

研究区分	教員特別研究推進 独創・先進的研究
------	-------------------

研究テーマ	チェックポイントを活性化する 9-1-1 が DNA 修復反応を促進するメカニズムの解明				
研究組織	代 表 者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	橋本 博
	研究分担者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	原 幸大
		所属・職名	薬学部・講師	氏名	菱木 麻美
		所属・職名	薬学部・助教	氏名	淵上 壮太郎
	発 表 者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	橋本 博

講演題目
チェックポイントクランプ 9-1-1 と DNA 修復酵素との相互作用
研究の目的、成果及び今後の展望
【背景】9-1-1 は RAD9-RAD1-HUS1 ヘテロ 3 量体のドーナツ状タンパク質であり、分子中央の穴に DNA を結合する。9-1-1 は DNA 損傷を感知し、細胞周期チェックポイントのリン酸化シグナル経路を活性化することで細胞周期を停止させる。がん細胞では 9-1-1 が活性化するリン酸化シグナル経路が亢進されている。すなわち、がん細胞は抗がん薬による DNA 損傷を修復する時間を稼ぐために細胞周期チェックポイントを利用しており、9-1-1 は創薬標的としても注目されている。興味深いことに、9-1-1 は細胞周期チェックポイントを活性化するだけでなく、DNA 修復酵素と結合することで DNA 修復反応に直接関与することが知られている。したがって、9-1-1 による DNA 修復反応の促進も、がん細胞が抗がん薬耐性を獲得する一因と考えられている。しかし、9-1-1 の DNA 修復における機能を説明できる原子分解能での立体構造は一例も無い。 【目的】本研究では、9-1-1 が DNA 修復反応を促進するメカニズムを原子レベルの解像度で解明することを目的とする。具体的には、塩基除去修復に関わる 4 つの酵素（FEN1、MUTYH、NEIL1、Pol β）に着目し、それぞれの酵素と 9-1-1 との複合体形成を検証し、X 線結晶構造解析あるいはクライオ電子顕微鏡解析の手法により、修復反応における 9-1-1 の機能を構造生物学的に解明することを目指す。申請者はこれまでに、9-1-1 のサブユニットに結合するためのアミノ酸配列モチーフ（RAD1 結合モチーフ、RAD9 結合モチーフ）を同定しているが、本研究で対象とする上記 4 つの酵素にはそのような配列モチーフは保存されておらず、新規 9-1-1 結合モチーフの発見とその相互作用メカニズムの解明が期待できる。 【成果及び今後の展望】ヒト NEIL1 の組み換えタンパク質を調製し、構造解析に向けた 9-1-1 との複合体形成を調べた。NEIL1 は塩基除去修復に関わる DNA グリコシラーゼの一種であり、酸化損傷を受けた DNA 塩基を除去する。ヒト NEIL1 は全長 390 アミノ酸残基からなるタンパク質であり、N 末端側約 290 残基が触媒ドメイン、C 末端側約 100 残基は天然変性領域である。全長 NEIL1 について、大腸菌発現系により組み換えタンパク質を精製し、9-1-1 と混合しゲル濾過クロマトグラフィーを行った。その結果、9-1-1 との複合体形成を確認し、9-1-1-NEIL1 複合体の調製に成功した。次に、複合体形成に重要な NEIL1 の領域を絞り込むため、NEIL1 に様々な欠失変異を導入し、先と同様にゲル濾過クロマトグラフィーにより 9-1-1 との複合体形成を評価したところ、NEIL1 の C 末端約 100 残基の領域が 9-1-1 との複合体形成に必要であることが明らかとなった。今後、9-1-1-NEIL1 の構造解析を行うことで相互作用メカニズムを明らかにし、DNA 修復反応における 9-1-1 の機能解明に繋げたい。