

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440024

研究課題名(和文) X線結晶解析によるブルーム症候群BLMヘリカーゼのがん抑制機構解明

研究課題名(英文) X-ray crystallographic study of Bloom syndrome helicase BLM and its role in prevention of tumorigenesis.

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ブルーム症候群(Bloom syndrome)は、DNA修復タンパク質のひとつ、BLMヘリカーゼの変異によって引き起こされる、高発がん性の病気である。本研究では、ヒト由来のBLMヘリカーゼを対象として、タンパク質立体構造と生化学解析の研究を行った。BLMヘリカーゼが、DNA二本鎖切断の修復中間体であるホリデイジャンクションに作用する仕組みについて、新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Bloom syndrome is a rare cancer-predisposition disorder caused by mutations of the Bloom syndrome protein (BLM). In this study, structural and biochemical studies of human BLM helicase were performed. New information about the reaction mechanism of BLM helicase toward Holliday junction (a repair intermediate in the DNA double-stranded break repair) was obtained.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線構造解析 ブルーム症候群 ヘリカーゼ ホリデイジャンクション タンパク質 DNA

1. 研究開始当初の背景

常染色体劣性の遺伝病であるブルーム症候群 (Bloom syndrome) は、小柄な体型、光過敏症、免疫不全等の特徴に加えて、様々なタイプの悪性腫瘍を生じる高発がん性の病気である。治療法はまだ見つかっていない。

本疾病は、二本鎖 DNA を一本にほどく (巻き戻す) ヘリカーゼの一種、BLM (Bloom syndrome protein) が変異によって機能欠損してしまうことで引き起こされる。BLM ヘリカーゼと同じく RecQ ファミリーに属する DNA ヘリカーゼ WRN (Werner syndrome protein) の変異も、早老症の病気ウェルナー症候群を引き起こすことが知られている (雑誌論文 ②, ④)。

BLM ヘリカーゼは一般的な複製ヘリカーゼと異なり、通常の DNA 二重らせんに加えて、ゲノムの修復過程で生じる特殊な DNA 構造もほどくことができる。特に、ホリデイジャンクションとよばれる十字型の DNA 構造がふたつ並んだ、ダブルホリデイジャンクションの解きほぐし (図 1) は、ヒトの細胞を突然変異から守るための、最重要ながん抑制機構のひとつとして知られている。

しかし、この解きほぐし反応が、なぜ BLM ヘリカーゼにしかできないのかなど、病気の発症を理解するのに必要な分子機構は、まだよく分かっていない。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト由来 BLM ヘリカーゼを対象としたタンパク質立体構造の研究を進めることで、その特殊なヘリカーゼ活性の仕組みに迫ることを目的としている。特に、BLM ヘリカーゼのホリデイジャンクション DNA への作用を、構造生物学やコンピュータ解析、生化学実験で調べることに重点を置いて、研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

