

超好熱古細菌由来新規 DNA 修復酵素の構造解析

Crystal structure of the novel lesion-specific endonuclease from *Pyrococcus furiosus*

宮園健一, 田之倉優*

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻

養生訓を科学する医食農連携寄付講座, 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Laboratory of Basic Science on Healthy Longevity, Department of Applied Biological Chemistry,
Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, 113-8657,
Japan

1 はじめに

生物の遺伝情報を記録する DNA は、常に様々な要因により損傷を受けている。DNA の損傷は突然変異の原因となるため、生物は DNA 損傷を速やかに修復するシステムを発展させてきた。例えば、高温や電離放射線、また好気呼吸等によって引き起こされる塩基の脱アミノ化は、DNA 複製の段階で突然変異の原因となる (図 1)。このような塩基の脱アミノ化損傷を修復するシステムとして、塩基除去修復 (base excision repair, BER) 経路や alternative excision repair (AER) と呼ばれる DNA 鎖に二か所のニックを導入することから始まる修復経路が存在する。

DNA 修復系における AER 経路に関与するタンパク質として、これまでに EndoV がよく研究されている。EndoV はバクテリアからヒトまで高く保存されており、アデニンの脱アミノ化によって生じるヒポキサンチン塩基を認識し、その 3'末端側の二つ目のホスホジエステル結合を加水分解する反応を触媒する。一方、本研究で研究対象とする PfuEndoQ は、超好熱古細菌 *Pyrococcus furiosus* から発見された新規 DNA 分解酵素であり、ヒポキサンチンだけではなく、他の脱アミノ化を受けた塩基 (キサンチン、ウラシル) や DNA 鎖中の塩基が欠失した apurinic/aprimidinic (AP) サイトを認識し、その 5'末端側のホスホジエステル結合を加水分解する活性を持つ。このような活性から、PfuEndoQ およびその

ホモログは、DNA 修復系における AER 経路に関与すると予想されている (図 1) [1]。

PfuEndoQ は、すでにその構造が既知である EndoV と似通った活性を持つ酵素であるが、そのアミノ酸配列やドメイン構成は、EndoV と全く異なっている。そこで本研究では、PfuEndoQ による損傷部位認識機構および切断機構を構造学的な観点から解明するため、PfuEndoQ の X 線回折実験および構造解析を行った。その結果、PfuEndoQ は他のタンパク質では見られない新規の立体構造を有し、その構造を利用して、DNA の認識と切断を行うことが明らかになった。

2 実験

PfuEndoQ を大腸菌の異種タンパク質発現系を用いて大量調製し、精製及び結晶化を行った。その結果、PEG3000 を沈殿剤とする条件で、PfuEndoQ の良質な結晶を得ることに成功した。この結晶を用いて、BL-17A にて X 線回折実験を行った。PfuEndoQ の活性部位には亜鉛イオンが結合することが予想されたため、亜鉛由来の異常散乱の測定を目指し、亜鉛原子の吸収端の前後の波長の X 線を利用した X 線回折データの取得を行った。

3 結果および考察

PfuEndoQ の立体構造を 2.5 Å の分解能で決定することに成功した。構造解析の結果、PfuEndoQ の立体構造は、N 末端 PHP ドメイン、亜鉛結合ドメイン、C 末端ヘリカルドメインからなることが明らかになった。異常散乱データの測定結果から、PfuEndoQ は N 末端 PHP ドメインに二つの亜鉛イオン、また、亜鉛結合ドメインに一つの亜鉛イオンを結合することが示された。また、既知のタンパク質構造との比較や点変異体解析の結果、PfuEndoQ は、PHP ドメインに結合した二つの亜鉛イオンを用いて DNA 鎖を切断することが明らかになった (図 2)。

PfuEndoQ は、二本鎖 DNA 鎖中の損傷塩基を認識し、DNA を切断する。DNA グリコシラーゼや EndoV といった DNA 鎖中の損傷塩基を認識し、

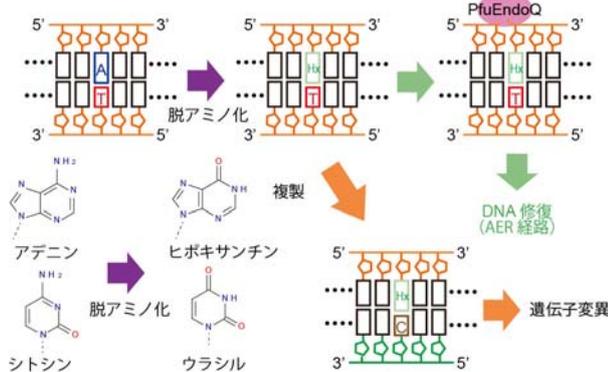


図 1 : PfuEndoQ による DNA 修復

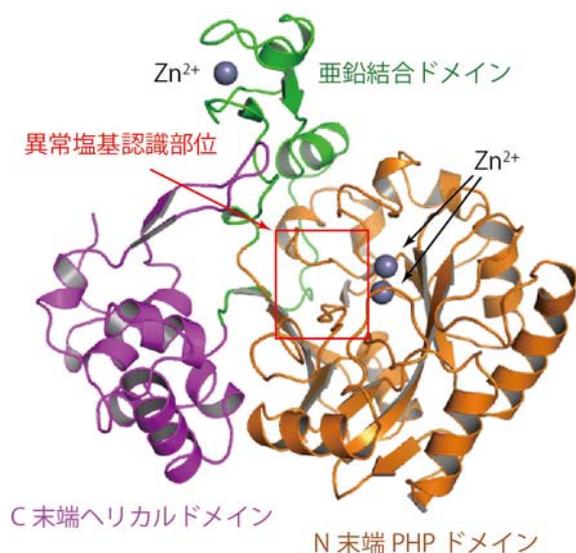


図2：PfuEndoQの全体構造

DNA鎖を分解する酵素は、異常塩基を認識し、特定の部位でDNA鎖を分解するため、異常塩基をDNA二重鎖の外側に排出する機構を持つことが多い。PfuEndoQの構造を精査すると、N末端PHPドメインにみられた亜鉛結合型活性部位の近傍に、高く保存されたポケットが存在することが示された(図2)。このポケットを形成する残基の変異体解析実験の結果、PfuEndoQはこの保存されたポケットを用いて脱アミノ化された塩基を認識していることが明らかになった。

PfuEndoQは、高温環境下で生育する古細菌や一部のバクテリアでのみ保存されているDNA分解酵素である。PfuEndoQは、その活性部位にPHPドメインを利用し、そこに亜鉛結合ドメインとC末端ヘリカルドメインを融合させることによって、損傷部位特異的なDNA切断を可能としていた。高温環境は、DNAの脱アミノ化を促進する要素の一つである。PfuEndoQが進化上どのようにできてきたかを知ることは、高温環境で生育する生物による環境適応を理解するうえで大変興味深い。

4 まとめ

本研究では、超好熱古細菌 *Pyrococcus furiosus* 由来新規DNA修復酵素PfuEndoQの構造を世界で初めて決定することに成功した。放射光特有の、波長可変なX線を利用することにより、PfuEndoQに結合した金属イオンが亜鉛イオンであることが示され、PfuEndoQによる基質DNAの認識及び切断機構を構造学的な観点から明らかにすることができた。

謝辞

X線回折実験を行うにあたり、ご協力くださったPhoton Factoryのスタッフの方々に深くお礼申し上げます。

参考文献

[1] Shiraishi, M. *et al. Nucleic Acids Res.* **43**, 2853–2863 (2015).

成果

1. Miyazono *et al.* Crystal structure of the novel lesion-specific endonuclease PfuEndoQ from *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res.* **46**, 4807-4848 (2018).

* amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp