



## 私の研究

# 傷ついた DNA をなおす

## ～メチル基転移酵素のメカニズム

### その形と働き～

#### 角田 大 (つのだ まさる)

いわき明星大学薬学部 准教授  
いわき明星大学大学院理工学研究科



#### 1. はじめに

親から子へ、子から孫へ、その生物の設計図である遺伝情報は DNA（デオキシリボ核酸）によって伝達されています。その DNA は、紫外線や化学物質などによって実は簡単に傷ついてしまいます。しかし、傷ついたままにしておいては、私たちは生きていけないので、生物には DNA の傷を治したり、傷を避けて活動を続けたりして、壊れやすい DNA をいろいろな方法で守っています。筆者らのグループでは、傷ついた DNA を治すしくみについて研究しています。

#### 2. DNA の損傷と修復

およそ60年前にジェームズ・ワトソンとフランシス・クリックによって、DNA は二重らせん構造をしていることが発見されました（図1左）。DNA は、アデニン（A）、チミン（T）、グアニン（G）、シトシン（C）の4種類の塩基と呼ばれる部分と、デオシキリボース、リン酸という共

通部分からなるヌクレオチドが、数珠状に連なってできています。この4種類の塩基がAとT、GとCといった決まった組合せ（塩基対）を作ることによって二重らせん構造をとり、元からある2本の鎖それぞれに、1本ずつ新しい鎖を作る半保存的複製といった働きによって、同じものが作られ子孫に伝わります。

細胞の中の DNA は、1つの細胞あたり1日5万回以上の損傷を受けます。損傷には塩基を変化させるものや、鎖の切断、架橋といったものが見られます。損傷を受けた DNA の情報をもとに作られた RNA やたんぱく質は、細胞の老化や死、ガン細胞の発生などを引き起こす原因となります。そのため、生物には DNA の損傷を修復する仕組みがいくつか存在します。塩基が損傷した場合に修復する仕組みの一つに“直接修復”と呼ばれる仕組みがあります。この直接修復は、塩基除去修復やヌクレオチド除去修復とは異なり、塩基やヌクレオチドを除去せずに、損傷した部分を直接修

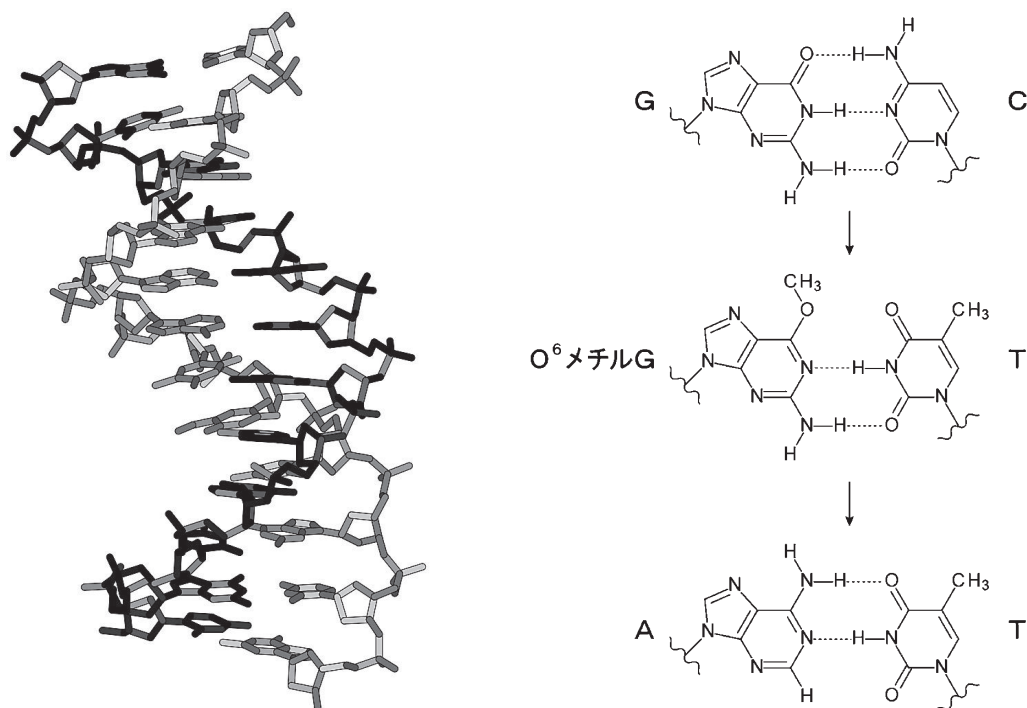


図1 DNAの二重らせん構造(左)とメチル化によるG≡CからA=Tへの塩基の突然変異(右)

復することで、損傷DNAを治します。

### 3. DNAのメチル化による突然変異

DNA損傷の中の一つにメチル化が挙げられます。生体内に入り込んだ化学物質により、DNA中の塩基のメチル化が引き起こされます。

グアニンにある酸素原子がメチル化されると、O<sup>6</sup>-メチルグアニンが形成され、このグアニンは本来シトシンと塩基対を形成するはずが、チミンと塩基対を形成するようになります。さらにこの間違っただ塩基対が複製によって、本来G≡Cであった塩基対がA=T塩基対に変わる突然変異を引き起こします(図1右)。

### 4. メチル基転移酵素による修復

O<sup>6</sup>-メチルグアニンは、O<sup>6</sup>-メチルグアニンDNA-メチル基転移酵素(MGMT)により、直接修復されます。この酵素(たんぱく質の一種)は酵素自身のシステイン(アミノ酸の一種)

の硫黄原子にO<sup>6</sup>-メチルグアニンのメチル基(CH<sub>3</sub>-)を転移させることで、グアニンのメチル基を除去します。通常、酵素は化学反応が終了すると元の状態に戻りますが、MGMTはメチル基を受け取ると、再度働くことができなくなる(失活する)ため、このメチル基転移反応は一方通行であることが知られています。

### 5. X線結晶構造解析

1個のたんぱく質の大きさは非常に小さく、大きいものでも0.1ミクロン(1万分の1ミリ)以下なので、通常の光学顕微鏡で観察しても、その構造は見えません。たんぱく質の構造を調べるためには、主に「X線結晶構造解析」という手法が用いられます。

X線結晶構造解析では、最初に純度の高いたんぱく質をある程度の量を集め(作り)ます。そのたんぱく質を特定の条件の下で結晶化させます。イメージとしては雪の結晶よりも塩の結晶に近い

感じます。従来は、この結晶化実験が比較的難しく時間がかかっていましたが、現在はロボットを開発したり、宇宙ステーションを利用したりするなど様々な工夫がなされています。この結晶にX線をあてると、回折というX線の向きが変わる現象が観測されます。この回折X線を測定し、たんぱく質内部の電子の分布を計算することで、原子の位置を決めることができます。結晶にあてるX線は、細く絞った強いX線が適しており、放射光を利用しています。放射光は、数十億電子ボルトに加速した電子を大きなリング状の電磁石の中で高速回転させると、発生する大きなエネルギーを持つ電磁波です。茨城県つくば市にある高エネルギー加速器研究機構のフォトンファクトリーが代表的な施設です。

## 6. MGMT のX線結晶構造解析

MGMT が  $O^6$ -メチルグアニンのメチル基をシステインに転移する様子をX線結晶構造解析によって調べました。

結晶化を行うためには、その条件検討も含め多量のたんぱく質が必要となるため、大腸菌による多量発現系を利用しました。これは、大腸菌にプラスミドと呼ばれる特定のたんぱく質（ここではMGMT）の遺伝子をもつDNAを取り込ませ、そのたんぱく質を多量に作る特徴を持たせたものです。この大腸菌を数リットルの液体培地中で増殖させることで、多量のMGMTを作らせました。

大腸菌からMGMTを取り出して、純度を高くする作業を精製といいます。今回用いたMGMTは、元々、好熱性古細菌という通常は温泉の中で生育している菌が生産しているたんぱく質のため、熱に強いという特徴があります。そのため、大腸菌を超音波によって破碎して、細胞の中身を取り出した後に、加熱することで大腸菌のたんぱく質の

多くは熱変成を起こし、取り除くことができます。さらに、液体カラムクロマトグラフィーという細かいビーズ状の樹脂にたんぱく質の性質ごとに吸着させる手法を用いて、純度を上げました。

精製したたんぱく質を用いて、400条件程度の結晶化を行ったところ、X線を照射し回折実験ができるような結晶ができました（図2）。この結晶を用いて、放射光で測定を行い、立体構造を求めました（図3）。

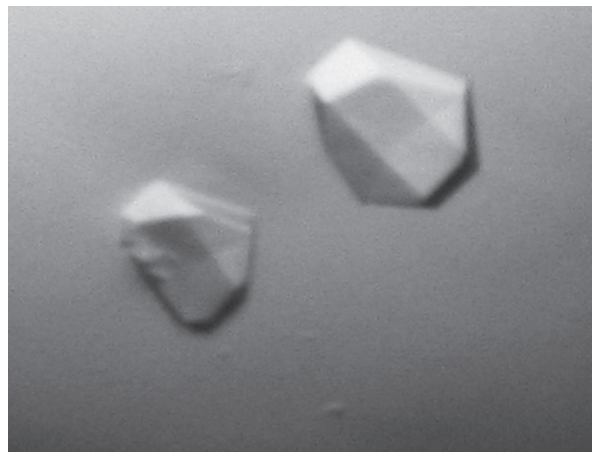


図2 MGMTの結晶写真



図3 MGMTの立体構造

## 7. MGMT の反応メカニズム

さらに  $O^6$ -メチルグアニンを取り込んだ MGMT の立体構造を解析することで、メチル基転移のメカニズムが明らかになりました (図4)。

活性部位 (化学反応が起こる酵素の部分) は、セリンプロテアーゼと呼ばれる別の酵素が持つアスパラギン酸-ヒスチジン-セリンの三つのアミノ酸からなるカタリティックトライアド (触媒三人組) に似た様式をしたグルタミン酸 (Glu)-ヒスチジン (His)-水 (W)-システイン (Cys) の4者ネットワークを形成していて、 $O^6$ -メチルグアニンのメチル基が Cys に転移すると4者ネットワークは崩壊し、この酵素は失活することがわかりました。

メチル基を受け取る Cys をセリン (S が O に置き換わっているアミノ酸) に置き換えた変異体の立体構造からは、メチル基の転移が起こらず、システインの硫黄 (S) 原子のアニオン化 ( $:S^-$ ) が必要であることがわかりました。

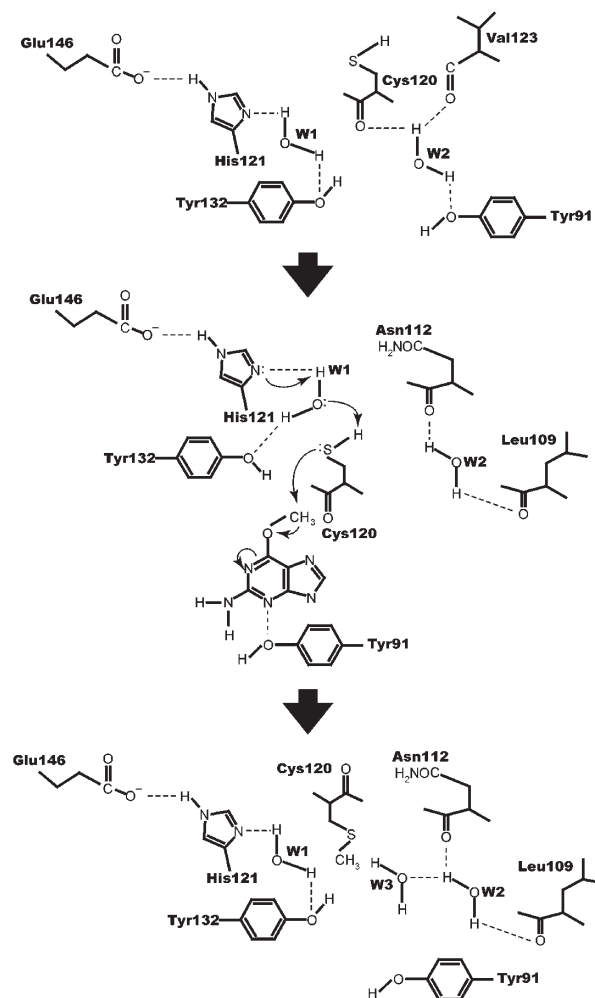


図4 MGMT のメチル基転移メカニズム

## 8. おわりに

私たちは日頃から、様々な化学物質や放射線にさらされており、それは DNA からなる遺伝子の損傷をもたらしています。しかし、生命はそれに打ち勝つ力を持ち合わせており、修復という作用により、損傷した部分をもとに戻します。方や一方では、損傷という表現を変化あるいは変異と言

い換えただけで、それは生命の進化の主要な要因であり、DNA 修復の頻度は進化の速度に影響を与えます。個々の生物 (個体) で見た場合には致命的な損傷であっても、種全体から見たら実はそれは大いなる飛躍への一歩かもしれません。

### <プロフィール>

1972年 神奈川県生まれ。1996年 東京工業大学生命理工学部卒業、2001年 東京工業大学大学院生命理工学研究科博士後期課程修了、博士 (理学)、同年 いわき明星大学理工学部ハイテクリサーチセンター博士研究員、2002年 昭和大学薬学部助手、2007年 いわき明星大学薬学部講師、2013年 同准教授、2015年 いわき明星大学大学院理工学研究科 兼任。