

DNA 複製開始タンパク質 (DnaA) の活性発現と相分離した混合二分子膜の関連性

九州大学 有機化学基礎研究センター、大分大学 工学部応用化学科

石川 雄一

DnaA protein is the initiator of chromosomal DNA replication in *Escherichia coli*. We examined the influence of artificial mixed membrane composed of synthetic anionic (phosphate) lipid and cationic (ammonium) lipid on the affinity of DnaA protein for ATP. Two sets of anionic and cationic lipids with distinguishable numbers of hydrophobic alkyl chains were devised for regulating the cluster (phase separated) formation of anionic lipid around the cationic matrix. Anionic lipid, not cationic membranes, inhibited the ATP-binding and stimulated ATP-release from the ATP-DnaA active form. In the case of the mixed membrane, only anionic lipids forming cluster structures inhibit of ATP-binding and stimulate the ATP release. These results suggest that in mixed membrane a cluster formation (phase separated state) of anionic lipids seems to be an important factor to affect the affinity of DnaA protein for ATP.

1 緒言

細胞の自己増殖（複製）が考慮される時、多くの研究は、遺伝情報を担う DNA の親から娘への伝達の素過程に主眼を据えている。染色体 DNA の複製は、脂質膜の増殖と同調しバイオクロックに従って進行するため、脂質二分子膜の分離、融合などと遺伝子の増殖のシステムは親密な関係にある。しかし、脂質膜を視点に据えた細胞膜の中での DNA の複製や分裂に関する研究はほとんど無く、モデル系での研究は全くない。本研究は、遺伝子複製システムに「能動的」に関与できる界面活性剤「人工の脂質膜」を開発する事を意識している。ここでは、遺伝子の複製の「開始」プロセスに作用する混合脂質膜のクラスター形成能力（相分離特性）の重要性について検討した。また、この目的とは直接関係しないが、本研究と並列して実行していたフォトダイナミックセラピー（PDT）用のポルフィリン性色素として混乱（反転）ポルフィリンの三重項酸素発生効率をコーセー中央研究所の荒金博士に評価して頂いた結果についても簡単にまとめる。

DNA の複製を開始するタンパクは、遺伝子の複製開始点に結合し、二重鎖をゆるめ、そこにヘリカーゼ活性を持つ次のタンパクを導く^{1, 2)}。従って、遺伝子の複製を開始するタンパクを制御することは、最も効率の良い、細胞複製の「スイッチング」を意味する。最も複製系が単純で、且つ、そのプロセスに広く一般性を持つ大腸菌の DNA 複製の開始は、「DnaA」タンパク質に司られている^{3~5)}。遺

伝子の複製を開始するこのタンパク質 DnaA の活性発現には ATP が不可欠である。ATP の結合を DnaA タンパク機能の「on-off 制御」の鍵として使用することができる^{6, 7)}。

大腸菌の二分子膜は、単一の脂質でなく数種類の脂質の混合膜として存在する。具体的には、四本鎖のカルジオリピン型アニオン性の脂質と二本鎖のフォスファチジルエタノールアミン型の双性イオン（中性）の脂質が混合している。これらの中で、アニオン性の天然脂質は、DnaA と ATP との親和性に影響する事が報告されている。しかしながら、その結果は全て単独のアニオン性脂質膜と DnaA タンパク質との実験から出されており、実際の細胞膜のような混合膜での取扱いはなされていない。異種の構成成分からなる混合膜の最大の特徴は、ある特定構成分子が集合したクラスター形成（相分離）能⁸⁻¹⁰⁾があるが、アニオン性脂質の相分離性と DnaA タンパク質の機能発現との関係は今まで一切実験されてこなかった。とりわけ、上述した四本鎖と二本鎖の脂質の組み合わせのように異なる鎖数の混合膜は、膜化学的に相分離しやすい事を考えると、相分離クラスターからの検討が必要なることは明確である。

合成の脂質膜の特徴は、天然膜と異なり分子設計によりその分子の並び方や流動性を制御できる点から生まれる。アゾベンゼンを含む一本鎖脂質（1P、1N）は、グルタミン酸型（2P、2N）の二本鎖型脂質の母体膜中で容易に相分離クラスターを形成することが既に知られている⁸⁻¹⁰⁾。本研究では、この明確なクラスター状態の混合膜を利用して、その DnaA タンパク質に与える効果を検討した¹¹⁻¹²⁾。

2 実験

実験に用いた合成脂質の構造を図 1 に示す。これら四種の化合物は、文献に従って合成した^{10, 13-15)}。脂質粉末は、プローブ型の超音波照射により、10~20mM の濃度で 1 mL の分散液を調整した。リン脂質の場合、等量モルのトリスヒドロキシメチルアミノメタンを中和のために添加した。



Synthetic membrane lipids regulating the DNA duplication.

Yuichi Ishikawa

Department of Applied Chemistry, Oita University

DnaA タンパク質は、水島らにより文献に従って調整された⁴⁾。このタンパク質の比活性は、 0.7×10^6 unit/mg である。タンパク質と脂質膜は、50 mM HEPES-KOH (pH8.0)、0.5mM Mg (OAc) 2、0.3mM EDTA、5mM dithiothreitol、10mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、17 (v/v) %グリセリン、0.005 (v/v) % Triton X-100 の緩衝液に分散させた。

示差走査熱量計 (DSC) は、Seiko SSC-5200 (DSC120) により、銀製サンプルパンを用いて行った。

ATP と DnaA タンパク質の親和性は、 0°C の結合過程と、 37°C での解離過程を評価した。DnaA タンパク質が、定量的に Millipore $0.45\mu\text{m}$ の membrane filter に結合する事を利用した。ATP の結合かは、 α ^{32}P -ATP 同位体を使用して先の良く洗浄された filter をシンチレーションカウンターにより計測して、定量した。

3 結果と考察

3.1 カチオン性母体膜におけるアニオン性脂質膜のクラスター相分離特性

図2は、「単独」膜によりどの程度 ATP の DnaA タンパク質に対する親和性が低下するのか示している。一本鎖、二本鎖の鎖数に依らずカチオン性の 1N、2N 膜は ATP を取り込んだ DnaA タンパク質から ATP の解離をほとんど促進させない。これに対して、アニオン性の 1P、2P 膜は、ATP の解離を促進している事が明かである。即ち、カチオン性膜は DnaA タンパク質の ATP 親和性に対してサイ

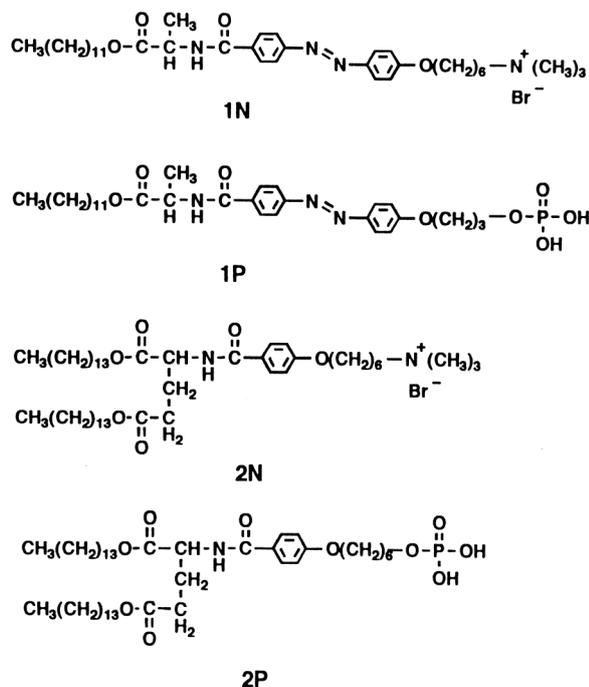


図1 合成樹脂の分子構造

アラニン骨格の一本鎖脂質とグルタミン酸骨格の二本鎖脂質を「1」と「2」で表わしている。リン酸親水基とアンモニウム親水基を大文字の P と N で示している。

レントなのでマトリックス母体膜として混合膜に使用できる事を確認した。

図3にアニオン性脂質を 1/10 等量ゲスト膜としカチオン性のマトリックス膜に混合した分散液の DSC 吸熱サーモグラムを示している。二本鎖のマトリックス膜に同じ鎖数のアニオン性ゲスト膜が混在する場合 (2P/2N: 図3 A) は、マトリックス 2N 単独膜のゲル-液晶相転移温度の 49°C とほぼ等しい温度に一つのブロード (吸熱幅約 5°C)

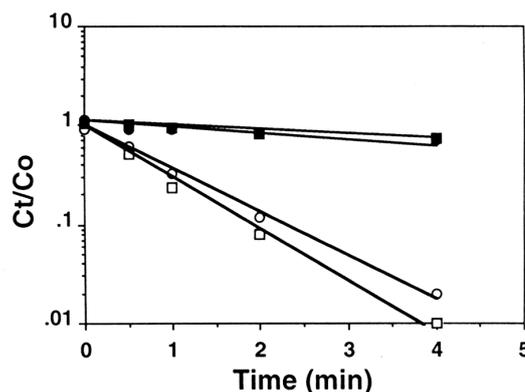


図2 ATP-DnaA タンパク質複合体からの ATP 放出過程の動力学
Ct、Co は ATP-DnaA の残存濃度と初濃度を示す。○: 1P、●: 1N、□: 2P、■: 2N、 37°C [ATP-DnaA] = $0.03\mu\text{M}$ 、[膜] = $30\mu\text{M}$

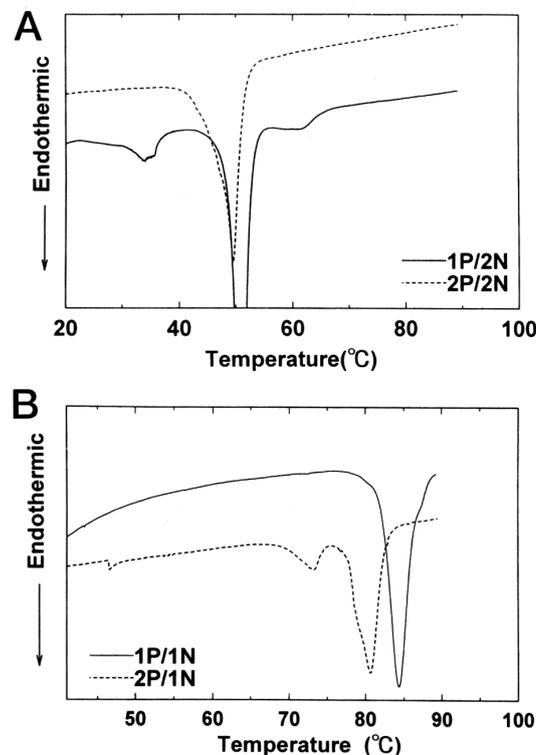


図3 二本鎖型マトリックス膜 2N (A) および一本鎖型マトリックス膜 1N (B) との混合膜分散液の DSC サーモグラム
[アニオン性脂質] = 5mM、[カチオン性マトリックス膜] = 50mM、[トリスヒドロキシアミノメタン] = 5mM、17% (v/v) グリセリン水溶液

な吸熱ピークを与える。二本鎖のマトリックス膜と異なる鎖数である一本鎖のゲスト膜が混在すると、マトリックス膜の50℃近傍の比較的鋭い(吸熱幅2.2℃)主転移(80%)に加えて、35℃前後に約15%、62℃付近に5%前後の副転移を持つ。この場合の主転移の吸熱幅は、2N膜単独に比較し約二倍と幅広いが、同じ鎖数の混合膜のその半分の鋭さである。これらのDSC曲線は、次の二つの点を意味している。

(1)同じ鎖数のアニオン性のゲスト膜がカチオン性のホスト膜中でクラスタードメインを形成する事無く静電的に分散して存在している。その結果、マトリックス膜内に分散したゲスト膜によりマトリックス膜の協同性が低下し主吸熱ピークのプロード化となっている。

(2)異なる鎖数のゲスト膜は、マトリックス膜から弾き出されクラスター相分離化し主転移以外の吸熱ピークを示している。また、マトリックス内に取り込まれているゲスト膜分子が少ないため主転移は比較的鋭い。

一本鎖脂質はアゾベンゼンを剛直基として含んでいる。この発色団は、分子会合をそのUV-vis吸収スペクトルから簡単に評価できる。即ち、頭-頭型の会合状態であれば、360nmから数重nm短波長シフトする。1Pゲスト膜は、2Nマトリックス膜中、37℃で336nmに λ_{max} を示し、70℃で完璧に会合が解けた360nmを示す。この事も、DSCから得られる相分離クラスターの形成と矛盾しない。

1Nをマトリックス膜として使用したときも同じ傾向が認められる(図3B)。即ち、マトリックス膜と異なる鎖数の組み合わせ(1P/2N)ではクラスター形成にともなう吸熱が74℃にマトリックス膜の吸熱81℃に加えて存在する。これに対し、同じ鎖数の組み合わせの混合膜(1P/1N)では、84℃に一つの吸熱ピークを示すのみである。疎水基が全く同じ構造のアニオン脂質はカチオン母体膜に完全に均一分散していることが明かである。

まとめると、鎖数が同じ組み合わせの混合膜(1P/1N)、(2P/2N)は、均一分散し、今なる鎖数の混合膜(1P/2N)、(2P/1N)は、クラスター相分離している。

3.2 ATPのDnaAタンパク質への結合に与える混合膜の添加効果

カチオン性の膜は、ATPとDnaAタンパク質との親和性にほとんど影響を与えない事を上述した。図4には、低温でのATPの結合に対する混合膜の添加効果を示している。横軸は、アニオン脂質の量である。縦軸が大きい程ATPとの親和性が高い事を意味している。アニオン性脂質の添加効果が、二つのパターンに分類できる。相分離してアニオン脂質のクラスターが形成されている組み合わせの混合膜は、アニオン膜単独に匹敵するATP結合の阻害効果を示している。これは一本鎖アニオン膜でも二本鎖アニオン膜でも同じである。

3.3 ATP-DnaA複合体からのATP解離に対する混合膜の添加効果。

ATPとDnaAタンパク質との親和性を、高温における解離挙動からモニターした。図5にその結果を示している。縦軸は、ATPが結合したDnaAタンパク質の変化量を対数で、横軸を時間で示している。どの系も直線で減少していることからその直線の傾斜から見かけの一次の反応速度定数を見積もる事が可能である。1P、1P/1N、1P/2N、2P、2P/2N、2P/1N膜の解離速度定数は、各々、8.5m、5.7m、7.6m、11m、6.6m、9.2m(s⁻¹)である。ATPの解離は、鎖数の組み合わせに大きく依存している。異なる鎖数の組み合わせの混合膜(1P/2N、2P/1N)は、同じ鎖数の組み合わせよりもATPがより高速に解離している。これらの傾向は、低温でのATP結合過程の動向と一致している。

3.1節で述べたように、異なる鎖数の組み合わせの混合膜は、アニオン性脂質のクラスター相分離を母体膜中で取り易い。マトリックス膜中でのアニオン膜のクラスター構造は、アニオン膜単独と同じように作用する事が推察される。

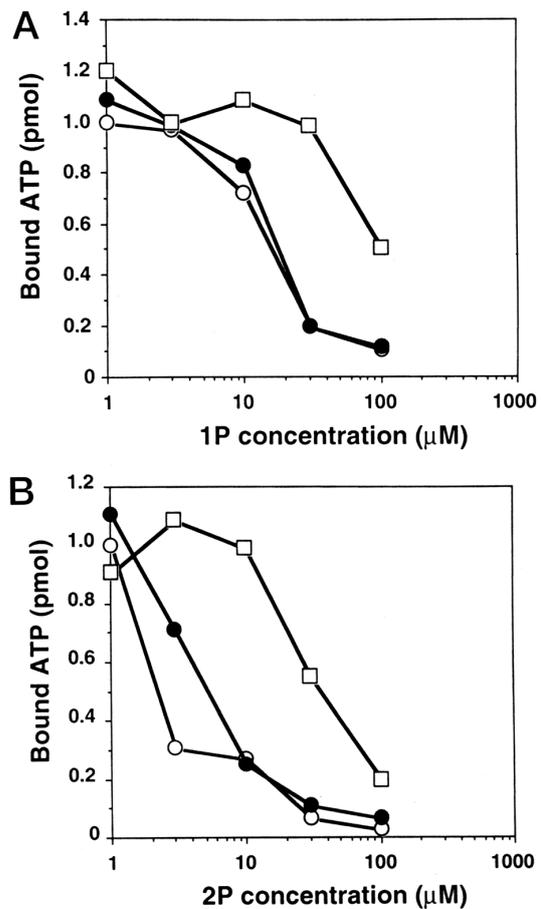


図4 DnaAタンパク質のATP取り込みに与える脂質膜の添加効果
図1と同じ濃度条件で行っている。4℃。

A, ○ 1P; ● 1P/2N, □ 1P/1N

B, ○ 2P; ● 2P/1N, □ 2P/2N

[アニオン膜] / [カチオン膜] = 1/10

4 総括 (クラスター相分離脂質と DnaA タンパク質との相互作用)

本研究では、混合膜におけるクラスター形成に焦点を当て、その DnaA タンパク質との相互作用に与えるインパクトを明らかにした。アルキル鎖数について同質でない組み合わせの混合膜は、アニオン性脂質のクラスターを形成する。これに対して、疎水部が同じ構造の組み合わせでは親水基間の静電相互作用によりアニオン性膜はカチオン性母体膜に分散してしまう。カチオン性の膜成分に取り囲まれたアニオン性脂質は、その DnaA タンパク質に対する親和性を低下させる。これに対し、アニオン性脂質同士が集合して一塊になりカチオン性膜に分散していれば、アニオン性の単独膜と同様な DnaA タンパク質との親和性を示す。母体膜中のアニオン性クラスタドメインの大きさに分布があり、これが、わずかな DnaA タンパク質との親和性の差として現れていると考えている。

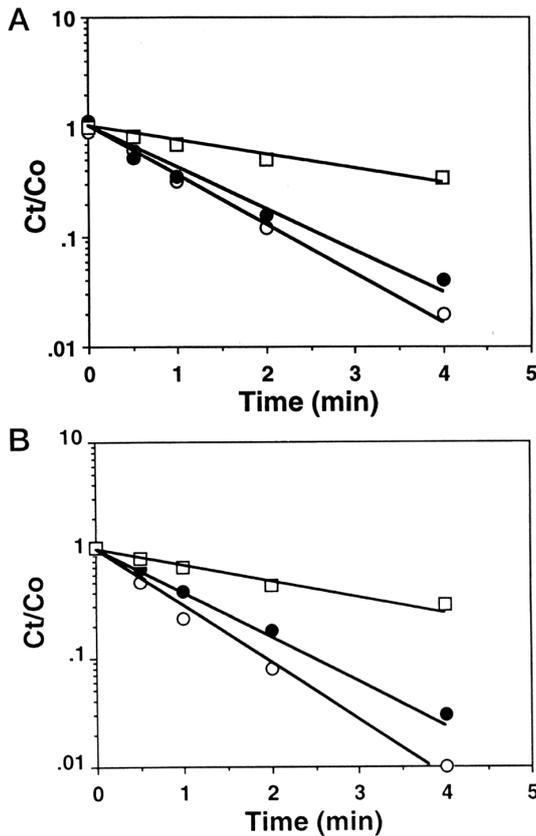


図5 ATP-DnaA 複合体からの ATP 放出の動力学に与える脂質膜の添加効

37°C、濃度条件はず 4 と同じ。

[ATP-DnaA (仕込み)] = 1.1 pmol/40L、[アニオン性脂質] = 30 μM、[カチオン性脂質] = 300 μM

A : ○ 1P ; ● 1P/2N ; □ 1P/1N

B : ○ 2P ; ● 2P/1N ; □ 2P/2N

5 その他 (反転 (N-混乱) ポルフィリンの光による一重項酸素発生効率)

本プロジェクトと並んで、我々の研究グループは、反転環をもつ全く新しいポルフィリンを扱っている。一般に、通常のポルフィリンは、光物理化学適療法 (photodynamic therapy : PDT) において、癌細胞に濃縮しやすく、さらに三重項酸素を効率良く一重項酸素へ光増感するため PDT の治療剤の一つの候補として知られている。癌細胞近傍での光照射による反応活性な一重項酸素の発生が制ガン効果につながっているものである。いかに効率的な一重項の発生が可能で代謝に負担が掛からない色素であるかどうかは、PDT 治療剤としての一つの重要な評価ポイントである。幸い、本研究助成財団の一つの基礎研究所であるコーセー基礎研究所の荒金久美博士グループが、この一重項評価システムをたちあげられておられ、ご厚意により、

