様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２２年　５月１８日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：２００８～２００９
課題番号：２０７７０１３９
研究課題名（和文）複製開始因子 DiaA を介した開始複合体の解析および DiaA 制御因子の解析

研究課題名（英文）Analysis on the initiation complex and a DiaA-regulating factor

研究代表者
毛谷村　賢司（KEYAMURA KENJI）
九州大学大学院・薬学研究院・助教
研究者番号：７０４６４３８６

研究成果の概要（和文）：生物の個体を形成する細胞の増殖において、遺伝情報を担う染色体 DNA の複製は必要不可欠な反応である。代表者は、この染色体複製が開始されるメカニズムついて大腸菌を研究材料に解析を行った。大腸菌では、染色体 DNA 上の複製開始点に DnaA-DiaA タンパク質複合体が結合した後、DnaB タンパク質が装着することで染色体複製を起こす事ができる。本研究では、DnaA-DiaA 複合体の結合様式の解析を行った。さらに、DiaA タンパク質を DnaA から解離させるタンパク質の探索を行った。

研究成果の概要（英文）：In many cellular organisms, chromosomal replication initiation requires the regulated formation of dynamic higher-order complexes. *E. coli* DnaA-DiaA complexes form a specific multimer on *oriC*, resulting in DNA unwinding and DnaB helicase loading. DiaA, a DnaA-binding protein, directly stimulates the formation of ATP-DnaA multimers on *oriC* and ensures timely replication initiation. In this study, the structural model of DnaA-DiaA complex was determined. Moreover, a DiaA-regulating factor was searched.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００８年度	2,400,000	720,000	3,120,000
２００９年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：DNA 複製、複製開始複合体、タンパク質相互作用

１．研究開始当初の背景

(1)全ての細胞性生物の増殖、個体と種の維持において、遺伝情報を担う染色体 DNA の複製は、必要不可欠なプロセスである。染色体 DNA 複製は、細胞周期の適切な時期に一度だけ起こるように厳密に制御されている。この制御は主に複製開始段階で起こっている。代表者は、複製開始研究が最も進んでいる生物の一つである大腸菌を材料として、複製開始制御機構の全貌を分子レベルで理解した

いと考えている。

(2)大腸菌の染色体 DNA 複製開始反応は、染色体DNA 上に唯一存在する複製起点(*oriC*)上で起こる。*oriC* は AT-rich な開裂領域と複数の DnaA 結合領域から構成されている。開始タンパク質 DnaA の ATP 結合型が *oriC* 上の DnaA 結合領域を介して、特異的な高次複合体(開裂複合体)を形成し、AT-rich 領域での二重鎖 DNA 開裂を引き起こす。これを引き金として、開裂した一本鎖 DNA 領域上に DnaB ヘリケースが装着され、一本鎖 DNA 領域を拡大していくことで複製開始反応が進行していく。このような一連の複製開始反応の制御、つまり、複製開始が一細胞周期中で起こるタイミングを決定している機構や過剰な複製開始を抑止する機構 (Katayama et al. Cell 1998)は、DnaA を標的としている場合が多い。我々の研究グループは DnaA を標的とした複製開始促進因子の探索を行い、新規因子として DiaA タンパク質を同定している(Ishida et al. JBC 2004)。ホモ 4 量体である DiaA は、複数の DnaA 分子と複合体形成し、*oriC* 上への DnaA の集合を促進する。さらに、DiaA は ATP-DnaA と *oriC* の特異的な高次複合体形成を促進し、二重鎖 DNA の開裂を促す。このようなメカニズムにより DiaA は複製開始を促進している(Keyamura et al. Genes Dev. 2007)。

２．研究の目的

本研究では、*oriC* 上での DiaA を介した高次複合体がどのように二重鎖 DNA を開裂し、DnaB ヘリケースを装着させるのかに着目した。以下の目的を掲げ研究を遂行する。

