

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00551

研究課題名（和文）損傷乗り越え合成による染色体複製反応の再開を統括・制御する分子基盤の解析

研究課題名（英文）Studies on the molecular mechanisms to regulate the resumption of stalled replication by translesion synthesis at DNA damage sites

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） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：DNA損傷部位で停止した染色体複製反応の再開に重要な損傷乗り越え合成（translesion synthesis: TLS）が、いかにして統括・制御されているかを明らかにするため、染色体複製反応の停止で誘起されるTLS関連因子の翻訳後修飾とその各因子の機能への影響や染色体複製の停止と再開が起きる場であるクロマチンの構造変換が果たす役割について解析を行なった結果、ヒトの主要な損傷乗り越え合成酵素であるDNAポリメラーゼ・イータ（POLH）の安定性や低分子阻害剤、DNA複製部位でのPOLHの集積に関わるクロマチン構造変換についての新たな発見があり、研究目的に対して十分な研究成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で得られた成果は、紫外線や化学物質などの環境由来の原因で生じたDNA損傷が原因で停滞した染色体複製の再開を担うTLS機構の統括・制御機構を明らかにする上で重要な知見である。この他、生細胞イメージングの数値解析で用いたソフトを独自にプログラミングするなど技術的なオリジナリティも高く、さらに、POLHを標的とした創薬につながる新たな発見もあったことなどから、当該研究分野の発展に対する貢献が大いに期待できる点で学術的に意義がある。また、環境リスク評価やがん治療などへの幅広い展開も期待でき、これらは社会的ニーズと関心が高い点で社会的意義があると言える。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research is to elucidate the fundamental mechanism(s) which is important for the resumption of stalled DNA replication by translesion synthesis (TLS) at DNA damage sites. DNA replication arrest at DNA lesion induces post-translational modifications (PTM) of TLS factor(s) such as replication accessory protein PCNA and/or TLS polymerase(s) on chromatin. In order to clarify how TLS governs and controls the resumption of chromosomal replication stalled at the DNA damage on chromatin, the effects of PTM on the function of TLS factors and its relation on chromatin organization were studied. As a result of analysis, new discoveries regarding the stability control of TLS polymerase, the relation of TLS and chromatin organization, and small molecules which inhibit TLS polymerase were obtained.

研究分野：分子生物学

キーワード：損傷乗り越え合成 染色体複製 DNA損傷 クロマチン 脱ユビキチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類細胞において、損傷乗り越え合成反応 (TLS) は DNA 損傷部位で停止した染色体複製反応の迅速な再開・継続に重要であり、その過程で、TLS 反応を担う DNA ポリメラーゼや染色体複製および TLS 反応の切り替えに重要な PCNA などの TLS 関連因子が、複製反応の停止を引き金として翻訳後修飾を受けることが分かっている。一方、クロマチン上で進行する複製反応は様々なクロマチン構造変換因子の影響を受けることが知られている。しかし、DNA 損傷部位での染色体複製反応の停止に起因する TLS 因子の翻訳後修飾とクロマチンの構造変換を関連付けた研究はこれまでに報告されていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、DNA 損傷部位で停止した染色体複製反応の再開に重要な損傷乗り越え合成 (translesion synthesis: TLS) が、いかにして統括・制御されているかを明らかにすることを目的とした。具体的には、染色体複製反応の停止で誘起される TLS ポリメラーゼをはじめとした TLS 関連因子の翻訳後修飾とその各因子の機能への影響、さらに染色体複製の停止と再開が起きる場であるクロマチンの構造変換が果たす役割について、これまでの研究代表者自らの研究結果に基づいて生細胞イメージングと試験管内再構成を軸とした解析を行うことで明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

「細胞生物学的解析」と「試験管内反応系による解析」を並行して行い、相互に反映させながら検証するシステムを用いた。主な内容は、以下の通りである。

ヒト TLS 因子の翻訳後修飾に関わる因子の探索と解析

タンパク質間相互作用を用いた系で、TLS 因子のユビキチン化および脱ユビキチン化に関わる可能性のある因子を同定し、組換えタンパク質を用いて TLS 因子の翻訳後修飾について解析する。また、各因子を siRNA でノックダウンした細胞について、TLS 因子の安定性や DNA 障害剤に対する細胞の感受性を試験する。

TLS 反応に関与するクロマチン構造変換因子の探索と解析

クロマチン構造変換へ関与すること、あるいは関与が示唆される因子 140 種類を対象とした siRNA ライブラリーを用い、細胞の DNA 障害剤に対する感受性を指標に TLS 反応に関わる因子を同定する。得られた因子を siRNA でノックダウンした細胞で、TLS 因子の解析を行う。

多光子励起生細胞イメージングによる染色体複製反応と TLS 反応の解析

多光子励起生細胞顕微鏡を用いて高精細かつ高時間分解でライブセルイメージを取得することにより TLS 反応の進行と TLS 因子の翻訳後修飾およびクロマチン構造変換の連携を観察し、画像データを解析することで、損傷発生から損傷部位での複製反応の停止、TLS 反応の開始と終了、染色体複製反応の再開までの時間軸に沿って解析を行う。

TLS 反応を特異的に阻害する化合物の探索

TLS ポリメラーゼを対象とした阻害活性化合物のスクリーニングと他の DNA ポリメラーゼも用いた特異性試験

4. 研究成果

ヒトの主要な損傷乗り越え DNA 合成酵素 POLH と相互作用する因子として同定した脱ユビキチン化酵素 UPS11 について、GST 融合タンパク質として発現した POLH 欠失変異体と His タグ付き USP11 を部分精製し、GSH-Sepharose を用いたプルダウン実験で POLH の C 末端側非触媒領域の約 80 アミノ酸で USP11 と結合することを見出した。さらに、USP11 に特異的な siRNA で USP11 をノックダウンした細胞において、POLH の安定性が低下することを新たに見出した。これは、分解速度の速い POLH のタンパク質量を TLS に対応可能なレベルに保つ機構の存在を示唆する結果である。興味深いことに、同じ条件で紫外線を照射すると POLH の分解が抑制されることも新たに見出し、USP11 以外の因子が紫外線に反応した POLH の TLS に寄与する可能性を示した。これらの結果から、USP11 が、ユビキチン依存的な POLH の分解に拮抗する役割を持つことを示し、DNA 損傷部位で停止した染色体複製の迅速な再開を担う TLS が作用する上で極めて重要な因子であることが示唆された。これとは別に、POLH のユビキチン化を担う因子を同定する目的で、組換えタンパク質を用いた FRET を基盤とするタンパク質間相互作用実験を利用して、POLH と RING 型 E3 ユビキチンリガーゼ 288 種類との結合を調べ、これまでに POLH との相互作用の報告がない候補タンパク質を複数同定した。現在、POLH の試験管内ユビキチン化実験を行う準備を

進めており、USP11 による脱ユビキチン化との関係に注目していく。

、生細胞イメージングを行うため、POLH を EGFP 融合タンパク質として安定発現するヒト骨肉腫由来培養細胞 U2OS を樹立し、複製のアクセサリタンパク質である PCNA に特異的なラウダ科動物由来の重鎖抗体を RFP 融合タンパク質として同時に発現させることで、核内の「複製の場」に局在するレプリソームを可視化して S 期進行のモニタリングを可能にした。この細胞を G1/S 期同調してからリリースし、任意のタイミングで核内の任意の領域に紫外線刺激を与え、その直後から継時観察を行った。その結果、刺激領域内の複数の「複製の場」において、EGFP-POLH の蛍光シグナルの明確な上昇が見られた。一方、紫外線刺激を与える S 期のステージによって、EGFP-POLH の蛍光シグナルの数や輝度変化に差が見られた。染色体複製阻害に対する応答機構の解析には、S 期ステージの判定に加えて紫外線刺激領域に含まれる複数の「複製の場」から EGFP-POLH に関する情報を得ることが重要である。そこで、数値解析ソフト MATLAB を利用して解析プログラムの作成に取り組み、得られた画像データから刺激領域に含まれる複数の「複製の場」における EGFP-POLH の蛍光シグナルに関する情報を同時に抽出することに成功した。また、DNA 損傷を誘発した細胞における POLH の核内局在に関与することが示唆されたクロマチン構造関連因子を 4 種類同定した。生細胞イメージングを利用した解析により、紫外線刺激を与えた核での POLH の動態に、クロマチン構造関連因子の一つである SMARCB1 が関わる可能性を新たに見出した。現在、他の 3 因子についても同様の解析を行なっている。

理化学研究所(理研)NPDepo が所有する約 30,000 種類の天然化合物からなるライブラリーから POLH との結合を指標に 44 種類の化合物を同定し、Strand Displacement Assay(SDA)と Primer Extension Assay(PEA)によって阻害効果を評価した結果、4 化合物で POLH に対する阻害効果が認められた。一方、その 4 種類の化合物と構造が類似している 28 化合物を対象に、PEA によって POLH に対する阻害活性を調べたところ、14 化合物において阻害効果が認められた。18 化合物について POLH に特異的な阻害であるかどうかを検討する第 1 ステップとして、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・アルファに対する阻害活性の有無を PEA により判定した。その結果、POLH に対する特異性が期待できる 5 種類の化合物を特定した。これらとは別に、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に対して SDA を実施し、60 化合物に POLH に対する阻害効果を認めた。この候補物質に対して PEA を行い、9 化合物まで絞り込みを行った(第 1 グループ)。この 9 化合物の構造類似物質として新たに 39 化合物を対象に PEA を行い、新たに 9 化合物について POLH に対する阻害効果を認めた(第 2 グループ)。上記第 1 グループの 9 化合物については濃度依存性実験を行い、現在、5 化合物が候補化合物として残った。現在、POLH 以外の TLS ポリメラーゼを含むヒト DNA ポリメラーゼ 12 種類に対して特異性の検証を行っている。

以上は、当該分野の発展に貢献する新規性の高い研究成果であり、DNA 損傷部位で停止した染色体複製反応の迅速な再開・継続における TLS 機構の役割を解明するうえで重要な知見であると考えている。また、TLS ポリメラーゼを阻害する化合物の解析から、シスプラチンなどと併用して治療効果を上げる抗がん剤の開発につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akagi Jun-ichi, Yokoi Masayuki, Cho Young-Man, Toyoda Takeshi, Ohmori Haruo, Hanaoka Fumio, Ogawa Kumiko	4. 巻 61
2. 論文標題 Hypersensitivity of mouse embryonic fibroblast cells defective for DNA polymerases , and to various genotoxic compounds: Its potential for application in chemical genotoxic screening	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 76 ~ 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2017.11.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akagi Jun-ichi, Hashimoto Keiji, Suzuki Kenji, Yokoi Masayuki, de Wind Niels, Iwai Shigenori, Ohmori Haruo, Moriya Masaaki, Hanaoka Fumio	4. 巻 87
2. 論文標題 Effect of sequence context on Pol -dependent error-prone extension past (6-4) photoproducts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 102771 ~ 102771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2019.102771	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Akagi, J., Cho, Y-M., Toyoda, T., Yokoi, M., Hanaoka, F., Ohmori, H., Ogawa, K.
2. 発表標題 Effect of Pol deficiency on benzo[a]pyrene-induced tumorigenesis
3. 学会等名 The 5th DNA polymerase meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yokoi, M., Shikaya, Y., Sugawara, K., Hanaoka, F.
2. 発表標題 Translesion synthesis-associated chromatin remodeling factors contribute the function of human DNA polymerase in cisplatin-treated cells
3. 学会等名 The 11th 3R+3C Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akagi, J., Cho, Y-M., Toyoda, T., Yokoi, M., Hanaoka, F., Ohmori, H., Ogawa, K.
2. 発表標題 Benzo[a]pyrene-induced tumorigenesis in Pol ⁻ knockout mice
3. 学会等名 The 11th 3R+3C Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秦済萌、西村潤、菅野新一郎、安井明、菅澤薫、花岡文雄、横井雅幸
2. 発表標題 Analysis of interaction between DNA polymerase β and deubiquitinating enzyme
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akagi, J., Yokoi, M., Cho, Y-M., Yamamoto, J., Mizuta, Y., Iwai, S., Hanaoka, F., Ogawa, K.
2. 発表標題 N7-glycidamide-dG adduct inhibits DNA replication in mammalian cells
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akagi, J., Cho, Y-M., Toyoda, T., Mizuta, Y., Yokoi, M., Hanaoka, F., Ohmori, H., Ogawa, K.
2. 発表標題 Contribution of Pol ⁺ to tumorigenesis in the forestomach of benzo[a]pyrene-fed mice
3. 学会等名 ComBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akagi, J., Cho, Y-M., Toyoda, T., Mizuta, Y., Yokoi, M., Hanaoka, F., Ohmori, H., Ogawa, K.
2. 発表標題 Analysis of contribution of Pol to benzo[a]pyrene-induced tumorigenesis
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤木純一、Young-Man Cho、豊田武士、横井雅幸、花岡文雄、小川久美子
2. 発表標題 ベンゾ[a]ピレンおよび -ナフトフラボン併用投与による腫瘍形成におけるPol 欠損の影響
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤木純一、横井雅幸、Young-Man Cho、岩井成憲、花岡文雄、菅澤薫、小川久美子
2. 発表標題 N7-グリシドアミドdG付加体により誘発されるDNA複製阻害と変異原性の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 案済萌、西村潤、菅野新一郎、安井明、酒井恒、菅澤薫、花岡文雄、横井雅幸
2. 発表標題 DNAポリメラーゼ・イータと脱ユビキチン化酵素の相互作用の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福永匠、尾崎未羽、佐藤正康、酒井恒、菅澤薫、花岡文雄、横井雅幸
2. 発表標題 TLSポリメラーゼの損傷部位への導入過程を生細胞イメージングにより解析する試み
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤木純一、横井雅幸、Young-Man Cho、岩井成憲、花岡文雄、菅澤薫、小川久美子
2. 発表標題 アクリルアミドの活性代謝物であるグリシルアミドのデオキシグアノシンN7位付加体はDNA複製阻害と点突然変異を誘発する
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	花岡 文雄 (Hanaoka Fumio) (50012670)	学習院大学・理学部・研究員 (32606)	