

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570131

研究課題名（和文） 高度好熱菌ゲノム情報維持の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of genome maintenance in *Thermus thermophilus*

研究代表者

増井 良治 (MASUI RYOJI)

大阪大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：40252580

研究成果の概要（和文）：高度好熱菌のミスマッチ修復系および塩基除去修復系を構成するタンパク質群を精製し、修復反応の再構成実験や相互作用解析、さらに立体構造解析を行った結果、新たな相互作用によってミスマッチを含む DNA 鎖を識別していること、その DNA 鎖を分解するヌクレアーゼが特有の構造で一本鎖 DNA を認識していること、さらに2種類の DNA ポリメラーゼが異なる塩基除去修復経路で働いていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：I prepared *Thermus thermophilus* HB8 proteins involved in mismatch repair and base excision repair systems and performed reconstitution of repair reactions, protein-protein interaction analysis and crystal structural analysis. Based on the results, I revealed that novel interactions between mismatch repair proteins contribute to strand discrimination, the nuclease which degrades an error-strand recognizes single-stranded DNA by its unique structure, and two DNA polymerases function in different pathways of base excision repair.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：蛋白質化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：酵素, 核酸, 生体分子, ゲノム, 細菌

1. 研究開始当初の背景

ゲノム情報の正確な複製と子孫への伝達を行うために、多様なゲノム情報安定維持機構が進化してきた。放射線や化学変異原などの外的な要因だけでなく、DNA複製時のエラーや活性酸素などの内的要因により、増殖中の細胞のDNAは絶えず損傷を受けている。そのまま放置すると、自然突然変異の増加やDNAの二重鎖切断が生じる。

これらの損傷を修復するため、細胞内には多様なDNA傷害修復系が存在している。

我々は、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 を用いて、直接修復、塩基除去修復、ヌクレオチド除去修復、ミスマッチ修復、組換え修復などを構成する数多くのタンパク質について構造・機能解析を行い、立体構造に基づく反応機構の解明を行ってきた。さらにDNA修復系の場合、さまざまな要因により

DNAに及ぼされた損傷がどのような形で修復されるか、そのメカニズムを多面的に解析することが求められる。そのためには個々のタンパク質の働きだけでなく、修復系全体をシステムとしてとらえた上で複合体やタンパク質ネットワークのレベルでの解析も行う必要があった。また、よく研究されている大腸菌の修復システムはヒトを含む他の多くの生物とは共通しない点が多く、その意味でも高度好熱菌の修復システムの研究には大きな意義があった。

2. 研究の目的

本研究では、高度好熱菌のミスマッチ修復系と塩基除去修復系について反応機構解析を行う。

(1) ミスマッチ修復系

① ミスマッチ修復経路の初期段階は、ミスマッチ塩基対を認識する MutS、および MutS とヌクレアーゼと結びつける MutL によって担われている。しかし、大腸菌など一部の生物を除いて、ミスマッチを含む DNA 鎖を切断するニッキングエンドヌクレアーゼは同定されていない。さらに、ミスマッチ塩基対のどちらの塩基を修復すべきか、新旧鎖を区別する機構も不明である。ヒトを含む多くの生物のミスマッチ修復系において解決されるべき最も重大な課題であるこの2点が、第1の研究目的である。

② ミスマッチ修復経路の中盤では、切断部位から鎖を巻き戻す UvrD ヘリカーゼ、二重鎖の復元を阻害する一本鎖 DNA 結合タンパク質 (SSB)、ほどかれた一本鎖を分解する RecJ エキソヌクレアーゼが共同して働く。そして最終的には DNA ポリメラーゼ III により修復合成が行われ、DNA リガーゼにより二重鎖が復元される。これら中盤以降で働くタンパク質個々の働きは実験的に示されているが、それらの要素が同時に存在する環境でどのような挙動を示すのかについての理解は不十分である。また、他のヘリカーゼやエキソヌクレアーゼが関与している可能性も考えられている。これらが共存する条件での働きを調べるのが第2の目的である。

(2) 塩基除去修復系

① 塩基除去修復過程の初期段階は、傷害塩基特異的な各種の DNA グリコシラーゼによる傷害塩基の除去によって開始される。続いて塩基除去の結果として生じた脱塩基部位で DNA 鎖が AP エンドヌクレアーゼあるいは AP リアーゼによって切断される。DNA 鎖に生じたニックあるいはギャップは DNA ポリメラーゼ I、DNA リガーゼによって二重鎖に復元され、修

