

令和元年6月18日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15433

研究課題名(和文) 高速AFMによる古細菌由来MCMタンパク質複合体の観察

研究課題名(英文) High-speed AFM observation of archaeal MCM protein complexes

研究代表者

能代 大輔(NOSHIRO, Daisuke)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・博士研究員

研究者番号：90751107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：六量体リングを形成し、二本鎖DNAを一本鎖へと分離するヘリカーゼとして機能する2種の古細菌由来MCM(ssoMCMとmthMCM)タンパク質を高速AFMにより観察した。マイカ上でのssoMCMタンパク質全長の観察の結果、ヘリカーゼ活性を持つと考えられている六量体リング(およびその部分構造)の他、梯子状に連なった長い複合体や六量体以上の多量体リング(およびその部分構造)の形成が確認された。また、タマビジン2の二次元結晶上に固定したビオチン化mthMCMタンパク質全長の観察の結果、横倒しの状態で固定された六量体リングおよびダブル六量体リング(十二量体)と思しき2種類の構造体の存在を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高速AFMを用いて、フレキシブルなC末端を含めた全長の古細菌由来MCMタンパク質を観察した結果、MCMタンパク質が六量体リング以外の多量体構造を形成し得ることを明らかにした。また、本研究の遂行過程で発見されたタマビジン2の二次元結晶をマイカ上に直接形成させる方法は、ビオチンを導入した生体分子の固定基板の簡便で迅速な作製法として有用であり、他の研究にも利用することができる。

研究成果の概要(英文)：Two archaeal MCM(ssoMCM and mthMCM) proteins which have helicase activities to unwind double-stranded DNA to produce single-stranded DNA were observed by high-speed AFM(HS-AFM). The observation of the full-length ssoMCM protein on mica surface revealed the formation of ladder-like long-shaped oligomers and ring(or partial ring) structures composed of more than hexamer as well as hexameric ring structure with helicase activity(or partial hexameric ring structure). In addition, observation of biotinylated full-length mthMCM protein on the 2D crystals of tamavidin 2 confirmed the formation of hexameric ring and double hexameric ring(12 mer) structures.

研究分野：生物物理学

キーワード：高速原子間力顕微鏡 ヘリカーゼ ATPase 観察基板 タマビジン2 二次元結晶

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MCM タンパク質は、細胞において DNA 複製の開始に必須のタンパク質である。これらは複製フォークを形成する際に、二本鎖 DNA を一本鎖にほどく DNA ヘリカーゼとして働く。真核生物における MCM は、AAA+ ATPase ファミリーに属する MCM2-7 の 6 種のタンパク質で構成されるヘテロ六量体であると考えられている。一方、古細菌 *Sulfolobus solfataricus* 由来の MCM (ssoMCM) タンパク質は、ホモ六量体のリングを形成し、ヘリカーゼ活性を発揮することが知られている[1]。真核生物と古細菌の DNA 複製開始過程は類似しているため、古細菌由来 MCM タンパク質は、単純化された DNA 複製過程のモデルとしてよく研究されている。複製フォークにおいて、鋳型一本鎖 DNA は MCM タンパク質六量体リング構造を通過しており、ATP の加水分解に伴い六量体リングが移動して一本鎖 DNA を露出させる立体排除 (steric exclusion) モデルがこれまでの研究から支持されている[2]。しかしながら、一分子レベルで DNA と結合している様子や動的プロセスを捉えた直接的な画像による証拠は未だに存在しない。また、これまでの X 線結晶構造解析では、ssoMCM の C 末端から約 90 残基はフレキシブルなため構造が決定されていなかった。

本研究は、ナノレベルの解像度でリアルタイムな観察が可能な高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) を用いて、古細菌由来 MCM タンパク質の複合体形成の様子、六量体リングがヘリカーゼとして機能している様子を高速 AFM で捉えることを目標として研究を開始した。

2. 研究の目的

(1) 古細菌由来 MCM タンパク質の複合体形成の様子の観察

MCM タンパク質複合体形成の様子を高速 AFM により観察し、六量体リングがどのように形成されるのか明らかにする。

(2) 古細菌由来 MCM タンパク質がヘリカーゼ活性を発揮の動的過程の観察

六量体リングが ATP の加水分解エネルギーを用いて二本鎖 DNA を一本鎖 DNA に分離する動的過程を高速 AFM により動画として捉え、提唱されている立体排除モデルの検証を行う。

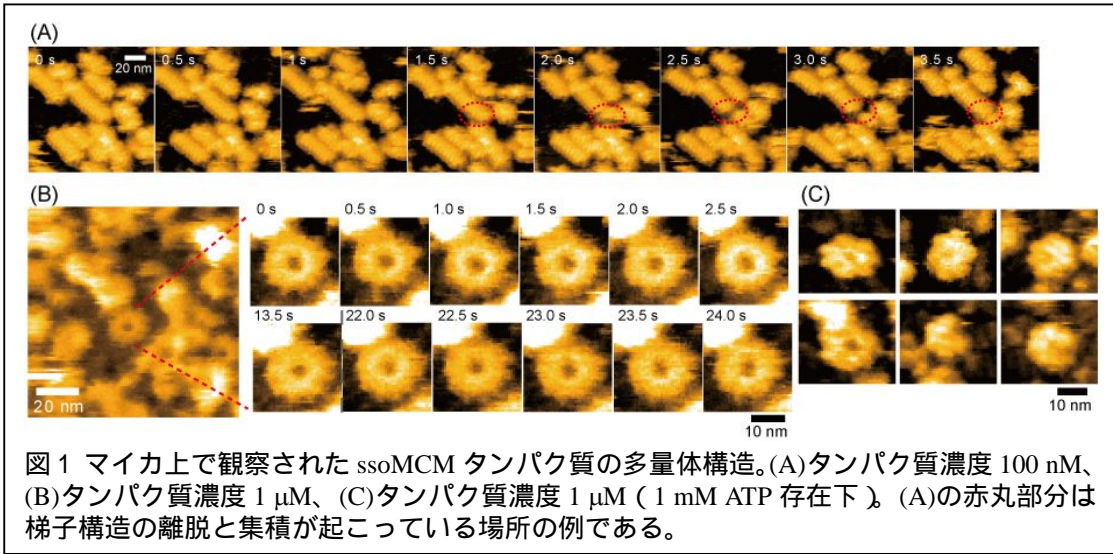
3. 研究の方法

MCM タンパク質の調製は大腸菌発現系により行った。MCM タンパク質の複合体形成および機能発現のダイナミクスを捉えるために高速 AFM を用いた。高速 AFM は、結晶化できないフレキシブルな構造もイメージすることが可能であり、水溶液中において 1 画像最速 50 ミリ秒の速さで、かつナノレベルの解像度で撮影することができる[3]。

4. 研究成果

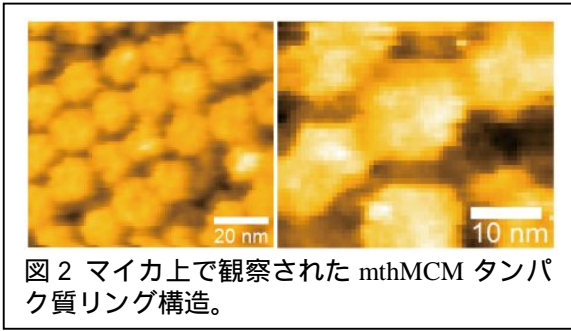
(1) 古細菌 *Sulfolobus solfataricus* 由来の MCM (ssoMCM) タンパク質の高速 AFM 観察

N 末端に FLAG-tag、C 末端に Strep-tag を付与した ssoMCM タンパク質を大腸菌発現系により調製し、調製した ssoMCM タンパク質がヘリカーゼ活性を有していることをヘリカーゼアッセイにより確認した。100 nM 程度の濃度の ssoMCM をマイカ基板に載せ、KCl 水溶液中で高速 AFM 観察を行った結果、予想していなかったことに、長径 10 nm 程度の細長い構造体が隣り合うように複数連なった梯子状の複合体を形成している像が得られた (図 1A)。一つ一つの細長い構造体が ssoMCM タンパク質一分子であると考えられ、この梯子構造への集積と離脱を絶えず繰り返している様子が観察された。梯子構造は必ずしも直線状に伸びるわけではなく、ある曲率をもった曲線を描く場合もあった。さらに、マイカに固定する際のタンパク質濃度を 1 μ M に増やした場合、マイカを覆った梯子構造の上に、六量体リングとともに、最大で十量体と推定されるリング構造や、その部分構造が観察された (図 1B)。観察された ssoMCM の梯子構造、六量体以上の多量体リング構造 (およびその部分構造) は近年まで報告のなかった構造であるが、2013 年に Slaymaker らによって報告された、二本鎖 DNA 共存下において、二本鎖 DNA に巻き付くようにして形成された ssoMCM タンパク質のフィラメント構造の一周分と類似していた[4]。MCM は六量体として機能するヘリカーゼ活性のみでなく、二本鎖 DNA の幾何学的構造を変化させる活性があることが近年になって報告されているが、今回観察された多量体構造は、その活性に関連するものであると推察される。ATP 存在下では、観察される六量体リングやその部分構造の形成割合が若干増加した (図 1C)。



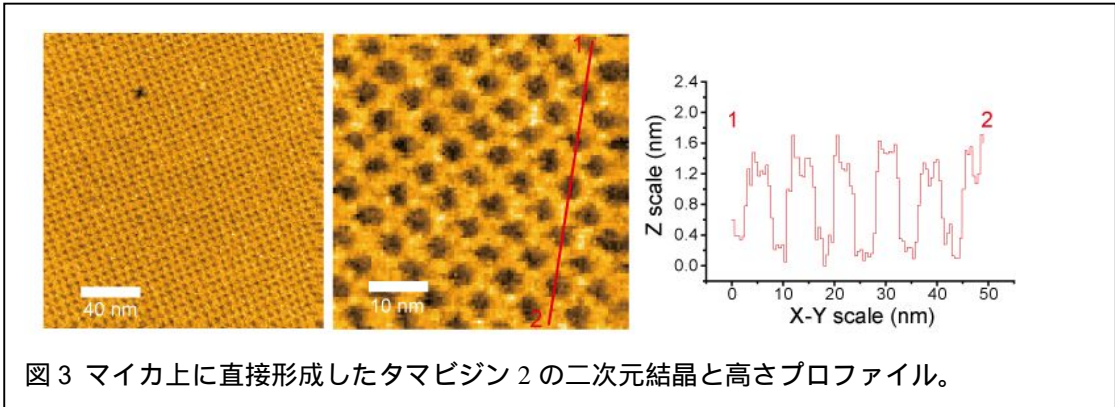
(2) 古細菌 *Methanothermobacter thermautotrophicus* 由来の MCM (mthMCM)タンパク質の高速 AFM 観察

同じく古細菌である *M. thermautotrophicus* 由来の mthMCM タンパク質も ssoMCM タンパク質と同様にホモ六量体を形成してヘリカーゼ活性を発揮する。N末端に FLAG-tag、C末端に Strep-tag を付与した mthMCM タンパク質を大腸菌発現系により精製し、高速 AFM により観察した。その結果、ssoMCM タンパク質の観察結果とは異なり、マイカ上に多数のリング構造が敷き詰められている様子が観察された (図2)。



(3) ビオチン化 MCM タンパク質固定のための新しい基板の開発

タンパク質の固定基板の一つとしてよく用いられるものにストレプトアビジンの二次元結晶がある[5]。これはビオチン化したサンプルを特異的に固定できる基板として有用であるが、ストレプトアビジンはマイカ上に結合しにくく、二次元結晶を直接マイカ上に形成させることはできない。そのため、まずビオチンを含む脂質膜をマイカ上に張り、その膜上に二次元結晶を形成させるという方法が用いられるが、これら一連の操作には数時間から1日費やさなければならなかった。一方、タモギタケ由来のタマビジン2はストレプトアビジンと同程度の高いビオチン結合能を有するタンパク質であるが[6]、本研究課題の遂行過程において、高濃度の MgCl₂ およびポリエチレングリコール(PEG)の存在下において、タマビジン2がマイカ上に二次元結晶を直接形成することを見出した。この発見は当初の予定にはなかったことであるが、これにより、ビオチン化サンプル用の基板を30分程度で作製することが可能になった。この二次元結晶は脂質膜上に展開されたストレプトアビジン二次元結晶の type-1 P2型と類似していた(図3)。全く同じ条件でストレプトアビジンもマイカ上に直接二次元結晶を形成するかどうかを調べたが、ストレプトアビジンはやはりマイカ基板に結合しにくいため、二次元結晶は形成されなかった。



(4) タマビジン 2 二次元結晶上に固定された mthMCM タンパク質の観察

ヘリカーゼ活性を発揮する六量体リングの様子を詳しく観察するためには、六量体リングを横倒しの状態で固定する必要があると考えた。そこで、C 末端に Avi-tag を付与した mthMCM (mthMCM-Avi) タンパク質を大腸菌発現系により調製し、これとは別に精製したビオチンリガーゼ (BirA) を用いて Avi-tag にビオチンを導入した。Avi-tag は 1 つのリジン残基を含む 15 アミノ酸から成るペプチドタグであり、BirA によりリジン残基にビオチンを部位特異的に導入することができる。図 4A はビオチン化した mthMCM-Avi をタマビジン 2 変異導入体の二次元結晶上に固定して高速 AFM 観察した結果得られた像を示す。図のように、横倒しの状態で固定されていると考えられる約 12 nm の高さを持つ六量体リングとダブル六量体リング (十二量体) と考えられる 2 種の構造体が観察された。六量体リングは非対称な、ダブル六量体リングは対称的な高さプロファイルを有していた (図 4A)。さらに、ATP 存在下において、リング中央部分の末端が伸縮する様子が観察された (図 4B)。この動きはヘリカーゼ活性を発揮する際、DNA を通過させる駆動力となるのではないかと推察される。

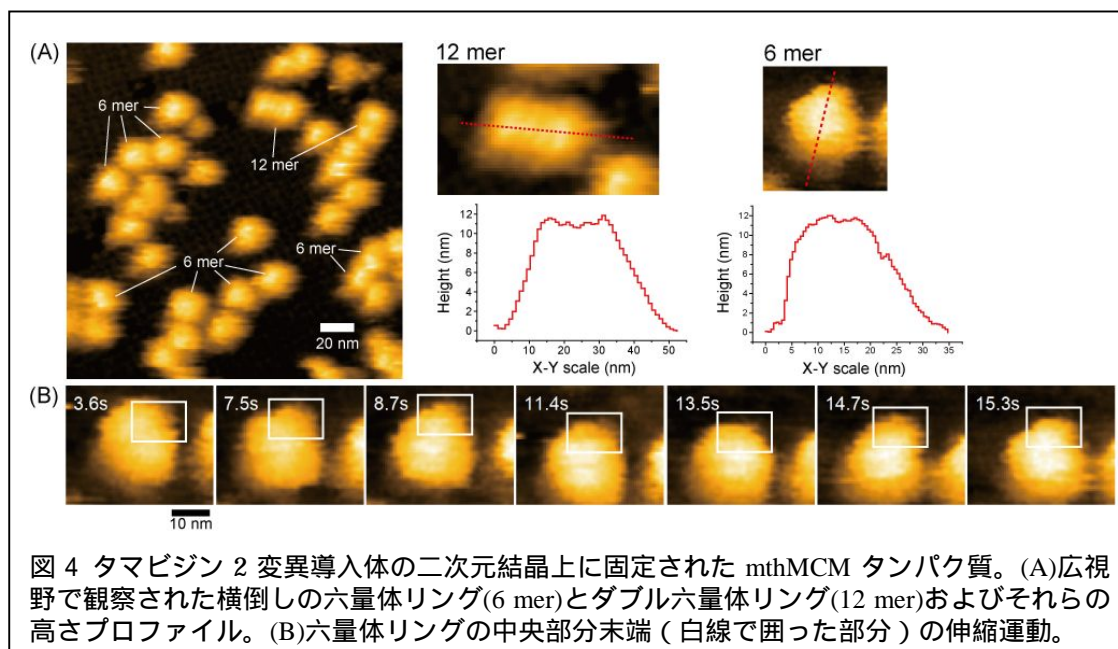


図 4 タマビジン 2 変異導入体の二次元結晶上に固定された mthMCM タンパク質。(A)広視野で観察された横倒しの六量体リング(6 mer)とダブル六量体リング(12 mer)およびそれらの高さプロファイル。(B)六量体リングの中央部分末端 (白線で囲った部分) の伸縮運動。

なお、タマビジン 2 の二次元結晶の作製法は、以下の研究テーマにも応用された。

(5) 変性基質存在下における GroEL と GroES の動的相互作用の観察

大腸菌由来のシャペロニン GroEL は、七量体サブユニットから成るリングが 2 つ背中合わせに結合して十四量体として存在し、リング内側の空洞内に変性した基質タンパク質を閉じ込める。GroES は単一の七量体リングで、GroEL に結合しているヌクレオチドの状態に依存して GroEL リングに蓋をするように結合する。本研究では、GroEL の 2 つのリングで動的に起こる GroES の結合と解離を高速 AFM により直接観察し、結合・解離の反応パターンとそれぞれの反応ステップの反応速度を測定した。そのために、GroEL 十四量体を横倒しの状態で固定する必要があったため、赤道面付近にある 490 番目の Cys 残基に、長さ約 2.5 nm のリンカーを介してビオチンを導入し、GroEL 十四量体を横倒しの状態でタマビジン 2 変異導入体の二次元結晶上に固定化した。本固定法は、脂質膜上のストレプトアビジン二次元結晶を用いて既に行われていたが[7]、タマビジン 2 の二次元結晶を用いても同様に固定可能であることが示され、実験操作の簡便化につながった。巻き戻し可能な変性基質タンパク質 (変異導入マルトース結合タンパク質 (DM-MBP)) 存在下及び基質タンパク質非存在下において GroEL と GroES との相互作用を可視化し (図 5)、この結果と既に報告された巻き戻し不可能な変性基質タンパク質 (還元 α -ラクトアルブミン) 存在下での結果を比較することにより、GroEL と GroES の結合・解離の反応パターンと反応ステップの速度の相違等を明らかにした。本研究成果は Philosophical Transactions Royal Society B 誌に掲載された。

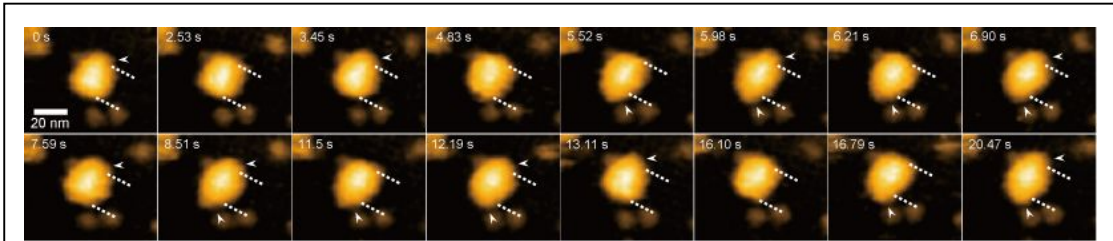


図5 巻き戻し可能な変性基質タンパク質 (DM-MBP) 存在下における GroEL と GroES の相互作用の観察。赤道面付近にある Cys 残基にリンカーを介してビオチンを導入した GroEL がタマビジン 2 変異導入体の二次元結晶上に固定されている。白い点線で仕切られた箇所は GroEL 十四量体に相当する部分を、矢印は GroES 七量体を示す。

< 引用文献 >

- [1] Brewster A.S. & Chen X.S. (2010) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 45:243-56.
- [2] Graham B.W., *et al.* (2011) *Nucleic Acids Res.* 39:6585-95.
- [3] Ando T., *et al.* (2014) *Chem. Rev.* 114:3120-88.
- [4] Slaymaker I.M., *et al.* (2013) *Nucleic Acids Res.* 41:3446-56.
- [5] Yamamoto D., *et al.* (2009) *Biophys. J.* 97:2358-67.
- [6] Takakura Y., *et al.* (2009) *FEBS J.* 276:1383-97.
- [7] Yamamoto D. & Ando T. (2016) *J. Mol. Biol.* 428:3090-101.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1) Daisuke Noshiro, Toshio Ando

Substrate protein dependence of GroEL-GroES interaction cycle revealed by high-speed atomic force microscopy imaging.

Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences. 373: 20170180 (2018), DOI: 10.1098/rstb.2017.0180, 査読有り

〔学会発表〕(計4件)

1) 能代大輔、藤岡優子、安藤敏夫、野田展生

高速 AFM による Atg17-Atg29-Atg31 の S 字構造と Atg13-Atg17-Atg29-Atg31 複合体により形成される液滴の観察

第 11 回オートファジー研究会、2018 年

2) 能代大輔、藤岡優子、野田展生、安藤敏夫

オートファジーの足場タンパク質 Atg17-Atg29-Atg31 複合体の高速 AFM 観察

第 91 回日本生化学会大会、2018 年

3) Daisuke Noshiro, Noriyuki Kodera, Toshio Ando

Two-dimensional crystals of tamavidin 2 on mica surface and their application

International Symposium on Atomic Force Microscopy at Solid-Liquid Interfaces, 2017 年

4) 能代大輔、古寺哲幸、安藤敏夫

Two-dimensional crystals of tamavidin 2 for a quick and easy method of immobilization of biotinylated biomolecules

第 55 回日本生物物理学会年会、2017 年

〔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

<https://www.bikaken.or.jp/>

<https://researchmap.jp/noshirodaisuke/>

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。