

「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

((独)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 (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 DNA repair; TCR) に関与するコケイン症候群 (Cockayne syndrome; CS) A群 (CSA) タンパク質をHeLa細胞から複合体として精製し、それがユビキチンリガーゼ活性を持つこと、CS-A患者由来の変異CSAタンパク質では複合体形成が起こらずユビキチンリガーゼ活性も欠損していることを明らかにした。

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。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。今回、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重要な手がかりと思われる知見が得られた。すなわち細胞が紫外線照射を受けると、XPCタンパク質がDDB依存的にユビキチン化を受けることを見出した。今後、これらの因子の翻訳後修飾などの調節機構を調べる。TCRに関しては、今後、CSA複合体ユビキチンリガーゼのターゲットタンパク質を同定し、ユビキチン化によるTCRの制御機構を明らかにする。一方、UV^s症候群は、コケイン症候群同様にTCRに欠損を持つが、コケイン症候群とは異なり神経症状を示さない。今回、UV^s症候群が、コケイン症候群B群 (CSB) 遺伝子のヌル突然変異により発症することを明らかにした。今後、CSBの新規の機能を明かにし、なぜUV^s症候群患者が神経症状を示さないのかを明らかにす

ると共に、神経症状を表すCSBモデルマウスの作成を行う。TLSに関しては、ヒトpol η 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。更にヒトpol η のDNA結合能を調べ、本酵素が損傷部位にリクルートされる仕組みの一端を明らかにした。今後、試験管内再構成系を構築し、そのメカニズムを明らかにする。一方、マウスpol η 遺伝子ノックアウト個体の作成に成功したので、他のYファミリーDNAポリメラーゼを含む様々な修復欠損マウスと掛け合わせるなどの実験により、修復経路間のクロストークを調べていく。

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。また細胞に紫外線照射すると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ることを見出した。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) 細胞に紫外線照射した際に見られるXPCタンパク質の翻訳後修飾は、その分子量からマルチユビキチン化と考えられた。そこでXP-C細胞にタグ付きXPCおよびタグ付きユビキチンを共発現させ、紫外線照射後、経時的に細胞抽出液を調製し、ウエスタンにより検出した。その結果、UV照射後、5分でXPCタンパク質は既にユビキチン化され、60分をピークとして、その後、徐々にユビキチン化XPCは減少した。このパターンは細胞から6-4光産物が除去される様子とよく一致した。その際、シクロヘキシミド処理により新たなタンパク質合成を阻害したところ、非修飾体XPCはいったん減少した後、また増加した。このことは、ポリユビキチン化XPCがプロテアソームにより分解されるのではなく、リサイクルされることを示唆している。このXPCの損傷依存的なポリユビキチン化は、XP-E細胞では起こらず、他のXP相補性群あるいはCS細胞においては観察された。したがってこの翻訳後修飾はDDB依存的であることが示唆された。

(b) XPC複合体には、中心体タンパク質として知られるcentrin2 (Cen2) が存在することを以前、我々は見出している。Cen2のNERにおける機能を明らかにする目的で、XPCタンパク質におけるCen2の結合領域を調べた。Cen2はカルモジュリンタンパク質ファミリーの一員であるが、このファミリーは他のタンパク質の α ヘリックス部分と相互作用することが知られている。そこでXPCタンパク質の二次構造予測の結果に基づき、 α ヘリックスを指標とした種々の欠変異体を作成してCen2との相互作用を検討した。その結果、XPCタンパク質のC末端近傍の20アミノ酸(847-866アミノ酸)からなる領域がCen2との結合に十分であることが分かった。この領域の疎水性アミノ酸をアラニンに置換した点突然変異

XPCを用い、Cen2との相互作用に重要なアミノ酸を同定した。

(c) 酵母2ハイブリッド法によるスクリーニングの結果、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昨年度見出した。また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。TDGはSUMO-1化されてAPサイトから遊離しやすくなることが報告されている。そこでSUMO1-TDGを調製し、その活性に対するXPC-HR23Bの影響を調べたところ、促進が見られた。このことはTDG活性に対するXPCとSUMO1化による促進効果は共存していることを示唆している。一方、一本鎖および二本鎖のDNAからウラシルを除去するSMUG1の活性もXPC-HR23Bによって促進された。このことは、XPCタンパク質が少なくとも複数のDNAグリコシラーゼの働きを制御していることを示している。

(d) 光増感反応やヒドロキシラジカルによるチミンの損傷生成物としてホルミルウラシル (fU) が同定されており、その変異原性やBER反応については既に報告されている。fUはチミンとほぼ同じ形で、水素結合様式も維持しているため、そのような損傷がNERの基質になるのに興味深い。そこでゲルシフト法により、XPC-HR23B はfUを認識することが分かった。次いでRIラベルしたfU入り二本鎖DNAを調製して切り出し反応を調べたところ、XPC-HR23B存在下では弱いながらもNER反応が進行した。このことはfUがNER反応の基質になることを示している。

II) 哺乳類細胞のTCR反応の分子機構

TCRには、CSの原因遺伝子産物である CSA、CSBタンパク質、それにRNAポリメラーゼIIを始め多数のタンパク質が関与すると考えられている。しかし、CSA、CSB遺伝子の機能を始め、ヒトにおけるTCRの分子機構は依然として不明である。今年度は以下のような知見を得た。

(a) オリゴdC-tailed templateに紫外線損傷であるCPDあるいは(6-4)光産物を1箇所挿入し、ヒトRNAポリメラーゼIIを用いて転写伸長反応を行わせた。その結果、いずれの損傷の場合も紫外線損傷部位でRNAポリメラーゼIIは完全に転写を停止した。この時のnascent RNAのRT-PCR/sequencingから、RNAポリメラーゼIIは損傷部位に正しい塩基を取り込んだ場合も3者複合体を形成して転写を停止することを明らかにした。他方、原子間力顕微鏡を用い、損傷部位で停止したRNAポリメラーゼIIを可視化した。

(b) XPAタンパク質に結合する新規タンパク質で、転写およびTCRに関与するXAB2 (XPA-binding protein 2) を単離した。XAB2タンパク質は他に5種類の構成因子からなる複合体を形成することを明らかにした。siRNAでXAB2をノックダウンした細胞のTCR能は低下し、紫外線高感受性となること、mRNAスプライシングにも異常を示すことを明らかにした。

(c) 紫外線照射を受けた細胞では、CSAタンパク質が、CSBタンパク質依存性に核マトリクスに移行し、DNA損傷部位で停止しているRNAポリメラーゼIIと共局在することを明らかにした。一方、CS-A患者由来の変異CSAタンパク質は核マトリクスに移行せず、本現象がTCRに関連したものであることが示唆された。

(d) コケイン症候群A群(CSA)タンパク質をタンパク質複合体として精製し、DDB1、COP9 signalosome、Roc1、Cullin4AがCSAタンパク質とstoichiometricに複合体に含まれること、さらに、CSAタンパク質複合体はユビキチン・リガーゼ(E3)活性を持つことを確認した。CSAタンパク質複合体はRNAポリメラーゼIIaとも結合しているが、紫外線照射した細胞ではRNAポリメラーゼIIoとより多く結合した。他方、CS-A患者由来の変異CSAタンパク質は複合体形成することができず、E3活性もなかった。これらの結果は、CSAタンパク質複合体形成によるE3活性がTCRに必須であることを示唆する。CSAタンパク質複合体に含まれるDDB1の役割を解明するため、DDB1遺伝子をコンディショナルにノックアウトしたマウス及び細胞の作成を進展させた。

(e) UV^s症候群は、コケイン症候群と同様、TCRに異常を持つ遺伝疾患である。しかし、コケイン症候群と異なり神経症状や早期老化徴候は示さず、軽微な皮膚症状を示すのみである。あるUV^s症候群患者細胞の原因遺伝子を同定する目的で、単一染色体導入法により各染色体を導入したところ、10番染色体を導入した細胞がTCR能を正常化することを見いだした。10番染色体にはCSB遺伝子が存在するので、この患者細胞のCSB遺伝子をシーケンスしたところ、ヌル突然変異がホモ接合性に認められた。この患者がコケイン症候群と異なり神経症状や早期老化徴候を全く示さないにもかかわらず、CSB遺伝子ヌル突然変異を持つことは驚きであった。UV^s症候群患者が何故コケイン症候群徴候を示さないのが疑問として残った。

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 η 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ことが出来るが、もう一つの主要な紫外線損傷である(6-4)光産物は、normal型、Dewar型のいずれのisomerとも1つ目のヌクレオチドを重合した後に停止する。そこで本年度はpol η のパラログであるpol ι について調べた。いずれのisomerについてもpol ι はpol η に比べてはるかに取り込みの効率が悪く、またpol η とは逆にnormal型のほうがDewar型の約5倍効率が良いこと、normal型に対しては正しい塩基であるAを主に取り込むのに対し、Dewar型に対してはAとTを同程度の効率で取り込むことが分かった。加えてpol ι がCPDに対して塩基を取り込む効率は、(6-4)のnormal型、Dewar型よりも悪かった。これらの結果から、pol η の活性中心は2本鎖DNAのひずみの小さい損傷に適しており、pol ι の活性中心はよりひずみの大きい損傷に適していることが示唆される。

(b) Pol η の生理的機能を知る一助として、酵母2ハイブリッド法により相互作用するタンパク質を検索している。そのひとつとして、ヒトREV1タンパク質との相互作用が検出された。この相互作用はhREV1およびpol η をそれぞれ発現させた昆虫細胞のcrude extract

を有した免疫沈降によっても確認出来た。この相互作用に必要なREV1上の領域は、酵母2ハイブリッド法およびhREV1のC末端フラグメント（810-1251）を用いたpull-down法の結果から、C末端に存在すると考えられる。

(c) Pol η 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のほかに、プライマー/テンプレート型DNAに対する親和性も寄与している可能性を昨年度の研究で示唆した。そこで今年度は更に詳細に検討した。Pol η はテンプレート上のTT dimerに対してその一つ先まで延びたプライマーに安定に結合したが、そのプライマー末端が間違っただけの場合、結合性は顕著に減弱した。すなわち間違っただけのプライマー末端を持つ鋳型DNAからはpol η は容易に遊離すると考えられる。更にプライマーの長さがTT dimerの手前から2個先までの様々な長さのものを複製ポリメラーゼであるpol α や pol δ の基質にしてDNA合成反応を行わせたところ、いずれの酵素もTT dimerの2つ先のプライマーから効率良く合成を行い、それより手前のプライマーからはほとんど合成が行えなかった。このことは、pol η がTT dimerの2つ先まで合成してプライマーから離れ、そこから複製ポリメラーゼが伸長するというモデルを支持している。

(d) XP-V患者のモデルマウスを作成するため、pol η の必須領域を含むエクソン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、ES細胞へ導入した。薬剤で選択後、キメラマウスを作成し、B6マウスと交配してpol η のヘテロKOマウスを得た。そのヘテロ同士を掛け合わせたところ、ほぼメンデル則に従ってpol η のホモKOマウスが得られた。このマウスに毎日 2,000 J/m² のUVBを20週間継続して照射したところ、15週目あたりから背中に腫瘍が検出され、22週ではほとんど全てのホモKOマウスに腫瘍が観察された。一方、同じ条件下で、野生型およびヘテロKOマウスには腫瘍は検出されなかった。

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（(独)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

- ・ in vitro転写伸長反応系を用いたDNA損傷部位でのRNAポリメラーゼII及び修復タンパク質の動態解析
- ・ TCR、転写、スプライシングに関与するXAB2蛋白質複合体の機能解析

- ・ TCRに関与するCSA蛋白質複合体の構造と機能の解析
- ・ UV^o症候群原因遺伝子のクローニング
- ・ COFS症候群原因遺伝子のクローニング
- ・ DDB1欠損マウス及びコケイン症候群モデルマウスの作成

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) 論文発表

- Groisman R, Polanowska J, Kuraoka I, Sawada J, Saijo M, Drapkin R, Kisselev AF, Tanaka K and Nakatani Y: The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage, *Cell*, 113, 357-367 (2003).
- Inukai N, Yamaguchi Y, Kuraoka I, Yamada T, Kamijo S, Kato J, Tanaka K, and Handa H: A novel hydrogen peroxide-induced phosphorylation and ubiquitination pathway leading to RNA polymerase II proteolysis, *J. Biol. Chem.*, 279, 8190-8195 (2004).
- Lan L, Hayashi T, Rabeya RM, Nakajima S, Kanno S, Takao M, Matsunaga T, Yoshino M, Ichikawa M, te Riele H, Tsuchiya S, Tanaka K, and Yasui A: Functional and physical interactions between ERCC1 and MSH2 complexes for resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in mammalian cells, *DNA Repair*, 3, 135-143 (2004).
- Kino K, Shimizu Y, Sugasawa K, Sugiyama H, and Hanaoka F. ; Nucleotide Excision Repair of 5-formyluracil in vitro is enhanced by the presence of mismatched bases, *Biochemistry*, 43, 2682-2687 (2004).
- Watanabe T, Hayashi K, Tanaka A, Furumoto T, Hanaoka F, and Ohkuma Y: The carboxy terminus of the small subunit of TFIIE regulates the transition from transcription initiation to elongation by RNA polymerase II, *Mol. Cell. Biol.*, 23, 2914-2926 (2003).
- Kamada K, Hanaoka F, and Burley SK: Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition, *Mol. Cell*, 11,

875-884 (2003).

- McDonald JP, Frank EG, Plosky BS, Rogozin IB, Masutani C, Hanaoka F, Woodgate R, and Gearhart PJ: 129-derived strains of mice are deficient in DNA polymerase and have normal immunoglobulin hypermutation, *J. Exp. Med.*, 198, 635-643 (2003).
- Ng JM, Vermeulen W, van der Horst GT, Bergink S, Sugasawa K, Vrieling H, and Hoeijmakers JH.: A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein, *Genes Dev.*, 17, 1630-1645 (2003).
- Vaisman A, Frank EG, Iwai S, Ohashi E, Ohmori H, Hanaoka F, and Woodgate R.: Sequence context-dependent replication of DNA templates containing UV-induced lesions by human DNA polymerase iota, *DNA Repair*, 2, 991-1006 (2003).
- Jaoszycki P, Masutani C, Hanaoka F, Perez AB and Nishimura S: 8-Hydroxyguanine in a mutational hotspot of the c-Ha-ras gene causes misreplication, 'action-at-a-distance' mutagenesis and inhibition of replication, *Nucleic Acids Res.*, 31, 6085-6095 (2003).
- Higurashi M, Ohtsuki T, Inase A, Kusumoto R, Masutani C, Hanaoka F, and Iwai S : Identification and characterization of an intermediate in the alkali degradation of (6-4) photoproduct-containing DNA, *J. Biol. Chem.*, 278, 51968-51973 (2003).
- You Z, Ishimi Y, Mizuno T, Sugasawa K, Hanaoka F, and Masai H.: Thymine-rich single-stranded DNA activates Mcm4/6/7 helicase on Y-fork and bubble-like substrates, *EMBO J.*, 22, 6148-6160 (2003).
- Bassett E, Vaisman A, Havener JM, Masutani C, Hanaoka F, and Chaney SG: Efficiency of extension of mismatched primer termini across from cisplatin and oxaliplatin adducts by human DNA polymerases and in vitro, *Biochemistry*, 42, 14197-14206 (2003).
- Ito N, Nureki O, Shirouzu M, Yokoyama S, and Hanaoka F.: Crystal structure of the *Pyrococcus horikoshii* DNA primase-UTP complex: implications for the mechanism of primer synthesis, *Genes Cells*, 8, 913-923 (2003).
- Katafuchi A, Nakano T, Masaoka A, Terato H, Iwai S, Hanaoka F, and Ide H: Differential specificity of human and *Escherichia coli* endonuclease III and VIII homologues for oxidative base lesions, *J. Biol. Chem.*, 279, 14464-14471 (2004).
- Takemoto A, Kimura K, Yokoyama S, and Hanaoka F: Cell Cycle-dependent phosphorylation, nuclear localization, and activation of human condensin,

J. Biol. Chem., 279, 4551-4559 (2004).

- McCulloch SD, Kokaska RJ, Masutani C, Iwai S, Hanaoka F, and Kunkel TA: Preferential *cis-syn* thymine dimer bypass by DNA polymerase η occurs with biased fidelity, Nature, 428, 97-100 (2004).
- Takasawa K, Masutani C, Hanaoka F, and Iwai S: Chemical synthesis and translesion replication of *cis-syn* cyclobutane thymine-uracil dimer, Nucleic Acids Res, 32, 1738-1745 (2004).

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：0件（研究期間累積件数：1件）