

## 研究成果

## 染色体DNA配列が複製開始蛋白質DnaAを活性化する



藤光 和之 特任助教  
Kazuyuki Fujimitsu

九州大学薬学研究院

論文 : Specific genomic sequences of *E. coli* promote replicational initiation by directly reactivating ADP-DnaA.  
Fujimitsu K., Senriuchi T., Katayama T.  
Genes Dev 2009 23:1221-1233

今回、私達は、大腸菌の特異的な配列をもつ染色体DNAが染色体複製イニシエーターであるDnaAを活性化することを見出しました。現在までに、2箇所の染色体領域がDnaA活性化能を持つことを見出しており、DARS (DnaA-Reactivating Sequence) 1、DARS2と呼んでいます。本稿では、DARS1/2の発見に至るまでの経緯を紹介させて頂きます。

## 背景

大腸菌の染色体複製はDnaA蛋白質が、複製起点*oriC*に結合し、この領域の2重鎖DNAを開裂することで開始されます。DnaAの複製開始活性は、結合アデニンヌクレオチドで制御されており、ATP結合型(ATP-DnaA)が活性型で、ADP結合型(ADP-DnaA)は不活性型です。細胞内ATP-DnaAの割合は、複製サイクルと同調して変動しており、複製開始前に急速に上昇し、複製開始後には減少してゆきます。複製開始後のATP-DnaAの減少に関しては、DNA複製中にDNA上にロードされるβスライディングクランプとHdaの複合体によって、DnaA-ATPが加水分解されることが明らかとなっています。この複製開始に応じてDnaAを不活性化するシステムはRIDAと呼ばれており、複製開始後の再複製の抑制に機能しています。一方、ATP-DnaA分子の増加のメカニズムは長い間、未解明でした。

## 偶然に発見したColE1プラスミド上のDARS

DARS1/2を語る上で、ColE1系プラスミドDNA上に存在するDARSの発見は欠かせません。「ColE1-DARSの発見」、これが全ての始まりでした。私がDnaA再活性化因子を探索する事になったのは、今からさかのぼること、10年前です。当時、既に、DnaA再活性化経路が存在することが実験的に示唆されていましたが、その決定的な因子の同定には至っていませんでした。そこで、新規DnaA再活性化因子の探索に着手しました。その方法として、DnaA結合ADPを解離させる活性を指標とし、大腸菌から抽出した蛋白質粗画分から単離、同定するという方法を選択しました。これは、大腸菌内のATPの濃度はADPより約10倍高いため、ADP-DnaAからADPが解離すれば、生じたヌクレオチドフリー DnaA (Apo-DnaA) は優先的にATPと再結合し、再活性化されると考えられたためです。しかしながら、なかなか予想通りには事は進まず、最初は全くADP解離活性を検出できませんでした。粗画分の調製

方法やADP-DnaAと粗画分の反応条件を検討することで、やっと微弱なADP解離活性を検出することができるようになりました。ただ、あまりにも微弱な活性であったため、調製ロットによってはADP解離活性がありませんでした。そのため、調製段階で混入する物質がADP解離活性を安定化しており、その混入量の違いが活性を左右しているのではないかと考えました。調製した画分の混入物を調べた結果、活性のある画分には、核酸が多く含まれることが分かりました。そこで、大量にラボストックがあったColE1系プラスミドの1種であるpBluescriptを反応系に加えたところ、ADP解離活性を安定的に検出する事が出来ました。さらに、安定化する要素を調べていくと、最終的に、ColE1に由来した70bpの特異的なDNA配列自体が、ADP解離活性を有することが分かりました（あのとき、pBluescriptが大量になかったら、今日の自分はここにいないと思います）。さらに解析を進めることで、仮説通り、ADP解離後、ATPが再結合し、DnaAの複製活性が再活性化されることをin vitroで示す事が出来ました。そこで、このような活性を持つ配列をDARS, DnaA-reactivating Sequenceと名付けました。ColE1-DARSの特徴として、DnaA boxと呼ばれるDnaA結合配列が3つ存在する事が上げられます。さらに解析を進めた結果、これらDnaA boxの配置がDARS活性に重要である事が分かりました。

## ColE1-DARSからDARS1、そしてDARS2へ

ColE1-DARSで得られた知見から、DnaA boxに注目し、大腸菌の染色体からDARSの単離を試みました。まず、DnaA boxのクラスターをデータベースから検索し、51カ所の候補領域をPCR增幅後、得られたDNA断片のADP解離活性を測定しました。DARS1はColE1-DARSとほぼ同程度の活性を持っていたため、この方法で比較的容易に単離する事が出来ました。しかしながら、DARS1欠失変異株は増殖可能であり、この変異株をFACSで解析しても、既知の複製開始因子の変異体のような劇的な複製開始活性の低下はみられませんでした。このあたりから、再び試行錯誤の日々が始まりました。DARS1欠失の影響がより顕著にみられる条件を求めて、培養条件の検討や他の複製関連因子との二重、三重変異株作製、等々試みましたが、全く満足のいく結果は得られませんでした。この苦難の日々から救ってくれたのが、DARS2です。DARS2領域は、最初のスクリーニングで候補領域として上がっていたのですが、ColE1-DARSやDARS1と比較して、微弱なADP解

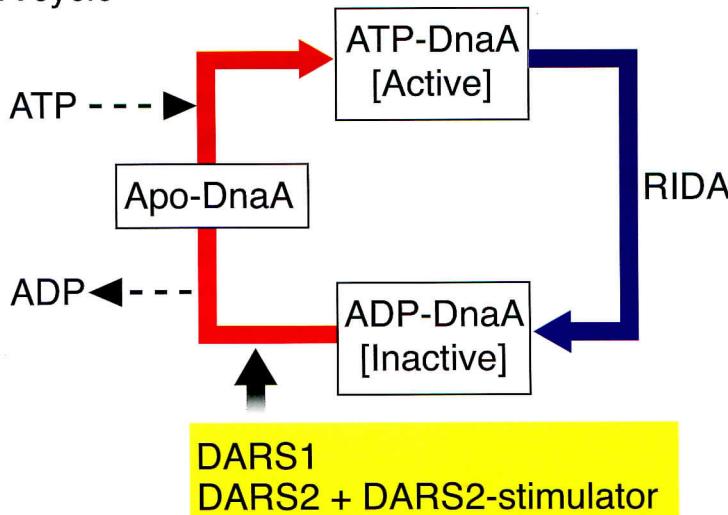
# 染色体DNA配列が複製開始蛋白質DnaAを活性化する

離活性しかないといため、以降の解析を行っていませんでした。このような状況下、藁をもつかむ思いでDARS2内のDnaA boxを欠損した株を構築し、複製開始活性をFACSで測定しました。その結果、DARS2欠失のみでは、劇的な複製開始活性の低下はみられませんでしたが、DARS1とDARS2の両者を欠失すると、相乗効果で顕著な複製開始活性低下がみされました。DARS1とDARS2はredundantに機能していたため、どちらか一方の欠失変異体では顕著な複製開始活性の低下がみられなかったのだと思われます。その後、DARS2がin vitroで低活性な理由は、大学院生だった千里内君が明らかにしてくれました。彼は、大腸菌の蛋白質粗画分を添加すると、DARS2活性が促進さ

れることを見出しました。蛋白質粗画分を高温で処理するとDARS2促進活性が消失する事から、未同定の蛋白性因子がDARS2活性を促進していると考えています。現在、DARS2促進因子の同定を試みておりますが、複数の因子が関わっているようです。

最後になりましたが、学会等で、私の未完成なデータを前に、熱心にディスカッションして頂いた先生がた、本当にありがとうございました。本研究は、全て片山研究室で行われました。長期化した研究に最後までお付き合い頂いた片山先生に感謝致します。

(A) DnaA cycle



(B) DARSの最小領域とDnaA box

