

「ゲノムの構造と機能」
平成11年度採択研究代表者

花岡 文雄

(理化学研究所 主任研究員)

「ゲノム情報維持の分子メカニズム」

1. 研究実施の概要

ヒトを含めた地球上のすべての生物は、外的あるいは内的要因により生じたゲノムDNA上の構造的異常を見つけて修復する、多様な機構を進化の過程で獲得してきた。これらの機構が、ゲノムに関わる広範な病気の発生を防御している。なかでもヌクレオチド除去修復の機構は、極めて広範なゲノム損傷に対応する重要な経路である。我々は、最近、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER) における損傷認識タンパク質の同定に成功し、その経路を解明する手がかりを得た。さらに最近、損傷を越えて忠実なDNAの複製をすることが出来る新たなDNAポリメラーゼ (pol) をヒト細胞から発見し、複製中に遭遇した損傷を回避する機構の研究に端緒を開いた。

本研究では、これらの代表的な遺伝子修復機構を徹底的に解析し、ゲノム情報を安定に保持するための、分子メカニズムを明らかにすることを目標にしている。またこれらの機構に働く遺伝子に欠損を持つマウス個体を作成し、それらの解析から、これらの遺伝子がゲノム情報を維持し、個体をがんや老化、遺伝病から守る仕組みを明らかにするとともに、他の細胞機能におけるこれらの遺伝子の役割を知ることにも目指している。本研究により、哺乳類におけるゲノム情報維持のための普遍的な戦略を明らかにすることが期待されるばかりでなく、がんや老化の仕組みの根本的な理解がなされるであろう。

2. 研究実施内容

(1) 哺乳類細胞におけるDNA損傷の認識と修復の分子機構

哺乳類細胞において、XPC-hHR23B複合体等によりDNA損傷が認識された後、その次のステップ、そしてさらに次のステップとどのようなカスケードで反応が起きるかを試験管内修復系等を用いて明らかにすることを目的とする。

バクテリアからヒト細胞まで、転写鎖上のDNA損傷は非転写鎖上のそれよりも早く修復される機構が存在し、「転写と共役したDNA修復」 (transcription-coupled repair; TCR) と呼ばれ、転写機構とNER機構の密接な相互作用が示唆される。転写鎖上の損傷以外はゆっくりと修復され、「ゲノム全体の修復」 (global genome

repair; GGR) と呼ばれる。コケイン症候群 (CS) 患者由来の細胞は、色素性乾皮症 (XP) 患者由来の細胞と同様、紫外線に高感受性を示すが、CSではTCR機構が選択的に欠損していることがその原因であると考えられている。逆に、XP-C細胞ではTCR機構は正常だが、GGR機構が特異的に欠損している。XPの他の相補性群ではTCRとGGRの両方の過程に異常を示す。これらの結果は、CSA、CSBタンパク質がTCR機構特異的な役割を担い、逆に、XPCタンパク質がGGR機構特異的な役割を担っていることを示唆する。しかし、CSA、CSB、XPCタンパク質の機能を始め、TCRとGGRに特異的な分子機構は全くといってよいほど不明の状態である。

最近我々は、自分たちが同定したXPC-hHR23B複合体が、GGRにおいて、紫外線照射によりDNA上に生じる6-4光産物などのDNAに比較的大きな構造変化を与える損傷を認識し、NER反応の開始因子として働くことを見出した。XPC-hHR23B複合体は、損傷を中心としたDNA 2本鎖にきちんとしたフットプリントをかける点で、これまで損傷DNAに優先的に結合すると言われていた他のNER因子とは明らかに異なり、GGR機構の詳細な解明の糸口になると期待される。そこでXPC-hHR23B複合体の役割を詳細に解析するために、XPC-hHR23B複合体と相互作用するタンパク質を検索した。その結果、基本転写因子の一つTFIIHが浮かび上がってきた。XPC-hHR23B複合体とTFIIHサブユニットとの結合実験から、XPCタンパク質とXPBあるいはp62サブユニットとが直接相互作用することを見出した。さらにXPC-hHR23B複合体が、細胞抽出液中でTFIIHをDNA上に導入する過程に必要であること、またTFIIHを効率よくDNA上に導入するには、XPC-hHR23B複合体とDNA損傷の両者が必要であることも明らかとなった。

