

研究報告書

「DNA複製フォーク複合体の構築原理及び遷移・制御機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研究者: 真柳 浩太

1. 研究のねらい

本研究は DNA の複製・修復・組換え(Replication, Recombination, Repair)に関与する所謂3R 関連蛋白質群、なかでも遺伝情報の継承の根幹をなす DNA の複製装置であるレプリソームの機能と構造の関係を電子顕微鏡による単粒子解析を用いて解明することを目的とする。これら3R 系は互いに、とりわけ密接にカップルしており、特に修復の異常は直ちに癌などの重篤な疾患に繋がるため医学的にも注目されている。近年、個々の3R 関連蛋白質に関しては、主に結晶構造解析研究の結果から多数の原子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。しかしながら、実際の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、綿密に制御されることで複雑な一連の反応をスムーズに行っている。また反応の各段階で新たに蛋白質因子をリクルートし、或は余分な因子を解離させることによって適切に複合体を再編成させている。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、反応の各段階で遷移していく複合体の全体構造の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、レプリソームやリペアロ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。

電子顕微鏡はナノメートル領域に威力を発揮し、また生理的条件下で試料の機能的構造を直接可視化できる利点がある。本研究では PCNA をはじめとするレプリソーム関連タンパク質と DNA からなる超分子複合体の機能構造を解析し、結晶の高分解能データの知見を最大限に活用し、変異体解析、計算機によるモデリング技術を加えてより詳細な解析を行うことで、電子顕微鏡データと有機的に融合していく。この様なアプローチにより複製フォーク複合体の構造学的実体に迫る情報を獲得し、その構築・再編及び反応制御機構の分子レベルの理解に貢献することが本研究の主要な目的である。これと同時に新規電子顕微鏡観察技術、画像解析・構造解析技術や、複合体の安定条件の迅速検索法、新規分子ラベル法等、超分子複合体の解析に必要な新規技術の開発を行っていく。

2. 研究成果

(1) 概要

DNA の複製は、リーディング鎖においては連続的に DNA の重合が行われるのに対して、ラギング鎖では断続的に、多数の岡崎断片の形成及び連結によって行われる。本研究においては、因子の切り換えがより頻繁に起こるラギング鎖に注目し、複製因子と PCNA、DNA から構成される複製フォーク複合体の構造解析を行った(テーマ A)。

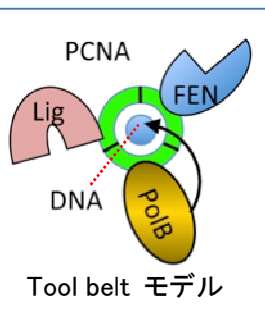
ラギング鎖においては、ポリメラーゼ(PolB)による DNA 伸長、FEN による Flap 切断、リガーゼ(Lig)による岡崎断片の連結が繰り返し行われる。各因子は全て基盤分子 PCNA3 量体リン

グに結合することから、因子を3つとも常時保持し効率をあげる tool belt モデルが提唱されている。

その一方で、PCNAに結合するタンパク質の数は既に50種を超えており、また反応ステップ毎に該当する因子が呼び込まれ、反応後離脱する sequential モデルを示唆する生化学データも報告される等、機構の詳細は全く分かっていない。

精製した複製因子及び DNA から複合体を再構成して、電子顕微鏡による単粒子解析で立体構造を構築し、構築原理及び遷移再編、機能制御の機構を考察した。これまでに

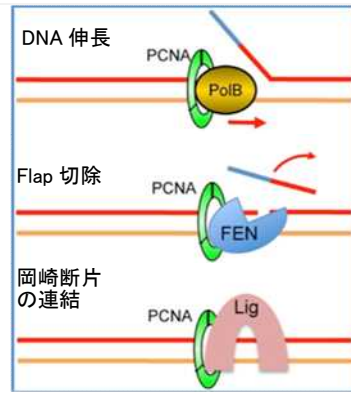
PoIB-PCNA-DNA 及び Lig-PCNA-DNA 複合体の構造を得ていたため、残る3つ目の



FEN-PCNA-DNA 複合体の解析から着手した。続いて tool belt モデルの検証や、因子切り換えの中間状態を調べるため、複製因子を複数含んだ Lig-FEN-PCNA-DNA 複合体等の解析を行った。更に、近年飛躍的にその性能が向上した電子直接検出カメラを用いて、研究開始当初は解析が困難であったクライオ電子顕微鏡法による解析にも着手した。

MCM を中心に構成される複製ヘリケース複合体の解析も平衡して行い、その構成因子である MCM オリゴマーや、GAN-GINS 複合体の単粒子解析を行った(テーマ B)。

解析する系が複雑になるに従い、構成因子の標識技術の導入・開発が必要となる。DNA の可視化、特に単鎖領域の可視化は電子顕微鏡を用いても極めて困難であるため、DNA 末端の可視化用標識の開発を行った(テーマ C)。



(2) 詳細

研究テーマ A (複製因子-PCNA 複合体の構造解析):

精製した各因子から複合体を再構成し、安定な組み合わせを電気泳動、ゲルろ過、そして電子顕微鏡観察などで探索した。安定な条件が得られたものについては単粒子解析を開始し、3次元マップの構築、及びその精密化を行い、各因子の結晶構造をマップに当てはめることで、原子モデルを構築した。更に、より高分解能化を目指し、近年飛躍的に性能が向上した電子直接検出カメラを用い、クライオ電子顕微鏡法による凍結試料の解析を行った。

1) FEN-PCNA-DNA 複合体

FEN は DNA ポリメラーゼが形成したプライマー構造を認識しこれを切断、リガーゼが連結可能なニックを形成する。FEN と PCNA(Sakurai et al.,2005)、FEN と DNA (Tsutakawa et al., 2011) の結晶構造は既に明らかになっていたものの、FEN-PCNA-DNA 複合体は未だ解かれていなかった。DNA 基質としてフラップ構造をもつオリゴ DNA を精製し、FEN、PCNA と混合して複合体を再構成、ゲル濾過によって精製を行った。野生型 FEN は通常のフラップを切断してしまうので、切断箇所の DNA の分岐領域を S 化することで、安定な複合体の形成を試みたが、FEN のヌクレアーゼ活性が予想以上に強く、反応を抑えきれないことが明らかになった。そこで FEN の活性部位のアスパラギン酸をアラニンに置換した変異体 FEN を用いて解析を行い、

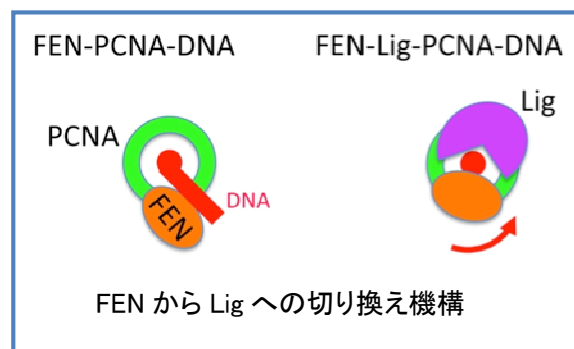
PCNA のリング上に FEN、PCNA リングを貫通し且つ FEN と結合する DNA を可視化することに成功した。この構造は FEN-PCNA の結晶構造から予想されたものとは異なっていた。これまでに我々は PoIB-PCNA-DNA 及び Lig-PCNA-DNA 複合体の構造を明らかにしており、本複合体の解析によって、ラギング鎖の複製における重要な3つの反応ステップを担う複合体の解析を完結することができた。

本複合体は分子量が15万程しかなく、これまでは凍結試料の解析が困難であった。しかしながら次項の FEN-Lig-PCNA-DNA 複合体の解析の結果、本複合体でも電子直接検出カメラを用いることで解析が可能であることが分かり、クライオ電子顕微鏡観察を開始し、凍結条件の検討を行った。

2) FEN-Lig-PCNA-DNA 複合体

以前に解析した Lig-PCNA-DNA 複合体において、クランプを形成する3つの PCNA サブユニットのうち2つは Lig と結合していたが、3番目の PCNA は空いており、ここに FEN 分子が結合できることが示唆された。実際に4つの構成因子から複合体を再構成し単粒子解析を試みたところ、FEN-Lig-PCNA-DNA 複合体の構造を初めて明らかにすることができた。

この構造は前述の FEN-PCNA-DNA によるフラップ切除から、次の岡崎断片連結を担う Lig-PCNA-DNA 複合体へ移行する中間状態に相当する。FEN 分子が反応後も複合体中に留まり、次のライゲーション反応の担い手である Lig に DNA を正に手渡ししている様子を可視化することができ、切換え機構を考察する上で重要な知見を得る事ができた。本研究による結果からは PCNA クランプを「単なる留め金」とは捉えることができず、またこれまでの「ツールベルト」か「シーケンシャル」か、という二者択一の単純な議論とは異なる視点が必要であることを示す。FEN 分子はフラップを解消した後も留まり、PCNA のむしろ中心側へシフトして、DNA を押し込むように「手渡し」している様子を捉えていた。このような DNA hand over(手渡し)或は、DNA をリレー競技のバトンに見立てた DNA baton pass モデルは塩基除去修復に関する報告で言及され(Wilson & Kunkel, 2000)、また FEN



の構造解析においてこれを引用する記述(Tsutakawa et al., 2011)がみられるものの、同一の PCNA 上の異なる2つの因子間で実際に行われているところを可視化したのは今回が初めてである。

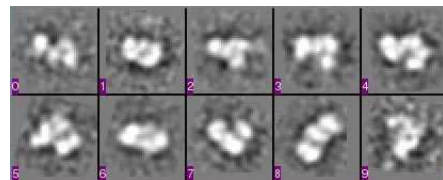
更にこの複合体を本プロジェクトで導入した急速凍結装置 EM-GP(Leica)、及び所属研究所に既設の極低温電顕 Polara(FEI)を用いて凍結条件を検討し、良好な条件を得ることができた。得られた条件のもと、作成した試料を電子直接検出器で観察し、2次元平均像において DNA の螺旋構造の可視化に成功した。立体構造解析に関しては、現在氷中の分子の向きに偏りがあり、高分解能の解析には至っておらず、負染色と同程度の解析(分解能15 Å)に留まっている。

3) Hjm-PCNA-DNA 等その他の複合体

古細菌の Hjm ヘリケースは大腸菌の RecQ やヒトの Hel308 の機能ホモログであり、複製フォークの進行停止の際に DNA の修復に寄与する DNA ヘリケースである。Hjm-PCNA-DNA 複合体をゲル濾過で精製し、単粒子解析で立体構造を再構築、用いた DNA の全長を含む各因子の可視化に成功した。しかしながら現時点では低分解能に留まっており、特に Hjm の向きについては恣意性が残る。また PolD に関しては PolB 同様 PCNA との相互作用が確認されているが、PolD 単独の解析に留まっており、PolD-PCNA-DNA 複合体の立体構造解析には至っていない。

研究テーマ B (複製ヘリケース複合体の構造解析)

複製ヘリケース CMG 複合体は MCM の6量体と GINS4量体、及び CDC45 から構成される。GINS 及び古細菌の CDC45 ホモログの GAN を精製し、両者の相互作用を調べたところ、非常に安定な複合体を形成することが明らかになった。再構成した GINS-GAN 複合体をゲル濾過により精製し、電顕で観察、単粒子解析を行った。2次元平均像解析の結果、本複合体が非常に柔軟な構造をもつことが明らかとなった。この他 MCM オリゴマーの観察等を行ったが、MCM、GINS、GAN、DNA の全てからなる複合体については、未だ最適な複合体再構成条件を得るに至っていない。



GINS-GAN 複合体の2次元クラス平均像

研究テーマ C (新規解析手法の開発)

1) DNA の高次構造体を利用した標識法

複合体の構成因子が増えて複雑になるにつれ、たとえ立体構造が得られても、分子間の境界が明確でなく、個々の蛋白質や DNA の原子モデルを組み込む事が困難になってくる。そのような場合、ターゲットの因子を標識することが極めて効果的な場合がある。これまで電子顕微鏡では主として金属クラスター等の高密度の標識を用いてきたが、単粒子解析では標識としてターゲットと同程度の密度のもの、即ち蛋白質や DNA を用いた方が有効な場合も多い。

本研究課題の先行研究においてストレプトアビジンを標識に用いて、DNA 末端の同定に成果を上げてきたが、高分解能の解析の際にはストレプトアビジン 4 量体(約60kD)は標識として必要以上に大きいことも分かってきた。

そこで DNA 末端を DNA の高次構造を用いて標識する方法を試みた。2重鎖の両端に DNA 高次構造体を形成する反復配列を付加したところ、設計通りアレイ状 DNA が形成されることを単粒子解析で明らかにした。この標識法は単に標識部の配列を付加するだけで、事前の精製等も必要なく、大変簡便に利用できることが分かった。また実際のタンパク質-DNA 複合体において、本標識を用い設計通り標識部が可視化されることを確認できた。

2) 金支持膜によるクライオ電子顕微鏡の改善

電子直接検出カメラによる高速撮影の結果、凍結試料の観察において、電子線の照射により観察している粒子が動くことで分解能が向上しなかったこと、画像処理によりこのブレを補正することで飛躍的に分解能が向上することが近年明らかになった。更に従来の炭素から金

に試料支持膜を変えることで、この現象自体を大幅に抑制できるという報告があった。現時点で国内では電子直接検出カメラは未だ一般的に普及している状態ではなく、マシンタイムも不足している。この金の支持膜の効果を調べ、本プロジェクトのターゲットに対して最適化するため、金薄膜の厚さを再現性良く制御可能なスパッタ装置を導入し、凍結試料を作成、電子顕微鏡で観察した。現在、電子直接検出カメラによる、粒子揺動抑制の効果の測定には至っていない。しかしながら、炭素支持膜による過剰な吸着作用が抑制されることによって、観察可能な氷中の複合体粒子の数が大幅に増加する等、試料の質の向上が確認できた。

3. 今後の展開

本研究によって、複製因子が切り替わる際の間状態を明らかにすることができ、DNA の「手渡し」(或は「バトンパス」)機構を初めて可視化することができた。今後は DNA 基質を変えることで中間状態の前後のステップの可視化や、PolB 等の他の複製因子間での切り換え機構を調べる。また、電子直接検出器によって高分解能の解析の可能性が示されたので、試料作成条件の検討を行い、高分解能の立体構造解析を目指し、原始レベルでの切り換え機構の考察を行う。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

複製因子-PCNA 複合体の構造解析に関しては、FEN-PCNA-DNA 複合体の構造を得ることで、ラギング鎖における重要な3つの3者複合体の構造解析を完結することができた。また次のライゲーション反応への過度的状態である FEN-Lig-PCNA-DNA 複合体の構造解析も進展し、2つの因子の間で実際に「DNA バトンパス」がなされる様子を初めて可視化することができるなど、概ね当初の計画通りの成果を達成できたと思われる。

単粒子解析に関しては近年、研究開始時には想定できなかった革新的な検出器の進化がみられ、本研究においても急遽取り組み、高分解能の解析の可能性を示すことができた。今後は早急に同新技術により高分解能の解析を完遂することが急務であると考えます。

PCNA は複製のみならず、DNA の修復、転写に関わる様々な因子と結合することから、本研究は他の DNA 代謝に関わる超分子複合体の制御機構の解明にも、直接繋がる可能性が高い。また本研究で培われた解析技術も、これらの超分子複合体の解析に応用可能であると考えている。

一方、複製ヘリケース、複合体ヘリケースに関しては、上記のテーマ A に注力したこと、安定な複合体の再構成条件を得るのが困難であったため、複合体全体の解析に進展しなかった。最近、海外で MCM 複合体の電子顕微鏡による高分解能の解析が報告された(Li et al., 2015)が、DNA については可視化されておらず、DNA の2重鎖から単鎖への巻き戻しの機構も全く未知のままである。この系についても解析を進めて行く必要がある。

標識技術については、簡便で実効性のある DNA 末端標識が得られた。本標識は AFM 等の他の可視化技術にも応用可能で、汎用性は高いと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での

評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

PCNA(Proliferating Cell Nuclear Antigen)を介して DNA に結合する DNA polymerase 複合体の構造をクライオ電顕で単粒子解析し、分解能は低いが DNA が含まれた構造を解明することに成功し、新たなメカニズムを提唱した。しかし、まだ分解能が低く、論文発表には至っていない。

今後は、電子直接観察検出器(DED: Direct Electron Detector)のマシントimeを確保して、高分解能構造を得る努力をするのが急務であると思われる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Kozo Takeuchi, Tatsuya Nishino, Kouta Mayanagi, Naoki Horikoshi, Akihisa Osakabe, Hiroaki Tachiwana, Testuya Hori, Hitoshi Kurumizaka, Tatsuo Fukagawa. The centromeric nucleosome-like CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA. *Nucleic Acids Research* (2014), 42(3):1644-1655.

著者. 発表論文タイトル. 掲載誌名. 発行年, 巻号, 始頁-終頁, その他

2. Shinji Aramaki, Kouta Mayanagi, Kazuhiro Aoyama, Takuo Yasunaga. Revealing the intracellular ultrastructure of filopodia with cryo-electron tomography. *Microscopy* (2014) **63**: 133-134.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. Kouta Mayanagi, Molecular Architecture and Regulation Mechanism of DNA Replication Fork Complex Revealed by Single Particle Analysis. IGER International Symposium on Frontiers in Biological Research with Advanced Electron Microscope Technologies, Nagoya, 2015 年 1 月 15-16 日(招待講演)
2. Kouta Mayanagi, Shinichi Kiyonari, Hirokazu Nishida, Sonoko Ishino, Ryosuke Fujikane, Mihoko Saito, Daisuke Kohda, Yoshizumi Ishino, Tsuyoshi Shirai, Kouta Mayanagi Single particle analysis of molecular architecture of DNA replication fork complex and switching mechanism of replication factors. 18th International Microscopy Congress, Prague Czech Republic, 2014 年 9 月 8 日
3. Kouta Mayanagi, Shinichi Kiyonari, Hirokazu Nishida, Sonoko Ishino, Mihoko Saito, Daisuke Kohda, Yoshizumi Ishino, Tsuyoshi Shirai, Kosuke Morikawa, Molecular architecture and switching mechanism of the replication fork complex Gordon Research

Conference, Three Dimensional Electron Microscopy, Girona, Spain, 2014 年 6 月 23 日

4. 真柳 浩太 DNA 複製に関する超分子複合体の単粒子解析、日本顕微鏡学会第 57 回シンポジウム、名古屋、2013 年 11 月 16 日(招待講演)
5. Kouta Mayanagi, Shinichi Kiyonari, Hirokazu Nishida, Sonoko Ishino, Mihoko Saito, Daisuke Kohda, Yoshizumi Ishino, Tsuyoshi Shirai, Kosuke Morikawa, Electron microscopic analysis of molecular architecture and switching mechanism of DNA replication fork complex, ICSG2013-SLS, Sapporo, 2013 年, 7 月 30 日-8 月 31 日

総説

1. 真柳浩太、単粒子解析で迫る DNA 複製フォーク複合体の機能構造連関. 顕微鏡、(2014)、49(2): 110-117.(査読有)