

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月20日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510063

研究課題名（和文）Ku タンパク質の DNA 二本鎖切断末端の認識・結合機構の解析

研究課題名（英文）Structural analysis of the interaction between the Ku protein and DNA

研究代表者

藤本 浩文 (FUJIMOTO HIROFUMI)

国立感染症研究所 放射能管理室 主任研究官

研究者番号：60373396

研究成果の概要（和文）：

DNA 修復酵素である Ku タンパク質の DNA 二本鎖切断末端認識・結合機構を、計算化学的手法および細胞生物学的手法を用いて解析した。Ku-DNA 間の結合力を推定可能な Ku-DNA 複合体の分子モデルを構築し、また、結晶構造解析において分子構造が不明な領域を補完した分子モデルを用いて、この領域に DNA との結合に重要な役割を果たすと考えられる部位がある事を明らかにした。また、これらの領域の機能を実際に確認するための Ku 欠損培養細胞を用いた新たな実験系も構築した。

研究成果の概要（英文）：

The binding mechanism of the repair enzyme, Ku, to the end of double strand DNA was examined by both computational and experimental techniques. Molecular models of Ku-DNA complex were constructed to estimate the binding energy between Ku and DNA, and amino acids that would interact with both DNA and Ku itself were identified. The new Ku-deficient cell line was established to investigate a detailed function of the predicted region.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,100,000	0	1,100,000
22年度	1,200,000	226,200	1,426,200
23年度	1,200,000	133,800	1,333,800
年度			
年度			
総計	3,500,000	360,000	3,860,000

研究分野：環境学

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：(1) DNA 二本鎖切断 (2) Ku (3) DNA 損傷認識 (4) 分子動力学シミュレーション

## 1. 研究開始当初の背景

放射線によって生じる DNA 損傷のうち、DNA 二本鎖切断 (DSB) は最も重篤な損傷の一つである。Ku はこの DSB を認識し DNA の切断末端に結合するタンパク質であり、Ku の結合を足がかりとして DNA-PKcs, XRCC4, XLF, Ligase IV 等の修復関連酵素が誘導され、DSB 修復の主要な経路の一つである non-homologous

end-joining (NHEJ) が開始されると考えられている。NHEJ における Ku 結合後のプロセスは生化学的・分子生物学的実験により詳細な報告がなされているが、その最も初期の段階である Ku がどのように DNA 末端を認識し、結合しているのかについては不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

ヒト Ku タンパク質は Ku70 と Ku80 の 2 つのサブユニットから構成されるヘテロダイマーであり、Ku タンパク質内部のリングを貫通する形で DNA と結合していることが結晶構造解析によって判明している。しかしながら、2 つのサブユニットのうち、DNA との結合に中心的な役割を果たしていると考えられている Ku70 の N、C 両末端側には、結晶構造中の位置が特定できない領域 (N 末端側 33 残基、C 末端側 71 残基) が存在する。このうち、Ku70 の C 末端側に存在する SAP ドメインは、X 線結晶構造解析において、Ku タンパク質が DNA と結合した場合、および結合していない場合の分子構造を比較すると、DNA と結合していない場合には結晶構造中の位置が判明しているにもかかわらず、DNA が結合するとその位置が特定できなくなる。また、電子顕微鏡像を用いた単粒子解析では、SAP ドメイン消失現象に加え、DNA の結合によって Ku タンパク質のリングが塞がれることも報告されている。これらの現象は、Ku70 の N、C 両末端領域が、Ku タンパク質と DNA との結合によって、その分子構造を変化させた可能性、すなわち、N 末端側は DNA と結合することで Ku のリングを塞ぐ位置に固定され、C 末端側では DNA と結合する際に SAP ドメインが Ku の中心部から離れた位置で DNA と相互作用するように移動した可能性を示唆している。また、この Ku70 の N、C 両末端領域は、その一部を欠損すると Ku タンパク質と DNA との結合能が著しく低下することが判明している。このことから、これらの領域が Ku タンパク質による DNA 切断末端認識・結合機構において重要な役割を果たしていることが示唆されるが、その具体的な機能を実験的手法を用いて確認することは、これらの領域が DNA と作用する部位が明らかになっていないため、困難であると考えられる。

本研究では、従来の実験的手法に加えて新たに分子シミュレーション等の計算化学的手法を導入することで、これら Ku70 の両末端領域がどのように DNA と相互作用し、Ku タンパク質と DNA の切断末端認識・結合機構に関与しているのかを明らかにしたいと考えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) Ku と DNA 複合体のモデリング

既報の結晶構造を元に Ku-DNA 複合体を設計した。まず、Ku70、Ku80 の各サブユニット中の N 末端側、C 末端側以外の構造が不明なアミノ酸 (Ku70: A224 - R230, Ku80: K171 - D180) を分子モデリングソフトウェア Molecular Operating Environment (MOE) を用いて補完した Ku ヘテロダイマーを設計し、既報の Ku-DNA 複合体の結晶構造 (PDB#: 1JEY) から座標を抽出した 14bp の DNA 断片を、Ku のリング内に配置した。Ku-DNA 複合体の結晶構造には Ku に作用する DNA の位置等を制限するために DNA の一端にヘアピン構造を付加する等の加工がなされて

いる。そこで、Docking simulation 用ソフトウェア Auto Dock 4.0 を用いて Ku と最も安定して結合できる DNA の位置を検索し決定した。得られた野生型の Ku-DNA 複合体モデルに対し、対象となるリジン残基をグルタミン置換、アルギニン置換、およびアセチルリジン置換した Ku-DNA 複合体モデルをそれぞれ作成した。アセチルリジン残基の力場パラメータは、分子軌道計算ソフトウェア GAUSSIAN 3.0 を用いてアセチルリジン残基周辺の電荷分布を計算し作成した。

次に Ku70 の N 末端側、C 末端側のアミノ残基を補完した Ku-DNA 複合体モデルを作成した。まず、リング内に配置した 14bp の DNA を 40bp まで延長し、単独の分子構造が NMR によって明らかにされている SAP ドメイン (PDB#: 1JJR) の座標を抽出して、DNA から 10 Å 程離して配置した。次に、SAP ドメインと Ku タンパク質本体との間のリンカー領域、および Ku70 の N 末端側のアミノ酸を MOE を用いて補完した。

#### (2) Ku-DNA 間の結合力の推定

各分子モデルに対して分子動力的 (MD) シミュレーションプログラム AMBER 8、および 9 を用いてナノ秒のオーダーで計算を行い、分子の挙動が安定した後、Ku-DNA 間の自由結合エネルギーを MM-PBSA 法を用いて推定した。

#### (3) ライブセルイメージング

Ku タンパク質の挙動を解析するために Ku を欠損した培養細胞系を樹立した。これまでハムスター *xrs-6* 細胞を元に樹立した Ku80 欠損培養細胞系を使用していたが、今回マウスの肺上皮から Ku70 欠損培養細胞系を新たに樹立し、蛍光タンパク質 EGFP を融合させた野生型および変異型の Ku タンパク質を細胞内で発現させ、レーザーを用いて局所的に誘発した DSB への Ku の集積をリアルタイムで観察した。

## 4. 研究成果

### (1) Ku と DNA との結合力の推定

実験から Ku70 のリング中のリジン残基がアセチル化されると Ku と DNA 間の結合が抑制される可能性が示唆されている。一般に、リジンのアセチル化を実験的に制御する事は難しく、グルタミン残基を擬似アセチルリジン残基のモデルとして、また、アルギニン残基を擬似非アセチル化リジン残基のモデルとして扱う事が多い。そこで実験結果と比較するために、野生型以外に対象となるリジン残基をグルタミン置換、アルギニン置換、およびアセチルリジン置換した Ku-DNA 複合体モデルをそれぞれ作成し、計算化学的手法を用いて Ku-DNA 間の結合力の推定を行った。その結果、グルタミン置換体では DNA との結合力が下がり、アルギニン置換体では結合力は低下しなかった。この結果は、既報の実験結果と完全に一致している。一方、これらのリジン残基をアセチル化しても DNA との結合力は低下しなかった。したがって、擬似アセチル化タンパク質のモデルとしてグルタミン置換体を用い



DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.07.018

〔学会発表〕(計6件)

小池学 "Molecular mechanisms of DNA double-strand break recognition process by NHEJ factor Ku in mammalian living cells", 第68回日本癌学会学術総会, 2009年10月1日, 神奈川.

小池学 「近紫外線レーザーマイクロ照射によるDNA修復酵素の挙動解析」, 第4回高崎量子応用研究シンポジウム, 2009年10月9日, 群馬.

藤本浩文 "Structural analysis of the interaction between the Ku protein and DNA", 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月11日, 神奈川.

藤本浩文 「計算化学的手法を用いたKuタンパク質とDNAの相互作用部位の構造解析」, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会(BMB2010), 2010年12月7日, 兵庫.

Fujimoto H "Structural analysis of the interaction between the Ku protein and DNA", The 14th International Congress of Radiation Research (ICRR2011), 2011年8月31日, Warsaw, Czech republic.

小池学 「がん細胞への放射線作用とDNA修復機構」, 昭和大学腫瘍分子研セミナー, 2011年10月17日, 東京.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤本 浩文 (FUJIMOTO HIROFUMI)

国立感染症研究所・放射能管理室・主任研究官

研究者番号: 60373396

### (2) 研究分担者

小池 学 (KOIKE MANABU)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線障害研究グループ・主任研究員

研究者番号: 70280740

### (3) 連携研究者

作道 隆 (SAKUDOH TAKASHI)

国立感染症研究所・放射能管理室・主任研究官

研究者番号: 70455393

土田 耕三 (TSUCHIDA KOZO)

国立感染症研究所・放射能管理室・室長

研究者番号: 40231435