

博士（生命理工学）学位論文

好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来
増殖細胞核抗原の構造解析

医療創生大学大学院
生命理工学研究科 生命理工学専攻
山内 崇浩

氏名: 山内崇浩

論文題名: 好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来 増殖細胞核抗原の構造解析

論文内容の要旨

本論文は、様々な分子装置が有機的に関与する DNA 複製機構の解明において、好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来増殖細胞核抗原 (PCNA) により構成されるスライディングクランプ複合体の関与に着目し、これまでに成されなかった構造生物化学的観点からのアプローチで解析を行い、その理解をまとめたものである。*A. pernix* は生育至適温度が 90℃を超える超好熱性古細菌に分類される偏性好気性生物である。

第一章では、DNA 複製機構における PCNA の持つ生化学的役割や、*A. pernix* およびその PCNA の配列的特徴、構造解析領域における測定技術の変遷など、研究背景について概説し、先行研究における研究成果、ならびに本研究の位置づけを示した。

第二章から第四章において、著者は三種類の *A. pernix* 由来 PCNA(ApePCNA)それぞれの単独状態での結晶構造と以下のことを解き明かした。まず、三種の ApePCNA の組み換えタンパク質の発現系を構築し、精製することにより高純度試料とした。その中で、ApePCNA1 の発現量を高度に増大させる培地組成を発見し、その組成より TP 培地と命名した。ApePCNA1 の結晶構造より、他の生物種で発見されていない、長鎖 N 末端領域によって形成される相互作用を発見した。ApePCNA2 の結晶構造は、先行研究の結論と異なる四量体リングを形成していた。ApePCNA3 の結晶構造中では、C 末端領域を介した相互作用が観察され、ApePCNA1 と同様の相互作用様式であった。

第五章から第七章において、著者は先行研究で三量体と結論づけられた複合体について小角散乱法を用いた溶液中の複合体表面より溶液構造を明らかにした。ApePCNA2 のホモ複合体は溶液中ではリングを形成しておらず、球状の五量体であった。ApePCNA1, ApePCNA2, ApePCNA3 による複合体はリングに近い配置の三量体であったが、完全なリングを構成していなかった。ApePCNA2, ApePCNA3 による複合体は平たい四量体であり、リングの穴にあたる部分は存在しなかった。ApePCNA2-3 複合体と ApePCNA1-2-3 複合体の間での構造比較より、ApePCNA1 が特殊環境でのリング形成に関与している可能性が示唆された。今後、ApePCNA の複合体形成への温度条件の影響を検証することにより、スライディングクランプの形成条件と ApePCNA1 の詳細な作用の解明が期待される。

第八章において、ApePCNA1, ApePCNA2, ApePCNA3 によって構成される三者複合体を、クライオ電子顕微鏡を用いて解析した。その構造上の特徴より *A. pernix* の DNA 複製において、三量体リングの開裂を伴うスライディングクランプの形成への ApePCNA1 の寄与が示唆された。今後、ApePCNA2-3 複合体の構造を明らかにすることで、これら二種類のスライディングクランプの特徴づけ、および生命進化の謎の解明とともに、病原細胞の治療抵抗性獲得のメカニズムが解明されることが期待される。

Name: Takahiro Yamauchi

Title of paper: Structural analysis of proliferating cell nuclear antigen from the thermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*.

Abstract of Paper Contents

This paper focuses on the involvement of the sliding clamp complex composed of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from the thermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* in the elucidation of the DNA replication mechanism involving various molecular devices organically and summarizes the authors' findings of the complex from the perspective of structural biochemistry, which has never been achieved before. *A. pernix* is a hyperthermophilic archaeon with a growth optimum temperature exceeding 90°C.

In Chapter I, the biochemical role of PCNA in DNA replication, sequence characteristics of *A. pernix* and its PCNA, and evolution of experimental techniques in the field of structural analysis are reviewed. The results of the previous studies and the position of this study are also presented.

In Chapters II–IV, the author revealed three crystal structures of each PCNA from *A. pernix* (ApePCNA) in their single states and the following. First, recombinant protein expression systems for the three ApePCNAs were constructed and purified to obtain highly purified samples. In this process, the author found a medium composition that highly increased the expression of ApePCNA1, which he named TP medium. The crystal structure of ApePCNA1 revealed an interaction with the long N-terminal region, which has not been found in other species. The crystal structure of ApePCNA2 forms a tetrameric ring, which differs from the conclusions of previous studies. In the crystal structure of ApePCNA3, an interaction through the C-terminal region was observed, which was similar to the interaction mode of ApePCNA1.

In Chapters V–VII, the authors elucidated the solution structures of the complexes that were concluded to be trimeric in previous studies from the surface of the complexes in solution using small-angle X-ray scattering. The homocomplex of ApePCNA2 did not form a ring in solution but was a spherical pentamer. The complexes of ApePCNA1, ApePCNA2, and ApePCNA3 were trimeric in a near-ring arrangement but did not form a complete ring. The ApePCNA2 and ApePCNA3 complex is a flat tetramer with no holes in the ring. Structural comparisons between the ApePCNA2-3 and ApePCNA1-2-3 complexes suggest that ApePCNA1 may be involved in ring formation in special environments. Future studies are expected to examine the effect of temperature conditions on the formation of the ApePCNA complex, and to elucidate the conditions for the formation of the sliding clamp and the details of the action of ApePCNA1.

In Chapter VII, the complex composed of ApePCNA1, ApePCNA2, and ApePCNA3 was analyzed using cryo-EM. The structural features suggest that ApePCNA1 contributes to the formation of a sliding clamp with the cleavage of the trimeric ring during DNA replication in *A. pernix*. Future work on the structure of the ApePCNA2-3 complex is expected to help characterize these two types of sliding clamps, elucidate the mysteries of life evolution, and elucidate the mechanisms by which pathogenic cells acquire therapeutic resistance.

目次

第 1 章	序論	1
1.1	背景	1
1.1.1	DNA 複製の指揮者”スライディングクランプ”	1
1.1.2	スライディングクランプの構成要素	2
1.1.3	"好熱性古細菌 <i>Aeropyrum pernix</i> " の PCNA	3
1.1.4	ApePCNA のアミノ酸配列	3
1.1.5	開拓されるタンパク質構造解析の手法	5
1.2	目的	6
第 2 章	好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原 1 の単独結晶構造決定	8
2.1	タンパク発現系の構築および高純度試料の調製	8
2.1.1	組み換えタンパク質のプラスミド調製	8
2.1.2	タンパク質発現系および発現プロトコルの探索	8
2.1.3	高純度試料の調製	9
2.2	タンパク質の結晶化	10
2.2.1	方法	10
2.2.2	結果	11
2.2.3	考察	11
2.3	X 線回折実験および構造決定	12
2.3.1	方法	12
2.3.2	結果	13
2.3.3	考察	14
第 3 章	好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原 2 の単独結晶構造決定	22
3.1	タンパク発現系の構築および高純度試料の調製	22
3.1.1	組み換えタンパク質のプラスミド調製	22

3.1.2	タンパク質発現系および発現プロトコルの探索	22
3.1.3	高純度試料の調製	23
3.2	タンパク質の結晶化	24
3.2.1	方法	24
3.2.2	結果	24
3.2.3	考察	26
3.3	X 線回折実験および構造決定	26
3.3.1	方法	26
3.3.2	結果	27
3.3.3	考察	29
第 4 章	好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原 3 の単独結晶構造決定	32
4.1	タンパク発現系の構築および高純度試料の調製	32
4.1.1	組み換えタンパク質のプラスミド調製	32
4.1.2	タンパク質発現系および発現プロトコルの探索	32
4.1.3	高純度試料の調製	33
4.2	タンパク質の結晶化	34
4.2.1	方法	34
4.2.2	結果	34
4.2.3	考察	35
4.3	X 線回折実験および構造決定	36
4.3.1	方法	36
4.3.2	結果	37
4.3.3	考察	38
第 5 章	好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原 2 の溶液構造	40
5.1	方法	40
5.2	結果	41
5.3	考察	42
第 6 章	好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原 1-2-3 複合体の溶液構造	47
6.1	方法	47
6.2	結果	48
6.3	考察	49

第 7 章	好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原 2-3 複合体の溶液構造	52
7.1	方法	52
7.2	結果	53
7.3	考察	54
第 8 章	Cryo-EM による ApePCNA1-2-3 複合体の構造解析	57
8.1	方法	57
8.2	結果	58
8.3	考察	59
第 9 章	結語	62
第 10 章	付録	63
10.1	ターゲットタンパク質の基礎情報	63
引用文献		69
出版リスト		75
謝辞		78

略語一覽

ApePCNA	PCNA from <i>Aeropyrum pernix</i>
Bio-SAXS	Biological SAXS
Cryo-EM	Cryo-Electron Microscopy
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
dsDNA	double strand DNA
EDS	Energy Dispersive X-ray Spectrometry
FSC	Fourier Shell Correlation
GCC	Golden & Coconut Chocolate
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IDCL	Inter-Domain-Connecting Loop
LB	Luria-Bertani broth
LBL	Lennox LB broth
MAD	Multiple wavelength Anomalous Dispersion
MCA	Multi Channel Analyser
NITE	National Institute of Technology and Evaluation
NBRC	Biological Resource Center, NITE
ORF	Open Reading Frame
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
PfuPCNA	PCNA from <i>Pyrococcus furiosus</i>
PIP-Box	PCNA Interacting Peptide-Box
r.m.s.d.	root mean square deviation
SAD	Single wavelength Anomalous Dispersion

SAXS	Small Angle X-ray Scattering
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEC-SAXS	Size Exclusion Chromatography coupled SAXS
SEC-MALS	Size Exclusion Chromatography coupled Multi Angle Light Scattering
SOC	Super Optimal broth with catabolite repression
SsoPCNA	PCNA from <i>Saccharolobus solfataricus</i>
StoPCNA	PCNA from <i>Sulfurisphaera tokodaii</i>
TLS	Translesion DNA Synthesis
TP	Tryptone and Peptone Broth
UHRF2	Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 2
VDX	Vapor Difusion Crystallization
wwPDB	world wide PDB
XAFS	X-ray Absorption Fine Structure

第 1 章

序論

1.1 背景

1.1.1 DNA 複製の指揮者" スライディングクランプ"

生命の発生・維持・再生に不可欠なプロセスの一つである細胞分裂は、多種多様なタンパク質が有機的に関連して引き起こされる DNA 複製によって支えられている [1]. DNA 複製に関与する種々のタンパク質のうち、長鎖 DNA を合成または分解する酵素活性をもつものの多くはスライディングクランプを介して DNA 近辺に固定される [2][3][4](図 1.1). スライディングクランプは DNA 二重らせんを取り囲むリング状のタンパク質複合体であり、スライディングクランプのもつ DNA 合成活性に与える影響は、合成する DNA が長くなるにしたがって顕著になる [5]. スライディングクランプを介して DNA に作用するタンパク質は DNA 依存性 DNA ポリメラーゼをはじめ、フラップエンドヌクレアーゼ、DNA リガーゼ等多岐にわたる [6]. スライディングクランプのリング内径は 40 \AA 弱であり、二本鎖 DNA(dsDNA) の外径 20 \AA の約 2 倍である. DNA のらせん軸に対し、スライディングクランプのリングの軸は約 20° 程度の傾斜が存在する. この傾斜によって、スライディングクランプに結合する関連酵素群と dsDNA 間の距離を変化させることにより DNA 伸長、修復、ライゲーション等の活性をスイッチングする. スライディングクランプは DNA 複製複合体 (レプリソーム) 全体の活性制御に関与する指揮者のような存在と例えることができる.

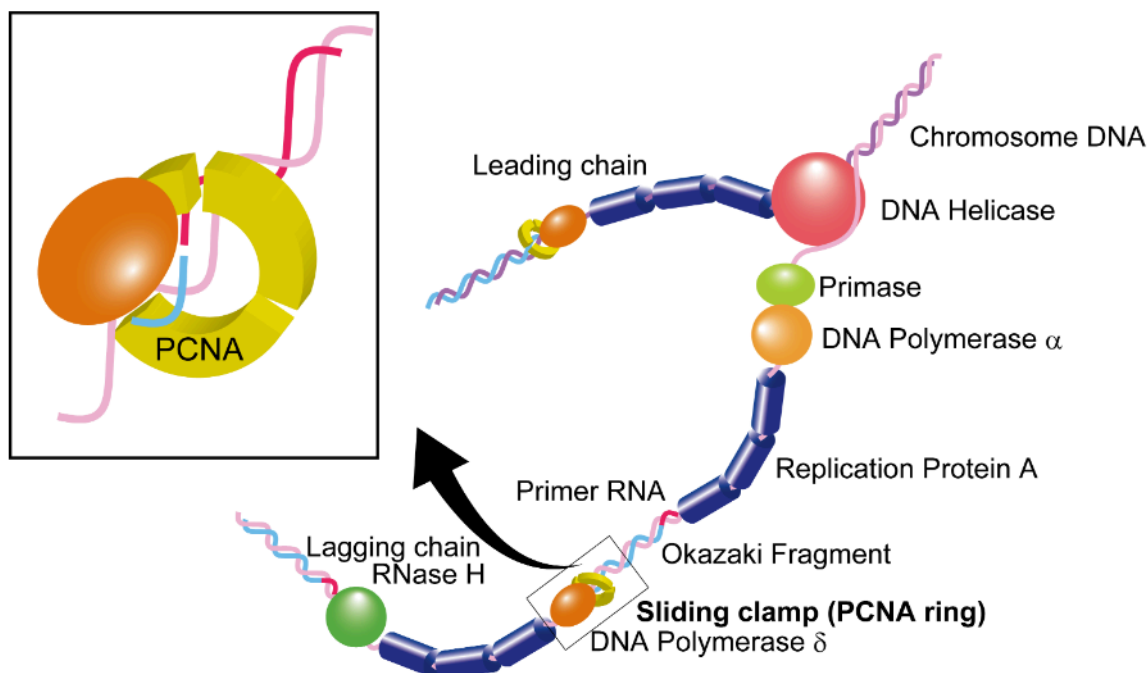


図 1.1. 複製フォークの模式図 PCNA 付近の拡大図を黒枠部に示した (左上). DNA は鋳型鎖を桃色および紫色で、娘鎖を水色で、RNA プライマーをマゼンタ色で着色した. タンパク質の各因子の名称は図中に表記している.

1.1.2 スライディングクランプの構成要素

スライディングクランプ複合体の立体構造は多くの場合類似した構造として報告されている. スライディングクランプは分子量約 80 kDa~90 kDa の六角形に近いリング状であり, リング内側は正電荷に富む α ヘリックスが平行に整列する [7]. この構造の類似性はスライディングクランプが 6 つのドメインによって構成されることに起因しており, 生物ドメインごとにリングを構成するサブユニットのサイズや構成様式が異なる. 細菌ドメインでは 3 ドメインで構成される約 40 kDa の β サブユニットによる二量体 (β クランプ) で, ゲノム上の遺伝子は 1 種類とされている. このホモ 2 量体は 2 種類の酵素と複合体を形成, スイッチングする. 真核生物ドメインでは約 25 kDa の増殖細胞核抗原 (PCNA) による三量体によって構成されている [4, 7, 8]. 真核生物の PCNA は 2 ドメインで構成されており, コードする遺伝子は単一, したがって複合体もホモ複合体となる. 三量体リングは理論上 3 種類の複製因子を保持, スイッチングする. 古細菌ドメインも, 真核生物と同様に PCNA 三量体によるリングが形成されるが,

Sulphurisphaera tokodaii 由来の StoPCNA2-3 複合体は四量体リングの結晶構造が報告されている。また、ユーリ古細菌 (euryarchaea) に代表される多くの古細菌は単一遺伝子だが、好熱性古細菌 (crenarchaea) はゲノム上に複数の PCNA 遺伝子を持ちヘテロ三量体を形成する [2]。

PCNA は医療の分野でも着目されている標的分子の一つである [9]。PCNA の発現量は細胞増殖の活発さを表現しており、肺がん切片を用いた調査では、がん組織で PCNA 発現が増加することが報告された [10]。また、活発に増殖する微生物 (病原微生物) をターゲットとして、抗菌薬として有用な β クランプ阻害薬の探索が行われている [11][12][13]。その他、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR; Polymerase chain reaction) 法をはじめとする耐熱タンパク質の応用などの技術開発にも本研究の知見が役立つ可能性がある。

1.1.3 "好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix*" の PCNA

好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* は 1996 年に鹿児島県の小宝島で発見された [14]。1999 年にゲノムが解読され、そのゲノム上には 3 種類の PCNA 遺伝子 (ApePCNA1, ApePCNA2, ApePCNA3) が存在すると結論付けられた [15]。以上の経緯を鑑み、*A. pernix* は純国産の好熱性古細菌とも表現できるだろう。その生化学的な特徴づけとして、組み換えタンパク質による複合体形成のゲル濾過分析や *A. pernix* 細胞内でのタンパク質発現量解析などが行われた [16, 17]。

1.1.4 ApePCNA のアミノ酸配列

三種類の ApePCNA のアミノ酸配列を比較すると、ApePCNA1 と ApePCNA2、ApePCNA2 と ApePCNA3、ApePCNA3 と ApePCNA1 のアミノ酸配列の同一性は、それぞれ 28.16%, 21.81%, 28.57% であった。3 つの PCNA の平均同一性は 26.18% であった。ApePCNA1 の配列は、他の 2 つの配列よりも N 末端側で約 10 残基長かった (図 1.2)。同様に、*Saccharolobus solfataricus* 由来の SsoPCNA3 は、長い N 末端領域を含んでいた (PDB entry 2ix2, chain C)[4]。しかし、ApePCNA1 と SsoPCNA3 の相同性は、ApePCNA 間の相同性よりも低く (24.9%), 各 PCNA の 2 番目のメチオニン残基の前の N 末端領域 (ApePCNA1 では Met17, SsoPCNA3 では Met16) において一致しているのは Met1 のみであった。*A. pernix* 由来 PCNA 群 (ApePCNAs) のアミノ酸配列は登録されているデータベースによってその配列が異なる。これは

開始コドンの設定に起因するもので、本研究では KEGG データベースに登録されている配列を用いた [18]. KEGG データベースは DOGAN データベースを継承しており、その母体である独立行政法人 製品評価技術基盤機構 (NITE) の研究では、*A. pernix* の遺伝子の中で、開始コドンが ATG であるものは約 30% であり、約半数が TTG, 残る 20% が GTG であると結論付けられた [19]. また、九州大学の研究では *A. pernix* 細胞から採取したネイティブ ApePCNA と、プラスミドベクターによる組み換え ApePCNA を SDS-PAGE で解析することにより、その分子量からオープンリーディングフレーム (ORF) について言及された [16]. その結論は ApePCNA1, ApePCNA2, ApePCNA3 の開始コドンがそれぞれ GTG, TTG, GTG であり、全てが一般的な開始コドンである ATG と異なる衝撃的なものであった.

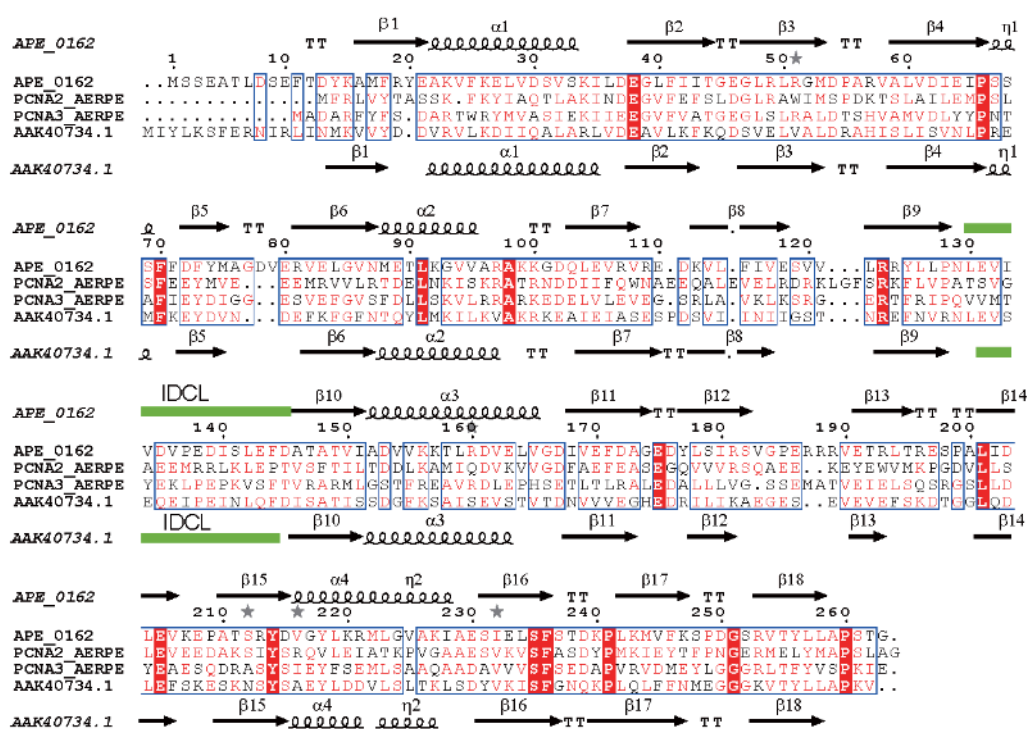


図 1.2. ApePCNA と SsoPCNA3 の多重配列アラインメント ヘリックス, β シート, IDCL はそれぞれ, コイル, 矢印, 緑色のバーで表されている. 物理化学的特性に基づいて 70% 以上類似している残基を含む列 (閾値は 0.7) は青枠で囲まれており, 100% 同一のアミノ酸残基は赤色の背景で強調されている. この図は, ESPript 3.0[20] を使用して作成された.

1.1.5 開拓されるタンパク質構造解析の手法

日本国におけるタンパク質構造解析領域の一大イベントの一つといえ、2002 年より五ヶ年計画で進められたタンパク 3000 プロジェクトであろう。当時主流であった結晶構造解析、および核磁気共鳴 (NMR) 法により、3000 種の重要なタンパク質の基本構造と機能を解析することを目標としたこのプロジェクトは、2007 年に終了を迎えた。*A. pernix* もこのプロジェクトの対象として白羽の矢が立った生物種であり、プロジェクト期間内に報告されたタンパク質構造のうち約 50 種の構造が Protein data bank(PDB) に登録されている。これは 2025 年 1 月現在で PDB に登録されている *A. pernix* 由来のタンパク質構造 160 種の約 30% を占めており、当時のタンパク 3000 プロジェクトが大規模であったことは想像に難くない。当時より結晶構造解析は最大 1 Å~2 Å 分解能の最も高分解能な構造が得られる手法であったが、特に多種の構成要素を含む複合体の結晶化と構造決定 (位相決定) は期待通りの成果が得られない場合も多く、この手法におけるボトルネックのひとつであった。

X 線結晶構造解析の弱点を補う方法の一つとして、溶液試料を対象とした生体試料小角 X 線散乱法 (Bio-SAXS; Small angle X-ray Scattering) が挙げられる。この手法は結晶構造解析と比較して 10 Å 分解能程度と低い分解能ではあるが、巨大な複合体の溶液中での分子表面の概形を分析することができる。結晶構造解析同様に X 線を用いる手法であるが、位相問題を Dummy atom model の構築で解決する *ab initio* 解析が可能である。また、モータータンパク質などの動的構造変化の解析のほか、測定部にゲルろ過カラムをタンデム接続する SEC-SAXS (Size Exclusion Chromatography-SAXS) により混合試料の単分散データを測定可能である。

さらには、新たな解析手法としてクライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM; Cryo Electron Microscopy) を用いた手法が確立され、*A. pernix* においても 2023 年に鞭毛および線毛のクライオ電顕構造が報告されている [21, 22]。この手法はアモルファス氷の薄膜氷層中に分散した粒子の画像データを収集し、単粒子解析によって立体構造が得られるため、X 線を使用する手法での重要課題であった位相問題の解決を要さない。Cryo-EM は総分子量の大きなタンパク質または複合体の構造解析においては結晶構造解析と同程度の分解能で構造が得られる場合があるが、約 100 kDa に満たない低分子量の場合には不適とされている。本研究では取

り扱わないが、近年、これらの手法によって得られたタンパク質構造をもとにアミノ酸配列から構造予測を行う *in silico* 解析が注目を集めており、DeepMind 社による AlphaFold の開発が 2024 年にノーベル賞を受賞したことは記憶に新しい。AlphaFold による予測構造はビックデータ中の構造が明らかになっているタンパク質のホモログに対しては明確な解が得られる一方、天然変性タンパクをはじめとする構造が未知であるタンパク質の場合は信頼に足る予測ができない。そのため、人工知能が発展した現代においても、実験的に構造を解き明かす研究は非常に価値のあるものであるといえるだろう。好熱性古細菌を対象とした研究は多くの研究チームにより進められている。好熱性古細菌由来のタンパク質は細菌同様にイントロンを含まない点やそのほとんどが耐熱性であり取り扱いが容易である。特に *A. pernix* は全ゲノム配列が解読されており、培養方法も確立している [14]。加えて、その生育環境においては偏性好気性生物でありながらその生息温度が最も高く、近縁種の中でも特殊な環境に適応している点も大きな特徴と言える。ApePCNAs およびスライディングクランプの構造解析自体が疾病の治療など実臨床に直接的に役立つ確証はないが、このような特殊な環境への適応を伴う進化の過程を解明することは、(方向性は大きく異なるが) 同様に逆境とも呼べる環境で生きる特殊な病原細胞、例えば抗生物質、抗がん剤等に暴露された病原細胞の耐性化、治療抵抗性獲得のメカニズムの解明にも役立つ可能性がある。

1.2 目的

過去の研究では、近縁種の *Saccharolobus solfataricus* や *S. tokodaii* 由来の PCNA 複合体の立体構造が報告されている [4, 23]。九州大学の先行研究により *A. pernix* 由来 PCNA 群 (ApePCNAs) は生化学的特性として、複合体形成の特徴づけや細胞内でのタンパク質発現量が実験的に明かされているが、立体構造や原子レベルでの特徴づけはされていない [17]。先行研究ではそれぞれの ApePCNA と代表的な関連タンパク質である DNA ポリメラーゼ I(Pol I), DNA ポリメラーゼ II(Pol II), フラップエンドヌクレアーゼ 1(Fen1), DNA リガーゼ (Lig) 間の相互作用 (解離定数) を定量的に分析することにより、ApePCNA2-Lig, および ApePCNA3-Fen1 の特異的な相互作用が同定され、これらがラギング鎖の複製に関与している可能性が提案された。また、2 種の DNA ポリメラーゼに関しては Pol I に関しては ApePCNA2 と特異的に相互作用す

る一方, Pol II は ApePCNAs のどのサブユニットにも結合しうるが, そのどちらが DNA 複製に関与する主要なポリメラーゼであるかは予測が困難であり, 実験的には両方が DNA 鎖合成をカバーしている可能性があると考えられた. 一方, 先行研究のターゲットであった 4 種の関連タンパク質いずれも ApePCNA1 特異的な相互作用はみられず, 損傷乗り越え DNA 合成 (TLS; Translesion DNA Synthesis) 活性を持つポリメラーゼが特異的に結合する可能性が提案されていた. 三種類の ApePCNA のうち, ApePCNA1-2, ApePCNA2-3 間, および ApePCNA2 単独状態で三量体が形成され, ポリメラーゼ活性の増強を伴うスライディングクランプの組成として ApePCNA1-2-3, および ApePCNA2-3 の組み合わせが示唆された. 一方, 三量体として報告された結果はゲルろ過のピーク位置による分子量計算値からの予測であり, ApePCNA2-3 複合体の場合分子量の和が 75 kDa~80 kDa に対してピーク位置が 115 kDa であるなど, 理論値 (各サブユニットの分子量の和) に対して最大 50% 程度の誤差がある. 本研究では, *A. pernix* ゲノム上の三種類の PCNA について単独での結晶構造解析に加え, Bio-SAXS, クライオ電子顕微鏡など多種の手法を用いて構造解析を行い, その動作メカニズムを原子レベルで特徴づける. 単独での結晶構造を決定することにより, 複合体の構造解析への応用のほか, 先行研究で発見に至らなかった ApePCNA1 のパートナーをドッキングシミュレーションで探索する *in silico* スクリーニング等のアプローチが可能となる. また, 先行研究で提案された複合体について Bio-SAXS および Cryo-EM を用いて複合体構造を解析することにより, 先行研究の分子量解析の予測を検証する.

第 2 章

好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原 1 の単独結晶構造決定

2.1 タンパク発現系の構築および高純度試料の調製

2.1.1 組み換えタンパク質のプラスミド調製

ApePCNA1 について, 大腸菌を用いた発現系を構築するためにプラスミドの調製を行った. *Aeropyrum pernix*K1^T 由来の ApePCNA1 のコード領域 (APE_0162) を, NBRC 100138^T 株 (NITE) のゲノム DNA を鋳型とし, PCR 法を用いて増幅した. PCR 産物を制限酵素 *Nde*I, *Bgl*III で処理したのち, *Nde*I, *Bam*HI で制限酵素処理した pET-11a ベクター (Merck KGaA 製) にサブクローニングした. 本研究用いたプラスミドベクターは, 大阪大学大学院理学研究科タンパク 3000 代謝系事務局で調製されたものを使用した.

2.1.2 タンパク質発現系および発現プロトコルの探索

pET-11a-APE0162 プラスミドを氷上, 25 μ F, 180 kV, 4 ms 設定のエレクトロポレーション法により Rosetta-gami(DE3) コンピテント細胞に導入した. Rosetta-gami(DE3) は pRARE プラスミドを持ち, レアコドンを含むタンパク質の発現をカバーできる. pRARE プラスミド上には Chloramphenicol 耐性遺伝子がコードされており, 培養中のプラスミドの欠落を防止するために培地中に Chloramphenicol を添加した. 同様に, pET-11a には Ampicillin 耐性遺伝子が組み込まれているため, Ampicillin も添加した. 導入後細胞を

Super Optimal broth with catabolite repression(SOC 培地) で 310 K, 30 min 培養し, 34 mg/mL Chloramphenicol を添加したのち, Ampicillin 添加 Luria-Bertani(LB) 寒天培地に播種し, 310 K, 34 h 培養した. 寒天培地上に形成されたコロニーのうち 3 つの単コロニーを選択し, 50 mg/mL Ampicillin, 34 mg/mL Chloramphenicol を添加した LB 培地 15 mL で 310 K, 12 h 培養した後, 菌液を 80%Glycerol と等量混合しストックとした. ApePCNA1 組み換え大腸菌について, 50 mg/mL Ampicillin, 34 mg/mL Chloramphenicol を添加した 1.0% Bacto Tryptone(Becton, Dickinson & Co. 製), 0.5% Yeast extract(Kyokuto Pharmaceutical Industrial 社製), 0.5% NaCl(LBL 培地 [19])15 mL を用いて 310 K, 9 h の前培養を行った. 前培菌液 7.5 mL を, 50 mg/mL Ampicillin, 34 mg/mL Chloramphenicol を添加した 1.0% Bacto Tryptone, 0.5% Peptone(Kyokuto Pharmaceutical Industrial 社製), 0.5% NaCl(TP 培地)1 L を用いて 310 K, 12 h 培養した. 細胞の増殖を 600 nm 波長の吸光度 (A_{600}) で確認し, A_{600} が 0.6 を超えた時点で 10% Lactose 40 mL を添加し, 最終濃度 0.4% とし, APE_0162 遺伝子の発現を誘導した. 310 K で培養を 4 h 継続した.

2.1.3 高純度試料の調製

得られた菌体を菌体質量の 2 倍量の 20 mM Tris-HCl pH8.0, 50 mM NaCl に再懸濁し, 氷上にて超音波処理し破碎した. その後, 80 °C, 30 min 加熱し, 8000 × *g*, 15 min 遠心分離し上清を得た. 上清の体積を測定し, 氷上にて 40% 飽和となるよう粉碎した Ammonium Sulfate を添加し, 4 °C, 90 min 攪拌したのち, 15000 × *g*, 15 min 遠心分離し沈殿を回収した. 得られた沈殿物を 20 mM Tris-HCl pH8.0 2 mL で溶解し, 分子量カットオフ 10 kDa の透析チューブに封入し, 1 L の 20 mM Tris-HCl pH8.0 に対し, 30 min, 1 h, オーバーナイトの計 3 回透析を行った. ApePCNA1 を分取するために, 液体クロマトグラフィー装置 (ÄKTA prime plus, Cytiva 社製) を用いて陰イオン交換カラム HiTrap Q HP 5 mL によるカラムクロマトグラフィーを行った. 平衡化バッファーとして 20 mM Tris-HCl pH8.0, 200 mM NaCl, 溶出バッファーとして 20 mM Tris-HCl pH8.0, 1 M NaCl を用い, 流速は 2.5 mL/min とした. 平衡化バッファーで試料吸着後, 溶出バッファーへ線形増加グラジエントを 0 → 50%/100 mL で設定し, フラクションサイズ 2.5 mL 分画を回収した. 溶出フラクションを SDS-PAGE で確認し, ApePCNA を含むフラクショ

ンを回収し、限外ろ過フィルター (Amicon Ultra-15 centrifugal filter units 10,000 NMWL; Merck KGaA 製) を用いて 0.1 mL に濃縮した。濃縮した試料を HiLoad 16/600 Superdex 75pg(Cytiva 社製) を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。バッファーは 20 mM Tris-HCl pH8.0, 200 mM NaCl を使用した。カラムの排除体積 (V_0)65 mL に対し, 60 mL 時点でフラクション回収を開始し, 190 mL(カラム容積 183 mL) まで回収を行った。溶出フラクションを SDS-PAGE で確認し, 単一バンドのフラクションを回収した。限外ろ過でバッファー置換 (20 mM Tris-HCl pH8.0) と濃縮を行い, 最終濃度を 10 mg/mL とした。

2.2 タンパク質の結晶化

2.2.1 方法

蛋白質の結晶化は VDX プレート (Hampton Research 社製) を使用しハンギングドロップ蒸気拡散法にて行った。初期条件スクリーニングはスクリーニングキット Wizard Classic 1, 2(Rigaku Reagents 社製) および Index(Hampton Research 社製) を使用した。スクリーニング溶液はリザーバー 700 μ L, ドロップサイズ 4 μ L(タンパク質液 2 μ L + リザーバー 2 μ L) とし, 25 °C で静置した。初期条件スクリーニングで結晶が観察された条件について, pH, 塩濃度, 沈殿剤濃度を 100 mM McIlvaine buffer pH4.2~pH4.6, 100 mM~250 mM Lithium Sulfate, 7% 2-Propanol, リザーバー量 1 mL に最適化した。結晶が確認され最適化に着手した条件を表 2.1 に示す。

表 2.1. ApePCNA1 の結晶化条件

条件	リザーバー溶液	参照
#1	100 mM McIlvaine buffer pH4.2~pH4.6 100 mM~250 mM Lithium sulfate 7% 2-propanol	Wizard Classic 2, #6
#2	100 mM Sodium cacodylate/HCl pH6.5 100 mM~250 mM Lithium sulfate 15%~40% PEG400	Wizard Classic 2, #12
#3	1.14 M~1.34 M Sodium phosphate monobasic 0.18 M~0.06 M Potassium phosphate dibasic	Index, #17

2.2.2 結果

ApePCNA1 はアミノ酸に富む TP 培地で効果的に発現が誘導された。タンパク質発現に広く使用される Lennox LB(LBL) 培地の 0.5% Yeast extract を 0.5% Peptone に置換した TP 培地では、SDS-PAGE 上でも LBL 培地と比較し高い発現量を示した (図 2.1)。さらに、大腸菌由来の (目的のタンパク質以外の) タンパク質は従来の LBL 培地より少なかった。

ApePCNA1 はゲルろ過で単一ピーク、SDS-PAGE 上で単一バンドとなる純度に精製された (図 2.2)。

ゲルろ過のピーク位置より分子量計算値は約 30 kDa であった。結晶化条件を最適化することにより、結晶化後 48 h 程度で最大 0.2 mM の結晶を得ることができた (図 2.3)。

2.2.3 考察

TP 培地はアミノ酸が主成分であり、エネルギー代謝や核酸代謝が制限される。培地中の核酸量が極めて少ないことにより、大腸菌にとって、核酸代謝では *de novo* 経路が優位であり、salvage 経路はあまり重要ではない環境といえるため、これらの代謝関連タンパク質の発現が抑制されると考えられる。したがって、目的タンパク質である ApePCNA1 の特異的な発現量は、それらの代謝に必要なタンパク質の減少によるものと考えられる。本発現系では、培地組成のほか、*lac* オペロンを用いてタンパク質の発現を誘導しており、Lactose 添加のタイミングも検討した。実験手技の利便性と培養中の異物混入のリスクを考慮すると、Lactose 溶液は別々に調製して用時に混合するのではなく、あらかじめ Lactose を培地に混合し、滅菌することが望ましい。しかし、Lactose を含む培地で ApePCNA1 が過剰発現すると、宿主大腸菌の増殖が抑制され、溶液が目視で濁りが確認できるまでに必要な培養時間が 26 h に倍増した。この結果から、予め Lactose を添加した培地を用いたプロトコルは不適と判断し、 A_{600} が 0.6 に達したことを確認し Lactose 溶液を添加することにより、より効率のよいプロトコルで ApePCNA1 を発現させることができた。TP 培地を用いたタンパク質発現量は、対象となるタンパク質、発現ベクター、宿主菌種による影響も含めて、その性質を定量的に解析されることで、以降のタンパク質研究により良いプロトコルを提供できると考えられる。ApePCNA1 のゲルろ過溶出体積より、液

中での概算分子量はおよそ 30 kDa である。これは ApePCNA1 の分子量である 29.4 kDa と一致するため、溶液中で ApePCNA1 は単量体で存在すると考えられる。この結果は先行研究と一致している [17]。先行研究の濃度設定は不明であるが、本研究のプロトコルではゲルろ過のピークで 0.223 mg/mL (8.67 mM) であり、先行研究で定量された発現量に基づく細胞内濃度の計算値は 1 μ M と比較し高濃度である。この結果により、ApePCNA1 は細胞内濃度においても単量体であると考えられる。

2.3 X 線回折実験および構造決定

2.3.1 方法

得られた ApePCNA1 結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構 (KEK) 放射光実験施設 (PF; Photon Factory) にて X 線回折実験を行った。結晶化実験のドロップよりクライオループを使用し結晶を回収した。実験温度下で凍結による結晶への亀裂を防止するために、抗凍結剤として PEPE oil Fomblin Y (Merck KGaA 製) に結晶を浸漬し、周囲のリザーバーを置換した。回折実験は PF-AR NW12A および PF BL-1A の 2 種のビームラインで実施した。PF-AR NW12A では抗凍結処理後の結晶をクライオループで回収し手作業で回折装置へ設置し、100 K 条件下での回転法にて回折像を測定した。BL-1A では結晶のクライオループはビームライン内のロボットで回折装置へ移乗するため、抗凍結剤処理した結晶をクライオループに再度回収し、液体窒素中 (77 K) で Universal V1-Puck (UniPuck) に封入した。UniPuck はドライシッパーを用い 77 K でビームライン PF BL-1A に搬入した。回折像は PF-AR NW12A 同様に 100 K 条件下での回転法にて測定した。測定データは PF Remote Monitoring system (PReMo) 上で簡易的に処理される (Fast XDS), 測定データの統計値により、回折像の質を比較した。選定した測定データを XDSGUI[24] で処理 (標識, 積分処理, スケーリング, 統合) し, R_{merge} が 0.2 となる 2.0 Å 分解能でカットオフした。MOLREP[25] による分子置換法で位相決定を行った。初期位相の探索には好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* 由来 PCNA (PfuPCNA; PDB entry 1liz4[26]) をモデルとして用いた。両者間のアミノ酸配列の同一性は 30.12% であった。出力された構造 (PDB ファイル) を Coot[27] にて確認し, $C\alpha$ と電子密度がおおよそ一致していることを確認した。ARP/wARP Classic[28] を用

いてモデル構築を行い, 同時に 92 の水分子が配置された. この構造より Coot を用いて各所の修正を行い, REFMAC5[29] を用いて精密化および電子密度の計算を行った. 位相決定, モデル構築, 構造精密化は CCP4 suite[30] による CCP4i[31] パッケージを使用した. ApePCNA1 の構造を Coot, および Protein Data Bank(PDB) に登録する際に wwPDB バリデーションシステム [32] を用いてバリデーションを行った. 回折データの収集および処理の統計値を表 2.2 に示す.

表 2.2. ApePCNA1 の構造精密化の結果

	ApePCNA1
Beam Line	PF BL-1A
Space group	$P4_32_12$
Unitcell parameters	
a, b, c (Å)	69.03, 69.03, 120.86
Resolution range (Å)	48.8–1.59
Wavelength (Å)	1.10
Unique reflections	27 830
Completeness	99.9%
Overall $I/\sigma(I)$	28.3
Multiplicity	12.8
R_{merge}	0.054
Resolution range (Å)	48.8–2.0
R_{workt}	0.181
R_{free}	0.220
r.m.s.d. bond length (Å)	0.024
r.m.s.d. bond angles (°)	2.22
Average B -factors	28.5
Ramachandran plot	
Most favored regions	98.8%
Allowed regions	1.2%
Outliers regions	0.0%

2.3.2 結果

ApePCNA1 の結晶は最大 1.59 Å 分解能で回折し, 最終的に 2.0 Å 分解能で構造を決定した. カットオフ値は AIMLESS [33], XDSGUI とともに 1.7 Å と提案されたが 1.99 Å~1.66 Å 分解能の領域で R_{merge} と I/σ が負の値を示す異常

値であったため、最終的に 2.0 Å と決定した。最終の構造では、N 末端 4 残基 (Met1-Ser2-Ser3-Glu4) および C 末端 (Gly263) を除くほとんどのアミノ酸が割り当てられた (図 2.4)。

ApePCNA1 は N 末端ドメインと C 末端ドメインに大別され、Leu130–Gln145 の領域が二つのドメインを連結する inter-domain-connecting loop(IDCL) として観察された。N 末端ドメインおよび C 末端ドメインは共通して 2 つの β シートと 2 つの α ヘリックスを含んでいた。N 末端ドメインでは $\beta 5$, $\beta 1$, $\beta 7$, $\beta 8$, $\beta 9$ および $\beta 6$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ がそれぞれ小さな β シートを形成していた。C 末端ドメインでは $\beta 13$, $\beta 12$, $\beta 11$, $\beta 15$ および $\beta 18$, $\beta 17$, $\beta 16$, $\beta 10$, $\beta 14$ が小さな β シートを形成していた。各ドメインの 2 つの β シートのうち、それぞれ 1 つずつが連結することにより、一連の大きな β シート ($\beta 6$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 18$, $\beta 17$, $\beta 16$, $\beta 16$, $\beta 14$) を形成している。したがって、ApePCNA1 全体では、1 つの大きな β シートと 2 つの小さな β シートを含んでいた。 β 鎖は全てが逆並行に整列していた。計 4 つの α ヘリックスは逆並行に並び、分子表面は正に帯電していた。このうち、 $\alpha 4$ は $\eta 2$ へ連結しており、 $\eta 2$ は $\alpha 4$ と比較し急な螺旋であった。3 つの β シートのうち、大きな β シート (背面 β シート) が 4 本の逆並行 α ヘリックスと平行にで整列し、その中心部は内側の α ヘリックスである $\alpha 1$, $\alpha 4$ に近距離であるが、両端部になるにつれて $\alpha 2$, $\alpha 3$ から離れた距離にあった。2 つの小さな β シートは $\alpha 2$ と $\beta 6$ および $\alpha 3$ と $\beta 14$ にまたがるように、分子両端に配置されていた。分子内部は疎水性残基に富み、一連の疎水性相互作用が観察された。また、各ドメインの二つの β シートの接合部の内部に空洞の領域が観察された。その他、空洞は C 末端ドメインの背面 β シートと IDCL の付近にも存在した (図 2.5)。

2.3.3 考察

結晶構造中の非対称単位は 1 分子の ApePCNA1 を含む。また、空間群 $P4_32_12$ では 3 回対称の軸を含まないため、結晶中でホモ 3 量体の形成は見られない。ApePCNA1 の全体構造を構造が公開されている PCNA (ヒト PCNA[7], 酵母 PCNA[34], PfuPCNA[26]) と比較すると、 $C\alpha$ を用いた構造アラインメントの root mean square deviations(r.m.s.ds)(PyMOL での計算値) はそれぞれ 1.178 Å (ホモ三量体の平均値), 1.061 Å, 0.881 Å であり、ApePCNA1 が他種の PCNA と類似した構造であるといえる。他種由来の PCNA リングは α ヘリッ

クス領域が内側に存在しているが, ApePCNA1 においても他種同様の配置を取りうると考えられる. ApePCNA1 の α ヘリックス領域は正に帯電しているため, PCNA リングの内側に存在することにより, リン酸により負に帯電した DNA 二重らせんと相互作用が可能になると考えられる. ApePCNA1 構造のみで構築されたホモ三量体モデルでは, その分子両端は $\beta 5$ と隣接分子の $\beta 13$ の間に形成された水素結合により相互作用している. それに加え, ApePCNA1 は溶液中では単量体であり, N 末端の長いループが溶液中では無秩序であることに起因すると考えられる. IDCL 領域は可動性があり顕著な二次構造をとらないため, PDB に登録された PCNA の構造においてしばしば無秩序な構造をとる (電子密度が不明瞭となる). 一方, ApePCNA1 は IDCL 領域においても電子密度が観察された. さらに, その長さから無秩序であると予測した ApePCNA1 の N 末端も, その予想に反して明瞭な電子密度が観察された. これらの長いループは本結晶の空間群 ($P4_32_12$) の 4 回らせん軸上で隣接するサブユニットの接点に存在している. 一般的に, スライディングクランプは DNA 複製の進行方向に C 末端が存在するとされ [35], DNA 複製に関連する酵素群は IDCL 近傍の結合ポケットに結合する [36]. 興味深いことに, ApePCNA1 の N 末端は隣接する ApePCNA1 の IDCL 領域と C 末端によって形成される裂溝と相互作用している (図 2.6).

この相互作用中では, N 末端の Asp8 のカルボキシル基は隣接分子の Arg57 のグアニジノ基と, Leu7 の主鎖 NH は隣接分子 Arg57 の主鎖 CO と水素結合を形成していた. Leu7 の疎水性側鎖は, 隣接するサブユニットの Met53, Leu60, Pro137, Pro241, Leu257, および Ala259 によって形成される疎水性ポケットに配置されている. この相互作用は, ヒト PCNA と UHRF2-PIP[37](PDB entry 5yco) との間で観察されたものと同様である. PIP-box のコンセンサス配列は QXXhXXaa であり, X は任意のアミノ酸, h は疎水性アミノ酸, a は芳香族アミノ酸である. ApePCNA1 の N 末端領域の 4-EATLDSEF-11 配列は, PIP-box のコンセンサス配列と類似している. これらの結果は, ApePCNA1 の PIP-box 結合部位が他の種の PCNA のものと類似した位置にあり, 類似した方法で結合することを示唆している. さらに, ApePCNA1 の N 末端領域は, PIP-box 結合を誘導するアンカー配列であることが示唆される. これらの結果は, ApePCNA1 が N 末端アンカー配列によって媒介される未知の機能を有しており, それが PIP-box 様相互作用をもたらすことを示唆している. この N 末端相互作用が複合体形成にどのように影響するかは, N 末端排除型 PCNA または

N 末端ペプチドを用いた ApePCNA1 との比較や, ドッキングシミュレーションによる *in silico* 解析, N 末端 Leu7 または Arg8 への変異導入などの手法で定量的に解析されることで新たな洞察が得られることが期待される.

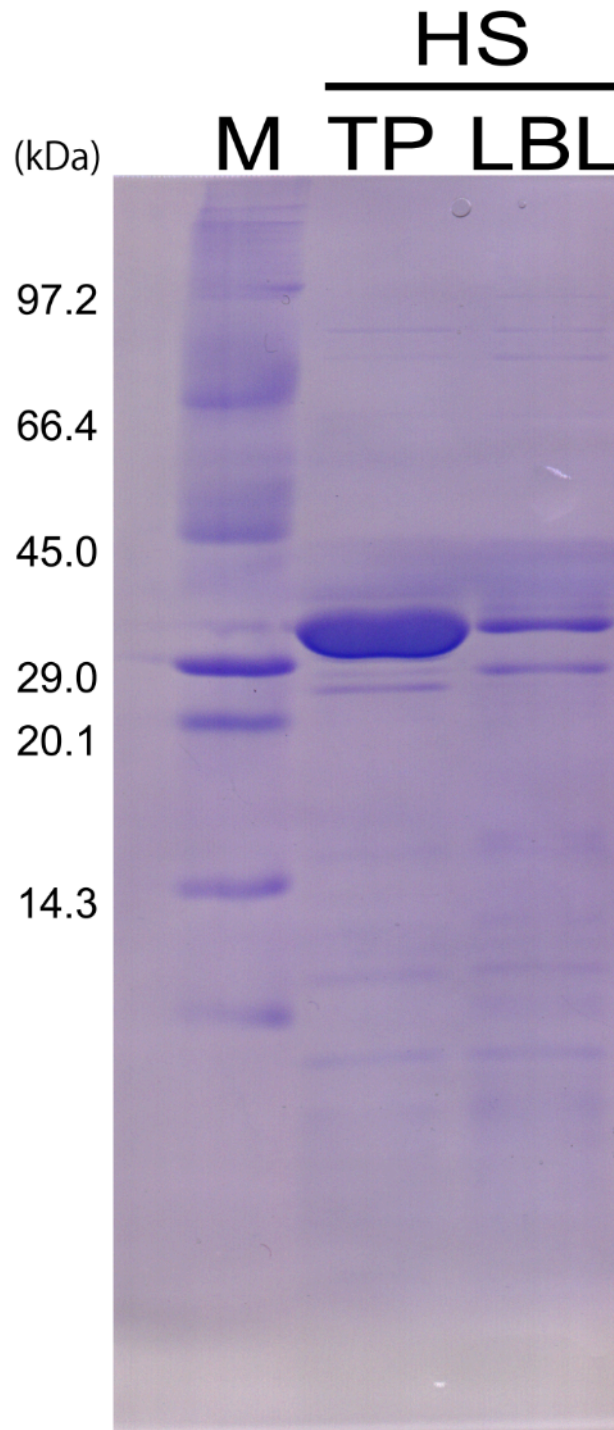


図 2.1. 2 種類の培地における ApePCNA1 発現の比較 SDS-PAGE 画像の各レーンには分子量マーカー (左; M) , TP 培地 (中央; TP) , Lennox LB 培地 (右; LBL) . 各サンプルは同量の菌体重量を再懸濁し熱処理後, 上清 (HS) を比較した.

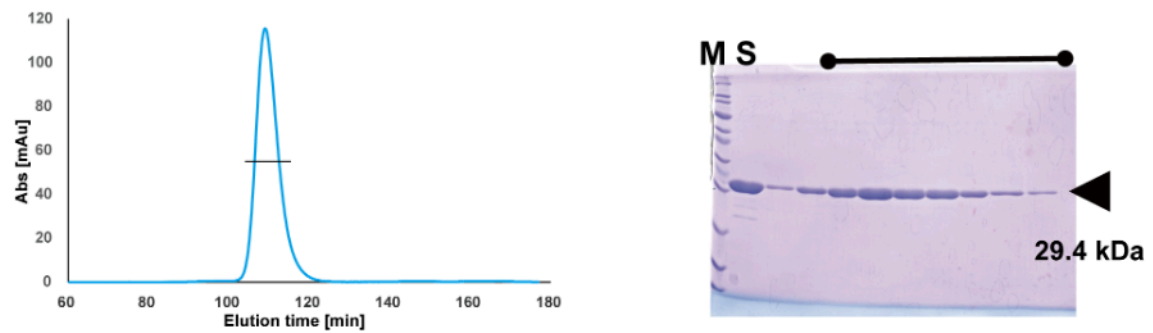


図 2.2. ApePCNA1 のゲルろ過結果 (左) および最終精製後の SDS-PAGE (右)

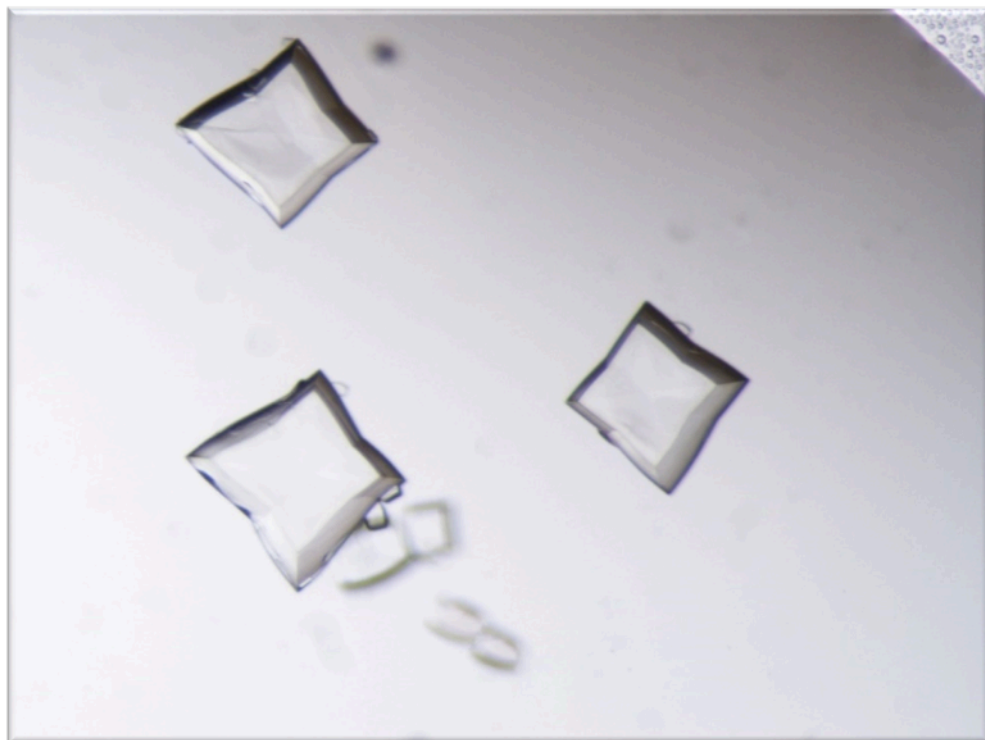


図 2.3. ApePCNA1 の結晶写真 結晶化条件は表 2.1, #1 結晶は約 0.2mm

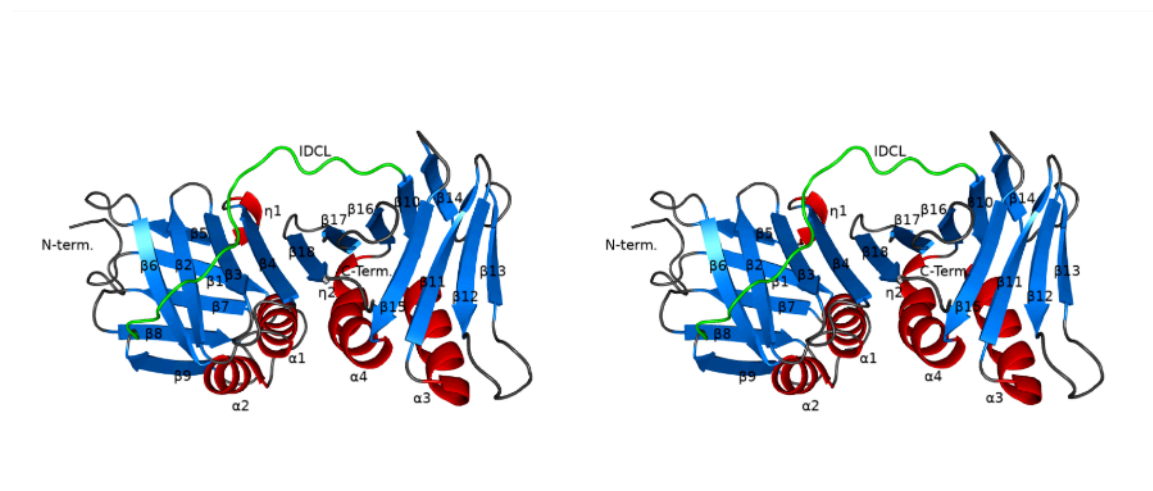


図 2.4. ApePCNA1 構造のステレオ図 タンパク質はリボン図で表され, α -ヘリックス, β -シート, ループ, IDCL はそれぞれ赤, マリンブルー, 灰色, 緑で着色されている.

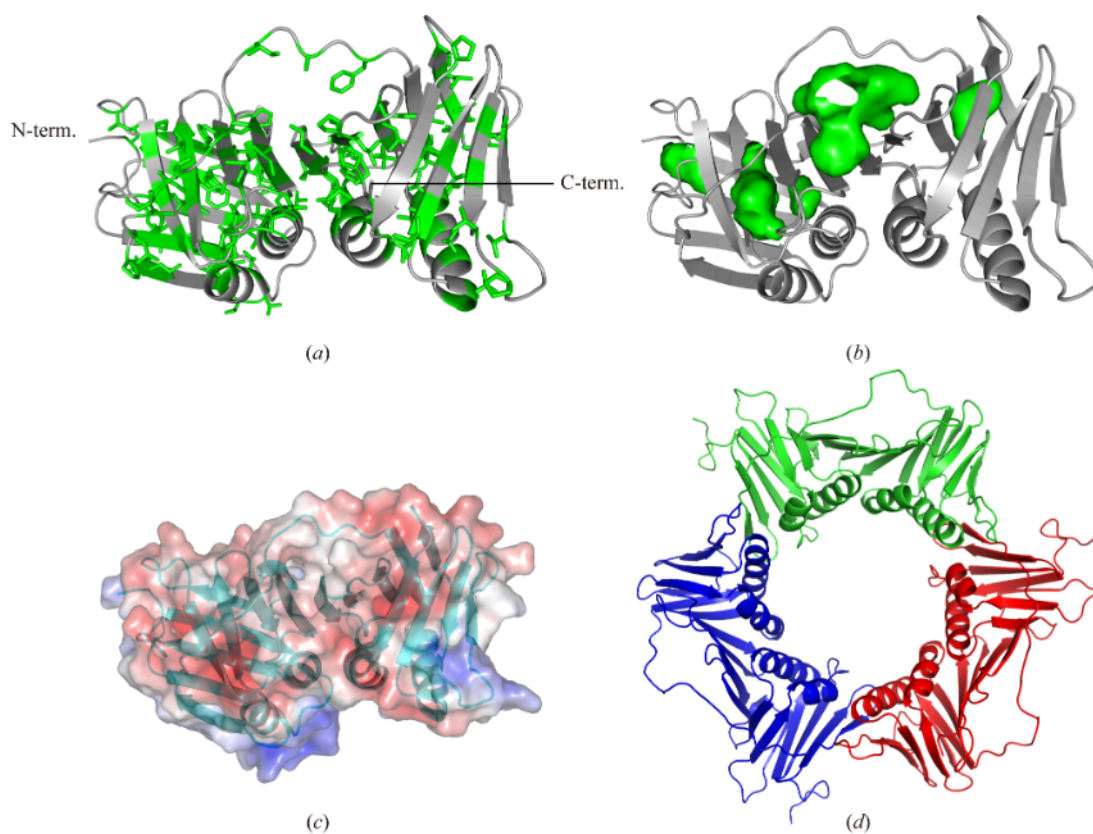


図 2.5. ApePCNA1 の構造的特徴 (a) 疎水性アミノ酸は緑色の棒で表示. (b) 空洞領域は緑色のメッシュで表示. 空洞は PyMOL を使用して描画. (c) 分子表面の静電ポテンシャルは, それぞれ正および負の電荷に対して青および赤で表示. (a), (b), (c) は, 図 2.4 と同じ方向から見たもの. (d) ApePCNA1 ホモ三量体のリングモデルを 3 回軸方向から見たもの. 各サブユニットは異なる色で着色されている.

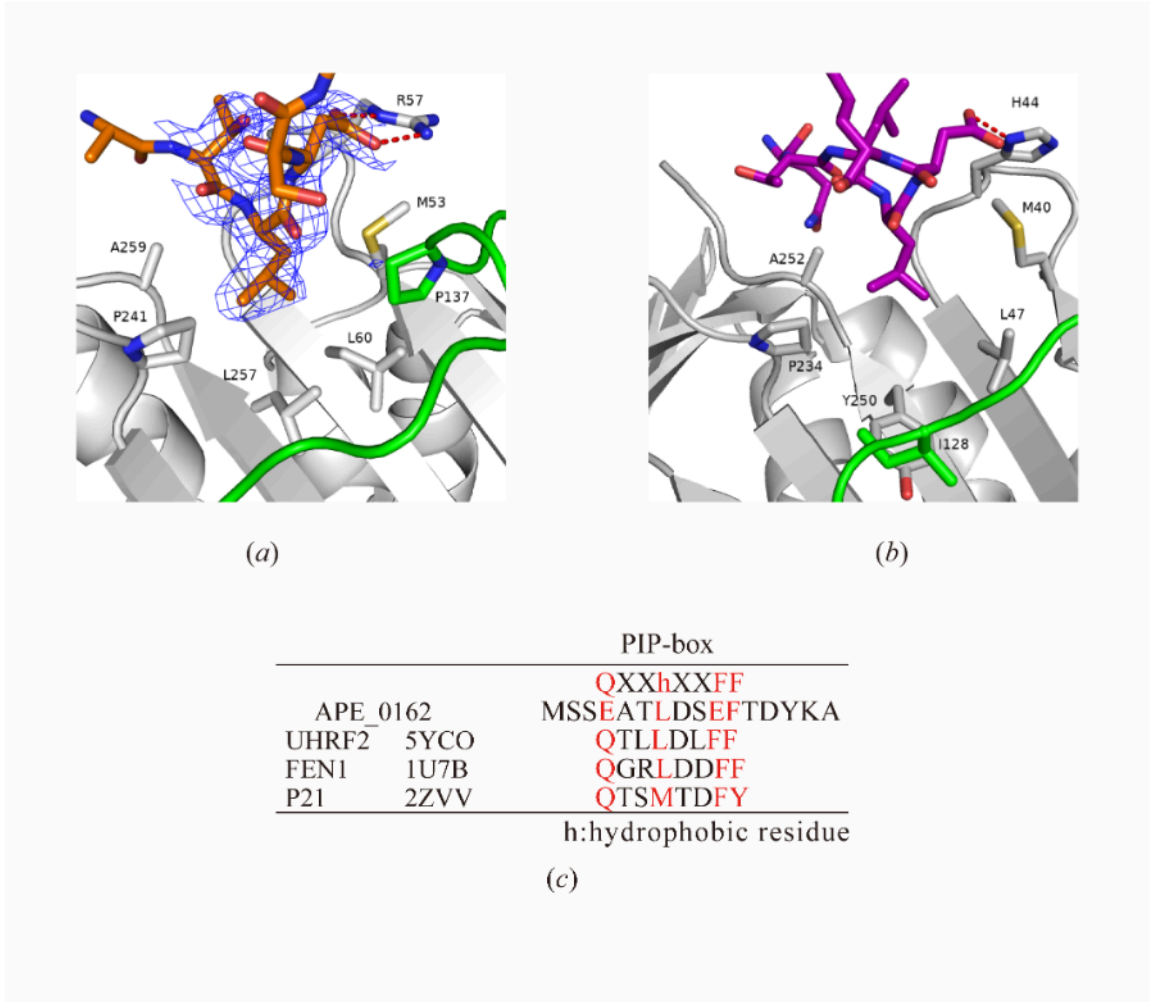


図 2.6. PCNA 構造と PIP-box 配列の比較 (a) ApePCNA1 (オレンジ) の N 末端を除いて計算した Fo-Fc 差マップ (青いメッシュ) を 2 σ で輪郭表示. ICDL は緑色で, 水素結合は赤い破線で表示. (b) UHRF2PIP (PDB entry 5yco[37]) と結合したヒト PCNA は, (a) と同じ向きで表示. (c) PIP-box コンセンサス配列を, ヒト PCNA の PIP-box 配列と, 類人猿 PCNA1 の N 末端配列および PIP-box 配列を持つタンパク質 (PDB entry 1u7b[38], および 2zvv[39]) と比較した.

第 3 章

好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原 2 の単独結晶構造決定

3.1 タンパク発現系の構築および高純度試料の調製

3.1.1 組み換えタンパク質のプラスミド調製

ApePCNA2 について, 大腸菌を用いた発現系を構築するためにプラスミドの調製を行った. *A. pernix*K1^T 由来の ApePCNA2 のコード領域 (APE_0441.1) を, NBRC 100138^T 株のゲノム DNA を鋳型とし, PCR 法を用いて増幅した. PCR 産物を制限酵素 *Nde*I, *Bam*HI で処理したのち, pET-11a ベクターにサブクローニングした.

3.1.2 タンパク質発現系および発現プロトコルの探索

pET-11a-APE0441.1 プラスミドを氷上, 25 μ F, 180 kV, 4 ms 設定のエレクトロポレーション法により Rosetta-gami(DE3) に導入した. 導入後細胞を Super Optimal broth with catabolite repression(SOC) 培地で 310 K, 30 min 培養し, 34 mg/mL Chloramphenicol を添加したのち, Ampicillin 添加 Luria-Bertani(LB) 寒天培地で培養した. 各ターゲットに対し 3 つの単コロニーを選択し, Glycerol と等量混合しストックとした. ApePCNA2 組み換え大腸菌について, 50 mg/mL Ampicillin, 34 mg/mL Chloramphenicol を添加した 1.0% Bacto Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl(LBL 培地)15 mL を用いて 310 K, 9 h の前培養を行った. 前培菌液 7.5 mL を, 50 mg/mL Ampicillin,

34 mg/mL Chloramphenicol を添加した LBL 培地 [11] 1 L を用いて 310 K, 12 h 培養した. A_{600} が 0.6 を超えた時点で 10% Lactose 40 mL を添加し, 最終濃度 0.4% とし, APE_0441.1 遺伝子の発現を誘導した. 310 K で培養を 4 h 継続した.

3.1.3 高純度試料の調製

得られた菌体を菌体質量の 2 倍量の 20 mM Tris-HCl pH8.0, 50 mM NaCl に再懸濁し, 氷上にて超音波処理し破碎した. その後, 80 °C, 30 min 加熱し, 8000 × g , 15 min 遠心分離し上清を得た. 上清の体積を測定し, 氷上にて 30% 飽和となるよう粉碎した Ammonium sulfate を添加し, 4 °C, 90 min 攪拌したのち, 15000 × g , 15 min 遠心分離し沈殿を回収した. 得られた沈殿物を 20 mM Tris-HCl pH8.0 2 mL で溶解し, 分子量カットオフ 10 kDa の透析チューブに封入し, 1 L の 20 mM Tris-HCl pH8.0 に対し, 30 min, 1 h, オーバーナイトの計 3 回透析を行った. ÄKTA prime plus を用いて陰イオン交換カラム Q Sepharose 30 mL によるカラムクロマトグラフィーを行った. 平衡化バッファーとして 20 mM Tris-HCl pH8.0, 300 mM NaCl, 溶出バッファーとして 20 mM Tris-HCl pH8.0, 1 M NaCl を用い, 流速は 5.0 mL/min とした. 平衡化バッファーで試料吸着後, 溶出バッファーへ線形増加グラジエントを 0% → 70%/200 mL で設定し, フラクションサイズ 5.0 mL で分画を回収した. 溶出フラクションを SDS-PAGE で確認し, ApePCNA2 を含むフラクションを回収し, 限外ろ過フィルターを用いて 0.1 mL に濃縮した. 濃縮した試料を HiLoad 16/600 Superdex 75pg を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った. バッファーは 20 mM Tris-HCl pH8.0, 200 mM NaCl を使用した. カラムの排除体積 (V_0)65 mL に対し, 60 mL 時点でフラクション回収を開始し, 190 mL(カラム容積 183 mL) まで回収を行った. 溶出フラクションを SDS-PAGE で確認し, 単一バンドのフラクションを回収した. 限外ろ過でバッファー置換 (20 mM Tris-HCl pH8.0) と濃縮を行い, 最終濃度を 10 mg/mL とした.

3.2 タンパク質の結晶化

3.2.1 方法

蛋白質の結晶化は VDX プレートを使用しハンギングドロップ蒸気拡散法にて行った. 初期条件スクリーニングはスクリーニングキット Wizard Classic 1, 2 および Index を使用した. スクリーニング溶液はリザーバー 700 μ L, ドロップサイズ 4 μ L (タンパク質液 2 μ L + リザーバー 2 μ L) とし, 20 °C で静置した. 初期条件スクリーニングで結晶が観察された条件について, pH, 塩濃度, 沈殿剤濃度を 100 mM McIlvaine buffer pH4.4~pH5.0, 250 mM~350 mM Lithium Sulfate, 7% 2-Propanol, リザーバー量 1 mL に最適化した. 結晶が確認され最適化に着手した条件を表 3.1 に示す.

表 3.1. ApePCNA2 の結晶化条件

条件	リザーバー溶液	参照
#1	100 mM McIlvaine buffer pH4.4~pH4.5 100 mM~250 mM Lithium sulfate 7% 2-propanol	Wizard Classic 2, #6
#2	40 mM~140 mM Succinic acid pH7.05 5%~20% PEG3350	Index, #89
#3	140 mM~240 mM Sodium formate 10%~50% PEG3350	Index, #90
#4	150 mM HEPES/NaOH pH7.5 50 mM~200 mM Sodium chloride 5%~30% PEG400	Wizard Classic 2, #42
#5	75 mM HEPES/NaOH pH7.5 15%~40% PH/OH 100 mM~250 mM Potassium chloride	Index, #90

3.2.2 結果

ApePCNA2 は ApePCNA1 と異なり, LBL 培地でもタンパク質が発現した. 一方, ラクトース添加による発現誘導は ApePCNA1 同様, 初期より添加することにより大腸菌の生育が阻害された. 硫酸分画では条件探索の設定上最低濃度の 30% 飽和で沈殿へ移行した. 最終的に SDS-PAGE 上で単一バンドとなる純

度まで精製された (図 3.1).

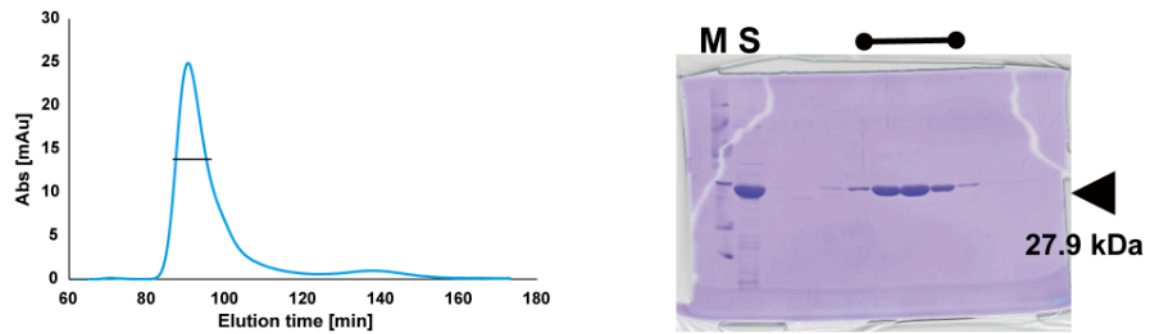


図 3.1. ApePCNA2 の精製結果 ゲルろ過クロマトグラフィーのチャート (左) および SDS-PAGE のゲル写真 (右)

結晶化条件は ApePCNA1 と同じ初期条件で結晶が確認された. 得られた結晶は径 0.1 mm, 厚さ 0.02 mm 程度の六角形の板状結晶であり, ApePCNA1 の結晶とは異なった (図 3.2).



図 3.2. ApePCNA2 の結晶写真 サイズは約 0.1 mm

3.2.3 考察

ApePCNA2 の発現系は、培地こそ LBL で発現がみられるものの、初期のラクトース添加で増殖が遅くなる結果は ApePCNA1 と一致する。ApePCNA2 と大腸菌ゲノム間または大腸菌 β サブユニットなどのタンパク質への相互作用の可能性が考えられる。また、Ammonium sulfate 添加による沈殿濃度の違いを塩強度に対する可溶性ととらえた場合、ApePCNA2 は ApePCNA1 に比べて塩環境での凝集が起こりやすいと考えられる。最初期の精製プロトコルでは陰イオン交換カラムは HiTrap Q HP 5 mL を使用していたが、この段階で結晶化可能な純度の試料を得ることができた。しかし、後述の理由によりプロトコルにゲルろ過を追加した。ゲルろ過の溶出体積は約 90 mL であり、推定分子量は 90 kDa～100 kDa の三量体または四量体であることが示唆される (図 3.1)。

3.3 X 線回折実験および構造決定

3.3.1 方法

得られた ApePCNA2 結晶を用いて、KEK-PF にて X 線回折実験を行った。結晶化実験のドロップよりクライオループを使用し結晶を回収した。実験温度下で凍結による結晶への亀裂を防止するために、抗凍結剤として PEPF oil Fomblin Y に結晶を浸漬し、周囲のリザーバーを置換した。回折実験は PF-AR NW12A, PF-AR NE3A, PF BL-5A で行った。手作業での移乗または UniPuck を使用し、100 K 条件下での回転法にて測定した。PF-AR NE3A ではリモート、フルオートでの測定を行った。測定データは PReMo 上で簡易的に処理された。測定データの統計値により、回折像の質を比較した。選定した測定データを XDSGUI で処理 (標識, 積分処理, スケーリング, 統合) し、 $I/\sigma > 2.0$ となるよう 2.0 \AA 分解能でカットオフした。位相決定は、プラチナ錯体による単波長異常散乱 (SAD; Single wavelength Anomalous Dispersion) 法を用いた。プラチナ錯体は Heavy Atom Screen (Hampton Research 社製) の製品を使用した。アミノ酸配列を参考に、候補となる試薬として 5 種 (K_2PtCl_4 , K_2PtCl_6 , $\text{K}_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_4$, $\text{K}_2\text{Pt}(\text{CN})_4$, K_2PtBr_4) を選択した。各試薬粉末を少量計量し、超純水 (Milli-Q 水) で溶解した。試薬の添加はソーキング法を用いた。結晶ドロップに、解凍した試薬溶液をクライオループで添加し室温で静置した (5 min～2 h, および

overnight). 結晶ドロップより回収された結晶を、一度 Pt を含まないリザーバーへ移し、PEPF oil Fomblin Y を用いて抗凍結処理を行った後に回折装置へ移乗した。結晶中の Pt を確認するために、マルチチャンネルアナライザー (MCA) を用いて蛍光を確認した。続いて X 線吸収微細構造 (XAFS; X-ray Absorption Fine Structure) を解析し、スペクトルを参照し回折測定 of 波長を決定した。多波長異常散乱 (MAD; Multiple wavelength Anomalous Dispersion) 法での解析を考慮し, peak, edge, high remote, low remote, 1.00 Å の 5 波長で 0.1° 間隔で 0°~360° のデータを測定した。位相決定の測定データとして PReMo システムの FastXDS で処理された反射データを用いた。一度 AIMLESS でスケーリングし, $I/\sigma > 2.0$ で提案された 2.48 Å でカットオフを設定し, 再度 AIMLESS でスケーリングした。反射データと APE_0441.1 のアミノ酸配列をもとに, Phaser SAD pipeline[3] で初期位相の探索を行った。その後, 実験位相をもとに ARP/wARP Classic を用いてモデル構築を行った。位相決定された ApePCNA2 結晶構造をモデルに, 高分解能の回折データを用いて分子置換法で構造決定し, この構造より Coot を用いて各所の修正を行い, REFMAC5 を用いて精密化および電子密度の計算を行った。位相決定, モデル構築, 構造精密化は CCP4i パッケージを使用した。回折データの収集およびデータ構造精密化の結果を表 3.2 に示す。

3.3.2 結果

ApePCNA2 の結晶は K_2PtCl_4 のソーキング下で安定に存在し, SAD 法により実験位相での構造決定に至った。最初期のプロトコルでは熱処理, 硫安分画, 陰イオン交換クロマトグラフィーで結晶化可能な純度の試料を得ることができた。しかし, 回折実験での分解能が最大 2.2 Å 程度であった。紫外領域の吸光スペクトルでは 260 nm にピークが存在したため, ApePCNA2 の定量は Bradford 法で行っていた。結晶化に用いた試料溶液を電子顕微鏡の元素解析 (EDS; Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) で解析した際には, リンのスペクトルが検知され, 核酸分子の混入が疑われた (図 3.3)。

分子置換法で位相が決定できなかったため, 生成プロトコルにゲル濾過クロマトグラフィーを追加し核酸を除去することにより, タンパク質純度と結晶の分解能向上を目指した。ゲル濾過クロマトグラフィーにより低分子量の核酸が除去され, 回折測定時の分解能は最大 1.88 Å に向上した。SAD 法を用いた位相決定で

表 3.2. ApePCNA2 の構造精密化の結果

	ApePCNA2
Beam Line	PF-AR NEW12A
Space group	$C222_1$
Unitcell parameters	
a, b, c (Å)	119.21, 173.38, 172.20
Resolution range (Å)	69.9–1.8
Wavelength (Å)	1.00
Unique reflections	163 444
Completeness	94.5%
Overall $I/\sigma(I)$	11.8
Multiplicity	5.6
R_{merge}	0.067
Resolution range (Å)	64.9–2.0
R_{work}	0.203
R_{free}	0.236
r.m.s.d. bond length (Å)	0.013
r.m.s.d. bond angles (°)	1.84
Average B -factors	34.0
Ramachandran plot	
Most favored regions	95.1%
Allowed regions	3.3%
Outliers regions	1.6%

は, 初期位相として 28 原子の Pt が配置された. 計算上の非対称単位は 6 分子程度のサイズであったが, 位相決定の結果, 非対称単位中に 4 分子の ApePCNA2 が配置された (図 3.4).

構造精密化の結果, 最終的に 2.0 Å で精密化された. 4 つのモノマーはそれぞれが ApePCNA1 と類似した構造で, ApePCNA1 との構造アラインメントでの $C\alpha$ 原子間の r.m.s.d. は平均値 1.640 Å であった. 初期状態の非対称単位中の ApePCNA2 の配置は橋のような配置であり, 小さな β シートで接続された 2 分子の ApePCNA2 が 2 列配置されていた. この非対称単位が期間限定で発売されていたゴールデン&ココナツチョコレートに似た形状であったことから, 非対称単位を GCC と命名した.

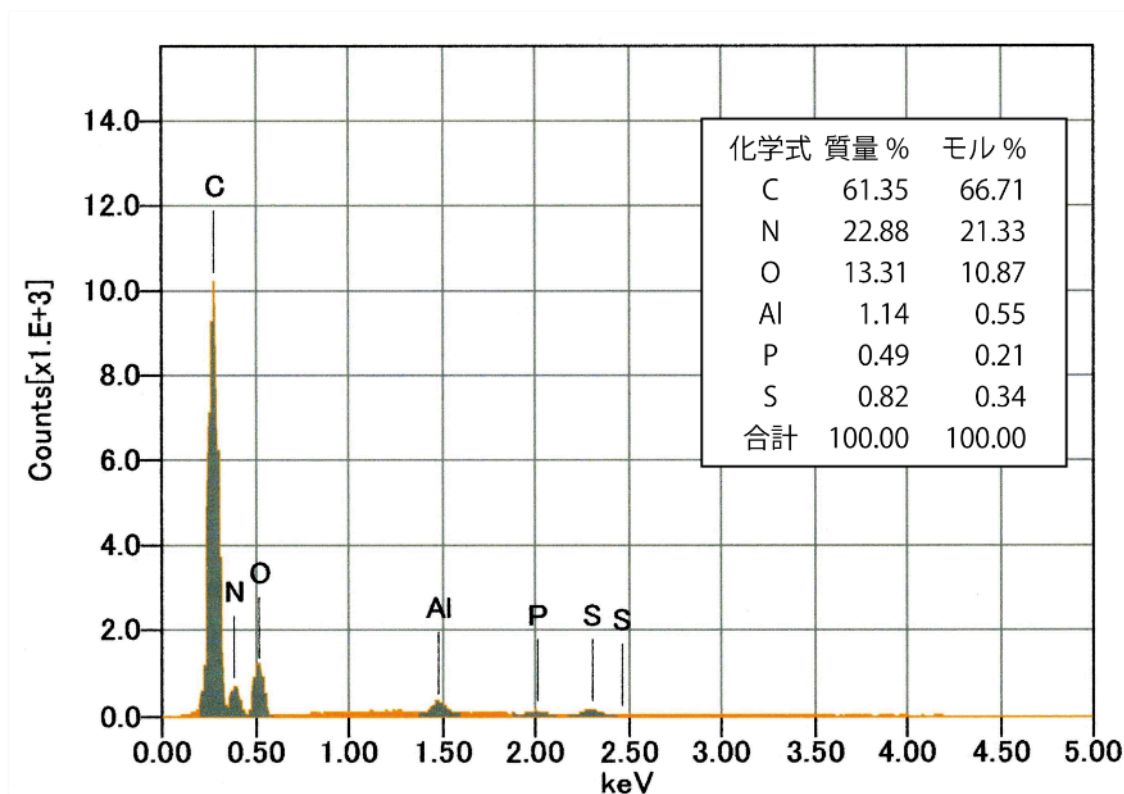


図 3.3. ApePCNA2 溶液試料の元素分析結果 陰イオン交換クロマトグラフィー後に結晶化した溶液試料の残差を限外ろ過法にて MilliQ 水に溶媒置換 (脱塩) し, 遠心エバポレーターで乾燥し試料とした。

3.3.3 考察

ゲルろ過を行わない試料 (限外ろ過法での緩衝液置換後) を用いた EDS の結果より、ApePCNA2 配列中の硫黄とリンのモル % を比較すると、一分子の ApePCNA2 に対し 5 原子のリンが対応する。これはゲルろ過での分子サイズである三量体または四量体に対し 15 mer~20 mer(10 bp) 程度の核酸が混入していたと考えられる。初期位相の探索は最終的に SAD 法を用いることで初期位相を決定した。結晶格子が比較的大きく非対称単位中の計算値 6 分子に比して実際の構造が 4 分子であり、2 分子分の体積が空間であるため、分子置換法で解が得られなかったと考えられる。ApePCNA2 は橋状の配置 (GCC 型) であるが、空間群 $C222_1$ における 2 回軸が橋の両端を結ぶように存在する。この回転対象により、対称を加味した結晶中での配置は背中合わせの 4 量体でもある。ゲル濾過上の概算分子量は 3 量体であるが、対称操作によって 4 量体リングが観察され

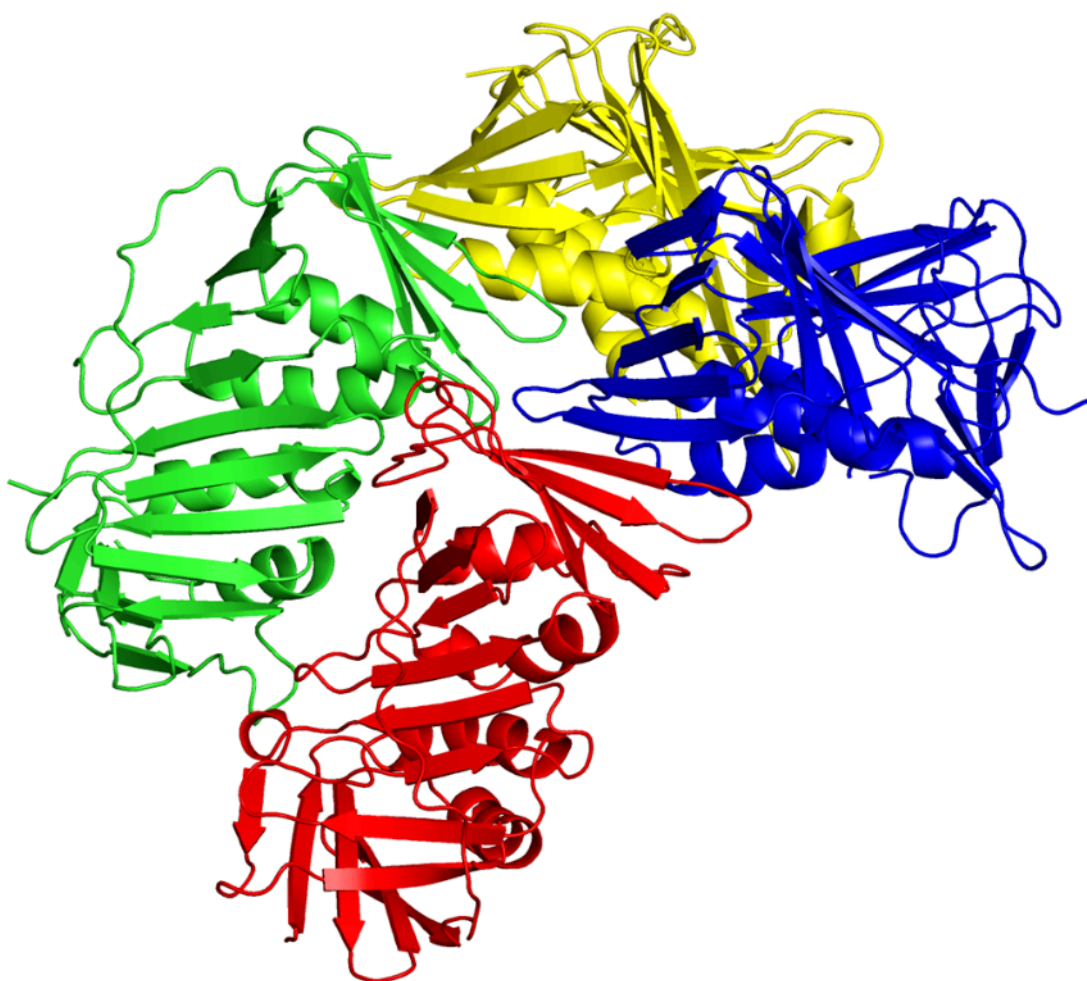


図 3.4. ApePCNA2 の結晶構造 非対称単位 (GCC) のリボン図

る (図 3.5).

近縁種の好熱性古細菌 StoPCNA2-3 複合体の結晶構造は 2 分子の StoPCNA2 および 2 分子の StoPCNA3 で構成されるヘテロ四量体リングであり, 溶液構造も同様であることが報告されている [23]. Ramachandran プロット上では 13 残基が Outlier であった. 該当のアミノ酸はいずれも分子外側に位置し, 隣接する分子間で相互作用していた. 特に Ser106 は全てのサブユニットで指摘されており, Arg107 が隣接分子側に伸びるような配置であった. 四量体リングの分子量はゲルろ過時の概算値と概ね一致しているが, 後述のとおり溶液中の構造はリングを形成しない (第 5 章参照). この結果は, 先行研究では DNA

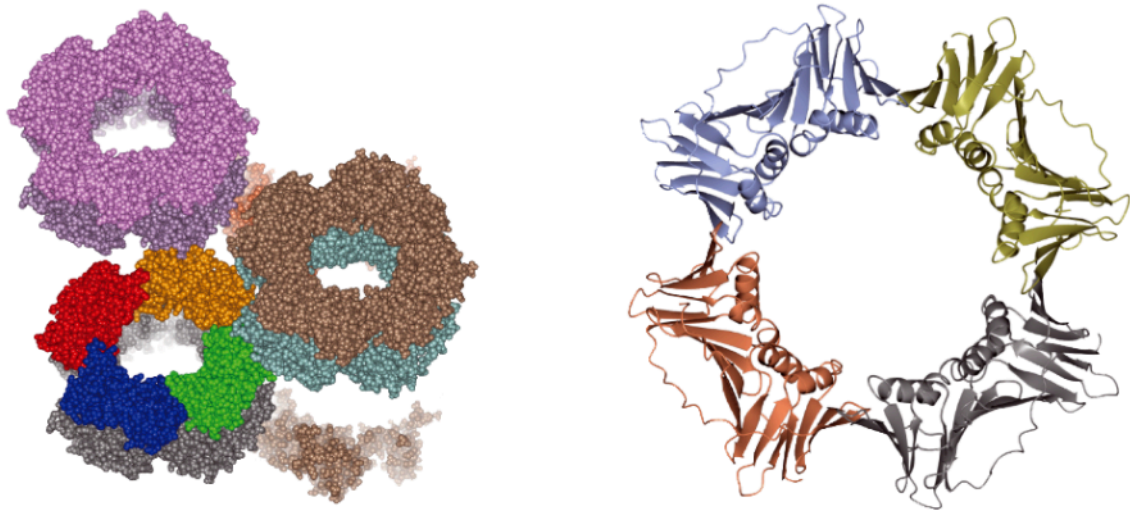


図 3.5. ApePCNA2 の対称 $C222_1$ 中のパッキング (左) および, 観察される四量体リング (右) はモノマーごとに着色している.

ポリメラーゼの伸長活性を増強しなかったことを支持している [17]. ただし、DNA 二本鎖に対する相互作用は本研究においては検討していないため、表面プラズモン共鳴 (SPR; Surface Plasmon Resonance) 法等で定量的に分析することにより、さらなる洞察が得られることが期待される.

第 4 章

好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原 3 の単独結晶構造決定

4.1 タンパク発現系の構築および高純度試料の調製

4.1.1 組み換えタンパク質のプラスミド調製

ApePCNA3 について, 大腸菌を用いた発現系を構築するためにプラスミドの調製を行った. *A. pernix* K1^T 由来の ApePCNA3 のコード領域 (APE_2182) を, NBRC 100138^T 株のゲノム DNA を鋳型とし, PCR 法を用いて増幅した. PCR 産物を制限酵素 *Nde*I, *Bam*HI で処理したのち, pET-11a ベクターにサブクローニングした.

4.1.2 タンパク質発現系および発現プロトコルの探索

pET-11a-APE2182 プラスミドを氷上, 25 μ F, 180 kV, 4 ms 設定のエレクトロポレーション法により Rosetta-gami(DE3) に導入した. 導入後細胞を SOC 培地で 310 K, 30 min 培養し, 34 mg/mL Chloramphenicol を添加したのち, Ampicillin 添加 LB 寒天培地で培養した. 各ターゲットに対し 3 つの単コロニーを選択し, Glycerol と等量混合しストックとした. ApePCNA3 組み換え大腸菌について, 50 mg/mL Ampicillin, 34 mg/mL Chloramphenicol を添加した LBL 培地 15 mL を用いて 310 K, 9 h の前培養を行った. 前培菌液 7.5 mL を, 50 mg/mL Ampicillin, 34 mg/mL Chloramphenicol を添加した LBL 培地 1 L を用いて 310 K, 12 h 培養した. A_{600} が 0.6 を超えた時点で 10% Lactose

40 mL を添加し、最終濃度 0.4% とし、APE_2182 遺伝子の発現を誘導した。310 K で培養を 4 h 継続した。

4.1.3 高純度試料の調製

得られた菌体を菌体質量の 2 倍量の 20 mM Tris-HCl pH8.0, 50 mM NaCl に再懸濁し、氷上にて超音波処理し破碎した。その後、80°C, 30 min 加熱し、8000 × *g*, 15 min 遠心分離し上清を得た。上清の体積を測定し、氷上にて 40% 飽和となるよう粉碎した Ammonium sulfate を添加し、4°C, 90 min 攪拌したのち、15000 × *g*, 15 min 遠心分離し上清を回収した。上清中の ApePCNA3 を沈殿として回収するために 40% 硫酸分画の上清の体積を再度測定し、氷上にて 65% 飽和となるよう粉碎した Ammonium sulfate を添加し、4°C, 90 min 攪拌したのち、15000 × *g*, 15 min 遠心分離し沈殿を回収した。得られた沈殿物を 20 mM Tris-HCl pH8.0 2 mL で溶解し、分子量カットオフ 10 kDa の透析チューブに封入し、1 L の 20 mM Tris-HCl pH8.0, 200 mM NaCl に対し、30 min, 1 h, オーバーナイトの計 3 回透析を行った。ÄKTA prime plus を用いて陰イオン交換カラム Q Sepharose 30 mL によるカラムクロマトグラフィーを行った。平衡化バッファーとして 20 mM Tris-HCl pH8.0, 200 mM NaCl, 溶出バッファーとして 20 mM Tris-HCl pH8.0, 1 M NaCl を用い、流速は 5.0 mL/min とした。平衡化バッファーで試料吸着後、溶出バッファーへ線形増加グラジエントを 0 → 70%/200 mL で設定し、フラクションサイズ 5.0 mL で分画を回収した。溶出フラクションを SDS-PAGE で確認し、ApePCNA3 を含むフラクションを回収し、限外ろ過フィルターを用いて 0.1 mL に濃縮した。濃縮した試料を HiLoad 16/600 Superdex 75pg を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。バッファーは 20 mM Tris-HCl pH8.0, 200 mM NaCl を使用した。V₀ 65 mL に対し、60 mL 時点でフラクション回収を開始し、190 mL(カラム容積 183 mL) まで回収を行った。溶出フラクションを SDS-PAGE で確認し、単一バンドのフラクションを回収した。限外ろ過でバッファー置換 (20 mM Tris-HCl pH8.0) と濃縮を行い、最終濃度を 10 mg/mL とした。

4.2 タンパク質の結晶化

4.2.1 方法

蛋白質の結晶化は VDX プレートを使用しハンギングドロップ蒸気拡散法にて行った. 初期条件スクリーニングはスクリーニングキット Wizard Classic 1, 2 および Index を使用した. スクリーニング溶液はリザーバー 700 μ L, ドロップサイズ 4 μ L (タンパク質液 2 μ L + リザーバー 2 μ L) とし, 20 °C で静置した. 初期条件スクリーニングで結晶が観察された条件について, pH, 塩濃度, 沈殿剤濃度を 100 mM Sodium acetate pH5.0, 1.8 M~2.4 M Sodium chloride, リザーバー量 1 mL に最適化した. 結晶が観察され, 条件最適化を試みた条件を表 4.1 に示す.

表 4.1. ApePCNA3 の結晶化条件

条件	リザーバー溶液	参照
#1	100 mM Sodium acetate pH5.0 1.8 M~2.4 M Sodium chloride	Index, #8
#2	100 mM Sodium/potassium phosphate pH6.2 50 mM~200 mM Sodium phosphate 0%~15% PEG8000	Wizard Classic 2, #8
#3	100 mM Imidazole/HCl pH8.0 100 mM~600 mM Sodium phosphate monobasic 1900 mM~1400 mM Potassium phosphate dibasic 100 mM~250 mM Sodium chloride	Wizard Classic 1, #20

4.2.2 結果

ApePCNA3 は ApePCNA2 同様, LBL 培地で発現した. ApePCNA3 の精製にあたり, 陰イオン交換カラムでの精製ではグラジエント領域において A280 が急激かつ持続的に上昇する異常な挙動を示した. ゲルろ過上での概算分子量はおおよそ 30 kDa であり, ApePCNA3 の単量体分子量とおおよそ一致した (図 4.1).

ApePCNA3 の結晶は, 結晶化直後に沈殿が発生した後に 2 日程度で発生した. 得られた結晶は 0.1 mm 程度の正四面体に近い形状であったが, まれに 0.3 mm ほどの板状の巨大な結晶がみられる例もあった (図 4.2).

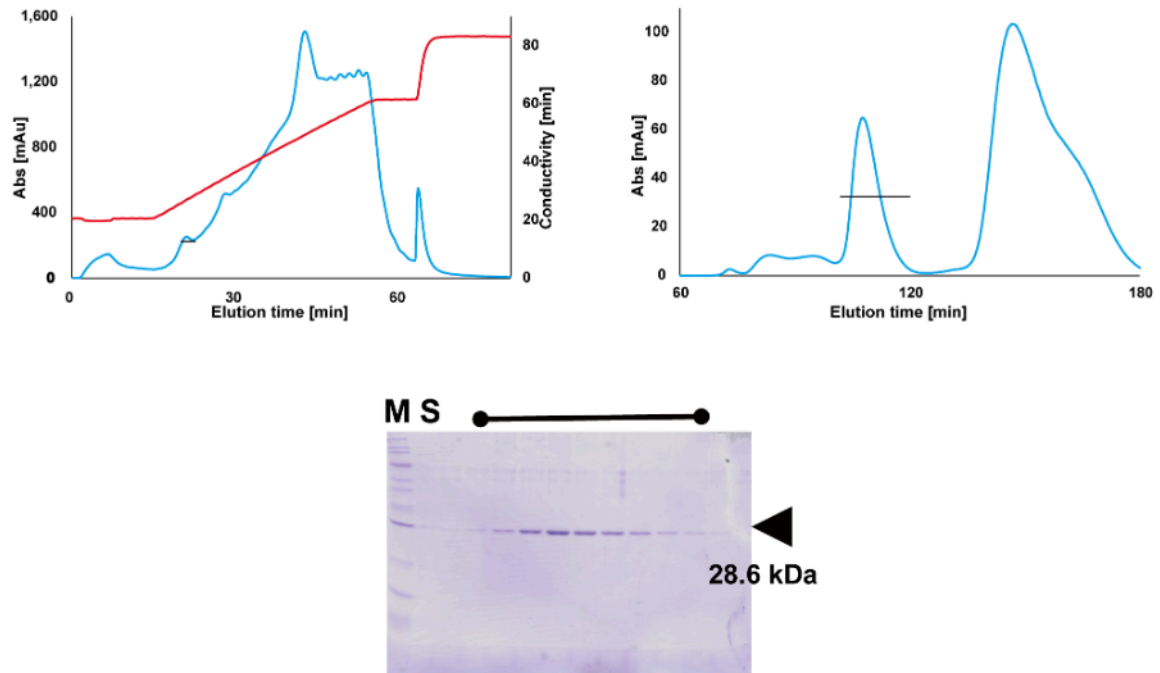


図 4.1. ApePCNA3 の精製結果 陰イオン交換カラムの結果 (上段左) ゲルろ過結果 (上段右) および最終精製後の SDS-PAGE (下段)

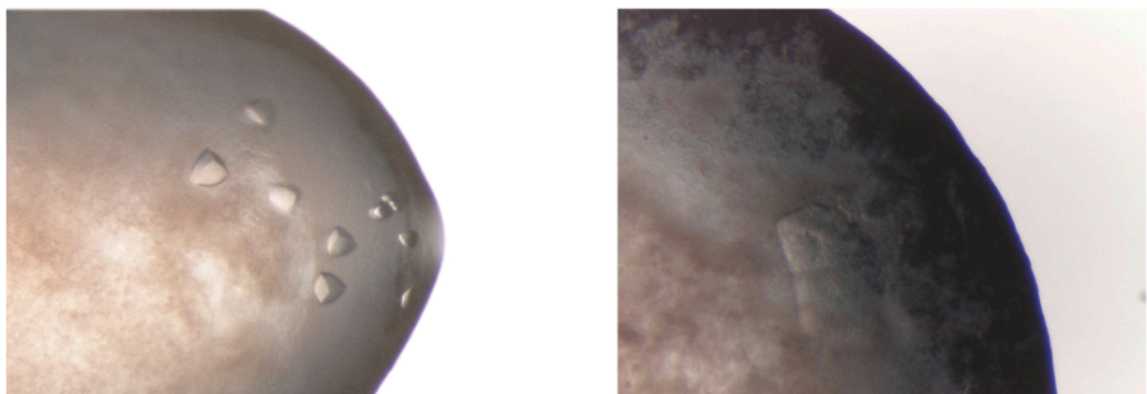


図 4.2. ApePCNA1 の結晶写真 結晶化条件は表 4.2, #1 結晶は約 0.1mm (左), まれに約 0.3mm (右) の板状結晶が観察された.

4.2.3 考察

陰イオン交換カラムでの各フラクションの紫外スペクトルを測定するとほとんどの領域で 260 nm にピークが存在し、アプライした試料のほとんどが核酸であると考えられる. ApePCNA2 同様に, ゲルろ過クロマトグラフィー単一ピークとなり, 紫外スペクトルのピークも 280 nm となったことから, 核酸は除去さ

れたと考えられる。ゲルろ過で 140 min~180 min に見られたピークの紫外領域の吸光スペクトルは 260 nm に最大吸収が見られたため、低分子量の核酸であると考えられる。また、ゲルろ過での分子量計算値は ApePCNA3 が溶液中で単量体であることを示唆している。最適化を試みた結晶化条件の多くで、初期に沈殿が発生しその後結晶が発生している。硫酸分画の析出濃度は 40%~65% 飽和であり、発現量が少ないことを加味しても、三種類の ApePCNAs の中では塩強度への耐性が最も高いと考えられる。そのため結晶化には 1.5 M を超える高濃度の塩を要したと考えられる。

4.3 X 線回折実験および構造決定

4.3.1 方法

得られた ApePCNA3 結晶を用いて、KEK-PF にて X 線回折実験を行った。結晶化実験のドロップよりクライオループを使用し結晶を回収した。実験温度下で凍結による結晶への亀裂を防止するために、抗凍結剤として Glycerol : リザーバー (1 : 9) 混液に結晶を浸漬し、周囲のリザーバーを置換した。回折実験は PF-AR NW12A, および PF BL-5A で行った。回折装置への移乗は手作業で行った。測定データは PReMo 上で簡易的に処理された。測定データの統計値により、回折像の質を比較した。選定した測定データを XDSGUI で処理 (標識, 積分処理, スケーリング, 統合) し, $I/\sigma > 2.0$ となるよう 2.0 Å 分解能でカットオフした。位相決定は, ApePCNA2 同様に Pt 錯体による SAD 法を用いた。Pt 錯体は Heavy Atom Screen の製品を使用した。ApePCNA2 で使用後に凍結保存していた試薬溶液を, 用時解凍して用いた。試薬溶液をクライオループで添加し室温で静置した (5 min~2 h, および overnight)。回収した結晶は同様に抗凍結処理し, 同時にリザーバー中の Pt を除去した。結晶中の Pt を確認するために, MCA を用いて蛍光を確認した。続いて XAFS を解析し, スペクトルを参照し回折測定の波長を決定した。MAD 法での解析を考慮し, peak, edge, high remote, low remote, 1.00 Å の 5 波長で 0.1° 間隔で 0°~360° のデータを測定した。位相決定の測定データとして PReMo システムの FastXDS で処理された反射データを用いた。一度 AIMLESS でスケーリングし, $I/\sigma > 2.0$ で提案された 2.00 Å でカットオフを設定し, 再度 AIMLESS でスケーリングした。反射データと APE_2182 のアミノ酸配列をもとに, Phaser SAD pipeline で初

期位の探索を行った. ARP/wARP Classic を用いてモデル構築を行った. 位相決定された ApePCNA3 結晶構造をモデルに, 高分解能の回折データを用いて分子置換法で位相を解決し, この構造より Coot を用いて各所の修正を行い, REFMAC5 を用いて精密化および電子密度の計算を行った. 位相決定, モデル構築, 構造精密化は CCP4i パッケージを使用した. 回折データの収集および構造精密化の統計値を表 4.2 に示す.

表 4.2. ApePCNA3 の構造精密化の結果

ApePCNA3	
Beam Line	PF-AR NEW12A
Space group	$P2_13$
Unitcell parameters	
a, b, c (Å)	170.45, 170.45, 170.45
Resolution range (Å)	49.3–1.9
Wavelength (Å)	1.00
Unique reflections	126 326
Completeness	99.89%
Overall $I/\sigma(I)$	15.9
Multiplicity	20.3
R_{merge}	0.144
Resolution range (Å)	49.3–1.9
R_{workt}	0.182
R_{free}	0.206
r.m.s.d. bond length (Å)	0.013
r.m.s.d. bond angles (°)	1.78
Average B -factors	30.1
Ramachandran plot	
Most favored regions	97.9%
Allowed regions	1.8%
Outliers regions	0.3%

4.3.2 結果

ApePCNA3 の結晶は K_2PtCl_6 の添加に安定であり, SAD 法で最大 2.0 Å 分解能での構造決定に至った. 結晶構造は非対称単位中に 4 分子を含み, そのうち 3 分子は三量体リングを形成していた (図 4.3). 空間群 $P2_13$ は 3 回対称の軸を含み, 非対称単位で三量体リングの属さない分子も結晶格子内で対称による三量

体リングを形成していた。それぞれの単量体の全体構造は ApePCNA1 の結晶構造に類似しており、構造アラインメントでの $C\alpha$ 原子間の r.m.s.d. の平均値は 1.093 \AA であった。リング内の隣接分子間での水素結合による β シート形成のほか、隣接分子間 (B 鎖および D 鎖) の接触部に C 末端と IDCL 付近の相互作用があった (図 4.4)。

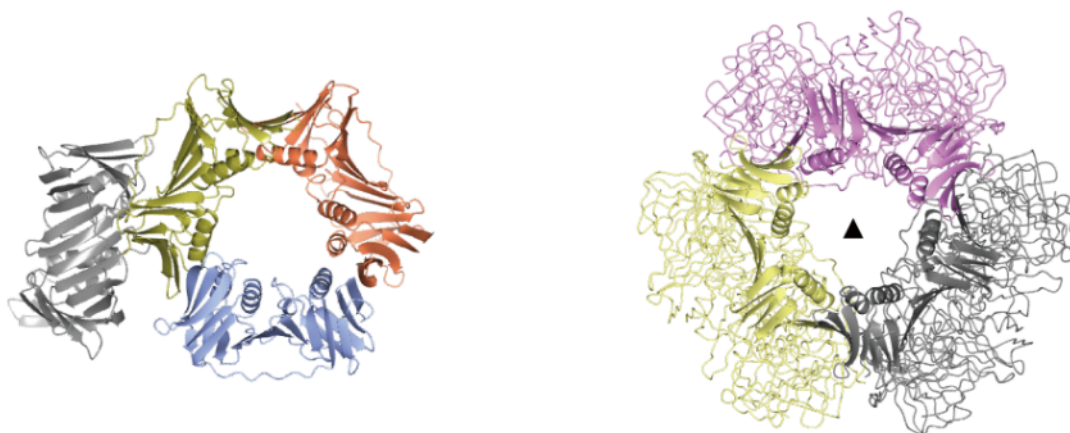


図 4.3. ApePCNA3 の結晶構造 モノマーごとに着色した非対称単位のリボン図 (左) および、対称操作による三量体リング (右) . 非対称単位でモノマーであった分子は二次構造を表示, リングを形成していた分子は二次構造を省略している. 3 回軸 (▲) 方向から描画しており, 非対称単位ごとに着色している.

4.3.3 考察

隣接分子間で観察された相互作用は 3 回対称で電子密度も鮮明である, それぞれの C 末端部の Leu249 は隣接分子の疎水ポケットに相互作用している. この相互作用部位は ApePCNA1 と一致するため, ApePCNA1 と同様に PIP-Box 相互作用と同じものと考えられる.

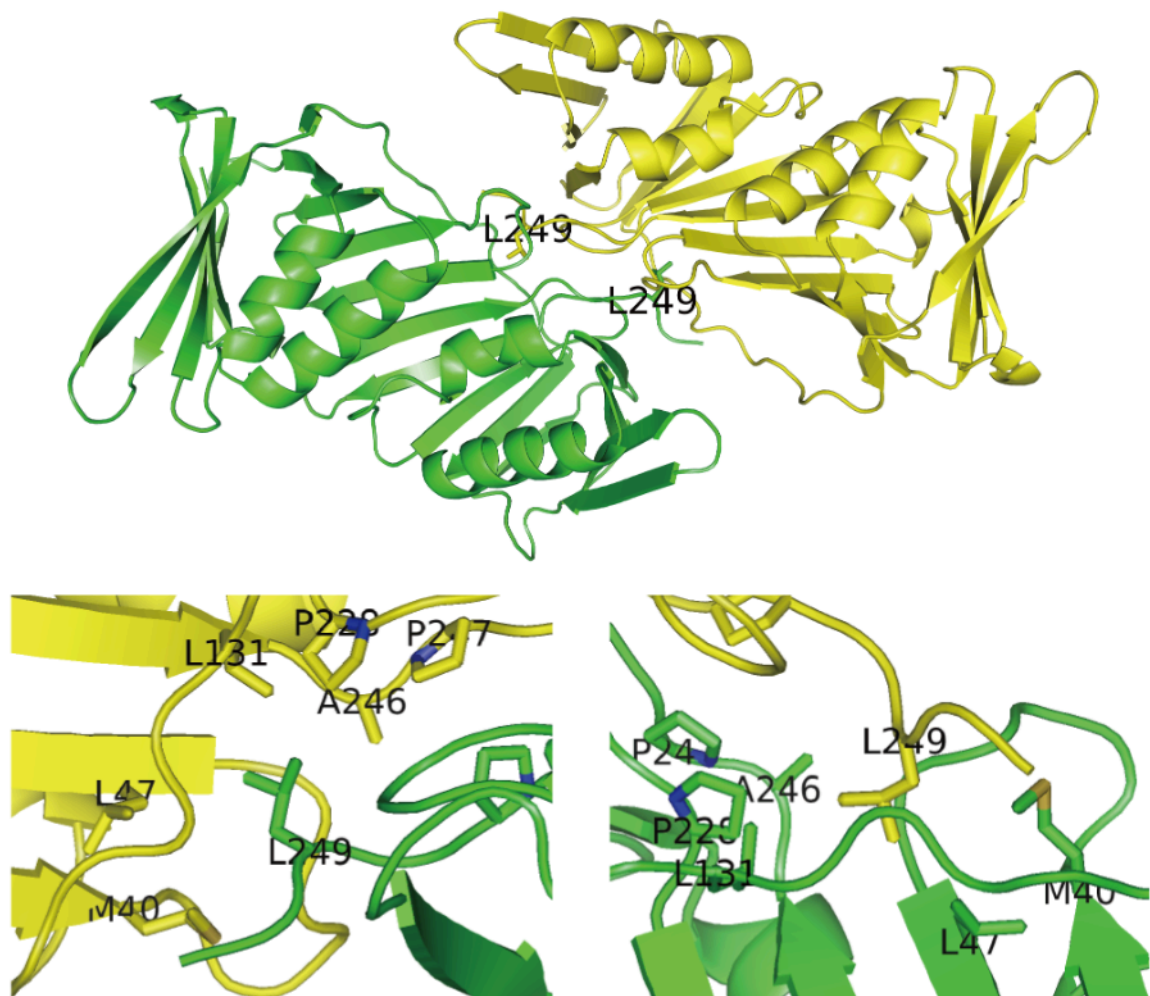


図 4.4. ApePCNA3 のリング-リング間相互作用 接触するそれぞれの分子を黄色および緑で着色している. 分子全体 (上段) および, 各末端部の拡大図 (下段).

第 5 章

好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原 2 の溶液構造

5.1 方法

ApePCNA2 の溶液中の構造を SEC-SAXS により決定した。タンパク質試料の調製は第 3 章と同様の手順で行った。緩衝液は 20 mM Tris HCl, 200 mM NaCl pH 8.0, 最終タンパク質濃度は 1.5 mg/mL とした。予備実験として KEK-PF にて Size exclusion chromatography coupled multi angle light scattering (SEC-MALS) を行い、分子量の推定および分散状態の確認を行った。ゲルろ過カラムは Superdex 200 increase 10/300 (Cytiva 社製) を使用し、試料溶液 40 μ L をアプライした。SEC-SAXS は PF BL-10C で Sangler[40] および Serial analyzer[41] を用いて行った (表 5.1)。クロマトグラフィー装置はビームライン搭載の Acquity HPLC (Waters 社製) を使用した。ゲルろ過カラムは Superdex 200 increase 10/300 を使用し、試料溶液 80 μ L をアプライした。散乱強度を円周平均化し、Guinier プロット、Kratky プロット、距離分布関数 $P(r)$ および粒子重量を計算した。DAMMIF を用いて *ab initio* 解析を行い、Dummy atom model を計算した。CRY SOL を用いて実験データの散乱曲線とモデル複合体によって計算される散乱曲線の比較を行った。CORAL を用いて、GCC 型配置を初期構造として構造配置解析を行い、溶液構造を決定した。これらの散乱データの解析には ATSAS[42] パッケージを用いた。内包分子として想定される核酸を除外するために、20 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 40%~80% Sucrose を用いて核酸およびタンパク質の電子密度をマスキングし

た状態での Bio-SAXS 測定を行った. Sucrose 濃度は 40%, 60%, 80% とし, タンパク質試料 200 μ L を透くん TOR-14K(日本ジェネティクス社製) を用いて各濃度の緩衝液に対してオーバーナイトの透析を行い, 透析外液を用いて液量を 200 μ L とした. 測定時に, それぞれの試料単体および, 等量混合試料を調製し 40%, 50%, 60%, 70%, 80% Sucrose 試料とし, 小角散乱を測定した [9].

表 5.1. ApePCNA2 の SEC-SAXS 測定条件

カメラ長	2 m
波長	1 Å
測定時試料温度	20 °C
測定タイプ	SEC-SAXS/UV 同時測定
SAXS 検出器	PILATUS3 2M (Dectris)
SAXS 露光時間	20 sec
SAXS 露光間隔	20.01 sec
SAXS 測定枚数	363
紫外可視ファイバマルチチャンネル分光器	QE65pro (Ocean Optics)
UV 光源	L10290 (浜松ホトニクス)
UV 計測時間	1 sec
UV 計測間隔	10 sec
UV 計測回数	727
試料セル材質	ステンレス製
X 線光路長	1 mm
分光光路長	2 mm
窓剤	研磨合成石英ガラス (厚み 0.02 mm)
SEC-SAXS 用 HPLC	Acquity HPLC (Waters)
ゲル濾過カラム	Superdex 200 increase 10/300 (Cytiva)
インジェクション量	80 μ L
初期溶出速度	0.1 mL/min
SAXS 露光時溶出速度	0.01 mL/min (11 min later)

5.2 結果

SEC-MALS での分子量計算値は 128 kDa であり, ピーク濃度においても単分散であることが確認された (図 5.1).

Kratky プロットでは, ピークと広角域での上昇傾向が確認され, 距離分布関数による分子量計算値は 120 kDa~150 kDa であった (図 5.2). 最大距離 (D_{\max})

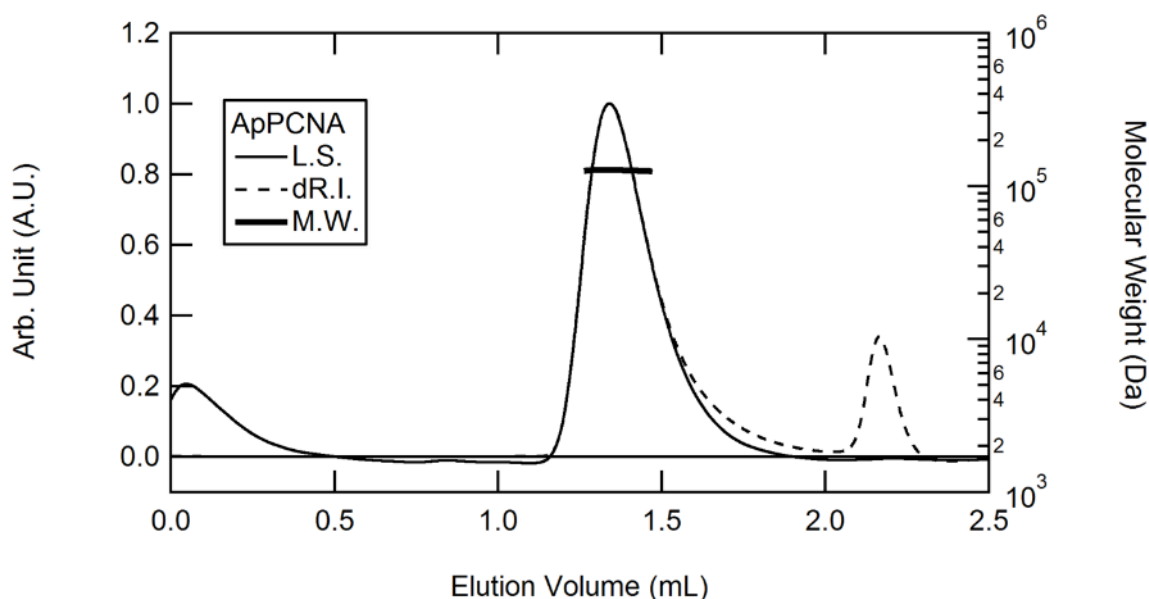


図 5.1. ApePCNA2 の SEC-MALS の結果

は 99.97 \AA であった. Porod 体積を用いた分子量計算値は 177 kDa であった. DAMMIF によって得られた Dummy atom model は顆粒状であり, リング状構造による空間は存在しなかった (図 5.3). CRY SOL での散乱曲線計算値との突合は, GCC 型, 四量体リングともに $Q = 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ 付近で一致しなかった (図 5.4). CORAL を用いた分子配置解析では, GCC 型四量体でフィッティングした場合 $Q = 0.20 \text{ \AA}^{-1}$ 付近の領域で散乱曲線が一致せず, Dummy atom model との間で空隙がみられた (図 5.5).

五量体を初期位置としてフィッティングを行うことで, 散乱曲線計算値が測定データと一致した (図 5.6). 各濃度の Sucrose 緩衝液での測定では, 散乱曲線 (Log Prot) に著明な変化はなく, 80% Sucrose 試料では散乱曲線のコントラストが消失した (図 5.7).

5.3 考察

分子量計算値において, SEC-MALS では 128 kDa , 距離分布関数上では $120 \text{ kDa} \sim 150 \text{ kDa}$, Porod 体積上では 177 kDa と計算値に幅がある. これらの分子量は分子量 28.4 kDa に対し, 四量体から六量体に相当する. 一方, 散乱データは単分散である. Kratky プロットは Partial Unfold のパターンであり, 溶液中で可動性があることを示唆する. この可動性により, それぞれの分子量に差異

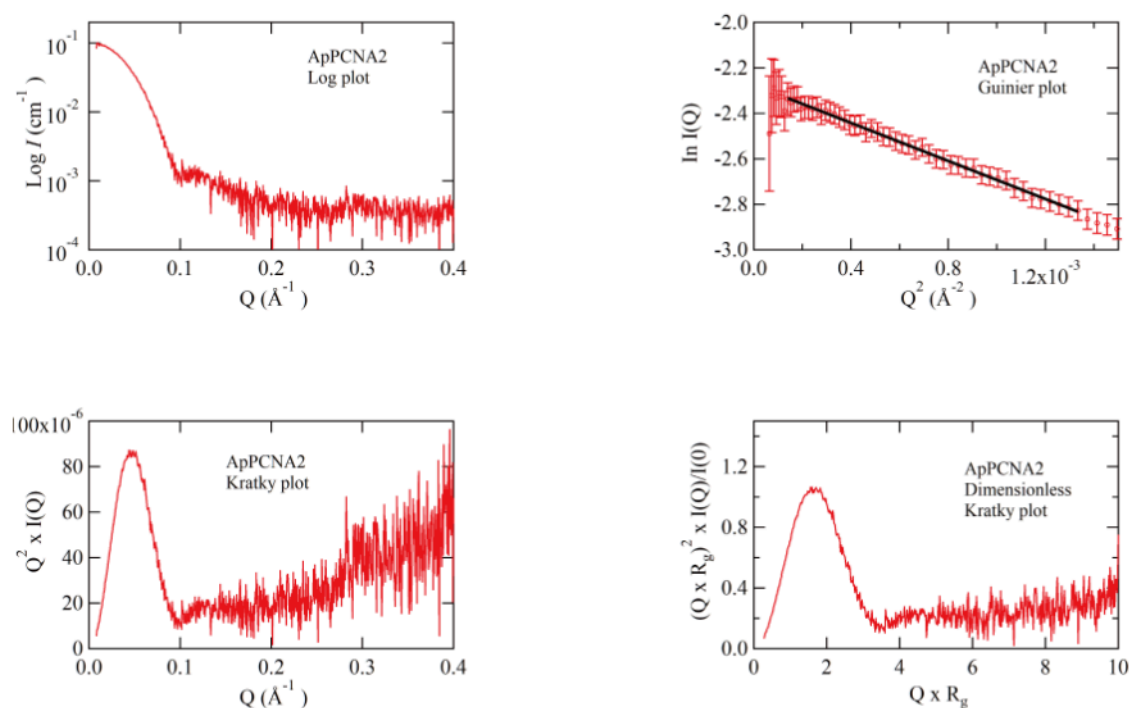


図 5.2. ApePCNA2 の散乱曲線 基本散乱曲線 (左上), Guinier プロット (右上), Kratky プロット (左下), および無次元 Kratky プロット (右下).

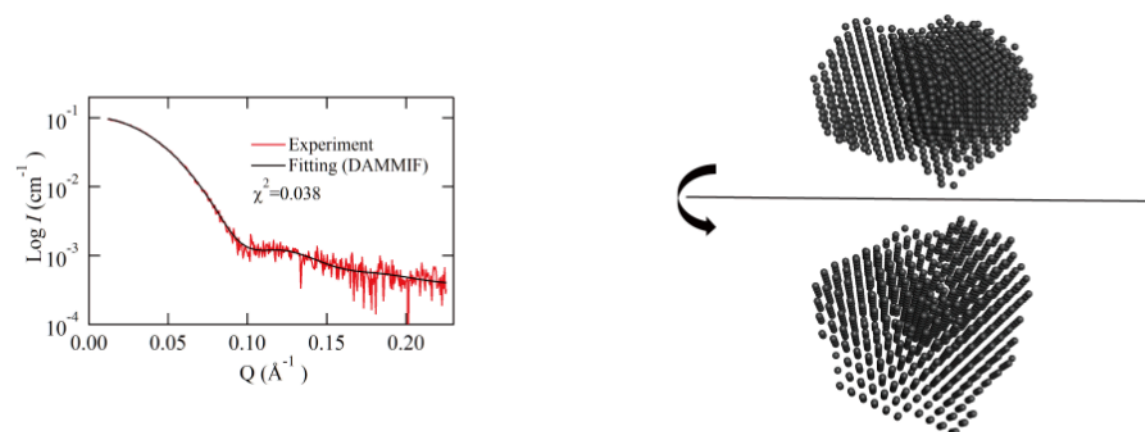


図 5.3. ApePCNA2 の Dummy atom model 散乱曲線とのフィッティング (左), およびビーズモデル (右).

が出たと考えられる。

分子配置解析では、四量体に比較して五量体が確からしい構造である。九州大の先行研究においても、ApePCNA2 ホモ複合体は機能面での活性を持っておらず、DNA 複製とは異なる機能を持つ可能性が提案されている [17]。しかしながら、生化学的なプロファイル上では DNA 関連反応に重要であるが、具体的

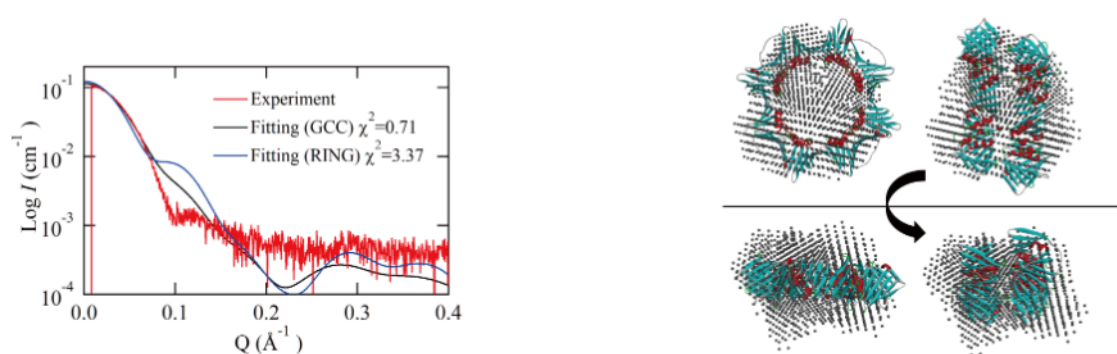


図 5.4. ApePCNA2 の結晶構造フィッティング 散乱曲線の比較 (左), 四量体リング構造とのフィッティング, および GCC とのフィッティング (右).

