

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23247002

研究課題名(和文) 環境適応型DNA損傷ストレス耐性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Functional analysis of cellular tolerance to chronic genotoxic stress in *Saccharomyces cerevisiae*

研究代表者

菱田 卓 (Hishida, Takashi)

学習院大学・理学部・教授

研究者番号：60335388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,700,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷トレランス(DDT)は、DNA複製装置に含まれるDNAクランプ(PCNA)のユビキチン化修飾を介して複製阻害の解消に機能しており、慢性的なDNA損傷ストレス耐性において主要な役割を果たす。本研究では、研究代表者が同定したMgs1の解析を中心として、DNA損傷トレランス機構を制御する分子メカニズムの解析と、慢性的なDNA損傷が引き起こすゲノム不安定性や代謝機能への影響を解析した。その結果、Mgs1はDDT経路とDNA相同組換え経路の制御に関わることや、慢性的な紫外線損傷ストレスがトレハロースや活性酸素種のなどの代謝ストレスの増大を引き起こしていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：DNA damage tolerance (DDT) provides a mechanism to tolerate chronic genotoxic stress during replication, allowing the lesions to be repaired after replication, thus reducing the overall risk of genome instability. The post-translational modification of PCNA, proliferating cell nuclear antigen, by ubiquitination plays an important role in coordinating the process of DNA damage tolerance. Here we examined the effects of mutations in the Mgs1 ATPase, UBZ and C-terminal domains on DNA damage tolerance. The results demonstrate that the UBZ domain negatively regulates the DDT pathway, whereas the C-terminal domain stimulates the homologous recombination pathway, implicating a role for Mgs1 in the regulation of both pathways. We also found an increasing number of metabolic compounds, such as trehalose and reactive oxygen species, linked with the maintenance of genome integrity. These observations underscore the importance of metabolic functions on replication stress tolerance.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：DNA損傷 出芽酵母 DNA損傷トレランス

1. 研究開始当初の背景

生物のゲノム DNA では、様々な外的・内的要因による DNA 損傷が常に発生しており、生物はこのような慢性的な DNA 損傷ストレスに対する耐性能力を獲得することで様々な環境に適応してきた。しかしながら、微量ながらも長期に渡る損傷ストレスへの暴露は、ゲノム不安定性を引き起こす原因となるため、ヒトにおいては発がんや老化と密接に関連している。様々な DNA 損傷ストレスの中でも、紫外線による塩基損傷は日常的に発生している主要な外的要因の一つである。紫外線損傷が引き起こす最も重篤な障害として DNA 複製阻害があり、細胞死や突然変異を引き起こすことが知られている。そのため生物は、紫外線損傷応答機構を進化の過程で獲得してきており、DNA 損傷の修復を行うヌクレオチド除去修復 (NER) 機構や、損傷の程度に応じて細胞周期や遺伝子発現などを制御する DNA 損傷チェックポイント機構の他、DNA 複製阻害部位のバイパスを促進し複製の完了を保障する DNA 損傷トレランス (DDT; DNA damage tolerance) 機構が存在する。研究代表者によるこれまでの研究から、慢性的低線量率の紫外線 (CLUV; chronic low-dose UV) 環境下では、従来の急性紫外線照射に対して最も高い感受性を示す NER 経路の欠損株が増殖阻害を引き起こさない一方で、DDT 経路の欠損株 (*rad18Δ*株) が劇的な増殖阻害を引き起こすことを明らかにした (Hishida, T., et al. *Nature*, 2009)。この結果から、自然環境レベルの紫外線照射下においては、DNA 損傷トレランス機構が CLUV 耐性の獲得において中心的な役割を果たしていると考えられる。さらに、研究代表者が単離・命名した *MGS1* 遺伝子の解析から、*mgs1* 変異が DNA 複製阻害に応答したゲノム不安定性を引き起こすことや *mgs1Δrad18Δ* 二重変異株が合成致死を示すことを明らかにしてきた。このことは、*mgs1* 変異が DDT 経路を必要とする慢性的な複製ストレス環境に類似した状況を引き起こしていることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、CLUV 環境や *mgs1* 変異株を用いて、慢性的な複製ストレスに対する細胞の耐性機構の解明を目的としている。損傷耐性機構の中心的役割を果たす DDT 経路は、複製装置による DNA 損傷部位のバイパスを可能とするため、この制御異常は突然変異などのゲノム不安定性を誘発する原因となる。このような観点から、本研究においては、DDT 機構の制御に関わる *Mgs1* の複製ストレス応答における役割について、分子遺伝学、分子生物学、生細胞イメージングなどを組み合わせて明らかにする。さらに、慢性的な DNA 損傷ストレス環境におけるゲノム安定性の維持のメカニズムとストレスに応答した代謝物質の変動との関連性を明らかにする。これらの研究を基に、慢性的な DNA 損傷ストレス時の細

胞応答の包括的な理解を目指す。

3. 研究の方法

以下の3つの研究手法を用いて DDT 経路の詳細な解析を行った。

(1) *mgs1* 変異が引き起こす複製ストレスの実態や DDT 経路との関連性を明らかにするため、合成致死を抑制する多コピーサプレッサーの単離を行った。(2) *MGS1* は AAA⁺ATPase ファミリーに属するタンパク質をコードし、N 末にユビキチン化 PCNA と結合する UBZ ドメイン、C 末にバクテリアからヒトまで高度に保存された機能未知の領域を持っている。本研究では、様々な *mgs1* 変異体を作製し、DDT 経路の制御メカニズムの解析を行った。(3) 慢性的な複製ストレスが代謝及びゲノム安定性に及ぼす影響を解析するため、CLUV 照射後の酵母細胞を用いたメタボローム解析及び突然変異頻度の測定を行った。

4. 研究成果

(1) 本研究では、出芽酵母ゲノム全体をカバーするゲノムタイリングクローンコレクションを用いて、*mgs1-18 rad18Δ*株の高温感受性を抑制する多コピーサプレッサーの単離を試みた。その結果、84 株のサプレッサークローンを得ることができた。すべてのクローンプラスミド上のゲノム断片の塩基配列を決定後、*RAD18* や *MGS1* 遺伝子を除くクローンのサブクローニングにより責任遺伝子の同定を行った結果、6 種類の遺伝子の同定に成功した。しかしながら、いずれの候補遺伝子においても抑制効果は部分的であったことから、これら 6 種類の遺伝子を *GAL1* プロモーターの下流につなぎ、*mgs1-18 rad18* 株において過剰発現を行った結果、*STM1* 遺伝子が特に高い高温感受性の抑制効果を示した。*Stm1* は、リボソームや G4 DNA 二次構造への結合活性を持ち、翻訳制御やテロメアの安定性維持等に関与することが報告されているが、複製ストレス応答との関連性については不明である。さらに、*Stm1* の過剰発現は DDT 欠損株の DNA 損傷高感受性を抑制することがわかった。この結果は、*mgs1-18 rad18* 株の *Stm1* による抑制効果が DDT 経路のバイパス活性によるものであることを示唆している。

(2) *Mgs1* の過剰発現は DDT 経路を負に制御することによって DNA 損傷感受性を引き起こす。今回、様々な *Mgs1* 変異体を用いて DNA 損傷感受性について解析した結果、この感受性が UBZ ドメイン及び *Mgs1* の ATP 加水分解活性に依存して起こることを明らかにした。さらに、C 末領域を欠いた *Mgs1* は、DNA 損傷に対して極めて高い感受性を示すことがわかった。この高い DNA 損傷感受性は相同組換えの欠損によって抑制された。以上の結果から、*Mgs1* は UBZ ドメインを介して DDT 経路を抑制する一方で、C 末領域を介して相同組換え経路を制御する役割を果たしていることが示唆された。また、この C 末を介した組換

え制御が DNA 損傷チェックポイント経路による複製フォークの安定性維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

(3)-1、大阪大学大学院工学研究科の福崎研究室との共同研究により、CLUV 環境で培養した野生型酵母株及び DDT 経路の欠損株から得た粗抽出液を用いてメタボローム解析を行ったところ、CLUV ストレスを受けた DDT 経路欠損株特異的にトレハロースの細胞内濃度が上昇することを見出した。トレハロースは ROS などのストレスに反応して細胞内含量が増大することが知られていることから、CLUV 環境においても ROS が過剰に発生している可能性が示唆された。これと一致して、CLUV は活性酸素代謝に関わる Sod1 の欠損株の増殖阻害を引き起こすことを明らかにした。

(3)-2、CLUV ストレスによってつくられるピリミジンダイマーはヌクレオチド除去修復 (NER) によって修復される。今回、NER 欠損細胞を CLUV 環境において培養後、CAN1 遺伝子の変異によるカナバニン耐性の獲得を指標として突然変異頻度を測定した。その結果、経時的に C から T への突然変異の上昇が観察され、特に興味深い点としてこの変異が転写の鋳型鎖において顕著に生じていることが明らかになった。この結果は、DNA 損傷による転写の阻害が突然変異の誘発に関与していることを示唆している。さらに、CLUV 環境下で継代培養による長時間 (~6 日間) に渡る突然変異頻度の測定を行ったところ、培養開始後数日は突然変異頻度の顕著な上昇が観察されたが、培養 3 日目以降に急激に頻度が低下するという興味深い結果が得られた。そして継代培養時の細胞の DNA 含量を FACS 解析により調べたところ、3 日目以降に二倍体化した細胞の割合が顕著に増大することを見いだした。したがって、突然変異頻度の急激な低下は、細胞の二倍体化 (遺伝子を 2 コピー持つこと) を反映したものであると考えられる。このように、慢性的に発生する致死的でない DNA 損傷ストレスが倍数性の増加を引き起こすという興味深い結果が得られた。

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 4 件)

Keyamura, K., Arai, K., *Hishida, T. (2016). Srs2 and Mus81-Mms4 Prevent Accumulation of Toxic Inter-homolog Recombination Intermediates. *PLoS Genet.* in press.

Keyamura, K., Sakaguchi, C., Kubota, Y., Niki, H., *Hishida, T. (2013). RecA protein recruits structural maintenance of

chromosomes (SMC)-like RecN protein to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* 288: 29229-29237.

Haruta, N., Kubota, Y., *Hishida, T. (2012). Chronic low-dose ultraviolet induced mutagenesis in nucleotide excision repair-deficient cells. *Nucleic Acids Res.* 40:8406-8415.

*Masuda, Y., Suzuki, M., Kawai, H., Hishiki, A., Hashimoto, H., Masutani, T., Hishida, T., Suzuki, F., Kamiya, K. (2012). En bloc transfer of polyubiquitin chains to PCNA in vitro is mediated by two different human E2-E3 pairs. *Nucleic Acids Res.* 40:10394-10407.

[学会発表](計 26 件)

Ishige, D., Keyamura, K., Hasegawa, Y., Iwasaki, H., and Hishida, T. A genetic screen for genes that suppress the temperature sensitivity of mgs1-18 rad18Δ cells in *Saccharomyces cerevisiae*. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1 日、神戸

長谷川ゆき、毛谷村賢司、重森 悠、菱田 卓 複製ストレス応答における出芽酵母 Mgs1 の役割。第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2015 年 10 月 19 日、静岡

塩入拓馬、毛谷村賢司、田中修平、菱田 卓 慢性的な低線量率紫外線照射下における出芽酵母 NER 欠損株の動態解析。第 87 回日本遺伝学会、2015 年 9 月 24 日、東北大学川内北キャンパス

石毛大輔、毛谷村賢司、長谷川ゆき、岩崎博史、菱田 卓 出芽酵母における複製ストレス応答に関わる新たな因子の探索。第 87 回日本遺伝学会、2015 年 9 月 24 日、東北大学川内北キャンパス

吉田麻美、毛谷村賢司、菱田 卓 DNA 損傷ストレス応答に影響を及ぼすヒストン変異体の解析。第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、横浜
菱田 卓 慢性的な紫外線損傷ストレスに対する耐性獲得に関与するヌクレオソーム構造。第 57 回日本放射線影響学会、2014 年 10 月 1 日、鹿児島

毛谷村賢司、新井康太、菱田 卓 相同染色体間の DNA 相同組換え制御メカニズムの解析。第 85 回日本遺伝学会、

ワークショップ、2013年9月19日、慶
応義塾大学日吉キャンパス
菱田 卓、慢性的な紫外線照射による突
然変異の誘起メカニズム。放射線影響学
会第55回大会(招待講演)、2012年9月
6日、仙台

〔図書〕(計2件)

菱田 卓、ゲノムを司るインターメア：
非コードDNA領域のDNA損傷応、化学同
人、2015、pp161-174。
菱田 卓、ノーベル化学賞：DNA修復の
分子メカニズムの解明、パリテイ、2015、
Vol.30 No.12、pp43-45.

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.gakushuin.ac.jp/univ/sci/bio/
laboratory/detail_hishida/theme.html](http://www.gakushuin.ac.jp/univ/sci/bio/laboratory/detail_hishida/theme.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菱田 卓 (HISHIDA Takashi)
学習院大学・理学部・教授
研究者番号：60335388