

令和元年5月7日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02957

研究課題名(和文)複製停止解除におけるポリメラーゼネットワーク制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the regulatory network of polymerases upon replication arrest

研究代表者

廣田 耕志(hirota, kouji)

首都大学東京・理学研究科・教授

研究者番号：00342840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：複製はDNA損傷により頻繁に停止している。この停止解除には、以下の3つの機構が関わっている。1つ目は、損傷乗り越え修復と呼ばれる損傷を乗り越えて複製を継続するDNA変異につながる機構である。2つ目は損傷下流からのリプライミグ機構である。3つ目は最近我々が発見した複製ポリメラーゼ自身がその場で乗り越えを行いDNA変異を誘導する機構である。この研究では、これら3経路の関係を調査し、これらの経路はそれぞれが相補的に働いていることを明らかにした。さらに、1つ目の機構に関わるYファミリーポリメラーゼのポリメラーゼ、の関係を調査し、これらが損傷の種類ごとに使い分けをしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究ではDNA損傷応答に関わる3つの経路の相補性を明らかにした。このような経路間の相補的関係性は、近年新しいガン治療への応用に期待が向けられている。ガン細胞の一般的性質としてなんらかのゲノム維持システムが変異で減弱していることが知られている。この減弱経路と相補的関係にある経路を阻害することでガン細胞を特異的に細胞死に追い込むことが可能である。本研究で得られた知見を今後さらに発展させ、さらなるポリメラーゼ、ゲノム維持ネットワークを包括的に理解することで革新的なガン治療に繋げていきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Genome replication is stalled by unrepaired damage, potentially leading to fork collapse, mutagenesis, and genome instability. Eukaryotic cells have evolved several mechanisms to complete replication beyond a damaged template. The first is translesion DNA synthesis (TLS), which employs specialized DNA polymerases, including Polymerase to permit continued replication beyond the damaged template. A second mechanism, in which DNA primases play a role, involves the repriming of DNA synthesis downstream from the lesion or structure. A third mechanism, in which DNA polymerase delta continues replication across damaged template, leading mutagenic replication. In this study, we analyzed relationship between these three classes of DNA damage tolerance systems and found these mechanisms complementary play roles. Moreover, we also analyzed the relationship in Y-family TLS polymerases (Pol-eta, iota and kappa) and found the division of labor in these enzymes by the type of DNA damages.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA損傷 複製 変異 損傷乗り越え

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線や化学物質によって引き起こされる DNA の変異は発ガンや遺伝的影響などの確率的影響につながる。このような DNA 変異は正確性の低いポリメラーゼが正確なポリメラーゼである複製ポリメラーゼの機能を肩代わりしてゲノム複製を行う際に誘導される。損傷乗り越え複製機構と呼ばれる機構が働く際に、正確性の低いポリメラーゼがゲノム複製を行う。すなわち、DNA の損傷部位で複製ポリメラーゼが停止した際に、乗り越え複製機構が損傷部分を乗り越えて DNA 複製を継続する際に変異が誘導されるのである。損傷乗り越え複製では、損傷した DNA を鋳型に用いてヌクレオチドを挿入できる TLS ポリメラーゼと呼ばれる正確性の低い酵素が関わっている。細胞内には様々な種類の TLS ポリメラーゼが存在しており、DNA 損傷の種類ごとに作業分担があると考えられている。例えば、紫外線の損傷にはポリメラーゼ η (イータ) が効果的に働き変異を避けて損傷乗り越えを行うが、他の酵素が誤って働くと変異につながる。しかし、損傷の種類ごとの詳細な作業分担や、制御機構については、ほとんどわかっていない。さらに、申請者は複製ポリメラーゼ δ が POLD3 サブユニットに依存して損傷を乗り越える新規の乗り越え機構を発見している。しかし、この新規の損傷乗り越え機構と従来の TLS ポリメラーゼの乗り越え機構との関係など、不明のままであった。

2. 研究の目的

損傷 DNA で停止した複製フォークの停止解除には、①損傷乗り越えポリメラーゼ(以下 TLS ポリメラーゼと表記)の損傷乗り越えと②損傷下流からの再開の経路とが中心的に働く。これら経路でポリメラーゼ群による DNA 複製が中心的な役割を担っている。しかし、①と②経路の関係や、使用する TLS ポリメラーゼの選択機構は分かっていない。さらに本研究では、申請者が独自に発見した、第3の経路：複製ポリメラーゼによる損傷乗り越え経路と既知の①~②の経路の関係や役割分担を研究し、ポリメラーゼネットワークの制御機構の解明を行う。また、複製ポリメラーゼの DNA 損傷応答における新規機構の解明を合わせて行う。

3. 研究の方法

本研究では、研究方法において作製した細胞株や実験手法も成果の一部であるので方法について4の項目に含めて記載する。

4. 研究成果

損傷乗り越え機構と損傷部位下流から複製再開 (リプライミング機構) の分担の解明

DNA 複製は、鋳型鎖上の DNA 損傷部位において頻繁に停止している。この停止を解除する機構として、DNA 損傷乗り越え機構が知られている。この機構は複製ポリメラーゼから、忠実度の低い TLS ポリメラーゼにスイッチすることで損傷部位でのその場しのぎの複製を継続することが知られている、このほか、下流からの複製のリプライミング機構も複製停止解除に寄与することが知られている。申請者は TLS ポリメラーゼの Pol η - ζ とリプライミングに必要な PrimPol の関係を調査し、紫外線などの DNA 損傷に対する応答において、相補的に機能することを示した (図1)。

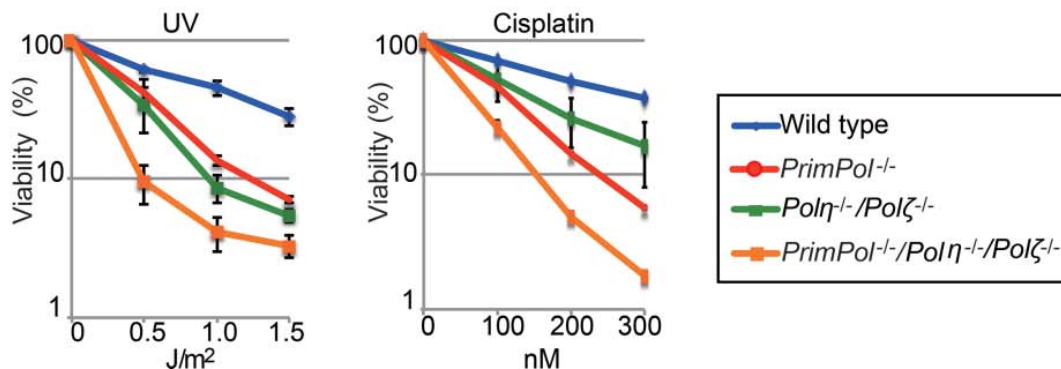


図1 ニワトリ DT40 細胞より PrimPol 遺伝子 (赤) や Pol η - ζ (緑) や両経路 (オレンジ) の破壊細胞を作製し、紫外線 (左) シスプラチン (右) に対する生存率を測定した。縦軸は生存率、横軸は線量及び薬品濃度を表す。Kobayashi *et al.* 2016 *Cell cycle* より

複製ポリメラーゼによる乗り越え機構と TLS 機構の関係性

申請者は TLS ポリメラーゼの Pol η - ζ と複製ポリメラーゼ δ による乗り越え活性化に寄与する POLD3 の関係を調査し、これらが相補的に細胞生存に必須の働きをしていることを示した。さらに Pol δ の損傷乗り越え活性を、この酵素の校正エキソヌクレアーゼ活性を変異で潰すことによって実験的に上昇させ、Pol η - ζ /POLD3 三重破壊細胞の致死性がレスキューされることを示した (図2)。

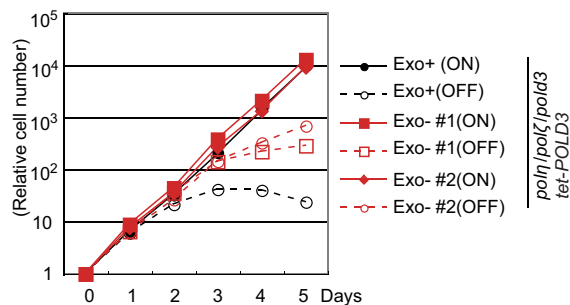


図2 ニワトリ DT40 細胞より Pold3 遺伝子や Pol η - ζ や両経路 (黒点線-丸) の破壊細胞を作製した。横軸は培養時間、縦軸は細胞数を表す。三重破壊細胞は細胞増殖が遺伝子破壊後に停止する。この細胞に Pol δ の校正エキソヌクレアーゼ活性を変異で潰す (赤点線) と増殖不良が回復する。Hirota *et al.* 2016 *Nucleic acids res.* より

