

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440031

研究課題名(和文)複製再開始複合体における分子集合・解離メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular association and dissociation mechanism in replication restart

研究代表者

阿部 義人 (Abe, Yoshito)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：60315091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌におけるDNA複製再開始機構は、複数のタンパク質(PriA、PriB、DnaT、PriC、DnaB)がDNA上で规律的に結合・解離する多段階の反応である。本申請ではこれらの再開始構成タンパク質群の構造および相互作用解析を行った。DnaTにおいては、N末端ドメインの多量体形成、PriBとの相互作用による一本鎖DNAを解離させる機構について調べた。さらにPriCにおいては、C末端ドメインとDnaBの相互作用に関して調べた。これらの情報は、大腸菌の複製再開始機構の解明に寄与できると考えている。

研究成果の概要(英文)：In DNA replication restart, systematic association and dissociation of several proteins are occurred on DNA. In this application, we performed the structure and function analysis of the proteins (PriA, PriB, DnaT, PriC, DnaB) involved in replication restart in Escherichia coli. In DnaT, we examined the oligomeric state of the N-terminal domain and the ssDNA (single-stranded DNA) dissociation activity from PriB-ssDNA (single-stranded DNA) complex by the linker region between the N-terminal and C-terminal domains, which is involved in the binding to PriB. Moreover, we examined the interaction between PriC and DnaB. Together with these results, we contributed elucidating the mechanism in replication restart.

研究分野：構造生物学、タンパク質化学

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 PriC PriB DnaT DnaB

1. 研究開始当初の背景

生命活動にとって重要な複製・転写は、生命の設計図である DNA 上でのイベントとして起こる。このイベントは DNA 上にある特異的な配列もしくは三次元に形成された DNA 構造上に蛋白質が集合し、イベント終了後にタンパク質が解離もしくは分解されることによって制御されている。また、これらのイベントでは各タンパク質が順番に集合、解離を行っており、これらの分子および原子レベルでのメカニズム解明は生命の基本原理の解明につながると考えられている。

大腸菌においては、ゲノム DNA の複製開始に複製起点 *oriC* 配列内に DnaA のオリゴマーが結合すると、二本鎖 DNA の開裂が起こり、生成された一本鎖 DNA (以下 ssDNA) に DnaB ヘリカーゼの導入がおこる。そこに DnaG プライマーゼが加わり、DNA 合成開始に必要なプライマー RNA が合成され、DNA ポリメラーゼホロ酵素による DNA 鎖の伸長が起こる。ゲノムの DNA 複製はこのような DNA 複製装置によって行われている。

一方で紫外線や化学物質によって生じる DNA 損傷によって、一時的に DNA 複製は停止し、複製装置は複製途中の DNA から解離する。その後 DNA 修復系関連タンパク質により DNA 修復が起こった後、RecA などの相同組み替えタンパク質が関与し、複製フォーク構造が再形成されると考えられている。この複製フォーク構造の形成後に DnaB ヘリカーゼが再導入され、複製は再開される (Cox et al. 2000, Nature)。

この DnaB の再導入には複製フォーク構造を認識するタンパク質群が必要である。一つは複製フォーク構造で形成される D-loop 構造中の 3' 末端を PriA ヘリカーゼが認識し、PriB、DnaT から構成されるプレプライモソームが構築される PriA 依存的複製再開経路である。もう一つは、PriC が複製フォークを認識し、複製再開を行う PriC 依存的複製再開経路である (図 1)。これらの経路はそれぞれ細胞内で相補的に機能していることが各欠失株を用いた遺伝学的研究によって知られている。

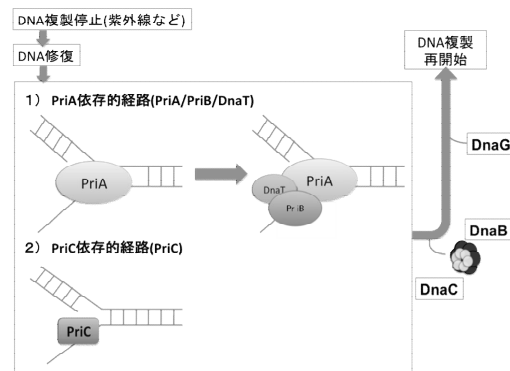


図 1. 大腸菌における DNA 複製再開経路

我々は、PriA 依存的複製再開と PriC 依存的複製再開に関わる各分子の構造生物学的研究を行ってきた。特に我々は「複製再開時に DnaB ヘリカーゼを如何に導入するのか」という点に着目し、PriA 依存的複製再開経路および PriC 依存的複製再開経路において DnaB ヘリカーゼの導入に重要な役割を持っていると考えられる DnaT、PriC の機能・構造を調べている。

