

令和元年5月31日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K16128

研究課題名(和文) DNA相同組換えにおけるDNAクランプの酵素反応制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of DNA clamp reactions involved in DNA recombination

研究代表者

河合 聡人 (Kawai, Akito)

藤田医科大学・医学部・助教

研究者番号：20435150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、構造生物学的な手法を用いて、四量体型DNAクランプによってstoHjmやstoHjcの酵素活性が制御される仕組みを明らかにすることを目的に研究を行った。stoHjc、stoHjm、四量体型DNAクランプの大量調製系を確立し、stoHjc-四量体型DNAクランプ複合体、stoHjc-四量体型DNAクランプ-ホリデイ構造複合体およびstoHjmの結晶化条件を検討した。また得られた結晶はX線回折実験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではこれまで不明であった四量体型DNAクランプの機能を解明するため研究を進め、立体構造が未知であるstoHjc-四量体型DNAクランプ-ホリデイ構造複合体の構造解析へとつながる結晶化条件の発見に至った。今後、さらに研究を進めることで四量体型DNAクランプの機能解明を行い、この四量体型DNAクランプの機能を利用してDNA修復の正確性、効率を向上につながるアイデアを生み出したい。

研究成果の概要(英文)：In this research, we have carried out structural study of heterotetrameric DNA clamp complexed with holliday junction resolvase stoHjc and RecQ-like DNA helicase stoHjm. stoHjc, stoHjm, and heterotetrameric DNA clamp were overexpressed in *E. coli* and purified over 98% for the crystallization. The stoHjc-heterotetrameric DNA clamp complex was prepared by mixing each protein solution and purified using a gel filtration column chromatography. After performing the crystallization screenings and the modification of the crystallization conditions, we obtained the crystals of the stoHjc-heterotetrameric DNA clamp complex, stoHjc-heterotetrameric DNA clamp-holliday junction complex, and stoHjm, and carried out X-ray diffraction experiments using the synchrotron radiation at Photon Factory and SPring-8.

研究分野：構造生物学

キーワード：タンパク質の結晶化 X線結晶構造解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA 複製や修復時には、様々な酵素が次々と順序良く DNA に作用することで一連の酵素反応が実施されている。ここで、酵素反応の足場となり、円滑な反応を進行させる重要な因子として DNA クランプの存在が注目されている。古細菌 *Sulfolobus tokodaii* の DNA クランプである *stoPCNAs* は、ゲノム中に三種類の遺伝子 (*stoPCNA1*、*stoPCNA2*、*stoPCNA3*) がコードされていて、これらが 1 分子ずつ集まり、ヘテロ三量体 (*stoPCNA123*) を形成することで、DNA クランプとしての役割を果たす。加えて、DNA クランプは、この *stoPCNA123* だけでなく、*stoPCNA2-stoPCNA3* 複合体といった二種類の分子のみで構成される DNA クランプの存在も確認されている。申請者は、これまでに実施した構造生物学的な研究で、*stoPCNA123* は三量体型、*stoPCNA2-stoPCNA3* 複合体は四量体型 DNA クランプとして存在し、四量体型では DNA と相互作用する中心の空洞部分の大きさが DNA 二組分に相当することを明らかにした。そして、この大きさの違いに注目し、三量体型は一組の DNA 鎖上での酵素反応に、四量体型は二組の DNA 鎖上での酵素反応に関与するという、DNA クランプの役割の違いを提案してきた (*J. Struct. Biol.*, 2011, *Acta Crystallogr. Sect. F*, 2009)。そこで、二組の DNA が交差した特殊な DNA 構造 (ホリデイ構造) の形成を伴う DNA 相同組換え機構に四量体型 DNA クランプが関与するのではないかと考えた。

DNA 相同組換え機構は、類似した塩基配列をもつ DNA 鎖が交換、またはコピーされる現象で、放射線などによる DNA 損傷の中で最も危険度が高い DNA 二重鎖切断を、修復する手段として利用されている。この DNA 相同組換え機構は、二組の DNA 鎖のうち、片方がヌクレアーゼによって一本鎖にされ、もう一方の相補的な DNA 鎖に組み込まれることで、ホリデイ構造が形成される。そして次に、ホリデイ構造の位置が移動され、最終的にホリデイ構造が切断されることで、修復された二組の DNA 鎖が生成される。本研究では、ホリデイ構造が形成された後、その位置が移動し、切断されるまでの酵素反応に注目する。この場面では、ホリデイ構造の移動は *stoHjm* ヘリカーゼが行い、その後、*stoHjc* リゾルバーゼによってホリデイ構造が切断される。そして、*stoHjm* の活性は、DNA クランプや *stoHjc* によって抑制され、次の反応を担う *stoHjc* の活性は、DNA クランプによって増強されるという、一連の酵素反応の分子メカニズムが示唆されている (*BBRC*, 2008; *DNA repair*, 2012)。さらに、*stoHjc* では、*stoPCNA2-stoPCNA3* 複合体の共存下で活性が最も増強されることも報告されていた。

2. 研究の目的

上述の背景に記した知見に *stoPCNA2-stoPCNA3* 複合体が四量体型 DNA クランプであることを加え考察すると、四量体型 DNA クランプが中心の空洞部分でホリデイ構造を捕まえることで、動きの多いホリデイ構造は固定される。そして、このホリデイ構造の固定がそれぞれの酵素反応を制御することに繋がっているのではないかと考えられた。しかし、四量体型 DNA クランプがどのような機序で酵素反応に寄与しているのか? という四量体型 DNA クランプの動作機序については未だ解明されていない。そこで、本研究では、生化学的・構造生物学的な手法を用いて、四量体型 DNA クランプによって *stoHjm* や *stoHjc* の酵素活性が制御される仕組みを明らかにすることを目的とした。そして、X線結晶構造解析により *stoHjc*-四量体型 DNA クランプ-ホリデイ構造複合体および *stoHjm* 立体構造を解明するため、それぞれのタンパク質複合体の結晶化条件の検討、X線回折実験を行った。

3. 研究の方法

(1) タンパク質、ホリデイ構造の調製

各タンパク質は大腸菌を用いた大量発現系を利用して調製し、熱処理、硫酸アンモニウム沈殿、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの手法を組み合わせ高純度に精製した。結晶化に使用する DNA は、外部委託により化学合成した後 HPLC 精製されたもの購入した。この購入した DNA を STE 溶液で溶解し、それぞれの DNA 鎖を混ぜた後、Thermal cycler を用いて 95°C からゆっくりと室温まで温度を下げることでホリデイ構造を形成した DNA を調製した。

(2) 各種タンパク質および DNA 複合体の結晶化

結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて行い、スクリーニングには Hampton Research 社の結晶化スクリーニングキット (Index, Crystal Screen, Crystal Screen 2, Salt Rx) 及び Qiagen 社の結晶化スクリーニングキット (JCSG+, Protein Complex) を使用した。

(3) X線回折実験

得られた結晶はグリセロール、エチレングリコール、スクロースやトレハロースなど不凍剤の入った溶液中に浸し、-173°C の窒素ストリーム中または液体窒素中で急速凍結させた。この凍結した結晶をドライシッパー中に保存して、放射光実験施設 Photon Factory BL-17A または SPring-8 BL44XU へ運び、X線回折実験を行った。波長 0.98 Å (Photon Factory BL-17A) または 0.90 Å (SPring-8 BL44XU) の X線、各ビームラインに設置されている

検出器などの機器を用いて X 線回折実験を行った。得られた回折データは目視で回折点を観察した後、構造解析に使えると判断したデータはプログラム HKL2000 またはプログラム XDS を用いて処理した。

4. 研究成果

(1) *stoHjc*-四量体型 DNA クランプ複合体の結晶化、X 線回折実験

精製した *stoHjc* と四量体型 DNA クランプの複合体を用いて、結晶化条件を探索した。その結果、図 1 左に示すような結晶が得られた。この結晶を再度、水に溶解し、SDS-PAGE で結晶に含まれる分子を分離してみると、*stoHjc*、四量体型 DNA クランプに対応する 3 つのバンドが観察された (図 1 右)。この結果から得られた結晶は目的の *stoHjc*-四量体型 DNA クランプ複合体の結晶であることが確認できた。そこで、得られた結晶を用いて Photon Factory BL-17A で X 線回折実験を行ったところ、最大でも 7 Å 程度までしか回折点が観察されなかった。その後、結晶の凍結条件を検討するなど、X 線回折実験条件の最適化を試みたが結晶の回折能を改善することができず、構造解析ができるほどのデータを得ることはできなかった。



図 1 *stoHjc*-四量体型 DNA クランプ複合体の(左)結晶(右)結晶を溶かし泳動した SDS-PAGE

(2) *stoHjc*-四量体型 DNA クランプ-ホリデイ構造複合体の結晶化、X 線回折実験

上述の *stoHjc*-四量体型 DNA クランプ複合体の溶液に化学合成したホリデイ構造を形成した DNA を混ぜ、*stoHjc*-四量体型 DNA クランプ-ホリデイ構造複合体溶液を調製した。この溶液を用いて結晶化条件を探索したところ、図 2 左のような結晶が得られた。この結晶を用いて Photon Factory BL-17A で X 線回折実験を行ったところ、広角まで回折点が観察される面とそうではない面があり、異方性の強い結晶であることがわかった。この結晶について、X 線回折データも収集してみたが異方性のため統計値が悪く、構造解析が可能なデータを取得することはできなかった。そこで、ホリデイ構造を形成する DNA 鎖の設計を変え、DNA 鎖の長さが異なるホリデイ構造を準備し、再度結晶化スクリーニングを行ったところ、図 2 右に示すような結晶が得られた。この結晶を用いて SPring-8 BL44XU で X 線回折実験を行ったところ、最大分解能 3 Å 程度の X 線回折データを収集することに成功した。現在、このデータを用いて構造解析を進めている。



図 2 *stoHjc*-四量体型 DNA クランプ-ホリデイ構造複合体の結晶

(3) *stoHjm* の精製方法の検討、結晶化、X 線回折実験

本課題の申請時に精製できたと考えていた方法では、核酸成分の除去が不十分であり、それが原因で *stoHjm* が凝集体を形成していることが明らかになった。そこで、スペルミジンやポリエチレンジアミンを用いて核酸成分を除去する方法について検討した。まず、スペルミジンやポリエチレンジアミンをタンパク質溶液へ加えることで核酸成分を沈殿させた。この沈殿を遠心分離によって除いた後、溶液中に残存するスペルミジンやポリエチレンジアミンを除くため、硫酸アンモニウム沈殿によりタンパク質成分だけを沈殿させた。遠心分離によりタンパク質成分である沈殿物だけを回収し、この沈殿物に緩衝液を加え再溶解させ、透析により塩類を完全に除去した後、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。その結果、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー後のクロマトチャート上を観察すると、*stoHjm* が含まれるフラクションには核酸の存在を示す 260 nm の吸収が未だ強く観察された。よって、スペルミジンやポリエチレンジアミンを用いた沈殿では完全に核酸を除去することができないことが明らかになった。次に、Blue カラムクロマトグラフィーを用いた核酸の除去を試みた。Blue カラムクロマトグラフィー後のクロマトチャートでは *stoHjm* が含まれるフラクションに核酸の存在を示す 260 nm の吸収が十分に低くなっていることが確認できた。よって、*stoHjm* の核酸成分の除去には Blue カラムクロマトグラフィーが有効であることがわかった。この精製した *stoHjm* を用いて、結晶化スクリーニングを行ったところクラスター状の微結晶が得られ、条件を最適化した結果、図 3 のような結晶が得られた。この結晶を用いて Photon Factory BL-17A で X 線回折実験を行ったが、回折点を確認することができなかった。これは得られた結晶が X 線回折実験に十分な大きさではなかったことが原因であると考え、結晶が大きくなるような結晶化条件の探索を継続して行っている。



図 3 *stoHjm* の結晶

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

- ① Kawai A, Higuchi S, Tsunoda M, Nakamura KT, Yamagata Y, Miyamoto S, Crystal structure of family 4 uracil-DNA glycosylase from *Sulfolobus tokodaii* and a function of tyrosine 170 in DNA binding., FEBS letters, 査読有, 589, 2015, 2675-2682, DOI: 10.1016/j.febslet.2015.08.019

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 河合 聡人, 吉田 紀生, 中村 照也, 下野 和実, 山縣 ゆり子, 宮本 秀一, ファミリー4 ウラシル DNA グリコシラーゼによる酵素触媒機構の解明, 第 18 回 日本蛋白質科学会 年会 (新潟), 2018 年
- ② 河合 聡人, 中村 照也, 下野 和実, 山縣 ゆり子, 宮本 秀一, ファミリー4 ウラシル DNA グリコシラーゼ-DNA 複合体の結晶構造解析, 第 55 回 日本生物物理学会 年会 (熊本) 2017 年
- ③ 河合 聡人, 中村 照也, 山縣 ゆり子, 宮本 秀一, ファミリー4 ウラシル DNA グリコシラーゼ-DNA 複合体の立体構造に基づく酵素反応機構の解明, 2016 年度量子ビームサイエンスフェスタ (つくば) 2017 年
- ④ 河合 聡人, 中村 照也, 山縣 ゆり子, 宮本 秀一, ファミリー4 ウラシル DNA グリコシラーゼと DNA の複合体構造解析, 2015 年度量子ビームサイエンスフェスタ (つくば) 2016 年
- ⑤ 河合 聡人, 中村 照也, 山縣 ゆり子, 宮本 秀一, ファミリー4 ウラシル DNA グリコシラーゼによる DNA 認識機構の解明, 第 15 回 日本蛋白質科学会 年会 (徳島) 2015 年

〔図書〕（計 0 件）

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

なし

○取得状況（計 0 件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/~microb/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

※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。