

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570110

研究課題名(和文) 大腸菌染色体複製関連タンパク質における相互作用解析

研究課題名(英文) Interaction analysis of chromosomal replication related proteins in *Escherichia coli*.

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

研究成果の概要(和文)：

タンパク質には単体で機能するものもあるが、他のタンパク質と複合体を形成したり、相互作用することによって分子機能を持つものが多い。本研究では、そのような分子間相互作用が機能につながっていると考えられる CedaA、HSPQ、PriB、PriC、DnaT などの大腸菌染色体複製に関与する蛋白質の構造および相互作用を NMR 解析および変異体解析を用いて調べ、その機能との相関を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

Most of functional proteins work in protein complex and interact with other proteins. In this study, we examined protein-protein interaction based on the protein structure using NMR and amino acid mutation analysis. We found and discussed the function of CedaA, HSPQ, PriB, PriC, and DnaT involved in replication in *Escherichia coli*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	910,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：分子認識および相互作用、複製、NMR

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

タンパク質には単体で機能するものもあるが、他のタンパク質と複合体を形成したり、相互作用することによって分子機能を持つものが多い。よって分子間の相互作用解析はその分子機能の解析につながり、さらには生物機能につながっていく。本研究では、そのような分子間相互作用が機能につながっていると考えられる大腸菌染色体複製に関与する蛋白質の構造解析を行い、その構造をもとに相互作用を調べていった。以下主に3つの解析を行った。

1) 細胞分裂機構再活性化因子 CedA に関する相互作用解析

大腸菌 dnaAcos 変異株では DnaA の4つのアミノ酸に変異がかかっており、DNA 過剰複製と細胞分裂阻害がおこる。その際 cedA 遺伝子を多コピー型ベクターに組み込み、過剰発現させると、DNA 過剰複製が起こったままの状態での細胞分裂の阻害が解除される。すなわち CedA は細胞分裂の再活性化因子として機能しているのではないかと考えられている (Katayama et al. 1997 Mol. Microbiol. 26, 687-97.)。しかし、CedA の分子としての機能はいまだ分かっていなかった。CedA は NMR 構造から二本鎖 DNA と結合するタンパク質と構造が似ていることが示唆されている (Chen HA et al. 2005 Biochemistry, 44 6738-44) が、その DNA 結合能は非常に弱く、その特異性は明らかではなかった。さらに、我々はこれまでの研究で CedA が RNAPolymerase と結合する分子であることを示している。RNAPolymerase の転写活性が大腸菌の細胞分裂と相関しているという報告もあり (Salomon RA and Farias RN 1992, J. Bacteriol. 174, 7428-35)、その分子認識機構をさらに詳細に解析していくことで、DNA 複製と細胞分裂の相関を分子レベルで議論することが可能になると考えられた。

2) HSPQ の機能解析

DnaA 変異体を持つ温度感受性 DnaA508 変異株は熱ショックを与えると、大腸菌の増殖効率が抑制される。その表現型を顕著に回復させる遺伝子として、HspQ 遺伝子が同定された (Shimuta et al. 2004 Genes Cells, 9, 1151-66.)。さらに Heat shock promoter を持つ HspQ 遺伝子は熱ショック時にのみ特異的に発現が誘導され、変性した DnaA に直接的、もしくは間接的に相互作用して分解するという新しいカスケードが存在することが示唆された。我々は、HSPQ の X 線結晶構造 (PDBID: 1VBV) を解析し、その構造から HSPQ が三量体を形成し、その機能を発揮するのではないかと予測した。

3) プライモソーム構成因子の機能解析

プライモソームは大腸菌においては複製再開始に必要な複合体である。すなわち DNA 損傷が原因で一時的に複製が止まったときに RecA 依存的に形成される D-loop を PriA が認識することによってプライモソームが形成され、再び DNA 合成が開始される。プライモソームは少なくとも6種のタンパク質 (PriA, PriB, PriC, DnaT, DnaB, DnaC) と DNA (PAS, Primosome Assemble Aite) から構成される高分子複合体である。我々は、このプライモソーム中の因子の一つである PriB の結晶構造 (PDBID: 1WOC) を解析した (Shioi et al. 2004 Biochem. Biophys. Res. Commun. 26, 766-76.)。PriB はプライモソーム複合体形成時に PriA と相互作用し、効率的に複製開始を亢進する。さらに、PriB は一本鎖 DNA と結合する活性を持っていることがわかってきた。

2. 研究の目的

我々は以上の研究背景をもとに以下の研究目的を考えた。

1) 細胞分裂機構再活性化因子 CedA に関する相互作用解析

CedA と DNA もしくは RNAPolymerase の相互作用を①NMR による相互作用解析、②タンパク質化学的手法を用いた相互作用部位の決定、③分子生物学的手法を用いた in vivo 解析などの手法を用いて解析する。

2) HSPQ の機能解析

HSPQ の分子機能を①NMR を用いた相互作用解析、②分子生物学的手法を用いた in vivo 解析などを行い、大腸菌複製開始の新たな調節機構を調べていく。

3) プライモソーム構成因子の機能解析

①NMR を用いてプレプライモソームの構成因子である一本鎖 DNA、また PriA との相互作用を調べる。また、②PriB 以外のプライモソーム複合体構成因子である、PriC、DnaT の構造を決定し、その機能解析を行う。

3. 研究の方法

1) CedA に関する機能解析

①CedA と RNA polymerase の結合部位
我々は RNAPolymerase と CedA の結合が、1-25 残基までの構造を持たない N 末領域を切断すると起こらないこと、また、N 末領域に対するアミノ基特異的な化学修飾を用いるとこの結合が起こらなくなるという実験事実を見いだしている。すなわち CedA の N 末端領域が RNAPolymerase との相互作用に重要であることがわかっている。一方で RNAPolymerase における CedA の結合部位を同

定するため、CedA のシステイン変異体を作成し、光架橋試薬を CedA に導入し、RNA polymerase のどのサブユニットに反応するのかを検討した。また相互作用するサブユニットが同定された場合、そのサブユニット上での結合領域をタンパク化学的手法を用いて同定しようとした。

②CedA-DNA 間の相互作用

我々は 26-87 残基までの四本の β シートと一本の α ヘリックスで形成される CedA の C 末領域と DNA の相互作用が配列特異的であるかどうかを調べるために、SELEX 法を用いて、CedA の特異的結合 DNA 配列を検討した。強い相互作用を持つ DNA 配列が見つかった場合、その配列を持つ二本鎖 DNA との複合体構造を NMR もしくは X 線結晶解析により決定しようとした。

を NMR もしくは X 線結晶解析により決定する。

③細胞増殖抑制再活性化機能の確認

大腸菌 dnaAcos 変異体に CedA 変異体を組み込んだプラスミドを導入する。CedA 遺伝子は①、②から得られた RNA polymerase 結合もしくは DNA 結合部位に変異をかけたものを準備した。細胞増殖抑制再活性化機能を大腸菌の増殖により評価する。これにより CedA の RNA polymerase 結合もしくは DNA 結合が細胞増殖抑制再活性化機能に重要であるか検討した。

2) HSPQ に関する機能解析

我々は、HSPQ の X 線結晶構造 (PDB 1VBV) を解析し、HSPQ は三量体を形成し、プロテアーゼもしくは分子シャペロン機能を発揮すると予測している。そこで以下の検討を行う。

① 以前報告されている HspQ 遺伝子の 大腸菌内への形質転換法 (Shimuta et al. 2004 Genes Cell 9, 1151) を利用し、HSPQ 変異体作成後、DnaA508 変異株に導入し、大腸菌増殖抑制機能、DnaA 分解活性の比較を行った。活性に変化のあった変異体を精製、調整し in vitro におけるプロテアーゼ活性、凝集性をの検出を行った。それぞれの活性検出においては基質として DnaA508 変異体を利用する。DnaA および HSPQ の発現、精製法に関しては当研究室において検討済みであり、各変異体の調製も可能である。プロテアーゼ活性検出に関しては、SDS-PAGE および MALDI-TOF MS を利用して行った。また凝集性の検出は蛍光測定装置を用いて行った。

③ ^{15}N , ^{13}C 安定同位体ラベル化 HSPQ を調製し、主鎖の全帰属を行った。3 量体 (分子量 33kDa) であるにもかかわらず比較的良好な HSQC スペクトルが現在得られている。一方で基質である DnaAN 末端ドメインの全帰属および構造決定は既に完了している (Abe et al. 2007 J. Biol. Chem. 282, 27459, Abe et al.

2007 Biomol. NMR assign. 1, 57)。NMR 帰属情報を元に、温度感受性 DnaA 変異体との相互作用を HSPQ 側および基質である DnaA 変異体側の両方で検出し、その相互作用情報を得ることとした。

3) プライモソーム構成因子の機能解析

プライモソーム構成因子の構造解析を行いながら、相互作用の検討を行っていく。

① PriB に関しては ^{15}N , ^{13}C ラベル化蛋白質を発現し、NMR を測定し、主鎖の全帰属を行った (図)。また、一本鎖 DNA との相互作用についても化学シフト変化からその結合部位を確認し、DNA-PriB 複合体の結晶構造と同様の結合部位であることを確認した。また全長の PriA を発現精製し、PriA との結合部位の同定を行った。一方で PriA の N 末、C 末各ドメインを発現精製して、各ドメインにおける結合部位の検出を行った。決定した相互作用部位情報を元に変異体を作成し、PriA-PriB-DNA 相互作用の確認を表面プラズモン共鳴等の方法で行った。

②DnaT, PriC に関しては現在大量発現系、精製系を構築している。双方ともに不安定で凝集しやすい蛋白質であるため、結晶化は難しいと考えており、NMR による構造決定を目指す。しかしながら、NMR の HSQC スペクトルも良好では無いため、現在限定分解によるドメイン化を行った。これらの情報を用いて DnaT, PriC の立体構造決定を行った。一方で各プライモソーム構成因子との相互作用の確認を NMR を用いて行った。

4. 研究成果

1) CedA に関する機能解析

①CedA と RNA polymerase の結合部位

RNA polymerase における CedA の結合部位を同定するため、CedA の 21 番目のセリンをシステインに変異した変異体を作成した。変異したシステインに光架橋試薬 (4-(N-maleimido)benzophenone) を CedA に導入し、Western blotting および MALDI-TOF を用いて RNA polymerase の b-subunit と CedA の N 末端が相互作用していることを見いだした。Irina Artsimovitch 博士 (Ohio state university) から献与していただいた RNA polymerase の変異体を用いて、 β -subunit のどの部位に結合したかを同定しようとしたが、CedA 側の化学修飾がうまく行かなかったため、これは断念した。

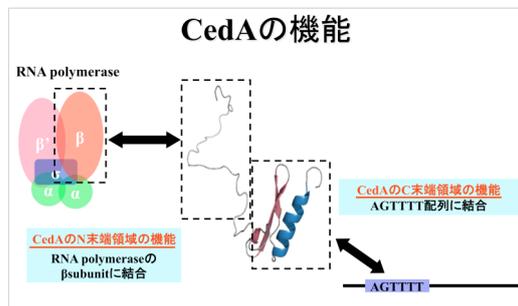
②CedA-DNA 間の相互作用

SELEX 法を用いて CedA の DNA 結合特異的配列が AGTTTT であることを見いだした。この配列は従来の報告では $100\ \mu\text{M}$ であった解離定

数を $0.5\mu\text{M}$ まで減少させる結果となり、結合力が 400 倍増加した。
 強い結合力を持つ DNA 配列を用いて二本鎖 DNA との複合体構造を NMR で検証した。これまで類似構造の比較からベータシート側に DNA が結合するのではないかと考えられていたが、NMR での DNA 添加の CedA の化学シフト変化の実験でそのことを証明することができた。X 線結晶解析は未だ結晶を得られていない。

③細胞増殖抑制再活性化機能の確認

大腸菌 dnaAcos 変異体に CedA 変異体を組み込んだプラスミドを導入した。RNA polymerase 結合配列を欠損させた CedA 変異体遺伝子を持つプラスミドを大腸菌 dnaAcos 変異体に導入した。細胞増殖抑制再活性化機能を大腸菌の増殖により評価し、CedA の RNA polymerase 結合部位が細胞増殖抑制再活性化機能に重要であることを見いだした。これらの結果はとりまとめ、学会発表を行った (学会発表⑤、⑩)。



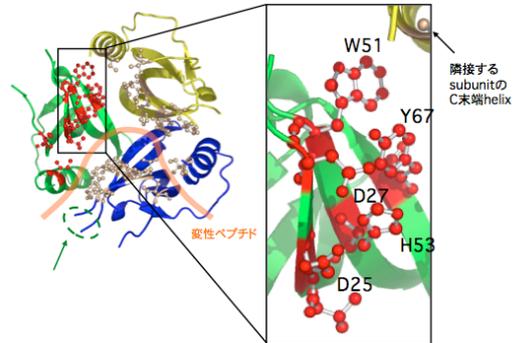
2) HSPQ に関する機能解析

①HspQ 遺伝子の¹⁵N 大腸菌内への形質転換法を利用し、HSPQ 変異体作成後、DnaA508 変異株に導入し、大腸菌増殖抑制機能の比較を行い、Ile8、V24A、D25A、D27A、W51A、Y51A、H53A、Y67A、I94A などが大腸菌増殖抑制機能に関与していることがわかった (図)。
 In vitro において DnaA508 を基質とし、HSPQ のプロテアーゼ活性を測定したが、HSPQ 存在下、非存在下においてプロテアーゼ活性は検出できなかった。一方で DnaA および DnaA508 の凝集活性を調べたところ、DnaA508 は野生型の DnaA よりも凝集しやすいことがわかった。この系を用いて、野生型および変異型の HSPQ を使って凝集性の変化を現在検出中である。傾向として HSPQ 存在下において凝集性の増加が見られており、HSPQ は大腸菌内において、蛋白質を凝集させる性質を持っているのではないかと考えている。変異体を使った結果も In vivo での実験と同様の傾向を示しており、HSPQ の凝集活性に関与する部位を特定することができた。

②NMR をもちいて相互作用情報を得ようとし

たが、測定時に DnaA508 の沈殿が形成されるため、総合作用情報を得ることが困難であった。これらの結果はとりまとめ、学会発表を行った (学会発表⑦、⑪)。

HspQの機能部位



18,V24,D25A,D27,H53,Y67,I94

... 疎水性クレフトの周辺

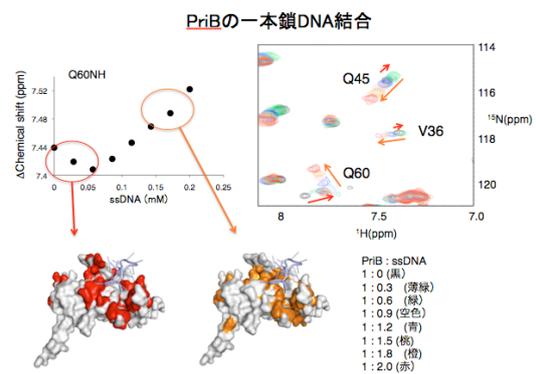
⇒ DnaA508との相互作用を直接的に阻害

W51 ... 境界面

⇒ 疎水性クレフトのパッキングに影響?

3) プライモソーム構成因子の機能解析

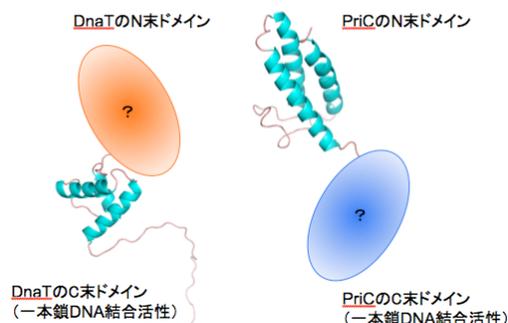
①PriB と PriA、一本鎖 DNA の結合部位を NMR を用いて同定した。一本鎖 DNA の場合に長さ依存的なもう一つの結合部位が形成されることを示した。他の大腸菌プライモソーム構成因子との相互作用も検出し、DnaB-PriB 間で相互作用が起こる可能性を示した。



②DnaT に関してはドメイン化および C 末ドメインの NMR 構造を決定した。また NMR 情報から一本鎖 DNA との結合部位を見だし、その部位の変異体を作成し、その部位が DnaT-一本鎖 DNA の相互作用に必要であることを示した。PriC に関してはドメイン化および N 末ドメインの NMR 構造を決定した。また C 末ドメインが一本鎖 DNA との結合部位であることを見いだした。

これらの結果はとりまとめ、学会発表を行った (学会発表①、②、③、④、⑥、⑧、⑨)。

DnaT・PriCの構造・機能



1) ~ 3) の結果は、今回の研究費を用いて我々が独自に見いだした結果であり、これまで他の研究者には発表されていない。よって現在論文として取りまとめて今後発表する予定である。

4) その他

本研究期間中に、膜蛋白質解析法を報告した(雑誌論文③、④、⑥)。また、NMR解析などによって蛋白質の相互作用情報を解析した(雑誌論文①、⑤、⑦、⑧、⑨、⑩)。今回の目的とは直接は関係ないが、今後、大腸菌複製関連蛋白質の構造解析を行う上で、利用できる技術をこれらの論文で報告しているのであわせて成果として報告する。

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 12 件)

- ①. Nagata-Uchiyama M, Abe Y, Monji A, Kanba S, Ueda T, Evidence for the binding of phosphate ion to the C-terminus region in A β 1-40 using heteronuclear NMR analyses, (査読あり) Protein Peptide lett., 17, 176-180. (2010)
- ②. Goto T, Abe Y, Imoto T, Ueda T, Effect of protein concentration and pH on the chitinase activity of Tapes japonica lysozyme, (査読あり) Protein Peptide lett., 17, 172-175. (2010)
- ③. Yamaguchi T, Ikeda Y, Abe Y, Kuma H, Kang D, Hamasaki N, Hirai T, Structure of membrane domain of human erythrocyte anion exchanger 1 revealed by electron crystallography, (査読あり) J. Mol. Biol., 397, 1, 179-189. (2010)
- ④. Takazaki S, Abe Y, Yamaguchi T, Yagi M, Ueda T, Kang D, Hamasaki N, Mutation of His 834 in human anion exchanger 1 affects substrate binding, (査読あり) BBA -

Biomembranes, 1798, 5, 903-908, (2010)

⑤. Oda M, Kitai A, Murakami A, Nishimura M, Ohkuri T, Abe Y, Ueda T, Nakamura H, Azuma T, Evaluation of the conformational equilibrium of reduced hen egg lysozyme by antibodies to the native form, (査読あり) Arch Biochem Biophys, 494, 2, 145-150. (2010)

⑥. Yamaguchi T, Fujii T, Abe Y, Hirai T, Kang D, Namba K, Hamasaki N, Mitsuoka K, Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals, (査読あり) J. Struct. Biol., 169, 3, 406-12. (2010)

⑦. Mishima T, Ohkuri T, Monji A, Kanemaru T, Abe Y, Ueda T, Effects of His mutations on the fibrillation of amyloidogenic V λ 6 protein Wil under acidic and physiological conditions, (査読あり) Biochem Biophys Res Commun, 391, 1, 615-20. (2010)

⑧. Mishima T, Ohkuri T, Monji A, Kanemaru T, Abe Y, Ueda T, Residual Structures in the Acid-Unfolded States of V λ 6 Proteins Affect Amyloid Fibrillation. (査読あり) J. Mol. Biol., 392, 1033-1043. (2009)

⑨. Keyamura K, Abe Y, Higashi M, Ueda T, Katayama T, DiaA dynamics are coupled with changes in initial origin complexes leading to helicase loading. (査読あり) J. Biol. Chem., 284, 25038-25050. (2009)

