

氏名	美馬 伸治
授与した学位	博士
専攻分野の名称	薬学
学位授与番号	博甲第2519号
学位授与の日付	平成15年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生体調節科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	大腸菌染色体DNA複製開始蛋白質DnaAのN末端領域の機能解析
論文審査委員	教授 土屋 友房 教授 篠田 純男 教授 成松 鎮雄

学位論文内容の要旨

DnaA 蛋白質は大腸菌染色体 DNA の複製開始因子である。DnaA 蛋白質が複製開始因子として機能するためには種々の活性が必要である。DnaA は複製開始点である *oriC* に結合し、ついで重合することにより二本鎖 DNA を開裂し DNA 複製反応を開始させる。この複製開始反応には *oriC* 特異的な DNA 結合活性、DnaA 蛋白質同士の重合活性が必要であるまた、DnaA 蛋白質は ATP や ADP といったアデニンヌクレオチドを高い親和性で結合し、ATP 結合型が複製活性の活性型、ADP 結合型が不活性型であることが試験管内の実験によって示されている。しかしながら、二本鎖 DNA の開裂反応に必要な DnaA 蛋白質の重合反応の分子機構はこれまで不明であった。一方、DnaA 蛋白質の N 末端領域の機能も不明であった。我々は N 末端領域の種を越えてよく保存されている疎水性アミノ酸残基に着目し、これらを親水性アミノ酸残基に置換した変異蛋白質を構築した。この変異蛋白質は細胞内および試験管内で複製開始活性を持たないことが示された。これら変異 DnaA 蛋白質が複製開始反応において、どの段階の活性を失っているかを変異蛋白質を精製し、試験管内における生化学的解析により調べた。その結果、変異 DnaA 蛋白質は二本鎖 DNA を開裂できないことがわかった。二本鎖 DNA の開裂反応は少なくとも三つの段階に分けられる。はじめの段階として、DnaA 蛋白質に ATP が結合する段階。そして二番目の段階として、*oriC* への結合。そして三番目の段階として、*oriC* における DnaA 蛋白質同士の相互作用による重合の段階である。そこで ATP 結合活性、*oriC* DNA 結合活性について測定したところ、野生型 DnaA 蛋白質と変わらない活性を持つことが示された。我々は DnaA 蛋白質 同士の結合（重合）に関するアッセイシステムを確立し、この系を用いてこの変異蛋白質の重合活性が減弱していることを見出した。以上の結果は、DnaA 蛋白質の N 末端領域の疎水性アミノ酸残基が DnaA 蛋白質の重合に関与していることを示している。

論文審査結果の要旨

染色体 DNA の複製は厳密に制御されている。DnaA タンパク質は染色体 DNA の複製開始因子であり、この制御において中心的役割を果たす。DnaA タンパク質には複製開始因子として機能するための種々の活性が備わっている。まず、DnaA は DNA の複製開始点である *oriC* に結合し、ついで重合することにより二本鎖 DNA を開裂し DNA 複製反応を開始させる。この複製開始反応には *oriC* に特異的な DNA 結合活性、DnaA タンパク質同士の重合活性が必要である。また、DnaA タンパク質は ATP 結合型が活性型、ADP 結合型が不活性型である。これまで、二本鎖 DNA の開裂反応に必要な DnaA タンパク質の重合反応の分子機構は不明であった。一方、DnaA タンパク質の N 末端領域の機能も不明であった。著者は N 末端領域のよく保存されている疎水性アミノ酸残基に着目し、これらを親水性アミノ酸残基に置換した変異タンパク質を構築した。この変異タンパク質は細胞内および試験管内で複製開始活性を持たないことが示された。これら変異 DnaA タンパク質が複製開始反応において、どの段階の活性を失っているかを、試験管内における生化学的解析により調べている。その結果、変異 DnaA タンパク質は二本鎖 DNA を開裂できないことを明らかにしている。著者は DnaA タンパク質 同士の結合（重合）に関する測定系を確立し、この系を用いてこの変異タンパク質の重合活性が減弱していることを見出している。このようにして、DnaA タンパク質の N 末端領域の疎水性アミノ酸残基が DnaA タンパク質の重合に関与していること明らかにした。

本論文は学術上大変興味深く、博士の学位に値するものと判断する。