

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770118

研究課題名(和文) RecQヘリカーゼによるテロメア維持機構の構造研究

研究課題名(英文) Structural study of telomere maintenance mechanism of RecQ helicases

研究代表者

北野 健 (Kitano, Ken)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：40346309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)： WRN タンパク質と BLM タンパク質は、RecQ ファミリーに属する DNA ヘリカーゼで、ヒトのゲノム DNA を変異損傷から守る重要な役割を担っている。本研究では、BLM のヘリカーゼ活性に必須な BLM RQC (RecQ C-terminal) ドメインの構造研究に取り組んだ。その結果、X線結晶解析法により、同ドメインの立体構造を初めて決定することに成功した。RecQ ヘリカーゼが、巻き戻しの困難な DNA 構造を解きほぐす仕組みについて、新しい知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)： RecQ family of DNA helicases WRN (Werner syndrome protein) and BLM (Bloom syndrome protein) play a key role in protecting the genome against deleterious changes. In this study, we determined the first three-dimensional structure of a RecQ C-terminal (RQC) domain from human BLM bound to a phosphate ion. Our result gave insights into the unique DNA-unwinding activity of RecQ helicases toward recombination and repair intermediates (Kim, SY., Hakoshima, T., and Kitano, K., 2013, Sci. Rep., 3, 3294.).

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：タンパク質 DNA ヘリカーゼ RecQ ファミリー X線結晶解析 構造生物学 生物物理学 三量体Gタンパク質 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

WRN (Werner syndrome protein) と BLM (Bloom syndrome protein) は、二本鎖 DNA を一本にほどく (巻き戻す) ヘリカーゼの一種で、RecQ ファミリーに属するタンパク質である。変異によって機能が欠損すると、ウェルナー症候群、ブルーム症候群という、早老症と高発ガン性の病気を引き起こす。いずれも、常染色体劣性のまれな遺伝病 (難病) であり、ブルーム症候群は特に、10 代にして様々な悪性腫瘍を頻発する、重篤な疾病として知られている。

WRN と BLM は一般的な複製ヘリカーゼと異なり、通常の二重らせんに加えて、ホリデイジャンクションとよばれる十字型の組換え中間体や、染色体末端を保護しているテロメアなど、特殊な構造をとった DNA を解きほぐすことができる。この優れたヘリカーゼ活性こそ、WRN と BLM が細胞を、早期老化とガン化から守ることができる理由と考えられているが、その仕組みはよく分かっていない。

WRN と BLM は、DNA 上を移動するためのモーターとして働く ATPase ドメインに加えて、C 末に特徴的に保存された RQC (RecQ C-terminal) ドメインと HRDC (helicase-and-ribonuclease D-C-terminal) ドメインを有している。研究代表者らは、これらふたつのドメインが RecQ ファミリーヘリカーゼの機能に重要と考えて、構造解析の研究を進めてきた ([1] Kitano, K. *et al.*, 2010, *Structure* 18, 177. [2] Kitano, K. *et al.*, 2007, *J. Biol. Chem.* 282, 2717. [3] Sato, A. *et al.*, 2010, *J. Biochem.* 148, 517.)。

2. 研究の目的

本研究では、WRN タンパク質と BLM タンパク質の新たな立体構造を決定することを目的に、X線結晶構造解析の研究を行った。特に、BLM のヘリカーゼ活性に必須の役割を担っている BLM RQC ドメインの構造研究に、重点的に取り組んだ。

3. 研究の方法

結晶化に必要なタンパク質試料を調製するにあたり、まず BLM のアミノ酸配列から、コンピュータを用いてドメイン領域の推定作業を行った。ここでは、以前に決定した WRN RQC ドメイン (PDB ID: 3AAF) と BLM HRDC ドメイン (2RRD) の立体構造が役立った。解析結果をもとに、BLM RQC ドメインをコードする cDNA を PCR 法で切り出し、10 種類ほどの発現プラスミドを作成した。

発現プラスミドを大腸菌に導入して培養することによって、目的のタンパク質を大量発現させた。菌体を超音波で破碎したのち、クロマトグラフィーによるタンパク質精製を行った。この精製作業では、あらかじめタンパク質の N 末側に融合させておいた精製タグ Glutathione-S-transferase (GST) とアフィニティーカラム Glutathione Sepharose 4B (GE ヘルスケア) の使用が有効であった。さらにイオン交換カラム、ゲルろ過カラムを使用して精製を進めることで、結晶化に適した、高純度のタンパク質試料を調製することができた。

タンパク質試料は、分光光度計で吸光度と濃度を測定しながら、限外ろ過フィルターを用いた遠心濃縮を行った。最終的に、30 mg/ml の高濃度にまで濃縮することができた。

このタンパク質結晶化試料に、様々な沈殿剤試薬、添加剤、合成 DNA 等を加えて、結晶化条件のスクリーニングを行った。その結果、ポリエチレングリコール (PEG 4,000) を沈殿剤として用いて、かつリン酸ナトリウムを添加剤として加えたときにのみ、BLM RQC ドメインの結晶を得ることができた。得られた結晶は、兵庫県の大型放射光施設スプリング 8 のビームラインに持ち込んで、高輝度 X 線を照射して X 線回折データの測定収集を行った。

次に、構造解析の計算に必要な位相情報を決定するために、BLM RQC ドメインのセレノメチオニン置換体タンパク質を精製し

た。ネイティブタンパク質の結晶化と同じように、PEG 4,000 とリン酸ナトリウムを結晶化試薬に用いることで、結晶を作成することができた。このセレノメチオニン置換体結晶を使って、スプリング8のビームラインで、3つの異なる波長でのX線回折データの収集を行った（多波長異常分散法 MAD: multi wavelength anomalous dispersion）。

得られたX線回折データはすべて、Linuxワークステーションおよびパーソナルコンピュータを使って計算解析を行った。セレノメチオニン置換体結晶の位相情報を使ったフーリエ変換の計算を行うことで、タンパク質の電子密度マップを作成した。この電子密度マップに沿って、コンピュータ上でタンパク質の分子モデルを構築していくことで、BLM RQC ドメインの新規立体構造を決定した。

4. 研究成果

本研究によって、ヒト BLM RQC ドメインにリン酸イオンが結合した状態のタンパク質立体構造を、分解能 2.7 Å で決定することができた。これは、BLM の DNA 作用部位の構造を、世界で初めて明らかにした研究成果である。

結晶中の BLM RQC ドメインは、リン酸イオンを挟むようにして二量体を形成していた（図 1 A）。前述したように、リン酸は結晶化に必須の添加剤であったが、これは同イオンが結晶化の分子間パッキングに必要であったからと理解できる（図 1 B）。ただし、ゲルろ過クロマトグラフィー法、超遠心分析法、CD スペクトル測定法を用いて、BLM RQC ドメインの分子形状解析を行ったところ、同ドメインは溶液中で単量体として存在していることが判明した。

図 2 に、BLM RQC ドメインの単量体構造を示した。BLM に特徴的なふたつの二次構造モチーフ、BLM-insertion と C-term extended loop（いずれも赤色で示した）の存在が明らかとなった。WRN RQC ドメインの立体構造との比較を行った結果、これらのモチーフが、BLM 特有の機能活性に使われて

いる可能性が示された。

また本結晶構造によって、BLM RQC ドメインにある尖ったヘアピン構造 (β -wing) が、“DNA 鎖分離ヘアピン”としてヘリカーゼ反応に直接利用されている可能性も示すことができた。

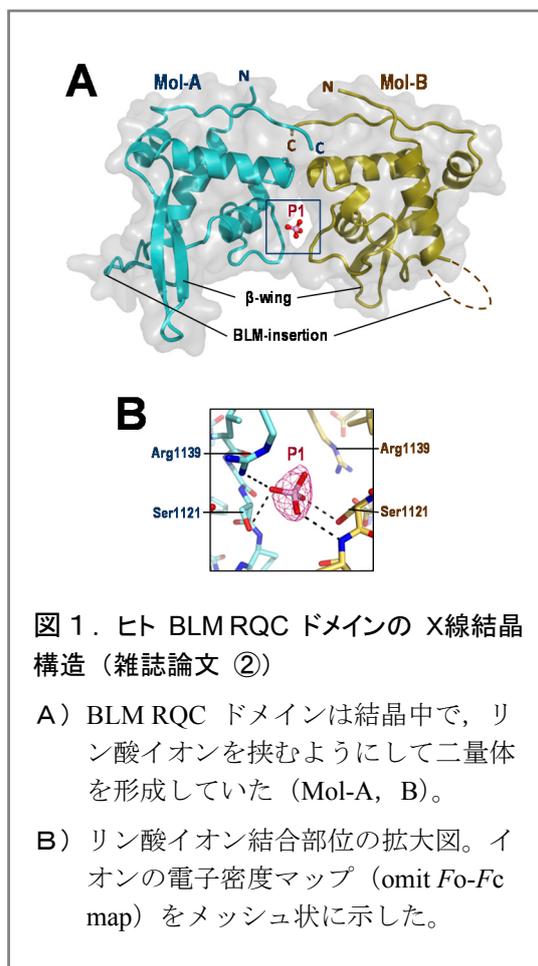


図 1. ヒト BLM RQC ドメインの X線結晶構造（雑誌論文 ②）

- A) BLM RQC ドメインは結晶中で、リン酸イオンを挟むようにして二量体を形成していた (Mol-A, B)。
- B) リン酸イオン結合部位の拡大図。イオンの電子密度マップ (omit Fo-Fc map) をメッシュ状に示した。

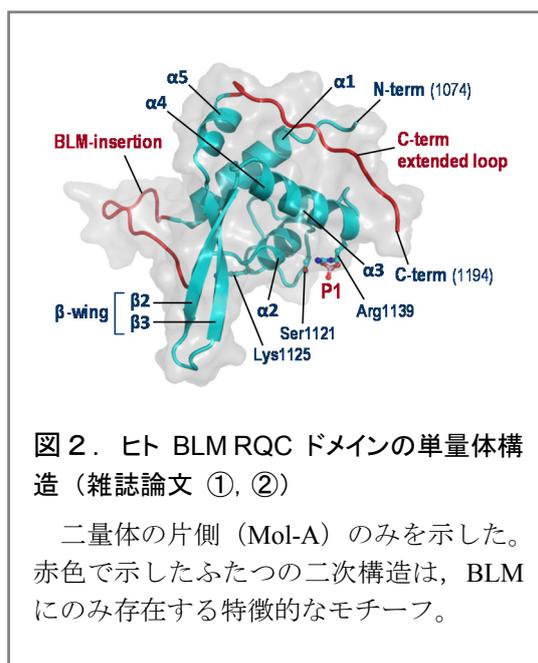


図 2. ヒト BLM RQC ドメインの単量体構造（雑誌論文 ①, ②）

二量体の片側 (Mol-A) のみを示した。赤色で示したふたつの二次構造は、BLM にのみ存在する特徴的なモチーフ。

以上の研究成果を原著論文にまとめて、国際科学ジャーナルに発表した(雑誌論文②)。リン酸結合型 BLM RQC ドメインの立体構造(原子座標)とX線回折データは、タンパク質構造データベース PDB (Protein Data Bank) に登録して、インターネット上で一般公開した(その他①)。

さらに WRN と BLM の立体構造についての解説論文を、国内学術誌に発表した(雑誌論文①)。WRN と BLM が、テロメアなどの DNA を巻き戻す仕組みについて、新しい機構を提唱することができた。

また、BLM の研究と平行して、研究代業者らが以前にX線構造を決定した三量体Gタンパク質-阻害剤複合体(Nishimura, A.*, Kitano, K.* *et al.*, 2010, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 13666. *Both authors equally contributed.)についても、引き続き、阻害剤(環状ペプチド誘導体 YM-254890)の作用機構を立体構造的に調べた。

図3に、阻害剤が結合した $G\alpha_q \beta \gamma$ (A) と、Gタンパク質共役受容体 GPCR が結合した $G\alpha_s \beta \gamma$ (B; スタンフォード大学 Kobilka 博士らによる結晶構造で、2012年ノーベル化学賞のトピックになった)の立体構造の比較を示した。両者をコンピュータ上で重ね合わせた結果、YM-254890が、 $G\alpha$ のドメイン間を結ぶヒンジの隙間に結合することで、ヘリカルドメインの開口運動を直接ブロックしている新事実が明らかとなった。

$G\alpha$ の開口運動は、GPCR受容体の結合によって誘導される構造変化で、 $G\alpha$ が活性化の初期ステップとしてGDPを放出するのに必須のコンフォメーション変化である。阻害剤YM-254890は、いわば“分子くさび(Molecular wedge)”とでも言うべきユニークな作用原理によって、 $G\alpha$ のGDPからGTPへのヌクレオチド交換を抑制していることがわかった。

さらに三量体Gタンパク質のポケット(ドメイン間のヒンジの隙間)を、他のファミリーの $G\alpha$ についても調べたところ、すべてに存在を確認することができた(図4)。ただしポケット周辺のアミノ酸組成は保存されてお

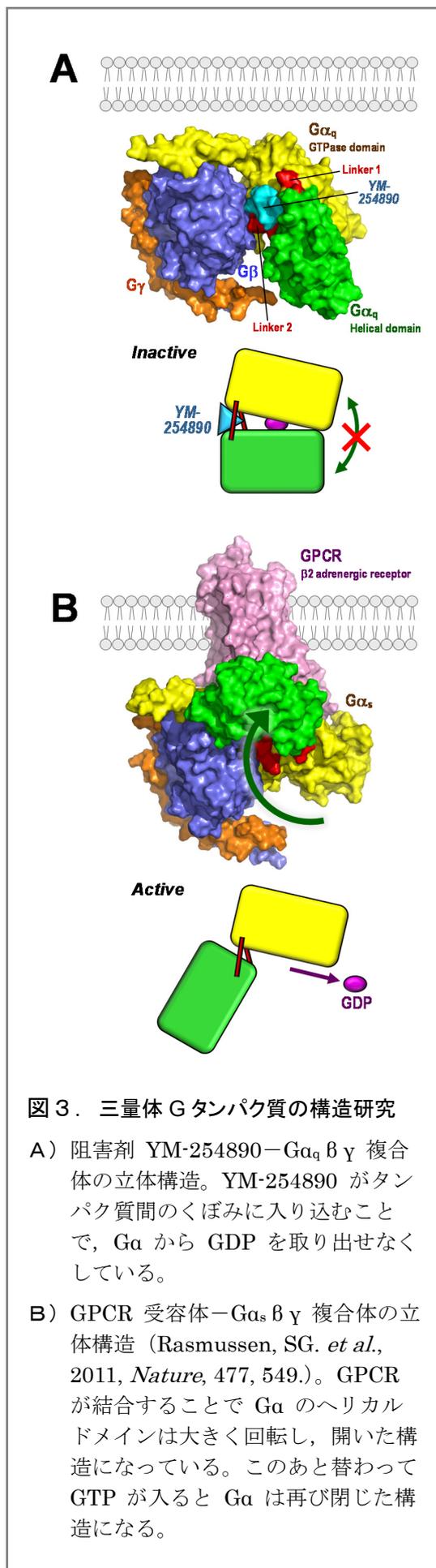


図3. 三量体Gタンパク質の構造研究

- A) 阻害剤 YM-254890- $G\alpha_q \beta \gamma$ 複合体の立体構造。YM-254890 がタンパク質間のくぼみに入り込むことで、 $G\alpha$ から GDP を取り出せなくしている。
- B) GPCR 受容体- $G\alpha_s \beta \gamma$ 複合体の立体構造 (Rasmussen, SG. *et al.*, 2011, *Nature*, 477, 549.)。GPCR が結合することで $G\alpha$ のヘリカルドメインは大きく回転し、開いた構造になっている。このあと替わって GTP が入ると $G\alpha$ は再び閉じた構造になる。

らず、形状が少しずつ異なることがわかった。この形状の違いを利用すれば、他の $G\alpha$ ($G\alpha_i$, $G\alpha_s$, $G\alpha_{12/13}$ など) のポケットにフィットする新しい阻害剤を設計スクリーニングすることも可能と考えられる。

これら三量体Gタンパク質に関する研究は、国際学会（学会発表 ⑤）と、国内のふたつの研究会（学会発表 ⑧, ⑨）で発表を行った。

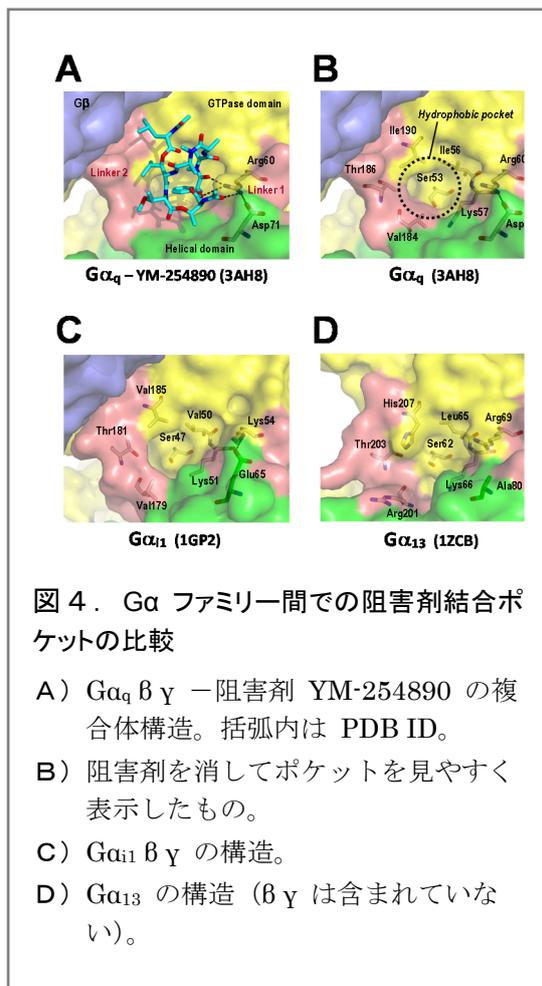


図 4. $G\alpha$ ファミリー間での阻害剤結合ポケットの比較

- A) $G\alpha_q$ $\beta\gamma$ - 阻害剤 YM-254890 の複合体構造。括弧内は PDB ID。
 B) 阻害剤を消してポケットを見やすく表示したもの。
 C) $G\alpha_{i1}$ $\beta\gamma$ の構造。
 D) $G\alpha_{13}$ の構造 ($\beta\gamma$ は含まれていない)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 北野 健 (2014), "ヒト RecQ ヘリカーゼ WRN と BLM の結晶構造解析" *日本結晶学会誌*, 56(2), 133-138, 査読有.
<http://dx.doi.org/10.5940/jcrsj.56.133>
- ② Kim, SY., Hakoshima, T., Kitano, K. (2013), "Structure of the RecQ C-terminal domain of human Bloom syndrome protein." *Scientific Reports*,

3, 3294, 査読有.

<http://dx.doi.org/10.1038/srep03294>

[学会発表] (計 12 件)

- ① Kim, SY., Hakoshima, T., Kitano, K. "Structural study of Bloom syndrome protein." *Biophysical Society 58th Annual Meeting*, 2014 年 2 月 18 日, San Francisco, USA.
- ② 寺脇慎一, 北野 健, 森 智行, 青山美樹, 箱嶋敏雄 "Radixin と MT1-MMP との複合体の X 線結晶構造解析" 平成 25 年度 日本結晶学会年会, 2013 年 10 月 12 日, 熊本大学, 熊本市.
- ③ Mochizuki, D., Arai, T., Hara, K., Matsumoto, T., Kitano, K., Zako, T., Okada, M., Yohda, M., Sato, J., Kawasaki, S., Kanamaru, S., Arisaka, F., Niimura, Y. "Protein interaction between NADH oxidase and AhpC (Prx) from *Amphibacillus xylanus*." *21st International Conference on Analytical Ultracentrifugation, Hydrodynamics, Thermodynamics and Complementary Methods (AUC2013)*, 2013 年 9 月 26 日, 静岡県熱海市, ホテルニューアカオ.
- ④ 寺脇慎一, 北野 健, 青山美樹, 箱嶋敏雄 "膜貫通型プロテアーゼ MT1-MMP の ERM 蛋白質による細胞骨格連結の構造的基盤" 第 13 回 日本蛋白質科学会年会, 2013 年 6 月 13 日, とりぎん文化会館, 鳥取市.
- ⑤ Kitano, K., Nishimura, A., Hakoshima, T., Itoh, H. "Allosteric inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule." *EMBO Conference on Allosteric Interactions in Cell Signaling and Regulation*, 2013 年 5 月 15 日, Paris, France.
- ⑥ Kitano, K., Kim, S.Y., Hakoshima, T. "Crystallographic Studies of Werner Syndrome DNA Helicase." *Meeting of the American Crystallographic Association (ACA2012)*, 2012 年 7 月 29 日, Boston, USA.
- ⑦ 寺脇慎一, 北野 健, 青山美樹, 箱嶋敏雄 "ERM 蛋白質による膜貫通型プロ

テアーゼ MT1-MMP 認識の構造的基盤" 日本生化学会関東支部例会, 2012年6月23日, 群馬大学, 前橋市.

- ⑧ 北野 健 "環状ペプチドによる三量体 G タンパク質の阻害機構" 日本学術振興会 169 委員会 第 37 回研究会, 2011年12月13日, ゆうぽうと, 東京.
- ⑨ 北野 健 "三量体 G タンパク質の構造生物学と環状ペプチドのドラッグデザイン" 包括脳ネットワーク研究会・蛋白研セミナー共催セミナー, 2011年11月22日, 岡崎コンファレンスセンター.
- ⑩ Kitano, K., Kim, S.Y., Hakoshima, T. "Structural study of Werner syndrome DNA helicase." *The EMBO Meeting*, 2011年9月12日, Vienna, Austria.
- ⑪ Kitano, K. "Structural biology of human RecQ DNA helicases." *The 2nd International Conference on Pharmacy and Advanced Pharmaceutical Sciences*, 2011年7月19日, Yogyakarta, Indonesia.
- ⑫ 森 智行, 北野 健, 箱嶋敏雄 "微小管+端集積因子, EB1-CLASP の複合体結晶構造解析" 第 11 回 日本蛋白質科学会年会, 2011年6月7日, ホテル阪急エキスポパーク, 大阪.

[その他]

Protein Data Bank (PDB) への登録

- ① Kim, SY., Hakoshima, T., Kitano, K. (2013), "Structure of BLM RQC domain bound to a phosphate ion." 3WE2.

6. 研究組織

(1)研究代表者

北野 健 (KITANO KEN)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号 : 40346309