

研究題目：天然変性領域を介した DNA 損傷認識機構の解明

神戸大学バイオシグナル総合研究センター 日下部 将之

1. 研究の背景・目的

生体内の様々な生命活動を担っているタンパク質は、20 種類のアミノ酸が多様な順番で繋がった一本のポリペプチドである。一般的に、タンパク質は自身のアミノ酸配列に応じて折りたたまれて特定の「立体構造」を形成し、酵素活性の獲得やパートナー分子との相互作用効率を上昇させることが知られている。一方で、真核生物においては特定の立体構造を形成しない「天然変性領域」と呼ばれるアミノ酸配列を持つタンパク質が全体の約 30% 存在することが知られている。特に、細胞核はゲノム DNA を収納する重要な細胞小器官であるが、核内に局在するタンパク質は多くが天然変性領域を保有することが知られており、遺伝子発現や DNA 複製、DNA 損傷の修復といったゲノム DNA の機能発現において天然変性領域が重要な寄与をする可能性が示唆されている。しかしながら、天然変性領域とパートナー分子との相互作用機構や生物学的意義は、未だに全容は明らかにされていない。

一方、生物のゲノム DNA は紫外線、電離放射線、活性酸素などの外的・内的ストレスに曝されて常に DNA 損傷が発生しており、これらを修復するために生物は様々な DNA 損傷修復機構を備えている。この中でもヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair : NER) は、紫外線によって誘発される DNA 損傷や変異原性物質によって生じる DNA 付加体など、主に環境因子に由来する様々な DNA 損傷を修復する生体防御機構である。NER は損傷認識因子である XPC が損傷部位と相互作用することによって、修復反応が開始される (図 1)。この損傷認識のステップは、XPC と DDB2 という二種類の DNA 結合タンパク質が関与することが知られている。XPC は DNA 損傷そのものではなく、損傷によって生じる遊離した塩基と相互作用する立体構造を有しており、このユニークな生化学的性質によって多様な DNA 損傷の存在を認識することが可能である。一方、DDB2 は紫外線によって誘発される損傷を直接認識する立体構造を有しており、XPC の損傷認識を補助する働きがあると考えられている (図 1)。これらの因子と DNA 損傷との相互作用様式は詳細に解明されている一方で、真核生物のゲノム DNA はヒストンなどの核内タンパク質と結合したクロマチン構造という高度に凝縮した構造を形成して核内に収納されている (図 1)。一般的に、クロマチン構造は DNA 損傷と損傷認識因子の相互作用を阻害すると考えられており、高次クロマチン構造中に発生した損傷がどのように認識されているかは未だに不明な点が多い。特に、DDB2 を欠損した細胞においても多くの DNA 損傷は修復されることが知られており、DDB2 とは独立した XPC の補助機構があると考えられているが、この機構の全貌はほぼ不明である (図 1)。

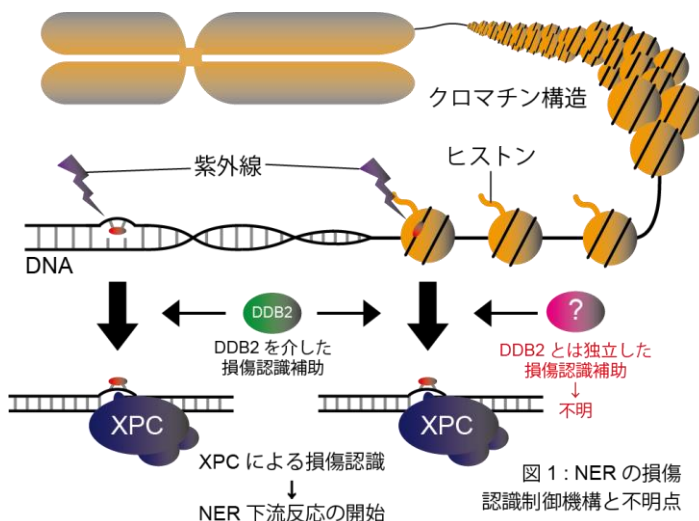
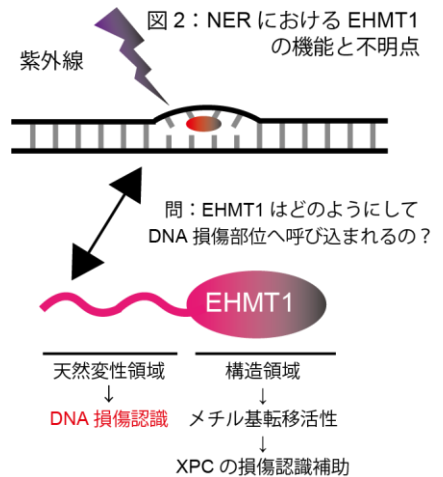


図 1)。この損傷認識のステップは、XPC と DDB2 という二種類の DNA 結合タンパク質が関与することが知られている。XPC は DNA 損傷そのものではなく、損傷によって生じる遊離した塩基と相互作用する立体構造を有しており、このユニークな生化学的性質によって多様な DNA 損傷の存在を認識することが可能である。一方、DDB2 は紫外線によって誘発される損傷を直接認識する立体構造を有しており、XPC の損傷認識を補助する働きがあると考えられている (図 1)。これらの因子と DNA 損傷との相互作用様式は詳細に解明されている一方で、真核生物のゲノム DNA はヒストンなどの核内タンパク質と結合したクロマチン構造という高度に凝縮した構造を形成して核内に収納されている (図 1)。一般的に、クロマチン構造は DNA 損傷と損傷認識因子の相互作用を阻害すると考えられており、高次クロマチン構造中に発生した損傷がどのように認識されているかは未だに不明な点が多い。特に、DDB2 を欠損した細胞においても多くの DNA 損傷は修復されることが知られており、DDB2 とは独立した XPC の補助機構があると考えられているが、この機構の全貌はほぼ不明である (図 1)。

我々はこれまで、生細胞イメージングを主軸として XPC の損傷認識を制御する分子機構の解析を行い、XPC の損傷認識を促進する新規因子としてヒストンタンパク質などにメチル化修飾を導入するメチル基転移酵素の一種である EHMT1 を見出した。EHMT1 には C 末端側にメチル基転移活性を持つ構造領域、N 末端側には機能が不明である天然変性領域が存在するが、これまでの解析により EHMT1 は DNA 損傷部位に呼び込まれた後にヒストンへメチル化修飾を導入することで XPC の損傷認識を補助することが示唆された (図 2)。一方興味深いことに、EHMT1 は構造領域ではなく天然変性領域を介して DNA 損傷が発生した領域へ呼び込まれることが観察された (図 2)。

この結果から、一部の天然変性領域には DNA 損傷部位に集積する性質があることが示唆されたが、天然変性領域がどのような機構で損傷部位に呼び込まれるかは不明であった。そこで、我々は EHMT1 をモデルとして天然変性領域が DNA 損傷部位へ集積するユニークな性質を明らかにすることを目的として、細胞生物学的・生化学的手法を組み合わせた解析を実施した。



