

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11638

研究課題名(和文) PCNAホモ3量体のマルチ翻訳後修飾で制御されるDNA損傷トレランス機構の研究

研究課題名(英文) Analysis of DNA damage tolerance mediated by multi-modification of PCNA homo-trimer

研究代表者

金尾 梨絵 (Kanao, Rie)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：30542287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：DNAに損傷が生じるとDNA複製が阻害される。DNA損傷トレランスはDNA複製阻害を回避するメカニズムで複数の経路があると考えられている。DNA損傷トレランスの制御にはPCNAの翻訳後修飾が重要である。本研究では、ホモ3量体であるPCNAの複数のモノマーが翻訳後修飾を受ける、マルチ翻訳後修飾で制御されるDNA損傷トレランス機構について解析を行った。PCNAのマルチ翻訳後修飾が生存に要求されるDNA損傷剤を用いて、PCNAの翻訳後修飾と同経路で機能する因子を探索、同定し解析した。本研究によりPCNAの翻訳後修飾で制御されるDNA損傷トレランスに関わる新たな因子を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA損傷トレランスはDNAに損傷が生じても複製を継続させる、生物にとって重要なメカニズムである。一方で、DNA損傷によりDNA複製を阻害するタイプの抗がん剤に対しては耐性になるメカニズムである。ヒト細胞のDNA損傷トレランスはPCNAの翻訳後修飾で制御されるが、不明な点も多い。本研究では1つのPCNAホモ3量体上のマルチ翻訳後修飾で制御されるDNA損傷トレランスに着目し、解析を行った。その結果、新たなDNA損傷トレランス因子を見出し、これはDNA損傷トレランス研究の発展に貢献するものである。また、DNA損傷タイプの抗がん剤耐性の新たな知見につながるものである。

研究成果の概要(英文)：DNA damage blocks the progression of DNA replication. DNA damage tolerance is an important mechanism to prevent replication blockage. Homo-trimeric PCNA forms a ring-shaped structure, and PCNA modifications regulate DNA damage tolerance pathways. In this study, I analyzed the DNA damage tolerance pathway regulated by PCNA multi-modifications in human cells. I used the DNA damaging agent to which PCNA multi-modifications are required for cellular survival. I screened factors that function in the same pathway with PCNA modifications and found a new factor for DNA damage tolerance regulated by PCNA modifications.

研究分野：DNA修復

キーワード：DNA損傷トレランス PCNA 翻訳後修飾 ユビキチン化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA 上の損傷は DNA 複製を阻害するが、細胞には DNA 損傷があっても複製を継続する、DNA 損傷トレランス機構が備わっている。DNA 損傷トレランスには、損傷乗り越え複製(Translesion synthesis; TLS)と、テンプレートスイッチがあると考えられており、真核細胞の DNA 損傷トレランスの制御機構には、PCNA の 164 番目のリジン(K164)の翻訳後修飾が重要である。しかし、ヒト細胞では TLS 以外の DNA 損傷トレランスのメカニズムの詳細はわかっておらず、PCNA の K164 の翻訳後修飾の生理的意義も不明な点が多い。

我々は PCNA がホモ 3 量体であることに着目し、PCNA3 量体の全ての K164 にモノユビキチン化が起こるマルチモノユビキチン化によって、TLS に加えて別の DNA 損傷トレランス経路が働くことを明らかにした。

マルチモノユビキチン化 PCNA を減少させたヒト細胞株を用いた解析から、様々な DNA 損傷剤の中で、アルキル化剤であるイルジン S ではマルチモノユビキチン化の要求性が高いことを見出した。イルジン S で生じる損傷は転写と共役した修復(Transcription-coupled repair; TCR)で修復されることが示唆されている。しかし、我々の解析では PCNA の翻訳後修飾の TCR への関与の可能性は低く、PCNA の翻訳後修飾はイルジン S に対する DNA 損傷トレランスで機能していると考えられた。そのため、イルジン S に対する DNA 損傷トレランス機構を解析することで PCNA のマルチ翻訳後修飾が要求される DNA 損傷トレランスを明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

本研究ではマルチモノユビキチン化を含む PCNA のマルチ翻訳後修飾により制御される DNA 損傷トレランス機構を明らかにすることを目的とする。

これまで DNA 損傷トレランスの研究で主に用いられてきた紫外線損傷は、PCNA のマルチ翻訳後修飾で制御される機構への依存度は低かったが、この機構への依存度が高い DNA 損傷剤であるイルジン S を利用し、これまで明らかになっていない DNA 損傷トレランス経路を解析することとした。

3. 研究の方法

本研究では DNA 損傷剤であるイルジン S を用いて解析を行った。イルジン S は DNA 複製と転写を阻害することが知られている。イルジン S による転写の阻害は、TCR によって損傷が修復されることで解消されることが示唆されているが、複製の阻害を回避する機構はわかっていない。そのため、イルジン S 損傷に対する DNA 損傷トレランス機構を明らかにするため、以下の解析を進めた。

PCNA の翻訳後修飾の種類解析

イルジン S 損傷応答に関与する因子のスクリーニング

得られた因子のイルジン S 損傷に対する細胞内機能の解析

4. 研究成果

PCNA の翻訳後修飾の種類

イルジン S 処理後の細胞ではモノユビキチン化が主に検出された。また、マルチモノユビキチン化も検出されたが、その他の翻訳後修飾はこれまでのところ検出されていない。

イルジン S 損傷応答に関与する因子のスクリーニング

siRNA ライブラリーを用いて、イルジン S の誘導体であるイロフルベンに対する細胞の感受性を指標に、スクリーニングを行った。候補因子の個別ノックダウンによる確認を行い、イルジン S 損傷応答に関与する、2 つの因子を同定した。

得られた因子のイルジン S 損傷に対する細胞内機能

イルジン S 損傷応答に関与する因子は TCR に関与する可能性もある。このため、のスクリーニングで得られた因子を、変異体 PCNA 発現細胞株と TCR 欠損細胞株でノックダウンし、イルジン S 感受性を調べた。その結果、本研究で見出した 2 つの因子は PCNA の翻訳後修飾と同経路で働くことが示唆された。また、これらの因子をノックダウンすると、イルジン S 処理後の細胞で DNA 複製に異常が見られた。これらの結果から、得られた 2 因子は DNA 損傷トレランスに関わると考えられた。この 2 因子のうち、1 つは TLS ポリメラーゼであったが、もう 1

つの因子はこれまで DNA 損傷トレランスに関与するとは知られておらず、本研究により新規 DNA 損傷トレランス因子を明らかにすることができた、

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masuda Yuji, Kanao Rie, Kawai Hidehiko, Kukimoto Iwao, Masutani Chikahide	4. 巻 294
2. 論文標題 Preferential digestion of PCNA-ubiquitin and p53-ubiquitin linkages by USP7 to remove polyubiquitin chains from substrates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 4177-4187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.005167	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 Masuda Yuji, Mitsuyuki Satoshi, Kanao Rie, Hishiki Asami, Hashimoto Hiroshi, Masutani Chikahide	4. 巻 46
2. 論文標題 Regulation of HLTf-mediated PCNA polyubiquitination by RFC and PCNA monoubiquitination levels determines choice of damage tolerance pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 11340-11356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gky943	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 金尾梨絵、益谷央豪
2. 発表標題 ヒト細胞におけるPCNAの翻訳後修飾で制御される新規DNA損傷トランスの解析
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 Kanao R, Song H, Masuda Y, Masutani C.
2. 発表標題 Analysis of the regulation mechanism of human DNA polymerase eta via its PCNA interacting protein (PIP) boxes
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金尾梨絵、 増田雄司、 益谷央豪
2. 発表標題 ヒト細胞におけるセスキテルペン化合物イルジンS及びイロフルベンに対するDNA損傷トレランスの解析
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 金尾梨絵、 益谷央豪
2. 発表標題 ヒト細胞においてセスキテルペン化合物で誘発される複製阻害を回避するメカニズムの解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rie Kanao, Chikahide Masutani
2. 発表標題 Analysis of multi-mono-ubiquitinated PCNA-mediated DNA damage tolerance pathways in human cells.
3. 学会等名 3R & 3C Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金尾梨絵、 増田雄司、 益谷央豪
2. 発表標題 ヒト細胞のDNA 損傷トレランスにおけるマルチモノユビキチン化PCNA の役割
3. 学会等名 日本遺伝学会第90回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪
2. 発表標題 ヒト細胞においてマルチモノユビキチン化PCNAで制御されるDNA損傷トランス経路の解析
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 金尾梨絵, 益谷央豪
2. 発表標題 抗がん作用を持つセスキテルペンに対するDNA損傷トランスの解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金尾梨絵, 増田雄司, 益谷央豪
2. 発表標題 ヒト細胞におけるDNAポリメラーゼ・イータの制御機構の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------