

令和元年5月31日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06935

研究課題名(和文) PCNAアンローディングをミスマッチ修復機構が制御するメカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms that the eukaryotic mismatch repair system regulates PCNA unloading

研究代表者

河添 好孝 (Kawasoe, Yoshitaka)

九州大学・理学研究院・学術研究員

研究者番号：60805422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：複製クランプPCNAは、DNA複製や修復など様々な反応の足場となる必須因子である。PCNAのDNAからのアンローディングはDNA合成エラーを修復するミスマッチ修復機構によっても制御を受ける。本研究では、ツメガエル卵抽出液や精製タンパク質を用いた試験管内再構成系を利用して、Elg1の免疫除去によってPCNAアンローディングが著しく遅延すること、精製Elg1-RFCのみではPCNAをアンロードできないことを明らかにした。このことから、卵抽出液においてElg1-RFCがPCNAをアンロードしていること、Elg1-RFCによるPCNAアンローディングに未知の因子による機能制御がある可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PCNAのDNA上でのローディングやアンローディングは、PCNAを足場する様々な反応を協調的に機能させ、ゲノムを安定に維持するために非常に厳密に制御される必要がある。実際に酵母ではElg1の欠失によって突然変異や染色体再編の頻度が上昇し、哺乳類においても多くの臓器での腫瘍形成が報告されている。PCNAアンローディング反応のみに着目した申請者独自の生化学的解析によって得られた本成果は、生化学的な知見が乏しいアンローディング過程の理解を深め、PCNAのDNA上での挙動制御の理解が進むだけでなく、人工的な変異導入法、がんや遺伝病などの原因解明、創薬のターゲットの応用へと繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：The replication clamp PCNA is essential for various reactions coupled with DNA replication. PCNA is loaded onto DNA by clamp loader complexes, and DNA-loaded PCNA functions as a platform for numerous factors involved in DNA replication and repair. We previously found that the unloading of PCNA is regulated by the mismatch recognition complex MutS. In this study, we examined the dynamics of PCNA unloading in *Xenopus* egg extracts and a reconstitution system with purified proteins. Our results indicate that the Elg1-RFC complex unloads PCNA in *Xenopus* egg extracts and suggest a possibility that an additional factor(s) is involved in the Elg1-RFC-mediated PCNA unloading reaction.

研究分野：分子遺伝学、生化学

キーワード：PCNA ミスマッチ修復 DNA複製 ツメガエル卵抽出液 クランプローダー

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA 複製の正確性の維持には、正確な DNA 合成に加え、DNA 損傷に応じた修復などの様々な反応が適切なタイミングで機能することが重要である。複製クランプ PCNA は DNA 複製・修復因子の足場として機能する DNA 複製に必須の因子である。PCNA は DNA 複製の際に DNA にロードされ、DNA 複製や修復、クロマチン形成などの様々な反応を統制し、DNA 複製完了後に DNA からアンロードされる。

(2) PCNA の DNA へのローディングやアンローディングはクランプローダー複合体によって制御される。真核生物には、Rfc2-5 複合体を共有するが、大サブユニットがそれぞれ異なる 3 種類のクランプローダー複合体が存在する。PCNA の DNA 上へのローディングには RFC 複合体や Ctf18-Rfc2-5 複合体 (Ctf18-RFC) が機能する。一方で近年の解析から Elg1-RFC 複合体が PCNA をアンロードすると考えられている (Kubota et al., 2013, Lee et al., 2013, Shiomi and Nishitani, 2013)。しかしながら、Elg1 は生存に必須な因子ではなく、Elg1 を欠失させても PCNA は最終的にクロマチンから解離するため、Elg1-RFC が生体内における唯一の PCNA アンローダーであるかは分かっていない。また、ローダーとして考えられている RFC や Ctf18-RFC も試験管内で PCNA アンローディング活性を示す (Yao et al., 1996, Bylund and Burgers, 2005)。しかしながら、これらの活性の生体内における寄与は明らかではなかった。この問題が解決していない理由の一つは、PCNA ローダーを欠失させると PCNA ローディングにも影響が出るために解析が難しいことにある。

(3) PCNA はミスマッチ修復 (MMR) 機構による DNA 合成エラー修復においても中心的な役割を果たす。申請者はこれまでに、ミスマッチを認識する MutS α 複合体が PCNA との相互作用を介して PCNA アンローディングを阻害することを発見していた (Kawasoe et al., 2016)。しかしながら、クランプローダーが PCNA をアンロードするどのステップを、MMR 因子が阻害しているのかは分かっていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、MMR 機構による PCNA アンローディング過程の制御メカニズムを明らかにするために、大きく 2 つの目的を定めた。1 つ目は、生体内での PCNA アンローディングに対するクランプローダー複合体の活性制御メカニズムを明らかにすることである。2 つ目は、MMR 因子による PCNA アンローディング反応の阻害メカニズムの解明である。

(2) これらの目的の達成のために、まず、RFC や Ctf18-RFC の PCNA アンローディングに対する寄与を明らかにすることを目指した。さらに、MMR 因子が PCNA アンローディングのどのステップを阻害しているのか、具体的には PCNA とアンローダーとの相互作用やアンローダーが PCNA リングを開く過程に着目して、2 つ目の目的を達成することを研究目標とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、生理的な経路での DNA 合成エラー修復や、DNA 複製に伴った PCNA ローディング・アンローディング反応を試験管内で再現するツメガエル卵核質抽出液 (NPE) を PCNA アンローディングの解析系として用いた。また、クランプローダーの PCNA ローディング活性とアンローディング活性を独立に解析するために、PCNA がロードされた閉環状プラスミドを用いた。その作成には既に構築済みの以下の方法を利用した (Kawasoe et al., 2016)。特定の一箇所にビオチン化修飾をもたせたプラスミドを試験管内合成した。PCNA のローディングポイントとして、試験管内合成したプラスミドにニッキング酵素を用いて特定の一箇所に nick を導入した。その後、ビオチンを介してセファロースビーズに結合させることで DNA ビーズを得た。その DNA ビーズに精製ヒト PCNA、RFC を用いて PCNA を DNA にロードした後、ライゲーションを行い、非特異的に結合したタンパク質を洗い落とすことで、PCNA のロードされた閉環状プラスミドを作成した。DNA 上にロードした PCNA は、ヒト PCNA 特異的な抗体を用いて検出し、DNA 上の PCNA の結合数をもとに、ロードした PCNA がアンロードされる過程を NPE もしくは試験管内再構成系内で経時的に解析した。

(2) RFC や Ctf18-RFC の生体内における PCNA アンローディングに対する寄与を解析するため、それぞれのクランプローダーに特異的な大サブユニットに対する抗体を作成した。その抗体を用いて NPE から免疫除去を行い、クランプローダー除去 NPE 中での PCNA アンローディングを解析した。

(3) MMR 因子 MutS α が PCNA アンローディングのどのステップを阻害しているのか明らかに

するため、Elg1-RFC による PCNA アンローディング反応の試験管内再構成に取り組んだ。そのため、ヒト細胞発現系を用いてヒト Elg1-RFC を発現させ、精製した。精製した Elg1-RFC、PCNA がロードされたプラスミドを用いて、PCNA が DNA からアンロードされる過程の再構成を試みた。Elg1-RFC による PCNA アンローディング反応の試験管内再構成が完了した後は、MutSa の PCNA との相互作用に必要な領域の周辺領域や ATP アナログなどを加えて、PCNA アンローディングが MutSa によって阻害されるステップの探索を予定した。

4. 研究成果

(1) NPE からそれぞれのクランプローダーの特異的な大サブユニット Rfc1、Ctf18、Elg1 に対する抗体を用いて免疫除去を行った。さらに、NPE 中に存在するすべてのクランプローダーを免疫除去するために共通のサブユニットである Rfc3 に対する抗体を用いて同様に免疫除去操作を行った。それぞれの NPE に PCNA をロードしたプラスミドを加え、DNA 上の PCNA の結合数を解析した。Rfc3 除去 NPE 中での DNA 上の PCNA の解離キネティクスは、バッファー中での PCNA の解離キネティクスとほぼ一致していたことから、NPE 中の PCNA アンローディングはクランプローダーに大きく依存していることがわかった (図 1)。さらに、NPE から Elg1 を免疫除去するだけでも PCNA アンローディングは大きく遅延した。一方で、Rfc1 や Ctf18 の免疫除去は PCNA アンローディングに影響を与えなかった。以上の結果から、Elg1-RFC がツメガエル卵抽出液中での主たる PCNA アンローダーであると示唆された。

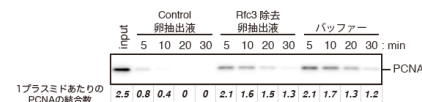


図 1 : Control では速やかにプラスミドから PCNA が解離したが、Rfc3 を免疫除去することによって大きく遅延した。Rfc3 除去によって遅延した PCNA のアンローディングのパターンは、バッファー中でプラスミドを反応させた場合とほぼ同じであったことから、卵抽出液中の PCNA アンローディングがクランプローダーに大きく依存していると考えられる。

(2) Elg1-RFC による PCNA アンローディング反応を試験管内再構成するため、ヒト細胞発現系を用いてヒト Elg1-RFC の発現を行った。Elg1 の C 末端に精製に用いるための FLAG タグを挿入した。ELG1-FLAG、RFC2、RFC3、RFC4、RFC5 それぞれの遺伝子が組み込まれた 5 種類のプラスミドをすべてヒト 293T 細胞にトランスフォーメーションし、Elg1-RFC 複合体のサブユニットを共発現した。この抽出液から、抗 FLAG 抗体カラムを用いてヒト Elg1-RFC を粗精製した。Elg1-RFC の PCNA アンローディング活性には、Elg1 の ATP 加水分解ドメインに存在する 1138 番目のリジン残基が重要であることが報告されている (Lee et al., 2013)。その部位の変異体 Elg1^{K1138E}-RFC の精製も同様の方法で行った。現段階では、抗 FLAG 抗体カラムを用いた 1 段階の精製までしか行えていないため、さらなる精製と生化学的解析が今後の課題である。

(3) Elg1-RFC が精製できたので、卵抽出液を用いて Elg1-RFC の PCNA アンローディング活性を解析した。卵抽出液から Elg1 に対する抗体を用いて免疫除去を行った後、粗精製 Elg1-RFC を加え戻すと、Elg1 除去によって遅延した PCNA アンローディング反応は回復した。一方で、Elg1^{K1138E}-RFC 変異体を Elg1 除去卵抽出液に加えても、PCNA アンローディング反応は遅延したままであった。したがって、Elg1 の ATPase 活性は Elg1-RFC の PCNA アンローディング活性に重要であり、Elg1-RFC は PCNA のリングを開いて DNA から外していることが予測された。

(4) 粗精製 Elg1-RFC の卵抽出液中での PCNA アンローディング活性が見られたため、Elg1-RFC を用いて PCNA アンローディング反応の試験管内再構成を試みた。しかしながら、これまでのところ PCNA アンローディング反応に用いているバッファー条件や卵抽出液に似せた条件など様々な条件下においても、精製タンパク質のみで Elg1-RFC の PCNA アンローディング活性は検出できていない。解析を行った一つの条件である、卵抽出液に似せた条件 (熱処理でタンパク質を不活化した卵抽出液を遠心した後の上清画分) で行った解析結果を図 2 に示す。PCNA アンローディング反応後には約 9 分子結合していた PCNA は、Elg1 除去卵抽出液中では、加える粗精製 Elg1-RFC の増加に伴って PCNA の結合量も減少したが (緑色のバー)、試験管内再構成系では PCNA の結合量は変化しなかった (青色のバー)。これは、Elg1-RFC の PCNA アンローディング活性に至適な条件が見つからない可能性もあるが、Elg1-RFC がアンローディング活性を示すためには、DNA 上もしくは Elg1-RFC に結合するなにかしら未同定の因子を必要とする可能性を示唆している。

