九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

大腸菌染色体の複製開始複合体におけるDnaAタンパク質の機能制御と多量体形成の分子機構

野口，泰徳

https://hdl.handle.net/2324/1441176

出版情報：九州大学，2013，博士（薬学），課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

大腸菌染色体の複製開始複合体における DnaA タンパク質の機能制御と多量体形成の分子機構

分子生物薬学分野　3PS11010T　野口　泰徳

【序論】

恒常的な生命機能の維持には、細胞周期に依存した染色体 DNA の複製が必要である。染色体複製には、開始タンパク質と複製起点からなる開始複合体の形成が必要である。また、染色体を正確に二倍化するため、開始複合体形成は、1 回の細胞周期で複製起点あたり 1 度しか起こらないように制御されている。

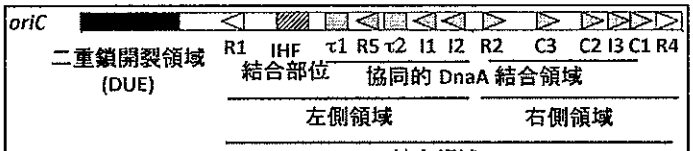

図1 *oriC*の構造
*oriC*内の白色の三角は高親和性DnaA boxであり、灰色の三角と四角は低親和性のDnaA boxである。また、斜線の四角はIHF結合部位であり、黒色の四角は二重鎖開裂領域である。

大腸菌では、まず複製起点 *oriC* 内にある特定の部位に核様体形成因子 IHF が結合する(図 1)。さらに、DnaA 結合配列(DnaA box)クラスター上に ATP 結合型 DnaA(ATP-DnaA)が協同的に結合して、多量体を形成する(図 1)。このとき、DnaA 結合 ATP は隣接する DnaA 分子の R285 残基(アルギニンフィンガー)によって認識される(1)。これらの相互作用により開始複合体が形成される。その後、二重鎖 DNA の開裂が導かれ、2 分子の DnaB ヘリカーゼが DnaA 結合を介して、開裂領域に対称的な向きで装着され、両方向に進む。これにより、プライマーゼや DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素(Pol III)が装着し、DNA 複製反応が進む。岡崎フラグメント合成後、Pol III の Clamp サブユニットのみが新生 DNA 上に残る。この DNA 装着型 Clamp と Hda タンパク質の複合体により、DnaA-ATP の加水分解が促進される(2)。これにより、*oriC* 上で開始活性をもつ多量体を形成できない ADP 結合型 DnaA(ADP-DnaA)が生じる。生じた ADP-DnaA は、安定な複合体として存在する。そして、次の周期の複製開始時に特異的な DNA 配列(DARS)により ATP-DnaA に変換される(2)。このように ADP-DnaA 複合体を長時間安定に維持することは複製開始の制御に重要であるが、そのために必要とされる DnaA の機能構造には不明な部分が残っている。

また、最近、*oriC*-DnaA 複合体は、異なった機能をもつ二つのサブ複合体から形成されていることが示された(3)。左側(R1 box 側) *oriC*-DnaA サブ複合体は、*oriC* の開裂と DnaB 装着に必要であり、右側(R4 box 側) *oriC*-DnaA サブ複合体は DnaB 装着を促進する。しかしながら、この機能的な違いを説明する分子構造はわかっていない。

oriC における DnaA box クラスターの両端には、R1 box と R4 box があり、これらは向かい合った配向をしている(図 1)。染色体上の *oriC* の R1 box 配列が反転されると、著しい細胞増殖阻害を示すことから、*oriC*-DnaA 複合体中の DnaA 分子の配向性は重要であると考えられる。しかしながら、その配向性、つまりアルギニンフィンガーが内側に向くのか、外側に向くのかについてはまだ具体的に解明されていない。

【方法】

in vitro DNA 複製再構成系

DnaA を ADP または ATP と氷上で、10 分間前反応させた。生じた ATP-DnaA または ADP-DnaA を、*oriC* を含むミニ染色体、DnaB ヘリカーゼ、DnaC ヘリカーゼローダー、DnaG プライマーゼ、核様体形成因子 HU、DNA ジャイレース、1 本鎖 DNA 結合タンパク質 SSB、DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素、rNTPs、[α-^{32}P]dATP を含む dNTPs と反応させた。反応後、10% トリクロロ酢酸により反応を停止させ、GF/C フィルタにより DNA を回収した。そして、合成された DNA を液体シンチレーションカウンターにより、測定した。

EMSA(Electrophoretic Mobility Shift Assay) による DnaA 複合体形成

DAR の右側領域または左側領域の DNA 断片を DnaA と 30℃、10 分間反応させた。その後、2%アガロースゲル電気泳動により DNA を分離し，Gel-Star 染色(TAKARA Co.)を行った。

