最近の研究から

真核生物の複製制御因子 GINS 複合体の構造解析

理化学研究所 中央研究所 鎌田勝彦

Katsuhiko KAMADA: Structural Studies of GINS Complex in Eukaryote Replication Machinery

The eukaryotic GINS complex is essential for the establishment of DNA replication forks and replisome progression. We report the crystal structure of the human GINS complex. The heterotetrameric complex adopts a pseudo symmetrical layered structure comprising two heterodimers, creating four subunit-subunit interfaces. The structural and biochemical data suggest that the tetrameric complex ensures a stable platform for the C-terminal domain of Psf1 to act as a key interaction interface for other proteins in the replication-initiation process.

1. はじめに

真核生物の染色体の複製は、複製開始点から細胞周期の DNA 合成 (S) 期に一度だけ行われるように厳密に制御されている。この過程は、原核生物のシステムと比べ非常に多くの蛋白質因子が関与し、分解や修飾などの影響を受け、離散集合的かつ精密に DNA 複製フォークの形成と進行が制御されている。この分子機構の解明は、基本的な生命現象に密接に関連した細胞増殖や再生、また老化、がん化などの疾病のメカニズムの解明につながる。

真核生物の複製過程における段階的制御は、さまざまな生物種の研究によって明らかになってきた。複数の開始点には、細胞周期を通じて ORC (Origin Recognition Complex) が結合している。そこへ、S 期以前の間期 (G1) には、Cdc6 と Cdt1 を伴って MCM2-7 (Mini-Chromosome Maintenance 2,3,4,5,6,7) が集結し、複製前複合体 (pre-RC: pre-Replicative Complex) を形成させている。細胞周期を通してこの形成に阻害的に働くサイクリン依存性キナーゼ (CDK: Cyclin Dependent Kinase) は、G1 においてその活性が抑えられているためである。その後の CDK 活性の上昇は細胞に S 期開始を認識させる。同時にもう 1 つの S 期特異的キナーゼ (DDK: Dbf4 Dependent Kinase) に依存して、MCM 複合体は複製に必須なヘリカーゼとして構造的に成熟する。このとき、GINS、Cdc45 などのさまざまな蛋白質因子の介入がある。この MCM ヘリカーゼの活性化で DNA 二重鎖が開裂され、続く数種の DNA ポリメラーゼのローディングによって複製開始可能となる。概念的には、この形成された DNA ヘリカーゼとポリメラーゼを含むレプリソーム複合体が複製フォーク上で DNA 合成を担うと考えられている。

GINS 複合体は、4 つのサブユニット (Sld5, Psf1, Psf2, Psf3) から成り立っており、酵母からヒトまでよく保存さ

れている。Sld5 サブユニットの遺伝子は、出芽酵母の *dpb11-1* 変異と同時にもつことができない、合成致死変異 (synthetic lethality with *dpb11-1*) の分離で同定され、そして、SLD5 遺伝子の一連した遺伝的相互作用や生化学的手法によって、PSF (Partner of Sld Five) 1-3 遺伝子が同定された。¹⁾ これらの遺伝子産物は等量比の複合体を形成し、末尾の数字から GINS (Go-Ichi-Ni-San) と命名された背景がある。GINS は pre-RC の形成後の複製開始に必須であり、酵母においては Dpb11, Sld3 に、²⁾ ツメガエルの系では Cdc45 に相互に依存して、²⁾ 複製開始領域に結合する。

出芽酵母の GINS は DNA 合成の伸張反応にも関与することが示唆され、続く生化学的解析から、S 期特異的に形成される巨大な複製フォーク複合体には、MCM 複合体、Cdc45 とともに GINS が検出されると報告された。^{3),4)} これはレプリソーム進行複合体 (Replisome Progression Complex) と名付けられ、同時にフォーク安定化因子の Mrc1, Tof1, Cms3, 染色体接着制御因子 Ctf4, ヒストンシヤペロンなどの複数の制御蛋白質が含まれていることがわかった。また、ショウジョウバエの胚抽出液とその Cdc45 の抗体を使って、MCM 複合体、GINS 複合体を含む巨大複合体が精製され、弱いながらもこの巨大複合体がヘリカーゼ活性をもつことが報告された。⁵⁾ これらのことは、単離された巨大フォーク複合体が複製ヘリカーゼとして機能し、GINS はその構成因子であることを示唆している。

当初、SLD5 遺伝子が単離されてきた背景から、GINS と DNA やポリメラーゼへの結合が示唆されてきた。しかしながら、十分な物理的相互作用があるというコンセンサスはいまだ得られていない。現在のこの複製分野の研究において、特に DNA ポリメラーゼのローディングに至るレプリソーム複合体形成の分子構造的解明が望まれている。筆者らは、構造的な観点からアプローチし、機能的にどこが重要なサブユニットであるかを指標に、GINS

複合体の複製開始過程における解析を試みた。

2. 結晶構造解析

複合体のため、ヒト GINS の4つのサブユニット遺伝子のそれぞれが、T7 プロモーターからターミネーターまでの領域を含み、2つずつタンデム構造になるように pET ベクターを構築した。そしてその両ベクターで形質転換した大腸菌を用いて共発現した。ほとんどすべてのサブユニットは不溶性であるが、複合体のみが十分な可溶性を示した。可溶性画分から1:1:1:1の複合体をすることができたが、その結晶を得ることはできなかった。この組換え体を用いてさまざまなプロテアーゼによる限定分解を試みたところ、Psf1 サブユニットのC末端領域は比較的切断されやすいことが判明した。そこで、1-134 アミノ酸領域に相当する Psf1 サブユニットを用いて複合体の発現系を再構築した。得られたコア複合体 (GINS1Δc) も同様に安定なヘテロテトラマーを形成したため、切断した部分はテトラマー形成に関与していないと判断した。この複合体の結晶は初期スクリーニングで容易に得られたが、pH の条件が非常に限定的であり、針状結晶しか得られなかった。マロン酸に変更したことで、ほかの緩衝液より安定に板状結晶へ成長させることができた。得られた三斜晶系の結晶は、非対称単位中には2分子の複合体を含んでいた。セレノメチオニン置換体を作製し、多波長異常分散法によって位相決定し、Photon Factory の BL-5 で測定したデータを用いて、最終的に 2.3 Å で精密化を行った。⁶⁾

3. 全体構造

GINS1Δc 複合体のヘテロテトラマーの構造は台形状をしている (図 1a, b)。上層と下層にそれぞれよく似たサブユニットのヘテロダイマーのペア (Sld5 と Psf1, Psf2 と Psf3) が配置しているため、中心に擬二回対称軸を有している。大局的には1つのサブユニットは、隣と縦方向 (上

または下) に接するサブユニットの2カ所で相互作用し、対角関係にあるものとはほとんど結合が見られない。そのため複合体構造の中心には、厚さ 7 Å の先細った平たい空間 (Central cleft) が存在している (図 1b)。そこには Psf2 と Psf3 の N 末端領域が横たわっており、その内部の表面に一次構造上の保存性は見られない。複合体の分子表面は全体的に酸性残基に富んでいる。

4. サブユニット構造

各のサブユニットは、5本の α -helix で構成される A ドメインと、主に β -strand で構成される B ドメインによって構成されている (図 2a, b)。その2つのドメインは各サブユニットにおいて構造的な一致が見られる (図 2c)。面白いことに、一次構造上から見た Psf1 と Sld5 サブユニットのドメイン配置は A-B であり、Psf2 と Psf3 の B-A と比較すると、互いをひっくりかえした並びになっている (図 2b)。この現象は、祖先型の B-A 型のサブユニットの遺伝子領域で入れ替え (permutation) が起きたことで、2種類の遺伝子が生まれ、さらにそれらが重複 (duplication) によって真核生物型の4つの遺伝子座が生まれたためと解釈される。⁷⁾ 実際には、多くの古細菌の GINS は、入れ替えが起きた直後の2種類サブユニット構成で、ダイマーのダイマーとして複合体を構成している。⁸⁾ また、祖先型古細菌は B-A 型の1種類のみのサブユニットである。これは、真核生物の MCM2-7 複合体のサブユニットが、遺伝子レベルで重複しながらも機能的に1つの複合体を形成している状況と類似している。

進的起源を反映した特徴は内部構造からも見て取ることができる。すべてのサブユニットにおいて、完全に保存されたアルギニンとグルタミン酸は A ドメインの疎水的な環境に存在している (図 2b)。これらは互いに2本の水素結合 (bidentate hydrogen bond) をつくり、一連の水素結合ネットワークを形成している (図 2d)。また、残基間で形成された平面構造は各サブユニット内部の疎水環境

図1 GINS コア複合体の全体構造。(Overall structure of the GINS core complex.) (a) 擬二回対称軸に対して垂直な方向から見たヘテロテトラマー構造。(b) ヘテロテトラマーの分子表面。2種類のサブユニット相互作用面とそのドメインの配置を示す。

図2 サブユニット構造。(Subunit structures.) (a) サブユニットのリボン図. (b) 各サブユニットの対応する二次構造とドメインの配置の模式図. (c) 4つのサブユニットに見られる2つのドメイン構造の重ね合わせ. (d) Aドメインの重ね合わせによって見られる内部の保存されたアルギニンとグルタミン酸残基の水素結合.

図3 サブユニット間の主要相互作用面の詳細。(Details of major interfaces between subunits.) (a) Sld5-Psf1 サブユニット間で aH3 と aH5 ヘリックスで形成される A ドメイン間の相互作用. (b) Psf2-Psf3 サブユニット間. 三角はグリシン残基によるヘリックスの屈曲点を示す. (c) Sld5-Psf2 サブユニット間で B ドメインを介して形成される相互作用部位. (d) Psf1-Psf3 サブユニット間.

へ寄与し、互いに厳密に保存されてきたと考えられる。これらのアミノ酸の変異は水素結合形成を不能にし、サブユニット構造を不安定化すると容易に考えられる。実際、分裂酵母の PSF2 遺伝子が単離された条件致死変異株は、この保存されたアルギニン残基に変異がある。⁹⁾こ

れは、GINS のサブユニットの遺伝子が、共通の祖先から派生してきたことを示す1つの構造的痕跡といえる。

5. サブユニット相互作用

複合体中の擬二回対称軸を中心に、Sld5 と Psf1 サブユ

ニットは、互いの A ドメインの aH3 と aH5 ヘリックスを介して、多くの疎水結合によってヘテロダイマーを形成している (図 1b (Vertical interface), 図 3a). この関係は Psf2 と Psf3 サブユニット間でも保たれ、二次構造上の同様のアミノ酸がこの相互作用に従事している (図 3b). Sld5-Psf1 間の相互作用面を形成する 4 本のヘリックスは、ねじれた相互作用面をつくるのに対して、Psf2-Psf3 間では、グリシン残基によるヘリックスの屈曲によって直線になり、相互作用面は平面的である。

Sld5 と Psf1 の A ドメインは、Psf2 と Psf3 の B ドメインを介してそれぞれ結合している (図 1b (Horizontal interface), 図 3c, d). Psf2 と Psf3 の B ドメインは短く折りたたまれた β シートの側面から疎水残基を露出しており、そこへ、Sld5 と Psf1 のヘリックス aH3 と aH1 の一部が結合している。この部位でアルギニン残基の特徴的な相互作用が見られる (図 3c, d). aH3 ヘリックスから提供される Sld5 の Arg84 は、Psf2 の 2 つの芳香環をもつ残基の間に挿入され、スタッキングによる相互作用を形成している。同時に、そのグアニジル基は主鎖のカルボニル基や酸性アミノ酸と水素結合を形成している。Psf1-Psf3 間においても、Psf1 の Arg71&Arg74 によって同種の相互作用が観察される。事実、Psf1 サブユニットの Arg74 のグリシンへの変異は出芽酵母において複製の初期過程を阻害することがわかっており、このアルギニンプラグによる相互作用が GINS の構造形成に大きく寄与しているものと判断される。¹⁾

6. 電顕構造との比較から

以前ツメガエルの組換え GINS 複合体分子の電子顕微鏡観察が報告されている。²⁾ 回転蒸着法 (rotary shadowing) によって得られたこの低分解能像から、GINS は分子の中心に空間があるリング状構造であると報告された。そのため、真核生物の複製蛋白質の 1 つである PCNA 分子と形状が似ているため、GINS 複合体もレプリソームで DNA をはめ込む機能をもつ因子であると、十分な検証が行われないうちに多くの複製の研究者の間で考えられていた。^{2),5),10)}

高分解能の結晶構造はサブユニットの配置は確かにリング状であることを示している。しかし、複合体の中心に位置する平たい小穴は、二本鎖はおろか一本鎖 DNAすら収容するに足る空間ではないことを示し、反対の表面はほとんどふさがっていた (図 4a)。同様にわれわれのサンプルも電子顕微鏡で観察したが (図 4b)、分子の中心をシャドウイングできるものとできないものが存在し、そのことは結晶化に用いた GINS1 Δ c でも変わらなかった。小穴の有無は複合体を見る方向で変わるため、大局的には電顕像と結晶構造は一致する。つまり以前の報告は、その低分解能電顕像から、複合体分子中の電子分布の薄い部分を“リング”と誤認してしまっていたようである。GINS サブユニットが、4 つの箇所疎水結合部分によって強固な複

図 4 ヒト GINS 複合体の切片表面モデルと電子顕微鏡画像。(Cut-open surface model and electron micrographs of human GINS complex.) (a) 複合体の内部空間を表示するため、図 1 (b) のモデルを水平にカットした。 (b) GINS 複合体 (全長) の電顕図。

合体を形成していることを考えれば、その小穴を制御できるようなコンフォメーション変化を期待できない。また、負に帯電したその小穴と分子表面電荷は、DNA との相互作用に都合のいいものではない。これらの結果から、GINS 複合体は PCNA のような DNA はめ込み因子ではないと判断される。

7. 複合体の B ドメインの役割

Sld5 と Psf1 サブユニットのドメイン間はリンカーペプチド領域を介して結ばれている。Sld5 の A ドメインから伸びるリンカー領域は疎水残基に富み、Sld5 と Psf1 の A ドメイン間の溝を埋めるように結合している。そして、続く Sld5 の B ドメインも Sld5 と Psf2 の A ドメイン間に固定され、非常に多くの相互作用が見られる。特に、Sld5 の B ドメインから提供されるかさ高い残基 (Phe172, Leu205) が Psf2 上の窪地にアンカーされることで、複合体構造の安定化に寄与している (図 5a)。

一方、Psf1 の A-B ドメイン間のリンカーペプチドは、Sld5 のものと比べ短く、続く Psf1 の B ドメインは、Sld5 の B ドメインのような結合様式で、Psf3 に結合していないと考えられる。Psf1 の B ドメインはこの結晶構造では欠失しているため、詳細構造はわからないが、サブユニット間に見られる一次構造の相同性から、同様の基本構造をもつ

図5 サブユニット構造の詳細。(Details of subunit structures.) (a) Sld5 Bドメイン-Psf2サブユニット間の相互作用 (b) Psf1 Bドメインの構造モデル. 各種のプロテアーゼによる切断部位を矢印で示した. (c) Sld5とPsf1のBドメインの対応するアミノ酸配列の比較.

ことが推察される. 実際そのドメインの三次構造モデルを作製し, プロテアーゼによる限定分解部位をマップすると, 局所的なループに限られることから, このモデルは妥当であると判断される (図5b, c). GSTとPsf1のBドメインの融合蛋白質を用いて, リンカーペプチド領域とBドメインのGINS複合体の表面上への結合を調べたところ, 通常の条件下でまったく結合が見られなかった. つまり, Psf1のリンカーペプチド領域を含めそのBドメインは, 水溶液中では安定に結合していないと考えられる. GINS複合体単体の溶液構造は, 動的に独立したPsf1のBドメインと, それ以外からなる静的なヘテロテトラマー構造体であることがわかった.

8. 卵無細胞系を用いた生化学的解析

アフリカツメガエルの卵無細胞系は, 高いクロマチン形成能をもち, 細胞周期のコントロールによって, 細胞生物学的現象を再現することができる実験系である. きわめて豊富な蛋白質が存在するため, 細胞周期の進行に伴う染色体の形態や複製調節機構の研究に幅広く用いられている. ヒトのGINS複合体中の機能部位を明らかにするため, 複製活性とクロマチン結合能を指標に, このシステムとさまざまな変異体蛋白質を用いて実験を試みた.

手法としては, 分裂期の状態にあるツメガエルの未受精卵を採取し, Ca^{2+} イオンの導入による偽受精によって間期に移行させ (賦活化), 遠心分離によって細胞抽出液を調整する. これに脱膜処理を施したツメガエルの精子をクロマチン基質として加えることで, 核膜が形成されDNA複製が開始される. このとき, カエル由来のGINSを認識する抗体を用いて抽出液から除き, ヒトの組換えGINSを加えることで複製活性の有無を調べた. 免疫除去した抽出液では活性がまったくないのに対して, ヒトGINS複合体を入れると複製活性が完全に回復されており, GINSの添加によって複製開始の初期過程が制御できることを確認した (図6a). Psf1のBドメインを欠失した複合体は, Psf1のBドメインのみと同様に活性がまったく得られ

図6 卵無細胞系を用いたGINS変異体の複製活性。(Replication activity of GINS mutants in cell-free system.) (a) ツメガエルの卵抽出液を用いたDNA活性の測定. (b) 複製開始時のクロマチン結合画分.

れなかった. Sld5のBドメインを欠失した変異体は等量比のサブユニットで複合体を作ることができないが, 面白いことに, それは弱いながらも複製活性を示した (図6a). このことは, Psf1のBドメインは複製開始過程に必須であり, そのドメインはテトラマー構造の安定性より重

要であることを示唆している。

そこで、Psf1 のリンカーから B ドメインに至る領域も重要ではないかと考え、その領域にアラニン変異を含む複合体を作製し、活性を測定したところ、それらは安定なテトラマー構造を形成するが大きく活性に影響を与えた(図 6a)。特に保存性の高い疎水性残基の変異によって複製活性が低下し、Psf1 のリンカー領域を介した GINS テトラマー構造上のポジショニングも複製に必須であることがわかった。

さらにこれらの変異体を用いて、クロマチン結合画分の既知の複製蛋白質の結合段階を調査した(図 6b)。pre-RC 形成はどれも正常で、GINS の結合は Cdc45 の結合と一致しており、相互依存するという過去の結果と一致する。つまり変異体 GINS の結合に応じて、ポリメラーゼのローディングに至る複製の初期反応が制御され、それが複製活性に反映されている。この結果は、GINS 複合体上での Psf1 の B ドメインとリンカーのポジショニングがクロマチン上での何らかの制御にかかわっていることを示している。

