

# 超好熱始原菌由来 O<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼの構造解析

大阪大学大学院・工学研究科 橋本 博 ・ 甲斐 泰

Structure determination of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase from hyperthermophilic archaeon

Department of Materials Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University  
Hiroshi HASHIMOTO and Yasushi KAI

The crystal structure of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (EC 2.1.1.63) of hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* strain KOD1 (Pk-MGMT) was determined by single isomorphous replacement method with anomalous scattering (SIRAS) at 1.8 Å resolution. The archaeal protein is extremely thermostable and repairs alkylated DNA by suicidal alkyl transfer from guanine O<sup>6</sup> to its own cysteine residue. Archaea constitute the third primary kingdom of living organisms, sharing characteristics with prokaryotic and eucaryotic cells. They live in various extreme environments and are thought to include the most ancient organisms on the earth. Structural studies on hyperthermophilic archaeal proteins reveal the structural features essential for stability under the extreme environments in which these organisms live, and will provide the structural basis required for stabilizing various mesophilic proteins for industrial applications. In this paper, we report crystal structure of Pk-MGMT and structural comparison of Pk-MGMT and methyltransferase homologue from *E. coli* (AdaC: C-terminal fragment of Ada protein). Analyses of solvent accessible surface area (ASA) reveals a large discrepancy between Pk-MGMT and AdaC with respect to the property of the ASA. In the Pk-MGMT structure, the ion-pairs in helices contribute to reinforce stability of  $\alpha$ -helices. The ion-pairs between helices exist in the interior of Pk-MGMT and stabilize internal packing of tertiary structure. Furthermore, structural features of helix cappings, the ion-pairs in and between helices are found around the active site structure in Pk-MGMT.

## 1) はじめに

超好熱始原菌 *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 株は、今中らによって、鹿児島県沖合、小宝島から単離された微生物で最適生育温度が 95°C であり、生産するタンパク質は熱安定

表1 結晶学的データ

	Native	KAu(CN) <sub>2</sub>
Space group	$P2_12_12_1$	
Cell dimensions	$a = 53.2, b = 86.2, c = 39.8 \text{ \AA}$	$a = 53.1, b = 86.2, c = 39.8 \text{ \AA}$
$V_M$ (Solvent Content)	$2.3 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ (48%)	
Wavelength	1.00 $\text{\AA}$	1.54 $\text{\AA}$
X-ray source	SR (KEK-PFBL18)	CuK $\alpha$
Detector	Weissenberg camera	RAXIS-IIc
Resolution	40.0 ~ 1.8 $\text{\AA}$	20.0 ~ 2.0 $\text{\AA}$
No. of total reflections	92,828	69,449
No. of unique reflections	16,314	12,421
Completeness	92.4% (76.8%)	95.9% (89.5%)
$R_{\text{merge}}$	6.5% (16.0%)	7.6% (17.6%)
$R_{\text{deriv}}$		18.6% (21.3%)

表2 位相決定

Resolution	20.0 ~ 2.0 $\text{\AA}$
No. of site	1
Occupancy	0.60
Anomalous Occupancy	0.43
B factor	13.3
Phasing power for acentric reflections	2.39
Phasing powerd for centric reflections	1.89
FOM	0.52

表3 構造精密化

Resolution	20.0 ~ 1.8 $\text{\AA}$
No. of reflections	15,463
$R$ -factor	17.3%
$R_{\text{free}}$	21.8%
r.m.s. (bonds)	0.018 $\text{\AA}$
r.m.s. (angles)	2.5°
No. of amino acid residues	169
No. of protein atoms	1,334
No. of water molecules	129
No. of SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	3

図1  $u = v = w = 1/2$ におけるパターンマップ(左:同形差、右:異常分散差)

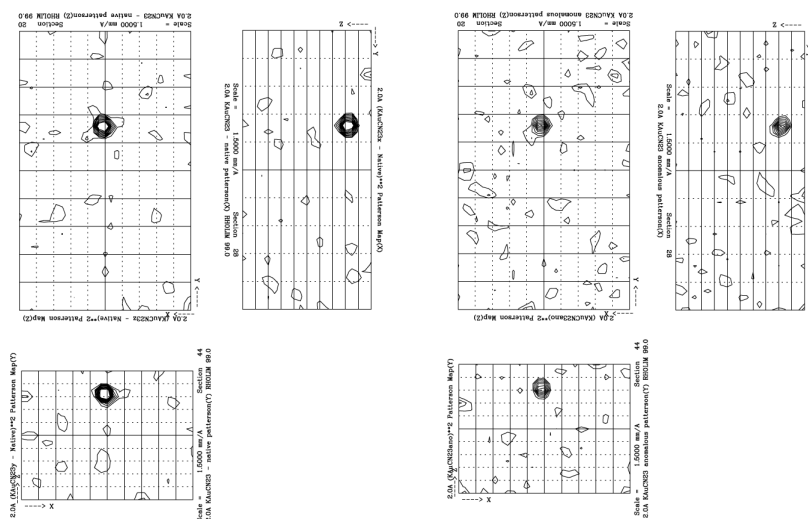
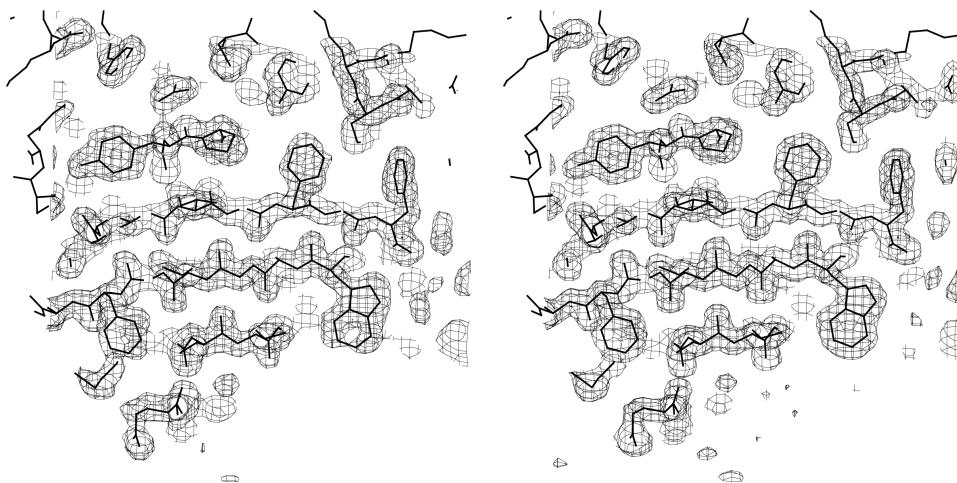


図2 電子密度図(左:DM後のマップ、右:最終の $2Fo-Fc$ を係数とするマップ)  
いずれも精密化後の最終座標を重ねて表示してある



性に優れている<sup>1)</sup>。始原菌(archaea)は、超好熱菌、メタン生成菌(絶対嫌気性)、好塩菌に分類され、原始地球環境に類似した極限環境に生息しており、進化の源流に位置していると考えられており、このような極限生物の産出するタンパク質の立体構造には関心が寄せられている。

KOD1 由来の O<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ(Pk-MGMT)はアミノ酸残基数174、分子量約 20 kDa の1本のポリペプチドからなる小型のタンパク質であり、98°CにおいてもCDスペクトルでは熱変性を検出できないほど熱安定性に優れている<sup>2)</sup>。

O<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ(MTase)はDNA修復タンパク質の一つで、アルキル化剤によってグアニンのO<sup>6</sup>位がメチル化された、O<sup>6</sup>-メチルグアニンDNAからメチル基を自分自身のシステイン残基に転移させることでDNAを修復するタンパク質であり、バクテリアから哺乳動物まで広く存在している。

今回は、Pk-MGMTの結晶構造解析およびその熱安定性を構造化学的に考察したい。

## 2) 結晶化<sup>3)</sup>および結晶構造解析<sup>4)</sup>

Pk-MGMTの結晶化は200 mM硫酸アンモニウム存在下、12-15% PEG20000を沈殿剤とし、ハンギングドロップ蒸気拡散法で行ったところ、数日で0.8 x 0.1 x 0.1 mmの柱状結晶を再現性良く得ている。MTaseの結晶構造は1994年に*E. coli*由来のものが報告されているため(AdaC)<sup>5)</sup>、その分子をサーチモデルとした分子置換法を、プログラムAMoRe、XPLORを用いて行ったが、正解を得ることができなかった。

そこで、MIR法での構造解析を行うために、重原子誘導体の検索を行った。様々な重原子水溶液に結晶を浸潤させて検索を行ったところ、K<sub>2</sub>Au(CN)<sub>2</sub>と水銀化合物に関してパターンマップ上に重原子ピークが確認できた。しかし、今回試みた金化合物と水銀化合物は全て同じサイトに結合してしまうため、MIR法の代わりにSIRAS法を用いて初期位相を決定した。最終的に得られた結晶学的データを表1に示す。ネイティブデータ収集はPF18Bで行い、カメラ距離430 mm、400 x 800 mmのIPを用い、ワイセンベルグ法により2軸分のデータを収集した。デリバティブデータは実験室系のCuK $\alpha$ をX線源としRAXIS-IIcにより測定した。回折強度データの処理は全て、プログラムDENZOとSCALEPACKを使用した。図1に同形差(左)、異常分散差(右)パターンマップを示す。これを見ると、異常分散効果が十分観測されていることがわかる。

初期位相の決定は、プログラムMLPHAREを用いて行い、2.0 Å分解能までの反射データに対しPhasing Powerが、アセントリック反射とセントリック反射に対してそれぞれ2.39と1.89という良好な結果が得られた(表2)。続いてプログラムDMにより溶媒領域の平滑化を行い、さらに1.8 Å分解能まで位相を拡張したところ、明瞭な電子密度図が得られ(図2左)、分子モデル構築の初期段階から側鎖を含めたアミノ酸のトレースが可能であった。最終的な

$2Fo-Fc$  を係数とした電子密度図を図2右に示すが、これと比較しても初期位相がかなり正確に決定されているのがわかる。構造精密化は、プログラム *XPLOR* と *REFMAC* を用いて行い、最終的に  $1.8 \text{ \AA}$  分解能で  $R = 17.3\%$ ,  $R_{\text{free}} = 21.8\%$  の構造を得た。構造精密化における統計値を表3に示す。