Chimera DnaA(ChDnaA)の精製

大腸菌 DnaA のドメイン IV の塩基配列を超好熱菌 *Thermotoga maritima* の DnaA のドメイン IV の塩基配列で置換した発現プラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌内で Chimera DnaA を過剰発現させた。その後、可溶化、硫酸アンモニウム沈殿、透析、グアニジン変性、ゲル濾過により精製した。

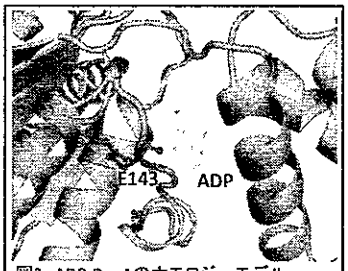

図2 ADP-DnaAのホモロジーモデル
DnaAドメインIIIの一部の構造と結合しているADPを示している。

【結果】

序論に示した 3 つの不明な点について、解析を行った。

DnaA とヌクレオチドとの安定な結合に必要な機能構造解析

DnaA E143 残基はヌクレオチドとの安定な結合に機能していた。

DnaA-ADP 結合領域に存在する N-linker モチーフ内の Glu143 のアラニン置換変異体の解析を行った(4)(図 2)。不活型である ADP-DnaA E143A 変異体では、結合していた ADP の解離が促進され、ATP 存在下において効率よく活性型の ATP-DnaA E143A が生じ、複製開始活性を回復した。

開始複合体における DnaA 間相互作用の機能構造解析

DnaA R227 と DnaA L290 残基は複製開始に必要であった。

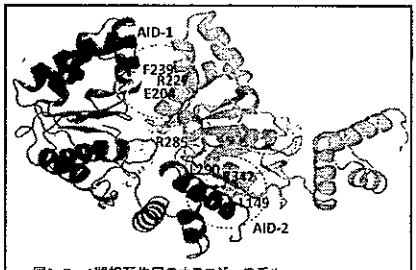

図3 DnaA間相互作用のホモロジーモデル
2分子のDnaAドメインIIIの構造を示している。点線で囲まれた領域がそれぞれAID-1、AID-2モチーフである。また、それぞれのモチーフ内のあるアミノ酸も示している。

ホモロジーモデル解析により、AID-1、AID-2 モチーフが DnaA 間相互作用に機能していると考えられていた(5)(図 3)。そこで、AID-1、AID-2 内の DnaA R227、DnaA L290 残基のアラニン置換変異体が複製開始活性を持つかどうか、*in vitro* 複製再構成系を用いて、調べた。その結果、両方の変異体は、複製活性を示さなかった。これは、これら残基が複製開始に機能していることを示している。

DnaA R227 と DnaA L290 残基は左側 *oriC* における多量体形成に必要であった。

左側 DAR と右側 DAR 上における DnaA R227A と DnaA L290A の多量体形成活性を EMSA により調べた。その結果、左側 DAR において、DnaA R227A と DnaA L290A は多量体形成活性が低下していた。

一方、右側 DAR では、活性の低下は見られなかった。これらのことは、DnaA R227 と DnaA L290 残基が、左側 DAR 上における多量体形成に機能していることを示唆している。

開始複合体中における DnaA 分子の配向性解析

ChDnaA アッセイ系の構築。

大腸菌の DnaA box と *T. maritima* の DnaA box(tmaDnaA box)は異なる配列である。実際、大腸菌 DnaA は tmaDnaA box に結合しなかった。そこで、R1 box を tmaDnaA box で置換した変異 *oriC* をもつミニ染色体と精製した ChDnaA を用いて、*in vitro* 複製再構成系を構築し、複製開始活性を調べた。その結果、大腸菌 DnaA を加え、ChDnaA を加えていない場合、複製活性が見られなかった。一方、大腸菌 DnaA と同時に ChDnaA も加えた場合、複製活性が見られた。これらのことは、ChDnaA が R1 box に結合して、活性を持つ開始複合体が形成されることを示している。つまり、*oriC* 上の DnaA box を tmaDnaA box に置換することで、その場所に結合する DnaA の向きを解析できると考えられる。

R1 box 上の DnaA のアルギニンフィンガーは複製開始に必要であった。

R1 box 上の DnaA の向きを解析するため、R1 box に ATP-ChDnaA、ADP-ChDnaA、および ATP-ChDnaA R285A(アルギニンフィンガー変異体)を結合させて、複製活性をもつかどうか同様に検証した。その結果、ATP-ChDnaA と ADP-ChDnaA では、同程度の複製開始活性が示された。一方、ATP-ChDnaA R285A では、複製開始活性が見られなかった。つまり、R1 box 上の DnaA においては、ATP ではなく、アルギニンフィンガーが複製開始に必要であった。

R4 box 上の DnaA のアルギニンフィンガーは複製開始に必要であった。

R4 box 上の DnaA の向きの解析も、R1 box と同様に行った。その結果、ATP-ChDnaA と ADP-ChDnaA では、同程度の複製開始活性が示された。一方、ATP-ChDnaA R285A では、複製開始活性が見られなかった。つまり、R4 box 上の DnaA においても、ATP ではなく、アルギニンフィンガーが複製開始に必要であった。

