

令和元年6月27日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04646

研究課題名(和文) 損傷乗り越え型DNAポリメラーゼ・イータの立体構造に基づく機能解析と阻害剤の開発

研究課題名(英文) Functional analyses and development of inhibitors based on higher-order structure of translesion DNA polymerase eta

研究代表者

花岡 文雄 (HANAOKA, Fumio)

学習院大学・理学部・研究員

研究者番号：50012670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトDNAポリメラーゼ・イータ(Pol η)と紫外線損傷DNAとの共結晶構造に基づいて、鋳型DNAとの相互作用に重要と考えられるアミノ酸を置換したPol η 点変異体を作成し、精製タンパク質の生化学的な解析を行った。またこれらの点変異体を発現するベクターを導入したXP-V細胞について、紫外線感受性および6-チオグアニン耐性による突然変異率の測定を行った。

一方、ヒトPol η に対して阻害効果を示す化合物のスクリーニングを実施した。天然物由来の低分子化合物を固定化した化合物アレイを用い、Pol η に結合する化合物を抽出、その中からPol η のプライマー伸長活性に対して阻害効果を示す化合物を絞り込んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトPol η と紫外線損傷DNAとの共結晶構造に基づいて、鋳型DNAとの相互作用に重要と考えられるアミノ酸を置換した点変異体タンパク質の解析から、鋳型DNAとの相互作用が弱い変異体は全て野生型と比較してDNA鎖の伸長反応が進みにくい結果となった。このことは結晶構造解析によるタンパク質の機能予測が非常に的確であることを示している。

一方、天然物由来の低分子化合物を固定化した化合物アレイを用い、ヒトPol η に対して阻害効果を示す化合物のスクリーニングを行い、Pol η に特異的な阻害剤の候補を選択した。これらは代表的な制がん剤であるシスプラチンとの併用により、制がん効果の増強に効果的な可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In order to identify the important amino acid residues for the template DNA binding of human DNA polymerase eta (Pol η), we generated several point mutants of Pol η based on the co-crystal structure of Pol η -UV-damaged DNA complex. We analyzed these purified Pol η biochemically as well as UV sensitivity and mutation frequency of 6-thioguanine resistance.

We also conducted screening of Pol η inhibitors using chemical arrays of natural low molecular-weight compounds by Pol η -binding at first and then examined inhibitory activities of these compounds using primer-extension reaction. We successfully obtained several Pol η inhibitor candidates and some of them are plausibly specific for Pol η .

研究分野：分子生物学

キーワード：DNAポリメラーゼ 損傷乗り越え合成 DNA損傷 紫外線感受性 突然変異 阻害剤 スクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私どもの研究グループは、皮膚がんを高頻度に発症するヒト遺伝病の一つ、色素性乾皮症 (XP)の中で唯一ヌクレオチド除去修復が正常なバリエーション群(XP-V)細胞では、紫外線(UV)による主要な損傷であるシクロブタン型ピリミジン 2 量体 (cyclobutane pyrimidine dimer: CPD)を効率よく乗り越えることの出来る特殊な DNA ポリメラーゼ (Pol η) が欠損していることを世界に先駆けて見出した。この発見が端緒になって損傷乗り越え合成 (translesion synthesis: TLS) に関わるその他の DNA ポリメラーゼの発見、それらの生化学的な研究などが急速に進められ、遺伝子ノックアウトなどによる TLS ポリメラーゼの生理的機能の研究も盛んに行われている。我々も Pol η およびそのパラログである Pol ϵ の単独あるいは二重ノックアウトマウスを作出し、これらの TLS ポリメラーゼが UV による皮膚がんの抑制に働いていること、さらに Pol η は免疫グロブリン遺伝子領域の体細胞超突然変異や相長的遺伝子組換えにも関与していることを明らかにした。

その後、我々は米国 NIH の Wei Yang 博士のグループとの共同研究により、世界に先駆けてヒト Pol η と UV 損傷 DNA の共結晶構造の解明に成功し、ヒト Pol η がどのようにして DNA 上の UV 損傷を乗り越えるかを分子レベルで明らかにした。同時期に別の研究グループから出芽酵母の Pol η ホモログの結晶構造が発表され、両者の比較により全体的な構造類似性が示されたと同時に局所的な相違も明らかとなり、ヒト Pol η の損傷 DNA へのエンターリースへの関与が示唆されるアミノ酸残基、他のタンパク質との相互作用部位と推測されるアミノ酸領域、さらに D ループ複製への関与が推測されるアミノ酸残基などを見出した。またヒト Pol η の W297 を中心とした疎水性ポケットにヌクレオチドが相互作用し、Pol η の DNA 合成活性を阻害することを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、背景の項で述べたヒト Pol η と出芽酵母 Pol η の構造比較に基づいて独自に見出したヒト Pol η の特徴から、ヒト Pol η の TLS 反応およびその制御機構やヒト Pol η の TLS 反応以外の細胞内機能の解析に迫ることである。またヒト Pol η の構造情報を基に、特異的阻害剤を探索することをも一つの目的とする。それによって、未だに代表的な制がん剤であるシスプラチンと併用することによって、その制がん効果を増強することが可能となるはずである。

3. 研究の方法

1) Pol η の損傷 DNA への結合活性および損傷乗り越え合成活性の測定法

ヒト Pol η の損傷 DNA への結合活性は、30mer のオリゴ DNA のほぼ中央部に主たる UV 損傷である CPD を有する一本鎖 DNA とそれに相補的な非損傷一本鎖 DNA とをアニールさせた二本鎖オリゴ DNA の片側の 5'末端を P³² で標識し、ゲルシフト反応によって測定した。また損傷乗り越え合成活性は、ゲルシフト反応に用いたと同じで中央部付近に CPD を有する 30mer の一本鎖オリゴ DNA とそれに相補的で CPD の手前までの 16mer の一本鎖 DNA をプライマーとしてアニールさせた部分二本鎖 DNA を基質として測定した。プライマーの 5'末端は P³² で標識し、反応後、尿素を含むゲルで泳動し、プライマーの長さを測定した。

2) XP-V 細胞に Pol η の点変異体発現ベクターを導入した細胞の UV 感受性と突然変異率測定

細胞の UV 感受性は、ミトコンドリアの活性を指標とする MTS アッセイとコロニー形成法により測定した。また細胞の UV 誘発突然変異率および自然突然変異率は、6-チオグアニン耐性によって測定した。

3) Pol η に対する阻害活性を持つ化合物のスクリーニングには、理化学研究所の長田裕之先生のグループとの共同研究で、天然物由来の低分子化合物を固定化した化合物アレイと、理研 NPDepo が保有する化合物バンクを代表する 376 種類の化合物パイロットライブラリーを用いた。前者については、His タグを有する Pol η を流して化合物に結合させ、抗 His タグ抗体を用いて検出した。後者のライブラリーについては、PCR 法を用いた簡易な反応で、プライマー伸長活性を測定した。

4. 研究成果

1) ヒト Pol η の点変異体タンパク質の生化学的解析

ヒト Pol η の構造に基づいて、鋳型 DNA との相互作用に重要と考えられるアミノ酸残基 42 番目および 64 番目のトリプトファン、378 番目のロイシンをそれぞれアラニン、アラニンとセリン、アラニンとグリシンに置換した点変異体を作成し、それらのタンパク質を大腸菌にて発現・精製後、生化学的な解析を行った。W42 と W64 はアミノ酸置換により DNA 結合活性が低下し、特に W42A の DNA 結合活性は W64A および W64S の DNA 結合活性よりも低かった。L378 はアラニンへの置換により野生型ヒト Pol η との間に顕著な差は認められなかったが、グリシンへの置換により DNA 結合活性が若干低下した。主たる UV 損傷である CPD を有する鋳型 DNA と、それに相補的で CPD の手前までの 16mer のプライマーを使用したプライマー伸長反応の結果、L378A を除くすべての点変異体で野生型と比較して 17mer と 19mer の生成物蓄積が見られた。この結果から、鋳型 DNA との相互作用が弱い変異体はすべて野生型より伸長反応が進みにくいことが示唆された。

やはりヒト Pol η の構造情報から、297 番目のトリプトファンを中心とした疎水性ポケットがヌクレオチドとの相互作用に重要であると考えられたので、W297 変異体を作成してそれらの性質を調べた。その結果、野生型および W297K において高濃度の dATP によるポリメラーゼ活性の阻害がみられたのに対し、W297Y および W297A ではこの阻害が見られなかった。dATP のアナログについて阻害効果を調べたところ、dGTP にも若干の阻害効果が見られ、プリン環、デオキシリボース、リン酸基が阻害に重要であることが示唆された。

また組換えタンパク質の不溶性の問題から解析が進まなかった欠失変異体ヒト Pol η については、N 末に GST タグを、C 末に His タグを付けることによって可溶性が増すことが分かった。

2) ヒト Pol η の点変異体を発現する XP-V 細胞の解析

上記のように生化学的な解析を行ったヒト Pol η の点変異体を発現するベクターを導入した XP-V 細胞 (XP2SA SV3) について、UV 感受性および突然変異率の測定を行った。XP-V 細胞に野生型ヒト Pol η を発現させた場合、ポジティブコントロールである WI38 VA13 細胞とほぼ同じ UV 感受性を示した。同様に XP-V 細胞にヒト Pol η W42A、W64A、W64S、L378G を発現させた場合、程度の差はあるもののいずれも野生型 Pol η を発現させた場合に近い UV 感受性の回復が見られた。一方、XP-V 細胞にヒト Pol η L378A を発現させた場合には、UV 感受性が高いままであった。このことは、in vitro での生化学的な解析結果から予想されるのとは逆の結果であり、大変興味深い。UV 誘発突然変異率に関しては、XP-V 細胞に野生型ヒト Pol η を発現させた場合と W42A 変異体、W64A 変異体、L378A 変異体を発現させた場合とで、いずれも XP-V 細胞とは異なり、低い変異率しか示さなかった。また自然突然変異率はいずれの場合にも低かった。

3) ヒト Pol η に対して阻害効果を示す化合物のスクリーニング

化合物アレイを用い、ヒト Pol η に結合する 44 化合物を抽出した。その中から Pol η のプライマー伸長活性に対して阻害効果を示す 4 種類の化合物を絞り込んだ。それらの構造類似物質である 28 化合物に対して、同様の活性阻害効果を調べた結果、新たに 14 化合物で阻害効果が認められた。これら計 18 化合物について、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I に由来する Klenow fragment (Kf) 及び真核細胞の複製ポリメラーゼの一つである DNA ポリメラーゼ α (Pola) に対する阻害効果を調べることにより、Pol η に対する特異性が期待出来る 5 種類の化合物を特定した。

一方、376 種類の化合物パイロットライブラリーに対して Pol η への阻害効果を検討し、9 化合物に阻害効果を認め、A グループとした。さらに濃度依存性実験を行うことで 5 化合物まで絞り込み、B グループとした。また A グループの構造類似物質 39 種類に対して阻害効果を検討した結果、新たに 9 化合物で阻害効果を認め、C グループとした。そこで、B グループと C グループの化合物について Kf および Pola に対する阻害効果の有無を判定した結果、B グループから 2 化合物と C グループから 3 化合物が残った。これにより、異なる二つのアプローチで、それぞれ 5 化合物ずつ、計 10 化合物を Pol η に対する特異性が期待できる候補物質として特定するに至った。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

1. Kurashima K., Sekimoto T., Oda T., Kawabata T., [Hanaoka F.](#), Yamashita T. (2018) Pol η , a Y-family translesion synthesis polymerase, promotes cellular tolerance of Myc-induced replication stress. *J. Cell Sci.* **131**, pii: jcs212183. doi: 10.1242/jcs.212183.
2. Yasuda T., Kagawa W., Ogi T., Kato T., Suzuki T., Dohmae N., Takizawa K., Nakazawa Y., Genet M. D., Saotome M., Hama M., Konishi T., Nakajima N., Hazawa M., Tomita M., Koike M., Noshiro K., Tomiyama K., Obara C., Gotoh T., Ui A., Fujimori A., Nakayama F., [Hanaoka F.](#), Sugasawa K., Okayasu R., Jeggo P A., Tajima K. (2018) Novel function of HATs and HDACs in homologous recombination through acetylation of human RAD52 at double-strand break sites. *PLoS Genetics* **14**, e1007277. doi: 10.1371/journal.pgen.1007277.
3. Akagi J., Yokoi M., Cho Y. M., Toyoda T., Ohmori H., [Hanaoka F.](#), Ogawa K. (2018) Hypersensitivity of mouse embryonic fibroblast cells defective for DNA polymerases η , ι and κ to various genotoxic compounds: Its potential for application in chemical genotoxic screening. *DNA Repair* **61**, 76-85. doi: 10.1016/j.dnarep.2017.11.006.
4. Takahashi S., Motooka S., Kawasaki S., Kurita H., Mizuno T., Matsuura SI., [Hanaoka F.](#), Mizuno A., Oshige M., Katsura S. (2017) Direct single-molecule observations of DNA unwinding by SV40 large tumor antigen under a negative DNA supercoil state. *J. Biol. Struct. Dyn.* **5**, 1-13. doi: 10.1080/07391102.2016.1269689.
5. Izumi M., Mizuno T., Yanagi K., Sugimura K., Okumura K., Imamoto N., Abe T., [Hanaoka F.](#) (2017) The Mcm2-7-interacting domain of human mini-chromosome maintenance 10 (Mcm10) protein is important for stable chromatin association and origin firing. *J. Biol. Chem.* **292**, 13008-13021. doi: 10.1074/jbc.M117.779371.

6. Yokoi M., Hanaoka F. (2017) Two mammalian homologs of yeast Rad23, HR23A and HR23B, as multifunctional proteins. **Gene** 597, 1-9. doi: 10.1016/j.gene.2016.10.027.
7. Kino K., Sugasawa K., Miyazawa H., Hanaoka F. (2016) 2,2,4-Triamino-5(2H)-oxazolone is a weak substrate for nucleotide excision repair. **J. Pharm. Negative Results** 7, 42-45. doi: 10.4103/0976-9234.177068.
8. Kashiwaba S., Kanao R., Masuda Y., Kusumoto-Matsuo R., Hanaoka F., Masutani C. (2015) USP7 is a suppressor of PCNA ubiquitination and oxidative- stress-induced mutagenesis in human cells. **Cell Rep.** 13, 2072-2080. doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.014.
9. Osakabe A., Tachiwana H., Kagawa W., Horikoshi N., Matsumoto S., Hasegawa M., Matsumoto N., Toga T., Yamamoto J., Hanaoka F., Thoma NH., Sugasawa K., Iwai S., Kurumizaka H. (2015) Structural basis of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct recognition by UV-DDB in the nucleosome. **Sci. Rep.** 5, 16330. doi: 10.1038/srep16330.
10. Masuda Y., Kanao R., Kaji K., Ohmori H., Hanaoka F., Masutani C. (2015) Different types of interaction between PCNA and PIP boxes contribute to distinct cellular functions of Y-family DNA polymerases. **Nucleic Acids Res.** 43, 7898-7910. doi: 10.1093/nar/gkv712.
11. Akita M., Tak YS., Shimura T., Matsumoto S., Okuda-Shimizu Y., Shimizu Y., Nishi R., Saitoh H., Iwai S., Mori T., Ikura T., Sakai W., Hanaoka F., Sugasawa K. (2015) SUMOylation of xeroderma pigmentosum group C protein regulates DNA damage recognition during nucleotide excision repair. **Sci. Rep.** 5, 10984. doi: 10.1038/srep10984.
12. Uchiyama M., Terunuma J., Hanaoka F. (2015) The protein level of Rev1, a TLS polymerase in fission yeast, is strictly regulated during the cell cycle and after DNA damage. **PLoS One** 10, e0130000. doi: 10.1371/journal.pone.0130000.
13. Kanao R., Yokoi M., Ohkumo T., Sakurai Y., Dotsu K., Kura S., Nakatsu Y., Tsuzuki T., Masutani C., Hanaoka F. (2015) UV-induced mutations in epidermal cells of mice defective in DNA polymerase and/or . **DNA Repair (Amst)** 29, 139-146. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.02.006.
14. Tsaalbi-Shtylik A., Ferras C., Pauw B., Hendriks G., Temviriyankul P., Carlee L., Calleja F., van Hees S., Akagi J., Iwai S., Hanaoka F., Jansen JG, de Wind N. (2015) Excision of translesion synthesis errors orchestrates responses to helix-distorting DNA lesions. **J. Cell Biol.** 209, 33-46. doi: 10.1083/jcb.201408017.

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 赤木純一, Young-Man CHO, 豊田武士, 横井雅幸, 花岡文雄, 大森治夫, 小川久美子 C57BL/6J 野生型および Pol⁻ 欠損マウスにおけるベンゾ[a]ピレンおよび ナフトフラボン併用投与の効果. 第 35 回日本毒性病理学会学術総会 (2019 年 1 月 31 日、東京)
2. 赤木純一, 横井雅幸, Young-Man Cho, 岩井成憲, 花岡文雄, 小川久美子 N7 グリシド アミド dG 付加体は哺乳類細胞において DNA 複製を阻害する. 第 41 回日本分子生物学会年会 (2018 年 11 月 28 日、横浜)
3. Akagi J., Cho Y-M., Toyoda T., Yokoi M., Hanaoka F., Ohmori H., Ogawa K. Benzo[a]pyrene-induced tumorigenesis in Pol⁻-knockout mice. The 11th 3R & 3C Symposium (国際学会) (2018 年 11 月 13 日、金沢)
4. Akagi J., Cho Y-M., Toyoda T., Yokoi M., Hanaoka F., Ohmori H., Ogawa K. Effect of Polk deficiency on benzo[a]pyrene-induced tumorigenesis. 5th DNA Polymerases meeting (国際学会) (2018 年 9 月 23 日、Leiden, the Netherlands)
5. 赤木純一, Young-Man Cho, 豊田武士, 水田保子, 横井雅幸, 大森治夫, 花岡文雄, 小川久美子 ベンゾ[a]ピレン誘発がんに対する Polk の寄与の解析. 日本薬学会第 138 年会 (2018 年 3 月 26 日、金沢)
6. Akagi J., Cho Y-M., Toyoda T., Mizuta Y., Yokoi M., Hanaoka F., Ohmori H., Ogawa K. ベンゾ[a]ピレン混餌投与によるマウス前胃腫瘍発生に対する Polk の寄与 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017 年 12 月 7 日、神戸)
7. 泉雅子, 水野武, 柳憲一郎, 杉村和人, 奥村克純, 今本尚子, 阿部知子, 花岡文雄 ヒト MCM10 の MCM2-7 相互作用ドメインの同定. 第 24 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ (2017 年 11 月 27-29 日、長良川)
8. 横井雅幸, 鹿谷有由希, 菅澤薫, 花岡文雄 シスプラチン誘発 DNA 鎖内架橋の乗り越え合成に関わるヒストン修飾酵素とクロマチン構造変換因子の探索. 第 24 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ (2017 年 11 月 27-29 日、長良川)
9. Hanaoka F. TLS polymerases and mutagenesis. ICEM-ACEM 2017 Satellite Symposium on DNA Repair (招待講演)(国際学会) (2017 年 11 月 20-21 日、神戸)
10. 横井雅幸, 菅澤薫, 花岡文雄 シスプラチン処理した細胞においてヒト DNA ポリメラーゼ η の働きに寄与するクロマチン構造変換因子. 第 76 回日本癌学会学術総会 (2017 年 9 月 28-30 日、横浜)

11. 赤木純一, 横井雅幸, Young-Man Cho, 豊田武士, 大森治夫, 花岡文雄, 小川久美子 損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼ イータ・イオタ・カッパ三重欠損細胞を用いた新規遺伝毒性試験法の研究. 第3回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(2017年9月16日、東京)(優秀発表賞)
12. Hanaoka F. My CV: From our studies on XP-C to XP-V. 6th US-Japan DNA Repair Meeting (招待講演)(国際学会)(2017年5月17-21日、Berkeley, CA, 米国)
13. Hanaoka F., Yokoi M., Masutani C., Yang W. Mutant analyses of human DNA polymerase eta based on high-resolution crystal structures of the protein-DNA- dNTP complex. 4th International Meeting on DNA Polymerases (招待講演)(国際学会)(2016年10月4-8日、Biarritz, France)
14. Sakurai Y., Yokoi M., Hanaoka F. Cancer and translesion synthesis polymerases. 2016 Cold Spring Harbor Asia Conference - DNA Metabolism, Genomic Stability and Diseases (招待講演)(国際学会)(2016年6月13-17日、蘇州、中国)
15. Akagi J., Yokoi M., Toyota T., Cho Y-M., Ohmori H., Hanaoka F., Ogawa K. Pol eta, Pol iota, Pol kappa exhibit different genetic interactions to various compounds of different genotoxic mechanisms and the triple knockout cells are useful for screening of genotoxins. Gordon Research Conference on Mutagenesis (国際学会)(2016年6月5-10日、Girona, Spain)
16. 花岡文雄 総括 BMB2015 ワークショップ「放射線生物影響の課題に挑む分子生物学研究の力」(招待講演)(2015年12月1-4日、神戸)
17. 花岡文雄 私の DNA 修復研究: XPC から XPV へ. 新学術領域研究「ゲノム普遍的制御」終了シンポジウム: ゲノム安定性の機構と生命の維持 - 進化、癌化、老化の理解のために(招待講演)(2015年8月29-30日、京都)
18. Osakabe A., Tachiwana H., Kagawa W., Horikoshi N., Matsumoto S., Yamamoto J., Hanaoka F., Sugasawa K., Iwai S., Kurumizaka H. Structural and biochemical analyses for accommodation and recognition of UV-damaged bases within nucleosome. 「クロマチン動構造」国際シンポジウム(国際学会)(2015年8月23-26日、淡路島)
19. Uchiyama M., Terunuma J., Hanaoka F. Regulation of the protein level of Rev1 in fission yeast. Genomic Integrity, ZING Conference 2015 (招待講演)(国際学会)(2015年8月1-5日、Cairns, Australia)
20. Hanaoka F. Forty years of DNA damage tolerance. 15th International Congress of Radiation Research (ICRR 2015) (招待講演)(国際学会)(2015年5月25-29日、京都)

[図書](計3件)

1. Hanaoka F., Sugasawa K. edited (2016) DNA Replication, Recombination, and Repair - Molecular Mechanisms and Pathology. **Springer Japan**, Tokyo, Japan. 555 pages. doi 10.1007/978-4-431-55873-6
2. Masuda Y., Hanaoka F., Masutani C. (2016) Translesion DNA synthesis and damage tolerance pathways. *In* "DNA Replication, Recombination, and Repair - Molecular Mechanisms and Pathology. Eds. by F. Hanaoka and K. Sugasawa), pp. 249-304. **Springer Japan**, Tokyo, Japan. doi 10.1007/978-4-431-55873-6_11
3. Masutani C., Kanao R., Hanaoka F. (2015) DNA polymerase eta. *In* "Function of translesion DNA polymerases in genome stability. Eds. By D. Maiorano and J.-S. Hoffman), pp. 73-90. **Research Signpost**, Kerala, India.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。