Y-family ポリメラーゼの作業分担

TLS ポリメラーゼの Pol η は酵母で特にその働きが研究され、紫外線による損傷 (チミンダイマー) の乗り越えに重要であることが知られている。この酵素は、酵母からヒトまで保存されており、ヒトでは 3 種類存在する。これらは構造の類似性から Y-family ポリメラーゼと呼ばれている。しかし、これら酵素の作業分担は不明のままであった。申請者は、ヒトリンパ球細胞 TK6 から Pol η とその近縁酵素 Pol ι 及び Pol κ の 2 重破壊や、すべてを欠損した三重破壊細胞を系統的に作製し、それら酵素の損傷ごとの使い分けについて研究した。その結果、損傷の種類 (酸化、アルキル化、紫外線によるチミン二量体) ごとに異なる酵素の要求性があり、酵素の使い分けがあることを見出した (図 3)。

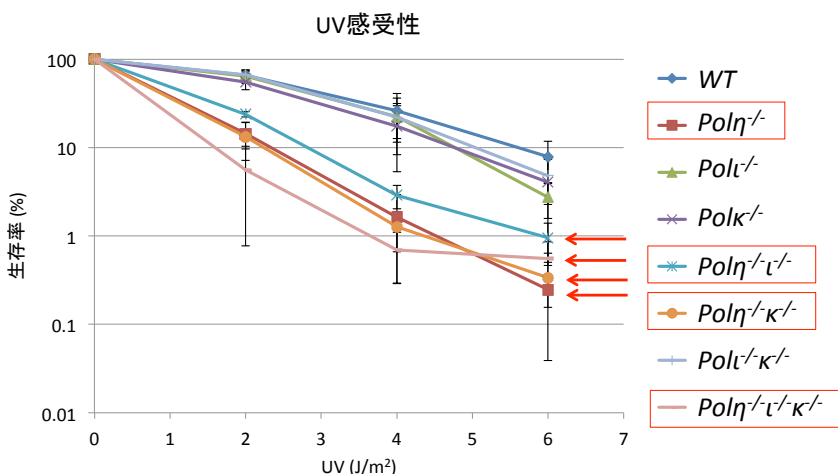


図3 TLS ポリメラーゼ Pol η とその近縁酵素 Pol ι 及び Pol κ の遺伝学的関係。紫外線感受性を調査した研究例を示す。縦軸は細胞生存率(%), 横軸は紫外線量を表す。(未発表データ)

複製ポリメラーゼ ϵ の校正エキソヌクレアーゼ活性のゲノム維持における機能

複製ポリメラーゼ ϵ の校正エキソヌクレアーゼ活性を変異で潰した細胞をヒト TK6 細胞より作製した (Pol ϵ^{exo} 細胞)。Pol ϵ^{exo} 細胞はカンプトテシンに対し高い感受性を示した。カンプトテシンは、トポイソメラーゼ I を阻害し末端にトポイソメラーゼが共有結合した TopI-cc 複合体を形成する。このような損傷に複製フォークが遭遇すると二重鎖切断が発生する。この二重鎖切断の防止のためには、複製フォークの斑点による安全は停止が重要であることが知られている。申請者は、複製ポリメラーゼ ϵ の校正エキソヌクレアーゼ活性が、鋳型鎖同士の相同組換えを誘導することで、フォークの安全な停止に寄与するという新規機能を明らかにした (図 4)。

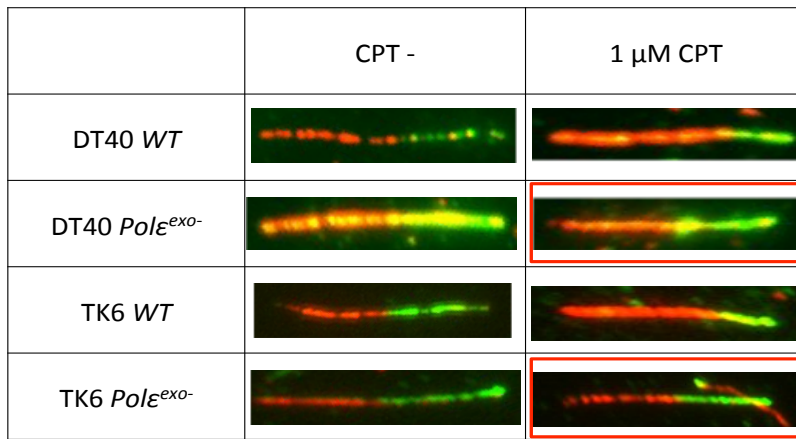


図4 ポリメラーゼ ϵ のエキソヌクレアーゼ活性を変異で潰した細胞 *Polε^{exo-}*細胞では、カンプトテシンによる DNA 損傷に応答した複製フォーク停止が不良である。赤で示す部分はカンプトテシン処理前 15 分の複製長を示す。緑で示す部分は、カンプトテシン処理後 15 分の複製長を示す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 22 件)

