

平成 22 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ~ 2009
 課題番号：20790040
 研究課題名 (和文) DNA 複製後修復に働く MUTYH-PCNA 複合体の新生鎖修復機構の構造学的研究
 研究課題名 (英文) Structural basis of the replication-associated DNA repair by the MUTYH-PCNA complex
 研究代表者
 中村 照也 (NAKAMURA TERUYA)
 熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
 研究者番号：40433015

研究成果の概要 (和文): DNA 修復酵素である MUTYH と DNA 複製に関わるタンパク質 PCNA の修復複合体の X 線結晶構造解析を行い、その DNA 複製後修復機構および、MUTYH が関与する遺伝性疾患の発症機構を原子レベルで解明することを目的に研究を行った。結晶化実験に適した MUTYH および PCNA の精製に成功し、そして MUTYH 複合体の結晶化条件の探索を行い、結晶構造決定への前進となる成果を得た。

研究成果の概要 (英文): In order to reveal the structural insight into the replication-associated DNA repair by MUTYH and PCNA, we performed the purification and crystallization experiments for the crystal structure determination of the MUTYH-PCNA complex. We have succeeded in the purification of MUTYH and PCNA, and carried out the initial screening of crystallization conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：構造生物学

1. 研究開始当初の背景

8-オキソグアニン (8-oxoG) は、通常生命活動において生じる酸化損傷塩基の中でも生成頻度が非常に高く、シトシンのみならず

アデニン (A) と塩基対を形成するため、高い変異原性を示す。MUTYH は、8-oxoG:A ミス塩基対からアデニンを取り除く真核生物由来の DNA グリコシラーゼであり、DNA 複製

の足場タンパク質 PCNA との相互作用を介して、8-oxoG:A ミス塩基対から新生鎖上のアデニンを特異的に取り除くという DNA 複製後修復を行うと考えられている。MUTYH が 8-oxoG:A ミス塩基対の塩基除去修復を行う際、アデニンが鋳型鎖上にある時に機能すると変異の固定を引き起こすため、MUTYH と PCNA の複合体による、新生鎖上のアデニンに対して特異的に機能するという機構は、突然変異の抑制に大きく寄与していると考えられている。また近年、DNA 複製・修復、細胞周期に関わる種々のタンパク質が PCNA 結合配列を有することが確認されており、PCNA を介したタンパク質の機能制御についての研究価値は、国内外で飛躍的に上昇している。さらに、MUTYH は疾患にも密接に関連しており、ヒト *MUTYH* 遺伝子の変異は家族性大腸腺腫症の原因となっている。

研究代表者は、これまでに 8-oxoG 修復に関わる酵素の構造学的研究を行ってきた。DNA 中の 8-oxoG は、DNA 前駆体 8-oxo-dGTP が DNA ポリメラーゼにより、誤って DNA 中に取り込まれることによって生じる。8-oxo-dGTP の加水分解酵素である大腸菌 MutT のアポ体、ホロ体、8-oxoG ヌクレオチド複合体の結晶構造を決定し、MutT の 8-oxoG ヌクレオチドへの高親和性 (Nakamura T. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2010) および加水分解反応機構の構造学的基盤を得た。さらに、8-oxo-dGTP 以外にも様々な酸化損傷ヌクレオチドを加水分解する MutT のヒトホモログ、MTH1 について複数の基質との複合体構造を決定し、MTH1 の幅広い基質特異性の発現機構を明らかにしている。

この様な研究背景下、真核生物において高度に制御された MUTYH の 8-oxoG に関与する DNA 修復機構を構造学的に解明し、さらに、MUTYH が関わる家族性大腸腺腫症の分子レベルでの発症機構についての構造学的知見を得ることを目的に、本研究に着手した。

2. 研究の目的

酸化損傷塩基 8-oxoG はアデニンとミス塩基対を形成する内在性の変異原であり、DNA グリコシラーゼである MUTYH が、8-oxoG:A ミス塩基対からアデニンを取り除く。MUTYH が 8-oxoG:A ミス塩基対の塩基除去修復を行う際、アデニンが鋳型鎖上にある時に機能すると変異の固定を引き起こすため、アデニンが新生鎖上にある時のみ機能する必要がある。MUTYH は PCNA 結合配列を有し、PCNA との複

合体形成により、新生鎖上のアデニンを特異的に認識して効率的に DNA を修復するという高度に制御された DNA 複製後修復を行うと考えられている。また、MUTYH は、遺伝性疾患との関与からも注目されており、ヒト *MUTYH* 遺伝子の変異は家族性大腸腺腫症の原因となっている。本研究では、MUTYH の修復複合体の X 線結晶構造解析を行い、複合体の結晶構造を決定し、

(1) PCNA が関与する MUTYH の DNA 新生鎖特異的修復機構の解明を行う。

(2) 家族性大腸腺腫症の原因である変異型 MUTYH について、結晶構造から分子レベルでの発症機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、MUTYH の新生鎖 DNA 修復機構の解明を目的として、MUTYH-DNA、MUTYH-PCNA、MUTYH-PCNA-DNA の複合体の結晶構造解析を行う。MUTYH と PCNA は、大腸菌により発現させる。その際、MUTYH については、チオレドキシシン融合 MUTYH (TRX-MUTYH) として発現させる。なお、MUTYH によるミス塩基対の認識様式を明らかにするため、MUTYH は、DNA 結合能は保持しているが、グリコシラーゼ活性を失った変異体を用いる。

(2) MUTYH および PCNA の大量発現、精製を行う。PCNA については、大腸菌で大量発現させ、イオン交換カラム、ゲルろ過カラム等を用いて、結晶化実験に適応できる高純度かつ大量精製を行う。MUTYH については、大腸菌で TRX-MUTYH を大量発現させ、アフィニティーカラム、ゲルろ過カラム、イオン交換カラム等を用いて精製を行う。精製過程において、プロテアーゼ処理により、TRX タグを取り除く。MUTYH は TRX タグ除去前後で安定性が変化する傾向にあることから、単独でより安定な MUTYH の精製系を確立するため、TRX タグ除去のプロテアーゼ処理前後において種々の界面活性剤を含めた溶液条件の検討を行う。単独での MUTYH の精製を優先するが、MUTYH-PCNA 複合体形成によって、安定な状態で精製できることも期待して、TRX-MUTYH の TRX タグ除去のプロテアーゼ処理溶液中に PCNA を加えるなど、PCNA との複合体での精製条件も検討する。

(3) MUTYH 複合体の形成および結晶化実験を行う。精製した MUTYH および PCNA を用い、それぞれの複合体の形成、さらには DNA を含

めた複合体の形成を Native-PAGE, ゲルろ過等の手法により確認する。得られた MUTYH 複合体について結晶化条件の探索を行う。タンパク質-DNA 複合体では, DNA の配列や長さが結晶化においてさらなる重要な要素として追加されるため, スクリーニング数が大幅に増加するが, 微量結晶化装置 TOPAZ (1.5 μ L で 96 スクリーニングが可能) を用いることにより, 少量で広範なスクリーニングができる。ヒットした条件の周辺で結晶化条件の精密化を行い, X線回折実験に適した結晶を調製する。

(4) X線回折強度データの収集を行う。得られた結晶のチェックと初期回折データの測定は, 理学社のX線回折装置を用いて行う。構造解析, 精密化に用いる回折データは放射光施設 SPring-8, PF で測定する。位相の決定は, MUTYH が有する[4Fe-4S]クラスターの鉄原子, または, セレノメチオニル化 PCNA を用いた複合体結晶のセレン原子を利用した単(多)波長異常分散法により行う。また, 構造が明らかになっている PCNA をサーチモデルとした分子置換法も並行して行う。

(5) MUTYH の発現領域も検討する。MUTYH 全長を用いた構造解析を最優先とするが, 結晶化には, 発現領域を変えたコンストラクトによる検討を行う場合もあるので, 全長に近い発現領域の異なるコンストラクトを調製し, 発現および可溶性画分への移行が見られる発現系を構築する。

4. 研究成果

(1) まず, 結晶化実験に必要となる MUTYH と PCNA の大量調製を行った。PCNA については, 大腸菌で大量発現させ, イオン交換カラム, ゲルろ過カラム等を用いて, 高濃度かつ高純度タンパク質を調製した。MUTYH は, これまで発現領域も含め, ヒスチジンタグ, グルタチオン S-トランスフェラーゼ, TRX 等の融合タンパク質として発現条件を検討した結果, 収量の多い TRX 融合タンパク質として大腸菌で大量発現させ, 精製を行った。大量スケールにおいて, プロテアーゼによる TRX タグの切断を行うと, MUTYH 単独では凝集, 沈殿するという問題が生じた。そこで, TRX タグ切断過程において, プロテアーゼの反応時間, PCNA 添加による複合体としての安定性の向上, 界面活性剤の利用など種々の条件検討を行った結果, TRX タグを切断した単独

MUTYH を安定な状態で回収することができた。続けて, カラムを用いた精製を行い, 最終的に, 結晶化実験に適した高濃度のサンプルを調製し, MUTYH を精製した。

(2) 精製した MUTYH について, Native-PAGE により DNA との結合を確認した MUTYH と DNA 溶液を混合し, MUTYH-DNA 複合体の結晶化条件の探索を行った。結晶化実験には, 微量結晶化装置 TOPAZ を用いて行った。同様に, MUTYH-PCNA 複合体についても結晶化実験を行った。現在のところ結晶は得られておらず, 今後は, ゲルろ過カラム等を用いて, 複合体のさらなる精製, および(3)に示した発現領域の異なる MUTYH を用いて, 引き続き結晶化条件の探索を行っていく予定である。また, TOPAZ は結晶化方法が自由界面拡散法であるため, 結晶化方法が異なり, 蒸気拡散法を適用できるナノリッター分注システム mosquito も用いて, 結晶化条件の探索を行いたいと考えている。

(3) これらの実験と並行して MUTYH の発現領域の再検討もを行い, 全長に近い発現領域の異なるコンストラクトを調製し, 発現および可溶性画分への移行が見られる発現系を構築した。これら MUTYH の複数のコンストラクトを用いて, より安定かつ高純度で調製できる複合体サンプルについて結晶化条件の探索を行っていく。

(4) 本研究では, 可溶化タグを取り除いた MUTYH の精製に成功し, MUTYH 複合体の結晶化条件の探索を行った。これらの研究成果は, DNA 複製後修復に働く MUTYH-PCNA 複合体の新生鎖修復機構の解明に向けた, 結晶構造決定への前進であると考えられる。また, ヌクレオチドプール中の 8-oxoG ヌクレオチド除去に働く 8-oxo-dGTP 加水分解酵素である大腸菌 MutT については, これまでに動的タンパク質結晶学により一連の結晶内反応過程を明らかにしているが, さらに詳細な機構の解明を目的とし, 結晶化条件および反応条件を変更した。その結果, 結晶内反応が速く, 同期性がより高い条件を見出すことに成功し, それらの条件下での反応中間体の結晶構造を決定した。

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 5 件)

Teruya Nakamura, Sachiko Meshitsuka, Seiju Kitagawa, Nanase Abe, Junichi Yamada, Tetsuya Ishino, Hiroaki Nakano, Teruhisa Tsuzuki, Takefumi Doi, Yuji Kobayashi, Satoshi Fujii, Mutsuo Sekiguchi, and Yuriko Yamagata, "Structural and dynamic features of the MutT protein in the recognition of nucleotides with the mutagenic 8-oxoguanine base" *J. Biol. Chem.*, 285, 444-452 (2010) 査読有

Masanori Miyata, Takashi Sato, Mineyuki Mizuguchi, Teruya Nakamura, Shinji Ikemizu, Yuko Nabeshima, Seiko Susuki, Yoshiaki Suwa, Hiroshi Morioka, Yukio Ando, Mary Ann Suico, Tsuyoshi Shuto, Tomoaki Koga, Yuriko Yamagata, and Hirofumi Kai "Role of the glutamic acid 54 residue in transthyretin stability and thyroxine binding" *Biochemistry*, 49, 114-123 (2010) 査読有

Yohei Mukai, Teruya Nakamura, Yasuo Yoshioka, Hiroko Shibata, Yasuhiro Abe, Tetsuya Nomura, Madoka Taniai, Tsunetaka Ohta, Shinsaku Nakagawa, Shin-ichi Tsunoda, Haruhiko Kamada, Yuriko Yamagata, and Yasuo Tsutsumi "Fast binding kinetics and conserved 3D structure underlie the antagonistic activity of mutant TNF: useful information for designing artificial proteo-antagonists" *J. Biochem.*, 146, 167-172 (2009) 査読有

Yohei Mukai, Teruya Nakamura, Yasuo Yoshioka, Shin-ichi Tsunoda, Haruhiko Kamada, Shinsaku Nakagawa, Yuriko Yamagata, and Yasuo Tsutsumi, "Crystallization and preliminary X-ray analysis of the tumour necrosis factor alpha-tumour necrosis factor receptor type 2 complex" *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 65, 295-298 (2009) 査読有

Yohei Mukai, Hiroko Shibata, Teruya Nakamura, Yasuo Yoshioka, Yasuhiro Abe, Tetsuya Nomura, Madoka Taniai, Tsunetaka Ohta, Shinji Ikemizu, Shinsaku Nakagawa, Shin-ichi Tsunoda, Haruhiko Kamada,

Yuriko Yamagata, and Yasuo Tsutsumi, "Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant" *J. Mol. Biol.*, 385, 1221-1229 (2009) 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

中村 照也, "動的タンパク質結晶学により捕らえた 8-oxo-dGTPase の求核水分子の活性化機構", 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 6 回公開シンポジウム, 2009 年 12 月 2 日, 千里ライフサイエンスセンター, 大阪

Teruya Nakamura, "Visualization of the Mn²⁺ dependent 8-oxo-dGTP hydrolysis reaction in *E. coli* MutT crystal", 第 19 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 2009 年 6 月 12 日, 大阪大学銀杏会館, 大阪

中村 照也, "機能未知であるヒト一回膜貫通型タンパク質の C 末ドメインの立体構造に基づく機能予測", 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 2009 年 5 月 20 日, 熊本全日空ホテルニュースカイ, 熊本

中村 照也, "ヒト MTH1 の酸化ヌクレオチドに対する幅広い基質特異性の構造学的基盤", 第 26 回 PF シンポジウム, 2009 年 3 月 25 日, つくば国際会議場, つくば

Teruya Nakamura, "High-resolution X-ray diffraction study of the hMTH1 mutant", XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2008), 2008 年 8 月 28, 29 日, 大阪国際会議場, 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 照也 (NAKAMURA TERUYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号: 40433015