

2011B1152, 2012A1142, 2012B1132

BL38B1

大腸菌複製再開始因子 DnaT、PriC の構造解析 Structural Analysis of DnaT and PriC, Replication Restart Factor in *Escherichia coli*

阿部 義人, 白石 充典, 荒牧 峻彦
Yoshito Abe, Mitsunori Shiroishi, Takahiko Aramaki

九州大学 薬学研究院
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

大腸菌においては紫外線照射などで生じる DNA 損傷後、DNA の修復系が作動する。修復後、蛋白質複合体プライモソームが形成され、プライモソームを起点として DNA 複製が再開始されると考えられている。本研究ではプライモソームの一つの因子である DnaT、PriC の機能解明を目指し 立体構造を X 線結晶構造解析により明らかにすることを目的として実験を行った。

キーワード： Primosome、DnaT、PriC

背景と研究目的：

大腸菌においてはチミン飢餓状態や紫外線照射などで生じる DNA 損傷が原因で一時的に DNA 複製が停止することがある。その際には誤った DNA 配列を子孫に残さないために DNA の修復系が作動する。修復後、蛋白質複合体プライモソームが形成され、プライモソームを起点として DNA 複製が再開始されると考えられている。プライモソームの因子である DnaT、PriC は分子量が約 20,000 の α ヘリックスリッチな蛋白質である。DnaT また PriC に関しては他のプライモソーム構成因子とは異なり、構造情報が少ない。一方で、近年我々はプロテアーゼ消化により DnaT、PriC が 2 つのドメイン構造を持っていることを明らかにした^[1,2]。DnaT に関しては DnaT-C 末ドメイン (89-179) の構造 (PDBid : 2RU8) を NMR によって解析し、一本鎖 DNA との結合活性を持っていることを明らかにした^[1]。さらに DnaT-N 末ドメイン (1-88) が DnaT と相互作用すると考えられているプライモソーム蛋白質 PriB と結合する部位を持ち、ホモ三量体形成をしていることを見いだした^[1]。一方で、PriC に関しては PriC-N 末ドメイン (1-97) の構造 (PDBid : 2RT6) を NMR によって解析した^[3]。さらに -C 末ドメインの機能である一本鎖 DNA および SSB (single stranded DNA binding protein) との結合を 20 数種の変異体を作成し、評価した^[4]。

そこで今回は未だ構造の解かれていない DnaT-N 末ドメインおよび PriC-C 末ドメインを結晶化し、X 線結晶構造解析により立体構造から機能を議論することを目的として、実験を行った。

実験：

大腸菌から発現・精製した DnaT-N 末ドメイン (1-88) を以前結晶が得られていた条件にて結晶化させた。さらにハンプトン社のクリスタルスクリーンキットを使って、さらに別の結晶化条件を探した。また、大腸菌発現系から精製した PriC-C 末ドメイン (96-175) をハンプトン社のクリスタルスクリーンキットを使って、結晶化条件を探した。得られた結晶は BL38B1 ビームラインに持ち込み、1 Å の波長で、30 秒露光で測定した。データ処理は BL38B1 ビームラインの HKL2000 を用いた。また、クライオ測定のためのクライオ条件の決定を行った。PriC-C 末ドメインに関しては大腸菌発現系を用いて、セレノメチオニン含有蛋白質を作成し、XAFS 測定を行った。

結果および考察：

1) DnaT-N 末ドメインの結晶評価

大腸菌から発現・精製した DnaT-N 末ドメイン (1-88) を以前結晶が得られていた条件にて結晶化させたところ、0.3 mm 程度の比較的大きな針状結晶が得られた (図 1、左)。この結晶を BL38B1 で評価したところ、回折点は観測されなかった。

一方で、ハンプトン社のクリスタルスクリーンキットを使って、別の結晶化条件で結晶化を行っ

たところ、あるスクリーニング条件で 0.1~0.2 mm の六角形結晶が得られた (図 1、右)。この結晶化条件を中心に種々の条件を検討した。次にクライオ条件を検討し、100 K にて結晶の評価を行った。1 Å の波長で、20 秒露光で測定したところ、図 2 のような回折点を得られ、最大分解能で約 8 Å であった。この DnaT-N 末ドメインの結晶の空間群は $P23$ であり、格子状数は $a=b=c=219$ Å であることがわかった。

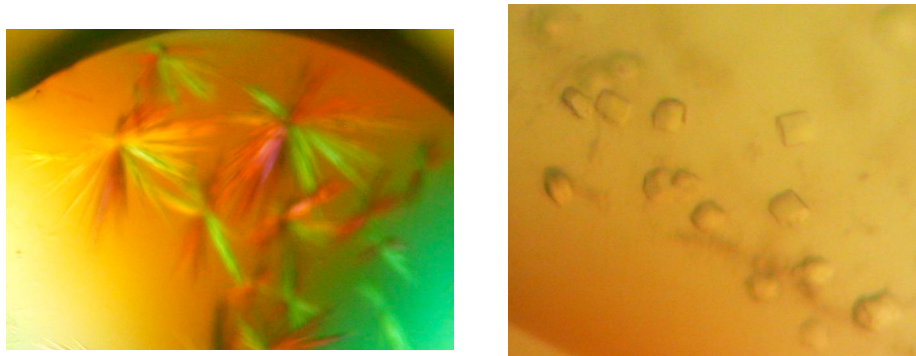


図 1. DnaT-N 末ドメインの結晶

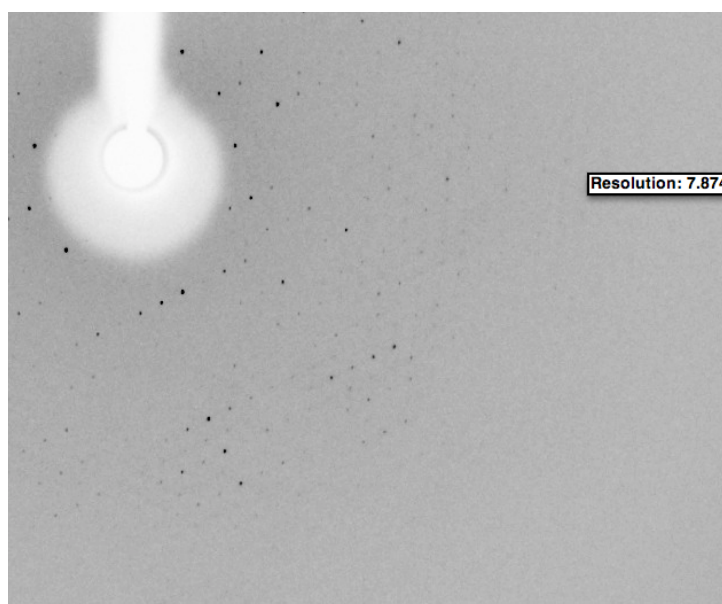


図 2. BL38B1 における DnaT-N 末ドメインの回折像

2) PriC-C 末ドメインの結晶評価

大腸菌から発現・精製した PriC-C 末ドメイン (96-175) をハンブトン社のクリスタルスクリーンキットを使って、結晶化を行ったところ、長方形の結晶が得られた (図 3)。この結晶化条件を中心に種々の条件検討を検討し、クライオ条件を検討し、100 K にて結晶の評価を行った。1 Å の波長で、10 秒露光で測定したところ、図 4 のような回折点を得られ、最大分解能で約 4 Å であった。この PriC-C 末ドメインの結晶の空間群は $C2$ であり、格子状数は $a=72$ Å、 $b=132$ Å、 $c=48$ Å、 $\beta=124^\circ$ であることがわかった。また、大腸菌発現系を用いて、セレンメチオニン含有蛋白質を作成し、XAFS 測定を行い、結晶中にセレンが含まれていることを確認した (図 5)。