⑩. Ueda Y, Ohwada S, Abe Y, Shibata T, Iijima M, Yoshimitsu Y, Koshiba T, Nakata M, Ueda T, Kawabata SI., Factor G Utilizes a Carbohydrate-Binding Cleft That Is Conserved between Horseshoe Crab and Bacteria for the Recognition of β -1, 3-d-Glucans. (査読あり) J. Immunol., 183, 3810-3818. (2009)

⑪. 阿部 義人, 植田正, アサリ貝リゾチームの構造と機能, 生化学, 81, 314-319. (2009)

⑫. Goto T, Ohkuri T, Shioi S, Abe Y, Imoto T, Ueda T, Crystal structures of K33 mutant hen lysozymes with enhanced activities. (査読あり) J. Biochem., 144, 619-23. (2008)

[学会発表] (計 12 件)

①. 阿部 義人, 片山勉, 植田 正, 大腸菌の複製再開始蛋白質の構造と一本鎖 DNA 認識, 平成 23 年度 九大 P&P 拡大研究会「超高次複合体解析に基づくゲノム動態研究プロジェクト」, 2011.01

②. 荒牧 峻彦, 阿部 義人, 大栗 誉敏, 植田 正, DNA 複製再開始におけるプライモソーム構成因子 PriC の構造機能解析, 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大

会 合同大会, 2010. 12.

③. 阿部義人、竹縄太一、塩井誠次郎、片山勉、植田正, NMR を用いた大腸菌複製再開始因子 PriB の相互作用解析, 第 10 回日本蛋白質科学会, 2010. 06

④. 荒牧 峻彦、阿部 義人、大栗 誉敏、三島朋徳、片山 勉、植田 正, 大腸菌 DNA 複製再開始因子 PriC のドメイン化およびその構造と機能, 第 10 回日本蛋白質科学会, 2010. 06

⑤. 阿部義人、三好孝法、渡邊典子、片山 勉、植田 正, 構造生物学アプローチによる大腸菌細胞分裂阻害再活性化因子 CedA の機能解析, P&P 合同公開シンポジウム「生命活動を制御する高次複合体の構造と機能」, 2009. 12

⑥. 荒牧峻彦、阿部義人、大栗誉敏、三島朋徳、片山 勉、植田 正, 大腸菌 DNA 複製再開始因子 PriC のドメイン化およびその構造と機能について, P&P 合同公開シンポジウム「生命活動を制御する高次複合体の構造と機能」, 2009. 12

⑦. 中田光、阿部義人、塩井誠次郎、片山勉、植田正, 大腸菌熱ショック蛋白質 HSPQ の機能解析, 第 9 回日本蛋白質科学会, 2009. 05.

⑧. 谷純也、阿部義人、佐藤健治、片山勉、植田正, DNA 複製再開に関わるプライモソーム構成因子 DnaT のドメイン化及び NMR による構造解析, 日本生化学会九州支部会, 2009. 05

⑨. 荒牧峻彦、阿部義人、大栗誉敏、三島朋徳、片山勉、大腸菌プライモソーム構成因子 PriC N 末ドメインの NMR 構造解析, 日本生化学会九州支部会, 2009. 05

⑩. 三好孝法、阿部義人、渡辺典子、片山勉、植田正, 細胞分裂阻害再活性化因子 CedA の機能解析, 第 31 日本分子生物学会・第 83 回生化学会合同年会, 2008. 12

⑪. 中田光、阿部義人、塩井誠次郎、片山勉、植田正, 大腸菌熱ショックタンパク質 H S P Q の機能解析, 日本薬学会九州支部大会, 2008. 12

⑫. 阿部義人、大栗誉敏、片山勉、植田正, 構造生物学的アプローチによる大腸菌複製開始因子 DnaA の機能解析, 日本生化学会九州支部例会, 2008. 05

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 義人 (ABE YOSHITO)

研究者番号 : 60315091

(2) 研究分担者

片山 勉 (KATAYAMA TSUTOMU)

研究者番号 : 70264059

(3) 連携研究者

なし