

Title	Functional analyses of the proteins involved in DNA mismatch repair
Author(s)	島田, 敦広
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34029
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (島田 敦広)

論文題名

Functional analysis of the proteins involved in DNA mismatch repair
(DNA ミスマッチ修復に関与するタンパク質群の機能解析)

論文内容の要旨

背景

DNA ミスマッチは、DNA の複製時に DNA ポリメラーゼが鋳型鎖に対して誤った塩基を取り込むことによって生じる DNA 傷害である。DNA ミスマッチ修復 (MMR) タンパク質群の変異や欠失は、細菌において 20 から 400 倍もの複製忠実度の低下をもたらし、ヒトにおいては遺伝性非ポリポーシス大腸癌などの原因となることが報告されている。MMR は、修復に関わる蛋白質の種類とその活性によって、大きく 3 つのタイプ (真核生物型、大腸菌型、大腸菌以外のバクテリア型) に分類することができる (図 1)。真核生物型の MMR では、まず MutSα がミスマッチ部位を認識し、エンドヌクレアーゼである MutLα をミスマッチ部位に誘導する。MutLα は DNA 複製クランプ (PCNA) との相互作用を介して、新生鎖側へ特異的に切れ目 (ニック) を導入することが強く示唆されている。そして、導入されたニック部分からエキソヌクレアーゼ EXO1 によって誤った DNA 鎖が除去され、DNA ポリメラーゼによって正しい DNA 鎖の再合成が行われる。一方、大腸菌型の MMR では、MutL にエンドヌクレアーゼ活性が存在せず、新生鎖へのニック導入には大腸菌とその近縁種にのみ保存されている MutH エンドヌクレアーゼを利用している。MutH は GATC 配列のメチル化修飾を受けていない側の DNA 鎖へ特異的にニックを導入することで、MMR の新旧鎖識別を可能にしている。大腸菌型の MMR では導入されたニック部分から DNA ヘリカーゼによって二重鎖 DNA がほどかれ、遊離した一本鎖 DNA を一本鎖特異的なエキソヌクレアーゼが分解する。大腸菌以外のバクテリア型の MMR では、エンドヌクレアーゼ活性を持つ MutL を有することから、真核生物型に近い MMR を利用していると考えられるが、MMR に関わるタンパク質群の種類や詳細な修復メカニズムはいまだ未解明である。そこで、本研究では高度好熱菌をモデル生物として用いて、大腸菌以外のバクテリア型の MMR の全容解明を目指して研究を行った。その結果、MMR に関わる新規エキソヌクレアーゼを同定し、MutS, MutL の ATP 加水分解活性の MMR における重要性を明らかにした。

MMR に関わる新規エキソヌクレアーゼ TTHB178 の機能解析

大腸菌型の MMR では、ニックからほどかれた DNA 鎖の除去に一本鎖 DNA 特異的 3'→5' および 5'→3' エキソヌクレアーゼ (ssExo) が必要と考えられているが、高度好熱菌では 5'→3' ssExo である RecJ は同定されていたが、3'→5' ssExo は同定されていなかった。そこで、高度好熱菌のゲノム配列を検索した結果、TTHB178 が 3'→5' ssExo に高度に保存された DnaQ exo モチーフを持つことが分かった。大腸菌を用いて大量発現し、精製した TTHB178 を用いて活性測定を行ったところ、TTHB178 は一本鎖 DNA を特異的に 3' 末端から分解することが分かった。また、TTHB178 の分子量を動的光散乱法を用いて解析した結果、TTHB178 は溶液中で二量体を形成していることが分かった。原核生物由来の二量体 ssExo は報告がなく、新規性の高いタンパク質である。次に、TTHB178 遺伝子の欠損変異体を作製し、ストレプトマイシンに対する自然突然変異率を調べたところ、野生型と大きな差はなかった。しかし、5'→3' ssExo である RecJ との二重欠損変異体では、自然突然変異率が 30 倍以上に上昇した。このことから、TTHB178 は RecJ と共に MMR におけるミスマッチを含む DNA 鎖除去反応を担うエキソヌクレアーゼであることが予想された。大腸菌では、ssExo の欠損変異体は 6 倍程度の自然突然変異率の上昇しか示さないことから、高度好熱菌の MMR において ssExo は非常に重要な役割を担っていることが示唆される。

MutL のエンドヌクレアーゼ活性に与える MutS および MutL の ATP 加水分解活性の影響

MutS および MutL は、それぞれ ABC ATPase と GHKL ATPase スーパーファミリーに属している。真核生物や枯草菌などにおいて、ミスマッチ部位に安定に結合している MutS は ATP の結合に伴って構造変化を起こし、ミスマッチ部位から移動可能なクランプ構造になることが知られている。この構造変化によって、DNA 上を移動し

て新旧鎖識別シグナルの探索などを行うと考えられている。しかし、ATP の加水分解が何に利用されているのかは分かっていなかった。また、MutL のエンドヌクレアーゼ活性は ATP 結合によって強く抑制されることが報告されているが、MutL の ATP 加水分解活性は非常に弱いため、細胞内で MutL のエンドヌクレアーゼ活性がどのように発現しているのか分かっていない。そこで、1 塩基ミスマッチを含む環状プラスミド DNA を基質に用いて、MutL のエンドヌクレアーゼ活性を調べた。その結果、MutL は ATP および MutS 存在下で、MutS 非存在下に比べて 7 倍高い活性を示した (図 3)。また、AMPPNP や ADP の存在下、あるいはミスマッチを含まない基質に対しては、MutS による MutL の活性化は確認されなかった。そこで、MutS による MutL の活性化に与える ATP の影響をより詳細に解析するために、MutS および MutL の ATP 加水分解活性欠損変異体を作製した。これら変異体を用いて解析を行ったところ、MutS の変異体では、MutL の活性化はほとんど観察されなかったが、MutL の変異体は MutS によってわずかに活性化されることが分かった (図 3)。以上の結果から、MutL の活性化には MutS および MutL による ATP 加水分解が関与しているが、MutS の ATP 加水分解は必須であることが分かった。

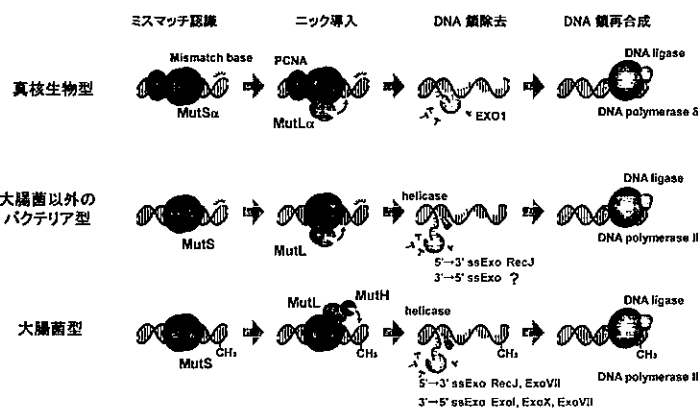


図 1. MMR 経路

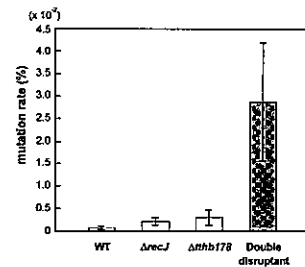


図 2. 自然突然変異率

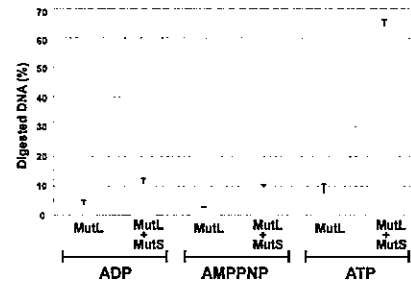


図 3. MutL の活性化に与える MutS と ATP の影響

発表論文

1. Shimada A., Masui R., Nakagawa N., Takahata Y., Kim K., Kuramitsu S., and Fukui K. (2010) A novel single-stranded DNA-specific 3'-5' exonuclease, *Thermus thermophilus* exonuclease I, is involved in several DNA repair pathways. *Nucleic Acids Res.* 38, 5692-5705
2. Shimada A., Kawasoe Y., Hata Y., Takahashi T.S., Masui R., Kuramitsu S., and Fukui K. (2013) MutS stimulates the endonuclease activity of MutL in an ATP hydrolysis-dependent manner. *FEBS J.* 280, 3467-3479

<副論文>

1. Iino H., Kim K., Shimada A., Masui R., Kuramitsu S., and Fukui K. (2011) Characterization of C- and N-terminal domains of *Aquifex aeolicus* MutL endonuclease: N-terminal domain stimulates the endonuclease activity of C-terminal domain in a zinc-dependent manner. *Biosci. Rep.* 31, 309-322
2. Shimada A., Ishikawa H., Nakagawa N., Kuramitsu S., and Masui R. (2010) The first crystal structure of an archaeal metallo-β-lactamase superfamily protein: ST1585 from *Sulfolobus tokodaii*. *Proteins* 78, 2399-2402.
3. Fukui K., Bessho Y., Shimada A., Yokoyama S., and Kuramitsu S. (2013) Thermostable mismatch-recognizing protein MutS suppresses nonspecific amplification during PCR. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6436-6453

Review

1. Morita R., Nakane S., Shimada A., Inoue M., Iino H., Wakamatsu T., Fukui K., Nakagawa N., Masui R., and Kuramitsu S. (2010) Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. *J. Nucleic Acids* Article ID 179594, 32 pages
2. Fukui K., Shimada A., Iino H., Masui R., and Kuramitsu S. (2011) Biochemical properties of MutL, a DNA mismatch repair endonuclease. In Storici F (ed.), *DNA Repair - On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors* (Storici F, ed.), pp. 123-142. InTech, Rijeka, Croatia

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (島 田 敦 広)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教 授 倉 光 成 紀
	副 査 教 授 升 方 久 夫
	副 査 教 授 米 崎 哲 朗
	副 査 助 教 高 橋 達 郎
論文審査の結果の要旨	
<p>これまで、微生物の DNA ミスマッチ修復系 (MMR) の研究には、大腸菌が利用されることが多かったが、その大腸菌は他の大多数の微生物とは異なる MMR を有しており、これまで明らかにされている MMR のメカニズムは一般性に乏しい。そこで、他の多くの微生物と共通な MMR を持つ高度好熱菌 <i>Thermus thermophilus</i> HB8 をモデル生物として、MMR についての研究を行った。高度好熱菌のタンパク質は安定性が高いため、立体構造解析や機能解析に適しており、その反応機構を化学的なレベルで理解するために都合が良いことも、経験的に知られている。</p> <p>その高度好熱菌の MMR には約 10 種類のタンパク質の関与が知られていたものの、3'→5' の方向に一本鎖 DNA を削る活性を持つエキソヌクレアーゼ (ssExo) の存在はこれまで不明であった。その不明の 3'→5' エキソヌクレアーゼが、これまで機能未知タンパク質と考えられていた TTHB178 であることを明らかにした。</p> <p>MMR で DNA 分解活性を持つ MutL タンパク質が、正常な DNA を誤って切断すると、細胞の生存を脅かす可能性がある。しかし、そのようなことが起きないように通常は、細胞内に高濃度で存在する ATP によって、MutL タンパク質の DNA 切断活性が抑制されていた。そして、ミスマッチ DNA 部分を除去する際に必要な MutL タンパク質の DNA 切断活性の発現には、MutS や MutL タンパク質の ATP 加水分解活性が非常に重要であることを明らかにした。</p> <p>よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。</p>	