The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

【48】

氏　　名	飯（いい）　野（の）　均（ひとし）
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）を引き起こす。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://robetta.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 モチーフが仲介することで 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 μM）が、NTD 単独では強く（K_d = 6.5 μM）、全長ではより強くなる（K_d = 150 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った。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った。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った。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、安定性が高くて、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、機能解析を行った。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。

よって、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。