

2022 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	DNA 修復タンパク質 PprA の耐熱化
キーワード	① DNA 修復、② 耐熱化、③ 放射線抵抗性

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	クボ アヤ 久保 彩
配付時の所属先・職位等 (令和4年4月1日現在)	東洋大学 学術推進研究センター・研究助手
現在の所属先・職位等 (令和5年7月1日現在)	東洋大学 学術推進研究センター・研究助手
プロフィール	2019年東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 後期博士課程修了。米国オクラホマ州立大学でのポスドクを経て2021年8月より現職。博士課程では土壌細菌と外来DNAプラスミドの相互作用について、ポスドクでは緑膿菌の病原性を引き起こす分子機構について研究していた。現在は放射線抵抗性細菌のもつ放射線耐性機構について研究している。

1. 研究の概要

ゲノムDNAの安定な維持は正常な細胞機能の持続性および種の存続において必須であるが、紫外線をはじめとした放射線や化学物質などのストレスにより絶えず損傷を受けている。*Deinococcus radiodurans* は特異的なDNA損傷の修復機構をもつために類まれな高い放射線抵抗性を示す。中でも*D. radiodurans*のDNA修復機構において中心的な役割を担うタンパク質であるPprA (Pleiotropic protein promoting DNA repair A, DNA修復を促進する多面的なタンパク質A) はDNA操作技術に用いる研究試薬として利用されている。しかし、現在市販されているPprAタンパク質は安定性に問題があり、使用温度の利便性や保存期間の長期化を向上させるために当該タンパク質の耐熱性が重要な課題となってくる。そこで、本研究ではPprAの耐熱性を向上させることを目的として研究を行った。

PprAは既に全長の結晶構造が明らかになっているため、これを基に16カ所のアミノ酸を一つずつ変異させたところ、10カ所でPprAの耐熱性が向上することが明らかとなった。これら10カ所の変異を複数組み合わせ合わせた変異PprAの耐熱性を調べたところ、6カ所のアミノ酸を同時に変異させることで最も耐熱性が向上することが明らかとなった。今後は耐熱性PprAを生産する好熱菌 *Thermus thermophilus* は放射線耐性が向上するのか、また、PCRなどに用いる好熱菌由来の酵素と耐熱性PprAの親和性について調べていく予定である。

当該酵素の機能を解明することで、DNA操作技術に用いる研究試薬へ応用できるだけでなく、ヒトにおいてDNA損傷により引き起こされるがんや老化を予防する手立てを講じられると期待される。

2. 研究の動機、目的

生物が種族として生き残るためには、ゲノム配列の情報を安定に保持し次世代へと伝えていくことが必須である。しかしながら、ゲノムは放射線や環境中の化学物質、活性酸素等といったストレスにより絶えず損傷をうけている。また、細胞老化もDNA損傷の一因であり、神経

変性疾患やがんの発生および進行の原因となる。損傷した DNA を速やかに修復することが生体恒常性を維持する基礎であるため、DNA 修復機構を明らかにすることは非常に重要である。

放射線抵抗性細菌 *Deinococcus radiodurans* は 1956 年に米国オレゴン州にてガンマ線滅菌後の牛肉の缶詰から単離された極限環境微生物であり、大腸菌の約 100 倍、ヒトの約 1,000 倍の放射性抵抗性を示す。既にゲノム DNA の全塩基配列が決定されており、この類まれなる放射性抵抗性は、*D. radiodurans* が特異的で高性能な DNA 修復機構をもつためであることが明らかとなっている。大腸菌等の細菌は数個の DNA 二本鎖切断 (double-strand breaks, DSBs) により死に至るが、*D. radiodurans* は 100 箇所以上の DSBs がゲノム中に生じたとしても元通りに修復し生存することが可能である。この DNA 修復の分子機構を明らかにすることにより、DNA 損傷などによって引き起こされるがんや老化を予防する手立てを講じられるだけでなく、DNA 操作技術に用いる研究用試薬へ応用できると期待される。

