

損傷乗越え DNA 合成に関わるタンパク質複合体の結晶構造解析 Crystallographic analysis of multi-protein complexes in Translesion DNA synthesis

原幸大*, 橋本博

静岡県立大学薬学部

〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1

Kodai Hara* and Hiroshi Hashimoto

School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8526, Japan

1 はじめに

TFII-I は近年、新たに同定された損傷乗越え DNA 合成 (TLS) に必須のタンパク質であり、DNA の損傷部位で停止した複製因子 PCNA に損傷乗越え型ポリメラーゼ (Pol ζ) をリクルートする機能を持つ。TFII-I を中心とした新規の分子間相互作用のメカニズムを理解することで、遺伝子疾患やがん化の分子基盤の解明や抗がん剤の開発などが期待される。我々はこれまでに Pol ζ (REV7-REV3 複合体) や Pol ζ -REV1 複合体など、損傷乗越え型ポリメラーゼの立体構造とタンパク質間相互作用を明らかにしてきたが、TFII-I が形成する TLS 高次複合体の構造基盤は不明である。従って本年度は、新規 TLS 因子である TFII-I に着目し、PCNA や Pol ζ と形成する高次複合体の立体構造と相互作用を X 線結晶構造解析により明らかにすることを目指した。

2 実験

ヒト由来 TFII-I を GST 融合タンパク質として大腸菌 BL21 (DE3) で過剰発現させ、GS4B アフィニティーカラムを用いて精製した。その後、N 末端に付加した GST タグをプレジジョンプロテアーゼにより切断し、イオン交換カラム、ゲルろ過カラムグラフィーを用いて高純度に精製した。ヒト由来 REV7-REV3 複合体は His タグ融合タンパク質として大腸菌で過剰発現させ、同様の手順で精製を行った。ヒト及び出芽酵母由来 PCNA は大腸菌で過剰発現させたのち、イオン交換カラム、硫酸分画分、疎水カラム、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより精製した。精製した TFII-I と REV7-REV3 複合体、もしくは PCNA を混合し複合体を形成させたのち、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより、複合体のフラクションを分取し、結晶化スクリーニングを行った。得られた結晶を用いて、PF BL-17A で回折強度データを収集した。

3 結果および考察

TFII-I-REV7-REV3 複合体に関して、4.4Å 分解能の回折データを収集し、REV7-REV3 複合体をサーチモデルとした分子置換法により位相決定を行った。

しかし、TFII-I の明瞭な電子密度を確認することができなかった。

TFII-I-PCNA 複合体に関して、3.0Å 分解能の回折データを収集し、PCNA をサーチモデルとした分子置換法により位相決定を行ったが、上記と同様に TFII-I の電子密度を確認することができなかった。原因として、① TFII-I と REV7-REV3 複合体、もしくは PCNA の結合定数が低いことや、② 結晶内でのパッキングの影響などが考えられた。①の問題を解決するために、異なる生物種の PCNA (出芽酵母) を用いてキメラ複合体を調製したところ、キメラ複合体はヒト由来の複合体よりも強い結合能を有することがゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる解析で観測することができた。そこで再度結晶化を行い、3.0Å 分解能の回折データを収集し、位相決定を行ったが、複合体の電子密度を確認することはできなかった。次に、②の問題を解決するために、PCNA の会合状態に着目した。野生型の PCNA は溶液中で三量体を形成することが知られるが、PCNA のシステイン残基を N-エチルマレイミドにより化学修飾する事で単量体を形成することが近年、報告されている。従って、化学修飾した PCNA 単量体と TFII-I の複合体を調製し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより複合体形成を評価したところ、ストイキオメトリーが 1:1 の複合体を確認することができた。PCNA の会合状態を変化させた複合体を用いて結晶化を行い、3.5Å 分解能の回折データを収集し、位相決定を行ったところ、野生型の PCNA とは異なるパッキングを確認することができたが、複合体の電子密度を確認することができなかった。

今後は、等温滴定型熱量測定 (ITC) を用いて様々なキメラ複合体の結合能を評価し、より安定な複合体を用いて X 線結晶構造解析を目指す。

謝辞

PF のビームラインスタッフの方々には回折データ収集を行うにあたり、大変お世話になっております。心より感謝致します。

* khara@u-shizuoka-ken.ac.jp