

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計 畫 *
* : 引子合成體蛋白質 PriA 與 DnaT 的結合模式分析 *
* 名 稱 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 李韋蓁
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-034-B
研究期間： 104年07月01日至105年02月28日止，計8個月
指導教授： 黃晟洋

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 105年04月05日

(一)摘要：

在細菌的複製叉停止時，需要 DNA 複製重新啟動 (DNA replication restart)。DNA 複製重新啟動需要 PriA 解旋酶的載入，接著必須與下游的 PriB、PriC、DnaT、DnaC、DnaB 解旋酶與 DnaG 引子合成酶有次序的相互在複製叉 DNA 上結合以喚回 DNA 聚合酶，重新合成未完的 DNA。在此研究，我們分析了 PriA 與 DnaT 的結合，並發現 DnaT 可以刺激 PriA ATPase 的活性大幅上升數 10 倍之多。雖然我們在此計畫執行區間來不及將各片段的 DnaT 與 PriA 的結合方式做清楚，以致於無法明確的結論 PriA 與 DnaT 其分子間是如何交互作用，但由於我們發現了 DnaT 可增強數十倍 PriA 活性，且可跳過 PriB 單獨與 PriA 產生結合，希望未來仍可解答這個單套體蛋白質-三套體蛋白質交互作用的詳細模式，且期評估 PriA 這個在細菌極度保留的蛋白質但人類卻沒有的基因是否可作為分子標靶來進行下一步新型抗生素的研發工作。

(二)研究背景：

目前各式各樣的生物其 DNA 複製機制雖大致保留，但在 DNA 修復後重啟 DNA 複製的程序則相當的不同，例如細菌與人類。細菌對於紫外光或其他化學物質等都非常敏感，一有突變其 DNA 複製馬上就陷入停滯情況，進而影響細胞分裂與生長，因此必須馬上啟動複製叉重啟機制。若能抑制或阻斷此複製叉的重啟，將可使細菌生長速率急速壓制，而第一步就是要先了解此重啟 DNA 複製的程序，包含牽涉在此程序的各蛋白質是如何自我辨識與組裝(1-3)。

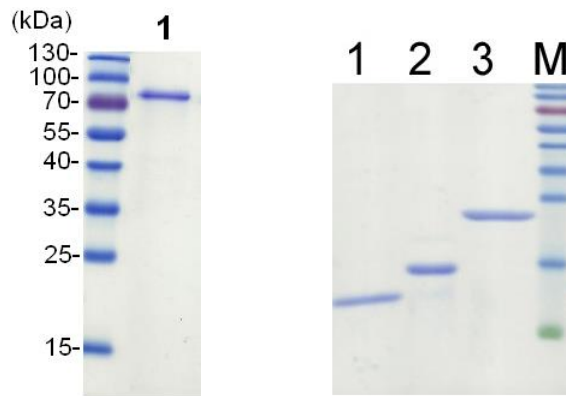
重啟 DNA 複製的程序在細菌主要是利用引子合成體來喚回 DNA 聚合酶。引子合成體蛋白質包括 PriA、PriB、PriC、DnaT、DnaC、DnaB 與 DnaG，其中引子合成體的組裝機制早已研究清楚，主要是以換手機制 (hand-off mechanism) 以進行各蛋白質的進入、活化與離開。目前已有相當的文獻在探討大腸桿菌的 DNA 複製是如何被重新啟動：第一步是 PriA 辨

認並結合上停滯的複製叉，第二步 PriB 辨認此 DNA-蛋白質複合體並也結合上，第三步是 DnaT 辨認此 PriA-PriB-DNA 複合體並結合上，此時會誘使 DnaC-DnaB 複合體接上此 DNA-蛋白質複合體上並驅使 PriA、PriB、DnaT 離開。最後 DnaG 會辨認 DnaB 而完成重新啟動聚合酶的任務(4)。此每一步都是必須的步驟，不過許多詳細的細節包括幾個蛋白質相互結合與互相如何辨認機制目前都不清楚。有趣的是，這個在分子生物學教科書中大腸桿菌所發現的系統在我們分析其他的細菌時，竟發現許多細菌並不含有 PriB。因此這些組裝步驟是可以跳過某個步驟呢或是有些蛋白質可以承接起相當的功能則仍不清楚。這些 PriA 下游的蛋白質群在大腸桿菌與枯草桿菌的基因學研究中顯示出極度的重要且缺一不可，但在不同的細菌，竟有著如此大的不保留性。

直到最近我們才發現 DnaT 竟然擁有一強的 DNA 結合能力(5)，因此我們不禁懷疑是否還有許多新的交互作用未被發現，以致於過去所推測的組裝機制須被大幅修正。若是 DnaT 能結合 DNA，則 PriB 應可與 DnaT 共同協助後續 DnaB 解旋酶的載入而不須與 DnaT 換手；這也可以說明為何像 PriB 如此重要的載入因子，並不在所有的細菌中廣泛的保留。是不是 PriB 只是一個可有可無的增強性蛋白質？如此的話誰來結合 PriA 並引入後續一連串的蛋白質-蛋白質與蛋白質-DNA 的交互作用？因此引發了我們極大的探討興趣，並發現 PriA 其實可以單獨與 DnaT 直接交互作用而並不一定必須靠 PriB 媒介。

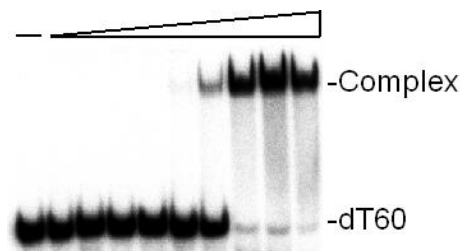
(三)結果與討論：

1. 蛋白質純化。我們利用基因重組表達與純化出 PriA 與各種不同大小的 DnaT 片段，並進行後續細部研究。我們在此計畫執行區間來不及將各片段的 DnaT 是如何與 PriA 交互作用與刺激 PriA 的 ATPase 活性研究清楚，但這些材料仍有助於之後的研究工作。



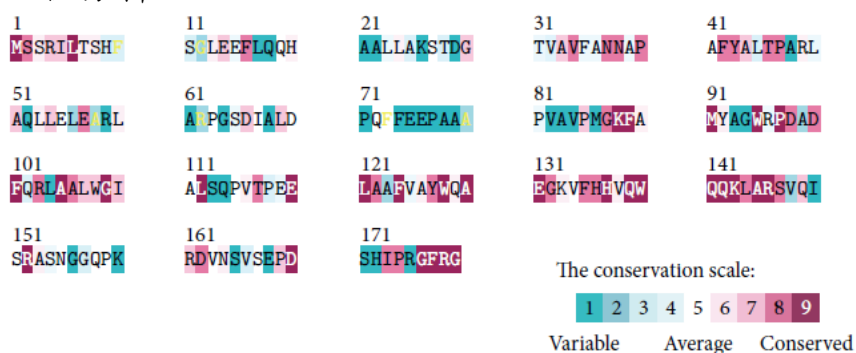
圖一：利用 SDS-PAGE 分析在純化過程中使用金屬螯合 Ni^{2+} -NTA 的親和管柱層析法所純化出蛋白質的純度。大約 200 mM imidazole 緩衝溶液可開始沖滌出目標蛋白質。左圖 lane 1, PriA。右圖 lane 1-3: DnaT84-179、DnaT42-179、DnaT26-179。

2. PriA-DNA 交互作用。我們利用 T4 kinase 先將單股 DNA dT60 標定上同位素 ^{32}P ，再與不同濃度純化後的 PriA 反應，顯影後發現電泳有遲滯的現象，確定 PriA 與單股 DNA dT60 有交互作用。其 K_d 數值為 $3 \mu\text{M}$ 。



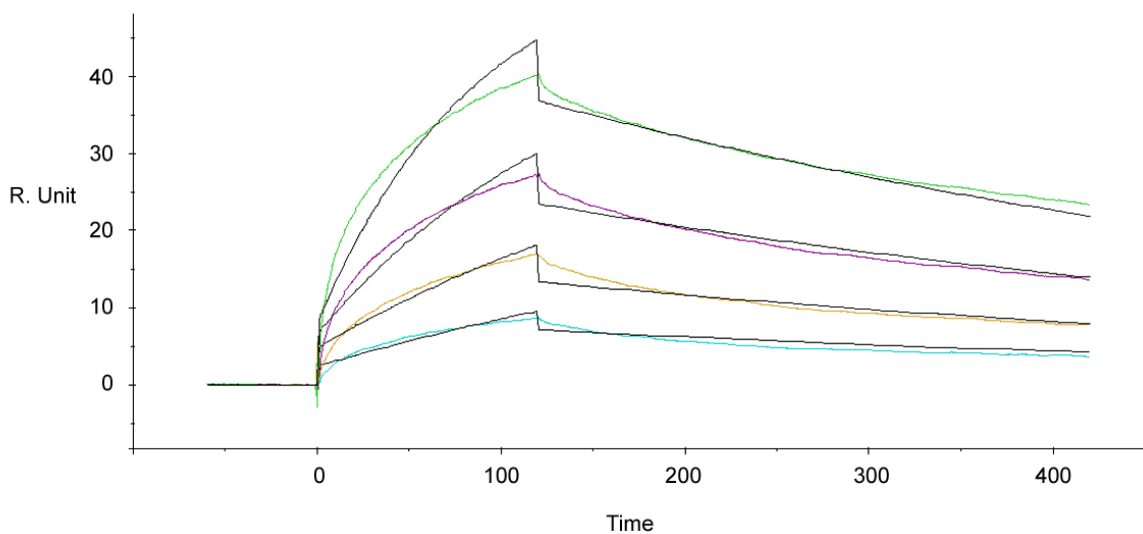
圖二：利用單股 DNA dT60 與不同濃度的 PriA ($0-20 \mu\text{M}$) 進行反應。首先將單股 DNA dT60 利用 T4 kinase 額外標定同位素 ^{32}P ，以便追蹤 DNA。如電泳後 DNA 位置發生偏移，可能有相互作用產生。在加入 PriA 後觀察到複合體的形成，其 K_d 經計算為 $3 \mu\text{M}$ 。

3. 我們已利用 ConSurf 分析 DnaT 各胺基酸的保留性，以便了解何為重要胺基酸以供分析之。



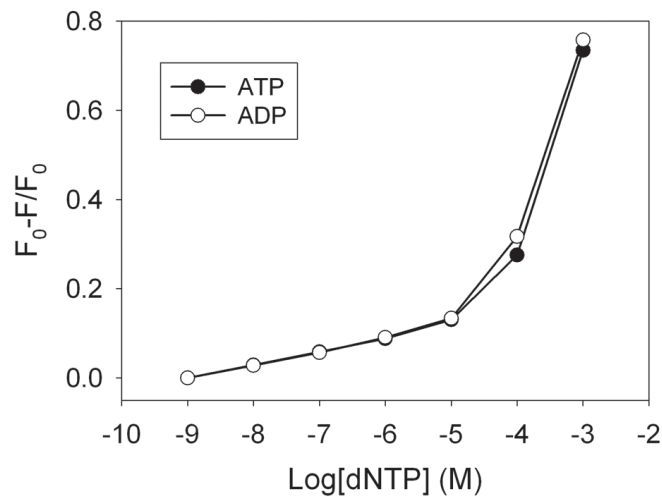
圖三：我們利用生物資訊軟體 ConSurf 對所有已定序的DnaT在演化中其胺基酸的保留程度。

4. 蛋白質-蛋白質交互作用分析。我們已經利用表面電漿共振儀(SPR)，測得 PriA 與 DnaT 間有強的交互作用。其 K_d 數值為 $8 \times 10^{-8}M$ 。這個結果顯示，不同於之前熟知的大腸桿菌模型必須要有 PriB 參與，事實上我們發現 DnaT 可跳過 PriB 直接與 PriA 交互作用。



圖四：我們已利用表面電漿共振儀(SPR)驗證PriA與DnaT有無直接的交互作用力。首先將PriA固定在CM5晶片，接著引入DnaT。若是PriA與DnaT沒有交互作用，則沒有質量改變(從光折射角度改變得知)，圖形將為直線。我們發現PriA與DnaT有一強的交互作用，其解離常數為 $8 \times 10^{-8}M$ 。另由圖知其PriA與DnaT的結合較慢但解離也較慢(相對一些其他蛋白質來說)。因此，很明顯此計劃所提PriA與DnaT確實可相結合。

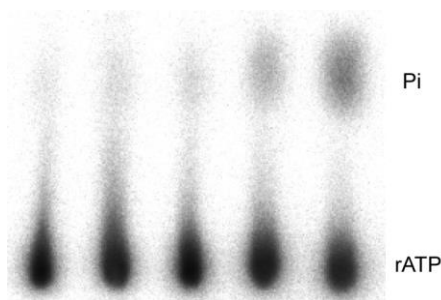
5. 我們已利用螢光淬滅分析 PriA 與 ATP 與 ADP 的結合能力，其 K_d 數值為 192 與 155 μM 。希望後續將加入 DnaT 看看是否有改變。



圖五：利用螢光淬滅分析PriA與ATP與ADP的結合能力，其 K_d 數值為192 與155 μM 。我們已知DnaT不會結合ATP與ADP。因此為了觀察DnaT是否對PriA的ATP/ADP結合有影響，之後我們將加入不同的DnaT來觀察PriA與ATP或ADP的結合能力之變化。

6. DnaT 可以大幅促進 PriA 解旋酶的 ATPase 活性。PriA 解旋酶是一個活性非常低的酵素，然而我們利用 TLC 片分析 PriA 水解同位素標定的 ATP 活性時發現加入 DnaT 可以大幅增強數 10 倍 PriA 的 ATPase 活性。

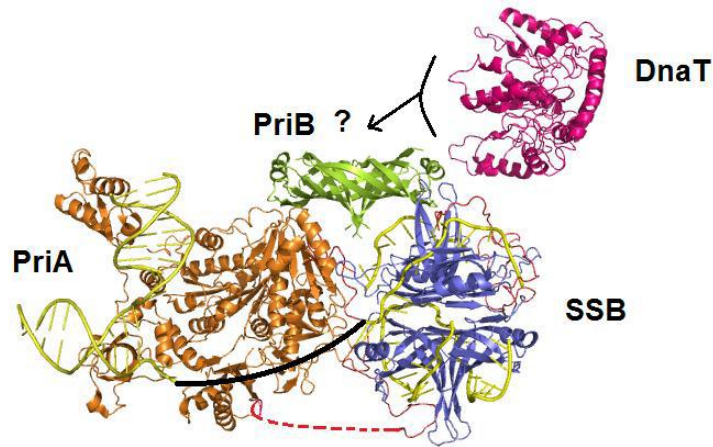
PriA (0.1 μM)	+	+	+	+	+
DnaT	—	0.1	0.2	0.4	0.8 (μM)



圖六：利用 TLC 片分析 PriA 水解同位素標定的 ATP 活性時發現加入 DnaT 可以大幅增強數 10 倍 PriA 的 ATPase 活性。Pi, 被水解的 ATP 所釋放出的游離磷酸根，與 ATP 的移動不同而漸分離，進而可觀察之。隨著加入的 DnaT 濃度越高，其產生的 Pi 濃度也越高。

7. PriA與DnaT以及其他蛋白質的聚集結構猜想。由於PriA與C端的DnaT已經有結晶結構，我們利用結構的分析，猜測可能的PriA又型DNA的結合

區。



圖七：利用結構分析，我們猜測可能的DNA與其下游蛋白質的結合區。PriA 與 PriB 的結晶結構已被解出，我們放入RecG 解旋酶(其胺基酸序列與PriA相似度高)與DNA 結晶結構中的叉型 DNA (金色)，發現極為吻合。然而一個PriA是如何與這麼多的不同蛋白質交互作用仍必須再更深入的研究。

(四) 結論與檢討：

在此研究計畫，我們分析了 PriA 與 DnaT 的結合，並發現 DnaT 可以刺激 PriA ATPase 的活性大幅上升數 10 倍之多。然而總的來說，我們在此計畫執行區間來不及將各片段的 DnaT 與 PriA 的結合方式做清楚以致於無法明確的結論 PriA 與 DnaT 其分子間是如何交互作用，因此並未達到計畫所預期的進度與結果。但由於我們發現了 DnaT 可增強 PriA 活性，且可跳過 PriB 單獨與 PriA 產生結合，希望這些新的知識仍有助於引子合成體新機制的推導。

(五) 參考文獻：

1. Heller, R.C., Marians, K.J. (2006) Replisome assembly and the direct restart of stalled replication forks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 932-943.
2. McGlynn, P., Lloyd, R.G. (2002) Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 859-870.
3. Cox, M.M., Goodman, M.F., Kreuzer, K.N., Sherratt, D.J., Sandler, S.J., Marians, K.J. (2000) The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* **404**, 37-41.
4. Huang, Y.H., Huang, C.Y. (2014) Structural insight into the DNA-binding mode of the

primosomal proteins PriA, PriB, and DnaT. *Biomed Res Int*, **2014**, 195162.

5. Huang, Y.H., Lin, M.J., Huang, C.Y. (2013) DnaT is a single-stranded DNA binding protein. *Genes Cells*, **18**, 1007-1019.