

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22310034

研究課題名（和文）タンパク質のマルチ翻訳後修飾による損傷乗り越えDNA複製の制御

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of translesion DNA synthesis

## 研究代表者

益谷 央豪（MASUTANI CHIKAHIDE）

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：40241252

研究成果の概要（和文）：ヒトDNAポリメラーゼ・イータ(Pol $\eta$ )は、高発癌性遺伝疾患である色素性乾皮症バリエーション群の責任遺伝子産物であり、紫外線DNA損傷などによるDNA複製の阻害を解消し、細胞死や突然変異を防いでいる。本研究期間においては、Pol $\eta$ が正確で効率の良い損傷乗り越え複製を担う分子構造基盤を解明した。また、損傷乗り越え複製及び関連機構の制御において重要なPCNAのユビキチン化の分子機構について、従来の予想とは異なる新機構を見出した。

研究成果の概要（英文）：Human DNA polymerase eta (Pol $\eta$ ) is the responsible gene product of a cancer prone genetic disorder, xeroderma pigmentosum variant, catalyzes accurate and efficient translesion DNA synthesis, and prevents cell death and carcinogenesis induced by DNA damages. This project revealed that human Pol $\eta$  has a unique structure to catalyze the accurate and efficient translesion DNA synthesis. This project also identified a novel mechanism of PCNA ubiquitylation which is crucial for regulation of translesion DNA synthesis and related mechanisms.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：分子細胞生物学

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・損傷乗り越えDNA複製

## 1. 研究開始当初の背景

放射線・紫外線や種々の化学物質等の環境要因や、活性酸素を始めとする細胞自身の代謝産物などの内的要因により、遺伝情報物質であるDNAは種々の損傷を受け続けている。DNA損傷が放置されれば、正常な転写やDNA複製の妨げとなり、細胞死や突然変異・染色体異常を引き起こし、ひいては癌化や老化の原因となる。しかし、細胞は、DNA損傷に応答して細胞周期の進行を制御する細胞

周期チェックポイント機構、及び、様々なDNA損傷に対応する複数のDNA修復機構を備えており、DNA損傷による異常は未然に防がれている。これらの機構に加えて、DNA損傷によるDNA複製の阻害を回避する、DNA損傷トレランスと総称される機構の重要性が明らかになり始めている。本代表者らは、高発癌性遺伝疾患である色素性乾皮症バリエーション群の責任遺伝子産物としてヒトDNAポリメラーゼ・イータ(Pol $\eta$ )を同定し、損傷

乗り越え複製(TLS: translesion synthesis)の分子機構と生理的意義を明らかにしてきた。Pol $\eta$ は、主要な紫外線損傷であるシクロブタン型ピリミジン 2 量体(CPD: cyclobutane pyrimidine dimer)を正確に効率よく乗り越えて複製する TLS を担い発癌防御に寄与する一方で、突然変異の誘発機構にも関わる諸刃の剣であることを明らかにしてきた。また、細胞はさらに複数の損傷乗り越え DNA ポリメラーゼを備えており、それらは総じて誤りがちであることが明らかになってきている。さらに、テンプレートスイッチと呼ばれる未知の DNA 損傷トレランス機構が存在すると考えられており、その実態解明が待たれている。TLS 及びテンプレートスイッチの制御には、DNA 複製のスライディングクランプである PCNA (proliferating cell nuclear antigen)の特定のリジン(K164)の翻訳後修飾が重要な役割を担うことが明らかになってきている。具体的には、PCNA-K164 が RAD6/RAD18 によりモノユビキチン化されることにより TLS が活性化され、さらに RAD5 によりポリユビキチン化されることによりテンプレートスイッチが活性化されると考えられていた。しかし、それらの具体的なメカニズムなどはほとんど明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

Pol $\eta$ を始めとする TLS ポリメラーゼによる損傷乗り越え複製の分子機構を明らかにし、さらに、PCNA の翻訳後修飾による DNA 損傷トレランスの制御機構の分子メカニズムと生理的意義を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒト Pol $\eta$ と CPD を含む鋳型 DNA との共結晶の X 線構造解析を行い、構造上重要な位置にあるアミノ酸の変異タンパク質の機能解析を行った (論文 1)。高熱環境化に生息する生物の Pol $\eta$ の生化学的機能解析を行った (論文 2)。ニワトリ細胞における Pol $\eta$ と Pol $\zeta$ の関係を遺伝学的手法により解析した (論文 3)。cis-syn 型に加えて trans 型の CPD を合成して、Pol $\eta$ による TLS 反応を生化学的に解析した (論文 4)。ヒト細胞系において、REV1 が関与する TLS に対する分子シャペロン Hsp90 の役割を調べた (論文 5)。ヒト細胞系において、ナイミヘン症候群責任遺伝子産物(Nbs1)と TLS との関係を調べた (論文 6)。PCNA のポリユビキチン化の分子機構を生化学的に解析した (論文 8)。

## 4. 研究成果

ヒト Pol $\eta$ と CPD に対してヌクレオチドを重合して乗り越え複製を行う素過程に相当する鋳型 DNA-プライマーと Pol $\eta$ との共結

晶構造解析に成功し、CPD を含む鋳型 DNA に対して Pol $\eta$ が添え木のように働くことにより DNA 構造の歪を解消し、正確で尚且つ効率の良い損傷乗り越え複製が可能となることを明らかにした。さらに、鋳型 DNA 上の CPD 及び重合するヌクレオチドと接触する位置にあるアミノ酸点変異を導入した組換え Pol $\eta$ の機能解析により、DNA 合成の効率と忠実度に寄与するアミノ酸を同定した。これらの成果は、Pol $\eta$ が紫外線損傷による細胞死と癌化を防ぐ分子構造基盤を解明したものであり、Pol $\eta$ を対象とした創薬研究などへの発展を可能にするものである (論文 1)。

PCNA-K164 のポリユビキチン化には、2 組の E2-E3 複合体が関与することが知られている。ヒトの E2-E3 複合体である RAD6-RAD18 及び UBC13-MMS2-HLTF の組み換えタンパク質を精製して、DNA 上にロードされた PCNA のポリユビキチン化反応を試験管内で再構成することに成功した。詳細な反応機構の解析の結果、HLTF は、E2 である UBC13 及び RAD6 上にチャージされたユビキチンにユビキチンを付加してポリユビキチン鎖を形成する E3 であることを明らかにした。一方で、RAD18 は RAD6 上にチャージされたモノユビキチン及びポリユビキチン鎖を PCNA-K164 に付加する E3 であることを示した。従来は、RAD6-RAD18 により PCNA-K164 のモノユビキチン化が起こり、引き続いて UBC13-MMS2-HLTF が PCNA 上のユビキチンにユビキチンを付加することによりポリユビキチン鎖が形成されると考えられてきたが、本成果により、E2 上にユビキチン鎖を形成する E2-E3 複合体と、PCNA にユビキチン鎖を付加する E2-E3 との連携により、*en bloc*としてポリユビキチン鎖が形成されることを明らかにした。従来モデルでは、ポリユビキチン化はモノユビキチン化の下流に位置し、それぞれにより制御されると考えられる TLS とテンプレートスイッチも、上流と下流の関係にあると考えられてきた。しかし、この成果は、モノユビキチン化とポリユビキチン化が独立に制御されうることを示すものであり、即ち、TLS とテンプレートスイッチも独立に制御されうることを示すものであり、未解明のテンプレートスイッチ機構の解明に新たな道筋を与えるものである (論文 8)。

上の成果に加えて、高熱環境化に生息する深海生物の Pol $\eta$ がヒト Pol $\eta$ と同様の損傷乗り越え複製能を持つこと (論文 2)、ニワトリ細胞においては Pol $\eta$ と Pol $\zeta$ との間に巧妙な相互の連携機構があるであろうこと (論文 3)、ヒト Pol $\eta$ が cis-syn 型に加えて trans 型の CPD の乗り越え複製も担えること (論文 4)、分子シャペロン Hsp90 が、REV1 が関与する損傷乗り越え複製の制御に寄与して突然

変異の生成を制御すること (論文 5)、DNA 鎖切断の修復において重要な役割を担うナイミヘン症候群責任遺伝子産物 NBS1 が、PCNA-K164 のモノユビキチン化において中心的な役割を担う RAD18 との相互作用により、Polη による損傷乗り越え複製を制御することを明らかにした (論文 6)。また、ヒト Polη に関する総説をまとめた (論文 7)。

#### 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 8 件)

1. Biertümpfel C., Zhao Y., Kondo Y., Ramón-Maiques S., Gregory M., Lee J.Y., Masutani C., Lehmann A.R., \*Hanaoka F., \*Yang W. Structure and mechanism of human DNA polymerase η. **Nature** 465, 1044-1048, 2010. Jun. 査読有
2. Kashiwagi S., Kuraoka I., Fujiwara Y., Hitomi K., Cheng Q.J., Fuss J.O., Shin D.S., Masutani C., Tainer J.A., Hanaoka F., Iwai S. Characterization of a Y-family DNA polymerase eta from the eukaryotic thermophile *Alvinella pompejana*. **J. Nucleic Acids** 2010, 2010 Sep. pii: 701472. 査読有
3. Hirota K., Sonoda E., Kawamoto T., Motegi A., Masutani C., Hanaoka F., Szüts D., Iwai S., Sale J.E., Lehmann A., Takeda S. Simultaneous disruption of two DNA polymerases, Polη and Polζ, in avian DT40 cells unmasks the role of Polη in cellular response to various DNA lesions. **PLoS Genetics** 6(10), 2010 Oct. pii: e1001151. 査読有
4. Yamamoto J., Nishiguchi K., Manabe K., Masutani C., Hanaoka F., Iwai S. Photosensitized [2 + 2] cycloaddition of N-acetylated cytosine affords stereoselective formation of cyclobutane pyrimidine dimer. **Nucleic Acids Res.** 39, 1165-1175, 2011. Feb. 査

読有

5. Pozo F.M., Oda T., Sekimoto T., Murakumo Y., Masutani C., Hanaoka F., \*Yamashita T. Molecular Chaperone Hsp90 Regulates REV1-Mediated Mutagenesis. **Mol. Cell. Biol.** 31 (16), 3396-3409, 2011, Aug. 査読有
6. Yanagihara H., Kobayashi J., Tateishi S., Kato A., Matsuura S., Tauchi H., Yamada K., Takwzawa J., Sugawara K., Masutani C., Hanaoka F., Weemaes C.M., Mori T., Zou L., \*Komatsu K. NBS1 recruits RAD18 via a RAD6-like domain and regulates Polη-dependent translesion DNA synthesis. **Mol. Cell** 43 (5), 788-797, 2011, Sep. 査読有
7. Masutani C. Human DNA polymerase η and its regulatory mechanisms. **Genes Environ.** 34 (2), 63-69, 2012, May. 査読有
8. \*Masuda Y., Suzuki M., Kawai H., Hishiki A., Hashimoto H., Masutani C., Hishida T., Suzuki F., \*Kamiya K. *En bloc* transfer of poly-ubiquitin chains to PCNA *in vitro* is mediated by two human E2-E3 pairs. **Nucleic Acids Res.** 40(20), 10394-10407, 2012 Nov. 査読有

[学会発表] (計 31 件)

1. 益谷央豪: 損傷乗り越えDNA複製による発癌防御の分子機構. 平成 22 年度文部科学省新学術領域研究 がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動公開シンポジウム. 2011. 2. (東京) (招待講演)
2. 益谷央豪: XPV責任遺伝子産物Pol etaを制御するメカニズム. 平成 23 年度日本環境変異原学会公開シンポジウム. 2011. 5. (東京) (招待講演)
3. Masutani C., Kashiwaba S., Kanao R.,

- Hanaoka F.: Analysis of physiological relevance of PCNA mono-ubiquitination in human cells. 27<sup>th</sup> RBC-NIRS International symposium "Chromatin dynamics and epigenetic memory in DNA damage response". 2011. 12. (京都) (招待講演)
4. Masutani C.: Analysis of mono-ubiquitylation of PCNA in human cells. US-Japan DNA repair meeting, 2012. 4. (Leesburg, USA) (招待講演)
  5. Biertumpfel C., Zhao Y., Kondo Y., Ramon-Maiques S., Gregory M., Lee J.Y., Masutani C., Lehmann A.R., Hanaoka F., Yang W.; The ying and yang and human DNA polymerase eta in cancer avoidance. The 7<sup>th</sup> 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, 2010. 10. (富山) 口頭
  6. Kanao R., Hanaoka F., Masutani C.; Physiological relevance of post-translational modifications of PCNA at lysine-164 in human cells. The 7<sup>th</sup> 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, 2010. 10. (富山) ポスター
  7. Sekimoto T., Oda T., Pozo F.M., Murakumo Y., Masutani C., Hanaoka F., Yamashita T.: The molecular chaperone Hsp90 regulates Pol $\eta$ -mediated translesion synthesis. The 7<sup>th</sup> 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, 2010. 10. (富山) ポスター
  8. Katafuchi A., Sassa A., Niimi N., Gruz P., Yamada M., Shimizu M., Fujimoto H., Masutani C., Hanaoka F., Ohta T., Nohmi T.: Y-family DNA polymerases and nucleotide pool damage. 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会. 2010. 12. (神戸) 口頭
  9. 益谷央豪, 金尾梨絵, 花岡文雄: ヒト細胞の損傷乗り越えDNA複製の制御機構の解析. 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会. 2010. 12. (神戸) 口頭
  10. 金尾梨絵, 花岡文雄, 益谷央豪: ヒト細胞内におけるPCNAの翻訳後修飾によるTLS制御機構. 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会. 2010. 12. (神戸) ポスター
  11. Masutani C., Kanao R., Hanaoka F.: Physiological relevance of post-translational modifications of PCNA at lysine-164 in human cells. International symposium on the physicochemical field for genetic activities. 2011. 1. (淡路) ポスター
  12. 益谷央豪, 金尾梨絵, 花岡文雄: ヒト細胞内におけるPCNAの翻訳後修飾による損傷乗り越えDNA複製の制御. 日本薬学会第 131 回年会. 2011. 3. (静岡) ポスター
  13. Pozo M.F., Oda T., Sekimoto T., Murakumo Y., Masutani C., Hanaoka F., Yamashita T.: Molecular chaperone hsp90 regulates REV1-mediated mutagenesis. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011. 10. (名古屋) (ポスター)
  14. Kanao R., Hanaoka F., Masutani C.: Regulation of translesion DNA synthesis by post translational modifications of PCNA at lysine-164 in human cells. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011. 10. (名古屋) (ポスター)
  15. 益谷央豪, 柏葉脩一郎, 金尾梨絵, 花岡文雄: Mechanisms and physiological relevance of mono-ubiquitylation of PCNA in human cells. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011. 12. (横浜) (口演)
  16. 金尾梨絵, 花岡文雄, 益谷央豪: ヒト細胞内のPCNAの翻訳後修飾によるDNA損傷トランス制御機構. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011. 12. (横浜) (ポスター)

17. 関本隆志, 小田 司, 益谷央豪, 花岡文雄, 山下孝之: Y-family DNAポリメラーゼによる損傷乗り越えDNA合成は、cyclin E過剰発現によるDNA複製ストレス応答に関与する. 第34回日本分子生物学会年会, 2011. 12. (横浜) (ポスター)
18. 柏葉脩一郎, 金尾梨絵, 益谷央豪: Analysis of mechanisms and biological significance of oxidative stress-induced PCNA ubiquitination. 第34回日本分子生物学会年会, 2011. 12. (横浜) (ポスター)
19. 増田雄司, 益谷央豪: PCNAのユビキチン化の新規分子機構. 日本遺伝学会第84回大会, 2012.9. (福岡) (招待講演)
20. 増田雄司, 鈴木美紀, 益谷央豪, 神谷研二: ヒトPCNAのユビキチン化酵素RAD6-RAD18複合体の構造と機能. 放射線影響学会第55回大会, 2012. 9. (仙台)
21. Kanao R., Hanaoka F., Masutani C.: Regulation of DNA damage tolerance by PCNA post-translational modifications in human cells. The 8<sup>th</sup> 3R Symposium, 2012. 11. (淡路) ポスター
22. Kashiwaba S., Kanao R., Masuda Y., Masutani C.: The regulatory mechanism of PCNA monoubiquitination induced by oxidative stress is different from that induced by UV irradiation. The 8<sup>th</sup> 3R Symposium, 2012. 11. (淡路) ポスター
23. Masuda Y., Suzuki M., Kawai H., Hishiki A., Hashimoto H., Masutani C., Hishida T., Suzuki F., Kamiya K.: *En bloc* transfer of poly-ubiquitin chains to PCNA *in vitro* is mediated by two different human E2-E3 pairs. The 8<sup>th</sup> 3R Symposium, 2012. 11. (淡路) ポスター
24. Niimi A., Downs J.A., Lehmann A.R., Masutani C.: A role of chromatin remodellers in replication of damaged DNA. The 8<sup>th</sup> 3R Symposium, 2012. 11. (淡路) ポスター
25. Masuda Y., Suzuki M., Kawai H., Hishiki A., Hashimoto H., Masutani C., Hishida T., Suzuki F., Kamiya K.: *En bloc* transfer of poly-ubiquitin chains to PCNA *in vitro*, implication in regulation of post-replication repair pathway. 28<sup>th</sup> RBC-NIRS International Symposium, 2012. 11. (京都) ポスター
26. 金尾梨絵, 花岡文雄, 益谷央豪: PCNAの翻訳後修飾によるDNA損傷トレランス制御機構の解析. 第35回日本分子生物学会年会, 2012. 12. (福岡) ポスター
27. 新美敦子, LEHMANN A.R., DOWNS J.A., 益谷央豪: 複製後修復におけるクロマチン構造の解析. 第35回日本分子生物学会年会, 2012. 12. (福岡) (口演とポスター)
28. 柏葉脩一郎, 金尾梨絵, 増田雄司, 益谷央豪: 酸化ストレスによって誘導されるPCNAのユビキチン化の制御機構と生理的意義. 第35回日本分子生物学会年会, 2012. 12. (福岡) ポスター
29. 関本隆志, 小田 司, 益谷央豪, 花岡文雄, 山下孝之: Y-family DNAポリメラーゼは、発がんシグナルが誘導するDNA再複製に関与する. 第35回日本分子生物学会年会, 2012. 12. (福岡) ポスター
30. 増田雄司, 鈴木美紀, 河合秀彦, 菱木麻美, 橋本 博, 益谷央豪, 神谷研二: ヒトPCNAのポリユビキチン化の新規分子機構. 第35回日本分子生物学会年会, 2012. 12. (福岡) ポスター
31. 金尾梨絵, 花岡文雄, 益谷央豪: ヒト細胞におけるモノユビキチン化PCNAによるDNA損傷トレランス制御機構. 日本薬学会第133回年会, 2013. 3. (横浜) ポスター

[図書] (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/genome/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

益谷 央豪 (MASUTANI CHIKAHIDE)

名古屋大学環境医学研究所・教授

研究者番号：40241252

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし