

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580098

研究課題名（和文） 耐熱性 DNA 修復促進タンパク質の構造機構解析による実用化アプローチ

研究課題名（英文） Approach toward the practical use of thermotolerant DNA repair promoting protein by structure-machinery analysis

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）：中等度好熱性の放射線抵抗性細菌 *Deinococcus geothermalis* 由来の DNA 修復促進タンパク質 PprA の構造・機能について、分子遺伝学、構造生物学、生化学的解析を行い、PprA タンパク質が当該菌の DNA 修復機構に重要な役割を持つことを明らかにした。また、PprA タンパク質と同様に DNA 損傷に応答する DdrA タンパク質の X 線結晶構造解析から、*Deinococcus radiodurans* DdrA タンパク質の基本 7 量体構造を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The role of DNA repair promoting protein PprA in the moderately thermophilic radioresistant bacterium *Deinococcus geothermalis* was revealed by a combination of molecular genetics, structural biology and biochemistry. X-ray crystal structure analysis revealed that the basic heptamer structure of the *Deinococcus radiodurans* DdrA that responds to DNA damage along with PprA protein.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2012年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

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、耐熱性

1. 研究開始当初の背景

デインコッカス属細菌は、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。デインコッカスを放射線照射すると、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、デインコッカスはこの DNA 2 本鎖切断を修復する能力に優れている。デインコッカスの優れた 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。デインコッカス属細菌の中で最初に分離されたのは、デインコッカス・ラジオデュランス (*Deinococcus radiodurans*) (以下、ラジオデュランス) であり、放射線抵抗性細菌の DNA 修復機構についてのほとんどすべての研究

はラジオデュランスを用いて行われてきた。

研究代表者らは、これまでに、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新規タンパク質 PprA を発見した。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機能があること等を明らかにしてきた。さらに、PprA タンパク質の DNA 末端結合反応促進活性の利用について技術移転を行い、高効率 DNA ライゲーションキット「TA Blunt Ligation Kit」が和光純薬工業から発売になっている。

しかしながら、上市されている高効率 DNA ライゲーションキットは、PprA タンパク質の安定性に問題があり、PprA タンパク質と T4 DNA リガーゼを、DNA との反応の直前に混合する必要がある。そこで、研究代表者は好熱菌の PprA タンパク質に着目した。ラジオデュランスは至適生育温度が 30℃ の常温菌であるのに対して、ラジオデュランスと同じデイノコッカスに属するデイノコッカス・ジオサーマリス (*Deinococcus geothermalis*) (以下、ジオサーマリス) は至適生育温度が 45~50℃ の中等度好熱菌である。デイノコッカス属の高度好熱菌は、今のところ発見されていない。ジオサーマリスのゲノム DNA の塩基配列が 2007 年に決定され、ラジオデュランス *pprA* 遺伝子のホモログがジオサーマリスのゲノムに存在することが分かっている。

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。その中で、本研究では、放射線抵抗性の好熱菌ジオサーマリスの DNA 修復促進タンパク質 PprA の構造・機能について、分子遺伝学、構造生物学、生化学的解析を行うとともに、耐熱性 PprA タンパク質の利用開発を進めることで、バイオ研究試薬としての実用化に結びつけることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子破壊株の作製

遺伝子破壊株の作製にはラジオデュランスで確立済みの方法を適用し、遺伝子破壊用マーカー供給プラスミド pKatHPH4 及び pKatAAD2 を使用した。

(2) プラスミド相補試験

遺伝子破壊株中で、プラスミドベクターに挿入した *pprA* 遺伝子を発現させ、欠失した遺伝子の機能を相補するかどうかを調べた。

(3) X 線結晶構造解析

PprA タンパク質の結晶から X 線回折データを取得し、分子置換法により結晶構造解析を決定した。

(4) *In silico* 解析

Tri-oligonucleotide usage correlations (TOUC)に着目し、2つのオルソログ間の機能の類似性を評価した。

4. 研究成果

(1) *pprA* 遺伝子破壊株の性質

ジオサーマリスの PprA タンパク質の機能解析のため、ゲノム上の *pprA* 遺伝子 (Dgeo_2628) 及びその上流の 231 bp プロモーター領域をカナマイシン耐性遺伝子と二重交叉で交換し、遺伝子破壊株 XGPA1 を作製した (図 1)。XGPA1 株は、野生株に比べて、ガンマ線に感受性を示した (図 2)。このことから、*pprA* 遺伝子は、デイノコッカス・ジオサーマリスの DNA 修復機構に重要な役割を持つことが明らかになった。

