

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 8 日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2013

課題番号：22510063

研究課題名（和文）細胞の紫外線抵抗性における損傷乗り越え DNA ポリメラーゼ間相互作用の生理的意義

研究課題名（英文） Physiological role of protein-protein interaction among translesion DNA polymerases in cellular resistance to ultraviolet light

研究代表者

横井 雅幸（YOKOI MASAYUKI）

学習院大学・理学部生命科学科・助教

研究者番号：00322701

研究成果の概要（和文）：哺乳類の TLS ポリメラーゼ Pol η 、Pol ι 、Pol κ 、REV1 と Pol ζ は、複製装置の一構成因子である PCNA を足掛かりに、損傷部位で停止した複製装置と相互作用して損傷部位に限定的な DNA 重合反応を行う。TLS ポリメラーゼと PCNA との結合や TLS ポリメラーゼ間の相互作用は、多様な損傷に応じて最適な TLS ポリメラーゼを複製停止部位に導入する機構を理解する上で重要であり、近年注目を集めている。代表者は、紫外線損傷誘発時の TLS ポリメラーゼの役割を明らかにするため、様々な TLS ポリメラーゼを欠損させたマウス胚性線維芽細胞（MEF）を材料として研究を行い、Pol η が紫外線損傷の TLS を行えない場合でも、Pol η と REV1 が直接結合することで別経路の TLS 反応が起こること、そしてこの別経路の TLS 反応は突然変異を引き起こしやすいことを新たに明らかにした。

研究成果の概要（英文）：DNA polymerase η (Pol η), whose gene mutation is responsible for the inherited disorder xeroderma pigmentosum variant (XP-V), carries out accurate and efficient TLS against cyclobutane pyrimidine dimer (CPD). Since Pol η interacts with Pol ι and REV1, it is suggested that Pol η plays a role in recruitment of these TLS polymerases at lesion site. But it is unclear whether UV sensitivity of XP-V patients is caused not only by defect of Pol η activity but also by dysfunction of network between Pol η and other TLS polymerases. Here, we examined whether the TLS polymerase network via Pol η is important for replicative bypass of CPDs and DNA damage tolerance induced by UV in mouse cells. We observed that UV sensitivity of Pol η -deficient mouse cells was moderately rescued by the expression of inactive Pol η . Moreover, this recovery of cellular UV sensitivity was mediated by the interaction between Pol η and REV1. However, expression of inactive mutant Pol η was not able to suppress the striking incidence of UV-induced mutation observed in Pol η -deficient cells. Finally we demonstrated that REV1 and Pol κ are involved in mutagenic DNA damage tolerance via Pol η -REV1 interaction when Pol η was failed to bypass its cognate substrates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	800,000	240,000	1,040,000
平成 23 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 24 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：環境学

科研費の分科・細目：環境解析学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：DNA ポリメラーゼ/DNA 損傷/損傷乗り越え複製/紫外線

1. 研究開始当初の背景

染色体 DNA 複製では、DNA 合成酵素などの多くの因子が複雑な分子間ネットワークを構築し、一つの精緻な装置として複製反応を担う。紫外線で生じる損傷は、この複製装置の進行を妨げるが、生物は損傷に対応して DNA 合成を行える「TLS ポリメラーゼ」と総称される特殊な酵素を獲得した。哺乳類の Pol η 、Pol ι 、Pol κ 、Rev1 と Pol ζ が、複製装置の構成因子 PCNA (proliferating cell nuclear antigen) を足掛かりに、損傷部位で停止した複製装置と相互作用して損傷部位に限定的な DNA 重合反応を担うことで、複製装置による染色体複製の速やかな再開に極めて重要な役割を担うことが、代表者の所属研究室を含め、本邦および欧米の複数の研究室で明らかにされている。とりわけ、TLS ポリメラーゼと PCNA との相互作用や TLS ポリメラーゼ間のネットワークは、多様な損傷に応じて最適な TLS ポリメラーゼを複製停止部位に導入する機構を理解する上で近年最も注目を集めている。

2. 研究の目的

(目的1) Pol η および Pol ι の不活性型と Rev1 相互作用不全変異体の安定発現細胞の樹立：Pol η 欠損あるいは Pol η -Pol ι 二重欠損 MEF を材料に、Pol η の不活性型および Rev1 相互作用部位に変異体安定発現細胞を既に樹立済みで、同様にして①不活性型 Rev1 ノックインマウスを利用した多重変異マウス系統由来の MEF を樹立し、②Pol η と Pol ι の不活性型や Rev1 相互作用不全変異体の安定発現細胞を作製する。

(目的2) 不活性型および Rev1 相互作用不全変異体を安定発現している細胞の表現型解析：(目的1) で樹立した MEF を用いて、①紫外線に対する感受性や変異スペクトラム、②局所的紫外線照射技術と蛍光抗体免疫染色法を利用した損傷部位における細胞内 TLS ポリメラーゼ複合体形成とその構成、③免疫沈降法による相互作用の有無、について解析する。

(目的3) 不活性型 Pol η ノックインマウス個体の作出：①不活性型 Pol η を安定発現しているノックインマウス系統の樹立と、②不活性型 Rev1 ノックインマウスや Pol η 欠損マウスとの交配で、不活性型 Pol η 安定発現の多重変異マウス系統を樹立する。

3. 研究の方法

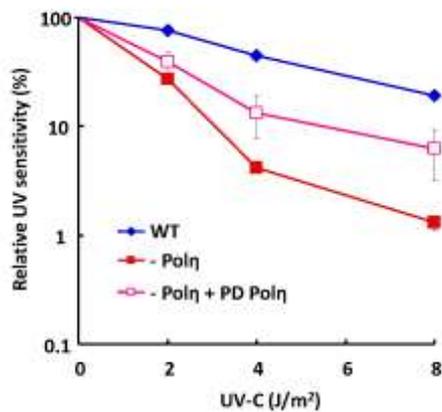
(方法1) Pol η および Pol ι の不活性型と Rev1 相互作用不全変異体の安定発現細胞の樹立：不活性型変異と Rev1 相互作用不全変異を持つ Pol η を、過去に樹立済みの Pol η 欠損および Pol η -Pol ι 二重欠損 MEF に導入し、安定に発現する株を樹立する。

(方法2) Pol η および Pol ι の不活性型と Rev1 相互作用不全変異体の安定発現細胞の表現型解析①(方法1) ①と②で樹立した細胞株の紫外線 ($0\sim 8$ J/m²) 感受性について、先行研究と同様にしてコロニー形成率とミトコンドリア活性を指標にした生存率で求め、紫外線感受性における Pol η 、Pol ι 、Rev1 の活性と相互作用の破綻の影響を明らかにする。②HPRT 遺伝子の変異を検出する 6-thioguanine 耐性を指標として自然突然変異と紫外線誘発突然変異の変異率およびスペクトラム解析を行い、不活性型および相互作用不全変異体の存在時に働く TLS ポリメラーゼを推定する。③紫外線処理後の MEF の核から、0.1% Triton-X100 抽出、更に 0.3 M NaCl 抽出とクロマチン画分を調製し各 TLS ポリメラーゼ特異的な抗体を用いた免疫沈降を行う。各画分中に存在する TLS ポリメラーゼの組成や PCNA の修飾パターンを解析することで、変異に応じた TLS ポリメラーゼ複合体の量的、質的な変化を解析する。

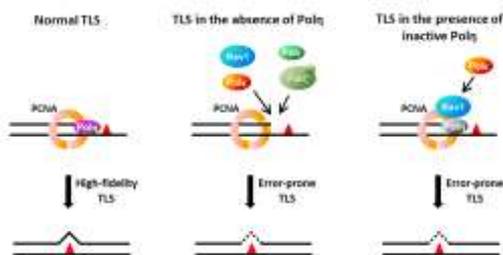
(方法3) Pol η および Pol ι の不活性型と Rev1 相互作用不全変異体の安定発現細胞の表現型解析①Pol η および Pol ι の不活性型と Rev1 相互作用不全変異体を発現している MEF に局所的紫外線照射を行い、TLS ポリメラーゼの損傷部位での集積を解析する。初年度(方法2) ③の結果と併せて、損傷に応じた TLS ポリメラーゼの相互作用と挙動を解析する。②紫外線で生じる主要な DNA 損傷であるシクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) と 6-4 光産物を、光エネルギーを利用して特異的に修復する光回復酵素を各 MEF に発現させ、CPD あるいは 6-4 光産物を特異的に除去した条件で解析を行うことで、損傷の種類に応じた TLS ポリメラーゼ切り替え機構とバックアップ機構について明らかにする。

4. 研究成果

Pol η 欠損 MEF の紫外線感受性が、活性中心のアミノ酸置換変異により活性を失った不活性型 Pol η (PD Pol η) の発現で有意に低下することを代表者は独自に見出した。(次図)



申請時に予定した研究方法に従って解析を進めた結果、不活性化により Pol η 自身が紫外線損傷の TLS を行えない場合でも不活性化型 Pol η は紫外線損傷部位に蓄積し、REV1 との直接結合を介して別経路の TLS 反応を引き起こすこと、そしてこの別経路の TLS 反応は突然変異を引き起こしやすいことを新たに明らかにした。複数の TLS ポリメラーゼを同時に欠損している MEF を用いた解析から、この別経路の TLS 反応に Pol ι は関わらず、一方で Pol κ が重要な働きを担うことを明らかにした。ただし Pol κ を単独で欠損した MEF は部分的な紫外線感受性を示すことから、Pol η のバックアップ経路としてだけ機能するのか、Pol η とは関係なく紫外線損傷の TLS 反応に関わるのかは定かでない。これらの結果から、特定の損傷部位の複製時に働く TLS ポリメラーゼに何らかの問題が生じた場合でも、TLS ポリメラーゼ間の相互作用を介して別の TLS ポリメラーゼに切り替わり、突然変異の導入というリスクを負いながらも細胞死を防ぐために複製を継続させる経路の存在を世界に先駆けて明らかにした (下図)。



このようなバックアップ経路の存在は、Pol η の役割から推測して紫外線損傷に限定されるものではないと予想される。また損傷との親和性という点でも、損傷の種類に応じて異なる TLS ポリメラーゼが関与する複数のバックアップ経路が発動する可能性も考えられ、損傷乗り越え機構の解析に新たな展開をもたらす研究として、今後の解析の進展が大いに期待される。

変異誘発のリスクを負いながら細胞の生

存を優先する経路が正しく制御されないこと、紫外線で誘発される皮膚がんの発生率を上げると予想される。このような観点に立って、不活性化型 Pol η を安定発現しているノックインマウス系統の樹立を試みた。申請時点ですでにスクリーニングが終盤に差し掛かっていたマウス ES 細胞の遺伝子型解析を進め、ノックインマウス作成に使用する ES 細胞を樹立できた。しかし新設された動物飼育施設の不具合と期間中に発生した東日本大震災の影響とでマウス個体作出の時期が遅れ、ようやく最終年度の末から個体作出に取り掛かっている。個体作出が叶えば、Pol η 欠損マウスに比較して不活性化型 Pol η 発現マウスでの紫外線誘発皮膚腫瘍の発生率は上昇すると期待される。また代表者らは、過去の研究から Pol η 欠損マウスでは免疫グロブリン遺伝子の体細胞超突然変異に異常の生じることを報告している。不活性化型 Pol η によるバックアップ経路と体細胞超突然変異導入との関係も、不活性化型 Pol η 発現マウスで注目すべき重要なテーマである。

一方で、Pol η のパラログでありながら、主な生理的機能が未だ不明な点の多い Pol ι について、紫外線で誘発される突然変異を抑制する役割のあることが強く示唆される結果を得た。Pol ι の紫外線損傷における役割については、過去に代表者らがマウスにおける紫外線誘発皮膚腫瘍の発生抑制への関与を報告しており、本申請課題での成果はそれを裏付ける結果として今後の解析に注力する。

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)

道津貫太郎、横井雅幸、花岡文雄

立体構造から見てきた損傷乗り越え DNA 複製の分子メカニズム

放射線生物研究 (査読無) **46** (2011) 1-14

Ito, W*, Yokoi, M*, Sakayoshi, N., Sakurai, Y., Akagi, J., Mitani, H., and Hanaoka, F. (*: equal contribution)

Stalled Pol η at its cognate substrate initiates an alternative translesion synthesis pathway via interaction with REV1.

Genes to Cells (査読有) **17** (2012) 98-108

Ahmad, S. I., Yokoi, M., Hanaoka, F. Identification of new scavengers for hydroxyl radicals and superoxide dismutase by utilizing ultraviolet A

photoreaction of 8-methoxypsoralen and a variety of mutants of *Escherichia coli*: implications on certain diseases of DNA repair deficiency.

J. Photochem. Photobiol. B (査読有) **116** (2012) 30-36

[学会発表] (計 22 件)

伊藤若菜、横井雅幸、坂吉伸隆、星本英史、三谷啓志、花岡文雄

CPDの損傷乗り越え複製におけるDNAポリメラーゼ η とREV1との相互作用の役割
第62回日本細胞生物学会大会 2010年5月19-21日 大阪

櫻井靖高、横井雅幸、大雲剛志、道津貫太郎、塚本徹哉、立松正衛、花岡文雄

UVB照射DNAの損傷乗り越え複製におけるDNAポリメラーゼ η と ι の生体内での役割
第62回日本細胞生物学会大会 2010年5月19日 大阪

Yokoi, M., Sakurai, Y., Tsukamoto, T., Tatematsu, M., Hanaoka, F.
Roles of DNA polymerase η and ι in translesion synthesis past UVB-induced DNA lesions *in vivo*
Gordon Research Conference, Mutagenesis
2010年8月4日 Waterville, USA

横井雅幸

ノックアウトマウスを用いた紫外線損傷乗り越え複製の解析
平成22年度 京都大学原子炉実験所専門研究会 招待講演 2010年9月11日 大阪

Sakurai, Y., Yokoi, M., Tsukamoto, T., Tatematsu, M., Wei, M., Wanibuchi, H., Hanaoka, F.

UV照射DNAの損傷乗り越え複製におけるDNAポリメラーゼイータとイオタの生体内での役割
第69回日本癌学会学術総会 2010年9月24日 大阪

Yokoi, M., Sakurai, Y., and Hanaoka, F.
Tissue specific function of DNA polymerases η and ι in suppression of UV-induced skin tumor and mutagenesis
The 7th 3R Symposium 2010年10月26日 富山カンファレンスセンター (富山県)

Ito, W., Yokoi, M., Mitani, H., Hanaoka, F.
Analysis of back-up mechanism in

translesion synthesis past CPD in the absence of Pol η activity
BMB2010 2010年12月8日 神戸

Dotsu, K., Sakurai, Y., Ohkumo, T., Yokoi, M., Hanaoka, F.
Unidentified function of DNA polymerase η and ι in cellular sensitivity to potassium bromate
BMB2010 2010年12月8日 神戸

Sakurai, Y., Yokoi, M., Ohkumo, T., Tsukamoto, T., Tatematsu, M., Wei, M., Wanibuchi, H., Hanaoka, F.
Roles of DNA polymerase η and ι in UV-induced mutagenesis and DNA damage tolerance
BMB2010 2010年12月8日 神戸

Yokoi, M., Sakurai, Y., and Hanaoka, F.
Roles of DNA polymerase η and ι in translesion synthesis past UVB-induced DNA lesions: division of labor at mouse skin.
Responses to DNA Damage: From Molecular Mechanism to Human Disease 2011年4月5日 Egmond aan Zee, The Netherlands

Yokoi, M., Ito, W., and Hanaoka, F.
An alternative TLS pathway for UV-induced DNA damages induced by Pol η -REV1 in interaction.
第34回日本分子生物学会年会 (招待講演) 2011年12月14日 横浜

Suzuki, K., Akagi, J., Ohashi, E., Yokoi, M., Ohmori, H., and Hanaoka, F.
Pol κ contributes to suppression of UV-induced mutagenesis
第34回日本分子生物学会年会 (招待講演) 2011年12月14日 横浜

Dotsu, K., Sakurai, Y., Ohkumo, T., Yokoi, M., and Hanaoka, F.
Unidentified function of DNA polymerase η and ι in cellular sensitivity to an oxidizing agent potassium bromate
第34回日本分子生物学会年会 (招待講演) 2011年12月14日 横浜

Ito, W., Yokoi, M., Mitani, H., Ohmori, H., Hanaoka, F.
Stalled pol η at its cognate substrate emerged an alternative TLS pathway via interaction with REV1
第34回日本分子生物学会年会 (招待講演) 2011年12月14日 横浜

Sakurai, Y., Yokoi, M., Ohkumo, T., Hanaoka, F.

Tissue-specific roles of DNA polymerase η and ι in UV-induced mutagenesis and DNA damage tolerance

第 34 回日本分子生物学会年会 (招待講演)
2011 年 12 月 14 日 横浜

Hanaoka, F., Yokoi, M.

Involvement of DNA polymerase η -REV1 interaction in a part of error-prone translesion DNA synthesis

US-Japan DNA Repair Workshop 2012 年 4 月 13 日 Leesburg, USA

Yokoi, M., and Hanaoka, F. η

Physiological role of DNA polymerase η -REV1 interaction in mammalian cells. Cantoblanco Workshops (招待講演) 2012 年 6 月 6 日 Madrid, Spain

Hanaoka, F., Yokoi, M.

Functional roles of mammalian DNA polymerase η , the product of the XP-V responsible gene

3rd Erling Seeberg Symposium 2012 年 6 月 21 日 Trondheim and Orland, Norway

Hanaoka, F., Yokoi, M.

Alternative translesion synthesis pathway via interaction between stalled DNA polymerase η and REV1

第 8 回 3R Symposium 2012 年 11 月 27 日 淡路夢舞台

Yokoi, M., Ito, W., Otomo, M., and Hanaoka, F.

Physiological role of DNA polymerase ι in suppression of UV-induced mutagenesis.

第 8 回 3R Symposium 2012 年 11 月 27 日 淡路夢舞台

Suzuki, K., Akagi, J., Ohashi, E., Yokoi, M., Ohmori, H., and Hanaoka, F.

Rev1-dependent activity of Pol κ contributes to translesion synthesis past UV-induced DNA lesions

第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 12 日 福岡

Morita, D., Sakurai, Y., Sakayoshi, N., Ito, W., Yokoi, M., Hanaoka, F.

Establishment of mouse expressing inactive DNA polymerase η

第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 12 日 福岡

[その他]

ホームページ等

学習院大学理学部 花岡研究室 (分生生物学)

<http://www-cc.gakushuin.ac.jp/~20080213/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井 雅幸 (YOKOI MASAYUKI)

研究者番号 : 00322701