

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12163

研究課題名（和文）ゲノム複製の停止と再開に関連したTLS機構とクロマチン構造変換のクロストーク

研究課題名（英文）Crosstalk between translesion DNA synthesis and chromatin remodelling related to the arrest and resumption of replication

研究代表者

横井 雅幸（Yokoi, Masayuki）

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・准教授

研究者番号：00322701

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損傷による複製反応の停滞を回避する損傷乗り越えDNA合成（TLS）とそのクロマチンにおける制御機構の理解を深めるため、主要なTLS因子であるPOLHに注目した。その成果として、脱ユビキチン化酵素USP11が、POLHの細胞周期特異的な発現調節に関わること、またUSP11が紫外線で損傷を受けたクロマチンにPOLHをリクルートする過程に寄与することを新たに見出した。さらに、クロマチン構造変換因子CHD9とSMARCAD1がPOLHを紫外線誘発DNA損傷ヘリクルートする経路に関わることを見出した。また、化合物スクリーニングにより、POLHに対する阻害活性を示す化合物を複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAにおける代謝反応の理解には、クロマチン構造との関わりを明らかにすることが重要である。転写や修復に比べて、クロマチンにおけるDNA複製とりわけTLSの制御はほとんど明らかにされていない。本研究の成果として、脱ユビキチン化酵素USP11やクロマチン構造変換因子がクロマチンの損傷部位へのPOLHのリクルートに関わる可能性を見出したことは、DNA損傷による複製の停止と再開を制御する機構を理解する足がかりとして重要である。また、DNAを標的とした抗がん剤の効果を減弱しうるTLS経路を標的とした創薬は、世界的に注目されていることから、POLHの阻害物質の同定は、同分野の発展に貢献しうる成果である。

研究成果の概要（英文）：The efficient translesion DNA synthesis (TLS) is important for the resumption of stalled DNA replication reaction at the site of DNA damage. In order to deepen our understanding of the regulatory mechanism(s) of TLS on chromatin, this research focused on POLH, a major TLS polymerase and its posttranslational modification in response to DNA damage. As the results, USP11, one of ubiquitin-specific peptidase, might be involved in the stability of POLH at the beginning of S phase. And, chromatin remodeling factors SMARCAD1 and CHD9 are required for efficient recruitment of POLH to the damaged site. Furthermore, some small chemical compounds were identified as candidates for the POLH-specific inhibitor. These findings are novel and will lead to further development of research.

研究分野：分子生物学

キーワード：損傷乗り越えDNA合成 クロマチン構造変換因子 脱ユビキチン化酵素 阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

損傷乗り越え DNA 合成反応 (TLS) は、多様な要因で損傷した DNA を鋳型として複製反応を行えることから、損傷部位で停止した染色体複製反応の迅速な再開・継続に重要である。TLS で中心的役割を担う主な TLS ポリメラーゼは、哺乳類細胞では5種類あり、それらが損傷の種類に応じて使い分けられることで、継続的な複製を可能にしている。一方、TLS ポリメラーゼの特徴として、損傷のない鋳型に対する忠実度は極めて低い。遺伝情報の書き換えは細胞のがん化に代表される種々の問題を引き起こす原因になることから、TLS ポリメラーゼの機能調節を中心とした TLS 経路の制御は安定的な遺伝情報の継承にとって重要である。一方で、真核生物の転写や複製、損傷の修復などの代謝反応は、ヒストンタンパク質に巻き付いた DNA 上で起こることから、その制御機構の理解には、クロマチン構造との関連を明らかにする必要がある。しかしながら、研究開始当初、転写や修復に比べて、クロマチンにおける DNA 複製とりわけ TLS の制御機構の実態はほとんど明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

TLS ポリメラーゼとその調節因子から構成される TLS 機構のクロマチン上での巧妙な制御が、「細胞の遺伝情報の恒久性」と「その破綻から始まる細胞のがん化」をコントロールする鍵になると考えた。そこで、細胞のイメージング技術と試験管内再構成を軸とした解析手法により、「TLS 関連因子の翻訳後修飾」と「複製反応の停止と再開に関連したクロマチン構造変換」に着目し、これらのクロストークが関わる TLS 反応の開始と終了を規定する分子基盤の理解を深めることを主たる目的とした。特に、クロマチン上での TLS 因子の集合・解離において重要なユビキチン化に注目した解析を行った。さらに、DNA ポリメラーゼに対して阻害活性を示す化合物の探索を行なった。これにより、DNA 損傷に限定されずに複製停止を誘発する手法の確立と損傷を乗り越えるという特徴から DNA を標的とする抗がん剤の効果を減弱しうる TLS の阻害剤が、抗がん剤による治療効果の亢進を可能にする創薬研究の足がかりとすることを目指した。

## 3. 研究の方法

### ①ヒト TLS 因子の翻訳後修飾に関わる因子の解析

ヒトの主要な TLS ポリメラーゼである POLH のクロマチン上での機能調節に注目し、これまでに POLH と直接相互作用することを明らかにした脱ユビキチン化酵素 USP11 および先行研究でタンパク質間相互作用を報告していた USP34 について、siRNA による発現抑制が POLH および POLH のクロマチンへの導入に関わる PCNA のユビキチン化状態およびタンパク質の安定性について解析した。具体的には、紫外線照射条件の異なる非同調細胞および同調した細胞を用いて、USP11 および USP34 の発現抑制を行い、細胞のクロマチン画分における POLH と PCNA の定量的解析を中心に行った。

### ②TLS 反応に関与するクロマチン構造変換因子の解析

これまでの研究から、DNA 損傷トランスへの関与を示してきたクロマチンリモデラーの SMARCAD1 と CHD9 について、発現抑制による POLH の損傷部位への導入を詳細に解析した。多光子励起生細胞顕微鏡を用いた解析ならびに従来の局所紫外線照射による手法で、EGFP-POLH のセルイメージを取得して画像データを解析することで、損傷誘発から TLS 反応の開始段階における SMARCAD1 の影響を解析した。具体的には、これまでに作成した EGFP-POLH 安定発現細胞を G1/S 期同調し、マイクロポアメンブレンフィルターを通して核の局所に紫外線を照射し、SMARCAD1 と CHD9 の発現抑制により POLH の紫外線照射部位への導入効率を解析を中心に行った。

### ③TLS 反応を特異的に阻害する化合物の探索

TLS ポリメラーゼを対象とした阻害活性化合物のスクリーニングにより得られた化合物とその類似化合物を用い、代表的な DNA ポリメラーゼも対象としたプライマー伸長法に基づく特異性試験の実施と細胞レベルでのシスプラチン感受性における化合物の影響ならびに局所紫外線照射部位への POLH の導入に対する化合物の影響を解析した。

## 4. 研究成果

①ヒトの主要な損傷乗り越え DNA 合成酵素 POLH と相互作用する因子として同定した脱ユビキチン化酵素 UPS11 について、これまでの研究から USP11 の発現抑制が POLH の安定性に関わる可能性を見出していた。そこで、過剰チミジン存在下で細胞を G1/S 境界に同調した場合と細胞周期

を再開させてからの POLH の発現レベルにおける USP11 の発現抑制の影響を調べた。その結果、細胞を G1/S 期に同調させることで POLH だけでなく USP11 の発現レベルが非同調時に比べて有意に上昇した。USP11 を発現抑制すると POLH の発現レベルが低下したことから、USP11 は S 期に先立って POLH のタンパク質量を増加させ、S 期で必要とされる TLS に備えていることが示唆された。一方で、USP34 の発現抑制は POLH の発現レベルに影響しなかった。また、S 期以前の POLH の発現量を調べるため、S 期の開始に重要な CDC7 の阻害剤により細胞を主に G1 期に同調したところ、POLH のタンパク質量は検出限界まで低下した。これらの結果は、USP11 が、ユビキチン依存的な POLH の分解に拮抗する役割を持つ可能性を見出した。また、POLH の複製の正確性は損傷部位以外では極めて低いことから、DNA 修復に伴う DNA 合成などに POLH が関わらないよう S 期以外では積極的に分解されている可能性を示唆した。これに対し、損傷依存的なクロマチンでの POLH の増加と PCNA のモノユビキチン化への USP11 と USP34 の関与を調べた結果、USP11 の発現抑制により、PCNA のモノユビキチン化レベルと POLH の検出レベルが優位に減弱した。一方で、USP34 の関与は認められなかった。これにより、USP11 が PCNA のモノユビキチン化状態を維持を介して POLH の損傷部位への導入に関わる可能性が示された。

②これまでに EGFP 融合タンパク質として POLH を安定発現する細胞を樹立し、PCNA との局在解析を行、核内の「複製の場」に局在するレプリソームを可視化して S 期進行のモニタリングを可能にしていた。この細胞に対して、クロマチンリモデラーである SMARCAD1 あるいは CHD9 を発現抑制し、G1/S 期同調してから S 期を進行させたのち、局所紫外線照射による損傷部位での POLH の導入効率を調べた。なお、SMARCAD1 ならびに CHD9 の発現抑制は、細胞増殖や細胞周期の進行には影響を与えないことを確認している。その結果、SMARCAD1 あるいは CHD9 に対する 2 種類の siRNA を用いて発現抑制すると、S 期における紫外線部位への EGFP-POLH の導入効率が有意に減弱した。損傷部位への POLH の導入には PCNA のモノユビキチン化が重要であることから、モノユビキチン化 PCNA のレベルをウエスタンブロットで確認したところ影響は認められなかった。このことから、損傷部位への POLH の導入において、損傷周辺のクロマチン構造の調節もしくはクロマチンリモデラーと POLH の相互作用が損傷部位への効率的な POLH の導入に関わる可能性が示された。そこで、クロマチンリモデラーとしての活性に必須な ATP 加水分解活性に関わるアミノ酸の変異体を作成し、発現抑制による影響を相補できるか解析を行なっている。またこの過程で、SMARCAD1 が損傷部位に集積することを見出した。そこで、S 期以外での損傷応答における SMARCAD1 の関与を調べるため、G1 期に同調した細胞で局所紫外線照射を行った結果、S 期以外でも SMARCAD1 が損傷部位に集積する可能性を示唆する結果を得ている。紫外線損傷の修復は主にヌクレオチド除去修復が担うことから、現在、SMARCAD1 の発現抑制が損傷部位へのヌクレオチド除去修復因子の導入に関与するかについても調べている。

③理化学研究所（理研）NPDepo が所有する約 30,000 種類の天然化合物からなるライブラリーから POLH との結合を指標に 44 種類の化合物を同定し、Strand Displacement Assay (SDA) と Primer Extension Assay (PEA) による阻害効果の評価により、9 種類の化合物が候補化合物として残った。そこで、POLH 以外の TLS ポリメラーゼを含めて、ヒト DNA ポリメラーゼの 4 つのファミリーを全て含む代表的な 7 種類 (POLH、POLI、POLK、POLA、POLB、POLG、POLM) に対して特異性の検証を行った。その結果、POLH に比較的特異性の高い化合物を 4 種類 (化合物 A~D) を見出した。そこで、POLH に対する阻害機構を詳細に解析するため、プライマー伸長反応を①プライマー/基質 DNA との結合と②活性部位への dNTP の結合 (プライマーの伸長) の 2 ステップに区別して解析した。初めに、①に対する影響をゲルシフトアッセイ (EMSA) により調べた。その結果、程度の違いはあるが化合物 A、C、D は DNA との結合を阻害し、化合物 B は阻害しなかった。次に、酵素反応速度論による解析を試みたところ、化合物 A と B は非競合阻害、化合物 C と D は競合阻害であることが示唆された。X 線結晶構造解析により明かな POLH の酵素活性領域と化合物の分子モデルを用いた結合予測を行った結果、化合物 A と B は POLH と鋳型 DNA の結合に対して競合的に作用する可能性が示され、生化学的な解析と矛盾しない結果を得た。さらにこれら 4 種類の化合物の細胞レベルでの影響を調べるため、EGFP-POLH 発現細胞に局所紫外線照射し、損傷部位での POLH の集積効率を評価した、その結果、化合物 B で有意差が得られたものの、生化学的な結果とは必ずしも一致しなかった。さらに、シスプラチンに対する細胞の感受性試験を行った結果、化合物 B は影響を与えなかったものの、残り 3 種類の化合物は感受性が亢進することを示す結果が得られた。化合物の細胞内での安定性や代謝経路など不明

以上は、当該分野の発展に貢献する新規性の高い研究成果であり、DNA 損傷部位で停止した染色体複製反応の迅速な再開・継続における TLS 機構の役割を解明するうえで重要な知見であると考えている。また、TLS ポリメラーゼを阻害する化合物の解析から、細胞内での化合物の安定性や代謝など不明な点は多いものの、シスプラチンなどと併用して治療効果を上げる抗がん剤の開発につながることを期待される基礎的な知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 仲野由佳梨, 案濟萌, 菅野新一郎, 安井明, 酒井恒, 菅澤薫, 花岡文雄, 横井雅幸
2. 発表標題 脱ユビキチン化酵素による損傷乗り越え合成の制御機構の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤木純一, 横井雅幸, Young-Man Cho, 岩井成憲, 花岡文雄, 菅澤薫, 小川久美子
2. 発表標題 グリシドアミドN7位デオキシグアノシン付加体による点突然変異に寄与する損傷乗り越え型DNAポリメラーゼの解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤木純一, 横井雅幸, Young-Man Cho, 岩井成憲, 花岡文雄, 菅澤薫, 小川久美子
2. 発表標題 損傷乗り越え型DNAポリメラーゼPol <sub>I</sub> とREV1はグリシドアミドN7位デオキシグアノシン付加体による点突然変異に寄与する
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 184.Jun-ichi Akagi, Masayuki Yokoi, Young-Man Cho, Shigenori Iwai, Fumio Hanaoka, Kaoru Sugawara, Kumiko Ogawa
2. 発表標題 The N7-glycidamide adduct of 2'-deoxyguanosine on the template strand induces DNA replication inhibition and mutagenesis in human cells
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
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
---------	---------