

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）

氏名	赤間 勇介
論文名	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
論文調査委員	主 査 九州大学 教授 片山 勉 副 査 九州大学 教授 植田 正 副 査 九州大学 教授 藤田雅俊 副 査 九州大学 農学研究院 教授 石野良純

論文審査の結果の要旨

大腸菌においても酵母やヒト細胞のような真核細胞においても、染色体 DNA の複製は複製起点から両方向に進むことが知られている。大腸菌の染色体複製においては、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いる。特に DnaB ヘリカーゼは複製装置の先頭に位置し、DNA 上を 5'-3' 方向に進行しながら二重鎖 DNA を開裂していく。このため、DnaB ヘリカーゼ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。また DNA 複製に重要なヘリカーゼの動態制御の理解は、ヘリカーゼの不全に起因する遺伝病の発症機構や抗菌剤あるいは抗ガン剤の開発にとっても重要な基礎となると考えられる。

複製開始反応では、まず開始蛋白質 DnaA が *oriC* 上で特異的な多量体構造を形成する。形成された DnaA-*oriC* 複合体 (以下、DnaA 複合体という) は *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。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行する。一方、もう片方の DnaB 分子は逆方向に進行するため、DnaA 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、高次な蛋白質-DNA 複合体である DnaA 複合体の形成部位を DnaB が通過する機構は理解されていない。

本論文において、赤間勇介氏は、複製起点からの両方向複製を成り立たせている分子機構を理解するため、以上に述べたように解析が進んでいる大腸菌 *oriC* での複製開始系に着目した。そして、*oriC* 上での DnaA 複合体を *in vitro* 再構築し、DnaB ヘリカーゼがこの複合体形成部位を通過できるか詳細に検討した。そのため、まず、*oriC* の DnaA 結合領域と一本鎖 DNA 領域とを持つフォーク型 *oriC* DNA を作成した。そして、DnaA 存在下および非存在下において、DnaB ヘリカーゼがこのフォーク型 *oriC* DNA を開裂できるか検討した。

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 の開裂が効率的に進むことが示された。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ることがわかった。このことから、DnaA 複合体は DnaB 進行の障害になると考えられた。また DnaA 変異体を用いて同様の実験を行い、DnaB の進行阻害には DnaA-DnaB 間の特異的な相互作用は必要ないことを示唆する結果を得た。これらの結果と過去の解析結果とをあわせて、赤間氏は、DnaA 複合体では DnaA 分子の共同的結合により DNA に対する総合的結合力が上昇しており、その結果、DnaB ヘリカーゼの進行に対して強い障害物となり、DnaB ヘリカーゼ単独ではこの障害を乗り越えられないと考えた。

そこで赤間氏は、DnaB ヘリカーゼは、何らかの補助因子とともににはたらい、DnaA 複合体形成部位を通過すると想定した。そのため、赤間氏は、染色体複製に必要な種々の蛋白質因子をその補助因子の候補として、上記の *in vitro* 再構成系を用いて探索を行った。その結果、赤間氏は、一本

鎖 DNA 結合蛋白質 SSB の存在下で、DnaB ヘリカーゼが DnaA 複合体の形成領域を通過して DNA 開裂を行うことができることを突き止めた。詳しい解析の結果、フォーク型 *oriC* DNA 1 分子に対して SSB が 2 分子あれば、DnaB ヘリカーゼが DnaA 複合体の形成領域を通過できることがわかった。これまでに大腸菌の DnaB ヘリカーゼと SSB が直接相互作用するという報告はないが、これらの結果から、この 2 者の直接相互作用が起こり、DnaB ヘリカーゼの機能が增強される可能性が考えられた。そのため、変異 SSB 精製蛋白質を用いて追加解析したところ、DnaB ヘリカーゼと SSB との直接相互作用によって、DnaB ヘリカーゼの機能が補強された可能性が支持された。

以上のように本研究によって大腸菌の複製ヘリカーゼである DnaB の制御機構について新たな発見がなされた。この機構は、染色体上で形成された蛋白質-DNA 複合体の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、この機構の原理は原核細胞のみならず真核生物にも存在する可能性があり、新たな薬剤開発につながる基盤としても有意義と考えられる。よって、赤間氏による本研究は、染色体複製の分子機構の理解において重要であり、分子生物学と基礎薬学の進歩にとって有意義な貢献をなすものである。よって本学位請求論文は博士（創薬科学）の学位に値すると認める。