

## 総 説

## DNAミスマッチ修復系の生化学

福 井 健 二

大阪医科薬科大学医学部生化学教室

**要旨:** DNA修復系のひとつDNAミスマッチ修復系は、主にDNA複製のエラーにより生じたミスマッチ塩基対を修復するしくみで、ゲノムの安定性に大きく寄与している。そのため、ヒトのDNAミスマッチ修復遺伝子の変異やエピジェネティックな不活性化は、遺伝性腫瘍であるリンチ症候群の原因となり得る。本稿では、生化学的研究によって解明されてきたDNAミスマッチ修復系の概要と、そこから得られた知見の臨床的な意義を概説し、最後に、我々が行った最新の研究成果を紹介する。

## DNAミスマッチ修復系とは

生体内のDNAには、多様な要因により様々な傷が生じている。DNAの傷はDNA複製や転写を阻害することで細胞死を引き起こし、また、複製を経て突然変異を生じ、癌化につながることもある。生物は多様なDNA修復系を備えており、生体内に生じるDNAの傷を修復している。その中のひとつDNAミスマッチ修復系(MMR)は、DNA複製のエラーや非相同なDNA鎖間の組換えなどによって生じるミスマッチ塩基を修復・処理する系で、その進化的な起源は極めて古く、地球上のほぼ全ての生物が有する。

ミスマッチ塩基には、間違った塩基どうしが対を形成したミスペア塩基と、対を持たずバルジループ状に突出したアンペア塩基が含まれる。“DNAミスマッチ修復系”と呼ばれる反応系には、いくつかの種類の系が存在するが、中でもロングパッチ型MMRは、多様なミスペア塩基に加え、1~6塩基ほどまで連続したミスペア塩基を修復することが出来る<sup>1)</sup>。ロングパッチ型MMRは、ミスマッチ塩基を含む比較的長い一本鎖DNA領域を除去し、再びDNA合成をやりなおすことで修復を行うためこの名がつけられている。ロングパッチ型MMRはヒトの疾病と深くかわることもあって最も盛んに研究されており、通常、単に“MMR”という場合にはロングパッチ型MMRを指すことが多い。本稿でも、ロングパッチ型MMRをMMRと呼ぶ。

## 最初に明らかとなった、大腸菌のDNAミスマッチ修復系

細胞内でDNA複製時に生じるミスマッチ塩基を修復する系の存在は、1960年代に、5-ブロモウラシルによって誘発される大腸菌株の変異を観察した研究結果に基づいて提唱された。その後、1970年代に*mutS*, *mutL*, *mutH*, *mutU* (*uvrD*)といった大腸菌のミューテーター遺伝子(この遺伝子の変異が大腸菌の変異率を大きく上昇させる)がDNAミスマッチ修復に関わることが発見された。*mut* (ミュートあるいはムットと読む)のあとのアルファベットは、それぞれのミューテーター遺伝子を同定した研究者の名前などに由来する。例えば、*mutS*はSiegel's mutator geneを意味する<sup>2)</sup>。これらのミューテーター遺伝子の有無によって大腸菌のDNA複製の忠実度は100~1000倍も変動することが確認された。続いて1980年代には、それらの遺伝子産物であるMutS, MutL, MutH, UvrDの生化学的機能解析から、大腸菌におけるMMRの概要が判明した。

まずMutSがミスマッチ塩基対に結合する。続いてMutLがミスマッチ-MutS複合体に結合する。その後、MutS-MutLはクランプ状に構造を変えてミスマッチから離れ、DNA上をスライドしながら移動し、GATCの塩基配列に結合しているMutHを活性化する。制限酵素であるMutHはGATC配列を切断するが、Damメチラーゼによってアデニンがメチル化されたGATC配列は切断できない。DNA複製の直後は、新しく合成された鎖はDamメチラーゼによるメチル化が起こっておらず、鋳型

鎖のみがメチル化された半メチル化状態となっているため、MutHはメチル化の起こっていない新生鎖側だけを切断することになる。MutHが作ったDNA鎖の切れ目(ニック)を足掛かりに、UvrDヘリカーゼが二本鎖DNAをほどこき、RecJやExoIなどのエキソヌクレアーゼが新生鎖を消化する。こうして作られたギャップをDNAポリメラーゼが埋め、DNAリガーゼが連結することで修復が完了する<sup>3)</sup>。

ミスマッチ塩基対は他のDNA傷害と異なり、ミスマッチを形成する塩基/ヌクレオチド自体には異常はなく、その組合せが正しくないだけである。他のDNA修復系では異常のある塩基またはヌクレオチドのある鎖を修復すれば良いが、MMRではどちらの鎖を修復すべきか、つまりどちらが新しい鎖か、新旧鎖を識別する必要がある。そうでなければ、生じたエラーを変異として固定するように機能してしまう。上述のように、大腸菌においてはMutH認識配列の半メチル化状態を利用して新旧鎖の識別を行い、エラー鎖の除去と修復合成を新生鎖側に誘導している。

