

令和 4 年 11 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06081

研究課題名(和文)古細菌CMGヘリカーゼとDNAポリメラーゼDの相互作用に関する構造生物学的研究

研究課題名(英文)Structural biology on the interaction between archaeal CMG helicase and DNA polymerase D

研究代表者

大山 拓次(OYAMA, Takuji)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：60423133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：DNA複製開始初期過程では、MCMヘリカーゼ(6量体)をコアとして活性化因子GINS(4量体)、Cdc45(古細菌ではGAN)を伴った総分子量約30万のCMG複合体が鋳型DNAを解きほぐす。本研究は、真核生物と良く似たDNA複製機構を持つ古細菌に着目し(1)真核生物と共有するCMGと(2)古細菌固有のDNAポリメラーゼDについて、生化学解析により明らかとなった新規複合体間相互作用の機能的な重要性を原子レベルで解明するため、機能相互作用を含む部分複合体の結晶構造解析を目指した。部分複合体の再構成、結晶構造決定に成功し、相互作用の詳細をアミノ酸レベルで解明し、生化学解析によりその重要性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

古細菌が持つDNA複製に関わるタンパク質の構造と機能は、真核生物由来のものに似ており、複合体はしばしば簡略化されているため、ヒトを含む真核生物の複雑なシステムを理解するための有用なモデルである。超好熱古細菌由来タンパク質は熱安定性に優れ、構造解析に有利である。一方、古細菌は他生物界と異なる独自システムも併せ持ち、構造生物学的に興味深い。本研究でターゲットとしたDNAポリメラーゼDは古細菌固有酵素であるが、古細菌としてのユニークな特性に加え、構造機能解析を通して真核生物システムとの類似性を見出せば、学術的に意義高く、生物種間の進化上の関連まで視野を広げれば、知の蓄積の観点で社会的意義に富む。

研究成果の概要(英文)：In the early stage of DNA replication, the CMG complex, comprising a MCM helicase core (hexamer) and two activators GINS (tetramer) and Cdc45 (GAN in archaea), unwinds the template DNA. Archaea have a DNA replication mechanism similar to that of eukaryotes, and we have recently found a novel interaction between (1) CMG, which is shared among archaea and eukaryotes, and (2) DNA polymerase D, which is unique to archaea. In order to elucidate the functional importance of the new complex interaction revealed by biochemical analysis, we performed X-ray crystallography of a partial complex containing the functional interaction. We succeeded in reconstructing and determining the crystal structure of the complex, elucidated the details of the interaction at the amino acid level, and confirmed the importance of the interaction by biochemical analysis.

研究分野：構造生物化学

キーワード：DNA複製 CMGヘリカーゼ 超好熱古細菌 結晶構造解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 真核生物および古細菌の DNA 複製における複製フォーク形成後の主役はスライディングクランプ PCNA である。PCNA はリング状分子であり、DNA 鎖に装填された状態で DNA ポリメラーゼを始めとする多数の DNA 代謝酵素群の活性を上昇させる (Moldan, *Cell* 2007)。一方、複製フォーク形成までの主役は CMG ヘリカーゼホロ酵素である。CMG は MCM ヘリカーゼ 6 量体コアに GINS4 量体および Cdc45 という 2 個の活性化因子が結合した分子量約 30 万の超分子複合体であり、鋳型 2 本鎖 DNA を 2 本の 1 本鎖 DNA にほどく。一旦鋳型 DNA を解き始めれば複製完了まで一気に反応を進める必要があるため、鋳型 DNA 解きほぐし = CMG 活性化は慎重に行われる。2 種のプロテインキナーゼ (CDK, DDK) による複数のサブユニットのリン酸化、それに連動した鋳型 DNA 鎖上での段階的な CMG 複合体形成、Mcm10 など別の活性化因子の結合が必要である (Tanaka & Araki, *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 2012)。

