

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12824

研究課題名(和文) DNAポリメラーゼ(ゼータ)が誘発する変異の生成・抑制の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of mutation induction and suppression by DNA polymerase zeta

研究代表者

鈴木 哲矢(Suzuki, Tetuya)

広島大学・医系科学研究科(薬)・助教

研究者番号：20573950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：損傷乗り越えDNA合成を行うDNAポリメラーゼ(Pol)の1つであるPolは、損傷を乗り越えた後も十数塩基のDNA合成を行い損傷部位以外にも変異を誘発する。本研究では、ベンツピレンのグアニン付加体(BPDE-dG)をPolが乗り越え合成する際に誘発する変異の分子機構を解析した。低正確性のPolを発現する細胞では、BPDE-dGがリーディング鎖の鋳型鎖に含まれる場合に比較して、ラギング鎖の鋳型に含まれる場合の方が高い変異頻度を示すことを見出した。また、Polが誘発する変異にミスマッチ修復は関与していないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA polymeraseが損傷乗り越えDNA合成時に誘発する変異に合成鎖が影響しうることを明らかにすることができた。また、ミスマッチ修復はそれらの変異を抑制しない可能性も示した。今後、さらにその他の因子との関連を研究することによりPolによる変異誘発の分子機構の解明と発癌との関連を明らかにできることが期待される。また、本研究により開発したノックインによる標的遺伝子への変異導入法は効率的なモデル細胞/動物の作製への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：DNA polymerase (pol), which is one of translesion DNA polymerases, extends several nucleotides in an error-prone manner bypass through DNA lesions. In this study, the mechanisms of mutagenesis by pol in replication across benzopyrene diol epoxide-guanine adduct (BPDE-dG) were analyzed. BPDE-dG in the lagging strand template induced more mutations in cells expressing low-fidelity pol than that in the leading strand template. Moreover, mismatch repair could not suppress mutations mediated by translesion DNA synthesis across BPDE-dG by pol.

研究分野：DNA損傷

キーワード：損傷乗り越えDNA合成 DNAポリメラーゼ 変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

複数ある損傷乗り越え (TLS) 型 DNA ポリメラーゼ (Pol) の中でも、Pol ζ は TLS において重要な役割をしている Pol の 1 つであり、様々な損傷塩基の TLS に関わることが知られている。研究代表者は、ヒトの培養細胞を用いて、Pol ζ の触媒サブユニットである REV3 の DNA 合成の正確性に関わるアミノ酸である 2618 番目のロイシンをメチオニンに置換した変異細胞株 (REV3 L2618M) を作製し、野生型の細胞と比較して Benzo[a]pyrene-diol-epoxide (BPDE) や紫外線に対して高い突然変異感受性を示すことを明らかにした。さらに、この変異細胞株を用いて、BPDE の N²-グアニン付加体 (BPDE-dG) を部位特異的に含むシャトルプラスミドでの実験を行い、BPDE-dG の 5' 側の非損傷部位に同時に複数の変異が誘発されることを明らかとした。このことは、Pol ζ が、損傷塩基を乗り越えて DNA 合成を行った後、十数塩基の DNA 合成を行い、非損傷部位で変異を誘発することを示唆している。しかしながら、その変異誘発・抑制機構の詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、REV3 L2618M 変異細胞株と DNA 損傷を部位特異的に含むシャトルプラスミドを用いることにより、ヒト細胞内での Pol ζ による損傷塩基の TLS 時に誘発される変異とその抑制の分子機構を解明することを目的とした。また、目的たんぱく質の特定アミノ酸の機能を解析するために、内在性の目的とする遺伝子にアミノ酸置換を導入するための効率的なノックイン方法を開発することも目的とした。

3. 研究の方法

損傷塩基がリーディング鎖の鋳型およびラギング鎖の鋳型にある場合の影響を解析するため、シャトルプラスミドの変異検出用レポーターである *supF* 遺伝子直近の上流あるいは下流に SV40 複製起点を配置したシャトルプラスミドを構築し、化学合成した BPDE-dG を含むオリゴデオキシリボヌクレオチドを用いて *supF* 遺伝子中に BPDE-dG:C を部位特異的に含むプラスミドを作製した。作製したプラスミドをエレクトロポレーション法により Nalm-6 細胞の野生型および REV3 変異型 (REV3 L2618M) の細胞に導入し、培養した。培養後、細胞からプラスミドを回収後、指示大腸菌に導入して *supF* 変異体頻度を算出した。また、*supF* 変異体に含まれるプラスミドのシーケンス解析を行い、変異スペクトルを調べた。

