

構造を基にした DNA 酸化損傷修復酵素 hOGG1 の塩基除去機構の解析 Structure-based analysis of base excision mechanism of DNA oxidative damage repair enzyme, hOGG1

小室智稀^{1,2}, 服部良一³, 田中好幸³, 海野昌喜^{1,2,*}

¹茨城大学大学院理工学研究科, 〒316-8511 日立市中成沢町 4-12-1

²茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター, 〒319-1106 那珂郡東海村白方 162-1

³徳島文理大学薬学部, 〒770-8514 徳島県山城町西浜傍示 180

Saki KOMURO^{1,2}, Ryoichi HATTORI³, Yoshiyuki Tanaka³ and Masaki UNNO^{1,2,*}

¹ Graduate School of Science and Engineering, Ibaraki University,
4-1-12 Nakanarusawa, Hitachi, 316-8511, Japan

² Frontier Research Center for Applied Atomic Sciences,
162-1 Shirakata, Tokai, Naka 319-1106, Japan

³ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University,
Nishihama-Boji, Tokushima 770-8514, Japan

1 はじめに

human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (hOGG1) は、DNA の酸化損傷塩基である 8-oxoguanine (8oxoG) を除去する酵素である。hOGG1 は、損傷塩基を除去するグリコシラーゼ反応に続き、脱塩基部位の 3'末端を切断する β リアーゼ反応も触媒する。その触媒残基として、249 番目のリシン残基 (Lys249) と 268 番目のアスパラギン酸残基 (Asp268) が同定されている [1-3]。 β リアーゼ反応の触媒機構においては Lys249 が中心的に働くことが明らかになっている [4] が、グリコシラーゼ反応の触媒機構は不明である。そこで、hOGG1 のグリコシラーゼ反応中間体を X 線結晶構造解析により直接観測することで、グリコシラーゼ反応の触媒機構を解明することを目指した。

2 実験

大腸菌を用いた hOGG1 の遺伝子発現とタンパク質精製法の検討を行い、高純度 hOGG1 試料を得た。結晶化は蒸気拡散法で行い、hOGG1 変異体 Lys249Cys/Cys253Lys (KCCK), Lys249Tyr (K249Y) のリガンドフリーの結晶を得た。また、pH 依存的な活性を持つ K249H 変異体と 8oxoG 含有 DNA (8oxoG DNA) との複合体の共結晶化を行った。得られた結晶について、放射光を利用した X 線回折実験と構造解析を行った。

3 結果および考察

リガンドフリー hOGG1 変異体 KCCK および K249Y の回折データをそれぞれ最高分解能 1.50 Å, 1.46 Å で得ることに成功した。構造解析の結果、KCCK 変異体では、Lys253 が野生型 (WT) の Lys249 と同じ役割を果たすが、WT の場合より基質との距離が遠くなることで β リアーゼ活性が低下す

ると考えられた。また、K249Y 変異体では、柔軟性の高い活性残基である Lys249 が柔軟性の低いチロシンに置き換わったことで立体障壁が生じ、不活性化することが考えられた。

中間体捕捉のために作成した hOGG1 変異体 X-8oxoG DNA 複合体結晶から、まず、最高分解能 3.8 Å の回折データを得た。8oxoG が切断されていないことから、中間体の捕捉に必要なグリコシラーゼ反応前の複合体が得られたことを確認したが、分解能が低く、8oxoG の向きや側鎖の向きまでは精確に決定できなかった。さらに結晶化スクリーニングを続け、別条件で良質な結晶を得て (図 1)、2.4 Å 分解能回折データを得ることに成功した。これにより、今後、グリコシラーゼ反応中間体の捕捉および反応機構の解明に繋がると考えている。

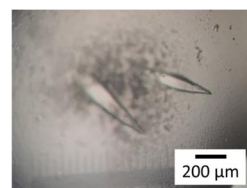


図 1. hOGG1 変異体 X-8oxoG DNA 複合体結晶

4 まとめ

反応中間体を捉えるのに適した変異体を探索し、8oxoG DNA との複合体の結晶とその回折データを得ることに成功した。

参考文献

- [1] M. Dizdaroglu *Mutat. Res.* **763**, 212 (2015).
- [2] T. Lindahl *Biochemistry* **11**, 361 (1972).
- [3] S. V. Jovanovic *J. Phys. Chem.* **90**, 974 (1986).
- [4] S. Steenken *J. Am. Chem. Soc.* **119**, (1997).

* masaki.unno.19@vc.ibaraki.ac.jp