

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440030

研究課題名(和文)塩基除去修復における DNA 傷害の初期認識機構の解明

研究課題名(英文)Damage-recognition mechanism of MutM in a base excision repair

研究代表者

中川 紀子(Nakagawa, Noriko)

大阪大学・理学研究科・招へい研究員

研究者番号：50379278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：MutM タンパク質はグアニンの酸化傷害を認識し、除去する酵素である。傷害認識の初期段階を解明するために、傷害を含む DNA だけでなく傷害を含まない DNA との複合体の立体構造解析を行った。傷害を含まない DNA との複合体では、これまで報告されている傷害を含む DNA との複合体とは異なり塩基のフリップアウトも DNA 鎖の曲がりも起こっていなかった。これらの立体構造をもとに、傷害認識の初期段階では MutM は塩基をフリップアウトさせることなく、DNA 鎖の主溝側から傷害を認識しているモデルを提唱した。

研究成果の概要(英文)：MutM protein is a trifunctional DNA base excision repair enzyme, which removes oxidatively damaged bases and cleaves both the 3' - and 5' -phosphodiester bonds of the resulting apurinic/apyrimidinic site. The structures of the various complexes between a DNA glycosylase and same kinds of damaged DNA were reported. However, it remains to reveal the initial recognition mechanism of DNA glycosylases. To elucidate the initial recognition mechanism based on 3D structures, the complexes between of MutM and normal DNA or damaged DNA were crystallized and the structures of these complexes were determined. In the complex with damaged DNA, the DNA helix was sharply bent at the portion of the lesion and the 8-oxoguanine was flipped out of the DNA helix. In contrast, DNA bending and nucleotide flipping were not observed in the complex with the normal DNA. These results suggest that MutM searches lesions in an intact DNA helix at an initial recognition.

研究分野：構造生物化学

キーワード：DNA 修復 塩基除去修復 X線結晶構造解析 酵素 基質認識 高度好熱菌

1. 研究開始当初の背景

酵素の機能や反応メカニズムを理解する上で、酵素の活性測定だけでなくそれらの立体構造を解析することは必須である。これまでに酵素の基質認識機構を解明するために、様々な酵素-基質複合体の構造解析が行われている。DNA 修復酵素においても、傷害のある DNA との複合体構造が多数報告されている^①。しかしながら他の酵素とは異なり、DNA 修復酵素は大部分の傷害のない DNA から傷害部位を見つける必要があり、傷害部位にたどり着くまでにどのように DNA と相互作用しているかはあまり知られていない。

2. 研究の目的

DNA 修復において最も重要な過程の1つが傷害部位の発見である。DNA 修復系の1つである塩基除去修復系では、DNA グリコシラーゼが傷害部位の認識と傷害塩基の除去を行う。これまでに様々な DNA グリコシラーゼと傷害を含む DNA との複合体の立体構造解析が報告されている^①。それらの立体構造では、DNA グリコシラーゼが DNA 鎖を曲げて、傷害塩基を DNA 鎖の外側にフリップアウトされることにより、傷害塩基の認識を行っている。これらの立体構造は傷害塩基の認識の「最終段階」を明らかにするものであり、傷害認識の「初期段階」は未解明である。本研究では、傷害塩基を含む DNA だけでなく傷害を含まない DNA との複合体構造を明らかにすることにより、傷害認識の「初期段階」を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) MutM タンパク質の精製と活性測定

発現用プラスミド pET-3a に *Thermus thermophilus* HB8 由来の mutM 遺伝子または E2A, E5A 変異型遺伝子を組み込み、大腸菌 BL21(DE3)pLysS を形質転換した。IPTG による発現誘導を行い、得られた菌体を超音波破碎後、熱処理、疎水・陽イオン交換・ゲルろ過クロマトグラフィーで精製を行った^②。8-オキソグアニンを含む 21 bp の DNA を基質として、精製した MutM と反応させ、ゲル電気泳動で反応生成物を分離後定量した。MutM の濃度を変化させて各反応の初速度を求め、反応の速度論的パラメータ k_{cat} 及び K_m を算出した。AP 部位を含む DNA をゲル電気泳動で分離する場合は、泳動前に反応溶液に NaOH を加え、95°C で 2 分間加熱処理を行った。

(2) MutM-DNA 複合体の立体構造解析

精製した E2A 変異型 MutM と 8-オキソグアニンを含む 11 bp の DNA を用いて、PEG2000 を沈殿剤としてハンギングドロップ蒸気拡散法により傷害を含む DNA との複合体の結晶を作製した。傷害を含まない DNA との複合体は、野生型 MutM と 11 bp の DNA を用い、PEGMME2000 を沈殿剤として結晶化を行った。得られた結晶の回折データを大型放

射光施設 SPring-8 にて収集し、回折データを HKL2000 を用いて反射強度 (h, k, l) に変換した。

複合体の構造解析は、基質を含まない MutM の立体構造 (PDB: 1EE8) を基に^③、Molrep (CCP4) を用いて分子置換法により行った。精密化には CNS を用い、プログラム 0 を用いてモデルの修正を行った。

4. 研究成果

(1) MutM 野生型と変異型の活性測定

MutM は 8-オキソグアニンを除去する DNA グリコシラーゼ活性と 8-オキソグアニンが除去された後の AP 部位を切断する AP リアーゼ活性を有する。MutM の全反応の初速度を MutM の濃度に対してプロットした (図 1)。Michaelis-Menten の式を用いて解析し、反応の速度論的パラメータを算出した (表 1)

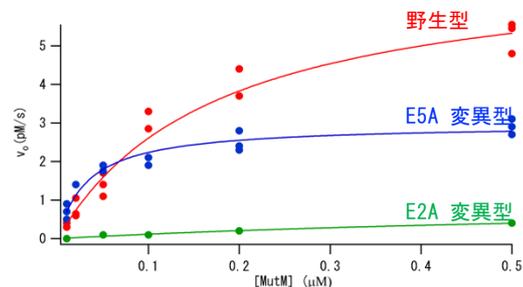


図 1 野生型と変異型の活性の初速度

表 1 反応速度論的パラメータ

	K_m (nM)	k_{cat} (msec ⁻¹)
野生型	176	2.1
E2A	804	0.3
E5A	33	0.9

E2A 変異型 MutM では活性が著しく低下することが分かった。E2A 変異型 MutM の活性のうち DNA グリコシラーゼ活性と AP リアーゼ活性のどちらの活性が低下しているのかを調べるために、反応生成物の熱アルカリ処理を行った。その結果、E2A 変異型 MutM は DNA グリコシラーゼ活性を失っていることが分かった。さらに AP 部位を含む DNA と反応させたところ、E2A 変異型 MutM は AP リアーゼ活性を保持していることが分かった。

これらの結果をふまえ、8-オキソグアニンを含む DNA との複合体の構造解析には E2A 変異型 MutM を、傷害を含まない DNA との複合体の構造解析には野生型 MutM を使用することにした。

(2) 8-オキソグアニンを含む DNA と MutM の複合体の立体構造解析

8-オキソグアニンを含む DNA と E2A 変異型 MutM を PEG2000 を沈殿剤として結晶化したところ、約 2 週間で角柱状の結晶が得られた。得られた結晶の回折データを測定し、分子置換法により構造決定した。回折データ

と精密化の結果を表 2 に示す。

表 2 回折データと精密化 (傷害あり)

Data collection	
Wavelength (Å)	0.979
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell a (Å)	66.5
b (Å)	75.0
c (Å)	124.5
Resolution (Å)	50.0–2.1 (2.18–2.10)
Reflections total	153,960
unique	36,628
Completeness (%)	99.7 (98.8)
R _{merge} (%)	7.0 (27.8)
Average I/σ (I)	25.9 (6.5)
Refinement	
Resolution (Å)	50.0–2.1
R _{work}	0.207
R _{free}	0.246

非対称単位中に MutM が 2 分子と DNA が 1 分子含まれていた。MutM 2 分子のうち 1 分子が DNA と結合しており、残りの 1 分子は DNA と結合していなかった。以下の構造比較では、DNA と結合している MutM を使用した。

(3) 傷害を含まない DNA と MutM の複合体の立体構造解析

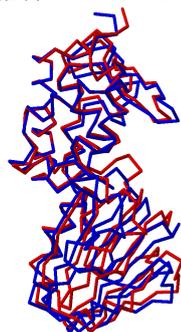
傷害を含まない DNA と野生型 MutM を PEGMME2000 を沈殿剤として結晶化したところ、約 2 週間で棒状の結晶が得られた。得られた結晶の回折データを測定し、分子置換法により構造決定した。回折データと精密化の結果を表 3 に示す。

表 3 回折データと精密化 (傷害なし)

Data collection	
Wavelength (Å)	1.000
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2
Unit cell a (Å)	117.5
b (Å)	122.3
c (Å)	38.3
Resolution (Å)	50.0–2.6 (2.69–2.60)
Reflections total	102,681
unique	17,971
Completeness (%)	99.9 (99.9)
R _{merge} (%)	10.4 (28.9)
Average I/σ (I)	12.6 (2.8)
Refinement	
Resolution (Å)	50.0–2.6
R _{work}	0.236
R _{free}	0.287

非対称単位中に MutM が 2 分子と DNA が 1 分子含まれていた。二つの MutM は DNA を挟んで対面しており、それぞれが DNA と結合していた。

(4) 基質が結合していない MutM と DNA が結合した MutM の構造比較

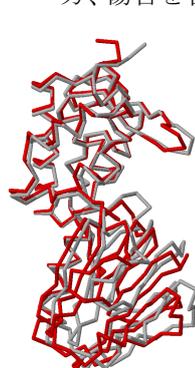


DNA と結合していない MutM の立体構造 (図 2 青色) と 8-オキソグアニンを含む DNA と結合している MutM の立体構造 (図 2 赤色) を比較したところ、DNA と結合した MutM のドメインが僅かに閉じていることが分かった。

図 2 MutM の構造の重ね合わせ

青色：基質なし、赤色：8-オキソグアニンを含む DNA との複合体

一方、傷害を含まない DNA と結合している



MutM の立体構造 (図 3 赤色) は、DNA と結合していない MutM の立体構造 (図 3 灰色) に比べやや open な構造をしていることが分かった。ただし、これらの構造変化は僅かであり、MutM 全体の立体構造は DNA 結合の有無に関わらず非常に似ている。

図 3 MutM の構造の重ね合わせ

灰色：基質なし、赤色：傷害を含まない DNA との複合体

(5) 傷害を含む DNA と傷害を含まない DNA との複合体の構造比較

8-オキソグアニンを含む DNA と傷害を含まない DNA はどちらも MutM の 2 つのドメインの間に結合しており、8-オキソグアニンを含む DNA では、8-オキソグアニンがフリップアウトしている (図 4 左側の赤丸で囲んだ塩基)。傷害を含まない DNA では塩基のフリップアウトは起こっておらず、グアニンとシトシンが塩基対を形成している (図 4 右側のスティックモデル)。

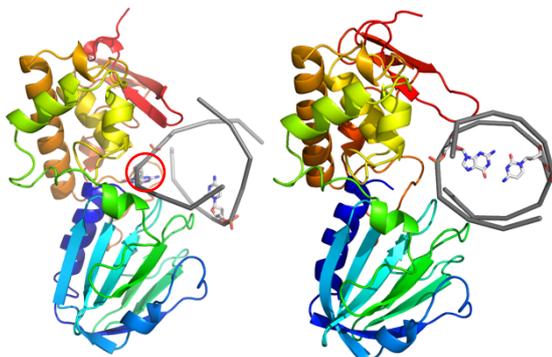


図 4 傷害を含む DNA との複合体構造 (左) と傷害を含まない DNA との複合体構造 (右) DNA を灰色のリボンで表示した。

複合体中の DNA の構造を比較したところ、8-オキシグアニンを含む DNA は傷害部位を起点に曲がっている(図5 左側)が、傷害を含まない DNA は曲がっていない(図5 右側)ことが分かった。

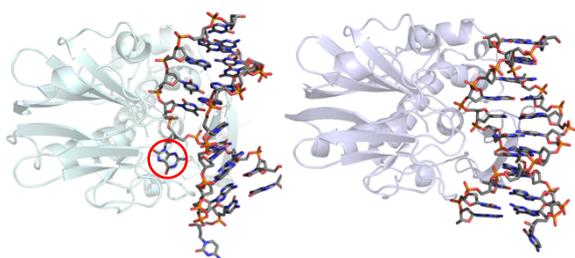


図5 傷害を含む DNA との複合体構造(左)と傷害を含まない DNA との複合体構造(右) DNA をスティックモデルで表示した。

8-オキシグアニンを含む DNA の MutM の複合体の立体構造では、他の DNA グリコシラーゼと同様に MutM は DNA を曲げて、傷害塩基をフリップアウトさせている。塩基のフリップアウトによって生じた空間には MutM から3つの残基 Met70, Arg99, Phe101 が DNA と相互作用しており、8-オキシグアニンと塩基対を作っていたシトシンは Arg99 によって認識されている。フリップアウトした8-オキシグアニンは、Asp211 の側鎖と Ser207, Leu209 の主鎖によって認識されている。これは傷害塩基の認識過程の最終段階の構造を反映していると考えられる。

一方、傷害を含まない DNA と MutM の複合体の立体構造では、DNA は曲がっておらず、塩基のフリップアウトも起こっていない。

8-オキシグアニンを含む DNA 単体の X 線結晶構造解析から、DNA 鎖中に 8-オキシグアニンが含まれていても、8-オキシグアニンとシトシンは通常の Watson-Crick 型塩基対を形成し、DNA 鎖も曲がっていない⁴。DNA 鎖の Minor Groove 側はグアニン:シトシン塩基対と 8-オキシグアニン:シトシン塩基対のどちらも同じ構造であるが、Major Groove 側は水素結合の donor と acceptor の配置が異なっている(図6 赤色の矢印)。

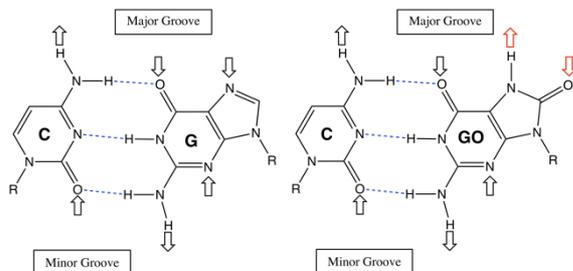


図6 グアニン:シトシン塩基対(左)と8-オキシグアニン:シトシン塩基対(右)の構造塩基対の水素結合を青色の点線で表示した。水素結合の donor と acceptor になりうる箇所を矢印で表示した。

この構造解析から 8-オキシグアニン:シトシン塩基対を含む DNA 鎖では 8-オキシグアニンを DNA 鎖からフリップアウトさせなくとも、Major Groove 側からシトシンと塩基対を形成した状態で傷害の有無を認識することができると考えられる。

今回構造解析に成功した傷害を含まない DNA と MutM の複合体では、グアニン:シトシン塩基対の Major Groove 側に Arg99 や Met70 が存在する。Arg99 はグアニン:シトシン塩基対ではグアニンの6位の酸素と水素結合している。Met70 は保存性の非常に高い残基であり、グアニンの7位の窒素の近傍に存在する。グアニンの7位の窒素は酸化されて 8-オキシグアニンになると水素結合の acceptor と donor の関係が反転する。これらのことから、MutM は傷害認識の初期段階では DNA に存在する傷害を一つ一つフリップアウトさせて認識するのではなく、DNA 鎖状をスライドしながら Major Groove 側の変化を認識している可能性がある。

<引用文献>

- ① Geir Slupphaug, Clifford D. Mol, Bodil Kavli, Andrew S. Arvai, Hans E. Krokan and John A. Tainer, A nucleotide-flipping mechanism from the structure of human uracil-DNA glycosylase bound to DNA, *Nature*, Vol.384, 1996, 87-92
- ② Tsutomu Mikawa, Ryuichi Kato, Mitsuaki Sugahara and Seiki Kuramitsu, Thermostable repair enzyme for oxidative DNA damage from extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB8, *Nucleic acids research*, Vol.26, 1998, 903-910
- ③ Mitsuaki Sugahara, Tsutomu Mikawa, Takashi Kumasaka, Masaki Yamamoto, Ryuichi Kato, Keiichi Fukuyama, Yorinao Inoue and Seiki Kuramitsu, Crystal structure of a repair enzyme of oxidatively damaged DNA, MutM (Fpg), from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8, *The EMBO journal*, Vol. 19, 2000, 3857-3869
- ④ Leigh Ann Lipscomb, Mary Elizabeth Peek, Marshall L. Morningstar, Susan M. Verghis, Elizabeth M. Miller, Alexander Rich, John M. Essigmann and Loren Dean Williams, X-ray structure of a DNA decamer containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 92, 1995, 719-723

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Fumiaki Tomoike, Noriko Nakagawa,

- Seiki Kuramitsu and Ryoji Masui,
Structural and biochemical studies on
the reaction mechanism of uridine-
cytidine kinase, *The Protein Journal*,
査読有, Vol. 34, 2015, 411-420
DOI: 10.1007/s10930-015-9636-8
- ② Makoto Nakabayashi, Naoki Shibata,
Emi Ishido-Nakai, Mayumi Kanagawa,
Yota Iio, Hirofumi Komori, Yasufumi
Ueda, Noriko Nakagawa, Seiki
Kuramitsu and Yoshiki Higuchi,
Crystal structure of a hypothetical
protein, TTHA0829 from *Thermus
thermophilus* HB8, composed of
cystathionine- β -synthase (CBS) and
aspartate-kinase chorismate-mutase
tyrA (ACT) domains, *Extremophiles*, 査
読有, Vol. 20, 2016, 275-282
DOI: 10.1007/s00792-016-0817-y
- ③ Yuza Watanabe, Hisaaki Yanai, Mayumi
Kanagawa, Sakiko Suzuki, Satoko
Tamura, Kiyoshi Okada, Seiki Baba,
Takashi Kumasaka, Yoshihiro Agari,
Lirong Chen, Zheng-Qing Fu, John
Chrzas, Bi-Cheng Wang, Noriko
Nakagawa, Akio Ebihara, Ryoji Masui,
Seiki Kuramitsu, Shigeyuki Yokoyama,
Gen-ichi Sampei and Gota Kawai,
Crystal structures of a subunit of the
formyl- glycinamide ribonucleotide
amidotransferase, PurS, from *Thermus
thermophilus*, *Sulfolobus tokodaii* and
Methanocaldococcus jannaschii, *Acta
crystallographica. Section F*,
Structural biology communications, 査
読有, Vol. 72, 2016, 627-635
DOI: 10.1107/S2053230X1600978X
- ④ Fumiaki Tomoike, Akiko Tsunetou,
Kwang Kim, Noriko Nakagawa, Seiki
Kuramitsu and Ryoji Masui, A putative
adenosine kinase family protein
possesses adenosine diphosphatase
activity, *Bioscience, Biotechnology,
and Biochemistry*, 査読有, Vol. 80,
2016, 2138-2143
DOI: 10.1080/09168451.2016.1214532

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 紀子 (NAKAGAWA, Noriko)

大阪大学・大学院理学研究科・招へい研究
員

研究者番号：5 0 3 7 9 2 7 8