

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651045

研究課題名(和文) 損傷乗り越え複製と細胞周期チェックポイントとの新規クロストーク機構の解析

研究課題名(英文) Crosstalk of translesion synthesis and checkpoint mechanisms

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：色素性乾皮症バリエーション(XP-V)群の責任遺伝子産物であるヒトPolhは、紫外線照射により生じる主要な紫外線損傷のうちシクロブタン型ピリミジン2量体(CPD)をたいへん効率よく、無傷のDNAの場合と同等の反応効率で、乗り越えて複製できるが、6-4光産物に対してはヌクレオチドをひとつ重合したところで停止してしまい、乗り越えて複製することはできない。本課題では、Polhによる損傷乗り越え複製(TLS)が細胞周期チェックポイントの活性化に及ぼす影響を解析した。PolhやPCNAの変異体を発現させたヒト培養細胞の解析により、TLSと細胞周期チェックポイントの連携機構が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Human Polh is the responsible gene product of xeroderma pigmentosum variant, a cancer prone syndrome. Polh catalyzes translesion DNA synthesis (TLS) past the most prominent UV-induced DNA lesion, cyclobutane pyrimidine dimer (CPD), very efficiently. On the other hand, Polh is unable to bypass another UV-induced DNA lesion, 6-4 photoproduct, resulting in the activation of cell cycle checkpoint mechanisms. This project aims to address the relations between TLS and cell cycle checkpoint mechanisms. Expression of Polh or PCNA mutants affected cell cycle checkpoint, suggesting a linkage of TLS and checkpoint mechanisms in human cells.

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：癌 ゲノム 放射線

## 1. 研究開始当初の背景

環境中の放射線や紫外線、種々の化合物、あるいは、細胞自身の代謝により生じる活性酸素など、様々な要因により DNA は損傷を受け続けている。DNA 損傷の多くは、正確なゲノム DNA 複製を担う DNA ポリメラーゼの進行を阻害する。複製フォークの進行阻害は、細胞周期チェックポイント機構を活性化して DNA 複製を負に制御して DNA 修復を促すと考えられてきた。一方で、本応募者は、高発癌性遺伝疾患である色素性乾皮症バリエーション(XP-V)群の責任遺伝子産物として、ヒト Polη を同定し(Masutani *et al.*, EMBO J. 18, 3491-3501, 1999; Masutani *et al.*, Nature 399, 700-702, 1999)、Polη が主要な紫外線損傷のひとつを効率よく乗り越えて複製できることを明らかにしてきた(Masutani *et al.*, EMBO J. 19, 3100-3109, 2000; McCulloch *et al.*, Nature 428, 97-100, 2004; Biertümpfel *et al.*, Nature 465, 1044-1048, 2010)。これらを含む近年の研究により、ゲノム上に未修復の DNA 損傷を残したまま複製を行う損傷乗り越え DNA 複製(TLS: translesion synthesis)機構の重要性が明らかになってきている。即ち、細胞は、細胞周期チェックポイントを活性化して複製を抑制する機構と、TLS を活性化して複製を継続する機構を併用していると考えられる。しかし、両機構間の連携機構はほとんど明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

細胞は、DNA 損傷による複製阻害に対して、大別して2つの対応機構を備えている。ひとつは細胞周期チェックポイント機構であり、DNA 複製を負に制御して DNA 修復を促すと考えられている。もうひとつは、ゲノム上に損傷を残したまま DNA 複製を行う機構であり、損傷乗り越え複製機構が主要な一翼を担う。即ち、細胞は、DNA 損傷に反応して DNA 複製を抑制する機構と、DNA 複製を継続する

機構を併用していると考えられるが、それらの連携制御機構は明らかではない。本研究では、ヒト細胞の損傷乗り越え複製において中心的な役割を担う DNA ポリメラーゼ・イータ(Polη)に着目し、損傷乗り越え複製機構が細胞周期チェックポイント機構に及ぼす影響を明らかにすることにより、両機構間の新規クロストーク機構を見出すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

