

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840027

研究課題名(和文) DNA複製開始反応を時系列で可視化し、その分子機構を明らかとする試み

研究課題名(英文) Time series visualization of DNA replication initiation process by protein X-ray crystallography

研究代表者

伊藤 啓 (Itou, Hiroshi)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・特任研究員

研究者番号：10390626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：DNA複製に先立ってその2本鎖構造が解かれる必要がある。一般的には複製開始因子が多量体としてDNAに結合して解くが、ColE2プラスミドの複製開始因子Repは単量体としてDNAに結合し、その2本鎖構造を解く。RepのDNA結合領域とDNAとからなる2本鎖解裂中間体の立体構造を得て、小さいタンパク質がそれ単量体でDNAの2本鎖構造を解く新しい仕組みを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Duplex DNA is generally unwound by protein oligomers prior to replication. The Rep protein of plasmid ColE2 is an essential initiator for plasmid DNA replication. This protein binds the replication origin (Ori) in a sequence-specific manner as a monomer and unwinds DNA. We determined the crystal structure of the DNA-binding domain of Rep (E2Rep-DBD) in complex with Ori. The structure unveils the basis for Ori-specific recognition by the E2Rep-DBD and also reveals that it unwinds DNA by the concerted actions of its three structural modules. The structure also shows that the functionally unknown PriCT domain plays a central role in DNA unwinding. The conservation of the PriCT domain in the C-termini of some archaeo-eukaryotic primases indicates that it probably plays a similar role in these proteins. This is the first report providing the structural basis for the functional importance of the conserved PriCT domain and also reveals a novel mechanism for DNA unwinding by a single protein.

研究分野：構造生物学

キーワード：DNA複製開始因子 タンパク質DNA複合体 プラスミド Rep PriCT X線結晶構造解析法

### 1. 研究開始当初の背景

DNA 複製は遺伝情報伝達のために必須の生物現象であり、その正確性を保証するために開始の時期と位置が厳密に調節されている。DNA 複製の開始反応は、この段階にて調節の多くが行われるという点で生理的意義が高く、その理解は特に重要である。DNA 複製開始反応は複数の因子から構成される開始複合体が再構成を伴うダイナミックな構造変化を行い進むと考えられている。この概念を検証し理解を深めるためには構造生物学的解析によりプロセスを可視化することが不可欠である。この広く生物に普遍的かつ重要な現象を理解するために構造生物学が果たすべき役割は大きく、DNA 複製開始反応に関わる多くの因子またはその機能ドメインの立体構造がこれまでに解明され重要な知見が得られている。しかし、それら既存研究の成果から、複合体中で起こる構造変化、つまり機能的に最も重要度が高いと考えられる、各構成因子や機能ドメインが協同的に働く仕組みを理解するにはまだ至っていない。その実現のためには、複合体を安定に得て、なおかつ反応を段階毎に生化学的に分離生成出来る実験系が必要となる。

そこで本研究では、大腸菌を宿主とする  $\theta$  型プラスミド、ColE2 プラスミドの複製開始系に着目している。一般的に  $\theta$  型プラスミドは自身の複製に関わる Rep タンパク質を持つ。Rep はプラスミド上の複製開始点 ori へ特異的に結合する。そこへ DnaA、DnaG など宿主由来の複製開始因子がリクルートされ、宿主染色体 DNA と類似の機構で DNA 複製開始反応が進む。一方で ColE2 の Rep は、これまでに研究が選考し別ファミリーに属するそれら Rep とは異なる性質を持つ。ori に結合し複製開始点を規定するのみならず ori 周辺の 2 本鎖 DNA の解裂 (DnaA の働きに相当) やプライマー-RNA 合成 (DnaG に相当) などを行う多機能な因子である。この特徴により、ColE2 Rep の系では他の複製開始因子が必要とされず、またその ori 配列も既知の複製開始領域中で最小 (32bp) である事と併せて、比較的シンプルな構成の複合体で反応が進む。これは構造生物学的解析を行う上で実験上有利である。また更に、ColE2 Rep が形成する DNA 複製開始複合体では、複製開始反応を段階毎に生化学的に分離できる事が最大の利点として挙げられる。既存研究では不可能であった複合体変化の時系列での解析が可能となる事が期待された。

### 2. 研究の目的

DNA 複製開始初期に形成される複製開始複合体中で起こる立体構造の変化を、X 線結晶構造解析法を用いて原子分解能で可視化し追跡する。DNA 上に存在する複製開始点への複製開始因子の特異的結合に始まり、プラ

イマー-RNA の合成を経て DNA 合成酵素へのその受け渡しへと至る、DNA 複製開始プロセスの核となる反応について、その過程で複合体中にて行われる各構成因子 (機能ユニット) が協同的に働く仕組みを理解する。

### 3. 研究の方法

上記目的の達成に好適と考えられる ColE2 プラスミドの複製開始因子 Rep を用いて、必要となる構造学的基盤を構築する。Rep の ori への結合に始まり、プライマー-RNA 合成、その DNA 合成酵素への受け渡しを経て娘鎖合成開始へと至る複製開始反応の各段階での複合体結晶をシリーズで調製し、その立体構造を X 線結晶構造解析法により決定する。得られる構造学的情報と、研究協力者である信州大学理学部・伊藤建夫博士の研究室で蓄積されている詳細な機能解析研究の結果とを合わせ、構造と機能の両面からその機能メカニズムを明らかとする。まず、Rep と ori との複合体の解析を行うことで、複製開始因子としての Rep の ori 認識、2 本鎖 DNA の解裂の分子機構を明らかとし、次段階として、プライマーゼとしての Rep の機能に注目し、プライマー-RNA 合成の分子機構を明らかとする事を試みた。

### 4. 研究成果

ColE2 Rep は多機能な複製開始因子であり、研究協力者のこれまでの解析により N 末側にプライマーゼ領域、C 末側に DNA 結合領域を持つ事が示唆されていた。ori への塩基配列特異的な結合と 2 本鎖 DNA の解裂は Rep の DNA 結合領域 (E2Rep-DBD, 13kDa) のみで単量体にて行われる。そこでまずこのユニークな因子の複製開始因子としての機能に注目し、本タンパク質による ori 認識機構と 2 本鎖 DNA 解裂機構の解明に取り組んだ。E2Rep-DBD と ColE2 プラスミドの ori 配列を含む 2 本鎖 DNA との複合体の結晶を得て、その立体構造解析に成功した (図 1)。研究協力者の元で行われ

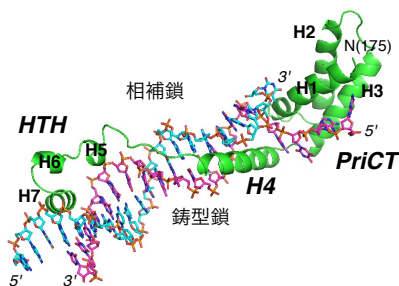


図 1: E2Rep-DBD と ori 複合体のリボン図

た生化学的解析の結果から、得られた結晶構造が Rep による 2 本鎖 DNA 解裂中間体であることが示唆された。

DNA複製に先立ち、安定なDNAの2本鎖構造が解消される必要がある。多くの複製開始因子はオリゴマー形成を通じて必要となるDNAとの結合力を確保している。一方でE2Rep-DBDは、小型な分子ながら単量体で2本鎖DNAを解裂させる。E2Rep-DBDはフレキシブルなリンカー領域で連結した3つの構造モジュールで構成された細長い形状をしており、DNAの形状に沿って巻き付く様に結合する事でoriとの広範囲にわたる相互作用を確保し、DNAへの配列特異的な結合とその2本鎖構造を解くために必要な結合力を担保している事が明らかとなった。E2Rep-DBD分子表面の1/3がDNAとの結合に用いられており、その表面は酸性のDNAリン酸バックボーンとの相互作用のために高度に塩基性であった。結合の配列特異性はC末側のHTHモジュールが主に担っている事が知られていたが、本領域はDNAの主溝に結合していた。中間のH4モジュールはDNAの副溝に結合しており、DNAは本モジュールのN末側で解裂していた(図1)。N末側のPriCTモジュールは1本鎖化した鋳型鎖を保持する事で、DNAの解けた状態を安定化していた。今回、2つの異なるコンフォメーションをもつ結晶構造が得られた。両者を比較すると、鋳型DNA鎖を結合したPriCTモジュールの位置がH4モジュールとつなぐリンカー部分を支点にしてそれぞれ異なっており、PriCTがDNAの2本鎖を解く向きに動いている事が観察された。アミノ酸変異実験の結果と合わせ、このPriCTモジュールの変移がDNA鎖の解裂に重要である事が示唆された(図2)。