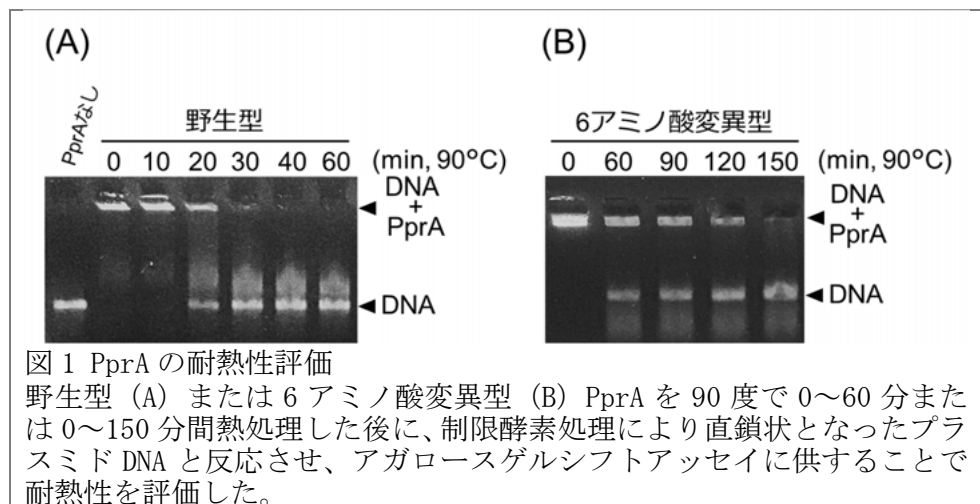
D. radiodurans の DNA 修復機構には、大腸菌などで広く保存されている RecA タンパク質や LexA タンパク質による SOS 応答で制御される DNA 修復機構の他に、*D. radiodurans* 独自の新規機構が存在する。当該分子機構において中心的な役割を果たす因子として PprA タンパク質 (Pleiotropic protein promoting DNA repair A, DNA 修復を促進する多面的なタンパク質 A) が同定された (Narumi *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 2004, 54(1), p. 278)。PprA タンパク質は *D. radiodurans* の DNA リガーゼのみではなく、大腸菌の DNA リガーゼや商品化されている T4 DNA リガーゼの活性を促進し、TA クローニングの効率をも向上させることが分かっている。このように、PprA タンパク質は *in vitro* 条件下において他の DNA 操作技術に用いる研究試薬に対して高い親和性を示すため、産業利用への応用が期待された。実際に PprA タンパク質の性質に関しては特許が取得されており (特許第 4111369 号) これを基とした高効率 DNA 修復試薬「TA-Blunt Ligation Kit」(ニッポンジーン) が販売されている。

しかしながら、現在市販されている PprA は熱に対して不安定であるという課題が残っている。使用温度の利便性や保存期間の長期化を向上させるためには、当該タンパク質の耐熱化が効果的であると考えた。そこで本研究では、PprA タンパク質を耐熱化し、それに伴う機能変化を調べることを目的とした。これにより、現在販売されているキットの改良のみにとどまらず、他の DNA 操作技術に用いる研究試薬の活性促進効果も期待できる。さらには、PprA タンパク質の汎用的な DNA 修復作用は、*in vitro* 条件下のみならず、*in vivo* 条件下においても発揮されるため、DNA 損傷により引き起こされる各種疾病の予防・治療等を含む新規細胞工学の技術への応用も期待される。

3. 研究の結果

まずは野生型 PprA タンパク質の耐熱性を調べた。タンパク質発現用ベクターに *D. radiodurans* の *pprA* 遺伝子を挿入したプラスミドを大腸菌に導入した。遺伝子組換え大腸菌にて生産された PprA タンパク質

をアフィニティー精製し、精製度を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて確認した。精製した PprA タンパク質を 90 度にて熱処理した後に、制限酵素処理により DNA 切断が生じ直鎖状となったプラスミド DNA と反応させた。これをアガロースゲル電気泳動に供することで PprA タンパク質の DNA 結合能を評価した。その結果、野生型 PprA タンパク質は 30 分間の熱処理により完全に DNA 結合能を失うことが明らかとなった (図 1A)。



次に、PprA タンパク質の結晶構造 (Adachi *et al.*, *FASEB J.*, 2019, 33(3), p. 3647) を基に ① α ヘリックス内のプロリン残基または水素結合を増やす ② β シート内の疎水結合を増やす、という 2 つの観点からアミノ酸残基を選択し、野生型 *pprA* 遺伝子の発現プラスミドを鋳型とした部位特異的変異導入法により合計 16 種の一アミノ酸変異 PprA タンパク質を作製した (図 2)。一アミノ酸変異 PprA タンパク質生産大腸菌を作製し、変異型 PprA タンパク質を精製し、先ほどと同様に熱処理後に直鎖状 DNA との結合能を調べたところ、16 種中 10 種の一アミノ酸変異 PprA タンパク質は野生型 PprA タンパク質よりも耐熱性が向上していることが明らかとなった。そこで、10 種のアミノ酸変異を複数組み合わせることでさらに耐熱性が向上するかどうかを調べた。最終的には 6 カ所のアミノ酸を同時に変異させることで最も耐熱性が向上することが明らかとなった (図 1B)。野生型 PprA タンパク質は 30 分間の熱処理により DNA 結合能を失うが、6 カ所変異型 PprA タンパク質は 2 時間以上の熱処理後も DNA 結合能を維持していた。

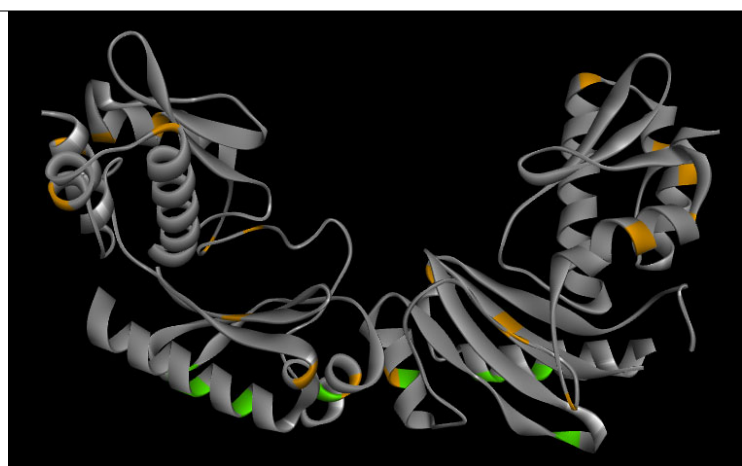


図 2 PprA の耐熱性向上のために置換したアミノ酸残基置換したアミノ酸残基を橙色で、DNA と結合するアミノ酸残基を緑色で示している。

現在では細胞内でも PprA タンパク質の耐熱性および DNA 修復促進機能が維持されているのかを調べるために、好熱菌であり、かつ *D. radiodurans* と近縁である *Thermus thermophilus* を宿主とした耐熱性 PprA タンパク質生産菌を作製している。今後は耐熱性 PprA タンパク質が高温培養時に *T. thermophilus* に DNA 修復能を付与するか否かを調べる予定である。さらには耐熱性の DNA 操作試薬である PCR 用 DNA ポリメラーゼとの親和性を調べることを予定している。

4. 研究者としてのこれからの展望

指導教員の先生方におんぶに抱っこであった学生時とは異なり、書類上は「一人前の研究者」となった現在、じっくりと自分の研究について考えること、他の研究者との交流、外部資金の獲得、そしてそれらを成すための業績の大切さについてより一層実感しています。共同研究についても、研究試料のやり取りのような簡単なものしか経験がないため、今後は留学経験で学んだことなどを生かし、本格的な共同研究も行っていきたいと考えています。そのためにも、本研究について早期に学術論文として発表したいと思っています。また、研究を推進するには長期的な視野が必要不可欠であることもわかってきました。腰を据えて研究ができるように、任期なしの大学教員職へのキャリアアップを目指していきます。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

本研究へご支援いただき誠にありがとうございました。貴奨励金により PprA タンパク質の変異体をどんどん作り、最終的には耐熱性の高い変異型 PprA タンパク質を作製することができました。必要でありながら高価なために購入を躊躇してしまう試薬を無事に購入することもできました。また、迅速に研究を進められただけでなく、積極的に学会に参加し、本研究を発信することもできました。本研究について発表した学会の一つでは優秀ポスター賞も受賞することができました。さらには、金銭面のみではなく、女性研究者奨励金に採択されたこと、そして書類審査時に選考委員会の方々からいただいたコメントにより、本研究の重要性を改めて確認することができ、研究遂行の励みとなりました。偏に支援してくださる皆様のおかげです。重ねて御礼申し上げます。本研究は DNA 操作作用の新規試薬を開発するというだけでなく、将来的にはヒトの DNA 修復治療につながる可能性も秘めている将来性の高い研究であると自負しております。今後もより一層精進してまいります。