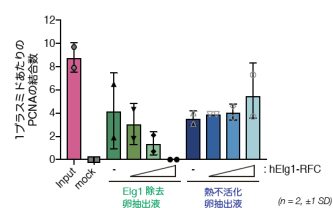


図 2 : それぞれの条件で 15 分間反応させた後のプラスミド上の PCNA の結合数をグラフ化した。粗精製ヒト Elg1-RFC は Elg1 除去卵抽出液中では、加える量に応じて PCNA のプラスミド結合数が減少したが、熱処理によって不活化した卵抽出液では、Elg1-RFC を加える量を変化させても PCNA の結合数は変化しなかった。

<参考文献>

- ① Bylund GO, Burgers PM. Replication protein A-directed unloading of PCNA by the Ctf18 cohesion establishment complex. *Mol Cell Biol*, 25: 5445-5455, 2005.
- ② Kawasoe Y, Tsurimoto T, Nakagawa T, Masukata H, Takahashi TS. MutSalpna maintains the

mismatch repair capability by inhibiting PCNA unloading. *Elife*, 5, 2016.

③ Kubota T, Nishimura K, Kanemaki MT, Donaldson AD. The Elg1 replication factor C-like complex functions in PCNA unloading during DNA replication. *Mol Cell*, 50: 273-280, 2013.

④ Lee KY, Fu H, Aladjem MI, Myung K. ATAD5 regulates the lifespan of DNA replication factories by modulating PCNA level on the chromatin. *J Cell Biol*, 200: 31-44, 2013.

⑤ Shiomi Y, Nishitani H. Alternative replication factor C protein, Elg1, maintains chromosome stability by regulating PCNA levels on chromatin. *Genes Cells*, 18: 946-959, 2013.

⑥ Yao N, Turner J, Kelman Z, Stukenberg PT, Dean F, Shechter D, Pan ZQ, Hurwitz J, O'Donnell M. Clamp loading, unloading and intrinsic stability of the PCNA, beta and gp45 sliding clamps of human, E. coli and T4 replicases. *Genes Cells*, 1: 101-113, 1996.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

① Terui R, Nagao K, Kawasoe Y, Taki K, Higashi TL, Tanaka S, Nakagawa T, Obuse C, Masukata H, Takahashi TS.

Nucleosomes around a mismatched base pair are excluded via an Msh2-dependent reaction with the aid of SNF2 family ATPase Smarcd1.

Genes & development, 32(11-12), 806-821, 2018. 査読あり. DOI: 10.1101/gad.310995.117

② Kato N, Kawasoe Y, Williams H, Coates E, Roy U, Shi Y, Beese LS, Schärer OD, Yan H, Gottesman ME, Takahashi TS, Gautier J.

Sensing and Processing of DNA Interstrand Crosslinks by the Mismatch Repair Pathway.

Cell reports, 21(5), 1375-1385, 2017. 査読あり. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.10.032

〔学会発表〕(計 2 件)

① Yoshitaka Kawasoe, Sakiko Shimokawa, Toshiki Tsurimoto, Tatsuro Takahashi.

The Elg1-Rfc2-5 complex (Elg1-RFC) is the major PCNA-unloading complex in *Xenopus* egg extracts.

OKAZAKI Fragment Memorial Symposium, 2018 年 12 月 17 日

② 河添 好孝, 下川 紗貴子, 釣本 敏樹, 高橋 達郎

Elg1-Rfc2-5 複合体 (Elg1-RFC) はツメガエル卵抽出液における主たる PCNA アンローディング複合体である

第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年 11 月 30 日

〔図書〕(計 0 件)

〔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

九州大学理学研究院生物科学部門染色体機能学研究室ホームページ

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~chromosome/top.html>

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。