

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2007～2009
課題番号：19310036
研究課題名（和文） タンパク質の翻訳後修飾による損傷乗り越え DNA 複製の制御
研究課題名（英文） Regulation of translesion DNA synthesis by post-translational modifications

研究代表者

益谷 央豪 (MASUTANI CHIKAHIDE)
大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授
研究者番号：40241252

研究成果の概要（和文）：ヒト DNA ポリメラーゼ・イータ(Pol η)は、高発癌性遺伝疾患である色素性乾皮症バリエーション群の責任遺伝子産物であり、紫外線損傷などの正確な損傷乗り越え複製(TLS)を担うことにより、細胞死や癌化を抑制している。本研究期間においては、Pol η が正しい TLS だけではなく損傷の種類や状況に応じて、変異を誘発し得ることを明らかにした。また、新たなタンパク質間相互作用及びタンパク質の翻訳後修飾を見出し、TLS 制御における生理的意義を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Human DNA polymerase eta (Pol η) is the responsible gene product of xeroderma pigmentosum variant, a cancer-prone genetic disorder, and protects cells from cell death or carcinogenesis by catalyzing accurate translesion DNA synthesis (TLS). During this project, we showed that Pol η has mutagenic properties depending on DNA damages and situations. We have also identified novel protein-protein interactions and post-translational modifications of Pol η and related proteins which could be important for regulating TLS in human cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響学

キーワード：損傷乗り越え DNA 複製、DNA 修復、翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者らは、1999年に色素性乾皮症バリエーション群の責任遺伝子産物であるヒト DNA ポリメラーゼ・イータ(Pol η)を同定した。この発見が端緒となり、損傷乗り越え DNA

複製(TLS)機構研究は急速に発展してきた。本研究の開始時点においては、TLSに関与する DNA ポリメラーゼはほぼすべて見出され、それらを制御する機構の解明が重要な課題となりつつあった。特に、DNA 複製のスラ

イディンクランプである PCNA のユビキチン化修飾が、TLS の制御に重要な役割を担うことが、酵母を用いた研究で明らかになり始めていた。また、Pol η を始めとする複数の TLS タンパク質の翻訳後修飾やタンパク質間の相互作用が見出されつつあった。しかし、それらのタンパク質の翻訳後修飾や相互作用を制御する仕組み及びその生理的意義についてはほとんど明らかにされていなかった。従って、TLS 機構の発見に引き続き、その制御機構の解明について先駆的な研究を展開したいと考えた。

2. 研究の目的

- (1) PCNA のモノユビキチン化に関して、ユビキチン化部位の変異体 PCNA[K164R]の細胞内での機能を解析することにより、PCNA のモノユビキチン化の生理的意義を明らかにする。併せて、無細胞 PCNA モノユビキチン化系を用いて、分子機構を明らかにする。
- (2) Pol η のユビキチン化に関して、その生理的意義及び分子機構を明らかにする。
- (3) Pol η のリン酸化に関して、その生理的意義及び分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) PCNA のユビキチン化に関して、siRNA により内在性の PCNA を抑制し、siRNA に耐性の外来 PCNA を発現させたヒト細胞株を作出する。被修飾部位の変異体 PCNA[K164R]を発現させた細胞株における各種 DNA 損傷に対する感受性及び TLS を調べる。また、無細胞の PCNA のモノユビキチン化修飾系を構築し、分子機構を調べる。
- (2) Pol η のユビキチン化に関して、タグを付加した Pol η 及びユビキチンを発現させたヒト細胞から、タグを用いてタンパク質を回収して検出し、その動態やタンパク質間相互作用を調べる。また、無細胞の修飾系を構築して分子機構を調べる。
- (3) Pol η のリン酸化に関して、リン酸化状態と細胞内動態の関連を調べる。また、被リン酸化部位を同定し、その変異体を作成して細胞内動態やタンパク質間相互作用の解析を行う。

4. 研究成果

ヒト Pol η が酸化ヌクレオチドを重合して誤りを引き起こしたり、免疫グロブリン遺伝子領域の超突然変異の生成に寄与していることを明らかにした。また、ヒト細胞内で、Pol η が TLS 因子である REV1 やミスマッチ修復因子 MLH1 などと複合体を形成していることを見出した。さらに、ヒト細胞中の内在性の PCNA を siRNA により抑制し、siRNA に耐性かつ 164 番目の K を R に置換した外来性 PCNA を発現させたヒト細胞株を樹立し

て解析を行った結果、この細胞株は顕著な紫外線感受性を示すことを明らかにした。また、この細胞株では、紫外線照射後の S 期の進行が遅延すること、Pol η の紫外線損傷部位への集積が認められないことを明らかにし、PCNA の 164 番目の K の翻訳後修飾が、ヒト細胞内での Pol η の機能発現制御に重要であることを明らかにした。さらに、Pol η の C 末領域に存在する PCNA との相互作用に必要な PIP 領域及びユビキチンとの相互作用に必要な UBZ 領域の変異体を作成し、それらを発現させた XP-V 群細胞株を樹立した結果、UBZ 変異体は細胞の紫外線感受性を回復できないが、PIP 変異体は紫外線感受性を回復した。また、PIP 変異体は UBZ 変異体と同様に、紫外線損傷部位へ集積しなかった。これらの結果から、Pol η とユビキチン化された PCNA との相互作用には複数の様式があり、未解明の複雑な制御機構が存在することが強く示唆された。さらに、ヒト細胞中の Pol η のリン酸化候補部位の変異体を作成して解析を行った結果、587 番目の S を A に置換した Pol η は、XP-V 群細胞の紫外線感受性を回復できないが、D に置換した変異体は、細胞の紫外線感受性を部分的に回復したことから、この S のリン酸化が Pol η の機能発現制御に関わる可能性が極めて高いことを初めて明らかにした。

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 13 件)

- ① Sekimoto, T., Oda, T., Pozo, F. M., Murakumo, Y., Masutani, C., Hanaoka, F., Yamashita, T. The molecular chaperone Hsp90 regulates accumulation of DNA polymerase η at replication stalling sites in UV-irradiated cells. *Mol. Cell*, 査読有, 37, 79-89, 2010.
- ② Chijiwa, S., Masutani, C., Hanaoka, F., Iwai, S., Kuraoka, I. Polymerization by DNA polymerase η is blocked by cis-diamminedichloroplatinum(II) 1,3-d(GpTpG) crosslink: Implications for cytotoxic effects in nucleotide excision repair-negative tumor cells. *Carcinogenesis*, 査読有, 31, 388-393, 2010.
- ③ Katafuchi, A., Sassa, A., Niimi, N., Gruz, P., Fujimoto, H., Masutani, C., Hanaoka, F., Ohta, T., Nohmi, T. Critical amino acids involved in erroneous incorporation of oxidized nucleotides by human DNA polymerase

- η and κ. *Nucleic Acids Res.*, 査読有, 38, 859-867, 2010.
- ④ Kanao, R., Hanaoka, F., Masutani, C. A novel interaction between human DNA polymerase η and MutLα. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 389, 40-45, 2009.
- ⑤ Fukuda, H., Takamura-Enya, T., Masuda, Y., Nohmi, T., Seki, C., Kamiya, K., Sugimura, T., Masutani, C., Hanaoka, F., Nakagama, H. Translesional DNA synthesis through a C8-guanyl adduct of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) *in vitro*: REV1 inserts dC opposite the lesion and DNA polymerase κ potentially catalyzes extension reaction from the 3'-dC terminus. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 284, 25585-25592, 2009.
- ⑥ Akagi, J., Masutani, C., Kataoka, Y., Kan, T., Ohashi, E., Mori, T., Ohmori, H., Hanaoka, F. Interaction with DNA polymerase η is required for nuclear accumulation of REV1 and suppression of spontaneous mutations in human cells. *DNA Repair*, 査読有, 8, 585-599, 2009.
- ⑦ Kimura, T., Takeuchi, T., Kumamoto-Yonezawa, Y., Ohashi, E., Ohmori, H., Masutani, C., Hanaoka, F., Sugawara, F., Yoshida, H., Mizushina, Y. Penicillins A and B, novel inhibitors specific to mammalian Y-family DNA polymerases. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 査読有, 17, 1811-1816, 2009.
- ⑧ Yasui, M., Suenaga, E., Koyama, N., Masutani, C., Hanaoka, F., Gruz, P., Shibutani, S., Nohmi, T., Hayashi, M., Honma, M. Miscoding property of 2'-deoxyinosine, a nitric oxide-derived DNA adduct, during translesion synthesis catalyzed by human DNA polymerases. *J. Mol. Biol.*, 査読有, 377, 1015-1023, 2008.
- ⑨ Hidaka, K., Yamada, M., Kamiya, H., Masutani, C., Harashima, H., Hanaoka, F., Nohmi, T. Specificity of mutations induced by incorporation of oxidized dNTPs into DNA by human DNA polymerase η. *DNA Repair*, 査読有, 7, 497-506, 2008.
- ⑩ Shiomi, Y., Masutani, C., Hanaoka, F., Kimura, H., Tsurimoto, T. A second PCNA loader complex, Ctf18-RFC, specifically stimulates DNA polymerase η activity. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 282, 20906-20914, 2007.
- ⑪ Satou, K., Kasai, H., Masutani, C., Hanaoka, F., Harashima, H., Kamiya, H. 2-Hydroxy-2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate enhances A.T → C.G mutations caused by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate by suppressing its degradation upon replication in a HeLa extract. *Biochemistry*, 査読有, 46, 6639-6646, 2007.
- ⑫ Masuda, K., Ouchida, R., Hikida, M., Kurosaki, T., Yokoi, M., Masutani, C., Seki, M., Wood, R.D., Hanaoka, F., O-Wang, J. DNA polymerase η and θ function in the same genetic pathway to generate mutations at A/T during somatic hypermutation of Ig genes. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 282, 17387-17394, 2007.
- ⑬ Shimizu, M., Gruz, P., Kamiya, H., Masutani, C., Xu, Y., Sugiyama, H., Harashima, H., Hanaoka, F., Nohmi, T. Efficient and erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by human DNA polymerase η. *Biochemistry*, 査読有, 46, 5515-5522, 2007

