

DNA 二重鎖切断領域における DNA ポリメラーゼ μ による DNA 合成機構の解析

[1] 組織

代表者：前澤 創
(東京理科大学理工学部)
対応者：安井 明
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 28万7千円

[2] 研究経過

DNA 二重鎖切断 (DSB) は、最も重篤な DNA 損傷であり、その速やかな認識と修復は遺伝的安定性の維持と細胞癌化の抑制に極めて重要である。また、癌の放射線治療や抗癌剤の効果や副作用を評価する上で、DSB 修復の詳細な分子機構の解明が求められている。DNA ポリメラーゼ μ ($\text{pol}\mu$) は、DSB 修復機構である非同源性末端結合 (NHEJ) に機能する。 $\text{pol}\mu$ は、切断された DNA 末端を橋渡しして DNA を合成できる唯一の酵素であり、NHEJ を効率よく遂行するために必要な重要な因子である。NHEJ に機能する因子は、DSB が生じると DSB 領域へ迅速に集積する。我々は、 $\text{pol}\mu$ が、他の NHEJ 因子と同様に、レーザーマイクロ照射法によって導入した DSB 領域へ集積することを見出した。しかし、 $\text{pol}\mu$ の DSB 領域への集積機構の詳細は不明である。また、NHEJ 因子の DSB 認識及び集積機構といった修復過程の初期のステップは明らかにありつつあるが、NHEJ 因子が DSB 領域において反応装置を形成する過程や活性を示すタイミングなど、中期から後期にかけてのステップは不明な点が多い。本研究では、 $\text{pol}\mu$ の DSB への集積機構、集積後に DNA 合成活性を示すタイミングを明らかにすることを目的とした。

以下、研究活動状況の概要を記す。

研究打合せは、平成 22 年 12 月 26 日 (東北大学加齢医学研究所) と平成 23 年 8 月 31 日 (ワルシャワでの学会参加時) に行った。また、メール連絡等で随時討論を行い、実験材料の授受を行った。

東北大学加齢医学研究所では、安井教授らによ

て確立された DSB 選択的な修復因子集積可視化システムを用いて、 $\text{pol}\mu$ やその相互作用因子の DSB への集積実験を行った。また、 $\text{pol}\mu$ の活性を制御する因子を含む DSB 依存的な複合体の単離、成分同定を試みた。

一方、東京理科大学では、 $\text{pol}\mu$ の欠失変異体や点変異体を作製し、レーザーマイクロ照射法によって導入した DSB への集積を調べた。また、*in vitro* DNA 合成活性測定系を用いて、 $\text{pol}\mu$ の活性に機能するドメインを同定した。さらに、DNA 修復時の DNA 合成をリアルタイムに可視化するための蛍光標識ヌクレオチドプローブを設計し、合成した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

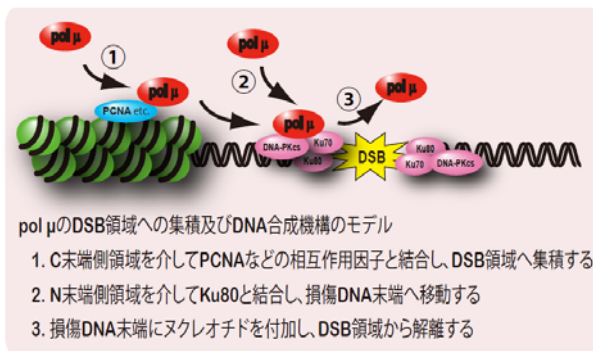
本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第一に、DSB 選択的な修復因子集積可視化システムを用いて、 $\text{pol}\mu$ が確かに DSB 領域へ集積することを示した。また、 $\text{pol}\mu$ 全長 494 a.a.のうち、BRCT ドメインを含む N 末端側 1-142 a.a.領域と、活性ドメインを含む C 末端側 143-494 a.a.領域がそれぞれ DSB 領域への集積能を有していることを示した。NHEJ に機能する因子の多くは、Ku80 に依存して DSB 領域へ集積する。しかし、N 末端側 1-142 a.a.領域は Ku80 に依存して DSB 領域へ集積するのに対し、C 末端側 143-494 a.a.領域は、Ku80 に依存していなかった。そこで、 $\text{pol}\mu$ C 末端側 143-494 a.a.領域に結合する因子として PCNA を同定した。PCNA のノックダウン実験より、C 末端側 143-494 a.a.領域の集積に PCNA が機能していることを示した。

第二に、*in vitro* DNA 合成活性測定系を用いて、 $\text{pol}\mu$ N 末端側 1-142 a.a.領域の $\text{pol}\mu$ 活性への影響を検討した。N 末端側 1-142 a.a.領域は、DNA 末端での $\text{pol}\mu$ 活性に必要な領域であることを明らかにした。これまでに、N 末端側領域を欠失すると Ku80 との結合能が失われ、DNA 合成活性を保持しているにもかかわらず、NHEJ 時の DNA 合成活性が失

われるという報告あった。本研究により、 $pol\ \mu$ N 末端側領域それ自身が、NHEJ 時の DNA 合成に機能することが示唆された。また、 $pol\ \mu$ に結合し活性を負に制御する因子を同定した。現在、その因子の DNA 修復への機能解析、及び DSB 依存的に形成される複合体成分同定を行っている。

第三に、細胞内 DNA 合成をリアルタイムに可視化するための蛍光標識ヌクレオチドプローブを設計した。本プローブは、蛍光物質と消光物質の両方で修飾したデオキシヌクレオチド三リン酸である。プリン塩基の 7 位、及びピリミジン塩基の 5 位に蛍光物質を、 γ 位のリン酸基に消光物質を付加することにより、DNA 合成反応に用いられたプローブのみが蛍光を発するよう工夫した。現在、ほぼ合成過程を完了し、*in vitro* DNA 合成活性測定系を用いてプローブの有用性を検討中である。



(3-2) 波及効果と発展性など

本研究によって、 $pol\ \mu$ の DSB 領域への集積機構が明らかになった。また、 $pol\ \mu$ N 末端側 1-142 a.a. 領域の機能として、Ku80 を介した DSB 領域への集積のほか、DNA 末端での DNA 合成に働くことを明らかにした。これらの成果を、14th International Congress of Radiation Research、日本放射線影響学会第 54 回大会、第 34 回日本分子生物学会にて発表した。本研究の発展により、NHEJ の分子機構の全貌の理解に貢献できる。

本研究で合成・検討中の蛍光標識ヌクレオチドプローブの完成によって、細胞内 DNA 合成のリアルタイムイメージング系が確立されるため、DNA 修復研究以外の研究領域にも多大な貢献が期待できる。

[4] 成果資料

本共同研究に関する研究成果について論文発表準備中であるが、現時点での発表論文はなし。