

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 13 日現在

機関番号： 14501
研究種目： 基盤研究(A)
研究期間： 2008~2011
課題番号： 20241013
研究課題名(和文) 環境ストレスによるゲノム損傷の修復を制御する新たな分子機構の
解明
研究課題名(英文) Studies on novel molecular mechanisms that regulate repair of
genomic DNA damage caused by environmental stresses
研究代表者
菅澤 薫 (SUGASAWA KAORU)
神戸大学・自然科学系先端融合研究環バイオシグナル研究センター・教授
研究者番号： 70202124

研究分野： 生化学・分子生物学

科研費の分科・細目： 環境学 放射線・化学物質影響科学

キーワード： ヌクレオチド除去修復、色素性乾皮症、ユビキチン化、SUMO 化

1. 研究計画の概要

ヌクレオチド除去修復 (NER) の開始段階に必須である DNA 損傷認識因子 XPC について、我々が既に見出した翻訳後修飾 (ユビキチン化、SUMO 化) に着目し、それぞれの修飾を受けるリジン残基の特定、および修飾・脱修飾に関わる因子の同定を行う。

決定された修飾部位に変異を導入した XPC の組換えタンパク質をバキュロウイルス系を用いて発現・精製し、生化学的な性状変化を解析するほか、これらの変異体を安定に発現する形質転換細胞株を単離して、細胞レベルでの NER 活性、DNA 損傷に伴うタンパク質の安定性や動態変化、およびチェックポイントや細胞死誘導に関わるシグナリングに対する変異の影響などを体系的に調べる。また、修飾部位を特異的に認識する抗体の作成や GFP 再構成システムを構築することにより、それぞれの修飾の時空間的動態制御を観察するとともに、相互の機能的連関を明らかにする。さらに、修飾タンパク質と特異的に相互作用する因子を探索することにより、修飾が直接影響を与える細胞機能について分子レベルでの知見を得る。

2. 研究の進捗状況

(1) XPC の脱ユビキチン化機構

XPC の脱ユビキチン化酵素の候補として見出されたプロテアソームサブユニット PSMD14 について siRNA による発現抑制を行い、紫外線照射によって誘導される XPC ユビキチン化の亢進と脱ユビキチン化の遅延を確認した。XPC のユビキチン化が亢進した状態で細胞核の局所に紫外線を照射すると、損傷部位への XPC の集積が大幅に遅延したことから、

修復反応を開始した後、XPC が次の損傷部位へ移行する段階に脱ユビキチン化に関わる可能性が示唆された。

(2) XPC SUMO 化の機能解析

XPC の SUMO 化部位として N 末端近傍の 3 か所のリジン残基を同定し、これらのリジンをアルギニンに置換した 3KR 変異体を安定発現する細胞株を樹立した。この細胞では紫外線損傷の修復に遅延が見られたほか、XPC のユビキチン化の誘導が減弱していた。この表現型は XPC 3KR 変異体に SUMO を融合することによって相補されたことから、ユビキチン化と SUMO 化の間に機能的なクロストークが存在する可能性が示された。

(3) UV-DDB E3 リガーゼの活性調節機構

UV-DDB E3 リガーゼによるユビキチン化の標的として DDB2 の N 末端ドメインを同定し、この領域が紫外線照射後の DDB2 の分解に関わることを証明した。また、細胞をプロテアソーム阻害剤で処理することによってこの E3 リガーゼの活性化が阻害され、UV-DDB がクロマチンから解離できなくなることを新たに見出した。

(4) NER における多段階損傷認識機構

XPC は損傷を直接認識するのではなく、DNA 二重鎖構造の歪みを認識して結合する性質を持つが、その後にリクルートされる TFIIH 複合体の XPD ヘリカーゼが DNA 鎖を走査することにより、最終的に損傷の存在と位置を確認していることを生化学的に証明した。

3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している

(理由)

XPC の脱ユビキチン化酵素と SUMO 化部位については、その発現抑制や変異導入によって

NER 活性やタンパク質の細胞内動態に影響が見られ、順調に成果があがっている。それに対して、XPC のユビキチン化部位は非常に多岐にわたっており、最終的に同定を断念せざるを得なかった。また当初 SUMO 化部位の変異マウスの作成を視野に入れていたが、細胞レベルでの表現型からその有用性を確信するまでには至っていないのが現状である。一方、UV-DDB E3 リガーゼの機能と活性調節、および NER における損傷認識機構に関して当初予想していなかった新たな成果が得られつつあり、研究全体としてはおおむね順調に進展していると言える。

4. 今後の研究の推進方策

XPC の脱ユビキチン化と SUMO 化の機能については、これまで得られた細胞レベルでの知見に基づいて詳細な分子機構の解明、特にそれぞれの修飾がどのような因子との相互作用に関わるのかを最終年度で明らかにしたい。

UV-DDB E3 リガーゼについては、その活性制御機構とプロテアソーム阻害との関連、および DDB2 分解の意義について検討を進める予定である。UV-DDB→XPC→TFIIH と損傷が受け渡される分子機構と、そこに関わる翻訳後修飾の意義の理解を目指して研究を推進する。

5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- ① Nishi R, Alekseev S, Dinant C, Hoogstraten D, Houtsmuller AB, Hoeijmakers JHJ, Vermeuken W, Hanaoka F, Sugasawa K. UV-DDB-dependent regulation of nucleotide excision repair kinetics in living cells. *DNA Repair* 8, 767-776 (2009). 査読有
- ② Sugasawa K, Akagi J, Nishi R, Iwai S, Hanaoka F. Two-step recognition of DNA damage for mammalian nucleotide excision repair: directional binding of the XPC complex and DNA strand scanning. *Mol. Cell* 36, 642-653 (2009). 査読有
- ③ Sugasawa K. Regulation of damage recognition in mammalian global genomic nucleotide excision repair. *Mutat. Res.* 685, 29-37 (2010). 査読有
- ④ Shimizu Y, Uchimura Y, Dohmae N, Saitoh H, Hanaoka F, Sugasawa K. Stimulation of DNA glycosylase activities by XPC protein complex: roles of protein-protein interactions. *J. Nucleic Acids* 2010, doi: 10.4061/2010/805698 (2010). 査読有

〔学会発表〕 (計 7 件)

- ① Sugasawa K. Damage recognition mechanism for mammalian nucleotide excision repair. Russian-European Workshop on DNA Repair and Epigenetic Regulation of Genome Stability. St. Petersburg, Russia, June 24-26 (2008).
- ② Sugasawa K, Nishi R, Akagi J, Tak Y-S, Kobayashi H, Hanaoka F. Molecular mechanisms underlying efficient DNA damage recognition for nucleotide excision repair. The 6th 3R Symposium. Kakegawa, Japan, Oct. 27-30 (2008).
- ③ Sugasawa K. Molecular mechanism for DNA damage recognition in nucleotide excision repair. International Symposium on DNA Damage Response and Repair Mechanism. Crete, Greece, Apr. 20-23 (2009).
- ④ Sugasawa K. Coordinated actions of multiple DNA damage detectors in nucleotide excision repair. National Conference on Medical Genomics and Proteomics. Novosibirsk, Russia, Sep. 9-10 (2009).
- ⑤ Sugasawa K. Post-translational modifications involved in cellular DNA damage response. 2009 Japan-Taiwan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation. Kobe, Japan, Nov. 11-12 (2009).
- ⑥ Sugasawa K. DNA damage recognition mechanism for mammalian nucleotide excision repair. International Conference on Radiation and Cancer Biology. Nagasaki, Japan, Feb. 17-20 (2010).
- ⑦ Nishi R, Tak Y-S, Sakai W, Hanaoka F, Sugasawa K. Roles for centrin-2 in DNA damage recognition for global genome nucleotide excision repair. The 7th 3R Symposium. Toyama, Japan, Oct. 26-30 (2010).

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