

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24310040

研究課題名(和文) 誘発突然変異と複製後修復経路の制御機構の解明に向けた生化学的分子基盤の確立

研究課題名(英文) Biochemical study on the molecular mechanisms of induced mutagenesis and post-replication repair pathways

研究代表者

増田 雄司 (Masuda, Yuji)

名古屋大学・医学系研究科(環医)・准教授

研究者番号：30273866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,200,000円

研究成果の概要(和文)：放射線や環境変異原によって引き起こされる重要な生物影響の一つは突然変異の誘発であり、その分子機構の解明は当該研究分野の重要課題である。誘発突然変異の主要な原因である複製後修復には、忠実度の低い損傷乗り越えDNAポリメラーゼによる損傷乗り越えDNA合成経路と、鋳型鎖交換反応を介した忠実度の高いDNAポリメラーゼによる経路が存在し、その制御は遺伝的安定性の維持に極めて重要である。本研究では、これら二つの経路を制御するPCNAのモノ/ポリユビキチン化と脱ユビキチン化の試験管内の再構成系を確立し、その生化学反応を解析した。

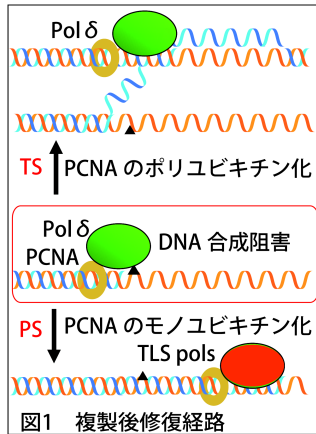
研究成果の概要(英文)：Radiation and environmental mutagens induce mutations. To elucidate molecular mechanisms of the induced mutagenesis is one of the biggest issues in this field. A large fraction of the induced mutation is generated by a cellular process, post-replication repair pathway. In humans, cells have two sub-pathways. One is the error-prone pathway, translesion DNA synthesis (TLS). The other is the error-free, in principle, pathway, template switch (TS). The regulation of the pathway choice that is a crucial step for the maintenance of genetic stability is regulated by ubiquitination of PCNA. In this study, we established in vitro reconstitution systems for PCNA ubiquitination and deubiquitination, and analyzed molecular mechanisms of these biochemical reactions.

研究分野：生化学

キーワード：複製後修復

1. 研究開始当初の背景

放射線や環境変異原によって引き起こされる重要な生物影響の一つは突然変異の誘発であり、その分子機構の解明は当該研究分野の重要課題である。放射線や環境変異原は多種多様な DNA 損傷を引き起こすが、DNA 損傷自体は変異ではなく、誘発突然変異は DNA 複製（おそらくは損傷塩基を鋳型とした複製）の課程で起こる生化学的



的反応の帰結である。DNA 損傷は DNA 修復機構により完全に除去されることが難しいので、複製の際、DNA ポリメラーゼは損傷 DNA に度々遭遇する。DNA 複製を忠

実に行う複製型の DNA ポリメラーゼ (Pol または Pol ) はその忠実度ゆえに損傷塩基に対しては DNA 伸長反応を続けることができない。したがって、DNA 損傷 (特にチェックポイントが活性化しない程度の低レベルの障害) から細胞を保護するためには損傷を除去することなく DNA 合成を再開する複製後修復、Post-replication repair (PRR) と呼ばれる分子機構を必要とする。PRR には二つの経路、忠実度の低い損傷乗り越え DNA ポリメラーゼ (Pol , Pol , Pol , REV1, Pol ) を介した Polymerase switch (PS) と、忠実度の高い DNA ポリメラーゼ、Pol を介した Template switch (TS) 経路が存在する (図 1)。PS 経路では忠実度の低い DNA ポリメラーゼが損傷塩基を直接鋳型としてヌクレオチドを重合する Translesion DNA synthesis (TLS) により DNA 合成を再開することから、この過程は error-prone (誤りがち) であり、突然変異誘発の原因となる (図 1)。一方 TS 経路では、停止したプライマー末端が新生娘鎖とアニーリングすることにより損傷のない鋳型を使った DNA 合成を行う (図 1)。一般的にこの過程は error-free である。したがって、損傷部位での PS または TS への振り分けは、突然変異誘発のリスクに直接反映されると考えられ、その制御は遺伝的安定性の維持に極めて重要である。PRR は PCNA のユビキチン化により制御され、モノユビキチン化酵素として RAD6-RAD18<sub>2</sub> (E2-E3 複合体) が、ポリユビキチン化酵素として MMS2-UBC13 (E2) と HLTF (E3) が同定されている。モノユビキチン化された PCNA はタンパク質間相互作用により TLS ポリメラーゼを複製阻害部位

に動員し、損傷部位での DNA 合成を促進すると予想され、一方ポリユビキチン化された PCNA は未知の分子機構により TS を促進すると考えられている。

PS 経路の制御機構を解析するにあたり、申請者はまず、Pol , RFC, PCNA, RPA による DNA 複製反応の再構成系を確立した。詳細な解析から、この複製装置はこれまでの認識以上にダイナミックであることを見いだしている。(Masuda et al NAR 2007)。この成果は洗練された生化学的解析を通じて始めて明らかにされた事実であり、この複製装置のダイナミックな性質が、PS 反応の分子レベルでの基盤をなすものと考えられた。ユビキチン化関連因子については、E1, RAD6A-RAD18<sub>2</sub> (E2-E3 複合体)、ユビキチンの精製法を確立し、PCNA のモノユビキチン化反応を再現することに成功している (Masuda et al JMB 2010, Masuda et al NAR 2011)。さらに申請者はこの二つの反応系を組み合わせることによって、DNA 複製反応にカップルした PCNA のユビキチン化反応と DNA 損傷部位でのポリメラーゼ交換反応を再構成することに成功している。この反応系においてポリメラーゼ交換反応は非常にダイナミックであり、PCNA のモノユビキチン化と Pol のユビキチン結合ドメインにより促進されることを証明した。詳細な生化学的解析から、これまでは予想されていなかった新規な PS 反応の分子機構を提唱し、その論文 (Masuda et al JMB 2010) は JMB の四半期の最もダウンロードされた論文の一つにリストにされ、注目された。

TS 経路の制御については、PCNA のポリユビキチン化が二段階の反応であり、RAD6A-RAD18<sub>2</sub> がまず PCNA をモノユビキチン化した後に、UBC13 と HLTF がこれを基質にユビキチン鎖を伸長すると考えられていた (図 2A)。しかし、このモデルには二つの疑問点があった。一つは、なぜ忠実度の高い TS 経路が、忠実度の低い PS 経路の下流なのかという遺伝学的な疑問であり、もう一つは、HLTF がどのようにして PCNA から遠く離れたポリユビキチンの末端を認識するのかという生化学的な疑問である。一方で PRR は PCNA の脱ユビキチン化酵素 USP1 によっても制御される。USP1 の機能解析は PRR の制御機構の全体像を知る上で必要不可欠であるが、その生化学的解析はほとんど進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究は、PRR における PCNA のユビキチン化/脱ユビキチン化の分子機構を解明し、PRR の制御機構の全体像を明らかにすることを目的とする。具体的には次の二つの点に

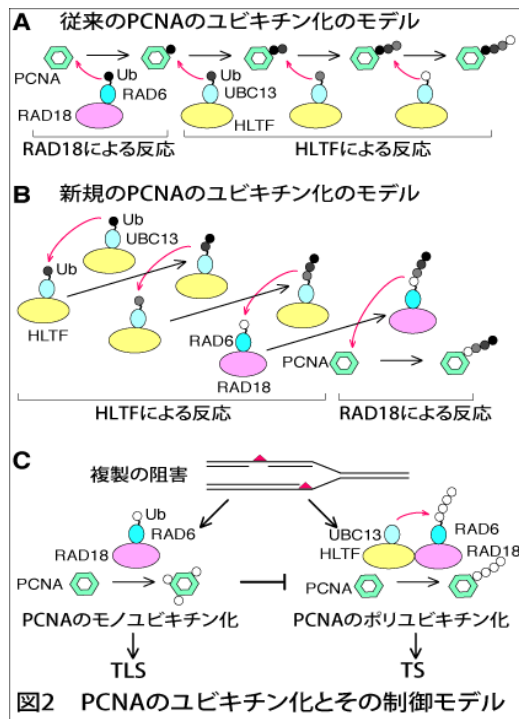


図2 PCNAのユビキチン化とその制御モデル

焦点を絞り研究する。1)HLTF の生化学的性質と生化学的反応を詳細に解析し、その分子機構を解明する。2) USP1 の精製法を確立し生化学的性質を詳細に解析する。

### 3. 研究の方法

本研究では、複製後修復経路を制御するPCNA の翻訳後修飾の分子基盤を確立するために、PCNA のポリユビキチン化と脱ユビキチン化の分子機構に着目し研究を推進する。PCNA のポリユビキチン化については、これまでに確立した試験管内の再構成系を実験の基盤とし、あらゆる生化学的手法を駆使することで、ポリユビキチン化の分子機構を解明する。一方、脱ユビキチン化については、まずは USP1 に着目し、試験管内での再構成系を確立することで、その分子機構を解析する。本研究では、洗練された再構成系からでしか解明できない分子メカニズムに関する諸問題の解析を研究計画の中核とし、これまでに蓄積した技術と一連の精製タンパク質因子を利用することで、研究目的の達成を目指す。

### 4. 研究成果

TS 経路の制御機構の解析については、ユビキチンリガーゼ(E3)である HLTF を精製し、試験管内での PCNA のポリユビキチン化反応の再構成系を確立した。反応機構の解析から、HLTF はモノユビキチン化された PCNA を良い基質とせず、図 2A のような反応はほとんど起こらないことが判明した。解析の結果、申請者が得た知見は全く新しいものであった(図 2B)。その反応ではまず、HLTF の活性によって、UBC13 上にチオエステル結合で連結したユビキチン鎖が合成される。この反応機構で特筆すべきは、ユビキチン鎖の側が donor として転移することに

より、HLTF がユビキチン鎖末端を認識する必要がない点である(図 2B)。したがって HLTF の基質特異性は、ユビキチン鎖の長さに影響されない。その後、このユビキチン鎖が RAD6 に転移し、RAD18 の酵素活性によって PCNA に転移する。したがって RAD18 の酵素活性は RAD6 上のユビキチン鎖の長さには影響されないが、その基質は PCNA に特異的である(図 2B)。

このモデルは、上述の二つ疑問に対してとても示唆に富んだ新しい知見をあたえるものである。一つ目の遺伝学的な疑問「なぜ忠実度の高い TS 経路が、忠実度の低い PS 経路の下流なのか」に関しては、実は TS と PS は、これまで考えられていたような上流-下流の関係ではなく、それぞれ独立の経路であることを示唆する(図 2C)。そのように考えても、これまでの遺伝学的解析結果とは全く矛盾しない。TS には必ず新生娘鎖を必要とするので、その開始時にはこれが保証されていなければならない。したがって、TS の開始は厳密に制御される必要があり、HLTF は利用可能な新生娘鎖が存在し、TS 反応が許容される状況でのみリクルートされると思われる。この分子機構の解明は今後の課題である。また二つ目の疑問「HLTF がどのようにして PCNA から遠く離れたポリユビキチンの末端を認識するのか」についても、本研究で提唱したモデルは、HLTF がユビキチン鎖の末端を認識する必要のないことを示しており(図 2B)、生化学的に矛盾ない反応機構であることが強く示唆された。

一方、USP1 については、大腸菌からの組換えタンパク質の精製法を確立し、解析を行った。

### 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 6 件)

Cao L, Kawai H\*, Sasatani M, Iizuka D, Masuda Y, Inaba T, Suzuki K, Ootsuyama A, Umata T, Kamiya K, Suzuki F. A Novel ATM/TP53/p21-Mediated Checkpoint Only Activated by Chronic Irradiation. *PLoS One*. 9:e104279. 2014. 査読有

doi:10.1371/journal.pone.0104279  
 Shibutani T, Ito S, Toda M, Kanao R, Collins LB, Shibata M, Urabe M, Koseki H, Masuda Y, Swenberg JA, Masutani C, Hanaoka F, Iwai S, Kuraoka I.\* Guanine-5-carboxylcytosine base pairs mimic mismatches during DNA replication. *Sci Rep*. 4:5220. 2014. 査読有

doi: 10.1038/srep05220  
 Tomida J, Itaya A, Shigechi T, Unno J, Uchida E, Ikura M, Masuda Y, Matsuda

S, Adachi J, Kobayashi M, Meetei AR, Maehara Y, Yamamoto KI, Kamiya K, Matsuura A, Matsuda T, Ikura T, Ishiai M, Takata M\*. A novel interplay between the Fanconi anemia core complex and ATR-ATRIP kinase during DNA cross-link repair. *Nucleic Acids Res.* 41:6930-41. 2013. 査読有  
doi: 10.1093/nar/gkt467  
Arichi N, Yamamoto J, Takahata C, Masuda Y, Kuraoka I, Iwai S\*. Strand breakage of (6-4) photoproduct-containing DNA at neutral pH and its repair by the ERCC1-XPF protein complex. *Org. Biomol. Chem.* 11:3526-34. 2013. 査読有  
doi: 10.1039/c3ob00012e  
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. *Nucleic Acids Res.* 40:10394-10407. 2012. 査読有  
doi: 10.1093/nar/gks763  
Masuda Y\*. *In vitro* studies of exchanges between replicative and translesion DNA polymerases in eukaryotic post-replication repair pathway. *Genes Environ.* 34:70-76. 2012. 査読有  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jemsge/34/2/34\\_GE-2012-0011/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jemsge/34/2/34_GE-2012-0011/_article/-char/ja/)

〔学会発表〕(計 56 件)

増田雄司: ユビキチンリガーゼによるユビキチン鎖リンケージとユビキチン鎖の伸長制御. 国立遺伝学研究所研究集会「染色体DNAの安定維持の分子メカニズム」, 2014.11.6-7. (三島)  
益谷央豪, 金尾梨絵, 増田雄司, 花岡文雄: PCNAの翻訳後修飾によるDNA損傷トランス制御機構の解析. 日本放射線影響学会第57回大会, 2014.10.1-3. かごしま県民交流センター(鹿児島)  
増田雄司: PCNAのユビキチン修飾による複製後修復経路の制御. 国立遺伝学研究所・研究会「染色体DNAの安定維持の分子メカニズム」, 2013. 9.27-28 (三島)  
MASUTANI Chikahide: Analysis of mono-ubiquitylation of PCNA in human cells. US-Japan DNA repair meeting, 2012. 4. 11-14 (Leesburg, USA)  
MASUDA Yuji: *En bloc* transfer of poly-ubiquitin chains to PCNA *in vitro* mediated by two human E2-E3 pairs. Gordon Research Conferences 2012. 8.

19-24 (Newport, USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ  
<http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/genome/home.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

増田 雄司 (MASUDA, Yuji)  
名古屋大学・医学系研究科(環医)・准教授  
研究者番号: 30273866

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

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

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