

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370064

研究課題名（和文） 大腸菌の複製開始複合体の新たな分子解剖と新たな制御因子の作動機構の解明

研究課題名（英文） Molecular analyses on the replication initiation complex and its novel regulatory factors in *E. coli*

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（和文）：

染色体 DNA の複製開始には、高次な DNA-タンパク質複合体の形成が必要であり、細胞周期においてはその複合体の機能の制御が必要です。本研究ではモデル細胞として大腸菌を用い、複製起点 DNA と複製開始因子 DnaA タンパク質が形成する高次複合体を解析し、複製開始反応に重要な部分構造と新たな分子機構を解明しました。さらに DnaA に対する主要な制御因子を解析し、その相互作用様式を新たに解明したことに加え、新たな分子機構も解明しました。

研究成果の概要（英文）：

The initiation of the chromosomal DNA replication requires formation of higher-order nucleoprotein complexes and their functions must be regulated during the cell cycle. In this study, by analyzing higher-order complexes formed by the replication origin DNA and the replication initiator DnaA protein in *E. coli* as a model cell, we identified subcomplexes important for replication initiation reactions and revealed novel molecular mechanisms. Moreover, by analyzing major factors regulating DnaA functions, we revealed a novel regulatory mechanism for DnaA in addition to novel interaction modes between DnaA and the factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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, DnaB, *oriC*, ATP, 細胞周期制御, 染色体複製開始制御, タンパク質高次複合体, 試験管内再構成

1. 研究開始当初の背景

細胞性生物の染色体 DNA の複製開始とその制御には、DNA-タンパク質の高次複合体が主要な役割を演じていることがわかってきた。特に、高次複合体の形成過程や構造変化、他因子との相互作用が、複製開始反応の

遂行と制御に重要であること明らかになってきたのである。原核、真核を問わず、複製開始複合体は、広域の DNA とタンパク質多量体からなる高次複合体である。大腸菌の複製開始因子 ATP-DnaA は、真核生物の複製起点認識因子（ORC 因子）同様、ATP と相互作

用する AAA+ドメインをもつタンパク質である。真核生物では構成蛋白質因子が多種だが、大腸菌では、複製起点 *oriC* (245 bp) と ATP-DnaA のみで複製開始複合体の基幹構造が形成されるという単純性がある。これらの特性を活用し、研究代表者は、大腸菌の複製開始複合体中における ATP-DnaA による基本相互作用様式を独自に解明し、これに基づき、開始複合体の基本構造のモデルと活性化メカニズムを新たに提唱した (*J. Biol. Chem.* 2005,2008; *Genes Dev.* 2009 等)。

また、研究代表者は新規 DnaA 結合因子として DiaA タンパク質を初めて同定し、これが複製開始複合体の新規構成因子であることを解明した (*J Biol Chem*, 2004; *Genes Dev*, 2007 等)。DiaA ホモログは真正細菌に広く保存されている。さらに、構造生物学グループとの共同研究により研究代表者グループは、DnaA の全て (4つ) のドメインの立体構造解明に成功した (*Nucleic Acids Res*, 2003; *J Biol Chem*, 2007, 2008 等)。加えて、これらを基に研究代表者は、複製開始のキー反応である *oriC* DUE (2重鎖開裂部位) における 2重鎖 DNA 開裂反応 (局所的な 1本鎖化) に特異的に関わる機能モチーフも独自に解明し、新たな分子機構を提唱した (*J Biol Chem*, 2008 等)。さらに、研究代表者と研究分担者 (植田) は、解明した DnaA ドメイン I の立体構造上に DnaB ヘリカーゼ相互作用部位を同定した (*J Bio. Chem*, 2008: *JBC Paper of the Week* 受賞論文)。

複製開始後は、過剰複製を抑制するため、開始複合体が不活性化される。研究代表者は、適時的な DnaA 不活性化機構を初めて見いだしている (*Katayama et al.*, *Cell*, 1998)。この機構 (RIDA) では、DNA ポリメラーゼのクランプ因子と新規制御因子 Hda とに依存して、DnaA 結合 ATP の加水分解が促進され、不活性化 ADP-DnaA が産生される。Hda は DnaA 同様、AAA+ドメインをもつ。近年、RIDA の基幹機構は、原核、真核に共通するものであることもわかってきた (*Arias & Walker*, *Nature Cell Biol.* 2006 他)。RIDA は、B. Lewin 著の教科書「*Genes*」にも掲載された。RIDA の分子機構と制御機構の解明推進の重要度が高まっている。

また、DnaA を活性化する制御機構についてはほとんど未解明だったが、最近、研究代表者は、これに関わる新たな制御因子「DARS」を見いだした。DARS は、ゲノム DNA 因子であり、複数の DnaA を吸着し特殊な複合体を形成させることにより、ADP-DnaA から ADP を解離させ ATP の再結合を促す (*Genes Dev*, 2009)。DARS は細胞周期中での複製開始タイミング制御に必須であった。

2. 研究の目的

(1) 複製開始複合体の分子解剖により主要開始機構を解明する。---これまでの解析から、新たに、複製開始複合体は、特異的な役割をもつ部分複合体構造をもつことがわかってきた。部分複合体構造の構成と機能について、独自のアッセイ系や変異体 DnaA を用いて生化学的、合成生物学的に詳細に解析する。

(2) DnaB ヘリカーゼ装着に関わる主要機構を解明する。---複製開始複合体による 2重鎖開裂後、DnaB ヘリカーゼが DNA に装着する。この過程では、DnaB-DnaA 相互作用、および、DnaB-DnaC ヘリカーゼローダー相互作用が必要である。先述した DnaA ドメイン I 上の部位に加え、DnaA ドメイン III(AAA+ドメイン)上に第 2 の DnaB 結合部位があることが示唆されている。変異体解析により第 2 の DnaB 結合部位を同定し、DnaB ヘリカーゼの装着過程における役割を解明する。また、DnaC の機能構造解析等も既に進めており、これらの結果にもとづき、DnaB ヘリカーゼの装着の基幹分子機構を解明する。

(3) RIDA における Hda 機能制御機構とクランプ-Hda-DnaA 複合体における主要相互作用機構を解明する。---RIDA が、Hda と DNA 装着型クランプにより活性化することは、過去に申請者が示した (*Cell*, 1998; *EMBO J.*, 1999,2001 他)。最近、申請者は ADP 結合により Hda が活性化されることを示した (*J Biol Chem*, 2008)。これらの結果をふまえ、クランプ-Hda-DnaA 間の主要相互作用をさらに解明する。

(4) ADP-DnaA を ATP-DnaA に変換する「DARS」の主要機能メカニズムを解明する。---すでに、細胞粗抽出液中に未知の活性化因子があることを見いだしていた (*Genes Dev.* 2009 他、未発表データ)。その後の精製解析により、活性化因子は複数存在することも示唆されている (未発表)。よって、活性化因子を同定して DARS 上での複合体動態、および、増殖相や細胞周期における DARS 活性制御機構について解析する。

3. 研究の方法

(1) 複製開始複合体の分子解剖による開始機構解析---まず、*oriC* 変異体や DnaA 変異体などを、*in vitro* 再構成系に適用して、開始複合体形成能、複製開始能、1本鎖 DNA 結合能、DnaB ヘリカーゼ装着能などを解析し、開始複合体内の要となる機能構造と開始反応機構を解明する。P1 アッセイ[DUE 開裂 (1本鎖化) 能の検出]やフットプリント解析に加え、EMSA 法やプルダウン法を基に独自に創出した解析法を用いて、DnaA-1本鎖 DUE 結合能、DiaA 結合能、DnaB 結合能などを定量的に解析し、これらの結果を総合的、体系的に検討する。

(2) DnaB ヘリカーゼ装着に関わる主要機構を解析---上と同様に、対象因子の変異体、および、*in vitro* 再構成や独自に創出した解析法を用いて、複製開始複合体への DnaB ヘリカーゼ装着機構を、DnaB-DnaA 相互作用動態、DnaB-DnaC 相互作用動態を中心として解明する。変異体の作成に関しては、これまでの研究分担者との共同研究である DnaA ドメイン I の構造解析から得られた詳細な構造情報に基づき焦点を絞って進める。

