

令和 3 年 05 月 20 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年

受付番号 201860733

氏 名 野口 泰徳

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：Imperial College London（国名： 英国）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

染色体複製開始における複製ヘリカーゼ活性化機構の解明

3. 派遣期間：平成 31 年 1 月 21 日 ～ 令和 3 年 4 月 20 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名：Imperial College London

部局名： Institute of Clinical Sciences

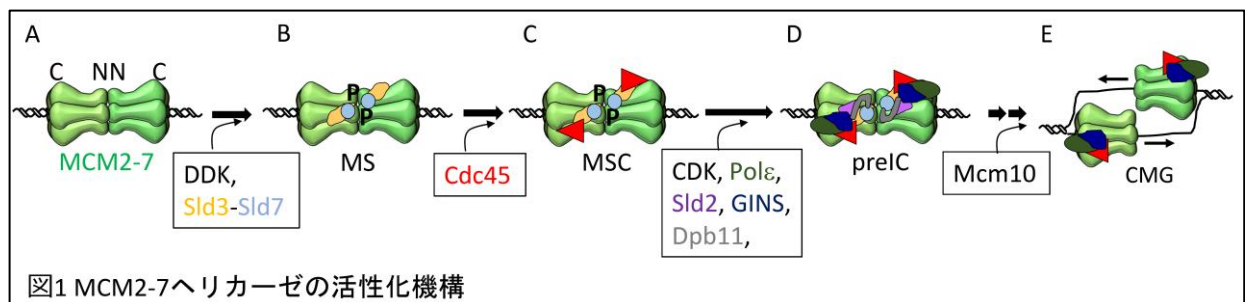
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

<背景>

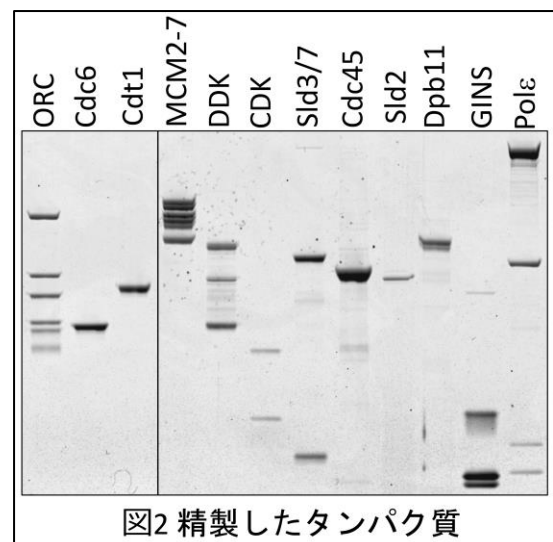
DNA が正確に複製されることはすべての生物においてもっとも重要なことのひとつである。DNA 複製の異常は、染色体の不安定化やガンを引き起こす。真核生物では、MCM2-7 ヘリカーゼが DNA 複製の中心的な役割と担う。DNA 複製を開始するために、まず MCM2-7 が ORC、Cdc6、Cdt1 により染色体上の複製起点に装着され、MCM2-7 Double-Hexamer(DH)を形成する。この MCM2-7 DH はヘリカーゼ活性をもたない。MCM2-7 を活性化するために、まず Dbf4-Cdc7(DDK)キナーゼが MCM2-7 DH を特異的にリン酸化する。そして、Sld3-Sld7 がリン酸化された MCM2-7 DH に結合し、Cdc45 を MCM2-7 上に集合させる。その後、CDK キナーゼ依存的に Sld2、Dpb11、Sld5-Psf1-Psf2-Psf3(GINS)、PolIII-Dbp2-Dpb3-Dpb4(Polε)が MCM2-7-Sld3/7-Cdc45 複合体に結合する。最後に、Mcm10 がこの複合体に結合することで、活性型ヘリカーゼである Cdc45-MCM2-7-GING(CMG)が一本鎖 DNA に装着される(図 1)。この MCM2-7 DH の活性化の際に、DNA の開裂、MCM2-7 DH の分離、MCM2-7 の一本鎖 DNA への装着が起こらなければならない。しかしながら、これらの反応がどのように、いつ起こっているのかはよくわかっていない。近年、Cryo- electron microscopy (Cryo-EM)技術の急激な発展により結晶構造解析や NMR 解析では困難だった高次複合体の構造解析が可能になった。そこで、Cryo-EM による構造解析と生化学的解析を用いて、MCM2-7 DH 活性化機構の解明を行うことにした。DNA 複製の異常は染色体の不安定化とガンを引き起こすので、MCM2-7 DH 活性化複合体構造の解明は抗がん剤の開発に貢献できる。また、Meier-Gorlin 症候群は、複製開始に関わるタンパク質の変異が原因であると考えられている。複製開始機構の解明は Meier-Gorlin 症候群の理解と治療にも役に立つと考えられる。さらに、植物、動物、人に感染する真菌の DNA 複製を阻害する化合物の開発にも貢献できる。



