

平成 30 年 10 月 22 日

DNA 損傷が引き起こす遺伝子変異のリスクを コントロールする仕組みを解明！

名古屋大学環境医学研究所（所長・山中宏二）（医学系研究科（研究科長・門松健治）協力講座）の増田 雄司（ますだ ゆうじ）准教授、光行 智司（みつゆき さとし）医学部 6 年生、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、静岡県立大学薬学部生命物理化学分野の橋本 博（はしもと ひろし）教授、菱木 麻美（ひしき あさみ）助教と共同で、DNA を損傷しているゲノム DNA の複製に必要な「DNA 損傷トレランス」をコントロールするユビキチン転移酵素の働き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」（2018 年 10 月 18 日付けの電子版）に掲載されました。

DNA 損傷は生物にとって有害です。細胞増殖の際、損傷しているゲノム DNA の複製を完了させるためには「DNA 損傷トレランス」というメカニズムを必要とします。このように DNA 損傷トレランスは、紫外線からの生体の防御や DNA 損傷を引き起こす抗がん剤への耐性、遺伝子の変異誘発などに関与しています。DNA 損傷トレランスには 2 つのメカニズムが知られています。一つは「損傷乗り越え DNA 合成」と呼ばれるメカニズムで、損傷のある DNA を鋳型として DNA 合成をすることによってゲノム DNA の複製を完了させます。損傷乗り越え DNA 合成は損傷 DNA を鋳型として DNA を合成する性質のため、DNA 損傷が誘発する変異への関与が指摘されています。もう一つは、損傷していない姉妹染色分体^{*1}を鋳型として DNA 合成をする「テンプレートスイッチ」と呼ばれるメカニズムです。テンプレートスイッチは損傷 DNA を避けて DNA 合成をするため、損傷 DNA による変異の誘発を防ぐことができますが、一方で姉妹染色分体の類似した配列を誤って利用して反応が進むと、大きな欠失などの変異を引き起こす可能性があります。この 2 つのメカニズムのいずれを選択するかは、紫外線や DNA 損傷を誘発する抗がん剤にさらされた細胞の生死や、遺伝子変異の誘発リスクを適切にコントロールする上でとても重要ですが、その仕組みは不明でした。

本研究チームは、DNA 複製の停止を模倣したモデル DNA と酵素などを試験管内で反応させる実験を行い、特に 2 つのユビキチン転移酵素（RAD18^{*2} と HLT^{*3} と呼ばれる酵素）に着目してその酵素反応を詳細に調べました。その結果、DNA 複製が停止した DNA の末端では、ユビキチン転移酵素の活性が巧妙にコントロールされることを発見し、損傷乗り越え DNA 合成とテンプレートスイッチがそれぞれ独立に選択される場合と、損傷乗り越え DNA 合成が選択された後でテンプレートスイッチに切り替わる場合に必要とされる、特徴的な酵素反応の実体を明らかにしました。本研究成果は、紫外線や抗がん剤などによる DNA 損傷によって誘発される遺伝子変異等の生体応答を理解する上での知的基盤を与えるものです。

DNA 損傷が引き起こす遺伝子変異のリスクを コントロールする仕組みを解明！

ポイント

- DNA 損傷トレランスは DNA 損傷のあるゲノム DNA を複製するメカニズムであり、紫外線などによる DNA 損傷からの生体の防御や、DNA 損傷が引き起こす変異誘発などに関与する。
- がん細胞において DNA 損傷トレランスは、DNA 損傷を誘発する抗がん剤への耐性や変異誘発などに関与する。
- DNA 損傷トレランスには 2 つのメカニズムが知られており、その 2 つのメカニズムのどちらを選択するかは、紫外線や DNA 損傷を誘発する抗がん剤にさらされた細胞の生死や、遺伝子変異の誘発リスクを適切にコントロールする上でとても重要である。
- 本研究は DNA 損傷トレランスの 2 つのメカニズムの選択反応を解明し、紫外線や抗がん剤などによる生体応答を理解する上での知的基盤を与えるものである。

1. 背景

DNA 損傷は生物にとって有害です。細胞増殖の際、DNA を損傷しているゲノム DNA の複製を完了させるためには、「DNA 損傷トレランス」というメカニズムを必要とします。このように DNA 損傷トレランスは、紫外線からの生体の防御や DNA 損傷を引き起こす抗がん剤への耐性、遺伝子の変異誘発などに関与する重要な生物機能の一つです。DNA 損傷トレランスには 2 つのメカニズムが知られています（図 1）。一つは「損傷乗り越え DNA 合成」と呼ばれるメカニズムで、損傷のある DNA を鋳型として DNA 合成をすることによってゲノム DNA の複製を完了させます。損傷乗り越え DNA 合成は損傷 DNA を鋳型として DNA を合成する特徴から、DNA 損傷が誘発する変異への関与が指摘されています。もう一つは、損傷していない姉妹染色分体を鋳型として DNA 合成をする「テンプレートスイッチ」と呼ばれるメカニズムです。テンプレートスイッチは損傷 DNA を避けて DNA 合成をするため、損傷 DNA による変異の誘発を防ぐことができますが、一方で姉妹染色分体の類似した配列を誤って利用して反応が進むと、大きな欠失などの変異（染色体再編等）を引き起こす可能性があります。この 2 つのメカニズムのどちらを選択するかは、紫外線や DNA 損傷を誘発する抗がん剤にさらされた細胞の生死と遺伝子変異の誘発リスクを適切にコントロールする上でとても重要です（図 1）。

先行研究から、この 2 つのメカニズムの選択には、DNA 複製に必要不可欠なタンパク質因子の一つである PCNA というタンパク質のユビキチン化^{※4}の状態が関与していることが知られていました（図 2）。PCNA はユビキチン化される部位を一ヶ所持つ同一の 3 つのタンパク質がリング状につながった構造（ホモ三量体構造）をしており、そのリングの中に DNA が突き刺さるように DNA に結合することで（DNA に結合している状態を図 2 に図示）、DNA から外れることなく DNA 上をスライドしながら移動することができます。この性質によって PCNA は、DNA 複製がまさに進行している DNA の末端に常に位置し、DNA 複製に必要なタンパク質が働くための足場として機能しています。この PCNA が一つのユビキチンによって修飾（モノユビキチン化^{※4}）されると損傷乗り越え DNA 合成が選択されます。PCNA はホモ三量体構造なので、計 3 ヶ所ユビキチン化（マルチモノユビキチン化^{※4}）されることが可能で、ここでもまた、損傷乗り越え DNA 合成が選択されます。一方で、数珠状（鎖状）につながったユビキチン（ユビキチン鎖）によって PCNA

が修飾（ポリユビキチン化^{※4}）されるとテンプレートスイッチに進むと考えられています（図2）。酵母や動物細胞を使った研究から、損傷乗り越え DNA 合成とテンプレートスイッチはそれぞれが独立に選択される場合と、片方がうまく機能しなかった場合には相互に入れ替わる事象が観察されていました。しかしながら、その分メカニズム、すなわち PCNA のモノユビキチン化とポリユビキチン化が生化学的にどのようにコントロールされているかについては不明な点が多く残されていました。

2. 研究成果

本研究チームによる先行研究から、ユビキチン転移酵素 RAD18 が DNA 複製の末端に位置する PCNA を選択的にモノユビキチン化し、損傷乗り越え DNA 合成を促進することが示されていました。別のユビキチン転移酵素 HLTF は RAD18 と同時に働くことで PCNA をポリユビキチン化することが示されていましたが、HLTF が働く場所は不明でした。また、RAD18 が PCNA をモノユビキチン化した後では、HLTF が単独で PCNA をポリユビキチン化することはできませんでした（図2では✖で示した反応様式）。つまり、損傷乗り越え DNA 合成からテンプレートスイッチへの切り替えの仕組みが不明でした。

本研究チームは HLTF が働く場所と、PCNA のモノユビキチン化とポリユビキチン化が生化学的にどのようにコントロールされているかを明らかにすることを目的に研究を行いました。まず、HLTF のユビキチン転移酵素活性が DNA 非存在下では観察されないことに着目し、HLTF のユビキチン転移酵素活性に必要な DNA 構造を探索しました。その結果、HLTF のユビキチン転移酵素活性は DNA 複製の末端の構造で最も促進されることを見出しました。この結果は、HLTF の働く場所が、DNA 複製が停止した末端であることを意味しています。そこで DNA 複製の停止を模倣したモデル DNA とその場で機能する酵素など最多で計 20 種類のタンパク質を試験管内で反応させ、PCNA がユビキチン化される実験系（試験管内再構成系^{※5}）を構築し、酵素反応を詳細に調べました。その結果、DNA 複製が停止した末端では RAD18 と HLTF が同時に働くことで PCNA がポリユビキチン化されることを明らかにしました。さらにこの実験の過程で、RAD18 が PCNA の 3 ヶ所をマルチモノユビキチン化した場合に限り、HLTF が単独で PCNA をポリユビキチン化することができることを見出しました。この結果は、損傷乗り越え DNA 合成が選択された後にテンプレートスイッチに切り替わるためには、PCNA が RAD18 によってマルチモノユビキチン化される必要があることを意味しています（図2）。

本研究では、損傷乗り越え DNA 合成とテンプレートスイッチがそれぞれ独立に選択される場合と、損傷乗り越え DNA 合成が選択された後にテンプレートスイッチに切り替わる際に必要とされる特徴的な酵素反応の実体を明らかにしました。これらの研究成果は、紫外線や抗がん剤などによって引き起こされる DNA 損傷に対する生体応答を理解する上での生化学的な知的基盤を与えるものです。

3. 今後の展開

研究チームはこれまでに、損傷乗り越え DNA 合成とテンプレートスイッチの選択や切り替えに必要な酵素とその制御の仕組みについて研究を行ってきました。現在残された問題は、テンプレートスイッチから損傷乗り越え DNA 合成に切り替わる際に必要な酵素とその制御の仕組みです。研究チームは今後この点を研究することで、DNA 損傷トレランスの2つのメカニズムの選択をコン

トロールする酵素反応の全貌を明らかにできると考えています。

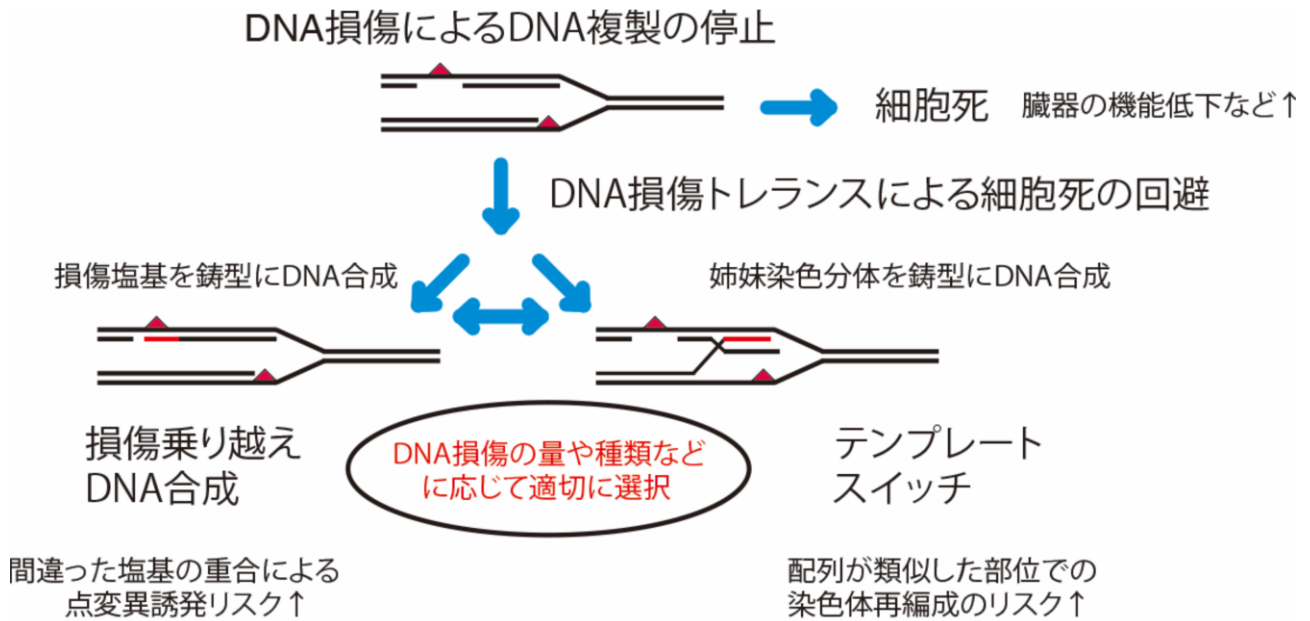


図1 DNA損傷トレランスの2つのメカニズム機能と特徴

※赤三角は損傷 DNA、赤線は DNA 損傷トレランスによって合成された DNA 部分を指す。

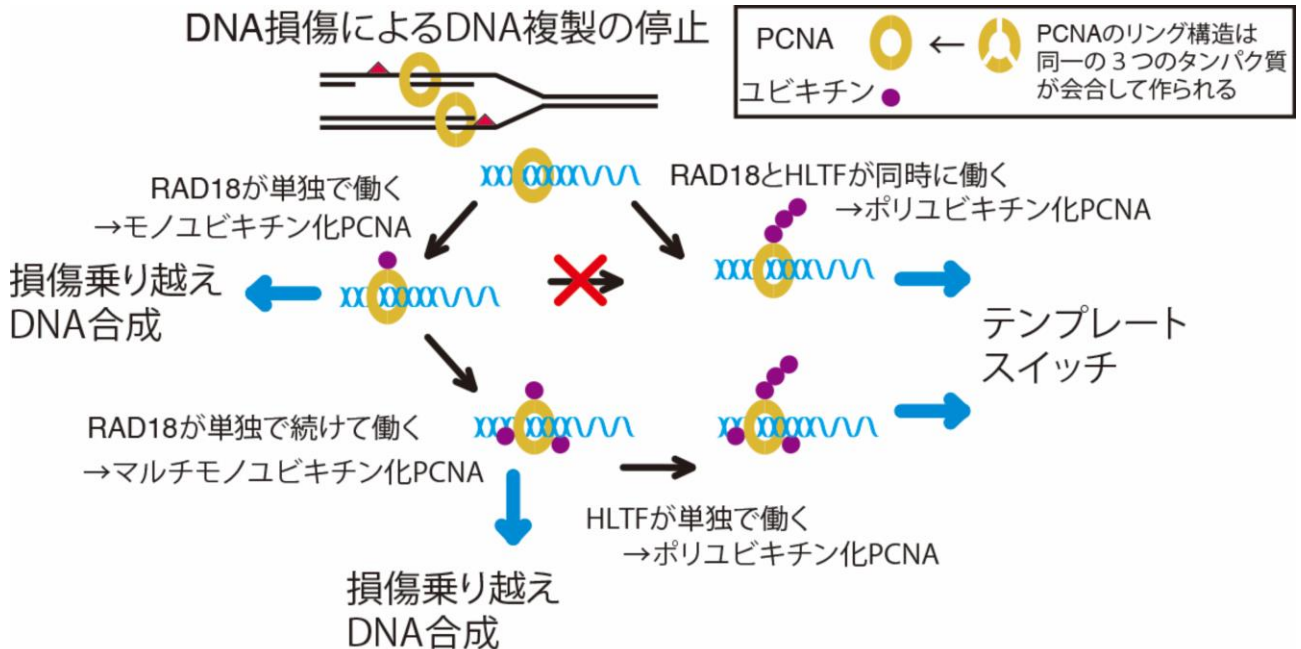


図2 DNA損傷トレランスの2つのメカニズムの選択と切り替えの制御機構

※PCNA のホモ三量体構造は四角の枠の中、黄色いリング状のイラストで図示。DNA は黒線もしくは青色の二重螺旋で図示。紫色の丸がユビキチンを指しており、モノユビキチン化はPCNA（黄色）の1ヶ所にユビキチン（紫）が連結している。マルチモノユビキチン化はPCNA（黄色）の3ヶ所にユビキ

チン（紫）が連結しており、ポリユビキチン化は PCNA(黄色)の一ヶ所からユビキチン（紫）が数珠状に連結したイラストで図示している。

4. 用語説明

1. 姉妹染色分体：DNA 複製後にできる同じ遺伝情報をもつ 2 本の染色分体のこと。
2. ユビキチン転移酵素 RAD18：PCNA のモノユビキチン化を触媒するユビキチンリ転移酵素（ユビキチン転移酵素の解説は 4 を参照）。
3. ユビキチン転移酵素 HLTF：PCNA のポリユビキチン化に必要とされるユビキチン転移酵素（ユビキチン転移酵素の解説は 4 を参照）。
4. ユビキチン化：ユビキチン化はタンパク質修飾の一種である。ユビキチン転移酵素などの働きによりユビキチンと呼ばれるタンパク質が標的タンパク質に付加される。ユビキチンが標的タンパク質に結合する様式として、ユビキチンが単体で結合する場合をモノユビキチン化、ユビキチンが数珠状（鎖状）につながって結合する場合をポリユビキチン化、多数のユビキチンが標的タンパク質の別々の場所に結合する場合をマルチユビキチン化という。マルチユビキチン化では、それぞれのユビキチンが単体で結合する場合をマルチモノユビキチン化、それぞれが数珠状の場合をマルチポリユビキチン化という。ユビキチン化された標的タンパク質はユビキチンの結合様式によって分解に導かれたり、情報伝達機能などの性質が付加されたりする。
5. 試験管内再構成系：多数のタンパク質によって引き起こされる生体内の複雑な生化学反応を試験管内で再構築する実験系。単一の酵素による反応実験と異なり、タンパク質間の相互作用などを含む高次の酵素反応の解析が可能である。

5. 発表雑誌

雑誌名：Nucleic Acids Research（英国時間 2018 年 10 月 18 日付け電子版に掲載）

論文タイトル：Regulation of HLTF-mediated PCNA polyubiquitination by RFC and PCNA monoubiquitination levels determines choice of damage tolerance pathway

著者：Yuji Masuda^{1,2}, Satoshi Mitsuyuki^{1,2}, Rie Kanao^{1,2}, Asami Hishiki³, Hiroshi Hashimoto³, and Chikahide Masutani^{1,2}

¹Department of Genome Dynamics, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University. ²Nagoya University Graduate School of Medicine.

³School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka.

DOI : [10.1093/nar/gky943](https://doi.org/10.1093/nar/gky943)

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Nucleic_A_20181022en.pdf