#### 真核生物のDNAミスマッチ修復系

DNA修復系の異常はゲノムの不安定性を招くため、ヒトのDNA修復遺伝子の異常は多様な疾患に関係している。MMRについても、ヒトにおけるその遺伝子の変異やエピジェネティックな不活性化は、常染色体顕性遺伝性疾患であるリンチ症候群の原因となり、大腸がんをはじめ、子宮体癌、卵巣癌、胃癌、など多くの癌の若年発症および複数臓器での発症と関連している<sup>4)~6)</sup>。このことが判明すると、主に大腸菌を対象として行われていたMMR研究が、真核生物をも対象として行われるようになった。しかし、大腸菌で新旧鎖の識別を担い、エラー鎖の除去を指令する制限酵素MutHは、真核生物はおろか、ほとんどの真性細菌にも存在せず、MMRの概要は大腸菌以外の生物では長らく未解明のままであった(このため、多くの分子生物学・生化学の教科書にはいまだに大腸菌の反応機構のみが書かれている)。とはいえ、ほとんどすべての真核生物やバクテリアには大腸菌MutSおよびMutLのホモログが存在しており、これらがMMRを担うことが確認された。

2000年代に入ると、ポール・モドリッチ博士らが、真核生物細胞の核抽出液や精製タンパク質を用いて試験管の中でミスマッチ塩基対を修復させる再構成系を完成させた。この系を利用し、真核生物においてはミスマッチ塩基対を有する二本鎖DNAのうち、不連続性を持つ鎖に除去反応と修復合成が誘導されることが示された。不連続性は、岡崎フラグメントの末端のように、新生鎖側

に豊富に存在することから、生体内ではこれらの末端が新旧鎖の識別シグナルとして機能していると考えられるようになった。さらに意外なことに、大腸菌においてはMutSとMutHの仲介役としてのみ機能していたMutLが、真核生物においてはDNA切断活性を持ち、ミスマッチを形成する二本鎖DNAのうち不連続性を有する鎖を切断することが明らかとなった<sup>7)</sup>。真核生物MutLホモログによる切断には、ミスマッチに結合したMutSホモログ、ATP、DNA複製因子のひとつであるPCNAが必要であること、この際、PCNAが新旧鎖の識別情報をMutLホモログに伝達することも示された<sup>8) 9)</sup>。MutLが新生鎖を切断した後の除去反応にはヘリカーゼは必要無く、EXO1のエキソヌクレアーゼ活性が関わること、エラー鎖を除去した後の修復合成はDNAポリメラーゼ $\delta$ が担うことも明らかとなり、真核生物においてもMMRの概要が提示されるに至った(図1)<sup>10) 11)</sup>。モドリッチ博士は大腸菌とヒトにおけるMMRの概要の大部分を明らかにした功績により、他のDNA修復系の研究者らとともに2015年のノーベル化学賞を共同受賞した。

#### DNAミスマッチ修復活性の臨床的意義

ヒトのMMRの初期反応は、主にふたつのMutSホモログとひとつのMutLホモログが担っている。MutS $\alpha$ (MSH2とMSH6の複合体)、MutS $\beta$ (MSH2とMSH3の複合体)そしてMutL $\alpha$ (MLH1とPMS2の複合体)である<sup>10)</sup>。MSH(エムエスエイチあるいはムッシュと読む)、MLH(エムエルエイチ)、PMS(ピーエムエス)はそれぞれ、MutS Homolog, MutL Homolog, Post Meiotic Segregationの略である。同じ真核生物でも酵母ではヒトPMS2のカウンターパートは、同定された経緯からPms1と名付けられており、注意が必要である。これまでにリンチ症候群関連の症例において同定されたMMR関連遺伝子の変異のうち、90%以上がMSH2またはMLH1遺伝子に、5%程度がMSH6遺伝子に存在するとされている。しかし、遺伝子解析技術やMMRタンパク質に関する知見の蓄積に伴い、それ以外のPMS2などの遺伝子の変異も増加する傾向にある。

リンチ症候群の癌に関する診断は、以下の観点から重要視される。MMRは、メチル化剤により生じたO<sub>6</sub>-メチルグアニンとシトシンあるいはチミンの対をミスマッチ塩基として認識することができる。しかし、メチル化は新生鎖にあるとは限らないため、いつまでもMMRが完了せず、結果としてアポトーシスが誘導されるなどして細胞死につながる。一方、MMR活性を欠失した癌細胞ではこのようなことが起こらず、細胞死を逃れる。したがって、アルキル化剤の種類によっては、抗がん剤とし

