

氏名	出原 啓介
(ふりがな)	(いずはら けいすけ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第1147号
学位審査年月日	令和3年1月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	A Lynch syndrome-associated mutation at a Bergerat ATP-binding fold destabilizes the structure of the DNA mismatch repair endonuclease MutL (Bergerat の ATP 結合部位におけるリンチ症候群関連の変異は DNA ミスマッチ修復のエンドヌクレアーゼである MutL の構造を不安定化する)
論文審査委員	(主) 教授 林 秀行 教授 樋口 和秀 教授 小野 富三人

学位論文内容の要旨

《緒言》

DNA複製の誤りは遺伝情報の変化に繋がり、細胞の老化やがん化の原因となる。生体内ではミスマッチ修復系 (mismatch repair: MMR) が DNA 複製の誤りを修復している。MMR で中心的な役割を果たす MutL はエンドヌクレアーゼ活性を有し、誤りを含む DNA 鎖を切断することで修復反応を駆動する。バクテリア MutL はホモ二量体であるが、ヒトでは PMS2 と MLH1 の二種類のサブユニットから成るヘテロ二量体 MutL が主な MMR 活性を担っており、これらの遺伝子の変異は、遺伝性のがんであるリンチ症候群の原因と

なる。MutL の N 末端ドメイン (NTD) には Bergerat の ATP 結合部位と呼ばれる ATPase モチーフが存在し、ATP の結合と分解によってエンドヌクレアーゼ活性が制御される。近年、リンチ症候群が疑われる症例において MutL 遺伝子の変異が多数報告されているが、病原性との因果関係が不明なものも多い。それらの変異の病原性を判断するためには MutL タンパク質の生化学的解析が必須である。本研究では、超好熱性バクテリア *Aquifex aeolicus* 由来 MutL (aqMutL) およびヒト由来 PMS2 を用いて、Bergerat の ATP 結合部位や他の領域に存在するリンチ症候群関連変異が MutL タンパク質に及ぼす影響を評価した。

《対象・方法》

まず、高い安定性を有し生化学的解析に適した aqMutL を用いて解析を行った。大腸菌を用いた発現系により aqMutL NTD を大量発現させて精製し、ATP アナログとの複合体の結晶構造解析を行った。また、リンチ症候群関連の変異を導入した変異型 aqMutL NTD も同様に調製し、タンパク質の二次構造や安定性を円二色性分光法とタンパク質分解酵素による限定分解を用いて解析した。また、ATPase 活性および DNA 結合能を解析した。さらに、ヒト PMS2 NTD についても変異を導入したタンパク質を調製し、ATPase 活性を評価した。

《結果・考察》

ATP アナログ結合型 aqMutL NTD の結晶構造を決定したところ、その ATP 結合様式がヒト MLH1 とは異なり、PMS2 と同様であることが確認された。これはヒト PMS2 とバクテリア MutL の構造および機能的類似性を示すものである。そこで、aqMutL をモデル分子として用い、PMS2 遺伝子で報告されているリンチ症候群関連変異である S34I、R95W、E97K、R168T、K252N の評価を行うこととした。S34I、R95W、E97K は Bergerat の ATP 結合部位に存在し、残りはその他の領域に位置する。

円二色性スペクトルによる二次構造の比較では S34I において α ヘリックス含量が大きく

減少している結果が得られた。その他の変異型タンパク質のスペクトルは WT と同様であり二次構造の変化は見られなかった。熱および変性剤に対する安定性を評価したところ、S34I と R95W において安定性の低下が見られた。また、タンパク質分解酵素を用いた限定分解では S34I は WT やその他の変異型タンパク質よりも分解されやすかったが、ATP アナログ存在下では WT と同様の分解パターンを示した。S34I 変異は Bergerat の ATP 結合部位に存在するにも関わらず、S34I は ATP を結合できることが示唆された。これらの結果から、S34I と R95W 変異は MutL の不安定化を引き起こすことが分かった。ヒト PMS2 NTD に、aqMutL S34I に相当する S46I 変異を導入して発現を試みたが、WT は調製可能であったのに対し、S46I は宿主細胞内で消化されてしまうことが分かった。このように、ヒトの MutL においても、この Bergerat の ATP 結合部位における変異がタンパク質構造を不安定化することが確認された。

ATPase 活性に関しては、R95W と E97K は WT と同等の活性を示した。S34I は WT よりもやや低いものの活性を認め、上記の実験結果と矛盾しない結果となった。R168T と K252N に関しては WT よりも活性が上昇していたが、Arg168 と Lys252 は DNA 結合に関与すると考えられる残基であり、ATPase 活性と DNA 結合能に関連がある可能性が示唆された。

DNA 結合能に関しては、S34I、R95W、E97K は WT と同等であったが、R168T と K252N は結合能の低下を示した。MutL の DNA への結合には、これらの残基の正電荷が関わると考えられた。

《結 論》

超好熱性バクテリア由来の安定な aqMutL NTD をモデル分子として使用することで、リンチ症候群関連の変異の影響を多様な観点から評価することができた。Arg168 と Lys252 は DNA 結合部位に存在するが、それらの残基で見られるリンチ症候群関連変異が DNA 結合能を低下させることを実験的に確かめ、これらの変異の病原性を説明することができた。S34I および R95W 変異は Bergerat の ATP 結合部位にあるため、その変異は

ATPase 活性を失わせると予想して実験を行ったが、実際には ATPase 活性に対する影響は弱く、代わりにタンパク質構造を局所のおよび全体的に不安定化するという結果が得られた。E97K 変異に関しては、今回の解析では MutL の機能と構造に明らかな影響は見られなかった。E97K については MutL の二量体化に影響を及ぼす可能性も考えられる。

Bergerat の ATP 結合部位の完全性が MutL の構造安定性に重要であるという知見は、今後の MutL 遺伝子診断において重要になると考えられる。

論文審査結果の要旨

DNA 複製の際に生じる誤りは遺伝情報を変化させ、細胞の老化やがん化の原因となる。DNA 修復機構の一つであるミスマッチ修復系 (mismatch repair: MMR) は DNA 複製の誤りを修復する一連の酵素反応系である。MMR において中心的な役割を果たす MutL は、エンドヌクレアーゼ活性を有しており、複製の誤りを含む DNA 鎖に切れ目を入れる。MutL による切断部位を足掛かりにして新たな DNA 鎖が合成されることで複製の誤りが修復される。バクテリア MutL はホモ二量体であるが、ヒト MutL ホモログは主に MLH1 と PMS2 の二種類のサブユニットから成るヘテロ二量体である。MLH1 および PMS2 遺伝子の変異は、遺伝性のがんであるリンチ症候群の原因となることが知られている。近年、リンチ症候群が疑われる症例において MutL 遺伝子上の変異が多数報告されるようになった。それらの変異の病原性を判断するためには MutL タンパク質の生化学的解析が必須である。MutL の N 末端ドメイン (NTD) には ATPase モチーフが存在しており、Bergerat の ATP 結合部位と呼ばれる。一方、C 末端ドメインにはエンドヌクレアーゼ活性部位が存在する。Bergerat ATP 結合部位における ATP の結合と加水分解は、MutL のエンドヌクレアーゼ活性を調節しており、MMR に必須である。本研究では、超好熱性細菌 *Aquifex aeolicus* 由来 MutL (aqMutL) とヒト PMS2 を用いて、リンチ症候群関連変異の生化学的な評価を行った。

ヒト PMS2 NTD は不安定であり生化学的な特徴を解析することは困難であるが、本研究では、安定な aqMutL NTD をモデル分子として使用することで MutL/MutL ホモログを評価することが可能となった。Arg168 と Lys252 は DNA 結合部位に存在し、それらの残基で見られるリンチ症候群関連変異が DNA 結合能を低下させることが実験的に確かめられ、それらの変異の病原性が説明できるようになった。S34I 変異は Bergerat の ATP 結合部位に存在するが、ATPase 活性に対する影響は弱く、代わりにタンパク質構造を局所的小および全体的に不安定化するという予想外の結果が得られた。Bergerat の ATP 結合部位の完全性が MutL の安定性に重要であるという発見は、ATPase 活性に直接関与しないアミノ酸残基の変異であってもリンチ症候群の原因となる可能性を示しており、今後の MutL 遺伝子診断において重要な知見となる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学

位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

The Journal of Biological Chemistry 295 (33): 11643-11655, 2020 Aug

doi: 10.1074/jbc.RA120.013576