

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570140

研究課題名(和文)大腸菌複製再開始複合体におけるDnaBヘリケース導入の構造基盤

研究課題名(英文)Structural basis of replication restart primosome proteins involved in DnaB helicase loading

研究代表者

阿部 義人(Abe, Yoshito)

九州大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60315091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本申請では大腸菌複製再開始時に必要な再開始構成タンパク質群(PriB、DnaT、PriC)の構造・機能解析を行った。その因子であるPriBの一本鎖DNA結合が二段階に起こることを明らかにした。また、DnaTのN末端ドメインにある三量体形成部位、PriBとの相互作用部位の同定を行い、C末端ドメインの構造を決定し、一本鎖DNAとの相互作用部位を同定した。さらにPriCにおいてもN末端ドメインの構造決定、C末端ドメインが一本鎖DNAおよび一本鎖DNA結合タンパク質(SSB)との結合に関与していることを明らかにした。これらの情報をもとに大腸菌の複製再開始機構のモデルを提唱した。

研究成果の概要(英文)：We performed the structure and function analysis of PriB, DnaT and PriC proteins engaged in replication restart in Escherichia coli. PriB is a single-stranded DNA (ssDNA) binding protein. Our NMR and FRET results showed that PriB bound to ssDNA in two-step binding manner, suggesting the cooperative binding between PriB and ssDNA. We also performed domain analysis of DnaT and PriC. From the domain information of DnaT, we suggested that the N-terminal domain of DnaT was involved in trimer formation and interaction with PriB, and the C-terminal domain of DnaT was involved in ssDNA binding based on the structure determined by NMR analysis. Furthermore, the domain information of PriC suggested that the C-terminal domain of PriC was involved in the ssDNA and SSB (single-stranded DNA binding protein) binding. Additionally, we determined the N-terminal domain of PriC using NMR analysis. Together with these results, we proposed the model of replication restart in Escherichia coli.

研究分野：構造生物化学

科研費の分科・細目：分子認識及び相互作用

キーワード：複製再開始プライモソーム タンパク質-DNA複合体 タンパク質構造 DnaT PriC

## 1. 研究開始当初の背景

すべての生物において、ゲノム DNA の複製と細胞分裂が周期的に規則正しく繰り返されることが、個体と種の維持に必要不可欠である。大腸菌を例にとると、ゲノム DNA の複製開始には DnaA が主要な制御因子として同定されており、このゲノム DNA 複製の一連の流れは厳密に制御されていることが知られている。

一方で大腸菌においてはチミン飢餓状態や紫外線照射などで生じる DNA 損傷が原因で一時的に DNA 複製が停止することがある。その際には謝った DNA 配列を子孫に残さないために DNA の修復系が作動する。修復後、蛋白質複合体プライモソームが形成され、プライモソームを起点として DNA 複製が再開されると考えられている。複製再開プライモソームに関しては遺伝学的な研究から 2 つの再開経路が有ると考えられている。それぞれ 1) PriA 依存的複製再開、2) PriC 依存的複製再開と呼ばれている。

本研究ではこれまで明らかとなっていない複製再開プライモソームの構成タンパク質を構造生物学的手法を用いて、その構造、機能を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究では複製再開プライモソームにおいて、これまで構造の明らかとなっていない DnaT および PriC の構造機能解析を中心に進めていった。

DnaT、PriC は分子量 20,000 程度で、それぞれが N 末 C 末の 2 つのドメインからなり、ヘリックスリッチ構造の蛋白質である。また DnaT は PriA 依存的複製再開経路、PriC は PriC 依存的複製再開経路に必須の蛋白質である。いずれも DNA 複製に重要なヘリカーゼである DnaB を ssDNA 上にリクルートする役割をもっていると考えられている。DnaB は大腸菌の複製開始、および複製再開に必須なヘリカーゼである。しかしながら、これまで複製再開における DnaB ヘリカーゼの DNA への導入機構の構造的基盤は明らかになっていない。よって、本研究期間において DnaT および PriC の構造機能の解析を行い、さらには DnaT および PriC によって誘起される蛋白質-DNA 複合体の解明またその複合体への DnaB ヘリカーゼの導入機構の解明を本研究の最終的な目的としていた。

