

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22289

研究課題名(和文) DNA複製起点の無い超好熱性アーキアの生命維持機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of the life-sustaining mechanism of hyperthermophilic archaea without DNA replication origin

研究代表者

石野 良純 (Ishino, Yoshizumi)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：30346837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：進化系統樹の根元に位置する *Thermococcus kodakarensis* ゲノムから、oriC領域とその隣のorc1/cdc6遺伝子をそれぞれ欠失させた変異株を単離し、それらが野生株とほぼ同等に増殖することを示した。精製したOrc1/Cdc6のATPase活性がoriC依存的に抑制されたので、Orc1/Cdc6がATP型としてoriCに結合し、開始スイッチを入れると考えた。Orc1/Cdc6がoriC領域の二本鎖を開裂する活性は検出できていないが、oriC欠失変異株ではRadA産生の上昇が見られ、*T. kodakarensis*がoriC依存と非依存のDNA複製様式を使い分けると予想した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生命の維持に必須のDNA複製起点(oriC)がゲノム上に存在しなくても生き続ける超好熱性の生物が、どのように生命を維持しているのかを解明することによって、現在の我々の細胞で怒っている生命維持装置がどのように生まれ進化していったのかを理解することができると考えて行ったもので、未だ解明には至っていないが、着実に研究は進み、我々の理解は深まった。

研究成果の概要(英文)：Mutant strains, lacking the oriC and adjacent orc1/cdc6 gene, respectively, were isolated from *Thermococcus kodakarensis*, which is located at the root of the phylogenetic tree. and they were shown to grow almost in the same manner as the wild type strain. Since the ATPase activity of the purified Orc1/Cdc6 was suppressed in an oriC-dependent manner, it was considered that Orc1/Cdc6 binds to oriC as an ATP-form and turns on the switch to start DNA replication. The activity of Orc1/Cdc6 to unwind the double strand of the oriC region has not been detected, but the oriC-deficient mutant shows an increase in RadA production, and we expect *T. kodakarensis* uses oriC-dependent and independent DNA replication modes properly.

