

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291017

研究課題名(和文) DNAの傷を直さずに複製を続ける構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis for molecular interactions in DNA damage tolerance

研究代表者

橋本 博 (HASHIMOTO, HIROSHI)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：40336590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：私たちのDNAは一日に何万もの塩基が損傷を受ける。DNA複製中に生じた損傷は、複製ポリメラーゼを停止させてしまい、その結果、細胞死やがん化など、細胞にとって概ね好ましくない状況になる。このような場合、細胞はDNA損傷による複製停止を回避するために、「損傷トレランス」と呼ばれる仕組みによってDNA複製を継続する。損傷トレランスには、2つの経路、「損傷乗り越え合成」と「テンプレートスイッチ」が知られている。本研究では、DNA損傷を修復せずにDNA複製を続ける「損傷トレランス」の分子メカニズムを、タンパク質のX線結晶構造解析と構造に基づく機能解析によって解明し、さらに新たな創薬戦略の構造基盤を得た。

研究成果の概要(英文)：DNA damage occurs both naturally and artificially. Damaged template DNA blocks accurate and processive DNA synthesis by replicative DNA polymerases, resulting in genomic instability which causes various diseases including cancer. To avoid replication arrest and to restart DNA synthesis, cells initiate DNA damage tolerance (DDT). DDT is divided into two pathways, translesion DNA synthesis (TLS) and template-switched DNA synthesis (TS). TLS is transient DNA synthesis using a damaged template by error-prone DNA polymerases specialized for DNA damage. TS, in which one newly synthesized strand is utilized as an undamaged template for replication by replicative polymerases, is an error-free process. In this study, we performed structural analyses by x-ray crystallography and structure-based functional analyses of proteins involved in DDT, thereby clarifying the structural basis for molecular interactions in DDT. Our results could provide a clue to develop novel drugs for cancer therapy.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

私たちの DNA は一日に何万もの塩基が損傷を受けるが、それらの損傷塩基は正常に修復され、ゲノムの恒常性が維持されている。しかし、DNA の複製中に生じた損傷を修復する機構は知られていない。DNA の複製中に生じた損傷は、複製ポリメラーゼを停止させてしまい、その結果、細胞死やがん化など、細胞にとって概ね好ましくない状況になる。このような場合、細胞は DNA 損傷による複製停止を回避するために、「損傷トレランス」と呼ばれる仕組みによって DNA 複製を継続する。損傷トレランスには、2つの経路、「損傷乗り越え合成」と「テンプレートスイッチ」が知られている (図 1)。

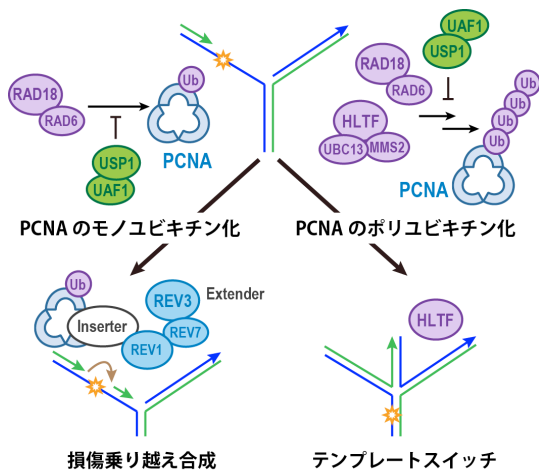


図 1 DNA 損傷トレランス

損傷乗り越え合成は、複数の損傷乗り越えポリメラーゼによる損傷塩基を鋳型にした一時的な DNA 合成である。一方、テンプレートスイッチは、すでに合成された無傷の相補鎖を鋳型にした DNA 合成であり、複製フォークの一時的な後退という相同組換えに類似した複雑な鎖交換反応を伴う。上記 2つの経路は、DNA クランプ分子である PCNA のユビキチン化の程度によって制御されている。PCNA がモノユビキチン化されると、Inserter (インサーター) と呼ばれる DNA ポリメラーゼと Extender (エクステンダー) と呼ばれる REV3 を含む DNA ポリメラーゼ複合体 (REV1-REV7-REV3 複合体) によって損傷乗り越え合成が行われる。一方、PCNA がポリユビキチン化されるとテンプレートスイッチが起こる。また、DNA 損傷が無い状態では、脱ユビキチン化酵素 USP1 (USP1-UAF1 複合体) によって PCNA のユビキチン化は抑制されている (図 1)。損傷トレランスに関わるタンパク質のほとんどは発がんとの関係が示唆されており、重要な細胞機能を担っていると考えられるが、損傷トレランスの分子メカニズムは未だ多くの点で解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は、DNA 損傷を修復せずに DNA 複製を続ける「損傷トレランス」の分子メカニズムを、タンパク質の X 線結晶構造解析によって構造生物学的に明らかにすることを目的とする。さらに、損傷トレランスを標的とした全く新しい抗がん剤開発の構造基盤を得ることを目指す。損傷トレランスは、複製中に生じた DNA 損傷をやり過ごす重要な細胞機能である。しかし一方では、損傷トレランスは、がん細胞がシスプラチンなどの DNA 損傷を起こす抗がん剤に抵抗性を持つ原因である。従って、損傷トレランスの分子メカニズムを原子レベルで理解することで、損傷トレランスにおける分子間相互作用を標的とした新規抗がん剤のリード/シード化合物の創出が期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、1) PCNA-阻害化合物複合体の構造研究、2) 損傷乗り越え合成におけるアダプタータンパク質 REV7 の構造研究、3) テンプレートスイッチに関わる HLTf の構造研究を行った。目的タンパク質を大腸菌の発現系を用いて大量発現させ、各種クロマトグラフィーによって精製した。精製タンパク質を濃縮し、結晶化スクリーニングによって X 線回折実験に適した結晶を得た。得られた結晶は放射光実験施設において、X 線回折強度データを収集した。対象タンパク質の類似構造が既知の場合は分子置換法、対象タンパク質の構造が新規の場合は異常分散法を用いて構造解析を行った。また、得られた構造に基づく部位特異的変異体を用いた機能解析を行った。

4. 研究成果

1) PCNA-阻害化合物複合体の構造研究

PCNA はリング状のホモ三量体を形成し、中央の孔で二本鎖 DNA と結合することで DNA 合成の足場となるタンパク質である。損傷乗り越えポリメラーゼはモノユビキチン化された PCNA に結合することで損傷部位にリクルートされることから、損傷乗り越えポリメラーゼと PCNA との相互作用を阻害する化合物は新規抗がん剤開発の手かかりとなる。

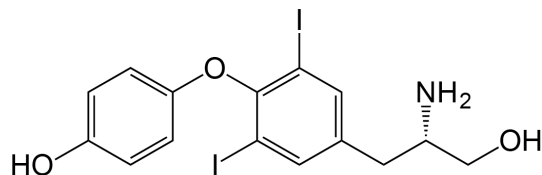


図 2 PCNA 阻害剤 T2AA の化学構造

本研究では、米国 St. Jude Children's Research Hospital の Fujii 博士らが開発した新規 PCNA 阻害化合物 T2AA (図 2) と PCNA

との複合体の結晶化に成功し、X線結晶構造解析によって立体構造と相互作用を明らかにした(図3)(発表論文③)。

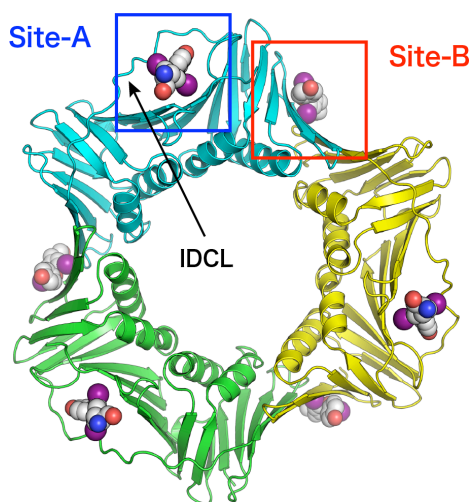


図3 PCNA-T2AA 複合体の構造

PCNA と相互作用するタンパク質は PCNA の IDCL と呼ばれる部分に結合することが知られている。すでに研究代表者らは Fujii 博士と共同で化合物 T3 が PCNA の IDCL に結合し、PCNA のタンパク質間相互作用を阻害することを明らかにしている (Punchihewa *et al.* *JBC*, 2012)。今回、T2AA との複合体の構造解析によって、T2AA が T3 と同様に IDCL (Site-A) に結合するとともに、第二の結合部位として PCNA のサブユニット境界近傍 (Site-B) に結合することが明らかになった (図3)。PCNA のこの部分に結合する分子はこれが初めての例である。興味深いことに、Site-B は PCNA のユビキチン化部位に隣接していた。さらに、Fujii 博士らの相互作用解析によって、T2AA は PCNA のモノユビキチン化は阻害しないが、モノユビキチン化 PCNA にリクルートされる損傷乗り越えポリメラーゼとの相互作用は阻害することが示された。したがって、本成果は損傷乗り越えポリメラーゼのみを選択的に阻害する化合物の設計が可能であることを示しており、本研究によって、損傷乗り越え合成を標的とする新たな創薬戦略の構造基盤を得た。

