

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04335

研究課題名(和文) ヒト細胞のDNA損傷トレランスの分子機構と細胞レベルの機能の解析

研究課題名(英文) Analyses of molecular mechanisms of DNA damage tolerance in human cells

研究代表者

益谷 央豪 (Masutani, Chikahide)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：40241252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：紫外線損傷に対してはDNAポリメラーゼ・イータによる損傷乗り越えDNA合成(TLS)が重要な役割を担うが、イルジジンSによるDNA損傷に対しては、PCNAのユビキチン化に依存するが、DNAポリメラーゼ・イータによるTLSとは異なる経路が重要であることを見出した。イルジジンS抵抗性に関わるTLS因子として、DNAポリメラーゼ・カッパを同定した。さらに、RFWD3がイルジジンS抵抗性に重要なことを示した。DNA損傷の種類に応じた適切なDNAポリメラーゼによるTLSと、RFWD3が担う未同定の経路が、PCNAユビキチン化に依存した主要な2つのDNA損傷トレランス機構であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA損傷トレランスはゲノム安定性の維持に重要なメカニズムである。一方で、DNA損傷によるDNA複製阻害を引き起こすことで細胞死を誘導する、シスプラチンのような抗がん剤に対しては、耐性に寄与するという側面があり、がん細胞の増殖に寄与する。従って、RFWD3のDNA損傷トレランスにおける詳細な機能を解析するとともに損傷乗り越えDNA合成との連携機構などを解明することにより、ゲノム安定性を維持するしくみだけでなく、がん細胞の抗がん剤耐性のメカニズムの解明及びその克服法や、新たな抗がん戦略の構築につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that cells have mechanisms to tolerate for illudin S-induced DNA lesions. Importantly, the tolerance required PCNA ubiquitination but independently of DNA polymerase eta. We found that DNA polymerase kappa and RFWD3 play crucial roles independently to each other, but both dependently on PCNA ubiquitination. We published "RFWD3 and translesion DNA polymerases contribute to PCNA modification-dependent DNA damage tolerance".

研究分野：環境解析評価およびその関連分野

キーワード：DNA損傷 DNA損傷トレランス 損傷乗り越えDNA複製 RFWD3 PCNA ユビキチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放射線・紫外線や化学物質などの環境要因や細胞自身の代謝により生じる活性酸素などの内的な要因により、ゲノム DNA は容易に損傷を受ける。DNA 損傷が放置されれば、DNA 複製や転写が妨げられてゲノムの不安定化や細胞死が引き起こされ、癌化をはじめとする様々な生理機能の異常がもたらされる。対して、細胞は DNA 損傷に应答して細胞周期を停止するチェックポイント機構及び様々な種類の DNA 損傷に対応した複数の DNA 修復機構を備えている。さらに、ゲノム上に DNA 損傷を残したまま DNA 複製の阻害を回避する“DNA 損傷トレランス”と総称される機構もゲノムの安定性制御に重要な役割を担う。ヒト細胞の DNA 損傷トレランスにおいては、DNA 損傷の種類に応じた複数の DNA ポリメラーゼによる損傷乗り越え複製(TLS: translesion synthesis)が主要な役割を担うが、他にもテンプレート・スイッチ(TS)などの機構があると考えられている。しかし、複数のメカニズムを連携制御する仕組みは明らかではない。さらに、TLS 以外の機構の実態はほとんど明らかにされていない。

本応募者らは、紫外線に高感受性を呈して高頻度で皮膚癌を発症する遺伝性疾患である色素性乾皮症バリエーション(XP-V)群の責任遺伝子産物として、ヒト DNA ポリメラーゼ・イータ(Pol $\eta$ )を同定し、Pol $\eta$ が主要な紫外線 DNA 損傷であるシクロブタン型ピリミジンダイマー(CPD)を鋳型として効率良く正確な TLS を担うことを明らかにしてきた。一方で、Pol $\eta$ は本質的にはたいへんエラーを起こしやすい DNA 合成酵素であり、厳密に制御されて機能すると考えられる。

2002年に独国のグループにより、真核生物の DNA 損傷トレランスの制御に重要な E2(ユビキチン(Ub)結合酵素)-E3(Ub リガーゼ)である RAD6-RAD18 が、DNA 複製のスライディング・クランプである PCNA (proliferating cell nuclear antigen)の 164 番目のリジン(K164)を Ub 化することが明らかにされた。Pol $\eta$ を含む Y ファミリー DNA ポリメラーゼは、PCNA 相互作用領域(PIP)と Ub 相互作用領域(UBZ, UBM)を有しており、これらの領域を介したモノ Ub 化 PCNA との相互作用が TLS 制御において重要な役割を担うと考えられるが、適切なポリメラーゼを選択的に活性化する機構は明らかにされていなかった。RAD6-RAD18 に加えて、もう一組の E2-E3 である MMS2/UBC13-HLTF(酵母 RAD5 のヒトホモログ)により、PCNA-K164 がポリ Ub 化(K63 鎖)されると TS が活性化されると考えられる。しかし、ヒト細胞中のポリ Ub 化 PCNA の検出報告は少なく、その形成機構もほとんど明らかではなかった。本研究者らは、PCNA のモノユビキチン化とポリユビキチン化が動的・可逆的に連関制御されることを報告した。また、PCNA の Ub 化は可逆的であり、複製ストレスに应答したモノ Ub 化の制御には脱 Ub 化酵素 USP1 が関与することが報告されていた。本応募者らは、USP7 が酸化損傷により誘導される過剰な Ub 化を制御して突然変異を抑制していることを明らかにした。さらに、本応募者らは、PCNA ホモ 3 量体中の 1 ユニット以上がモノ Ub 化されれば Pol $\eta$ による TLS を活性化できることに加えて、複数のユニットが同時にマルチ修飾されると TLS 以外の機構が活性化されることも報告していた。しかしながら、複数の TLS ポリメラーゼの中から DNA ポリメラーゼ・イータが選択されて機能する仕組みは必ずしも明らかではなく、また、TLS 以外の機構の実態については全く明らかではなかった。

### 2. 研究の目的

本研究は、ヒト細胞の DNA 損傷トレランスの全体像を理解することを目的としたものである。ヒト細胞の主要な DNA 損傷トレランス経路は、DNA ポリメラーゼ・イータを中心とする

エラーを起こしやすい DNA ポリメラーゼが担う損傷乗り越え DNA 合成(TLS)であり、その制御機構の解明を目指した。一方で、TLS 以外の機構にかかる分子の解明は当該分野の次のブロックスルーにかかるものであり、その端緒を開くことをもう一つの主要な目標とした。

### 3. 研究の方法

精製タンパク質を用いた無細胞系における生化学的解析と、ヒト培養細胞内における細胞生物学的解析を両輪として解析を行った。

#### 1) 多重のタンパク質間相互作用による TLS 制御機構の解析

ヒト DNA ポリメラーゼ・イータ上の PCNA との相互作用領域を改変した変異組換えタンパク質を作成・精製し、無細胞系における DNA ポリメラーゼ活性への影響等を解析した。一方で、変異タンパク質をヒト細胞内で発現させて、細胞の増殖への影響、紫外線などに対する感受性、および、ゲノム DNA の変異生成について解析を行った。

また、DNA ポリメラーゼ・イータと Rad18 との相互作用については、変異組換えタンパク質を作成・精製して、無細胞系における相互作用に必須のアミノ酸を探索・同定した。さらに、これらの変異体の細胞レベルでの機能を解析した。

#### 2) 未同定の DNA 損傷トランス機構の解析

siRNA ライブラリースクリーニングなどにより、細胞のイルジン S 抵抗性に寄与する遺伝子を探索、同定した。遺伝子破壊細胞株および siRNA による発現抑制系を用いて、得られた遺伝子群及び PCNA のユビキチン化との関係性を細胞レベルで解析した。

