

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05442

研究課題名(和文) 超好熱性アーキアから発見された新規エンドヌクレアーゼによるDNA修復経路の解明

研究課題名(英文) Elucidation of DNA repair pathway involving the novel endonuclease derived from hyperthermophilic archaea

研究代表者

石野 園子 (Ishino, Sonoko)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：80399740

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)：DNAが受ける化学的損傷のひとつ、脱アミノ化塩基損傷に働くエンドヌクレアーゼ、EndoVおよびEndoQはそれぞれ損傷塩基の3'側と5'側でDNAを切断する。その後に2種のDNAポリメラーゼ、PoIBおよびPoIDが切断部位を処理して伸長する修復が、どのように進行するのか、超好熱性アーキア由来の組換えタンパク質を用いて、*in vitro*再構成系を構築して解析をおこなった。ミスマッチ塩基対を認識して切断するEndoMSをコードする遺伝子の細胞内での働きを調べるために、遺伝子欠損株に蓄積される変異を継代培養後のゲノムDNAについて、次世代シーケンシングにより塩基配列を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生物の遺伝情報を担うDNAが化学的損傷を受けたとき、どのように修復し遺伝情報を守っているのかを理解することを目的に、遺伝学的、および分子化学的にDNA修復機構の解明を進めた。厳しい生育環境で自らの遺伝情報を安定に維持している超好熱性アーキアにおいて、主導するタンパク質因子がどのように関連分子を認識してDNAを修復するのか理解が深まった。また細胞内に蓄積する変異をゲノムDNAの塩基配列を直接分析することにより、生化学的性質と合わせて議論することを可能にした。これらの成果は基礎科学への貢献と共に、新たな遺伝子工学技術の開発および医療分野への応用にもつながる。

研究成果の概要(英文)：Base deamination is a typical form of DNA damage, and it must be repaired quickly to maintain the genome integrity of living organisms. Endonuclease V (EndoV) and Endonuclease Q (EndoQ) from hyperthermophilic archaea hydrolyze the phosphodiester bond at the 3' and 5' site from the damaged nucleotide, respectively. The two DNA polymerases, PoIB and PoID, could repair the lesion and elongate the DNA strand. The *in vitro* reconstitution system was constructed using the recombinant proteins derived from hyperthermophilic archaea. EndoMS recognizes and cleaves mismatched base pairs. In order to investigate the intracellular function of the EndoMS gene, mutation accumulation assay was performed using the gene-disrupted strains. Mutation spectra were consistent with the biochemical properties.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA修復 アーキア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA 修復は生命の根幹に関わる現象で、生物種を超えた共通の機構が存在するいっぽうで、多様な生命に対応して複雑に進化してきたこともわかってきた。このような学術的背景を基に、生物の 3 ドメインのひとつであるアーキアにおいて、遺伝情報がどのように守られて種を保存してきたのかという問いに本研究は向き合っており、100°C 以上で生息する超好熱性アーキアを用いて DNA 修復機構の解析に取り組んだ。

研究開始当初までに、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* および *Pyrococcus furiosus* を対象にした研究で、いくつかの新規の DNA 修復関連酵素を発見してそれらを解析してきた。Endonuclease Q (EndoQ) は、DNA 塩基の A, G, C が脱アミノ化されてヒポキサンチン、キサンチン、ウラシルになった時に、そのすぐ 5'側のリン酸ジエステル結合を切断した (Ishino, S. et al., *Nucleic Acids Res.* 2015)。ヒポキサンチンに対しては、Endonuclease V (EndoV) という、真核生物および真正細菌と共通のホモログも保有しており、切断は 3'側 2 塩基隣のリン酸ジエステル結合であった。アーキアには、真核生物や真正細菌と進化的に繋がっている遺伝子で、他にも脱アミノ化塩基に対応すると予想されるものが存在し、Uracil DNA Glycosylase (UDG)、AP (Apurinic/apyrimidinic) endonuclease (APE) についても *in vitro* における機能解析をおこなってきた。また、アーキアにおいてミスマッチ塩基対特異的な切断をおこなう酵素、Endonuclease mismatch-specific (EndoMS) を見出した。EndoMS はヒポキサンチンなどの脱塩基部位を有するミスマッチも切断できることがわかった。こうしてアーキアにおける遺伝情報の維持と伝達の分子機構に対する理解が深まってきた。

しかし、嫌気性超好熱性アーキアはその特殊な培養条件から、大腸菌や酵母で早くから取り組まれていた遺伝子操作がたいへん困難であった。2000 年代には嫌気性超好熱性アーキア *T. kodakarensis* の遺伝子操作技術が開発され (Sato, T. et al., *J. Bact.* 2003)、遺伝子破壊株を作製できるようになり遺伝学的解析が取り入れられるようになった。しかし表現型を観察するときに、常温生物の試験で用いられてきた DNA 損傷を引き起す試薬/方法の多くが、特殊な培養条件 (高温、嫌気) では期待通りに働かないことを経験してきた。この問題が少しずつ克服され、現在は増殖能や感受性に影響を与える要素の知見が広がってきている。

超好熱性アーキアにおける DNA 修復機構の解明に向けて生化学的解析と遺伝学的解析の両方のアプローチでより深い理解が得られることはあきらかである。

2. 研究の目的

アーキア特有の EndoQ およびアーキアと一部の真正細菌のみに保存されている EndoMS が損傷 DNA に作用することを *in vitro* の詳細な機能解析で証明したが、これらに加えて、EndoV、UDG、APE といったタンパク質が細胞内でどのように修復に関わっているのかを解析することを一つの目的とした。これらがアーキア細胞内で、どのように働いているかを遺伝学的に解析し、*in vitro* で解析してきた生化学的な知見と合わせて修復の機構を理解する。また脱アミノ化塩基に働く複数のタンパク質はアーキア特有の EndoQ および EndoMS とどのようにかわるのかを遺伝学的に調べようと取り組んだ。

EndoMS はエンドヌクレアーゼとして二本鎖 DNA を切断するが、その後の修復経路が不明である。どのようなタンパク質因子が関わっているのか、相互作用因子の探索とその解析をもう一つの目的とした。

3. 研究の方法

嫌気性超好熱性アーキア *T. kodakarensis* の遺伝子 (*endoQ*, *endoV*, *endoMS*, *udg*, *ape*) について、それぞれ遺伝子破壊株を作製し、紫外線、高温、および化学変異原に対する感受性を、段階希釈によるコロニー形成の観察で調査した。

遺伝子欠損株を培養して濁度を測定することで増殖特性を調べた。

当初は 6 メチルプリン耐性を利用し、細胞の変異率を定量する実験系の構築を検討したが、ゲノム変異の蓄積および解析を次世代シーケンシング (NGS) を用いておこなうことにした。試料調製は、各株を固定培地で培養してシングルコロニーを選択し、固定培地上にストリークし培養して生育した中立的な大きさのシングルコロニーを 1 個選択してストリークする、という操作で継代し、各 line で 20-40 継代の培養を繰り返し行うことで、ゲノム DNA 上の変異を蓄積させた。遺伝子欠損株における修復関連酵素遺伝子の発現量を定量 PCR を用いて、相対定量をおこなった。

EndoMS の相互作用因子の候補は大腸菌を用いて組換えタンパク質を作製し、高純度に精製して SPR 解析およびゲル濾過解析に供した。

4. 研究成果

(1) *T. kodakarensis* において *endoQ*, *endoV*, *endoMS*, *udg* および *ape* 遺伝子の単独および *endoQ* と *endoV* 遺伝子の二重欠損に加えて、*endoMS* と *endoQ* または *endoV*, *ape* と *endoQ* または *endoV* の二重遺伝子欠損株の単離に成功した。すなわち、base excision repair (BER)、Alternative excision

repair (AER)、および mismatch repair (MMR)のうち1つないし2つの修復経路を欠失しても生育は可能であり、その場合欠失していない別の修復経路が補完できる可能性が考えられる。