(1)目的 1. DiaA を含む DnaA-*oriC* 開裂複合体の構造様式を決定する。

DnaA は四つの機能ドメインに分かれており、その部分タンパク質ごとの解析から DnaA 全体の構造が明らかになっている(Abe et al. JBC 2007; Fujikawa et al. Nucleic Acid Res. 2003)。さらに、その構造から DnaA-*oriC* 開裂複合体様式が提唱されている(Erzberger et al. Nat. Struct. Mol. Biol. 2006; Ozaki et al. JBC 2008)。また、DiaA のホモ 4 量体構造と DnaA 結合部位が明らかになっている(Keyamuraet al. Genes Dev. 2007)。そこで、代表者は、DnaA 内の DiaA 結合部位を決定し、DiaA と DnaA の結合様式を明らかにする。さらに、構造学的知見と統合し、どのような複合体構造が二重鎖 DNA を開裂させているのか理解したいと考えている。

(2)目的 2. DnaB ヘリケース装着機構および DiaA 制御機構を明らかにする。

DiaA はタンパク質粗画分を用いた試験管内ミニ染色体 DNA 複製系を促進する。一方、精製複製タンパク質を用いた試験管内ミニ DNA 複製系を阻害する。現在までにこの阻害のターゲットは、*oriC* 上の二重鎖 DNA 開裂後に起きる DnaB ヘリケース装着段階であることが分かっている(Keyamura et al. JBC 2009)。このことより、タンパク質粗画分中に DiaA を標的として、その活性を制御し、DnaB 装着を円滑に行わせるような因子の存在が示唆される。この DiaA 制御因子の同定・解析により、DiaA による二重鎖 DNA 開裂促進後に起こる DnaB 装着機構を解明するだけでなく、DiaA 制御機構についても解明したいと考えている。

３．研究の方法

本研究の目的は DiaA 介した複製開始複合体の解明と DiaA 制御機構の解明にある。そのため、生化学的・構造学的手法を用いた DnaA と DiaA の結合様式の解明と DiaA 活性制御因子の同定およびその機能解析を行う。下記に、その具体的な研究方法について述べる。

(1)DnaA の DiaA 結合残基の決定

代表者は NMR 解析により、DnaA の N 末端領域で DiaA と相互作用することが予想されるアミノ酸残基を複数見出している。また、その内の一つについて変異体解析を行った結果、DiaA 結合能が欠損していた(Keyamura et al. JBC 2009)。そこで、残りのアミノ酸残基についても結合解析を行う。

①DiaA と結合するアミノ酸残基の候補について、変異を導入し、変異 DnaA タンパク質を精製する。

②変異 DnaA が DiaA と結合するか検討する。方法は、プルダウン法を用いる。

(2)DiaA を介した DnaA-*oriC* 開裂複合体様式の決定

①変異 DnaA と野生型 DnaA を混ぜ、DiaA による DnaA 集合促進および開裂促進能を検討する。これにより、*oriC* 上に複数結合している DnaA 分子への DiaA 結合様式を解明する。

②DiaA、DnaA 構造と上記解析結果を踏まえ、DiaA と DnaA の結合様式を予測し、それを開裂複合体モデルに組み込む。

(3)DiaA 制御因子の活性を評価する実験系の構築

プルダウン法において、DiaA は DnaA-DnaB 結合を阻害するため、DiaA が DnaA から外れる事が、DnaB の DnaA 結合に必要であると考えられた。そこで、DnaA-DiaA 複合体から DiaA を解離させるような活性を指標に粗画分中からの DiaA 制御因子の探索を行う。そのため、まず DiaA 添加依存的に複製を促進する粗画分を DnaA-DiaA 結合実験系（プルダウン

法）に加え、DnaA から DiaA が解離する条件を決定する。

(4) DiaA 制御因子の単離および同定
①加熱処理した粗画分が DnaA から DiaA を解離させるか検討する。この実験により、DiaA 制御因子がタンパク性因子か非タンパク性因子のどちらかを見極める。
②タンパク性因子の場合
タンパク質粗画分をカラムクロマトグラフィーで分画し、DiaA 制御タンパク質の精製を進める。この方法で候補となったタンパク質は、MS(質量分析)解析法を用いて同定する。同定された因子は、ヒスチジンタグ融合型タンパク質として精製し、機能解析に用いる。
③非タンパク性因子の場合
熱処理した粗画分をクロマトグラフィー(HPLC)および薄層クロマトグラフィー(TLC)を駆使して分画し、精製を行う。精製した候補因子は MS および NMR 解析法を用いて同定する。

(5)DiaA 制御因子の機能解析
①タンパク性因子の場合
(A) 同定されたタンパク質に対応する遺伝子の欠失変異株を作製し、複製開始への影響についてフローサイトメーターやリアルタイム PCR を用いて検討する。また、既知の機能モチーフがあるのかデータベースを用いて検索する。機能モチーフがある場合は、そのモチーフに変異を導入し、同様に複製開始への影響を検討する。
(B) 同調培養した細胞を用いて、DiaA 制御因子の転写量および細胞内量の変動を測定する。
(C) DiaA による DnaB 装着阻害を回復する機構の解明を行う。
方法は、プルダウン法、SPR 解析、ゲルろ過解析を駆使して行う。
1. DiaA と同定されたタンパク質が直接結合するか検討する。
2. DiaA 制御因子が *oriC* 上の DiaA-DnaA 複合体に与える影響を検討する。
3. DiaA 制御因子存在下、非存在下の DnaB 装着実験系に DiaA を加えてできる複合体を分離し、複合体形成の相違を検討する。
(D) 制御因子のアミノ酸配列から、既知の機能モチーフがある場合は、そのモチーフに変異を導入し、DnaB 装着阻害を回復するか検討する。
(E) 既知のタンパク質の場合は、その関連因子を検索し、上述と同様の方法で解析を行っていく。
②非タンパク性因子の場合
(A) 非タンパク性因子と関連するタンパク質を文献やデータベースを用いて検索する。関連するタンパク質があれば、その遺伝子あるいはタンパク質について解析を行う。解析手順はタンパク性因子の解析の場合と同様に行う。
(B) DiaA による DNA 複製阻害を回復する機構の解明を行う。
解析手順はタンパク性因子の解析の場合と同様にして行う。

４．研究成果
(1)DnaA の DiaA 結合残基の同定
①NMR 解析により DiaA と相互作用する事が予想された DnaA の N 末端内のアミノ酸残基に変異導入を行い、数種類の変異 DnaA タンパク質を精製した。
②精製した変異 DnaA と DiaA との結合をプルダウン法で解析した結果、DnaA E21A と DnaA F46A 変異体の DiaA 結合能が顕著に低下している事が明らかになった。さらに、DnaA F46A について解析した結果、この変異体は、DiaA 依存的な *oriC* 上への DnaA 集合や二重鎖 DNA 開裂活性も欠損している事が明らかになった。

(2)DnaA-DiaA 結合様式の決定
NMR 解析および(1)の解析で明らかにした DiaA 結合残基と既に同定済みであった DiaA の DnaA 結合残基(Keyamura et al. Genes Dev. 2007)から、本研究で初めて、DnaA-DiaA 結合様式を明らかにした。

(3) DiaA を介した DnaA-*oriC* 開裂複合体様式の決定
DiaA 結合の欠損した DnaA F46A と野生型 DnaA の混合実験を行った結果、*oriC* 上の全ての DnaA に DiaA が結合する必要がない事が明らかになった。この結果をこれまでに提唱されている DnaA-*oriC* 開裂複合体モデルに導入することで、新規の DiaA-DnaA-*oriC* 開裂複合体モデルを提唱した。

