

Structure and function analysis of PriC, a replication restart factor in *Escherichia coli*

荒牧, 峻彦

<https://hdl.handle.net/2324/1441173>

出版情報：九州大学, 2013, 博士（薬学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



Structure and function analysis of PriC, a replication restart primosomal factor in Escherichia coli (大腸菌 DNA 複製再開因子 PriC の構造および機能解析)

蛋白質創薬学分野 3PS11006S 荒牧 峻彦

【序論】

原核生物から真核生物に至るすべての細胞性生物は、種の維持および個体の生存のために迅速かつ正確な染色体 DNA の複製を行っており、厳密な複製制御機構を有している。たとえば大腸菌においては、**i)** 染色体 DNA 上の特異的な配列からなる複製起点 *oriC* への DnaA タンパク質の集合が引き金となって複製装置が形成され、**ii)** DnaB ヘリカーゼによる DNA 二重鎖の開裂によって複製フォークは進行し、**iii)** DnaG プライマーゼによる RNA プライマーの合成、さらには **iv)** ポリメラーゼによる新生鎖の伸長が行なわれ、DNA 複製は完了する。しかしながら、進行中の複製装置は紫外線や化学物質などによる DNA 損傷に出会うことで進行を停止し、場合によっては DNA から解離してしまう。すなわち、DNA 複製の完全性を保つためには一旦解離した複製装置を DNA 上に再び呼び込む機構が必要となる。大腸菌においては、DNA 複製再開因子である PriA、PriB、PriC および DnaT が協調的・規制的に集合して DnaB および DnaG を呼び込むことで DNA 複製が再開すると考えられている。また、DNA 複製再開因子は 1980 年代に大腸菌に感染する ϕ X174 ファージが DNA 複製を行なうために必須の宿主由来タンパク質群として発見されたが、大腸菌自身の *oriC* への DnaB の導入には必須ではない。一方で、停止した複製フォークへの DnaB の導入は DnaA ではなく DNA 複製再開因子が担うことから、その分子メカニズムを解明することは重要であると考えられる。

近年、構造生物学的なアプローチが様々な反応の分子メカニズムの解明に大きく貢献している。DNA 複製再開機構において、DnaB の導入に至るまでにいくつかの規制的経路が知られており、PriA を起点とした協調的な複合体形成経路に関しては、PriA および PriB の立体構造が解かれ、原子レベルでのメカニズムが解明されてきている。一方で、PriC を起点とした複製再開経路に関しては、PriC が単独で DnaB を導入するという生化学的な報告があるものの、PriC の立体構造は未だ不明であり、詳細なメカニズムの解明には至っていない。そこで私は、PriC の立体構造解析および詳細な機能解析を行なうことで、DNA 複製再開のメカニズム解明を目指した。

【方法】

・ドメインの同定

0.5 mg/ml PriC に対して 10 あるいは 100 μ g/ml の Tosyl-L-Phenylalanine Chloromethyl Ketone (T-PCK)-Trypsin、Chymotrypsin、V8 protease を用いて 4°C で 16 時間かけて限定分解を行なった。得られたペプチド断片から Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI TOF-MS)により PriC のドメイン (N 末ドメイン:NTD、C 末ドメイン:CTD) を同定した。

・各ドメインおよび変異体の発現・精製系の構築

ドメイン情報を基に NTD あるいは CTD の配列をコードする pET22b(+) ベクターを導入した大腸菌 BL21(DE3) 株を新たに作製し、各々の発現・精製系を構築した。さらに NMR を用いた立体構造解析のために ^{13}C 、 ^{15}N でラベルした NTD を作製した。また、アラニン変異体 22 種に関しても同様に発現・精製系を構築した。

・ DNA 結合解析

一本鎖 DNA として oligo(dT)_{7, 15, 25, 35} を用いて、PriC、NTD、CTD および PriC 変異体に対して、ゲルシフトアッセイ、蛍光消光法、円二色性分光法および NMR 法による DNA 結合を解析した。

