

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

研 究 テーマ	DNA 修復反応を促進する 9-1-1 クランプの構造生物学的新展開				
研究組織	代 表 者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	橋本 博
	研究協力者	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	湊上 壮太郎
	発 表 者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	橋本 博

講演題目
DNA 修復反応を促進する 9-1-1 クランプの構造生物学的新展開
研究の目的、成果及び今後の展望
【研究の目的】 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。9-1-1 を活性化するタンパク質として RHINO が知られている。RHINO は 9-1-1 の RAD9 サブユニットと RAD1 サブユニットに結合し、がん細胞におけるリン酸化シグナル経路を亢進する。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 修復に関わるタンパク質と結合し 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 修復における分子間相互作用を説明できる原子分解能での立体構造は一例も無い。本研究では 9-1-1 が DNA 修復を促進するメカニズムを原子レベルの解像度で構造生物学的に解明することを目指した。 【成果】 これまでの研究により、DNA 損傷によって誘導される p21 は RAD9 結合モチーフを持つことが予想されている。そこで本研究では、RAD9 サブユニットの C 末端尾部領域を欠失させたヒト 9-1-1 リングを調製し、p21 のペプチドとの複合体の結晶化を行った。その結果、結晶化に成功し、4.02 Å 分解能での X 線結晶構造を得た。X 線結晶構造解析の結果、9-1-1 リングの RAD9 サブユニットに結合した p21 ペプチドの電子密度を得た。低分解能であるためアミノ酸残基の側鎖の詳細な構造は決定できていないが、p21 は RHINO と同様な相互作用で RAD9 サブユニットと結合すると考えられた。次に、X 線結晶構造解析で示唆された相互作用に重要と思われるアミノ酸残基に変異を導入した p21 を調製し、プルダウンアッセイにより 9-1-1 リングとの相互作用を調べた。その結果、p21 は先行研究から予想した RAD9 結合モチーフ以外に 9-1-1 との相互作用部位を持つことが示唆された。 【今後の展望】 9-1-1 リングと p21 ペプチド複合体については、相互作用の詳細を解明するためにより高分解能な結晶構造が必要である。そのために結晶化条件の改良および結晶化に用いる p21 ペプチドの配列を検討していく。また、p21 の新規 9-1-1 結合モチーフを同定するため、様々な p21 の組み換えタンパク質を調製し、9-1-1 リングとの相互作用を検討することで、結合領域の特定を進めていく。これらの研究によって、p21 と 9-1-1 リングとの相互作用の詳細を明らかにし、DNA 修復における 9-1-1 の機能に迫る手がかりを得たい。