

基質とFEN-1複合体形成メカニズムを解明

DNA複製・修復に重要な酵素 FEN-1の構造解析

Flap エンドヌクレアーゼ (FEN-1) は、DNA の複製・修復に関与する重要な酵素のひとつである¹⁾。この酵素は、DNA 配列ではなく、特定の DNA 高次構造 (Single flap 構造や Double flap 構造) (図1) を認識し、Flap 鎖を切断する機能を持つエンドヌクレアーゼである。

当研究センターでは、その分子構造解明に成功し、構造情報に基づく機能解析を進めている²⁾。

我々は、FEN-1 ファミリー酵素 (例えば、phFEN-1 や T5 ファージ由来のエクソヌクレアーゼ等) の活性中心近傍に位置し、高度に保存されている芳香族性アミノ酸 (図2) の部位特異的変異体を作製し、様々な基質を用いた反応速度論的解析を進めた。その結果を図3に示す。Y33、F79、F278F279 が活性中心付近で共同してヌクレオチド塩基とスタッキング相互作用を行い、鋳型ストランドと下

流ストランド間の水素結合を解き、不安定な一本鎖 DNA を固定化し、加水分解を起こさせるために必須な基質酵素複合体を形成するメカニズムが明らかになった³⁾。

FEN-1 の欠損が起こると、紫外線に対する感受性・遺伝子の不安定化による変異等が増加する。つまり、FEN-1 が存在しないことで、DNA 複製・修復が正常に機能しなくなってしまう。マウスでは、腫瘍の成長が促進したという報告もある。このことは、細胞内における FEN-1 機能の重要性を示している。さらに FEN-1 は、様々なヒト遺伝病 (ウエルナー症候群、ブルーム症候群等) の原因遺伝子と共同で DNA 複製や修復を行うため、その分子機能が世界的に注目されている。今後我々は、FEN-1 と複製因子との複合化とその機能構造を詳細に解析し、その実用化を図っていく予定である。

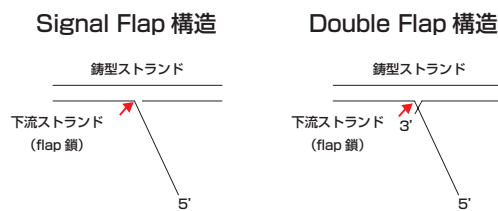


図1 この研究で用いられた Single flap 基質と Double flap 基質の構造
赤矢印は切断点を示す。

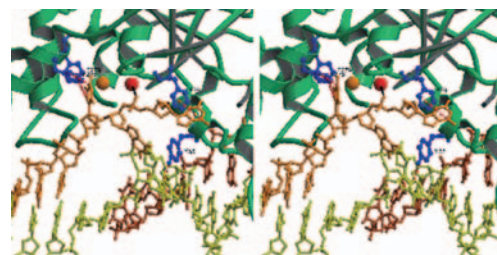


図3 phFEN-1 の活性中心におけるマルチスタッキング相互作用による基質酵素複合体形成メカニズムのステレオ図

酵素分子は薄緑色、注目する芳香族性アミノ酸残基は青色、赤球は活性中心 Mg^{2+} イオン、黄色鎖およびオレンジ鎖は変性・固定化される鋳型 DNA ストランドと下流 DNA ストランドを示す。赤破線はスタッキング相互作用を示す。

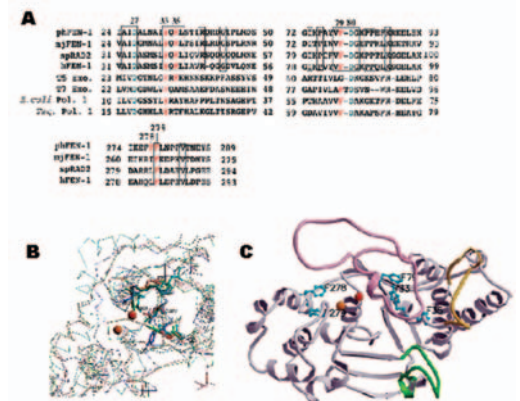
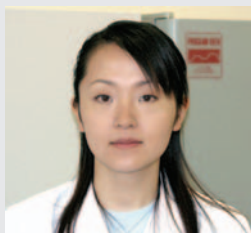


図2 超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 FEN-1 (phFEN-1) の一次配列アライメントと保存領域

- A: FEN-1 ファミリー間の一次配列アライメント
緑字の Asp²⁷Asp⁸⁰ は活性残基で、赤字は変異が導入された高保存性芳香族性アミノ酸残基である。高保存性芳香族性アミノ酸残基は太字で示した。
- B: FEN-1 ファミリーの分子構造を重ね合わせた図
phFEN-1: ピンク色、T5 ヌクレアーゼ (T5 Exo): 水色、*Thermus aquaticus* の DNA ポリメラーゼ 1 の 5' -ヌクレアーゼドメイン (Taq.Pol.1): 青色、*Methanococcus jannaschii* FEN-1 (mjFEN-1): 緑色、活性中心を構成する Mg^{2+} イオン 1 と 2 は赤とオレンジ色で示す。
- C: 注目する高保存性芳香族アミノ酸残基を phFEN-1 分子上に示した。



あべじゅんこ
阿部純子
junko.abe@aist.go.jp
生物情報解析研究センター

関連情報

- 1) E. Matsui, S. Kawasaki, H. Ishida, K. Ishikawa, Y. Kosugi, H. Kikuchi, Y. Kawarabayashi, I. Matsui : J. Biol. Chem., Vol. 274, 18297-18309 (1999).
- 2) E. Matsui, K. V. Musti, J. Abe, K. Yamasaki, I. Matsui, K. Harata : J. Biol. Chem., Vol. 277, 37840- 37847 (2002).
- 3) E. Matsui, J. Abe, H. Yokoyama, I. Matsui : J. Biol. Chem., Vol. 279, 16687- 16696 (2004).