

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：63801

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07328

研究課題名（和文）バクテリアコンデンシンMukBEFの染色体DNAへの結合の分子機構

研究課題名（英文）The mechanism of the binding of the bacterial condensin MukBEF to the chromosomal DNA

研究代表者

秋山 光市郎 (Akiyama, Koichiro)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・博士研究員

研究者番号：10800675

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では大腸菌のコンデンシンであるMukBの染色体DNAへの結合の分子機構の解明に取り組んだ。MukBの変異体を22種類作製した。それらの変異体を用いた大腸菌細胞内及び試験管内での実験により、MukBのDNA結合に重要なアミノ酸残基を特定した。MukBの立体構造と照らし合わせると、それらの残基は一直線上に整列していた。これらの結果を元に、MukBによるDNA結合の新たなモデルを立てた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コンデンシンタンパク質は大腸菌からヒトまで広く存在する。コンデンシンは一般に一本鎖DNAと二本鎖DNAのいずれにも結合するが、一本鎖DNAへの結合能をどのように利用しているかについては不明点が多い。本研究ではMukBの一本鎖DNA結合に着目することでDNAへの結合の分子機構について新たな機能モデルを示した。この成果は大腸菌にとどまらず、コンデンシンの普遍的な機能の理解に貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：I studied the mechanism of DNA binding of MukB, the E. coli condensin. I made 22 kinds of mutant forms of MukB. In vivo and in vitro experiments by using these MukB mutants revealed the residues important for the DNA binding. These residues are align on the line in the MukB crystal structure previously reported. Based on these results, I propose a novel DNA binding model of MukB.

研究分野：分子生物学

キーワード：バクテリアコンデンシン 染色体 MukBEF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)コンデンシンの構造

コンデンシンは染色体凝縮を司るタンパク質複合体であり、SMC コアユニットとそれに結合する kleisin サブユニット、そして kleisin サブユニットと相互作用する第3のサブユニットから構成される。コンデンシンは原核生物にも存在し、バクテリアコンデンシンと呼ばれる。大腸菌においては SMC コアユニットには MukB タンパク質、kleisin サブユニットには MukF タンパク質、第3のサブユニットには MukE タンパク質がそれぞれ対応する(図1)。SMC コアユニットはヒンジドメインとヘッドドメイン、そしてそれらをつなぐアームドメインから成り、ヒンジドメインを介して二量体を形成する。ヘッドドメインは開閉が可能で、ヘッドドメインが閉じた状態でリング内部に DNA を捕捉することはトポロジカル結合と呼ばれる。

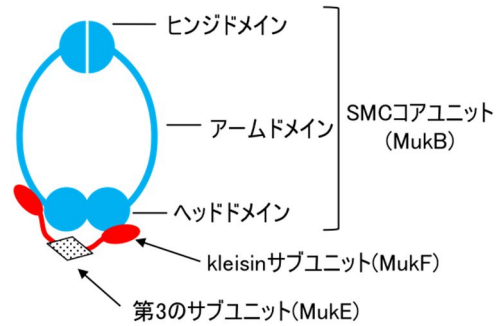


図1. 大腸菌コンデンシンの模式図.

(2)トポロジカル結合の分子機構

染色体上のどこに結合するのか

MukB による DNA 結合には塩基配列特異性がないが、染色体上の複製起点近傍に集合する。塩基配列によらずに適切な場所に結合する機構は不明であった。これに関して、枯草菌は *parS*-ParB システムによって染色体上の *parS* 配列領域に結合することが知られていた。しかし、大腸菌は *parS* 配列を持っておらず、これとは異なる機構が示唆された。

MukB は一本鎖 DNA と二本鎖 DNA のいずれにも結合する。MukB を用いた生化学実験から、MukB は二本鎖 DNA よりも一本鎖 DNA により効率良くトポロジカル結合することが示された。このことから、MukB が細胞内でも一本鎖 DNA 領域に結合する可能性が考えられた。

どのように結合するのか

上述した一本鎖 DNA への効率的なトポロジカル結合は、MukB が一本鎖 DNA と二本鎖 DNA を見分けられることを示す。この一本鎖 DNA と二本鎖 DNA を見分ける分子機構はどのようなものなのであろうか。そして、一本鎖 DNA 結合能を利用したトポロジカル結合の分子機構は如何なるものなのであろうか。これらの疑問の解明はトポロジカル結合の分子機構の解明に繋がる。

2. 研究の目的

トポロジカル結合はコンデンシンの構造を利用したユニークな DNA 結合様式であり、その理解は重要な課題である。本研究では、大腸菌 MukB によるトポロジカル結合の分子機構解明を目的とする。

3. 研究の方法

トポロジカル結合はリング内部に DNA を捉える反応である為、リング内部の残基に一本鎖 DNA 特異的なトポロジカル結合に關与する残基があると考え、「一本鎖 DNA とトポロジカル結合した時、MukB はリング内部の残基で一本鎖 DNA と相互作用することで構造変化し、安定なトポロジカル結合状態を維持する」という作業仮説を立てた。この仮説の検証の為、MukB の主な DNA 結合部位であるヘッドドメインの内、リング内部に向いている残基を対象とした変異解析を実施した。DNA のリン酸基の負電荷と MukB の正電荷による電気的相互作用を想定し、正電荷を帯びたリシン残基(K)及びアルギニン残基(R)を、負電荷を帯びたグルタミン酸残基(E)又は電気的に中性なグルタミン残基(Q)に置換した変異体を作製し、その機能を調べた。MukB ホモログの結晶構造を参考に、リング内部のリシン残基及びアルギニン残基計 11 箇所を選び出し、解析対象部位とした(図2)。

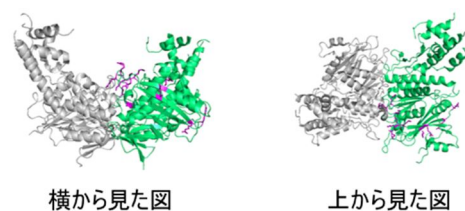


図2. MukBへの変異導入部位

MukBヘッドドメインの結晶構造(PDB-ID: 3EUK)上に、本研究で変異を導入した11箇所の残基をマゼンタで示した。灰色と緑はそれぞれがMukBの単量体である。

4. 研究成果

(1)変異型 MukB の細胞内機能

mukB 欠失株は高温条件下で生育できない。また、*mukB* 欠失株を顕微鏡で観察すると、DNA を持たない無核細胞を高頻度で産出していること、高温条件下では異常に伸長した細胞形態となることが確認できる。これらの表現型を指標に、変異型 MukB の細胞内での機能を調べた。*mukB*

欠失株中で変異型 MukB をプラスミドから発現し、MukB の機能を相補できるか確認した。作製した 22 種類の変異体のうち、R61E、R61Q、K75E、K80E、K80Q、R112E の 6 つの変異体は高温条件下での生育を相補できなかった(図 3)。これらの変異型 MukB を発現する細胞を顕微鏡で観察すると無核細胞の放出頻度の上昇と高温条件下での細胞伸長が確認された。以上の結果から、上記の 6 つの変異体は MukB 機能を失っていると結論した。

機能が失われていた変異が見つかった 4 箇所内、R61 と K80 は以前の報告等から、MukB の ATP 加水分解活性に重要であることが強く疑われた。ATP 加水分解活性は MukB 機能において必須であることから、R61E、R61Q、K80E、K80Q 変異体では ATP 加水分解が不全となったことで MukB 機能が損なわれたと考えられる。一方、K75 と R112 は正電荷を帯びたグルタミン酸残基への変異は許容しないが電気的に中性なグルタミン残基への置換は許容するという特徴的な挙動を示した。

(2) 変異型 mukB の DNA 結合能

作製した 22 種類の変異型 MukB を、N 末端に付加したヒスチジンタグ(His6 タグ)を用いて精製し、試験管内で DNA 結合能を調べた。基質には環状の二本鎖 DNA である pUC119 プラスミドと、環状一本鎖型の pUC119 プラスミドをそれぞれ用いた。電気泳動による泳動度の変化で DNA とタンパク質の結合を検出可能なゲルシフト法により、各種変異型 MukB と一本鎖及び二本鎖 DNA の結合を定量した。いくつかの変異体で一本鎖 DNA 及び二本鎖 DNA 結合の低下が見られた。上記(1)の実験により重要性が見出された K75 残基と R112 残基について、グルタミン酸残基への置換変異体(K75E、R112E)では一本鎖 DNA と二本鎖 DNA への結合が共に低下していたのに対し、グルタミン残基への置換変異体(K75Q、R112Q)では二本鎖 DNA 結合は低下していたが一本鎖 DNA への結合が十分に維持されていた(図 4)。細胞内機能が失われていた K75E 及び R112E では一本鎖 DNA 結合が低下しており、細胞内機能を保持していた K75Q 及び R112Q 変異体では一本鎖 DNA 結合が維持されていた。このことは K75 残基及び R112 残基での一本鎖 DNA 結合の重要性を示唆する。

ゲルシフト法とは異なる方法として、部位特異的光架橋法による MukB と DNA の相互作用の検出も試みた。この方法を用いることで、アミノ酸残基レベルの空間分解能で MukB と DNA の直接的な相互作用の検出を期待した。しかしながら、光架橋法では MukB のヘッドドメインと DNA の相互作用は検出されなかった。光架橋法はタンパク質-タンパク質相互作用の検出の報告例は多数あるもののタンパク質-DNA 相互作用の検出例はわずかであることから、MukB と DNA の相互作用を光架橋法で検出するには更なる工夫と実験系の改良が必要である。

(3) 変異型 MukB によるトポロジカル結合

ゲルシフト法では MukB と DNA が複合体を形成していることを検出可能であるが、それがトポロジカル結合によるものかどうかはわからない。そこで、トポロジカル結合の効率を検出可能な実験(トポロジカル結合アッセイ)を実施した。この方法では、MukB と DNA を反応させた後、高塩濃度条件(750 mM)で MukB の His6 タグを用いたプルダウンを行うことで、トポロジカル結合した DNA のみを MukB と共に回収する。環状一本鎖 DNA を基質に用いてトポロジカル結合実験を行なった。K75E 変異体及び R112E 変異体ではトポロジカル結合効率が低下していたが、K75Q 変異体及び R112Q 変異体は野生型と同程度のトポロジカル結合効率を保持していた。この結果から、K75 残基及び R112 残基での一本鎖 DNA 結合能は効率的なトポロジカル結合に重要であることがわかった。

(4) K75 残基と R112 残基の機能モデル

(1)~(3)の結果により、K75 残基と R112 残基の重要性を示した。MukB はホモ二量体として機能するため、1 つの MukB 分子には 2 つの K75 残基と 2 つの R112 残基が存在する。これらの 4 残基を結晶構造上にマッピングすると、MukB ヘッドドメインが閉じた時に一直線上に整列する(図

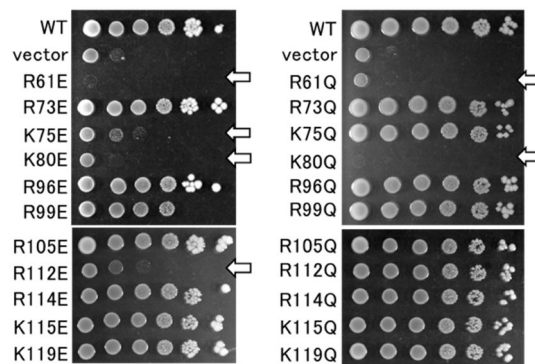


図3. MukB変異体の細胞内での機能

図中に示した変異型MukBを*mukB*欠失背景でプラスミドから発現した株の高温(37°C)での生育を調べた。変異型MukBの内、矢印で示した6つは生育を相補できなかった。

一方、K75 と R112 は正電荷を帯びたグルタミン酸残基への変異は許容しないが電気的に中性なグルタミン残基への置換は許容するという特徴的な挙動を示した。

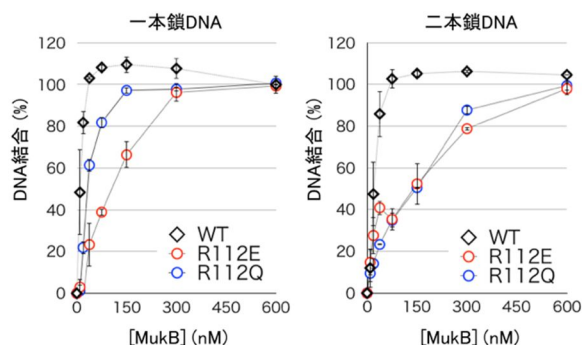


図4. R112変異体のDNA結合

R112E変異体(赤)及びR112Q変異体(青)のDNA結合をゲルシフト法により定量した。左は一本鎖DNA、右は二本鎖DNAを基質に用いた実験の結果を示す。

細胞内機能が失われていた K75E 及び R112E では一本鎖 DNA 結合が低下しており、細胞内機能を保持していた K75Q 及び R112Q 変異体では一本鎖 DNA 結合が維持されていた。このことは K75 残基及び R112 残基での一本鎖 DNA 結合の重要性を示唆する。

5)。この事実は、ヘッドドメインが閉じるとリング内側に一本鎖 DNA 結合部位を新たに形成しているという様に解釈できる。

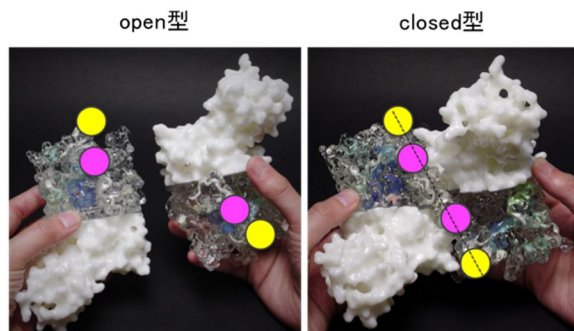


図5. K75とR112はヘッドドメインが閉じると一直線上に並ぶ結晶構造を元に3Dプリンターで作製したMukBのヘッドドメインの分子模型上にK75残基(マゼンタ)とR112残基(黄色)の位置を示した。

以上の結果から、K75 残基と R112 残基の働きについて、「MukB はリングの内側に一本鎖 DNA を捉えたことを、一直線に並んだ 4 つの残基 (K75、R112 が各 2 つ) によって感知し、安定なトポロジカル結合へと移行する」という機能モデルを立てた(図 6)。これは「3. 研究の方法」で述べた作業仮説の妥当性を裏付けるものである。今後は、リング内で一本鎖 DNA と結合した MukB がどのような構造変化を起こすのかについて調べることで、トポロジカル結合の分子機構を更に詳細に理解できるだろう。また、本研究では MukB タンパク質を単独で用いて解析したが、大腸菌コンデンシンの機能には MukF 及び MukE タンパク質もまた必須の役割を果たす。MukF と MukE のトポロジカル結合形成への寄与を調べることも重要な課題である。

「1. 研究開始当初の背景」で述べた様に、*parS* 配列を持たない大腸菌が複製起点近傍という特定の領域に結合する機構は不明であった。複製起点近傍にはリボソーム RNA 遺伝子 (*rrn*) が複数コピー存在する。*rrn* 領域は転写が非常に盛んで、且つ DNA-RNA ハイブリッドである R-ループ構造を形成することで一本鎖 DNA 構造が安定に存在すると考えられている。MukB が *rrn* 領域の安定な一本鎖 DNA 領域にトポロジカル結合すれば、結果的に複製起点近傍に集合することができる。実際に枯草菌においては *rrn* 領域にコンデンシンが集積することが報告されていることから、一本鎖 DNA 結合は染色体上の適切な位置への結合に寄与していると推測される。



図6. K75とR112の機能モデル

(5) 今後の展望と得られた成果の位置づけ

コンデンシンが二本鎖 DNA だけでなく一本鎖 DNA にも結合することは広く知られていたが、一本鎖 DNA 結合能をどのように利用しているのかについては不明な点が多かった。本研究では MukB の一本鎖 DNA 結合の重要性を明らかにし、具体的なモデルを示した。コンデンシンは原核生物から真核生物まで存在し、その立体構造やサブユニット構成の類似から、機能を果たす際の本質的な点は普遍的なものであると考えられる。本研究の成果は大腸菌を含むバクテリアのみならず、種々の生物のコンデンシンに新たな知見を提供するものである。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yano Koichi, Akiyama Koichiro, Niki Hironori	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 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 有
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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 秋山光市郎、仁木宏典
2. 発表標題 バクテリアコンデンシンMukBの DNA構造を認識したローディング機構
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山光市郎、仁木宏典
2. 発表標題 バクテリアコンデンシンMukBのDNA構造を認識したローディング機構
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichiro Akiyama, Hironori Niki
2. 発表標題 Sensor residues of MukB for the binding to single-stranded DNA
3. 学会等名 Gordon Research Conference; Chromosome Dynamics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山光市郎、仁木宏典
2. 発表標題 大腸菌コンデンシンMukBのDNA構造を認識したローディング機構
3. 学会等名 第16回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山光市郎、仁木宏典
2. 発表標題 大腸菌コンデンシンMukBの一本鎖DNA認識機構
3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山光市郎、仁木宏典
2. 発表標題 バクテリアコンデンシンの一本鎖DNA 認識機構
3. 学会等名 第36回染色体ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichiro Akiyama, Hironori Niki
2. 発表標題 Bacterial condensin MukB binds to RNA
3. 学会等名 The 11th 3R&3C Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----