DNAにクランプをはめ込むしくみ —単粒子解析で見た生き生きとした姿

独立行政法人科学技術振興機構CREST 鈴木博文*

*現在の所属：大阪大学蛋白質研究所附属プロテオミクス
総合研究センター

大阪大学大学院生命機能研究科 宮田知子
長浜バイオ大学バイオサイエンス学部

バイオサイエンス学科 真柳浩太
九州大学農学研究院遺伝子資源工学部門 石野良純

大阪大学蛋白質研究所生体分子認識 (タカラバイオ)

寄附研究部門 大山拓次, 森川耿右

1. 近頃の単粒子解析

タンパク質や核酸などの生物分子は、ダイナミックでフレキシブルだ。自身の構造を多様に変化させ、多彩な分子とのゆきずりの相互作用を繰り返し、しばしば巨大な複合体の形成に参加しながら、生命の営みを支えている。生物分子の原子レベルでの構造解析手法としてはX線結晶解析が最もメジャーで有効な手法であることは論を待たないが、その結果から見えるダイナミックでフレキシブルな特性は限られている。なぜなら、柔軟性や複雑性は結晶化の妨げになるため、それらの特性を削ぎ落とし、構造が均一な分子を解析対象とすることが多いからだ。一方、もっと「生き生きとした姿」を見るために、電子顕微鏡像の単粒子解析が近年盛んになっている。

単粒子解析とは、結晶のように配列した状態ではなくバラバラの状態の分子の電子顕微鏡写真を多数用意し、それらの画像解析からその分子の構造をもとめる手法である¹⁾。最大の長所は試料作成のハードルが低い

ことだ。X線結晶解析やNMR解析には濃度、純度、安定性、均一性の高い試料が大量に必要だが、単粒子解析はある程度の条件を満たせば可能だ。このため不安定な複合体や膜タンパク質などの、より「生き生きとした」状態の分子の構造解析に使用されている。これと引き換えになる最大の短所は分解能が低いことだ。現段階では原子レベルの分解能にたどり着けた例はない。20年以上の歴史をもつ単粒子解析が近年になって盛んになっている要因としては、(1) 構造研究の対象が結晶化に適さないものへ広がっていること、(2) 装置とノウハウの発展、(3) 単粒子解析から得られる3次元マップの「使い道」が急速に広がっていること、の3つがあげられる。この古くて新しい単粒子解析の近年の発展や今も抱える問題点などを、筆者らのクランプはめ込み機構の研究²⁾の紹介を通じて眺めてみよう。

2. ターゲットはリングをはめ込む分子機械

DNA鎖上を行き交うさまざまなタンパク質には、DNA鎖から離れることなく効率よく移動する能力が要求される。DNAと強く結合してはすばやく動けないし、弱い結合ですぐにはずれてしまうので工夫が必要だ。DNA複製の主役であるDNAポリメラーゼなどがこの問題の解決のためにとったのは、DNA鎖に直接結合するのではなく、DNA鎖を囲むリング状タンパク質であるクランプに結合するという方式である。これはカーテンレールなどにも見られるようにわれわれにも身近な方式だが、1つ面倒なことがある。クランプは閉じたリングのままではDNA鎖にはまり込むことができない。これを解決するのが、クランプローダーとよばれる酵素複合体である。クランプローダーは、リング状のクランプを開き、DNA鎖上の然るべき場所に導き、再び閉じるという一連の反応を、ATPの加水分解によるエネルギーを利用して触媒する³⁾。

クランプはめ込みメカニズムの興味深い点としては、生存に不可欠であることやその特徴的な働きのほかに、個性豊かな親戚をもつことがあげられる。クランプローダー構成タンパク質が属するAAA⁺ファミリーは、共通する構造モチーフをもつタンパク質のグループであるにもかかわらず、おのおのはタンパク質の分解やDNA

Mechanism to Load the Clamp onto DNA: Seeing Vivid Structures by Single Particle Analysis

Hirofumi SUZUKI¹, Tomoko MIYATA², Kouta MAYANAGI³, Yoshizumi ISHINO⁴, Takuji OYAMA⁵ and Kosuke MORIKAWA⁵

¹CREST, Japan Science and Technology Agency

²Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University

³Department of Bioscience, Faculty of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

⁴Laboratory of Protein Chemistry and Engineering, Faculty of Agriculture, Kyushu University

⁵Institute for Protein Research, Osaka University

Fig. 1 Electron micrograph of the clamp-loading complex. Bar, 500 Å.

複製、膜輸送などの実に多彩な細胞機能にかかわっている⁴⁾。クランプはめ込み機構の研究で明らかになる分子メカニズムは、多様な生命現象の研究に役立つ幅広い知見となるはずだ。

3. そこで単粒子解析

しかし残念なことに、このクランプはめ込みの分子メカニズムはほとんどわかっていない。クランプをはめ込んでいる瞬間の構造がわかっていないからだ。この「はめ込んでいる瞬間」を再現するには3人の役者、クランプ、クランプローダー複合体、DNAが不可欠で、その構造を見るには都合よく反応が停止した状態を捉える必要がある。全体の分子質量は約300 kDaで、現在の結晶化のターゲットとしてはそれほど巨大とはいえないが、構成分子の種類が比較的多いこと、DNA鎖も含む反応中間体の構造でありフレキシブルである可能性が高いことなどから、結晶化のリスクは高い。そこで筆者らは単粒子解析を使ってこの研究に取り組んでいる。

筆者らが使用しているのは超好熱古細菌 *Pyrococcus furiosus* 由来の系で、クランプはPCNAの3量体、クランプローダーは大サブユニット (RFCL) 1個と小サブユニット (RFCS) 4個の5量体である。これらのタンパク質と、複製途中の状態を模したDNA、つまり片側が2重鎖で途中から1重鎖になっているDNA鎖を混合し、ATPγSという加水分解を受けにくいATPの類似体を加えると、これらの分子は複合体を形成する。筆者らはこれを「クランプはめ込み複合体」とよんでいるが、その単粒子解析を以下の方法で行った。

4. 古い手法と新しい手法

単粒子解析で高分解能を目指すのであれば、氷に包埋された無染色試料の像 (クライオ電子顕微鏡像) を、電界放出型電子銃などの高度な技術を導入した顕微鏡で撮影するというのが常道であり、筆者らもそれに向

Fig. 2 Surface representations of the non-labeled (a) and labeled (b, c) clamp-loading complex. The double-(b) and single-(c) stranded termini on the DNAs were labeled. Bar, 100 Å.

けたアプローチを続けている。しかしスループットの都合などもあり、今回の解析で最も質の高い結果が得られたのは、昔ながらの方法で負染色した試料を、JEM-100CXという古い電子顕微鏡で撮影した像からであった (Fig. 1)。とはいえ、この旧式の方法にもいくつかの工夫を凝らした。特に重要だったのは撮影する視野を選ぶ基準だ。染色剤である酢酸ウラニルが試料を厚く覆っている部分は、一見コントラストが低く印象が悪いが、このような視野の像が解析には適していた。

撮影とは対照的に、画像解析については最新の手法を使用したことが功を奏した。今回使用したソフトウェアは比較的新しく製作が始まったEMAN⁵⁾とよばれるものである。EMANの作者らはこのソフトの開発の中でさまざまな新しい解析手法を導入し、シャペロニンGroELの構造を6 Å分解能で解析することに成功し、単粒子解析の1つの記録を打ち立てた⁶⁾。詳細はここでは述べないが、筆者らの解析も自動3次元マスクなどのEMANに導入されたばかりの手法をいくつか利用して、大幅に分解能を向上させることができた。

古い手法にも工夫の余地があり、新しい手法による大幅な進展もある。単粒子解析は今でも発展途上だ。

5. 地図は手に入った、その次は？

一般に、単粒子解析で直接得られるのは3次元マップである。しかし、3次元マップを得ることは電子顕微鏡による構造解析の最初のステップでしかないとChiuらという⁷⁾。3次元マップは白地図に似ていて、分子メカニズムの解明という名の旅に利用するには、方位を示しランドマークや地名を記す作業が不可欠だ。

上に述べた方法で、筆者らはクランプはめ込み複合

体の 12 Å 分解能の 3 次元マップを得た (Fig. 2a). 既知の結晶構造と比較し、クランプローダーとクランプの位置は概形からそれぞれ上側と下側であることがわかった。これでタンパク質の配置は特定できたが、問題は DNA の配置であった。そこで DNA のそれぞれの末端をストレプトアビジンというタンパク質でラベルした 2 種類の複合体を用意し、それらの構造解析も行った (Fig. 2b, c)。結果は明快だった。ラベル付の複合体の両方のマップにはっきりとラベル由来の密度が見られ、DNA の各末端の位置が明らかになった。これによりクランプの中央にある棒状の構造が DNA の 2 重鎖部分であること、そこから 1 重鎖の部分が右上に向かって複合体の中を通り抜けていることがわかった。このようにして全要素の配置が明らかになった。

実は、筆者らの研究グループにとってクランプはめ込み複合体の構造の論文発表は 2 度目のものである。1 度目の結果はクオリティがあまり高いものでなかったこともあり、そこから誤った結論を導いてしまった⁸⁾。このことが象徴するように、単粒子解析は分解能の問題に加えて、解釈が難しいという問題も抱えている。今回の解析では試料の作成方法から画像解析までさまざまな見直しをおこなったが、何よりこの 3 次元マップの解釈に気を配った。

6. 原子構造のジグソーパズル

X 線結晶解析には原子座標の決定という明確なゴールがあるが、単粒子解析のゴールはなんだろうか？ 単粒子解析で得られる 3 次元マップの最も効果的な「使い道」は、既知の部分的な原子構造を当てはめて、より大きい部分、あるいは全体の原子モデルを構築することである。また、原子構造がうまく当てはまることは、3 次元マップの正しさを示すことにもなる。原子構造データベースが充実し 3 次元構造予測も有力な手法となっている近年では、当てはめに使う部分構造が得られるチャンスが多くなり、このような方法が結晶化の困難な複合体全体の原子構造を構築するための主要な選択肢になりつつある。

今回のクランプはめ込み複合体の構成要素では、PCNA と RFCS のおのおののオリゴマーの結晶構造が得られているので^{9), 10)}、その中から取り出したサブユニット構造を当てはめに使った。RFCL の原子構造は得られていないので、類似性の高い RFCS で代用した。DNA については、1 重鎖部分は正確な予測が難しいので 2 重鎖部分のみの構造を使った。これらの原子モデルの当てはめは非常にうまくいった。原子モデルのマップからはみ出しも、原子モデルどうしの衝突もほとんど見られなかった。RFCL の代わりとして当てはめた RFCS

の付近に、原子構造が当てはまらず棒状にぽっかりと抜けた部位があった。この部位は RFCL にはあるが RFCS にはないドメインを示すものと考えられ、この構造から RFCL は酵母由来の RFC1 とよく似たドメイン配置をしていることがわかった。

今回の原子モデルは 1 個 1 個の分子を剛体として、しかも DNA 以外の分子は目視で当てはめたものである。しかし、生物分子は剛体ではないので、結晶化した状態と単粒子解析に使用した状態では大なり小なり構造が違っているはずである。正確な当てはめをするには分子内の構造変化も考慮に入れ、形状だけでなくエネルギー的にもつじつまの合う、最も妥当な当てはまりかたを計算する方法が必要になる。そのような方法はまだ実験段階であり今後の課題だ。

7. できあがった原子モデルは雄弁だった

こうして複合体の大部分を占める原子モデルが手にはいった (Fig. 3b)。文字通りの原子レベルの詳細な考察は今回のようなモデルからは困難だが、それでも以下に述べるようにクランプはめ込み機構についていくつかの興味深い知見が得られた。

クランプローダーは、(1) クランプを開き、(2) DNA 鎖上に導き、(3) クランプを閉じ、(4) 離れる、という具合に働いているはずだ。この流れを考えながら、できあがった原子モデルを見てみよう。まず最もインパクトがあるのは、クランプが開いていてその中心を DNA が貫いていることだ。このことから、これは (2) と (3) の間の状態を表した構造だと考えられる。つまり、念願の「クランプをはめ込んでいる瞬間の姿」を捉えたということだ。クランプは平面的ではなく、らせんを描きながら開いていて、クランプと密接に結合しているクランプローダーも同様のらせんを描いている。このらせんは DNA の 2 重らせんと同じ右向きで、ピッチは約半分である。今回の試料中の ATPγS は加水分解を受けていないことが別の実験で確かめられているので、実際の反応で ATP 加水分解のエネルギーが使われるのは (3)以降だと考えられる。

さらに考察を進めるため、既知の 2 つの結晶構造と比較をした。1 つ目は、Jeruzalmi らが明らかにした大腸菌由来のクランプローダー複合体の構造だ¹¹⁾ (Fig. 3a)。これは単独の構造なので反応が始まる前、つまり (1) よりも前の状態ということになるが、筆者らの複合体中のクランプローダーと驚くほど似た形態をとっている。(1) の前の状態と (2) の後の状態で、クランプローダーの形態に大きな違いがないというのは非常に興味深い。クランプローダーは大きな形態変化をすることなく、クランプとの結合で生じるエネルギー差を使っ

Fig. 3 Structural comparison of the *E. coli* clamp loader⁽¹¹⁾ (a), the archaeal clamp-loading complex (b), and the yeast clamp and clamp loader complex⁽¹²⁾ (c).

てクランプを開くということだろうか。

2つ目の構造はBowmanらから明らかにした酵母由来のクランプとクランプローダーの複合体の構造である⁽¹²⁾ (Fig. 3c). この複合体にDNAは含まれていないが、「見えないDNA」がそこにあるかのような構造をしている。クランプローダー中のDNA結合部位が2重鎖DNAにぴったり一致するらせんを描き、このらせん軸が閉じたクランプの中心を貫いているからだ。Bowmanらの主張どおりこの構造がDNAと結合している状態をあらわしているとする、これは(3)と(4)の間の状態ということになる。筆者らの構造とこの酵母の複合体の構造、つまりクランプが閉じる前後の構造を比較すると(3)の構造変化は次のようなものだと考えられる。クランプローダーはクランプをはめ込むべき場所、つまりDNAプライマー鎖の3'末端部分を認識して構造変化を始める。クランプと密接に結合していたクランプローダーは、らせんピッチを変えて2重らせんDNAと密接に結合し、これに伴ってクランプを一部手放す。そして部分的に開放されたクランプは、再び閉じてリング状に戻る。残る問題はATP加水分解のエネルギーの使い方と(4)のクランプやDNAから離れる部分だが、これらについては今後の課題だ。

なお、当てはめた原子モデルの動画と形態変化を模

式的に示した動画が、<http://www.pnas.org/cgi/content/full/0506447102/DC1>で公開されている。

8. おわりに

単粒子解析については、最近の本誌に掲載された岩崎らの総説に詳しく述べられている¹⁾。クランプはめ込み機構の研究に関しては、最近筆者らが別の総説を書いたところだ¹³⁾。これらと重複する部分を減らすために本稿は少々偏った内容になったが、おかげで普段はあまり語られない話題にもふれられたという点で、有意義なものとなれば幸いある。この研究は、技術研究組合 生物分子工学研究所 (2005年9月末で研究終了) で行われたものである。

文 献

- 1) 岩崎憲治, 宮澤淳夫 (2005) 生物物理 **45**, 192-197.
- 2) Miyata, T., Suzuki, H., Oyama, T., Mayanagi, K., Ishino, Y. and Morikawa, K. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 13795-13800.
- 3) Bowman, G. D., Goedken, E. R., Kazmirski, S. L., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (2005) *FEBS Lett.* **579**, 863-867.
- 4) Hanson, P. I. and Whiteheart, S. W. (2005) *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**, 519-529.
- 5) Ludtke, S. J., Baldwin, P. R. and Chiu, W. (1999) *J. Struct. Biol.* **128**, 82-97.
- 6) Ludtke, S. J., Chen, D. H., Song, J. L., Chuang, D. T. and Chiu, W. (2004) *Structure* **12**, 1129-1136.
- 7) Chiu, W., Baker, M. L., Jiang, W. I., Dougherty, M. and Schmid, M. F. (2005) *Structure* **13**, 363-372.
- 8) Miyata, T., Oyama, T., Mayanagi, K., Ishino, Y. and Morikawa, K. (2005) *Nature Struct. Mol. Biol.* **11**, 632-636.
- 9) Matsumiya, S., Ishino, Y. and Morikawa, K. (2001) *Protein Sci.* **10**, 17-23.
- 10) Oyama, T., Ishino, Y., Cann, I. K., Ishino, S. and Morikawa, K. (2001) *Mol. Cell* **8**, 455-463.
- 11) Jeruzalmi, D., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (2001) *Cell* **106**, 429-441.
- 12) Bowman, G. D., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (2004) *Nature* **429**, 724-730.
- 13) 宮田知子, 鈴木博文, 大山拓次, 森川耿右 (2006) タ蛋白質 核酸 酵素 **51**, 155-161.

DNAにクランプをはめ込むしくみー単粒子解析で見えた生き生きとした姿

鈴木博文（すずき ひろふみ）

科学技術振興機構 CREST 研究員

現在の所属：大阪大学蛋白質研究所附属プロテオミクス総合研究センター特任研究員

連絡先：〒565-0874 大阪府吹田市古江台 6-2-3 大阪大学バイオ関連多目的研究施設

E-mail: hirofumi@protein.osaka-u.ac.jp

宮田知子（みやた ともこ）

大阪大学大学院生命機能研究科プロトニックナノマシン研究室特任研究員

連絡先：〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-3

E-mail: miya@fbs.osaka-u.ac.jp

真柳浩太（まやなぎ こうた）

長浜バイオ大学バイオサイエンス学部バイオサイエンス学科生命情報科学コース博士研究員

連絡先：〒565-0874 大阪府吹田市古江台 6-2-3 大阪大学バイオ関連多目的研究施設

E-mail: maya@protein.osaka-u.ac.jp

石野良純（いしの よしずみ）

九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門タンパク質化学工学分野教授

連絡先：〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

E-mail: ishino@agr.kyushu-u.ac.jp

大山拓次（おおやま たくじ）

大阪大学蛋白質研究所生体分子認識（タカラバイオ）寄附研究部門助手

連絡先：〒565-0874 大阪府吹田市古江台 6-2-3 大阪大学バイオ関連多目的研究施設

E-mail: chicago@protein.osaka-u.ac.jp

森川耿右（もりかわ こうすけ）

大阪大学蛋白質研究所生体分子認識（タカラバイオ）寄附研究部門教授

連絡先：〒565-0874 大阪府吹田市古江台 6-2-3 大阪大学バイオ関連多目的研究施設

E-mail: morikako@protein.osaka-u.ac.jp