

酸化 DNA 損傷の修復に働くアデニン DNA グリコシラーゼ MUTYH と PCNA の X 線結晶構造解析

X-ray crystallographic study on the adenine DNA glycosylase MUTYH and PCNA involved in the repair of oxidative DNA damage

中村照也^{1,2*}, 山縣ゆり子^{2,3}

¹ 熊本大学大学院先導機構, 〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1

² 熊本大学大学院生命科学研究部, 〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1

³ 尚絅大学・尚絅大学短期大学部, 〒862-8678 熊本市中央区九品寺 2-6-78
Teruya NAKAMURA^{1,2*} and Yuriko YAMAGATA^{2,3}

¹ Priority Organization for Innovation and Excellence, Kumamoto University,
5-1 Oehonmachi, Chuo-ku, Kumamoto, 862-0973, Japan

² Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,
5-1 Oehonmachi, Chuo-ku, Kumamoto, 862-0973, Japan

³ Shokei University and Shokei University Junior College,
2-6-78, Kuhonji, Chuo-ku, Kumamoto, 862-8678, Japan

1 はじめに

8-オキシグアニン (8-oxoG) は、活性酸素種により生じるグアニンの酸化体であり、シトシンと塩基対を形成するだけでなく、アデニンともミス塩基対を形成するため、突然変異の原因となる。哺乳類由来の MUTYH は、DNA 中に生じた A(アデニン):8-oxoG ミス塩基対を認識し、アデニンを除去する DNA グリコシラーゼである。A:8-oxoG ミス塩基対において鋳型 DNA 鎖上にあるアデニンは、保持されるべき遺伝情報をコードしているため、MUTYH が突然変異を抑制するには、鋳型 DNA 鎖上の 8-oxoG とミス塩基対を形成して取り込まれたアデニン (新生 DNA 鎖上のアデニン) を除去修復する必要がある。MUTYH は、DNA 複製の主要タンパク質である PCNA (DNA クランプ) と複合体を形成することで、「新生 DNA 鎖に取り込まれたアデニンを効率的に除去する」という複製と共役した DNA 修復機構が提案されている。本研究では、MUTYH と PCNA による DNA 修復機構を構造学的に理解することを目的に MUTYH と PCNA の X 線結晶構造解析を行った[1]。

2 実験

マウス MUTYH は、大腸菌発現系を用いて N 末端にチオレドキシシンと His タグを付加させた融合タンパク質として発現させ、Coアフィニティークラム、陽イオン交換カラム、ヘパリンカラムを用いて精製した。N 末端タグはプロテアーゼ処理により除去した。得られた MUTYH は、8-oxoG を含む DNA との複合体としてゲルろ過カラムによりさらに精製した。MUTYH-DNA の結晶は、0.25 M lithium sulfate/ammonium sulfate, 0.1 M Bis-Tris (pH 6.0), 20% PEG3350 の結晶化溶液を用いることで得た。X 線回

折実験は BL-17A と AR-NW12A で行った。MUTYH-DNA 複合体の結晶は、空間群 I222 に属し、格子定数が $a = 74.3, b = 107.2, c = 156.4 \text{ \AA}$ の Form I と格子定数が $a = 71.7, b = 108.5, c = 158.5 \text{ \AA}$ の Form II の 2 種類の X 線回折強度データを収集した (Form I: 2.45 \AA , Form II: 1.97 \AA)。位相は、サーチモデルにヒト MUTYH の N 末端ドメインの構造 (PDB ID: 3N5N) を用いた分子置換法と MUTYH が持つ鉄原子を利用した単波長異常分散法により決定した。構造の精密化はプログラム PHENIX と COOT を用いて行い、Form I と Form II それぞれの最終構造を得た (Form I: $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 0.198/0.221$, Form II: $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 0.178/0.197$)。

MUTYH と PCNA の相互作用様式を明らかにするため、MUTYH の PCNA 結合部位 (PIP box) を含んだ C 末端ドメイン (CTD) を調製した。MUTYH の CTD は、大腸菌発現系を用いて N 末端に GST タグを付加させた融合タンパク質として発現させ、グルタチオンアフィニティークラム、陽イオン交換カラム、ゲルろ過カラムを用いて精製した。GST タグはプロテアーゼ処理により除去した。ヒト PCNA は過去の報告に基づいて大量調製した[2]。CTD と PCNA の複合体はゲルろ過カラムを用いてさらに精製した。CTD-PCNA 複合体の結晶は、0.1M imidazole (pH 8.0), 20% PEG8000 の結晶化溶液を用いることで得た。X 線回折実験は BL-17A で行い、2.7 \AA 分解能の X 線回折強度データを収集した。CTD-PCNA の結晶は、空間群 $P6_3$ に属し、格子定数は $a = b = 87.8, c = 124.4 \text{ \AA}$ であった。位相の決定は分子置換法により行い、 $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 0.235/0.286$ の最終構造を得た。

3 結果および考察

MUTYH-DNA の構造から (図 1A)、MUTYH による 8-oxoG の認識機構を明らかにし (図 1B)、アデニン除去修復機構を提案した。MUTYH は、自身の interdomain connector (IDC) と呼ばれる領域で、DNA

損傷に応答して働く DNA クランプの 9-1-1 複合体やエンドヌクレアーゼである APE1 と相互作用をすることが知られている。構造解析の結果、IDC に存在することが報告されていた新規 Zn 結合モチーフの構造が、1 つの His と 3 つの Cys が配位子となって構成されていることを明らかにした (図 1A)。MUTYH-DNA の Form I と Form II では、この Zn 結合モチーフを含む IDC 領域の構造が異なっていること、また一部がディスオーダーしていることがわかった。IDC の一部が柔軟な構造をとることが、9-1-1 や APE1 などの異なったパートナー分子との相互作用に重要であることが示唆された。また MUTYH 遺伝子の変異は、家族性大腸腺腫症の原因となることが知られている。今回決定した MUTYH-DNA の構造から、家族性大腸腺腫症の原因となる遺伝子の変異が、MUTYH の活性をどのように低下させるかを原子レベルで明らかにした (図 2)。

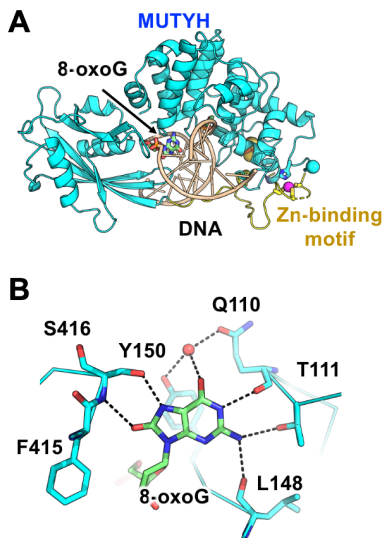


図 1 MUTYH-DNA 複合体構造 (Form I)。A) 全体構造。B) 8-oxoG の認識様式。

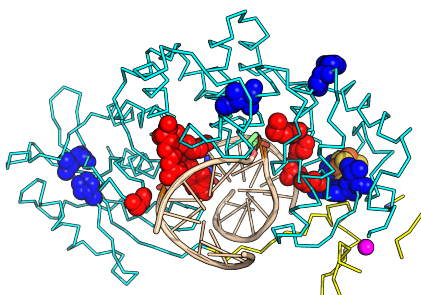


図 2 MUTYH の変異箇所。

DNA 結合に関わる箇所を赤色で、立体構造の安定性に関わる箇所を青色で示した。

CTD-PCNA の構造から (図 3A)、MUTYH の PIP box と PCNA の相互作用様式を明らかにした (図 3B)。さらに MUTYH と PCNA の相互作用解析から、MUTYH と PCNA の結合には PIP box が必須である

ことを示した。MUTYH-DNA と CTD-PCNA の構造から、複製と共役した MUTYH-PCNA-DNA 修復複合体モデルを提案した (図 4)。このモデルから、MUTYH の PIP box と PCNA との相互作用により、PCNA が MUTYH を決まった方向で A:8-oxoG 部位に呼び込むこと、さらにその MUTYH の方向が新生 DNA 鎖上のアデニンを効率的に除去修復するのに適切であることが明らかになった。

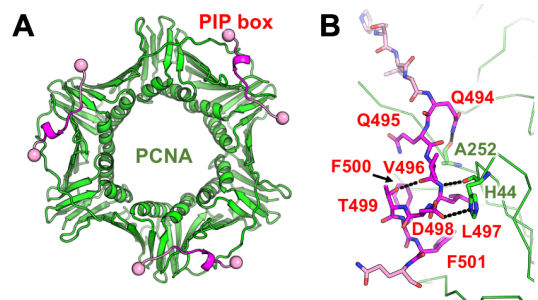


図 3 CTD-PCNA 複合体構造。A) PIP box の結合位置。B) PIP box の結合様式。

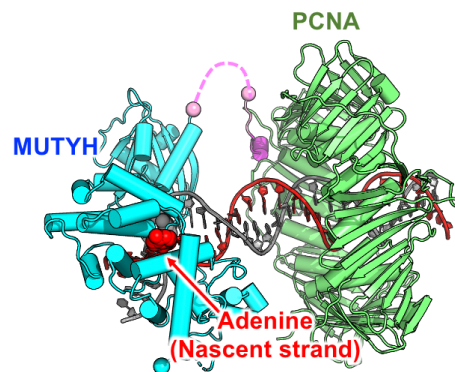


図 4 MUTYH-PCNA-DNA 修復複合体モデル。

4 まとめ

本研究で決定した MUTYH と PCNA の結晶構造から、MUTYH の複製と共役した DNA 修復機構の構造学的基盤を明らかにし、MUTYH の Zn 結合モチーフを含んだ IDC とパートナー分子の相互作用様式を提案した。さらに、家族性大腸腺腫症の原因となる MUTYH 遺伝子の変異が、MUTYH の DNA 修復活性をどのように低下させるかを原子レベルで明らかにした。

謝辞

本研究の X 線回折実験にご協力いただきましたビームラインスタッフの皆様はこの場を借りてお礼申し上げます。

参考文献

- [1] T. Nakamura *et al.*, *Nucleic Acids Research* **49**, 7154-7163 (2021).
- [2] S. Sakurai *et al.*, *EMBO J.* **24**, 683-693 (2005)

* tnaka@gpo.kumamoto-u.ac.jp