

平成22年 3月31日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20810021

研究課題名（和文）DNA 損傷修復過程における複製忠実度の低い DNA ポリメラーゼの機能解析

研究課題名（英文）Functional analyses of DNA polymerases in nucleotide excision repair

研究代表者

氏名 荻 朋男 (Tomoo Ogi)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80508317

研究成果の概要（和文）：

ヌクレオチド除去修復(NER)は、紫外線による DNA 損傷を修復するメカニズムであり、その遺伝的な欠損は皮膚がんを好発する色素性乾皮症の原因となる。NER の際には、損傷 DNA が切り出された後に、修復の為に DNA 合成が行われるが、その詳細は不明である。本研究課題では、NER の際にどのようなメカニズムで DNA 合成が行われるのかを解析した。

研究成果の概要（英文）：

Nucleotide excision repair (NER) removes the UV photolesions from DNA. Compromised NER activity causes xeroderma pigmentosum, a skin cancer predisposition genetic disorder. The early step of NER is well established, whereas the later step, which involves repair synthesis and nick ligation, is not well understood. Here we demonstrate that three DNA polymerases coordinately role in the NER repair synthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：DNA 修復

科研費の分科・細目：放射線・DNA 修復

キーワード：DNA 修復 ヌクレオチド除去修復

## 1. 研究開始当初の背景

高等生物の染色体 DNA 複製は高精度 DNA polymerase(pol δ、pol ε)により行われ、複製エラーの発生頻度は 1000 万～1 億塩基対合成に 1 個以下の正確さに保たれている。この一方で、DNA は各種内的外的要因で損傷を受け、常に

修復の必要に迫られている。高等生物の DNA 修復機構は多重経路であるが、これらに生じた先天あるいは後天的な機能の欠損は、遺伝情報の不安定化をもたらす、発達障害、老化、発癌等を含む各種疾患の原因となる。DNA 修復は細胞機能の維持と遺伝情報の安定的伝達

を目的としており、このことから元の遺伝情報に極力忠実であるという暗黙の了解がある。一方で、大腸菌などでは古くから損傷誘発突然変異-未修復のDNA損傷に複製フォークがさしかかった際、DNA複製の忠実度をあえて低下させることで損傷バイパス合成をおこない、これにより細胞の生存率は向上するがその代償として突然変異頻度が上昇する-が知られていたが、これはDNA修復においてはむしろ緊急避難的な事象と考えられてきた。特に、紫外線損傷バイパス合成に関与する複製忠実度の低いDNA polymerase である pol  $\eta$  の発見と、その欠損がヒトにおいて好発がん性の疾患である色素性乾皮症異型群(XP-V)の原因であることが大阪大学の花岡文雄博士らの研究で明らかにされたことから、高等生物においては複製忠実度の低いDNA polymerase による損傷バイパス合成によってさえも、突然変異はむしろ抑制的であると考えられた。

ゲノムプロジェクトの進行と前後して pol  $\eta$  と構造が類似する DNA polymerase が多数見つかリ、これまでに酵素の生化学的解析を中心とした研究が先行して行われてきた。ヒトには pol  $\eta$  に類似する構造をもつ Y ファミリー DNA polymerase が4種類(pol  $\eta$ 、pol  $\iota$ 、pol  $\kappa$ 、Rev1)見つけたが、これらは酵素活性を中心とした解析がまずなされ、各々が特徴的な損傷バイパス合成活性を持つことが明らかにされた。本研究代表者らは、Y ファミリー polymerase のうち pol  $\kappa$  を中心に解析を行い、pol  $\kappa$  が AAF やベンゾ[a]ピレン等の付加型損傷のバイパス合成を行うこと、pol  $\kappa$  の欠損細胞がベンゾ[a]ピレンに対して感受性になることと突然変異の抑制に寄与することを発表した。この研究の過程で、pol  $\kappa$  は紫外線損傷のバイパス合成を単独では行えないにもかかわらず、その欠損細胞が顕著な紫外線感受性を示すことが明らかになった。本研究代表者らは、pol  $\kappa$  欠損細胞の紫外線感受性がバイパス合成の欠陥に由来するのではなく、他の修復機構の欠陥によるものであると着想してさらに研究を進め、pol  $\kappa$  が紫外線損傷のヌクレオチド除去修復機構(NER)に関与することを報告した。

## 2. 研究の目的

本研究は、近年まで pol  $\delta$  や pol  $\epsilon$  等の高精度複製型 polymerase により行われ、元の遺伝情報に忠実であると考えられてきた修復DNA合成経路のうち、特に紫外線に起因する損傷を修復する経路であるNERについて、複製忠実度の低いDNA polymerase が関与するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

研究期間を通して、以下のテーマに関して研究を実施した。

- (1)細胞周期や細胞種に応じた修復DNA合成に関与する polymerase の特定
- (2)修復DNA合成活性の効率的な定量法の開発

(3)修復合成過程でDNA polymerase の選択を決定する因子の探索同定

## 3. 研究の方法

研究は、以下に列挙した方法にて実施した。

(1)複製精度の低いヒトDNA polymerase  $\kappa$  に対する抗体作成

(2)核内局所紫外線照射によるDNA損傷誘導と、蛍光免疫染色法による修復蛋白質の局在確認

(3)初代培養細胞への siRNA 導入による修復関連遺伝子の発現抑制

(4)デオキシチミジン誘導体の取り込みによる修復DNA合成活性の定量

(5)siRNA 導入細胞での各種DNA修復に関するエンドポイントの調査

## 4. 研究成果

-修復合成の定量-

DNA修復に伴う修復DNA合成(UDS: unscheduled DNA synthesis)は、細胞周期の染色体DNA複製とは異なり、合成されるDNA量がごく微量である。このためUDSの検出には、放射性同位体(RI)ヌクレオシドの取り込みがこれまで一般的であった。RIを使用したUDSの検出はDNA損傷処理後にトリチウム標識ヌクレオシドによりラベルをおこない、オートラジオグラフィによる核内銀粒子の形成を顕微鏡により観察、定量化する。この手法は正確である反面、大変煩雑な手技を伴い、一連の作業に2-3週間を要する。また、自動化が不可能であるため、スクリーニングには適用できなかった。そこで我々は、UDSを迅速に定量する手法を開発することにより、これを放射線DNA損傷の修復に関与する新規因子の探索や、DNA修復欠損の遺伝病等の臨床診断に利用することを計画した。2008年初頭に、アルキン化ヌクレオシドと蛍光アジドを銅イオン触媒によりカップリングさせる手法が開発された。我々は、反応条件等を工夫することでバックグラウンドを低下させ、これにより蛍光を使用したUDSの正確な測定が可能となった。一連の成果は、Nucleic Acids Research 誌に発表された。

上述の手法をさらに改良することで、DNA損傷に起因するRNA転写の抑制と回復(RRS)を検出することも可能となった。また、スクリーニングの実施を視野に、システム全体を自動化することに成功した。これにより、主として紫外線DNA損傷に起因するヌクレオシドの取り込みを指標とした遺伝性疾患(色素性乾皮症やコケイン症候群)の診断手法、光細胞老化や老化によるDNA修復活性低下の測定技術、化粧品等への有用添加物の開発技術として、国内及び米国特許の申

請をおこなった。これらの成果は、DNA Repair 誌に掲載された。

-NER 修復 DNA 合成過程での polymerase 選択のメカニズム-

ゲノムプロジェクトの結果、ヒトには少なくとも 17 種類の DNA ポリメラーゼが確認されたが、その多くは機能未知である。DNA ポリメラーゼの酵素活性の重要な要素の一つである複製精度(フィデリティ)は、ポリメラーゼ毎に異なっており、複製エラーの発生頻度は最も精度の高い複製型 pol  $\delta$ 、 $\epsilon$  の 100 万塩基対合成あたり 1 エラーから、最も精度が低い pol  $\eta$  の 100 塩基対合成あたり 1 エラーまで幅がある。この複製精度は、DNA ポリメラーゼ毎の機能と密接に関連しており、染色体 DNA 複製には精度の高い酵素、特殊な DNA 修復である損傷バイパス DNA 合成-塩基損傷を乗り越えて DNA 合成をおこなうにはフィデリティの低い酵素が用いられる。DNA 修復に着目したとき、修復の過程で用いられるポリメラーゼが何なのかというテーマには厳密な解答が得られていない。DNA 修復は研究テーマとしてオーソドックスであるが、多くの DNA ポリメラーゼが発見されたのはごく近年である。また、この間には生化学的な解析のみが精力的に行われていた。この結果、多くの研究者は DNA 修復の際、鋳型が完全な修復 DNA 合成においては、染色体 DNA 複製と同じ複製精度の高い DNA ポリメラーゼが使用されると考えており、修復合成に複製精度の低いポリメラーゼが使用されるという観点での研究はおこなわれていない。

DNA 修復の過程でどの DNA ポリメラーゼが関与するのかは、生化学的な解析のみからでは厳密な解答は得られない。当研究においては、DNA 損傷箇所へのポリメラーゼの局在観察と修復 DNA 合成活性を主たる指標に in vivo での解析を試みた。siRNA による遺伝子発現抑制により、DNA ポリメラーゼとその補因子、さらにはポリメラーゼを損傷箇所へリクルートする際に必要と考えられるローディング因子、またはチェックポイント関連因子などの遺伝子を順次ノックダウンし、その効果を調査した。この結果、紫外線 DNA 損傷などをはじめとする多様な DNA 損傷を修復するヌクレオチド除去修復において、生化学的な解析の結果からは複製型 pol  $\delta$  と  $\epsilon$  によりおこなわれると考えられていた修復 DNA 合成が、pol  $\delta$  と  $\kappa$  が協調的に約半分の損傷を修復し、残りの半分を pol  $\epsilon$  が単独で修復するという結果が得られた。この際に、これらの DNA ポリメラーゼを損傷箇所へロードする因子を検討したところ、pol  $\delta$  のローディングには RFC1-RFC が、pol  $\kappa$  は PCNA のユビキチン化と XRCC1 が、そして pol  $\epsilon$  には CHTF18-RFC がそれぞれ必要であることが明らかにされた。これらの因子の発現を siRNA によって抑制すると、当該 DNA ポリメラーゼの損傷箇所への局在が抑制され、また UDS を指標とした修復 DNA 合成活性が低下した。これ

らの反応にはチェックポイントの活性化は不要であった。これら一連の成果は、Molecular Cell 誌に掲載された。

#### 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 3 件)

(1) 荻 朋男 (責任著者), S. Limsirichaikul, R. Overmeer, M. Volker, K. Takenaka, R. Cloney, Y. Nakazawa, A. Niimi, Y. Miki, N. Jaspers, L. Mullenders, S. Yamashita, M. Fousteri, and A. Lehmann. Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. *Molecular Cell* **37**: 714-27 (2010) 査読有り.

(2) Nakazawa, Y., S. Yamashita, A. Lehmann, and 荻 朋男 (責任著者). A semi-automated non-radioactive system for measuring recovery of RNA synthesis and unscheduled DNA synthesis using ethynyluracil derivatives. *DNA Repair* **9**: 506-16 (2010) 査読有り.

(3) Limsirichaikul, S., A. Niimi, H. Fawcett, A. Lehmann, S. Yamashita, 荻 朋男 (責任著者). A rapid non-radioactive technique for measurement of repair synthesis in primary human fibroblasts by incorporation of ethynyl deoxyuridine (EdU). *Nucleic Acids Research* **37**: 1-10 (2009) 査読有り.

[学会発表] (計 2 件)

(1) 3R 2008 International Conference

「DNA polymerases  $\kappa$  and  $\delta$  co-operate in the gap-filling synthesis step of nucleotide excision repair」

2008 年 10 月 掛川

(2) International Conference on Radiation and Cancer Biology at Nagasaki 2010

「Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells」

2010 年 2 月 18 日 長崎

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況（計 2 件）

名称：損傷 DNA 修復物質のスクリーニング方法

発明者：萩 朋男 他 2 名

権利者：長崎大学

種類：日本国特許出願

番号：特願 2009-172521

出願年月日：2009 年 7 月 23 日

国内外の別：国内

米国特許出願(12/656,408)

上記国内特許を米国へ優先権出願

発明者：萩 朋男 他 2 名

権利者：長崎大学

出願年月日：2010 年 1 月 28 日

国内外の別：国外

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩 朋男 (OGI TOMOO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80508317

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：