

DNA 修復タンパク質 XRCC4 及びその変異体タンパク質の SAXS 構造解析

長谷川真保^{1,2}、西久保開^{1,2}、藤原悟²、松尾龍人²、松本義久³、横谷明德^{2,1}¹ 茨城大学, 〒310-8512 茨城県水戸市文京 2-1-1² 量子科学技術研究開発機構, 〒319-1106 茨城県那珂郡東海村大字白方 2-4³ 東京工業大学, 〒152-8550 東京都目黒区大岡山 2-12-1Maho Hasegawa^{1,2}、Kai Nishikubo^{1,2}、Satoru Fujiwara²、Tatsuhito Matsuo²、
Yoshihisa Matsumoto³、Akinari Yokoya^{2,1}¹ Ibaraki University, 2-1-1 Bunkyo, Mito, Ibaraki 310-8512, Japan² National Institutes of Quantum and Radiological Sciences and Technology, 2-4 Shirakata, Tokai,
Ibaraki 319-1195, Japan³ Tokyo Institute of Technology, 2-12-1, Ookayama, meguro-ku, Tokyo 152-8550, Japan

1 はじめに

電離放射線によって引き起こされる細胞中のゲノム DNA に生じた二本鎖切断 (DSB) を修復するタンパク質の活性は、リン酸化などの化学修飾によってエピジェネティックに制御される。そのようなタンパク質の一つである XRCC4 は、通常二量体で存在する。DNA 修復の際には、特定のセリンまたはスレオニン残基のリン酸化によって活性化され、別のタンパク質 (XLF) と協調して LigIV が DSB 末端を再結合するための足場として機能する。Hammel 等 (2010) は、この足場は DSB 末端を安定化し、なおかつ XRCC4 と XLF はポリマー化しフィラメント構造を形成すると推定した [1]。私たちはこれまで XRCC4 の二次構造について、真空紫外線領域の放射光 (HiSOR) を用いた CD 解析を実施してきた。その結果からこれまで結晶構造解析で解かれていない C 末端領域は、turn 構造と若干の α ヘリックス及び天然変性部位が占めていること、一方 β 構造は殆どないことを報告している [2]。この C 末端領域には、リン酸化部位が多く存在していることから、リン酸化したことにより生じた負電荷は、C 末端局所の静電荷分布と最終的にはこのタンパク質のコンフォメーション変化が誘導されることが推測され、また活性化に向けた分子スイッチがオンになることが予想される。本研究では、SAXS により疑似リン酸化により XRCC4 の構造が実際に変化するか否かを調べた。

2 実験

XRCC4 には多くのリン酸化部位があるため、特定の部位だけをリン酸化することは困難である。本研究では、野生型 (WT) の XRCC4 に加え、リン酸化部位であるセリンを負電荷を持つアスパラギン酸に

置換した疑似リン酸化変異体 (S260D 及び S328D) について SAXS 測定を実施した。用意された試料は、二量体とまた精製過程で二量体から分離した会合体である。精製技術の限界から、会合体試料には僅かな DNA を含むことがアガロースゲル電気泳動により確認された。しかし DNA と強い相互作用すること及び会合体を形成しやすいことは、このタンパク質の持つ本来の性質であると考えこれも測定対象とした。

3 結果および考察

測定された散乱曲線のうち、典型的な WT 二量体の結果を図 1 に示す。WT 及び変異体について、ギニエ解析可能な領域があることから、感性半径 R_g (50–60 Å) 程度を得ることができた (表 1)。

無塩環境 (NaCl なし) で得られた WT の二量体の R_g は、S260D、S328D そのそれよりも若干大きかった。一方、NaCl 添加 (150mM) によりこれが逆転した。これらの結果より、細胞内イオン強度条件下では、リン酸化した XRCC4 はコンパクト化する傾向があることが推測された。

一方、会合体分化の試料についてはギニエ領域が存在なかったが、断面ギニエ解析は可能であった。このことから、会合体はフィラメント状の構造体であることが明らかになった。解析により得られた断面の直径は、疑似リン酸化による明確な違いはないものの二量体の慣性半径よりも 10–20 Å 程度大きい 60–70 Å 程度であり、僅かに含む DNA 断片を介してフィラメントが形成されたと考えられる (Fig. 2)。これは、実際の DSB の修復の際の足場と近い構造体であると推測される。

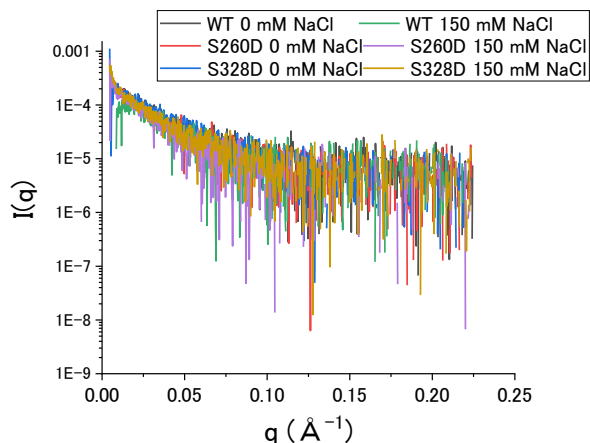


図 1 : XRCC4WT 二量体の散乱曲線
縦軸は散乱強度 $I(q)$ 、横軸は散乱ベクトル q (\AA^{-1})。

表 1 : XRCC4 の WT (二量体) の NaCl 存在及び非存在下における慣性半径

	WT	S260D	S327D
Without salt (0 mM NaCl)			
R _g (\AA)	53.6	51.88	52.6
With salt (150 mM NaCl)			
R _g (\AA)	48.29	60.84	60.19

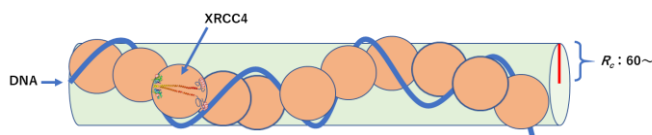


図 2 : XRCC4 会合体フィラメントと DNA との相互作用モデル
オレンジの球 : XRCC4、青い実線 : DNA。フィラメントの半径 : R_c は 60~70 \AA 。

4 まとめ

試料調製のプロセスにおいて二量体のみ分離するプロセスには大きな労力が必要であったことから、このタンパク質が極めて会合しやすい、すなわちフィラメントかし易い性質を持つことが分かった。またこの制御に、C 末端側のリン酸化が重要な役割を果たしていることも推測された。二量体の SAXS 測定結果は、疑似リン酸化によりタンパク質の外形がシュリンクすることを示している。C 末端側のリン酸化はおそらく、XRCC4 の活性化ではなく不活性化、すなわち修復反応が終了した後に DNA からこのタンパク質を“外す”機能を発揮することに使われて

いる可能性がある。これを検証するため、今後さらに詳細な解析を進める必要がある。

参考文献

- [1] M. Hammel *et al.*, *Structure* 2010, 18, 1431-42.
- [2] K. Nishikubo *et al.*, *Radiat. Protect. Dosim.* 2019, 183, 36-39.

* yokoya.akinari@qst.go.jp