

令和 6 年 3 月 21 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12598

研究課題名(和文)新規損傷乗り越えアッセイによる損傷乗り越えの鎖特異性の解明

研究課題名(英文)Analysis of Translesion synthesis (TLS) mechanism by novel assay method

研究代表者

廣田 耕志(Hirota, Kouji)

首都大学東京・理工学研究科・教授

研究者番号：00342840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷部位での複製停止の解除には損傷乗り越え機構が中心的な役割を果たす。この反応では損傷したDNAを鋳型に用いて複製を継続することのできるTLSポリメラーゼと呼ばれる酵素群が関与することが知られているが、損傷の種類に対しどのポリメラーゼが選ばれて作用するのかほとんど分かっていない。例えば、紫外線の損傷にはポリメラーゼ(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。本研究では、損傷乗り越え時の変異パターンや損傷乗り越え頻度をシークエンス解析することで、損傷乗り越えの効率や、使われるポリメラーゼ酵素について解明する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで不明であった損傷乗り越え機構において機能するTLSポリメラーゼ群の包括的多重変異細胞を作成し、これらポリメラーゼ酵素群の関係性を明らかにすることができた。この機構は、発癌につながるDNA変異に関わるため、癌発生のメカニズムに住むにつなるとともに、新規のがん治療法開発につながる知見であり社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Translesion DNA synthesis (TLS) is pivotal for releasing replication arrest at DNA damage on the template strand. TLS polymerases are involved in this bypass replication across damaged template. However, the mechanism to select a polymerase to carry out TLS across some specific damage has not been elucidated. For the bypass of UV induced T-T dimer damage, Polymerase- ϵ can replicate in error free manner, while other TLS polymerases induce replication errors during TLS and thereby induce mutations. In this study, we employed novel TLS assay using artificial damaged oligo DNAs and revealed selectivity of TLS polymerase to the kind of DNA damage.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA損傷 損傷乗り越え TLSポリメラーゼ 変異

1. 研究開始当初の背景

放射線など変異原による発ガンや遺伝的影響などの確率的影響は、DNA の変異が原因であると考えられている。DNA の損傷部位で停止した複製の再開を行う乗り越え複製機構が、DNA 変異の主要な原因であると考えられている。乗り越え複製では、損傷した DNA を鋳型に用いヌクレオチドを挿入できる TLS ポリメラーゼと呼ばれる特別な酵素が関わることが知られている。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 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ことを発見している。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

本課題では、化学合成した損傷 DNA を染色体に導入し、細胞内で複製させるアッセイなど、多面的な細胞生物学的アプローチで研究を推進し、複製ポリメラーゼ δ が POLD3 サブユニットに依存して行う TLS と従来知られている TLS ポリメラーゼによる乗り越え機構の使い分けや関係について解明した。

3. 研究の方法

本研究では、研究方法を作成する部分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

(1) ポリメラーゼ ζ - η 経路と複製ポリメラーゼ δ による TLS の関係

申請者は、ポリメラーゼ ζ と η が様々な広い範囲の損傷の種類に対して一緒に働くことを以前示していた (Hirota et al 2010 PLoS Genetics)。そこで、主要な TLS ポリメラーゼ 2 種 ζ と η を欠損した $POL \zeta^{-/-} POL \eta^{-/-}$ 細胞、 $POLD3^{-/-}$ 細胞、両経路を同時に欠損した $POL \zeta^{-/-} POL \eta^{-/-} POLD3^{-/-}$ 細胞を作成した。この3重破壊のために、テトラサイクリン添加時のみ細胞中の $POLD3$ 発現が消える条件変異を利用した。テトラサイクリン添加後、3重破壊細胞は3日以降で細胞増殖が停止した (図1の Exo+(OFF))。このことから、細胞生存にとって TLS ポリメラーゼ ζ と η の経路と、複製ポリメラーゼ δ が POLD3 サブユニットに依存して行う TLS 経路が相補的関係にあることがわかった。複製ポリメラーゼ δ による損傷乗り越えでは、複製ポリメラーゼ δ 内在する校正エキソヌクレアーゼ活性は、TLS の妨げとなる。それは、損傷部位に取り込んだヌ

