

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（B）一般

研究期間：2008～2010

課題番号：20370068

研究課題名（和文）DNA損傷による複製フォーク進行阻害とその回復過程の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of recovery of stalled DNA replication fork

研究代表者

真木 寿治 (MAKI HISAJI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：20199649

研究成果の概要(和文): oriCプラスミドを用いた試験管内DNA複製系での生化学的解析により、複製フォーク進行阻害の回復について大きな進展が見られた。損傷乗り越え型DNAポリメラーゼであるDNA Pol IV (DinB) はLeading鎖およびLagging鎖上のDNA損傷部位でバイパスDNA合成を極めて効率良く行い、Leading鎖上の損傷で停止していた複製フォークが再開することが観察された。また、精製した酵素を用いた生化学的解析により、Pol III HEのDNA鎖伸長がPol IVによって強く阻害されることを発見し、阻害の仕組みとして、Pol IVがPol Vを積極的に鋳型DNAから解離させること明らかにした。その後の解析により、DNA上でβクランプと安定に結合しているPol IIIがDinBの働きによりDNAから解離することが見いだされた。この発見は、世界ではじめてDNA損傷による複製フォークの阻害が損傷乗り越え型DNAポリメラーゼの働きにより解消されて再開することを示したことになる。

研究成果の概要(英文): Using *oriC* plasmid DNA replication *in vitro*, we analyzed molecular mechanisms recovering the stalled replication fork. We found that a translesion DNA polymerase, Pol IV, readily catalyzed a bypass DNA synthesis at a DNA lesion placed on leading or lagging strand DNA and that the replication fork progression was resumed by this bypass DNA synthesis. We demonstrated that Pol IV rapidly (<15 sec) obstructs the stable interaction between Pol III* and the beta clamp (the lifetime of the complex >5 min), causing the removal of Pol III* from template DNA. Our study suggests a model in which the interaction between Pol III* and the beta clamp is mediated by Pol IV to ensure that DNA replication proceeds with minimal interruption.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 5,800,000 | 1,740,000 | 7,540,000 |
| 2009年度 | 5,300,000 | 1,590,000 | 6,890,000 |
| 2010年度 | 4,600,000 | 1,380,000 | 5,980,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 15,700,000 | 4,710,000 | 20,410,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：遺伝学、突然変異、DNA複製

1. 研究開始当初の背景

細胞増殖において、細胞周期制御の重要性は広く知られており、酵母や高等動植物など

の真核生物の細胞を用いて活発に研究が進められている。特に、発がんの過程やがんの悪性度の進行に細胞周期制御機構の欠損や

破綻が深く関わっており、その原因の解明の過程で、多数のがん抑制遺伝子が細胞周期制御、特にチェックポイント制御に関与していることが明らかにされている。チェックポイント制御は、細胞周期の進行において、周期の各ステージが正常に完了したかどうか、あるいは次のステージに進行できる状態であるかどうかをモニターして、もしそれらが不完全である場合には細胞周期の進行を一時的に停止して、不具合を解消するための細胞機能を働かせる仕組みである。したがって、チェックポイント制御が働かなくなると、不具合が解消されないままに細胞周期が進行することになるので、染色体の喪失や染色体異常が高頻度で発生してしまう。チェックポイントが働くステージの違いにより、G1期チェックポイント、S期チェックポイント、G2/Mチェックポイント、M期チェックポイントが知られている。それぞれ、異常を感知するセンサー、シグナル伝達経路ならびに最終的な効果作用機構の各段階で働く遺伝子が同定されている。しかし、それらの生化学的な機能については不明な点が多い。一方、細菌などの原核生物では細胞周期が明瞭でないために、チェックポイント制御そのものが存在しないと考えられてきたが、最近になって米国マサチューセッツ工科大学のGraham Walkerらが大腸菌のSOS応答の働きとしてS期チェックポイント制御の存在を示唆する結果を報告している。

申請者らは、複製フォークが鋳型DNA上の損傷に出会った時にどのような挙動をするのかを調べるために、*oriC*プラスミドDNA複製系での解析を行い、世界で初めて複製フォークの進行阻害の実態を解明することに成功した(Higuchi, K., Katayama, T. Iwai, S, Hidaka, M. Horiuchi, T. and Maki, H. (2003))。その後、この実験系で停止した複製フォークの再開の機構を調べる過程で、Pol IVによる複製フォークの再開の検出に成功するとともに、Pol IVによる複製装置のDNA鎖伸長反応の阻害を発見した。この発見から、本研究計画を着想した。

2. 研究の目的

本研究計画では、DNA損傷による複製フォークの進行阻害とその回復過程を分子レベル・酵素反応レベルで理解することを目的として、以下の研究項目に焦点を絞って研究を進める。1) 単一DNA損傷を導入した*oriC*プラスミドDNAを用いて、試験管内で複製装置・複製フォークを再構成し、複製フォークが鋳型DNA上の各種の損傷によりどのように進行阻害を受けるのかを明らかにする。2) 精製したUmuCD、DinB、PolBタンパク質を用いて、複製フォーク進行阻害の回復に損傷乗り越えDNA合成がどのような役割を

果たしているかを明らかにする。3) 複製フォークの進行阻害が引き起こす複製フォーク退行(replication fork regression)と二本鎖切断、さらに複製フォークの再形成過程について、試験管内で再現された複製フォーク阻害に対するRecAタンパク質などの組換えタンパク質の作用を検討し、進行阻害を受けた複製フォークの回復過程を解明する。

より具体的には、Pol IVによる染色体複製の迅速な停止と複製装置のDNA合成に対する特異的な阻害の分子機構を解明し、細菌におけるS期チェックポイント制御を実証する。また、S期チェックポイントの基本原理を明らかにする。

3. 研究の方法

*oriC*プラスミドDNAを鋳型にした試験管内複製系を基にして、複製フォークの進行を詳細に解析する実験系の構築に成功した。このin vitro DNA複製系では、*oriC*プラスミド上にクローン化された大腸菌のDNA複製開始領域配列*oriC*より両方向に複製フォークが進行する。さらに、大腸菌複製終結領域配列*terC*をプラスミド上に導入して複製終結タンパク質Tusを結合させることにより、極性を持つ*terC*の複製終結作用に依存して片方の複製フォークの進行をブロックすることができる。このことにより、染色体複製での複製フォークの進行を特定の一方のフォークに限定して詳細に解析する実験系を構築することが可能になった。

これまでに、反応に必要な20種類程度のタンパク質を大量にかつ高純度に調製し、*oriC*からの特定の一方の複製フォークでのDNA合成の検出・解析に成功している。複製産物の解析は、アルカリアガロースゲルおよびD1シーケンスゲル電気泳動、二次元ゲル電気泳動にサザンブロッティングを組み合わせて行っている。leading鎖新生鎖や岡崎フラグメントの長さの分布や経時的な変化の分析から、単一の複製装置複合体によりleading鎖とlagging鎖が協調して合成されていることも確認している。

この実験系で再現される複製フォークブロックの再開を精製したタンパク質を用いて検討した。

4. 研究成果

2008年度：*oriC*プラスミドDNAを鋳型にした試験管内複製系を用いて、DNA損傷により複製が阻害された場合に損傷乗り越え型DNAポリメラーゼが複製の再開や複製フォークの再形成を行うかどうかを、シクロブタン型チミンダイマーを含むオリゴDNAを鋳型に導入して検討を行った。その結果、過去に我々が行った脱塩基損傷を含む鋳型を用いた場合と同様に、損傷がleading鎖上であれ

lagging鎖上であれ、DNA鎖伸長は損傷部位でほぼ完全に停止すること、しかし、複製フォークの進行は、lagging鎖に損傷がある場合には全く影響を受けず、leading鎖に損傷がある場合にもlagging鎖の合成がしばらく継続して複製フォークはしばらくは両鎖の合成が脱共役した状態で約1 kb程度は進行することが明らかになった。次に、leading鎖上の損傷により複製フォークの進行が停止した場合に、複製装置が阻害部位に留まるのか、あるいは速やかに解離するののかについて調べることが試みた。化学架橋剤とPolIIIホロ酵素あるいはDnaBヘリカーゼに対する抗体を用いて、クロマチン免疫沈降法により解析することにしたが、予備的な実験で、抗体の性質のために明確な実験結果を得ることが困難であることが判明した。一方、複製フォーク進行阻害の回復についての研究は進展が見られた。RecAタンパク質とDNA Pol VによるDNA複製の再開は検出できなかったが、DNA Pol IV (DinB) ではLeading鎖およびLagging鎖上でバイパスDNA合成が極めて効率良く生じ、Leading鎖上の損傷で停止していた複製フォークが再開することが示唆された。その後の解析により、DNA上でβクランプと安定に結合しているPol IIIがDinBの働きによりDNAから解離することが見いだされた。この発見は、世界ではじめてDNA損傷による複製フォークの阻害が損傷乗り越え型DNAポリメラーゼの働きにより解消されて再開することを示したことになる。

2009年度：DNA Pol IVによる複製フォークの再開の分子機構の解明に焦点を絞って、以下の研究を行った。1) 精製した酵素を用いた生化学的な解析により、Pol III HEのDNA鎖伸長がPol IVによって強く阻害されることを発見し、阻害の仕組みとして、Pol IVがPol Vを積極的に鋳型DNAから解離させること明らかにした。その後の解析により、DNA上でβクランプと安定に結合しているPol IIIがDinBの働きによりDNAから解離することが見いだされた。この発見は、世界ではじめてDNA損傷による複製フォークの阻害が損傷乗り越え型DNAポリメラーゼの働きにより解消されて再開することを示したことになる。2) 細胞内ではPol IVが単独で作用しているのではなく、様々なタンパク質と複合体を形成して働く可能性が考えられる。これを検証するためにプロテオミクス解析を行ったところ、Pol IVと相互作用することがすでに報告されているβクランプに加えて、単鎖DNA結合タンパク質SSBがPol IVと安定な複合体を形成することが見いだされた。

2010年度：プロテオミクス解析から、Pol IVと相互作用することがすでに報告されているβクランプに加えて、単鎖DNA結合タンパク質SSBがPol IVと安定な複合体を形成する

ことが見いだされた。そこで、本年度は、DNA Pol IVとSSBの相互作用に焦点を絞り、研究を行った。その結果、Pol IVは複数の領域でSSBと相互作用するのに対し、SSBは、そのC末端領域でPol IVと相互作用することが分かった。この知見をもとに、酵素学的解析を行ったところ、Pol IVが鋳型DNA上でDNA鎖伸長を行う過程でSSBのC末端領域との相互作用がDNA鎖伸長速度を促進し、鋳型DNAとの複合体を安定化することが示唆された。

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5件)

- ① Ide S., Miyazaki T., Maki H., and Kobayashi T., Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity., *Science*誌, 327巻, 693-696, 2010, 査読有
- ② Ogawara D., Muroya T., Yamauchi K., Iwamoto TA., Yagi Y., Yamashita Y., Waga S., Akiyama M., and Maki H., Near-full-length REV3L appears to be a scarce maternal factor in *Xenopus laevis* eggs that changes qualitatively in early embryonic development., *DNA Repair (Amst)*誌, 9巻1号, 90-95, 2010, 査読有
- ③ Uchida K., Furukohri A., Shinozaki Y., Mori T., Ogawara D., Kanaya S., Nohmi T., Maki H. and Akiyama M., Overproduction of *Escherichia coli* DNA polymerase DinB (Pol IV) inhibits replication fork progression and is lethal., *Molecular Microbiology*誌, 70巻3号, 608-622, 2008, 査読有
- ④ Furukohri A., Goodman M.F. and Maki H., A dynamic polymerase exchange with *Escherichia coli* pol IV replacing pol III on the sliding clamp., *J Biol Chem*誌, 283巻17号, 11260-11269, 2008, 査読有
- ⑤ Hasegawa K., Yoshiyama K. and Maki H., Spontaneous Mutagenesis Associated with Nucleotide Excision Repair in *Escherichia coli*., *Genes to Cells*誌, 13巻, 459-469, 2008, 査読有

[学会発表] (計25件)

- ① 内田香里 (他7名、7番目) Overproduction of *Escherichia coli* DNA Polymerase DinB (Pol IV) Inhibits Replication Fork Progression and is Lethal, The 57th NIBB Conference THE DYNAMIC GENOME, 2010.10.15, 岡崎カンファレンスセンター
- ② 沙魚川公子、愿山郁、真木寿治 Spontaneous Mutagenesis Associated with Nucleotide

- Excision Repair in *Escherichia coli.*, The 57th NIBB Conference THE DYNAMIC GENOME, 2010. 10. 16, 岡崎カンファレンスセンター
- ③ 岡本明弥(他 5 名、6 番目) 短鎖アルデヒドを介した活性酸素スーパーオキシドによる突然変異の誘発, 日本遺伝学会第 82 回大会, 2010. 9. 22, 北海道大学高等教育機能開発総合センター
- ④ 真木寿治 酸素ラジカルに起因する自然突然変異の発生と抑制の分子機構, 日本遺伝学会第 82 回大会, 2010. 9. 20, 北海道大学高等教育機能開発総合センター
- ⑤ 真木寿治 酸素ラジカルに起因する自然突然変異の誘発経路の発見とその展開, 変異機構研究会・第 23 回夏の学校, 2010. 7. 11, 小牧東部市民センター・小牧勤労センター
- ⑥ 村尾雅司(他 6 名、7 番目) 大腸菌の三種類のエキソヌクレアーゼ活性による配列置換変異の抑制, 第 7 回 21 世紀大腸菌研究会, 2010. 6. 3, ホテルグリーンピア南阿蘇
- ⑦ 池田美央(他 5 名、6 番目) 大腸菌 *dinB* の過剰発現による染色体の断裂, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 12, パンフィコ横浜
- ⑧ 真木寿治(他 5 名、1 番目) 大腸菌 DNA ポリメラーゼ I の配列置換変異抑制機能, 日本遺伝学会第 81 回大会, 2009. 9. 16, 信州大学理学部
- ⑨ 森哲也(他 6 名、7 番目) DinB DNA ポリメラーゼによるゲノム複製の調節, 日本遺伝学会第 81 回大会, 2009. 9. 18, 信州大学理学部
- ⑩ 池田美央(他 5 名、6 番目) 大腸菌 *dinB* の過剰発現による染色体の分割, 日本遺伝学会第 81 回大会, 2009. 9. 16, 信州大学理学部
- ⑪ 池田美央(他 5 名、6 番目) DNA ポリメラーゼ IV (DinB) の過剰発現によるゲノムの断裂, 第 6 回 21 世紀大腸菌研究会, 2009. 6. 12, KKRホテル熱海
- ⑫ 西川義人(他 4 名、5 番目) 大腸菌 DNA ポリメラーゼ IV (DinB) の活性制御機構の解析, 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. 12. 12, 神戸ポートアイランド神戸国際展示場 1 号館 2 階
- ⑬ 森哲也(他 7 名、3 番目) 大腸菌の SOS 応答を誘導しない複製フォークの停止, 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. 12. 12, 神戸ポートアイランド神戸国際展示場 1 号館 2 階
- ⑭ 山口和勇、梅津桂子、真木寿治 A new role of *RDH54* in genome maintenance., The 6th International 3R (DNA Replication, Recombination and Repair) Symposium, 2008.10.28, ヤマハリゾートつま恋
- ⑮ 内田香里(他 8 名、8 番目) Overproduction of *Escherichia coli* DNA polymerase DinB(Pol IV) inhibits replication fork progression and is lethal., The 6th International 3R (DNA Replication, Recombination and Repair) Symposium, 2008.10.28, ヤマハリゾートつま恋
- ⑯ 古郡麻子、Goodman, M.、真木寿治 A dynamic polymerase exchange with *Escherichia coli* Pol IV replacing Pol III on the sliding clamp., The 6th International 3R (DNA Replication, Recombination and Repair) Symposium, 2008.10.28, ヤマハリゾートつま恋
- ⑰ 沙魚川公子、愿山郁、真木寿治 Spontaneous mutagenesis associated with nucleotide excision repair in *Escherichia coli.*, The 6th International 3R (DNA Replication, Recombination and Repair) Symposium, 2008.10.28, ヤマハリゾートつま恋
- ⑱ 篠崎裕(他 7 名、8 番目) 大腸菌 DinB DNA ポリメラーゼの SOS 応答レベルでの過剰発現による DNA 複製と細胞増殖の遅延, 日本遺伝学会第 80 回大会, 2008.9.3, 名古屋大学工学部 IB 電子情報館
- ⑲ 沙魚川公子、愿山郁、真木寿治 大腸菌ヌクレオチド除去修復による自然突然変異の誘発経路, 日本遺伝学会第 80 回大会, 2008.9.3, 名古屋大学工学部 IB 電子情報館
- ⑳ 池田美央(他 7 名、8 番目) 大腸菌 DinB DNA ポリメラーゼの過剰発現による自殺的細胞分裂, 日本遺伝学会第 80 回大会, 2008.9.3, 名古屋大学工学部 IB 電子情報館
- ㉑ 池田美央(他 7 名、8 番目) 大腸菌 DinB (DNA ポリメラーゼ IV) の過剰発現による複製フォーク停止と自殺的細胞分裂, 第 5 回 21 世紀大腸菌研究会, 2008.7.29, 静岡国民年金健康センター藤枝エミナース
- ㉒ 内田香里(他 6 名、7 番目) Upregulation of *Escherichia coli* DNA Polymerase DinB(Pol IV) Arrests Replication Fork Progression and is Lethal., XX International Congress of Genetics(第 20 回国際遺伝学会), 2008.7.17, The congress center(ドイツ)
- ㉓ 古郡麻子、Goodman, M.、真木寿治 A dynamic polymerase exchange with *Escherichia coli* pol IV replacing pol III on the sliding clamp., XX International Congress of Genetics(第 20 回国際遺伝学会), 2008.7.12-17, The congress center(ドイツ)
- ㉔ 沙魚川公子、愿山郁、真木寿治 Spontaneous Mutagenesis Associated with Nucleotide Excision Repair in *Escherichia coli* Spontaneous Mutagenesis Associated with Nucleotide Excision Repair in *Escherichia*

coli. , XX International Congress of
Genetics(第20回国際遺伝学会),
2008.7.12-17, The congress center(ドイツ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真木 寿治 (MAKI HISAJI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・教授

研究者番号：20370068