

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26740017

研究課題名(和文) PCNAのマルチユビキチン化による複製阻害回避機構の解明

研究課題名(英文) Rescue of arrested replication forks by multiple ubiquitination of PCNA

## 研究代表者

金尾 梨絵 (Kanao, Rie)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：30542287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷によって起こるDNA複製阻害を回避するメカニズムはDNA損傷トレランスと呼ばれている。DNA損傷トレランスの制御には細胞増殖核抗原(PCNA)の164番目のリジン(K164)の翻訳後修飾が重要であると考えられている。本研究では、1つのPCNAリング上にK164が3つあることに着目し、その3ヶ所のK164が同時にユビキチン化を受けることで制御されるDNA損傷トレランス機構の解析を行った。K164に変異を導入したPCNAを発現した細胞株のDNA損傷剤に対する応答を解析した。

研究成果の概要(英文)：DNA damage tolerance is an important mechanism to prevent DNA replication arrest by DNA damage. It is suggested that DNA damage tolerance is regulated by post-translational modifications of PCNA at K164. PCNA forms a ring-shaped structure consist of homo-trimeric PCNA molecules, which means a single PCNA ring have three modifiable K164. In this study, I investigated the mechanism of DNA damage tolerance pathway which is regulated by simultaneously mono-ubiquitinated PCNA on three K164 in a ring. I analyzed the responses of the cells expressing ectopic PCNA mutated at K164 to DNA damaging agents.

研究分野：DNA修復

キーワード：DNA損傷トレランス PCNA モノユビキチン化 損傷乗り越え複製

### 1. 研究開始当初の背景

DNA 上の損傷は、DNA 複製の阻害要因となり、突然変異や細胞の老化、癌化の原因となりうる。そのため細胞には DNA 損傷にตอบสนองする様々なメカニズムが備わっており、その1つに DNA 損傷による複製阻害を回避するメカニズムがある。このメカニズムは DNA 損傷トランスと呼ばれている。真核細胞の DNA 損傷トランスには細胞増殖核抗原(PCNA)の翻訳後修飾が重要であることが明らかになってきている。特に 164 番目のリジン(K164)のモノユビキチン化は損傷乗り越え複製(TLS)に重要であることが示唆されている。しかし、PCNA の翻訳後修飾のヒト細胞における生理的意義は不明な点も多い。また、PCNA はホモ三量体でリング構造をとり機能しており、1つの PCNA リング上には K164 が3ヶ所存在する。しかし、これまでの研究では3ヶ所の K164 のうち何ヶ所が翻訳後修飾を受けているのかを考慮した研究はほとんどなされていない。研究代表者らは K164 をアルギニンに置換した点変異体 PCNA(PCNA[KR])を恒常的に発現したヒト細胞株を樹立し、解析を行ってきた。その解析から、PCNA 三量体が全てユビキチン化される(マルチユビキチン化)ことにより何らかの DNA 損傷トランスが機能することが示唆された。

### 2. 研究の目的

ヒト細胞におけるマルチユビキチン化 PCNA の DNA 損傷トランスにおける役割を明らかにすることを目的とする。これにより不明な点が多いヒト細胞の DNA 損傷トランスの分子メカニズムの一端が明らかになることが期待される。

### 3. 研究の方法

研究代表者らが作成した PCNA 被修飾部位点変異体 PCNA(PCNA[KR])を恒常的に発現するヒト細胞株を用いて解析を行う。紫外線損傷に対するヒト細胞の DNA 損傷トランスの主要な経路は DNA ポリメラーゼ・イータ(Pol $\eta$ )による TLS である。本研究開始までの研究代表者らの解析から、紫外線損傷に対して、マルチユビキチン化 PCNA は Pol $\eta$  による TLS に加えて別の DNA 損傷トランス経路を制御することが示唆されていた。しかし、紫外線損傷に対する Pol $\eta$  による TLS 以外の DNA 損傷トランス経路はマイナーな経路であると考えられるため、解析が困難である。そこで、研究代表者らは本研究で、DNA 複製を阻害する DNA 損傷剤 A を用いることとした。この DNA 損傷剤に対して、Pol $\eta$  を欠損する細胞は正常細胞と同等の感受性を示すが、PCNA をモノユビキチン化する酵素である RAD18 の欠損細胞は高感受性を示すことが報告されている。このため、DNA 損傷剤 A は PCNA のモノユビキチン化が制御する、Pol $\eta$  による TLS 以外の DNA 損傷トランス経路の解析に適していると考えられる。そのため本研究では DNA

損傷剤 A に対する PCNA[KR]発現細胞の応答を中心に解析することとした。

### 4. 研究成果

#### (1) DNA 損傷剤に対する点変異体 PCNA 発現細胞の解析

本研究で用いた DNA 損傷剤 A に対して、PCNA[KR]を恒常的に発現し、マルチユビキチン化 PCNA を減少させた細胞株では野生型 PCNA のみを発現する細胞株よりも高感受性を示した。このことから DNA 損傷剤 A で生じる DNA 損傷に対する DNA 損傷トランス経路にはマルチユビキチン化 PCNA が関与している可能性が示唆された。

#### (2) PCNA マルチユビキチン化と転写と共役した修復の関連

DNA 損傷剤 A に対しては、RAD18 欠損細胞の他に、転写と共役した修復(TCR)因子の欠損細胞でも高感受性を示すことが報告されている。本研究では、PCNA のマルチユビキチン化が TCR に関与するかどうかを検討した。その結果、PCNA のマルチユビキチン化が TCR に関与する可能性は低いと考えられたため、PCNA のマルチユビキチン化が関与する DNA 損傷トランス機構の解析に進んだ。

#### (3) マルチユビキチン化 PCNA と既知の DNA 損傷トランス経路の関連

PCNA のマルチユビキチン化が既知の DNA 損傷トランス経路を制御する可能性を検討するため、Pol $\eta$ 以外の TLS ポリメラーゼなどの既知の DNA 損傷トランス因子とマルチユビキチン化 PCNA との関連を調べた。

#### (4) マルチユビキチン化 PCNA が制御する経路に關する因子の探索

マルチユビキチン化 PCNA が制御する DNA 損傷トランス経路のメカニズムを明らかにするため、この経路に關する因子の探索を行った。その結果、ノックダウンすることで DNA 損傷剤 A に対する感受性が亢進する因子を見出した。本研究で見出した因子が DNA 損傷トランスに關与しているという報告はこれまでになく、この因子の解析から DNA 損傷トランスの解析に新たな展開が期待される。

#### (5) マルチユビキチン化 PCNA が制御する DNA 損傷トランス経路の解析

(4)で見出した新たな因子をノックダウンした細胞で DNA 損傷剤 A に対する細胞応答を解析した。この解析により、本研究で新たに見出した因子のノックダウン細胞とマルチユビキチン化を減少させた細胞が共に DNA 損傷剤 A に高感受性を示すことがわかった。本研究成果から、Pol $\eta$ による TLS 以外の DNA 損傷トランス経路の解析が可能になったと考えられる。Pol $\eta$ による TLS 以外の DNA 損傷トランス経路の解析は国内外で難航しており、本研究によりヒト細胞の DNA 損傷トランス

ンス経路の解明が進展することが期待される。また、研究代表者はこの経路に関わることが示唆される新たな因子を見出し、本研究で得られた成果は今後新たな DNA 損傷トレランス経路の詳細な分子メカニズムの解明につながることを期待される。

#### 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 5 件)

Kashiwaba S, Kanao R, Masuda Y, Kusumoto-Matsuo R, Hanaoka F, Masutani C.: USP7 Is a Suppressor of PCNA Ubiquitination and Oxidative Stress-Induced Mutagenesis in Human Cells. *Cell Reports*, 13, 2072-2080 (2015) doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.014 査読あり

Masuda Y, Kanao R, Kaji K, Ohmori H, Hanaoka F, Masutani C.: Different types of interaction between PCNA and PIP boxes contribute to distinct cellular functions of Y-family DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 43, 7898-7910 (2015) doi: 10.1093/nar/gkv712 査読あり

Kanao R, Yokoi M, Ohkumo T, Sakurai Y, Dotsu K, Kura S, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Masutani C, Hanaoka F: UV-induced mutations in the epidermal cells of mice defective in DNA polymerase h and/or i. *DNA Repair (Amst.)*, 29, 139-146 (2015) doi:10.1016/j.dnarep.2015.02.006 査読あり

Kanao R, Masuda Y, Deguchi S, Yumoto-Sugimoto M, Hanaoka F, Masutani C. Relevance of Simultaneous Mono-Ubiquitinations of Multiple Units of PCNA Homo-Trimers in DNA Damage Tolerance. *PLoS One* 10, e0118775 (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0118775 査読あり

Shibutani T, Ito S, Toda M, Kanao R, Collins LB, Shibata M, Urabe M, Koseki H, Masuda Y, Swenberg JA, Masutani C, Hanaoka F, Iwai S, Kuraoka I. Guanine-5-carboxylcytosine base pairs mimic mismatches during DNA replication. *Sci Rep* 4, 5220 (2014) doi: 10.1038/srep05220 査読あり

[学会発表](計 8 件)

金尾梨絵, 増田雄司, 益谷央豪 .PCNA の翻訳後修飾が制御する DNA 損傷トレランス機構. 日本薬学会第 137 年会, 2017.3, 仙台. (ポスター)

金尾梨絵, 増田雄司, 益谷央豪 .PCNA の翻訳後修飾が制御する DNA 損傷トレランスの解析 第39回日本分子生物学会年会, 2016.12, 横浜. (ポスター)

Kanao R, Kashiwaba S, Masuda Y, Kusumoto-Matsuo R, Hanaoka F, Masutani C. Suppression of PCNA ubiquitination and oxidative stress-induced mutagenesis by USP7. The 10th 3R (Replication, Recombination and Repair) symposium, 2016.11, Matsue. (ポスター)

金尾梨絵, 柏葉脩一郎, 増田雄司, 松尾(楠本)理加, 花岡文雄, 益谷央豪. PCNA のモノユビキチン化の制御によるヒト細胞での酸化的 DNA 損傷誘発突然変異抑制機構. 日本薬学会 第 136 年会, 2016. 3, 横浜 (口演)

Kanao R, Masuda Y, Hanaoka F, Masutani C. Regulation of DNA damage tolerance by simultaneous mono-ubiquitinations of multiple-units of PCNA in human cells. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015. 10, 名古屋 (ポスター)

金尾梨絵, 柏葉脩一郎, 増田雄司, 松尾(楠本)理加, 花岡文雄, 益谷央豪. 酸化損傷によって誘導される PCNA のモノユビキチン化を制御する新規メカニズムの解析. 第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ, 2015.10, 焼津 (口演)

金尾梨絵, 増田雄司, 花岡文雄, 益谷央豪: ヒト細胞における PCNA の翻訳後修飾による DNA 損傷トレランス制御機構の解析. 平成 26 年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム, 2015.1, 東京 (ポスター)

金尾梨絵, 増田雄司, 花岡文雄, 益谷央豪. 変異体 PCNA 発現ヒト細胞を用いた DNA 損傷トレランス制御の解析. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2014.11, 横浜 (ポスター)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 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 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

金尾 梨絵 (KANAOKA, Rie)  
名古屋大学・環境医学研究所・助教  
研究者番号：30542287

##### (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

( )