

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05394

研究課題名（和文）アーキアにおける新規DNA修復機構の探索

研究課題名（英文）Study on a DNA repair mechanism in archaea.

研究代表者

石野 園子（Ishino, Sonoko）

九州大学・農学研究院・学術特定研究者

研究者番号：80399740

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* 由来のミスマッチDNA切断酵素EndoMSについて、相互作用因子の網羅的な探索をおこなった。見出した新規のEndoMS結合タンパク質について、その機能およびEndoMSとの複合体構造を解析した。
Pyrococcus furiosus 由来EndoMSとDNAクランプPCNAとの複合体構造を解析し、相互作用様式を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の対象であるタンパク質EndoMSは、バクテリアや真核生物に共通のミスマッチDNA修復酵素とはまったく異なる、アーキア由来の酵素であり、関与する分子機構はほとんど明らかになっていなかった。新たな相互作用因子を見出しその解析により、地球上の生物のDNA切断酵素の進化に関して科学的な考察が得られた。
また、EndoMSとDNAクランプPCNAとの相互作用様式を明らかにしたことで、アーキアにおけるDNA修復機構の理解が進んだ。

研究成果の概要（英文）：A comprehensive search was conducted to identify proteins interacting with EndoMS, a mismatch DNA-cleaving enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. The structure and function of a novel EndoMS-binding protein were analyzed. The structure of EndoMS-PCNA complex from *Pyrococcus furiosus* was analyzed and the mode of interaction was elucidated.

研究分野：分子生物学

キーワード：アーキア DNA切断酵素 DNA修復

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の維持と伝達の分子機構は、分子生物学の中心的課題として今日まで活発な研究がなされ、その理解が深まってきた。DNA は絶えず損傷や化学変化を受け、また複製にともなって生じるエラーによって遺伝情報の維持が脅かされている。しかし遺伝情報が崩壊しないのは、DNA を継続的に監視し修復する機構が何重にも働いているからである。したがって DNA 修復は生命の維持と種の保存の根幹に関わる現象で、生物種を超えた共通の機構が存在するいっぽうで、多様な生命に対応して様々な環境下での生息に応じて複雑に進化してきた。このような学術的背景を基に、我々は生物の 3 ドメインのひとつであるアーキアの遺伝情報がどのように守られて種を保存してきたのかという問いに向き合っており、100°C という高温で生息する超好熱性アーキアを用いて DNA 修復機構を解析してきた。本研究で着目したのはミスマッチ修復(MMR)である。DNA 鎖中のアデニンとチミン、シトシンとグアニンの組み合わせ以外の塩基対はミスマッチ塩基対と呼ばれ、修復しなければ変異の原因となる。MMR は生物が進化の過程で獲得した重要な修復機構の一つであり、MutS/MutL を介した MMR 機構はバクテリアと真核生物に広く保存されており、遺伝学的にも生化学的にもすぐれた研究がなされてきた。ところが多くのアーキアと一部のバクテリア(*Corynebacterium*, *Mycobacterium*)は、この MutS/MutL を持たず、長年の間ミスティアスな疑問の一つであった。

我々は、超好熱性アーキアから、MutS/MutL とは配列も構造も全く異なる酵素が G/T、G/G、T/T といったミスマッチ塩基対を認識し、DNA の二本鎖切断を起こして働いていることを発見し、Endonuclease MS (EndoMS)と名付けた。さらに、MutS/MutL を有さないバクテリアとして、食品工業用としても重要な *C. glutamicum* から EndoMS を発見し、EndoMS 遺伝子破壊株を作成して細胞内に変異が蓄積することを証明した。これらの研究によって、MutS/MutL 経路とは異なる、アーキア由来の新規 MMR 経路の存在が明らかになった。しかし、EndoMS の基質特異性が GT 型 (G/T、G/G、T/T) のミスマッチに偏っていて、AC 型 (A/C、C/C、A/A) ミスマッチを認識しないという問題が疑問点として残った。AC 型ミスマッチに対して別の修復経路が存在するのか？また EndoMS が働く修復経路ではどのような相互作用因子が関与して進行していくのか？これらの課題に向き合うことは、生物のゲノム安定性維持機構を解明する上で、たいへん重要である。

