

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 B
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19370077
 研究課題名（和文） 複製開始複合体の高次構造に基づく、複合体形成・DNA 開裂・解離の分子機構解明
 研究課題名（英文） High-order Structure-based Molecular Mechanisms in Replicational Initiation Complex Formation, DNA Unwinding, and Dissociation
 研究代表者
 片山 勉 (KATAYAMA TSUTOMU)
 九州大学・大学院薬学研究院・教授
 研究者番号：70264059

研究成果の概要：

本研究計画では、特に、高次蛋白質複合体の立体構造と特異機能との連関を基盤として、染色体複製開始の主要な分子機構を解明することを目指した。成果として、大腸菌の複製開始蛋白質 DnaA による複製開始複合体の高次構造を推定解析し、DNA 開裂のためキーとなる複製開始複合体の機能構造を同定した。および、DNA 開裂のメカニズムを開始複合体の機能構造と連関させて解明した。さらに、DNA 開裂後におこる、DnaB ヘリカーゼ装着開始機構を解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
20 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：DNA 複製開始、DnaA、細胞周期、蛋白質複合体、蛋白質機能構造解析、ATP、

1. 研究開始当初の背景

染色体 DNA の複製開始は、複製起点 DNA と特異的なタンパク質（開始タンパク質）とで形成される複合体（開始複合体）で起こる。開始複合体が活性化されると、複製起点の 2 重鎖 DNA を局所的に 1 本鎖化（DNA 開裂）する（開裂複合体）。ここに DNA ヘリカーゼや DNA ポリメラーゼなど、伸長反応に必要な因子が装着し、DNA 合成反応を進める。このとき、開始タンパク質は一時的に複製

起点 DNA から解離する可能性がある。

染色体複製開始の分子機構の解析が最も進んでいる種の 1 つである大腸菌においてさえ、いまだに複製開始複合体の高次構造や DNA 開裂の分子メカニズムは解明されていない。大腸菌では開始タンパク質 DnaA が複製起点 *oriC* DNA 上で多量体を形成することにより開始複合体となる。我々は構造情報とコンピュータシミュレーションを用いて、DnaA の複合体構造モデルを作成した。我々は、*oriC* 上

で多量体となった DnaA がリング（または螺旋）状複合体となり、そのポア内表面に新たな機能構造が形成されることを仮定したのである。その機能は 1 本鎖 DNA と相互作用し、複製開始反応を進めるキーとなるものと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、この独自の構造モデルや実験基盤を利用して、複製開始複合体の高次構造を解析し、DNA 開裂のためキーとなる複製開始複合体の機能構造を同定すること、および、DNA 開裂のメカニズムを開始複合体の機能構造と関連させて解明することを第 1 の目的とする。第 2 に、複製開始複合体形成のための DnaA-DnaA 相互作用部位を新たに同定し、機能メカニズムと関連させて、その意義を解明する。さらに、DNA 開裂後、生じた 1 本鎖 DNA 上への DnaB ヘリカーゼ装着機構と複製開始複合体の動態関係を解析する。

3. 研究の方法

(1) 開裂複合体の機能構造解析

ポア部位の推定と一部の変異体解析（複製開始能の検討）を終了している。よって、変異体の ATP/ADP 結合能、2 重鎖 DNA 結合能を解析する。これらに欠損がなければ、実際に複製起点 DNA 上で高次複合体を形成できるか否かをゲルシフト法とフットプリント法で解析する。さらに 1 本鎖 DNA 結合部位および DnaA 間相互作用部位の解析を進め、その結果に基づき、ATP-型 DnaA タンパク質複合体立体構造から DNA 開裂反応メカニズムをまとめる。

(2) DnaB 相互作用解析

DnaA N 末ドメインが DnaB 相互作用領域であるので、この領域の変異体を作成し、DnaB ヘリカーゼアッセイ、NMR 解析などを用いて検討する。複製開始複合体の形成メカニズムとあわせて検討する。

(3) ヘリカーゼローダー DnaC の機能解析

6 量体リングとなった DnaB の各プロトマーに DnaC が結合することがわかっている。また、DnaA と DnaC の中心ドメインには構造的相同性がある。そこで、DnaA の機能構造を参考にして、DnaC の ATP 結合/加水分解ドメインの変異体を多数作成する。機能欠損した DnaC 変異体を選出し、DnaB 相互作用能、ATP 相互作用能、DNA (2 重鎖および 1 本鎖) 相互作用能を解析する。

4. 研究成果

複製開始反応と 2 本鎖 DNA 開裂反応に特異的に必要とされるアミノ酸残基の同定し、DNA 開裂のメカニズムの新規モデルを提唱した (J. Biol. Chem., 2008)。その後さらに、複製開始複合体形成に必要な DnaA の機能アミノ酸残基を新たに数種同定し、DnaA 高次複合体の全体像の点から上記モデルを裏付けた。加えて、DnaA が多数集合する複製開始 DNA 領域の機能構造を新たに同定し、複製開始複合体の機能構造と複製開始 DNA 領域の機能構造との相関を明らかにした (日本遺伝学会ベストペーパー受賞)。

DnaA N 末ドメインの立体構造決定に基づき、DnaB ヘリカーゼ装着に必要な機能アミノ酸残基を同定し、DnaB ヘリカーゼ装着機構モデルを新たに提唱した (J. Biol. Chem., 2007 : JBC Paper of the Week 受賞)。その後、さらに別のアミノ酸残基も DnaB ヘリカーゼ装着に必要であることがわかった。これらを総合して、DnaB ヘリカーゼ装着部位の構造が判明し、提唱したモデルを裏付けた (論文投稿済み)。さらに、DnaC の機能構造解析も計画通り進め、重要な機能アミノ酸を同定した (学会発表済み)。これらにより、頭書の目的を十分達成することができた。

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 12 件)

- 1 Fujimitsu, K., Senriuchi, T., and Katayama, T.; Specific genomic sequences of *E. coli* promote replicational initiation by directly reactivating ADP-DnaA. *Genes Dev.* (2009) 23(10) (in press) 査読あり
- 2 Riber, L., Fujimitsu, K., Katayama, T., and Løbner-Olesen, A.; Loss of Hda activity stimulates replication initiation from I-box, but not R4 mutant origins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 71(1):107-22 (2009) 査読あり
- 3 片山 勉; 大腸菌の染色体複製開始制御機構, 蛋白質核酸酵素 3 月号増刊「染色体サイクル: ゲノムの恒常性維持、継承とダイナミクス」54 巻 4 号、343-349 頁 (2009) 査読なし
- 4 Ozaki, S., Kawakami, H., Nakamura, K., Fujikawa, N., Kagawa, W., Park, S.-Y., Yokoyama, S., Kurumizaka, H., and

- Katayama, T.; A common mechanism for the ATP-DnaA-dependent formation of open complexes at the replication origin, *J. Biol. Chem.* 283(13), 8351-8362 (2008) 査読あり
- 5 Fujimitsu, K., Su'etsugu, M., Yamaguchi, Y., Mazda, K., Fu, N., Kawakami, H., and Katayama, T. ; Modes of over-initiation, *dnaA* gene expression and the inhibition of cell division in a novel cold-sensitive *hda* mutant in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 190 (15), 5368-5381 (2008) 査読あり
 - 6 Su'etsugu, M., Nakamura, K., Keyamura, K., Kudo, Y., and Katayama, T. ; Hda monomerization by ADP binding promotes replicase clamp-mediated DnaA-ATP hydrolysis, *J. Biol. Chem.* 283 (54), 36118-36131 (2008) 査読あり
 - 7 Katayama, T. ; Roles for the AAA+ motifs of DnaA in the initiation of DNA replication, *Biochem. Soc. Trans.* 36(1), 78-82 (2008) 査読あり
 - 8 片山 勉 ; イニシエーターDnaA タンパク質による大腸菌染色体複製開始機構, *細胞工学*(10月号), 27巻10号, 974-979頁 (2008) 査読なし
 - 9 Keyamura, K., Fujikawa, N., Ishida, T., Ozaki, S., Su'etsugu, M., Fujimitsu, K., Kagawa, W., Yokoyama, S., Kurumizaka, H. and Katayama, T. ; The interaction of DiaA and DnaA regulates the replication cycle in *E. coli* by directly promoting ATP-DnaA-specific initiation complexes, *Genes Dev.* 21, 2083-2099 (2007) 査読あり
 - 10 Abe, Y., Jo, T., Matsuda, Y., Matsunaga, C., Katayama, T.*, and Ueda, T.* (*Co-corresponding authors) ; Structure and function of DnaA N-terminal domains: Specific sites and mechanisms in inter-DnaA interaction and in DnaB helicase loading on *oriC*, *J. Biol. Chem.* 282(24),17816-17827 (2007) 査読あり
 - 11 Abe, Y., Watanabe, N., Yoshida, Y., Ebata, F., Katayama, T., and Ueda, T. ; Assignment of ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonances of N-terminal domains of DnaA protein *Biomol. NMR Assign.* 1, 57-59 (2007) 査読あり
 - 12 片山 勉; 複製再開抑制の分子機構, *実験医学*, 25巻5号(増刊「染色体サイクル」), 49-55頁、(2007) 査読なし
- [学会発表] (計 42 件)
- 1 毛谷村賢司、片山 勉, 複製開始反応を適時的に制御する DiaA-DnaA 相互作用機構の解析, 遺伝研研究会「単細胞における複合システム系の連帯と統合」, 2009年3月23-24日, 三島
 - 2 片山 勉, 大腸菌染色体 DNA 複製のイニシエーターDnaA の構造と機能, 福岡歯科大学シンポジウム---環境とゲノムをつなぐ細胞機能, 2008年12月8日, 福岡
 - 3 Katayama, T., Mechanism and Regulation for the Initiation of Chromosomal DNA Replication in *Escherichia coli*: ATP-DnaA assembly and duplex unwinding., PUSAN-KYUSHU JOINT SYMPOSIUM, November 28, 2008, Fukuoka, Japan
 - 4 Su'etsugu, M., Nakamura, K., Keyamura, K., and Katayama, T., Functional regulation of Hda, a replicase clamp-binding protein that promotes the regulatory inactivation of DnaA in *E. coli*., 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 2008年12月9-12日, 神戸
 - 5 大山祐樹、藤光和之、千里内啓行、片山 勉, ADP型DnaAからのADP解離およびATP再結合を促す特異的DNA配列の促進因子の*in vitro*探索, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 2008年12月9-12日, 神戸
 - 6 篠崎沙織、波田野俊之、末次正幸、毛谷村賢司、尾崎省吾、仁木宏典、片山 勉, 大腸菌の複製開始複合体形成を促進するDnaA結合因子DiaAの細胞内局在性の解析, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 2008年12月9-12日, 神戸
 - 7 山野裕介、末次正幸、尾崎省吾、片山 勉, 大腸菌DNAヘリカーゼ装着因子DnaCの変異体解析, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 2008年12月9-12日, 神戸
 - 8 藍原竜夫、藤光和之、末次正幸、片山 勉, 大腸菌 *hda* 低温感受性変異株からの多コピー抑圧遺伝子の探索, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日

- 本生化学会大会合同大会, 2008 年 12 月 9-12 日, 神戸
- 9 中村賢太、末次正幸、片山 勉, 複製クランプに依存する制御的 DnaA 不活性化機構における DnaA-Hda 間相互作用メカニズムの解析, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008 年 12 月 9-12 日, 神戸
 - 10 付尼斯、松田雄作、中村賢太、尾崎省吾、片山 勉, 大腸菌の染色体分配における RisA の β クランプ結合の役割の解析, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008 年 12 月 9-12 日, 神戸
 - 11 Katayama, T., Mechanism and Regulation for ATP-DnaA Assembly and Duplex DNA Unwinding on the *E. coli* Chromosomal Origin *oriC*, 6th 3R (Replication, Recombination, Repair) Symposium, October 27-30, 2008, Kakegawa, Japan
 - 12 Fujimitsu, K., Su'etsugu, M., Yamaguchi, Y., Mazda, K., Fu, N., Kawakami H., and Katayama, T., Multiple copies of the ribonucleotide reductase genes repress overinitiation of chromosomal replication caused by a novel cold-sensitive *hda* mutant in *Escherichia coli*, 6th 3R (Replication, Recombination, Repair) Symposium, October 27-30, 2008, Kakegawa, Japan
 - 13 Ozaki, S., Nakamura, K. and Katayama, T., A common role of the DUE binding activity of DnaA for the initiation of chromosomal replication., 6th 3R (Replication, Recombination, Repair) Symposium, October 27-30, 2008, Kakegawa, Japan
 - 14 Katayama, T., Mechanisms of ATP-DnaA Assembly and Duplex DNA Unwinding for the Initiation of DNA Replication in Reconstituted Systems., The 17th RIKEN CDB Meeting "Towards Synthesis of Cells", October 14-15, 2008, Kobe, Japan
 - 15 Katayama, T., Brief Introduction to Reconstituted systems of the *E. coli* Minichromosomal Replication and the Regulation of Replicational Initiation., The 1st Annual Meeting of the Japanese Society for Cell Synthesis Research, October 16-17, 2008, Osaka, Japan,
 - 16 片山 勉, 1 回性複製の制御に必要な Hda タンパク質の機能解析, 2008 年度「染色体サイクル」領域会議, 2008 年 9 月 24-26 日, 御殿場
 - 17 尾崎省吾、片山 勉, DnaA による 2 重鎖開裂における複製起点の最小機能構造, 第 80 回日本遺伝学会大会, 2008 年 9 月 3-5 日, 名古屋
 - 18 篠崎沙織、波田野俊之、尾崎省吾、仁木宏典、片山 勉, 大腸菌染色体の複製開始促進因子 DiaA の細胞内局在性解析, 第 80 回日本遺伝学会大会, 2008 年 9 月 3-5 日, 名古屋
 - 19 山野裕介、末次正幸、尾崎省吾、片山 勉, 大腸菌 DNA ヘリカーゼ装着因子 DnaC における高度保存性アミノ酸残基の機能解析, 第 5 回 21 世紀大腸菌研究会, 2008 年 7 月 28 日-29 日, 藤枝
 - 20 林靖久、尾崎省吾、片山 勉, ATP 型 DnaA 間相互作用に關与するアミノ酸残基の同定, 第 5 回 21 世紀大腸菌研究会, 2008 年 7 月 28 日-29 日, 藤枝
 - 21 Katayama, K., Ozaki, S., Keyamura, K., Kawakami, H., Fujikawa, N., Kagawa, W., Nakamura, K., Kazuyuki Fujimitsu, Su'etsugu, M., Yokoyama, S., and Kurumizaka, H., Analysis on Mechanisms of ATP-DnaA Assembly on *oriC* and Duplex Unwinding., EMBO Workshop on Replication & Segregation of Chromosomes, June 16-20, 2008 (Geilo, Norway)
 - 22 Keyamura, K., Fujikawa, N., Ishida, T., Ozaki, S., Su'etsugu, M., Fujimitsu, K., Kagawa, W., Yokoyama, S., Kurumizaka, H., Katayama, T., DiaA promotes the unwinding of *oriC* by directly

- stimulating the formation of ATP-DnaA-oriC complexes in *E. coli.*, EMBO Workshop on Replication & Segregation of Chromosomes, June 16-20, 2008 (Geilo, Norway)
- 23 Fujimitsu, K., Senriuchi, T., and Katayama, T., Specific *E. coli* chromosomal regions can reactivate replication initiation activity of DnaA by exchanging bound nucleotide from ADP to ATP *in vitro.*, EMBO Workshop on Replication & Segregation of Chromosomes, June 16-20, 2008 (Geilo, Norway)
- 24 片山 勉, 尾崎省吾, 川上広宣, 中村賢太, 藤川乃り映, 香川 亘, 横山茂之, 胡桃坂仁志, DnaA による複製開始複合体の形成と 2 重鎖開裂機構モデル, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 ワークショップ「複製開始複合体形成のダイナミクスと分子制御」, 2007 年 12 月, 横浜
- 25 松田健作, 山口陽子, 藤光和之, 片山 勉, 大腸菌における染色体複製開始の抑制因子 *hda* の低温感受性株の解析と抑圧変異遺伝子の探索, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 2007 年 12 月, 横浜
- 26 木吉壯太, 川上広宣, 片山 勉, 大腸菌スライディングクランプの新たな蛋白質相互作用部位の探索とその意義の解析, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 2007 年 12 月, 横浜
- 27 付 尼斯, 川上広宣, 末次正幸, 藤光和之, 片山 勉, *dinG* 遺伝子の多コピー化による大腸菌 *dnaAcos* 変異株の低温感受性の抑圧, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 2007 年 12 月, 横浜
- 28 森田泰江, 石田琢磨, 片山 勉, 大腸菌の複製開始制御因子の探索:*diaA* オペロンの機能未知 ORF の解析, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 2007 年 12 月, 横浜
- 29 毛谷村賢司, 藤川乃り映, 石田琢磨, 尾崎省吾, 末次正幸, 藤光和之, 香川亘, 横山茂之, 胡桃坂仁志, 片山 勉, 大腸菌染色体の複製開始促進因子 DiaA は ATP-DnaA 特異的な開裂複合体形成を促進する, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 2007 年 12 月, 横浜
- 30 藤川乃り映, 香川 亘, 胡桃坂仁志, 石田琢磨, 尾崎省吾, 末次正幸, 藤光和之, 片山 勉, 横山茂之, 大腸菌染色体の複製開始制御因子 DiaA の立体構造解析, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 2007 年 12 月, 横浜
- 31 Ozaki, S., Kawakami, H., Nakamura, K., Fujikawa, N., Kagawa, W., Yokoyama, S., Kurumizaka, H., and Katayama, T., Role for specific residues of DnaA AAA+ domain in duplex DNA unwinding during the initiation of chromosomal replication., The Seventh International Meeting on AAA Proteins, September 9-13, 2007 (Royal Agricultural College, Cirencester, England)
- 32 Katayama, T., Ozaki, S., Kawakami, H., Nakamura, K., Keyamura, K., Fujikawa, N., Kagawa, W., Yokoyama, S., and Kurumizaka, H., Biochemical analysis of DnaA AAA+ domain on the ATP-dependent regulation for the initiation of chromosomal replication., The Seventh International Meeting on AAA Proteins, September 9-13, 2007 (Royal Agricultural College, Cirencester, England) (招待講演)
- 33 山口陽子, 末次正幸, 藤光和之, 片山 勉, 大腸菌染色体の複製開始制御遺伝子 *hda* の低温感受性変異株の解析, 第 4 回薬学研究院若手研究者セミナー, 2007 年 9 月 4 日, 九州大学
- 34 毛谷村賢司, 石田琢磨, 尾崎省吾, 末次正幸, 藤光和之, 片山 勉, 大腸菌の染色体複製開始反応の適時的活性

- 化を制御する分子機構, 第 19 回微生物シンポジウム「微生物科学の発展と感染症対策」, 2007 年 9 月 7 日～8 日, 東京大学
- 35 片山 勉、毛谷村賢司、藤川乃り映、石田琢磨、尾崎省吾、末次正幸、藤光和之、香川 亘、横山茂之、胡桃坂仁志, DnaA 結合因子 DiaA 蛋白質による複製開始の制御機構, 日本遺伝学会第 79 回大会ミニシンポジウム「染色体の複製機構とゲノム安定性」, 2007 年 9 月, 岡山
- 36 尾崎省吾、川上広宣、中村賢太、藤川乃り映、香川 亘、横山茂之、胡桃坂仁志、片山 勉, 染色体複製開始点の 2 重鎖 DNA 開裂を制御する DnaA 新奇機能構造の解析, 日本遺伝学会第 79 回大会, 2007 年 9 月, 岡山
- 37 中村賢太、末次正幸、片山 勉, 大腸菌の染色体複製開始抑制因子 Hda の転写単位及び遺伝子発現機構, 日本遺伝学会第 79 回大会, 2007 年 9 月, 岡山
- 38 古郡麻子、片山 勉、真木寿治, 大腸菌 *in vitro* DNA 複製系を用いた DNA ポリメラーゼスイッチの解析: Pol VI による Pol III 制御機構, 日本遺伝学会第 79 回大会, 2007 年 9 月, 岡山
- 39 松田雄作、片山 勉, 新規クランプ結合因子 RisA の機能解析 = RisA- β クランプ相互作用の染色体分配における役割 =, 第 4 回 21 世紀大腸菌研究会, 2007 年 7 月 17～18 日, 藤枝市
- 40 藤光和之、千里内啓行、片山 勉, 複製開始蛋白質 DnaA を再活性化する 2 種類の機能性 DNA 部位は異なる制御様式をもつ, 第 4 回 21 世紀大腸菌研究会, 2007 年 7 月 17～18 日, 藤枝市
- 41 末次正幸、藤光和之、片山 勉, 細胞周期進行と共役した大腸菌複製開始蛋白質 DnaA の活性制御機構, 特定領域「バイオ操作」若手研究者第 2 回ワークショップ, 2007 年 7 月 20 日, 東京都小金井市
- 42 片山 勉, 新たな DnaA N 末ドメインの機能構造、および、DnaA 結合因子 DiaA の機能メカニズムについて, 第 3 回「染色体サイクル」領域会議, 2007 年 5 月 21～23 日, 加賀山代温泉
- [図書] (計 1 件)
- ①毛谷村賢司、尾崎省吾、片山 勉 (朝倉書店) タンパク質実験マニュアル (2006) 7-14 頁、
- [その他]
ホームページ等
<http://210.233.60.66/~bunsei/>
(九州大学 大学院薬学研究院 分子生物薬学分野)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
片山 勉 (KATAYAMA TSUTOMU)
九州大学 大学院薬学研究院 教授
研究者番号: 70269059
- (2) 研究分担者
植田 正 (UEDA TADASHI)
九州大学 大学院薬学研究院 教授
研究者番号: 90184928
阿部 義人 (ABE YOSHITO)
九州大学 大学院薬学研究院 准教授
研究者番号: 60315091
- (3) 連携研究者
該当なし