

TSUBAME 共同利用 令和7年度 学術利用 成果報告書

利用課題名 DNA 損傷修復タンパク質の核-細胞間輸送制御機構の解明

英文: Computational analysis of controlling the intracellular localization of the DNA repair protein

利用課題責任者

藤本 浩文

First name Surname

Hirofumi Fujimoto

所属

国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所

Affiliation

National Institute of Infectious Diseases

URL

<https://www.niid.jihs.go.jp/>

邦文抄録(300字程度)

DNA二本鎖切断(DSB)修復タンパク質の一つKuのサブユニットであるKu70はDSB修復以外にも核外において様々な機能に関与している。最近、Ku70のNLS近傍のリジン残基がメチル化されると核内のKu70が細胞質に移動することが報告され、この領域に核外輸送シグナル(NES)も存在する可能性が示唆された。そこで本プロジェクトでは、予想されるNESと核外輸送受容体との結合力がリジン残基のメチル化によってどのように変化するかを計算化学的手法を用いて解析することでKu70と核外輸送受容体との結合が当該リジン残基のメチル化によって制御されているのではないかと仮説を証明したいと考えている。

英文抄録(100 words程度)

Ku has been well characterized as a DNA double-strand-break (DSB) sensor in a major DSB repair pathway, the non-homologous end-joining. Ku70 is a subunit of Ku and participates in various intra- and extra- nucleic processes. For multifunctional control, machinery that precisely regulates the intracellular localization of Ku70 is essential. Recently, the methylation of K570 in Ku70 was shown to involve its nuclear export, suggesting that the nuclear export signal (NES) of Ku70 is located in the region including K570. Therefore, in this project, we intended to analyze how lysine methylation affects the binding affinity between the Ku70 NES-like motif and the nuclear export factor, using computational chemistry methods.

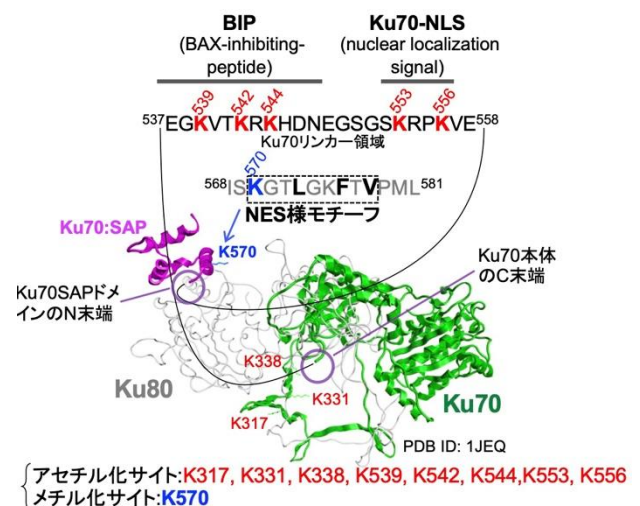
Keywords: 5つ程度

Ku70, nuclear export signal (NES), molecular dynamics (MD), AMBER, Gaussian

背景と目的

KuはDNA二本鎖切断(DSB)末端を認識・結合し、主要なDSB修復経路であるnon-homologous end-joining (NHEJ)過程開始のきっかけとなるタンパク質である。KuのサブユニットであるKu70はDSB修復機能以外にも様々な核内/核外の細胞機能に関与していることが報告されており、このような多機能性を発揮するためには、Ku70の細胞内局在を正確に制御する機構が不可欠であると考えられる。これまで我々はKu70の核移行シグナル(NLS)を同定し、NLS中のリジン残基のアセチル化によってKu70の核移行が制御されている可能性を示した。最近、Ku70のC末端領域のリジン残基がメチル化されると核内のKu70の細胞質への移行が促進されることが報告された。メチル化のター

ゲットとなるK570は前述のNLSやアポトーシス誘導タンパク質BAX結合サイト(BIP)が存在する領域の近傍に位置しており、このリジン残基周辺に核外輸送シグナル(NES)も存在するのではないかと予想した[下図]。



そこで本プロジェクトでは、ターゲットとなるリジン残基を含む Ku70 の領域と核外輸送受容体との相互作用がリジン残基のメチル化／脱メチル化によってどのように変化するかを計算化学的手法を用いて解析することで、Ku70 と核外輸送受容体との結合が当該リジン残基のメチル化によって制御されているのではないかとこの仮説を証明したいと考えている。本仮説が正しければ、これまで我々のグループが解明してきた Ku70 の核への移行機構と合わせて、Ku70 が細胞質においてアポトーシスによる細胞死を抑制しながら、同時に核内で DNA の DSB 修復を行うために必要な細胞内局在を制御する機構の全容が明らかになるのではないかと期待している。

概要

本プロジェクトでは以下のステップを経て前述の仮説を検証したいと考えている。

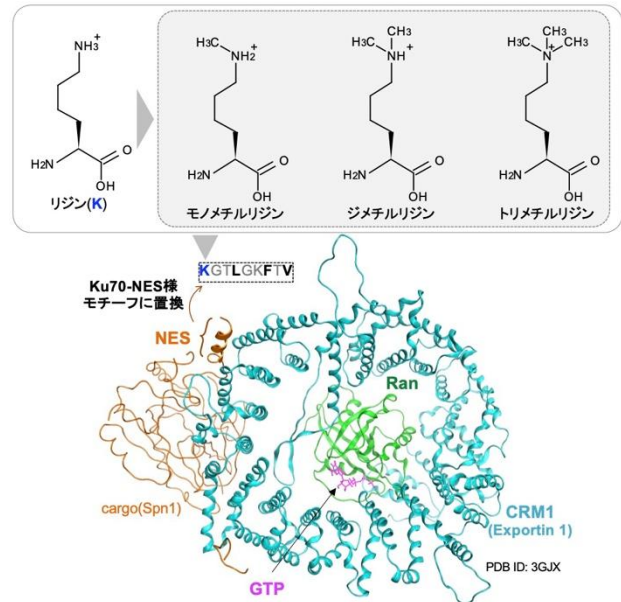
- ・分子構造が解かれている典型的な核外輸送受容体である CRM1(Exportin 1)/RanGTP—NES モチーフ複合体を元に分子モデルを作成する。
- ・分子モデル中の NES モチーフを K570 を含む Ku70 の NES 様モチーフと置換し、数十ナノ秒レベルの分子動力学(MD)シミュレーションを実行する。
- ・MD シミュレーションによって得られた安定な分子構造に対し分子力学的計算を行ない CRM1/RanGTP—Ku70 NES 様モチーフ間の結合力を推定する。
- ・同過程を Ku70 の NES 様モチーフ中の K570 をメチル化リジンと置換した置換体でも実行し、メチル化されていない通常のリジン残基を含む場合と比較して結合力がどの様に変化するのかを評価する。

仮説が正しければ、Ku70 の NES 様モチーフ中の K570 をメチル化リジンに置換すると CRM1/RanGTP—Ku70 NES 様モチーフ間の結合力が強くなるのではないかと予想している。

結果および考察

本年度は既報の結晶構造(PDB ID: 3GJX)を元に変異体作成のベースとなる MD シミュレーションを実行するための分子モデルの作成を試みた。CRM1/RanGTP 複合体には Ran (Ras-related nuclear protein) と結合する guanosine triphosphate (GTP)が含まれる。また、リジン

には3つのメチル化状態が存在するため、CRM1/RanGTP 複合体に作用させる Ku70 の NES 様モチーフ中の K570 の位置には通常のリジン残基に加えてこれら3種類のメチルリジンを用意する必要があるが、これらの分子の部分電荷は MD シミュレーション用ソフトウェア AMBER に標準では実装されていない[下図]。



そこで、分子軌道法(MO)計算プログラム Gaussian を用いてこれらの分子中の電子状態を算出し、計算結果から得られた部分電荷を分子モデルに適用して MD シミュレーションを実行したところ原子同士が衝突するエラーが頻発した。計算結果を解析すると、GTPを構成する原子の一部に不自然に大きな部分電荷が割り当てられ、その原子に接近する水分子に大きなエネルギーが付与されたことが原因であると判明した。MOPAC 等の半経験的な MO 計算を行うソフトウェアを用いると、非経験的な手法を採用している Gaussian で計算した場合は異なり、不自然に大きな部分電荷の割り当てが回避されたことから、Gaussian を用いて GTP の MO 計算を行う際の条件を再検討する必要があると考えられた。

まとめ、今後の課題

Ku70 の NES 様モチーフと CRM1/RanGTP 複合体との結合力を推定するため、MD シミュレーション実行用のベースとなる分子モデルの構築を行った。MD シミュレーションソフトウェアに非実装の分子の部分電荷を求めるために Gaussian による MO 計算の結果を適用すると GTP 分子の一部の原子に不自然に大きな部分電荷が割り当てられることが判明した。次年度も引き続き計

算条件の再検討を進める。GTP 分子に対して適切な部分電荷の算出に成功し、MD シミュレーションの実行結果から CRM1/RanGTP-Ku70 NES 様モチーフ間の結合力を算出することに成功すれば、引き続き同モデルをベースに Ku70 NES 様モチーフ中の K570 を3種類のメチルリジンと置換した分子モデルに対して同様の計算を行うことで、NES 様モチーフ中の K570 のメチル化が核外輸送受容体との結合力に与える影響を推定したい。もし予想通り、Ku70 の NES 様モチーフ中の K570 をメチル化リジンに置換すると CRM1/RanGTP-Ku70 NES 様モチーフ間の結合力が増強される結果が得られれば、各メチル化リジンを含む Ku70 NES 様モチーフペプチドを実際に合成し、市販の組換えヒト CRM1、および抗 CRM1 抗体を用いて pull-down assay 法やバイオレイヤー干渉法といった実験手法を用いて、CRM1-Ku70 NES 様モチーフ間の結合力を測定することで計算結果の妥当性を評価したいと考えている。