クレオチドは正しいワトソンクリック塩基対を作れないので、損傷とみなされ即時に除去されるからである。そこで、この3重破壊細胞に $POLD1^{exo-}$ 変異を導入して4重変異細胞を作成した。4重変異細胞 (図1 Exo-(OFF)) では Exo+(OFF) と比較して有意に生存の回復が見られた。

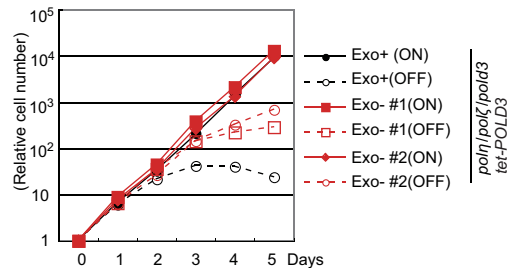


図1 テトラサイクリン添加後の細胞増殖。

(2) 脱塩基部位の乗り越え

脱塩基損傷は、遺伝情報を担う塩基を失う損傷であり、最も有毒な損傷の1つであるにもかかわらず、細胞あたり1日に1万回以上発生する多発損傷である。この損傷の乗り越え効率は、ニワトリ免疫遺伝子座での体細胞超変異の効率で測定した、細胞において AID (デアミネースの一種) を過剰発現させると、免疫遺伝子座中で C→U の変化が起こり、塩基除去修復が働くと U が除去され中間体として脱塩基損傷が発生する。この中間体に、複製フォークが遭遇すると TLS に依存した体細胞超変異が引き起こされる。

ニワトリ DT40 細胞から主要な TLS ポリメラーゼ 2 種を欠損した $POL \zeta^{-/-} POL \eta^{-/-}$ 細胞は、この体細胞超変異の効率はほとんど低下しなかった。一方、 $POLD3^{-/-}$ 細胞では 20% 程度まで低下していた (図2)。さらに、この低下は、 $POLD1^{exo-}$ 変異によってレスキューされた。この事実から、脱塩基損傷の乗り越えにおいて、複製ポリメラーゼ δ による損傷乗り越えが重要な働きをしており、POLD3 による促進と校正エキソヌクレアーゼ活性による阻害が拮抗的に作用していることが示唆された。

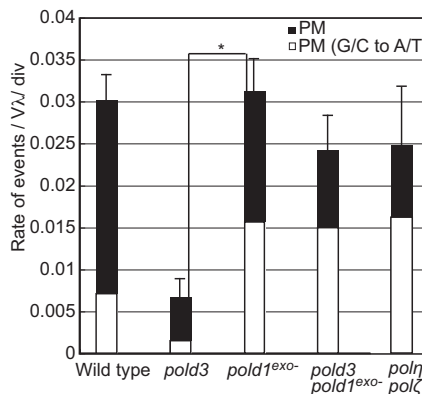


図2 免疫グロブリン遺伝子の体細胞超変異の効率。白で示す部分は G が A に変化した部分で Pol δ によると考えられている。

(3) T-T ダイマーの乗り越え反応

次に紫外線によって誘導される TT-ダイマーを細胞内に導入した。この損傷は、化学合成オリゴ DNA を用いて、図 3 に示すような両方の鎖に損傷が入った損傷乗り越えによってのみ複製されるような、生理的には存在しない形で導入した。このような状況を作ることによって、乗り越え反応のみを選択的に解析することに成功した (図 3)。

主要な TLS ポリメラーゼ 2 種 ζ と η を欠損した *POL ζ ^{-/-} POL η ^{-/-}* 細胞は、TT ダイマーの複製が不正確になっていた。このことからポリメラーゼ ζ と η が働かない場合には、不正確に複製を行う酵素によって複製が肩代わりされていることがうかがわれる。この細胞に *POLD1^{exo}*-変異を導入し、ポリメラーゼ δ による TLS を活性化させると、大きく正確性が回復することから、ポリメラーゼ δ はポリメラーゼ ζ と η 不在時には、正確に複製するためのバックアップ経路として機能することがわかった (図 4)。

さらに、UV 処理後の複製速度を DNA ファイバーアッセイで検定した。この実験では、チミジン類似体化合物である、IdU と CldU を 15 分間ずつ複製中の DNA 鎖に取り込ませて、DNA をスライドガラス上に展開して免疫染色することで複製長を測定する実験である。IdU と CldU 処理の間に UV 照射を行い、照射前と照射後の DNA 複製長の比を出した。図 5 に示すように UV 照射後の CldU の取り込み長が、*POLD3^{-/-}* 細胞では顕著に低下していた。この低下は、*POLD1^{exo}*-変異を導入することで正常レベルまで回復することがわかった。このことから、紫外線処理後の複製に、ポリメラーゼ δ が貢献できることが強く示唆された (図 5)。

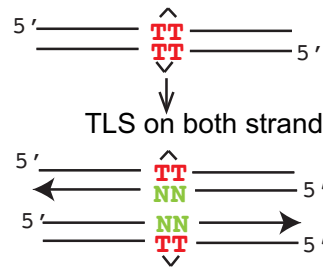


図 3 合成損傷 DNA の染色体導入による、損傷乗り越え反応の選択的な観測方法

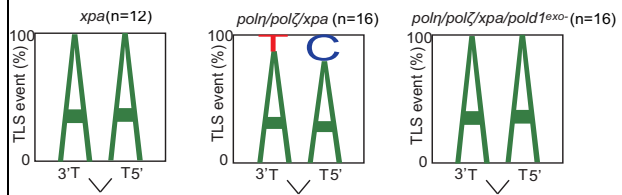


図 4 各変異細胞での変異率。XPA-ヌクレオチド除去修復酵素を欠損した背景の細胞で実験した。

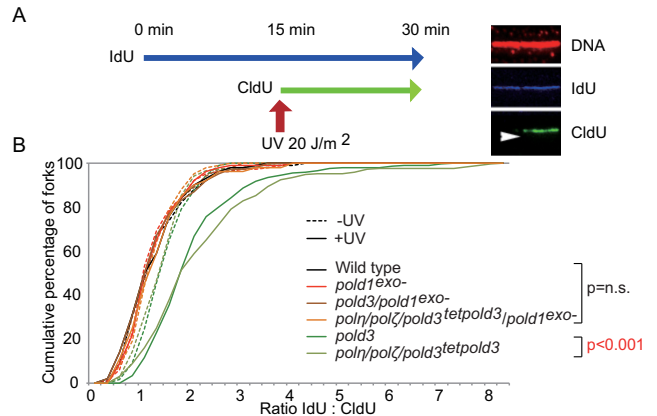


図 5 DNA ファイバー実験による UV 処理後の複製長の変化。

(A) チミジン類似体化合物 IdU と CldU による DNA 標識方法。代表的なファイバーの図 (B) 各種変異細胞の IdU/CldU の比を積算して表示した。(横軸比、縦軸は累積表示)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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*
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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

13. 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

〔学会発表〕（計 45 件）

1. 廣田耕志, ALC1 クロマチンリモデリング因子のゲノム維持における働き, 分子生物学会（神戸 2017 12 月 7 日）
2. 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）
3. Kouji Hirota, Masataka Tsuda, Julian E. Sale, Shunichi Takeda 「In vivo evidence for translesion synthesis by the replicative DNA polymerase δ 」 10th 3R International Symposium (2016 年 11 月 松江)
4. Kouji Hirota, Masataka Tsuda, Julian Sale, Shunichi Takeda 「In vivo Evidence for translesion synthesis by the replicative DNA polymerase delta (Oral presentation)」 4th Meeting on DNA polymerases (2016 年 10 月 Paris)
5. 廣田耕志、安井明、萩朋男、原田浩、Yves Pommier、武田俊一「PAR結合蛋白質 ALC1/CHDL1とXRCC1による単鎖切断修復」第33回染色体ワークショップ第14回核ダイナミクス研究会合同研究会（2016 年1月宮城）

上記の他に 40 件

〔図書〕（計 1 件）

橋本健朗 化学結合論-分子の構造と機能
放送大学教材（分担執筆）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 耕志 (Hirota Kouji)
首都大学東京・理工学研究科・教授
研究者番号： 00342840

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 研究協力者

Sale Julian（英・ケンブリッジ大・教授）
Doherty Aidan（英・サセックス大・教授）
Branzei Dana（伊・IFOM 研究所・教授）
Keeney Scott（米・スローンケタリング癌研究所・教授）
Hoffman Charles S.（米・ボストン大・教授）
Pommier Yves（米・NIH・教授）