

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19770084
研究課題名 (和文) ウェルナー早老症タンパク質によるゲノム維持機構の構造研究
研究課題名 (英文) Structural study of the genome maintenance mechanism by the Werner syndrome protein WRN

研究代表者

北野 健 (KITANO KEN)
奈良先端科学技術大学院大学・情報科学研究科・助教
研究者番号：40346309

研究成果の概要：

ウェルナー症候群は、若い年齢で老化が急速に進行する早老症の病気のひとつである。本研究ではその原因タンパク質 WRN ヘリカーゼの結晶を作成し、大型放射光施設 SPring-8 を使った X 線構造解析の研究を進めた。この結果、WRN RQC (RecQ C-terminal) ドメインと DNA の複合体構造を初めて決定することに成功した。WRN は尖ったヘアピン構造を“DNA 巻き戻しナイフ”としてヘリカーゼ反応に用いている新事実などが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

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，ウェルナー症候群，ブルーム症候群，早老症，DNA ヘリカーゼ

1. 研究開始当初の背景

早老症は、文字通り若くして全身の老化が急速に進む珍しい病気である。ドキュメンタリー番組などでは海外のハッチンソン・ギルフォード症候群患者（プロジェリアともよばれる）が紹介され、社会にも広く知られるよ

うになってきた。しかし早老症疾患として日本人に身近なのは、実は“ウェルナー症候群”とよばれるもうひとつの遺伝病である。ウェルナー症候群は、出生後すぐに症状が現れるプロジェリアとは異なり、10代なかばから全身の老化が急速に進む。治療法は見付かって

いない。患者数は世界で数千人と推定されているが、現時点で 7 割を日本人患者が占めている。実際、日本では数百人に一人がウェルナー症の潜在的な保因者、すなわち発症しなくてもウェルナー遺伝子に変異を有すると推定されている。

2. 研究の目的

細胞が正常に分裂するためには、二本の遺伝子 DNA がねじれ合わさった二重らせん構造がいったんほどかれ、それぞれがコピーされる必要がある。このさいに DNA をほどく（巻き戻す）という重要な作用をするのが、ヘリカーゼとよばれる一群のタンパク質酵素である。ウェルナー症候群は、そのひとつ“ウェルナーヘリカーゼ（Werner syndrome protein; WRN）”に異常が生じることで、2 倍ものはやさの老化が進行する。WRN ヘリカーゼが細胞の寿命を守ることができるのは、通常のヘリカーゼではほどくことのできない特殊な構造の DNA（ホリデイジャンクションとよばれる 4 本鎖の中間体や、染色体末端にあって細胞寿命を調節しているテロメア；[図4A](#)）を解きほぐす能力にあることが示されていたが、なぜ可能なのか、仕組みは分かっていた。

本研究では、タンパク質と早老症の関係を三次元構造から明らかにするため、健康な人の WRN ヘリカーゼが DNA に作用している状態を X 線結晶構造解析で調べた。

3. 研究の方法

WRN ヘリカーゼは、1,432 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。N 末端側のエキソヌクレアーゼドメイン、中央の ATPase ドメインに加えて、C 末端側に RQC（RecQ C-terminal）ドメインと HRDC（helicase-and-ribonuclease D-C-terminal）ドメインとよばれる領域を有している（[図1](#)）。WRN ヘリカーゼのアミノ酸配列は、ブルーム症候群（幼少期にがんを頻発するまれな疾患）

の原因タンパク質、ブルームヘリカーゼ（Bloom syndrome protein; BLM）と相同性を有している。最初に見つかった大腸菌ホログの RecQ ヘリカーゼにちなんで、RecQ ファミリーヘリカーゼとよばれている。

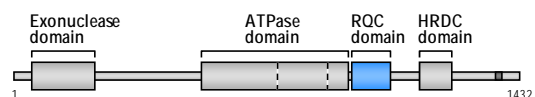


図 1. WRN ヘリカーゼのドメイン構造
今回、青色で示した RQC ドメインの研究を行った。

RQC ドメインと HRDC ドメインは、ウェルナー症候群 WRN ヘリカーゼとブルーム症候群 BLM ヘリカーゼに共通して見出される特徴的なドメインである。ヒトの健康維持に重要なドメインと考えられるが、構造と機能はよく分かっていなかった。研究代表者らは 2007 年に、WRN ヘリカーゼの HRDC ドメインの立体構造を世界に先駆けて決定するとともに、このドメインが予想に反して DNA 結合能を示さないこと、対照的に RQC ドメインが DNA へ強い結合を示すことを報告した（*Kitano et al., 2007, J. Biol. Chem.*）。

今回、WRN ヘリカーゼの RQC ドメインに着目した研究を行った。ヒト WRN RQC ドメインをコードする発現プラスミドを大腸菌に導入し、タンパク質を大量発現させた。次いでクロマトグラフィーによる精製をおこない、高純度な WRN RQC 試料を調製した。この試料に合成した二本鎖 DNA を加え、様々な沈殿剤試薬を加えることによって結晶化条件の検討を行ったところ、[図 2A](#) に示す複合体の結晶を作成することができた。この結晶を兵庫県播磨市の大型放射光施設 SPring-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。データを Linux コンピュータで処理したところ、[図 2B](#) に示す良質な電子密度マップを得ることができた。

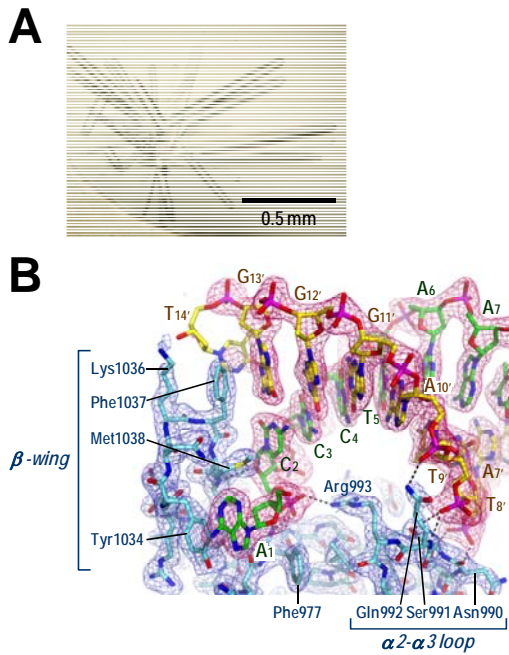


図2. X線結晶構造解析の実験

A. ヒト WRN RQC ドメイン-DNA 複合体の結晶。B. 結晶にX線を当てた結果得られた電子密度マップ。タンパク質部分を青色、DNA部分を赤色で示した。

4. 研究成果

本研究の結果、WRN RQC ドメインが二本鎖DNAに結合している状態の三次元構造を、1.9 Å という高分解能で決定することができた。RecQ ファミリーとして世界初のDNA複合体構造である。驚いたことに本結晶構造では、WRN RQC ドメインがDNA二重らせんの末端一塩基をほどこしている状態がはっきりと確認できた。つまり他の領域が切り落としてあるにもかかわらず、WRNヘリカーゼによるDNA巻き戻しの反応がとらえられていた。これほどコンパクトなタンパク質ドメインが、ATP加水分解のエネルギー供給なしに、一塩基だけとはいえDNAをほどくのは予想外の結果であった。

立体構造上の仕組みを詳しく調べると、“DNA巻き戻しナイフ”と名付けた突き出したヘアピン構造が、巻き戻しを巧妙に触媒していることが分かった。RQCドメインはこの巻き戻しナイフを使って、ちょうどナイフでリンゴの皮をむくように回転しながら、DNA

二重らせんを一本鎖にほどこしていくと考えられる(図3)。

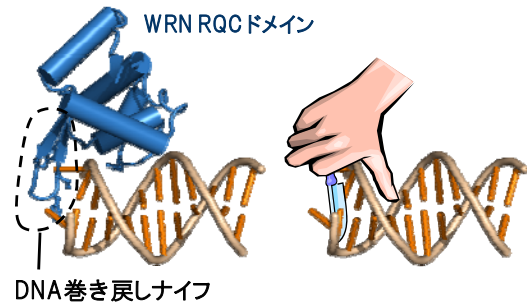


図3. WRNヘリカーゼのDNA巻き戻しナイフ手に持ったナイフのようなかたちをしていた。

さらにこの巻き戻しナイフは、ちょうどドメインの端から細長く突き出しているため、入り組んだ形状のDNAをほどくのに最適なかたちであることが分かった(図4)。WRNヘリカーゼはこの尖ったDNAナイフを進化させたことによって、老化の原因となるホリダイジャンクションやテロメアなど、入り組んだDNAを解きほぐす特別な活性を獲得したと考えられる。テロメアは細胞が分裂するたびに短くなり、“老化時計”と比喻されるほど私達の寿命に深く関わっている。ウェルナー症患者の細胞では、テロメア損失のスピードが通常より速いことが報告されている。

ヒトが持っている全タンパク質のなかで、RQCドメインが含まれているのはWRNヘリカーゼとBLMヘリカーゼ、そしてもうひとつのホモログRECQ1ヘリカーゼ(RecQファミリーの一員とされるが、HRDCドメインを欠いており病気には関係しない)の3つしか見つかっていない。WRNやBLMが変異すると、細胞は巻き戻しナイフを使ったDNAのメンテナンスができなくなり、染色体ダメージの蓄積、ひいては早老症やガンの病気が引き起こされると考えられる。

健康な人でも日常生活で遺伝子は傷つき、老化やがんの原因となる。なかでもテロメアは寿命の調節に重要な部位であるが、ループ状の入り組んだかたちをとっているため、通

常のタンパク質だけで長さを維持することは困難と考えられている。ウェルナー症候群では WRN ヘリカーゼが変異しているため、テロメア長の欠落などを招きやすく、からだの老化がはやく進んでしまうと考えられる。

今後、本研究で得られたタンパク質のノウハウを最大限に活用し、WRN と早老症の関係をさらに詳細に調べていきたい。また今回の研究で、BLM ヘリカーゼにも同様の DNA 巻き戻しナイフがあることが示唆された。ブルーム症候群のタンパク質研究にも発展させていきたい。

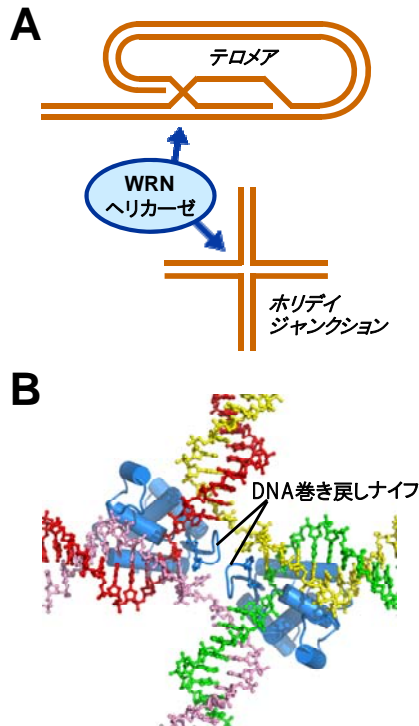


図4. WRN ヘリカーゼによる特殊な DNA 構造の解きほぐし

A. WRN ヘリカーゼの巻き戻しナイフは、通常のヘリカーゼでは入り込めない DNA のわずかな隙間にも差し込むことができる細さである。この特徴を活かして、テロメアやホリデイジャンクションなどの、入り組んだ DNA をほどくのに使われていると考えられる。**B.** WRN ヘリカーゼがホリデイジャンクションをほどくようす (本研究からのシミュレーションモデル)。2分子の RQC ドメイン (青色) が、ホリデイジャンクションの分岐点に巻き戻しナイフを差し込み、それぞれ左と右の DNA をほどこうとしている。

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 11 件、すべて査読有)

- ① Kitano, K., Kim, SY., Hakoshima, T. (2010). "Structural basis for DNA strand separation by the unconventional winged-helix domain of RecQ helicase WRN." *Structure*, 18(2), 177-187.
- ② Terawaki, S., Kitano, K., Mori, T., Zhai, Y., Higuchi, Y., Itoh, N., Watanabe, T., Kaibuchi, K., Hakoshima, T. (2010). "The PHCCE domain of Tiam1/2 is a novel protein- and membrane-binding module." *EMBO J.*, 29(1), 236-250.
- ③ Mori, T., Kitano, K., Terawaki, S., Maesaki, R., Fukami, Y., Hakoshima, T. (2008). "Structural basis for CD44 recognition by ERM proteins." *J. Biol. Chem.*, 283(43), 29602-29612.
- ④ Takai, Y., Kitano, K., Terawaki, S., Maesaki, R., Hakoshima, T. (2008). "Structural basis of the cytoplasmic tail of adhesion molecule CD43 and its binding to ERM proteins." *J. Mol. Biol.*, 381(3), 634-644.
- ⑤ Terawaki, S., Kitano, K., Hakoshima, T. (2008). "Crystallographic characterization of the membrane-targeting domains of the Rac-specific guanine nucleotide-exchange factors Tiam1 and Tiam2." *Acta Crystallogr. F.*, 64(11), 1039-1042.
- ⑥ Terawaki, S., Kitano, K., Aoyama, M., Hakoshima, T. (2008). "Crystallographic characterization of the radixin FERM domain bound to the cytoplasmic tail of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)." *Acta Crystallogr. F.*, 64(10), 911-913.
- ⑦ Sakurai, S., Kitano, K., Morioka, H., Hakoshima, T. (2008). "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the catalytic domain of human flap endonuclease 1 in complex with a nicked DNA product." *Acta*

Crystallogr. F., 64(1), 39-43.

- ⑧ Terawaki, S., Kitano, K., Hakoshima, T. (2007). "Structural basis for type II membrane protein binding by ERM proteins revealed by the radixin-neutral endopeptidase 24.11 (NEP) complex." *J. Biol. Chem.*, 282(27), 19854-19862.
- ⑨ Takai, Y., Kitano, K., Terawaki, S., Maesaki, R., Hakoshima, T. (2007). "Structural basis of PSGL-1 binding to ERM proteins." *Genes Cells*, 12(12), 1329-1338.
- ⑩ Nishino, TG., Kitano, K., Kojima, K., Ogishima, T., Ito, A., Kitada S. (2007). "Spatial orientation of mitochondrial processing peptidase and a preprotein revealed by fluorescence resonance energy transfer." *J. Biochem.*, 141(6), 889-895.
- ⑪ Mori T., Kitano, K., Terawaki S., Maesaki R., Hakoshima T. (2007). "Crystallographic characterization of the radixin FERM domain bound to the cytoplasmic tail of adhesion molecule CD44." *Acta Crystallogr. F.*, 63(10), 844-847.

[学会発表] (計 19 件)

- ① 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.
- ② 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.
- ③ 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.
- ④ 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.

- ⑤ 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.
- ⑥ 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, 葉山町.
- ⑦ 寺脇慎一, 北野 健, 箱嶋敏雄 "グアニンヌクレオチド交換因子Tiam2 のPHドメインを含む新規細胞膜結合ドメインのX線結晶構造解析" *BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)*, 2008.12.11, 神戸ポートアイランド.
- ⑧ 櫻井 滋, 北野 健, 内田真希代, 森岡弘志, 箱嶋敏雄 "ヒトFEN1 によるDNA 認識の構造学的基盤" *BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)*, 2008.12.11, 神戸ポートアイランド.
- ⑨ Mori, T., Kitano, K., Terawaki, S., Maesaki, R., Fukami, Y., Hakoshima, T. "Structural basis for CD44 recognition by ERM proteins." *The XXI Congress and Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2008)*, 2008.08.28-29, Osaka, Japan.
- ⑩ Terawaki, S., Kitano, K., Hakoshima, T. "Structural basis of type-II membrane protein binding by ERM proteins." *The XXI Congress and Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2008)*, 2008.08.26-27, Osaka, Japan.
- ⑪ Kitano, K., Hakoshima, T. "Crystal structure of the HRDC domain of human Werner syndrome protein, WRN." *The XXI Congress and Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2008)*, 2008.08.24-25, Osaka, Japan.

- ⑫ Sakurai, S., Uchida, M., Kitano, K., Yamaguchi, H., Morioka, H., Hakoshima, T. "Crystallization and structure of human flap endonuclease 1, FEN1, in complex with a DNA product." *The XXI Congress and Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2008)*, 2008.08.24-25, Osaka, Japan.
- ⑬ Kitano, K. "Structural study of the HRDC domain of human Werner syndrome protein, WRN" *33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference*, 2008.07.03, Athens, Greece.
- ⑭ 櫻井 滋, 北野 健, 内田真希代, 森岡弘志, 箱嶋敏雄 "ヒトFEN1 の活性促進と基質認識の構造学的基盤" *日本生化学会九州支部例会シンポジウム*, 2008.05.18, 福岡.
- ⑮ 森 智行, 北野 健, 箱嶋敏雄 "ヒアルロン酸受容体である接着分子CD44 とERMタンパク質との相互作用" *BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会)*, 2007.12.12, パシフィコ横浜.
- ⑯ Kitano, K., Yoshihara, N., Hakoshima, T. "Crystal Structure of the HRDC Domain of Human Werner Syndrome Protein, WRN." *The 8th Conference of the Asian Crystallographic Association (AsCA2007)*, 2007.11.05-06, Taipei, Taiwan.
- ⑰ Mori, T., Kitano, K., Terawaki, S., Maesaki, R., Hakoshima, T. "Crystallographic characterization of the radixin FERM domain bound to cytoplasmic tail of adhesion molecule CD44" *The 8th Conference of the Asian Crystallographic Association (AsCA2007)*, 2007.11.05-06, Taipei, Taiwan.
- ⑱ Kitano, K., Hakoshima, T. "Crystal structure of the HRDC domain of human WRN" *FASEB Summer Research Conferences "Helicases & NTP-Driven Nucleic Acid Motors: Structure, Function, Mechanisms & Roles in Human Disease"*, 2007.06.23-28, Indian Wells, CA, U.S.A.
- ⑲ 北野 健 "タンパク質のかたちから探る早老症" *アステラス製薬研究会*, 2007.06.02, 金沢市.

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・情報科学研究科・助教

研究者番号 : 40346309