

## 内因性の主要な DNA 損傷である脱塩基損傷の 新規修復メカニズムの発見

名古屋大学大学院医学系研究科 分子機能薬学(研究当時)の杉本 陽平(すぎもと ようへい)大学院生と名古屋大学環境医学研究所ゲノム動態制御分野(同大学大学院医学系研究科協力講座)の増田 雄司(ますだ ゆうじ)准教授、金尾 梨絵(かなお りえ)助教、益谷 央豪(ますたに ちかひで)教授の研究チームは、大阪大学大学院基礎工学研究科の岩井成憲(いわい しげのり)教授、大阪大学大学院理学研究科附属フォアフロント研究センターの三宅ゆみ(みやけ ゆみ)特任研究員と共同で、DNA 脱塩基損傷<sup>\*1</sup> の新規修復メカニズムを明らかにしました。本研究成果は、英国の科学雑誌「Nucleic Acids Research」(2023年4月6日付けの電子版)に掲載されました。細胞内の代謝産物等に起因して生じる内因性の DNA 損傷は、老化や発がん過程に関与すると考えられています。DNA 脱塩基損傷は最も頻繁に生じる内因性の DNA 損傷の一つであり、塩基除去修復<sup>\*2</sup> というメカニズムにより修復されますが、それでもヒトの組織では1細胞あたり 50,000–200,000 か所の脱塩基損傷が蓄積しています。DNA 脱塩基損傷は、遺伝情報が欠落した損傷である点と、化学的に不安定な構造を介して DNA 鎖の切断を生じる点に特徴があります。DNA 複製の際、鋳型となる DNA の一本鎖上に露出した脱塩基損傷は、遺伝情報の欠落により DNA ポリメラーゼ<sup>\*3</sup> の進行を妨げるだけでなく、DNA 鎖の切断に伴う重篤な DNA 二本鎖切断を引き起こし、細胞死を誘導します。

近年、海外の研究グループは、DNA 脱塩基損傷と共有結合し、DNA-タンパク質クロスリンク<sup>\*4</sup> を形成することによって脱塩基部位での DNA 鎖の切断を防ぐタンパク質 HMCES を発見し、DNA 脱塩基損傷から細胞を保護する役割として DNA-HMCES タンパク質クロスリンクの重要性を指摘しました。一方で、この DNA-HMCES クロスリンク自体がより大きな DNA 損傷であり、DNA-HMCES クロスリンクが損傷のない元の DNA に修復されるメカニズムは不明のままでした。本研究では、この DNA-HMCES クロスリンク損傷の修復過程を世界で初めて明らかにしました。

### ポイント

- DNA 脱塩基損傷は最も頻繁に生じる内因性の DNA 損傷の一つであり、細胞死や突然変異誘発の原因になると考えられている。
- DNA 脱塩基損傷の修復に関与する HMCES タンパク質は、DNA 脱塩基損傷に共有結合し、より大きな DNA 損傷である DNA-タンパク質クロスリンクを形成するが、その修復メカニズムは不明であった。
- 本研究では、DNA-HMCES クロスリンク損傷の修復過程を世界で初めて明らかにした。

## 1. 背景

細胞内の代謝産物等に起因して生じる内因性の DNA 損傷は、老化や発がん過程に関与すると考えられています。DNA 脱塩基損傷は、電離放射線や紫外線、様々な化学物質等による外因性の化学作用のみならず、内因性の代謝産物や酸化ストレスを介した化学反応や、損傷 DNA の修復過程の酵素反応によって、最も頻繁に生じる DNA 損傷の一つであり(図1A)、細胞死や突然変異誘発の原因となります。また、抗ウイルスタンパク質 APOBEC による副反応、免疫細胞での体細胞超突然変異、受精卵の初期化の過程においても酵素反応的に生じ、その修復メカニズムの重要性は生命現象の多岐に及びます。細胞は DNA 脱塩基損傷の修復メカニズムを備えており、二本鎖 DNA 上の脱塩基損傷は塩基除去修復という一連の酵素反応により修復されますが(図1A)、それでもヒトの組織では 1 細胞あたり 50,000-200,000 か所の脱塩基損傷が蓄積しています。DNA 脱塩基損傷は、遺伝情報が欠落した損傷である点と、化学的に不安定な構造を介して DNA 鎖が切断する点に特徴があります。DNA 複製の際には、鋳型となる DNA の一本鎖上に露出した脱塩基損傷は 遺伝情報の欠落により DNA ポリメラーゼの進行を妨げるだけでなく、DNA 鎖の切断が伴うことで、より重篤な DNA 二本鎖切断を引き起こし、細胞死を誘導します(図 2)。

