

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07290

研究課題名(和文) 倍数体化と非対称分裂による環境ストレス耐性機能の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for adapting to chronic UV exposure

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：紫外線によるDNA損傷は、ゲノム不安定性を誘発する原因となっており、ヒトにおいては発がんや老化と密接に関連している。本研究では、致死的でない慢性的な紫外線ストレス(CLUV)環境において、紫外線損傷の修復に関与するNER経路の欠損株のストレス耐性機能について詳細に解析した。その結果、1倍体よりも2倍体の方が高いCLUV耐性能を持ち、この違いは直接的な紫外線損傷によるものではなく一本鎖DNAの蓄積が影響していることがわかった。さらに、この倍数体化による耐性獲得にはDNA相同組換えが必須の役割を果たしており、CLUV耐性を獲得する一方でLOH頻度を顕著に増加させることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝情報物質であるDNAでは、様々なDNA損傷が常に起こっている。そのため、DNA修復機能の欠損はゲノム不安定性の増大を引き起こし、ヒトの発がんリスクを顕著に増加させることが知られている。本実験では、紫外線によるDNA損傷の修復に関与するヌクレオチド除去修復を欠損した酵母細胞を用いて紫外線ストレス耐性機能および染色体構造に及ぼす影響を解析した。その結果、相同染色体間で起こる組換えがストレス耐性機能の向上とゲノム不安定性の増加というトレードオフの関係を生みだしていることが明らかになった。この結果は、DNA相同組換えが発がんの過程で重要な役割を果たしていることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：UV-induced DNA lesions are a potential source of genome instability, which can increase the risk of cancer and induce premature aging in humans. Here, we examined growth and genome stability in NER-defective haploids (rad14 mutants) during chronic low-dose UV (CLUV) exposure, focusing on adaptive changes in fitness. We found that haploid rad14 mutants became diploid following CLUV, and evolved diploids were more resistant to CLUV than haploids. Strikingly, accumulation of single-stranded DNA gaps, but not UV-induced photoproducts, contributed to diploid cell fitness. Consistently, inter-homologue recombination involved in generating loss of heterozygosity (LOH) was increased in CLUV-exposed rad14 deletion diploids. These results demonstrate that HR plays an essential role in maintaining the proliferating potential in CLUV-exposed rad14 mutants, but results in a frequent outcome of LOH, both of which are a hallmark of cancer.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA損傷 出芽酵母 DNA相同組換え

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生物は、外的・内的要因による DNA 損傷ストレスに対して耐性を獲得することで様々な環境に適応してきた。しかしながら、長期に渡る DNA 損傷ストレスへの暴露は、生物の様々な機能に影響を及ぼし、ヒトにおいては発がんや老化と密接に関連している。紫外線は DNA 損傷を引き起こす主要な環境要因の一つであり、紫外線によって生じるピリミジン二量体は DNA 複製や転写を阻害するため、突然変異や細胞死を引き起こす原因となっている。そのため生物は、ピリミジン二量体を修復できるヌクレオチド除去修復(NER)機構のほか、DNA 複製阻害を解消する DNA 損傷トランス(DDT)機構を持っている。研究代表者は、自然環境で問題となる慢性的かつ低レベルの紫外線ストレスが生物に及ぼす影響を理解することが重要であるという点に着目し、自然環境で問題となる慢性的低線量率の紫外線照射(chronic low-dose UV; CLUV)下で酵母細胞を培養可能な装置を作製した。本実験系を用いた研究から、紫外線損傷の修復ができない NER 経路の欠損株が CLUV 環境では増殖阻害を引き起こさない一方で、複製ストレスの解消に關与する DDT 経路が細胞増殖にとって必須の役割を果たしていることを明らかにした(Hishida, T., et al. *Nature*, 2009)。また、NER の欠損株では、CLUV 環境下(〜24 時間)の細胞増殖に伴って突然変異頻度が顕著に増大した(Haruta, N., et al. *Nucleic Acids Res.*, 2012)。さらに、CLUV 環境下でこれまでより長時間(〜6日間)に渡って継代培養を行ったところ、1 倍体 NER 欠損株(*rad14Δ*)において、3 日目以降に 2 倍体化した細胞の割合が顕著に増大することを見いだした。その際、CLUV により DNA 損傷チェックポイントの活性化を引き起こす RPA (1 本鎖 DNA 結合タンパク質)の核内フォーカスが形成されるにもかかわらず、細胞増殖が可能であることがわかった。これらの結果は、本実験系が致死的でない DNA 損傷ストレスに対する細胞の耐性機構とゲノム安定性について解析する優れた実験系であることを示している。