復が完了する。しかし近年、新たに DNA ポリメラーゼ X という酵素が発見された。第一の目的はこの新しいポリメラーゼが塩基除去修復系にどのように関与するかを明らかにすることである。

② 真核生物の塩基除去修復系では、1ヌクレオチドギャップをそのまま埋める経路と、ギャップから長い DNA が合成され、置換された DNA 鎖が根元から切断される経路が存在する。バクテリアでは前者の経路はよく知られているが、後者の経路が存在するかどうかは不明である。そこで、第2の目的は、バクテリアにおける後者の経路の存在を検証することである。

③ 塩基除去修復系では各反応段階でのタンパク質間の相互作用が示唆されているが、それによって活性がどのように影響を受けるのか等、システム全体として見たときの詳細はほとんど明らかにされていない。また、その基盤となる立体構造情報もまだいくつかの酵素については得られていない。これらを解明することが第3の目的である。

3. 研究の方法

(1) ミスマッチ修復系

① MutS2, MutL について、ミスマッチを含む DNA だけでなく、複製過程で存在すると予想される種々の構造を擬した DNA に対する結合ならびに切断活性の特異性を調べる。同様の測定を MutS, ATP, ADP の存在下・非存在下でも行い、ヌクレアーゼ活性に対する影響(特に切断部位の変化や鎖特異性)を調べる。切断が見られた場合には、生成物を質量分析にかけ、切断部位ならびに切断様式を決定する。ヌクレアーゼの活性中心を有すると予想される各々の C 末端ドメインについても同様の解析を行う。

② ニッキングエンドヌクレアーゼの候補である MutS2, MutL は、エラー鎖を識別する仕組みに関与していると予想される。そこで、それぞれに対する抗体を用いた免疫沈降法により高度好熱菌細胞内で相互作用しているタンパク質を抽出し、質量分析により同定する。平行して、結合が想定されるタンパク質については、個別に発現・精製し、*in vitro* での解析により、相互作用の確認と相互の活性に与える影響を調べる。同様の解析は全長だけでなく、C末端ドメインについても行う。

③ MutL や MutS2 の全長の立体構造はまだ明らかになっていない。なかでも、ヌクレアーゼ活性を有するそれぞれの C 末端ドメインは新奇構造である。さらに RecJ など他のミスマッチ修復関連酵素の構造も未決定なものが多い。そこで、これらのタンパク質および活性

ドメインを発現・精製し、X線結晶解析による立体構造決定を目指す。

④ MutS, MutL を含むタンパク質群を用いて再構成系を確立し、ミスマッチを含む鎖を識別するのに必要な因子を同定する。相互作用が見つかったタンパク質については、クロスリンク実験や重水素交換反応、質量分析などを利用して、相互作用部位の同定を行う。

(2) 塩基除去修復系

① DNA ポリメラーゼ X を精製し、そのポリメラーゼ活性ならびにヌクレアーゼ活性を解析する。さらに、N末端とC末端ドメインを個別に調製し、それぞれの活性中心がどちらのドメインに存在するかを明らかにする。また、ポリメラーゼ活性の基質として、どのような構造をもつものとよく反応するかを調べることで、塩基除去修復系への関与を検討する。

② 傷害塩基を除去するウラシルDNAグリコシラーゼ、APエンドヌクレアーゼであるエンドヌクレアーゼ IV、DNAポリメラーゼ、DNAリガーゼを調製し、それらを用いて塩基除去修復系の再構成系を構築する。その反応で傷害を含むDNAがどのように修復されるかを調べることで、1塩基ギャップだけをうめる経路とDNAを長く合成する経路の存在を検証する。

4. 研究成果

(1) ミスマッチ修復系

① MutLのヌクレアーゼ活性はC末端ドメインが担っているが、N末端ドメインにATPが結合すると非特異的な分解活性が抑制され、MutS存在下でミスマッチ特異的なDNA結合能を示すことを明らかにした。ドメイン解析の結果からは、MutLのヌクレアーゼ活性が2つのドメイン間の相互作用を介してヌクレオチドによって制御されていることを示した。その制御に重要な働きをする領域も同定した。一方、MutS2は分岐構造をもつDNAを認識・分解することから、相同組換えの抑制に働くと考えられた。