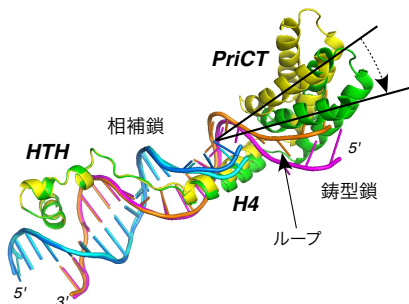


図2: PriCTモジュールの変移

これらの結果から、小型なE2Rep-DBD分子がそれ単体で配列特異的にoriに結合し、その2本鎖構造を解くメカニズムが明らかとなった。本タンパク質を構成する3つの構造ドメインが連携し、安定なDNAの2本鎖構造を巧みに解いていた。複製開始因子ほかDNAの構造を解裂するタンパク質の多くが多量体として機能し、構造生物学的解析を通じてその分子機構がこれまでに提唱されてきたが、今回、分子量13kDaと小型のE2Rep-DBDタンパク質がそれ単体で2本鎖構造を解く新しい仕組みを明らかとする事に成功した。プライマーゼ領域はこのDBD領域のすぐN末側に存在

する。プライマーRNAの鋳型となる配列はPriCTモジュールによって配列特異的に保持されている領域のすぐ下流に位置する事から、PriCTがプライマー合成の際に鋳型鎖を固定するプラットフォームとして機能する事が考えられた(図3)。PriCTモジュール上には、鋳型鎖が結合していたものとは別の保存された塩基性のチャンネルが観察されており、機能解析実験の結果と合わせる事で、そのチャンネルが今回の解析ではモデル構築が出来なかった相補鎖との結合を担うであろう事が示唆された(図3)。

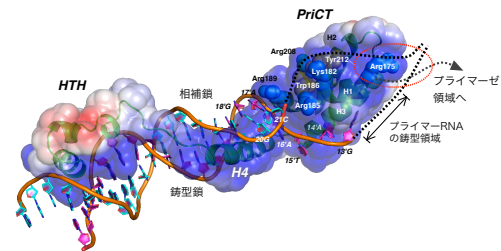


図3: Repによるori解裂のモデル

複製開始因子としてユニークな特徴を持つColE2 Repであるが、近年のゲノム解析研究の進展に伴い、本因子と類似の因子を複製開始因子とするプラスミドがグラム陽性、陰性を問わず、幅広いバクテリアから見いだされ、「ColE2 Repファミリー」と呼べる一群を形成している事が明らかとなりつつある。ColE2 Repファミリーを複製開始因子とするプラスミドは、コレラなど重篤な感染性の食中毒症患者から単離された病原性バクテリアから多剤耐性遺伝子のキャリアーとしても見つかり、近年医療の現場でしばし問題となる多剤耐性菌の蔓延に対する抜本的対策(多剤耐性プラスミドの水平伝播の防止)の手がかりとして、ファミリーの体系的因子として最も機能解析が進むColE2 Repの詳細な分子機構の解明は意味を持つとも考えられる。

今回、E2Rep-DBDにおいて、DNAの解裂と、解けた構造の維持に重要な役割を果たす事が明らかとなったPriCTモジュールは、バクテリアや真核生物のウイルス等が持つプライマーゼの一群に保存されている事が知られていた。これまでその機能は明らかではなかったが、ColE2 Rep同様にPriCT領域はいつでもプライマーゼ領域のすぐC末側に保存されている。ゆえにそれらタンパク質においてもColE2 RepのPriCTと同様の働きを持つ事が予想される。本研究により得られた成果は、保存された機能未知領域PriCTの機能を初めて明らかとした(Itou *et al.* 2015として論文発表済み)。

研究計画に基づき、次のステップとして、N

末側のプライマーゼ領域を含む Rep の全長タンパク質と ori、プライマーRNA の基質となる塩基との複合体の結晶化を試みた。ColE2 Rep は ppApGpA の 3 塩基からなるプライマーを合成し、基質となる塩基を順に加えた複合体の結晶を得る事で、プライマー伸長反応を可視化できる。しかし、研究実施期間内に目的とする複合体の結晶を得る事は出来なかった。

## 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 1 件)

- ① H. Itou, M. Yagura, Y. Shirakihara, T. Itoh “Structural basis for replication origin unwinding by an initiator primase of plasmid ColE2-P9: Duplex DNA unwinding by a single protein” J. Biol. Chem、査読有、Vol. 209、2015、pp. 3601-3611  
DOI: 10.1074/jbc.M114.595645

[学会発表] (計 1 件)

- ① H. Itou, M. Yagura, Y. Shirakihara, T. Itoh “Structural basis of replication origin binding and double-stranded DNA unwinding by an initiator primase ColE2-Rep protein” International conference on structural genomics 2013、2013 年 7 月、札幌京王プラザホテル

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 啓 (ITOU HIROSHI)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・特任研究員

研究者番号：10390626

### (2) 研究協力者

伊藤 建夫 (ITOH TATEO)

信州大学・理学部・特任教授

研究者番号：40051817