

# 研究終了報告書

## 「ゲノム複製・組換えにおける DNA 高次構造制御機構の解明」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：村山 泰斗

### 1. 研究のねらい

真核生物のゲノム DNA 複製の分子機構を解明しようとする研究として、近年、複製反応を丸ごと試験管内で再現する生化学的解析が行われている。複製効率は低いものの、細胞内の DNA 合成に必要な種々の過程を再現できており、この系を高効率化することで、試験管内で長鎖 DNA を合成する技術に発展させよう。ゲノム DNA の複製を阻害する要因の一つとして、複製装置の進行を阻害する DNA 超螺旋構造や DNA 修復反応の中間体などの DNA の絡まり構造 (DNA 高次構造) が挙げられる。このような DNA の高次構造は、通常トポイソメラーゼなどの DNA 酵素群により解消される。それに加え、本研究では染色体構造の形成制御に機能する SMC 複合体のはたらきに着目した。

SMC 複合体は、巨大なリング構造をとる ATPase 複合体であり、染色体の 3 次元構造の形成に関与する主要因子である。真核生物では、複製された姉妹染色分体同士を接着するコヒーシン (Smc1/3)、細胞分裂期に染色体の凝縮に機能するコンデンシンが知られる。これらの複合体は、DNA を束ねる分子バンドルとして機能し、この活性を介して、接着や凝縮といった染色体のマクロな構造を構築する。一方、第三の SMC 複合体である Smc5/6 複合体は、元々は DNA の損傷修復に関与するタンパク質として同定されたが、接着や凝縮のようなマクロな染色体構造の形成において明確な機能を示さない。その変異細胞の表現型の解析から、Smc5/6 複合体は、DNA の絡まりを解消する酵素群と類似して、DNA 複製や修復に機能することが報告されており、複製過程で生じる DNA の高次構造の制御を介してゲノム DNA の安定性に機能すると考えられている。しかし、Smc5/6 複合体が、SMC タンパク質としてどのような DNA 結合や構造制御活性を持ち、それがどのように発揮されて、正確かつ効率的なゲノム複製に機能するのかは不明である。

そこで、本研究は、Smc5/6 複合体のもつ DNA 構造制御機能を明らかにし、その DNA の高次構造制御機能を搭載することにより、試験管内で長鎖 DNA を効率的に合成、保全する技術基盤の確立を目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

酵母の Smc5/6 複合体を精製し、DNA 結合活性を解析したところ、超螺旋構造をもつ DNA に高い親和性を示した。DNA 超螺旋構造は、複製装置による DNA 二重鎖の開裂、および複製装置の進行により不可避免的に形成される DNA のねじれ構造であり、特に複製の進行や終結過程を阻害する。また、他の SMC 複合体であるコヒーシンやコンデンシンと同様に、DNA をリング構造におおす DNA 結合活性 (トポロジカル結合) や 2 分子の DNA 鎖を架橋する活性が見出された。以上から、Smc5/6 複合体は 2 本以上の DNA と同時に結合する生化学的特性を利用して、DNA のコイル構造を含む様々な DNA 高次構造を認識して結合するものと結論づ

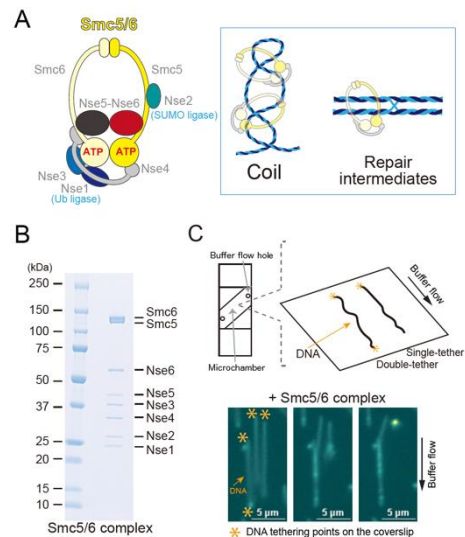
けられる。

次に、DNA 複製における Smc5/6 複合体の影響を解析した。酵母の精製タンパク質・複合体を用いて、試験管内で DNA 複製反応を再構成した。その結果、Smc5/6 複合体は、DNA 複製において DNA コイル構造が蓄積する終結段階において阻害的に働くことがわかった。また、Smc5/6 複合体が機能する DNA 修復である DNA 相同組換えを試験管内再構成して解析したところ、修復の中期に起こる DNA 合成過程を阻害することが判明した。これらの結果から、Smc5/6 複合体は、DNA 高次構造を認識して結合し、DNA 複製や修復反応に抑制的にはたらくことで、ゲノム DNA の安定性や維持に機能すると考えられる。今後は、DNA 高次構造を解消する活性を持つ DNA 酵素群や SMC 複合体と関連するタンパク質修飾酵素との機能相関に着目し、Smc5/6 複合体がゲノム DNA 複製の正確性を制御する機構を明らかにしていく。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「Smc5/6 複合体の DNA 結合活性」

Smc5/6 複合体の DNA 関連活性が DNA 複製を制御する機構を明らかにするため、酵母の複合体を精製し、まずその DNA 結合活性を解析した (図 1A,B)。Smc5/6 複合体は、2 つの SMC サブユニット (Smc5, Smc6) と Nse4 が形成するリング構造のコア複合体を中核に、5 つの制御サブユニット (Nse1,3,4,5,6) が結合したヘテロ 8 量体の ATPase 複合体である。これらのサブユニットを共発現させ、Smc5/6 複合体を精製した。精製した Smc5/6 複合体は、コヒーシンやコンデンシンと同様にリング構造の複合体を形成し、リングが折れ曲がる構造変化を繰り返すことが高速 AFM で観察された。また、コヒーシン、コンデンシンと同様にリング内に DNA をとおす ATP 依存的にトポロジカル DNA 結合活性を示した。次に、環状 DNA を基質に、ゲルシフト法で結合を調べたところ、Smc5/6 複合体は超螺旋構造を持つ DNA に対して、弛緩した DNA よりも高い親和性を示し、その結合は ATP により上昇することが確認された。このことは Smc5/6 複合体が DNA 高次構造を認識して結合することを示唆した。次に、比較的長鎖の DNA であるラムダファージ DNA (48 kbp) を基質にして、Smc5/6 複合体を反応させた時の DNA の構造変化をリアルタイムで観察した。Smc5/6 複合体と反応させることにより、基質 DNA は折り畳まれコンパクションする様子や、基質 DNA が近距離に存在する場合、2 本の独立した DNA が架橋される活性が検出された (図 1C)。また、バルク再構成実験から、Smc5/6 複合体は ATP 依存的に安定した DNA 間の架橋 (高塩濃度に耐性) を形成し、これがトポロジカル DNA 結合を介して形成されることが示唆された。Smc5/6 複合体の DNA 結合状態を高速 AFM により可視化したところ、個々の複合体は ATPase ドメインとヒンジドメインを介して DNA に結合し、また複合体同士が集合して DNA 上でマルチマーを形成することが観察された。以上の結果を総



【図 1】Smc5/6 複合体の DNA 結合活性。(A,B) 精製した Smc5/6 複合体。(C) ラムダ DNA の末端をカバースライド上に固定し、Smc5/6 複合体を添加して蛍光顕微鏡で DNA を観察した。

合し、Smc5/6 複合体はトポロジカル結合を介して2本の DNA と結合し、さらにマルチマーを形成して、DNA の架橋を安定化することが示唆された。2本の DNA と同時に結合するという生化学的特性により、Smc5/6 複合体はDNA の超螺旋構造や組換え中間体を含む多様なDNA 高次構造を認識する分子バンドルとして機能するものと考えられる。

#### 研究テーマ B「DNA 複製・相同組換えにおける Smc5/6 複合体の機能」

DNA 複製における Smc5/6 複合体の機能を解析するため、国立遺伝学研究所 荒木弘之 名誉教授が構築した系をもとに、計 25 種の複製タンパク質・複合体を精製し、酵母の DNA 複製の試験管内再構成系を構築した。これらには、複製の終結過程を促進するヘリカーゼや、新生鎖のライゲーションを行うタンパク質を含む。複製起点をもつ環状 DNA を用いて、これらを合わせて反応させることで、複製起点をもつ環状 DNA を用いて、複製の開始から終結までを再構成する系を構築した。また、ヒストンおよび関連タンパク質を精製し、ヌクレオソームが配向したクロマチンを鋳型に DNA 複製を行う系も構築した。