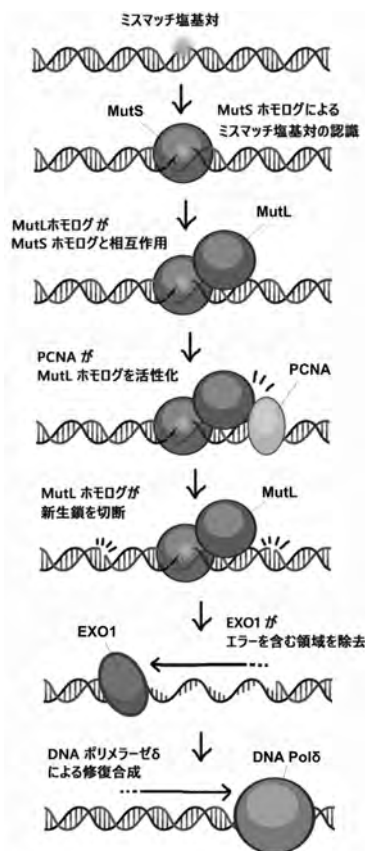


図1 真核生物MMRの概要

ミスマッチ塩基対をMutSホモログが認識する。MutS $\alpha$ はミスペアや小さいアンペア塩基を、MutS $\beta$ は大きいアンペア塩基を認識する。MutS $\alpha$ -ミスマッチ複合体にMutL $\alpha$ が相互作用する。PCNAは二本鎖DNA鎖の不連続な部分において、クランプローダーによってDNAに載せられる。クランプ状のPCNAは、DNAをクランプの穴に通してスライドしながら移動する。PCNAの構造には極性(裏と表)があるため、PCNAはDNA上を、極性を維持したまま移動し、MutL $\alpha$ に相互作用する。PCNAの極性の違いによって、新生鎖側のみを切断するようにMutL $\alpha$ が活性化され、ミスマッチの両側にニックが生じる。エキソヌクレアーゼEXO1がエラーを含む領域を除去し、生じたギャップ領域を複製ポリメラーゼであるDNAポリメラーゼ $\delta$ が埋める。大腸菌とその近縁種を除き、多くの真性細菌でもほぼ同じ機構で反応が進むと考えられている。ただ、新旧鎖の識別機構についてはバリエーションがあると予想される<sup>24)</sup>。古細菌では、真核生物型のMMRを持つものもある(おそらく真性細菌から水平伝搬したもの)<sup>40)</sup>、これは少数派で、多くはEndoMS系という全く別のメカニズムを有する<sup>41)</sup>。EndoMSは制限酵素と構造・機能上の類似性を示す酵素で、ミスマッチ塩基対の近傍で二本鎖DNAの両鎖を切断する。この二本鎖切断は相同組換え系によって修復されると予想されている。相同組換え系による修復反応は極めて正確性が高く、また、その修復合成は別のDNA分子(染色体)の相同領域を鋳型として行われるため新旧鎖の識別を行う必要もないため理にかなっている。

て用いた場合に正常細胞では細胞死が起こるがMMR活性欠失細胞は選択的に生き残ってしまうことになる<sup>12)</sup>。MMR活性を欠失した癌細胞は、他にも、シスプラチンや5-FUなどに対しても耐性を示す。さらに近年、MMR活性が欠失した癌には、免疫チェックポイント阻害薬が高い奏効率を示すことが分かってきた<sup>13)</sup>。これは、MMR活性の欠失によって変異率が高まり、ネオ抗原の産生が促進され、免疫系によって認識されやすくなるせいであると考えられている<sup>14) 15)</sup>。このように、MMR活性の欠失の判定/リンチ症候群の診断が、治療法の選択に重要である。

MMR活性の欠失の判定は、マイクロサテライト不安定性を指標に行われることが多い。ヒトゲノム中には、マイクロサテライトと呼ばれる比較的短い塩基配列の繰り返し領域が存在する。この領域が複製される際、鋳型または新生鎖がスリップを起こしバルジループ状の構造をとることがある。MMRが機能すると、このバルジループ状のミスペア塩基を認識し修復するが、そうでなければそのまま複製が進行し、マイクロサテライトの繰り返し数が変化する。これがマイクロサテライト不安定性と呼ばれる現象であり、PCRでマイクロサテライト領域を増幅することで確認できる。また、病理組織の免疫染色によりMMRタンパク質の有無を調べることも行われている。これらの結果に加え、生殖系列細胞のMMR遺伝子の検査もリンチ症候群の診断に貢献する。特に近年では、症状が現れる前に予防の目的でMMR遺伝子の検査を受けることも推奨されている。しかし、検出されたMMR遺伝子の変異がミスセンス変異であった場合、その変異が病的なものか良性のものであるか、判定することが困難な場合が多く、臨床的意義不明変異(VUS)として問題になっている。

#### DNAミスマッチ修復遺伝子に関する 臨床的意義不明変異(VUS)の評価方法

VUSの意義を明らかにする目的で、the cell-free *in vitro* DNA mismatch repair activity assay (CIMRA assay)と呼ばれる手法が開発されている(図2)。この手法は、評価対象となるMMR遺伝子を欠失したヒト細胞の核抽出液に、VUSを持ったMMRタンパク質を加え、その修復活性を試験管内で調べるものである<sup>16)</sup>。基質であるプラスミドDNAの制限酵素サイトにミスマッチを持たせておくことで、制限酵素への感受性の回復の程度によって修復活性を評価することが多い。この手法はUVSを信頼性高く評価することができるため広く用いられている。しかし、なぜその変異が病原性なのか、ある



いは良性なのか、という点については未解明のままとなる。また、新たなVUSが見つかるたびに、この実験を繰り返す必要が出てくる。

VUSの意義を、ドライな手法によって判定する試みも行われている。特に、近年発展が目覚ましい、タンパク質の立体構造予測に基づいた手法に期待が寄せられている。DeepMind社が発表したAlphaFold2は、画期的なディープラーニングの手法を取り入れ、それまでのタンパク質立体構造予測とは一線を画す驚くべき精度を達成したプログラムであり、一般的なタンパク質の主鎖の構造についてはほぼ間違いなく予測できるとされている<sup>17)</sup>。AlphaFold2を活用し、ミスセンス変異がタンパク質の主鎖構造に与える影響を評価するように開発されたプログラムが、同じくDeepMind社から発表されたAlphaMissenseである<sup>18)</sup>。ミスセンス変異が存在するアミノ酸残基をマスクしてAlphaFold2で立体構造予測を行った際に、マスクせずに行った場合と比べてどの程度の影響が表れたかを指標にして変異の病原性を評価する。このプログラムを用いて、ヒトタンパク質のうち、現段階で2万弱のものについて、すべてのアミノ酸残基の置換の病原性を、良性、病原性、不確定、のいずれかに分類したデータベースが公開されている。この手法は極めて迅速なVUSの分類が可能で、今後大いに活用されるべきである。しかし、万能な手法ではないことにも注意が必要である。この手法はタンパク質の主鎖の立体構造に基づく予測であるため、例えば酵素活性に必須な解離基を持ったアミノ酸残基の置換といった、主鎖の立体構造に影響を与えずに活性を消失させるような変異については評価を誤る可能性が高い。

以上の理由から、上述のようなVUSの意義を網羅的に明らかにする努力に加え、MMRタンパク質の生化学的機能解析を行い、どのアミノ酸残基がどのように活性に

関わるか、作用機序を理解することも必要である。

#### DNAミスマッチ修復タンパク質の生化学的機能解析

我々はこれまでに、ヒト由来タンパク質に加えて、*Thermus thermophilus*や*Aquifex aeolicus*といった真性細菌を対象として、そのMutSやMutLタンパク質の構造機能解析を行ってきた。まず、これらのタンパク質をコードする遺伝子の欠失は自然突然変異率を大きく上昇させることを確認し、続いて、精製したMutLがDNA切断活性を有すること<sup>19)</sup>、その切断活性はMutSとミスマッチ塩基対、ATPに依存することを明らかにした<sup>20)</sup>。これにより、大腸菌とその近縁種を除いたほとんどの真性細菌でも、ヒトと同様のメカニズムによるMMRが機能していることが分かった(古細菌のMMRについては図1のレジェンドを参照)。

*A. aeolicus*は95℃の熱水で生育する超好熱性真正細菌であり、そのタンパク質も95℃以上まで安定なため生化学的解析に適している。特に、結晶構造解析においては真核生物由来ホモログに比べて格段に高い分解能での解析が可能であること、また、触媒基を同定するための温度やpHの摂動実験においても十分な耐性を示すことなどから、モデル分子として*A. aeolicus*由来MutLを用いることに利点がある。

ヒトMutLホモログの立体構造は、大腸菌MutLのそれと異なりATP結合に伴う構造変化がほとんどないことが分かっていたが、*A. aeolicus* MutLの立体構造も、ヒトMutLホモログと同様にATP結合の有無で構造に違いが無く、両者が非常に近い機能上の特性を示すことが、構造解析からも裏付けられた<sup>21)</sup>。そこで、MutLのATPase活性に影響を及ぼす可能性のある様々なVUSを、*A. aeolicus* MutLに導入し、その影響を構造・機能の両面から評価した。また、大きな影響が表れたVUSについては、ヒトMutLホモログに導入し、同様の評価を行った。これらの結果については、中心となって研究が行われた、大阪医科薬科大学三島南病院 一般・消化器外科 出原啓介先生の稿に詳しく記載されているため参照されたい<sup>22)</sup>。本稿においては、以下に、MutLのDNA切断活性に関する解析結果について詳細を述べる。

#### DNA切断を担うMutLの触媒機構

MutLホモログのDNA切断活性が発見された後も、長らくその触媒機構は不明のままであった。MutLホモログが既知のDNA切断活性モチーフを持たず触媒部位の位置が分からないということも理由のひとつだが、触媒に必要な金属種がはっきりしない、ということが最大の理由であった。リン酸基の加水分解を触媒する酵素の多

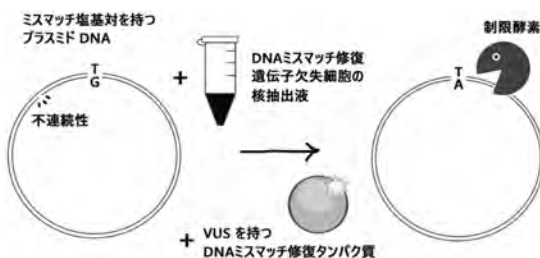


図2 CIMRA assayの概要

制限酵素の認識サイトにミスマッチ塩基対を持たせたプラスミドDNAを基質として用いる。評価対象であるMMR遺伝子を欠損した細胞の核抽出液に、VUSを有するタンパク質を加え、その修復活性を制限酵素感受性の回復により評価する。

くは二価の金属イオンを利用する。この場合、複数の極性アミノ酸残基の側鎖に固定された二価の金属イオンが水を活性化し、リン酸基への求核攻撃を促すことが多い。DNA切断活性を有することが判明する以前から、MutLホモログは亜鉛タンパク質であることが知られていた。実際、我々が決定した*A. aeolicus* MutLの立体構造においても、亜鉛イオンが、複数のシステインとヒスチジンから成る結合部位に固定されていた<sup>23)</sup>。しかし、MutLホモログのDNA切断活性はマンガンイオンによって強く促進されることから、亜鉛イオンはDNA切断活性には関わらずに立体構造を維持する役割を担っており、亜鉛イオンとは別の部位にマンガンイオンなどの触媒金属イオンが結合する、と考えられてきた。

我々は偶然、*A. aeolicus* MutLの立体構造解析から、カドミウムイオンが亜鉛イオンと置き換わり、同じ部位に結合することを見つけた(図3)<sup>24)</sup>。その後、他の研究グループが、ヒトMutLホモログは、マンガンイオン不在のもと、亜鉛イオンのみに依存して弱いながらもDNA切断活性を示すこと、また、その活性がカドミウムイオンで阻害されることを発見した<sup>25)</sup>。さらに我々がマンガンイオン結合型の*A. aeolicus* MutLの立体構造を明らかにしたところ、マンガンイオンもカドミウムイオンと同じように、亜鉛イオンと置き換わって同じ部位に結合することが分かった(図3)<sup>26)</sup>。ここに至り、これまでに様々なグループから報告されてきた結果を、「亜鉛が触媒金属イオンである」という解釈で統一して説明できるようになった。

DNA切断酵素を含め、リン酸基を切断する酵素は生物界に多々存在するが、その中にはtwo-metal-ion mechanismと呼ばれる、複数の二価金属イオンを協調的に働かせる機構によって切断する酵素が存在する<sup>27) 28)</sup>。MutLの亜鉛イオンの結合様式を見ると、two-metal-ion mechanismを利用する酵素の結合様式との類似性が確認された。亜鉛イオンを配位するアミノ酸残基への変異

導入は、*A. aeolicus* MutLのDNA切断活性や細胞内MMR活性を消失させた。さらに、*A. aeolicus* MutLによるDNA切断産物を質量分析計で解析したところ、MutLは、切断産物の5'末端にリン酸基を、3'末端に水酸基を残すように切断反応を触媒することが分かった<sup>26)</sup>。これはtwo-metal-ion mechanismに特徴的な性質である。以上の結果から、MutLは亜鉛イオンを利用したtwo-metal-ion mechanismによってDNAを切断すると結論した。

two-metal-ion mechanismでは、金属イオンを配位するアミノ酸残基以外にも、求核水がリン酸基を攻撃することによって生じる負電荷に富んだ中間体(遷移状態)を安定化する塩基性アミノ酸残基が触媒に関わることがある。そこで、不活性型であるカドミウムイオン結合型と、活性型である亜鉛イオン結合型の立体構造を比較し、両者の違いを詳細に評価した。*A. aeolicus* MutLの立体構造解析では1.2~1.4Åの高分解能での解析が可能であるため、アミノ酸残基の側鎖を含めた比較が可能であった。その結果、亜鉛イオン結合部位近くに位置するアルギニン残基の側鎖が、亜鉛イオン結合型(活性型)では不明瞭である(自由度が高い)のに対して、カドミウムイオン結合型(不活性型)では明確に見える(自由度が低い)ことが分かった<sup>26)</sup>。これは両金属イオンのイオン半径の違いにより、カドミウムイオンの場合にはアルギニン残基の側鎖に相互作用が及ぶためであった(図4)。

このアルギニン残基はあらゆる生物のMutL(ただし、大腸菌とその近縁種のMutLを除く)において保存されており、さらに、この残基への変異の導入は、MutLのDNA切断活性と細胞内の修復活性を消失させることを確認した。アルギニン残基から、アルギニンと同じ塩基性アミノ酸であるリジン残基への置換は、MutLのDNA切断活性を完全には消失させなかったことから、正電荷が触媒に必要であると考えられた。以上から、このアルギニン残基が触媒基のひとつであり、two-metal-ion mechanismによって中間体(遷移状態)として生じる負

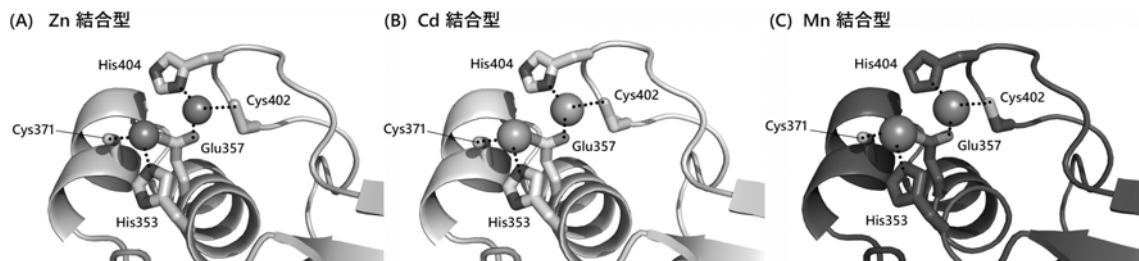


図3 *A. aeolicus* MutLの二価金属イオン結合部位

A: 亜鉛イオン(Zn)結合型結晶。B: カドミウムイオン(Cd)結合型結晶。C: マンガンイオン(Mn)結合型結晶。金属イオンを球体モデルで、金属イオンを配位するアミノ酸残基の側鎖を棒状モデルで示した。

電荷に富んだ中間体をその正電荷によって安定化する役割を担っていると結論した。

このように、これまでに長く未解明であったMutLのDNA切断活性の触媒メカニズムを解明した。これにより、リンチ症候群関連のVUSを評価するための基盤となる新たな知見が蓄積された。例えば、今回新しく同定された触媒基であるアルギニン残基に関しては、ヒトMutLホモログPMS2のR847TがVUSとして登録されているが、CIMRA assayではこの変異によって修復活性が欠失することが報告されている<sup>29)</sup>。今回の結果と合わせて考えると、この変異が病原性を示す可能性は高いと言える。

#### カドミウムの変異原性をMutLのDNA切断活性阻害から説明できる

今回の結果は、MutLの触媒メカニズムを明らかにしただけでなく、カドミウムイオンが生体に及ぼす作用の一端についても明らかにすることとなった。カドミウムイオンが変異原性を示すこと<sup>30) 31)</sup>、また、その原因のひとつがMMRの阻害にもあること<sup>32)</sup>は古くから知られていた。過去には、カドミウムイオンがMutSホモログのATPase活性を特異的に阻害すると考えられたこともあった。しかしその後、カドミウムイオンによるMutSホモログの阻害には、一分子のMutSホモログにつき数百個のカドミウムイオンが結合する必要があることが分かり、生体内では起こりえない非特異的な阻害であると結論された。そのため、カドミウムイオンによるMMRの阻害の原理は不明であった。我々と他のグループによって行われたMutL DNA切断活性の阻害に関する一連の研究によって、カドミウムイオンは、MutLの亜鉛結合部位に特異的に結合し、触媒基の自由度を制限することで反応の進行を阻害することが分かった。このように、カドミウムイオンの変異原性のメカニズムのひとつ

を、原子レベルで理解できるようになった。

#### 今後の展開

##### ～トリプレットリピートの拡張とDNAミスマッチ修復～

複製エラーの修復におけるMMRの作用機序の解明が進んだことで、リンチ症候群関連癌の予防や治療のための基盤を構築するための世界的な流れができた。今後、タンパク質立体構造予測をはじめとしたバイオインフォマティクス分野の発展によりこの流れはますます加速されると考えられる。

一方、複製エラーの修復以外の細胞機能とMMRの関わりについては理解が遅れており、特に、トリプレットリピートの拡張におけるMMRの関与が注目を集めている<sup>33)</sup>。トリプレットリピートとは、ゲノム中に存在する三塩基の繰り返し配列のこと((CAG)*n*など。マイクロサテライトの一種といえる)で、このリピート数の拡大が、ハンチントン病や筋緊張性ジストロフィーなどの神経病の原因となる。これらの神経病とMMR遺伝子の関係は、多くのゲノムワイド関連解析(GWAS)によって指摘されてきた<sup>34)</sup>。さらに、トリプレットのリピート数の変化は、MutSホモログのミスマッチ認識能やMutLホモログのDNA切断活性に依存し<sup>35) 36)</sup>、両タンパク質を不活性化するとトリプレットリピートが安定することも分かっていた<sup>37)</sup>。これは一見するとDNA複製エラーを修復するという両タンパク質の機能と矛盾する印象を受けるが、複製に依存せずに起こるトリプレットリピートの拡張(有糸分裂後のニューロンではこれが主たる要因となる)において、両タンパク質が関わりと解釈されている。いずれにしても、MMRタンパク質の活性がどのようにリピート数の変化をもたらすのかは分かっていない。上記疾病の治療薬の開発につながる可能性もあることから、作用機序の早期解明が求められている。

MMRで中心的な役割を果たすMutLは、GHKL ATPase

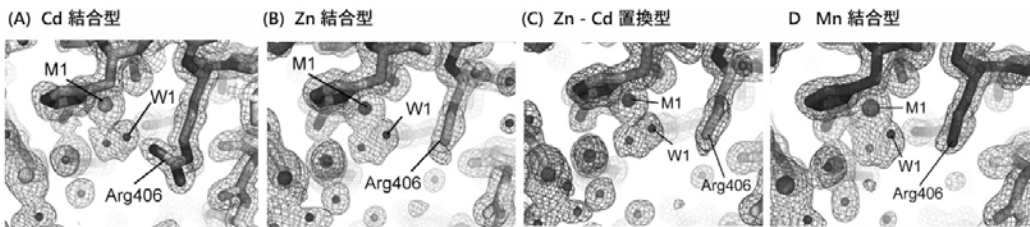


図4 *A. aeolicus* MutL結晶構造における金属部位近傍の電子密度(2Fo-Fcマップを3σのレベルで表示した)

