

博士（理工学）学位論文

Structural analysis of  $O^6$ -methylguanine-DNA  
methyltransferase from *Sulfurisphaera tokodaii*

医療創生大学大学院

理工学研究科 物質理工学専攻

菊池 槇子

# 目次

第 1 章	序論	1
1.1	背景	1
1.2	目的	3
第 2 章	ドッキングシミュレーション	4
2.1	方法	4
2.2	結果	6
2.3	考察	7
第 3 章	$O^6$ -メチルグアニン DNA メチル基転位酵素の X 線結晶構造解析	8
3.1	発現系の構築およびタンパク質の高純度精製	8
3.2	タンパク質の結晶化	15
3.2.1	方法	15
3.2.2	結果	15
3.3	X 線回折実験および立体構造の決定	16
3.3.1	方法	17

---

3.3.2	結果 . . . . .	18
3.4	考察 . . . . .	30
第 4 章	結語	33
第 5 章	付録	34
	参考文献	53
	出版リスト	61
	謝辞	63

# 第 1 章

## 序論

本章では、本研究に至る背景および本研究の目的について述べる。

### 1.1 背景

DNA のメチル化は遺伝子発現の制御に関わっている [1]。シトシンとグアニンが集中して存在する CpG アイランドでは、発生や分化に伴ってシトシンがメチル化されることで、遺伝子発現が抑制される。しかし、加齢や炎症、ウイルスなどによって DNA の異常なメチル化が起こることがある。グアニン 6 位の酸素原子がメチル化された  $O^6$ -メチルグアニン塩基はシトシンだけでなく、チミンとも塩基対を形成するようになる (図 1.1)。このことにより  $G \equiv C$  から  $A = T$  への塩基対変異を誘導するため、DNA の複製において癌や突然変異の原因になると考えられている。また  $O^6$ -メチルグアニンはアポトーシスを誘導することが知られている [2]。

生物は  $O^6$ -メチルグアニン DNA メチル基転位酵素 (以下 MGMT) を持って

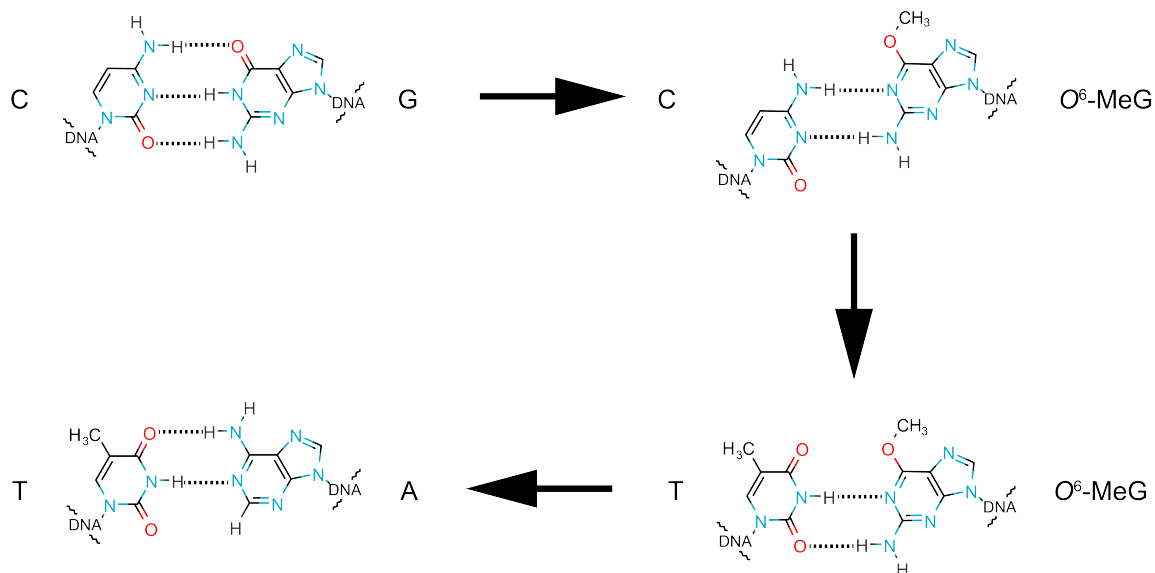


図 1.1. G≡C から A=T への塩基転位 グアニンの 6 位の酸素原子にメチル基が結合することで、1 位の窒素原子がアミンからイミンに変化する。すると、シトシンの代わりにチミンと塩基対を形成することができる。その後、DNA 複製により、塩基転位が生じる [3]。

おり、異常なメチル化から DNA が守られている。MGMT は DNA 中の  $O^6$ -メチルグアニン塩基を探しだし、そのメチル基を MGMT 中のシステイン残基のチオール基に転移させることで、グアニン 6 位の酸素原子の二重結合をもとに戻す働きをする。これにより DNA 中の  $O^6$ -メチルグアニンはグアニンに修復される。

本研究室では今までに好熱性古細菌 *Sulphurisphaera tokodaii* 由来 MGMT (以下 StoMGMT) のメチル基の転移反応のメカニズムを明らかにした [4]。この研究では、酵素と基質 DNA の一部に相当する  $O^6$ -メチルグアニンとの複合体の結晶構造により、セリンプロテアーゼの酸-塩基-求核剤 (触媒三残基) 類似の酸-塩基-水-求核剤の触媒ネットワークを形成していることがわかった。

同時に複数の生物種間の MGMT のアミノ酸配列の比較において、活性部位のアミノ酸 PCHRV だけでなく、基質結合部位近くのチロシン残基 (*S. tokodaii* においては Tyr91) が保存されていることがわかった (図 5.1)。このチロシン残基は、基質認識の特異性に関与しているのではないかと示唆された。ヒト由来酵素においては、このチロシン残基は求核剤の働きを助ける可能性が示唆されている [5]。

これらのことから、このチロシンの関与を明らかにするためにチロシンから水酸基が欠損しているフェニルアラニンに変異させた変異体を作成された。 $O^6$ -メチルグアニンとの複合体との結晶構造解析からは酵素反応が進行していると見られ、チロシンの水酸基の基質認識への関与は必要不可欠なものである可能性は低いと考えられた [6]。

## 1.2 目的

過去の研究から StoMGMT では、基質に相当する  $O^6$ -メチルグアニン 3 位の窒素原子と Tyr91 の水酸基との間に水素結合が形成されていることが明らかになっている [4]。他の生物種でも Tyr91 に相当する残基が保存されており、ヒト由来酵素においては求核剤の働きを助ける可能性が示唆されている [5]。

本研究では数種類の変異体を作成し、このチロシン残基の働きを明確にするために、より DNA 中のグアニン塩基に近い  $O^6$ -メチル-2'-デオキシグアノシン (以下  $O^6$ -mdG) との複合体のドッキングシミュレーションおよび結晶構造解析を行う。

## 第2章

# ドッキングシミュレーション

本章では、 $O^6$ -mdG 誘導体と StoMGMT のドッキングシミュレーションの方法について述べる。得られた結果に対して、Tyr91 の基質特異性への寄与に対して考察する。

### 2.1 方法

野生型 StoMGMT の結晶構造の座標とそれを元に作成した Tyr91Phe 変異 StoMGMT モデルの座標に対して、4つの基質  $O^6$ -メチルグアニン、 $O^6$ -mdG、 $O^6$ -メチル-2'-デオキシグアノシン-5'-メチルリン酸 (mP- $O^6$ -mdG)、 $O^6$ -メチル-2'-デオキシグアノシン-3',5'-ビスメチルリン酸 (mP- $O^6$ -mdG-mP) を用いて、ドッキングシミュレーションによる、基質の結合様式の探索を行った。ドッキングシミュレーションには、プログラム *AutoDock4.2*[7] を用いた。評価関数には、ファンデルワールス力、水素結合、静電的相互作用、脱溶媒和により求められた複合体の自由エネルギーを用いた。

まず始めに座標ファイルを準備した。タンパク質の座標ファイルは、Protein Data Bank ID 1WRJ[4] を用いた。USCF *Chimera*[8] を用いて.pdb ファイルを編集し、水分子を取り除き、タンパク質部分のみの座標にした。4 種類のリガンド座標の作成には *Avogadro*[9] を用いた (図 2.1)。プログラム *PMV*[10] を用いて、座標ファイルに水素原子を付加し、ADT[11] にて電荷情報を付加した。

続いて、活性ポケット部分をリガンド結合部位と仮定し、ADT でグリッドパラメータファイル (リスト 5.1) およびドッキングパラメータファイル (リスト 5.2) を準備した。グリッドパラメータファイルは、野生型 StoMGMT の結晶構造, Tyr91Phe 変異 StoMGMT モデル毎に、ドッキングパラメータファイルは、酵素とリガンドのそれぞれの組合せに用意した。

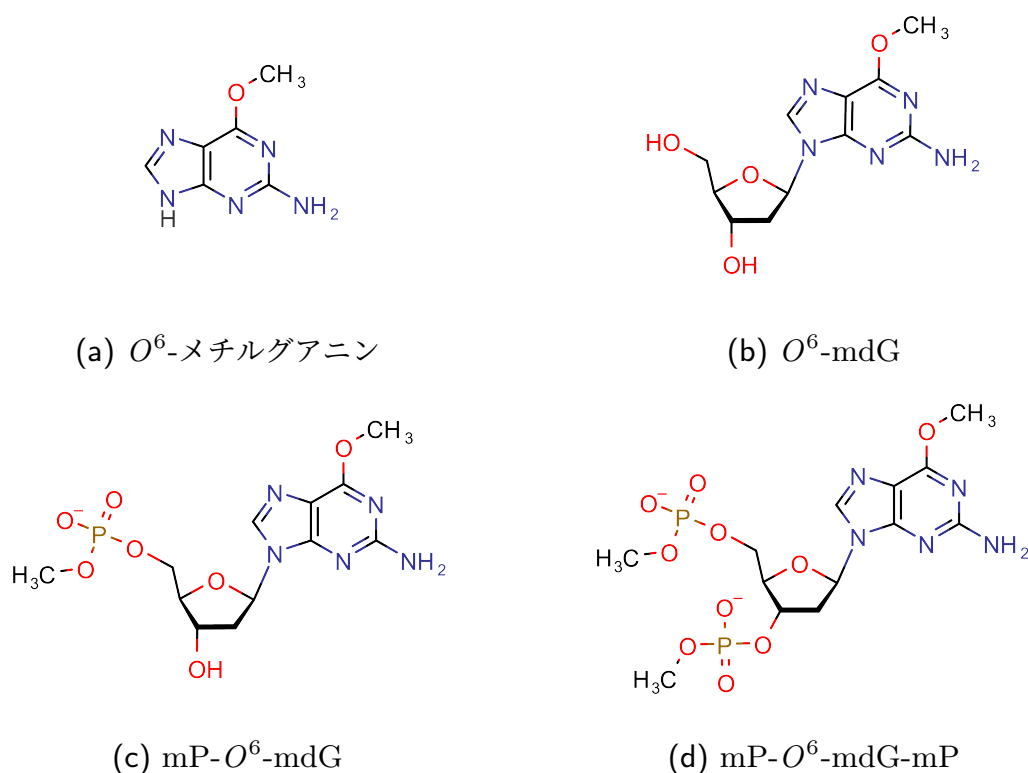


図 2.1. 計算に用いたリガンドの構造



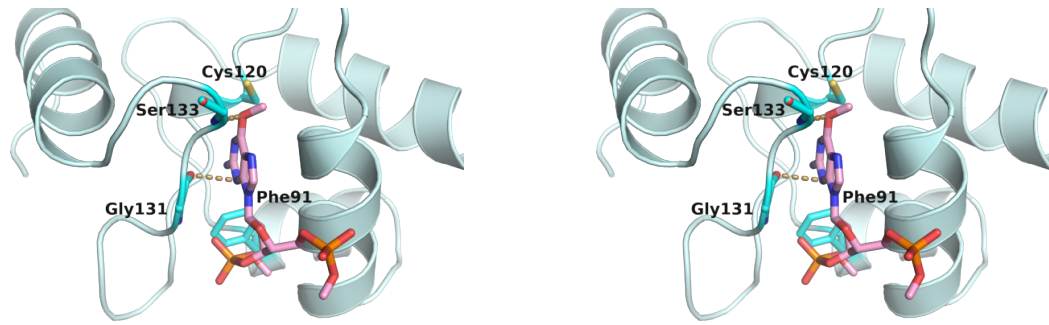
## 2.2 結果

野生型 StoMGMT の結晶構造または Tyr91Phe 変異 StoMGMT モデルと、4 ついずれかの基質との、計 8 つのパターンでドッキングシミュレーションを行った。*AutoDock* で得られた解の自由エネルギー変化  $\Delta G$  と解離定数  $K_d$  を表 2.1 に示す。

野生型酵素に mP- $O^6$ -mdG-mP グアニン塩基部分は本酵素の結合ポケットにしっかりとハマっており、3 位の窒素原子は Tyr91 の水酸基と水素結合していた (図 2.2)。また、この水酸基はデオキシリボースやリン酸基とも近いことがわかった。

表 2.1. *AutoDock* で得られた解の自由エネルギー変化  $\Delta G$  と解離定数  $K_d$

	野生型 StoMGMT		Tyr91Phe 変異 StoMGMT	
	$\Delta G$ (kcal/mol)	$K_d$ ( $\mu$ M)	$\Delta G$ (kcal/mol)	$K_d$ ( $\mu$ M)
mP- $O^6$ -mdG-mP	-7.01	7.29	-6.76	11.07
mP- $O^6$ -mdG	-6.17	29.93	-5.80	56.00
$O^6$ -mdG	-5.70	66.58	-4.53	474.83
$O^6$ -メチルグアニン	-4.62	410.68	-4.28	727.75



(a) 野生型 StoMGMT の結晶構造

(b) Tyr91Phe 変異 StoMGMT モデル

図 2.2. 各酵素と mP-O<sup>6</sup>-mdG-mP との結合様式

## 2.3 考察

野生型 StoMGMT の結晶構造はいずれの基質との結合でも  $\Delta G$ ,  $K_d$  がともに小さいので、酵素反応に有利であると考えられる。ドッキングシミュレーションの結果から、Tyr91 の水酸基は、グアニン 3 位の窒素原子だけでなく、デオキシリボースやリン酸基とも相互作用している可能性が示唆された。

## 第3章

# $O^6$ -メチルグアニン DNA メチル 基転位酵素の X 線結晶構造解析

本章では、StoMGMT の発現系の構築，精製，結晶化，結晶構造解析の方法，得られた立体構造について述べ，その結果に対して考察を行う。

### 3.1 発現系の構築およびタンパク質の高純度精製

既にある野生型のプラスミド (pET-11a-WILD) を用い，Tyr91Phe, Cys120Ser, Tyr91Phe/Cys120Ser の部位特異的変異をもつ発現プラスミドを作製した。作成したプラスミド4種 (pET-11a-WILD, pET-11a-Tyr91Phe, pET-11a-Cys120Ser, pET-11a-Tyr91Phe/Cys120Ser) を用いて，タンパク質の発現を確認した。発現の確認ができた大腸菌を培養スケールをアップし，タンパク質を多量に得た。回収した菌体より，液体クロマトグラフィーにてタンパク質の高純度精製を行った。

