

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19380054

研究課題名 (和文) DNA 修復促進タンパク質の DNA 鎖切断部位への結合様式の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of the binding mode of DNA repair promoting protein to strand breaks

研究代表者

鳴海 一成 (NARUMI ISSAY)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究主幹

研究者番号：90343920

研究成果の概要 (和文)：放射線抵抗性細菌 *Deinococcus radiodurans* 由来の DNA 修復促進タンパク質 PprA について、1.35 Å の分解能での結晶構造解析に成功し、DNA 結合に重要なアミノ酸残基の空間配置を明らかにした。また、PprA タンパク質の放射線誘導に関わる新規制御タンパク質 PprM を同定し、その作用機序を明らかにした。さらに、*Deinococcus* 属細菌で使用できる新規プラスミドベクターを開発した。

研究成果の概要 (英文)：Crystal structure analysis of the *Deinococcus radiodurans* DNA repair promoting protein PprA was carried out at 1.35 Å resolution, and the spatial configuration of amino acids important for DNA binding was elucidated. PprM protein that modulates *pprA* expression was identified. A novel plasmid vector was developed for *Deinococcus*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2008年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：放射線微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：放射線、遺伝子、微生物、タンパク質、DNA 修復

1. 研究開始当初の背景

デインコッカス・ラジオデュランズ (*Deinococcus radiodurans*) (以下、ラジオデュランズ) は、無芽胞性、カロテノイド色素生産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。ラジオデュランズを放射線照射すると、他の放射線に比較的弱い生物と同様に、DNA 損傷の中で最も修復が困難

な損傷である DNA 2 本鎖切断が生じるが、ラジオデュランズはこの DNA 2 本鎖切断損傷を修復する能力に優れている。ラジオデュランズの優れた DNA 2 本鎖切断修復には、放射線照射後に誘導される何らかの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、この菌の分

離から 50 年経った現在でも未だに完全には解明されていない。この優れた放射線耐性の分子機構が解明されれば、それに関わる生体高分子を医学・農学・生命科学分野で産業応用することが可能となる。

2. 研究の目的

本研究の全体構想は、ラジオデュランスの DNA 修復機構の全容を解明し、当該菌が持つ DNA 修復タンパク質の特徴を生かしたバイオ産業などへの応用研究に結びつけることである。本研究では、我々が発見したラジオデュランス由来の新規 DNA 修復促進タンパク質 PprA の新機能開発と機能改良を目指し、タンパク質の立体構造と DNA 鎖切断部位への結合様式を解明することを目的とした。また、PprA タンパク質の放射線誘導機構に関わる新規制御因子の同定とその機能解析を行った。さらに、デイノコッカス属細菌で遺伝子操作を容易にするために、新規宿主ベクター系の開発を行った。

3. 研究の方法

(1) 既知の知見

我々の研究グループでは、ラジオデュランスの DNA 修復能欠損変異株の責任遺伝子を突き止めることで、DNA 修復に必要な複数のタンパク質群を同定してきた。これらの中にはヒトや大腸菌でも持っている DNA 修復タンパク質が含まれていたが、既知のものとはまったく異なりラジオデュランスにしか存在しない放射線耐性タンパク質を 2 種類発見した。ひとつは PprA、もうひとつは PprI である。PprA は放射線で誘導されるタンパク質であり、DNA に生じた単鎖切断部位および 2 本鎖切断部位を認識して優先的に結合し、exonuclease による DNA 分解を阻止し、DNA リガーゼによる DNA 末端結合反応を促進する。一方、PprI タンパク質は上述の PprA タンパク質や組換え修復タンパク質である RecA の放射線誘導に必須な transcriptional activator である。

(2) 構造生物学的解析

PprA タンパク質は、既知のタンパク質のいずれとも相同性がなく、また、PprA のアミノ酸配列を最新のアミノ酸配列データベースを検索しても、類似のアミノ酸配列をもつ既知のタンパク質が存在しないことから、PprA タンパク質は新しい立体構造に基づいた独特の DNA 結合様式をもつと考えられる。そこで我々は、PprA タンパク質の立体構造を決定すると共に、PprA タンパク質と DNA の相互作用についての知見を得ることで、PprA タンパク質が DNA 修復にどのように関与しているかを明らかにすることに力を注いだ。

(3) 分子生物学的解析

ランダム変異導入法および部位特異的変異導入法によって、DNA との相互作用が欠損した変異型 PprA タンパク質のライブラリーを作製し、ゲルシフトアッセイを行うことで、DNA との結合に重要なアミノ酸残基の部位を特定した。

(4) 分子遺伝学的解析

ラジオデュランスの野生株と *pprI* 遺伝子破壊株を用いて、プロテオーム解析を行った。また、プロテオーム解析から同定した新規制御タンパク質 PprM について、*pprM* 遺伝子破壊株を作製し、トランスクリプトーム解析を行った。

(5) 宿主ベクター系の開発

ラジオデュランスと同属のデイノコッカス・ラジオプクナンスに小型潜在性プラスミド pUE30 が存在することに注目して、このプラスミドのベクター化を行い、形質転換可能な宿主を探索した。まず、pUE30 の DNA 塩基配列を同定した。シャトルベクターは、pUE30 とラジオデュランスの遺伝子破壊実験に用いられている薬剤耐性マーカー供給プラスミド pKatCAT5 を連結し構築した。さらに、外来遺伝子発現について、ルシフェラーゼアッセイ法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) PprA の立体構造

まず、野生型 PprA タンパク質の電子顕微鏡イメージングを行い、タンパク質多量体の基本骨格構造を明らかにした。並行して、野生型 PprA タンパク質の X 線結晶構造解析を数回試みたが、分解能 4.97 Å 以上の結晶が得られなかった。この原因は、PprA タンパク質同士が高次会合体を形成し、高濃度条件下で粘性を持つことと関係していると考えられた。そこで、高次会合せずに 2 量体を形成する変異型 PprA タンパク質 W183R を用いて結晶化を進めた。その結果、1.35 Å の分解能を持つ結晶が得られた。結晶化に用いたタンパク質を分析したところ、部分消化されていることが分かった。これは、おそらく共雑タンパク質によって部分消化されたものであると考えられた。これを踏まえて次に、位相を決定するために、セレノメチオン含有培地で発現させた W183R タンパク質を新たに精製し、リジルエンドペプチダーゼで部分消化したものをを用いて結晶を作製した。これを用いて、2.2 Å の回折データを取得し、単波長異常散乱法による位相決定を行うことで、結晶構造解析に成功した。さらに、2.2 Å の構造をモデルとした分子置換法によって 1.35 Å の結晶構造解析にも成功した。これにより、PprA タンパク質の全アミノ酸 284 個のうち、

最高で 83.8%のアミノ酸について原子分解能での立体構造が明らかになった。分子表面に正の電荷を持つアミノ酸が集中している領域があり、これが DNA との結合面であると推定している。また、野生型 PprA タンパク質を用いた X 線小角散乱実験を行い、PprA タンパク質が高濃度溶液中で繊維状構造をとり、繊維断面の慣性半径が 27.9 Å、繊維軸方向の単位長が 30.8 Å であることを明らかにした。

(2) PprA と DNA の結合様式

ゲルシフトアッセイを用いて、PprA タンパク質と DNA の相互作用解析を行った。その結果、PprA タンパク質は 1 分子の 2 本鎖 DNA に少なくとも約 280 分子の結合が可能であること、PprA タンパク質と DNA の複合体形成が、1mM の低濃度の Mg、Ca あるいは Sr イオンにより促進されること、PprA タンパク質の多量体構造の形成及び PprA タンパク質と DNA の複合体の形成の両方に塩濃度依存性があることが分かった。また、直鎖状の 2 本鎖 DNA と PprA タンパク質が複合体を形成する場合、PprA タンパク質の濃度上昇に伴って複合体どうしが会合し、大きな分子量をもつ複合体を形成することを明らかにした。この結果は、放射線によって切断されたゲノム DNA の 2 つの末端同士を PprA タンパク質が近づける役割を持つことを示唆し、PprA タンパク質の機能発現において重要な知見である。