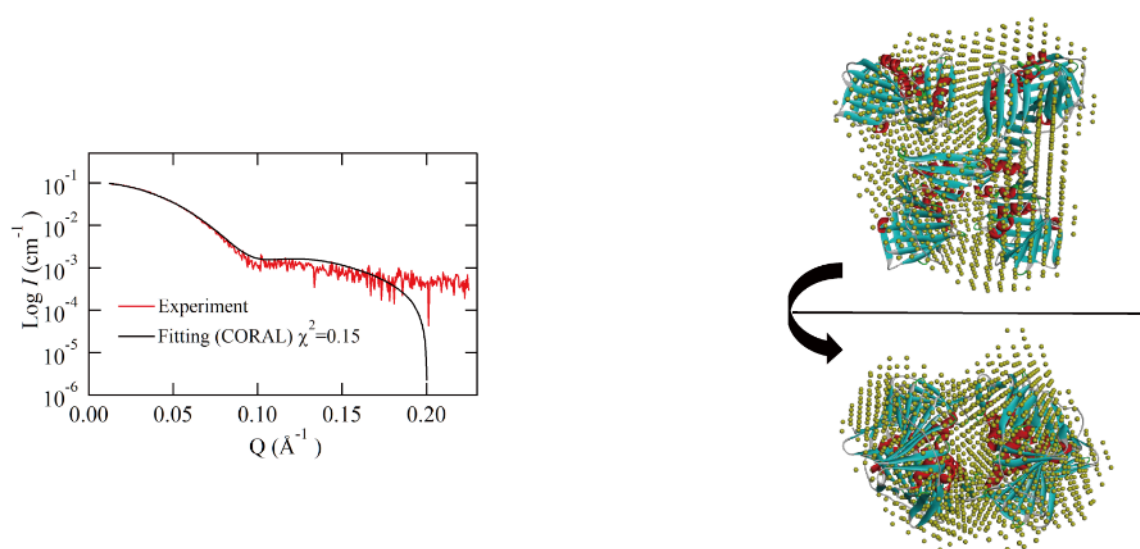


図 5.5. ApePCNA2 の四量体分子配置解析結果 基本散乱曲線とのフィッティング (左), および溶液構造 (右).

な機能の詳細は不明とされている。本研究で得られた溶液構造は、先行研究における機能的特徴を支持しており、DNA ポリメラーゼの伸長活性に寄与する可能性は低いことが示唆される。Sucrose 解析でもタンパク質と等しい電子密度とされる 80% Sucrose でマスクし散乱が消失した結果より、内包分子としても核酸は含まれていないことが示唆される。この結果は ApePCNA2 が高純度の試料であることの裏付けとなったが、この試料に核酸を添加し単独溶液構造を解析することで、機能面での特徴づけの一助となる可能性がある。複合体分子量は五量体で 125 kDa であり、サイズとしてはヒストンと同程度である。A. pernix はゲノム上にヒストンを持たないが、代替として DNA 結合タンパク質

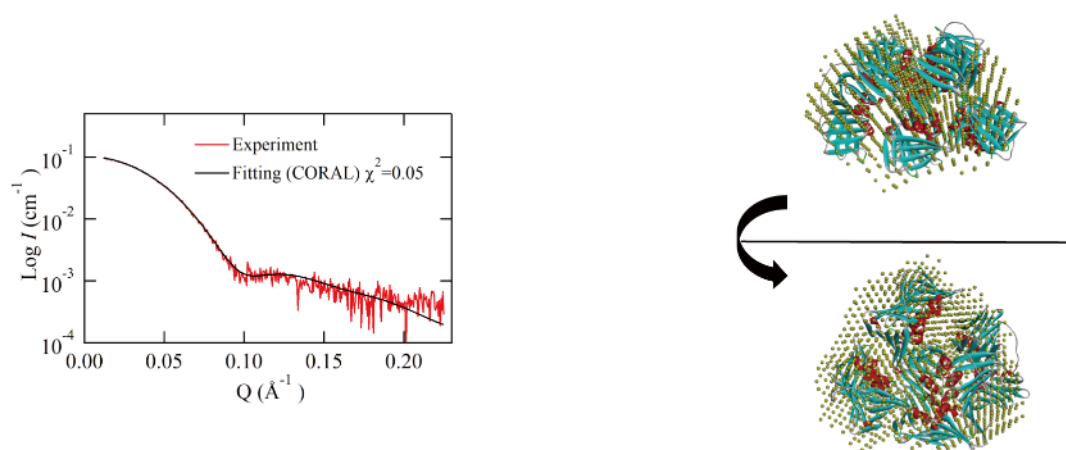


図 5.6. ApePCNA2 の五量体分子配置解析結果 基本散乱曲線とのフィッティング (左), および溶液構造 (右).

である Alba (Acetylation lowers binding affinity) タンパク質ファミリーに該当する ApeAlba1, および ApeAlba2 が機能すること提案されているが, それ以外のタンパク質の関与を否定する報告はない. ApePCNA2 ホモ五量体が原初のヒストンとして機能する可能性については長鎖 DNA との複合体化によって検証が可能となるだろう.

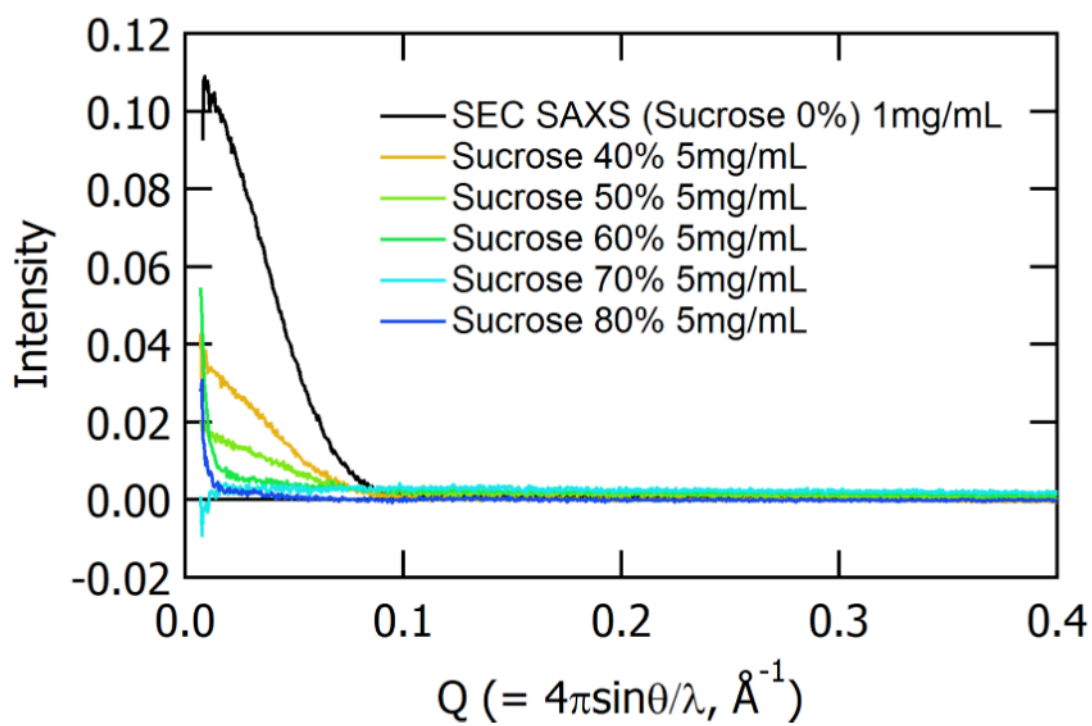


図 5.7. ApePCNA2 の Sucrose 解析の結果

第 6 章

好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原 1-2-3 複合体の溶液構造

6.1 方法

ApePCNA1, ApePCNA2, および ApePCNA3 による三者複合体 (ApePCNA1-2-3) の溶液中の構造を SEC-SAXS により決定した. タンパク質試料の調製は第 2~4 章と同様の手順で行った. 緩衝液は 20 mM Tris HCl, 200 mM NaCl pH 8.0, 最終タンパク質濃度は 7 mg/mL とした. 予備実験として KEK-PF にて SEC-MALS を行い, 分子量の推定および分散状態の確認を行った. ゲルろ過カラムは Superdex 200 increase 10/300 を使用し, 試料溶液 30 μ L をアプライした. SEC-SAXS は PF BL-10C で Sangler および Serial analyzer を用いて行った (表 6.1). クロマトグラフィー装置はビームライン搭載の Acquity HPLC を使用した. ゲルろ過カラムは Superdex 200 increase 10/300 を使用し, 試料溶液 150 μ L をアプライした. 散乱強度を円周平均化し, Guinier プロット, Kratky プロット, 距離分布関数 $P(r)$ および粒子重量を計算した. DENSS を用いた *ab initio* 解析および, CORAL を用いて ApePCNA1, ApePCNA2, ApePCNA3 をそれぞれ 1 分子で組み合わせた三量体モデルを初期構造として構造配置解析を行い, 溶液構造を決定した. これらの散乱データの解析には ATSAS パッケージを用いた.

表 6.1. ApePCNA1-2-3 の SEC-SAXS 測定条件

カメラ長	2 m
波長	1 Å
測定時試料温度	20 °C
測定タイプ	SEC-SAXS/UV 同時測定
SAXS 検出器	PILATUS3 2M (Dectris)
SAXS 露光時間	20 sec
SAXS 露光間隔	20.01 sec
SAXS 測定枚数	596
紫外可視ファイバマルチチャンネル分光器	QE65pro (Ocean Optics)
UV 光源	L10290 (浜松ホトニクス)
UV 計測時間	1 sec
UV 計測間隔	10 sec
UV 計測回数	1192
試料セル材質	ステンレス製
X 線光路長	1 mm
分光光路長	1.414 213 56 mm
窓剤	研磨合成石英ガラス (厚み 0.02 mm)
SEC-SAXS 用 HPLC	Acquity HPLC (Waters)
ゲル濾過カラム	Superdex 200 increase 10/300 (Cytiva)
インジェクション量	150 µL
初期溶出速度	0.5 mL/min
SAXS 露光時溶出速度	0.05 mL/min (22.5 min later)

6.2 結果

予備実験の SEC-MALS では, 135 kDa, 79.7 kDa, 57.6 kDa, 26.8 kDa にピークが確認された (図 6.1). それぞれ四量体, 三量体, 二量体, 単量体と分子量が一致しており, 最も高いピークは三量体, 次いで単量体であった.

SEC-SAXS では濃度依存的な変化はほとんど見られず, 単分散の散乱が測定された. Kratky プロットは 2 つのピークが確認されたが, 広角での上昇傾向はみられなかった (図 6.2).

距離分布関数での分子量計算値は約 90 kDa であり, 三量体の理論値と一致した. D_{\max} は 100 Å であり, Porod 体積での分子量計算値は 78.8 kDa であった. 得られた溶液構造はブリテン島に類似した外観であり, 大小二つのドメイ

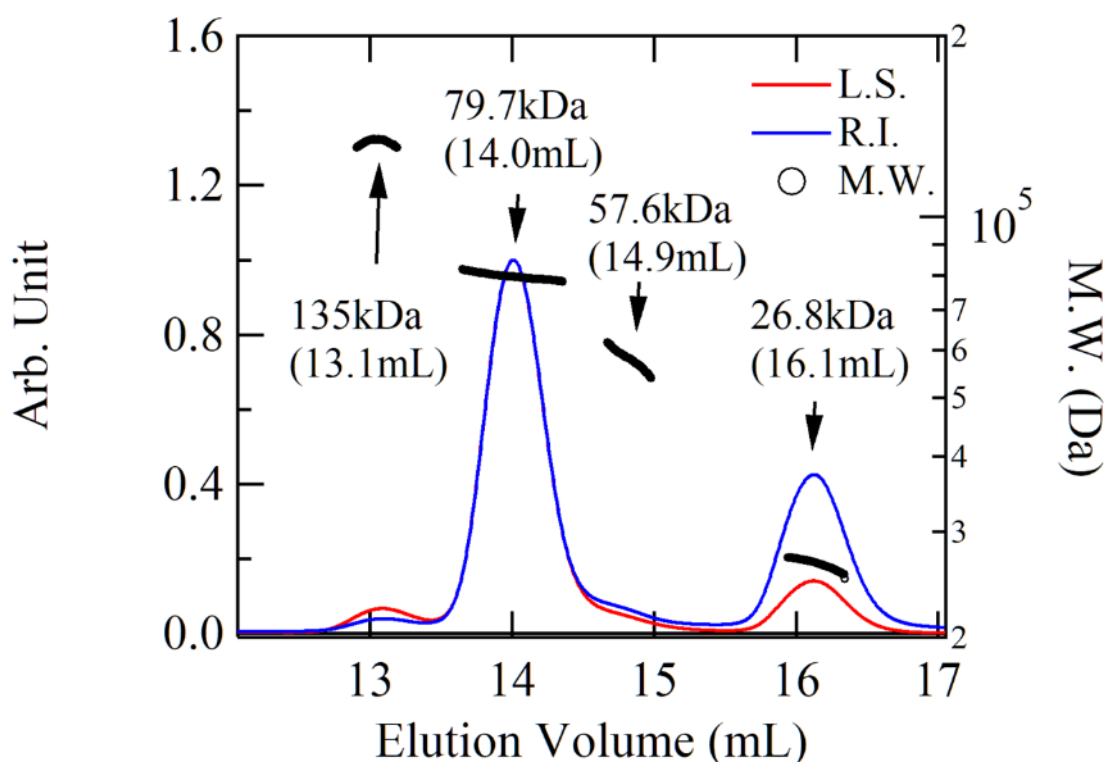


図 6.1. ApePCNA1-2-3 混合試料の SEC-MALS の結果

ンが観察された (図 6.3). 二つのドメインの間には空間となる領域が存在した. CORAL で計算されたフィッティングモデルはリングに近い配置であったが, 完全なリングは形成しなかった.

6.3 考察

SEC-MALS で観察された 4 つのピークのうち, 最も分子量の大きい 135 kDa のピークは ApePCNA2 単独の複合体であると考えられる. 同様に, 57.6 kDa は二量体の分子量と一致するが, 分子量は他のピークに比較して幅広い. 先行研究で示されたゲルろ過解析の結果では, 二量体を形成する組み合わせは ApePCNA1-2 のみであると結論付けられているが [17], 本研究の SEC-MALS で R_g に幅があったことから複合体はある程度の可動性があると考えられる. 26.8 kDa のピークにも, 分子量の幅があるが, ApePCNA1 (29.4 kDa) と ApePCNA3 (28.6 kDa) の単量体が同時に溶出していることに起因すると考えられる. Kratky Plot 上で二つのピークが確認されたことから, 複合体は複数ドメインによって構成されていることが推察され, 広角域の収束はコンパクトにフォー

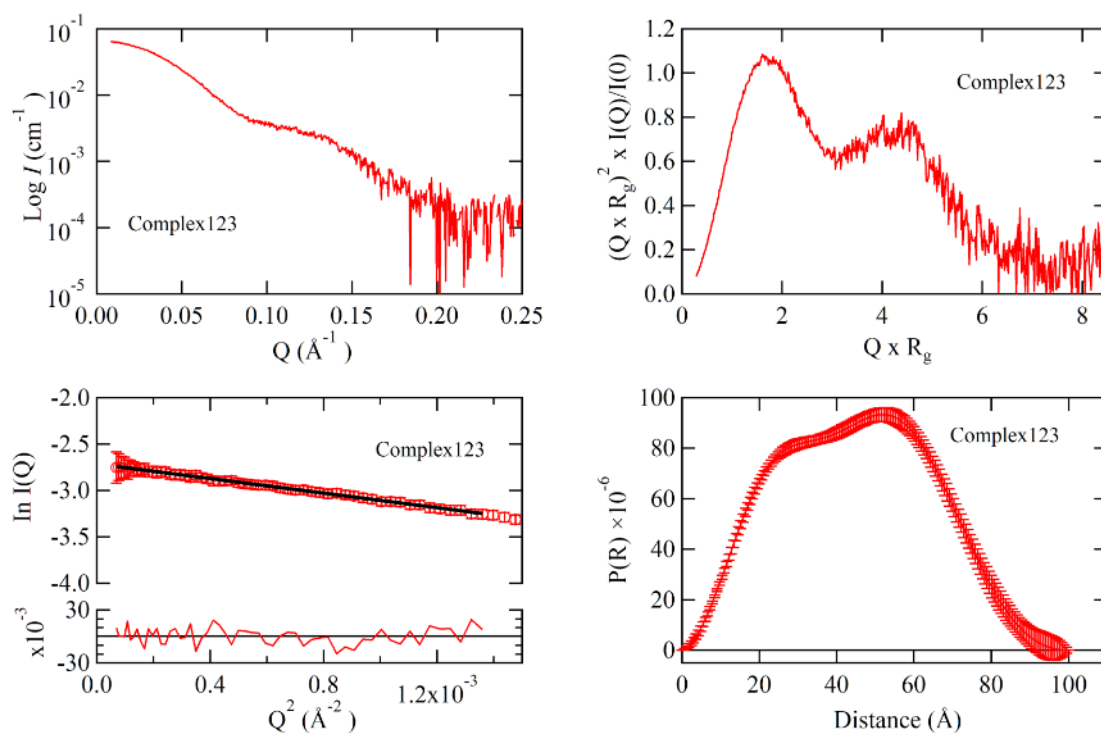


図 6.2. ApePCNA1-2-3 複合体の散乱曲線 基本散乱 (左上), Kratky プロット (右上), Guinier プロット (左下), および距離分布関数 (右下)

ルディングされていることを示している。溶液構造は完全リング状ではなかったが、空間領域が確認されたためスライディングクランプの厚みと同じ長さ (10 bp 程度) の二本鎖 DNA を添加することにより、リングが形成される可能性がある。また、SEC-SAXS の測定条件 (特に測定温度) が溶液中の複合体形成自体に影響するかも考慮することで、複合体構造により明確な解をもたらすと期待できる。

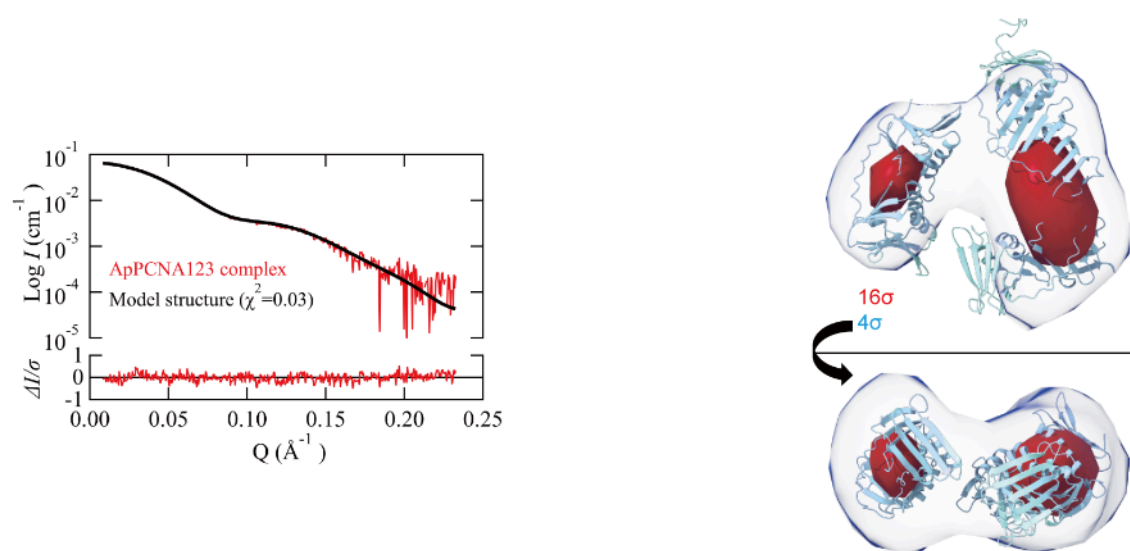


図 6.3. ApePCNA1-2-3 複合体の分子配置分析の結果 散乱曲線フィッティング (左) , および溶液構造 (右)

第 7 章

好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原 2-3 複合体の溶液構造

7.1 方法

先行研究で DNA ポリメラーゼの伸長活性を増強したもう一つの複合体の組み合わせとして, ApePCNA2-3 の溶液中の構造を SEC-SAXS により決定した. タンパク質試料の調製は第 3~4 章と同様の手順で行った. 精製後, ApePCNA2 と ApePCNA3 を等量混合し混合試料とし限外ろ過法で 0.1 mL 程度に濃縮した. 20 mM Tris HCl, 200 mM NaCl pH8.0 で平衡化した Superdex 200pg(Cytiva 社製)(カラムサイズ $\phi 2.6\text{ cm} \times 60\text{ cm}$) を用いてゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行った. 274 mL 溶出 (116 kDa) ピークを限外ろ過にて濃縮し, 最終タンパク質濃度を 6 mg/mL とした. 予備実験として KEK-PF にて SEC-MALS を行い, 分子量の推定および分散状態の確認を行った. ゲルろ過カラムは Superdex 200 increase 10/300 を使用し, 試料溶液 30 μL をアプライした. SEC-SAXS は PF BL-10C で Sangler および Serial analyzer を用いて行った (表 7.1). クロマトグラフィー装置はビームライン搭載の Prominence-I(SHIMADZU 社製) を使用した. ゲルろ過カラムは Superdex 200 increase 10/300 を使用し, 試料溶液 180 μL をアプライした. 散乱強度を円周平均化し, Guinier プロット, Kratky プロット, 距離分布関数 $P(r)$ および粒子重量を計算した. DENSS および DA MM IF を用いて *ab initio* 解析を行った後, CORAL を用いて ApePCNA2, ApePCNA3 をそれぞれ 2 分子ずつ組み合わせた四量体モデルを初期構造として構造配置解析を行い, 溶液構造を決定した. これらの散

乱データの解析には ATSAS パッケージを用いた。

表 7.1. ApePCNA2-3 の SEC-SAXS 測定条件

カメラ長	2060 mm
波長	1 Å
測定時試料温度	20 °C
測定タイプ	SEC-SAXS/UV 同時測定
SAXS 検出器	PILATUS3 2M (Dectris)
SAXS 露光時間	20 sec
SAXS 露光間隔	20.01 sec
SAXS 測定枚数	320
紫外可視ファイバマルチチャンネル分光器	QE65pro (Ocean Optics)
UV 光源	L10290 (浜松ホトニクス)
UV-Vis 入射角度	45°
サンプルセル	石英セル
X 線光路長	1 mm
分光光路長	1.414 213 56 mm
窓剤	研磨合成石英ガラス (厚み 0.02 mm)
SEC-SAXS 用 HPLC	Prominence-I (SHIMAZU)
ゲル濾過カラム	Superdex 200 increase 10/300 (Cytiva)
インジェクション量	180 µL
初期流速	0.5 mL/min
SAXS 露光時溶出速度	0.05 mL/min (23.5 min later)

7.2 結果

混合試料調製時のゲルろ過クロマトグラフィーでは、3つのピークが確認された。これらのピークは分子量の大きい順に、116 kDa, 33.6 kDa, 8.8 kDa であった (図 7.1)。SEC-MALS では、89.4 kDa に単一ピークが確認された。

SEC-SAXS ではピーク高の半値以上の領域で濃度依存的な変化はほとんど見られず、単分散の散乱が測定された。Kratky プロットは $Q = 0.5 \text{ Å}^{-1}$ 付近にピークがあり、 $Q = 2.4 \text{ Å}^{-1}$ 付近で収束した (図 7.2)。距離分布関数における D_{max} は 120 Å であり、Porod 体積は $172\,000 \text{ Å}^3$ であった。

分子量計算値は約 100 kDa~130 kDa であった。得られた溶液構造はナンに類似した平たい外観であり、複数のドメインが観察されなかった (図 7.3)。モデル粒子中に空間領域は存在せず、CORAL で計算されたフィッティングモデル

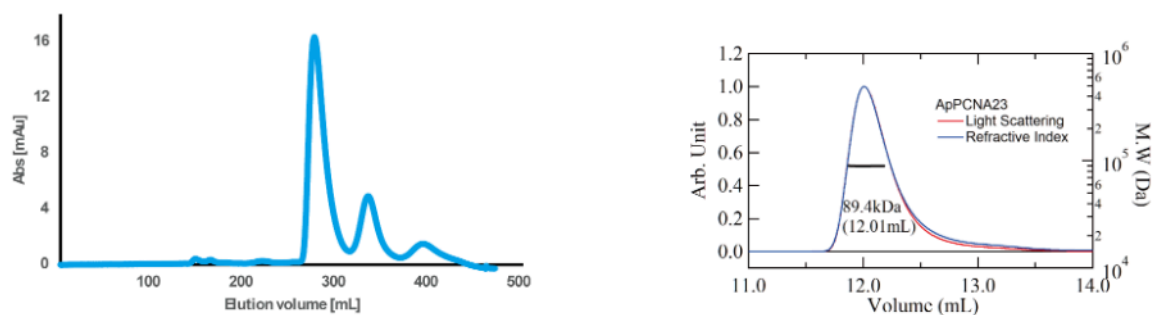


図 7.1. ApePCNA2-3 のカラム分析結果 混合試料のゲルろ過 (左), およびフラクション選択後の SEC-MALS(右)

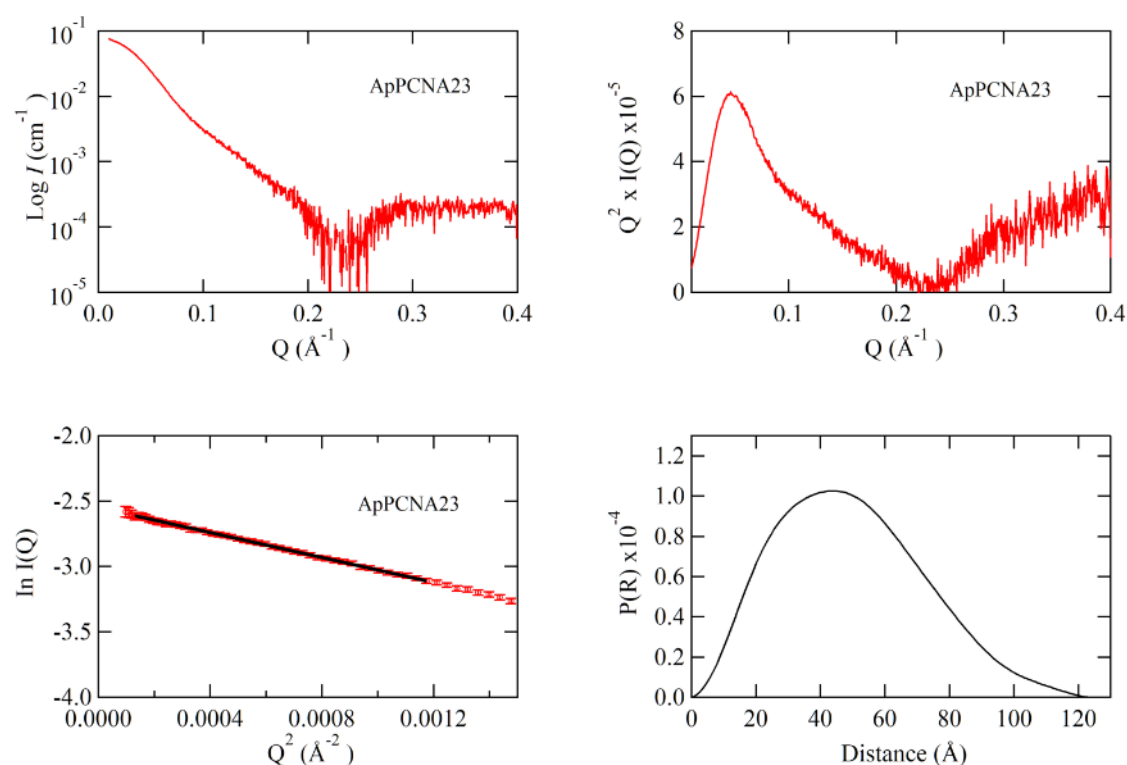


図 7.2. ApePCNA2-3 複合体の散乱曲線 基本散乱 (左上), Kratky プロット (右上), Guinier プロット (左下), および距離分布関数 (右下)

は四量体であった。

7.3 考察

試料調製段階での混合試料を用いたゲルろ過で観察されたピークのうち、116 kDa は四量体、33.3 kDa は単量体であると考えられる。8.8 kDa ピークは

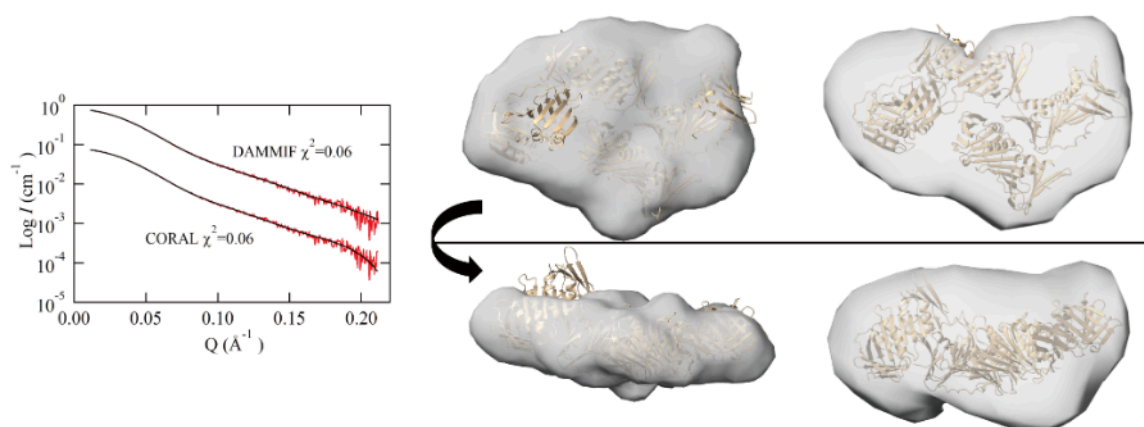


図 7.3. ApePCNA2-3 複合体の分子配置解析 散乱曲線の比較 (左), DAMMIF で解析された構造 (中), および DENNS で解析された構造 (右).

該当のフラグメントとして想定される分子として、保管中に生じた断片または ApePCNA3 のゲルろ過で除去されなかった核酸などが考えられる。一方, SEC-MALS では 89.4 kDa の単一ピークであり, 精製時の分取ピークとも異なる結果であった。先行研究では, ApePCNA2-3 複合体は 115 kDa のヘテロ三量体と提案されている [17]。SEC-MALS のみ分子量計算値が異なるが, SEC-SAXS では 100 kDa~130 kDa である。Kratky プロット上で, 単一ピークで収束したことから, 複合体のフォールディングは単一ドメインによるコンパクトな状態であると推察される。分子量計算値は複合体が三量体または四量体であることを示唆している。分子配置解析によって得られた溶液構造は ApePCNA2 と ApePCNA3 を各 2 分子ずつ含む四量体が最も確からしい構造であり, ApePCNA-2-3 複合体に比較してリング形状からは遠ざかる配置である。ただし, 先行研究でヘテロ三量体として提案された活性を持つ組み合わせであり, DNA ポリメラーゼ伸長活性は 70 °C で測定されており, 鋳型-プライマー DNA やクランプローダーが含まれる条件であるため, これらの条件を再現することで異なる溶液構造が得られる可能性がある。

この結果と第 6 章の結果を並べて比較するとその構造の違いが見て取れる。ここで, ApePCNA2-3 の混合試料に ApePCNA1 を加えた状態を仮定すると, ApePCNA1 が ApePCNA2-3 四量体からそれぞれ 1 分子ずつのペアを分離して三量体となる機構を提案する。加えて, 室温の DNA を含まない条件でよりリングに近い配置を形成することから, 鋳型-プライマーが形成される前の段階 (DNA 複製の初期段階) や *A. pernix* の生育温度よりも低温環境でのヘテ

ロ三量体の形成に関与していると捉えることもできる。好熱性古細菌の持つ耐熱スライディングクランプはクランプローダーを介さない DNA への結合 (self-loading) が起こりやすく、先行研究では ApePol2-ApePCNA1-2-3 または ApePol2-ApePCNA2-3 条件で、複製因子 C(RFC; Reprication factor C) 添加せずとも DNA 伸長活性が増強されている。70 °C 条件で行われたこの実験は、ApePCNA2-3 条件がより長鎖側に密集した結果であるが、低温条件では異なる結果が得られる可能性がある。

第 8 章

クライオ電子顕微鏡による好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原 1-2-3 複合体の構造解析

8.1 方法

ApePCNA1-2-3 の薄膜氷層中の構造をクライオ電子顕微鏡での単粒子解析により決定した。タンパク質試料の調製は第 2～4 章と同様の手順で行った。精製後、各溶液試料を等量混合し混合試料とし限外ろ過法で 0.1 mL 程度に濃縮した。20 mM Tris HCl, 200 mM NaCl pH8.0 で平衡化した Superdex 200pg(カラムサイズ $\phi 2.6$ cm \times 60 cm) を用いてゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行った。275 mL 溶出 (115 kDa) ピーク、濃度 0.65 μ g/mL を最終タンパク質として分取した。KEK 構造生物学研究センター (SBRC; Structural Biology Research Center) にて、クライオ電顕測定を行った。装置は Talos Arctica G2(Thermo Fisher Scientific 社製) を使用し、200 kV で測定した (表 8.1)。得られた電顕画像より、1237 粒を手動で選択しクラス 2D リファレンスを作成し、54 万粒を自動収集、平均像を作成した。厳選した粒子 49861 粒を用いて 3D initial model を作成し、対象を拡大した 255404 粒で Class 3D を精密化した。解析には Relion 3.1[43] を使用した。Coot を使用し手動でモデル構築を行った。

表 8.1. ApePCNA1-2-3 複合体のクライオ電顕測定条件およびデータ解析

Sample	ApePCNA1-2-3 complex
Data Collection	
Electron microscope	Talos Arctica
Detector	Falcon 3EC
Pixel size ($\text{\AA}/\text{px}$)	0.88
Defocus range (μm)	-1.0 to -2.5
Exposure time (s)	49.82
Dose ($\text{e}/\text{\AA}^2$)	1.02
Frames (no)	49
Focus	Always
Drift	Always
Total micrographs	1791
Reconstruction	
Software	Relion 3.1
Particles for 2D Classification	542 432
Particles for 3D Classification	255 404
Particles in the final map	63 886
Symmetry	$C1$
Final resolution (\AA)	10.56
FSC threshold	0.143
Map sharpening B factor (\AA^2)	up to 140
Model building	
Software	Coot

8.2 結果

電顕画像上では、リング状、棒状、ヒモ状の構造物が観察された (図 8.1). 分解能のピークは 4.5 \AA で、 $3 \text{ \AA} \sim 6 \text{ \AA}$ に分布していた. 粒子間の相互作用を除外するために、Class 2D はヒモ状の構造物を除く粒子を対象として作成した.

単粒子解析の結果、 10.56 \AA 分解能のリング状の電子密度が得られた (図 8.2). モデル構築は ApePCNA1, ApePCNA2, ApePCNA3 各 1 分子ずつが配置された. 電子密度の中心部にはリングの穴にあたる空間が存在し、リングの一部で電子密度が切断されていた.

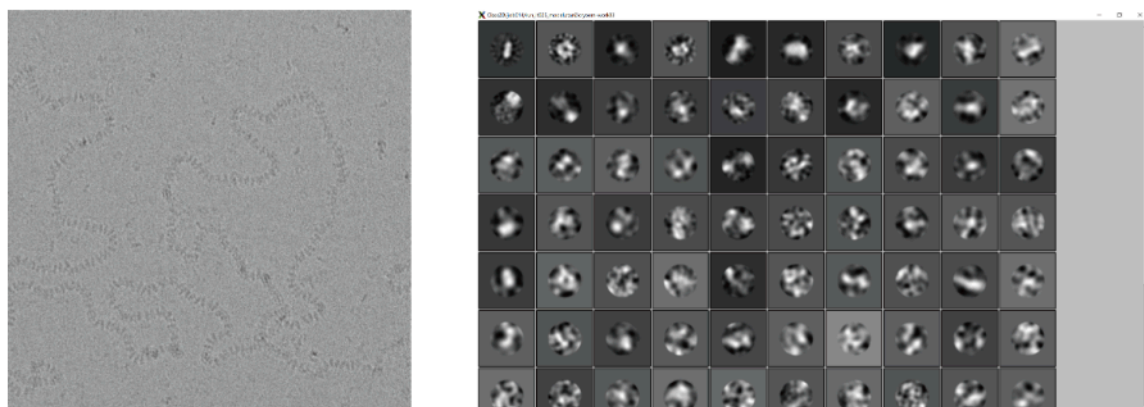


図 8.1. ApePCNA1-2-3 複合体のクライオ電顕測定結果 電顕写真 (左), および Class 2D 解析の結果

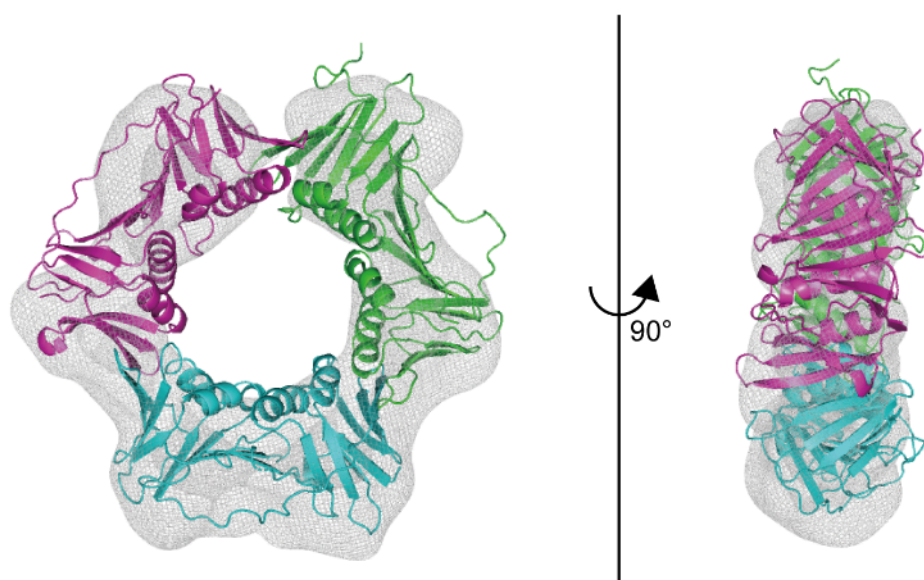


図 8.2. ApePCNA1-2-3 複合体のクライオ電顕構造 リング正面 (左), およびリング側面 (右)

8.3 考察

ApePCNA1-2-3 複合体の分子量計算値は 85.9 kDa であり, 高分子量複合体を対象としたクライオ電顕の測定分子量の下限値 (約 100 kDa) を下回る. しかし, 後述のような複合体化も含めた要因や, 混合試料のゲルろ過時の分子量計算値 115 kDa であった点も含め, 電子顕微鏡で解析が可能であったと考えられる. 測定試料の濃度に関しては 1 mg/mL 以上が推奨されているが, ApePCNA2

の溶液散乱測定 (初回) の際に規定濃度 7.5 mg/mL において Guinier Plot 上でアグリゲーションが確認されており, 設定濃度よりも希薄な条件が試料として好ましいと考えられる. 電顕画像上で観察された各構造物について, リング状構造物は正面または裏面から見た三量体リング, 棒状構造物は横方向から見た三量体リング, ヒモ状構造物は棒状構造物の連なったものであると考えられる. このヒモ状構造物はリング同士の接触による相互作用に起因すると考えられる. 例えば, ApePCNA1 と ApePCNA3 は結晶構造内でリング形成に関与しない分子間相互作用が確認されている. この相互作用は ApePCNA1 では N 末端, ApePCNA3 では C 末端を介した PIP-box 様配列と PIP-Box 結合部位間の相互作用であり, 互いに正面 (DNA 複製が進行する方向) で起こりうる. ApePCNA2 は結晶構造内で四量体リングが背中合わせで配置されており, 三量体間でも形成可能な相互作用であると考えられる. これらの分子間相互作用が薄膜氷層中で発生したため, front to front, back to back の反復形成によりヒモ状に連なった構造物を形成した可能性がある. 得られたクライオ電顕構造はリングであったが, この構造は同じ組み合わせである ApePCNA1-2-3 複合体の溶液構造とは異なる. 溶液構造は SEC-MALS の段階で単分散であることが確認されているため, 測定条件の差として測定温度による影響, 濃度設定による影響などが考えられる. また, 溶液構造測定時の複合体分子量は 79.7 kDa で, この時点で異なる状態であったとも考えられるが, ApePCNA2-3 複合体でも同様に, SEC-MALS のみ分子量が低サイズにシフトしたため, 装置による器差やカラム性能によるものが主であると考えられる. クライオ電顕の測定温度は 100 K 未満の極低温であり, 室温で測定された溶液構造に比較して熱による分子の運動が制限される. 多くの生物種を通して PCNA は IDCL などの可動性の高いループを含み, ApePCNA1 は N 末端も長く可動性が高いと予測される. また, リング内の各サブユニットをつなぐ分子間相互作用は β シートを形成する水素結合のみであり, 四量体リングを形成可能な程度にはフレキシブルであることを考慮すると, 常温でも熱運動の影響が表れやすく構造変化は起こりうると考えられる. クライオ電子顕微鏡構造で確認されたリングの切れ目は, β シートの切断が繁栄されている可能性がある. 先行研究では ApePCNA1-3 間には複合体形成がみられないことから, この間隙は ApePCNA1-3 の境界によるもので, ApePCNA1 の長い N 末端による立体障害に起因すると考えられる. この相互作用が極低温環境で機能するのであれば, ApePCNA1 は低温環境でのリング構造の解除によりセルフローディングの引き金として機能する可能性が提案される. また, 先行

研究で検証した候補中では, ApePCNA1 に特異的に結合する複製因子は発見に至っておらず, ApePCNA1 は TLS に関与する特殊な DNA ポリメラーゼと相互作用する可能性が予測されていたが, *A. pernix* ゲノムには TLS 活性を持つとされ Y-ファミリーポリメラーゼのホモログは存在しておらず新規配列を持つ DNA ポリメラーゼの発見が待たれている. TLS に ApePCNA1 が関与する仮説に対し, ApePCNA1-2-3 複合体で観察されたリングの間隙が DNA 塩基のミスマッチによって二本鎖間に形成される螺旋外径の増大に対応できる可能性があることは, 先行研究の仮説を補完する根拠となるだろう. ApePCNA1 結合タンパク質の探索, およびミスマッチを含む dsDNA との相互作用の定量的分析により, この仮説をさらに検証できると考えられる.

第 9 章

結語

本研究では、好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来の三種類の増殖細胞核抗原の立体構造を多角的な手法で解析し、原子レベルでの特徴づけを行った。それぞれの単独での結晶構造が 2.0 Å 分解能で解析され、ApePCNA1 および ApePCNA3 は末端部によって形成された分子間相互作用により、関連タンパク質との相互作用部位が明らかとなった。ApePCNA2 の結晶構造が四量体リング、溶液構造が五量体であったことは先行研究の予測とは大きく異なる結果であった。溶液中の複合体構造では実験条件の課題は残るものの、先行研究で不明瞭であった ApePCNA1 の機能として、特殊環境でのリング形成への関与が示唆された。また、クライオ電顕構造で観察された三量体リングの間隙は、先行研究で提案された ApePCNA1 が損傷乗り越え DNA 合成に関与する可能性を裏付ける特徴と言える。結晶構造、溶液構造、クライオ電顕のいずれにおいても長い N 末端による相互作用の影響が示唆され、その未知の機能は *A. pernix* の DNA 複製イベントにおいて、新たな相互作用の様式を提案した。また、小角 X 線散乱とクライオ電顕の構造が一致しなかったデータは、測定条件がタンパク質複合体の構造に与える影響として新たな課題を提供した。加えて本研究では、発現・精製に適した組み換えタンパク質を高効率で発現可能な新たな培地およびプロトコルを提案した。この培地はターゲットタンパク質の発現系の構築に苦戦する研究者に問題の解決を提供し、より簡便な精製プロトコルの発見に寄与することが期待される。

第 10 章

付録

10.1 ターゲットタンパク質の基礎情報

発現系を構築したタンパク質のアミノ酸配列, 組成, 分子量計算値, 吸光係数計算値を掲載する. 吸光係数はトリプトファン残基およびチロシン残基の数量より算出した. エクセル VBA を用いた等電点計算機能を実装することで, さらなる利便性の向上が期待できる. データシートのタンパク質名称 (ApeXXXX) の下に, 研究室内での愛称を括弧書きで示した. ApePCNA の愛称は頭文字がいろは歌の順になるよう名付けた.

ApePCNA1 (ichibo)								Data source			
								APE_0162(KEGG)			
sequence											
MSSEATLDSEFTDYKAMFRYEAKVFKELVDSVSKILDEGLFIITGEGRLRLRGMDPARVAL								60			
VDIEIPSSSFFDFYMAGDVERVELGVNMETLKGVARAKKGDQLEVRVREDKVL FIVESV								120			
VLRRYLLPNLEIVDVPEDISLEFDATATVIADVVKTLRDVELVGDIVEFDAGEDYLSI								180			
RSVGPERRRVETRLTRESPALIDLEVKEPATSRYDVGYLKRMLGVAKIAESIELSFSTDK								240			
PLKMVFKSPDGSRVTYLLAPSTG								300			
size		263	aa								
molecular mass		29410	Da	(29.41	kDa)					
aa composition	A	V	L	I	F	W	P	M	G	S	
	Ala	Val	Leu	Ile	Phe	Trp	Pro	Met	Gly	Ser	
	17	32	28	14	12	0	10	7	15	20	
	T	C	N	Q	Y	K	H	R	D	E	
	Thr	Cys	Asn	Gln	Tyr	Lys	His	Arg	Asp	Glu	
	13	0	2	1	8	16	0	20	22	26	
OD280											
ε 280[AU/mM/cm]		9.232									
E280 [AU/(mg/mL)]		0.313906834									
pI		4.4									

図 10.1. ApePCNA1 の基本データ ApePCNA1 は好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原 1 のアミノ酸配列である.

ApePCNA2 (Rose)										Data source	
										APE_0441.1(KEGG)	
sequence											
MADARFYFSDARTWRYMVASIEKIIIEGVFVATGEGLSLRALDTSHVAMVDLYYPNTAFI										60	
EYDIGGESVEFGVSFDLLSKVLRRARKEDLVLEVEGSRLAVKLKSRGERTFRIPQVWMT										120	
YEKLPEPKVSFTVRARMLGSTFREAVRDLEPHSETLTLRALEDALLVGSSSEMATVEIEL										180	
SQSRGSLLDYEAESQDRASYSIEYFSEMLSAAQAADAVVVSFSEDAPVRVDMEYLGGGRL										240	
TFYVSPKIE										300	
size of protein	249										
molecular mass	27903				(27.903	kDa)				
aa composition	A	V	L	I	F	W	P	M	G	S	
	Ala	Val	Leu	Ile	Phe	Trp	Pro	Met	Gly	Ser	
	23	24	26	9	12	1	7	8	14	25	
	T	C	N	Q	Y	K	H	R	D	E	
	Thr	Cys	Asn	Gln	Tyr	Lys	His	Arg	Asp	Glu	
	12	0	1	4	11	8	2	20	14	28	
OD280											
ε280[AU/mM/cm]	18.194										
E280 [AU/(mg/mL)]	0.652044583										
pI	4.4										

図 10.2. ApePCNA2 の基本データ ApePCNA2 は好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原 2 のアミノ酸配列である。

ApePCNA3 (hatu)										Data source	
										APE_2182(KEGG)	
sequence											
MFRLVYTASSKFKYIAQTLAKINDEGVFEFSLDGLRAWIMSPDKTSLAILEMPSLSFEEY										60	
MVEEEMRWVLRTELNKISKRATRNDIIFQWNAEEQALEVELRDRKLGFSRKFLVPATS										120	
VGAEEMRRLKLEPTVSFTILTDDLKAMIQDVKVVGDFAEFEASEGQVWVRSQAEEKEYEW										180	
VMKPGDVLLSLEVEEDAKSIYSRQVLEIATKPVGAAESVKVSFASDYPMKIEYTFPNGER										240	
MELYMAPSLAG										300	
size of protein	251										
molecular mass	28585				(28.585	kDa)				
aa composition	A	V	L	I	F	W	P	M	G	S	
	Ala	Val	Leu	Ile	Phe	Trp	Pro	Met	Gly	Ser	
	21	22	23	12	13	3	9	11	10	20	
	T	C	N	Q	Y	K	H	R	D	E	
	Thr	Cys	Asn	Gln	Tyr	Lys	His	Arg	Asp	Glu	
	11	0	5	7	8	17	0	14	14	31	
OD280											
ε280[AU/mM/cm]	25.732										
E280 [AU/(mg/mL)]	0.900192409										
pI	4.4										

図 10.3. ApePCNA3 の基本データ ApePCNA3 は好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原 3 のアミノ酸配列である。

ApePCNA1_Noff (nico)								Data source			
								PCNA1_Aerpe(U.P.)			
sequence											
MFRYEAKVFKELVDSVSKILDEGLFIITGEGRLRLRGMDPARVALVDIEIPSSSFFDFYMA								60			
GDVERVELGVNMETLKGVARAKKGDQLEVRVREDKVLFIYESVVLRRYLLPNLEVIVDV								120			
PEDISLEFDATATVIADVVKTLRDVELVGDIVFDAGEDYLSIRSVGPERRRVETRLTR								180			
ESPALIDLEVKEPATSRVDVGYLKRMLGVAKIAESIELSFSTDKPLKMFVKSPDGSRVTY								240			
LLAPSTG								300			
size of protein											
247		AA									
molecular mass											
27635		Da		(27.635		kDa)			
aa composition											
A		V		L		I		F		W	
Ala		Val		Leu		Ile		Phe		Trp	
15		32		27		14		11		0	
T		C		N		Q		Y		K	
Thr		Cys		Asn		Gln		Tyr		Lys	
11		0		2		1		7		15	
OD280											
ε280[AU/mM/cm]		8.078									
E280											
[AU/(mg/mL)]		0.292310476									
pI											
4.5											

図 10.4. N 末端排除型 ApePCNA1 の基本データ N 末端排除型 ApePCNA1 は長鎖 N 末端を排除した好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原 1 のアミノ酸配列である。

ApeRCFS (Husky)								Data source		
								APE_1522(KEGG)		
sequence										
MSSVLEMLWVEKYRPRSLDDIVDQKHVVERLKQFVKQRNMPHLLFAGPPGTGKTTAAHAL								60		
AHDLFGENYRQYMLELNASDERGINVIREKVKEFARSRTPEIPFKIVLLDEADNMTSDA								120		
QQALRRLMELYSSVTRFILIANYPYSKIIDPIQSRCFFRFQPLSKQDVIERLRYIAENEG								180		
VDYEEEALDAIYEISEGDMRKAINVLQAASYLGKVTVDVYRVVGMKPREVREMLATAL								240		
KGDFTAARSLLRKIMIEYMSGEDVARQIHRELFSTELKMPEELRVLAADYLGEVHYRLV								300		
EGSDDDIQLSAFLAWLTMMSRKLEV								360		
size of protein	325									
molecular mass	37301				(37.301	kDa)			
aa composition	A	V	L	I	F	W	P	M	G	S
	Ala	Val	Leu	Ile	Phe	Trp	Pro	Met	Gly	Ser
	29	24	35	19	12	2	12	14	14	19
	T	C	N	Q	Y	K	H	R	D	E
	Thr	Cys	Asn	Gln	Tyr	Lys	His	Arg	Asp	Glu
	11	1	8	12	13	17	6	27	20	30
OD280										
ε280[AU/mM/cm]	26.002									
E280 [AU/(mg/mL)]	0.697085869									
pI	5.2									

図 10.5. ApeRCFS の基本データ ApeRCFS は好熱性古細菌由来複製因子 C(クランプローダー複合体) を構成する小サブユニットのアミノ酸配列である。

引用文献

- [1] Yao, N. Y. and O'Donnell, M. E. (2016), Evolution of replication machines. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **51**, 135–149.
- [2] MacNeill, S. A. (2016), PCNA-binding proteins in the archaea: novel functionality beyond the conserved core. *Curr. Genet.*, **62**, 527–532.
- [3] McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. and Read, R. J. (2007), Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.*, **40**, 658–674.
- [4] Williams, G. J., Johnson, K., Rudolf, J., McMahon, S. A., Carter, L., Oke, M., Liu, H., Taylor, G. L., White, M. F. and Naismith, J. H. (2006), Structure of the heterotrimeric PCNA from *Sulfolobus solfataricus*. *Acta Cryst.*, **F62**, 944–948.
- [5] Maga, G. and Hubscher, U. (2003), Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.*, **116**, 3051–3060.
- [6] Moldovan, G. L., Pfander, B. and Jentsch, S. (2007), PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, **129**, 665–679.
- [7] Gulbis, J. M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (1996), Structure of the C-terminal region of p21 (WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell*, **87**, 297–306.
- [8] Georgescu, R. E., Kim, S. S., Yurieva, O., Kuriyan, J., Kong, X. P. and O'Donnell, M. (2008), Structure of a sliding clamp on DNA. *Cell*, **132**, 43–54.
- [9] Tokuda, J. M., Pabit, S. A. and Pollack, L. (2016), Protein-DNA and ion-DNA interactions revealed through contrast variation SAXS. *Biophys. Rev.*, **8**, 139–149.
- [10] Chen, X., Sun, J. and Wang, Y. (2021), Expressions of CD44, PCNA

- and MRP1 in lung cancer tissues and their effects on proliferation and invasion abilities of lung cancer cell line 95D. *J. BUON*, **26**, 72–78.
- [11] Lennox, E. S. (1955), Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*, **1**, 190–206.
- [12] Nedal, A., Rader, S. B., Dalhus, B., Helgesen, E., Forstrom, R. J., Lindland, K., Sumabe, B. K., Martinsen, J. H., Kragelund, B. B., Skarstad, K., Bjoras, M. and Otterlei, M. (2020), Peptides containing the PCNA interacting motif apim bind to the β -clamp and inhibit bacterial growth and mutagenesis. *Nucleic Acids Res.*, **48**, 5540–5554.
- [13] Pandey, P., Verma, V., Gautam, G., Kumari, N., Dhar, S. K. and Gournath, S. (2017), Targeting the β -clamp in helicobacter pylori with FDA-approved drugs reveals micromolar inhibition by diflunisal. *FEBS Lett.*, **591**, 2311–2322.
- [14] Sako, Y., Nomura, N., Uchida, A., Ishida, Y., Morii, H., Koga, Y., Hoaki, T. and Maruyama, T. (1996), *Aeropyrum pernix* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic hyperthermophilic archaeon growing at temperatures up to 100°C. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 1070–1077.
- [15] Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Yamazaki, S., Haikawa, Y., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Nakazawa, H., Takamiya, M., Masuda, S., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A. and Kikuchi, H. (1999), Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Res.*, **6**, 83–101.
- [16] Daimon, K., Kawarabayasi, Y., Kikuchi, H., Sako, Y. and Ishino, Y. (2002), Three proliferating cell nuclear antigen-like proteins found in the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*: interactions with the two DNA polymerases. *J. Bacteriol.*, **184**, 687–694.
- [17] Imamura, K., Fukunaga, K., Kawarabayasi, Y. and Ishino, Y. (2007), Specific interactions of three proliferating cell nuclear antigens with replication-related proteins in *Aeropyrum pernix*. *Mol. Microbiol.*, **64**, 308–318.
- [18] Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y. and Morishima, K.

- (2017), KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 353–361.
- [19] Yamazaki, S., Yamazaki, J., Nishijima, K., Otsuka, R., Mise, M., Ishikawa, H., Sasaki, K., Tago, S. and Isono, K. (2006), Proteome analysis of an aerobic hyperthermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 811–823.
- [20] Robert, X. and Gouet, P. (2014), Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.*, **42**, W320–W324.
- [21] Kreutzberger, M. A. B., Cvirkaite-Krupovic, V., Liu, Y., Baquero, D. P., Liu, J., Sonani, R. R., Calladine, C. R., Wang, F., Krupovic, M. and Egelman, E. H. (2023), The evolution of archaeal flagellar filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **120**, e2304256120.
- [22] Beltran, L. C., Cvirkaite-Krupovic, V., Miller, J., Wang, F., Kreutzberger, M. A. B., Patkowski, J. B., Costa, T. R. D., Schouten, S., Levental, I., Conticello, V. P., Egelman, E. H. and Krupovic, M. (2023), Archaeal DNA-import apparatus is homologous to bacterial conjugation machinery. *Nature commun.*, **14**, 666.
- [23] Kawai, A., Hashimoto, H., Higuchi, S., Tsunoda, M., Sato, M., Nakamura, K. T. and Miyamoto, S. (2011), A novel heterotetrameric structure of the crenarchaeal PCNA2-PCNA3 complex. *J. Struct. Biol.*, **174**, 443–450.
- [24] Brehm, W., Trivino, J., Krahn, J. M., Uson, I. and Diederichs, K. (2023), XDSEGUI: a graphical user interface for XDS, SHELX and ARCIMBOLDO. *J. Appl. Cryst.*, **56**, 1585–1594.
- [25] Vagin, A. and Teplyakov, A. (2010), Molecular replacement with MOLREP. *Acta Cryst.*, **D66**, 22–25.
- [26] Matsumiya, S., Ishino, Y. and Morikawa, K. (2001), Crystal structure of an archaeal DNA sliding clamp: proliferating cell nuclear antigen from *Pyrococcus furiosus*. *Protein Sci.*, **10**, 17–23.
- [27] Emsley, P., B. Lohkamp, W. G. S. and Cowtan, K. (2010), Features and development of Coot. *Acta Cryst.*, **D66**, 486–501.
- [28] Langer, G., Cohen, S. X., Lamzin, V. S. and Perrakis, A. (2008),

- Automated macromolecular model building for X-Ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat. Protoc.*, **3**, 1171–1179.
- [29] Murshudov, G. N., Skubak, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F. and Vagin, A. A. (2011), Refmac5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Cryst.*, **D67**, 355–367.
- [30] Agirre, J., Atanasova, M., Bagdonas, H., Ballard, C. B., Basle, A., Beilsten-Edmands, J., Borges, R. J., Brown, D. G., Burgos-Marmol, J. J., Berrisford, J. M., Bond, P. S., Caballero, I., Catapano, L., Chojnowski, G., Cook, A. G., Cowtan, K. D., Croll, T. I., Debreczeni, J., Devenish, N. E., Dodson, E. J., Drevon, T. R., Emsley, P., Evans, G., Evans, P. R., Fando, M., Foadi, J., Fuentes-Montero, L., Garman, E. F., Gerstel, M., Gildea, R. J., Hatti, K., Hekkelman, M. L., Heuser, P., Hoh, S. W., Hough, M. A., Jenkins, H. T., Jimenez, E., Joosten, R. P., Keegan, R. M., Keep, N., Krissinel, E. B., Kolenko, P., Kovalevskiy, O., Lamzin, V. S., Lawson, D. M., Lebedev, A. A., Leslie, A. G. W., Lohkamp, B., Long, F., Maly, M., McCoy, A. J., McNicholas, S. J., Medina, A., Millan, C., Murray, J. W., Murshudov, G. N., Nicholls, R. A., Noble, M. E. M., Oeffner, R., Pannu, N. S., Parkhurst, J. M., Pearce, N., Pereira, J., Perrakis, A., Powell, H. R., Read, R. J., Rigden, D. J., Rochira, W., Sammito, M., Rodriguez, F. S., Sheldrick, G. M., Shelley, K. L., Simkovic, F., Simpkin, A. J., Skubak, P., Sobolev, E., Steiner, R. A., Stevenson, K., Tews, I., Thomas, J. M. H., Thorn, A., Valls, J. T., Uski, V., Uson, I., Vagin, A., Velankar, S., Vollmar, M., Walden, H., Waterman, D., Wilson, K. S., Winn, M. D., Winter, G., Wojdyr, M. and Yamashita, K. (2023), The CCP4 suite: integrative software for macromolecular crystallography. *Acta Cryst.*, **D79**, 449–461.
- [31] Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M. and Dodson, E. (2003), A graphical user interface to the CCP4 program suite. *Acta Cryst.*, **D59**, 1131–1137.
- [32] Young, J. Y., Westbrook, J. D., Feng, Z., Sala, R., Peisach, E., Oldfield, T. J., Sen, S., Gutmanas, A., Armstrong, D. R., Berrisford, J. M.,

- et al. (2017), Onedep: unified wwPDB system for deposition, biocuration, and validation of macromolecular structures in the PDB archive. *Structure*, **25**, 536–545.
- [33] Evans, P. R. and Murshudov, G. N. (2013), How good are my data and what is the resolution? *Acta Cryst.*, **D69**, 1204–1214.
- [34] Krishna, T. S., Kong, X. P., Gary, S., Burgers, P. M. and Kuriyan, J. (1994), Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell*, **79**, 1233–1243.
- [35] Horsfall, A. J., Vandborg, B. A., Kikhtyak, Z., Scanlon, D. B., Tilley, W. D., Hickey, T. E., Bruning, J. B. and Abell, A. D. (2021), A cell permeable bimane-constrained PCNA-interacting peptide. *RSC Chem. Biol.*, **2**, 1499–1508.
- [36] Gonzalez-Magana, A. and Blanco, F. J. (2020), Human PCNA structure, function and interactions. *Biomolecules*, **10**, 570.
- [37] Chen, W., Wu, M., Hang, T., Wang, C., Zhang, X. and Zang, J. (2017), Structure insights into the molecular mechanism of the interaction between UHRF2 and PCNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **494**, 575–580.
- [38] Bruning, J. B. and Shamoo, Y. (2004), Structural and thermodynamic analysis of human PCNA with peptides derived from DNA polymerase-delta p66 subunit and flap endonuclease-1. *Structure*, **12**, 2209–2219.
- [39] Strzalka, W., Oyama, T., Tori, K. and Morikawa, K. (2009), Crystal structures of the *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen 1 and 2 proteins complexed with the human p21 C-terminal segment. *Protein Sci.*, **18**, 1072–1080.
- [40] Shimizu, N., Yatabe, K., Nagatani, Y., Saijyo, S., Kosuge, T. and Igarashi, N. (2016), Software development for analysis of small-angle X-ray scattering data. *AIP Conf. Proc.*, **1741**, 050017.
- [41] Yonezawa, K., Takahashi, M., Yatabe, K., Nagatani, Y. and Shimizu, M. (2019), Software for serial data analysis measured by SEC-SAXS/UV-Vis spectroscopy. *AIP Conf. Proc.*, **2054**, 060082.
- [42] Manalastas-Cantos, K., Konarev, P. V., Hajizadeh, N. R., Kikhney, A. G., Petoukhov, M. V., Molodenskiy, D. S., Panjkovich, A.,

- Mertens, H. D. T., Gruzinov, A., Borges, C., Jeffries, C. M., Svergun, D. I. and Franke, D. (2021), ATSAS 3.0: expanded functionality and new tools for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.*, **54**, 343–355.
- [43] Zivanov, J., Nakane, T., Forsberg, B. O., Kimanius, D., Hagen, W. J., Lindahl, E. and Scheres, S. H. (2018), New tools for automated high-resolution Cryo-EM structure determination in Relion-3. *Elife*, **7**, e42166.

出版リスト

本博士論文を作成するにあたり、学術雑誌へ掲載された論文は以下の通りである。

1. Takahiro Yamauchi, Makiko Kikuchi, Yasuhito Iizuka, Masaru Tsunoda. X-ray crystal structure of proliferating cell nuclear antigen 1 from *Aeropyrum pernix*. *Acta Crystallographica Section F* (2024). **F80**, 294–301.
2. Takahiro Yamauchi, Tsubasa Takemori, Makiko Kikuchi, Yasuhito Iizuka, Satoshi Ishikawa, Masaru Tsunoda. Crystal and solution structures of proliferating cell nuclear antigen from crenarchaeon *Aeropyrum pernix*. *Acta Crystallographica Section A* (2020). **A76**, a178–a179.
3. Takahiro Yamauchi, Tsubasa Takemori, Makiko Kikuchi, Yasuhito Iizuka, Satoshi Ishikawa, Masaru Tsunoda. Structural Comparison of heterotrimer PCNA from Crenarchaeon *Aeropyrum pernix* by solution scattering, Cryo-EM, and Crystallography. *Acta Crystallographica Section A* (2021). **A77**, C873.

本研究における受賞履歴は以下のとおりである。

受賞 2020 RCSB Protein Data Bank Poster Prize

授与機関 American Crystallographic Association

受賞年月日 2020 年 08 月 20 日

受賞理由 Crystal and Solution structures of Proliferating Cell Nuclear Antigen from Crenarchaeon *Aeropyrum pernix*.

また、以下の学会・シンポジウムにて発表済みである。

1. 山内崇浩, 菊池槇子, 馬籠将, 金成麗奈, 角田大. 好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原の精製および結晶化. 日本薬学会第 138 年会, 金沢. (2018 年 3 月)
2. 山内崇浩, 菊池槇子, 角田大. 好熱性古細菌由来増殖細胞核抗原の結晶構造解析. 第 57 回日本薬学会東北支部大会, 仙台. (2018 年 10 月)
3. 山内崇浩, 菊池槇子, 石川暁志, 角田大. 好熱性古細菌由来 PCNA2 の結晶構造解析. 2018 年度量子ビームサイエンスフェスタ 第 36 回 PF シンポジウム, つくば. (2019 年 3 月)
4. 山内崇浩, 菊池槇子, 石川暁志, 角田大. 好熱性古細菌由来 PCNA の精製および結晶化. 日本薬学会第 139 年会, 千葉. (2019 年 3 月)
5. 山内崇浩, 石川暁志, 菊池槇子, 角田大. 古細菌由来増殖細胞核抗原の結晶構造解析. 第 17 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2019), 大津. (2019 年 9 月)
6. Takahiro Yamauchi, Tsubasa Takemori, Makiko Kikuchi, Tasuhito Iizuka, Satoshi Ishikawa, Masaru Tsunoda. Crystal and Solution structures of Proliferating Cell Nuclear Antigen from Crenarchaeon *Aeropyrum pernix*. 2020: 70th ACA Annual Meeting, Virtual. (2020 年 8 月)
7. 山内崇浩, 菊池槇子, 竹森飛翔, 飯塚康人, 石川暁志, 角田大. 好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来 PCNA の結晶及び溶液構造解析. 第 59 回日本薬学会東北支部会, いわき. (2020 年 9 月)
8. 山内崇浩, 太田昂希, 菊池槇子, 竹森飛翔, 飯塚康人, 角田大. 古細菌由来複製因子 C の小サブユニットの精製および結晶化. 日本薬学会第 141 年会, 広島. (2021 年 3 月)
9. Yamauchi Takahiro, Takemori Tsubasa, Kikuchi Makiko, Iizuka Yasuhito, Ishikawa Satoshi, Tsunoda Masaru. Structural Comparison of heterotrimer PCNA from Crenarchaeon *Aeropyrum pernix* by solution scattering, Cryo-EM, and Crystallography. 25th Congress of the International Union of Crystallography, Prague, Czech Republic. (2021 年 8 月)
10. 山内崇浩, 竹森飛翔, 菊池槇子, 飯塚康人, 石川暁志, 角田大. 好熱性古細菌 *A. pernix* 由来増殖細胞核抗原の構造解析. 第 18 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム PPF2020/2021, 仙台. (2021

年 9 月)

11. 山内崇浩. 好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来増殖細胞核抗原の構造解析. 第 22 回生物化学系若手研究者セミナー, 仙台. (2024 年 11 月)

以下は関連論文である.

1. Makiko Kikuchi, Takahiro Yamauchi, Yasuhito Iizuka, Masaru Tsunoda. Roles of the hydroxy group of tyrosine in crystal structures of *Sulphurisphaera tokodaii* O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase. *Acta Crystallographica Section F* (2021). **F77**, 444–451.
2. Yasuhito Iizuka, Makiko Kikuchi, Takahiro Yamauchi, Masaru Tsunoda. Crystal structure of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase from the archaeon *Aeropyrum pernix* K1. *Acta Crystallographica Section A* (2023). **A79**, C834.

謝辞

本研究を進めるにあたり終始あたたかいご指導と激励を賜りました医療創生大学薬学部 角田 大 教授に心より感謝の意を表します。

菊池槇子 博士, 飯塚康人 助教, 馬籠将 先輩, 金成麗奈 先輩, 長谷川さとみ さん, 竹森飛翔 さん, 太田昂希 さん, 安田理央 さん, 阿部康平 さんをはじめ, 本研究を一緒に進めた仲間にも深く感謝いたします。

研究に関する助言をいただきました, 医療創生大学薬学部 石川暁志 准教授, 坂本直道 教授に心よりお礼申し上げます。

結晶構造解析のデータ測定でご支援いただきました高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所 千田 俊哉 教授, 松垣 直宏 教授, 加藤 龍一 准教授, 引田 理英 助教, 東北大学 国際放射光イノベーション・スマート研究センター 山田 悠介准教授に感謝申し上げます。

生命科学・創薬研究支援基盤事業 (BINDS) を通して溶液構造解析をご支援いただきました特定国立研究開発法人理化学研究所 放射光科学研究センター 清水 伸隆 グループディレクター, 奈良先端科学技術大学院大学 デジタルグリーンイノベーションセンター 米澤健人 特任助教に感謝申し上げます。

クライオ電子顕微鏡でのデータ測定の機会をくださりご支援いただいた高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所 川崎 政人 准教授, 筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 安達 成彦 准教授に感謝申し上げます。

病院での勤務と大学院での研究の両立にご支援を賜りました福島労災病院薬剤部 中村智 薬剤部長, 上平美穂子 薬剤副部長をはじめ, 薬剤部スタッフの皆様にも心より御礼申し上げます。

最後に構造生物化学研究室の皆様, 家族に心から感謝いたします。



X-ray crystal structure of proliferating cell nuclear antigen 1 from *Aeropyrum pernix*

Takahiro Yamauchi, Makiko Kikuchi, Yasuhito Iizuka and Masaru Tsunoda

Acta Cryst. (2024). F80, 294–301



IUCr Journals

CRYSTALLOGRAPHY JOURNALS ONLINE

This open-access article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Licence <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original authors and source are cited.



X-ray crystal structure of proliferating cell nuclear antigen 1 from *Aeropyrum pernix*Takahiro Yamauchi,^{a,b} Makiko Kikuchi,^{c,d,†} Yasuhito Iizuka^{a,d} and Masaru Tsunoda^{a,c,d,*}^aGraduate School of Life Science and Technology, Iryo Sosei University, Iwaki, Fukushima, Japan, ^bDepartment of Pharmacy, Fukushima Rosai Hospital, Iwaki, Fukushima, Japan, ^cGraduate School of Science and Engineering, Iryo Sosei University, Iwaki, Fukushima, Japan, and ^dFaculty of Pharmacy, Iryo Sosei University, Iwaki, Fukushima, Japan.

*Correspondence e-mail: masaru@isu.ac.jp

Received 9 July 2024

Accepted 26 September 2024

Edited by A. Nakagawa, Osaka University, Japan

† Present address: Structural Biology Research Center, Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization, KEK, Japan.

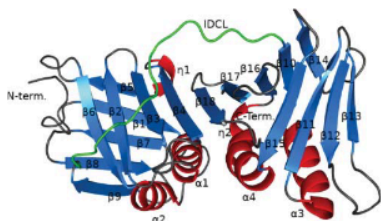
Keywords: proliferating cell nuclear antigens; DNA replication; *Aeropyrum pernix*; amino-acid-rich medium; lactose operon.**PDB reference:** proliferating cell nuclear antigen 1 from *Aeropyrum pernix*, 6aig**Supporting information:** this article has supporting information at journals.iucr.org/f

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) plays a critical role in DNA replication by enhancing the activity of various proteins involved in replication. In this study, the crystal structure of ApePCNA1, one of three PCNAs from the thermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*, was elucidated. ApePCNA1 was cloned and expressed in *Escherichia coli* and the protein was purified and crystallized. The resulting crystal structure determined at 2.00 Å resolution revealed that ApePCNA1 does not form a trimeric ring, unlike PCNAs from other domains of life. It has unique structural features, including a long inter-domain-connecting loop and a PIP-box-like sequence at the N-terminus, indicating potential interactions with other proteins. These findings provide insights into the functional mechanisms of PCNAs in archaea and their evolutionary conservation across different domains of life. A modified medium and protocol were used to express recombinant protein containing the *lac* operon. The expression of the target protein increased and the total incubation time decreased when using this system compared with those of previous expression protocols.

1. Introduction

DNA replication is a key event in the cell cycle that precedes cell division. It involves various proteins, including DNA-dependent DNA polymerases (Yao & O'Donnell, 2016). Among these factors, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) forms a trimeric ring (sliding clamp) around DNA and directly enhances the activity of proteins involved in replication (Maga & Hübscher, 2003). Several enzymes bind to PCNA via the PCNA-interacting peptide-box (PIP-box) motif, including DNA-dependent DNA polymerases, flap endonucleases and DNA ligases involved in DNA replication (MacNeill, 2016; Moldovan *et al.*, 2007; Winter & Bunting, 2012). PCNA has a PIP-box binding site near the C-terminus that is oriented in the direction of DNA replication (Horsfall *et al.*, 2021). Sliding clamps can be considered to be DNA scaffolds that allow specific enzymes (such as DNA polymerase) to bind and catalyze DNA replication.

Sliding clamps are involved in cell proliferation and are frequently expressed in cancer cells (Chen *et al.*, 2021). They have attracted attention as a potential target for disease diagnosis and treatment (Wendel *et al.*, 2023). Furthermore, bacterial β -subunit (a monomer of the bacterial sliding-clamp complex) inhibitors have been explored to develop new antimicrobial agents (Liu *et al.*, 2021; Nedal *et al.*, 2020; Pandey *et al.*, 2017). The sliding clamp is one of the earliest reported proteins to have its three-dimensional structure



OPEN ACCESS

Published under a CC BY 4.0 licence

Table 1
Macromolecule-production information.

Source organism	<i>A. pernix</i> K1 ^T
Expression vector	pET-11a
Expression host	<i>E. coli</i> Rosetta-gami (DE3)
Complete amino-acid sequence of the construct produced	MSSEATLDSEFTDYKAMFRYEAKVFKELVDSVSKILDEGLFIITGEGRLRLRGMDPARVALVDIEIPSSSFFDFYMAGDVERVELGVNMETLKGVARAKKGDQLEVRVREDKVLFIVESVVLRRYLLPNLEIVDVPEDISLEFDATATVIADVVKTLRDVELVGDIVFDAGEDYLSIRSVGPERRRVETRLTRESPALIDLEVKEPATSRVDVGYLKRMLGVAKIAESIELSFSTDKPLKMFVKSPDGSRVTYLLAPSTG

determined, and has been described in many species, including humans, eukaryotes and bacteria (Georgescu *et al.*, 2008; Gulbis *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 2006). The sliding clamp is widely present in the three major domains of living organisms, forming a β -clamp dimer in bacteria and a PCNA trimer in eukaryotes. In these two domains, a single PCNA or β -clamp gene is present in the genome, and the sliding clamp refers to a homo-complex. In the archaeal domain, Euryarchaeota form homotrimers encoded by a single gene, whereas some species belonging to the Crenarchaeota family have multiple PCNAs that form heterotrimers and homotrimers (MacNeill, 2016).

Aeropyrum pernix is a crenarchaeon that inhabits high-temperature and aerobic conditions and was discovered on Kodakara-Jima Island, Japan (Sako *et al.*, 1996). Analysis of the *A. pernix* genome showed that the sequence contains three PCNA genes (Kawarabayasi *et al.*, 1999): ApePCNA1 (*APE_0162*), ApePCNA2 (*APE_0441.1*) and ApePCNA3 (*APE_2182*) in the KEGG database (Kanehisa *et al.*, 2017). Of the *A. pernix* genes, approximately 30% have an ATG start codon, approximately 50% have a TTG start codon and 20% have a GTG start codon (Yamazaki *et al.*, 2006). The start codon of the *APE_0162* gene is GTG, and the molecular weights of the recombinant and native (cell-extract) proteins are identical on sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE; Daimon *et al.*, 2002). The sliding clamp of *A. pernix* forms heterotrimers and enhances polymerase activity in the ApePCNA1–ApePCNA2–ApePCNA3 and ApePCNA2–ApePCNA3 complexes (Imamura *et al.*, 2007). ApePCNA1 is expressed in *A. pernix* cells but is not essential for its *in vitro* activity. However, the specific activity of ApePCNA1 has not been determined, and its three-dimensional structure has not yet been analyzed. In this study, we determined the crystal structure of ApePCNA1 and described its features.

2. Materials and methods

2.1. Macromolecule production

The *APE_0162* gene encoding ApePCNA1 from *A. pernix* K1^T was amplified from the genomic DNA of strain NBRC 100138^T (obtained from NBRC, NITE, Kisarazu, Japan) using polymerase chain reaction (PCR). The PCR product was

Table 2
Crystallization.

Method	Vapor diffusion, hanging drop
Plate type	VDX plate
Temperature (K)	298
Protein concentration (mg ml ⁻¹)	10
Buffer composition of protein solution	20 mM Tris–HCl pH 8.0
Composition of reservoir solution	Mcllvaine buffer, lithium sulfate, propan-2-ol
Volume and ratio of drop	4 μ l, 1:1
Volume of reservoir (μ l)	1000

treated with the NdeI and BglII restriction enzymes and was subcloned into pET-11a vector (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The plasmid was introduced into *Escherichia coli* Rosetta-gami (DE3) cells by electroporation on ice for 4 ms at 1.80 kV and 25 μ F; the cells were incubated in Super Optimal broth with catabolite repression at 310 K for 30 min and spread onto Luria–Bertani (LB) agar containing ampicillin and chloramphenicol. A colony was selected and grown as a primary culture in 15 ml LB broth (Lennox) containing 50 μ g ml⁻¹ ampicillin and 34 μ g ml⁻¹ chloramphenicol for 9 h at 310 K. Subsequently, 7.5 ml bacterial suspension from the primary culture was grown in 1 l 1% Bacto tryptone (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, New Jersey, USA), 0.5% peptone (Kyokuto Pharmaceutical Industrial, Tokyo, Japan), 0.5% sodium chloride, 50 μ g ml⁻¹ ampicillin and 34 μ g ml⁻¹ chloramphenicol for 12 h at 310 K. The cells were cultured to an *A*₆₀₀ of 0.6, and expression of the *APE_0162* gene was induced by adding 10% lactose to a final concentration of 0.4%. Cultivation continued for a further 4 h at 310 K.

The cells were harvested, resuspended in 20 mM Tris–HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, disrupted by sonication and heated for 30 min at 353 K. Heat-resistant fractions were obtained by centrifugation (8000g for 15 min at 277 K). Soluble proteins were precipitated using 40% saturated ammonium sulfate. The precipitate was resuspended in 10 ml 20 mM Tris–HCl pH 8.0 and dialyzed three times against 1 l 20 mM Tris–HCl pH 8.0 containing 200 mM NaCl (the three dialysis times were 30 min, 1 h and overnight). The dialysate was loaded onto a HiTrap Q HP column (5 ml; Cytiva, Marlborough, Massachusetts, USA) and ApePCNA1 protein was eluted with 200–500 mM sodium chloride.

The eluted protein was concentrated to 100 μ l by ultrafiltration using an Amicon Ultra-15 10K centrifugal filter (Merck) and applied onto a HiLoad 16/600 Superdex 75 pg column (Cytiva) pre-equilibrated with 20 mM Tris–HCl pH 8.0, 200 mM sodium chloride. The macromolecule-production process is summarized in Table 1.

2.2. Crystallization

Purified ApePCNA1 was concentrated to 10 mg ml⁻¹ via ultrafiltration using an Amicon Ultra 10K centrifugal filter. The buffer solution was changed to 20 mM Tris–HCl pH 8.0 at the same time. Crystallization was performed by hanging-drop vapor diffusion in a VDX Plate with sealant (Hampton Research, Aliso Viejo, California, USA) at 298 K. The initial

Table 3
Data collection and processing.

Values in parentheses are for the outer shell.

Diffraction source	Beamline BL-1A, Photon Factory
Wavelength (Å)	1.1000
Temperature (K)	100
Detector	Dectris EIGER X 4M
Crystal-to-detector distance (mm)	92.260
Rotation range per image (°)	1
Total rotation range (°)	180
Exposure time per image (s)	10
Space group	<i>P</i> 4 ₃ 2 ₁ 2
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	69.03, 69.03, 120.86
α , β , γ (°)	90, 90, 90
Mosaicity (°)	0.138
Resolution range (Å)	48.86–2.00 (2.05–2.00)
Total No. of reflections	258157 (12621)
No. of unique reflections	20481 (1056)
Completeness (%)	100.0 (100.0)
Multiplicity	12.5 (13.4)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	34.4 (15.0)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$	0.048 (0.164)
$R_{\text{r.i.m.}}^{\ddagger}$	0.051 (0.177)
$R_{\text{p.i.m.}}^{\S}$	0.019 (0.067)
Overall <i>B</i> factor from Wilson plot (Å ²)	19.354

$\dagger R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I(hkl)$ is the intensity of reflection hkl . $\ddagger R_{\text{r.i.m.}} = \sum_{hkl} \{N(hkl)/[N(hkl) - 1]\}^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $N(hkl)$ is the data multiplicity. $\S R_{\text{p.i.m.}} = \sum_{hkl} [1/[N(hkl) - 1]]^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$.

crystallization conditions were screened using Wizard Classics 1 and 2 (Rigaku Reagents, The Woodlands, Texas, USA) and Index (Hampton Research). Finally, colorless, origami shuriken-shaped (paper ninja star-like) crystals grew after two days in 100 mM McIlvaine buffer pH 4.2–4.6, 100–250 mM lithium sulfate, 7% propan-2-ol. The crystallization conditions are summarized in Table 2.

2.3. Data collection and processing

The ApePCNA1 crystals were collected and packed into a Universal V1-Puck at 77 K in liquid nitrogen. Diffraction data for ApePCNA1 were collected on BL-1A at the Photon Factory, Tsukuba, Japan. The diffraction images were processed (indexed, integrated, scaled and merged) using *XDSGUI* (Brehm *et al.*, 2023). The data-collection statistics are summarized in Table 3.

2.4. Structure solution and refinement

Phases were determined by molecular replacement using *MOLREP* (Vagin & Teplyakov, 2010) and the PCNA model from *Pyrococcus furiosus* (PDB entry 1iz4; Matsumiya *et al.*, 2001). The model was rebuilt using *ARP/wARP Classic* (Langer *et al.*, 2008) and 92 water molecules were added. The structure was modified using *Coot* (Emsley *et al.*, 2010) and refined using *REFMAC5* (Murshudov *et al.*, 2011). These processes were performed within the *CCP4i* interface (Potterton *et al.*, 2003) using the *CCP4* suite (Agirre *et al.*, 2023). The ApePCNA1 structure was validated using *Coot* and the wwPDB validation services (Young *et al.*, 2017) during deposition. Figures were constructed using *PyMOL* ([https://](https://www.pymol.org/)

Table 4
Structure refinement.

Values in parentheses are for the outer shell.

Resolution range (Å)	48.86–2.00 (2.052–2.000)
Completeness (%)	99.9
σ Cutoff	2.00
No. of reflections, working set	19446 (1403)
No. of reflections, test set	991 (69)
Final $R_{\text{work}}^{\dagger}$	0.185 (0.196)
Final $R_{\text{free}}^{\ddagger}$	0.226 (0.251)
Cruickshank DPI	0.1220
No. of non-H atoms	
Protein	1959
Ligand	0
Water	63
Total	2022
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.014
Angles (°)	1.583
Average <i>B</i> factors (Å ²)	
Protein	29.6
Water	32.6
Ramachandran plot	
Most favored (%)	98.8
Allowed (%)	1.2

$\dagger R_{\text{work}} = \sum_{hkl} ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|$. $\ddagger R_{\text{free}}$ is calculated the same way as R_{work} for data omitted from refinement (5% of the reflections in the data set).

www.pymol.org/). The refinement statistics are summarized in Table 4.

3. Results and discussion

3.1. Sequence comparison of PCNAs

The amino-acid sequence identities between ApePCNA1 and ApePCNA2, between ApePCNA2 and ApePCNA3 and between ApePCNA3 and ApePCNA1 were 28.16%, 21.81% and 28.57%, respectively. The average identity among the three PCNAs was 26.18% (Fig. 1). The ApePCNA1 sequence was approximately ten residues longer at the N-terminus than the other two sequences. Similarly, PCNAs from *Saccharolobus solfataricus* contained a long N-terminal region, as in SsoPCNA3 (PDB entry 2ix2, chain C; protein ID AAK40734.1; Williams *et al.*, 2006). However, the homology between ApePCNA1 and SsoPCNA3 (24.9%) was lower than those between the ApePCNAs, and only Met1 matched the N-terminal region before the second methionine residue of each PCNA (Met17 in ApePCNA1 and Met16 in SsoPCNA3). These long N-terminal amino-acid sequences (ApePCNA1, Q9YFT8; SsoPCNA3, P57765) are considered to be errors in the initial positions in the UniProt database (The UniProt Consortium, 2023). However, as discussed later, they can be used as anchor sequences.

3.2. Evaluating the enhanced expression system

ApePCNA1 was effectively expressed in an amino-acid-rich medium that differs from the Lennox LB medium (Lennox, 1955) that is widely used in protein-expression systems. SDS-PAGE showed that the expression in 1% tryptone, 0.5% peptone, 0.5% NaCl broth (TP broth) was higher than that in Lennox LB medium (Fig. 2). Furthermore, the expression of

E. coli-derived proteins (other than the target proteins) was significantly lower in this medium than in conventional LB medium. This medium is mostly composed of amino acids, which limit energy and nucleic acid metabolism. For example, the expression of these metabolism-related proteins is reduced owing to the extremely low amount of nucleic acids in the medium, since the *de novo* pathway is dominant in nucleic acid metabolism and the salvage pathway is of little significance. Therefore, the specificity of the expression levels of the target proteins may be attributed to the reduced expression of proteins required for their metabolism. We examined the timing of lactose addition by inducing protein expression using the *lac* operon. Considering the simplicity of this technique and the risk of contamination during incubation, it is preferable to mix lactose with the culture medium and sterilize it at the time of use, rather than separately preparing and sterilizing the culture medium and lactose solution before mixing them. However, the growth rate of the host *E. coli* was suppressed when ApePCNA1 was overexpressed in a medium containing lactose, and the incubation time required for the solution to reach visually observable turbidity doubled to 26 h.

Thus, the premix protocol was unsuitable for *E. coli* growth. To resolve this issue, lactose was added after *E. coli* reached an A_{600} of 0.6, which facilitated the successful growth of *E. coli* cells overexpressing ApePCNA1.

3.3. Crystal structure of ApePCNA1

ApePCNA1 crystals diffracted to a maximum of 1.59 Å resolution and the final structure was determined at a resolution of 2.00 Å (Fig. 3). The final resolution cutoff was 2.0 Å, because the R_{margin} and $I/\sigma(I)$ showed abnormal values in the resolution range 1.96–1.66 Å, although the statistics for the outer shell (resolution range 1.66–1.59 Å) were normal. Most amino-acid residues of ApePCNA1 (except for the N-terminal Met1-Ser2-Ser3-Glu4 and the C-terminal Gly263) were assigned in the final structure. The crystal structure contains a single ApePCNA1 subunit within the asymmetric unit. The crystals did not contain a threefold axis and the subunits did not form a ring-shaped trimeric structure. The ApePCNA1 subunit is composed of N- and C-terminal domains and a long loop called the inter-domain-connecting loop (IDCL) that

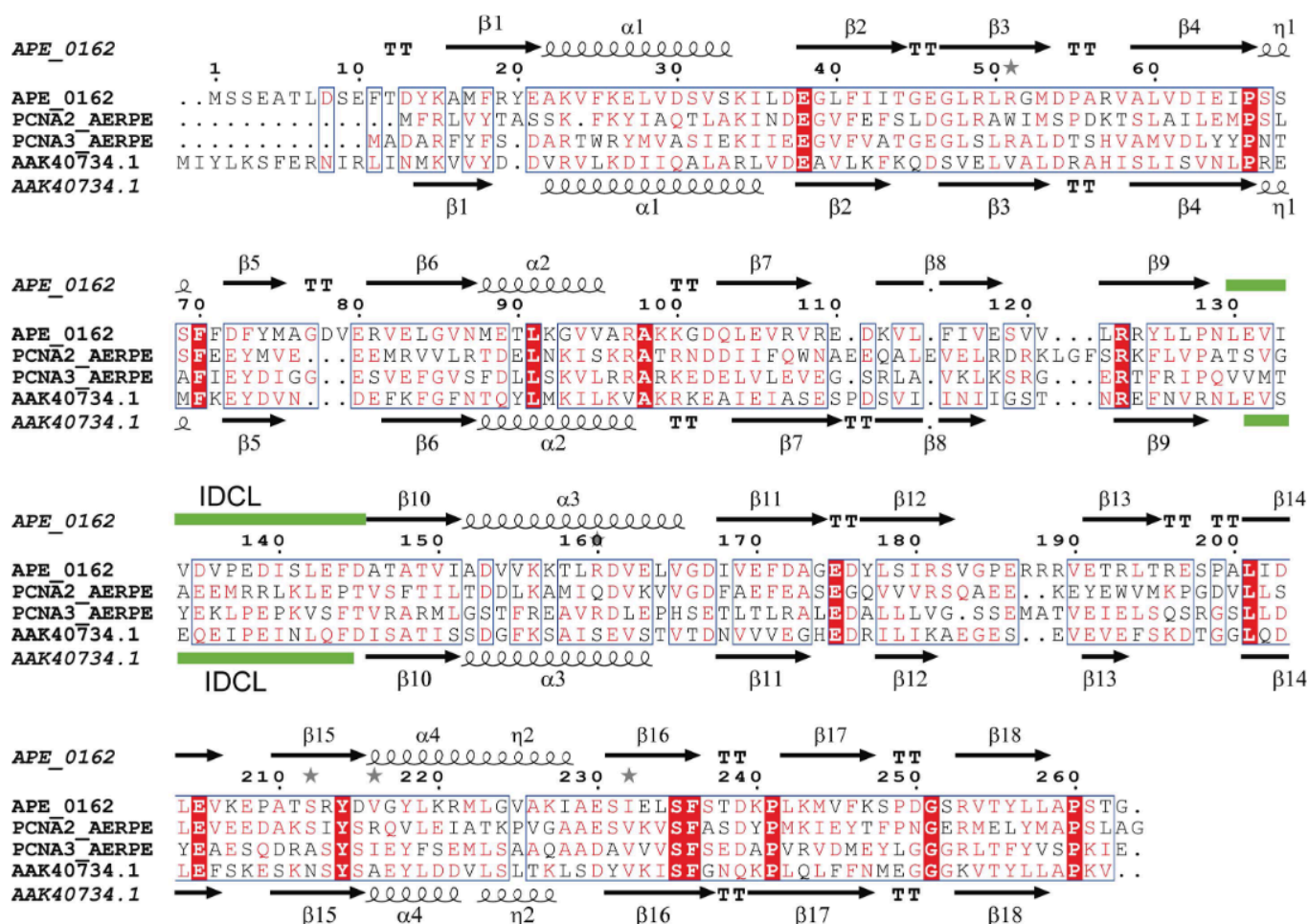


Figure 1
Multiple sequence alignment of ApePCNAs and SsoPCNA3. Helices, β -sheets and the IDCL are represented by coils, arrows and green bars, respectively. Columns with residues that are more than 70% similar according to physicochemical properties (threshold set to 0.7) are framed in blue and amino-acid residues with 100% identity are highlighted by a red background. This figure was created using *ESPrpt* 3.0 (Robert & Gouet, 2014).

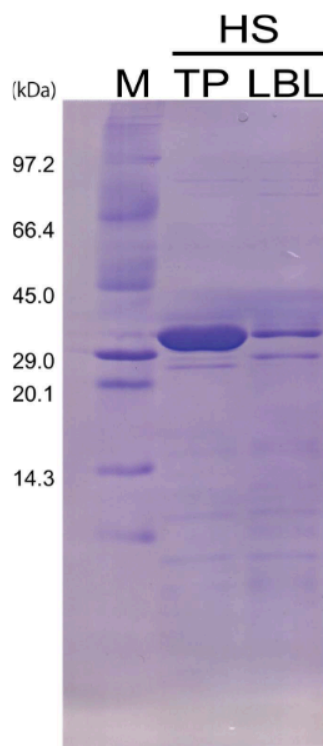


Figure 2

Comparison of ApePCNA1 expression between the two media. In the SDS-PAGE image, the molecular-weight marker (lane M) is on the left, TP medium (lane TP) is in the middle and Lennox LB medium (lane LBL) is on the right. Supernatants (lanes HS) of each sample with the same weight were compared after heat treatment.

connects the two domains formed by Leu130–Gln145. The N- and C-terminal domains consist of two β -sheets and two α -helices. In the N-terminal domains, each β -strand ($\beta 5$, $\beta 1$, $\beta 7$, $\beta 8$, $\beta 9$ and $\beta 6$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$) forms small β -sheets. In the C-terminal domains, $\beta 15$, $\beta 11$, $\beta 12$, $\beta 13$ and $\beta 14$, $\beta 10$, $\beta 16$, $\beta 17$, $\beta 18$ form β -sheets. One of the two β -sheets in each domain is linked to a β -sheet in the neighboring domain in the same molecule to form a large continuous β -sheet ($\beta 6$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 18$, $\beta 17$, $\beta 16$, $\beta 10$, $\beta 14$). Therefore, the ApePCNA1 subunit contains one large β -sheet and two small β -sheets. All of these β -sheets are arranged in an antiparallel manner. The four α -helices are arranged in an inverse parallel manner and are positively charged. Of these, $\eta 2$ follows $\alpha 4$ to form a tighter helix. The individual β -strands that make up the large β -sheet

are aligned parallel to the antiparallel α -helices, but although the middle of the sheet is close, the edges of the sheet are further away from the α -helices. The two small β -sheets that do not belong to the large β -sheet are arranged so that one covers one end of the large β -sheet and the other covers one end of the α -helices. The inner side of the ApePCNA1 subunit surrounded by these secondary structures is rich in hydrophobic residues that form a series of hydrophobic interactions (Fig. 4a). Cavity regions are present near the contacts between the two sides and the dorsal β -sheet (Fig. 4b). A cavity is also present between the C-terminal side of the IDCL region and the back β -sheet, which is rich in hydrophobic residues. The overall structure is similar to those of the homotrimeric ring of human PCNA (PDB entry 1axc; Gulbis *et al.*, 1996), a monomer of the PCNA ring from yeast (PDB entry 1plq; Krishna *et al.*, 1994) and a PCNA monomer from the thermophilic archaeon *P. furiosus* (PDB entry 1ge8; Matsumiya *et al.*, 2001). Structural alignment was performed for these PCNAs (human PCNA, yeast PCNA and *P. furiosus* PCNA). PyMOL was used for the alignment, which was performed using C^α atoms. The r.m.s.d.s for each were 1.178 Å (the average value for the trimer), 1.061 Å and 0.881 Å, respectively.

3.4. Interaction of ApePCNA1 with other molecules

The PCNA rings from other species have an inward α -helix region (Li *et al.*, 2021). The positive surface charge of the α -helix region suggests that ApePCNA1 has an α -helix region located in the inner part of the ring that interacts with the negative charge of the DNA double helix like that in other species (Fig. 4c). The trimeric ring model based on the structure of ApePCNA1 is connected by two adjacent small β -sheets between each subunit (Fig. 4d). In addition, the long N-terminus may be disordered in aqueous solution, suggesting that it does not form a homotrimer. This insight follows the results of gel-filtration analysis in a previous study (Imamura *et al.*, 2007). The IDCL region of PDB-deposited PCNAs is a movable, partially unfolded loop that often has a disordered structure. In contrast, electron density was observed in the IDCL region of ApePCNA1. Contrary to our expectations, clear electron density was observed at the N-terminus of ApePCNA1, which was expected to be a partially unfolded loop owing to its length. These long loops are the contact points of the adjacent subunits related to the screw axis in the

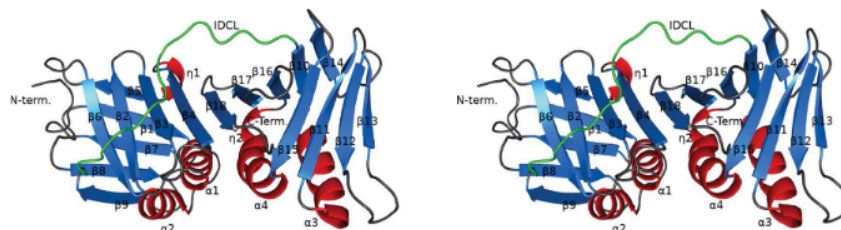


Figure 3

Stereoview of the ApePCNA1 structure. The protein is depicted as a ribbon diagram, with the α -helices, β -sheets, loops and IDCL colored red, marine blue, gray and green, respectively.

space group ($P4_32_12$) of the crystal. In general, the C-terminal side of the sliding clamp is considered to be the direction of DNA replication, and a group of enzymes responsible for DNA replication bind to the binding pocket near the IDCL (González-Magaña & Blanco, 2020). Interestingly, the N-terminus of ApePCNA1 interacted with the cleavage groove of the adjacent ApePCNA1 molecule (Fig. 5a). In this interaction, the carboxyl group of the N-terminal Asp8 is connected to Arg57 of the neighboring subunit by a hydrogen bond. Additionally, the NH of the main chain of Leu7 formed a hydrogen bond to the CO of the main chain of Arg57 in the neighboring subunit. The hydrophobic side chain of Leu7 is placed in a hydrophobic pocket formed by Met53, Leu60, Pro137, Pro241, Leu257 and Ala259 in an adjacent subunit. This interaction is like that observed between human PCNA and UHRF2^{PIP} (PDB entry 5yco; Chen *et al.*, 2017; Fig. 5b). The consensus sequence of the PIP-box is QXXhXXaa, where X is any amino acid, h is a hydrophobic amino acid and a is an

aromatic amino acid. The 4-EATLDSEF-11 sequence in the N-terminal region of ApePCNA1 is similar to the consensus sequence of the PIP-box (Fig. 5c). These results suggest that the PIP-box binding site of ApePCNA1 is in a similar location and binds in an analogous manner to those of PCNAs from other species. Furthermore, the N-terminal region of ApePCNA1 was suggested to be an anchor sequence that induces PIP-box binding. These results suggest that ApePCNA1 has an unknown function mediated by an N-terminal anchor sequence that results in PIP-box-like interactions.

In conclusion, we determined the crystal structure of ApePCNA1. A unique interaction via the N-terminus (which contains a PIP-box-like sequence) may be involved in the uncharacterized DNA-replication machinery in thermophilic archaea. We developed a new approach using a modified medium and protocol to express recombinant proteins containing the *lac* operon. These findings may be useful for protein research.

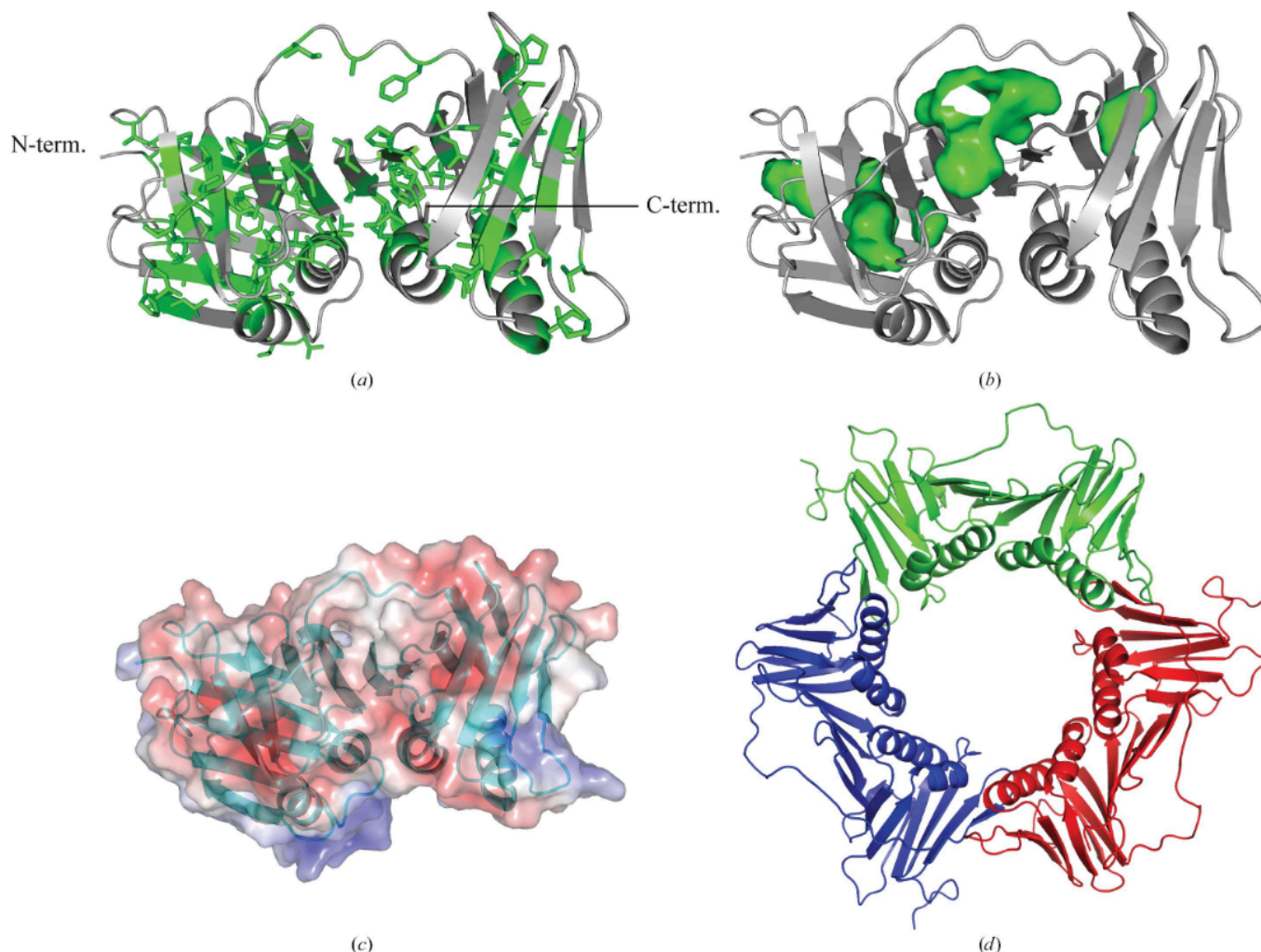


Figure 4

Structural features of ApePCNA1. (a) Hydrophobic amino acids are shown as green sticks. (b) Cavity regions are shown as green meshes. The cavities were drawn using *PyMOL*. (c) Electrostatic potentials on the molecular surface are shown in blue and red for positive and negative charge, respectively. (a), (b) and (c) are viewed from the same orientation as in Fig. 3. (d) Model of the ApePCNA1 homotrimeric ring viewed from the threefold axis direction. Each subunit is colored differently.

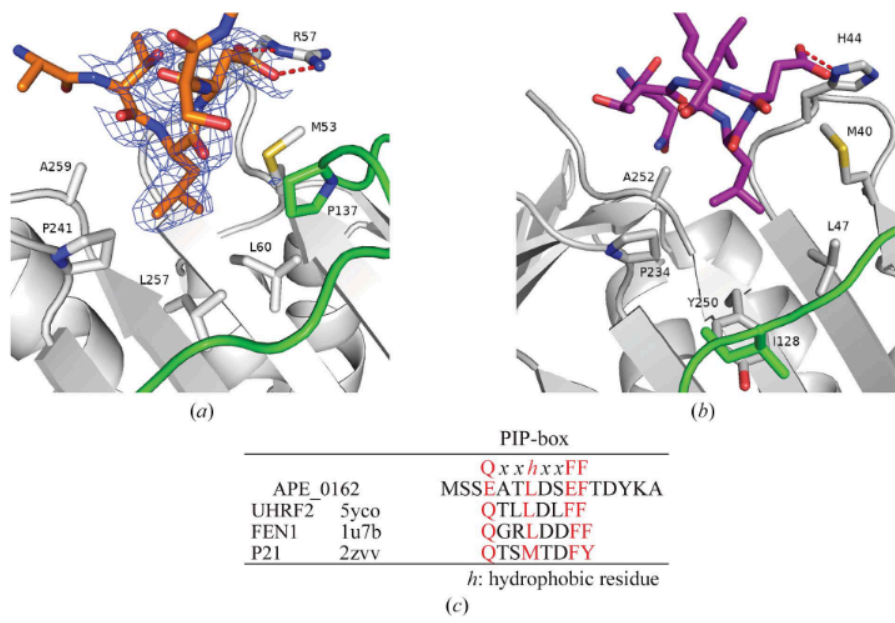


Figure 5
Comparison of the PCNA structures and PIP-box sequences. (a) Omit $F_o - F_c$ difference map (blue mesh) calculated without the N-terminus of ApePCNA1 (orange) contoured at 2σ . The ICDL is colored green and red dashes represent hydrogen bonds. (b) Human PCNA with UHRF2^{PIP} (PDB entry 5yco) is shown in the same orientation as in (a). (c) The PIP-box consensus sequence was compared with the N-terminal sequence of ApePCNA1 and proteins with the PIP-box sequence [PDB entries 1u7b (Bruning & Shamoo, 2004) and 2zvv (Strzalka *et al.*, 2009)].

Acknowledgements

We thank Professor T. Senda of the Structural Biology Research Center (SBRC), Professor N. Matsugaki, Dr Y. Yamada and Dr M. Hikita for their support with data collection at the Photon Factory of the High Energy Accelerator Research Organization (KEK), Japan. We thank Editage (<https://www.editage.com>) for English language editing.

Funding information

This study was funded by the National Project on Protein Structural and Functional Analysis of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References

Agirre, J., Atanasova, M., Bagdonas, H., Ballard, C. B., Baslé, A., Beilsten-Edmands, J., Borges, R. J., Brown, D. G., Burgos-Mármol, J. J., Berrisford, J. M., Bond, P. S., Caballero, I., Catapano, L., Chojnowski, G., Cook, A. G., Cowtan, K. D., Croll, T. I., Debreczeni, J. É., Devenish, N. E., Dodson, E. J., Drevon, T. R., Emsley, P., Evans, G., Evans, P. R., Fando, M., Foadi, J., Fuentes-Montero, L., Garman, E. F., Gerstel, M., Gildea, R. J., Hatti, K., Hekkelman, M. L., Heuser, P., Hoh, S. W., Hough, M. A., Jenkins, H. T., Jiménez, E., Joosten, R. P., Keegan, R. M., Keep, N., Krissinel, E. B., Kolenko, P., Kovalevskiy, O., Lamzin, V. S., Lawson, D. M., Lebedev, A. A., Leslie, A. G. W., Lohkamp, B., Long, F., Malý, M., McCoy, A. J., McNicholas, S. J., Medina, A., Millán, C., Murray, J. W., Murshudov, G. N., Nicholls, R. A., Noble, M. E. M., Oeffner, R., Pannu, N. S., Parkhurst, J. M., Pearce, N., Pereira, J., Perrakis, A., Powell, H. R., Read, R. J., Rigden, D. J., Rochira, W., Sammito, M., Sánchez Rodríguez, F., Sheldrick, G. M., Shelley, K. L., Simkovic, F., Simpkin, A. J., Skubak, P., Sobolev, E., Steiner, R. A., Stevenson, K., Tews, I., Thomas, J. M. H., Thorn, A., Valls, J. T.,

Uski, V., Usón, I., Vagin, A., Velankar, S., Vollmar, M., Walden, H., Waterman, D., Wilson, K. S., Winn, M. D., Winter, G., Wojdyr, M. & Yamashita, K. (2023). *Acta Cryst. D* **79**, 449–461.
Brehm, W., Triviño, J., Krahn, J. M., Usón, I. & Diederichs, K. (2023). *J. Appl. Cryst.* **56**, 1585–1594.
Bruning, J. B. & Shamoo, Y. (2004). *Structure*, **12**, 2209–2219.
Chen, W., Wu, M., Hang, T., Wang, C., Zhang, X. & Zang, J. (2017). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **494**, 575–580.
Chen, X., Sun, J. & Wang, Y. (2021). *J. BUON*, **26**, 72–78.
Daimon, K., Kawarabayasi, Y., Kikuchi, H., Sako, Y. & Ishino, Y. (2002). *J. Bacteriol.* **184**, 687–694.
Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. (2010). *Acta Cryst. D* **66**, 486–501.
Georgescu, R. E., Kim, S. S., Yuriev, O., Kuriyan, J., Kong, X. P. & O'Donnell, M. (2008). *Cell*, **132**, 43–54.
González-Magaña, A. & Blanco, F. J. (2020). *Biomolecules*, **10**, 570.
Gulbis, J. M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M. & Kuriyan, J. (1996). *Cell*, **87**, 297–306.
Horsfall, A. J., Vandborg, B. A., Kowalczyk, W., Chav, T., Scanlon, D. B., Abell, A. D. & Bruning, J. B. (2021). *J. Biol. Chem.* **296**, 100773.
Imamura, K., Fukunaga, K., Kawarabayasi, Y. & Ishino, Y. (2007). *Mol. Microbiol.* **64**, 308–318.
Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y. & Morishima, K. (2017). *Nucleic Acids Res.* **45**, D353–D361.
Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Yamazaki, S., Haikawa, Y., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Nakazawa, H., Takamiya, M., Masuda, S., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K., Kubota, K., Nakamura, Y., Nomura, N., Sako, Y. & Kikuchi, H. (1999). *DNA Res.* **6**, 83–101.
Krishna, T. S., Kong, X. P., Gary, S., Burgers, P. M. & Kuriyan, J. (1994). *Cell*, **79**, 1233–1243.
Langer, G., Cohen, S. X., Lamzin, V. S. & Perrakis, A. (2008). *Nat. Protoc.* **3**, 1171–1179.
Lennox, E. S. (1955). *Virology*, **1**, 190–206.
Li, H., Zheng, F. & O'Donnell, M. (2021). *FEBS J.* **288**, 7256–7262.

- Liu, B., Li, S., Liu, Y., Chen, H., Hu, Z., Wang, Z., Zhao, Y., Zhang, L., Ma, B., Wang, H., Matthews, S., Wang, Y. & Zhang, K. (2021). *Nucleic Acids Res.* **49**, 11367–11378.
- MacNeill, S. A. (2016). *Curr. Genet.* **62**, 527–532.
- Maga, G. & Hübscher, U. (2003). *J. Cell Sci.* **116**, 3051–3060.
- Matsumiya, S., Ishino, Y. & Morikawa, K. (2001). *Protein Sci.* **10**, 17–23.
- Moldovan, G. L., Pfander, B. & Jentsch, S. (2007). *Cell*, **129**, 665–679.
- Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F. & Vagin, A. A. (2011). *Acta Cryst. D* **67**, 355–367.
- Nedal, A., Raeder, S. B., Dalhus, B., Helgesen, E., Forstrøm, R. J., Lindland, K., Sumabe, B. K., Martinsen, J. H., Kragelund, B. B., Skarstad, K., Bjørås, M. & Otterlei, M. (2020). *Nucleic Acids Res.* **48**, 5540–5554.
- Pandey, P., Verma, V., Gautam, G., Kumari, N., Dhar, S. K. & Gourinath, S. (2017). *FEBS Lett.* **591**, 2311–2322.
- Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M. & Dodson, E. (2003). *Acta Cryst. D* **59**, 1131–1137.
- Robert, X. & Gouet, P. (2014). *Nucleic Acids Res.* **42**, W320–W324.
- Sako, Y., Nomura, N., Uchida, A., Ishida, Y., Morii, H., Koga, Y., Hoaki, T. & Maruyama, T. (1996). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 1070–1077.
- Strzalka, W., Oyama, T., Tori, K. & Morikawa, K. (2009). *Protein Sci.* **18**, 1072–1080.
- The UniProt Consortium (2023). *Nucleic Acids Res.* **51**, 523–531.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (2010). *Acta Cryst. D* **66**, 22–25.
- Wendel, S. O., Snow, J. A., Gu, L., Banerjee, N. S., Malkas, L. & Wallace, N. A. (2023). *J. Med. Virol.* **95**, e29244.
- Williams, G. J., Johnson, K., Rudolf, J., McMahon, S. A., Carter, L., Oke, M., Liu, H., Taylor, G. L., White, M. F. & Naismith, J. H. (2006). *Acta Cryst. F* **62**, 944–948.
- Winter, J. A. & Bunting, K. A. (2012). *Archaea*, **2012**, 951010.
- Yamazaki, S., Yamazaki, J., Nishijima, K., Otsuka, R., Mise, M., Ishikawa, H., Sasaki, K., Tago, S. & Isono, K. (2006). *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 811–823.
- Yao, N. Y. & O'Donnell, M. E. (2016). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **51**, 135–149.
- Young, J. Y., Westbrook, J. D., Feng, Z., Sala, R., Peisach, E., Oldfield, T. J., Sen, S., Gutmanas, A., Armstrong, D. R., Berrisford, J. M., Chen, L., Chen, M., Di Costanzo, L., Dimitropoulos, D., Gao, G., Ghosh, S., Gore, S., Guranovic, V., Hendrickx, P. M. S., Hudson, B. P., Igarashi, R., Ikegawa, Y., Kobayashi, N., Lawson, C. L., Liang, Y., Mading, S., Mak, L., Mir, M. S., Mukhopadhyay, A., Patwardhan, A., Persikova, I., Rinaldi, L., Sanz-Garcia, E., Sekharan, M. R., Shao, C., Swaminathan, G. J., Tan, L., Ulrich, E. L., van Ginkel, G., Yamashita, R., Yang, H., Zhuravleva, M. A., Quesada, M., Kleywegt, G. J., Berman, H. M., Markley, J. L., Nakamura, H., Velankar, S. & Burley, S. K. (2017). *Structure*, **25**, 536–545.

Crystal and Solution structures of Proliferating Cell Nuclear Antigen from Crenarchaeon *Aeropyrum pernix*

T Yamauchi¹, T Takemori², M Kikuchi³, Y Iizuka⁴, S Ishikawa², M Tsunoda⁴

¹Graduate School of Life Science and Technology, Iryo Sosei University, Japan, Iwaki, Fukushima,

²Faculty of Pharmacy, Iryo Sosei University, Iwaki, Fukushima, ³Graduate School of Science and Engineering, Iryo Sosei University, Iwaki, Fukushima, ⁴Graduate School of Life Science and Technology, Iryo Sosei University, Iwaki, Fukushima

df2002@jsu.ac.jp

Introduction Sliding clamps are ring-shaped proteins that encircle DNA and confer high processivity on DNA polymerases. In bacteria, the β -clamp protein forms a homodimer, whereas in eukaryotes or euryarchaeotes, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) proteins form homotrimers. However, PCNA from *Aeropyrum pernix* (ApPCNA), a crenarchaeote species, forms a heterotrimer. The actual structure of ApPCNA-mediated sliding clamps and the mechanism by which they slide along DNA is unknown. The present study aimed to analyze the crystal and solution structure of the heterotrimeric ring of ApPCNA, examine its interaction with DNA and other proteins, and elucidate the mechanism of PCNA function. Previously, we have analyzed the crystal structure of ApPCNA1 from the APE_0162 gene.¹⁾

Experimental procedures Each ApPCNA molecule, which constitutes a heterotrimer, was expressed using the *Escherichia coli* expression system. The proteins were purified using heat treatment, ammonium sulfate precipitation, and column chromatography. The purified proteins were crystallized using the vapor-diffusion method and the crystals were analyzed by X-ray diffraction. The crystal structures of ApPCNA2 from the APE_0441.1 gene and ApPCNA3 from the APE_2182 gene were determined by the single-wavelength anomalous dispersion method using platinum. To verify the ring shape of ApPCNA2 in solution, the solution structure was analyzed using size-exclusion chromatography-small-angle X-ray scattering (SEC-SAXS). A mixture of ApPCNAs was analyzed by SEC-multi-angle light scattering for the presence of a complex, and the solution structure was analyzed by SEC-SAXS.

Results Crystals of ApPCNA2 were grown up to 0.1 mm and diffracted to 1.8 Å resolution. ApPCNA2 crystallized as a tetramer. Two sets of dimers, linked through hydrogen bonds, joined back to back in an asymmetric unit. This structure also formed a tetrameric-ring. Crystals of ApPCNA3 diffracted to 1.9 Å resolution. The structure formed a trimeric ring. The C-terminal interacted with the cleavage site, a possible PCNA-interacting peptide box (PIP-box) binding site, of the adjacent trimeric ring. The solution structure of the complex was similar to shape of the British Isles islands. ApPCNA2 and ApPCNA3 interacted in a similar manner as the PCNA rings of other organisms; however, ApPCNA1 was located such that it did not form a perfect ring-shaped structure. The scattering curves of the complex and those of the model edited trimeric ring were almost similar with minor differences.

Discussion The crystal structure of ApPCNA2 showed that it exists as a tetrameric-ring. PCNA is a trimeric ring. Although this molecule, which forms a trimer, is unstable as a tetramer, the crystal structure forms a tetrameric-ring. Hydrogen bonds present in neighboring molecule, from Thr175 to Glu179 and Glu109 to Ile114, form a β -sheet. This flexible interaction suggests that the protein could be forming tetrameric-ring-shaped structure. The crystal structure of ApPCNA3 shows that the C-terminal contacts the cleavage site surrounded by β -sheets, formed behind the α -helices, and the inter-domain connecting loop between the neighboring trimeric-rings. Leu249 in the C-terminal is placed in the hydrophobic pocket formed by Met40, Leu47, Leu131, Pro228, Ala246, and Pro247 (Figure). Thus, this hydrophobic cleavage site may be a binding site for PIP-box motif containing proteins. The N-terminus of ApPCNA1 is approximately 10 residues longer than that of ApPCNA2 and ApPCNA3. This could be why the tripartite complex is not ring shaped. Moreover, Met16 is present downstream of the N-terminal of ApPCNA1. In the future, the effect of N-terminus deletion and binding of the DNA duplex on ApPCNA1 structure should be evaluated.

1) T. Yamauchi, et al., Purification and Crystallization of PCNA from thermophilic archaea. Poster presented at: 138th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan; Mar. 25-28, 2018; Kanazawa, JAPAN. in a similar manner as the PCNA rings of other organisms; however, [i]Ap[/*i*]PCNA1 was located such that it did not form a perfect ring-shaped structure. The scattering curves of the complex and those of the model edited trimeric ring were almost similar with minor differences.

[b]Discussion[/b] The crystal structure of [i]Ap[/*i*]PCNA2 showed that it exists as a tetrameric-ring. PCNA is a trimeric ring. Although this molecule, which forms a trimer, is unstable as a tetramer, the crystal structure forms a tetrameric-ring. Hydrogen bonds present in neighboring molecule, from Thr175 to Glu179 and Glu109 to Ile114, form a β -sheet. This flexible interaction suggests that the protein could be forming tetrameric-ring-shaped structure. The crystal structure of [i]Ap[/*i*]PCNA3 shows that the C-terminal contacts the cleavage site surrounded by β -sheets, formed behind the α -helices, and the inter-domain connecting loop between the neighboring trimeric-rings. Leu249 in the C-terminal is placed in the hydrophobic pocket formed by Met40, Leu47, Leu131, Pro228, Ala246, and Pro247 (Figure). Thus, this hydrophobic cleavage site may be a binding site for PIP-box motif containing proteins. The N-terminus of [i]Ap[/*i*]PCNA1 is approximately 10 residues longer than that of [i]Ap[/*i*]PCNA2 and [i]Ap[/*i*]PCNA3. This could be why the tripartite complex is not ring shaped. Moreover, Met16 is present downstream of the N-terminal of [i]Ap[/*i*]PCNA1. In the future, the effect of N-terminus deletion and binding of the DNA duplex on [i]Ap[/*i*]PCNA1 structure should be evaluated.

1) T. Yamauchi, [i]et al.[/*i*], Purification and Crystallization of PCNA from thermophilic archaea. Poster presented at: 138^[sup]th^[sup] Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan; Mar. 25-28, 2018; Kanazawa, JAPAN.

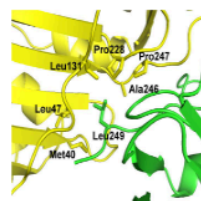


Figure 1

Structural Comparison of heterotrimer PCNA from Crenarchaeon *Aeropyrum pernix* by solution scattering, Cryo-EM, and Crystallography

T. Yamauchi^{1,2}, T. Takemori³, M. Kikuchi⁴, Y. Iizuka^{1,3}, S. Ishikawa³, M. Tsunoda^{1,3,4}

¹Grad. Sch. of Life Sci. and Tech., Iryo Sosei Univ., 5-5-1 Chuodai-Iino Iwaki, Fukushima Japan,

²Dept. of Pharm., Fukushima Rosai Hosp., 3 Numajiri Uchigo-Tsuzuramachi Iwaki, Fukushima Japan,

³Fac. of Pharm., Iryo Sosei Univ., ⁴Grad. Sch. of Sci. and Eng., Iryo Sosei Univ.

df2002@isu.ac.jp

Sliding clamps are ring-shaped proteins that encircle DNA and confer high processivity on DNA polymerases. In bacteria, the β -clamp protein forms a homodimer, whereas in eukaryotes or euryarchaeotes, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) proteins form homotrimers. However, PCNA from *Aeropyrum pernix* (ApPCNA), a crenarchaeote species, forms a heterotrimer. The actual structure of ApPCNA-mediated sliding clamps and the mechanism by which they slide along DNA is unknown. Previously, we have analysed the crystal structure of ApPCNA1 from the APE_0162 gene^[1], ApPCNA2 from the APE_0441.1, and ApPCNA3 from the APE_2182 genes^[2]. The present study aimed to analyse the crystal, solution structure and cryo-electron microscopy (cryo-EM) of the heterotrimeric ring of ApPCNA, examine its interaction with DNA and other proteins, and elucidate the mechanism of PCNA function.

Each ApPCNA molecule, which constitutes a heterotrimer, was expressed using the *Escherichia coli* expression system. The proteins were purified using heat treatment, ammonium sulfate precipitation, and column chromatography. The purified proteins were crystallized using the vapor-diffusion method and the crystals were analysed by X-ray diffraction. To verify the ring shape of ApPCNA2 in solution, the solution structure was analysed using size-exclusion chromatography-small-angle X-ray scattering (SEC-SAXS). A mixture of ApPCNA1-2-3 and ApPCNA2-3 were analysed by SEC-multi-angle light scattering for the presence of a complex, and the solution structure was analysed by SEC-SAXS. The mixture was analysed by cryo-EM, after purified with gel filtration chromatography.

The solution structure of the ApPCNA1-2-3 complex is similar to shape of the British Isles islands. ApPCNA2 and ApPCNA3 interact in a similar manner as the PCNA rings of other organisms; however, ApPCNA1 is located such that it did not form a perfect ring-shaped structure. The scattering curves of the complex and those of the model edited trimeric ring are almost similar with minor differences. The solution structure of ApPCNA2-3 complex was similar to shape of a naan. This particle contains four subunits rather than trimer. The electron density from cryo-EM forms hexagon.

The solution structure was not trimeric ring, containing ApPCNA1-2-3. The N-terminus of ApPCNA1 is approximately 10 residues longer than that of ApPCNA2 and ApPCNA3. This could be why the tripartite complex is not ring shaped. Moreover, Met16 is present downstream of the N-terminal of ApPCNA1. In the future, the effect of N-terminus deletion and binding of the DNA duplex on ApPCNA1 structure should be evaluated. The solution structure of ApPCNA2-3 complex was not trimeric ring too. In crystal structure of ApPCNA3, the C-terminus interacts between adjacent subunits, probably PIP-Box binding site. This interaction may cause ApPCNA2-3 Complex does not form ring shape. Generally, PCNA rings that consists of homotrimer have 3-fold symmetry, comprise six edges from concave edge between subunits and flat edge that formed PIP-Box binding site. This hexagonal electron density suggests ApPCNA1-2-3 forms trimeric ring in cryo-EM structure. Interestingly, one of the three edges is completely separated. The Fitting model containing ApPCNA1-2-3 hetero subunits suggests, the long N-terminus of ApPCNA1 cause this separated edge.

[1] Yamauchi, T., *et al.*, Purification and Crystallization of PCNA from thermophilic archaea. Poster presented at: 138 Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan; Mar. 25-28, 2018; Kanazawa, JAPAN.

[2] Yamauchi, T., *et al.*, Crystal and Solution structures of Proliferating Cell Nuclear Antigen from Crenarchaeon *Aeropyrum pernix*. Poster presented at: 70 Annual Meeting of the American Crystallographic Association; Aug. 2-7, 2020; Virtual.

Keywords: DNA Replication; PCNA

This research was partially supported by the National Project on Protein Structural and Functional Analysis by the MEXT of Japan. We are grateful to Professor T. Senda and the beamline scientists for support in data collection at PF, KEK-IMSS. We acknowledge Professor N. Shimizu and Dr. K. Yonezawa for collecting of SEC-SAXS data at PF, KEK-IMSS. We also acknowledge Dr. N. Adachi and Dr. M. Kawasaki for collecting of cryo-EM data at PF, KEK-IMSS.



2020 RCSB Protein Data Bank Poster Prize Winner

Takahiro Yamauchi

For

Crystal and Solution structures of Proliferating Cell Nuclear Antigen from *Cryptosporidium parvum*

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'BT', is positioned above the printed name of the president.

Brian H. Toby
2020 ACA President

August 20, 2020

Date