

# 大腸菌の複製開始複合体によるDnaBヘリカーゼの進行阻害と一本鎖DNA結合タンパク質SSBによる阻害解除

赤間, 勇介

<https://hdl.handle.net/2324/1543946>

---

出版情報：九州大学, 2015, 博士（創薬科学）, 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）

大腸菌の複製開始複合体による DnaB ヘリカーゼの進行阻害  
と一本鎖 DNA 結合タンパク質 SSB による阻害解除

大腸菌の染色体複製においては、唯一の複製起点 *oriC* で 2 個の複製装置が形成されて両方向に進行する。複製装置は DnaB ヘリカーゼ、DnaG プライマーゼ、DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素等で構成されており、DnaB が複製装置の先頭に位置する。このため、DnaB の進行が円滑に進むことは両方向複製の制御に重要となる。

複製開始反応では、まず開始タンパク質 DnaA が *oriC* 上で特異的な多量体構造を形成する。つまり、DnaA は *oriC* 上に 12 箇所存在する DnaA box と呼ばれる DnaA 結合配列と共同的に結合し、高次複合体を形成する。DnaA-*oriC* 複合体は DnaA の ATP 結合に依存した構造変化により、*oriC* 内の特定の領域を局所的に開裂する。次に、DnaB ヘリカーゼ 6 量体が、DnaA-DnaB 間相互作用を介して、開裂によって生じた 2 本の一本鎖 DNA の両方に対して装着される。また、DnaB の装着には DnaC ヘリカーゼローダーも必要であり、DnaB-DnaC 複合体が DnaB の DNA 装着前に形成される。DnaC は、DnaB の一本鎖 DNA への装着過程で、ATP 加水分解を伴い DnaB から解離する。次いで、DnaB は DNA 上を 5' -3' 方向に進行し、二重鎖 DNA を開裂していく。開裂した一本鎖 DNA 上に一本鎖 DNA 結合タンパク質 SSB 4 量体が結合する。さらに DnaG プライマーゼ、DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素が導入され、DnaB 分子を先頭とした複製装置が形成される。

一本鎖 DNA に装着された DnaB 2 分子のうち片方は *oriC* から離れる方向に進む。一方、もう片方の DnaB 分子は逆方向に進むため、DnaA-*oriC* 複合体形成部位を通過しなければならない。しかしながら、DnaA-*oriC* 複合体形成部位を DnaB が通過する機構についてはほとんど研究されていない。この分子機構を理解する端緒として、私は *oriC* 上の複数の DnaA box に DnaA を結合させた DnaA-*oriC* 複合体を *in vitro* 再構築し、DnaB がこの複合体形成部位を通過できるか検討した。そのため、まず、*oriC* の DnaA box クラスター領域と 30 ヌクレオチドの一本鎖 DNA とを持つフォーク型 *oriC* DNA を作成した。そして、DnaB がこのフォーク型 *oriC* DNA を開裂できるか、DnaA 存在下および非存在下で検討した。

その結果、まず DnaA 非存在下では、DnaB 依存的にフォーク型 *oriC* DNA の開裂が 30°C で効率的に進んだ。これに対して、DnaA 存在下では、フォーク型 *oriC* DNA の DnaB 依存的な開裂が阻害された。このことから、フォーク型 *oriC* DNA と結合した DnaA 多量体は DnaB 進行の障害になると考えられた。また DnaA 野生型だけでなく、DnaB との特異的な相互作用部位をア

ラニン置換した DnaA 変異体を用いても同様の阻害が見られた。このことから、DnaB の進行阻害には DnaA-DnaB 特異的な相互作用は必要ないことが示唆された。

以前の解析で私は、DnaB は 1 個の DnaA box に結合した DnaA 単量体を DNA から解離させることを示した (修士論文)。よって、DnaA 単量体の時と比べて DnaA 多量体では共同的結合により DNA に対する総合的結合力が上昇しており、その結果、DnaB の進行阻害が起こると考えられる。このことから、染色体複製時に DnaB が DnaA-*oriC* 複合体形成部位を通過するためには別の因子による補助が必要であると想定できる。そこで、染色体複製に必要な DnaC や SSB 等のタンパク質を候補として因子の探索を行った。その結果、SSB 依存的に、DnaA 存在下でもフォーク型 *oriC* DNA の開裂が進むことがわかった。次いで、この活性に必要な SSB 量を検討した。その結果、フォーク型 *oriC* DNA 1 分子に対して SSB 4 量体が 2 分子あれば DnaA 存在下でも DnaB によるフォーク型 *oriC* DNA 開裂が確認された。さらに、SSB によって DnaB のフォーク型 *oriC* DNA 結合が促進されるか検討した。反応系を氷上で保温した場合、SSB 依存的な DnaB 結合量の増加が確認された。これまでに大腸菌の DnaB と SSB が直接相互作用するという報告はされていないが、これらの結果は SSB と DnaB が直接相互作用している可能性を示している。つまり、フォーク型 *oriC* DNA の 1 本鎖 DNA 上で DnaB と SSB が相互作用した結果、DnaB の DNA 結合能が補強された可能性がある。この補強により DnaB が DnaA-*oriC* 複合体形成部位を通過できるようになったのかもしれない。

本研究によって大腸菌の複製ヘリカーゼである DnaB の機能制御について新たな発見がなされた。DnaB は染色体複製装置の先頭に立って機能するため、今回発見された機構は、染色体上で形成されたタンパク質-DNA 複合体形成部位を複製装置が通過する際に重要であると考えられる。また、真核生物の一本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA は複製ヘリカーゼ MCM2-7 と直接結合することが知られている。今回発見した機構の原理は真核生物にも存在するかもしれない。またヘリカーゼ機能の変化によって起こる種々の遺伝病の分子機構の解明や治療薬の開発の基盤として重要かもしれない。