

Dynamics of DNA replication initiation complex in *Escherichia coli* : From forming initial duplex unwinding complex to helicase loading complex

崎山, 友香里

<https://hdl.handle.net/2324/1931845>

出版情報 : 九州大学, 2017, 博士 (創薬科学), 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)

Dynamics of DNA replication initiation complex in *Escherichia coli* –From forming initial duplex unwinding complex to helicase loading complex–

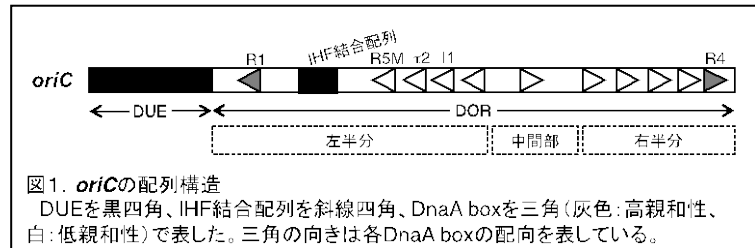
大腸菌の染色体複製開始複合体の機能構造動態
–初期二重鎖開裂複合体形成からヘリカーゼ装着過程の解析–

分子生物薬学分野 3PS15005N 崎山 友香里

【序論】

細胞性生物は、娘細胞に遺伝情報を伝達するために、染色体 DNA を正確に複製・分配する。染色体 DNA の複製開始過程では、複製開始因子が複製開始点を認識し、DNA 複製ヘリカーゼを呼び込んだ後、ヘリカーゼを足場として DNA 合成装置が構築される。これら一連の過程は、原核・真核生物間で共通であり、厳密に制御されている。異常な複製開始は、染色体数の異数化による細胞のがん化や細胞死を招くため、DNA 複製開始機構の解明は、生物学的及び薬学的に高い意義をもつ。

私は、生化学的・遺伝学的解析に適したモデル生物である大腸菌を、複製開始反応の解析に用いた。大腸菌の染色体 DNA 複製は、複製開始活性のある ATP 結合型の DnaA 蛋白質(ATP-



DnaA)が唯一の複製開始点 *oriC* 上に集合することにより開始される。*oriC* は二重鎖開裂領域(DUE; Duplex unwinding region)と、11個の DnaA 結合配列(DnaA box)、DNA 屈曲因子 IHF の結合配列を含む DnaA 重合領域(DOR; DnaA oligomerization region)とで構成される(図1)。DOR は DnaA box の配向と位置によって左半分、右半分、及び中間部に分けられる(1)。DOR の両端にはそれぞれ高親和性の DnaA box R1 と R4 が位置し、隣接する低親和性 DnaA box クラスター上への ATP-DnaA 分子の集合の起点となると考えられている。形成された DnaA 複合体は、IHF による DNA の屈曲と協調して DUE を一本鎖化(開裂)する(2)。生じた一本鎖 DUE(ssDUE)が DnaA 複合体表面の特異的な残基と結合することにより、DUE 開裂状態は安定化される(3)。これにより、続く DnaB 複製ヘリカーゼの ssDUE への装着が可能となる。これらの反応過程に左半分 DOR は必須である一方、右半分と中間部は不要であり、DnaB 装着の促進に機能する(2)。しかしながら、DnaA の *oriC* 上への集合、DUE 開裂、DnaB ヘリカーゼの装着における、DOR 内の個々の DnaA 分子の役割、及び複合体の機能構造は不明である。

【方法】

DUE 開裂活性の評価: ATP/ADP-DnaA、IHF、*oriC* プラスミドを 38°C で 3 分間保温した後、P1 スクレアーゼを加えて、さらに 38°C で 200 秒反応させた(DUE 開裂再構成系)。DUE が開裂した場合、P1 スクレアーゼによって ssDUE が消化を受けることを指標として、DUE 開裂活性を評価した。

