

# 単粒子解析法で迫る DNA 複製フォーク複合体の機能構造連関

## Single Particle Analysis of Replication Fork Complex

真 柳 浩 太

Kouta Mayanagi

九州大学生体防御医学研究所

科学技術振興機構, さきがけ

**要 旨** 全ての生命の遺伝情報の継承の根幹をなす DNA の複製には、多数の蛋白質因子が関わり、レプリソームと呼ばれる巨大な超分子複合体を形成し、綿密な制御を通じてその機能を発揮している。電子顕微鏡による単粒子解析は、このような複雑で結晶構造解析が困難な系の解析に最適である。我々は DNA の複製の中核であるレプリソームの中で重要な役割を担う DNA ポリメラーゼや DNA リガーゼと、基盤分子 PCNA そして DNA から構成される複合体の解析を行い、結晶構造解析からは知り得なかった因子間の相互作用を新たに見いだした。その結果をもとにレプリソームを構成する因子の制御機構、複合体の再編機構を考察した。

キーワード：単粒子解析, クランプ, DNA 複製, 複製フォーク, 超分子複合体

### 1. はじめに

DNA の複製・修復・組換えには多数の蛋白質因子が関わり、DNA 上でレプリソーム等の巨大な超分子複合体を形成している。これらの超分子複合体は、反応の各段階で構成因子の会合及び解離を適宜行うことで適切に自身の構成を再編成させて、一連の反応を綿密に制御している。従ってその機構を理解するためには、個々の構成因子の結晶構造を知るだけでは限界があり、各反応段階における複合体全体の構造解析が必要である。現在、蛋白質の立体構造解析で最も威力を発揮しているのは結晶構造解析である。2014年6月現在で10万件を超える PDB (Protein Data Bank) の構造情報のうち、大半が結晶構造解析によってもたらされている。この手法を用いて、転写と翻訳に関してはその中心的な超分子複合体の構造 (RNA ポリメラーゼ複合体及びリボソーム) が、既に原子レベルで得られている。しかしながら、筆者等が対象としている DNA の複製に関しては、その中核と考えられているレプリソーム (図 1A) の全体構造の知見が未だ十分ではない。レプリソームの場合、複製開始点認識複合体 (Orc: origin recognition complex) から始まって、複製前複合体 (PreRC: pre-replicative complex)、複製開始複合体 (PreIC: pre-initiation complex) 等の構造を経る。構成因子が様々な段階で大きく入れ替わるため遷移的あり、それに伴ってダイナミックな構造変換も起こる。そのために、全体像を捉えにくいということが構造解析がなかなか進まない一因として挙げられる。

電子顕微鏡による単粒子解析は、複合体の多数の粒子像から立体構造を得るため、このような結晶構造解析が困難なシステムの機能構造の解析に適している。また、複製に関しては、複合体全体の構造は未知であるが、必要な因子はほぼ全て同定されており、且つそれぞれの因子単独の結晶構造は既に得られているものが多い。従って、単粒子解析によって複合体全体の3次元マップが得られれば、個々の因子や部分構造の結晶構造を当てはめることで、複合体全体の原子モデルを構築して、反応及び制御機構をアミノ酸レベルで考察することも可能となる。

### 2. 複製フォーク複合体

DNA 複製の進行時、DNA2 重鎖はヘリカーゼによってほどこかれて、2本の単鎖に分かれることで複製フォーク構造を形成する (図 1B)。DNA ポリメラーゼを始め、PCNA、DNA リガーゼ等の様々な因子はこの領域に集まり、複製フォーク複合体を形成し協調的に DNA の複製を行う。ここで、2本の DNA 単鎖は互いに逆向きであり、また DNA ポリメラーゼが 5' → 3' の方向にのみ複製可能であることから、“リーディング鎖” においてのみ連続的な複製が行われる。反対側の“ラギング鎖” はヘリカーゼによる巻き戻りで一本鎖領域が拡大される度に 5' → 3' 方向へ断片的に複製が行われ、後に DNA リガーゼによりこの断片 (岡崎断片) の連結が行われる。また DNA ポリメラーゼが複製を行う際、単独では直ぐに DNA から外れてしまい効率良い複製が行えない。例えば真核生物の Polδ では数塩基しか連続で複製できないことが知られている。しかしながら、DNA クランプ (或はスライディングクランプ) と総称され、リング状に DNA を取り囲む (クランプする) タンパク質に結合することで DNA か

〒 812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1  
TEL & FAX: 092-642-6833  
E-mail: maya@bioreg.kyushu-u.ac.jp  
2014年5月11日受付

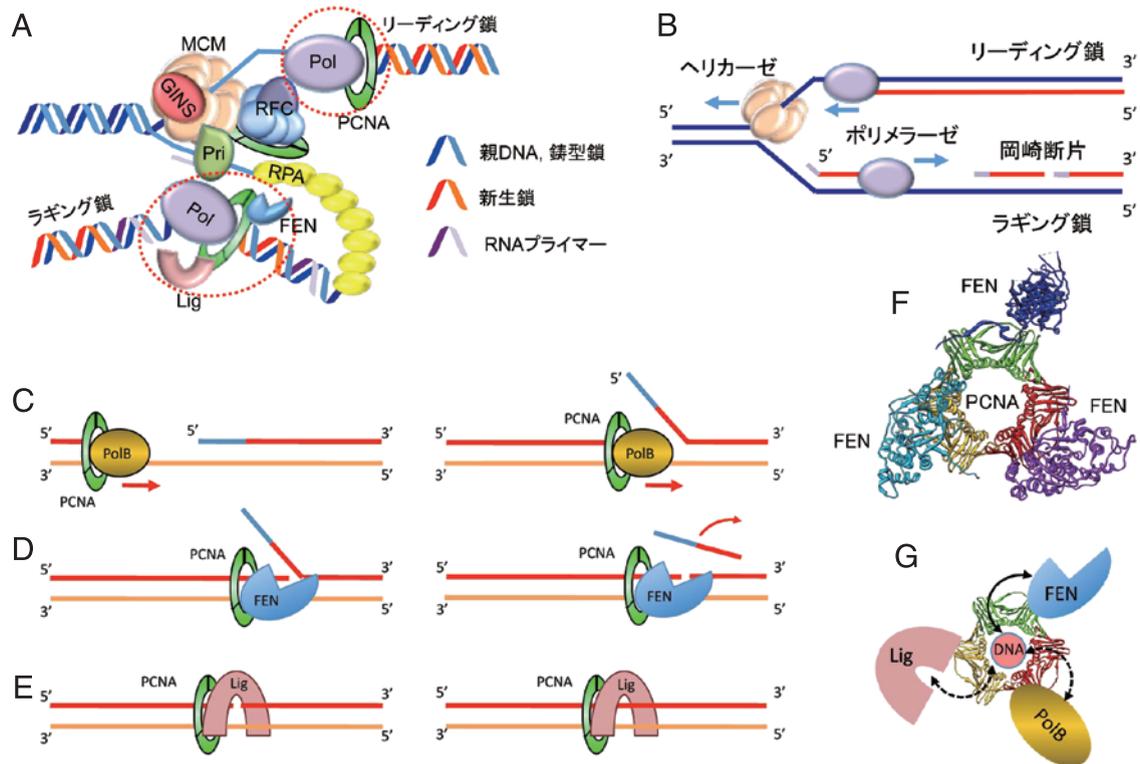


図1 (A) DNA複製の場レプリソームの模式図(トロンボーンモデル)。構成因子個々の構造はほぼ得られているものの、全体の構造は明らかになっていない。本稿で扱った構造を赤点線で囲んだ。(Pol:ポリメラーゼ, Lig:リガーゼ, PCNA:クランプ, MCM:ヘリカーゼ, GINS:MCM補助因子複合体, RFC:クランプローダ, Pri:プライマーゼ, RPA:一本鎖DNA結合蛋白質, FEN:フラップエンドヌクレアーゼ) (B)複製フォーク。DNA2重鎖はヘリカーゼによってほどかれ、リーディング鎖では複製が連続的に行われるのに対して、ラギング鎖側では断片的におこる。(C)–(E)ラギング鎖におけるDNA複製。PolBによる複製が進行して前方の既に複製が済んだ領域に到達し、フラップ構造を形成する(C)。FEN分子(Flap Endonuclease)がフラップ構造を認識してこれを切断する(D)。DNAリガーゼがニックを認識して断片同士を連結する(E)。(F)ヒトのFEN-PCNA複合体の結晶構造<sup>1)</sup>(PDB ID:1ul1)。(G)PCNAツールベルトモデル。複数の因子を同一のPCNAリング上に留め、反応に応じて切替える。

ら外れることなく効率良い複製が可能となる(図1C)。真核生物と古細菌では、PCNA(Proliferating cell nuclear antigen)がこのクランプの役割をしている。PCNA分子は2つの相同なドメインから成り、3量体リングを形成する。このため、電子顕微鏡を用いて観察すると六角形で中心に穴の空いた粒子として認識される。

現在ではこのPCNAはポリメラーゼの活性を促進するだけでなく、複製、修復、細胞周期制御等、実に様々なDNAの代謝に関与する因子が結合することが分かってきており、結合因子の数は既に50を超える。たとえば、複製の過程においては、前出のラギング鎖では図1C~1Eに示す1連の反応が繰り返していると考えられているが、ポリメラーゼのみならず、図中のリガーゼそしてFlap endonuclease(以下FEN)といった因子等もPCNAに結合することが知られている。

これらの因子の多くは、主にN末端やC末端の柔軟なループ上に現れるPIP(PCNA interacting peptide) boxモチーフと呼ばれる保存されたアミノ酸配列を介してPCNAに結合する。PCNA自体が3量体を形成することから、最大で3つの因子が同一のPCNAリングに結合可能であり、実際に複製因子の

一つであるFENとPCNAの結晶構造<sup>1)</sup>では3つのFEN分子が一つのPCNAリングに結合していた(図1F)。このような知見から、3つの異なる因子をDNAの近傍に留め、必要に応じて切替えるPCNAツールベルトモデル<sup>2)</sup>が提唱されている(図1G)。このようなモデルは、反応の効率向上を説明できるという点では、確かに魅力的ではあるが、上述のように、既に50を超える因子の切替えをこのような単純なモデルのみで説明するのは困難である。複製因子の複合体からの解離、新たな因子の結合、即ち複合体の再編による切替えも必要であると考えられるが、前述のツールベルトモデルと同様に、その詳細な機構については全く分かっていない。このような機構の解明には複合体全体の構造解析が必須である。しかしながら現在、フォーク複合体の結晶構造解析については、主に複製因子とDNAや、複製因子とPCNAの複合体等の部分構造の解析に留まっているのが現状である。

我々は以前、PCNAをDNA上に装填するクランプローダRFCとPCNA及びDNAの3者複合体について電子顕微鏡と単粒子解析を用いて三次元構造を解析した<sup>3)</sup>。これに対し、結晶解析では近年になって、ようやくファージのクランプと

クランプローダを用いて3者複合体の構造が得られているに過ぎず<sup>4)</sup>、結晶構造解析の難易度が非常に高い系であることには変わりはない。また、真核生物と古細菌の間で、複製に関与するタンパク質を比較すると、その構造が大変良く似た構造であることが明らかになってきた。実際、両者で結晶構造が明らかになっているPCNA、リガーゼ等を比較して見ると大変に似た構造<sup>1,5~8)</sup>であり(図1F, 図3A, 図7)、このことから、非常に安定な超好熱古細菌の系を用いて複製の構造解析研究を進めるメリットは大きい。

### 3. 単粒子解析

電子顕微鏡は本来、非常に高分解能の装置であるが、生物試料が観察対象の場合には電子線による損傷が深刻であるために、照射できる電子線量が限られてしまい、なかなかその能力を存分に発揮できない。それ故、分解能を向上させるためには、なんらかの平均化のプロセスが必須となる。2次元結晶やチューブ状結晶等、対称性の高い試料を利用すると、この平均化のプロセスが大変効率良く行えるため、特に高分解能の解析を中心に活用されてきた。その一方で、電子顕微鏡が超分子複合体の個々の粒子の像を直視できるという最大の利点を活用し、平均化のプロセスを計算機による画像処理及び、構造解析計算で行うのが単粒子解析である。この手法は結晶化のプロセスを必要としないため、溶液条件に比較的縛られることなく、生理的条件下の複合体の観察が可能であり、微量希薄なサンプルでも解析が可能という電子顕微鏡の利点も非常に有効に活用できる。尚、本稿で紹介する研究においては、画像データの取得にあたり、MDS (Minimum Dose system) を用いた。この「電子線損傷軽減システム」は、特に凍結試料を解析する際に必須な撮影システムであるが、電子線に比較的強いとされる負染色試料の場合にも、構造解析を行う際にはやはり必要であり、また画像データの取得の効率向上にも繋がると筆者は考える。

電子顕微鏡で観察される像は複合体の投影像であるので、立体構造解析を行うためには、複合体粒子の様々な方向を向いた像を用いて、その投影方向を個々の粒子像について決定し、逆投影法等で再構築する必要がある。(立体構造の再構築法に関して、邦文の概説としては本誌の解説<sup>9)</sup>等を参照して頂きたい。) その際に原則としては、観察している複合体の組成は無論同一である必要があるが、解析する粒子の立体構造も同一、つまり構造変化はないことが通常前提となる。組成の違いあるいは構造変化が起きている可能性がある場合、投影像の違いが粒子の向きに因るものなのか、組成及び構造変化に因るものなのかを知る事は難しく、各粒子像の投影方向の決定を誤りやすくなり、また実際には異なる複数の構造を同一の構造として解析してしまうため、誤った立体構造を構築してしまう。このような誤りを防ぐため、先ず複合体の組成が同じになるように、電顕観察用試料を作成する直前に、ゲル濾過クロマトグラフィー等を用いて対象となる複合体を精製する。筆者等は微量試料用の液体クロマト装置と

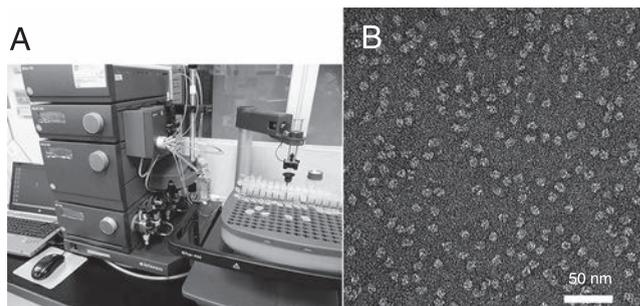


図2 (A) 複合体精製に用いる微量試料用液体クロマト装置 (AKTA micro (GEヘルスケア社)). (B) PoIB-PCNA-DNA複合体 (負染色) の電子顕微鏡写真<sup>18)</sup>. スケールバーは50 nm.

して、これまでSMARTシステム(旧アマシャムバイオサイエンス社(現GEヘルスケア):製造中止)、そして現在はその後継機に相当するAKTA micro(図2A, GEヘルスケア社)等を主に使用している。

さて、複合体の粒子が支持膜に対して特定の方向にのみ向いて吸着する際、立体構造解析を行うためには試料を傾斜させることで、様々な方向からの投影像を取得する。一般的には傾斜像に続き同一視野の非傾斜像をセットで記録して解析するランダムコニカルティルト法(Random conical tilt method<sup>10)</sup>(邦文総説<sup>11)</sup>も参照)を用いる。この手法に適した解析ツールとしては単粒子解析の開祖の一人でもあるJoachim FrankのグループによるSPIDER & WEB<sup>12)</sup>([http://spider.wadsworth.org/spider\\_doc/spider/docs/spider.htm](http://spider.wadsworth.org/spider_doc/spider/docs/spider.htm))が有名である。筆者等が以前行ったRFC小サブユニット6量体リング<sup>13)</sup>、リバースジャイレース<sup>14)</sup>、PDE6複合体<sup>15)</sup>等の解析にはこのソフトウェアを用いた。

一方で、超分子複合体が支持膜に対して様々な方向を向いて吸着する場合は、様々な方向から投影した像が得られているので、コモンライン法等を用いて個々の粒子像の投影方向を決定し、逆投影法により初期立体構造を構築する。その後、粒子の向き等のパラメータを繰り返し計算によって精密化し、立体構造計算を収束させていく。今回取り上げる複製フォーク複合体は上記条件を満たしていたため、本手法を用いて解析した。

解析ソフトとしては、EMAN<sup>16)</sup>(<http://www.msg.ucsf.edu/local/programs/eman>)を用いた。現在ではこの後継のパッケージとしてEMAN2も公開されている。コモンライン法の問題点としては、先ず投影像から投影方向を決定するために原理的に半分の確率で鏡像体が構築されることがあげられる。また、得られる投影像が多様であることが本手法を適用する際の一つの判断基準ではあるが、対象の立体構造が変化してしまう場合には前述のように、解析の大前提が崩れてしまうため、実際とは異なる立体構造が構築されてしまう。これらの問題が生じているか否か判断する方法としては、傾斜像のデータを活用する<sup>17)</sup>。また複合体の部分結晶構造が得られている場合には、電顕の密度マップの該当する領域と比較する

ことで解決することもある。

我々はこれまでに、リング状のクランプPCNAをクランプローダRFCが開いてDNAに乗せる瞬間の複合体<sup>3)</sup>、ポリメラーゼとPCNAとDNAの複合体<sup>18)</sup>、そして岡崎断片の連結を担うリガーゼとPCNAとニック入りDNAの複合体<sup>19)</sup>、以上3つの系に関して構造解析を行ってきた。本稿ではポリメラーゼ及びリガーゼの系の構造解析を中心に解説する。

#### 4. ポリメラーゼ-PCNA-DNA 複合体

真核生物と古細菌ではファミリーBに属するDNAポリメラーゼ(以下PolB)がDNAの複製時に重合反応を行う。これらの酵素は複製を行うにあたって実に $10^9$ 塩基につき、1個程度の間違いしか起こさず、極めて高い忠実度を誇る。その一つの要因として複製を行うポリメラーゼ活性部位の他に、複製を誤った際にその部分を削ってやり直す、即ち校正を行うために必要なエキソヌクレアーゼ(exonuclease)活性部位を持つことが挙げられる。また超好熱古細菌のPolBはPCR反応に用いられることから、応用面でも大変重要な蛋白質である。

解析の当初、この複合体の部分構造として、まず同じ古細菌*Pyrococcus furiosus*(以下Pfu)のPCNAの3量体リングの構造<sup>5)</sup>をすでに我々のグループが決定していた。PolBに関し

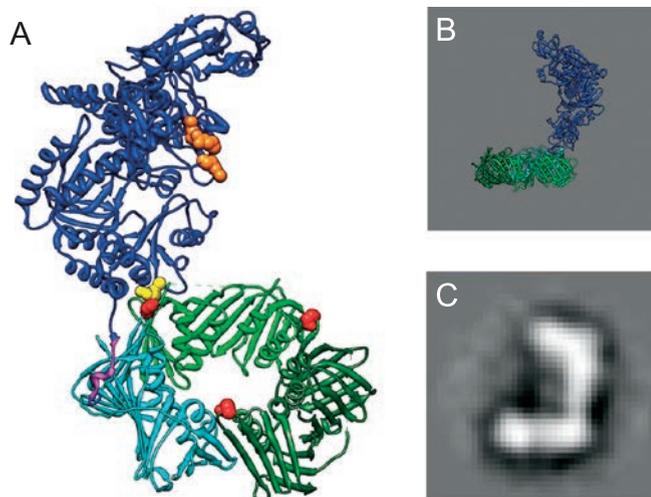


図3 PolB-PCNAの結晶構造

(A) 古細菌*Pyrococcus furiosus*(Pfu)のPolB-PCNAの結晶構造(PolB:青, PCNA:シアン, PDB ID:3a2f)この結晶構造にPCNA分子2個(緑及び深緑)をモデリングによって足すことで複合体の構造を構築した。PolBはPCNAに対して相対的に立った配置となっており、複製モードにおける構造に近いと考えられる<sup>6)</sup>。PolBのC末ループ上のPIP boxモチーフを紫で表示した。その近傍でPCNAのグルタミン酸(E171:赤色)とPolBのアルギニン(R706:黄色)が塩橋を形成している。この結合は校正モード時には切れる。オレンジは単粒子解析で校正モード時にPCNAとの相互作用に用いられることが明らかになったアルギニンのクラスター。(B) A図の推定モデルのside view図(文献6)より改変)。この予想モデルと極めて類似した構造がPolB-PCNA-DNA複合体の電子顕微鏡像の平均像(C)で観察された<sup>6)</sup>。

ては、Pfu PolBを含むいくつかの類縁の古細菌PolB単独の構造<sup>20)</sup>、ポリメラーゼとDNAの複合体の構造<sup>21,22)</sup>、PolBとPCNAの複合体の構造等の幾つかの部分構造は得られていた。このうちPolBとPCNAの複合体<sup>6)</sup>は我々のグループの西田博士等によって得られたが、結晶化のためにリングを形成しない変異型PCNAを用い、PolBとPIP-box配列を介して結合したPCNAを1分子ずつ含む構造であった(図3A, 青: PolB, シアン: PCNA)。この部分構造にモデリングによってPCNAを2分子(図3A, 緑, 黄緑)補間することでPCNAリングとPolBの複合体のモデルを構築し、これを元にPIP-box(図3A, 紫)近傍の両分子間の重要な相互作用(後述)とポリメラーゼの反応モードの切り替えの機構を論じた。しかしながら、PolBとPCNAそしてDNAの三つを含んだ複合体については構造が得られていなかったため、単粒子解析によって研究を進めた。

#### 5. PolB-PCNA-DNA 複合体の単粒子解析

PolB-PCNA-DNA複合体の電子顕微鏡像を図2Bに示す。このような電子顕微鏡画像から個々の複合体の像を約2万粒子程切り出し、構造解析を行った<sup>18)</sup>。

単粒子解析によって得られた複合体の立体構造を図4に示す。前述の通り、PCNAは今では様々な因子に対する基盤分子であることが判明しているが、そもそもはDNAポリメラーゼを活性化する因子として着目された。その点において本構造はいわば原点とも言える構造であり、それを初めて可視化した点で重要である。複合体は2層で構成され、下側にはPCNAの3量体リングが配置され、その上にPolBがPCNAリング上に覆い被さるように結合していた。底面から見ると、PCNAの輪郭は六角形状であるものの、詳細にみると平らな辺と凹んだ辺が交互に現れ、3量体構造に起因する3回対称性をもつことに気付く(図4A)。

この特徴のため、PCNAサブユニットを一意的に当てはめることが可能となった(図4A)。実際にPCNAの結晶構造を当てはめてみると極めて良く一致し、凹んだ辺はPCNAのサブユニット間の境界に相当する。一方フラットな辺は、PCNAを構成する2つのドメイン間を繋ぎ、且つPIP-boxモチーフの結合部位でもあるループ(IDCL: Inter-Domain Connecting Loop)に相当する事が分かった。DNAはPCNAのリングの中心を貫通し、PolBのエキソヌクレアーゼ活性部位へ伸びていることから、得られたのは校正モードにおける複合体の構造であることが分かった(図4B)。興味深いことに、PolBは2個のPCNA分子と接触していた。PolBの結晶構造を当てはめたところ、そのうちの一つは予想どおりPolBのPIP-boxとPCNAの既知の結合であったが(図4C, 4E)、もう一方はこれまで、結晶構造解析や表面プラズモン共鳴等、他の手法からは全く予想されていなかった新規の接触であった(図4D, 4F)。この接触のために、PolBはこれまでの予想と異なり、ほぼ水平に、完全に蓋をする様にPCNAに覆い被さっていた。

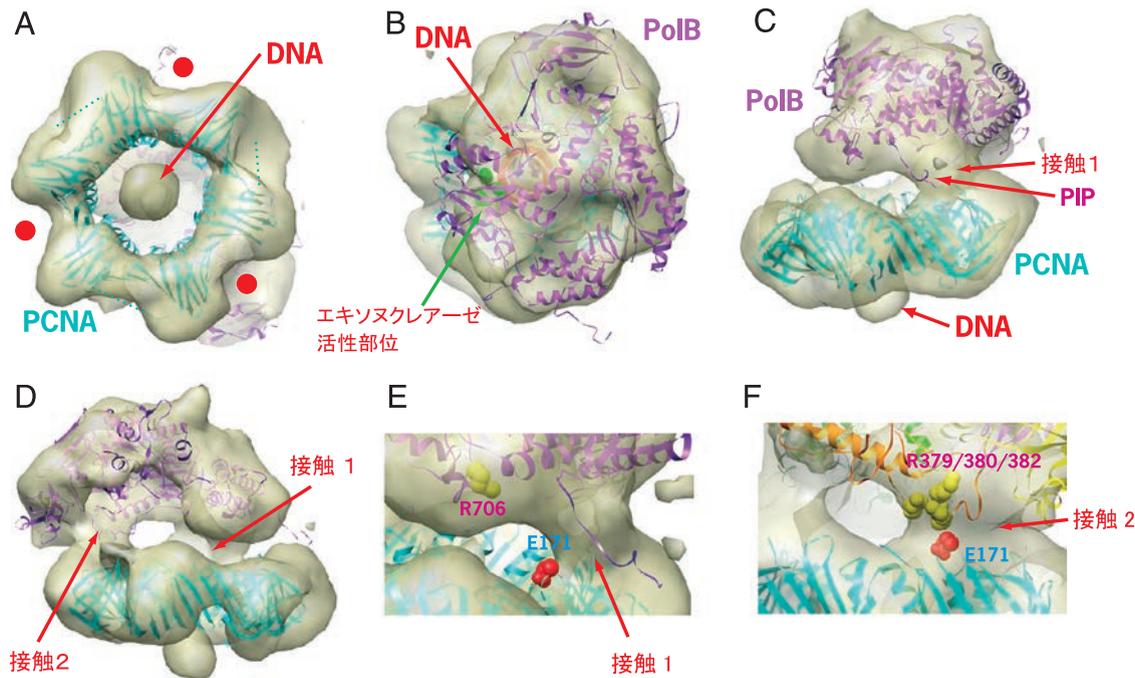


図4 PolB-PCNA-DNA 複合体の立体構造

(A)–(D) 電子顕微鏡による単粒子解析法によって18897個の複合体の粒子像から計算した。PolB (紫)、PCNA (シアン) 及びDNA (赤) の原子モデルを当てはめた。PIP配列による既知のPolB-PIP結合(接触1)の他に、新たに隣のPCNAとも結合していること(接触2)が明らかになった。DNAがエキソヌクレアーゼ活性部位へ向かうことから校正モードにおける複合体の構造だと分かる。(E)接触1付近の拡大図。図3で塩橋を形成していたPolBのR706とPCNAのE171は離れている。(F)接触2付近の拡大図。(文献18)より改変)

## 6. PolBの複製・校正モードスイッチ

これまでに、複製モードにおける3者複合体の結晶構造は得られていない。ポリメラーゼとDNA複合体等の部分構造や、DNAがPCNAを貫通するという条件をもとにするとPolBは図4の構造よりもPCNAに対して立っていて、我々が以前構築した図3A(及び図3B)の推定モデルに近い配置になることが予想される。この構造はあくまでモデリングで得たものではあるが、電子顕微鏡像を詳細に見ると、我々の観察条件において頻度は高くはないものの、この構造に相当するものが存在することが明らかになった。それらを積算・平均することで、図3Cに示す2次元平均像を得ることができ、この構造が確かに溶液中に存在することを示すことができた<sup>6)</sup>。

結晶中でPolBはPCNAとPIP-boxモチーフを介して結合していたが、そのヒンジの近傍で2つのアミノ酸、すなわち負電荷を持つPCNAのグルタミン酸(E171:図3Aで赤で表示)と正電荷を持つPolBのアルギニン(R706:図3Aで黄色で表示)が塩橋を形成していることを見いだした。PolBとPCNA及びDNA間の立体障害等を考慮すると、DNAをエキソヌクレアーゼ活性部位に、即ち校正モードの配置に持つていくには、この両アミノ酸間の塩橋が切れる必要があることが分かった。この両アミノ酸は他のPolBやPCNAで保存されているうえに、他のアミノ酸に入れ替えた変異体が影響を受けることから、このアミノ酸間の結合が、複製・校正のモード間の切り換えに寄与していることが明らかになった<sup>6)</sup>。

以上の既知情報を念頭に我々の単粒子解析の結果を精査すると、我々の構造では両アミノ酸は有意に離れており(図4E)、上記の切り換えモデルでの校正モードの要件を満たしている。さらに、今回新たに見いだした第2の接触を見ると、驚くべきことに、隣のPCNAの同じグルタミン酸(E171)がこの場所に存在し、PolB側には3つのアルギニンがクラスターを作るように(R379/380/382)配置されていた(図4F)。更に、他の古細菌の類縁のPolBで構造が既知のものについて構造配列アライメントを行うと、この領域に塩基性アミノ酸が頻出していることも明らかになった。つまりPIP-box近傍で使われていたE171とPolBのアルギニンによる切り換えスイッチが隣のPCNAで第2の接触でも用いられていることが示唆された。この事をアミノ酸レベルで確認するため、変異体を用いた生化学実験、電子顕微鏡観察実験を行った。PolB側の3つのアルギニンに順次変異を入れていくにつれ、エキソヌクレアーゼ活性が激減し(図5A)、また複合体の平均像においても、従来の閉じた図4の構造よりも第2のコンタクトが解放されてPolBが立った構造のほうがむしろ主流になることが分かった(図5C)。以上のことにより、図6のようにPolBのモード間の切り換えはPolB-PCNA-DNA複合体のダイナミックな構造変換を伴い、PCNAのE171とPolBのアルギニンの相互作用のオン・オフによって制御されていることを示す事ができた。尚、図中の複製モードの複合体の立体構造(図6B)は実験では未だ得られていないが、図3Aの構造やPolB-DNA等の部分構造を元にモデ

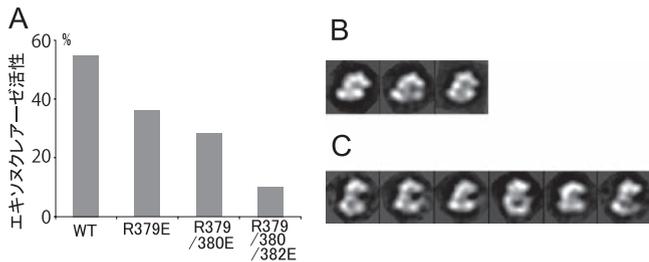


図5 PolB 変異体の解析<sup>18)</sup>

(A) 接触2の3つのアルギニンを順次置換していくにつれ、DNA校正時に機能するPolBのエキソヌクレアーゼ活性の低下がみられた。(B)-(C) PolB (変異体)-PCNA-DNA複合体の平均像。接触2のアルギニンをグルタミン酸に置換した変異体の平均像には野生型と同様の閉じた形状のもの(B)も観察されたが、多くは接触2が切れることによりPolBがPCNAに対して立った構造(C)を示していた。

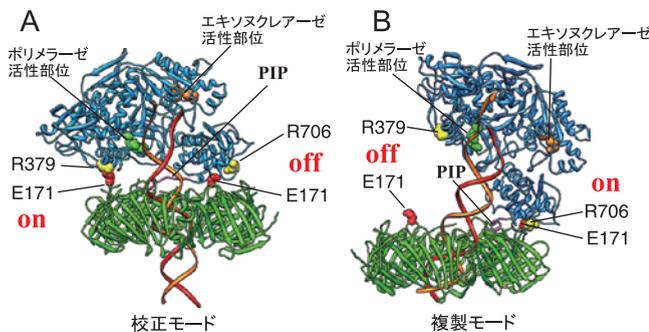


図6 複製モード・校正モード切換え機構<sup>18)</sup>

(A) PolB-PCNA-DNA複合体の校正モードと、(B)複製モードの切換えには隣接する2つのPCNAのE171が寄与しており、PolBのPIP-box近傍のR706とR379近傍のアルギニンクラスターとの塩橋の架け替えによって制御されるという機構が考えられる。

リングツール、SIRDシステム<sup>18)</sup> (<http://sird.nagahama-i-bio.ac.jp/sird/>, 邦文の解説は文献23)参照)を用いて構築したものである。このシステムは構造データベースから配列・構造類似性の高い因子の結晶構造を抽出(2次データベースの構築)、相互作用部位情報を元に、複合体の構造を予想するもので、本解析と並行して開発が進められたものである。

## 7. リガーゼ-PCNA-DNA複合体の単粒子解析

DNAリガーゼはラギング鎖において断片的に複製される岡崎断片を連結する非常に重要な因子であり、PolBと同様、生体中でPCNAにPIP-boxモチーフを用いて結合する(図1E)。DNAリガーゼについても筆者等が複合体の解析を始める時点でいくつかの結晶構造が解かれていて、そのうちの1つはヒトのリガーゼ(Lig1)とDNAの共結晶<sup>8)</sup>であった(図7)。それぞれの構造を見ると、全て柔軟なループで連結された3つのドメインから構成され、対応するドメイン個々の構造自体は極めて良く似た構造をしていた。しかしながら3つのドメインの相対的位置及び向きは異なり、全体構造は一見してかなり異なっていることが分かる。図7Aは我々のグループの古

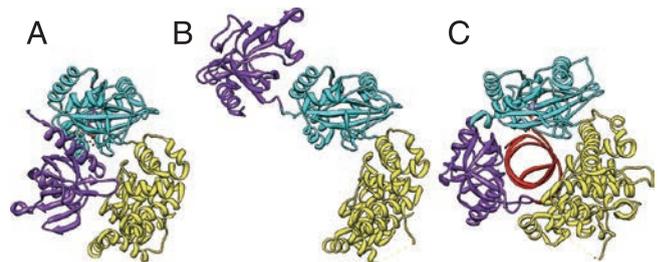


図7 DNAリガーゼ(Lig)の結晶構造

(A) 古細菌*P. furiosus* (PDB ID: 2cfm)<sup>7)</sup>, (B) 古細菌*S. sulfofolobus* (PDB ID: hiv3)<sup>24)</sup>, (C) ヒト由来 (PDB ID: 1x9n)<sup>8)</sup>のDNAリガーゼの結晶構造。N末から3つのドメインを黄色(DBD)、シアン(AdD)、紫(OBD)のリボンモデルで色わけした。ヒトのリガーゼLig1はDNAとの共結晶で解析され、ライゲーション反応時の構造をとらえている。

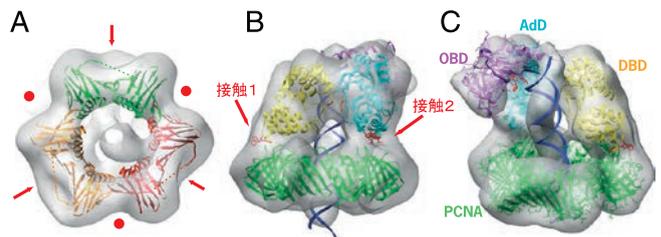


図8 Lig-PCNA-DNA複合体の立体構造<sup>19)</sup>

電子顕微鏡による単粒子解析法によって19544個の複合体の粒子像から計算した。底面(A)、正面(B)及び斜め上(C)から見た立体構造。DNA、PCNA及び、リガーゼの3つのドメイン(N末端よりDBD、AdD、OBD)の原子モデルを当てはめた。(A)のPCNAの領域では、サブユニット境界の凹んだ辺(赤丸)とドメイン間ループ(IDCL)由来の平らな辺(赤矢印)が明確に識別できた。またLigとPCNAの間で新規の接触2がみつかった。尚、(A)ではPCNAの3量体構造をより判別しやすくするため、3つのサブユニットを異なる色で表示した。

