

論文の内容の要旨

論文題目 「Identification and characterization of *Staphylococcus aureus dnaD*, *dnaB* and *dnaI* temperature-sensitive mutants defective in chromosomal DNA replication」
(黄色ブドウ球菌の *dnaD*, *dnaB*, *dnaI* 温度感受性変異株の同定と解析)

氏名 李燕

細菌の DNA 複製の開始段階は、そのタイミングと同時性について厳密に制御されている。複製開始の同時性とは、細菌細胞内にある複数の複製起点から複製が同時に生じることである。複製の開始段階では複製フォークの適切な会合のために多くの蛋白が必要である。複製フォークの会合反応は、複製進行中のフォークが DNA 上の障害によって一時停止し、その後再開する時にも生じることが考えられている。

グラム陰性の大腸菌では複製開始直後の複製の再開を抑える機構として、DnaA 蛋白の制御的不活性化機構と、*oriC* の隔離の機構が知られる。しかしながら、これらの機構に関わる Hda、Dam、SeqA といった蛋白は、グラム陽性の黄色ブドウ球菌にそのホモログを有しない。また黄色ブドウ球菌は DNA ポリメラーゼ III の触媒サブユニットとして、DnaE と PolC という二つの蛋白を有するが、この点は大腸菌のそれとは異なっている。これらの知見は、黄色ブドウ球菌の複製の開始と伸長段階の調節機構は、これまで研究が進められてきた大腸菌とは異なっていることを示唆している。

DnaD、DnaB、及び DnaI 蛋白は、黄色ブドウ球菌を含む GC 含量の低いグラム陽性の細菌種に特異的に存在する。枯草菌における研究ではいずれも複製開始に必要とされる。生化学的には、枯草菌の複製の再開時の複製フォークの再構成に働く蛋白であると報告されている。しかしながら同じく複製フォークの再構成に関わる大腸菌の PriB や PriC と異なり、枯草菌の DnaD、DnaB、及び DnaI 蛋白は菌の増殖に必須であることから、両者には機能的相違があることが予想される。私は、グラム陽性菌の DNA 複製機構を明らかにすることを目的とし、*dnaD*、*dnaB*、及び *dnaI* 遺伝子の温度感受性変異株の分離と解析を行った。

1) *dnaD*, *dnaB*, 及び *dnaI* 遺伝子の温度感受性変異株の分離

黄色ブドウ球菌 RN4220 株を親株とし、変異剤であるエチルメタンサルホン酸処理により、約千株の温度感受性変異株を分離した。これらの株は 30℃では増殖するが、43℃では増殖できない。次に、黄色ブドウ球菌のゲノムを含むプラスミドライブラリーを用いて、温度感受性を相補するプラスミドを選択した。相補プラスミドには、変異株の温度感受性の原因となっている変異遺伝子の野生型遺伝子が挿入されており、これを決定することにより変異株の変異遺伝子を同定できることが期待される。その結果、二つの温度感受性変異株の温度感受性が *dnaD* 遺伝子によって、五つが *dnaB* 遺伝子によって、三つが *dnaI* 遺伝子

Table-1 Temperature-sensitivity phenotypes of the mutants were complemented by the corresponding wild type *dnaD*, *dnaB* or *dnaI* gene.

Strain	Plasmid			Mutational site
	Vector	p <i>SdnaD</i>	p <i>dnaB</i>	
Transformants ×10 ⁻⁴ (43°C / 30°C)				
<i>dnaD1726</i>	0.0 / 3.7	5.0 / 3.1		Gly56Ser
<i>dnaD2021</i>	0.0 / 1.9	4.8 / 2.7		Glu141Lys
<i>dnaB2203</i>	0.0 / 4.8		4.0 / 4.5	Ala90Thr
<i>dnaB2831</i>	0.0 / 4.6		4.6 / 3.9	Gly92Glu
<i>dnaB4374</i>	0.0 / 7.2		6.7 / 7.6	Pro38Leu
<i>dnaB8410</i>	0.0 / 1.0		1.1 / 1.7	Pro361Leu
<i>dnaB9803</i>	0.0 / 4.6		3.0 / 4.8	Pro311Ser
<i>dnaI6120</i>	0.0 / 1.2		1.1 / 1.2	Gly159Asp
<i>dnaI8651</i>	0.0 / 2.8		3.2 / 3.6	Gly228Val
<i>dnaI7302</i>	0.0 / 1.0		1.2 / 1.1	Gly228Glu

