

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05705

研究課題名(和文) 遺伝子修復酵素の触媒機構解析：構造・メカニズム・阻害剤設計

研究課題名(英文) Mechanistic Study on Gene Repair Enzyme

研究代表者

田中 好幸 (Tanaka, Yoshiyuki)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：70333797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん病理の理解および生体の恒常性維持機構の理解に向けて、hOGG1の触媒機構の解明に挑んだ。hOGG1の活性残基としては、Lys249(K249)とAsp268(D268)が触媒残基と目されている。しかしこれらの触媒残基の化学的役割については未同定の部分が多い。そこで以下の研究を実施した。1) hOGG1の活性残基の置換変異体を作製し、pH依存的な酵素活性の変化から酵素学的pKaを決定した。2) 上記変異体および天然型hOGG1を用いてNMR分光法による活性残基のpKa値を直接的に決定した。上記の実験から、グリコシラーゼ反応には活性残基からのプロトン供与が必須であることが解った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子修復は生体の恒常性維持機構であり、その異常はがんの病理とも深くかかわる。中でも、損傷塩基として頻度の高い8-oxoguanineを除去修復する酵素：ヒト8-OxoGuanine Glycosylase 1 (hOGG1) は修復系で中核的役割を果たす酵素である。本研究では、hOGG1の触媒機構の解明に挑んだが、これは分子論的な立場から、がんに対する防御機構を理解すること、および、生体の恒常性維持機構を解明することにつながる。また遺伝子修復系を標的としたがん治療薬の開発も進んでおり、がん治療薬の開発にも将来的に資する研究と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human 8-OxoGuanine Glycosylase 1 (hOGG1) is a central enzyme within the gene-repair system that is related with the pathology of cancer and the homeostasis in living organisms. To understand the relationship between those biological activities and its enzymatic activity, we tried to reveal the catalytic mechanism of hOGG1. In hOGG1, Lys249 (K249) and Asp268 (D268) are considered to be catalytic residues at its active site. However, there are many uncertainties about the chemical role of these catalytic residues. Based on this understanding, the following research was conducted. 1) An hOGG1 mutant was prepared, and its enzymatic pKa value was determined from the pH-dependent changes in enzyme activity. 2) Using the above mutant, its pKa values of the active residue was directly determined with NMR spectroscopy. From these experiments, the enzymatic activity of the mutant and pKa values were explored. Then, the possible enzymatic pathway was considered.

研究分野：生物物理化学

キーワード：酵素反応機構解析 構造化学 NMR X線結晶構造解析 タンパク質核酸複合体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子修復は生体の恒常性維持機構であり、その異常はがんの病理とも深くかかわる。中でも、損傷塩基として頻度の高い 8-oxoguanine (8oxoG) を除去修復する酵素: ヒト 8-OxoGuanine Glycosylase 1 (hOGG1) は修復系で中核的役割を果たす酵素である。hOGG1 は 8oxoG の脱塩基反応 (グリコシラーゼ反応) と、引き続く DNA 鎖切断反応 (β リアーゼ反応) の二つの反応を触媒する。また、hOGG1 の活性残基としては、249 番目のリシン残基 (リシン 249/K249) と 268 番目のアスパラギン酸残基 (アスパラギン酸 268/D268) が触媒残基と目されている (図 1,)。

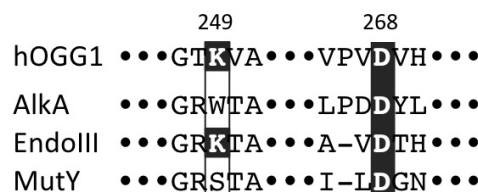


図 1. hOGG1 および類縁酵素の配列保存度

実験開始当時の時点におけるメカニズム研究では、リシン 249 (K249) は β リアーゼ反応の触媒残基であることが結晶構造解析により示されていた (引用文献 1, 図 2)。それに加えてリシン 249 (K249) は、グリコシラーゼ反応の触媒残基であるとの見解も示されている (引用文献 2)。一方、アスパラギン酸 268 については、類縁酵素との配列保存性から活性残基である可能性が指摘されてはいるものの、具体的な触媒機構上の役割については諸説混沌とした状態であった (図 1, 2)。上述のような背景のもと申請者は、アスパラギン酸 268 の役割が脱塩基反応の触媒残基であることを同定した (引用文献 3)。しかしながら、アスパラギン酸 268 の触媒機構上の役割は誰も決定できていなかった。加えてリシン 249 についても、グリコシラーゼ反応における具体的な役割は明示されていなかった。

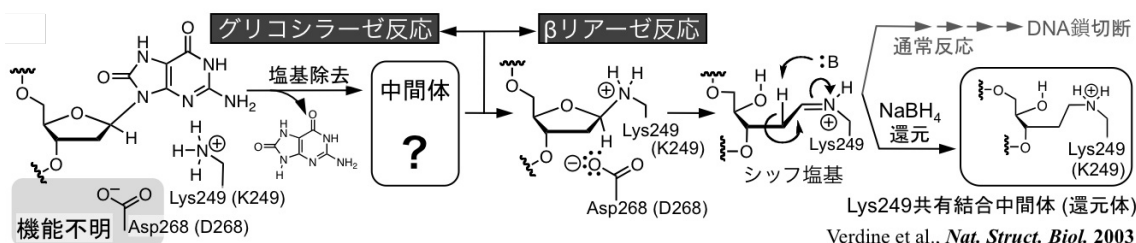


図 2. hOGG1 反応経路

2. 研究の目的

上述の通り、hOGG1 の活性残基としては、リシン 249 とアスパラギン酸 268 が触媒残基と目されている。しかしこれらの触媒残基の化学的役割については未同定の部分が多い。そこで本研究では、リシン 249 とアスパラギン酸 268 の触媒機構上の役割の解明を目指した。また触媒機構が判明すれば、それに基づいて hOGG1 の共有結合型阻害剤 (suicide inhibitor) などの設計指針がわかると期待される。もって、酵素の触媒機構解析という基礎科学の成果を、抗がん剤創製という疾病治療へとつなげるための指針の導出を目指した。

3. 研究の方法

そこで上記活性残基の触媒機構上の役割の解明を目指し、hOGG1 タンパク質と基質 DNA 複合体について NMR による物性解析および X 線結晶構造解析を実施する。加えて、hOGG1 の酵素学的な解析を実施して、触媒残基の役割を同定する。なお、海外研究協力者の Vladimir Sychrovsky 博士 (チェコ科学アカデミー) の理論計算によれば、リシン 249 は脱塩基反応の際

に 8oxoG 塩基へのプロトン供与体としても機能することが示唆されている。本仮説を証明することも当研究の目的である。具体的には、以下の実験を計画した。

1. NMR 分光法による活性残基リシン 249 の物性解析
2. 反応機構解析用 hOGG1 変異体の作製 & 変異体の活性評価
3. hOGG1-基質 DNA 複合体の X 線結晶構造解析
4. Suicide inhibitor の設計指針の導出
5. 量子化学計算による hOGG1 触媒機構解析

4. 研究成果

1. NMR 分光法による活性残基リシン 249 の物性解析

海外研究協力者の Vladimir Sychrovsky 博士 (チェコ科学アカデミー) の理論計算によれば、リシン 249 は脱塩基反応の際に 8oxoG 塩基へのプロトン供与体としても機能することが示唆されている。そこで反応開始前の基底状態でのリシン 249 側鎖アミノ基のプロトン化状態を解析した。なおこの実験の遂行にあたり、リシン 249 側鎖アミノ基に由来するの NMR シグナルを帰属するために、表面に存在する 7 つのリシン残基をアルギニンに置換した不活性変異体を作製した (D268N 変異も加えて不活性化)。これにより、リシン残基を活性残基リシン 249 とタンパク質内部のリシン 261 の 2 個に減らすことができた。なおリシン 261 を別アミノ酸に置換した変異体はタンパク質として発現できなかった。よって、リシン 249 の帰属にあたっては、上記変異体 1、および、当該変異体 1 にリシン 249 をグルタミンに変異させた変異体 2 を作製して ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した。また、基質非結合時よりも基質結合時の基底状態が、反応開始前の状態により近いと見られるため、両変異体と基質 DNA が結合した状態で ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した。

まず、変異体 1-基質 DNA 複合体の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルでは、リシン 249 とリシン 261 の側鎖アミノ基に由来する 2 つのピークが観測された (図 3)。

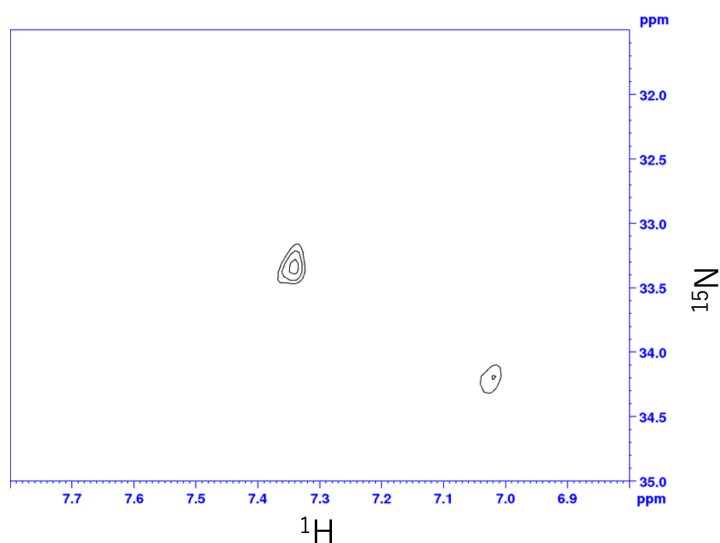


図 3. 変異体 1-基質 DNA 複合体におけるリシン側鎖アミノ基の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル

この結果、この 2 つのピークのいずれかがリシン 249 の側鎖アミノ基の ^1H - ^{15}N 相関ピークであ

ることがわかった。

次に、変異体 2-基質 DNA 複合体の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルでは、リシン 261 側鎖アミノ基に由来する単一ピークが観測された (図 4)。

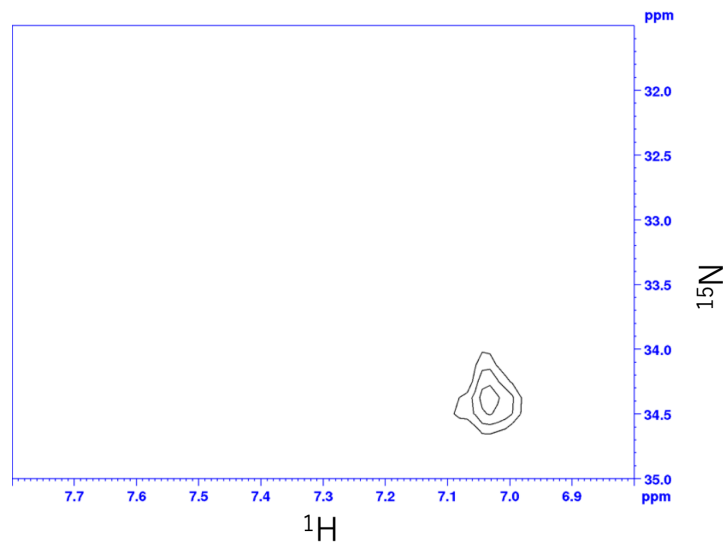


図 4. 変異体 2-基質 DNA 複合体におけるリシン側鎖アミノ基の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル

この結果、図 3,4 で観測された右下のピークがリシン 261 の側鎖アミノ基の相関ピークであり、残りのピークがリシン 249 の相関ピークであると帰属できた。

上記データを元にして、リシン 249 側鎖アミノ基がアミン型であるか、アンモニウム型であるかの検討を行なった。一般に、リシン側鎖アミノ基の化学シフト値はアンモニウム型 (32.7 ppm) とアミン型 (25.2 ppm) である (引用文献 5)。今回同定されたリシン 249 由来の相関ピークの ^{15}N 化学シフト値は 33ppm 付近に存在するため、hOGG1 のリシン 249 側鎖アミノ基はアンモニウム型で存在していると結論づけられる。

