

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24370046

研究課題名(和文) クランプによるレプリソームの制御機構の機能構造連関の研究

研究課題名(英文) Structural analysis to investigate the coordinating role of DNA clamp in replisome

研究代表者

真柳 浩太 (Mayanagi, Kouta)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：50418571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：PCNAはDNAクランプと総称される蛋白質であり、DNAを囲む様にリング状3量体を形成し、様々な複製因子と結合することから、これらの因子をDNA近傍に留めるレプリソームの基盤分子であると考えられている。これらの因子の切り換え機構及び制御機構を調べるため、DNAポリメラーゼ、DNAリガーゼ、フラップエンドヌクレアーゼ等とPCNA、及びDNAから構成される複合体の構造を単粒子解析によって明らかにした。その結果、2つの異なる因子間でDNAを正に受け渡す瞬間を捉えることができた。その結果これまで定説であったツールベルトモデルは修正される必要がある事が分かり、新たに複製因子の切り換え機構を考察した。

研究成果の概要(英文)：PCNA has a trimeric ring structure that encircles the DNA, and increases the processivity of the bound DNA polymerase by tethering it to the DNA. It is known now, that PCNA also interacts with multiple partners, such as DNA ligase and FEN, to control DNA replication, and works not only as the platform, but also as the conductor for the recruitment and release of these factors. However, the molecular architectures as well as the mechanism of the regulation of these replication factors are not known in detail. In order to investigate the switching mechanism between the replication factors in more detail, we studied the complex structures with two replication factors bound to one PCNA ring, by single particle analysis. We could successfully visualize the 3D structure of FEN-DNA ligase-PCNA-DNA complex, the intermediate state of Okazaki fragment maturation, and the handing over of the ds DNA strand from FEN to DNA ligase.

研究分野：構造生物学

キーワード：電子顕微鏡 ナノバイオ 生体分子 可視化 生物物理 画像解析 複合体 立体構造

1. 研究開始当初の背景

転写や翻訳に関してはその基盤となる RNA ポリメラーゼやリボソーム等の巨大分子装置の構造が結晶解析等によって詳細に調べられているのに対して、レプリソームに関しては主に個々の構成因子単独の構造解析に留まっており、レプリソーム全体構造については解析が未だ十分ではない。レプリソームの形成が複製起点認識複合体から始まり、多数の因子の結合離脱を伴い非常に遷移的であることも要因の一つである。電子顕微鏡はこのような超分子複合体の解析に大変適している。

我々は電子顕微鏡による単粒子解析を用いて、これまでレプリソームの基盤分子である PCNA に着目し、DNA ポリメラーゼや DNA リガーゼ等、複製で中心的な役割を果たす因子と PCNA 及び DNA との複合体の構造解析を行ってきた。PCNA は (DNA) クランプと総称される蛋白質であり、DNA を囲む様にリング状 3 量体を形成し、非常に多数の重要な DNA 関連酵素と、PIP (PCNA interacting peptide) モチーフを介して結合することが知られている。複数の複製因子が同一の PCNA を足場として DNA 近傍に停めおかれ、反応の効率化が計られている (ツールベルトモデル) と考えられていることから、PCNA はレプリソームの構築、再編、機能制御における最重要因子のひとつとみなされてきた。実際、複製においてプライマー除去反応を触媒する Fen1 と PCNA の共結晶 (引用文献) において、一つの PCNA リング中の 3 つのサブユニットは各々一個の Fen1 分子と結合していた。