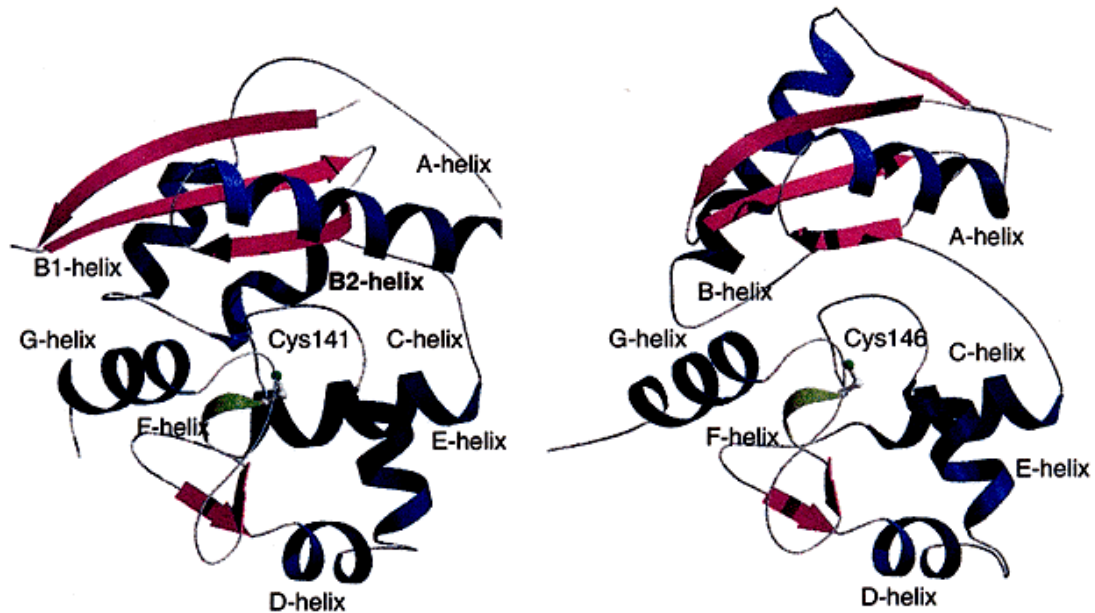


図3 Pk-MGMT (左図)、AdaC (右図) の結晶構造

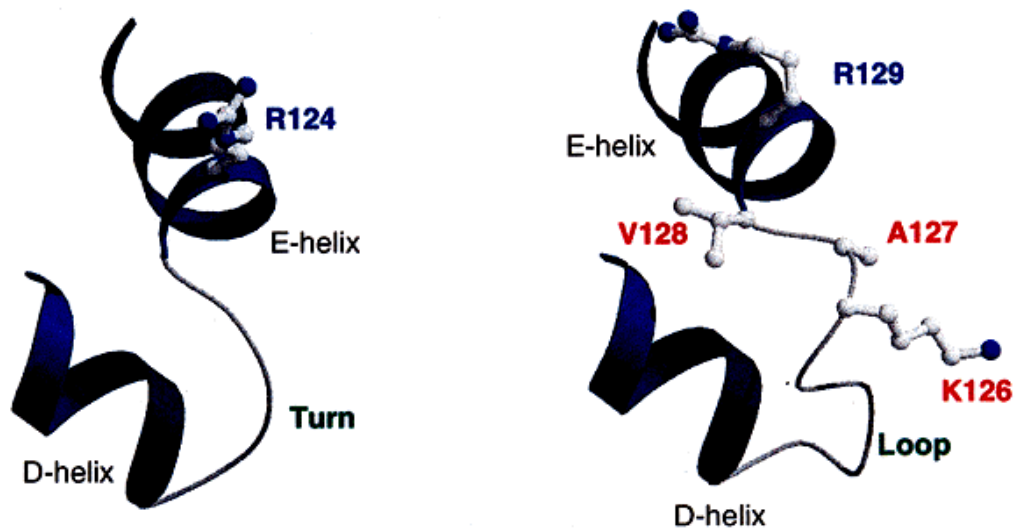


図4 Pk-MGMTとAdaCにおけるDNA結合領域 (DからEヘリックス)  
Pk-MGMT (左図)、AdaC (右図)

Pk-MGMT の結晶構造は図3左に示す通り、N 末端側の N ドメインと C 末端側の C ドメインの 2 つのドメイン構造で表される。N ドメインは3つの  $\beta$  ストランドからなる逆平行  $\beta$  シートを2本の  $\alpha$  ヘリックス(A, B1)が挟む  $\alpha$   $\beta$  フォールドを形成している。活性残基である C141 は C ドメインに位置し、4つの  $\alpha$  ヘリックス(C, D, E, G)に囲まれた分子内部に存在している。また、N と C ドメインの連結部分には  $3_{10}$  ヘリックス(B2)が形成されている。

Pk-MGMT と *E. coli* 由来 MTase(AdaC)の結晶構造(図3右)を比較すると、C ドメインの構造はよく似ているのに対し、N ドメインは  $\alpha$  ヘリックスや  $\beta$  シートの長さの違いが目立つ。Pk-MGMT で見られた、N ドメインと C ドメインの連結部の B2 ヘリックスは、AdaC では長いループ構造である。また、C ドメインの構造は類似しているが、D と E ヘリックスとの間の構造に違いがみられた。Pk-MGMT の場合、D と E ヘリックスの間は4残基からなるターン構造であるのに対し(図4左)、AdaC では3残基の挿入があり(K126, A127, V128)、計7残基からなるループ構造である(図4右)。