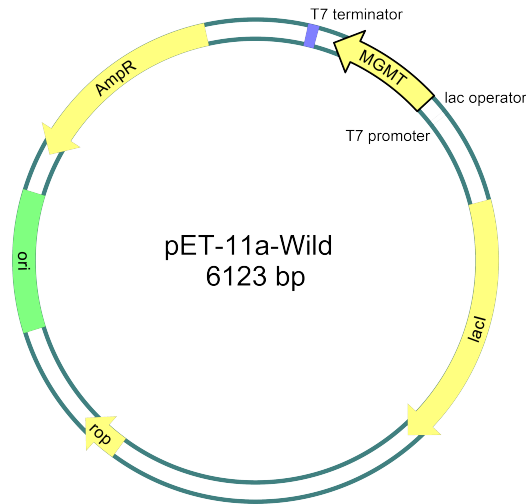


図 3.1. pET-11a-WILD の遺伝子マップ

## 方法

独立行政法人製品評価技術基盤機構 (National Institute of Technology and Evaluation; NITE) から入手した *S. tokodaii* 7<sup>T</sup> 株のゲノム DNA (NBRC 100140G) より MGMT タンパク質をコードする STK\_RS05355 遺伝子領域をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) にて増幅した。その PCR 断片を制限酵素 NdeI および BamHI で消化し、pET-11a 発現ベクターにクローニング (図 3.1) したものを使用した [4]。

QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (アジレント・テクノロジー株式会社) を用い、表 5.1 のプライマーで Tyr91Phe, Cys120Ser, Tyr91Phe/Cys120Ser の部位特異的変異をもつ発現プラスミドを作製した。pET-11a-Tyr91Phe の作成は飯塚 [6] がおこなった。pET-11a-Cys120Ser, pET-11a-Tyr91Phe/Cys120Ser は菊池が作成した。手順は、製品添付のマニュアルに従った。作成したプラスミドは何れも、ユニバーサルプライマー T7 (配

列:5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')を用いて、DNA シーケンス解析により塩基配列の確認をおこなった(株式会社ファスマックに依頼)。

各プラスミドで大腸菌 Rosetta-gami(DE3) をエレクトロポレーション法にて形質転換し、アンピシリンとクロラムフェニコールを含む Luria-Bertani(LB) 寒天プレートで希釈平板法にて、37°C, 24 hr 培養した。LB 寒天プレートから単一コロニーを採取し、50 mg/mL アンピシリンと 34 mg/mL クロラムフェニコールを 0.1% 添加した LB 液体培地 15 mL に接種し、37°C, 一晚培養した。培養液の一部 (100  $\mu$ L) を取り、80% グリセロールを等量加え、クライオチューブにて -80°C で、種菌として保存した。残りを 4°C, 10 000  $\times$ g にて 15 min 集菌し、菌体を -20°C で保存した。1 mL の溶解バッファー (20 mM Tris-HCl pH8.0, 50 mM NaCl) に再懸濁し、氷上にてウルトラソニケーターを用いて、7 回、30 s オン / 60 s オフのサイクルで超音波処理した。破碎液を等量に半分にし、一方を 70°C で 30 min 加熱した。加熱、非加熱それぞれ 10 000  $\times$ g で 15 min 遠心分離し、上清と沈殿に分けた。沈殿を溶解バッファーに懸濁し、上清とともに 15% SDS-PAGE を行った。

種菌より 2 段階で培養を行った。4 本の LB 液体培地 15 mL に、50 mg/mL アンピシリンと 34 mg/mL クロラムフェニコールをそれぞれ 15  $\mu$ L 添加し、保存してある種菌を滅菌チップの先端で刮き取り植菌した。37°C, 10 hr 振とう培養し、前培養液とした。規定量のアンピシリンとクロラムフェニコールを添加した LB 液体培地 1 L 4 本に、15 mL の前培養液をそれぞれ加え、37°C, 12 hr ~15 hr 振とう培養し、本培養を行った。4°C, 6 000  $\times$ g にて 15 min で複数回に分けて 4 L 全てを集菌し、さらに、4°C, 8 000  $\times$ g にて 15 min で 2 本に集菌

し、菌体を  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

菌体の質量の 2 倍量の溶解バッファー (20 mM Tris-HCl pH8.0, 50 mM NaCl) に再懸濁し、氷上にてウルトラソニケーターを用いて、7 回、30 s オン / 60 s オフのサイクルで超音波処理した。70  $^{\circ}\text{C}$  で 60 min 加熱した後、8000  $\times$ g で 15 min 遠心分離し、上清を得た。

上清の体積を測定し、氷上にて 50 % 飽和になるように、粉碎した硫酸アンモニウムを加え、1 hr $\sim$ 2 hr 置いた後、4  $^{\circ}\text{C}$ 、15 000  $\times$ g にて 15 min 遠心し、上清を回収した。再び、上清の体積を測定し、氷上にて 70 % 飽和になるように、粉碎した硫酸アンモニウムを加えた。1 hr $\sim$ 2 hr 置いた後、4  $^{\circ}\text{C}$ 、15 000  $\times$ g にて 15 min 間遠心し、沈殿を回収した。沈殿を約 10 mL の透析バッファー (50 mM リン酸カリウム pH6.5, 50 mM 塩化カリウム, 0.1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)) で溶かし、分子量 10 kDa カットオフの透析チューブに封入した。これを 1 L の透析バッファーに対し、3 回透析を繰り返した。

液体クロマトグラフィー装置 (ÄKTA prime) を用いて、陽イオン交換カラム Hi-Trap Q HP 5 mL でカラムクロマトグラフィーを行った。透析バッファーで、カラムを平衡化し、試料を吸着させた。透析バッファーで、未吸着の試料を洗い流し、その後、溶出バッファー (50 mM リン酸カリウム pH6.5, 550 mM 塩化カリウム, 0.1 mM EDTA) で 0 % から 50 % の増加線形グラジエントを 30 CV でかけた。

溶出フラクションを SDS-PAGE にて分子量を確認した。StoMGMT を含むフラクションを回収し、限外ろ過フィルター (Amicon Ultra centrifugal filter units) にて、脱塩及びバッファー置換 (50 mM リン酸カリウム pH 6.5, 50 mM

KCl, 0.1 mM EDTA) を行い, 4 mg/mL~10 mg/mL まで濃縮した。

## 結果

塩基配列確認の結果, 期待される部位に変異が入っていることが確認できた。SDS-PAGE により分析した結果を図 3.2 に示す。分子量マーカールとの比較から, HS に 17.95 kDa 付近のバンドが確認された。本バンドは以前構造決定された結果と同じ位置 [4] であるため, 目的タンパク質が発現していると判断した。目的タンパク質が発現していると判断した。プラスミド pET-11a-WILD, pET-11a-Tyr91Phe, pET-11a-Cys120Ser, pET-11a-Tyr91Phe/Cys120Ser を用いて発現したタンパク質を以下, それぞれ WILD, Y91F, C120S, Y91FC120S と表す。4 L の培養液から, 平均して 12 g の湿潤菌体を得られた。

陽イオン交換カラムクロマトグラフィーの結果を図 3.3 に示す。フラクシオンサイズ 2.5 mL にて, Fr.38 から Fr.45 まで収集した。各フラクシオンを SDS-PAGE した結果を図 3.4 に示す。得られたピークは以前構造決定された構造のピークと同じ位置である。また以前構造決定された結果と同じ位置にバンドが見られたので, StoMGMT およびその変異体が高純度精製できたと判断した [4]。

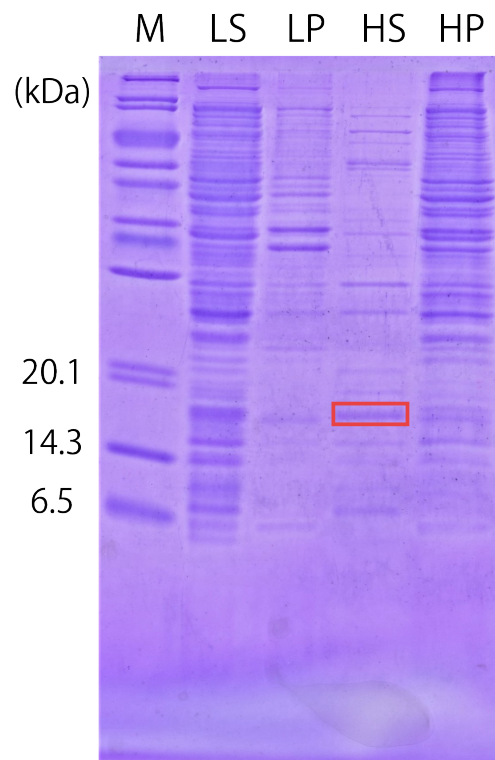


図 3.2. pET-11a-Tyr91Phe 発現確認の SDS-PAGE HS は熱処理後の上清, HP は熱処理後の沈殿, LS は熱処理前の上清, LP は熱処理前の沈殿を示す。M は分子量マーカー。



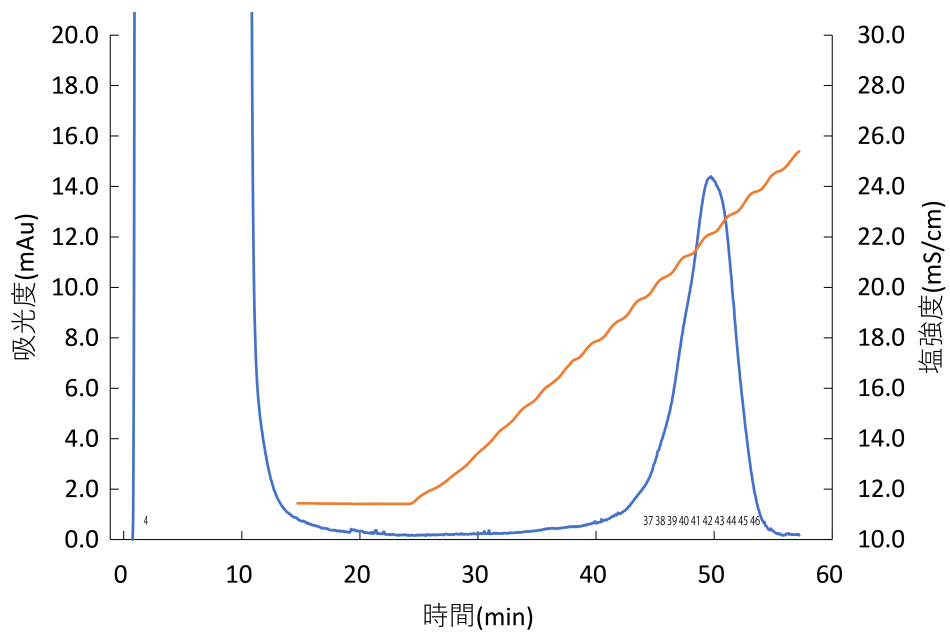


図 3.3. 陽イオン交換カラムクロマトグラフィーのチャート 流速 2.5 mL。青線は 280 nm の吸光度，オレンジ線は塩強度を示す。数値はフラクションを示す。

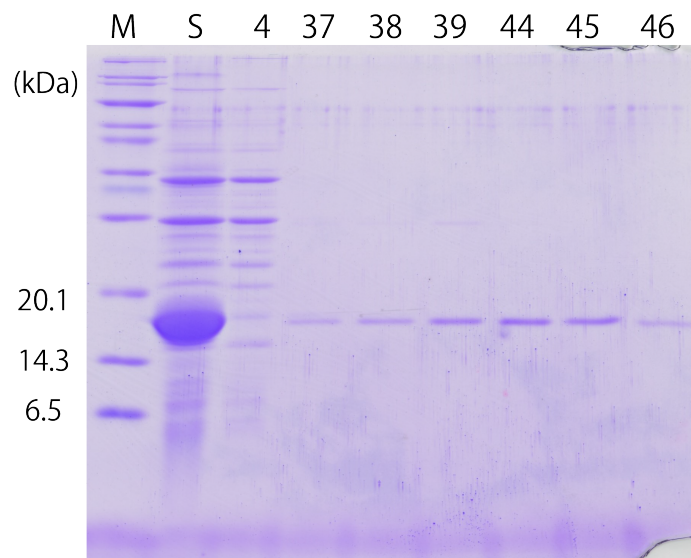


図 3.4. 各フラクションの SDS-PAGE 数値は各フラクションを示す。M は分子重量マーカー。S は陽イオン交換する前のサンプル。

## 3.2 タンパク質の結晶化

精製 StoMGMT を用い、スクリーニングキットにより結晶化条件を検索し、最適化を行った。

### 3.2.1 方法

結晶化はハンギングドロップ蒸気平衡拡散法にて行った。Y91F の初期スクリーニングとして、表 3.1 に示す市販のスクリーニングキットを使用した。リザーバ溶液の容量は 700  $\mu\text{L}$  で、ドロップサイズは 4  $\mu\text{L}$  とし、タンパク質溶液とリザーバ溶液を 1:1 で混合し、20  $^{\circ}\text{C}$  で静置した。

表 3.1. 初期条件の探索に用いたスクリーニングキット

タンパク質	スクリーン名称	条件番号
Y91F	Index (Hampton Research)	#1-96
	Wizard Classic I (Rigaku Reagents)	#1-15

結晶が得られた初期条件をもとに WILD, C120S, Y91FC120S も含め、さらにバッファー pH, 沈殿剤濃度を変化させ条件最適化を行った。

### 3.2.2 結果

条件最適化の結果、結晶が得られた条件を表 3.2 に、写真を図 3.5 に示す。

表 3.2. 結晶化の最適条件

条件	リザーバ溶液
#1	0.2 M KCl 0.05 M HEPES pH7.5 35 %v/v Pentaerythriol propoxylate (5/4PO/OH)
#2	5 % Tacsimate <sup>TM</sup> pH7.0 0.1 M HEPES pH7.0 10 %w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
#3	0.2 M Ammonium sulfate 0.1 M Tris pH8.5 25 %w/v Polyethelene glycol 3,350

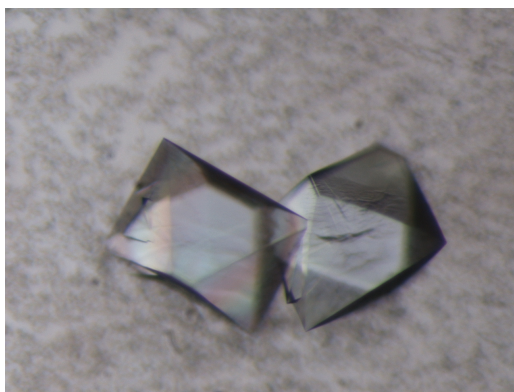


図 3.5. Y91F の結晶写真 大きさは 0.4 mm 程度

### 3.3 X線回折実験および立体構造の決定

得られた結晶を、高エネルギー加速器研究機構放射光実験施設のビームラインにて回折実験を行った。測定したデータから質が良いものを選んで構造精密

化を行った。

### 3.3.1 方法

結晶は全て、クライオグループにてドロップからすくい出し、抗凍結剤として用いたPEPFオイルFomblin Y(メルク株式会社)に浸漬した。再度、クライオグループですくい、回折装置にセットし、 $-173^{\circ}\text{C}$ の窒素ガスで凍結し回転法にて測定した。複合体構造の解析には、 $1\text{ mM } O^6\text{-メチル-2'-デオキシグアノシン}$ (以下 $O^6\text{-mdG}$ , Berry & Associates)を加えたりザーバ溶液に結晶を $10\text{ min}$ 〜 $3\text{ hr}$ 浸し、その後、抗凍結剤処理し、凍結して回転法にて測定した。結晶化条件および測定条件は、表 5.4 に示す。

測定したデータはプログラムパッケージ *XDS*[12] を用いて、積分処理した。積分済みデータは、回折データの質を評価するため、また、タンパク質以外の電子密度の存在を確認するため、バッチ処理により一括してリスト 5.3 から 5.13 に示す処理を順に行い、比較した。これらのプログラムはプログラムパッケージ Collaborative Computational Project Number 4(CCP4)[13] を利用した。

一連の流れを示す。*XDS* の指数付けされた強度ファイルから、プログラム *Pointless*[14][15] を用い、空間群 (Laue グループ) を決定した (リスト 5.3)。つづいて、プログラム *Aimless*[16] にて1回目のスケーリングを行った (リスト 5.4)。この結果から、最外殻の  $R_{\text{merge}}$  が  $0.2$  以下になる分解能を確認し、再び *Aimless* にて、その分解能以下のデータで2回目のスケーリングを行った (リスト 5.5)。プログラム *Truncate*[17] にて強度データ ( $I$ ) を振幅 ( $F$ ) に変換し (リスト 5.6)、一旦構造因子情報をテキストファイルに出力した (リスト 5.7)。出力

したファイルから、格子定数、空間群、分解能範囲を取り出し、それを元に空の反射データファイルを作成した (リスト 5.8)。そのファイルに一旦、FreeR[18] フラグ情報を付加し (リスト 5.9)、リスト 5.6 で得られたファイルと統合した (リスト 5.10)。そのファイルの FreeR フラグ情報を完成させ (リスト 5.11)、最終的な構造因子ファイルとした。PDB ID 1WRJ(セレノメチオニンを用いた単波長異常分散法で構造決定した StoMGMT) を探索座標として用いて、プログラム *MOLREP*[19] で分子置換法により初期位相を決定した (リスト 5.12)。決定した構造を、プログラム *Refmac5*[20] にて初期精密化および電子密度マップを計算した (リスト 5.13)。

測定データのうち、データを選んで構造精密化を行った。CCP4 上のグラフィカルインターフェイスである *CCP4i*[21] を用いて精密化および電子密度の計算は *Refmac5* で行い、モデルの構築および妥当性の確認はプログラム *Coot*[22] で行った。

### 3.3.2 結果

回折データの測定結果を表 5.7 に示す。空間群は何れも  $P2_12_12_1$  であった。これらのデータのうち、基質ポケット部位にリガンド等の電子密度が現れた条件を表 3.3 に示す。表中の -Me は Cys120 がメチル化されていること、-SO<sub>3</sub> は Cys120 が酸化されていることを示す。*O*<sup>6</sup>-メチルグアニン、*O*<sup>6</sup>-mdG は基質ポケット部分にそれぞれ *O*<sup>6</sup>-メチルグアニン、*O*<sup>6</sup>-mdG の電子密度が現れたことを示している。

精密化の結果を表 3.4 に示す。また、Ramachandran plot を図 3.6 に示す。

表 3.3. 基質ポケット部分にリガンド等の電子密度が現れた条件

条件番号	リガンド等	条件番号	リガンド等
4	$O^6$ -mdG	27	-SO <sub>3</sub>
5	$O^6$ -メチルグアニン	28	-SO <sub>3</sub>
6	$O^6$ -メチルグアニン	29	-SO <sub>3</sub>
7	$O^6$ -mdG	30	-SO <sub>3</sub>
20	-Me	31	-SO <sub>3</sub>
21	-SO <sub>3</sub>	32	-SO <sub>3</sub>
22	-SO <sub>3</sub>	33	-SO <sub>3</sub>
23	-SO <sub>3</sub>	34	-SO <sub>3</sub>
24	-SO <sub>3</sub>	35	-SO <sub>3</sub>
25	-SO <sub>3</sub>	36	-SO <sub>3</sub>
26	-SO <sub>3</sub>	39	$O^6$ -mdG

outlier region に該当する残基はなかった。allowed region の Asn19, Asp38, Lys99, Thr100, Val114, Leu116, Ser133 はいずれもターン部分に位置する残基のため、問題はない。C120S の Cys31 は以下で述べるマルチコンフォメーションのジスルフィド結合を形成しており、電子密度マップと一致していた (図 3.6d)。

これらの座標データおよび構造因子データは Protein Data Bank[23] に登録

表 3.4. 精密化の結果

	WILD	WILD <sup>m</sup>	C120S	C120S:: <i>O</i> <sup>6</sup> -mdG	Y91F	Y91FC120S	Y91FC120S:: <i>O</i> <sup>6</sup> -mdG
条件番号	16	20	14	4	22	45	39
PDB ID	7DKN	7DQR	7CSM	7E1 P	7DQT	7D4V	7DQQ
分解能 (Å)	40.05-1.79	39.99-1.74	38.11-1.25	30.86-1.63	30.94-1.13	39.96-1.78	38.24-2.60
最外殻分解能 (Å)	(1.84-1.79)	(1.79-1.74)	(1.28-1.25)	(1.67-1.63)	(1.16-1.13)	(1.83-1.78)	(2.67-2.60)
全領域							
反射数 (work)	15164	16613	44110	20232	59597	15427	5274
反射数 (test)	726	893	2184	949	2959	656	265
最終 $R_{\text{cryst}}$	0.180	0.189	0.169	0.183	0.171	0.206	0.191
最終 $R_{\text{merge}}$	0.219	0.226	0.192	0.223	0.197	0.245	0.284
最外殻							
反射数 (work)	976	1136	2999	1378	4032	1044	382
反射数 (test)	47	61	154	80	221	61	10
最終 $R_{\text{cryst}}$	0.18	0.19	0.184	0.194	0.19	0.217	0.24
最終 $R_{\text{merge}}$	0.183	0.24	0.221	0.229	0.218	0.275	0.389
CruickhankDPI	0.1281	0.1194	0.0444	0.0975	0.0346	0.1336	-
水素以外の原子数							
タンパク質	1207	1215	1243	1221	1235	1186	1195
イオン (SO <sub>4</sub> )	10	5	5	5	5	5	0
リガンド ( <i>O</i> <sup>6</sup> -mdG)	0	0	0	20	0	0	20
水	106	100	229	145	208	55	41
合計	1323	1320	1477	1391	1448	1246	1256
根 2 乗平均変位							
結合 (Å)	0.011	0.013	0.018	0.013	0.018	0.012	0.008
角度 (°)	1.689	1.866	2.095	1.898	2.176	1.748	1.571
平均温度因子 (Å <sup>2</sup> )							
タンパク質	18.2	22.9	13.2	19.6	11.7	29.8	1195
イオン (SO <sub>4</sub> )	55.0	39.4	20.5	43.8	15.9	67.9	0.0
リガンド ( <i>O</i> <sup>6</sup> -mdG)	-	-	-	24.2	-	-	58.2
Ramachandran plot							
臨まれる領域 (%)	95.9	96.6	95.4	95.3	96.7	96.6	96.6
許される領域 (%)	4.1	3.4	4.6	4.7	3.3	3.4	3.4

した。

C末端の一部の残基 (Val150-Lys156) を除いて、ほぼすべてのアミノ酸残基が最終モデルに割り当てられた (図 3.7a)。StoMGMT の N 末端ドメイン (NTD) は、3本の  $\beta$  ストランドからなる逆平行の  $\beta$  シートと、相互に連結した1本の折り返しヘリックス (2本の  $3_{10}$  ヘリックスと1本の  $\alpha$  ヘリックスからなる h1-H3) で構成されていた。この  $\beta$  シートは、 $\beta 3$  の Asp27 と h1 の Glu33 の間のループを介して h1 とつながっていた。このループ領域内には、ジスルフィド結合を形成する2つのシステイン残基 Cys29 と Cys31 が存在し、2つの異なるコンフォメーションを示していた。溶媒にさらされている H3 ヘリックスは、 $\beta 1$  鎖に沿って配置されており、C末端ドメイン (CTD) は Lys56 と Phe69 の間の領域からなる連結ループを介して NTD に接続されていた。H5 と H6 のヘリックスは DNA のマイナーグループに結合する HTH モチーフから構成されていた。CTD と  $\beta 5$  鎖の間にある短い H7 ヘリックスには、保存された PCHRV モチーフの触媒作用を持つ Cys120 残基が含まれていた。CTD の最後の H9 ヘリックスは、Y91F の結晶構造と C120S の結晶構造を除き、どの構造にも見られなかった。

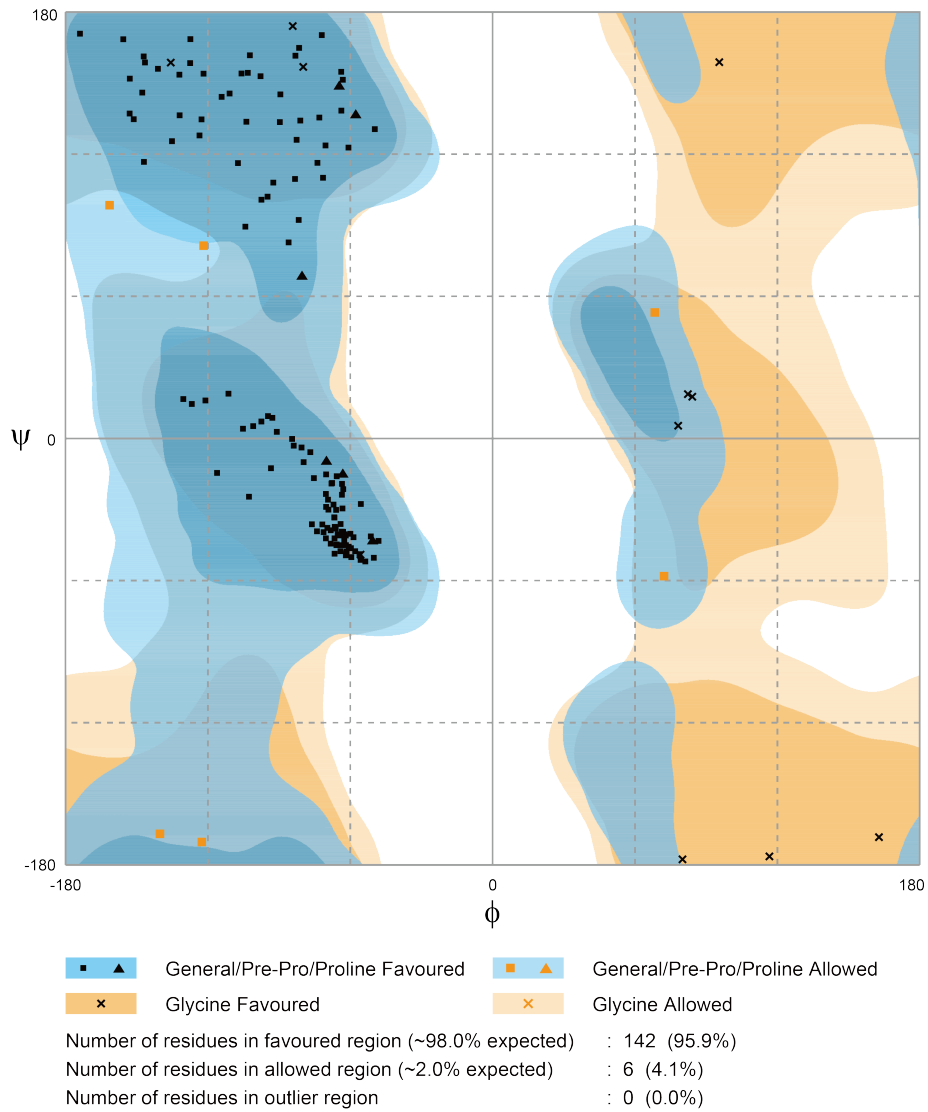
WILD の結晶構造には2つの硫酸イオンが見られた。1つ目は WILD の結晶構造にのみ見られ、Glu126 と Lys127 の主鎖の N 原子に水素結合で結合していた (図 3.9)。2つ目の硫酸イオンは、Y91FC120S:: $O^6$ -mdG の結晶構造を除く全ての結晶構造でも見られ、Met1 の N と隣の分子の Arg75 と Lys99 の側鎖からなる正電荷の鞍部に見られた (図 3.10a~3.10f)。

変異体の結晶の構造は予想通りだった。Y91F の結晶構造では Tyr91 の水酸



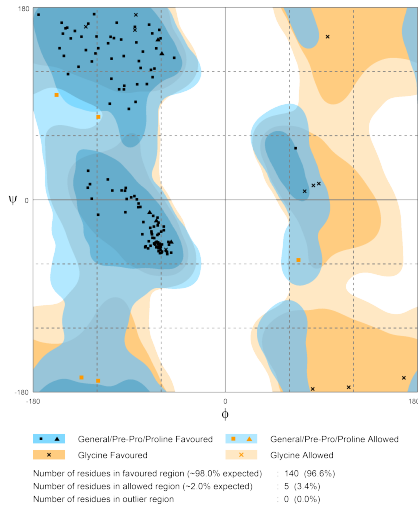
基の電子密度が観測されなかった (図 3.8e)。C120S の結晶構造では Cys120 の硫黄原子が酸素原子に置換されてセリンになっており (図 3.8c), Y91FC120S の結晶構造の結晶では 2 つの変異が同時に起こっていた (図 3.8f)。野生型と新しい変異体の個々の構造の間の二乗平均変位 (RMSD) は、主鎖の全原子で平均  $0.24(\pm 0.14)$  Å, タンパク質の全原子で平均  $0.93(\pm 0.26)$  Å であった。これらの結晶構造は、変異した部分を除いてほとんど構造変化が見られなかった。

WILD<sup>m</sup> の結晶構造では、活性部位の Cys120 残基の  $\gamma$  位の硫黄原子にメチル基が結合していた。しかし、この結晶構造では、 $O^6$ -mdG や 2' -デオキシグアノシン (dG) の電子密度は観測されなかった (図 3.8b)。一方、C120S:: $O^6$ -mdG の結晶構造では、メチル基がタンパク質に転移することなく、 $O^6$ -mdG の電子密度が得られた。また、 $O^6$ -mdG の塩基部分の 3 位の N 原子と Tyr91 の水酸基が水素結合していた (図 3.8d)。Y91FC120S:: $O^6$ -mdG の結晶構造でも、メチル基がタンパク質に転移していない  $O^6$ -mdG の電子密度が示された (図 3.8g)。しかし、Y91F を  $O^6$ -mdG 溶液に浸しても、Y91F の結晶構造には  $O^6$ -mdG や dG の電子密度は見られなかった (図 3.8e)。

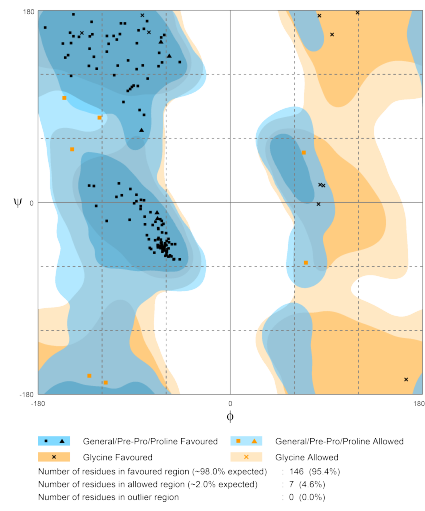


(a) WILD の結晶構造

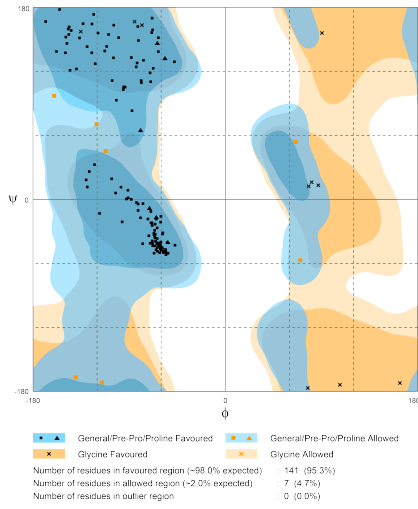
図 3.6. Ramachandran plot[24]



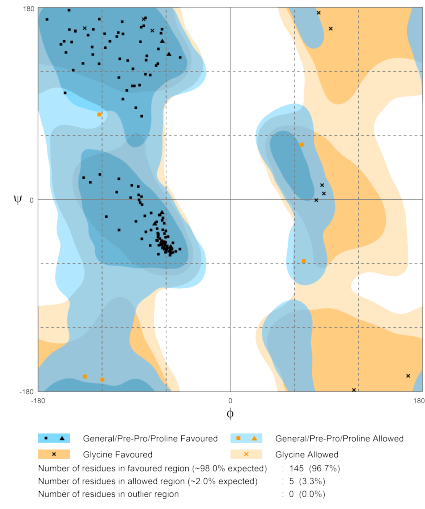
(c) WILD<sup>m</sup> の結晶構造



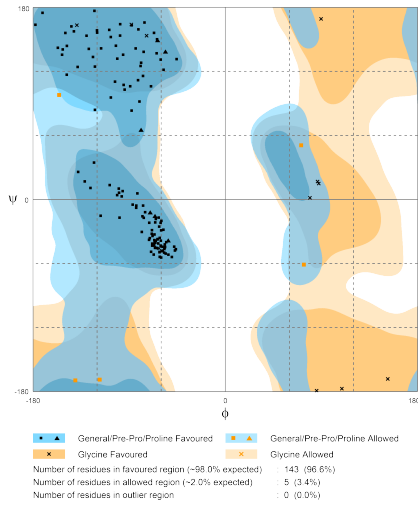
(d) C120S の結晶構造



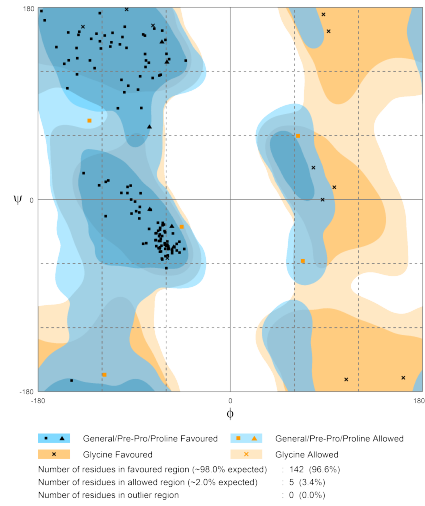
(e) C120S::O<sup>6</sup>-mdG の結晶構造



(f) Y91F の結晶構造

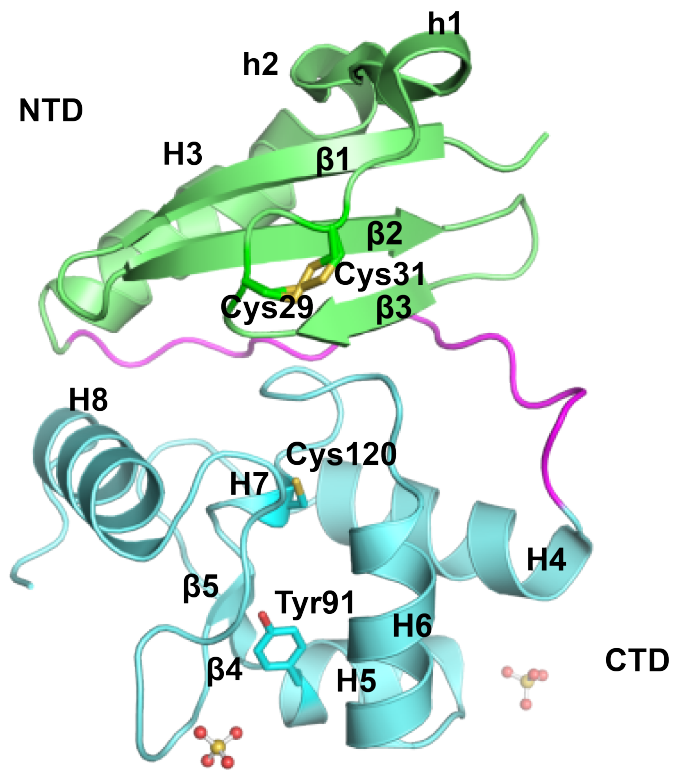


(g) Y91FC120S の結晶構造



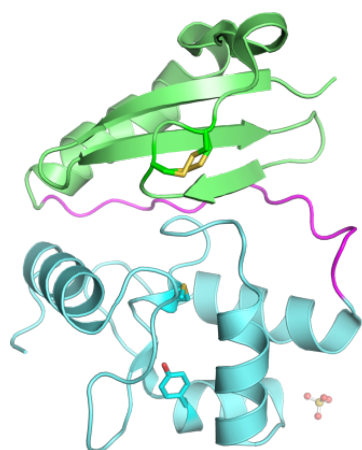
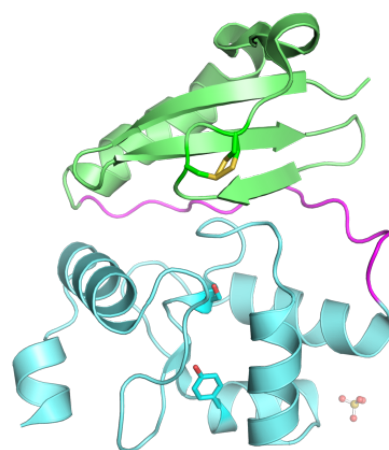
(h) Y91FC120S::O<sup>6</sup>-mdG の結晶構造

図 3.6. Ramachandran plot(続き)

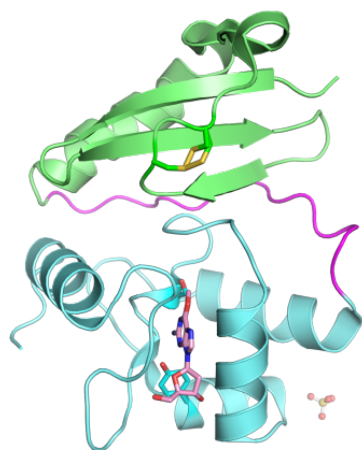
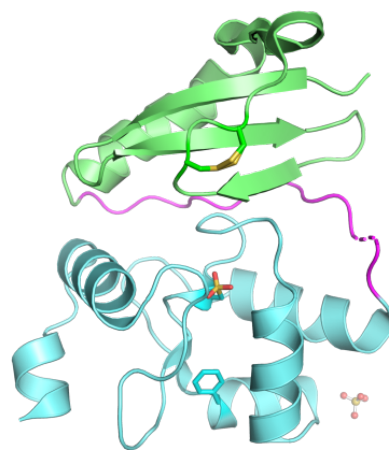


(a) WILD の結晶構造

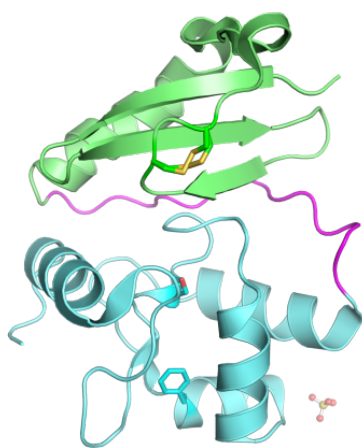
図 3.7. 全体構造のリボン図 NTD をシアンで、コネクテッドループをマゼンタ、CTD を緑で表している。黄色はジスルフィド結合，ボール&スティックは硫酸イオンを示している。

(c) WILD<sup>m</sup> の結晶構造

(d) C120S の結晶構造

(e) C120S::O<sup>6</sup>-mdG の結晶構造

(f) Y91F の結晶構造



(g) Y91FC120S の結晶構造

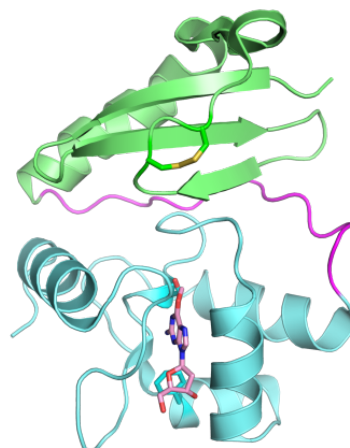
(h) Y91FC120S::O<sup>6</sup>-mdG の結晶構造

図 3.7. 全体構造のリボン図 (続き)

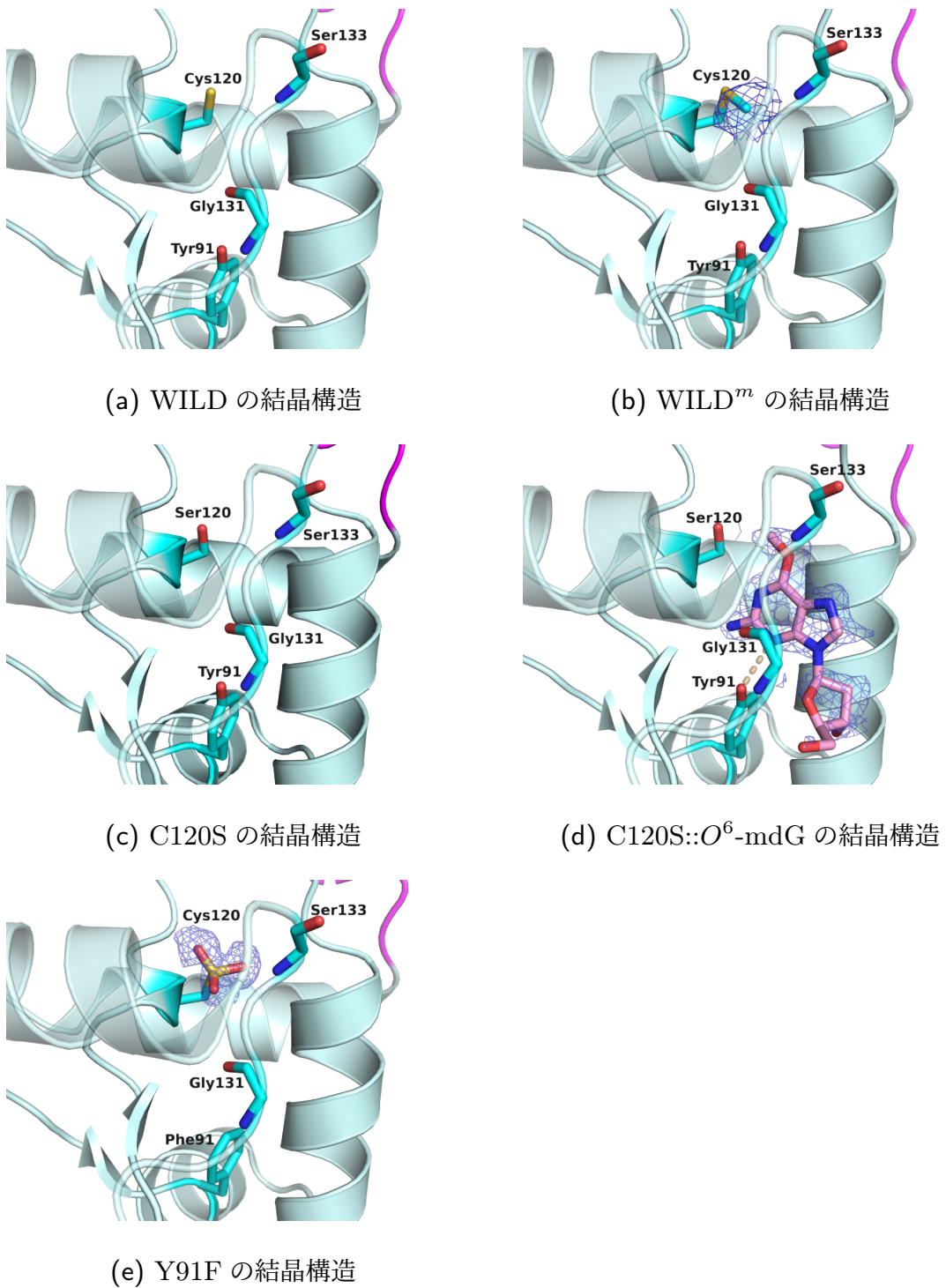
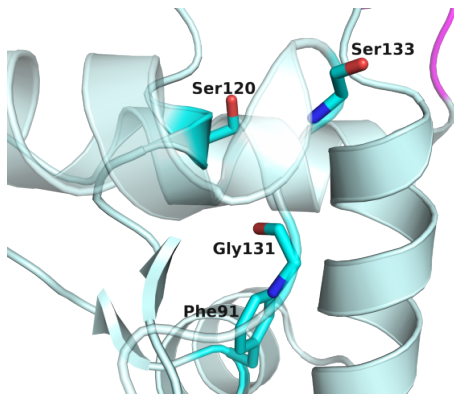
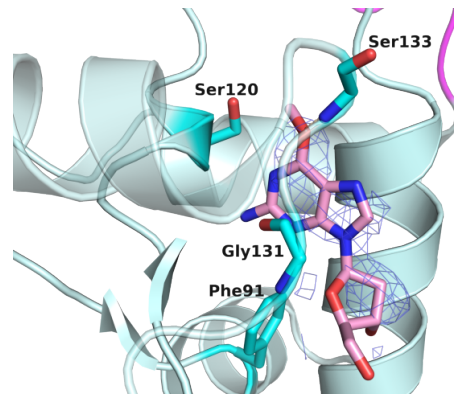


図 3.8. 活性部位



(f) Y91FC120S の結晶構造



(g) Y91FC120S::O<sup>6</sup>-mdG の結晶構造

図 3.8. 活性部位 (続き)

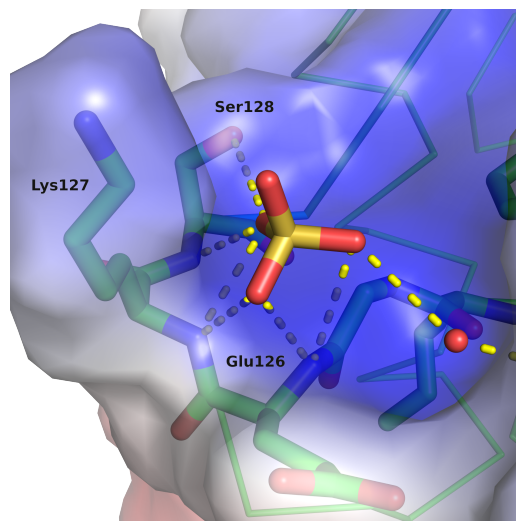
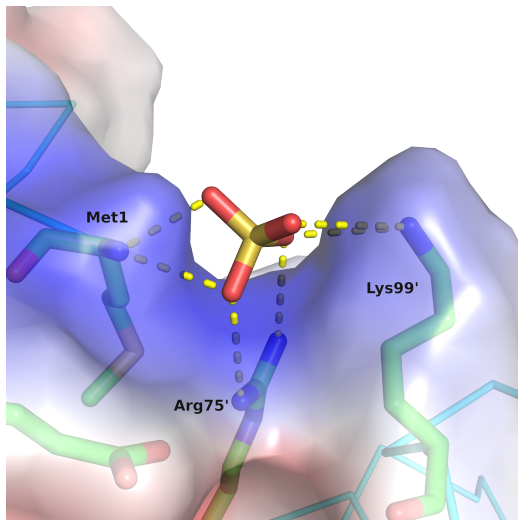
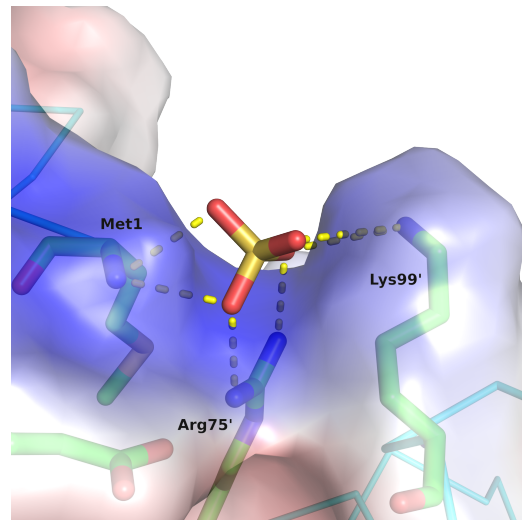


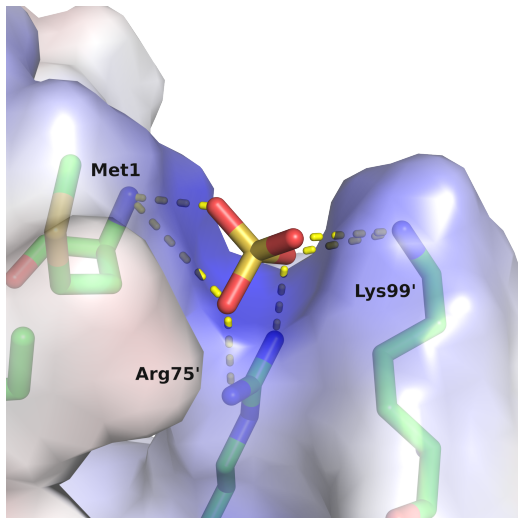
図 3.9. WILD の結晶構造の HTH 部位に見つかった硫酸イオン



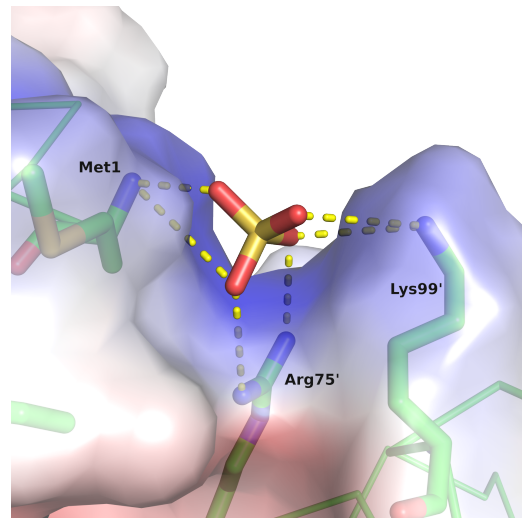
(a) WILD の結晶構造



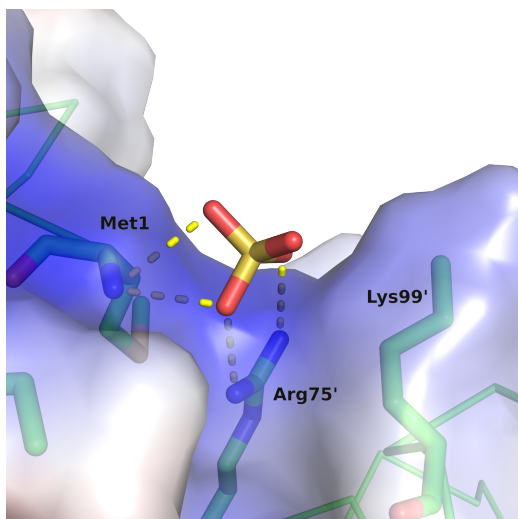
(b) WILD<sup>m</sup> の結晶構造



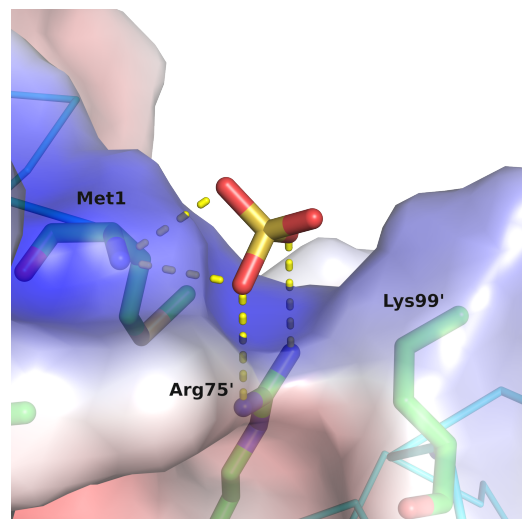
(c) C120S の結晶構造



(d) C120S::O<sup>6</sup>-mdG の結晶構造



(e) Y91F の結晶構造



(f) Y91FC120S の結晶構造

図 3.10. 分子間に見つかった硫酸イオン



### 3.4 考察

種を超えた MGMT の CTD は非常によく似ているが, NTD はかなり変化している (図 5.1, 表 3.5)。

表 3.5. StoMGMT と他の生物種で構造既知の MGMT のアミノ酸配列の比較

生物種	相同性
<i>Homo sapiens</i> [5][25][26][27]	43 %
<i>Pyrococcus kodakaraensis</i> [28]	41 %
<i>Escherichia coli</i> [29]	31 %
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> [30][31]	35 %
<i>Saccharolobus solfataricus</i> [32][33][34]	68 %

NTD ドメインに存在するジスルフィド結合は, *S. solfataricus* の MGMT にも存在するもので, 好熱性タンパク質の特徴であり, 熱安定性に必要なものである [32]。興味深いことに, MGMT のこのジスルフィド結合の多様なコンフォメーションは *S. tokodaii* に特有のものであるが, その正確な理由は不明である。StoMGMT の最も類似したオルソログである *S. solfataricus* の MGMT でさえ, ジスルフィド結合のこのような複数のコンフォメーションは見られない。

WILD の結晶構造に見られる 1 つ目の硫酸イオンは, 基質の活性ポケットに隣接しており, DNA のリン酸基の位置を模倣していると考えられる。2 つ目の硫酸イオン周囲の 2 つの塩基性アミノ酸は, 他の生物種の MGMT との比較か

ら、DNA 結合に関与する側鎖であると考えられる [32]。また、2 つの分子をつなぐ硫酸イオンは、結晶構造を維持するためのアーティファクトである可能性がある。

C120S:: $O^6$ -mdG の結晶構造と Y91FC120S:: $O^6$ -mdG の結晶構造の結晶構造におけるグアニン塩基部分の位置は、*S. solfataricus* 由来の MGMT の Cys119 と基質 DNA の位置と同じであるように見える。両者の構造で、このアミノ酸とグアニン部分の重ね合わせの RMSD は約 0.18 だった。つまり、今回の  $O^6$ -mdG は、基質の位置を再現したとみなすことができる。当初、Tyr91 の水酸基が DNA のメチル化塩基部分を活性部位に位置づけるために必要であると考えていた。C120S:: $O^6$ -mdG の結晶構造では、Tyr91 の水酸基とプリン塩基の N3 との間に水素結合が観察された。Y91FC120S:: $O^6$ -mdG の結晶構造では、結合している  $O^6$ -mdG の電子密度が曖昧で、温度因子も高く、さらに、分解能も他の構造に比べて低い。したがって、Tyr91 の水酸基は、基質の結合の安定化に寄与しているのかもしれない。しかし、Y91FC120S:: $O^6$ -mdG の結晶構造の結晶構造は、基質の塩基が結合ポケットに入るためには、Tyr91 の水酸基の存在は必須ではないことを示唆している。WILD<sup>m</sup> の結晶構造では、メチル基を失った dG の電子密度が不足していることから、メチル基を失った基質は速やかに酵素から取り除かれることを示唆している。

以前の研究では、Tyr91 の水酸基が負の電荷を減らすことで、修復されたグアニンを安定化させる可能性が報告されている [5]。システインの S 原子は求核性が高く、メチル基は  $S_N2$  反応によって容易にシステインに転位する [29]。Y91F では、追加の操作を行っていないにもかかわらず、Cys120 のチオール基が、3

つの O 原子が結合したスルホ基 (Cys-SO<sub>3</sub>H) に変換されていた。これは、発現したタンパク質のシステインが何らかの物質によって酸化されたことを意味する。この場合、酸化されたシステインは反応の求核剤として機能しないため、酵素は不活性となる。O<sup>6</sup>-mdG に浸した Y91F には dG やメチル基の電子密度が観察されず、WILD では酸化されなかったことから、Tyr91 の水酸基がその大きさや電荷によって酸化剤の活性部位への侵入を妨げたのではないかと推測している。このことから、種を超えて HTH モチーフの N 末端に高度に保存されているチロシンの役割は、一度しか働けない自殺酵素である MGMT の活性部位を保護することではないかと考えられる。しかし、タンパク質の特定の変異がその機能に影響を与えるかどうかを決定するには、生理学的な背景が重要な役割を果たすため、これらの StoMGMT 変異体における Tyr91 の役割の明確な証明、および Cys120 の酸化からの保護は *in vivo* での研究によってのみ可能となるだろう。

## 第4章

### 結語

結論として、*S. tokodaii* 由来の MGMT の WILD および Y91F, C120S, Y91FC120S の結晶構造から、チロシンの水酸基は、酸化剤が活性部位に入るのを防ぐことで MGMT の保護的役割を果たしている可能性が明らかになった。今回の結果は、保存されたアミノ酸を多く含むことが、酵素活性の促進に加えて、自殺酵素の完全性の確保にも一役買っているという分子メカニズムの解明に向けた、今後の研究の枠組みを提供するものと考えられる。

## 第5章

# 付録

各章の図表の一部を付録として掲載する。

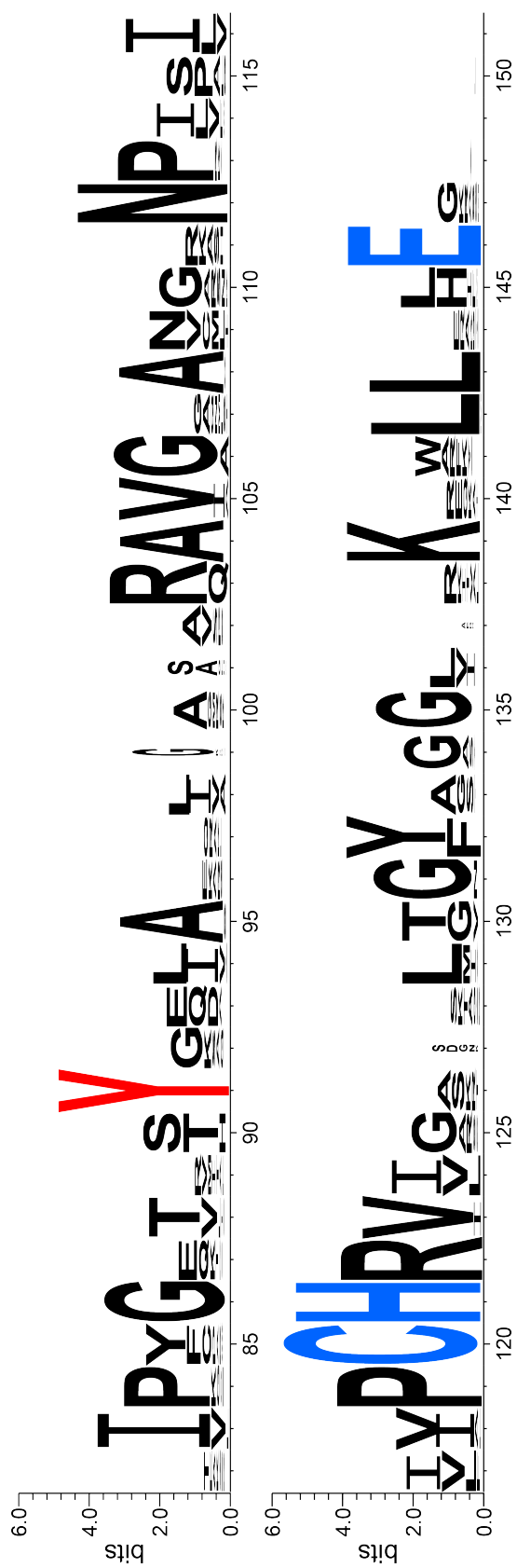


図 5.1. 生物種間の MGMT のアミノ酸配列の比較 UniProtKB[35] にて見つかった MGMT のアミノ酸配列を Clustal Omega[36] でアライメント後, weblogo で処理した。



```

14 elecmap protein_wild.e.map
15 desolvmap protein_wild.d.map
16 move o6m_guanosine_pp.pdbqt
17 about -2.5572 -3.0145 -0.0977
18 tran0 random
19 quaternion0 random
20 dihe0 random
21 torsdof 10
22 rmstol 2.0
23 extnrg 1000.0
24 e0max 0.0 10000
25 ga_pop_size 150
26 ga_num_evals 250000
27 ga_num_generations 27000
28 ga_elitism 1
29 ga_mutation_rate 0.02
30 ga_crossover_rate 0.8
31 ga_window_size 10
32 ga_cauchy_alpha 0.0
33 ga_cauchy_beta 1.0
34 set_ga
35 sw_max_its 300
36 sw_max_succ 4
37 sw_max_fail 4
38 sw_rho 1.0
39 sw_lb_rho 0.01
40 ls_search_freq 0.06
41 set_psw1
42 unbound_model bound
43 ga_run 100
44 analysis
# electrostatics map
# desolvation map
# small molecule
# small molecule center
# initial coordinates/A or random
# initial orientation
# initial dihedrals (relative) or random
# torsional degrees of freedom
# cluster_tolerance/A
# external grid energy
# max initial energy; max number of retries
# number of individuals in population
# maximum number of energy evaluations
# maximum number of generations
# number of top individuals to survive to next generation
# rate of gene mutation
# rate of crossover
#
# Alpha parameter of Cauchy distribution
# Beta parameter Cauchy distribution
# set the above parameters for GA or LGA
# iterations of Solis & Wets local search
# consecutive successes before changing rho
# consecutive failures before changing rho
# size of local search space to sample
# lower bound on rho
# probability of performing local search on individual
# set the above pseudo-Solis & Wets parameters
# state of unbound ligand
# do this many hybrid GA-LS runs
# perform a ranked cluster analysis

```

リスト 5.2. wild-o6m\_guanosine\_pp.dpf: ドッキングパラメータファイル 野生型酵素と mP-O<sup>6</sup>-mdG-mP のドッキングパラメータファイル。



表 5.1. 変異体の構築に用いたプライマー配列

作成プラスミド	オリジナルプラスミド	変異箇所	forward primer	reverse primer
pET-11a-Y91F	pET-11a-Wild	Y91F	5'-GGGGTGAGGTAAGGACTTTCAGCAAGTGGC-3'	5'-GCCACTTGGCTTGAAGTCCTTCACTCACCCC-3'
pET-11a-C120S	pET-11a-Wild	C120S	5'-CCATCTCATAGGGTTATAGGAGAAAAGCTTAGGTGG-3'	5'-CCACCTAAGCTTTTTTCTCCTATAACCGTATGAGATGG-3'
pET-11a-Y91F/C120S	pET-11a-Y91F	Y91F/C120S	5'-CCATCTCATAGGGTTATAGGAGAAAAGCTTAGGTGG-3'	5'-CCACCTAAGCTTTTTTCTCCTATAACCGTATGAGATGG-3'

下線部分が塩基変位を入れる部分

```
1  #!/bin/bash
2
3  dir_path="/home/makiko/Umibo-ikkatsu/*"
4  command="/home/xtal/ccp4-7.0/bin/pointless"
5  dirs='find $dir_path -maxdepth 0 -type d'
6  task="1_pointless"
7
8  for dir in $dirs;
9  do
10     echo $dir
11     cd $dir
12     $command \
13     HKLOUT ${task}.mtz \
14     XMLOUT ${task}.xml \
15     <<_EOT_ | tee ${task}.log
16     NAME PROJECT umibo CRYSTAL umibo DATASET P
17     XDSIN XDS_ASCII.HKL
18     _EOT_
19     cd ..
20 done
```

リスト 5.3. 1-pointless.sh: 空間群の決定

```
1  #!/bin/bash
2
3  dir_path="/home/makiko/Umibo-ikkatsu/*"
4  command="/home/xtal/ccp4-7.0/bin/aimless"
5  dirs='find $dir_path -maxdepth 0 -type d'
6  task="2_aimless"
7  pre_task="1_pointless"
8
9  for dir in $dirs;
10 do
11     echo $dir
12     cd $dir
13     $command \
14     HKLIN ${pre_task}.mtz \
15     HKLOUT ${task}.mtz \
16     SCALES ${task}.scales \
17     ROGUES ${task}_rogues.log \
18     NORMPLOT ${task}_normplot.xmgr \
19     ANOMPLOT ${task}_anomplot.xmgr \
20     CORREL PLOT ${task}_correlplot.xmgr \
21     ROGUEPLOT ${task}_rogueplot.xmgr \
22     XMLOUT ${task}.xml \
23     <<_EOT_ | tee ${task}.log
24     output &
25     mtz MERGED
26     _EOT_
27     cd ..
28 done
```

リスト 5.4. 2-aimless.sh:1 回目のスケーリング

```
1  #!/bin/bash
2
3  dir_path="/home/makiko/Umibo-ikkatsu/*"
4  command="/home/xtal/ccp4-7.0/bin/aimless"
5  command_xml="xmllint"
6  dirs='find $dir_path -maxdepth 0 -type d'
7  task="2_aimless2"
8  preAim_task="2_aimless"
9  pre_task="1_pointless"
10
11  xmlex() {
12      $command_xml --xpath "$@" ${preAim_task}.xml
13  }
14
15  for dir in $dirs;
16  do
17      echo $dir
18      cd $dir
19      array=( `xmlex '/AIMLESS/CCP4Table[10]/data[1]/
20              text()'` )
21      br=1
22      for ((i=1;i<=${#array[@]}/17;i++));
23      do
24          if [ `echo "${array[(i-1)*17+3]} <= 0.2" | bc
25              ` == 1 ];
26          then
27              res=${array[(i-1)*17+2]}
28          else
29              echo ${res}
30              br=0
31              break
32          fi
33      done
34      if [ ${br} == 1 ]; then
35          echo ${res}
36      fi
37
38      $command \
39      HKLIN ${pre_task}.mtz \
40      HKLOUT ${task}.mtz \
41      SCALES ${task}.scales \
42      ROGUES ${task}_rogues.log \
43      NORMPLOT ${task}_normplot.xmgr \
44      ANOMPLOT ${task}_anomplot.xmgr \
45      CORRELPLOT ${task}_correlplot.xmgr \
46      ROGUEPLOT ${task}_rogueplot.xmgr \
47      XMLOUT ${task}.xml \
48      <<_EOT_ | tee ${task}.log
49      resolution &
50          low 50.0 &
51          high ${res}
52      output &
53          mtz MERGED
54      _EOT_
55      cd ..
```

54 done

リスト 5.5. 2-aimless2.sh: 最外殻の  $R_{merge}$  が 0.2 以下になるように分解能でカットしてスケーリング

```
1  #!/bin/bash
2
3  dir_path="/home/makiko/Umibo-ikkatsu/*"
4  command="/home/xtal/ccp4-7.0/bin/ctruncate"
5  dirs='find $dir_path -maxdepth 0 -type d'
6  task="3_truncate"
7  pre_task="2_aimless2"
8
9  for dir in $dirs;
10 do
11     echo $dir
12     cd $dir
13     $command \
14 -hklin ${pre_task}.mtz \
15 -hklout ${task}.mtz \
16 -colin "/*/*/[IMEAN,SIGIMEAN]" \
17 -colano "/*/*/[I(+),SIGI(+),I(-),SIGI(-)]" \
18 -colout P \
19 -xmlout ${task}.xml \
20 | tee ${task}.log
21     cd ..
22 done
```

リスト 5.6. 3-truncate.sh: 強度 ( $I$ ) を振幅 ( $F$ ) へ変換

```
1  #!/bin/bash
2
3  dir_path="/home/makiko/Umibo-ikkatsu/*"
4  command="/home/xtal/ccp4-7.0/bin/mtzdump"
5  dirs='find $dir_path -maxdepth 0 -type d'
6  task="4_mtzdump"
7  pre_task="3_truncate"
8
9  for dir in $dirs;
10 do
11     echo $dir
12     cd $dir
13     $command \
14 HKLIN ${pre_task}.mtz \
15 <<_EOT_ | tee ${task}.log
16 NREF 0
17 SYMMETRY
18 END
19 _EOT_
20     cd ..
21 done
```

リスト 5.7. 4-mtzdump.sh: 構造因子情報の出力

```

1  #!/bin/bash
2
3  dir_path="/home/makiko/Umibo-ikkatsu/*"
4  command="/home/xtal/ccp4-7.0/bin/unique"
5  dirs='find $dir_path -maxdepth 0 -type d'
6  task="5_unique"
7  pre_task="4_mtzdump"
8
9  for dir in $dirs;
10 do
11     echo $dir
12     cd $dir
13 # Get Parameters
14 cell='grep -A 2 Cell ${pre_task}.log | tail -1'
15 symmetry='awk -F\' \' /Space Group/{print $2}' ${pre_task}
16 resolution='grep -A 2 'Resolution Range' ${pre_task}.log
17 #
18     $command \
19 HKLOUT ${task}.mtz \
20 <<_EOT_ | tee ${task}.log
21 CELL ${cell}
22 SYMMETRY '${symmetry}'
23 LABOUT F=FUNI SIGF=SIGFUNI
24 RESOLUTION ${resolution}
25 _EOT_
26     cd ..
27 done

```

リスト 5.8. 5-unique.sh: 指定分解能までの空の反射データの作成

```

1  #!/bin/bash
2
3  dir_path="/home/makiko/Umibo-ikkatsu/*"
4  command="/home/xtal/ccp4-7.0/bin/freerflag"
5  dirs='find $dir_path -maxdepth 0 -type d'
6  task="6_freerflag"
7  pre_task="5_unique"
8
9  for dir in $dirs;
10 do
11     echo $dir
12     cd $dir
13     $command \
14 HKLIN ${pre_task}.mtz \
15 HKLOUT ${task}.mtz \
16 <<_EOT_ | tee ${task}.log
17 FREERFRAC 0.05
18 END
19 _EOT_
20     cd ..
21 done

```

リスト 5.9. 6-freerflag.sh: FreeR flag を追加

```
1  #!/bin/bash
2
3  dir_path="/home/makiko/Umibo-ikkatsu/*"
4  command="/home/xtal/ccp4-7.0/bin/cad"
5  dirs='find $dir_path -maxdepth 0 -type d'
6  task="7_cad"
7  pre2_task="6_freerflag"
8  pre_task="3_truncate"
9
10 for dir in $dirs;
11 do
12     echo $dir
13     cd $dir
14     $command \
15 HKLIN2 ${pre2_task}.mtz \
16 HKLIN1 ${pre_task}.mtz \
17 HKLOUT ${task}.mtz \
18 <<_EOT_ | tee ${task}.log
19 LABI FILE 2 E1=FreeR_flag
20 LABI FILE 1 ALLIN
21 END
22 _EOT_
23     cd ..
24 done
```

リスト 5.10. 7-cad.sh:mtz ファイルの統合

```
1  #!/bin/bash
2
3  dir_path="/home/makiko/Umibo-ikkatsu/*"
4  command="/home/xtal/ccp4-7.0/bin/freerflag"
5  dirs='find $dir_path -maxdepth 0 -type d'
6  task="8_freerflag"
7  pre_task="7_cad"
8
9  for dir in $dirs;
10 do
11     echo $dir
12     cd $dir
13     $command \
14 HKLIN ${pre_task}.mtz \
15 HKLOUT ${task}.mtz \
16 <<_EOT_ | tee ${task}.log
17 COMPLETE FREE=FreeR_flag
18 END
19 _EOT_
20     cd ..
21 done
```

リスト 5.11. 8-freerflag.sh:FreeR flag の完成

```

1  #!/bin/bash
2
3  dir_path="/home/makiko/Umibo-ikkatsu/*"
4  command="/home/xtal/ccp4-7.0/bin/molrep"
5  dirs='find $dir_path -maxdepth 0 -type d'
6  task="9_molrep"
7  taskno="9"
8  pre_task="8_freerflag"
9
10 for dir in $dirs;
11 do
12     echo $dir
13     cd $dir
14     type='echo $dir | awk -F/ '{print $5}' | awk -F-
15         '{print $1}' | sed -e 'y/csyfwild/CSYFWILD/'
16     $command \
17     -po ${taskno}_ \
18     -ps ${taskno}_ \
19     -i \
20     <<_EOT_ | tee ${task}.log
21     labin F=F_P SIGF=SIGF_P
22     file_f ${pre_task}.mtz
23     file_m /home/makiko/1wrj.pdb
24     file_s /home/makiko/umibo${type}.fasta
25     _EOT_
26     cd ..
27 done

```

## リスト 5.12. 9-molrep.sh: 分子置換法の実施

```

1  #!/bin/bash
2
3  dir_path="/home/makiko/Umibo-ikkatsu/*"
4  command="/home/xtal/ccp4-7.0/bin/refmac5"
5  dirs='find $dir_path -maxdepth 0 -type d'
6  task="10_refmac"
7  pre_task="9_molrep"
8  pre2_task="8_freerflag"
9
10 for dir in $dirs;
11 do
12     echo $dir
13     cd $dir
14     $command \
15     XYZIN ${pre_task}.pdb \
16     XYZOUT ${task}.pdb \
17     HKLIN ${pre2_task}.mtz \
18     HKLOUT ${task}.mtz \
19     LIBOUT ${task}.cif \
20     <<_EOT_ | tee ${task}.log
21     make check NONE
22     make -
23     hydrogen ALL -
24     hout NO -
25     peptide NO -

```



```
26     cispeptide YES -
27     ssbridge YES -
28     symmetry YES -
29     sugar YES -
30     connectivity NO -
31     link NO
32  refi -
33     type REST -
34     resi MLKF -
35     meth CGMAT -
36     bref ISOT
37  ncyc 10
38  scal -
39     type SIMP -
40     LSSC -
41     ANISO -
42     EXPE
43  solvent YES
44  weight -
45     AUTO
46  monitor MEDIUM -
47     torsion 10.0 -
48     distance 10.0 -
49     angle 10.0 -
50     plane 10.0 -
51     chiral 10.0 -
52     bfactor 10.0 -
53     bsphere 10.0 -
54     rbond 10.0 -
55     ncsr 10.0
56  labin  FP=F_P SIGFP=SIGF_P -
57     FREE=FreeR_flag
58  labout  FC=FC FWT=FWT PHIC=PHIC PHWT=PHWT DELFWT=DELFWT
59     PHDELWT=PHDELWT FOM=FOM
59  PNAME umibo
60  DNAME P
61  RSIZE 80
62  EXTERNAL WEIGHT SCALE 10.0
63  EXTERNAL USE MAIN
64  EXTERNAL DMAX 4.2
65  END
66  _EOT_
67     cd ..
68  done
```

