

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)

氏 名	崎山 友香里		
論 文 名	Dynamics of DNA replication initiation complex in <i>Escherichia coli</i> -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-)		
論文調査委員	主 査	九州大学	教授 片山 勉
	副 査	九州大学	教授 藤田雅俊
	副 査	九州大学農学研究院	教授 石野良純
	副 査	九州大学	准教授 尾崎省吾

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

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み、DNA 複製装置の構築へと導く。これら一連の過程は原則として原核・真核生物間で共通であり、しかも、細胞周期中で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死、変異生成、あるいはがん化を招くことがあるため、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。

本研究では、生化学的、分子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機構の解析に用いた。大腸菌の染色体 DNA 複製は、活性型である ATP 結合型の DnaA 蛋白質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。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。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 結合型 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。生じた一本鎖 DUE 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。これにより、続く DnaB 複製ヘリカーゼの一本鎖 DUE 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。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 DnaA 複合体の機能構造にはまだ不明な部分が多い。

本論文では初めに、DUE 開裂までの過程における個々の DnaA 分子の役割を知るために、種々の変異 *oriC* を DUE 開裂再構成系に適用して解析した結果が述べられた。そこでは、まず、左半分 DOR 内の DnaA box R1 と低親和性 DnaA box R5M の 2 つが特に DUE 開裂に重要であることが見出された。さらに、これまでの定説と異なり、DnaA box R1 ではなく、DnaA box R5M が左半分

DOR での ATP 結合型 DnaA による複合体形成に中心的役割を果たすことがゲルシフト解析、および、DNase I フットプリント解析により明らかにされた。

次に、DnaA box R1 および R5M に結合した DnaA 分子の一本鎖 DNA 結合能の役割を解析した結果が述べられた。ここでは、これらの DnaA box に一本鎖 DNA 結合欠損型 DnaA 変異体の特異的に導入した複合体では、DUE 開裂活性および一本鎖 DUE 結合能が阻害されるが明らかにされた。よってこれらの DnaA box に結合した DnaA 分子と一本鎖 DUE との直接結合が DUE 開裂に重要であることが示された。

さらに、DnaB 装着反応における各 *oriC* 領域の役割、及び、右半分 DOR 内の DnaA box R4 の役割を解析した結果が述べられた。ここでは、右半分 DOR 上の DnaA サブ複合体、特に DnaA box R4 上に結合した DnaA 分子による一本鎖 DUE 結合が DnaB 装着を促進することが示唆された。

加えて、試験管内再構成系解析で得られた上記のような結果が大腸菌細胞にも適用できるのか解析された結果が述べられた。ここでは、まず、ゲノム編集技術を用いて上記と同様の *oriC* 変異が染色体に導入された。フローサイトメーターや細胞サイズ解析装置等を用いて、それらの変異体の細胞増殖能、及び複製開始能が詳しく解析された結果、試験管内再構成系解析から導かれた結論が支持された。

全体として、本研究により、まず、左半分 DOR 上での DnaA サブ複合体の集合過程において、これま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 が中心的役割を持つことが明らかとなった。DnaA box R1 とは異なり、DnaA box R5M を含む低親和性 DnaA box クラスターには活性型の ATP 結合型 DnaA が高い効率で結合することから、この分子機構は DnaA の結合ヌクレオチドに応じた適時的な複製開始制御に重要かもしれない。さらに、本研究により、DnaA box R1 と R5M に結合した DnaA 分子が一本鎖 DUE と直接結合して、DUE 開裂複合体の基本構造を形成することが独自に明らかにされた。DUE 開裂複合体の基本構造の解明は本研究領域では極めて重要な課題であり、世界的な研究競争も引き続けている。そのようななか得られたこの結論の意義は決して小さくない。加えて、右半分 DOR 上で形成された DnaA サブ複合体も一本鎖 DUE と結合して DnaB 装着を促進することが示唆された。最後に、*oriC* の塩基配列や DnaA box の配置の共通性を基にした考察により、これらの分子機構は、大腸菌のみならず、多種の病原菌を含む真正細菌に広く保存されていることも示唆された。したがって、本研究は染色体複製開始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、基礎薬学および生命科学の進展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（創薬科学）の学位に値すると認める。