

放射線抵抗細菌 *Deinococcus radiodurans* の DNA 2本鎖切断修復

●山本 和生

東北大学大学院生命科学研究所

〈研究の目的と進め方〉

D. radiodurans は、6000グレイ (Gy) の放射線照射が致死量の細菌で、DNAには200個の2本鎖切断ができる。この場合、菌自身がゲノム構造をダイナミックに変化させていること、放射線抵抗性を支配する遺伝子の存在することの2点が強く示唆されている。即ち、放射線耐性が遺伝子支配のもとに成立している生命系である。この遺伝子群を同定し、遺伝子産物を生化学的に解析することで、新たな生命観を提供することができる。本研究では、1) ゲノム構造と放射線耐性との関係、2) 同定した放射線耐性遺伝子の遺伝学的、生化学的解析、3) 損傷誘導遺伝子の発現制御機構、以上の3点を明らかにすることを目的とする。

〈研究開始時の研究計画〉

1) 修復遺伝子のクローニング；*D. radiodurans* から分離された既存の各種DNA修復欠損株を用い、 α -線感受性を相補する遺伝子をコスミドライブラリーからクローニングする。得られた遺伝子を大腸菌内で機能するように改変し、大腸菌で既知の修復系をどのように相補するかも調べる。遺伝子クローニングとその後の解析のためのDNA sequencer等は完備している。2) 遺伝子産物の機能解析；遺伝子産物を精製し、*in vitro* で損傷認識の機構、損傷修復の機構を解明する。3) 2本鎖切断修復機構の解析；*D. radiodurans* *recA*欠損株、KH3111株及びKH840株、それらの二重、三重変異株を用い、DNA 2本鎖切断修復に関わるタンパク質の実体及び修復の仕組みをパルスフィールドゲル電気泳動で明らかにする。4) *D. radiodurans* DNA損傷修復変異株の分離；*D. radiodurans* 全ゲノム配列をもとに、 α -線感受性に関わると思われる遺伝子の破壊株を作る。このためには、我々の開発した抗生物質耐性遺伝子カセットの導入による遺伝子破壊法を用いる。このようにして出来た放射線感受性変異株と、既存の修復欠損との二重、三重欠損株を作成し、*D. radiodurans* での修復機構のネットワークを明らかにする。

〈研究期間の成果〉

1) *recA*欠損株とは別であるが組換えに関わると思われる変異株の原因遺伝子及び発現調節に関わると思われる変異株の原因遺伝子をクローニングした。これは non-homologous end-joining に関わる遺伝子であることが明らかとなった。

2) 3 kGy の γ -線照射でできた約100個のDNA 2本鎖切断を、*D. radiodurans* は数時間で修復することができる。この過程には γ -線で誘導されるタンパク質が関与していること、*recA* 遺伝子と *recA* 以外の遺伝子の少なくとも2個の遺伝子が関係すること、染色体が5～10コピー存在するので、組換えが容易に行われることを明らかにした。

3) *D. radiodurans* 全ゲノム配列をもとに、約1000個存在する機能未知のORFについて、網羅的遺伝子の破壊株を作る作業を行ったが、成果を揚げることは出来なかった。

〈国内外での成果の位置づけ〉

放射線耐性に関わると思われるいくつかの遺伝子については、その後詳細な解析が行われ、大きな成果につながった。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当初、網羅的な遺伝子破壊を行い、その中から新規の放射線耐性遺伝子を同定することを計画した。*D. radiodurans* の GC content が70%と大変高く、遺伝子クローニングのPCRの条件設定が大変困難で、10数個の遺伝子破壊を行った段階で、それ以降の実験を中止した。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) Narumi, I., Satoh, K., Kikuchi, M., Funayama, T., Yanagisawa, T., Kobayashi, Y., Watanabe, H., and Kazuo Yamamoto, K., The LexA protein from *Deinococcus radiodurans* is not involved in RecA induction following γ -ray irradiation, *J. Bacteriol.*, 183, 6951-6956 (2001).
- 2) Satoh, K., Narumi, I., Kikuchi, M., Kitayama, S., Yanagisawa, T., Yamamoto, K., and Watanabe, H., Characterization of RecA424 and RecA670 proteins from *Deinococcus radiodurans*, *J. Biochemistry*, 131, 121-129 (2002)
- 3) Tanaka, M., Narumi, I., Funayama, T., Kikuchi, M., Watanabe, H., Matsunaga, T., Nikaido, O., and Yamamoto, K., Characterization of pathways dependent on *uvrE*, *uvrA1*, or *uvrA2* gene product for ultraviolet resistance in *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.*, 187, 3693-3697 (2005)
- 4) 山本和生, 放射線抵抗性細菌 *Deinococcus radiodurans* の DNA 2本鎖切断修復, *遺伝*, 54, 9-10 (2000)