

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770187

研究課題名 (和文) 開始蛋白 DnaA が形成する高次複合体の ATP 依存活性化メカニズム

研究課題名 (英文) Mechanisms for ATP-dependent activation of highly-ordered complex formed by the initiator protein DnaA.

研究代表者

尾崎 省吾 (OZAKI SHOGO)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：70510147

研究成果の概要 (和文)： DnaA-*oriC* 複合体中では 2 本鎖 DNA 弛緩反応や 1 本鎖化 DNA 結合、そして DnaB ヘリカーゼ装着という異なる機能構造を利用した反応が起こる。しかしながら、これらの反応を協調的に遂行するためのメカニズムは不明であった。申請者は多種の試験管内再構成系を用いて、大腸菌 DnaA-*oriC* 複合体中にそれぞれの反応に特化された部分機能構造が形成されることを初めて見出した。DUE を含む *oriC* の左半分で形成される DnaA 複合体は 2 重鎖弛緩と DnaB 装着とを促した。この複合体はさらに二つの複合体から構成された。一つは DUE の遠位に形成される (DUE-distal) DnaA 複合体で、この複合体は 1 本鎖化 DUE との結合能を有した。もう一つの複合体は DUE 近傍に形成され、1 本鎖化 DUE を DUE-distal DnaA 複合体へとリクルートする活性を有した。このように開始装置の中で起こるダイナミックな構造変化を示す報告は今回が初めてである

研究成果の概要 (英文)： ATP-DnaA multimerize on the DnaA-assembly region (DAR) of the replication origin *oriC*, unwinding the duplex unwinding element (DUE) flanking DAR. The ATP-DnaA-*oriC* complex binds the resultant single-stranded (ss)DUE, promoting DnaB helicase loading. However, mechanisms in DUE unwinding remain unclear. Here, using various *in vitro* reconstituted systems, we identify functionally distinct DnaA sub-complexes formed on DAR and reveal their specific roles and novel mechanisms in DUE unwinding. The DUE-flanking left-half DAR carrying high-affinity DnaA box R1 and several ATP-DnaA-preferential sites formed a DnaA sub-complex competent to DUE unwinding and ssDUE binding, thereby supporting basal DnaB loading activity. This sub-complex is further subdivided to two; The DUE-distal DnaA sub-complex formed on the ATP-DnaA-preferential sites binds ssDUE. The DUE-flanking DnaA sub-complex formed on DnaA box R1 recruits DUE to the DUE-distal DnaA sub-complex cooperatively with a DNA-bending protein IHF, promoting initiation. These dynamics in the initial complexes are likely conserved in eubacterial evolution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：DnaA、複製開始、高次複合体、AAA+、2重鎖DNA弛緩

1. 研究開始当初の背景

真核、原核細胞に共通して、ゲノム複製開始には複製起点での高次な蛋白質複合体（開始複合体）の形成が必要である。大腸菌の場合、AAA+ファミリーに属する開始蛋白 DnaA が複製開始点 *oriC* 上で開始複合体を形成する。*oriC* は DnaA が特異的に結合する配列 (DnaA box) を複数有している。*oriC* に結合した DnaA 複合体は ATP 結合に依存して近傍の 2 重鎖 DNA (DUE 領域) を 1 本鎖に緩める。DnaA と直接結合する DiaA 蛋白は DnaA 複合体の形成と構造変化とを効率よく起こすことで、DUE の 1 本鎖化を促進する。この DUE の 1 本鎖化を引き金として DNA 合成酵素装着に至る反応素過程が連続的に進行する。DnaA に結合した ATP は複製の進行とともに加水分解される。生じた ADP 結合型 DnaA は *oriC* 上で高次複合体を形成するが、DUE 領域を 1 本鎖化できない。ゆえに DnaA による高次複合体形成は複製反応の開始とその制御とを司る重要反応であると考えられる。

一方、真核細胞のゲノム複製開始においても、大腸菌ゲノム複製開始と基本的に類似した高次複合体が必要とされる。まず ORC 複合体、Cdc6、MCM 複合体などの複数の AAA+ファミリー蛋白質が開始点に集合する。これらの蛋白質を足場として、さらに多数の蛋白質が集合して巨大な開始複合体が形成される。これにより AAA+ファミリー蛋白質が活性化され 2 重鎖 DNA の 1 本鎖化が起こると考えられる。ゆえにゲノム複製開始反応を理解する鍵は AAA+複製蛋白質がどのようにして開始複合体を形成し、構造変化を受けた後、2 重鎖 DNA を 1 本鎖化するかにある。特に DnaA は単独で開始複合体を形成しうることから、解析容易で単純な機能構造をもつことが予想され、2 重鎖 DNA の 1 本鎖化を理解する上で重要基盤になると考えた。

2. 研究の目的

DnaA による 2 重鎖 DUE の 1 本鎖化において、「DnaA がドーナツ様多量体を形成した後、ポア領域で DUE と結合する」ことの重要性がわかってきた。ポアによる DUE 結合は DnaA の ATP 結合により制御される。ゆえに、複製開始を引き起こす複合体のメカニズムを理解する鍵は「ATP 型の DnaA 多量体がどのように構造変化し、ポア残基を機能させるか」にある。よって本研究では、まず DUE と相互作用するために必要な DnaA 複合体の形成機構解明を目指すことにした。さらに、生じた複合

体による ATP に依存した構造変化を 2 重鎖弛緩反応や 1 本鎖 DNA 結合と関連して理解することを目指した。

3. 研究の方法

本研究は以下の 2 つの課題に分けて遂行した。

(1) DnaA-*oriC* 複合体を構成する DnaA サブコンプレックスの試験管内再構成

(2) DnaA-*oriC* 複合体が引き起こす動的な構造変化の解明

(3) DnaB ヘリカーゼ装着に必要な DnaA サブコンプレックスの解明

4. 研究成果

(1) 研究代表者はまず、様々な部分欠失変異をもつ *oriC* 変異体 DNA を構築した。これらと精製 DnaA 蛋白質とを混合し、DnaA サブコンプレックスを調製した。生じたサブコンプレックスの活性は、試験管内 DUE 弛緩活性、1 本鎖 DUE 結合活性により評価した。解析の結果、DUE を含む *oriC* の左半分の領域で形成される DnaA サブコンプレックスは、試験管内 DUE 弛緩反応において、高い活性を保持していた。1 本鎖 DUE 結合実験の結果、この DnaA サブコンプレックスはさらに複数のサブコンプレックスからなることがわかった。1 本鎖 DUE 結合には、DUE から遠位の領域で形成された (DUE-distal) DnaA サブコンプレックスが必要だった。

(2) 研究代表者は新たな試験管内再構成系を構築し、1 本鎖化 DUE が DUE-distal DnaA サブコンプレックスへとリクルートされることを見出した。このリクルートには DUE 近傍に形成された DnaA サブコンプレックスが必要だった。このサブコンプレックスの解析により、2 重鎖弛緩や 1 本鎖 DNA 結合に必要なダイナミックな高次構造変化が明らかとなった。

(3) 試験管内再構成された DnaB 装着実験の結果、2 重鎖弛緩や 1 本鎖 DNA 結合に必要な左半分の *oriC* 領域で形成される DnaA サブコンプレックスが DnaB 装着に必須であることがわかった。右半分の *oriC* 領域で形成される DnaA 複合体は DnaB 装着を特異的に促進した。DnaB 結合実験により、右半分の DnaA

サブコンプレックスは DnaB の *oriC* 集合能を促進することがわかった。

これらの研究成果により、研究代表者は当初の目的達成に加えて、開始装置による DnaB ヘリカーゼ装着の分子機構の理解にまで到達することができた。研究代表者は本研究成果と周辺研究を総合し、総説論文を発表した (Ozaki & Katayama, 2009, *Plasmid*; Katayama et al., 2010, *Nat. Rev. Microbiol.*)。また、筆頭著者として、現在学術論文を投稿中である (Ozaki & Katayama, submitted)。

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)

1) Katayama, T, Ozaki, S., Keyamura, K and Fujimitsu, K., Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and *oriC*. *Nat. Rev. Microbiol.* , 8, 163-170., 2010.

2) Ozaki, S. and Katayama, T., DnaA structure, function, and dynamics in the initiation at the chromosomal origin. *Plasmid*, 62, 71-82, 2009.

[学会発表] (計 14 件)

国際発表

1) Fujimitsu, K., Kasho, K., Ozaki, S., Keyamura, K. and Katayama, T., DnaA, the replication initiator, is activated for the timely initiation of the chromosomal replication by a specific DNA element, DARS. International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities, Session 5, Hyogo, Japan, 2011

2) Ozaki, S. and Katayama, T., Mechanism for ATP-DnaA-dependent unwinding of duplex DNA within the chromosomal replication origin. EMBO Workshop on Replication/Repair & Segregation of Chromosomes, Freiburg, Germany, 2010

3) Fujimitsu, K., Kasho, K., Ozaki, S., Senriuchi, T. and Katayama, T., DARS, DnaA-reactivating sequence promotes exchange of DnaA-bound ADP to ATP. EMBO Workshop on Replication/Repair & Segregation of Chromosomes, Freiburg, Germany, 2010

4) Ozaki, S. and Katayama, T., Specific interaction between DnaA AAA+ domain and the single-stranded DNA promotes duplex DNA unwinding during the initiation of chromosomal replication. 8th International conference on AAA+ proteins, Poster 18, Toronto, Canada, 2009

国内発表

5) 片山勉, 藤光和之, 尾崎省吾, 加生和寿, 高次複合体形成による大腸菌染色体の複製開始因子 DnaA の機能制御. 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会合同大会, 2W16-4, 神戸市, 2010

6) 永田小桃, 松田雄作, 尾崎省吾, 毛谷村賢司, 片山勉, 大腸菌の染色体分配に機能する新規因子 RisA と相互作用する因子の探索とその機能解析. 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会合同大会, 2P-0500, 神戸市, 2010

7) 尾崎省吾, 片山勉, 大腸菌染色体複製開始を制御する DnaA-*oriC* 複合体の機能構造. 第 7 回 21 世紀大腸菌研究会, 熊本市, 2010

8) 尾崎省吾, 片山勉, 大腸菌染色体複製を開始する超高次 DnaA-*oriC* 複合体の機能的制御機構. 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会合同大会ワークショップ, 3W18-1, 神戸市, 2010

9) 加生和寿, 藤光和之, 尾崎省吾, 毛谷村賢司, 片山勉, ヒストン様蛋白質による複製開始促進因子 DARS2 (DnaA-reactivating sequence 2) の制御様式の解明. 第 82 回日本遺伝学大会, 1B02, 札幌市, 2010

10) 尾崎省吾, 片山勉, 染色体複製開始点で形成される超高次 DnaA 複合体による 2 重鎖 DNA 開裂のメカニズム, 生命活動を制御する高次複合体の構造と機能, 2009. 12. 23.

11) 林靖久, 尾崎省吾, 片山勉, 開始複合体の活性化に必要な ATP-DnaA 間相互作用の解析, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009. 10.

12) 尾崎省吾, 片山勉, DnaA による 2 本鎖開裂を制御するための複製開始点の新規機能構造特性, 第 20 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ, 2009. 11. 02.

13) 尾崎省吾, 片山勉, 複製開始点の 2 本鎖開裂を制御する DnaA 複合体の最小機能構造, 日本生化学会第 82 回大会, 2009. 10. 23.

14)永田小桃、尾崎省吾、松田雄作、末次正幸、片山勉, DNA 分配に関与する新規因子 RisA に相互作用する因子の探索, 第 6 回 21 世紀大腸菌研究会, 2009. 06.

[その他]

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003350/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

()

研究者番号 :

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :