

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：32615

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340029

研究課題名(和文) 高度好熱菌における遺伝学的解析ツールの構築とゲノム情報維持機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms for genomic integrity through establishing novel tools for genetic analysis in *Thermus thermophilus*.

研究代表者

布柴 達男 (NUNOSHIBA, Tatsuo)

国際基督教大学・教養学部・教授

研究者番号：10270802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：70℃で生息する高度好熱菌のゲノム情報維持機構を解明するための遺伝学的なアプローチのため、i)大腸菌supFを標的とした突然変異頻度と変異スペクトル解析法、ii)相同組換え頻度解析法、iii)カロテノイド遺伝子crtBを用いた遺伝子発現解析レポーターアッセイを樹立した。これらを用い、脱塩基損傷部位の修復酵素AP endonucleaseのゲノム安定化への寄与、紫外線DNA損傷に対する光回復遺伝子の発現機構、脱アミノ化ヌクレオチド浄化酵素Ham1のpyrophosphatase活性の同定とゲノム安定化への寄与を解析した。

研究成果の概要(英文)：To investigate genome integrity in *Thermus thermophilus*, which survives in extreme environment around 70°C, three assays from genetic approach were established. They were i) mutation assay to analyze mutation spectra by using *E. coli* supF gene as a target, ii) assay to examine the frequency of homologous recombination, iii) assay to monitor the gene expression by monitoring yellow color carotenoid encoded by the crtB gene. By using these assays, contribution to genome integrity of AP endonuclease, which can repair the abasic site, gene regulation mechanism of the phr gene whose product can repair UV induced DNA damage, and identification of Ham1 pyrophosphatase for deaminated nucleotides and its contribution to genome integrity.

研究分野：環境学・放射線・化学物質影響学

キーワード：高度好熱菌 ゲノム情報維持 突然変異 相同組み換え 遺伝子発現 レポーター カロテノイド シヤトルベクター

## 1. 研究開始当初の背景

高度好熱菌 HB27 株は至適生息温度が 70-80°C のグラム陰性細菌であり、高温下でのゲノム情報の維持やタンパク質の安定化の仕組みを理解するためのモデル生物の一つとして注目されている。すでにゲノム解析が完了し、1.8Mb のゲノムと 0.23Mb のメガプラスミド pTT27 に 2218 個の遺伝子が存在すると推定されている。70°C という高温は、DNA 中の塩基の欠落や塩基の脱アミノ化、酸化などの塩基損傷の誘発、さらに DNA のみならずヌクレオチド 3 リン酸の塩基損傷なども生じると考えられる。従って好熱菌にはさまざまなゲノム安定化機構が備わっていると容易に推定できる。事実、すでにゲノム安定化や遺伝情報維持に関わる機能として、DNA 複製後の誤対合をみつけ修復するミスマッチ修復、光回復や UV 損傷エンドヌクレアーゼ、塩基除去修復、ヌクレオチド除去修復、そして組み換え機構など、多くの DNA 修復系を保持することが示されている。いくつかのタンパク質はすでに精製され、少なくとも *in vitro* での活性が確認され、結晶構造が明らかなものもある。しかしなぜこの高度好熱菌が 70°C という高温で生息可能なのか？ という問い、特にゲノム情報を安定に維持する仕組みについては十分な回答は得られていない。すなわち機能を失ったときどのような形質を示すかという *in vivo* での役割を調べる必要性を示唆している。

ゲノム情報維持の仕組みを明らかにするときには、精製したタンパク質を用いた *in vitro* での分子生物学的アプローチや生化学的アプローチに加えて、その機能の欠損株を樹立し遺伝学的アプローチでその機能の役割や暴露されうる環境要因での遺伝子発現様式などを *in vivo* (細胞レベル) から解析する必要がある。遺伝学的アプローチに必須のツールとして抗生物質抵抗性があるが、高度好熱菌では高温での培養のため抗生物質の多くは失活し、使用できる抗生物質や耐性遺伝子が限定される。ここに *in vivo* でのゲノム情

報維持機構の検討が遅れてきた理由がある。

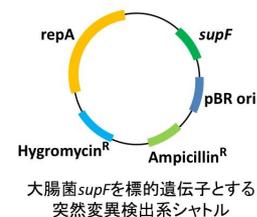
## 2. 研究の目的

本申請では、ゲノム情報維持に関わると推定される機能を欠損したときに、その株の高温下での生息状況、自然突然変異頻度とスペクトル、相同組換え頻度、それらの遺伝子の発現様式などを解析するための、3 つのツール、i) 突然変異頻度や変異スペクトル解析法、ii) 相同性組換え頻度解析法、iii) 遺伝子発現解析のためのレポーターアッセイを樹立する。これらの遺伝学的アプローチと精製したタンパク質を用いた *in vitro* での分子生物学的アプローチや生化学的アプローチを併用し、高度好熱菌のゲノム情報維持の仕組みを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 突然変異頻度・スペクトル解析法の樹立

突然変異の解析には通常抗生物質抵抗性を指標にすることが多いが、高温で培養することから抗生物質の使用制限が問題になる。そこで大腸菌と高度好熱菌の両方で複製可能なシャトルベクターを用い、変異固定は高度好熱菌、変異体選択は大腸菌で行う方法を構築した。この場合変異体の選択は大腸菌を用いるので抗生物質の制限はない。そこで大腸菌 *supF* を標的遺伝子として採用し、下図のような突然変異検出系シャトルを構築した。



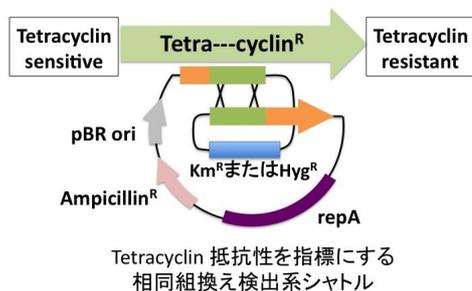
方法の原理) このシャトルベクターで高度好熱菌野生株と各種

欠損株を形質転換し、細胞内で複製させる。このシャトルを回収し、すでに申請者らが構築した *supF* 変異選択用大腸菌 KS40/pOF105 (J Rad Res, 39, 263, 1998) を形質転換する。この KS40 は *rpsL*-と *gyrA*-をもつためストレプトマイシン (Sm)、ナリジキシン酸 (Nal) に抵抗性を示す一方、pOF105 には *rpsL*+ の amber 変異と *gyrA*+ の amber 変異があるため、それらが *supF*+ でサプレスされると KS40/pOF105

は Sm<sup>S</sup> Nal<sup>S</sup>を示し，一方変異 *supF* ではそれらがサプレスされないので Sm<sup>R</sup> Nal<sup>R</sup>を示す．すなわち変異をもつ *supF* が Sm<sup>R</sup> Nal<sup>R</sup>として選択できる．さらにこの *supF* の変異をシーケンスにより同定すると突然変異特性の情報を得ることができる．

### 相同組換え頻度解析法の樹立

申請者はすでにヘテロに変異をもつ2倍体の出芽酵母を用い，化学物質などで誘導されるヘテロ接合性喪失 (LOH) が主として相同性組換えに依存することを見いだしている (Biochem Biophys Res Commun, 325, 928, 2004)．従って突然変異頻度やそのスペクトル同様，相同組み換えもゲノム安定性の指標となる．そこで同様にシャトルベクターを用い，シャトル内の遺伝子間での相同組換えを大腸菌における抗生物質耐性を



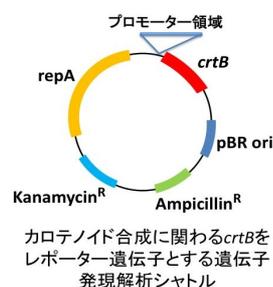
指標に検出する方法を構築した．

**方法の原理)** この系では上図に示すような相同組換え検出系シャトルを樹立する．このシャトルには相同組換えの標的となるテトラサイクリン (Tc) 抵抗性遺伝子をもつ．この Tc 抵抗性遺伝子は前半部分と後半部分がそれぞれ一部配列を重複するように順向きに挿入され，その重複部分で組換えがおこると Tc 抵抗性を示す．このシャトルで高度好熱菌野生株と各種欠損株を形質転換し，細胞内で複製させる．このシャトルを回収し，大腸菌組換え欠損株を形質転換し，形質転換体の Tc 抵抗性出現頻度から相同組換え頻度を算出できる．この方法を構築し，相同組換え検出系としての有効性を確認するとともに，各種欠損株の自然誘発相同組換え頻度を解析した．

### 遺伝子発現解析レポーターの樹立

大腸菌の遺伝子発現レポーターでは一般にβ-ガラクトシダーゼをコードする *lacZ* 遺伝子が用いられることが多い．しかし高度好熱菌ではβ-ガラクトシダーゼ活性が高く，レポーターにこの遺伝子を使うことは困難で，他の適切な遺伝子をレポーターとする必要がある．

**方法の原理)** カロテノイド合成に関わる *crtB* 遺伝子をレポーターとするアッセイの樹立を目指した．大腸菌と高度好熱菌の両方で複製可能なシャトルベクターにプロモーター



領域を除いた *crtB* の ORF をクローニングし，その上流にクロー

ニングサイトを挿入した上図のようなレポーターベクターを構築した．この方法を構築し，*crtB* 上流のクローニングサイトに高温下でのゲノム情報維持に関わると推定される DNA 修復関連遺伝子の遺伝子上流領域をクローニングし，プロモーター領域や発現量を解析するとともに環境要因による誘導の有無や発現機構を解析した．

## 4. 研究成果

### 突然変異頻度・スペクトル解析法の樹立

突然変異検出の標的遺伝子として大腸菌 *supF* を採用し，大腸菌のベクターに *supF* とともに高度好熱菌での薬剤マーカーとしてハイグロマイシン，複製可能にするために *repA* を挿入し，突然変異を解析するシャトルベクター pKAT925 の構築に成功した．高度好熱菌で *supF* に変異が固定したベクターは選択用大腸菌 KS40/pOF105 に導入後，ナリジキシン酸とストレプトマイシンに耐性をしめすことが確認された．

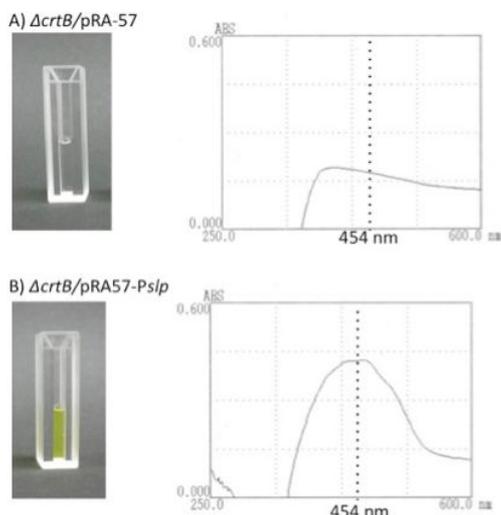
### 相同組換え頻度解析法の樹立

相同組換え (HR) の標的となるテトラサイクリン (Tc) 抵抗性遺伝子を前半部分と後半部分

がそれぞれ一部配列を重複するように順向きに挿入したシャトルベクター pMO11 および pMO12 を樹立した。その重複部分で相同組換えがおこると、そのシャトルベクターをもつ大腸菌が Tc 抵抗性を示すことを確認した。

### 遺伝子発現解析レポーターの樹立

カロテノイド合成の律速反応に関わる *crtB* 遺伝子をレポーターとするアッセイの樹立した。シャトルベクターにプロモーター領域を除いた *crtB* の ORF をクローニングし、その上流にクローニングサイトを挿入したベクター pRA57 を構築した。カロテノイド合成系には少なくとも 4 つの遺伝子が関与しているが、*crtB* を欠損することで合成は阻害され白いコロニーをつくり、この *crtB* 欠損株にプラスミドで *crtB* を発現させると相補され濃い黄色のコロニーをつくることを確認した。樹立した pRA57 ベクターを *crtB* 欠損株に導入しても黄色を呈しないが、クローニングサイトに発現ベクター pT8H-P<sub>slp</sub> のプロモーター P<sub>slp</sub> を挿入することで、濃い黄色を呈した。さらにこのカロテノイド色素を  $10^8 \sim 10^9$  細胞から SDS やメタノール/クロロホルムにより抽出し、OD454 により定量化出来ることも確認した。



以上の遺伝学的アプローチと精製したタンパク質を用いた *in vitro* での分子生物学的アプローチや生化学的アプローチを併用し、AP site に対する DNA 修復酵素 AP

endonuclease のゲノム情報維持への寄与、UV 誘導 DNA 損傷 cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) の光回復酵素 photolyase の発現機構、そして nucleotide pool に存在する脱アミノヌクレオチド損傷 dITP 浄化酵素 HamI 候補の活性同定およびそのゲノム安定化への寄与について解析した。

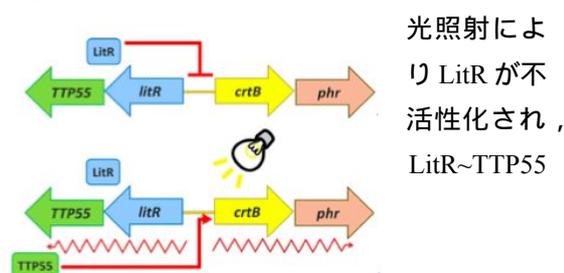
### AP endonuclease

脱塩基損傷の修復酵素 AP endonuclease である *nfo* 候補 TTC0482 に着目し、*nfo* 候補遺伝子欠損株における HP 頻度、そして *nfo* 候補遺伝子発現について検討した。その結果、高度好熱菌野生株と *nfo* 候補遺伝子欠損株の HR 頻度はそれぞれ  $1.10 \times 10^{-3}$ 、 $1.77 \times 10^{-3}$  とほぼ同程度であった。しかし大腸菌の野生株と *nfo* 欠損株の HR 頻度はそれぞれ  $3.13 \times 10^{-3}$ 、 $1.52 \times 10^{-1}$  と 50 倍も高頻度であることから、高度好熱菌には TTC0482 以外にもバックアップ *nfo* 候補が存在する可能性が示唆された。また *nfo* 候補 TTC0482 遺伝子の promoter 活性を pRA57 ベクターにより解析したところ、下図のように *nfo* 候補 TTC0482 遺伝子は陽性対照として用いた発現プロモーター P<sub>slp</sub> まではいかないものの、その 70% 程度の発現が確認された。しかしながら、*nfo* 候補 TTC0482 の発現の高温処理による誘導は観察されなかった。

### CPD photolyase

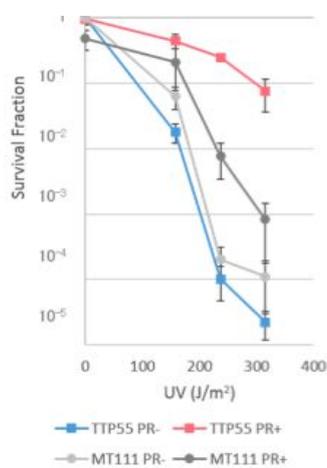
光回復は紫外線によって生じる DNA 損傷 CPD に結合し可視光のエネルギーにより CPD を壊裂する修復系で、高度好熱菌でもその活性が確認されている。本研究においてその光回復能が、高度好熱菌を可視光照射下で培養することにより増強された。

そこでゲノムデータベースによると上図のように *phr* はカロテノイド合成に関わる *crtB* の下流に存在しており、光非照射時は LitR が repressor として *crtB* の転写を抑制しているが、

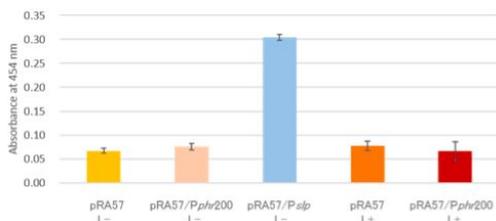


光照射により LitR が不活性化され、LitR~TTP55

が転写・翻訳されて生じた TTP55 が *crtB* の activator として転写を促進すると報告されている。そこで TTP55 をプラスミドにより強制発現させたところ、光回復能は

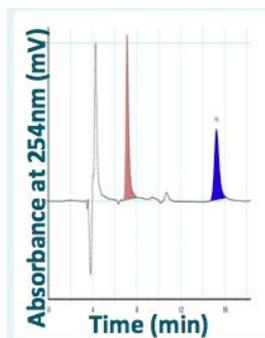
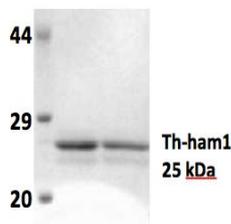


4.5 倍以上高まった (図 : (青) TTP55 発現/非照射, (赤) TTP55 発現/照射). さらに *crtB* の下流で *phr* の上流部分をレポーターベクター-pRA57 に組み込み発現の有無を確認したところ、陽性対照の *Pslup* の発現は確認された一方で *phr* 自身の上流域にプロモーター活性は確認できず、光照射によっても転写は誘導されなかった (下図). 以上の結果より、可視光照射下で培養することにより増強された光回復能は *phr* が *crtB* とオペロンを形成しているためであると結論づけた。



### 脱アミノ化ヌクレオチド浄化酵素 HamI

突然変異は DNA の直接損傷だけでなく、ヌクレオチドプール内で生じた損傷ヌクレオチドの取り込みによる経路も知られており、脱アミノ化ヌクレオチドを分解する浄化機構が知られている。特に高温下ではヌクレオチド損傷がより生じやすいことから、高度好熱菌のゲノム安定化にこの機構が重要であると考えられる。脱アミノ化はされたヌクレオチドの脱 2 リン酸酵素である *ham1* 候補 TTC1290 をクローニングし、HamI 候補タンパク質を GST との融合タンパク質として精



製し、トロンピンにより GST を除去した 25kDa のタンパク質の pyrophosphatase 活性を、HPLC ピークシフトアッセイを用いて検討した。その結果、HamI 候補タンパク質は dITP (脱アミノ化 dATP) を脱二リン酸して dIMP に加水分解することが確認でき、Lineweaver-Burk plot により  $K_m$  27.6  $\mu$ M,  $k_{cat}$  0.8/sec が求められた。さらにこの *ham1* 候補 TTC1290 遺伝子欠損株を樹立し、野生株とともに HR 頻度を検討したところ、 $\Delta ham1$  欠損株では  $0.33 \times 10^{-3}$  と野生株の  $1.10 \times 10^{-3}$  であったのに対し予想に反し野生株よりわずかに低い HR 頻度であった。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

X. Fang, T. Nunoshiba, M. Yoshida, A. Nishikawa, K. Nemoto, M. Degawa, S. Arimoto, K. Okamoto, E. Takahashi, T. Negishi, Effects of Oral Administration of Non-genotoxic Hepato-hypertrophic Compounds on Metabolic Potency of Rat Liver, refereed, *Gene and Environment*, 36, 1-9 (2014)

〔学会発表〕(計 15 件)

塩谷詩織、河東祐季、江崎和音、牧野耕三、布柴達男、平津圭一郎、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の突然変異検出系の構築, 日本分子生物学会 日本生化学会 合同大会, Nov. 30-Dec. 2, 2016 (横浜)

Shiori SHIOTANI, Yuki KATO, Kazune ESAKI, Kozo MAKINO, Tatsuo NUNOSHIBA, Keiichiro HIRATSU,

Construction of a *supF*-based system for detection of mutation in *Thermus thermophilus*, 日本環境変異原学会第45回大会, Nov. 16-18, 2016 (つくば)

塩谷詩織, 河東祐季, 江崎和音, 牧野耕三, 布柴達男, 平津圭一郎, 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の突然変異検出系の構築, 第29回変異機構研究会, Sep 9~10, 2016 (京都)

塩谷詩織, 河東祐季, 江崎和音, 牧野耕三, 布柴達男, 平津圭一郎, 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の突然変異検出系の構築, 日本分子生物学会 日本生化学会合同大会, Dec 1-4, 2015 (神戸)

布柴達男 (招待講演) 酸化ストレスで生じる突然変異の由来は? 日本環境変異原学会第44回大会シンポジウム, Nov 27-28, 2015 (福岡)

Miki Nishimura, Emiko Morimoto, Keiichiro Hiratsu, Tatsuo Nunoshiba, Purification and identification of pyrophosphatase Ham1 for the sanitization of deaminated nucleotides in *Thermus thermophilus*, 日本環境変異原学会第44回大会, Nov 27-28, 2015 (福岡)

Mikako Onozaka, Hisae Miyashita, Miki Nishimura, Keiichiro Hiratsu, Tatsuo Nunoshiba, Roles of GO system on genome integrity in *Thermus thermophilus*, 日本環境変異原学会第44回大会, Nov 27-28, 2015 (福岡)

西村美起, 森本絵美子, 平津圭一郎, 米良花香, 布柴達男, 高度好熱菌の脱アミノ化ヌクレオチド浄化酵素Ham1の活性測定とゲノム安定化における役割, 日本極限環境生物学会 Nov 8-9, 2015 (東京)

布柴達男 (招待講演) 酸化ストレスで生じる突然変異の由来は? 日本遺伝学会第87回大会ワークショップ, Sept 24-26, 2015 (仙台)

西村美起, 森本絵美子, 平津圭一郎, 米良花香, 布柴達男, 高度好熱菌の脱アミノ化ヌクレオチド浄化酵素Ham1の精製と機能解析, 日本遺伝学会第87回大会, Sept 24-26, 2015 (仙台)

布柴達男 (招待講演) ヌクレオチド損傷とゲノム安定化機構~ヌクレオチド損傷浄化機構の役割~, 先端・老化研究推進戦略セミナー(福岡歯科大学) May 22, 2015 (福岡)

Miki Nishimura, Emiko Morimoto, Keiichiro Hiratsu, Tatsuo Nunoshiba, Purification and identification of pyrophosphatase Ham1 for the sanitization of deaminated nucleotides in *Thermus thermophilus*, 日本環境変異原学会第43回大会 Dec 4-5, 2014 (東京)

Reiko Aihara, Hanaka Mera, Kazune Esaki, Keiichiro Hiratsu, Tatsuo Nunoshiba, Analysis of Genomic Integrity in *Thermus thermophilus* -The Roles of AP endonuclease-, 日本環境変異原学会第43回大会 Dec. 4-5, 2014 (東京)

相原玲子, 米良花香, 江崎和音, 平津圭一郎, 布柴達男, 高度好熱菌のゲノム維持機構の解明~ AP endonuclease *nfo* の役割~, 日本遺伝学会第86回大会, Sept 17-19, 2014 (長浜)

西村美起, 相原玲子, 平津祐啓, 平津圭一郎, 布柴達男, 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の光回復酵素遺伝子の発現機構, 日本遺伝学会第86回大会, Sept 17-19, 2014 (長浜)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

布柴 達男 (NUNOSHIBA, TATSUO)  
国際基督教大学・教養学部・教授  
研究者番号: 10270802

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

平津圭一郎 (HIRATSU, KEIICHIRO)  
防衛大学校・応用化学群・准教授  
研究者番号: 00294538

### (4) 研究協力者

相原玲子 (AIHATRA, REIKO)  
西村美起 (NISHIMURA, MIKI)