・ SSB および DnaB 結合解析

SSB、その C 末端領域 (SSB-Ct) を欠損させた SSB Δ C8、および DnaB に関しては既知の方法を用いて培養・精製を行なった。それらに対して PriC、NTD、CTD および PriC 変異体を用いて、プルダウンアッセイ、ゲルシフトアッセイによる結合解析を行なった。また、等温滴定型熱量測定 (ITC) により SSB-Ct に対する解離定数 K_D を算出した。

【結果および考察】

・ NTD は 3 本の α ヘリックスおよび 1 本の長いループ構造を有する

PriC を V8 protease で消化して得られたペプチド断片に対して MALDI TOF-MS 解析を行なった結果、PriC の 1-97 および 12-97 残基からなる断片を示す 2 つのピーク (10,802 および 9,536) を得た。また、TPCK-Trypsin および Chymotrypsin を用いて得られた断片に関しても同様に解析した結果、PriC は 93~97 残基を境に、N 末側および C 末側に各々ドメイン (NTD および CTD) を有することが分かった。さらに、¹³C、¹⁵N でラベルした NTD に関して NMR を用いて構造解析を行なった結果、3 本の α ヘリックスと 1 本の長いループからなる構造を取っていた (図 1)。3 本のヘリックスから構成されるバンドル構造は様々なタンパク質に見られ、構造を基にした PriC の機能の類推はできなかった。一方で、原核生物の持つ PriC にはそのループにあたる領域で一次配列が高く保存されており、PriC の機能に関与する可能性が示唆された。

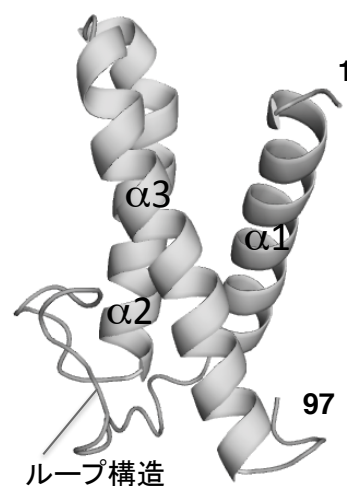


図 1 NTD の溶液構造

PriC の 1-97 残基からなる NTD の溶液構造を示した。 α 1 (5-22 残基)、 α 2 (46-64 残基) および α 3 (71-93 残基) は 3 本のヘリックスを示す。

・ CTD が DNA 結合ドメインとして機能する

ゲルシフトアッセイを行なった結果、DNA-NTD 複合体は検出されなかった。一方で、DNA-CTD 複合体は見られたことから、CTD が DNA 結合ドメインであることが分かった (図 2)。また、高塩濃度存在下でその結合が弱まり、静電的な相互作用が窺えた。さらに、22 種類のアラニン変異体を用いて同様にゲルシフトアッセイを行なった結果、野生型と比べて 9 種類の変異体 (R107A、K111A、R121A、R123A、R129A、R158A、R155A、K165A、F118A) において DNA 結合能の低下が見られた。すなわち、それら 9 個のアミノ酸残基が DNA 結合に重要であることが示唆された。

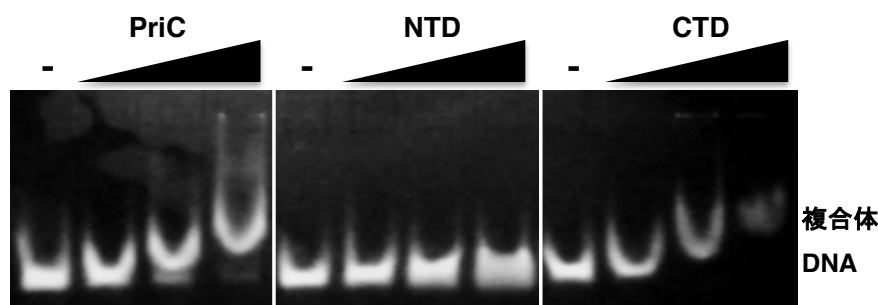


図 2 ゲルシフトアッセイ

PriC、NTD および CTD と oligo(dT)₃₅ を用いて結合解析を行なった。検出は DNA の 5'末端を標識した FITC に対して青色 LED を照射することで行なった。PriC および CTD を用いた場合、複合体のバンドが検出された。一方、NTD を用いた場合は複合体のバンドが検出されなかった。

