

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間： 2007 ~ 2009

課題番号：19770150

研究課題名 (和文)

染色体複製開始を促進する機能性 DNA 配列とその活性化因子の探索及び解析

研究課題名 (英文)

Identification of activators for a functional DNA sequence that promotes replication initiation.

研究代表者

藤光 和之 (FUJIMITSU KAZUYUKI)

九州大学・大学院薬学研究院・特任助教

研究者番号：90448431

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、複製開始タイミングを制御するメカニズムの解明するため、大腸菌の複製開始蛋白質 DnaA を活性化する特異的な DNA 領域に注目した。既に、我々の解析結果から、複製開始タイミングを制御する因子として、この DNA 領域の活性を促進する因子の存在が示唆されていた。そこで、この DNA 領域の促進因子を探索した結果、2 つの DNA 結合蛋白質が同時に機能している事を見出した。

研究成果の概要 (英文)：

To study the mechanism for regulation of the initiation of DNA replication, I focused on a specific DNA segment that activates the initiator of *E. coli* chromosomal replication, DnaA. Our recent results suggested the presence of a soluble factor that can promote the activity of the DNA segment. Here, we reveal that two DNA binding proteins simultaneously function to stimulate the DNA segment in vitro and in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	540,000	3,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：核酸、遺伝子、ゲノム DNA 複製、蛋白質、活性制御、機能性 DNA

1. 研究開始当初の背景

細胞が増殖する過程で、遺伝情報の担い手であるゲノム DNA の複製は必須のステップである。ゲノム DNA 複製は、細胞周期の適切な時期に一度だけ起こり、その頻度は主に開始段階で制御されている。

大腸菌のゲノム複製反応の第一ステップは、DnaA が複製開始点 (*oriC*) の DNA 二重鎖を局所的に一本鎖化することである。DnaA の複製開始活性は、ヌクレオチド結合によって調節されており、ATP 結合型が活性型で、ADP 結合型は不活性型である。通常、

細胞内の ATP 結合型の割合は低く抑えられているが、複製開始期で一過的に上昇する。故に、適時的に染色体複製を開始するには、DnaA の活性制御が重要であると考えられる。既に、DnaA に結合している ATP は、スライディングクランプ(DNA ポリメラーゼ III の構成因子)と Hda の両者に依存して、複製開始後速やかに加水分解されると分かっている。この DNA 複製と共役した DnaA 不活性化経路は、RIDA(Regulatory inactivation of DnaA)と呼ばれ、詳細な解析が行われている(Katayama et al 1998 *Cell*; Su'etsugu et al 2005 *J. Biol. Chem.*; Fujimitsu et al 2008 *J Bacteriol*)。

一方、複製開始時に ATP 結合型 DnaA を供給する経路に関しては、ADP 結合型を ATP 結合型へ再変換する経路の存在が示唆されているものの、その詳細は明らかになっていなかった。そこで我々は、まず *in vitro* 系で新規 DnaA 再活性化因子を探索し、プラスミドの特異的な DNA 配列が ADP-DnaA を再活性化することを見出していた(Fujimitsu 2004 *Biochem Biophys Res Commun*)。この DNA 配列は、ATP 存在下 DnaA に結合した ADP の解離を促進する事で、ATP の再結合を促し、ATP 型 DnaA を産生させる。このような DnaA 再活性化能をもつ DNA 配列を DARS(DnaA-Reactivating Sequence)と名付けている。さらに、大腸菌のゲノム配列からプラスミド DARS と相同性の高い配列を検索した結果、新たに 2 つの DARS(DARS1, DARS2)を見出した(Fujimitsu et al 2009 *Genes & Development*)。興味深いことに、DARS2 は、プラスミド DARS や DARS1 と異なり、大腸菌の蛋白粗画分存在下でのみ、高い DnaA 再活性化能を有していた。そのため、蛋白粗画分中には DARS2 を促進する因子(DSF, DARS2-Stimulating Factor)の存在が考えられた。また、DARS1/2 の解析を進めた結果、DARS1/2 二重欠失変異株は、複製開始活性が著しく低下しているものの、増殖可能であった。そのため、DARS1/2 とは独立した DnaA 再活性化経路が存在する可能性が考えられた。

2 . 研究の目的

本研究の目的は、DARS による DnaA 再活性化を介した複製開始促進メカニズムを解明

することである。そこで、申請者は、以下の 2 項目を指針に、DnaA 再活性化による複製開始制御の解析に着手する。

(1) DSF の単離、同定及び機能解析

DSF による DARS2 活性の促進は、複製開始タイミングの決定に大きく寄与している可能性がある。そこで、DSF を単離、同定し、同定された DSF の機能解析を行う。

(2)DSF 存在下で DnaA 再活性化能を持つ染色体領域の網羅的探索

DARS1/2 の二重欠失変異株は増殖可能であることから、DARS1/2 とは独立した DnaA 再活性化経路の存在が考えられる。そこで、大腸菌ゲノム上から新たな DARS の単離を試みる。

3 . 研究の方法

(1) DSF の単離、同定及び機能解析

DSF 単離、同定

DSF は直接 DARS2 に結合することで機能している可能性が考えられた。そこで、以下の 2 の方法を採用した。また、DAF が直接 DARS2 に結合しない場合も考慮し、以下の方法も並行して進めた。

ブルダウン法で蛋白粗画分から DARS2 と特異的に相互作用する因子を単離する。

DSF を含む蛋白粗画分 (Fujimitsu et al 2009 *Genes & Development*)から、ピオチン化された DARS2 とアビジンビーズを用い、DARS2 と特異的に相互作用する因子を単離した。得られた候補因子は MALDI-ToF/PMF 法を用いて同定した。

DARS2 内の配列を認識しうる蛋白質の探索

既知の DNA 結合蛋白質の中から、DARS2 内の配列を認識しうる蛋白質を探索した。より効果的に因子を探索するために、まず DARS2 領域の部分欠失解析によって DARS2 の機能領域を限定した。次に、機能領域内の DNA 配列を認識しうる蛋白質を検索し、得られた候補因子の DARS2 促進活性を検討した。

カラムクロマトグラフィーによる DSF の精製

DSF を含む蛋白粗画分からカラムクロマトグラフィーを用いて、DSF の単離を試みた。その際、ADP-DnaA から ADP を解離させる活性を精製の指標とした。得られた候補因子を MALDI-Tof/PMF 法を用いて同定した。

で得られた候補因子の DARS2 促進活性を検討するために、候補因子の大量発現株の構築並びに精製を行い、得られた精製蛋白質が DARS2 促進活性を有するか検討した。欠失可能な遺伝子の場合は、その欠失株から粗画分を調製し、DARS2 促進活性を測定した。

(2) DSF 存在下で DnaA 再活性化能を持つ染色体領域の網羅的探索

新たな DARS を探索するために、ほぼ大腸菌ゲノムを網羅している小原 DNA ライブラリーを用いるスクリーニングを計画した。このライブラリーは、ファージ上に大腸菌のゲノム配列断片がクローン化されており約 400 クローンからなる。それぞれのファージ DNA を精製し、*in vitro* で DnaA 再活性化能を測定した。まず、蛋白粗画分非存在下で DnaA 再活性化能を持つ領域を探索したが、DARS1 以外に顕著な DnaA 再活性化能を持つ領域はなかった。さらに、蛋白粗画分存在下で DnaA 再活性化能を持つ領域を探索するため、DARS2 領域を含むクローンを用いて条件検討を行った。しかしながら、このクローンを用いた場合、蛋白粗画分による DARS2 活性の促進はみられなかった。問題点として、DARS2 以外のクローン化された領域、もしくはファージ由来の領域が、DSF の活性を阻害している可能性が考えられる。今後、上記(1)の実験で同定された DSF の精製蛋白質を用いた再構成系で、スクリーニングするための条件を検討する予定である。

4. 研究成果

(1) DSF の単離、同定及び機能解析

本研究では、DSF を単離同定するために、3 つの異なるアプローチを行った[本報告書(3. 研究方法)の項]。その結果、の方法で DSF

の同定に成功した。そのため、以下のに詳細な DSF 解析結果を記し、に関しては進行状況を記している。

ブルダウン法で蛋白粗画分から DARS2 と特異的に相互作用する因子を単離する

ビオチン化された DARS2 とアビジンビーズを用いたブルダウン法で、蛋白粗画分から DARS2 と特異的に相互作用する因子を複数単離、同定した。まず、それらの因子の中で最も特異的に結合した因子について解析を進めた。しかしながら、この因子は DARS2 促進活性を有していなかった。現在は、この因子が DARS2 の阻害因子として機能する可能性を検討している。

DARS2 内の配列を認識しうる蛋白質の探索

まず、DARS2 の部分欠失解析で、DARS2 内の機能領域を限定した。次に、得られた結果に基づいて DNA 結合蛋白質を検索し、2 種類の DNA 結合蛋白質を候補因子として見出した。さらに、これらの候補因子に関して *in vitro* で DARS2 促進活性を検討した。それぞれの破壊株から調製した蛋白粗画分は DARS2 促進活性を失っていた。これら破壊株粗蛋白画分の DARS2 促進活性は、精製蛋白質によって相補された。また、各精製蛋白質のみでは DARS2 促進活性はなく、両者を添加する事によって、粗画分存在下と同程度の DARS2 活性を示した。以上の結果は、得られた 2 つの因子が協同して DARS2 を促進する事を強く示唆している。さらに、*in vivo* の解析を進めると、これらの各破壊株では実際に複製開始活性が低下していることがわかった。また、染色体の DARS2 内の DSF 結合領域に変異を導入すると、複製開始活性が低下した。以上の結果から、これら 2 つの因子が DSF であると判断した。現在、これら DSF の発現や DARS2 への結合が、細胞周期に応じて制御されているか検討している。また、DSF の 1 つは、増殖層に応じて発現量が変化する事が報告されている。DARS2 の活性も同様に制御されている可能性が考えられる事から、DARS2 が環境に応じた複製開始調節機構に関与するか検討する予定である。現在、以上の結果を含む論文を投稿準備中である。

カラムクロマトグラフィーによる DSF の

精製

2種類のカラムクロマトグラフィーを用いる事で、DARS2 促進活性が蛋白粗画分の約 8 倍まで上昇した蛋白画分が得られた。さらに、この DSF 濃縮画分から DSF の精製を試みたが、比活性が上昇する条件は見つけられなかった。そのため、この段階で DARS2 促進活性と SDS-PAGE の挙動が一致しているバンドを Mass 解析で同定し、DARS2 促進活性をもつか検討した。しかしながら、同定された蛋白質は、上述の DSF とは異なる蛋白質で、DARS2 促進活性を持っていなかった。DARS2 促進には少なくとも2つの因子が必要である事から、カラムクロマトグラフィーを用いる方法では、最適な条件を得る事が難しかったのかもしれない。

(2) DSF 存在下で DnaA 再活性化能を持つ染色体領域の網羅的探索

本報告書(3.研究方法)の項で述べたように、小原 DNA ライブラリー上の DARS2 の活性は、蛋白粗画分で DSF を供給しても促進されなかった。現在は、同定された DSF の精製蛋白質を用いるスクリーニング系の構築を試みている。

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)

[雑誌論文](計5件)

(1) Katayama, T., Ozaki, S., Keyamura, K. and Fujimitsu, K.

Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and *oriC*

Nature Reviews Microbiology, 査読有、8 巻、2010、163-170

(2) Fujimitsu, K., Senriuchi, T. and Katayama T.

Specific genomic sequences of *E. coli* promote replicational initiation by directly reactivating ADP-DnaA

Genes & Development, 査読有、23 巻、2009、1221-1233

(3) 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, 査読有、71 巻、2008、107-122

(4) Fujimitsu, K., Su'etsugu, M., Yamaguchi, Y., Mazda, K., Fu, N., Kawakami, H. and Katayama, T.

Modes of overinitiation, *dnaA* gene expression, and inhibition of cell division in a novel cold-sensitive *hda* mutant of *Escherichia coli*

J Bacteriol, 査読有、190 巻、2008、5368-5381

(5) 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 & Development*, 査読有、21 巻、2007、2083-2099

[学会発表](計5件)

(1) 藤光和之 他1名、
大腸菌染色体複製イニシエーターDnaA は特異的な DNA 配列上で高次複合体を形成し活性化される、
第 82 回 生化学会大会、
2009 年 10 月 24 日、兵庫県神戸市

(2) Fujimitsu, K. 他6名、
Multiple copies of the ribonucleotide reductase genes repress overinitiation of chromosomal replication caused by a novel cold-sensitive *hda* mutant in *Escherichia coli*,
3R Symposium 2008、
2008 年 10 月 27 日、静岡県掛川市

(3) Fujimitsu, K. 他2名、
Specific *E. coli* chromosomal regions can reactivate replication initiation activity of DnaA by exchanging bound nucleotide from ADP to ATP *in vitro*,

EMBO workshop (Replication & Segregation
of Chromosomes)、
2008年6月16日、ノルウェー王国ヤイロ

(4) Fujimitsu, K. 他2名、
Specific *E. coli* chromosomal regions can
promote exchanging of DnaA-bound
nucleotide from ADP to ATP、
Keystone symposia(DNA replication and
recombination)、
2008年2月11日、アメリカ合衆国ニューメキ
シコ州サンタフェ

(5) 藤光和之 他2名、
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日、静岡県藤枝市

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤光 和之 (FUJIMITSU KAZUYUKI)
九州大学・大学院薬学研究院・特任助教
研究者番号：90448431