1. Tsuda M, Ogawa S, Ooka M, Kobayashi K, Hirota K, Wakasugi M, Matsunaga T, Sakuma T, Yamamoto T, Chikuma S, Sasanuma H, Debatisse M, Doherty AJ, Fuchs RP, Takeda S. PDIP38/PolDIP2 controls the DNA damage tolerance pathways by increasing the relative usage of translesion DNA synthesis over template switching. *PLoS One*. 14(3):e0213383. (2019) doi: 10.1371/journal.pone.0213383.
2. Senmatsu S, Asada R, Abe T, Hoffman CS, Ohta K, *Hirota K *lncRNA* transcriptional initiation induces chromatin remodeling within a limited range in the fission yeast *fbp1* promoter. *Sci Rep* 9: 299 (2019) doi: 10.1038/s41598-018-36049-0.
3. Abe T, Branzei D, Hirota K DNA Damage Tolerance Mechanisms Revealed from the Analysis of Immunoglobulin V Gene Diversification in Avian DT40 Cells. *Genes (Basel)* 9(2018) doi: 10.3390/genes9120614.
4. Taoka M, Nobe Y, Yamaki Y, Sato K, Ishikawa H, Izumikawa K, Yamauchi Y, Hirota K, Nakayama H, Takahashi N, Isobe T. Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome. *Nucleic Acids Res.* 46(18):9289-9298. (2018) doi: 10.1093/nar/gky811.
5. Abe T, Kawasumi R, Giannattasio M, Dusi S, Yoshimoto Y, Miyata K, Umemura K, Hirota K, Branzei D AND-1 fork protection function prevents fork resection and is essential for proliferation. *Nat Commun* 9: 3091 (2018) doi: 10.1038/s41467-018-05586-7.
6. Abe T, Ooka M, Kawasumi R, Miyata K, Takata M, Hirota K, Branzei D Warsaw breakage syndrome DDX11 helicase acts jointly with RAD17 in the repair of bulky lesions and replication through abasic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: 8412-8417 (2018) doi: 10.1073/pnas.1803110115.
7. Nakazato A, Kajita K, Ooka M, Akagawa R, Abe T, Takeda S, Branzei D, *Hirota K SPARTAN promotes genetic diversification of the immunoglobulin-variable gene locus in avian DT40 cells. *DNA Repair (Amst)* 68: 50-57 (2018) doi: 10.1016/j.dnarep.2018.06.003.

8. Saha LK, Kim S, Kang H, Akter S, Choi K, Sakuma T, Yamamoto T, Sasanuma H, Hirota K, Nakamura J, Honma M, Takeda S, Dertinger S Differential micronucleus frequency in isogenic human cells deficient in DNA repair pathways is a valuable indicator for evaluating genotoxic agents and their genotoxic mechanisms. *Environ Mol Mutagen* 59: 529–538 (2018) doi: 10.1002/em.22201.
9. Umeda M, Tsunekawa C, Senmatsu S, Asada R, Abe T, Ohta K, Hoffman CS, *Hirota K Histone Chaperone Asf1 Is Required for the Establishment of Repressive Chromatin in Schizosaccharomyces pombe fbp1 Gene Repression. *Mol Cell Biol* 38(2018) doi: 10.1128/MCB.00194-18.
10. Ooka M, Abe T, Cho K, Koike K, Takeda S, *Hirota K (2018) Chromatin remodeler ALC1 prevents replication-fork collapse by slowing fork progression. *PLoS One* 13: e0192421 doi: 10.1371/journal.pone.0192421.
11. Tsuda M, Terada K, Ooka M, Kobayashi K, Sasanuma H, Fujisawa R, Tsurimoto T, Yamamoto J, Iwai S, Kadoda K, Akagawa R, Huang SN, Pommier Y, Sale JE, Takeda S, Hirota K (2017a) The dominant role of proofreading exonuclease activity of replicative polymerase epsilon in cellular tolerance to cytarabine (Ara-C). *Oncotarget* 8: 33457–33474 doi: 10.18632/oncotarget.16508.
12. Tsuda M, Cho K, Ooka M, Shimizu N, Watanabe R, Yasui A, Nakazawa Y, Ogi T, Harada H, Agama K, Nakamura J, Asada R, Fujiike H, Sakuma T, Yamamoto T, Murai J, Hiraoka M, Koike K, Pommier Y, Takeda S, Hirota K (2017b) ALC1/CHD1L, a chromatin-remodeling enzyme, is required for efficient base excision repair. *PLoS One* 12: e0188320 doi: 10.1371/journal.pone.0188320.
13. Kawasumi R, Abe T, Arakawa H, Garre M, Hirota K, Branzei D (2017) ESCO1/2's roles in chromosome structure and interphase chromatin organization. *Genes Dev* 31: 2136–2150 doi: 10.1101/gad.306084.117.
14. Fujisawa R, Ohashi E, Hirota K, Tsurimoto T (2017) Human CTF18-RFC clamp-loader complexed with non-synthesising DNA polymerase epsilon efficiently loads the PCNA sliding clamp. *Nucleic Acids Res* 45: 4550–4563 doi: 10.1093/nar/gkx096.
15. Asada R, Umeda M, Adachi A, Senmatsu S, Abe T, Iwasaki H, Ohta K, Hoffman CS, Hirota K (2017) Recruitment and delivery of the fission yeast Rst2 transcription factor via a local genome structure counteracts repression by Tup1-family corepressors. *Nucleic Acids Res* 45: 9361–9371 doi: 10.1093/nar/gkx555.
16. Adachi A, Senmatsu S, Asada R, Abe T, Hoffman CS, Ohta K, Hirota K (2017) Interplay between chromatin modulators and histone acetylation regulates the formation of accessible chromatin in the upstream regulatory region of fission yeast fbp1. *Genes Genet Syst* doi: 10.1266/ggs.17-00018.
17. Yamamoto J, Takahata C, Kuraoka I, Hirota K, Iwai S (2016) Chemical Incorporation of Chain-Terminating Nucleoside Analogs as 3' -Blocking DNA Damage and Their Removal by Human ERCC1-XPF Endonuclease. *Molecules* 21 doi: 10.3390/molecules21060766.
18. Takemata N, Oda A, Yamada T, Galipon J, Miyoshi T, Suzuki Y, Sugano S, Hoffman CS, Hirota K, Ohta K (2016) Local potentiation of stress-responsive genes by upstream

- noncoding transcription. *Nucleic Acids Res* 44: 5174-89 doi: 10.1093/nar/gkw142.
19. Ooka M, Takazawa H, Takeda S, Hirota K (2016a) Cytotoxic and genotoxic profiles of benzo[a]pyrene and N-nitrosodimethylamine demonstrated using DNA repair deficient DT40 cells with metabolic activation. *Chemosphere* 144: 1901-7 doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.10.085.
 20. Ooka M, Kobayashi K, Abe T, Akiyama K, Hada M, Takeda S, Hirota K (2016b) Determination of genotoxic potential by comparison of structurally related azo dyes using DNA repair-deficient DT40 mutant panels. *Chemosphere* 164: 106-112 doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.
 21. Kobayashi K, Guillian TA, Tsuda M, Yamamoto J, Bailey LJ, Iwai S, Takeda S, Doherty AJ, Hirota K (2016) Repriming by PrimPol is critical for DNA replication restart downstream of lesions and chain-terminating nucleosides. *Cell Cycle* 15: 1997-2008 doi: 10.1080/15384101.2016.
 22. Hirota K, Tsuda M, Mohiuddin, Tsurimoto T, Cohen IS, Livneh Z, Kobayashi K, Narita T, Nishihara K, Murai J, Iwai S, Guilbaud G, Sale JE, Takeda S (2016) In vivo evidence for translesion synthesis by the replicative DNA polymerase delta. *Nucleic Acids Res* 44: 7242-50 doi: 10.1093/nar/gkw439.

[学会発表] (計 54 件)

1. 廣田耕志, In vivo evidence for translesion DNA synthesis by replicative DNA polymerase δ , US-JP DNA repair work meeting (カルフォルニア 2017 5月17日) 招待講演 ほかに 53 件

[図書] (計 1 件)

化学結合論 分子の構造と機能 分担執筆 2017年 NHK出版

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : 阿部 拓也

ローマ字氏名 : ABE Takuya

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。