2. 研究の目的

前述のように、我々は DnaB ヘリカーゼの導入部分に關与する複製再開機構のメカニズムの解明を構造生物学的な見地から行っており、未だ解かれていない複製再開因子の立体構造を決定し、各因子同士の相互作用解析を行い、各因子の機能を探っている。

さらに本申請では我々はこれまで得られた構造生物学的データに基づいて複製再開関連タンパク質分子の集合・解離という観点から研究を行うことを目的とした。すなわち、これまで解析した各因子同士の相互作用の結合・解離の評価を行うことで、各因子が結合・解離する順番を決定することができないかを検討し、複合体形成のメカニズム解明を目指す。さらに複製再開複合体の分子集合・解離の過程を検出できないかを検討して行く。特に今回は複製再開機構の DnaB ヘリカーゼの導入に重要な、DnaT-PriB の相互作用、解離および DnaT オリゴマーの分子集合など、DnaT の機能を中心に研究を行った。今回の研究をもとに複製開始、複製再開に関わる DnaB ヘリカーゼ導入の共通した機構を見いだすことができれば、基礎的ではあるが非常にインパクトのある研究に展開できるのではないかと考えている。

研究計画書においては、下記の各項目を個別の研究目的とした。

(1) PriA 依存的複製開始における構造および相互作用解析

PriB に関しては、既に結晶構造解析 (Shioi et al., 2002, BBRC)、NMR 解析により一本鎖 DNA (Fujiyama et al., 2014, BBA) との相互作用解析が行われている。また DnaT は限定分解を行い、その情報を基に N 末ドメイン、C 末ドメインを決定した。

本申請では PriB と相互作用するタンパク質と PriB との相互作用解析を NMR、ITC、Biacore などにて解析すること、DnaT の立体構造および相互作用を解析することを目的とした。

(2) PriC 依存的複製開始における相互作用解析

PriC に関しても限定分解を行い、その情報を基に PriC の N 末ドメイン、C 末ドメインを以前決定した (Aramaki et al., 2013, Genes Cell)。PriC は SSB、DnaB、一本鎖

DNA との相互作用が考えられている。(Wessel et al., 2013, JBC)。我々は相互作用解析の情報を集め、さらに C 末ドメインの構造決定を行うことを目的とした。

(3) DnaB に関する複製再開における機能・相互作用・立体構造解析

DnaB に関しては、各種変異体を利用し、PriC、DnaT との相互作用情報を集め、どの相互作用が複製再開に必要なかを調べることを目的とした。

(4) DNA 構造の検出

(5) 複製再開複合体の再構成

(6) 真核生物の複製再開タンパク質の同定

なお、(4)～(6)の3項目に関しても、研究計画には記載していたが、(1)～(3)の目的を優先的に研究を進めたため、今後の検討課題としたい。

3. 研究の方法

(1) PriA 依存的複製開始における構造および相互作用解析

PriB と相互作用するタンパク質との相互作用解析

PriB は、PriA と相互作用することが知られている。我々は NMR によって決定した PriB の主鎖の化学シフト情報を持っており、この情報を利用した滴定実験をおこない、PriB と相互作用部位を調べた。さらに 10 種類近くの PriB 変異体を利用して、PriB と各因子との相互作用を ITC、Biacore を用いて調べた。

DnaT の立体構造および相互作用の解析

DnaT の C 末ドメインおよび N 末ドメインの立体構造を NMR もしくは X 線結晶解析によって構造決定を行う。また、各ドメインの相互作用情報などを NMR や変異体を用いた解析などの種々の方法によって集めていく。また、DnaT 欠失株は細胞分裂阻害が起こり、DnaT を挿入したベクターによって回復する。この系を利用し in vitro における相互作用部位の結果と in vivo での機能との比較を行うことでその相互作用部位の生体内での重要性を検討する。

(2) PriC 依存的複製開始における相互作用解析

我々は、SSB、DnaB、一本鎖 DNA と C 末ドメインが相互作用していることを見出している。そこですでに作成した 30 種類近くある PriC の C 末ドメインの変異体を利用して、相互作用解析を行い、情報を集める。また既に N 末ドメインは NMR による構造決定を行っているが(Aramaki et al. 2013, Protein Science)、C 末ドメインについても構造決定を行う。

(3) DnaB に関する複製再開における機能・相互作用・立体構造解析

DnaB に関しては、N 末側ドメイン(1-202)までの発現系を構築している。このドメインは C 末ヘリカーゼドメインと異なり、大腸菌特異的なアミノ酸配列および構造を持っており、複製再開、複製開始に関わる因子との相互作用部位ではないかと予測している。このドメインと PriC、DnaT との相互作用を調べ、結合・解離の情報を集める。

4. 研究成果

(1) PriA 依存的複製開始における構造および相互作用解析

PriB と相互作用するタンパク質との相互作用解析

PriA-PriB 相互作用に関しては、PriB の主鎖の化学シフト変化の情報をもとに PriA の結合部位を調べ、ssDNA との結合部位に比較的によく似ていることを明らかとした。各変異体との結合活性を調べたが、現時点で特に有意な差をもつ変異体を見いだせていない。ssDNA との三者複合体も含めて、今後検討していく予定である。

DnaT の立体構造および相互作用の解析

DnaT の N 末ドメイン(1-88)に関しては、多量体形成に参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 の領域が多量体形成に重要であることを見いだした。また、C 末ドメイン(89-179)に関しては NMR を用いて、立体構造を解いた(PDBID: 2RU8, BMRBID:11549)。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(図2、PDBID: 2RU8, BMRBID:11549)。また、N 末ドメインとの間にあるリンカー領域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ことを見出した。これらの結果は論文として、FEBS journal に報告した。(雑誌論文, Fujiyama et al., 2014, FEBS journal)

PriB-DnaT 間の相互作用に関しては、さらに研究を進め、PriB の主鎖の化学シフト変化の情報をもとに DnaT の結合部位を調べた。化学シフト変化は起こらなかったが、中性付近の pH でシグナルのブロードニングが観測された。ブロードニングが確認された部位である PriB の His26, また His26 と水素結合を形成していると考えられる Ser20 をアラニンに変化させた変異体を作成し、等温滴定型熱量計(ITC)およびゲルシフトアッセイ(EMSA)を用いて調べたところ、両変異体は DnaT との結合活性および PriB-一本鎖

DNA 複合体から一本鎖 DNA を解離させる活性を失っていることを確認した。これらの部位はこれまで相互作用アミノ酸として考えられていた Glu39 および Arg44 とともに PriB が形成する二量体界面に存在し、この界面の形成によって溝を形成している (図 2)。この溝において、ssDNA の結合、解離さらには DnaT の結合が起こっていることを示唆した。

DnaT の各ドメインの間のリンカー部位に関して、N 末ドメインをリジルエンドプロテアーゼによって切断し、ペプチド (60-88) を得た。このペプチドは PriB との結合や PriB-一本鎖 DNA 複合体から一本鎖 DNA を解離させる活性をわずかに持っていることを確認した。さらにこのペプチドを 15N 標識し、NMR を用いて、PriB の滴定を行ったところ、DnaT の 66-76 の領域がシグナルブロードニングを起こしていることを見出した。さらに、その間の D66、D70、Y74、E76 をアラニンに置換した変異体を作成し、PriB-一本鎖 DNA 複合体から一本鎖 DNA を解離させる活性が減弱していることから、DnaT66-76 と PriB の二量体界面の溝が PriB-DnaT 間の相互作用部位であることを確認した。これらの結果は、種々の学会に発表し、論文にまとめ、Biochemistry に現在投稿中である。

さらに DnaTN 末ドメインに関して、我々は、アミノ酸変異体およびゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、F42、Y43、L50 が多量体形成に重要であることを見いだした。これらのアミノ酸をアラニンに変異させると、多量体形成能が失われ、N 末ドメインの安定性が低下する。現在、N 末ドメインの構造解析を目指し、結晶を作成したが分解能が悪く構造解析までは至っていない (雑誌論文, 阿部その他., 2015, SPring-8/SACLA 利用研究成果集)。一方で各種変異体を作成し、X 線結晶解析のための結晶を得、分解能の改善を現在行っている。

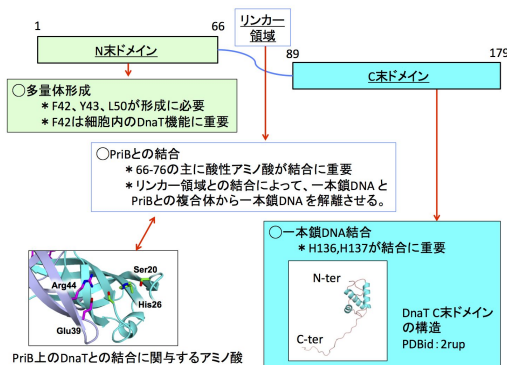


図 2. DnaT の構造と機能まとめ

また、DnaT 欠失株を用いた *in vivo* の実験として、野生型の DnaT を導入したプラスミドでは細胞分裂阻害の回復が起こる系を構築した。各種変異体を含むベクターを作成し、

形質転換したところ、多量体形成に關与する F42A 変異体を含むベクターを形質転換した細胞の細胞分裂阻害が回復しないことを確認した。F42A が不安定であるためなのか、それとも多量体形成が阻害されているためなのかを現在確認しており、多量体形成の結果を含めて、論文作成を予定している。

(2) PriC 依存的複製開始における相互作用解析

C 末端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。これらの結果は論文として、Journal of Biochemistry に報告した。(雑誌論文, Aramaki et al., 2015, Journal of Biochemistry)

また、C 末ドメインの構造解析を目指し、結晶を作成したが分解能が悪く構造解析までは至らなかった。(雑誌論文, 阿部その他., 2015, SPring-8/SACLA 利用研究成果集)。一方 NMR により PriC の全体構造が他のグループによって解明されたため (Wessel et al., JBC, 2016)、PriC の構造解析に関しては中断した。

(3) DnaB に関する複製再開における機能・相互作用・立体構造解析

DnaB に関しては、発現系を構築した N 末側ドメイン (1-202) を利用し、PriC および DnaT との相互作用を調べた。DnaT に関しては、結合活性は確認できなかったが、PriC において N 末側ドメイン (1-202) との結合をブルダウンアッセイにて確認することができた。また、DnaBN 末側ドメインの欠失変異体を作成し、171-202 の領域を欠失させると、PriC との結合がなくなることから、171-202 の領域に PriC との結合部位が存在することが示された。現在、171-202 の領域のペプチドを準備し、PriC との結合の確認を行っている。

その他

本研究の成果がきっかけとなり、中山医学大学 (台湾) の Huang 教授らとともに雑誌 BioMed Research International に「Helicase and Its Interacting Factors: Regulation Mechanism, Characterization, Structure, and Application for Drug Design」というタイトルの特集号を編集し、ゲストエディターとして参加した。(雑誌論文, Huang et al., 2015, BioMed Research International)

また、その他の結果として、大腸菌複製開始因子 DnaA の変異体が関わる大腸菌の細胞分裂阻害の再活性化因子 CedA の機能解析を行った。(雑誌論文, Abe et al., 2016,

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 5 件)

Abe, Y., Fujisaki, N, Miyoshi, T, Watanabe, N, Katayama, T & Ueda, T. Functional analysis of CeaA based on its structure: residues important in binding of DNA and RNA polymerase and in the cell division regulation. *J Biochem.* 査読あり, 159, (2016), 201-208.

doi: 10.1093/jb/mvv096

阿部義人, 白石充典, 荒牧峻彦, 大腸菌複製再開因子 DnaT, PriC の構造解析, *SPring-8/SACLA 利用研究成果集*, 査読あり, 3, (2015) 294-297 2015

doi: 10.18957/rr.3.2.294

Huang, CY, Abe, Y., Ding, H & Chung, I. Helicase and Its Interacting Factors: Regulation Mechanism, Characterization, Structure, and Application for Drug Design (Editorial). *BioMed Research International*, 査読なし, 2015, (2015), Article ID 909047, doi: 10.1155/2015/90904

Aramaki, T, Abe, Y., Furutani, K, Katayama, T & Ueda, T, Basic and aromatic residues in the C-terminal domain of PriC are involved in ssDNA and SSB binding. *J Biochem*, 査読あり, 157, (2015), 529-537.

doi: 10.1093/jb/mvv014

Fujiyama, S, Abe, Y., Tani, J, Urabe, M, Sato, K, Aramaki, T, Katayama, T & Ueda T, Structure and mechanism of the primosome protein DnaT: functional structures for homotrimerization, dissociation of ssDNA from PriB-ssDNA complex and formation of DnaT-ssDNA complex. *FEBS journal*, 査読あり, 281, (2014), 5356-5370.

doi: 10.1111/febs.13080

[学会発表](計 14 件)

藤山紗希, 阿部義人, 片山勉, 植田正, 大腸菌 DNA 複製再開タンパク質 PriB・DnaT の構造を基盤とした相互作用解析, 第 89 回日本生化学会年会, 2016.09.26., 仙台

Fujiyama, S, Abe, Y., Katayama, T., Ueda, T, NMR Analysis of an Interaction between PriB and DnaT on Bacterial Replication Restart Primosome, The XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016.07.25., 京都

池田陽平, 藤山紗希, 阿部義人, 片山勉, 植田正, 大腸菌 DNA 複製再開因子 DnaT の多量体構造解析, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016.06.08., 福岡

阿部義人, 藤山紗希, 池田陽平, 片山勉, 植田正, 大腸菌 DNA 複製再開因子 DnaT の構造と機能, 第 13 回 21 世紀大腸菌研究会, 2016.06.02., 阿蘇

藤山紗希, 阿部義人, 片山勉, 植田正, 大腸菌 DNA 複製再開タンパク質 PriB・DnaT の相互作用機序の解析, 日本生化学会九州支部会, 2016.05.14., 鹿児島

阿部義人, Structure basis of replication restart primosome in *E. coli*, 第 3 回生命科学分子科学研究会, 2016.03.15.ニセコ

藤山紗希, 阿部義人, 片山勉, 植田正, 物理化学的手法を用いた大腸菌 DNA 複製再開因子 PriB・DnaT の相互作用解析, 第 88 回日本生化学会, 2015.12.03.神戸

阿部義人, 構造を基盤とした大腸菌 DNA 複製再開の分子機構, 第 169 委員会 第 48 回研究会, 2015.11.18., 大阪 (招待講演)

阿部義人, 藤山紗希, 荒牧峻彦, 片山勉, 植田正, 構造を基盤とした大腸菌 DNA 複製再開の分子機構, 第 39 回タンパク質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2015.09.12., 別府

藤山紗希, 阿部義人, 片山勉, 植田正, NMR を用いた大腸菌 DNA 複製再開タンパク質 PriB-DnaT 間の相互作用解析, 第 13 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2015), 2015.08.20., 長崎

阿部義人, 藤山紗希, 片山勉, 植田正, 大腸菌 DNA 複製再開因子 DnaT の構造と機能, 第 42 回生体分子科学討論会, 2015.06.12., 名古屋

Fujiyama, S, Abe, Y., Katayama, T., Ueda, T Analysis of interaction between PriB and DnaT at replication

restart by mutational and biophysical approaches, the 9th 3R Symposium, 2014.11.18., 静岡

藤山紗希, 阿部義人, 片山勉, 植田正, 大腸菌 DNA 複製再開因子 PriB-DnaT 間の相互作用部位の同定, 第87回日本生化学会, 2014.10.16., 京都

Abe, Y, Fujiyama, S, Aramaki, T, Katayama, T & Ueda, T, Structure and mechanism of the replication restart primosome proteins, 第 87 回日本生化学会, 2014.10.17., 京都 (招待講演)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

PDB 登録

PriBS55A 変異体 : 5WQV

DnaTC 末端ドメイン構造 : 2RU8

6 . 研究組織

(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

(4) 研究協力者

植田 正 (UEDA Tadashi)

九州大学・大学院薬学研究院・教授

白石充典 (SHIROISHI Mitsunori)

九州大学・大学院薬学研究院・助教