(3) RIDA における Hda 機能制御機構とクランプ-Hda-DnaA 複合体における主要相互作用機構を解析---上と同様に、対象因子の変異体、および、*in vitro* 再構成や独自に創出した解析法を用いて、さらに、RIDA における Hda の分子機構、および、DnaA-Hda-クランプの相互作用機構解析に焦点を絞って解析する。

(4) ADP-DnaA を ATP-DnaA に変換する「DARS」の主要機能メカニズムの解析---上と同様に、対象因子の変異体、および、*in vitro* 再構成や独自に創出した解析法を用いて、DARS の活性化因子の探索と解析、および、機能構造の解析、複合体形成の動態解析を進める。

4. 研究成果

(1) 複製開始複合体の分子解剖による開始機構解析---開始複合体の部分構造の解明に成功した。これにより、DNA二重鎖の開裂と1本鎖DNAの結合、および、DnaBヘリカーゼの装着に関わる部分構造が明確になった(図1)。さらに、DNA二重鎖の開裂に必要な、新たな複合体動態を解明し、これをssDUE recruitment(呼び込み)と命名した。ここではDNA屈曲因子IHFタンパク質によって、1本鎖化したDUEのDNA鎖がDnaA多量体に呼び込まれ、DnaAと直接結合することが、キーとなる。また、DnaBヘリカーゼの結合や1本鎖DNAへの装着の動態を解析した結果、ここで明らかにした開始複合体の部分構造との対応が示された。そこで、これらの結果を統合して、複製開始複合体の構造動態の新たなモデルを構築した(図1)。この成果は論文2編にまとめ国際誌に発表するとともに、Nature Rev. Microbiol.誌の総説としても発表した。このモデルに示された基本構造は、他の研究者による総説や論文にも採用されており、広く支持されるようになっている。さらにDnaAのATP/ADP結合をサポートする新たな機能構造を見出し、論文発表した。

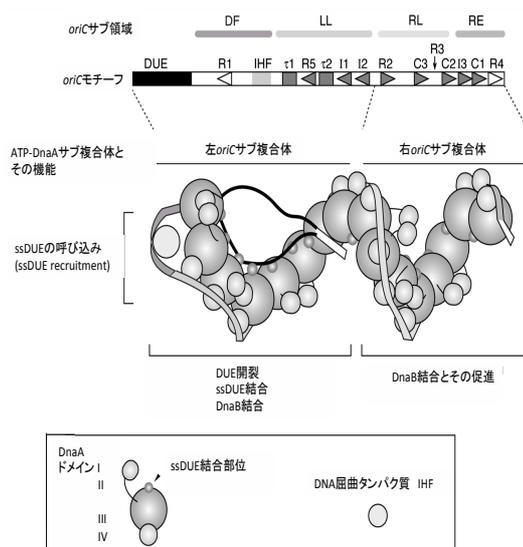


図1：開始複合体の新たなモデル

(2) DnaBヘリカーゼ装着に関わる主要機構--- DnaA-DnaB相互作用部位の探索を進め、複製開始時のDnaB装着に必要な新たな機能構造の解明に初めて成功した。かつて研究分担者との共同研究によりDnaAドメインIのDnaB結合部位を解明したが、今回の新たな発見が加わったことで、ほとんど不明であったDnaA-DnaB相互作用について新たな機構が解明された。この成果についてはすでに学会発表した。さらに、研究分担者との共同研究によりDnaB-DnaC結合における機能構造も解析し、重要なアミノ残基を新たに特定した。

(3) RIDAにおけるHda機能制御機構とクランプ-Hda-DnaA複合体における主要相互作用機構---Hda-クランプ相互作用解析を進め、Hdaとクランプの相互作用に重要となる新たな機能構造を見出した。特にこれはHdaの機能制御に重要であった。この成果については、すでに学会発表した。さらに、クランプ-Hda-DnaA複合体における、新たな相互作用機構を解明した。すなわち、DnaAドメインIおよびIVがHdaと相互作用すること、および、この相互作用に重要なアミノ酸残基を明らかにした。加えて、DnaAとHdaのAAA+ドメイン間の相互作用様式についてもアミノ酸レベルで詳細に解明した。これらにより、Hda-DnaA間における基盤的な相互作用機構については、ほぼ解明されたといえる。この成果については、論文3編にまとめ国際誌に発表するとともに、米国Cold Spring Harbor Laboratory Pressの専門書「DNA Replication」にも記載した。これらにより当研究室が独自に発見し解析してきたRIDAについて、その分子機構と制御機構の理解が一段と深まった。

(4) ADP-DnaAをATP-DnaAに変換する「DARS」の主要機能メカニズム--- DARSを活性化する制御因子を同定し、これらの精製

因子をもちいて *in vitro* 再構成系の構築に成功した。これにより DnaA-DARS 複合体形成の制御メカニズムを詳細に解析し、制御因子の役割を解明した。これらにより、細胞増殖モードと共役して DARS 複合体の活性化を制御するキーマカニズムが解明された。この成果については、すでに学会発表した。さらに、この研究過程で、DnaA 活性の制御に関わるゲノム DNA 因子 *datA* が、IHF 結合に依存して DnaA-ATP 加水分解反応を進めることを新たに解明し、この制御経路を DDAH

(*datA*-dependent DnaA-ATP hydrolysis) と命名した。*datA* 部位への IHF 結合は複製開始後に促進されるため、適時的に DnaA を不活化することができる。これにより、DnaA 活性制御サイクルの全体像が書き変わった (図 2)。これは DARS 解析の過程からの合理的な発展であるが、一種のセレンディピティーであるともいえ、本研究の計画以上の発展を示す一端でもある。この新たな *datA* 機能の解明は、大変高く評価されており、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 誌に論文を掲載した。

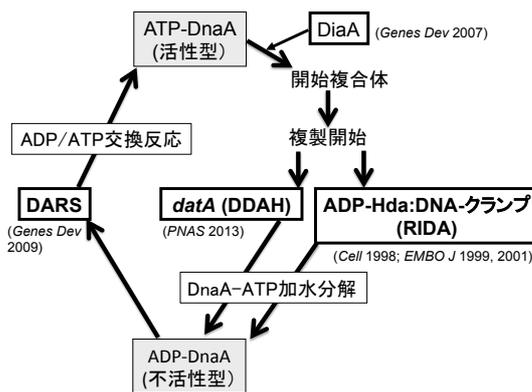


図 2 : DnaA サイクル ; 代表者独自の発見を太四角で示す

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 10 件)

- ① Su'etsugu, M., Harada, Y., Keyamura, K., Matsunaga, C., Kasho, K., Abe, Y., Ueda, T. and Katayama, T. (2013) **The DnaA N-terminal domain interacts with Hda to facilitate replicase clamp-mediated inactivation of DnaA.** *Environ. Microbiol.* (印刷中) 査読有. DOI: 10.1111/1462-2920.12147
- ② Kasho K., and Katayama, T. (2013) **DnaA-binding locus *datA* promotes DnaA-ATP hydrolysis to enable cell cycle-coordinated**

replication initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 946-941. 査読有.

DOI: 10.1073/pnas.1212070110

③ Ozaki, S., and Katayama, T. (2012) **Highly organized DnaA-oriC complexes recruit the single-stranded DNA for replication initiation.** *Nucleic Acids Res.* 40, 1648-1665. 査読有. DOI: 10.1093/nar/gkr832

④ Ozaki, S., Noguchi, Y., Hayashi, Y., Miyazaki, E., and Katayama, T. (2012) **Differentiation of the DnaA-oriC sub-complex for DNA unwinding in a replication initiation complex.** *J. Biol. Chem.* 287, 37458-37471. 査読有. DOI: 10.1074/jbc.M112.371052

⑤ Ozaki, S., Noguchi, Y., Nishimura, M., and Katayama, T. (2012) **Stable nucleotide binding to DnaA requires a specific glutamic acid residue within the AAA+ box II motif.** *J. Struct. Biol.* 179, 242-250. 査読有. DOI: 10.1016/j.jsb.2012.05.001

⑥ Keyamura, K., and Katayama, T. (2011) **The DnaA DNA-binding domain binds to Hda to promote the inter-AAA+ domain interaction involved in the regulatory inactivation of DnaA.** *J. Biol. Chem.* 286, 29336-29436. 査読有. DOI: 10.1074/jbc.M111.233403.

⑦ Charbon, G., Riber, L., Cohen, M., Skovgaard, O., Fujimitsu, K., Katayama, T., Løbner-Olesen, A. (2011) **Suppressors of DnaA-ATP imposed overinitiation in *Escherichia coli*.** *Mol. Microbiol.* 79, 914-928. 査読有. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07493.x.

⑧ Nakamura, K. and Katayama, T. (2010) **Novel essential residues of Hda for interaction with DnaA in the regulatory inactivation of DnaA: Unique roles for Hda AAA+ Box VI and VII motifs.** *Mol. Microbiol.* 76, 302-317. 査読有. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07074.x.

⑨ Katayama, T., Ozaki, S., Keyamura, K. and Fujimitsu, K. (2010) **Regulation of the replication cycle: Conserved and diverse regulatory systems for DnaA and oriC.** *Nature Rev. Microbiol.* 8, 163-170 査読有. (Invited review) DOI: 10.1038/nrmicro2314.

⑩ Kawakami, H. and Katayama, T. (2010) **DnaA, ORC, and Cdc6: Similarity beyond the domains of life and diversity.** *Biochem. Cell Biol.* 88, 49-62. 査読有. (Invited review) DOI: 10.1139/o09-154.

[学会発表] (計 56 件)

- ① Kasho, K. and Katayama, T. **A novel mechanism of a specific DnaA-binding locus *datA* for regulation of the replication initiator DnaA.** *Keystone Symposia X5/X6 DNA Replication and Recombination.* Banff, Canada. 2013, March 3-8

- ② Noguchi, Y., Ozaki, S., Miyazaki, E., and Katayama, T. **Specific inter-DnaA interaction for construction of functionally-distinct DnaA sub-complexes on the *E. coli* replication origin.** Keystone Symposia X5/X6 DNA Replication and Recombination. *Keystone Symposia X5/X6 DNA Replication and Recombination*. Banff, Canada. 2013, March 3-8
- ③ 片山 勉, 尾崎省吾, 野口泰徳, 宮崎恵里加, 川上広宣. **大腸菌の開始複合体の解析から見えてきた基盤システム.** 第35回日本分子生物学会年会 ワークショップ「DNA複製機構とその制御---生物種を超えた統一的理解を目指して---」(オーガナイザー: 荒木弘之, 片山 勉). 福岡, 2012年12月11-14日
- ④ 加生和寿, 片山 勉. **Finding and molecular analysis of a novel inactivation mechanism for the replication initiator DnaA by a specific chromosomal locus.** 第35回日本分子生物学会年会 ワークショップ「Chromosome replication and its coordination with nucleo-cellular functions」(オーガナイザー: 田中誠司, 杉本のぞみ) 福岡, 2012年12月11-14日
- ⑤ 片山 勉, 加生和寿, 藤光和之, 尾崎省吾, 野口泰徳, 宮崎恵里加, 増田圭美, 末次正幸, 川上広宣. **DnaA 制御サイクルの再構築による解明: 新たな DnaA-ATP 加水分解経路と核様体構築因子の役割.** 第85回日本生化学会大会 シンポジウム「細胞周期進行とゲノムの安定な維持を支える染色体イベントの酵素的合成生物学的再構築による解明」(オーガナイザー: 正井久雄, 片山 勉) 福岡, 2012年12月14-16日
- ⑥ 片山 勉, 尾崎省吾, 野口泰徳, 宮崎恵里加. **大腸菌複製開始複合体の構造構築様式の解析.** 日本遺伝学会第84回大会 ワークショップ「原核生物に習う遺伝情報安定性の維持機構の原理」(世話人: 片山 勉, 石野良純) 福岡, 2012年9月24-26日
- ⑦ Ozaki, S. and Katayama, T., **Dynamics in DNA unwinding of the DnaA-oriC complex,** 第34回日本分子生物学会年会シンポジウム“Frontier of reconstitution biology toward understanding of principals in dynamics of higher-order complexes”(Organizers: Katayama, T., Iwasaki, H.) 横浜, 2011年12月13-16日
- ⑧ Ozaki, S. and Katayama, T. **Architecture and mechanism for DNA unwinding of the ATP-DnaA initiation complex of the *E. coli* chromosomal replication.** 9th International Conference on AAA Proteins (招待口演) 2011, November 6-10, Kumamoto
- ⑨ Keyamura, K. and Katayama, T. **The Interaction Mode between DnaA and Hda** AAA+ Proteins in Regulatory Inactivation of DnaA. 9th International Conference on AAA Proteins. 2011, November 6-10, Kumamoto
- ⑩ Kasho, K., Fujimitsu, K. and Katayama, T. **Search and analysis for novel stimulators of DARS2, DnaA-reactivating sequence 2.** 9th International Conference on AAA Proteins. 2011, November 6-10, Kumamoto
- ⑪ Noguchi, Y., Ozaki, S. and Katayama, T. **Role for a residue within AAA+ domain of DnaA protein in stable maintenance of bound nucleotide.** 9th International Conference on AAA Proteins. 2011, November 6-10, Kumamoto
- ⑫ 増田圭美, 毛谷村賢司, 片山 勉, **DnaA 不活性化因子 Hda の活性制御に必要なクラップの機能構造解析,** 第21回 DNA複製・組換え・ゲノム安定性制御ワークショップ(世話人: 釣本敏樹・片山 勉・藤田雅俊), 福岡県福津市, 2011年10月25-27日
- ⑬ 原田雄二, 毛谷村賢司, 片山 勉, **DnaA ドメイン I とクラップ-Hda 複合体の相互作用様式の解明,** 第21回 DNA複製・組換え・ゲノム安定性制御ワークショップ(世話人: 釣本敏樹・片山 勉・藤田雅俊), 福岡県福津市, 2011年10月25-27日
- ⑭ 尾崎省吾, 片山 勉, **大腸菌染色体の複製開始複合体のアーキテクチャとメカニズム,** 日本遺伝学会第83回大会ワークショップ「ゲノムの恒常性と可塑性を保障する高次複合体の制御機構」(世話人: 片山 勉) 京都, 2011年9月20-23日
- ⑮ Keyamura, K., Higashi, M. and Katayama, T. **Interaction modes between DnaA and DiaA in initial complexes in *E. coli*.** *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology: DNA replication and Recombination*, Keystone, Colorado, USA, 2011, February 27-March 4.
- ⑯ 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*, Awaji, 2011年1月24-26日
- ⑰ 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ワークショップ「染色体複製とその制御における超高次複合体のダイナミクス」、神戸, 2010年12月7-10日
- ⑱ Fujimitsu, K., Kasho, K., Ozaki, S., Senriuchi, T. and Katayama, T. **DARS, DnaA-reactivating sequence promotes exchange of DnaA-bound ADP to ATP.** *EMBO Conference Series; Replication, Repair & Segregation of*

Chromosomes, Freiburg-Munzingen, Germany, 2010, June 13-17.

⑱ Shogo, O. and Katayama, T. **Mechanism for ATP-DnaA-dependent unwinding of duplex DNA within the chromosomal replication origin.** *EMBO Conference Series; Replication, Repair & Segregation of Chromosomes*, Freiburg-Munzingen, Germany, 2010, June 13-17.

[図書] (計 3 件)

① Skarstad, K. and Katayama, T. (2013)
Regulating DNA Replication in Bacteria
In "*DNA Replication*", Edited by Bell, S.D., Me'chali, M, and DePamphilis, M.L., Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp343-359. (Invited review)

② Su'etsugu, M., and Katayama, T. (2012)
Chromosome replication in *E. coli* and *B. subtilis*. In "*Escherichia coli and Bacillus subtilis; The Frontiers of Molecular Microbiology Revisited*", Edited by Yoshito Sadaie and Kouji Matsumoto, Research Signpost. pp29-43. (Invited review)

③ 片山 勉 (2011) **高次制御機構を備えた新たなゲノム複製系の再構成に向かって.** *実験医学「細胞を創る・生命システムを創る」* 羊土社 29巻7号 (増刊)、83-89頁. (Invited review)

[その他]

ホームページ等

<http://bunsei.phar.kyushu-u.ac.jp>
(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：70264059

(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