

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340039

研究課題名(和文)ヌクレオチド除去修復によるアルキル化損傷DNAの修復開始段階の解析

研究課題名(英文) Study of initial steps in the repair of DNA alkylation damage by nucleotide excision repair.

研究代表者

池田 正五 (Ikeda, Shogo)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：10176092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：DNAのアルキル化で生じる損傷塩基やAPサイトは細胞死や突然変異の原因となるが、通常、塩基除去修復(BER)で修復される。本研究では、分裂酵母のヌクレオチド除去修復(NER)によるアルキル化損傷DNAの修復開始段階を、遺伝学的および生化学的に解析した。NER因子のRhp7pとRhp41pがAPサイトの修復に関与していた。さらに、rhp7とrhp16が異なるDNA損傷により誘導された。従って、NERはUV損傷ばかりでなく、APサイトなど小さな傷をBERと協調して効率よく除去することができる。

研究成果の概要(英文)：Base modification and AP site in DNA generated by alkylation damage cause cell death and mutagenesis, but the lesions are usually repaired by base excision repair (BER) pathway. Here, we studied initial steps in the repair of DNA alkylation damage by nucleotide excision repair (NER) using fission yeast. NER factors Rhp7p and Rhp41p are involved in repair of AP site. The rhp7 and rhp16 genes are induced by different types of DNA damage. Therefore, NER activity not only target UV lesion, but can also remove AP site and subtle base modifications synergistically with BER.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ヌクレオチド除去修復 アルキル化損傷 塩基除去修復 分裂酵母 損傷認識 APサイト

## 1. 研究開始当初の背景

メタンスルホン酸メチル (MMS) のようなアルキル化剤や生体内の S-アデノシルメチオニン、7-メチルグアニンや 3-メチルアデニン (3-mA) のような DNA の塩基損傷を引き起こす。これらアルキル化塩基は、自然におこる脱プリン反応や特異的 DNA グリコシラーゼの作用により、直ちに AP サイトになる。3-mA や AP サイトは複製や転写をブロックするので致死的であり、さらにこれらの損傷の乗り越え DNA 複製は突然変異を誘起する。これまでの研究で、3-mA や AP サイトは主に塩基除去修復 (BER) によって修復されるといわれているが、ヌクレオチド除去修復 (NER) の関与も遺伝学的解析により指摘されている。例えば、私たちは分裂酵母の Rad16p (ヒトの XPC ホモローグ) が BER 酵素と協調して MMS 損傷を修復することを見出した。また NER の損傷認識過程で働く Rhp41p (XPC ホモローグ) や Rhp26p (CSB ホモローグ) も MMS 損傷 DNA の修復に関わってことを示した。一般的に、NER の基質は紫外線 (UV) 損傷やかさばった付加体といわれているので、3-mA や AP サイトのような小さな損傷の NER による認識機構の解明は大変意義深いと考える。

NER には、ゲノム全体の損傷を対象とする GG-NER と転写と共役した TC-NER がある。ヒト XPC は GG-NER の損傷認識因子であるが、分裂酵母の Rhp41p は転写鎖・非転写鎖両方の UV 損傷の修復に関わっていることが示されている。私たちは、Rhp41p 欠損株では MMS 損傷による転写抑制の迅速な解除ができないことより、Rhp41p がアルキル化損傷の TC-NER にも関わっている可能性を示した。また、出芽酵母の UV 損傷修復では、Rad7p/Rad16p 複合体 (Rad16p は SWI/SNF ファミリー) が GG-NER で UV 損傷に誘導されるクロマチンリモデリング因子として働いている。私たちの実験では、分裂酵母の Rhp7p (Rad7p ホモローグ) 欠損株も MMS 感受性であり、ア

ルキル化損傷の GG-NER でもクロマチンリモデリングが起こる可能性が示唆される。

以上のように、アルキル化損傷が NER により修復されることが遺伝学的に示されているが、どのような仕組みで 3-mA や AP サイトのような損傷が認識されて NER が開始するのか、またアルキル化損傷修復の主な経路である BER と NER による修復がどのような関係にあるのか未解決のままである。

## 2. 研究の目的

本申請では、分裂酵母をモデル生物として、BER 酵素を欠損させた株と、これらをバックグラウンドとして *rhp41* や *rhp7* など NER 遺伝子を欠損させた株を用いて、NER 因子によるアルキル化損傷の認識・開始過程について、次のようなことを明らかにしたい。

(1) アルキル化損傷塩基など、小さな損傷の修復における BER/NER 遺伝子群のエピスタシス解析で NER 因子の機能を考察する。

(2) GG-NER におけるクロマチンリモデリングは損傷認識の初期過程に必須である。アルキル化損傷によるヒストン H3 のアセチル化 (H3Ac) がおこるかどうか、ウエスタンブロットティングなどにより、UV 損傷の場合と比較しながら確かめる。

(3) GG-NER 遺伝子 *rhp7* と *rhp16* が UV 以外のアルキル化や酸化による DNA 損傷で発現誘導されるか、解析する。

## 3. 研究の方法

分裂酵母の BER や NER の多重欠損株は、研究室のストックから、または新規に作成して用いた。これら遺伝子間の相互作用を種々の DNA 損傷に対する感受性の変化で調べた。ヒストン H3 のアセチル化は抗 H3Ac (K9/K14) 抗体を用いたウエスタンブロットティングで検出した。遺伝子の発現誘導は RT-PCR やレポーターアッセイで解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) *rhp7* と *rph41* の BER 遺伝子との DNA 修復における遺伝学的相互作用

分裂酵母の *rhp7* や *rph41* 欠損株、および NER の構造特異的エンドヌクレアーゼをコードする *rad16* の欠損株は、程度の異なる UV 感受性を示し、*rad16Δ* > *rph41Δ* > *rhp7Δ* の順に強い。一方、アルキル化剤 MMS に対する感受性は *rad16Δ* = *rph41Δ* > *rhp7Δ* で、UV 感受性とは異なる。すなわち、これらの NER 因子がアルキル化損傷修復を行うとき、UV 損傷修復時とは異なった役割を果たしている可能性を示唆する。

MMS によって生じた 3-mA は BER 酵素の Mag1p/Mag2p により取り除かれ、BER による修復を受ける。*rhp7* は *mag1/mag2* と MMS 損傷における遺伝的相互作用を示さなかった。一方、*rph41* は *mag1/mag2* と相互作用するので、Rhp41p は Mag1p/Mag2p によって開始される BER と協調して 3-mA を修復していることが示される。

Nth1p は AP リアーゼ活性を持ち、分裂酵母内で生じた AP サイトに働く主な酵素である。*nth1Δ* 細胞から *rhp7* と *rph41* を欠損させると、MMS 損傷に対する感受性が増加した。従って、Rhp7p や Rhp41p は AP サイトを Nth1p と協調して修復していることがわかった。

亜硫酸水素ナトリウム ( $\text{NaHSO}_3$ ) はシトシンを脱アミノしてウラシルに変える。生じたウラシルは直ちにウラシル DNA グリコシラーゼにより AP サイトに変換される。*rhp7* と *rph41* はともに *nth1* と  $\text{NaHSO}_3$  誘発 DNA 損傷の修復において相互作用するで、この系においても Rhp7p や Rhp41p が AP サイトを Nth1p と協調して修復していることが示された。

分裂酵母の Apn2p は AP エンドヌクレアーゼであるが、細胞内で主に Nth1p によって生じた 3'-ブロック( , 不飽和アルデヒド) をホスホジエステラーゼ活性でクリーンアップしている。*rhp7* と *rph41* は *apn2* と相互

作用しなかったため、これらの因子は 3'-ブロックの修復には関与していない。

##### (2) 分裂酵母の GG-NER におけるクロマチンリモデリング

出芽酵母の UV 損傷修復では、Rad7p/Rad16p 複合体は、ヒストン H3 のアセチル化を介して GG-NER による効率的な修復に必要なクロマチンリモデリング因子として働いている。UV-誘導 H3Ac は Gcn5p ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) を介して起こる。分裂酵母の NER におけるクロマチンリモデリングの役割を調べるため、UV 照射後の全ゲノムの H3Ac の変化を抗 H3Ac (K9/K14) 抗体を用いたウエスタンブロッティングで調べた。対照の出芽酵母では UV 損傷により H3Ac が増加したが、分裂酵母では見られなかった。また、HAT 阻害剤の CPTH2 や MB-3 の UV 損傷修復活性に及ぼす影響や、SAGA クロマチンリモデリング複合体を構成する Ada2p の欠損株の NER 活性や UV 損傷に依存した H3Ac 化を調べた。しかし、本研究で行った条件下では、GG-NER における H3Ac の影響をほとんど観察することはできなかった。今後、実験方法や条件の検討を進める必要がある。

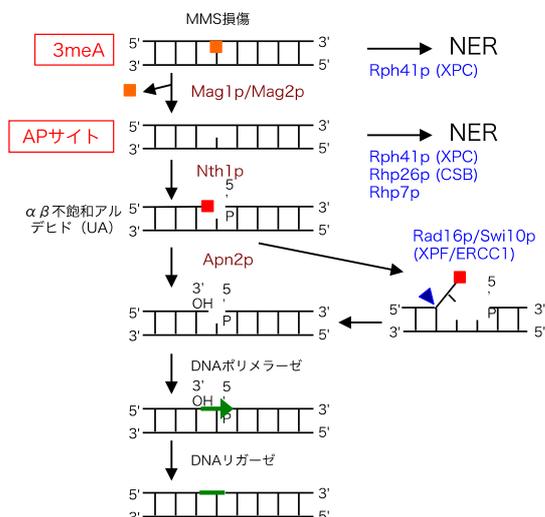
##### (3) *rhp7* と *rph16* の DNA 損傷による遺伝子発現誘導

*rhp7* と *rph16* の両遺伝子は head-to-head の向きで互いに非常に近接して存在する。RT-PCR で両遺伝子の DNA 損傷に応答した発現を調べた。*rhp7/rph16* 両遺伝子は UV 損傷により強く誘導された。さらに両遺伝子は MMS でわずかに誘導された。DNA 損傷による遺伝子発現誘導をさらに詳しく解析するため、*rhp7* と *rph16* のプロモーターを *lacZ* と融合させたプラスミドを作成してレポーターアッセイを行った。分裂酵母のデータベース (PomBase) で、それぞれの遺伝子の転写開始点が反対側遺伝子のコード領域内に存在

することや、*rhp16*の antisense ncRNA が *rhp7* 遺伝子の直ぐ上流にあることなど、*rhp7/rhp16* 両遺伝子が複雑な制御を受けていることをうかがわせる。本実験では、UV 誘導性を示す *rhp7* プロモーター領域を見出すことはできなかった。しかし、*rhp16* プロモーター断片は UV 照射により約 4 倍の誘導が見られた。また、この断片は MMS や過酸化水素によっても誘導が見られた。この結果は *rhp7* と *rhp16* が別々に制御されていることや、*rhp16* プロモーターが種々の DNA 損傷により誘導されることを示す。

#### (4)まとめ

NER と BER 遺伝子のアルキル化損傷や脱アミノ損傷に対する修復における遺伝的相互作用を調べたところ、Rhp7p や Rhp41p が DNA グリコシラーゼによる作用によって生じた AP サイトの修復に関与することがわかった。さらに、*rhp7*と *rhp16*が異なった DNA 損傷により誘導された。本研究で得られた結果は、NER が DNA ヘリックスをゆがめる大きな傷を標的にしているばかりでなく、アルキル化塩基や AP サイトのような小さな DNA 損傷の修復に BER と協調的に作用していることを示し、NER の生物学的意義やヒトにおける NER 欠損の病態の理解に役立つものと考える。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Susuki M., Kawano S. and Ikeda S.: Analysis of DNA damage-induced histone H3 acetylation during nucleotide excision repair of *Schizosaccharomyces pombe*. The Bulletin of Okayama University of Science 査読無 51A, 47-51 (2015).

Sakurai E., Susuki M., Kanamitsu K., Kawano S. and Ikeda S.: Global genome nucleotide excision repair proteins Rhp7p and Rhp41p are involved in abasic site repair of *Schizosaccharomyces pombe*. Advances in Bioscience and Biotechnology 査読有 6, 265-274 (2015).

DOI: 10.4236/abb.2015.64026

[学会発表](計4件)

池田正五、櫻井詠司、須々木深雪、金光恭一郎、河野真二: 分裂酵母のゲノム全体ヌクレオチド除去修復因子 Rhp7p/Rhp16p の AP サイト修復への関与 第40回中国地区放射線影響研究会 2015年7月17日 広島大学(東広島市)

妹尾聖典、河野真二、池田正五: 分裂酵母細胞の経時寿命における塩基除去修復の役割の解析 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月26日 パシフィコ横浜(横浜市)

池田正五、河野真二、草野貴雄、櫻井詠司: アルキル化損傷 DNA 修復ネットワークの解析 OUS フォーラム 2014 2014年11月21日 岡山プラザホテル(岡山市)

櫻井詠司、須々木深雪、河野真二、池田正五：分裂酵母のヌクレオチド除去修復によるアルキル化損傷 DNA の修復初期過程に働く因子の機能と遺伝子発現制御  
第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 15 日 京都国際会議場（京都市）

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

池田 正五（IKEDA Shogo）  
岡山理科大学・理学部・教授  
研究者番号：1 0 1 7 6 0 9 2

### (2)研究分担者

河野 真二（KAWANO Shinji）  
岡山理科大学・理学部・助教  
研究者番号：0 0 6 0 0 2 2 2