

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2007～2009

課題番号：19681004

研究課題名 (和文) DNA 修復と細胞周期制御機構のクロストークの解明

研究課題名 (英文) Crosstalk between cell cycle regulatory mechanism and DNA repair

研究代表者

西 良太郎 (RYOTARO NISHI)

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・助教

研究者番号：80446525

研究成果の概要 (和文)：ヌクレオチド除去修復 (NER) は紫外線照射によって生じる DNA 損傷を含む多様な損傷を修復する重要な DNA 修復機構である。XPC 蛋白質複合体 (XPC 複合体) は NER における DNA 損傷認識に必須の因子である。XPC 複合体のサブユニットの一つである centrin 2 (1-172 アミノ酸) はこれまでに XPC の損傷 DNA 結合活性を促進することが報告されている。その一方で、centrin 2 は中心体蛋白質として同定され、中心体複製に必須の因子であることが知られている。Centrin 2 による XPC の損傷 DNA 結合活性増強の機構を解明する為に、centrin 2 のドメイン解析を行った。Centrin 2 のカルボキシ末端ドメイン (94-172 残基) は XPC との相互作用及び、上述の XPC の損傷 DNA 結合活性の増強に十分であることを明らかにした。一方、アミノ末端ドメイン (1-93 残基) は他の DNA 損傷認識因子であり、ユビキチン E3 リガーゼである UV-DDB と相互作用することを見出した。さらに centrin 2 を欠く条件下では XPC のユビキチン化が減弱することから centrin 2 は XPC のユビキチン化を二つの損傷認識因子と相互作用することにより制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Nucleotide excision repair (NER) is a versatile DNA repair mechanism that eliminates a wide variety of DNA lesions including UV-induced thymine dimers. XPC complex plays an essential role in DNA damage recognition of NER. Although centrin 2 which belongs to calmodulin super family was suggested to enhance NER by increasing DNA-binding activity of XPC, the precise mechanism of this enhancement remains to be elucidated. Biochemical studies using truncated mutant of centrin 2 indicated that C-terminal domain of centrin 2 is sufficient for enhancement of reconstituted NER and DNA-binding activity of XPC *via* complex formation with XPC. On the contrary, N-terminal domain interacted with UV-DDB, which is a component of E3 ligase ubiquitylating XPC according to UV irradiation. Electrophoretic mobility shift assay suggested that centrin 2 aids in formation of complex between XPC and UV-DDB on damaged-DNA. Furthermore, UV-C induced ubiquitylation of XPC was compromised in the absence of centrin 2, implying that centrin 2 might regulate ubiquitylation of XPC by interacting with two damage recognition factors *via* structurally independent two domains.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	6,200,000	1,860,000	8,060,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響学

キーワード：放射線生物影響、DNA 修復、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair: NER) は紫外線損傷を含む多様な DNA 損傷を除去、修復する機構である。NER の重要性はその異常が色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum: XP) に代表される幾つかのヒト遺伝性疾患の原因となることから容易に理解することができる。これまでに、XP 等のヒト患者由来の NER 因子欠損細胞を用いた相補性実験により NER 反応に必須とされる因子の同定が完了している。さらに精製組換え蛋白質のみを用いて損傷を含むオリゴヌクレオチドの切り出し、もしくは損傷切り出し後の DNA 複製を検出する無細胞 NER 反応の再構成系が構築されている。これらの研究により NER コア反応に関与する因子の同定及び機能解析が進む一方で、無細胞 NER 反応に必須ではないが、NER 反応に関与する因子が発見されている。今後、このような NER コア反応に必須ではないが、制御的な機能を持つ因子の同定はさらに進むと考えられる。また、C 群色素性乾皮症の責任遺伝子産物である XPC が塩基除去修復における損傷認識因子である Thymine DNA glycosylase (TDG) と相互作用し、TDG の損傷部位からの解離を促すことにより、修復活性を促進することが示されている。このことは、これ以外にも NER と他の細胞機能のクロストークが存在することを想起させるものである。