リスト 5.13. 10-refmac.sh: 初期精密化および電子密度マップの計算

表 5.2. 結晶化条件および測定条件

条件番号	タンパク質			結晶			ソーキング			測定条件			
	名称	濃度 mg/mL	条件	番号	物質	時間 分	ビームライン	波長 Å	回転角 °	露光時間 秒	分解能 Å	枚数	
1	C120S	8.6	#3	C120S#1	-	-	BL-5A	1.000	0.1	0.1	1.6	1800	
2	C120S	8.6	#3	C120S#1	-	-	BL-5A	1.000	0.1	1.0	1.6	1800	
3	C120S	8.6	#3	C120S#2	<i>O</i> <sup>6</sup> -mdG	30	BL-5A	1.000	0.1	0.1	1.6	1800	
4	C120S	8.6	#3	C120S#3	<i>O</i> <sup>6</sup> -mdG	60	BL-5A	1.000	0.1	0.1	1.6	1800	
5	C120S	8.6	#3	C120S#4	<i>O</i> <sup>6</sup> -メチルグアニン	30	BL-5A	1.000	0.1	0.1	1.6	1800	
6	C120S	8.6	#3	C120S#5	<i>O</i> <sup>6</sup> -メチルグアニン	60	BL-5A	1.000	0.1	0.1	1.6	1800	
7	C120S	8.6	#3	C120S#6	<i>O</i> <sup>6</sup> -mdG	120	BL-5A	1.000	0.1	0.1	1.6	1800	
8	C120S	4.3	#3	C120S#7	-	-	AR-NW12A	1.000	1.0	10.0	1.6	180	
9	C120S	4.3	#3	C120S#8	-	-	AR-NW12A	1.000	1.0	10.0	1.6	180	
10	C120S	4.3	#3	C120S#9	-	-	BL-5A	1.000	0.1	0.1	1.8	1800	
11	C120S	4.3	#3	C120S#9	-	-	BL-5A	1.000	0.1	0.5	1.8	1800	
12	C120S	4.3	#3	C120S#10	-	-	BL-5A	1.000	0.1	0.5	1.8	1800	
13	C120S	4.3	#3	C120S#11	-	-	BL-5A	1.000	1.0	1.0	1.2	180	
14	C120S	4.3	#3	C120S#11	-	-	BL-5A	1.000	0.1	0.5	1.2	1800	
15	WILD	5.2	#3	Wild#1	<i>O</i> <sup>6</sup> -mdG	30	BL-1A	1.100	0.1	0.2	1.6	1800	
16	WILD	5.2	#3	Wild#2	-	-	BL-1A	1.100	0.1	0.2	2.0	1800	
17	WILD	5.2	#3	Wild#2	-	-	BL-1A	1.100	0.1	0.2	1.6	1800	
18	WILD	5.2	#3	Wild#3	<i>O</i> <sup>6</sup> -mdG	10	BL-1A	1.100	0.1	0.2	1.6	1800	
19	WILD	5.2	#3	Wild#4	<i>O</i> <sup>6</sup> -mdG	60	BL-1A	1.100	0.1	0.2	1.6	1800	
20	WILD	5.2	#3	Wild#5	<i>O</i> <sup>6</sup> -mdG	120	BL-1A	1.100	0.1	0.2	1.6	1800	

表 5.3. 結晶化条件および測定条件

条件番号	タンパク質			結晶			ソーキング			測定条件			
	名称	濃度 mg/mL	条件	番号	物質	時間 分	ビームライン	波長 Å	回転角 °	露光時間 秒	分解能 Å	枚数	
21	Y91F	5	#1	Y91F#1	-	-	BL-5A	1.000	1.0	5.0	1.4	180	
22	Y91F	5	#1	Y91F#2	-	-	BL-5A	1.000	1.0	5.0	1.2	180	
23	Y91F	5	#1	Y91F#2	-	-	BL-5A	1.000	1.0	5.0	1.1	180	
24	Y91F	5	#2	Y91F#3	-	-	BL-5A	1.000	1.0	30.0	1.0	180	
25	Y91F	5	#2	Y91F#3	-	-	BL-5A	1.000	1.0	5.0	2.5	180	
26	Y91F	5	#3	Y91F#4	-	-	BL-5A	1.000	0.5	20.0	1.1	720	
27	Y91F	5	#3	Y91F#4	-	-	BL-5A	1.000	0.5	5.0	1.8	720	
28	Y91F	4	#2	Y91F#5	O <sup>6</sup> -mdG	0	BL-5A	1.000	0.5	1.0	1.6	360	
29	Y91F	4	#2	Y91F#5	O <sup>6</sup> -mdG	0	BL-5A	1.000	1.0	2.0	1.6	180	
30	Y91F	4	#2	Y91F#5	O <sup>6</sup> -mdG	0	BL-5A	1.000	0.1	0.2	1.6	1800	
31	Y91F	4	#2	Y91F#6	O <sup>6</sup> -mdG	30	BL-5A	1.000	0.1	0.2	1.6	1800	
32	Y91F	4	#2	Y91F#6	O <sup>6</sup> -mdG	30	BL-5A	1.000	0.1	0.5	1.6	1800	
33	Y91F	4	#2	Y91F#7	O <sup>6</sup> -mdG	60	BL-5A	1.000	0.1	0.2	1.6	1800	
34	Y91F	4	#2	Y91F#7	O <sup>6</sup> -mdG	60	BL-5A	1.000	0.1	1.0	1.6	1800	
35	Y91F	4	#2	Y91F#8	O <sup>6</sup> -mdG	120	BL-5A	1.000	0.1	1.0	1.6	1800	
36	Y91F	4	#2	Y91F#9	O <sup>6</sup> -mdG	180	BL-5A	1.000	0.1	1.0	1.6	1800	

表 5.4. 結晶化条件および測定条件

条件番号	タンパク質			結晶			ソーキング					測定条件			
	名称	濃度 mg/mL	条件	番号	物質	時間 分	ビームライン	波長 Å	回転角 °	露光時間 秒	分解能 Å	枚数			
37	Y91FC120S	10	#2	Y91FC120S#1	-	-	BL-5A	1.000	0.1	0.5	2.0	1800			
38	Y91FC120S	10	#3	Y91FC120S#2	$O^6$ -mdG	60	BL-5A	1.000	0.1	0.5	1.8	1800			
39	Y91FC120S	10	#2	Y91FC120S#3	$O^6$ -mdG	30	BL-5A	1.000	0.1	0.5	1.8	1800			
40	Y91FC120S	10	#2	Y91FC120S#4	$O^6$ -mdG	10	BL-5A	1.000	0.1	0.5	1.6	1800			
41	Y91FC120S	10	#2	Y91FC120S#5	$O^6$ -mdG	30	BL-5A	1.000	0.1	0.5	1.6	1800			
42	Y91FC120S	10	#2	Y91FC120S#6	$O^6$ -mdG	0	BL-5A	1.000	0.1	0.5	1.8	1800			
43	Y91FC120S	10	#2	Y91FC120S#7	$O^6$ -mdG	30	BL-5A	1.000	0.1	0.5	1.8	1800			
44	Y91FC120S	10	#2	Y91FC120S#8	$O^6$ -mdG	60	BL-5A	1.000	0.1	0.5	1.8	1800			
45	Y91FC120S	10	#3	Y91FC120S#9	-	-	BL-5A	1.000	0.1	0.5	1.8	1800			
46	Y91FC120S	10	#2	Y91FC120S#10	$O^6$ -mdG	120	BL-5A	1.000	0.1	0.5	1.8	1800			
47	Y91FC120S	10	#2	Y91FC120S#11	$O^6$ -mdG	120	BL-5A	1.000	0.1	0.5	1.8	1800			
48	Y91FC120S	10	#3	Y91FC120S#12	$O^6$ -mdG	0	BL-5A	1.000	0.1	0.5	1.8	1800			
49	Y91FC120S	10	#3	Y91FC120S#13	$O^6$ -mdG	30	BL-5A	1.000	0.1	0.5	1.8	1800			

表 5.5. 収集した回折データ

条件	タンパク質	格子定数			全領域				最外殻						
		a Å	b Å	c Å	R <sub>merge</sub>	I/σ	完全性 %	多重度	分解能 Å	R <sub>merge</sub>	I/σ	完全性 %	多重度	モザイク度 °	
1	C120S	48.311	53.096	61.818	48.31-1.78	0.049	22.8	99.1	6.5	1.82-1.78	0.164	9.2	98.4	6.5	0.09
2	C120S	48.326	53.161	61.875	48.33-1.53	0.028	32.6	97.8	6.4	1.56-1.53	0.170	8.1	87.5	5.7	0.10
3	C120S	48.379	52.989	61.801	48.38-1.56	0.023	39.0	100.0	6.4	1.59-1.56	0.169	8.4	100.0	5.9	0.11
4	C120S	48.330	52.687	61.654	48.33-1.63	0.023	40.0	100.0	6.4	1.66-1.63	0.159	9.7	100.0	6.6	0.10
5	C120S	48.330	52.790	61.471	48.33-1.86	0.029	37.5	100.0	6.4	1.90-1.86	0.164	9.9	100.0	6.7	0.09
6	C120S	48.288	52.810	61.512	48.29-1.67	0.038	27.7	100.0	6.4	1.70-1.67	0.155	9.6	100.0	6.6	0.08
7	C120S	48.367	52.956	61.647	48.37-1.72	0.035	30.2	99.9	6.4	1.75-1.72	0.158	9.7	99.9	6.3	0.12
8	C120S	48.369	49.218	62.223	38.60-1.70	0.029	34.3	99.9	6.3	1.73-1.70	0.160	9.3	100.0	6.3	0.24
9	C120S	48.179	52.540	61.954	38.03-1.46	0.052	21.2	97.8	6.5	1.48-1.46	0.165	8.4	90.1	6.0	0.15
10	C120S	47.566	52.194	61.292	47.57-1.78	0.032	34.0	99.2	6.5	1.82-1.78	0.163	9.5	98.0	6.7	0.08
11	C120S	47.603	52.228	61.327	47.60-1.55	0.025	38.0	87.8	6.2	1.58-1.55	0.170	5.4	40.8	3.2	0.07
12	C120S	48.192	52.299	61.994	48.19-1.91	0.030	33.8	100.0	6.3	1.96-1.91	0.129	11.3	100.0	6.5	0.13
13	C120S	48.183	52.789	62.051	48.18-1.50	0.050	22.1	99.7	6.5	1.53-1.50	0.174	8.9	99.1	6.5	0.15
14	C120S	48.213	52.868	62.088	48.21-1.25	0.035	27.0	99.1	6.5	1.27-1.25	0.164	9.3	97.9	6.5	0.07
15	WILD	48.454	52.933	62.020	40.26-1.68	0.043	24.2	99.9	6.5	1.71-1.68	0.173	8.9	100.0	6.9	0.20
16	WILD	48.072	52.705	61.618	40.05-1.79	0.050	20.8	99.3	5.9	1.83-1.79	0.121	6.2	92.4	3.3	0.19
17	WILD	48.096	52.779	61.630	48.10-1.93	0.054	21.1	99.9	6.3	1.98-1.93	0.142	11.3	100.0	6.8	0.24
18	WILD	48.238	51.945	61.436	48.24-1.92	0.058	18.5	99.7	6.2	1.97-1.92	0.184	8.4	99.9	6.6	0.26
19	WILD	48.300	51.848	61.798	48.30-2.25	0.051	20.5	99.8	6.1	2.32-2.25	0.149	9.6	99.9	6.3	0.21
20	WILD	48.206	52.472	61.775	48.21-1.74	0.029	34.8	99.9	6.5	1.77-1.74	0.133	11.3	100.0	6.9	0.26

表 5.6. 収集した回折データ

条件	タンパク質	格子定数			全領域				最外殻						
		a Å	b Å	c Å	分解能 Å	R <sub>merge</sub>	I/σ	完全性 %	多重度	分解能 Å	R <sub>merge</sub>	I/σ	完全性 %	多重度	モザイク度 °
21	Y91F	48.086	52.848	61.875	48.09-1.49	0.088	14.5	100.0	6.5	1.52-1.49	0.154	8.3	100.0	6.0	0.10
22	Y91F	48.102	52.839	61.837	40.17-1.13	0.063	26.1	99.9	12.7	1.15-1.13	0.171	11.9	97.7	11.7	0.16
23	Y91F	48.137	52.890	61.880	40.21-1.21	0.058	28.3	100.0	12.9	1.23-1.21	0.190	12.6	100.0	13.1	0.17
24	Y91F	48.203	52.915	61.945	26.73-1.15	0.070	17.0	96.4	6.4	1.17-1.15	0.177	9.4	94.2	6.8	0.19
25	Y91F	48.294	53.027	62.029	48.29-1.96	0.047	31.0	86.2	5.9	2.01-1.96	0.081	14.0	32.1	1.8	0.23
26	Y91F	48.289	52.611	62.093	35.58-1.54	0.124	21.7	100.0	12.3	1.57-1.54	0.153	16.2	99.9	11.3	0.17
27	Y91F	48.566	52.844	62.406	48.57-1.80	0.028	40.5	100.0	12.6	1.84-1.80	0.177	19.6	100.0	13.1	0.20
28	Y91F	48.605	53.141	62.308	48.60-1.95	0.064	19.0	99.9	6.4	2.00-1.95	0.147	10.2	99.9	6.8	0.15
29	Y91F	48.645	53.151	62.335	48.65-1.99	0.064	18.7	99.9	6.4	2.04-1.99	0.165	9.5	100.0	6.7	0.17
30	Y91F	48.675	53.131	62.353	48.67-1.95	0.059	20.4	99.9	6.4	2.00-1.95	0.128	11.6	100.0	6.8	0.16
31	Y91F	48.437	52.824	62.364	48.44-1.79	0.094	14.3	100.0	6.4	1.83-1.79	0.159	8.6	100.0	6.4	0.12
32	Y91F	48.465	52.848	62.392	40.33-1.62	0.080	15.8	100.0	6.4	1.65-1.62	0.170	8.2	100.0	6.6	0.12
33	Y91F	48.435	52.826	62.404	48.44-2.41	0.156	9.5	99.9	6.3	2.50-2.41	0.182	7.7	100.0	6.5	0.12
34	Y91F	48.479	52.831	62.450	40.33-1.95	0.104	13.2	99.9	6.5	2.00-1.95	0.157	9.1	99.8	6.8	0.12
35	Y91F	48.457	52.831	62.375	40.31-1.62	0.070	17.1	100.0	6.5	1.65-1.62	0.156	9.0	100.0	6.6	0.13
36	Y91F	48.566	52.911	62.348	40.34-1.71	0.050	23.1	99.9	6.4	1.74-1.71	0.127	10.4	99.9	6.0	0.14