2. 研究の目的

- (1) ミスマッチ塩基を含む DNA 鎖を切断する未知の酵素がアーキアに存在するのではないかと予想し、その活性を超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* から探索する。
- (2) EndoMS が作用する MMR 機構がどのように進行するのか、相互作用因子の探索および機能解析をおこない修復経路の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) A/C 型のミスマッチを切断する新規酵素のスクリーニングを 2 種類の方法でおこなった。ひとつは *T. kodakarensis* ゲノム上の遺伝子(ORF)とその両側の隣接領域(500~700 bp)を組み込んだプラスミドのライブラリを用いる方法である。各々のプラスミドで大腸菌を形質転換し、培養した菌体を超音波破碎して細胞抽出液を作製した後、80°C で熱処理して得られた耐熱性のタンパク質を含む粗酵素液を用いて切断活性を調べた。もうひとつは *T. kodakarensis* および *Pyrococcus furiosus* の細胞抽出液をカラムクロマトグラフィーにより分画し、その画分について切断活性を調べた。

(2) EndoMS と相互作用する因子の探索に酵母 two-hybrid 法を用いた。*T. kodakarensis* 由来 EndoMS 遺伝子を標的 DNA 配列とし、ゲノム DNA 断片をライブラリとして用いた。検出された相互作用因子の候補および EndoMS について、組換えタンパク質を作製して *in vitro* における機能解析および結晶構造解析をおこなった。また、すでに知られている相互作用として EndoMS-PCNA があるが、DNA に作用する様式が未解明であったので、*P. furiosus* 由来のタンパク質を用いて複合体構造の取得を目指した。

4. 研究成果

(1) AC 型ミスマッチ切断酵素の網羅的な探索
スクリーニングに用いるプラスミドライブラリは、クローニングできなかった遺伝子があるものの、約 2000 の遺伝子候補がある。すでに明らかな機能が報告されているものをスクリーニング対象から除外した。Archaeal Clusters of Orthologous Genes (arCOGs) データベース (Makarova, KS. et al. Life (2015)) ではアーキアの遺伝子について機能予測や保存性など有用な情報が得られるので、これを利用して核酸に作用する可能性のあるものから優先順位をつけた。A/C 型のミスマッチを有するオリゴ DNA に対する切断活性を指標にスクリーニングを実施した。数種の粗酵素液に DNA 分解活性を検出したが、それらはミスマッチを持たない二本鎖 DNA に対しても切断を生じたことから、目指すところの A/C 型ミスマッチに作用する酵素でないかと判断した。その中で TK0069 は NCBI のデータベースで CRISPR-associated exonuclease, Cas4 family とアノテーションされており、高純度の組換えタンパク質を作製して解析を行なった。

耐熱性で dsDNA に対する切断活性が見られ、さらなる解析に進めたいと考えている。これまでに単独の酵素で AC 型ミスマッチを切断する酵素が得られなかったことから、複合体を形成している可能性を考えて、細胞抽出液を用いて活性画分を調べる方法を実施した。超好熱性アーキアの *T. kodakarensis* および *P. furiosus* を大量培養し、それぞれ細胞抽出液を作製した。この抽出液を用いて AC 型ミスマッチを含む二本鎖 DNA に対する切断活性を調べた。この抽出液には多種のヌクレアーゼが含まれており、非特異的な切断産物が生じて解析には不都合であったため、陽イオン交換カラムクロマトグラフィーで分画した。それぞれの画分についてスクリーニングを続けたが、目的の活性を検出することができなかった。同様に細胞抽出液の分画操作を陰イオン交換カラムクロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーでそれぞれ実施したが、これらのカラムによる分画では多種のヌクレアーゼが同一画分に含まれるため、特異的な活性を検出することができなかった。

(2) EndoMS と相互作用する因子の探索

T. kodakarensis のゲノム DNA を用いて 500~1500 bp 長の断片をゲノムライブラリとし、*endoMS* 遺伝子を用いて酵母ツーハイブリッド法による網羅的な探索をおこなった結果、3 つの相互作用候補タンパク質、TK0097, TK0411, TK0583 が得られた。これら 3 つのアミノ酸配列は C 末端側の同一性が高く、またそれぞれの遺伝子がコードされている領域は、ゲノム上でウイルス様の外来 DNA が挿入されたと考えられている領域であった。これらの一つ、TK0583 について組換えタンパク質を作製し、EndoMS の切断反応に対する機能を調べたところ、TK0583:EndoMS が約 1:1 のモル比で、活性を阻害することがわかった(図 1)。そこで EndoMS との複合体を作製し結晶構造解析を行なった。TK0583 の 2 分子が EndoMS 二量体と結合している構造をとることがわかり、TK0583 結合部位は EndoMS が基質の二本鎖を挟みこむ部位に相当した(図 2)。

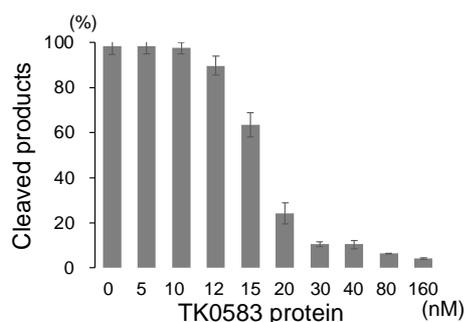


図 1 TK0583 による EndoMS の活性阻害

TK0583 の阻害機能と構造から考えると、EndoMS のミスマッチ修復の進行に働くとは考え難く、むしろ阻害作用の意義を考察する必要があった。EndoMS は II 型制限酵素に構造が似ており、分子進化的に二量体で働くヌクレアーゼと共通の祖先をもつ可能性がある。そこで、進化の過程で、アーキアやバクテリアにおいて外来遺伝子が侵入したときに、宿主の防御に働くような二量体のヌクレアーゼが存在し、TK0583 およびそのホモログはそれに対抗するために外来遺伝子が持ち込んだ痕跡ではないか、という可能性が考えられた。TK0583 の制限酵素に対する働きを調べたが、制限酵素の阻害例は未だ見つからない。微生物の遺伝子配列データベースを検索すると、TK0583 に似たタンパク質をコードする遺伝子の近傍に、核酸関連タンパク質がコードされている例が見つかったので、核酸に働く酵素と関係している可能性が考えられる。

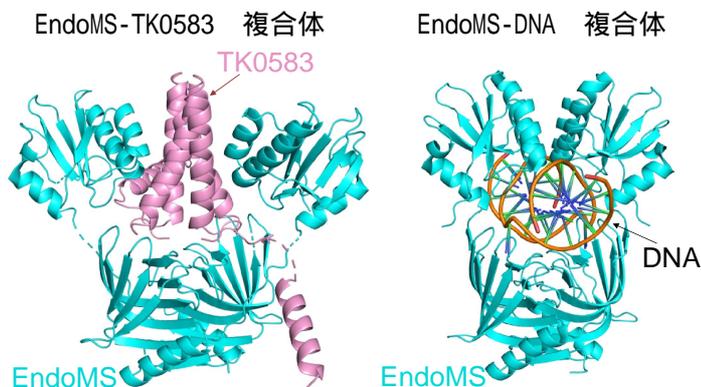


図 2 EndoMS の複合体構造

EndoMS の相互作用因子としても知られる PCNA は、環状構造の中に二本鎖 DNA を通して結合し、EndoMS のミスマッチ塩基対を含む二本鎖 DNA へのアクセスを助けていると予想している。その機能的な構造を得るために、*P. furiosus* 由来 EndoMS の不活化変異体(D162A)を用いて、EndoMS-PCNA-dsDNA の三者から成る複合体の調製を行なった。合成オリゴ DNA を用いて GT ミスマッチ部位を有する種々の長さの二本鎖 DNA を作製した。安定な三者複合体の取得に成功したが、X 線結晶構造解析を行なったところ、EndoMS 二量体と PCNA 三量体から成る二者複合体であることがわかった。しかしこの結果により、これまでに詳細な構造が不明であった EndoMS の PIP-box を含む C 末端ドメイン(CTD)と PCNA の CTD 間の安定な相互作用様式を明らかにすることができた。また、この相互作用様式を機能的に解析するために種々の変異体を作製し、表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて、溶液中の相互作用の強度を測定した。EndoMS の PIP-box を欠失させたところ、EndoMS の野生型と比較して PCNA との相互作用は大幅に低下したことから、見出した相互作用が重要であることがわかった。しかし、相互作用が完全に消失しなかったことから、第 2 の相互作用部位の存在が示唆された。

EndoMS の相互作用因子としても知られる PCNA は、環状構造の中に二本鎖 DNA を通して結合し、EndoMS のミスマッチ塩基対を含む二本鎖 DNA へのアクセスを助けていると予想している。その機能的な構造を得るために、*P. furiosus* 由来 EndoMS の不活化変異体(D162A)を用いて、EndoMS-PCNA-dsDNA の三者から成る複合体の調製を行なった。合成オリゴ DNA を用いて GT ミスマッチ部位を有する種々の長さの二本鎖 DNA を作製した。安定な三者複合体の取得に成功したが、X 線結晶構造解析を行なったところ、EndoMS 二量体と PCNA 三量体から成る二者複合体であることがわかった。しかしこの結果により、これまでに詳細な構造が不明であった EndoMS の PIP-box を含む C 末端ドメイン(CTD)と PCNA の CTD 間の安定な相互作用様式を明らかにすることができた。また、この相互作用様式を機能的に解析するために種々の変異体を作製し、表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて、溶液中の相互作用の強度を測定した。EndoMS の PIP-box を欠失させたところ、EndoMS の野生型と比較して PCNA との相互作用は大幅に低下したことから、見出した相互作用が重要であることがわかった。しかし、相互作用が完全に消失しなかったことから、第 2 の相互作用部位の存在が示唆された。

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 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Feng, X., Zhang, B., Xu, R., Gao, Z., Liu, X., Yuan, G., Ishino, S., Feng, M., Shen, Y., Ishino, Y. and She, Q.	4. 巻 12
2. 論文標題 Enzymatic switching between archaeal DNA polymerases facilitates abasic site bypass.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontier Microbiol.	6. 最初と最後の頁 802670
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.802670.	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 Feng, X., Zhang, B., Xu, R., Gao, Z., Liu, X., Yuan, G., Ishino, S., Feng, M., Shen, Y., Ishino, Y. and She, Q.	4. 巻 13
2. 論文標題 A well conserved archaeal B-family polymerase functions as a mismatch and lesion extender.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e02659-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mbio.02659-21	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 Okii, 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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石野園子
2. 発表標題 ゲノム安定性維持に寄与するエンドヌクレアーゼ
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石野園子
2. 発表標題 アーキアにおけるミスマッチ修復酵素の進化的な考察
3. 学会等名 第35回日本Archaea研究会講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 石野園子 (伊藤 政博、鳴海 一成、道久 則之(監修))	4. 発行年 2023年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 8
3. 書名 極限環境微生物の先端科学と社会実装最前線 第3章第3節アーキアの新規ミスマッチ修復酵素の特性	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------