我々は超分子複合体の溶液中での機能構造を捉えるのに適した電顕単粒子解析によって、複合体全体の構造の解析に着手し、ポリメラーゼ (PolB) -PCNA-DNA 複合体や、リガーゼ (Lig) -PCNA-DNA 複合体の構造解析を行ってきた (引用文献 及び)。得られた複合体の構造はともに結晶解析の部分構造から推察されていたものとは異なっており、特に興味深いことに両者の場合で、古典的な PIP による結合の他に更に隣接する PCNA とも結合していることが明らかになった。前者が各因子を PCNA に繋ぎとめる役割を果たすのに対し、この新規の結合はポリメラーゼの複製と校正のモードの切り換えなど、反応の制御に寄与していることを変異体による機能解析実験で確認した。この第 2 の結合部位は、これまで結晶構造解析や表面プラズモン共鳴解析などでは一切浮かび上がってこなかった、全く新規の知見であり、複合体全体の構造を直接観察することの重要性を改めて認識した。

現在、PCNA が 3 量体を形成することから、常時 3 つの異なる因子を留め、効率を上げるツールベルトモデルが定説となっている。その一方で、反応のステップごとに因子が PCNA との結合、そして解離によって切り替わるシーケンシャルモデルを支持する生化学デー

タも発表される等、その機構は謎に包まれている。我々の先行研究より、Pol や Lig など、代表的な因子が PCNA を 2 つ占有することから、ツールベルトモデルは部分的には破綻していることは明らかであり、構造的知見の蓄積が待たれる状況であった。

2. 研究の目的

遺伝情報の継承の根幹をなす DNA の複製には、多数の蛋白質因子が関わり、レプリソーム等の巨大な超分子複合体を形成し、綿密な制御を通じてその機能を発揮している。本研究では X 線結晶構造解析のみでは解析が困難な、これら超分子複合体、特にレプリソームの構造・機能相関を主に電子顕微鏡を用いて研究する。電子顕微鏡はナノメートル領域に威力を発揮し、また生理的条件下で試料の機能的構造を直接可視化できる利点がある。申請者はその特性を用い、レプリソームの基盤分子 PCNA クランプが、DNA ポリメラーゼ DNA やリガーゼの制御に寄与していることを明らかにしてきた。本研究ではこの PCNA を介した複製の制御機構を明らかにするとともに、結晶解析、変異体解析、計算機によるモデリング技術を加えてより詳細な解析を行うことで、未だ解明されていないレプリソームの実体の構築様式、反応機構についての統合的知見を獲得することが目的である。

3. 研究の方法

(1) 複合体の再構成および精製

DNA ポリメラーゼ、DNA リガーゼ、FEN 等の複製因子を発現精製する。複合体の安定性向上や機能解析のために必要に応じて変異体も設計し精製を試みる。個々に精製した複製因子や PCNA 及び DNA を混合し複合体を再構成しゲル濾過等の手法により精製する。複合体の安定性を電気泳動法や電子顕微鏡による観察によって調べる。その結果をもとに各因子の混合比やバッファー条件、DNA の配列等を考察し改善を試みる。

(2) 電子顕微鏡観察

主に負染色法により手がける。希釈系列を作成し観察及び画像記録に適した条件を検討する。透過型電顕を用いて試料を観察し、CCD カメラによって画像を記録する。電子線による複合体の損傷を考慮し、電子線損傷軽減システムを使用して画像データを収集する。構造解析が進み最適な試料作成条件が得られた試料については、クライオ電子顕微鏡法による解析に進む。膜穴炭素支持膜のメッシュに試料を滴下し、凍結ロボットによって凍結しクライオ電顕にて観察、凍結条件の最適化を図る。本課題の標的である複合体は分子量が 20 万前後と小さく、得られる画像のコントラストは極めて低いため、所属研究所のクライオ電子顕微鏡に組み込まれた電子分光装置を活用する。

(3) 画像解析及び立体構造解析

画像データを目視及びフリーエ像などにより、ドリフト及び非点収差の有無を調べ、良質の画像を選出した。最初に電顕画像から複合体粒子の像を目視によって抽出する。続いて抽出した像を元に計算機による自動抽出を行い、再度目視により問題のある像を除去し、自動抽出の過程では選ばれなかった良質の像を加えることでデータセットを完成させた。得られた粒子像のデータセットを元に、画像の平均及びクラス分けを反復計算することで2次元クラス平均画像を算出した。平均像から初期立体構造をコモンライン法等で構築した。初期立体構造を参照データとして、反復計算による構造精密化を行い、最終マップを構築した。複合体の構成因子が増えるにつれ、解離や凝集等により本来の複合体と組成の異なるものや、組成は同じでも構造が柔軟であるため異なる形態の粒子が混在することがあり得る。そのため近年開発されたベイズ統計を利用した解析ツールを用い3次元のクラス分けを行った。

