

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770109

研究課題名（和文）DNA 損傷を乗り越える DNA ポリメラーゼ ζ /REV1 複合体の構造機能解析研究課題名（英文）Structural study of translesion DNA polymerase ζ /REV1 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）：

REV1, REV3, REV7 は損傷乗り越え DNA 合成において中心的なタンパク質である。損傷乗り越え DNA 合成とは、損傷塩基を鋳型にした DNA 合成であり、DNA 損傷による複製停止を回避する戦略である。REV1 と REV3 は誤りがちな DNA ポリメラーゼである。REV7 は REV1 と REV3 の両方と相互作用し、三者複合体 REV1-REV7-REV3 を形成する。特に REV7-REV3 複合体を DNA ポリメラーゼ ζ という。REV7 は 2 つの誤りがちな DNA ポリメラーゼを機能的かつ物理的に繋ぐアダプタータンパク質である。本研究では、REV1, REV3, REV7 が中心となって機能する損傷乗り越え DNA 合成の分子機構を原子レベルで明らかにするため、REV1-REV7-REV3 複合体の X 線結晶構造解析を行った。我々は REV1-REV7-REV3 複合体の結晶化に成功し、電子密度から REV1 の C 末端ドメインが 4 つの α ヘリックスで構成されたヘリックスバンドル構造であることを明らかにした。研究成果の概要（英文）：

REV1, REV3 and REV7 are pivotal proteins in translesion DNA synthesis that allows to continue DNA synthesis even in the presence of DNA damage. REV1 and REV3 are error-prone DNA polymerases. REV7 interacts with both polymerases, thereby acts as an adaptor protein that functionally links those polymerases. The ternary complex of the C-terminal domain of human REV1 in complex with REV7 bound to a REV3 fragment was successfully crystallized. The crystals belong to the space group of $P3_121$ with the cell-dimension of $a = b = 74.7$, $c = 124.5$ Å and $\beta = 120^\circ$. Electron density map obtained from molecular replacement method using REV7-REV3 complex as a search model clearly shows that the REV1 C-terminal domain adopts a four-helices bundle structure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 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：生物化学・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

損傷乗り越え DNA 合成は損傷塩基を鋳型とした DNA 合成である。損傷乗り越え DNA 合成

では、複製型 DNA ポリメラーゼに代わって、REV1, REV3, REV7 が中心的役割を果たす。損傷乗り越え DNA 合成は、損傷部位での 1 塩基挿入反応（インサージョン）とそれに続く数塩基の伸長反応（エクステンション）の 2 段階反応で進行する。挿入反応は REV1, Pol η, Pol κ, Pol ι などのインサーターと呼ばれる DNA ポリメラーゼが行い、伸長反応はエクステンダーと呼ばれる REV7-REV3 複合体（Pol ζ）が行う。つまり損傷乗り越え DNA 合成では、損傷部位において、複製型ポリメラーゼとインサーターの交換、インサーターとエクステンダーの交換、エクステンダーと複製型ポリメラーゼの交換が起こる。最近申請者は、複製型 DNA ポリメラーゼとインサーターの交換メカニズムを構造生物学的に解明した。しかし、インサーターとエクステンダーの交換メカニズムは未だ不明であった。

前述のように、REV1 はインサーターであり、損傷塩基の一つである脱塩基部位を効率よく乗り越える。エクステンダーである Pol ζ は、触媒サブユニット REV3 と非触媒サブユニット REV7 から構成される複合体であり、REV3 が損傷部位からの伸長反応を行う。REV1, REV3, REV7 遺伝子のいずれかを欠失させた動物細胞は UV や DNA 損傷薬剤に対して高い感受性を示す。また、REV3 ノックアウトマウスは胎性致死であることから、これら REV タンパク質の重要性が広く認識されている。

最近申請者は、ヒト REV7 とヒト REV3 フラグメントの複合体（Pol ζ）の結晶構造解析に成功し、Pol ζ の形成メカニズムを解明した。また申請者は、ヒト REV7-REV3 複合体がヒト REV1 の C 末端領域と相互作用し、REV1-REV7-REV3 複合体（Pol ζ/REV1 複合体）を形成することを世界で初めて示した。しかし、REV1-REV7-REV3 複合体の立体構造、相互作用メカニズム、複合体の詳細な細胞機能は不明であり、REV1-REV7-REV3 複合体の構造生物学的研究が求められている。

2. 研究の目的

申請者は、これまでに科学研究費補助金（若手研究 (B)：20770089）の支援を受け、損傷乗り越え DNA 合成におけるタンパク質間相互作用の構造機能研究を精力的に進めてきた。

先に述べたとおり、損傷乗り越え DNA 合成では、損傷部位において、複製型ポリメラーゼとインサーターの交換、インサーターとエクステンダーの交換、エクステンダーと複製型ポリメラーゼの交換が起こる。申請者はこれまでに、ヒト PCNA と様々なインサーターの複合体の結晶構造解析を行い、複製型ポリメラーゼとインサーターの交換メカニズムを解明した。さらに、X 線結晶

構造解析によって、ヒト Pol ζ（REV7/REV3 複合体）の原子レベルの立体構造を世界に先駆けて決定し、Pol ζ の形成メカニズムを解明した。また、ヒト Pol ζ とヒト REV1 が複合体を形成することを世界で初めて示した。しかし、REV1-REV7-REV3 複合体の立体構造、相互作用メカニズム、インサーターとエクステンダーの交換メカニズムは未だ不明である。申請者は、損傷乗り越え DNA 合成における DNA ポリメラーゼの交換メカニズムを統合的に理解するためには、REV1-REV7-REV3 複合体の構造解析・機能解析が不可欠であると考え、ヒト REV1-REV7-REV3 複合体の構造生物学的研究を計画した。本研究では、インサーターとエクステンダーの交換メカニズムを多角的に解明することを目指す。

3. 研究の方法

ヒト REV1-REV7-REV3 複合体の結晶構造解析、機能解析に向けて試料調製を行う。申請者はすでに、全長 REV7 と REV3 フラグメント（1847-1898）を用いて、ヒト REV7-REV3 複合体の結晶構造解析に成功している。さらに申請者は、ヒト REV1 の C 末領域（1130-1251）を用いて、REV1-REV7-REV3 複合体の形成を示した。したがって、この系をもとに REV1-REV7-REV3 複合体の大量調製、結晶化を行った。

4. 研究成果

ヒト REV7-REV3 複合体は、pETDuet-1 ベクターを利用した大腸菌の共発現系で発現させ、カラムクロマトグラフィーによって精製した。具体的には、ニッケルアフィニティーカラムクロマトグラフィー、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いた。申請者はこれまでに、ヒト REV1（1130-1251）を GST 融合タンパク質として精製を行ってきた。しかし、この系では REV1 の安定性が低く、分解する傾向が見られた。そこで REV1 の発現領域および発現ベクターの再検討を行った結果、1140-1251 の領域で比較的安定な REV1 C 末端ドメインを得ることに成功した（図 1）。

その後、精製した REV7-REV3 複合体と REV1 を混合し、REV1-REV7-REV3 複合体の形成をゲル濾過カラムクロマトグラフィーによって確認した（図 2）。それに基づき、結晶化条件のスクリーニングを行ったところ、いくつかの条件で微結晶が得られ、さらに条件の最適化を行ったところ、X 線回折実験が可能な結晶を得ることに成功した（図 3）。X 線回折実験はつくばフォトンファクトリービームライン BL-1A を用いて行い、3.0 Å 分解能の回折データを収集した（表 1）。集積

したデータは、プログラム HKL2000 を用いて統計処理を行った。REV1-REV7-REV3 の構造解析は、すでに我々が構造決定に成功している REV7-REV3 複合体をモデル分子とした分子置換法で行った。その結果、REV7-REV3 複合体に結合した REV1 C 末端ドメインの電子密度を確認できた (図 4)。現在、結晶化及び初期構造解析の論文を投稿し、構造解析を進めている。

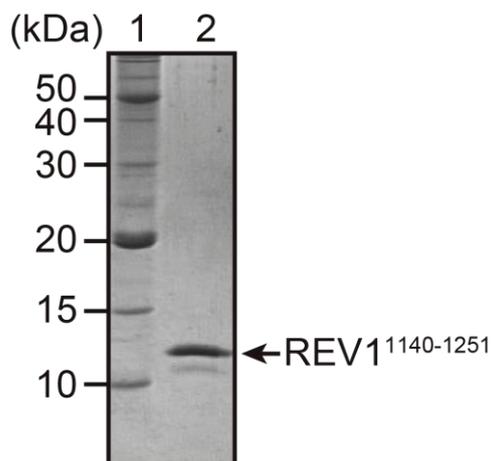


図 1 REV1CTD の精製標品

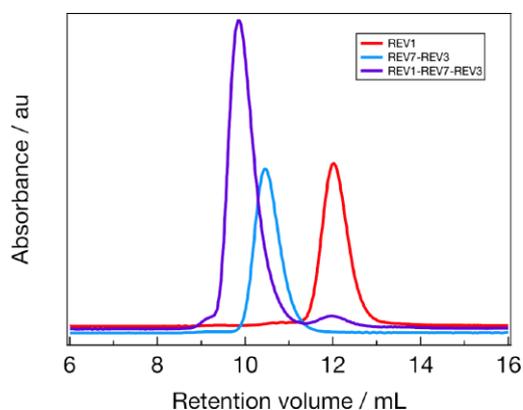


図 2 REV1-REV7-REV3 複合体の形成

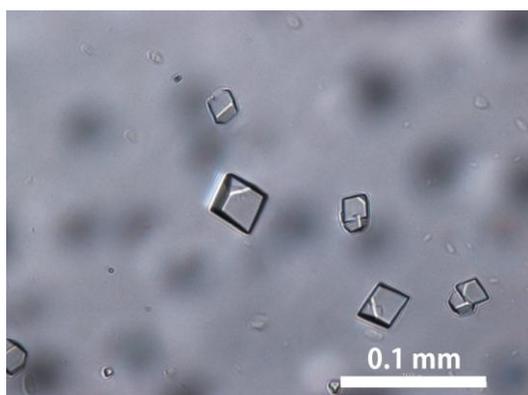


図 3 REV1-REV7-REV3 複合体の結晶

表 1
REV1-REV7-REV3 複合体の結晶学的データ

Wavelength (Å)	1.1000
Resolution range (Å)	20.0 - 3.0 (3.11 - 3.00)
Measured reflections	36,414
Unique reflections	7,829
Completeness	93.6 (88.3)
Mean I/σ (I)	10.7 (2.1)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$	0.124 (0.386)

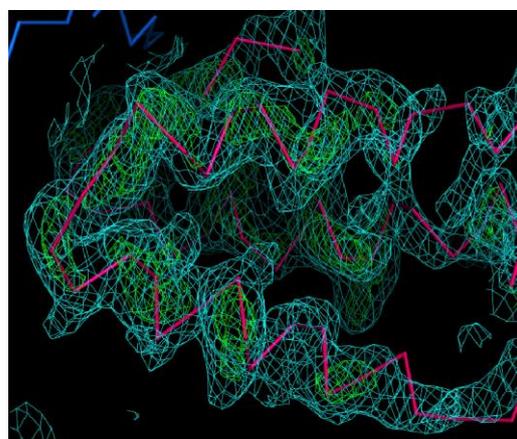


図 4 REV1CTD の電子密度と $C\alpha$ モデル

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 15 件)

[学会発表] (計 32 件)

- 1) Hiroshi Hashimoto, Structure of REV7 in complex with a REV3 fragment and structural implication of the interaction between DNA polymerase ζ and REV1, SNY-YCU Bilateral Symposium on Structural Biology, 11/14, 2011, RIEKN Yokohama Institute, Yokohama, Japan
- 2) Hiroshi Hashimoto, Kodai Hara, Yoshiaki Murakumo, Shunsuke Kobayashi, Toshiaki Kogame, Satoru Unzai, Satoko Akas

hi, Shunichi Takeda, Toshiyuki Shimizu, Mamoru Sato,
Structure of REV7 in complex with a REV3 fragment and structural implication of the interaction between DNA polymerase ζ and REV1,
6/7-6/9, 2011,
NH Grand Hotel Krasnapolsky, Amsterdam, Netherlands

- 3) 橋本 博,
損傷乗り越えDNA合成におけるタンパク質間相互作用の構造生物学,
第18回大阪府立母子保健総合医療センターシンポジウム(母と子のすこやか基金),

12/24, 2010,
大阪府立母子保健総合医療センター研究所

- 4) Hiroshi Hashimoto, Kodai Hara, Yoshiaki 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,
3R meeting,
10/16-10/30, 2010,
Toyama Conference Center

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：