

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657004

研究課題名(和文)大腸菌ゲノムの遺伝子間領域の体系的機能解析

研究課題名(英文)Systematic analysis on the inter-gene regions of the Escherichia coli genome

研究代表者

片山 勉(Tsutomu, Katayama)

九州大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70264059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸菌ゲノムで0.5 kb以上の長さを持つ遺伝子間領域を体系的に解析した。まず独自の情報解析に基づきゲノムデータベースから目的に沿う領域を94部位抽出した。優先順位にしたがって欠失変異体を作成し解析すると、増殖が低温感受性を示すものが1種見出された。さらにこの領域には長鎖の逆方向反復配列が見出され、この配列に重要な機能があると示唆された。また並行して、複製開始タンパク質DnaAの結合部位クラスターを遺伝子間領域にもつdatA領域の機能解析も進め、datAがDnaAを制御するメカニズムを解明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the inter-gene regions which have a length of more than 0.5 kb in the Escherichia coli genome. First, based on original analysis using informatics and E. coli genome database, we deduced 94 sites which meet our present study. Next, according to priority determined by further database analysis, we systematically constructed deletion mutants of the regions. One of those mutants was found to have clear sensitivity in cell growth at low temperatures. A specific sequence motif was also found in the region, which was suggested to support cell growth at low temperatures. In parallel, we analyzed the datA region which has a cluster of DnaA-binding sites in an inter-gene region. DnaA is the replication initiator protein and we revealed functional mechanism in datA for regulating DnaA,

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 遺伝・ゲノム動態

キーワード：遺伝子間領域 非コードDNA ゲノム 遺伝学 大腸菌 DARS datA oriC

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノムの全体構造の特徴として、分子生物学の教科書には、ウイルスや原核生物のゲノムは遺伝子で間断なく埋まっており、一方、酵母を例外として真核細胞のゲノムには広大な遺伝子間領域があるとされている。そして、そのような真核生物における遺伝子間領域の機能については、機能性 RNA を中心として研究が進んでおり、Junk DNA という言葉もあまり使われなくなった。

代表者は、大腸菌の複製開始因子 DnaA の機能制御の研究から、全く予想されていなかった遺伝子間領域の機能を見いだした (Fujimitsu et al. *Genes Dev.*, 2009)。DARS (DnaA-reactivating Sequence) と命名したこの配列は、ゲノム上に 2 カ所あり (DARS1, DARS2)、いずれも 0.5 kb~1.0 kb に亘る遺伝子間領域であった。DARS のコア配列は 0.1 kb であり、DnaA 結合部位を 3 つもつ。ここで DnaA が多量体を形成し、特異的な DnaA 間相互作用を促すことにより、不活性な ADP 結合型から複製開始能をもつ ATP 結合型へ変換する。このような DARS 機能は細胞周期に共役した DnaA 活性の変動、および、複製開始タイミングの制御に必須である (Fujimitsu et al. *Genes Dev.*, 2009)。以上のことは、原核生物の遺伝子間領域には重要な機能があるにも関わらず、現在はそれがほとんど解明されていないことを示している。

## 2. 研究の目的

本研究では、大腸菌ゲノム上の遺伝子間領域を個々に欠失させて、細胞周期解析や多様な条件下での増殖能、温度や紫外線等への応答能を体系的に解析する。そして重要な領域を見出し、その役割を解明する。並行して遺伝子間領域に機能部位を持ち、複製開始タンパク質 DnaA の制御に重要である *data* 部位について、機能メカニズムを解析する。

## 3. 研究の方法

(1) 大腸菌ゲノムデータベースから 0.5 kb 以上の遺伝子間領域を抽出する。それらについて個々に塩基配列の特徴 (反復配列の有無等) をコンピュータ解析や文献をもとに検討し、新規性や重要性によって順位付けを行なう。高いプライオリティーが見込まれるものから、体系的に欠失変異株を作成する。変異株作成の手法には  $\lambda$  Red タンパク質による部位特異的組換えシステムを用いる。次いで、作成された欠失変異株について体系的に表現型解析を進める。欠失変異によって増殖阻害が生じた場合には、多様なサイズの欠失変異を導入することにより必須領域を限定する。表現型解析においては、多様な条件下での増殖能、フローサイトメータを用いた細胞周期パラメータ、紫外線感受性、各種阻害剤感受性等を解析する。重要な遺伝子間領域が