子によって相補されることが分かった (Table 1)。これらの変異株は全て一アミノ酸置換を導く変異を、それぞれの蛋白に有することが見出された (Table 1)。DnaD、DnaB、DnaI 蛋白は、DNA 複製に必要であるとされる。そこで変異株の DNA 合成、蛋白合成をそれぞれ [³H]thymidine、[³⁵S]methionine の酸不溶性画分への取り込みによって測定したところ、いずれの変異株においても DNA 合成が制限温度下で特異的に停止することが分かった (Fig. 1)。

それぞれの変異が温度感受性の原因であるかについてさらに検証するために、ファージを用いた形質導入実験を行った。その結果、いずれの温度感受性の表現形質も、対応する遺伝子の近傍に挿入した薬剤耐性マーカーとある一定の頻度で形質導入されたことから、同定したそれぞれの変

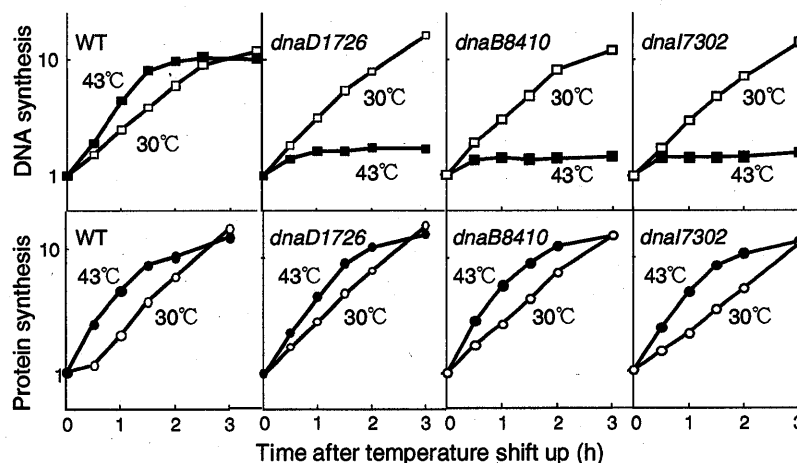


Fig. 1 The *dnaD*^{ts}, *dnaB*^{ts} and *dnaI*^{ts} mutants specifically exhibited DNA synthesis defects

異が温度感受性の原因であることが示唆された。従って、*dnaD*、*dnaB*、及び *dnaI* 遺伝子が黄色ブドウ球菌の DNA 複製に必須であることが示唆された。

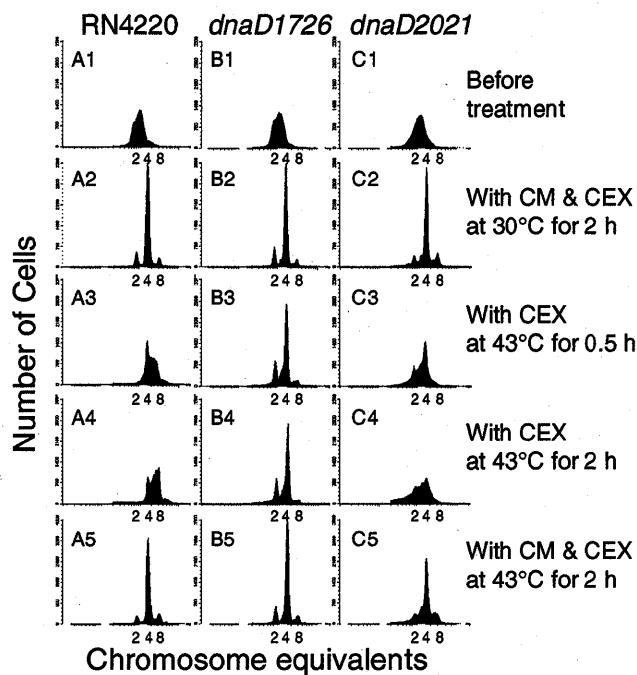
2) DnaD 蛋白は DNA 複製の開始段階、並びにその伸長段階の完了に必要である

dnaD の変異株において DNA 複製が開始段階で止まるのかを明らかにするために、染色体の複製起点と終結点の相対比 (ori/ter 比) をサザンプロット法によって同定した。変異株を 43°C で 2 時間培養すると、*dnaD1726* 株の ori/ter 比は 2.1 から 1.4 に減少した。後者の数値は野生株にクロラムフェニコール処理した際の数値、1.5 と同程度であったことから、*dnaD1726* 株は開始段階で DNA 複製を停止していることが示唆された。一方、*dnaD2021* 株の ori/ter 比は 2.9 から 3.4 と減少しなかったことから、*dnaD2021* 株では DNA 複製が伸長段階で停止していることが示唆された。*dnaD* 遺伝子が複製の伸長段階に必要であるとい

う知見は新規であったので、この点を確認するために細胞内の DNA 量をフローサイトメトリー法によって決定する実験を行った。*dnaD2021* 株に細胞分裂を阻害するセファレキシンを加え 43°C で 30 分培養した際には 2N と 4N の染色体の位置にピークが認められたが (Fig. 2、C3)、さらに 2 時間まで培養するとこのピークはシャープになるのではなく崩れてゆき、全体として幅広のピークを形成した (Fig. 2、C4)。このピークの崩壊は温度シフト時にタンパク質合成阻害剤であるクロラムフェ

ニコールを同時に添加することにより阻害された (Fig. 2、C5)。これらの結果は、菌液中のある細胞群は進行中の複製を終了するがその他の細胞群は終了できないこと、また染色体 DNA の分解が新規蛋白合成に依存して生じていることを示唆する。この知見は ori/ter 比の解析によるのそれと一致するものであった。

dnaD1726 株においては、細胞をセファレキシン処理し 43°C で 30 分あるいは 2 時間培養した際に、ともに明瞭な 2N、4N および小さな 8N のピークを示した (Fig. 2、B3 and B4)。



CEX(cephalexin) inhibits cell division by blocking septum formation. CM(chloramphenicol) inhibits replication initiation by inhibiting protein synthesis

Fig.2 Flow cytometric analysis of DNA contents in *dnaDts* mutants

このパターンはクロラムフェニコールとセファレキシンを処理し 30°Cで培養した細胞と同様であった (Fig. 2, B2)。この結果は ori/ter 比の結果と同様に、*dnaD1726* 株では開始段階で DNA 複製が停止していることを示唆する。従って、DnaD 蛋白は DNA 複製の開始段階だけでなく、複製の伸長段階の完了にも必要であることが示唆された。

枯草菌において DnaD 蛋白は、複製再開の複製フォークの再構成に必要とされることから、DnaD 蛋白が DNA 修復に必要であることを予想した。そこで私は *dnaD* 変異株が DNA 修復に欠損があるかを調べた。DNA に障害を与えるマイトマイシン C に対して、二つの *dnaD* 変異株は共に野生株よりも感受性を示した。また紫外線処理により、*dnaD2021* 株の生菌数は野生株に比べ顕著に減少した。またこれらの DNA 障害への感受性は *dnaD* 遺伝子を含むプラスミドによって相補された。この結果は、DnaD 蛋白が黄色ブドウ球菌において DNA の修復に必須であることを示唆している。

3) DnaB 蛋白は DNA 複製の開始、ならびにその同時性の調節に必要である。

五つの *dnaB* 変異株のシフト後 2 時間の ori/ter 比はいずれも 1.4 あるいは 1.5 と、複製が開始段階で停止するクロラムフェニコール処理菌の 1.5 と同様のレベルに低下した。フローサイトメトリー法による DNA 量の解析によっても、上記の *dnaD1726* 株と同様に、進行中の複製は完了し次の複製開始が生じていないことが示唆された。*dnaB2831* 株においては、2N、4N のピークの他に、3N のピークが認められた (Fig.3 A1)。この 3N のピークは細胞内の複製起点が同時に開始しない際に生じる形質である。従ってこれらの結果は、DnaB 蛋白が黄色ブドウ球菌の複製開始に必要であるだけでなく、その同時性の制御にも必要であることを示唆している。

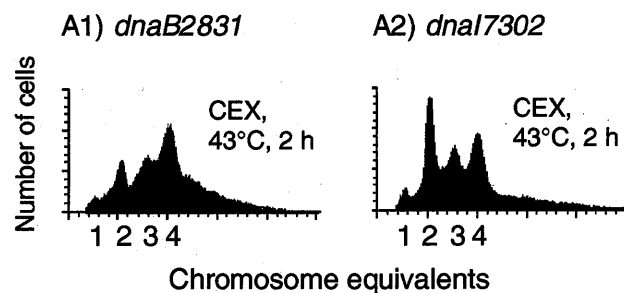


Fig. 3 FACS analysis of DNA pattern in *dnaB2831* and *dnaI7302* mutants.

4) DnaI 蛋白も DNA 複製の開始、ならびにその同時性の調節に必要である。

三つの *dnaI* 変異株の 43°C、2 時間培養後の ori/ter 比はいずれも 1.7 と、これも複製が開始段階で停止するクロラムフェニコール処理菌と同様のレベルに低下した。フローサイトメトリー法による DNA 量の解析によっても、上記の *dnaD1726* 株と同様に、進行中の複製は完了し次の複製開始が生じていないことが示唆された。複製開始の阻害時に *dnaI7302* 株においては、2N、4N のピークの他に、3N のピークが認められた (Fig.3 A2)。従ってこれら

の結果は、DnaI 蛋白が黄色ブドウ球菌の複製開始に必要なだけでなく、その同時性の制御にも必要であることを示唆している。

5) 考察

本研究において私は、黄色ブドウ球菌において DnaD、DnaB、および DnaI 蛋白が DNA 複製の開始段階に必要なことを明らかにした (Fig. 4, A)。dnaB, dnaI 変異株においては複製開始の同時性の欠損を明らかにした。これはグラム陽性細菌のプライモソーム蛋白がその制御に関わることを示す初めての結果である。DnaD 蛋白は染色体複製の伸長段階にも必須であった。この DnaD 蛋白の複製伸長段階への関与は、一時停止した複製フォークが PriA 依存に再開する過程に DnaD 蛋白が関与することによって説明できる (Fig. 4, B)。

この解釈は DnaD 蛋白が DNA 修復に必須である結果からも支持される。大腸菌においては

ヘリカーゼとヘリカーゼローダーの機能の厳密な制御が複製伸長段階に必要なとされることから、複製伸長段階におけるヘリカーゼとヘリカーゼローダーの活性の調節に DnaD 蛋白が機能することも考えられる (Fig. 4, C)。

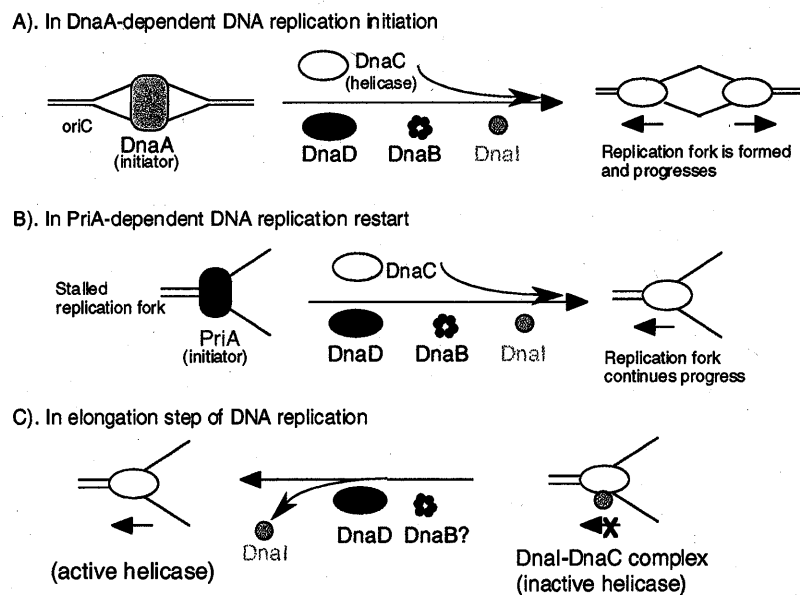


Fig. 4. Model for functional roles of *S. aureus* DnaD, DnaB and DnaI in DNA replication

参考文献:

- 1) Y. Li, K. Kurokawa, M. Matsuo, N. Fukuhara, K. Murakami and K. Sekimizu Identification of temperature-sensitive *dnaD* mutants of *Staphylococcus aureus* that are defective in chromosomal DNA replication. *Mol Gen Genomics* **271**: 447-457(2004)
- 2) M. Matsuo, K. Kurokawa, S. Nishida, Y. Li, H. Takimura, C. Kaito, N. Fukuhara, H. Maki, K. Miura, K. Murakami and K. Sekimizu. Isolation and mutation site determination of the temperature-sensitive *murB* mutants of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*. **222**(1):107-13 (2003)