

# Mutational and Biophysical Studies on the Interaction of PriB and DnaT, Necessary for DNA Replication Restart in *Escherichia coli*

藤山, 紗希

<https://doi.org/10.15017/1806972>

---

出版情報：九州大学, 2016, 博士（創薬科学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：全文ファイル公表済



Mutational and Biophysical Studies on the Interaction of PriB and DnaT,  
Necessary for DNA Replication Restart in *Escherichia coli*

変異体及び生物物理学的手法を用いた  
大腸菌 DNA 複製再開始因子 PriB・DnaT の相互作用の研究

創薬科学専攻 蛋白質創薬学分野 藤山紗希

< 序論 >

全ての生物が生存する上で、正確かつ周期的な DNA 複製は不可欠な過程である。通常の DNA 複製開始では、特徴的な配列を持つ複製起点と複製開始タンパク質の結合によってヘリカーゼが DNA 上に導入され、そこにプライマーゼ、ポリメラーゼが集合し複製装置が構築される。一方で、紫外線や化学物質の曝露が原因で生じる DNA 鎖の損傷は、進行中の複製装置の解離を招く。大腸菌に代表される原核生物では複製起点が 1 つしか存在しないため、DNA 複製を完遂するためには途中で停止した複製を再開させることが重要となる。

大腸菌には、PriA 依存的経路と呼ばれる複製再開始機構が備わっている。この経路では、損傷が修復された後の DNA 構造に PriA、PriB、DnaT と呼ばれるタンパク質が规律的に集合し複合体を形成することで、複製装置が再構築されると考えられている。しかしながら、これらタンパク質間の相互作用機序は不明な点が多く、特に PriB 及び DnaT の挙動については理解が不十分である。そこで本研究では、PriB 及び DnaT が関与する相互作用の解析を行い、PriA 依存的経路における PriB 及び DnaT の機能を解明することを目的とした。

第一章 PriB・ssDNA の結合解析

< 方法 >

FRET (蛍光共鳴エネルギー移動)

両端を Cy3、Cy5 で標識した oligo-dT35 に PriB を滴定した時の FRET を評価した。

蛍光偏光解消法

FITC 標識 oligo-dT35 に PriB を滴定した時の蛍光偏光を測定した。

EMSA (ゲルシフトアッセイ)

FITC 標識 oligo-dT35 と PriB を混和して 25 °C で 30 分間保温した後、ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。泳動後、FITC の蛍光を検出した。

< 結果・考察 >

PriB の機能を調べるため、種々の手法を用いて PriB と ssDNA の結合解析を行った。FRET 及び EMSA の結果、PriB と ssDNA は二段階の結合様式を呈することが分かった。また、二段階目の結合は弱酸性条件で起こることを見出した。さらに、PriB 変異体を用いた解析により、二段階目の結合には His64 が重要であることが示唆された。一方で、蛍光偏光解消法を用いた解析から、二段階目の結合が起こる際に分子サイズの変化は起こらないことが分かった。以上の結果から、PriB は pH 依存的に ssDNA との結合様式を変化させることで、ssDNA の保護ないし複製再開始機構の調節をする機能があると考察した。

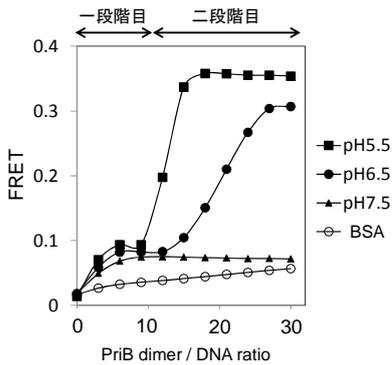


図1 FRETを用いたPriBとssDNAの結合解析

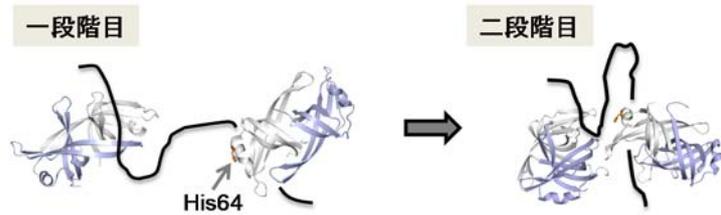


図2 PriBとssDNAの結合モデル

一段階目では、ssDNA上に二つのPriB二量体が独立して結合している。二段階目では、PriB二量体同士がHis64を介して相互作用する。

## 第二章 DnaTの多量体構造に関する解析

### <方法>

DnaTの変異体を作製し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより多量体形成を評価した。

### <結果・考察>

DnaTの多量体構造を調べるため、変異体を作製して多量体形成の評価を行った。DnaT1-88及びDnaT1-66は多量体を形成した。この結果と、Met1からAla41の領域が多量体形成に関与しないという報告(Huang *et al.*, *Genes Cells*, 2013)より、Phe42からAsp66の領域が多量体形成に重要であることが示唆された。さらなる変異体解析の結果、Leu53を介した疎水性相互作用がDnaTの構造安定化に寄与していることを示した。

