



## ゲノム DNA 複製開始を制御する新規 DNA 因子の発見とそれを用いた試験管内 DNA 複製制御システムの開発

～高等な生物のゲノム複製制御や病原菌・ガン細胞などの増殖制御の研究にも促進効果が期待～

### 概 要

九州大学薬学研究院の片山 勉教授と藤光和之助教の研究グループは、大腸菌ゲノムの複製開始を制御する、新たな分子システムを解明しました。大腸菌ゲノムの複製開始は DnaA 蛋白質により制御されており、DnaA 蛋白質の活性化により複製が適時的に開始されます。今回の研究で、ゲノム上の 2 カ所の DNA 因子が、直接、DnaA 蛋白質を活性化することが初めてわかりました。当グループは、これらの因子を DARS (DnaA Reactivating Sequence) と命名しました。DARS は、正常な細胞のゲノム複製開始制御に必須です。また、DnaA 活性化因子が、蛋白質因子でなく、DNA 因子であることは、予想されなかったことです。全く新しいメカニズムではたらく新規抗菌剤の開発の基盤ともなります。さらに、DARS 因子を用いて、試験管内で DnaA 蛋白質活性制御系を再構成することにも成功しました。これは、新規薬剤探索の新基盤となるばかりでなく、試験管内で DNA 複製を自律制御できることを示しており、細胞の化学的再構築のためにも重要な 1 歩となるものです。これらのことから、細胞増殖とその制御機構の解明が各段に加速されるとともに、より高等な生物のゲノム複製制御やガン細胞などの増殖制御の研究にも促進効果が期待されます。

本研究成果は、2009年5月1日(米国東部時間)に米国科学雑誌 Genes & Development 誌オンライン版に掲載される予定です。

### ■背景

細胞が増殖するには、遺伝子の担い手である染色体 DNA を正確に 2 倍化する事が必要です。染色体 DNA 複製は細胞周期の適切な時期に 1 度だけ起こります。適時的に染色体 DNA を複製するには、その開始段階の制御が最も重要です。当グループがモデル生物として用いている大腸菌では、DnaA 蛋白質<sup>\*1</sup>が、染色体 DNA 複製の開始反応を進める主役です。DnaA 蛋白質の複製開始活性は、アデニンヌクレオチド<sup>\*2</sup> で制御されており、ATP 結合型 DnaA(ATP-DnaA)が活性型で、ADP 結合型 DnaA(ADP-DnaA)は不活性型です。細胞内 ATP-DnaA 分子の割合は、複製サイクル(周期)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 の減少は、ATP 加水分解反応によるもので、この反応は DNA ポリメラーゼ(合成酵素)の活性化と直接連動しています。このシステム(RIDA; Regulatory Inactivation of DnaA)<sup>\*3</sup>も、当グループによって初めて解明され、1998年に米国科学雑誌 Cell 誌に掲載されています(Katayama et al., Cell, 94: 61-71)。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。今回、ADP-DnaA から ATP-DnaA への再活性化(リサイクル)が、予想されなかった DNA 因子によって直接、進められることがわかりました。

## ■内 容

今回、当グループは、染色体上の特異的な DNA 配列が ADP-DnaA を ATP-DnaA へ再活性化（リサイクル）し、染色体複製を促進する事を明らかにしました。このような DnaA 再活性化能をもつ DNA 配列を DARS(DnaA-Reactivating Sequence)と名付けています。DARS は、DnaA に結合している ADP を解離させ、細胞内に高濃度に存在する ATP の再結合を促す事で、DnaA を再活性化していました。染色体上には、2 カ所の DARS 配列が存在し、それぞれ DARS1、DARS2 と名付けています。DARS1 と DARS2 の共通点として、3 つの DnaA 結合配列(DnaA box)の配置があげられます。それぞれの DnaA box が DARS 活性に重要な役割を果たしていました。さらに解析を進めた結果、複数の ADP-DnaA 分子が DARS 上で高次複合体を形成する事が分かりました。この結果から、DARS は、ADP-DnaA 分子間の相互作用を促進し、各分子の立体構造を変化させる事で、ADP を解離させると考えられます。

また、当グループはこの DARS による DnaA 再活性化システムと、当グループがすでに再構成に成功していた RIDA(DnaA 不活性化)システムを組み合わせる事で、DnaA 活性制御システム全体を精製タンパク質に用いて試験管内で再構成する事に成功しました。これは、これらの DnaA 活性制御システムが実際に試験管内 DNA 複製を制御できることを示しており、自律的な DNA 複製サイクルを試験管内で再構築できる可能性を示しています。

## ■効果と今後の展開

今回、初めて当グループは、特異的な DNA 配列が DnaA の再活性化（リサイクル）を介して染色体 DNA 複製の開始を促進することを明らかにしました。今後は DARS 活性を制御する、より高次な連係システムの解明が課題です。それにより、染色体複製が、細胞内の様々なイベントと連動して起こるためのメカニズムなど、細胞増殖とその制御メカニズムの解明が期待されます。

DnaA 蛋白質は、ほとんどの細菌種（バクテリア）に共通して存在します。ゲノム塩基配列から DARS も多くの細菌種に共通する因子と示唆されます。これらの細菌のなかには、病原性を持つ赤痢菌やコレラ菌も含まれます。また、DnaA 活性化因子（DARS）が、蛋白質因子でなく、DNA 因子であることは、予想されなかったことです。全く新しいメカニズムではたらく新規抗菌剤の開発の基盤ともなります。

また、DnaA などの主要な DNA 複製因子や制御系は、進化的に保存されていることがわかっているため、本研究成果により、より高等な生物のゲノム複製制御やガン細胞などの増殖制御の研究にも促進効果が期待されます。実際、大腸菌で見いだされた RIDA と原理的に共通するメカニズムが、酵母、カエル、ショウジョウバエ、ヒト細胞など高等生物にも存在することも現在ではわかっています。

DnaA 再活性化システムが明らかになった事で、精製タンパク質による、DnaA 活性制御システム全体の試験管内再構成が可能となりました。細胞の最大の特徴である自己増殖を行うには、適時的な DNA の複製が必須です。この再構成系の成功により、細胞増殖とその制御機構の解明が各段に加速されるでしょう。また、試験管内 DNA 複製制御システムの構築は、新規薬剤の探索の基盤ともなるばかりか、細胞の生化学的再構成への新たな一步として位置づけられます。

【用語解説】

- \*1) DnaA 蛋白質 大腸菌の複製開始蛋白質。DnaA 蛋白質は、染色体上の *oriC* と呼ばれる領域に結合し、染色体 DNA の複製を開始させる。
- \*2) ヌクレオチド 糖、塩基、リン酸からなる化合物。酵素反応の基質や酵素の活性調節因子となる。ATP は、ヌクレオチドの一種であり、加水分解等でリン酸基が一つ遊離すると ADP となる。
- \*3) DnaA 不活性化システム RIDA (Regulatory inactivation DnaA)と呼ばれ、DnaA に結合した ATP の加水分解を促進し、DnaA を不活性化する。片山勉教授の研究グループによって、発見及び試験管内再構成された。

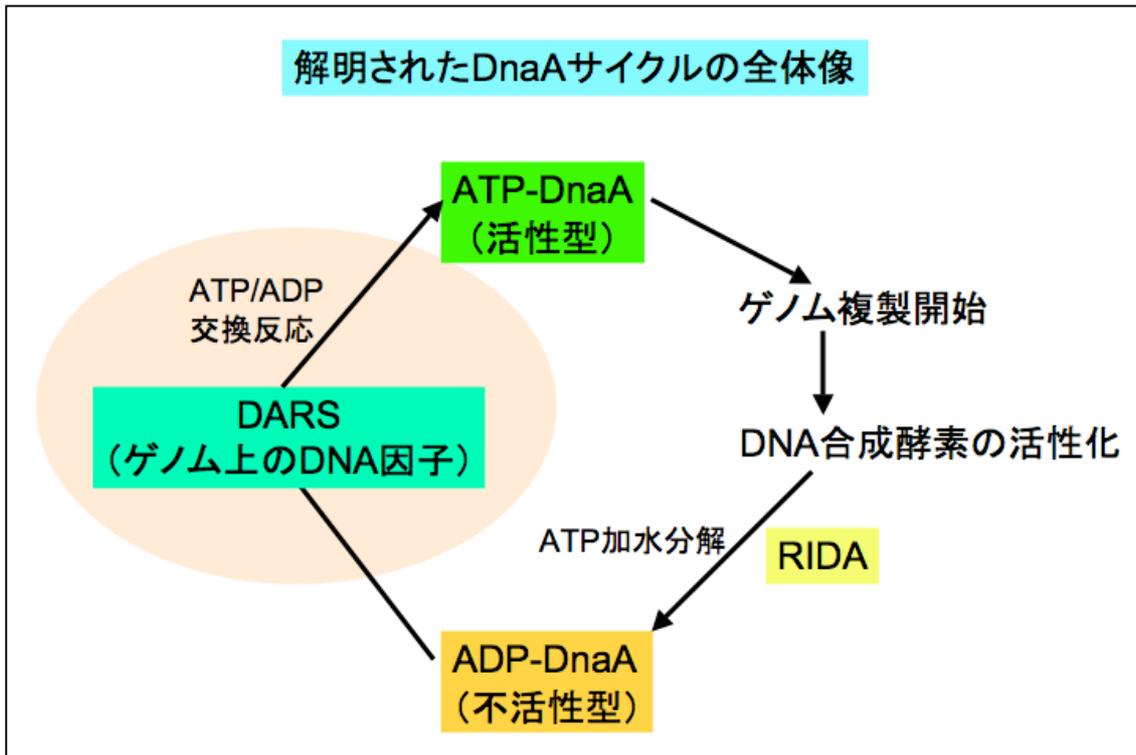
【お問い合わせ】

薬学研究院教授 片山 勉；助教 藤光和之

電話：092-642-6641、6643

FAX：092-642-6646

Mail：katayama@phar.kyushu-u.ac.jp



DARS は、ADP-DnaA から、ADP を解離させ、細胞内に高濃度で存在する ATP の再結合を促すことにより、DnaA を再活性化（リサイクル）することが、わかりました。複製開始後は、DnaA 不活性化システム(RIDA)により、不要になった ATP-DnaA の機能が抑制されます（ATP 加水分解により ADP-DnaA へ変換）。今回、このような DnaA 制御サイクルの全体像が解明されました。さらに、この一連の DnaA 制御システムを試験管内で連続して行うことにも成功し、DnaA 制御システム全体を試験管内で再構築することができました。