

2005年5月6日

独立行政法人理化学研究所
独立行政法人科学技術振興機構

紫外線による遺伝子の傷を修復するために働く新たなメカニズムを発見

- 皮膚がんの予防に向けて新たな可能性 -

◇ポイント◇

- 色素性乾皮症の欠損因子である XPC 複合体と UV-DDB が協力して働く修復メカニズムを解明
- 紫外線による DNA 損傷を効率よく修復するにはユビキチン化が重要
- 皮膚がんの予防法の開発への応用も期待される

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）と独立行政法人科学技術振興機構（JST、沖村憲樹理事長）は、細胞が紫外線によって DNA に発生した損傷を効率よく見つけ出し、修復するために働く新たなメカニズムを解明しました。理研中央研究所花岡細胞生理学研究室および JST 戦略的創造研究推進事業チーム型研究（CREST タイプ）「ゲノムの構造と機能」研究領域（研究総括：大石道夫）における研究テーマ「ゲノム情報維持の分子メカニズム」の研究代表者の花岡文雄主任研究員、菅澤薫副主任研究員らと、大阪大学大学院生命機能研究科、東京都臨床医学総合研究所などとの共同研究による成果です。

ヒトの遺伝病である色素性乾皮症（XP）^{※1}の患者は、紫外線による DNA 損傷を修復する機構に異常があるため、皮膚がんを非常に起こしやすいとされています。XP 患者で欠損が見られる XPC タンパク質複合体^{※2}と紫外線損傷 DNA 結合因子（UV-DDB）は、いずれも紫外線による DNA 損傷に結合する性質があり、最初に損傷を見つけて出して修復を開始するメカニズムに関わっています。

今回研究グループは、紫外線によって DNA 損傷が発生すると UV-DDB に結合しているユビキチン・リガーゼが活性化され、XPC タンパク質と UV-DDB 自身がそれぞれユビキチン化^{※3}されることを見出しました。このユビキチン化によって両者の DNA 損傷に対する結合性に変化が起こり、UV-DDB から XPC 複合体に損傷が受け渡されることによってスムーズに修復反応が開始されることが明らかになりました。

今後、このメカニズムを詳細に調べることによって、病気の治療だけでなく、本来細胞が持つ DNA 修復活性を高めることで皮膚がんの予防につながられる可能性も考えられます。

本研究成果は、米国の科学雑誌「Cell」（5月6日付）に掲載されます。

1. 背景

細胞に紫外線が当たると、ピリミジン塩基（シトシンまたはチミン）が2個連続した場所で特徴的な DNA 損傷が発生します（図1）。このような損傷は、ヌクレオチド除去修復（NER、図2）と呼ばれる機構によって元通りに修復されます。色素性乾皮症（XP）の患者ではこの修復機構が遺伝的に欠損しているため、皮膚細胞が

日光にさらされた時にできる DNA 損傷を十分修復することができません。そのため、XP 患者は非常に皮膚がんを起こしやすいことが知られています。つまり、NER は私たちを皮膚がんから守ってくれる重要な防御機構として働いているのです。

DNA 修復では、巨大なゲノム DNA に発生した損傷をどうやって効率よく見つけ出すか、その最初のステップが重要な鍵を握っています。ヒトの NER でこの過程に必要な不可欠なのが、XP の原因遺伝子産物の一つである XPC タンパク質を含む複合体です。研究グループの菅澤 薫副主任研究員らは、XPC 複合体が紫外線による損傷だけでなく、化学物質などが塩基に結合することによって発生する様々な DNA 損傷を認識して、特異的に結合する性質を持つことをこれまで明らかにしてきました。一方、紫外線損傷に対して XPC 複合体よりもさらに強力に結合できる別の因子として、UV-DDB (UV-damaged DNA-binding protein) が以前から知られていました (図 3)。UV-DDB は DDB1 と DDB2 の 2 つのサブユニットからなる複合体で、DDB2 は XP の原因遺伝子産物の一つ (XPE) です。UV-DDB は NER に必ずしも必須ではありませんが、XPC 複合体による損傷の認識を補助することで修復を促進するものと考えられてきました。しかし、実際に XPC 複合体と UV-DDB の機能がお互いにどのように関わっているのかについては、これまでわかっていませんでした。

2. 研究手法と成果

今回研究グループは、ヒトの培養細胞に紫外線を照射した時に XPC タンパク質の一部がユビキチン化されることにより、電気泳動上の移動度が遅くなることに気づきました (図 4 左)。タンパク質のユビキチン化に関する研究は 2004 年のノーベル化学賞の授賞対象にもなりましたが、近年さらに、生物の様々な機能の調節に重要な役割を果たしていることが急速に明らかになっています。特にユビキチン化の機能としては、タンパク質を分解に導く引き金となることがよく知られていますが、実験を重ねた結果、XPC タンパク質の場合はユビキチン化されても分解されるわけではなく、時間が経つと脱ユビキチン化されて再び元の状態に戻ることがわかりました。

この XPC タンパク質のユビキチン化を様々な細胞を使って調べたところ、興味深いことに DDB2 の異常により UV-DDB が欠損している E 群 XP 患者由来の細胞やチャイニーズ・ハムスター由来の細胞ではユビキチン化が起こらないことがわかりました (図 4 右)。これらの細胞に正常なヒト DDB2 遺伝子を導入すると XPC タンパク質のユビキチン化も回復したことから、UV-DDB が XPC タンパク質のユビキチン化に必要であることが明らかになりました。

さらに、XPC 複合体と UV-DDB が直接物理的に相互作用することが、抗体を使った共沈降実験によってはじめて示されました。

一方、UV-DDB が細胞内において、ユビキチンをタンパク質に結合させるのに必要な酵素の一つであるユビキチン・リガーゼ (E3) と複合体を形成していることが 2003 年に報告されていました。研究グループはこの UV-DDB-E3 複合体を精製し、試験管の中で XPC タンパク質のユビキチン化を再現することに成功しました。この時 XPC タンパク質だけでなく、DDB2 も同時にユビキチン化されることがわかりました。次に、XPC 複合体と UV-DDB、それぞれの DNA 損傷に対する結合が、ユビキチン化によってどのような影響を受けるかを解析しました。その結果、DDB2

がユビキチン化されると UV-DDB はもはや DNA 損傷に結合できなくなるのに対して、XPC 複合体はユビキチン化されても依然として DNA 結合能を保持していることがわかりました。さらに、試験管内で紫外線損傷の NER 反応を行ったところ、UV-DDB を反応系に加えた場合に限り、ユビキチン化を阻害することによって修復反応も阻害されてしまうことが明らかになりました。

細胞内で発生した紫外線損傷を長大なゲノム DNA の中から効率よく見つけるには、損傷に対して非常に強力に結合する性質を持つ UV-DDB のような因子が有利です。損傷に結合した UV-DDB はタンパク質間相互作用によって XPC 複合体を呼び寄せると考えられますが、両者の損傷に対する結合力に大きな差があるため、そのままでは XPC 複合体が UV-DDB と入れ替わることができず、結果として修復反応を先に進めることができません (図 5 右)。今回の結果は、ユビキチン化によって UV-DDB と XPC 複合体の DNA 損傷に対する結合の強さが逆転することを示しており、ユビキチン化の助けを借りることで XPC が UV-DDB と入れ替わることが可能になると考えられます (図 5 左)。このようなメカニズムによって損傷が UV-DDB から XPC 複合体にスムーズに受け渡され、修復反応が開始されることがわかったと同時に、ユビキチン化の機能としても従来知られていない新たな側面が明らかになりました。

3. 今後の展開

オゾン層の破壊などにより、紫外線による皮膚がんの発生が人類にとって今後大きな脅威となる可能性があります。紫外線による DNA 損傷を修復するメカニズムを理解することにより、XP などの病気の治療にとどまらず、本来正常な細胞が持つ修復活性をさらに高めることによって皮膚がんの予防につながられるかも知れません。例えば、今回新たに見出した UV-DDB と XPC とのタンパク質間相互作用、あるいは UV-DDB に依存したユビキチン化を促進するような化合物や因子が見つけれれば、それを皮膚がんの予防薬として応用できる可能性もあると期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

中央研究所 花岡細胞生理学研究室

副主任研究員 菅澤 薫

Tel : 048-467-9532 / Fax : 048-462-4673

独立行政法人科学技術振興機構 戦略的創造事業本部

研究推進部 研究第一課 佐藤 雅裕

Tel : 048-226-5635 / Fax : 048-226-1164

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 色素性乾皮症(xeroderma pigmentosum: XP)

ヒトの常染色体性劣性遺伝疾患で、皮膚の露光部での様々な光線過敏症状、特に皮膚がんの発症を特徴とする。現在までに *XPA*、*XPB*、*XPC*、*XPD*、*DDB2 (XPE)*、*XPF*、*XPG*、*XPV* の 8 種類の原因遺伝子が同定されており、このうち *XPV* を除く 7 種類の遺伝子はいずれもヌクレオチド除去修復機構に関わるタンパク質をコードしている (図 1)。

※2 XPC タンパク質複合体

XPC 遺伝子がコードする XPC タンパク質は、出芽酵母の Rad23p に相同性を持つ HR23 タンパク質、および centrin 2 と結合したヘテロ三量体として細胞内で存在している。XPC タンパク質は DNA 損傷に結合する活性を担っており、この複合体が損傷部位に結合することがその後の修復反応には必須である。

※3 ユビキチン化

タンパク質の翻訳後修飾の一種で、76 個のアミノ酸からなるユビキチンのカルボキシル末端が、別のタンパク質のリジン残基側鎖のアミノ基とイソペプチド結合により枝分かれ状に結合したもの。ユビキチンが 1 分子だけ結合する場合 (モノユビキチン化) と、ユビキチンにさらにユビキチンが結合することによって鎖状に伸長する場合 (ポリユビキチン化) がある。

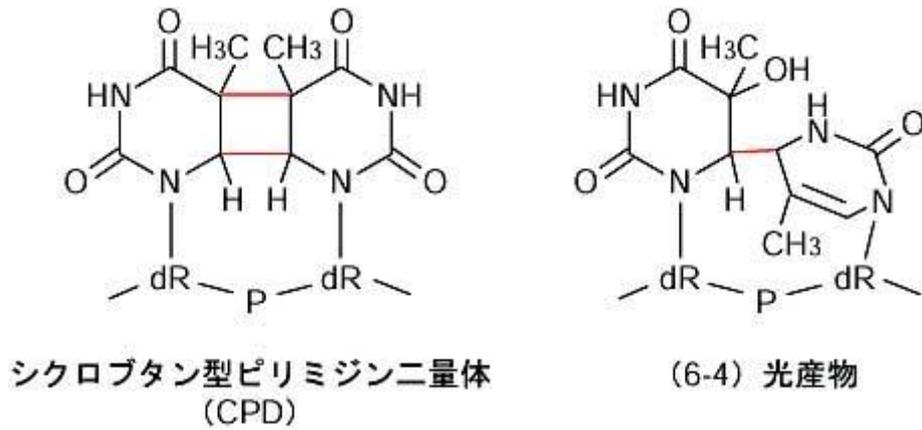


図1 紫外線によって発生する代表的な DNA 損傷

同一の DNA 鎖内で連続した 2 個のピリミジン塩基（シトシンまたはチミン）が、共有結合によって二量体を形成する（ここではチミン二量体の化学構造を示した）。このような損傷が生じると、DNA 複製や転写の妨げとなり、細胞死や突然変異、染色体の不安定化など、様々な弊害を細胞にもたらす。dR：デオキシリボース残基 P：リン酸基

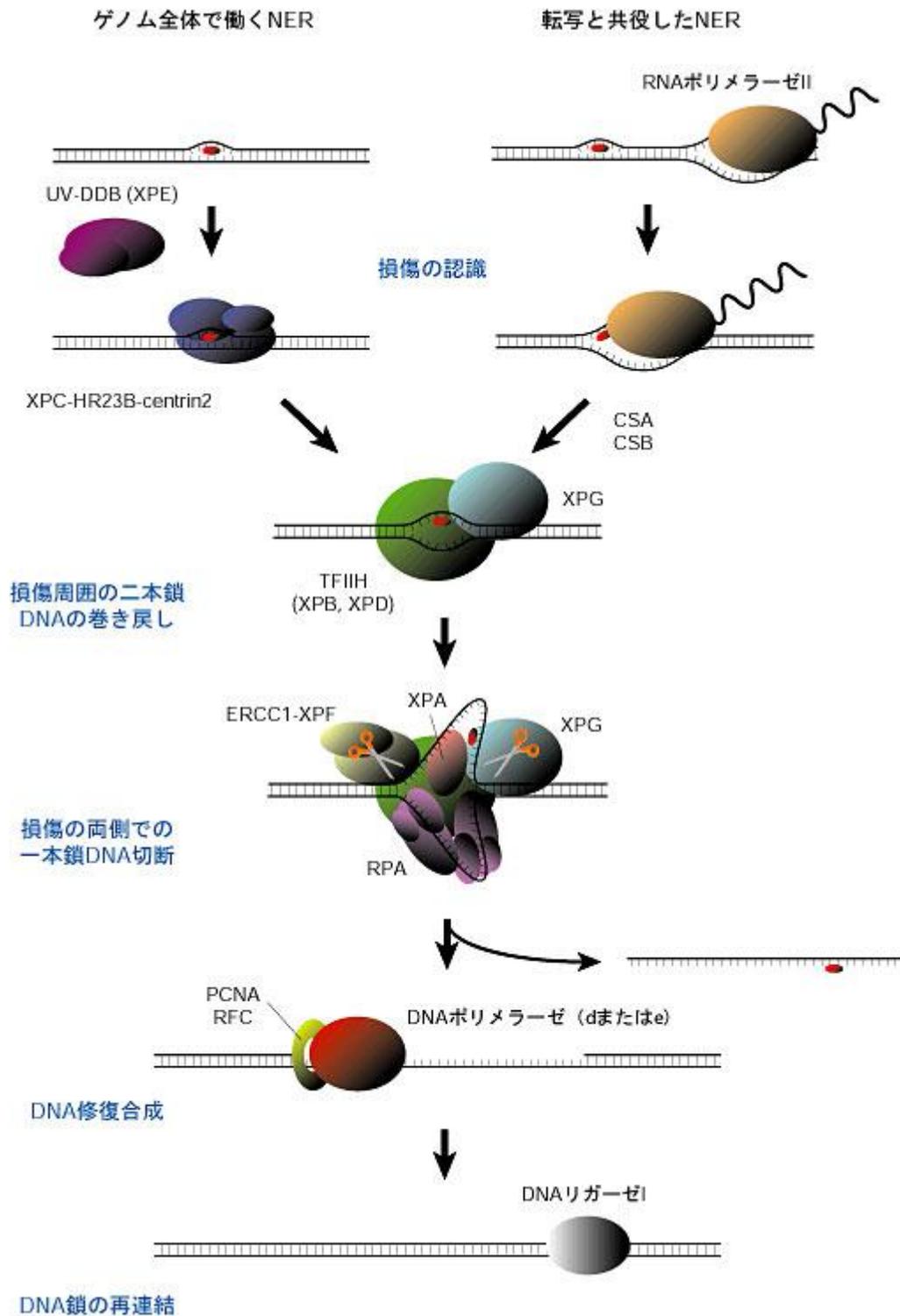


図2 哺乳類ヌクレオチド除去修復の反応機構のモデル

哺乳類のヌクレオチド除去修復には、ゲノム全体を対象とする修復と転写と共役した修復という2種類の経路が存在する。このうち前者においては、XPCタンパク質複合体がDNA損傷に結合することがその後の修復反応に必須である。

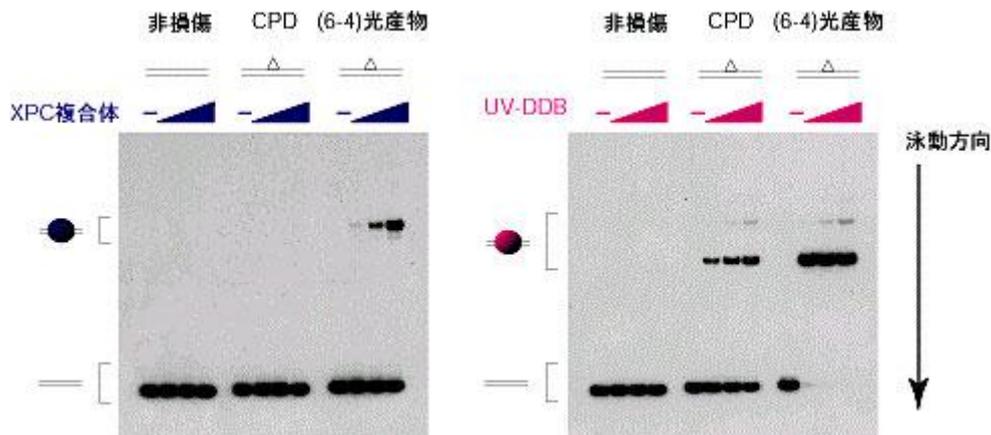


図3 紫外線損傷に対する XPC 複合体と UV-DDB の結合性の比較

代表的な紫外線損傷である CPD、および (6-4) 光産物 (図 1) を 1 個含む DNA を用いて、ゲルシフト法により XPC 複合体と UV-DDB の結合を調べた。UV-DDB の方が XPC 複合体よりも損傷認識能力が圧倒的に高いことがわかる。

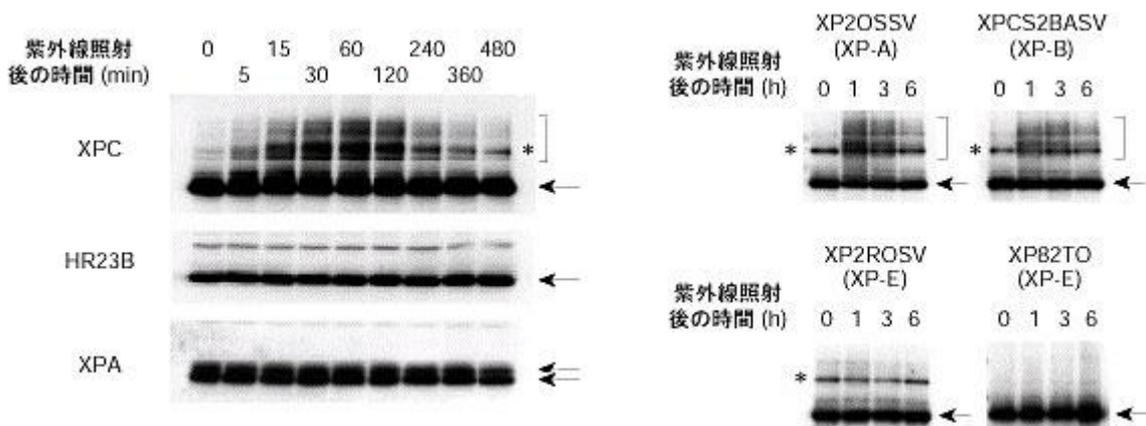


図4 細胞の紫外線照射に伴う XPC タンパク質のユビキチン化

左：ヒトの培養細胞株 (WI38 VA13) に紫外線 (10 J/m²) を照射した後、経時的に細胞抽出液を作成し、そこに含まれる XPC タンパク質をイムノブロッティングによって検出した。照射後 1 時間程度をピークとして、ユビキチン化による移動度の遅い複数のバンドが出現している。HR23B や XPA タンパク質では、同様の修飾は見られない。

右：XP 患者由来の細胞を使って、左と同様の実験を行った。XPA や XPB に欠損を持つ細胞 (上段) では正常細胞と同様に XPC のユビキチン化が起こるのに対して、UV-DDB を欠損した XP-E 群細胞 (下段) では応答が見られない。矢印は通常の泳動度を示す未修飾タンパク質のバンド、括弧はユビキチン化された XPC タンパク質のバンド、星印は抗体と交差反応する非特異的なバンドをそれぞれ示す。

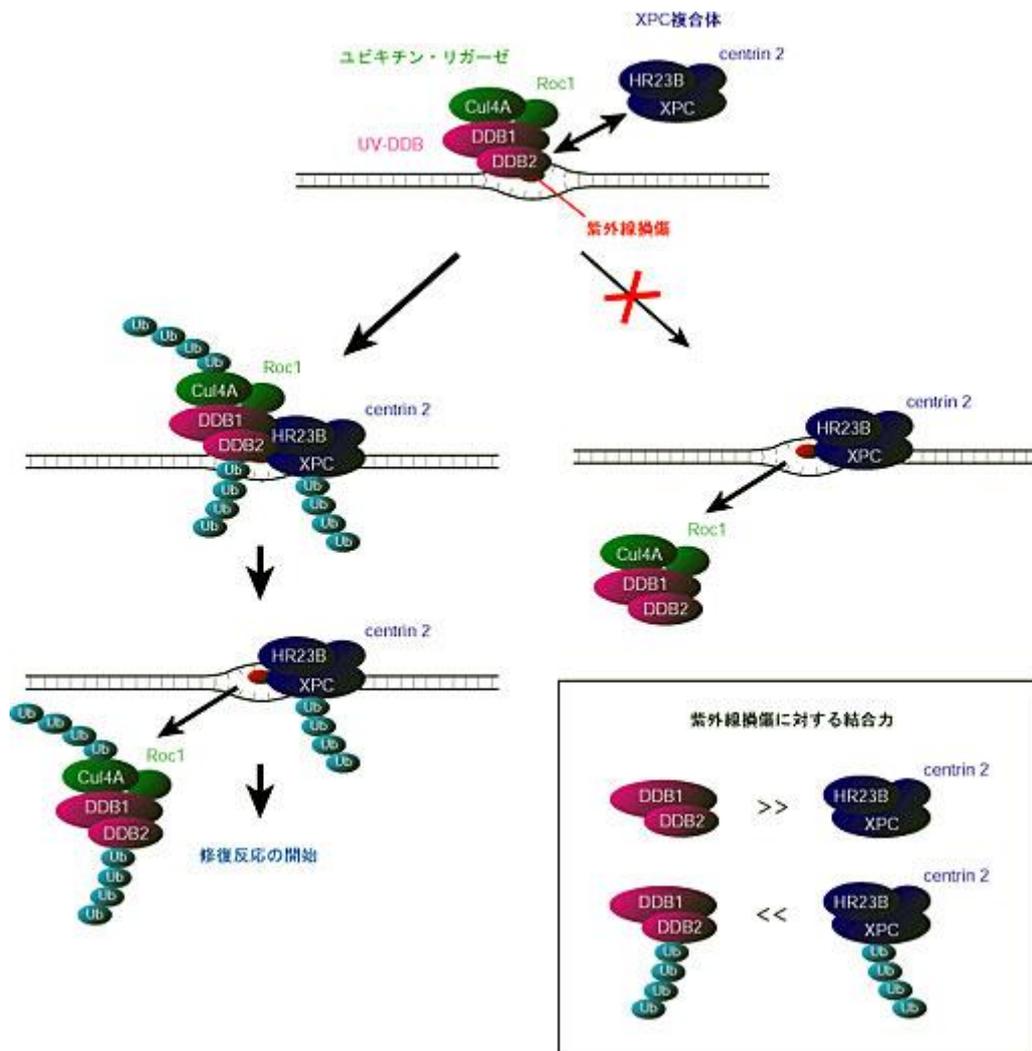


図5 ヌクレオチド除去修復の損傷認識過程におけるユビキチン化の役割