

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440023

研究課題名(和文) クランプローダーRFCによるクランプPCNA装てん機構の構造生物学的研究

研究課題名(英文) Structural study on the clamp PCNA-loading mechanism by the clamp loader RFC

研究代表者

大山 拓次(OYAMA, Takuji)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：60423133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：クランプローダーRFCがATP依存的にクランプPCNAをDNA鎖に装てんする仕組みを原子レベルで解明することを目的とし、(1)重原子同型置換法による構造決定を念頭においた組換え体セレノメチオニン化(Se-Met) PCNAの調製、(2)RFCの高分解能構造決定、(3)RFC-PCNA-DNA複合体の結晶化と構造解析を目指した。Se-Met PCNAについては2.5 Å分解能で結晶構造を決定した。RFCについては組換え体の新規高純度精製法を確立したが、高分解能構造決定には至らなかった。RFC-PCNA-DNA3者複合体について、広範囲に結晶化条件検索を行ったが、結晶を得ることができなかった。

研究成果の概要(英文)：To understand the detailed loading mechanism of the clamp PCNA onto DNA by the clamp-loader RFC in an ATP-dependent manner, we aimed (1) preparation of selenomethionine-labeled (SeMet) PCNA, (2) high resolution structure determination of RFC, and (3) crystallization and structure determination of the RFC-PCNA-DNA ternary complex. We determined the crystal structure of SeMet PCNA at 2.5 angstrom resolution. We established a novel preparation method of the highly purified recombinant RFC, but did not succeed in the high-resolution structure determination of the RFC. We performed crystallization screening of the RFC-PCNA-DNA ternary complex in a wide range of conditions, but obtained no crystals during this research project.

研究分野：構造生物化学

キーワード：DNA複製 タンパク質DNA複合体 結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA の正確な複製は、生命の生存維持と子孫への正確な遺伝情報伝達に必須である。DNA 新鎖の合成は複製用 DNA ポリメラーゼが行うが、酵素単独では合成能が低く、その活性を大きく促進させる 2 個の必須因子として、クランプとクランプローダーが存在する。クランプは分子量約 9 万のリング状タンパク質であり、DNA 鎖に装てんされたクランプと結合することにより、DNA ポリメラーゼの活性は劇的に上昇する。クランプは DNA ポリメラーゼだけでなく、DNA リガーゼや flap エンドヌクレアーゼなど、多数の DNA 代謝酵素の機能を促進する (Moldovan et al, *Cell* 2007)。また、クランプは DNA 修復やエピジェネティックな DNA メチル化にも重要な役割を果たすと考えられている。クランプは単独では DNA 鎖に装てんされず、クランプローダーの助けを必要とする。クランプローダーは、AAA+ファミリーに属する分子量約 20 万のヘテロ 5 量体であり、ATP 依存的にクランプを開環し、DNA 鎖上の適切な位置にクランプを装てんし、しかも DNA ポリメラーゼとクランプの相互作用を妨げないよう、ローダーは DNA から離れる。

我々は、クランプ装てん反応の原子レベルでの解明を目指し、真核生物に良く似た DNA 複製システムを持つ古細菌 (*Pyrococcus furiosus*: Pfu) 由来のタンパク質群を用いて研究を行って来た (Matsumiya et al, *Protein Sci* 2001, Oyama et al, *Mol Cell* 2001)。特に、12 Å 分解能で決定したクランプ装てん中間状態に相当する RFC-PCNA-DNA 3 者複合体の電子顕微鏡 3 次元構造から、『単独では平面状に閉じたリングの PCNA が、RFC と結合することでスプリングワッシャー状に開環する』という、それまで未知であった重要な仕組みを明らかにした (Miyata et al, *Proc Natl Acad Sci* 2006)。本構造を基に提唱した装てん機構は概ね正しいと考えているが、電子顕微鏡構造では原子レベルの情報は何れなく、特に RFC による DNA 認識機構については不明のままである。

一方、大腸菌やバクテリオファージの DNA 複製タンパク質を用いたクランプ装てん機構に関する構造生物学的研究も多数報告されているが (Kelch et al, *Science* 2011 など)、クランプとクランプローダーは生物種によってサブユニット構成や相同タンパク質間のアミノ酸配列同一性が低い。したがって、真核生物/古細菌のクランプ装てん機構を原子レベルで理解するには、古細菌由来 RFC およびクランプローダー-クランプ-DNA (RFC-PCNA-DNA) からなる 3 者複合体の結晶構造を決定する必要がある。

2. 研究の目的

RFC および RFC-PCNA-DNA 複合体の結晶構造を決定する。RFC は既に中分解能の構造を決定しており、結晶の質を改善すれば直ちに原子レベルの構造決定に至ると考えられる。3 者複合体については、電子顕微鏡解析に成功した複合体を出発点とし、またバクテリオファージ T4 由来タンパク質を用いたローダー-クランプ-DNA 3 者複合体構造を参照し、タンパク質および DNA の改変を含め、結晶化可能な試料調製法と結晶化条件を探索する。複合体結晶のクオリティ改善を進めながら、研究期間内での高分解能 3 者複合体構造決定を目指す。

本研究で用いる Pfu 由来の DNA 代謝に関わるタンパク質の構造と機能は、真核生物由来のものに似ており、かつ熱安定性に優れ、構造機能解析に有利である。また、古細菌のタンパク質複合体はしばしば簡略化されており、複雑な真核生物の DNA 複製を理解する上で有用なモデルとなる。例えば真核生物 RFC が 5 種のサブユニットからなる 5 量体であるのに対し、Pfu RFC は、RFCL (479 アミノ酸残基) と RFCS (327 アミノ酸残基) の 2 種のサブユニットが 1:4 で機能複合体を形成する。タンパク質の種類が少なければ、特に変異タンパク質の調製では実験がより速やかに進行する。

3. 研究の方法

(1) RFC 高分解能構造決定に向けて

中分解能で部分構造を決定している Pfu RFC について、これまでのタンパク質精製および結晶化条件をさらに詳細に見直し、改善を施すことにより高品質結晶取得および構造決定を目指す。RFC は ATP の加水分解に伴って大きな構造変化を起こすと考えられる。そこで、ATP とほぼ同じ親和力および様式で結合するものの加水分解を受けないため、タンパク質構造が ATP 結合状態でトラップされると期待される ATP アナログ化合物の添加、あるいは ATP 結合および加水分解能に関わるアミノ酸残基への部位特異的変異導入などにより、高分解能の構造解析に適した試料調製を試みる。

(2) セレノメチオニン (Se-Met) 置換体 PCNA の調製

RFC-PCNA-DNA 3 者複合体は分子量 30 万で計 8 個のタンパク質サブユニットを含むため、分子置換法による構造決定は保証されおらず、重原子同型置換法による構造決定に備える必要がある。超分子複合体構造解析における初期位相情報取得には Ta や W の重金属クラスター誘導体とともに、各タンパク質サブユニットの詳細構造を決定する手掛かりとなる Se-Met 置換体の調製が重要となる。そこで、RFC での成功例を踏襲し、PCNA についても Se-Met 置換体の大量調製および精製法の確立を目指す。実験が順調に進めば Se-Met PCNA 単独での結晶化および構造解

析を試みる。

(3) RFC-PCNA-DNA 3 者複合体結晶化

以前電子顕微鏡解析に成功した複合体調製条件を出発点とし、構造解析に適した単結晶を得るために、種々条件検討を行う。RFC 単独の解析同様、RFC に関して ATP アナログ添加、部位特異的変異の導入を検討するとともに、DNA の配列や構造、場合によっては PCNA についても複合体安定性を高める変異・修飾の導入を検討する。結晶が得られない場合、あるいは得られた結晶の品質が容易に向上しない場合は連携研究者の機能解析・複合体モデリング・電子顕微鏡解析による支援を仰ぎ、構造決定に向けての手がかりを得る。

4. 研究成果

(1) RFC

RFC の構造解析においては MPD を主たる沈殿剤として初期結晶は不安定であったが、タンパク質の発現、結晶化、結晶収穫条件を広範に検討することで、結晶をある程度安定に保持できる条件を得ることに成功し、中分解能ながら部分的な構造決定に成功した(図 1)。ただし、全体構造を決定出来たのは RFCS のみであり、RFCL は一部分しかモデルを構築できていない。そこで、より高分解能の X 線回折データを得るため、さらなる結晶の改善を試みた。特に、精製プロトコールについては大きな改善を行うことに成功した。これまで計 3 種類のカラムクロマトグラフィーを軸としてタンパク質を精製していたが、精製タグとの親和力を利用した 1 種類のカラムクロマトグラフィーの操作方法を改善することで、迅速に結晶化可能な純度の RFC を調製することに成功した。その RFC 試料を用いて高品質結晶の調製および X 線回折データ取得を目指したが、目的に叶う結晶の調製には至らなかった。

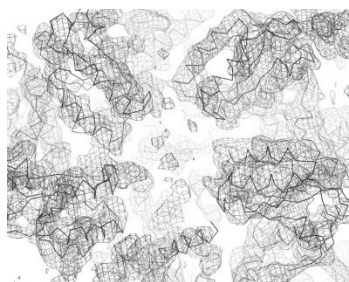


図 1. 中分解能の構造解析で得た RFC の電子密度マップ。RFCS の構造は全て決まったが、RFCL は全長の約 1/10 程度の部分モデルのみの構築に留まっている。

(2) セレノメチオニン(Se-Met)置換体 PCNA

3 者複合体の同型置換法による構造解析計算を念頭に置き、Se-Met 化 PCNA 組換えタンパク質の調製を行ったところ、宿主大腸菌 1 L 培養菌体当たり、2~3mg の精製タンパ

ク質を得るプロトコールを確立した。このタンパク質を結晶化し、SAD(単波長異常分散法)による構造解析計算を行った。その結果、以前の解析とは独立に構造を決定したにも関わらず、全体構造は以前の非 Se-Met 化 PCNA と原子レベルでの詳細にわたり、本質的に同一構造を取ることが分かり、3 者複合体の構造解析に有用なラベル化タンパク質として使えることが示唆された。本構造はプロテイン・データ・バンクに登録した(登録 ID: 5AUJ)。

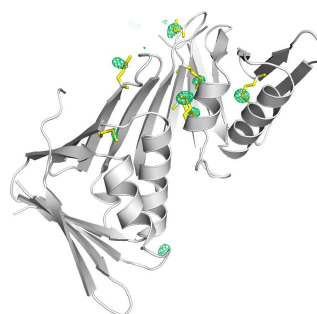


図 2. Se-Met 化 PCNA の SAD 解析で決定した全体構造(リボンモデル)。SAD マップのピーク(3 以上)を緑色のメッシュ、セレノメチオニン残基をスティックモデルで示している。

(3) RFC-PCNA-DNA

RFC への ATP 結合は PCNA や DNA との相互作用に重要であり(Seybert et al, *EMBO J* 2004)、電子顕微鏡解析では ATP アナログ(ATP γ S)を用いて複合体を安定化することで解析に成功したが、同条件で調製した複体の結晶化には成功しなかった。そこで、ATP 結合状態での構造トラップという基本的戦略は電子顕微鏡解析の成功例を踏襲しつつ、その成功例に固執せず種々の条件での結晶化を試みた。特に ATP γ S を含めそれ以外で結晶化に有用な ATP アナログの探索 ATP 結合状態を安定化するような RFC を中心とした部位特異的変異の探索 結晶化前の複合体単分散状態を保持しつつ結晶化を妨げない適度な複合体からの突出領域を持ちうる DNA の探索、を軸として条件検索を行った。また、限られた試料で効率良く実験を進めるため、微量クロマトグラフィーシステムおよび微量半自動結晶化装置を積極的に活用した。しかしながら、本プロジェクト期間内に RFC-PCNA-DNA3 者複体の結晶を得ることは出来なかった。

電子顕微鏡では主たる良質の粒子像のみを選別して解析を進めることが可能であるが、結晶化では、試料のわずかな不均一性が結晶化を妨げる可能性がある。本研究では主にゲルろ過クロマトグラフィーと動的光散乱法による複合体品質評価を行ったが、機能解析や電子顕微鏡観察を含め、より詳細な品質評価を行うことで結晶化に適した試料を探索する必要があるかもしれない。また、結晶化では長時間の静置を要するため、ATP ア

ナログの分解や脱離などが緩やかに進行し、複合体を不安定化させていたかもしれない。そこで、機能構造を保持し、ATP加水分解能をより厳密にコントロールすることで結晶化が可能となるかもしれない。

一方で(1)および(2)で述べた通り、3者複合体結晶化に繋がると期待される成果を挙げることに成功しており、今後も引き続きRFC-PCNA-DNA結晶構造決定とそれに基づくクランプローダーRFCによるクランプPCNAのDNA鎖への装てん機構に関する研究を継続したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計12件)

- (1) T. Oyama, S. Ishino, T. Shirai, T. Yamagami, M. Nagata, H. Ogino, M. Kusunoki, Y. Ishino. Atomic structure of an archaeal GAN suggests its dual roles as an exonuclease in DNA repair and a CMG component in DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **44**, 9505-9517 (2016) 査読有 doi: 10.1093/nar/gkw789
- (2) 大山 拓次, 栗栖 源嗣, 昆 隆英. 細胞内の巨大な分子モーター「ダイニン」の構造解析, 放射光 **29**, 82-89 (2016) [http://http://www.jsrr.jp/journal/29-2.html](http://www.jsrr.jp/journal/29-2.html)
- (3) Y. Tsunaka, Y. Fujiwara, T. Oyama, S. Hirose, K. Morikawa, Integrated molecular mechanism directing nucleosome reorganization by human FACT. *Genes Dev.* **30**, 673-686. (2016) 査読有 doi: 10.1101/gad.274183.115
- (4) M. Ohashi, K. Gamo, T. Oyama, H. Miyachi, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) has multiple binding points that accommodate ligands in various conformations: Structurally similar PPAR γ partial agonists bind to PPAR γ LBD in different conformations. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 2758-2762 (2015) 査読有 doi: 10.1016/j.bmcl.2015.05.025
- (5) M. Ohashi, T. Oyama, H. Miyachi, Different structures of the two peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) ligand-binding domains in homodimeric complex with partial agonist, but not full agonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 2639-2644 (2015) 査読有 doi: 10.1016/j.bmcl.2015.04.076
- (6) T. Shimegi, K. Mochizuki, T. Oyama, T. Ohtsuki, M. Kusunoki, S. Ui, Modification of Chimeric (2S, 3S)-butanediol dehydrogenase based on structural information. *Protein Pept. Lett.* **22**, 226-233 (2015) 査読有 doi: 10.2174/0929866522666150121120823
- (7) H. Ogino, S. Ishino, T. Oyama, D. Kohda, Y. Ishino, Disordered interdomain region of Gins is important for functional tetramer formation to stimulate MCM helicase in *Thermoplasma acidophilum*. *BioSci. Biotechnol. Biochem.* **79**, 432-438 (2015) 査読有 doi: 10.1080/09168451.2014.982503
- (8) M. Ohashi, K. Gamo, Y. Tanaka, M. Waki, Y. Beniyama, K. Matsuno, J. Wada, T. Tenta, J. Eguchi, M. Maskishima, N. Matsuura, T. Oyama, H. Miyachi, Structural design and synthesis of arylalkynyl amide-type peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)-selective antagonists based on the helix12-folding inhibition hypothesis. *Eur. J. Med. Chem.* **90**, 53-67 (2015) 査読有 doi: 10.1016/j.ejmech.2014.11.017
- (9) Y. Nishikawa, T. Oyama, N. Kamiya, T. Kon, Y.Y. Toyoshima, H. Nakamura, G. Kurisu, Structure of the entire stalk region of the dynein motor domain. *J. Mol. Biol.* **426**, 3232-3245 (2014) 査読有 doi: 10.1016/j.jmb.2014.06.023
- (10) Y. Tanaka, K. Gamo, T. Oyama, M. Ohashi, M. Waki, K. Matsuno, N. Matsuura, H. Tokiwa, H. Miyachi, Molecular dynamics study-guided identification of cyclic amine structures as novel hydrophobic tail components of hPPAR γ agonists. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 4001-4005 (2014) 査読有 doi: 10.1016/j.bmcl.2014.06.023
- (11) C. Takekawa, K. Nakamura, H. Homma, T. Oyama, Purification and characterization of a protease from *Isaria cicadae*. *Mushroom Science and Biotechnology* **22**, 74-78 (2014) 査読有 http://www.jsmsb.jp/JSMSBjournal/CiNii/?action=common_download_main&

upload_id=682

- (12) T. Shimegi, T. Oyama, T. Ohtsuki, G. Kurisu, M. Kusunoki, S. Ui, Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of domain chimeric L-(2S, 3S)-butanediol dehydrogenase. *Acta Crystallogr. Section F*, **70**, 461-463 (2014) 査読有 doi: 10.1107/S2053230X13032755

〔学会発表〕(計3件)

- (1) 大山 拓次、石野 園子、白井 剛、山上 健、永田 麻梨子、尾木野 弘実、楠木 正巳、石野 良純「結晶構造から明らかになった古細菌 GAN の DNA 複製での CMG 因子および修復でのヌクレアーゼとしての 2 つの役割」第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2016 年 11 月 30 日
- (2) 桑名 美貴子、楠木 正巳、大山 拓次、中山 亨「大豆イソフラボングルコシルトランスフェラーゼ GmIF7GT の結晶構造解析」平成 26 年度日本結晶学会年会、東京大学農学部本郷キャンパス弥生地区(東京都文京区) 2014 年 11 月 3 日
- (3) 桑名 美貴子、楠木 正巳、大山 拓次、中山 亨「大豆イソフラボングルコシルトランスフェラーゼ GmIF7GT の構造生物学」第 87 回日本生化学会年会、国立京都国際会館(京都市左京区) 2014 年 10 月 17 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

- (1) 山梨大学 研究者総覧
http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_Dispatch/Scholar/0/32B8A9CF314A20D1.html
- (2) 研究成果掲載(山梨大学生命環境学部)
<http://www.les.yamanashi.ac.jp/modules/news/index.php?page=article&storyid=204>
- (3) 研究成果掲載(山梨大学生命環境学部)
<http://www.les.yamanashi.ac.jp/modules/news/index.php?page=article&storyid=232>

- (4) 研究成果掲載(山梨大学 NEWS)
<http://www.yamanashi.ac.jp/6595>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 拓次(OYAMA, Takuji)
山梨大学・総合研究部・准教授
研究者番号: 60423133

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

石野 良純(ISHINO, Yoshizumi)
九州大学・農学研究院・教授
研究者番号: 30346837

白井 剛(SHIRAI, Tsuyoshi)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授
研究者番号: 00262890

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