

「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 $\eta$ ) 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

#### ) 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、ある種のDNA損傷がXPC-hHR23B複合体により認識された後、基本転写因子の一つであるTFIIHが損傷部位にリクルートされることが明らかになった。しかしXPC-hHR23B複合体が具体的にDNAのどのような構造を認識するのか、という点については不明である。その点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DNA2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複合体が具体的にDNAのどのような構造変化を認識するのかをゲルシフト法により調べた。その結果、驚いたことに損傷の有無にかかわらず、3ないし5個の小さなバブル構造にXPC-hHR23B複合体は効率良く結合した。したがって、このタンパク質複合体は損傷そのものを認識するのではなく、損傷によってその周囲に誘起されたDNA構造の歪みを認識して結合するものと考えられた。実際、紫外線によって生じるDNA損傷のうち6-4型光産物に比べ、DNA二重らせんに大きな歪みを起こさないシクロブタン型ピリミジン二量体 ( CPD ) はXPC-hHR23B複合体によってほとんど認識されないのに対し、CPDの反対側にミスマッチを導入し、DNAの歪みを大きくしてやると、XPC-hHR23B複合体の親和性が増強された。しかしながら、無細胞系においてNER機構によるDNA鎖の切り出しが起こるためには、バブル構造中に損傷塩基が存在することが必要であった。すなわち1) XPC-hHR23BがDNA構造の歪みを認識して結合した後、2) NERによって除去すべき損傷が実際に存在するかどうかを確認する、という2段階の損傷認識機構が働いているものと考えられる。

#### ) 哺乳類細胞のTCR反応の分子機構

遺伝学的及び細胞生物学的実験結果より、ヒトのTCR機構には転写伸長中のRNAポリメラーゼ、CSA、CSB蛋白質が関与することが示唆されるが、それぞれの機能を始め、TCR機構の詳細な分子機構は不明である。田中らは、ヌクレオ

チド除去修復の共通過程に關与するXPA蛋白質と結合する新規蛋白質XAB2を同定し、それがCSA、CSB、RNAポリメラーゼ と結合すると共に、抗XAB2抗体のマイクロインジェクションによりTCR及び転写に關与することを明らかにした。XAB2は5つの因子とほぼstoichiometricに結合し、コアXAB2複合体を形成すること、XAB2複合体はDNAやRNAへの結合活性及び転写伸長を促進する活性を有することを明らかにした。XAB2蛋白質複合体は、転写伸長及びTCR機構に關与する種々の蛋白質を、転写伸長部位及びDNA損傷によって転写が停止した部位に集合させる重要な役割を果たすことが示唆された。遺伝子ターゲティング法により、マウスXAB2遺伝子のプロモーター領域とエキソン1-4を欠失させたマウス、及び、XAB2のC末端162アミノ酸残基を欠失させたマウスを作成したが、いずれも桑実胚まで成育するものの、着床前に死亡し、XAB2が胚発生に必須の遺伝子であることを明らかにした。他方、CSA蛋白質は紫外線照射後、核マトリクスに移行すること、本現象はXPA、XPC蛋白質の機能には依存しないが、CSB蛋白質に依存した現象であることを見つけた。すなわち、TCR反応の場として核マトリクスが重要な役割を果たすこと、CSAとCSBはTCR機構において密接な相互作用をすること、CSAはCSBの後で、しかもXPAの前の段階で働く蛋白質であることを明らかにした。

#### ）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、比較的エラーを起こし難いもののが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 $\eta$ が、CPDだけでなく、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なども乗り越えることを既に明らかにしているが、本年度はその際、損傷の反対側にどの塩基を好んで挿入するかについて検討した。その結果、APサイトに対してはAあるいはGを、またシスプラチンGGに対してはCCを、更にAAF-Gに対してはCを、それぞれ好んで合成した。またpol $\eta$ は従来型のDNAポリメラーゼに比べると、明らかに複製の忠実度が低く、一定頻度で正しくない塩基を取り込む。その際、それを効率良く伸長できるかを検討したところ、正しい塩基の場合に比べ、伸長しにくいことが判明した。これらの結果から、本酵素は損傷の反対側に比較的正しい塩基を取り込み易いという性質と、もし誤った塩基を取り込んでしまったときにそれを伸長しにくいという性質で、全体的にエラーの少ない損傷乗り越え複製を行っていると考えられる。

### 3 . 主な研究成果の発表 ( 論文発表 )

Kuwamoto, K., Hashimoto, K., Tanaka, K., Eguchi, N., Inui, T., Urade, Y., and Horio, T. : "Possible involvement of enhanced prostaglandin E<sub>2</sub> production in the photosensitivity in xeroderma pigmentosum group A model mice", J. Invest. Dermatol. 114 : 241-246, Feb.( 2000 )

Imaida, K., Ogawa, K., Takahashi, S., Ito, T., Yamaguchi, T., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., Tanaka, K., Ito, N., and Shirai, T. : "Delay of DNA-adduct repair and severe toxicity in xeroderma pigmentosum group A gene ( XPA ) deficient mice treated with 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo [ 4,5-b ]pyridine", Cancer Lett. 150 : 63-69, Feb.( 2000 )

Matsuda, T., Bebenek, K., Masutani, C., Hanaoka, F., and Kunkel, T. A. : "Low fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase- $\eta$ ", Nature 404 : 1011-1013, Apr.( 2000 )

Vaisman, A., Masutani, C., Hanaoka, F., and Chaney, S. G. : "Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase $\eta$ ", Biochemistry 39 : 4575-4580, Apr.( 2000 )

Nishikawa N S., Izumi M., Uchida A., Yokoi M., Miyazawa H., Hanaoka F.: "Cloning and characterization of the 5'-upstream sequence governing the cell cycle-dependent transcription of mouse DNA polymerase $\alpha$  68 kDa subunit gene", Nucleic Acids Research, 28(7), 1525 -1534, Apr( 2000 )

Murai, H., Takeuchi, S., Nakatsu, Y., Ichikawa, M., Yoshino, M., Gondo, Y., Katsuki, M., and Tanaka, K. : "Studies of *in vivo* mutations in *rpsl* transgene in UVB-irradiated epidermis of XPA-deficient mice", Mutat. Res. 450 : 181-192, May ( 2000 )

Ichikawa, M., Nakane, H., Marra, G., Corti, C., Jiricny, J., Fitch, M., Ford, J. M. Ikejima, M., Shimada, T., Yoshino, M., Takeuchi, S., Nakatsu, Y., and Tanaka, K.: "Decreased UV sensitivity, mismatch repair activity and abnormal cell cycle checkpoints in skin cancer cell lines derived from UVB-irradiated XPA-deficient mice", Mutat. Res., 459: 285-298, May ( 2000 )

Ide, F., Iida, N., Nakatsuru, Y., Oda, H., Tanaka, K., and Ishikawa, T. : "Mice deficient in the nucleotide excision repair gene XPA have elevated sensitivity to benz[ a ]pyrene induction of lung tumors", Carcinogenesis 21 : 1263-1265, Jun. ( 2000 ) .

Masutani, C., Kusumoto, R., Iwai, S., and Hanaoka, F. : "Mechanisms of accurate traslesion synthesis by human DNA polymerase $\eta$ ", EMBO J. 19 : 3100-3109, Jun.

( 2000 ) .

Yamada, A., Masutani, C., Iwai, S., and Hanaoka, F. : "Complementation of defective translesion synthesis and UV light sensitivity in xeroderma pigmentosum variant cells by human and mouse DNA polymerase $\eta$ ", Nucl. Acids Res. 28 : 2473-2480, Jul.( 2000 )

Ohashi, E., Ogi, T., Kusumoto, R., Iwai, S., Masutani, C., Hanaoka, F., and Ohmori, H. : "Error-prone bypass of certain DNA lesions by the human DNA polymerase  $\kappa$ ", Genes Dev., 14, 1589 -1594, Jul.( 2000 )

Nakatsu, Y., Asahina, H., Citterio, E., Rademakers, S., Vermeulen, W., Jinnai S., Yeo, J.-P., Khaw, M.-C., Saijo, M., Kodo, N., Matsuda, T., Hoeijmakers, J. H. J., and Tanaka, K. : "XAB2, a novel tetratricopeptide repeat protein involved in transcription-coupled DNA repair and transcription", J. Biol. Chem. 275 : 34931-34937, Aug.( 2000 )

Yuasa, M., Masutani, C., Eki, T., and Hanaoka, F. : "Genomic structure, chromosomal localization and identification of mutations in the xeroderma pigmentosum variant ( *XPV* ) gene", Oncogene 19 : 4721-4728, Sep.( 2000 )

Miao, F., Bouziane, M., Dammann, R., Masutani, C., Hanaoka, F., Pfeifer, G., and O'Connor, T. R. : "3-Methyladenine-DNA glycosylase ( MPG protein ) interacts with human RAD23 proteins", J. Biol. Chem. 275 : 28433-28438, Sep.( 2000 )

Tissier, A., Frank, E. G., McDonald, J. P., Iwai, S., Hanaoka, F., and Woodgate, R.: "Misinsertion and bypass of thymine-thymine dimers by human DNA polymerase  $\epsilon$ ", EMBO J. 19 : 5259-5266, Oct.( 2000 )

Nitta, M., Saijo, M., Kodo, N., Matsuda, T., Nakatsu, Y., Tamai H., and Tanaka, K.: "A novel cytoplasmic GTPase XAB 1 interacts with DNA repair protein", Nucl. Acids Res. 28 : 4212-4218, Nov.( 2000 )

Horiki, S., Miyauchi-Hashimoto, H., Tanaka, K., Nikaido, O., and Horio, T.: "Protective effects of suncreening agents on photocarcinogenesis, photoaging, and DNA damage in XPA gene knockout mice", Arch. Dermatol. Res. 292 : 511-518, Nov.( 2000 )

Hanaoka, F. : " SOS polymerases", Nature 409 : 33 -34, Jan.( 2001 )

Bebenek, K., Matsuda, T., Masutani, C., Hanaoka, F., and Kunkel, T. A. : "Proofreading of DNA polymerase  $\eta$ -dependent replication errors", J. Biol. Chem. 276 : 2317-2320, Jan.( 2001 )

McDonald, J. P., Tissier, A., Frank, E. G., Iwai, S., Hanaoka, F., and Woodgate, R.: "DNA polymerase iota and related rad30-like enzymes", Philos. Trans. Royal Soc.

Lond. B Biol. Sci . 356: 53-60, Jan.( 2001 )

Kannouche, P., Broughton, B. C., Volker, M., Hanaoka, F., Mullenders, L. H., and Lehmann, A. R. : "Domain structure, localization, and function of DNA polymerase  $\eta$ , defective in xeroderma pigmentosum variant cells", Genes Dev. 15: 158-172, Jan.( 2001 )

Sugasawa, K., Okamoto, T., Shimizu, Y., Masutani, C., Iwai, S., and Hanaoka, F.: "A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair", Genes Dev. 15 : 507-521, Mar.( 2001 )

浴 俊彦、花岡文雄：“ DNA複製関連因子 - 概論 - ”、Biotherapy, 14 : 759 -765, 8月( 2000 )

菅澤 薫：“ 色素性乾皮症とヌクレオチド除去修復機構 ”、医学のあゆみ、194 : 649-652, 8月( 2000 )

益谷央豪、花岡文雄：“ バリエント型色素性乾皮症と損傷乗り越えDNA複製 ”、医学のあゆみ、194 : 679 - 680, 8月( 2000 ) .

菅澤 薫：“ DNA除去修復機構間のクロストーク ”、細胞工学、19 : 1476-1482, 10月( 2000 ) .