(2) 哺乳類細胞のTCR反応の分子機構

TCR反応においては、上記と異なり、RNAポリメラーゼIIが損傷の認識に働くことはほぼ確かであるが、その後の反応は不明である。田中らはXPAタンパク質と相互作用する未知のタンパク質因子として、酵母2ハイブリッドシステムによりXAB2 (XPA-binding protein 2) を見出した。XAB2タンパク質は、XPAのみならずCSA、CSBタンパク質やRNAポリメラーゼIIとも結合することから、TCRに關与する可能性が示唆された。2種類の抗XAB2抗体 (完全長のXAB2に対する抗体anti-XAB2FLと、XAB2のC端に対する抗体anti-XAB2C) を生きた細胞にマイクロインジェクションし、TCR能が抑制されるか否かを調べた。その結果、いずれの抗体によっても、XP-C細胞における紫外線照射後の不定期DNA合成、及び、正常細胞の紫外線照射後のRNA合成の回復が著明に抑制され、XAB2タンパク質が、TCRに必須の因子であることが明らかになった。Anti-XAB2Cでは未照射細胞のRNA合成が影響を受けなかったのに対し、anti-XAB2FLをマイクロインジェク

ションすると、未照射細胞のRNA合成も抑制され、XAB2タンパク質は転写そのものにも重要な役割を果たすことが明らかになった。

(3) 哺乳類細胞における損傷乗り越え複製の分子機構

複製中の鋳型DNAに損傷がある場合の、緊急避難的な損傷乗り越え複製の機構にも、誤りがちなものと、エラーフリーのものとの存在することが分かってきた。そこで損傷乗り越え複製経路の全体的な理解を目指して、それらの分子メカニズムを明らかにすることを目標としている。

バリエーションXPの責任遺伝子産物であるpol が、どのような損傷を乗り越えることができるのかを明らかにするため、脱塩基部位 (AP)、シスプラチンを付加したグアニン、アセチルアミノフルオレン (AAF) を付加したグアニンについて検討した。その結果、シクロブタン型ピリミジンダイマー (CPD) を鋳型にしたときほどには効率はよくないものの、pol はAP、シスプラチン、AAFを乗り越えることが出来た。この結果から、pol はCPD以外の損傷にも対応することが判明した。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Mizuno, T., Yamagishi, K., Miyazawa, H., and Hanaoka, F.: Molecular architecture of the mouse DNA polymerase β -primase complex. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 7886-7896, 1999.

Araki, M., Masutani, C., Maekawa, T., Watanabe, Y., Yamada, A., Kusumoto, R., Sakai, D., Sugawara, K., Ohkuma, Y., and Hanaoka, F.: Reconstitution of damage DNA excision reaction from SV40 minichromosomes with purified nucleotide excision repair proteins. *Mutat. Res.* 459: 147-160, 2000.

Okuda, M., Watanabe, Y., Okamura, H., Hanaoka, F., Ohkuma, Y., and Nishimura, Y.: Structure of the central core domain of TFIIIEb with a novel double-stranded DNA-binding surface. *EMBO J.* 19: 1346-1356, 2000.

Yokoi, M., Masutani, C., Maekawa, T., Sugawara, K., Ohkuma, Y., and Hanaoka, F.: The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA. *J. Biol. Chem.* 275: 9870-9875, 2000.

Okamoto, H., Mizuno, K., Itoh, T., Tanaka, K., and Horio, T. Evaluation of apoptotic cells induced by ultraviolet light B radiation in epidermal sheets stained by the TUNEL technique. *J. Invest. Dermatol.* 113: 802-807, 1999.

Tamamaki, N., Sugimoto, Y., Tanaka, K., and Takauji, R. Cell migration from the ganglionic eminence to the neocortex investigated by labeling nuclei with UV-irradiation via a fiber-optic cable. *Neuroscience Res.* 35: 241-251, 1999.

Kuwamoto, K., Miyauchi-Hashimoto, H., Tanaka, K., Eguchi, N., Inui, T., Urade, Y.,

Ito, S., and Horio. T. Possible involvement of enhanced prostaglandin E2 production in the photosensitivity in xeroderma pigmentosum group A model mice. *J. Invest. Dermatol.* 114: 241-246, 2000.