

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 2 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21370048

研究課題名（和文）DNA 複製におけるユビキチン化シグナルと分子間相互作用の構造生物学

研究課題名（英文）Structural biology of protein-protein interactions involved in DNA replication under DNA damage

研究代表者

佐藤 衛 (SATO MAMORU)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号：60170784

研究成果の概要（和文）：

DNA クランプは複製・修復・組み換えなど、DNA 上で起こる様々なイベントの足場となるタンパク質で、必要なタンパク質を適切な場所に集合させる。真核生物は 2 種類の DNA クランプ、PCNA と RAD9/HUS1/RAD1 (9-1-1) を持つ。本研究では、9-1-1 の最も重要な部分である RAD9 の C 末端領域(270-391) (RAD9CTD) の構造解析を行った。CD スペクトルによって溶液構造を調べたところ、明確な 2 次構造を示すスペクトルは示さなかった。そこで、X 線溶液散乱 (SAXS) 実験を行い、得られた散乱データからクラツキープロットを計算したところ、RAD9CTD は天然変性構造であることがわかった。RAD9CTD は DNA 損傷シグナルによって高度にリン酸化されることが知られている。したがって、RAD9CTD が天然変性構造であることは、この領域が翻訳後修飾を受けるには適した構造であり、リン酸化によってその構造が変化することが予想される。

いくつかの古細菌はヘテロ三量体 DNA クランプ (PCNA1-PCNA2-PCNA3) を持つ。我々は *Sulfolobus tokodaii* 由来 PCNA2-PCNA3 の SAXS 実験を行い、PCNA2-PCNA3 が 2:2 の 4 量体リング構造を形成することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

DNA clamp is involved in various cellular events on DNA including DNA replication, repair and replication, and functions as a scaffold protein in those events. DNA clamp forms a ring-shaped trimer that encircles the DNA double helix and slides freely along the DNA axis. PCNA and RAD9/HUS1/RAD1 (9-1-1) are DNA clamp in eukaryote. PCNA is a homo-trimer, whereas 9-1-1 is a hetero-trimer. Each subunit of 9-1-1 is composed of PCNA-like domain. However, RAD9 has an additional domain with a molecular weight of 13 kD in the C-terminus. Structure of 9-1-1 trimer of PCNA-like domains is similar to that of PCNA trimer. In this study, we prepared the C-terminal domain of RAD9CTD and performed structural analysis by small angle X-ray scattering (SAXS). Some archaea have heterotrimeric DNA clamp (PCNA1-PCNA2-PCNA3). We reveals that PCNA2-PCNA3 from *Sulfolobus tokodaii* forms tetrameric ring structure in solution by SAXS.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2009 年度 | 6,200,000  | 1,860,000 | 8,060,000  |
| 2010 年度 | 4,200,000  | 1,260,000 | 5,460,000  |
| 2011 年度 | 4,200,000  | 1,260,000 | 5,460,000  |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 総計      | 14,600,000 | 4,380,000 | 18,980,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶解析

## 1. 研究開始当初の背景

DNA クランプは複製・修復・組み換えなど、DNA 上で起こる様々なイベントの足場となるタンパク質で、必要なタンパク質を適切な場所に集合させる。真核生物は2種類のDNA クランプ、PCNA と RAD9/HUS1/RAD1 を持つ。PCNAは同一サブユニットがリング状に3分子会合し、対称なホモ三量体を形成する。一方、RAD9/HUS1/RAD1はヘテロ三量体で、電子顕微鏡でリング状構造が確認されている (Griffith et al., JBC 2002; Shiomi et al., Genes Cells 2002)。しかし、詳細な三次元構造や会合様式は不明であり、原子レベルの精緻な構造解析が求められている。ヒトにおいて、RAD9 (391 残基)、HUS1 (280 残基)、RAD1 (282 残基) の間で同一なアミノ酸はわずか3つであり、RAD9、HUS1、RAD1 と PCNA との配列同一性はそれぞれ、12%、14%、15%である。よって、RAD9/HUS1/RAD1 は PCNA のような単純なリング構造ではないと予想される。余談であるが、米国の緊急連絡番号が 911 であることから、RAD9/HUS1/RAD1 は 9-1-1 と呼ばれている。

