

提出日：2019年4月19日

平成30年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

課題名	損傷塩基除去修復酵素の触媒反応機構解析		
研究代表者	氏名	田中 好幸	
	所属機関名・部局名	徳島文理大学・薬学部	
	職名	教授	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)	<input type="radio"/>	共同研究員	
	<input type="radio"/>	超高磁場NMR 共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	客員フェロー	
蛋白研受入担当教員名	藤原 敏道		
<p>DNA を構成する塩基の化学的な修飾は遺伝子変異をもたらし、がん化や遺伝子疾患の引き金となるため、損傷塩基の除去反応機構を理解することは重要である。本研究は、グアニン塩基 8 位の酸化修飾体 8-オキソグアニン (8oxoG) のヒトでの除去修復酵素 8-オキソグアニン DNA グリコシラーゼ 1 (hOGG1) の触媒作用解明を目的とする。hOGG1 は 8oxoG を脱塩基させるための N-グリコシド結合切断 (DNA グリコシラーゼ) 活性に加え、Lys249 と基質 DNA との共有結合中間体形成を介した脱塩基部位の 3'-リン酸エステル結合切断 (β リアーゼ) 活性を有する。このような二機能性 (bifunctional) DNA グリコシラーゼについて、DNA グリコシラーゼ反応における Lys249 の役割は申請者らを含め諸説が提唱されている。また、もう 1 つの触媒残基である Asp268 の役割はいまだ不明である。</p> <p>本研究課題では Lys249 および Asp268 の触媒作用に焦点をあて、その作用機構を NMR 解析などに基づき、明らかとする。申請者らは DNA グリコシラーゼ反応において Lys249 が基質 DNA との水素結合を介してプロトン供与体となること、および脱塩基した DNA が Asp268 との共有結合中間体形成によって安定化されることを、計算化学的見地から仮定した。</p> <p>この実験的検証のため、触媒残基 Lys249 の変異体を網羅的に作製し、基質 DNA との反応性を調べた。作製した 6 種の変異体のうち K249H 変異体は、pH 6 付近で中性 pH とくらべて高い活性を示した。ヒスチジンの pKa は一般に 6 付近であることから、DNA グリコシラーゼ反応におけるプロトン供与体としての触媒作用が重要であると示唆された。これは、申請者の共同研究者らとの共著論文で示された、プロトン化状態のリジン側鎖アミノ基 (-NH₃⁺) が活性種である、という計算化学的見地を支持する。</p> <p>さらに Lys249 のプロトン化状態を同定するため、野生型 hOGG1 リジン側鎖アミノ基の 2 次元 ¹H-¹⁵N 相関 NMR スペクトルを測定した。しかし Lys249 のピークは検出されず、速いプロトン交換によるものと考えられた。そこで今後は、基質 DNA との複合体にすることでプロトン交換を抑制し、Lys249 由来のピーク検出を試みる。</p>			

※本様式は、“拠点事業成果報告”として、拠点ホームページにて公開させていただく予定です。

※必ず A4 用紙 1 枚におさめて下さい。 ※提出期限：令和元年 5 月 17 日（金） ※提出の際は PDF 変換して下さい。

※提出先：大阪大学蛋白質研究所拠点プロジェクト班 E-mail: tanpakuken-kyoten@office.osaka-u.ac.jp