<これまでの成果>

DNA 複製開始に機能するタンパク質の精製

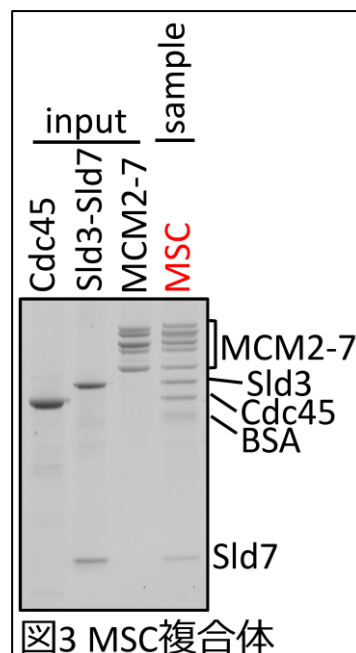
これまでの研究により、32 個のタンパク質が複製開始に機能していることが知られている。MCM2-7 DH 活性化複合体形成を精製タンパク質を用いて試験管内で再構成するために、まずこれらのタンパク質を精製した。すべてのタンパク質またはタンパク質複合体にアフィニティタグを導入し、大腸菌、出芽酵母、昆虫細胞のいずれかで過剰発現させた。次に、アフィニティ精製により、細胞溶解液から目的タンパク質を精製した。その後、イオン交換クロマトグラフィー、ヘパリンカラ



ム、ハイドロキシアパタイトカラム、ゲル濾過クロマトグラフィーを必要に応じて使用し、さらにタンパク質を精製した。すべてのタンパク質を高純度で精製することができた (図 2)。

MCM2-7 DH -Sld3-Sld7-Cdc45 複合体構造の解析

複製開始反応は 2 つのキナーゼ DDK と CDK によって制御されている。DDK に依存して、Sld3-Sld7 と Cdc45 が MCM2-7 DH に結合し、その後の反応は CDK によって制御されている。そこでまず、DDK 活性に依存する MCM2-7 DH 活性化複合体である MCM2-7 DH-Sld3-Sld7-Cdc45(MSC)複合体の構造解析を行うことにした。私は先行研究として DNA に装着された MCM2-7 DH 複合体を高濃度で調整する方法を確立し、その Cryo-EM 構造を報告している(Noguchi et al., PNAS, 2017)。そこで、この方法を基にして、MSC 複合体形成の試験管内再構成を行なった。まず、磁性ストレプトアビジンビーズに多数の複製起点をもつビオチン化 DNA を結合させた。そして、この DNA と ORC、Cdc6、Cdt1、MCM2-7 タンパク質を反応させ、DNA に MCM2-7 DH を装着させた。MCM2-7 DH 以外のタンパク質は洗浄により取り除いた。次に、DDK により MCM2-7 DH をリン酸化



し、洗浄により DDK を取り除いた。リン酸化した MCM2-7 DH と Sld3-Sld7、Cdc45 を反応させ、MCM2-7 DH に結合していないタンパク質を取り除いた後、制限酵素を用いて磁性ストレプトアビジンビーズから MCM2-7 DH-Sld3-Sld7-Cdc45 複合体を精製した。ネガティブ染色法により、複合体の安定性や均一性などを評価し、バッファーや反応条件の最適化を行った。その結果、Cryo-EM 解析に十分な MSC 複合体の精製に成功した(図 3)。Cryo-EM の画像からタンパク質分子を抽出し、2D classification、3D classification を行い、最終的に、4.2 Å の解像度で MSC 複合体の構造を得ることに成功した。これまでの生化学的手法を用いた MCM2-7 と Sld3 の相互作用解析により、Sld3-Sld7 は MCM2-7 の N 末端領域上に位置していると考えられてきた。しかし、MSC 構造では、Sld3-Sld7 は MCM2-7 の中間領域から C 末端領域にかけて存在していた。また、MSC 構造から Sld3-Sld7 と Cdc45 の相互作用領域の同定に成功した。相互作用部位の変異体を精製し、MSC 複合体の形成活性を調べた結果、変異体タンパク質では複合体形成活性が低下していた。このことは、この相互作用領域が Cdc45 の MCM2-7 への集合に重要であることを示している。MSC 構造における Cdc45 の位置は CMG 構造における Cdc45 の位置とほぼ同じであった。このことは、Sld3-Sld7 が Cdc45 の活性化構造の形成において中心的な役割を果たしているを示している。MSC 構造における DNA 構造を確認したところ、DNA は二重鎖 DNA のままであった。さらに、MCM2-7 DH の分離も起こっていなかった。これらのことから、DNA の開裂と MCM2-7 DH の分離は CDK 依存的な複製開始反応で起こると考えられる。

MCM2-7 DH -Sld3/7 複合体構造の解析

MSC 構造では、Sld3-Sld7 がこれまで考えられていた領域とは異なる MCM2-7 の領域に位置していた。これは、Cdc45 の結合により Sld3-Sld7 の構造が変化している可能性が考えられる。この仮説を検証するため、MCM2-7 DH-Sld3-Sld7(MS)複合体の構造を Cryo-EM 解析により調べた。上記と同様に磁性ストレプトアビジンビーズを用いて MS 複合体を精製し

た。しかし、ネガティブ染色法と Cryo-EM の結果、複合体の安定性と均一性が高解像度の構造を得るには不十分であることがわかった。そこで、MS 複合体を MCM2-7 DH から分離し、均一性を高めるために、0.8 ml で行うミニグリセロールグラジエント法を構築した(図 4)。これにより、

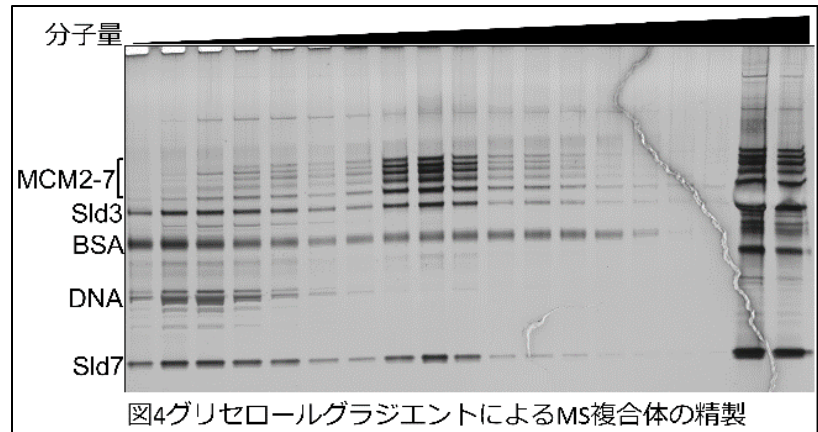


図4グリセロールグラジエントによるMS複合体の精製

り、Cryo-EM 解析で高解像度の構造を得るのに十分な MS 複合体の精製に成功した。現在、データ解析の初期段階ではあるが、これまでのところ 10 Å の解像度で MS 複合体の構造が得られている。さらなるデータ解析により高解像度の構造が得られることが期待される。この MS 複合体の構造では、Sld3-Sld7 は MCM2-7 の N 末端領域に結合していた。これは、上記の仮説が正しく、Sld3-Sld7 は MCM2-7 上でダイナミックな構造変化をすることを示唆している。

PreIC 複合体構造の解析

MSC 複合体では、DNA 開裂や MCM2-7 DH の分離は見られなかった。そこで、CDK 依存的な複製開始反応によりこれらのことが起こるかを調べるために、MCM2-7 DH-Sld3-Sld7-Cdc45-Sld2-Dpb11-GINS- Polε (preIC)複合体の構造解析を行うことにした。まず MSC 複合体形成と同様の手法により preIC 複合体の精製を行なった。リン酸化された MCM2-7 DH と Sld3/7、Cdc45、CDK、Sld2、Dpb11、GINS、Polεを反応させた(図 5)。制限酵素により、磁性ビーズから preIC 複合体を精製し、ネガティブ染色解析と Cryo-EM 解析を行った。Cryo-EM 解析の結果、14 Å の解像度で preIC 複合体の構造が得られた。これまでに知られている CMG と Polεの構造を当てはめたと、これらはよく preIC 構造にあてはまった。CMG と Polε以外のタンパク質が preIC 構造には含まれていることがわかったが、解像度が十分ではなく、それらタンパク質の構造決定までには至らなかった。また、preIC 構造中に DNA は確認されたが、DNA が開裂しているかどうかは解像度が低くはっきりしなかった。Cryo-EM 解析では、複数の preIC 複体の中間複体が得られた。これは、

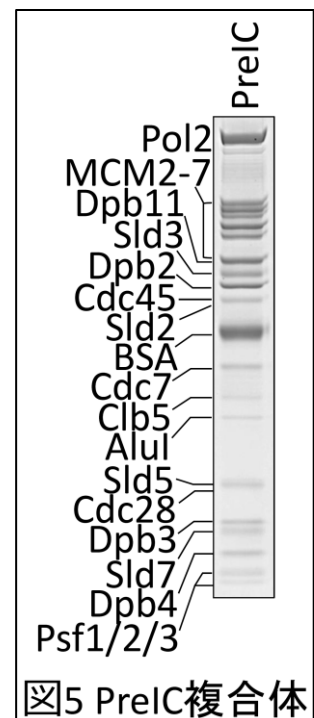


図5 PreIC複合体

は、preIC 複合体形成が、段階的な反応により行われることを示唆する。しかし、この中間体の存在により、高解像度の preIC 複合体構造が得られなかった。そこで、ミニグリセロールグラジエント法により、preIC 複合体とその中間体を分離することにした。その結果、preIC と中間体は別の画分に移動し、分離に成功した。preIC 複合体とその中間体のそれぞれについて現在 Cryo-EM 解析を行なっている途中である。

MCM2-7 DH-DDK 構造の解析

DDK は MCM2-7 ではなく、MCM2-7 DH 特異的にリン酸化することが知られているが、その機構はわかっていない。MSC 複体の試験管内再構成の過程で、DDK が他のキナーゼ

とは異なり、MCM2-7 DH と安定に結合することがわかった。そこで、DDK による MCM2-7 DH のリン酸化機構を解明するために、MCM2-7 DH-DDK (MD)複合体の構造解析を行った。ミニグリセロールグラジエントにより、MD 複合体と MCM2-7 DH を分離し、Cryo-EM 解析を行った。その結果、3.1 Å の解像度で MD 複合体の構造が得られた。その構造では、2 つの DDK が MCM2-7 DH に結合していた。また、1 つの DDK が MCM2-7 DH の両方の MCM2-7 に結合していた。このことは、DDK がなぜ MCM2-7 DH を特異的に認識できるのかをよく説明できる。また、得られた複数の構造から DDK が MCM2-7 DH 上でどのように基質を認識しているのかがわかった。

現在、上記の結果について論文を複数執筆している。コロナウイルスの影響により学会が延期または中止になったため、学会で発表する機会はなかった。