(2) 同一菌種でのプラスミド相補試験

ジオサーマリスゲノム上の *pprA* 遺伝子及びその上流の 231 bp プロモーター領域を含む計 1140 bp を PCR 増幅し、予め構築しておいたジオサーマリス-大腸菌シャトルベクター pGEC6 の *EcoRV* 部位に挿入し、発現ベクター pDG2628L1 を作製した (図 1)。この発現ベクターを遺伝子破壊株 XGPA1 に導入したプラスミド相補試験株 XGA1 (pDG2628L1) は、XGA1 株の感受性を相補し、ガンマ線に対して野生株レベルに耐性を示した (図 2)。この結果は、*pprA* 遺伝子発現がデイノコッカス・ジオサーマリスの DNA 修復にとって重要であることを裏付けるものである。

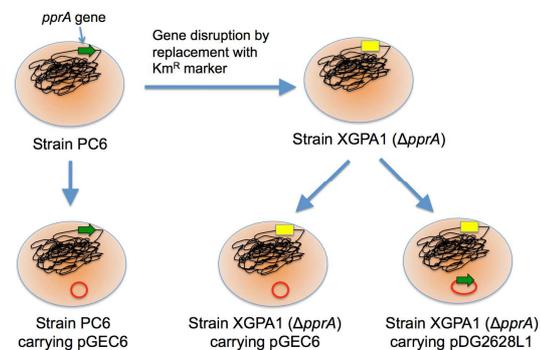


図 1. 遺伝子破壊株の作製とプラスミド相補試験のための形質転換 (Strain PC6 はジオサーマリスの野生株)

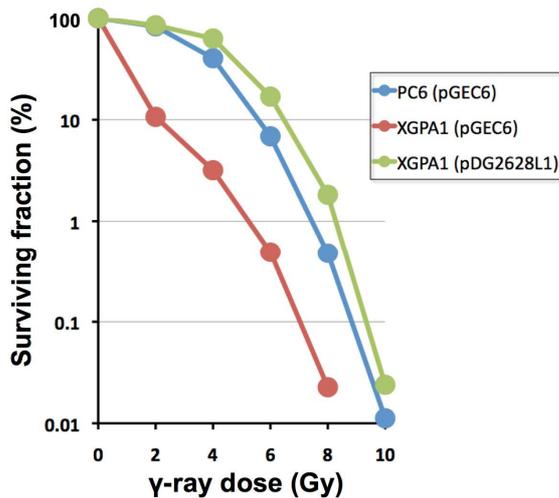


図2. プラスミド相補試験の結果

(3) X線結晶構造解析

放射線抵抗性細菌由来のDNA修復促進タンパク質 PprA の構造解析を進め、PprA のホモポリマー形成に関わるアミノ酸残基に変異を導入し、ホモ2量体を形成するタンパク質変異体の結晶を用いて、2.5 Å分解能のX線回折データを取得し、分子置換法により結晶構造解析に成功した。この構造をもとに、PprA のホモポリマー形成のモデルを構築した。このモデルでは、PprA がホモポリマーを形成したときタンパク質モノマー8分子で螺旋1回転し、その距離は約400から420 Åであった(図3)。また、この螺旋構造の内側に正電荷を持つアミノ酸残基が集積していた。この結果から、PprA タンパク質はDNAを取り巻くように結合し、上記の正電荷を持つアミノ酸が集積する領域がDNAとの結合ドメインを形成しているものと考えられた。

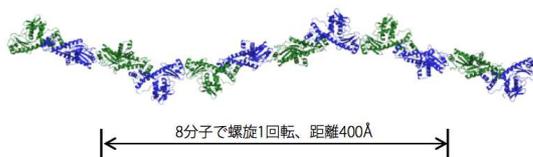


図3. PprA ホモポリマーの構造モデル

(4) RecFOR タンパク質複合体の機能解析

相同組換え修復経路で機能する RecF、RecO、RecR の機能解析を進め、RecFOR タンパク質複合体の中でも、RecF タンパク質が組換え修復に一番重要で、相同組換え修復機構の初期過程において、相同組換え反応を司る RecA タンパク質の活性化 (LexA タンパク質の自己分解の促進から判定) を担っていることを明らかにした(図4)。また、リファンピシン耐性を付与する *rpoB* 変異型遺伝子を用いた形質転換能の解析から、RecR タンパク質は組換え反応の基質となるDNAの安定性に寄与して

いることが分かった(発表論文②)。

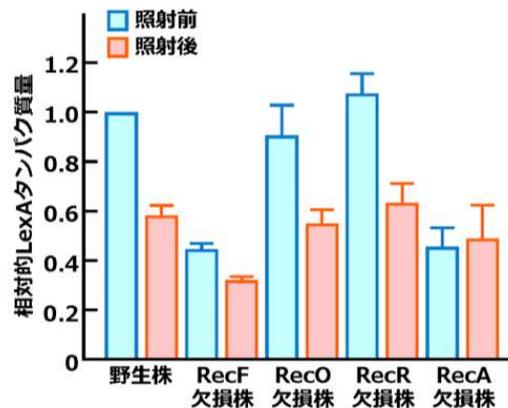


図4. ガンマ線照射前後の細胞内 LexA タンパク質含量の変化

(5) 機能類似性予測

2つのオルソログ間の機能の類似性を評価するための方法を開発し、ジオサーマリス、ラジオデュランス並びに高度好熱菌サーマス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) の RecA タンパク質の機能類似性を評価した。その結果、デノコッカス・ジオサーマリスの RecA タンパク質をサーマス・サーモフィルスで発現させた場合に、十分に機能が発現するであろうことが予測できた(発表論文③)。

(6) ジオサーマリス・ラジオデュランス異種菌種間でのプラスミド相補試験

ジオサーマリスの *pprA* 遺伝子 (Dgeo_2628) を常温菌ラジオデュランスで発現させる系を構築した。このためにまず、ラジオデュランスのゲノム上に存在する *pprA* 遺伝子 (DR_A0346) 及びその上流の 216 bp プロモーター領域をスペクチノマイシン耐性遺伝子と二重交叉で交換し、遺伝子破壊株 XPA2 を作製した。研究成果(2)で作製済みのジオサーマリス-大腸菌シャトル発現プラスミド pDG2628L1 は、ラジオデュランスで複製できなかったため、ジオサーマリス *pprA* 遺伝子及びその上流の 231 bp プロモーター領域を含む計 1140 bp を PCR 増幅し、ラジオデュランス-大腸菌シャトルベクター pRADN1 に挿入し、発現プラスミド pRAD-DG2628L1 を作製した。この発現プラスミドを遺伝子破壊株 XPA2 に導入したプラスミド相補試験株 XPA2 (pRAD-DG2628L1) は、XPA2 株のガンマ線感受性を相補し、野生株レベルに耐性を示した。この結果は、Dgeo_2628 が DR_A0346 の機能ホモログであることを示すと同時に、好熱菌由来の PprA タンパク質が常温でも安定に機能を発揮することを示すものである。

(7) *ygjD/yeaZ* 遺伝子ファミリーの機能解析
ygjD/yeaZ 遺伝子ファミリーは多様な生物のゲノムに保存されている機能未知遺伝子の一環である。DNA 修復や転写制御に関連した何らかの重要かつ普遍的な機能が示唆されるものの、*ygjD/yeaZ* 遺伝子ファミリーの実際の基本的な機能はまだ良く分かっていない。大腸菌や枯草菌といったモデル微生物では、*ygjD/yeaZ* オルソログを欠損すると致死になることが知られており、遺伝子完全欠損株を作製することができないため、詳細な機能解析を行えない問題点があった。そこで、細胞内に複数コピーのゲノムを有するラジオデュランスに着目して、当該遺伝子座にヘテロ変異を導入した株（ヘテロ破壊株：複数コピーあるゲノムの内、一部のゲノム上の当該遺伝子が破壊された株）を用いて分子遺伝学的解析を行うことを計画し、二回交叉を介した遺伝子交換で野生株ゲノム上の標的遺伝子を薬剤耐性遺伝子とすげ替える方式の遺伝子破壊実験を行ったところ、予想に反し、標的遺伝子座が完全欠失した遺伝子破壊株を作製することができた。さらに、作製した遺伝子破壊株について、各種 DNA 損傷剤で処理して生存率を測定したところ、DNA 鎖間架橋損傷を生じるマイトマイシン C に対して著しい感受性を示した。これらの結果から、ラジオデュランスの *ygjD* 及び *yeaZ* 遺伝子がマイトマイシン C で誘発される DNA 鎖間架橋 DNA 損傷の修復に大きく関与することが強く示唆された（発表論文①）。

(8) DNA 損傷応答タンパク質 DdrA の構造解析
PprA タンパク質は細胞中に DNA 損傷があると発現が誘導される DNA 損傷応答タンパク質である。一方、ラジオデュランスで最も誘導量の多い DNA 損傷応答タンパク質は DdrA である。DdrA もデイノコッカス独特のタンパク質であり、DNA の 3' 末端突出に結合し、exonuclease による DNA 分解を阻止することで、DNA 修復過程に関与すると考えられている。X 線結晶構造解析を行った結果、ラジオデュランスの DdrA タンパク質は、真核生物の DNA 修復タンパク質 Rad52 と同様に、7 量体リングが 2 つ重なった高次構造を持つことが分かった（図 5）（発表論文④）。

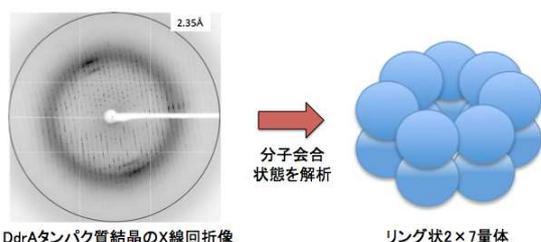


図 5. DdrA タンパク質の X 線回折像と推定される高次構造

(9) 今後の予定

今後は、耐熱性 PprA タンパク質の機能を利用した新たな遺伝子工学試薬の開発を目指し、*pprA* 遺伝子が存在しない近縁種高度好熱菌サーマス・サーモフィルスでジオサーマリス *pprA* 遺伝子を発現させ、遺伝子シャッフリングによってランダム DNA 組換えを繰り返すことで、高耐熱化した PprA タンパク質を進化分子工学的に獲得することを計画している。

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 7 件）

- ① 小野寺威文、佐藤勝也、太田敏博、鳴海一成、*Deinococcus radiodurans* YgjD and YeaZ are involved in the repair of DNA cross-links, *Extremophiles*, 査読有、17 巻、2013、171-179
DOI: 10.1007/s00792-012-0506-4
- ② 佐藤勝也、菊地正博、Abu M. Ishaqu、大庭寛史、山田貢、手島光平、小野寺威文、鳴海一成、The role of *Deinococcus radiodurans* RecFOR proteins in homologous recombination, DNA Repair, 査読有、11 巻、2012、410-418
DOI: 10.1016/j.dnarep.2012.01.008
- ③ Haïtham Sghaier、佐藤勝也、鳴海一成、In silico method to predict functional similarity between two RecA orthologs, *J. Biomol. Screen.*, 16 巻、2011、457-459
DOI: 10.1177/1087057111400909
- ④ 山田貢、佐藤勝也、鳴海一成、Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of DNA damage response A protein from *Deinococcus radiodurans*, *Acta Crystallogr. Sec. F*, 66 巻、2010、1614-1616
DOI: 10.1107/S1744309110040224

〔学会発表〕（計 4 5 件）

- ① 小野寺威文、中村頭、佐藤勝也、太田敏博、鳴海一成、*Deinococcus* と *Thermus* に共通する新規 DNA 鎖間架橋修復遺伝子の遺伝学的解析、第 13 回極限環境生物学会年会、2012 年 12 月 1 日、日本大学文理学部（東京都）
- ② 鳴海一成、Discovery of a novel DNA repair promoting protein from *Deinococcus radiodurans* and its application to biotech industry (招待講演)、XXXVI All India Cell Biology Conference and International Symposium on Stress Adaptive Response and Genome

Integrity (SARGI)、2012年10月19日、
Bhabha Atomic Research Centre (ムンバイ・インド)

- ③ 鳴海一成、小野寺威文、佐藤勝也、New host-vector system for *Deinococcus geothermalis*、The 9th International Conference on Extremophiles (Extremophiles 2012)、2012年9月12日、Hotel NH Central Convenciones (セビリャ、スペイン)
- ④ 鳴海一成、Analysis of radioresistant bacterium and its application (招待講演)、日本農芸化学会2012年度大会シンポジウム「特殊環境下における微生物の潜在能力とその応用」、2012年3月26日、京都女子大学(京都市)
- ⑤ 鳴海一成、生命と放射線耐性(招待講演)、諏訪シンポジウム「生命現象素過程の時空間軸上への展開と統合」、2011年7月29日、かんぼの宿諏訪(諏訪市)
- ⑥ 鳴海一成、量子ビームで誘発される突然変異の特徴と育種への応用(招待講演)、平成22年度第2回量子ビーム科学研究施設研究会、2010年11月30日、大阪大学産業科学研究所(茨木市)
- ⑦ 竹本邦子、鳴海一成、佐藤勝也、大東琢治、難波秀利、木原裕、Feasibility study of X-ray imaging with near carbon K-shell edges on *Deinococcus radiodurans*、The 10th International Conference on X-ray Microscopy (XRM 2010)、2010年8月18日、Sheraton Hotel & Towers (シカゴ・アメリカ)

[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) 連携研究者

山田 貢 (YAMADA MITSUGU)

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・任期付研究員

研究者番号：80510924

藤原 悟 (FUJIWARA SATORU)

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：10354888