

平成22年6月1日現在

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2005～2009  
 課題番号：17013041  
 研究課題名（和文） DNA 損傷バイパスに伴う突然変異の誘発とその抑制の分子メカニズム  
 研究課題名（英文） Molecular mechanisms of induction and suppression of mutations accompanied with bypass of DNA damages  
 研究代表者  
 大森 治夫 (OHMORI HARUO)  
 京都大学・ウイルス研究所・准教授  
 研究者番号：10127061

研究成果の概要（和文）：ほ乳類では DNA 損傷バイパス (TLS) に関わる DNA ポリメラーゼは複数存在し、異なる損傷特異性を示す。個々の損傷に対して適当な TLS DNA ポリメラーゼがどうやってリクルートされるかを探るために、ヒトの Pol $\kappa$ 、Pol $\eta$ 、Pol $\iota$  とその他のタンパク質との相互作用について解析した。Pol $\kappa$ 、Pol $\eta$ 、Pol $\iota$  はいずれも REV1 の C 末端領域 (REV1-CTD) に結合するが、1) Pol $\kappa$  の機能には REV1-CTD との相互作用には必要であること、2) Pol $\eta$  が紫外線照射によって生じた損傷をバイパスするという機能には REV1-CTD との相互作用は必要ではないが、その他の損傷のバイパスには必要であろうという結果が得られた。Pol $\eta$  は PCNA に対する結合するばかりでなく、Rad6-Rad18 複合体にも結合することから、DNA 損傷個所で進行停止となった複製フォーク中の PCNA を Rad6-Rad18 複合体がユビキチン (Ub) 化すると Pol $\eta$  が優先的に Ub-PCNA に結合すると考えられ、Pol $\eta$  がバイパスできない損傷が存在する場合には REV1 との相互作用を通じて他の TLS DNA ポリメラーゼへのスイッチが起こると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Mammals have multiple DNA polymerases for translesion DNA synthesis (TLS), which show different specificities for lesions to bypass. In order to investigate how a TLS DNA polymerase appropriate for bypassing a given DNA lesion is recruited, we studied on the interactions of human Pol $\kappa$ , Pol $\eta$  or Pol $\iota$  with other proteins. Pol $\kappa$ , Pol $\eta$  and Pol $\iota$  each interact with a C-terminal region of REV1 (REV1-CTD). We found 1) interaction of Pol $\kappa$  with REV1-CTD is necessary for its functions, 2) the interaction of Pol $\eta$  is not required for the enzyme to bypass UV-induced lesions, but it may be required for the enzyme to bypass other lesions. Pol $\eta$  interacts with PCNA and also with Rad6-Rad18 complex that ubiquitinates PCNA in DNA-damaged cells. Therefore, Pol $\eta$  likely has a priority to bind Ub-PCNA when Rad6-Rad18 complex modifies PCNA in a stalled replication fork. When Pol $\eta$  cannot bypass the lesion in the stalled replication fork, switching from Pol $\eta$  to another TLS DNA polymerase may occur through their interactions with REV1-CTD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,700,000	0	9,700,000
2006年度	9,700,000	0	9,700,000
2007年度	9,700,000	0	9,700,000
2008年度	9,700,000	0	9,700,000
2009年度	9,700,000	0	9,700,000
総計	48,500,000	0	48,500,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：DNA 損傷バイパス、YファミリーDNAポリメラーゼ、突然変異誘発、分子間相互作用、結合認識配列、細胞周期チェックポイント

## 1. 研究開始当初の背景

(1) DNA に損傷が生じると突然変異が誘発されることは古くから知られてきた。1999年ごろに、新たなタイプのDNAポリメラーゼ(PolI)が大腸菌からほ乳類にまで保存されて存在し、それらがDNA損傷のバイパス合成(translesion DNA synthesis, TLS)に関わることが明らかになった。筆者らはこのようなDNAポリメラーゼをYファミリーと呼ぶことを提唱した。現在では、ヒトやマウスにおいてYファミリーDNAポリメラーゼはPolη、Polι、Polκ、そしてREV1の4種類が存在し、その他にBファミリーに属するPolζなどがDNA損傷バイパス合成に関わると考えられている。

Polηはin vitro反応において紫外線照射によって生じる主要な損傷であるシクロブタン型ピリミジンダイマー(CPD)を効率良く、また正確にバイパスすることが出来る。このことはPolηを欠損した色素性乾皮症バリエーション型(XP-V)の患者は紫外線暴露により皮膚がんを生じやすいことと合致している。しかし、筆者らの見つけたPolκは、紫外線照射によって生じるCPDなどをバイパスすることは出来ないが、肺がんの原因物質と考えられているベンゾピレンの体内代謝物(BPDE)がDNAのグアニン(G)のN2の位置に付加した損傷(BPDE-N2-dG)の向かい側に相補的なシトシンを挿入してバイパスする。このように、TLS DNAポリメラーゼはそれぞれ異なる特異性を持つことが明らかになった。

個々のDNA損傷のバイパスに適当なTLS DNAポリメラーゼが働くと突然変異の発生は抑制され、逆に間違ったTLS DNAポリメラーゼが働くと突然変異の発生は上昇すると考えられる。それでは個々のDNA損傷個所にどうやって適当なTLS DNAポリメラーゼがリクルートされるのかということが重要な研究課題となった。

(2) DNA に損傷が生じると、それらが修復されるまで細胞周期を一端停止させるチェックポイント機構が作動することが知られている。TLS DNAポリメラーゼの一つであるPolζは触媒活性を持つREV3と機能が不明のREV7の二つのサブユニットから構成されるが、REV7はスピンドルアッセムブリーチェックポイント(spindle assembly checkpoint,

SAC)に働くMAD2と有意な相同性を示すことからMAD2L2とも呼ばれ、TLSばかりでなくSACにも関与するというモデルが提唱されている。

## 2. 研究の目的

(1) Yファミリーの一つであるREV1はその中央部分の触媒活性領域を持つが、そのC末端領域にはPolη、Polι、Polκ及びPolζの非触媒活性サブユニットREV7が結合することが筆者らを含む複数のグループの解析によって明らかになった。このことからREV1がin vivoにおけるTLS反応において中心的な役割を果たしていると考えられた。そのようなREV1との相互作用の生理学的意義を探索。Polη、Polι、Polκなどとの相互作用について解析し、損傷部位へのリクルートに何が重要であるかを探索。

(2) REV7がTLSばかりでなくSACにも関与するというモデルを検証する。

## 3. 研究の方法

(1) REV1のC末端領域(REV1-CTD)に結合に必要なPolκ(及びPolη、Polι)の領域を同定し、REV1-CTDとの結合能を失った変異体を作成する。そして、そのような変異体をPolκ欠損細胞内で発現させ、野生型と比較検討する。

(2) REV7はREV3やREV1ばかりでなく、その他の幾つかのタンパク質とも相互作用することが報告されている。REV7が結合する領域を同定して、MAD2の結合様式と比較する。

## 4. 研究成果

(1) yeast two-hybrid assay法を用いて、REV1-CTDとの結合に必要なPolκの領域は16アミノ酸(aa)からなる短い配列で十分であり、特にその中のPheが二つ並んだモチーフ配列(FF)が重要であることが分かった。Polκの全長870aaの配列においてこのFFをAla-Ala(AA)に変えるとREV1-CTDとの結合能は完全に消失した。全長のPolιの配列中にはFF配列は一箇所だけ存在するが、それをAAに変えると、Polκの場合と同様にREV1-CTD

との結合能は完全に消失した。また、Pol $\eta$ では中央部分に FF 配列が二箇所存在し、その両方を AA に変えると REV1-CTD の結合能は野生型の 15%程度にまで低下した。

(2) Pol $\kappa$ を欠損したマウス胎児繊維芽細胞は BPDE 感受性を示し、野生型の Pol $\kappa$ を発現させるとその性質は補正される。しかし、上記の FF-AA 変異体を発現させた場合には BPDE 感受性は補正されなかった。従って、Pol $\kappa$ がその機能を発揮するためには REV1-CTD との結合が必須であると結論された。

(3) Pol $\eta$ を欠損した XP-V 患者由来の細胞の示す UV 感受性は、Pol $\eta$ の上述の中央部分の二箇所の FF を AA に変えて REV1-CTD の結合能が大きく減少した変異体を発現させた場合でも Pol $\eta$ の野生型を発現させた場合と同程度にまで補正された。また、XP-V 患者由来の細胞は UV 照射すると突然変異の発生頻度が顕著に上昇するが、そのような性質もまた変異型あるいは野生型の Pol $\eta$ を発現させると元に戻った。従って、Pol $\kappa$ の場合とは異なり、Pol $\eta$ が UV 照射により生じた損傷をバイパスするという機能を発揮するためには REV1-CTD との結合は必須ではないと結論された。しかし、XP-V 患者由来の細胞は高い自然発生的突然変異を示すが、その性質は野生型 Pol $\eta$ により補正されたが、変異型 Pol $\eta$ によっては補正されなかった。このことは UV 照射により生じた損傷とは別な損傷 (例えば酸化ストレスによる 8-oxoG など) のバイパスには REV1-CTD との結合が重要であると考えられた。

(4) FF という配列は Pol $\kappa$ にはもう一箇所 C 末端部分の PCNA-interacting protein (PIP)-box にも存在するが、こちらを AA に変えても REV1-CTD との結合には全く影響は無いが、PCNA との結合は失われる。Pol $\eta$ も同様に C 末端に FF を含む PIP-box を持つ。Pol $\kappa$ 、Pol $\eta$ 、Pol $\iota$ の PIP-box の配列を含むペプチドと PCNA との結合を Surface Plasmon Resonance (SPR)法を用いて測定したところ、Pol $\eta$ 、Pol $\iota$ の PIP ペプチドでは 0.4  $\mu$ M 程度の解離定数 (Kd) 値が得られた。Pol $\kappa$ の PIP ペプチドでは本来の配列のままでは PCNA との結合は検出できなかったが、Pol $\kappa$ の PIP ペプチドの C 末端に Pol $\eta$ の PIP ペプチドと似るように PLTH という 4 アミノ酸を付加した場合には PCNA との結合が検出可能となり、4.9  $\mu$ M という Kd 値が得られた。そのようなペプチドと PCNA との複合体の結晶構造解析により、Pol $\kappa$ 、Pol $\eta$ 、Pol $\iota$ の PIP-box がこれまで解析されてきた p21 あるいは Fen1 タンパク質の PIP-box よりも PCNA との結合が弱いことについて合理的な説明が得られた。

(5) DNA に損傷を受けた細胞では PCNA が Rad6-Rad18 複合体によりユビキチン (Ub) 化を受けることが知られている。実際、Y ファミリーに属する TLS DNA ポリメラーゼは 4 種類ともに 1-2 コピーのユビキチン結合ドメイン (UBD) を持つことが分かっている。従って、DNA 損傷個所での複製型 DNA ポリメラーゼから TLS DNA ポリメラーゼへのスイッチングが起こるためには、TLS DNA ポリメラーゼが Ub-PCNA に選択的に結合することが重要であると考えられている。しかし、Pol $\eta$ や Pol $\iota$ の UBD と Ub との結合は PIP と PCNA との結合に比べて明らかに弱く (Kd 値において 2 桁程度の違いがある)、Ub-PCNA との結合においてもそれぞれの TLS DNA ポリメラーゼにおける PIP の PCNA との親和性がより重要であると考えられた。

Pol $\eta$ の場合には Rad18 との相互作用を通じて Rad6-Rad18 複合体に結合することが分かっている。従って、DNA 損傷部位に Rad6-Rad18 複合体が先ずリクルートされて PCNA を Ub 化すると、Rad6-Rad18 複合体に結合した Pol $\eta$  が Ub-PCNA に優先的に結合すると考えられる。複製フォークを進行停止にした DNA 損傷が CPD であれば、Pol $\eta$ により TLS 反応は問題無く達成されることが考えられる。一方、もしそこに存在する損傷が Pol $\eta$ によってバイパスされない BPDE-N2-dG などであれば、Pol $\eta$ は Pol $\kappa$ に置き換わられることが必要であり、そのような TLS DNA ポリメラーゼ間のスイッチングに REV1-CTD との相互作用が必要であるというモデルが想定された。

(6) REV3 の中央部分に存在する ILKPLMSPP という 9 aa から成るアミノ酸配列が REV7 との結合に必要な最小コア配列 (MCS) であることが明らかになった。また、これまで REV7 が結合することが報告されていた他のタンパク質 (ADAM9 や ELK-1) にも REV3 の MCS に似た配列が存在し、それらの配列と REV7 との結合は REV3 の MCS に比べると遥かに弱いことが分かった。意外なことに、MAD2 もまた REV3 の MCS の配列に結合することが分かったが、MAD2 は ADAM9 や ELK-1 の REV7 結合配列には結合せず、また REV7 は MAD1 や CDC20 の MAD 2 結合配列には結合しなかった。

これまで REV7 が SAC に関与するというモデルでは CDC20 のホモログである CDH1 に REV7 が結合すると想定されてきた。しかし、CDH1 には REV3 の MCS に類似した配列は存在せず、全長の CDH1 を用いた yeast two-hybrid assay によっても REV7 との相互作用は検出できなかった。同一条件下で MAD2 と CDC20 との相互作用は検出されることから、REV7 が

CDH1 に結合するとしても、結合は非常に弱く、REV7 が CDH1 との相互作用を通じて SAC に関する可能性は極めて低いと考えられた。

#### 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 16 件)

- ① T Hanafusa, T Habu, J Tomida, E Ohashi, Y Murakumo, H Ohmori. Overlapping in short motif sequences for binding to human REV7 and MAD2 proteins. *Genes Cells* **15**, 281-296, 2010 (査読有)
- ② H Ohmori, T Hanafusa, E Ohashi, C Vaziri. Separate roles of structured and unstructured regions of Y-family DNA polymerases. *Adv. Prot. Chem. Struct. Biol.* **78**, 99-146, 2009 (査読無)
- ③ A Hishiki, H Hashimoto, T Hanafusa, K Kamei, E Ohashi, T Shimizu, H Ohmori, M Sato. Structural basis for novel interactions between human translesion synthesis polymerases and proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* **284**, 10552-10569, 2009 (査読有)
- ④ E Ohashi, T Hanafusa, K Kamei, I Song, J Tomida, H Hashimoto, C Vaziri, H Ohmori. Identification of a novel REV1-interacting motif necessary for DNA polymerase  $\kappa$  function. *Genes Cells* **14**, 101-111, 2009 (査読有)
- ⑤ X Bi, DM Slater, H Ohmori, C Vaziri C. DNA Polymerase  $\kappa$  is specifically required for recovery from the benzo[*a*]pyrene-dihydrodiol epoxide (BPDE)-induced S-phase checkpoint. *J. Biol. Chem.* **280**, 22343-22355, 2005 (査読有)

[学会発表] (計 21 件)

- ① 花房 朋, 村雲 芳樹, 原 幸大, 橋本 博, 大橋 英治, 大森 治夫, REV7 タンパク質とMAD2 タンパク質の結合モチーフ配列のオーバーラッピング、第31回日本分子生物学会年会及び第81回日本生化学会大会、神戸、12月9～12日、2008
- ② 大森 治夫、Protein-protein interactions during translesion DNA synthesis, 第30回日本分子生物学会年会及び第80回日本生化学会大会、横浜、12月11～15日、2007
- ③ 大橋 英治, 花房朋 亀井恵二郎, 大

森 治夫, Interactions between hREV1 and three Y-family DNA polymerases. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. 京都、6月18～23日、2006

- ④ 大橋 英治, 花房朋 亀井恵二郎, 大森 治夫, Interactions between hREV1 and three Y-family DNA polymerases. The 22nd Radiation Biology Center, International symposium, 京都、11月21～22日、2005
- ⑤ 大橋 英治, 花房朋 亀井恵二郎, 大森 治夫, Interactions between hREV1 and three Y-family DNA polymerases. The 5<sup>th</sup> 3R symposium, 兵庫、11月13～17日、2005

[その他]

ホームページ等

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/ohmori.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大森 治夫 (OHMORI HARUO)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：10127061

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者