

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：32606

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23114007

研究課題名（和文）非コードDNA領域が果たすDNA損傷ストレス耐性功能

研究課題名（英文）Functional role of non-coding DNA region in DNA damage tolerance

研究代表者

菱田 卓（HISHIDA, Takashi）

学習院大学・理学部・教授

研究者番号：60335388

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 94,100,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内では、様々なDNA損傷がランダムな箇所ですら常に発生している。したがって、生物はこのようなDNA損傷を修復する能力を獲得することで様々な環境に適応してきた。一方、非コードDNA領域に特徴的な反復配列やクロマチン構造は、DNA損傷修復の際に障害となりうるため、非コードDNA上で生じるDNA損傷がゲノムの安定性維持に及ぼす影響は極めて大きいと考えられる。本研究では、DNA損傷トランスやDNA相同組換え経路の制御に関わるクロマチン動態制御機構や、反復配列の制御がDNA損傷ストレス耐性功能に及ぼす影響を詳細に解析し、非コードDNA領域が損傷ストレス耐性功能に果たす役割を明らかにする。

研究成果の概要（英文）：Genomic integrity is constantly challenged by damage from a variety of sources such as certain chemical agents and UV radiation. The repetitive sequences and chromatin compaction characteristic of non-coding DNA are known to constitute a barrier for DNA replication and repair. Hence, DNA damage and replication stress caused in non-coding DNA regions are implicated in genomic instability. Yeast Srs2, conserved from bacteria to humans, plays important roles in the integrity of repetitive sequences by regulating homologous recombination (HR) pathway. In this study, we demonstrated that Srs2 participates in essential pathways preventing accumulation of inter-homolog recombination intermediates, thereby reducing the risk of genome instability. This work also identified novel H3/H4 alleles involved in replication stress tolerance, which requires a functional HR pathway. Thus, our data identify novel roles of Srs2 and histone H3/H4 in regulating the HR pathway.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：DNA修復 DNA相同組換え

1. 研究開始当初の背景

細胞内では、地球環境及び細胞内環境に由来する様々な因子によって DNA 損傷がランダムな箇所では発生している。生物は、このような微量ながらも慢性的な DNA 損傷を受け続ける環境において、ゲノムの安定性を維持しながら増殖する能力、すなわち DNA 損傷ストレスに対する耐性能力を獲得することで様々な環境に適応してきた。一方で、この微量ながらも長期に渡る損傷ストレスへの曝露は突然変異を誘発する原因となりうるため、ヒトにおける発がんや老化と密接に関連している。自然界に存在する紫外線や電離放射線、DNA 損傷剤などの損傷ストレスは、慢性的かつ微量であるため、これらが生物に及ぼす影響や様々な損傷応答機構の生理的な役割を理解する為には、自然環境と類似した条件で研究を行うことが重要である。このような観点から、研究代表者は慢性的かつ低レベルの紫外線照射下で酵母細胞を培養できる独自の実験系を開発した。本実験系を用いた研究から、慢性的低線量率の紫外線照射 (CLUV) 下では、従来の急性紫外線照射に対して最も高い感受性を示すヌクレオチド除去修復 (NER) 経路の欠損株が増殖阻害を引き起こさない一方で、DNA 複製阻害の解消に關与する DNA 損傷トランス (DDT) 経路や DNA 相同組換え (HR) 経路の欠損株が増殖阻害を引き起こすことを明らかにした (Hishida, T., et al. *Nature*, 2009)。このことは、慢性的な低レベルの損傷ストレス環境下では、DNA 複製阻害がゲノム不安定性を引き起こす主要な原因となっていることを示している。このように、生物は慢性的な DNA 損傷ストレスに対して、DDT や HR 機構の他、DNA 修復や細胞周期制御機構などが一つのシステムとして機能することで損傷ストレスに対する耐性を獲得していると考えられる。

ヒトを含む真核生物の DNA は、ヒストンと結合したヌクレオソームを基本単位として、クロマチンと呼ばれる高次構造を形成している。また、ヒトゲノムの大部分を占める非コード領域には反復配列が多く存在することが知られており、反復配列の大部分は染色体が密に凝集したヘテロクロマチンを形成している。このように、非コード領域は塩基配列とクロマチン構造の両面においてコード領域とは異なった特徴を持っている。さらに、この非コード領域に特徴的な反復配列やクロマチン構造などは、DNA 損傷修復や複製阻害の解消の際に障害となりうるため、非コード DNA 領域上で生じる DNA 損傷がゲノムの安定性維持に及ぼす影響は極めて大きいと考えられる。実際、最近の研究から、非コード領域では紫外線による DNA 損傷の修復速度が遺伝子のコード領域に比べて極めて遅く、テロメア領域に至っては DNA 損傷がほとんど修復されていないことが明らかとなってきている。したがって、非コード

領域では DNA 損傷部位での複製阻害を回避する仕組み (DDT や HR 経路) が染色体不安定性の防御に重要な役割を果たしていると考えられるが、その実体はほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

非コード DNA 領域の多くが反復配列からなるため、この領域における組換え反応は重複や欠失、転座などのゲノム不安定性を増大させる要因となる可能性がある。また、慢性的な損傷ストレス環境における耐性獲得には、個々の DNA 損傷修復機構に加えてクロマチン構造を介した染色体レベルで構造を制御する機構が重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、非コード DNA 領域が DNA 損傷耐性機構に及ぼす影響を明らかにするためには、反復配列の安定性維持やクロマチン構造を介した染色体機能を制御しているメカニズムを明らかにする必要がある。本研究では、反復配列の安定性制御やクロマチン構造変換に關与する因子が DDT や HR 経路を介した DNA 損傷ストレス耐性機能に及ぼす影響を詳細に解析し、非コード領域が染色体構造や損傷ストレス耐性機能に果たす役割を明らかにする。具体的には、(1) 慢性的な紫外線ストレスによって誘発される突然変異のゲノム情報解析と変異誘発の分子メカニズムの解明、(2) DNA 損傷ストレスに対する耐性獲得に關与するクロマチン動態制御機構の解明、(3) 非コードの安定性や染色体構造維持における HR 経路の役割の解明の 3 つの項目について研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 出芽酵母をモデル生物として、慢性的な紫外線照射によって引き起こされる *CAN1* 遺伝子座における突然変異のスペクトラム解析及び、様々な変異株を用いた変異頻度を測定することで変異誘発の分子メカニズムの解析を行った。

(2) DDT の欠損株 (*rad18* 変異株) は、DNA 損傷による複製阻害が高頻度に発生するため、慢性的な DNA 損傷に対して高い感受性を示す。本研究では、421 種類のヒストン H3、H4 変異コレクションと *rad18* 変異との二重変異株を作製し、DNA 損傷ストレス (UV、メチルメタンサルホン酸、ヒドロキシ尿素) の耐性機能を解析した。

(3) 反復配列の不安定性は、欠失や重複の原因となるだけでなく、相同染色体間の組換えによるヘテロ接合性の喪失や異なる染色体間の組換えの原因となる。実際、ヒトのがん細胞などでは、相同染色体間の組換えによるヘテロ接合性の喪失 (LOH) や染色体転座などが高頻度に生じていることが明らかになっている。本研究では相同染色体間の組換えによって生じる LOH 型組換えの制御に關与している因子を同定するため、出芽酵母の

4,700 の非必須遺伝子破壊株を用いた DNA 損傷剤に対する感受性スクリーニングを行い、1 倍体に比べて 2 倍体において高い感受性を示す複数の変異体を同定した。

4. 研究成果

(1) 慢性的な紫外線ストレスによって誘発される突然変異のゲノム情報解析と変異誘発の分子メカニズムの解明: 本研究では、出芽酵母の *CAN1* 遺伝子前進突然変異検出系を用いて、CLUV によって引き起こされる突然変異のスペクトラム解析と変異誘発の分子メカニズムに関して詳細に解析を行った。これまでの研究から、紫外線による DNA 損傷の修復に関わる NER 機構の破壊株 (*rad14Δ*) は、細胞増殖に影響を与えない一方で突然変異頻度が劇的に上昇することを見いだしていたが、今回あらたに、この突然変異の誘発には DDT 経路に属する DNA ポリメラーゼ ζ 及び η が関与していることを明らかにした。特に、これまでの急性紫外線を用いた研究では突然変異を抑える働きが知られていた DNA ポリメラーゼ η が、本実験条件ではむしろ突然変異の誘発に関わっているという興味深い結果が得られた。さらに、*CAN1* 遺伝子の変異スペクトラム解析を行った結果、DNA ポリメラーゼ η による突然変異の誘発は、全てシトシンからチミンへのトランジション型変異であることがわかった。ピリミジンダイマー内のシトシンは、脱アミノ化が非常に起こりやすいことが知られているが、実際、CLUV 環境ではゲノム上に多くのウラシル残基が蓄積していることを見いだした。したがって、DNA ポリメラーゼ η は、ピリミジンダイマー内の脱アミノ化されたシトシン残基 (ウラシル残基) を乗り越える際にグアニンではなくアデニンを対合することで、結果としてシトシンからチミンへの変異を誘発していると考えられる (NAR, 2012)。今回の研究により、長時間にわたる低線量率紫外線への曝露はピリミジンダイマー内の脱アミノ化を介した突然変異の誘発を引き起こすことが明らかになった。

(2) DNA 損傷ストレスに対する耐性獲得に関与するクロマチン動態制御機構: DNA 損傷ストレスによる DNA 複製阻害の回避は、損傷ストレス耐性において中心的な役割を果たしている。本研究では、損傷ストレス耐性とクロマチンの動態制御機構との関連性を明らかにするために、DDT 欠損株 (*rad18Δ* 株) と 421 種類のヒストン H3/H4 変異コレクションとの二重変異株を作製し、様々な DNA 損傷ストレスに対する耐性機能を解析した。その結果、DNA 損傷感受性の相乗的な増加を引き起こす 64 種類のヒストン H3/H4 変異と、*rad18Δ* 株の DNA 損傷感受性を抑圧する 9 つのヒストン変異を同定した。また、この DNA 損傷感受性の抑圧効果は HR 経路に依存して起こることや、増殖を回復する一方で反復配列間の組換え頻度の上昇などのゲノム不安

定性を増大させていることを明らかにした。さらに、非コード DNA 領域の有吉班員との共同研究から、9 つの抑圧型ヒストン H3/H4 変異は、互いにヌクレオソームの非常に近接した場所に位置しており、これらの残基を介して H3-H4-DNA の分子間相互作用が可能であることが明らかになった。これらの結果から、今回明らかにしたヌクレオソーム領域が DNA 相同組換えの制御と損傷ストレス耐性機能に重要な役割を果たしていることが示唆された (論文投稿準備中)。

(3) 非コードの安定性や染色体構造維持における HR 経路の役割: ヒトを含めた 2 倍体細胞では、DNA 損傷に伴う相同組換え修復の際に無傷の姉妹染色体が鋳型として用いられるが、低い頻度ながらも相同染色体が用いられる場合がある。特に、ヒトのがん細胞などでは、相同染色体間の組換えによるヘテロ接合性の喪失 (LOH) や染色体再編などが高頻度に生じていることが明らかになっている。本研究では、体細胞分裂において相同染色体間の組換えが起こる原因とその制御機構について明らかにするため、出芽酵母の 4,700 の非必須遺伝子破壊株を用いたスクリーニングを行い、1 倍体細胞に比べて 2 倍体細胞において高い DNA 損傷感受性を示す複数の変異体 (*srs2*、*mus81*、*mms4* 変異他) を同定した。出芽酵母 *SRS2* は、バクテリアからヒトまで保存された DNA ヘリケースをコードし、HR の制御を介した反復配列の安定性維持に重要な役割を果たしている。今回、*Srs2* の様々な変異体を用いて解析を行ったところ、ATP 加水分解活性を失った *srs2(K41A)* 変異体は、DNA 損傷の有無に関わらず 2 倍体株特異的に増殖阻害を引き起こすことがわかった。また、この変異体は 2 倍体細胞において相同染色体間の組換え中間体の蓄積を顕著に引き起こし、染色体の異数性や反復配列の不安定性が顕著に増大することがわかった。さらに、この 2 倍体特異的な致死効果が組換え中間体の解消に関与する *Mus81-Mms4* エンドヌクレアーゼの阻害によって引き起こされていることを明らかにした。この結果と一致して、*srs2Δ mus81Δ* や *srs2Δ mms4Δ* 二重変異株は、2 倍体細胞においてのみ組換え中間体の蓄積による増殖阻害を引き起こすことがわかった。以上の結果から、相同染色体間の組換え抑制や中間体制御には *Srs2* 及び *Mus81-Mms4* が必須の機能を果たしていることが示された (PLOS Genet. 2016)。本研究成果は、相同及び姉妹染色体間で生じる組換え反応の制御機構に違いが存在することを意味しており、2 倍体酵母を使った研究は、がん化と関連の深い相同染色体間の組換え制御モデルの構築において有効な解析手段として今後益々の発展が期待できる。

< 引用文献 >

Hishida, T., et al. *RAD6-RAD18-RAD5*

pathway-dependent tolerance to chronic low-dose UV light. *Nature* 457, 612-615, 2009

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4件)

Keyamura, K., Arai, K., *Hishida, T. (2016). Srs2 and Mus81-Mms4 Prevent Accumulation of Toxic Inter-homolog Recombination Intermediates. *PLoS Genet.* in press.

Keyamura, K., Sakaguchi, C., Kubota, Y., Niki, H., *Hishida, T. (2013). RecA protein recruits structural maintenance of chromosomes (SMC)-like RecN protein to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* 288: 29229-29237.

Haruta, N., Kubota, Y., *Hishida, T. (2012). Chronic low-dose ultraviolet induced mutagenesis in nucleotide excision repair-deficient cells. *Nucleic Acids Res.* 40:8406-8415.

*Masuda, Y., Suzuki, M., Kawai, H., Hishiki, A., Hashimoto, H., Masutani, T., Hishida, T., Suzuki, F., Kamiya, K. (2012) En bloc transfer of polyubiquitin chains to PCNA in vitro is mediated by two different human E2-E3 pairs. *Nucleic Acids Res.* 40:10394-10407.

[学会発表](計33件)

毛谷村 賢司、菱田 卓「SMC ファミリータンパク質 RecN の二本鎖 DNA 切断修復における役割」第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、横浜
林 匡史、毛谷村 賢司、菱田 卓「出芽酵母 Rad5 におけるリン酸化修飾の解析」第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、横浜

Shioiri, T., Keyamura, K. and Hishida, T. Effect of chronic low-dose UV irradiation in nucleotide excision repair-deficient cells. 第 10 回 3R シンポジウム、2016 年 11 月 15 日、島根(松江)

塩入 拓馬、毛谷村 賢司、菱田 卓「慢性的な紫外線ストレスに対する出芽酵母ヌクレオチド除去修復欠損株の耐性獲得メカニズム」第 88 回日本遺伝学会、2016 年 9 月 8 日、日本大学三島キャンパス

長谷川 ゆき、毛谷村 賢司、菱田 卓「複製ストレス応答における出芽酵母 Mgs1 の役割」第 88 回日本遺伝学会、2016 年 9 月 8 日、日本大学三島キャンパス

林 匡史、毛谷村 賢司、菱田 卓「出芽酵母 DNA 損傷トレランス経路関連タンパク質におけるリン酸化修飾の解析」第 88 回日本遺伝学会、2016 年 9 月 8 日、日本

大学三島キャンパス

毛谷村 賢司、菱田 卓「二本鎖 DNA の切断修復に關与する SMC タンパク質 RecN の DNA 相互作用メカニズム」第 13 回 21 世紀大腸菌研究会、2016 年 6 月 2 日、熊本

Ishige, D., Keyamura, K., Hasegawa, Y., Iwasaki, H., and Hishida, T. A genetic screen for genes that suppress the temperature sensitivity of *mgs1-18 rad18Δ* cells in *Saccharomyces cerevisiae*. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1 日、神戸

毛谷村賢司、菱田 卓「相同染色体間の組換え制御メカニズムの解析」第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1 日、神戸
長谷川ゆき、毛谷村賢司、重森 悠、菱田 卓「複製ストレス応答における出芽酵母 Mgs1 の役割」第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2015 年 10 月 19 日、静岡(焼津)

石毛大輔、毛谷村賢司、長谷川ゆき、岩崎博史、菱田 卓「出芽酵母における複製ストレス応答に關わる新たな因子の探索」第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2015 年 10 月 19 日、静岡(焼津)

毛谷村賢司、菱田 卓「出芽酵母 Srs2 ヘリカーゼと Mus81-Mms4 ヌクレアーゼによる相同染色体間の組換え制御機構」第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2015 年 10 月 19 日、静岡(焼津)
塩入拓馬、毛谷村賢司、田中修平、菱田 卓「慢性的な低線量率紫外線照射下における出芽酵母 NER 欠損株の動態解析」第 87 回日本遺伝学会、2015 年 9 月 24 日、東北大学川内北キャンパス

石毛大輔、毛谷村賢司、長谷川ゆき、岩崎博史、菱田 卓「出芽酵母における複製ストレス応答に關わる新たな因子の探索」第 87 回日本遺伝学会、2015 年 9 月 24 日、東北大学川内北キャンパス

Keyamura, K., and Hishida, T. Regulation of inter-homologue recombination by the Srs2 helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能、2015 年 8 月 7 日、兵庫(淡路島)

毛谷村賢司、戸羽あす美、仁木宏典、菱田 卓「二本鎖 DNA の切断修復に關与する RecN の機能解析」第 11 回 21 世紀大腸菌研究会、2015 年 6 月 4 日、滋賀

毛谷村賢司、菱田 卓「相同染色体間の組換え制御機構における出芽酵母 Srs2 の役割」第 32 回染色体ワークショップ・第 13 回核ダイナミクス研究会、2014 年 12 月 15 日、広島

吉田麻美、毛谷村賢司、菱田 卓「DNA 損傷ストレス応答に影響を及ぼすヒストン変異体の解析」第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、横浜

- 重森 悠、毛谷村賢司、菱田 卓「出芽酵母 Mgs1 タンパク質の機能ドメインの解析」第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、横浜
毛谷村賢司、新井康太、菱田 卓 Roles of the *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 helicase in inter-homologue recombination repair 第 9 回 3R シンポジウム、2014 年 11 月 17 日、静岡（御殿場）
- 21 菱田 卓「慢性的な紫外線損傷ストレスに対する耐性獲得に關与するヌクレオソーム構造」第 57 回日本放射線影響学会、2014 年 10 月 1 日、鹿児島
- 22 吉田麻美、毛谷村賢司、菱田 卓「DNA 損傷ストレス応答に關与するヒストン変異体の網羅的解析」第 86 回日本遺伝学会、2014 年 9 月 17 日、滋賀（長浜）
- 23 毛谷村賢司、金子佳樹、仁木宏典、菱田 卓「DNA 二本鎖切断修復に關与する RecN の DNA 相互作用メカニズムの解析」第 11 回 21 世紀大腸菌研究会、2014 年 6 月 5 日、盛岡
- 24 毛谷村賢司、久保田佳乃、小林万希子、金子佳樹、仁木宏典、菱田 卓「SMC ファミリータンパク質 RecN の DNA 二重鎖切断修復における役割」第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸
- 25 櫻本健郎、毛谷村賢司、菱田 卓「出芽酵母を用いたジーンターゲットングに關与する新規因子の同定」第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸
- 26 櫻本健郎、毛谷村賢司、菱田 卓「出芽酵母を用いたジーンターゲットングに關与する新規遺伝子の探索」第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2013 年 11 月 20 日、仙台
- 27 毛谷村賢司、新井康太、菱田 卓「相同染色体間の組換えにおける出芽酵母 Srs2 ヘリカーゼの役割」第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2013 年 11 月 20 日、仙台
- 28 毛谷村賢司、新井康太、菱田 卓「相同染色体間の DNA 相同組換え制御メカニズムの解析」第 85 回日本遺伝学会、2013 年 9 月 19 日、慶応義塾大学日吉キャンパス
- 29 毛谷村賢司、久保田佳乃、仁木宏典、菱田 卓「DNA 二重鎖切断修復に關与する SMC ファミリータンパク質 RecN の機能解析」第 10 回 21 世紀大腸菌研究会、2013 年 6 月 20 日、静岡（熱海）
- 30 菱田 卓「Srs2 による相同染色体間の組換え制御機構」第 35 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 11 日、福岡
- 31 菱田 卓「相同染色体間の組換え制御機構の解析」第 84 回日本遺伝学会、2012 年 9 月 23 日、福岡
- 32 菱田 卓「慢性的な紫外線照射による突然変異の誘起メカニズム」放射線影響学会第 55 回大会（招待講演）2012 年 9 月 6 日、仙台

- 33 菱田 卓「DNA 二重鎖切断修復に關与する RecN の機能解析」第 9 回 21 世紀大腸菌研究会、2012 年 6 月 21 日、滋賀（長浜）

〔図書〕(計 2 件)

菱田 卓、ゲノムを司るインターメア：非コード DNA 領域の DNA 損傷応、化学同人、2015、pp161-174.

菱田 卓、ノーベル化学賞：DNA 修復の分子メカニズムの解明、パリティ、2015、Vol.30 No.12、pp43-45.

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

http://www.gakushuin.ac.jp/univ/sci/bio/laboratory/detail_hishida/theme.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菱田 卓 (HISHIDA Takashi)

学習院大学・理学部・教授

研究者番号：60335388