DNA に損傷が生じると、DNA クランプは RAD18/RAD6 によってモノユビキチン化される (Hoegge et al., Nature 2002) (Fu et al., Cell 2008)。これが引き金となり、損傷応答タンパク質が損傷部位にリクルートされ、TLS ポリメラーゼによる損傷乗り越え DNA 合成、ATR/ATRIP キナーゼ、CHK1 キナーゼによるチェックポイントの活性化などの細胞応答が作動する。しかし、その分子機構やそれを制御するタンパク質間相互作用は未だ不明な点が多い。現在のところ、UV によるチミンダイマーなど、軽度の塩基損傷では PCNA 経路が働き、DNA 構造が大きく歪む塩基損傷や二本鎖切断など、重度の損傷では 9-1-1 経路が働くと考えられている (Jacob et al., Mol. Cell 2007)。

PCNA は複製、修復、組み換え、姉妹染色分体の接着などに関わる様々なタンパク質と相互作用し (Moldovan et al., Cell 2007)、それらのタンパク質は PIP-box と呼ばれる PCNA 結合モチーフを持つ。損傷乗り越え DNA 合成を行う TLS ポリメラーゼ (Pol  $\eta$ , Pol  $\kappa$ , Pol  $\iota$ ) も PIP-box を有するが、それらは典型的な PIP-box とは配列が異なる。PCNA はこれら TLS ポリメラーゼの非典型的な PIP-box と相互作用するとともに、ユビキチン修飾の結果、ユビキチン部分が TLS ポリメラーゼ

のユビキチン結合ドメイン (UBD) と相互作用する。ユビキチン化 PCNA は、この2つの相互作用によって Pol  $\eta$ , Pol  $\kappa$ , Pol  $\iota$  による損傷乗り越え DNA 合成を促進すると考えられているが (Bienko et al., Science 2005)、詳細は不明である (Acharya et al., MCB 2007)。

一方、9-1-1 は重度の損傷で働く新規な DNA クランプであり、REV7 を介して REV1/REV3/REV7 複合体と相互作用すると報告されている (Sabbioneda et al., JBC 2005)。9-1-1 は、PCNA 同様 RAD18/RAD6 によってユビキチン化され、ユビキチン部分は REV1 の UBD と相互作用し、REV3 による損傷乗り越え DNA 合成を促進すると考えられる。さらに、RAD9 のリン酸化された C 末端が TopBP1 と相互作用し、チェックポイントが作動し、細胞周期を遅延させると考えられている (Delacroix et al., Gene Dev., 2007)。

## 2. 研究の目的

申請者は、損傷応答におけるタンパク質間相互作用を構造生物学的に解明することを目指し、DNA クランプと相互作用タンパク質複合体の構造研究を立案した。研究期間内の具体的な研究目的は、新奇チェックポイントクランプ 9-1-1 の構造解析、9-1-1 と相互作用タンパク質との複合体構造解析、大腸菌を使ったユビキチン化 DNA クランプの調製法の開発、ユビキチン化クランプと相互作用タンパク質との複合体構造解析である。

## 3. 研究の方法

原子レベルの精緻な構造解析は X 線結晶構造解析法を用い、分子レベルの動的な構造解析は X 線溶液散乱法を用いる。DNA クランプのユビキチン化は、損傷乗り越え DNA 合成やチェックポイントの活性化など、DNA 損傷に対するイベントを発動させる重要なトリガーである。本研究は、2つの DNA クランプ (PCNA と RAD9/HUS1/RAD1) に注目し、DNA 損傷応答におけるユビキチン化シグナルとタンパク質間相互作用を構造生物学的に明らかとすることを旨とする。

## 4. 研究成果

【9-1-1】

2009年に3つのグループから同時に9-1-1の結晶構造が報告された。しかし、その構造はPCNA様ドメインのみの構造であり、9-1-1の最も重要なRAD9のC末端領域を含んでいない。そこで本研究では、RAD9のC末端領域(270-391)(RAD9CTD)の構造解析を目指した。RAD9CTDを大腸菌BL21(DE3)を用いて大量発現させ、カラムクロマトグラフィーによって精製した(図1)。

得られた精製標品を用いて、CDスペクトルによって溶液構造を調べたところ、明確な2次構造を示すスペクトルは示さなかった(図2)。

そこで、X線溶液散乱(SAXS)実験を行い、得られた散乱データからクラツキープロットを計算したところ、RAD9CTDは天然変性構造であることがわかった。RAD9CTDはDNA損傷シグナルによって高度にリン酸化されることが知られている。したがって、RAD9CTDが天然変性構造であることは、この領域が翻訳後修飾を受けるには適した構造であり、リン酸化によってその構造が変化することが予想される。今後、リン酸化の有無で、RAD9CTDがどのような構造変化を起こすのかを明らかにする必要がある。

