

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12181

研究課題名(和文) DNAポリメラーゼ (ゼータ) が関与する内在的DNA構造と変異誘発の分子機構

研究課題名(英文) Mutagenesis by translesion synthesis bypass endogenous DNA structures by DNA polymerase zeta

研究代表者

鈴木 哲矢 (Suzuki, Tetsuya)

広島大学・医系科学研究科(薬)・助教

研究者番号：20573950

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)：損傷乗り越えDNA合成を行うDNAポリメラーゼ(Pol)の1つであるPolの欠失はゲノム不安定性を引き起こす。本研究では、Polを必要とする内在的なDNA構造を検討し、Polが関与する変異およびゲノム不安定性要因を解析した。内在的に多く生じるDNA損傷である8-oxo-7,8-dihydroguanineや脱塩基部位およびリボヌクレオチドのバイパスにはPolが関与していない可能性が示唆された。一方で、非B型構造であるZ形構造や三重鎖構造ではPolの低正確性および低活性変異細胞で変異頻度の変化が見られたことから、これらのDNA構造の複製にPolが関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Polが内在的に多く生じるDNA損傷である8-oxo-7,8-dihydroguanine、脱塩基部位およびリボヌクレオチドの複製には関与しないことおよび非B型構造であるZ形構造や三重鎖構造の複製に関与する可能性を明らかにした。これらの研究成果は、内在的に生じるDNA損傷などよりも非B型DNA構造の方がPol欠損時のゲノム不安定性に関与している可能性を示唆しており、通常の複製条件下で起こるゲノム不安定性の要因を解明するうえで重要な結果であると考えられる。今後、さらに他のDNA構造とPolとの関連を研究することによりゲノム不安定化機構の解明と発癌との関連を明らかにできることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Deficiency of DNA polymerase (Pol), which is one of translesion DNA polymerases, causes genomic instability. In this study, the roles of Pol in mutagenesis and genomic instability in replication across endogenous chemical and higher-order structures were analyzed. Pol could not be significantly involved in the bypass of 8-oxo-7,8-dihydroguanine and abasic site, endogenous DNA damages that occurs frequently, and ribonucleotides that are incorporated into DNA during replication. On the other hand, the mutation frequencies of plasmid with non-B-form DNA, such as Z-form and triplex structures, were changed in Pol mutant cells (low-fidelity and weak-catalytic-activity mutants). This result suggests that Pol can be involved in replication of Z-form and triplex structures.

研究分野：生物系薬学、分子生物学、DNA損傷学

キーワード：DNA損傷 非B型DNA 変異 損傷乗り越えDNA合成 DNAポリメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

損傷乗り越え (TLS) 型 DNA ポリメラーゼ (pol) は、DNA 損傷などにより DNA 複製が停止した時に複製型 DNA pol (pol δ 、pol ϵ) に代わって DNA 合成を行うことで複製を継続させるために必要である。TLS 型 DNA pol の中でも Pol ζ は、様々な損傷塩基の TLS に関わっており、TLS において極めて重要な役割を担っている。Pol ζ は、損傷塩基の TLS を行う際に変異を誘発する一方で、その欠損は DNA 損傷誘発時のみならず、非ストレス条件下でさえゲノム不安定性の誘因となる。このことから、化学物質などにより外因的に生じる DNA 損傷以外にも Pol ζ による DNA 合成を必要とする DNA 構造が内在的に存在すると考えられる。しかしながら、Pol ζ 欠損時のゲノム不安定性の原因となる内在的な DNA の化学構造および高次構造は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、Pol ζ による合成を必要とする内在的な DNA 構造要因を明らかにするとともに、それにより誘発される変異やゲノム不安定性の詳細を明らかにすることを目的とした。化学構造として内在的に多く生じる DNA 損傷である 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-OH-G) や脱塩基部位、複製時によく誤って DNA 中に取り込まれるリボヌクレオチドおよび高次構造として非 B 型 DNA (図 1) によって誘発される変異における Pol ζ の関与とその影響を検証した。

3. 研究の方法

シャトルプラスミドを用いた変異解析

変異検出用レポーターである *supF* 遺伝子を含む SV40 および EBNA1-OriP の複製系を基盤としたシャトルプラスミドの *supF* 遺伝子近傍に非 B 型 DNA 構造 (Z 型構造、三重鎖構造、G 四重鎖構造、十字型構造) を取る配列を含むプラスミドを作製した。また、SV40 の複製系を基盤としたシャトルプラスミドの一本鎖環状 DNA および化学合成した 8-OH-G、脱塩基部位アナログ (tetrahydrofuran, THF)、リボグアノシン (rG)、リボアデノシン (rA) を含むオリゴデオキシリボヌクレオチドを用いて DNA ポリメラーゼ・リガーゼ反応により *supF* 遺伝子中に DNA 損傷を含むプラスミドを作製した。

これらのプラスミドをエレクトロポレーション法によりヒト TK6 細胞の野生型 (WT) および変異型 Pol ζ (REV3 L2618M: 低正確性型 (LF)、REV3 D2781N: 低活性型 (WCA)) 発現細胞に導入した。導入して 48 時間培養後に細胞からプラスミドを抽出し、*Dpn I* により複製されていないプラスミドを分解後、指示大腸菌 RF01 に導入して *supF* 変異体頻度の測定および変異の解析を行った。

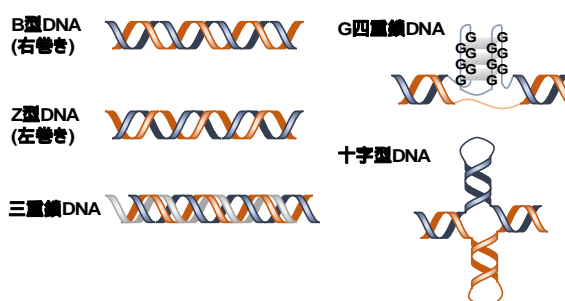


図 1 非 B 型 DNA の構造

ゲノムでの変異解析方法の確立

TK1 遺伝子のエキソン 6 近傍のイントロンに非 B 型構造 (Z 型構造、三重鎖構造、G 四重鎖構造) を取る DNA 配列を導入したターゲティングベクターを作製し、これらのベクターを *TK1* 遺伝子のエキソン 6 を標的とする sgRNA を発現する CRISPR/Cas9 プラスミドと TK6 細胞に共導入した。導入して 72 時間培養後に薬剤選択により目的の配列がゲノム中の *TK1* 遺伝子に挿入された細胞をスクリーニングした。これらの細胞を HAT 培地で培養して TK 変異体を除いた後、7 日間培養し、トリフルオロチミジン存在下で培養して *TK* 遺伝子変異頻度を測定した。

AAVS1 領域にターゲティング可能な TetOn ベクターに Cre recombinase 遺伝子を挿入したプラスミドを作製した。このプラスミドを AAVS1 領域を標的とする sgRNA を発現する CRISPR/Cas9 プラスミドと TK6 細胞に共導入した。導入して 48 時間培養後に薬剤選択により目的の配列がゲノム中の AAVS1 領域に挿入された細胞をスクリーニングした。さらに、この細胞に、RMCE (Recombinase-Mediated Cassette Exchange) 法のアクセプターとなる配列を *TK1* 遺伝子のエキソン 5 と置換するようにノックインした細胞を作製した。さらに、*TK1* 遺伝子のエキソン 5 を含むドナープラスミドを作製した。ドキシサイクリンにより Cre recombinase の発現を誘導した細胞にドナープラスミドを導入後、ピューロマイシン選択により RMCE の効率を測定した。

4. 研究成果

非 B 型 DNA による変異誘発

supF 遺伝子近傍に高次構造を取る DNA 配列 (Z 型構造、三重鎖構造) を導入した SV40 origin と large T 抗原を基盤としたシャトルプラスミドを用いて変異解析を行った (図 2)。その結果、低正確性型 Pol ζ 発現細胞では、Z 型構造および三重鎖構造を導入したプラスミドのいずれも野生型細胞と比較して変異体頻度に差は見られなかった。一方、低活性型 Pol ζ 発現細胞では、野生型細胞と比較して、Z 型構造を導入したものは変異体頻度が高く、三重鎖構造を導入したものは変異体頻度が低い傾向が見られた。また、変異スペクトル解析の結果、B 型構造を取る DNA 配列を導入したコントロールを含む全てのプラスミドにおいて APOBEC3 が関与すると考えられる変異 (TpC/GpA 配列中の C/G での変異) が多数検出された。三重鎖構造を有するプラスミドでは、他のプラスミドと比較して *supF* 遺伝子のセンス鎖における C での変異が増加し、クラスター変異が多く見られた。これらの変異は、低活性型 Pol ζ 発現細胞で減少する傾向があった。また、Z 型構造を有するプラスミドでは、野生型や低正確性型 Pol ζ 発現細胞では、G:C \rightarrow A:T、G:C \rightarrow T:A の割合が多かったが、低活性型 Pol ζ 発現細胞では G:C \rightarrow C:G 変異の割合が多かった。以上の結果から、これらの DNA 構造の複製に Pol ζ が関与している可能性が示唆された。