### 4. 研究成果

#### 1) DNA ポリメラーゼ・イータによる TLS の制御における繊細なタンパク質間相互作用の重要性を明らかにした(解析継続中及び投稿準備中)

Rad18 による PCNA のユビキチン化が、DNA 損傷トランスの制御において中心的な役割を担う。DNA ポリメラーゼ・イータを始めとして、TLS を担う DNA ポリメラーゼの多くは、PCNA 及びユビキチンとの相互作用領域を有している。一方で、TLS ポリメラーゼの中で、DNA ポリメラーゼ・イータだけが、Rad18 と相互作用することが報告されている。

DNA ポリメラーゼ・イータは、PCNA との相互作用配列(PIP: PCNA interacting peptide)を3つ有していることを既に報告しているが、これらはコンセンサス配列と完全には一致しておらず、弱い相互作用による繊細な制御に寄与すると考えられる。本計画では、PIP の様々な変異体の無細胞系における DNA 合成系における機能と細胞レベルでの機能解析を行った。特に、細胞レベルでは、コンセンサス型の PIP を持つ DNA ポリメラーゼ・イータは細胞増殖を抑制することを示唆する結果を得た。DNA ポリメラーゼ・イータと PCNA との繊細な多重の相互作用による制御機構については、発現誘導系を用いた解析などが必要であり、継続して解析を行っていく。

DNA ポリメラーゼ・イータは、その N 待部分に DNA 合成活性の触媒部位を持ち、C 末端部分は他のタンパク質との相互作用などを介して、その制御に寄与すると考えられる。Rad18 との相互作用についても、C 末端部分で相互作用することが報告されている。ところが、精製した組換えタンパク質を用いて検討したところ、DNA ポリメラーゼ・イータの N 末部分が直接 Rad18 と相互作用することを見出した。興味深いことに、両タンパク質間の相互作用は、DNA が存在と乖離した。詳細な解析の結果、DNA ポリメラーゼ・イータの DNA 結合領域と Rad18 相互作用領域がオーバーラップしており、DNA ポリメラーゼ・イータが鋳型・プライマーDNA に結合すると、Rad18 との相互作用は競合されて乖離することが判明した。複数の DNA 損傷トランス経路の中から、

Rad18 との相互作用により DNA ポリメラーゼ・イータが優先的に損傷 DNA 部位へリクルートされることにより、その優先制が担保されるとともに、DNA ポリメラーゼ・イータによる TLS が行えない種類の DNA 損傷であった場合は、Rad18 が担う PCNA のユビキチン化により他の経路が活性化されるモデルに新たな分子基盤を与える知見であり、投稿準備中である。

2) RFWD3 が担う TLS 以外の DNA 損傷トレランスを見出した(Kanao et al. Life Science Alliance. 2022、プレスリリース参照 <https://www.nagoya-u.ac.jp/researchinfo/result/2022/08/-dna-dna-dna.html>)

PCNA の 164 番目のリジン(K164)がモノユビキチン化されることにより TLS が活性化され、ポリユビキチン化、または、マルチユビキチン化されることによりテンプレート・スイッチなどの未解明の経路が活性化されると考えられている。しかしながら、ヒト細胞においては後者の解析は進んでいない。その大きな理由のひとつは、ヒト細胞では DNA 損傷抵抗性獲得における TLS の寄与が大きく他の経路の寄与が小さいことによると考えた。例えば、紫外線照射後の細胞の生存においては、PCNA のユビキチン化に依存した経路の大きな部分は DNA ポリメラーゼ・イータによる紫外線 DNA 損傷の TLS であり、他の経路のマイナーな寄与は大きくない。そこで、TLS 以外の DNA 損傷トレランス経路の寄与が大きな DNA 損傷を探索することから始めた。細胞内の PCNA を非修飾部位の変異体(K164R)に置換した細胞の様々な DNA 損傷剤に対する感受性を検討したところ、紫外線やシスプラチンなどに加えて、キノコ毒であるイルジン S に高い感受性を示した。重要な点として、DNA ポリメラーゼ・イータ欠損細胞は、紫外線やシスプラチンに高い感受性を示すのに対して、イルジン S には感受性を示さない。つまり、イルジン S による DNA 損傷に対する抵抗性獲得には、PCNA のユビキチン化に依存する、DNA ポリメラーゼ・イータによる TLS とは異なる経路が重要であることが分かった。そこで次に、イルジン S 抵抗性に関わる因子を探索した。まず、TLS への関与が報告されている DNA ポリメラーゼについて検討したところ、DNA ポリメラーゼ・カッパを抑制すると同薬剤に感受性を示すことが分かった。しかし、その感受性は、PCNA のユビキチン化を抑制した場合に比べてマイルドであったことから、PCNA のユビキチン化に依存する TLS 以外の経路の関与が強く示唆された。そこで、siRNA ライブラリーのスクリーニングを行い、RFWD3 の発現を抑制するとイルジン S に高感受性となることが分かった。RFWD3 と DNA ポリメラーゼ・カッパはそれぞれ相加的な別の経路を構成するが、共に PCNA のユビキチン化依存的であり、即ち、PCNA のユビキチン化依存的に働く 2 つの経路を構成していることを示した。RFWD3 のとある点変異は、ファンコニー貧血症の原因となり、RFWD3 は他の FANCD2 と協調して、DNA 鎖間架橋損傷の相同組換え修復に関与することが報告されている。ところが、イルジン S 損傷に対する抵抗性獲得には、FANCD2 などの FANCD2 経路で重要な役割を担うタンパク質は関与しておらず、RFWD3 は FANCD2 経路における役割とは独立に、PCNA のユビキチン化依存的な DNA 損傷トレランスに寄与していることが明らかになった。TLS 以外の経路回目への短所を切り拓いた成果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanao Rie, Kawai Hidehiko, Taniguchi Toshiyasu, Takata Minoru, Masutani Chikahide	4. 巻 5
2. 論文標題 RFWD3 and translesion DNA polymerases contribute to PCNA modification-dependent DNA damage tolerance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202201584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.202201584	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sonohara Yuina, Takatsuka Reine, Masutani Chikahide, Iwai Shigenori, Kuraoka Isao	4. 巻 43
2. 論文標題 Acetaldehyde induces NER repairable mutagenic DNA lesions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 52～59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgab087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計27件（うち招待講演 4件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Masuda, Y., Sugimoto, Y., Iwai, S., Miyake, Y., Kanao, R., Masutani, C.
2. 発表標題 Responses of DNA polymerases and AP endonucleases to thiazolidine-DNA adducts in humans.
3. 学会等名 7th US-EU Conference on Endogenous DNA Damage and Repair（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kanao, R. Kawai, H. Taniguchi, T. Takata, M., Masutani, C.
2. 発表標題 RFWD3 and TLS polymerases play crucial roles in PCNA ubiquitination-dependent DNA damage tolerance in human cells
3. 学会等名 7th US-EU Conference on Endogenous DNA Damage and Repair（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kanao, R., Kawai, H., Taniguchi, T., Takata, M., Masutani, C.
2. 発表標題 Analysis of PCNA ubiquitination-dependent DNA damage tolerance in human cells.
3. 学会等名 19th Ataxia-Telangiectasia workshop (ATW2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masuda, Y., Sugimoto, Y., Iwai, S., Miyake, Y., Kanao, R., Masutani, C.
2. 発表標題 Responses of human DNA polymerases and AP endonucleases to HMCES- and thiazolidine-DNA adducts.
3. 学会等名 The 19th Ataxia-Telangiectasia workshop (ATW2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kanao R., Kawai H., Taniguchi T., Takata M. Masutani C.
2. 発表標題 RFWD3 mediates a crucial pathway of PCNA ubiquitination-dependent DNA damage tolerance in human cells.
3. 学会等名 NIG International Symposium 2002. Chromosome Replication in the New Era; Old and New Questions in Life Science. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田雄司, 杉本陽平, 岩井成憲, 三宅ゆみ, 金尾梨絵, 益谷央豪.
2. 発表標題 脱塩基部位のヒトDNA損傷トレランスと修復経路の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪.
2. 発表標題 RFWD3はヒト細胞において紫外線損傷のDNA損傷トランスに關与する
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本陽平, 増田雄司, 益谷央豪
2. 発表標題 DNA脱塩基部位の新規損傷トランス経路 HMCESクロスリンクの複製と修復経路に関する生化学的解析
3. 学会等名 変異機構研究会・第33回夏の学校
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪
2. 発表標題 RFWD3とDNAポリメラーゼ・イータはPCNAのユビキチン化依存的に紫外線損傷のDNA損傷トランスに關与する
3. 学会等名 日本分子生物学会第45回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪
2. 発表標題 ヒト細胞におけるPCNA のユビキチン化に依存するDNA損傷トランスの解析
3. 学会等名 第40回染色体ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪.
2. 発表標題 PCNA ubiquitination-dependent DNA damage tolerance in human cells.
3. 学会等名 第4回 CIBoGリトリート, 第5回名大医薬系3部局・岐阜薬科大学・岐阜大学G-CHAIN・ラクオリア創薬合同シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪.
2. 発表標題 紫外線とイルジンSで誘発されるDNA損傷によるDNA複製阻害を回避する機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉本陽平, 増田雄司, 益谷央豪
2. 発表標題 DNA脱塩基部位-HMCESクロスリンクの複製と修復経路に関する生化学的解析
3. 学会等名 第12回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 益谷央豪, 金尾梨絵, 河合秀彦, 谷口俊恭, 高田穰
2. 発表標題 PCNAのユビキチン化によって制御されるヒト細胞の新規DNA損傷トレランス経路の検出
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会 放生研シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 金尾梨絵, 河合秀彦, 谷口俊恭, 高田穰, 益谷央豪
2. 発表標題 ヒト細胞においてRFWD3はPCNAの翻訳後修復依存的なDNA損傷トレランスに關与する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本陽平, 増田雄司, 益谷央豪
2. 発表標題 脱塩基部位のDNA損傷トレランス経路に關するタンパク質因子群の生化学的解析
3. 学会等名 日本遺伝学会93回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪
2. 発表標題 イルジンSで生じるDNA損傷に対するヒト細胞におけるDNA損傷トレランスの解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本陽平, 増田雄司, 益谷央豪
2. 発表標題 脱塩基部位-HMCESクロスリンクにおけるDNA損傷トレランス経路の生化学的解析
3. 学会等名 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田雄司, 汪佳, 益谷央豪
2. 発表標題 DNA損傷応答を制御するユビキチンリガーゼRFWD3の生化学的解析
3. 学会等名 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪
2. 発表標題 ヒト細胞におけるユビキチン化PCNAに依存するDNA損傷トランスの解析
3. 学会等名 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本陽平, 増田雄司, 益谷央豪
2. 発表標題 脱塩基部位を標的として機能するタンパク質因子群のDNA損傷トランス経路における役割
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会, 第50回記念大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪
2. 発表標題 ヒト細胞におけるPCNA のユビキチン化依存的なDNA損傷トランスの解析
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪
2. 発表標題 DNA付加体を形成するセスキテルペン化合物イルジンSを用いたDNA損傷トレランスの解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金尾梨絵, 増田雄司, 益谷央豪
2. 発表標題 ヒト細胞におけるDNAポリメラーゼ・イータの制御機構の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田雄司, 益谷央豪
2. 発表標題 ヒト損傷乗り越えDNAポリメラーゼ とPCNAとの相互作用
3. 学会等名 日本遺伝学会92回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 益谷央豪, 金尾梨絵, 増田雄司
2. 発表標題 ヒト細胞のDNA損傷トレランス~ゲノム上にDNA損傷を残したまま複製するメカニズム~
3. 学会等名 第14回エピジェネティクス研究会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 益谷央豪
2. 発表標題 ヒト細胞のDNA損傷トレランス
3. 学会等名 第10回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム（招待講演）
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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関