BLM ヘリカーゼは、C 末側に特徴的に保存された、RQC (RecQ C-terminal) ドメイン

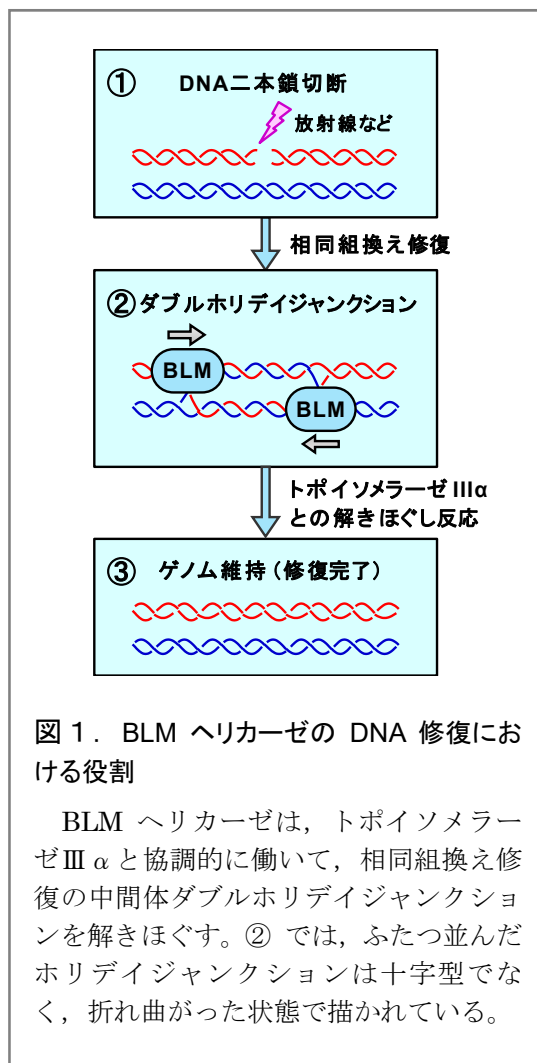


図 1. BLM ヘリカーゼの DNA 修復における役割

BLM ヘリカーゼは、トポイソメラーゼ III α と協調的に働いて、相同組換え修復の中間体ダブルホリデイジャンクションを解きほぐす。② では、ふたつ並んだホリデイジャンクションは十字型でなく、折れ曲がった状態で描かれている。

と HRDC (helicase-and-ribonuclease D-C-terminal) ドメインを有している。本研究ではまず、BLM ヘリカーゼの機能に重要な RQC ドメインの X 線構造解析と、変異体解析の実験に取り組んだ。

研究に用いるタンパク質は、発現プラスミドを組み込んで培養した大腸菌から、クロマトグラフィー精製を行うことで調製を行った。ホリデイジャンクション DNA は、十字型になるよう配列設計した 30 塩基ほどの一本鎖 DNA オリゴを 4 本、受託合成して、溶液中で混ぜてアニーリングさせることで調製を行った。分子間相互作用解析に用いる DNA 試料は、3' 末端を Fluorescein isothiocyanate (FITC) で蛍光ラベルした DNA オリゴを受託合成して、調製を行った。

放射光施設スプリング 8 で測定した X 線回折データは、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解析を行

った。タンパク質の電子密度マップに沿うように分子モデルを構築して、計算プログラム CNS を用いて立体構造の精密化を行った。タンパク質に結合したイオンの位置確認には、ヒ酸イオン As 原子のピーク波長(1.0439 Å)で測定した X 線回折データの利用が有効であった。タンパク質や DNA の立体構造表示には、分子構造描画ソフト PyMOL を使用した。

BLM ヘリカーゼ RQC ドメインとホリデイジャンクションのドッキング・シミュレーションは、構造モデリングソフト Coot や解析プログラム CCP4 Suite を利用して行った。また、図 4 に示した BLM ヘリカーゼとホリデイジャンクションの複合体改良モデルの構築は、上記シミュレーションの結果に対して、BLM ヘリカーゼのマルチドメイン構造 (Swan *et al.*, 2014, *Acta Crystallogr. D.*, 70, 1465-1475.) を重ね合わせていくことで作成を行った。このときドッキングによるタンパク質との構造衝突を避けるために、上下 2 本の DNA 二重らせんは配向調節を要した。

4. 研究成果

ヒト BLM ヘリカーゼ RQC ドメインに、リン酸イオンとヒ酸イオンが結合した状態の立体構造を、それぞれ分解能 2.7 Å と 2.9 Å で決定することができた(図 2)。これらの構造は、タンパク質立体構造データベース PDB (Protein Data Bank) に原子座標と X 線回折データを登録して、インターネット上で一般公開した (PDB-IDs 3WE2, 3WE3)。

構造解析の結果、リン酸イオンとヒ酸イオンは、BLM ヘリカーゼ RQC ドメインの同一場所に結合していることが分かった。X 線回折データの分解能が中程度だったため、これらイオンの結合様式の確認には、ヒ酸イオンに対する anomalous difference Fourier map (異常分散効果を利用した差フーリエマップ; 図 2 B) の作成が有効であった。

ここで、BLM ヘリカーゼは DNA 結合タンパク質であるので、結合したリン酸イオンは、基質であるホリデイジャンクション DNA のリン酸骨格のひとつを表すと考えられた。



図 2. リン酸イオンとヒ酸イオンに結合した、ヒト BLM ヘリカーゼ RQC ドメインの X 線結晶構造 (雑誌論文 ⑤)

- A) リン酸塩を添加して結晶化した BLM ヘリカーゼ RQC ドメインは、リン酸イオン (PO_4^{3-}) を挟むようにして二量体を形成していた (四角で囲った部分)。
- B) リン酸塩のかわりにヒ酸塩を使って結晶化すると、結合イオンがヒ酸イオン (AsO_4^{3-}) に置き換わり、より明瞭な電子密度を得ることができた (結合部位の拡大図)。As 原子の anomalous difference Fourier map をメッシュ状に示した。

この仮説を検証するために、BLM ヘリカーゼ RQC ドメインの 3 種類の点変異体 (S1121A, K1125A, R1139A) と、1 種類の欠損変異体 (BLM-insertion ループの欠損) の発現コンストラクトを作成して、分子間相互作用解析の実験を行った。解析には、蛍光偏光消法、およびゲルシフト電気泳動法を用いたが、蛍光標識した DNA を別途、受託合成して使用したことで、タンパク質との相互作用測定が可能であった。

実験の結果、リン酸イオンと相互作用していた Arg1139 の塩基性側鎖と、突き出した構造の BLM-insertion ループが、DNA との相互作用に重要であることが明らかとなった。

次に、これら変異体実験の結果と、リン酸イオンの位置を手がかりにして、BLM ヘリカーゼ RQC ドメインがホリデイジャンクション DNA に作用している状態の立体構造モデルを、コンピュータ上で作成することを試みた。この作業では、以前に決定したBLM HRDC ドメインの構造情報 (Sato *et al.*, 2010, *J. Biochem.*, 148, 517-525. ; PDB-ID 2RRD) も利用した。

作成した複合体モデルを検討した結果、RQC ドメインの端から突き出したヘアピン構造 (β -wing) が、ホリデイジャンクションの穴の内側から塩基対の引きはがしを触媒するという、興味深い機構を示すことができた。

以上の研究成果を原著論文にまとめて、国際学術ジャーナルに発表した (雑誌論文 ⑤)。また国内学会誌に解説論文を発表するとともに (雑誌論文 ④)、日本生化学会大会で企画された国際シンポジウムでの講演発表も行った (学会発表 ②)。

次に、ブルーム症候群の発症機構を探るために、BLM ヘリカーゼの分子形状に特徴がないかを調べた。まず、構造決定した BLM ヘリカーゼの立体構造を用いて、ウェルナー症候群の原因タンパク質である WRN ヘリカーゼの立体構造 (Kitano *et al.*, 2010, *Structure* 18, 177-187. ; Kitano *et al.*, 2007, *J. Biol. Chem.* 282, 2717-2728. ; PDB-IDs 3AAF, 2E1E, 2E1F) との比較を行った。

この結果、両タンパク質のあいだには、ドメインの静電ポテンシャル分布や DNA 鎖分離ヘアピン β -wing の形状に、注目すべき差異があることが分かった (図 3)。これらの差異は、二つの異なる遺伝病の発症にも関係しているとみられる。

さらに、上記ホリデイジャンクションとの複合体モデルに対して、最近、イギリスのグループが構造決定した BLM ヘリカーゼのマルチドメイン構造を重ね合わせることで、複合体改良モデルの構築を行った (図 4)。

得られたモデルを詳細に検討したところ、従来の予想に反して、BLM ヘリカーゼが結合したときのホリデイジャンクションは理想

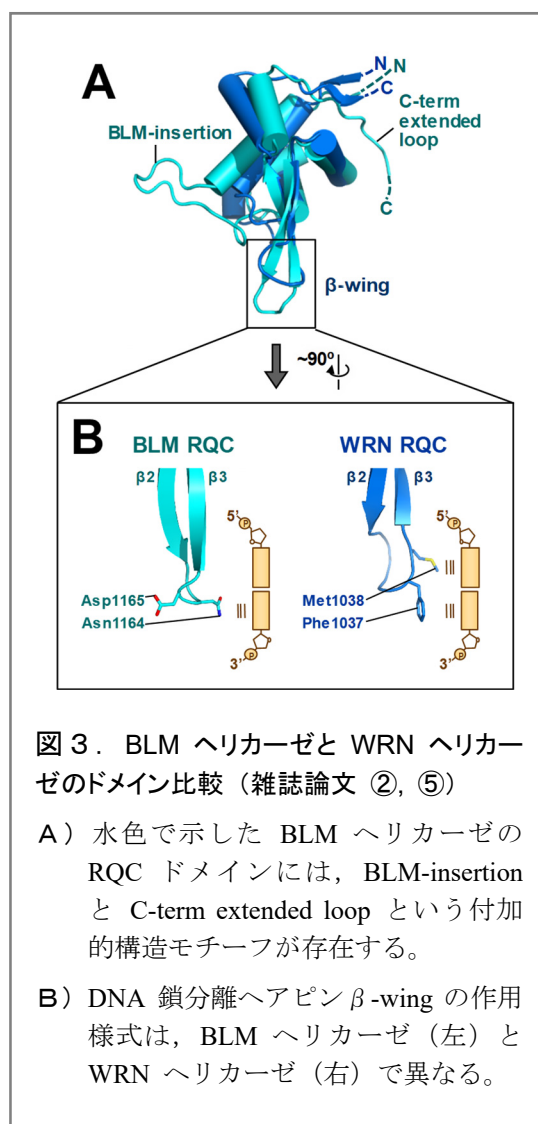


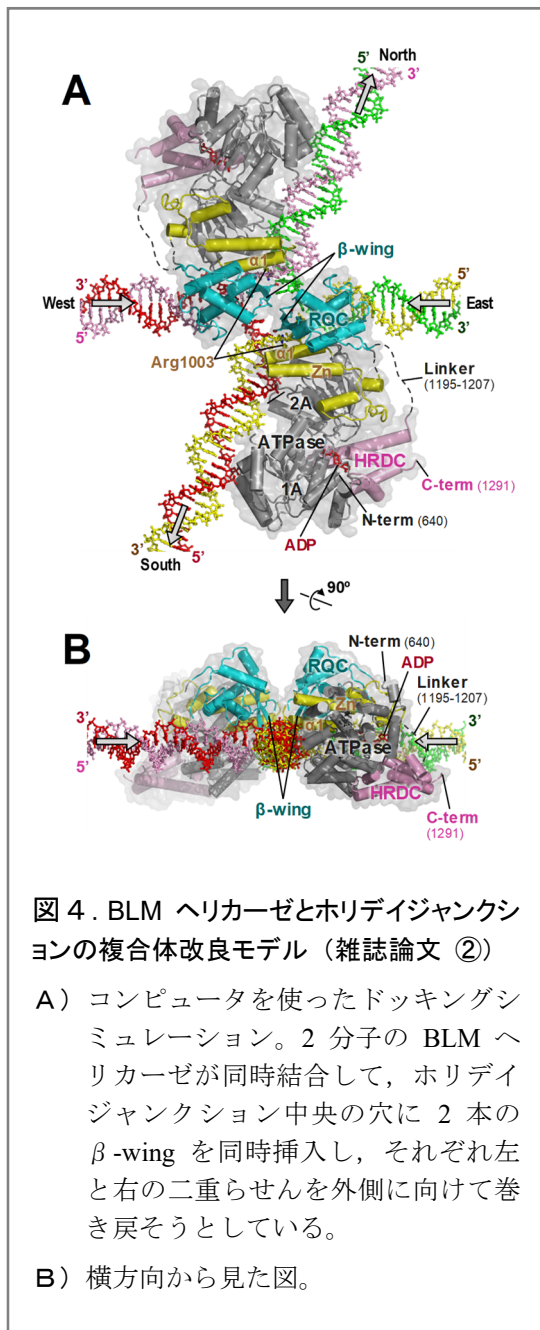
図 3. BLM ヘリカーゼと WRN ヘリカーゼのドメイン比較 (雑誌論文 ②, ⑤)

A) 水色で示した BLM ヘリカーゼの RQC ドメインには、BLM-insertion と C-term extended loop という付加的構造モチーフが存在する。

B) DNA 鎖分離ヘアピン β -wing の作用様式は、BLM ヘリカーゼ (左) と WRN ヘリカーゼ (右) で異なる。

的な十字型構造ではなく、上下の DNA 二重らせんが 21° ほど歪んだ状態にあることが示唆された。この DNA 鎖の歪みは、BLM ヘリカーゼがダブルホリデイジャンクションの解きほぐしを行うのに有効とみられる。

以上の研究成果を、総説を交えた新たな研究論文にまとめて、国際学術ジャーナルに発表した (雑誌論文 ②)。また 2016 年に、米国・フレッドハッチンソン癌研究センターで開催された国際シンポジウム RECQ 2016 (3rd International Meeting on RECQ Helicases in Biology and Medicine) の招待講演でも発表を行った (学会発表 ①)。同シンポジウムでは、研究者のみならず、医師や患者とその家族が世界中から一同に会し、ブルーム症候群やウェルナー症候群の発症機構と治療法を探るための、非常に活発な討議が交わされた。



また本研究では、BLM ヘリカーゼの研究に加えて、他のタンパク質を対象とした研究も行った。ヒトの細胞内シグナル伝達に重要な三量体Gタンパク質の作動機構を調べて、国内学会誌に解説を発表した(雑誌論文 ③)。マウス由来ラディキシン複合体のX線結晶構造を分解能 2.4 Å で決定して論文発表するとともに(雑誌論文 ①; PDB-ID 3X23), ヒト由来ホスホジエステラーゼ 12 のX線結晶構造を分解能 1.8 Å で決定して、一般公開した(PDB-ID 4ZKF)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Terawaki, S., Kitano, K., Aoyama, M., Mori, T., Hakoshima, T. (2015), "MT1-MMP recognition by ERM proteins and its implication in CD44 shedding." *Genes to Cells*, 20(10), 847-859, 査読有.
<http://dx.doi.org/10.1111/gtc.12276>
- ② Kitano, K. (2014), "Structural mechanisms of human RecQ helicases WRN and BLM." *Frontiers in Genetics.*, 5, 366, 査読有.
<http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2014.00366>
- ③ 北野 健 (2014), "環状ペプチドによる三量体 G タンパク質の新しい阻害機構." *生物物理*, 54(5), 265-266, 査読有.
<http://doi.org/10.2142/biophys.54.265>
- ④ 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>
- ⑤ 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 11 件)

- ① Kitano, K. "Structural mechanisms of human RecQ helicases WRN and BLM." (招待講演) *3rd International Meeting on RECQ Helicases in Biology and Medicine (RECQ2016)*, 2016年5月28日~30日, Seattle (USA).
- ② Kitano, K., Kim, S.Y., Hakoshima, T. "Structural study of human RecQ helicases WRN and BLM." (招待講演) *第87回 日本生化学会大会*, 2014年10月15日~18日, 国立京都国際会館(京都市).

この他の学会発表 9 件。

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