

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710059

研究課題名(和文)ゲノム損傷により停止した複製フォークの再活性化機構の解明

研究課題名(英文)Mechanism of reactivation of replication forks stalled by DNA damage

研究代表者

宮本 真由美(松原真由美)(Miyamoto, Mayumi)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：10457278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：高等真核生物では、ゲノム損傷により停止した複製フォークがどのような機構で処理され複製が再開されるかについての詳細は明らかにされていない。本研究では、DNA-タンパク質クロスリンク(DPC)をゲノム損傷として用い複製再開機構を検討した。種々のDPC誘発剤に対するDNA修復欠損細胞の感受性及びDNA二本鎖切断(DSB)の蓄積の解析から、停止した複製フォークではフォークの切断が起こり、これが相同組換え(HR)により処理され複製が再開される機構が示唆された。

研究成果の概要(英文)：DNA replication forks are stalled when they encounter genome damage. However, it has not been fully elucidated how stalled replication forks are reactivated and complete DNA synthesis in higher eukaryotes. In the present study we analyzed the sensitivity of DNA repair mutants to various DNA-protein cross-link (DPC) agents and accumulation of DNA double-strand breaks (DSB). Cells deficient in homologous recombination (HR) were hypersensitive to DPC-inducing agents. The HR-deficient but not wild type cells accumulated DSBs upon treatment with DPC-inducing agents. These results suggest that replication forks that are stalled by DPCs undergo breakage and that the resulting DSB ends are processed by HR to resume DNA replication.

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 相同組換え

1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA に生じた損傷は、そのタイプに応じて修復機構がまず働き、さらに未修復の損傷に対して損傷許容機構が働く。最も一般的な修復機構は塩基除去修復 (BER) とヌクレオチド除去修復 (NER) 機構であり、損傷許容機構は損傷乗り越え合成 (TLS) と相同組換え (HR) である。TLS では、TLS ポリメラーゼが損傷により停止した複製ポリメラーゼと一時的にスイッチし、損傷部位の DNA 合成を行う。HR では、損傷により停止した複製フォークが HR により処理され複製が再開される。TLS については、これまでに多数の原核および真核 TLS ポリメラーゼが同定され、その作用機序が明らかにされた。HR についても、原核生物の HR をモデルとして高等真核生物の研究が進んでいる。

原核生物では、DNA-タンパク質クロスリンク (DPC) 損傷で停止した複製フォークの処理に RecB 依存的な HR が働き、引き続き PriA 依存的な経路によりフォークが再活性化され複製が再開するが、もう一つの損傷許容機構である TLS は関与しない。真核生物では、一連の DNA 修復関連遺伝子をノックアウトしたニワトリ血球細胞 (DT40) を用いて DNA 損傷誘発剤 (ホルムアルデヒド) 感受性が調べられ、修復欠損細胞の感受性が、HR > TLS > NER, BER > WT = 非同相末端結合 (NHEJ) となること示されたが、停止した DNA 複製フォークの HR 機構については未解明の部分が多く残されている。

2. 研究の目的

HR は、DNA 二本鎖切断だけでなく、DNA 複製フォークの進行を阻害するゲノム損傷の処理にも関与していることがわかっている。しかし、高等真核生物では、停止した DNA 複製フォークがどのような HR 機構を経て処理され、さらに複製が再開されるかについての詳細は明らかにされていない。本研究では、HR により選択的に処理される DPC をゲノム損傷として用い、これに端を発する HR と停止した複製フォークの再活性化機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 細胞の感受性は、ディッシュに播種した細胞を DNA 損傷誘発剤で処理し、6~7 日間インキュベート後コロニー形成法で調べた。
- (2) 修復タンパク質の核内集積は、処理後の細胞をインキュベートし、固定した多細胞をそれぞれの特異的二次抗体及び蛍光標識二次抗体で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。
- (3) DPC は、処理後の細胞からゲノム DNA を精製し、FITC 標識により定量した。
- (4) DNA 二本鎖切断 (DSB) は、SFGE ゲル電気泳動により調べた。

4. 研究成果

- (1) Decitabine は DNA に取り込まれ、CpG の

メチル化に関わる DNA cytosine methyltransferase 反応中間体を不可逆的にトラップする。その結果、ゲノムに DPC を誘発することが報告されている。Decitabine 処理した細胞から精製した DNA を FITC 標識により調べた結果、ゲノムに DPC が誘発されていることが確認された。Chinese hamster 由来 DNA 修復欠損細胞の Decitabine 感受性を調べた。この目的で、生存率曲線から 20% 生存率を与える薬剤濃度 (LD_{20}) を求め、野生型細胞と修復欠損細胞の比 ($LD_{20}(wt)/LD_{20}(mutant)$) を感受性の指標とした (図 1)。XRCC3 欠損細胞 (irs1SF) 及び RAD51D 欠損細胞 (51D1) は、修復野生型細胞 (AA8) に比べ高感受性を示した。一方、NER 欠損細胞 (XPD (UV5), XPF (UV41)) 及び NHEJ 欠損細胞 (DNA-PKcs (V3)) は感受性を示さなかった。この結果から、停止した複製フォークの再活性化には HR が必要であることが確認された。

RAD51 は損傷部位に集積しフィラメントを形成し、相同配列の鎖交換反応が進行すると予想されることから、RAD51 核内集積及びヒストン H2AX のリン酸化 (γ H2AX) を調べた。Decitabine 処理後の細胞では、RAD51 及び H2AX の核内フォーカス数の有意な上昇が認められた。また、Decitabine 処理後、修復野生型細胞では DSB の蓄積が起こらなかったが、HR 欠損細胞では DSB の蓄積が起こった。この結果は、DPC により複製フォークが停止すると、フォークが崩壊し DSB が生じ、修復野生型細胞では HR により複製が速やかに再開されるのに対し、HR 欠損細胞では再開されず DSB の蓄積が起こったと考えられる (図 2)。

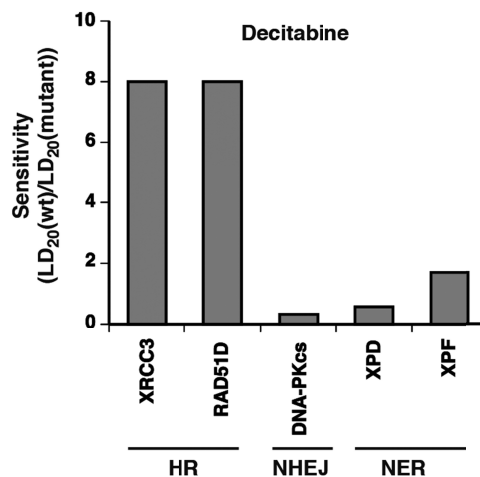


図 1 修復欠損細胞の Decitabine 感受性

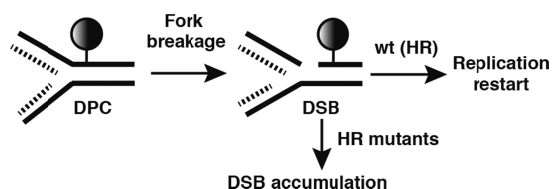


図 2 複製フォークの崩壊と DSB の蓄積

(2)ゲノム損傷誘発剤として Camptothecin 及び Cisplatin を用いて、これらが誘発するゲノム損傷と複製再開機構を検討した。Camptothecin は、Topoisomerase I の反応中間体を可逆的にトラップし、ゲノムに DPC を誘発する。Cisplatin は、鎖内あるいは鎖間のグアニン同士を架橋し DNA クロスリンクを誘発するが、DNA 結合タンパク質を架橋し DPC も誘発する可能性が示唆されている。Camptothecin あるいは Cisplatin 処理した修復野生型細胞から精製した DNA を FITC 標識により調べた結果、ゲノムに DPC が誘発されていることが確認された。また、処理した修復野生型細胞の DSB を電気泳動により調べた結果、Camptothecin では DSB が起こっているが、Cisplatin では DSB は起こっていなかった。Chinese hamster 由来 DNA 修復欠損細胞の感受性を調べた。感受性の指標としては、Decitabine と同様に、生存率曲線から求めた野生型細胞と修復欠損細胞の比 ($LD_{20}(wt)/LD_{20}(mutant)$) を用いた (図 3)。HR 欠損細胞 (XRCC3, RAD51D) は、Camptothecin 及び Cisplatin いずれに対しても高感受性を示した。また、Cisplatin では、NER 欠損細胞のうち XPD 欠損細胞は感受性とならなかったが、XPF 欠損細胞が特徴的な高感受性を示したことから、DNA 鎖間架橋 (ICL) の関与が示唆された。

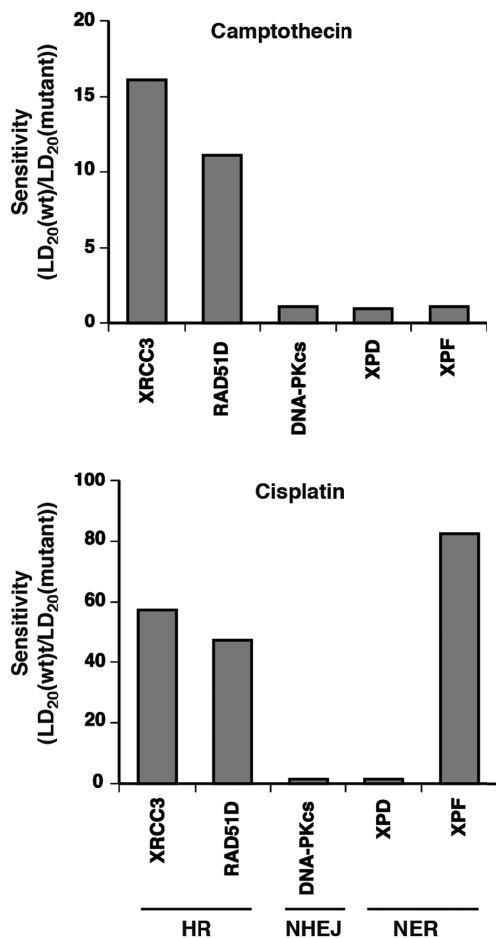


図 3 修復欠損細胞の Camptothecin 及び Cisplatin 感受性

以上の結果から、Camptothecin 及び Cisplatin はともに DPC を誘発するが、複製再開を考える上では、ゲノム損傷として DSB (Camptothecin) 及び ICL (Cisplatin) の関与も無視できないことがわかった。Camptothecin では、3'-末端に DPC をもつ損傷部位に複製フォークが到達すると DNA ポリメラーゼが鋳型から解離し、片側の鎖に DSB が形成される (図 4)。この DSB 形態は、Decitabine 誘発 DPC で起こる DSB と類似しているが (図 2)、放射線等で誘発される DSB とは異なっている。このことは、NHEJ 欠損株が、Decitabine 及び Camptothecin 感受性を示さなかったことから支持される。フォークの崩壊により形成される DSB の形態を考慮すると、Decitabine 及び Camptothecin で形成される DSB 末端は同じ HR 機構で処理され複製再開に導かれる可能性がある。一方、Cisplatin で誘発される DPC と ICL の処理には HR が関わっているが、HR が関わる機構が異なっているため (前者では崩壊した複製フォークの処理、後者では unhooking 後の DSB 組換え修復, 図 5), それぞれの機構を区別して HR の役割を調べる必要がある。

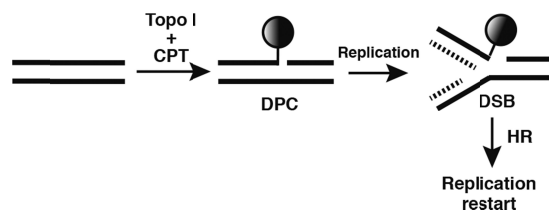


図 4 Camptothecin (CPT) による Topoisomerase (Topo) I-DPC 及び DSB 生成機構

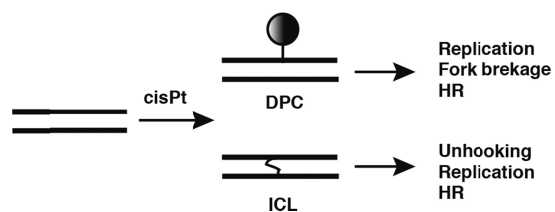


図 5 Cisplatin (cisPt) が誘発するゲノム損傷と処理機構

(3) 損傷許容機構として働く TLS では、TLS ポリメラーゼが損傷により停止した複製ポリメラーゼに一時的にスイッチし、損傷部位の DNA 合成を行う。TLS については、TLS ポリメラーゼ欠損 MEF 細胞の Decitabine 感受性を調べた。その結果、Decitabine 感受性を示す TLS ポリメラーゼ欠損細胞と感受性を示さない欠損細胞があることがわかった。今後、TLS が単独で働き損傷乗り越え合成を行うのか、あるいは HR と共同して働くのか検討してい

く必要がある。

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0件)

[学会発表](計4件)

1. 大場俊也, 謝明章, Mahmoud ShouIkamy, Amir Salem, 宮本(松原)真由美, 中野敏彰, 井出博 抗がん剤が誘発する致死ゲノム損傷の解析, 第36回日本分子生物学会年会, 2013.12.3-6, 神戸市
2. 中野敏彰, 光定雄介, 宮本(松原)真由美, 平山亮一, 鷗澤玲子, 古澤佳也, 井出博 放射線照射腫瘍における DNA 二本鎖切断と DNA-タンパク質クロスリンク損傷の解析, 日本放射線影響学会第56回大会, 2013.10.18-20, 青森市
3. 中野敏彰, 大内綾, 宮本(松原)真由美, 井出博 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, 日本環境変異原学会第41回大会, 2012.11.29-30, 静岡市
4. Mahmoud ShouIkamy, 大場俊也, 宮本(松原)真由美, 中野敏彰, 井出博 アルデヒド化合物が誘発する DNA-タンパク質クロスリンク損傷の解析, 日本放射線影響学会第55回大会, 2012.9.6-8, 仙台市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 真由美 (松原真由美) (MIYAMOTO, Mayumi)

広島大学・大学院理学研究科・特任助教

研究者番号: 10457278