この複製再構成系に Smc5/6 複合体を添加して解析したが、当初の仮説に反して、Smc5/6 複合体は DNA 複製に抑制的に働き、特に複製の終結過程で阻害が見られた(図 2E-G)。この阻害は、複製終結を促進する Rrm3 ヘリカーゼの存在下や、クロマチン化した DNA 基質でも同様に見られた。テーマ A で判明した Smc5/6 複合体の DNA 結合活性や複製過程で接着構造を形成するコヒーシンの比較から、Smc5/6 複合体は複製の終結部位で形成される DNA の超螺旋構造に結合することで、複製の終結を阻害する可能性が示唆された。次に、Smc5/6 複合体が機能するもう一つの経路である DNA 相同組換えにおける影響を解析した。Smc5/6 複合体が機能する相同組換えの中後期を中心に、関連する組換えタンパク質を精製して生化学実験を行ったところ、相同組換え反応でおこる修復 DNA 合成反応を Smc5/6 複合体が阻害することが見出された。よって、Smc5/6 複合体それ自体は複製や相同組換えにおいて、これらの反応を抑制することが示唆される結果となった。

### 3. 今後の展開

Smc5/6 複合体の基本的な DNA 結合活性の解析から、この複合体が SMC 複合体に共通した生化学活性を用いながら、DNA 高次構造を認識することが分かってきた。また、複製や組換えと共役させた生化学解析から、Smc5/6 複合体がこれらの経路で機能する作用点は絞られてきた。しかし、Smc5/6 複合体のみでは、複製や組換えの反応自体を促進する方向には働かず、DNA 高次構造の解消に機能する DNA 酵素など、別の因子と協調して機能することが予想される。今後は、Smc5/6 複合体と関連する DNA 酵素群の活性制御の観点から、Smc5/6 複合体の複製・組換え経路における機能を解析していく。

また、さきがけ研究の過程で、DNA 複製を介した染色体高次構造(姉妹染色分体間接着)の形成機構の一端が分かってきた(論文投稿中)。この再構成を軸にした研究を進め、DNA 複製や複製を起点とする染色体構造構築の分子機構を明らかにすることで、その知見をもとに、長鎖 DNA 合成や染色体構築を制御する技術の開発につなげていきたい。

### 4. 自己評価

Smc5/6 複合体の機能的な DNA 結合・構造制御活性を再構成し、DNA 複製や組換えにお

ける機能を検証するという目標は一定程度達成した。DNA 複製に対する効果として得られた結果は、仮説を支持するものではなく、DNA 複製が効率的に行われる機構を明らかにするには、この知見をもとに、さらなる研究が必要である。また、本研究の展望として当初考えていた DNA 複製に共役して形成される染色体高次構造について、計 30 種の精製タンパク質を用いることで、その経路の一つを試験管内で再構成することができた。このような大規模スケールで、細胞核で起こる生化学反応過程を再構成した点は、大きな進展であったと自負している。一方で、期間内に論文として報告ができなかった点は反省点である。再構成系を構築していく過程で、領域内外で共同研究を進めることができ、複製や染色体構築機構を解明していく上で、新たな視点を取り入れることができた。以上より、今後の研究の発展に繋がる発見や成果があったと考えている。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

準備中

### (2) 特許出願

該当なし

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(学会発表)

- 1) 第 93 回日本生化学会大会、村山泰斗、黒川裕美子、染色体接着を担うコヒーシン複合体の生化学的解析 (2020)(招待公演)
- 2) PombeTalks, Yasuto Murayama, Biochemical analysis of the fission yeast structural maintenance of chromosomes (SMC) complex (2020) (invited)
- 3) 第 93 回日本遺伝学会年会、村山泰斗、黒川裕美子、高次染色体構造の形成を担うタンパク質複合体の機能と構造 (2021) (招待公演)
- 4) 第 94 回日本生化学会大会、村山泰斗、黒川裕美子、染色体構造の形成を担う SMC 複合体の機能と構造 (2021) (招待公演)
- 5) Biochemical society, Yasuto Murayama, Yumiko Kurokawa, Hiroyuki Araki, Cohesin's response to DNA replication in vitro (2022)(selected oral presentation)