

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07376

研究課題名(和文) リンチ症候群発症機序の解明と創薬に向けたDNAミスマッチ修復蛋白質の構造機能解析

研究課題名(英文) Structural and functional characterization of DNA mismatch repair proteins for elucidation of the pathogenic mechanism of Lynch syndrome and drug discovery

研究代表者

福井 健二 (Kenji, Fukui)

大阪医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：00466038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：DNAミスマッチ修復系で中心的な役割を果たすMutLタンパク質の構造機能解析を行った。MutLはATPを加水分解することで構造変化し、DNAを切断するが、ATP加水分解とDNA切断の触媒機構は不明であった。本研究では、MutLのATPaseドメインのフリー・ADP結合型・ATP結合型の立体構造をX線結晶構造解析により明らかにし、また、多様な部位特異的変異体の作製とそれらの活性測定結果より、ATP加水分解のメカニズムを明らかにした。また、MutLのDNaseドメインについても、亜鉛・カドミウム・マンガン結合型の高分解能の構造をX線結晶構造解析により決定し、DNA切断の触媒機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MutL遺伝子におけるミスセンス変異はリンチ症候群の原因となり得る。しかし、病的な変異と中立な変異を区別する基準が不足していることが問題となっていた。今回、MutLのATPase活性とDNA切断活性の触媒メカニズム、つまりこれらの活性に必須の残基を明らかにしたことは、MutL遺伝子ミスセンス変異の病原性の判断に大きく貢献すると期待される。また、触媒メカニズムが明らかになったことで、ミスマッチ修復系を阻害する薬剤の開発が可能となった。

研究成果の概要(英文)：We characterized the MutL protein, which plays a central role in the DNA mismatch repair system. MutL undergoes a conformational change upon binding/hydrolyzing ATP, and cleaves mismatch-containing dsDNA. However, the catalytic mechanisms for ATP hydrolysis and DNA cleavage had remained unclear, which has been an obstacle in determining the pathogenicity of missense mutations in the mutL genes. In this study, the structures of the free, ADP-bound, and ATP-bound forms of the ATPase domain of MutL were determined by X-ray crystallography. Together with the results of kinetic analyses of the ATPase-mutant forms of the MutL, the catalytic mechanism for ATP hydrolysis was elucidated. The high resolution structure of the zinc-, cadmium-, and manganese-bound forms of the DNase domain of MutL were also determined by the X-ray crystallography, and the catalysis of the DNA cleavage MutL was elucidated to be performed by the two-metal-ion mechanism.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：ミスマッチ修復 MutL X線結晶構造解析 DNA修復 亜鉛 カドミウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA ミスマッチ修復系関連タンパク質の機能異常は、主要な遺伝性腫瘍症候群のひとつであるリンチ症候群の原因となりうる。このため、ミスマッチ修復系遺伝子の遺伝子診断が推奨されているが、病原性の判別が困難な臨床的意義不明変異の存在が問題となっている。

2. 研究の目的

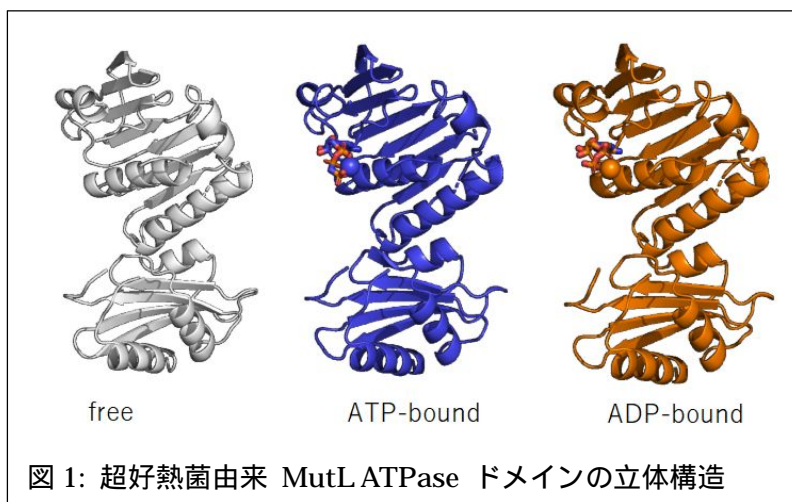
ミスマッチ修復系で中心的な役割を果たす MutL タンパク質の立体構造および機能を明らかにすることで、*mutL* 遺伝子上の変異がリンチ症候群発症につながる分子メカニズムを明らかにし、リンチ症候群の遺伝子診断基準の構築に貢献する。特に、MutL の ATPase 活性および DNA 切断活性のメカニズムが不明であったため、これらの活性の触媒機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

物理化学的解析に適した超好熱菌 MutL をモデル分子として、立体構造解析と酵素学的解析を行い、触媒メカニズムを明らかにした。ここで明らかになった触媒残基の、細胞内修復活性における役割については、高度好熱菌をモデル生物として検証した。最後に、同定された触媒残基が、ヒト由来 MutL においても同様に触媒に関わることを確認した。

4. 研究成果

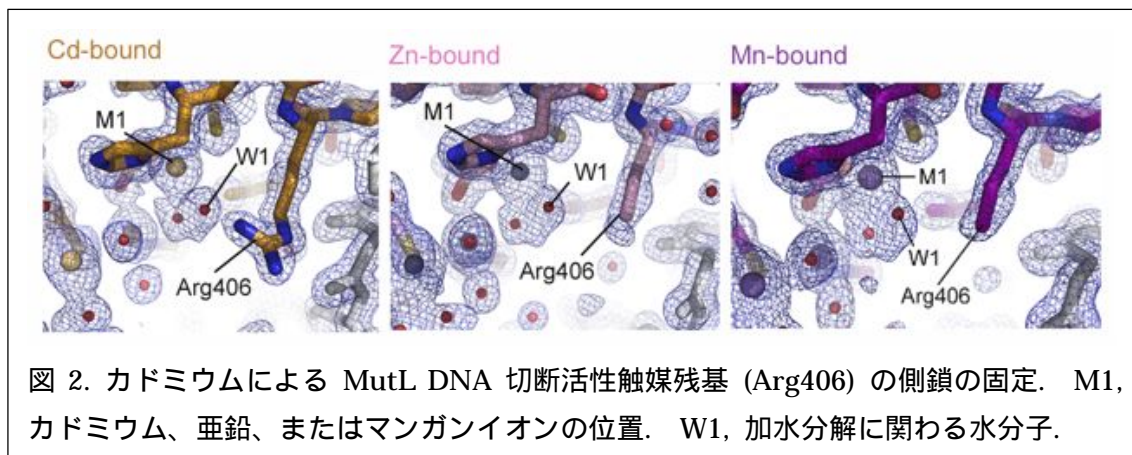
超好熱菌由来 MutL の ATPase ドメインを調製し、フリー・ADP 結合型・ATP 結合型の3種類の立体構造を X 線結晶構造解析により明らかにした(図1)。過去に報告されていた大腸菌 MutL と異なり、ATP 結合依存的な2量体化が観察されなかった。大腸菌 MutL には DNA 切断活性が無いことから、大腸菌 MutL は、他の生物種由来 MutL とは異なる特徴を持つと考えられた。よって、今回構造が得られた超好熱菌由来 MutL をモデル分子として今後の研究に用いることとした。



得られた立体構造に基づき、ATPase への関与が推定されるアミノ酸残基に変異を導入し、ATPase 活性を測定した。その結果、ATP 加水分解が一般塩基触媒によって触媒されることを見出し、一般塩基触媒、ルイス酸として触媒に関わる Lys 残基を同定した。これらのアミノ酸残基が細胞内ミスマッチ修復に必須であることを高度好熱菌をモデルとした相補試験により検証した。最後に、これらの残基に相当する部位に変異を導入するとヒト由来 MutL ホモログ (MLH1 および PMS2) の ATPase 活性が消失することを確認した。以上より MutL の ATPase 活性触媒メカニズムを解明した。

また、超好熱菌 MutL の DNA 切断ドメインを調製し、亜鉛・マンガン結合型の立体構造を X 線結晶構造解析により明らかにした。MutL は亜鉛を特異的に結合するが、その DNA 切断活性はマンガンによって活性化されるため、触媒金属は亜鉛結合部位とは別の箇所と結合すると推定されていた。しかし、今回の結果から、マンガンは亜鉛結合部位に亜鉛と置き換わる形で結合することが明らかになった。このことから、MutL は亜鉛を用いて DNA を切断していると考えられた。MutL による亜鉛結合は、DNA/RNA 切断酵素によくみられる two-metal-ion mechanism の結合様式に類似しており、MutL もこのメカニズムを採用している可能性が考えられた。そこで、MutL による切断産物を質量分析により解析した結果、MutL は切断部位の 5'末端にリン酸基を 3'末端にヒドロキシ基を残すように切断することが分かった。これは two-metal-ion mechanism による切断でよく見られる切断様式である。以上から、MutL は亜鉛を利用した two-metal-ion mechanism で DNA を切断すると結論した。

MutL はカドミウムによる阻害を受けることが知られていた。これによってミスマッチ修復活性が阻害されることがカドミウムによる変異原性の要因のひとつであると考えられる。しかし、カドミウムがなぜ MutL を阻害するのかは分かっていなかった。そこで MutL の DNA 切断ドメインのカドミウム結合型の立体構造を X 線結晶構造により明らかにしたところ、カドミウムは亜鉛と競合することが分かった。また、カドミウムは亜鉛と異なり、触媒部位近傍に位置する Arg 残基の側鎖を固定することが分かった (図 2)。この Arg に変異を導入すると、DNA 切断活性と細胞内ミスマッチ修復活性が消失することを確認した。カドミウムは、MutL の DNA 切断触媒残基のフレキシビリティを制限することで DNA 切断活性を阻害するものと考えられる。



以上のように、MutL の ATPase 活性と DNA 切断活性の触媒メカニズムを明らかにした。これらの結果は、mutL 遺伝子の遺伝子診断の基盤構築に貢献すると期待される。また、カドミウムにより MutL の阻害メカニズムを明らかにしたことで、カドミウムの変異原性の分子メカニズムのひとつを理解したと言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Izuhara Keisuke, Fukui Kenji, Murakawa Takeshi, Baba Seiki, Kumasaka Takashi, Uchiyama Kazuhisa, Yano Takato	4. 巻 295
2. 論文標題 A Lynch syndrome-associated mutation at a Bergerat ATP-binding fold destabilizes the structure of the DNA mismatch repair endonuclease MutL	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 11643 ~ 11655
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.013576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------