## 3. 研究の方法

### (1) PriC の立体構造解明、また DNA や他のプライモソーム構成因子との相互作用を含めた機能の解析

PriC に関しては限定分解を行い、その情報をもとに N 末ドメイン、C 末ドメインを決定し(雑誌論文) それらの発現系を構築し、各ドメインの立体構造決定を行った。また、

C 末ドメインの持つ一本鎖 DNA および SSB(一本鎖 DNA 結合タンパク質) DNA 結合においてどのアミノ酸がこの結合に必要なかを変異体解析により検討を行った。解析はゲルシフトアッセイ、CD 変化、蛍光変化、NMR 解析などを用いてを行った。

### (2) DnaT の立体構造解明、また DNA や他のプライモソーム構成因子との相互作用を含めた機能の解析

DnaT に関しても限定分解を行い、その情報を基に N 末ドメイン、C 末ドメインを決定し、それらの発現系を構築した。各ドメインの立体構造決定を行った。DnaT の一本鎖 DNA 結合、PriB 結合及び三量体形成などの機能に関して、変異体解析、ゲルシフトアッセイ、NMR 解析を用いて調べた。

### (3) PriB と DNA の協同的結合の解析

PriB は 0Bfold をもつ蛋白質で、複製再開プライモソームの PriA 依存的経路において、PriA-DNA 複合体に結合し、さらに DnaT と結合する役割を持っている。これまで一本鎖 DNA との複合体の結晶構造解析が解かれている。しかしながら PriB と一本鎖 DNA とは協同的な結合をおこなうと考えられており、そのメカニズムは未だ明らかとなっていない。そこで PriB の結合に特異的なアミノ酸に変異を入れ、その協同的な結合にどのように関わるかを調べて行く。結合の解析はゲルシフトアッセイ、FRET 解析、NMR 解析などを用いて調べた。

### (4) PriA のドメイン解析

これまで PriA は N 末の一部の構造(1-105)しか解析されておらず、一本鎖 DNA と相互作用すると考えられているリンカードメイン(106-192)と 3'→5'ヘリカーゼ活性を持っていると考えられる PriA ヘリカーゼドメイン(193-732)の構造解析は行われていない。よって立体構造解析可能な PriA ヘリカーゼドメインの安定な高発現系の構築を目指し、その立体構造解析を行う。

### (5) 複製再開プライモソームの invitro 再構成系の確立

プライモソーム構成因子の各変異体解析の結果、一本鎖 DNA 結合能に必要なアミノ酸がわかった場合、Heller&Marions の文献(Heller & Marions Mol. Cell 2007)を参考に、プライモソームの再構築系を立ち上げ、DnaB loading 活性を測定する。これらの方法を駆使して、一本鎖 DNA 結合能と DnaB loading 活性の相関を調べる。一方で NMR の結果得られた各構成因子間の相互作用に重要なアミノ酸変異体も用いて同様の解析を行う。また、種々の相互作用情報をもとにプライモソーム複合体を再構成し、電子顕微鏡による観察を行い、複製再開機構における

複合体を確認する。

#### (6) プライモソーム構成因子の in vivo での役割

プライモソーム構成因子の in vivo での役割を調べるため、各タンパク質の変異欠損株を国立遺伝学研究所から譲渡してもらい、これに各蛋白質変異体をプラスミドにて導入し、UV 照射後の大腸菌のコロニー形成を測定することで、in vivo での変異の効果を調べる。

