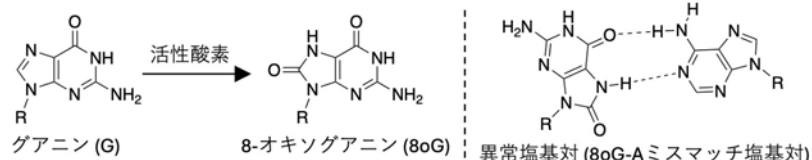


研究のポイント：

- 人の体には DNA 損傷を修復する酵素が備わっており、そのひとつが「hOGG1」。
- hOGG1 は、特に酸化によって傷ついた「8-オキシグアニン」を見つけて DNA から取り除く役割を担う。
- 今回の研究では、この 8-オキシグアニン除去修復反応の途中段階（反応中間体）を世界で初めて直接可視化することに成功。
- hOGG1 の酵素反応を行う「リシン（K）」というアミノ酸を「ヒスチジン（H）」というアミノ酸に置き換えた変異体（hOGG1(K249H)）を作製し、pH（酸性度）条件で反応を制御可能とした。
- hOGG1(K249H)と基質 DNA の複合体を結晶化し、Cold Trap 法により反応中間体の構造を X 線結晶構造解析で明らかにした。
- 捕捉された中間体は、糖部分の環が開いた「ヘミアミナール型構造」であり、修復反応の鍵となるステップを示している。
- 酵素内のアスパラギン酸残基（D268）がプロトン供与体として作用する「酸触媒」であることを、構造解析と理論計算により突き止めた。
- この成果は、hOGG1 の DNA 修復の仕組みを分子レベルで理解するうえで大きな前進であり、がんや老化、神経変性疾患の研究にも貢献が期待される。

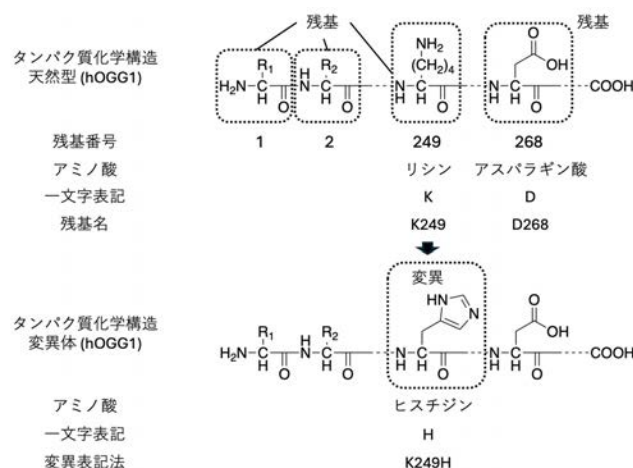
背景：

【研究】 私たちの細胞内では、ストレスや紫外線などのさまざまな要因によって DNA が損傷を受けています。特に「活性酸素」と呼ばれる物質は、遺伝子の材料である塩基のひとつ「グアニン」を酸化し、「8-オキシグアニン」という異常な物質（損傷塩基）に変えてしまいます。この 8-オキシグアニンは、異常な塩基対を組む性質があるため、放置すると突然変異の原因となり、がんや老化、神経変性疾患などを引き起こす恐れがあります。



この危険な塩基を修復するのが、hOGG1 という酵素です。hOGG1 は、8-オキシグアニンを見つけて DNA から切り離す役割を担っています。ただし、この酵素反応の中で一時的に形成される「反応中間体」は、極めて短命であり、直接観測するのは極めて難しい対象です。反応中間体は、酵素と基質 DNA がどのように結合し、反応がどのように進行するかを示す“途中の姿”であり、その構造情報の解明は、酵素がどのように働いているかを原子レベルで理解する手がかりになります。本研究は、hOGG1 が DNA 損傷を修復する際に形成される反応中間体の構造を世界で初めて可視化した、DNA 修復反応の本質的な理解に資する重要な成果です。

【酵素・タンパク質の概説】「酵素」とは、生体内で特定の化学反応を促進（触媒）するタンパク質の総称です。酵素の本体であるタンパク質は、20 種類のアミノ酸が化学的に連結された一本のポリペプチド鎖で構成されており、その配列や長さによって多様な機能を発揮します。hOGG1 もその一つであり、構成アミノ酸のうち 249 番目の残基はリシン（K）、268 番目はアスパラギン酸（D）です。それぞれを K249、D268 と表現します。K249 および D268 は、DNA 損傷修復に直接関与する「活性残基」として機能しています。本研究では、hOGG1 の K249 残基をヒスチジン（H）に置換した変異体（hOGG1(K249H)）



を作製し、酵素反応を人工的に制御可能なシステムを構築しました。

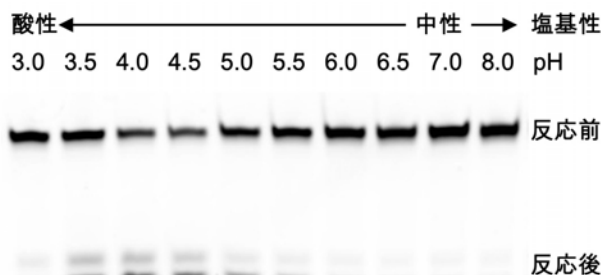
また、タンパク質は化学構造としてはヒモ状ですが、実際には折り畳まれて特定の三次元構造を形成し、機能を発揮します。本研究では、hOGG1(K249H)が基質 DNA と結合した状態、ならびに反応を進行させた状態における三次元構造を、X 線結晶構造解析により明らかにした。

研究手法：

本研究では、ヒトの DNA 修復酵素「hOGG1」がどのように働くのかを解明するために、以下の4つの高度な手法を組み合わせる解析を行いました。

● hOGG1 タンパク質変異体の作製（徳島文理大学：田中教授・森川助教）：

まず、酵素の働きを人工的に制御するために、「hOGG1(K249H)」という変異体を作製しました。これは、本来酵素に含まれるアミノ酸の一つ「リシン (K)」を、「ヒスチジン (H)」というアミノ酸に置き換えることで、酸性の環境でだけ働く酵素に設計したものです（右図で、酸性になるほど反応物のバンドが濃くなっている（＝生成物が増えている））。これにより、結晶中の hOGG1 の酵素反応を“好きなタイミング”で開始できるようになりました。



● X 線結晶構造解析による反応中間体の直接観測（構造決定）（茨城大学：海野教授）：

次に、酵素 hOGG1 が 8-オキソグアニンを切断・除去する反応の途中段階、すなわち「反応中間体」の構造を観察するため、X 線結晶構造解析を用いました。これは、酵素と基質 DNA が結合した複合体を結晶化させ、X 線を照射することで原子レベルの構造情報を得るものです。hOGG1(K249H)は塩基性条件下で酵素反応が進行しないため、まずその状態で結晶を作製しました。その後、結晶を酸性溶液に浸漬することで、酵素反応を結晶内で人為的に開始させ、反応中間体の構造を世界で初めて可視化することに成功しました。

● NMR 分光法による酸性度 (pK_a) 決定（徳島文理大学：田中教授・服部助教（現徳島大学））：

この変異酵素に含まれるヒスチジン (H249) が酵素反応のプロトン (H^+) 供与体として機能するかどうかを調べるため、NMR（核磁気共鳴）分光法を使って H249 残基の pK_a （酸性度の指標）を測定しました。これにより、H249 残基がどの程度の酸性度（pH）でプロトンを受けとるかが明らかとなり、下記の酵素学的実験と照らし合わせることで H249 残基がプロトン供与体として機能しているかどうかを評価する上で重要な情報となりました。

● 酵素学的実験による活性残基の酸性度 (pK_a) の決定（徳島文理大学：田中教授・森川助教）：

本研究では、酵素反応に関与するアミノ酸残基を特定するために、異なる pH 条件下で hOGG1 の反応速度（酵素活性）を測定しました。酵素活性と pH の関係を解析することで、反応において実際に機能しているアミノ酸残基の pK_a を推定することができます。他の実験から得られた pK_a と比較することで、活性残基を絞り込んだり、特定することができます。

● 量子化学計算による酵素反応経路の精密計算（チェコ科学アカデミー：Vladimír Sychrovský 博士）：

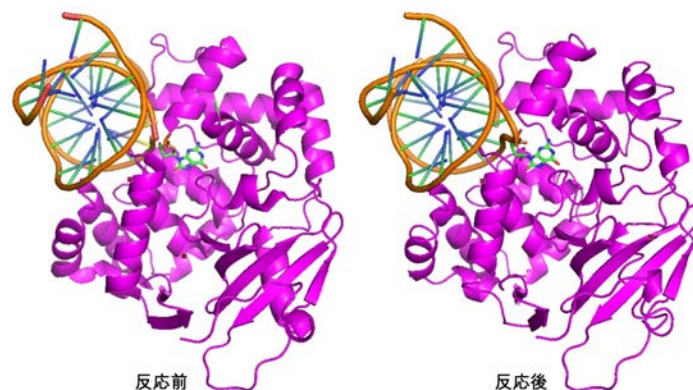
量子化学計算では、実験的な直接観測が難しい化学反応の経路を計算化学的に導き出すことができます。反応中間体の結晶構造と酵素学実験から推定された反応経路が、計算化学的にも裏付けられました。

研究成果：

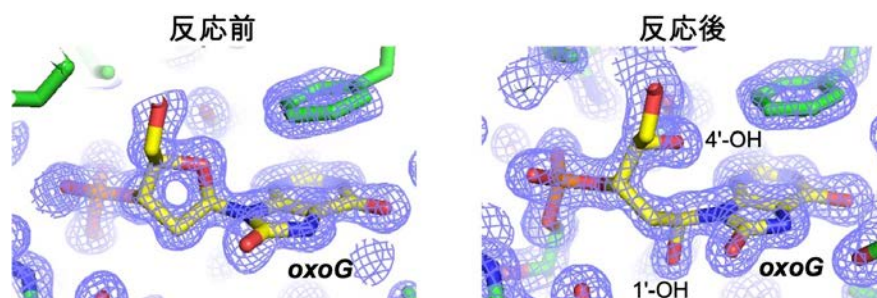
本研究では、DNA 修復酵素 hOGG1 の機能のうち、これまで誰も直接観察できていなかった「hOGG1 のグリコシラーゼ反応の途中段階（反応中間体）」の構造を初めて捉えることに成功しました。

まず、変異体 hOGG1(K249H)と基質 DNA からなる複合体を、酵素が不活性となる塩基性条件下で結晶化し、未反応状態の三次元構造を X 線結晶構造解析によって決定しました（次頁図左）。

その後、この結晶を酸性条件の溶液に浸すことで、結晶中で酵素反応を人為的に開始させ、反応中の構造を凍結状態で捕捉しました（下図右）。なお、この反応中間体の構造決定は、pH に応答して活性化可能な hOGG1(K249H)変異体の設計によって初めて実現可能となったものです。

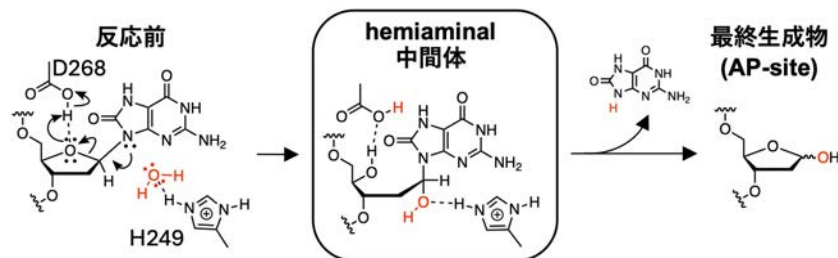


構造解析の結果、8-オキシグアニンの糖部分において環が開いた「ヘミアミナール型構造」をとる中間体が形成されていることが明らかになりました（下図右）。この構造は、hOGG1(K249H)が損傷塩基を除去する過程において必ず通過する重要な中間状態を直接示すものであり、DNA 修復機構の理解における画期的な成果です。



また、NMR 分光法によって変異部位ヒスチジンの pK_a （酸性度の指標）が 5.5 と正確に決定されました。さらに、酵素の反応速度を pH ごとに詳しく測定し、その変化から反応を進める鍵となるアミノ酸（活性残基）の pK_a を 4.5 と決定しました。この値は上記ヒスチジンの pK_a とは異なっており、ヒスチジンは反応に関わる残基ではないことがわかりました（プロトン供与体ではない）。一方、活性残基の pK_a はアスパラギン酸の性質と一致し、D268 残基が反応を進める酸触媒として働いていることを強く示しています。

これらの成果を統合すると、hOGG1(K249H)は酸性環境下において、D268 からのプロトン供与と水分子による求核攻撃によって、8-オキシグアニンの糖部がヘミアミナール化し、その後に損傷塩基が脱離して AP 部位が形成されるという、酵素反応の詳細な機構が明らかになりました（下図）。



今後の展望：

近年、DNA 修復機構ががんだけでなく、神経変性疾患や老化といったさまざまな疾患とも深く関わっていることが明らかになってきました。今回の研究成果は、hOGG1 による DNA 修復の分子メカニズムを原子レベルで明らかにするものであり、今後これらの疾患の理解や治療法の開発にも貢献することが期待されます。

また、本研究で作製した hOGG1(K249H)変異体は、天然型 hOGG1 が有する二つの酵素活性（グリコシラーゼ活性と AP リアーゼ活性）のうち、AP リアーゼ活性を欠失しています。この特徴を

活かすことで、hOGG1 の各酵素活性が疾患発症において果たす役割を個別に検証することが可能となり、酵素学的病理解析の新たな展開が期待されます。

論文タイトル : Capturing a glycosylase reaction intermediate in DNA repair by freeze-trapping of a pH-responsive hOGG1 mutant

掲載雑誌 : Nucleic Acids Research

DOI: 10.1093/nar/gkaf718

URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf718>

<問い合わせ先>

(発表者の問い合わせ先)

hOGG1 の変異体作製及び hOGG1 触媒機構解析プロジェクト全般について

徳島文理大学 薬学部

薬品分析学研究室

教授 田中 好幸

(機器分析センター長兼任)

TEL: 088-602-8462, FAX: 088-655-3051

E-mail: tanakay@ph.bunri-u.ac.jp

hOGG1 の結晶化及び X 線結晶構造解析について

茨城大学 学術研究院 応用理工学野

構造生物化学研究室

教授 海野 昌喜

TEL. 0294-38-5041, FAX. 0294-38-5041

E-mail: masaki.unno.19@vc.ibaraki.ac.jp

(報道担当者の問い合わせ先)

徳島文理大学

広報企画監 戸川 友美 (とがわ ゆみ)

TEL: 088-602- 8606, FAX: 088-626-6264

E-mail: togawa@tks.bunri-u.ac.jp

茨城大学 広報・アウトリーチ支援室

TEL : 029-228-8008

E-mail : koho-prg@ml.ibaraki.ac.jp