

放射性同位体³²P を利用した DNA ポリメラーゼの 活性測定法による色素性乾皮症バリエーション群の 責任遺伝子産物 DNA ポリメラーゼ^{イータ} η の機能解析



増田 雄司

(環境医学研究所 ゲノム動態制御分野・医学系研究科 トキシコゲノミクス)

はじめに

DNA ポリメラーゼは鋳型 DNA に対して相補的な dNMP (deoxyribonucleoside monophosphate) を重合する、生命活動の根幹を支える酵素である。ヒトではこれまでに14あまりの DNA ポリメラーゼが発見されている。その中で、3つの DNA ポリメラーゼ (DNA ポリメラーゼ α , DNA ポリメラーゼ δ , DNA ポリメラーゼ ϵ)がゲノム DNA の複製に必要不可欠である。DNA ポリメラーゼ γ はミトコンドリア DNA を複製する。その他の DNA ポリメラーゼは、DNA 複製には必ずしも必須ではないが、主に DNA 修復に関与することで遺伝情報の維持に寄与していると考えられている。

色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum: XP) は日光高過敏性、高発がん性の皮膚疾患の一つであり、常染色体劣性遺伝性の遺伝病である。XP は A ~ G 群と V (variant: バリエーション) 群の8種類に分類され、それぞれ原因遺伝子が明らかにされている。紫外線を含む日光が細胞に当たると紫外線に特徴的な DNA 損傷が生じる。A ~ G 群の責任遺伝子はこの紫外線 DNA 損傷を修復する酵素群をコードしており、皮膚を紫外線から防御している。XP の A ~ G 群の細胞では、紫外線 DNA 損傷の修復酵素が正常に働かず、紫外線に高感受性となる。一方、バリエーション群の細胞は紫外線 DNA 損傷の修復は正常であるが、紫外線が照射された後の、DNA 複製に異常が観察される。DNA 複製

に必要な DNA ポリメラーゼ α , DNA ポリメラーゼ δ , DNA ポリメラーゼ ϵ は、鋳型 DNA に紫外線 DNA 損傷があると、そこで DNA 合成を停止してしまう。バリエーション群の責任遺伝子は、紫外線 DNA 損傷があっても DNA 合成を継続することができる特殊な DNA ポリメラーゼ、DNA ポリメラーゼ η をコードしており、紫外線 DNA 損傷によって停止した DNA 複製を再開することで、皮膚を紫外線から防御している。DNA ポリメラーゼ η に欠損がある XP のバリエーション群の細胞では、紫外線 DNA 損傷によって停止した DNA 複製を効率よく再開することができないため、紫外線に感受性となる。

DNA ポリメラーゼ η は化学的構造が変化した塩基を鋳型として利用することができる特殊な性質をもつ DNA ポリメラーゼの一つであり、この性質によって、紫外線損傷塩基を鋳型として DNA 合成を再開することができる。この分子機構は「損傷乗り越え DNA 合成」と呼ばれる。一方で DNA ポリメラーゼ η は、通常の塩基に対しては相補的塩基を重合する精度が著しく低い性質を併せ持つ。したがって、DNA ポリメラーゼ η に代表される、損傷乗り越え DNA 合成に寄与する一群の DNA ポリメラーゼは、その働きが「損傷乗り越え DNA 合成」に限定されるように制御されていると考えられている。筆者が所属するゲノム動態制御分野を主宰する益谷教授は、XP バリエーション群の責任遺伝子産物として DNA ポリメラーゼ

η を発見し^{1, 2)}, それ以来DNAポリメラーゼ η の機能解析を行っている³⁻⁵⁾。DNAポリメラーゼや様々なDNA代謝酵素の生化学的解析には、放射性同位体の利用が必要不可欠である。本稿では、放射性同位体³²Pを利用したDNAポリメラーゼの活性測定法について概説し、DNAポリメラーゼ η の活性制御の分子機構についての最近の解析結果を紹介する。

³²Pを利用したDNAポリメラーゼの活性測定法

DNAポリメラーゼは鋳型塩基に対して相補的なdNMPを重合する。試験管内でこの反応を再現する際には、鋳型となる一本鎖DNAとそれに相補的に水素結合した短いDNA(プライマーDNA)及び、重合反応の基質となる4種類のdNTP(deoxyribonucleoside triphosphate)を必要とする(図1)。重合反応の際には、dNTPから β 位と γ 位のピロリン酸が外れて、 α 位のリン酸がプライマーDNAのデオキシリボースの3'-OHと結合する。この反応系に α 位のリン酸が³²Pで標識された $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dNTPを添加することで、新規に合成されたDNAを³²Pで標識、可視化、定量することが可能となる(図1)。

