

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570125

研究課題名（和文） バクテリアの染色体凝縮因子の構造生物学的及び分子遺伝学的解析

研究課題名（英文） Structural and molecular genetical analyses of factors related to bacterial chromosome condensation

研究代表者

鎌田 勝彦 (KAMADA KATSUHIKO)

独立行政法人理化学研究所・平野染色体ダイナミクス研究室・専任研究員

研究者番号：70360526

研究成果の概要（和文）：

細菌のコンデンシンの制御サブユニット (ScpA, ScpB) の組換え蛋白質を用いて、機能領域を同定し、それらの生化学的性質を調査した。また、制御サブユニット変異体を作製し、SMC サブユニットが担う ATP 加水分解活性を調べた。その結果、ScpA のいくつかのペプチド領域が、ScpB の C 末端ドメインの結合を介して、コンデンシンの SMC サブユニットの活性を制御していることがわかった。つまり、コンデンシンには、制御サブユニット複合体の内部構造変化に応じて、その SMC サブユニットの二量化を制御する機構が備わっていると推測された。

研究成果の概要（英文）：

I have identified functional regions of regulator subunits (ScpA and ScpB) of the bacterial condensin, and investigated their biochemical properties. In addition, using various mutants of the subunits, I examined the ATPase activity of the SMC subunit. As a result, some peptide regions of ScpA, through binding of the C-terminal domain of ScpB, control the ATPase activity of the SMC subunit. This result suggests that internal conformational changes of the regulatory subcomplex organize dimerization of the SMC subunit in the bacterial condensin.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：染色体凝縮

1. 研究開始当初の背景

真核生物の染色体は、遺伝情報の担い手として古くから顕微鏡下で観察されてきた。しかし、核膜消失に伴う染色体形成の分子基盤と分裂期における動態についての理解は大変遅れていた。近年アフリカツメガエル卵抽出液を利用した染色体の試験管内再構成系が開発され、新規の蛋白質複合体コンデンシンが染色体の凝縮とその構造維持に必要であることを見いだされた。

真核生物のコンデンシン複合体のコアとなるサブユニットは、SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) 蛋白質と総称され、約 50nm の長さのコイルドコイル領域のアームと ATP 加水分解ドメインを持つ (図 1)。SMC サブユニットは、さらに non-SMC 制御サブユニットと結合し、コンデンシンのホロコンプレックスを構成する。また、高等真核細胞には、異なる non-SMC 制御サブユニットをもつ第 2 の複合体が存在することがわかっている (図 1)。

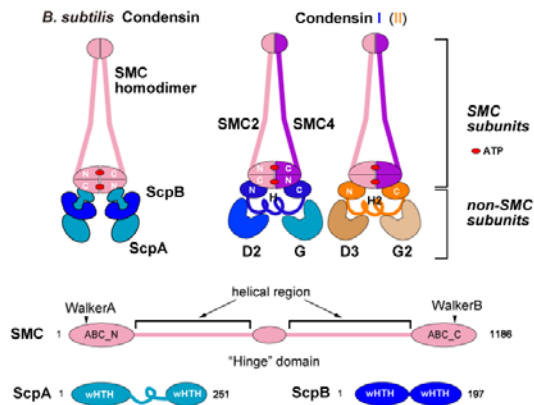


図 1 バクテリアと真核生物のコンデンシンサブユニット構成の比較

一方原核細胞は、核膜をもたず、染色体 DNA は細胞内で核様体と呼ばれる構造体を形成している。真核細胞の染色体が規則的な核内領域を占有しているように、バクテリアの核様体も一定の配向性をもって細胞内に存在している。核様体の維持には、コンデンシンの原型ともいえる SMC 蛋白質と 2 種類の制御サブユニット (ScpA と ScpB) が関与しており、その ATPase ドメインの制御機構は、真核生物のものとも共通している (図 1)。おそらく、原核細胞における核様体の構築や配置にも、真核細胞における染色体の構築や配置と共通する分子基盤があると考えられる。