研究分野：分子生物学

キーワード：アーキア DNA複製 複製起点 超好熱菌 DNA組換え

1. 研究開始当初の背景

本研究提案は、地球上の生命の起原に最も近いと言われる超好熱性アーキア細胞の生命維持戦略の基礎を解明するもので、既知の生命維持機構の常識と異なり、未だ知られざる超好熱性アーキア独自の生命維持機構が存在することを解明しようとする挑戦的研究である。アーキアは、細菌と同じ原核生物でありながら、その複製装置は真核生物と類似しており、両者の複製装置は共通の祖先から進化したと考えられる。一方で、アーキアのゲノム DNA は環状であり、本報告者は *Pyrococcus* のゲノム中にアーキア初の *oriC* を同定した (Matsunaga, F., Forterre, P., Ishino, Y., and Myllykallio, H., 2001, In vivo interactions of archaeal Cdc6/Orc1 and minichromosome maintenance proteins with the replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11152-11157)。その後、多くのアーキアは細菌と同様にゲノム中に 1 ヶ所存在する複製起点 (*oriC*) にイニシエータタンパク質が結合することによって DNA 複製が開始されると信じられてきたが、興味深いことにその後の研究で、*oriC* が 2 箇所、3 箇所、4 箇所と複数存在するアーキアが見つかった。このことはアーキアがバクテリアとは異なる特徴を有していることを示しているが、いずれにしても、アーキアも *oriC* に依存した複製機構で生命を維持していると考えられてきた。さらに本報告者は、*P. furiosus* の Orc1/Cdc6 タンパク質が *oriC* 領域に特異的に結合して、その部分の二本鎖を開裂させることを実験的に示した (Matsunaga, F., Takemura, K., Akita, M., Adachi, A., Yamagami, T., and Ishino, Y., 2009, Localized melting of duplex DNA by Cdc6/Orc1 at the DNA replication origin in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Extremophiles* 14, 21-31., Akita, M., Adachi, A., Takemura, K., Yamagami, T., Matsunaga, F., and Ishino, Y., 2010, Cdc6/Orc1 from *Pyrococcus furiosus* may act as the origin recognition protein and Mcm helicase recruiter. *Genes Cells* 15, 537-552)。 *Thermococcus kodakarensis* のゲノム上にも *P. furiosus* の *oriC* と類似した配列が存在し、さらに、*P. furiosus* と同様に *oriC* と予想される部位にイニシエータ候補の Orc1/Cdc6 をコードする遺伝子が存在する (Matsunaga, F., Glatigny, A., Mucchielli-Giorgi, M. H., Agier, N., Delacroix, H., Marisa, M., Durosay, P., Ishino, Y., Aggerbeck, L., and Forterre, P. (2007) Genomewide and Biochemical Analyses of DNA-binding activity of Cdc6/Orc1 and Mcm proteins in *Pyrococcus* sp. *Nucleic Acids Res.* 35, 3214-3222.)。したがって、*T. kodakarensis* の複製も 1 ヶ所の *oriC* から両方向に複製が進むと予想されてきた。超好熱嫌気性アーキアである *T. kodakarensis* の遺伝子操作実験系が確立した後、我々は DNA 修復関連の遺伝子を破壊した変異株を多数取得し、その表現系を解析してきた (Fujikane, R., Ishino, S., Ishino, Y., and Forterre, P., 2010, Genetic analysis of DNA repair in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*. *Genes Genet. Syst.* 85, 243-257.)。複製起点に関しては、本研究の分担者である松見らによって、*oriC* 領域とそれに隣接した *orc1/cdc6* 遺伝子領域を全部欠失させた株が単離され、野生株と同等に生育することがわかった (Gehring AM, Astling DP, Matsumi R, Burkhardt BW, Kelman Z, Reeve JN, Jones KL, Santangelo TJ., 2017, Genome replication in *Thermococcus kodakarensis* independent of Cdc6 and an origin of replication. *Frontier Microbiol.*, 27, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02084>)。 *oriC* とイニシエータが複製にとって必須でないことは驚くべき結果であり、*oriC* (レプリケータ) に複製開始因子 (イニシエータ) が作用して始まるという、これまでの複製研究によって証明されてきたレプリコン説に従わないものである。このような複製起点や複製開始因子が欠損した細胞がどのようにしてゲノム DNA を複製し、細胞分裂して子孫を残していくのか、その分子機構にたいへん興味を持たれた。

2. 研究の目的

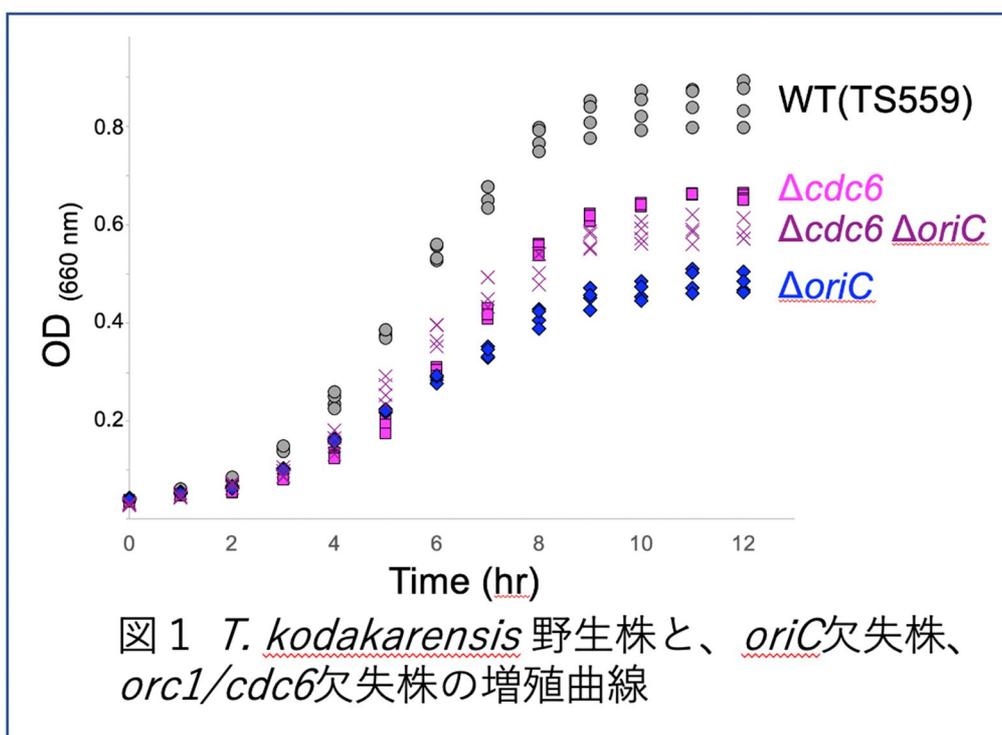
本研究の主題は、*oriC* や *orc1/cdc6* 遺伝子欠損の *T. kodakarensis* がどのようにして複製しているのか、その分子機構を解明しようとするものであり、これまでの学術の体系や方向を大きく変革、転換させる潜在性を有する課題に取り組む。また、生命は熱水から始まったと言われるように、進化系統的に生命の起原に最も近い超好熱菌の複製様式を解析して理解することは、遺伝情報を複製する機構が地球上でどのようにして誕生し、どのように進化してきたのかを知るために大きく貢献すると考えられる。つまり、複製起点からイニシエータが複製を開始して進行するという、我々が理解している複製様式が確立される以前に、生命がどのように遺伝情報を複製して伝達してきたのかを知る手がかりが得られるだろうと考えた。さらに、遺伝情報を複製する機構が地球上でどのようにして誕生し、どのように進化してきたのかを知るために大きく貢献すると考えた。そしてこのような基礎的な学術研究としての意義だけでなく、これらの研究結果を利用すると、人工 DNA 合成装置の開発などの手がかりが得られ、新規遺伝子工学技術展開への応用も期待できると考えて実施を開始した。

3. 研究の方法

本提案では、大きく分けて3つの課題、*T. kodakarensis*の *oriC* 依存型複製機構の解析、*oriC* 非依存型複製機構解析のための RadA と相互作用する制御因子の探索と同定およびその機能解析、RadA の翻訳後修飾の有無とその機能変換の解析を当初の目標にした。*T. kodakarensis* の *oriC*, *cdc6/orc1* 遺伝子欠失変異体が野生株と同等に増殖することは分かったが、*oriC* 依存的な複製機構を有していることは未だ実験的に証明されていなかったため、まずその証明実験を計画した。次に、*T. kodakarensis* の *oriC* -、*orc1/cdc6*-株が生育するために、組換え依存的複製が起きるのではないかと予想されたので、その可能性を調べる計画をした。そして、*T. kodakarensis* が *oriC* 依存複製と非依存複製を使い分けるのであれば、その制御機構があるはずである。本課題では、*T. kodakarensis* の RadA に依存した複製開始機構を想定して、*oriC* -、*orc1/cdc6*-株での *radA* 遺伝子の発現様式を解析するとともに、RadA タンパク質の機能解析を行う。さらに、RadA との相互作用タンパク質を網羅的に探索して調節因子を同定する方法と、RadA の翻訳後修飾による機能変換の両面からリコンビナーゼ活性を制御する機構を解明することとした。

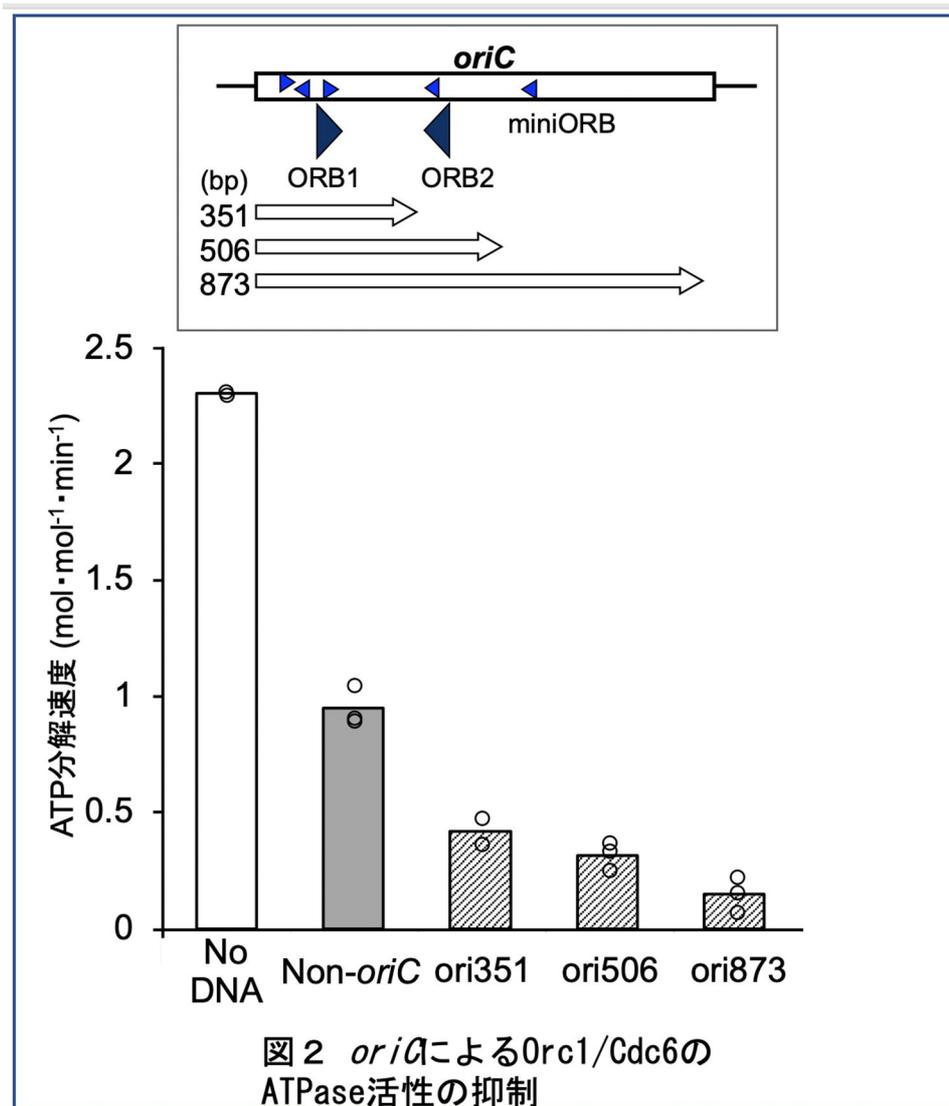
4. 研究成果

本研究開始までに、超好熱性のアーキアの *Thermococcus kodakarensis* のゲノム DNA から、*oriC* 領域と、その隣に位置するイニシエーターと予想される *Orc1/Cdc6* をコードする遺伝子領域全体を欠失させた変異体が単離されていたので、本研究ではまず、*oriC*, *orc1/cdc6* 領域を単独で破壊することにした。1年目には変異株の取得に成功し、それらがどちらも野生株と比べて少し増殖速度が遅くなるものの、はっきりと増速することを証明した(図1)。これより、*T. kodakarensis* は確かに *oriC* に依存しない DNA 複製機能が働いていると確認された。



きた。本報告者は以前に、近縁種の *Pyrococcus furiosus* で *Orc1/Cdc6* が *oriC* に選択的に結合して局所的に二本鎖を開裂することを示している (Matsunaga, F., Takemura, K., Akita, M., Adachi, A., Yamagami, T., and Ishino, Y., 2009, Localized melting of duplex DNA by Cdc6/Orc1 at the DNA replication origin in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Extremophiles* 14, 21-31., Akita, M., Adachi, A., Takemura, K., Yamagami, T., Matsunaga, F., and Ishino, Y., 2010, Cdc6/Orc1 from *Pyrococcus furiosus* may act as the origin recognition protein and Mcm helicase recruiter. *Genes Cells* 15, 537-552). *T. kodakarensis* に存在する *Orc1/Cdc6* がイニシエーターとして機能するのと同様の方法で調べた。しかし、*T. kodakarensis* の *Orc1/Cdc6* を単離精製しようとしたが、タンパク質の性質により、非常に溶解性が悪く、タンパク質の調製が困難を極めた。大腸菌での組換えタンパク質産生系を種々の方法で試みた。発現ベクターを種々用いたり、DnaK, DnaJ, GrpE, GroES, GroEL 分子シャペロンとの共発現系を用いたり、また GST などのタグとの融合タンパク質として産生させ

た後タグ切断する方法や、*Brevibacillus*での分泌産生も試みたが全てうまくいかず、不溶化したものを精製してから、試験管内でリホールディングする方法で何とかATPase活性を有する可溶性のタンパク質標品を調製した。ATPase活性を詳細に解析した結果、Orc1/Cdc6のATPase活性は、*oriC*配列依存的に抑制され、その抑制は非特異的な配列のDNAを加えた時に比べて顕著であった(図2)。この結果は、Orc1/Cdc6がATP型として*oriC*領域に結合し、複製開始のスイッチを入れる可能性を示すものであると考えた。そこで、以前に*P. furiosus*のOrc1/Cdc6で検



出されたように、この *T. kodakarensis* のOrc1/Cdc6タンパク質が *in vitro*で *oriC*領域の二本鎖DNAを開裂する活性を検出しようとしたが、プロジェクトの終了までに成功しなかった。その理由はいくつか考えられるが、*T. kodakarensis*のOrc1/Cdc6の溶解性が悪く、実験条件設定が難しい点が一番の原因であると思われる。しかし、ATPase活性が*oriC*配列特異的に抑制されることに加えて、*oriC*欠変異株では野生株に比べて、RadAリコンビナーゼの産生量が上昇していることが観察されたので、*oriC*が機能しない時にはRadAが主体となって組換え依存的な複製を開始させるシステムが働くためではないかと予想した。以上のことから、報告者は *T. kodakarensis* では *oriC*依存と非依存の2種類のDNA複製様式を使い分けているのではないかと考えている。本成果報告書には、本研究に関連する *T. kodakarensis* のDNA複製機構に関する発表論文や学会発表について記載しているが、上記記載の内容の大部分は未だ未発表であり、現在、これらをまとめて論文原稿を執筆中である。さらに、組換え依存的複製開始機構の鍵を握ると予想されるRadAの相互作用因子については、これまでにスクリーニングを行ってきてその候補はいくつか見つかっているものの、さらに現在も探索を続けており、引き続き解析していき、結果をまとめて執筆する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Hogrel Gaëlle, Lu Yang, Alexandre Nicolas, Boss Audrey, Dulermo Remi, Ishino Sonoko, Ishino Yoshizumi, Flament Didier | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Role of RadA and DNA Polymerases in Recombination-Associated DNA Synthesis in Hyperthermophilic Archaea | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biomolecules | 6. 最初と最後の頁 1045 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom10071045 | 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 |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Ishino Y. | 4. 巻 84 |
| 2. 論文標題 Studies on DNA-related enzymes to elucidate molecular mechanisms underlying genetic information processing and their application in genetic engineering. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem. | 6. 最初と最後の頁 1749-1766 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2020.1778441. | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Oki, K., Nagata, M., Yamagami, T., Numata, T., Ishino, S., Oyama, O., and Ishino, Y. | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 Family D DNA polymerase interacts with GINS to promote CMG-helicase in the archaeal replisome. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nucleic Acids Res. | 6. 最初と最後の頁 3601-3615 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab799 | 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 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 石野園子、松見理恵、John N. Reeve, 石野良純 |
| 2. 発表標題 Isolation and characterization of the deletion mutants for the oriC and the orc1/cdc6 genes |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会ワークショップ「生物における非典型的DNA複製の共通性と多様性」（招待講演）（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yoshizumi Ishino |
| 2. 発表標題 Functional interactions of the core components in the replisome of <i>Thermococcus kodakarensis</i> , |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会 シンポジウム(国際)(招待講演)(国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Keisuke Oki, Mariko Nagata, Takeshi Yamagami, Tomoyuki Numata, Sonoko Ishino, Takuji Oyama and Yoshizumi Ishino, |
| 2. 発表標題 Structural and functional analysis of the interaction between family D-DNA polymerase and CMG-like helicase in the replisome of <i>Thermococcus kodakarensis</i> |
| 3. 学会等名 第44回日本分子生物学会ワークショップ「What is life in a microbe?」(招待講演)(国際WS)(招待講演)(国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|-------|--|-------------------------------|----|
| 研究分担者 | 松見 理恵 (Matsumi Rie) (90397597) | 九州大学・農学研究院・准教授 (17102) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 | | |
|---------|-----------------------|-------------------------|--|
| フランス | Ifremer, | CNRS, University Brest, | |
| 米国 | Ohio state University | Dept of Microbiology | |