

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05423

研究課題名(和文)放射線抵抗性細菌のDNA損傷応答誘導因子PprIの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the DNA damage response regulator protein PprI in the radioresistant bacterium Deinococcus radiodurans

研究代表者

佐藤 勝也 (Sato, Katsuya)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・上席研究員(定常)

研究者番号：90370402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：変異型PprIを用いて、DNA損傷応答機構への影響について解析を行った。E119Q及びE149Qを含む変異型PprIは、DNA損傷応答反応を示さなかったことからメタロプロテアーゼ活性の欠失により、Ddr0が分解されずRDRレギュロン発現の脱抑制が起こらないと考えられた。また、Y196A、V237A及びH260Lを含む変異型PprIは、低いDNA損傷応答反応を示したことから、それぞれ、DNA結合性及び環状ヌクレオチドの結合性を低下させ立体構造及び触媒活性に影響を与えていると考えられた。このように、DNA損傷応答機構におけるPprIの機能に関わるアミノ酸部位について重要な知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PprIは、放射性抵抗性細菌において高次に保存される特有のタンパク質であり、機能ドメインとして、メタロプロテアーゼドメイン、DNA結合ドメイン、GAF様結合ドメインを有している。本研究によって、放射性抵抗性細菌に特有のDNA損傷依存的なDNA修復タンパク質群の発現誘導の分子機構において、PprIのメタロプロテアーゼ部位が最も重要な役割を担っていることを見出した。これにより、放射線抵抗性細菌の極めて効率的なDNA修復機構の一端を明らかにすることができた。さらに、DNA修復に重要な役割を担うタンパク質を有用微生物資源として、生命科学・バイオ技術分野の新たな研究開発にも貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The PprI protein is highly conserved in the radioresistant bacterium *Deinococcus* and consists of three domains, which is metalloprotease, DNA binding and GAF-like binding domains. In an effort to gain an insight into the role of PprI in DNA damage response mechanism in *D. radiodurans*, the functional analyses of PprI were conducted. The pprI-deleted mutant strain, wild-type and 15 mutated pprI expression plasmids were constructed. The pprI-deleted mutant strains carrying two mutated pprI plasmids (E119Q and E149Q) exhibited significant sensitive to gamma rays compared to wild-type, respectively. Moreover, the DNA damage response using the luciferase reporter assay in these strains were not observed following gamma irradiation. These results suggest that the metalloprotease domain contained these mutation (E119Q and E149Q) plays most critical role for DNA damage response regulator among three domains.

研究分野：応用微生物学

キーワード：放射線抵抗性細菌 デイノコッカス・ラジオデュランス DNA損傷応答機構 DNA修復機構 PprI 放射線乾燥応答モチーフ DdrA Ddr0

1. 研究開始当初の背景

放射線抵抗性細菌の代表菌種であるデインコッカス・ラジオデュランスは、1956年に単離された最初の極限環境微生物であり、他の生物にとって致死効果あるいは変異原性を示すガンマ線、紫外線、乾燥及び薬剤など様々なDNA変異原に誘起されるDNA損傷に対して、極めて高い抵抗性を有する。ラジオデュランスも他の生物と同様に、放射線照射によってDNA損傷が引き起こされるが、特筆すべきは、DNA損傷の中でも最も致死効果の高いDNA二本鎖切断に対しても高いDNA修復能力を持っている点である。ラジオデュランスの高いDNA修復能力は、DNA損傷後に発現誘導されるDNA修復タンパク質群の応答機構(DNA損傷応答機構)が特に重要である。しかしながら、どのようにしてDNA損傷を認知し、DNA修復タンパク質群を発現誘導するのかといったその分子機構については、現在でも完全には解明されていない。

これまでに我々は、ラジオデュランスのDNA修復機構の全容を明らかにするために、ラジオデュランスのDNA修復能が欠損した変異株からDNA修復能欠損の責任遺伝子の同定、並びにDNA塩基配列情報を利用したDNA修復関連遺伝子の破壊株を作製しその影響を解析する戦略をとってきた。その結果、ラジオデュランスの効率的なDNA修復機構の中心的な役割を担う因子として、相同組換え修復に関与するRecAタンパク質をコードする遺伝子、及び既知の遺伝子とは全く相同性を持たないデインコッカス属細菌独特の凝縮核様体依存性末端結合修復に関与するDNA修復を促進する多面的タンパク質PprA (pleiotropic protein promoting DNA repair) をコードする遺伝子などの同定に成功している。さらに、異なるDNA修復能欠損変異株の解析から、既知の遺伝子と相同性を示さない責任遺伝子を同定した。この遺伝子にコードされるタンパク質が、RecA及びPprAタンパク質のDNA損傷後の発現誘導に非常に重要な役割を持つスイッチタンパク質であることから、PprI (inducer of PprA; 多面的タンパク質の誘導制御因子) と命名した。ラジオデュランスにおいて、PprIタンパク質の欠失は、他のDNA修復タンパク質を欠失させた場合に比べて最も放射線感受性を示すことから、DNA損傷応答機構においてPprIタンパク質が最も重要な誘導制御因子であると考えている。

PprIタンパク質は、デインコッカス属細菌において高次に保存される特有のタンパク質であり、メタロプロテアーゼドメイン、DNA結合ドメイン、GAF様結合ドメインを有している。デインコッカス属細菌に特有のDNA損傷応答機構において、定常状態では、リプレッサータンパク質であるDdrOが放射線/乾燥応答(Radiation/Desiccation Response; RDR)モチーフに結合することで、DNA修復タンパク質を含むRDRレギュロンの発現を抑制している。これに対して、DNA損傷が生じると、PprIタンパク質とDdrOタンパク質との相互作用によって、脱抑制がおこり、RDRレギュロンの発現が誘導され、DNA修復が活性化する。しかしながら、DNA損傷応答機構におけるPprIタンパク質の各ドメインの役割は明らかではない。

2. 研究の目的

生物の放射線耐性は、生物種によって大きく異なるが、どんな生物でもDNA損傷を修復する機構を有している。そのため、生命維持は、いかに効率よく正確にDNA損傷を修復するかに懸かっている。したがって、生物のDNA修復機構を明らかにすることは、巧妙な生命機能を理解する上で非常に重要である。研究の全体構想は、放射線抵抗性細菌が持つ効率的なDNA修復機構の全容を解明し、DNA修復に重要な役割を担うタンパク質を有用微生物資源として、生命科学・バイオ技術分野の応用研究に繋げることである。しかし、デインコッカス・ラジオデュランスの高いDNA修復能を担うDNA損傷応答機構において、DNA損傷の認知やDNA修復タンパク質群の発現誘導の分子機構は、十分に解明されていない。そこで本研究では、DNA損傷応答機構において、DNA修復タンパク質群の発現誘導のスイッチタンパク質であるPprIの機能に注目し、DNA損傷時におけるリプレッサータンパク質との相互作用やDNA修復タンパク質群の発現誘導への影響を解析することで、PprIタンパク質のDNA修復タンパク質群の発現誘導機能に重要なドメインを明らかにし、DNA損傷応答機構の解明に迫ることを目的とする。ラジオデュランスの有する極めて効率的なDNA修復機構を対象とすることで、生物のDNA修復能力の限界や可能性を見極め、巧妙な生命機能についてのより深い理解を得られると共に、有用な遺伝子資源としての利用及び生命維持機能を増強する手だてを講じる研究開発に新たな方向性を与えることにも繋がり、生命科学の新たな展開に貢献できると考えられる。

3. 研究の方法

(1) PprI欠失変異株の作製

デインコッカス・ラジオデュランスの*pprI*遺伝子プロモーター上流領域(802 bp)、ラジオデュランスのカタラーゼ遺伝子プロモーターによって制御される大腸菌由来のハイグロマイシン耐性遺伝子を連結した遺伝子カセット(1,289 bp)及び*pprI*遺伝子の下流領域(777 bp)をPCR増幅後に、ライゲーションにより連結したDNA断片を作製した。得られたDNA断片を用いてラジオデュランスの野生株(ATCC13933)を形質転換し、PprI欠失変異株を作製した。

(2) 野生型及び変異型 *pprI* 遺伝子発現プラスミドの作製

制限酵素切断部位タグ付きプライマーで野生型 *pprI* 遺伝子領域 (1,012 bp) 及び *pprI* 遺伝子プライマー領域 (164 bp) を PCR 増幅後に、ライゲーションによりラジオデュランス/大腸菌シャトルベクター pRAD1 に連結し、野生型 *pprI* 遺伝子発現プラスミドを作製した。さらに、野生型 *pprI* 遺伝子発現プラスミドをテンプレートとして、Error-prone PCR 法及び部位特異的変異導入法によって、*pprI* 遺伝子領域内に 1 箇所アミノ酸置換となるように変異を導入し、変異型 *pprI* 遺伝子発現プラスミドを作製した。

(3) ガンマ線照射に対する影響解析

PprI 欠失変異株に野生型及び変異型 *pprI* 遺伝子発現プラスミドを導入し、PprI 相補株 PIPW 及び PIM 株を作製した。また、対照として、ベクター pRAD1 で野生株及び PprI 欠失変異株を形質転換し、それぞれ WTP 株及び XP 株とした。ガンマ線照射に対する影響を平板希釈法により解析した。各菌株を 30°C で 24 時間振とう培養後、リン酸緩衝液で洗浄再懸濁した。菌体懸濁液は、ガンマ線照射後、適宜希釈し寒天培地に塗布し、30°C で 3 日間静置培養した。形成したコロニー数より生存率を算出した。ガンマ線照射は、量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所のガンマ線照射施設にて行った。

(4) DNA 損傷応答解析に向けたレポーター株の作製

RDR レギュロンの中でも最も DNA 損傷後に発現誘導量が高い *ddrA* 遺伝子の RDR モチーフを含むプロモーター配列の下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子とカタラーゼ遺伝子プロモーターの制御下に大腸菌スペクチノマイシン耐性遺伝子を連結した遺伝子カセットをラジオデュランスの野生株 (ATCC13933) 及び PprI 欠失変異株のゲノム配列に導入し、DARP 及び SIRD 株を作製した。さらに、SIRD 株に野生型及び変異型 *pprI* 遺伝子発現プラスミドを導入し、レポーター株 DAW 及び DAM 株を作製した。また、対照として、ベクター pRAD1 で DARP 及び SIRD 株を形質転換し、それぞれ DAWP 及び XDAP 株とした。

(5) ガンマ線照射による DNA 損傷応答機構への影響解析

各菌株を 30°C で 24 時間振とう培養後、リン酸緩衝液で洗浄再懸濁した。菌体懸濁液は、ガンマ線照射後 (2 kGy)、液体培地に再懸濁し、30°C で 2 時間振とう培養した。培養菌体を回収し、ルシフェラーゼ遺伝子の発現活性を指標に DNA 損傷応答機構への影響解析を行った。ガンマ線照射は、量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所のガンマ線照射施設にて行った。

4. 研究成果

(1) 変異型 *pprI* 遺伝子発現プラスミドの作製

Error Prone PCR 法及び部位特異的変異導入法によって、15 種の変異型 *pprI* 遺伝子発現プラスミドを作製した。PprI タンパク質は、異なる 3 つの機能ドメインを有しており、導入した各変異部位は、主要な 3 つのドメインに含まれない S12T、メタロプロテアーゼドメイン内の A64T、E97Q、E119Q、E149Q、DNA 結合ドメイン内の R172C、A184S、Y196S、及び GAF 様結合ドメイン内の T236S、V237A、H260L、P261S、S276N、R181A、D291N である (図 1)。

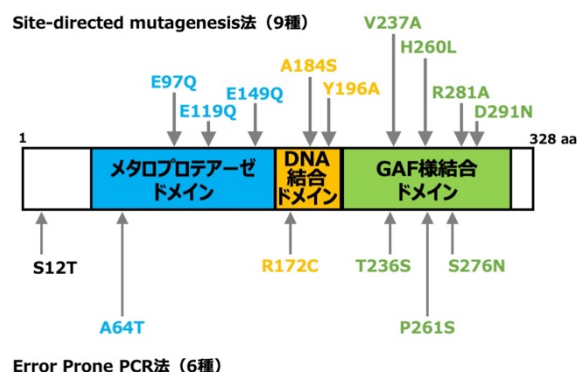


図 1. PprI タンパク質の機能ドメイン及び変異導入部位。

(2) ガンマ線に対するプラスミド相補試験

PprI 相補株 PIPW、ベクターのみを含む WTP 及び XP 株を用いて、ガンマ線に対する感受性を指標としたプラスミド相補試験を行った。ガンマ線に対して、XP 株は非常に高感受性であったが、PprI 相補株 PIPW は、WTP 株と同程度に耐性が復帰しており、野生型 *pprI* 遺伝子がガンマ線耐性を相補できることを確認した (図 2A)。E119Q 及び E149Q を含む相補株 PIM は、XP 株

と同程度に高感受性であった (図 2A)。また、S12T、Y196A、V237A 及び H260L を含む相補株 PIM は、PprI 欠失変異を完全に相補することができず比較的感受性を示した (図 2B)。一方、その他の変異を含む相補株 PIM は、WTP 株と同程度に耐性が復帰したことから (図 2C)、PprI タンパク質の機能に大きく関与していない部位であると考えられた。

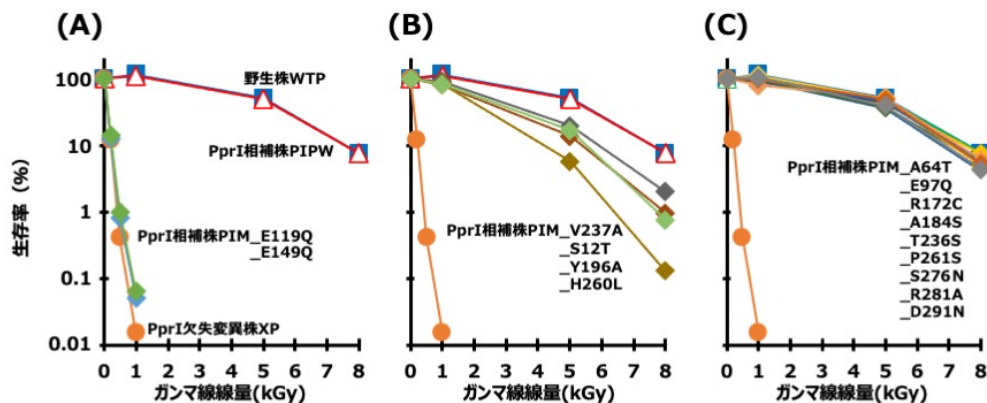


図 2. ガンマ線に対する野生型及び変異型 PprI タンパク質の相補試験.

(3) ガンマ線照射による DNA 損傷応答機構への影響解析

レポーター株 DAW、ベクターのみを含む DAWP 及び XDAP 株を用いて、ガンマ線に対してルシフェラーゼ遺伝子の発現活性の変動を指標としたレポーターアッセイを実施した。野生型 *pprI* 遺伝子発現プラスミドを含むレポーター株のルシフェラーゼ遺伝子の発現活性の変動を確認でき、レポーターアッセイによる PprI タンパク質の機能解析を行う実験系を構築することができた (図 3)。メタロプロテアーゼドメイン内の E119Q 及び E149Q を含むレポーター株 DAM は、XDAP 株と同様にルシフェラーゼ発現によるレポーター活性が誘導されなかった (図 3)。メタロプロテアーゼドメインにおける E119Q 及び E149Q の変異は、メタロプロテアーゼ活性を欠失させ、DdrO タンパク質が分解されず RDR レギュロン発現の脱抑制が起こらないと考えられた。また、また、DNA 結合ドメイン内の Y196A 変異、GAF 様結合ドメイン内の V237A 及び H260L 変異は、野生型よりも低いレポーター活性を示したことから (図 3)、それぞれ、DNA 結合性及び環状ヌクレオチドの結合性を低下させ PprI タンパク質の立体構造及び触媒活性に影響を与えていると考えられた。このように、プラスミド相補試験及びレポーターアッセイの結果から、PprI タンパク質の有するメタロプロテアーゼ部位が最も DNA 損傷応答の制御に重要な役割を担っていることを見出した。