・NTDは弱いDNA結合能およびそれに伴う多量体形成能を有する

一方、高濃度のNTDがDNA存在下で凝集性を示す結果を得たことから、NMRを用いたDNA滴定実験を行なった。その結果、NTDは片側にDNA結合サイトを有し(図3、黒)、またゲルシフトアッセイでは検出できない程度の弱いDNA結合能を有することが分かった($K_D = 1.25$ mM)。さらに、架橋実験により、NTDがDNA結合に伴って多量体を形成することが分かった。

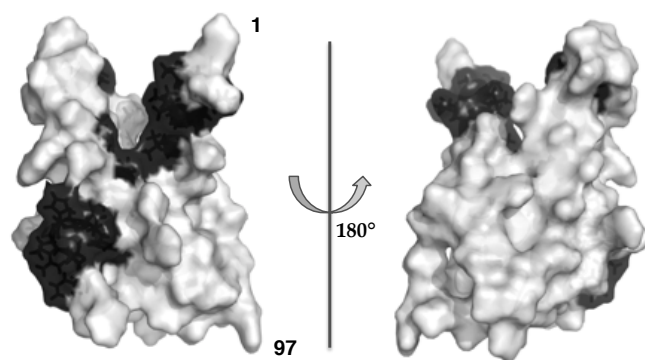


図3 NTDのDNA結合サイト

NTDに対してoligo(dT)₂₅をモル比1:2になるまで滴定し、NMRを用いて化学シフト変化を測定した。DNAの添加に伴って顕著に化学シフトが変化した残基(3・8, 10, 34・39, 63・64, 76, 79・80, 82)を黒で表示した。

・CTDはSSB結合サイトを有し、それはDNA結合サイトと重なる位置に存在する

プルダウンアッセイによりSSBとの相互作用を解析した結果、CTDがSSB結合ドメインであることが分かった。さらに、SSBおよびSSBΔC8を用いてゲルシフトアッセイを行なった結果、PriCがSSB-Ctと相互作用して三者複合体を形成することが分かった(図4)。

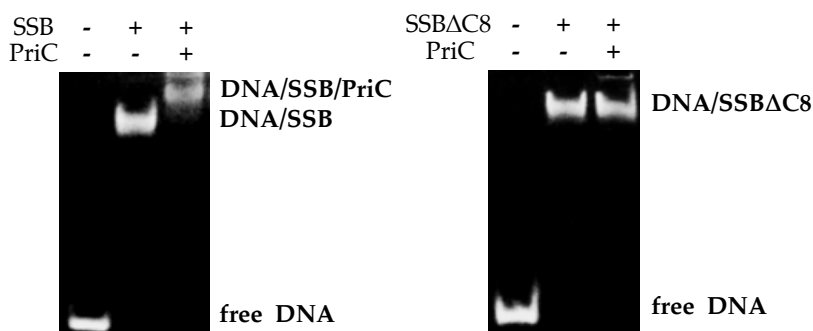


図4 DNA/SSB/PriC三者複合体の検出(ゲルシフトアッセイ)

DNA (10 pmol)とSSBあるいはSSBΔC8 (180 pmol)を混合し、さらにPriC (400 pmol)を添加して試料の調製を行なった。その後、8.4%アクリルアミドゲル(1 x TBE)にて電気泳動を行なった。検出はDNAの5'末端を標識したFITCに対して青色LEDを照射することで行なった。SSB-Ctを欠損させたSSBΔC8を用いた場合、DNA上で三者複合体が形成されなかったことから、PriCがDNA上のSSBに対してSSB-Ctを介して結合することが示唆された。

また、アラニン変異体を用いて同様に解析した結果、野生型と比べて5種類の変異体

(R121A、R129A、R155A、F118A、Y152A)においてSSB結合能の低下が見られた。すなわち、それら5個のアミノ酸残基がSSB結合に重要であることが示唆された。ここで、CTDの立体構造モデルを構築し、DNA結合およびSSB結合に重要であるアミノ酸残基をプロットすると、各々結合サイトを形成していた(図5、黒)。さらに、それらの結合サイトは重なる位置に存在しており、DNA複製再開始においてこの重なりが、DNA結合とSSB結合とを切り替える働きをしていることが示唆された。

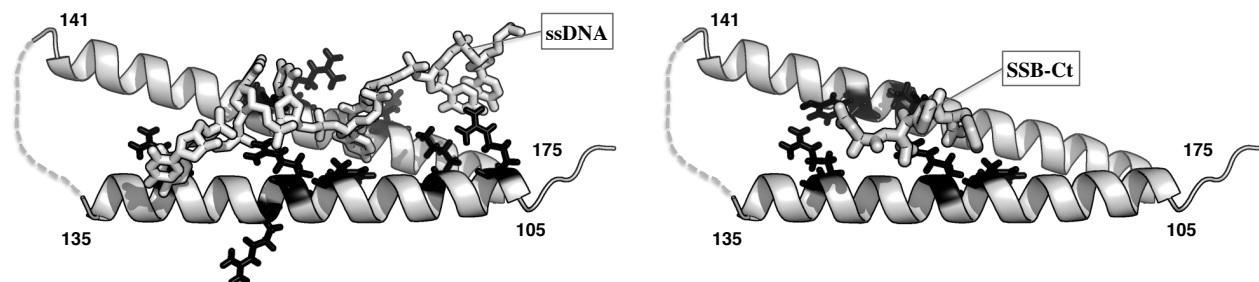


図5 DNA結合サイトおよびSSB結合サイトの重なり

2本のαヘリックスを主構造とするCTDの立体構造モデル上に、DNA結合サイト(左)およびSSB結合サイト(右)を表示した。(左)変異体解析より示唆された9つの残基(R107, K111, R121, R123, R129, R155, R158, K165, F118)を黒のスティックモデルで表示した。ssDNAは白いスティックモデルで表示した。(右)変異体解析より示唆された5つの残基(R121, R129, R155, F118, Y152)を黒のスティックモデルで表示した。SSB-Ctは白いスティックモデルで表示した。

・ CTD は DNA、SSB だけでなく DnaB ヘリカーゼとも相互作用する

プルダウンアッセイにより DnaB ヘリカーゼとの相互作用を解析した。その結果、PriC は CTD を介して DnaB ヘリカーゼと相互作用することが分かった (図 6)。DnaB ヘリカーゼは DNA 複製および複製再開始において DNA 複製装置を進行させるために必須なタンパク質である一方で、これまでに DnaA や DnaC、DnaG との相互作用が知られているだけであった。今回新たに PriC との直接的な相互作用が見られたことは、DNA 複製再開始における PriC の重要性を支持する結果であると考えられる。

