

## 自己評価報告書

平成23年 4月 4日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008~2012

課題番号：20310030

研究課題名 (和文) 突然変異誘発に関与する複製後修復経路の分子機構の解明に向けた  
生化学的基盤の確立研究課題名 (英文) Biochemical analysis of post-replication repair pathway involved in  
induced mutagenesis

研究代表者

増田 雄司 (Masuda Yuji)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：30273866

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：複製後修復・突然変異・損傷乗り越え DNA 合成

## 1. 研究計画の概要

放射線や環境変異原によって引き起こされる重要な生物影響の一つは突然変異の誘発であり、その分子メカニズムの解明は当該研究分野の重要課題である。放射線や環境変異原は多種多様な DNA 損傷を引き起こすが、DNA 損傷自体は変異ではなく、突然変異は DNA 複製 (おそらくは損傷塩基を鋳型とした複製) の課程で起こる生化学的反応の帰結である。DNA 損傷は DNA 修復機構により完全に除去されることはないので、複製の際 DNA ポリメラーゼは損傷 DNA に遭遇する。DNA 複製を忠実に進行複製型の DNA ポリメラーゼ (Pol  $\delta$  または Pol  $\epsilon$ ) はその忠実度ゆえに損傷塩基に対しては DNA 伸長反応を続けることができない。したがって、DNA 損傷 (特にチェックポイントが活性化しない程度の低レベルの障害) から細胞を保護するためには損傷を除去することなく DNA 合成を再開する複製後修復、Post-replication repair (PRR) と呼ばれる分子機構を必要とする。PRR には二つの経路があり、一つは忠実度の低い損傷乗り越え DNA ポリメラーゼ (Pol  $\eta$ , Pol  $\iota$ , Pol  $\kappa$ , REV1, Pol  $\zeta$ ) を介した Polymerase switch (PS) と、忠実度の高い DNA ポリメラーゼ、Pol  $\delta$  を介した Template switch (TS) 経路が存在する。PS 経路では忠実度の低い DNA ポリメラーゼが損傷塩基を直接鋳型としてヌクレオチドを重合する Translesion synthesis (TLS) により DNA 合成を再開する。しかしこの過程は error-prone (誤りがち) であり、突然変異誘発の原因となる。一方 TS 経路では、停止したプライマー末端が新生娘鎖とアニーリングすることにより損傷のない鋳型を使った DNA 合成を行う。一般的にこの過程は error-free である。これまでに酵母の遺

伝学的解析などから、PRR 経路に関与するタンパク質因子が多数同定された。しかし、それらの因子による PRR 経路の生化学的基盤は脆弱である。本研究の目的は、これまでに知られているヒトの PRR 関連タンパク質を網羅的に精製し PRR の二つの経路の生化学反応を試験管内で再構成し、その分子機構を解析することにある。本研究では、洗練された再構成系からでしか解明できない分子メカニズムに関する諸問題に焦点を絞り PRR 経路の生化学的基盤を確立することで、当該研究分野の発展に寄与することを目指している。

## 2. 研究の進捗状況

損傷乗り越え DNA 合成 (TLS) 経路の解析では、RAD6-RAD18 による PCNA のモノユビキチン化反応と、複製型の DNA ポリメラーゼ (Pol  $\delta$ ) が、損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼ (Pol  $\eta$ ) と交換する反応、を試験管内で再構成することに成功した (初年度)。二年目は、Pol  $\iota$ , Pol  $\kappa$  と REV1 がこの反応系に影響を及ぼすことを明らかにし、三年目は、複製型の DNA ポリメラーゼと REV1 の交換反応を解析した。

Template switch (TS) 経路の解析では、停止したプライマー末端が新生娘鎖とアニーリングし、損傷のない鋳型を使った DNA 合成を行うことにより DNA 合成を再開する。この反応は、SHPRH または HLTF タンパク質による PCNA のポリユビキチン化により制御されると考えられる。本研究では、PCNA のポリユビキチン化に始まる一連の生化学的反応を再構成し、TS 経路の生化学的実体の解析を目指している。初年度は、PCNA をポリユビキチン化するユビキチン E3 リガーゼのひとつ、HLTF の精製法を確立し、二年目は、HLTF が

実際に PCNA をポリユビキチン化する活性を持つことを証明した。三年目は、この反応機構を分子レベルで解析した。

### 3. 現在までの達成度

#### ②おおむね順調に進展している

本研究は精製したタンパク質の生化学的解析を中心とした研究を計画したが、予定したタンパク質因子の精製が順調に達成されていることから、今後の解析を予定通り行うことができると期待される。またこれまでの成果は、JMB に発表した論文が JMB の最も多くダウンロードされた論文の一つにリストされ、日本遺伝学会第 82 回大会での発表ではベストペーパー賞を受賞するなど、客観的評価も高い。

### 4. 今後の研究の推進方策

精製したタンパク質因子を使ってより詳細な分子機構の解析を行う。

### 5. 代表的な研究成果

(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 9 件)

1. Huang QM, Tomida S, Masuda Y, Arima C, Cao K, Kasahara TA, Osada H, Yatabe Y, Akashi T, Kamiya K, Takahashi T, Suzuki M. Regulation of DNA polymerase POLD4 influences genomic instability in lung cancer. *Cancer Res.* 2010. **70**:8407-8416. 査読有
2. Masuda Y, Piao J, Kamiya K. DNA replication-coupled PCNA mono-ubiquitination and polymerase switching in a human *in vitro* system. *J. Mol. Biol.* 2010. **396**:487-500. 査読有
3. Piao J, Masuda Y, Kamiya K. Specific amino acid residues are involved in substrate discrimination and template binding of human REV1 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. **392**:140-144. 査読有
4. Gu Y, Masuda Y, Kamiya K. Biochemical analysis of human PIF1 helicase and functions of its N-terminal domain. *Nucleic Acids Res.* 2008. **36**:6295-6308. 査読有
5. Tomida J, Masuda Y, Hiroaki H, Ishikawa T, Song I, Tsurimoto T, Tateishi S, Shiomi T, Kamei Y, Kim J, Kamiya K, Vaziri C, Ohmori H, Todo T. DNA damage induced ubiquitylation of RFC2 subunit of RFC complex. *J. Biol. Chem.* 2008. **283**:9071-9079. 査読有

#### [学会発表] (計 25 件)

1. Yuji Masuda, Miki Suzuki, Hidehiko Kawai, Asami Hishiki, Hiroshi Hashimoto, Fumio Suzuki and Kenji Kamiya: Biochemical analysis of PCNA-ubiquitination in humans: The 7th 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium: 2010 年 10 月 26 日: 富山市
2. 増田雄司, 鈴木美紀, 可合秀彦, 菱木麻美, 橋本 博, 鈴木文男, 神谷研二: PCNA のユビキチン化反応の生化学的解析: 日本放射線影響学会第 53 回大会: 2010 年 10 月 20 日: 京都市
3. 増田雄司, 鈴木美紀, 河合秀彦, 菱木麻美, 橋本 博, 鈴木文男, 神谷研二: PCNA のユビキチン化の分子機構: 日本遺伝学会第 82 回大会: 2010 年 9 月 23 日: 札幌市
4. 増田雄司, 神谷研二: 複製後修復経路における DNA ポリメラーゼ交換反応の生化学的解析: 日本放射線影響学会第 52 回大会: 2009 年 11 月 12 日: 広島市
5. 増田雄司, 神谷研二: ヒト RAD6-RAD18 による PCNA のユビキチン化反応の分子機構: 日本放射線影響学会第 51 回大会: 2008 年 11 月 19 日: 北九州市

#### [その他]