

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23710070
 研究課題名（和文） 高等真核生物の転写および複製に対する 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 cross-link lesions on eukaryotic transcription and replication
 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）損傷が、高等真核生物の転写や複製に対しどのような影響を及ぼすかを調べるためのアッセイ系を確立した。まず、バルキータンパク質損傷のモデルとして、fluorescein を含む鋳型を用い RNA polymerase II の転写反応を行った。その結果、非転写鎖の fluorescein は転写を阻害しなかったが、転写鎖の fluorescein は転写を阻害し、損傷部位で転写が止まった生成物が見られた。また、Click 反応を用いた DNA への新規な DPC 導入法を確立した。これにより、本研究で確立した試験管内 RNA polymerase II 転写反応系と DNA 鋳型を用いて、DPC の転写阻害および転写エラー誘発を調べることが可能となった。

研究成果の概要（英文）：DNA-protein cross-links (DPCs) are superbulky and ubiquitous DNA lesions induced by various agents. It is likely that DPCs interfere with many aspects of DNA transactions. In the present study, we established *in vitro* assays to investigate the effect of DPCs on eukaryotic transcription catalyzed by RNA polymerase II, showing that the formation of runoff products are dependent on the amount of nuclear cell extracts and reaction time. We then analyzed the effect of a model bulky lesion (fluorescein) on transcription. Fluorescein on the transcribed strand but not on the nontranscribed strand inhibited the transcription. We also established a novel method to introduce DPCs by employing Click reactions between protein azides and C5 alkyne-dT. We are currently studying the effect of DPCs on transcription by RNA polymerase II.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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 損傷、転写、複製

1. 研究開始当初の背景

DNA-タンパク質クロスリンク（DPC）は、様々な DNA 傷害性因子により誘発される普遍的なゲノム損傷である。申請者はこれまで

に、原核および高等真核生物の DPC 修復機構を明らかにした。さらに、若手研究 B (H21-22)では、DPC の遺伝・細胞伝毒性発現の分子機構を明らかにするため、ファージナ

らびに大腸菌をモデルとして転写および複製影響に関する研究を行った。その結果、superbulky な DPC は、従来の bulky な損傷とは異なるメカニズムで転写および複製装置を阻害することが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究では、ファージならびに大腸菌で得られた研究をより高度な転写・複製装置をもつ哺乳類細胞に発展させ、転写・複製の阻害機構を解明する。以上の研究から、DPC に代表される巨大 DNA 付加体 (superbulky DNA lesion) に固有な遺伝・細胞伝毒性発現の分子機構を明らかにすることを目的とする。また、DPC を含む DNA の簡便な調製法を確立し、DNA 複製・修復分野の研究に貢献する。

3. 研究の方法

本研究では、プロモーターを含む DNA に DPC を部位特異的に含む DNA を連結し、プロモーターと DPC を含む DNA 基質を調製した。プロモーターを含む DNA は、CMV プロモーターを含むプラスミドを PCR で増幅することにより調製した。また、DPC を含む DNA は、Click 反応を用いて、DNA とタンパク質の特異的なクロスリンク反応により調製した。哺乳類細胞における転写に転写影響を明らかにするため、HeL 細胞核抽出物を調製した。得られた鋳型と HeLa 細胞核抽出物を用いて試験管内 RNA polymerase II (RNAP II) 転写反応を行い、転写鎖および非転写鎖上の DPC による転写影響を検討した。

4. 研究成果

RNAP II 転写反応に用いる DNA 鋳型の構築

プロモーターとしては、RNAP II の強い

プロモーターである CMV プロモーターを用いた。まず、pGL4.50 プラスミドの CMV プロモーターを含む約 1 kbp の領域を PCR で増幅し、この DNA を制限酵素で末端から約 100bp の位置で切断しアガロース電気泳動で精製した。次に、損傷を含む DNA を制限部位にライゲートし、生成物を精製し基質とした。この鋳型では、転写反応が position 726 で始まり、runoff 転写産物の長さは 287 ヌクレオチド、損傷の手前で転写が停止すると、転写産物の長さは非転写鎖損傷で 242、転写鎖損傷で 241 ヌクレオチドになる (図 1)。

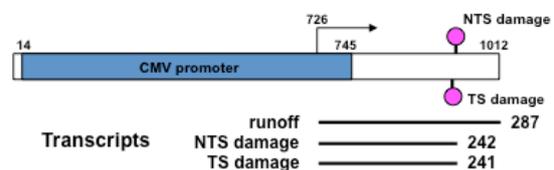


図 1 転写反応に用いた DNA 鋳型

Click 反応を用いた新規な DPC 導入法

これまで、DNA へのタンパク質クロスリンク導入には、oxanine とタンパク質のクロスリンク反応を用いていたが、より簡便で汎用性の高い DPC 導入法を検討した。この目的で、アジド化したタンパク質と C5 alkyne dT を含むオリゴヌクレオチドの Click 反応による架橋形成反応を行った。PAGE による生成物分析の結果、histone、midkine などが比較的効率よくクロスリンクを形成することが明らかとなった (図 2)。これにより、DPC を含む DNA 鋳型の調製が可能となった。

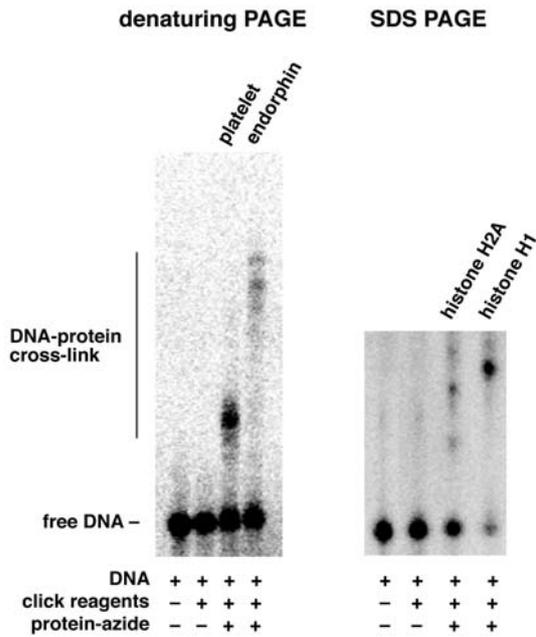


図2 Click反応で得られた架橋反応生成物のPAGE分析

RNAPII 転写反応のタンパク量及び反応時間依存性

損傷を含まないDNA鋳型(図1)をHeLa細胞核抽出物とインキュベーションし、転写産物を変性PAGEで分析した。その結果、runoff転写産物の生成が認められた(図3上段)。さらに、転写産物の量はタンパク量及び反応時間とともに増加した(図3中・下段)。このことから、HeLa核抽出物を用いた試験管内RNAP II転写反応系を確立できたことが確認された。

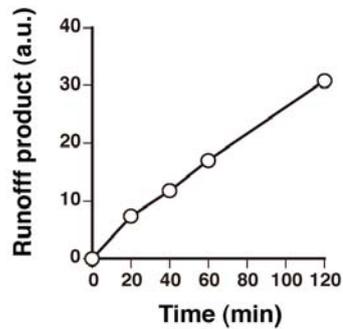
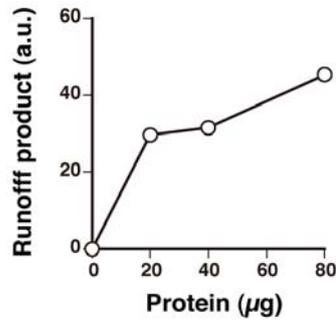
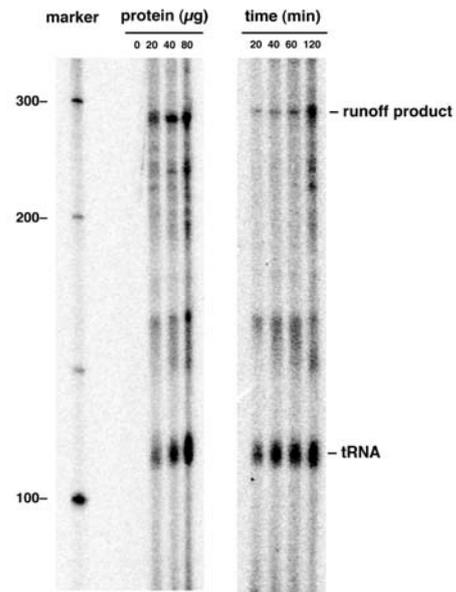


図3 未損傷DNA鋳型を用いた転写反応
上段: 転写産物のPAGE分析、中段: タンパク量依存性、下段: 反応時間依存性

バルキー損傷の転写影響

バルキー損傷のモデルとしてfluoresceinを含む鋳型を用いRNAPII転写反応を行い、生成物をPAGE分析した。その結果、非転写鎖の

fluorescein (NTS-FLU) は転写を阻害せず、runoff転写産物が生成することがしまされた

(図4)。一方、転写鎖の fluorescein(NTS-FLU) は転写を阻害し、損傷部位で転写が止まった転写産物が見られた。この時、runoff 転写産物の生成は認められなかった (図4)。

現在、この試験管内転写系を用いて DPC の転写阻害および転写エラー誘発を調べている。得られた結果に基づき、bulky DNA lesion (fluorescein) と superbulky DNA lesion (DPC) の相違を検討していく予定である。

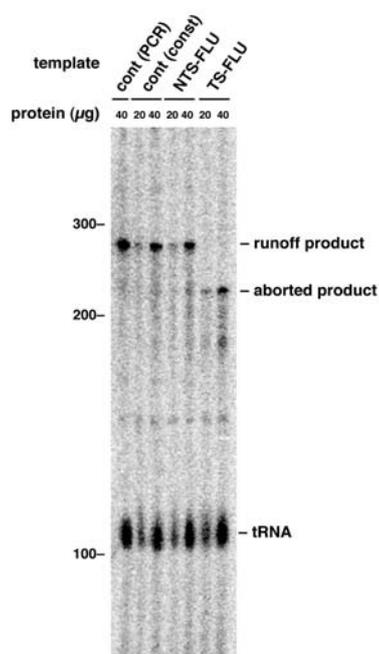


図 4 非転写鎖及び転鎖バルキー損傷 (fluorescein) の転写阻害効果

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. Nakano, T., Miyamoto-Matsubara M., Shoukamy M.I. Amir M.H., Pack S.P., Ishimi Y., and Ide, H., Translocation and stability of replicative DNA helicase upon encountering DNA-protein cross-links. *J.*

Biol. Chem., **288**, 4649-4658 (2013) 査読有

2. Nakano, T., Ouchi R., Kawazoe, J., Pack S.P., Makino K., and Ide, H., T7 RNA polymerases backed up by covalently trapped proteins catalyze highly error prone transcription. *J. Biol. Chem.*, **287**, 6562-6572 (2012) 査読有
3. Shoukamy M.I., Nakano T., Ohshima M., Hirayama R., Uzawa A., Furusawa Y., and Ide H., Detection of DNA-protein crosslinks (DPCs) by novel direct fluorescence labeling methods: distinct stabilities of aldehyde and radiation-induced DPCs. *Nucleic Acids Res.*, **40**, e123 (2012) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 中野敏彰, (他 3 名), DNA-タンパク質クロスリンク損傷が誘発する非標的転写エラー, 第 33 回日本環境変異原学会, 2012 年 11 月 29 日~11 月 30 日, 静岡市
2. Toshiaki Nakano, (他 5 名), DNA-protein crosslinks stall T7 RNA polymerase and induce untargeted transcriptional mutations, 12th International Workshop on Radiation Damage to DNA, May 2012.6~6.6, Prague, Czech
3. 中野敏彰, (他 5 名), 蛍光標識を用いた DNA-タンパク質クロスリンク損傷が複製ヘリカーゼの進行に及ぼす影響, 第 34 回日本分子生物学会, 2011 年 12 月 15 日, 横浜市
4. 中野敏彰, (他 4 名), 蛍光標識を用いた DNA-タンパク質クロスリンク損傷の新規検出法, 第 32 回日本環境変異原学会, 2011 年 11 月 21 日, 東京

[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

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：