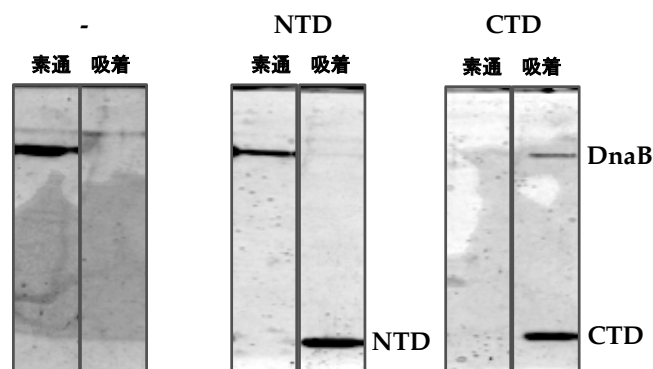


図 6 プルダウンアッセイ
His タグを付けた NTD あるいは CTD (20 μ M) とタグの付いていない DnaB (6.7 μ M) を混合し、Ni-NTA 樹脂にロードした。DnaB 単独 (左) および NTD を用いた場合 (中) は DnaB が素通画分に得られた。一方で、CTD を用いた場合 (右) は DnaB が吸着画分に得られた。このことから、CTD と DnaB が相互作用することが分かった。

これまでの報告および今回得られた結果から、DNA 複製再開始における PriC の機能モデルを構築した (図 7)。すなわち、停止した複製フォークに存在するラギング鎖の一本鎖 DNA 領域に対して SSB が、またリーディング鎖の一本鎖 DNA 領域に対して PriC が CTD を介して結合する (step 1)。さらに、PriC が SSB-Ct を介して DNA/SSB/PriC 三者複合体を形成する (step 2)。その際、結合サイトの重なりが DNA 結合との競合を引き起こし、リーディング鎖に一本鎖 DNA 領域が生じる。生じた一本鎖 DNA 領域に弱い結合能を持った NTD が結合し、多量体を形成する (step 3)。この多量体形成が、DnaB ヘリカーゼとの相互作用面を増やし、DnaB ヘリカーゼの導入を促進するのではないかと考えられる。

PriC は原核生物に保存され、進化の早い段階から存在する単純な複製再開始機構として重要な研究対象であると考えられる。また、最近では真核生物においても複製再開始機構の解析が少しずつ進んできており、本研究がその解明にも貢献できることを期待する。

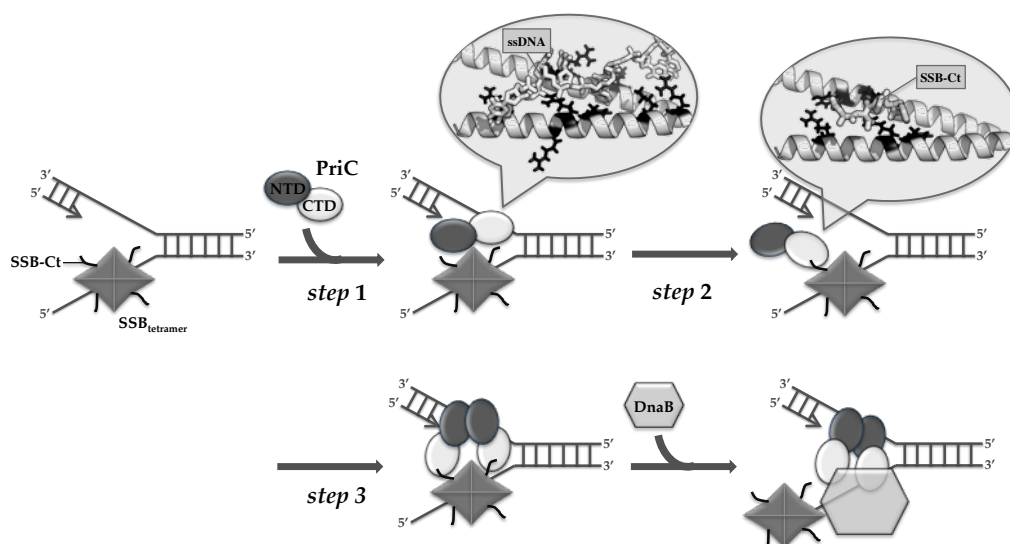


図 7 DNA 複製再開始における PriC の機能モデル

【発表論文】

1. **Aramaki T**, Abe Y, *et al. Genes Cells*, 2013, **18**, 723-732.
2. **Aramaki T**, Abe Y, *et al. Protein Sci.*, 2013, **22**, 1279-1286.