

原著論文

## 脱塩基部位損傷乗り越え複製における 酵母 Rev1 タンパク質 Gly193→Arg 変異の影響

守谷 智恵<sup>1)</sup>, 川上 賀代子<sup>1)</sup>, 根岸 和雄<sup>2)</sup>, 坪井 誠二<sup>1)\*</sup>

<sup>1)</sup> 就実大学 薬学部 生化学研究室

<sup>2)</sup> 日本薬科大学 生命分子薬学分野

### Influence of a mutation Gly193 to Arg in BRCT region of Rev1 protein on translesion DNA synthesis of abasic sites in yeast

Chie Moritani<sup>1)</sup>, Kayoko Kawakami<sup>1)</sup>, Kazuo Negishi<sup>2)</sup>, Seiji Tsuboi<sup>1)\*</sup>

<sup>1)</sup> *Laboratory of Biochemistry, Department of Pharmaceutical Science, School of Pharmacy, Shujitsu University*

<sup>2)</sup> *Nihon Pharmaceutical University*

(Received 30 October 2014; accepted 19 November 2014)

---

**Abstract:** Rev1p in yeast is essential for the translesion DNA synthesis of abasic sites. The protein has two domains, BRCT and Y-family polymerase. We have analyzed the mutagenic specificity of abasic sites, a natural abasic site and its tetrahydrofuran analog, using the yeast oligonucleotide transformation assay. Previously we showed that the lack of the BRCT domain reduced efficiencies of translesion synthesis at abasic sites, but that substantial translesion synthesis took place. In the present study, we have studied the influence of a mutation of Gly193 to Arg in the BRCT domain. The mutation reduced efficiencies of translesion synthesis through both abasic sites. The efficiency of nucleotide incorporation opposite a natural abasic site was affected and the incorporation of cytosine reduced to 25% from 63%. On the other hand, the efficiency opposite tetrahydrofuran was not affected. Gly193 residue in BRCT domain may be important, but dispensable for translesion synthesis.

**Key words:** oligonucleotide transformation, abasic site, tetrahydrofuran, translesion DNA synthesis

---

#### 緒言

脱塩基部位は自然発生的に起きる脱プリンや塩基除去修復の中間体として生成する。鋳型としての情報をもたないために変異を誘発す

る可能性の高い DNA 損傷である<sup>1)</sup>。修復を受けずにゲノム上に残った脱塩基部位は、複製に関わる DNA ポリメラーゼ (pol δ または pol ε) の進行を強く妨げる。そのため損傷塩基に対し塩基を

取り込むことのできる特殊な DNA ポリメラーゼ (損傷乗り越え DNA ポリメラーゼ) の働きにより複製の停止を回避し, DNA 合成を続行させる. 出芽酵母における脱塩基部位の損傷乗り越え複製では, Rev1 タンパク質 (Rev1p) が関与することが知られている<sup>2)</sup>.

酵母の *REV1* 遺伝子は, 始めに紫外線による突然変異の誘発に関与する遺伝子として単離された<sup>3)</sup>. その後, 脱塩基部位に対しシトシンを取り組むデオキシチジル酸トランスフェラーゼであることが明らかとなった<sup>4)</sup>. 酵母 Rev1 タンパク質は 985 アミノ酸残基からなり, BRCT (BRCA1 C-terminus) ドメインやその他の損傷乗り越え複製 DNA ポリメラーゼ (Y-family DNA ポリメラーゼ) と相同性を有するポリメラーゼ領域をもつ (図 1)<sup>5)</sup>. Nelson らによる BRCT 領域に G193R 変異をもつ *rev1-1* 変異体の解析から, 天然型脱塩基部位 (O) や紫外線より生じる 6-4 光産物の損傷乗り越え複製における BRCT 領域の重要性が指摘されている<sup>6)</sup>.

我々はこれまで酵母オリゴヌクレオチド形質転換法を用いて, 脱塩基部位や 6-4 光産物の変異誘導特性の解析を行ってきた<sup>7, 8)</sup>. O 及びそのヘミアセタール型の構造アナログであるテトラヒドロフラン型脱塩基部位 (F) (図 1) の変異誘導特性の解析から, これまでに, O にはシトシンが, F にはアデニンが最もよく取り込まれ両者の変異誘導特性には違いがあること, しかしながらどちらの損傷乗り越え複製にも Rev1p が必須であ

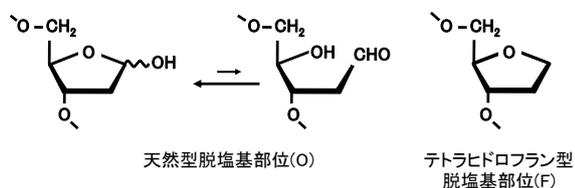


図 1 脱塩基部位の構造

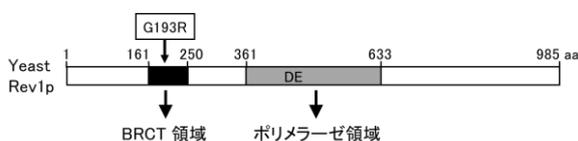


図 2 酵母 Rev1p の一次構造および変異導入部位

ることを明らかにした<sup>7)</sup>. 更に, ポリメラーゼ領域に変異を導入しデオキシチジル酸トランスフェラーゼの機能を失わせた株や BRCT 領域のみを欠損させた株を用い, 酵素活性は脱塩基部位に対するシトシンの取り込みに必須であるが損傷乗り越え複製の効率にはあまり影響がないこと, BRCT 領域を欠損させると効率は低下するものの *rev1* 欠損株に比べて有意に損傷乗り越え複製が起こることを明らかにした<sup>8)</sup>.

今回, BRCT 領域の役割を更に明らかにするため Rev1p に G193R を導入した *rev1-1* 株を作成し, O および F の変異誘導特性の解析を行った.

## 方法

**培地:** 酵母の生育には YPD 培地 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) あるいは YPG 培地 (1% yeast extract, 2% peptone, 3% glycerol) を用いた. YPG 培地は形質転換体の形質の確認に使用した.

***apn1Δrev1-1* 株の作成:** 脱塩基部位の酵母細胞内での除去を抑制するために B7528 株に AP エンドヌクレアーゼ欠損を導入した株 (*apn1Δ*) より作成した<sup>7)</sup>. まず, Rev1 全オープンリーディングフレームをもつ pCO15 を鋳型としてプライマー Rev7 (5'-CGGGGTACCATGGGACATCACCATCACCATCACATGGGTGAACATGGTGGTCTT-3') -Rev12 (5'-ATTTTCtGCCATGTAAAAC-3') 及び Rev11 (5'-CATGGCaGAAAATTTTACAC-3') -Rev8 (5'-CGGATCCCCTTTAAAATCACATGC-3') で増幅し, 変異を導入した DNA 断片を得た. 次に得られた 2 種類の DNA 断片を混ぜ合わせたものを鋳型とし, Rev7-Rev8 を用いて再度 PCR を

表 1 使用したオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド	配列
Oligo-W	5'-ATAATGACTGAA TTC AAGCCGGTTC-3'
Oligo-U	5'-ATAATGACTGAA TTU AAGCCGGTTC-3'
Oligo-O	5'-ATAATGACTGAA TTO AAGCCGGTTC-3'
Oligo-F	5'-ATAATGACTGAA TTF AAGCCGGTTC-3'

行い、変異を導入した Rev1 N-末端領域の DNA 断片 (1-1163) を得た。これを KpnI 及び BamHI で消化後、pCO15 に導入し野生型のもと置き換え pCO17 を構築した。導入した DNA 断片領域の塩基配列を決定し、変異の導入を確認した。次に pCO17 の NaeI 部位に、YIp5 を HindIII で消化し Klenow fragment で平滑化した URA3 を含む DNA 断片を導入し、pCO22 を作成した。文献(8)の方法に従い、*apn1Δ*株に導入し、*apn1Δrev1-1*株を得た。

**オリゴヌクレオチド:** 酵母形質転換に用いたオリゴヌクレオチドを表1に示した。Oligo-O は、oligo-U をウラシル-DNA グリコシラーゼで処理することにより調製した<sup>7)</sup>。

**オリゴヌクレオチド形質転換:** 酵母コンピテントセル 40 μl (約 5 x 10<sup>8</sup> cells) に各オリゴヌクレオチド 300 pmol を加え、エレクトロポレーション法 (1.5 kV, 25 μF, 200 Ω, Bio-rad) により導入した。電気パルスを与えた後、YPD 培地を全量が 1 ml となるように添加し酵母を YPD プレートに広げた。5-6 日間培養後、非形質転換体である *cyc<sup>-</sup>* のローン上にオーバーグロースした *Cyc<sup>+</sup>* 形質転換体を YPG プレートに移植し形質を確認した。Oligo-W の導入によって得られた形質転換体数に対する、修飾塩基を含むオリゴヌクレオチドによる形質転換体数の割合を形質転換効率とした。損傷部位に対する導入塩基の決定には、PCR 法により *CYC1* 領域を増幅し、変異導入部位の塩基配列を決定することで行った<sup>7)</sup>。

**結果**

**Rev1 変異株の損傷塩基を含むオリゴヌクレオチドに対する形質転換効率:** 酵母オリゴヌクレオチド形質転換法は、1988 年に Moerschell らのグループにより報告された方法であり、チトクローム *c* をコードする *CYC1* 遺伝子の 4 番目のコドンに終止コドンが導入された B7528 株 (*Cyc<sup>+</sup>*) に 26-70mer の一本鎖の野生型の配列をもつオリゴヌクレオチドを導入すると、読み枠が回復し *Cyc<sup>+</sup>*

となった形質転換体を得ることができると報告されている<sup>9)</sup>。この系において、野生型の配列をもつオリゴヌクレオチドの代わりに修飾塩基を含むオリゴヌクレオチドを導入し、このオリゴヌクレオチドが染色体 DNA に取り込まれ鋳型となり損傷乗り越え複製が起きると形質転換体を得られる (図 2)。各オリゴヌクレオチドが同じ頻度で染色体 DNA に取り込まれると仮定すると、コントロールオリゴヌクレオチド (oligo-W) の導入によって得られる形質転換体数に対する損傷塩基を含むオリゴヌクレオチドの導入によって得られる形質転換体数の比 (形質転換効率) は、損傷塩基の損傷乗り越え複製の効率と考えることができる。更に、修飾塩基挿入部位の塩基配列を調べることで、損傷部位に対して取り込まれたヌクレオチドを同定できる。この方法を用いて脱塩基部位の変異誘導特性を解析した。

*apn1Δ*株では野生型のオリゴヌクレオチド

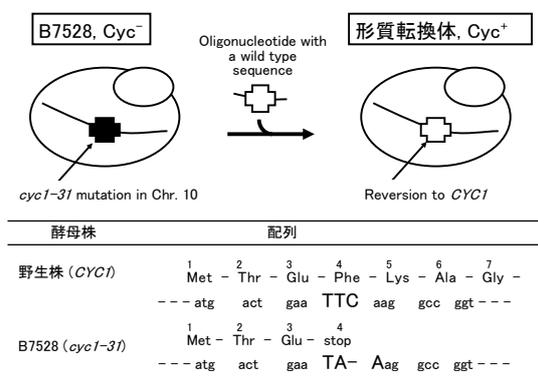


図3 合成オリゴヌクレオチドによる酵母の形質転換

表2 *apn1Δ rev1-1* 変異株の各オリゴヌクレオチドによる形質転換効率

	形質転換効率 (% of Oligo-W)	
	<i>apn1Δ</i> <sup>a</sup>	<i>apn1Δ rev1-1</i>
Oligo-W	100 (3164)	100 (1972)
Oligo-U	8.1 ± 2.2	3.2 ± 1.9
Oligo-O	8.6 ± 2.4	3.6 ± 1.3
Oligo-F	6.2 ± 4.9	1.6 ± 0.5

<sup>a</sup>(7)より引用

oligo-W に対して oligo-O 及び oligo-U で約 8%, oligo-F で約 6% の形質転換効率であったのに対し, *apn1Δrev1-1* 株では oligo-O, oligo-U ではともに *apn1Δ* 株の約 40% に, oligo-F では約 25% に低下した (表 2). G193R 変異の導入によりいずれの損傷に対しても形質転換効率の低下が見られた.

**天然型脱塩基部位及びウラシルに対するヌクレオチドの取り込み**: *apn1Δ* 株では O の相手に 63% の割合で C が, 続いて T が取り込まれた. 一方, *apn1Δrev1-1* 株ではポリメラーゼ領域をもっているものの, シトシンの取り込み頻度は 25% に低下し, T が 47% と最も多く取り込まれた (図 3). U に対するヌクレオチドの取り込み頻度を図 4 に示した. Oligo-U 上のウラシル残基は細胞内でウラシル-DNA グリコシラーゼの働きによって脱塩基部位になった後, 修復あるいは損傷乗り越え複製が起こると考えられる. U に対する取り込み頻度は, T, C, A, G の順となり, O に対する取り込み頻度と多少差はあるものの, ヌクレオチドの取り込まれやすさの順は同様の結果となった.

**テトラヒドロフラン型脱塩基部位に対するヌクレオチドの取り込み**: *apn1Δ* 株では F の相手に 47% の割合で A が取り込まれ, 続いて C と G (25%) が同程度取り込まれた. *apn1Δrev1-1* 株においても, A が 53% と最も高頻度に, 続いて C の順 (25%) にとりこまれた. *rev1-1* 変異株では乗り越え複製の効率が低下するものの, ヌクレオチドの取り込み頻度には大きな影響を与えなかった.

### 考察

酵母オリゴヌクレオチド形質転換法を用いて *rev1-1* 変異の O 及び F 変異誘導特性を調べたところ, 野生型 *REVI* をもつ株に比べて損傷乗り越え複製の効率は低下した. しかしながら, *REVI* を欠損した *apn1Δrev1Δ* 株で効率が 0.2% 以下となったことと比較すると優位に効率は高かった<sup>7)</sup>. この残基は, 損傷乗り越え複製の進行に重要な残基であると考えられた. 一方, BRCT 領域を欠損し

た *apn1Δrev1ΔN250* 株で O 及び F に対する効率が 1% であったのに対しては高い値であり<sup>8)</sup>, BRCT 領域の他にも損傷乗り越え複製の効率に影響を与える残基・領域の存在が示唆された.

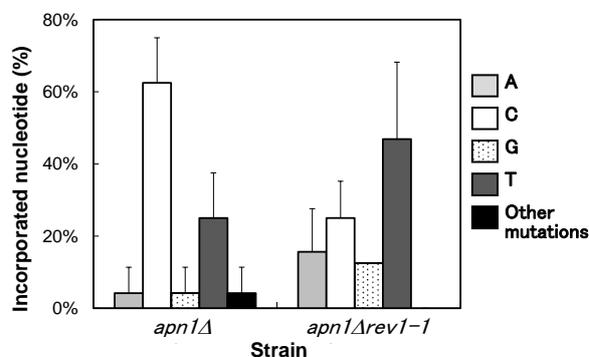


図 4 天然型脱塩基部位 (O) に対する各ヌクレオチドの取り込み頻度

*apn1Δ* の結果は(7)より引用.

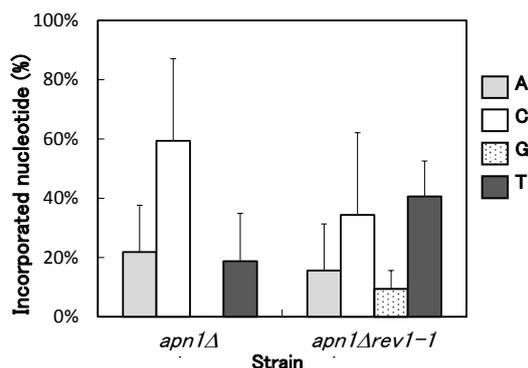


図 5 ウラシルに対する各ヌクレオチドの取り込み頻度

*apn1Δ* の結果は(7)より引用.

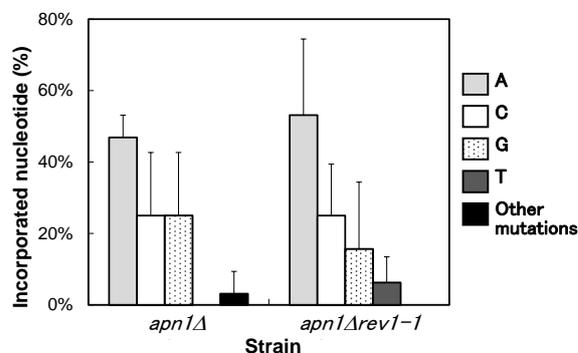


図 6 テトラヒドロ型脱塩基部位 (F) に対する各ヌクレオチドの取り込み頻度

*apn1Δ* の結果は(7)より引用.

O に対するヌクレオチドの取り込み頻度では、シトシンの取り込み効率は低下し、チミンの取り込みが優位となった。これは *apn1Arev1ΔN250* 株と同様の傾向であった。Rev1-1p と Rev1ΔN250p はいずれもポリメラーゼドメインをもっており、*in vitro* の実験によりデオキシシチジル酸トランスフェラーゼ活性を有することが示されている<sup>6,8)</sup>。酵素活性を有しているものの酵母細胞内においては Rev1p に置き換わりの他のポリメラーゼによるヌクレオチドの取り込みが優位になったためにスペクトラムが変化したものと考えられた。また、この結果は G193R 変異は O に対するシトシンの取り込み効率に影響を与えないという Nelson らの結果とは異なっていた<sup>9)</sup>。

一方、F に対するヌクレオチドの取り込みについては *apn1Arev1ΔN250* 株の場合と同様に G193R 変異の影響はほとんど見られなかった。O 及び F の損傷乗り越え複製には Rev1p が必須であるが、ヌクレオチドの取り込みにおいてはポリメラーゼの寄与が異なるというこれまでの結果を支持していた<sup>7,8)</sup>。

最近、Rev1p は BRCT 領域を介して DNA 複製や修復に関わる PCNA と相互作用することで DNA 損傷部位にリクルートされることや、C 末端領域で Pol η, Pol ζ など損傷乗り越え DNA ポリメラーゼと相互作用することが明らかとなり、一連の損傷乗り越え複製に関わるタンパク質群の足場タンパク質として機能が示されている<sup>11-13)</sup>。G193R 変異は PCNA の足場としての役割に影響を与えるだけでなく、Rev1p と連携して損傷乗り越え複製に関わる DNA ポリメラーゼの機能にも関与している可能性が示唆された。

## 引用文献

- 1) Loeb L.A., Preston B.D.: Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites., *Annu. Rev. Genet.*, **20** 201-230 (1986)
- 2) Lawrence C.W.: Cellular roles of DNA polymerase ζ and Rev1 protein., *DNA Repair*, **1**

- 425-435 (2002)
- 3) Gibbs, P.E.M. & Lawrence, C.W.: Novel mutagenic properties of abasic sites in *Saccharomyces cerevisiae*., *J. Molec. Biol.*, **251** 229-236 (1995)
- 4) Nelson J.R., Lawrence C.W., Hinkle D.C.: Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein., *Nature* **382** 729-731 (1996)
- 5) Gerlach V.L., Aravind L., Gotway G., Schultz R.A., Koonin E.V., Friedberg E.C.: Human and mouse homologs of *Escherichia coli* DinB (DNA polymerase IV), members of the UmuC/DinB superfamily., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96** 11922-11927 (1999)
- 6) Nelson J.R., Gibbs P.E., Nowicka A.M., Hinkle D.C., Lawrence C.W.: Evidence for a second function for *Saccharomyces cerevisiae* Rev1p., *Mol. Microbiol.*, **37** 549-554 (2000)
- 7) Otsuka C., Sanadai S., Hata Y., Okuto H., Noskov V.N., Loakes D., Negishi K.: Difference between deoxyribose- and tetrahydrofuran-type abasic sites in the *in vivo* mutagenic responses in yeast., *Nucleic Acids Res.*, **30** 5129-5135 (2002),
- 8) Otsuka C., Kunitomi N., Iwai S., Loakes D., Negishi K.: Roles of the polymerase and BRCT domains of Rev1 protein in translesion DNA synthesis in yeast *in vivo*., *Mutat. Res.*, **578** 79-87 (2005)
- 9) Moerschell R.P., Tsunasawa S., Sherman F.: Transformation of yeast with synthetic oligonucleotides., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **85** 524-528 (1988)
- 10) Masuda Y., Takahashi M., Tsunekuni N., Minami T., Sumii M., Miyagawa K., Kamiya K.: Deoxycytidyl transferase activity of the human REV1 protein is closely associated with the conserved polymerase domain., *J. Biol. Chem.* **276** 15051-15058 (2001)

- 11) Pustovalova Y., Maciejewski M.W., Korzhnev D.M.: NMR mapping of PCNA interaction with translesion synthesis DNA polymerase Rev1 mediated by Rev1-BRCT domain., *J Mol Biol.* **425** 3091-3105 (2013)
- 12) Ohashi E., Murakumo Y., Kanjo N., Akagi J., Masutani C., Hanaoka F., Ohmori H.: Interaction of hREV1 with three human Y-family DNA polymerases., *Genes Cells* **9** 523-531 (2004)
- 13) Kikuchi S., Hara K., Shimizu T., Sato M., Hashimoto H.: Structural basis of recruitment of DNA polymerase  $\zeta$  by interaction between REV1 and REV7 proteins., *J. Biol. Chem.* **287** 33847-33852 (2012)