A: カドミウムイオン(Cd)結合型結晶。B: 亜鉛イオン(Zn)結合型結晶。C: カドミウムイオン結合型結晶を亜鉛イオンを含む溶液に浸すことで、カドミウムを亜鉛イオンに置換したもの。D: マンガンイオン結合型結晶。カドミウム結合型結晶でのみ、Arg406側鎖のグアニジン基の電子密度が明瞭に確認された。M1金属イオンを、W1は、金属イオンとArg406の相互作用を仲介する水分子を示す。Fukui et al. (2023) Life Science Alliance 6, e202302001よりCC BY 4.0ライセンスのもとに改変。



スーパーファミリーと呼ばれる生物界に広く分布する ATPaseのひとつである。GHKLはDNA Gyrase B, Hsp 90, mitochondrial Kinase, MutLの頭字語であるが、これらのタンパク質間の類似性が提唱されて以降も、新たなGHKL ATPaseの発見が続いており、例えば近年では、クロマチンリモデリング因子であるMORC ATPase群もGHKL ATPaseであることが報告された<sup>38) 39)</sup>。GHKL ATPaseは共通の立体構造、ATP結合モチーフ、ATP加水分解メカニズム、その他の分子機能を有すると考えられている。実際に、我々はDNA Gyrase BやMORC3がMutLと同様の反応機構でATPを加水分解することを確認している。MutLの研究により得られた知見を活用して他のGHKL ATPaseの機能解明を進めることで、多様な生命現象を生化学的に理解できると期待している。

### 謝 辞

本研究は医学部生化学教室において、矢野貴人教授のご指導のもとに行いました。A. *aeolicus*およびヒト由来MutLホモログのATPase活性測定やその他の生化学的解析では、一般消化器外科教室(当時。現 大阪医科薬科大学 三島南病院)出原啓介 先生の多大なご貢献がありました。A. *aeolicus* MutLのX線結晶構造解析では、本学医学部 生化学教室 村川武志 先生、高輝度光科学研究センター 馬場清喜 先生、熊坂崇 先生に、MutL切断産物の質量分析では、サントリー生命科学研究所の山本竜也 先生にご協力いただきました。また、研究の遂行にあたり、大阪大学理学研究科 倉光成紀 先生、大阪医科薬科大学 一般消化器外科教室・研究支援センタートランスレーショナル部門 谷口高平 先生、Southern Illinois大学 Farid Kadyrov 先生に貴重なアドバイスをいただきました。この場をお借りして先生方に厚く御礼を申し上げます。

### 文 献

- 1) Fukui K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *J. Nucleic Acids* 2010;2010.
- 2) Siegel EC, Bryson V. Mutator gene of *Escherichia coli* B. *J. Bacteriol* 1967;94(1):38-47.
- 3) Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem. Rev* 2006;106(2):302-323.
- 4) Fishel R, Kolodner RD. Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev* 1995;5(3):382-395.
- 5) Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75(5):1027-1038.
- 6) Lynch HT, Kimberling W, Albano WA, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). I. Clinical description of resource. *Cancer* 1985;56(4):934-938.
- 7) Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P. Endonucleolytic function of MutLa in human mismatch repair. *Cell* 2006;126(2):297-308.
- 8) Genschel J, Kadyrova LY, Iyer RR, Dahal BK, Kadyrov FA, Modrich P. Interaction of proliferating cell nuclear antigen with PMS2 is required for MutLa activation and function in mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2017;114(19):4930-4935.
- 9) Pluciennik A, Dzantiev L, Iyer RR, Constantin N, Kadyrov FA, Modrich P. PCNA function in the activation and strand direction of MutLa endonuclease in mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107(37):16066-16071.
- 10) Modrich P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J. Biol. Chem* 2006;281(41):30305-30309.
- 11) Fishel R. Mismatch Repair. *J. Biol. Chem* 2015; 290(44):26395-26403.
- 12) Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin. Cancer Res* 1998;4(1):1-6.
- 13) Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med* 2015;372(26):2509-2520.
- 14) Le DT, Durham JN, Smith KN, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 2017;357(6349):409-413.
- 15) Mandal R, Samstein RM, Lee KW, et al. Genetic diversity of tumors with mismatch repair deficiency influences anti-PD-1 immunotherapy response. *Science* 2019;364(6439):485-491.
- 16) Drost M, Zonneveld J, van Dijk L, et al. A cell-free assay for the functional analysis of variants of the mismatch repair protein MLH1. *Hum. Mutat* 2010;31(3):247-253.
- 17) Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 2021;596(7873):583-589.
- 18) Cheng J, Novati G, Pan J, et al. Accurate

- proteome-wide missense variant effect prediction with AlphaMissense. *Science* 2023;381(6664): eadg7492.
- 19) Fukui K, Nishida M, Nakagawa N, Masui R, Kuramitsu S. Bound nucleotide controls the endonuclease activity of mismatch repair enzyme MutL. *J. Biol. Chem* 2008;283(18):12136-12145.
- 20) Shimada A, Kawasoe Y, Hata Y, et al. MutS stimulates the endonuclease activity of MutL in an ATP-hydrolysis-dependent manner. *FEBS J* 2013;280(14):3467-3479.
- 21) Izuhara K, Fukui K, Murakawa T, et al. A Lynch syndrome-associated mutation at a Bergerat ATP-binding fold destabilizes the structure of the DNA mismatch repair endonuclease MutL. *J. Biol. Chem* 2020;295(33):11643-11655.
- 22) 出原啓介, 福井健二, 村川武志, 馬場清喜, 熊坂崇, 内山和久, 矢野貴人. DNAミスマッチ修復系エンドヌクレアーゼであるMutLのATP結合部位におけるリンチ症候群関連の変異はMutLの構造を不安定化させる. *大阪医科薬科大学医学会雑誌* 2021; 80(1-2):85-91.
- 23) Fukui K, Baba S, Kumasaka T, Yano T. Multiple zinc ions maintain the open conformation of the catalytic site in the DNA mismatch repair endonuclease MutL from *Aquifex aeolicus*. *FEBS Lett* 2018;592(9):1611-1619.
- 24) Fukui K, Baba S, Kumasaka T, Yano T. Structural Features and Functional Dependency on b-Clamp Define Distinct Subfamilies of Bacterial Mismatch Repair Endonuclease MutL. *J. Biol. Chem* 2016;291(33):16990-17000.
- 25) Sherrer SM, Penland E, Modrich P. The mutagen and carcinogen cadmium is a high-affinity inhibitor of the zinc-dependent MutLa endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2018; 115(28):7314-7319.
- 26) Fukui K, Yamamoto T, Murakawa T, Baba S, Kumasaka T, Yano T. Catalytic mechanism of the zinc-dependent MutL endonuclease reaction. *Life Sci. Alliance* 2023;6(10).
- 27) Yang W. An equivalent metal ion in one- and two-metal-ion catalysis. *Nat. Struct. Mol. Biol* 2008;15(11):1228-1231.
- 28) Steitz TA, Steitz JA. A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993;90(14):6498-6502.
- 29) Kosinski J, Hinrichsen I, Bujnicki JM, Friedhoff P, Plotz G. Identification of Lynch syndrome mutations in the MLH1-PMS2 interface that disturb dimerization and mismatch repair. *Hum. Mutat* 2010;31(8):975-982.
- 30) Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis. *Mutat. Res* 2003;533(1-2):107-120.
- 31) Ochi T, Ohsawa M. Induction of 6-thioguanine-resistant mutants and single-strand scission of DNA by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells. *Mutat. Res* 1983;111(1):69-78.
- 32) Jin YH, Clark AB, Slebos RJ, et al. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat. Genet* 2003;34(3):326-329.
- 33) Williams GM, Paschalis V, Ortega J, et al. HDAC3 deacetylates the DNA mismatch repair factor MutSb to stimulate triplet repeat expansions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020;117(38):23597-23605.
- 34) Genetic Modifiers of Huntington's Disease Consortium. CAG Repeat Not Polyglutamine Length Determines Timing of Huntington's Disease Onset. *Cell* 2019;178(4):887-900 e14.
- 35) Kadyrova LY, Gujar V, Burdett V, Modrich PL, Kadyrov FA. Human MutLgamma, the MLH1-MLH3 heterodimer, is an endonuclease that promotes DNA expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020;117(7):3535-3542.
- 36) Pluciennik A, Burdett V, Baitinger C, Iyer RR, Shi K, Modrich P. Extrahelical (CAG)/(CTG) triplet repeat elements support proliferating cell nuclear antigen loading and MutLa endonuclease activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013; 110(30):12277-12282.
- 37) Manley K, Shirley TL, Flaherty L, Messer A. Msh2 deficiency prevents in vivo somatic instability of the CAG repeat in Huntington disease transgenic mice. *Nat. Genet* 1999;23(4): 471-473.
- 38) Zhang Y, Klein BJ, Cox KL, et al. Mechanism for autoinhibition and activation of the MORC3 ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2019; 116(13):6111-6119.
- 39) Douse CH, Bloor S, Liu Y, et al. Neuropathic



- MORC2 mutations perturb GHKL ATPase dimerization dynamics and epigenetic silencing by multiple structural mechanisms. Nat. Commun 2018;9(1):651.
- 40) Minobe A, Fukui K, Yonezu H, et al. Biochemical characterization of mismatch-binding protein MutS1 and nicking endonuclease MutL from a euryarchaeon *Methanosaeta thermophila*. DNA Repair (Amst) 2019;75:29-38.
- 41) Ishino S, Nishi Y, Oda S, et al. Identification of a mismatch-specific endonuclease in hyperthermophilic Archaea. Nucleic Acids Res 2016;44(7):2977-2986.