

「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  $\eta$ ) 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 (translesion synthesis; TLS) の研究に端緒を開いた。一方、田中らは、「転写と共役したDNA修復」 (transcription-coupled repair; TCR) に関わるコケイン症候群A群 (CSA) タンパク質が損傷に応じて核マトリクスへ移行することを見出し、更にCSAタンパク質を含む複合体の分離に成功している。

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。これまでに「ゲノム全体の修復」 (global genome repair; GGR) に関してXPC-HR23Bタンパク質複合体が損傷DNAに特異的に結合すること、しかしその認識は損傷自体ではなく、むしろ損傷に伴って生じるDNAの構造異常によって規定されていることを明らかにした。今後、GGRにおけるもう一つの損傷認識タンパク質と考えられるdamaged DNA binding factor (DDB) とどのように協調して働いているのかを明らかにする。またこれらの因子の翻訳後修飾などの調節機構も調べる。一方、TCRに関しては、TCR特異的因子であるCSA蛋白質及びXAB2蛋白質を多因子複合体として精製し、それぞれユビキチンリガーゼ活性及び転写伸長活性を持つことを明らかにした。今後これらの活性がどの因子に由来するのかを同定すると共に、それがTCR機構にどのように関与するのかを明らかにする。さらに新規TCR遺伝子のクローニングを試みる。TLSに関しては、ヒトpol  $\eta$  が紫外線による損傷のみならず様々な損傷を乗り越えること、また損傷に対し比較的正確に乗り越える機構を明らかにした。今後、他のTLSポリメラーゼとどのように使い分けされるか、またこれらのポリメラーゼが損傷部位にリクルートされる仕組みを明らかにする。

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

昨年度までの研究で、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複合体を中心にさらに研究を進め、以下に述べる成果を得た。

- (a) 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、scanning force microscopy (SFM) を用いて、約800塩基対のDNA分子の中央から100塩基ほど離れた場所にコレステロール損傷を有するDNAとXPC複合体との complex を観察した。その結果、XPC複合体は損傷部位に1分子結合し、結合部位を中心として平均135度の角度に折り曲げることが明らかとなった。この折れ曲がり構造がGGRの以下のステップに寄与していると考えられる。
- (b) XPC複合体のDNA結合は損傷非依存的であり、NER反応の正確性を保証するためには以後の反応過程において損傷塩基の存在を改めて確認するステップが重要である。人工的なDNA基質と無細胞系を用いた解析により、NERには最初のXPC複合体が結合した位置からある程度離れたところに存在する損傷を修復する潜在的な能力があることが明らかになった。このとき、対象となる損傷はXPC複合体の結合部位から見て3'側に存在しなければならないことから、DNA鎖上を5'→3'方向に移動して損傷塩基をサーチする機構の存在が考えられる。
- (c) 細胞内においてXPC複合体が他のタンパク質と相互作用することによってより効率よく損傷を認識したり、NER以外の機能に関わっている可能性を考慮して、酵母2ハイブリッド法によるスクリーニングを行った。その結果、XPCが塩基除去修復 (BER) 因子であるチミンDNAグリコシラーゼ (TDG) と相互作用することを見出した。TDGはシトシン、および5-メチルシトシンの脱アミノ化によって生じる G/U、および G/T ミスマッチを解消する BER 反応を開始する因子で、自然突然変異の抑制に寄与すると考えられている。XPCはTDGと物理的に相互作用するだけでなく、無細胞系におけるTDGの活性 (G/T ミスマッチからのTの遊離) に対して有意な促進効果を示した。このことは、XPCがNERにとどまらず、BERへの関与を通じて自然突然変異の抑制に寄与していることを示唆している。
- (d) DNA損傷に伴う細胞内シグナル伝達における損傷認識因子の関与を調べるため、細胞を紫外線照射した後、XPC複合体を形成する各サブユニットの挙動をwestern法により解析した。その結果、XPCの一部が損傷特異的な翻訳後修飾を受け、高分子量領域でラダー状のバンドとして検出された。ユビキチン化、SUMO-1化などが考えられ、現在、

調べている。

## 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。今年度は以下のような知見を得た。

- (a) 転写及びTCRに関与するXAB2蛋白質を6つの構成因子からなる蛋白質複合体としてHeLa細胞から精製した。それぞれの構成因子に対する抗体を作成し、それらを用いた免疫共沈降法及び共焦点レーザー蛍光顕微鏡法により6つの構成因子が実際に複合体を形成していることを確認した。また、XAB2蛋白質は他の5つの構成因子とTPRモチーフで直接結合することを示唆する結果を得た。さらに、XAB2複合体はoligo dC tailed templateとRNA polymerase IIを用いた*in vitro*の転写伸長系においてその反応を高める活性を示した。
- (b) TCRに関与するCSAはWD-40 repeat motifを持つことから蛋白質複合体形成に関与することが示唆された。FLAG-HA-tagged CSA cDNAを発現するHeLa細胞抽出液から、抗HA抗体・抗FLAG抗体によりCSA蛋白質複合体を精製した。質量分析によりその構成因子を同定し、CSA蛋白質複合体にはDDB1、COP9 signalosome、Roc1、Cullin4Aが含まれていることを明らかにした。そして、CSA蛋白質複合体はユビキチンリガーゼ(E3)活性を持つことを見いだした。一方、紫外線照射した細胞においてはCSA蛋白質複合体には多くのCOP9 signalosomeが結合し、そのユビキチン・イソペプチダーゼ活性によりCSA蛋白質複合体のE3活性は抑制された。その意義に関しては不明である。CSA蛋白質複合体はRNA polymerase IIaと結合しているが、紫外線照射した細胞ではRNA polymerase IIoとより多く結合し、CSAが転写過程に何らかの機能を持つこと、紫外線損傷部位で停止したRNA polymerase IIoにCSAが結合することを示唆した。
- (c) TCR機構にも重要な機能を果たすと考えられるDDB1遺伝子をターゲティングにより欠損させた細胞及びマウスを作成する目的で、マウスDDB1遺伝子を単離し、Cre-loxP系を用いるコンディショナルターゲティングベクターを構築した。
- (d) 正常細胞由来の各染色体を一つずつ持つ微小核を、TCRを欠損するUV<sup>S</sup> 症候群細胞に導入し、その紫外線高感受性が回復するか否かを調べ、UV<sup>S</sup> 症候群原因遺伝子の染色体座位を決定した。
- (e) 酸化的DNA損傷である8-oxoguanine等を1カ所に持つ鋳型DNAを用いた*in vitro*転写伸長系を構築し、一部のRNA polymerase IIは損傷部位で停止するが、一部は損傷を乗り越えて転写を伸長できること、その時、一部のmRNAに変異が導入されることを明らかにした。

## 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。本年度は以下に述べる成果を得た。

- (a) ヒト pol  $\eta$  は主要な紫外線損傷であるシクロブタン型チミン 2 量体 (CPD) を、正しいヌクレオチドを重合して効率良く乗り越える。もう一つの主要な紫外線損傷である (6-4) 光産物には、normal型とDewar型の二つのisomerが存在する。そこで pol  $\eta$  がこれらの損傷に対してどのようなTLS反応を行うかを調べた。その結果、pol  $\eta$  は (6-4) 光産物に対して 1 つ目のヌクレオチドを重合した後に停止し、単独では、いずれの isomer も乗り越えることが出来なかった。反応速度論的解析により、この取り込みは Dewar 型のほうが normal 型よりも約 7 倍効率が良かった。またいずれの場合にも、正しい塩基である A よりも G を効率良く取り込んだ。pol  $\eta$  が (6-4) TT における紫外線による T→C transition を担っている可能性を示唆するデータと言える。
- (b) pol  $\eta$  が損傷 DNA 上にロードされるメカニズムとして、PCNA などの複製タンパク質との相互作用が考えられるが、もう一つの可能性として、特異的な DNA 構造との相互作用も考えられる。そこでゲルシフト法により検討した。その結果、pol  $\eta$  はプライマー/テンプレート型 DNA に最も強く結合することが分った。更に結合の特異性を調べるために、テンプレートに TT dimer を持ち、プライマーの長さが TT dimer の手前から直後までの様々な長さのもので比較した。コントロールの損傷を持たない DNA に比べ、TT dimer を持ち、プライマーがその反対側に一つあるいは二つヌクレオチドを重合した形のもの、また更に一つ伸ばした形のものが pol  $\eta$  と安定した複合体を形成した。これらの性質は、Klenow 断片や T4 DNA ポリメラーゼには見られなかった。
- (c) XP-V 患者のモデルマウスを作成するため、pol  $\eta$  遺伝子の翻訳開始コドンを含むエキソン 2 から 8 までをネオマイシン (Neo) 発現カセットと置換したターゲティングベクターでの KO マウス作成を試みたが、ホモ KO マウスは胎生致死であった。そこで新たに、pol  $\eta$  の必須領域を含むエキソン 8 へ Neo 発現カセットを挿入したターゲティングベクターを構築した。
- (d) pol  $\eta$  遺伝子の個体レベルでの機能を解析する一助として、線虫での RNAi 法による遺伝子発現抑制実験を行った。その結果、通常の培養条件下では野生型に比べて異常は観察されなかった。しかし紫外線照射した F1 の初期胚において卵の孵化率の著しい低下が見られ、pol  $\eta$  が胚発生時における紫外線損傷からの防御に働いていることを示唆した。

### 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（大阪大学大学院生命機能研究科、教授）
- ② 研究項目
  - ・ UV<sup>s</sup>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（大阪大学大学院生命機能研究科、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. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

##### （1）論文（原著論文）発表

- Takahashi, Y., Nakatsuru, Y., Zhang, S., Shimizu, Y., Kume, H., Tanaka, K., Ide, F., and Ishikawa, T.: “Enhanced spontaneous and aflatoxin-induced liver tumorigenesis in xeroderma pigmentosum group A-deficient mice”, *Carcinogenesis*, 23, 627-633 (2002).
- Chiapperino, D., Kroth, H., Kramarczuk, I., Sayer, J. M., Masutani, C., Hanaoka, F., Jerina, D. M., and Cheh, A. M.: “Preferential misincorporation of purine nucleotides by human DNA polymerase eta opposite benzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide deoxyguanosine adducts”, *J. Biol. Chem.*, 277, 11765-11771 (2002).
- Kusumoto, R., Masutani, C., Iwai, S., and Hanaoka, F.: “Translesion synthesis by human DNA polymerase eta across thymine glycol lesions”, *Biochemistry*, 41, 6090-6099 (2002).
- Hey, T., Lipps, G., Sugawara, K., Iwai, S., Hanaoka, F., and Krauss, G.: “The XPC-HR23B complex displays high affinity and specificity for damaged DNA in a true-equilibrium fluorescence assay”, *Biochemistry*, 41, 6583-6587 (2002).
- Uchida, A., Sugawara, K., Masutani, C., Dohmae, N., Araki, M., Yokoi, M., Ohkuma, Y., and Hanaoka, F.: “The carboxy-terminal domain of the XPC protein

plays a crucial role in nucleotide excision repair through interactions with transcription factor IIH”, DNA REPAIR, 1, 449-461 (2002).

- Pavlov, Y. I., Rogozin, I. B., Galkin, A. P., Aksenova, A. Y., Hanaoka, F., Rada, C., and Kunkel, T. A.: “Correlation of somatic hypermutation specificity and A-T base pair substitution errors by DNA polymerase  $\epsilon$  during copying of a mouse immunoglobulin kappa light chain transgene”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 9954-9959 (2002).
- Fukumoto, Y., Hiyama, H., Yokoi, M., Nakaseko, Y., Yanagida, M., and Hanaoka, F.: “Two budding yeast RAD4 homologs in fission yeast play different roles in the repair of UV-induced DNA damage”, DNA REPAIR, 1, 833-845 (2002).
- Yamada, A., Masutani, C., and Hanaoka, F.: “Detection of reduced RNA synthesis in UV-irradiated Cockayne syndrome group B cells using an isolated nuclear system”, Biochim. Biophys. Acta, 1592, 129-134 (2002).
- Yanagi, K., Mizuno, T., You, Z., and Hanaoka, F.: “Mouse geminin inhibits not only Cdt1-MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity”, J. Biol. Chem., 277, 40871-40880 (2002).
- You, Z., Ishimi, Y., Masai, H., and Hanaoka, F.: “Roles of Mcm7 and Mcm4 subunits in DNA helicase activity of mouse Mcm4/6/7 complex”, J. Biol. Chem., 277, 42471-42479 (2002).
- Servant, L., Cazaux, C., Bieth, A., Iwai, S., Hanaoka, F., and Hoffmann, J. S.: “A role for DNA polymerase  $\beta$  in mutagenic UV lesions bypass”, J. Biol. Chem. 277, 50046-50053 (2002).
- Yoshino, M., Nakatsu, Y., te Riele, H., Hirota, S., Kitamura, Y., and Tanaka, K.: “Additive roles of XPA and MSH2 genes in UVB-induced skin tumorigenesis in mice” DNA REPAIR, 1, 935-940 (2002).
- Ogi, T., Shinkai, Y., Tanaka, K., and Ohmori, H.: “Pol kappa protects mammalian cells against the lethal and mutagenic effects of benzo[a]pyrene”, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 99, 15548-15553 (2002).
- Ren, Y., Saijo, M., Nakatsu, Y., Nakai, H., Yamaizumi, M., and Tanaka, K.: “Three novel mutations responsible for Cockayne syndrome group A”, Genes & Genetic Systems, 78, 93-102 (2003).
- Shimizu, Y., Iwai, S., Hanaoka, F., and Sugasawa, K.: “Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase”, EMBO J., 22, 164-173 (2003).
- Janicievic, A., Sugasawa, K., Shimizu, Y., Hanaoka, F., Wijgers, N., Djurica, M., Hoeijmakers, J. H. J., and Wyman, C.: “DNA bending by the human damage recognition complex XPC-HR23B”, DNA REPAIR 2, 325-336 (2003).

- Shimizu, M., Gruz, P., Kamiya, H., Kim, S.-R., Pisani, F. M., Masutani, C., Kanke, Y., Harashima, H., Hanaoka, F., and Nohmi, T.: “Erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by Y-family DNA polymerases”, *EMBO Rep.*, 4, 269-273 (2003).
- Kuraoka, I., Endou, M., Yamaguchi, Y., Wada, T., Handa, H., and Tanaka, K.: “Effects of endogenous DNA base lesions on transcription elongation by mammalian RNA polymerase II: Implications for transcription-coupled DNA repair and transcriptional mutagenesis”, *J. Biol. Chem.*, 278, 7294-7299 (2003).

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：1件（研究期間累積件数：1件）