

Analyses for mechanisms in formation of the replication initiation complex and for functional characteristics of the DNA unwinding region at the replication origin of hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*

盧, 楚元

<https://hdl.handle.net/2324/7157321>

---

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (創薬科学) , 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :

氏 名	盧 楚元		
論 文 名	Analyses for mechanisms in formation of the replication initiation complex and for functional characteristics of the DNA unwinding region at the replication origin of hyperthermophilic bacterium <i>Thermotoga maritima</i> (高度好熱性真正細菌 <i>Thermotoga maritima</i> の複製起点における開始複合体の形成メカニズムと開裂部位の特性の解析)		
論文調査委員	主 査	九州大学	教 授 藤田雅俊
	副 査	九州大学	教 授 田中嘉孝
	副 査	九州大学	教 授 Jose Caaveiro
	副 査	九州大学	准教授 尾崎省吾

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

染色体複製は細胞周期の特異的な時期に一度のみ開始するように厳密に制御される。複製開始制御の破綻は、染色体コピー数の異常をもたらし、遺伝子発現の異常を誘起するのみならず、細胞のがん化や細胞死を導くこともある。そのため、染色体複製開始を制御する分子機構の解明は、生物学的および医薬学的に高い意義を持つ。複製開始の制御は、複製開始メカニズムとも深く関係しているため、これら双方の研究を推進してゆく必要がある。

盧 楚元氏による本論文においては、細菌における複製開始メカニズムについて一般的な原理を追究するため、進化的に始原細胞に近いとされる高度好熱性真正細菌 *Thermotoga maritima* の複製開始複合体が解析された。モデル生物とされる大腸菌では、複製開始タンパク質 DnaA が複製起点 *oriC* 上でオリゴマーを形成した開始複合体の主要構造が提唱されている。*oriC* の基本構造は、DNA 一本鎖化領域 (DUE: Duplex Unwinding Element) と DnaA オリゴマー化領域 (DOR: DnaA-Oligomerization Region) から成る。DnaA の基本構造はドメイン I~IV に分けられ、C 末のドメイン IV が DNA 結合部位をもち、特異的な非対称配列からなる DnaA box に結合する。ドメイン IV は短いリンカーを介してドメイン III に繋がる。ドメイン III は、ATP/ADP 結合、DnaA-DnaA 結合、一本鎖化 DUE の特異的配列への結合を担う。そして、N 末領域は、関連タンパク質との相互作用部位をもつドメイン I と長鎖の天然変性領域となるドメイン II からなる。大腸菌 *oriC* 上では、DnaA box が順方向に整列しており DnaA 自体も ATP 結合を介したドメイン III-ドメイン III 間の順方向結合によって五量体を形成する。そして、この DnaA-DOR 複合体が、DNA の構造変化によって一本鎖化した DUE の特定の配列と結合して、*oriC* の開裂 (局所的 DNA 一本鎖化) を支える。これが開始反応に必須なステップとなっている。

細菌の進化過程では、DnaA については構造的な保存性が高いものの、*oriC* については、DUE の塩基配列や DOR における DnaA box の配置・配向に多様性が大きい。そのため大腸菌で提唱された開始複合体の構造やメカニズムが *T. maritima* にも適用できるか不明だった。

本研究で盧 楚元氏は、精製した因子を用いた、多様な試験管内再構成系を活用して、*T. maritima* における *oriC* の開裂と DnaA の複合体形成のメカニズムを詳細に解析した。まず、*oriC* の開裂に必須な DUE の機能構造について、一連の変異 DUE の機能解析が体系的に遂行された。*T. maritima*

DUE には、大腸菌と枯草菌とで見出された DnaA 結合配列がそれぞれ存在する。しかしながら、これらは両方とも *T. maritima* DnaA-DOR 複合体には結合しなかった。一方、それらの配列に挟まれた新たな塩基配列、すなわち TAG の 3 回繰り返し配列、が *T. maritima* DnaA-DOR 複合体に結合することが新たに解明された。またここでは一本鎖化 DUE と DnaA との結合機構は原理的には大腸菌のものと共通することが示唆された。

次に *T. maritima* DOR 上での DnaA 複合体の形成メカニズムが解析された。*T. maritima* DOR 上には 5 個の DnaA box (box 1~5) が存在するが、大腸菌と異なり、それらのうち 1 つ (box 2) は逆方向となっている。そこで盧 楚元氏は、多様な変異をもつ *T. maritima* DnaA や DOR を試験管内再構成系に適用し野生型がもつ構造や機能と比較検討した。DNA 結合アッセイやフットプリントアッセイの結果、逆方向 DnaA box が存在しても、ドメイン III-ドメイン III 間の相互作用は ATP 結合を介して順方向に起っていることが示唆された。さらに、一对の逆方向 DnaA box において ATP 依存的な DnaA 複合体が形成されるためには特異的な DnaA box 間のスペーサー長が必要であることもわかった。野生型 *T. maritima* DOR では最適のスペーサー長となっていた。さらに *T. maritima* DOR の逆方向 DnaA box (box 2) を逆方向に置換した場合、すなわち 5 個の DnaA box 全部を順方向にした場合、においても、隣接の DnaA box とのスペーサー長を適切に調整すれば野生型と同等レベルの *oriC* 開裂活性が見られた。これらの結果から、*T. maritima* DnaA では、ドメイン IV に対して、DnaA ドメイン III が大きく旋回して順方向に結合した複合体を形成できるという新たな仮説が提唱された。実際にアルファフォールド 2 を用いた構造予測では、大腸菌 DnaA では 4 アミノ酸残基しかないドメイン III-IV 間のリンカー部位が、*T. maritima* DnaA では 12 残基に延長しておりドメインどうしを大きく旋回させることが可能となっていることが示唆された。これらのことから、DnaA box の配向の多様性があっても、DnaA の構造変化によって大腸菌と同様な DnaA 複合体の形成を可能とするメカニズムが初めて示唆された。さらに、同様な DnaA 構造の特徴は DnaA box の配置・配向に多様性をもつ他の細菌種においても見られた。

以上のように本研究で盧 楚元氏は、*T. maritima* における *oriC* の開裂機構と DnaA の複合体形成とを詳しく解析して新たなメカニズムを解明した。これらの結果は、細菌の複製開始複合体における共通原理と多様性の理解において重要である。加えて、病原性細菌の増殖機構の理解や新たな抗生物質の開発の基礎にも重要となる。したがって、本論文は、生命科学のみならず、基礎薬学の進展にとって重要な意義がある。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。