複合体形成能の評価: *oriC* 断片と ATP/ADP-DnaA とを 30°C で 10 分間保温した後、ゲル電気泳動に

より形成された複合体を分離した(ゲルシフト解析)。末端を ^{32}P で末端標識した *oriC* 断片と ATP/ADP-DnaA とを、IHF の存在下または非存在下で 30°C で 10 分間保温した後、デオキシリボヌクレアーゼ I (DNアーゼ I)による切断パターンの変化を調べた(DNアーゼ I フットプリント解析)。

ssDUE 結合能の解析: *oriC* 断片と ATP/ADP-DnaA を氷上で結合させた後、 ^{32}P で末端標識した ssDUE を加えて 30°C で 10 分間保温した後、ゲル電気泳動により *oriC*-DnaA-ssDUE 三者複合体の形成を解析した (ssDUE 結合アッセイ)。

DnaB 装着活性の解析: *oriC* プラスミドに ATP/ADP-DnaA、IHF、DnaB、DnaC(ヘリカーゼローダー)、SSB(一本鎖 DNA 結合蛋白質)、ジャイラーゼ(超らせん調節酵素)を反応させると、開裂によって生じた ssDUE 上に DnaB が装着される。DnaB の装着・進行に伴い、ジャイレースが *oriC* プラスミドに負の超らせんを蓄積させる。このように超らせんの蓄積した *oriC* プラスミドをゲル電気泳動により未反応のものから分離してそれぞれ定量し、DnaB 装着活性を評価した。

大腸菌細胞の複製開始能の解析: 対数増殖期の細胞に、複製開始阻害剤リファンピシンと細胞分裂阻害剤セファレキシンを加えて 4 時間培養し、各細胞の染色体 DNA 量をフローサイトメーターで解析した。また、細胞体積をコールターカウンターで測定し、複製開始能の指標となる染色体 DNA 量/細胞体積の比を算出した(フローサイトメーター・コールターカウンター解析)。

【結果】

DnaA box R1、あるいは R5M 変異 *oriC* プラスミドでは DUE 開裂活性が低下した

まず、*oriC* の部分領域欠失プラスミドの DUE 開裂活性を、DUE 開裂再構成系を用いて調べた結果、DUE 開裂最小領域に DnaA box R1、R5M、 $\tau 2$ 、II が含まれることがわかった。続いて、これらの DnaA 分子の DUE 開裂過程での役割を知るために、各 DnaA box に変異を持つ *oriC* プラスミドを DUE 開裂再構成系に用いて解析した。その結果、DnaA box R1 と R5M の 2 つが特に DUE 開裂に重要であることを見出した(4)。また DnaA box $\tau 2$ 、II は DUE 開裂に促進的に機能することが示唆された。

DnaA box R5M 変異 *oriC* では、左半分 DOR 上の DnaA 複合体の形成が低下した

DnaA box R1 と R5M に変異を持つ *oriC* 断片の複合体形成能をゲルシフト解析、及び DNアーゼ I フットプリント解析を用いて調べた。その結果、高親和性の DnaA box R1 ではなく、低親和性の DnaA box R5M が、左半分 DOR での ATP-DnaA による複合体形成に中心的役割を果たすことが明らかになった(4)。また、ゲルシフト解析の泳動産物の解析から、DnaA box R5M 周辺の DnaA box クラスターへの ATP-DnaA の結合は、1 分子ずつ段階的に結合するのではなく、中~高濃度の ATP-DnaA 存在下で協同的に起こることが示唆された。

DUE 開裂は DnaA box R1、R5M 上の DnaA 分子による ssDUE 結合に依存していた

DnaA box R1、R5M の DnaA 分子が DUE 開裂時に ssDUE と結合しているかを検討するために、それぞれの DnaA box 上に ssDUE 結合能を欠損した変異 DnaA を導入し、DUE 開裂活性・ssDUE 結合能を再構成系で調べた(4,5)。その結果、これらの DnaA box 上に結合した DnaA 分子による ssDUE との直接結合が、DUE 開裂に重要であることを見出した(4)。

右半分 DOR 上の DnaA 複合体の ssDUE 結合が DnaB 装着の促進に必要なだった

各 *oriC* 領域の部分欠失プラスミドの DnaB 装着活性を DnaB 装着再構成系で評価した。その結果、左半分 DOR 上の DnaA 複合体による DnaB 装着には、DUE 内の左側領域が必要であることが示唆された。また、右半分 DOR 上の DnaA 複合体も ssDUE と結合することが、ssDUE 結合アッセイによって明らかになった。さらに、DnaB 装着時に、右半分 DOR の端に位置する DnaA box R4 上の DnaA 分子が ssDUE と結合するか、R4 上に ssDUE 結合能を欠損した変異 DnaA を導入し、DnaB 装着再構成系で DnaB 装着活性を調べた。その結果、DnaA box R4 上に結合した DnaA 分子による ssDUE 結合によって、DnaB 装着が促進されることが示唆された。

大腸菌細胞内でも DnaA box R1、R5M、R4 上の DnaA 分子の ssDUE 結合が正常な複製開始に重要だった

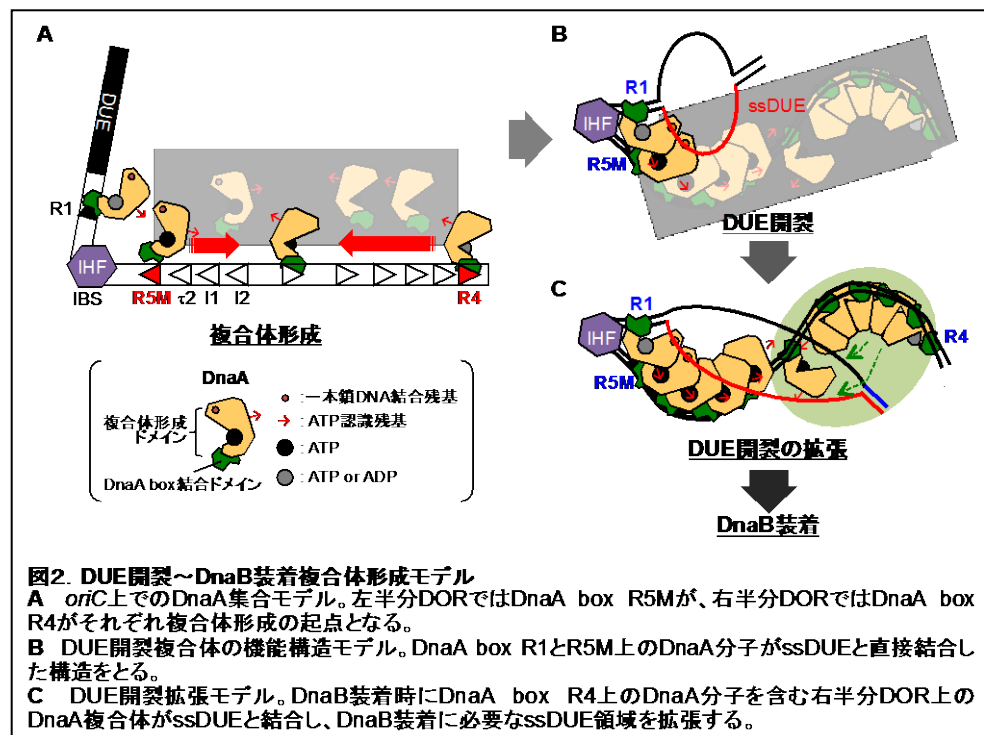
上記の結果が大腸菌細胞内でも当てはまるのか、同様の *oriC* 変異を染色体上に導入し、複製開始に与える影響をフローサイトメーター・コールターカウンター解析で調べた。その結果、DnaA box R1、R5M、あるいは R4 上に ssDUE 結合能を欠損した DnaA 分子が結合しうる場合に、いずれも複製開始が阻害されることがわかった。これらの結果は、試験管内再構成系の解析結果と一致する。

【考察】

低親和性 DnaA box R5M の DUE 開裂複合体の形成における役割

本研究により、左半分 DOR 上での ATP-DnaA 分子の集合には、これまでの仮説で考えられていた高親和性の DnaA box R1 ではなく、低親和性の DnaA box R5M が中心的役割を果たすことが新たに見出された(図 2 A)。複製開始活性のある ATP-DnaA 量は、細胞内で複製開始前に一過的に増加するよう、厳密に制御されている。高親和性 DnaA box R1 とは異なり、DnaA box R5M などの低親和性 DnaA box

には、ATP-DnaA が ADP-DnaA より高い親和性で結合する(3, 4, 6)。そのため、低親和性の DnaA box R5M が複合体形成の中心的役割を果たすことは、DnaA の結合ヌクレオチドに応じた適時的な DUE 開裂複合体の形成制御に重要かもしれない。



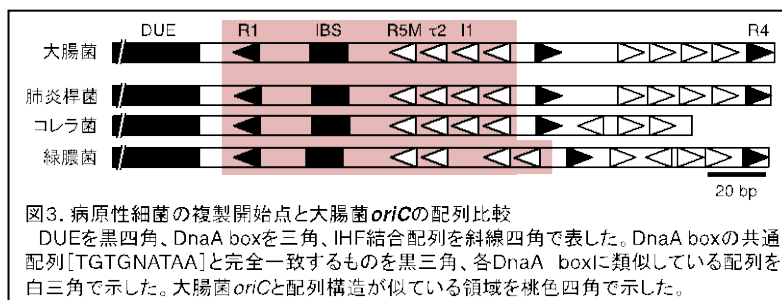
DnaA box R1、R5M、R4 上に結合した各 DnaA 分子の DUE 開裂と DnaB 装着における役割

これまでに複数の DUE 開裂複合体モデルが提唱されていたが、本研究により、DnaA box R1 および R5M 上の DnaA 分子が、ssDUE と直接結合するような DUE 開裂複合体構造をとることが支持された(図 2 B)。これらの DnaA box は DUE の近傍に位置しており、開裂初期にこれらに結合した DnaA 分子が ssDUE と結合することが、DUE 開裂状態の安定化に重要であると考えられる。

加えて、右半分 DOR 上で形成された DnaA 複合体も、左半分 DOR 上の DnaA 複合体と同様に ssDUE と結合できること、また DnaA box R4 上の DnaA 分子の ssDUE 結合が、DnaB 装着の促進に重要であることがわかった(図 2 C)。これらの結果から、DnaB 装着時に左右対称な ssDUE 結合複合体が形成されることが、DnaB 装着制御に重要であると予想される。

本研究の生物学的・薬学的意義

モデル生物である大腸菌を用いた本研究から DUE 開裂における DnaA box R1 と R5M の重要性が明らかになったが、肺炎桿菌やコレラ菌、緑膿菌などの病原性細菌におい



ても、これらの DnaA box の DUE からの位置関係の保存性や *oriC* の全体構造の類似性が、配列解析から示唆された(図 3)。そのため、本解析によって明らかになった大腸菌の DUE 開裂から DnaB 装着までの分子機構は、これらの病原性細菌にも共通していると考えられる。複製開始反応は細胞増殖に必須であるため、この研究を展開させることにより新規抗菌剤の開発に貢献できるかもしれない。

また、近年、他のモデル生物の解析からも、ヘリカーゼ装着複合体の左右対称性が両方向への DNA 合成に重要であることが示唆されている。そのため、この研究を深めることは、普遍的な複製開始反応の理解に繋がると考えられる。

【発表論文と引用文献】

- (1) Shimizu, M., Noguchi, Y., **Sakiyama, Y.**, Kawakami, H., Katayama, T. and Takada, S. (2016) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **113**, E8021-E8030.
- (2) Ozaki, S. and Katayama, T. (2012) *Nucleic Acids Res.*, **40**, 1648-1665.
- (3) Ozaki, S., Kawakami, H., Nakamura, K., Fujikawa, N., Kagawa, W., Park, S. Y., Yokoyama, S., Kurumizaka, H. and Katayama, T. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 8351-8362.
- (4) **Sakiyama, Y.**, Kasho, K., Noguchi, Y., Kawakami, H. and Katayama, T. (2017) *Nucleic Acids Res.*, **45**, 12354-12373.
- (5) Noguchi, Y., **Sakiyama, Y.**, Kawakami, H. and Katayama, T. (2015) *J. Biol. Chem.*, **290**, 20295-20312.
- (6) Kawakami, H., Keyamura, K. and Katayama, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 27420-27430.