

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370002

研究課題名 (和文) 慢性低紫外線環境ストレスによるゲノム損傷応答と耐性機構に関する研究

研究課題名 (英文) Molecular mechanisms of DNA damage tolerance for chronic low-dose UV light

研究代表者

菱田 卓 (HISHIDA TAKASHI)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：60335388

研究成果の概要 (和文)：

紫外線は DNA 塩基損傷を引き起こす主要な環境要因であり、細胞死や突然変異などのゲノム不安定性増大の原因となることが知られている。研究代表者は、様々な紫外線損傷応答機構の生理的な役割を明らかにするためには、自然環境に類似した環境下で研究を行うことが重要であるという点に着目し、“慢性低線量紫外線”環境で細胞を培養できる実験系を構築した。本実験系を用いた研究の結果、従来の研究結果とは大きく異なった紫外線損傷応答が存在することを見出し、特に、DNA 損傷トレランス機構が細胞増殖を阻害する損傷チェックポイントの活性化を抑えることで、環境レベルの紫外線に対する耐性獲得において中心的な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、損傷トレランス機能を欠損した細胞では、Srs2 DNA ヘリケースが相同組換え修復機能を阻害することでチェックポイントの活性化に必須の機能を果たしていることを見いだした。

研究成果の概要 (英文)：

Ultraviolet (UV) light in from sunlight, which is a primary significant environmental cause of DNA damage, that, if left unrepaired, can lead to cancer- and other disease-causing mutations. In nature, organisms are exposed to chronic low-dose UV (CLUV) as opposed to the acute high doses common to laboratory experiments. Here we examine the response of yeast cells to CLUV and identify a key role for the *RAD6* error-free postreplication repair (*RAD6* error-free PRR) pathway in promoting cell growth and survival. Notably, we showed that the error-free PRR pathway is specifically important during chronic low-dose UV exposure to prevent counter-productive DNA checkpoint activation and allow cells to proliferate normally. Furthermore, we also showed that suppression of homologous recombination (HR) in PRR-deficient cells by Srs2 is required for checkpoint activation and checkpoint maintenance during CLUV irradiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：分子遺伝、DNA 損傷、紫外線

1. 研究開始当初の背景

地球規模で起こる環境破壊は、我々の社会システム及び生命システムの維持にとって脅威となりうる為、これらの環境問題に対する取り組みの重要性は益々強まってきている。したがって、環境破壊が生物に対して及ぼす影響について、分子レベルで詳細に解析することは、予防を含めた対策を講じる上で非常に重要かつ緊急を要する課題である。様々な環境問題の中でも、自然界にもともと存在しないフロン等に起因するオゾン層の破壊は、現代及び将来の地球環境が抱える大きな問題の一つである。特に、オゾン層破壊に伴って生じる有害紫外線の増加は、皮膚がんや白内障などの健康被害や農作物の収穫量の減少、さらには生物種の絶滅などによる生物多様性の減少などが懸念されている。これまで、有害紫外線が生物に及ぼす影響に関する研究は、主に紫外線による DNA 損傷の修復機構に関するものであり、実験室レベルにおいては、致死的な紫外線量を短時間照射することで解析が行われてきた。しかしながら、実際に自然環境で問題となる紫外線は非常に低いレベルであり、また、細胞における影響を考えた場合、時間的に長時間、つまり慢性的に紫外線を受けた場合の影響を調べるのが重要である。しかしながら、自然環境レベルの紫外線の影響を調べる実験系が存在しないため、低レベルの慢性的な紫外線が生物に及ぼす影響や耐性に関わる分子メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

紫外線は DNA 塩基損傷を引き起こす主要な外的要因であり、細胞死や突然変異などのゲノム不安定性の原因となることが知られている。従来の有害紫外線が生物に及ぼす影響に関する研究は、主に紫外線による DNA 損傷の修復機構に関するものであり、実験室レベルにおいては、致死的な紫外線量を短時間照射することで解析が行われてきた。しかしながら、実際に自然環境で問題となる紫外線は非常に低いレベルであり、また、細胞における影響を考えた場合、時間的に長時間、つまり慢性的に紫外線を受けた場合の影響を調べるのが重要である。本研究では、出芽酵母をモデル生物として、自らが作成した紫外線照射下で培養可能な装置を用い、慢性的に低紫外線量の照射を受けた細胞の損傷応答機構を詳細に解析し、有害紫外線量の増大が及ぼす生物学的影響を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

実験材料

本研究では、DNA 損傷耐性に関わる様々な機構のクロストークや詳細な分子メカニズムを明らかにするため、豊富な実験材料と多彩な実験手法を用いることが可能か出芽酵母を用いて実験を行った。