#### 4. 研究成果

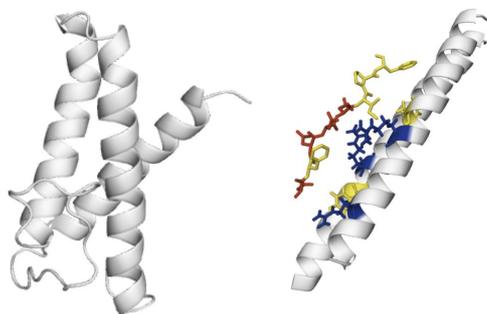
#### (1) PriC の立体構造解明、また DNA や他のプライモソーム構成因子との相互作用を含めた機能の解析

##### PriCN 末ドメインの構造機能解析

N 末ドメインに関しては NMR を用いて、立体構造を解いた。N 末ドメインの構造は3本のヘリックスバンドル構造であり、ヘリックス1と2間の長いループ構造が特徴的であった(下図)。また、N 末ドメインは弱く一本鎖 DNA と結合し、その結合により多量体を形成することが明らかとなった。これらの結果は論文としてまとめ、Protein Science に掲載された(雑誌論文)。また構造、NMR 帰属データに関してはそれぞれ PDB、BMRB データベースに登録した(PDBID:2RT6, BMRBID:11525)。

##### PriCC 末ドメインの構造機能解析

C 末ドメインに関しては、X 線結晶解析のための結晶を得たが、分解が悪く、未だその構造は得られていない。一方で C 末ドメインに存在する、塩基性アミノ酸、芳香族性アミノ酸 23 種類をアラニンに置換し、一本鎖 DNA および SSB との結合を調べた。その結果、一本鎖 DNA および SSB との結合部位が重なっており、その結合が競合することを見いだした。また、SSB の C 末端 8 残基が PriC との結合に重要であることが明らかとなった(下図)。この結果は現在 PLOS ONE に投稿、論文審査中である。



PriCN 末ドメインの構造  
(PDBID:2RT6)

PriCC 末ドメインと  
SSB 末端ペプチド  
との結合モデル

これら、の結果は我々の研究で初めて明らかになったものであり、PriC 依存的複製

再開の機構の理解につながって行くと考えている。この他に我々は DnaB と PriC が直接相互作用する結果も得ており、現在その相互作用を詳細に調べている。

#### (2) DnaT の立体構造解明、また DNA や他のプライモソーム構成因子との相互作用を含めた機能の解析

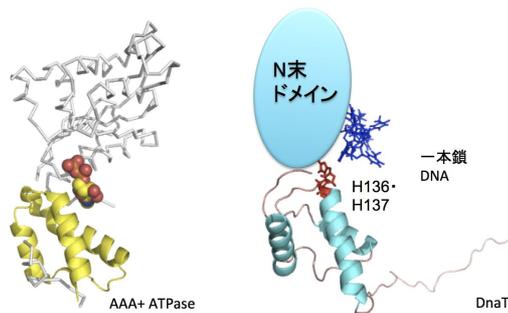
##### DnaTN 末ドメインの構造機能解析

N 末ドメインに関しては、三量体形成に関与することが知られていたが、我々は、欠失変異体、アミノ酸変異体を用いて、アミノ酸番号 43-66 の領域が三量体形成に重要であることを見いだした。またこのドメインの構造解析を目指し、各種変異体を作成し、X 線結晶解析のための結晶を得たが、分解が悪く、未だその構造は得られていない。また、N 末ドメインの C 末端領域には酸性アミノ酸が多数存在する部位があり、この部位が PriB と結合し、PriB-一本鎖 DNA 複合体から一本鎖 DNA を解離させている部位である可能性を見いだした。

