

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 5月18日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570114

研究課題名（和文） レプリソームの構築・再編成及び機能制御機構の構造生物学的研究

研究課題名（英文） Molecular architecture and regulation mechanism of replication fork complex revealed by single particle analysis

研究代表者

真柳 浩太（MAYANAGI KOUTA）

九州大学・生体防御医学研究所

研究者番号：50418571

研究成果の概要（和文）：

単粒子解析によって DNA の複製を行う超分子複合体レプリソームで中心的役割を担う DNA ポリメラーゼ-PCNA-DNA 複合体の構造解析を行った。その結果得られた構造は DNA の複製・校正両モードのうち後者の状態に相当することが分かった。また既知の PIP モチーフを介した結合の他に新規の接触部位がポリメラーゼと PCNA の間で見つけることができた。変異体を用いた機能解析、構造解析の結果、この新規の接触はポリメラーゼの活性の制御に関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the three-dimensional structure of the DNA polymerase B (PolB)-PCNA-DNA complex, which is the core components of the replisome, by single particle electron microscopy. Notably, besides the authentic interaction through a PCNA-interacting protein box (PIP-box), a novel contact was found between PolB and PCNA. The obtained molecular architecture of the complex, including the new contacts found in this work, provides clearer insights into the mechanism of switching between the two distinct modes of the complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：可視化・生物物理・電子顕微鏡・ナノバイオ・生体分子

1. 研究開始当初の背景

近年、DNA の複製・修復・組換えに関与する 3R 関連蛋白質の個々の因子に関しては多数の結晶構造が明らかになり、各反応の活性中

心、反応機構についての構造的知見は蓄積されてきている。しかし生体内では、これらの蛋白質は巨大な超分子複合体として DNA に結合しており、反応の各段階で構成因子のリク

ルート及び解離を適宜行うことで適切に複合体を再編成させて、一連の複雑な反応を綿密に制御している。したがって、このシステムの機構を理解するためには、個々の蛋白質の構造のみでは不十分であり、複合体全体の構造解析が必須であるが、一般的にこれら複合体の結晶化が困難であるため、レプリソーム等の実体についての立体構造的知見は乏しいのが現状である。本課題のターゲットである PCNA はリング状の 3 量体を形成し、非常に多数の重要な酵素の PIP (PCNA interacting peptide) モチーフと結合することが知られている。DNA に結合し、同一リングに複数の因子を結合可能なことから、レプリソームの構築、再編、機能制御でキーとなる分子であると考えられている。Fen1 と PCNA の共結晶において、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、且つ Fen1 は柔軟なヒンジにより、全く異なる配向で結合していた。この構造解析を始め一連の研究等から PCNA が複数の因子を DNA の近傍に留め、適宜必要な因子が DNA と相互作用するという機構が提唱されている。

その一方で PCNA は複製以外にも修復、転写、組換え等に関わる多数の因子と結合する事から、因子の解離・結合による機構も必須と考えられる。しかしながら研究開始当初はこのような複製因子と PCNA 及び DNA からなる 3 者複合体に関する知見は申請者等による RFC-PCNA-DNA 複合体と解析が進行中であった DNA リガーゼ-PCNA-DNA 複合体 (Mayanagi et al., PNAS, 2009) のみで、特に結晶構造解析の報告は皆無であり、詳細な機構は全く分かっていなかった。

2. 研究の目的

DNA の複製・修復・組換えは密接に関連した現象であり、その分子機構の解析は、癌等の重篤な疾患に繋がる医学的にも重要な研究課題である。これらの現象には多数の蛋白質因子が関わり、レプリソームやリペアソーム等の巨大な超分子複合体を DNA と共に形成し、綿密な制御を通じてその機能を発揮している。本研究は X 線結晶構造解析のみでは解析が困難な、これら DNA トランスアクションに関わる超分子複合体、特にレプリソームの構造・機能相関を立体構造の観点から理解することを目的とする。中心的な解析手段として、ナノメートル領域の研究に威力を発揮し、生理的条件下で試料の機能的構造を直接可視化できる、電子顕微鏡を用いる。ターゲット蛋白質としては、先ず、複合体の構築・機能制御の上で基盤的役割を果たす DNA クランプ、PCNA に焦点をあてる。即ち、この分子と相互作用する polymerase 等からなる複合体の立体構造解析から手掛け、複合体全体の原子モデルを構築する。このようなアプローチに

よって、より複雑で未知の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。

3. 研究の方法

主たるターゲットとして複製関連因子の基盤分子である PCNA に焦点を当て、まず DNA ポリメラーゼ-PCNA-DNA 等の 3 者複合体の構造解析から着手する。蛋白質は構造解析に適した超好熱古細菌 *Pyrococcus furiosus* 由来のものを発現、ゲル濾過にて精製した。様々な長さの合成 DNA と蛋白質を混合して複合体を再構成した後、ゲル濾過で精製した。複合体の安定性をゲル濾過の結果や電子顕微鏡にて確認した後、複合体の電子顕微鏡像を CCD カメラにて撮影した。電子顕微鏡像から複合体の粒子像を多数抽出し、単粒子解析法にて立体構造を構築した。DNA の単鎖末端はラベルを導入し可視化を試みた。得られた 3 次元マップにポリメラーゼと PCNA の結晶構造や DNA の原子モデルを当てはめた。構築した原子モデルをもとに因子間の相互作用部位を調べ、機能との関連を推察し、変異体の機能解析、構造解析によってこれらの相互作用による制御の機構の考察等を行った。

4. 研究成果

DNA ポリメラーゼ-PCNA-DNA 複合体の立体構造を単粒子解析で得る事に成功した。複合体は 2 層からなり、リング状の PCNA からなる下層の上に、貝殻状のポリメラーゼが蓋をする様に被さっていた。PCNA のリングの中心部には DNA の 2 重鎖に相当する棒状の密度をはっきりと確認することができた。さらに、分解能を向上させることにより、DNA がポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性部位に接触している様子を可視化することに成功した。DNA ポリメラーゼには複製と校正の両モードがあるが、DNA の配向から現在得られている構造は校正モードに相当することを明らかにした。DNA ポリメラーゼと PCNA の間に PIP-box モチーフによる既知の結合の他に隣の PCNA サブユニット上にも第 2 の結合が存在していること、また PIP-box モチーフによる結合の近傍に、ポリメラーゼの複製モードと校正モードの切換えに関与するグルタミン酸 E171 が

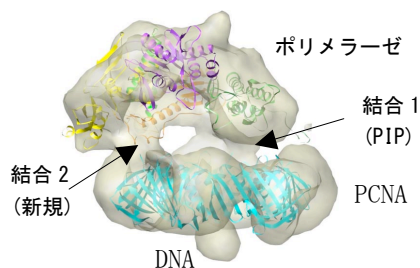


図 1 ポリメラーゼ-PCNA-DNA 複合体の立体構造。既知の PIP を介した結合に加え、新規の結合 2 が見つかった。

保存されていることを明らかにした。

更に第2の結合の位置に隣のPCNAの同じグルタミン酸 E171 が配置されていることが分かった。この第2の結合のポリメラーゼ側のアミノ酸を調べたところ、3つのアルギニンから形成されるクラスターが存在しており、しかもこの様な塩基性残基によるクラスターが、様々なDNAポリメラーゼにおいて頻繁に存在していることが明らかになった。両モード間の切り換えにおいて、隣り合う2つのサブユニット上の同じ E171 が用いられ、第2の結合中ではアルギニンクラスターが重要な役割を担っていることが分かった。この切り換えの機構を更に検証するため、ポリメラーゼのアルギニンクラスターを潰した変異体を用いて複合体の構造解析を行った。その結果、変異により、複合体は著しく構造が不安定化することを明確に示すことに成功し、このアルギニンクラスターが校正モードの構造の安定化に非常に寄与していることを明らかにした。また実際変異体から構成される複合体は著しく exonuclease 活性が損なわれることも示された。以上の結果をまとめ誌上発表を行った (Mayanagi et al., PNAS, 2011)。

更に、polymeraseの校正モードの活性を担うエキソヌクレアーゼ活性部位に変異を入れたpolymeraseからDNA polymerase-PCNA-DNA複合体を再構成し、単粒子解析によって立体構造を得た。これまでSteitz等によってPCNA非存在下において変異型polymeraseとDNAの共結晶が得られており、DNAがexonuclease活性部位からpolymerase活性部位に転移した複製モードの構造が得られていた。しかしながら我々の変異型DNA polymerase-PCNA-DNA複合体の構造は野生型の複合体 (校正モード)の構造と有意な差が確認できなかった。これは我々が新規に明らかにしたpolymeraseとPCNA間の第2の結合に起因し、PCNAを含んだより生理的な構造においては、モード間の切り換えはDNAとポリメラーゼのみでは決まらず、PCNAが従来考えられていたよりも積極的に切り換えの制御に関わっていることを示す。更にこれまでの解析が種に依存せず、一般性をもつことを、*Thermococcus kodakarensis* (Tko)のDNAポリメラーゼ及びPCNAからなる3者複合体を用いて確認した。精製した複合体を電子顕微鏡観察した結果、*Pyrococcus furiosus*の複合体より不安定で、解離したサブユニットや複合体間の凝集が確認できたものの、*Pyrococcus furiosus*の複合体と類似した2次元平均像が得ることができた。

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 11 件)

- ① Naoyuki Kuwabara, Yasuto Murayama, Hiroshi Hashimoto, Yuuichi Kokabu, Mitsunori Ikeguchi, Mamoru Sato, Kouta Mayanagi, Hiroshi Iwasaki and Toshiyuki Shimizu. Mechanistic insights into the activation of the Rad51-mediated strand exchange from the structure of a recombination activator, Swi5-Sfr1 complex. *Structure* 20(3):440-449 (2012). (査読有)
- ② Hiromi Ogino, Sonoko Ishino, Kouta Mayanagi, Gyri Teien Haugland, Nils Kåre Birkeland, Akihiko Yamagishi, Yoshizumi Ishino. The GINS complex from the thermophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum* may function as a homotetramer in DNA replication. *Extremophiles* 15(4):529-539 (2011). (査読有)
- ③ Takuji Oyama, Sonoko Ishino, Seiji Fujino, Hiromi Ogino, Tsuyoshi Shirai, Kouta Mayanagi, Mihoko Saito, Naoko Nagasawa, Yoshizumi Ishino, Kosuke Morikawa. Architectures of archaeal GINS complexes, essential DNA replication initiation factors. *BMC Biol.* 9: 28 (2011). (査読有)
- ④ Kiyohira Ohnishi, Kumiko Nakahira, Satoru Unzai, Kouta Mayanagi, Horoshi Hashimoto, Kentaro Shiraki, Takeshi Honda, Itaru Yanagihara, Relationship between heat-induced fibrillogenicity and hemolytic activity of thermostable direct hemolysin and a related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* *FEMS MicroBiol Lett.* 318(1):10-17 (2011). (査読有)
- ⑤ Kouta Mayanagi, Shinichi Kiyonari, Hirokazu Nishida, Mihoko Saito, Daisuke Kohda, Yoshizumi Ishino, Tsuyoshi Shirai, Kosuke Morikawa, Architecture of the DNA polymerase B-proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-DNA ternary complex. *PNAS*, 108, 1845-1849 (2011) (査読有)
- ⑥ Itaru Yanagihara, Kumiko Nakahira,

- Tsutomu Yamane, Shuji Kaieda, Kouta Mayanagi, Daizo Hamada, Takashi Fukui, Kiyohisa Ohnishi, Shin'ichiro Kajiyama, Toshiyuki Shimizu, Mamoru Sato, Takahisa Ikegami, Mitsunori Ikeguchi, Takeshi Honda, Hiroshi Hashimoto. Structure and functional characterization of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin (TDH). *J Biol Chem*. 285(21):16267-74 (2010) (査読有)
- ⑦ 西田洋一, 真柳浩太, 石野良純, 森川 耿助: DNA クランプ/複製 DNA ポリメラーゼ複合体における DNA 合成・修正スイッチング機構. 日本結晶学会誌, 52, 201-207 (2010) (査読有)
- ⑧ Masayuki Oda, Susumu Uchiyama, Masanori Noda, Yoshinori Nishi, Maiko Koga, Kouta Mayanagi, Carol V. Robinson, Kiichi Fukui, Yuji Kobayashi, Kosuke Morikawa, and Takachika Azuma. Effects of antibody affinity and antigen valence on molecular forms of immune complexes. *Molecular Immunology*, 47, 357-364 (2009). (査読有)
- ⑨ Hirokazu Nishida, Kouta Mayanagi, Shinich Kiyonari, Yuichi Sato, Takuji Oyama, Yoshizumi Ishino, Kosuke Morikawa. Structural determinant for switching between the polymerase and exonuclease modes in the PCNA-replicative DNA polymerase complex. *PNAS*, 106, 20693-20698 (2009). (査読有)
- ⑩ Kouta Mayanagi, Shinichi Kiyonari, Mihoko Saito, Tsuyoshi Shirai, Yoshizumi Ishino, Kosuke Morikawa, Mechanism of replication machinery assembly as revealed by the DNA ligase-PCNA-DNA complex architecture. *PNAS*, 106, 4647-4652 (2009). (査読有)
- ⑪ Takuji Oyama, Hayato Oka, Kouta Mayanagi, Tsuyoshi Shirai, Kyoko Matoba, Ryosuke Fujikane, Yoshizumi Ishino, Kosuke Morikawa, Atomic structures and functional implications of the archaeal RecQ-like helicase Hjm, *BMC Structural Biology*, 9, 2 (2009). (査読有)
- [学会発表] (計 26 件)
1. Shinji Aramaki, Kazuaki Aoyama, Kouta Mayanagi, Takuo Yasunaga, 3D ultrastructure within intact cells explored by electron cryo-tomography in TEM and STEM, The 10th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC10), (2012, 2/5-9) Perth, Australia
 2. 真柳浩太, 清成信一, 西田洋一, 齊藤美保子, 神田大輔, 石野良純, 白井剛, 森川耿右, 電子顕微鏡単粒子解析による複製因子の切換機構の研究, 第34回日本分子生物学会年会, (2011, 12/13-16) 横浜
 3. Hiromi Ogino, Sonoko Ishino, Kouta Mayanagi, Gyri Teien Haugland, Nils-Kare Birkeland, Akihiko Yamagishi and Yoshizumi Ishino, The GINS complex from the thermoacidophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum* may function as a homotetramer in DNA replication, 第 34 回日本分子生物学会年会, (2011, 12/13-16) 横浜
 4. 荒牧 慎二, 青山 一弘, 真柳 浩太, 安永 卓生, TEM 及びSTEM を用いたクライオ電子線トモグラフィーによる神経細胞の超微細構造観察, 2011年日本生物物理学会九州支部例会, (2011, 12/4) 飯塚
 5. Kouta Mayanagi, Molecular architecture and switching mechanism of DNA replication fork, *Structural Biology & DNA Repair*, (2011, 10/16-18) Amsterdam, The Netherlands
 6. 金 明月, 柳澤 春明, 小屋迫 光太郎, 神谷律, 真柳 浩太, 安永 卓生, クライオ電子線トモグラフィーによる遺伝的な重金属でラベルしたLC4の検出, 第49回日本生物物理学会年会, (2011, 9/16-18) 姫路
 7. 荒牧 慎二, 青山 一弘, 真柳 浩太, 安永 卓生, 電子線クライオトモグラフィー法による神経細胞NG108-15の超微細構造観察, 第49回日本生物物理学会年会, (2011, 9/16-18) 姫路
 8. 真柳 浩太, 清成 信一, 西田 洋一, 齊藤 美保子, 神田 大輔, 石野 良純, 白井 剛, 森川 耿右, 単粒子解析によるDNA 複製の制御機構の研究, 第11回日本蛋白質科学会年会, (2011,

6/7-9)大阪

9. 桑原 直之, 橋本 博, 小甲 裕一, 池口 満徳, 佐藤 衛, 真柳 浩太, 村山 泰人, 岩崎 博史, 清水 敏之, 相同組換えに関わる Swi5-Sfr1 複合体の構造機能解析, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, (2011, 6/7-9) 大阪
10. 藤野誠司, 石野園子, 井田梨沙, 尾木野弘実, 富田宏矢, 金井保, 跡見晴幸, 真柳 浩太, 大山 拓次, 森川 耿右, 石野 良純, 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* の複製フォーク複合体解明に向けての MCM, GINS 複合体解析, 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会, (2010, 12/7-10) 神戸
11. 尾木野弘実, 石野園子, 真柳浩太, Nils-Kare Birkeland, 山岸明彦, 石野良純, Homotetrameric GINS from the thermoacidophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*, 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会, (2010, 12/7-10) 神戸
12. 中尾祐士, 服部淳子, 原唯史, 山口浩輝, 郷田秀一郎, 真柳浩太, 神田大輔, 角田佳充, 木村誠, 超好熱古細菌リボヌクレアーゼ P の高次構造解析を目指した再構成酵素の精製, 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会, (2010, 12/7-10) 神戸
13. 桑原直之, 橋本博, 小甲裕一, 池口満徳, 佐藤衛, 真柳浩太, 村山泰斗, 岩崎博史, 清水敏之, 相同組換えに関わる Swi5-Sfr1 複合体の構造機能解析, 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会, (2010, 12/7-10) 神戸
14. 真柳浩太, 西田洋一, 清成信一, 齊藤美保子, 神田大輔, 石野良純, 白井剛, 森川耿右, 電子顕微鏡単粒子解析による複製関連複合体の反応制御機構の研究, 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会, (2010, 12/7-10) 神戸
15. Mayanagi K, Saito M, Oyama T, Ishino Y, Shirai T, Modeling of 3R complexes from structure database, 日本生物物理学会 第 48 回年会, (2010, 9/20-22) 仙台
16. 井倉真由美, 真柳浩太, 神田大輔, 大腸菌膜に発現させた Asn 結合型糖鎖修飾を決定するオリゴ糖転移酵素の精製と結晶化, 第 10 回日本蛋白質科学会年会, (2010, 6/16-18) 札幌
17. 真柳浩太, 西田洋一, 清成信一, 神田大輔, 白井剛, 石野良純, 森川耿右, DNA Pol-PCNA-DNA 複合体の電子顕微鏡単粒子解析, 第 10 回日本蛋白質科学会年会, (2010, 6/16-18) 札幌
18. 真柳浩太, 清成信一, 齊藤美保子, 白井剛, 石野良純, 森川耿右, The switching mechanism of replication factors as revealed by the molecular architecture of the DNA ligase-PCNA-DNA complex, 第 32 回日本分子生物学会年会, (2009, 12/9) 横浜
19. 真柳浩太, 単粒子解析による DNA 複製関連複合体の構造研究, 第 51 回日本顕微鏡学会 九州支部総会・学術講演会, (2009, 12/5) 北九州
20. 真柳浩太, 複製関連超分子複合体の電子顕微鏡単粒子解析, 第 19 回 WS フォーラム -タンパク質・ペプチド研究の現状と展望, (2009, 11/27) 福岡
21. Kouta Mayanagi, Hirokazu Nishida, Yoshizumi Ishino, and Kosuke Morikawa, Mechanism of replication machinery assembly as revealed by the single particle analysis of DNA ligase-PCNA-DNA complex, Gordon Research Conferences on Three Dimensional Electron microscopy, (2009, 6/28) Colby-Sawyer College, 米国
22. 真柳浩太, 清成信一, 齊藤美保子, 白井剛, 石野良純, 森川耿右, DNA ligase-PCNA-DNA 複合体の単粒子解析, 第 9 回日本蛋白質科学会年会, (2009, 5/20-22) 熊本
23. 大山託次, 真柳浩太, 白井剛, 藤兼亮輔, 石野良純, 森川耿右, RecQ に関連する古細菌由来 Hjm ヘリカーゼの結晶構造とその機能, 第 9 回日本蛋白質科学会年会, (2009, 5/20-22) 熊本
24. 西田洋一, 真柳浩太, 清成信一, 石野良純, 森川耿右, DNA 複製ポリメラーゼの複製⇔校正モード変換の分子基盤, 第 9 回日本蛋白質科学会年会, (2009, 5/20-22) 熊本
25. 井倉真由美, 真柳浩太, ニレンダ ジ

エイムス，神田大輔，大腸菌膜に発現させたオリゴ糖転移酵素の精製と結晶化，第9回日本蛋白質科学会年会，（2009，5/20-22）熊本

26. 宮城篤，津中康央，内橋貴之，真柳浩太，広瀬進，西野達哉，安藤敏夫，森川耿右，高速 AFM による蛋白質天然変性領域の観察，第9回日本蛋白質科学会年会，（2009，5/20-22）熊本

〔図書〕（計1件）

真柳浩太，廣明秀一，白井 剛，7章 構造決定法、タンパク質の立体構造入門 藤博幸編（講談社）（2010）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔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

なし

(3) 連携研究者

石野 良純 (ISHINO YOSHIKAZUMI)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：30346837