



Title	The molecular regulatory mechanism of the DNA mismatch repair endonuclease
Author(s)	飯野, 均
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58613
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	飯野 均
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 24343 号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	The molecular regulatory mechanism of the DNA mismatch repair endonuclease (DNAミスマッチ修復系におけるエンドヌクレアーゼ活性調節の分子機構)
論文審査委員	(主査) 教授 倉光 成紀 (副査) 教授 米崎 哲朗 教授 福山 恵一 准教授 増井 良治

論文内容の要旨

ミスマッチ修復系(MMR)はDNA修復系の1つで、主にDNA複製に伴って発生するミスマッチ塩基対傷害を修復する。この修復機能を損なう変異は、ヒトではリンチ症候群(遺伝性非腺腫性大腸癌)を引き起す。MutLはミスマッチ修復系の中心的な働きをするタンパク質の1つであり、2つのドメインからなる。ヒトタイプのMutLでは、N末端ドメイン(NTD)にATPが結合すると全体構造が変化し、C末端ドメイン(CTD)が有するエンドヌクレアーゼ活性が調節されるとされている。CTDには、DQHA(X)₂E(X)₄モチーフとCPHGRPモチーフとが高く保存されており、前者はエンドヌクレアーゼ活性に必須であり、後者は機能は不明なもの、*in vivo*でのDNA修復活性に必須とされている。しかし、このエンドヌクレアーゼ活性調節機構については、MutL全体の立体構造が明らかになっていないこともあり、未だ解明されていない。また、MutLは、二本鎖DNAのうちで、新規に複製され、誤った塩基を取り込んだDNA鎖のみを切断する活性をもつが、そのように二本鎖DNA鎖の片方の鎖を切断するニッキングエンドヌクレアーゼの中で、MutL CTDのみが二量体であるため、この特異な会合状態が活性発現機構と関係している可能性が考えられた。

そこで、ヒトタイプMutLの特徴を備えながら高い安定性を有するなど種々の実験に適した超好熱菌*Aquifex aeolicus*由来MutL(aqMutL)を材料として用いて、構造に基づいた機能解析を試みた。まず初めに、ROSETTA program(<http://rosetta.bakerlab.org/>)などのコンピューターモデリングの手法を用いて aqMutL の三次構造をドメイン毎に予測した。次に、クロスリンク法やX線小角散乱法などの複数の方法を用いて、四次構造についても検証し、信頼性のあるモデル構造を得た。その結果、CPHGRPモチーフは DQHA(X)₂E(X)₄モチーフと NTD に挟まれた位置関係にあり、NTDの構造変化を CPHGRPモチーフが介することで CTDのエンドヌクレアーゼ活性が調節されていることが示唆された。また、CTDのC末端に位置するα-ヘリックスが CTDの二量体化に大きく寄与していることも示唆された。

次に、CTDのみ、もしくは NTDのみから成る欠失変異体について、解析を行った。その結果、CTD単独の

DNA 結合能は極端に低い ($K_d = 40 \mu\text{M}$) が、NTD 単独では強く ($K_d = 6.5 \mu\text{M}$)、全長ではより強くなる ($K_d = 150 \text{ nM}$) など、ドメイン間の関係が相乗的であることが明らかになった。また、CTD の C 末端に位置する α -ヘリックスを欠失させると、二量体形成能が低くなつた。この変異体を解析した結果、エンドヌクレアーゼ活性が低下しており、二量体化がエンドヌクレアーゼ活性に重要であることが分かつた。この α -ヘリックスに位置する変異は、ヒトのリンチ症候群と関連していた。

最後に、ドメイン間相互作用を解析したところ、NTD は CTD のエンドヌクレアーゼ活性を促進すること、この活性促進には CPHGRP モチーフへの Zn の結合が必要であることが分かつた。更に、クロスリンク法と重水素交換質量分析法によって、NTD と CTD が直接相互作用していることを確かめた。以上の結果から、NTD は CTD のエンドヌクレアーゼ活性を CPHGRP モチーフを介して、直接的に調節していることを実証した。

論文審査の結果の要旨

申請者は、ミスマッチ DNA を修復する際に重要な役割を果たすエンドヌクレアーゼの MutL について、活性調節の分子機構を解析した。

その解析には、ヒトの MutL の特徴を備えており、安定性が高く、構造機能解析に適した超好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来の MutL を用いた。まず初めに、コンピューターモデリングの手法を用いて N 末端側と C 末端側の各ドメインの立体構造を予測し、次に、X 線小角散乱、重水素交換、アミノ酸側鎖間の架橋などの方法を用いて、予測した立体構造を確認した。

次に、N 末端側および C 末端側ドメインの変異体を作製し、機能解析を行つた。その結果、N 末端ドメインが C 末端ドメインのエンドヌクレアーゼ活性を調節していることや、その活性調節には Zn^{2+} の結合が必要であることを明らかにした。

よつて、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。