AERで働くことが示唆される EndoQ、EndoV および MMR に機能すると考えられる EndoMS について、BER で働く UDG、APE と共に細胞内での機能を明らかにするため、parent strain KUW1、 $\Delta endoQ$ 、 $\Delta endoV$ 、 $\Delta endoMS$ 、 Δudg 、 ΔAPE を単離し、それぞれの増殖特性を調べた。

endoQ または *endoV* 遺伝子を欠損させた株で、至適生育温度 (85°C) および低温 (60°C) において親株 KUW1 との増殖の大きな違いは見られなかった。しかし、*endoQ* および *endoV* 両遺伝子を欠失すると、いずれの温度でも対数増殖期における増殖の遅れが観察され、特により高温の 93°C においては *endoV* 遺伝子の単独の欠損株でも増殖が遅れた。固定培地上での紫外線照射の生育への影響をしらべたところ、*endoQ*、*endoV* 遺伝子の単独および二重欠損株では紫外線への感受性は示さなかった (図 1)。一般に高温環境下では脱アミノ化反応が促進されると考えられ、EndoQ もしくは EndoV による修復経路が細胞内で機能することが示唆された。しかし EndoQ と EndoV による経路の存在は生育に必須ではなく、その場合別の修復経路で補完されると予想される。そこで MMR に注目し、*endoMS* の遺伝子欠損株についても調べた結果、60°C および 85°C どちらにおいても KUW1 との増殖特性の違いは見られなかった。

BER に関わる酵素に注目すると、60°C および 85°C で APE 遺伝子の欠損で定常期が短縮される特性が見られたうえ、より高温の 93°C では明らかな増殖阻害の傾向が観察された (図 2)。固定培地上で生育への影響を調べた結果、至適生育温度においても、APE 遺伝子を欠損した株では KUW1 と比較して約 10 倍少ないコロニー数を形成した。93°C の高温になるとより顕著な差が得られ、KUW1 と比べてコロニー数が約 100 倍少なかった。損傷塩基と同様にその塩基を除去するグリコシラーゼも複数種類存在するため *udg* 遺伝子の欠損では大きな生育の影響が見られなかったと考えられ、BER で働く除去修復因子とは別の修復酵素の存在が示唆された。また各グリコシラーゼが機能した後に AP 部位を認識して切断する APE の働きが BER において重要であることが示唆された。

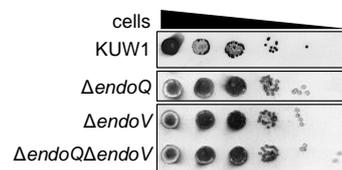


図 1 *endoQ* および *endoV* 遺伝子欠損株の紫外線感受性

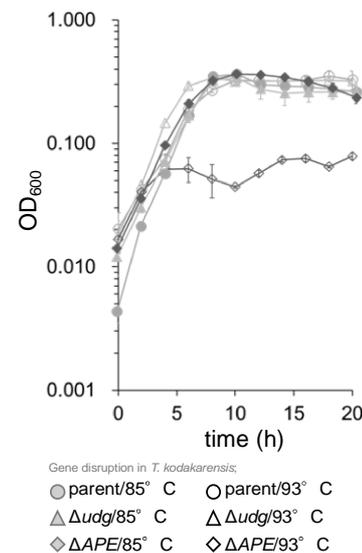


図 2 *udg* および *ape* 遺伝子欠損株の増殖特性

(2) 1つないし2つの修復経路を欠失した場合に、別の修復経路が補完できる可能性を考えて、修復関連酵素の遺伝子欠損による各酵素の発現量の変化を定量 PCR で調べた。各修復経路で働くことされる酵素 PolB、EndoQ、EndoV、EndoMS、UDG および APE に加えて、PolB 欠損時に PolD が代わりに機能する可能性を考えて PolD を構成する小サブユニット DP1、ハウスキーピング遺伝子と考えられる PCNA1 および PCNA2 の計 9 種類の酵素をコードする遺伝子の発現量を qPCR により解析し、各遺伝子欠損株での発現量を KUW1 の発現量と比較して相対定量を行った。得られた相対定量値を、PCNA1、PCNA2 または欠損させた標的遺伝子を除く全遺伝子の発現量の平均値 (mean) で標準化した。いずれの遺伝子欠損株においても、いずれの遺伝子発現量も共通して KUW1 の 1 倍前後であったため、各遺伝子は一部の遺伝子欠損で増加や減少することなく、恒常的に発現していると考えられた。

(3) EndoMS はその生化学特性から修復への関与が示唆される一方で、遺伝子欠損による生育への影響は見られなかった。そこで、EndoMS の細胞内での機能を詳細に調べたいと考えて、遺伝子欠損株に蓄積したゲノム変異の解析を試みた。解析手法は 3. で述べた通りであり、20-40 継代の培養を繰り返してゲノム DNA 上に変異を蓄積させた後にゲノム DNA を抽出し、NGS 解析を行って変異スペクトルを調べた。現在データ解析中である。

(4) EndoMS の相互作用因子として、すでに解析がなされている PCNA に加えて、網羅的解析の結果、複数のタンパク質の候補が報告されている (Pluchon, P.F. et al. *PLoS One*, 2013). それらの組換えタンパク質を大腸菌を用いて作製し、SPR 解析およびゲル濾過クロマトグラフィーにより相互作用を解析した。PCNA 以外のタンパク質では、SPR 解析では相互作用を検出したものの、安定な複合体を形成するものはまだ得られていない。DNA 上で複合体を形成した可能性があるので、構造解析へと進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Koonin Eugene V., Krupovic Mart, Ishino Sonoko, Ishino Yoshizumi	4. 巻 18
2. 論文標題 The replication machinery of LUCA: common origin of DNA replication and transcription	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12915-020-00800-9	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 該当する
1. 著者名 Oki Keisuke, Yamagami Takeshi, Nagata Mariko, Mayanagi Kouta, Shirai Tsuyoshi, Adachi Naruhiko, Numata Tomoyuki, Ishino Sonoko, Ishino Yoshizumi	4. 巻 -
2. 論文標題 DNA polymerase D temporarily connects primase to the CMG-like helicase before interacting with proliferating cell nuclear antigen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab243	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 Liu Ying, Brandt David, Ishino Sonoko, Ishino Yoshizumi, Koonin Eugene V., Kalinowski Jorn, Krupovic Mart, Prangishvili David	4. 巻 -
2. 論文標題 New archaeal viruses discovered by metagenomic analysis of viral communities in enrichment cultures	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1462-2920.14479	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 該当する
1. 著者名 Shiraishi Miyako, Ishino Sonoko, Heffernan Matthew, Cann Isaac, Ishino Yoshizumi	4. 巻 8
2. 論文標題 The mesophilic archaeon Methanosarcina acetivorans counteracts uracil in DNA with multiple enzymes: EndoQ, ExoIII, and UDG	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-34000-x	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 該当する

[学会発表] 計27件(うち招待講演 0件/うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Wataru Mine, Hanae Kudo, Takeshi Yamagami, Tomoyuki Numata, Patrick Forterre, Mart Krupovic, Yoshizumi Ishino, and Sonoko Ishino.
2. 発表標題 Study on diversity of mismatch repair system in archaea.
3. 学会等名 15th International Congress on Thermophiles (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Meika Harada, Mariko Nagata, Keisuke Oki, Rie Matsumi, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi, Tomoyuki Numata, Miyako Shiraishi, Sonoko Ishino, and Yoshizumi Ishino
2. 発表標題 Reconstitution of endonuclease Q-mediated and endonuclease V-mediated repair pathways for deaminated base repair in the hyperthermophilic archaeon, <i>Thermococcus kodakarensis</i> .
3. 学会等名 15th International Congress on Thermophiles (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Ichikawa, Enzo Petracco, Hanae Kudo, Takeshi Yamagami, Tomoyuki Numata, Yoshizumi Ishino, and Sonoko Ishino
2. 発表標題 The nucS homologs in the genomes of hyperthermophilic archaea encode active mismatch-specific endonuclease, EndoMS
3. 学会等名 15th International Congress on Thermophiles (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石野園子、牧田成人、白石 都、山上 健、宮園健一、田之倉 優、石野良純
2. 発表標題 アーキア由来損傷塩基特異的エンドヌクレアーゼEndoQの変異体解析
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 石野園子、工藤華枝、Stephane Skouloubris、Caroline l'Hermitte-Stead、Asmae Essadik、Jean Christophe Lambry、Hannu Myllykallio、石野良純
2. 発表標題 ミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼEndoMS/NucSのDNA修復における役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sonoko Ishino, Ken-ichi Miyazono, Naruto Makita, Tomoko Ito, Masaru Tanokura and Yoshizumi Ishino
2. 発表標題 Structure-based mutational analysis of the lesion-specific endonuclease.
3. 学会等名 Molecular Biology of Archaea 6 / EMBO Workshop (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学 生物化学(石野)研究室 http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/seibutsukagaku/index.html

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	松見 理恵 (Matsumi Rie) (90397597)	九州大学・農学研究院・学術研究員 (17102)	

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