

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月14日現在

機関番号：22701  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23770125  
 研究課題名（和文） DNA 損傷に应答して PCNA をユビキチン化するヒト HLTF の構造生物学的研究  
 研究課題名（英文） Study of human HLTF, a ubiquitin ligase for PCNA under DNA damage  
  
 研究代表者  
 菱木 麻美（HISHIKI ASAMI）  
 横浜市立大学 大学院生命ナノシステム科学研究科・特任助教  
 研究者番号：60571172

研究成果の概要（和文）：HLTF は DNA 損傷による複製停止を回避する戦略の一つであるテンプレートスイッチに関与する。HLTF はユビキチンリガーゼ活性を持つ RING ドメインと DNA ヘリカーゼ活性を持つ Snf2 ドメインを併せ持つ特殊なタンパク質であり、さらに新奇 DNA 結合ドメインと予想される HIRAN ドメインを持つことが知られている。本研究ではヒト HLTF (hHLTF) RING ドメインの試料調製、hHLTF HIRAN ドメインの調製および結晶化を行い、hHLTF HIRAN ドメイン-DNA 複合体の構造解析を行った。さらに、hHLTF HIRAN ドメインと DNA との相互作用解析を行い、hHLTF HIRAN ドメインの DNA との結合に重要な残基を特定した。

研究成果の概要（英文）：Helicase-Like Transcription Factor (HLTF) is involved in template switching pathway, one of DNA damage tolerance mechanism, which allows continuous DNA synthesis even in the presence of DNA lesion. HLTF consists of RING, Snf2, and HIRAN domains. RING and Snf2 domains are responsible for ubiquitination of PCNA and unwinding of DNA, respectively. The N-terminal HIRAN domain is predicted as a novel DNA-binding domain. We tried to prepare human HLTF (hHLTF) RING and HIRAN domains as recombinant proteins. We analyzed interaction between hHLTF HIRAN domain and DNA by Electrophoresis Mobility Shift Assay.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

遺伝情報の中枢であるゲノム DNA は、放射線や化学物質などの外的要因や、細胞内代謝産物、活性酸素や細胞内 pH の変化などの内

的要因によって絶えず損傷を受ける。DNA 損傷が修復されずに複製装置が損傷箇所に到達すると、塩基の誤対合や複製フォークの進行阻害が起こる。これらの DNA 複製の異常は、ゲノムの不安定性や細胞死を引き起こすこ

とから、発がんや老化促進の原因となる。このような危機的事態を回避するために、細胞は『損傷トランス』と呼ばれる戦略を用いる。損傷トランスは、損傷乗り越え DNA 合成 (TLS) とテンプレートスイッチの二つの経路で構成されるが、いずれの場合も DNA ポリメラーゼの活性化因子である増殖細胞核抗原 (PCNA) のユビキチン化によって制御されている。鋳型 DNA の損傷により複製が停止した場合、PCNA に Rad6-Rad18 複合体、Ubc13-Mms2 (E2)、Rad5 (E3) が作用すると、PCNA はユビキチンの K63 残基を介したポリユビキチン化修飾を受け、テンプレートスイッチが誘導される。テンプレートスイッチとは、組換え修復に類似した修復機構である。テンプレートスイッチでは、新生鎖の相同領域や姉妹染色体の相同鎖を鋳型として部分的に DNA 合成が行われ、その後、複製装置が複製の進行方向に移動することで損傷塩基を乗り越えると考えられているが、詳細な分子機構は不明である。

近年、酵母 Rad5 (yRad5) がユビキチンリガーゼ活性とは別に、二本鎖 DNA を巻き戻す DNA ヘリカーゼ活性を持ち、これがテンプレートスイッチを促進することが示された。さらに、yRad5 のホモログとして、同様のドメイン構造を持つヒト HLTf (hHLTf) が同定された。yRad5 と hHLTf は、新奇 DNA 結合ドメインと予想される HIRAN ドメイン、ヘリカーゼ活性を持つ Snf2 ドメイン、ユビキチンリガーゼ活性を持つ RING ドメインを持つことが知られている。しかし、Rad5 あるいは HLTf による PCNA のポリユビキチン化が、どのようにしてテンプレートスイッチを引き起こすのか、HIRAN ドメインや Snf2 ドメインがテンプレートスイッチでどのように機能するかは不明である。

そこで、申請者はユビキチンリガーゼ活性とヘリカーゼ活性を併せ持つ hHLTf の構造機能解析によってテンプレートスイッチの構造基盤を得ることを目指し、hHLTf の構造生物学的研究を計画した。

## 2. 研究の目的

HLTf はユビキチンリガーゼ活性と DNA ヘリカーゼ活性を併せ持つ特殊なタンパク質であり、テンプレートスイッチを誘導するために重要なタンパク質である。本研究では、hHLTf の構造解析と構造に基づく機能解析を行い、テンプレートスイッチの構造基盤を得ることを目指す。

## 3. 研究の方法

hHLTf は全長 1009 アミノ酸残基からなる。N 末端側から順に、新奇 DNA 結合ドメインと

予想される HIRAN ドメイン、ヘリカーゼ活性を持つ Snf2 ドメイン、ユビキチンリガーゼ活性を持つ RING ドメインを持つ (図 1)。

hHLTf は、全長での試料調製が困難であると考えられたため、RING ドメインと HIRAN ドメインに着目し、組み換えタンパク質として大腸菌を用いて調製した。得られた hHLTf HIRAN ドメインを用いて hHLTf HIRAN ドメイン単体、hHLTf HIRAN ドメイン-DNA 複合体の結晶化を行った。X 線結晶構造解析法により hHLTf HIRAN ドメイン-DNA 複合体の三次元構造解析を行った。また、hHLTf HIRAN ドメインと DNA との相互作用をグルシフトアッセイによって調べ、DNA との相互作用に重要なアミノ酸残基を特定した。



図 1 hHLTf のドメイン構造

## 4. 研究成果

### (1) hHLTf RING ドメインの調製

hHLTf RING ドメインをコードする遺伝子を発現ベクターにサブクローニングし、大腸菌を用いて大量発現させた。その後、アフィニティーカラムクロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー等の各種クロマトグラフィーを用いて精製を試みたが、結晶化に適した純度の目的タンパク質を得ることはできなかった。

### (2) hHLTf HIRAN ドメインの構造解析

#### ① hHLTf HIRAN ドメインの調製

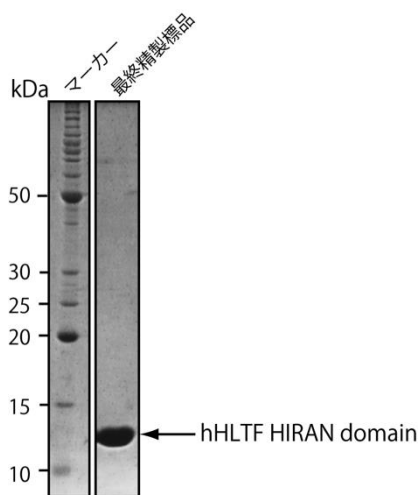


図 2 hHLTf HIRAN ドメインの精製標品

hHLTF HIRAN ドメインをコードする遺伝子を発現ベクターにサブクローニングし、大腸菌を用いて大量発現させた。その後、アフィニティークラムクロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって精製した。最終的に図 2 に示すような、高純度の hHLTF HIRAN ドメインを得た。

同様の方法でセレノメチオニンを導入した hHLTF HIRAN ドメインを調製した。最終的に図 3 に示すような、高純度のセレノメチオニン置換体 hHLTF HIRAN ドメインを得た。

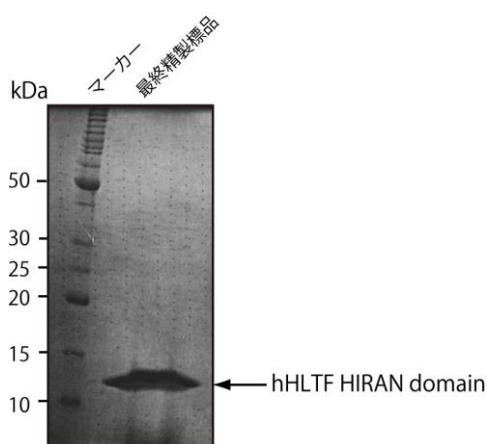


図 3 セレノメチオニン置換体 hHLTF HIRAN ドメインの精製標品

② hHLTF HIRAN ドメイン単体、hHLTF HIRAN ドメイン-DNA 複合体の結晶化

2-1. hHLTF HIRAN ドメイン単体の結晶化

市販のスクリーニングキットを用いて結晶化スクリーニングを行った結果、針状結晶を得ることに成功した。この条件を基に、沈殿剤濃度、pH、添加剤などを変化させて結晶化条件の検討を重ねたが、現在までのところ、X 線結晶構造解析に適した結晶は得られていない。

2-2. hHLTF HIRAN ドメイン-DNA 複合体の結晶化

市販のスクリーニングキットを用いて結晶化スクリーニングを行った。結晶が得られた条件を基に、結晶化条件を最適化した結果、柱状結晶を得ることに成功した。

③ hHLTF HIRAN ドメイン-DNA 複合体の結晶構造解析と相互作用

前項で得られた結晶を用いて X 線回折実験を行った。回折強度データの収集は、高エネルギー加速器研究機構の放射光実験施設フォトンファクトリーのビームラインを使用した。得られた回折データを用いて、hHLTF HIRAN ドメイン-DNA 複合体の X 線結晶構造解析を行った。構造解析には、セレノメチオニンを利用した異常分散法を用いた。また、hHLTF HIRAN ドメインと DNA との相互作用をゲルシフトアッセイによって調べ、DNA との相互作用に重要なアミノ酸残基を特定した。

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 2 件)

- (1) Masuda Y, Suzuki M, Kawai H, Hishiki A, Hashimoto H, Masutani C, Hishida T, Suzuki F, Kamiya K. En bloc transfer of polyubiquitin chains to PCNA in vitro is mediated by two different human E2-E3 pairs. *Nucleic Acids Res.* 査読有, Vol. 40 (2012) 10394-10407, 10.1093/nar/gks763.
- (2) Punchihewa C, Inoue A, Hishiki A, Fujikawa Y, Connelly M, Evison B, Shao Y, Heath R, Kuraoka I, Rodrigues P, Hashimoto H, Kawanishi M, Sato M, Yagi T, Fujii N. Identification of small molecule proliferating cell nuclear antigen (PCNA) inhibitor that disrupts interactions with PIP-box proteins and inhibits DNA replication. *J Biol Chem.* 査読有, Vol. 287 (2012) 14289-14300. 10.1074/jbc.M112.353201.

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 増田雄司, 鈴木美紀, 河合秀彦, 菱木麻美, 橋本博, 益谷央豪, 神谷研二. ヒト PCNA のポリユビキチン化の新規分子機構. 第 35 回日本分子生物学会年会. 12/11-12/14 (2012) 福岡国際会議場
- (2) Hashimoto H, Kikuchi S, Hishiki A, Punchihewa C, Fujii N, Sato M. Crystal structures of human PCNA in complex with small molecule inhibitors for cancer therapeutics. *AsCA 12/CRYSTAL 28.* 12/2-12/6 (2012) Aderaide Convention Centre

- (3) Masuda Y, Suzuki M, Kawai H, Hishiki A, Hashimoto H, Masutani C, Hishida T, Suzuki F, Kamiya K. En bloc transfer of poly-ubiquitin chains to PCNA in vitro is mediated by two different human E2-E3 pairs. The 8<sup>th</sup> 3R Symposium. 11/25-11/28 (2012) Awaji Yumebutai International Conference Center
- (4) 菊池壮太郎, 菱木麻美, Chandanamali Punchihewa, 藤井直明, 佐藤衛, 橋本博. 抗がん剤併用薬開発に向けた PCNA と阻害剤との複合体構造. 第 12 回日本蛋白質科学会年会. 6/20-6/22 (2012) 名古屋国際会議場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菱木 麻美 (HISHIKI ASAMI)  
横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・特任助教  
研究者番号：60571172