

機関番号: 15401

研究種目: 若手研究(B)

研究期間: 2009~2010

課題番号: 21710059

研究課題名(和文) DNA複製及び転写に対するDNA-タンパク質クロスリンク損傷の影響

研究課題名(英文) Effects of DNA-protein crosslink lesions on DNA replication and transcription

研究代表者

中野 敏彰(NAKANO TOSHIAKI)

広島大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号: 10526122

研究成果の概要(和文):

DNA-タンパク質クロスリンク(DPC)は非常に bulky なゲノム損傷であり、ヌクレオチド除去修復ではほとんど修復されない。したがって、DNA複製や転写に重篤な影響をおよぼすことが予想される。本研究では、部位特異的にDPCを含むDNA基質を調製し、DNA複製および転写に対する影響を *in vitro* で検討することを目的とした。複製ヘリカーゼであるDnaBに対する影響を検討した結果、ラギング鎖にDPCがある場合、DnaBの進行はDPCのサイズ依存的に阻害されるが、リーディング鎖にDPCがある場合、その進行は阻害されないことが明らかとなった。現在、転写に対する影響を検討するため、転写鎖および非転写鎖にDPCを含む鋳型DNAの構築が完了し、T7 RNAポリメラーゼの転写反応に対する影響の検討を進めている。

研究成果の概要(英文):

DNA-protein crosslinks (DPCs) are extremely bulky genomic lesions and are not efficiently repaired by nucleotide excision repair, suggesting that DPCs will exert detrimental effects on DNA replication and transcription in cells. In this study, we have prepared model DNA substrates containing site-specific DPCs and assessed their effects on DNA replication and transcription *in vitro*. DPCs on the lagging strand inhibited the progression of DnaB, the replicative helicase of *E. coli*, in a DPC size-dependent manner. Conversely DPCs on the leading strand had no effects on the progression of DnaB. We also have prepared DNA templates containing DPCs for *in vitro* transcriptions studies with T7 RNA polymerase. We are currently assessing the effects of DPCs in transcribed and nontranscribed strands on transcription.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野: ゲノム損傷

科研費の分科・細目: 環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード: 修復 複製 転写

1. 研究開始当初の背景

生物のゲノムには様々なタンパク質が付随しており、複製や転写の際には、これらのタンパク質が速やかに解離あるいは転位することにより遺伝情報の読み出しが行われる。放射線、アルデヒド化合物、アルキル化剤など多くのゲノム損傷誘発因子はDNAとタンパク質の間に架橋を形成し、DNA-タンパク質クロスリンク (DPC) 損傷を生じる。我々は、これまでの研究でDPC修復機構の概要を明らかにした。一般に、bulkyなゲノム損傷はヌクレオチド除去修復 (NER) により除去されるが、DPCは従来のbulkyな損傷に比べはるかに大きいため、除去効率が非常に低いことが明らかとなった。したがって、ゲノムに生じたDPCの多くはそのまま残留し、DNA複製や転写に影響をおよぼすと予想された。

2. 研究の目的

多くのゲノム損傷誘発因子はDNAとタンパク質の間に架橋を形成し、非常にbulkyなDPC損傷を生じる。しかし、NERによる修復効率が低いため、DNA複製や転写に重篤な影響をおよぼすと予想される。しかし、DPCがDNA複製や転写にどのような影響を与えるかは明らかにされていない。本研究では、DPCを部位特異的に導入したDNA基質を構築し、*in vitro*におけるDNA複製ヘリカーゼおよび転写反応に対する影響を明らかにし *in vivo* 研究への研究基盤を構築する。

3. 研究の方法

1) 複製ヘリカーゼ反応

本研究では、oxanine (OXA) とタンパク質の選択的な反応 (図1) を用いてDPCを部位特異的に含むY字型の複製フォークモデル基質を調製した。この目的で、OXAを含むオリゴヌクレオチド (85mer) を化学合成し、これを種々

