

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510066

研究課題名(和文) 損傷乗り越えDNAポリメラーゼの生化学的解析と動的構造解析による作用機序の解明

研究課題名(英文) Biochemical and dynamic structural analysis of translesion DNA polymerase

研究代表者

唐田 清伸 (KARATA, Kiyonobu)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・産学官連携研究員

研究者番号：90345017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌のDNAポリメラーゼV(Pol V)は誤りがちなDNA複製を行い、DNA損傷による突然変異誘発に重要な役割を果たす。私たちは新たにPol Vがリボヌクレオチドを基質として利用出来る事を見出し、DNA合成中にPol Vが取り込んだリボヌクレオチドが起点となってPol VIによって導入された変異が修復されるというリボヌクレオチド除去修復モデルを提唱した。またPol VIはRecAによる特異な活性化制御を受けるが、RecA変異体の解析などからRecAはPol Vの触媒活性ユニットであるUmuCに結合することが分かり、活性型と不活性型ではその結合部位が異なることが判明した。

研究成果の概要(英文)：DNA polymerase V is responsible for most mutations that arise from DNA damages in *E. coli*. We found that Pol V can incorporate ribonucleotide as well as deoxyribonucleotide and proposed a new model referred to as "ribonucleotide excision repair (RER)". In the model, a part of Pol V-synthesized strand is resynthesized by error-free DNA polymerase utilizing ribonucleotide-deoxyribonucleotide hybrid region and it leads to a reduction of mutation frequency. We also found that RecA bound to UmuC, Pol V's catalytic subunit, in 2 different regions. One was for active Pol V, and the other was for inactive Pol V.

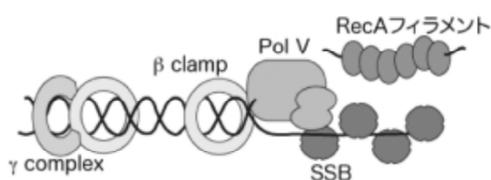
研究分野：分子生物学

キーワード：DNA複製 損傷乗り越え

1. 研究開始当初の背景

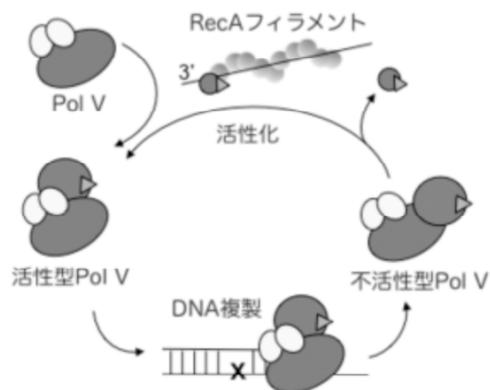
大腸菌では、DNA に大量の損傷が生じると“SOS 応答”と呼ばれる防御機構が発動し、40 以上の遺伝子が発現誘導される。それらは主に細胞分裂の停止や変異を伴わない DNA 修復に関わるものであるが、高頻度の変異を伴う損傷乗り越え DNA 複製を行う DNA ポリメラーゼ V (Pol V) も SOS 応答で誘導される。60 年以上も前から大腸菌では SOS 応答時 (紫外線照射後) には突然変異頻度が急上昇する現象が知られていて“DNA 損傷誘発突然変異”または“SOS 突然変異生成”と呼ばれているが、in vivo においてその突然変異のほとんどは Pol V に起因するものである。Pol V は UmuD タンパク質の N 末端がプロセスされた UmuD' の 2 量体と触媒活性サブユニットである UmuC からなるヘテロ 3 量体である。umuDC 遺伝子は紫外線誘発突然変異の責任因子として 40 年前に同定され、それ以来 SOS 突然変異生成に重要な因子として精力的に遺伝学的解析が行われてきたが、UmuC が不溶性で精製が困難なことから in vitro の生化学的解析が進まず UmuDC 複合体が DNA 合成能をもつ Pol V であると判明するまでには遺伝子の発見から 30 年の歳月を要した。

私たちは試行錯誤の後、極めて効率的で簡便な Pol V の精製方法を確立することに成功した。さらに、Pol V はそれ自体だけではほとんど活性が無く、DNA 合成をするためには RecA、SSB、β クランプ、γ 複合体といった補助タンパク質因子が必要であるが、これらのタンパク質についても夾雑物の混入のない標品を精製する系を立ち上げた。それらと同時に Pol V の DNA 合成反応の測定に適切な DNA 基質の作製法を確立して、Pol V の生化学的解析を行える in vitro 実験系を確立した。



私たちはこの再構成した Pol V の in vitro 実験系を用いることによって初めて、極めて弱い活性しかないとされていた Pol V が実は適切な条件下では非常に強固な活性を発揮するといった新事実などを明らかにした。特に、Pol V は RecA フィラメント末端の RecA タンパク質が 1 分子結合することによって活性型になり、しかもその複合体の活性には半減期があるという発見は誰もが思いもしなかったことであった (Jiang et al, Nature 2009)。しかしながら、RecA 分子は Pol V のどこにどのように結合して、それによってどうして Pol V が活性型になるのかは不明のままであった。細胞にとって不要な変異を防ぐためにも Pol V のスイッチ ON/OFF 制御は非常に重要であり、この巧妙な制御機構がどう

ように行われているのか、酵素学的にも興味深い問題であった。



<引用文献>

① Jiang Q, Karata K, Woodgate R, Cox MM, Goodman MF. The active form of DNA polymerase V is UmuD' (2)C-RecA-ATP. Nature. 2009, 460(7253), 359-363.

2. 研究の目的

(1) Pol V の生化学的解析

調べ尽くされていない Pol V の生化学的特性を解析して、どのような状況でどういった変異が導入されるかなど細胞内での突然変異生成のメカニズム解明に繋がる Pol V の特性を明らかにしていく。特に、再構成した Pol V の in vitro DNA 合成反応における突然変異頻度の計測や変異スペクトラムの解析が可能な in vitro 突然変異検出系を確立して、さまざまな条件における Pol V の活性を解析する。

また、Pol V がデオキシリボヌクレオチド (dNTP) のみならずリボヌクレオチド (rNTP) をも基質として利用出来ることを示唆するデータがあり、変異体を作製するなどして解析を行い、Pol V に RNA ポリメラーゼ活性があるのならばそれは大腸菌にとって何か意義のある活性であるのか明らかにしていく。

(2) Pol V の活性化機構の解明

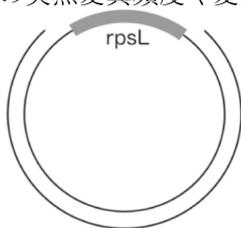
Pol V は RecA フィラメントと直接相互作用することによってフィラメントの 3' 末端から 1 分子 RecA を受け取り活性型 Pol V として DNA 合成をおこなう。そして、この活性型 Pol V は、DNA 合成後にテンプレートから解離すると即座に不活性型になり、DNA 合成をしなくても数十分で自然と不活性型に変化していく。不活性型の Pol V は、RecA フィラメントが存在する限りフィラメントから新しく RecA 分子を結合することによって再活性化することができる。この Pol V の活性化・不活性化サイクルにおいて、RecA は Pol V にどのように結合し、なぜその結合が Pol V の DNA 合成活性に必要なのかを明らかにしていく。さらに、活性型から不活性型への変換

は単純に RecA 分子の解離などではなく不活性型でも RecA は Pol V に結合したままであるため、何かしらの構造変化が起きることによって Pol V は活性化・不活性化すると予測される。Pol V や RecA の変異体などの生化学的解析を行うと同時に、高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）をもちいて Pol V の動的構造解析を行い、この活性化・不活性化の作用機序解明に挑む。

### 3. 研究の方法

#### (1) in vitro 突然変異検出系

Pol V の in vitro での突然変異頻度や変異スペクトラムを調べるための rpsL 遺伝子をターゲットとした突然変異検出系を確立する。右図のような rpsL 遺伝子領域が一本鎖になったギャップ



プラスミドを作製し、そのギャップ領域を in vitro で DNA 合成する。rpsL 遺伝子の野生型と変異型はストレプトマイシン培地で簡単に識別できるので、それにより突然変異頻度を測定する。これまでこのようなギャッププラスミドは一本鎖ファージ DNA から作製していたためバックグラウンドの突然変異頻度が高く ( $10^{-4}$  以上) 実用的ではなかったが、本研究では突然変異頻度が低い ( $10^{-6}$  以下) 二本鎖のプラスミドの状態から直接ギャッププラスミドを作製する。また私たちは特定の場所に 1 カ所損傷を導入した一本鎖プラスミドの構築方法を確立している (Karata et al, DNA Repair 2009)、それを応用すれば rpsL 遺伝子内に特定の損傷を導入したギャッププラスミドの作成も可能である。それらにより、Pol V の突然変異頻度や変異スペクトラムを測定するだけに留まらず、損傷を乗り越える際の変異の頻度や種類、また反応系に複製型 DNA ポリメラーゼを加えることなどにより DNA 損傷近傍での両者の競合を in vitro で再現出来るはずである。

#### (2) Pol V の RNA ポリメラーゼ活性

DNA ポリメラーゼには基質のデオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドの識別に関与する“Steric Gate”と呼ばれるアミノ酸残基が存在する。Pol V も例外ではなく Steric Gate のアミノ酸を保持しているが、まずは Pol V が間違いなくリボヌクレオチドを基質として利用出来るかどうかを検証する。その上で、Pol V の Steric Gate の変異体を作製・精製して解析し、野生型より rNTP の取り込みが亢進または減少した変異体があれば、それら変異体の in vivo での活性の違いから Pol V が rNTP を利用する生物学的意義を考察していく。

#### (3) Pol V の活性化機構

RecA の結合による Pol V の活性化機構の解明のために、Pol V を常に活性化できる RecA 変異体や Pol V を活性化できない RecA 変異体と ATP アナログの使用を組み合わせた生化学的解析を行う。また、遺伝学的に単離された RecA との相互作用部位に変異があると思われる Pol V の変異体を精製して、RecA との結合能や活性化について解析を行い、Pol V の活性化メカニズムを考察していく。

#### (4) Pol V の高速 AFM 観察

Pol V の活性型と不活性型ではその構成要素が変わらないことから、活性化・不活性化のメカニズムは何かしらの構造変化によるものと考えられ、その解明には Pol V そのものを直接観察するのが最良と考えられる。そこで高速 AFM を所有する熊本大学発生医学研究所の小椋光教授 (連携研究者) と共同して、高速 AFM による 1 分子の Pol V の可視化、特に活性化/不活性化過程の観察を試みる。

高速 AFM では、試料を結晶化や乾燥などさせることなく、溶液中そのままの 1 分子のタンパク質の構造をナノオーダーで観察する事が出来、さらにその動きをミリ秒単位で撮影することまで出来る。Pol V は 2 mg/ml を超えると即座に凝集して高濃度標品が得られないことから結晶化すらままならず構造解析が全く進まなかったが、1 分子を観察する高速 AFM では高濃度標品は全く必要とされず Pol V の観察も可能である。また Pol V の DNA 合成速度は 0.3 base/秒と他の DNA ポリメラーゼ (数十~1000 base/秒) に比べ非常に遅く、高速 AFM で DNA 合成反応を観察するのに適している。まずは、高速 AFM 観察によって Pol V の 3 量体構造の概要を明らかにし、特に RecA が結合した活性型 Pol V と、それが不活性化する際の構造変化を捉え、さらには Pol V が損傷を乗り越えて DNA 合成を行う反応を直接観察することにより、突然変異生成過程の視覚化に迫ることを目指す。

#### <引用文献>

- ① Karata K, Vidal AE, Woodgate R. Construction of a circular single-stranded DNA template containing a defined lesion. DNA repair. 2009, 8(7), 852-856.

### 4. 研究成果

#### (1) Pol V の RNA ポリメラーゼ活性

Pol V の in vitro DNA 合成反応系には、 $\gamma$  複合体による  $\beta$  クランプローディングのために 1~3 mM ほどの ATP が含まれる。始め Pol V 精製標品中の夾雑物によると思われる不可解なポリメラーゼ活性は、Pol V がこの ATP を基質として利用するためであることが明

らかになった。実際に Pol V は ATP に限らず  
どの rNTP でも基質として利用出来、プライ  
マー末端に数十塩基付加出来る事が確認  
された。そこで dNTP と rNTP の識別に関わる  
Steric Gate のアミノ酸を変異させた Pol V  
を数種類作製して解析を行った。その結果、  
Steric Gate のアミノ酸 Y11 の変異体 Y11A で  
は野生型よりも rNTP をより取り込みやす  
くなっていた。しかもその Y11A 変異体は、  
in vivo の突然変異頻度が野生型に比べ顕著  
に減少することか判明した。さらに DNA ポリ  
メラーゼ I の変異体などの解析も行い、最終  
的に、Pol V が DNA 複製中にある頻度で rNTP  
を取り込み、その DNA 中に取り込まれた rNTP  
が RNaseH のターゲットになって分解され、  
生じたニック部位から忠実度の高い DNA ポリ  
メラーゼ I がニックトランスレーション DNA  
合成を行い、結果として Pol V によって導入  
された変異が修復されるというリボヌクレ  
オチド除去修復モデルを提唱するに至った。  
私たちは、Pol V の DNA 合成活性は想像以上  
に高く長い距離を複製できることを見出し  
ていたが、細胞にとって有害な突然変異を導  
入する Pol V が長い距離複製することはあり  
得ないと否定され続けていた。今回のモデル  
は Pol V が長い距離を複製しても突然変異頻  
度は低く抑えることが出来るという私たち  
のこれまでの知見を整合性よく説明できる  
モデルであった。

#### (2) Pol V の活性化機構

Pol V は RecA フィラメントの 3' 末端の  
RecA 分子が結合することで活性化される  
ことが分かっており、さらにその 3' 末端の  
RecA 分子中でも最も 3' 末端側に位置する  
S117 の変異体が Pol V を活性化できない変異  
体として同定されていたことから、今回 RecA  
フィラメントの 3' 末端側の最端部を形成す  
る RecA 分子の 112~117 番目のアミノ酸から  
なる領域に注目して解析を進めた。その結果、  
D112 や N113 の変異体でも RecA はフィラメン  
ト形成能と相同組換え活性は保持しつつも  
S117 変異体同様に Pol V の活性化が出来な  
くなっていた。そこでフォトクロスリンクと  
MS/MS 解析により RecA の D113~S117 領域が  
Pol V のどの部位と結合しているか調べた  
ところ、Pol V の触媒活性ユニットである UmuC  
の 2 つの異なる領域が同定された。その内の  
一方の領域は不活性型 Pol V-RecA 複合体に  
見られ他方は活性型に見られることなどか  
ら Pol V の活性型と不活性型では RecA の結  
合領域が異なることが明らかになり、Pol V  
複合体は活性型と不活性型では大きな構造  
変換が起きるといふモデルを強く指示する  
結果となった。

#### (3) in vitro 突然変異検出系

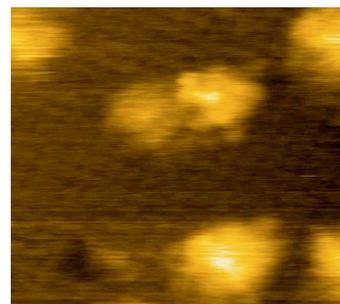
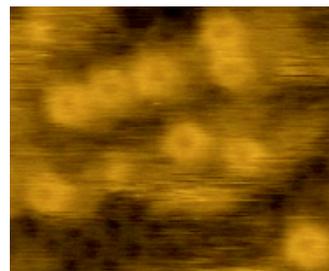
rpsL 遺伝子領域を in vitro で DNA 合成し  
てプラスミドの形で大腸菌を形質転換し、ス  
トレプトマイシン耐性で rpsL 遺伝子中の変

異の有無を検出する実験系を確立した。この  
系を用いて忠実度の高い T7 DNA ポリメラー  
ゼや DNA ポリメラーゼ I (Klenow fragment)  
の突然変異頻度を計測すると約  $1 \times 10^{-6}/\text{bp}$   
となり、それまでの in vitro 突然変異検出  
系よりもバックグラウンドを 1~2 桁低く抑  
えることができた。この検出系を用いて Pol V  
の in vitro の突然変異を解析すると、多様  
な変異が検出され、突然変異頻度は  $3 \times$   
 $10^{-6}/\text{bp}$  となった。バックグラウンドに比べわ  
ずか 3 倍の上昇という意外な結果であったが、  
前項で触れているように in vitro DNA 合成  
反応系に ATP が含まれるためリボヌクレオチ  
ド除去修復によって変異頻度が低く抑えら  
れたのではないかと考えられる。

#### (4) Pol V の高速 AFM 観察

まず、サンプル台 (マイカ基板) に直接固  
定することで Pol V を直径 10 nm ほどの楕円  
形の球状として観察することが出来た。しか  
し、高速 AFM の解像度が十分ではなく Pol V  
のドメイン構造等を判別出来るほどには至  
らず、また Pol V 以外の複合体 (RecA や DNA  
テンプレートなど) はそのままではマイカ基  
板に結合しないため観察が出来なかった。そ  
こでマイカ基板上にストレプトアビジンの  
二次元結晶の層を形成したサンプルステー  
ジを作成して、ビオチン-NTA-Ni を介して His  
タグ Pol V やビオチン化 DNA を積極的にサン  
プル台に結合させて Pol V 複合体の観察をし  
た。また、高速 AFM の解像度に直接大きく影  
響するのが探針の形状 (特に細さ) であるが、  
福岡大学の走査型電子顕微鏡を利用してプラ  
ズマエッチングすることでより精度の高い探  
針を作製することとした。さらに、高速  
AFM 本体についても微弱な振動の除去など  
AFM 画像改良のための対策を行った。

その結果、  
 $\beta$  クランプは  
直径 10 nm 弱  
のドーナツ  
型の分子で  
あるが、その  
中心の 2 nm ほど  
の穴も明瞭に  
観察でき、さ  
らに 6 個のドメイン構造まで判別できる  
ようになった (右上図)。今まで球状にし  
か見えなかった Pol V についても突起状  
構造をもつ複雑な形として観察されるよ  
うになった



(左下図)。しかしながら、 $\gamma$  複合体などの大きな分子は観察中に構造が揺れ動くなどするためその形状がクリア

に観察できず、Pol V の特異な形状も高速 AFM の探針の動きにともない揺れ動くために観察されたアーティファクト画像である可能性があった。今度もさらにサンプルの固定法や観察条件などの検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Gruber AJ, Erdem AL, Sabat G, Karata K, Jaszczur MM, Vo DD, Olsen TM, Woodgate R, Goodman MF, Cox MM. A RecA protein surface required for activation of DNA polymerase V. *PLoS Genet.* 査読有, 2015, 11(3), e1005066.  
DOI:10.1371/journal.pgen.1005066.
- ② Frank EG, McDonald JP, Karata K, Huston D, Woodgate R. A strategy for the expression of recombinant proteins traditionally hard to purify. *Anal Biochem.* 査読有, 2012, 429(2), 132-139.  
DOI:10.1016/j.ab.2012.07.016.
- ③ Kuban W, Vaisman A, McDonald JP, Karata K, Yang W, Goodman MF, Woodgate R. Escherichia coli UmuC active site mutants: effects on translesion DNA synthesis, mutagenesis and cell survival. *DNA Repair (Amst).* 査読有, 2012, 11(9), 726-732.  
DOI:10.1016/j.dnarep.2012.06.005.
- ④ Vaisman A, Kuban W, McDonald JP, Karata K, Yang W, Goodman MF, Woodgate R. Critical amino acids in Escherichia coli UmuC responsible for sugar discrimination and base-substitution fidelity. *Nucleic Acids Res.* 査読有, 2012, 40(13), 6144-6157.  
DOI:10.1093/nar/gks233
- ⑤ Karata K, Vaisman A, Goodman MF, Woodgate R. Simple and efficient purification of Escherichia coli DNA polymerase V: cofactor requirements for optimal activity and processivity in vitro. *DNA Repair (Amst).* 査読有, 2012, 11(4), 431-440.  
DOI:10.1016/j.dnarep.2012.01.012.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 唐田清伸, 大腸菌 DNA ポリメラーゼ V によるリボヌクレオチドの取り込み, 第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18 日, 「幕張メッセ国際会議場 (千葉市)」

- ② 唐田清伸, 大腸菌 DNA ポリメラーゼ V によるリボヌクレオチドの取り込み, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日, 「福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡市)」

- ③ 唐田清伸, 大腸菌 DNA ポリメラーゼ V の DNA 合成後修復, 国立遺伝学研究所研究集会・遺伝情報の安定性を支えるメカニズム, 2012 年 10 月 3 日, 「国立遺伝学研究所 (静岡県三島市)」

- ④ Karata K, In vitro analysis of DNA polymerase V, Gordon Research Conference : Mutagenesis, 2012 年 8 月 19 日, 「Newport (USA)」

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

唐田 清伸 (KARATA, Kiyonobu)  
長崎大学・原爆後障害医療研究所・産学官  
連携研究員  
研究者番号 : 90345017

### (2) 連携研究者

小椋 光 (OGURA, Teru)  
熊本大学・発生医学研究所・教授  
研究者番号 : 00158825