

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：82645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26506030

研究課題名(和文)放射線抵抗性細菌由来DNA鎖切断末端結合タンパク質の構造機能解析

研究課題名(英文)Structural and functional analysis of single-stranded DNA-binding protein DdrA

研究代表者

山田 貢(YAMADA, Mitsugu)

国立研究開発法人宇宙航空研究開発機構・有人宇宙技術部門・主任研究開発員

研究者番号：80510924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では極めて効率のよいDNA修復機構を持つ放射性抵抗性細菌Deinococcus radioduransのDNA二本鎖切断修復関連蛋白質DdrAの構造機能解析を行うことを目的としている。これまでに複数の生物種由来のDdrAのコンストラクトの構築を行い、結晶化に適したコンストラクトの選抜および結晶化に成功した。またこれまで知られていないプロセッシングが存在していることを見出した。今後、結晶解析を進めるとともに新規プロセッシング機構の解明を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, crystallization experiments were carried out to obtain the information of structural and functional relationship of DdrA, a DNA-related protein repair-related protein of Deinococcus radiodurans.

We have constructed expression vector of DdrA derived from multiple species and successfully selected the constructs suitable for crystallization. We also found that there is novel processing mechanism.

We are going to clarify the new processing mechanism as well as advance the crystal analysis in the future.

研究分野：構造生物学

キーワード：タンパク質結晶解析 構造生物学

## 1. 研究開始当初の背景

ラジオデュランスはDNA 損傷に対して大腸菌の約100倍、ヒトの約1000倍もの極めて高い抵抗性をもつ。これはこの菌が非常に高いDNA 修復能力、特に生物にとって致命的効果の高いDNA 二本鎖切断を効率よく修復する機構を持つ事に起因している。日本原子力研究開発機構の研究グループではこれまでに他の生物種には見られないDNA 修復促進タンパク質 PprA(Narumi et al.,2004)を同定し機能解析を行ってきた。PprA は放射線誘導性タンパク質であり、in vitro においてDNA に生じた単鎖切断部位及び二本鎖切断部位を認識・結合し、大腸菌 DNA リガーゼ(NAD 依存型)、T4 DNA リガーゼ(ATP 依存型)による DNA 連結反応を促進する事がこれまでに明らかにされ、PprA は放射線によって生じたDNA 二本鎖切断を非同末端再結合(NHEJ)によって修復する機構の中核タンパク質である事が解明された。また、PprA と同様に放射線誘導性タンパク質であり、照射後に遺伝子が活性化し、平時に比べて約40倍もの高い発現量変化をすることが明らかになっており、この約40倍という発現量変化はラジオデュランスにおいて放射線によって誘導されるタンパク質の中で最も高い発現量変化である。この DdrA タンパク質は真核生物のDNA 二本鎖切断修復に重要な役割を果たしている Rad52 に相同性を持つタンパク質である。ヒトにおいてDNA の二重鎖切断は、放射線や化学療法剤などの外的要因、または体内に生じた活性酸素やDNA 複製のエラーなどの内的要因によってしばしば引き起こされ、相同DNA 組み換えによって修復されることが知られている。相同DNA 組み換えが欠損した細胞では、DNA の二重鎖切断が修復されずに蓄積し、やがてがん化することが知られている。この相同DNA 組み換え機構の中では、DNA の二重鎖切断部位と同じ塩基配列を無傷の染色体の中から見つけたして、二分子の染色体の間でDNA を組み換える「相同的対合反応」が非常に重要であり、この相同的対合反応に重要な役割を果たしているタンパク質が Rad52 である。この Rad52 において部分的な構造がすでに明らかにされているが、その詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。この DdrA は切断された Rad52 と同様にDNA の末端に結合し消化酵素からの分解を妨げている事が近年明らかになっている (Dennis R. Haris, et al., J. Bacteriol. 2008)。しかし DdrA は Rad52 とは異なりDNA 末端同士を引き寄せアニーリングさせる機能は有していない。そのため効率的にDNA の再連結を行うためには消化酵素からは末端を守りながら連結酵素にはうまく末端を渡さなければならない。しかしその分子機構は未だ不明のままである。またこの DdrA はラジオデュランスにおいてPprA と共に UV 抵抗性、DNA 架橋剤耐性に関与し

ていることが近年明らかになりつつある (Kathiresan Selvam, et al., PLOS ONE. 2013)。この機構を原子レベルで明らかにする事でラジオデュランスにおいて放射線照射直後のDNA 保護機構、UV 照射を受けた核酸の修復機構を明らかにすることができると考えられる。

これまでに申請者はラジオデュランス由来の全長およびコア領域のみの DdrA タンパク質の発現・精製系を確立し、コア領域のみの DdrA においては結晶化・回折実験に成功し、2.38 分解能の回折データ収集が完了している (M. Yamada et al., Acta Crystallogr Sect F, 2010)しかし、地上において DdrA は擬欠面双晶となり、位相決定が出来ていない。

## 2. 研究の目的

本研究では放射線抵抗性細菌 *Deinococcus radiodurans* R1 が持つ DdrA タンパク質の X 線結晶解析を実施し、DdrA の持つ DNA 結合メカニズムや末端保護メカニズムの解明を行い、*Deinococcus radiodurans* の持つ極めて効率のよい DNA 修復機構の解明につながる知的基盤を創出することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (DrDdrA コア領域の結晶解析)

DrDdrA コア領域については申請者が既に決定している結晶化条件を基に国際宇宙ステーションを利用した高品質タンパク質結晶生成実験を実施する。

### (DrDdrA 全長領域の発現・精製・結晶化)

DrDdrA 全長領域についてはすでに構築済みの大腸菌発現系を用いて、発現実験を実施し、精製、結晶化を行う。

### (DgeoDdrA 発現系の構築・発現・精製・結晶化)

DrDdrA のホモログである *Deinococcus geothermalis* 由来 DdrA(DgeoDdrA)の発現系を構築し、発現実験、精製、結晶化を行う。結晶化条件が得られ次第、国際宇宙ステーションを利用した高品質タンパク質結晶生成実験を実施する。

### (熱安定性測定)

リアルタイム PCR を用いた Thermal shift assay を行い、DrDdrA および DgeoDdrA の熱安定性を測定した。また至適 pH および塩濃度、添加剤などを探索し、試料の状態を結晶化に適した状態に改善した。

### (DgeoDdrA の分解実験)

DgeoDdrA の発現サンプルと *Deinococcus geothermalis* の細胞破砕液を混合し、45 でインキュベートしたのちに SDS-PAGE にて分

解の有無の確認を実施した。

#### 4. 研究成果

(DrDdrA コア領域の結晶解析)

すでに確立済みの発現条件、精製条件、結晶化条件を用いて、結晶化を実施し、宇宙実験に供したところ、疑似欠面双晶が解消しないことが判明した。また分解能も明確に向上しないことが判明した。

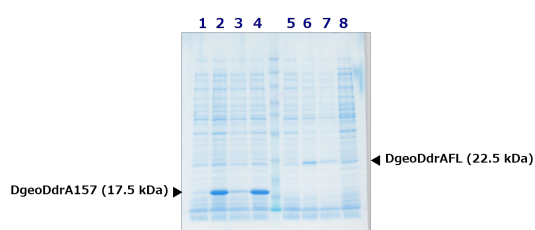
そこで、精製条件を再度見直し、結晶化条件探索を行った。結晶化条件探索によって疑似欠面双晶がほぼ完全に消失する結晶化条件を見出すことに成功し、2.2 の回折データの取得に成功した。現在、新規に見出した結晶化条件を用いて重原子置換体結晶を作製し、in-house の回折計でデータを取得中である。これまでに4 の TaBr 置換体の回折データ収集に成功している。

(DrDdrA 全長領域の発現・精製・結晶化)

DrDdrA の全長に関して、発現・精製を実施し、結晶化に適した試料を調整できたが、これまでのところ、結晶化に成功していない。また大腸菌由来のプロテアーゼによる限定分解によって DdrA157 程度の分子量のフラグメントに分解されることが判明した。

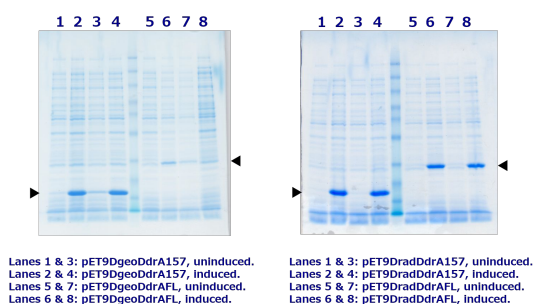
(DgeoDdrA 発現系の構築・発現・精製・結晶化)

*Deinococcus geothermalis* 由来 ddrA 遺伝子を pET9 に挿入し、スモールスケール発現実験を実施したところ、計算値と一致する位置にタンパク質の発現が認められた。



Lanes 1 & 3: BL21(DE3) pLysS pET9DgeoDdrA157, uninduced controls.  
Lanes 2 & 4: BL21(DE3) pLysS pET9DgeoDdrA157, induced samples.  
Lanes 5 & 7: BL21(DE3) pLysS pET9DgeoDdrAFL, uninduced controls.  
Lanes 6 & 8: BL21(DE3) pLysS pET9DgeoDdrAFL, induced samples.

