

「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 (nucleotide excision repair; NER) 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。花岡らは、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、損傷を乗り越えて忠実な DNA の複製をすることが出来る新たな DNA ポリメラーゼ (pol η) 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、個体ががんや老化、遺伝病など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

I) 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

損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。

昨年度までの研究で花岡らは、自分たちが同定した XPC-hHR23B 複合体が、GGR において損傷そのものではなく、損傷によって誘起される DNA の構造異常を認識して結合することを明らかにした。また XPC 複合体が結合した後の NER 反応の過程で、実際に損傷が存在することを改めて確認する過程が存在することを示唆した。そこで本年度は XPC 複合体による損傷認識機構をさらに詳細に調べるため、ゲルシフト法を応用した競合実験により、XPC 複合体の DNA 結合特異性を解析した。その結果、小さなバブル構造を含む二本鎖 DNA に高い結合親和性を示した。更に XPC 複合体は DNA が二本鎖から一本鎖に移行する境界部分の構造を好んで結合することが分った。NER によって修復される損傷の大部分は DNA の二重鎖構造に歪みを起こし、周囲の正常な塩基対形成を妨害することが示唆されている。すなわち二本鎖と一本鎖の境界形成は NER 損傷に共通した性質であり、ここで明らかになった XPC 複合体の性質は、NER が化学構造上まったく共通性のない種々の損傷を認識するための重要な分子基盤を与えているものと考えられる。

一方、XPC 複合体が DNA の構造異常、特に非対合塩基の存在を認識して結合することから、従来 NER 以外の機構によって修復されると考えられてきた種々の損傷に対しても、それを認識して結合できる可能性が出て来た。実際、O⁶-アルキルグアニンや脱塩基部位に対して XPC 複合体が特異的に結合できることがゲルシフト法により示された。特に O⁶-アルキルグアニンについては反対側に C が対合したときには XPC 複合体によって認識されるのに対して、pre-mutagenic に T が対合した場合にはほとんど認識されなかった。さらに細胞抽出液を用いた無細胞 NER 系において、O⁶-アルキルグアニンの切り出しが検出されたが、細胞種によってその活性に大きな違いが見られた。これはアルキルグアニン・アルキルトランスフェラーゼや塩基除去修復など、他の修復機構の活性レベルに依存しているものと考えられ、ある種の損傷に関して複数の修復機構間でのクロストークがあることを示唆するものである。

II) 哺乳類細胞の TCR 反応の分子機構

「転写と共役した修復」(transcription-coupled repair: TCR) 機構には、コケイン症候群 (Cockayne syndrome; CS) の原因遺伝子産物である CSA や CSB 蛋白質、さらには RNA ポリメラーゼ II を始め、多数の蛋白質が関与すると考えられている。しかし、その分子機構の詳細は未だ不明である。田中らは、DNA 損傷を受けた細胞では CSA 蛋白質が CSB 蛋白質依存性に核マトリクスに移行することを見つけた。さらに、CS-A 患者で認められた変異 CSA 蛋白質は紫外線照射によっても核マトリクスに移行せず、CSA 蛋白質の核マトリクスへの移行が TCR に関連した現象であることを確認した。これらの結果から、CSA 蛋白質が DNA 損傷の認識や修復蛋白質の損傷部位へのリクルート等に関与することが示唆された。そこで、CSA 蛋白質の機能解析を進めるため、CSA 蛋白質

質がWD40リピートモチーフを持つことに注目し、HeLa細胞からCSA蛋白質複合体の精製を行った。さらに、CSA蛋白質複合体構成因子について、質量分析法によりそれらの構成因子の同定を行った。

他方、田中らは、色素性乾皮症A群(XPA)遺伝子産物であるXPA蛋白質、CSA、CSB蛋白質、RNAポリメラーゼIIとも相互作用し、転写及びTCRに関与するXAB2蛋白質を見いだした。XAB2はTPRモチーフを持つことから大きな蛋白質複合体に含まれることが予想された。そこで、XAB2蛋白質複合体をHeLa細胞から精製し、その構成因子を質量分析法により同定した。そして、XAB2蛋白質複合体は*in vitro*転写伸長反応系において転写伸長反応を促進する活性を持つことを見いだした。

田中らが樹立したXPA欠損マウスとオランダの研究グループが樹立したCSB欠損マウスは単独では顕著な異常を示さないが、XPA/CSBダブル欠損マウスは生後まもなくより運動失調等を示し、生後20日で死亡した。XPA/CSBダブル欠損マウスでは小脳の発育異常、とくに、外顆粒層における細胞増殖の低下とアポトーシス上昇が認められた。これらの結果は、XPAやCSB遺伝子が脳の発育に重要な働きを持つこと、それらは異なる作用機序によること、DNA修復機構が神経発育に必須であることを示したものである。

III) 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。

昨年度までに、バリエーション群XPの責任遺伝子産物であるpol η がCPDだけでなく、脱塩基部位(AP)アナログ、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、その際損傷の反対側に比較的正しい塩基(APサイトに対してAあるいはG)を重合しやすいこと、またプライマー末端がミスマッチ塩基である場合、正しい塩基対の場合に比べ、伸長しにくいことを明らかにした。しかしこれらの解析は定性的なものであり、反応機構に関して結論を出すには不十分である。そこで本年度は反応速度論的解析を行い、pol η による損傷乗り越え反応の効率と忠実度を定量的に評価した。その結果、pol η は損傷のない鋳型とほとんど同じ効率でCPDに対してヌクレオチドを重合し、また伸長することが出来た。特筆すべき点として、損傷のない鋳型DNA上では、pol η は鋳型のTに対してAを最もよく重合するものの、Gも重合しやすく、またこれを伸長してしまうが、CPD(T-T)に対しては、損傷がない場合に比べて10~100倍高い忠実度で正しいヌクレオチドであるAを重合し、伸長した。この結果は、pol η が損傷乗り越え複製においてのみ機能すべきDNAポリメラーゼであることを示唆している。各種損傷に対するpol η の反応効率は、ヌクレオチドの重合効率、伸長効率ともにCPD>AAF-G>APアナログの順であった。CPDの場合に比べると反応効率は低下するものの、AAF-Gに対しても、pol η は正しいヌクレオチドであるCを選択的に重合し、Cが重合された場合に最も効率よく伸長反応を行った。この結果は、pol η がAAF-Gのようなかさ高い損傷塩基に対してもヌクレオチドの選択性を保っていること

を示しており、構造生物学の観点からも興味深い。更に主要な酸化損傷であるチミングリコールやエテノアデニンについても検討し、pol η がこれらの酸化損傷も効率よく乗り越えることを明らかにした。

Pol η が誤ったヌクレオチドを重合してしまった場合、それ自身はエキソヌクレアーゼ活性を持たないため、細胞内の別の 3'-5' エキソヌクレアーゼにより誤ったヌクレオチドを取り除く必要がある。この点について、細胞抽出液による試験管内 DNA 複製系を用いて検討した結果、3'-5' エキソヌクレアーゼ活性を阻害すると、pol η に依存した突然変異が誘発されることが示された。この結果は、pol η による DNA 合成反応は、3'-5' エキソヌクレアーゼ活性を有する未知のタンパク質と協調して働くことにより、高い忠実度を保っていることを予想させる。今後、pol η と相互作用する因子を同定し、複製 DNA ポリメラーゼと pol η のスイッチングの分子機構を明らかにしたいと考えている。

3. 研究実施体制

I) GGR グループ

① 研究分担グループ長名: 花岡文雄(理化学研究所、主任研究員)

② 研究項目

- ・ GGR 反応の分子機構の解析
- ・ GGR 反応における損傷認識後のステップの解析
- ・ GGR 反応における損傷認識機構の解析
- ・ GGR 反応の再構成系の構築

II) TCR グループ

① 研究分担グループ長名: 田中亀代次(大阪大学細胞生体工学センター、教授)

② 研究項目

- ・ UV^s 症候群遺伝子のクローニング
- ・ 哺乳類細胞における TCR 反応の分子機構の解析
- ・ CSA 蛋白質複合体の構造と機能の解析
- ・ XAB2 蛋白質複合体の構造と機能の解析
- ・ TCR 欠損の分子病態の解析

III) TLS グループ

① 研究分担グループ長名: 花岡文雄(大阪大学細胞生体工学センター、教授)

② 研究項目

- ・ 真核細胞における損傷乗り越え複製の分子機構の解明
- ・ 新たな損傷乗り越え複製蛋白質の同定と解析
- ・ XPV ポリメラーゼの性状解析
- ・ XPV 遺伝子ノックアウトマウスの作成と解析

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Miyauchi-Hashimoto, H., Kuwamoto, K., Urade, Y., Tanaka, K., and Horio, T.: “Carcinogen-induced inflammation and immunosuppression are enhanced in xeroderma pigmentosum group A (XPA) model mice associated with hyperproduction of prostaglandin E2”, *J. Immunol.*, 166, 5782–5791, Apr (2001).
- Ide, F., Iida, N., Oda, H., Nakatsuru, Y., Tanaka, K., and Ishikawa, T.: “Xeroderma pigmentosum group A gene action as a protection factor against 4-nitroquinoline-1-oxide-induced tongue carcinogenesis”, *Carcinogenesis*, 22, 567–572, Apr (2001).
- Ura, K., Araki, M., Saeki, H., Masutani, C., Ito, T., Iwai, S., Mizukoshi, T., Kaneda, Y., and Hanaoka, F.: “ATP-dependent chromatin remodeling facilitates nucleotide excision repair of UV-induced DNA lesions in synthetic dinucleosomes”, *EMBO J.*, 20, 2004–2014, Apr (2001).
- Kusumoto, R., Masutani, C., Sugasawa, K., Iwai, S., Araki, M., Uchida, A., Mizukoshi, T., and Hanaoka, F.: “Diversity of the damage recognition step in the global genomic nucleotide excision repair *in vitro*”, *Mutation Res.*, 485, 219–227, Apr (2001).
- Tanaka, K., Kamiuchi, S., Ren, Y., Yonemasu, R., Ichikawa, M., Murai, H., Yoshino, M., Takeuchi, S., Saijo, M., Nakatsu, Y., Miyauchi-Hashimoto, H., and Horio, T.: “UV-induced skin carcinogenesis in xeroderma pigmentosum group A (XPA) gene-knockout mice with nucleotide excision repair-deficiency”, *Mutation Res.*, 477, 31–40, Jun (2001).
- Ishikawa, T., Ide, F., Qin, X., Zhang, S., Takahashi, Y., Sekiguchi, M., Tanaka, K., and Nakatsuru, Y.: “Importance of DNA repair in carcinogenesis: evidence from transgenic and gene targeting studies”, *Mutation Res.*, 477, 41–49, Jun (2001)
- Araki, M., Masutani, C., Takemura, M., Uchida, A., Sugasawa, K., Kondoh, J., Ohkuma, Y., and Hanaoka, F.: “Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair”, *J. Biol. Chem.*, 276, 18665–18672, Jun (2001).
- Levine, R. L., Miller, H., Grollman, A., Ohashi, E., Ohmori, H., Masutani, C., Hanaoka, F., and Moriya, M.: “Translesion DNA synthesis catalyzed by human pol eta and pol kappa across 1,N⁶-ethenodeoxyadenosine”, *J. Biol. Chem.*, 276, 18717–18721, Jun (2001).
- Ohmori, H., Friedberg, E. C., Fuchs, R. P. P., Goodman, M. F., Hanaoka, F., Hinkle, D., Kunkel, T. A., Lawrence, C. W., Livneh, Z., Nohmi, T., Prakash, L., Prakash, S., Todo, T., Walker, G. C., Wang, Z., and Woodgate, R.: “The Y-Family of DNA polymerase”, *Mol. Cell*, 8, 7–8, Jul (2001).

- Matsuda, T., Bebenek, K., Masutani, C., Rogozin, I. B., Hanaoka, F., and Kunkel, T. A.: “Error rate and specificity of human and murine DNA polymerase η ”, *J. Mol. Biol.*, 312, 335–346, Sep (2001).
- Murai, M., Enokido, Y., Inamura, N., Yoshino, M., Nakatsu, Y., van der Horst, G. T. J., Hoeijmakers, J. H. J., Tanaka, K., and Hatanaka, H.: “Early postnatal ataxia and abnormal cerebellar development in mice lacking xeroderma pigmentosum group A and the Cockayne syndrome group B DNA repair genes”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13379–13384, Nov (2001).
- Horio, T., Miyauchi-Hashimoto, H., Kuwamoto, K., Horiki, S., Okamoto, H., and Tanaka, K.: “Photobiologic and photoimmunologic characteristics of XPA gene-deficient mice”, *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, 6, 58–63, Nov (2001).
- Boudsocq, F., Iwai, S., Hanaoka, F., and Woodgate, R.: “*Sulfolobus solfataricus* P2 DNA polymerase IV (Dpo4): an archaeal DinB-like DNA polymerase with lesion-bypass properties akin to eukaryotic pol η ”, *Nucleic Acids Res.*, 15, 4607–4616, Nov (2001).
- Mizuno, T., Takai, Y., Yanagi, K., Yanagihara, M., and Hanaoka, F.: “Molecular architecture of DNA replication apparatus in mammalian cells”, *RIKEN Review*, 41, 17–18, Nov (2001).
- Hanaoka, F., Masutani, C., Mizuno, T., and Sugasawa, K.: “Molecular mechanisms of duplication and maintenance of genetic information”, *RIKEN Review*, 41, 12–13, Nov (2001).
- Izumi, M., Yatagai, F., and Hanaoka, F.: “Cell cycle-dependent proteolysis and phosphorylation of human Mcm 10”, *J. Biol. Chem.*, 276, 48526–48531, Dec (2001).
- Ito, N., Nureki, O., Shirouzu, M., Yokoyama, S., and Hanaoka, F.: “Crystallization and preliminary X-ray analysis of a DNA primase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*”, *J. Biochem.*, 30, 727–730, Dec (2001).
- Sugasawa, K., Shimizu, Y., Iwai, S., and Hanaoka F.: “A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex”, *DNA Repair*, 1, 95–107, Jan (2001)
- Kamiuchi, S., Saijo, M., Citterio, E., de Jager, M., Hoeijmakers, J. H. J., and Tanaka, K.: “Translocation of Cockayne syndrome group A protein to the nuclear matrix: possible relevance to transcription-coupled DNA repair”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 201–206, Jan (2002).
- Broughton, B. C., Cordonnier, A., Kleijer, W. J., Jaspers, N. G., Fawcett, H., Raams, A., Garritsen, V. H., Stary, A., Avril, M. F., Boudsocq, F., Masutani, C., Hanaoka, F., Fuchs, R. P. P., Sarasin, A., and Lehmann, A. R.: “Molecular analysis of mutations in DNA polymerase η in xeroderma pigmentosum-variant patients”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 815–820, Jan (2002).

- Ng, J. M., Vrieling, H., Sugawara, K., Ooms, M. P., Grootegoed, J. A., Vreeburg, J. T., Visser, P., Beems, R. B., Gorgels, T. G., Hanaoka, F., Hoeijmakers, J. H. J., and van der Horst, G. T. J.: “Developmental defects and male sterility in mice lacking the ubiquitin-like DNA repair gene mHR23B”, *Mol. Cell. Biol.*, 22, 1233-1245, Feb (2002).
- Nakanishi, A., Imajoh-Ohmi, S., and Hanaoka, F.: “Characterization of the interaction between DNA gyrase inhibitor and DNA gyrase of *Escherichia coli*”, *J. Biol. Chem.*, 15, 8984-8954, Mar (2002).
- Wada, M., Miyazawa, H., Wang, R. S., Mizuno, T., Sato, A., Asashima, M., and Hanaoka, F.: “The second largest subunit of mouse DNA polymerase epsilon, DPE2, interacts with SAP18 and recruits the Sin3 co-repressor protein to DNA”, *J. Biochem.*, 131, 307-311, Mar (2002).
- 菅澤 薫: “ヌクレオチド除去修復の分子機構”、蛋白質 核酸 酵素、46, 893-901, 6 月 (2001)
- 中津 可道: “転写と共役した DNA 修復とその欠損症”、蛋白質 核酸 酵素、46, 908-915, 6 月 (2001)
- 益谷 央豪、花岡 文雄: “色素性乾皮症バリエントにおける損傷乗り越え複製の異常”、蛋白質 核酸 酵素、46, 1097-1106, 6 月 (2001)