細菌由来のリガーゼ(以下Ligと表記)の結晶構造<sup>7)</sup>であるが、この構造とDNAに結合したヒトのLig1の結晶構造はコンパクトな構造をとっていたのに対して、古細菌*S. sulfofolobus*のLigでは図7Bの様に伸びきった構造をしていた<sup>24)</sup>。特に3番目のC末端ドメイン(OBD:図7にて紫で表示)が非常にダイナミックに動いていて、一見似た構造に見えるPfuLigとヒトのLig1を比較してもOBDの向きはほぼ逆になっていた。LigもPIP-boxモチーフを持っており、PCNAに結合することが分かっているが、複合体の結晶構造は未だ得られていないため、我々はこのLig-PCNA-DNA複合体をターゲットにした。基質のDNAはニックの塩基に2',3'ジデオキシヌクレオチドを用い、ライゲーション反応が進んでしまわない様にして、PolB-PCNA-DNA複合体と同様に精製、単粒子解析を行った(図8)<sup>19)</sup>。複合体は2層からなり、下側において中心のDNAを取り囲むようにPCNAが結合し、一方のLigはPCNAの上側に結合して、DNAには約半周程巻き付けていた。またPCNAのリングの3回対称性はPolBの複合体より分解能が高いこともあって、より顕著にみる事ができた(図8A)。

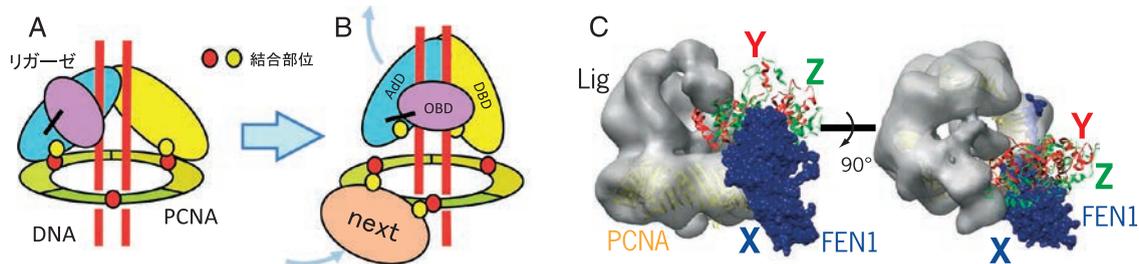


図9 因子の結合・解離による切換えの機構<sup>19)</sup>

(A) (B) Lig-PCNA-DNA 複合体の単粒子解析から推定されるモデル. 中間状態では PCNA との相互作用のため Lig は DNA と強固には結合していない (A). DNA に完全に巻き付いて反応が起きると PCNA との接触は解除され、次の因子が PCNA に結合可能となる (B). (C) ツールベルトモデルの検証. Lig-PCNA-DNA の構造に FEN-PCNA の結晶構造を重ねる事で、Lig と FEN 分子が共存できるかを調べた. 結晶構造中の 3 通りの配向のうち、X で示す配置の場合、立体障害は見られず、Lig と FEN は同一の PCNA クランプ上で共存できることが分かった.

一方で、3つの結晶構造から Lig は非常に柔軟性が高いことが予想されていたが、我々の単粒子解析から得た立体構造においても、Lig の領域の構造は結晶構造の何れとも異なり、そのまま当てはめることは不可能であった。しかしながら個々のドメインの形状は良く一致することから、3つのドメインの間のループを切り、各ドメインを独立に当てはめることにより、図8のリボンモデルに示す原子モデルを構築することができた。PolB の場合と同様、Lig は2つの PCNA と接触を持ち、N 末ドメイン DBD の既知の PIP-box を介した接触とは別に、中央の AdD ドメインも隣接する PCNA サブユニットと接触していた。我々の複合体も DNA を含んでいることから、本来なら部分構造に相当する Lig1-DNA 複合体の結晶構造 (図7C) に最も近いことが予想された。しかしながら両者を実際に比較してみるとまるで異なり、この第2の接触のために、我々の構造では Lig が DNA に完全に巻き付くことができていないことが分かる。これまでの結晶構造や生化学的なデータを元にするると、我々の構造はライゲーションを起こす前の中間状態と考えられる (図9A)。DNA のニックを埋めるためにはリガーゼは結晶構造のようにきつく DNA に巻き付く必要があり、その際には接触のうち少なくとも一つ、(DNA に密着する事を考慮すれば2つともの可能性もある)接触が解放されることになる (図9B)。ライゲーション反応の完了に伴って PCNA 上の結合部位が解放されることにより、次の因子が PCNA に結合可能となり、複合体の再編がおこるとい機構が考えられる。また本構造において、2つの接触がライゲーション直前の状態を安定化している様に見えるが、これに関連して PCNA が Lig のライゲーション反応に対して、むしろ阻害的に働くという生化学的な知見<sup>25)</sup>もあり、大変に興味深い。PolB の場合も同様の様子がみられたが、PCNA との多重の接触によって DNA を抱え込み、反応が完遂するまで、他の余計な因子の相互作用をブロックしているようにも見える。

## 8. 複製の切換え機構

以上、2つの複製因子 PolB 及び Lig において、既知の PIP-

box モチーフの他に隣接する PCNA との間にも接触が存在し、反応の制御等に寄与していることが明らかになった。複製において最重要な2つの因子でこのような共通の機構が見つかったことから、筆者等は、PCNA は従来考えられていたような単なる留め金に留まらず、反応の制御に積極的に寄与しており、更にこの多重の接触による制御機構は他の複製因子を始め、複製系以外の PCNA 結合蛋白質においても、一般的に存在している可能性があると考えている。

それでは、図1Gのツールベルトモデルは間違いなのか？反応の効率の面ではこの機構は大変有利であり、理に適っているように思える。また実際に FEN-PCNA の結晶構造 (図1F) のような知見<sup>1)</sup>や生化学的なデータで、このモデルをサポートするものも存在している。我々の2つの構造でも、共に PCNA は2分子占有されているものの、残る1つの PCNA サブユニットに関しては PIP-box 結合部位は完全にフリーである。この場所に他の因子が結合可能であるか、FEN-PCNA の結晶構造を当てはめて調べたところ、PCNA リングの穴から最もフリップアウトした FEN 分子の配向ならば、PolB の場合も Lig の場合 (図9C) も、FEN 分子は共存可能であることが分かった<sup>18,19)</sup>。おそらく複製因子は各反応段階に応じて、ツールベルトモデル、あるいは再編成による切換えの両機構を適宜使い分けているものと思われる。

## 9. おわりに

本稿では、JST の BIRD プロジェクト「実践による超分子複合体モデリングシステムの開発」及びその後継プロジェクト (2005 ~ 2010 年、研究代表者：白井剛) のもとで主に得られた成果のうち、筆者が実践した単粒子解析の部分を中心に紹介した。本プロジェクトは情報生物学、生化学・分子生物学、X 線結晶解析、電子顕微鏡を専門とする研究者が密接に連携することにより、実践的な解析を通じて超分子モデリングツール SIRD<sup>18,23)</sup>を開発するものであった。このような超分子複合体は、未だ決定的な解析法が確立していないものの、上記の複数の手法を用いて緊密に連携することが極めて有効であることが分かる。また、この連携において、単粒子解

析法が極めて重要な貢献ができたのではないかと自負する。これまで単粒子解析法の問題点はなかなか分解能が向上しないことであったが、上記の連携によって十分アミノ酸レベルの知見が得られる事が理解していただければ幸いである。また分解能に関しても、近年開発された Direct Electron Detector (DED: 電子直接検出カメラ<sup>26)</sup>) がこの数年で急速な発展をみせており、従来は高分解能の解析が困難な試料において原子レベルの解析が可能となってきた<sup>27,28)</sup>。今後、本装置の更なる改良、そしてなによりも一般研究室レベルにまで広く普及することで、単粒子解析法によって原子レベルに迫る解析が日常的に行われるようになることが期待される。

## 文 献

- 1) Sakurai, S., Kitano, K., Yamaguchi, H., Hamada, K., Okada, K., Fukuda, K., Uchida, M., Ohtsuka, E., Morioka, H. and Hakoshima, T.: *Embo J.*, **24**, 683–693 (2005)
- 2) Pages, V. and Fuchs, R.P.: *Oncogene*, **21**, 8957–8966 (2002)
- 3) Miyata, T., Suzuki, H., Oyama, T., Mayanagi, K., Ishino, Y. and Morikawa, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **102**, 13795–13800 (2005)
- 4) Kelch, B.A., Makino, D.L., O'Donnell, M. and Kuriyan, J.: *Science*, **334**, 1675–1680 (2011)
- 5) Matsumiya, S., Ishino, Y. and Morikawa, K.: *Protein Sci.*, **10**, 17–23 (2001)
- 6) Nishida, H., Mayanagi, K., Kiyonari, S., Sato, Y., Oyama, T., Ishino, Y. and Morikawa, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **106**, 20693–20698 (2009)
- 7) Nishida, H., Kiyonari, S., Ishino, Y. and Morikawa, K.: *J. Mol. Biol.*, **360**, 956–967 (2006)
- 8) Pascal, J.M., O'Brien, P.J., Tomkinson, A.E. and Ellenberger, T.: *Nature*, **432**, 473–478 (2004)
- 9) 安永卓生, 我妻竜三: 顕微鏡, **47**, 110–117 (2012)
- 10) Radermacher, M., Wagenknecht, T., Verschoor, A. and Frank, J.: *J. Microsc.*, **141**, RP1–2 (1986)
- 11) 真柳浩太, 宮田知子: 細胞工学 (秀潤社), **20**, 1350–1358 (2001)
- 12) Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M. and Leith, A.: *J. Struct. Biol.*, **116**, 190–199 (1996)
- 13) Mayanagi, K., Miyata, T., Oyama, T., Ishino, Y. and Morikawa, K.: *J. Struct. Biol.*, **134**, 35–45 (2001)
- 14) Matoba, K., Mayanagi, K., Nakasu, S., Kikuchi, A. and Morikawa, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **297**, 749–755 (2002)
- 15) Kajimura, N., Yamazaki, M., Morikawa, K., Yamazaki, A. and Mayanagi, K.: *J. Struct. Biol.*, **139**, 27–38 (2002)
- 16) Ludtke, S.J., Baldwin, P.R. and Chiu, W.: *J. Struct. Biol.*, **128**, 82–97 (1999)
- 17) Rosenthal, P.B. and Henderson, R.: *J. Mol. Biol.*, **333**, 721–745 (2003)
- 18) Mayanagi, K., Kiyonari, S., Nishida, H., Saito, M., Kohda, D., Ishino, Y., Shirai, T. and Morikawa, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **108**, 1845–1849 (2011)
- 19) Mayanagi, K., Kiyonari, S., Saito, M., Shirai, T., Ishino, Y. and Morikawa, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **106**, 4647–4652 (2009)
- 20) Hopfner, K.P., Eichinger, A., Engh, R.A., Laue, F., Ankenbauer, W., Huber, R. and Angerer, B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **96**, 3600–3605 (1999)
- 21) Shamoo, Y. and Steitz, T.A.: *Cell*, **99**, 155–166 (1999)
- 22) Franklin, M.C., Wang, J. and Steitz, T.A.: *Cell*, **105**, 657–667 (2001)
- 23) 白井 剛: 生物物理, **52**, 246–249 (2012)
- 24) Pascal, J.M., Tsodikov, O.V., Hura, G.L., Song, W., Cotner, E.A., Classen, S., Tomkinson, A.E., Tainer, J.A. and Ellenberger, T.: *Mol. Cell*, **24**, 279–291 (2006)
- 25) Jonsson, Z.O., Hindges, R. and Hubscher, U.: *Embo J.*, **17**, 2412–2425 (1998)
- 26) 宮崎直幸, 村田和義: 顕微鏡, **48**, 57–60 (2013)
- 27) Liao, M., Cao, E., Julius, D. and Cheng, Y.: *Nature*, **504**, 107–112 (2013)
- 28) Cao, E., Liao, M., Cheng, Y. and Julius, D.: *Nature*, **504**, 113–118 (2013)