

蛋白質の活性に着目した、新しい網羅的遺伝子解析の試み

●水島 徹

熊本大学院医学薬学研究部

〈研究の目的と進め方〉

ゲノム情報を用いた解析によって、ある蛋白質に依存して発現が変化する遺伝子、あるいは、ある蛋白質と結合する蛋白質の網羅的な同定が盛んになされており、数多くの有益な情報がもたらされている。しかし蛋白質の本質は生化学的活性であり、その生化学的活性に着目した網羅的解析により、その蛋白質に関してより本質的な情報がもたらされると我々は考えている。特に、複数の活性を持った蛋白質に関しては、個々の活性に着目した（個々の活性ごとの）網羅的解析が重要であると思われるが、そのような試みは全くなされていない。本研究の目的は、複数の生化学的活性を持った、大腸菌染色体DNA複製開始蛋白質DnaAに対し、ゲノム情報を活かした、個々の活性に着目した網羅的解析を行い、DnaAの機能ネットワークの全体像を明らかにすることである。

DnaAはoriginDNAに結合した後、重合し二本鎖DNAを開裂させると同時にDNAヘリカーゼであるDnaBをorigin上にロードすることによりDNA複製を開始させる。DnaAは複製開始時のみ活性化され、それ以外の時不活性化されている必要がある。DnaAが膜リン脂質の助けを借りてATPと結合することによって活性化され、及びDnaA自身が持つATPase活性により、不活性化される。このような複製開始因子としての役割以外にも、DnaAはDNAに非特異的に結合しDNA高次構造形成に関与していることを我々は報告した（Mizushima, T., et al. Biochemistry 1996）。またDnaAは複数の遺伝子のプロモーターに結合しその発現を抑制することも知られている。

このようにDnaAは多くの生化学的活性を持った多機能蛋白質である。我々は既に部位特異的変異導入法を用いて、ATP結合（Mizushima, T., et al. J. Biol. Chem.1998）、ATPase（Mizushima, T., et al. EMBO J.1997）、膜リン脂質結合（Hase M., et al. J. Biol. Chem. 1998; Makise M., et al. J. Biol. Chem. 2000; Makise M., et al. J. Biol. Chem. 2001）、非特異的DNA結合（Makise M., et al. Mol. Microbiol. 2002; Makise M., et al. Biochem. J. 2002）、及びDnaA同士の結合（重合）（Mima S., et al. Biochem. J. 2002）それぞれの活性に関して、必須アミノ酸残基を世界に先駆け同定し、その変異蛋白質の解析を行いこれらの活性の複製における役割を明らかにしてきた。また、DnaB結合、及びorigin特異的DNA結合に関しては、他の研究グループが必須アミノ酸残基を同定している。そこでそれらのアミノ酸に変異を持つdnaA変異株、及び変異DnaA蛋白質を用いて、それぞれの活性を介して、発現が変化する遺伝子、及びDnaAに結合する因子を網羅的に同定する。

このように本研究提案は、我々がこれまでに蓄積してきたDnaAに関する情報とゲノム情報の両者を活かした独創的な研究提案である。この解析から得られる情報と最近報告されたDnaAのX線結晶構造解析から得られる情報を合わせることで、DnaAの機能の全体像を理解できると考えている。また我々は最近、真核生物の複製開始因子ORCが、DnaAとよく似た機能（ATPaseによって不活性化される、膜リン脂質に結合する、非特異的にDNA

に結合するなど）を有していることを発見した（Mizushima, T., et al. Genes & Dev. 2000; Takahashi, N., et al. J. Biol. Chem. 2002）。従って本研究は、真核生物におけるDNA複製研究、及び複製と他の生体内反応との間の協調的な制御機構の研究にも有用な情報をもたらすと考えている。

〈研究開始時の研究計画〉

（1）DNAチップを用いた、各種dnaA変異株において発現が変化する遺伝子の解析

我々を中心としたこれまでの研究により、DnaAが有する種々の活性（ATP結合、ATPase、膜リン脂質結合、非特異的DNA結合、DnaA同士の結合（重合）、DnaB結合、origin特異的DNA結合）に関して、必須アミノ酸残基が同定され、そのアミノ酸に変異を持つdnaA変異株も単離されている。我々は、変異による遺伝子発現変化を調べる際には、細胞増殖（DNA複製）が停止するような変異株だけでなく、部分的に影響を受けるような変異株も解析すべきと考えているのでまずそのような部分的な変異株を各活性に対して得る。例えば、必須アミノ酸を類似のアミノ酸に変換することなどによりそのような変異株が得られると考えている。

次に、種々の活性に関するすべての変異株を使って、変異により発現が変化する遺伝子を、大腸菌全遺伝子を含むDNAチップを使って検討する。このような検索で機能未知の遺伝子が見つかった場合には、その遺伝子破壊を行いその機能を調べる。また興味深い遺伝子に関しては同時に、その遺伝子産物を精製しDnaAと相互作用するかを調べるとともに、試験管内DNA複製再構成系、DnaAが関与する遺伝子の試験管内転写系、DnaA依存のDNA高次構造形成系など、我々がこれまでに確立してきた試験管内再現系を用いてそのタンパク質の解析を行う。

（2）DnaAと相互作用する因子の網羅的検索

生化学的には、GST融合型DnaAを用いた解析を行う。我々は既にGST融合型DnaAを使って、グルタチオンビーズによりDnaAを沈殿させた時、DnaBなどが共沈することを見いだしている。そこでこのシステムを使って、細胞粗抽出液からDnaAと結合する因子を検索する。上述の種々の変異タンパク質を用いて、例えばATPと結合できないDnaAとは結合できないが、野生型のDnaAとは結合できる因子を検索することにより、個々のDnaAの活性を介して、DnaAと結合する因子を網羅的に同定する。興味深い因子が得られたら、まず上述の試験管内の系（DNA複製系など）に加えその影響を調べる。また遺伝子を単離し、変異株を作成しその因子の役割を明らかにしたい（この研究に遠心機が必要である）。

一方、two-hybrid法を使って、細胞内でDnaAと相互作用する因子の検索も行う。この場合も、各種の変異dnaA遺伝子を使って、個々のDnaAの活性を介して、DnaAと結合する因子を網羅的に同定する。興味深い遺伝子が得られたら、まずその遺伝子破壊を行いその細胞内での機

能を調べる。次に、その遺伝子産物を精製しDnaAと相互作用するかなど生化学的解析を行う。

〈研究期間の成果〉

まず我々は、それぞれの活性を介して発現が変化する遺伝子の同定に必要な、ATP結合、重合、膜リン脂質結合、ATPase活性部位に変異を持つ、温度感受性dnaA変異株の作成を行った。そして重合活性に関する変異株とDNAチップ技術を用いて、変異により発現が変化する遺伝子の同定を行った。数多くの遺伝子が同定されたが、特にDnaKなど分子シャペロン関連の遺伝子が多かった。一方我々はGST Pull-downアッセイを用いた方法で、DnaAの重合活性依存にDnaAに結合する蛋白質を検索した。興味深いことにやはり分子シャペロンが同定された。以上の結果から我々は、DnaAの重合に分子シャペロンが関与しているのではないかと考え、実際に試験管内複製再構成系を用いて、精製したDnaKがDnaAの重合を促進し、DNA複製を促進することを見出した。これまでdnaK変異株がなぜdnaの性質を示す（DNA複製を行えない）のかは不明であったが、この研究によりDnaAの重合を促進するためであることが分かった。一方、ATP結合活性に関しても同様の解析を行い、DnaB蛋白質（DNAヘリカーゼ）とDnaAの結合がDnaAのATP結合に依存していることを見出した。この結果は、ATP結合型DnaAがDnaBを複製開始点に導入し複製が開始され、その後、DnaAのATPase活性が促進されDnaAがADP型に変化するとDnaBがDnaAから離れ複製反応が進行する（DNAヘリカーゼは複製フォークと共にゲノム上を移動する必要がある）という機構の存在を示唆している。

〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究により、蛋白質活性に着目した遺伝子ネットワーク解析が大変有用であることが分かったため、他の蛋白質へ応用することにより大きな成果が生まれることも期待できる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文／プロシーディング（査読付きのものに限る）

0311120814

Hoshino, T., Takano, T., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hwang, H-J., Koura, Y., Nishimoto, K., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. Effects of sucralfate on gastric irritant-induced necrosis and apoptosis in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 24-27. (2003)

0311120825

Lee, E. W., Chen, J., Huda, M. N., Kuroda, T., Mizushima, T. and Tsuchiya, T. Functional cloning and expression of emeA, and characterization of EmeA, a multidrug efflux pump from *Enterococcus faecalis*. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 266-270. (2003)

0311120841

Hoshino, T., Tsutsumi, S., Tomisato, W., Hwang, H-J., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. Prostaglandin E2 protects gastric mucosal cells from apoptosis via EP2 and EP4 receptor activation. *J. Biol. Chem.* 278, 12752-12758. (2003)

0401071323

Morita, Y., Murata, T., Mima, T., Shiota, S., Kuroda, T.,

Mizushima, T., Gotoh, N., Nishino, T. and Tsuchiya, T. Induction of mexCD-oprJ operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 911-914. (2003)

0401071359

Huda, N., Chen, J., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T. and Tsuchiya, T. Gene cloning and characterization of VcrM, a Na⁺-coupled multidrug efflux pump, from *Vibrio cholerae* non-O1. *Microbiol. Immunol.* 47, 419-427. (2003)

0401071340

Chen, J., Kuroda, T., Huda, M. N., Mizushima, T. and Tsuchiya, T. An RND-type multidrug efflux pump SdeXY from *Serratia marcescens*. (2003) *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 176-179.

0311120844

Mizushima, T., Tsutsumi, S., Hoshino, T., and Tomisato, W. Protection of gastric mucosal cells from apoptosis and necrosis by induction of HSP and PGE2. *Jpn. J. Hyperthermic Oncol.* 19, 67-78. (2003)

0401071355

Huda, M. N., Lee, E. W., Chen, J., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T. and Tsuchiya, T. Molecular cloning and characterization of an ABC-type multidrug efflux pump VcaM from *Vibrio cholerae* non-O1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2413-2417. (2003)

0401071404

Sekiya, H., Mima, T., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T. and Tsuchiya, T. Functional cloning and characterization of a multidrug efflux pump, MexHI-OpmD, from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2990-2992. (2003)

0401071408

Li, Y., Mima, T., Komori, Y., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T. and Tsuchiya, T. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 572-575. (2003)

0311120851

Tsutsumi, S., Mima, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. Molecular mechanism of adaptive cytoprotection induced by ethanol in human gastric cells. *Exp. Biol. Med.* 228, 1089-1095. (2003)

0311120905

Makise, M., Takenaka, H., Kuwae, W., Takahashi, N., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. Kinetics of ATP-binding to Origin Recognition Complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 46440-46445. (2003)

0401071412

Lee, E. W., Huda, M. N., Kuroda, T., Mizushima, T. and Tsuchiya, T. EfrAB, an ABC-type multidrug efflux pump, from *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents*

Chemother. 47, 3733-3738. (2003)

0401071431

Xu, X-J., Su, X-Z., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T. and Tsuchiya, T. Molecular cloning and characterization of the HmrM multidrug efflux pump from *Haemophilus influenzae* Rd. *Microbiol. Immunol.* 47, 937-943. (2003)

0401071416

He, G-X., Kuroda, T., Mima, T., Morita, Y., Mizushima, T. and Tsuchiya, T. An H⁺-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 186, 262-265. (2004)

0311120856

Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Hwang, H-J., Mio, M., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions. *Biochem. Pharmacol.* 67, 575-585. (2004)

0311191407

Takahashi, N., Yamaguchi, Y., Yamairi, H., Makise, M., Takenaka, H., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. Analysis on Origin Recognition Complex containing Orc5p with defective Walker A motif. *J. Biol. Chem.* 279, 8469-8477. (2004)