2. 研究の目的

SMC サブユニットの部分構造については、

古細菌等のホモログを中心とした解析からある程度の理解が進んでいるが、non-SMC 制御サブユニットの分子機構はほとんどわかっていなかった。申請者は、これまでの研究から、non-SMC 制御サブユニット分子がどのような構造的基盤を介して SMC サブユニットの活性を制御しているか、という問題を理解すべく研究を進めてきた。特に、枯草菌のコンデンシンの組換え蛋白質を用いて、機能領域を同定し、その生化学的性質を調査してきた。その結果、①バクテリアの non-SMC サブユニット ScpA は、もう一つのサブユニット ScpB の結合によって、その分子内構造変化が誘導されて可能性があること②その際に ScpA 内のドメイン間領域が、コンデンシン複合体の形成と解離に重要な役割を示している可能性を見いだした。

これらについてさらに検証を進めるため、以下の点について実験を進める。

(1) 申請者の別課題で進められている ScpA-ScpB 複合体の立体構造解析の結果から、二つのサブユニットの詳細な結合様式を明らかにしている。この情報から、機能ドメイン間の詳細な結合定数を求める。

(2) これまでの生化学的解析で明らかとなった non-SMC 制御サブユニットの機能ドメイン領域を枯草菌内で過剰に発現させることによって、それらの細胞内での役割を調査する。

(3) 様々な制御サブユニット変異体を精製し、それらの SMC サブユニットの ATP 加水分解活性への影響を調べることで、それらの機能的役割を調査する。

これらの情報を基に、構造機能相関を明らかにすることによって、原核生物のコンデンシン複合体分子の機能に迫る。さらに、染色体凝縮に関与する真核生物のコンデンシン複合体分子の機能を異なる観点から考察する。

3. 研究の方法

(1) 構造情報から得られた主要構造部位の結合活性の評価

立体構造から解釈された ScpA と ScpB の機能ドメイン間の結合部位について、等温滴定型カロリメータで、それらの結合に伴う熱変化を直接測定することによって、反応結合比と結合定数を決定する。

(2) *B. subtilis* を用いた分子遺伝学実験

B. subtilis の *smc* 遺伝子の欠失や変異は 37°C で増殖阻害を引き起こす。また、*scpAB* 両遺伝子に対しても同じ表現型を示すことから、*scpAB* 変異優性阻害株を作製した。まず、*scpAB* 両遺伝子に対して、また *scpB* 遺伝子単独に対して、条件致死株を作製した。*scpAB* 両遺伝子は一部重複領域を有するオペ

ロン構造を持つ。そのため、*scpA* 遺伝子の上流からその ORF の一部を含む約 500bp の領域を Pspac プロモーターの下流に挿入し、一点交差によって野生株のホストに導入することによって、IPTG による誘導可能な条件致死株を作製した。同様に、*scpB* 遺伝子単独条件致死株を作製した。

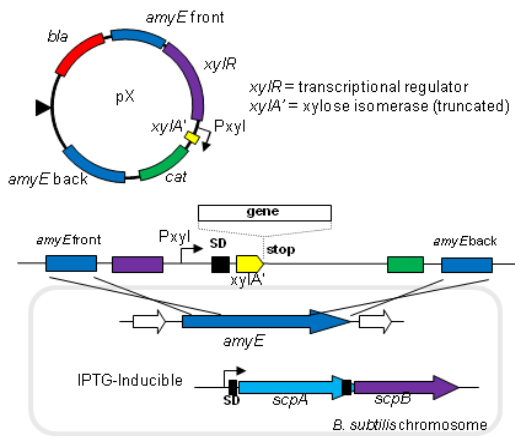


図2 *B. subtilis* を用いた分子遺伝学実験の概略図 *xyiA'* の下流に優勢発現させたい遺伝子を挿入する。

次に、これらの株を基にして、ScpA または ScpB の機能ドメインやその変異体の遺伝子領域を、キシロースの添加で誘導可能な Pxy プロモーターの支配下にクローニングし、2点交差によって増殖に必須ではない *amyE* 遺伝子領域に導入した。このようにして作製した株は、IPTG 非存在下で野生型の遺伝子発現が劣性形質となり、かつ、キシロース存在下で目的の遺伝子領域を過剰発現することができる。作製した形質転換体の生育状況は限界希釈によって視覚的に確認した。

(3) 制御サブユニットによる SMC サブユニットの ATP 加水分解活性への影響

ScpA または ScpB 蛋白質の機能ドメインの変異体を作製し、ATP 存在下で SMC 蛋白質の二量化に伴う ATP 加水分解活性を測定した。それには、MESG(2-amino-6-mercapto-7-methylpurine riboside)と遊離リン酸を基質として、PNP(purine nucleoside phosphorylase)活性を持つ酵素を介して生じる二次反応産物 2-amino-6-mercapto-7methyl purine を 360 nm の吸光を測定することによって、SMC 蛋白質の活性を決定した。立体構造は *Geobacillus stearothermophilus* 由来の蛋白質で得られたため、この由来の蛋白質を用いた。

4. 研究成果

(1) 構造情報から得られた主要構造部位の

結合活性の評価

non-SMC 制御サブユニットの結晶構造が得られた ScpA(1-174)と ScpB(12-191)の領域の結合は Kd (解離定数)が $5.6 \times 10^{-8} M^{-1}$ であり、非常に強い結合であった。ScpA に ScpB はおよそ 2 分子で結合しており、これまでの実験結果と一致した。この複合体は、二つの ScpB の C 末端ドメインが ScpA の 2 カ所に結合することで形成されている。その一つの結合は、Kd が $5.1 \times 10^{-8} M^{-1}$ と非常に強い結合能を示したが、もう一方は、Kd が $2.2 \times 10^{-6} M^{-1}$ であった。つまり、一方の相互作用部位は、ScpA-ScpBx2 複合体分子の形成を決定づけるほど非常に強い結合であり、もう一方は制御因子などに見受けられる、比較的結合能の弱いものであることがわかった。

(2) *B. subtilis* を用いた分子遺伝学実験

ScpB の C 末端領域の発現はバクテリアの増殖を支持するが、ScpB の N 末端領域の発現は、強い増殖阻害を引き起こし、IPTG の誘導による ScpB 全長の発現に対しても阻害的に働くことがわかった。

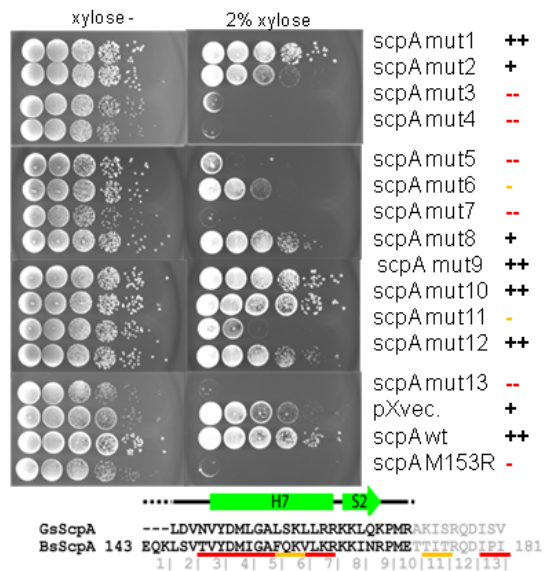


図3 ScpB 蛋白質との結合領域である H7 ヘリックス領域に変異をもつ *scpA* を発現させ、ドミナントネガティブな効果があらわれた。

立体構造上、ScpA の H7 ヘリックスに相当する領域は、ScpB の C 末端ドメインの結合に関与し、弱い結合能を示す部位である。ここが制御領域の一つであると考えられたため、3 アミノ酸ずつの Ala 変異導入し、ドミナントネガティブの表現形が見られるかどうかを調べた。特に ScpA の Met153 は結合に重要と考えられるため、Arg の様な性質の異なるアミノ酸を導入することによって、ドミナントネガティブ効果を期待した。この結果、Ala x3 変異によって、mut3~7、11 と 13 の領域でドミナントネガティブの表現型が見られた。

M153R 点変異体もドミナントネガティブの表現型を示したことから、ScpB の C 末端ドメインによるこの領域への結合阻害が増殖に重要であり、これが SMC 蛋白質の機能阻害を引き起こしていると解釈された。

(3) 制御サブユニットによる SMC サブユニットの ATP 加水分解活性への影響

SMC サブユニットの ATP 加水分解ドメイン単独では、その活性はほとんど無いが、ScpA の H7 ヘリックスに相当する領域を含む ScpA (144-251) の添加によって、明らかな活性の上昇が見られた。しかし、この領域を含

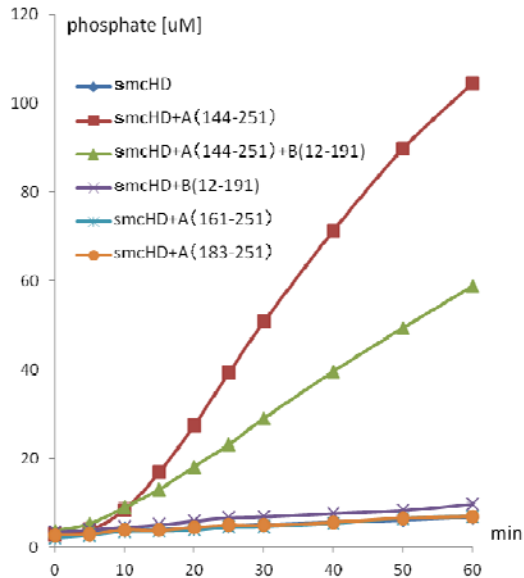


図4 制御サブユニットの添加による SMC サブユニットの ATP 加水分解活性への影響
smcHD, SMC 蛋白質の加水分解ドメイン; A, ScpA; B, ScpB.

まない欠失変異体は、その活性が全く見られなかった。この結果から、H7 ヘリックス付近のアミノ酸によって SMC の ATP 加水分解ドメインの活性を誘導していると考えられる。実際に、ScpB 蛋白質の添加によって、その活性の低下が見られることから、ScpB 蛋白質の C 末端ドメインの結合がその活性を抑制していると判断される。つまり、得られている制御サブユニットの立体構造は、抑制型であると解釈され、その加水分解を誘導するためには H7 ヘリックス周辺の構造変化が不可欠である。つまりバクテリアのコンデンシンの SMC サブユニットの二量体化制御機構とは、制御サブユニット複合体の内部構造変化によって誘導されるものと考えられる。

今後の展望として、ScpB がいかに ScpA の機能領域に構造変化を与えているかをより詳細に原子レベルで解明することにより、一連の構造変化を視覚化することを目指す。また、生化学的、構造的に重要性判断される制御サブユニットの領域を、分子遺伝学的手法

によって検証する。特に ScpA のドメイン間を結ぶ領域が重要であると予測されるため、この領域に集中的に変異を導入し、どのアミノ酸残基が重要であるかを特定する。

今後も、染色体の構築と分離に中心的な役割をもつ分子群を解析することで、高次の核酸基盤構造の階層性について理解することを目指している。しかし、これまで明らかになっている事象を DNA 基盤上で説明するためには、媒介する他の因子の存在、または、既存の因子の構造変化によって、SMC 蛋白質がリクルートされている可能性が高い。今後、このような候補因子を探索し、生化学的にその相互作用を検証することで、DNA 上で展開されている上部構造を突きとめたい。そして、原核生物を材料として、真核生物からでは解析が困難なコンデンシン複合体の構造階層性と分子機構を、異なった視点から明らかにし、より深い理解に繋がりたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[その他]

ホームページ

<http://www.riken.jp/chromdyna/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌田 勝彦 (KAMADA KATSUHIKO)

独立行政法人理化学研究所・平野染色体ダイナミクス研究室・専任研究員

研究者番号：70360526

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし