

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570010

研究課題名(和文) DNA損傷トレランス機構の分子制御メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of regulatory mechanisms for the DNA damage tolerance pathway

研究代表者

毛谷村 賢司 (Keyamura, Kenji)

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：70464386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：生物のゲノムDNAは、内的あるいは外的要因によって絶えず損傷を受けており、DNA損傷によるDNA複製阻害は、遺伝子突然変異やゲノムの不安定性を引き起こす。この複製阻害を回避する仕組み(DNA損傷トレランス機構)の制御メカニズムを明らかにするため、クロマチン動態や損傷トレランス関連因子に着目して解析を行った。本研究では、損傷トレランス経路を効率よく働かせるためには、クロマチンの動態制御が重要であることを明らかにした。また、損傷トレランスの制御に関与する新たな因子を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：Genomic DNA is constantly damaged by exposure to endogenous metabolic products and exogenous DNA-damaging agents. DNA replication stress caused by DNA damages potentially leads to genomic mutations and genome instabilities. On the other hand, replication stress can be abolished through the DNA-damage tolerance pathway. In this study, we analyzed a regulatory mechanism of DNA damage tolerance. Our findings indicate that dynamics of chromatin and novel factors are important for regulation of the DNA damage tolerance pathway.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA損傷トレランス DNA相同組換え

1. 研究開始当初の背景

すべての生物の遺伝情報を担うゲノム DNA は、様々な内的・外的ストレスにより常にランダムな箇所では損傷を受けている。DNA 損傷による DNA 複製の進行阻害は、突然変異頻度の上昇などのゲノム不安定性や細胞死を誘発し、ヒトにおいてはガンや老化の原因となっている。一方で、生物はこのような DNA 損傷ストレスに対して耐性能力を獲得することで様々な環境に適応している。損傷ストレス耐性経路の一つとして、DNA 損傷部位での複製阻害を回避する仕組み (DNA 損傷トレランス経路) が存在する。この DNA 損傷トレランス経路には、ゲノム DNA 上の損傷を無視して DNA 合成を続ける損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼによる「損傷バイパス」と、損傷がない姉妹染色体の相同領域を鋳型鎖として利用する「テンプレートスイッチ」という 2 つの経路が存在する。いずれの経路も複製阻害を回避させ、DNA 損傷を残したまま複製装置の進行を優先させる役割を果たしている。これらの経路は、Rad18 ユビキチンライゲースを中心とした PCNA (複製クランプ) の 164 番目のリジン残基のユビキチン化修飾に依存して働き、損傷バイパス経路ではモノユビキチン化、テンプレートスイッチ経路ではポリユビキチン化が起点となっている。また、複製阻害時には、DNA 損傷トレランス経路と競合して Rad51 リコンビナーゼに依存した DNA 相同組換え経路が働くことが知られている。通常、この経路は PCNA の SUMO 化修飾に依存した Srs2 ヘリカーゼの働きにより抑制されており、ゲノム不安定化のリスクを伴わない DNA 損傷トレランス経路が優先的に働けるように制御されていると考えられている。

2. 研究の目的

複製阻害に伴って引き起こされるクロマチンの動態変化は、Rad18 を介した DNA 損傷トレランス経路の制御と密接に関わっていることが予想されるが、その分子制御メカニズムは不明である。また、損傷バイパスとテンプレートスイッチ間の選択的移行は PCNA のユビキチン化修飾により決定されるが、その選択性や特異性を含めた分子メカニズムの詳細も不明である。

出芽酵母の Mgs1 は、原核生物から高等真核生物まで高度の保存されている。MGS1 と RAD18 の二重欠損株は合成致死性を示すため、Mgs1 は DNA 損傷トレランス経路の制御に関与することが示唆されている。しかしながら、その分子機能については、不明な点が多く残されている。

そこで、本研究では、上記の点に着目して、DNA 損傷トレランス経路がどのようなメカニズムで制御されているのかについて解明を目指す。

3. 研究の方法

DNA 損傷トレランスにおけるクロマチン動態

制御の解析

DNA 損傷剤に対する感受性に影響を及ぼすヒストン変異体の同定と解析を行う。

(1) DNA 損傷トレランス経路とクロマチン動態制御との関係性を明らかにするため、出芽酵母のクロマチン構成因子であるヒストン H3 および H4 の変異ライブラリーを用いて、*rad18* 欠損との二重変異株を網羅的に作製する。

(2) 単離した二重変異株について、様々な DNA 損傷ストレスを与える薬剤に対する感受性を調べる。

(3) 薬剤に対して顕著な影響が見られた変異体について、DNA 損傷トレランス経路や DNA 損傷チェックポイント、相同組換え経路への影響について解析を行う。

DNA 損傷トレランス制御ネットワークの解析

MGS1 と RAD18 の高温感受性二重変異株からのマルチコピーサプレッサーの単離と解析を行う。

(1) MGS1 と RAD18 の両方に変異を持つ高温感受性二重変異株を用いて、出芽酵母ゲノムライブラリーの導入により、制限温度下で増殖可能となった細胞を単離する。

(2) 単離した細胞からゲノムライブラリー由来のプラスミドを精製し、シーケンス解析によりゲノム領域を同定する。さらに複数の遺伝子や特異的な配列が存在する場合には、領域限定を行い、抑圧原因因子を同定する。

(3) 同定した因子について、Mgs1 や Rad18 などの損傷トレランス経路に関与する因子との関係性について解析を行う。

4. 研究成果

DNA 損傷トレランスにおけるクロマチン動態制御の解析

(1) DNA 損傷剤に対する感受性に影響を及ぼすヒストン変異体の同定

出芽酵母 *rad18* 遺伝子欠損とヒストン変異の両方をもつ二重変異体の作製を行った。ヒストン H3 および H4 の変異ライブラリー (合計 345 株) を用いて、*rad18* 欠損株との二重変異株をそれぞれ遺伝学的手法により単離した結果、345 種類の全ての変異株について二重変異株が得られた一方で、二重変異により合成致死を示すものは得られなかった。

単離した二重変異株について、DNA 損傷剤であるメチルメタンサルホン酸 (MMS) および DNA 複製阻害剤であるヒドロキシ尿素 (HU) に対する感受性を検討した。その結果、*rad18* 単独欠損株およびヒストン単独変異体に比べて高感受性を示したものが、H3 では 29 株、H4 では 22 株見出された。また、*rad18* 単独欠損株の高感受性と比べてより耐性を示し

たものが、H3では5株、H4では3株見出された。これらの内、36種類の変異体については、これまでにDNA損傷ストレスに対しての影響が報告されていない新規のヒストン変異体であることがわかった。

(2) DNA 損傷ストレスに耐性を示したヒストン変異体の解析

DNA 損傷ストレス (MMS あるいは HU) に耐性を示したヒストン変異 (H3 と H4 の合わせて 8 つ) の内、MMS と HU の両者に対して顕著な耐性を示した 3 つの変異 (H3 が 2 つ、H4 が 1 つ) について、さらに解析を行った。

Rad18 は PCNA (Pol30) の 164 番目のリジン (K164) をユビキチン化修飾することで DNA 損傷トレランス経路を促進する。そこで、*rad18* 欠損に対するヒストン変異の DNA 損傷ストレス耐性効果が、PCNA のユビキチン化阻害を特異的に回避しているかどうか検討した。ヒストン変異体と *pol30^{K164R}* との二重変異株を作製し、DNA 損傷ストレスに対する感受性を調べた結果、*rad18* 欠損と同様に、耐性を示すことがわかった。

また、*pol30^{K164R}* 変異体では、DNA 損傷ストレスにより、Rad53 のリン酸化修飾を介した DNA 損傷チェックポイントの著しい活性化が起こり、細胞は細胞周期の G2/M 期で停止することが知られている。ヒストン変異体との二重変異株について調べた結果、Rad53 のリン酸化は抑制されており、また G2/M 期での細胞周期停止も緩和されていることがわかった。

これらのことより、耐性を示したヒストン変異は、PCNA のユビキチン化を介した DNA 損傷トレランス経路の欠損をバイパスしていることが示唆された。

DNA 損傷トレランス経路のバイパス経路として、Rad51 を介した相同組換え経路が知られている。そこで、ヒストン変異による耐性効果と相同組換え経路との関係性を調べるため、ヒストン変異体と *pol30^{K164R}* との二重変異株に、さらに *rad51* 欠損を導入した三重変異株の解析を行った。その結果、二重変異株の DNA 損傷耐性効果は、*rad51* 欠損により消失することが明らかになった。このことより、ヒストン変異による DNA 損傷ストレス耐性効果は、相同組換えに依存していることが示唆された。

DNA 損傷ストレス耐性を示すヒストン変異体では、Rad51 による相同組換え経路が促進していることが考えられた (上記)。そこで、これらのヒストン単独変異体を用いて、組換え頻度の測定を行った。その結果、どの変異体においても組換え頻度が恒常的に上昇していることがわかった。このことから、ストレス耐性を示すヒストン変異は、DNA 損傷トレランス経路が欠損している場合には、相同組換え経路を促進することで DNA 損傷耐性の

獲得に寄与する一方で、このような相同組換えの活性化は、ゲノムの不安定性の原因になっていることが示唆された。

(3) DNA 損傷ストレス耐性メカニズムの解明

DNA 損傷トレランスが働く場合においては、通常、DNA 相同組換え経路は Srs2 により抑制されている。そこで、GFP-Srs2 のフォーカス形成について解析を行った。その結果、ヒストン変異体では、GFP-Srs2 の核内フォーカス形成頻度の低下が観察された。このことから、これらのヒストン変異体では、相同組換えを抑制する Srs2 のクロマチン上へのリクルート能が低下しているために相同組換えが亢進していることが予想された。

以上のことより、クロマチン構造を形成するヒストンは、相同組換えを抑制することで、ゲノム不安定性のリスクの低い DNA 損傷トレランス経路を優先的に起こす働きをもつことが考えられた。

上記成果については、下記学会にて発表済みである (学会発表 および 参照)

DNA 損傷トレランス制御ネットワークの解析

(1) *MGS1* と *RAD18* の高温感受性二重変異株からのマルチコピーサプレッサーの単離

DNA 損傷トレランス経路の制御に重要な *MGS1* と *RAD18* に変異をもつ高温感受性二重変異株を用いて、出芽酵母のゲノムライブラリーを導入した。その結果、制限温度下 (37°C) において複数のサプレッサーを得ることができた。

抑圧領域の同定

制限温度下で得られたサプレッサーからゲノムライブラリー由来のマルチコピープラスミドを抽出し、シーケンス解析を行った。さらに、シーケンス解析により得られた候補領域について原因領域の同定を行った結果、遺伝子を含まないゲノム上の特定領域が高温感受性株の抑圧に機能していることがわかった。また、これまで DNA 損傷トレランス経路との関係性が報告されていない新規の遺伝子も見出された。これらのことから、*Mgs1* や *Rad18* を介した DNA 損傷トレランス経路の制御は多様な因子と密接に連携し、ゲノムの安定性維持に機能していることが示唆された。

今後の研究展開

(1) DNA 損傷ストレスに耐性を示したヒストン変異部位は、DNA 相同組換えの制御を介して、DNA 損傷トレランス経路に働くことが示唆されたものの、その具体的なメカニズムについては不明な点が多い。今後はクロマチン構造の変化やタンパク質相互作用の制御、ヒストン修飾との関係性について解析する予定である。

(2)Mgs1 や Rad18 を介した DNA 損傷トランス経路を欠損した高温感受性株から単離したマルチコピーサプレッサーについては、どのようなメカニズムで高温感受性を抑圧しているのかは不明である。その抑圧遺伝子や特定配列の機能を踏まえ、Mgs1 や Rad18、DNA 損傷トランス経路、DNA 損傷チェックポイントなどとの関係性について今後解析を進めて行く予定である。

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)

著者名: Ozaki, S., Matsuda, Y., Keyamura, K., Kawakami, H., Noguchi, Y., Kasho, K., Nagata, K., Masuda, T., Sakiyama, Y., and Katayama, T.

論文タイトル: A replicase clamp-binding dynamin-like protein promotes colocalization of nascent DNA strands and equipartitioning of chromosomes in *E. coli*
雑誌名: *Cell Reports*

査読: 有り

巻: 4

発行年: 2013

ページ: 985-995

DOI: 10.1016/j.celrep.2013.07.040

著者名: Keyamura, K., Sakaguchi, C., Kubota, Y., Niki, H., and Hishida, T.

論文タイトル: RecA protein recruits structural maintenance of chromosomes (SMC)-like RecN protein to DNA double-strand breaks
雑誌名: *J. Biol. Chem.*

査読: 有り

巻: 288

発行年: 2013

ページ: 29229-29237

DOI: 10.1074/jbc.M113.485474

著者名: *Su 'etsugu, M., *Harada, Y., *Keyamura, K., Matsunaga, C., Kasho, K., Abe, Y., Ueda, T., and Katayama, T.

*; Equal contributors

論文タイトル: The DnaA N-terminal domain interacts with Hda to facilitate replicase clamp-mediated inactivation of DnaA

雑誌名: *Environmental Microbiology*

査読: 有り

巻: 15

発行年: 2013

ページ: 3183-3195

DOI: 10.1111/1462-2920.12147

[学会発表](計13件)

発表者名: 毛谷村 賢司、菱田 卓

発表タイトル: 相同染色体間の組換え制御機構における出芽酵母Srs2の役割

学会等名: 第32回染色体ワークショップ・第13回核ダイナミクス研究会

発表年月日: 2014年12月15-17日

発表場所: 広島

発表者名: 吉田 麻美、毛谷村 賢司、菱田 卓

発表タイトル: DNA損傷ストレス応答に影響を及ぼすヒストン変異体の解析

学会等名: 第37回日本分子生物学会年会

発表年月日: 2014年11月25-27日

発表場所: 横浜

発表者名: 重森 悠、毛谷村 賢司、菱田 卓

発表タイトル: 出芽酵母Mgs1タンパク質の機能ドメインの解析

学会等名: 第37回日本分子生物学会年会

発表年月日: 2014年11月25-27日

発表場所: 横浜

発表者名: 毛谷村 賢司、新井 康太、菱田 卓

発表タイトル: Roles of the *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 helicase in inter-homologue recombination repair

学会等名: 第9回3Rシンポジウム

発表年月日: 2014年11月17-21日

発表場所: 静岡

発表者名: 吉田 麻美、毛谷村 賢司、菱田 卓

発表タイトル: DNA損傷ストレス応答に関与するヒストン変異体の網羅的解析

学会等名: 第86回日本遺伝学会

発表年月日: 2014年9月17-19日

発表場所: 滋賀

発表者名: 毛谷村 賢司、金子 佳樹、仁木 宏典、菱田 卓

発表タイトル: DNA二本鎖切断修復に関与するRecNのDNA相互作用メカニズムの解析

学会等名: 第11回21世紀大腸菌研究会

発表年月日: 2014年6月5-6日

発表場所: 盛岡

発表者名: 毛谷村 賢司、久保田 佳乃、小林 万希子、金子 佳樹、仁木 宏典、菱田 卓

発表タイトル: SMCファミリータンパク質RecNのDNA二重鎖切断修復における役割

学会等名: 第36回日本分子生物学会年会

発表年月日: 2013年12月3-6日

発表場所: 神戸

発表者名: 櫻本 健郎、毛谷村 賢司、菱田 卓

発表タイトル: 出芽酵母を用いたジーンターゲットングに関する新規因子の同定

学会等名: 第36回日本分子生物学会年会

発表年月日：2013年12月3-6日

発表場所：神戸

発表者名：毛谷村 賢司、新井 康太、菱田 卓

発表標題：相同染色体間の組換えにおける出芽酵母 Srs2 ヘリカーゼの役割

学会等名：第22回DNA複製・組換え・修復ワークショップ

発表年月日：2013年11月20-22日

発表場所：仙台

発表者名：櫻本 健郎、毛谷村 賢司、菱田 卓

発表標題：出芽酵母を用いたジーンターゲットイングに関する新規遺伝子の探索

学会等名：第22回DNA複製・組換え・修復ワークショップ

発表年月日：2013年11月20-22日

発表場所：仙台

発表者名：毛谷村 賢司、久保田 佳乃、仁木 宏典、菱田 卓

発表標題：DNA 二重鎖切断修復に関する SMC ファミリータンパク質 RecN の機能解析

学会等名：第10回21世紀大腸菌研究会

発表年月日：2013年6月20-21日

発表場所：伊豆

発表者名：新井 康太、毛谷村 賢司、菱田 卓

発表標題：Srs2 による DNA 相同組換え制御機構の解析

学会等名：第35回日本分子生物学会年会

発表年月日：2012年12月11-14日

発表場所：福岡

発表者名：新井 康太、毛谷村 賢司、菱田 卓

発表標題：相同染色体間の制御機構の解析

学会等名：第84回日本遺伝学会

発表年月日：2012年9月24-26日

発表場所：福岡

〔その他〕

ホームページ等

学習院大学理学部生命科学科

分子遺伝学研究室ホームページ

[http://www.gakushuin.ac.jp/univ/sci/bio](http://www.gakushuin.ac.jp/univ/sci/bio/laboratory/detail_hishida/theme.html)

[/laboratory/detail_hishida/theme.html](http://www.gakushuin.ac.jp/univ/sci/bio/laboratory/detail_hishida/theme.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

毛谷村 賢司 (KEYAMURA KENJI)

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：70464386

(2)研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

菱田 卓 (HISHIDA TAKASHI)

学習院大学・理学部・教授

研究者番号：60335388