のサイズのタンパク質 (1.6-44 kDa、表1) とインキュベートした。反応後、DPCを形成したDNAをPAGEで分離し、ゲルから抽出した。これを相補鎖 (5' -³²P標識) とアニールし、複製ヘリカーゼ反応のY字型複製フォークモデルDNAを調製した。このY字型基質を大腸菌DnaBとインキュベートし、未変性PAGEで反応生成物を分析した。反応生成物は放射活性により定量した。

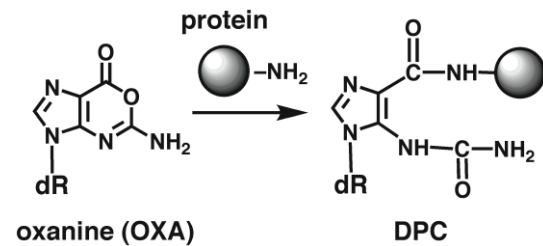


図1 OXAとタンパク質のDPC形成反応

表1 DPC導入に用いたタンパク質

Protein	Amino acids	MW
platelet factor-4	13	1573
β-endorphin	31	3465
midkine (60-121)	62	6789
histone H2A	130	14091
T4 endonuclease V	137	16046
hNEIL1 glycosylase	390	43710

2) 転写反応

OXAを含むオリゴヌクレオチド (60mer) およびT7プロモターを含むオリゴヌクレオチド (60mer) 化学合成した。T4DNAリガーゼによる両者の連結前あるいは連結後にOXAとタンパク質 (表1) をクロスリンクさせ、複製ヘリカーゼの場合と同様に精製した。得られたDPCを含むDNA (120mer) を相補鎖とアニールし、転写鎖および非転写鎖にDPCを含む鋳型DNAを調製した。鋳型DNAをT7 RNAポリメラーゼおよびNTPとインキュベートし、変性PAGE

で転写産物を分析した。転写産物は取り込まれた³²P-UTPにより定量した。比較のため行ったDNAポリメラーゼ反応には、DPCを含む120merを鋳型として用いた。

4. 研究成果

1) DPCが複製におよぼす影響

大腸菌複製ヘリカーゼ DnaB は、複製ポリメラーゼである Pol III ホロ酵素に先立って複製フォークの先頭でDNA二重らせんを巻き戻し一本鎖に変換する。本研究ではリーディング鎖およびラギング鎖およびDPCを含むフォーク型基質をDnaBとインキュベートし、巻き戻し生成物を定量した。

リーディング鎖にDPCがある場合、すべてのDPCで巻き戻された生成物が観察された。巻き戻された生成物量の時間変化からヘリカーゼの反応速度を比較したが、DPCを含まないコントロール基質とすべてのDPCで反応速度に有意な差は認められなかった。一方、ラギング鎖にDPCがある場合、クロスリンクタンパク質のサイズが6.8 kDa以下では巻き戻し生成物が生成したが、これより大きいクロスリンクタンパク質では巻き戻し生成物は観察されなかった。

以上の結果から、リーディング鎖のDPCはDnaBヘリカーゼの進行を阻害しないが、ラギング鎖のDPCはサイズ依存的にDnaBヘリカーゼの進行を阻害することが明らかとなった。環状6量体構造を形成したDnaBがラギング鎖を取り囲むように結合し、二本鎖DNAを解離しながら複製フォークが進行するモデルが提案されている。この環状構造のホールサイズをクロスリンクタンパク質がすり抜けられるかどうかで進行の阻害が生じるか決まると考えられる。そのため、ラギング鎖においては、環状構造をすりぬけられるサイズのタンパク質(6.8 kDa以下)は阻害を

示さず、それ以上大きいタンパク質ではヘリカーゼとの立体障害のため進行が停止したと考えた。一方、リーディング鎖はDnaBの環状構造のホール外側を通るため、DPCとの立体障害が起らずヘリカーゼの進行が阻害されなかったと考えた。

