

DNA 損傷 AP site を含むヌクレオソームの構造解析

Structural analysis of the nucleosome containing apurinic or apyrimidinic sites

有村泰宏¹, 胡桃坂仁志^{1,*}¹ 早稲田大学先端生命医科学センター
〒162-8480 東京都新宿区若松町 2-2Yasuhiro Arimura¹ and Hitoshi Kurumizaka^{1,*}¹ Waseda University, 2-2 Wakamatsu-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8480, Japan.

1 はじめに

遺伝情報の担い手である DNA は、真核生物の核内において、ヒストンタンパク質複合体と結合しヌクレオソームを形成している。ヌクレオソームは、DNA 約 200 塩基対に 1 つの割合で、DNA 上に連なって形成されている。ヌクレオソームの立体構造を考慮すると、DNA がヌクレオソームを形成することによって、DNA の溶媒への露出面が大きく減少することから、DNA の転写や損傷修復に必要なタンパク質の DNA への結合は阻害されると考えられる。一方で、実際に生体内においては、ヌクレオソーム存在下で、DNA の転写や修復を適切に行なっている。本研究では、DNA 損傷の一種である AP sites (apurinic or apyrimidinic sites) が、どのようにしてヌクレオソームを形成した DNA 中で損傷認識タンパク質に認識されるのかを明らかにするために行なった。AP sites は、真核生物の各細胞のゲノム DNA 上に 1 日あたり数万箇所形成される DNA 損傷であり、DNA から塩基が脱落した状態になる。本研究では AP サイトを模倣したテトラヒドロフラン (THF) を DNA 上の 2 箇所を導入したヌクレオソームの X 線結晶構造解析を行い、2.5 Å の分解能でその立体構造を明らかにした。本成果は *Scientific Reports* 誌に掲載された(成果 1.)。

2 実験

AP サイトを含むヌクレオソームを試験管内で再構成するために、AP サイトを模倣したテトラヒドロフラン (THF) を導入した 146 塩基対の DNA を調製した (図 1)。さらに、ヒトの各種ヒストンタンパク質 (H2A, H2B, H3, H4) をリコンビナントタンパク質として精製した。これらの DNA、ヒストンを用いて試験管内でヌクレオソームを再構成した。再構成したヌクレオソームをハンギングドロップ蒸気拡散法によって結晶化した。得られた結晶をクライオプロテクト溶液に浸潤し、液体窒素で凍結し、Uni-puck に装填して photon factory の BL-17A に持ち込んだ。ビームラインに設置されている結晶交換ロボットをもちいて、結晶を回折計にマウントした。波長 0.98000Å の条件下で 360°分のデータを取得した。HKL2000 を用いて 2.5 Å の分解能でスクーリングを行った。位相決定は Phaser を用いて分子置

換法によって行い、サーチモデルには 146 塩基対の非損傷の DNA を含むヌクレオソームの X 線結晶構造解析による座標データ(3AFA)を用いた。分子置換法によって得られた初期構造を phenix を用いて、精密化を行なった。この結果、2.5 Å の分解能で、THF を導入したヌクレオソームの立体構造を決定した。

3 結果および考察

AP サイトを模倣したテトラヒドロフラン (THF) を導入した 146 塩基対の DNA を調製し、この DNA を用いてヌクレオソームを試験管内で再構成し、精製した。この産物のヒストン組成を SDS-PAGE を用いて確認したところ、4 種類のヒストンが等量ずつ含まれており、THF の有無にかかわらずヌクレオソームの形成が可能であることが明らかになった。このヌクレオソームを用いて上記の方法によってハンギングドロップ蒸気拡散法によって結晶化を行い、結晶を得た。得られた結晶を用いて BL-17A を用いて、データセットを取得し、分子置換法によって、2.5 Å の分解能で、THF を導入したヌクレオソームの立体構造を決定した (図 2)。

驚いたことに、この構造中に含まれる 2 箇所の THF 導入位置は、それぞれ DNA の構造が大きく異なることが明らかになった。1 つ目の THF 導入サイト(図 3、サイト 1)は、これまで THF を含む DNA の結晶構造解析から明らかにされていた構造と同様に、B 型 DNA 様の構造であり、THF 導入サイトの向かいに、相補塩基を持たない塩基(orphan base) が存在していた。一方で、2 つ目の THF 導入サイト(図 3、サイト 2)は、THF 導入サイトのリン酸およびリボースが、DNA 2 重らせん構造からフリップアウトした特殊な構造を形成していた。我々はこの特殊な DNA 構造を inchworm 構造と名付けた。inchworm 構造は、損傷 DNA が飛び出すという特徴の他に、orphan base が存在しないという特徴も有していた。AP サイトを含む DNA は、生体内においては AP エンドヌクレアーゼによって認識され、切断されることで修復される。これまで、AP サイトを含む DNA と AP エンドヌクレアーゼとの共結晶の X 線結晶構造解析により、AP サイトの向かいに形成さ

れる orphan base が AP エンドヌクレアーゼに結合することが明らかにされている[1]。今回我々が明らかにした inchworm 構造においては、orphan base が存在しないことから、AP エンドヌクレアーゼによって inchworm 構造を形成した AP サイトを認識することは困難であると考えられた。生体内において、inchworm 構造を形成した AP サイトは、AP エンドヌクレアーゼに認識されず、修復されないのか、それとも inchworm 構造を認識するための特別な機構が存在するのか、今後の解析が期待される。

4 まとめ

本研究では、DNA 損傷の一種である AP サイトのヌクレオソーム中における構造を決定するために、AP サイトを模倣したテトラヒドロフラン (THF) を導入したヌクレオソームの構造を X 線結晶構造解析により、2.5Å の分解能で明らかにした。

その結果、THF 導入サイトのリン酸およびリボースが、DNA 2 重らせん構造から飛び出した特殊な構造を形成していることを明らかにし、我々はこの特殊な DNA 構造を inchworm 構造と名付けた。

これまでの知見から考えると、inchworm 構造を形成した AP サイトは orphan base を形成しないため、AP エンドヌクレアーゼによって inchworm 構造を形成した AP サイトを認識することは困難であると考えられる。生体内において、inchworm 構造を形成した AP サイトがどのように扱われるのか、今後の解析が期待される。

謝辞

X 線回折データの収集にあたり、ご協力いただいた PF のスタッフの方々に深くお礼申し上げます。

参考文献

[1] C.D. Mol et al., *Nature* **403**, 451-456 (2000).

成果

1. A. Osakabe, Y. Arimura, S. Matsumoto, N. Horikoshi, K. Sugasawa, and H. Kurumizaka. *Scientific Report* **7**, 41783 (2017).

* kurumizaka@waseda.jp

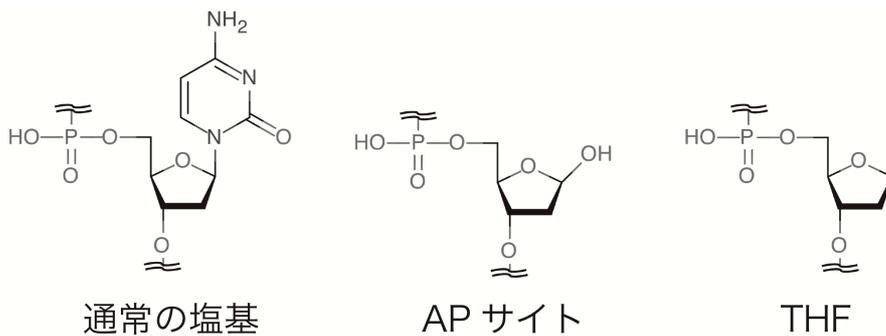


図 1

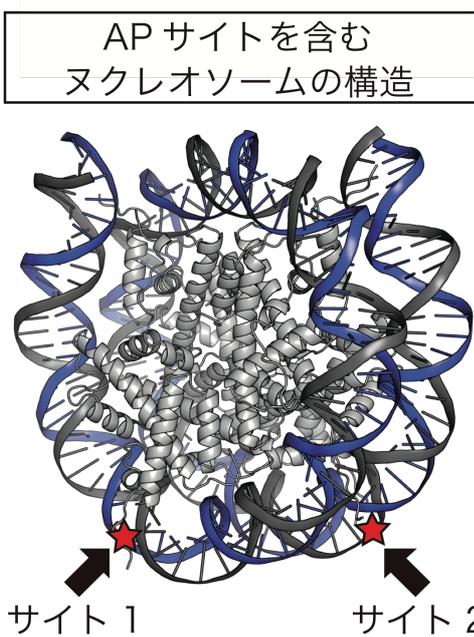


図 2

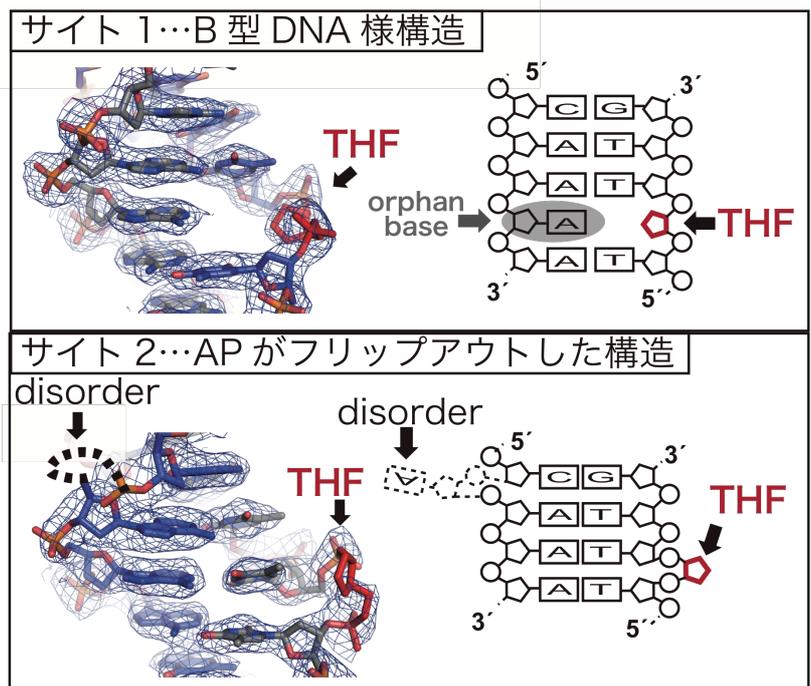


図 3