Osaka University Knowledge Archive

Title	Comprehensive interaction analysis of DNA mismatch repair protein MutL by NMR
Author(s)	水島, 良太
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/60033
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【87】

氏　　名	水　島　良　太（みず　しま　りょう　た）
博士の専攻分野の名称	博　士（理学）
学　位　記　番　号	第　２６２６８　号
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学　位　論　文　名	Comprehensive interaction analysis of DNA mismatch repair protein MutL by NMR （核磁気共鳴法によるミスマッチ DNA 修復蛋白質 MutL の相互作用解析）
論文審査委員	（主査） 教　授　中村　春木 （副査） 教　授　倉光　成紀　　教　授　中川　敦史

論　文　内　容　の　要　旨

ミスマッチ塩基対修復（MMR）はDNA複製後の新生鎖の複製エラーを修復し、DNA複製の精度を２～３桁程度高めている。MMR蛋白質をコードする遺伝子の変異を原因とする遺伝性大腸がんはリンチ症候群と呼ばれ全大腸がんの２－５％程度がリンチ症候群によるとされる。この変異の保有者の約８０％が生涯にがんを発症する。リンチ症候群は他の消化器や子宮、腎臓などの臓器のがん発症リスクも高めるとされ、医学的に重要である。私は現在、このMMR蛋白質のうち、MutLの構造生物学的な解析を、NMRを中心として、行なっている。MutLには、大腸菌型とヒト型の２つがあり、前者はエンドヌクレアーゼ活性を持たず（MutHがエンドヌクレアーゼ活性を担う）、後者はエンドヌクレアーゼ活性を持つ。私が研究しているのは、あるバクテリア由来の、後者のMutLである。MutLは、溶液中で安定な二量体を形成するC末端ドメイン（CTD）と、ATPと結合することで二量体を形成し、ATP加水分解活性を持つN末端ドメイン（NTD）,それらをつなぐリンカーで構成される蛋白質である。ATPの結合と加水分解によって、CTDとNTDのドメイン間の相対配置が変化すると考えられており、先行研究の結果から、このドメイン間相互作用が、エンドヌクレアーゼ活性や他のMMR蛋白質との相互作用を制御していることが示唆されている。

本研究は、NMRにより、CTDと、金属イオン、ATPとの相互作用を解析することで、MutLのエンドヌクレアーゼ活性の制御機構の一端について明らかにすることを目的とする。

本研究では、まずCTDドメインを発現、精製し、^{15}N,^{13}C,^{2}Hで安定同位体ラベルしたサンプルによって、主鎖の帰属を行った。CTDについては、HNCO,HNCACO, HNCACB,　CBCACONHの３次元スペクトルによる主鎖連鎖帰属と、選択的アミノ酸残基アイソトープラベリング法により、95％まで、主鎖を帰属することに成功した。これまでに、先行研究のX線結晶構造（M.C. Pillon et al. *Mol. Cell*, 2010）を鋳型として、homology modeling（SWISS-MODEL）により、現在研究している種由来MutLの立体構造モデルを作成し、これとCTDの主鎖の帰属結果を用いて、CTDと金属イオンの結合について解析した。マンガンイオンやマグネシウムイオンなどの二価の金属イオンは、これまでの先行研究のin vitroの活性実験の結果から、CTDのエンドヌクレアーゼ活性に必須であることがわかっているが、マンガンイオンが常磁性金属であり、結合するアミノ酸残基のHSQCスペクトル上のピーク強度が減少することを利用して、マンガンイオンの結合部位についてアミノ酸残基レベルで同定することができた。また、亜鉛イオンは、CTDとNTDとの相互作用に必須であることがわかっており、X線結晶構造解析

の先行研究より、システイン残基とヒスチジン残基が亜鉛との結合に重要であることが示されている。化学シフト摂動法による解析により、亜鉛との結合によって、CTD二量体の疎水性相互作用による結合が不安定化していることが示唆された。また、同様の方法で、ATPとCTDが、NTDと比較して弱い親和力で結合することを明らかにした。また、NMRシグナルのピーク強度の解析によって、ATPとの結合に伴って、CTDのN末端の１０残基程度の二次構造をとっていない領域で顕著なピーク強度の変化を観測した。これは、この領域でアミノ酸主鎖のflexibilityが大きく変化したことを示唆する。このことから、CTDとATPとの結合は、CTDとNTDとのドメイン間相互作用の制御に関わっていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究では，DNAミスマッチ修復系で働く蛋白質MutLについて，主にNMRの手法を用いてその分子構造と機能を解析した．まず，超好熱菌由来のMutLについて，エンドヌクレアーゼ活性ドメイン(316ー425残基)を発現，精製し，^{15}N，^{13}C，^{2}Hの安定同位体でラベルした試料を用いて主鎖の帰属を行った．対象とする超高熱菌由来MutLと43%の相同性を持つ枯草菌由来MutLのX線結晶構造を鋳型としたホモロジーモデルを構築したところ，この帰属結果に基づくNMR化学シフトによる二次構造の同定と良く一致した．さらに，化学シフト摂動実験によって，金属イオンおよびATPとの結合部位についてアミノ酸残基レベルで決定することができ，上記立体構造モデルにマップすることができた．ATPとエンドヌクレアーゼドメインとの結合については，先行研究においてほとんど注目されていなかったが，本NMRによる解析とdocking simulationを組み合わせ，定量的な結合活性と結合部位とを示すことができた．また，このATPの結合は，ドメイン間相互作用の制御に関わっていると考えられ，ATPの結合を考慮に入れたドメイン間相互作用のモデルを提案した. 研究と発表内容を総合的に判断すると，申請者が学位を受けるに値するものと認める．