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）

氏名	野口　泰徳
論文名	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

論文審査の結果の要旨

細胞増殖には、染色体DNAの複製が必要である。染色体複製は細胞周期と共役して適時的に、かつ、1回の細胞周期で1度しか起こらないように厳密に制御されている。複製開始には、染色体DNA上の特定部位における高次な蛋白質複合体の形成が必要である。この複合体、すなわち、開始複合体の形成機構、機能機構、および制御機構の解明は、染色体複製の制御機構の理解のため、極めて重要である。また、抗菌剤あるいは抗ガン剤の開発にとっても重要な基礎となると考えられている。モデル細胞として詳細な解析に有利である大腸菌の系では、多数の蛋白質を含み動的な構造変化にも富む開始複合体の解析においても先導的な立場で研究が進んでいる。

大腸菌では、複製起点 *oriC* 内にある 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。このときDnaA結合ATPは隣接するDnaA分子のArg285残基(アルギニンフィンガー)によって認識される。その後、二重鎖DNAの開裂が導かれ、複製開始反応の口火を切る。複製開始が完了すると、過剰な開始反応を抑制するため、DNA 複製と共役したフィードバック抑制により DnaA-ATP の加水分解が促進される。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、次の周期の複製開始時まで、安定な複合体として存在する。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。ADP-DnaA 複合体を安定維持は複製開始の制御に必須である。

また、最近、開始複合体は、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唆された。左側(R1 box 側)サブ複合体は、二重鎖 DNA の開裂に必要であり、右側(R4 box 側)はその後の開始反応を促進する。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。染色体上の *oriC* の R1 box の配列を反転する変異を導入すると著しい細胞増殖阻害が起こること等から、開始複合体中の DnaA 分子の配向性は複製開始に重要であることが示唆されている。R1 box と R4 box の内側には結合活性が比較的弱い DnaA box がクラスター形成しており、R1 に近い左側サブと R4 に近い右側サブグループに分けられる。そして左側サブグループの DnaA box は R1 box と同じ方向性を、右側サブグループのそれは R4 box と同じ方向性をもっている可能性が高い。しかしながら、これらに結合する DnaA 分子の方向性、つまりアルギニンフィンガーが内側を向くのか、外側と向くのかについて、具体的な解析は成されていなかった。

本論文において、野口泰徳氏は、上記の３つの重要ポイントについて詳細な生化学的、分子生物学的解析を進めた。その結果、まず、DnaA-ATP(ADP)結合領域に存在する特異的なアミノ酸残基(Glu143) が DnaA とヌクレオチドとの安定結合と DnaA 活性の制御に重要であることを見出した。これに相当する残基は多種の真正細菌の DnaA オーソログにおいてよく保存されているので、この機構は真正細菌に広く共通するものかもしれない。

次に野口氏は、開始複合体の左側サブ複合体形成に特異的に必要なる２つのアミノ酸残基(Arg227、Leu290)を見出した。これらの残基は DnaA 間相互作用に直接機能することが推定された。これを含む多数のデータに基づき、野口氏は、これらの残基が関与する DnaA 間相互作用様式の違いにより、左右のサブ複合体は異なる構造となり、それぞれ異なる機能をもつに至ると考え、新たな開始複合体の形成様式を提唱した。

さらに、野口氏は、*oriC*に結合したDnaA多量体中の任意のDnaAの配向性を解析する新規なアッセイ系を構築した。このアッセイ系を用いて、野口氏は、R1 boxとR4 boxに結合するDnaA分子は、どちらも、アルギニンフィンガーを*oriC*領域の内側に向けて結合していることを示唆する結果を得た。これまで、開始複合体中のDnaA多量体は全体として一様な配向性であると考えられていた。しかしながら、この結果に基づくと、左右のサブ複合体で対称的な配向性をもつと考えられる。これは未だ誰も提唱していない新たなモデルとなる。しかも、これまで解明された複製開始の制御機構や複製開始反応の分子機構と合理的に体系を組上げることができ、今後の分子機構の解析のために重要な示唆を含むものでもある。

以上の研究は、染色体複製の開始複合体の分子機構の理解において高い重要性をもつものであり、分子生物学と基礎薬学の進歩にとって有意義な貢献をなすものである。よって本学位請求論文は博士（薬学）の学位に値すると認める。