

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24年 5月18日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770173

研究課題名（和文）大腸菌の複製開始因子 DnaA のマルチ蛋白質結合領域を介した開始制御システムの解析

研究課題名（英文）Analysis of replication initiation systems regulated through the proteins-interacting domain of DnaA

研究代表者

毛谷村 賢司（KEYAMURA KENJI）

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：70464386

研究成果の概要（和文）：染色体 DNA の複製反応は、遺伝情報を正確に娘細胞へと伝達するために厳密な制御を受けている。研究代表者は、この染色体複製が制御される仕組みについて大腸菌を研究対象に解析を行った。大腸菌では、複製反応を開始する因子 DnaA を不活性化する制御経路が知られている。本研究では、DnaA と不活性化因子間の相互作用様式を明らかにした。さらに、複製開始を制御する新たな因子の探索および同定を行った。

研究成果の概要（英文）：The initiation of chromosomal replication is strictly controlled to ensure that chromosomal DNA is replicated only once per cell cycle in all cellular organisms. In *Escherichia coli*, the DnaA initiator is inactivated to repress extra initiations by the Hda-replicase clamp complex. Here, this study showed that specific amino acid residues of DnaA N- and C-terminal domains are important for interaction with Hda. Moreover, candidates of novel initiation regulation factors were searched by protein purification methods, and then identified by mass spectrometry analyses.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |
| 2011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 複製制御、蛋白質間相互作用

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、必要不可欠なイベントの一つである。この DNA 複製は、細胞周期の適切な時期に一度だけ起こり、正確に二倍化するよう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り、その基本的な原理は原核生物、真核生物を問わず保存されている。申請者は、複製開始研究が

最も進んでおり、かつ非常にシンプルな複製開始機構を有する大腸菌を研究対象として、複製開始を適時的に起こすよう制御する分子機構の解明を目指す。

(2) 大腸菌の DNA 複製開始反応は、染色体上に唯一存在する複製起点 (*oriC*) 上で起こる。*oriC* は開裂領域と複数の 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 (ATP-DnaA) が *oriC* 上の DnaA 結合領域

に集合することで、特異的な高次複合体を形成し、開裂領域での二重鎖 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 DnaA との相互作用を介して DnaB ヘリカーゼが装着され、一本鎖 DNA 領域を拡大することで複製開始反応が完了する。その後、一本鎖 DNA 領域にプライマー合成酵素と DNA ポリメラーゼが装着し、新生鎖 DNA が合成される。一細胞周期中に一度だけ適切なタイミングで複製開始を起こす制御には、複製開始促進と抑制の 2 つのシステムがあり、これらが適度なバランスを維持していることが重要である。大腸菌の複製開始の促進および抑制には以下に示す機構が明らかになっている。

①DnaA の *oriC* 上への集合促進と DnaB ヘリカーゼ装着抑制

複製開始を適時的に促進する DiaA タンパク質 (DnaA initiator-associating factor) は、ホモ 4 量体構造を形成し複数の DnaA 分子と複合体を形成する。これにより、*oriC* 上へ DnaA 分子を効率的に集合させることで二重鎖 DNA の開裂を促進する (Keyamura et al. *Genes Dev.* 2007; Ishida et al. *J. Biol. Chem.* 2004)。加えて、DiaA は開裂反応の促進後、続く DnaB ヘリカーゼの装着を抑制する。これは、DiaA と DnaB が DnaA 分子内の共通領域で結合するためである。この抑制の解除には、DiaA を DnaA から解離させ、DnaB 装着を促す因子が必要であることも明らかになっている (Keyamura et al. *J. Biol. Chem.* 2009)。この作用により、DnaB は適切なタイミングで DNA 上に装着されるよう制御されていると考えられる。

②DnaA の不活性化

複製開始後、DNA 上に装着した DNA ポリメラーゼのサブユニットの一つであるクランプと Hda タンパク質の複合体によって、DnaA に結合した ATP が加水分解される (Su'etsugu et al. *J. Biol. Chem.* 2008; Katayama et al. *Cell* 1998)。これにより、DnaA は二重鎖 DNA 開始活性を持たない ADP 結合型 DnaA (ADP-DnaA) へと変換される。この抑制的制御は、RIDA (Regulatory inactivation of DnaA) と呼ばれ、過剰な複製開始を抑えている。

2. 研究の目的

DnaA は 4 つの機能ドメインに分類される。この内、N 末端に位置するドメイン I は、立体構造解析から疎水性残基の密集したポケットが存在しており、この部位で DiaA や DnaB ヘリカーゼと相互作用する (Keyamura et al. *J. Biol. Chem.* 2009)。また、このドメインは RIDA 反応にも必要である (Su'etsugu et

al. *J. Biol. Chem.* 2005)。このことから、DnaA ドメイン I が DiaA や DnaB だけでなく、RIDA 構成因子 (クランプ、Hda) とも相互作用することで、複製開始の促進と抑制のシステムを互いに制御できるような仕組みになっていると考えられる。

本研究では、DnaA ドメイン I を介した上記の 2 つの制御システムの分子メカニズムについて理解する。さらに、各制御システムの分子メカニズムを基盤として、これらを統合し、各制御システムがどのように相互に連携し機能しているのかについて理解することを目指す。

3. 研究の方法

DnaA の不活性化機構にける DnaA-Hda 相互作用様式の解析

(1) DnaA の Hda 相互作用残基の決定

これまでの研究から DnaA ホモログタンパク質の部分的な立体構造が明らかになっている。また、Hda についてもそのホモログタンパク質の立体構造が明らかになっている。そこで、これらの基本構造を基に DnaA と Hda の複合体の全体構造予測を行う。さらに、DnaA の N 末端 (ドメイン I) については、タンパク質間相互作用が予想される分子表面残基をターゲットに解析を行う。

①Hda との相互作用が予想されるアミノ酸残基について、変異導入を行い、解析に必要な変異 DnaA タンパク質を精製する。

②精製した DnaA 変異体について、Hda による DnaA 不活性化活性を測定する。

(2) DnaA 変異体と Hda の結合活性

プルダウン法、SPR 解析およびゲル濾過解析を用いて、DnaA 変異体の Hda に対する結合能を測定する。

(3) DnaA 変異体の複製開始活性

変異部位の機能特異性を検討するため、複製開始活性の有無を DNA 合成量や DNA 二重鎖開裂活性を指標に判断する。

(4) 細胞内における DnaA 変異体の活性

DnaA 変異体を細胞内へ導入した際の影響を検討する。具体的には、細胞の生存率や ATP 結合型 DnaA の蓄積量を解析する。

DiaA 解離因子の探索・同定と DnaB ヘリカーゼ装着制御メカニズムの解析

(1) 研究代表者は、すでに *oriC* DNA 断片を用いたプルダウン法を構築し、タンパク質粗面分中に *oriC* 上の DnaA に結合した DiaA を解離させる活性を見出している。そこで、この活性を指標にカラムクロマトグラフィーを

用いてタンパク質粗画分からの DiaA 解離因子の精製を進める。

(2)DiaA 解離因子の候補は MS (質量分析) 解析法を用いて決定する。決定された候補因子についてはタンパク質発現系を用いて精製を行う。次に精製した候補因子の DiaA 解離活性を測定し、目的因子の同定を行う。

(3)DiaA 制御因子がどのようなメカニズムで DiaA を DnaA から解離させ、DnaB ヘリカーゼの装着を促すのか、各精製タンパク質を用いて試験管内で再構成し解析する。また、変異導入により機能モチーフの同定と構造-機能相関解析を行い、機能メカニズムを解明する。

4. 研究成果

DnaA の不活性化機構にける DnaA-Hda 相互作用様式の解析

(1)DnaA の Hda 相互作用残基の決定

①DnaA ドメイン I の立体構造および構築した DnaA-Hda 複合体モデルから、Hda との相互作用が予想された DnaA の N 末端に位置するドメイン I 内のアミノ酸残基に変異導入を行い、数種の変異 DnaA タンパク質を精製した。また、DnaA-Hda 複合体モデルから、DnaA の C 末端に位置するドメイン IV (DNA 結合ドメイン) 内に新たに Hda との相互作用残基が見つかったため、同様に変異 DnaA タンパク質を精製した。

②精製した変異 DnaA タンパク質について、Hda に依存した DnaA の不活性化活性を測定した。その結果、ドメイン I 変異体の 2 種およびドメイン IV 変異体の 2 種について、その活性が低下していることがわかった。

(2)DnaA 変異体と Hda の結合活性

不活性化活性の低下した変異体について、プルダウン法、SPR 解析やゲル濾過解析を用いて Hda との相互作用を調べた結果、変異体の Hda 結合活性が低下していることがわかった。

(3)DnaA 変異体の複製開始活性

DnaA ドメイン IV 変異体について、DNA 結合活性、DNA 合成活性や DNA 二重鎖開裂活性を調べた結果、これらの活性は保持されていた。このことから、今回同定したアミノ酸残基は、Hda との相互作用に特異的に機能していることが示唆された。

(4)細胞内における DnaA 変異体の活性

DnaA ドメイン IV 変異体を大腸菌細胞で発現したとき、複製開始点である *oriC* 依存的に増殖阻害が引き起こされることがわかった。このことから、細胞内において、変異体

は不活性化されずに過剰な複製開始を引き起こすことが示唆された。さらに、DnaA ドメイン I および IV 変異体を細胞内で発現させ、変異体の ATP 結合型 DnaA 量を調べた結果、野生型に比べ増加していることがわかった。このことから、同定したアミノ酸残基は細胞内においても Hda による不活性化に重要であることが示唆された。

(5)DnaA-Hda 複合体モデルからの DnaA 不活性化制御メカニズム

本解析結果より、DnaA の 2 つのドメイン内での Hda 相互作用残基が同定された。また、これまでの解析により、DnaA のドメイン III と Hda との相互作用様式が明らかになっている (Nakamura and Katayama, *Mol. Microbiol.* 2010)。これらの結果を総合することで、DnaA と Hda の相互作用様式の全体像がほぼ明らかになった。特に本研究から派生した DnaA ドメイン IV 変異体の解析結果から、DnaA が DnaA 結合配列に結合した場合、結合した DnaA は Hda により不活性化されないという新たな制御モデルを提唱した。

上記 DnaA ドメイン IV 変異体の解析については、原著論文 (Keyamura et al. *J. Biol. Chem.* 2011) として発表済みである。また、DnaA ドメイン I 変異体の解析については、下記学会により発表済みである (学会発表②参照)。

DiaA 解離因子の探索・同定と DnaB ヘリカーゼ装着制御メカニズムの解析

(1)DiaA 解離因子を同定するため、DiaA 解離活性を指標に複数のタンパク質精製カラムを用いて精製した結果、20 種類程度まで候補因子を絞り込むことができた。

(2)精製された複数の候補因子について、質量分析によりタンパク質同定を行った。

(3)数種のタンパク質について発現株を用いて精製を行い、DiaA 解離活性を測定した。その結果、精製した因子の中で DiaA 解離活性を示す因子は同定できなかった。このことから、タンパク質精製が未だ完了していない候補因子の中に存在している可能性が考えられた。また、複数の因子が DiaA 解離活性に必要である可能性も考えられた。

上記解析結果については、下記学会により発表済みである (学会発表①、⑥参照)。

今後の研究展開

(1)DnaA のドメイン I については、Hda に加えて、DiaA や DnaB ヘリカーゼとも相互作用する。これら複数のタンパク質がどのように

共通領域を共有し、また相互に制御されているかを検討する予定である。

(2) 同定した DiaA 制御因子の候補は、さらにタンパク質精製を行い、DiaA 解離活性を測定することで、その原因因子を特定する。また同定完了後は、DiaA 制御因子の機能解析、DnaA ドメイン I からの DiaA 解離メカニズム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を進める予定である。

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: Keyamura, K., and Katayama, T.
論文標題: The DnaA DNA-binding domain binds to Hda to promote the inter-AAA+ domain interaction involved in the regulatory inactivation of DnaA
雑誌名: *J. Biol. Chem.*
査読: 有り
巻: 286
発行年: 2011
ページ: 29336-29346

② 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

[学会発表] (計 6 件)

① 発表者名: 東 雅裕、毛谷村 賢司、片山 勉
発表標題: DnaB 装着反応を制御する DiaA-DnaA 解離因子の解析と探索
学会等名: 第34回日本分子生物学会年会
発表年月日: 2011年12月13-16日
発表場所: 横浜

② 発表者名: 原田 雄二、毛谷村 賢司、片山 勉
発表標題: 制御的 DnaA 不活性化機構における DnaA ドメイン I の機能解析
学会等名: 第34回日本分子生物学会年会
発表年月日: 2011年12月13-16日
発表場所: 横浜

③ 発表者名: 毛谷村 賢司、東 雅裕、片山 勉

発表標題: The Interaction Mode between DnaA and Hda AAA+ Proteins in Regulatory Inactivation of DnaA

学会等名: 9th International Conference on AAA Proteins

発表年月日: 2011年11月6-10日

発表場所: 熊本県

④ 発表者名: 毛谷村 賢司、東 雅裕、片山 勉

発表標題: Interaction modes between DnaA and DiaA in initial complexes in *E. coli*

学会等名: Keystone Symposia

発表年月日: 2011年2月27-3月4日

発表場所: コロラド州 (米国)

⑤ 発表者名: 毛谷村 賢司、片山 勉

発表標題: DNA複製クランプ依存性 DnaA 不活性化機構 (RIDA) における DnaA-Hda 相互作用メカニズム

学会等名: 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会

発表年月日: 2010年12月17-10日

発表場所: 神戸ポートアイランド (兵庫)

⑥ 発表者名: 毛谷村 賢司、東 雅裕、篠崎 沙織、波多野俊之、仁木宏典、片山 勉

発表標題: 大腸菌の DNA 複製開始を適時的に制御する分子動態システム

学会等名: 第82回 日本遺伝学会

発表年月日: 2010年9月20-23日

発表場所: 北海道大学 (北海道)

[その他]

ホームページ等

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

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

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

(4) 研究協力者

① 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

②原田 雄二 (HARADA YUJI)
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