

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：82502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26550034

研究課題名(和文) DNAポリメラーゼによる新規変異誘発機構に関する研究

研究課題名(英文) Novel mutagenic pathway involving DNA polymerase

研究代表者

鹿園 直哉 (Shikazono, Naoya)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・関西光科学研究所 量子生命科学部・部長(定常)

研究者番号：10354961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、クラスターDNA損傷の未知の変異誘発機構に対する知見を得るため、クラスターDNA損傷において変異誘発性のDNA損傷があるDNA鎖がDNAポリメラーゼにより優先的に複製されかどうかの検証を行った。検証を行うため、新たなプラスミド作製法を開発し、クラスターDNA損傷を有するプラスミドDNAの各々の鎖のどちらを複製に用いているかを調べる実験系を構築した。本研究で開発した実験系を用いて調べた結果、(1)クラスターDNA損傷の周囲は一方の鎖が優先的に複製されること、また、(2)一方の鎖が優先的に複製される範囲は数十塩基対であり、(3)優先的複製はPollに依存すること、を突き止めた。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to gain insight into the unknown mechanism of cluster DNA damage-induced mutagenesis, we investigated whether DNA strand with mutagenic DNA damage is preferentially replicated by DNA polymerase(s). We developed a new method for constructing plasmids that can determine the fraction of DNA strand used as the template for replication in plasmids carrying cluster DNA damage. Using plasmids constructed by the method developed in this study, we found that (1) one of the strand is preferentially replicated around cluster DNA damage, and (2) several tens of base pairs in length are preferentially replicated, and (3) the preferential replication is mediated by Poll.

研究分野：放射線生物学

キーワード：クラスターDNA損傷 変異メカニズム

1. 研究開始当初の背景

放射線による突然変異誘発機構において、クラスターDNA 損傷は突然変異を高頻度に誘発する主要な要因であることが示唆され、注目されていた (Nucleic Acids Res. 37:4430-4440 (2009), Mutat Res., 732: 34-42 (2012), Mutat Res., 49:9-15 (2013))。一連のクラスターDNA 損傷誘発突然変異研究の中から、損傷塩基 (8-オキシグアニン) の除去能を欠損する株 (*fpg* 欠損突然変異株) において、8-オキシグアニンの相補鎖に複製阻害を生じる損傷があるクラスターDNA 損傷は単独の8-オキシグアニンに比べ変異頻度がほぼ2倍になるという興味深い現象が見出された。損傷の修復ができないということのみが突然変異を誘発する原因であると考え、クラスターDNA 損傷であろうが単独損傷であろうが変異頻度は変化しないはずであり、上記結果は説明が困難である。したがって、損傷の修復とは別なメカニズムがクラスターDNA 損傷による変異誘発に関与している可能性が考えられた。しかしながら、その詳細な機構に関しては不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、クラスターDNA 損傷誘発突然変異に関わる未知のメカニズムの存在を示すととともに、その詳細に関して知見を得ることを目指した。研究代表者は、クラスターDNA 損傷内に複製阻害を生じる損傷があることから、変異誘発能をもつDNA 損傷があるもう一方の鎖の情報を優先的に複製の鋳型とする変異誘発機構が存在すると考えた (図1)。図1においては、複製阻害を生じるDNA 鎖切断と変異誘発能を有する塩基損傷である8-オキシグアニン (8-oxoG) から構成されるクラスターDNA 損傷の場合を示してある。DNA 鎖切断のため、レプリソームは複製の鋳型としてDNA 鎖切断が生じた鋳

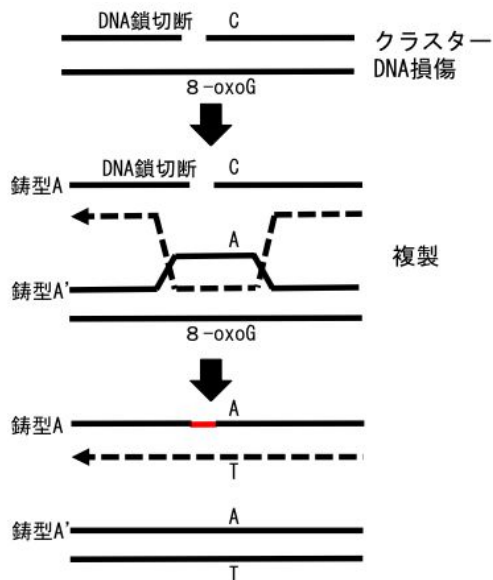


図1. 複製阻害を生じる損傷 (DNA鎖切断) を有するクラスターDNA 損傷において、一方の鎖を優先的に複製して変異誘発を生じる機構 (仮説)

型 A を用いず、鋳型を乗り換えて複製を終えた鋳型 A' を用いて複製するという仮説が示してある。本研究では、一方の鎖を優先的に複製の鋳型として使用する変異誘発メカニズムを調べることを目的として研究を進めた。さらに、一方の鎖を優先的に鋳型として複製が進行するためには、レプリソームが鋳型を乗り換えることが必要となる。研究代表者は、複製を担う DNA ポリメラーゼ自身が複製阻害に起因して鋳型乗り換え活性を示す可能性を考慮して研究を進めた。

3. 研究の方法

細胞内での鋳型乗り換え活性を調べることを可能とする実験系を確立し、その実験系を用いて研究を行った。

化学合成した DNA 損傷を組み合わせ構成したクラスターDNA 損傷が環状のプラスミド上に配置された DNA 基質は、クラスターDNA 損傷の変異誘発機構を分子遺伝学的に調べるために大変適したものであると考えられる。しかしながら、これまでプラスミドにクラスターDNA 損傷を配置させる手法として主に用いられてきたのは、クラスターDNA 損傷が配置されたオリゴヌクレオチドと制限酵素で切断されたプラスミドをライゲーションによって連結するというものであった。この手法では多量体や末端にオリゴヌクレオチドが連結した線状のプラスミドといった目的とする環状のプラスミド以外の産物も作製されてしまうという難点がある。そこで、まずクラスターDNA 損傷を有する環状プラスミド基質のみを作製する手法に関して研究を進めた。また、ミスマッチを目印に鋳型の乗り換えが生じている領域を推定することを目指し、クラスターDNA 損傷とミスマッチを含んだプラスミド DNA の作製を試みた。さらに、作製したプラスミドを大腸菌内に導入し、鋳型乗り換え活性に影響を与える遺伝子を破壊した突然変異株を見出して、クラスターDNA 損傷誘発変異機構に関する手掛かりを得るというアプローチで研究を進めた。

4. 研究成果

クラスターDNA 損傷を含む環状プラスミドは、Karata らが開発した DNA 損傷を含む 1 本鎖環状プラスミド DNA 合成法 (DNA Repair 8:852-856 (2009)) を改変して作製した。その方法は、まず (1) ウラシルを含む 1 本鎖 DNA を鋳型として DNA 損傷が入ったオリゴヌクレオチドをプライマーとして DNA 合成を行い、(2) DNA 損傷を含む第 1 鎖の 1 本鎖の環状 DNA 鎖を合成し、(3) その後ウラシルを含む鋳型鎖を、ウラシル DNA グリコシラーゼ、エキソヌクレアーゼで消化後、(4) 再び DNA 損傷をもつオリゴヌクレオチドをプライマーとして DNA 損傷を含む 1 本鎖の環状 DNA 鎖を鋳型として第 2 鎖の DNA を合成し、目的の環状プラスミドを作製するというものである (図2)。本研究では、DNA の各々の鎖のど

こちらを複製の鋳型に用いたかを調べることを可能とするために、ミスマッチを導入したプライマーも作製時に加えて DNA 損傷とミスマッチそれぞれを有する環状プラスミド DNA の合成を行った (図 2)。

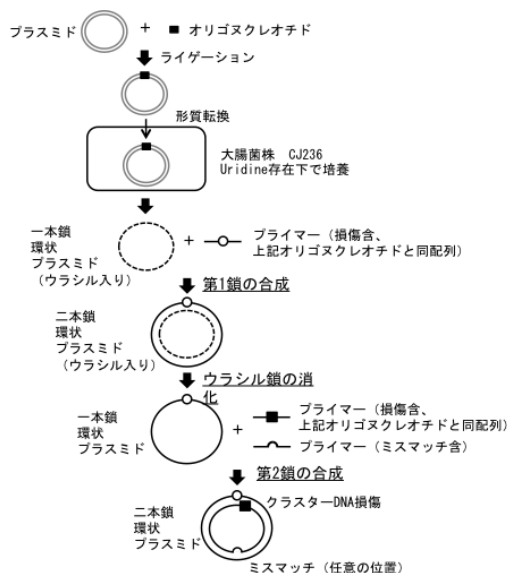


図2. クラスターDNA損傷を有する環状プラスミドを作製する手順

DNA 損傷がプラスミドに導入されていることは、DNA 損傷を認識しその位置で鎖切断を引き起こす塩基除去修復酵素 (Fpg や Nth) を利用して解析するとともに、大腸菌にプラスミドを形質転換後、DNA 損傷のクラスター化により変異誘発頻度が高くなることにより確認した。一方、ミスマッチが導入されているかどうかは、プラスミド複製後、ミスマッチ部位に挿入した配列を認識する制限酵素の切断効率により調べた。DNA 損傷とミスマッチが約 1800bp 離れて位置するプラスミド DNA を作製して実験を行ったところ、損傷がない場合、単独の損傷を有する場合、クラスターDNA 損傷を有する場合で、DNA 複製の鋳型として使用される DNA 鎖の割合は大きく変化せず、少なくともクラスターDNA 損傷から 1800bp 離れた位置では、変異誘発能を有する損傷 (8-オキソグアニン) の相補鎖 (の情報) は喪失しない、すなわち一方の鎖の優先的な複製は起こっていない、ことが示唆された (図 3)。

続いて、一方の鎖の優先的な複製は、クラスターDNA 損傷からの距離に依存するのかわかを調べる実験を進めた。ミスマッチはクラスターDNA 損傷を構成する 8-オキソグアニンから上流 138bp と 21bp、及び、下流 22bp と 246bp に配置した。実験を行った結果、上流 138bp と下流 246bp の位置ではどちらの鎖も同程度の割合で複製されていることが示唆されたが、上流 21bp と下流 22bp の位置では 8-オキソグアニンがある鎖が優先的に複製されることがわかった。この結果は、クラスターDNA 損傷の変異誘発機構には、数十塩基対といった短い領域で、変異誘発性 DNA 損

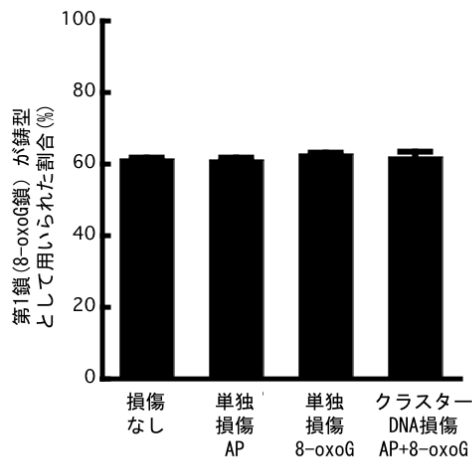


図3. 損傷から1800bp離れた位置において第1鎖(8-oxoGがある鎖)が鋳型として用いられた割合

傷がある鎖を優先的に複製する機構が存在することを示唆する。また、PolII を欠損すると上流 138bp と下流 246bp の位置においても 8-オキソグアニンがある鎖が優先的に複製される傾向が観察され、鋳型の優先性を示す領域が数百塩基対以上に拡大することを見出した。

さらに、変異過程に関わる PolII をコードする *polA* 遺伝子の突然変異株を用いて、複製時の分子機構を調べ、クラスターDNA 損傷を含む分子の複製過程に対するさらなる知見を得ることを目指して研究を行った。具体的には、PolII が有する 5' エキソヌクレアーゼ活性、または、3' エキソヌクレアーゼ活性を欠損した突然変異株を作製し、一方の DNA 鎖が鋳型として使われる範囲を調べた。その結果、3' エキソヌクレアーゼ活性を欠損した PolII 変異株では野生型との違いが見られなかったが、5' エキソヌクレアーゼ活性を欠損した PolII 変異株では一方の DNA 鎖が鋳型として使われる範囲が狭まることが示唆された。このことは PolII の 5' エキソヌクレアーゼ活性がクラスターDNA 損傷の変異誘発に関わる複製過程の範囲を規定している可能性を示している。一方、DNA 組換え過程の関与も想定されることから、相同組換えに関与する *recA* 遺伝子の欠損突然変異株を用いて同様の実験を行ったが、一方の鎖の優先的な複製の範囲に関して RecA の機能の関与は認められなかった。

本研究では、クラスターDNA 損傷の変異誘発機構には変異誘発性の DNA 損傷がある DNA 鎖が DNA ポリメラーゼにより優先的に複製される過程が関与するという仮説を立て、それを検証した。本研究においては新たなプラスミド作製法を開発し、さらにクラスターDNA 損傷を有するプラスミド DNA の各々の鎖のどちらを優先的に複製に用いるかを調べることを可能とする実験系を構築した。本研究で開発した実験系を用いて調べた結果、(1) クラスターDNA 損傷の周囲では一方の鎖が優先的に複製されること、また、(2) 一方の

鎖が優先的に複製される範囲は数十塩基対であり、(3)その優先的複製の範囲は PoII に依存すること、を突き止めた。PoII 非存在下でも一方の鎖が優先的に複製される現象が存在することが示されたが、どのようなメカニズムによるものかはわかっていない。一方の鎖の優先的な複製の範囲は *recA* 欠損変異株と野生型とでは差が見られないことを考えると、クラスターDNA 損傷における鋳型乗り換えは通常 PoII が行い、PoII 非存在下では RecA が関与する可能性がある。以上まとめると、本研究では DNA 損傷が局所的に複数個存在する「クラスターDNA 損傷」に対する変異誘発機構の解明を通じ、DNA 複製が関与する新たな変異誘発機構の重要な手がかりを得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) E. Sage and N. Shikazono, Radiation-induced clustered DNA lesions: repair and mutagenesis *Free Rad. Med. Biol.* 107:125-135 (2017), DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2016 査読有
- (2) M. Takahashi, K. Akamatsu and N. Shikazono, A polymerization-based method to construct a plasmid containing clustered DNA damage and a mismatch, *Anal. Biochem.* 510:129-135, (2016) DOI:10.1080/09553002.2017.1239849, 査読有
- (3) 鹿園直哉 放射線生物影響の原因となる DNA 損傷の塊、*Isotope News*, 738:6-10 (2015)、https://www.jrias.or.jp/books/pdf/201510_TENBO_SHIKAZONO.pdf, 査読無

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) N. Shikazono and K. Akamatsu, Detection and mutagenic potential of clustered DNA lesions, 17th International Symposium on Microdosimetry, 2017, Venice, Italy
- (2) 高橋桃子、赤松憲、鹿園直哉 クラスターDNA 損傷及びミスマッチを有するプラスミドの作製法の開発、日本放射線影響学会、2016、広島市
- (3) N. Shikazono and K. Akamatsu, Biological consequences of clustered DNA damage in *Escherichia coli*, 15th International Congress of Radiation Research, 2015, 京都市
- (4) 鹿園直哉、赤松憲 クラスターDNA 損傷による変異誘発における DNA ポリメラーゼの関与、第 57 回日本影響学会 2014, 鹿児島市

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 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
鹿園 直哉 (SHIKAZONO, Naoya)
国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・関西光科学研究所 量子生命科学研究部・部長(定常)
研究者番号：10354961

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()