2. 反応機構解析用 hOGG1 変異体の作製 & 変異体の活性評価

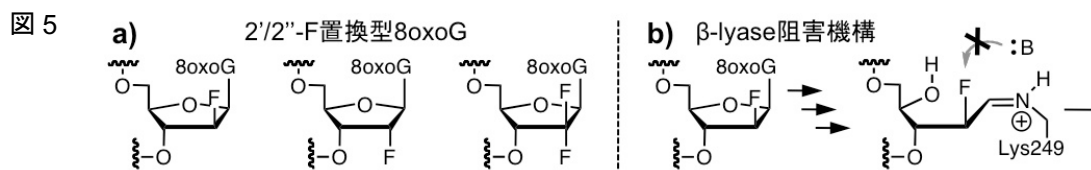
本サブテーマでは、酵素反応中間体の捕捉に適した hOGG1 変異体の取得を目指した。グリコシラーゼ反応に引き続く β リアーゼ活性を失活させることで、グリコシラーゼ反応直後の構造決定につなげることを計画した。 β リアーゼ反応の活性残基が Lys249 であるため、Lys249 に変異を導入して、尚且つ、グリコシラーゼ活性が維持される変異体の取得を目指した。種々アミノ酸置換を行うことで、活性残基 (Lys249) に変異を入れても、活性を有した変異体が取得できた。

3. hOGG1-基質 DNA 複合体の X 線結晶構造解析

上述の実験 2 で得られた各種 hOGG1 変異体について、X 線結晶構造解析を行い、その三次元構造を決定した。KCCK 変異体は、 β リアーゼ活性を失った変異体として報告がなされたものである (引用文献 4)。後日、当研究室の追試験により、高濃度で実験すれば β リアーゼ活性を発現することがわかった変異体であるが、この変異体に関して結晶構造の決定を達成している。これにより、活性残基の三次元空間における配置と、活性残基周りの環境を明らかとした。本構造は酵素反応の反応経路推定の基礎的データとなる。

4. Suicide inhibitor の設計指針の導出

ここまでの hOGG1 の触媒機構の情報を元にするると、2'/2"-F 置換型核酸は suicide inhibitor となる可能性がある。本阻害剤は β リアーゼ反応で Lys249 がアノマー位に結合した後の 2'位脱プロトン化を阻害し、以降の反応を止める。結果、Lys249 と基質の共有結合が残り suicide inhibitor となると期待される (図 5)。



5. 量子化学計算による hOGG1 触媒機構解析

上述の実験 1 で見出された変異体について Vladimir Sychrovsky 博士が量子化学計算による反応経路探索を行っている。得られた結晶構造・酵素学実験データ・NMR 分光法による活性残基の状態を反映した反応経路が同定されつつあり、実験と理論の統一に道筋が付いたと考えられる。

まとめ

hOGG1 の酵素反応前の基底状態では、触媒残基のプロトン化を明らかとし、触媒反応にプロトン源が必要であることを示すことができた。これにより触媒残基の化学的役割が解明された。がんの病理の解明の分子論的な理解を進めたとともに、将来的に、がん治療薬の開発に資する成果が得られたものと考えられる。

(引用文献)

1. Fromme, J. C., Bruner, S. D., Yang, W., Karplus, M. and Verdine, G. L. (2003) Product-assisted catalysis in base-excision DNA repair. *Nat. Struct. Mol. Bio.*, **10**, 204–211.
2. Bruner, S. D., Norman, D. P. G. and Verdine, G. L. (2000) Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature*, **403**, 859–866.
3. Šebera, J., Hattori, Y., Sato, D., Řeha, D., Nencka, R., Kohno, T., Kojima, C., Tanaka, Y. and V. Sychrovský (2017) The mechanism of the glycosylase reaction with hOGG1 base-excision repair enzyme: Concerted effect of Lys249 and Asp268 during excision of 8-oxoguanine. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 5231-5242.
4. Dalhus, B., Forsbring, M., Helle, I. H., Vik, E. S., Forstrøm, R. J., Backe, P. H., Alseth, I. and Bjørås, M. (2011) Separation-of-Function Mutants Unravel the Dual-Reaction Mode of Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase. *Structure*, **19**, 117–127.
5. Platzer, G., Okon, M., McIntosh, L. P. (2014) pH-dependent random coil (1)H, (13)C, and (15)N chemical shifts of the ionizable amino acids: a guide for protein pK_a measurements. *J Biomol NMR*, **60**, 109-129.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryo Yamada, Issei Nomura, Yuki Yamaguchi, Yosuke Matsuda, Yoshikazu Hattori, Hirokazu Tada, Akira Ono and Yoshiyuki Tanaka	4. 巻 39
2. 論文標題 Electrical conductance measurement of HgII- mediated DNA duplex in buffered aqueous solution.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 1083-1087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2020.1755044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Filip Sebesta, Jakub Sebera, Vladimir Sychrovsky, Yoshiyuki Tanaka and Jaroslav V. Burda	4. 巻 41
2. 論文標題 QM and QM/MM umbrella sampling MD study of the formation of Hg(II)-thymine bond: Model for evaluation of the reaction energy profiles in solutions with constant pH.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Computational Chemistry	6. 最初と最後の頁 1509-1520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcc.26194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mitsuhiro Yamada, Yoshiyuki Tanaka	4. 巻 39
2. 論文標題 Structure-activity relationship of pseudoknot-type hammerhead ribozyme reveals key structural elements for enhanced catalytic activity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 245-257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2019.1669169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takenori Dairaku, Rika Kawai, Kanako Nozawa-Kumada, Kentaro Yoshida, Tetsuya Ono, Yoshinori Kondo, Jiro Kondo, Akira Ono, Yoshiyuki Tanaka, and Yoshitomo Kashiwagi	4. 巻 50
2. 論文標題 Chemical reduction of Ag+ to Ag employing organic electron donors: Evaluation of the effect of Ag+-mediated cytosine-cytosine base pairing on the aggregation of Ag nanoparticles.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dalton Transactions	6. 最初と最後の頁 12208-12214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1dt01927a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takenori Dairaku, Rika Kawai, Teppei Kanaba, Tetsuya Ono, Kentaro Yoshida, Hajime Sato, Kanako Nozawa-Kumada, Yoshinori Kondo, Jiro Kondo, Akira Ono, Yoshiyuki Tanaka and Yoshitomo Kashiwagi	4. 巻 50
2. 論文標題 Effect of cytosine-Ag+-cytosine base pairing on the redox potential of the Ag+/Ag couple and the chemical reduction of Ag+ to Ag by tetrathiafulvalene.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dalton Transactions	6. 最初と最後の頁 7633-7639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1dt00975c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Noriko Saito Tarashima, Yusuke Kumanomido, Katsuyuki Nakashima, Yoshiyuki Tanaka and Noriaki Minakawa	4. 巻 86
2. 論文標題 Synthesis of a cyclic dinucleotide analog with ambiguous bases, 5-aminoimidazole-4-carboxamide.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 15004-15010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.1c01706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 重松航太, 福田万里子, 岡田卓也, 市原尚弥, 眞野逢佳, 服部良一, ウラジミール シフロフスキー, 田中好幸
2. 発表標題 1H-15N HSQCスペクトルによるhOGG1の活性残基Lys249の状態解析
3. 学会等名 日本薬学会141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小松 優真、服部 良一、中島 勝幸、中川治、堅田 笑里、山本 普樹、山根 滉生、竹原正也、永浜 政博、田中 好幸
2. 発表標題 改変ジフテリア毒素による薬剤送達技術の開発
3. 学会等名 日本薬学会141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 服部良一, 竹原正也, 小原一朗, 蛭子翔太, 後藤真希, 山根滉生, 中島勝幸, 山口健太郎, 永浜政博, 田中好幸
2. 発表標題 遺伝子治療薬の構造学的分子設計
3. 学会等名 第19回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田万里子, 眞野遥佳, 市原尚弥, 岡田卓也, 海野昌喜, Vladimir Sychrovsky, 服部良一, 田中好幸
2. 発表標題 N-グリコシド結合切断反応における 8-オキソグアニン DNA グリコシラーゼ 1 (OGG1) Lys249 の触媒的役割
3. 学会等名 第19回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小室智稀, 服部良一, 田中好幸, 海野昌喜
2. 発表標題 ヒトDNA修復酵素hOGG1のX線結晶構造解析
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 田中好幸	4. 発行年 2020年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 執筆部位 : p.385-389、全体 : 576頁
3. 書名 核酸科学ハンドブック (第11部 5 DNAとメタル執筆) 日本核酸化学会監修	

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島文理大学薬学部 薬品分析学（田中研究室）
<http://p.bunri-u.ac.jp/lab05/>

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
研究協力者	シフロフスキー ウラジミール (Sychrovsky Vladimir)		チェコ科学アカデミー(10CB)
研究協力者	海野 昌喜 (Unno Msaki)		

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		
チェコ	チェコ科学アカデミー (10CB)		