見出された場合は、その機能に必要な塩基配列を特定する。さらにその機能配列の特徴を解析し、基盤的な分子機構を解析する。

(2) 並行して複製開始制御に重要な *data* 部位の機能解析も進めた。ここでは精製タンパク質を用いた *in vitro* 再構成系を活用する。また、各種の変異体を独自のアッセイ法で解析する。

## 4. 研究成果

(1) まず、大腸菌ゲノムデータベースをもとに 0.5 kb 以上の遺伝子間領域 94 ヶ所を特定した。この際には独自に開発した計算プログラムを用いた。これらの候補のそれぞれに対して、プロモーター領域、既知の反復配列、既知のタンパク質因子結合配列などを詳しく検討した。この際にもデータベースにあるタンパク質結合領域の網羅的情報を活用するため、独自に計算プログラムを開発した。なお、これらのプログラム開発と情報解析は、研究協力者の川上広宣博士 (九州大学薬学研究院分子生物薬学分野) が行なった。これらの情報解析に基づき、見込まれる新規性や重要性を勘案して、実験的解析に供する優先順位を決定した。

次に、優先順位に従って欠失変異株を体系的に構築した。この際には  $\lambda$  Red 組換え酵素を用いた部位特異的変導入法を用いた。最優先グループとした 12 部位の欠失変異株の構築に成功し、それぞれの変異株の表現型を体系的に解析した。その結果、0.6 kb の遺伝子間領域を欠失した変異株 1 種の増殖が低温感受性を示すことがわかった。つまり、この欠失変異体は 30°C 以下の温度では増殖できなかった。またこの欠失変異株に対するフローサイトメータを用いた細胞周期パラメータ解析においては、染色体複製が阻害されていることも示唆された。一方、他の欠失変異体では有意な細胞周期パラメータの変動は検出できなかった。また、紫外線感受性や薬剤感受性については、どの欠失変異体においても検出されなかった。

0.6 kb 領域の欠失変異株の低温感受性は、同じ DNA 領域をもつプラスミドの導入により相補された。この領域の塩基配列を検討すると、長鎖の逆方向反復配列が存在することがわかった。上と同じ手法でこの逆方向反復配列のみの欠失変異株を作成すると、同様の低温感受性が示された。さらに、この領域を持つ高コピー数のプラスミドを野生型細胞に導入すると、染色体コピー数が増加した。

以上をまとめると、本研究において、低温での細胞の増殖に必須となる遺伝子間領域が新たに見出された。この領域には特異的な長鎖逆方向反復配列が含まれており、これが機能実体となっている可能性が示された。また、この領域から転写が起こっており、その RNA 産物が重要である可能性もある。この領域の機能は染色体複製の制御に重要である

ことも示唆された。これらの成果は、新たなゲノム機能の理解において重要な内容を含むと考えられる。

(2) 本研究では、並行して、遺伝子間領域に重要なモチーフを持つ *datA* 部位の解析も進めた。大腸菌においては、ATP 結合型 DnaA タンパク質が染色体の複製起点 (*oriC*) と高次複合体を形成し、複製開始反応を進行させる。複製開始後、DnaA 結合性 ATP は、DNA 上に装着した DNA ポリメラーゼのクランプ・サブユニットの機能により加水分解され、ADP 結合型 DnaA が生じる。この ADP-DnaA は、不活性化型であるため、過剰な複製開始反応が抑制される。このような DNA ポリメラーゼ・クランプに依存する DnaA-ATP 加水分解システムを RIDA (Regulatory inactivation of DnaA) と呼ぶ。本研究において、*datA* 部位は、RIDA とは独立に働く DnaA-ATP 加水分解システムを担うことが新たに発見された。すなわち、*datA* 部位において、染色体構築因子である IHF タンパク質と ATP-DnaA 多量体による高次複合体が形成され、そこで DnaA-ATP 加水分解が活性化され、DnaA が不活性化される。この第 2 の DnaA 不活性化システムを DDAH (*datA*-dependent DnaA-ATP hydrolysis) と命名した。さらに、IHF が複製開始後に *datA* 部位に結合することを解明した。これにより DDAH が細胞周期と協調して適時的に活性化されることが明らかになった。これらの成果は、新たなゲノム機能と染色体複製の制御機構の理解において重要な内容を含むと考えられる。なお、この成果をまとめた論文は米国科学アカデミー紀要 (Pro Natl Acad Sci USA) に掲載された。

