

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390012

研究課題名（和文） Rad18 タンパク質の多様な相互作用機構発現の構造基盤

研究課題名（英文） Structural Basis for diverse functions of the Rad18 protein

研究代表者

山縣 ゆり子（YAMAGATA YURIKO）

熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号：40183678

研究成果の概要：

様々な DNA の損傷に対して生物は DNA を修復する様々な仕組みをもっている。そのような DNA の修復に重要な Rad18 の働く仕組みを Rad18 相互作用するタンパク質や DNA との複合体の結晶化を行い Rad18/Rad6 複合体の結晶を得た。さらに Rad18 の SAP ドメインが複製フォーク様 DNA との結合に重要であることをドメインの構造モデルを構築することによって説明した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2008年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：生物物理化学・構造生物学

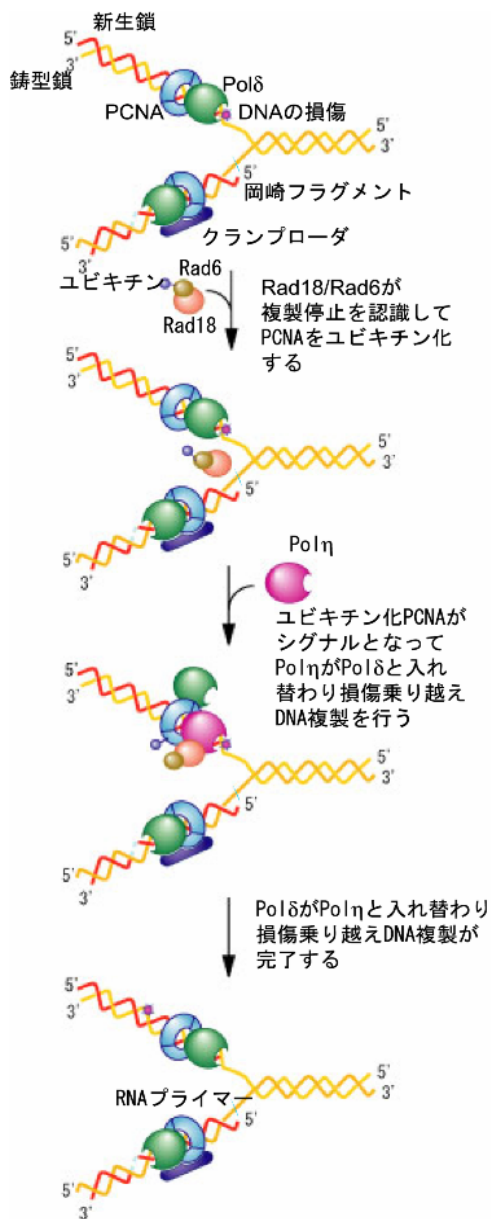
1. 研究開始当初の背景

地球環境下、DNA は常に損傷を受ける。そのため生物はすべての細胞に多様な DNA 修復機構を備えている。その1つに DNA 中に損傷が残っていても DNA 複製を可能にするいわゆる損傷寛容という仕組みがある。それにはいくつかの損傷乗り越え DNA ポリメラーゼが働くが、その中で特に『紫外線による皮膚癌（色素性幹皮症）と関係する重要な DNA ポリメラーゼ（Pol γ ）が働くためのシグナルが DNA 複製の足場タンパク質である PCNA のユビキチン化である』ことが熊本大学故山泉らによって明らかにされた。ヒト Rad18 タンパク質

（495 アミノ酸）はユビキチン結合酵素（E2）である Rad6 と複合体を形成し、損傷 DNA を認識し、PCNA をモノユビキチン化するユビキチンリガーゼ（E3）であり、Pol γ は Rad6/Rad18 による PCNA のモノユビキチン化と Rad18 との相互作用を通して DNA 損傷部位に近づき、損傷乗り越え DNA 複製が可能となると考えられる。

最近、我々は、Rad18が複製フォーク様DNAに強く結合することを見出した。この発見は、複製DNAポリメラーゼ（Pol γ ）がDNAの損傷部位で複製を停止したその状態を Rad18が認識してPCNAのユビキチン化する

という新しいモデル（次ページの図）を提唱できるものである。このモデルの超分子複合体の3次元構造レベルの構造解析が課題となっている。



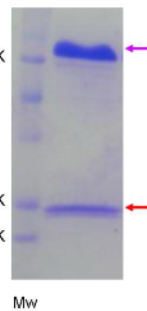
2. 研究の目的

- 1) Rad18 (分子量 5.6 万) / Rad6 (分子量 1.7 万) 複合体
 - 2) Rad18/Rad6 と Rad18 と強く結合することが明らかになった複製フォーク様 DNA (Y-DNA) との複合体
 - 3) Rad18/Rad6 と Pol 158C の Rad18 結合領域を含む C 末端ドメイン (556~713; Pol 158C) との複合体
- 以上の超分子複合体の結晶化を行い、分子量が7万を超えるような複合体タンパク質の立体構造決定に最も有効なX線結晶構造

解析法を用いて立体構造を明らかにし、それらの働く仕組みを原子レベルで理解する、すなわち、ダイナミックに動き、働くタンパク質の姿（スナップショット）を明らかにすることである。この結果を基に“真の損傷乗り越えDNA複製機構”を提案する。

3. 研究の方法

Rad18/Rad6 タンパク質複合体の結晶化のためのタンパク質試料の調製は、バキュロウイルス/SF9 細胞の系でそれぞれの遺伝子を共発現させ、はじめに、His タグをつけた Rad6 と Rad6 に結合する Rad18 を Ni カラムで精製した。次にイオン交換カラムとゲルろ過カラムを用いることによって、高純度 Rad18/Rad6 複合体を得ることができた。精製した Rad18/Rad6 複合体の SDS ポリアクリドアミド電気泳導の結果を左図に示す。上のバンドが Rad18、下のバンドが Rad6 である。得られた Rad18/Rad6 複合体を数 mg/ml に濃縮、結晶化のスクリーニングを行った。スクリーニングキットとして OptiMix™-1、OptiMix™-2、OptiMix™-3、OptiMix™-4 PEG、OptiMix™-5 Membrane の 5 種類を使用し、計 480 条件について、温度は 20 で行った。



次に結合が証明されている複製フォーク様 DNA フラグメントを委託合成、アニーリング法によって Y-DNA を調製し、Rad18/Rad6 複合体と 1 : 1 で混合し、Y-DNA/Rad18/Rad6 の 3 元複合体の結晶化のスクリーニングをほぼ Rad18/Rad6 複合体の結晶化と同様な方法で行った。

Pol 158C との 3 元複合体の結晶化のため、Pol 158C の大量調製をめざし、すでに作成した大腸菌中での発現ベクターを用いて可溶性分画への移行の確認後、Ni カラムで精製したが、タンパク質の分解が認められたので、分解しない条件の検討を行い、イオン交換カラムとゲルろ過カラムで精製した。完全には分解を抑える条件を見出すのは困難であったが、精製後、即座に Pol 158C/Rad18/Rad6 の 3 元複合体の結晶化を行った。

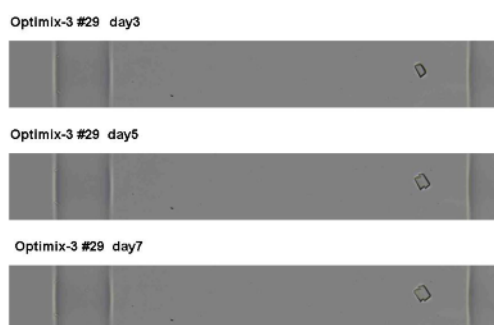
結晶化には主に、少量の試料で結晶化可能な微量タンパク質結晶化装置 Topaz システムを用いて自由界面拡散法で行った。また、最

も頻繁に利用される Crystal Screen I や II なども用いてハンギングドロップ蒸気拡散法による結晶化も平行して行った。

なお、Rad18/Rad6 複合体は、時間が経つと凝集を起こすことがあるので、サンプル調製は結晶化に合わせ随時行った。

4. 研究成果

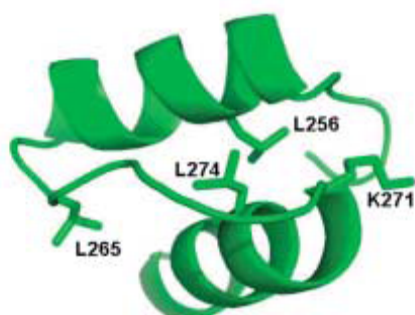
数多くのスクリーニング条件を用いて Rad18/Rad6 複合体の結晶化を行った結果、酢酸マグネシウムを沈殿剤とし、pH8.5 の条件で、下図のような結晶が得られた。



今後、X 線回折強度データの測定、Rad18 に含まれる Zn 原子の異常分散項を利用した多(単)波長異常分散法での X 線結晶構造解析に進む予定である。

Rad18/Rad6 複合体とフォーク様 DNA や Pol 158C との 3 元複合体については、結晶化のスクリーニングを行っているが、現在のところ、X 線結晶構造解析のための X 線回折実験に可能な結晶は得られていない。安定な 3 本鎖によるフォーク様 DNA や Pol 158C の調製について改善を試み、引き続き、3 元複合体の結晶化を行っている。

フォーク様 DNA の結合には Rad18 の SAP 領域の L256 と L274 が重要であることが、変異体実験から明らかになった。SAP 領域の 3 次元立体モデルをすでに解析されている SAP ドメインの立体構造を基にホモロジーモデリングによって作成してみると上図のように L256 と L274 はヘリックス間の疎水相互作用に関わっていること、すなわち、SAP ドメインの 2 本のヘリックス構造の安定化に



寄与していることが示唆された。したがって、このような構造がフォーク様 DNA の認識に重要であると説明できる(発表雑誌論文 3) このモデルの妥当性に関して、今後、Y-DNA/Rad18/Rad6 の 3 元複合体の X 線結晶構造解析で実証することが重要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the tumor necrosis factor - tumor necrosis factor receptor type 2 complex. Mukai Y, Nakamura T, Yoshioka Y, Tsunoda S, Kamada H, Nakagawa S, Yamagata Y, and Tsutsumi Y., *Acta Cryst.* **F65**, 295-298 (2009) 査読有
2. Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant. Mukai, Y., et al., and Yamagata, Y., Tsutsumi Y. 他 9 名, *J. Mol. Biol.*, **385**, 1221-1229 (2009) 査読有
3. Recognition of forked and single-stranded DNA structures by human RAD18 complexed with RADB protein triggers its recruitment to stalled replication forks. Tsuji, Y., Watanabe, K., Araki, K., Shinohara, M., Yamagata, Y., Tsurimoto, T., Hanaoka, F., Yamamura, K., Yamaizumi, M., and Tateishi, S. *Genes to Cells*, **13**, 343-354 (2008) 査読有
4. Preparation, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the DNA binding domain of the Ets transcription factor in complex with target DNA., Suwa, Y., Nakamura, T., Toma, S., Ikemizu, S., Kai H., and Yamagata Y., *Acta Cryst.*, **F64**, 171-174 (2008) 査読有
5. Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1 selective mutant of a TNF · antagonist. Shibata, H., et al., and Yamagata, Y., Tsunoda, S., Kamada, H., Tsutsumi Y. 他 22 名, *J. Biol. Chem.*, **283**, 998-1007 (2008) 査読有
6. Crystal structure of the IL-15-IL-15R complex, a

- cytokine-receptor unit presented in trans., Chirifu, M., Hayashi, C., Nakamura, T., Toma, S., Shuto, T., Kai, H., Yamagata, Y., Davis S.J., and Ikemizu, S., *Nature Immunol.*, **8**, 1001-1007 (2007) 査読有
7. Crystallographic Investigation of the Inhibition Mode of a VIM-2 Metallo-
-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* by a Mercaptocarboxylate Inhibitor., Yamaguchi, Y., Jin, W., Matsunaga, K., Ikemizu, S., Yamagata, Y., Wachino, J., Shibata, N., Arakawa, Y., and Kurosaki H., *J. Med. Chem.*, **50**, 6647-6653 (2007) 査読有
8. アルツハイマー病治療薬塩酸ドネペジルによるアセチルコリンエステラーゼの阻害機構、中村照也、山縣ゆり子、*医薬ジャーナル*, 43, No.5, 5-14 (2007) 査読無

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 機能未知であるヒト一回膜貫通型タンパク質の C 末ドメインの立体構造決定、山縣ゆり子、日本薬学会第 129 回年会 2009.3.26-28 京都
2. hMTH1 による 8-oxo-dGTP の基質認識と加水分解反応機構の構造学的基盤、稲里みゆき、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 (PPF2009)、2009.3.24 - 25、高槻
3. 中性子回折実験のための大型結晶作成の試み、山縣ゆり子、タンパク質結晶育成研究会、2009.3.5-6、東海村
4. 変異原ヌクレオチド分解酵素の反応機構解明、山縣ゆり子、第 32 回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2008.9.11-13、阿蘇
5. Structural insights into the substrate recognition and hydrolysis reaction mechanisms of 8-oxo-dGDPase. Takao Arimori, IUCr, 2008.8.23-31, Osaka
6. High resolution X-ray diffraction study of the hMTH1 mutant. Teruya Nakamura, IUCr, 2008.8.23-31, Osaka
7. Structural basis for transcriptional regulation mechanisms by the transcription factor Ets2. Yoshiaki Suwa, IUCr, 2008.8.23-31, Osaka
8. 8-oxo-dGDP 加水分解酵素における基質認識機構および反応機構の構造学的基盤、有森貴夫 (ポスター賞受賞)、第 8 回日本蛋白質科学会年会、2008.6.10-12、東

京

9. 蛋白質の立体構造から熱安定化機構と分子間相互作用を探索、山縣ゆり子、財団法人化学及血清療法研究所 KIKUCHI バイオセミナー、2008.5.16.、熊本
10. ヒト MTH1 蛋白質の機能解明に必須の高分解能 X 線結晶構造解析、山縣ゆり子、第 21 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、2008.1.12-14、草津
11. hMTH1 による 8-oxo-dATP の認識機構 山縣ゆり子、日本生物物理学会第 45 回年会、2007.12.21 - 23、横浜
12. STRUCTURE-BASED DESIGN OF INHIBITORS OF HUMAN MTH1 PROTEIN I, Yuriko Yamagata, The 8th Conference of the Asian Crystallographic Association, 2007.11.4-7, Taipei
13. Structure-function relationships of enzymes for oxidative nucleotide processing, Yuriko Yamagata, 2007 Frontier Research Symposium on Genome Stability in Control of Diseases and Aging at Fukuoka Dental College, 2007.10.29, Fukuoka
14. DNA 修復関連酵素による核酸塩基の正常と異常の識別に関する構造生物学的研究、山縣ゆり子、変異機構研究会・第 20 回夏の学校、2007.7.28-29. 名古屋
15. ゲノムの酸化損傷を抑制するタンパク質の構造生物学的研究、山縣ゆり子、独立行政法人医薬基盤研究所セミナー、2007.5.18 大阪

〔図書〕(計 1 件)

1. 2 章 X 線結晶構造解析法の展開
中村照也、山縣ゆり子、薬学分析科学の最前線 (日本薬学会物理系薬学部会・分析化学担当教員会議編) (株)じほう、29-33(2009)

6. 研究組織

- (1)研究代表者
山縣 ゆり子 (YAMAGATA YURIKO)
熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号：40183678
- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
なし