

機関番号：14603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870023

研究課題名（和文） 複製フォークにおける損傷乗り越え DNA 合成機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of translesion synthesis at replication fork *in vitro*

研究代表者

古郡 麻子 (FURUKOHR I ASAKO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：90546293

研究成果の概要（和文）：本研究では、特に損傷乗り越えDNA合成に着目し、DNA複製の新たな仕組みを明らかにすることを目的とした。そこで大腸菌の試験管内DNA複製系を利用し、複製フォークにおけるポリメラーゼスイッチと損傷乗り越えDNA合成の検出を試みた。その結果、損傷乗り越え型DNAポリメラーゼPol IVの働きにより、複製フォークにおいてもポリメラーゼスイッチが起きること、またそれは主にはPol IVの濃度依存的に引き起こされることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is finding a new role of translesion DNA polymerase in a mechanism for chromosomal DNA replication. Using *E. coli in vitro* DNA replication system, we found that the polymerase switching from replicative polymerase Pol III to translesion polymerase Pol IV was stimulated by the action of Pol IV.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,110,000	633,000	2,743,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：DNA複製, DNA修復, 突然変異, 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞が染色体DNAを複製する際、UVや活性酸素などによりDNAに生じた損傷によって複製フォークが停止することがある。停止した複製フォークは容易にDNA二重鎖切断を生じるため、染色体の断裂や欠失、突然変異などの遺伝的不安定性の原因となることが知られている。

近年細胞中には多種多様なDNAポリメラーゼが存在することが明らかになってきた。その中にはDNAに損傷があっても複製する

ことができる特殊なDNAポリメラーゼ(損傷乗り越え型DNAポリメラーゼ)が含まれる。染色体DNA複製が行われる際、鋳型DNA上に損傷が存在すると、複製型DNAポリメラーゼは損傷部位でDNA合成を停止してしまう。そこで複製フォークの停止を回避するために、一度複製型DNAポリメラーゼが鋳型DNAおよび新生鎖3'末端から解離し、それに代わって損傷乗り越え型DNAポリメラーゼが新生鎖3'末端に結合し、DNA合成を再開していると考えられている。しかし、こうした一連のポリメラーゼの交代反応(ポリメラ

ーゼスイッチ)が、いつ、どのようにして起こるのか、またその結果、複製フォーク全体にどのような変化が生じるのかは不明であった。

また、複製フォークにおいては、各々の鎖上においてDNA合成の様式が異なっており、リーディング鎖では通常は一個の複製型DNAポリメラーゼが連続的にDNA合成を行うのに対して、ラギング鎖においては合成の終わった岡崎フラグメントの3'末端から複製型ポリメラーゼが次々に解離し、新たな岡崎フラグメントの合成を開始する不連続合成が行われていることが知られている。こうしたDNAポリメラーゼの性質から、とくにリーディング鎖上で複製型DNAポリメラーゼが停止した際、ラギング鎖上に比べてポリメラーゼの解離が起きにくい事が予想され、リーディング鎖上でもポリメラーゼスイッチが起りうるのかという疑問が生じた。

(2) その一方で、近年、本研究グループにおいて、精製した大腸菌複製型DNAポリメラーゼPol IIIと損傷乗り越え型DNAポリメラーゼPol IVを用いて、試験管内でポリメラーゼスイッチ反応を再構成する研究が行われた。その結果、Pol IV自身にPol IIIを新生鎖3'末端から解離させ、ポリメラーゼスイッチを促進する新たな活性があることを見いだした。この結果から、Pol IVのスイッチ促進活性によって、リーディング鎖上におけるポリメラーゼスイッチ反応が引き起こされるのではないかとこの仮説が立てられた。しかしこれまでの実験では、複製フォークにおける反応ではなく、より単純な構造の鋳型DNAにおける反応を調べたに過ぎないため、こうした疑問に答えることはできず、染色体DNA複製における損傷乗り越えDNA合成機構の解明には不十分であった。

(3) そこで本研究計画では、より忠実に染色体DNA複製を試験管内で再構成できる、*oriC*プラスミド*in vitro*複製系 (*oriC*複製系)を用いて、複製フォークにおけるポリメラーゼスイッチおよび損傷乗り越えDNA合成について調べることを目的とした。特に、Pol IVによってリーディング鎖上でのポリメラーゼスイッチが起こるのではないかとこの仮説の検証を行なうことを計画した。また、実際にポリメラーゼスイッチが観察された場合、野生型に加えて様々な変異型のPol IIIを用いてポリメラーゼスイッチの起りやすさを比較することで、この反応がどのようなメカニズムで起きているのかを調べる事ができるのではないかと考えた。

また、こうした事に加え、複製フォークでのポリメラーゼスイッチが検出されれば、複製フォークで損傷乗り越えDNA合成が働い

た後、どのようにして複製フォークの再スタートが起こるのかという重要な疑問にも何らかの答えを得る事が出来るのではないかと考えた。ポリメラーゼスイッチが起き、Pol IVがDNA合成を行なう際、もしPol IIIを含む正常なレプリソームが複製フォークに留まるなら、複製フォークの再スタートは容易であるが、レプリソームが完全に崩壊してしまえば再スタートは困難であると考えられるため、ポリメラーゼスイッチ後のレプリソームの状態の解析をすることが必要であると考えられた。

2. 研究の目的

第一に、連続的にDNA合成を行うことからポリメラーゼスイッチが起こりにくいと考えられる、リーディング鎖上でも実際にポリメラーゼスイッチが起りうるのかを明らかにしたいと考えた。第二に、もしポリメラーゼスイッチが起こるとすれば、その際に複製型ポリメラーゼは複製フォークに留まるのか、それとも完全に解離するのかを明らかにする必要があると考えた。またその際、複製フォークを構成するヘリカーゼ等の他の因子はどのような挙動を示すのかを明らかにしたいと考えた。これらのことを明らかにすることにより、染色体DNA複製における損傷乗り越えDNA合成機構を理解することを研究全体の目的とした。

3. 研究の方法

(1) まず必要な複製関連タンパク質の精製を行った。特に、精製が困難であることが研究の進展の妨げとなっていた、Pol IIIの新たな精製方法を確立することとした。Pol IIIは10以上の複数のサブユニットからなる巨大な複合体であるため、過剰発現系は用いることができない。そこで近年、他研究グループで開発された、TAPタグを染色体上のPol III構成サブユニット遺伝子下流に導入することにより細胞内のPol IIIをアフィニティー精製する方法を用いることとし、この方法をさらに改良して生化学的解析に使用できる活性の高い高純度のPol IIIの簡便な精製方法を確立した。またこの方法を用いて、野生型Pol IIIの他に、校正機能を欠損した ϵ サブユニット変異型Pol IIIや、校正機能の他にポリメラーゼ活性も変化した α サブユニット変異型Pol IIIなど、複数の校正機能欠損型Pol IIIの精製を行った。

(2) 次に精製したPol IIIや他の複製関連タンパク質因子を用いて、*oriC*複製系による試験管内複製フォークの再構成を行った。またさらにこの系に損傷乗り越え型のPol IVを加

えた際の複製産物を解析し、ポリメラーゼスイッチが起きるかどうかを調べる事とした。ポリメラーゼスイッチの検出は、主として複製産物の長さの解析から行った。Pol IIIにくらべるとPol IVの鎖伸張速度は極めて遅いため、ポリメラーゼスイッチが起きれば産物の長さは短くなる。複製産物の解析は、³²Pラベルした複製産物をアルカリアゲロスゲル電気泳動にて分離して行った。また校正機能欠損変異型Pol IIIでも同様の実験を行った。

4. 研究成果

(1) 他研究グループにて構築された、TAPタグを使用したPol IIIの精製方法を基に、さらに簡便かつ活性の高いPol IIIの精製方法の確立を試みた結果、細胞中からPol IIIを短時間にかつ高純度に精製することが可能となった。そこで、この方法を用いて、野生株、Pol IIIの校正機能を担うεサブユニットの変異株、およびポリメラーゼ活性を担うαサブユニットの変異株それぞれからPol IIIの精製を試み、どの株からもPol IIIを精製することに成功した。精製したPol IIIはすべての構成サブユニットが揃っており、夾雑物もほとんどみられない純度の高いタンパク質であった(図1)。

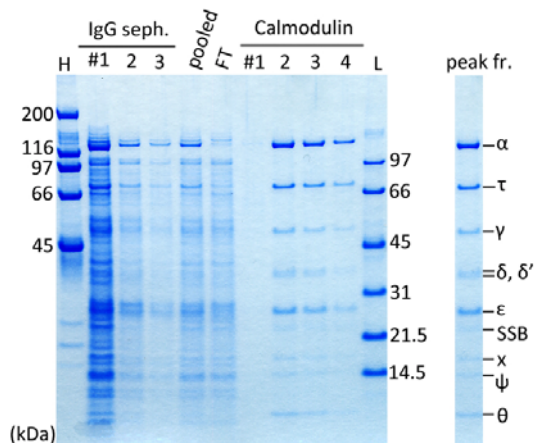


図1 TAPタグを用いた野生型Pol III精製
TAPタグはProteinAとCBPからなり、それぞれIgG sepharose、Calmodulin agaroseを用いたアフィニティー精製を用いることができる。各精製段階での精製度をSDA-PAGEおよびCBB染色によって調べた結果を示す。(H、L;分子量マーカー、IgG seph. #1~#3;IgG sepharose溶出画分、pooled;IgG Sepharose溶出画分をあわせたもの、FT; Calmodulin agarose非結合画分、Calmodulin #1~#4; Calmodulin agarose溶出画分) Calmodulin agarose精製ピークフラクションには、Pol III holoenzymeの全てのサブユニットが含まれており、精製度の高いPol IIIを精製することができていることが確認された。右端にピークフラクションに含まれるPol IIIの各サブユニットを示す。

更に、今回精製した野生型Pol IIIと他の複製関連タンパク質を用いて*oriC*複製系を再構成し、試験管内でDNA複製反応を行わせたところ、リーディング、ラグging鎖由来の複製産物が検出されたことから、精製したPol IIIを用いて正常な複製フォークが再構成できることが確認できた。また、各種変異株から精製したPol IIIの性質を調べたところ、それぞれの変異に由来した活性の変化が起きていることが確認された。

(2) 次に、野生型Pol IIIを用いて*oriC*複製系で複製フォークを再構成し、そこに更にPol IVを加えてポリメラーゼスイッチが起こるかどうかを調べた。その結果、Pol IVの濃度を上げるに従い、Pol III由来の長い複製産物が顕著に減少し、代わってPol IV由来の複製産物と考えられる短い複製産物が増加する現象が見られた。これは、リーディング鎖上でも、Pol IVの濃度依存的にPol IIIからPol IVへのポリメラーゼスイッチが起きたことを示していると考えられる。

また、Pol IVが複製したと考えられる産物が検出されたことから、損傷乗り越え型DNAポリメラーゼが複製フォークでDNA合成を行う可能性が示された。これまで、損傷乗り越え型DNAポリメラーゼが複製フォークで働くモデルは提唱されていたが、直接の証明はなされていなかったため、この結果は特に興味深いと考えられる。

(3) 複製フォークにおけるポリメラーゼスイッチは、損傷等でPol IIIが停止していなくても、Pol IVの濃度依存的に起こる事が明らかとなった。また、校正機能欠損型のPol III(αサブユニット変異型)を用いて同様の研究を行ったところ、野生型と同様にポリメラーゼスイッチが検出され、またその際のPol IV濃度は野生型とほとんど同じであった。これらの結果から、Pol IVは損傷の有無に関わらず複製フォークでPol IIIと入れ替わることが可能であり、またPol IVによるポリメラーゼスイッチは、Pol IIIのミスインサクション等による校正機能の働きとは無関係に、主としてPol IVの濃度依存的に引き起こされる事が明らかとなった。

生体内においては、多くのDNAポリメラーゼの濃度がさまざまな要因により変動することが知られている。特に、SOS応答などのストレス応答によって、Pol IVを含む損傷乗り越え型DNAポリメラーゼの濃度は大きく上昇し、特にPol IVは生体内で最も濃度の高いDNAポリメラーゼとなることが知られている。こうした結果から、実際に生体内でも、Pol IVを含む様々なDNAポリメラーゼが濃度の変動によって複製フォークへアクセスし、時にはPol IIIと入れ替わる事によって、複製フォ

ークの進行を助けているのではないかと
いうモデルが考えられた。

(4) 当初の目的である、複製フォークでの
ポリメラーゼスイッチの検出、特にリーディ
ング鎖上でのポリメラーゼスイッチの検出
に関しては、これらの結果から多くの知見が
得られた。その一方で、本研究計画では、損
傷乗り越えDNA合成が完了した後、再び正常
なレプリソームが複製フォークを再スター
トするまでのメカニズムの解明ももう一つ
の目的であった。しかし、本研究計画で予定
していた、ポリメラーゼスイッチ後の複製フ
ォークの動態解析ならびにレプリソームの
状態解析に関しては、主として時間的な要
因によって行いうることができなかった。こ
れらの問題は、複製フォークの進行阻害回
避機構を解明する上では非常に重要である
ことから、今後はこれらの解析に焦点を置
いて研究を進めたのち、それらの結果を論
文にまとめて発表したいと考えている。

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2件)

- ① Kundu LR, Seki M, Watanabe N, Murofushi H, Furukohri A, Waga S, Score AJ, Blow JJ, Horikoshi M, Enomoto T, Tada S., Biphasic chromatin binding of histone chaperone FACT during eukaryotic chromatin DNA replication., *Biochim Biophys Acta.*, 1813 (6), p1129-1136, 2011, 査読有り
- ② Kundu LR, Kumata Y, Kakusho N, Watanabe S, Furukohri A, Waga S, Seki M, Masai H, Enomoto T, Tada S., Deregulated Cdc6 inhibits DNA replication and suppresses Cdc7-mediated phosphorylation of Mcm2-7 complex., *Nucleic Acids Res.*, 38 (16), p5409-5418, 2010, 査読有り

[学会発表] (計1件)

Uchida K, Furukohri A, Shinozaki Y, Mori T, Ogawara D, Kanaya S, Nohmi T, Maki H, Akiyama M, Overproduction of *Escherichia coli* DNA Polymerase DinB(Pol IV) Inhibits Replication Fork Progression and is Lethal., The 57th NIBB Conference THE DYNAMIC GENOME, Oct. 14, 2010 Okazaki Conference Center, Okazaki, Aichi, Japan

[図書] (計1件)

Hisaji Maki, Asako Furukohri, Elsevier, The Encyclopedia of Biological Chemistry second edition, 2011, 共著, in press

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古郡 麻子 (FURUKOHRI ASAKO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・助教

研究者番号：90546293