2) 損傷乗り越え合成におけるアダプタータンパク質 REV7 の構造研究

損傷乗り越え合成はインサーターとエクステンダーとの共同作業で行われる。すでに研究代表者らは、REV1-REV7-REV3 三者複合体の構造解析によって、エクステンダーである REV7-REV3 複合体 (Po1 ζ) が REV1 を介した相互作用で損傷部位にリクルートされるメカニズムを明らかにしている (Kikuchi *et al.*, *JBC*, 2012)。本研究では、インサーターの1つであるヒト Po1 κ のペプチドを用い、Po1 κ ペプチドが REV1-REV7-REV3 複合体に結合した四者複合体の結晶化に成功し、X線結

晶構造解析によって、その立体構造と相互作用を明らかにした (学会発表④)。

また、岡山大学の国枝教授らは、REV7 が生殖細胞の発生に関与し、REV7 に C70R 変異を持つマウスは完全な致死ではなく、アダルトまで成長するものの、生殖細胞が完全に欠損するという興味深い表現型を示すことを見出している。本研究では、国枝教授らと共同で、REV7-REV3 複合体の立体構造に基づく REV7 C70R 変異体の相互作用解析を行い、C70R 変異の機能を明らかにした (図4)(発表論文④)。REV7-REV3 の構造から、REV7 の Cys70 は「シートベルト」と呼ばれる REV7 自身の C 末端領域とファンデルワールス相互作用を形成し、パートナーである REV3 が結合した「閉じた構造」を安定化している (図4A)。したがって、Cys70 がアルギニンに変異した REV7 C70R 変異体は自身のシートベルトとの相互作用が阻害され、REV3 と安定な複合体を形成できないと予想された。REV7 C70R 変異体を用いた相互作用解析から、立体構造から予想した通り REV7 C70R 変異体は REV3 との相互作用が著しく弱まること明らかになった (図4B)。このことから、REV7-REV3 複合体の形成が生殖細胞の発生に重要であり、REV7-REV3、すなわち Po1 ζ の発生過程における新たな機能が示唆された。

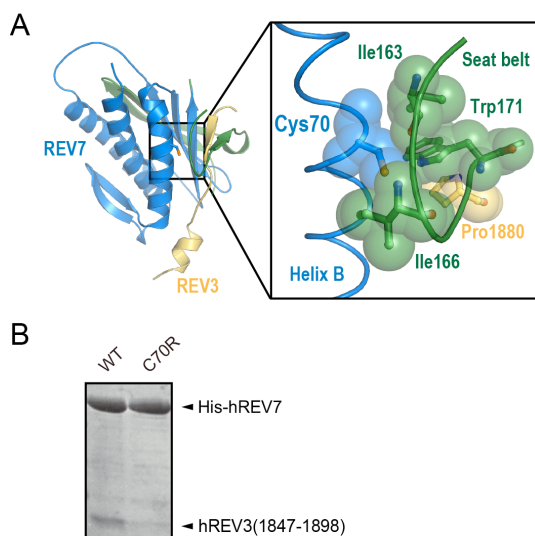


図4 A: Cys70 周辺の構造

B: REV7(C70R) 変異体の相互作用解析

損傷乗り越え合成のアダプタータンパク質である REV7 (別名 Mad2L2) は細胞周期制御にも関わることが知られている。その REV7 の機能を標的とし、赤痢菌の産生するエフェクタータンパク質である IpaB は REV7 に結合し、上皮細胞の細胞周期を遅延させることで、効率的に感染することが報告されている (Iwai *et al.*, *Cell*, 2007)。本研究では、REV7-REV3 複合体における REV3 のアミノ酸配列を IpaB に似せた REV3 を作製し、REV7 との複合体の構造解析と相互作用解析を行い、

REV7 と IpaB との相互作用を考察した (学会発表①⑤⑥)。

3) テンプレートスイッチに関わる HLTf の構造研究

テンプレートスイッチは損傷の無い新生 DNA 鎖を鋳型として用いた DNA 合成であり、DNA 損傷によって停止した複製フォークを後退させるために、相同組換えに似た DNA の大きな構造変化を伴う。そのメカニズムはほとんど分かっていないが、ユビキチンリガーゼ活性と DNA ヘリカーゼ活性を併せ持つ HLTf が重要な働きを担っていると考えられている。本研究では、HLTf の N 末端に位置する新規 DNA 結合ドメインに関して、その立体構造と機能を明らかにした (発表論文①②、学会発表③)。

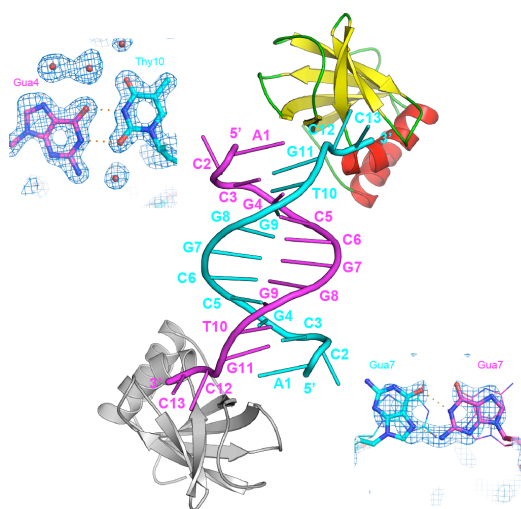


図5 DNAに結合した HLTf N末端ドメインの構造

すでに研究代表者らは、DNA が結合した本ドメインの構造解析に成功しており、HLTf の DNA 結合ドメインが典型的な OB フォールドをとることがわかっていた。今回は、より高分解能 (1.38 Å 分解能) での立体構造を決定し (図5)、構造に基づく部位特異的変異体を用いた相互作用解析を行った (図6)。その結果、生物種間で保存された Tyr72 と Tyr93 が DNA 塩基とスタックしており、DNA 結合に重要であることが明らかになった。

また、本研究では DNA 結合ドメイン単独の構造解析にも成功した (図7)。そこで、DNA 複合体構造と比較した結果、DNA 結合に伴う構造変化はほとんど見られなかった。2010年7月、NMR を用いて決定された HLTf DNA 結合ドメイン単独の構造がプロテインデータバンクに登録されている (PDB ID: 2L1I)。その構造と今回得られた構造を比較したところ、両者は全く異なっており、登録されている構造 (PDB ID: 2L1I) が間違っていることが明らかになった。研究代表者らが本研究に関する論文発表を行った後、2つのグループ

が独立に同じ DNA 結合ドメインの構造を報告しているが、それらは研究代表者らが決定した構造と本質的に同一であり、本研究成果が支持された (Kile *et al.*, *Mol. Cell*, 2015; Achar *et al.*, *NAR*, 2015)。なお、2016年6月、登録されていた構造 (PDB ID: 2L1I) は新しい構造に更新されており、その新たに登録された構造 (PDB ID: 5K5F) は、2015年に研究代表者らが報告した構造と同一であった。

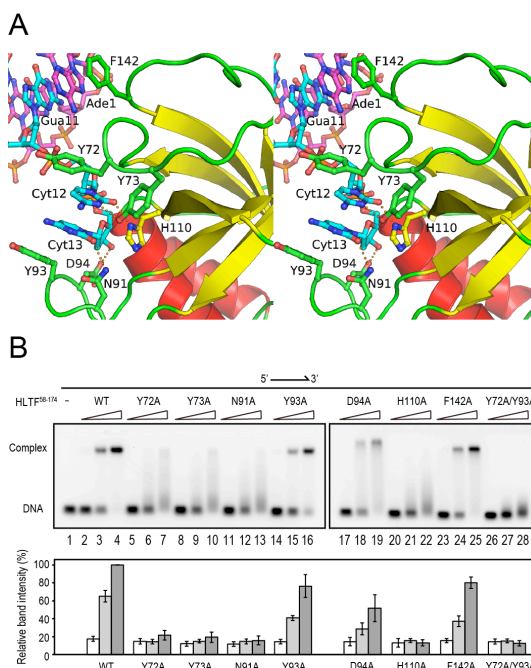


図6 A: DNA 複合体構造の詳細 (ステレオ図)
B: HLTf 変異体を用いた DNA との相互作用解析

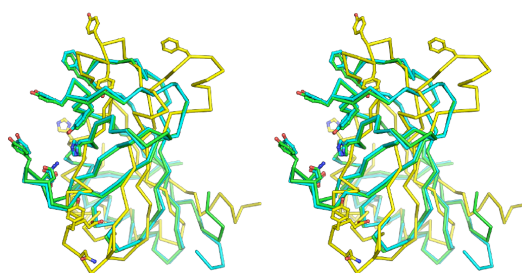


図7 構造比較 (ステレオ図)
緑: DNA 結合状態での構造
シアン: 単体の構造
黄: すでに登録されていた単体の構造 (2L1I)

このように、損傷トレランスのうち、損傷乗り越え合成については、様々な複合体構造が明らかになったことで、分子メカニズムの解明に向けて大きく前進している。一方、テンプレートスイッチに関しては、近年ようやく関わるタンパク質が同定されてきている。本研究を足がかりに、今後はテンプレートス

イッチの分子メカニズムの解明を目指し、構造生物学的研究を進めていきたい。

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 8 件)

- ① Asami Hishiki, Kodai Hara, Yuzu Ikegaya, Hideshi Yokoyama, Toshiyuki Shimizu, Mamoru Sato & Hiroshi Hashimoto, Structure of a Novel DNA-binding Domain of Helicase-like Transcription Factor (HLTF) and Its Functional Implication in DNA Damage Tolerance, *J. Biol. Chem.* (2015) 290, pp. 13215-13223, doi: 10.1074/jbc.M115.643643 (査読有り)
- ② Yuzu Ikegaya, Kodai Hara, Asami Hishiki, Hideshi Yokoyama & Hiroshi Hashimoto, Crystallographic study of a novel DNA-binding domain of human HLTF involved in the template-switching pathway to avoid the replication arrest caused by DNA damage, *Acta Crystallogr. F* (2015) 71, pp. 668-670, doi: 10.1107/S2053230X15005907 (査読有り)
- ③ Akira Inoue, Sotaro Kikuchi, Asami Hishiki, Youming Shao, Richard Heath, Benjamin J. Evison, Marcelo Actis, Christine E. Canman, Hiroshi Hashimoto & Naoaki Fujii, A Small Molecule Inhibitor of Monoubiquitinated Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) inhibits Repair of Interstrand DNA Crosslink, enhances DNA Double-strand Break, and sensitizes Cancer Cells to Cisplatin, *J. Biol. Chem.* (2014) 289, pp. 7109-7120, doi:10.1074/jbc.M113.520429 (査読有り)
- ④ Maryam Khalaj, Abdolrahim Abbasi, Hiroshi Yamanishi, Kouyou Akiyama, Shuso Wakitani, Sotaro Kikuchi, Michiko Hirose, Misako Yuzuriha, Masaki Magari, Heba A Degheidy, Kuniya Abe, Atsuo Ogura, Hiroshi Hashimoto & Tetsuo Kunieda, A Missense Mutation in Rev7 Disrupts Formation of Pol ζ , Impairing Mouse Development and Repair of Genotoxic Agent-induced DNA Lesions, *J. Biol. Chem.* (2014) 289, pp. 3811-3824, doi:10.1074/jbc.M113.514752 (査読有り)

[学会発表] (計 15 件)

- ① 田原迫奨大、菊池壮太郎、原幸大、横山英志、清水敏之、佐藤衛、橋本博: Mad2L2

と IpaB の相互作用に関する構造生物学的研究、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26 日~29 日、「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」

- ② 内田雅之、田形梨紗、原幸大、横山英志、橋本博: PCNA-ZRANB3 PIP 複合体の構造解析、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26 日~29 日、「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」
- ③ 橋本博: DNA 損傷トレランスの構造生物学、第 4 回若手生命科学研究交流セミナー、2016 年 2 月 9 日~10 日「新潟国際情報大学・新潟中央キャンパス(新潟県・新潟市)」
- ④ Hiroshi Hashimoto: Structure and function of REV7 as the adaptor protein of REV1 and REV3 polymerases, 15th International Congress of Radiation Research (ICRR2015) Symposium, 2015 年 5 月 25 日~29 日、「京都国際会議場 (京都府・京都市)」
- ⑤ 片川裕理、原幸大、花岡佑樹、菊池壮太郎、横山英志、Kim Minsoo、笹川千尋、佐藤衛、橋本博: 赤痢菌 IpaB による Mad2L2 の機能阻害複合体の結晶学的研究、平成 26 年度日本結晶学会年会、2014 年 11 月 1 日~3 日、「東京大学農学部 (東京都・文京区)」
- ⑥ 菊池壮太郎、原幸大、清水敏之、佐藤衛、橋本博: REV7-REV3 複合体構造から示唆される REV7/Mad2L2 と赤痢菌タンパク質 IpaB との相互作用、第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013 年 6 月 12 日~14 日、「とりぎん文化会館 (鳥取県・鳥取市)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 博 (HASHIMOTO, Hiroshi)
静岡県立大学・薬学部・教授
研究者番号: 40336590