(4) 複合体の原子モデル構築及び機能構造関連の考察

得られたマップ中に各構成因子の結晶構造等の原子モデルを当てはめ、複合体全体の原子モデルを構築。蓄積した複合体構造情報を元に因子間の相互作用様式を精査、基盤分子 PCNA を介したレプリソームの構築様式、因子の制御・切換え機構及び複合体の再編性機構を考察する。

(5) 新規解析技術の開発

複合体が複雑になるにつれ、全体の構造マップ中の個々の因子の結合部位を同定するのが困難になる。その対策となる新規分子標識法、モデリング技術の改良など必要な技術を随時開発する

4. 研究成果

(1) Hjm-PCNA-DNA 複合体の解析

Hjm は複製フォーク進行停止の際に機能するヘリカーゼで PIP-box もチーフを有し PCNA と結合することが明らかになっている。機能解析実験を考慮して、近年古細菌において遺伝子破壊株実験が可能となった *Thermococcus kodakarensis* 由来のタンパク質を用いて解析を開始したが、安定な複合体精製条件を見つけないことができず、*Pyrococcus furiosus* 由来のタンパク質に変更したところ、初期立体構造の構築に成功し、リング状の PCNA、PCNA の中心を走る DNA 2 重鎖、Hjm の各因子を可視化することができた。しかしながら得られたマップは低分解能に留まり、Hjm の向きについては一意的に決定できるには至っていない。

(2) FEN-PCNA-DNA 複合体の解析

ラギング鎖において DNA ポリメラーゼは先に複製された岡崎断片のプライマー領域に達すると、更に断片の下に潜り込む様に複製を続け、フラップ構造を形成する。次に FEN がこのフラップ切断し、生じたニックを DNA リガーゼが埋めることで一サイクルが終了し以降これを繰り返すことでラギング鎖の伸長が起こる。これまでに我々はこのサイクルにおける重要な3つの反応のうち2つを遂行する PoIB-PCNA-DNA 及び Lig-PCNA-DNA 複合体の構造を明らかにしてきた。残る FEN-PCNA-DNA 複合体の解析のため FEN と PCNA、FEN の基質であるフラップ DNA から構成される複合体の再構成を試みた。FEN のエンドヌクレアーゼ活性は極めて高く、そのままではフラップ DNA は瞬時に切断されてしまうため、切断され難い S 化 DNA の利用や FEN 変異体を用い、またバッファー条件等を検討することで複合体の精製条件の最適化を行った。得られた構造は、DNA を欠いた FEN-PCNA 結晶構造等から推察されるものと異なっていた。本構造は因子の切り換えを考察するうえで重要な参照構造であるに留まらず、先の PoIB-PCNA-DNA 及び Lig-PCNA-DNA の解析も含めて重要な3者複合体の構造解析を完結させた点に置いて極めて重要な意味をもつ。

(3) FEN-Lig-PCNA-DNA 複合体の解析

PoIB-PCNA-DNA も Lig-PCNA-DNA も3つの PCNA サブユニットのうち2つと結合していたが、3つ目の PCNA は空いており、他の因子が結合可能であった。また FEN の複合体の構造と比較しても、この PCNA に FEN が結合することはモデルのうえでは十分可能であった。そこで2つ因子を単一の PCNA に載せた複合体の形成を確認するため、精製した Lig、FEN、PCNA 及び DNA から複合体を再構成、ゲル濾過による精製を試みたところ、安定な複合体の形成条件に達することに精製した。この複合体は FEN によるフラップの解消から次の Lig によるニックの連結に移行する際の間状態に相当し、これまで定説とされていたツールベルトモデル、またそれを否定するシーケンシャルモデルの双方に厳密には相容れないものであった。本構造は両因子の間で DNA が正に手渡しされる様に移行する瞬間を初めて捉えたものである。

また、申請時には予想できなかった事柄として、電子顕微鏡カメラの飛躍的な発展があった。従来、本プロジェクトのターゲットとなる複合体は分子量が20万程度であり、クライオ電顕を用いた高分解能の解析は困難であった。高速撮影が可能な電子直接検出器の開発によって撮影時の試料の揺動が補正可能となり、分解能が飛躍的に向上したほか、我々のサンプルのような比較的小さい複合体も解析できる可能性が生じた。大阪大学微細構造プラットフォームの装置を用いてデータ収集を行ったところ、従来の検出器では

不可能だった高分解能のデータを記録でき、複合体中の DNA の螺旋構造を明確に捉えることができた。

(4) NucS-PCNA-DNA 複合体の解析

NucS はミスマッチ DNA 特異的エンドヌクレアーゼであり、PIP-box もチーフを有し PCNA と結合する。分担者の白井はこの NucS と DNA の複合体の結晶構造を得ることに成功した。更に PCNA を含んだ NucS-PCNA-DNA 複合体を再構成し、単粒子解析によって平均像を得ることに成功した。この平均像は複合体モデリングツールによって構築した複合体の予想原子モデルから予想される投影像と良く一致することが明らかになった。

(5) 新規標識技術

DNA の高次構造を利用した標識法の開発を行った。DNA ナノ構造体の一つである 4 面体構造の頂点を利用した標識及び、従来用いられたストレプトアビジンより小さい高次構造を形成する DNA トリプレットリピートによる標識を試みた。このうち、DNA ナノ構造体については設計通りの構造体の形成を確認できたものの、単粒子解析に利用するためには精製過程が煩雑になり、簡便性に問題があることが明らかになった。一方リピート配列に関しては簡便性にも優れ、可視化の点においても問題なく、実際の複合体において DNA 末端の標識として利用、その可視化に成功、その有効性を示すことができた。また 2 価イオンの有無によって高次形成を制御できる標識の開発にも成功した。

<引用文献>

Sakurai *et al.*, Structural basis for recruitment of human flap endonuclease 1 to PCNA *EMBO J.*, 24(4):683-693 (2005)
Mayanagi *et al.*, Mechanism of replication machinery assembly as revealed by the DNA ligase-PCNA-DNA complex architecture. *PNAS*, 4;106(12):4647-52 (2009)
Mayanagi *et al.*, Architecture of the DNA polymerase B-proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-DNA ternary complex. *PNAS*, 108(5):1845-9 (2011)

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 33 件)

Ishino S, Oda S, Uemori T, Sagara T, Takatsu N, Yamagami T, Shirai T, Ishino Y, Identification of a mismatch-specific endonuclease in hyperthermophilic Archaea. *Nucleic*

Acid Res. 44(7): 2977- 2086 (2016), DOI: 10.1093/nar/gkw153. (査読有)

Yamashita S, Hata A, Usui T, Oda H, Hijikata A, Shirai T, Kaneko N, Hata D, Novel AVPR2 mutation causing partial nephrogenic diabetes insipidus in a Japanese family. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 29(5): 591-596 (2016), DOI: 10.1515/jpem-2015-0323. (査読有)

Tsuji T, Yoda T, Shirai T, Deciphering Supramolecular Structures with Protein-Protein Interaction Network Modeling. *Scientific Reports* 5: 16341 (2015) DOI: 10.1038/srep16341(査読有)

Kobayashi A, Teruya K, Mitsuura Y, Shirai T, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H, Mohri S, Kitamoto T, The influence of PRNP polymorphisms on human prion disease susceptibility: an update. *Acta Neuropathol.* 130(2): 159-170, (2015) DOI: 10.1007/s00401-015-1447-7. (査読有)

Tsunaka Y, Fujiwara Y, Oyama T, Hirose S, Morikawa K, Integrated molecular mechanism directing nucleosome reorganization by human FACT. *Genes Dev* 30(6): 673- 686 (2015) DOI: 10.1101/gad.274183.115. (査読有)

真柳浩太 単粒子解析法で迫る DNA 複製フォーク複合体の機能構造連関 *顕微鏡* 4: 110-117 (2014) (査読有)

Aramaki S, Mayanagi K, Aoyama K, Yasunaga T, Revealing the intracellular ultrastructure of filopodia with cryo- electron tomography *Microscopy* 63: 133-134 (2014) DOI: 10.1093/jmicro/dfu071(査読有)

Shirai T, Saito M, Kobayashi A, Asano M, Hizume M, Ikeda S, Teruya K, Morita M, Kitamoto T, Evaluating prion models on comprehensive mutation data of mouse PrP, *Structure*, 22, 560-571 (2014) (査読有)

Takeuchi K, Nishino T, Mayanagi K, Horikoshi N, Osakabe A, Tachiwana H, Hori T, Kurumizaka H, Fukagawa T. The centromeric nucleosome-like CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA. *Nucleic Acids*

Research 42(3):1644-1655. (2014). DOI: 10.1093/nar/gkt1124(査読有)

Nakae S, Ito S, Higa M, Senoura T, Wasaki J, Hijikata A, Shionyu M, Ito S, Shirai T, Structure of novel enzyme in mannan biodegradation process 4-O-beta-D-mannosyl-D-glucose phosphorylase MGP, *J. Mol. Biol.* 425, 4468-4478 (2013) DOI: 10.1016/j.jmb.2013.08.002. (査読有)

Kon, T., Oyama, T., Shimo-Kon, R., Imamura, K., Shima, T., Sutoh, K. & Kurisu, G. The 2.8 Å crystal structure of the dynein motor domain. *Nature* 484(7394): 345-350 (2012) DOI: 10.1038/nature10955. (査読有)

[学会発表](計 48 件)

高島 夏希, 石野 園子, 高藤 三加, 真柳 浩太, 原 智彦, 山上 健, 石野 良純 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* 由来ファミリー-D DNAホリメラーゼの構造と機能の相関 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会・合同大会 (2015, 12/1-4) 兵庫

Mayanagi K. Single particle analysis of DNA replication fork complex. The 25th Hot Spring Harbor International Symposium (2015, 11/14) 福岡

真柳 浩太 DNA複製フォーク複合体の構築原理及び遷移・制御機構の解明、きがけ - ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的 基盤技術 - 研究領域 研究成果報告会、(2015, 11/9) 東京

Mayanagi K. Architecture and Regulation Mechanism of DNA Replication Fork Complex Revealed by Single Particle Analysis IGER International Symposium on Frontiers in Biological Research with Advanced Electron Microscope Technologies (招待講演) (2015, 1/15-16) 名古屋

真柳 浩太 単粒子解析によるDNA複製フォーク複合体の機能構造連関の研究、京都大学放射線生物研究センターセミナー (招待講演)、(2014, 11/7) 京都

Mayanagi K., Kiyonari S, Nishida H, Ishino S, Fujikane R, Saito M, Kohda D, Ishino Y, Shirai T, Morikawa K, Mayanagi K., Kiyonari S, Nishida H, Ishino S, Saito M, Kohda D, Ishino Y.

Shirai T, Morikawa, Single particle analysis of molecular architecture of DNA replication fork complex and switching mechanism of replication factors 18th International Microscopy Congress (2014, 9/7-14) Prague Czech, Republic

Mayanagi K., Kiyonari S, Nishida H, Ishino S, Saito M, Kohda D, Ishino Y., Shirai T, Morikawa K, Molecular architecture and switching mechanism of the replication fork complex Gordon Research Conference, Three Dimensional Electron Microscopy (2014, 6/22-27) Girona Spain

真柳 浩太 DNA複製フォーク複合体の分子構築及び切換え機構の研究、タンパク質研究所セミナー、(2014, 2/7-8) 大阪。(招待講演)

Ogino H, Ishino S, Mayanagi K., Oyama T, Shirai T, Morikawa K, Haugland GT, Birkeland NK, Kohda D, Ishino Y. Divergently evolved activation mechanism of the replicative helicase in the thermophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*. 第36回日本分子生物学会、(2013, 12/3-6) 神戸

真柳 浩太 DNA複製に関与する超分子複合体の単粒子解析、日本顕微鏡学会第57回シンポジウム、(2013, 11/15-16) 名古屋。(招待講演)

尾木野 弘実, 石野 園子, 真柳 浩太, 大山 拓次, 白井 剛, 森川 耿右, Haugland Gyri Teien, Birkeland Nils-Kare, 神田 大輔, 石野 良純, 好熱性アーキア *Thermoplasma acidophilum* における複製ヘリカーゼ活性化機構の分岐進化。第14回極限環境生物学会、(2013, 10/26-27) 川崎。

Ogino H, Ishino S, Mayanagi K., i Oyama T, Shirai T, Morikawa K, n Haugland GT, Birkeland NK, Kohda D, Ishino Y. Activation mechanism of the replicative helicase in the thermophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*. *Thermophiles* 2013, (2013. 9/8-13) Regensburg, Germany.

Mayanagi K. Electron microscopic structure analysis of protein-DNA complexes. The 3rd International conference on New Frontier of the Research on RecA-family recombinases and their accessory proteins, (2013,

10/3-5) Nantes, France

Mayanagi K, Kiyonari S, Nishida H, Ishino S, Saito M, Kohda D, Ishino Y, Shirai T, Morikawa K, Electron microscopic analysis of molecular architecture and switching mechanism of DNA replication fork complex. ICSG2013-SLS, (2013, 7/30-8/1) Sapporo.

Mayanagi K, Molecular architecture and switching mechanism of DNA replication fork complex. Gordon Research Conference, Three Dimensional Electron Microscopy, (2013, 6/23-28) Colby-Sawyer College, USA.

尾木野 弘実、石野 園子、真柳 浩太、大山 拓次、白井 剛、森川 耿右、Gyri Teien Haugland、Nils-Kare Birkeland、石野 良純、Thermoplasma acidophilum 由来 Cdc6/Orc1 とホモ 4 量体の GINS による MCM との相乗的な活性化。第 35 回日本分子生物学会年会, (2012, 12/11-14) 福岡

真柳 浩太、単粒子解析による複製関連複合体の制御機構の研究。遺伝研研究集会、(2012, 10/3-4), 三島

〔図書〕(計 4 件)

辻 敏之、白井 剛、ビッグデータからの展開: 古代タンパク質解析と超分子モデリング, 生命のビッグデータ利用の最前線 (植田充美 監修), シーエムシー出版, pp. 225-231 (2014) 総ページ 231

Ogawa T, Shirai T, Methods in Molecular Biology vol. 1200 Springer, 539-551 (2014) 総ページ 608

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 耐熱性ミスマッチエンドヌクレアーゼの利用方法

発明者: 上森隆司, 石野 良純, 相良武宏, 石野園子, 山上 健, 白井剛

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2014-184934

出願年月日: 2014 年 9 月 11 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真柳 浩太 (MAYANAGI, Kouta)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号: 50418571

(2) 研究分担者

白井 剛 (SHIRAI Tsuyoshi)

長浜バイオ大学・教授

研究者番号: 00262890

大山 拓次 (OYAMA Takuji)

山梨大学・准教授

研究者番号: 60423133

(3) 連携研究者

石野 良純 (ISHINO Yoshizumi)

九州大学・(連合) 農学研究科・教授

研究者番号: 30346837