近年、海外の研究グループは、DNA 脱塩基損傷に特異的に共有結合し、化学的により安定であるチアゾリジン<sup>※5</sup>構造を伴って DNA-タンパク質クロスリンクを形成する、HMCES タンパク質を発見しました(図1B、図 2)。この HMCES タンパク質を欠損した培養細胞では、DNA 二本鎖切断が増加するなど DNA 脱塩基損傷に対してより感受性になることから、DNA 脱塩基損傷から細胞を保護する役割として、DNA-HMCES クロスリンクの重要性が指摘されていました。一方で、この新たな DNA 損傷である DNA-HMCES クロスリンクが DNA 複製に与える影響と、DNA-HMCES クロスリンク損傷が損傷のない元の DNA に修復されるメカニズムは不明でした。

## 2. 研究成果

本研究チームは、DNA-HMCES クロスリンク損傷が DNA 複製に与える影響を調べるために、まず大腸菌を利用して生産したヒトの HMCES タンパク質を精製し、DNA 脱塩基損傷を含む人工合成した DNA と試験管内で反応させることにより、DNA-HMCES クロスリンク損傷を含む一本鎖の人工合成 DNA(一本鎖 HMCES クロスリンク DNA)を作製する方法を開発しました。次に、この一本鎖 HMCES クロスリンク DNA を鋳型とした DNA 複製反応を試験管内で再現する実験手法により解析したところ、DNA-HMCES クロスリンク損傷は脱塩基損傷よりも強く DNA ポリメラーゼの進行を妨げることを見出しました。この結果から本研究チームは、DNA-HMCES クロスリンク損傷は、損傷部位を直接鋳型として DNA 複製されるのではなく、姉妹染色分体の相同性を利用した複製メカニズム<sup>※6</sup>によって複製される可能性を示唆しました。

次に姉妹染色分体を利用した複製メカニズムによって生じたと考えられる、二本鎖 DNA-HMCES クロスリンク損傷の安定性を測定しました。すると、一本鎖 HMCES クロスリンクが非常に安定であることに對して、二本鎖 DNA-HMCES クロスリンクはより速やかに半減期 3.5 時間で DNA から解離することを見出しました(図 2)。この結果は、DNA-HMCES クロスリンク損傷が姉妹染色分体を利用した複製メカニズムによって二本鎖 DNA-HMCES クロスリンクに変換されると、HMCES が逆反応により解離することで元の DNA 脱塩基損傷に復帰し、この DNA 脱塩基損傷が通常の塩基除去修復

によって修復されるメカニズムの存在を示唆しています(図 2)。

先行研究では、DNA-HMCES クロスリンクの HMCES タンパク質部分はプロテアソーム<sup>※7</sup>によって消化され、第三の DNA 損傷である、DNA-チアゾリジン損傷が生じる可能性が示唆されていましたが(図 1B)、この DNA-チアゾリジン損傷が DNA 複製に与える影響と、DNA-チアゾリジン損傷が損傷のない元の DNA に修復されるメカニズムは不明でした。そこで、一本鎖 HMCES クロスリンク DNA をタンパク質消化酵素で処理し、HMCES タンパク質の大部分を除去することで、DNA-チアゾリジン損傷が露出した一本鎖 DNA を作製する方法を開発しました。次に、DNA-チアゾリジン損傷が DNA 複製に与える影響を試験管内での DNA 複製反応によって解析したところ、DNA-チアゾリジン損傷は DNA 脱塩基損傷と同程度に DNA ポリメラーゼの進行を妨げ、その複製反応は DNA 脱塩基損傷と同等に非効率的でした(図 2)。また、一本鎖 DNA-チアゾリジン損傷と二本鎖 DNA-チアゾリジン損傷は比較的安定で、それぞれ 20-24 時間と 12 時間の半減期で DNA 脱塩基損傷に復帰することがわかりました(図 2)。これらの結果から、複製後の二本鎖 DNA-チアゾリジン損傷には、何らかの DNA 修復メカニズムが関与し修復される可能性が示唆されました。

そこで、大腸菌を利用して生産した、さまざまな種類のヒトの DNA 修復酵素を精製し、二本鎖 DNA-チアゾリジン損傷の修復反応を解析したところ、塩基除去修復で機能する APE1 というエンドヌクレアーゼ<sup>※8</sup> が唯一、二本鎖 DNA-チアゾリジン損傷の修復に関与することを明らかにしました。これらの結果から本研究チームは、DNA 脱塩基損傷に起因した DNA-HMCES クロスリンク損傷の修復メカニズムの全体像に迫ることができたと考えています(図 2)。

### 3. 今後の展開

DNA 脱塩基損傷を修復する塩基除去修復は細胞の生存に必要な不可欠なメカニズムであり、その機能不全はさまざまな脳神経疾患をはじめとする、ゲノム不安定性疾患群の原因となることが知られています。本研究は DNA 脱塩基損傷の修復メカニズムにおける基礎研究にとどまらず、未解明の難治性ゲノム不安定性疾患群の原因究明につながることを期待しています。

◎本研究は、日本学術振興会科研費(18H03371、21K12238、20H04335、21K19843)、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(事業名:難治性疾患実用化研究事業 研究開発課題名:ゲノム不安定性疾患群を中心とした希少難治性疾患の次世代マルチオミクス解析拠点構築)、文部科学省先端研究基盤共用促進事業(コアファシリティ構築支援プログラム)(JPMXS0441200022)、公益財団法人大幸財団 2022 年度学術研究助成などの支援を受けて実施されました。

図1 A、DNA 脱塩基損傷と塩基除去修復 B、チアゾリジン構造を介した HMCES クロスリンク

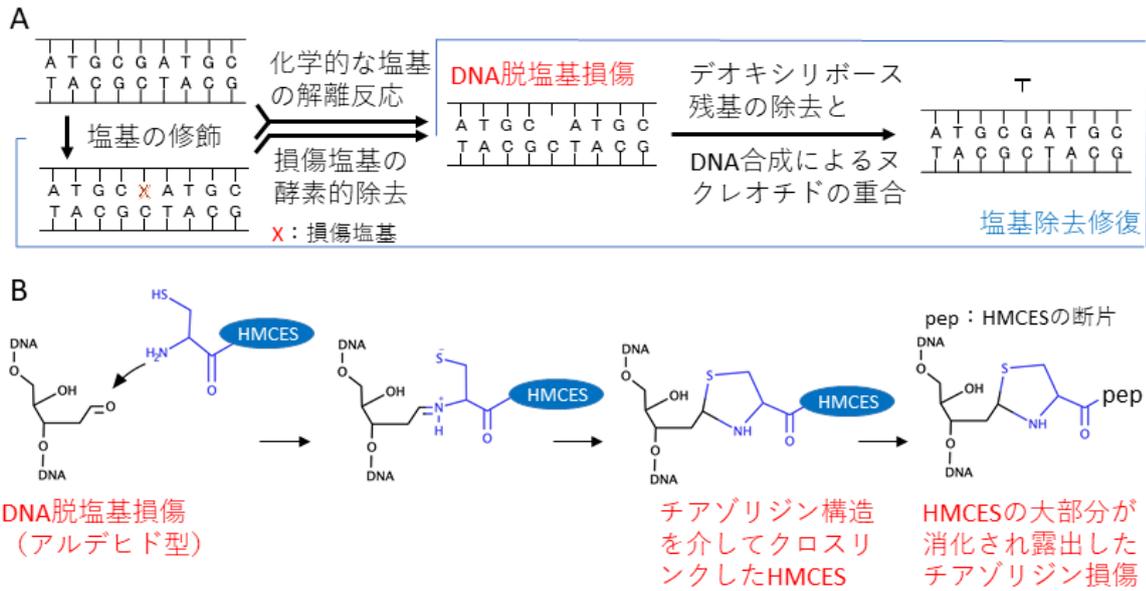


図2 脱塩基損傷に起因した DNA-HMCES クロスリンク損傷の修復メカニズム

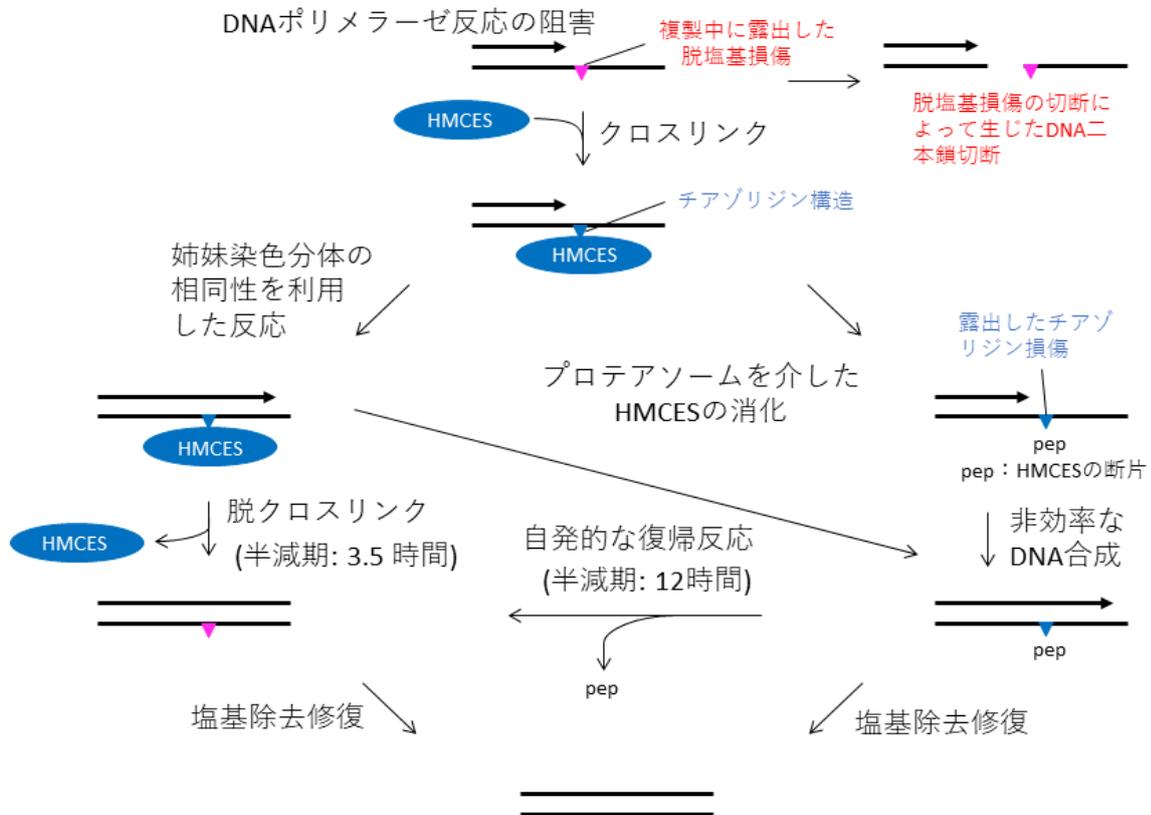
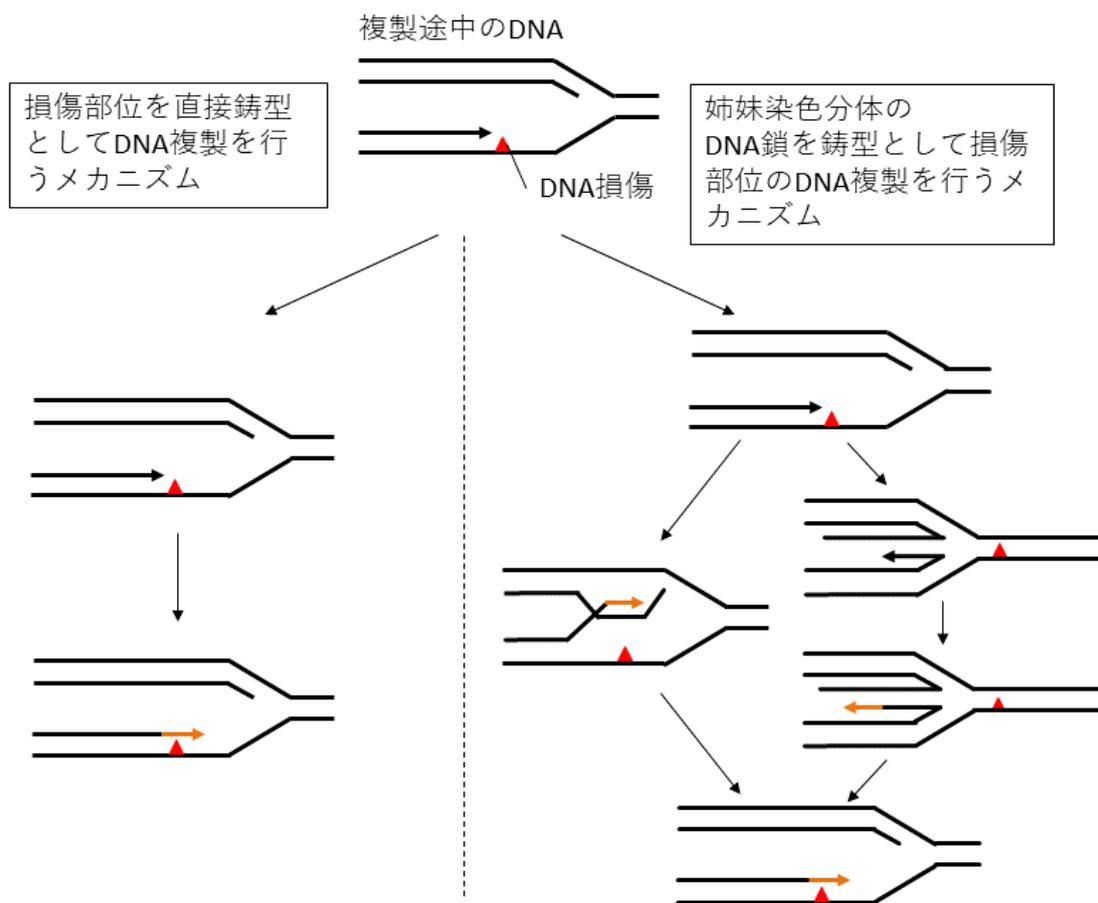


図3 損傷 DNA の複製メカニズム



#### 4. 用語説明

※1 DNA 脱塩基損傷(図 1A 参照)

DNA はリン酸とデオキシリボース、塩基(アデニン、グアニン、シトシンもしくはチミン)からなるヌクレオチドのリン酸とデオキシリボース残基が直鎖状に重合した構造をとり、デオキシリボース残基に結合した塩基の相補的な対合によって二重螺旋を形成している。DNA 脱塩基損傷はリン酸とデオキシリボース部分はそのまま、デオキシリボース残基に結合していた塩基が脱離した DNA 損傷である。したがって DNA 脱塩基損傷では二重螺旋の相補的に対合する片方の塩基が消失しており、DNA 複製においては重合するべき塩基が不明となる。真核細胞の DNA 脱塩基損傷部位に対しては、DNA 複製酵素の作用により元の塩基に関係なく、主に dCMP、次いで dAMP が重合されと考えられている。塩基が脱離したデオキシリボース残基は閉環構造のフラノース型と開環構造のアルデヒド型の平衡状態で存在し、アルデヒド型は化学的に不安定なためリン酸とデオキシリボース残基の間で切断が起こりやすい。

※2 塩基除去修復(図 1A 参照)

DNA 中の塩基が酸化やアルキル化などの修飾によって生じた損傷塩基を切り取り、損傷のない元の塩基に修復するメカニズム。塩基除去修復の第一段階では、損傷塩基が DNA グリコシラーゼによって切り取られ、DNA 脱塩基損傷が生じる。生じた DNA 脱塩基損傷はエンドヌクレアーゼ等の酵素によ

って処理され、最終的に修復部位とは反対側の DNA 鎖の遺伝情報を鋳型とした DNA 合成によって元の塩基が重合される。内因性、外因性の化学反応によって直接生じた DNA 脱塩基損傷もまた、DNA グリコシラーゼによって切り取られた DNA 脱塩基損傷と同様のメカニズムを経て修復される。

### ※3 DNA ポリメラーゼ

一本鎖 DNA を鋳型としてそれぞれの塩基(アデニン、グアニン、シトシンもしくはチミン)に相補的な塩基を一つずつ重合し、二本鎖 DNA を合成する酵素。酸化やアルキル化等により化学修飾された塩基や脱塩基損傷に対しては塩基の重合反応に支障をきたす場合が多い。姉妹染色分体の相同性を利用した複製(図 3 参照)は損傷部位での複製問題を回避するメカニズムの一つである。

### ※4 DNA-タンパク質クロスリンク

DNA とタンパク質の間に共有結合を介した架橋(クロスリンク)を生じ、タンパク質が DNA に固定化された DNA 損傷。損傷のサイズが大きいことに特徴があり、一般に DNA 複製を強く阻害する。

### ※5 チアゾリジン

飽和五員環の 1 位と 3 位がそれぞれチオエーテル基とアミノ基の構造を持つ複素環式化合物の名称である。HMCES タンパク質は自身のペプチダーゼ活性によって N 末端のメチオニン残基が切り取られ、二番目のシステイン残基が N 末端に露出することで活性化する。このシステイン残基と脱塩基損傷(アルデヒド型)とのクロスリンク反応によってこの複素環構造が生じる(図 1B 参照)。

### ※6 姉妹染色分体の相同性を利用した複製メカニズム(図 3 参照)

損傷のある DNA の複製に際して、損傷 DNA を直接鋳型として DNA 複製する(図 3 左側の経路)のではなく、複製されたもう一方の姉妹染色分体の相同な DNA を鋳型として損傷部位を複製するメカニズム(図 3 右側の経路)。

### ※7 プロテアソーム

ユビキチン修飾により標識されたタンパク質を選択的に分解する酵素複合体。DNA にクロスリンクした HMCES を DNA から除去するメカニズムの一つとして、プロテアソームによる HMCES の分解除去が提唱されている。

### ※8 エンドヌクレアーゼ

ポリヌクレオチド内部の糖とリン酸の間のホスホジエステル結合を切断する酵素の総称。エンドヌクレアーゼの一つ APE1 の主な活性は、DNA 脱塩基損傷部位の 5' 側のホスホジエステル結合を加水分解し、3'-OH と、リン酸とリボース残基が残った 5'-末端を生成する。本研究では、この APE1 がチアゾリジン損傷の 5' 側のホスホジエステル結合を加水分解し、3'-OH と、リン酸とチアゾリジン残基が残った 5'-末端を生成することを発見した。

## 5. 発表雑誌

掲雑誌名: Nucleic Acids Research

論文タイトル: Novel mechanisms for the removal of strong replication-blocking HMCEs- and thiazolidine-DNA adducts in humans

著者:

Yohei Sugimoto<sup>1,2,†</sup>, Yuji Masuda<sup>1,2,\*†</sup>, Shigenori Iwai<sup>3</sup>, Yumi Miyake<sup>4</sup>, Rie Kanao<sup>1,2</sup>, and Chikahide Masutani<sup>1,2</sup>

\* Corresponding author

† Joint First Authors.

所属:

<sup>1</sup>Department of Genome Dynamics, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601, Japan

<sup>2</sup>Department of Molecular Pharmacology-Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan

<sup>3</sup>Graduate School of Engineering Science, Osaka University, 1-3 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka, 560-8531, Japan

<sup>4</sup>Forefront Research Center, Graduate School of Science, Osaka University, 1-1 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan

Present Address: Yohei Sugimoto, Division of Molecular Oncology, Center for Neurological Diseases and Cancer, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan

DOI: [doi.org/10.1093/nar/gkad246](https://doi.org/10.1093/nar/gkad246)

English ver.

[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_E/research/pdf/Nuc\\_230410en.pdf](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Nuc_230410en.pdf)