

報告番号	※ 甲 第 10590 号
------	---------------

## 主論文の要旨

論文題目 Analysis of UV-induced DNA Damage Response  
by Gene Technology  
(紫外線によるDNA損傷応答反応の遺伝子工学的研究)

氏名 柘植真亜沙

### 論文内容の要旨

細胞は紫外線 (UV)、放射線、化学物質などの外部刺激、あるいは活性酸素などの内部刺激により常に DNA に損傷を受けている。生体内にはそのような様々な DNA 損傷に対応した複数の修復機構が備わっているおかげで健康が保たれている。従って DNA 修復機構に欠陥があった場合、DNA 上の損傷を正しく修復できず、転写やそれに続く翻訳、DNA 複製ができない、あるいは変異を誘発して、細胞老化、癌、アポトーシスなどを引き起こしてしまう。

DNA 修復機構に関与する遺伝子の欠陥は重篤な遺伝病の原因となる。その1つが色素性乾皮症(XP)であり、UV による損傷を修復する修復因子に異常がある。この修復因子が関与する修復機構はヌクレオチド除去修復(NER)とよばれ、チミンダイマーなど、DNA を歪曲させるような損傷を修復する機構である。これまでNERの大まかなメカニズムは解明されてきた。しかしながら、30以上ものタンパク質が関与すると報告されている中で、複合体同士の関連性等の詳細は定まっておらず、現在も世界中で研究が進んでいる。

このように、多種のタンパク質が関与する複雑な修復機構は、タンパク質翻訳後修飾によって制御されていることが多い。近年では特に、ユビキチン化、SUMO化、ポリADPリボシル化が注目されている。これらがタンパク質間相互作用やタンパク質の安定化を制御したり、さらにこれらの翻訳後修飾が損傷の目印となり、修復因子だけでなく、凝縮したクロマチンを弛緩する役割を担うリモデリング因子や、細胞周期チェックポイント因子などを呼び寄せることで、効率の良いDNA修復が可能になっている(第1章)。

本研究では、NER機構で始めに損傷を認識するタンパク質DDB2と翻訳後修飾であるSUMO化のNERへの影響と、リモデリング因子BRG1の転写制御について報告する。

## 第2章：SUMOylation of damaged DNA-binding protein DDB2

私達が日常浴びている UV によって、細胞は常に DNA に損傷を受けている。その損傷は NER という DNA 修復機構によって修復される。NER の修復遺伝子が欠損していたり遺伝子に変異を持っている XP 患者は、紫外線による DNA 損傷を修復できないため、多くの患者は皮膚がんになりやすい。XP の原因遺伝子は 7 つあり (XPA~APG)、中でも DDB2 (XPE) に着目した。この修復因子は XPC と共に DNA 損傷を最初に認識し、結合して損傷部位に他の修復因子を呼び寄せる働きがある。DDB2 はこれまで様々な翻訳後修飾を受けることが分かっているが、翻訳後修飾同士の関連性などは明らかになっていない。DDB2 複合体自身はユビキチン化酵素活性を持っており、そのユビキチン化活性が修復機構において重要な役割を担っていることが報告されている。具体的には、DDB2 複合体は DNA 損傷に結合すると XPC 複合体を損傷部位に呼び寄せ、同時に DDB2、XPC と周囲のヒストンをユビキチン化する。ポリユビキチン化 DDB2 は分解、ポリユビキチン化 XPC は損傷 DNA との結合能の増大、ユビキチン化ヒストンはクロマチンの弛緩に必要であると言われている。一方、DDB2 のポリ ADP リボシル化はリモデリング因子の損傷部位への呼び寄せに必要であると報告されている。さらに私達は新たに DDB2 が SUMO 化されることと、その重要性を示した。SUMO 化はユビキチンに似たタンパク質修飾で、NER で SUMO 化が重要であることは酵母の研究から明らかになっている。しかし NER での DDB2 の SUMO 化とその重要性は報告がなかった。私達は以下の実験を行い、DDB2 の SUMO 化を示した。タグ付き DDB2 を恒常的に発現する HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌由来細胞) に UV を当て、変性条件下の免疫沈降法で DDB2 を落とし、DDB2 の SUMO 化をウェスタンブロッティングにより確認したところ、UV 照射後 5 分という早い段階から DDB2 の SUMO 化が観察でき、30 分でピーク最大となった。次に、ロックダウンの系により DDB2 の SUMO 化酵素を同定したところ、PIASy が主に UV 依存的に DDB2 に結合し、SUMO 化していることが明らかになった。また、DDB2 と PIASy との結合や DDB2 の SUMO 化はいずれもクロマチン上 (DNA 上) で起こっており、このことは DDB2 が UV 依存的に損傷を認識した後に起こっていることを示している。次に、PIASy が実際に NER に関わっているか免疫染色法により確認したところ、DDB2 や DNA 損傷との共局在が確認できた。さらに PIASy をロックダウンした細胞では、2 種類ある DNA 損傷のうち (CPD, 6-4PP)、CPD の修復効率のみを減少させた。in vitro では 6-4PP の修復には DDB2 がなくてもよく、一方 CPD の修復には DDB2 が不可欠であることから、この結果は、PIASy による DDB2 の SUMO 化が CPD の修復を促進していることを示唆している。

## 第3章： Implication of SUMO E3 ligases in nucleotide excision repair

第2章では損傷認識タンパク質 DDB2 の SUMO 化の重要性を示した。近年、DNA 修復因子の SUMO 化の重要性が注目されている。DNA 二本鎖切断の修復機構では、ほとんどの修復因子が SUMO 化を受け、SUMO を介したタンパク質間相互作用が効率的な修復に必要であると報告されている。これまで NER における SUMO 化についてもいくつか報告されているが、修復効率への寄与に関しては酵母での報告のみであり、PIAS family である SIZ1,2 が NER に重要な酵素であると言われている。ヒトでは、もう 1 つの損傷認識タンパク質 XPC とその複合体サブユニットである centrin-2 が SUMO 化を受けることが報告されているが、XPC の SUMO 化の意義は定まっておらず、centrin-2 に関しては UV 依存性が報告されていない。さらにそれらの SUMO 化酵

素も不明なままである。第3章では、ヒト細胞を用いてNERにおけるSUMO化酵素の重要性を示した。NERにSUMO化が重要であることを示すため、HeLa細胞にUVを当て、クロマチン上のタンパク質のSUMO化をウエスタンブロットティングにより確認したところ、UV依存的にSUMO化が増えた。典型的なSUMO化酵素は6つあり、PIAS family (PIAS1, PIAS2, PIAS3, PIASy)、Pc2、RanBP2が知られている。PIASy以外の5つをノックダウンし、UVによるDNA損傷である6-4PPとCPDの修復効率をELISA法により測定した。Pc2のノックダウンはPIASyと同様に、CPDの修復効率のみを減少させたが、PIAS1のノックダウンは6-4PPとCPDのどちらの修復にも影響があった。第2章でも述べたように、CPDの修復のみに重要性を示したPc2は、DDB2に影響があると考えられるが、DDB2に対するSUMO化活性は確認できていない。PIAS1は6-4PPとCPDの両方に寄与していることから、XPCよりも下流で働くNER因子のSUMO化を担っていることが考えられた。PIAS1がどのようにNERに寄与しているのか、今後の研究が期待される。

#### 第4章：Constitutive expression of the *brg1* gene requires GC-boxes near to the transcription start site

クロマチンを弛緩させるリモデリング因子の代表である、SWI/SNF複合体は、生物間でとても保存されている。中でも重要なサブユニットであるBRG1、BRMはATPase活性を持つ。SWI/SNF複合体は2種類あり、BAFとPBAF複合体が挙げられる。BAF複合体はBRG1またはBRMのどちらか一方を含んでいるが、PBAF複合体はBRG1のみを含んでいる。このように異なる複合体を形成しているが、BRG1とBRMの機能の違いに関しては不明な点が多い。以前の報告から、BRG1とBRMは異なる転写制御を受けており、未分化細胞と分化した細胞では発現量が異なっていた。BRG1は細胞を問わず常に発現しているのに対し、BRMは分化した細胞で特異的に発現していた。以前の研究結果より、BRMの転写制御領域が1.5 kbに及ぶのに対し、BRG1は100 bpで最大活性を示した。また、BRMがTATAボックスを持つのに対し、BRG1は基本転写因子の典型的な結合サイトが見られない。そこで第4章では*brg1*遺伝子の転写制御について報告した。*brg1*遺伝子のプロモーター解析をするにあたり、TFSEARCHプログラムを用いて結合する転写因子を予測したところ、Sp3/3の結合領域が4カ所(転写開始点前後で2カ所ずつ)、YY1は1カ所挙げられた。さらにChIPアッセイにより、Sp3とYY1が確かに*brg1*のプロモーター領域に結合することが分かった。*brg1*転写開始点付近でSp3の結合領域を1つずつ削り、転写に重要な領域をルシフェラーゼアッセイにより確認したところ、転写開始部位より上流の2カ所が転写活性に重要であることが示された。そのうち1カ所はSp3ではなく、YY1が結合していることが確認された。YY1の結合配列に1塩基変異を入れると*brg1*の転写活性が下がったことから、YY1は*brg1*の転写に必要であることが分かった。Sp3とYY1をそれぞれノックダウンした場合、いずれもBRG1のタンパク質量は減少したことから、Sp3とYY1はどちらも*brg1*の転写を促進していることを示すことができた。Sp3とYY1が*in vivo*, *in vitro*で結合することと、ルシフェラーゼアッセイの結果から、2者は協調的に働くことが示唆された。また、Sp3とYY1は基本転写因子TBPと結合できることから、Sp3とYY1はプロモーター領域に基本転写因子を呼び寄せ、*brg1*の転写を活性化していることが予想できる。

近年、DNA修復機構の解明が世界中で盛んに行われており、その成果をもとに、

DNA 修復タンパク質をターゲットとした分子標的薬が開発されている。以上の結果は NER に対して新たな見解を示したものであり、今後のメカニズム解明や創薬に貢献できると考える。