域を再現性よく、また定量的に検出することに成功した。その結果、細胞内で特異的に一本鎖 DNA を作り出す領域を rDNA 遺伝子領域内に確認した。枯草菌の細胞を直接、Sodium Bisulfate 処理し細胞内でのゲノム中の一本鎖の検出を試みた。活発に転写している rDNA は、一本鎖 DNA 領域を形成する傾向が高いと考えられた。一本鎖 DNA のシトシンは、Sodium Bisulfate 処理による修飾を受けウラシルとなり、さらに複製を経てチミンへと変換される (CT 変換)。次世代シーケンサーを用いて、PCR 増幅された rDNA セグメント上の各シトシンをカバーする平均 11,000 リードを作成し、実際の CT 変換率を求めた。原理的には、CT 変換率は一本鎖 DNA 領域を形成する傾向を反映するものとなる。また一定の領域での CT 変換率の増加は、rDNA 内のある領域が開裂して一本鎖 DNA 領域として存在していることを意味すると考えられた。実際に、rDNA 全体で転写に活性に応じて、複数の ssDNA セグメントが検出された。そのうちバクテリア-コンデンシンの結合に影響する rDNA 領域として、プロモーター下流の 100-500bp のセグメントが関係していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yano K., Akiyama K., Niki H.	4. 巻 2004
2. 論文標題 In Vivo and In Vitro Assay for Monitoring the Topological Loading of Bacterial Condensins on DNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 In Vivo and In Vitro Assay for Monitoring the Topological Loading of Bacterial Condensins on DNA. In: Badrinarayanan A. (eds) SMC Complexes. Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 181-196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-9520-2_14	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------