(4)DnaB ヘリケース装着メカニズム
DnaA の DiaA 結合部位を明らかにした事で、DiaA 結合部位が DnaB ヘリケースの結合部位と重複している事が考えられた。そこで、DnaA F46A を解析した結果、この変異体は、DnaB 結合能を欠損している事が明らかになった。さらに、DiaA は *oriC* 上での DnaA-DnaB 相互作用を阻害する事が明らかになった。また、この阻害は、タンパク質粗画分により解除されることが明らかになった。
以上の結果から、DiaA が二重鎖 DNA の開裂反応を促進後、*oriC* 上の DnaA から解離することが、続く DnaB ヘリカーゼの装着に必要であることを初めて明らかにした。また、この反応には、DiaA を DnaA から解離させる因子が必要であることが考えられ、この因子と DiaA によって、DnaB ヘリケースの装着が制

御されているという新しい概念を提唱した。

以上の研究成果は、原著論文(Keyamura et al. *J. Biol. Chem.* 2009)にて発表済みである。

(5)DiaA 制御因子の探索実験法の構築
これまでの解析結果から、DiaA 制御因子の一つは、*oriC* 上の DnaA から DiaA を解離させる因子である事が予想された。そこで、*oriC* DNA 断片を用いて DnaA-DiaA を回収する実験系にタンパク質粗画分を添加した結果、予想通り DiaA の回収低下が見られた。そこで、この実験系を活用し、タンパク質粗画分からの DiaA 制御因子の精製を行うことにした。

(6)DiaA 制御因子の精製
①タンパク質粗画分を加熱処理し、DiaA 解離活性を調べた結果、顕著に活性が低下することが明らかになった。熱失活し易い事より、タンパク性因子である可能性が考えられた。
②DiaA 制御タンパク性因子を同定するため、解離活性を指標に硫安沈殿、タンパク質精製用カラムクロマトグラフィーの検討を行った。現在までに、20-30 種類まで候補因子を限定できている。

(8)今後の研究および展望
①DiaA 制御因子の候補は、ゲルろ過後、MS（質量分析）解析により同定する。さらに、候補因子の精製を行い、活性を指標に目的因子の同定をはかる。
②因子の同定後、研究の方法（5）に従い、DiaA 制御因子の機能解析、DiaA および制御因子による DnaB ヘリケース装着制御メカニズムの解明、DiaA 制御関連因子の同定と解析を行う予定である。
③これまで、DnaB ヘリケースの装着制御メカニズムの存在は、研究代表者以外に提唱しておらず、上記メカニズムの証明と解明は、染色体複製開始の制御研究に新たな展開を切り開くものと思われる。

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２件）
①著者名：Katayama, T., Ozaki, S., Keyamura, K. and Fujimitsu, K.
論文標題：Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and *oriC*.
雑誌名：*Nat. Rev. Microbiol.*
査読：有り
巻：8
発行年：2010
ページ：163-170

②著者名：Keyamura, K., Abe, Y., Higashi, M., Ueda, T. and Katayama, T.
論文標題：DiaA dynamics are coupled with changes in initial origin complexes leading to helicase.
雑誌名：*J. Biol. Chem.*
査読：有り
巻：284
発行年：2009
ページ：25038-25050

〔学会発表〕（計２件）
①発表者名：毛谷村　賢司
発表標題：大腸菌の複製開始複合体形成におけるDiaA-DnaA相互作用メカニズムの解析
学会等名：第81回　日本遺伝学会
発表年月日：2009年9月16-18日
発表場所：信州大学（長野）

②発表者名：毛谷村　賢司
発表標題：DiaA promotes the unwinding of *oriC* by directly stimulating the formation of ATP-DnaA-*oriC* complexes in *E. coli*.
学会等名：EMBO workshop on Replication and Segregation of Chromosomes.
発表年月日：2008年6月16-20日
発表場所：ノルウェー・ヤイロ

６．研究組織
(1)研究代表者
毛谷村　賢司（KEYAMURA KENJI）
九州大学大学院・薬学研究院・助教
研究者番号：７０４６４３８６

(2)研究分担者
該当なし　（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
該当なし　（　　）

研究者番号：

(4)研究協力者
東　雅裕（HIGASHI MASAHIRO）
九州大学大学院・薬学研究院・大学院生
研究者番号：取得なし