【考察】

DnaA とヌクレオチドとの安定な結合に必要な機能構造解析

DnaA の N-linker 内の Glu143 残基が DnaA への安定なヌクレオチド結合に必要であることを示した。Glu143 残基は酸性アミノ酸であるので、ATP または ADP のアデニンリングと水素結合をして、安定化しているかもしれない。また、側鎖の炭化水素鎖がアデニンリングと相互作用しているかもしれない。DnaA は ATP の加水分解のみならず、ATP または ADP と安定に結合することが複製開始の制御に重要である。そのため、Glu143 残基により DnaA が ATP または ADP と安定な複合体形成することは、複製開始の制御に必要であると考えられる。

開始複合体における DnaA 間相互作用の機能構造解析

DnaA R227A と L290A において、複製開始活性がなかったのは、左側 DAR 上での DnaA 多量体形成が阻害されたことが原因であると考えられる。これは、DnaA R227、L290 が複製開始に必要な新規

の機能構造として重要であることを示唆する。また、右側 DAR では、多量体形成活性の低下は見られなかった。これは、DAR 上の DnaA 多量体は一様ではなく、少なくとも２つの異なる部分構造からなっていることを示している(図 4)。これら異なった部分構造により、右側 DAR と左側 DAR において機能が異なっていると考えられる。

開始複合体中における DnaA 分子の配向性解析

oriC 上の R1 box と R4 box 上に結合する DnaA の配向性を解析した結果、R1 box と R4 box 上の DnaA は共に ATP 結合ではなく、アルギニンフィンガーを複製開始に必要とした。よって、どちらもアルギニンフィンガー側が *oriC* の中心方向を向いていると考えられる。つまり、アルギニンフィンガーが隣接する DnaA の ATP を認識して、Head-to-Tail 型の多量体をするので、R1 box と R4 box からアルギニンフィンガーを *oriC* の中心方向に向けて、DnaA 多量体は形成されていると考えられる。これは、*oriC* 上で DnaA が連続した配向により多量体を形成しているという従来の開始複合体モデルとは異なる。そこで、今回 DnaA 多量体が DAR の右側と左側において対称になっているという新たな開始複合体モデルを提唱する(図 4)。

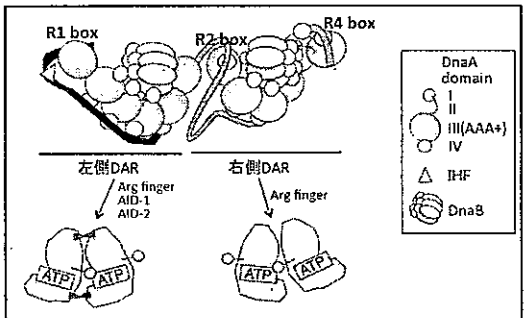

図4 開始複合体モデル
上段はDAR-DnaA複合体の配向性を示している。ドメインIIIの黒色側がアルギニンフィンガー側であり、白色側がATP側である。
下段はDnaA間相互作用を示している。

DnaB ヘリカーゼは開裂によって生じる 1 本鎖 DNA 対して、正確な向きで、そして選択的に装着される必要がある。DnaB は 1 本鎖 DUE 装着前に DAR の右側と左側の DnaA 多量体上にそれぞれ集合すると考えられている。DAR の右側と左側の DnaA 多量体が対称の配向になっていると考えられるので、DnaB も構造的に対称の向きに集合すると考えられる。それにより、DnaB が 1 本鎖に装着される向きが制限され得るだろう。さらに、上で報告したように、DnaA 多量体は DAR の右側と左側で構造が異なっている。この構造の違いが DnaB 装着時の 1 本鎖 DNA の選択に機能しているのかもしれない。これら、DnaA 多量体の配向性と構造的な違いにより、DnaB の選択的な装着が行われているのかもしれない。

【発表論文と引用文献】

1) Kawamami H., Keyamura K., Katayama T. (2005) J. Biol. Chem. 280, 27420-27430.

2) Katayama T., Ozaki S., Keyamura K., Fujimitsu K. (2010) Nat. Rev. Microbiol. 3, 163-170

3) Ozaki S., Katayama T. (2012) Nucleic Acids Res. 40, 1648-1665

4) Ozaki S., Noguchi Y., Nishimura M., Katayama T. (2012) J. Struct. Biol. 179, 242-50

5) Ozaki S., Noguchi Y., Hayashi Y., Miyazaki E., Katayama T. (2012) J. Biol. Chem. 287, 37458-37471.

6) Ozaki S., Matsuda Y., Keyamura K., Kawakami H., Noguchi Y., Kasho K., Nagata K., Masuda T., Sakiyama Y., Katayama T. (2013) Cell Rep. 4, 985-995