##### DnaTC 末ドメインの構造機能解析

C 末ドメインに関しては NMR を用いて、立体構造を解いた。N 末ドメインの構造は3本のヘリックスを持っており、その構造は AAA+ATPase のスモールドメインと類似していた(下図)。また、C 末ドメインは His136, His137 を介して一本鎖 DNA と結合しており、この結合はアミノ酸変異体を用いて、DnaT 全長においても起こっていることを確認した。DnaTC 末ドメインの立体構造、NMR 帰属データに関してはそれぞれ PDB、BMRB データベースに登録した(PDBID:2RU8, BMRBID:11549)。

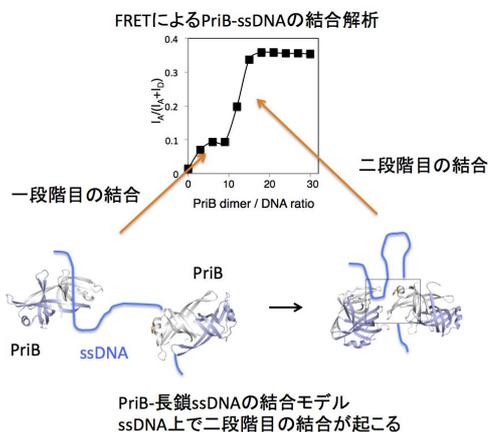
DnaT の構造モデル



これら、の結果は我々の研究で初めて明らかになったものであり、PriA 依存的複製再開において DnaB の loading に関わる DnaT の構造・機能に関する新たな知見である。これらの相互作用解析をもとに PriA 依存的複製再開のモデル作成し、その結果は現在論文として FEBS journal へ投稿中である。

#### (3) PriB と DNA の協同的結合の解析

長鎖 (35mer) 一本鎖 DNA-PriB の結合において、NMR の解析によって一本鎖 DNA-PriB 複合体の結晶構造から見える相互作用だけでは理解できない多価な結合が観測された。すなわち PriB と ssDNA との相互作用において結合力の異なる二段階の結合が存在し、それらの結合部位が異なっていることを見いだした。これらの結合は、FRET、ゲルシフトアッセイにおいても見いだされた。アミノ酸変異体を用いた種々の解析の結果から、一段階目の結合は一本鎖 DNA-PriB 複合体結晶構造から推定される部位であること、また二段階目の結合は His64 を相互作用面に持つ結合であり、この結合によって、PriB と長鎖一本鎖 DNA が協同的な結合を行う可能性を示唆した (下図)。これらの結果は論文としてまとめ、BBA に掲載された (雑誌論文)。



#### (4) PriAのドメイン解析

PriA に関しては、構造解析を目指し、ドメイン化、発現系構築などを行った。しかしながら X 線結晶解析により PriA の全体構造が他のグループによって解明されたため (Bhattacharyya et al. PNAS, 2014) 構造解析に関しては中断した。一方で、発現系を構築した各ドメインに関しては他の因子との相互作用解析に今後用いて行く予定である。

#### (5) 複製再開始プライモソームの invitro 再構成系の確立

invitro 再構成に関しては現在進行中であるが、安定な複合体が取れないため、現在難航している。

#### (6) プライモソーム構成因子の in vivo での役割

PriC, DnaT, PriB の変異欠損株を国立遺伝学研究所から譲渡してもらい、各欠損変異に関して調べた。DnaT の欠損変異は細胞分裂阻害を引き起こすため、これに DnaT 変異体をプラスミドにて導入し、細胞分裂阻害の回復を見ている段階である。

本科研費において (1) ~ (6) の結果を得ることができた。上記に書いてあるように、現在 2 つの論文を投稿中であり、今後さらに今回の結果をふまえた論文を作成して行く予定である。さらに平成 26 年度の日本生化学会のシンポジウムで本内容の一部を発表する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Fujiyama, S, Abe, Y., Takenawa, T, Aramaki, T, Shioi, S, Katayama, T & Ueda, T, Involvement of histidine in complex formation of PriB and single-stranded DNA. Biochim Biophys Acta, 査読あり 1844, (2014), 299-307.

