

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06190

研究課題名(和文) 原核生物で見出された非従来型(mutS 非依存型) DNAミスマッチ修復機構の解析

研究課題名(英文) Mismatch repair system in prokaryotes lacking canonical mutS-dependent system

研究代表者

竹本 訓彦 (Takemoto, Norihiko)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・上級研究員

研究者番号：40546793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生物はゲノム情報(DNAの配列情報)にわずかな変化を許容しつつも基本的には核酸配列情報を正確に複製することで種を繋いできた。正確な複製はDNA二本鎖の間の塩基対形成によりなされるが、複製酵素はしばしば誤った核酸を取り込みDNAミスマッチが生じる。ほとんどの生物では複製直後にミスマッチを修復する機構(MMR機構)が備わっているが、一部の原核生物ではこのための遺伝子を持たないことが知られていた。我々は、従来型のMMR機構を持たない生物に共通する遺伝子の探索から、新たな遺伝子を介した複製エラー修復機構を見出した。これにより、複製直後に複製エラーを修復する機構が生物に普遍的なものであることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA複製や修復は生物全般に極めて重要で共通する現象であるが、分子基盤についてはモデル生物といわれる一部の生物での解析が先行している。これらの現象やその分子基盤が生物にとってどれほど重要なものなのかについて明らかにするには、その分子基盤を持たない生物が存在するのか？存在するのであればそのような生物においてどのように欠損を補っているのか？について理解する必要がある。本研究では、DNA複製の正確性担保に必要と考えられていた従来型の機構を持たない、ごく少数の生物群において新たな機構を見出した。分子基盤は違えど複製エラーを修復する機構が普遍的に備わっていることを示し、その重要性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：MutS-dependent mismatch repair system have been known to be conserved from bacteria to human, as a replication error correction system. Disruption of MMR system results in increased mutation rate, leading to high occurrence of cancer cells or drug-resistant pathogens. However, recent advances in Next Generation Sequencing technologies shed light on the existence of exceptions, in which mutation rate is not so high regardless of the lack of canonical MMR system. In this study, we searched for conserved gene which works to decrease mutations in prokaryotes lacking canonical MMR system. We found that EndoMS works for replication error correction.

研究分野：分子生物学

キーワード：Mismatch修復 DNA複製エラー 突然変異

1. 研究開始当初の背景

生物は、遺伝情報を次世代に忠実に伝達するため、DNA を正確に複製し、維持する必要がある。このため、正確な DNA 複製システムに加え、損傷 DNA やミスマッチなど、様々な DNA 異常認識・修復機構を備えている。DNA ミスマッチ修復 (MMR) は DNA 複製時の誤ったヌクレオチド取込みに起因するミスマッチを複製直後に修復する機構である。*mutS*, *mutL* は複製エラー修復において中心的役割を担い、これらの遺伝子の機能欠損は突然変異率の大幅な上昇を引き起こす。結果、病原性細菌であれば薬剤耐性株の出現頻度上昇、ヒトなどにおいては変異蓄積に伴う細胞の癌化を引き起こすことが知られている。一方で、放線菌門に属する細菌を対象とした研究から、これらの細菌は *mutS*, *mutL* ホモログを持たないにもかかわらず変異率がそれほど高くないことが知られていた。

放線菌における従来型 MMR 機構の欠損と変異率の関連については 2000 年代に多くの細菌のゲノム解析が進んで以降、問題視されていたがギャップを埋める機構に関する報告は 2017 年までなかった。申請者はここに着目し、放線菌において特異的に保存されている遺伝子の探索を行い、*nucS* 遺伝子が突然変異率抑制に寄与する事を見出した。*nucS* の生物種間での分布の確認から、一部の古細菌にも分布し、*nucS* を有する生物のほぼ全てが *mutS* を欠損していた。これらの結果は申請直前に発表された報告 (Castañeda-García et al., 2017 Nat. Commn.) と一致するが、この報告では細菌型 NucS の DNA 切断活性は検出されず、複製エラーとの関連も検討されていなかった。

一方で申請者らは、細菌型 NucS の生化学的解析を行い(分担研究者が実施)、同酵素がミスマッチ特異的に二本鎖切断する事、sliding clamp との相互作用により活性が上昇する事を確認していた。この結果は古細菌の NucS (EndoMS) のものと似ており (Ishino et al., 2016 Nucl. Acid Res.)、NucS /EndoMS の機能は生物ドメインを超えて保存されていると考えられた。また、*nucS* 破壊と DNA polymerase の校正機能の阻害が相乗的な変異率上昇を引き起こす、すなわち EndoMS (以降、機能的な特徴をもとに名付けられた「EndoMS」を *nucS* 遺伝子産物名とする) が複製エラーに起因するミスマッチの修復に寄与することを明らかにしていた(申請当時、論文投稿準備中)。

2. 研究の目的

本研究では、確認済みの EndoMS が複製エラーに起因するミスマッチの修復に寄与するという新規知見を論文報告したうえで、以下の点について解析を進めることを目的とした。

複製エラー修復機構における最重要ポイントは、「どのように鋳型鎖と新生鎖を識別し、新生鎖の除去・再合成に導くか」である。従来型 MMR では、複製直後の新生鎖が非メチル化状態にある事(大腸菌など)や、複製複合体の sliding clamp が DNA に対し方向性をもって結合する事(ヒト、枯草菌など)を利用して新生鎖のみを特異的に切断し、核酸除去修復経路へと導く。一方で、非従来型 MMR は EndoMS が *in vitro* で二本鎖切断活性を示したことから、従来型 MMR 機構とは新生鎖認識とその後の修復機構が根本的に異なっている可能性がある。非従来型 MMR システムがどのように新生鎖側を「間違えた方」として修復するのか、新生鎖認識機構が必要なのか、が本研究課題において明らかにすべき問題とした。

このため、研究 細胞内での切断様式(一本鎖 or 二本鎖切断)の確認、研究 *in vitro* 再構成系を用いた切断パターンの確認、研究 候補となる下流経路因子の探索、を行う事とした。

3. 研究の方法

論文化に向けた実験

EndoMS によるミスマッチ DNA の切断、及び切断効率の sliding clamp による活性化について、様々な塩濃度・タンパク質濃度で活性測定を行い生化学的パラメーターを測定した。

研究 細胞内での切断様式の確認

二本鎖切断修復には相同組換え修復経路が用いられる。過程では RecA-一本鎖 DNA 複合体により SOS 応答が惹起され、特定の遺伝子群の発現が上昇する。細胞内で EndoMS 依存的に二本鎖切断が行われているかを確認するため、EndoMS の IPTG 誘導発現系を構築し、EndoMS 発現に依存して SOS response が起こるかどうかなを確認した。

研究 *in vitro* 再構成系を用いた切断パターンの確認

一部の生物ではミスマッチ修復時の新生鎖認識に sliding clamp の向きを利用することが知られている。EndoMS についても sliding clamp と相互作用し、活性が変化するため、EndoMS が sliding clamp を介した新生鎖認識を行い、新生鎖特異的一本鎖切断を行っている可能性が考えられる。そこで、環状二本鎖 DNA 上に sliding clamp を方向性を指定してロードし、EndoMS で処理することで、いずれの鎖が切断されるのかを確認する事とした。

研究 候補となる下流経路因子の探索

一本鎖切断、二本鎖切断の何れが行われる場合でも、その後には誤って取り込まれたヌクレオチドを含む新生鎖の除去が必要となる。そこで、ここに関わる遺伝子を特定するため、配列情報からヌクレアーゼやヘリケースとアノテートされている遺伝子の破壊株を作製し、変異率への影響を確認した。

4. 研究成果

EndoMS が sliding clamp 依存的に複製エラー修復に関わることを示し、論文をして報告

In silico screening、候補遺伝子破壊株の薬剤耐性頻度測定により *nucS* 遺伝子が変異率抑制に関わること、ヌクレアーゼ活性ドメインへの変異導入により機能を失うことを確認した (Fig. 1A)。また、EndoMS が *in vitro* においてミスマッチ特異的な二本鎖切断活性を示すことを確認した (Fig. 1B, C)。

超好熱古細菌である *Thermococcus kodakarensis* の EndoMS が sliding clamp により活性化することが示されていた。私たちは *C. glutamicum* においても EndoMS が sliding clamp (DnaN) と C 末の clamp binding motif を介して相互作用している事 (Fig. 2B)、その相互作用が変異率測定に必須であることを示した (Fig. 2C)。また、sliding clamp 存在下では EndoMS の活性が上昇することを示した (Fig. 2D, E)。EndoMS の基質特異性を確認したところ、G/G、G/T、T/T を特異的に切断し、それ以外のミスマッチや indel を含む基質は切断しないことを見出した (Fig. 2F)。

ここまでの変異率測定法は RNA polymerase 阻害剤である rifampicin に対する *rpoB* 遺伝子の rifampicin 耐性化変異体頻度を指標としたものであるが、この方法では *rpoB* が耐性化する変異のみしか検出できず、ゲノムワイドに生じる変異へ

Fig. 1

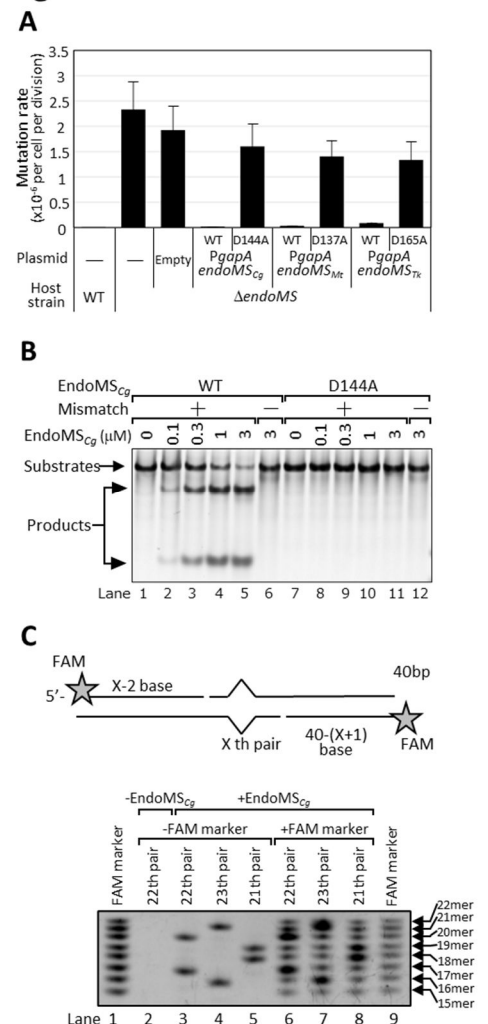
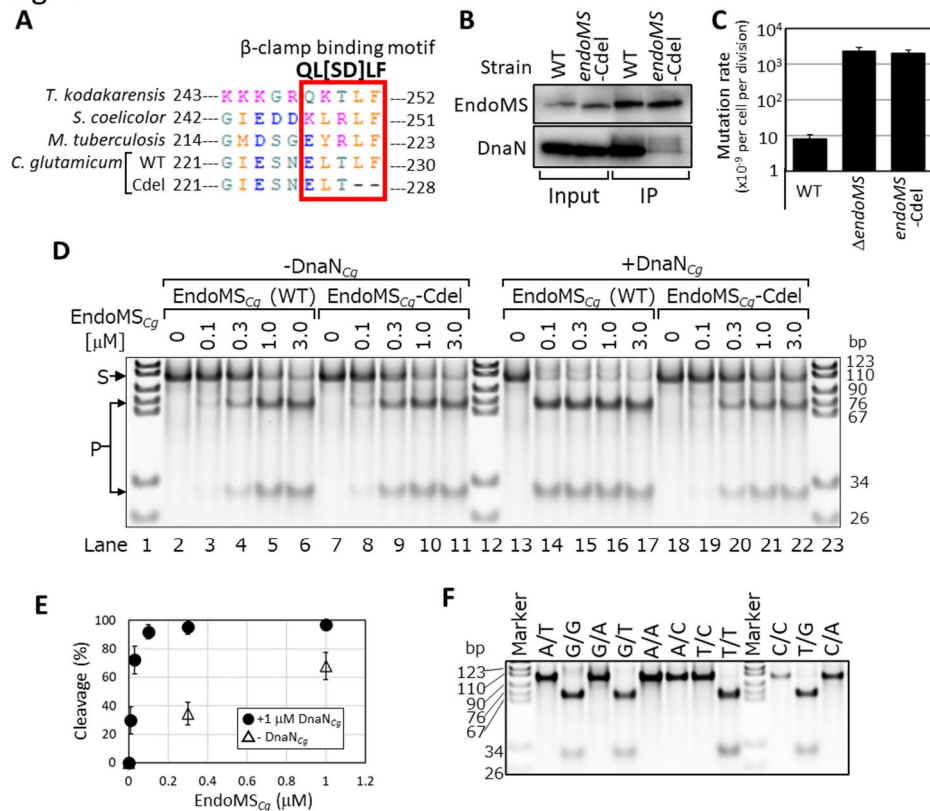


Fig. 2



の影響とは言えない。また *rpoB* は必須遺伝子であるため遺伝子破壊を伴う indel 変異率は測定できない。そこで、継代培養により変異を蓄積させたのちに全ゲノム解析によって変異点を同定し、継代培養の世代時間と検出された変異の数から変異率を求める Mutation Accumulation assay を行った (Table 1)。同時に EndoMS が複製時のエラーの修復に寄与するのかどうかを明らかにするため、DNA polymerase に変異を導入し、複製エラーを生じやすい株で EndoMS 欠損の影響を調べた。その結果、DNA polymerase 変異と EndoMS 欠損は単独での変異と比較して、二重変異株では変異率が大幅に上昇し、両者の効果が相乗的である、つまり、EndoMS が複製エラーの修復を担う事を見出した。一方、EndoMS の欠損は indel 変異率には影響を与えなかった。大腸菌では MutS 欠損により indel 変異率が大幅に上昇する事、大腸菌野生株と *C. glutamicum* 野生株では indel 変異率が同程度である事から、*C. glutamicum* では MutS に代わる indel 抑制システムが存在することが示唆された。また、変異率が上昇した変異はいずれも EndoMS が基質として切断可能なミスマッチに起因するものであり、生化学的特性と表現型がうまく合致した。

G/T, C/A のミスマッチはいずれも transition 変異の原因となる。MutS は G/T, C/A の両方のミスマッチを修復経路へ導くことが可能であるため、破壊株を用いた結果を見ても、生体内で G/T と C/A の何れが多く生じているのかを特定することは出来なかった。一方で、EndoMS は G/T ミ

Table 1. Mutation rates of BPSs

Mutation type*			Mutation rate (x 10 ⁻⁹ per nucleotide per generation)							
			WT		<i>ΔendoMS</i>		<i>dnaE</i> (D647G)		<i>ΔendoMS</i> - <i>dnaE</i> D647G)	
Transition	A:T G:C	A G	0.84	0.53	52	44	37	26	430	460
		T C	0.22		37		17		520	
	G:C A:T	G A	0.57	0.80	33	47	24	39	360	330
		C T	1.04		62		56		310	
Transversion	A:T C:G	A C	0.19	0.24	0.38	0.57	17	16	16	14
		T G	0.28		0.75		15		14	
	G:C T:A	G T	0.16	0.20	-	0.16	11	14	11	14
		C A	0.25		0.20		17		21	
	A:T T:A	A T	0.04	0.06	-	<0.19	4.7	3.5	6.0	6.3
		T A	0.09		-		2.3		8.5	
	G:C C:G	G C	0.07	0.08	-	<0.16	0.39	1.0	6.0	4.5
		C G	0.09		-		1.7		4.1	
Indels	Deletion		0.06		<0.07		4.9		5.6	
	Insertion		0.04		<0.07		7.1		7.3	
Overall			1.1		46		62		420	

*Mutations are represented as that occurred in leading strand

スマッチは切断できるが C/A ミスマッチを切断することは出来ない。 *C. glutamicum* において EndoMS 破壊が transition 変異の大幅な上昇を招いたことから、生体内では C/A ミスマッチより G/T ミスマッチの発生頻度が高く、ミスマッチ修復システムは役者を問わず細胞内で生じやすい G/T ミスマッチを除去するために発達したシステムである可能性が考えられる。

以上の結果を論文としてまとめ Nucleic Acid Research 誌に発表した。

研究 細胞内での切断様式の確認

同一株において条件依存的に EndoMS を発現させるため、*lacI-tac promoter* を染色体上の *nucS* (EndoMS) 遺伝子のプロモーターと置き換え、さらに DNA polymerase に変異を導入することで複製エラー過剰発生条件でかつ、IPTG により EndoMS 発現を誘導できる株を作製した。同株において、rifampicin assay により変異率測定を行ったところ、IPTG 誘導により機能的な EndoMS が発現し、変異を抑制できることを確認した(Fig.6A)。この株の DNA polymerase の校正機能を更に破壊した *Ptac-nucS* かつ DNA polymerase 二重変異株において、IPTG 添加の有無で、SOS response により発現が上昇することが知られている遺伝子群の mRNA 量を測定した。IPTG 誘導により *endoMS* の発現上昇は確認できたものの、SOS response で発現上昇することが報告されている *recA*, *dnaE2*, *divS* の発現量には変化が見られなかった(Fig. 6B)。

研究 *in vitro* 再構成系を用いた切断パターンの確認

EndoMS は環状 DNA に対しては二重鎖切断ではなく、一本鎖ニックを導入する活性を持つことを見出した。よって、Sliding clamp を介して新生鎖を特異的に認識しニックを導入するミスマッチ修復メカニズムの仮説を立てた。その証明のため、一本鎖環状 DNA をもとに Sliding clamp を一定方向に指向させて配置し、かつミスマッチを有する基質を準備した。このとき、ミスマッチ部分については、修復されると制限酵素認識配列となるよう設計した。この基質を EndoMS で処理すると、二本鎖切断であればミスマッチ部分が除去されるが、新生鎖の一本鎖切断であれば、DNA polymerase I で処理することで、ミスマッチが修復され、制限酵素認識配列が生じる。これを指標に解析を行っているところであるが、今のところ一貫した結果は得られておらず、引き続き反応条件の検討が必要である。

研究 候補となる下流経路因子の探索

全ゲノム配列情報からヌクレアーゼやヘリカーゼと予想される遺伝子 22 個を含む約 40 遺伝子について破壊株を作製し、rifampicin 耐性株頻度測定を行ったが、変異率への影響は確認できなかった。いくつかの遺伝子については互いにホモログである可能性が高かったため、欠損を重ねた多重欠損株も作製したが、rifampicin 耐性頻度への影響は見られなかった。これらの解析からは、EndoMS 依存的ミスマッチ修復の下流経路への手掛かりは掴めていない。

EndoMS 依存的ミスマッチ修復を持つ生物にとって、indel 変異を抑制する因子の存在が予想されたため、リボフラビン合成経路遺伝子 *ribA* にある T が 5 個連続(5T)する配列について 4T 及び 6T の変異体を作製した。*ribA4T*, *ribA6T* 株はリボフラビン要求性であり、最少培地では増殖できないが、一定頻度で 5T に変異し、遺伝子復帰した復帰株が出現した。この復帰株頻度を指標に、nuclease 破壊の indel 変異率への影響について検討した。その結果、ある遺伝子のホモログと考えられる 4 つの遺伝子をすべて破壊した 4 重破壊株 (Quad) において、変異体頻度が 3-5 倍程度上昇していることを見出した。今後、Mutation Accumulation assay により、ゲノムワイドに変異率や変異スペクトルへの影響を検討する。

Fig. 3

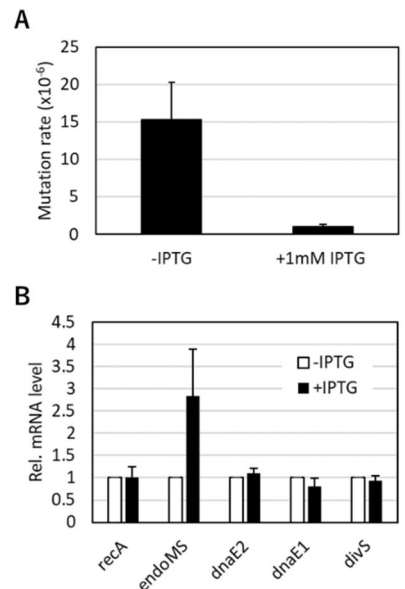
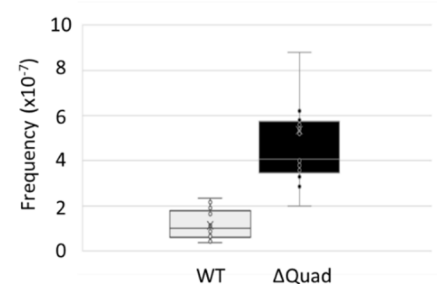


Fig. 4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takemoto Norihiko, Numata Itaru, Su'etsugu Masayuki, Miyoshi-Akiyama Tohru	4. 巻 46
2. 論文標題 Bacterial EndoMS/NucS acts as a clamp-mediated mismatch endonuclease to prevent asymmetric accumulation of replication errors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 6152 ~ 6165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gky481	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4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Norihiko Takemoto, Itaru Numata, Masayuki Su'etsugu, Tohru Miyoshi-Akiyama
2. 発表標題 Bacterial EndoMS/NucS acts as a clamp-mediated mismatch endonuclease to prevent asymmetric accumulation of replication errors
3. 学会等名 International 3R&3C Symposium（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 MutS非依存型新規ミスマッチ修復機構の解析
2. 発表標題 竹本 訓彦, 沼田 格, 末次 正幸, 秋山 徹
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹本 訓彦, 沼田 格, 末次 正幸, 堀野 芽生, 渡邊 真弥, 秋山 徹
2. 発表標題 Bacterial EndoMS/NucS acts as a clamp-mediated mismatch endonuclease to prevent asymmetric accumulation of replication errors
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norihiko Takemoto, Itaru Numata, Masayuki Su'etsugu, Tohru Miyoshi-Akiyama
2. 発表標題 Fidelity of Genome Replication in Organisms Lacking Canonical Mismatch Repair System
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	末次 正幸 (Su'etsugu Masayuki) (00363341)	立教大学・理学部・教授 (32686)	
研究分担者	福井 健二 (Fukui Kenji) (00466038)	大阪医科大学・医学部・助教 (34401)	

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