9. レプリソームでの GINS 複合体中の役割

これまでに、いくつかの酵母 GINS サブユニット遺伝子の変異が同定されているが、それらすべてのアミノ酸は、立体構造上、サブユニット内部またはサブユニット間の相互作用面にマップされる。このことは、安定な複合体の基盤形成が必須であることを示している。それ以上に、Psf1 の B ドメインにこそ真核生物の GINS としての重要な役割があると考えられる。進化的には、Sld5 と Psf1 のリンカーから B ドメインの領域は、psf2, psf3 の祖先型の遺伝子から入れ替えによって派生したものである。その後 Sld5 の B ドメインは、Psf2 と Psf3 の B ドメインと同様にテトラマー形成に従事したが、構造的に独立した Psf1 の B ドメインは、真核生物特有の役割を獲得した可能性が高い。Psf1 の B ドメインは複製初期過程における機能的に重要であり、pre-RC 形成後、GINS 複合体は、このドメインを介して、Cdc45 とともに MCM ヘリカーゼの構造的成熟に関与しているだろう。Psf1 の B ドメインのモデル上の Tyr147 と Phe176 は、Sld5 のサブユニット結合に従事しているアミノ酸に相当し(図 5b, c)、これらの変異も活性に影響するため(図 6a, b)、GINS はこれらの残基を介して結合しているかもしれない。そのとき、GINS のテトラマー構造は、その重要なドメインを安定に提供する足場になっていると考えられる。実際に、Psf1 の B ドメインが近くにあると想定されるテトラマーの分子表面は比較的保存性が高く(図 1b)、この領域とともにその結合に関与すると期待される。

今後、Psf1 の B ドメインが実際何と結合しているか明

らかにすることが今後の課題である。また真核生物の複製フォークには、進行をモニターする因子など、さまざまな蛋白質が備わった状態で一緒に行動する。これらの因子の構築過程や生化学的解明も重要になってくると思われる。より単純化したシステムにおいて MCM, GINS, Cdc45 を含めたヘリカーゼ複合体の全体構造を明らかにしていく必要がある。

10. 最後に

生化学的実験について、共同研究者である大阪大学理学部の久保田弓子博士、滝澤温彦博士には助言をいただき大変お世話になりました。また電子顕微鏡解析は、進藤洋介氏、荒田洋二博士にご協力いただきました。この研究は理化学研究所旧花岡細胞生理学研究室で行い、主任研究員の花岡文雄博士には多くの支援をいただきました。また、各研究段階で多くのみなさまにご助言いただきました。この場を借りてお礼申し上げます。

文 献

- 1) Y. Takayama, Y. Kamimura, M. Okawa, S. Muramatsu, A. Sugino and H. Araki: *Genes Dev.* **17**, 1153 (2003).
- 2) Y. Kubota, Y. Takase, Y. Komori, Y. Hashimoto, T. Arata, Y. Kamimura, H. Araki and H. Takisawa: *Genes Dev.* **17**, 1141 (2003).
- 3) M. Kanemaki, A. Sanchez-Diaz, A. Gambus and K. Labib: *Nature* **423**, 720 (2003).
- 4) A. Gambus, R. C. Jones, A. Sanchez-Diaz, M. Kanemaki, F. van Deursen, R. D. Edmondson and K. Labib: *Nat. Cell Biol.* **8**, 358 (2006).
- 5) S. E. Moyer, P. W. Lewis and M. R. Botchan: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 10236 (2006).
- 6) K. Kamada, Y. Kubota, T. Arata, Y. Shindo and F. Hanaoka: *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 388 (2007).
- 7) K. S. Makarova, Y. I. Wolf, S. L. Mekhedov, B. G. Mirkin and E. V. Koonin: *Nucleic Acids Res.* **33**, 4626 (2005).
- 8) N. Marinsek, E. R. Barry, K. S. Makarova, I. Dionne, E. V. Koonin and S. D. Bell: *EMBO Rep.* **7**, 539 (2006).
- 9) E. B. Gomez, V. T. Angeles and S. L. Forsburg: *Genetics* **169**, 77 (2005).
- 10) T. Aparicio, A. Ibarra and J. Mendez: *Cell Div.* **1**, 18 (2006).

プロフィール

鎌田勝彦 Katsuhiko KAMADA
理化学研究所 中央研究所
RIKEN Discovery Research Institute
〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1
2-1 Hirosawa, Wako, Saitama, 351-0198, Japan
e-mail: kamadak@riken.jp
最終学歴：総合研究大学院大学生命科学研究科博士課程修了
専門分野：特になし
現在の研究テーマ：染色体形成に関わる蛋白質の解析