(2) CMG は DNA ポリメラーゼとも機能的に結合する。DNA 複製の進行プロセスを考えると、鋳型 DNA をほどいた後にはプライマーを合成する必要がある。CMG の DNA ポリメラーゼ / プライマーとの結合は合理的だが (Villa et al., *Mol Cell* 2016 など) CMG は複製フォーク形成後に PCNA と「活性な」複合体を形成すべき DNA ポリメラーゼ (Pol) とも結合すると言われており (Zhou et al., *Proc Natl Acad Sci* 2017 など) 複製フォーク進行に伴う Pol の CMG から PCNA への乗り換えといったダイナミックな反応も想定される。さらに、真核生物の DNA 複製では、ヌクレオソームの構造変換も必要であり、興味深いことに、MCM の一因子 Mcm2 が、DNA では無く、クロマチンリモデリング因子の作用により生じるヒストン H3-H4 ヘテロ 4 量体と結合する (Huang et al., *Nat Struct Mol Biol* 2015)。このように、CMG の活性化や他のタンパク質との機能的相互作用は複雑であり、かつ生物種により詳細な機構は異なると言われている。一体 CMG はどれほど多くのタンパク質と出会い、そして相互に協力し、複製フォークを形成していくのか? CMG の詳しい機能解明には、さらに多くの構造情報および機能情報を蓄積する必要がある。

### 2. 研究の目的

(1) 古細菌が持つ DNA 複製に関わるタンパク質の構造と機能は、真核生物由来のものに似ている。また、古細菌由来のタンパク質は熱安定性に優れ、複合体はしばしば簡略化されていることから、古細菌タンパク質は複雑な真核生物の DNA 複製を理解する上で有用なモデルと考えられている。最近我々が報告した *Thermococcus kodakarensis* 由来 GAN (Gins-Associated Nuclease) の構造機能解析 (Oyama et al., *Nucleic Acids Res* 2016) では、古細菌の RecJ ホモログである GAN は Cdc45 の役割を担うと予想され、結晶構造解析から GAN は真正細菌 RecJ と活性部位を共有し、エキソヌクレアーゼ活性を持ちつつ、真核生物 Cdc45 と共有している CMG 活性化に重要なドメイン (CID: CMG-Interacting Domain) を併せ持つことが分かった。さらに、GAN と GINS の機能的相互作用部位を探索し、GAN は Gins51 サブユニットの C 末ドメイン (Gins51C) と強固に結合することが分かった。Gins51C は GINS 本体とは非常に長いループで繋がっており、高いモビリティを持つ (Kamada et al., *Nat Struct Mol Biol* 2007) ことから、鋳型 DNA 上での CMG 形成における Gins51C の役割を詳細に定義したユニークなモデルを提唱した。DNA ポリメラーゼについても、古細菌は真核生物との類似点とユニークな点を併せ持つ。*Pyrococcus furiosus* などのユーリアーキオータでは、典型的複製用ポリメラーゼであるファミリー-B ポリメラーゼ (PolB) と古細菌のみに見出されるファミリー-D ポリメラーゼ (PolD) を持つ (Tori et al., *J Bacteriol* 2007)。PolD はおそらく校正能を発揮するエキソヌクレアーゼ DP1 ドメインと、ポリメラーゼ活性の本体である DP2 ドメインからなり、その構造は既知の DNA ポリメラーゼとは異なり、特に DP2 は RNA ポリメラーゼと活性部位構造が似ている (Sauguet et al., *Nat Commun* 2016)。PolD に関する最近の機能解析から、PolD はリーディング、ラギングどちらの鎖の合成にも重要であることが示唆されているが (Henneke et al., *J Mol Biol* 2005 など) PolD の機能に関してはまだ不明な点も多い。

(2) 最近、我々は免疫沈降法などの機能解析より *T. kodakarensis* 生体内で真核生物由来複合体と同等の CMG 複合体が形成されていることを突き止め、in vitro 再構成により調製した CMG の構造解析をクライオ電子顕微鏡解析により進めている (Mayangi et al., *BMC Biol* 2020)。一方、組換え精製タンパク質を用いた相互作用解析から、CMG と PolD が直接相互作用しているという新規の知見を得た (Oki et al., *Nucleic Acids res* 2021)。この相互作用の詳細が原子レベルで明らかになれば、CMG と PolD 間の未知のクロストークについて世界に先駆けて提唱することができる。

### 3. 研究の方法

(1) CMG-PolD 機能複合体の結晶構造解析: CMG-PolD 相互作用に関する生化学解析に基づき、機

能的相互作用を含み、かつ構造が均一な複合体の探索と再構成、ならびに結晶化を行う。解析に適した単結晶が得られれば、結晶構造解析によって原子レベルの結晶構造決定し、CMG と PoID 間の機能的相互作用を同定する。

(2) 結晶構造解析により得られた CMG-PoID 相互作用の検証：分子間相互作用表面に存在するアミノ酸残基の部位特異的の変異体あるいは欠失変異体タンパク質を用いた相互作用解析を行う。インターフェイスへの変異導入が結合親和力、CMG のヘリカーゼ活性、PoID の DNA ポリメラーゼ活性にどのような影響を及ぼすかを生化学的に検証する。

