

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22621

研究課題名（和文）低温電子顕微鏡を用いたクロマチン構造上のDNA損傷認識メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of DNA damage recognition mechanisms on chromatin by cryo-electron microscopy

研究代表者

松本 翔太（Matsumoto, Syota）

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：10880643

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々のDNAは紫外線や電離放射線、活性酸素種などにより常に損傷を受けている。生物はこのようなDNA損傷を絶えず修復することで、DNAの安定性を維持している。この機構はDNA修復機構と呼ばれ、DNA修復機構の破綻はさまざまな疾病の原因となることがわかっている。特に損傷を認識する機能を持つXPCタンパク質は紫外線による修復機構の開始に必須であり、XPCの異常は色素性乾皮症の原因となることが報告されている。本研究ではこのXPCの損傷認識機能が、DNAがとり得る三次元構造によって大きく影響を受けることを見出した。この結果により、DNA修復は特定のDNA領域の修復を優先的に行っている可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA修復機構の中でも紫外線損傷の修復はヌクレオチド除去修復（NER）というメカニズムによって取り除かれる。色素性乾皮症やコケイン症候群などの遺伝病は、NERが欠損することにより引き起こされることが明らかになっている。そのため、NERにおいて損傷認識タンパク質がどのように細胞内のDNA損傷を見つけ、修復するかの詳細なメカニズムを解明することで、これらの病気の原因となるメカニズムを理解することが可能となる。ひいては、このような症例を持つ患者に対して、症状を緩和する防御策や治療法の提供に寄与することが期待でき、本研究結果の学術的意義や社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Our genomic DNA is exposed by various environmental stresses, such as ultraviolet, ionizing radiation, or reactive oxygen species. Mammalian cells eliminate these DNA lesions to maintain genome stability. This mechanism is called “DNA repair,” and previous studies have reported that the defect of DNA repair pathways causes various diseases, for example, Xeroderma Pigmentosum (XP). XPC protein is an essential factor to initiate DNA repair against ultraviolet. Our study revealed that the functions of XPC are affected by the conformational status of DNA, which suggested that certain regions of DNA have priority to be repaired by DNA repair pathways.

研究分野：DNA修復

キーワード：DNA修復 クロマチン ヌクレオチド除去修復 紫外線 ヌクレオソーム XPC 色素性乾皮症 クライオ電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

生物のゲノムは日常的にさまざまな損傷を受けており、これらの損傷は DNA の複製異常や転写の停止などを引き起こすため、生物にとって適切に除去される必要がある。ヌクレオチド除去修復 (NER) は紫外線などにより生じる損傷を主に標的とし、幅広い損傷をゲノムから取り除く重要な修復機構の一つである。ほ乳類の NER においては無細胞実験により詳細な分子機構が解明されており、主に損傷認識、損傷切り出し、埋め戻しの反応から構成されることが明らかとなっている。特に損傷認識についてはまず損傷認識因子である UV-DDB や XPC が損傷を認識して結合した後、下流の因子へ損傷を受け渡すことが示唆されており、これらの因子が正常な NER 反応に重要であることが示されてきた。実際に、UV-DDB と XPC の遺伝的欠損により、色素性乾皮症 (XP) を示すことが臨床的にも報告されていた。そのため、損傷認識機構の分子基盤を理解することは、XP 患者における紫外線の防御方や治療法の確立への応用を考える上で、非常に重要である。

2. 研究の目的

一方、これらの損傷認識機構の詳細な分子メカニズムは、裸の損傷 DNA を用いた無細胞実験により明らかにされてきており、実際の細胞に近い環境での分子メカニズムの解明が求められていた。細胞内において、DNA はヒストンタンパク質に巻き付いたヌクレオソームを最小単位とした、クロマチン構造と呼ばれる三次元構造をとっており、これは裸の DNA とは大きく異なる。近年、クロマチン構造の理解が進むにつれ、クロマチン構造はタンパク質による DNA へのアクセスの障壁となることがわかっており、クロマチン構造の変化が DNA へのアクセスに大きく関与することが次々と報告されてきている。この環境下で、上述した UV-DDB や XPC などの損傷認識因子がどのようにして、クロ

マチン上に生じた紫外線損傷を認識しているか興味を持たれた (図 1)。そこで、本研究ではクロマチン構造の最小単位であるヌクレオソームに損傷をデザインする系を用いることにより、損傷ヌクレオソームを基質として、NER における損傷認識機構を理解することを目指した。

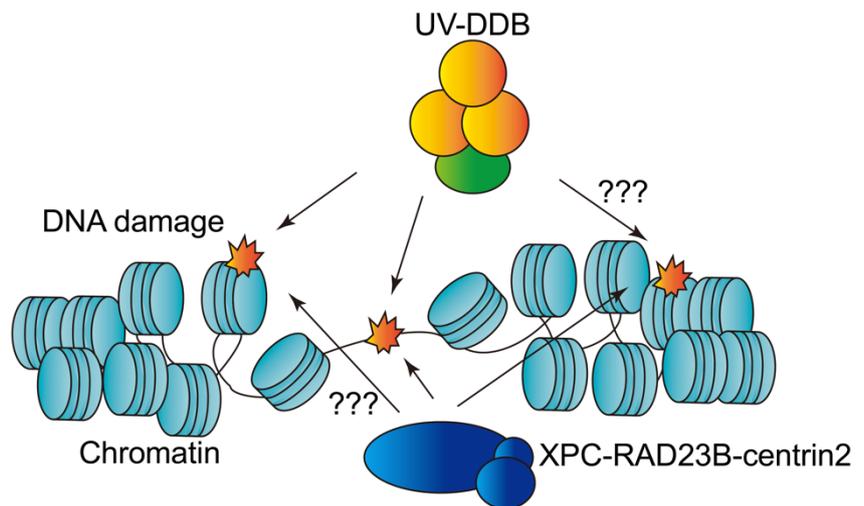


図 1. クロマチン上の損傷に対する DNA 修復機構

3. 研究の方法

まず損傷を含むヌクレオソームの再構成を試みた。XPC については三塩基のミスマッチからなるループ構造に対して特異的に結合することが報告されていたため、このループ構造を紫外線損傷ミミックとして使用した。このミスマッチを特定の位置に含むオリゴヌクレオチドからアニ

ーリングとライゲーションにより 145 塩基対の直鎖 DNA を精製した。ヒストンタンパク質については組換えタンパク質を大腸菌で発現、精製し、それぞれ 4 種類のヒストンタンパク質を混ぜ合わせることで、ヒストン八量体を再構成した。これらの DNA とヒストン八量対を高塩濃度で混ぜ合わせ、透析法により塩濃度を徐々に下げていくことで、ヌクレオソームの再構成を行い、最後にヌクレオソームのみを単離することで、損傷が溶媒側に露出したヌクレオソームを得た。損傷認識タンパク質である UV-DDB と XPC はバキュウウイルスを用いた昆虫細胞発現系により、単離・精製した。UV-DDB はそれぞれのサブユニットである DDB1 と DDB2 をそれぞれ発現するウイルスを作製し、共感染により UV-DDB 複合体を発現させ、親和性カラム、陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムを通すことで精製を行った。XPC は単体では不安定であることが報告されていたため、相互作用因子である RAD23B と centrin2 を含むヘテロ三量体として精製した。XPC 複合体についてはそれぞれのタンパク質を同一ウイルスで発現する系により発現させ、UV-DDB と同様にカラムを複数通すことにより、単離、精製した (図 2)。

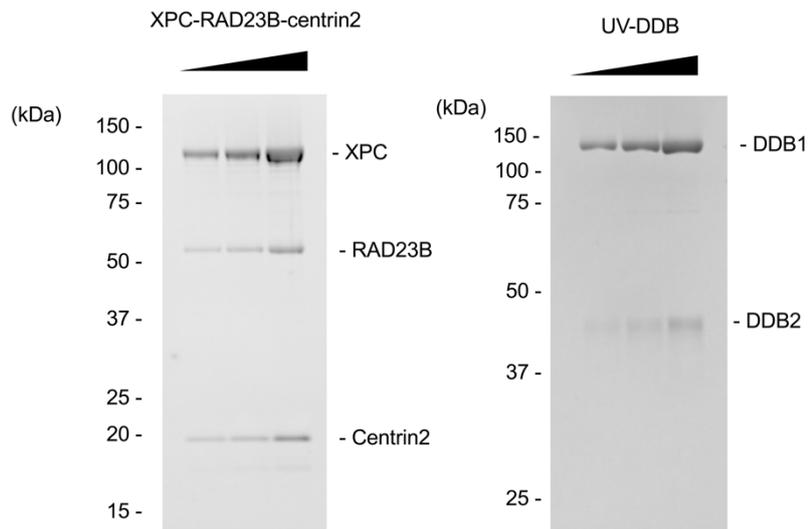


図 2. 昆虫細胞発現系による損傷認識タンパク質複合体の精製

上述の方法により得た損傷ヌクレオソームと、損傷認識因子 UV-DDB と XPC 複合体をさまざまな組み合わせで混ぜ合わせることで、損傷認識因子がどのようにしてヌクレオソーム上の損傷を認識し得るのかについて、生化学的な解析を試みた。

4. 研究成果

溶媒側に損傷が露出した損傷ヌクレオソームを基質として、精製した XPC 複合体 (XPC-RAD23B-centrin2) を混ぜ合わせてゲル電気泳動を行った。その結果、XPC 複合体の量が増えるに従って、ヌクレオソームと XPC 複合体と思われるバンドが見られており、XPC がヌクレオソーム上の損傷に結合し得ることが示唆された (図 3)。

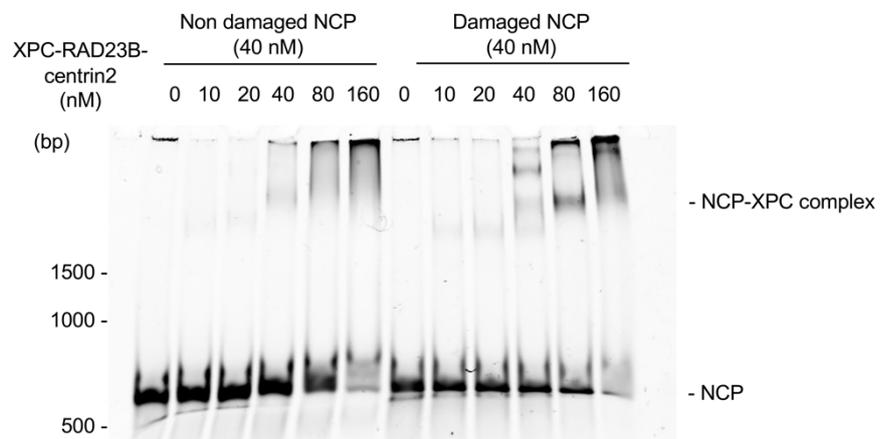


図 3. 損傷ヌクレオソームと XPC 複合体のゲルシフト試験

一方、先行研究で見られたような強固な結合は見られず、ヌクレオソーム上の損傷への結合は、裸の損傷 DNA と比較して減弱である可能性が考えられた。次に XPC がヌクレオソーム上の損傷

と、複数のヌクレオソームをつなぐリンカー領域上の損傷のどちらを効率良く認識するかを調べた。ここではヌクレオソーム

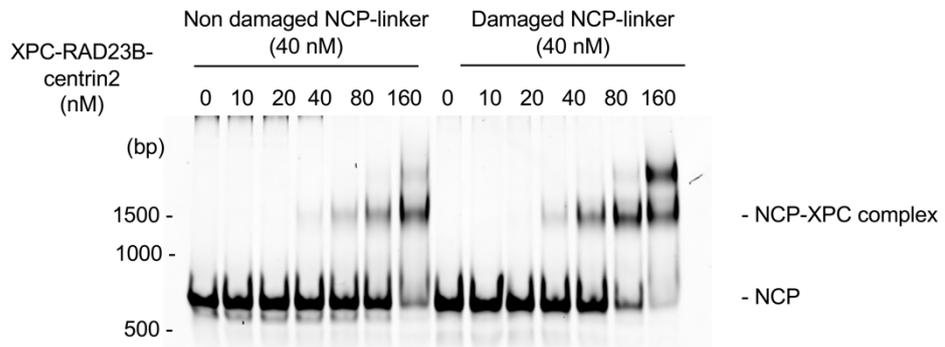


図 4. リンカーを持つ損傷ヌクレオソームと XPC 複合体のゲルシフト試験

用の DNA を長く設計することにより、突出端を人為的に作製し、その突出端に同様の損傷をデザインした。これらのヌクレオソームに対する XPC 複合体の結合を調べたところ、リンカー領域を持たないヌクレオソームと比較して、損傷をリンカー領域に持つヌクレオソームには比較的強く結合することが見出された (図 4)。このことは、XPC 複合体はクロマチン上では損傷の位置によって結合力が異なり、ヌクレオソーム上の損傷よりもヌクレオソーム間の損傷に対して強く結合することが示唆された。一方、ここで使用したリンカー領域を持つヌクレオソームは突出端を形成しており、ヌクレオソーム間を繋いでいる細胞内のリンカー領域とは異なる生化学的性質を持つ可能性が指摘される。そこで、より生体内の基質に近づけるため、ヌクレオソーム二量体を再構成し、その間のリンカー領域に損傷を含む新たな基質をデザインした。これに対する XPC 複合体の結合力を調べたところ、ヌクレオソーム間のリンカー領域においても、前述と同程度の結合力で XPC は損傷を認識することが示唆された (図 5)。

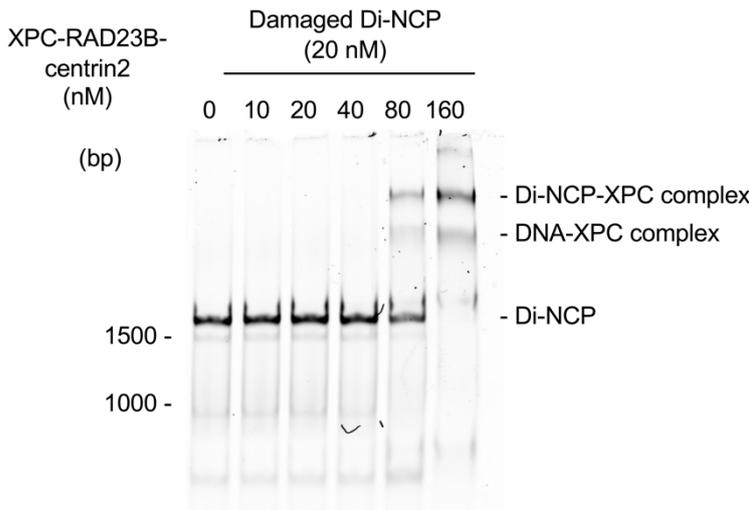


図 5. ヌクレオソーム間の損傷と XPC 複合体のゲルシフト試験

これらの結果から、XPC 複合体はクロマチン上の損傷を認識し得るが、損傷の位置によって結合力が異なることが示唆された。特に物理的な障壁が小さいヌクレオソーム間の損傷は認識するが、ヌクレオソーム上に存在する損傷に対する結合力は減弱することが示唆された。これは XPC 複合体が、緩んだクロマチン構造に生じた損傷は認識し易い一方、凝集したクロマチン上の損傷に対しては比較的認識しづらく、クロマチンリモデリングなどクロマチン構造を弛緩させる分子機構の関与が期待される (図 6)。

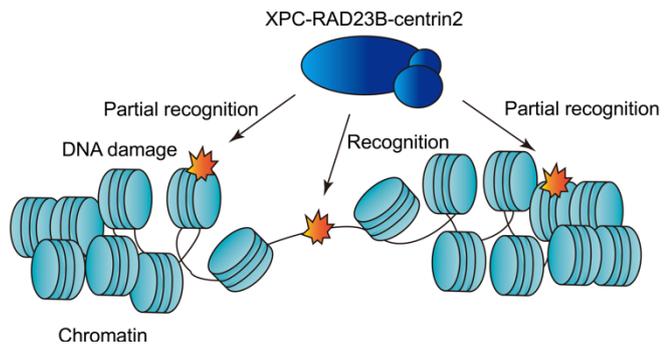


図 6. XPC 複合体によるクロマチン損傷認識モデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------