

研究区分	教員特別研究推進（地域振興）
------	----------------

研 究 テーマ	DNA 損傷チェックポイントにおける 9-1-1 の分子内相互作用のシミュレーション解析				
研究組織	代 表 者	所属・職名	薬学部・助教	氏名	洲上 壮太郎
	研究協力者	所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
	発 表 者	所属・職名	薬学部・助教	氏名	洲上 壮太郎

講演題目
DNA 損傷チェックポイントにおける 9-1-1 の分子内相互作用のシミュレーション解析
研究の目的、成果及び今後の展望
【背景】DNA に損傷が生じると、DNA クランプである RAD9-RAD1-HUS1 複合体（9-1-1）が損傷部位に結合し、損傷部位を修復するために DNA 損傷チェックポイントの ATR-Chk1 経路が活性化される。この活性化は RAD9 の C 末端領域（RAD9CT）によって負に制御されることが示唆されており、RAD9CT と 9-1-1 のリング部分の分子内相互作用が DNA の 9-1-1 への結合を阻害することが実験的に確認されている。RAD9 変異体を用いた実験によって RAD9CT が RAD9 の疎水性ポケットに結合することが確認され、RAD9CT に存在する RAD9 結合モチーフが結合部位であると予想されているが、この分子内相互作用の構造的な詳細は未解明であり、DNA の結合が阻害される分子機構も明らかとなっていない。 【目的】本研究では、ATR-Chk1 経路の活性化を負に制御する RAD9CT の分子内相互作用に着目し、9-1-1 の立体構造モデリングと全原子分子動力学（MD）シミュレーションによって、RAD9CT の分子内相互作用の形成・安定化機構と DNA 結合の阻害機構の解明を目指す。RAD9 結合モチーフをもつ RHINO ペプチド断片と 9-1-1 の複合体の構造をもとに、RAD9CT がリング部分に結合した立体構造を作成する。また、得られた構造を用いて MD シミュレーションによる解析を実行し、RAD9CT と 9-1-1 のリング部分の分子内相互作用を同定・解明するとともに、9-1-1 の DNA 結合能を検証・評価する。 【結果】RHINO ペプチド断片が結合した 9-1-1 の構造を用いたホモロジーモデリングによって、RAD9CT が 9-1-1 リングに結合した構造としてリングの外部と内部を通過する 2 種類のものを作成することができた。また、AlphaFold3（AF）による立体構造予測によって、RAD9CT がリング外部を通る構造を得ることができた。これら 3 種類の 9-1-1 の構造（外部、内部、AF）を用いて MD シミュレーションを実行したところ、RAD9CT の RAD9 結合モチーフはリングに安定に結合していたのに対し、それ以外の RAD9CT 部分は大きく変動し、安定な構造へと到達した（図 左：外部，中：内部，右：AF）。得られた安定構造の妥当性を検証するため、9-1-1 と DNA の MD シミュレーションによって DNA 結合が阻害されるかを確認した。まず、RAD9CT を除いた 9-1-1 リングと DNA の MD シミュレーションでは、DNA がリングに結合することが確認された。続いて、RAD9CT を含む 9-1-1 の 3 種類の構造と DNA の MD シミュレーションを複数回実行したところ、DNA の結合阻害は「外部」では観察されず、「内部」と「AF」では観察され、その頻度は「AF」より「内部」の方が高いことが判明した。以上より、RAD9CT は DNA の結合を阻害する構造を取り得ることが示された。

