
DNA損傷における複製フォーク進行阻害と
その回復過程の分子機構に関する総合的研究

17370063

平成17年度～平成19年度科学研究費補助金
(基盤研究(B)) 研究成果報告書

平成20年5月

研究代表者 真木 寿治

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科教授

1. 研究の目的

本研究計画では、DNA 損傷による複製フォークの進行阻害とその回復過程を分子レベル・酵素反応レベルで理解することを目的として、以下の研究項目に焦点を絞って研究を進めることとした。

- 1) 単一 DNA 損傷を導入した *oriC* プラスミド DNA を用いて、試験管内で複製装置・複製フォークを再構成し、複製フォークが鋳型 DNA 上の各種の損傷によりどのように進行阻害を受けるのかを明らかにする。
- 2) 精製した UmuCD、DinB、PolB タンパク質を用いて、複製フォーク進行阻害の回復に損傷乗り越え DNA 合成がどのような役割を果たしているかを明らかにする。
- 3) 複製フォークの進行阻害が引き起こす複製フォーク退行 (replication fork regression) と二本鎖切断、さらに複製フォークの再形成過程について、試験管内で再現された複製フォーク阻害に対する RecA タンパク質などの組換えタンパク質の作用を検討し、進行阻害を受けた複製フォークの回復過程を解明する。

2. 研究成果の概要

3年間の研究実施は順調に進み、上記3つの項目について以下のような成果が得られた。

- 1) 試験管内で複製フォークの進行を解析する実験系を構築することに成功し、鋳型上に導入した DNA 損傷により複製フォークの進行阻害の様態を初めて明らかにすることができた。
- 2) DNA 損傷により進行が阻害された DNA 複製フォークに対する損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼの効果を調べた結果、DinB はラギング鎖とリーディング鎖の両方での損傷乗り越え DNA 合成を行うことができ、リーディング鎖上の損傷により進行が阻害されていた複製フォークの進行を回復させることを明らかにした。
- 3) RecA タンパク質を試験管内 DNA 複製系に加えて、DNA 損傷により進行が阻害された DNA 複製フォークの回復を解析してみたが、複製フォーク退行や進行阻害の回復は観察できなかった。

本研究の実施の途中で、複製酵素による DNA 複製が DinB により強く阻害されることを見いだした。この発見を端緒に、DinB が DNA ポリメラーゼ III を特異的に阻害することを明らかにし、特に、 β クランプと DNA ポリメラーゼ III の結合を解離させる新規の活性を DinB が持つことを発見した。また、DinB は細胞内で染色体 DNA 複製を停止することが可能であることを示し、細胞生物学的解析から、DinB が大腸菌の S 期チェックポイント制御の役割を果たしている可能性を示唆する結果を得た。

以上の結果から、DinB タンパク質は損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼとして DNA

損傷により停止した複製フォークの回復に働くことに加えて、DNA 損傷応答の重要なプロセスである細胞周期チェックポイントにおいて重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

3. 研究組織

研究代表者 真木寿治

(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

4. 交付決定額（配分額）

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	5,300,000	0	5,300,000
平成18年度	4,900,000	0	4,900,000
平成19年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	14,400,000	1,260,000	15,660,000

5. 研究発表

別紙参照

6. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

別紙参照

研究期間の年度毎の研究成果の詳細

17年度 研究実績

oriC プラスミド DNA を鋳型にした試験管内複製系を基にして、複製フォークの進行を詳細に解析する実験系の構築に成功した。この *in vitro* DNA 複製系を用いて、鋳型 DNA 上の DNA 損傷が及ぼす複製フォークの進行に対する影響を詳細に研究することが可能になった。本年度では、DNA 損傷により複製が阻害された場合に損傷乗り越え DNA 合成を触媒する特殊な DNA ポリメラーゼが複製の再開や複製フォークの再形成を行うかどうかを検討した。試験管内複製系に RecA タンパク質と損傷乗り越え DNA 合成を触媒する UmuD'C タンパク質 (DNA polymerase V) を加えて、Leading 鎖および Lagging 鎖上でバイパス DNA 合成が行われるかどうかを検討したが、どちらの場合も DNA 複製の再開は検出できなかった。しかしながら、もう一つの損傷乗り越え DNA ポリメラーゼである DinB タンパク質 (DNA polymerase IV) の働きについて検討した結果、Leading 鎖および Lagging 鎖上でバイパス DNA 合成が極めて効率良く生じ、Leading 鎖上の損傷で停止していた複製フォークが再開することを示すデータが得られた。この発見は、世界ではじめて DNA 損傷による複製フォークの阻害が解消されて再開することを示したことになる。この過程で、DinB タンパク質が複製酵素である DNA polymerase III ホロ酵素の DNA 鎖伸長反応を特異的に阻害することを見いだした。この発見は DNA ポリメラーゼ同士の相互作用や交換過程を明らかにする上で極めて重要な発見と思われる。

18年度 研究実績

昨年度の研究の過程で発見した DinB タンパク質による DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素 (Pol III) の DNA 鎖伸長反応の阻害について、*in vivo* および *in vitro* での詳細な解析を行った。まず、Pol III に対する DinB の阻害効果は、DinB の濃度に依存して様々な様式を示すことを明らかにした。高濃度の DinB の効果としては、Pol III と DNA が形成する開始複合体および DNA 鋳伸長反応を行っている Pol III に作用して DinB が Pol III からプライマー-DNA を奪うことができる。さらに低い濃度では、DNA 鋳伸長反応を行っている Pol III の伸張速度を低下したり、鋳型上の特定の領域で Pol III の伸長反応を停止させる。さらに、この DNA 鎖伸長反応の阻害の分子機構を解明する過程で、DNA 上で β クランプと安定に結合している Pol III が DinB の働きにより DNA から解離することが見いだされた。クランプと複製酵素の結合を解離させる酵素活性はこれまで報告はなく、全く新規の酵素活性である。おそらく、この活性が DNA 鎖上の損傷部位などで停止してしまった Pol III を損傷部位から離脱させて他の損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼなどの介入を容易にするものと予想される。また、複製酵素を DNA 複製フォークから取り除くことにより、DNA 複製を

一時的に停止させることに役立っているのかも知れない。このことを大腸菌細胞で検証するために、DinB の発現を制御できる菌株を作成し、DinB 過剰発現の DNA 複製に対する影響を調べた。その結果、DinB の過剰発現の直後から細胞の DNA 複製が完全に抑制され、DinB が単に損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼとして働くのではなく、DNA 複製の制御因子として働く可能性が示唆された。

19 年度 研究実績

本研究計画において見いだされた DinB タンパク質による DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素 (Pol III) の DNA 鎖伸長反応の阻害について、さらに詳細な解析を行い、DinB タンパク質がこれまでに知られている DNA ポリメラーゼの機能とは全く異なる細胞機能を有することを明らかにした。まず、Pol III に対する DinB の阻害効果は、Pol III と DNA が形成する開始複合体および DNA 鋳伸長反応を行っている Pol III に作用して DinB が Pol III からプライマー-DNA を奪うことができることを新規のアッセイ系を開発して照明した。さらに、この阻害効果のベースとして、DNA 上で β クランプと安定に結合している Pol III が DinB の働きにより DNA から解離することを見だし、各種の変異型 DinB を作成してその活性に必要な DinB の機能ドメインを決定した。変異型 DinB の細胞内の挙動についても解析を行い、Pol III の阻害に必要なドメインが染色体複製の阻害にも必要であることを示した。染色体複製の阻害について、DNA チップを用いて詳細に検討した結果、複製フォークがゲノム上の様々な位置で停止していることを明らかにした。これらのことから、DinB は細胞周期のチェックポイント機構、特に S 期チェックポイントに重要な役割を担うことを仮説として提案した。DinB 自体の働きを制御する機構についても検討を開始し、少なくとも *recA* 遺伝子に依存する SOS 応答は関与しないことを明らかにした。

11. 研究発表(印刷中も含む。)

〔雑誌論文〕 計(9)件

著者名	論文標題			
A. Furukohri	A dynamic polymerase exchange with <i>Escherichia coli</i> pol IV replacing pol III on the sliding clamp.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
J. Biol. Chem.	有	283	2008	11260-11269

著者名	論文標題			
K. Hasegawa	Spontaneous mutagenesis associated with nucleotide excision repair in <i>Escherichia coli</i> .			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Genes to Cells	有	13	2008	459-469

著者名	論文標題			
K. Sakamoto	MUTYH-null mice are susceptible to spontaneous and oxidative-stress-induced intestinal tumorigenesis.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Cancer Research	有	67	2007	6599-6604

著者名	論文標題			
F. Yanagihara	The <i>dnaE173</i> mutator mutation confers on the a subunit of <i>Escherichia coli</i> DNA polymerase III a capacity for highly processive DNA synthesis and stable binding to primer-template DNA.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Genes Genet. Systems	有	82	2007	273-280

著者名	論文標題			
S. Kanie	Roles of RecA protein in spontaneous mutagenesis in <i>Escherichia coli</i> .			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Genes Genet. Systems	有	82	2007	99-108

著者名	論文標題			
S. Ide	Abnormality in initiation program of DNA replication is monitored by the highly repetitive rDNA array on chromosome XII in budding yeast.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Mol. Cell Biol.	有	27	2007	568-578

著者名	論文標題			
A. Sakai	Impact of reactive oxygen species on spontaneous mutagenesis in <i>Escherichia coli</i> .			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Genes to Cells	有	11	2006	767-778

著者名	論文標題			
T. Tsubota	Double-stranded DNA binding, an unusual property of DNA polymerase epsilon, promotes epigenetic silencing in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
J. Biol. Chem.	有	281	2006	32898-32908

著者名	論文標題			
Y. Yagi	DNA polymerases η and κ are responsible for error-free translesion DNA synthesis activity over a <i>cis-syn</i> thymine dimer in <i>Xenopus laevis</i> oocyte extracts.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
DNA Repair	有	4	2005	1252-1269

〔学会発表〕 計(40)件

発表者名	発表標題		
古郡麻子	大腸菌 <i>in vitro</i> DNA複製系におけるDNA polymerase switchの解析: Pol IV によるPOL III制御機構		
学会等名	発表年月日	発表場所	
組換え・染色体再編ワークショップ、第19回DNA複製・分配ワークショップ(合同開催)	2008年3月5日	ラフォーレ修繕寺(伊豆市)	

発表者名	発表標 題		
真木寿治	複製開始制御異常に起因する染色体異常と細胞死の誘発；rDNA 領域の役割		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本遺伝学会第79回大会	2007年9月19日	岡山大学理学部	

発表者名	発表標 題		
秋山昌広	DNA ポリメラーゼDinB によるDNA 複製の阻害		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本遺伝学会第79回大会	2007年9月19日	岡山大学理学部	

発表者名	発表標 題		
古郡麻子	大腸菌 <i>in vitro</i> DNA 複製系を用いた DNA ポリメラーゼスイッチの解析：Pol IVによる Pol III 制御機構		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本遺伝学会第79回大会	2007年9月20日	岡山大学理学部	

発表者名	発表標 題		
真木寿治	A new pathway of spontaneous mutagenesis: repair DNA synthesis error during unnecessary action of nucleotide excision repair.		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第3回 日米DNA修復会議	2007年5月8日	クレセントホテル(仙台市)	

発表者名	発表標 題		
古郡麻子	A novel activity of DNA polymerase IV (DinB) to promote the dissociation of a replicative enzyme complex, Pol III, from beta clamp subunit on primer-template DNA.		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第3回 日米DNA修復会議	2007年5月8日	クレセントホテル(仙台市)	

発表者名	発表標 題		
井手 聖	染色体複製開始異常のモニター機構		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本分子生物学会2006フォーラム	2006年12月7日	名古屋国際会議場	

発表者名	発表標 題		
古郡麻子	DNA ポリメラーゼスイッチングに関する生化学的解析：大腸菌DNA Pol VI (DinB) による複製酵素DNA Pol IIIの制御		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本分子生物学会2006フォーラム	2006年12月6日	名古屋国際会議場	

発表者名	発表標 題		
柳原 芳光	大腸菌DNAポリメラーゼIIIにより誘発される配列置換変異に関する研究		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本分子生物学会2006フォーラム	2006年12月6日	名古屋国際会議場	

発表者名	発表標 題		
秋山 昌広	DNA ポリメラーゼDinB の過剰発現による大腸菌のDNA 複製の阻害		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本分子生物学会2006フォーラム	2006年12月6日	名古屋国際会議場	

発表者名	発表標 題		
中磯 和敏	<i>sgs1</i> 欠損のサブレッサー遺伝子である <i>SHU1</i> 、 <i>SHU2</i> の新規機能の探索		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本分子生物学会2006フォーラム	2006年12月6日	名古屋国際会議場	

発表者名	発表標 題		
小林 武彦	リボソームRNA遺伝子のExtra-coding機構		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本分子生物学会2006フォーラム	2006年12月6日	名古屋国際会議場	

発表者名	発表標 題		
中磯 和敏	sgsI欠損のサブレッサー遺伝子であるSHU1、SHU2の新規機能の探索		
学会等名	発表年月日	発表場所	
組換え・染色体再編ワークショップ	2006年11月29日	淡路夢舞台国際会議場	

発表者名	発表標 題		
井手 聖	染色体の複製開始制御異常をモニターする機構		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第18回 DNA複製・分配ワークショップ	2006年10月30日	KKRホテル熱海	

発表者名	発表標 題		
古郡 麻子	DNA ポリメラーゼスイッチングに関する生化学的解析：大腸菌DNA Pol VI (DinB) による複製酵素DNA Pol IIIの制御		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第18回 DNA複製・分配ワークショップ	2006年10月31日	KKRホテル熱海	

発表者名	発表標 題		
柳原 芳光	大腸菌DNAポリメラーゼIIIにより誘発される配列置換変異に関する研究		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第18回 DNA複製・分配ワークショップ	2006年10月30日	KKRホテル熱海	

発表者名	発表標 題		
秋山 昌広	DNA ポリメラーゼDinB の過剰発現による大腸菌のDNA 複製の阻害		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第18回 DNA複製・分配ワークショップ	2006年10月30日	KKRホテル熱海	

発表者名	発表標 題		
沙魚川 公子	大腸菌のヌクレオチド除去修復による自然突然変異の誘発経路		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第3回21世紀大腸菌研究会	2006年10月4日	ウエルサンピア滋賀	

発表者名	発表標 題		
井手 聖	染色体複製開始異常のモニター機構		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本遺伝学会第78回大会	2006年9月26日	つくば国際会議場エポカル	

発表者名	発表標 題		
内田 香里	大腸菌のY型DNA ポリメラーゼDinB の過剰発現によるDNA 複製の阻害		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本遺伝学会第78回大会	2006年9月26日	つくば国際会議場エポカル	

発表者名	発表標 題		
大橋 慧也	大腸菌DNA ポリメラーゼI のエキソヌクレアーゼ活性は配列置換変異の発生を抑制するか？		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本遺伝学会第78回大会	2006年9月26日	つくば国際会議場エポカル	

発表者名	発表標 題		
沙魚川 公子	大腸菌のヌクレオチド除去修復による自然突然変異の誘発経路		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本遺伝学会第78回大会	2006年9月26日	つくば国際会議場エポカル	

発表者名	発表標 題		
田島 理絵	出芽酵母DNAポリメラーゼε (Pol ε) のアクセサリサブユニットDpb3pとDpb4pの新規の生化学的機能：一本鎖DNAセンシングとPol ε-DNA相互作用の制御における役割		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第28回日本分子生物学会年会	2005年12月8日	ヤフードーム	

発表者名	発表標 題		
澤井 和子	大腸菌dam mutS二重変異株における超高頻度DNA組み換え		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第34回日本環境変異原学会大会	2005年11月16日	こまばエミナース	

発表者名	発表標題	
真木 寿治	Mechanisms of DNA polymerase switching upon translesion DNA synthesis: A novel action of DinB protein on the DNA chain elongation by DNA polymerase III holoenzyme.	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 5th International 3R (DNA Replication, Recombination and Repair) Symposium	2005年11月14日	淡路夢舞台国際会議場

発表者名	発表標題	
柳原 芳光	Novel biochemical properties of the <i>dnaE173</i> mutant a subunit of <i>Escherichia coli</i> DNA polymerase III.	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 5th International 3R (DNA Replication, Recombination and Repair) Symposium	2005年11月16日	淡路夢舞台国際会議場

発表者名	発表標題	
秋山 昌広	DNA polymerase η and κ are responsible for error-free translesion DNA synthesis over a <i>cis-syn</i> thymine dimer in <i>Xenopus laevis</i> oocyte extracts.	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 5th International 3R (DNA Replication, Recombination and Repair) Symposium	2005年11月16日	淡路夢舞台国際会議場

発表者名	発表標題	
古郡 麻子	Mechanisms of DNA polymerase switching upon translesion DNA synthesis: A novel action of DinB protein on the DNA chain elongation by DNA polymerase III holoenzyme.	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 5th International 3R (DNA Replication, Recombination and Repair) Symposium	2005年11月16日	淡路夢舞台国際会議場

発表者名	発表標題	
沙魚川 公子	Spontaneous Mutagenesis Associated with Nucleotide Excision Repair in <i>Escherichia coli</i> .	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 5th International 3R (DNA Replication, Recombination and Repair) Symposium	2005年11月16日	淡路夢舞台国際会議場

発表者名	発表標題	
坂井 亜紀子	Impact of Reactive Oxygen Species on Spontaneous Mutagenesis in <i>Escherichia coli</i> .	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 5th International 3R (DNA Replication, Recombination and Repair) Symposium	2005年11月16日	淡路夢舞台国際会議場

発表者名	発表標題	
井手 聖	Involvement of rDNA locus in monitoring abnormality in the initiation program of chromosomal DNA replication by DNA damage checkpoint control.	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 5th International 3R (DNA Replication, Recombination and Repair) Symposium	2005年11月16日	淡路夢舞台国際会議場

発表者名	発表標題	
中磯 和敏	Roles of <i>SRS2</i> in genome maintenance in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 5th International 3R (DNA Replication, Recombination and Repair) Symposium	2005年11月16日	淡路夢舞台国際会議場

発表者名	発表標題	
A. Egashira	Comprehensive analyses of genomic changes in mouse cells defective in DNA mismatch repair using <i>Msh2</i> ^{-/-} mice harbouring the <i>rpsL</i> transgene.	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 5th International 3R (DNA Replication, Recombination and Repair) Symposium	2005年11月16日	淡路夢舞台国際会議場

発表者名	発表標 題		
真木 寿治	Involvement of rDNA locus in monitoring abnormality in the initiation program of chromosomal DNA replication by DNA damage checkpoint control.		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第51回基礎生物学研究所コンファレンス	2005年11月6日	基礎生物学研究所	

発表者名	発表標 題		
真木 寿治	DNAポリメラーゼIV(DinB)による複製フォーク進行阻害の回復機構		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本遺伝学会第77回大会	2005年9月28日	国立オリンピック記念青少年総合センター	

発表者名	発表標 題		
坂井 亜紀子	自然突然変異の発生における酸素ラジカルの役割		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本遺伝学会第77回大会	2005年9月28日	国立オリンピック記念青少年総合センター	

発表者名	発表標 題		
沙魚川 公子	大腸菌のヌクレオチド除去修復による自然突然変異の誘発経路		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本遺伝学会第77回大会	2005年9月28日	国立オリンピック記念青少年総合センター	

発表者名	発表標 題		
井手 聖	出芽酵母の染色体複製開始制御異常をモニターする機構		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本遺伝学会第77回大会	2005年9月29日	国立オリンピック記念青少年総合センター	

発表者名	発表標 題		
沙魚川 公子	大腸菌のヌクレオチド除去修復による自然突然変異の誘発経路		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第2回21世紀大腸菌研究会	2005年6月24日	メルバール伊勢志摩	

発表者名	発表標 題		
真木 寿治	自然突然変異の発生と抑制の分子機構		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本環境変異原学会公開シンポジウム	2005年5月28日	共立薬科大学記念講堂	

〔図 書〕 計 (2) 件

著者名	出版社		
真木 寿治	共立出版		
	書名	発行年	総ページ数
	バイオインフォマティクス辞典	2006	

著者名	出版社		
真木 寿治	共立出版		
	書名	発行年	総ページ数
	遺伝子から生命をみる - 分子生物学の誕生と発展 -	2010	71-102

12. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出 願〕 計 () 件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取 得〕 計 () 件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別

13. 備考

※ 研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページがある場合は、URLを記載すること。

--