

令和 2 年 5 月 4 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07730

研究課題名(和文)放射線誘導性タンパク質DdrA及びそのパラログDdrAPの構造機能解析

研究課題名(英文)Structural-functional analysis of the radiation-inducible protein DdrA and its paralog DdrAP

研究代表者

鳴海 一成(Narumi, Issay)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：90343920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：DdrA及びDdrAPのDNA修復における機能を解析した。ddrA欠失株はナリジクス酸に感受性、ddrAP欠失株はノビオシンに耐性を示したことから、DdrAはGyrAと、DdrAPはGyrBと相互作用し、タンパク質立体構造を歪めることでDNAトポイソメラーゼ阻害剤の影響を変化させていることが示唆された。また、ウエスタンブロット解析によるin vivo実験と、精製タンパク質を用いたin vitro実験の結果から、放射線抵抗性細菌の細胞粗抽出物には、DdrAを分解する酵素が存在するが、DdrAはDdrAPとヘテロ複合体を形成することで、DdrA分解酵素による分解を免れていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線抵抗性細菌に特有のDNA修復機構である凝縮核様体依存性末端結合の構成要素としてこれまでに、PprAタンパク質、DNAトポイソメラーゼ、DNAリガーゼが明らかになっている。本研究によって、DdrAタンパク質及びDdrAPタンパク質は、DNAトポイソメラーゼと相互作用することが示唆され、CNDEJの構成要素として放射線抵抗性細菌が持つDNA損傷誘導性のDNA修復機構の一端を担うことが明らかになった。これらの構成要素の相互作用の詳細が明らかになれば、それらの相互作用を利用した新たな遺伝子工学試薬の開発にも繋がり、生命科学の新たな展開に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The functional analyses of radiation-inducible protein DdrA and its paralog protein DdrAP from the radioresistant bacterium were carried out especially in terms of DNA repair. The ddrA deletion mutant showed a sensitivity to nalidixic acid. On the other hand, the ddrAP deletion mutant showed a resistance to novobiocin. These results suggest that DdrA and DdrAP proteins interact with the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase, respectively, thereby, the interaction triggers a conformational change in topoisomerase, and changes the effects of topoisomerase inhibitors. The in vivo experiment using Western blot analysis and in vitro experiment using purified recombinant proteins revealed that a certain DdrA-degradative enzyme exists in crude cell extracts from the radioresistant bacterium, and it was suggested that DdrA protein avoids the cleavage activity of the DdrA-degradative enzyme by forming a heterocomplex with DdrAP protein.

研究分野：応用微生物学

キーワード：DNA修復 放射線抵抗性細菌 DNA損傷誘導性 ゲノム2本鎖切断修復

1. 研究開始当初の背景

Deinococcus radiodurans は、好気性、無芽胞性の真正細菌であり、放射線抵抗性細菌として知られている。*D. radiodurans* に放射線を照射すると、放射線に弱い他の生物と同様に、DNA 損傷の中で最も修復の困難な DNA 2 本鎖切断が生じるが、*D. radiodurans* は DNA 2 本鎖切断を修復する能力に優れている。*D. radiodurans* の優れた DNA 2 本鎖切断修復には、放射線照射後に誘導される DNA 修復タンパク質が重要な役割を果たしていると考えられているが、この修復能がどのような分子機構によって実現しているのかについては現在でも完全には解明されていない。

これまでに我々は、他の生物種からは見つかっていない *D. radiodurans* に独特の新規遺伝子を同定することに成功し、pleiotropic protein promoting DNA repair (DNA 修復を促進する多面的タンパク質) の意から *pprA* 遺伝子と命名した。PprA タンパク質の生化学的性質を解析した結果、2 本鎖 DNA に生じた単鎖切断部位及び 2 本鎖切断部位を認識して優先的に結合し、exonuclease III による DNA 分解を阻止すること、DNA リガーゼによる DNA 末端結合反応促進活性を持つことなどを明らかにしてきた。また、PprA タンパク質は DNA リガーゼや DNA トポイソメラーゼとも相互作用することが明らかになり、さらに *Deinococcus* 属細菌の核様体の凝縮程度が他の生物に比べて高いことから、このような凝縮したゲノムを持つ放射線抵抗性細菌に特有な 2 本鎖切断修復の機構を、凝縮核様体依存性末端結合 (condensed nucleoid-dependent end joining, CNDEJ) と我々は提唱した。CNDEJ で中心的な役割を果たすのが PprA タンパク質であり、真核生物に広く存在して不正確な修復をもたらす非同源性末端結合修復 (non-homologous end joining, NHEJ) とは異なる機構であると考えている。

D. radiodurans では、DNA 損傷応答タンパク質 PprI によって、放射線照射後に一群の遺伝子の発現が誘導されることも我々の過去の研究によって明らかになっている。これらの遺伝子産物には、CNDEJ に関与する PprA タンパク質や DNA トポイソメラーゼ、相同組換え修復に関与する RecA タンパク質などが含まれるが、放射線誘導性タンパク質群の中で最も誘導率の高いタンパク質が DdrA (DNA damage response A) である。DdrA の N 末端から 157 番目までのアミノ酸配列は真核生物の Rad52 タンパク質の N 末端側ドメインと相同性があり、3' 突出末端を持つ 2 本鎖 DNA 及び 1 本鎖 DNA に対する結合能を持つ。Rad52 タンパク質の N 末端側ドメインは DNA 結合能とホモ多量体リング構造に重要であり、C 末端側ドメインは相同組換え修復に係わる Rad51 タンパク質及び RPA タンパク質との相互作用部位を持つ。したがって、Rad52 タンパク質の C 末端側ドメインと相同性がない DdrA タンパク質の相同組換え修復への寄与はあったとしても限定的であると考えられる。一方、Rad52 タンパク質は 1 本鎖 DNA 鎖対合 (single-strand annealing, SSA) を介して NHEJ にも関与すると考えられている。よって、DdrA タンパク質が放射線抵抗性細菌に特有の 2 本鎖切断修復機構である CNDEJ にどのように関わっているのかを調べることは大いに意義のあることである。

研究計画の過程で、*Deinococcus-Thermus* 門の細菌群における DdrA タンパク質の存在を調べてみたところ、DdrA は *Deinococcus* 科 (*Deinococcus* 属、*Truepera* 属) で高度に保存されており、近縁の *Thermus* 科 (*Thermus* 属、*Meiothermus* 属、*Marinithermus* 属、*Rhodothermus* 属) にも存在することが分かった。さらに興味深いことに、DdrA タンパク質のパラログ DdrAP が *Deinococcus* 科細菌のみに高度に保存されており、DdrAP タンパク質は *Deinococcus* 科と *Thermus* 科の DdrA タンパク質分岐群とは別の分岐群を系統樹上で形成することを見いだした。DdrAP タンパク質は DdrA タンパク質とは異なり放射線誘導性ではないため今まで注目されてこなかったが、放射線に感受性の高い *Thermus* 科細菌には DdrAP タンパク質が存在せずに、放射線耐性を持つ *Deinococcus* 科細菌のみに DdrAP タンパク質があることから、DdrAP タンパク質が放射線抵抗性細菌の DNA 修復に何らかの関与をしている可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

研究の全体構想は、放射線抵抗性細菌が持つ極めて効率的な DNA 修復機構の全容を解明し、当該細菌の DNA 修復に重要な役割を果たす遺伝子を生命科学・バイオ技術分野での応用研究に結びつけることである。その中で本研究では、放射線抵抗性細菌 *D. radiodurans* 由来の放射線誘導性タンパク質 DdrA 及びそのパラログ DdrAP の DNA 修復における機能を解析すると共に、*D. radiodurans* 由来の DNA 修復促進タンパク質 PprA、DNA リガーゼ、トポイソメラーゼとの相互作用を解析することで、放射線抵抗性細菌に特有の凝縮核様体依存性末端結合修復における DdrA タンパク質及び DdrAP タンパク質の役割を明らかにすることを目的とする。本研究によって、我々が提唱した放射線抵抗性細菌に特有の CNDEJ による DNA 修復機構の特徴を明らかにすることができる。また、DdrA タンパク質及び DdrAP タンパク質の DNA 修復に関する機能が明らかになれば、未だに未知の部分が多い真核生物の Rad52 タンパク質の機能解明に対する貢献も期待できる。PprA タンパク質については、我々が取得した特許に基づく技術移転の結果、2005 年 11 月に、PprA タンパク質の DNA 修復促進活性を利用した高効率 DNA ライゲーションキット TA-Blunt Ligation Kit が、2015 年 12 月にはバージョンアップした TA-Enhancer Cloning Kit が富士フイルム和光純薬工業株式会社から発売になっている。DdrA タンパク質及び DdrAP タンパク質と PprA タンパク質、DNA リガーゼ、トポイソメラーゼの相互作用が明らかになれば、学術的意義のみならず、それらの相互作用を利用した新たな遺伝子工学試薬の開発にも繋がり、生命科学の新たな展開に貢献すると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子欠失株の作製

D. radiodurans ddrA 遺伝子及び *ddrAP* 遺伝子の欠失株を作製した。具体的には、*ddrA* プロモーター上流 750 bp、カナマイシン耐性マーカー 1,065 bp、*ddrA* 遺伝子下流領域 750 bp を、4 種類の異なる制限酵素切断部位タグ付きプライマーでそれぞれ PCR 増幅後、制限酵素処理とライゲーションでタンデムに連結した DNA 断片を用いて、*D. radiodurans* 野生株 (ATCC13939) を形質転換し、*ddrA* 欠失株を作製した。また、*D. radiodurans ddrAP* 遺伝子についても同様にして、ハイグロマイシン耐性マーカーとすげ替えた形の *ddrAP* 欠失株を作製した。さらに、*D. radiodurans ddrA ddrAP* 二重遺伝子欠失株も同様にして作製した。

(2) 各種変異原・阻害剤処理に対する影響解析

野生株及び作製した 3 種類の欠失変異株 ($\Delta ddrA$ 、 $\Delta ddrAP$ 、 $\Delta ddrA \Delta ddrAP$) を用いて、各種変異原・阻害剤処理に対する感受性を serial dilution spotting 法で解析した。24 時間培養した菌体の 10 倍希釈系列を作製し、5 μ l ずつ寒天培地に滴下したものにガンマ線あるいは紫外線を照射後、30°C で 2 日間培養した。ガンマ線照射は、量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所のガンマ線照射施設にて行った。その他の化学変異原及び阻害剤については、寒天培地に一定濃度添加したものに培養菌液の希釈系列を滴下した。

(3) 大腸菌での組換えタンパク質の大量発現と精製

Deinococcus geothermalis ddrA 構造遺伝子領域を PCR 増幅したものを pET16a 及び pET23b ベクターにクローニングし、5'領域に His タグを付けた *ddrA* 遺伝子、3'領域に His タグを付けた *ddrAP* 遺伝子を作製し、それぞれについて pET9a を用いてベクター交換を行い、カナマイシン耐性マーカーを持つ発現プラスミドを作製した。これらのプラスミドを用いて大腸菌 BL21(DE3) を pLysS プラスミドと共に形質転換することで発現系を構築した。His タグ付き組換え DdrA タンパク質は TALON カラムで精製した。また、pMAL-c5x ベクターに *ddrA* 遺伝子をクローニングし、マルトース結合タンパク質を N 末端に付加した可溶性融合 DdrA タンパク質の発現系を構築し、マルトースカラムを用いて精製した。

4. 研究成果

(1) 各種変異原・阻害剤処理に対する影響解析

ddrA 欠失株はガンマ線、紫外線およびナリジクス酸に僅かに感受性を示したのに対して、*ddrAP* 欠失株はガンマ線、ブレオマイシンおよびノボピオシンに明らかな耐性を示した (図 1)。DNA アルキル化剤であるメチルメタンサルホン酸と酸化損傷を誘発する過酸化水素に対する感受性は、試験した菌株間での差異が認められなかった。ナリジクス酸は DNA ジャイレース A サブユニット (GyrA) の阻害剤、ノボピオシンは DNA ジャイレース B サブユニット (GyrB) の阻害剤である。感受性解析の結果から、DdrA は GyrA と、DdrAP は GyrB と相互作用し、タンパク質の立体構造を歪めることで阻害剤の影響を変化させていることが示唆された。*ddrAP* 欠失株が DNA 鎖切断を引き起こすガンマ線およびブレオマイシンに野生株よりも耐性を示したことから、*D. radiodurans* のガンマ線耐性に関与している DNA 修復促進タンパク質 PprA が DNA ジャイレースと相互作用することを勘案すると、DdrAP は GyrB との相互作用を介して PprA と DNA ジャイレース等による DNA 二本鎖切断修復機構である凝集核様体依存的末端結合 (CNDEJ) に関与していると考えられた (図 2)。また、上述の様に、*ddrA* 及び *ddrAP* 遺伝子の欠失は、DNA アルキル化剤メチルメタンサルホン酸に対する耐性には関与していなかったが、鎖間架橋損傷を伴う DNA アルキル化剤であるマイトマイシン C に対して、*ddrA* 欠失株は僅かな感受性を示したのに対して、*ddrAP* 欠失株は中程度の感受性を示した。このことから、マイトマイシン C が誘発する鎖間架橋損傷といった複雑な DNA 損傷の修復機構への DdrAP タンパク質の重要性が示された。

