

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22131010

研究課題名（和文）DNA-タンパク質クロスリンクとクロマチンリモデリング

研究課題名（英文）DNA-protein cross-links and chromatin remodeling

研究代表者

井出 博（IDE, HIROSI）

広島大学・理学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：30223126

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 101,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、DNA-タンパク質クロスリンク（DPC）の複製および転写を介した生物影響と修復機構解明に取り組んだ。その結果、DPCは、複製ヘリカーゼの進行を阻害し従来損傷とは異なるモードで複製を阻害すること、RNAポリメラーゼの渋滞を引き起こし誤りがちな合成モードに変化させることが明らかとなった。さらに、新規なDPC検出法を確立し、アルデヒド、放射線、抗がん剤によるDPC誘発と修復動態の分析を可能にした。クロマチンリモデリング複合体INO80のサブユニットRUVBL2ノックダウン細胞はDPC誘発剤にmoderateな感受性を示し、相同組換え修復への関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have assessed the biological effects and repair mechanism of DNA-protein cross-link (DPC) damage. DPCs inhibited the translocation of replicative helicases, showing a unique mechanism of replisome stalling. DPCs caused backup of RNA polymerases, resulting in error-prone transcription. We have established a novel method of DPC detection using fluorescence labeling, and analyzed the induction of genomic DPCs by aldehydes, ionizing radiation, and anticancer drugs and their repair. We also showed that knockdown of RUVBL2, an essential subunit of a chromatin remodeling complex INO80, conferred a moderate sensitivity to DPC-inducing agents, suggesting a role of the chromatin remodeling complex in homologous recombination.

研究分野：DNA損傷の生物影響と修復

キーワード：ゲノム損傷 DNA複製 転写 DNA修復

1. 研究開始当初の背景

複製、転写、修復では、DNA に結合した構造・制御タンパク質が一時的に解離あるいは転位し、遺伝情報の読み出しや復元作業を可能にする。しかし、多くの DNA 傷害性因子(放射線、変異原物質、抗がん剤)は、タンパク質を共有結合により不可逆的に DNA に固定化し DNA-protein cross-link (DPC) を誘発する。ゲノム損傷としての DPC の存在は 1960 年代から知られていたが、複製・転写を介した生物影響や修復機構については、最近までほとんど未解明の状態であった。当研究グループは、DPC の生物影響や修復機構について先導的な研究を行っており、本研究ではこれをいっそう発展させるとともに、クロマチンリモデリングの関与についても検討することとした。

2. 研究の目的

本研究では、以下の(1)~(3)を研究目的とした。

- (1) DPC の複製および転写影響を調べ、生物影響を明らかにする。
- (2) DPC の定量的な検出法を確立し、ゲノムにおける誘発および修復動態を明らかにする。
- (3) DPC 修復機構とクロマチンリモデリングの関与について検討する。

3. 研究の方法

- (1) 複製および転写影響については、DPC を部位特異的に導入した DNA 基質を用いて試験管内反応を行うとともに、細胞あるいは DPC を含むレポータープラスミドを用いて検討した。
- (2) 検出については、塩化セシウム密度勾配超遠心法により DNA を細胞・組織から精製し、蛍光標識を用いて DPC を定量した。さらに、原子間力顕微鏡を用いた直接検出法も検討した。
- (3) 修復機構については、相同組換えの役割を主に検討するとともに、siRNA を用いたクロマチンリモデリング因子のノックダウン影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 複製影響

複製では、フォークの先端で働くヘリカーゼが DNA 二本鎖を巻き戻し、一本鎖となった鋳型が後続の DNA ポリメラーゼに運ばれコピーされる。このような酵素の配置を考慮し、6 量体複製ヘリカーゼ(原核生物 DnaB、真核生物 MCM467 複合体等)に対する DPC の影響を調べた。ヘリカーゼが移動する DNA 鎖上の従来損傷はヘリカーゼの進行を阻害しなかったが、かさ高い DPC はヘリカーゼの中心チャンネルを通過できないため進行を阻害した。DnaB および MCM467 複合体が通過できる DPC の上限サイズは約 10 kDa であった(図 1)。したがって、移動鎖上の DPC は helicase

block、従来損傷は polymerase block として作用し、異なるモードで複製を阻害することが明らかとなった。一方、非移動鎖上の DPC はヘリカーゼの進行を阻害しなかった。さらに、DPC で停止した複製ヘリカーゼの安定性を調べたところ、半減期 15~36 分で DNA から解離することが分かり、複製フォークの崩壊が示唆された。helicase block で停止した複製フォークの再活性化機構を探るため、細胞を DPC 誘発剤(formaldehyde, 5-aza-2'-deoxycytidine)で処理し、相同組換え因子(RAD51 等)の核内 focus が形成されることを確認した。また、損傷乗り越え合成(TLS)欠損細胞が DPC 誘発剤に感受性を示したことから、複製再開につながる相同組換えに TLS DNA ポリメラーゼの関与が示唆された。

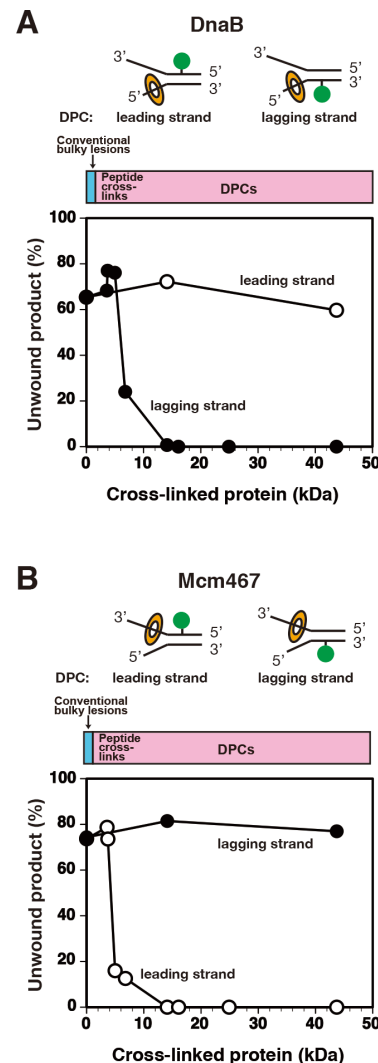


図 1 複製ヘリカーゼに対する DPC の影響 (A)原核生物 DnaB, (B) 真核生物 MCM467

(2) 転写影響

RNA ポリメラーゼ (RNAP) は、二本鎖 DNA を巻き戻し、一本鎖を鋳型に転写を行う。DPC の転写影響を明らかにするため、T7 RNAP をモデルとして転写反応を行った。転写鎖の DPC は転写を強く阻害したが、非転写鎖の DPC

の阻害効果は弱かった。転写鎖の DPC では RNAP の渋滞が起こり、進行を阻害された leading RNAP および後続の trailing RNAP は、ともに誤りがちな合成モードに変化し、損傷のない鋳型上での転写エラー頻度が 100 倍以上増加することを明らかにした (図 2A)。進行を阻害された RNAP の誤りがちな転写反応は、新規な転写エラー誘発機構である。さらに、trailing RNAP は leading RNAP のランダムな後退反応を抑制し DPC 乗り越え合成を促進することも示された。また、DPC を含む転写レポータープラスミドを培養細胞に導入し、ルシフェラーゼ遺伝子の転写活性を調べた。その結果、DPC が哺乳類 RNAPII の転写を阻害することも明らかとなった (図 2B)。

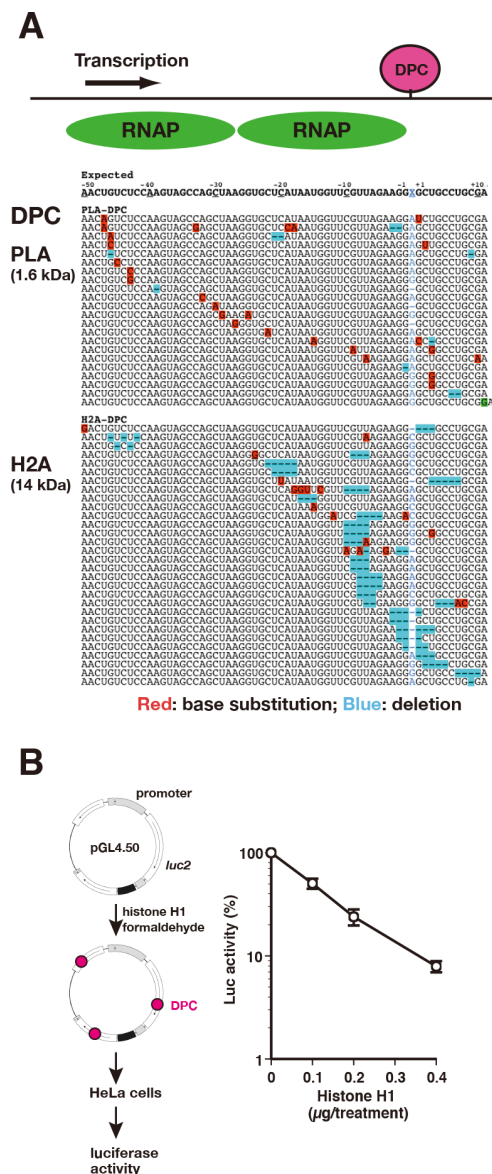


図 2 DPC の転写影響 (A) 渋滞した T7 RNAP の転写エラースペクトル, (B) ルシフェラーゼ遺伝子転写に対する影響

(3) DPC 検出と細胞内動態
ゲノムにおける DPC の誘発・除去動態は本

研究の基盤をなすことから、クロスリンクタンパク質の蛍光標識 (FITC, DyLight550) を用いた新規な DPC 定量法を確立した。

DPC 誘発剤としてアルデヒド化合物で処理した細胞から経時的に DNA を単離精製し DPC を定量した。ゲノム DPC は半減期 5-8 時間で減少し、この反応の主経路は自発的な加水分解であり、ヌクレオチド除去修復は関わっていないことを明らかにした。さらに、各アルデヒド化合物が誘発するゲノム DPC 量と姉妹染色分体交換 (SCE) 頻度の間に正の相関が認められ、DPC 処理に対する相同組換えの直接的なリンクが示唆された。

放射線については、マウス移植腫瘍を X 線および炭素イオン線で照射し、蛍光標識により DPC を定量した。DPC は線量依存的に増加したが、X 線・炭素イオン線ともに、常酸素腫瘍に比べ低酸素腫瘍の方が生成量は多かった。また、高 LET 放射線である炭素イオン線の方が X 線に比べ DPC 生成量は多かった。これらの結果から、放射線による DPC 生成は、細胞の酸素分圧と放射線の電離密度に依存することが示された。また、放射線誘発 DPC には二つの成分があり、速やかに除去される DPC (30%, 半減期 0.65~1 時間) と除去されにくい DPC (70%, 半減期 63~70 時間) があること分かった (図 3)。後者は、放射線誘発 DNA 二本鎖切断 (DSB) の長半減期成分 (半減期 4~5 時間) に比べ長期にわたりゲノムに残留し、ゲノム不安定性に関与する可能性が示唆された。

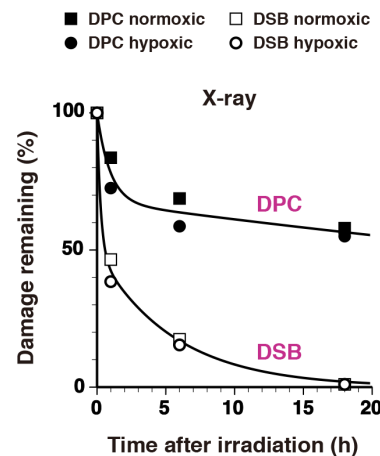


図 3 X 線誘発 DPC と DSB の除去動態

次に、他の DNA 損傷との生物影響を比較するため、DPC 由来の蛍光を calibration し、単位線量 (1 Gy) あたりの生成数を求めた。その結果、常酸素下における DPC の生成数は、ピリミジン塩基損傷、プリン塩基損傷、DNA 一本鎖切断と同程度であることが明らかとなった。

抗がん剤については、培養細胞を DNA 代謝酵素阻害剤で処理し、DNA を精製後、原子間力顕微鏡で DPC を観察した。未処理の細胞では DPC はわずかにしか観察されなかったが、

処理後には明確な増加が認められた。topoisomerase I 阻害剤および DNA methyltransferase 阻害剤では DNA 鎖内部に DPC が認められたのに対し、topoisomerase II 阻害剤では、DNA 鎖末端に DPC が認められた (図 4)。現在、サンプル数を増やし、観察された DPC 部位に複製フォーク様の構造がないか調べている。

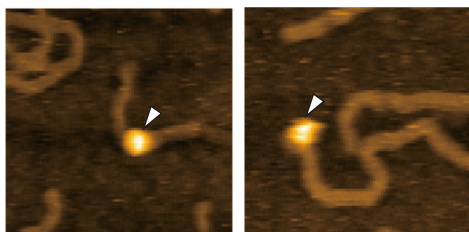


図 4 原子間力顕微鏡による DPC 観察(矢印)
(左) DNA 鎖内部の DPC, (右) DNA 鎖末端の DPC

(4) 修復機構とクロマチンリモデリング

相同組換え欠損 CHO 細胞 (XRCC3, RAD51D) が DPC 誘発剤高感受性を示したことから、DPC で停止した複製フォークの再活性化に、相同組換えが関与していることが示唆された。酵母では、DNA 二本鎖切断切断の相同組換え修復にクロマチンリモデリング複合体 (INO80) が関与していることが報告されている。そこで、DPC で停止した複製フォークの再活性化にクロマチンリモデリングが関与しているか検討した。INO80 および TIP60 複合体の必須サブユニットである RUVBL2 を siRNA でノックダウンし、5'-aza-2'-deoxycytidine (azadC) および cisplatin (cisPt) に対する感受性を調べた (図 5)。ノックダウン細胞は、azadC・cisPt とともに感受性を示したが、感受性は相同組み換え欠損細胞に比べ低かった。他のリモデリング複合体による補償経路が関わっている可能性が示唆された。

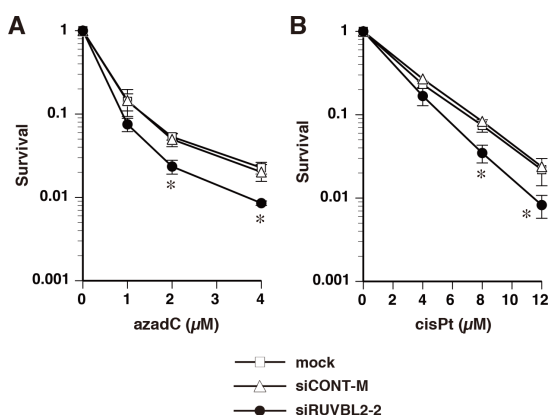


図 5 RUVBL2 ノックダウン細胞の (A) azadC および (B) cisPt 感受性

5. 主な発表論文等

(研究代表者び連携研究者に下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Nakano T., Mitsusada Y., Salem A., Shoulkamy M., Sugimoto T., Hirayama R., Uzawa A., Furusawa Y., and Ide H. Induction of DNA-protein cross-links by ionizing radiation and their elimination from the genome. *Mutat. Res.*, 771, 45-50 (2015). 査読有 DOI:10.1016/j.mrfmmm.2014.12.003
2. Tokuyama Y., Furusawa Y., Ide H., Yasui A., and Terato H. Role of isolated and clustered DNA damage and the post-irradiating repair process in the effects of heavy ion beam irradiation. *J. Radiat. Res.*, 56, 446-455 (2015). 査読有 DOI: 10.1093/jrr/rru122
3. Matsumoto Y., Rodriguez V., Whitford T.A., Beeharry N., Ide H., and Tomkinson A.E. Synergistic enhancement of 5-fluorouracil cytotoxicity by deoxyuridine analogs in cancer cells. *Oncoscience*, 2, 272-284 (2015). 査読有 PMID: 25897430
4. Fukuyo M., Nakano T., Zhang Y., Furuta Y., Ishikawa K., Watanabe-Matsui M., Yano H., Hamakawa T., Ide H., and Kobayashi I. Restriction-modification system with methyl-inhibited base excision and abasic-site cleavage activities. *Nucleic Acids Res.*, 43, 2841-2852 (2015). 査読有 DOI: 10.1093/nar/gkv116
5. Miyamoto-Matsubara M., Han Y., Ono K., Xie M., Salem A., Shoulkamy M., Nakano T., and Ide H. Depletion of RUVBL2 in human cells confers moderate sensitivity to anticancer agents. *J. Cancer Sci. Ther.*, 6, 440-445 (2014). 査読有 DOI: 10.4172/1948-5956.1000306
6. Yamamoto R., Ohshiro Y., Shimotani T., Yamamoto M., Matsuyama S., Ide H., and Kubo K. Hypersensitivity of mouse NEIL1-knockdown cells to hydrogen peroxide during S phase. *J. Radiat. Res.* 55, 707-712 (2014). 査読有 DOI: 10.1093/jrr/rru021
7. Nakano T., Miyamoto-Matsubara M., Shoulkamy M.I., Salem A.H.M., Pack S.P., Ishimi Y., and Ide H. Translocation and stability of replicative DNA helicases upon encountering DNA-protein cross-links. *J. Biol. Chem.*, 288, 4649-4658 (2013). 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M112.419358

8. Shoukamy M. I., Nakano T., Ohshima M., Hirayama R., Uzawa A., Furusawa Y., and Ide H. Detection of DNA-protein crosslinks (DPCs) by novel direct fluorescence labeling methods: distinct stabilities of aldehyde and radiation-induced DPCs. *Nucleic Acids Res.*, 40, e143 (2012). 査読有 DOI: 10.1093/nar/gks601

9. Yamamoto R., Yamamoto M., Kusaka H., Masatsugu H., Matsuyama S., Tajima T., Ide H., and Kubo K. NEIL1 mRNA splicing variants are expressed in normal mouse organs. *J. Radiat. Res.*, 53, 234-241 (2012). 査読有 DOI:10.1269/jrr.11029

10. Nakano T., Ouchi R., Kawazoe J., Pack S.P., Makino K., and Ide H. T7 RNA polymerases backed up by covalently trapped proteins catalyze highly error prone transcription, *J. Biol. Chem.*, 287, 6562 - 6572 (2012). 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M111.318410

11. Ide H., Shoukamy M. I., Nakano T., Miyamoto-Matsubara M., and Salem A. Repair and biochemical effects of DNA-protein crosslinks, *Mutat. Res.*, 771, 113-122 (2011). 査読有 DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2010.12.007

12. Matsumoto N., Toga T., Hayashi R., Sugawara K., Katayanagi K., Ide H., Kuraoka I., and Iwai, S. Fluorescent probes for the analysis of DNA strand scission in base excision repair. *Nucleic Acids Res.*, 38, e101 (2010). 査読有 DOI: 10.1093/nar/gkq022

[学会発表] (計 51 件)

1. Ide H. Formation and repair of DNA-protein cross-link damage. 13th International Workshop on Radiation Damage to DNA, Cambridge, USA, 2014. 6. 14-18

2. Ide H., Nakano T., and Shoukamy M. Induction and repair of DNA-protein cross-links. International Conference on Coupling of Replication, Repair and Transcription, and Their Common Mechanism of Chromatin Remodeling, Kyoto Univ., Kyoto, 2014. 2. 4-5

3. Ide H., Nakano T., Miyamoto-Matsubara M., and Shoukamy M. Effects of covalently trapped proteins on DNA transactions. 1st International Symposium of the Mathematics on Chromatin Live Dynamics,

Hiroshima Univ., Higashi-Hiroshima, 2013. 3. 14-15

4. Ide H. Induction and repair of DNA-protein cross-link damage. 28th RBC-NIRS International Symposium - Radiation-associated Repair Proteins and DNA Repair Network. COOP Inn Kyoto, Kyoto, 2012. 11. 29-30

5. Ide H. Detection and biological consequences of DNA-protein crosslink damage. 12th International Workshop on Radiation Damage to DNA, Prague, Czech Republic, 2012. 6. 2-7

6. Ide H. and Nakano T. Unique properties of DNA-protein cross-links as a barrier to transcription and replication. 4th US-Japan DNA Repair Meeting, Leesburg, USA, 2012. 4. 11-14

7. Ide H. Genotoxic effects and repair of DNA-protein crosslink damage. NIRS International Symposium on Radiation Life Sciences, NIRS, Chiba, 2010. 6. 11-12

[図書] (計 1 件)

1. Ide H., Nakano T., Shoukamy M., and Salem A. Formation, repair, and biological effects of DNA-protein cross-link damage. In *DNA Repair* (Chen C. ed.), InTech, in press.

[その他]

ホームページ

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/genechem/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井出 博 (IDE HIROSHI)

広島大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 30223126

(2) 連携研究者

中野 敏彰 (NAKANO TOSHIKI)

広島大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号: 10526122