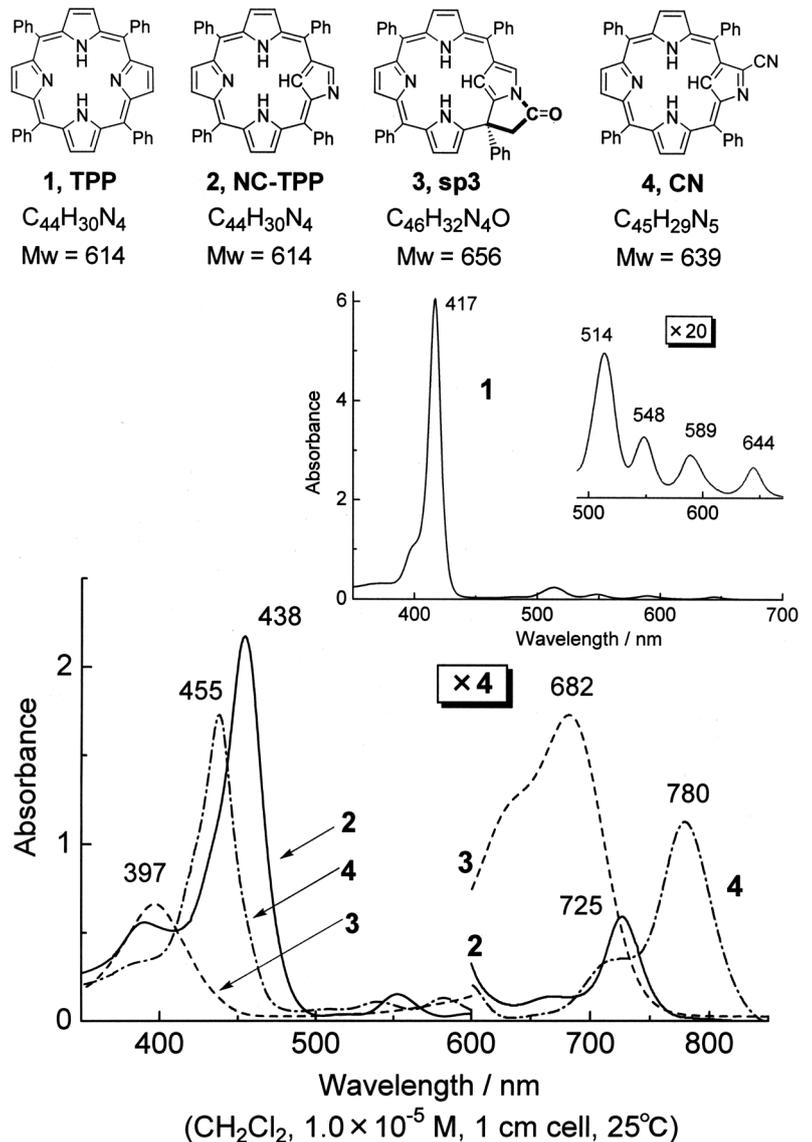


図6 各種ポルフィリンの分子構造と吸収スペクトル

私どもの新しいポルフィリンの一重項酸素の発生について定性的な評価を行って頂いた。忙しい中で、このような門外漢からの申し出を快く引き受けて頂き感謝して致します。

使用した化合物の分子構造とそれらの吸収スペクトルを図6に示す。測定条件は、Arレーザー:波長514nm(強度100mW)、試料濃度0.1mMで行った。相対標準化合物としてTPPを利用している。514nmの吸光度の化合物間の比は、TPP 1に対し、その他の反転体ポルフィリンは、約1/3から1/4の強度である。オーダーが異なる

様な差はない。一重項酸素の発生は、その1268nmの吸光度の相対比から求めた。図7に化合物1から4の増感剤としてのプロファイルと比較している。TPPが明確に1268nmにピークとして一重項酸素の存在を示しているのに対し、全く同じ条件のもと反転環を持つポルフィリンの場合は、肩となって現れるのがやっとなのである事が判る。また、反転体の二つの互変異性体の効果を検討している。どちらの構造でも著しい一重項酸素の発生は認められなかった。これ以上、踏み込んで検討していない。通常ポルフィリンが一重項酸素の発生能力に優れている事が明かである。

(引用文献)

- 1) T. Atlung, Mol. & Gen. Genet., 197, 125-128 (1984) .
- 2) A. van der Ende, T. A. Baker, T. Ogawa, and A. Kornberg et al., Proc., Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 3954-3958 (1985) .
- 3) A. Kornberg, and T. A. Baker, in DNA Replication, 2nd Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1992) .
- 4) Y. Hirota, J. Mordoh, and F. Jacob, J. Mol. Biol, 53, 369-387 (1970) .
- 5) S. R. Fuller, and A. Kornberg, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 80, 5817-5821 (1983) .

