

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21780102
 研究課題名 (和文) 高効率DNA連結反応に関与するタンパク質複合体の構造・機能解析
 研究課題名 (英文) Structural and functional analysis of high efficient DNA ligation complex
 研究代表者
 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・博士研究員
 研究者番号：80510924

研究成果の概要 (和文)：

ラジオデュランスは二種類の DNA リガーゼ (DR2069、DRB0100) を持っている。解析の結果、DR2069 には DNA リガーゼ活性が認められたが、DRB0100 は DNA リガーゼ活性は認められなかった。一方で DNA リガーゼによる連結反応の前段階において消化酵素から DNA を保護する DdrA タンパク質の結晶解析を実施し、結晶化、回折データ収集に成功した。最大分解能 2.1Å までの良好な回折データを収集し、現在構造解析中である。

研究成果の概要 (英文)：

Two DNA ligase (DR2069, DRB0100) are identified in a genome of *Deinococcus radiodurans*. As a result of analysis, DR2069 was able to confirm DNA ligase activity, but DRB0100 was not able to confirm the DNA ligase activity. On the other hand, we carried out a crystallographic analysis of the DdrA protein which protected DNA from digestive enzymes before ligation with the DNA ligase and succeeded in crystallization and a diffraction data collection. Diffraction data were collected to 2.10 Å resolution and structural analysis are carrying out now.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

デイノコッカスラジオデュランスは生物

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。ラジオデュランスのゲノム中には NAD 依存型 DNA リガーゼ DR2069 と ATP 依存型 DNA リガーゼ DRB0100 の二種類の DNA リガーゼが存在する事がゲノム解析の結果から予想されている。しかしこれら2つの DNA リガーゼのどちらが高効率 DNA 二本鎖切断に関与しているか明らかにされていない。

2. 研究の目的

放射線抵抗性細菌 *Deinococcus radiodurans*、以下、ラジオデュランス) は生物にとって致死的效果の高い DNA 二本鎖切断を効率よく修復する事が可能である。このラジオデュランスのゲノム内には DNA 二本鎖切断修復に関わると思われる DNA リガーゼが2つ存在しているが、どちらの DNA リガーゼが DNA 修復機構に関与しているか今のところ明らかになっていない。本研究では生化学的解析、相互作用解析、構造解析を組み合わせ DNA 二本鎖切断を非相同末端再結合 (NHEJ) によって修復する機構の中核を担う PprA とともに効率よく DNA 二本鎖切断点を連結する DNA リガーゼの同定し、活性に必要な補因子の同定、基質特異性、PprA-DNA リガーゼ複合体の形成の有無、協調的反応機構を明らかにする。さらに連結反応に必要な因子の同定も試みる。

3. 研究の方法

(1)DNA リガーゼの大腸菌大量発現系構築、タンパク質の発現・精製

2つの DNA リガーゼ遺伝子 *dr2069*、*drb0100* を PCR にて増幅し、大腸菌ベクターに連結させる。作製したベクターを用いてタンパク質大量発現用大腸菌 BL21(DE3)を形質転換し、安定的に目的タンパク質を組み換え生産するシステムを構築する。目的のタンパク質は組み換え大腸菌中で大量生産し、複数のカラムを組み合わせたクロマトグラフィ装置によって高純度に精製する。精製したタンパク質は生化学実験、X線結晶構造解析実験に供する。

(2)DNA/RNA リガーゼ活性の生化学的測定

上記(1)にて高純度に精製した目的タンパク質を用いて DNA 連結反応の活性測定を行った。環状 DNA を制限酵素処理によって直鎖状にし、酵素反応の基質として用いた。DNA の末端構造が突出末端、平滑末端になるよう制限酵素を選択し、共に基質として用いた。直鎖状 DNA が連結される事による電気泳動度の変化を指標に連結反応の有無を確認した。

また RNA リガーゼ活性を測定するため、

基質として合成オリゴ RNA を作製し、全て RNase Free の試薬を用いて DNA リガーゼ活性測定度同様に電気泳動度の変化を利用して活性を測定した。

(3)DNA リガーゼの結晶化

高純度に精製した DNA リガーゼを用いて結晶化を行った。結晶化条件のスクリーニングには市販の結晶化条件探索キットを用いて sitting drop 蒸気拡散法によって探索を行った。

(4)DNA 末端結合蛋白質 DdrA の結晶解析

本研究実施期間に於いて他の研究グループから同一のタンパク質の機能解析の報告 (Kota S., Kamble VA., Rajpurohit YS., Misra HS., *Biochem. Cell Biol.*, 2010) がなされた。本報告によると ATP-type DNA リガーゼ (DRB0100) はその機能発揮に同一オペロンに存在する遺伝子産物 DRB0098 と本研究にて取り扱っていた PprA タンパク質を必要とする。これは本課題当初に想定していた複数の因子が DRB0100 の機能発揮に必要である仮説が証明されたという事である。そこで本課題では研究対象を発展させ、その機能発揮の場において重要な役割を果たす DNA 切断末端結合タンパク質 DdrA と DNA リガーゼとの関係の解明に発展的に研究対象を展開した。DdrA、DNA リガーゼ間の DNA の受け渡し機構を原子レベルで明らかにする事を目的とし、構造未知の2種の DNA リガーゼの結晶解析と並行して同じく構造未知の DdrA の結晶解析を実施した。

得られたタンパク質結晶を用いてこうエネ ルギー加速器研究機構の放射光施設にて X 線回折実験を実施した。また位相決定のためのデータ収集を目的としてセレンメチオン置換体 DdrA の作製を実施した。

4. 研究成果

大腸菌発現系の構築を行ったところ、両タンパク質の発現量は極めて乏しく高純度精製は困難であったが、N-末端もしくは C-末端に His-tag を付与した発現系を構築し、高純度に精製する事に成功した。N-末端に His-tag を付与した DR2069 には DNA リガーゼ活性が認められたが、C-末端に His-tag を付与した発現系では活性を確認できなかった。また N-末端もしくは C-末端に His-tag を付与した DRB0100 はどちらも DNA リガーゼ活性は認められなかった。また、DRB0100 が RNA リガーゼである可能性も検討するため、RNA 基質を作製し RNA リガーゼ活性を検討したところ、活性は認められなかった。

また活性測定実験を実施している期間に上述の生化学実験報告がなされ、本課題の対象である2種類のDNAリガーゼは共にDNA連結活性を持つ事が明らかになった事から、両タンパク質の機能を三次元構造に基づいて理解し、PprAなどの他のタンパク質因子との相互作用を詳細に理解するため研究の中心を2種のDNAリガーゼの三次元構造解析にシフトさせた。

2種のDNAリガーゼについてX線結晶構造解析に必要なタンパク質結晶の作製を試みたが、これまでに解析に十分な回折データを収集可能な結晶の取得には至っていない。またDNAリガーゼと共に働き、DNAリガーゼが切断点を修復する前に消化酵素からDNAを保護する役割を持ち、DNAリガーゼにDNAを受け渡す機能をもつタンパク質DdrAの大量発現系を構築し、全長型DdrAおよびコアとよばれる領域(1-157番目のアミノ酸からなる)DdrA157の発現系、精製系を確立した。DdrAのDNAリガーゼへのDNA受け渡し機構を明らかにするため、DdrAの結晶化を行い、X線回折実験を行った(Fig. 1, 2)。空間群 $P222_1$ 、結晶格子は $a=46$ 、 $b=114$ 、 $c=180$ Å、最大分解能 2.1 Åの解析データ収集に成功した。また位相決定を行うため、タンパク質中のメチオニンを全てセレノメチオニンに置換したタンパク質を作製し、セレン原子の異常分散を含む回折データの収集に成功した。

