

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 24 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22710059

研究課題名（和文） 紫外線誘発 DNA 損傷 6-4 光産物の哺乳類細胞における損傷乗り越え複製機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of translesion synthesis past UV-induced DNA lesion 6-4 photoproduct in mammalian cells

研究代表者

赤木 純一（AKAGI JUN-ICHI）

国立医薬品食品衛生研究所・病理部・研究員

研究者番号：60512556

研究成果の概要（和文）：

本研究では紫外線により誘発される DNA 損傷の一つである 6-4 光産物（6-4PP）の損傷乗り越え複製（TLS）機構と、それに伴う突然変異誘発の分子機構の解析を目的として、さまざまな TLS ポリメラーゼ欠損細胞を用いて細胞内 TLS アッセイを行った。その結果、主要な TLS ポリメラーゼである Polη（イータ）、Polι（イオタ）、Polκ（カッパ）をすべて欠損した細胞でも 6-4PP に対する TLS 活性がみられ、細胞内ではこれらの TLS ポリメラーゼ以外に複製ポリメラーゼ等が 6-4PP の TLS に関わっている可能性が示唆された。一方で Polζ（ゼータ）の活性サブユニットである Rev3 欠損細胞では TLS 活性が消失することから、Polζ が 6-4PP の TLS を完了するために必須の extender であることが示された。そこで Polζ による突然変異誘発メカニズムについてさまざまな配列中の 6-4PP を用いて解析したところ、Polζ は損傷の次の塩基に対して高い頻度で突然変異を引き起こすこと、およびその変異頻度は DNA 損傷前後の塩基配列の影響を大きく受けることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In this study we performed intracellular TLS assay by using a series of TLS-deficient cells to analyze molecular mechanisms of translesion synthesis past 6-4 photoproduct (6-4PP). In this assay, even *Polh^{-/-} Poli^{-/-} Polk^{-/-}* cells showed no TLS deficiency against 6-4PP, suggesting that another polymerases such as replicative pols are participate in TLS past 6-4PP. On the other hand, the TLS activity was abolished in Rev3 (a catalytic subunit of Polζ) deficient cells, indicating that Polζ is a unique extender for 6-4PP. Then we next analyzed the Polζ-dependent misincorporation spectrum by using 6-4PP in a various sequence context. This assay revealed that the +1 site, the next base to the 6-4PP, is a hot spot of misincorporation during the Polζ-dependent TLS. Moreover, we found that the local sequence contexts around 6-4PP are largely affect to the misincorporation frequency.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,500,000 | 103,493 | 1,603,493 |
| 2011 年度 | 1,500,000 | 0 | 1,500,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 103,493 | 3,103,493 |

研究分野： 複合新領域

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：DNA複製・修復 損傷乗り越え複製 ミスマッチ修復 突然変異 紫外線 癌

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報を担う DNA の損傷は転写や複製といった細胞の生存・増殖に必須の代謝活動を阻害し、個体レベルでは癌化・老化を引き起こす原因となるため、DNA 損傷から遺伝情報を守るための機構を研究することは発癌や老化の機構を理解する上で必要不可欠の知見をもたらす。DNA 損傷を引き起こす変異原の中でも紫外線は生命誕生以来最も重要な因子の一つであり、生物は紫外線損傷に対して複数の防御機構を発達させてきた。日光高感受性や高発癌性を示すヒトの常染色体劣勢遺伝病である色素性乾皮症バリエーション群(XP-V)の原因遺伝子産物 DNA ポリメラーゼ・イータ(Pol η)はそのうちの一つである。紫外線によって生じる DNA 損傷は主にシクロブタン型ピリミジン二量体(CPD)と6-4光産物(6-4PP)であり、いずれも隣接するピリミジン塩基が架橋されて二量体構造を形成し、DNA 複製を強く阻害する。Pol η はCPDを鋳型として非常に高い正確性と効率で直接 DNA 合成を行える損傷乗り越え複製(translesion synthesis; TLS)活性を持ち、紫外線によって誘発される突然変異を防いでいる。一方で、もう一方の紫外線損傷である6-4PPを乗り越える詳細な機構はいまだ明らかになっていない。正常細胞においてCPDはPol η によりほぼ正確に乗り越えられることから、紫外線誘発突然変異には6-4PPが大きく関与していることが予想され、その乗り越え機構を明らかにすることは重要な課題であった。

