

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23880022

研究課題名（和文） 極限環境微生物が有する新規 DNA 修復メカニズムの解明と有用宿主作成への実用化

研究課題名（英文） Elucidation of a novel DNA repair system from extremophiles and application to exploit of an available host.

研究代表者

森田 理日斗 (MORITA RIHITO)

九州大学・大学院農学研究院・学術研究員

研究者番号：10613268

研究成果の概要（和文）：多経路の DNA 修復に関わると予想される新規 DNA 修復タンパク質を複数の極限環境微生物ゲノム中に発見した。このタンパク質は N 末端側ドメインにアルキル化傷害修復タンパク質に類似した配列を持ち、C 末端側ドメインに脱アミノ傷害修復酵素、エンドヌクレアーゼ V (EndoV) に類似した配列を持つ。しかし、これらのタンパク質が関わる DNA 修復経路は全くの未知である。新規修復システムが、保存された重要な修復系である可能性も高く、その機能解明に向けてアプローチした。

研究成果の概要（英文）：A novel proteins likely involved in multiple DNA repair systems were found in extremophiles. These proteins are comprised of two domains, an alkylated lesion repair protein-like domain in N-terminus and an Endonuclease V (EndoV)-like domain, deamination repair protein, in C-terminus. However, the pathways which is involved in these novel proteins are completely unknown. Since the most of extremophiles are unculturable and their genome sequences are unclear, the novel DNA repair systems potentially act in important pathway from extremophiles. From my prediction, it is important as applications and basic science to elucidate the functions of these novel proteins, AGT-EndoV and ATL-EndoV. I tried to elucidate the function in this project.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：アーキア、多機能酵素、マルチドメイン、極限環境微生物、DNA 修復、アルキル化傷害

1. 研究開始当初の背景

高温、強酸性、有機性環境などの極限環境で生息する生物は、穏やかな環境に生息する生物に比べて DNA 損傷を受けやすい。

私は、アルキル化傷害修復、脱アミノ傷害修復の 2 経路に関わると予想される新規タンパク質を極限環境微生物ゲノム中から発見し、注目した。この新規タンパク質に相同な

タンパク質を持つ生物種のうち、80% が極限環境に生息するアーキアであるため、本タンパク質の機能は、極限環境に生息するために重要な機能を担うと考えられる。

このタンパク質は N 末端側ドメインにアルキル化傷害修復タンパク質に類似した配列を持ち、C 末端側ドメインに脱アミノ傷害修復酵素、エンドヌクレアーゼ V (EndoV) に類似した配列を持つ。さらに、本タンパク質は、N 末端ドメインの配列から AGT-endoV、ATL-endoV と呼ぶべき 2 種類に分類できることがわかった。これらの融合タンパク質では、それぞれのドメインに予想される本来の活性が推定されるが、これらのドメインが融合している理由は未知であり、どのような修復経路で働いているかは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

多経路の DNA 修復に関わると予想される新規 DNA 修復タンパク質を極限環境微生物ゲノム中に発見した。このタンパク質の分布は極限環境微生物に集中しており、このタンパク質が関わる DNA 修復経路は全くの未知である。難培養性の株が多くゲノム未解明の種も多い極限環境では、本タンパク質の関わる新規修復システムが、保存された重要な修復系である可能性も高く、その機能解明は基礎研究としても意義深い。この研究を通して、極限環境微生物がさらされやすい DNA 損傷への知見が得られると考えられ、また、この酵素を活用して極限環境微生物をバイオプロダクト等で生物利用するとき、その遺伝的情報を維持するために応用できる。

3. 研究の方法

Thermoplasma acidophilum 由来 AGT-EndoV、*Planctomyces brasiliensis* 由来 ATL-endoV の発現系の構築を行った。フェノール処理により、ゲノム DNA の抽出を行った。それを鋳型として PCR を行い *agt-endoV* 遺伝子、*ATL-endoV* 遺伝子の増幅に成功した。増幅した遺伝子をアガロース電気泳動により確認し、pET-21a、pMAL-c5E の 2 種類のベクターにライゲーションし、野生型での発現系、マルトース結合タンパク質との融合状態での発現系を構築した。

このプラスミドを Rosetta(DE3)、Rosetta-gami(DE3)、BL21-CodonPlus(DE3) の複数の大腸菌株に導入した。SDS-PAGE により、AGT-EndoV、ATL-EndoV の発現を確認した。

大量培養、超音波破碎、遠心分離後、上清をアミロースレジンを用いて精製した。

環状 DNA を用い、アガロースゲル電気泳動を行い、ゲルシフトアッセイを行った。

また、本タンパク質の各ドメインの働きを調べるために、単独ドメインのみでの発現を試みた。ドメイン発現の方法を確立するため、アーキアである *Pyrococcus horikoshii* 由来のタンパク質で、ATL-EndoV と同様の複数ドメインタンパク質、PH0925 を用いて、マルトース結合タンパク質と各ドメインの融合状態での発現を試みた。*P. horikoshii* からゲノムを抽出し、PCR を行い各ドメイン領域を増幅し、pMAL-c5E ベクターにライゲーションした。N 末端側のみ、C 末端のみでの発現精製を行った。

それぞれのドメインでの本来の活性、ヌクレオチド転移活性とイソメラーゼ活性を調べるため、ヌクレオチド転移活性を測定するために、酵素を用いて GTP とマンノース 1-リン酸を反応させ、HPLC により生成物である GDP-マンノースのピークを測定した。また、イソメラーゼ活性を測定するために、全長 PH0925 とホスホグルコースイソメラーゼ、グルコース 6-リン酸脱水素酵素の 3 種類の酵素を共役させ、マンノース 6-リン酸から 6-ホスホグルコノラクトンが生じる反応を、補酵素 NADPH の生成を分光学的に測定することにより測定した。

また、ATL 本来の単独の働きを調べるため、種々の修飾塩基を含む基質 DNA に対する親和性を調べた。共同研究先に極限環境微生物である高度好熱菌由来 ATL を提供した。主にタンパク質発現、精製と、測定段階での問題対処に貢献した。

4. 研究成果

多経路の DNA 修復に関わると予想される新規 DNA 修復タンパク質を複数の極限環境微生物ゲノム中に発見した。このタンパク質は N 末端側ドメインにアルキル化傷害修復タンパク質に類似した配列を持ち、C 末端側ドメインに脱アミノ傷害修復酵素、エンドヌクレアーゼ V (EndoV) に類似した配列を持つ。しかし、これらのタンパク質が関わる DNA 修復経路は全くの未知である。難培養性の株が多くゲノム未解明の種も多い極限環境では、AGT-EndoV と ATL-EndoV の関わる新規修復システムが、保存された重要な修復系である可能性も高く、その機能解明は基礎研究としても意義深い。

そこで私は、*Thermoplasma acidophilum* 由来 AGT-EndoV、*Planctomyces brasiliensis* 由来 ATL-endoV の発現系の構築を行った。pET-21a、pMAL-c5E の 2 種類のベクターにライゲーションし、野生型での発現系、マルトース結合タンパク質との融合状態での発現系を構築に成功した。

これらのプラスミドを用いて大腸菌を形質転換し、大量発現、集菌して、種々のカラムを用いての精製を試みた。pMAL-c5E ベクタ

一を用いた系では、アミロースレジジンにより単一に精製することに成功し、精製方法を確立することに成功した。

環状 DNA を用いたゲルシフトアッセイにより、バンドのシフトが見られ、DNA との結合が確認できた。

また、本タンパク質の各ドメインの働きを調べるために、単独ドメインのみでの発現を試みた。ドメイン発現の方法を確立するため、ATL-EndoV と同様のアーキア由来複数ドメインタンパク質、PH0925 を用いて、マルトース結合タンパク質との融合状態での発現を試みた。その結果、N 末端側のみ、C 末端のみでの発現精製に成功し、精製方法を確立した。

それぞれのドメインでの本来の活性、ヌクレオチド転移活性とイソメラーゼ活性の検出を試みた。その結果、N 末端ドメインから、確かに GDP-マンノースのピークが検出され、活性が確認できた (図 1)。また、C 末端ドメインからは、確かに 340 nm の波長の吸収が見られ、活性が確認できた。これらの結果により、全長 PH0925 はヌクレオチド転移活性、イソメラーゼ活性を確かに持つことがわかった (図 2)。これにより、アーキア由来複数ドメイン酵素において、ドメイン領域のみを発現精製することにより、単独ドメインのみの機能を解析する手法を確立した。

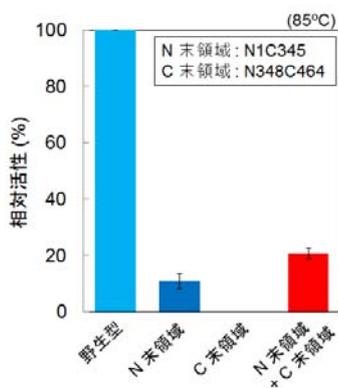


図 1. N 末端領域のマンノース 1 リン酸ヌクレオチド転移活性

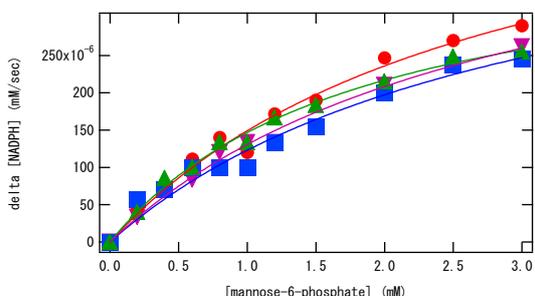


図 2. C 末端領域のホスホマンノースイソメラーゼ活性

また、ATL 本来の単独の働きを調べるため、種々の修飾塩基を含む基質 DNA に対する親和性を調べた。高度好熱菌由来 TTHA1564 は様々な大きさ、極性、電荷のアルキル化塩基に対し、強い基質特異性を示した。

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)

Oliver J. Wilkinson, Vitaly Latypov, Julie L. Tubbs, Christopher L. Millington, Rihito Morita, Hannah Blackburn, Andrew Marriott, Gail McGown, Mary Thorncroft, Amanda J. Watson, Bernard A. Connolly, Jane A. Grasby, Ryoji Masui, Christopher A. Hunter, John A. Tainer, Geoffrey P. Margison, and David M. Williams, Alkyltransferase-like protein (Atl1) distinguishes alkylated guanines for DNA repair using cation- π interactions., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 査読有り、2012, vol 109, 18755-18760, DOI 10.1073

[学会発表] (計 4 件)

1. Rihito Morita, Toshihisa Ohshima and Yutaka Kawarabayasi, Functional analysis of PH0925, a multifunctional enzyme working within the mannosylglycerate biosynthetic pathway in *Pyrococcus horikoshii* OT3, 6th International Congress on Biocatalysis (biocat2012) 2012 年 9 月 5, 6 日, Hamburg, Germany.

2. 森田理日斗、大島敏久、河原林裕、*Pyrococcus horikoshii* 由来 PH0925 タンパク質の機能解析、酵素補酵素研究会、2012 年 7 月 28 日、名古屋市

3. 森田理日斗、大島敏久、河原林裕、アーキア由来マンノシルグリセリン酸合成酵素 PH0925 の機能解析、平成 24 年度日本生化学会九州支部例会、2012 年 5 月 27 日、福岡市

4. 森田理日斗、菱沼久紘、大山礼雅、妻鹿良亮、太田敏博、中川紀子、上利佳弘、福井健二、新海暁男、倉光成紀、増井良治、河原林裕、極限環境微生物由来アルキル基転移酵素様タンパク質の機能解析と転写解析、第 12 回極限環境微生物学会、2011 年 11 月 27 日、長崎市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 理日斗 (MORITA RIHITO)

九州大学・大学院農学研究院・学術研究員
研究者番号：10613268