

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12159

研究課題名（和文）DNA損傷トレランスにおけるストランドトランスファー反応の分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of the strand transfer reaction in DNA damage tolerance

研究代表者

松尾 理加（楠本理加）（Matsuo, Rika）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・外来研究員（特別研究員RPD）

研究者番号：90514133

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）：DNA損傷トレランス（DDT）とはDNA損傷によって引き起こされるDNA複製阻害から免れるために起こる反応の総称である。DDTにはストランドトランスファー反応を介した経路が存在することが細胞を用いた実験で示唆されていた。本研究では、無細胞系を用いてこれを検出しようとした。そして、色素性乾皮症バリエーション群細胞抽出液、モデル姉妹染色体、UV損傷を含むオリゴDNAを用いてこの経路によるDNA産物を検出した。また、我々は、初代マウス胎児線維芽細胞(MEF)の不死化には何らかの形でDDTが関与すると考えている。UV-CがMEFの不死化を促進し、ポリフェノールの混合物が、不死化を抑制することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA損傷トレランスには未知の経路があると考えられており、そのメカニズムの一端を初めて無細胞系で明らかにしたことは、学術的に意義がある。また、ポリフェノール類がUVによるMEFの不死化促進を抑制したことは、ポリフェノール類によるがん予防の可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：DNA damage tolerance (DDT) is a term for reactions that occur to escape DNA replication inhibition caused by DNA damage. Cellular experiments suggested a pathway for DDT via the strand transfer reaction. In this study, we detected this pathway using oligo DNA containing UV damage, cell extracts from xeroderma pigmentosum variant, and a model DNA for sister chromatid. We hypothesize that DDT is involved in the immortalization of primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs). We show that UV-C promotes MEF immortalization and that a mixture of polyphenols suppresses immortalization in MEFs.

研究分野：DNA修復

キーワード：UV 損傷トレランス 不死化 MEF ゲノム不安定性

1. 研究開始当初の背景

紫外線や放射線、活性酸素、化合物などにより DNA は常に損傷を受けている。DNA 損傷は転写や複製を妨げる。DNA 損傷トレランスとは DNA 複製阻害を回避するメカニズムの総称である。DNA 損傷トレランスには DNA ポリメラーゼによる損傷乗り越え合成、姉妹染色体を用いたテンプレートスイッチ、その他未知の反応が存在すると考えられている。DNA ポリメラーゼ (イータ) は損傷乗り越え合成の主要な役割を果たし、UV 損傷の 1 つであるシクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) に対して効率よく DNA 合成を行う。損傷乗り越え合成については詳細が解明されつつあるが、テンプレートスイッチやその他の反応については未解明の部分が多い。

2. 研究の目的

損傷乗り越え合成やテンプレートスイッチとは異なる DNA 損傷トレランス反応のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は無細胞の実験系、および細胞生物学的な側面からストランドトランスファー反応のメカニズムを明らかにしようとするものである。

(1) XP-V 細胞抽出液を用いた新たな DNA 損傷トレランス反応の検出とそのメカニズム解析

我々は損傷乗り越え合成の検出に、以下の無細胞系を用いてきた。この系では、Simian virus 40 (SV40) の複製開始点および CPD を 1 つ含むプラスミド DNA (以下 pBS-SV40ori-CPD と略す) と細胞抽出液及び SV40 ラージ T 抗原をインキュベーションし、CPD を含む鎖を鋳型にして生成された複製産物を検出する。細胞抽出液に、Pol 欠損細胞である XP-V 細胞抽出液を用いると Pol 非依存的に行われた CPD を含む DNA の複製産物も少量検出される。本研究ではこの系を改良して損傷乗り越え合成以外の反応を検出する方法の開発を試みた。そしてどのようなタンパク質が関わるかを予測した。

(2) 初代マウス胎児線維芽細胞(MEF)の不死化実験

初代 MEF の培養を続けるとやがて老化様の形態を示し、増殖速度が遅くなる。しかし、そのまま培養を続けるとその一部から増殖速度が増加した集団が現れ、やがて不死化する。このように不死化した細胞はゲノム不安定性を示し、ARF/p53 モジュールの変異を伴うことが知られている。我々は MEF の不死化をモデルとして、ゲノム不安定性の誘導と変異の関係を解析してきた。その結果、DNA 複製を介して生成された DNA 二本鎖切断の蓄積後にゲノムが不安定性と大規模な変異が発生し、p53 あるいは ARF のクローン進化が誘導されることがわかった。また、変異はゲノム再編の近傍に集中していた。ゲノム再編が起きた領域では損傷トレランスが正常に機能しなかった可能性を考えている。本研究では UV-C がゲノム不安定性や不死化にどのような影響を与えるか調べ、不死化した細胞の全ゲノム解析によりメカニズムを探ることにした。また、我々は放射線照射により誘導される DNA 二本鎖切断やヘテロクロマチン生成を指標に、これらを抑える効果の高い低分子化合物をスクリーニングにより同定し、その混合物(ポリフェ

ノール類)をゲノムスタビライザーとして用いている。本研究では MEF の不死化に与える UV の影響がゲノムスタビライザーにより変化するのか検討した。

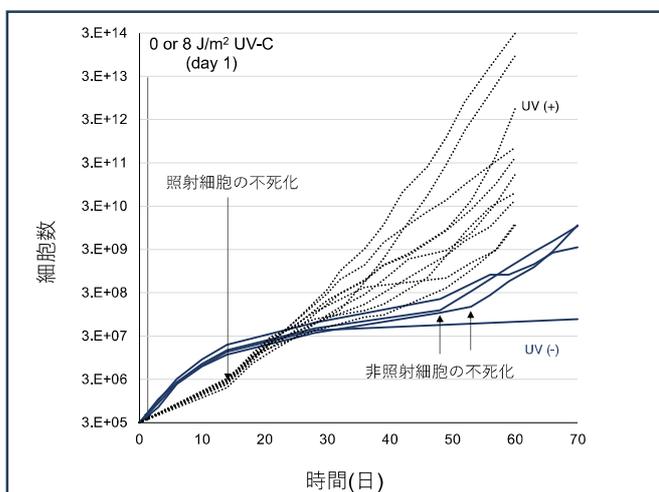
4. 研究成果

(1) XP-V 細胞抽出液を用いた新たな DNA 損傷トレランス反応の検出とそのメカニズム解析

^{32}P で 5'末端をラベルしたプライマーと CPD を 1 つのみ含むオリゴ DNA をアニールさせたものを基質として、XP-V 細胞抽出液により複製反応を行わせた。この条件では、複製産物を検出することはできなかったが、この反応に同一配列を含む二本鎖 DNA (姉妹染色体のモデル DNA) を加えると DNA 産物を検出することができた。この DNA 産物は加えた同一配列を含む二本鎖 DNA の長さに依存し、dNTP に依存していなかったことから、テンプレートスイッチ反応ではなくストランドトランスファー反応を検出したと考えている。また、ATP に依存していることから、DNA リガーゼが関与する可能性がある。一方で、損傷を含まない DNA を基質として同様の実験を行っても CPD を含む DNA を基質とした場合と同様の反応が起こった。そこで、損傷が存在するときのみストランドトランスファー反応が起こるように、姉妹染色体のモデル DNA の長さや形状を変えるなどの条件検討を行ったが、現在のところ、損傷特異的な反応が検出できるような条件は見つかっていない。損傷を含まない場合にこの反応を抑えるようなメカニズムがあるのか明らかにする必要がある。

(2) 初代マウス胎児線維芽細胞(MEF)の不死化実験

4 回継代した初代培養 MEF に UV-C を照射し、培養を継続したところ、増殖速度が増加した細胞集団を非照射時より早く得た。このことは UV-C 照射によりゲノムの不安定化が促進されたことを示唆している。自然に不死化した MEF と UV-C 照射後に不死化した MEF の全ゲノム解析を実施したところ、ゲノム再編や一塩基置換がほぼ同じ領域で起こることがわかった。自然に不死化した MEF と放射線照射後に不死化した MEF でも同様のことが明らかになっている。これらのことから UV-C 照射後の不死化でも自然不死化や放射線照射後の不死化と同じようなメカニズムでゲノム再編が起こる可能性がある。さらに、ヘテロクロマチン形成や DNA 二本鎖切断を抑制する効果を持つゲノムスタビライザーを UV-C 照射後に培地に添加し続けると、UV-C 照射後の不死化を抑制することを示した。



(図) UV-C 照射による MEF の不死化促進

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshioka Ken-ichi, Kusumoto-Matsuo Rika, Matsuno Yusuke, Ishiai Masamichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Genomic Instability and Cancer Risk Associated with Erroneous DNA Repair	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12254
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222212254	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 Matsuno Yusuke, Kusumoto-Matsuo Rika, Manaka Yuya, Asai Haruka, Yoshioka Ken-ichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Echoed induction of nucleotide variants and chromosomal structural variants in cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20964
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-25479-6	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 Suzuki Mafuka, Fujimori Haruka, Wakatsuki Kakeru, Manaka Yuya, Asai Haruka, Hyodo Mai, Matsuno Yusuke, Kusumoto-Matsuo Rika, Shiroishi Mitsunori, Yoshioka Ken-ichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Genome destabilization-associated phenotypes arising as a consequence of therapeutic treatment are suppressed by Olaparib	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0281168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0281168	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅井遥圭、松尾理加、眞中祐哉、松野悠介、吉岡研一
2. 発表標題 ヒストンH3K9トリメチルのメチル基転移酵素SETDB1のゲノム不安定性に与える影響
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------