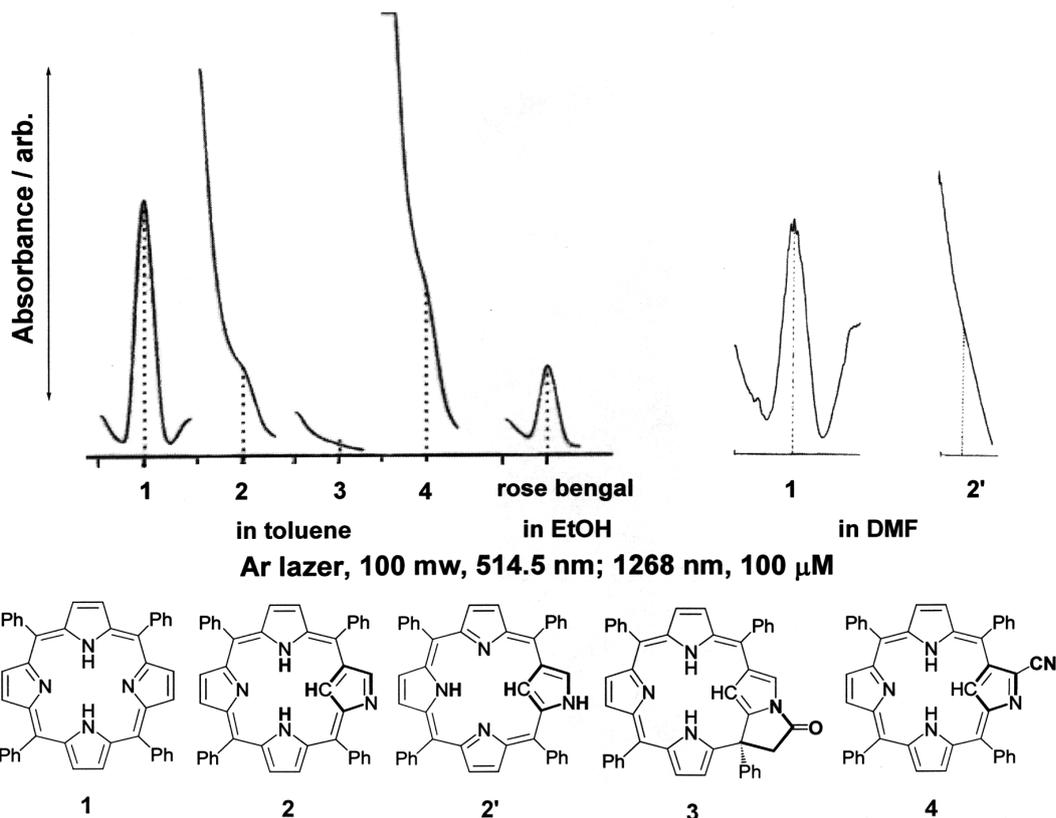


図7 各種ポルフィリンを光増感剤とした時の一重項酸素の発生と比較

- 6) T. Katayama, J. Biol. Chem., 269, 22075-22079 (1994) .
- 7) T. Katayama and E. Crooke, J. Biol. Chem., 270, 9265-9271 (1994) .
- 8) T. Kunitake, N. Kimizuka, N. Higashi, and N. Nakashima, J. Am. Chem. Soc., 106, 1978-1983 (1984) .
- 9) M. Shimomura, and T. Kunitake, J. Am. Chem. Soc., 104, 1757-1759 (1982) .
- 10) T. Kunitake, Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 31, 709-726 (1992) .
- 11) T. Mizushima, Y. Ishikawa, E. Obana, M. Hase, T. Kubota, T. Katayama, T. Kunitake, E. Watanabe, and K. Sekimizu, J. Biol. Chem., 271, 3633-3638 (1996) .
- 12) M. Hase, T. Yoshimi, Y. Ishikawa, A. Ohba, L. Guo, S. Mima, M. Makise, Y. Yamaguchi, T. Tsuchiya, and T. Mizushima, J. Biol. Chem., 273, 28651-28656 (1998) .
- 13) T. Kunitake, and N. Yamada, J. Chem. Commun., 655-656 (1986) .
- 14) Y. Ishikawa, and T. Kunitake, J. Am. Chem. Soc., 113, 621-630 (1991) .
- 15) T. Kunitake, J-M. Kim, and Y. Ishikawa, J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 6, 885-890 (1991) .