Aramaki, T, Abe, Y., Katayama, T & Ueda, T, Solution structure of the N-terminal domain of a replication restart primosome factor, PriC, in *Escherichia coli*. Protein Sci, 査読あり 22, (2013), 1279-1286.

Aramaki, T, Abe, Y., Ohkuri, T, Mishima, T, Yamashita, S, Katayama, T & Ueda, T, Domain separation and characterization of PriC, a replication restart primosome factor in *Escherichia coli*. Genes Cells, 査読あり 18, (2013), 723-732.

Su'etsugu, M, Harada, Y, Keyamura, K, Matsunaga, C, Kasho, K, Abe, Y., Ueda, T & Katayama, T. The DnaA N-terminal domain interacts with Hda to facilitate replicase clamp-mediated inactivation of DnaA. Environ Microbiol, 査読あり 15, (2013), 3183-3195.

〔学会発表〕(計 10 件)

荒牧峻彦, 阿部 義人, 古谷香織, 片山 勉, 植田 正, 大腸菌複製再開始因子 PriC の SSB 結合および DNA 結合に関する変異体解析, 日本生化学会, (2013), 横浜

藤山紗希, 阿部 義人, 谷純也, 浦辺大志, 片山 勉, 植田 正, DNA 複製再開始に関わる大腸菌プライモソーム構成因子 PriB・DnaT の相互作用解析, 日本生化学会, (2013), 横浜

Takahiko Aramaki, Yoshito Abe, Takatoshi Ohkuri, Tomonori Mishima,

Kaori Furutani, Shoji Yamashita, Tsutomu Katayama, Tadashi Ueda, Domain separation and characterization of PriC, a replication restart primosome factor in Escherichia coli., Protein Society 2013 symposium, (2013), USA

藤山 紗希, 阿部 義人, 塩井 誠次郎, 竹縄 太一, 片山 勉, 植田 正, DNA 複製再開に関わる大腸菌プライモソーム構成因子 PriB の変異体解析, 日本生化学会, (2012), 福岡

古谷 佳織, 荒牧 峻彦, 阿部 義人, 片山 勉, 植田 正, 大腸菌プライモソーム構成因子 PriC の塩基性アミノ酸残基に関する変異体解析, 日本生化学会, (2012), 福岡

荒牧 峻彦, 古谷 佳織, 阿部 義人, 片山 勉, 植田 正, 大腸菌プライモソーム構成因子 PriC の DNA 結合に関する解析, 日本生化学会, (2012), 福岡

阿部 義人, 大腸菌複製再開における分子機構の構造生物学的研究, 第 38 回日本応用酵素協会研究発表会, (2012), 大阪

荒牧 峻彦, 阿部 義人, 古谷佳織, 片山 勉, 植田 正, PriC が一本鎖および二本鎖 DNA いずれにも結合することの意義, 日本タンパク質科学会, (2012), 名古屋

藤山紗季, 阿部 義人, 谷純也, 浦辺大志, 片山 勉, 植田 正, DNA 複製再開に関わる大腸菌プライモソーム構成因子 DnaT の機能解析, 平成 24 年度 日本生化学会九州支部例会, (2012), 福岡

荒牧 峻彦, 阿部 義人, 古谷佳織, 片山 勉, 植田 正, DNA 複製再開因子 PriC の機能解析, 日本タンパク質科学会, (2011), 大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
なし

〔その他〕

PDB 登録

PriCN 末端ドメイン構造: 2RT6

DnaTC 末端ドメイン構造: 2RU8

BMRB 登録

PriCN 末端ドメイン NMR 帰属: 11525

DnaTC 末端ドメイン NMR 帰属: 11549

PriB NMR 帰属: 11527

(1) 研究代表者

阿部 義人 (ABE, Yoshito)

九州大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号: 60315091

(2) 研究分担者

片山 勉 (KATAYAMA, Tsutomu)

九州大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号: 70264059