2. 研究の目的

本研究では化学合成損傷塩基を持つ複製可能なシャトルベクターを用いた高感度損傷乗り越え検出法(以下細胞内 TLS アッセイと記す)により6-4PPの乗り越えの詳細な機構を解析し、正常細胞を含む様々な細胞における紫外線誘発突然変異の機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では化学合成損傷塩基を持つ複製可能なシャトルベクターを用いた高感度損傷乗り越え検出法(以下細胞内 TLS アッセイと記す)により6-4PPの乗り越えの詳細な機構を解析する。その概略は以下のとおりである。TT-6-4PPを含む30merのオリゴヌクレオチドを非修飾(unmodified; UM)オリゴヌクレオチドとアニールさせ、

Ampicillin 耐性、Blasticidin 耐性およびポリオーマウイルスの複製起点を持つ pMTEX6 ベクターに組み込む。この UM オリゴは損傷の向かい側に3塩基のミスマッチがあり、この部分が *EcoRV* の認識部位になっている。細胞から回収したプラスミドを *EcoRV* で処理すると、UM 鎖由来のプラスミドのみが切断され、損傷を乗り越えて複製された産物のみを得ることができるようになっている。この基質をマウス胚性繊維芽細胞(MEF)にトランスフェクションし、細胞内で複製を行わせてのち回収する(図1)。DpnI 処理により細胞内で複製されなかったプラスミドを除去し、次にサンプルを *EcoRV* 存在下(cut)または非存在下(no cut)において37°Cで処理する。それぞれに形質転換効率を補正するために Zeocine 耐性を持つプラスミド pZeo を加え、大腸菌に形質転換し、Amp/Bla プレートおよび Zeo プレートに播いて cut および no cut サンプル由来のコロニー数から TLS 効率を算出する。cut サンプルをトランスフォームした大腸菌由来のコロニーは損傷を乗り越えて複製されたプラスミドを保有しているため、コロニーダイレクトシーケンシングにより変異スペクトラムを明らかにする(図1)。

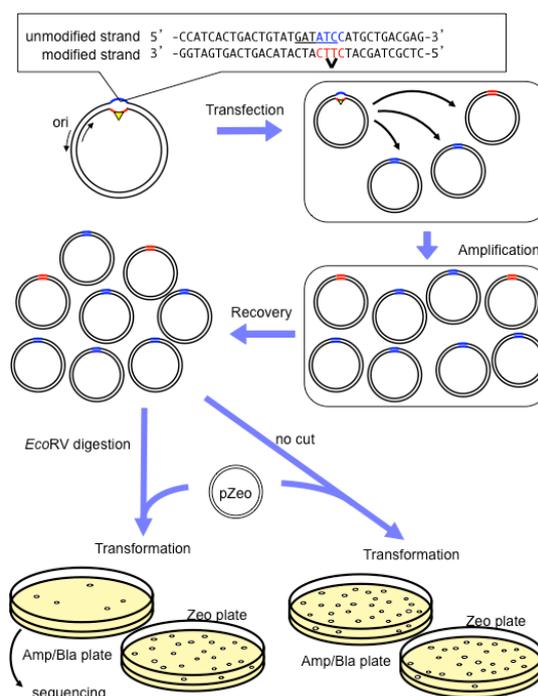


図1. 細胞内 TLS アッセイの概略

4. 研究成果

6-4PP の損傷乗り越えに關与する TLS ポリメラーゼを明らかにするため、*inserter* として働くと考えられている Polη、Polι、Polκ の単独欠損 MEF および三重欠損 MEF、*extender* として働くと考えられている Polζ の活性サブユニット Rev3 欠損 MEF、それらのスイッチングに關与すると考えられている Rev1 欠損 MEF に対して細胞内 TLS アッセイを行った。その結果、*inserter* である Polη、Polι、Polκ の欠損 MEF では 6-4PP の 3'T に対する誤った塩基の取り込み頻度に差があるものの、全体として TLS 活性はほぼ同程度であった。さらに、意外にもこれらの *inserter* をすべて欠損した三重欠損 MEF においても野生型細胞とほぼ同程度の 6-4PP の TLS 活性がみられた。一方で Rev3 欠損 MEF では TLS 活性がほとんど失われていた。これらの結果から、6-4PP の乗り越えにおいて *inserter* となるポリメラーゼには高い互換性があり、TLS ポリメラーゼ以外の DNA ポリメラーゼも 6-4PP に対する *inserter* 活性を持つこと、その一方でその後の伸長反応においては Polζ が必須な *extender* として働くことが示唆された(図 2)。また興味深いことに、調べた限りすべての細胞において、6-4PP

