

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07647

研究課題名(和文) 損傷乗り越え合成における新規経路の研究

研究課題名(英文) The novel pathway to function upon UV-induced DNA damage

研究代表者

吉村 明 (Yoshimura, Akari)

東北医科薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：70302164

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損傷による複製フォークの進行が阻害されると、DNA複製ポリメラーゼがDNA複製を続行できないという危機的状況に陥る。そこで損傷をバイパスすることでDNA複製を進行させる損傷トランス機構が存在する。損傷トランス機構には、DNA損傷乗り越えポリメラーゼがDNA複製ポリメラーゼに変わってDNA合成を行う損傷乗り越え合成というメカニズムが存在する。本研究では、損傷乗り越え合成時のDNA損傷乗り越えポリメラーゼとDNA複製ポリメラーゼの置き換わりに関与する因子として、Werner helicase interacting protein1 (WRNIP1)を候補として研究を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞には、DNA損傷を含む鋳型でもDNAを合成できる損傷乗り越えポリメラーゼによってDNA複製停止を回避させる機構が存在するが、誤りがちなDNA合成を行うというその性質から、発がんや損傷乗り越えポリメラーゼの密接なリンクが示唆されている。そこで、DNA複製ポリメラーゼと損傷乗り越えポリメラーゼの両方と相互作用するWRNIP1に着目して、損傷乗り越え合成における両ポリメラーゼの関わりについて研究を進め、損傷乗り越え合成の研究に新たな視点を提供する。損傷乗り越え合成の機序の理解につながる知見が得られることが期待され、DNA損傷による発がん機構の解明、がん治療への端緒となることが期待出来る。

研究成果の概要(英文)：When the progress of the replication fork is blocked by DNA damage, the replicative DNA polymerase is in a critical situation where DNA replication cannot continue. Therefore, a damage tolerance mechanism exists to allow DNA replication to proceed across the damaged DNA. In the damage tolerance mechanism, there is a mechanism called translesion synthesis, in which DNA translesion polymerase replaces the replicative DNA polymerase and performs DNA synthesis. In this study, we investigated Werner helicase interacting protein1 (WRNIP1) as a candidate factor that is involved in the replacement of translation polymerase and the replicative DNA polymerase during damage tolerance synthesis.

研究分野：DNA修復

キーワード：DNA修復 損傷乗り越え合成 Werner症候群 WRNIP1

1. 研究開始当初の背景

細胞内のゲノム DNA は、さまざまな障害を受けるが、DNA 修復機構によって安定に維持されている。DNA 修復機構に異常が発生すると遺伝子に変異が蓄積し、発がんや老化の原因となる。早老症の一つである Werner 症候群原因遺伝子産物 WRN は DNA 修復や DNA 複製に関与しており、ゲノム安定性の維持に必要と考えられている。この WRN と相互作用する因子として Werner helicase interacting protein1(WRNIP1)が見出された。WRNIP1 は AAA+ ATPase ファミリーに属するタンパク質で、大腸菌からヒトに至るまで高度に保存されている。代表者は WRNIP1 の機能の解明に取り組んできており、その過程で WRNIP1 が DNA 複製にカップリングした DNA 損傷の回避機構である損傷乗り越え合成 (translesion synthesis: TLS) に関わる可能性を示唆してきた。TLS で中心的な役割を果たす RAD18 と WRNIP1 が結合し、RAD18 の結合している DNA にリクルートされ、RAD18 と置き換わって DNA に結合することを見出した (*Genes Genet. Syst.*, **84**, 2009)。さらに、WRNIP1 が DNA 複製ポリメラーゼ Pol δ と結合し、その活性を促進すること、WRNIP1 が TLS ポリメラーゼ Pol η と結合することから、WRNIP1 と Pol η の遺伝学的解析を進めたところ、WRNIP1/Pol η 二重破壊株の UV 感受性が Pol η 破壊株の UV 感受性に比べて軽減しており、WRNIP1 が Pol η の上流で働くことを明らかにした。このことから、TLS において RAD18 にリクルートされた WRNIP1 が、Pol δ から Pol η 、Pol η から Pol δ というポリメラーゼスイッチに関与するという仮説をたてた。さらに、WRNIP1/Pol η 二重破壊株では UV 照射時の損傷を誤りなく修復していることが明らかとなり、WRNIP1 も Pol η も両方ない時に機能する新規の TLS 経路が存在する可能性を示唆した (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **452**, 2014)。この新規経路において、Pol δ だけが機能するのは不可能ではないかと考え、新規の TLS ポリメラーゼ PrimPol と Pol δ が協調している仮説をたてた。

2. 研究の目的

WRNIP1 が TLS において Pol η を制御することが示唆されたため、UV 照射時の TLS においては WRNIP1 が他の TLS ポリメラーゼではなく Pol η が機能するように制御しているのではないかと考えた。新規経路では誤りなく UV 照射時の損傷を修復していたことから、WRNIP1 も Pol η もない時には誤りがちな既知の TLS ポリメラーゼが Pol η の代替として機能するのではなく、新規の誤りのない TLS 経路が存在することを示唆している。そのため、その新規経路に関わると予想した PrimPol と Pol δ と WRNIP1 との関係について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、遺伝学的解析を主として行なった。用いるニワトリ DT40 細胞は、ニワトリ B リンパ球由来の細胞であり、標的組換えが高頻度で起こることから遺伝子破壊が容易であることが報告されている。細胞周期が 8 時間と短いことから、迅速な遺伝学的解析が可能であり、現在までに DNA 修復関連遺伝子をはじめ、多くの遺伝子破壊細胞が作製されている。しかし、WRNIP1 はニワトリではトリソミーである 2 番染色体に存在することから、トランスフェクションを 3 回行う必要があった。CRISPR-Cas9 システムを用いることで、遺伝子破壊をさらに効率よく行うことが可能となったため、このシステムを用いた遺伝子破壊細胞の作製、解析を行うこととした。また、ヒト細胞を用いて分子生物学的手法を用いた。

4. 研究成果

(1) WRNIP1 が PrimPol の発現量を制御している

代表者は WRNIP1 と TLS ポリメラーゼ Pol δ の両方が存在しないときには既知の修復機構ではない新規の経路が働くことが示唆され、TLS ポリメラーゼの PrimPol と複製ポリメラーゼの Pol δ が関わるのではないかと仮説をたてた。そこで、WRNIP1 と PrimPol との関わりについて研究を進めた。WRNIP1 と PrimPol を 293 細胞内で共発現させて免疫沈降を行なったところ、非常に弱いながらも相互作用することが確認されていた。また、その相互作用は UV などの DNA 損傷時に若干強くなることが観察されていた。このように細胞内で WRNIP1 を過剰発現させると PrimPol の発現が低下することが見出されていたため、この WRNIP1 の発現量増加による PrimPol の発現量の減少が PrimPol のタンパク質分解によるものなのか、mRNA の転写量の低下によるものなのか、mRNA の分解によるものなのか、解析を行なった。プロテオソーム阻害剤を用いた実験とリアルタイム PCR を用いた実験により、mRNA の分解や mRNA の合成低下によるものではなく、プロテオソームを介するタンパク質の分解が関与する可能性が示唆された。さらに、WRNIP1 の siRNA を用いて発現抑制すると内在性の PrimPol の発現量が増加していたことから、WRNIP1 が PrimPol の発現量を制御している可能性が示唆された。これらのデータは、WRNIP1 の非存在下で PrimPol が機能する新規経路の存在を支持すると考えられた。

(2) WRNIP1/PrimPol 二重破壊株の解析

WRNIP1 と Pol η 存在下で PrimPol と Pold が UV による損傷に対応するという仮説を証明するため、ニワトリ DT40 を用いて WRNIP1/PrimPol 二重破壊株の作製を行なった。UV 感受性を調べたところ、PrimPol 破壊株は UV 感受性を示すが、二重破壊株は同程度の感受性を示した。WRNIP1 と PrimPol が全く別の経路で UV による DNA 損傷に応答するわけではないことが示唆された。

(3) WRNIP1 の各ドメインの役割

WRNIP1 が PrimPol の発現量を制御していたが、WRNIP1 のどのドメインが PrimPol の発現量に影響を及ぼすのか調べた。WRNIP1 の野生型、UBZ ドメイン欠失型、ATPase ドメイン欠失型、ロイシンジッパードメイン欠失型 WRNIP1 を作製し、各 WRNIP1 と PrimPol を 293 細胞で過剰発現させたところ、ATPase ドメイン欠失型 WRNIP1 で PrimPol の発現が確認された(図1)。WRNIP1 の ATPase ドメインが PrimPol の発現量に影響を及ぼすと考えられた。

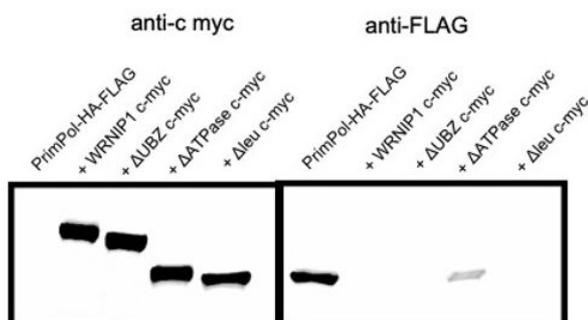


図1 *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 45, 2022 から引用

そこで、WRNIP1 の各ドメインが TLS においてどのように影響するのか調べた。ニワトリ DT40 WRNIP1/Pol η 二重破壊株に各ドメイン欠失型 cWRNIP1 を発現させ、UV 感受性を調べたところ、WRNIP1 のロイシンジッパードメイン欠失型でのみ二重破壊株と同程度の UV 感受性を示した。このことから、Pol η 破壊株の UV 感受性に影響を及ぼすのは、WRNIP1 のロイシンジッパードメインであることが示唆された(図2)。

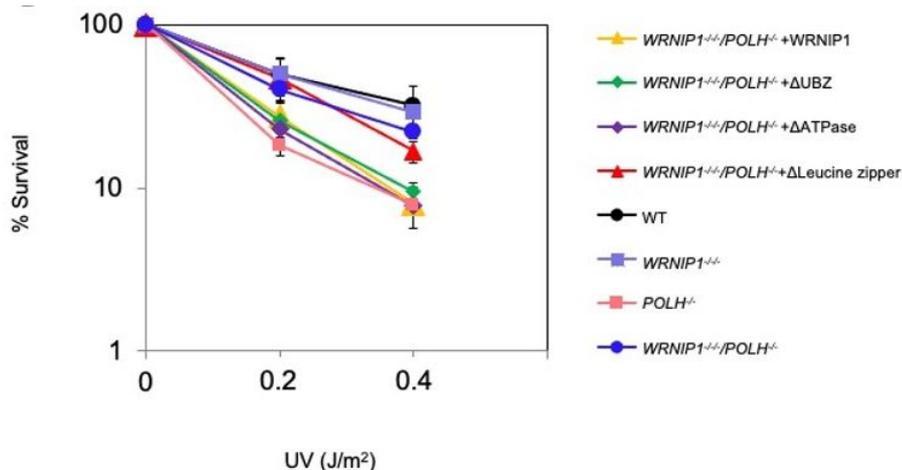


図2 *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 45, 2022 から引用

TLS に関わる RAD18 と WRNIP1 が結合することを明らかにしている。さらに Pol δ のサブユニット POLD1, POLD2, POLD4 と WRNIP1 との相互作用が報告されている。そこで、各 WRNIP1 欠失型を 293 細胞に発現させ、免疫沈降を行い、RAD18 と POLD1 との相互作用を調べたところ、ロイシンジッパードメイン欠失型の WRNIP1 とのみ RAD18, POLD1 との相互作用が確認されなかった(図3 A, B)。

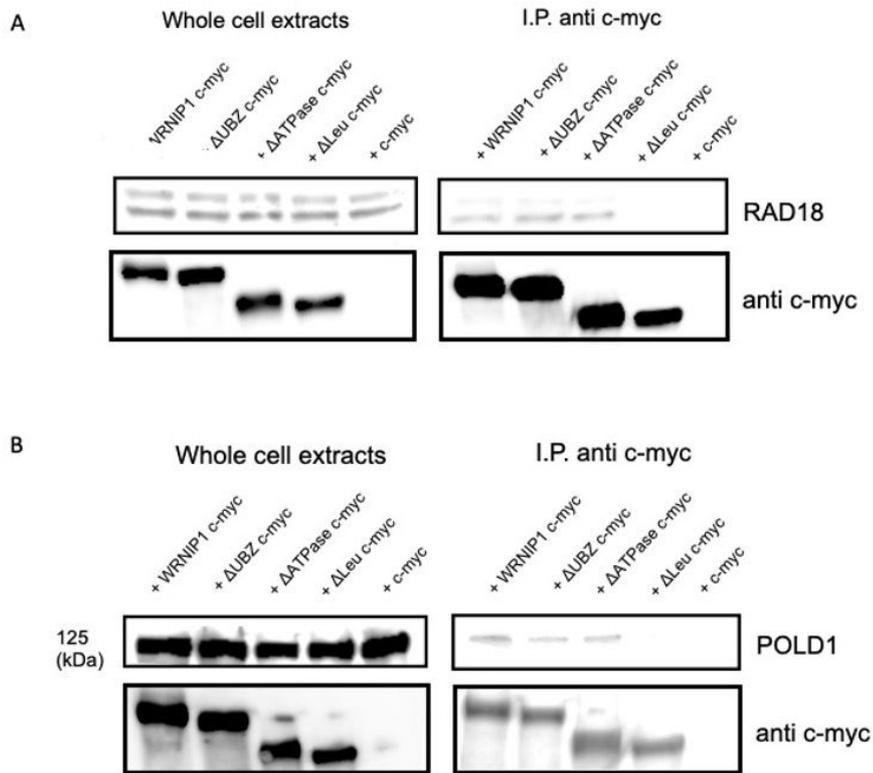


図3 *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 45, 2022 から引用

これらのデータから、WRNIP1 の非存在下での PrimPol の発現量の増加は、WRNIP1 と Pol η が存在しない際に働く新規の TLS 経路での主要なイベントではないのではないかと考えられる。これまで、PrimPol を新規 TLS 経路で機能するファクターとして想定していたが、新規の TLS 経路の解明においては Pol δ の役割をより重視して考え、今後の研究を進めるべきだと考えた。

(4) WRNIP1 と Pol δ との関係

WRNIP1 と Pol δ の関連を調べるにあたり、ニワトリ DT40 を用いて遺伝学的解析を行うこととしたが、二重破壊株の作製は難航していた。条件付き破壊細胞の作製を行うことで、Pol δ のサブユニット p66(Pol δ 3)と WRNIP1 との二重破壊細胞の作製に成功した。さらに、p12(Pol δ 4)と WRNIP1 との二重破壊細胞の作製にも成功した。今後、さらなる遺伝学的解析を進め、WRNIP1 が TLS において、どのようにポリメラーゼスイッチに関与するのか、解析を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yoshimura Akari, Sakakihara Tatsuya, Enomoto Takemi, Seki Masayuki	4. 巻 45
2. 論文標題 Functional Domain Mapping of Werner Interacting Protein 1 (WRNIP1)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 200~206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b21-00718	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 Moriwaki Takahito, Yoshimura Akari, Tamari Yuki, Sasanuma Hiroyuki, Takeda Shunichi, Seki Masayuki, Tano Keizo	4. 巻 43
2. 論文標題 PRDX1 is essential for the viability and maintenance of reactive oxygen species in chicken DT40	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41021-021-00211-4	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 Akari Yoshimura, Mizuho Oikawa, Hitomi Jinbo, Yuri Hasegawa, Takemi Enomoto, Masayuki Seki	4. 巻 42
2. 論文標題 WRNIP1 controls the amount of PrimPol	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 764-769
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b18-00955	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉村 明、阿部 拓也、関 政幸
2. 発表標題 Werner helicase interacting protein1 (WRNIP1)と損傷乗り越え合成
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉村 明、関 政幸
2. 発表標題 DNA二本鎖切断修復関連因子とWerner helicase interacting protein 1 (WRNIP1)との機能的関連についての解析
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2023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
---------	---------