

戦略的創造研究推進事業
発展研究 (SORST)

研究終了報告書

研究課題「ゲノムの修復機構を基盤とした癌
化・老化の制御」

研究期間：平成16年11月1日～
平成21年3月31日

研究代表者氏名：花岡文雄
(学習院大学理学部・教授)

1. 研究課題名

“ゲノムの修復機構を基盤とした癌化・老化の制御”

2. 研究実施の概要

癌は我が国における死因の第一位である。したがって癌の克服は国民的な悲願である。一方、我が国は男女ともに世界の最長寿国であり、美しく健康に歳をとること、これも生命科学者に託された使命である。ゲノムの損傷は、癌や老化のみならず遺伝病、神経疾患その他ゲノムに関わる広範な病気の原因となる。それを防御するために、生物は進化の過程で様々な DNA 修復機構を獲得してきた。本申請者らは、本研究事業の前段階として、戦略的基礎研究事業 (CREST) の「ゲノムの構造と機能」領域において、修復機構に欠損を有するヒト遺伝病の細胞を中心に研究し、代表的なゲノム修復機構であるヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair: NER) および損傷乗り越え複製 (translesion synthesis: TLS) に焦点を当て、その分子メカニズムの解明を行ってきた。NER には「ゲノム全体の修復」(global genome repair: GGR) と「転写と共役した修復」(transcription-coupled repair: TCR) と呼ばれる二つの経路があり、それぞれが癌化および老化・神経疾患の防止に役立っていると考えられる。

NER に欠損を有するヒト遺伝病の最も代表的なものとして色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum: XP) が知られている。XP は 8 つの遺伝的相補性群からなるが、そのうちの 7 つの群 (XP-A~G) は NER 欠損である。XP-C と XP-E とは GGR に欠損を持つが、TCR は正常である。その 2 群を除く XP-A~G は GGR、TCR の両方に欠損を有している。GGR に欠損を持つ 2 つの群は高頻度で皮膚癌を発症する。一方、GGR および TCR に欠損を示す XP の相補性群はやはり高頻度で皮膚癌を発症するが、それ以外に種々の神経症状を示す。他方、XP の 8 番目の群 (XP variant: XP-V) は NER には異常がなく、損傷乗り越え複製 (translesion DNA synthesis: TLS) に欠損を持っている。XP-V は GGR に欠損を持つ XP の相補性群同様、高頻度で皮膚癌を発症するが神経症状は示さない。

更に NER に欠損を有するヒト遺伝病として、XP のほかコケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS)、硫黄欠乏性毛髪発育異常症 (trichothiodystrophy: TTD)、紫外線高感受性症候群 (UV-sensitive syndrome: UV^sS) などが知られている。CS には A、B 二つの相補性群があり、いずれも遺伝的な早老症状を呈するが高発がん性は示さない。また TTD も高発がん性は示さず、早期老化傾向を示す。一方、UV^sS は日光紫外線高感受性を示すのみで、高発がん性も早期老化症状も示さない。これらの遺伝病では、NER のうち TCR にのみ欠損を示し、GGR は正常である。

本研究では、これらのヒト遺伝病の細胞や原因遺伝子とその産物である修復タンパク質を駆使することによって、GGR、TCR、TLS の分子メカニズムの解明に貢献することを目指した。特に巨大タンパク質複合体の単離・解析に焦点を当て分子レベルで徹底的に解明すると同時に、細胞レベル、個体レベル等、様々な階層を通して研究することにより、生物がゲノム情報を維持するための普遍的な戦略を明らかにし、老化や癌を制御するための手だてを獲得することを目的とした。また本研究の後半においては TCR を特に転写の側から研究すべく、crosstalk グループを立ち上げ、バックアップを図った。

我々をはじめとしたこれまでの生化学的な研究により GGR の基本的なメカニズムがある程度明らかにされてきた一方、その機能が生きた細胞内でどのように制御されているかについては、不明な点が多く残されていた。例えば、NER においてゲノム DNA 中に発生した数少ない損傷を効率よく検出するために、どのような機構で染色体構造が変換され、損傷認識因子がリクルートされるのか、また二つの損傷認識因子、紫外線損傷 DNA 結合タンパク質 (UV-DDB) と XPC の間にどのような機能連携があるのか、といった未解決の重要課題が山積していた。更にこれまで試験管内で得られた知見がどの程度 *in vivo* を反映しているのかを細胞内における修復タンパク質の挙動を解析することにより、分ってくるはずである。本研究においては GGR に関してこれらの点を研究し、UV-DDB が XPC タンパク質を

ユビキチン化し、損傷認識タンパク質どうしが損傷部位で交代するというメカニズムを明らかにした。また再構成クロマチンを用いた実験により、ヌクレオソーム・コアに損傷が発生した場合、XPC の認識に先立ってクロマチン構造のリモデリングが必要になることが分かった。さらに GFP 融合タンパク質と FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 法を用いた実験から、紫外線照射により XPC が損傷認識に働く際、UV-DDB に依存した反応と非依存的な反応とが存在することが明らかとなった。

TCR に関しては、未だ無細胞系が確立されておらず、その分子機構の解明は GGR に比べて立ち遅れていた。しかし既事業において田中らがいくつもの重要な手掛かりを得ており、本研究でその理解が特段に進むと期待された。実際にいくつものブレークスルーが得られた。まずこれまで機能未知であった CSA が DDB1 などと複合体を形成し、ユビキチンリガーゼ活性を示すことを見出した。またこれまで独立の修復因子と考えられていた TFIIH と XPG が複合体を形成し、XPG が TFIIH の安定性に寄与していること、XPG の変異によっては TFIIH が不安定となり、その結果、転写活性化に異常をもたらすことが分かった。さらに UV^sS 患者細胞の一つは CSB 遺伝子のヌル突然変異をホモ接合性に有し、CSB タンパク質を完全に欠損していた。他方、CS 徴候を示す CS-B 患者では短縮型 CSB タンパク質が生成しており、それが何らかの gain-of-function を有していることが示唆された。

TLS に関しては、これまでもっぱら生化学的な解析が中心であったが、細胞レベル、そして個体レベルの研究へと発展させていく必要がある段階に来ていた。そこでまず XP-V の原因遺伝子産物である DNA ポリメラーゼ・イータ (DNA polymerase η : Pol η) 複合体を分離し、質量分析によって複合体を構成しているタンパク質を網羅的に解析した。その結果、様々なタンパク質が Pol η 複合体に含まれていたが、量的に主要なものとして Rad18 と Rad6 というユビキチンリガーゼタンパク質と REV1 という Pol η と同じ Y ファミリーに属する DNA ポリメラーゼ、それに TLS 反応においてポリメラーゼ・スイッチングに働いていることが示唆されている PCNA などが検出された。中でも Pol η と REV1 という Y ファミリー DNA ポリメラーゼ同士の相互作用について深く追求し、その意義を明らかにすることができた。また Pol η とそのパラログである Pol ι について、それぞれ単独あるいは二重に遺伝子をノックアウトしたマウスを作出し、紫外線照射による皮膚発がん実験を行ない、興味深い結果が得られた。

さらに DNA 修復に関連の深い転写因子である TFIIH および TFIIIE についても研究も行った。RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) は、転写の際最大サブユニットの C 末 7 アミノ酸繰返し領域 CTD の 2 番と 5 番セリンがリン酸化され活性化される。基本転写因子の TFIIH の p62 の N 末 PH ドメインが TFIIIE α 酸性領域と結合することと両者の結合構造を解明し、この結合ががん抑制タンパク p53 の p62 との結合と競合する結果から、TFIIIE α と p62 は p53 による転写と DNA 修復のスイッチに関わる可能性を示した。

これらの研究成果は、今後人類にとってますます大きな脅威となる可能性のある紫外線を始めとする遺伝子傷害剤の克服に裨益すると考えられる。以下にサブグループごとの「研究実施の概要」について述べることにする。

(A) GGR に関わるクロマチン構造変換機構と GGR 因子の細胞内制御 (GGR グループ)

1) 哺乳類細胞に紫外線を照射すると、XPC タンパク質が一過性にユビキチン化を受けると、このユビキチン化 UV-DDB の存在に依存していることを見出した。解析の結果、本 SORST 研究の TCR グループの田中らによって見出された DDB1 と DDB2 とからなる UV-DDB が細胞内で cullin 4A、Roc1 と形成しているユビキチンリガーゼ (E3) 複合体が紫外線によって活性化され、XPC をポリユビキチン化することが判明した。一方、UV-DDB 中の DDB2 も自己ユビキチン化を受け、こちらは DNA 結合能を失するのに対し、XPC のポリユビキチン化体は DNA 結合能を保持していた。結果的に紫外線損傷部位にまず UV-DDB が結合した後、タンパク質間相互作用により XPC がリクルートされ、XPC と DDB2 のユビキチン化を経て、UV-DDB から XPC への受け渡しが可能になるというモデルが描ける。2) 我々のこれまでの研究から、XPC 複合体に中心体タンパク質である centrin 2 が含まれていることが分かっているが、その役割は明らかでなかった。そこでまず XPC 分子上、centrin 2 との結合に必須な疎水性アミノ酸を同定し、そこに変異を入れた XPC を細胞に発現させた。その結果、野生型 XPC

を発現している細胞に比べ、部分的な GGR 欠損を示した。 *In vitro* において、centrin 2 は XPC 複合体の損傷 DNA 結合活性を増強し、NER 反応を促進した。 3) 再構成クロマチンを用いた実験により、XPC による (6-4) 光産物の認識がヌクレオソーム構造によって顕著に阻害された。一方、UV-DDB の結合は、比較的抵抗性を示した。このことは、ヌクレオソーム・コア中に損傷が発生した場合、XPC による認識に先立ってクロマチン構造のリモデリングが必要であることを示唆している。そのような反応の候補としてヒストンの翻訳後修飾が考えられ、UV-DDB がヒストンアセチル化酵素の一つである CBP/p300 と相互作用することを見出した。 4) NER に関与するタンパク質の細胞内での挙動を調べるため、GFP 融合タンパク質として細胞内で発現させ、FRAP 法などを利用して解析した。細胞に紫外線照射した後の GFP-XPC の挙動は、低線量の場合は UV-DDB に依存していたが、比較的高い線量では UV-DDB に依存しなかった。このことは、UV 損傷への XPC の結合が、発生した (6-4) 光産物の数と DDB2 分子の数の兼ね合いによって規定されていることを示唆している。

(B) TCR の分子機構とコケイン症候群やその類縁疾患の病態解析 (TCR グループ)

1) CSA は、DNA 損傷を受けた細胞では、CSB や TFIIF 依存性に核マトリクスへ移行し RNA ポリメラーゼ II と共局在した。CSA は DDB1、Roc1、Cullin4A、COP9 signalosome と複合体を形成しユビキチンリガーゼ活性を持ち、紫外線照射された細胞において CSB や RNA ポリメラーゼ II をユビキチン化した。 2) TCR に関与する新規因子として XAB2 蛋白質複合体を同定した。XAB2 欠損マウスは着床前に致死となり、XAB2 は生命維持に必須の因子である。XAB2 をノックダウンした細胞は紫外線高感受性、TCR の異常を示し、RNA 合成や mRNA スプライシングの異常も示した。 3) 酸化的 DNA 損傷を 1 ヶ所に持つ oligo-dC tailed DNA template と ヒト RNA ポリメラーゼ II (RNAP II) を用いた *in vitro* 転写系を用い、RNAP II が損傷部位に遭遇した時、転写を停止あるいはバイパスする機構を解析した。一部は損傷部位で転写を停止したが、一部はバイパスした 8-Oxo-Guanine 損傷の場合、TFIIS の添加で RNAP II の転写バイパスが促進され、TFIIS をノックダウンした細胞は過酸化水素に高感受性を示した。TFIIS の損傷部位における転写バイパス促進機能が細胞の損傷応答に重要であることを示唆する。 4) XPG は TFIIF と安定な蛋白質複合体を形成することを明らかにした。XPG 遺伝子の突然変異で XP と CS を合併する患者 (XP-G/CS) では、TFIIF 構造の安定性に異常を示し、その結果、核内受容体の TFIIF によるリン酸化が欠損し、転写活性化に異常を示した。CS の発症が NER 異常に加え、転写の異常にも起因することを明らかにした。 5) UV^s 患者 UV^s1KO は CSB 遺伝子のヌル突然変異をホモ接合性に持ち、CSB 蛋白質は完全に欠損していた。他方、CS 徴候を示す CS-B 患者では何らかの短縮 CSB 蛋白質が生成されていた。これらの結果から、短縮 CSB 蛋白質が何らかの gain-of-function をもち、それが CS 徴候の原因になっていることを示唆した。正常型及び短縮 CSB 蛋白質と結合する蛋白質を同定し、その機能を短縮 CSB 蛋白質が阻害することを見いだした。一方、臨床的には同じ UV^s 徴候を示し TCR 能が欠損している患者 Kps3 は、CSB 遺伝子を始め既知の NER や TCR 因子の遺伝子に突然変異が認められないことを確認した。Kps3 原因遺伝子は新規 TCR 因子をコードしていると考えられたので、微小核融合法を用いた原因遺伝子のクローニングを試みた。 6) 遺伝子ターゲティング法により作成した A 群 XP 遺伝子欠損 *Xpa*(^{-/-}) マウスは、精巣が加齢依存性に変性し、自然発ガン頻度が高く種々の腫瘍が各臓器に発症した。高頻度日光皮膚がん発症以外でも *Xpa*(^{-/-}) マウスは XP-A 患者の良いモデルになることを示唆した。

(C) TLS におけるポリメラーゼスイッチング機構と Y ファミリーポリメラーゼの機能解析 (TLS グループ)

1) タグ付き Pol η を安定的に発現する HeLa 細胞株を確立し、Pol η 複合体を精製した。質量分析法により構成サブユニットの同定を行ったところ、Rad18、Rad6、PCNA などの既知タンパク質が検出された。また酵母 2 ハイブリッド法により見いだしていた REV1 も存在することがウエスタン法により確認された。この細胞に紫外線を照射して、それを分画して調べたところ、これらのタンパク質を含む複合体が紫外線照射によりクロマチン画分に移行することが分かり、その生理的意義が示唆された。また細胞を G1/S 境界に同調したとき、あ

るいは S 期の途中で紫外線照射したときにも同様の現象が見られ、複製フォーク停止との相関が示された。2) 上記のように、もともと Pol η と相互作用するタンパク質として酵母 2 ハイブリッド法により見出していた REV1 が細胞内で Pol η 複合体に含まれていることがわかったので、その相互作用の生理的意義を調べるため、相互作用部位の決定とそれに重要なアミノ酸残基の検索を行った。その結果、Pol η 上で二か所の連続したフェニルアラニンが候補として挙がってきたので、それらをアラニンに置換した変異タンパク質を XP-V 細胞に発現させた。その結果、紫外線感受性や紫外線誘発突然変異率には変化は見られなかったが、自然突然変異率が野生型 Pol η を発現する XP-V 細胞と比較して有意に高かった。3) 個体レベルでの Pol η の機能を探るため、feeding RNAi 法により線虫 Pol η の発現レベルを低下させ、その影響を調べた。予想通り Pol η は線虫個体の発生そのものや生存自体には必須ではないことが示された。次に卵形成から受精・発生の各ステージでの紫外線感受性を胚の孵化率により検討したところ、受精・卵割が行われる初期胚発生のステージの胚において、孵化率の著しい低下が見られた。すなわち、頻繁に DNA 複製と細胞分裂が行われている時期では、Pol η は恐らく損傷乗り越え複製を介して、紫外線損傷による障害を最小限に抑えていると考えられた。さらに初期胚発生のステージほどではないが、減数分裂過程で染色体間の相同組換えが起こる pachytene 期の胚でも孵化率の低下が見られ、Pol η は減数分裂時における DNA 障害の回避機構にも関与していることが示唆された。4) 既に我々は Pol η ノックアウトマウスを作出し、紫外線による高い皮膚発がんを示すことを見出しているが、本研究では Pol η /Pol ι 二重欠損マウスを作出し、Pol η あるいは Pol ι の単独ノックアウトマウスと比較した。紫外線皮膚発がん実験を行ったところ、皮膚がん発症の時期は二重欠損マウスでも Pol η 単独ノックアウトマウスと統計的な違いは見られなかった。また Pol ι 単独ノックアウトマウスは野生型マウスと同じく紫外線に抵抗性を示した。しかし生じた癌を病理学的に調べたところ、Pol η /Pol ι 二重欠損マウスにおいては、Pol η 単独ノックアウトマウスには見られない肉腫が検出され、Pol η /Pol ι 二重欠損マウスではより悪性度の高い癌が生じることが明らかとなった。このことは、Pol η だけでなく Pol ι も個体を紫外線による皮膚癌の形成から防御していることを示している。これまで Pol ι に何らかの生理的意義を認めた例はなく、これが初めての例である。また病理学的診断により、Pol η ヘテロ欠損マウスにおいて、統計的有意差をもって野生型マウスに比べて紫外線誘発皮膚がんの発症頻度が高く、POLH 遺伝子のヘテロの保因者においても紫外線照射に対する注意が必要な可能性を示唆している。

(D) DNA 損傷修復に関わる TFIIH の遺伝子発現に向けた核内 Crosstalk における機能解析 (Crosstalk グループ)

RNA ポリメラーゼ II (RNAP II) は、転写の際最大サブユニットの C 末 7 アミノ酸繰返し領域 CTD の 2 番と 5 番セリンがリン酸化され活性化される。本グループは、CTD キナーゼであるヒト基本転写因子 TFIIH とメディエーターによる転写制御を解析しており、転写開始複合体形成の際に TFIIH がその p62 サブユニットにより、基本転写因子 TFIIIE の α サブユニット C 末酸性領域と結合して複合体に加わることで、同じく CTD リン酸化するメディエーターの CDK8 サブユニット発現を siRNA によりノックダウンして転写活性化に機能することを明らかにしてきた。本研究では、p62 の N 末 PH ドメインが TFIIIE の酸性領域と結合することと両者の結合構造を解明し、この結合ががん抑制タンパク p53 の p62 との結合と競合する結果から、TFIIIE α と p62 は p53 による転写と DNA 修復のスイッチに関わる可能性を示した。またメディエーター分面に CDK8 同様に同定された CDK11 を解析し、CDK11 も複合体を形成して CTD リン酸化するが、転写では CDK8 の反対で抑制に働くことを見出した。

3. 研究構想

ゲノムの損傷は、癌や老化、遺伝病など、ゲノムに関わる広範な病気の原因となる。それを防御するため生物は進化の過程で様々な DNA 修復機構を獲得した。研究代表者らは修復機構に欠損を有するヒト遺伝病の細胞を中心に研究し、複数の原因遺伝子を世界に先駆けてクローニング・解析してきた。とりわけヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair: NER) 機構の二つの経路、「ゲノム全体の修復 (global genome repair: GGR)」と「転写とカップルした修復 (transcription-coupled repair: TCR)」について、分子レベルでの解析で世界をリードしている。更に「損傷乗り越え複製 (translesion synthesis; TLS)」という新しい損傷応答機構の発見・解析についても先駆的な研究を進めている。これらの研究は、CREST 研究において大きな進展を見せた。本研究では、CREST の研究成果を踏まえ、上記のようなゲノムの安定性を守る機構をさらに徹底的に解析し、近い将来、癌や老化を制御するための基盤を作るべく研究を遂行した。具体的には GGR 研究グループ、TCR 研究グループ、TLS 研究グループ、さらに研究の後半では転写調節の側から NER を観察する Crosstalk 研究グループを加え、4 つの研究グループが相互に連携をとりつつ行った。各研究グループの具体的な役割分担は下記のとおりである。

(A) GGR に関わるクロマチン構造変換機構と GGR 因子の細胞内制御 (GGR グループ)

遺伝情報維持に重要な役割を担う NER、とりわけ発がんの抑制に働く GGR の分子機構を解明するとともに、真核細胞の染色体 DNA に特有な構造体であるクロマチン構造が修復タンパク質、なかでも損傷認識機構に及ぼす影響の解明を目指し、以下のような研究計画を推進した。

- (a) 細胞が紫外線照射されたときの XPC タンパク質の動態を調べ、それがポリユビキチン化されることを見出したので、その修飾を行う因子の同定とその生理的な意義を調べた。
- (b) XPC タンパク質と相互作用する新規因子を探索し、SUMO 修飾に関わる酵素を見出したので、その生理的な意義を調べる。
- (c) XPC タンパク質複合体に中心体タンパク質である centrin 2 が存在することを見出したので、DNA 修復における centrin 2 の役割を調べる。
- (d) XPC や UV-DDB などの GGR における損傷認識タンパク質が損傷を認識する際、ヌクレオソーム構造がどのような影響を与えるかを再構成クロマチンを用いて検討する。
- (e) GGR 因子、とくに XPC タンパク質を中心に、細胞内動態を詳細に検討するため、GFP 融合タンパク質の形で細胞に発現させ、紫外線照射後の易動度の変化を FRAP 法により調べる。

以上の研究により、GGR の分子機構、とりわけその初期反応の解明やポリユビキチン化によるタンパク質の機能変化の例、また修復とクロマチン構造との関連の解明などに貢献した。

(B) TCR の分子機構とコケイン症候群やその類縁疾患の病態解析 (TCR グループ)

細胞死の抑制に働く TCR の分子機構を解明するとともに、TCR 異常遺伝疾患である XP、CS、UV^s の分子病態の解明を本研究グループの研究目標とした。本研究グループの XP や CS 遺伝子産物に関するこれまでの研究成果を基盤として、それらを発展させるべく、以下のような研究計画を推進した。

- (a) DNA 損傷を受けた細胞では CSA タンパク質が CSB 依存性に核マトリクスに移行し、損傷部位で停止した RNAPII と共局在するが、その分子機構と TCR における意義を解析した。
- (b) CSA はユビキチンリガーゼタンパク質複合体 (E3) を形成するが、CSA 複合体 E3 がユビキチン化するターゲットの検索と TCR 機構における意義を解析した。
- (c) *In vitro* 転写系を用いて TCR の初期反応を解析した。
- (d) XPD や XPG 等の新規機能を解析し、XP や CS の分子病態の解明を行った。特に、XPG タンパク質が TFIIH と安定な複合体を形成することを本研究で見出し、その分子機構と XP-G/CS の病態との関連を解析した。

(e) CS と同様に TCR に異常をもつヒト遺伝疾患 UV^s の原因遺伝子クローニングや病態の解析を行った。

以上の研究により、TCR、及び、転写と修復のクロストークに関わる新規の生命現象の解明、XP や CS の分子病態の解明に貢献した。

(C) TLS におけるポリメラーゼスイッチング機構と Y ファミリーポリメラーゼの機能解析 (TLS グループ)

TLS に関しては、われわれの研究によって Pol η が紫外線誘発がんの抑制に働いていることが明らかになったが、それ以外の Y ファミリー DNA ポリメラーゼについては、生理的な役割がほとんど分かっていない。また複製フォークが DNA 損傷によって進行を妨げられたときに、複製ポリメラーゼから損傷乗り越え型のポリメラーゼにどのようにスイッチするのかという点が非常に重要である。そのような観点から、以下に述べるような研究計画を推進した。

- (a) タグ付き Pol η を安定に発現する細胞株を作製し、大量培養後、Pol η 複合体を精製して、そこに含まれているタンパク質を質量分析により解析する。検出されたタンパク質の主要なものについては、ウェスタンブロット法などにより確認し、種々の条件においてその相互作用の変動を調べる。
- (b) 酵母 2 ハイブリッド法により既に Pol η との相互作用を見出している REV1 との相互作用部位を決定し、相互作用が出来なくなる変異 Pol η を作成、XP-V 細胞にて発現させ、その相互作用の生理的な意義を調べる。
- (c) RNAi 法により線虫 Pol η の機能を阻害したときの影響を調べる。
- (d) Pol η とそのパラログである Pol ι の単独および二重欠損マウスを作出し、それらの紫外線誘発皮膚癌の解析を行う。また発がん抑制以外の機能についても調べる。
- (e) ヒト Pol η の翻訳後修飾を調べ、その生理的な意義を追及する。

これらの研究によって、複数存在する TLS ポリメラーゼの機能と制御に関する知見を得る。また関連した研究として正常な DNA 複製の分子メカニズムに関する研究も並行して行い、損傷乗り越え複製との異同についても解析する。

(D) DNA 損傷修復に関わる TFIIH の遺伝子発現に向けた核内 Crosstalk における機能解析 (Crosstalk グループ)

NERの欠損遺伝病の原因遺伝子産物XPB、XPD、TFB5をサブユニットとして有するTFIIHは、真核生物細胞核内において遺伝子発現のための協調的事象のCrosstalkの要として機能している。そこで、これら機能が欠損病態とどのように関連しているかを解明していくことを目標とする。そのため、TFIIHの構造と活性解析、遺伝病の病態との関連、RNAPIIのCTDのリン酸化修飾と核内Crosstalkについて生化学、細胞生物学およびプロテオミクスの解析を進めていく。そこで、以下の4つの研究を行うことを計画した。

- (a) TFIIHが転写の際にRNAPIIのCTDをリン酸化し、転写開始点の周辺を開裂する際にこれを制御するTFIIEと、TFIIHの10サブユニットの中のp62サブユニットで結合している。そこで、このサブユニットとTFIIEの側のTFIIHとの結合に関わるTFIIE α サブユニットの結合構造を決定し、転写開始の際の制御機構の解明につなげる。
- (b) TFIIHのサブユニットの遺伝的欠損がTFIIH自身の転写活性に及ぼす影響を調べる。遺伝病患者由来の培養細胞を用いて、レポーターアッセイによる細胞内転写活性を調べ、また欠損TFIIHを精製して試験管内転写再構成系において活性への影響を調べる。
- (c) TFIIHのサブユニットの遺伝的欠損がPol I ICTDリン酸化とこれにより制御される核内遺伝子発現Crosstalkに及ぼす影響を見る。CTDリン酸化は転写に影響するだけでなく、RNAプロセッシングやクロマチン制御に関わるタンパク質因子群をリン酸化されたCTDに結合させるプラットフォームとしても機能しているので、遺伝的欠損がCTDリン酸化と、これと関連する核内事象にどう影響しているかを調べる。その際、TFIIHと協調してCTDリン酸化に関わることが明らかになってきているメディエーター複合体の関与に関しても、siRNAによるキナーゼ活性のノックダウンなどの手法を用いて解析していく。

(d) TFIIHの遺伝的欠損は、またその病態として脳神経疾患を呈するが、これがいかなる遺伝子の発現により現れるのかを培養細胞やChIP-on-CHIPアッセイ、プロテオミクスなどの手法を用いて解析する。

以上の研究により、TCRと関連した転写反応の詳細な機構の解明に貢献するとともに、修復とのクロストークについても有益な情報を提供することができた。

4. 研究実施内容

4. 1 “GGR に関わるクロマチン構造変換機構と GGR 因子の細胞内制御 (GGR グループ)”

(1) 実施の内容

XPC タンパク質および UV-DDB のユビキチン化の解析

細胞に紫外線を照射すると、XPC タンパク質が一過性にユビキチン化を受けることを見出した。この修飾は XP-E 群患者由来の細胞で特異的に欠損しており、野生型 DDB2 遺伝子の発現により回復することから、UV-DDB 依存的なユビキチン化であることが示された。一方、UV-DDB が細胞内において cullin 4A、Roc1 を含むユビキチンリガーゼ (E3) 複合体を形成しており、紫外線照射によってこの E3 が活性化されることが本 SORST 研究 TCR グループの田中らによって報告された。そこで田中グループとの共同研究により、DDB1、DDB2、cullin 4A、Roc1 から成るヘテロ 4 量体をバキュロウイルス発現系により発現・精製し、これに E1、E2 (UbcH5)、ユビキチンを加えて XPC のユビキチン化反応を *in vitro* で再構成することに成功した。この系において XPC だけでなく、DDB2 と cullin 4A もポリユビキチン化を受けることがわかった。興味深いことに、ユビキチン化された DDB2 がプロテアソームにより分解されるのに対して XPC のユビキチン化は可逆的であることが示された。

これらのユビキチン化の GGR における意義を明らかにするため、XPC、UV-DDB それぞれの損傷 DNA 結合活性に対するユビキチン化の影響を生化学的に解析した。その結果、ポリユビキチン化された UV-DDB が紫外線損傷 DNA に対する結合活性をほぼ完全に失うのに対して、ポリユビキチン化 XPC は DNA 結合能を保持していた。また、無細胞 NER 反応系において UV-DDB が存在する場合に限り、ポリユビキチン化を阻害すると修復反応も阻害されることがわかった。以上の結果から、紫外線による DNA 損傷の認識と修復機構に関して図 1 のようなモデルを提唱した。すなわち、まず UV-DDB が損傷を効率よく認識して結合した後、タンパク質間相互作用を介して XPC が損傷部位にリクルートされる。続いて損傷部位で UV-DDB-E3 によるポリユビキチン化反応が起こることにより、UV-DDB 自身は DNA 結合能を失って解離し、その結果 UV-DDB から XPC への損傷の受け渡しと修復反応の開始が可能になるものと考えられる。

DDB2 のユビキチン化に対して、XPC のユビキチン化の意義は必ずしも明らかになっていない。そこで XPC タンパク質のユビキチン化部位を絞り込むため、人工的にプロテアーゼ切断配列を挿入した変異タンパク質を発現・精製した。この変異 XPC を基質として *in vitro* でユビキチン化反応を行い、その後プロテアーゼ処理を行うことにより、XPC の中央領域が主にユビキチン化の標的となっていることが示唆された。同時に XPC のユビキチン化部位がかなり多いことがわかったため、この中央領域に存在する約 30 か所のリジン残基をすべてアルギニンに置換すると共に、N 末端の 117 アミノ酸を欠失した変異 XPC を作成したところ、*in vitro* におけるユビキチン化がほぼ抑えられることが示された。この変異 XPC の *in vivo*、*in vitro* における修復活性をさらに検討していく予定である。

さらに XPC タンパク質の可逆的ユビキチン化の意義を明らかにするため、XPC を基質とする脱ユビキチン化酵素の同定を試みた。ヒト正常線維芽細胞 WI38 VA13 に紫外線 10

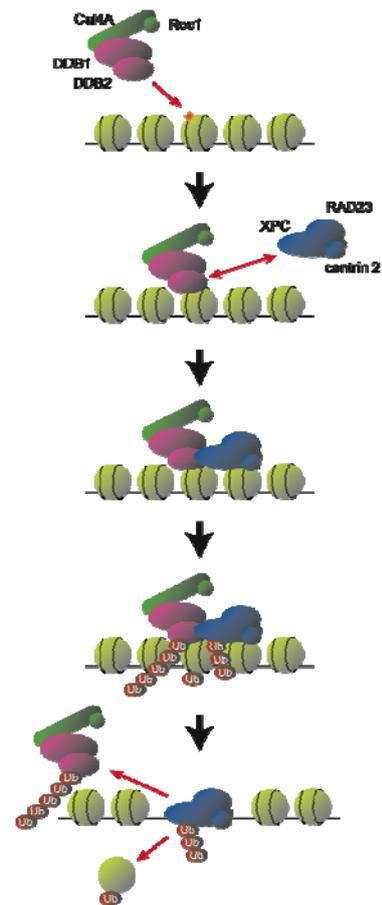


図 1 GGR におけるユビキチン化の役割に関するモデル

J/m2 を照射すると、約 1 時間後をピークとしてユビキチン化 XPC のバンドが蓄積し、照射後 6~8 時間までにはほぼ消失することがウェスタンブロッティングにより観察される。既知のヒト脱ユビキチン化酵素（約 60 種類）を体系的にノックダウンする siRNA ライブラリーを用い、照射後 8 時間でユビキチン化 XPC の残存が見られるものをスクリーニングした。その結果、候補となる脱ユビキチン化酵素が一つ見出された。この脱ユビキチン化酵素をノックダウンすると、紫外線未照射の細胞でもユビキチン化 XPC の若干の蓄積が見られること、また同時に DDB2 をノックダウンするとこの紫外線非依存的な XPC のユビキチン化も消失することがわかった。このことは UV-DDB E3 に依存した XPC のユビキチン化が、紫外線未照射細胞においても一定のレベルで起こっていることを示唆している。脱ユビキチン化酵素をノックダウンした時の細胞の GGR 活性に対する影響について解析を進めている。

XPC タンパク質の SUMO 化の解析

XPC と相互作用する新規因子を探索する目的で酵母 2 ハイブリッド法によるスクリーニングを行ったところ、ユビキチン様タンパク質 SUMO-1、および SUMO 修飾に関わる酵素 (Ubc9、PIAS) が候補として得られた。FLAG-XPC を安定に発現する細胞株で HA-SUMO-1 を過剰発現することにより、XPC が実際に細胞内で SUMO 化されうることを確認した。ユビキチン化と異なり SUMO 化 XPC は紫外線非照射細胞中でも存在しており、紫外線照射による誘導は特に観察されなかった。

精製した SUMO 化酵素を用いて、XPC の SUMO 化反応を *in vitro* で再構成することに成功した。この系は XPC の SUMO 化を高感度で検出できるため、これを利用して修飾部位の同定を試みた。XPC が数か所持つ SUMO 化コンセンサス配列についてさまざまな組み合わせでリジン→アルギニン置換変異体を作成し、*in vitro* SUMO 化反応を行うことにより、少なくとも N 末端に近い 3 か所が SUMO 化されうることがわかった。*in vitro* における XPC のユビキチン化が紫外線損傷 DNA の存在によって促進を受けるのに対して、SUMO 化反応に関してはそのような促進効果は認められなかった。また、XPC の紫外線損傷 DNA に対する結合性も SUMO 化の有無によって特に影響を受けなかった。

SUMO 化を受ける 3 か所のリジン残基をすべてアルギニンに置換した XPC 3KR 変異体を作成し、これを安定に発現する形質転換細胞を XP-C 群細胞 XP4PASV を親株として樹立した。この細胞に紫外線を照射した後、(6-4) 光産物の修復速度を測ったところ、部分的な修復の遅延が認められている。これが XPC の SUMO 化欠損の結果であるかどうかを調べるために、XPC 3KR 変異体の N 末端に SUMO を融合したものを XP4PASV 細胞で安定に発現させ、表現型が回復するかどうかを調べている。

XPC タンパク質複合体に含まれる centrin 2 の機能解析

中心体タンパク質として知られる centrin 2 が、XPC タンパク質と安定な複合体を形成することが明らかになった。このことは centrin 2 が GGR と細胞周期制御の関連において何らかの役割を担っている可能性を示唆するが、その詳細は明らかではない。そこでまず XPC の種々の欠失変異体を作成し、C 末端近くの約 20 アミノ酸から成る短い両親媒性 α -ヘリックスを centrin 2 結合領域として同定した。さらに、この領域に存在する 3 個の疎水性アミノ酸をアラニンに置換することにより、centrin 2 との相互作用を欠く変異 XPC を作成することに成功した。

centrin 2 と結合できない変異 XPC を安定に発現する細胞は、野生型 XPC を発現する細胞と比較して GGR の部分的な欠損を示した。また *in vitro* において、centrin 2 が XPC 複合体の損傷 DNA 結合活性を増強し、NER 反応を促進することを明らかにした (図 2)。centrin 2 が属するカルモジュ

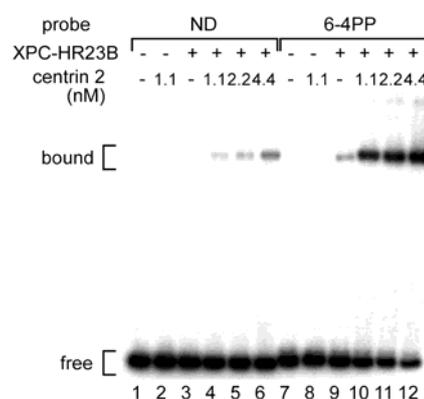


図 2 centrin 2 は XPC の損傷 DNA 結合活性を増強する

リン・ファミリータンパク質の多くは、N末端側とC末端側の二箇所のEFハンド・モチーフを介して標的タンパク質に結合することが知られているが、centrin 2 の場合はそのC末端側だけでXPCとの結合、およびNERの促進に十分であることがわかった。そこで、centrin 2のN末端側と特異的に相互作用する因子の存在を想定し、この領域をFLAGタグと融合したものを安定に発現する細胞株を作製して、アフィニティ・クロマトグラフィーと質量分析による因子の同定を進めている。

ヌクレオソーム構造を介したNERの解析

細胞内において発生したDNA損傷の認識や修復にあたっては、クロマチン構造の影響を考慮する必要がある。(6-4)光産物を部位特異的に含む約150塩基対のDNAと精製ヒストンを用いてモノヌクレオソームを再構成し、XPCやUV-DDBの結合を裸のDNAの場合と比較した。その結果、XPCによる(6-4)光産物の認識がヌクレオソーム構造によって顕著に阻害されるのに対して、UV-DDBの結合は比較的耐性を示すことがわかった。すなわち、ヌクレオソーム・コア中に損傷が発生した場合、XPCによる認識に先立ってクロマチン構造のリモデリングが必要になると考えられる。

一方、UV-DDBがヒストンアセチル化酵素(HAT)と相互作用することが以前に他のグループにより報告されていた。またUV-DDB-E3がヒストンをユビキチン化するという報告もなされており、UV-DDBがまずヌクレオソーム中の損傷を認識して結合した上で、ヒストン修飾→解離を経てXPCを呼び込む、という可能性が考えられた。このことを検証するため、FLAGタグを融合したCBP/p300をバキュロウイルスを用いて昆虫細胞で発現させ、精製した。UV-DDBとCBP/p300の物理的相互作用を確認した上で、*in vitro*で再構成したヌクレオソームを基質としてCBP/p300によるヒストンのアセチル化を観察したところ、UV-DDBや紫外線損傷の有無によるアセチル化レベルの変化は特に認められなかった。その一方で、DDB2がCBP/p300によるアセチル化の基質となることがわかった。このアセチル化がUV-DDBの損傷DNA結合活性、およびDDB2のユビキチン化や紫外線照射に伴う分解に与える影響について現在解析を進めている。

GGR 損傷認識因子の細胞内ダイナミクスの解析

XPCタンパク質の細胞内動態を詳細に検討する目的で、GFP融合XPCタンパク質(GFP-XPC)を生理的なレベルで安定に発現する細胞株を作成した。この細胞に紫外線を照射した時のGFP-XPCの細胞内易動度の変化をFRAP (fluorescence recovery after photobleaching)法により解析した。細胞に紫外線照射することにより、GFP-XPCが損傷認識と修復反応に関わることを反映して易動度の低下が認められた。GFP-XPCの易動度は紫外線照射後5時間までに元のレベルに回復したことから、この易動度低下は(6-4)光産物の修復を反映したものと考えられる。興味深いことに、GFP-XPCの易動度低下は単純に紫外線量に比例しない。すなわち5~10 J/m²の比較的低線量で一度飽和した後、さらに線量を増すと再び易動度が低下するという二相性を示す。DDB2の過剰発現、およびノックダウンの実験により、比較的低線量で見られる一段階目の易動度低下がUV-DDB依存的なXPCのリクルートを反映しており、発生した(6-4)光産物の数とDDB2分子数の兼ね合いで飽和線量が変動することが示唆された(図3)。さらに高線量で見られる二段階目の易動度低下は、UV-DDBを介さない、XPC単独による直接認識を反映していると考えられる。さらにDDB2をノックダウンするとGFP-XPCの局所紫外線照射部位への集積が遅延することから、UV-DDBがXPCを積極的に損傷部位ヘリクルートする、というモデル

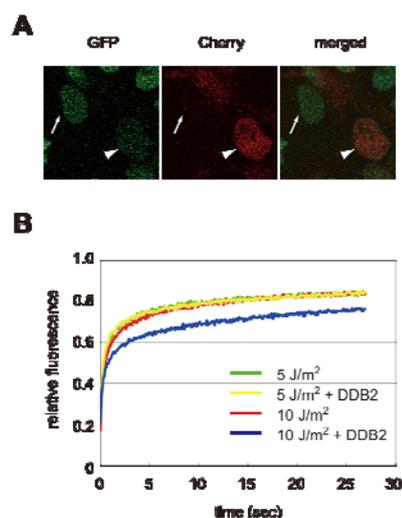


図3 DDB2の過剰発現がGFP-XPCの細胞内易動度に及ぼす影響

が強く支持された。一方、XPC よりも後の段階で働く TFIIH のサブユニット XPB、および XPA タンパク質について GFP 融合タンパク質を発現する細胞を用い、同様に FRAP による動態解析を行った。その結果、XPB は紫外線量依存性、および UV-DDB による制御という観点から XPC とほぼ同様の挙動を示したのに対し、XPA の細胞内易動度はある一定以上の紫外線量を照射するとそれ以上低下しないことがわかった。このことは、NER の反応過程において XPA が関与する以前の段階で何らかの制御（律速）が存在することを示唆する。

他方、損傷認識因子のダイナミクスとクロマチン高次構造との関係を調べるため、ヘテロクロマチン領域に着目した。マウス細胞はヒト細胞に比べてヘテロクロマチンの可視化が容易であることから、Xpc 遺伝子をノックアウトしたマウス胎仔線維芽細胞を親株として、GFP を融合したヒト XPC、および DsRed monomer を融合したマウス HP-1 α を同時に安定発現する細胞株を作成した。この細胞において DsRed monomer で可視化されるヘテロクロマチン領域に局所紫外線照射を行った時の GFP-XPC、および HP-1 α の動態を今後観察する予定である。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

本研究により、細胞の紫外線照射に伴って UV-DDB-E3 が活性化され、XPC と DDB2 がポリユビキチン化を受けることが明らかになった。その後、同じ E3 がコアヒストンをユビキチン化してヌクレオソーム構造の変換に関わる可能性が他のグループによって示され、GGR におけるユビキチン化の役割は大きく広がりつつある（図 1 参照）。その一方で、細胞内における UV-DDB-E3 活性化の制御については未だに不明な点が多く残されている。例えば、E3 が最初に DDB2 をポリユビキチン化してしまうと UV-DDB 自身が損傷部位から解離してしまうため、GGR に対する促進効果を発揮できないと予想される。cullin を含む E3 は CAND1 や COP9 シグナロソーム、Nedd8 修飾などの因子による活性制御を受けることが知られているが、これらの因子に関わる E3 活性化が、どこで、どのようなタイミングで起こり、ヒストン、DDB2、XPC などの基質をどのような順序でユビキチン化するのか解明することが今後の重要な課題である。XPC の酵母ホモログである Rad4 や UV-DDB と損傷 DNA との複合体の X 線結晶構造が近年相次いで明らかにされており、UV-DDB から XPC への損傷受け渡しの分子機構についても原子レベルでの解明が進められると期待される。

GGR の反応機構を反映した *in vitro* NER 系は既に精製タンパク質による再構成がなされており、XPC や DDB2 の翻訳後修飾そのものは GGR に必須ではないと考えられる。しかしながら、クロマチン構造の存在下における修復、細胞内におけるタンパク質の安定性、あるいは DNA 損傷に対する細胞応答（損傷チェックポイント、アポトーシス誘導など）につながるシグナル伝達においてタンパク質の修飾が関与することは十分に考えられる。XPC については細胞内でリン酸化を受けることも近年報告されており、centrin 2 と細胞周期制御との関連と合わせて、これらの修飾が果たす機能を今後明らかにしていきたい。

GFP-XPC の細胞内動態の解析から、XPC による損傷認識が UV-DDB による制御を受けていること、また NER 反応の過程においてこれまで明らかにならなかった律速段階が存在することが示された。細胞内において長大なゲノム DNA に発生した損傷を効率よく認識するための分子機構は、未だに明らかになっていない。例えば XPC や UV-DDB が DNA への結合と解離を繰り返しながら損傷を見つけるのか、あるいは DNA 上をスキャンするための何らかのメカニズムが存在するのかも不明である。GFP 融合タンパク質を用いたダイナミクス解析は、損傷認識因子の細胞内動態制御に関わる新規因子を同定するためのアッセイ系として利用できる可能性がある。また、DNA 損傷への損傷認識因子の結合様式を理解するため、一分子イメージングなどの手法を取り入れてさらに研究を進めて行く予定である。

4. 2 “TCR における XAB2 及び CS 複合体の機能解析 (TCR グループ)”

(1) 実施の内容

紫外線損傷により誘導される、CSA の核マトリクスへの移行

コケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS) は、CS-A、CS-B 群の 2 つの遺伝的相補性群からなり、転写と共役した修復 (transcription-coupled repair: TCR) に異常を持つ。従って、TCR 機構には CSA、CSB が必須であるが、それらの TCR における機能は明らかになっていなかった。我々は、通常は細胞核内に均等に分布する CSA 蛋白質が、紫外線などの DNA 損傷を細胞が受けた場合、CSB 蛋白質依存性に核マトリクスへと迅速に移動し、転写伸長中の RNA ポリメラーゼ IIo (Pol IIo) と共局在することを見いだした (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 201-206, 2002)。本現象の分子機構、TCR における意義の解明を目的として、以下のような実験を行った (*Mol. Cell. Biol.*, 27: 2538-2547, 2007)。

TCR に異常を持つ CS-A 患者で見つけた突然変異を持つ CSA cDNAs、さらに、N 端あるいは C 端を種々の長さ欠失させた変異 CSA cDNAs を作成し、それらを CS3BESV (CS-A) 細胞に導入し、各種の変異 CSA を発現する細胞を作成した (図 1 A)。いずれの細胞も紫外線に高感受性を示し (図 1 B)、紫外線照射後の RNA 合成の回復 (TCR 機能に対応する) も欠損したままだった (図 1 C)。

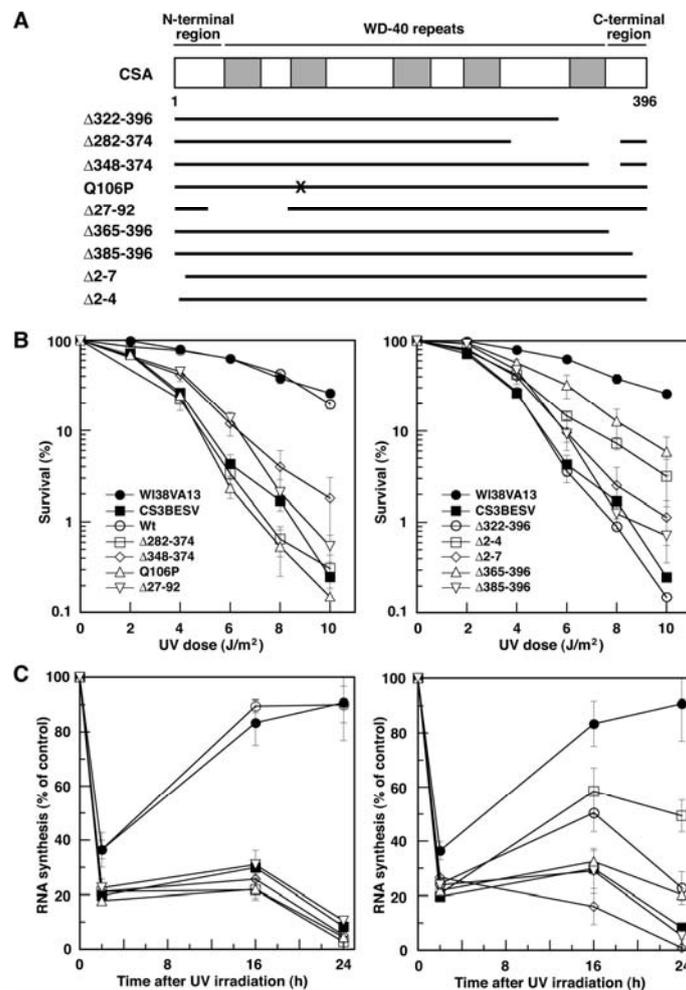


図 1 変異 CSA 蛋白質を発現する細胞は紫外線に高感受性を示し TCR 能に異常を示す

これらの変異 CSA を発現する細胞での、紫外線照射後の変異 CSA 蛋白質の核マトリクスへの移行を、免疫蛍光染色法を用いて調べた (図 2A)。ホルマリンによる細胞固定前に CSK-Triton Buffer で前処理すると、野生型 CSA 蛋白質以外は全て細胞核に留まることができなかつた。即ち、核マトリクスに移行しなかつた。一方、紫外線照射した細胞の抽出液を細胞質 (フラクション 1- 2)、クロマチン (フラクション 3- 8)、核マトリクス (フラクション 9) 画分に分画し、ウエスタンブロット法で CSA 蛋白質を検出する方法においても、野生型と C 末端欠失 CSA 蛋白質以外は核マトリクス画分に分画されなかつた (図 2B)。

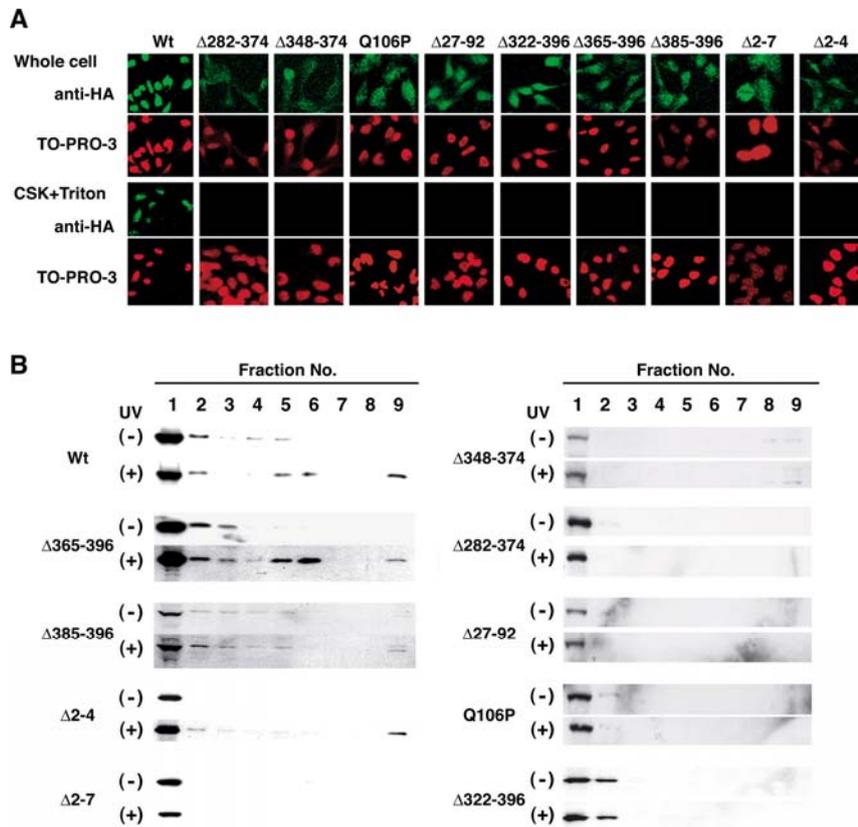


図 2 紫外線 DNA 損傷による変異 CSA タンパク質の核マトリクスへの移行

ついで、紫外線 DNA 損傷によって CSA 蛋白質が核マトリクス画分へと移行する無細胞系を構築した (図 3 A)。本無細胞系においても、CSA の核マトリクス画分への移行は、紫外線照射 (図 3 B)、紫外線線量 (図 3 C)、紫外線照射後時間 (図 3 D)、CSB (図 3 F) に依存性に起こることを確かめた。また、CSK-Sup は、精製した CSA 蛋白質で代用できた (図 3 E)。

また、CSA の核マトリクス画分への移行は、CSK-ppt の DNaseI 処理濃度依存性 (図 4 A)、塩濃度依存性 (図 4 B) に減少し、クロマチン構造に依存して CSA が核マトリクスへ移行することが示唆された。さらに、CSK-ppt は RNA 合成能をもつが、NTP を除き RNA 合成能を阻害すると、CSA は核マトリクスへ移行せず、転写依存性であることも示唆された。

他方、紫外線 DNA 損傷による CSA の核マトリクスへの移行は、XP-D、XP-D/CS、XP-D/TTD (*XPD* 遺伝子の突然変異により発症する硫黄欠乏性毛髪発育異常症)、及び、XP-B/CS 患者細胞では低下しており、外来性に XPD あるいは XPB cDNA をそれぞれの患者細胞に導入すると、CSA の核マトリクスへの移行が正常におこることを明らかにした (図 5)。以上の結果は、CSA 蛋白質の核マトリクスへの移行が、CSB のみならず機能的な TFIIH にも依存すること、TCR 機構に直接関連した現象であることを示唆し、TCR 機構解明に貢献する成果である。

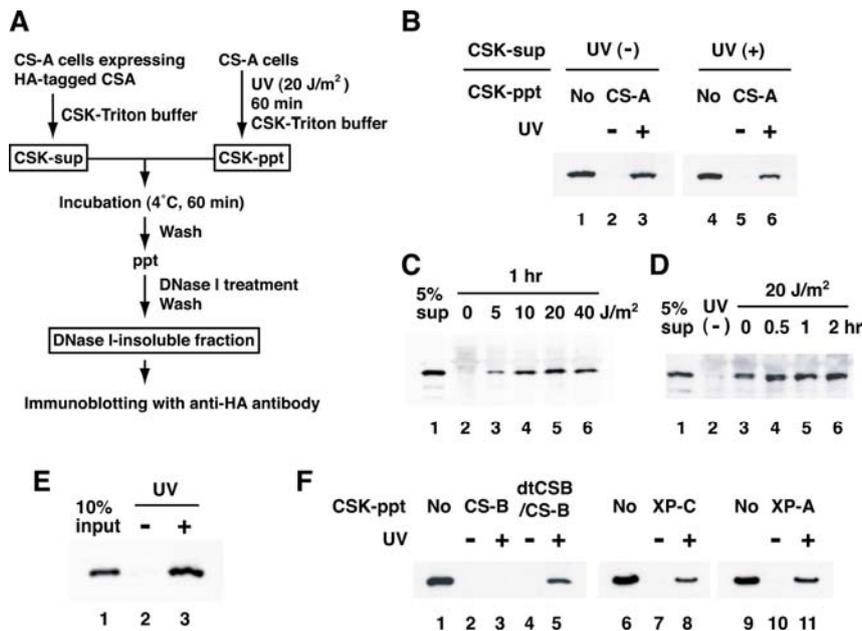


図3 CSA蛋白質の核マトリクスへの移行の無細胞系の樹立

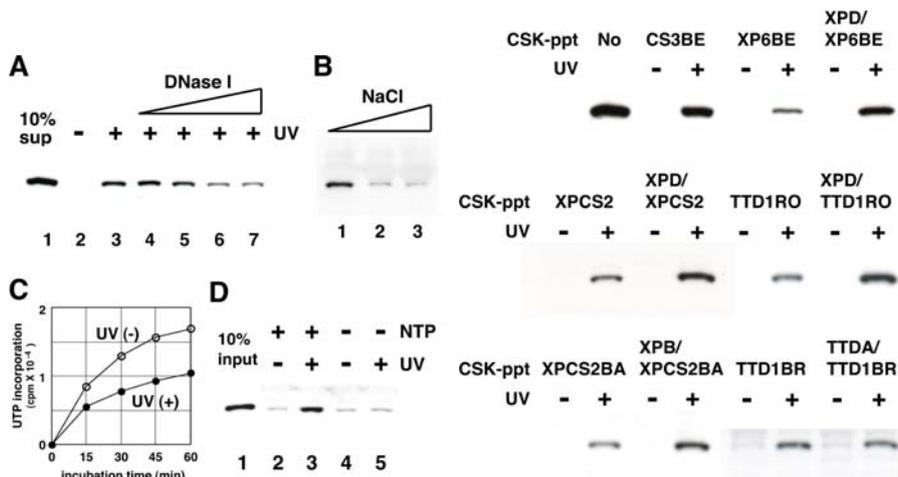


図4 CSAの核マトリクス画分への移行はクロマチン構築、転写伸長活性に依存して起こる

図5 CSAの核マトリクス画分への移行はXPB、XPD依存性である

CSA 複合体ユビキチンリガーゼの機能解析

CSAはWD40リピートモチーフを持つことから、蛋白質複合体形成や蛋白質間相互作用に関与することが予想された。本研究が始まる以前に、CSAを蛋白質複合体として精製し、CSAがDDB1、Roc1、Cullin4A、COP9 signalosomeと複合体を形成し、ユビキチンリガーゼ(E3)活性を持つことを明らかにした(*Ce11*, 113: 357-367, 2003)。そこで、CSA複合体E3の機能解析を本研究で進めた。CSAに結合する蛋白質の中にCSB蛋白質が認められた。しかし、紫外線照射後3時間~4時間経過した細胞ではCSB蛋白質は消失した。さらに、プロテアソーム阻害剤MG132の存在下ではCSBは消失しなくなった(図6A)。一方、紫外線照射後のCSBの消失はCS-A細胞では認められなかったのに対し、CSA cDNAを導入し正常化したCS-A細胞ではCSBが消失するようになった(図6B)。他方、*in vitro*ユビキチン系におい

て、CSA 複合体 E3 は CSB 蛋白質をポリユビキチン化した (図 7)。以上の結果から、CSA 複合体 E3 は紫外線照射細胞で CSB 蛋白質をポリユビキチン化し、分解へと導くことを示唆した (*Genes & Development*, 20: 1429-1434, 2006)。

一方、紫外線照射された細胞では RNA ポリメラーゼ IIo (Pol IIo) もポリユビキチン化されること、しかし、CS-A、CS-B 細胞では Pol IIo のユビキチン化が起こらないことが明らかになっている。これらの結果は、Pol IIo のユビキチン化に CSA 複合体 E3 が関与していることを示唆する。そこで、精製した Pol II と CSA 複合体 E3 を、E1、E2、ユビキチン、ATP と混ぜて反応させたところ、Pol II はユビキチン化されることを明らかにした。さらに、生体内での CSA 複合体 E3 による Pol II のユビキチン化の確認とその意義を解明する目的で、Pol II の最大サブユニット Rpb1 の、どのリジン残基が CSA 複合体 E3 によりユビキチン化されるかを調べ、候補リジン残基を同定することができた。(未発表データ)。そのリジン残基をアルギニンに置換した Rpb1 を持つ細胞の TCR 機能の解析を進めている。

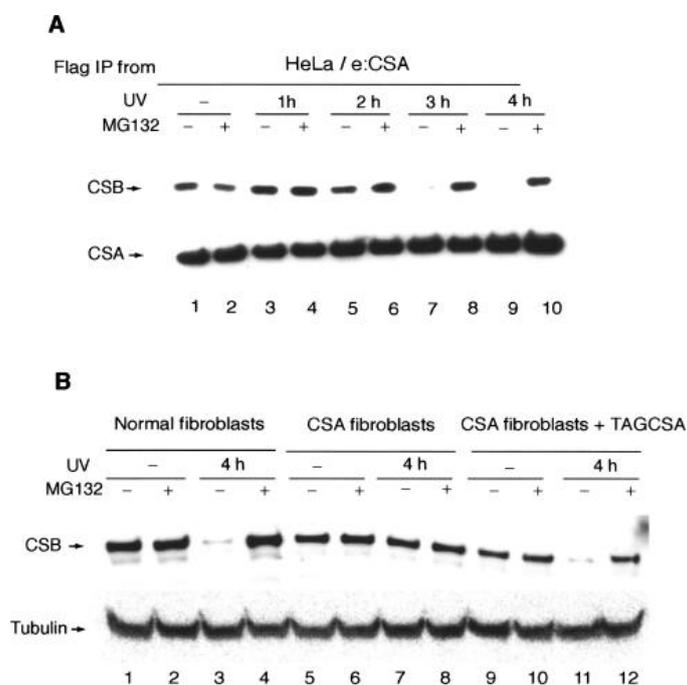


図 6 紫外線照射細胞における CSA 依存性の CSB 蛋白質のプロテアソームによる分解

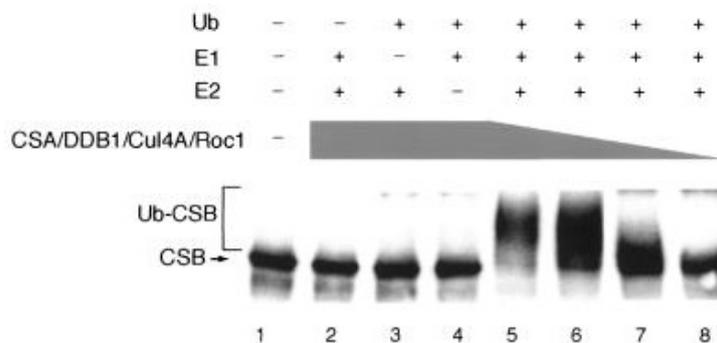


図 7 *In vitro* ユビキチン系を用いた CSA 複合体 E3 による CSB 蛋白質のポリユビキチン化

XAB2蛋白質複合体の解析

XPA、CSA、CSB、Pol II α と相互作用し、TCR や転写に関与する新規蛋白質 XAB2 を同定した (*J. Biological Chemistry*, 275:34931-34937, 2000)。XAB2 は蛋白質複合体形成に関与する TPR モチーフをもつことから、本研究では、HeLa 細胞から XAB2 蛋白質コア複合体の精製を行い、XAB2、hAquarius、hPRP19、CCDC16、hISY1、PPIE が結合するコア XAB2 複合体を同定した (*J. Biological Chemistry*, 283: 940-950, 2008)。XAB2 複合体は RNA と結合するが DNA とは結合しなかった。HeLa 細胞で XAB2 をノックダウンすると、hAquarius と hISY1 の蛋白質量が減少した (図 8 A)。そして細胞は紫外線高感受性を示し (図 8 C、8 D)、RNA 合成、TCR、mRNA スプライシング (図 8 B) の低下を示した。さらに、XAB2 と XPA、XAB2 と Pol II α の相互作用が、紫外線やシスプラチン、マイトマイシン C などの DNA 損傷を受けた細胞内で増強することを明らかにした。一方、我々が作成した XAB2 ノックアウトマウスは胎生致死を示した (*DNA Repair*, 4: 479-491, 2005)。以上の結果から、XAB2 は、通常状態では Pol II α と協調して転写伸長や mRNA スプライシングに関与し、生命維持に必須の因子であると考えられた。一方、細胞が紫外線照射などにより DNA 損傷を受け、Pol II α が DNA 損傷部位で転写伸長を停止した時には、XAB2 は CSA、CSB、XPA 等を Pol II α の停止部位にリクルートするプラットフォームとして働き、また、転写の再開にも関与する可能性が示唆された。

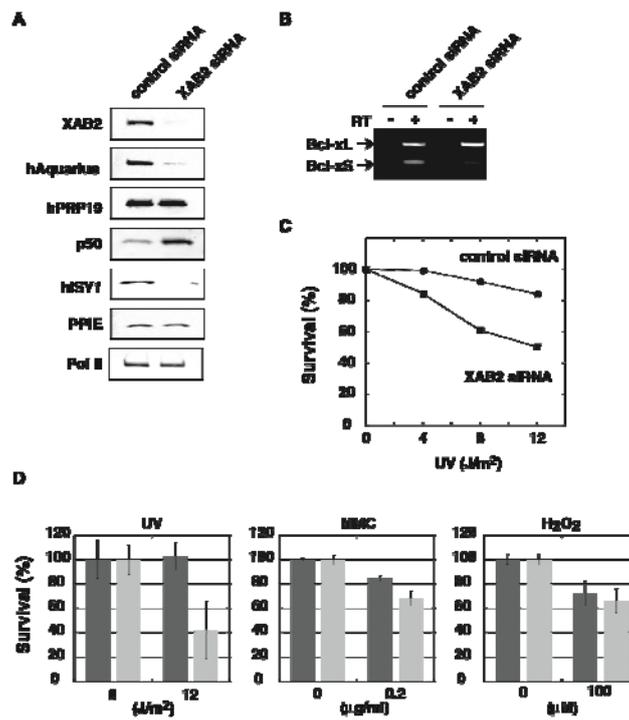


図 8 XPA、CSA、CSB、Pol II α と相互作用し、TCR、スプライシングや転写に関与する XAB2 蛋白質複合体

転写伸長因子 TFIIS は、Pol II の 8-oxo guanine 部位における転写のバイパスを促進する

DNA 損傷部位で Pol II が転写を停止することが TCR 開始につながると考えられている。TCR 機構解明のためには、Pol II が種々の損傷に遭遇した時、如何なる反応を示すかを調べる必要がある。紫外線損傷を 1ヶ所に持つ oligo-dC tailed DNA template と ヒト Pol II を用いた *in vitro* 転写系 (*Methods Enzymol.*, 408: 214-223, 2006) において、Pol II は紫外線損傷部位でリボヌクレオチドを 1-2 個取り込んだ後に転写を完全に停止することを明らかにした (*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320: 1133-1138, 2004)。他方、Pol II は酸化的損傷である 8-oxo-guanine 部位では一部は転写を停止したが、一部は損傷をバイパスし、その時、mRNA に変異が導入されることを明らかにした (*J. Biological Chemistry*, 278, 7294-7299, 2003)。

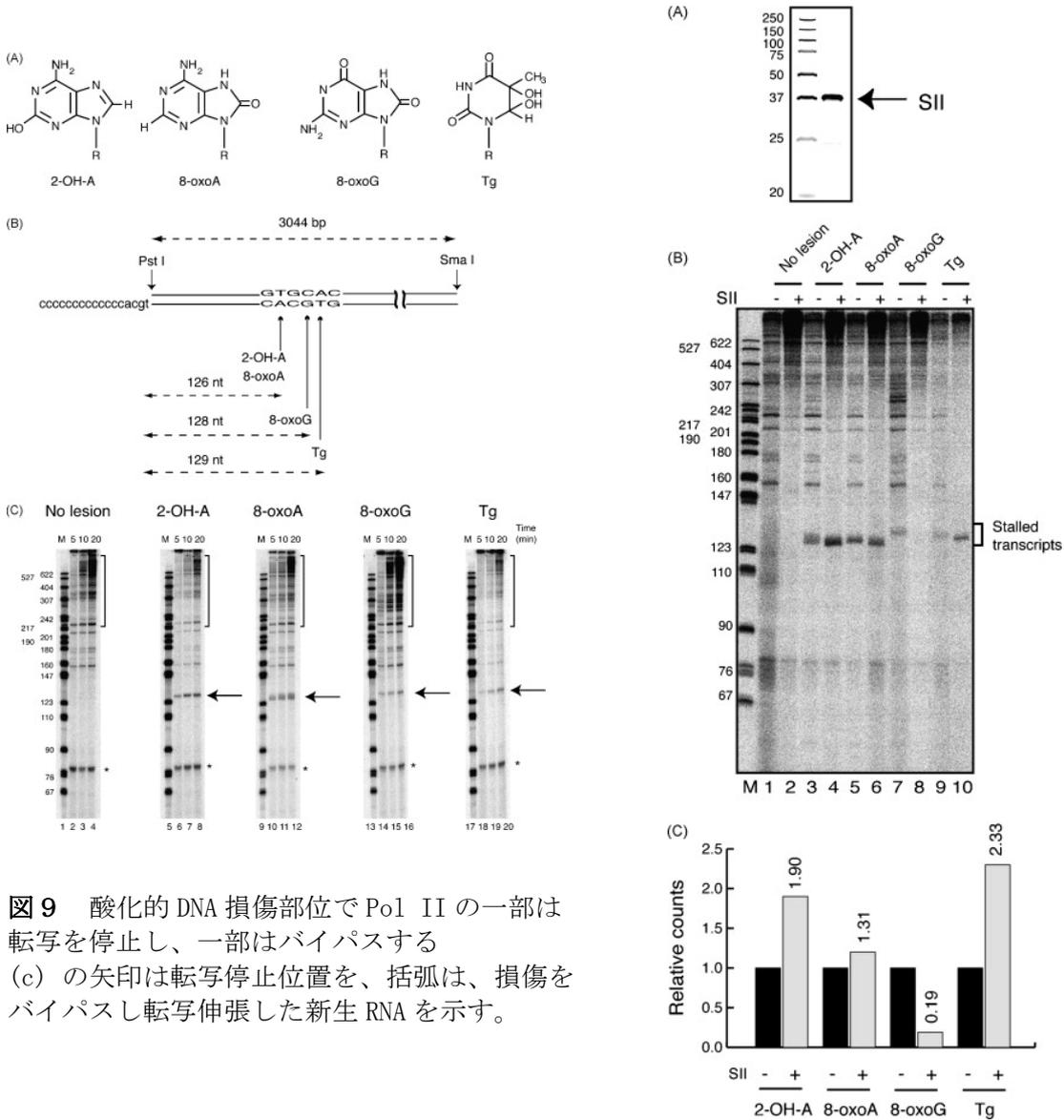


図 9 酸化的 DNA 損傷部位で Pol II の一部は転写を停止し、一部はバイパスする (c) の矢印は転写停止位置を、括弧は、損傷をバイパスし転写伸張した新生 RNA を示す。

図 10 酸化的 DNA 損傷部位での Pol II の転写バイパスに及ぼす TFIIS の効果

以上の成果をもとに、酸化 DNA 損傷である 8-Oxo-Guanine、2-OH-Adenine、8-Oxo-Adenine、Thymine glycol の場合についての Pol II の転写についてさらに詳しく解析した (*DNA Repair*, 6: 841-851, 2007)。これらの損傷部位で、Pol II の一部は転写を停止したが、一部はバイパスした (図 9)。そこで、この転写伸長系に、転写伸長因子 TFIIF、TFIIS を加えた時、損傷部位における転写バイパスが促進されるか否かを調べた。その結果、8-Oxo-Guanine の場合に、TFIIS を添加すると Pol II の転写バイパスが促進されることが明らかになった (図 10)。同じ転写伸長因子である TFIIF にはこのような効果は認められなかった。また、TFIIS をノックダウンした細胞は過酸化水素に高感受性を示し、TFIIS の損傷部位における転写バイパス促進機能が細胞の損傷応答に重要な役割を果たしていることを示唆した。

XPB は TFIIH と安定な複合体を形成し、転写活性化に関与する

XP-A 患者は、「転写と共役した修復」(TCR)のみならず、非転写鎖や転写非活性化部位の損傷を修復する「ゲノム全体の修復」(GGR)にも異常を持つ。しかし、コケイン症候群 (CS) を発症しない。このことは、CS 徴候の発症は単に TCR 異常のみが原因ではないことを示唆する。一方、色素性乾皮症 B、D、F、G 群 (XPB、XPD、XPF、XPG) 遺伝子の突然変異によって、XP 症状に CS 徴候を合併する症例 (XP/CS) がある。XPB、XPD は TFIIH のサブユニットであり、TFIIH がヌクレオチド除去修復 (NER) 以外に基本転写にも必須の機能を持つことから、CS 徴候が NER 異常に加えて転写機能に異常を持つことがその病因になっていることを示唆する。しかし、XP-G/CS についてはこれまでその病因が不明であった。我々は、XPG の新規の機能を解明する目的で、XPG を蛋白質複合体として精製した。その結果、XPG は TFIIH と複合体を形成することを見つけた (*Molecular Cell*, 26:231-243, 2007) (図 11)。

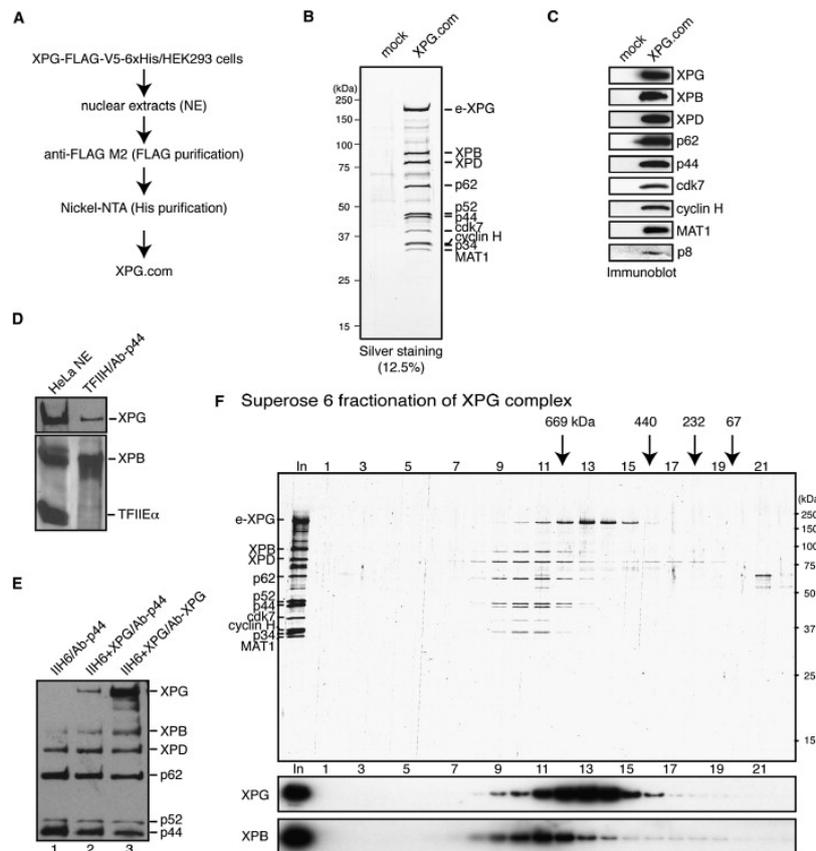


図 11 XPG 蛋白質は TFIIH と直接結合し、安定な複合体を形成する

しかも、XP のみの症状を示す XP-G 患者由来で、エンドヌクレアーゼドメインに点突然変異を持つ XPG 蛋白質は TFIIH と結合したのに対し、XP と CS を合併した XP-G/CS 患者由来で C 末端に欠失をもつ XPG 蛋白質は TFIIH と結合しなかった。さらに、正常人、XP-G、XP-G/CS、XP-D/CS 患者の細胞抽出液から抗 XPB 抗体を用いて免疫沈降をおこなったところ、TFIIH コアサブユニット (XPB、XPD、p62、p52、p44、p34、p8) は全ての細胞で同様に免疫沈降したが、CAK サブユニット (cdk7、cyclinH、MAT1) は、XP-G、XP-G/CS、XP-D/CS 細胞では免疫沈降しなかった。一方、抗 XPG 抗体を用いた免疫沈降において、XP-D 細胞ではコア TFIIH、CAK サブユニットとも免疫共沈降量が減少していた。以上の結果は、XPG の C 端が欠失すると TFIIH と結合できなくなり、その結果、TFIIH の安定性が減少し CAK サブユニットがコア TFIIH サブユニットから解離すること、さらに、XPG と TFIIH の相互作用や TFIIH の構造安定性には XPD も関与していることを示唆する (図 1 2)。

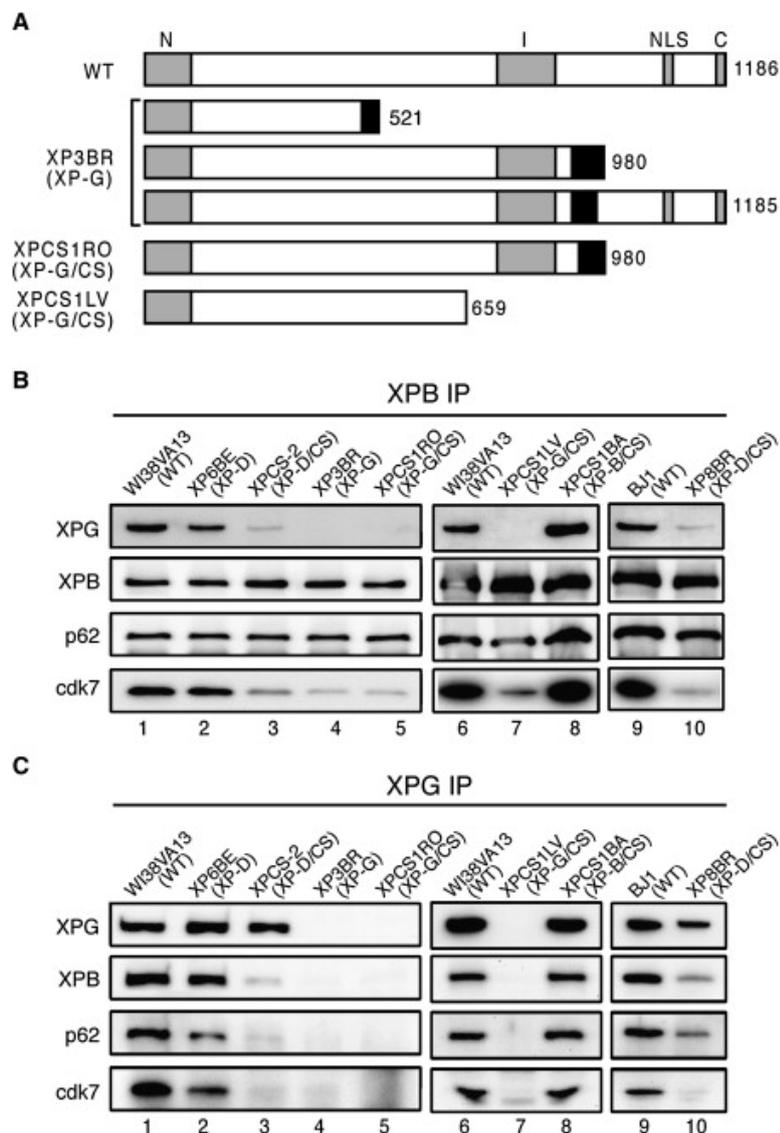


図 1 2 正常人、XP-G、XP-G/CS、XP-D/CS 患者の細胞抽出液を用いた抗 XPB 抗体及び抗 XPG 抗体による免疫共沈降

CAK サブユニットは、Pol II の CTD (C-terminal domain) や核内レセプター (nuclear receptor: NR) をリン酸化し、基本転写や NR の転写活性化に必須である。XP-D/CS や XP-G/CS 細胞では CAK サブユニットがコア TFIIH サブユニットから解離していることから、CAK サブユニットがリガンド誘導性に NR をリン酸化する活性が低下し、NR の転写活性化が欠如していることが予想された。そこで、XP-D/CS や XP-G/CS 細胞での NR 活性の異常の有無を明らかにする目的で以下のような実験を行った。エストロゲンレセプターを発現するプラスミドと、ルシフェラーゼ遺伝子上流にエストロゲンレセプター結合配列を持つプラスミドを各細胞にトランスフェクションした。エストロゲンを作用させ、それぞれの細胞でのルシフェラーゼ活性を測定した結果、XP-D/CS や XP-G/CS 細胞、さらには *Xpg* (-/-) Mouse Embryo Fibroblasts (MEF) ではルシフェラーゼ活性が上昇しないことが明らかになった (図 1 3)。他方、エストロゲン添加後のエストロゲンレセプターの 118 番目のセリンのリン酸化は XP-G/CS 細胞では欠如していたが、XPG cDNA を導入した XP-G/CS 細胞ではそのリン酸化が正常に起こった (図 1 3D)。以上の結果は、XPG がヌクレオチド除去修復 (NER) におけるエンドヌクレアーゼ活性以外に転写活性化機能をもつこと、XP-D/CS や XP-G/CS 細胞では TFIIH の構造安定性が低下することにより NR のリン酸化の低下、ひいては転写活性化の低下がおこることを初めて明らかにしたものである。

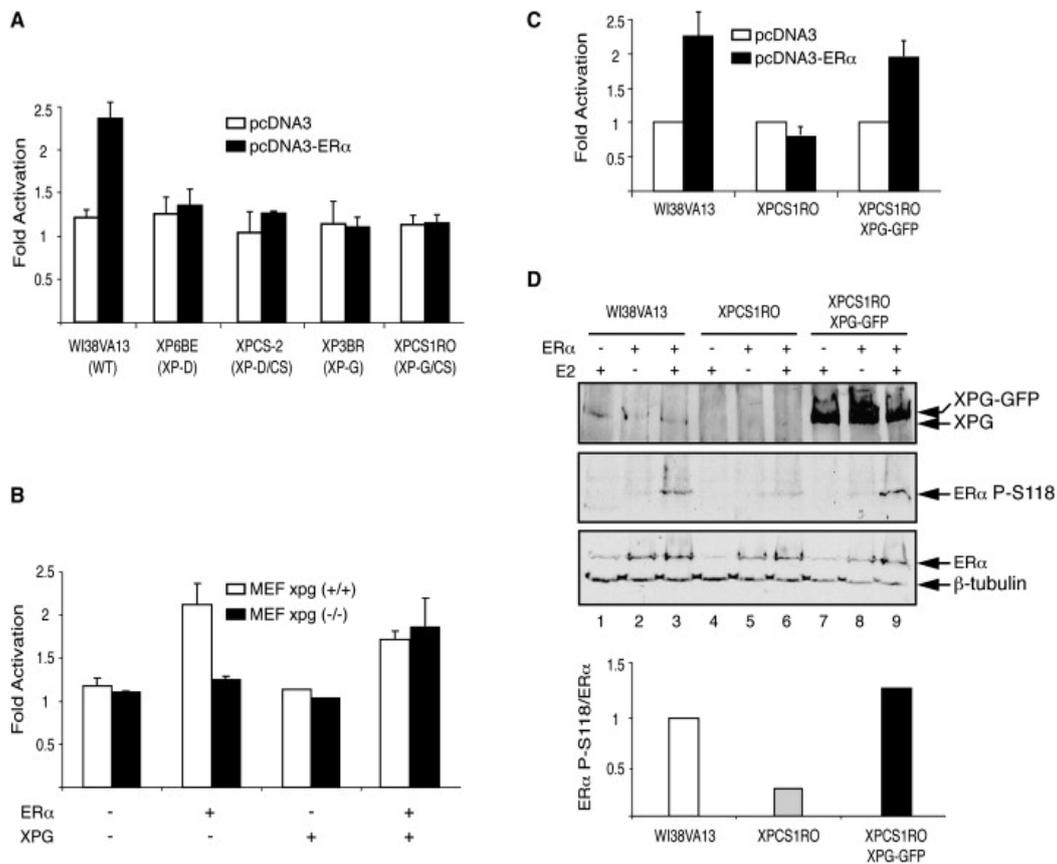


図 1 3 CAK サブユニットによる核内レセプターのリン酸化と転写活性化: XP-G/CS、*Xpg* (-/-) MEF、及び XP-D 細胞におけるエストロゲン誘導性エストロゲン受容体の転写活性化の低下、及び XP-G/CS 細胞におけるエストロゲン誘導性エストロゲン受容体リン酸化の低下

以上の結果は、XP-G/CS 及び XP-D 患者が示す生殖能の欠損、皮下脂肪組織の著明な減少、種々の神経症状発症など多彩な CS 徴候が、NER の異常に加えて、核内レセプターの転写活性化の異常に起因することを示唆するものである (図 1 4)。

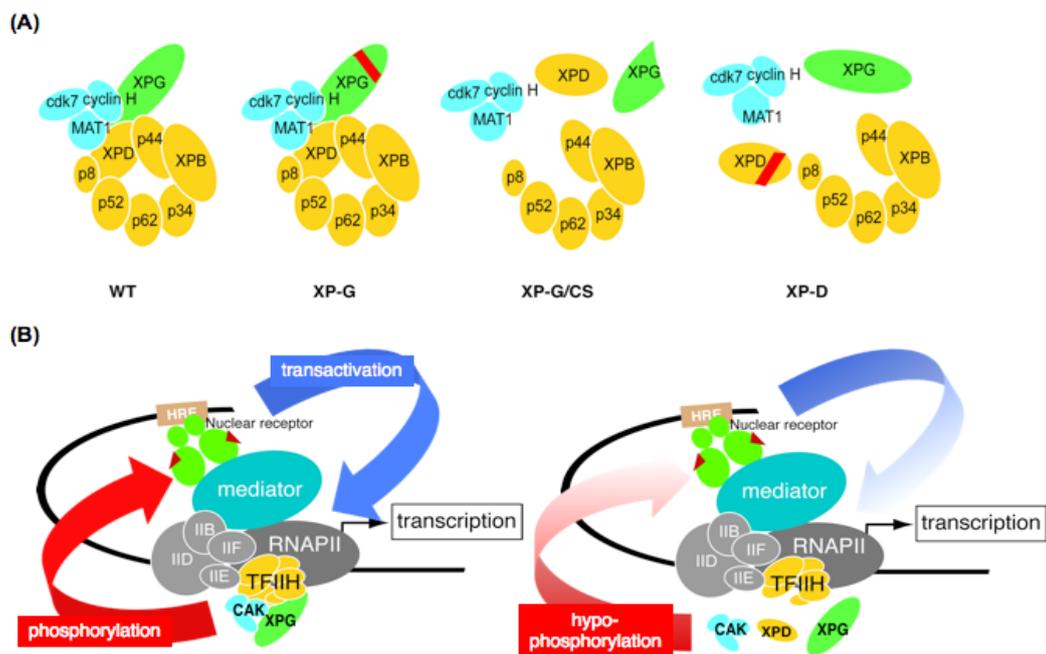


図 1 4 XP-G/CS 及び XP-D 患者における TFIIH 構造の不安定化と核内レセプター機能の低下

紫外線高感受性症候群 (UV sensitive syndrome : UV^sS) の分子病態の解析

UV^sS は「転写と共役した修復」(TCR)に異常を持ち、皮膚の日光過敏性を示す劣性遺伝疾患である。しかし、CS 患者とは異なり、知能低下、身体発育不全、悪液質、白内障などの神経症状や早期老化徴候は示さない。また、皮膚癌も発生しない。UV^s 症候群は遺伝的相補性試験により色素性乾皮症 A 群～G 群(XP-A~XP-G)、バリエーション群(XP-V)、さらには CS-A や CS-B のどの相補性群にも属しないとされてきた。UV^sS の原因遺伝子が TCR 機構に関わる新規遺伝子である可能性が示唆され、TCR 機構の解明には UV^sS 原因遺伝子のクローニングが必須であると考えられた。そこで、微小核融合による単一染色体導入法により UV^s 症候群の原因遺伝子が存在する染色体座位をまず決定し、その原因遺伝子のクローニングを試みようとした。その結果、UV^sS 患者 UV^s1K0 の原因遺伝子座位が 10 番染色体にあること、それが 10 番染色体に座位する *CSB* 遺伝子の null 変異が原因であることを発見した (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 101: 15410-15415, 2004)。これらの結果に一致して UV^s1K0 細胞では CSB 蛋白質が全く検出できなかった。これまでの概念からは、CSB 蛋白質の欠損は精神神経症状、身体発育異常及び早期老化等の CS 徴候の発症をもたらすことが予想されたので、UV^sS 患者 UV^s1K0 が何故 CS 徴候を示さないのかが説明できなかった。他方、CS 徴候を示す通常の CS-B 患者の *CSB* 遺伝子突然変異のデータベースを解析したところ、CS-B 患者では何らかの変異短縮 CSB 蛋白質の生成が示唆され、実際にウエスタンブロット法により、調べた 6 例全ての CS-B 患者で変異短縮 CSB 蛋白質を同定した。変異短縮 CSB 蛋白質が何らかの阻害効果を持ち、そのことが CS 徴候の発症に関連していると考えた。他方、UV^s1K0 では全く変異 CSB 蛋白質が存在しないため CS 徴候がでないと考えられた (図 1 5)。本研究ではこれらの作業仮説を証明すべく以下のような実験を行った。

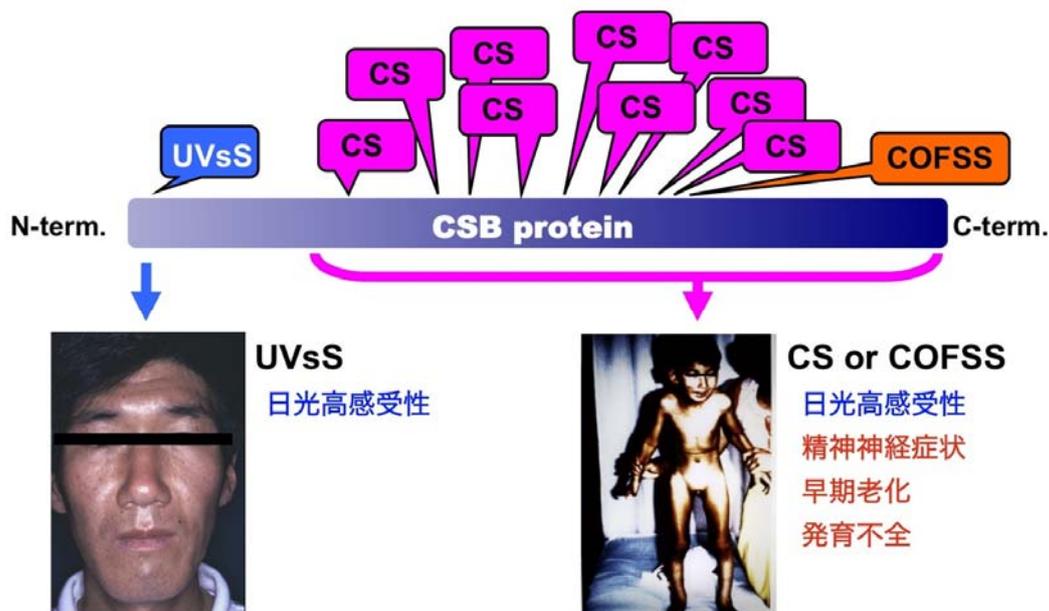


図 1 5 *CSB* 遺伝子に突然変異を持つ UV^s と CS-B 患者： 症状が軽微な UV^s 患者が *CSB* 蛋白質を発現せず、重症な CS-B 患者で短縮 *CSB* 蛋白質を発現していることから、短縮 *CSB* 蛋白質が何らかの gain-of-function をもつことが示唆された。

まず、CS-B 細胞で認められる変異短縮 *CSB* 蛋白質の構造を解析した結果、トランスポゾンが *CSB* 遺伝子のイントロン 5 に挿入されており、選択的可変素プライシングによって *CSB* の N 末端とトランスポゾンの融合蛋白質 (CPFP) や、*CSB* の N 末端からなる変異短縮 *CSB* 蛋白質が産生されていることを明らかにした。さらに、CPFP や変異短縮 *CSB* 蛋白質の抑制的な機能を解明するため、野生型 *CSB*、CPFP、変異短縮 *CSB* 蛋白質に結合する蛋白質を精製、同定した。これらの蛋白質が修復や転写にどのような影響を与えるかを解析し、gain-of-function を持つことを明らかにしつつある (未発表データ)。

他方、他の UV^s 患者 Kps3 においては、*CSB* 遺伝子の突然変異は認められなかった。このことから、UV^s には少なくとも 2 つの相補性群が存在することが示唆された。さらに、既知の修復遺伝子の DNA sequence を行ったが、突然変異は認められなかった。Kps3 の原因遺伝子は新規の遺伝子であることが示唆された。本研究では Kps3 の原因遺伝子を同定する目的で、微小核融合を介したヒト単一染色体移入法を用いて原因遺伝子の染色体マッピングを試みた。しかし、第 1 番から第 22 番の正常ヒト染色体を移入した Kps3 細胞をそれぞれ 5 ~ 15 クローン樹立したが、Kps3 の TCR 欠損を相補するクローンを得ることはできなかった。その原因については、当該染色体がうまく微小核を形成できないことが考えられたが、詳細は不明である。そこで、マウス A9 細胞から微小核を調整し、それを Kps3 細胞に融合させた後、紫外線照射し、抵抗性を獲得した細胞を選別した。その結果、正常細胞レベルに紫外線抵抗性を示し TCR 能を回復した細胞を得ることができた。微小核を融合させなかった Kps3 細胞を同様に紫外線照射したが、紫外線抵抗性を獲得したクローンを得ることができなかった。しかも、微小核を融合させ紫外線抵抗性を獲得した Kps3 細胞にはマウスゲノムが少量挿入されていることが、マウス繰り返し配列をプローブにしたサザンブロット解析やマウスプローブを用いたマルチカラー-FISH 法で明らかになった (未発表データ)。現在、当該領域の絞り込みをおこないつつある。

A 群 XP 遺伝子欠損 *Xpa*(-/-) マウスの精巣異常と高頻度自然皮膚発癌

遺伝子ターゲティング法により作成した A 群 XP 遺伝子欠損 *Xpa*(-/-) マウスの新規の表現型として、精巣が加齢依存性に変性し、自然発癌頻度が高く種々の腫瘍が各臓器に発症す

ることを明らかにした (図 1 6、図 1 7)。高頻度日光皮膚がん発症以外でも $Xpa(-/-)$ マウスは XP-A 患者の良いモデルになることを示唆した (*DNA Repair*, 7: 1938-1950, 2008)。

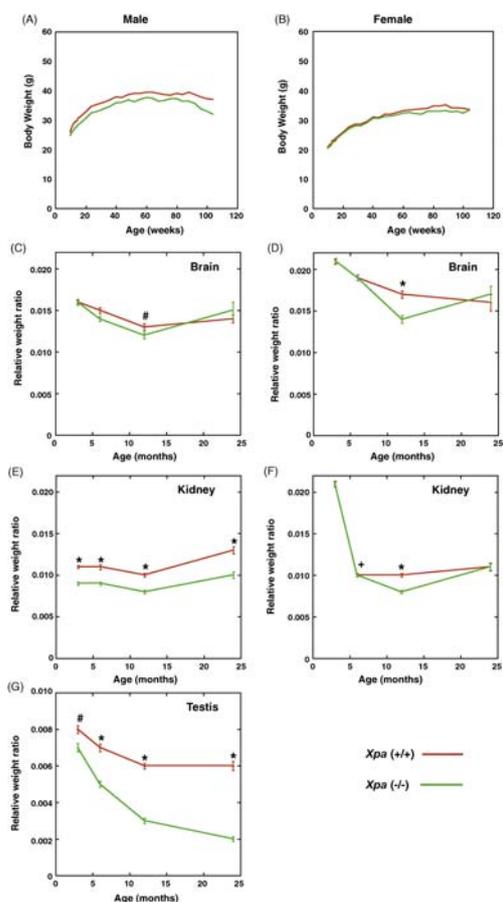


図 1 6 $Xpa(+/+)$ 、 $Xpa(-/-)$ マウスの臓器重量

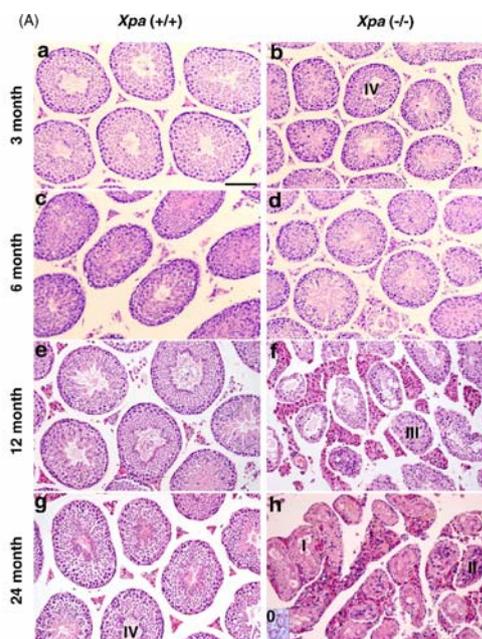


図 1 7 $Xpa(+/+)$ 、 $Xpa(-/-)$ マウスの精巣組織所見

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

DNA 損傷によって CSA が核マトリクスに移行する機構の解析を進展させた (*Molecular and Cellular Biology*, 27: 2538-2547, 2007)。本現象は TCR 機構に直接関与するものであり、TCR 過程における CSA 機能の今後の解析の基礎となるものである。他方、CSA はユビキチンリガーゼ複合体 (E3) を形成し、そのターゲットの一つが CSB であり、紫外線照射によって誘発される CSB の分解に関わることを共同研究により明らかにした (*Genes & Development*, 20: 1429-1434, 2006)。CSB ユビキチン化の TCR 過程における意義については今後の課題である。Po1 II も CSA 複合体 E3 によりポリユビキチン化されることを明らかにした。そしてユビキチン化される Po1 II (Rpb1) のリジン残基の一つを特定し、そのリジン残基をアルギニンに置換した Po1 II を発現する細胞も樹立した (未発表データ)。TCR 機構において Po1 II をユビキチン化する E3 が何であるのかは、これまで具体的なデータはなく、我々の結果はその問いに答えられる可能性がある。

新規 TCR 因子として XAB2 複合体を同定し、その機能解析を進めた (*J. Biological Chemistry*, 283: 940-950, 2008)。しかし、XAB2 の TCR 過程における具体的な役割については更なる解析が必要である。また、新規の UV^s 遺伝子のクローニングも TCR 機構の解明のためには必須であり、継続して微小核融合法を用いた実験を行っている。

XPG 蛋白質は基本転写因子 TFIIH と安定な複合体を形成し転写活性化に関わること、XP-G/CS 患者では変異 XPG が TFIIH と結合できず、その結果、TFIIH の構築が不安定となり、CAK 活性が低下し、核内レセプターのリガンド誘発性のリン酸化、ひいては転写活性化が起これないという重要な所見を得ることができた (*Molecular Cell*, 26: 231-243, 2007)。以上の結果は、CS 徴候が DNA 修復異常に加えて転写機能の異常により発症することを明確な形で示した初めての成果である。XPG は基本転写にも重要な役割を果たしている可能性があり、更なる解析が必要である。さらに、他の NER 因子も DNA 修復以外に転写を始め多様で重要な機能をはたしている可能性が高い。我々は、XPD、XPE、XPF 蛋白質についても新規機能の発見をめざし、それぞれを蛋白質複合体として精製し、一部は既に興味深い結果を得ており、更なる解析を行っている。

CS-B 患者の病因を解明する目的で、CS-B 細胞で認められる変異短縮 CSB 蛋白質の構造を解析し、CSB の N 末端とトランスポゾン融合蛋白質 (CPFP) や CSB の N 末端からなる変異短縮蛋白質が産生されていることを明らかにした。さらに、CPFP や変異短縮 CSB 蛋白質の抑制的な機能を解明するため、野生型 CSB、CPFP、変異 CSB 蛋白質に結合する蛋白質を精製、同定した。これらの蛋白質が修復や転写にどのような影響を与えるかを解析しており、CS-B の新たな病因に迫る成果となる可能性がある (論文改訂版投稿中)。

4. 3 “TLS におけるポリメラーゼスイッチング機構と Y ファミリーポリメラーゼの機能解析 (TLS グループ)”

(1) 実施の内容

Pol η 複合体の分離と解析

タグ付き Pol η を安定的に発現する HeLa 細胞株を確立し、それを大量培養して核抽出液を調製、抗体ビーズにより Pol η 複合体を精製した。質量分析法により構成サブユニットの同定を行ったところ、Rad18、Rad6、PCNA などの既知タンパク質が検出された (図 1)。

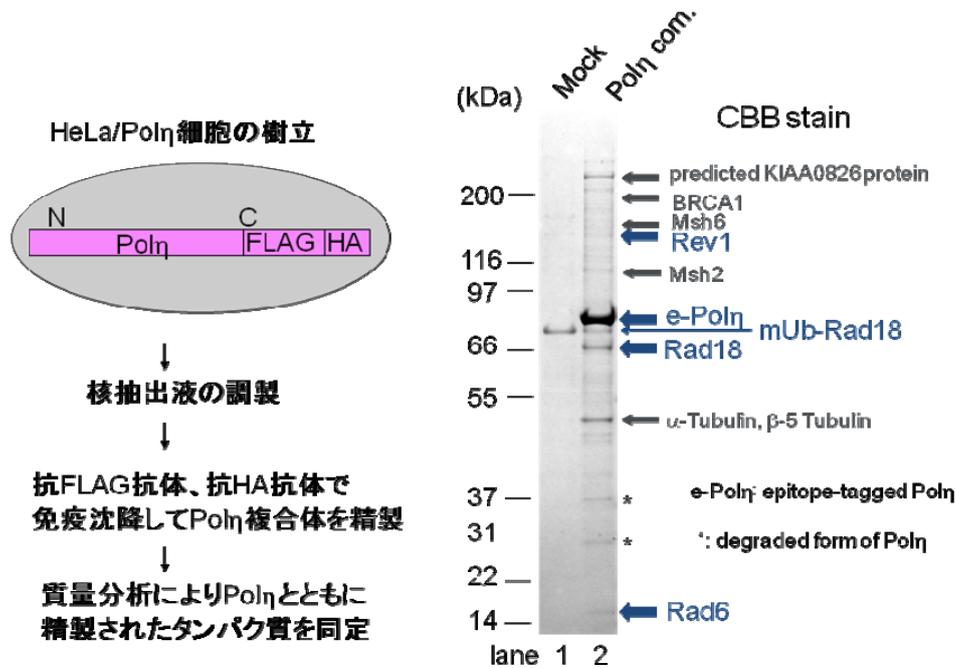


図 1 Pol η 複合体の分離と構成タンパク質の同定

また酵母 2 ハイブリッド法により見いだしていた REV1 も存在することがウエスタン法により確認された。この Pol η 複合体をグリセロール密度勾配遠心に掛けたところ、Pol η 、Rad18、Rad6、REV1 を同時に含む複合体の存在が示唆された。更にこの細胞に紫外線を照射して、それを分画して調べたところ、これらのタンパク質を含む複合体が紫外線照射によりクロマチン画分に移行することが分かり、その生理的意義が示唆された。同様の結果は、細胞を G1/S 境界に同調したとき、また S 期の途中で紫外線照射したときにも見られ、複製フォーク停止との相関が示された。

Pol η と REV1 との相互作用の解析:

もともと酵母 2 ハイブリッド法で我々が Pol η と相互作用するタンパク質として見出していた REV1 であるが、Pol η を含む複合体の解析 (上述) からその相互作用が確認された。そこでこの物理的な相互作用の生理的意義を調べるために、小孔紫外線照射法による細胞内局在実験を行った。ヒト正常細胞では、紫外線照射部位に両方のタンパク質とも集積し、共局在が観察された。一方、Pol η を欠損する XP-V 患者細胞においては、REV1 の紫外線損傷部位への集積はほとんど見られなかった (図 2)。タグ付き Pol η を安定に発現する XP-V 患者細胞では、正常細胞と同様に REV1 の局在が見られ、Pol η の局在とほぼ一致した (図 3)。以上の結果から、紫外線照射部位への REV1 の局在は Pol η によって促進されることが分った。このような紫外線照射部位への Pol η と REV1 の局在が DNA の複製に依存して起こっているかどうかを調べるために、紫外線照射後の培地にブロモデオキシウリジン (BrdU) を加えて S 期の細胞を標識した。意外なことに REV1 の局在は BrdU 陽性細胞と陰性細胞のどちらでも見られ、複製に依存しない可能性が示唆された。Pol η については内在性のタンパク質を免疫染色で検出することが出来なかったため、Pol η を過剰発現させた細胞で同様の実験を行い、REV1 同様、Pol η も BrdU 陰性細胞での局在が観察された。これらのことから複製非依存的に TLS ポリメラーゼを紫外線照射部位へリクルートする機構が存在すると考えられる。

そこでこの相互作用の生理的意義を更に調べるために、REV1 との相互作用に必要な Pol η 上の領域を決定することにした。酵母 2 ハイブリッド法により、Pol η のアミノ酸残基 370-492 および 509-557 の領域がこの相互作用に働いていると考えられた。一方、共同研究者の京大・大森博士らによって REV1 と他の TLS ポリメラーゼとの相互作用にはフェニルアラニンが 2 つ連続した配列 (FF) が重要であることが見いだされた (Genes Cells, 14: 101-111, 2009)。Pol η には全配列中 4 ヶ所の FF が存在し、そのうちの 2 ヶ所はそれぞれ上記の領域に含まれていた。そこで 483-4 および 531-2 の FF をアラニン (AA) に変異させた変異体を作成したところ、この変異体 Pol η は野生型 Pol η と同様に紫外線損傷である CPD を乗り越える活性を保持していたが、酵母 2 ハイブリッド法における REV1 との結合が野生型と比べて約 13% に低下していた。そこで 483-2、531-2 FF-AA 二重変異体をヒト細胞中で発現させ、REV1 との相互作用を失っているかどうか免疫沈降法により調べた。その結果、FF-AA 二重変異体 Pol η では REV1 との相互作用が著しく減弱していた (図 4)。そこで FF-AA 二重変異体 Pol η を安定に発現する XP2SA SV3 細胞 (XP-V 細胞) を作成し、紫外線感受性を測定したところ、親株の XP-V 細胞の高い紫外線感受性とは異なり、野生型 Pol η を発現させた細胞とほぼ同程度にまで生存率が回復した。このことは、紫外線照射後の細胞の生存には REV1 との相互作用よりも Pol η 自身の活性による寄与が圧倒的に大きいことを示している。更に Pol η と REV1 との相互作用の生理的な意義を追求するために、紫外線誘発突然変異率を調べた。しかしながら XP2SA SV3 細胞に FF-AA 二重変異体 Pol η を発現させた細胞は、野生型 Pol η を発現させた細胞とほぼ同程度にまで変異率が低下した。最後に自然突然変異率を調べたところ、FF-AA 二重変異体 Pol η を発現させた XP-V 細胞は野生型 Pol η を発現させた細胞に比べ明らかに突然変異率が高かった (図 5)。このことは、内在的な DNA 損傷の乗り越え反応に REV1 が関与し、そのためには Pol η と REV1 との相互作用が必要であることを示唆している。

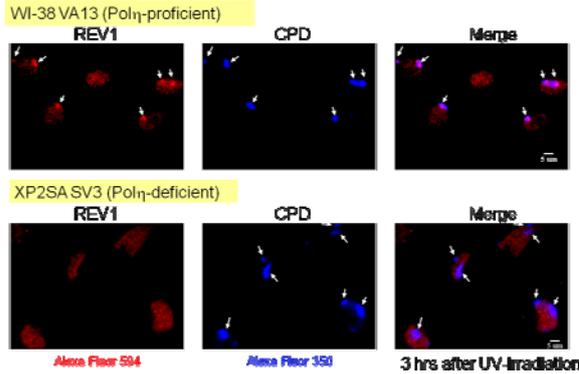


図2 REV1が紫外線照射部位へ集積するためには、Polηが必要である

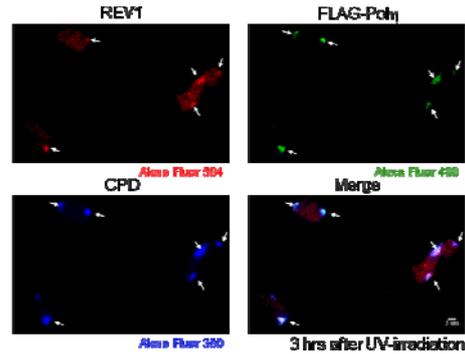


図3 XP-V細胞にPolηを発現させるとREV1は紫外線損傷部位に集積する

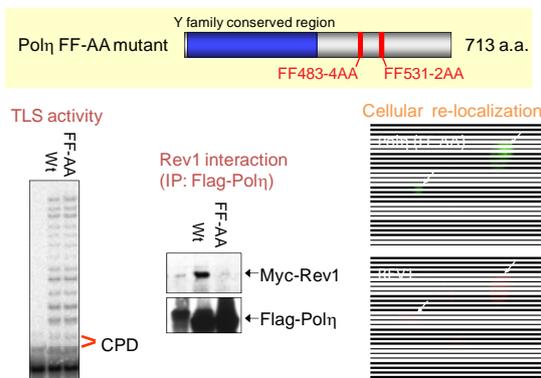


図4 PolηのFF-AA変異タンパク質はREV1と相互作用できない

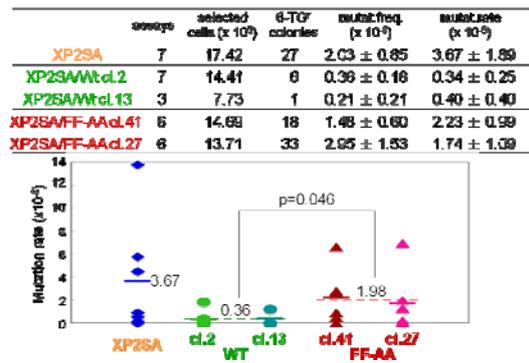


図5 PolηのFF-AA変異タンパク質の発現は、自然突然変異を上昇させる

RNAi法による線虫Polηの機能障害の影響

多細胞の個体レベルでのPolηの機能を知る一助として、線虫 (*Caenorhabditis elegans*: *Ce*) を用いて RNA interference (RNAi) 法による *Ce-polη* 遺伝子発現抑制個体における表現型の解析を行った。cDNA ライブラリーから PCR で増幅して得られた *Ce-polη* がコードするタンパク質は 584 アミノ酸からなり、ヒト Polη と 30%、ショウジョウバエ Polη と 26% の相同性を有した。*Ce-polη* の全長を含む領域の二本鎖 RNA を発現するベクターを有する大腸菌を餌として食べさせた線虫から total RNA を採取し、RT-PCR にて転写産物の量を調べたところ、コントロールとして空ベクターを有する大腸菌を食べさせた場合と比べて、*Ce-polη* 遺伝子の転写産物の量が著しく減少していることを確認した。野生型と比べて *Ce-polη* 遺伝子の発現抑制を行った線虫の形態、行動、胚の孵化率に異常は観察されなかった。一方、DNA 複製において主要な働きを担う DNA ポリメラーゼδ (Polδ) の発現抑制した胚は全く孵化しなくなった。このことから、Polδ は線虫の胚発生に重要であるが、Polη は線虫個体の発生そのものや生存自体には必須ではないことが示された。次に卵形成から受精・発生の各ステージでの紫外線感受性を胚の孵化率により検討した (図6)。主に形態形成が行われる後期胚発生のステージの胚に紫外線を照射すると、*Ce-polη* 遺伝子の発現抑制を行った胚はコントロールに比べて、わずかな孵化率の低下が見られた。これに対して、受精・卵割が行われる初期胚発生のステージの胚では、孵化率の著しい低下が見られた (図7)。すなわち、頻りに DNA 複製と細胞分裂が行われている時期では、Polη は恐らく損傷乗り越え複製を介して、紫外線損傷による障害を最小限に抑えていると考えられた。さらに初期胚発生のステージほどではないが、減数分裂過程で染色体間の相同組換えが起こる pachytene 期の胚でも孵化率の低下が見られたことから、Polη は減数分裂時における DNA 障害の回避

機構にも関与していると考えられる。

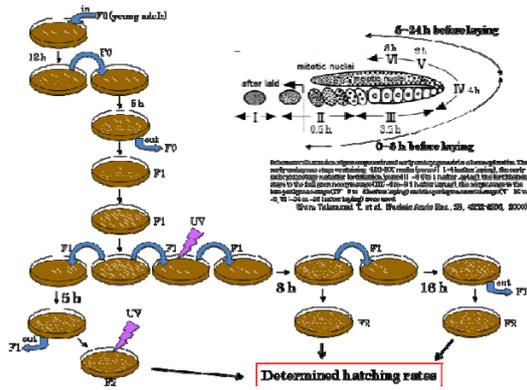


図6 線虫の紫外線感受性を調べる実験系

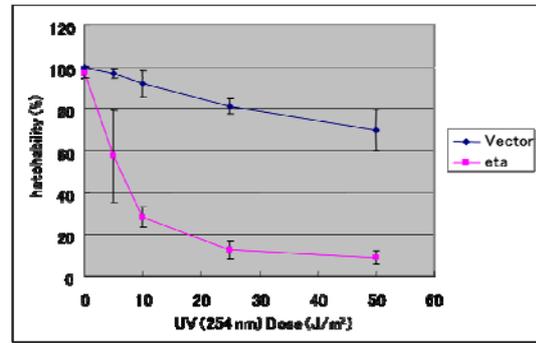


図7 PolηのRNAi処理は紫外線処理した線虫からの胚の孵化率を低下させる

Polη/Polι二重欠損マウスの作成と解析

我々は本研究開始前にPolηノックアウトマウスを作出し、紫外線照射により高い皮膚発がん性を示すことを明らかにした。そのときに用いたES細胞は129マウス由来のもので、このマウスは天然にPolι遺伝子がノックアウトされていることを既に我々は米国の研究者との共同研究により見出している。したがってPolηノックアウトマウスを作出する過程で、Polη/Polιのヘテロノックアウトマウスが出来ている。その雌雄を掛け合わせ、ダブルノックアウトマウスの作出を試みたところ、それぞれの遺伝子型を持つマウスがメンデル則に従って生まれてきた。そこでPolηノックアウトマウスと同様にまず紫外線発がん実験を行った。その結果、皮膚がん発症の時期はPolη単独ノックアウトマウスと比較して早くなる傾向が見られたが、統計的な違いを見出すまでには至らなかった(図8左)。これらのマウスからのMEF細胞を用いた実験でも、Polη単独ノックアウトマウスとPolη/Polι二重欠損マウス由来の細胞では、生存率で見た紫外線感受性に違いは見られなかった。しかし生じた癌を組織化学的に調べたところ、Polη/Polι二重欠損マウスにおいては、Polη単独ノックアウトマウスには見られない肉腫が検出され、Polη/Polι二重欠損マウスではより悪性度の高い癌が生じることが明らかとなった(図8右)。このことは、PolηだけでなくPolιも個体を紫外線による皮膚がんの形成から防御していることを示している。これまでPolιに何らかの生理的な意義を認めた例はなく、これが初めての例である。また病理学的診断により、Polηヘテロ欠損マウスにおいて、統計的有意差をもって野生型マウスに比べて紫外線誘発皮膚がんの発症頻度が高く、POLH遺伝子のヘテロの保因者においても紫外線照射に対する注意が必要な可能性を示唆している。

PolηやPolιの単独欠損とPolη/Polι二重欠損マウスにおける紫外線誘発皮膚発がんの特異性を追求する目的で、大腸菌*rpsL*遺伝子をゲノムに組み込ませたHITECマウスとの掛け合わせを行い、薬剤耐性コロニーの検出とDNAシーケンシングによって、紫外線を照射したマウスの皮膚を分離し、その表皮細胞の変異スペクトルを比較した。その結果、Polηを欠損するとすべての種類の塩基置換が増加すること、特にG:CからA:Tへのトランジションが最大なこと、変異はもっぱらピリミジン塩基が二つ連続した部位に起きることなどが分かった。一方、Polη/Polι二重欠損マウスではG:CからA:TへのトランジションがPolηの単独欠損マウスに比べて有意に低下した(図9)。このことはPolηが欠損しているときに、ジピリミジン部位でのCに対してPolιがGでなくAを重合しやすいことを示唆している。現在、真皮についても解析を行っており、Polη/Polι二重欠損マウスにおける肉腫形成の分子メカニズムの解明が期待される。

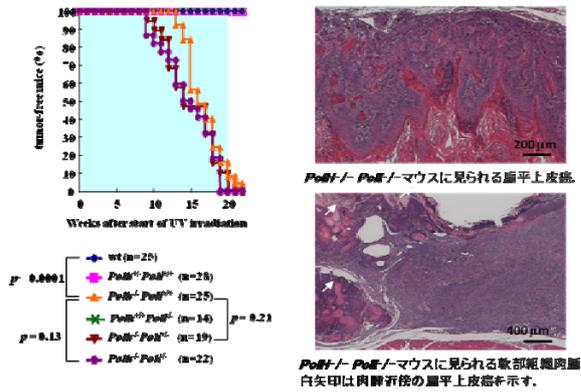


図8 Polη単独あるいはPolη/Polι二重欠損マウスは紫外線照射により皮膚癌を高頻度に発症する

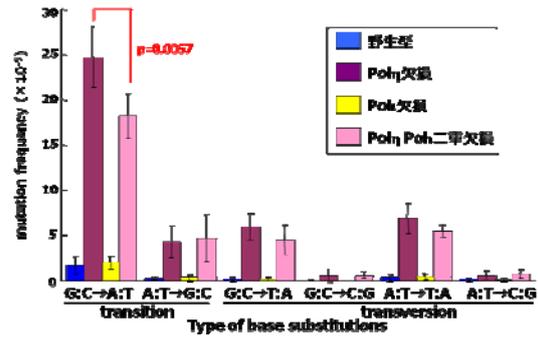


図9 種々の遺伝子型マウス皮膚における紫外線誘発突然変異のスペクトル

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

Polη 複合体の解析から、正常状態の細胞においても Polη が Rad6/Rad18 というユビキチン化酵素 E2/E3 と相互作用していることが示された。このことは、細胞が常に DNA 複製の停止という緊急時に備えて Polη あるいはその機能に重要なタンパク質（例えば PCNA）をユビキチン化できるように準備していることを示唆している。またこの複合体には REV1 も含まれており、Polη が常に REV1 とも相互作用して、何かに備えていると考えられる。ここで分離・解析した Polη 複合体は、DNA 損傷を与えていない細胞から分離したものであるが、紫外線照射後や G1/S 期境界に同調した細胞から分離して調べた場合にも、基本的には同様の複合体が得られている。ただしその量の増加が観察されている。したがって細胞は常に緊急時の準備をしており、必要な場合には、さらに複合体形成を促進させて、複製フォークの進行阻害に対処するものと思われる。今回、Polη 複合体の解析によって、ミスマッチ修復タンパク質や相同組換えあるいはクロスリンク修復に関わるタンパク質も見いだされている。実際に、ミスマッチ修復タンパク質については解析を進めている。今後、Polη が更に様々なプロセスに関わっていることが分かっていくことが期待される。

XP-V 細胞に REV1 との相互作用が出来ない変異 Polη を発現させると、自然突然変異率が上昇するという興味深い結果を得た。今後、REV1 欠損細胞や REV1 を siRNA などでノックダウンした細胞を用いて、同様な現象が見られるか観察したい。また我々のデータでは REV1 タンパク質の DNA 損傷部位へのリクルートには Polη が必要なため、REV1 がどのような内在性の DNA 損傷に働くのかを細胞を酸化損傷剤などで処理して調べる。

線虫の実験から、Polη が発生初期や減数分裂時にも DNA 障害の回避に働いていることが示唆された。このような働きが Polη 自身の損傷乗り越え活性によるものなのか、それとも REV1 など他のタンパク質をリクルートするために必要なかは今後の課題である。それを知るためには、活性部位に変異を入れて、ポリメラーゼ活性を持たない Polη を発現させた細胞を作成し、そのような細胞の DNA 損傷剤に対する感受性を調べる必要がある。

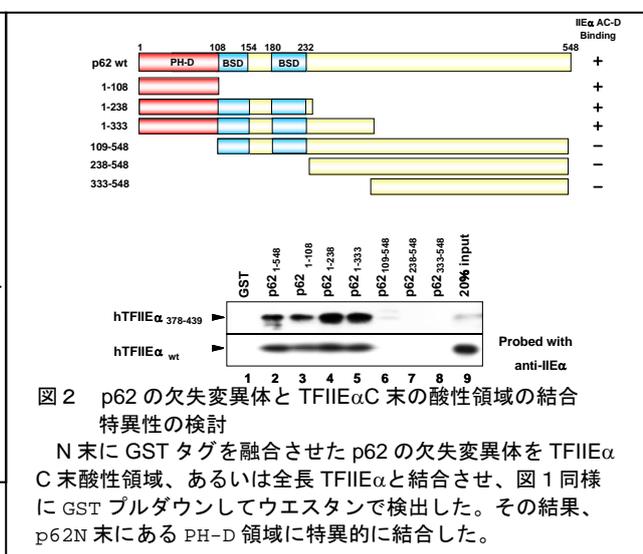
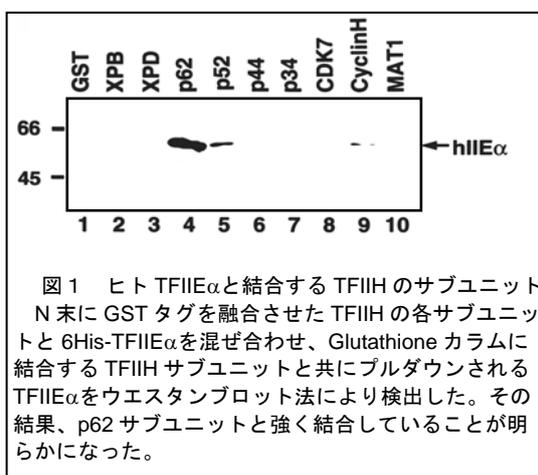
Polη/Polι二重欠損マウスを用いた紫外線誘発皮膚発がん実験から、これまで生理的な機能の分からなかった Polιの役割が初めて示された。特に上皮性の皮膚がんではなく、真皮由来の肉腫が観察されたことは、Polη と異なった機能を持っているという点で非常に興味深い。

4. 4 “DNA 損傷修復に関わる TFIIH の遺伝子発現に向けた核内 Crosstalk における機能解析 (Crosstalk グループ)”

(1) 実施の内容

TFIIH との結合に関わる TFII α サブユニットの構造- 機能解析

TFIIH は転写の際に Pol II の CTD をリン酸化し、転写開始点の周辺を開裂する際にこれを制御する TFII α と、その 10 サブユニットの中の p62 サブユニットで結合している (図 1)。本グループでは、ヒト TFIIH の p62 サブユニットのアミノ基末端にある pleckstrin homology ドメイン (PH-D) が TFII α の 2 つあるサブユニットのうち大きい方の α サブユニットのカルボキシル基末端の酸性領域 (AC-D) と特異的に結合することを見だし (図 2)、両者の結合構造を NMR により決定した。一方、ガン抑制タンパク質として良く知られる p53 も、その転写活性化ドメイン TAD で p62 の PH-D と結合し、その構造が最近発表されている。その構造を今回決定した構造と比較した。さらに、結合特異性を調べるため、あらかじめ p53 TAD と結合させた p62 PH-D に TFII α を量を増しながら加えて、結合が競合して p53 から p62 が離れるかどうかを見た。



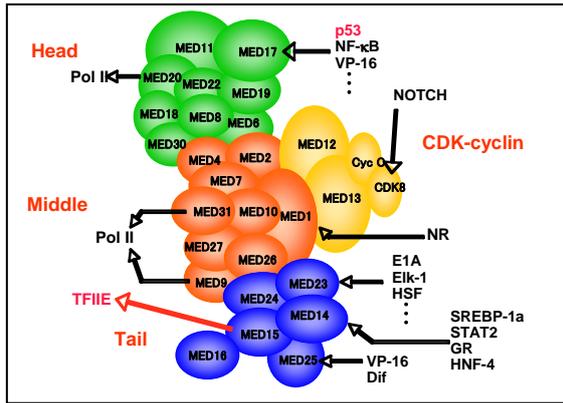
TFIIH と共に Pol II 最大サブユニット CTD のリン酸化に関わるメディエーターのキナーゼサブユニットの解析

TFIIH は、その 10 サブユニットの中に CDK7 キナーゼサブユニットを有する。一方、メディエーターは 30 サブユニットから構成されるが、これらが複体内で 4 つのサブモジュールを形成している (図 3)。その中で、CDK/cyclin サブモジュールに含まれる CDK8 サブユニットは、TFIIH の CDK7 と共に Pol II CTD の 7 アミノ酸繰返し配列の 5 番目セリンをリン酸化して転写開始から伸長への移行を制御していると考えられる。また最近になってメディエーター分画の中に CDK11 という CDK8 のパラログが見出され、脊椎動物において保存されて存在することが明らかになった。そこで今回、これらヒト CDK8 (hCDK8) とヒト CDK11 (hCDK11) の機能解析を行った。まず、各々のタンパクの N 末に HA と FLAG の両タグ (HF:) をつけてヒト HeLa 細胞中に導入してこれらを発現する細胞株を樹立した。そして、各々のサブユニットをアフィニティー精製して、それらに結合するタンパク質を調べた。

さらに、生化学的に精製した HA/FLAG:hCDK8 の複合体に関して試験管内転写再構成系を用いて Gal4-VP16 転写活性化条件で転写活性を調べた。次に siRNA を用いて hCDK8 と hCDK11 を各々ノックダウンして細胞内レポーターアッセイにて Gal4-VP16 転写活性化をみた。

図3 ヒトメディエーター複合体

メディエーター複合体は真核生物において高度に機能的、構造的に保存されて存在が確認されている、およそ30サブユニットから構成された巨大転写制御複合体である。各々のサブユニットは、MED1~31まで通し番号で命名されているサブユニット以外にCDK8あるいはCDK11、それにCyclinCというサブユニットがあり、Head、Middle、CDK-cylin、Tailの4つのサブモジュールを形成する。様々な転写制御因子からのシグナルを受領する他に、Pol IIと基本転写因子にその受容した転写活性化シグナルを受け渡すという役割を持つと考えられている。図にはシグナルを受容するサブユニットを矢印で示している。

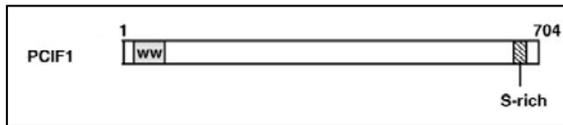


リン酸化 Pol II に結合する新規因子 PCIF1 の解析

上述したように、Pol II CTDは7アミノ酸の繰返し配列(YSPTSPS)の2番目と5番目のセリン(Ser2、Ser5)がリン酸化されてPol IIは活性化される。TFIIHとメディエーター複合体はSer5をリン酸化するが、このリン酸化Ser5 (P-Ser5)に特異的に結合する因子としてPCIF1 (Phosphorylated CTD-interacting Factor 1)を本グループは同定し、cDNAクローニングに成功している(図4) (Fan *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 301, 378-385, 2003)。そこでさらに、その機能解析を行った。

図4 ヒト PCIF1 の特徴的配列

ヒト PCIF1 はリン酸化5番目セリンを持つ合成 CTD ペプチドに結合するタンパク質のスクリーニングで単離された WW ドメインをN末に、セリンに富む領域をC末に有する704アミノ酸からなる新規因子である。



(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

TFIIH との結合に関わる TFIIHαサブユニットの構造-機能解析

NMRによる構造決定の結果、ヒト TFIIHαはフリーの状態であるとAC-Dは定型を取らないが、TFIIHのp62サブユニットのPH-Dと結合すると安定構造を取ることが明らかになった(図5)。またp53TADのPH-D上での結合領域は、TFIIHαAC-DのPH-D上の結合領域と重なることが分った(図6)。さらに、PH-Dへの結合のTFIIHαAC-Dとp53との間での競合実験により、紫外線等でp53がN末領域をリン酸化修飾されていない通常状態では、p53よりもTFIIHαAC-Dの方が優先的にp62のPH-Dと結合することを生化学的に証明した。このことは、p53が転写制御とともに紫外線などによる細胞のDNA損傷修復に関わっていることから、TFIIHαがTFIIHを転写で機能させるスイッチ、p53がTFIIHをDNA損傷修復で機能させるスイッチとしてそれぞれ機能している可能性を示唆する重要な発見であると考える (Okuda *et al.*, *EMBO J.*, 27, 1161-1171, 2008)。

図5 (右) ヒト TFIIHαの AC-D 領域の構造安定性

A. NMRにより得られた、AC-D単独での構造。
B. 20分子の各々の構造を重ねたもの。右のN-terはN末、左のC-terはC末を表す。B. AC-DとTFIIHp62サブユニットのPH-Dの共結合構造を20分子分重ねたもの。緑がAC-D、黄色がPH-Dを示す。AC-DのN末もC末もPH-Dと結合すると安定構造をとっている。

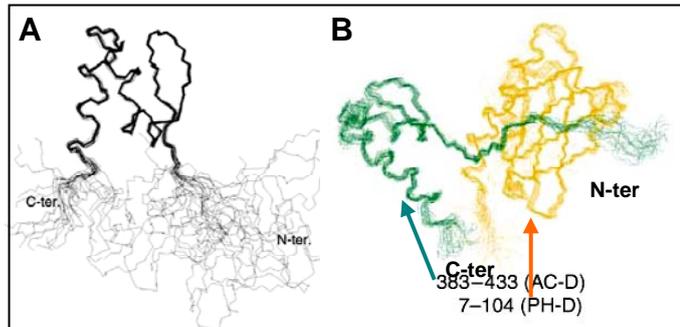
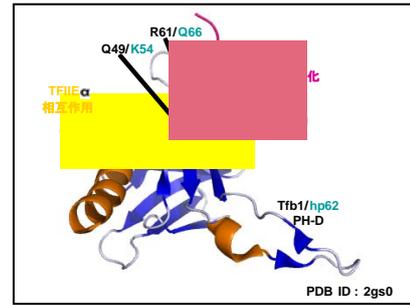


図6(左) ヒトTFII α のAC-Dとp53の転写活性化領域はPH-Dへの結合領域が重複している

ここでは酵母のp62ホモログTfb1とヒトp53の共結合構造(PDB ID:2gs0)の上に、AC-Dの結合領域を黄色の楕円形で、p53の活性化領域の結合を赤の楕円で示した。また結合に必要なp62PH-D上のアミノ酸を酵母(黒字)とヒト(青字)での番号で示している。p53とTFII α の結合領域がp62の同一表面で重なっていることがわかる。

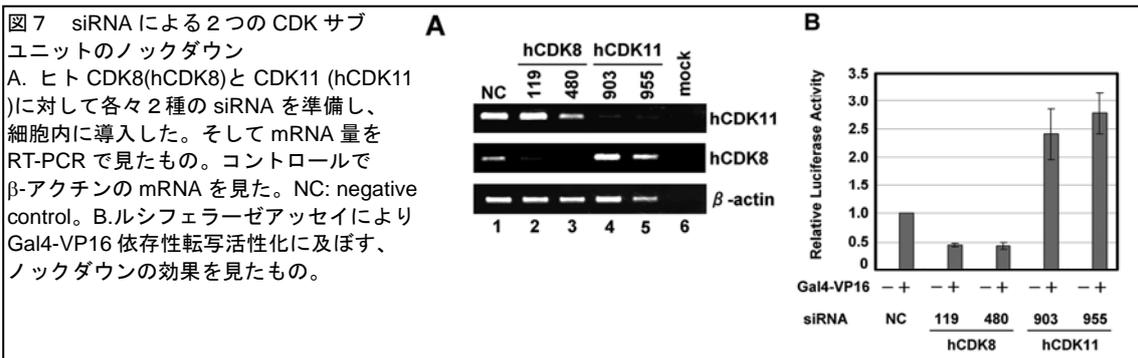


TFIIHと共にPoI II最大サブユニットCTDのリン酸化に関わるメディエーターのキナーゼサブユニットの解析

ヒトのCDK8とCDK11ではおよそ500アミノ酸残基の中でC末の140アミノ酸の配列が大きく異なるだけで、N末側360アミノ酸は95%以上一致していることが分った。そして、樹立した各々のHFタグ付きCDKを発現するHeLa細胞株から核抽出液を調製し、これらCDKに結合するタンパク質をアフィニティー精製して解析したところ、i)HF:hCDK8もHF:hCDK11もメディエーター複合体を形成していること、ii)互いは相手のサブユニットを含まない複合体を形成すること、iii)細胞内の両CDKタンパク質の発現を見るとほとんどが核内で異なる部分に局在すること、が明らかとなった。

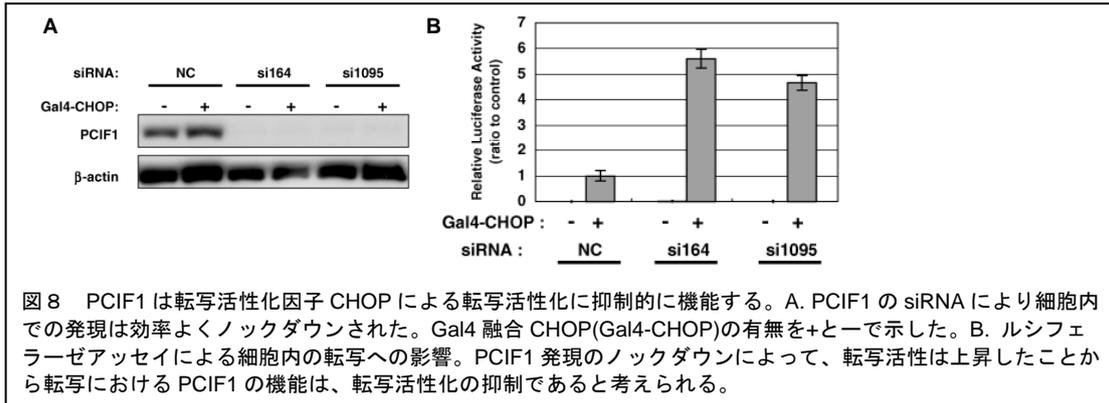
そこで次にCDK8の形成するメディエーター複合体の転写における役割を生化学的に解析し、*in vitro*において転写活性化因子Gal4-VP16依存の転写活性化に及ぼす影響を調べたところ、活性化に機能する複合体(分子量1.5MDa)と不活性化複合体(分子量1MDa)の2種のサブタイプが存在することが明らかになった(Furumoto *et al.*, *Genes Cells*, 12, 119-132, 2007)。

2つのCDKの細胞内の機能解析としてsiRNAによりhCDK8をノックダウンすると、転写活性は低下し、hCDK11ノックダウンでは反対に活性は上昇した(図7)。これらの結果から、細胞内においてはhCDK8は転写活性化に寄与しており、hCDK11は反対に転写抑制に機能していることが示唆された。細胞内でのタンパクの局在も異なっていることから、各々のメディエーターは異なる遺伝子プロモーターに結合して異なる転写制御をしていることを考えるに至っている(Tsutsui *et al.*, *Genes Cells*, 13, 817-826, 2008)。



リン酸化PoI IIに結合する新規因子PCIF1の解析

この解析では、転写開始の際にTFIIHとメディエーター複合体がリン酸化するPoI IICTDの細胞内での制御にPCIF1が関わっているかを検討した。その結果、この因子はリン酸化PoI IIや転写伸長因子DSIFと共局在しており、またリン酸化CTDの脱リン酸化酵素SCP1の脱リン酸化能を阻害すること、Gal4-VP16による細胞内での転写活性化を阻害することを明らかにした(図8)(Iwamoto *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 369, 449-455, 2008)。今後、TFIIHによるCTDリン酸化を伴う転写機能とどのように関連したメカニズムで細胞内で役割を果たしているかを明らかにしていく。



5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

GGR機構における損傷認識段階について、これまでXPCタンパク質複合体とUV-DDBとが関与していることは明らかになってきたが、両者の関係は不明であった。本研究によって、少なくともCPDに関してUV-DDB-E3リガーゼによるXPCおよびDDB2のユビキチン化が重要な役割を果たしており、二種類の損傷認識タンパク質が置き換わるという斬新な機構の存在が判明した。この反応については本研究が圧倒的に他をリードしており、今後もその状況が続くことを期待したい。XPCタンパク質のユビキチン化は可逆的であり、当然脱ユビキチン化酵素の関与が考えられる。siRNAライブラリーを用いてその候補タンパク質も同定しており、研究の発展が見込まれる。

先に我々はXPCタンパク質複合体に中心体タンパク質であるcentrin 2を見出した。本研究でcentrin 2がXPCタンパク質の損傷DNA結合活性を増強することを見つけた。この研究も国内外で初めてであり、ユニークである。近年、一つのタンパク質が細胞内の異なる場所で別の機能を有していることが次々と明らかになっており、本研究で明らかにしたcentrin 2のGGRにおける役割も細胞が如何に効率よく一つのタンパク質を使いまわしているか、というよい例である。

現在、DNA修復の分野に限らず、DNAの代謝反応全般でクロマチン構造の重要性が認識され、そうした研究が進められている。本研究で扱った再構成ヌクレオソームでのNER反応は、そうした中での先鞭を付ける研究になりうるもので、今後、更なる発展が期待される。特にUB-DDB-E3がヒストンをユビキチン化するという報告やUV-DDBとHATとの相互作用の報告もあり、本研究で見出されたCBP/p300によるDDB2のアセチル化の生理的な意義に関心が持たれる。一方、細胞内における修復タンパク質のダイナミクスは世界的な流行になっており、特にDNAの二本鎖切断修復に関わるタンパク質のダイナミクスが進んでいる。NERタンパク質に関しても、オランダのグループを中心にそのダイナミクスが進められており、我々のグループは彼らと長い間、協力関係にあり、このプロジェクトについても共同研究を進め、その成果の一部は既に論文として発表している。

CSA、CSBの役割を始めとしてTCR機構の詳細はこれまで十分に明らかではなかった。我々はCSA機能を中心に解析を進めた。いずれの研究も独創的で、TCR研究をリードする成果である。

XAB2がTCRに関与することを報告したが(*J. Biological Chemistry*, 275: 34931-34937, 2000; *J. Biological Chemistry*, 283: 940-950, 2008)、オランダの研究グループは、紫外線損傷部位で転写を停止したRNAPII α と結合する蛋白質を同定し(*Molecular Cell*, 23: 471-482, 2006)、その中にXAB2も含まれていることを報告した。しかも、転写を停止したPol II α へのXAB2のリクルートが、CSAやCSB依存性であることを示した。XAB2がTCR機構に関与するという我々の結果を強く支持するものとなった。

XPGがTFIIHと安定な複合体を形成し転写活性化に関わり、XP-G/CS患者ではこの複合体が不安定となり、TFIIHの核内レセプターの活性化が起こらないことを見出した(*Molecular Cell*, 26: 231-243, 2007)。これは、DNA修復因子として知られていたXPGが、TFIIHの構造安定化に関与することを介し転写に重要な役割を担うこと、CS徴候が転写の異常に起因することを始めて示したものであり、国際学会等で高い評価を受けた。TFIIHは基本転写因子として重要な役割を担っていることから、我々の今回の発見は転写研究への波及効果も大きいと考えられる。

CS-B細胞で認められる変異短縮CSB蛋白質が何らかのgain-of-functionを持ち、それがCS-Bの病態に関与しているという我々の仮説(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 15410-15415, 2004)は多くの論文で引用を受けている。我々はその仮説を支持する結果を得ており、現在、論文を投稿中(改訂版)である。

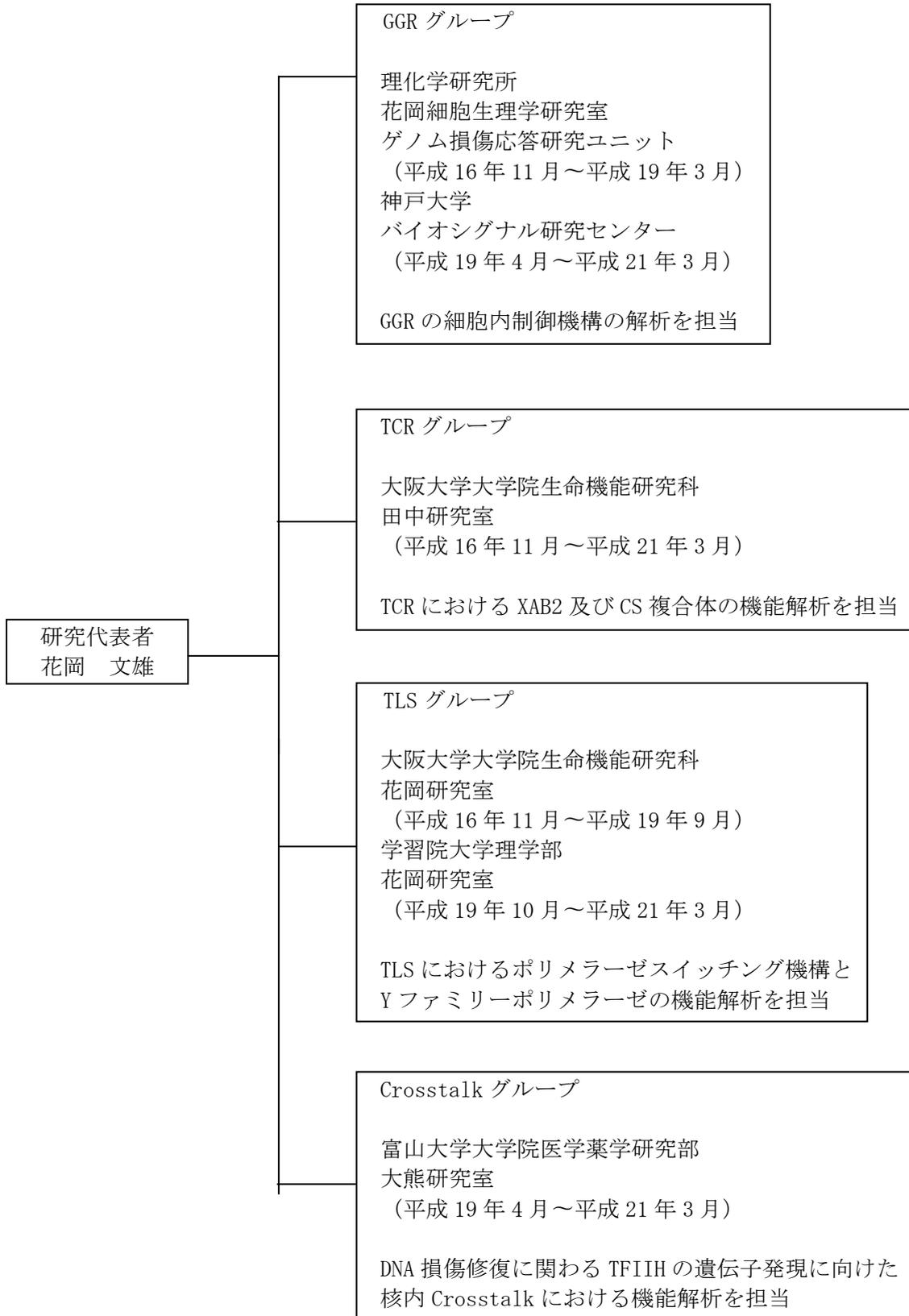
TLSに関しては、この4年半近くで、実に多くの研究成果が国内外から発表された。そのこと自体は、実質上、この分野を切り拓いた我々のグループとしてはうれしいことである。

が、一方では、競争が激化し、論文が出にくい状況でもあった。そうした中でも、REV1 と相互作用出来ない Pol η を発現している XP-V 細胞では、自然突然変異率が上昇するという我々の知見はユニークである。REV1 の紫外線損傷部位へのリクルートに Pol η の存在が必要であるという我々の知見に対し、別のグループは REV1 が単独で紫外線損傷部位へ集積するという論文を出している。この違いに関しては、我々が内在性の REV1 を観察しているのに対し、別のグループは過剰発現させた外来性の REV1 を見ているという点が理由として挙げられる。実際に我々も REV1 を過剰発現させると、それ単独で紫外線損傷部位へ集積するというデータを得ている。我々が単離した Pol η を含む複合体の質量分析から、実に様々なタンパク質（主として DNA 修復関連）が Pol η と相互作用していることが示された。本研究ではそれらのごく一部を解析したに過ぎず、現在、解析を進めているものも含め、今後の展開が楽しみである。TLS ポリメラーゼのノックアウトマウスの仕事も、癌化を中心に進めてかなりの成果が挙げられた。当然、国内外の他の研究グループも手掛けており、一部は競合しているが、出来るだけ協力して、無駄にないように進める方針である。

基本転写因子 TFIIH とメディエーター複合体による Pol II の CTD リン酸化修飾と、これに伴う真核生物の遺伝子発現制御の研究は、国内では本グループが転写開始と RNA プロセシングの制御解析、また東工大の半田宏教授のグループが、やはり CTD をリン酸化する CDK9 と Cyclin T1 の 2 サブユニットから成る転写伸長因子 P-TEFb を中心に研究している。病態と DNA 損傷修復の関連分野での解析は、本研究課題の GGR と TCR のグループが TFIIH の解析を活発に行い研究を牽引しているのが、国内の状況である。一方、国外では TFIIH による CTD リン酸化と遺伝子発現に関してフランスの Egly たちが、この TFIIH の同定以来解析を続けており、米国の複数のグループが転写後調節に対する CTD リン酸化の意味を解析している。最近になってメディエーター複合体の CDK8 サブユニットの転写調節との関連での研究が世界的に行われるようになったが、CDK11 の解析を行っているのは本研究グループだけである。

6. 研究実施体制

(1) 体制



(2)メンバー表

① GGR グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
花岡 文雄	理化学研究所	主任研究員	研究の総括、分裂酵母のNER因子の分離と解析	平成16年11月～ 平成18年3月
菅澤 薫	理化学研究所	副主任研究員	XPCタンパク質の翻訳後修飾とその機能の解析	平成16年11月～ 平成18年4月
	同 神戸大学	研究ユニットリーダー 教授	研究の総括、XPCタンパク質の翻訳後修飾とその機能の解析	平成18年5月～ 平成19年3月 平成19年4月～ 平成21年3月
水野 武	理化学研究所	先任研究員	XPCタンパク質の構造と機能の解析	平成16年11月～ 平成18年3月
木村 圭志	理化学研究所	先任研究員	ヌクレオソーム構造を介したNERの解析	平成16年11月～ 平成18年3月
鎌田 勝彦	理化学研究所	先任研究員	XPCタンパク質の翻訳後修飾とその機能の解析	平成16年11月～ 平成18年3月
安田 武嗣	理化学研究所	協力研究員	ヌクレオソーム構造を介したNERの解析	平成18年1月～ 平成18年6月
柳 憲一郎	理化学研究所	協力研究員	XPCタンパク質の構造と機能の解析	平成16年11月～ 平成18年3月
安田 源太郎	理化学研究所	大学院生	XPCタンパク質の構造と機能の解析	平成17年2月～ 平成18年3月
西 良太郎	理化学研究所	大学院生	XPCタンパク質の構造と機能の解析	平成17年2月～ 平成18年3月
		基礎科学特別研究員 助教	GGR損傷認識因子の細胞内ダイナミクスの解析	平成18年4月～ 平成19年3月 平成19年4月～ 平成21年3月
小林 広孝	理化学研究所	人材派遣パートタイマー	XPCタンパク質の構造と機能の解析	平成17年5月～ 平成19年3月
	神戸大学	技術補佐員	GGR損傷認識因子の細胞内ダイナミクスの解析	平成19年4月～ 平成21年3月
大野 綾子	理化学研究所	基礎科学特別研究員	XPCタンパク質の構造と機能の解析	平成18年4月～ 平成19年3月
志村 勉	理化学研究所 神戸大学	協力研究員 学術推進研究員	XPCタンパク質の構造と機能の解析	平成18年11月～ 平成19年3月 平成19年4月～ 平成19年7月

赤木 純一	神戸大学	学術推進 研究員	GGR に関わるクロマチン構造変換機構と GGR 因子の細胞内制御	平成 19 年 9 月～ 平成 21 年 3 月
-------	------	-------------	-----------------------------------	-----------------------------

② TCR グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
田中亀代次	大阪大学大学院生命機能研究科	教授	研究の総括、Xpa(-/-)マウスの解析	平成 16 年 11 月～ 平成 21 年 3 月
西條将文	同上	准教授	CSA、CSB の機能解析	平成 16 年 11 月～ 平成 21 年 3 月
堀端克良	同上	助教	UV ^s S の分子病態解析	平成 17 年 4 月～ 平成 17 年 7 月
成田 央	同上	助教	XPG の転写機能の解析	平成 18 年 6 月～ 平成 21 年 3 月
倉岡 功	同上	助教	XAB2 の機能解析	平成 16 年 11 月～ 平成 18 年 3 月
伊藤 伸介	同上	大学院生 研究員	XPG-TFIIH 複合体の機能解析	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 3 月 平成 19 年 4 月～ 平成 19 年 8 月
竹立新人	同上	大学院生	XPG の機能解析	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 11 月
鈴木恭子	同上	大学院生	RNAP II の <i>in vitro</i> 転写系	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 11 月

③ TLS グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
花岡 文雄	大阪大学大学院生命機能研究科 学習院大学理学部	教授	研究の総括、Pol η と相互作用する因子の解析	平成 16 年 11 月～ 平成 19 年 9 月
		教授		平成 19 年 10 月～ 平成 21 年 3 月
益谷 央豪	大阪大学大学院生命機能研究科	准教授	Pol η の翻訳後修飾の解析	平成 16 年 11 月～ 平成 21 年 3 月
横井 雅幸	大阪大学大学院生命機能研究科 学習院大学理	助教	Pol η ノックアウトマウスの解析	平成 16 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
		助教		平成 20 年 4 月～

	学部			平成 21 年 3 月
大雲 剛志	大阪大学大学院生命機能研究科	助教	Pol η ノックアウトマウスの解析	平成 16 年 11 月～平成 19 年 8 月
内山 雅司	大阪大学大学院生命機能研究科 学習院大学理学部	JST 研究員	分裂酵母 TLS ポリメラーゼの解析	平成 19 年 4 月～平成 20 年 3 月 平成 20 年 4 月～平成 21 年 3 月
増本 博司	大阪大学大学院生命機能研究科	JST 研究員	出芽酵母を用いた細胞老化の研究	平成 19 年 4 月～平成 19 年 12 月
砂川 真弓	大阪大学大学院生命機能研究科	JST 研究員	Pol η 複合体の解析	平成 18 年 4 月～平成 19 年 3 月
平野 暁彦	大阪大学大学院生命機能研究科	大学院生	Pol η の翻訳後修飾の解析	平成 18 年 4 月～平成 18 年 7 月
金尾 梨絵	大阪大学大学院生命機能研究科	大学院生	Pol η ノックアウトマウスの解析	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
道津 貫太郎	大阪大学大学院生命機能研究科	大学院生	Pol η ノックアウトマウスの解析	平成 19 年 8 月～平成 20 年 3 月
楊 姍姍	大阪大学大学院生命機能研究科	大学院生	Pol η と相互作用する因子の解析	平成 16 年 11 月～平成 18 年 3 月
高岡 匠	学習院大学理学部	大学院生	Pol η ノックアウトマウスの解析	平成 20 年 4 月～平成 21 年 3 月

④ Crosstalk グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
大熊 芳明	富山大学大学院医学薬学研究部	教授	TFIIH の欠損病態と核内事象の解析と総括	平成 19 年 4 月～平成 21 年 3 月
広瀬 豊	同上	助教	Pol IICTD のリン酸化とそれに伴う Crosstalk 解析	平成 19 年 4 月～平成 21 年 3 月
田中 亜紀	同上	助教	TFIIH の欠損病態と核内事象の解析と総括	平成 19 年 4 月～平成 21 年 3 月
山本 真也	同上	大学院生	Pol IICTD のリン酸化とそれに伴う Crosstalk 解析	平成 20 年 10 月～平成 21 年 3 月
高澤 学	同上	大学院生	TFIIH の欠損病態と核内事象の解析と総括	平成 20 年 10 月～平成 21 年 3 月

7. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

該当ありません。

(3) 招聘した研究者等

該当ありません。

8. 発展研究による主な研究成果

(1) 論文発表 (英文論文 82 件 邦文論文 8 件)

- 1) Nishi, R., Alekseev, S., Dinant, C., Hoogstraten, D., Houtsmuller, A. B., Hoeijmakers, J. H. J., Vermeulen, W., Hanaoka, F., and Sugasawa, K.: UV-DDB-dependent regulation of nucleotide excision repair kinetics *in vivo*. *DNA Repair in press* (2009).
- 2) Tanaka, K., and Ito, S.: Transcription-coupled repair and its defect in Cockayne syndrome. In *Molecular Mechanisms of Cockayne Syndrome*. Landes Bioscience, *in press* (will be published on April 1, 2009)
- 3) Ni, L., Saeki, M., Xu, L., Nakahara, H., Saijo, M., Tanaka, K., and Kamisaki, Y.: RPAP3 interacts with Reptin to regulate UV-induced phosphorylation of H2AX and DNA damage. *J. Cellular Biochemistry*, *in press*.
- 4) Akagi, J., Masutani, C., Kataoka, Y., Kan, T., Ohashi, E., Mori, T., Ohmori, H., and Hanaoka, F.: Interaction with DNA polymerase eta is required for nuclear accumulation of REV1 and suppression of spontaneous mutations in human cells. *DNA Repair in press* (2009).
- 5) Katsuno, Y., Suzuki, A., Sugimura, K., Okumura, K., Zineldeen, D. H., Shimada, M., Niida, H., Mizuno, T., Hanaoka, F., and Nakanishi, M.: Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 3184-3189 (2009).
- 6) Tanaka, A., Watanabe, T., Iida, Y., Hanaoka, F., and Ohkuma Y.: Central forkhead domain of human TFIIE beta plays a primary role in binding double-stranded DNA at transcription initiation. *Genes Cells* **14**, 395-405 (2009).
- 7) Sugasawa, K.: XPC: its product and biological roles. In *Molecular Mechanisms of Xeroderma Pigmentosum*. (Ahmad, S. I. and Hanaoka, F. eds.) *Adv. Exp. Med. Biol.* **637**, 47-56, Landes Bioscience, Austin, U.S.A. (2008).
- 8) Masutani, C., Hanaoka, F., and Ahmad, S. I.: Xeroderma Pigmentosum variant, XP-V: its product and biological roles. In *Molecular Mechanisms of Xeroderma Pigmentosum*. (Ahmad, S. I. and Hanaoka, F. eds.) *Adv. Exp. Med. Biol.* **637**, 93-102, Landes Bioscience, Austin, U.S.A. (2008).
- 9) Ahmad, S. I., and Hanaoka, F. (2008) Molecular mechanisms of xeroderma pigmentosum. Preface. In *Molecular Mechanisms of Xeroderma Pigmentosum*. (Ahmad, S. I. and Hanaoka, F. eds.) *Adv. Exp. Med. Biol.* **637**, vii-xiv, Landes Bioscience, Austin, U.S.A. (2008).
- 10) Roche, Y., Zhang, D., Segers-Nolten, GM., Vermeulen, W., Wyman, C., Sugasawa, K., Hoeijmakers, J. and Otto, C.: Fluorescence correlation spectroscopy of the binding

- of nucleotide excision repair protein XPC-hHr23B with DNA substrates. *J. Fluoresc.* 18, 987–995 (2008).
- 11) Sugasawa, K. : Xeroderma pigmentosum genes: functions inside and outside DNA repair. *Carcinogenesis* 29, 455–465 (2008).
 - 12) Ohkumo, T., Masutani, C., and Hanaoka, F. : Use of RNAi in *C. elegans*. In RNAi: Design and Application. (Barik, S. ed.) *Methods Mol. Biol.* 442, 129–137 (2008).
 - 13) Nakane, H., Hirota, S., Brooks, P. J., Nakabeppu, Y., Nakatsu, Y., Kitamura, Y., Nishimune, Y., Iino, A., and Tanaka, K. : Impaired spermatogenesis and elevated spontaneous tumorigenesis in xeroderma pigmentosum group A gene (XPA)-deficient mice. *DNA Repair* 7, 1938–1950 (2008).
 - 14) Masuda, K., Ouchida, R., Yokoi, M., Hanaoka, F., Azuma, T., and Wang, J. Y. : DNA polymerase eta is a limiting factor for A:T mutations in *Ig* genes and contributes to antibody affinity maturation. *Eur. J. Immunol.* 38, 2796–2805 (2008).
 - 15) Fukumoto, Y., Dohmae, N., and Hanaoka, F. : *Schizosaccharomyces pombe* Ddb1 recruits substrate-specific adaptor proteins through a novel protein motif, the DDB-box. *Mol. Cell. Biol.* 28, 6746–6756 (2008).
 - 16) Ouchida, R., Ukai, A., Mori, H., Kawamura, K., Dolle, M. E., Tagawa, M., Sakamoto, A., Tokuhisa, T., Yokosuka, T., Saito, T., Yokoi, M., Hanaoka, F., Vijg, J., and Wang, J. Y. : Genetic analysis reveals an intrinsic property of the germinal center B cells to generate A:T mutations. *DNA Repair* 7, 1392–1398 (2008).
 - 17) Martomo, S. A., Saribasak, H., Yokoi, M., Hanaoka, F., and Gearhart, P. J. : Reevaluation of the role of DNA polymerase theta in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *DNA Repair* 7, 1603–1608 (2008).
 - 18) Tsuji, Y., Watanabe, K., Araki, K., Shinohara, M., Yamagata, Y., Ysurimoto, T., Hanaoka, F., Yamamura, K., Yamaizumi, M., and Tateishi, S. : Recognition of forked and single-stranded DNA structures by human RAD18 complexed with RAD6B protein triggers its recruitment to stalled replication forks. *Genes Cells* 13, 343–354 (2008).
 - 19) Yasui, M., Suenaga, E., Koyama, N., Masutani, C., Hanaoka, F., Gruz, P., Shibutani, S., Nohmi, T., Hayashi, M., and Honma, M. : Miscoding properties of 2'-deoxyinosine, a nitric oxide-derived DNA adduct, during translesion synthesis catalyzed by human DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* 377, 1015–1023 (2008).
 - 20) Hidaka, K., Yamada, M., Kamiya, H., Masutani, C., Harashima, H., Hanaoka, F., and Nohmi, T. : Specificity of mutations induced by incorporation of oxidized dNTPs into DNA by human DNA polymerase eta. *DNA Repair* 7, 497–506 (2008).
 - 21) Tsutsui, T., Umemura, H., Tanaka, A., Mizuki, F., Hirose, Y., and Ohkuma, Y. : Human mediator kinase subunit CDK11 plays a negative role in viral activator VP16-dependent transcription. *Genes Cells*, 13, 817–826 (2008).
 - 22) *Okuda, M., *Tanaka, A., Satoh, M., Takazawa, M., Mizuta, S., Ohkuma, Y., and Nishimura, Y. (*these authors contributed equally to this work.): Structural insight into the TFIIE/TFIIF: TFIIE and p53 share the binding region on TFIIF. *EMBO J.*, 27, 1161–1171 (2008).
 - 23) *Hirose, Y., *Iwamoto, Y., Sakuraba, K., Yunokuchi, I., Harada, F., and Ohkuma, Y. (*these authors contributed equally to this work.): Human phosphorylated CTD-interacting protein, PCIF1, negatively modulates gene expression by RNA polymerase II. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 69, 449–455 (2008).
 - 24) Akashi, S., Nagakura, S., Yamamoto, S., Ohkuma, Y., and Nishimura, Y. : Structural characterization of human transcription factor TFIIF in solution. *Protein Sci.*

- 17, 389–400 (2008).
- 25) Kuraoka, I., Ito, S., Wada, T., Hayashida, M., Lee, L., Saijo, M., Nakatsu, Y., Matsumoto, M., Matsunaga, T., Handa, H., Qin, J., Nakatani, Y., and Tanaka, K.: Isolation of XAB2 complex involved in pre-mRNA splicing, transcription and transcription-coupled repair. *J. Biol. Chem.* 283, 940–950 (2008).
 - 26) Yatagai, F., Umebayashi, Y., Homma, M., Sugasawa, K., Takayama, Y., and Hanaoka, F.: Mutagenic radioadaptation in a human lymphoblastoid cell line. *Mutat. Res.* 638: 48–55 (2008).
 - 27) Ito, S., Kuraoka, I., Chymkowitch, P., Compe, E., Takedachi, A., Ishigami, C., Coin, F., Egly, J.-M., and Tanaka, K.: XPG stabilizes TFIIH allowing transactivation of nuclear receptors: Implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. *Mol. Cell*, 26, 231–243 (2007).
 - 28) Yasuda, G., Nishi, R., Watanabe, E., Mori, T., Iwai, S., Orioli, D., Stefanini, M., Hanaoka, F., and Sugasawa, K.: In vivo destabilization and functional defects of the xeroderma pigmentosum C protein caused by a pathogenic missense mutation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6606–6614 (2007).
 - 29) Kuraoka, I., Suzuki, K., Ito, S., Hayashida, M., Kwei, J. S. M., Ikegami, T., Handa, H., Nakabeppu, Y., and Tanaka, K.: RNA polymerase II bypasses 8-oxoguanine in the presence of transcription elongation factor TFIIS. *DNA Repair*, 6, 841–851 (2007).
 - 30) Sugasawa, K., and Hanaoka, F.: Sensing of DNA damage by XPC/Rad4: one protein for many lesion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 887–888 (2007).
 - 31) Bugreev, D. V., Hanaoka, F., and Mazin, A. V.: Rad54 dissociates homologous recombination intermediates by branch migration. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 746–753 (2007).
 - 32) Shiomi, Y., Masutani, C., Hanaoka, F., Kimura, H., and Tsurimoto, T.: A second PCNA loader complex, Ctf18-RFC, stimulates DNA polymerase η activity. *J. Biol. Chem.* 282, 20906–20914 (2007).
 - 33) Masuda, K., Ouchida, R., Hikida, M., Kurosaki, T., Yokoi, M., Masutani, C., Seki, M., Wood, R. D., Hanaoka, F., and O-Wang, J.: DNA polymerase η and θ function in the same genetic pathway to generate mutations at A/T during somatic hypermutation of Ig genes. *J. Biol. Chem.* 282, 17387–17394 (2007).
 - 34) Kawanishi, M., Matsukawa, K., Kuraoka, I., Takamura-Enya, T., Totsuka, Y., Matsumoto, Y., Watanabe, M., Zou, Y., Tanaka, K., Sugimura, T., Wakabayashi, K., and Yagi, T.: Molecular evidence of involvement of nucleotide excision repair (NER) system in repair of the mono ADP-ribosylated DNA adduct produced by pierisin-1, an apoptosis-inducing protein from cabbage butterfly. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 694–700 (2007).
 - 35) Saijo, M., Hirai, T., Ogawa, A., Kobayashi, A., Kamiuchi, S., and Tanaka, K.: Functional TFIIH is required for UV-induced translocation of CSA to nuclear matrix. *Mol. Cell. Biol.* 27, 2538–2547 (2007).
 - 36) Ikehata, H., Ono, T., Tanaka, K., and Todo, T.: Triplet mutations result from error-prone translesional DNA synthesis on UV photolesions. *DNA Repair*, 6, 658–668 (2007).
 - 37) van der Pluijm, I., Garinis, G. A., Brandt, R. M. C., Gorgels, T. G. M. F., Wijnhoven, S. W., Diderich, K. E. M., de Wit, J., Mitchell, J. R., van Oostrom, C., Beems, R., Niedernhofer, L. J., Velasco, S., Friedberg, E. C., Tanaka, K., van Steeg, H., Hoeijmakers, J. H. J., and van der Horst, G. T. J.: Impaired genome maintenance suppresses the growth hormone-insulin-like growth factor 1 axis in mice with Cockayne syndrome. *PLoS Biol.* 5, 23–38 (2007).
 - 38) Ikehata, H., Yanase, F., Mori, T., Nikaido, O., Tanaka, K., and Ono, T.: Mutation

- spectrum in UVB-exposed skin epidermis of Xpa-knockout mice: frequent recovery of triplet mutations. *Environ. Mol. Mutagen.* 48, 1-13 (2007).
- 39) Satou, K., Kasai, H., Masutani, C., Hanaoka, F., Harashima, H., and Kamiya, H.: 2-Hydroxy-dATP enhances A:T→C:G mutations caused by 8-hydroxy-dGTP by suppressing its degradation upon replication in a HeLa extract. *Biochemistry* 46, 6639-6646 (2007).
 - 40) Shimizu, M., Gruz, P., Kamiya, H., Masutani, C., Xu, Y., Usui, Y., Sugiyama, H., Harashima, H., Hanaoka, F., and Nohmi, T.: Efficient and erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by human DNA polymerase η . *Biochemistry* 46, 5515-5522 (2007).
 - 41) Okamada, K., Kubota, Y., Arata, T., Shindo, Y., and Hanaoka, F.: Structure of the human GINS complex and its assembly and functional interface in replication initiation. *Nature Struct. Mol. Biol.* 14, 388-396 (2007).
 - 42) Takemoto, A., Murayama, A., Katano, M., Urano, T., Furukawa, K., Yokoyama, S., Yanagisawa, J., Hanaoka, F., and Kimura, K.: Analysis of the role of Aurora B on the chromosomal targeting of condensin I. *Nucleic Acids Res.* 35, 2403-2412 (2007).
 - 43) Furumoto, T., Tanaka, A., Ito, M., Malik, S., Hirose, Y., Hanaoka, F., and Ohkuma, Y.: A kinase subunit of the human mediator complex, CDK8, positively regulates transcriptional activation. *Genes Cells* 12, 119-132 (2007).
 - 44) Sugasawa, K.: The XPC complex and UV-DDB: functional assays for the damage recognition factors involved in global genome repair. *Methods Enzymol.* 408, 171-188 (2006).
 - 45) Kuraoka, I., and Tanaka, K.: Assays for transcription elongation by RNA polymerase II using oligo(dC)-tailed template with single DNA damage. *Methods in Enzymol.* 408, 214-223 (2006).
 - 46) Groisman, R., Kuraoka, I., Chevallier, O., Gaye, N., Magnaldo, T., Tanaka, K., Kisselev, A. F., Harel-Bellan, A., and Nakatani, Y.: CSA-dependent degradation of CSB by ubiquitin-proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome. *Genes Dev.* 20, 1429-1434 (2006).
 - 47) Takemoto, A., Kimura, K., Yanagisawa, J., Yokoyama, S., and Hanaoka, F.: Negative regulation of condensin I by CK2-mediated phosphorylation. *EMBO J.* 25, 5339-5348 (2006).
 - 48) Ohkumo, T., Kondo, Y., Yokoi, M., Tsukamoto, T., Yamada, A., Sugimoto, T., Kanao, R., Higashi, Y., Kondoh, H., Tatematsu, M., Masutani, C., and Hanaoka, F.: Ultraviolet B radiation induces epithelial tumors in mice lacking pol η and mesenchymal tumors in mice deficient for pol ι . *Mol. Cell. Biol.* 26, 7696-7706 (2006).
 - 49) Yuasa, M. S., Masutani, C., Hirano, A., Cohn, M. A., Yamaizumi, M., Nakatani, Y., and Hanaoka, F.: A human DNA polymerase eta complex containing Rad18, Rad6 and Rev1; proteomic analysis and targeting of the complex to the chromatin-bound fraction of cells undergoing replication fork arrest. *Genes Cells* 11, 731-744 (2006).
 - 50) Baba, D., Maita, N., Jee, J. G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H., and Shirakawa, M.: Crystal structure of SUMO-3-modified thymine-DNA glycosylase. *J. Mol. Biol.* 359, 137-147 (2006).
 - 51) Chen, Y. W., Cleaver, J. E., Hanaoka, F., Chang, C. F., and Chou, K. M.: A novel role of DNA polymerase eta in modulating cellular sensitivity to chemotherapeutic agents. *Mol. Cancer Res.* 4, 257-265 (2006).

- 52) Fan, L., Arvai, A. S., Cooper, P. K., Iwai, S., Hanaoka, F., and Tainer, J. A. : Conserved XPB core structure and motifs for DNA unwinding: implications for pathway selection of transcription or excision repair. *Mol. Cell* 22, 27-37 (2006).
- 53) Ohkumo, T., Masutani, C., Eki, T., and Hanaoka, F. : Deficiency of the *Caenorhabditis elegans* DNA polymerase eta homologue increases sensitivity to UV radiation during germ-line development. *Cell Struct. Funct.* 31, 29-37 (2006).
- 54) Sugasawa, K. : UV-induced ubiquitylation of XPC complex, the UV-DDB-ubiquitin ligase complex and DNA repair. *J. Mol. Histol.* 37, 189-202 (2006).
- 55) Bergink, S., Severijnen, L.-A., Wijgers, N., Sugasawa, K., Yousaf, H., Kros, J. M., van Swieten, J., Oostra, B. A., Hoeijmakers, J. H. J., Vermeulen, W., & Willemsen, R. : The DNA repair-ubiquitin associated HR23 proteins are constituents of neuronal inclusions in specific neurodegenerative disorders without hampering DNA repair. *Neurobiol. Dis.* 23, 708-716 (2006).
- 56) Martomo, S. A., Yang, W. W., Vaisman, A., Maas, A., Yokoi, M., Hoeijmakers, J. H., Hanaoka, F., Woodgate, R., and Gearhart, P. J. : Normal hypermutation in antibody genes from congenic mice defective for DNA polymerase iota. *DNA Repair* 5, 392-398 (2006).
- 57) Kawamoto, T., Araki, K., Sonoda, E., Yamashita, Y. M., Harada, K., Kikuchi, K., Masutani, C., Hanaoka, F., Nozaki, K., Hashimoto, N., and Takeda, S. : Dual roles for DNA polymerase eta in homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis. *Mol. Cell* 20, 793-799 (2005).
- 58) Chiapperino, D., Cai, M., Sayer, J. M., Yagi, H., Kroth, H., Masutani, C., Hanaoka, F., Jerina, D. M., and Cheh, A. M. : Error-prone translesion synthesis by human DNA polymerase eta on epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *J. Biol. Chem.* 280, 39684-39692 (2005).
- 59) Itoh, T., Miyauchi-Hashimoto, H., Sugihara, A., Tanaka, K., and Horio, T. : The photocarcinogenesis of antibiotic lomefloxacin and UVA radiation is enhanced in xeroderma pigmentosum group A gene-deficient mice. *J. Invest. Dermatol.* 125, 554-559 (2005).
- 60) Miyauchi-Hashimoto, H., Sugihara, A., Tanaka, K., and Horio, T. : Ultraviolet radiation-induced impairment of tumor rejection is enhanced in xeroderma pigmentosum A gene-deficient mice. *J. Invest. Dermatol.* 124, 1313-1317 (2005).
- 61) Solovjeva, L., Svetlova, M., Sasina, L., Tanaka, K., Saijo, M., Nazarov, I., Bradbury, M., and Tomilin, N. : High mobility of Flap endonuclease 1 and DNA polymerase eta associated with replication foci in mammalian S-phase nucleus. *Mol. Biol. Cell* 16, 2518-2528 (2005).
- 62) O' Donovan, P., Perrett, C. M., Zhang, X., Montaner, B., Xu, Y. Z., Harwood, C. A., McGregor, J. M., Walker, S. L., Hanaoka, F., and Karran, P. : Azathioprine and UVA light generate mutagenic oxidative DNA damage. *Science* 309, 1871-1874 (2005).
- 63) Kamada, K., and Hanaoka, F. : Conformational change in the catalytic site of the ribonuclease YoeB toxin by YefM antitoxin. *Mol. Cell* 19, 497-509 (2005).
- 64) Yagi, Y., Ogawara, D., Iwai, S., Hanaoka, F., Akiyama, M., and Maki, H. : DNA polymerases eta and kappa are responsible for error-free translesion DNA synthesis activity over a cis-syn thymine dimer in *Xenopus laevis* oocyte extracts. *DNA Repair* 4, 1252-1269 (2005).
- 65) Hoffman, P. D., Wang, H., Lawrence, C. W., Iwai, S., Hanaoka, F., and Hays, J. B. : Binding of MutS mismatch repair protein to DNA containing UV photoproducts, "mismatched" opposite Watson-Crick and novel nucleotides, in different DNA sequence contexts. *DNA Repair* 4, 983-993 (2005).

- 66) Sano, S., Chan, K. S., Kira, M., Kataoka, K., Takagi, S., Tarutani, M., Itami, S., Kiguchi, K., Yokoi, M., Sugasawa, K., Mori, T., Hanaoka, F., Takeda, J., and DiGiovanni, J.: Signal transducer and activator of transcription 3 is a key regulator of keratinocyte survival and proliferation following UV irradiation. *Cancer Res.* 65, 5720-5729 (2005).
- 67) Nishi, R., Okuda, Y., Watanabe, E., Mori, T., Iwai, S., Masutani, C., Sugasawa, K., and Hanaoka, F.: Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5664-5674 (2005).
- 68) Baba, D., Maita, N., Jee, J.-G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H., and Shirakawa, M.: Crystal structure of SUMO1-conjugated thymine DNA glycosylase. *Nature* 435, 979-982 (2005).
- 69) Martomo, S. A., Yang, W. W., Wersto, R. P., Ohkumo, T., Kondo, Y., Yokoi, M., Masutani, C., Hanaoka, F., and Gearhart, P. J.: Different mutation signatures in DNA polymerase η - and MSH6-deficient mice suggest separate roles in antibody diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 8656-8661 (2005).
- 70) King, N. M., Nikolaishvili-Feinberg, N., Bryant, M. F., Luche, D. D., Heffernan, T. P., Simpson, D. A., Hanaoka, F., Kaufman, W. K., and Cordeiro-Stone, M.: Overexpression of DNA polymerase eta does not raise the spontaneous mutation rate in diploid human fibroblasts. *DNA Repair* 4, 714-724 (2005).
- 71) Sugasawa, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, R., Matsuda, N., Chu, G., Mori, T., Iwai, S., Tanaka, K., Tanaka, K., and Hanaoka, F.: UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* 121, 387-400 (2005).
- 72) Yanagi, KI, Mizuno, T., Tsuchiyama, T., Tada, S., Iida, Y., Sugimoto, A., Eki, T., Enomoto, T., and Hanaoka, F.: *Caenorhabditis elegans* geminin homologue participates in cell cycle regulation and germ line development. *J. Biol. Chem.* 280, 19689-19694 (2005).
- 73) Miyake, Y., Mizuno, T., Yanagi, KI, and Hanaoka, F.: Novel splicing variant of mouse Orcl is deficient in nuclear translocation and resistant for proteasome-mediated degradation. *J. Biol. Chem.* 280, 12643-12652 (2005).
- 74) Hayashi, K., Watanabe, T., Tanaka, A., Furumoto, T., Sato-Tsuchiya, C., Kimura, M., Yokoi, M., Ishihama, A., Hanaoka, F., and Ohkuma, Y.: Studies of *Schizosaccharomyces pombe* TFIIE indicate conformational and functional changes in RNA polymerase II at transcription initiation. *Genes Cells* 10, 207-224 (2005).
- 75) Yasuda, T., Sugasawa, K., Shimizu, Y., Iwai, S., Shiomi, T., and Hanaoka, F.: Nucleosomal structure of undamaged DNA regions suppresses the non-specific DNA binding of the XPC complex. *DNA Repair* 4, 389-395 (2005).
- 76) Wilson, T. M., Vaisman, A., Martomo, S. A., Sullivan, P., Lan, L., Hanaoka, F., Yasui, A., Woodgate, R., and Gearhart, P. J.: MSH2-MSH6 stimulates DNA polymerase η , suggesting a role for A:T mutations in antibody genes. *J. Exp. Med.* 201, 637-645 (2005).
- 77) Yamazaki, F., Okamoto, H., Matsumura, Y., Tanaka, K., Kunisada, T., and Horio, T. Development of a new mouse model (XPA-deficient, stem cell factor-transgenic) of UVB-induced melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 125, 521-525 (2005).
- 78) Matsuda, N., Azuma, K., Saijo, M., Iemura, S., Hioki, Y., Natsume, T., Chiba, T., Tanaka, K., and Tanaka, K.: DDB2, the xeroderma pigmentosum group E gene product, is directly ubiquitylated by Cullin 4A-based ubiquitin ligase complex. *DNA Repair* 4, 537-545 (2005).
- 79) Yonemasu, R., Minami, M., Nakatsu, Y., Takeuchi, M., Kuraoka, I., Matsuda, Y., Higashi, Y., Kondoh, H., and Tanaka, K.: Disruption of mouse XAB2 gene involved

- in pre-mRNA splicing, transcription and transcription-coupled DNA repair results in preimplantation lethality. *DNA Repair* 4, 479-491 (2005).
- 80) Shiomi, N., Mori, M., Kito, S., Harada, Y., Tanaka, K., and Shiomi, T.: Severe growth retardation and short life span of double mutant mice lacking Xpa and Exon 15 of Xpg. *DNA Repair* 4, 351-357 (2005).
- 81) Wilson, T. M., Vaisman, A., Martomo, S. A., Sullivan, P., Lan, L., Hanaoka, F., Yasui, A., Woodgate, R., and Geahart, P. J.: MSH2-MSH6 stimulates DNA polymerase η , suggesting a role for A:T mutations in antibody genes. *J. Exp. Med.* 201, 637-645 (2005).
- 82) Horibata, K., Iwamoto, Y., Kuraoka, I., Jaspers, N. G. J., Kurimasa, M., Oshimura, M., Ichihashi, M., and Tanaka, K.: Complete absence of Cockayne syndrome group B gene product gives rise to UV-sensitive syndrome but not Cockayne syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 15410-15415 (2004).
- 83) 菅澤 薫: 色素性乾皮症遺伝子産物によるDNA損傷認識機構. *医学のあゆみ* 228, 137-142 (2009).
- 84) 菅澤 薫、花岡文雄: DNA 修復におけるユビキチン化の役割. *蛋白質核酸酵素* 52, 760-767 (2007)
- 85) 西良太郎、菅澤 薫. 紫外線による DNA 損傷の修復機構. *蛋白質核酸酵素* 51, 2126-2133 (2006).
- 86) 菅澤 薫. Cu14A リガーゼによる DNA 修復経路. *蛋白質核酸酵素* 51, 1339-1344 (2006).
- 87) 菅澤 薫、花岡文雄. 紫外線による遺伝子損傷の修復メカニズム. *生化学* 78, 516-521 (2006).
- 88) 菅澤 薫. ヌクレオチド除去修復における損傷認識機構とユビキチン化の役割. *実験医学* 24, 357-363 (2006).
- 89) 田中亀代次. 転写を阻害する DNA 損傷の修復機構と早期老化. *実験医学* 24, 339-348 (2006).
- 90) 花岡文雄. ゲノム損傷応答の分子メカニズムと高次生命現象へのかかわり. *実験医学* 24, 330-334 (2006).

(2) 口頭発表

①学会

国内 67 件, 海外 29 件

②その他

国内 27 件, 海外 17 件

(3) 特許出願 (SORST 研究の成果に関わる特許 (出願人が JST 以外のものを含む))

	件数
国内出願	1
海外出願	0
計	1

(4) その他

① プレス発表：

菅澤 薫、花岡文雄：「紫外線による遺伝子の傷を修復するために働く新たなメカニズムを発見」、平成 17 年 4 月 28 日

② 受賞：

花岡文雄：「高発がん性遺伝病細胞を用いた遺伝情報維持機構の解明」第 39 回内藤記念科学振興賞（平成 20 年 3 月）

花岡文雄：「ゲノム情報維持の分子機構に関する研究」平成 21 年度日本薬学会賞（平成 21 年 3 月）

9. 結び

本研究プロジェクト全体として、当初の研究目標はほぼ達成出来たと考えている。具体的には、当初より世界をリードしていたヌクレオチド修復及び損傷乗り越え複製の分子機構の解明に関しては、順調に研究を発展させ、様々な新知見を得ることが出来た。またそれらのメカニズムに欠損を持つヒトあるいはマウスをはじめとするモデル生物でのがん化や老化の研究も大きく進めることが出来た。がん化や老化の制御という観点からは、まだまだやるべきことが残っているが、本研究プロジェクトの延長として研究を進めていけば、近い将来、必ずや現実のものとなると信じている。

研究代表者として、特に全体を集めてのミーティングの開催などは行わなかったが、個々の研究グループ間では、適宜、討論や相談をして、プロジェクトの推進がスムーズに行くよう努力していた。また発表論文等にも見られるように、グループ間での共同研究は盛んに行われた。以下に各研究グループでの総括あるいは感想などを簡単に述べさせて頂く。

GGR における DNA 損傷認識過程において、ユビキチン化が重要な役割を果たしていることを世界に先駆けて明らかにできたのは、本研究の最大の成果である。また XPC の脱ユビキチン化酵素、および XPC の SUMO 化部位の同定に向けて有力な手がかりが得られたことは、GGR の新たな制御機構の解明へ向けて今後大きく研究を発展させる礎となるものと期待される。一方、GGR 因子の細胞内動態とクロマチン構造変換の役割に関する解析は緒についたばかりであるが、centrin 2 を介した細胞周期制御との関連も含めて今後重点的に研究を進めていきたい。

GGR グループは平成 18 年度からリーダーが菅澤に交替し、また平成 19 年度には理化学研究所から神戸大学に研究拠点を移すことになった。そのような厳しい環境においてもポストドクや技術補佐員を雇用して研究成果を上げることができたのは、ひとえに本プロジェクトのご支援の賜物である。若手研究者の育成としては、本プロジェクトで雇用したポストドクが成果を上げ、放射線医学総合研究所の연구원や東北大学の助教として転出したことが挙げられる。

TCR グループは全研究期間を通して、大阪大学に拠点を置き、じっくりと研究が進められたこともあり、最大の成果を挙げた。特にヌクレオチド除去修復の欠損としてこれまで XP 研究の陰になってほとんど解析されていなかった CS の研究を、世界に先駆けて進め、数々の新知見を得たことは大きく評価されている。また XP と CS を併発する XP-G/CS 患者細胞の解析から、XPG が TFIIH の安定化に寄与し、核内レセプターの発現の活性化に働いているという観察も特筆すべき成果である。

TLS グループは、期間の途中で大阪大学から学習院大学へと移り、研究の一時中断を余儀なくされたが、本プロジェクトのご支援のお陰で、比較的スムーズに研究が再開でき、大いに感謝申し上げる。その甲斐もあって、損傷乗り越えの分野で、世界をリードする研究

成果を出し続けることが出来たと思っており、また今後につながる研究体制も確立することが出来た。

Crosstalk グループが当初の目的としていた TFIIH の欠損による病態の機構解析と絡めた研究に関しては、共同研究を含め進めることが十分にできなかったが、予想していなかった TFIIIE と p53 のタンパク質同士の競合により TFIIH の p62 サブユニットの PH-D ドメイン表面に結合することを、機能と構造の両面で解明できたことは大きな達成であると考えられる。また、メディエーター複合体の CDK8 と CDK11 が共に実際に Pol IICTD リン酸化を行って、転写制御に関わっていること、特に正反対に制御し合っていることを見いだしたことは、本プロジェクトの支援があって初めて可能になったと考えている。今後は、p53 といかにして TFIIIE が転写と DNA 損傷修復の際に機能する役者として入れ替わっているのかを、より詳細に生細胞を用いた細胞化学や生化学的に解析を進める。また、メディエーターによるヒトの遺伝子発現の制御ネットワークを、メディエーターと相互作用する因子の網羅的なマススペクトル解析と、メディエーターの制御する遺伝子の同定をクロマチン免疫沈降と次世代高速遺伝子配列解読を組み合わせた ChIP-Seq 法により推進して、転写制御の分子機構の解明につなげたく考えている。

若手研究者の育成としては、修士課程の学生が研究の進展により日本学術振興会の博士課程研究員に採択され、博士課程への進学を決めることができたこと、他の学生も生化学会や薬学会の学生発表賞を受賞することにつながる立派な成果をあげられることにつながったことが挙げられる。



↑ GGR グループ (神戸大学・菅澤研究室)



↑ TCR グループ (大阪大学・田中研究室)



↑ TLS グループ (学習院大学・花岡研究室)



↑ Crosstalk グループ (富山大学・大熊研究室)