

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成31年度（2019年度）研究進捗評価用〕

平成28年度採択分
平成31年 3月11日現在

ヌクレオチド除去修復におけるゲノム DNA 損傷認識の高次制御機構の解明

Higher-order regulatory mechanisms for DNA damage recognition in nucleotide excision repair

課題番号：16H06307

菅澤 薫 (SUGASAWA, KAORU)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・教授



研究の概要（4行以内）

本研究は紫外線や化学変異原等、主に環境要因によるゲノム DNA 損傷の修復を担うヌクレオチド除去修復の開始段階に着目し、プロテオミクス、イメージングスクリーニング、無細胞修復反応等のアプローチを統合的に駆使することにより、生体内で DNA 損傷認識を制御する新たな分子機構を解明することを目指している。

研究分野：環境学（放射線・化学物質影響科学）

キーワード：遺伝子、蛋白質、DNA 損傷認識、ヌクレオチド除去修復、色素性乾皮症

1. 研究開始当初の背景

ヌクレオチド除去修復（NER）は、主に環境要因によって生じるゲノム DNA 損傷を除去し、発がんの抑制に寄与する主要な DNA 修復経路である。NER の基本的な反応機構に関する理解が進み、精製タンパク質による修復反応の試験管内再構成が可能になっている一方、生体内における NER の制御、特にクロマチン高次構造を介した制御機構の詳細については不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究は、哺乳類 NER の最初期段階である DNA 損傷認識において重要な役割を担う XPC、DDB2 等のタンパク質因子の細胞内動態及びそれらの相互作用因子に着目し、生細胞内において NER の開始を制御する新たな分子機構を解明することを目的とする。これにより、NER の人為的制御と種々の疾患の予防にもつながる DNA 損傷認識の高次制御機構の理解の深化に貢献する。

3. 研究の方法

タグを融合した XPC、あるいは DDB2 を含むタンパク質複合体を細胞から単離し、その構成成分を質量分析により網羅的に同定する。一方、蛍光標識した XPC や DDB2 を発現する細胞核の局所に紫外線刺激を加え、それらの損傷認識因子の損傷部位への集積に影響を与える siRNA 及び低分子化合物をスクリーニングする。これらの解析により取得された

候補因子の機能を、細胞の紫外線感受性や NER 活性、クロマチン構造を取った損傷 DNA 基質を用いた無細胞 NER 反応系などにより解析する。

4. これまでの成果

① DNA 損傷認識因子と相互作用するタンパク質の同定と機能解析

FLAG タグを融合した XPC を含むタンパク質複合体の解析から XPC がヒストン H3 及び H1 と直接相互作用することを見出し、さらにヒストン H3 のアセチル化がこの相互作用を負に制御することを明らかにした。細胞をヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤で処理すると XPC の DNA 損傷部位へのリクルート及びゲノム DNA からの損傷除去が遅延すること、局所紫外線照射により損傷部位におけるアセチル化ヒストンレベルの低下が見られたことから、DNA 損傷の周辺でヒストンの脱アセチル化を含むクロマチン構造変化が誘導されることで XPC を積極的に呼び込み、損傷認識の効率を高めている可能性が示唆された（図1）。

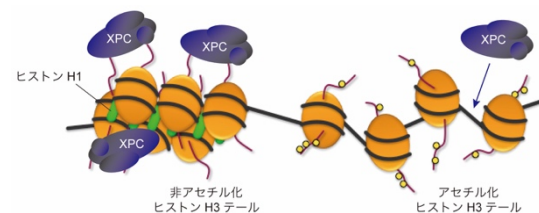


図1 DNA 損傷認識因子 XPC の局在制御機構モデル

② XPC と相互作用する TDG の新規機能の解明

XPC がチミン DNA グリコシラーゼ (TDG) と相互作用することで塩基除去修復 (BER) 活性を促進する一方、細胞内で TDG を過剰発現すると BER 活性に依存して細胞の紫外線感受性の増強及び NER による損傷除去の遅延が引き起こされることがわかった。TDG との相互作用を介して一部の XPC が BER 経路に動員された結果、NER 活性の低下が引き起こされている可能性が考えられる。さらに TDG の過剰発現は BER 活性非依存的に大規模な遺伝子発現の変動を引き起こすことが明らかになり、TDG が細胞の DNA 損傷応答の制御に多面的に関与することが示された。

③ 局所紫外線損傷部位への DNA 損傷認識因子のリクルートを制御する因子の探索

波長 780 nm のフェムト秒ファイバーレーザーと共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を組み合わせ、三光子吸収により細胞核の局所に波長 260 nm の紫外線と同等の刺激を与えることができるシステムを構築した。蛍光標識した XPC を発現する細胞で実際に XPC の損傷部位へのリクルートを観察し、DDB2 の発現抑制や HDAC 阻害剤処理によって XPC の集積が有意に遅延することが確かめられた (図 2)。

このシステムを用い、細胞を様々な siRNA や化合物で処理した際に XPC の損傷部位への集積速度が変化するものを探索している。これまでのスクリーニングで、ヒストンの翻訳後修飾に関わる酵素、クロマチンリモデリング複合体のサブユニット、RNA プロセッシングに関わる因子、ユビキチン-プロテアソーム系関連因子など、機能的に重要な意義を持つ候補因子が多数得られている。この中にはその因子自身が局所 DNA 損傷部位に集積するもの、あるいは発現抑制が損傷部位におけるヒストン修飾の変化を引き起こすものも見出されており、詳細な分子機構の解析を現在進めている。

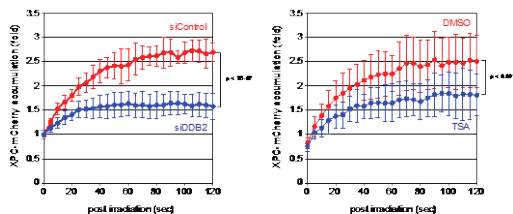


図 2 XPC の損傷部位への集積に対する DDB2 発現抑制及び HDAC 阻害剤処理の効果

④ 無細胞系を用いた生化学的解析及びクロマチン上の DNA 損傷認識の構造基盤

NER の基質となる特定の損傷を部位特異的に含む DNA 基質を用い、試験管内でヌクレオソームアレイを再構成して、精製した組

換え NER タンパク質因子と反応させる無細胞系を構築した。また、損傷を含むモノヌクレオソームに結合した DDB1-DDB2 複合体 (UV-DDB) の構造解析を行い、UV-DDB がヒストン 8 量体に巻きついた DNA の構造変化を誘起することで、ヌクレオソーム上の様々な位置の損傷を認識する能力を持つことが明らかになった。

5. 今後の計画

タンパク質複合体の構成成分の同定及び三光子刺激システムを用いたスクリーニングにより、DNA 損傷認識の制御に関わる候補因子の取得を引き続き進める。細胞内の紫外線誘発 DNA 損傷を抗体を用いて直接蛍光染色・定量するアッセイ系により、高スループットのスクリーニングも並行して試みる。

一方、これまでの研究で得られた候補因子について細胞での発現抑制や過剰発現、変異体発現細胞の作製等を行い、DNA 傷害剤に対する感受性や NER 活性に対する影響を検証する。DNA 損傷を含むヌクレオソームアレイを基質とする無細胞 NER 反応系にこれらの因子を添加し、実際にクロマチン上での NER 反応が促進されるかどうかを調べる。これらの研究を通して、NER の DNA 損傷認識を制御する新たな分子機構の解明を目指す。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Kusakabe M, Onishi Y, Tada H, Kurihara F, Kusao K, Furukawa M, Iwai S, Yokoi M, Sakai W, Sugawara K. Mechanism and regulation of DNA damage recognition in nucleotide excision repair. *Genes Environ.* 41: 2 (2019).

Nakamura T, Murakami K, Tada H, Uehara Y, Nogami J, Maehara K, Ohkawa Y, Saitoh H, Nishitani H, Ono T, Nishi R, Yokoi M, Sakai W, Sugawara K. Thymine DNA glycosylase modulates DNA damage response and gene expression by base excision repair-dependent and independent mechanisms. *Genes Cells* 22: 392-405 (2017).

Kakumu E, Nakanishi S, Shiratori HM, Kato A, Kobayashi W, Machida S, Yasuda T, Adachi N, Saito N, Ikura T, Kurumizaka H, Kimura H, Yokoi M, Sakai W, Sugawara K. Xeroderma pigmentosum group C protein interacts with histones: regulation by acetylated states of histone H3. *Genes Cells* 22: 310-327 (2017).

7. ホームページ等

神戸大学バイオシグナル総合研究センター
菅澤研究室ホームページ

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/brce-sugawara/>