

1F2b ヒト由来 DNA 修復酵素 NTH1 の結晶学的研究

広島大院理¹, 広島大 QuLiS²

萩原路^{1,2}, 毛敬潔¹, 紙谷康則^{1,2}, 寺東宏明^{1,2}, 井出博^{1,2}, 片柳克夫^{1,2}

細胞内では放射線や化学療法剤などの外的要因、または好気呼吸で生じる活性酸素などの内的要因により、DNA の損傷が頻繁に起こっている。この損傷は DNA 複製エラーとなり、癌や老化の主要因となる。そのため、DNA 修復機構は全ての生物にとって生命を維持・継承するために不可欠な働きである。Human Endonuclease III (ヒト由来 NTH1) は塩基除去修復機構においてピリミジン酸化損傷を特異的に認識し N-グリコシラーゼ/AP リアーゼ活性により損傷塩基を DNA 鎖から除去する役割を持つ。本研究では NTH1 の結晶化と X 線結晶構造解析を行い、立体構造を決定することで修復機構を解明することを目的とした。

NTH1 は pGEX-2T ベクターに遺伝子を組み込んだものを大腸菌 BL21 (DE3) にてグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質として大量発現した。精製はアフィニティーカラムにロードした後、トロンピンにより GST を切断分離し、陽イオン交換カラムで精製した。切断後のサンプルは非常に不安定であったが、精製過程において様々な工夫を試みた結果、安定な状態で切断できるようになった。また、精製後のサンプルに認識塩基のひとつであるヒドロキシウラシル (hoU) を溶解することで、時間経過によるサンプルの不安定性を軽減した。以上のようにして精製したサンプルを用いて結晶化条件の探索を行った結果、再現性は悪いもののマイクロバッチ法でバイピラミッド型の結晶を得ることができた。この結晶を用いて SPring-8 および高エネルギー加速器研究機構の各大型放射光ビームラインにおいて X 線回折実験を行ったが、結晶の大きさが 20 μm 四方と小さく、分解能も 4.2 Å で構造解析には至らなかった。そこで結晶化条件の探索と並行して、再現性の向上を目指し精製方法の改良を行った。その結果、陽イオン交換カラムに通さずに精製したサンプルで結晶化を行うと、再現性良く結晶ができることが分かった。このサンプルを用いてシッピングドロップ蒸気拡散法で結晶化を行い、最大 150 μm 四方の結晶を得た。そして再度 X 線回折実験を行い、分解能 3.2 Å の回折データを得た。空間群は立方晶の F23 で、格子定数は $a=50.19$ Å、非対称単位当たりの分子数は 1 個であった。

以上のように、凝集しやすい不安定な蛋白質の結晶化において、精製から結晶化までのプロセスについて様々な効率化を図ることで結晶化にこぎつけることができた。現在は、構造解析に必要な高分解能のデータを収集するため、さらに大きな結晶を得ることができる結晶化条件の精密化を行っている。

(参考文献)

- 1) F. Hagiwara, J. Mao, Y. Kamiya, T. Tanaka, H. Terato, H. Ide, and K. Katayanagi The 8th Conference on Biology and Synchrotron Radiation, Himeji, Japan (2004) p741
- 2) 紙谷康則, 萩原路, 毛敬潔, 田中多門, 寺東宏明, 井出博, 片柳克夫 第 18 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 佐賀 (2005) 9P154