モデル実験系の構築

自然環境で問題となる紫外線には、大きく分けて以下の2つの要素が存在する。

1) 自然環境における将来的な増加を考慮しても、紫外線量は致死的不是、非常に低いレベルである。

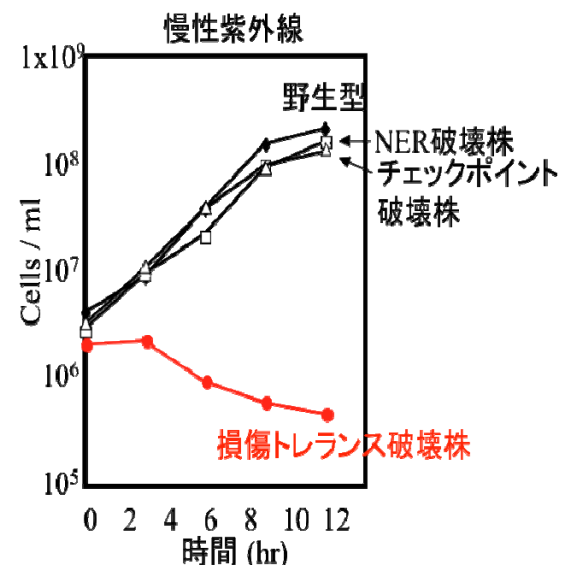
2) 自然環境下では、細胞（生物）は慢性的に紫外線の照射を受けている。

したがって、自然環境との関連性において紫外線による細胞への影響を調べるためには、上記の2つの要素を満たした実験系を構築することは非常に重要である。そこで、申請者は、低紫外線照射下で出芽酵母細胞を培養可能な装置を、紫外線照射器具、恒温インキュベーター、ロータリーシェーカー、紫外線防止フィルター等を組み合わせて作製した。さらに、紫外線量の変更や培養中の細胞に均一に紫外線が照射できるように工夫を加えた。

4. 研究成果

(1) 本研究では、極めて低いレベルの紫外線照射下 (chronic low-level UV; CLUV) で細胞を培養できる実験系を構築し、出芽酵母細胞における損傷応答機構について詳細に解析を行った。その結果、これまでの研究結果とは大

きく異なった紫外線損傷応答機構が存在することを見出し、その中でも、DNA 損傷トランス機構が CLUV 損傷に対する耐性機構として中心的な役割を果たしていることがわかった (Hishida, T., et al. *Nature*, 2009)。



また、DNA 損傷トレランス経路を欠損した細胞では、紫外線照射下における DNA 複製に伴って単鎖 DNA ギャップが蓄積し、その結果、DNA 損傷チェックポイントの活性化を引き起こしていた。これらの結果から、慢性的な低レベルの紫外線環境においても DNA 複製の障害が頻繁に起こっており、DNA 損傷トレランス経路がこの複製障害の解消において主要な働きをしていると考えられる。さらに、この損傷トレランスの機能は、短鎖 DNA ギャップに依存する損傷チェックポイントの活性化の抑制に関与しており、結果として低レベルの紫外線ストレス下に於ける細胞増殖を可能にしていると考えられる。

(2) バクテリアからヒトまで保存されている Srs2 DNA ヘリケースが DNA 損傷チェックポイントの活性化に重要な役割を果たしていることを見いだした。srs2 遺伝子の変異株では、DNA 相同組換え機能の活性化にともない、*rad18* 株で蓄積する一本鎖 DNA が修復されることで損傷チェックポイントの活性化が抑圧されることがわかった。これらの結果から、DNA 損傷トレランス機能を失った細胞では、Srs2 は相同組換え反応の阻害と損傷チェックポイントの活性化に重要な機能を果たしていることが考えられる。また、Srs2 は損傷チェックポイントの活性化に伴って CDK によるリン酸化を受けるが、今回、我々は、このリン酸化が CLUV 環境から細胞が解放された際に、組換え反応の促進に重要であることを見いだした (Hishida, T., et al. *Mol. Cell. Biol.*, 2010)。このように、Srs2 は損傷チェックポイントの活性化に必要であるだけでなく、その活性化にともなって自身もリン酸化制御を受けており、その結果、Srs2 は組換え阻害と促進の両面で機能するユニークなタンパク質であることがわかった。

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 5 件)

- ①. Hishida, T., Hirade, Y., Haruta, N., Kubota, Y., and Iwasaki, H. Srs2 controls DNA damage checkpoint responses via two distinct homologous recombination functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4840-4850, 2010. 査読有

- ②. Hishida, T., Kubota, Y., Carr, A. M. and Iwasaki, H. *RAD6-RAD18-RAD5* pathway-dependent tolerance to chronic low-dose UV light. *Nature* 457, 612-615, 2009. 査読有
- ③. 菱田卓 「環境レベルの紫外線に対する生物の耐性獲得戦略」実験医学 (2009 年、27 巻 No. 11, 羊土社) 査読無
- ④. Ohya T., Arai, H., Kubota, Y., Shinagawa, H. and *Hishida, T. A SUMO-like domain protein, Esc2, is required for genome integrity and sister chromatid cohesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 180, 41-50, 2008. 査読有
- ⑤. Sakaguchi, C., Morishita, T., Shinagawa, H. and *Hishida, T. Essential and distinct roles of the F-box and helicase domains of Fbh1 in DNA damage repair. *BMC Mol. Biol.* 9, 27, 2008. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ①. 菱田卓、環境レベルの紫外線照射による突然変異の分子メカニズム、第 33 回日本分子生物学会ワークショップ、2010 年 12 月 11 日、神戸
- ②. Takashi Hishida, Roles of TLS polymerases in CLUV-induced mutagenesis in NER-deficient cells, 3R symposium, Toyama, Oct. 28, 2010
- ③. 菱田卓、相同組換えタンパク Srs2 による DNA 損傷応答システムの制御メカニズム、第 32 回日本分子生物学会ワークショップ、2009 年 12 月 11 日、横浜
- ④. 菱田卓、環境レベルの紫外線損傷に対する DNA 損傷トレランスの役割、第 81 回日本遺伝学会、ワークショップ、2009 年 9 月 18 日、松本、
- ⑤. Takashi Hishida, The RAD6 post replication repair pathway plays a central role in the response to chronic low dose UV exposure, Yeast genetics & Molecular biology meeting, July 26, 2008, Tronto, Canada.

[図書] (計 1 件)

- ①. 菱田卓 「DNA複製阻害を回避する DNA 損傷トランス機構」蛋白質核酸酵素 (2009 年、Vol. 54, No. 4, 388-393 共立出版)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菱田 卓 (HISHIDA TAKASHI)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号：60335388