2種類の主要な紫外線 DNA 損傷のうち、CPD は Polη による TLS により効率よく複製されるが、6-4 光産物は複製されにくい。本計画では、細胞内にこれらの DNA 損傷を特異的に生じさせた状況を作り出すことができる細胞系を応用し、Polη の発現抑制実験系と発現誘導系を組み合わせることにより、TLS の成否と DNA 損傷応答チェックポイントの活性化及びその抑制機構との関係、及び、複製阻害によりひとたび活性化されたチェックポイントを解除する機構と TLS との関係を解析する。さらに、Polη とヒト細胞内で相互作用するタンパク質群の発現抑制実験を組み合わせることで解析する。以上の解析により、TLS とチェックポイントとのクロストーク機構解析の新しい道筋を示し、今後の研究の礎とする。本研究は研究代表者が統括し、連携研究者(助教)及び協力研究者と共に実施する。

## 4. 研究成果

細胞は、DNA 損傷による DNA 複製の阻害に対して、DNA 複製を負に制御して DNA 修復を促す細胞周期チェックポイント機構と、ゲノム上に損傷を残したまま DNA 複製を行う DNA 損傷トレランス機構を備えている。DNA 損傷トレランスは、損傷乗り越え複製とテンプレートスイッチと呼ばれる2つのサブ経路よりなり、これらは、PCNA のモノユビキチン化とポリユビキチン化により制御されると考えら

れている。試験管内のコピキチン化反応再構成系を構築し、ヒトタンパク質によるポリコピキチン化反応を解析した。その結果、従来はモノコピキチン化反応に引き続き、順次コピキチンが付加されることによりポリコピキチン鎖が形成すると考えられていたが、あらかじめE2上に形成されたポリコピキチン鎖が直接PCNAに付加される可能性が強く示唆された。一方で、細胞レベルにおけるPCNA翻訳後修飾と細胞周期チェックポイントとの連携についても解析を行った。内在性のPCNAの発現をsiRNAにより抑制し、siRNAに耐性の外来PCNAを導入したヒト細胞株におけるDNA損傷応答を調べた。その結果、被翻訳後修飾部位である164番目のリジンをアルギニンに置換したPCNA[K164R]変異体を導入した細胞株では、紫外線に感受性を示し、また、チェックポイント応答が長時間にわたって持続していた。DNA損傷トランスと細胞周期チェックポイントとの連携機構の解析系を構築できた。色素性乾皮症バリエーション(XP-V)群の責任遺伝子産物であるヒトPolηは、紫外線照射により生じる主要な紫外線損傷のうちシクロブタン型ピリミジン2量体(CPD)をたいへん効率よく、無傷のDNAの場合と同等の反応効率で、乗り越えて複製できるが、6-4光産物に対してはヌクレオチドをひとつ重合したところで停止してしまい、乗り越えて複製することはできない。本課題では、Polηによる損傷乗り越え複製(TLS)が細胞周期チェックポイントの活性化に及ぼす影響を解析した。PolηやPCNAの変異体を発現させたヒト培養細胞の解析により、TLSと細胞周期チェックポイントの連携機構が示唆された。

#### 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3件)

1. Masuda Y., Suzuki M., Kawai H., Hishiki A., Hashimoto H., Masutani C., Hishida T., Suzuki F., Kamiya K. *En bloc* transfer of polyubiquitin chains to PCNA *in vitro* is mediated by two different human E2-E3 pairs. *Nucleic Acids Research* 40: 10394-10407, 2012. PMID: 22904075
2. Masutani C. NA polymerase η and its regulatory mechanisms. *Genes and Environment* 34: 63-69, 2012. Doi: <http://dx.doi.org/10.3123/jemsge.34.63>
3. Yamamoto J., Oyama T., Kunishi T., Masutani C., Hanaoka F., Iwai S. A cyclobutane thymine-*N*<sup>4</sup>-methylcytosine dimer is resistant to hydrolysis but strongly blocks DNA synthesis. *Nucleic Acids Research*: 42(3), 2075-2084, 2014. PMID: 24185703

[学会発表](計36件)

1. Masutani C. Analysis of mono-ubiquitylation of PCNA in human cells. US-Japan DNA repair meeting, 2012. 4. (Leesburg, USA)
2. 増田雄司, 益谷央豪: PCNAのコピキチン化の新規分子機構. 日本遺伝学会第84回大会, 2012.9. (福岡)
3. 増田雄司, 鈴木美紀, 益谷央豪, 神谷研二: ヒトPCNAのコピキチン化酵素RAD6-RAD18複合体の構造と機能. 放射線影響学会第55回大会, 2012.9. (仙台)
4. Kanao R., Hanaoka F., Masutani C. Regulation of DNA damage tolerance by PCNA post-translational modifications in human cells. The 8<sup>th</sup> 3R Symposium, 2012. 11. (淡路)
5. Kashiwaba S., Kanao R., Masuda Y., Masutani C. The regulatory mechanism of PCNA monoubiquitination induced by oxidative stress is different from that induced by UV irradiation. The 8<sup>th</sup> 3R Symposium,

2012. 11. (淡路)
6. 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. The 8<sup>th</sup> 3R Symposium, 2012. 11. (淡路)
  7. Niimi A., Downs J.A., Lehmann A.R., Masutani C. A role of chromatin remodellers in replication of damaged DNA. The 8<sup>th</sup> 3R Symposium, 2012. 11. (淡路)
  8. 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*, implication in regulation of post-replication repair pathway. 28<sup>th</sup> RBC-NIRS International Symposium, 2012. 11. (京都)
  9. 金尾梨絵, 花岡文雄, 益谷央豪: PCNA の翻訳後修飾による DNA 損傷トランス制御機構の解析. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012. 12. (福岡)
  10. 新美敦子, Lehmann A.R., Downs J.A., 益谷央豪: 複製後修復におけるクロマチン構造の解析. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012. 12. (福岡)
  11. 柏葉脩一郎, 金尾梨絵, 増田雄司, 益谷央豪: 酸化ストレスによって誘導される PCNA のユビキチン化の制御機構と生理的意義. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012. 12. (福岡)
  12. 関本隆志, 小田 司, 益谷央豪, 花岡文雄, 山下孝之: Y-family DNA ポリメラーゼは、発がんシグナルが誘導する DNA 再複製に関与する. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012. 12. (福岡)
  13. 増田雄司, 鈴木美紀, 河合秀彦, 菱木麻美, 橋本 博, 益谷央豪, 神谷研二: ヒト PCNA のポリユビキチン化の新規分子機構. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012. 12. (福岡)
  14. 金尾梨絵, 花岡文雄, 益谷央豪: ヒト細胞におけるモノユビキチン化 PCNA による DNA 損傷トランス制御機構. 日本薬学会第 133 回年会, 2013. 3. (横浜)
  15. 新美敦子, ダウンス ジェシカ, レーマン アラン, 益谷央豪: 紫外線損傷 DNA 複製時におけるクロマチンリモデリング因子の役割解析. 日本放射線影響学会第 56 回大会, 2013. 10. (青森)
  16. 柏葉脩一郎, 金尾梨絵, 益谷央豪: 酸化ストレスによる PCNA のユビキチン化は紫外線照射時とは異なる機構によって制御される. 第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2013. 6. (名古屋)
  17. 増田雄司, 金尾梨絵, 益谷央豪: Y ファミリー-DNA ポリメラーゼと PCNA との相互作用による損傷乗り越え DNA 合成経路の制御. 変異機構研究会・第 26 回夏の学校, 2013. 6. (一宮)
  18. 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* mediated by two different human E2-E3 pairs. 第 35 回内藤コンファレンス, 2013. 7. (札幌)
  19. 増田雄司, 金尾梨絵, 益谷央豪: Y ファミリー-DNA ポリメラーゼと PCNA との相互作用の解析. 日本遺伝学会第 85 回大会, 2013. 9. (横浜)
  20. Masutani C., Kanao R. Regulation of DNA damage tolerance by ubiquitylations of PCNA. 第 72 回日本癌学会総会, 2013. 10. (横浜)
  21. 増田雄司, 金尾梨絵, 益谷央豪: DNA ポリメラーゼ  $\eta$  と PCNA との相互作用による損傷乗り越え DNA 合成経路の制御. 日本放射線影響学会第 56 回大会, 2013. 10. (青森)
  22. 金尾梨絵, 増田雄司, 花岡文雄, 益谷央豪:

- ヒト細胞における PCNA の翻訳後修飾による複製障害回避機構の解析. 第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ, 2013. 11. (仙台)
23. 松本清太郎, 増田雄司, 益谷央豪: PCNA のポリユビキチン化に關与する E3、ヒト HLTF の *in vitro* における作用機構の解析. 第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ, 2013. 11. (仙台)
24. 増田雄司, 金尾梨絵, 益谷央豪: ヒト Y ファミリー DNA ポリメラーゼと PCNA との相互作用. 第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ, 2013. 11. (仙台)
25. 柏葉脩一郎, 金尾梨絵, 益谷央豪: PCNA のモノユビキチン化は G1 期における酸化的 DNA 損傷の修復に關与する. 第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ, 2013. 11. (仙台)
26. 新美敦子, Downs J.A., Lehmann A.R., 益谷央豪: 複製後修復におけるクロマチンリモデリング因子 BAF180 の役割解析. 第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ, 2013. 11. (仙台)
27. Masutani C., Kanao R. Regulation of DNA damage tolerance pathways by ubiquitylations of PCNA. 29<sup>th</sup> RBC-NIRS International Symposium, 2013. 11. (京都)
28. 柏葉脩一郎, 金尾梨絵, 益谷央豪: 酸化ストレスによって誘導される PCNA のユビキチン化は G1 期における酸化的 DNA 損傷の修復に關与する. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013. 12. (神戸)
29. 新美敦子, Downs J.A., Lehmann A.R., 益谷央豪: 複製後修復におけるクロマチンリモデリング因子の役割解析. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013. 12. (神戸)
30. 金尾梨絵, 増田雄司, 花岡文雄, 益谷央豪: ヒト細胞における PCNA ホモ 3 量体の翻訳後修飾による DNA 損傷トランス制御. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013. 12. (神戸)
31. 金尾梨絵, 増田雄司, 益谷央豪: 非コード領域における DNA 損傷トランス制御機構の解析. 文部科学省科学研究費新学術領域研究「ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能」公開シンポジウム インターメアによる染色体制御機構, 2014. 1. (東京)
32. Kanao R., Masuda Y., Hanaoka F., Masutani C. Regulation of DNA damage tolerance distinct from Polη-mediated translesion synthesis. International Conference, Kyoto, 2014. Replication, repair and transcription; coupling mechanisms and chromatin dynamics for genome integrity, 2014. 2. (京都)
33. Niimi A., Downs J.A., Lehmann A.R., Masutani C. A role of BAF180, a chromatin remodeler during post replication repair. International Symposium on Xeroderma Pigmentosum and Related Diseases: Disorders of DNA Damage Response-Bench to Bedside-, 2014. 3. (神戸)
34. Masuda Y., Kanao R., Ohmori H., Hanaoka F., Masutani C. Two different types of interactions between PCNA and Y-family DNA polymerases have distinct roles for translesion DNA synthesis. International Symposium on Xeroderma Pigmentosum and Related Diseases: Disorders of DNA Damage Response-Bench to Bedside-, 2014. 3. (神戸)
35. Kanao R., Masuda Y., Hanaoka F., Masutani C. Regulation of DNA damage tolerance distinct from Polη-mediated translesion synthesis human cells. International Symposium on Xeroderma Pigmentosum and Related Diseases: Disorders of DNA Damage Response-Bench to Bedside-, 2014. 3. (神戸)
36. 金尾梨絵, 増田雄司, 花岡文雄, 益谷央豪: ヒト細胞における PCNA ホモ三量体の翻

訳後修飾による複製阻害回避機構. 日本  
薬学会第 134 回年会, 2014. 3. (熊本)

〔その他〕

ホームページ等：

<http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/genome/home.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

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

### (3)連携研究者

金尾 梨絵 (KANA O RIE)  
名古屋大学 環境医学研究所 助教  
研究者番号：30542287