

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18479

研究課題名(和文)複製開始を促進するDNA因子DARS2の適時的な活性化と局在制御の分子機構の解析

研究課題名(英文)Regulatory mechanism for timely DARS2 activation

研究代表者

加生 和寿 (KASHO, Kazutoshi)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：90726019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌において、適時的なDNA複製は開始蛋白質DnaAに対する多重の制御により達成されている。核様体蛋白質 IHFは複製開始点oriCやDNA因子datA、DARS2と結合することでDnaA活性と複製開始タイミングを制御する。代表者は、適時的なIHF結合制御機構について解析を進めた。まず、試験管内実験系を用いた探索によりIHF制御因子の候補を同定した。加えて、datA-IHF複合体形成制御におけるDNA超らせん構造の重要性と適時的な複製開始におけるDARS2位置の重要性を解明した (Kasho et al, 2016 Genes Cells; 2017 J Biol Chem.)。

研究成果の概要(英文)：Chromosomal DNA replication is rigidly regulated to initiate only once per cell cycle. In Escherichia coli, initiation regulation is sustained by multiple regulatory systems for the initiator DnaA and the unique replication origin oriC. A nucleoid protein IHF binds to oriC and other regulatory DNA factors datA and DARS2, and regulates DnaA activity and initiation timing. First, I found some candidates for IHF regulator through in vitro proteomic search. In addition, I revealed that DNA supercoiling plays a significant role in regulating datA-IHF binding and that chromosomal DARS2 position, in a central region between oriC and the termination site, is important for timely initiation (Kasho et al, 2016 Genes Cells.; 2017 J Biol Chem.).

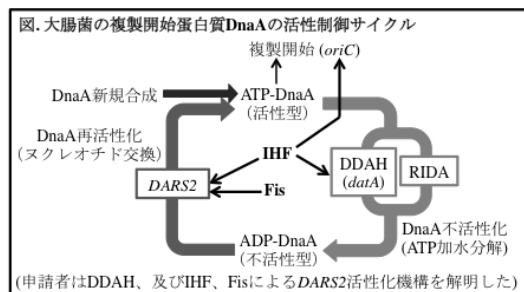
研究分野：分子生物学

キーワード：DNA複製 核様体蛋白質 IHF 細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

染色体 DNA が 1 細胞周期中 1 回だけ複製されることは普遍的に重要である。大腸菌の複製開始制御は、DnaA 蛋白質に対する複数の制御により達成されている (Katayama et al, 2010 Nat. Rev. Microbiol.; 他多数)。

まず、DNA 複製は ATP 結合型 DnaA (ATP-DnaA) と IHF が染色体の複製起点 oriC と複合体形成することで開始される (図)。細胞内 ATP-DnaA レベルは、複製開始時のみ一時的に上昇する。複製開始後、DNA ポリメラーゼ構成因子とその結合蛋白質 Hda の複合体により DnaA に結合した ATP が加水分解され、不活性型の ADP-DnaA が生じる (Katayama et al, 1998 Cell 他多数)。この DnaA 不活性化機構は RIDA (Regulatory inactivation of DnaA) と命名されている (図)。代表者は、RIDA と独立に、染色体の DnaA 結合部位 datA が IHF 依存的に DnaA に結合した ATP を加水分解することを解明した (図; Kasho and Katayama, 2013 Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.)。この第 2 の DnaA 不活性化機構 DDAH (datA-dependent DnaA-ATP hydrolysis) は、複製開始後の DnaA 不活性化において RIDA を補助する。



生じる ADP-DnaA は、次のサイクルの複製開始のために適時的に ATP-DnaA に変換される。これには、染色体の DnaA 結合部位 DARS2 (DnaA reactivating sequence 2) によるヌクレオチド交換が必要である (図; Fujimitsu et al, 2009 Genes Dev.)。代表者は、DARS2 活性化因子として IHF、及び Fis を同定した (Kasho et al, 2014 Nucleic Acids Res.)。加えて、DARS2 活性化には DNA 超らせん構造が必要だった (未発表データ)。さらに、DARS2-IHF 結合が起こる時期は ATP-DnaA が蓄積する時期と一致していた。従って、細胞周期に応じた DARS2-IHF 結合・解離の制御は適時的な ATP-DnaA の産生に重要と考えられる。また、染色体上で DARS2 は oriC 近傍 (約 1Mb 離れた位置) に存在する (図)。当研究室では、DARS2 領域を人為的に複製終結点 ter 近傍に移動させることで DARS2 機能が欠損することを見出している (申請時点では未発表)。細胞内で ter 領域は oriC 領域と共局在しないことから、DARS2 による適時的な複製開始促進には

oriC との共局在が重要である可能性が示唆された。

これらの成果を基に本研究では、DARS2 による複製開始タイミングの制御様式を解明する。DARS2 活性化の分子機構、及び細胞周期に応じた制御について解析を行う。

## 2. 研究の目的

大腸菌の DNA 複製は、細胞周期に応じて適時的に開始される。この複製開始タイミング制御には、特異的な非コード DNA 因子 DARS2 による開始蛋白質 DnaA の適時的な活性化が必要である。代表者は、DNA を湾曲させる蛋白質 IHF、及び Fis が DNA 超らせんという高次構造に依存して DARS2 機能を活性化することを解明した (Kasho et al, 2014 Nucleic Acids Res.)。さらに代表者は、細胞周期に応じた DARS2-IHF 複合体の結合・解離を見出している。しかしながら、そのメカニズムと制御様式は不明である。

本研究では、試験管内再構成系での変異体解析等により IHF、Fis による DARS2 活性化の詳細な分子機構を解明する。さらに、DARS2-IHF 複合体の解離因子の同定と解析、及び DARS2 の細胞内局在性の解析により適時的な複製開始の制御機構を解明する。

## 3. 研究の方法

計画 A. IHF、Fis による DARS2 活性化の分子機構の解明

27 年度の計画 について、まず DARS2 コア配列の DnaA 結合配列の親和性や距離を変化させた変異体、及び DnaA のヌクレオチド結合部位近傍の変異体解析により DARS2-DnaA 複合体の機能構造を解析する。加えて、DnaA 複合体と IHF、Fis との相互作用は架橋試薬を用いたプルダウン法により検証する

計画 B. DARS2 による適時的な DnaA 活性化機構の解明

第二に、現在までに代表者は、試験管内で簡便に IHF 解離を解析する系を構築している。本研究では、適時的な DARS2 活性化の制御機構を解明するために、プロテオミクス的手法を用いて DARS2-IHF 複合体の解離因子を網羅的に探索する。さらに並行して、細胞内での DARS2 過剰供給による増殖阻害の抑圧因子の中から IHF 解離因子を探索する。同定した IHF 解離因子について、試験管内解析により DARS2-IHF 複合体を特異的に解離させる分子機構を解明する。

28 年度の計画について、実験の進行状況を鑑みて平成 27 年度の研究計画を継続した。

#### 4. 研究成果

各研究計画について、下記の通り当初計画以上に進展があった。

##### 計画 A. IHF、Fis による DARS2 活性化の分子機構の解明

代表者は研究計画に沿って、DARS2 の DnaA 結合部位の変異体解析を進め、細胞内で複製開始が過剰に活性化される DARS2 変異体を単離した。加えて、ゲルシフト解析により DARS2 上での DnaA 複合体形成への影響が示唆された。これらの解析は、DARS2 上で形成される蛋白質高次複合体の解明に繋がる。

##### 計画 B. DARS2 による適時的な DnaA 活性化機構の解明

代表者は、簡便な DARS2-IHF 複合体解離の解析系を構築し、蛋白質粗抽出液から IHF 解離因子を探索した。現在までに、カラムクロマトグラフィーにより高い IHF 解離活性を持つ蛋白質画分を調製し、マスペクトル解析により候補因子の同定に成功した。

また、代表者は datA-IHF 複合体形成の制御に DNA 超らせん構造が重要である可能性を見出した。さらに代表者は、奈良先端科学技術大学院大学 大島 拓 助教（現；富山県立大学 准教授）との共同研究により細胞周期に応じた IHF 結合制御のゲノムワイド解析を試みた。その結果、複製開始時に広く IHF の結合動態が変化する事が示唆された（論文投稿準備中）。この結果は、DARS2 以外の DNA 領域を IHF 解離因子が認識する可能性を示唆している。

加えて、DARS2 の細胞内局在解析について、研究協力者の解析により染色体 DARS2 の位置を変化させた変異株で DARS2 による複製開始促進能が低下することが分かった。この結果は、DARS2 の局在制御が適時的な複製開始に重要であることを示唆している。

計画 B における DNA 超らせんによる datA-IHF 結合制御、及び DARS2 位置の重要性についての成果は学会、論文等で発表済みである (Inoue, Tanaka, Kasho (joint first authors) et al, 2016 *Genes Cells.*; Kasho et al, 2017 *J Biol Chem.*)。

#### 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）

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kasho, K., Tanaka, H., Sakai, R., and Katayama, T. Cooperative DnaA binding to the negatively supercoiled datA locus

stimulates DnaA-ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 2017; 292: 1251-1266. 査読あり. doi: 10.1074/jbc.M116.762815.

Inoue, Y., Tanaka, H., Kasho, K. (joint first authors), Fujimitsu, K., Oshima, T., and Katayama, T. Chromosomal location of the DnaA-reactivating sequence DARS2 is important to regulate timely initiation of DNA replication in *E. coli*. *Genes Cells.* 2016; 21(9): 1015-1023. 査読あり. doi: 10.1111/gtc.12395.

〔学会発表〕(計 5 件)

Kasho, K., Inoue, Y., Oshima, T., Fujimitsu, K., and Katayama, T. Regulation of timely replication initiation by a nucleoid protein IHF on DnaA activating and inactivating DNA elements, DARS2 and datA in *Escherichia coli*. 10th 3R symposium, Concurrent session I (口頭発表) and P-56 (ポスター発表)、2016 年 11 月 13-17 日、ホテル一畑（島根県松江市）

加生和寿、大島拓、片山勉、「核様体蛋白質 IHF と特異的な DNA 部位との複合体形成・解離による複製開始タイミング制御」、日本遺伝学会第 88 回大会、ワークショップ WS9-3、2016 年 9 月 7-10 日、日本大学国際関係学部三島駅北口校舎（静岡県三島市）

加生和寿、田中宏幸、酒井隆二、片山勉、「大腸菌染色体 datA 配列による複製開始蛋白質 DnaA 不活性化機構の DNA 超らせんに応じた制御の解析」、平成 28 年度日本生化学会九州支部例会、2016 年 5 月 14-15 日、鹿児島大学郡元キャンパス（鹿児島県鹿児島市）

加生和寿、田中宏幸、片山勉、「大腸菌染色体 datA 領域による複製開始蛋白質 DnaA の不活性化機構は DNA 超らせん構造依存的に制御される」、第 38 回日本分子生物学会年会 / 第 88 回日本生化学会大会 合同大会、3T25p-01 (口頭発表)、3P0645 (ポスター発表)、2015 年 12 月 1-4 日、神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）

加生和寿、村谷周悟、毛谷村賢司、片山勉、「大腸菌の複製起点における複製開始複合体の形成と複製タイミング調節因子の集合の動的な制御」、第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2015 年 10 月 19-21 日、T8、焼津グランドホテル（静岡県焼津市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://bunsei.phar.kyushu-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

加生 和寿 (KASHO Kazutoshi)  
九州大学大学院・薬学研究院・助教  
研究者番号：90726019

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

該当なし

### (4)研究協力者

真柳 浩太 (MAYANAGI Kota)  
九州大学・生体防御医学研究所 附属生体  
多階層システム研究センター・助教