スモールスケール発現実験を受け、ラージスケールでの発現実験を実施したところ、いかに示す通り、計算値通りの発現が認められた。



Lanes 1 & 3: pET9DgeoDdrA157, uninduced.  
Lanes 2 & 4: pET9DgeoDdrA157, induced.  
Lanes 5 & 7: pET9DgeoDdrAFL, uninduced.  
Lanes 6 & 8: pET9DgeoDdrAFL, induced.

Lanes 1 & 3: pET9DradDdrA157, uninduced.  
Lanes 2 & 4: pET9DradDdrA157, induced.  
Lanes 5 & 7: pET9DradDdrAFL, uninduced.  
Lanes 6 & 8: pET9DradDdrAFL, induced.

その後、発現サンプルを用いて、結晶化に適した純度まで精製を行い、結晶化を実施したところ、結晶化に適した高純度試料の調整に成功した。

結晶化条件探索は市販の結晶化条件探索キットを用いて行い、DgeoDdrA157 に関しては結晶を得ることに成功した。

その後、回折実験を行い回折点を確認したが、4 程度の回折にとどまり、DrDdrA157 と比較して明確に分解能が低く、解析に適さないことが判明した。

国際宇宙ステーションを用いた結晶化実験を実施し、結晶の品質が3 程度まで改善することが判明したが、DrDdrA157 では2.2

程度の回折データが取得できていることから、今後 DgeoDdrA の結晶化実験を注視し、DrDdrA157 の解析に注力することとした。

(熱安定性測定)

DrDdrA および DgeoDdrA の熱安定性測定を実施した。

両者の変性中点温度はそれぞれ 60 、80 であり、pH 依存性は両社ともほとんどなかった。

また過去に Hit した結晶化条件に含ませられるクエン酸が熱安定性を向上させていることが判明した。

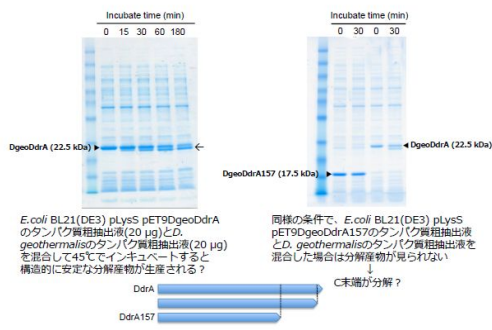
クエン酸を添加した DrDdrA、DgeoDdrA の動的光散乱を測定したところ、両者ともに粒子径が 120kDa (クエン酸なし) から 240kDa (クエン酸あり) に増大し、クエン酸が分子間架橋を行い、結晶化を誘起していることが示唆されたため、以後の結晶化条件探索は全てクエン酸を添加して実施したところ、結晶化条件 Hit 率が明確に向上した。

(DgeoDdrA の分解実験)

DrDdrA および DgeoDdrA ともに全長型は精製中に限定分解することが判明したため、C 末端のプロセッシングが生理的な環境でも生じる可能性があるとして想定し、菌体破碎液を精製サンプルに添加し、プロセッシングが起きるかを検証したところ、予想に反して、DdrA157 程度の分子量のフラグメントは生じず、全長からわずかに分解されたフラグメントが生じることが明らかになった。配列解析の結果、C 末端側の保存配列直下で切断を受けていると仮説を立てたが、当該領域にプロテアーゼ切断サイトは存在せず、どのような酵素で分解されているか判明しなかった。また、市販のプロテアーゼ阻害剤を添加し、プロセッシングが阻害されるかを検討したところ、阻害剤の有無にかかわらずプロセッシングを受けることが判明し、新規のプロセッシングが存在する可能性が示唆された。このプロセッシングは DgeoDdrA に特徴的ではなく、DrDdrA を用いた実験でも同様の結果が得られている。

今後、当該プロセッシングを担うプロテア

ーゼ、エステラーゼの探索を実施し、本プロセッシングによる DdrA の機能調節機構に迫る。



## 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0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 貢 (YAMADA, Mitsugu)

宇宙航空研究開発機構・有人宇宙技術部門・きぼう利用センター・主任研究開発員

研究者番号：80510924

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

なし ( )