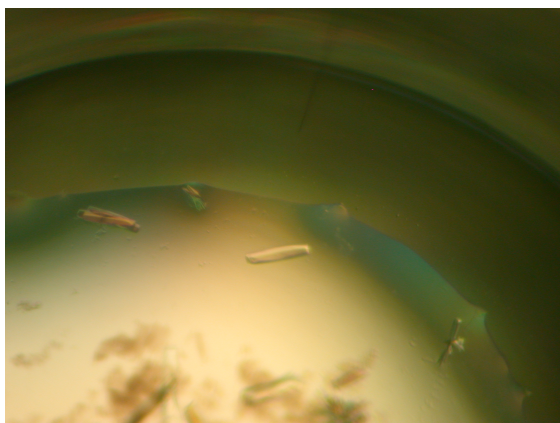


図3. PriC-C末ドメインの結晶

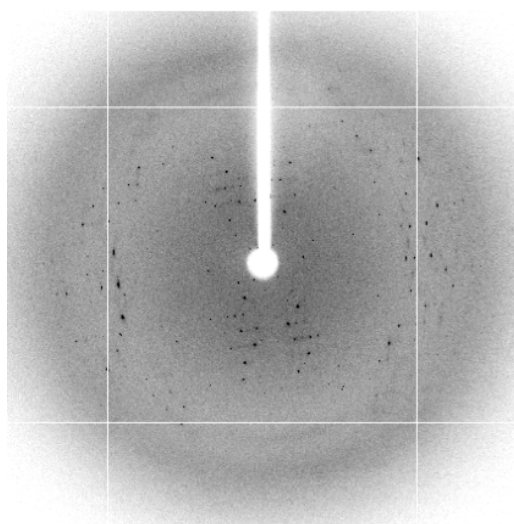


図4. BL38B1におけるPriC-C末ドメインの回折像

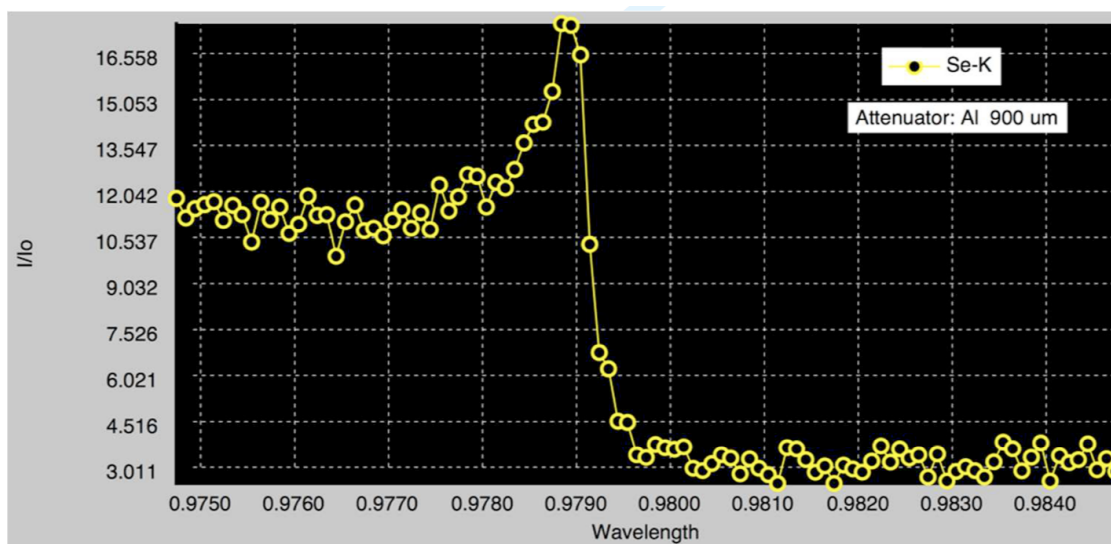


図 5. セレノメチオニン含有 PriC-C 末ドメインの XAFS 測定の結果

今後の課題：

各蛋白質共通の課題として、分解能が低いため、構造解析まで行き着くことができない。よって、今後分解能の改善の検討が必要である。そのために、更に結晶化条件、クライオ条件を検討することが必要と考えている。DnaT-N 末ドメインに関しては、結晶の成長が遅く、解析用の大きさになるまでに1ヶ月程度かかるため、変異体を作ることを検討している。PriC-C 末ドメインでは、結晶の成長は比較的早いですが、蛋白質のロットにより、結晶が出来ないことがあるため、精製条件の検討を考えている。これらの条件検討を行うことで、今後構造解析への道が開けると考えている。

謝辞：

本研究はJSPS 科研費 23570140 および2011 年度日本応用酵素協会研究助成金の助成を受けたものです。ここに感謝の意を表します。

参考文献：

[1] Saki Fujiyama, Yoshito Abe, Jun-ichi Tani, Masashi Urabe, Ken-ichi Sato, Takahiko Aramaki, Tsutomu Katayama, Tadashi Ueda, *FEBS journal*, **281**, 5356-5370 (2014)

- [2] Takahiko Aramaki, Yoshito Abe, Takatoshi Ohkuri, Tomonori Mishima, Shoji Yamashita, Tsutomu Katayama, Tadashi Ueda, *Genes to Cells*, **18**, 723-732 (2013)
- [3] Takahiko Aramaki, Yoshito Abe, Tsutomu Katayama, Tadashi Ueda, *Protein Science*, **22**, 1279-1286 (2013)
- [4] Takahiko Aramaki, Yoshito Abe, Kaori Furutani, Tsutomu Katayama, Tadashi Ueda, *Journal of Biochemistry*, in press (2015)

©JASRI

(Received: January 29, 2015; Early edition: April 28, 2015; Accepted: June 29, 2015;
Published: July 21, 2015)