2. 実験方法

(1) 細胞生物学的解析

我々はこれまでに、細胞核内の任意の領域に紫外線誘発 DNA 損傷を誘導するシステムと生細胞イメージングを組み合わせることで、目的タ

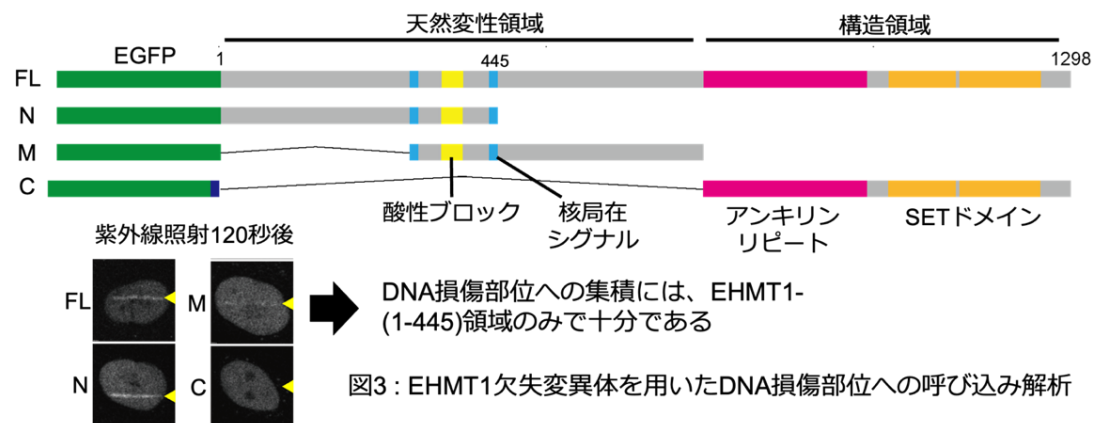


図3: EHMT1欠失変異体を用いたDNA損傷部位への呼び込み解析

ンパク質が DNA 損傷部位に呼び込まれる過程を可視化する独自の実験系を確立していた (Kusakabe et al., *Genes Environ.* 41:2, 2019)。そしてこのシステムを用いることで、緑色蛍光タンパク質 EGFP を融合した EHMT1 が DNA 損傷部位に 2 分以内に集積する様子が観察された (図 3)。さらに、EHMT1 のアミノ酸配列を欠失させた変異体を作製し損傷部位への呼び込みに必要十分なアミノ酸配列を探索した結果、損傷部位への集積には EHMT1 の N 末端側の 1-445 番目までの天然変性領域のみで十分であることを見出された (図 3)。そこで、EHMT1-(1-445)のアミノ酸をさらに削った欠失変異体や EHMT1 と約 65%の相同性を有するホモログの EHMT2 の N 末端領域を発現させ、これらが DNA 損傷部位に呼び込まれるか比較した。また併行して、EGFP を融合した EHMT1-(1-445)をゲノム編集により XPC、DDB2 遺伝子を破壊したヒト骨肉腫由来の U2OS 細胞に発現させ、EHMT1 の DNA 損傷部位への集積が XPC や DDB2 に依存するか解析した。

(2) 生化学的解析

EGFP を融合した EHMT1-(1-445)は、2 分以内の比較的短時間のうちに DNA 損傷部位に集積したことから、EHMT1-(1-445)と紫外線誘発 DNA 損傷は直接相互作用する可能性が考えられた。そこで、両者が直接相互作用するか生化学的に解析するため、昆虫細胞のタンパク質大量発現系を用いて EHMT1-(1-445)および EHMT2-(1-361)の組み換えタンパク質を発現・精製した。これらの精製タンパク質と磁気ビーズに固定した DNA を用いることによって、天然変性領域と DNA との相互作用をプルダウンアッセイにより評価した。

3. 実験結果

(1) 細胞生物学的解析

● EHMT1 の DNA 損傷部位への集積には、NLS と酸性ブロックが重要である

EHMT1-(1-445)のアミノ酸配列を欠失させた様々な欠失変異体を EGFP 融合タンパク質として野生型 U2OS 細胞に発現させ、損傷部位への集積に十分な領域を探索した結果、EHMT1 の N 末端側領域のうち酸性アミノ酸に富んだ

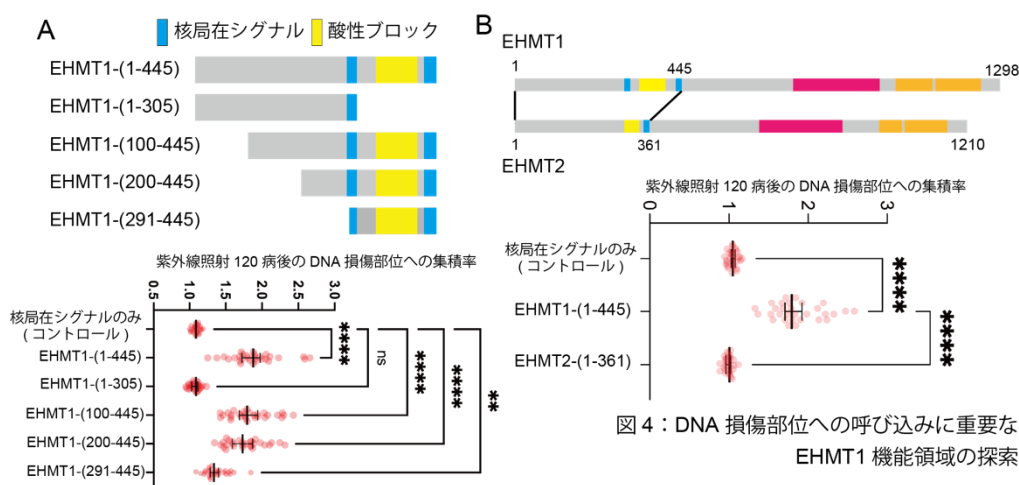


図4：DNA 損傷部位への呼び込みに重要な EHMT1 機能領域の探索

酸性ブロックという領域と二つの核局在シグナルが重要であることが見出された (図 4A)。一方で、EHMT1 のホモログである EHMT2 の相同領域 (EHMT2-(1-361)) を EGFP 融合タンパク質として発現させたところ、この領域では DNA 損傷部位への呼び込みは観察されなかったため、DNA 損傷部位への集積は EHMT1 の天然変性領域が有する特異な性質であることが示唆された (図 4B)。これらの結果を総合的に考えると、N 末端側から核局在シグナル-酸性ブロック-核局在シグナルのように配置されたペプチド配列が、DNA 損傷部位への呼び込みに重要であることが示唆された。

・ EHMT1 の DNA 損傷部位への呼び込みはポリ ADP-リボースポリメラーゼ (PARP) により制御される

野生型 U2OS 細胞および DDB2 と XPC の両遺伝子をゲノム編集により破壊した U2OS 二重破壊細胞 (DKO) に対して、EGFP-EHMT1-(1-445)を発現させ生細胞イメージングを実施したところ、DNA 損傷部位への集積が観察されたことから EHMT1 は DNA 損傷認識因子である DDB2 や XPC には依存せずに損傷部位へ呼び込まれることが示された (図 5)。さらに、これら DNA 損傷認識因子とは独立し

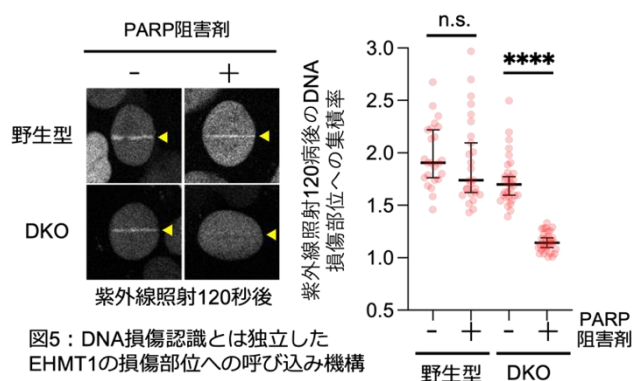


図5：DNA損傷認識とは独立した EHMT1の損傷部位への呼び込み機構

た EHMT1 の損傷部位への呼び込みがどのような因子によって制御されているか明らかにするため、DNA 損傷修復に参与する酵素の様々な阻害剤を処理した後に生細胞イメージングを行なった。この結果興味深いことに、DNA 損傷部位近傍のタンパク質に多数の ADP リボースを付加するポリ ADP-リボースポリメラーゼ (PARP) という酵素の機能を阻害することによって、DKO における EHMT1-(1-445)の損傷部位への呼び込みがほぼ見られなくなることが見出された (図 5)。

(2) 生化学的解析

(1)の解析を通して、DNA 損傷部位への呼び込みは EHMT2 では見られない、EHMT1 の天然変性領域の特異的な性質であることが示された。そこで EHMT1-(1-445)と EHMT2-(1-361)の組み換えタンパク質を調製し、生化学的性質を比較することで、EHMT1 の損傷部位への集積機構の詳細に迫れると考えた。まず、昆虫細胞のタンパク質大量発現系を用いて EHMT1-(1-445)と EHMT2-(1-361)の組み換えタンパク質を精製した (図 6A)。次に、EHMT1-(1-445)を用いて DNA プルダウンアッセイ

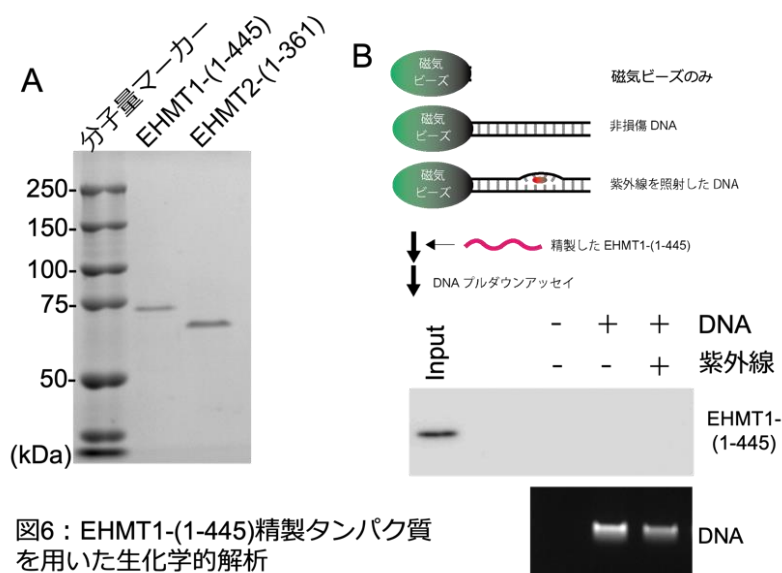


図6：EHMT1-(1-445)精製タンパク質を用いた生化学的解析

を行い、紫外線誘発 DNA 損傷の有無によって DNA への結合が上昇するか解析を行なった。しかし残念ながら、紫外線照射によって DNA への結合上昇は観察されなかった (図 6B)。一方で(1)の結果を踏まえると、EHMT1-(1-445)は DNA 損傷そのものではなく、DNA 損傷部位に付加される ADP リボースと相互作用する可能性の方が高いと考えられた。今後は、本研究において調製が達成された EHMT1-(1-445)と EHMT2-(1-361)の精製タンパク質を用いて、ADP リボースに対する相互作用の生化学的解析を行うことで、詳細な機能解明ができると期待される。

4. 結論・考察

本研究の結果より、以下の知見が得られた。

- EHMT1 の天然変性領域に存在する「核局在シグナル-酸性ブロック-核局在シグナル」という領域が DNA 損傷部位への集積に重要である
- EHMT1 は DNA 損傷認識因子に依存せずに損傷部位に呼び込まれ、これは PARP により制御される核局在シグナルはインポートと呼ばれるタンパク質因子と相互作用することによりタンパク質の細胞核への局在を制御する機能があるが、アミノ酸の組成のみに注目すると塩基性アミノ酸が集積していることが知られている。近年、天然変性領域中には塩基性アミノ酸 (リジン、アルギニン) に富んだ塩基性ブロック、酸性アミノ酸 (アスパラギン酸、グルタミン酸) に富んだ酸性ブロックが存在し、両者はお互いに相互作用することで天然変性領域同士の相互作用効率が上昇することが報告されている。したがっ

て、EHMT1 の損傷部位への集積に重要な領域は、「塩基性ブロック-酸性ブロック-塩基性ブロック」という塩基性アミノ酸、酸性アミノ酸が顕著に偏って存在するユニークな領域であると考えられた。重要なことに、ADP リボースは全体では酸性の電荷に偏っているものの、分子内には塩基性と酸性の性質を持つ官能基を有している。これらの実験結果と知見より、損傷部位に多数の ADP リボースが付加されることによって、EHMT1 の天然変性領域中の塩基性ブロック、酸性ブロックと相互作用が可能な「ADP リボースの足場」が形成されることで、EHMT1 は損傷部位に集積する可能性を現段階では考えている（図 7）。一方、PARP は DNA 二本鎖切断や DNA 一本鎖切断などの DNA 損傷と相互作用することによって活性化され、損傷部位近傍のタンパク質に多数の ADP リボースを付加することが知られているが、紫外線誘発損傷など NER の対象となる損傷によって活性化するかは詳細には解明されていない。今後は、EHMT1 に加え PARP にも着目した解析を実施することによって、DNA 損傷部位に集積する天然変性領域の性質やその制御機構、そして生理的意義を明らかにすることが期待される。

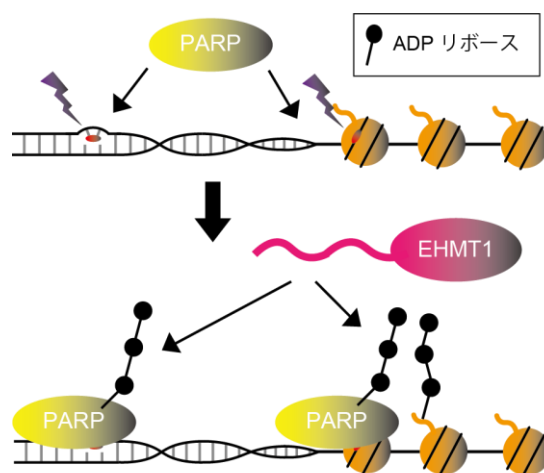


図 7：天然変性領域を介した EHMT1 の DNA 損傷部位への呼び込み機構

5. 謝辞

本研究は、川西記念新明和教育財団の助成を受け実施されました。心より感謝申し上げます。

6. 研究成果

口頭発表（国内学会）

- 1) ○日下部将之、綿田瑞希、前田拓海、各務恵理菜、藤原叶枝、乙部瑞貴、酒井 恒、横井雅幸、菅澤 薫、ヌクレオチド除去修復の損傷監視制御におけるヒストン修飾の役割、第 41 回染色体ワークショップ・第 22 回核ダイナミクス研究会 2024 年 1 月 29 日
- 2) ○日下部将之、前田拓海、綿田瑞希、藤原叶枝、各務恵理菜、乙部瑞貴、酒井 恒、横井雅幸、菅澤 薫、ゲノム全体を対象としたヌクレオチド除去修復の損傷認識を制御するクロマチン動態、第 46 回日本分子生物学会年会 2023 年 12 月 7 日
- 3) ○日下部将之、前田拓海、綿田瑞希、各務恵理菜、乙部瑞貴、藤原叶枝、菅澤 薫、ゲノム全体を対象としたヌクレオチド除去修復の損傷認識制御におけるヒストン修飾の役割、日本放射線影響学会 第 66 回大会 2023 年 11 月 7 日
- 4) ○日下部将之、前田拓海、綿田瑞希、各務恵理菜、菅澤 薫、ヌクレオチド除去修復の損傷認識制御におけるヒストン修復の役割、第 27 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2023 年 6 月 6 日