本研究で得られた結果、および、従来のbulkyな損傷(CPDや芳香族付加体)のサイズが0.5 kDa以下であることを考慮すると、従来のbulkyな損傷はリーディング鎖およびラギング鎖いずれにあってもDnaBの進行を阻害しない。その結果、DnaBを通過しPol IIIホロ酵素に到達し、活性部位におけるヌクレオチドの取込を阻害する。一方、細胞内でDPCを形成するDNA結合タンパクのサイズが10 kDa以上であることから、細胞内においては、リーディング鎖のDPCはDnaBヘリカーゼの進行を阻害しないが、ラギング鎖のDPCはDnaBヘリカーゼの進行を阻害すると予想される。したがって、リーディング鎖上の従来のbulkyな損傷およびDPCはいずれもポリメラーゼブロックとして作用するが、ラギング鎖上にある場合、従来のbulkyな損傷はポリメラーゼブロック、DPCはヘリカーゼブロックとして作用することになる。このような違いが、損傷応答や複製再開にどのような影響を与えるか興味深い。

2) DPCが転写におよぼす影響

本研究では、単一ペプチドからなるT7 RNAポリメラーゼと転写鎖および非転写鎖にDPCを含む鋳型DNAをインキュベートし転写産物を分析した。

転写鎖にDPCがある場合は、runoff生成物の量が大きく減少し、DPC部位で転写が停止した産物の蓄積が認められた。runoff生成物の生成量はDPCサイズ依存的に減少したが、大きいクロスリンクタンパク(表1)を含む

DPCにおいても runoff 生成物がわずかに生じた。この結果から、転写鎖の DPC は T7 RNA ポリメラーゼを強く阻害するが、完全にはブロックしないと予想された。比較のために、同じ鋳型（一本鎖）を用いて DNA ポリメラーゼ I（Klenow fragment）を用いて複製反応を行った。用いたすべての DPC（表 1）で DNA ポリメラーゼの進行が完全に停止した。この結果は、T7 RNA ポリメラーゼと DNA ポリメラーゼ I で DPC 乗り越え合成能に差があることを示唆する。

一方、非転写鎖に DPC がある場合は、runoff 生成物の量がわずかに減少したが、DPC 部位で転写が停止した産物の蓄積は認められなかった。この結果は、非転写鎖上の DPC は RNA ポリメラーゼが通過する際に立体障害とならず転写にほとんど影響を与えないことを示唆する。

従来の bulky な損傷は、転写鎖にある場合は RNA ポリメラーゼの進行を阻害するが、非転写鎖にある場合はまったく阻害しない。DPC においても定性的には同じ結果が得られたが、定量的な違いを今後検討していく必要があると考えられる。

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 3 件）

1. Ide H., Shoukamy M. I., Nakano T., Miyamoto-Matsubara M, and Salem A., Repair and biochemical effects of DNA-protein crosslinks, *Mutat. Res.*, (2011) in press.
2. Amir M. H., Nakano, T., Matoba N., Tuboi, T., Terato H., Yamamoto. K., Yamada. M, Nohmi. T. and Ide H., Genetics analysis of repair and damage tolerance mechanisms for DNA-protein crosslinks in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 191 (18), 5657-68 (2009)

3. Nakano, T., Katafuchi A., Matubara M., Terato H., Tuboi. T., Pack S. P., Makino K., Tauchi H and Ide H., Homologous recombination but not nucleotide excision repair plays a pivotal role in tolerance to DNA-protein crosslinks in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 284(40), 27065-27076 (2009)

〔学会発表〕（計 3 件）

1. 中野敏彰, その他(3 名), 試験管内反応を用いた DNA-タンパク質クロスリンク損傷の転写反応阻害の検討, 第 33 回日本分子生物学会年会, 2010 年 12 月 8 日, 神戸市
2. Toshiaki Nakano, et al. (3 名), Assesment of the activity of mammalian nucleotide excision repair for superbukly DNA lesions, 11th International Workshop on Radiation Damage to DNA, 15 May 2010, Atlanta, USA
3. Toshiaki Nakano, et al. (3 名), Activities of bacterial and human nucleotide excision repair systems for DNA-protein crosslink damage, ASM Conference on DNA Repair and Mutagenesis: From Molecular Structure to Human Disease, 2 Jun 2009, Whistler, Canada

〔その他〕

遺伝子化学研究室ホームページ

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/genechem/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 敏彰 (NAKANO TOSHIAKI)
広島大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：10526122

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し