

論文内容の要旨

申請者氏名 趙 恩河

細菌の染色体複製は、複製開始タンパク質DnaAが複製開始点 (*oriC*) に結合することにより開始するが、染色体複製は細胞周期に一度だけ起こるように、開始段階で厳密に制御されている。その制御において、大腸菌ではHdaタンパク質による、DnaAに結合したATPの分解を通じたDnaAの不活性化が重要な役割を果たしていることが明らかになっているが、枯草菌にはHdaのホモログは存在しない。一方、低GCグラム陽性細菌に保存されているYabAが、Hdaと同様に、DnaAと複製伸長タンパク質DnaN (slide clamp) の両方と相互作用する因子として同定された。その欠損株では過剰複製開始が起り、複製の同調性が失われることから、YabAは複製開始を負に調節する因子であると考えられるが、その分子機能は不明であった。

まず、枯草菌 YabA が大腸菌 Hda と同様に、*dnaA* の発現を自己制御しているか、YabA 発現量を人為的に増減させることによって解析したが、影響は認められなかった。また、YabA 量は、DnaA の染色体上の分布、*oriC* への結合量にも影響を与えないことを明らかにした。このことから、YabA は Hda とは異なる分子機能を持つと考えた。そこで、DnaA 上の YabA 結合部位を 2 ハイブリッド法により解析した。DnaA の部分配列を使った解析からは、ATP 結合部位である domain III と、そして、YabA との相互作用を失う点変異株の解析からは、YabA は ATP 結合ポケットの反対側に結合することが明らかになった。この結果は、Hda が DnaA の ATP 結合ポケットに直接結合することとは異なっていた。得られた DnaA 変異株の内、枯草菌の染色体複製開始に必須である DnaD の相互作用を弱いながらも保持している変異 DnaA (DnaA_{Y144C}) は、*in vitro* の実験でも、野生型 DnaA と比較して *oriC* との結合に変化はないが、YabA との相互作用が弱くなっていることを示した。この変異を持つ枯草菌株 (*dnaA*_{Y144C} 株) では、DnaA-YabA の相互作用依存的に観察される YabA の細胞内局在を失っており、枯草菌内でも相互作用を失っていることを確認した。また、*dnaA*_{Y144C} 株では、*yabA* 欠損株と同様に染色体の過剰複製が観察され、DnaA-YabA の結合が複製開始制御に直接必要であることを示した。面白いことに、酵母 2 ハイブリッド解析で得た DnaD との相互作用を失う変異 DnaA の変異部位をマッピングした結果は、YabA と DnaD が DnaA の同じ領域を認識していることを示唆していた。

こうした結果より、DnaA が DnaD との相互作用により複製を開始した後に、DnaN との相互作用により複製開始複合体に導入された YabA が、DnaA-DnaD の相互作用を阻害し、DnaA-YabA 複合体として安定し存在することにより染色体複製を負に制御するという、大腸菌と異なる新たな染色体複製開始の抑制機構を提唱した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 趙 恩河

細胞周期の制御は生命活動の根幹にある重要な分子機構である。細菌においても、染色体の複製・分配と細胞分裂は、細胞の成長と協調的に進むように厳密に制御されており、その中で、染色体の複製開始時期の制御が中心にあると考えられているが、その詳細な分子機構は完全には理解されていない。

大腸菌では、複製開始タンパク質 DnaA と複製開始点 *oriC* の相互作用による開始複合体の形成により複製が開始するが、その後、複製伸長タンパク質 DnaN との相互作用を介して Hda タンパク質が導入され、DnaA が不活化され、過剰な複製が抑制される。Hda は DnaA と直接相互作用し、活性型である ATP-DnaA を不活性型である ADP-DnaA に変換する。しかし、Hda は細菌に普遍的に存在するものではなく、枯草菌には存在しない。一方、枯草菌を含む低 GC グラム陽性細菌に保存され、染色体複製開始を抑制する因子として、YabA タンパク質が最近同定されたが、その分子機構は明らかになっていない。

申請者は、Hda と同様に、YabA が DnaA に加えて DnaN との相互作用することから、Hda と同様に DnaA の活性変化に関与する可能性を、細胞内 YabA 量を人為的に変化させ、*dnaA* 発現の自己制御、DnaA の染色体上の分布、DnaA-*oriC* の相互作用に対する影響を解析し、Hda とは異なり、YabA 量の変化はそれらに影響を与えないことを明らかにした。この結果と一致して、YabA との相互作用を失う変異 DnaA を酵母 2 ハイブリッド法により単離したところ、Hda が DnaA の ATP 結合ポケットに直接結合するのに対して、YabA は ATP 結合ポケットの反対側に結合することが明らかになった。そして、そうした変異 DnaA は細胞内においても YabA との相互作用を失っており、その結果、過剰な複製開始が起こることを確認した。興味深いことに、酵母 2 ハイブリッド解析によって得られた DnaD との相互作用を失った DnaA 変異部位のマッピングの結果、YabA と DnaD が DnaA の同じ領域を認識していることが示唆された。こうした実験結果に基づき、申請者は YabA は DnaD と DnaA の相互作用を競合的に阻害することにより、複製開始を負に制御するという新しい分子機構を提唱した。

このように、本論文は枯草菌 YabA タンパク質と相互作用する DnaA 上の部位を同定することにより、DnaA 及び DnaN との相互作用という大腸菌 Hda と同じ性質を持ちながらも、YabA は Hda と異なる機構で過剰な複製開始を抑制するという、非常に興味深いモデルを示唆した。このモデルは、今後直接的な証明が必要ではあるが、細菌の染色体複製開始の制御機構という普遍的機構における、種毎の特殊性の研究に大きく貢献するものである。また、この結果は、基礎生物学の上で重要な結果を得たのみでなく、新たな抗生物質探索という、実用面でも意義のあるものである。よって、本論文は博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値のあるものと認める。