さらに、非 B 型 DNA 構造の影響を詳細に解析するため、複製様式が染色体 DNA のそれに近い Epstein-Barr ウイルスの OriP と EBNA1 のシステムを搭載したシャトルプラスミドを作製し、非 B 型配列 (Z 型構造、三重鎖構造、G 四重鎖構造、十字型構造) の変異への影響を解析した。いずれの非 B 型構造についてもコントロールと比較して大きな変異体頻度の変化はなく、また、細胞ごとにおいても差は見られなかった。しかしながら、SV40 を基盤とした実験系と比較して細胞からのプラスミドの回収量が少なく変異体頻度の測定に用いたコロニー数が少なかったためさらなる検討の必要があると考えられた。

損傷 DNA・リボヌクレオチドによる変異誘発

8-OH-G および THF を導入したプラスミドでは損傷を含まないコントロールプラスミドと比較して変異体頻度が上昇したものの、各細胞での変異体頻度に差は見られなかった (図 3)。また、rA および rG を導入したプラスミドでも同様に変異体頻度が上昇したものの、細胞間での差は見られなかった (図 4)。これらの結果から、8-OH-G や THF といった損傷 DNA やリボヌクレオチドのバイパスに Pol ζ が大きく関与していない可能性が示唆された。

非 B 型 DNA 配列を有する細胞の作製

非 B 型構造 (Z 型構造、三重鎖構造、G 四重鎖構造) を取る DNA 配列を *TK1* 遺伝子のエキソン 6 の近傍に導入した TK6 細胞を作製した。これらの細胞の *TK* 遺伝子変異頻度を測定した結果、いずれの細胞も B 型構造を取るコントロール配列を導入した細胞と同程度の変異体頻度を示した。

RMCE法を利用した DNA 損傷のゲノム中への導入方法の確立

RMCE 法を用いて、染色体中の特異的部位に損傷塩基を有する DNA を導入可能な系 (図 5) を構築するために、Tet-On システムを用いて Cre recombinase を薬剤 (ドキシサイクリン) で発現誘導可能な細胞を作製した。また、この細胞に、RMCE 法のアクセプターとなる配列を *TK1* 遺伝子のエキソン 5 と置換するようにノックインした細胞を作製した。さらに、*TK1* 遺伝子のエキソン 5 を含むドナープラスミドを導入し、RMCE の効率を測定した結果、その効率は、約 0.1% と低かったものの、ほぼ全ての細胞において *TK1* 遺伝子の機能が回復していた。さらに、RMCE

