

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12238

研究課題名(和文) PCNAのコピキチン化で制御される新規DNA損傷トレランス経路の解析

研究課題名(英文) Analysis of the novel DNA damage tolerance pathway regulated by PCNA ubiquitination

研究代表者

金尾 梨絵 (Kanao, Rie)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：30542287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではDNA損傷剤として天然セスキテルペン化合物のイルジンSを用いてヒト細胞のDNA損傷トレランスについて解析を行った。イルジンS損傷に対してコピキチンE3リガーゼのRFWD3がPCNAのコピキチン化依存的にDNA損傷トレランスに寄与していることを明らかにした。また、RFWD3のE3リガーゼ活性及びRPAとの相互作用がDNA損傷トレランスに重要であった。さらにRFWD3が紫外線損傷に対してもDNA損傷トレランスで重要な役割を果たすことを明らかにした。イルジンS損傷、紫外線損傷の両方に対してRFWD3はTLSポリメラーゼとは独立して働くことを明らかにした。

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DNA複製の阻害を解消することで複製の破綻を防ぎ、ゲノム安定性に寄与している。しかし、がん化した細胞では複製を進行させ、増殖に貢献する側面がある。また、抗がん剤の耐性への寄与も知られている。DNA損傷トレランスのメカニズムを明らかにすることは、ゲノム不安定化と細胞のがん化の関係やがん細胞の増殖の理解に貢献し、新たな抗がん剤開発につながることを期待される。本研究の成果により、ヒト細胞のDNA損傷トレランスのこれまで明らかになっていない経路について新たな知見が得られたことで、DNA損傷応答研究の進展に貢献した。また、がん研究の発展にもつながるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, I analyzed DNA damage tolerance in human cells using the natural sesquiterpene compound illudin S. I showed that the ubiquitin E3 ligase RFWD3 contributes to the PCNA ubiquitination-dependent DNA damage tolerance pathway in response to illudin S-induced DNA damage. The E3 ubiquitin ligase activity of RFWD3 and the interaction of RFWD3 with RPA were important for DNA damage tolerance. I also showed that RFWD3 contributes to DNA damage tolerance for UV-induced DNA damage. RFWD3 had a role independent of DNA lesion-specific TLS polymerases.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA損傷トレランス DNA損傷 DNA複製 コピキチン

## 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、種々の化学物質などによって生じる DNA 損傷は、転写や DNA 複製を阻害し、正常な細胞活動にとって障害となる。細胞には DNA 損傷による DNA 複製阻害を解消し、複製を継続させる DNA 損傷トレランスと呼ばれるメカニズムが備わっている。DNA 損傷トレランスは、DNA 複製因子である PCNA の 164 番目のリジン(K164)の翻訳後修飾によって制御されている。モノユビキチン化 PCNA は、損傷のある鋳型 DNA に塩基を重合できる特殊な DNA ポリメラーゼが損傷箇所の DNA 合成を担う、損傷乗り越え DNA 合成(TLS)を制御する。一方、ポリユビキチン化はテンプレートスイッチと呼ばれる変異を誘発しないメカニズムを制御すると考えられているが、ヒト細胞では TLS 以外のメカニズムの実体はよくわかっていない。これまでのヒト細胞での DNA 損傷トレランスの研究の多くは紫外線損傷を用いて行われてきた。紫外線損傷に対しては、TLS ポリメラーゼである DNA ポリメラーゼ・イータ(Pol $\eta$ )がモノユビキチン化 PCNA による制御を受け、主要な役割を担う。我々は、DNA 複製阻害の解消について報告がなかった、イルジン S 損傷について解析を行った。イルジン S はキノコ毒成分のセスキテルペン化合物であり、比較的高いアルキル化 DNA 損傷を形成し、転写や DNA 複製を阻害する。イルジン S 損傷は、転写と共役するヌクレオチド除去修復(TC-NER)で修復される。本応募者らは、PCNA のユビキチン化がイルジン S に対する細胞生存に重要であることを見出していた。また、イルジン S に対する細胞生存には TLS ポリメラーゼの一つである DNA ポリメラーゼ・カッパ (Pol $\kappa$ ) と、ユビキチン E3 リガーゼである RFWD3 がそれぞれ独立して関与することを見出していた。また、RFWD3、Pol $\kappa$ は両者とも PCNA のユビキチン化に依存することを観察していた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、イルジン S 損傷に対する DNA 損傷トレランスのメカニズムを解析すること、特に、これまで DNA 損傷トレランスにおける機能が知られていない RFWD3 の機能の解析により、ヒト細胞における、DNA 損傷トレランスの TLS 以外のメカニズムを解明することである。

### 3. 研究の方法

本研究は、イルジン S を DNA 損傷剤として用い、以下の解析を行った。

RFWD3 のイルジン S 損傷に対する機能解析

- 1 RFWD3 の既知の機能の必要性の解析
- 2 RFWD3 の相互作用因子の解析

RFWD3 及び Pol $\kappa$ 発現抑制細胞、PCNA のユビキチン化を抑制した細胞のイルジン S 誘発変異の解析

RFWD3 が関与する DNA 損傷トレランスの分子メカニズムの解析

紫外線損傷の DNA 損傷トレランスへの RFWD3 の関与の検討

### 4. 研究成果

RFWD3 の既知の機能として、E3 ユビキチンリガーゼと RPA との相互作用が知られていた。本研究では、これらの機能を失わせた RFWD3 変異体を細胞内に発現させ、内在性 RFWD3 を発現抑制し、イルジン S 感受性を調べた。E3 ユビキチンリガーゼ活性及び RPA との相互作用を欠失した変異体はイルジン S 感受性を相補できなかった(図 1)。このことから、DNA 損傷トレランスに RFWD3 の E3 リガーゼ活性と RPA との相互作用が重要であることがわかった。また、RFWD3 と RPA との細胞内相互作用を解析した。さらに、RPA 以外の RFWD3 相互作用因子を探索し、分子シャペロンである CCT complex が細胞内で相互作用することを見出した。

RFWD3 及び Pol $\kappa$ 発現抑制細胞、PCNA のユビキチン化を抑制した細胞のイルジン S 誘発変異を、*HPRT* 遺伝子の変異を指標とした解析方法により解析した。その結果、RFWD3 及び Pol $\kappa$ 発現抑制細胞、PCNA のユビキチン

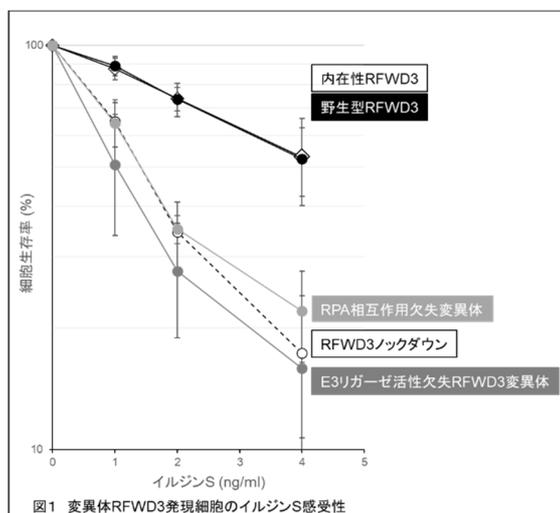
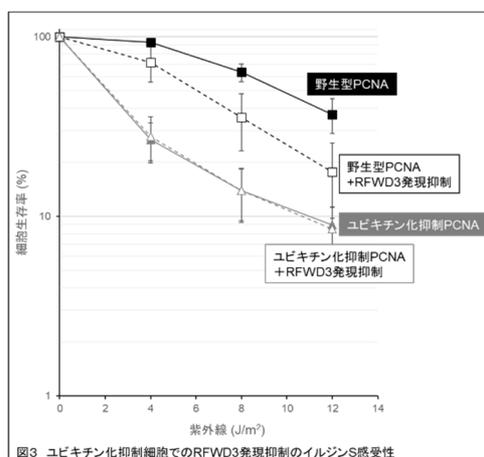
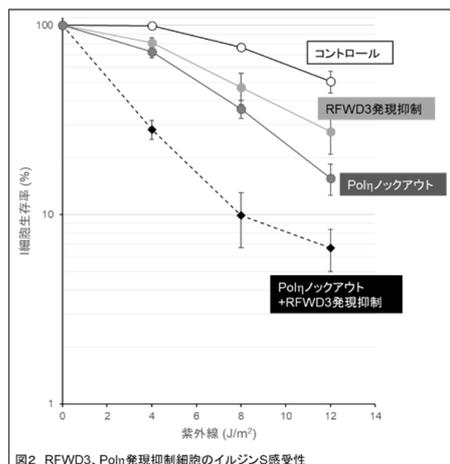


図1 変異体RFWD3発現細胞のイルジンS感受性

化を抑制した細胞で、コントロール細胞とイルジン S 誘発変異頻度が有意に変化するものはなかった。しかし、変異スペクトラムの解析により、RFWD3、Pol $\kappa$ 発現抑制細胞では、transversion 変異が増加していたことが分かった。さらに Pol $\kappa$ 発現抑制細胞では特に A:T T:A transversion 変異が増加しており、Pol $\kappa$ がアデニンの損傷に対して TLS を行っていることが示唆された。

の結果をふまえ、RFWD3 による RPA のユビキチン化について検討した。細胞内でイルジン S に応答して RFWD3 依存的に RPA がユビキチン化することを観察した。DNA 損傷トレランスにおける RPA のユビキチン化の重要性を調べるために、RPA ヘテロ 3 量体のサブユニットの RPA2 のユビキチン化部位のリジンをアルギニンに変異した変異体を発現する細胞株を樹立した。この細胞で内在性の RPA2 を発現抑制し、イルジン S 感受性を調べたところ、野生型 RPA と置換した細胞と比べ、有意な差は見られなかった。このことから、RPA のユビキチン化はイルジン S 損傷の DNA 損傷トレランスには重要でないことが示唆された。また、RFWD3、Pol $\kappa$ 発現抑制細胞でイルジン S 曝露後の S 期の進行、1 本鎖 DNA の露出、二本鎖切断マーカー、DNA 合成を調べ、これらの細胞ではイルジン S 曝露後に、複製フォークのアンカップリング、複製フォークの崩壊、S 期進行遅延、DNA 合成の低下が見られることが分かった。さらに、これらの表現型は RFWD3、Pol $\kappa$ を同時にノックダウンすることで相加的な効果が見られ、RFWD3 Pol $\kappa$ がそれぞれ独立して DNA 損傷トレランスに重要な役割を果たすことが明らかになった。

RFWD3 の DNA 損傷トレランスにおける機能がイルジン S 損傷に限定されるのかどうかを調べるために RFWD3 発現抑制細胞で紫外線感受性、紫外線照射後の DNA 合成を調べた。その結果、RFWD3 の発現抑制により紫外線感受性が亢進し (図 2) 紫外線照射後の DNA 合成の障害を観察した。この結果から、RFWD3 は紫外線損傷に対しても DNA 損傷トレランスに重要であることが明らかになった。さらに、紫外線損傷の DNA 損傷トレランスにおける主要な TLS ポリメラーゼである Pol $\eta$  ノックアウト細胞でも RFWD3 の発現抑制により紫外線感受性が亢進する (図 2) ことから、RFWD3 は Pol $\eta$ とは独立して働くことが分かった。イルジン S 損傷の結果と紫外線損傷の解析結果から、RFWD3 は TLS ポリメラーゼとは別の DNA 損傷トレランス経路に関わることが示唆された。PCNA のユビキチン化を抑制した細胞で RFWD3 を発現抑制すると紫外線感受性の亢進が見られなかった (図 3) ことから、紫外線損傷でも RFWD3 は PCNA のユビキチン化に依存して働くことが明らかになった。



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 Sugimoto Yohei, Masuda Yuji, Iwai Shigenori, Miyake Yumi, Kanao Rie, Masutani Chikahide	4. 巻 51
2. 論文標題 Novel mechanisms for the removal of strong replication-blocking HMCES- and thiazolidine-DNA adducts in humans	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 4959 ~ 4981
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkad246	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 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/lisa.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 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 金尾梨絵、増田雄司、益谷央豪
2. 発表標題 PCNAのコピキチン化に依存するDNA損傷トレランスの解析
3. 学会等名 第27回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金尾梨絵、益谷央豪
2. 発表標題 ヒト細胞のDNA損傷トレランスにおけるRFWD3の機能解析
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金尾梨絵、増田雄司、益谷央豪
2. 発表標題 DNA損傷トレランスにおけるRFWD3の機能解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第66回大会
4. 発表年 2023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RFWD3の関与するDNA損傷トレランス経路の解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金尾梨絵、益谷央豪
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼRFWD3はヒト細胞のDNA損傷トレランスで重要な役割を果たす
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024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損傷トレランスに関与する
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 Rie Kanao, Hidehiko Kawai, Toshiyasu Taniguchi, Minoru Takata, ChikahideMasutani
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 Rie Kanao, Hidehiko Kawai, Toshiyasu Taniguchi, Minoru Takata, ChikahideMasutani
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 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損傷トランスに関与する
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 Rie Kanao, Hidehiko Kawai, Toshiyasu Taniguchi, Minoru Takata, ChikahideMasutani
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 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 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 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損傷トレランスの解析
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 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 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損傷トレランスの解析
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 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

〔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
---------	---------