

平成22年 6月 9日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770089

研究課題名 (和文) ヒト REV1、REV3、REV7 超分子複合体の構造生物学的研究

研究課題名 (英文) Structural biology of human REV1, REV3 and REV7 complex

研究代表者

橋本 博 (HASHIMOTO HIROSHI)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・助教

研究者番号：40336590

研究成果の概要 (和文) : DNA 修復機構は恒常的に生じる DNA 損傷を修復し, ゲノムの安定性を維持している. しかし DNA 複製中に生じた損傷に対する積極的な修復機構は知られていない. 複製中に生じた損傷は複製型 DNA ポリメラーゼによる DNA 複製を阻害するため, 細胞は危機的な状況になる. 損傷による複製停止を回避するための一つの戦略が損傷乗り越え DNA 合成 (TLS) である. TLS は, 誤りがちな DNA ポリメラーゼ (TLS ポリメラーゼ) による損傷塩基を鋳型とした DNA 合成であり, 複製型ポリメラーゼに代わって, TLS ポリメラーゼが一時的に DNA 合成を行う. その後, 再び複製型ポリメラーゼが DNA 合成を再開し, DNA 複製が完了する. 本研究対象である REV7 は真核生物で保存されたタンパク質で, TLS ポリメラーゼである REV1 および REV3 と相互作用することが報告されている. また, 遺伝学的な研究によって, REV1, REV3, REV7 が協同的に働くことが報告されているが, REV7 の詳細な細胞機能や, 3 つの REV タンパク質がどのように損傷部位で協同的に TLS を行うかは明らかになっていなかった. 本研究では, REV7 の細胞機能, REV タンパク質による TLS の作用機序を構造生物学的に明らかにするために, ヒト REV7 と REV3 フラグメント (1847-1898) との複合体の X 線結晶構造解析を行った. さらに, 複合体の立体構造に基づいた REV タンパク質の相互作用解析, 動物細胞を用いた REV7 の機能解析を行った. その結果, REV1, REV3, REV7 は三者複合体を形成し, REV7 が 2 つの TLS ポリメラーゼ (REV1 と REV3) を構造機能的に繋ぐアダプター分子として機能することを明らかにした.

研究成果の概要 (英文) : DNA polymerase ζ (Pol ζ) is an error-prone DNA polymerase involved in translesion DNA synthesis (TLS). Pol ζ consists of two subunits: the catalytic REV3, which belongs to B-family DNA polymerase, and the non-catalytic REV7. REV7 also interacts with REV1 polymerase, which is an error-prone Y-family DNA polymerase and also involved in TLS. Cells deficient in one of the three REV proteins and those deficient in all three proteins show similar phenotype, indicating the functional collaboration of the three REV proteins. REV7 interacts with both REV3 and REV1 polymerases, but the structure of REV7 or REV3, as well as the structural and functional basis of the REV1-REV7 and REV3-REV7 interactions remains unknown. Here we show the first crystal structure of human REV7 in complex with a fragment of human REV3 polymerase (residues 1847-1898) and reveal the mechanism underlying REV7-REV3 interaction. The structure indicates that the interaction between REV7 and REV3 creates a structural interface for REV1-binding. Furthermore, we show that the REV7-mediated interactions are responsible for DNA-damage tolerance. Our results highlight the function of REV7 as an adapter protein to recruit Pol ζ to a lesion site. REV7 is alternatively called MAD2B or MAD2L2 and also involved in various cellular functions such as signal transduction and cell-cycle regulation. Our results will provide a general structural basis for understanding the REV7-interaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：X線結晶解析

1. 研究開始当初の背景

通常の DNA 複製は複製型ポリメラーゼが行うが、複製中に鋳型 DNA に損傷が生じると、複製型ポリメラーゼは損傷部位で DNA 合成を停止してしまう。この場合、特殊な DNA ポリメラーゼが一時的に DNA 合成を行う。これを損傷乗り越え DNA 合成 (TLS) といい、損傷塩基を鋳型として DNA 合成を行う特殊な DNA ポリメラーゼを TLS ポリメラーゼという。TLS では、TLS ポリメラーゼだけではなく、様々なタンパク質因子が関与し、複雑なタンパク質間相互作用によって、一時的な複合体が形成される。それらのタンパク質間相互作用のメカニズムは未だ明らかとされてないが、REV1 と PCNA が複合体形成・DNA 合成の足場となっていると考えられている。

REV3 は損傷の種類に依存せずに DNA 合成を行える TLS ポリメラーゼであり、REV7 と複合体を形成する。REV3 の DNA 合成は「誤りがち」で、大部分の突然変異導入に関与する。REV3 は、哺乳類において唯一生存に必須な TLS ポリメラーゼであることも興味深い。

申請者は、TLS 全体を理解するにはタンパク質間相互作用を原子レベルで解明する必要があると考えており、関連タンパク質の相互作用に関する構造研究を以前から行っている。すでに、ヒト REV1, REV3, REV7 による複数の複合体について、試料調製を進めており、REV7-REV3 (REV7 相互作用領域) 複合体の結晶化に成功していた。申請者は REV1, REV3, REV7 のタンパク質間相互作用とその作用機序に着目し、ヒト REV タンパク質を対象に、相互作用や TLS のメカニズムを解明することを目的として REV1, REV3, REV7 の構造生物学的研究を計画した。

2. 研究の目的

REV1, REV3, REV7 は多様な複合体を形成し、損傷乗り越え DNA 合成 (TLS) における中心的な DNA ポリメラーゼである。本研究では、X線結晶構造解析法によって、ヒト REV7 が形成する超分子複合体の立体構造を世界に先駆けて決定し、REV1, REV3, REV7 の複合体形成・DNA 合成のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

ヒト REV7 が形成するタンパク質複合体を大腸菌を用いて調製し、結晶化を行い、X線結晶構造解析法によって3次元構造を決定する。得られた構造を基に、部位特異的変異体を調製し、相互作用解析を行う。また、ニワトリ DT40 細胞を使った機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) REV7-REV3 複合体の結晶構造解析

REV7 と REV3 フラグメント (1847-1898) (以下 REV3 と略す) との複合体は溶液中で濃度依存的な2量体を形成し、結晶化することができなかった。そこで、REV7 に様々なアミノ酸変異を導入し、会合状態を調べたところ、REV7 の R124 をアラニンに置換した REV7 (R124A)-REV3 複合体は溶液中で単量体として存在するのを見いだした。そこで、REV7 (R124A)-REV3 複合体の結晶化を行ったところ、X線結晶構造解析が可能な結晶を得ることに成功した。構造解析は、水銀原子を利用した重原子同型置換法を用いた。その結果、REV7 (R124A)-REV3 複合体 (以下 REV7-REV3 複合体と略す) の3次元構造を決定すること

に成功した (図1).

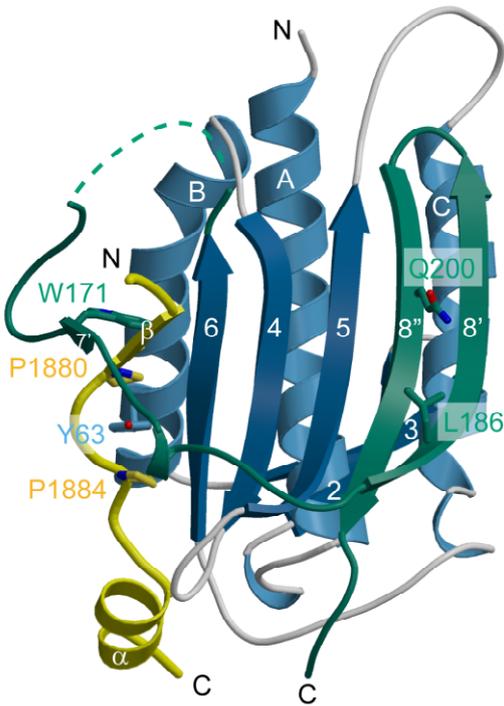


図1 ヒト REV7-REV3 複合体の三次元構造
REV7 を青と緑, REV3 を黄色で示す

(2) REV7-REV3 複合体の構造と相互作用様式

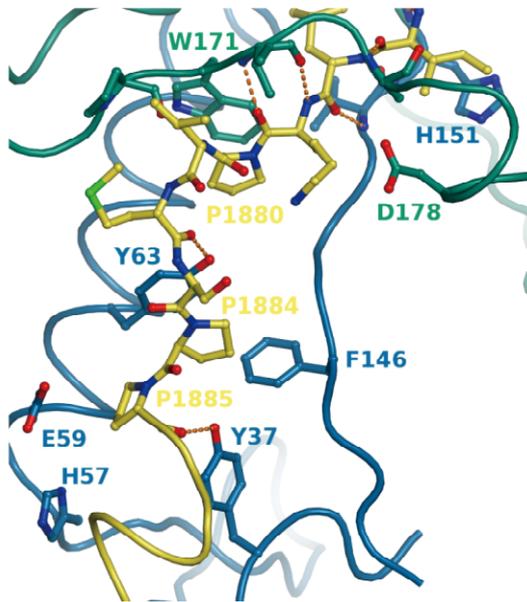


図2 REV7-REV3 相互作用の詳細
REV7 を青と緑, REV3 を黄色で示す

REV7 は3本の α ヘリックスと8本の β ストランドから構成されていた. REV7に結合したREV3は1つの β ストランドと α ヘリックスから構成されている. REV3はREV7のC末端領域に包み込まれるようにしてREV7に結合し

ていた. そのため, REV3の β ストランドはREV7の β ストランドと逆平行 β シートを形成していた (図1). 相互作用を詳細に調べた結果, REV7とREV3は水素結合と疎水結合によって相互作用していた (図2). 疎水結合に関して, REV7のY63がREV3のP1884と, REV7のW171がREV3のP1880と側鎖を介した特徴的なスタッキング相互作用をしていた (図2). どの相互作用がREV7-REV3複合体の形成に重要なかを調べるために, REV7変異体を用いた *in vitro* での結合実験を行った. その結果, Y63AとW171A変異体でREV3との結合が大きく減少した (Lane 5, 8). 特に, W171AではREV7とREV3の相互作用はほとんど見られなかった. つまり, REV7とREV3の相互作用は, Y63とW171による疎水結合が最も重要であることが明らかになった (図3).

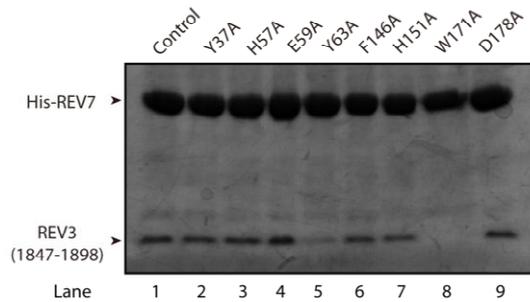


図3 REV7 変異体とREV3との結合実験

(3) REV1, REV3, REV7の相互作用

これまで, 3つのREVタンパク質がTLSにおいて協同的に働くことはわかっていたが, 高等真核生物において3つのREVタンパク質が3者複合体を形成するかどうかは不明であった. そこで, まずヒトREV7-REV3複合体がヒトREV1と結合するかどうかを調べたところ, 3者複合体の形成を世界で初めて確認できた (図4, Lane 1, 2).

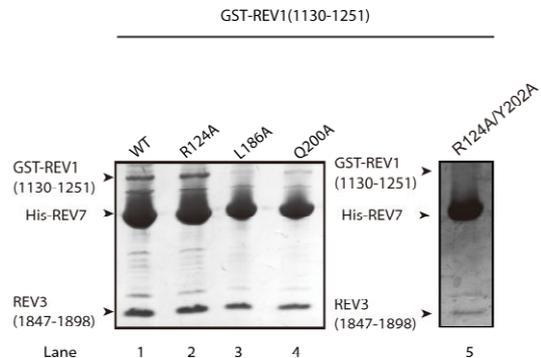


図4 REV7-REV3複合体とREV1との相互作用

次に, REV1がREV7の何処に結合するかを調べるために, REV7にアラニン変異を導入し,

REV1 との相互作用を *in vitro* で調べた。その結果、L186A, Q200A 変異によって、REV1 との相互作用が著しく減少することが分かった (図 4, Lane 3, 4)。L186 と Q200 は REV7 の C 末側の β シート上に位置する。REV7 の C 末領域は、REV3 との相互作用によって「開いた構造」から「閉じた構造」に変化すると考えられるため、REV1 は「閉じた構造」の REV7 と相互作用すると考えられる。このことから、まず REV7-REV3 複合体が形成され、その後、REV1 が REV7 の閉じた C 末領域と相互作用し、3 者複合体が形成されると考えられる (図 5)。

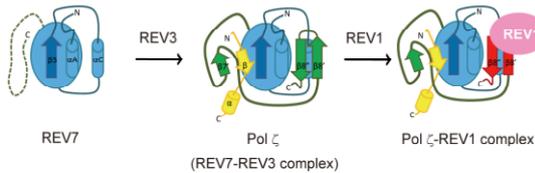


図 5 REV7, REV3, REV1 相互作用の作用機序

(4) REV7 の細胞機能

REV7 を介した相互作用の細胞機能を明らかにするために、REV7 ノックアウト細胞に、REV1 および REV3 と相互作用できない REV7 変異体 (Y63A/W171A) を発現させ、シスプラチンに対する感受性試験を行った。その結果、REV7 のノックアウト細胞と同程度の致死的な感受性を示した (図 6)。従って、REV7 を介した 3 者複合体の形成が DNA 損傷耐性に重要であることが明らかになった。

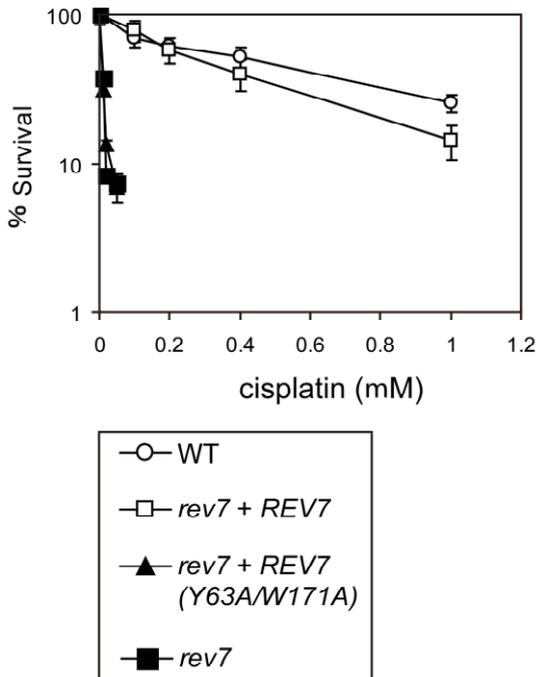


図 6 REV7 変異株のシスプラチンに対する感受性試験

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 6 件)

- ① Kodai Hara, Hiroshi Hashimoto, Yoshiki Murakumo, Shunsuke Kobayashi, Toshiaki Kogame, Satoru Unzai, Satoko Akashi, Shunichi Takeda, Toshiyuki Shimizu, Mamoru Sato, Crystal structure of human REV7 in complex with a human REV3 fragment and structural implication of the interaction between DNA polymerase ζ and REV1, *J Biol Chem* (2010) vol. 285 (16) pp 12299-307.
- ② Kodai Hara, Toshiyuki Shimizu, Satoru Unzai, Satoko Akashi, Mamoru Sato, Hiroshi Hashimoto, Purification, crystallization and initial X-ray diffraction study of human REV7 in complex with a REV3 fragment, *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* (2009) vol. 65 (Pt 12) pp. 1302-5

[学会発表] (計 24 件)

- ① PF シンポジウム (つくば) 3/8-3/9, 2010
ヒト REV7 の構造生物学的研究
原幸大, 橋本博, 村雲芳樹, 小林俊介, 小亀敏明, 雲財悟, 明石知子, 武田俊一, 清水敏之, 佐藤衛
- ② 日本分子生物学会 (横浜) 12/9-12/12, 2009
ヒト由来 DNA ポリメラーゼ ζ と REV1 の相互作用に関する構造生物学的研究
原幸大, 清水敏之, 村雲芳樹, 小林俊介, 小亀敏明, 武田俊一, 佐藤衛, 橋本博
- ③ 日本生物物理学会年会 (徳島) 10/30-11/1, 2009
Crystal structure of human REV7 in complex with REV3 fragment
Kodai Hara, Toshiyuki Shimizu, Yoshiki Murakumo, Tomo Hanafusa, Haruo Ohmori, Mamoru Sato, Hiroshi Hashimoto
- ④ 日本生化学会大会 (神戸) 10/21-10/24, 2009
ヒト由来 REV7-REV3 複合体の X 線結晶構造解析
原幸大, 清水敏之, 村雲芳樹, 小林俊介, 小亀敏明, 花房朋, 大森治夫, 武田俊一, 佐藤衛, 橋本博

- ⑤ AsCA 2009 (Beijing) 10/22-10/25
Crystal structure of human REV7 in
complex with REV3 fragment
Hiroshi Hashimoto
- ⑥ 遺伝研研究会 (非公開) 「ユビキチン・
SUMO による DNA 複製および DNA 修復系の
制御」(三島) 10/7-10/8, 2009
REV7 と REV3 フラグメントの複合体構造
橋本 博
- ⑦ ACA Meeting, 2009 (Toronto) 7/25-7/30
Crystal structure of REV7
Kodai Hara, Toshiyuki Shimizu, Yoshiki
Murakumo, Tomo Hanafusa, Haruo Ohmori,
Mamoru Sato, Hiroshi Hashimoto
- ⑧ 日本蛋白質科学会 (熊本) 5/20-5/22,
2009
ヒト由来 Mad2L2 の結晶学的研究
原幸大, 清水敏之, 村雲芳樹, 花房 朋,
大森治夫, 佐藤衛, 橋本博

[その他]

ホームページ等

<http://www.kek.jp/newskek/2010/marapr/REV7.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 博 (HASHIMOTO HIROSHI)

研究者番号 : 40336590

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :