

ゲノム維持に関わるタンパク質の構造生物学 Structural biology for proteins related to genome maintenance

原幸大*, 橋本博
静岡県立大学薬学部
〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1
Kodai HARA* and Hiroshi HASHIMOTO
School of Pharmaceutical Science, University of Shizuoka
52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan

1 はじめに

ゲノム情報の維持は細胞が等価な遺伝情報を保ちながら増殖していく上で重要であり、これらの機構の崩壊はがんや遺伝病などの発症につながる。従って、染色体を形作り、DNA 損傷からゲノムを守るタンパク質の構造基盤は、生命活動の根幹をなすタンパク質間相互作用やタンパク質-核酸間相互作用を原子レベルで説明できるだけでなく、それらを標的とした新規抗がん剤や腫瘍マーカーの開発につながる。

今回はゲノム維持に重要な機構の一つである、DNA 損傷チェックポイントの活性化に重要な RAD9-HUS1-RAD1 (9-1-1) とクランプローダー RAD17 ペプチドとの複合体の X 線結晶構造解析を報告すると共に、今後の展望について述べる [1]。

2 実験

ヒト由来 HUS1 の N 末端側に His タグを融合した組換えタンパク質と RAD1、RAD9 の組換えタンパク質を大腸菌 BL21 (DE3) で共発現させた。菌体を破碎し、遠心後、上清をへパリンカラム、陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて高純度に精製した。精製した 9-1-1 と RAD17 (16-26) の合成ペプチドをモル比 1 : 10 で混合し、結晶化スクリーニングを行った。得られた結晶を用いて、PF BL-17A で回折強度データを収集した。その後、9-1-1 をサーチモデルとした分子置換法 (プログラム PHASER) により位相決定、モデル構築 (プログラム Coot) と構造精密化 (プログラム PHENIX) を行い、最終構造を得た。

3 結果および考察

9-1-1-RAD17 (16-26) 複合体の結晶化スクリーニングを行なった結果、ポリエチレングリコール 3350 (PEG3350) を沈殿剤として含む結晶化条件で共結晶が得られ、2.12 Å 分解能の回折強度データを収集した。空間群は $P2_12_12_1$ 、格子定数は $a = 53.1$ Å、 $b = 136.3$ Å、 $c = 154.0$ Å、非対称単位中に 1 つの 9-1-1-RAD17 (16-26) 複合体が含まれていることが溶媒含量から推測された。その後、9-1-1 をサーチモデルと

した分子置換法により位相決定を行い、RAD17 の明瞭な電子密度を確認した。モデル構築と精密化を行い、最終構造を得た (R -work = 21.7%、 R -free = 26.2%)。

9-1-1-RAD17 (16-26) 複合体の構造解析から、9-1-1 と RAD17 は 1 : 1 : 1 : 1 のストイキオメトリーからなる複合体を形成することが明らかとなった。また、複合体構造から、RAD17 は RAD1 サブユニットに特異的に結合していた。具体的には、RAD17 の W18、V19、P21、F23 を介した疎水性アミノ酸残基を介したファンデルワールス相互作用がみられた。RAD17 の W18A/V19A/F23A 変異が RAD17 の 9-1-1 結合能を著しく低下させており、これらの疎水性相互作用が RAD1 サブユニット特異的な相互作用に重要であることを裏付けた。

9-1-1 と RAD17 の複合体の構造解析、及び以前報告した RHINO 複合体の構造解析から、RAD1 サブユニットとの相互作用には、WVxPxP モチーフ (x は任意のアミノ酸) が重要であることが示された。今後、9-1-1 とパートナータンパク質との複合体構造解析を更に進めていくことで、RAD9 や HUS1 サブユニットとの相互作用に重要なモチーフを特定し、9-1-1 の多彩な分子認識機構の解明を目指す。

謝辞

PF のビームラインスタッフの方々には回折データ収集を行うにあたり、大変お世話になりました。心より感謝致します。また、9-1-1 の結晶化を中心となり行った永田季穂さん (静岡県立大学薬学部)、澤田征昌くん (同)、飯田奈央さん (同)、9-1-1 と RAD17 の相互作用解析を行った菱木麻美講師 (同)、星野貴子さん (同)、研究を進める上で多大なご助言を頂いた大橋英治准教授 (長浜バイオ大学バイオサイエンス学部) にお礼を申し上げます。

参考文献

[1] K. Hara *et al.*, *J. Biol. Chem.* **299**, 103061 (2023).

* khara@u-shizuoka-ken.ac.jp