

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19843

研究課題名（和文）DNA損傷によるDNA複製の阻害と転写の阻害を連携制御するメカニズムの解析

研究課題名（英文）Analyses of mechanisms to tolerate for blockages of DNA replication and transcription by DNA lesions

研究代表者

益谷 央豪（Masutani, Chikahide）

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：40241252

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：DNA損傷により、DNA複製と転写はそれぞれ阻害される。遺伝子領域においては、転写の阻害とDNA複製の阻害がともに生じうるが、ゲノム全体の多くの領域では転写の阻害とは無関係にDNA複製が阻害されると考えられている。本計画では、転写の阻害とゲノム全体で起こるDNA複製の阻害の解消機構の連係を探索した。そして、DNA複製の阻害と転写の阻害及びそれらの解消機構の連携機構において、DNA損傷応答において重要な役割を担うATRの関与を見出した。DNA損傷によるDNA複製の停止と転写の停止をつなぐシグナル経路の存在を強く示唆するものであり、挑戦的研究として実施した本研究をさらに発展させる道筋を開いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境中の紫外線や細胞自身の代謝産物である活性酸素などにより、DNAは絶えず損傷を受けており、基礎的なDNA代謝であるDNA複製と転写は阻害される。本研究では、DNA損傷によるDNA複製の阻害と転写の阻害を連携して制御するネットワークの存在を強く示唆することができた。DNA損傷応答機構の破綻は、ゲノムの不安定化につながり、がん化や老化を始めとするさまざまな生理機能の異常をきたす。一方で、がん細胞は、DNA損傷存在下でも増殖するために、これらのメカニズムを利用して、DNA損傷に対する耐性を獲得する。従って、本研究は、発がん防御に加えて、新規抗がん戦略の構築に寄与することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：DNA replication and transcription are obstructed by DNA damage. In the active gene domain, inhibition of the transcription and inhibition of the DNA replication can occur together. However, it is expected that DNA replication is obstructed regardless of inhibition of the transcription in many domains of the whole genome. Through this study, we searched for a connection between the cancellation mechanism of inhibition of transcription and the inhibition of DNA replication on the whole genome. We demonstrated that, in the cooperation mechanism of inhibition of the DNA replication and inhibition of the transcription and that cancellation mechanism, we found the participation of the ATR plays crucial roles in the DNA damage response.

研究分野：環境解析評価およびその関連分野

キーワード：DNA損傷 DNA損傷トランス 損傷乗り越えDNA複製 転写 DNA損傷応答シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

放射線・紫外線や化学物質などの環境要因や細胞自身の代謝により生じる活性酸素などの内的な要因により、ゲノム DNA は容易に損傷を受ける。DNA 損傷が放置されれば、DNA 複製や転写が妨げられてゲノムの不安定化や細胞死が引き起こされ、癌化をはじめとする様々な生理機能の異常がもたらされる。対して、細胞は DNA 損傷に応答して細胞周期を停止するチェックポイント機構及び様々な種類の DNA 損傷に対応した複数の DNA 修復機構を備えている。特に、RNA ポリメラーゼの進行の妨げとなった転写鎖上の DNA 損傷については優先的に修復して転写を回復する機構が存在する。一方で、転写の阻害を検知して新たな転写の開始を停止するシグナル系の存在も知られている。さらに、転写が行われている遺伝子領域内で起こる転写と DNA 複製の衝突を回避解消する機構についても解析が進められてきた。

DNA 損傷による転写の阻害はゲノム全体のうち、遺伝子領域内に限定されるが、DNA 損傷の多くはゲノム全体にランダムに生じ、これらは DNA ポリメラーゼの妨げとなり、DNA 複製を阻害する。つまり、DNA 損傷の多くは、転写とは無関係に DNA 複製を阻害する。しかし、DNA ポリメラーゼの進行を妨げる DNA 損傷を優先的に修復する機構は知られていない。代わって、ゲノム上に DNA 損傷を残したまま DNA 複製の阻害を回避する“DNA 損傷トレランス”と総称される機構がゲノム全体における DNA 複製阻害の回避解消に重要な役割を担うことが明らかになってきた。ヒト細胞の DNA 損傷トレランスにおいては、DNA 損傷の種類に応じた複数の DNA ポリメラーゼによる損傷乗り越え複製(TLS: translesion synthesis)が主要な役割を担うが、他にも テンプレート・スイッチ(TS)などの機構があると考えられている。

本研究者らは、紫外線に高感受性を呈して高頻度で皮膚癌を発症する遺伝性疾患である色素性乾皮症バリエーション(XP-V)群の責任遺伝子産物として、ヒト DNA ポリメラーゼ・イータ(Pol $\eta$ )を同定し、Pol $\eta$ が主要な紫外線 DNA 損傷であるシクロブタン型ピリミジンダイマー(CPD)を鋳型として効率良く正確な TLS を担うことを明らかにしてきた。一方で、Pol $\eta$ は本質的にはたいへんエラーを起こしやすい DNA 合成酵素であり、厳密に制御されて機能すると考えられる。独国のグループにより、真核生物の DNA 損傷トレランスの制御に重要な E2(ユビキチン(Ub)結合酵素)-E3(Ub リガーゼ)である RAD6-RAD18 が、DNA 複製のスライディング・クランプである PCNA (proliferating cell nuclear antigen)の 164 番目のリジン(K164)を Ub 化することが明らかにされた。Pol $\eta$ を含む Y ファミリー DNA ポリメラーゼは、PCNA 相互作用領域(PIP)と Ub 相互作用領域(UBZ, UBM)を有しており、これらの領域を介したモノ Ub 化 PCNA との相互作用が TLS 制御において重要な役割を担うと考えられるが、適切なポリメラーゼを選択的に活性化する機構は明らかにされていなかった。RAD6-RAD18 に加えて、もう一組の E2-E3 である MMS2/UBC13-HLTF(酵母 RAD5 のヒトホモログ)により、PCNA-K164 がポリ Ub 化(K63 鎖)されると TS が活性化されると考えられる。しかし、ヒト細胞中のポリ Ub 化 PCNA の検出報告は少なく、その形成機構もほとんど明らかではなかった。本研究者らは、PCNA のモノユビキチン化とポリユビキチン化が動的・可逆的に連関制御されることを報告した。また、PCNA の Ub 化は可逆的であり、複製ストレスに応答したモノ Ub 化の制御には脱 Ub 化酵素 USP1 が関与することが報告されていた。本応募者らは、USP7 が酸化損傷により誘導される過剰な Ub 化を制御して突然変異を抑制していることを明らかにした。さらに、本応募者らは、PCNA ホモ 3 量体中の 1 ユニット以上がモノ Ub 化されれば Pol $\eta$ による TLS を活性化できることに加えて、複数のユニットが同時にマルチ修飾されると TLS 以外の機構が活性化されることも報告していた。しかしながら、複数

の TLS ポリメラーゼの中から DNA ポリメラーゼ・イータが選択されて機能する仕組みは必ずしも明らかではなく、また、TLS 以外の機構の実態については全く明らかではなかった。本研究からは、これらの未解明の問題点にアプローチするために、従来知られていたメカニズムでは対処できない特殊な DNA 損傷を探索し、キノコ毒イルジン S に着目した。イルジン S による DNA 損傷による DNA 複製阻害の解消機構の解析をすすめる中で、DNA 複製の阻害と転写の阻害及びそれらの解消機構には連携機構があることを示唆する知見を得た。そこで、本研究では、DNA 損傷による DNA 合成の停止にตอบสนองして転写の制御に関わる因子の探索を実施した。

## 2．研究の目的

紫外線や放射線に加えて、環境中の様々な天然及び人工の化合物などにより、DNA 損傷が生じる。DNA 損傷の多くは、RNA ポリメラーゼや DNA ポリメラーゼの進行を妨げて、転写と DNA 複製をとともに阻害する。遺伝子領域で起こる転写と複製の衝突の回避機構が知られている。しかし、DNA 損傷の多くは非遺伝子領域にランダムに生じており、それらの DNA 損傷による DNA 複製の阻害の大部分は、転写の阻害とは異なる場所で起こり、転写とは独立に解消されるはずである。ところが、イルジン S による DNA 損傷による DNA 複製阻害の解消機構の解析をすすめる中で、DNA 複製の阻害と転写の阻害及びそれらの解消機構には連携機構があることを示唆する知見を得た。本研究では、DNA 損傷による DNA 合成の停止にตอบสนองして転写の制御に関わる因子の同定を目的とした。

## 3．研究の方法

内在性の PCNA を K164 変異体に置換して PCNA の翻訳後修飾を阻害し、DNA 損傷による複製阻害の解消機構である DNA 損傷トレランスを阻害した細胞株を用いて観察されたイルジン S 処理後の持続的な転写の停止に関わる因子群を、siRNA ライブラリーを用いて探索した。それらについて、さらに複数の siRNA 及び種々阻害剤を用いて検証を進めた。

## 4．研究成果

1) DNA 複製の阻害と転写の阻害及びそれらの解消機構の連携機構において、DNA 損傷応答において重要な役割を担う ATR の関与を見出した。DNA 損傷による DNA 複製の停止と転写の停止をつなぐシグナル経路の存在を強く示唆するものであり、挑戦的研究として実施した本研究をさらに発展させる意義が明確になったと考えている。

2) RFWD3 が担う TLS 以外の DNA 損傷トレランスを見出した(Kanao et al. Life Science Alliance. 2022、プレスリリース参照 <https://www.nagoya-u.ac.jp/researchinfo/result/2022/08/-dna-dna-dna.html>)

PCNA の 164 番目のリジン(K164)がモノユビキチン化されることにより TLS が活性化され、ポリユビキチン化、または、マルチユビキチン化されることによりテンプレート・スイッチなどの未解明の経路が活性化されると考えられている。しかしながら、ヒト細胞においては後者の解析は進んでいない。その大きな理由のひとつは、ヒト細胞では DNA 損傷抵抗性獲得における TLS の寄与が大きく他の経路の寄与が小さいことによると考えた。例えば、紫外線照射後の細胞の生存においては、PCNA のユビキチン化に依存した経路の大きな部分は DNA ポリメラーゼ・イータによる紫外線 DNA 損傷の TLS であり、他の経路のマイナーな寄与は大きくない。そこで、TLS 以外の DNA 損傷トレランス経路の寄与が大きな DNA 損傷を探索することから始めた。細胞内の PCNA

を非修飾部位の変異体(K164R)に置換した細胞の様々な DNA 損傷剤に対する感受性を検討したところ、紫外線やシスプラチンなどに加えて、キノコ毒であるイルジン S に高い感受性を示した。重要な点として、DNA ポリメラーゼ・イータ欠損細胞は、紫外線やシスプラチンに高い感受性を示すのに対して、イルジン S には感受性を示さない。つまり、イルジン S による DNA 損傷に対する抵抗性獲得には、PCNA のユビキチン化に依存する、DNA ポリメラーゼ・イータによる TLS とは異なる経路が重要であることが分かった。そこで次に、イルジン S 抵抗性に関わる因子を探索した。まず、TLS への関与が報告されている DNA ポリメラーゼについて検討したところ、DNA ポリメラーゼ・カッパを抑制すると同薬剤に感受性を示すことが分かった。しかし、その感受性は、PCNA のユビキチン化を抑制した場合に比べてマイルドであったことから、PCNA のユビキチン化に依存する TLS 以外の経路の関与が強く示唆された。そこで、siRNA ライブラリーのスクリーニングを行い、RFWD3 の発現を抑制するとイルジン S に高感受性となることが分かった。RFWD3 と DNA ポリメラーゼ・カッパはそれぞれ相加的な別の経路を構成するが、共に PCNA のユビキチン化依存的であり、即ち、PCNA のユビキチン化依存的に働く 2 つの経路を構成していることを示した。RFWD3 のとある点変異は、ファンコニー貧血症の原因となり、RFWD3 は他の FANC タンパク質と協調して、DNA 鎖間架橋損傷の相同組換え修復に関わることを報告されている。ところが、イルジン S 損傷に対する抵抗性獲得には、FANCD2 などの FANC 経路で重要な役割を担うタンパク質は関与しておらず、RFWD3 は FANC 経路における役割とは独立に、PCNA のユビキチン化依存的な DNA 損傷トレランスに寄与していることが明らかになった。TLS 以外の経路回目への短所を切り拓いた成果である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanao Rie, Kawai Hidehiko, Taniguchi Toshiyasu, Takata Minoru, Masutani Chikahide	4. 巻 5
2. 論文標題 RFWD3 and translesion DNA polymerases contribute to PCNA modification-dependent DNA damage tolerance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202201584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lsa.202201584	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 Sonohara Yuina, Takatsuka Reine, Masutani Chikahide, Iwai Shigenori, Kuraoka Isao	4. 巻 43
2. 論文標題 Acetaldehyde induces NER repairable mutagenic DNA lesions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 52 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgab087	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23件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Masuda, Y., Sugimoto, Y., Iwai, S., Miyake, Y., Kanao, R., Masutani, C.
2. 発表標題 Responses of DNA polymerases and AP endonucleases to thiazolidine-DNA adducts in humans.
3. 学会等名 7th US-EU Conference on Endogenous DNA Damage and Repair (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kanao, R. Kawai, H. Taniguchi, T. Takata, M., Masutani, C.
2. 発表標題 RFWD3 and TLS polymerases play crucial roles in PCNA ubiquitination-dependent DNA damage tolerance in human cells
3. 学会等名 7th US-EU Conference on Endogenous DNA Damage and Repair (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kanao, R., Kawai, H., Taniguchi, T., Takata, M., Masutani, C.
2. 発表標題 Analysis of PCNA ubiquitination-dependent DNA damage tolerance in human cells.
3. 学会等名 19th Ataxia-Telangiectasia workshop (ATW2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masuda, Y., Sugimoto, Y., Iwai, S., Miyake, Y., Kanao, R., Masutani, C.
2. 発表標題 Responses of human DNA polymerases and AP endonucleases to HMCES- and thiazolidine-DNA adducts.
3. 学会等名 The 19th Ataxia-Telangiectasia workshop (ATW2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kanao R., Kawai H., Taniguchi T., Takata M. Masutani C.
2. 発表標題 RFWD3 mediates a crucial pathway of PCNA ubiquitination-dependent DNA damage tolerance in human cells.
3. 学会等名 NIG International Symposium 2002. Chromosome Replication in the New Era; Old and New Questions in Life Science. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田雄司, 杉本陽平, 岩井成憲, 三宅ゆみ, 金尾梨絵, 益谷央豪
2. 発表標題 脱塩基部位のヒトDNA損傷トレランスと修復経路の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪
2. 発表標題 RFWD3はヒト細胞において紫外線損傷のDNA損傷トランスに關与する
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本陽平, 増田雄司, 益谷央豪
2. 発表標題 DNA脱塩基部位の新規損傷トランス経路 HMCESクロスリンクの複製と修復経路に関する生化学的解析
3. 学会等名 変異機構研究会・第33回夏の学校
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪
2. 発表標題 RFWD3とDNAポリメラーゼ・イータはPCNAのユビキチン化依存的に紫外線損傷のDNA損傷トランスに關与する
3. 学会等名 日本分子生物学会第45回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪
2. 発表標題 ヒト細胞におけるPCNA のユビキチン化に依存するDNA損傷トランスの解析
3. 学会等名 第40回染色体ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪
2. 発表標題 PCNA ubiquitination-dependent DNA damage tolerance in human cells.
3. 学会等名 第4回 CIBoGリトリート, ~ 第5回名大医薬系3部局・岐阜薬科大学・岐阜大学G-CHAIN・ラクオリア創薬合同シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪
2. 発表標題 紫外線とイルジンSで誘発されるDNA損傷によるDNA複製阻害を回避する機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉本陽平, 増田雄司, 益谷央豪
2. 発表標題 DNA脱塩基部位-HMCESクロスリンクの複製と修復経路に関する生化学的解析
3. 学会等名 第12回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 益谷央豪, 金尾梨絵, 河合秀彦, 谷口俊恭, 高田穰
2. 発表標題 PCNAのユビキチン化によって制御されるヒト細胞の新規DNA損傷トレランス経路の検出
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会 放生研シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金尾梨絵, 河合秀彦, 谷口俊恭, 高田穰, 益谷央豪
2. 発表標題 ヒト細胞においてRFWD3はPCNAの翻訳後修復依存的なDNA損傷トレランスに關与する
3. 学会等名 44回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本陽平, 増田雄司, 益谷央豪
2. 発表標題 脱塩基部位のDNA損傷トレランス経路に關するタンパク質因子群の生化学的解析
3. 学会等名 日本遺伝学会93回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪
2. 発表標題 イルジンSで生じるDNA損傷に対するヒト細胞におけるDNA損傷トレランスの解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本陽平, 増田雄司, 益谷央豪
2. 発表標題 脱塩基部位-HMCESクロスリンクにおけるDNA損傷トレランス経路の生化学的解析
3. 学会等名 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田雄司, 汪佳, 益谷央豪
2. 発表標題 DNA損傷応答を制御するユビキチンリガーゼRFWD3の生化学的解析
3. 学会等名 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪
2. 発表標題 ヒト細胞におけるユビキチン化PCNAに依存するDNA損傷トランスの解析
3. 学会等名 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本陽平, 増田雄司, 益谷央豪
2. 発表標題 脱塩基部位を標的として機能するタンパク質因子群のDNA損傷トランス経路における役割
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会, 第50回記念大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪
2. 発表標題 ヒト細胞におけるPCNA のユビキチン化依存的なDNA損傷トランスの解析
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金尾梨絵, 益谷央豪
2. 発表標題 DNA付加体を形成するセスキテルペン化合物イルジンSを用いたDNA損傷トレランスの解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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
---------	---------