## 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 3 件)

① 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 (doi: 10.1073/pnas.1212070110)

② Ozaki, S., and Katayama, T. (2012) Highly organized DnaA-*oriC* complexes recruit the single-stranded DNA for replication initiation. Nucleic Acids Res. 40(4), 1648-1665 (doi: 10.1093/nar/gkr832)

③ 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(44), 37458-37471 (doi: 10.1074/jbc.M112.371052)

[学会発表] (計 12 件)

① 川上広宣、土田愛海、末次正幸、加生和寿、片山 勉. 大腸菌の増殖に必須な新奇非コード配列. 文部科学省 科学研究費 新学術領域研究 「ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能」 公開シンポジウム インターメインターメアによる染色体制御機構 (2014 年 1 月 8-9 日 東京大学)

② 川上広宣、土田愛海、末次正幸、片山 勉. 大腸菌染色体の非コード DNA 領域に存在し、細胞増殖に必須な新奇機能性配列 ELIXIR. 第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ「ウェット個別研究とドライ研究の実践的超融合～新しい分子生物学のあり方を模索する」(世話人: 川上 広宣, 加藤 護) (12 月 3-6 日 神戸)

③ 加生和寿、藤光和之、片山 勉. 複製開始を調節する機能性 DNA 因子 *datA* 及び DARS2 (DnaA-reactivating sequence 2) の核様体蛋白質による細胞周期制御. 第 36 回日本分子生物学会年会 (2013 年 12 月 3-6 日 神戸)

④ 土田愛海、川上広宣、片山 勉. Computational search for exceptional DNA elements at extremely long, intergenic regions in *E. coli* chromosome. 日本バイオインフォマティクス学会 2013 年年会 (2013 年 10 月 29-31 日 東京)

⑤ Katayama, T., Kasho, K., Noguchi, Y., Sakiyama, Y., Matoba, T., Tanaka, H., Taniguchi, M., Ozaki, O., Fujimitsu, K., and Kawakami, H. DnaA assemblies on the replication origin *oriC*, DARS and the *datA* locus for the replication initiation and regulation of the initiation in *E. coli*. 第 86 回日本生化学会大会 International Session: Assembly and architecture of protein complexes regulating inheritance and stable maintenance of genome (organizers: Hisao Masai, Tsutomu Katayama) (2013 年 9 月 11-13 日 横浜)

⑥ 土田愛海、川上広宣、末次正幸、片山 勉. 大腸菌染色体上に点在する長い遺伝子間領域の体系的欠失解析. 第 10 回 21 世紀大腸菌研究会 (2013 年 6 月 20-21 日 修善寺)

⑦ 加生和寿、片山 勉. 特異的 DNA 配列 *datA* による新規 DnaA 不活性化経路 DDAH (*datA*-dependent DnaA-ATP hydrolysis) の機能解析. 第 11 回 薬学研究院若手研究者セミナー (2013 年 3 月 15 日 九州大学)

⑧ Kasho, K. and Katayama, T. A novel

mechanism of a specific DnaA-binding locus *datA* for regulation of the replication initiator DnaA. 2013 Keystone Symposia X5/X6 DNA Replication and Recombination. (March 3-8, 2013, Banff, Canada)

⑨ 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学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) (2012 年 12 月 14-16 日 福岡)

⑩ 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) (2012 年 12 月 11-14 日 福岡)

⑪ Kasho, K. and Katayama, T. Molecular and cell cycle analyses of a novel inactivation mechanism for the replication initiator DnaA by a specific chromosomal locus. The 8th 3R Symposium, 2012 (2012 年 11 月 25-28 日 淡路島)

⑫ 加生和寿、片山 勉. 特異的 DNA 配列 *datA* による新規 DnaA 不活性化経路 DDAH (*datA*-dependent DnaA-ATP hydrolysis) の解析. 第 11 回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2012 (2012 年 9 月 15-16 日, 九大)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
九州大学薬学研究院分子生物薬学分野  
<http://bunsei.phar.kyushu-u.ac.jp>

九州大学薬学研究院研究成果

[http://www.phar.kyushu-u.ac.jp/bbs/view2.php?S\\_Publ\\_Year=&word=&page=&B\\_Code=144](http://www.phar.kyushu-u.ac.jp/bbs/view2.php?S_Publ_Year=&word=&page=&B_Code=144)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片山 勉 (KATAYAMA TSUTOMU)  
九州大学・薬学研究院・教授  
研究者番号: 70264059

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし