トピックス

TDGとMBD4グリコシラーゼの基質認識機構

橋本秀春 エモリー大学医学部生化学科

1. シトシン 5 位の修飾

高等動物のゲノム上のシトシン-グアニンと続く CG 配列のシトシン C5 位は可逆的にメチル化修飾を受ける。シトシン C5 位のメチル化は DNMT (DNA methyltransferase) により修飾される。脱メチル化経路は未だ不明であり、現在 2 つの塩基除去修復経路を介した脱メチル化経路が考えられている¹⁾。1 つめはメチル化シトシン (5mC) が脱アミノ化されチミン (T) に変換され、MBD4 (Methyl-CpG-binding domain protein 4) および TDG (Thymine DNA glycosylase) が G:T ミスマッチ塩基対を認識しチミン塩基を除去する経路。2 つめは TET (Ten-eleven translocation) たんぱく質がメチル化シトシン (5mC) をヒドロキシメチル化 (5hmC); ホルミル化 (5fC); カルボキシル化シトシン (5caC) へと次々に酸化し、TDG がホルミル化シトシン (5fC) とカルボキシル化シトシン (5caC) 塩基を除去する経路が考えられている。脱メチル化に関わると考えられているミスマッチ塩基対特異的 MBD4 グリコシラーゼとミスマッチ塩基対と 5fC, 5caC の両方に活性を持つ TDG グリコシラーゼの 2 つのグリコシラーゼの結晶構造から得られた基質認識機構を概説する。

2. MBD4 グリコシラーゼドメインによる基質認識機構

MBD4 グリコシラーゼドメインは、G:U, G:T, G:5hmU (5hmU: ヒドロキシメチル化ウラシル) ミスマッチ塩基対の U/T/5hmU に活性があり、シトシン誘導体 (C/5mC/5hmC/5fC/5caC) に対しては活性がない。この MBD4 の基質特異性はマウス MBD4 の不活性型酵素 (D534N) と G:T ミスマッチ DNA の基質複合体の構造解析から原子レベルでの明確な説明が可能になった^{2), 3)}。マウス MBD4 では Arg442 が副溝側からミスマッチ塩基対を認識し、基質であるチミンを完全にフリップアウトする (図 1a)。Arg442 はフリップアウトしたチミンの位置に挿入され、“みなしご” グアニンは Arg442 および Leu480 の主鎖との水素結合に

図 1

(a) Arg442 は副溝側からチミンをフリップアウトし、Leu480 と共に“みなしご”グアニンを安定化する。(b) MBD4 (D534N) によるフリップアウトしたチミンの認識機構; 矢印は水素結合のドナーとアクセプターを示す。(c) 酵素反応後のリボース。

よって安定化されている (図 1a)。MBD4 はフリップアウトしたチミンのワトソン・クリック極性エッジを Gln423 で正確に認識し、脱アミノ化された O4 酸素原子と Val422 の主鎖窒素原子との間で水素結合を形成する (図 1b)。シトシン誘導体ではワトソン・クリック極性エッジの極性が異なるため、メチル化シトシン (5mC) は MBD4 の基質にはなりえない。また、チミンの C5 位の修飾は認識されないため、U/T/5hmU に対してそれぞれ活性を持つ。

3. TDG による 5caC の基質認識機構

TDG は幅広い基質特異性を持つ。G:U, G:T, G:5hmU ミスマッチ塩基対の他に G:5fC, G:5caC, および G:eC (エテノシトシン) を基質とし、塩基をフリップアウトし塩基除去する⁴⁾⁻⁷⁾。TDG と大腸菌 Mug (mismatch uracil glycosylase) の 2 つがフリップアウトした 5caC を十分に取り込める大きさのケージを保持し、5caC に対する活性を持つ^{3), 4)}。興味深い点は、シトシン誘導体の中でも 5fC (-CHO), および 5caC (-COOH) には活性があるが、5mC (-CH₃), 5hmC (-CH₂OH) には活性がない点である。これらは主溝側の修飾の違いである。TDG が塩基フリップ時に 5fC/5caC を認識している可能性があった。しかし主たる基質認識は副溝側からの Arg275 であった^{4), 7)}。そして主溝側に接近する Pro-Gly-Ser ループのアミノ酸

Structural Insights into the Substrate Recognition by TDG Glycosylase Domain and MBD4 Glycosylase Domain

Hideharu HASHIMOTO

Department of Biochemistry, Emory University

※図 1, 図 2 は、電子ジャーナル (<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています。

図 2 (a) TDG による副溝側からの Arg275 による DNA 認識と主溝側の P-G-S ループ. (b) アミノ化, イミノ化による G:5fC および G:5caC の構造変換. (c) TDG の Ala145, Asn157 による 5caC 認識機構.

残基をすべて Ala に置換した変異体でも野生型と同様の酵素活性を保持していた. このことから主溝側からの PGS ループの側鎖で基質を認識している可能性は低い (図 2a). 一方, G:5fC/G:5caC 塩基対では互変異性により⁸⁾, アミノ化からイミノ化への構造変換で“ゆらぎ塩基対”が形成されると考えられる (図 2b). これにより TDG は G:5fC/G:5caC の“ゆらぎ塩基対”をミスマッチ塩基対と同様に副溝側から認識することが可能になり, Arg275 が 5fC/5caC をフリップアウトすると考えられる. 塩基フリップアウト後の 5caC の認識機構は 5caC と不活性型 TDG との結晶構造解析から Ala145, Asn157 が 5caC のカルボキシル基を認識しているが (図 2c)⁷⁾, Ala145S, N157A の変異体でも 5caC 活性が維持され, これらは基質認識 / 酵素活性には必須ではない^{4), 9)}. さらに変異体 N157D では 5caC 特異的な酵素となることから⁹⁾, 5caC のフリップアウト後の TDG の基質認識および酵素活性機構は不明のままである.

4. おわりに

ほ乳類では MBD4 と TDG の 2 つのグリコシラーゼが一塩基除去修復経路を介した脱メチル化に関わると考えられている. この 2 つのグリコシラーゼは植物の ROS1 (Repressor of Silencing) とは異なり, メチル化シトシン / ヒドロキシメチル化シトシンを直接除去できず, TET によるホルミル化, カルボキシル化に伴う“ゆらぎ塩基対”の形成, もしくはデアミナーゼによる脱アミノ化によるミスマッチ塩基対の形成によってはじめて塩基除去され, 一塩基修復機構により脱メチル化が完了すると考えられる. 一方, グリコシラーゼ

反応に関してはほとんど不明である. MBD4 では他のグリコシラーゼで見られるようなグリコシド結合切断後のリボース C1' 炭素原子の水酸化が観察されず, Asp534 により安定化されている (図 1c). これは他とはまったく異なる新たな反応機構であり酵素反応を理解する上でさらに高解像度の結晶解析が必要である. また TDG の 5caC の認識機構は, 構造解析の結果から 5caC のカルボキシル基を認識する N157A, N157D および Ala145S の変異体を作成したものの 5caC に対して依然活性が維持されている. よって Ala145/Asn157 による認識とは異なる 5caC の基質認識機構 / 酵素活性機構が存在すると考えられる. そして 5caC に対する活性は低 pH で上昇することから⁴⁾, 現在報告されている中性 pH 条件下の結晶構造とは異なる低 pH 条件下で酵素反応中を捉えた結晶の作製, および構造解析が必要である.

謝 辞

本研究はエモリー大学医学部生化学科, Xiaodong Cheng 研究室のもとで行われた成果であり, 米国 NIH のサポートを受け SER-CAT (22ID, 22BM) ビームライン (APS) を用いた成果である.

文 献

- 1) Branco, M. R. *et al.* (2012) *Nat. Rev. Genet.* **13**, 7-13.
- 2) Hashimoto, H. *et al.* (2012) *Nucleic Acids Res.* **40**, 8276-8284.
- 3) Morera, S. *et al.* (2012) *Nucleic Acids Res.* **40**, 9917-9926.
- 4) Hashimoto, H. *et al.* (2012) *Nucleic Acids Res.* **40**, 10203-10214.
- 5) Maiti, A., Drohat, A. C. (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 35334-35338.
- 6) He, Y. F. *et al.* (2011) *Science* **333**, 1303-1307.
- 7) Zhang, L. *et al.* (2012) *Nat. Chem. Biol.* **8**, 328-330.
- 8) Münzel, M. *et al.* (2011) *Chem. Eur. J.* **17**, 13782-13788.
- 9) Hashimoto, H. *et al.* (2013) *J. Mol. Biol.* **425**, 971-976.

橋本秀春

橋本秀春 (はしもと ひではる)

Dept. of Biochemistry, School of Medicine, Emory University; Research Associate

2000 年京都府立大学農学部卒業. 07 年京都大学大学院生命科学研究所単位取得退学. 07 年博士 (生命科学) (眞貝洋一教授). 同年 School of Medicine, Dept. of Biochemistry, Emory University, Postdoctoral Fellow (Professor Xiaodong Cheng), 12 年 10 月より現職.

研究内容: エピジェネティクス制御に関わる分子の生化学および X 線結晶構造解析

連絡先: Department of Biochemistry, Emory University 1510 Clifton Rd, Atlanta, GA 30322 USA

E-mail: hhashi3@emory.edu