

[別紙 1]

論 文 の 内 容 の 要 旨

論文題目 Molecular mechanisms of arrested replication fork recognition by  
PriA protein

PriA タンパク質による停止した複製フォークの認識と複製  
再開の分子機構

指導教官 新井 賢一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 田中 卓

DNA 複製フォークは染色体 DNA 複製中に様々な理由で停止すると考えられている。複製フォークの停止は生体の生命維持に重大な危機をもたらすため、この現象が起こると、直ちにチェックポイント機構が活性化されることが真核生物では知られている。この機構は、フォークが停止するとまず細胞周期の進行を一旦停止し、複製フォーク進行阻害の原因である DNA 上に生じた傷などの除去、修復が行われ、複製装置の再構築の後、フォークが再び進行を開始するという一連の反応である。この反応には多くの因子が関わるということが明らかにされてきた。しかしながら、この機構の極めて初期の段階で重要な役割を果たすと考えられる停止したフォークを認識するタンパク質の実体は明らかになっていない。

大腸菌の PriA タンパク質は最初に一本鎖 DNA フェージ、 $\phi$ X174 の *in vitro* での一本鎖から二本鎖複製型への変換に必須の因子として同定された。このタンパク質は DEXH 型の ATPase/DNA helicase であり、 $\phi$ X174 ゲノム上に存在する特異的なヘアピン構造をとる *n'-pas* (*primosome assembly site*) を認識して結合し、そこで PriB、PriC、DnaT、DnaB ヘリカーゼ、DnaC、および DnaG プライマーゼの会合を促進して複製装置 (*primosome*) を構築する。二本鎖への複製

は、この primosome と DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素により開始される。ColE1 型の二本鎖プラスミドのラギング鎖側の鋳型にも同様の *n'-pas* が存在し、PriA はこれらの plasmid のラギング鎖の複製開始においてもやはり必須の因子であることが明らかとなっている。*n'-pas* は大腸菌染色体上には存在せず、従って PriA は大腸菌の *oriC*-DnaA 依存性の染色体 DNA 複製の開始には必須ではないが、このタンパク質をコードする遺伝子の欠損変異株は以下のような様々な形質を示すことが知られている。1) 増殖速度の著しい低下、2) 高栄養培地に対する感受性、3) 相同的組み換え頻度の低下 4) 一部の細胞集団に見られる形態異常 (filamentous morphology)、5) 各種の DNA 傷害性因子に対する感受性の増大、そして、6) 大腸菌に特徴的に見られる、DnaA、*oriC*-非依存性のもう一つの染色体複製機構である、安定的 DNA 複製反応 (stable DNA replication, SDR) の欠失などである。これらの表現型から、PriA は大腸菌において、組み換え・修復反応に関わることが示唆されてきた。

安定的 DNA 複製は組み換え依存性 (RecA-dependent) であり、チミン飢餓などにより誘導される inducible stable DNA replication (iSDR) と、RNA-DNA 複合体を認識して RNA を切断する RnaseHI の欠損株で恒常的に見られる constitutive stable DNA replication (cSDR) の 2 種類が知られている。これらはそれぞれ組み換え中間体である D-loop あるいは、転写の副産物である R-loop から複製が開始されると考えられている。PriA は双方の SDR に必須である。iSDR は一般に複製フォークの停止により引き起こされること、さらに、PriA は *in vitro* で、停止した複製フォーク構造を mimic した合成 DNA に特異的に結合することから、私はこのタンパク質は、複製フォークが停止したときに最初にこれを認識して結合し、そこから複製を再開始させる、いわゆるセンサータンパク質の強力な候補であると想定した。

そこで、私は本研究において、PriA タンパク質が停止フォークを最初に認識するタンパク質であるという仮定の下、その認識と複製再開始における分子機構の解明を目的として、まずこのタンパク質の構造と機能の関係を決定し、各ドメインがその生物学的、生化学的機能に果たす役割を特定することを試みた。続いて、停止したフォークを認識結合する分子機構を明らかにするために、停止フォークのどのような構造的特性が PriA の DNA 結合ドメインのどのような構造により特異的に認識されるかについて詳細な解析を行った。

1. ATPase/helicase 活性の組み換え依存性複製に対する役割。

このモチーフは ATPase、DNA/RNA helicase に広く保存されており、7ないし8個の保存領域からなる。いくつかの ATPase/helicase における変異体解析の研究から、この領域に点変異を導入すると、ほとんどの場合、ATPase/helicase 活性に影響が出ることが分かっている。PriA は DNA 依存性の ATPase/helicase 活性を持つが、組み換え依存性複製における ATPase 活性の役割はよく分かっていなかった。これを解明するため、ATPase/helicase モチーフに点変異を導入した変異タンパク質を作製し生化学的活性を確認した上で、このモチーフの変異体を *priA* 欠損株に発現させ、各種細胞内機能に対する効果を観察したところ、ATPase 活性は、増殖、紫外線抵抗性などには必須でないが、組み換え依存性複製である SDR には必要であることが明らかとなった。