図5は様々な MTase の E ヘリックス付近のアミノ酸配列を比較したもので、上から4つ目までが始原菌、中央4つがバクテリア、下4列が真核生物由来 MTase である。また、上から5列目までが 80°C で生息可能な超好熱菌由来 MTase であるが、超好熱菌由来では全て3残基の挿入がなく、D と E ヘリックスの間はターン構造であると予想できる。この部分は、helix-loop-helixあるいはhelix-turn-helixモチーフであり、E ヘリックス中で全ての MTase で保存された R124(図5)が DNA の相互作用に必要であると考えられている<sup>6)</sup>。したがって、この構造の違いは熱安定性、とくに DNA 結合部位の安定化に関係があると考えられる。

### 3) 熱安定性

大腸菌は最適な生育温度が37°C付近であるため、AdaC は40°Cで放置すると、熱変性し沈殿する。しかし前述のように Pk-MGMT は熱に対して極めて安定である。その構造化学的要因を解明するために、さらに詳細な構造比較を Pk-MGMT と AdaC との間で行ったところ、溶媒露出表面積 ASA(表 4)とイオンペア(表 5)に関して興味ある違いが見られた。

分子全体の ASA の大きさに関しては、両者で顕著な違いは見られなかった。次に、疎水性アミノ酸、極性アミノ酸、荷電アミノ酸の全 ASA に対する寄与を算出したところ、興味ある知見が得られた。AdaC の場合、3種類のアミノ酸が全 ASA に占める割合に違いは見られな

表4 溶媒露出表面積の比較

	Pk-MGMT	AdaC
Total ASA ( $\text{\AA}^2$ )	8160	8339
ASA of hydrophobic residues ( $\text{\AA}^2$ ) (% of total)	1935 (24%)	2638 (32%)
ASA of polar residues ( $\text{\AA}^2$ ) (% of total)	1797 (22%)	2752 (33%)

ASA of charged residues ( $\text{\AA}^2$ ) (% of total)	4428 (54%)	2949 (35%)
No. of residues in crystal structure	169	165
No. of hydrophobic residues (% of total)	75 (44.4%)	78 (47.3%)
No. of polar residues (% of total)	46 (27.2%)	50 (30.3%)
No. of charged residues (% of total)	48 (28.4%)	37 (22.4%)

表5 イオンペア数の比較

	Pk-MGMT	AdaC
5 $\text{\AA}$ cut off	17	16
In helix	7	0
Between helices	6	2
Ion-pair network $\geq 4$	1	2
4 $\text{\AA}$ cut off	11	14
In helix	4	0
Between helices	4	2
Ion-pair network $\geq 4$	1	1

い(疎水性:32%、極性:33%、荷電:35%)。すなわち、アミノ酸の性質に関係なくほぼ均一に分布している。しかし、Pk-MGMT の場合には、全体の ASA に対して、疎水性アミノ酸の占める割合が小さく(24%)、荷電アミノ酸の占める割合が大きくなっている(54%)。つまり、Pk-MGMT では、疎水性アミノ酸はより分子内部に取り込まれ、荷電アミノ酸はより分子表面に分布していることがわかる。この結果は、両タンパク質を構成する3種のアミノ酸の割合(表4下)から判断して有意であると考えられる。次に Pk-MGMT と AdaC とでイオンペアに関する比較を行った。イオンペアの計算は 5  $\text{\AA}$  及び 4  $\text{\AA}$  以内の距離で2通り計算した(表 5)。

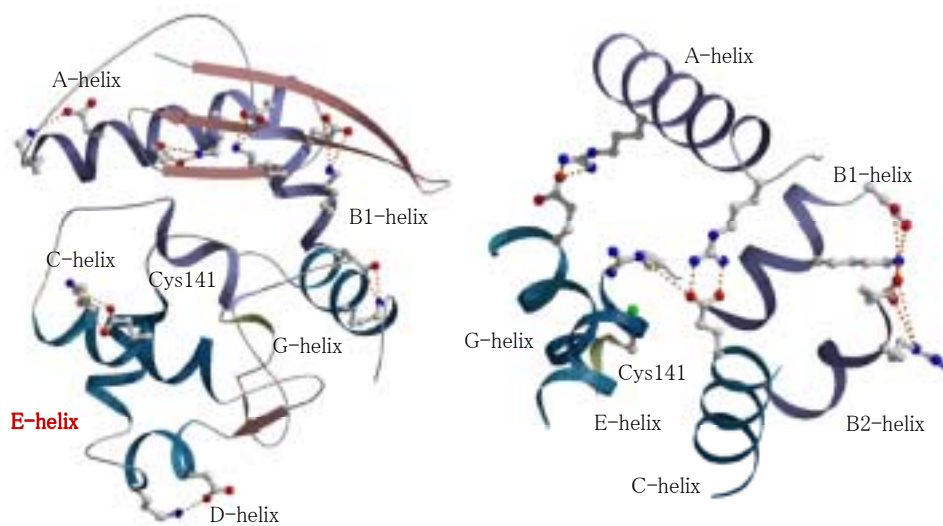
全体のイオンペア数は 5  $\text{\AA}$  以内では、Pk-MGMT が 17 個、AdaC が 16 個であり、同程度である。しかし、4  $\text{\AA}$  以内では Pk-MGMT が 11 個、AdaC が 14 個であり、Pk-MGMT の方が少ないという結果が得られた。一方、4 残基以上のアミノ酸で形成されるイオンペアのネットワーク数に関しては、Pk-MGMT と AdaC で顕著な違いは見られなかった。そこで、イオンペアの位置に注目したところ、Pk-MGMT の結晶構造では興味深い結果が得られた。Pk-MGMT の場合、ヘリックス内あるいはヘリックス間にほとんどのイオンペアが位置していた。特に、ヘリックス内イオンペアに関しては、AdaC では全く存在しないのに対し、Pk-MGMT では、5  $\text{\AA}$  以内で 7 つ、4  $\text{\AA}$  以内でも 4 つのイオンペアが形成されていた。 $\alpha$  ヘリックスは  $i$  番目の主鎖のカルボニル酸素と  $[i + 4]$  番目のアミドプロトンが水素結合を形成することで螺旋構造を形成しているため、 $i$  番目のアミノ酸残基と  $[i + 4]$  または  $[i + 3]$  番目のアミノ酸残基は近接することになる。したがって、それらのアミノ酸側鎖の電荷が相反する場合には、イオンペアを形成し、螺旋構造がとりやすくなることが、モデルペプチドを用いた研究で示されている<sup>7)</sup>。

Pk-MGMT には 6 つの  $\alpha$  ヘリックスがあり(A, B1, C, D, E, G)、そのうち E ヘリックスを除く

図5 Eヘリックス近傍でのアミノ酸配列の比較

		E-helix				
		Archaea				
		121	125	130		
Pk		T S P - - -	R A V G G A M K			
Mj		T S P - - -	R A V G M A L K			
Mt		G S P - - -	R S A A G A L S			
Af		T S P - - -	R A V G Q A V K			
		Bacteria				
Aa		L H P - - -	R F V G Y C M K		略称	
Bs		G S P K A V	R A V G Q A N K		Pk	<i>Pyrococcus kodakaraensis</i>
Ada		G K P K A V	R A V A S A C A		Mj	<i>Methanococcus janaschii</i>
Ogt		G R P G A A	R A V G A A N G		Mt	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
		Eucarya				
Human		G N P K A A	R A V G G A M R		Af	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
Rat		G N P K A A	R A V G G A M R		Aa	<i>Aquifex aeolicus</i>
Mouse		G N P K A A	R A V G G A M R		Dat	<i>Bacillus subtilis</i>
Yeast		G K P T A A	R S V G R A C G		Ada	<i>E. coli</i>
					Ogt	<i>E. coli</i>

