

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23729

研究課題名(和文)大腸菌の染色体複製開始における複製ヘリカーゼの定方向性装着メカニズムの解明

研究課題名(英文)Dynamic mechanisms of the replicative helicase loading in the E. coli chromosomal replication origin oriC

研究代表者

永田 麻梨子(Nagata, Mariko)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：60843787

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文):大腸菌の染色体複製機構において、複製起点oriCへの複製ヘリカーゼの装着が複製開始の最終制御点となる。oriC上で形成される複製開始複合体は、左側半分と右側半分で形成される2つの部分複合体に大きく分けられる。代表者は、右側の部分複合体に着目し、複製ヘリカーゼ装着における役割について解析を進めた。試験管内再構成系を用いた研究により、この部分複合体によって、複製ヘリカーゼの装着が促進され、この過程でoriCとその周辺のDNA構造の変化も促進されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞性生物にとって、染色体複製は遺伝情報継承のために必須である。染色体複製を開始するためには、複製ヘリカーゼが正しい方向に導入される必要がある。その分子機構には生物種間で多様性がある可能性もあるが、複製ヘリカーゼ装着機構の解明は、種間の違いの意味を理解する事実の発見だけでなく、生物共通の原理および原則の発見にも繋がる。モデル生物として用いる大腸菌は、生物学的知見の蓄積が大きい生物であり、染色体複製開始機構の研究が最も進んでいる生物の一つでもある。さらに病原性細菌種は大腸菌と進化的に近縁なものも多く、本研究から明らかになった分子機構は、新規制御因子を標的とした新規抗菌剤開発にも発展しうる。

研究成果の概要(英文): In all three domains of life, chromosomal DNA carries their genetic information. Therefore, understanding of mechanisms of its replication is important. The initiation of bacterial DNA replication requires unwinding of the double helix at a replication origin sequence, which is sustained by higher-order nucleoprotein complexes constructed on the origin. Loading of the replicative helicase on the unwound DNA functions as a platform for formation of sister replisomes, leading to bidirectional chromosomal replication. To clarify the mechanism of the replicative helicase loading, we investigated the roles of the nucleoprotein complex constructed on the right half of oriC. We found that construction of the complex stimulates the helicase loading.

研究分野：分子生物学

キーワード：染色体複製 大腸菌

### 1. 研究開始当初の背景

染色体 DNA の両方向複製のために、2 分子の複製ヘリカーゼが複製起点上で適切な配置をとるという原理は、おそらく細胞性生物で共通だと考えられるが、複製起点への複製ヘリカーゼ装着の分子機構は不明な点が多い。大腸菌においても、複製ヘリカーゼである DnaB が染色体複製起点 *oriC* へどのような制御により装着するのか明らかではない。

大腸菌 *oriC* は、複製開始タンパク質 DnaA の結合配列のクラスター領域(DOR)と、二重鎖 DNA 開裂領域(DUE)とで構成される。DOR は DnaA box の配置に依存して左、右、中央に分けられ、左側 DOR には DNA 屈曲因子 IHF が結合する(図 1)。

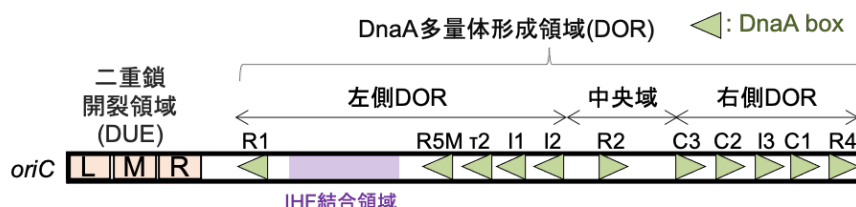


図1. 大腸菌の染色体複製起点*oriC*の構造

左右それぞれの DOR では DnaA が五量体となるサブ複合体が形成される。DnaA 複合体形成・IHF 結合による DNA の歪みにより、DUE の一部が開裂(一本鎖化)する(図 2)。2 分子の DnaB が装着するためには、DUE はさらに一本鎖化する必要がある。しかし、DnaB の装着時に一本鎖化領域を拡張させている分子機構は明らかではない。

左側の DnaA 複合体は IHF による DNA 屈曲と協調して DUE を開裂し、生じた一本鎖 DNA と結合する。そして、DnaA 複合体との相互作用を介して、複製ヘリカーゼ DnaB が一本鎖 DNA へ装着されることで複製が開始する。右側 DnaA 複合体がなくても DnaB 装着は可能だが、その効率は半減する。

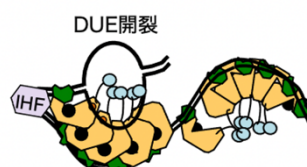


図2. DnaA複合体形成・IHF結合によるDNAの歪みにより、DUEが開裂(一本鎖化)する

### 2. 研究の目的

一本鎖 DNA への DnaB 装着機構はどのように制御されているのだろうか。本研究では、DnaB 装着時の右側半分複製開始複合体の構造変化に注目し、*oriC* における一本鎖領域および DnaB 装着部位を調べることで、ヘリカーゼ装着にかかる DnaB と複製開始複合体との相互作用機構の同定を試みた。

### 3. 研究の方法

DnaA 上的一本鎖 DNA 結合部位や DnaB 結合部位の変異、およびそれらとキメラ DnaA を組み合わせて用いた *in vitro* 複製再構成系に プルダウンアッセイや KMnO<sub>4</sub> フットプリント法を適用して、DnaB 装着に関わる分子機構を解析した。キメラ DnaA は大腸菌 DnaA の DNA 結合ドメインを、異なる配列に結合する高度好熱菌 DnaA ホモログのものに組換えたものである。これを、特定の DnaA 結合配列を高度好熱菌 DnaA 特有の結合配列と置換した変異 *oriC* と組み合わせることにより、DnaA 多量体中の特定の DnaA 分子の解析が可能となる。

また、DnaB ヘリカーゼローダーである DnaC の一本鎖 DNA 結合能を用いて、DnaC 側から DUE へ接触しながら DnaB を装着させる可能性がある。DNA 結合能を欠失した DnaC 変異体などを用いることで、DnaB 装着時の DnaC の DUE との結合や結合の配列特異性を解析した。

### 4. 研究成果

DnaB 装着のために一本鎖領域を拡張するには、右側 DnaA 複合体と DnaB との相互作用、または、右側 DnaA 複合体と一本鎖 DNA との相互作用、あるいは、いずれか片方の DnaB の DNA への装着、これらに関与していると仮定し、検証した。まず、DOR 断片を用いたプルダウン実験により、右側 DnaA 複合体は、左側 DnaA 複合体と同様に DnaB と複合体を形成可能であることがわかった。また、DnaA 上の DnaB 結合部位変異体および一本鎖 DNA 結合部位変異体、そして DnaC 上の DnaB-DNA 結合部位変異体を用いた *in vitro* 再構成実験により、DnaB 装着前後の *oriC* の一本鎖化領域の変化を KMnO<sub>4</sub> フットプリント法などにより解析した。すると、DnaB 装着過程において、右側 DnaA 複合体形成が一本鎖化領域の拡張を補助していることを示唆する結果が得られた。

さらに、キメラ DnaA を用いた  $\text{KMnO}_4$  フットプリントにより DUE の開裂機構を解析した。その結果、R4 結合 DnaA が安定な DUE 開裂に寄与していることが示唆された。また、一本鎖 DNA への DnaB 装着活性を欠失させた DnaC 変異体を用いた  $\text{KMnO}_4$  フットプリント実験では、DnaB 存在下でも一本鎖領域拡張が起らなかった。したがって、右側 DnaA 複合体は一本鎖 DNA 結合能および複合体形成と、DnaB の効率的な装着を支えるものであり、少なくとも 1 分子の DnaB の装着が、一本鎖領域拡張に必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林 千尋, 宮崎 恵里加, 永田 麻梨子, 尾崎 省吾, 片山 勉
2. 発表標題 大腸菌染色体の複製開始反応における複製ヘリカーゼDnaBと複製開始タンパク質DnaAの動的相互作用の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永田 麻梨子, 崎山 友香里, 尾崎 省吾, 片山 勉
2. 発表標題 大腸菌染色体の複製開始反応におけるDNA二重鎖開裂と複製ヘリカーゼDnaB装着の連動メカニズムの解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永田 麻梨子, 崎山 友香里, 林 千尋, 尾崎 省吾, 片山 勉
2. 発表標題 Analysis for Mechanisms of DnaB helicase loading by specific DnaA subcomplexes for bidirectional replication of the E. coli chromosome
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片山 勉, 三善 賢弥, 林 千尋, 吉田 竜星, 杉山 諒, 酒井 隆至, 崎山 友香里, 加生 和寿, 川上 広宣, 尾崎 省吾, 永田 麻梨子
2. 発表標題 Dynamic mechanisms of higher-order complexes for replication initiation and regulation of the E. coli genome
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片山 勉、永田 麻梨子、崎山 友香里、林 千尋、尾崎 省吾
2. 発表標題 擬対称性構造を持つ大腸菌複製開始複合体によるDnaB複製ヘリカーゼ導入の分子機構の解析
3. 学会等名 第25回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 千尋、宮崎 恵里加、永田 麻梨子、尾崎 省吾、片山 勉
2. 発表標題 大腸菌ゲノム複製開始複合体にDnaBヘリカーゼを呼び込む機構における複製開始因子DnaAとの特異的相互作用
3. 学会等名 第14回日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永田 麻梨子、崎山 友香里、尾崎 省吾、片山 勉
2. 発表標題 複製ヘリカーゼDnaBの装着を制御するDNA複製開始複合体の構造機能解析
3. 学会等名 第14回日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永田 麻梨子、崎山 友香里、尾崎 省吾、片山 勉
2. 発表標題 大腸菌染色体の複製起点における一本鎖DNA形成の動的メカニズムとDnaBヘリカーゼ装着における意義
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三善 賢弥、辰本 優香、尾崎 省吾、永田 麻梨子、片山 勉
2. 発表標題 大腸菌における染色体の複製開始促進因子DARS2を活性化する核様体蛋白質の適時的な結合制御機構の解析
3. 学会等名 日本遺伝学会第92回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------