

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26340028

研究課題名(和文)立体構造にもとづいた損傷乗り越え複製DNAポリメラーゼ・イータの機能解析

研究課題名(英文)Functional analyses of translesion synthesis DNA polymerase Poleta based on its structural features

研究代表者

横井 雅幸(YOKOI, MASAYUKI)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・准教授

研究者番号：00322701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの主要な損傷乗り越え合成酵素Poletaについて、紫外線照射とシスプラチン処理に応答した翻訳後修飾や細胞内局在変化、細胞の感受性において重要なアミノ酸残基とアミノ酸配列を、Poletaの立体構造から得られる特徴を元に予測し検証する事で、その機能に重要であるアミノ酸残基とアミノ酸配列を独自に特定する事ができた。特筆すべき成果は、特定のアミノ酸残基やアミノ酸配列に結合する新規相互作用分子が多数同定された事であり、それらにはPoletaに対して阻害効果を示す分子やクロマチン構造変換に関わる分子が複数含まれていた。今後これらの成果が、Poletaを中心とした新たな研究の端緒となる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Human Poleta is a major translesion synthesis polymerase involved in DNA damage tolerance against UV- or cisplatin-induced DNA lesions. To elucidate its physiological function and regulatory mechanism in cellular DNA damage tolerance, I focused on unique structural features of human Poleta identified from the comparison of its crystal structure against other eukaryotic TLS polymerases. As a result, unique amino acid sequences or amino acid residues of human Poleta were deleted or substituted by other amino acid to investigate their role. Biochemical and cellular analyses using these mutant proteins revealed that some of them were important for the translesion synthesis activity or regulation of human Poleta. It was notable, in this research, that several novel proteins and chemical compounds were identified to interact with or regulate human Poleta. These findings will open new phase of research on DNA damage tolerance associated with human Poleta.

研究分野：分子生物学

キーワード：損傷乗り越え合成

1. 研究開始当初の背景

(1) 高発がん性を特徴とする色素性乾皮症バリエーション群の責任遺伝子産物である Pol

は、紫外線やシスプラチンなどで生じた DNA 損傷に対して正確性の高い DNA 重合反応を行うことで、染色体複製の速やかな再開に極めて重要な役割を担う。

(2) Pol を含む複数の損傷乗り越え合成 (TLS) ポリメラーゼが免疫グロブリン遺伝子に変異を誘発し、免疫の多様性獲得に貢献する。

(3) Pol の TLS 以外の役割として、相同組換え時の D ループでの複製反応や染色体脆弱部位での複製への関与も報告されている。

(4) 代表者が所属した研究室と米国 NIH の Wei Yang 博士のグループとの共同研究により、ヒト Pol と DNA の共結晶構造の解明に成功し、どのようにしてヒト Pol が紫外線損傷を乗り越えるかを分子レベルで明らかにした。

2. 研究の目的

背景で述べたように、Pol は、TLS ポリメラーゼとしてのみならず、体細胞超変異や染色体安定性の維持などの幅広い生命現象に関わる重要なタンパク質であるといえる。しかし、各反応での Pol のアッセンブルやリリース、活性制御には不明な点が多く残されている。

一方、Wei Yang らとの共同研究の成果発表と同時期に別グループから出芽酵母の Pol ホモログの構造が発表され、それらの比較から全体的な構造的類似性の高さが示されたと同時に局所的な相違が明らかとなった。またヒトの他の TLS ポリメラーゼとの比較などと合わせて、ヒト Pol の損傷 DNA へのエンターリーやリリースへの関与が示唆されるアミノ酸残基 (W42、W64、L378 など)、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 (410-412 アミノ酸や 151-170 アミ

ノ酸など)、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 (W339 など) などを見いだした。

それに加え、Pol 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することを合わせて見出した。

以上のように、構造比較に基づいて独自に見出したヒト Pol の特徴から、Pol の TLS 反応およびその制御機構、Pol の TLS 反応以外の細胞内機能の解明に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト Pol 変異体を発現・精製し、種々の試験管内反応系を用いて DNA 合成活性、TLS 活性、steady state kinetics、DNA 結合活性などを測定した。

(2) 変異体全長ヒト Pol を発現する XP-V 細胞を樹立し、感受性実験 (コロニー形成率) と突然変異解析 (ウアバイン耐性) を行った

(3) ヒト Pol の N 末に付した FLAG タグを利用してアフィニティ精製し、LC-MS/MS による相互作用タンパク質の解析を行った。

(4) ヒト Pol W297 を中心とした疎水性ポケットとヌクレオチドの相互作用について、各種ヌクレオチドの濃度依存的な試験管内 DNA 合成活性を比較し、ヒト Pol の活性おける作用を調べた。

(4) DNA 傷害剤で処理した細胞についてヒト Pol の細胞内局在パターンや翻訳後修飾状態の変化を経時的に解析した。

(5) 理化学研究所天然化合物ライブラリーを利用し、ヒト Pol の阻害活性を指標としたスクリーニングを行った。

4. 研究成果

第一に、ヒト Pol とその構造的ホモログで立体構造の比較を行うことで判明した、ヒト

PoI に特徴的なアミノ酸の置換変異および部分アミノ酸欠失変異を導入したヒト PoI 変異体の発現と精製、さらに DNA 合成活性、DNA 結合活性、損傷乗り越え合成活性の評価を行った。その結果、アミノ酸点変異体について DNA 結合活性、DNA 合成活性、損傷乗り越え DNA 合成活性を調べることができた。第二に、アミノ酸点変異体ヒト PoI および欠失型変異体ヒト PoI を発現する細胞に対して、紫外線損傷感受性とシスプラチン感受性を比較し、主に欠失型変異体ヒト PoI において紫外線への抵抗性に重要と予想される領域を見出すことに成功した。第三に、DNA 損傷誘発時のヒト PoI の細胞内局在の変化について各種変異体発現細胞を用いて解析した。その結果、紫外線損傷への抵抗性と核内の紫外線損傷部位へのヒト PoI の集積に相関を見いだせた。これにより、紫外線依存的なヒト PoI の損傷部位への集積に重要な新規の領域の存在を確認できた。第四として、ヒト PoI の 151-170 アミノ酸領域および C 末側非活性領域と相互作用するタンパク質の探索を行い、マスペクトル解析で多数の相互作用因子を同定した。既知の相互作用因子も含まれたことから、生理的な結合を反映して単離された因子が含まれると期待された。そのうち、クロマチン構造変換に関わる因子とヒト PoI の翻訳後修飾への関与に注目して二つの因子についてさらなる解析を行った。特に脱ユビキチン化活性を持つ分子との相互作用については、直接的相互作用であることを明らかにした。第五として、ヒト PoI の W297 とヌクレオチドの相互作用が、ヒト PoI の活性阻害を引き起こすことを明らかにした。様々なヌクレオチドアナログを用いた解析の結果、W297 と dATP の特異的な相互作用が、ヒト PoI と基質 DNA との過度な親和性を回避する機構が示唆された。第六として、理化学研究所の天然化合物ライブラリーを用いてヒト PoI を阻害する化合物の

探索を行った。約 30,000 種類の化合物を代表する 3,400 種類の化合物と結合実験を行い、相互作用する結合分子と構造の類似した化合物を足掛かりとして、試験管内でのヒト PoI の活性への影響を調べた。結果として、複数種類の化合物でヒト PoI に高い特異性が期待される阻害効果が見いだせた。

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 2 件)

1) Ikehata, H., Cgang, Y., Yokoi, M., Yamamoto, M., Hanaoka, F., Remarkable induction of UV-signature mutations at the 3'-cytosine of dipyrimidine sites except 5'-TCG-3' in the UVB-exposed skin epidermis of xeroderma pigmentosum variant model mouse, DNA Repair, 査読有、22 巻、2014、112-122、DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.07.012.

2) Kanao, R., Yokoi, M., Ohkumo, T., Sakurai, Y., Dotsu, K., Kura, S., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Masutani, C., and Hanaoka, F., UV-induced mutagenesis in epidermal cells of mice defective in DNA polymerase and/or , DNA Repair, 査読有、29 巻、2015、139-146、DOI: 10.1016/j.dnarep.2015.02.006.

[学会発表](計 16 件)

1) Hanaoka, F., Sakurai, Y., Yokoi, M., Roles of mammalian DNA polymerase and UV-induced mutagenesis, 第 9 回 3R Symposium, 2014

2) 横井 雅幸, アミノ酸置換変異体を用いたヒト PoI の機能解析、国立遺伝学研究所研究集会、2014

3) Hanaoka, F., Sakurai, Y., Yokoi, M., Inhibition of human DNA polymerase by purine analogs, 第 37 回日本分子生物学会年会、2014

4) Morita, D., Sakurai, Y., Ito, W., Yokoi, M., Hanaoka, F., The influence of inactive PoI in UV sensitivity of cells derived from mouse skin, 第 37 回日本分子生物学会年会、2014

5) Akagi, J., Toyoda, T., Cho, Y-M, Yokoi, M., Ohmori, H., Hanaoka, F., Study of the in vitro genotoxicity test utilizing hypersensitivity of PoI , and triple knockout cells to mutagens, 第 37 回日本分子生物学会年会、2014

6) Sakurai, Y., Yokoi, M., Tsukamoto, T., Wei, M., Wanibuchi, H., Murakumo, Y., Hanaoka, F., Roles of DNA polymerase and

in UV-induced mutagenesis of skin cells and tissues、第 104 回日本病理学会総会、2015

7) Akagi, J., Yokoi, M., Cho, Y.-M., Toyoda, T., Hanaoka, F., Ogawa, K.、Hypersensitivity of Pols , , and triple knockout cells to mutagens is a valuable indicator of genotoxicity、第 74 回日本癌学会学術総会、2015

8) Yokoi, M., and Hanaoka, F.、High concentration of dATP attenuated the catalytic rate and efficiency of translesion synthesis of human Pol 、第 74 回日本癌学会学術総会、2015

9) Dotsu, K., Ohkumo, T., Yokoi, M., and Hanaoka, F.、Unidentified function of DNA polymerase and in cellular sensitivity to an oxidizing agent potassium bromate、第 38 回日本分子生物学会、2015

10) Akagi, J., Yokoi, M., Cho, Y.-M., Toyoda, T., Ohmori, H., Hanaoka, F., Ogawa, K.、Hypersensitivity of Pols , , triple knockout cells to various genotoxic m is a valuable indicator of genotoxicity、第 38 回日本分子生物学会、2015

11) Yokoi, M., Onaka, S., Mishima, K., Hanaoka, F.、Mutations of the finger or little-finger domains in human Pol alter lesion bypass efficiencies when copying DNA containing cyclobutane pyrimidine dimer、第 38 回日本分子生物学会、2015

12) Akagi, J., Yokoi, M., Cho, Y.-M., Toyota, T., Ohmori, H., Hanaoka, F., Ogawa, K.、Deficiency of Pols / / exhibit different sensitivities to various chemicals and are useful for screening of genotoxicity、第 75 回日本癌学会学術総会、2016

12) 横井雅幸、ヒト Pol の構造的特徴と損傷乗り越え活性の連関、国立遺伝学研究所研究集会、2016

13) Yokoi, M., Onaka, S., Mishima, K., Yang, W., Hanaoka, F.、Structure and function relations of human DNA polymerase : mutations of the finger or little finger domains alter lesion bypass efficiencies、第 10 回 3R Symposium、2016

14) Akagi, J., Yokoi, M., Cho, Y.-M., Toyota, T., Ohmori, H., Hanaoka, F., Ogawa, K.、Triple knockout mouse fibroblast cells defective for DNA polymerase , , and exhibit hypersensitivity to various genotoxic mechanisms and have potential for screening of chemical genotoxicity、第 10 回 3R Symposium、2016

15) Yokoi, M., Mishima, K., Noda, C., Nishimura, J., Yang, W., Hanaoka, F.、Functional analysis of human DNA polymerase harboring mutations in the

palm domain、第 39 回日本分子生物学会、2016

16) Akagi, J., Yokoi, M., Cho, Y.-M., Toyota, T., Ohmori, H., Hanaoka, F., Ogawa, K.、Translesion DNA polymerase , , and triple knockout cells exhibit hypersensitivity to unmetabolized benzo[a]pyrene、第 39 回日本分子生物学会、2016

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井 雅幸 (YOKOI, Masayuki)
 神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・准教授
 研究者番号：00322701

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()