表 5.7. 収集した回折データ

条件	タンパク質	格子定数			全領域				最外殻						
		<i>a</i> Å	<i>b</i> Å	<i>c</i> Å	分解能 Å	<i>R</i> <sub>merge</sub>	<i>I</i> / $\sigma$	完全性 %	多重度	分解能 Å	<i>R</i> <sub>merge</sub>	<i>I</i> / $\sigma$	完全性 %	多重度	モザイク度 °
37	Y91FC120S	48.296	52.992	62.196	48.30-2.18	0.041	27.1	100.0	6.2	2.25-2.18	0.150	10.9	100.0	6.1	0.16
38	Y91FC120S	47.792	52.424	62.255	47.79-1.67	0.020	42.9	99.0	6.1	1.70-1.67	0.152	7.4	89.8	4.3	0.12
39	Y91FC120S	48.473	53.166	62.085	48.47-2.60	0.037	32.3	100.0	6.3	2.72-2.60	0.127	12.9	100.0	6.6	0.19
40	Y91FC120S	48.205	52.947	62.125	48.21-1.81	0.030	33.9	99.8	6.3	1.85-1.81	0.179	9.8	99.4	6.5	0.22
41	Y91FC120S	47.818	52.583	61.805	47.82-1.71	0.030	34.1	100.0	6.4	1.74-1.71	0.162	9.9	100.0	6.5	0.09
42	Y91FC120S	48.159	53.094	61.960	48.16-1.90	0.028	36.9	99.2	6.5	1.94-1.90	0.157	10.8	99.4	6.6	0.09
43	Y91FC120S	48.215	53.115	62.091	48.22-1.86	0.032	31.6	100.0	6.4	1.90-1.86	0.149	10.4	100.0	6.7	0.08
44	Y91FC120S	48.150	53.043	61.921	48.15-1.95	0.034	30.6	99.6	6.4	2.00-1.95	0.181	9.2	99.1	6.2	0.14
45	Y91FC120S	47.848	52.056	62.336	47.85-1.78	0.029	33.3	99.9	6.4	1.82-1.78	0.146	9.5	100.0	6.5	0.09
46	Y91FC120S	44.293	47.693	61.117	47.69-6.77	0.141	9.4	98.8	4.5	7.57-6.77	0.157	6.6	98.4	4.6	0.49
47	Y91FC120S	48.010	52.748	61.973	48.01-1.70	0.025	36.6	99.9	6.2	1.73-1.70	0.153	7.7	98.7	4.5	0.12
48	Y91FC120S	47.897	52.199	62.263	47.90-2.01	0.038	28.8	99.9	6.3	2.06-2.01	0.148	10.2	99.9	6.3	0.19
49	Y91FC120S	47.874	52.404	62.163	47.87-1.61	0.030	29.7	99.4	5.8	1.64-1.61	0.151	5.5	92.3	3.1	0.08

## 参考文献

- [1] A. Razin and H. Cedar. DNA methylation and gene expression. *Microbiol Rev*, Vol. 55, No. 3, pp. 451–458, Sep 1991.
- [2] M. J. Hickman and L. D. Samson. Apoptotic signaling in response to a single type of DNA lesion, O(6)-methylguanine. *Mol Cell*, Vol. 14, No. 1, pp. 105–116, Apr 2004. [DOI:10.1016/s1097-2765(04)00162-5] [PubMed:15068807].
- [3] D. B. Yarosh. The role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in cell survival, mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res*, Vol. 145, No. 1-2, pp. 1–16, 1985.
- [4] 黒田美和. *Sulfolobus tokodaii* 由来 O<sup>6</sup>-メチル化 DNA 修復酵素の立体構造解析. Master's thesis, 昭和大学大学院薬学研究科, 2006.
- [5] D. S. Daniels, T. T. Woo, K. X. Luu, D. M. Noll, N. D. Clarke, A. E. Pegg, and J. A. Tainer. DNA binding and nucleotide flipping by the human DNA repair protein AGT. *Nat Struct Mol Biol*, Vol. 11, No. 8, pp. 714–720, Aug 2004. [DOI:10.1038/nsmb791] [PubMed:15221026].
- [6] 飯塚康人. 損傷 DNA の修復を担う O<sup>6</sup>-メチルグアニンメチル基転移酵素



- の変異体 Y91F の結晶構造. 平成 25 年度「総合薬学研究・総合薬学演習」(「卒業研究 (A)・卒業研究 (B)」) 発表要旨集. いわき明星大学, 2013.
- [7] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, and A. J. Olson. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*, Vol. 30, No. 16, pp. 2785–2791, Dec 2009. [PubMed Central:PMC2760638] [DOI:10.1002/jcc.21256] [PubMed:8723313].
- [8] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, Vol. 25, No. 13, pp. 1605–1612, Oct 2004. [DOI:10.1002/jcc.20084] [PubMed:15264254].
- [9] M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, and G. R. Hutchison. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform*, Vol. 4, No. 1, p. 17, Aug 2012. [PubMed Central:PMC3542060] [DOI:10.1186/1758-2946-4-17] [PubMed:21988558].
- [10] M. F. Sanner. Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model*, Vol. 17, No. 1, pp. 57–61, Feb 1999. [PubMed:10660911].
- [11] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, and A. J. Olson. AutoDock4 and AutoDockTools4:

- Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*, Vol. 30, No. 16, pp. 2785–2791, Dec 2009. [PubMed Central:PMC2760638] [DOI:10.1002/jcc.21256] [PubMed:8723313].
- [12] Wolfgang Kabsch. *XDS*. *Acta Crystallographica Section D*, Vol. 66, No. 2, pp. 125–132, Feb 2010.
- [13] M. D. Winn, C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. Leslie, A. McCoy, S. J. McNicholas, G. N. Murshudov, N. S. Pannu, E. A. Potterton, H. R. Powell, R. J. Read, A. Vagin, and K. S. Wilson. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, Vol. 67, No. Pt 4, pp. 235–242, Apr 2011. [PubMed Central:PMC3069738] [DOI:10.1107/S0907444910045749] [PubMed:20383000].
- [14] Philip Evans. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallographica Section D*, Vol. 62, No. 1, pp. 72–82, Jan 2006.
- [15] Philip R. Evans. An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallographica Section D*, Vol. 67, No. 4, pp. 282–292, Apr 2011.
- [16] Philip R. Evans and Garib N. Murshudov. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallographica Section D*, Vol. 69, No. 7, pp. 1204–1214, Jul 2013.
- [17] P. H. Zwart. Anomalous signal indicators in protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D*, Vol. 61, No. 11, pp. 1437–1448, Nov

- 2005.
- [18] A. T. Brunger. Free R value: cross-validation in crystallography. *Methods Enzymol*, Vol. 277, pp. 366–396, 1997. [DOI:10.1016/s0076-6879(97)77021-6] [PubMed:18488318].
- [19] A. Vagin and A. Teplyakov. *MOLREP*: an Automated Program for Molecular Replacement. *Journal of Applied Crystallography*, Vol. 30, No. 6, pp. 1022–1025, Dec 1997.
- [20] G. N. Murshudov, P. Skubak, A. A. Lebedev, N. S. Pannu, R. A. Steiner, R. A. Nicholls, M. D. Winn, F. Long, and A. A. Vagin. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, Vol. 67, No. Pt 4, pp. 355–367, Apr 2011. [PubMed Central:PMC3069751] [DOI:10.1107/S0907444911001314] [PubMed:12832760].
- [21] E. Potterton, P. Briggs, M. Turkenburg, and E. Dodson. A graphical user interface to the CCP4 program suite. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, Vol. 59, No. Pt 7, pp. 1131–1137, Jul 2003. [DOI:10.1107/s0907444903008126] [PubMed:12832755].
- [22] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, and K. Cowtan. Features and development of *Coot*. *Acta Crystallographica Section D*, Vol. 66, No. 4, pp. 486–501, Apr 2010.
- [23] Helen M. Berman, John Westbrook, Zukang Feng, Gary Gilliland, T. N. Bhat, Helge Weissig, Ilya N. Shindyalov, and Philip E. Bourne. The

- Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, Vol. 28, No. 1, pp. 235–242, 01 2000.
- [24] S. C. Lovell, I. W. Davis, W. B. Arendall, P. I. de Bakker, J. M. Word, M. G. Prisant, J. S. Richardson, and D. C. Richardson. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins*, Vol. 50, No. 3, pp. 437–450, Feb 2003. [DOI:10.1002/prot.10286] [PubMed:12557186].
- [25] D. S. Daniels, C. D. Mol, A. S. Arvai, S. Kanugula, A. E. Pegg, and J. A. Tainer. Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical base binding. *EMBO J*, Vol. 19, No. 7, pp. 1719–1730, Apr 2000. [PubMed Central:PMC310240] [DOI:10.1093/emboj/19.7.1719] [PubMed:9833319].
- [26] J. E. Wibley, A. E. Pegg, and P. C. Moody. Crystal structure of the human O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Nucleic Acids Res*, Vol. 28, No. 2, pp. 393–401, Jan 2000. [PubMed Central:PMC102527] [DOI:10.1093/nar/28.2.393] [PubMed:9857094].
- [27] E. M. Duguid, P. A. Rice, and C. He. The structure of the human AGT protein bound to DNA and its implications for damage detection. *J Mol Biol*, Vol. 350, No. 4, pp. 657–666, Jul 2005. [DOI:10.1016/j.jmb.2005.05.028] [PubMed:15964013].
- [28] H. Hashimoto, T. Inoue, M. Nishioka, S. Fujiwara, M. Takagi, T. Imanaka, and Y. Kai. Hyperthermostable protein structure main-

- tained by intra and inter-helix ion-pairs in archaeal O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase. *J Mol Biol*, Vol. 292, No. 3, pp. 707–716, Sep 1999. [DOI:10.1006/jmbi.1999.3100] [PubMed:10497033].
- [29] M. H. Moore, J. M. Gulbis, E. J. Dodson, B. Demple, and P. C. Moody. Crystal structure of a suicidal DNA repair protein: the Ada O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase from *E. coli*. *EMBO J*, Vol. 13, No. 7, pp. 1495–1501, Apr 1994. [PubMed Central:PMC394977] [PubMed:2233816].
- [30] R. Miggiano, V. Casazza, S. Garavaglia, M. Ciaramella, G. Perugino, M. Rizzi, and F. Rossi. Biochemical and structural studies of the *Mycobacterium tuberculosis* O<sup>6</sup>-methylguanine methyltransferase and mutated variants. *J Bacteriol*, Vol. 195, No. 12, pp. 2728–2736, Jun 2013. [PubMed Central:PMC3697256] [DOI:10.1128/JB.02298-12] [PubMed:10331874].
- [31] R. Miggiano, G. Perugino, M. Ciaramella, M. Serpe, D. Rejman, O. Pav, R. Pohl, S. Garavaglia, S. Lahiri, M. Rizzi, and F. Rossi. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase protein clusters assembled on to damaged DNA. *Biochem J*, Vol. 473, No. 2, pp. 123–133, Jan 2016. [DOI:10.1042/BJ20150833] [PubMed:26512127].
- [32] G. Perugino, R. Miggiano, M. Serpe, A. Vettone, A. Valenti, S. Lahiri, F. Rossi, M. Rossi, M. Rizzi, and M. Ciaramella. Structure-function

- relationships governing activity and stability of a DNA alkylation damage repair thermostable protein. *Nucleic Acids Res*, Vol. 43, No. 18, pp. 8801–8816, Oct 2015. [PubMed Central:PMC4605297] [DOI:10.1093/nar/gkv774] [PubMed:10497033].
- [33] C. Morrone, R. Miggiano, M. Serpe, A. Massarotti, A. Valenti, G. Del Monaco, M. Rossi, F. Rossi, M. Rizzi, G. Perugino, and M. Ciaramella. Interdomain interactions rearrangements control the reaction steps of a thermostable DNA alkyltransferase. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, Vol. 1861, No. 2, pp. 86–96, Feb 2017. [DOI:10.1016/j.bbagen.2016.10.020] [PubMed:27777086].
- [34] F. Rossi, C. Morrone, A. Massarotti, D. M. Ferraris, A. Valenti, G. Perugino, and R. Miggiano. Crystal structure of a thermophilic O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase-derived self-labeling protein-tag in covalent complex with a fluorescent probe. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 500, No. 3, pp. 698–703, Jun 2018. [DOI:10.1016/j.bbrc.2018.04.139] [PubMed:29684348].
- [35] The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, Vol. 49, No. D1, pp. D480–D489, 11 2020.
- [36] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Soding, J. D. Thompson, and D. G. Higgins. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple

---

sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*, Vol. 7, p. 539, Oct 2011. [PubMed Central:PMC3261699] [DOI:10.1038/msb.2011.75] [PubMed:17118958].

# 出版リスト

本博士論文を作成するにあたり、学術雑誌へ掲載された論文は以下の通りである。

1. Kikuchi, M., Yamauchi, T., Iizuka, Y., Tsunoda, M. Roles of hydroxy group of tyrosine in crystal structures of *Sulfurisphaera tokodaii* O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase. *Acta Crystallographica Section F*. *in press*.
2. 菊池槇子, 角田大 (2017). 非計算化学者におけるドッキングシミュレーションソフト AutoDock の活用. 医薬品相互作用研究. **41**(2) 1-14.

また、以下の学会・シンポジウムにて発表済みである。

1. 菊池槇子, 飯塚康人, 角田大 (2018) 好熱性古細菌由来 O<sup>6</sup>-メチル化 DNA 修復酵素の基質認識に関する構造化学的研究, 第 16 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2018) , 三浦
2. 菊池槇子, 飯塚康人, 角田大 (2018) メチル化 DNA 修復酵素の基質認識に関する構造化学的研究, 第 57 回日本薬学会東北支部大会, 仙台



3. Kikuchi, M., Iizuka, Y., Yamauchi, T., Magome, S., Kanari, R., Tsunoda, M. (2018) Structural analysis on substrate recognition of methylated DNA repair enzyme, AsCA2018/CRYSTAL32, Auckland, New Zealand
4. 菊池槇子, 飯塚康人, 山内崇浩, 馬籠将, 金成麗奈, 角田大 (2019) メチル化 DNA 修復酵素の活性部位における構造化学的研究, 2018 年度量子ビームサイエンスフェスタ 第 36 回 PF シンポジウム, つくば
5. 菊池槇子, 飯塚康人, 山内崇浩, 竹森飛翔, 長谷川さとみ, 柳田裕香, 船木明日香, 太田昂希, 角田大 (2020) メチル化 DNA 修復酵素の活性部位における構造化学的研究, 第 59 回日本薬学会東北支部会～いわき

以下は関連論文である。

1. Yamauchi, T., Takemori, T., Kikuchi, M., Iizuka, Y., Ishikawa, S., Tsunoda, M. (2020). Crystal and Solution structures of Proliferating Cell Nuclear Antigen from Crenarchaeon *Aeropyrum pernix*. *Acta Cryst.* **A76**, a178-a179.
2. Yamauchi, T., Takemori, T., Kikuchi, M., Iizuka, Y., Ishikawa, S., Tsunoda, M. (2021). Structural Comparison of heterotrimer PCNA from Crenarchaeon *Aeropyrum pernix* by solution scattering, Cryo-EM, and Crystallography. *Acta Cryst.* **A77**, *in press*.

# 謝辞

本研究を進めるにあたり終始あたたかいご指導と激励を賜りました医療創生大学大学薬学部 角田 大教授に心から感謝の意を表します。

山内 崇浩さん，飯塚 康人助教，馬籠 将さん，金成 麗奈さん，長谷川 さとみさん，太田 昂希さん，竹森 飛翔さんをはじめ本研究と一緒に進めた仲間に進めた仲間に深く感謝いたします。

研究に関する助言をいただきました医療創生大学大学薬学部 田島 裕久教授，石川 暁志講師に心からお礼申し上げます。

結晶構造解析のデータ測定でご支援いただきました高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所 千田 俊哉教授，加藤 龍一准教授，松垣 直宏准教授，山田 悠介助教，引田 理英助教に感謝申し上げます。

最後に構造生物化学研究室の皆様，家族に心から感謝します。