図6 ヘリックス内イオンペア(左図)とヘリックス間イオンペア(右図)



5つのヘリックスにヘリックス内イオンペアが存在し、螺旋構造が強化されていると考えられる(図6左)。また、それらのヘリックスはヘリックス間イオンペアによ



って連結されている(図6右)。これらのイオンペアを構成するアミノ酸残基のASAを平均すると、ヘリックス内イオンペアを構成するアミノ酸残基の場合では98.9<sup>2</sup>、ヘリックス間イオンペアの場合は39.5<sup>2</sup>である。このことはヘリックス内イオンペアが比較的分子表面に位置し、ヘリックス間イオンペアは比較的分子内部に位置していることを示している。

#### 4) まとめ

超好熱始原菌 *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 株の産出する O<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ (Pk-MGMT) の結晶構造を 1.8 Å 分解能で決定し、大腸菌由来の同族タンパク質と立体構造を比較することにより、Pk-MGMT の優れた熱安定性を考察した。まず溶媒露出表面積の比較から、AdaC と比べて、Pk-MGMT は分子表面は荷電アミノ酸が多く分布しており、溶媒和による安定化を受けると考えられる。またイオンペアの比較から、全体のイオンペア数に関しては両者で違いがみられなかったが、Pk-MGMT の場合、イオンペアの位置に特徴があった。つまり、イオンペアのほとんどがヘリックス内あるいはヘリックス間に分布しており、ヘリックス内のイオンペアによって螺旋構造(2次構造)が補強され、分子内部ではヘリックス間のイオンペアによって分子内パッキング(3次構造)が強化されていると考えられる。

#### 5) おわりに

本研究は京都大学 今中 忠行 教授、大阪大学 高木 昌宏 助教授、藤原 伸介 博士との共同研究によって行われた。本研究をおこなうにあたり、PF における回折強度データの収集の際お世話になった坂部 知平 教授、渡邊 信久 博士、鈴木 守 博士、五十嵐 教之 博士にお礼申し上げます。また、構造解析を行う際お世話になった、当研究室の井上 豪 講師に感謝します。

#### 参考文献

- 1) Morikawa, M., Izawa, Y., Rashid, N., Hoaki, T. & Imanaka, T. (1994). Purification and characterization of a hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4559-4566.
- 2) Leclere, M. M., Nishioka, M., Yuasa, T., Fujiwara, S., Takagi, M & Imanaka, T. (1998). The O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase from the hyperthermophilic archaeon

*Pyrococcus* sp. KOD1: a thermostable repair enzyme. *Mol. Gen. Genet.* **258**, 69–77.

- 3) Hashimoto, H., *et al.*, & Kai, Y. (1998). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of archaeal O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase. *Acta Crystallogr. D* **54**, 1395–1396.
- 4) Hashimoto, H., Inoue, T., Nishioka, M., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., & Kai, Y. (1999). Hyperthermostable protein structure maintained by intra- and inter- helix ion-pairs in archaeal O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase. *J. Mol. Biol.* **292**, 707–716.
- 5) Moore, M. H., Gulbis, M., Dodson, E. J., Demples, B. & Moody, P. C. E. (1994). Crystal structure of a suicidal DNA repair protein: the Ada O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase from *E.coli*. *EMBO. J.* **13**, 1495–1501.
- 6) Kanugula, S., Goodtzova, K., Edara, S. & Pegg, A. E. (1995). Alternation of arginine-128 to alanine abolishes the ability of human O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase to repair methylated DNA but has no effect on its reaction with O<sup>6</sup>-benzylguanine. *Biochemistry*, **34**, 7113–7119.
- 7) Marqusee, S. & Baldwin, R. L. (1987). Helix stabilization by Glu<sup>-</sup>...Lys<sup>+</sup> salt bridges in short peptides of *de novo* design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8898–8902.