[学会発表] (計 11 件)

- ① □ 益谷 央豪 「Analysis of regulatory mechanisms of human pol eta, the XPV gene product」第 32 回日本分子生物学会年会 ワークショップ「Molecular pathology of genetic instability disorders」2009 年 12 月 9 日 横浜
- ② □ 金尾 梨絵、出口 沙織、湯本 真弓、花岡 文雄、益谷 央豪 「Physiological relevance of post-translational modifications of PCNA at lysine-164 in human cells」第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 9 日 横浜
- ③ □ Franklin Mayca Pozo、小野 司、関本 隆志、益谷 央豪、花岡 文雄、村雲 芳樹、山下 孝之 「The molecular chaperone Hsp90 promotes DNA damage-induced nuclear focus formation of Y-family DNA polymerase REV1」第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 9 日 横浜
- ④ □ 赤木 純一、片岡 裕貴、益谷 央豪、花岡 文雄 「Human REV1 is phosphorylated and accumulated at spindle poles in mitotic cells」第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 9 日 横浜
- ⑤ □ 水品 善之、木村 拓馬、竹内 論文、米澤 裕子、大橋 英治、大森 治夫、益谷 央豪、花岡 文雄、吉田 弘美、菅原 二三男、坂口 健

吾「Penicillins A and B, novel inhibitors specific to mammalian Y-family DNA polymerases」第32回日本分子生物学会年会 2009年12月9日 横浜

- ⑥□益谷央豪「蛋白質間相互作用と翻訳後修飾による損傷乗り越え DNA 複製の制御」BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) シンポジウム「ゲノムの安定性と多様化を制御する分子機構」2008年12月12日 神戸
- ⑦□小野香苗、花岡文雄、益谷央豪「DNAポリメラーゼηのリン酸化による機能制御の解析」BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) 2008年12月9-12日 神戸
- ⑧□徐菲、花岡文雄、益谷央豪「PCNAのモノユビキチン化を制御するメカニズムの探索」BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) 2008年12月9-12日 神戸
- ⑨□益谷央豪、花岡文雄「損傷乗り越え DNA複製におけるタンパク質間相互作用」第67回日本癌学会学術総会 シンポジウム「DNA修復ネットワークの異常と発がん」2008年10月29日 (名古屋国際会議場)
- ⑩□Masutani, C., Akagi, J., Kataoka, Y., Ohashi, E., Iwai, S., Ohmori, H., Hanaoka, F. "Physiological relevance of the Pol eta-REV1 interaction in human cells." International Symposium on Chromosome Dynamics in Ise, May 28-30, 2008, Toba, Japan.
- ⑪□Masutani, C., Akagi, J., Kataoka, Y., Ohashi, E., Iwai, S., Ohmori, H., Hanaoka, F. "Physiological relevance of the Pol eta-Rev1 interaction in human cells." The International Ataxia-telangiectasia Workshop 2008 (ATW2008), April 22-26, 2008, Ohtsu, Japan.

[図書] (計2件)

- ① Masutani, C., Hanaoka, F., Ahmad, S.I. Xeroderma Pigmentosum Variant, XP-V: its product and biological roles. Adv. Exp. Med. Biol., 査読有, 637, 93-102, 2008.
- ② Ohkumo, T., Masutani, C., Eki, T., Hanaoka, F. Use of RNAi in C. elegans. Methods Mol. Biol., 査読有, 442, 129-137, 2008.

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jp/labo/091/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

益谷 央豪 (MASUTANI CHIKAHIDE)

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号：40241252

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし