

解説

DNA 損傷トレランスに関わる HIRAN ドメインの結晶構造

～アーティファクトから得られたこと～

菱木麻美¹・原幸大¹・橋本博^{1*}

Crystal structure of HIRAN domain involved in DNA damage tolerance

Asami Hishiki¹, Kodai Hara¹ and Hiroshi Hashimoto^{1*}

DNA damage tolerance (DDT) is a cell function to release replication blockage caused by DNA damage and to continue DNA synthesis even in the presence of DNA damage. DDT includes two pathways, translesion and template-switched DNA syntheses. Helicase-like transcription factor (HLTF) is a central protein in the template-switched DNA synthesis pathway, in which one newly synthesized strand is utilized as an undamaged template for replication. HLTF consists of three domains, N-terminal DNA binding, DNA helicase, and ubiquitin ligase domains. The N-terminal DNA binding domain is termed HIRAN domain. Here, we outline the crystal structure of HIRAN domain bound to DNA and its functional implication in template-switched DNA synthesis. Furthermore, we describe that artifacts in crystallization gave fruitful results in our structural study of HIRAN domain.

1. はじめに

結晶は隣接する分子が規則的な相互作用によって周期的に配列したものであり、結晶内の分子間には何らかの相互作用が存在する。逆に言えば分子間の相互作用がなければ結晶にはならない。結晶構造は原子レベルの詳細な構造情報を提供するが、結晶化という生体内や溶液中とは異なる環境下によって生じた相互作用や構造、すなわちアーティファクトによって結晶構造が真の構造とは違っている場合があることに気をつけないといけない。その一方で、アーティファクトが良い結果をもたらす場合もある。本稿では、DNA 損傷トレランスに関わる Helicase-like transcription factor (HLTF) の DNA 結合ドメイン (HIRAN ドメイン) の構造生物学的研究を解説するとともに、アーティファクトから HIRAN ドメインの機能に関する知見が得られたこと、アーティファクトが結晶成長に重要だったことを紹介する。

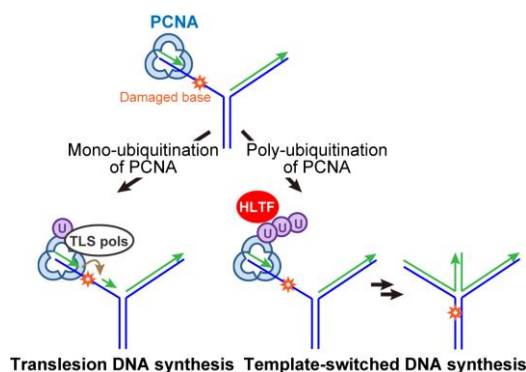


Fig. 1 Scheme of DNA damage tolerance pathways. Template and primer strands are shown in blue and green, respectively. "U" indicates ubiquitin.

¹ 静岡県立大学薬学部 〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田 52-1

¹ School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan

* Corresponding Author E-mail: hash@u-shizuoka-ken.ac.jp - 1 -

私たちの DNA は、紫外線、食品や環境中の化学物質、体内で産生される代謝物や活性酸素などによって常に損傷の危険にさらされており、1 細胞あたり 1 日に何万もの塩基に損傷が生じている。このようにして生じた損傷塩基は適切な DNA 修復機構によって元に戻すことが出来る。しかし、DNA の複製中の場合、損傷の修復に伴う複製の遅延は細胞死などの好ましくない状況を招くため、修復を後回しにして DNA の合成を優先することが求められる。複製型の DNA 合成酵素（複製型 DNA ポリメラーゼ）にとって DNA 損傷は障害物となり、DNA 合成は停止してしまう。細胞にはこのような複製停止を回避して DNA 合成を続ける仕組みがあり、それは DNA 損傷トレランスと呼ばれる (Fig. 1) ¹⁾。DNA 損傷トレランスには、「損傷乗り越え」と「テンプレートスイッチ」という 2 種類の回避手段があり、Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) と呼ばれる DNA 合成の足場タンパク質のユビキチン化の程度によって 2 つの経路が使い分けられている ²⁾。すなわち、PCNA がモノユビキチン化されると損傷乗り越え経路へ進み (Fig. 1, 左下)、複製型 DNA ポリメラーゼに代わって複数の特別な DNA ポリメラーゼ（損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼ, TLS pols）が損傷塩基を鋳型にして DNA 合成を行う ^{3,4)}。これによって障害物である DNA 損傷は乗り越えられるが、損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼによる DNA 合成は、しばしば複製の正確性に欠ける。一方、PCNA がポリユビキチン化されるとテンプレートスイッチ経路へ進み (Fig. 1, 右下)、損傷のある DNA を鋳型にするのではなく、損傷のない相補鎖から新たに複製された DNA を鋳型として、複製型 DNA ポリメラーゼが正確に DNA 合成を行う。テンプレートスイッチ経路では DNA を巻き戻す酵素である DNA ヘリカーゼが関与し、DNA ヘリカーゼによる DNA の構造変化によって鋳型鎖が交換されるが、その詳細な分子機構はあまりわかっていない。

DNA 損傷トレランスは DNA 損傷があっても複製を継続するための重要な細胞機能であり、細胞のがん化やアポトーシスを防ぐための仕組みの一つであると考えられる。しかし、がん細胞にとっては、シスプラチンなどの DNA 損傷を起こす医薬品に対する抵抗性を示す要因の一つである。したがって、DNA 損傷トレランスを制御する化合物は、新たな抗がん薬や併用薬となる可能性を秘めており、DNA 損傷トレランスに関わるタンパク質の立体構造や分子間相互作用を明らかにすることは医薬品開発に資すると考えられる。

2. HIRAN ドメインと DNA との複合体の結晶構造

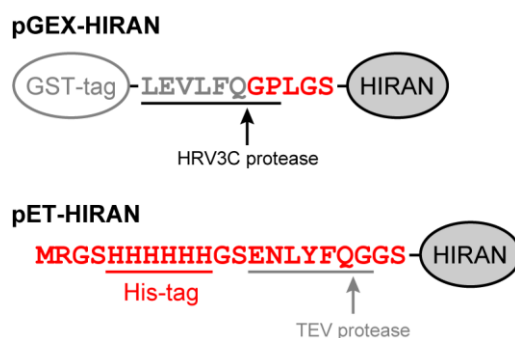


Fig. 2 Schematic drawings of expression vectors of recombinant HIRAN domain.

Extra residues added in the N-termini of HIRAN domains are shown in red characters. His-tag is shown in red line. Recognition sequences of HRV3C and TEV proteases are shown in black and grey lines, respectively. Cleavage sites by those proteases are shown by arrows.

HIRAN ドメインの調製は以下の方法で行った (Fig. 2) ⁵⁾。目的遺伝子を大腸菌用の発現ベクター pGEX-6P-1 に組み込んだ (Fig. 2, pGEX-HIRAN)。この発現ベクターを用いると、精製のためのタグの一種であるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) というタンパク質が HIRAN ドメインの N 末端側に付加された GST 融合 HIRAN ドメインが発現する。精製の過程で GST タグを HRV3C プロテアーゼで切り離すことで、HIRAN ドメインを得ることができる。したがって、GST タグと目的タンパク質の間には数残基のプロテアーゼ認識配列があり、HRV3C プロテアーゼによってタグを切断後、HIRAN ドメインの N 末端側には数残基の余計な付加残基 (GPLGS) が残る。本稿では、この HIRAN ドメインを単に HIRAN と呼ぶこととする。精製した HIRAN と 13 塩基の単鎖 DNA を混合し、結晶化条件の探索を行った結果、X 線結晶構造解析に適した良質な結晶を得ることに成功した。セレノメチオニンの異常分散効果を利用して結晶構造因子の位相付けを行い、最終的に 1.35 Å 分解能で HIRAN-DNA 複合体の結晶構造を決定した ⁵⁾。

HIRAN ドメインは 6 つの β ストランドからなる β パレル構造とそれに隣接する 2 つの α ヘリックスで構成されていた。このような構造は OB フォールドと呼ばれ、オリゴ糖やオリゴヌクレオチド結合タンパク質にしばしば見られる構造である。結晶化に用いた単鎖 DNA は 3' 末端側から 2 塩基 (C13 と C12) が HIRAN ドメインに結合していた (Fig.

3). 予想していなかったことであるが、単鎖 DNA が結晶学的 2 回軸で関係づけられ、その結果、結晶中において二重らせん構造を形成していた。結晶化に用いた単鎖 DNA どうしは完全な相補配列ではないため、結晶中で形成された二重らせん構造にはミスマッチ塩基対 (TG および GG ミスマッチ) を含んでいるが、HIRAN ドメインが 2 本鎖 DNA に結合した状態を反映していると考えられる。

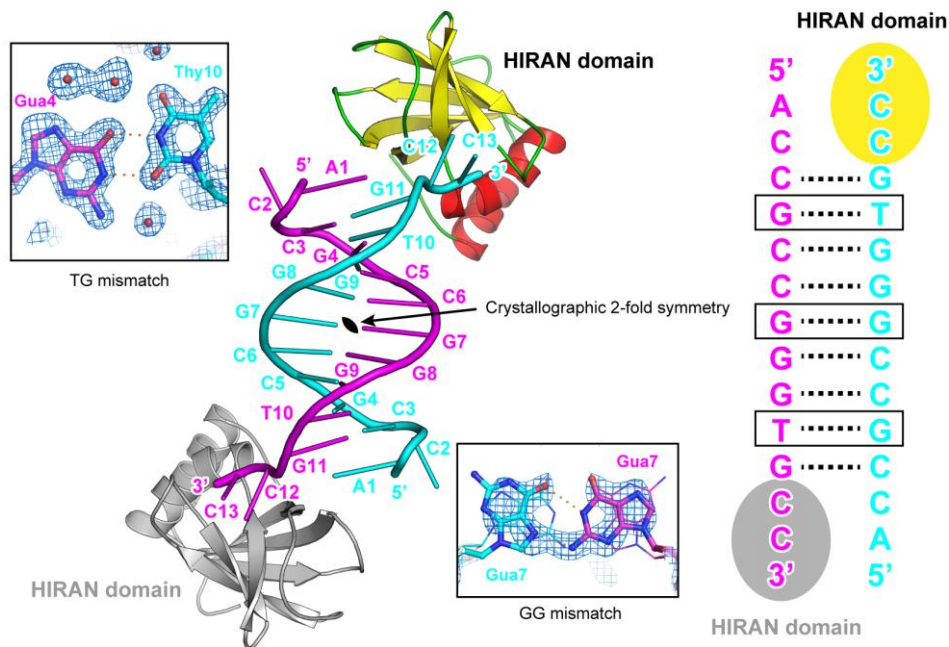


Fig. 3 Crystal structure of HLTf HIRAN domain in complex with DNA. The asymmetric unit includes one HIRAN domain shown by yellow strands, red helices, and green loops, and one DNA strand shown in cyan. Symmetry-related HIRAN domain and DNA are shown in grey and magenta, respectively. Mismatched base pairs are boxed and hydrogen bonds within these base-pairs are shown by orange dots. Schematic drawing of the DNA complex is shown in the right. Hydrogen bonds within base-pairs are shown by dashed lines.

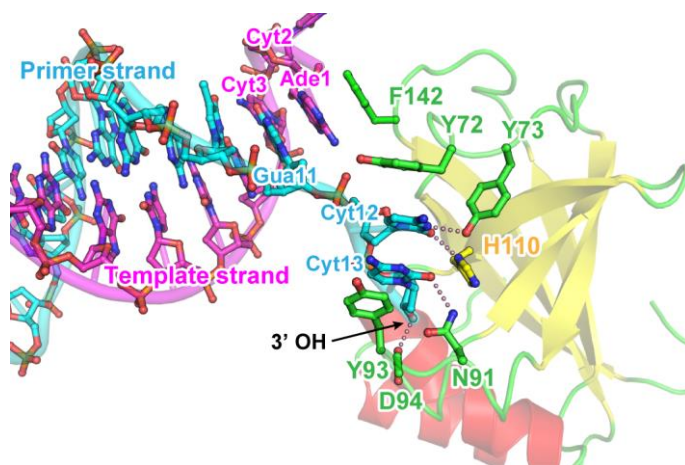


Fig. 4 Detailed interaction between HIRAN domain and DNA. Primer and template strands are shown in cyan and magenta, respectively. Residues involved in the interaction are shown by ball-and-stick representations. Hydrogen bonds are shown by orange dots.

HIRAN ドメインと DNA との相互作用の詳細を **Fig. 4** に示す。DNA の 3' 末端のヒドロキシ基は、HIRAN ドメイン

の D94 と水素結合を形成している。また、DNA の 3'末端側の 2 塩基 (Cyt13 と Cyt12) は、HIRAN ドメインの N91, H110, Y73 の側鎖を介した水素結合および Y72 と Y93 の芳香族側鎖によるスタッキング相互作用によって認識されている。2 本鎖 DNA に結合した HIRAN ドメインの結晶構造は結晶化のアーティファクトであるが、この結晶構造から HIRAN ドメインの機能を推測できる。Fig. 4 において、HIRAN ドメインに結合している DNA 鎖を DNA 合成が進むプライマー鎖 (新生鎖)、結晶学的 2 回軸で対称付けられた DNA 鎖を鋳型鎖と見立てると、HIRAN ドメインの結合によって 2 本鎖 DNA はプライマー鎖の 3'末端側から 2 塩基巻き戻されているように見える。また、HIRAN ドメインの F142 は鋳型鎖の塩基 (Ade1) とスタッキング相互作用をしている。以上のことから、HIRAN ドメインは DNA 損傷によって複製が停止した新生鎖の末端に結合し、塩基対を引きはがすことでテンプレートスイッチ経路の初期段階で重要な働きを担うと予想される。

3. HIRAN ドメイン単独での結晶化

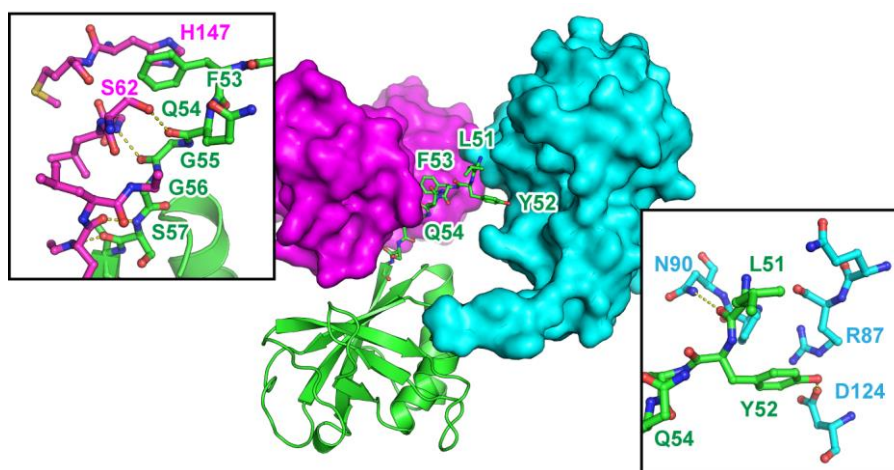


Fig. 5 Crystal packing of His-HIRAN. Structure of His-HIRAN is shown by ribbon representation colored in green. Extra residues added at the N-terminus of HIRAN domain are shown by ball-and-stick representations. Two His-HIRAN molecules that interact with those N-terminal extra residues are shown by surface representations colored in magenta and cyan. Interactions between the extra residues and adjacent molecules are boxed. Hydrogen bonds are shown by orange dots.

HIRAN ドメインと DNA の複合体の結晶構造解析と並行して、HIRAN ドメイン単体、すなわち DNA が結合していない HIRAN ドメインの結晶化も試みた。当初、DNA 複合体の結晶化と同じ方法で調製した HIRAN ドメインを用いて単体の結晶化を検討し、沈殿剤や塩の種類や濃度、pH を変化させて結晶化スクリーニングを行ったが、針状結晶は得られるものの、X 線回折実験に適した結晶を得ることは出来なかった。そこで、調製方法を変えることで HIRAN ドメインの性状が変化し結晶化が促進されることを期待し、改変した pET ベクターに目的遺伝子を組み込んだ (Fig. 2, pET-HIRAN)。この発現系を用いると、ヒスチジン残基が 6 個連続した His タグが HIRAN ドメインの N 末端側に付加される。本稿ではこの HIRAN ドメインを His-HIRAN と呼ぶ。His タグと HIRAN ドメインの間には TEV プロテアーゼの認識配列があり、精製の過程で His タグを除去できるが、本研究では精製の工程を減らすことで試料の劣化を防ぐことを優先し、His タグを除去しない試料で結晶化を試みた。その結果、X 線回折実験が可能な結晶を得ることが出来た⁶⁾。DNA 複合体の HIRAN ドメインの構造をモデル分子とした分子置換法によって、2.4 Å 分解能で His-HIRAN 単体の結晶構造を決定した。

His-HIRAN 単体の構造は、DNA 複合体中の HIRAN の構造と基本的に同じであったが、結晶内のパッキングに関与する興味深い相互作用が見られた (Fig. 5)。HIRAN ドメインの N 末端に付加された、L51, Y52, F53, Q54, G55, G56, S57 が隣接する分子と相互作用していた。特に、TEV プロテアーゼの認識配列の L51, Y52, F53 は側鎖を介した特異的な相互作用を形成していた。DNA 複合体の構造解析で用いた HIRAN では、N 末端の付加残基は GPLGS であるため、上記のような結晶内の相互作用は形成できない。このことは pGEX-HIRAN から調製した試料を用いた場合に良質な結晶を得ることができなかったことと符合する。また、His-HIRAN において、TEV プロテアーゼによって His タグを除去すると、HIRAN ドメインの N 末端に残る付加残基は GGS であるため (Fig. 2)、上記のような結晶内の相互作用は期待できない。したがって、もし定法通りに His タグを除去していたら X 線結晶構造解析に適した HIRAN ドメイン単体の結晶を得ることは難しかったかもしれない。

4. おわりに

タンパク質-DNA 複合体の結晶化において、DNA 同士の相互作用が結晶内でのパッキングに寄与することは珍しいことでは無い。むしろ、DNA 同士の相互作用によって結晶化を促進するために、DNA の配列をデザインすることもある。HIRAN ドメインと DNA の複合体の結晶化では、結晶内でのパッキングがミスマッチ塩基対を含む 2 本鎖 DNA の形成を促したのかもしれない。それによって得られた結晶構造から HIRAN ドメインの機能を考察できたことはセレンディピティと言えるだろう。また、His-HIRAN のように、組換えタンパク質の付加残基が結晶化に関与することもしばしば起こる。筆者らの研究室においても、His-HIRAN 以外のタンパク質で TEV プロテアーゼ認識配列中の疎水性側鎖が、やはり結晶内のパッキングに関与していた例がある（未発表）。1926 年に初めてタンパク質が結晶化されて 90 余年が経つ。以来、タンパク質の結晶化において様々な工夫がなされてきたが、未だ王道は無い。His タグを除去しない試料を用いることは、タンパク質の結晶化における選択肢の一つとして有望かもしれない。

His-HIRAN の調製で使用した改変 pET ベクターは島根大学医学部病態生化学の尾林栄治准教授からご提供頂きました。この場を借りてお礼申し上げます。また、X 線回折強度測定は高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリーおよび SPring-8 で行いました。X 線回折実験においてご支援頂いた両ビームラインスタッフにこの場を借りてお礼申し上げます。

5. 参考文献

- 1) D. Branzei and I. Psakhye: *Curr. Opin. Cell Biol.*, **40** (2016) 137.
- 2) P. Stelter and H. D. Ulrich: *Nature*, **425** (2003) 188.
- 3) E. C. Friedberg, A. R. Lehmann and R. P. Fuchs: *Mol. Cell*, **18** (2005) 499.
- 4) G. L. Moldovan, B. Pfander and S. Jentsch: *Cell*, **129** (2007) 665.
- 5) A. Hishiki, K. Hara, Y. Ikegaya, H. Yokoyama, T. Shimizu, M. Sato and H. Hashimoto: *J. Biol. Chem.*, **290** (2015) 13215
- 6) Y. Ikegaya, K. Hara, A. Hishiki, H. Yokoyama and H. Hashimoto: *Acta Cryst. F*, **71** (2015) 668.

(2018 年 10 月 23 日 受理)