

令和元年6月26日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04755

研究課題名(和文) 損傷を回避したDNA複製(テンプレートスイッチ)の構造生物学

研究課題名(英文) Structural studies on proteins involved in template switching pathway

研究代表者

橋本 博 (HASHIMOTO, HIROSHI)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：40336590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：テンプレートスイッチは、損傷の無い相同な新生鎖を一時的に鋳型として用い、DNA損傷を回避した「正確な」DNA合成である。テンプレートスイッチでは、2つのDNAヘリケース(HLTFとZNRANB3)が関与する考えられているが、それらの構造情報は乏しく、テンプレートスイッチのメカニズムはほとんどわかっていない。近年同定されたPARIは、組換え修復を抑制し、テンプレートスイッチを促進すると考えられている。本研究ではそれらの構造生物学研究を行い、HLTFとDNAとの相互作用、ZNRANB3とPCNAとの相互作用およびそれらのメカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちのDNAは毎日様々な要因によって損傷を受けているが、適切な修復機構によって直されている。しかしDNAのコピーが作られるときに損傷が生じるとDNAのコピーが途中で止まってしまう、細胞にとって好ましくない。このような状況を回避する手段の一つがテンプレートスイッチ(TS)である。TSは損傷の無いDNAを使ってコピーを作る。その一方で、TSはがん細胞が抗がん剤抵抗性を獲得する要因の一つである。したがって、TSのメカニズムを解明することで新たな創薬の手がかりを得ることができる。本研究ではTSを行うためのタンパク質とDNAとの相互作用、タンパク質とタンパク質との相互作用メカニズムをの一端を解明した。

研究成果の概要(英文)：Template switching (TS), also known as the damage avoidance path-way, in which one newly synthesized strand is utilized as an undamaged template for replication by replicative polymerases, is an error-free process. Several DNA helicases including HLTF and ZNRANB3 are crucially engaged in this pathway and these are involved in reversal of the replication fork. HLTF and ZNRANB3, might be involved in the early and late stages of the TS, respectively. Also, PARI that is recently identified protein that inhibit homologous recombination thereby stimulating TS. In this study, crystal structures of the HLTF N-terminal domain bound to DNA and PCNA bound to the ZNRANB3 peptides have been determined. These structures reveal interactions of these protein complexes and mechanisms of these interactions.

研究分野：構造生物学

キーワード：DNA損傷応答 X線結晶構造解析 DNA修復 構造生物学

1. 研究開始当初の背景

私たちのゲノム DNA は、紫外線、放射線、化学物質などの外的要因、活性酸素や代謝物などの内的要因によって常に損傷を受けている。通常、これらの DNA 損傷は適切な修復機構によって元通りに修復され、ゲノムの恒常性が維持されている。しかし、DNA が複製される時、すなわち S 期では、損傷の修復よりも速やかに複製を完了させることが優先される。なぜなら、S 期での DNA 損傷は DNA ポリメラーゼによる複製を停止させ、ゲノムの不安定性をもたらし、アポトーシスやがん化など、概ね好ましくない状況になるからである。DNA 損傷による複製の停止を回避するために、細胞は“DNA 損傷トレランス”という戦略を持っている。DNA 損傷トレランスは、損傷を直接修復するわけではないが、とりえず複製を継続するための仕組みである。DNA 損傷トレランスには 2 つの経路、“損傷乗り越え合成”と“テンプレートスイッチ”があり、いずれの場合でも DNA 合成の足場タンパク質である PCNA のユビキチン化がトリガーとなっている (図 1 参照)。すなわち、損傷乗り越え合成ではユビキチンリガーゼ RAD18 による PCNA のモノユビキチン化が起こり、テンプレートスイッチでは 2 つのユビキチンリガーゼ HLTF と RAD18 が協働し、PCNA のポリユビキチン化が起こる。

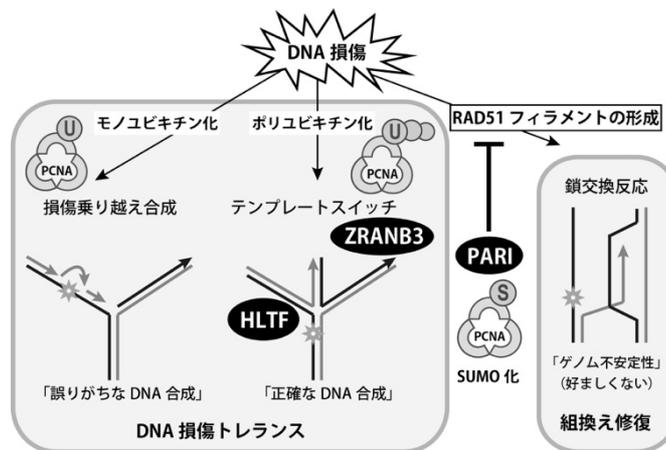


図 1 研究の背景

S 期においては組換え修復よりも DNA 損傷トレランスが好まれる

損傷乗り越え合成は損傷塩基を鋳型とした DNA 合成であり、損傷特異的な DNA ポリメラーゼが一時的に行う「誤りがちな DNA 合成」である。一方、テンプレートスイッチは、損傷の無い相同な新生鎖を一時的に鋳型として用いた DNA 合成であり、DNA 損傷を回避した「正確な」DNA 合成である (図 1)。テンプレートスイッチでは、2 つの DNA ヘリケース (HLTf と ZRANB3) が“鋳型鎖の切り替え”を行い、DNA 損傷を回避すると考えられている。HLTf はユビキチンリガーゼと DNA ヘリケース活性を持ち、ZRANB3 は DNA ヘリケース活性とスクレアーゼ活性を持つ興味深いタンパク質であるが、それらの構造情報は乏しく、テンプレートスイッチのメカニズムはほとんどわかっていない。最近、テンプレートスイッチを促進する新たな DNA ヘリケース様分子 “PARI” (PCNA Associated Recombination Inhibitor) が米国の研究グループによって発見された (Moldovan *et al.*, *Mol. Cell*, 2012)。興味深いことに、PARI が SUMO 化された PCNA と相互作用すること、RAD51 と結合し RAD51 フィラメントの形成・鎖交換反応を阻害することから、PARI は組換え修復を抑制し、その代わりにテンプレートスイッチを促進すると考えられている (図 1 参照)。不用意な組換え修復は相同組換えを促進し、染色体レベルでのゲノム再編によってゲノムの不安定性をもたらす。したがって、PARI は S 期に DNA 損傷が生じてもゲノムの安定性を維持する重要な役割を担っていると考えられる。しかし、このように重要な PARI の機能の構造基盤は全くわかっていない。テンプレートスイッチの分子機構を原子レベルで明らかにすることが求められている。

2. 研究の目的

テンプレートスイッチは、DNA の複製中に生じた DNA 損傷を回避して“正確に”複製を続けるための仕組みである。本研究では、テンプレートスイッチに関わる 3 つの DNA ヘリケース (HLTf、ZRANB3、PARI) の立体構造と分子間相互作用を X 線結晶構造解析によって明らかにし、テンプレートスイッチのメカニズムを原子レベルの解像度で明らかにし、創薬に資する構造基盤を得ることを目指している。

3. 研究の方法

本研究では、テンプレートスイッチに関わる3つのDNAヘリカーゼ、HLTF、ZNRANB3、PARIを対象として、構造生物学的研究を行った。目的とする組換えタンパク質を大腸菌の発現系を用いて大量発現させ、各種クロマトグラフィーによって精製した。精製タンパク質を濃縮し、結晶化スクリーニングによってX線回折実験に適した結晶を得た。得られた結晶は放射光実験施設において、X線回折強度データを収集した。分子置換法によって、目的タンパク質の立体構造を決定した。また、得られた構造に基づき、部位特異的変異体を作成し相互作用解析を行った。

4. 研究成果

本研究では構造生物学研究によって、HLTFとDNAとの相互作用、ZNRANB3とPCNAとの相互作用およびそれらのメカニズムを明らかにした。

1) HLTF

HLTFは、N末端側から、一本鎖DNA(ssDNA)に結合するHIRANドメイン、ヘリカーゼとして機能するSNF2 ATPaseドメイン、PCNAのポリユビキチン化に関与するRINGドメインから構成される。HIRANドメインは3'末端にヒドロキシ基を持つssDNAに対して高い親和性を示し、X線結晶構造解析によって、その認識メカニズムが明らかになっている(Hishiki *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2015; Kile *et al.*, *Mol. Cell*, 2015; Achar *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 2015)。しかし、二本鎖DNA(dsDNA)との相互作用およびテンプレートスイッチにおけるHIRANドメインの役割については不明な点が残されていた。本研究ではHIRANドメインと完全に相補的なdsDNAとの複合体のX線結晶構造解析に成功した(投稿準備中)。

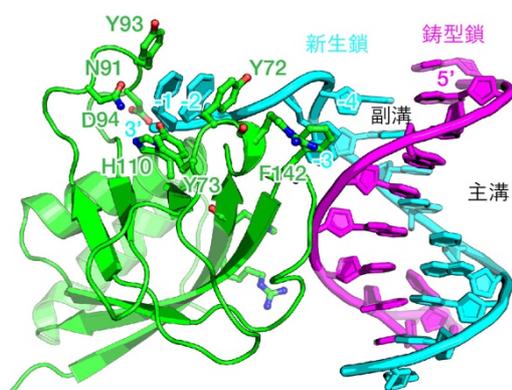


図2 HIRANドメインと二本鎖DNAとの複合体構造

HIRANドメインは予想通りdsDNAの3'末端に結合していた(図2)。興味深いことに、二本鎖DNAの3'末端側の3塩基は塩基対を作っておらず、HIRANドメインの結合によって巻き戻されていた。DNAの二本鎖部分はB型DNAの構造をとっており、その副溝側にHIRANドメインは位置していた。部位特異的変異体による相互作用解析の結果、Phe-142が二本鎖DNAの結合に重要であり、結晶構造からPhe-142がDNAの巻き戻しに関与していることが示唆された。本研究によってHIRANドメインの新たな機能およびテンプレートスイッチにHIRANドメインがどのように関わるか、それらに関する構造基盤を得ることができた。

2) ZNRANB3

ZNRANB3はN末端側から、ヘリカーゼとして機能するSNF2 ATPaseドメイン、PCNAと総誤差作用するモチーフPIPM、ユビキチン鎖と相互作用するNZFドメイン、DNA結合に結合するHPLドメイン、HNHヌクレアーゼドメイン、PCNAと相互作用するモチーフAPIMから構成される。本研究では、PIPMペプチドとPCNAとの複合体、APIMペプチドとPCNAとの複合体構造に関して、X線結晶構造解析に成功した。残念ながら海外のグループの後塵を拝したが(Sebesta *et al.*, *Nature Commun.*, 2017)、我々は独自にX線結晶構造解析に成功し、その構造からZNRANB3の部位特異的変異体を調製し、詳細な相互作用メカニズムを解明した。APIM-PCNA複合体に関しては、原著論文として発表した(Hara *et al.*, *Acta Cryst. F*, 2018)。PIPM-PCNA複合体に関しては、現在、投稿準備中である。

PCNAと相互作用するモチーフはPIPMが広く知られており(Warbrick, *Bioessays*, 1998)、多くの構造研究からその相互作用メカニズムが明らかになっている。APIMはPIPMとは異なるPCNA相互作用モチーフとして同定されたが(Gilljam *et al.*, *J. Cell Biol.*, 2009)、その相互作用メカニズムは明らかにされていなかった。ZNRANB3由来のAPIMペプチドとPCNAとの複合体の構造解析の結果、予想に反して、APIMはPIPMと同じようにPCNAと相互作用していた(図3)。

結晶構造に基づき、ZNRANB3 の部位特異的変異体を調製し、相互作用解析を行った結果、PCNA と相互作用するためには、ZNRANB3 の Phe-1075、Leu-1076 を介した疎水的なファンデルワールス相互作用が重要であることがわかった (図 4)。また、ZNRANB3 の Ser-1070 は PIPM における保存されたグルタミン (図 3 d における Gln-144) と同様に、PCNA の Q ポケットに結合していたが、その相互作用は PIPM の場合よりも寄与は弱いと考えられる。本研究によって、APIM と PCNA との詳細な相互作用メカニズムが明らかとなり、PCNA の機能を制御するための分子設計に資する構造基盤を得ることができた。

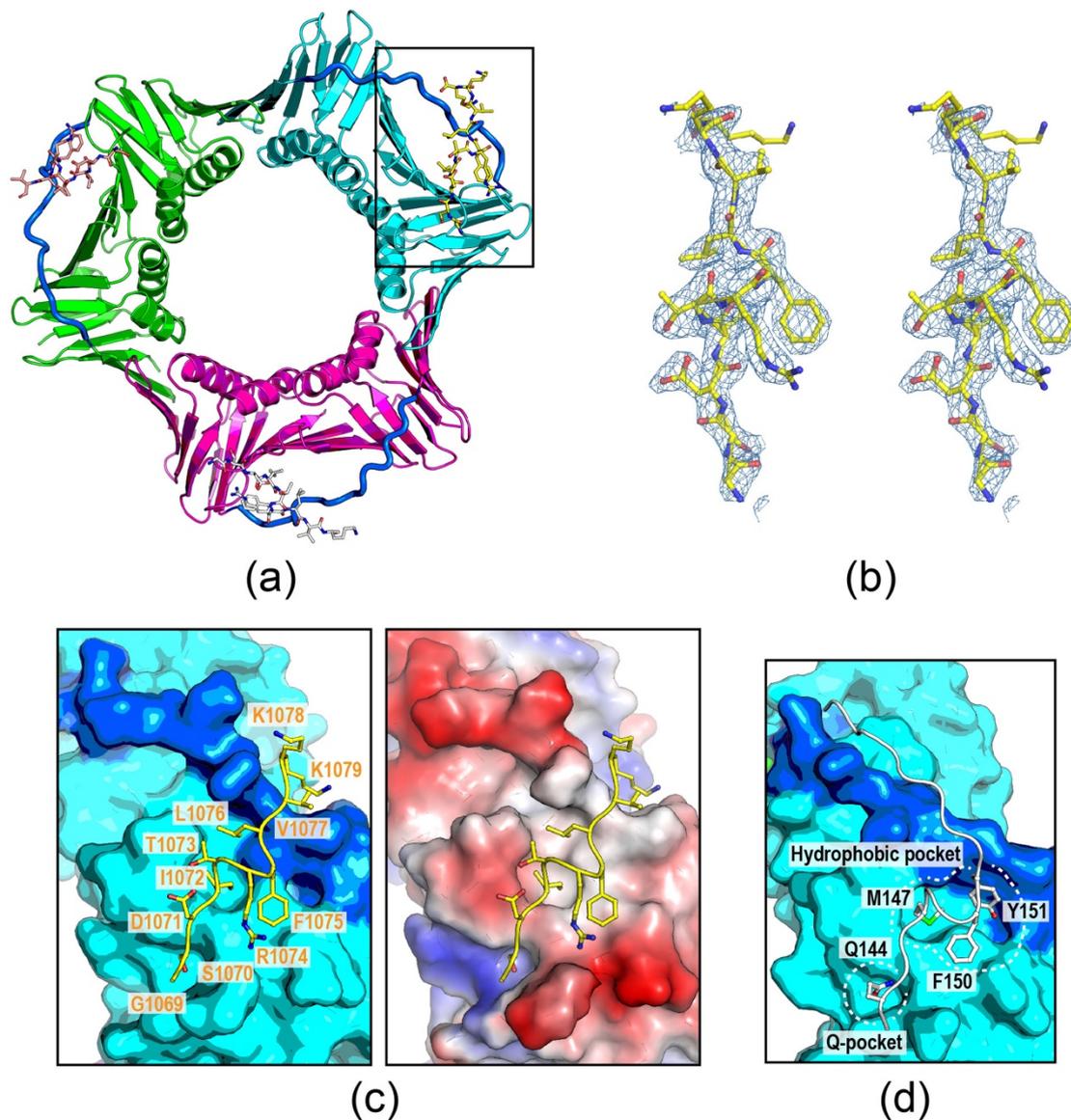


図 3 ZNRANB3 由来 APIM ペプチドと PCNA との複合体構造

- (a) APIM-PCNA 複合体の構造
- (b) PCNA に結合した APIM の電子密度 (ステレオ図)
- (c) APIM ペプチドと PCNA との相互作用
- (d) 比較のために示した PIPM と PCNA との複合体構造

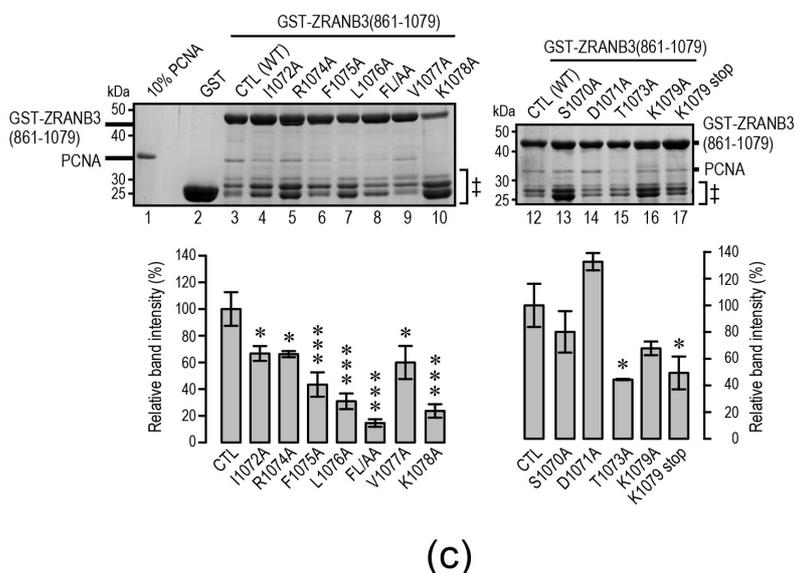
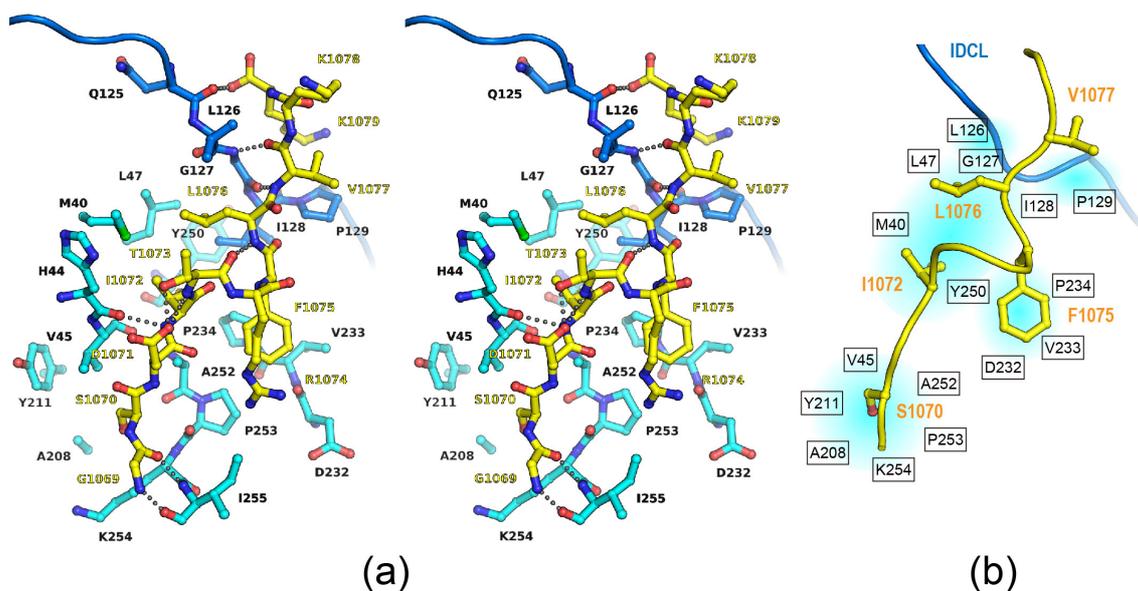


図4 ZRANB3 由来 APIM ペプチドと PCNA との相互作用メカニズム

(a)APIM と PCNA との相互作用 (ステレオ図)

(b)ファンデルワールス相互作用の模式図

(c)ZRANB3 の部位特異的変異体による相互作用解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 14 件)

- ① 菱木麻美、原幸大、橋本博、DNA 損傷トレランスに関わる HIRAN ドメインの結晶構造、日本結晶成長学会誌、45、2019 年
- ② Yuji Masuda, Satoshi Mitsuyuki, Rie Kanao, Asami Hishiki, Hiroshi Hashimoto, Chikashige Masutani, *Nucleic Acid Res.*, **46**, 11340-11356, 2018
- ③ Kodai Hara, Masayuki Uchida, Risa Hideshi Yokoyama, Yoshinobu Ishikawa, Asami Hishiki, Hiroshi Hashimoto, *Acta Cryst. F* **74**, 214-221, 2018
- ④ 橋本博、菱木麻美、原幸大、菊池壮太郎、DNA に傷があっても複製を続けるための分子メカニズム、*生物物理*、**57**、015-019、2017
- ⑤ Hiroshi Hashimoto, Asami Hishiki, Kodai Hara, Sotaro Kikuchi, Structural basis for the molecular interactions in DNA damage tolerance, *Biophys. Physicobiol.*, **12**, 199-205, 2017

〔学会発表〕 (計 77 件)

- ① Hiroshi Hashimoto : Structural study of DNA damage response, 1st International symposium on Interdisciplinary Approaches to Integrative Understanding of Biological Signaling Networks (2019年)
- ② 橋本博 : 複製・修復の足場タンパク質である PCNA の分子間相互作用に関する構造基盤、日本薬学会第 139 年会 (2019 年)
- ③ 松本貴宏、原幸大、田原迫奨太、菱木麻美、石川吉伸、橋本博 : 相同組換えの抑制に関わる PARI の調製と結晶化条件の探索、第 64 回日本薬学会東海支部総会・大会 (2018 年)
- ④ 松本貴宏、原幸大、田原迫奨太、菱木麻美、石川吉伸、橋本博 : 相同組換えの抑制に関わる PARI の調製と結晶化条件の探索、PPF2018 (2018 年)
- ⑤ Kodai Hara, Masayuki Uchida, Risa Tagata, Hideshi Yokoyama, Yoshinobu Ishikawa, Asami Hishiki, Hiroshi Hashimoto : Structure and interaction of PCNA-APIM complex, 3R&3C (2018 年)
- ⑥ Asami Hishiki, Kodai Hara, Yuzu Ikegaya, Hideshi Yokoyama, Yoshinobu Ishikawa, Toshiyuki Shimizu, Mamoru Sato, Hiroshi Hashimoto : Crystal structure of a novel DNA-binding domain of HLTf involved in DNA damage tolerance, 62nd Annual Meeting of Biophysical Society (2018 年)
- ⑦ 橋本博 : DNA 損傷応答に関わるヘリカーゼの DNA 結合ドメインの結晶構造、第 46 回結晶成長学会国内会議 (2017 年)
- ⑧ 原幸大、内田雅之、田形梨紗、横山英志、石川吉伸、菱木麻美、橋本博 : テンプレートスイッチに関わる ZRANB3 の AlkB homolog 2 PCNA-interacting motif (APIM) と PCNA の複合体の構造基盤と相互作用機構の解明、第 24 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ (2017 年)
- ⑨ Kodai Hara, Masayuki Uchida, Risa Tagata, Hideshi Yokoyama, Yoshinobu Ishikawa, Asami Hishiki, Hiroshi Hashimoto : Structure and interaction of PCNA-APIM complex, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017 年)
- ⑩ 内田雅之、原幸大、田形梨紗、横山英志、石川吉伸、菱木麻美、橋本博 : PCNA と APIM の複合体の構造と機能、2017 年度量子ビームサイエンスフェスタ (2018)
- ⑪ 内田雅之、原幸大、田形梨紗、菱木麻美、石川吉伸、横山英志、橋本博 : テンプレートスイッチに関わる ZRANB3 と PCNA の相互作用解析、2016 年度量子ビームサイエンスフェスタ (2017 年)
- ⑫ 内田雅之、原幸大、田形梨紗、菱木麻美、石川吉伸、横山英志、橋本博 : テンプレートスイッチに関わる Zranb3 PIP と PCNA の構造機能解析、第 62 回日本薬学会東海支部総会・大会 (2016 年)
- ⑬ 内田雅之、原幸大、田形梨紗、菱木麻美、石川吉伸、横山英志、橋本博 : テンプレートスイッチに関わる ZRANB3 と PCNA の相互作用解析、日本結晶学会平成 28 年度年会 (2016 年)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 原 幸大

ローマ字氏名 : HARA Kodai

所属研究機関名 : 静岡県立大学

部局名 : 薬学部

職名 : 講師

研究者番号 (8 桁) : 80729343

研究分担者氏名 : 菱木 麻美

ローマ字氏名 : HISHIKI Asami

所属研究機関名 : 静岡県立大学

部局名 : 薬学部

職名 : 助教

研究者番号 (8 桁) : 60571172

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。