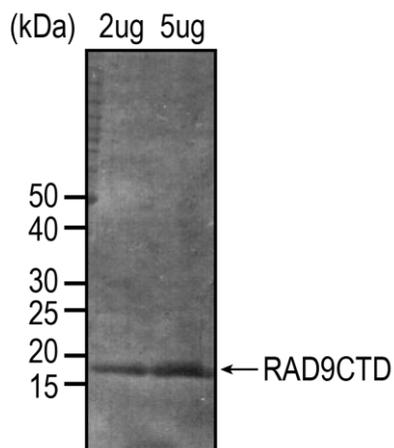


図1 RAD9CTDの精製標品(CBB染色)

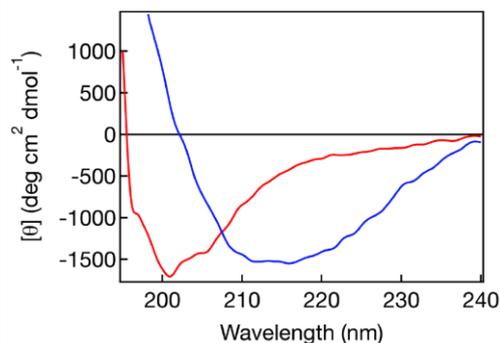


図2 RAD9CTDとPCNAのCDスペクトル

赤: RAD9CTD

青: PCNA

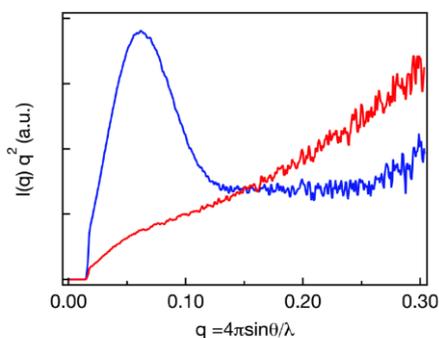


図3 RAD9CTDのクラツキープロット

赤: RAD9CTD

青: BSA(標準試料)

#### 【ユビキチン化PCNA】

大腸菌の共発現系を用いて、ユビキチン化PCNAの調製を行った。発現ベクターの組み合わせや培養条件を検討したが、100%の効率でのユビキチン化PCNAを調製する系の構築には至らなかった。しかしながら、ユビキチンにヒスタグを付加することで、機能解析には十分なクオリティのユビキチン化PCNAを得ることに成功した。

また、モノユビキチン化PCNAからユビキチンを切断するUSP1/UAF1複合体の調製を試みた。大腸菌を用いた発現系で、条件検討を重ねたが、USP1およびUSP1/UAF1複合体のX線結晶構造解析品質の組換えタンパク質を調製することは出来なかった。しかし、UAF1単独では高純度な精製標品を得ることに成功した(図4)。

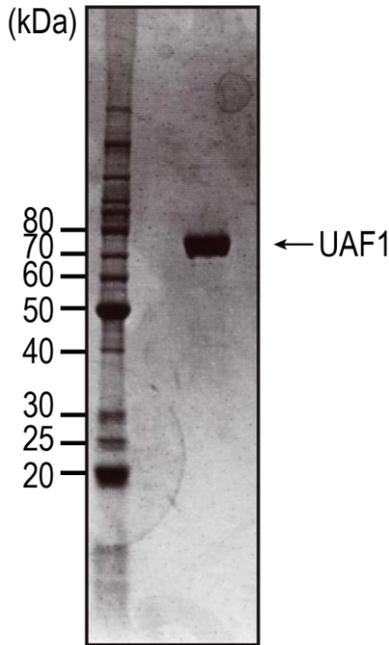


図 4 UAF1 の精製標品 (CBB 染色)

【DNA クランプとの相互作用解析】

当初の研究計画には含まれていなかったが、PCNA に結合し、PIP-box 相互作用を阻害する低分子化合物との複合体での X 線結晶構造解析に成功した。

共同研究者である St. Jude Children's Research Hospital の Fujii らは恒常性ホルモン T3 が PCNA と相互作用し、PIP-box 相互作用を阻害することを見だし、がん治療に向けた新しいアプローチを示した。我々は、X 線結晶構造解析によって、T3 が IDCL に結合し、PIP-box との相互作用を阻害するメカニズムを明らかにした(図 5, 6)。

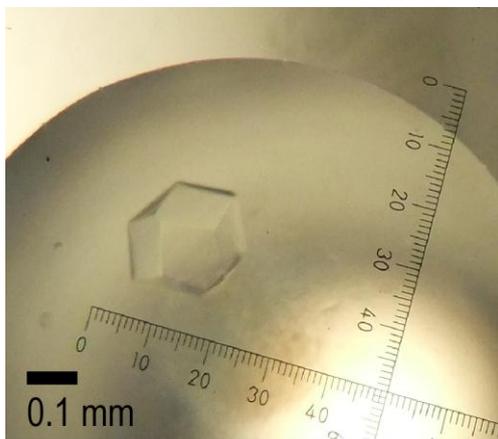


図 5 PCNA-T3 複合体の結晶

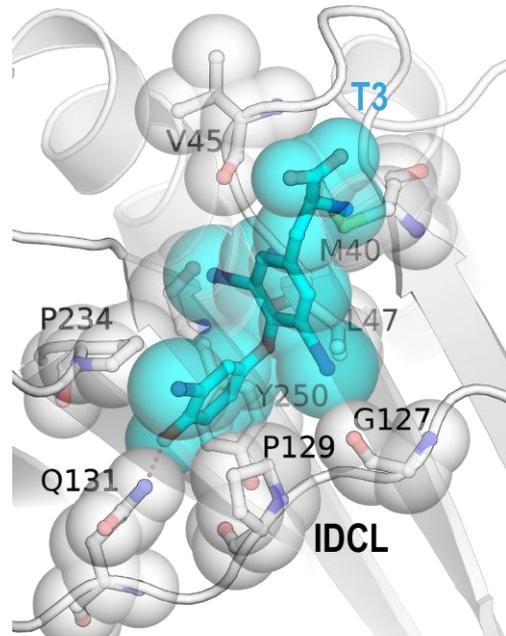


図 6 PCNA-T3 複合体の構造

【DNA クランプの溶液構造解析】

いくつかの古細菌はヘテロ三量体 DNA クランプ (PCNA1-PCNA2-PCNA3) を持つ。我々は *Sulfolobus tokodaii* 由来 PCNA2-PCNA3 の SAXS 実験を行い、PCNA2-PCNA3 が 2:2 の 4 量体リング構造を形成することを明らかにした (図 7)。

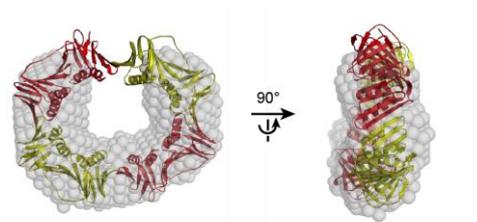


図 7 StPCNA2-3 のダミアトムモデル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 30 件)

- 1) Chandanamali Punchihewa, Akira Inoue, Asami Hishiki, Yoshihiro Fujikawa, Michele Connelly, Benjamin Evison, Youming Shao, Richard Heath, Isao

Kuraoka, Patrick Rodrigues, Hiroshi Hashimoto, Masanobu Kawanishi, Mamoru Sato, Takashi Yagi, & Naoaki Fujii, Identification of a small molecule PCNA inhibitor that disrupts interactions with PIP-Box proteins and inhibits DNA replication, *J. Biol. Chem.* (2012) **287**, 14289-14300

- 2) Akito Kawai, Hiroshi Hashimoto, Shigesada Higuchi, Masaru Tsunoda, Mamoru Sato, Kazuo T Nakamura, & Shuichi Miyamoto, A novel heterotetrameric structure of the crenarchaeal PCNA2-PCNA3 complex, *J. Struct. Biol.* (2011) **174**, 443-450

〔学会発表〕 (計 87 件)

〔図書〕 (計 1 件)

佐藤 衛、萩原央記、明石知子  
翻訳後修飾のプロテオミクス (第 4 章: 翻訳後修飾タンパク質の網羅的解析、4-13. 脱イミノ化) 平野 久、大野茂男編集  
講談社、2011、234

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗 PAD4 抗体医薬の創成  
発明者: 佐藤 衛, 金澤 智, 山田道之, 清水敏之  
権利者: 横浜市立大学, 名古屋市立大学  
種類: 特願  
番号: 2010-185734  
出願年月日: 2010 年 8 月 23 日  
国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 衛 (SATO MAMORU)  
横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・教授  
研究者番号: 60170784

### (2) 研究分担者

橋本 博 (HASHIMOTO HIROSHI)  
横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・助教  
研究者番号: 40336590

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: