

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月15日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

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）

名古屋大学・環境医学研究所・准教授

研究者番号：30273866

研究成果の概要（和文）：放射線や環境変異原によって生じるDNA損傷の多くはDNA複製を阻害する。DNA複製の停止は細胞にとって致命的であるが、これを回復、再開する分子機構（複製後修復）が働くことにより細胞死は回避される。一方で複製後修復は突然変異の誘発に深く関与している。本研究では、複製後修復をつかさどる酵素群を網羅的に精製し、その生化学反応を試験管内で再構成することにより、複製後修復の分子機構を詳細に解析した。

研究成果の概要（英文）：DNA lesions produced by ionizing radiation and environmental mutagen inhibit DNA replication. Stalling replication would lead to cell death if it persisted. Cells have mechanisms (post-replication repair, PRR) to restore DNA replication to survive against DNA-damaging agents. PRR is involved in induced mutagenesis. In this study, we purified enzymes required for PRR, reconstituted biochemical reactions with the enzymes and analyzed molecular mechanisms of the PRR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
総計	11,500,000	3,450,000	14,950,000

研究分野：分子生物学・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・損傷乗り越えDNA合成・突然変異誘発・PCNA・RAD6-RAD18・HLTF

## 1. 研究開始当初の背景

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複製を忠実に行う複製型のDNAポリメラーゼ（Pol δまたはPol ε）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  $\zeta$ ) を介した損傷乗り越え DNA 合成 (Translesion DNA synthesis, TLS) 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。TLS 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こと (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 経路の実態は不明であった。

## 2. 研究の目的

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することによって、その分子機構を解析することであった。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た。

## 3. 研究の方法

### (1) タンパク質の精製

TLS 経路の生化学反応を再構成するために必要なタンパク質因子 (Pol  $\delta$ , Pol  $\eta$ , RFC, PCNA, RPA, E1, RAD6A-RAD18, ubiquitin) を大腸菌で産生し、各種クロマトグラフィーにより精製した。

### (2) 複製反応に共役した PCNA のモノユビキチン化の条件検討

DNA 合成の鋳型は、7 kb の M13 単鎖 DNA の一カ所にオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせたものを利用した。この鋳型 DNA に複製因子 (Pol  $\delta$ , RFC, PCNA, RPA) を反応させると、7 kb の複製産物を観察することができる。次にこの反応系にユビキチン関連酵素 (E1, RAD6A-RAD18, ubiquitin) を添加し複製反応に共役した PCNA のモノユビキチン化反応を観察した。PCNA のモノユビキチン化はウエスタン法により検出した。

### (3) モノユビキチン化の基質となる PCNA の状態についての検討

PCNA のモノユビキチン化の効率について、DNA 合成の効果 (Pol  $\delta$  のあるなし、または dNTP のあるなしで実験) を検討した。dNTP のうち一つ (dCTP) を反応系から除くことによ

り、Pol  $\delta$  が停止した状態を模倣した。

(4) 紫外線損傷をもつ鋳型 DNA における PCNA のモノユビキチン化反応  
鋳型 DNA にあらかじめ紫外線を照射すると、Pol  $\delta$  による DNA 合成が阻害される。この実験系で PCNA のモノユビキチン化反応を観察した。PCNA のモノユビキチン化の効率を様々な線量の紫外線を照射した鋳型 DNA を用いて比較した。

### (4) Pol $\delta$ -Pol $\eta$ -Pol $\delta$ のポリメラーゼ交換反応の再構成

上述 (3) の実験系に Pol  $\eta$  を添加し TLS 反応を再構成し、この反応がユビキチン関連酵素に依存するか (RAD6A-RAD18 のあるなしで実験)、PCNA のモノユビキチン化に依存するか (PCNA のユビキチン化されるリジン残基の変異体 PCNA<sup>K164R</sup> で実験)、Pol  $\eta$  のユビキチン結合配列に依存するか (ユビキチン結合配列中のアスパラギン酸残基の変異体 Pol  $\eta$ <sup>D652A</sup> で実験) 検討した。

### (5) タンパク質の精製

TS 経路の生化学反応を再構成するために必要なタンパク質因子 (E1, RAD6A-RAD18, MMS2-UBC13, HLTf, ubiquitin) を大腸菌で産生し、各種クロマトグラフィーにより精製した。

(6) PCNA のポリユビキチン化反応の再構成  
PCNA のモノユビキチン化の反応系にポリユビキチン化酵素 (MMS2-UBC13, HLTf) を添加し、PCNA のポリユビキチン化を解析した。PCNA のユビキチン化はウエスタン法により検出した。

## 4. 研究成果

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。

この反応系での PCNA のモノユビキチン化は、RFC と DNA (7 kb の M13 単鎖 DNA の一カ所にオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせたもの) に依存した。このことから、RFC によって DNA 上にロードされた PCNA が効率の良いモノユビキチン化の基質となることが分かった。また、Pol  $\delta$  と RFC は DNA 上で PCNA と相互作用することによって、PCNA のモノユビキチン化を直接促進することも明らかにした。またこの実験系で、Pol  $\delta$  による DNA 複製反応を行ったところ、DNA 複製反応に共役した PCNA のモノユビキチン化反応を観察した。この共役反応は、dNTP のうち一つ (dCTP) を反応系から除くことにより、Pol  $\delta$  が停止した状態を模倣した場合にも同様に観察されたことから、RAD6-RAD18 複合体は、DNA 複製の停止を認識することなく、

PCNA をモノユビキチン化することが示唆された。鋳型 DNA にあらかじめ紫外線を照射すると、Pol  $\delta$  による DNA 合成が阻害される。この紫外線を照射した DNA を用いて、PCNA のモノユビキチン化反応を観察したところ、RAD6-RAD18 複合体が、DNA 複製の停止を認識することなく PCNA をモノユビキチン化するという結果を支持した。

Pol  $\delta$ -Pol  $\eta$ -Pol  $\delta$  のポリメラーゼ交換反応を再構成するために、紫外線を照射した DNA を用いて、Pol  $\delta$  による DNA 合成が阻害される実験系に Pol  $\eta$  を添加し TLS 反応を再構成した。その結果、予想された、Pol  $\delta$ -Pol  $\eta$ -Pol  $\delta$  のポリメラーゼ交換反応が観察された。この反応は RAD6A-RAD18 によって促進され、その促進効果は、PCNA のモノユビキチン化と Pol  $\eta$  のユビキチン結合配列に依存することを証明した。

PCNA のモノユビキチン化の反応系を利用して、RAD6-RAD18 複合体の機能と構造を解析した。その結果、RAD6-RAD18 複合体のサブユニット構成が RAD6-(RAD18)<sub>2</sub> であることを証明した。さらに、RAD6 と RAD18 の安定な結合がユビキチン転移反応に必要な不可欠であるという結果を得た。

さらに詳細な解析から、RAD18 は RING ドメインによって 2 量体を形成することを証明した。RING ドメインは、E2 と直接相互作用することによって、ユビキチンリガーゼ活性を発揮すると考えられている。RING ドメインの変異体を用いた実験から、RING ドメインがたとえ 2 量体を形成しても E2 と相互作用しなければ、ユビキチンリガーゼの活性が低下した。また、2 量体を形成する二つの RING ドメインのうち片方だけが変異体のハイブリッド分子では、野生型と同程度のユビキチンリガーゼ活性が観察された。これらの結果は、片方の RING ドメインだけが E2 と相互作用することによって、酵素活性を発揮していることを示唆している。

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、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ている。本研究では、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。

## 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 14 件)

1. Masuda Y. *In vitro* studies of exchanges between replicative and

translesion DNA polymerases in eukaryotic post-replication repair pathway. *Genes Environ.* in press (2012) 査読有

2. Masuda Y., Kamiya K. Molecular nature of radiation injury and DNA repair disorders associated with radiosensitivity. *Int. J. Hematol.* **95**:239-245. (2012) 査読有

3. Masuda Y., Suzuki M, Kawai H, Suzuki F, Kamiya K. Asymmetric nature of two subunits of RAD18, a RING-type ubiquitin ligase E3, in the human RAD6A-RAD18 ternary complex. *Nucleic Acids Res.* **40**: 1065-1076. (2012) 査読有

4. Toyoshima M, Honda H, Watanabe H, Masuda Y., Kamiya K. Proceedings of the Ninth International Conference on Tritium Science and Technology: Development of a Sensitive Assay System for Tritium Risk Assessment Using *Rev1* Transgenic Mouse. *Fusion Science and Technology.* **60**:1204-1207 (2011) 査読有

5. de Groote FH, Jansen JG, Masuda Y., Shah DM, Kamiya K., de Wind N, Siegal G. The *Rev1* translesion synthesis polymerase has multiple distinct DNA binding modes. *DNA Repair (Amst)* **10**:915-25. (2011) 査読有

6. Tachibana N, Iwamoto T, Kawamura T, Masuda Y., Mori T, Kamiya K. Generation and evaluation of an anti-*REV1* monoclonal antibody. *Hiroshima J. Med. Sci.* **59**:51-56. (2010) 査読有

7. 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.* **70**:8407-8416. (2010) 査読有

8. Masuda Y., Piao J, Kamiya K. DNA replication-coupled PCNA mono-ubiquitination and polymerase switching in a human *in vitro* system. *J. Mol. Biol.* **396**:487-500. (2010) 査読有

9. 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.* **392**:140-144. (2010) 査読有

10. Huang QM, Akashi T, Masuda Y., Kamiya K., Takahashi T, Suzuki M. Roles of POLD4, smallest subunit of DNA polymerase delta, in nuclear structures and genomic stability of human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**:542-546. (2010) 査読有

11. Fukuda H, Takamura-Enya T, Masuda Y, Nohmi T, Seki C, Kamiya K, Sugimura T, Masutani C, Hanaoka F, Nakagama H. Translesional DNA synthesis through a C8-guanyl adduct of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) *in vitro*: REV1 inserts dC opposite the lesion, and DNA polymerase kappa potentially catalyzes extension reaction from the 3'-dC terminus. *J. Biol. Chem.* **284**:25585-25592. (2009) 査読有
12. Masuda Y, Kamiya K. Induced mutagenesis and translesion DNA synthesis-structure and function of REV1. *Seikagaku* **80**:843-846. (2008) 査読無
13. Gu Y, Masuda Y, Kamiya K. Biochemical analysis of human PIF1 helicase and functions of its N-terminal domain. *Nucleic Acids Res.* **36**:6295-6308. (2008) 査読有
14. 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.* **283**:9071-9079. (2008) 査読有

[学会発表] (計 45 件)

1. 増田雄司: PCNAのユビキチン化に関わるユビキチンリガーゼ(E3)の解析: 遺伝学研究所研究集会「ユビキチン・SUMOによるDNA複製及びDNA修復系の制御」: 2012年2月9日: 国立遺伝学研究所: 三島(招待講演)
2. 増田雄司, 鈴木美紀, 神谷研二: DNA損傷トランスと複製後修復経路の機能: 日本分子生物学会第34回年会: 2011年12月14日: パシフィコ横浜: 横浜(招待講演)
3. 増田雄司: 誘発突然変異とその制御機構-PCNAのユビキチン修飾の分子機構の解析から-: 名古屋大学環境医学研究所, 群馬大学生体調節研究所, 第八回合同シンポジウム: 2011年12月9日: 群馬大学 昭和キャンパス: 前橋(招待講演)
4. 増田雄司, 鈴木美紀, 神谷研二: 放射線によるDNA損傷と複製後修復経路の機能: 2011年11月19日: 日本放射線影響学会第54回大会: 神戸商工会議所会館: 神戸(招待講演)
5. Masuda Y, Suzuki M, Kamiya K: DNA damage tolerance and molecular mechanism of PCNA ubiquitination: 14th International Congress of Radiation Research: 2011年8月30日: Warsaw, Poland
6. 増田雄司: 突然変異誘発経路の制御機構~PCNAのユビキチン修飾の生化学的解析から: 平成23年度 日本環境変異原学会公

開シンポジウム: 2011年5月28日: 慶應義塾大学芝共立キャンパス: 東京(招待講演)

7. Masuda Y, Suzuki M, Kawai H, Hishiki A, Hashimoto H, Suzuki F, Kamiya K: Biochemical analysis of PCNA-ubiquitination in humans: The 7th 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium: 2010年10月26日: 富山
8. 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
9. Masuda Y: Dynamics of human replication factors and DNA polymerase switching: Mini-Workshop on "DNA Polymerase": 2009年11月27日: 奈良先端科学技術大学院大学: 生駒(招待講演)
10. 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
11. Masuda Y, Suzuki M, Piao, J, Gu Y, Tsurumoto T, Kamiya K: Reconstitution of DNA replication reactions with purified recombinant human proteins *in vitro*: 2nd Asian Congress of Radiation Research: 2009年5月17日: Korea
12. 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

[その他]

ホームページ等

<http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/genome.html>

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

増田 雄司 (MASUDA YUJI)

名古屋大学・環境医学研究所・准教授

研究者番号: 30273866

### (2) 研究分担者

神谷 研二 (KAMIYA KENJI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号: 60116564

### (3) 連携研究者

なし