

DNA 修復に關与する FANCM-MHF 複合体の構造解析

Structural analysis of FANCM-MHF complex involved in DNA repair

伊藤 翔, 西野 達哉*

東京理科大学先進工学部生命システム工学科

〒125-8585 東京都葛飾区新宿 6-3-1

Sho Ito and Tatsuya Nishino*

Faculty of Advanced Engineering, Department of Biological Science and Technology,
Tokyo University of Science,
6-3-1 Niijyuku, Katsushika, Tokyo 125-8585, Japan

1 はじめに

DNA は紫外線や環境中の変異原物質などに晒されて様々な損傷を受ける。中でも DNA の二本鎖が架橋される ICL(Inter-strand crosslink)は、複製や転写などを停止させるとともに、DNA 二重鎖切断を生じる可能性もあることから、適切に修復されない場合はゲノム完全性の維持に重篤な影響を及ぼす。真核生物では、いくつかの ICL 修復経路が知られており、中でもファンコニ貧血 (FA) 経路は最もよく研究されている。FANCM は FA 経路因子の一つで、ヘリカーゼドメインとヌクレアーゼ様ドメインの構造ドメインに加えて、約 1000 アミノ酸残基からなる長い天然変性領域中に、様々なタンパク質複合体が結合し、機能する。本研究では、FANCM の天然変性領域中に結合する MHF との複合体形成や安定性について、立体構造解析を行った。

2 実験

大腸菌を用いた組換え発現系により、ニワトリ由来の FANCM-MHF 複合体を大量に調製し、結晶化を行った。結晶化はシッティングドロップ蒸気拡散法により行い、形状の異なる結晶を複数得た。結晶の回折データは、PF-BL1A, PF-BL17A にて取得し、XDS によりデータ処理を行った後、Phenix を用いて分子置換および構造の精密化を行った。

3 結果および考察

大腸菌で発現精製した FANCM-MHF 複合体は、ゲルろ過や分析用超遠心で、安定なヘテロ 5 量体を形成していた。結晶化は、メチルペンタンジオール (MPD) とポリエチレングリコール (PEG) 存在下で行い、それぞれの濃度と pH を最適化した。その過程で、複数の異なる形状 (針状、四面体、直方体) の結晶が得られた。各結晶に X 線を照射したところ、異なる空間群に属していた。針状結晶は $P2_12_12_1$ 、四面体結晶は $C2$ 、直方体結晶は $P4_12_12$ であった。ニワトリ MHF を使って分子置換を行ったところ、四面体結晶と直方体結晶はどちらも MHF で、針状結晶は FANCM-MHF 複合体であった。結晶中の

FANCM を確認するために、直方体結晶の SDS-PAGE 電気泳動を行ったところ、結晶化溶液では FANCM が存在したが、結晶は MHF のみで、ドロップの皮膜面分に FANCM が存在し、高濃度の MPD や酸化によって解離が促進されることがわかった (図 1)。FANCM と MHF の相互作用は主に疎水的な相互作用によって構成され、複数のシステイン残基が存在し、これらの影響により解離したと考えられる。

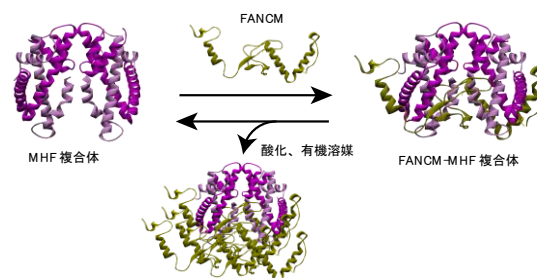


図 1 : FANCM-MHF 複合体の形成と解離。

FANCM は酸化や有機溶媒の影響により、複合体から解離しやすく、解離した FANCM は不安定で、他の FANCM-MHF 複合体と結合して凝集する。

4 まとめ

安定と思われた FANCM-MHF 複合体が、有機溶媒や酸化条件で解離することは予想外の結果であった。FANCM-MHF は細胞内タンパク質のため、同様な条件に遭遇する可能性は低いものの、一定の条件が整うことで FANCM が離れることがわかった。今後はさらなる生化学解析や構造解析のため、今回得られた知見を生かしていく予定である。

謝辞

回折データ取得にご協力いただいたビームラップの皆様には大変お世話になりました。深く感謝申し上げます。

参考文献

[1] S. Ito and T. Nishino, *Acta Cryst. F77*, 1-7 (2021).
*tnishino@rs.tus.ac.jp