

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24241019

研究課題名(和文) 環境ストレスに対するゲノム恒常性維持に関わる新たな分子機構の解明

研究課題名(英文) Novel molecular mechanism maintaining genomic homeostasis against 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム全体のヌクレオチド除去修復(GG-NER)において、環境ストレスに対する効率的なゲノム監視を可能にする分子基盤の理解を目的として研究を行った。精製タンパク質により再構成した無細胞系を用い、脱塩基部位などの内因性DNA損傷がGG-NERの損傷認識を促進しうること、DNAのトポロジー状態やタンパク質のリン酸化が修復効率に影響を与えることを見出した。また、UV-DDBを介した紫外線誘発DNA損傷の認識過程におけるXPCタンパク質のコピキチン化とSUMO化の新たな役割を明らかにした。さらに、XPCタンパク質がDNA損傷の認識過程でDNA上を一次元拡散運動することを一分子イメージングにより示した。

研究成果の概要(英文)：This research project was aimed to understand the molecular bases, which enable the global genomic nucleotide excision repair (GG-NER) pathway to efficiently survey genomic DNA for damage caused by various environmental stresses. By using the defined cell-free GG-NER system reconstituted with purified recombinant protein factors, it was shown that certain endogenous DNA lesions, such as abasic sites, facilitate the damage recognition process in GG-NER, and that DNA repair efficiency is affected by the topological state of damaged DNA as well as protein phosphorylation. We also elucidated novel roles of ubiquitination and SUMOylation of the xeroderma pigmentosum group C (XPC) protein in recognition of ultraviolet (UV)-induced DNA photolesions mediated by the UV-damaged DNA binding protein complex. Finally, single molecule imaging experiments revealed one-dimensional diffusion of the XPC protein during the search for lesions along DNA.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：遺伝子 ゲノム 蛋白質 DNA損傷修復 一分子解析

1. 研究開始当初の背景

生物の遺伝情報を担うゲノム DNA は、生体内で発生する活性酸素や代謝産物に加え、放射線、紫外線、化学物質などの環境由来因子によって絶えず損傷を受けている。これらの DNA 損傷は主に複製や転写を妨害することによって染色体異常や突然変異、細胞死等を引き起こし、それががんや老化、神経変性など多様な病態の発現につながるものが近年知られるようになった。このような弊害を未然に防ぐための防御機構として生物は種々の DNA 修復機構を備えており、その分子機序と生体内における制御の詳細を解明することは、環境変動に柔軟に対応する生物の恒常性維持戦略の理解、さらには様々な病態・疾患の制御につながるきわめて重要な課題である。

ヒトのゲノム全体で働くヌクレオチド除去修復 (GG-NER) 機構は紫外線や化学物質によって誘起される様々な DNA 損傷を取り除き、突然変異と発がんの抑制に寄与する重要な DNA 修復経路の一つである。研究代表者らは色素性乾皮症 (XP) 責任遺伝子産物の一つである XPC タンパク質が GG-NER における損傷認識段階に必須の機能を果たすこと、XPC が損傷そのものではなく非対合塩基の存在を認識することにより GG-NER の広範な基質特異性を規定すること、XP-E 群の欠損因子である UV-DDB (DDB1-DDB2 複合体) が XPC との相互作用を介して紫外線損傷の認識を促進するとともに、この過程で CUL4 リガーゼによるユビキチン化が重要な役割を果たすこと、XPC による DNA 構造異常の認識に続いて基本転写因子 TFIIH のサブユニット、XPD ヘリカーゼが DNA 鎖を 5'→3'方向にスキャンし、その進行の妨害により最終的に損傷の存在が確認されること (図 1)、DDB2 の N 末端領域が CUL4 リガーゼによるユビキチン化の主要な標的となり、紫外線照射に伴う DDB2 の分解を制御することなどを明らかにしてきた。このように GG-NER の損傷認識に関わる基本的分子機構の生化学的な理解が進んだ一方、長大なゲノ

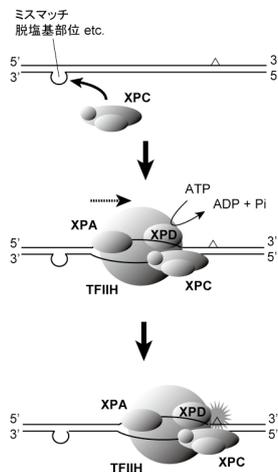


図1 GG-NERにおける二段階損傷認識機構モデル

ム DNA 上のいつどこで発生するか予測困難な損傷を細胞がどのように監視しているのか、とりわけ XPC や UV-DDB のような損傷認識因子が実際に損傷部位に到達するまでの分子動態に関しては不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、GG-NER を担う分子装置が最終的に損傷部位を認識するに至るまでの過程、特に DNA 鎖のスキャンング機構やタンパク質翻訳後修飾の役割に着目し、種々の環境ストレスに臨機応変に対応する効率的なゲノム DNA の監視と遺伝情報の維持を可能にする分子基盤を理解することを目的とした。具体的には、シクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) のように XPC による直接認識が困難な DNA 損傷の修復に対して、脱塩基部位や一本鎖切断といった内因性損傷が促進効果を示すかどうか検証するとともに、無細胞系、および生細胞内で GG-NER を促進する因子の探索と分子機構の解析を行った。また、蛍光標識した GG-NER タンパク質と損傷 DNA を用いた一分子イメージング系を構築し、これにより効率的な損傷部位の認識に必要とされるタンパク質因子とその分子動態を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 精製タンパク質による無細胞 NER 反応の再構成

6 種類の NER 因子 (XPC、TFIIH、XPA、XPG、ERCC1-XPF、RPA) は、主にバキュロウイルス発現系を用いて発現を行い、組換えタンパク質として精製したものをを用いた。DNA 基質は、損傷を含む合成オリゴヌクレオチドの 5'末端を ³²P 標識したものを一本鎖環状 DNA にアニールし、これをプライマーとして DNA ポリメラーゼによる伸長と DNA リガーゼによる連結を行うことで調製した。二種類以上の損傷を含む DNA 基質を作製する場合には、複数のオリゴヌクレオチドを同時に使用して同様に調製を行った。NER 反応後、精製した DNA を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、オートラジオグラフィにより検出した。

(2) 変異 XPC タンパク質安定発現細胞株の樹立と解析

N 末端に FLAG タグを融合した野生型 XPC、および種々の変異型 XPC の cDNA を pIREShyg ベクターに組み込み、XPC 欠損細胞である XP4PASV に導入した。hygromycin B による選択とコロニーの単離を行ったのち、選択薬剤の濃度を徐々に下げることで XPC タンパク質の発現を生理的レベルに調整した。GG-NER 活性を測定する場合は、DNA 複製による損傷の希釈を避けるため、6 mM チミジン培地に添加して培養を行った。紫外線 (UVC) を 10 J/m² 照射し、さまざまな

時間培養した後、ゲノム DNA を調製した。
 (6-4) 光産物、および CPD と特異的に反応するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法により、損傷の残存量を測定した。

(3)XPC タンパク質の一分子動態解析

N 末端に FLAG タグと Avi タグを融合した XPC タンパク質をバキュロウイルス発現系を用いて発現、精製し、ビオチンリガーゼにより試験管内でビオチン標識した。これにストレプトアビジン標識した量子ドットを結合させることで、XPC タンパク質を蛍光標識した。一方、両末端をビオチン標識したスファージ DNA をストレプトアビジンコートしたビーズを介して基板に固定化し、タイトロップアッセイにより蛍光標識 XPC タンパク質の DNA 上の挙動を一分子観察した。

4. 研究成果

(1)内因性 DNA 損傷による GG-NER 促進効果の検証

CPD は XPC による直接認識が困難であるため、無細胞 NER 反応系における修復効率が非常に低いことで知られる。一方、損傷から見て 5'側の非損傷鎖にミスマッチ塩基を導入して XPC が結合する足場を与えることで、CPD の修復効率は劇的に上昇する。人工的なミスマッチ構造に代わり、内因性の DNA 損傷が同様の効果を示すかどうかを無細胞系により検証した。

まず 6 種類の NER タンパク質因子を組換え体として発現、精製し、これにより損傷の切り出し反応を再構成した。この系を用い、CPD の 5'側、約 60 塩基の位置の損傷鎖に脱塩基部位の安定化アナログであるテトラヒドロフラン (THF) を挿入した基質を作製して、CPD の除去効率を調べた。その結果、THF の挿入によって、弱いながらも CPD の修復効率が有意に上昇することを見出した (図 2)。一方、CPD の 5'側に一本鎖切断を導入した場合には、修復促進効果は見られなかった。さらに、THF の反対側にループ構造を導入することにより、THF 自身の切り出しが有意に観察された。non-bulky な損傷である脱塩基部位は XPD ヘリカーゼの進行を妨害せず、従って NER の基質にならないと予想していたが、XPC が脱塩基部位と相互作用した場合には、1) 脱塩基部位自身が除去される、2) XPD ヘリカーゼが脱塩基部位を通過して下流の損傷を探索する、という 2 つの経路が存在していることが示唆された。

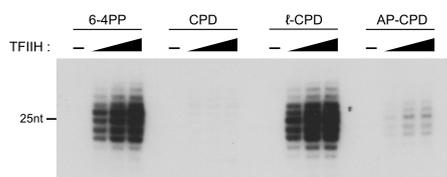


図2 脱塩基部位は無細胞系における CPD の修復を促進する

(2)無細胞 NER 反応の効率に影響を与える因子の解析

6 種類の精製タンパク質因子によって無細胞 NER 反応を再構成する過程で、損傷 DNA 基質の形状が修復効率に大きく影響することを見出した。すなわち、DNA 基質を制限酵素処理によって直鎖状にした場合、細胞粗抽出液を用いた系と同様に CPD の切り出しはほとんど見られず、損傷の 5'側にミスマッチ塩基を導入することで CPD 修復効率が上昇した。一方、DNA 基質が二本鎖閉環状で負の超らせん構造をとっている場合、CPD 単独でも有意な損傷の切り出しが観察された。さらに興味深いことに、反応系に DNA トポイソメラーゼを添加することで二本鎖閉環状の DNA 基質からの損傷除去効率が顕著に低下すること、DNA 基質にあらかじめミスマッチ塩基が含まれていると DNA トポイソメラーゼの効果が見られないことがわかった。以上の結果は、負の超らせん構造が DNA 二本鎖の一時的、局所的な一本鎖状態への開裂を引き起こすことで、XPC による損傷認識を助けている可能性を強く示唆しており、細胞内においてクロマチン構造をとった DNA における損傷認識機構を理解する上で重要な意義を持つと考えられる。

無細胞系における損傷切り出し反応の再構成に必須な 6 種類のタンパク質因子に加えて、修復反応を促進する因子が存在するかどうか探索する目的で、HeLa 細胞粗抽出液を種々のカラムクロマトグラフィーにより分離し、修復促進活性の同定を試みた。その結果、最終活性画分の質量分析によってカゼインキナーゼ II (CK2) のサブユニットを同定するとともに、組換え CK2 が再構成 NER 反応を実際に促進することを明らかにした。CK2 によるリン酸化の標的として XPC を含む複数のタンパク質が同定され、これらの因子におけるリン酸化部位の同定と修復機構における意義の解析を現在進めている。

(3)GG-NER の DNA 損傷認識におけるユビキチン化、SUMO 化の役割

細胞に紫外線を照射すると UV-DDB に結合した CUL4 リガーゼが活性化され、XPC と DDB2 がユビキチン化される。ユビキチン化された DDB2 は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ていたが、これらの現

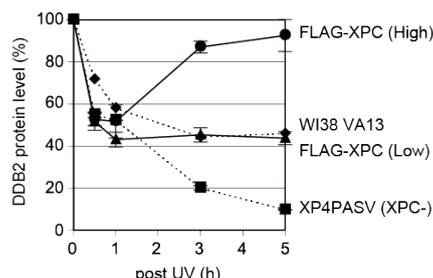


図3 XPC は DDB2 の紫外線誘導性分解を負に制御する

象の意義は不明であった。

本研究により、紫外線照射時の DDB2 の安定性が XPC によって制御されることを新たに見出した。すなわち、XPC 欠損細胞では正常細胞と比較して DDB2 の紫外線誘導性分解がより顕著であり、同じ細胞に野生型 XPC 遺伝子を導入して発現させると、XPC タンパク質の発現レベルに依存して DDB2 分解の抑制が観察された (図 3)。さらに無細胞ユビキチン化反応系を用いた解析から、DDB2 のポリユビキチン化反応を XPC が阻害することがわかった。以上の結果より、UV-DDB により XPC が適切に損傷部位にリクルートされれば、CUL4 リガーゼが XPC を優先的にユビキチン化することで DDB2 は分解を免れ、結果として GG-NER 活性が持続するのではないかと考えている。

XPC はユビキチン化だけでなく SUMO 化を受けることが知られていたが、3 か所の SUMO 化部位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 XPC 欠損細胞で安定発現したところ、(6-4) 光産物の修復に有意な遅延が見られた。この修復欠損は DDB2 に依存しており、UV-DDB から XPC への損傷の受け渡し過程において SUMO 化が重要な役割を担っていることが強く示唆された。

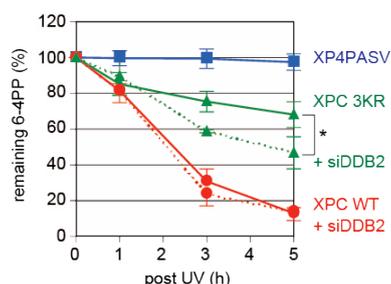


図4 XPC SUMO 化部位変異体が示す GG-NER 欠損は DDB2 発現抑制により緩和される

(4)XPC による DNA 損傷認識過程の一分子イメージング

XPC が DNA 上で損傷を探索する際の分子動態を詳細に観察する目的で、量子ドットと結合させた XPC タンパク質、および基板上に張った λ DNA (蛍光色素「YOYO1 により可視化) を用いて一分子レベルでリアルタイムイメージング観察を行った。その結果、紫外線照射によりランダムに損傷を導入した DNA 上では XPC が比較的安定に結合し続けたのに対し、非損傷 DNA 上では XPC が一次元拡散運動する様子が観察された。このことは、XPC による DNA 損傷の認識機構を理解する上で重要な意義を持つと考えられ、他の NER タンパク質因子との相互作用やクロマチン構造の関与も含めて、さらに解析を進めていく予定である。

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 9 件)

①Akita, M., Tak, Y.S., Shimura, T., Matsumoto, T., Okuda-Shimizu, Y., Shimizu, Y., Nishi, R., Saitoh, H., Iwai, S., Mori, T., Ikura, T., Sakai, W., Hanaoka, F., Sugasawa, K.: SUMOylation of xeroderma pigmentosum group C protein regulates DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *Sci. Rep.* 5, 10984; doi: 10.1038/srep10984 (2015).

②Matsumoto, S., Fischer, E.S., Yasuda, T., Dohmae, N., Iwai, S., Mori, T., Nishi, R., Yoshino, K., Sakai, W., Hanaoka, F., Thomä, N.H., Sugasawa, K.: Functional regulation of the DNA damage-recognition factor DDB2 by ubiquitination and interaction with xeroderma pigmentosum group C protein. *Nucleic Acids Res.* 43, 1700-1713; doi: 10.1093/nar/gkv038 (2015).

③Toga, T., Kuraoka, I., Watanabe, S., Nakano, E., Takeuchi, S., Nishigori, C., Sugasawa, K., Iwai, S.: Fluorescence detection of cellular nucleotide excision repair of damaged DNA. *Sci. Rep.* 4, 5578; doi: 10.1038/srep05578 (2014).

④Nishi, R., Sakai, W., Tone, D., Hanaoka, F., Sugasawa, K.: Structure-function analysis of the EF-hand protein centrin-2 for its intracellular localization and nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res.* 41, 6917-6929; doi: 10.1093/nar/gkt434 (2013).

⑤Krasikova, Y.S., Rechkunova, N.I., Maltseva, E.A., Pestryakov, P.P., Petruseva, I.O., Sugasawa, K., Chen, X., Min, J.H., Lavrik, O.I.: Comparative analysis of interaction of human and yeast DNA damage recognition complexes with damaged DNA in nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* 288, 10936-10947; doi: 10.1074/jbc.M112.444026 (2013).

⑥Pines, A., Vrouwe, M.G., Martejijn, J.A., Typas, D., Luijsterburg, M.S., Cansoy, M., Hensbergen, P., Deelder, A., de Groot, A., Matsumoto, S., Sugasawa, K., Thoma, N., Vermeulen, W., Vrieling, H., Mullenders, L.: PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *J. Cell Biol.* 199, 235-249; doi: 10.1083/jcb.201112132 (2012).

[学会発表] (計 20 件)

①大西優貴、戸根大輔、木下 実、岩井成憲、菅澤 薫: スクレオチド除去修復における DNA 損傷認識機構の解析、第 37 回日本分子生物学会年会、2014.11.25~27、パシフィコ横浜 (神奈川県)

②横田浩章、戸根大輔、大西優貴、韓 龍雲、原田慶恵、菅澤 薫: 哺乳類スクレオチド除去修復タンパク質 XPC の DNA 結合モードの

1 分子イメージング、第 37 回日本分子生物学会年会、2014.11.25~27、パシフィコ横浜（神奈川県）

③Matsumoto, S., Fischer, E.S., Thomä, N.H., Sugasawa, K.: Functional interactions between XPC and DDB2 in nucleotide excision repair. The 9th 3R Symposium, 2014.11.17~21、御殿場高原ホテル（静岡県）

④ Akita, M., Matsumoto, S., Sakai, W., Sugasawa, K.: Roles for post-translational protein modifications in regulation of DNA damage recognition in mammalian nucleotide excision repair. International Symposium on Xeroderma Pigmentosum and Related Diseases, 2014.3.5~7、神戸国際会議場（兵庫県）

⑤菅澤 薫：哺乳類スクレオチド除去修復における DNA 損傷認識過程の制御、第 36 回日本分子生物学会年会、2013.12.3~6、神戸ポートアイランド（兵庫県）

⑥秋田真季、酒井 恒、菅澤 薫：紫外線誘発 DNA 損傷の修復機構における SUMO 化修飾の役割、日本放射線影響学会第 56 回大会、2013.10.18~20、ホテルクラウンパレス青森（青森県）

⑦Tone, D., Yoshino, K., Iwai, S., Sugasawa, K.: Exploration of novel regulatory factors in mammalian nucleotide excision repair. 第 35 回日本分子生物学会年会、2012.12.11~14、福岡国際会議場（福岡県）

⑧菅澤 薫：紫外線誘発 DNA 損傷の認識と修復の分子基盤、第 34 回日本光医学・光生物学会、2012.7.27~28、神戸国際会議場（兵庫県）

⑨Sugasawa, K.: Post-translational modification regulating mammalian nucleotide excision repair. The 4th US-Japan DNA Repair Meeting、2012.4.11~14, Leesburg VA (U.S.A.)

〔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〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

岩井 成憲 (IWAI, Shigenori)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：10168544

(3)連携研究者

横田 浩章 (YOKOTA, Hiroaki)

光産業創成大学院大学・光産業創成研究科・准教授

研究者番号：90415547

吉野 健一 (YOSHINO, Ken-ichi)

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：90280792

(4)研究協力者

秋田 眞季 (AKITA, Masaki)

松本 翔太 (MATSUMOTO, Syota)

戸根 大輔 (TONE, Daisuke)

大西 優貴 (ONISHI, Yuki)

木下 実 (KINOSHITA, Minoru)