得られた回折データを用いてN(Z)テストおよびLテストを実行したところ、今回結晶を作製した条件下では β がほぼ 90 度の結晶格子であり、真の空間群、結晶格子は $P21$ 、 $a=46.31$ 、 $b=180.26$ 、 $c=114.17$ Å、 $\beta=90.02^\circ$ であるが、結晶面の欠陥によって $(h, k, l) = (-h, -k, l)$ の相関を持つ疑似欠面双晶になっており、上記結晶面欠陥による相関と結晶学的相関が区別しがたく、 $P222_1$ の空間群であるように見える難解析性の結晶が生成する事が明らかになった(Fig. 3)。現在収集したデータを真の空間群にて再処理し、異常分散効果を用いて解析中であるが、並行して新たな結晶化条件の探索を行い、タンパク質分子に化学修飾を施す事によって、現在得られている結晶とは別の結晶系に属する結晶を析出させる事に成功した。

今後はDdrAとDNAリガーゼによる二本鎖切断末端の協調的修復機構を明らかにするため今回実施した結晶解析を継続していく。さらに本課題に主題目であったDNAリガーゼの活性に他の蛋白質が必要である事が国内外の研究グループによってしだいに明らかにされつつ有り、ラジオデュランスのDNAリガーゼとその補助蛋白質の構造生物学的解析にも発展していきたい。

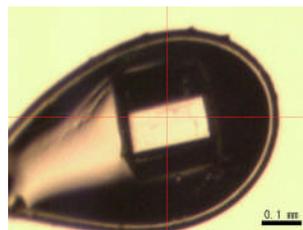


Fig. 1 DdrA157の結晶

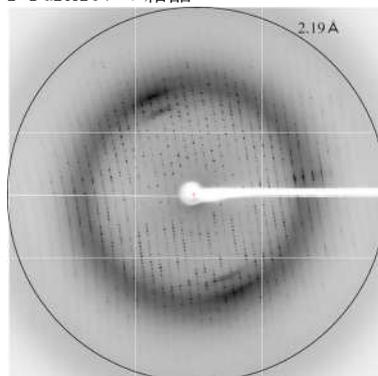


Fig. 2 DdrA157の回折点

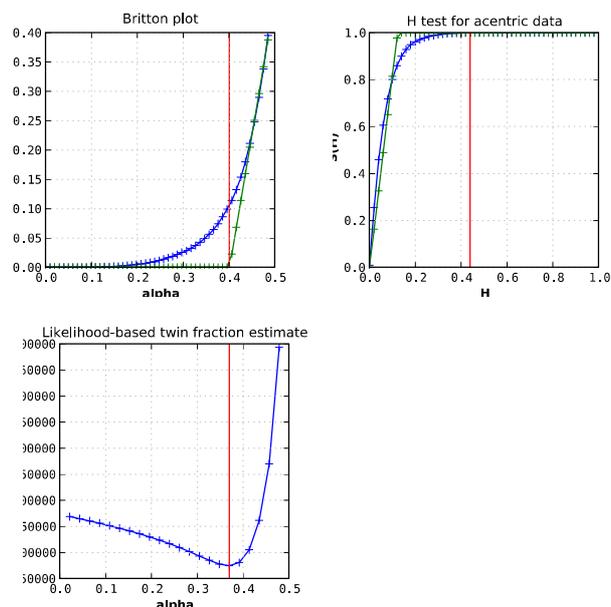


Fig. 3 $(h, k, l) = (-h, -k, l)$ 相関 Twin fraction の推定

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1件)

① Yamada M., Satoh K., Narumi I.

Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of DNA damage response A

protein from *Deinococcus radiodurans*
R1
*Acta Crystallogr Sect F Struct Biol
Cryst Commun.*, 査読有、**66**, 1614-1616.
(2010)

〔学会発表〕(計1件)

1. 山田 貢、安達 基泰、佐藤 勝也、
玉田 太郎、由良 敬、黒木 良太、
鳴海 一成
Structural and functional analysis
of PprA from *Deinococcus radiodurans*
第82回日本生化学会大会、神戸、2009
年10月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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・博士研究員
研究者番号：80510924