

DNA 二重鎖切断修復における染色体動態制御機構

Dynamic regulation of SMC-like RecN protein in response to DNA double-strand breaks in  
*Escherichia coli*.

(日本遺伝学会推薦)

代表研究者 大阪大学 菱田 卓 Osaka University Takashi Hishida

DNA double-strand breaks (DSBs) are major threats to the genomic integrity of cells. These result from exogenous and endogenous agents such as ionizing radiation and chemical mutagen and from endogenously produced radicals. Therefore, the repair of DSBs is important for cell survival and for maintaining the integrity of the genome. *Escherichia coli recN* is a member of the structural maintenance of chromosomes (SMC) family and is required for DNA double-strand break repair. This study shows that RecN protein has a short half-life and its degradation is dependent on the cytoplasmic protease ClpXP and a degradation signal at the C-terminus of RecN. In cells with DNA DSBs, GFP-RecN localized in discrete foci on nucleoids and also formed visible aggregates in the cytoplasm, both of which disappeared rapidly in wild-type cells when DSBs were repaired. In contrast, in  $\Delta clpX$  cells, RecN aggregates persisted in the cytoplasm after release from DNA damage. Furthermore, analysis of cells experiencing chronic DNA damage revealed that proteolytic removal of RecN aggregates by ClpXP was important for cell viability. These data demonstrate that ClpXP is critical component of the cellular clearance of toxic RecN aggregates from the cell, and therefore plays an important role in DNA damage tolerance.

## 研究目的

放射線や DNA 複製阻害などの外的、内的要因によって引き起こされるゲノム二重鎖切断は、染色体構造の不安定化を引き起こす要因となりうるため、その修復機構は染色体動態制御機構と密接に関わっていると考えられる。しかしながら、染色体 DNA の損傷修復と染色体動態制御の関連については未だ未開拓の研究分野である。大腸菌 *recN* 遺伝子は、SOS 誘導を受ける遺伝子群の一つで、SMC (structural maintenance of chromosomes) ファミリーに属するタンパク質をコードしている。SMC ファミリーに属するタンパク質群は、真性細菌、古細菌、及び真核生物に存在し、染色体動態制御に関わるマシナリーとして重要な役割を果たしていると考えられている。これまでの解析から、*recN* 遺伝子破壊株は、相同組換え頻度の低下やガンマ線高感受性などを引き起こすことから DNA 二重鎖切断修復に関与していると考えられていたが、RecN がどのような因子と相互作用し、またその機能がどのように制御されているのかに関しては明らかになっていない。本研究では、大腸菌 RecN タンパク質と相互作用する因子の同定し、それらの機能を詳細に解析することで、DNA 二重鎖切断修復における染色体動態制御の実態を明らかにすることを目標としている。

## 研究経過

今回我々は、精製した RecN タンパク質から作成した抗体を用いて、DNA クロスリンク剤であるマイトマイシン C (MMC) 存在下における RecN の発現制御機構を解析したところ、DNA 損傷に依存して発現した RecN は、半減期が非常に早いタンパク質 (約 8 分) であることを見出した。一般に、大腸菌のタンパク質の半減期は比較的長いことから、この結果は、RecN がプロテアーゼなどによって積極的な分解を受けている可能性を示唆している。そこで、我々は、RecN の分解に基質特異的プロテアーゼが関与している可能性を考え、大腸菌細胞質内で働くエネルギー (ATP) 依存性プロテアーゼである ClpAP、ClpXP、HslUV、FtsH、Lon の各遺伝子破壊株を用いて RecN の安定性を解析したところ、*clpP* 及び *clpX* 破壊株で RecN の分解が完全に抑えられることがわかった (Fig 1)。この結果は、RecN が ClpXP プロテアーゼによって分解されるターゲットタンパク質であり、RecN に何らかの分解シグナル (ClpXP 相互作用領域) が存在することを示している。

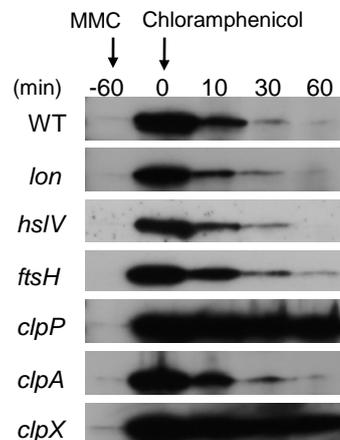


Fig1. RecN is a substrate for ClpXP protease. Cells were incubated in the presence of MMC (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) at 37°C for 60 min, and then chloramphenicol (100  $\mu\text{g/ml}$ ) was added at time zero. The RecN levels of WCE from *lon*, *hslV*, *ftsH*, *clpP*, *clpX*, and *clpA* deletion cells were examined by Western blotting with anti-RecN antibody.

細胞質中に存在する ClpXP プロテアーゼは、シャペロン様 AAA<sup>+</sup>ATPase の ClpX とセリンプロテアーゼ ClpP からなる複合体として機能しており、真核生物における 26S プロテアソームと構造的・機能的に類似している。ClpXP プロテアーゼは、基質特異性を持ち、転写因子の分解などによる様々な代謝プロセスの制御の他、ストレス環境下で頻繁に生じるタンパク質のミスフォールディングや、その結果引き起こされるタンパク質凝集体の蓄積を排除する為に重要な役割を果たしており、これらの働きは、温度や化学物質などの環境ストレス因子に対する細胞レベルでの適応応答と密接に関連している。これまでの解析から、ClpXP プロテアーゼは、リボソームにおける翻訳が途中で停止した際に生じるポリペプチドの分解を行うタンパク質品質管理機構においても重要な働きを行っていることが明らかになっている。この機構では、*ssrA* 遺伝子にコードされている機能性 small RNA が翻訳途中で停止したリボソームにリクルートされ mRNA とリボソームの解離及び、その結果生じる不完全なポリペプチドの C 末に SsrA RNA 内にコードされた 11 アミノ酸 (SsrA タグ) を付加する。ClpXP は、この SsrA タグが付加されたポリペプチドを認識・結合し、特異的に分解することで不完全なタンパク質の蓄積を抑えている。SsrA タグの中でも特に C 末端に位置する 2 つの非極性アミノ酸 AA が ClpXP との結合に非常に重要であり、実際、AA から DD へとアミノ酸を変異させた場合、ClpXP による分解が抑制されることが知られている。興味深いことに、我々は RecN の C 末端配列がこの SsrA タグと非常に高い相同性を持つことを発見し、SsrA と同様に RecN の C 末端配列 (AA) を DD に変異した RecN<sup>DD</sup> では、分解が完全に抑えられることがわかった (Fig2)。これらの結果は、RecN の C 末端配列が ClpXP プロテアーゼによる分解シグナル配列として機能していることを示している。

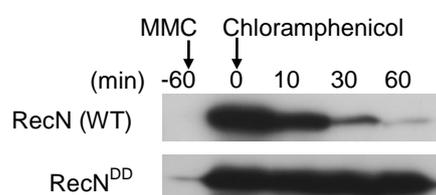


Fig2. The proteolytic stability of RecN and RecN<sup>DD</sup>.  $\Delta recN$  cells containing an SOS-inducible *recN* (pRecN) or *recN*<sup>DD</sup> (pRecN<sup>DD</sup>) plasmids were analyzed as in Fig 1.

次に、RecN の生細胞における動態制御を明らかにするため、自身の SOS プロモーターの下流に GFP を N 末に融合した GFP-RecN を作成し、生細胞における蛍光観察を行った。この GFP-RecN は野生型 RecN と同等の DNA 損傷修復機能を有しており、MMC 処理や  $\gamma$  線照射後に GFP フォーカスの形成が観察された。さらに、DAPI による核様体染色と重ね合わせたところ、GFP のフォーカスが、核様体上と細胞質上の 2 カ所に局在していることがわかった。非 DNA 損傷下で GFP-RecN を強制的に発現した場合は細胞質中のフォーカスのみ観察されたことから、核様体上のフォーカスは DNA 損傷に依存したものであり、一方、細胞質中のフォーカスは RecN の非特異的な凝集体 (集合体) であると考えられる (Fig3)。次に、*clpX* 破壊株において、GFP-RecN のフォーカス形成を観察したところ、DNA 損傷剤の除去後にも野生型株で起こるフォーカスの消失が起こらず、さらにこれらフォーカスの大部分

が細胞質中の凝集体であることがわかった。この結果は、ClpXP プロテアーゼが RecN の細胞質中の凝集体排除に重要な働きをしていることを示している。

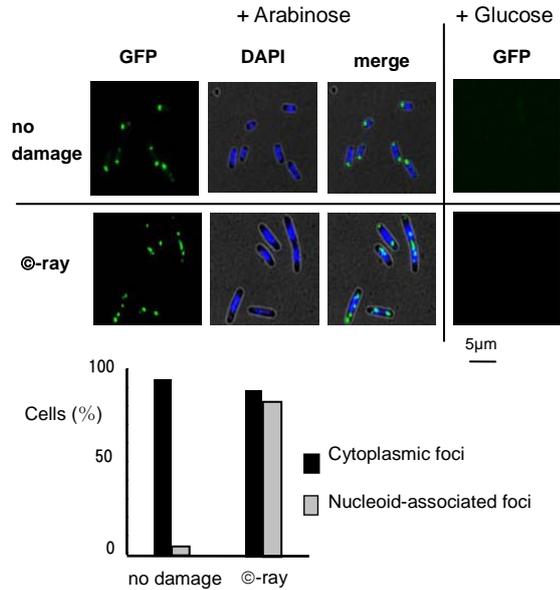


Fig3. RecN foci in cells with or without DNA damage. *Upper panel*; Localization of the GFP-RecN focus in the absence or presence of DNA damage. Cells containing an arabinose-inducible GFP-*recN* gene were exposed to  $\gamma$ -rays (200Gy) followed by the addition of arabinose (0.04%) to induce GFP-*recN*. The panels show GFP, DAPI, and GFP/DAPI-merged images of cells at 30 min after incubation in the presence of arabinose. Glucose control is shown at the right. *Lower panel*; Quantitative analysis of GFP-RecN foci. For cells with or without  $\gamma$ -rays, approximately 300 cells were examined.

ClpXP による細胞質 RecN 凝集体排除の生理的な意義を明らかにするため、*clpX*破壊株及び *recN<sup>DD</sup>* 変異株の DNA 損傷剤に対する感受性テストを行った。これまで、*clpX*破壊株は DNA 損傷剤に対して感受性を示さないことが知られていたが、今回、MMC 存在下で、一般に実験レベルで処理される時間より長い時間（2～10時間）大腸菌を培養したところ、*clpX*破壊株は、野生型に比べ1%以下の生存率（10時間培養後）となることを見いだした (Fig4)。また、*recN<sup>DD</sup>*変異株も短時間（1時間）の培養では、野生型と同程度の修復活性を示す一方、長時間培養した場合は、野生型より明らかな感受性を示した (Fig4)。これらの結果は、ClpXP による RecN の分解が起こらない場合、長時間の慢性的損傷ストレスによって細胞質中に RecN 凝集体が過剰に蓄積し、細胞の生存率低下を引き起こしていることを示している。

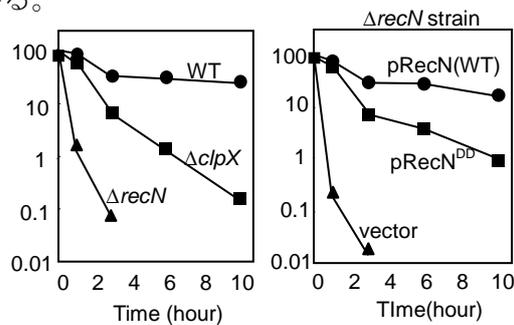


Fig4. Degradation of cytoplasmic RecN aggregates by ClpXP is important for cell viability. MMC sensitivity of *clpX* and *recN* cells. The bars represent the percentage of surviving wild-type (circle),  $\Delta clpX$  (square) and  $\Delta recN$  (triangle) cells after 10h of exposure to MMC. Survival of  $\Delta recN$  / pSCH19 (triangle),  $\Delta recN$  / pRecN (circle), and  $\Delta recN$  / pRecN<sup>DD</sup> (square) cells after 10 h of exposure to MMC.

## 考察

プロテアーゼは、様々な代謝プロセスの制御や、温度や DNA 損傷剤などの環境ストレス因子に対する細胞レベルでの適応応答に重要な役割を果たしている。本研究において、我々は RecN がタンパク質品質管理に関わる ClpXP プロテアーゼによって分解され、RecN の C 末端配列が ClpXP によって認識される分解シグナルとなっていることを明らかにした。また、GFP-RecN を用いた生細胞蛍光観察の結果、RecN は DNA 損傷に応答して核様体上にフォーカスを形成すると共に、細胞質中に凝集体を形成することを見いだした。さらに、ClpXP はこの凝集体の排除に必須の役割を果たしており、慢性的損傷ストレス環境下において *clpX* 変異などによって RecN 凝集体が過剰に蓄積した場合、細胞の生存率が大幅に低下することを明らかにした。この凝集体による生存率の低下の一つの可能性としては、慢性的損傷ストレス環境では、DNA 損傷の誘発とその修復が繰り返し起こっており、細胞質中の RecN の凝集体が過剰に蓄積すると、新規 RecN タンパク質の DNA 損傷部位へのリクルートが阻害されることで DNA 修復活性が阻害されることが考えられる。したがって、これらの結果は、ClpXP が DNA 損傷に依存して発現が誘導される RecN の積極的な分解を促進することで、DNA 損傷修復後の RecN の細胞質中の凝集体の蓄積を抑え、結果として、慢性的 DNA 損傷環境に対する適応や損傷後の細胞の増殖再開（脱適応）において重要な役割を果たしていることを示している。

今回、我々が新たに見いだした ClpXP プロテアーゼによる RecN 凝集体の分解や、*clpX* 欠損株が長時間の DNA 損傷ストレスのみに高感受性を示すという知見は、DNA 損傷修復におけるタンパク質品質管理の役割を明らかにすると共に、バクテリアにおいて慢性的 DNA 損傷ストレスに対する適応応答にタンパク質分解による制御が深く関与しているということを示している。DNA 損傷ストレスに長時間さらされることで繰り返し損傷を受け続けるという環境は、むしろ自然環境におけるバクテリアにとっては頻繁に起こりうる現象であり、ある種の抗生物質に対する耐性獲得なども含めて、この新たな細胞の恒常性維持機構の解明は、生理的に見てもバクテリアの環境因子に対する適応戦略として重要な機能であると考えられる。

## 研究発表

1. 永嶋浩二、柴田竜也、久保田佳乃、品川日出夫、菱田卓；「大腸菌 SMC 様タンパク質 RecN の機能解析」、日本分子生物学会（福岡、2005）
2. 永嶋浩二、久保田佳乃、柴田竜也、品川日出夫、菱田卓；「プロテアーゼによる RecN 分解制御機構の解析：DNA 損傷ストレスに対するバクテリア適応戦略」、日本遺伝学会 シンポジウム（筑波、2006）
3. 永嶋浩二、久保田佳乃、柴田竜也、品川日出夫、菱田卓；「プロテアーゼによる DNA 損傷ストレス環境に対するバクテリア適応戦略」、組換え・ゲノム再編ワークショップ（兵庫・淡路、2006）

誌上発表

1. Khoji Nagashima, Yoshino Kubota, Tatsuya Shibata, Chikako Sakaguchi, Hideo Shinagawa, Takashi Hishida; “Degradation of *Escherichia coli* RecN aggregates by ClpXP protease and its implications for DNA damage tolerance” J. Biol. Chem. 281:30941–30946, 2006.