

【研究費区分】：国際共同研究支援枠

【研究代表者所属】：理学研究科化学専攻

【研究代表者氏名】：廣田 耕志

【研究代表者氏名フリガナ】：ヒロタコウジ

【研究代表者職】：教授

【研究分担者（所属,氏名,職）】

・化学専攻, 阿部拓也, 助教

【国外研究分担者（所属,氏名,職）】

・Leicester Univ., Andrew Fry, Professor

・Leicester Univ., Kayoko Tanaka, Lector

・ケンブリッジ大学, Julian Sale, Professor

・サセックス大学, Aidan Doherty, Professor

・ボストン大学, Charles S. Hoffman, Professor

【研究課題名】：ゲノム編集・1分子イメージング・クライオ電顕の利用による蛋白質機能解析の国際共同研究ネットワーク

【研究実績の概要（600～800字程度で記入。図、グラフ等の使用も可。）】

DNA複製は、鋳型鎖上のDNA損傷部位において頻繁に停止している。この停止を解除する機構として、DNA損傷乗り越え機構が知られている。この機構は複製ポリメラーゼから、忠実度の低いTLSポリメラーゼにスイッチすることで損傷部位でのその場しのぎの複製を継続することが知られている、このほか、下流からの複製のリプライミング機構も複製停止解除に寄与することが知られている。申請者はTLSポリメラーゼのPol $\eta$ とリプライミングに必要なPrimPolの関係を調査し、紫外線などのDNA損傷に対する応答において、相補的に機能することを示している。さらに、申請者は第3の複製停止トレランス経路として、複製ポリメラーゼ $\delta$ が損傷部位で誤りがちな複製を行い変異を伴いながら複製を継続する「複製ポリメラーゼによる損傷の乗り越え」を発見した。この機構も、TLSポリメラーゼのPol $\eta$ の経路と相補的關係にあることを示している。本研究では、TLSポリメラーゼ群、複製ポリメラーゼ $\delta$ と $\epsilon$ 、リプライミングに必要なPrimPolプライマーゼがどのように連携し、ゲノム維持に寄与するのか解明する。2018年度には、下記3点を研究した。(1) TLSポリメラーゼの中で中心的役割を果たすPol $\eta$ とその近縁酵素Pol $\iota$ 及びPol $\kappa$ の2重破壊や、すべてを欠損した三重破壊細胞を系統的に作製しこれら酵素群の関係を調べ、損傷の種類（酸化、アルキル化、紫外線によるチミン二量体）ごとに異なる酵素の要求性があり、酵素の使い分けがあることを見出した（図1）。(2)複製ポリメラーゼ $\delta$ 複合体の相互作用因子を包括的に調査し、転写基本因子複合体の制御に関わる因子とのDNA損傷に応答した複合体形成を見出し、転写制御における損傷応答機構の一端を明らかにした。(3)ポリメラーゼ $\epsilon$ の複製フォークの安全な停止における機能を明らかにした（図2）。

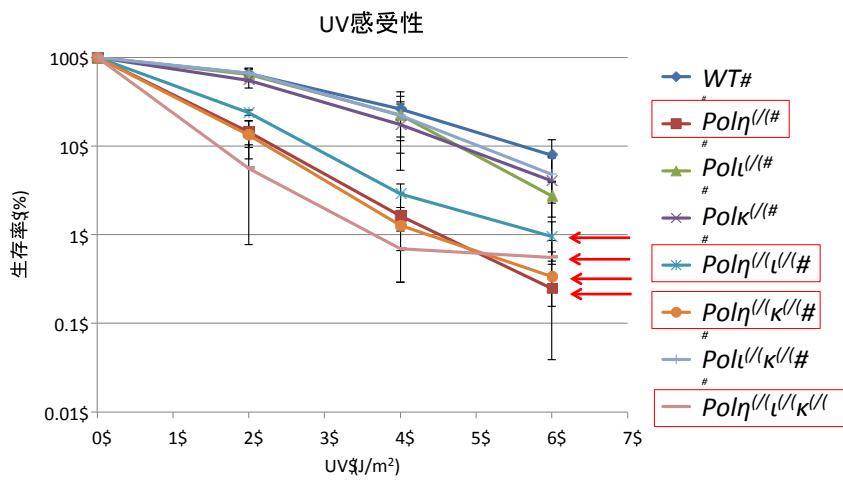


図1 TLS ポリメラーゼ Pol η とその近縁酵素 Pol ι 及び Pol κ の遺伝学的関係。紫外線感受性を調査した研究例を示す。縦軸は細胞生存率(%)、横軸は紫外線量を表す。

	CPT	1μM CPT
DT40 WT		
DT40 Polε<sup>exo-</sup>		
TK6 WT		
TK6 Polε<sup>exo-</sup>		

図2 ポリメラーゼ ε の構成エキソヌクレアーゼ活性を変異で潰した細胞 Polε<sup>exo-</sup>細胞では、カンプトテシンによる DNA 損傷に応答した複製フォーク停止が不良である。赤で示す部分はカンプトテシン処理前 15 分の複製長を示す。緑で示す部分は、カンプトテシン処理後 15 分の複製長を示す。

**【学会発表（発表題目，発表大会名，年月を記入）】**

- ・ 梅村小雪、阿部拓也、廣田耕志 Analysis of the function of topoisomerase 1 with auxin degron based conditional knock out system バイオコンファレンス 2018（首都大学東京 2018年 11月16日）
- ・ Satoshi Senmatsu, Ryuta Asada, Arisa Oda, Charles S. Hoffman, Kunihiro Ohta and Kouji Hirota The novel cis-acting element for metabolic stress-induced lncRNA (mlonRNA) and meiotic recombination in fission yeast. 3R&3C Symposium (Kanazawa, Japan November, 2018)
- ・ Yuya Suzuki, Takuya Abe, Kouji Hirota
  - The correction of chromosome 2 trisomy in chicken DT40 cell using negative selection markers バイオコンファレンス(東京, 2018, 11月16日)
- ・ Takuya Abe, Ryotaro Kawasumi, Michele Giannattasio, Sabrina Dusi, Yui Yoshimoto, Keiji Miyata, Koyuki Umemura, Kouji Hirota & Dana Branzei、AND-1 fork protection function prevents fork resection and is essential

for proliferation、The 11th 3R+3C Symposium (石川県 2018年11月15日)

- Yui Yoshimoto, Takuya Abe, Hirota Kouji, The hunting of synthetic lethal gene with ATR, International Symposium on 3R and 3C (石川県 2018年11月12日~16日)
- Keiji Miyata, Takuya Abe, Kouji Hirota Functional analysis of TopBP1 using *TOPBP1* conditional knock out cells The 11th 3R+3C Symposium (石川県 2018年11月15日)
- Kouji Hirota, Minami Fukuchi, Koji Kobayashi, Takuya Abe, Masataka Tsuda and Shunichi Takeda Role of proofreading exonuclease activity of replicative polymerase  $\epsilon$  in camptothecin induced safe replication fork slowing 3R&3C Symposium (Kanazawa, Japan November, 2018)
- 廣田耕志、大岡正人、津田雅貴、阿部拓也、浅田隆大、笹沼博之、荻朋男、安井明、武田俊一 ALC1 クロマチンリモデリング因子のゲノム維持における働き 分子生物学会 2018 12月 神戸

【論文発表又は著書発行（発表題目、著者、発表誌又は出版社、年月を記入）】

- Senmatsu S, Asada R, Abe T, Hoffman CS, Ohta K, \*Hirota K lncRNA transcriptional initiation induces chromatin remodeling within a limited range in the fission yeast *fbp1* promoter. *Sci Rep* 9: 299 (2019)
- Abe T, Branzei D, Hirota K DNA Damage Tolerance Mechanisms Revealed from the Analysis of Immunoglobulin V Gene Diversification in Avian DT40 Cells. *Genes (Basel)* 9(2018)
- Abe T, Kawasumi R, Giannattasio M, Dusi S, Yoshimoto Y, Miyata K, Umemura K, Hirota K, Branzei D AND-1 fork protection function prevents fork resection and is essential for proliferation. *Nat Commun* 9: 3091 (2018)
- Abe T, Ooka M, Kawasumi R, Miyata K, Takata M, Hirota K, Branzei D Warsaw breakage syndrome DDX11 helicase acts jointly with RAD17 in the repair of bulky lesions and replication through abasic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: 8412-8417 (2018)
- Nakazato A, Kajita K, Ooka M, Akagawa R, Abe T, Takeda S, Branzei D, \*Hirota K SPARTAN promotes genetic diversification of the immunoglobulin-variable gene locus in avian DT40 cells. *DNA Repair (Amst)* 68: 50-57 (2018)
- Saha LK, Kim S, Kang H, Akter S, Choi K, Sakuma T, Yamamoto T, Sasanuma H, Hirota K, Nakamura J, Honma M, Takeda S, Dertinger S Differential micronucleus frequency in isogenic human cells deficient in DNA repair pathways is a valuable indicator for evaluating genotoxic agents and their genotoxic mechanisms. *Environ Mol Mutagen* 59: 529-538 (2018)
- Taoka M, Nobe Y, Yamaki Y, Sato K, Ishikawa H, Izumikawa K, Yamauchi Y, Hirota K, Nakayama H, Takahashi N, Isobe T Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome. *Nucleic Acids Res* 46: 9289-9298 (2018)
- Umeda M, Tsunekawa C, Senmatsu S, Asada R, Abe T, Ohta K, Hoffman CS, \*Hirota K Histone Chaperone Asf1 Is Required for the Establishment of Repressive Chromatin in *Schizosaccharomyces pombe* *fbp1* Gene Repression. *Mol Cell Biol* 38(2018)
- Ooka M, Abe T, Cho K, Koike K, Takeda S, \*Hirota K (2018) Chromatin remodeler ALC1 prevents replication-fork collapse by slowing fork progression. *PLoS One* 13: e0192421

【科学研究費補助金への応募状況、採択状況】

- 基盤研究(B) (2018年度まで受理, 2019は不採択)、新学術領域 (不採択)、挑戦的研究 (萌芽) (申請中)、国際共同研究強化(B) (不採択, 2019は申請中)

**【国等の提案公募型研究費，企業からの受託研究費・共同研究費の獲得状況】**

・なし

**【受賞等】**

・なし

**【その他（都との連携施策，特許出願など）】**

・なし

**【公的審議会・委員会等の公的貢献，生涯学習支援・普及啓発，国際貢献・国際交流等】**

・海外に 2018 年度は 7 名研究室員の留学を斡旋した。（イタリア 5 名、米国 1 名、スウェーデン 1 名）

**【研究成果による特許等の工業所有権の出願・取得状況】**

（工業所有権の名称，発明者，権利者，工業所有権の種類・番号，出願年月日，取得年月日）

・なし

**【研究分担額】**

（研究代表者・分担者名，所属，金額（円））

・基盤研究(S)(武田俊一，京都大学，203 万円)