

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310152

研究課題名(和文) 超好熱生物の遺伝情報はどのように守られ、伝達されるのか？

研究課題名(英文) How is the genome integrity of the hyperthermophiles protected and propagated?

研究代表者

石野 良純 (ISHINO, YOSHIKUNI)

九州大学・(連合)農学研究科(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) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)：超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* と *Pyrococcus furiosus* をモデル生物として、それらのDNA複製、修復関連因子の生化学的、遺伝学的解析を進めた。特に、*T. kodakarensis* には3種のMcmと2種のPCNAが存在する生理的意味を解明すべく、これらのタンパク質の生化学的性質解析とこれらをコードする遺伝子破壊株の性質を調べる遺伝学的解析の双方から研究を進めた。またDNAの塩基に損傷が入った場合の修復機構を解析した結果、*P. furiosus* から、全く新規のDNA切断酵素を発見し、Endonuclease Qと名付けて、国際特許出願した。

研究成果の概要(英文)：Proteins and enzymes involved in DNA replication and repair in the hyperthermophilic archaea, *Thermococcus kodakarensis* and *Pyrococcus furiosus* were characterized by both biochemical and genetic techniques. There are three Mcm and two PCNA in *T. kodakarensis*, and to understand the functional sharing, we characterized the purified Mcm and PCNA proteins. In addition, we isolated mutant *T. kodakarensis* strains, in which one of these genes was knocked out, and characterized their phenotypes. We found that Mcm3 and PCNA1 are essential for the viability of *T. kodakarensis*. Exact functions of Mcm1, Mcm2, and PCNA2 remain to be elucidated. We searched for enzymes involved in the damaged base repair system in the hyperthermophilic archaea. We identified a novel endonuclease, which cleaves at 5'-side of the damaged nucleotide, hypoxanthine, uracil, xanthine, and AP site in the DNA strand. We designated it Endonuclease Q and applied for a patent as a novel substance from Kyushu University.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：アーキア DNA複製 極限環境生命

1. 研究開始当初の背景

細胞内における DNA 複製過程では、多くの関連因子からなるレプリソームと呼ばれる巨大複合体が、精密な制御のもと複製フォークを進行させるため、複合体としての解析なしには、個々のタンパク質因子の解析だけではその本質が理解できない。さらに、正確かつ伸長性の高い DNA 複製のためには、鋳型 DNA 上の種々の障害を克服しながら複製を進行させる機構が存在し、これには複製と協調して働く DNA 修復機能、特に相同組換えが重要な働きをしていることが明らかになりつつあった。本研究実施者は、超好熱性アーキアを実験材料として上記の問題に取り組んできた。研究を始めた 1990 年当時は、我が国にはこの領域の研究者は皆無であり、世界的に見ても全く進んでいなかった。多くのアーキアの全ゲノム配列解読が進んだポストゲノム時代に入り、多くの研究者がアーキア研究に参入してきたが、申請者のグループは長年の経験と材料の蓄積から、世界最先端に位置しており、本研究計画では、未だ世界の誰もが進められていない超好熱性アーキアの分子遺伝学的手法を取り入れた新展開を推進したいと考えた。この研究によって、それまで蓄積してきた生化学データを補うとともに、超好熱性菌の生命現象維持機構の本質を理解することに近づけると期待された。

2. 研究の目的

本研究計画は、極限環境下における生命現象の解明を目指すものであった。すなわち、100 の熱水中で生息する超好熱性アーキア（古細菌）がどのようにして遺伝情報を維持し、複製して子孫に伝達していくのかという課題に真正面から取り組んだ。アーキアは真正細菌とも真核生物とも異なる進化的に独立した第三の生物であり、太古の地球から現在まで生息してきた。本研究は、遺伝子破壊実験系の確立している超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* をモデル生物として、遺伝学的手法と生化学的手法を融合させて、超好熱性アーキアの遺伝情報維持伝達機構を解明するという、世界初の研究提案であった。

また、本研究は、超高温という特殊環境での生命現象の解明同時に、比較生物学によって生物が獲得した遺伝情報複製、修復装置の作動原理に迫ることができると考えた。すなわち、アーキアは、原核生物として真正細菌と類似した形態をとるが、遺伝情報系に関わるタンパク質は真核生物のものと同様であり、進化的に真核生物と共通の祖先を有すると考えてよいため、真核生物の DNA 複製装置の構造と機能を理解する目的にとって、アーキアは極めて有用な実験モデルとなるといえる。

3. 研究の方法

アーキアの中でも超好熱性菌は、最も研究

者人口が多いものの、遺伝学的取り扱いが難しく、それまで生化学だけが発展して来た。しかし、超好熱性アーキアの一つである *Thermococcus kodakaraensis* で遺伝子破壊実験系が開発されたことにより、本計画では、実施代表者がそれまで生化学的解析データを蓄積してきた *P. furiosus* 由来の DNA 複製因子について、同じ科に属する *T. kodakaraensis* を用いて遺伝学的変異体解析を進めることによって、細胞内でのそれぞれの役割をはっきり解明することを目指した。そのため、*T. kodakaraensis* 遺伝子破壊実験系の開発者が、本研究の分担者として加わり、協力して実験を進めた。そして、世界の誰もが成し得ていない、アーキア初の試験管内 DNA 複製再構成系の確立を目指した。

4. 研究成果

T. kodakaraensis の 3 種の *mcm* 遺伝子と 2 種の *pcna* 遺伝子をクローニングし、組換えタンパク質発現系を構築して、高純度タンパク質を調製して、生化学解析を行なった。3 種の Mcm タンパク質は、どれもそれら自身で *in vitro* でヘリカーゼ活性を示した。また、GINS タンパク質との相互作用も示したので、Mcm1, Mcm2 は Mcm3 とともに DNA 代謝の何か重要な機能を担っていることが予想された。遺伝子破壊株の単離を試みたところ、*mcm1*, *mcm2* は破壊株が得られたが、*mcm3* 遺伝子は破壊株が得られず、生存に必須の遺伝子であることが推定された。他の二つは必須ではないものの、細胞内では産生されていることを確認した。Mcm1 はしっかり産生されていたが、Mcm2 は遺伝子の転写はされるものタンパク量は極めて少ないことが分かった。Mcm1, Mcm2 タンパク質の細胞内での機能は未だ不明であるが、DNA 修復のどこかの過程で機能していることを考えて研究を進めている。

さらに本課題では、*T. kodakaraensis*, *P. furiosus* を用いて複製ヘリカーゼ複合体の解明を目指し、MCM-GINS に、RecJ 様のタンパク質が安定に結合することを見出した。また、GINS は、RecJ 様タンパク質の有するエキソヌクレアーゼ活性を促進することも発見した。この促進作用の生理的な意味を明らかにするとともに、この MCM-GINS-RecJ 複合体が複製ヘリカーゼとして重要であることを予想して、その構造解析を目指した。複合体を高純度に調製して、結晶化、電子顕微鏡観察などへ進めている（現在進行中）。この研究は、細胞壁を有しない独特の好熱好酸性アーキアである *Thermoplasma* でも平行して行い、複製ヘリカーゼ複合体の真の姿を解明すべく研究を進めた。この系では GINS, RecJ に加えて、Cdc6-2 というタンパク質も活性化に関わり、複製ヘリカーゼコア複合体に関与していることが分かってきた。興味深いことに、Cdc6-2 と GINS は相乗的に MCM のヘリカーゼ活性を促進した。アーキアの中でも、複製装置の多様性が観察され、今後の比較研究によって、さ

らに本質的な装置の原理についての説明が進むと期待される。

2種のPCNAについても同様に解析を進め、PCNA1とPCNA2で環状構造の安定性が大きく異なる事が分かった。どちらもDNAポリメラーゼの*in vitro*での連続合成促進因子としての機能は有するものの、*pcna2*の遺伝子は破壊された株が得られたが、*pcna1*は破壊株が得られなかった。

PCNA1は複製に必須なクランプ分子であると推定されたが、PCNA2の役目については継続して解析している。

さらに、DNA代謝にとって重要なヌクレアーゼについて理解するために、*P. furiosus*の有するヌクレアーゼを探索した結果、新規の酵素としてPfuExoI, Endo Qを発見した。これらの酵素は超好熱性アーキアの*Thermococcales*にのみ、または一部の他のアーキアにのみ保存されている酵素であり、超高温環境下のDNA代謝に関連する部分が大いのではないかと考えられる。それぞれは新規なものであるため、勅許出願した(PfuExoIの発見は本研究開始前)。PfuExoIは一本鎖DNAまたはRNAに作用して3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を示す。この酵素の性質解析を本研究で継続した。また、Endo Qは本研究で発見したものであり、ヒポキサンチン、キサンチン、ウラシルなどの脱アミノ化塩基を認識して、そのすぐ5'側のリン酸ジエステル結合を切断する活性を有していた。この酵素は、ダメージ塩基の修復にとって重要なものであると予想されるが、その具体的な修復機構の解明を目指して、研究を続けた。特にヒポキサンチンの3'側を切断することで知られているEndonuclease Vについても本研究において、実施者が*P. furiosus*のホモログを詳細に解析した。この酵素は広く生物に保存されているが、Endo VはDNAよりもむしろRNAのほうをむしろ基質として好むことが本研究で分かった。Endo Qを含む修復経路の解明について、現在も精力的に研究を継続中である。また、新しく九州大学で発見したものであり、九大のKyu (Q)をとってEndonuclease Qとして国際特許出願した(現在投稿論文執筆中)。この酵素の遺伝子工学技術への応用を目指して現在用途開発を考えている。

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11件)

Kiyonari, S., Egashira, Y., Ishino, S., and Ishino, Y. (2014) Biochemical characterization of endonuclease V from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*. *J. Biochem.* 155, 325-333

Ishino, S., Kelman, L.M., Kelman, Z., and Ishino, Y. (2014) The archaeal DNA replication machinery: past, present and future. *Genes Genet. Syst.* 88, 315-319

Richardson, T.T., Gilroy, L., Ishino, Y., Connolly, B.A. and Henneke, G. (2013) Novel inhibition of archaeal family-D DNA polymerase by uracil. *Nucleic Acids Res.* 41, 4207-7218

Tori, K., Ishino, S., Kiyonari, S., Tahara, S. and Ishino, Y. (2013) A novel single-strand specific 3'-5' exonuclease found in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*. *PLoS One*, 8, e58497

Kuba, Y., Ishino, S., Yamagami, T., Tokuhara, M., Kanai, T., Fujikane, R., Daiyasu, H., Atomi, H., Ishino, Y. (2012) Comparative analyses of the two PCNAs from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*. *Genes Cells* 17,923-937.

Ishino, Y. and Ishino, S. (2012) Rapid progress of DNA replication studies in Archaea, the third domain of life. *Sci. China, Ser-C Life Sci.* 55,1-18.

Ishino, S., Fujino, S., Tomita, H., Ogino, H., Takao, K., Daiyasu, H., Kanai, T., Atomi, H., and Ishino, Y. (2011) Biochemical and genetical analyses of the three *mcm* genes from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*. *Genes Cells* 16,1176-1189.

Ogino, H., Ishino, S., Mayanagi, K., Haugland, G. H., Birkeland, N-K., Yamagishi, A., and Ishino, Y. (2011) The GINS complex from the thermoacidophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum* may function as a homotetramer in DNA replication. *Extremophiles* 15, 529-539.

Oyama, T, Ishino, S, Fujino, S, Ogino, H, Shirai, T, Mayanagi, K, Saito, M, Nagasawa, N, Ishino, and Y, Morikawa, K. (2011) Architectures of archaeal GINS complexes, essential DNA replication initiation factors. *BMC Biol.* 9:28.

Liu, C., McKinney, MC., Chen, YH., Earnest, TM., Shi, X., Lin, LJ., Ishino, Y., Dahmen, K., Cann, I.K., Ha, T. (2011) Reverse-Chaperoning Activity of an AAA+ Protein. *Biophys J.* 100, 1344-1352.

Mayanagi, K., Kiyonari, S., Nishida, H., Saito, M., Kohda, D., Ishino, Y., Shirai, T., and Morikawa, K. (2011) Architecture of the DNA polymerase B-proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-DNA ternary complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108, 1845-1849.

〔学会発表〕(計 22 件)

Yoshizumi Ishino. Structural and functional analyses of the archaeal Hef protein involved in stalled replication fork repair. *Thermophiles* 2013 Sept. 8-13 Regensburg, Germany (招待講演)

Hiromi Ogino, Sonoko Ishino, Kouta Mayanagi, Takuji Oyama, Tsuyoshi Shirai, Kosuke Morikawa, Gyri Teien Haugland, Nils-Kåre Birkeland, and Yoshizumi Ishino. Activation mechanism of the replicative helicase in the thermophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*. *Thermophiles* 2013 Sept. 8-13 Regensburg, Germany

Sonoko Ishino, Kazuo Tori, Takafumi Hamasuna, Takeshi Yamagami, Ken-Ichi Miyazono, Masaru Tanokura, and Yoshizumi Ishino. Analysis of the single-strand-specific 3'-5' exonuclease found in *Thermococci*. *Thermophiles* 2013 Sept. 8-13, Regensburg, Germany

Yoshizumi Ishino. Gordon Research Conference on Archaea: Ecology, Metabolism & Molecular Biology 2013 Jul.28-Aug.2, Barga, Italy (招待講演)

白石都、石野園子、牧田成人、江頭由里子、清成信一、山上健、石野良純 アーキアに見出された損傷塩基修復酵素 Endonuclease Q の特性 日本 Archaea 研究会第 26 回講演会 2013.7.19-20 東京工業大学、東京

石野園子 當利和夫 瀧砂孝文 清成信一 田原沙樹 山上健 宮園 健一 田之倉 優 石野良純 超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* より見出された一本鎖特異的 3'-5' エキソヌクレアーゼ 第 13 回日本蛋白質科学会年会 2013.6.12-14 とりぎん文化会館、鳥取

白石 都、石野園子、牧田成人、江頭由里子、清成信一、山上 健、石野良純 超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* から同定された新規な修復エンドヌクレアーゼ 第 13 回日本蛋白質科学会年会 2013.6.12-14 とりぎん文化会館、鳥取

石野 良純、大門 克哉、石野 園子 アーキア研究から見えてくる DNA 複製装置の分子進化 生命の起源および進化学会第 38 回学術講演会 2013.3.14-16 九州大学、福岡 (招待講演)

Hiromi Ogino, Sonoko Ishino, Kouta Mayanagi, Takuji Oyama, Tsuyoshi Shirai, Kosuke Morikawa, Gyri Teien Haugland, Nils-Kåre Birkeland, and Yoshizumi Ishino. The synergistic stimulation of the MCM activity by Cdc6/Orcl

and GINS homotetramer from the archaeon, *Thermoplasma acidophilum*. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012. 12. 11-14. 福岡国際会議場、福岡

Yoshizumi Ishino. Molecular mechanism from initiation to elongation in the DNA replication process in Archaea. 第 35 回日本分子生物学会年会 ワークショップ 3W5I DNA 複製機構とその制御 -生物種を越えた統一的理解を目指して- 2012. 12. 11-14. 福岡国際会議場、福岡

石野園子、藤野誠司、富田宏矢、尾木野弘実、金井保、跡見晴幸、石野良純 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* が有する三種の Mcm ホモログの生化学的および遺伝学的解析 第 13 回極限環境生物学会 2012.12.1-2 日本大学、東京

Hiromi Ogino, Sonoko Ishino, Kouta Mayanagi, Takuji Oyama, Tsuyoshi Shirai, Kosuke Morikawa, Gyri Teien Haugland, Nils-Kåre Birkeland, and Yoshizumi Ishino. Divergently evolved replicative helicase from the archaeon, *Thermoplasma acidophilum* The 8th 3R symposium, 25-28, Nov, 2012, Awaji Yumebutai International Conference Center, Japan

Jacqueline Büttiker, Sonoko Ishino, Takeshi Yamagami, Takuro Nunoura, Yoshihiro Takaki, Hideto Takami, Ken Takai, Yoshizumi Ishino. Characterization of DNA polymerase BI from *Caldiarchoaeum subterraneum*, uncultivated archaea. 日本遺伝学会第 84 回大会 2012.9.24-26.九州大学、福岡

Seiji Fujino, Hiroya Tomita, Hiromi Ogino, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi, Yoshizumi Ishino. More than one Mcm protein functions in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011.12.13-16. パシフィコ横浜、横浜

Sonoko Ishino, Takeshi Yamagami, Makoto Kitamura, Yoshizumi Ishino. Two nucleases from *Thermococcus kodakarensis*, probably involved in replication fork progression. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011.12.13-16. パシフィコ横浜、横浜

久場由真仁、石野園子、山上健、徳原将弘、金井保、跡見晴幸、藤兼亮輔、石野良純 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* が有する二種類の PCNA の細胞内における機能解析 第 12 回極限環境生物学会年会 2011.11.27-28 長崎大学良順会館 長崎

藤野誠司、石野園子、富田宏矢、尾木野弘実、金井 保、跡見晴幸、石野良純 Functional

analyses of Mcm proteins in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*. 第21回 DNA複製・組換え・ゲノム安定性制御ワークショップ 2011. 10. 25-27 サンピア福岡、福津

石野園子、久場由真仁、山上健、徳原将弘、跡見晴幸、石野良純 Comparative analyses of the two PCNAs from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*. 第21回 DNA複製・組換え・ゲノム安定性制御ワークショップ 2011. 10. 25-27 サンピア福岡、福津

石野良純 アーキアにおけるDNA複製フォーク進行複合体の構造と機能 第84回日本生化学会大会シンポジウム 3S4a 「アーキア研究の最前線」(オーガナイザー 石野良純、跡見晴幸) 2011. 9. 23 京都国際会議場、京都

Yoshizumi Ishino DNA replication in Thermococcales -from initiation to elongation- Gordon Research Conference on Archaea: Ecology, Metabolism & Molecular Biology Jul. 31-Aug. 5, 2011 Waterville Valley, NH, USA (招待講演)

Sonoko Ishino, Yumani Kuba, Takeshi Yamagami, Masahiro Tokuhara, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi, and Yoshizumi Ishino DNA replication proteins from *Thermococcus kodakarensis*. Gordon Research Conference on Archaea: Ecology, Metabolism & Molecular Biology Jul. 31-Aug. 5, 2011 Waterville Valley, NH, USA

〔図書〕(計 3 件)

Ishino, Y., Ishino, S. (2013) DNA Replication in Archaea, the Third Domain of Life. In *The Mechanisms of DNA Replication* D. Stuart (Ed), pp. 91-126, InTech d.o.o., Rijeka, Croatia

Ishino, S. and Ishino, Y. (2013) DNA polymerases and DNA ligases. In *Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology* Litterchild J., Satyanarayana, T., Kawarabayasi, Y. (Eds) pp. 429-457, Springer Science+Business Media.

Ishino, S and Ishino, Y. (2012) Application of environmental DNA resources to create useful DNA polymerases with different properties. In *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*, Satyanarayana, T. et al (Eds.), pp. 663-678, Springer Science+Business Media.

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称: Novel DNA cleavage enzyme.
発明者: Ishino Y. Ishino S. Shiraishi M.
権利者: 九州大学
種類: 特許
番号: 61/821866
出願年月日: 2013.5.10
国内外の別: 国際出願

名称: Novel DNA polymerase
発明者: Ishino Y. Yamagami T. Matsukawa H.
権利者: 九州大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2012/067872
出願年月日: 2012.7.12
国内外の別: 国際出願

名称: Novel DNA cleavage enzyme.
発明者: Ishino Y. Ishino S. Shiraishi M.
権利者: 九州大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2012/067791
出願年月日: 2012.7.12
国内外の別: 国際出願

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
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.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/pce-web/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石野 良純 (ISHINO Yoshizumi)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 3 0 3 4 6 8 3 7

(2) 研究分担者

跡見 晴幸 (ATOMI Haruyuki)
京都大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 9 0 2 3 4 0 4 7

(3) 連携研究者

なし()

研究者番号: