

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460038

研究課題名(和文)複製と共役したDNA修復機構の構造生物学的研究

研究課題名(英文)Structural study of replication-coupled DNA repair

研究代表者

中村 照也(Nakamura, Teruya)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：40433015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、DNAグリコシラーゼが細胞内で働く姿である機能型修復複合体をX線結晶構造解析により決定し、複製と共役したDNA修復機構を構造学的に解明することを目的に実験を行った。DNAグリコシラーゼの大量調製系を確立し、結晶化スクリーニングを行ってDNAグリコシラーゼ-DNAの複合体結晶を得た。得られた結晶のX線回折強度データを収集し、DNAグリコシラーゼ-DNA複合体の結晶構造を決定した。さらに、結晶構造から明らかになった活性に重要なアミノ酸残基の変異体のグリコシラーゼ活性を測定し、DNAグリコシラーゼによるDNA修復機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this research, we have carried out structural study of a DNA glycosylase which repairs damaged DNA coupled with DNA replication. DNA glycosylase was expressed and prepared with high purity for crystallization. Crystals of the DNA glycosylase and DNA complex were obtained after the crystallization screening and modification of the conditions. X-ray diffraction experiments were carried out on beam lines at SPring-8 and Photon factory, and the crystal structure was determined. In addition, we measured the glycosylase activity of the wild type and its mutants, and revealed the structural insight into the DNA repair mechanism of the DNA glycosylase.

研究分野：医歯薬学

キーワード：構造生物学

1. 研究開始当初の背景

生物の生命活動は、遺伝情報物質である DNA の複製、転写、さらには修復により、高度に維持されている。DNA の複製・転写・修復は、独立した機構として扱われ研究が進んできたが、生命活動において、これら3つの機構が互いに密接に共役していることが明らかになるにつれて、DNA の複製・転写・修復を包括的に理解することが必要となってきた。X 線結晶学を主とする構造生物学においても、これらイベントに関わるタンパク質と DNA との複合体構造から DNA の複製・転写・修復機構がそれぞれ原子レベルで明らかにされてきた。しかしながら、各機構で働くタンパク質が共役してできる超分子複合体の構造解析例は依然少なく、これらタンパク質がどのような相互作用を介して細胞内で実際に機能するかという構造学的基盤のさらなる解明が期待されている。

これまでに申請者らは、X 線結晶構造解析により、DNA 修復酵素が DNA 損傷を認識する仕組みを明らかにし (*J. Biol. Chem.* 2010, *Nucleic Acids Res.* 2011, *Acta Cryst F* 2013&2006)、さらに、時分割 X 線結晶構造解析法を新たに確立することで、DNA 複製酵素である DNA ポリメラーゼの酵素反応過程を原子レベルかつリアルタイムで観察することに成功した (*Nature* 2012, *Biophysics* 2013)。本研究では、複製と共役した DNA 修復を行う DNA グリコシラーゼの構造生物学的研究を行った。

2. 研究の目的

本研究のターゲットである DNA グリコシラーゼは、DNA 複製に関わるタンパク質との相互作用を介して、複製と共役した DNA 修復を行う。本研究では、細胞内で働く姿である DNA グリコシラーゼの機能型修復複合体を X 線結晶構造解析により決定し、複製と共役した DNA 修復過程において、DNA グリコシラーゼがどのようにして損傷部位へリクルートされ、正しく塩基除去修復を行うのかという動

作機構を構造学的に解明することを目的とし、(1) DNA グリコシラーゼ複合体の X 線結晶構造解析、(2) DNA グリコシラーゼの活性測定を行った。

さらに、複数の酸化ヌクレオチドを加水分解する酵素の幅広い基質特異性を明らかにするため、(3) 酸化ヌクレオチド加水分解酵素の X 線結晶構造解析および活性測定を行った。

3. 研究の方法

(1) DNA グリコシラーゼ複合体の X 線結晶構造解析

DNA グリコシラーゼは、遺伝子組み換え体により、発現領域を変えた複数種のコンストラクトを用いて発現させ、アフィニティカラム、イオン交換カラム、ゲルろ過カラムなどを用いてそれぞれ高純度精製を行った。これらタンパク質と、長さや配列を変えた DNA との複合体の安定性は、ゲルろ過法によるピークシフトや、動的光散乱法による単分散性により評価した。

結晶化条件の探索は、ナノリッター分注システム mosquito を用いて行い、1 種類の複合体につき、約 1000 条件の結晶化スクリーニングを行った。その結果、幾つかの条件で DNA グリコシラーゼの微結晶を得た。さらに、結晶化溶液の pH、沈殿剤濃度やタンパク質濃度を細かく検討することで、マイクロリッタースケールで、長い辺が 300 μm 程度の結晶を得た。

(2) DNA グリコシラーゼの活性測定

野性型の大量調製プロトコルに準じて、活性および複合体形成に重要なアミノ酸残基の変異体を調製した。DNA グリコシラーゼの活性測定は、グリコシラーゼ濃度、基質濃度、反応時間を変えて酵素反応を行い、Urea-PAGE により基質および反応生成物を分離、定量した。

(3) 酸化ヌクレオチド加水分解酵素の X 線結

晶構造解析および活性測定

野性型および基質認識に関わる Asp 残基の変異型酸化ヌクレオチド加水分解酵素を大量調製し、2 種類の基質を用いて、それぞれの基質複合体結晶構造を決定した。さらに、野性型および変異型の活性測定を行った。

4. 研究成果

(1) DNA グリコシラーゼ複合体の X 線結晶構造解析

得られた結晶の X 線回折実験は、SPring-8 の BL44XU および Photon Factory Advanced Ring の NW12A にて行った。収集した X 線回折イメージをプログラム HKL2000 で処理した。位相の決定は、プログラム PHENIX を用いて、分子置換法と単波長異常分散法を合わせた手法で行った。さらにプログラム COOT および PHENIX を用いて構造の精密化を完了した。決定した DNA グリコシラーゼ-DNA 複合体の結晶構造から、DNA グリコシラーゼが損傷部位を認識して DNA 修復を行う構造学的基盤を明らかにした。

また、DNA グリコシラーゼとその相互作用因子との複合体についても精製を行った。得られた結晶化サンプルは、動的光散乱実験において、単分散を示し、結晶化スクリーニングにおいて微結晶を得た。

(2) DNA グリコシラーゼの活性測定

決定した DNA グリコシラーゼの構造から、活性および複合体形成に重要なアミノ酸残基の変異体 7 種類の発現コンストラクトを作製した。そのうち、発現量および安定性の良い 2 種類の変異体の大量調製を行った。野性型およびこれら変異体を用いて、DNA グリコシラーゼ活性を測定することで、構造から示唆されたアミノ酸残基の活性への寄与を実証することができた。

(3) 酸化ヌクレオチド加水分解酵素の X 線結晶構造解析および活性測定

野性型および 2 種類の変異型酸化ヌクレオ

チド加水分解酵素と 2 種類の基質を用いて合計 7 種類の基質複合体結晶を調製した。得られた結晶を用いて SPring-8 の BL44XU および Photon Factory の BL1A で X 線回折実験を行い、1.18~1.50 Å の高分解能結晶構造を決定した。

決定した結晶構造に加え、新たに行った野性型および変異型の活性測定の結果から、酸化ヌクレオチド加水分解酵素の活性部位の Asp 残基のプロトン化の状態が変わることで 2 種類の基質をそれぞれ認識するという幅広い基質特異性発現機構の構造学的基盤を明らかにした。

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)

Aoki, M., Hayashi, H., Yedidi, R.S., Martyr, C.D., Takamatsu, Y., Aoki-Ogata, H., Nakamura, T., Nakata, H., Das, D., Yamagata, Y., Ghosh, A.K., Mitsuya, H. C-5-Modified Tetrahydropyrano-Tetrahydrofuran-Derived Protease Inhibitors (PIs) Exert Potent Inhibition of the Replication of HIV-1 Variants Highly Resistant to Various PIs, including Darunavir. *Journal of Virology*, 90, 2180-2194 (2016), 査読有, doi: 10.1128/JVI.01829-15.

Obayashi, K., Tasaki, M., Jono, H., Ueda, M., Shinriki, S., Misumi, Y., Yamashita, T., Oshima, T., Nakamura, T., Ikemizu, S., Anan, I., Suhr, O., Ando, Y. Impact of antibodies against amyloidogenic transthyretin (ATTR) on phenotypes of patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) ATTR Valine30Methionine. *Clin. Chim. Acta*, 419, 127-131 (2013), 査読有, doi:

10.1016/j.cca.2013.02.002.

〔学会発表〕(計 8 件)

平田啓介, 中村照也, 吉川紘平, 池鯉鮒麻美, 池水信二, 山縣ゆり子, 時分割 X 線結晶構造解析による酸化ヌクレオチド加水分解酵素の反応機構の解明, 量子ビームサイエンスフェスタ第 7 回 MLF シンポジウム / 第 33 回 PF シンポジウム, 2016.3.15-16., エポカルつくば (つくば)

Teruya Nakamura, Chie Hashikawa, Yuya Yokote, Mami Chirifu, Yuu Taguchi, Jin Gohda, Taishin Akiyama, Kentaro Semba, Yoshinari Okamoto, Shinji Ikemizu, Masami Otsuka, Jun-ichiro Inoue, Yuriko Yamagata, Crystal structure and small-angle X-ray scattering analysis of TRAF binding protein, The 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2015.9.13-15., Kanazawa University, Kanazawa

Keisuke Hirata, Teruya Nakamura, Mami Chirifu, Shinji Ikemizu, Yuriko Yamagata, High resolution X-ray diffraction study of an enzyme for oxidative nucleotide processing, The 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2015.9.13-15., Kanazawa University, Kanazawa

中村照也, 酵素反応を原子レベルで観察する, 宮崎大学 テニユアトラック推進機構主催セミナー「蛋白質立体構造解析の最前線」, 2015.3.23., 宮崎大学 (宮崎)

中村照也, 橋川智恵, 上仮屋美歩, 野崎真里香, 池鯉鮒麻美, 藤間祥子, 田口祐, 合田仁, 秋山泰身, 仙波憲太郎, 岡本良成, 池水信二, 大塚雅巳, 井上純一郎, 山縣ゆり子, TRAF のシグナル伝達分子の X 線結晶構造, 平成 26 年度日本結晶学会年会, 2014.11.1-3., 東京大学 (東京)

中村照也, DNA 損傷修復に働く酸化ヌクレオチド分解酵素 MutT と DNA ポリメラーゼ η の反応機構の解明, 平成 25 年度日本結晶学会, 2013.10.12-13., 熊本大学 (熊本)

中村照也, Ye Zhao, 山縣ゆり子, Yue-jin Hua, Wei Yang, DNA polymerase η のヌクレオチド転移反応機構, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013.6.12-15., とりぎん文化会館 (鳥取)

Teruya Nakamura, Ye Zhao, Yuriko Yamagata, Yue-jin Hua, Wei Yang, Visualization of the nucleotidyl-transfer reaction process by human DNA polymerase η , 4th International Symposium on Diffraction Structural Biology, 2013.5.26-29, Fukiage Hall (Nagoya)

〔図書〕(計 1 件)

Nakamura, T., Mukai, Y., Tsutsumi, Y., Yamagata, Y. Structural Basis for Signal Initiation by TNF and TNFR., *Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling*, 127-141 (2015), 査読有

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究代表者

なし