ハイグロマイシン耐性遺伝子あるいはピューロマイシン耐性遺伝子の両側に piggyBac の ITR 配列を搭載したベクターに標的となる遺伝子の homology arm を挿入し、さらに、homology arm 内の目的部位と guideRNA の標的となる部位に変異を導入してターゲティングベクターを構築した。また、Cas9 と目的の遺伝子を標的とする 2 種類の guideRNA を発現するオールインワンベクターを構築した。直線化した両ターゲティングベクターと Cas9/guideRNA ベクターを培養細胞に共同導入し、ハイグロマイシンとピューロマイシンの両薬剤存在下で培養して得られたクローンについて、genotyping を行った。

4. 研究成果

正確性が低い Pol ζ (REV3 L2618M) を発現するミスマッチ修復欠損細胞において BPDE-dG がリーディング鎖の鋳型鎖にある場合に比較してラギング鎖の鋳型鎖にある場合の方が、*supF* 変異体頻度が上昇した。さらに、変異スペクトル解析の結果、損傷部位における変異では、BPDE-dG がラギング鎖の鋳型鎖にある場合では G:C → T:A 変異の割合が高く、リーディング鎖の鋳型鎖にある場合では、G:C → T:A 変異と G:C → C:G 変異が同程度の割合で観察された。また、損傷部位以外での変異では REV3 L2618M 細胞では、野生型細胞に比べて REV3 L2618M 変異細胞では、1-3 塩基の挿入変異の割合が多く、特に連続した塩基配列でのフレームシフト変異が多く見られた。また、BPDE-dG がラギング鎖の鋳型鎖にある場合において、損傷部位付近に 2-3 塩基並んだ変異が REV3 L2618M 変異細胞で多く見られた。さらに、BPDE-dG がラギング鎖の鋳型鎖にある場合では、損傷導入部位近傍の上流に変異が多く見られたのに対し、リーディング鎖の鋳型鎖にある場合では上流と下流の両方で変異が見られ、また、損傷導入部位から離れた位置にも変異が見られた。ミスマッチ修復が正常な細胞と欠損している REV3 L2618M 変異細胞における *supF* 変異体頻度を比較したところ、大きな差は見られなかった。これらの結果は、Pol ζ が TLS 時に誘発する変異に、損傷塩基がいずれの鋳型鎖に存在するかは影響するが、ミスマッチ修復は変異誘発の抑制には関与しないことを示唆している。

Cas9 ニッカーゼを用いて転写鎖にニックを導入することで、非相同末端結合に対する相同組換えの頻度が高く、また、相同組換えの頻度は DNA 二重鎖切断を導入した場合と比較して大きく変わらないことを明らかにした。しかしながら、この方法では、標的遺伝子のノックインによる目的変異の導入は効率的に行うことはできなかった。そこで、2 種類の薬剤耐性遺伝子を有するターゲティングベクターを用いて、ターゲティングベクターの 5'-homology arm と 3'-homology arm に相当するゲノム配列の中央近傍をそれぞれ CRISPR/Cas9 で切断する方法により、両アレル同時に標的遺伝子に目的の変異を導入することができた。さらに、piggyBac トランスポゾンシステムを併用することでシームレスにゲノム DNA 中の標的配列に目的変異を導

入ることが可能なシステムを開発することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tetsuya Suzuki, Yuri Katayama, Yasuo Komatsu, Hiroyuki Kamiya	4. 巻 34
2. 論文標題 Large deletions and untargeted substitutions induced by abasic site analog on leading versus lagging strand templates in human cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 421-429
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/mutage/gez034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 鈴木 哲矢、紙谷 浩之
2. 発表標題 ニックにより誘発される変異および相同組換え
3. 学会等名 第57回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂倉直人、鈴木哲矢、紙谷浩之
2. 発表標題 DNAポリメラーゼ が損傷乗り越え合成時に誘発する変異へのDNA合成鎖の影響
3. 学会等名 第58回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木哲矢
2. 発表標題 核酸を基盤とした変異誘発の分子機構の解明および遺伝子治療法の開発
3. 学会等名 第58回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yudai Zaima, Tetsuya Suzuki, Hiroyuki Kamiya
2. 発表標題 OGG1-knockdown increases large deletions but decreases untargeted substitutions induced by 8-oxo-7,8-dihydroguanine
3. 学会等名 The Joint Meeting of The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens(ACEM) and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society(JEMS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Suzuki, Yuri Katayama, Hiroyuki Kamiya
2. 発表標題 Abasic site analog in lagging strand template induces mutations more frequency than that in leading strand template
3. 学会等名 The Joint Meeting of The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens(ACEM) and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society(JEMS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木哲矢, 紙谷浩之
2. 発表標題 転写鎖に生じたDNA一本鎖切断は非転写鎖に比較して変異および相同組換えをより高頻度で誘発する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島瑠璃子, 鈴木哲矢, 河合秀彦, 紙谷浩之
2. 発表標題 supF遺伝子変異解析のための新規大腸菌株の作製
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----