図2はポリメラーゼ δ による試験管内のDNA合成反応の一例を示した⁶⁾。鋳型DNAとしてバクテリオファージM13に由来する約7000塩基の環状一本鎖DNAとその一部に相補的な30塩基長のプライマーを使って反応し、反応産物をアルカリリアガロースゲル電気泳動で分離した。アルカリ

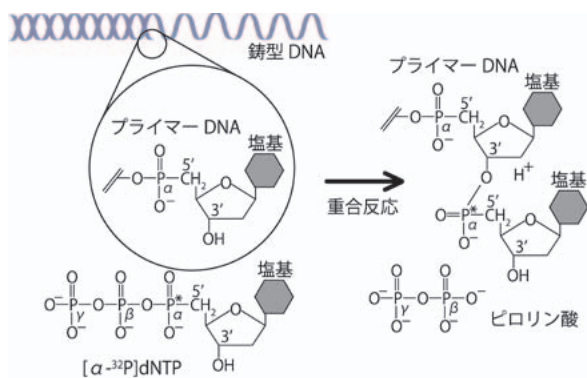


図1 DNAポリメラーゼの反応様式
P*は³²Pを示している。

条件では、合成されたDNAが鋳型鎖から乖離し、その長さを正確に測定することができる。基質に $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPを使用することで³²Pが取り込まれたDNAを可視化している(図2AB)。DNAポリメラーゼ δ は、補助因子の存在下でDNA伸長反応が強く促進されることに特徴があり、長大なゲノムDNAを効率良く複製することに適していると思われる。この反応に必要な補助因子はRPA(replication protein A), RFC(replication factor C), PCNA(proliferating cell nuclear antigen)の3つである(図2AB)。RPAは鋳型鎖の一本鎖DNAに結合することで、DNA合成の鋳型として適切な状態にする。PCNAはドーナツ状の分子で、中央の穴に二本鎖DNAが突き刺さるような様式でDNAと結合する(図2C)。RFCはプライマーの3'末端に結合し、ドーナツ状のPCNA分子の一部を開環-閉環することで、プライマー

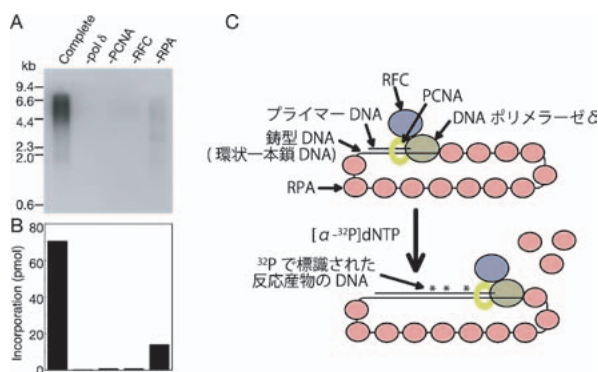


図2 DNAポリメラーゼ δ によるDNA合成反応の試験管内再構成

- (A) 鋳型DNAとしてバクテリオファージM13に由来する約7000塩基の環状一本鎖DNAとその一部に相補的な30塩基長のプライマー、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPを含むdNTP、ATP、 MgCl_2 、DNAポリメラーゼ δ をRPA、RFC、PCNA存在下(complete)、またはいずれかの非存在下(-)で混合し、30°Cで10分間反応させた後、反応産物をアルカリリアガロースゲル電気泳動で分離、オートラジオグラフィーにより可視化した。
- (B) 上記の反応産物に取り込まれた³²Pの放射活性を定量し、240 pmol dNMP相当量の鋳型鎖に対して取り込まれたdNMP量をグラフに示した。
- (C) 上記の反応系のイメージ図。図中の*は³²Pを示す。
- (A, BはNucleic Acids Research⁶⁾に掲載された図を改変し、許可を得て掲載)

の3'末端にPCNAを装着する。DNAポリメラーゼ δ はこのPCNAと結合することで、安定にプライマーの3'末端に保持され、連続的な効率の良いDNA伸長反応を行うことができる(図2C)。

^{32}P を利用したDNAポリメラーゼ η の生化学的解析

DNAポリメラーゼ η に代表される「損傷乗り越えDNA合成」に特化したDNAポリメラーゼでは、DNA伸長反応効率が著しく低いいため、前述の反応系では反応産物の検出は非常に困難である。このようなDNAポリメラーゼの活性測定には、別の測定法を利用する。前述と同様の鋳型DNAとその一部に相補的な30塩基長のプライマーを利用することは同様であるが、ここでは、プライマーの5'-OHを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPとポリヌクレオチドキナーゼを使ってリン酸化標識したものをを用い

る。30塩基長程度のDNAは7M尿素を含む変性アクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、オートラジオグラフィで可視化した(図3)。7M尿素による変性条件で電気泳動することにより、合成されたDNAを鋳型鎖から乖離させ、その長さを正確に測定することができる。

図3Bに示したように、DNAポリメラーゼ η のDNA伸長反応もまた、DNAポリメラーゼ δ と同じ補助因子の存在下で促進される。しかしその程度は、DNAポリメラーゼ δ では数百塩基の伸長が促進されるのに対して、DNAポリメラーゼ η では数十塩基程度であった⁷⁾。筆者らは、DNAポリメラーゼ η がPCNAと結合する部位(PIP box, PCNA interacting protein box)3箇所(N-末端側から順にPIP1, PIP3, PIP2)について、そのアミノ酸残基を置換した変異体DNAポリメラー

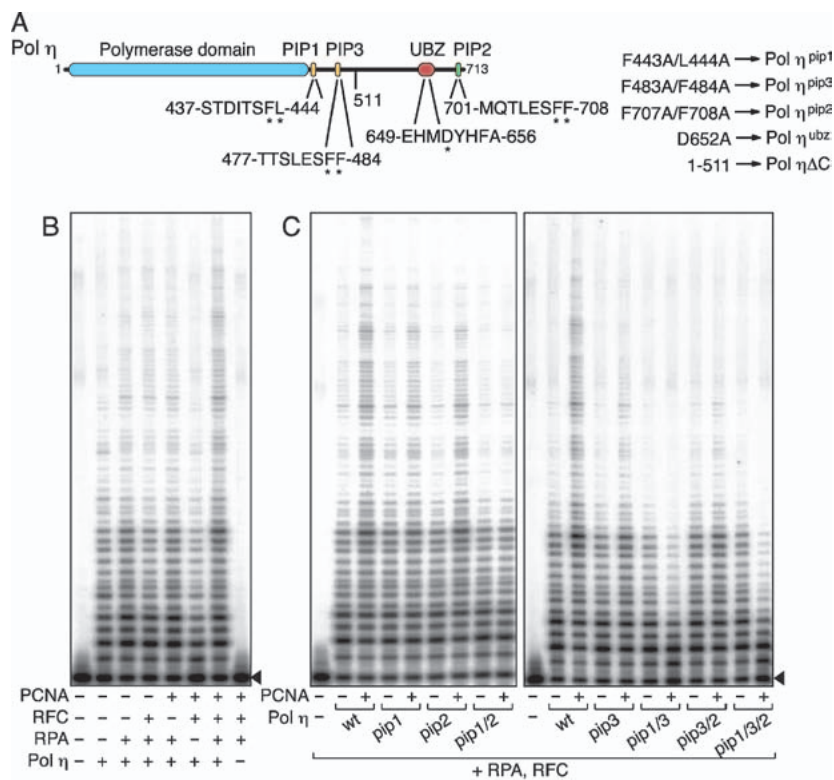


図3 PCNAによるDNAポリメラーゼ η の活性促進

- (A) DNAポリメラーゼ η の構造。本研究で使用した変異型DNAポリメラーゼ η のアミノ酸置換部位とその配列を示した。
- (B) 鋳型DNAとしてバクテリオファージM13に由来する約7000塩基の環状一本鎖DNAとその一部に相補的な5'-OHを ^{32}P で標識した30塩基長のプライマー、dNTP、ATP、 MgCl_2 、DNAポリメラーゼ η をRPA、RFC、PCNA存在下(+), またはそれぞれの非存在下(-)で混合し、 30°C で10分間反応させた後、反応産物を変性アクリルアミドゲル電気泳動で分離、オートラジオグラフィにより可視化した。◀は5'-OHを ^{32}P で標識した30塩基長のプライマーの位置を示している。
- (C) それぞれのPIP変異をもつDNAポリメラーゼ η (A)を使って(B)と同様に解析した。(Nucleic Acids Research⁷⁾に掲載された図を改変し、許可を得て掲載)

ゼ η を作成し(図3A), DNA伸長反応を測定した(図3C)。その結果, これらの変異は, DNAポリメラーゼ η それ自身の活性には影響を与えないが(図3B, PCNA[-]のレーンを比較), PCNAによる活性促進効果の減弱を引き起こした(図3B, PCNA[+]のレーンを比較)。この結果から, DNAポリメラーゼ η のすべてのPIP boxがDNA伸長反応の促進に少しずつ寄与することが明らかとなった⁷⁾。

先行研究により, DNAポリメラーゼ η が細胞内で効率よく機能するためには, PCNAの164番目のリジン残基にユビキチン分子が一つ結合したモノユビキチン化修飾が必要であることが示されていた。モノユビキチン化PCNAは紫外線照射によって誘導され, DNAポリメラーゼ η はユビキチン結合部位(UBZ, ubiquitin binding zinc finger)を有することから(図3A), ユビキチン化PCNAによるDNAポリメラーゼ η のDNA伸長反応の促進効果が指摘されていた。筆者らは試験管内の反応でPCNAをユビキチン化した後, 精製したモノユビキチン化PCNAを用いて, DNAポリメラーゼ η のDNA伸長反応における効果を観察した(図4)。その結果, モノユビキチン化PCNAでは未修飾のPCNAに比べてより強い促進効果が観察された(図4A)。この促進効果は, DNAポリメラーゼ η のUBZの変異体では観察されな

いことから(図4B), モノユビキチン化PCNAのユビキチンとUBZとの結合に起因すると考えられる。また, PCNAによるDNA伸長反応の促進効果がほとんど観察されないようなDNAポリメラーゼ η のPIP変異体についても, モノユビキチン化PCNAによる促進効果が観察されることから(図4CD), PIPとUBZによる活性促進は独立に機能することが示唆された⁷⁾。以上の結果から, DNAポリメラーゼ η とモノユビキチン化PCNAとの相互作用は, 限定された長さのDNA合成を促進することで, 忠実度の低いDNAポリメラーゼ η が必要最低限に機能する仕組みであると考えられる。

DNAポリメラーゼ η の細胞内での機能解析

このように試験管内で観察されたPIPとUBZを介したDNAポリメラーゼ η の活性促進効果が, 細胞内でどの程度寄与しているかについても当研究室で解析を行っている。XPバリエーション群の患者の繊維芽細胞から樹立した細胞株(以下, XP-V細胞と表記)は健常者のそれ(野生型細胞)に比べて紫外線照射後の細胞生存率の低下が観察される(図5)。このXP-V細胞に野生型のDNAポリメラーゼ η を発現させると, その感受性が野生型細胞のレベルにまで回復する(図5)。そこで様々な変異体DNAポリメラーゼ η をXP-V細胞で発

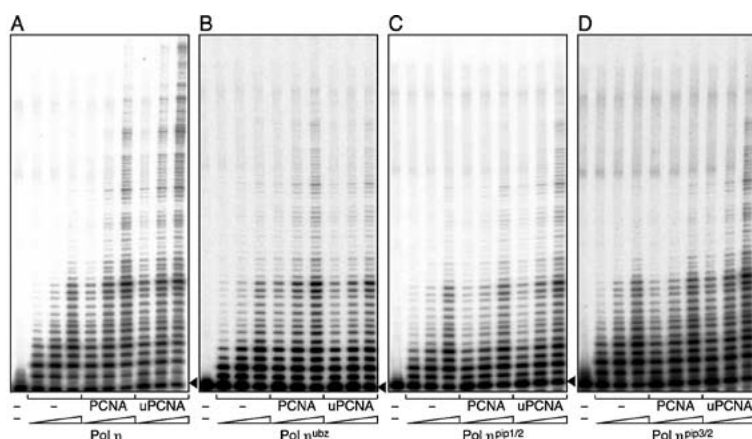


図4 モノユビキチン化PCNAによるDNAポリメラーゼ η の活性促進
(A-D) PCNAまたはモノユビキチン化PCNA(uPCNA)存在下, 非存在下でDNAポリメラーゼ η の活性を図3の(B)と同様に解析した。(A)は野生型, (B-D)は変異型DNAポリメラーゼ η を使って反応した。◀は5'-OHを³²Pで標識した30塩基長のプライマーの位置を示している。
(Nucleic Acids Research⁷⁾に掲載された図を改変し, 許可を得て掲載)

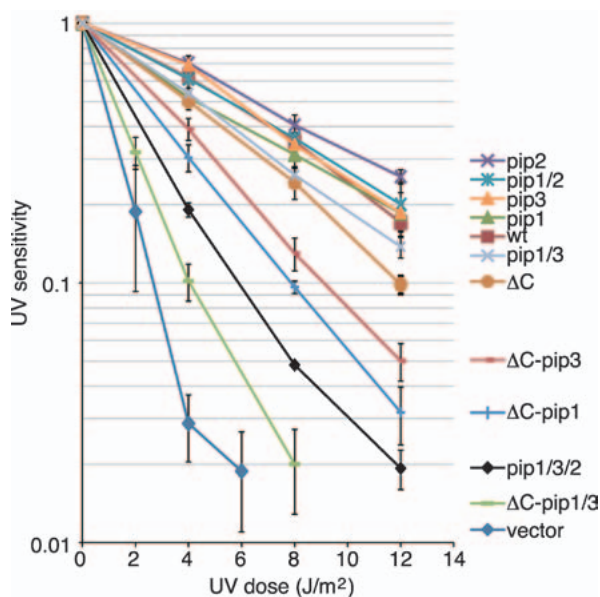


図5 DNAポリメラーゼ及びその変異体を発現する遺伝子によるXP-V細胞の紫外線感受性の相補性試験

XP-V細胞にそれぞれの遺伝子を導入し安定発現株を樹立した後、図で示した線量の紫外線を照射し、見かけ上の生存率を測定した。ΔCは図3の(A)で示したようにC末端側を欠失した変異体を示している。

(Nucleic Acids Research⁷⁾に掲載された図を改変し、許可を得て掲載)

現させて、紫外線感受性がどの程度回復するかを調べた。その結果、3つのPIPとUBZの内、どれか2つがあれば、紫外線感受性を大幅に回復できるが、どれか1つでは十分に回復することができず、DNAポリメラーゼ η の機能が十分に発揮されないことがわかった(図5)⁷⁾。これらの結果から、モノユビキチン化PCNAとDNAポリメラーゼ η との相互作用がDNAポリメラーゼ η のDNA伸長反応を局所的に促進することにより、ヒト細胞の紫外線耐性に寄与していると考えられる。

おわりに

DNAポリメラーゼ η は紫外線DNA損傷の乗り越えDNA合成だけでなく、シスプラチンなどの抗がん剤による損傷DNAの乗り越えDNA合成にも寄与している。実際に、DNAポリメラーゼ η が欠損したXP-V細胞はシスプラチンに高感受性であることから、DNAポリメラーゼ η の特異的な阻害剤はシスプラチンの効果を高める薬剤候補の一つである。DNAポリメラーゼ η の制御

メカニズムに関する新しい知見は、DNAポリメラーゼ η の分子標的阻害剤の開発に貢献するものと期待している。

謝辞

本稿で紹介した研究の大部分は環境医学研究所益谷央豪教授のもとで、一部は前職の広島大学原爆放射線医科学研究所神谷研二教授のもとで、科研費の補助を受けて実施した。DNAポリメラーゼ η の細胞内での機能解析は、環境医学研究所ゲノム動態制御分野金尾梨絵助教が行った研究である。放射線同位体は広島大学原爆放射線医科学研究所と名古屋大学アイソトープ総合センターにおいて使用した。関係者各位に感謝いたします。

参考文献

- 1) Masutani, C., Araki, M., Yamada, A., Kusumoto, R., Nogimori, T., Maekawa, T., Iwai, S. and Hanaoka, F. (1999) Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity. *EMBO J*, **18**, 3491-3501.
- 2) Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K. and Hanaoka, F. (1999) The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature*, **399**, 700-704.
- 3) Masutani, C., Kusumoto, R., Iwai, S. and Hanaoka, F. (2000) Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase η . *EMBO J*, **19**, 3100-3109.
- 4) Matsuda, T., Bebenek, K., Masutani, C., Hanaoka, F. and Kunkel, T.A. (2000) Low fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase η . *Nature*, **404**, 1011-1013.
- 5) Biertumpfel, C., Zhao, Y., Kondo, Y., Ramon-Maiques, S., Gregory, M., Lee, J.Y., Masutani, C., Lehmann, A.R., Hanaoka, F. and Yang, W. (2010) Structure and mechanism of human

- DNA polymerase η . *Nature*, **465**, 1044-1048.
- 6) Masuda, Y., Suzuki, M., Piao, J., Gu, Y., Tsurimoto, T. and Kamiya, K. (2007) Dynamics of human replication factors in the elongation phase of DNA replication. *Nucleic Acids Research*, **35**, 6904-6916.
- 7) Masuda, Y., Kanao, R., Kaji, K., Ohmori, H., Hanaoka, F. and Masutani, C. (2015) Different types of interaction between PCNA and PIP boxes contribute to distinct cellular functions of Y-family DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, **43**, 7898-7910.