一方、DNA 損傷に応じて DNA 修復機構に十分な時間を与えるために、細胞は DNA 修復チェックポイントと呼ばれる機構により細胞周期を停止させることが知られている。DNA チェックポイントを担う因子は損傷を認識するモニター、シグナル伝達を行うメディエーター、さらに細胞周期停止の実行因子であるエフェクターに大別することができる。DNA 損傷の種類により活性化されるチェックポイントカスケードは異なるが、DNA 二重鎖切断及び、DNA 複製阻害を損傷原とした研究が進行しており、メディエーター及び、エフェクターに関する知見が主として蓄積されている。

2. 研究の目的

上述のように DNA 損傷チェックポイントに関与する因子の同定及び翻訳後修飾を介したその制御機構が明らかにされつつある一方で、DNA 損傷チェックポイントにおけるモ

ニター分子は必ずしも明らかになってはいない。ゲノムの安定性を維持する上で DNA 修復機構の一つである NER と細胞周期制御機構は密接に関連している必要があると考えられるにも関わらず、両者を結ぶクロストークに関する知見は多くない。さらに、研究の背景で述べたように、近年 NER コア反応そのものには必須ではない因子の存在が示唆されていることから、NER とチェックポイントを関連付ける因子の存在が想起される。本研究においては、NER とチェックポイント機構の関連を細胞生物学的な手法により明らかにすることを目的とする。

Centrin 2 は中心体蛋白質として同定された蛋白質であり、中心体複製に必須の因子として知られている。またそのホモログは酵母からヒトまで広く保存されており、中心体制御、即ち細胞周期と密接に関連した重要性が示唆されている。興味深いことに、centrin 2 は NER コア反応に必須の因子ではないが、NER において損傷認識因子として機能する XPC 複合体のサブユニットとしても存在し、NER に対して促進的な機能を果たすことが報告されている。本研究においては細胞周期制御機構と NER 間のクロストークを明らかにする端緒として、centrin 2 の詳細なドメイン解析を行う。また、同時に siRNA ライブラリー等を用いたスクリーニングにより NER とチェックポイントのクロストークに重要な因子を同定する。

3. 研究の方法

(1) 精製組換え蛋白質の調製。FLAG-XPC は昆虫細胞-バキュロウイルスを用いた系により発現させ、別に調製した HR23B-His とのヘテロ二量体として精製した。Centrin 2 (野生型及び変異体) は大腸菌を用いて GST 融合蛋白質として発現、精製した。FLAG-DDB1 及び UV-DDB (FLAG-DDB1-DDB2 ヘテロ二量体) は共に、昆虫細胞-バキュロウイルスを用いた系により発現させ、精製した。

(2) *In vitro* における XPC と centrin 2 間の相互作用解析。精製 FLAG-XPC-HR23B-His 及び GST-centrin 2 を用いて、FLAG タグを利用した共免疫沈降法により *in vitro* における XPC と centrin 2 (野生型あるいは変異体) の相互作用を検討した。

(3) *In vivo* における XPC と centrin 2 間の相互作用解析。XPC を欠損したヒト XP 患者

由来細胞に FLAG-XPC 及び、HA-centrin 2 を一過性に過剰発現させ、細胞抽出液を調製後、FLAG あるいは HA タグを利用した共免疫沈降法により *in vivo* における XPC と centrin 2 間の蛋白質間相互作用を検討した。

(4) 精製組換え蛋白質を用いた無細胞 NER 反応系の再構築。無細胞 NER 反応は紫外線損傷を含み、損傷の近傍を放射性同位体で標識したプラスミドと精製した組換え必須 NER 因子を反応させることにより再構成した。NER 反応の結果生じる約 30 ヌクレオチドの DNA 断片を denaturing PAGE 後、オートラジオグラフィにより検出した。

(5) XPC 及び centrin 2 の細胞内局在の検討。XPC 及び centrin 2 の細胞内局在及び、局所的紫外線照射領域における集積を免疫染色法により検討した。局所的紫外線照射は細胞を isopore membrane filter で覆い、その上から紫外線を照射することにより行った。

(6) *In vitro* における centrin 2 と UV-DDB あるいは DDB1 間の相互作用の検討。

GST-centrin 2 (野生型あるいは変異体) をあらかじめ Glutathione Sepharose beads に結合させ、FLAG-DDB1 あるいは UV-DDB をさらに反応させた後に、GST タグを利用した pull down assay を行うことにより、centrin 2 と FLAG-DDB1 あるいは UV-DDB との相互作用を検討した。

(7) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) による精製組換え蛋白質の損傷 DNA 結合活性の検討。即ち、紫外線損傷を含み、放射性同位体で標識したオリゴヌクレオチドと種々の精製蛋白質を反応させ、形成された DNA-蛋白質複合体を native PAGE により分離後、オートラジオグラフィにより検出した。また、反応の結果形成された DNA 蛋白質複合体に含まれる因子を同定する為に、抗 XPC 抗体を用いた super shift assay を行った。

4. 研究成果

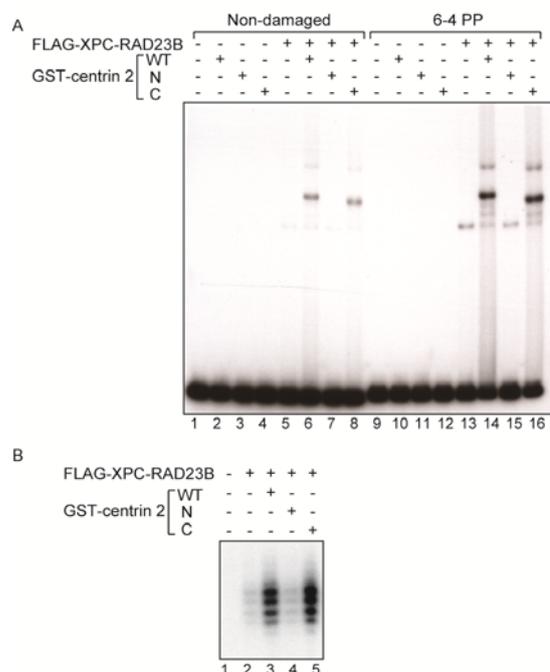
(1) centrin 2 のカルボキシ末端 (C 末端) ドメインは XPC との相互作用に十分である。精製 XPC 及び centrin 2 を用いた *in vitro* 共免疫沈降実験より centrin 2 の C 末端ドメインは野生型 centrin 2 と同程度に XPC と結合することが示された。一方、アミノ末端 (N 末端) ドメインと XPC の間に有意な相互作用は認められなかった。さらに、*in vivo* 共免疫沈降実験から細胞内においても centrin 2 の C 末端ドメインは XPC との結合に十分であることが示された。さらに、centrin 2 と XPC ペプチドの結晶構造解析に基づき centrin 2 の C 末端ドメインにアラニン置換によるアミノ酸変異 (L112A, F113A, L133A, M145A) を導入した。この変異 centrin 2 は細胞内において XPC との結合を欠失しており、全長

centrin 2 においても C 末端ドメインが XPC との相互作用に重要であることが示された。

(2) centrin 2 は XPC との相互作用依存的に核内及び、局所的紫外線照射領域に局在する。内在性の XPC を欠損したヒト XP 患者由来細胞に FLAG-XPC 及び HA-centrin 2 を一過性に過剰発現させ、免疫染色法によりそれぞれの局在を検討した。Centrin 2 は XPC の非存在下においては中心体への局在は認められるが、核への局在は認められなかった。しかしながら、XPC と centrin 2 を共発現させた場合、centrin 2 は中心体への局在に加え、核内への移行が認められた。さらに、C 末端ドメインが野生型 centrin 2 と同様の挙動を示す一方、XPC との結合を欠失した変異 centrin 2 は XPC の存在下においても核内への局在は認められなかった。また、centrin 2 の野生型及び、C 末端ドメインは XPC の発現依存的に局所的紫外線照射領域へ集積したが、N 末端ドメインは XPC の有無に関わらず、損傷部位への集積は認められなかった。

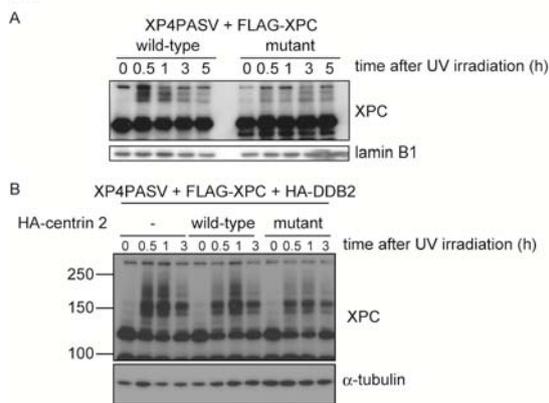
(3) centrin 2 の C 末端ドメインは XPC の損傷 DNA 結合活性の増強に十分である (図 1)。XPC の紫外線損傷 (6-4 光産物: 6-4 PP) に対する結合活性に centrin 2 の各ドメインが及ぼす影響を EMSA により検討した。C 末端ドメインは XPC の損傷 DNA 結合活性を野生型 centrin 2 (WT) と同程度に促進したが、N 末端ドメインを用いた場合は有意な変化は認められなかった (図 1A)。さらに、無細胞 NER 反応に対する centrin 2 各ドメインの効果を検討したところ、C 末端ドメイン及び野生型 centrin 2 が NER 活性を同程度に促進を示したのに対し、N 末端ドメインでは明確な影響は認められなかった (図 1B)。

図 1



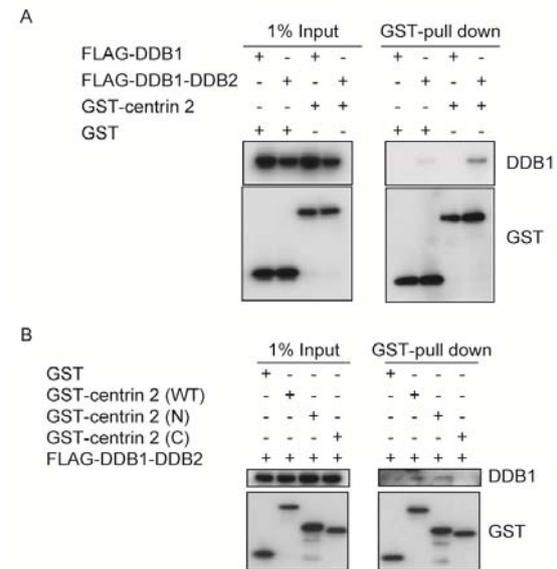
(4) centrin 2 は紫外線照射に伴う XPC のユビキチン化に参与する。これまでに我々は XPC において centrin 2 との結合に重要なアミノ酸を同定し、これらのアミノ酸をアラニンに置換することにより、centrin 2 との結合を欠失した変異 XPC を作製してきた (R. Nishi et al., 2005, MCB, 25:5664-5674)。この変異 XPC を発現する細胞においては、紫外線照射に伴う XPC のユビキチン化は起こるものの、その程度は野生型 XPC を発現する細胞に比較して減弱していることが示された (図 2A)。さらに、centrin 2 の XPC のユビキチン化に対する影響を検討する為に、XPC を欠損したヒト XP 患者由来細胞を親株として XPC 及び DDB2 を安定に発現する細胞株を樹立した。この細胞株に野生型あるいは、XPC との結合を欠失した変異 centrin 2 を一過性に過剰発現させ、紫外線照射後、経時的に細胞抽出液の調製を行い、XPC のユビキチン化を検討した。野生型 centrin 2 を過剰発現させた場合には XPC のユビキチン化は殆ど影響を受けなかったが、変異 centrin 2 を発現させた場合、XPC のユビキチン化は認められるものの、その程度は減弱することが示された (図 2B)。

図 2



(5) centrin 2 は UV-DDB とその N 末端ドメインを介して相互作用する。centrin 2 と UV-DDB 間の相互作用をそれぞれの精製蛋白質を用いて共免疫沈降実験により検討した。centrin 2 は DDB1 単量体との有意な結合は認められなかったが、UV-DDB (FLAG-DDB1-DDB2) との相互作用が認められた (図 3A)。さらに centrin 2 の各ドメインと UV-DDB 間の相互作用を同様の手法により検討した。C 末端ドメインは UV-DDB と有意な相互作用を示さない一方、centrin 2 の野生型及び N 末端ドメインは UV-DDB との相互作用が認められた (図 3B)。

図 3



(6) centrin 2 は損傷 DNA 上において XPC と UV-DDB との複合体形成を促進する。紫外線損傷を含む直鎖状二十鎖 DNA を基質とし、XPC、UV-DDB 及び centrin 2 の存在下に EMSA を行った。XPC 及び UV-DDB の両者が反応系に含まれた場合、それぞれ単独での反応では認められなかった移動度の小さい蛋白質-DNA 複合体が検出された。さらに、この蛋白質-DNA 複合体の形成は centrin 2 を反応系に加えることにより若干の促進が認められた。この蛋白質-DNA 複合体に含まれる因子を同定するため、抗 XPC 抗体を用いた super shift assay を行った。この移動度の小さい蛋白質-DNA 複合体は抗 XPC 抗体の添加により、さらに移動度の減少しスミア状のバンドとして認められ、XPC がこの複合体に含まれることが示唆された。

(7) 総括と展望

① centrin 2 は calmodulin 蛋白質ファミリーに属し、カルシウム結合性蛋白質として同定されている。このファミリーに属する蛋白質は centrin 2 と同様に、N 末端及び C 末端ドメインに 2 つずつカルシウムイオン結合モチーフである EF-hand motif を有する。このファミリーに分類される蛋白質は、一般的に、相互作用する蛋白質の α -ヘリックスを標的とし、EF-hand motif を介した疎水性相互作用により α -ヘリックスを包み込むように結合することが知られている。しかしながら、本研究により、centrin 2 は標的蛋白質である XPC の α -ヘリックスにその C 末端ドメインのみで結合し得ることが明らかにされた。さらに、C 末端ドメインは XPC の損傷 DNA 結合活性及び、無細胞 NER 反応の促進に十分であることが示された。その一方、N 末端ドメインは XPC との結合及び XPC の生理活性に対す

る影響は認められなかったが、他の DNA 損傷認識因子である UV-DDB と相互作用することが示された。これは centrin 2 は従来の calmodulin 蛋白質ファミリーとは異なる結合様式により標的蛋白質と相互作用することを示すものであり、古典的なカルシウム結合性蛋白質ファミリーに新たな制御機構を見出すものである。さらに、centrin 2 は中心体蛋白質、特に中心体複製に必須の因子として知られていることから、中心体制御機構を理解する上で centrin 2 と標的蛋白質の結合様式の理解は重要な知見を与えるものであると考えられる。

②centrin 2 との相互作用を欠失した XPC を発現する細胞を用いた結果及び、変異 centrin 2 を一過性に過剰発現させた細胞を用いた結果から、centrin 2 は紫外線照射に伴う XPC のユビキチン化の制御に関与している可能性が示唆された。さらに、精製蛋白質を用いた共免疫沈降実験により centrin 2 の N 末端ドメインが UV-DDB と相互作用することが示された。さらに、EMSA から centrin 2 は損傷 DNA 上において XPC と UV-DDB の相互作用を促進することが示された。XPC はユビキチン化の標的蛋白質であるが、そのサブユニットである centrin 2 が E3 リガーゼの構成因子である UV-DDB と相互作用することによりユビキチン化を制御する可能性が示唆されたことは SCF 型の E3 リガーゼの制御機構に新たな知見を与えるものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Ryotaro Nishi, Sergey Alekseev, Christoffel Dinant, Deborah Hoogstraten, Adriaan B. Houtsmuller, Jan. H. J. Hoeijmakers, Wim Vermeulen, Fumio Hanaoka and Kaoru Sugasawa, UV-DDB-dependent regulation of nucleotide excision repair kinetics in living cells, DNA Repair, 8, 2009, 767-776. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① Ryotaro Nishi, Centrin 2 mediates interaction between XPC and DDB2. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日、パシフィコ横浜
- ② Ryotaro Nishi, Centrin 2 は損傷認識因子 XPC と DDB2 の相互作用を促進する。第 20 回 DNA 複製・組換え・複製ワークショップ、2009 年 11 月 1 日、琵琶湖コンファレンスセンター

- ③ Ryotaro Nishi, Centrin 2 enhances in vitro nucleotide excision repair via complex formation with xeroderma pigmentosum group C protein through its C-terminal domain. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 11 日、神戸ポートアイランド
- ④ 西 良太郎、ヌクレオチド除去修復因子の細胞内動態とその制御機構。第 19 回 DNA 複製・分配ワークショップ・合同ワークショップ、2008 年 3 月、ラフォーレ修善寺
- ⑤ Ryotaro Nishi, ヌクレオチド除去修復因子の細胞内動態とその制御機構の解析第 30 回日本分子生物学会、2007 年 12 月、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 良太郎 (RYOTARO NISHI)

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・助教

研究者番号：80446525