トピックス

DNAクランプと複製因子の切換え機構

真柳浩太^{1,3}, 清成信一^{2,3}¹九州大学・生体防御医学研究所²九州大学・大学院農学研究院³JST・BIRD

1. はじめに

DNAの複製・修復・組換えには多数のタンパク質因子がかかわり、DNA上でレプリソームなど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および解離を適宜行うことで適切に複合体を再編成させて、一連の反応を綿密に制御している。したが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だけでは不十分であり、複合体全体の構造解析が必須であるが、DNAを含みかつこのように常に構造変化を伴う複合体の結晶化は容易ではない。電子顕微鏡による単粒子解析は、直接可視化した複合体の多数の粒子像から立体構造を得るため、結晶化を行う必要がなく、このようなシステムの機能構造の解析に適している。

2. DNAクランプ PCNA

DNAポリメラーゼはクランプと総称されるドーナツ状の分子に結合することでDNAから外れることなく効率よく複製を行う。真核生物および古細菌ではPCNAがこのクランプに相当する。近年PCNAは、DNA鎖の伸長促進因子という当初の位置づけよりも遥かに重要な役割を担っており、ポリメラーゼなどの複製関連因子のみならず、修復、転写など、さまざまなDNAトランスアクションにかかわる因子と結合することが明らかになっている^{1), 2)}。PCNAは疑似6回対称の3量体リングを形成し、1つのサブユニットがそれぞれ結合部位を有する。したがって、理論上は最大で3つの因子が同時に1つのPCNAリング上で共存可能であり、PCNAがレプリソームなどの超分子複合体の構築・再編や、因子の切換えにおいて重要な役割を担っていることは明白である。実際、複製因子の1つであるFen1とPCNAの共結晶中では、PCNAリング上に3つのFen1が結合していた³⁾。また最近、

クランプ中でDNAが約22度傾斜してチャンネルの内壁に結合することが示された。このことから図1のようにDNAの傾斜を利用して各因子間の切換えが行われるスイッチの機構も提唱されている⁴⁾。

3. DNAリガーゼ-PCNA-DNAの複合体の立体構造

DNAリガーゼLig1はDNAの複製において、ラギング鎖合成時の岡崎フラグメントの連結を担うたいへん重要な複製関連因子であり、PIP(PCNA interacting protein)-box様モチーフによって他の多くの因子同様にPCNAと複合体を形成して機能する。筆者らが電子顕微鏡による単粒子解析法を用いてDNAリガーゼ-PCNA-DNA複合体の立体構造を解析したところ(図2)、3つのドメインからなるリガーゼがPCNAリングに重なるように結合し、DNAに半周ほど巻き付いていた⁵⁾。この複合体の3次元密度マップのリング状領域にPCNAの結晶構造を重ねたところ、たいへんによくあてはまることがわかった。一方リガーゼについては、これまでに報告されている3つの真核生物型のATP依存DNAリガーゼの結晶構造が、すべて互いに異なるドメイン配置をとっていたことから⁶⁾⁻⁸⁾、非常に柔軟性に富む構造であることが予想されていた。得られたマップにおいて、リガーゼの個々のドメイン自体の構造は、これまでの3つの結晶構造と一致するものの、ドメインの相対的配置は、どの結晶とも異なっていた。

図1 Fen1とPCNAや大腸菌のクランプとDNAの共結晶などから提唱されている複製因子の切換え機構。

The DNA Clamp and the Switching Mechanism of Replicative Factors

Kouta MAYANAGI^{1,3} and Shinichi KIYONARI^{2,3}

¹Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

²Department of Genetic Resources Technology, Kyushu University

³BIRD, JST

図 2 DNA リガーゼ-PCNA-DNA 複合体の立体構造。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（左図）、正面（中央図）および斜め上（右図）から見た立体構造。DNA、PCNA および、リガーゼの 3 つのドメイン（N 末端より DBD、AdD、OBD）の原子モデルをあてはめた。接触 2 が今回新たに見つかった。また DNA は PCNA の軸に対し約 16 度傾斜していた。（電子ジャーナルではカラー）

図 3 因子の結合・解離による切換えの機構。リガーゼ-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リガーゼは DNA と強固には結合していない。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。

また N 末の DNA 結合ドメイン中の既知の PIP-box 様モチーフ以外に、真ん中の AdD ドメインも PCNA と接触していた。さらに、DNA は PCNA に対して傾斜（約 16 度）していたが、細菌のクランプと DNA の結晶⁴⁾の場合（約 22 度）ほどの傾斜は見られず、かつチャンネルの内壁の 1 ヶ所でのみ PCNA と結合していた。以前われわれが解析した RFC-PCNA-DNA 複合体では DNA は PCNA に対してほぼ垂直に貫通しており、PCNA との有意な結合は確認できなかった⁹⁾。これらのことから、細菌のクランプと DNA の結晶は、DNA が最も傾いた状態を示しているにすぎず、DNA の配向は複製因子の種類、さらには反応状態に応じて最適になるよう、さまざまに変わり得ると考えている。

4. 複製因子の切換え機構

複合体中でリガーゼは 2 つの PCNA サブユニットと結合しており、3 つの異なる因子が同時にリング上に留まる図 1 の機構は実現が困難である⁹⁾。また以前解析した RFC-PCNA-DNA 複合体にいたっては、RFC が完全に PCNA リングを覆ってしまっており、他の因子の結合を阻害している⁹⁾。現在すでに 50 個以上の PCNA 結合因子が見つかり、その多くが PCNA 上

の特定の結合サイトを共有していることを考慮すると、そもそも図 1 の機構のみで因子の切換えを説明することには無理があり、役目を終えた因子は速やかに解離する機構が存在することが示唆される。Lig1-DNA の共結晶（PCNA は含まない）では Lig1 は DNA を完全に取り囲むように巻きついている⁷⁾。一方、今回われわれが電子顕微鏡で解析した複合体では、PCNA との 2 ヶ所の接触のために、リガーゼは上記の結晶中ほど強固には DNA に巻き付いておらず、ライゲーション反応前の中間状態にあると考えられる。Lig1-DNA の結晶で見られるような、リガーゼの閉じたリング構造に変換してライゲーション反応を起こすためには、リガーゼと PCNA 間の接触の少なくとも一方は切れる必要がある。これにより PCNA クランプ上の結合サイトが解放されて、次の因子がアクセス可能になることが推察される（図 3）。しかしわれわれの構造においても、フリーな PCNA サブユニットは 1 つ残っており、実際 Fen1 の結晶構造を重ねてみると、この箇所に Fen1 は結合可能であり、リガーゼとも立体障害を起こすことなく共存可能である⁵⁾。実際の生体中ではおそらく、PCNA から不要ものを解離し、新たに必要な因子を導入して複合体を再編成する一方で、頻繁に用いる因子に関しては PCNA 上に結合したまま複数の因子間を切換え、すなわち両方の機構を適宜使い分けることで、一連の反応を効率よく行えるようにしていると考えられる。

（図はすべて文献 5 の図を改変）

文 献

- 1) Moldovan, G. L. *et al.* (2007) *Cell* **129**, 665-679.
- 2) Maga, G. *et al.* (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 3051-3060.
- 3) Sakurai, S. *et al.* (2005) *EMBO J.* **24**, 683-693.
- 4) Georgescu, R. E. *et al.* (2008) *Cell* **132**, 43-54.
- 5) Mayanagi, K. *et al.* (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 4647-4652.
- 6) Nishida, H. *et al.* (2006) *J. Mol. Biol.* **360**, 956-967.
- 7) Pascal, J. M. *et al.* (2004) *Nature* **432**, 473-478.
- 8) Pascal, J. M. *et al.* (2006) *Mol. Cell* **24**, 279-291.
- 9) Miyata, T. *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 13795-13800.

真柳浩太

真柳浩太（まやなぎ こうた）

九州大学生体防御医学研究所特任准教授
東京大学理学系研究科物理学専攻博士課程。博士（理学）。2008 年より現職。
連絡先: 〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出 3-1-1
九州大学生体防御医学研究所
E-mail: maya@bioreg.kyushu-u.ac.jp
清成信一（きよなり しんいち）
九州大学学術研究員（農学研究院）
九州大学生物資源環境科学府遺伝子資源工学専攻
博士後期課程修了。博士（農学）。2009 年より現職。
連絡先: 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎
6-10-1 九州大学農学研究院蛋白質化学工学分野
E-mail: skiyonari@agr.kyushu-u.ac.jp