### 2. 研究の目的

染色体の倍数体化は生物種または組織の種類毎にその生理的な意義は異なっているものの、これらに共通する概念として、倍数体化は多様性を生む原動力となっており、様々な細胞内外のストレスに対する適応応答の一つと考えることができる。そして、このような生物種を超えた普遍的な現象である点を踏まえると、倍数体化によるストレス適応メカニズムには根本的な部分において進化的に共通した仕組みがあると考えられる。研究代表者によるこれまでの研究から、長時間の紫外線ストレスへの暴露によって染色体の倍数性(Ploidy:細胞が持つゲノムセットの数)が変化することや、損傷を持った染色体が一方に偏って分裂する現象を見いだした。本研究では、CLUV ストレス環境下で細胞増殖を可能とする耐性機能について、倍数性の増加が CLUV ストレスに対する耐性獲得(適応)とゲノム安定性に及ぼす影響について詳細に解析し、その役割と生理的な意義を明らかにすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

倍数性の変化が CLUV ストレスに対する耐性獲得に果たす役割の解明に関しては、以下の4つの研究手法により解析を行なった。

(1) CLUV 環境における UV 損傷量の蓄積と倍数性との関連: UV 損傷の修復ができない NER 欠損細胞を用いて、CLUV 依存的にゲノム DNA 上に蓄積する UV 損傷量を定量的に解析するため、ピリミジン二量体に対する抗体を用いたドットプロット法を行なった。さらに、この解析を 1 倍体、2 倍体 NER 欠損細胞を用いて行い、紫外線損傷量の経時的な変化について測定した。

(2) CLUV 環境における RPA フォーカスの動態解析: CLUV 環境において増殖可能な NER 欠損細胞や HR 欠損細胞において、RPA フォーカスの形成と CLUV 耐性との関連性及び RPA フォーカスの核内動態について解析した。

(3) 2 倍体における相同染色体間の組換えが CLUV ストレス耐性に果たす役割の解明: 本研究では、2 倍体耐性株における CLUV 耐性機能に関して、DNA 相同組換え(HR)の欠損株を用いて詳細に解析した後、染色体喪失や染色体再編、ヘテロ接合性の喪失(LOH)等の染色体不安定性に及ぼす DNA 相同組換え機能の役割に注目して解析を行なった。

(4) HR による CLUV ストレス耐性に影響を及ぼすヌクレオソーム機能の解明: DNA 損傷トランス欠損株(*rad18Δ*)は CLUV に対して極めて高い感受性を示すが、この高感受性は *srs2Δ*などの HR サルベージ経路の活性化によって抑圧されることが知られている。そこで、ヒストン H3 及び H4 変異体ライブラリーを用いて、*srs2Δ*と同様に HR サルベージ経路を活性化させる変異体のスクリーニングを行い、CLUV 耐性に影響を及ぼすヒストン変異体の単離とその解析を行う。

### 4. 研究成果

(1) 1 倍体と 2 倍体 *rad14Δ*細胞の CLUV 耐性能の違いがゲノム DNA 上の UV 損傷量に依存しているのかをドットプロット法を用いて調べた。CLUV 非照射及び、CLUV を照射した細胞を継代培養によって対数増殖期の状態を維持した状態で 24 時間ごとに回収し、各サンプルからゲノム DNA

を精製した。精製した DNA をメンブレンに吸着させ、抗 CPDs 抗体で UV 損傷量を検出した。その結果、CLUV 照射 24 時間後における同じ DNA 量あたりの UV 損傷量は、1 倍体と 2 倍体 *rad14Δ* 細胞間で差がないことが示された (図 1)。このことは、1 倍体より 2 倍体の方が細胞あたりの UV 損傷量が多く蓄積していることを示しており、2 倍体の方が高い CLUV 耐性を持つ理由として UV 損傷量は関係ないことがわかった。さらに、2 日目及び 3 日目の結果から、*rad14Δ* 細胞の UV 損傷の蓄積量は一定の割合以上に増加せず、生存率も低下しないことが明らかになった。一方、細胞の増加が起こらない定常期の細胞においては時間と共に UV 損傷量が増加し、細胞生存率も低下した。この結果は、CLUV による細胞あたりの UV 損傷の蓄積が、新たな DNA 合成と細胞分裂によって抑えられ、と考えられた。この結果は、低レベルの DNA 損傷に対しては、しる細胞の耐性能力の向上に繋がることを示唆している。

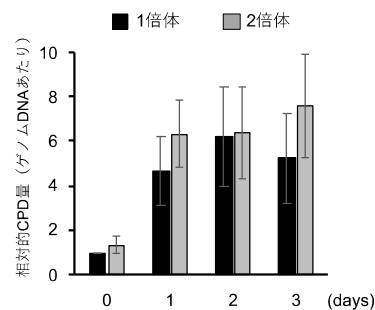


図1 ドットプロットアッセイ

動的な平衡状態が生じているため、細胞が活発に増殖している方がむ

(2) UV による DNA 損傷は、DNA の複製阻害を引き起こし、1 本鎖 DNA ギャップを形成することが知られている。そこで、ドットプロット解析と同様の条件において、1 本鎖 DNA に結合する Rfa1 タンパク質に YFP を融合した Rfa1-YFP の核内フォーカス形成を、蛍光顕微鏡を用いて観察し、フォーカスを形成した細胞の割合を比較した。その結果、1 倍体、2 倍体のいずれの細胞も RPA フォーカスを持つ細胞が CLUV によって増加する一方で、1 倍体 *rad14Δ* 細胞 (55%) に比べて 2 倍体 *rad14Δ* 細胞 (25%) では、Rfa1 フォーカスを形成する細胞の割合が約半分に抑えられていることが分かった (図 2)。このことから、2 倍体 *rad14Δ* 細胞では、1 本鎖 DNA の蓄積を解消するような機構が働いており、これが 2 倍体 *rad14Δ* 細胞が持つ高い CLUV 耐性原因であることが示唆された。また、興味深いことに、1 倍体 *rad14Δ* 細胞では、約半数の細胞が RPA フォーカスを持っているにも関わらず細胞増殖能に影響が見られなかった。さらに、この細胞をファクターによって G1 期に同調させた場合、RPA フォーカス形成割合が約 25% 程度になることや、これらの G1 期同調細胞は RPA の有無に関わらず、次の細胞増殖が可能であることがわかった。

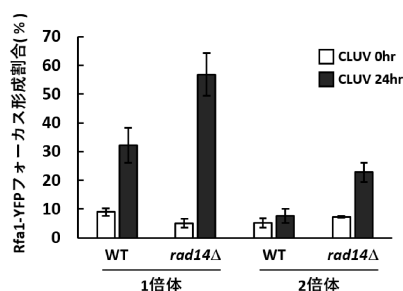


図2 .RPAフォーカス形成

そこで、これらの実験を *rad14Δ rad51Δ* 株を用いて行なった結果、1 倍体及び 2 倍体の両方で顕著な RPA フォーカスの形成割合の増加と細胞増殖の阻害が観察された。また、Rfa1 フォーカスを持つ細胞において、細胞あたりのフォーカス数に基づいて場合分けを行ったところ、*rad14Δ* 細胞では大部分がフォーカスを 1 個持つ細胞であるのに対し、*rad14Δ rad51Δ* 細胞では、複数のフォーカスを持つ細胞が顕著に増加することが示された。このことから、Rfa1 のマルチフォーカス形成は増殖阻害の原因となる修復が行えない傷の蓄積を反映していると考えられる。以上の結果より、*rad14Δ* 細胞の 1 倍体と 2 倍体の CLUV 耐性能の違いは HR 経路による一本鎖 DNA の修復活性に起因することが示唆された。

(3) これまでの結果から、1 倍体・2 倍体 *rad14Δ* 細胞の CLUV 耐性能の違いには HR 経路が重要であることが示された。そこで、相同染色体間の組換え頻度を調べるため、5 番染色体上にセントロメアを挟んで *URA3/HOM3*, *CAN1/HIS3* のヘテロアリルを持つ 2 倍体株を用いて、*CAN1* 遺伝子の変異 (カナバニン耐性) 頻度を測定した。この実験株では、カナバニン耐性を *CAN1* 遺伝子の突然変異、*CAN1/HIS3* 遺伝子間の相同組換え、染色体喪失、その他の染色体再編、のいずれかの方法で獲得することができ、これら変異パターンをマーカー遺伝子有無や PCR によって調べることが可能である。この株を用いて CLUV 環境においてカナバニン

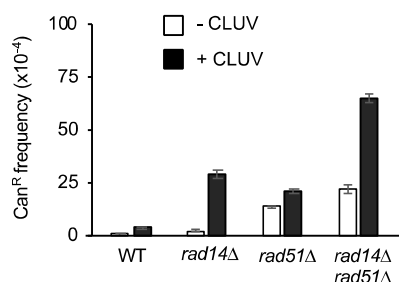


図3. 組換え頻度の測定

耐性頻度を測定した結果、2 倍体 *rad14Δ* 細胞は、CLUV 照射に依存してカナバニン耐性頻度が約 10 倍上昇することが分かった (図 3)。さらに、*can1* 変異アリルの構成について、PCR を用いて詳細に解析した結果、その大部分が *CAN1/HIS3* ヘテロアリルから *HIS3/HIS3* ホモアリルへの遺伝子変換型であることが分かった。このことから、2 倍体 *rad14Δ* 細胞では CLUV 照射に依存して相同組換え頻度が顕著に上昇することが示された。次に、これらの実験を *rad14Δ rad51Δ* 株を用いて行なった結果、*can1* 変異頻度の顕著な増加が見られ (図 3)、これらの変異タイプを解析した結果、*rad14Δ* 株では見られなかった染色体喪失を起こした細胞や増殖阻害を伴う組換え体の顕著な増加が見られた。これらの結果から、CLUV 環境において、修復されなかった UV 損傷の修復に相同染色体を用いた HR 活性が重要な働きをしていることが示された。このように HR は、染色体喪失や再編といった大規模な染色体異常を抑える重要な役割を果たしている一方で、この

働きは LOH の誘発を引き起こしていることが明らかになった。この結果は、HR による損傷ストレス耐性の獲得が LOH のようなゲノム不安定性の誘発に関与していることを示しており、がん細胞のようなストレス耐性とゲノム不安定性の誘発が顕著に見られる細胞における HR 活性の重要性を示す興味深い結果である。

(4) 酵母の接合実験により、ヒストン H3 及び H4 の 1 アミノ酸置換ライブラリーを持つ CLUV 高感受性株 (*rad18Δ*) を作製し、CLUV 感受性テストを行なった。その結果、*rad18Δ* 株の CLUV 感受性を部分的に抑圧する 6 つのヒストン変異アレルを同定し、さらに、この抑圧効果は HR 活性の亢進によって引き起こされていることが示された。そして、この抑圧効果について、さらに Srs2 などの組換え抑制因子の他、クロマチンリモデリング因子等の影響を調べた結果、この抑圧効果 (HR の亢進) は、組換え抑制因子の欠損とは異なるメカニズムで起こっていることや、INO80 クロマチンリモデラーに依存して起こることが示された。これらの結果より、クロマチン構造自体も HR による CLUV 耐性メカニズムに重要な役割を果たしていることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hayashi Masafumi、Keyamura Kenji、Hishida Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Cyclin-dependent kinase modulates budding yeast Rad5 stability during cell cycle	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0204680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0204680	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kenji Keyamura, Takashi Hishida	4. 巻 2
2. 論文標題 Topological DNA binding of SMC-like RecN promotes RecA-mediated DNA double-strand break repair	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 413
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0655-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kenji Keyamura, Takashi Hishida	4. 巻 2119
2. 論文標題 Monitoring of DNA Replication and DNA Double Strand Breaks in Saccharomyces cerevisiae by Pulsed-Field Gel Electrophoresis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 123-133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0323-9_11	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 毛谷村賢司・仁木杏樹・菱田卓
2. 発表標題 DNA二本鎖切断修復における核様体動態制御機構の解析
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会・ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仁木杏樹・毛谷村賢司・菱田卓
2. 発表標題 大腸菌RecNはDSB修復における核様体の動態制御に関与する
3. 学会等名 第25回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林匡史・吉田麻美・毛谷村賢司・菱田卓
2. 発表標題 DNA損傷ストレス応答の制御に関与するヌクレオソーム領域の同定と解析
3. 学会等名 第25回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芝田眞菜・毛谷村賢司・菱田卓
2. 発表標題 慢性的低線量率紫外線環境下におけるNER欠損株の損傷ストレス耐性メカニズムの解析
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相澤美貴・毛谷村賢司・菱田卓
2. 発表標題 DNA損傷ストレスの耐性獲得に関与する代謝機能調節の解析
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 毛谷村賢司・菱田卓
2. 発表標題 ゲノムDNAの切断修復に関するRecNの機能解析
3. 学会等名 第15回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菱田卓
2. 発表標題 DNA損傷ストレスの蓄積に対する耐性獲得メカニズム
3. 学会等名 第90回日本遺伝学会_ワークショップ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林匡史・吉田麻美・毛谷村賢司・菱田卓
2. 発表標題 DNA損傷ストレス応答におけるクロマチン構造の影響とその解析
3. 学会等名 第90回日本遺伝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中紫苑・毛谷村賢司・菱田卓
2. 発表標題 DNA二本鎖切断修復に関するアセチル基転移酵素の機能解析
3. 学会等名 第90回日本遺伝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芝田眞菜・毛谷村賢司・菱田卓
2. 発表標題 慢性的低線量率紫外線環境下におけるNER欠損株の損傷ストレス耐性メカニズムの解析
3. 学会等名 第90回日本遺伝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桶谷浩之・毛谷村賢司・菱田卓
2. 発表標題 DNA二本鎖切断修復に關与する大腸菌RecNの変異体解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mafumi Hayashi, Kenji Keyamura, Takashi Hishida
2. 発表標題 Phosphorylation of Rad5 regulates Rad5 stability during cell cycle in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 3R & 3C Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 毛谷村賢司・菱田卓
2. 発表標題 大腸菌のDNA二本鎖切断修復に關与するRecNの機能解析
3. 学会等名 第89回日本遺伝学会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 田中紫苑・毛谷村賢司・菱田卓
2. 発表標題 DNA二本鎖切断修復に關与するアセチル基転移酵素の機能解析
3. 学会等名 第89回日本遺伝学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 毛谷村賢司・菱田卓
2. 発表標題 ゲノムDNAの切断修復に關与する大腸菌由来RecNの機能解析
3. 学会等名 第24回DNA複製・組換え修復ワークショップ
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林匡史・吉田麻美・毛谷村賢司・菱田卓
2. 発表標題 DNA損傷ストレス応答を制御するヌクレオソーム機能の解析
3. 学会等名 第24回DNA複製・組換え修復ワークショップ
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 毛谷村賢司・菱田卓
2. 発表標題 DNA相同組換え修復の制御機構に關する研究
3. 学会等名 分子生物薬学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菱田 卓
2. 発表標題 倍数体化による紫外線ストレス耐性獲得の分子メカニズム
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017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