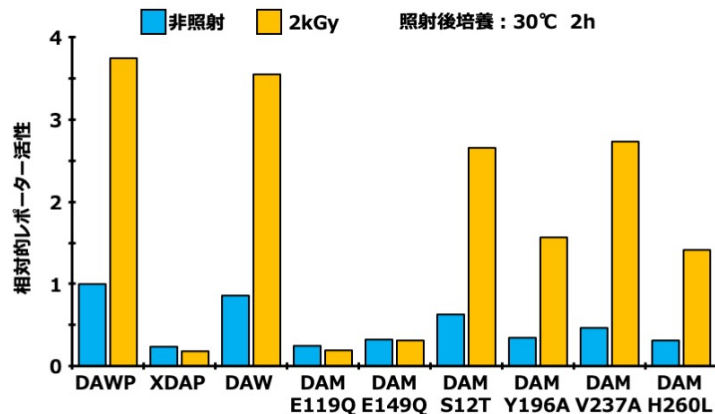


図 3. ガンマ線照射によるレポーター活性の変動.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sato Katsuya, Oono Yutaka	4. 巻 3
2. 論文標題 Studies on Application of Ion Beam Breeding to Industrial Microorganisms at TIARA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Quantum Beam Science	6. 最初と最後の頁 11~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/qbs3020011	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 -
1. 著者名 Shibai Atsushi, Sato Katsuya, Kawada Masako, Kotani Hazuki, Narumi Issay, Furusawa Chikara	4. 巻 8
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of a Radioresistant Bacterial Strain, <i>Deinococcus grandis</i> ATCC 43672	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01226-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.01226-19	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 -
1. 著者名 Katsuya Sato, Toshihiko Sanzen, Yutaka Oono, Issay Narumi.	4. 巻 QST-M-23
2. 論文標題 Functional analysis of PprI in the DNA damage response mechanism of <i>Deinococcus radiodurans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 QST Takasaki Annual Report 2018	6. 最初と最後の頁 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toshihiko Sanzen, Katsuya Sato, Yutaka Oono, Issay Narumi.	4. 巻 QST-M-23
2. 論文標題 Expression of the <i>Deinococcus grandis</i> imuB and dnaE2 Genes in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 QST Takasaki Annual Report 2018	6. 最初と最後の頁 89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Adachi Motoyasu, Shimizu Rumi, Shibazaki Chie, Satoh Katsuya, Fujiwara Satoru, Arai Shigeki, Narumi Issay, Kuroki Ryota	4. 巻 33
2. 論文標題 Extended structure of pleiotropic DNA repair-promoting protein PprA from Deinococcus radiodurans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 3647 ~ 3658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201801506R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katsuya Satoh, Hiroki Arai, Toshihiko Sanzen, Hidenori Hayashi, Issay Narumi, Yutaka Oono	4. 巻 QST-M-16
2. 論文標題 Genome analysis of the radioresistant bacterium Deinococcus aerius TR0125	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 QST Takasaki Annual Report 2017	6. 最初と最後の頁 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satoh Katsuya, Ozawa Shogo, Hayashi Hidenori, Tomioka Noriko, Narumi Issay, Oono Yutaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of the Cesium-Accumulating Bacterium Rhodococcus qingshengii CS98, Isolated from Soil in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01188-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.01188-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katsuya Satoh, Toshihiko Sanzen, Yutaka Oono, Issay Narumi	4. 巻 QST-M-29
2. 論文標題 Construction of Luciferase Reporter Strains for Functional Analysis of DNA Damage Response Regulators	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 QST Takasaki Annual Report 2019	6. 最初と最後の頁 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yusuke Futami, Katsuya Satoh, Naoki Tomita, Toshihiko Sanzen, Taichi Shimosaka, Yutaka Oono, Issay Narumi	4. 巻 QST-M-29
2. 論文標題 Functional analysis of radiation-inducible protein DdrA and its paralog DdrAP in Deinococcus radiodurans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 QST Takasaki Annual Report 2019	6. 最初と最後の頁 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 三善 英彦, 佐藤 勝也, 大野 豊, 鳴海 一成.
2. 発表標題 Deinococcus radioduransのDNA損傷応答タンパク質PprIの機能解析
3. 学会等名 極限環境生物学会2019年度 (第20回) 年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二見 祐作, 佐藤 勝也, 富田 尚希, 三善 英彦, 下坂 泰地, 大野 豊, 鳴海 一成.
2. 発表標題 放射線抵抗性細菌Deinococcus radioduransのDNA損傷誘導性DdrAタンパク質をコードする遺伝子およびそのパラログDdrAPタンパク質をコードする遺伝子の欠失株の特性解析
3. 学会等名 QST高崎サイエンスフェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三善 英彦, 佐藤 勝也, 大野 豊, 鳴海 一成
2. 発表標題 放射線抵抗性細菌 Deinococcus radiodurans の DNA 修復機構の正確性に関する比較ゲノム解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Katsuya Satoh, Toshihiko Sanzen, Issay Narumi, Yutaka Oono
2. 発表標題 The comparative genomic analysis between <i>Deinococcus radiodurans</i> , <i>D. grandis</i> , and <i>D. aerius</i>
3. 学会等名 The 12th International Conference on Extremophiles (Extremophiles 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshihiko Sanzen, Katsuya Satoh, Issay Narumi
2. 発表標題 Expression of translesion DNA polymerase genes from <i>Deinococcus grandis</i> in <i>Escherichia coli</i>
3. 学会等名 The 12th International Conference on Extremophiles (Extremophiles 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 勝也
2. 発表標題 イオンビームで産業微生物をつくる
3. 学会等名 第17回放射線プロセスシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三善 英彦, 佐藤 勝也, 鳴海 一成
2. 発表標題 <i>Deinococcus grandis</i> 由来TLSポリメラーゼの大腸菌内での発現
3. 学会等名 極限環境生物学会2018年度 (第19回) 年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三善 英彦, 佐藤 勝也, 大野 豊, 鳴海 一成
2. 発表標題 放射線抵抗性細菌由来TLSポリメラーゼの大腸菌での発現解析
3. 学会等名 QST高崎サイエンスフェスタ2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 勝也, 三善 英彦, 鳴海 一成, 大野 豊
2. 発表標題 デキノコッカス・ラジオデュランスのDNA損傷応答機構におけるPprIタンパク質の変異解析
3. 学会等名 極限環境生物学会2020年度(第21回)年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

量子科学技術研究開発機構・プロジェクト「イオンビーム変異誘発研究」 https://www.qst.go.jp/site/ion-beam-mutagenesis/
--

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
研究協力者	鳴海 一成 (Narumi Issay)		

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