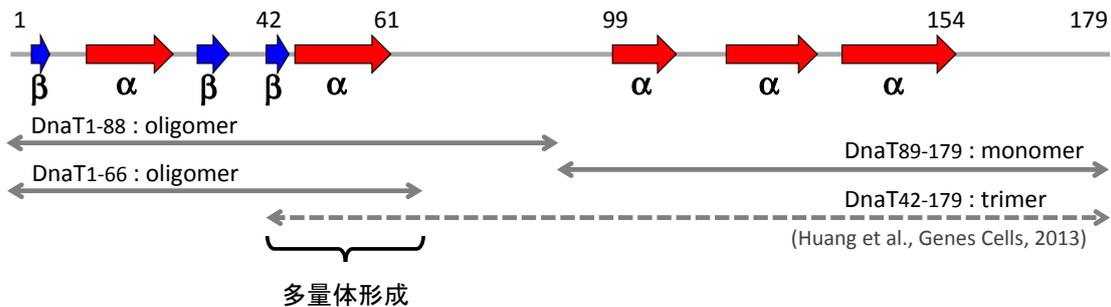


図3 DnaTの一次配列に基づく二次構造予測と、DnaT欠失変異体の多量体形成

## 第三章 PriB・DnaTの相互作用解析

### <方法>

#### EMSA

FITC標識 oligo-dT35とPriBを混和して25℃で30分間保温した後、DnaTを添加して25℃で30分間保温した。試料はポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、FITCの蛍光を検出した。

## 沈殿形成試験

PriB と DnaT1-88 を混和した際に生じる沈殿を遠心分離し、SDS-PAGE により解析した。

## ITC (等温滴定型カロリメトリー)

PriB に対して DnaT1-88 を滴定した際に生じる熱変化を測定した。

## NMR (核磁気共鳴)

<sup>15</sup>N 標識 DnaT60-88 の HSQC スペクトルを PriB 存在下及び非存在下で測定し、各アミノ酸残基に由来するシグナルの変化を観測した。

### < 結果・考察 >

#### DnaT における PriB との相互作用部位の同定

EMSA を用いた解析により、PriB-ssDNA 複合体に DnaT1-88 を添加すると ssDNA が遊離されることが分かった。この ssDNA 解離活性を DnaT1-69 が欠失していたため、Asp70 から Lys88 の領域に PriB との相互作用部位があると考えられた。そこでこの領域を含むペプチド断片 DnaT60-88 を調製し、NMR を用いた相互作用解析を行った結果、PriB は DnaT の Asp66 から Glu76 の領域に特異的に結合すると示唆された。さらに、変異体解析の結果から、DnaT の Asp66、Asp70 及び Tyr74 が PriB との相互作用に重要であった。

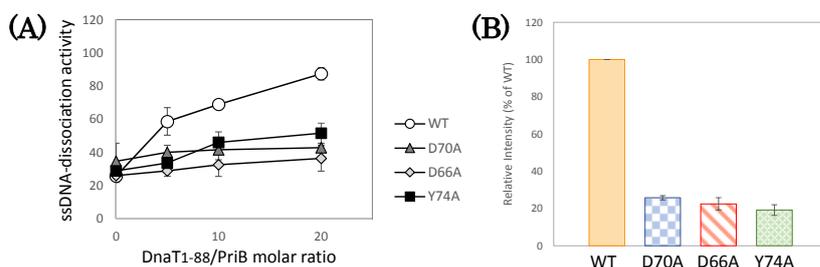


図 4 DnaT における PriB との相互作用部位の同定

(A) PriB-ssDNA と DnaT1-88 変異体の相互作用解析 (EMSA)

(B) PriB と DnaT1-88 変異体の結合解析 (沈殿形成試験)

#### PriB における DnaT との相互作用部位の同定

PriB の His 残基を Ala に置換した変異体 5 種類について EMSA による DnaT との相互作用解析を行った結果、変異体 H26A において相互作用の減弱が認められた。PriB の結晶構造に基づき、His26 と空間的に近接した 2 つの Ser 残基を Ala に置換した PriB 変異体 S20A、S55A を作製し、種々の手法を用いて DnaT との相互作用を解析した。その結果、S20A は H26A と同様に相互作用が減弱したが、S55A は相互作用を強めることが分かった。X 線結晶構造解析により決定した PriB 変異体 S55A の立体構造を見ると、His26 側鎖の向きが野生型と異なっていた。このことから、PriB の Ser55 は His26 側鎖の向きを固定することで DnaT との相互作用を負に制御していると考察した。

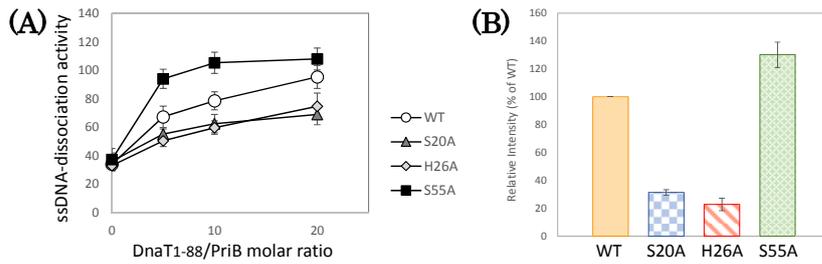
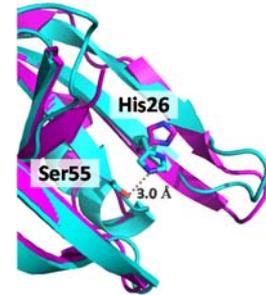


図5 PriBにおけるDnaTとの相互作用部位の同定

(A) 変異体 PriB-ssDNA と DnaT1-88 の相互作用解析 (EMSA)  
 (B) PriB 変異体と DnaT1-88 の結合解析 (沈殿形成試験)

図6 野生型 PriB と変異体 S55A の結晶構造の重ね合わせ  
 野生型をシアン、変異体 S55A をマゼンタで表した。His26  
 の側鎖をスティックモデルで示した。



<まとめ>

本研究では、PriB と DnaT の構造情報を基盤とした相互作用解析により、PriB 及び DnaT について新規の機能を提唱した。即ち PriB は ssDNA 及び DnaT との相互作用を pH 依存的に変化させることで、複製再開始を制御していると考えている。また、DnaT は ssDNA 上から PriB を解離させることで、複製装置の必須因子である DnaB ヘリカーゼの導入を補助する機能があると考えられる。得られた結果をもとに、複製再開始機構における DnaT の集合モデルを作製した (図 7)。本研究で得られた知見は、真核生物における複製再開始機構のモデルにもなり得るため (Yeeles *et al.*, *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2013) DNA 複製の異常がもたらすがんの発生機構の解明、並びに抗がん剤の開発に役立つと期待している。

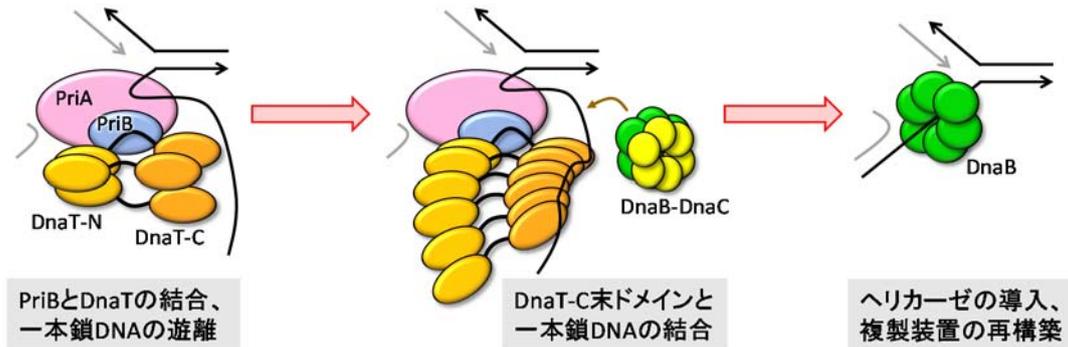


図7 PriA 依存的複製再開始機構の分子モデル

<発表論文>

- 1) **Fujiyama S.**, Abe Y., Takenawa T., Aramaki T., Shioi S., Katayama T. and Ueda T. (2014) *Biochim. Biophys. Acta.* **1844**, 299-307.
- 2) **Fujiyama S.**, Abe Y., Tani J., Urabe M., Sato K., Aramaki T., Katayama T. and Ueda T. (2014) *FEBS J.* **281**, 5356-5370.