## 2. DNA 結合ドメインの同定。

PriA は一本鎖 DNA、二本鎖 DNA、また RNA とも結合するが、特に D-loop など構造をとった DNA により強い特異性を示す。しかし、これらの DNA と結合するための特異的ドメインは明らかにされていなかった。停止フォークへの結合機序の解明のため、この結合ドメインを同定することを目的として、このドメインが存在すると予想される N 末端側のペプチド断片を作製し、結合活性を調べた。その結果、PriA は N 末端約 180 アミノ酸のみで D-loop に結合できることが明らかとなった。しかしながら、この結合は全長タンパク質の持つ D-loop 特異性を示さず、invading strand のない bubble 構造にも同様に結合したため、C 末端側に未知の D-loop 結合必須ドメインの存在が予想された。このドメインの検索の結果、helicase ドメインの中に存在する 336 番のヒスチジン及び 337 番のアラニンを含む領域と、512 番から 529 番の領域の 2 カ所に新規の D-loop 結合必須ドメインを同定した。各領域に変異を導入すると、N 末端の結合ドメインが存在するにもかかわらず、D-loop への結合が阻害された。これらの結果から、PriA タンパク質は N 末端の約 180 アミノ酸領域だけでも DNA に結合できるが、D-loop 特異的で強力な結合には C 末端側のヘリカーゼドメインも必要であり、その有効な結合のためには N 末側と C 末側が協調して作用する必要があると結論した。

## 3. PriA による停止フォーク認識機構の解明:”3'末端結合ポケット”の提唱。

PriA は停止した複製フォークのどのような構造を認識して結合するのであるか? PriA の N 端ポリペプチドは BIAcore assay により 1 本鎖 DNA に結合することが確認された。我々はこの結合が DNA 3'末端が free である時にのみ観

察されることを見出した。すなわち、DNA の 3'末端をリン酸化によりブロックすると結合が完全に阻害された。この事実は、PriA は、停止した複製フォークに存在すると想定される、DNA 鎖が伸長されないために露出する新生鎖の 3'末端を特異的に認識するという可能性を示唆した。そこで、停止したリーディング鎖の 3'末端が free のものとリン酸化により block されたものの二種類の停止複製フォーク構造を合成し、PriA の結合能をゲルシフトアッセイにより比較した。その結果、PriA は予想通り、前者のみに特異的に結合し、後者には結合しなかった。共同研究者の神田大輔博士のグループは、N 末端 105 アミノ酸ポリペプチドのみで DNA 鎖の 3'末端に結合できることを示し、さらに NMR の解析から、その中に 3'末端と特異的に相互作用するアミノ酸残基を同定した。これらの残基に変異を導入すると 3'末端の認識が消失した。興味深いことに、これらの残基は真性細菌の PriA ファミリーのタンパク質によく保存されていた。これらの結果は、これらの保存された残基が”3'末端結合ポケット”を構成している可能性を示唆する。さらに、この保存残基にアミノ酸置換を有する PriA 変異タンパク質は、*in vitro* で停止複製フォーク結合能の低下を示すとともに、SDR、増殖能などの *in vivo* での機能を喪失していた。

本研究により、PriA が停止複製フォークのリーディング鎖末端に存在する 3'末端を特異的に認識して結合することが明らかにされ、その結合に必須のアミノ酸残基が N 末端に存在し、それらが”3'末端結合ポケット”を構成する可能性が示唆された。そして、停止複製フォークに特異的かつ安定な結合をするためには N 末端に存在するフォーク認識・結合ドメインと C 末端ヘリカーゼドメインが協調的に機能することが必要であることも明らかとなった。さらにこの結合の後、そこからの複製再開には ATPase/helicase 活性が必要であることが示唆された。これらの結果は PriA の停止した複製フォーク認識の構造的基盤を明らかにし、その高次構造決定への重要な知見を提供するものである。また、未だ明らかになっていない、真核細胞の停止複製フォーク認識タンパク質の同定にも大きく貢献するであろう。また、このような”3'末端結合ポケット”は、他の複製、組み換え、修復など核酸代謝に関わるタンパク質においても存在することが予想される。今後、本研究で見出した、”3'末端結合ポケット”の高次構造を明らかにするとともに、同様な構造を有するタンパク質群を、種々の方法で同定し、その生物学的機能を明らかにしていきたい。