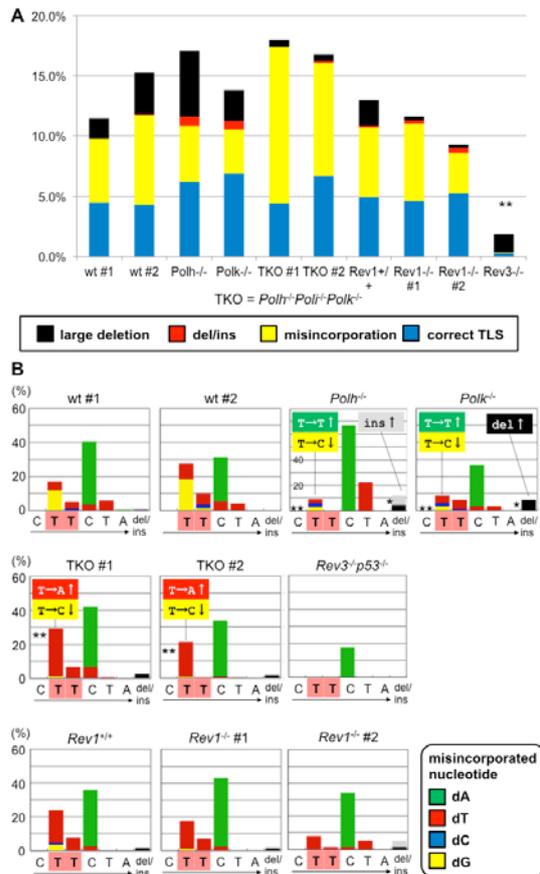


図 2. (A) TLS ポリメラーゼ欠損細胞における 6-4PP 複製効率 (B) 誤った塩基の取り込みスペクトラム

の次の塩基に対して最も高頻度に誤った塩基の取り込みがみられた。Rev3 欠損 MEF では TLS 活性がほぼ完全に消失していることから、これは伸長反応における Polζ による誤った塩基の取り込みを反映していると考えられた。Polζ についてはその重要性にも関わらず、触媒サブユニットである Rev3 が約 350 kDa と巨大なため *in vitro* での詳細な解析が行われていない。そこで Rev3 欠損 MEF とその対照群である p53 欠損 MEF を用いて、6-4PP の前後の塩基配列をさまざまに改変したオリゴヌクレオチドを用いて Polζ 依存的な伸長反応の詳細な解析を行った。その結果、いずれの配列においても Rev3 欠損 MEF では 6-4PP の TLS 活性はほとんど消失しており、伸長反応における Polζ の重要性が確認された(図 3A)。一方で誤った塩基の取り込み頻度は 6-4PP の周辺の配列により大きく異なり、ホットスポットである 6-4PP の次の塩基 (+1C) を A に変えた配列では誤った塩基の取り込み頻度は約 1/4 に低下していた。一方で、6-4PP の前の塩基 (-1C) を G に変えた配列では +1C に対する誤った塩基の取り込み頻度は約 2 倍になっていた(図 3B)。これらの結果から、Polζ による伸長反応の正確性には損傷塩基の周辺配列が大きく影響することが明らかとなった。

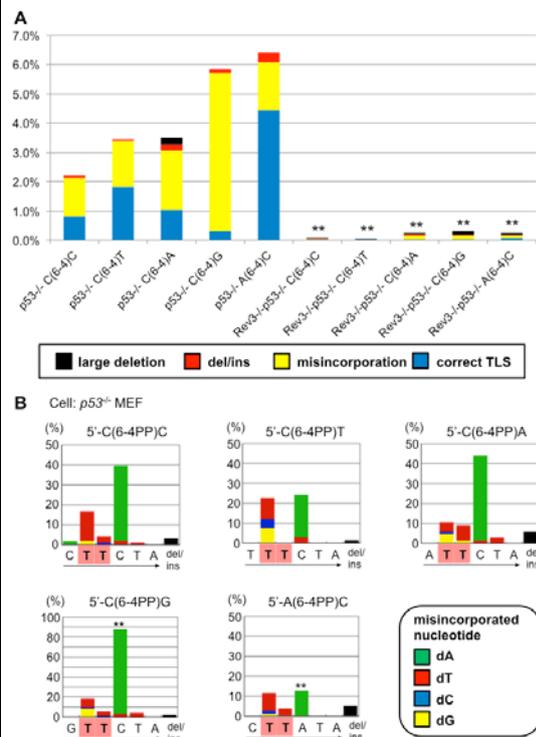


図 3. (A) Rev3 欠損細胞における 6-4PP 複製効率 (B) さまざまな塩基配列中の 6-4PP における誤った塩基の取り込みスペクトラム

また、TLS によって生じた誤塩基対をミスマッチ修復機構が除去しているという仮説を検証するためにミスマッチ因子の一つである Msh2 欠損細胞を用いて同様の実験を行った。その結果、6-4PP の 3' に対する誤った塩基の取り込み頻度が有意に上昇しており、ミスマッチ修復機構が損傷乗り越え複製と共役して紫外線誘発突然変異の抑制に働くことが示された (図 4)。

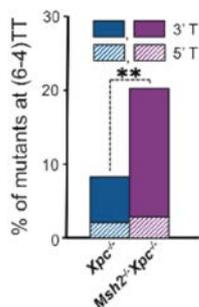


図 4. ミスマッチ修復欠損細胞における 6-4PP に対する誤った塩基の取り込み頻度

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 2 件)

Keiji Hashimoto, Youngjin Cho, In-Young Yang, Jun-ichi Akagi, Eiji Ohashi, Satoshi Tateishi, Niels de Wind, Fumio Hanaoka, Haruo Ohmori and Masaaki Moriya.

The Vital Role of Polymerase ζ and REV1 in Mutagenic, but Not Correct, DNA Synthesis across Benzo[a]pyrene-dG and Recruitment of Polymerase ζ by REV1 to Replication-stalled Site.

J. Biol. Chem. 2012, 287 9613-9622.

doi: 10.1074/jbc.M111.331728

Wakana Ito, Masayuki Yokoi, Nobutaka Sakayoshi, Yasutaka Sakurai, Jun-ichi Akagi, Hiroshi Mitani, Fumio Hanaoka.

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

Genes Cells 2012, 17 98-108.

DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01576.x

[学会発表] (計 4 件)

赤木 純一, 橋本 恵至, 大森 治夫, 岩井 成憲, 森谷 正明, 花岡 文雄.

TLS ポリメラーゼ欠損細胞と複製ベクターを用いた細胞内 TLS アッセイによる紫外線誘発 DNA 損傷 6-4 光産物の損傷乗り越え複製機構の解析.

第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11~14 日 福岡国際会議場

鈴木 健司, 赤木 純一, 大橋 英治, 横井 雅幸, 大森 治夫, 花岡 文雄.

Polk の Rev1 に依存した活性が紫外線による DNA 損傷の TLS に関与する.

第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11~14 日 福岡国際会議場

鈴木 健司, 赤木 純一, 大橋 英治, 大森 治夫, 横井 雅幸, 花岡 文雄.

Polk は紫外線により誘発される突然変異の抑制に関与する.

第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13~16 日 パシフィコ横浜

赤木 純一, 鈴木 健司, 大橋 英治, 大雲 剛志, 近藤 雄二, 横井 雅幸, 大森 治夫, 花岡 文雄.

損傷乗り越え複製 DNA ポリメラーゼ κ はマウス細胞において紫外線誘発 DNA 損傷に対して予備的な TLS ポリメラーゼとして働く.

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 年 12 月 7~10 日 神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤木 純一 (AKAGI JUN-ICHI)

国立医薬品食品衛生研究所・病理部・研究員

研究者番号 : 60512556