また、野生型 PprA タンパク質のリジン残基を還元的ジメチル化することで、DNA 末端結合反応促進活性を強化できることを明らかにし、人工的アミノ酸改変による PprA タンパク質の機能改良の可能性を示した。さらに、ランダム変異導入法および部位特異的変異導入法によって、DNA との相互作用が欠損した変異タンパク質のライブラリーを作製し、ゲルシフトアッセイを行うことで、DNA との結合に重要なアミノ酸残基の部位を特定した。これらのアミノ酸残基の位置を立体構造に当てはめることで、DNA 結合面に位置するものや、タンパク質間相互作用面に位置するものなどに分類することが可能となった (図 1)。

また、ラジオデュランスのゲノムに存在する *pprA* 遺伝子領域を完全に欠失した株を作製し、この株の中で野生型 *pprA* 遺伝子をプラスミド上で発現させることによって放射線耐性が復帰することを確認し、変異型 PprA タンパク質の *in vivo* での挙動を解析する実験系を確立した。この実験系を用いることで、PprA タンパク質のアミノ酸残基で重要なものを更に絞り込み、放射線耐性に最も重要な部位を明らかにすることができると考えている。

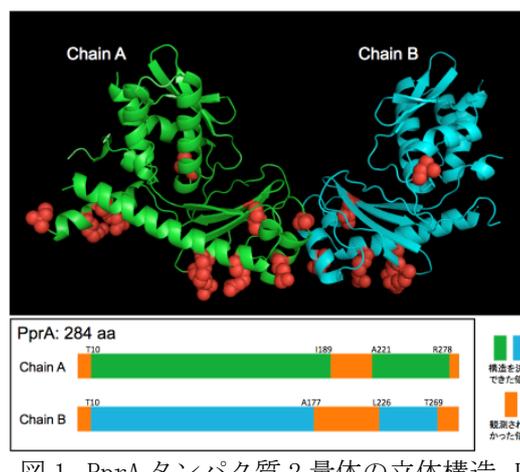


図 1. PprA タンパク質 2 量体の立体構造。DNA との結合に重要なアミノ酸残基を赤で示した。

(3) PprA タンパク質の放射線誘導を負に制御する新規タンパク質 PprM

ラジオデュランスの野生株と *pprI* 遺伝子破壊株を用いて、プロテオーム解析を行った結果、分子量 10 kDa のタンパク質の等電点が、野生株と遺伝子破壊株で異なっていることを明らかにした (図 2)。

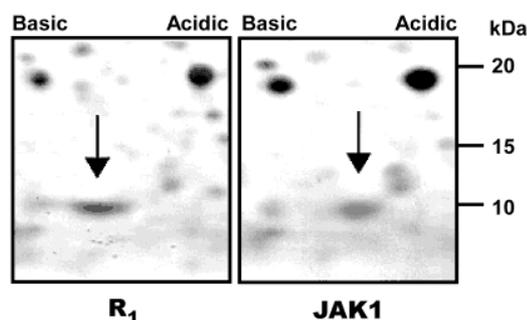


図 2. 野生株 (R1) 及び *pprI* 遺伝子破壊株 (JAK1) から抽出したタンパク質の 2 次元電気泳動像。矢印で示したタンパク質が PprM。

このタンパク質を TOF-MASS 解析によって同定したところ、DR0907 という ID が付いているタンパク質であることが分かった。このタンパク質は、大腸菌などが持っている低温ストレスタンパク質のホモログであり、PprA タンパク質発現の modulator という意から、PprM と命名した。*pprM* 遺伝子破壊株は、放射線に対して高い感受性を示した。PprI タンパク質並びに PprM タンパク質の解析結果を統合すると、ラジオデュランスの放射線照射による DNA 修復タンパク質誘導の分子機構は以下のとおりである。まず、DNA 損傷のシグナルを感知した PprI タンパク質が PprM タンパク質を翻訳後修飾する。PprM タンパク質は通常の状態では PprA タンパク質の誘導を抑制しているが、翻訳後修飾を受けることによって脱抑制機構が働き、PprA タンパク質の細胞

内発現を促す。

PprM タンパク質の機能を解析するため、DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行い、ラジオデュランスの野生株と *pprM* 遺伝子破壊株で、2 kGy 照射前後の発現に変化が見られる遺伝子群を調査した。その結果、ビタミン B1 の生合成に関わる遺伝子群、熱ストレスタンパク質をコードする遺伝子群、ATP 依存性プロテアーゼをコードする遺伝子群などの発現が、*pprM* 遺伝子破壊株で照射後に顕著に増加していることが分かった。このことは、PprM タンパク質がこれらの遺伝子の発現抑制に関わっていることを示している。一方、PprA タンパク質をコードする遺伝子の発現は、照射前後ともに、野生株と *pprM* 遺伝子破壊株で変化が認められなかった。*pprM* 遺伝子破壊株では非照射時でも PprA タンパク質の細胞内量が照射後と同様に高レベルに保たれているというタンパク質レベルでの実験と考え合わせると、PprM タンパク質は PprA タンパク質をコードする mRNA の発現抑制に直接関わっておらず、mRNA に結合することで PprA タンパク質の翻訳効率を抑制している、あるいは mRNA の安定性を低下させていると考えられた。

(4) 新規遺伝子操作系の開発

プラスミド pUE30 の 2,467 bp の DNA 塩基配列を同定した。同定した塩基配列には、2 つの open reading frame が存在しており、それぞれの orf から推測されるアミノ酸配列は、88 残基 (Orf1) 及び 501 残基 (Orf2) であった。推測されたアミノ酸配列について、既存のアミノ酸とホモロジー検索を行った結果、共にプラスミドの複製に関与するタンパク質とのホモロジーを示した。構築したシャトルベクター pZT23 は、ラジオデュランスでは自己複製できなかったが、デイノコッカス・グランディス (*D. grandis*) (以下、グランディス) 内で自律複製可能であった (図 3)。また、部分欠損したシャトルベクターを用いた形質転換によって、Orf2 が自律複製に必須であることを明らかにした。一方、Orf1 は、グランディス細胞内でのプラスミド安定性を阻害していた。さらに、グランディス細胞内で機能的な外来遺伝子の発現が可能かどうかを明らかにするために、シャトルベクター pZT29 をベースとして、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミドを構築した。その結果、非選択培地地下においても、グランディス細胞内で安定的なルシフェラーゼ遺伝子発現に成功した。新たに開発した宿主ベクター系は、DNA 修復機構の研究に有用であるのみならず、生物を用いた放射性廃棄物の浄化技術分野への応用も可能であると考えられる。

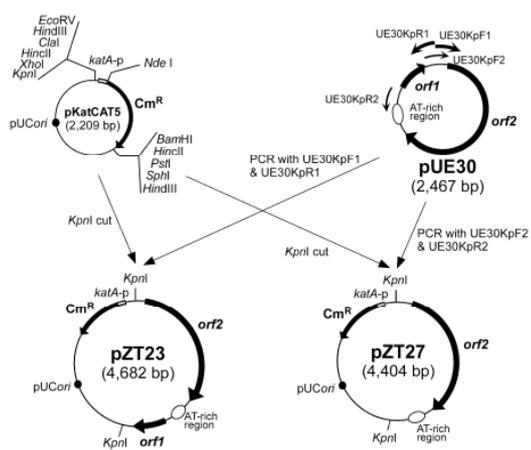


図 3. 構築したプラスミドベクター

(5) 今後の計画

立体構造で今回観測されなかった領域に、PprA タンパク質の機能に重要なアミノ酸があると予想されることから、この領域を含むタンパク質分子全体の立体構造の決定を急ぎたい。また、X 線小角散乱、中性子小角散乱、電子顕微鏡イメージング、*in vivo* タンパク質挙動解析実験等で、PprA タンパク質の高次会合体の性質や DNA との相互作用についての解析を行い、PprA タンパク質が DNA 修復にどのように関与しているのかを明らかにしていく予定である。

2007 年に温泉から分離されたデイノコッカス・ジオサーマリス (*D. geothermalis*) のゲノム配列が、2009 年には砂漠から分離されたデイノコッカス・デゼルティ (*D. deserti*) のゲノム配列が解読され、ラジオデュランスを含めてデイノコッカス属細菌の 3 菌種の遺伝子が比較できるようになった。3 菌種に共通して存在する遺伝子は約 2000 個であり、これらのうち、ゲノムが解読されている他の生物には存在せずデイノコッカス属細菌に特有な遺伝子が 230 個ある。デイノコッカス属細菌に特有な遺伝子の中には、我々のグループが発見した PprA タンパク質と PprI タンパク質をコードする遺伝子が含まれているが、その他のほとんどの遺伝子については、遺伝子の機能がまだ分かっていない。一方、ゲノム解読技術の進歩は著しく、次世代 DNA シークエンサーを用いて、ごく短期間で微生物のゲノムを解読できるようになってきた。今後、デイノコッカス属細菌の他の菌種のゲノムを解読し、デイノコッカス属細菌に特有な遺伝子を更に限定することで、放射線耐性機構に重要な遺伝子の解析が進展すると思われる。ゲノム情報が分かると、その情報を基に、目的遺伝子を人為的に破壊したり、DNA を外部から導入したりすることで、遺伝子の機能を調べることができるようになる。しかしそのためには、外部から導入した DNA をゲノム内の遺伝子と交換したり、人為的に改変

した目的遺伝子をプラスミドベクターに挿入して細胞内で発現させたりする分子生物学的解析のツールとしての遺伝子操作系が整っていることが前提となる。グランディスは、東京都日野市に昔あった水産試験場のコイの体表から日本の研究者が分離した細菌で、ラジオデュランスと同様に高い放射線耐性を持つ。また、グランディスは短桿菌であり、球菌であるラジオデュランスとは増殖時の細胞分裂の様式が異なるという特徴を持つ。グランディスの遺伝子操作系が確立されたことから、次にゲノムを解読すべきターゲットとしてはグランディスが最適だと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Yinjie Yang, 伊藤隆、横堀伸一、板橋志保、島田治男、佐藤勝也、大庭寛史、鳴海一成、山岸明彦、*Deinococcus aerius* sp. nov., isolated from the high atmosphere, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 査読有、59 巻、2009、1862-1866.
- ② 大庭寛史、佐藤勝也、Haitham Sghaier、柳沢忠、鳴海一成、Identification of PprM: a modulator of the PprI-dependent DNA damage response in *Deinococcus radiodurans*, Extremophiles, 査読有、13 巻、2009、471-479.
- ③ 佐藤勝也、Zhenli Du、大庭寛史、鳴海一成、Development of versatile shuttle vectors for *Deinococcus grandis*, Plasmid, 査読有、62 巻、2009、1-9.
- ④ Haitham Sghaier、鳴海一成、佐藤勝也、大庭寛史、三友宏志、Problems with the current deinococcal hypothesis: an alternative theory, Theor. Biosci., 査読有、126 巻、2007、43-45.

[学会発表] (計 29 件)

- ① 山田貢、安達基泰、佐藤勝也、玉田太郎、由良敬、黒木良太、鳴海一成、放射線抵抗性細菌由来 DNA 修復促進蛋白質 PprA の構造機構解析、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 23 日、神戸。
- ② 鳴海一成、佐藤勝也、大庭寛史、由良敬、岩崎憲治、Three-dimensional architecture of the *Deinococcus radiodurans* PprA protein, The 7th International conference on Extremophiles (Extremophiles 2008)、2008 年 9 月 9 日、ケープタウン、南アフリカ。
- ③ 安達基泰、玉田太郎、佐藤勝也、由良敬、

鳴海一成、黒木良太、放射線抵抗性細菌 *Deinococcus aerius* 由来の新たな DNA 修復促進蛋白質 PprA の DNA との相互作用解析、第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会、2007 年 12 月 13 日、横浜。

[図書] (計 1 件)

- ① 鳴海一成、放射線抵抗性細菌、微生物の辞典、朝倉書店、2008 年、pp. 688-691.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://www.taka.jaea.go.jp/rab_div/grr/index_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳴海 一成 (NARUMI ISSAY)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究主幹

研究者番号：90343920

(2) 研究分担者

黒木 良太 (KUROKI RYOTA)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究主席

研究者番号：30391246

由良 敬 (YURA KEI)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・教授

研究者番号：50252226

(H19→H20：連携研究者)