② 高度好熱菌のミスマッチ修復系を構成するタンパク質群を個別に精製し、修復過程を部分的に再構成した結果、新旧鎖の識別においてMutLとDNAポリメラーゼIIIのサブユニット等との相互作用が鎖識別に重要であることが分かった。この相互作用はこれまで大腸菌やヒトの系で提唱されているものとは異なっており、新たな鎖識別機構の存在を示唆するものであった。

③ エラー鎖の分解に働くエキソヌクレアーゼRecJの立体構造をX線結晶解析法により

初めて決定し、一本鎖DNAに特異的に結合するドメインを新たに発見した(図1)。さらに、RecJと同じファミリーに属する別のタンパク質の活性も明らかにし、それとの比較もふまえて、RecJの基質認識および反応機構モデルを提唱した。一方、MutS2のC末端ドメインの結晶構造を決定し、DNase Iなどの構造類似性を見いだした(図2)。

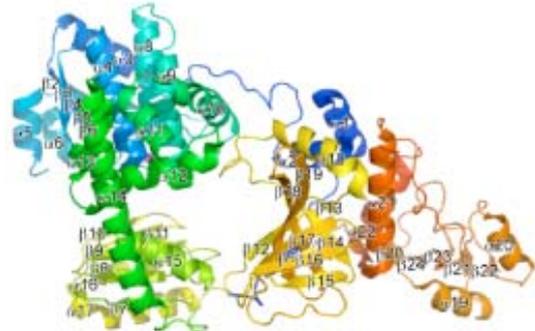


図 1

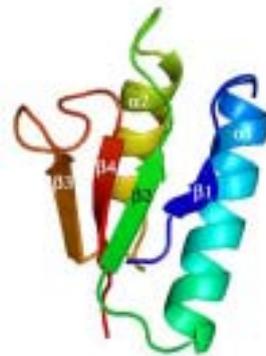


図 2

④ ミスマッチ修復系に関与する新たなエキソヌクレアーゼとしてExoIを発見した。この酵素はRecJとは異なる向きにDNAを分解し、さらに遺伝子破壊株では自然突然変異率が上昇したことなどから、ミスマッチ修復においてエラー鎖を分解する新たな酵素であることを示した。

(2) 塩基除去修復系

① DNAポリメラーゼXのDNA合成活性が1塩基のギャップを修復する反応に特化した酵素であることを見いだした。さらに、C末端のPHPドメインがエキソヌクレアーゼ活性を担うことを示した。さらにヌクレオチドおよびDNAとの複合体構造をX線結晶解析法により初めて決定した(図3)。その結果、DNA結合に伴い、ポリメラーゼドメイン中のサブドメインが活性発現のために大きな動きを示すことが分かった。さらに生化学的な解析などから、他のDNAポリメラーゼとは異なり、DNAなしでもヌクレオチドが強く結

合し、結合した構造が既知のものとは異なることを見いだした。これらの結果に基づいて、DNA ポリメラーゼ X の反応機構を新たに提唱した。

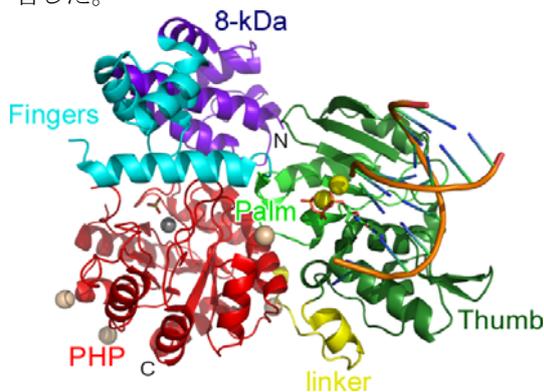


図 3

②高度好熱菌由来の塩基除去修復系で働く酵素を個別に精製し、その再構成系を用いて調べた結果、ウラシル DNA グリコシラーゼの作用によって生じた脱塩基部位をエンドヌクレアーゼ IV が切断し、生じた脱塩基部位から DNA ポリメラーゼ I が鎖置換合成を行うことを示した。その過程で、DNA ポリメラーゼ自身が修復過程で生じるフラップ構造を構造特異的ヌクレアーゼ活性によって除去することを明らかにした。この結果は、DNA ポリメラーゼ X と DNA ポリメラーゼ I が異なる経路で働いていることを示しており、さらにバクテリアにおいても真核生物の塩基除去修復系と似た経路が存在している可能性を示唆するものである。

③傷害塩基を除去したあとの脱塩基部位を切断する AP エンドヌクレアーゼ 2 種の立体構造を決定した結果、DNA との強い結合に寄与する新たな基質認識部位の存在を明らかにした (図 4)。

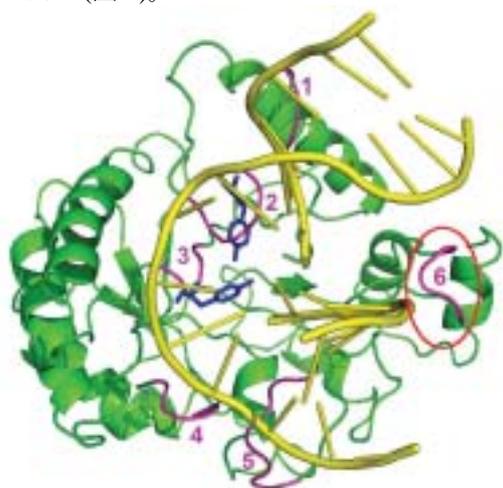


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 23 件)

① Asano, R., Ishikawa, H., Nakane, S., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., Masui, R. Long type endonuclease IV has an additional C-terminal loop that increases binding affinity to DNA. *Acta Crystallogr.* **D67**, 149-155, 平成 23 年 (2011 年), 査読あり

② Shimada, A., Masui, R., Nakagawa, N., Takahata, Y., Kim, K., Kuramitsu, S., Fukui, K. A novel single-stranded DNA-specific 3'-5' exonuclease, *Thermus thermophilus* exonuclease I, is involved in several DNA repair pathways. *Nucleic Acids Res.* **38**, 5692-5705, 平成 22 年 (2010 年), 査読あり

③ Wakamatsu, T., Kitamura, Y., Kotera, Y., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., Masui, R. Structure of RecJ exonuclease defines its specificity for single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* **285**, 9762-9769, 平成 22 年 (2010 年), 査読あり

④ Nakane, S., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., Masui, R. Characterization of DNA polymerase X from *Thermus thermophilus* HB8 reveals the POLXc and PHP domains are both required for 3'-5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 2037-2052, 平成 21 年 (2009 年), 査読あり

⑤ Fukui, K., Nishida, M., Nakagawa, N., Masui, R., and Kuramitsu, S. Bound nucleotide controls the endonuclease activity of mismatch repair enzyme MutL. *J. Biol. Chem.*, **283**, 12136-12145, 平成 20 年 (2008 年), 査読あり

〔学会発表〕(計 45 件)

① 中根修平, 増井良治 Structural and functional analysis of bacterial DNA polymerase X involved in DNA repair processes. 第 83 回日本生化学会大会, 2010 年 12 月 9 日, 神戸ポートアイランド

② 島田敦広, 増井良治 DNA ミスマッチ修復における鎖除去ステップの解析. 第 83 回日本生化学会大会, 2010 年 12 月 8 日, 神戸ポートアイランド

③ 若松泰介, 増井良治 Contribution of OB-fold domain to the activity of RecJ exonuclease. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 10 日, パシフィコ横浜

④ 福井健二, 増井良治 DNA ミスマッチ修復系初期反応における MutL エンドヌクレアーゼ活性の制御機構. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会. 2008 年 12 月 12 日. 神戸ポートアイランド

⑤ 浅野瑠一, 増井良治 好熱菌由来 endonuclease IV の 3'-5' exonuclease 活性発現機構の解析. 第 31 回日本分子生物学会年会・

第 81 回日本生化学会大会 合同大会. 2008
年 12 月 12 日. 神戸ポートアイランド

〔図書〕 (計 1 件)

倉光成紀, 増井良治 化学同人 「やさしい
原理からはいるタンパク質科学実験法 3 : タ
ンパク質のはたらきを知る」 (共著) 平成 21
年 (2009 年), 1-21 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増井 良治 (MASUI RYOJI)

大阪大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号 : 40252580