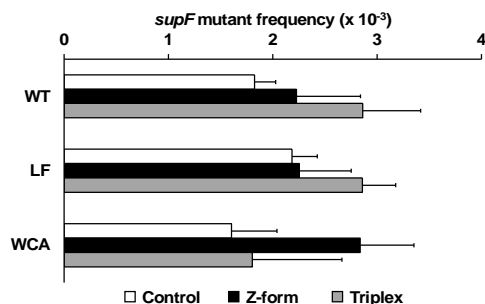


図 2 非 B 型 DNA の変異体頻度

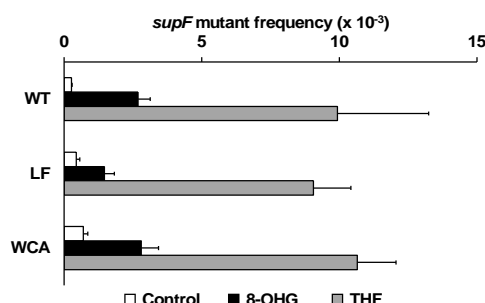


図 3. 損傷 DNA の変異体頻度

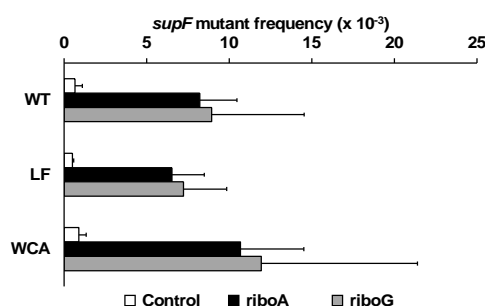


図 4 リボヌクレオチドの変異体頻度

の効率を上げる必要がある。

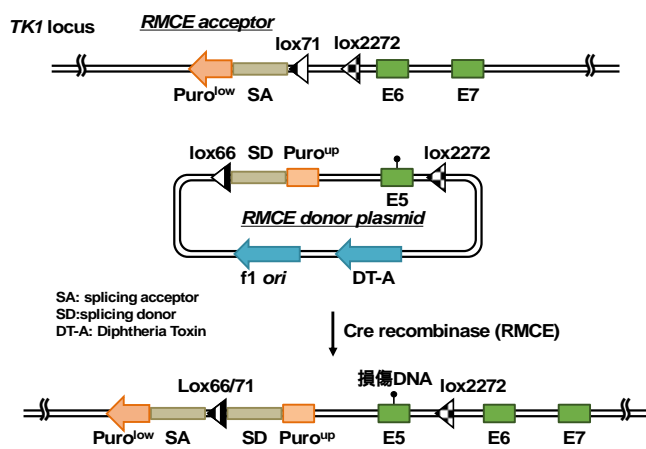


図 5 RMCE によるゲノム中への DNA 損傷の導入

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tetsuya Suzuki, Yudai Zaima, Toshihiro Fujikawa, Ruriko Fukushima, Hiroyuki Kamiya	4. 巻 111
2. 論文標題 Paradoxical role of the major DNA repair protein, OGG1, in action-at-a-distance mutation induction by 8-oxo-7,8-dihydroguanine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dnarep.2022.103276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tetsuya Suzuki, Hiroshi Masuda, Madoka Mori, Rikako Ito, Hiroyuki Kamiya	4. 巻 36
2. 論文標題 Action-at-a-distance mutations at 5'-GpA-3' sites induced by oxidized guanine in WRN-knockdown cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 349-357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/mutage/geab027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tetsuya Suzuki, Yuri Katayama, Yasuo Komatsu, Hiroyuki Kamiya	4. 巻 46
2. 論文標題 Similar frequency and signature of untargeted substitutions induced by abasic site analog under reduced human APE1 conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 283-288
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.46.283	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 Tetsuya Suzuki, Akira Sassa, Petr Gruz, Ramesh C Gupta, Francis Johnson, Noritaka Adachi, Takehiko Nohmi	4. 巻 100
2. 論文標題 Error-prone bypass patch by a low-fidelity variant of DNA polymerase in human cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103052
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dnarep.2021.103052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ruriko Fukushima, Tetsuya Suzuki, Hiroyuki Kamiya	4. 巻 42
2. 論文標題 New indicator Escherichia coli strain for rapid and accurate detection of supF mutations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 Article No. 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41021-020-00167-x	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16件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鈴木 哲矢
2. 発表標題 遺伝子改変細胞を用いたDNA損傷による変異誘発とその制御機構の解明
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroyuki Kamiya, Tetsuya Suzuki
2. 発表標題 Effects of OGG1-knockdown on untargeted substitutions and large deletions induced by 8-hydroxyguanine
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木哲矢、福島瑠里子、紙谷浩之
2. 発表標題 7,8-dihydro-8-oxoguanineによる遠隔作用変異誘発の方向性
3. 学会等名 第60回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 哲矢、紙谷 浩之
2. 発表標題 8-Oxo-7,8-dihydroguanineによる遠隔作用変異誘発におけるCpGメチル化の影響
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 福島瑠里子、鈴木 哲矢、紙谷 浩之
2. 発表標題 8-Oxo-7,8-dihydroguanineにより誘発される遠隔作用変異へのAPOBEC3シトシンデアミナーゼの関与
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 安井 聖晴、鈴木 哲矢、紙谷 浩之
2. 発表標題 DNA中に取り込まれたriboguanosineによる遠隔作用変異の解析
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 鈴木哲矢、福島瑠里子、紙谷浩之
2. 発表標題 8-Oxo-7,8-dihydroguanineを起点とした遠隔作用変異誘発におけるAPOBEC3の関与
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tetsuya Suzuki, Hiroyuki Kamiya
2. 発表標題 Effects of lagging- and leading-strand syntheses on mutagenesis in translesion DNA synthesis by DNA polymerase
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroyuki Kamiya, Tetsuya Suzuki
2. 発表標題 Effects of OGG1-knockdown on untargeted substitutions and large deletions induced by 8-hydroxyguanine
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 益田 裕司、鈴木 哲矢、紙谷 浩之
2. 発表標題 WRN、poI のノックダウンと8-hydroxyguanineによる遠隔作用変異誘発
3. 学会等名 第59回 日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木哲矢、紙谷浩之
2. 発表標題 DNA一本鎖切断により誘発される変異
3. 学会等名 第59回 日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福島 瑠里子、鈴木 哲矢、紙谷 浩之
2. 発表標題 supF遺伝子変異解析における有用な新規大腸菌株の作製
3. 学会等名 日本環境変異原学会 第49回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 財間 悠大、鈴木 哲矢、河合 秀彦、紙谷 浩之
2. 発表標題 8-Oxo-7-8-dihydroguanine による遠隔作用変異誘発への OGG1 と WRN のダブルロックダウンの影響の解析
3. 学会等名 日本環境変異原学会 第49回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 哲矢
2. 発表標題 遺伝子改変細胞を用いた変異誘発制御の分子機構の解明
3. 学会等名 日本環境変異原学会 第49回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田 翔吾、鈴木 哲矢、河合 秀彦、紙谷 浩之
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いたsupF遺伝子変異解析系の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福島 瑠里子、鈴木 哲矢、河合 秀彦、紙谷 浩之
2. 発表標題 変異シグネチャー解析による8-hydroxyguanineにより誘発される遠隔作用変異誘発機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021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
---------	---------