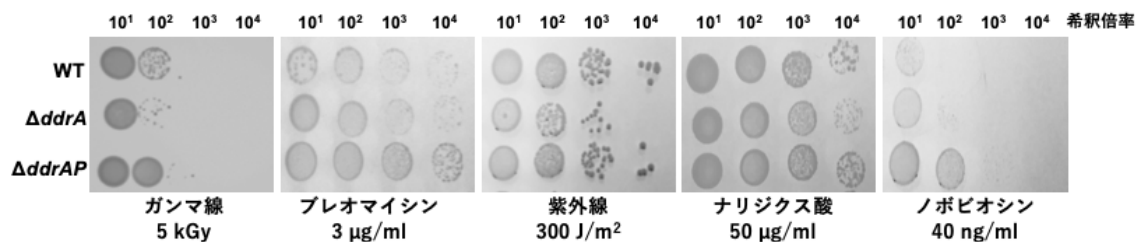


図 1 各種変異原・阻害剤に対する感受性

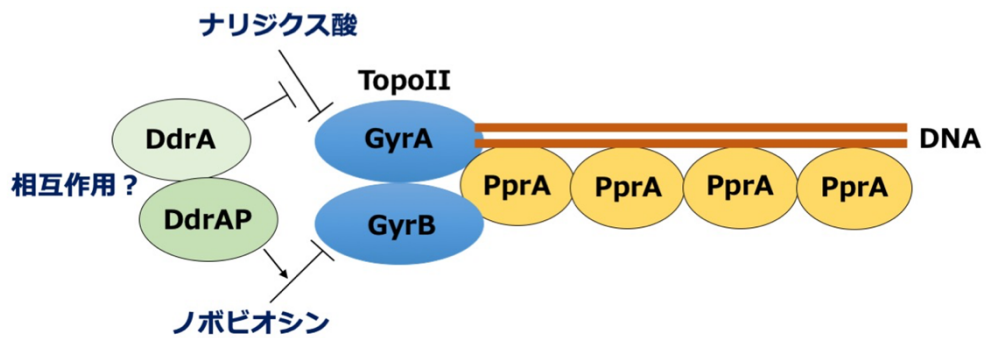


図2 DdrA タンパク質、DdrAP タンパク質、トポイソメラーゼ(TopoII)の GyrA・GyrB サブユニット及び PprA タンパク質の相互作用についての仮説

(2) 大腸菌での組換え DdrA タンパク質の大量発現と精製

精製した native form の *D. geothermalis* DdrA タンパク質を *D. geothermalis* の細胞粗抽出物と混合し、45°Cで 1 時間インキュベートすると、C 末端から十数残基のオリゴペプチドが分解されて、分子サイズの小さい産物が生成することから、細胞粗抽出物には DdrA タンパク質の C 末端ドメインの特定アミノ酸部位でペプチド結合を加水分解する酵素が存在することが分かった。また、C 末端に His タグが付加された DdrA タンパク質では、この分解が完全に阻害されることから、基質の立体構造変化によって DdrA 分解酵素の活性が阻害されることが示唆された。さらに、マルトース結合タンパク質 (MBP) を N 末端に付加した可溶性融合 DdrA タンパク質を用いて、同様の分解実験を行ったところ、DdrA タンパク質は C 末端だけではなく、N 末端部位も分解を受けて僅かに分子サイズの小さい産物を生成していることが明らかになった (図 3)。DdrA 分解酵素を簡易精製するため、細胞粗抽出液を硫酸分画したところ、DdrA 分解酵素は、硫酸濃度が 40%以上 50%以下で沈殿する分画に存在することが分かった。さらに、精製した DdrA タンパク質を抗原として、抗 DdrA ポリクローナル抗体を作製し、ウエスタンブロット解析を行った。その結果、*D. geothermalis* の DdrA タンパク質は紫外線照射によって誘導されること、*in vitro* で確認された DdrA タンパク質の分解が *in vivo* では認められないことが明らかになった。このことから、*in vivo* では DdrA タンパク質が DdrAP タンパク質とヘテロ複合体を形成することで (図 2)、DdrA 分解酵素による分解を免れている可能性が示唆された。

インキュベーション時間(h)	0	0	0	7	24	24	24
MBP-DdrAタンパク質	+	-	+	+	+	+	-
<i>D. geothermalis</i> 粗抽出液	-	+	+	+	+	-	+

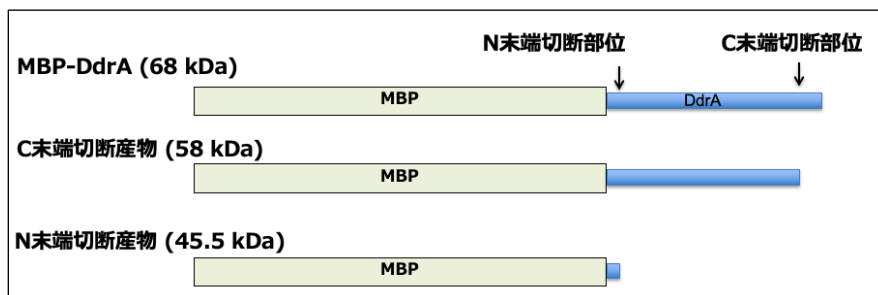
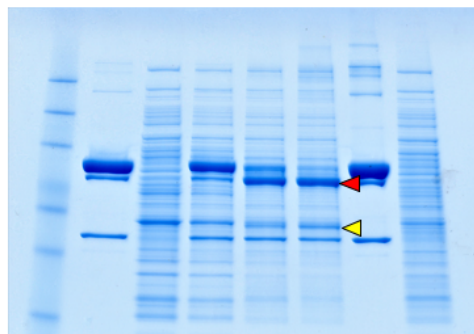


図3 精製 MBP 融合 DdrA タンパク質の細胞粗抽出物による分解 (赤矢印は C 末端分解産物、黄矢印は N 末端分解産物)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Motoyasu Adachi, Rumi Shimizu, Chie Shibasaki, Katsuya Satoh, Satoru Fujiwara, Shigeki Arai, Issay Narumi, Ryota Kuroki	4. 巻 33
2. 論文標題 Extended structure of pleiotropic DNA repair-promoting protein PprA from Deinococcus radiodurans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 3647 - 3658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201801506R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Park Sun-Ha, Singh Harinder, Appukuttan Deepti, Jeong Sunwook, Choi Yong Jun, Jung Jong-Hyun, Narumi Issay, Lim Sangyong	4. 巻 7
2. 論文標題 PprM, a Cold Shock Domain-Containing Protein from Deinococcus radiodurans, Confers Oxidative Stress Tolerance to Escherichia coli	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 article 2124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計37件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Issay Narumi
2. 発表標題 Evolution and diversity of radioresistant microbes
3. 学会等名 Optics & Photonics International Congress 2019 (OPIC 2019), Laser Solutions for Space & the Earth (LSSE 2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鳴海一成
2. 発表標題 放射線に耐える奇妙な球菌が極限環境で生きる仕組み
3. 学会等名 第24回自然科学研究機構シンポジウム「極限環境における生命 ~生命創成の探究に向けて~」(招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鳴海一成 (分担執筆)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 596 (うち、467 - 468を担当)
3. 書名 加速器ハンドブック (日本加速器学会編) 第16章 16.4 放射線抵抗性の機構	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東洋大学 生命科学部 生命科学科 放射線微生物学研究室 http://www2.toyo.ac.jp/~narumi/index.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	佐藤 勝也 (Satoh Katsuya) (90370402)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・上席研究員 (定常) (82502)	
連携研究者	山田 貢 (Yamada Mitsugu) (80510924)	国立研究開発法人宇宙航空研究開発機構・有人宇宙ミッション本部・主任研究開発員 (82645)	