

機関番号：14603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770113

研究課題名（和文） 早老症疾患ヘリカーゼによる染色体交差解消機構の構造研究

研究課題名（英文） Structural study of the chromosomal crossing-over resolution by the progeroid syndrome helicases

研究代表者

北野 健（KITANO KEN）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：40346309

研究成果の概要（和文）：

本研究では、早老症疾患の原因となるゲノム維持タンパク質や、細胞内へのシグナル伝達で重要な働きをするタンパク質複合体を対象として、構造生物学の研究を行った。ウェルナー症候群 WRN ヘリカーゼの RQC ドメインと二本鎖 DNA の複合体、ブルーム症候群 BLM ヘリカーゼの HRDC ドメイン、三量体 G タンパク質とその特異的阻害剤 YM-254890 の複合体など、生物学的かつ医学的に重要な立体構造を決定することが出来た。

研究成果の概要（英文）：

Structural studies of the proteins that are associated with human accelerated-aging diseases and the proteins that function in the cell signaling pathway, have been performed. Three-dimensional structures of the “RQC domain of Werner syndrome WRN helicase in complex with double-stranded DNA”, “HRDC domain of Bloom syndrome BLM helicase”, and the “heterotrimeric G protein in complex with its specific inhibitor YM-254890” have been determined. These new structures offered insights into the field of biology and medicine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：タンパク質，X線結晶構造解析，ヘリカーゼ，ウェルナー症候群，ブルーム症候

群, 三量体 G タンパク質, 阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

ウェルナー症候群とブルーム症候群は、常染色体劣性の遺伝病である。前者は、若くして全身の老化が進む早老症の病状、後者は、若年期における悪性腫瘍（がん）の頻発を特徴とする。いずれも治療法のない難病だが、発症の原因はすでに明らかにされている。すなわちそれぞれ、WRN ヘリカーゼ (Werner syndrome protein) と BLM ヘリカーゼ (Bloom syndrome protein) に変異が起り、機能欠損してしまうことが原因である。

WRN と BLM は、二本鎖 DNA を一本にほどこく（巻き戻す）ヘリカーゼの一種で、互いに相同性を持ったタンパク質である。全ての真核生物にホモログが確認されており、RecQ ヘリカーゼファミリーと呼ばれる。最近、RecQ ファミリーが、染色体の随所に生じる DNA 二本鎖切断（DSB: double stranded break）の修復や、染色体末端を保護しているテロメア DNA の維持に働いていることが発見され、世界的な注目を集めている。

WRN と BLM は、約 1,400 アミノ酸からなる大きなマルチドメインタンパク質である。モーターとして働く ATPase ドメインに加えて、C 末に特徴的に保存された RQC (RecQ C-terminal) ドメインと HRDC (helicase-and-ribonuclease DC-terminal) ドメインとよばれる領域を有している。研究代表者は、これらふたつのドメインに、RecQ ファミリーだけが有する特殊なヘリカーゼ活性の仕組みが隠されていると考え、その構造研究に取り組んできた。2007 年には、WRN HRDC ドメインの立体構造を初めて決定することに成功したが (Kitano *et al.*, 2007, *J. Biol. Chem.*, 282, 2717.), 病気の発症機構を理解するのに不可欠な、ヘリカーゼ反応の仕

組みは不明のままであった。

## 2. 研究の目的

本研究では、WRN に特徴的なもうひとつの領域、RQC ドメインに着目した研究を行った。また、これまでの WRN 研究で培ったノウハウを活かして、新たに BLM の構造研究に取り組んだ。さらに、細胞内シグナル伝達で重要な働きをする、三量体 G タンパク質 (heterotrimeric G protein,  $G \cdot q \cdot \cdot$ ) と、その特異的阻害剤として知られる環状ペプチド誘導體 YM-254890 との複合体 X 線構造解析にも取り組んだ。

## 3. 研究の方法

WRN の研究では、クロマトグラフィーで高純度に精製したヒト WRN RQC ドメインに、合成した二本鎖 DNA を加えて複合体を形成させた。このタンパク質試料に様々な沈殿剤試薬を加えて、結晶化条件の検討を行った。得られた複合体結晶を兵庫県の大型放射光施設スプリング-8 に持ち込み、高輝度 X 線を照射して X 線回折データの測定を行った。また構造解析の計算に必要な位相情報を決定するために、結晶に水銀試薬 (EMP: ethyl mercuric phosphate) をソーキング法で浸透させて、重原子同型置換体の結晶を作成した。この結晶は同じくスプリング-8 の高輝度 X 線を使って、多波長異常分散法 (MAD: multi wavelength anomalous dispersion) によるデータ測定を行った。

BLM の研究では、まずコンピュータを用いて、ヒト BLM のドメイン領域の推定作業を行った。ここでは、以前に決定した WRN HRDC ドメインの立体構造が役立った。この結果をもとに、BLM HRDC ドメインをコードする cDNA を PCR 法で切り出し、いくつかの発現プラスミドを作成した。プラスミドを大腸菌に導入することによってタンパク

質を大量発現させ、次いでクロマトグラフィーによる精製をおこなった結果、高純度な BLM HRDC 試料を調製することができた。

三量体 G タンパク質阻害剤 YM-254890 複合体の研究では、ポリエチレングリコール (PEG 4,000) を沈殿剤に用いることによって、複合体の棒状結晶を得ることができた。しかしこの結晶にX線を当てたところ、結晶の *c* 軸方向の異方性が非常に高かったため、構造解析に十分な質の回折データを収集することはできなかった。そこで結晶化条件とクライオ (結晶凍結) 条件の綿密な検討を行い、分解能の向上を目指してスプリング-8 でのX線回折実験を繰り返した。この結果、最終的に分解能 2.9 オングストロームのネイティブデータセットを収集することに成功した。

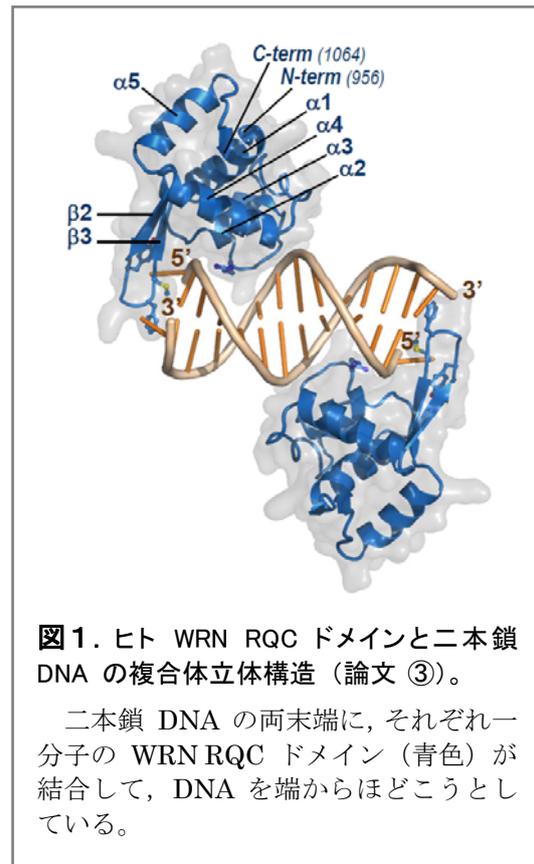
得られたX線データは、Linux ワークステーションおよびパーソナルコンピュータを用いて解析し、電子密度マップの計算やタンパク質立体構造モデルの構築作業を行った。

#### 4. 研究成果

本研究によってまず、ウェルナー症候群 WRN RQC ドメインと二本鎖 DNA の複合体構造を、分解能 1.9 オングストロームで決定することができた (図 1)。これは RecQ ファミリー初の DNA 複合体構造であるだけでなく、Winged-Helix ドメインと呼ばれる構造モチーフが、DNA の巻き戻しに使われていることを示した世界初の構造である。本結晶構造から、WRN が RQC ドメインにある尖ったヘアピン構造を、“DNA 鎖分離ナイフ” としてヘリカーゼ反応に利用しているなど、数々の新事実が明らかとなった。本研究成果は、米国の科学雑誌に論文発表するとともに (雑誌論文 ③)、国内や海外の研究会で発表した。

次に、ブルーム症候群 BLM HRDC ドメインのX線構造解析を行うために、その結晶

化を試みたが、どうしても結晶を得る



ことができなかった。BLM HRDC ドメインの分子形状を、ゲルろ過クロマトグラフィー、分析用超遠心などを使って調べてみたところ、熱安定性に優れた単量体であることが分かった。そこで、溶液 NMR 法による構造解析へと手法を切り換えた。M9 最小培地を使った大腸菌培養によって、<sup>15</sup>N および <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C 同位体標識した NMR 用試料の調製を行った。首都大学東京のグループの協力を得て、測定を行った結果、良好な NMR スペクトルが観測され、BLM HRDC ドメインの立体構造を決定することができた (図 2)。

この BLM HRDC 立体構造からは、多くの酸性アミノ酸がドメインの分子表面に露出しているなど、ウェルナー症候群 WRN HRDC ドメインとは異なる特徴が明らかとなった。また同ドメインが、これまでの定説に反して、DNA と直接の相互作用をほとんど示さないことも判明した。これらの研究成果

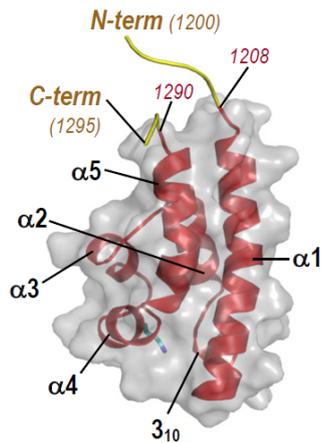


図2. ヒト BLM HRDC ドメインの立体構造 (論文 ①)。

5本の $\alpha$ ヘリックスと1本の $3_{10}$ ヘリックスの折れたたみによって、コンパクトなドメインが形づくられている。

をまとめて、国際科学雑誌に論文発表するとともに(雑誌論文 ①)、国内や海外の研究会で発表した。

さらに、三量体 G タンパク質 ( $G \cdot \alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ ) と、阻害剤 YM-254890 の複合体立体構造を、分解能 2.9 オングストロームで決定することにも成功した(図 3)。三量体 G タンパク質は、細胞膜直下において、Gタンパク質共役受容体 (GPCR ; heterotrimeric G protein-coupled receptor) とペアで働く、細胞で最も重要なシグナル伝達分子の一つである。

本結晶構造によって、YM-254890 がまるで“くさび”のようにタンパク質 ( $G \cdot \alpha$ ) のドメイン間に挟まって、その運動を阻害するという、新しい阻害剤作用の仕組みを明らかにすることができた。同研究成果は、国際科学雑誌に論文発表するとともに(雑誌論文 ②)、国内の研究会などで発表した。今後、本結晶構造を応用することによって、心筋梗塞、脳梗塞、がんなどの治療薬開発に向けた、ドラッグデザイン (SBDD: Structure-Based Drug Design) の研究が進むことが期待される。

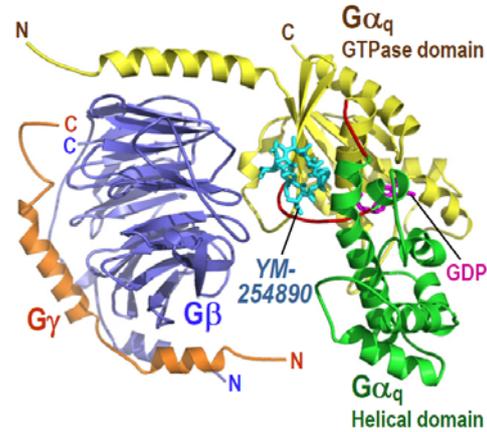


図3. 三量体 G タンパク質  $G\alpha_q\beta\gamma$  と特異的阻害剤 YM-254890 の複合体立体構造 (論文 ②)。

三量体 G タンパク質は、 $G\alpha$  (黄色と緑色)、 $G\beta$  (紺色)、 $G\gamma$  (オレンジ色) の3つのサブユニットから形成される、ヘテロ複合体である。YM-254890 は GDP (紫色) からやや離れた場所で、 $G\alpha$  のふたつのドメイン (黄色の GTPase ドメインと緑色のヘリカルドメイン) と、それらをつなぐ2本のリンカー (赤色) の間のポケットに、突き刺さるように結合していた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件、すべて査読有)

- ① Sato, A., Mishima, M., Nagai, A., Kim, SY., Ito, Y., Hakoshima, T., Jee, JG., Kitano, K. (2010). "Solution structure of the HRDC domain of human Bloom syndrome protein BLM." *J. Biochem.*, 148(4), 517-525.
- ② Nishimura, A.\*, Kitano, K.\*, Takasaki, J., Taniguchi, M., Mizuno, N., Tago, K., Hakoshima, T., Itoh, H. (*\*Both authors equally contributed*) (2010). "Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric  $G_q$  protein by a small molecule." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107(31), 13666-13671.

- ③ Kitano, K., Kim, S.Y., Hakoshima, T. (2010). "Structural basis for DNA strand separation by the unconventional winged-helix domain of RecQ helicase WRN." *Structure*, 18(2), 177-187.
- ④ Terawaki, S., Kitano, K., Mori, T., Zhai, Y., Higuchi, Y., Itoh, N., Watanabe, T., Kaibuchi, K., Hakoshima, T. (2010). "The PHCCEX domain of Tiam1/2 is a novel protein- and membrane-binding module." *EMBO J.*, 29(1), 236-250.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 北野 健 "環状ペプチドによる三量体Gタンパク質の阻害機構" 日本学術振興会 169 委員会 第 37 回研究会, 2011. 12. 13, ゆうぼうと, 東京.
- ② 北野 健 "三量体Gタンパク質の構造生物学と環状ペプチドのドラッグデザイン" 包括脳ネットワーク研究会・蛋白研セミナー共催セミナー, 2011. 11. 22, 岡崎コンファレンスセンター.
- ③ Kitano, K., Kim, S.Y., Hakoshima, T. "Structural study of Werner syndrome DNA helicase." *The EMBO Meeting*, 2011. 09. 12, Vienna, Austria.
- ④ Kitano, K. "Structural biology of human RecQ DNA helicases." *The 2nd International Conference on Pharmacy and Advanced Pharmaceutical Sciences*, 2011. 07. 19, Yogyakarta, Indonesia.
- ⑤ 森 智行, 北野 健, 箱嶋敏雄 "微小管+端集積因子、EB1-CLASP の複合体結晶構造解析" 第 11 回 日本蛋白質科学会年会, 2011. 06. 07, ホテル阪急エキスポパーク, 大阪.
- ⑥ 北野 健 "タンパク質のかたちから探る病気のしくみ" 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 成果公開発表会, 2011. 02. 05, 大阪科学技術センター.
- ⑦ 北野 健 "早老症ヘリカーゼによるゲノム維持機構の構造研究" 茨城県中性子利用促進研究会 平成 22 年度第 1 回生命物質構造解析研究会, 2010. 05. 26, いばらき量子ビーム研究センター.
- ⑧ 森 智行, 北野 健, 箱嶋敏雄 "+TIPs, EB1-CLASP 複合体結晶構造解析" 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 12, パシフィコ横浜.
- ⑨ 寺脇慎一, 北野 健, 森 智行, 樋口芳樹, 伊藤教道, 渡辺 崇, 貝淵弘三, 箱嶋敏雄 "The PHCCEX domain of Tiam1/2 is a novel protein- and membrane-binding module." 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 09, パシフィコ横浜.
- ⑩ 西村明幸, 北野 健, 高崎 淳, 谷口昌要, 水野憲一, 多胡憲治, 箱嶋敏雄, 伊東 広 "Structural basis of a novel targeting site for the specific inhibition of heterotrimeric G proteins." 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 09, パシフィコ横浜.
- ⑪ 寺脇慎一, 北野 健, 森 智行, Zhai Yan, 樋口芳樹, 伊藤教道, 渡辺 崇, 貝淵弘三, 箱嶋敏雄 "Tiam1/2 の PHCCEX ドメインによる新規な細胞膜認識機構の構造生物学研究" 特定領域研究「生体超分子構造」第 6 回公開シンポジウム, 2009. 12. 02, 千里ライフサイエンスセンター.
- ⑫ 森 智行, 北野 健, 箱嶋敏雄 "+TIPs, EB1-CLASP 複合体結晶構造解析" 特定領域研究「生体超分子構造」第 6 回公開シンポジウム, 2009. 12. 02, 千里ライフサイエンスセンター.
- ⑬ 森 智行, 北野 健, 箱嶋敏雄 "+TIPs, EB1-CLASP 複合体結晶構造解析" 特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第 5 回ワークショップ, 2009. 07. 27, 湘南国際村センター.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北野 健 (KITANO KEN)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：40346309