#### 4. 研究成果

(1) 結晶構造解析：CMG-PoID 間の機能的部分複合体について結晶構造解析を実施した。試験管内で再構成した複合体をカラムクロマトグラフィーによって、結晶化に適した純度まで精製した。精製過程での構成因子の著しい脱離は観測されず、この複合体が安定であることが分かった。次に結晶化条件検索を行い、構造解析可能と見込まれる単結晶を取得した。シンクロトロン放射光を用いた X 線回折実験を行い、解析初期段階で 3.0 分解能のデータセットを数セット取得することに成功した。その後、結晶化条件の最適化を行い、結晶の高品質化に成功し、最良で 2.45 分解能の X 線回折データ収集に成功した。以前に決定した GAN 全長-Gins51 サブユニット C 末端ドメイン(Gins51C)複合体(PDB ID: 5GHS, Oyama et al., *Nucleic Acids res* 2021)をプローブとした分子置換法による初期構造計算を行い、非対称単位に 2 個の複合体が含まれていることが分かった。差フーリエマップ中に PoID DP1 サブユニット N 末端ドメイン(DP1N)の存在が確認できた。そこで、*Pyrococcus horikoshii* DP1N (PDB ID: 2KXE, Yamazaki et al., *FEBS Lett* 2010)を参照構造としてマニュアルで初期モデルを構築した。その後、結晶学的精密化を計算が収束するまでに行い、 $R = 0.2162$ 、フリー  $R = 0.2419$  の最終構造を得た。複合体構造はプロテインデータバンクへ登録した(PDB ID: 7E15)。

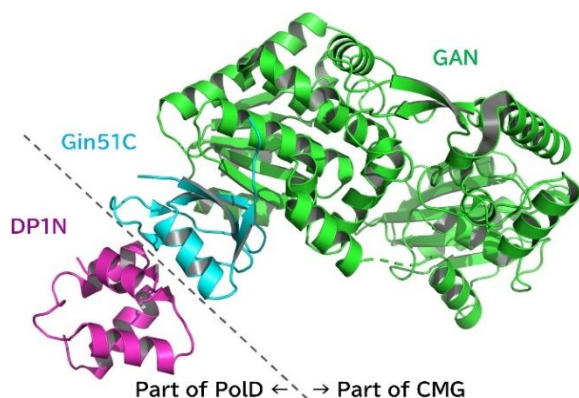


図1 GAN-Gins51C-DP1N 3者複合体の結晶構造

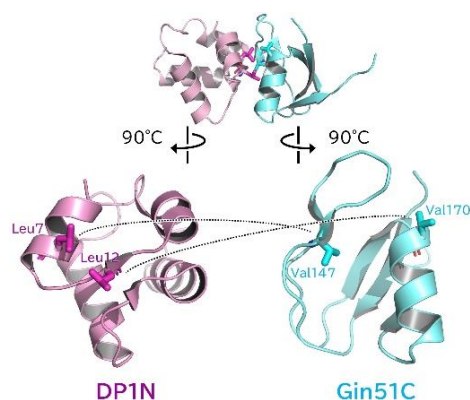


図2 Gins51C と DP1N 間の相互作用

(2) 機能複合体の結晶構造および分子間相互作用：本結晶の非対称単位には、2 個の複合体が含まれている。各複合体は GAN 全長、Gins51C (131 ~ 188 残基)、DP1N (1 ~ 64 残基) からなる。全体としては、以前に解析した GAN-Gins51C 2 者複合体とほぼ同じ構造に、DP1N が追加された状態である(図 1)。GAN のドメイン間配置に有意な変化があるが、機能を反映していない結晶中パッキング効果によるものと考えられる。DP1N は Gins51C と主に疎水相互作用で結合している一方、GAN とは全く接触していない。Gins51C-DP1N 相互作用表面は  $646 \text{ \AA}^2$  であり、2 個の水素結合と多くの疎水性相互作用が観察された(図 1)。特に、Gins51C の Val148 と Val170 および DP1N の Leu7 と Leu12 が相互作用の中心である。Gins51C (ヘリカーゼ側) と DP1N (DNA ポリメラーゼ由来) の相互作用は、以前に報告された、酵母由来の CMS ヘリカーゼ-DNA ポリメラーゼ-DNA 複合体のクライオ電子顕微鏡構造(Goswami et al., *Nat Commun* 2018)中で観測された Psf1C と Dpb2N の相互作用とよく似ていることが分かった。

(3) 以上の構造解析および生化学解析を総合的に考察すると、いずれも総分子量 20 万を超える CMG と PoID 間の相互作用は、いずれも 70 アミノ酸残基にも満たない小さなドメインからなる "ハブ" を介した接触に大きく依存している、言い換えれば、CMG と PoID 間の結合を小ドメイン間の最小限の接触に留め、つかず離れずの関係を構築・維持することによって、複製フォーク上、リーディング鎖およびラギング鎖に対して非対称な様式で、DNA 鎖解きほぐしと新鎖 DNA 合成が協調的に行われるという、ダイナミックな姿を想像することが出来る。さらに、真核生物由来関連複合体との構造類似性は、ヘリカーゼとポリメラーゼとの間のクロストークが生物種を越えて保存されていることを示唆する(Oki et al., *Nucleic Acids Res* 2022)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kamata Shotaro, Oyama Takuji, Ishii Isao	4. 巻 2
2. 論文標題 Preparation of co-crystals of human PPAR -LBD and ligand for high-resolution X-ray crystallography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100364 ~ 100364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100364	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kamata Shotaro, Oyama Takuji, Saito Kenta, Honda Akihiro, Yamamoto Yume, Suda Keisuke, Ishikawa Ryo, Itoh Toshimasa, Watanabe Yasuo, Shibata Takahiro, Uchida Koji, Suematsu Makoto, Ishii Isao	4. 巻 23
2. 論文標題 PPAR Ligand-Binding Domain Structures with Endogenous Fatty Acids and Fibrates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101727 ~ 101727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101727	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kowalska Ewa, Strza?ka Wojciech, Oyama Takuji	4. 巻 67
2. 論文標題 A crystallization and preliminary X-ray diffraction study of the Arabidopsis thaliana proliferating cell nuclear antigen (PCNA2) alone and in a complex with a PIP-box peptide from Flap endonuclease 1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Biochimica Polonica	6. 最初と最後の頁 49-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18388/abp.2020_2896	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Mayanagi Kouta, Ishino Sonoko, Shirai Tsuyoshi, Oyama Takuji, Kiyonari Shinichi, Kohda Daisuke, Morikawa Kosuke, Ishino Yoshizumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Direct visualization of DNA baton pass between replication factors bound to PCNA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-34176-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大山 拓次、大槻 隆司
2. 発表標題 ブタンジオール生産能に関わる <i>Serratia marcescens</i> 由来ニコチンアミダーゼのX線結晶構造解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第33回大会ポスター
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大山 拓次、大槻 隆司
2. 発表標題 結晶構造解析より明らかになったブタンジオール生産に重要な <i>Serratia marcescens</i> ニコチンアミダーゼの多量体構造
3. 学会等名 日本結晶学会 2019年度年会ポスター
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>*山梨大学生命環境学部生命工学科蛋白質構造生物学ホームページ  <a href="https://takujioyama1970.wordpress.com/">https://takujioyama1970.wordpress.com/</a></p> <p>*新型コロナウイルス禍におけるハイブリッド教育に関するメディア発表等          (1)文科省HP「新型コロナウイルスに関連した感染症対策に関する対応について」(2020/8/11) <a href="https://www.mext.go.jp/content/20200811-mxt_kouhou01-000004520_3.pdf">https://www.mext.go.jp/content/20200811-mxt_kouhou01-000004520_3.pdf</a>          (2)国立情報学研究所【第16回】4月からの大学等遠隔授業に関する取組状況共有サイバーシンポジウム(2020/9/11) <a href="https://www.nii.ac.jp/event/other/decs/">https://www.nii.ac.jp/event/other/decs/</a>          (3)UTYテレビ山梨すごろく「新型コロナ トビラの向こう(第3回)」(2020/10/7)          (4)読売新聞「教育ルネサンス 動画で学ぶ」(全国面)(2020/10/22)          (5)日経ビジネスNo.2067「振り回される高校3年生 問われる大学の意義」(2020/11/23)          (6)日本化学連合第14回シンポジウム(2021/3/9) <a href="https://www.jucst.org/media/2021_symposium_no14r.pdf">https://www.jucst.org/media/2021_symposium_no14r.pdf</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	石野 良純  (ISHINO Yoshizumi)  (30346837)	九州大学・農学研究院・教授    (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	白井 剛  (SHIRAI Tsuyoshi)  (00262890)	長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授    (34204)	
連携研究者	真柳 浩太  (MAYANAGI Kouta)  (50418571)	九州大学・生体防御医学研究所・助教    (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関