



DDB2の翻訳後修飾を介したゲノム損傷応答ネットワーク制御

松本, 翔太

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2015-09-25

(Date of Publication)

2017-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6497号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006497>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

DDB2 の翻訳後修飾を介した
ゲノム損傷応答ネットワーク制御

神戸大学大学院理学研究科

101S320S

松本 翔太

目次	p. 1
要旨	p. 2
<u>第一章</u>	
略語	p. 4
序論	p. 5
実験材料と実験手法	p. 8
実験結果	p. 17
考察	p. 26
参考文献	p. 58
<u>第二章</u>	
略語	p. 60
序論	p. 61
実験材料と実験手法	p. 64
実験結果	p. 69
考察	p. 72
参考文献	p. 84
謝辞	p. 86
研究業績	p. 87

【要旨】

哺乳類のヌクレオチド除去修復 (NER) において、紫外線により DNA 損傷が生じると、まず DDB1-DDB2 複合体 (UV-DDB) が損傷を認識して結合した後、NER 反応の開始に必須である XPC 複合体がリクルートされる。一方、UV-DDB は細胞内で CUL4 ユビキチンリガーゼと複合体を形成しており、紫外線照射に伴って DDB2 と XPC がポリユビキチン化される。無細胞系において DDB2 がポリユビキチン化されると DNA 損傷結合能が失われる一方、ユビキチン化 XPC は損傷結合能を保持するため、ユビキチン化を介した DDB2 から XPC への損傷受け渡しモデルが提唱されている。その後、DDB2 はプロテアソームにより分解される一方、XPC は脱ユビキチン化を受けるが、DDB2 の分解や XPC の可逆的ユビキチン化の生物学的意義については不明な点が多く残されている。

本研究で私はさまざまな変異 DDB2 をヒト正常線維芽細胞において安定発現することにより、DDB2 の N 末端領域の欠失およびリジン残基の変異が、DNA 修復活性とは独立して細胞の紫外線感受性に影響を与えることを見出した。変異 DDB2 の細胞内動態を調べた結果から、N 末端領域に存在する 7 か所のリジン残基が、プロテアソームに依存した DDB2 の紫外線誘導性分解に必要であることがわかった。精製タンパク質を用いて再構成した試験管内ユビキチン化反応系により、これら 7 か所のリジン残基が DDB2 におけるユビキチン化の主な標的であることを確かめるとともに、C 末端側の β -プロペラ領域においても少なくとも 5 か所のリジン残基がユビキチン化されうることを見出した。N 末端領域の 7 か所のリジン残基に加えて、同定された β -プロペラ領域のリジン残基をさらにアルギニンに置換することで、ユビキチン化抵抗性の変異 DDB2 を作成し、これをヒト正常線維芽細胞内で安定発現したところ、紫外線誘発 DNA 損傷の修復に遅延が見られた。

一方、紫外線照射に伴う内在性 DDB2 タンパク質の動態を改めて調べたところ、正常細胞と比較して XPC 欠損細胞における DDB2 の紫外線誘導性分解が有意に速いことを見出した。XPC 欠損細胞における DDB2 の分解は、野生型 XPC タンパク質の発現レベルに依存して抑制されることから、XPC が DDB2 の紫外線誘導性分解を負に制御していることが示された。さらに、試験管内ユビキチン化反応系を用いた実験から、XPC が DDB2 のユビキチン化を競合的に阻害することがわかった。以上の結果から、XPC が適切に損傷部位へリクルートされれば、XPC が優先的にユビキチン化の標的となることで DDB2 は分解を

免れ、これにより新たな DNA 損傷を認識して修復反応を開始できるのではないかと考えている。

DDB2 が何らかの因子との相互作用を介して紫外線に対する細胞応答に関わっている可能性を考え、二重タグを融合した DDB2 を安定発現する HeLa 細胞抽出液から、タグを利用したアフィニティクロマトグラフィーによりタンパク質複合体を単離・精製した。複合体構成成分の質量分析の結果より、DDB2 相互作用因子として RUVBL2 と PKM2 を含む多数の因子を同定した。siRNA を用いて RUVBL2 を発現抑制したところ、細胞が紫外線感受性を示すとともに、紫外線誘発 DNA 損傷の修復速度に低下が見られた。RUVBL2 はさまざまなクロマチンリモデリング複合体のサブユニットとして機能することが報告されており、DDB2 が RUVBL2 を介して損傷部位周辺のヌクレオソームの状態を変化させることで、NER 反応の促進に寄与している可能性が考えられる。

第一章

【略語】

ABC	ammonium bicarbonate
ACN	acetonitrile
BPB	bromophenol blue
BSA	bovine serum albumin
CHX	cycloheximide
CPD	cyclobutane pyrimidine dimer
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
GGR	global genome repair
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
NEM	<i>N</i> -ethylmaleimide
NER	nucleotide excision repair
NP-40	Nonidet P-40
PBS	phosphate-buffered saline
Pipes	piperazine-1,4-bis (2-ethanesulfonic acid)
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	polyvinylidene difluoride
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TCR	transcription-coupled repair
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
UV-DDB	UV-damaged DNA-binding protein
XP	xeroderma pigmentosum
β -ME	β -mercaptoethanol
6-4PP	pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct

【序論】

生物のゲノムは、紫外線や化学物質などによる外的要因、または活性酸素種といった内的要因により絶えず損傷を受けている。損傷が放置されると複製エラーが誘発されることによる突然変異、転写の停止による細胞死などが生じ、結果としてがんをはじめとする重大な疾患が引き起こされる。生物にはこれに対する防御メカニズムとして損傷を取り除く機構が複数備わっており、ヌクレオチド除去修復 (NER) は幅広い損傷を取り除くことが出来る重要な修復機構の一つである。

NER は、紫外線によって生じる主な損傷であるシクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD)、ピリミジン・ピリミドン (6-4) 光産物 (6-4PP) に加えてシスプラチンなどによって生じる DNA 鎖内架橋や種々の化学物質による付加体など、広範な DNA 損傷を対象とする修復機構である (1-3)。NER 欠損を原因とする疾患の例として、色素性乾皮症 (XP)、コケイン症候群、硫黄欠乏症毛髪発育異常症などが知られている。特に XP は皮膚がんの高発を主な特徴とし、一部の症例では神経変性疾患を併発する劣性遺伝病であり、DNA 修復欠損疾患の代表例として研究が進められて来た。古くから細胞融合を用いた相補性テストが行われ、これまでに XP-A 群から G 群、およびバリエーション (V) 群の 8 種類の遺伝的相補性群が同定されている。

哺乳類の NER では、転写の鋳型鎖上の損傷を取り除く転写と共役した NER (TCR) と、ゲノム全体の損傷を対象とした NER (GGR) の二つの副経路が存在することが知られている (4-5)。GGR においては修復開始因子である XPC-RAD23-centrin-2 複合体が損傷部位に結合することで修復反応が開始される (6-7)。その後、TFIIH と XPA が損傷部位へリクルートされ、TFIIH のサブユニットである XPB と XPD のヘリカーゼ活性により DNA が一本鎖に巻き戻される (8)。次に損傷を含まない方の DNA 鎖に RPA が結合することで一本鎖 DNA をヌクレアーゼから保護する一方、損傷鎖側では XPG と XPF-ERCC1 が持つ構造特異的エンドヌクレアーゼ活性によって損傷の両端で一本鎖切断が起こり、約 30 塩基からなるオリゴヌクレオチドが切り出される (9-12)。最後に生じた一本鎖ギャップが DNA ポリメラーゼによって埋め戻されることで修復反応が完了する (13)(図 1)。

精製タンパク質と損傷 DNA との結合能を調べた無細胞系実験において、XPC は DNA 二重鎖に対して比較的大きな歪みを引き起こす 6-4PP に対しては結合

出来るが、DNA 二重鎖に対して引き起こす歪みが比較的小さい CPD に対してはほとんど結合出来ないことが示されている。一方、XP-E 群の原因遺伝子産物である DDB2/XPE は細胞内では DDB1 とヘテロ二量体を形成して DDB1-DDB2 複合体 (UV-DDB) として存在している。UV-DDB は紫外線損傷に対して特に強く結合する性質を持っており、XPC 複合体がほとんど結合出来ない CPD に対しても結合出来ることが示されている (14)。また、これらの損傷の修復速度も異なっており、6-4PP は速やかに修復されるが、約 3 倍の頻度で生じる CPD の修復速度は 6-4PP と比較して遅いことがわかっている (15)。XP-E 群患者由来細胞では CPD がほとんど修復されないことが示され、DDB2 は CPD 損傷修復に必要であることが見出された。しかしながら DDB2 の CPD 修復促進効果は精製タンパク質を用いた無細胞系では未だに再現されておらず、CPD 損傷修復のメカニズムに関しては解明されていない点が多い。

細胞内の CPD 修復反応は UV-DDB から XPC に受け渡されることで開始されると考えられている。まず UV-DDB が CPD を認識して結合し、その後 XPC 複合体をリクルートする。一方で UV-DDB は細胞内において CUL4-RBX1 と結合してユビキチンリガーゼとして働き、紫外線照射に伴って DDB2 と XPC をポリユビキチン化する。DDB2 はポリユビキチン化されることで損傷結合能を失うことが無細胞系で見出されており、当研究室ではポリユビキチン化を介した DDB2 から XPC への損傷受け渡しモデルを提唱している (16)。その後 XPC は脱ユビキチン化を受ける一方、DDB2 はプロテアソームによって分解されることが見出されているが、XPC の可逆的なポリユビキチン化、および DDB2 が分解される意義に関しては不明な点が多く残されている (図 2)。

ヒト DDB2 は 432 アミノ酸からなり、X 線結晶構造解析から損傷部位への結合を担い、WD40 リピートを含む C 末端側の β -プロペラ領域、DDB1 との結合を担い helix-loop-helix 構造を取る中間領域、N 末端側にある特定の立体構造を取らないテール領域からなることが示された (17)(図 3)。一方、共免疫沈降実験によって DDB2 がヒストンアセチル化酵素 CBP/p300 と相互作用することが報告されており、DDB2 がクロマチンリモデリング因子と協調して働く可能性が指摘されている (18)。当研究室で行われた先行研究で、 ^{14}C 標識したアセチル CoA を基質として、精製した DDB2 と CBP/p300 による無細胞アセチル化反応が行われた結果、少なくとも無細胞系ではヒストンだけでなく、DDB2 自身が CBP/p300 によりアセチル化されることが見出された。一方、無細胞アセチル

化反応を行った DDB2 を質量分析により解析した結果、DDB2 の N 末端から 40 番目までのアミノ酸領域 (以下 DDB2 N 末端領域と呼ぶ) に含まれる 7 か所のリジン残基がアセチル化部位として同定された。N 末端領域の 7 か所のリジン残基をアルギニンに置換した変異 DDB2 では、アセチル化がほとんど起こらなかったことから、DDB2 は主に N 末端領域を標的としてアセチル化を受けることが見出された (未発表データ)。

このような先行研究の結果から、私は DDB2 の N 末端領域が細胞内でもアセチル化やユビキチン化の標的となっており、N 末端領域の翻訳後修飾を介して DDB2 の機能が制御されているのではないかと考えた。本章では DDB2 の N 末端領域における翻訳後修飾が担う役割を解析するため、N 末端領域のリジン残基にさまざまな変異を導入した DDB2 を、ヒト正常線維芽細胞 (WI38 VA13) において安定発現した。安定発現した変異 DDB2 が細胞の紫外線感受性や損傷修復速度に与える影響、および変異 DDB2 の細胞内動態を調べた。続いて、XPC のユビキチン化と DDB2 の分解の生物学的意義を調べるために、XP-C 群患者由来細胞 (XP4PASV) を親株として、正常な XPC を相補することで DDB2 の紫外線照射に伴う挙動にどのような影響を与えるかを調べた。

【実験材料と実験手法】

プラスミドコンストラクト

pBluescript II KS (+) (pBS: Stratagene) に FLAG タグを融合した DDB2 の cDNA が組み込まれたコンストラクト、および N 末端に FLAG タグを融合した DDB1 (FLAG-DDB1) タンパク質をコードする cDNA を、pFastBacDual ベクター (Life Technologies) のポリヘドリンプロモーター下流に組み込んだコンストラクト (pFastBacDual/FLAG-DDB1) は西良太郎博士 (現・立命館大学) に供与して頂いた。pBS に、DDB2 の N 末端領域のリジン残基全てをアルギニン (HA-DDB2-N7KR)、あるいはグルタミン (HA-DDB2-N7KQ) に置換した HA タグ融合変異型 DDB2 を組み込んだコンストラクトは放射線医学総合研究所・安田武嗣博士に供与して頂いた。

pBS にクローニングされたヒト DDB2 コーディング領域を鋳型として二種類のプライマー (DDB2-NdeI #1, #2: 表 1) を用いて PCR を行い、N 末端側に *NdeI* 認識配列、C 末端側に *SpeI* 認識配列が付加された N 末端領域欠失変異 DDB2 (DDB2-NdeI) をコードする PCR 産物を得た。この PCR 産物を、制限酵素 *EcoRV* (Takara Shuzo) で切断した pBS につなぎ、pBS/DDB2-NdeI を作成した。さらに上記の *NdeI* サイトを利用して N 末端に HA タグを融合した DDB2-NdeI の cDNA を含むコンストラクト (pBS/HA-DDB2-NdeI) を作成した。pBS にクローニングされた HA-DDB2-NdeI、HA-DDB2-N7KR、HA-DDB2-N7KQ の cDNA をそれぞれ制限酵素 *HindIII* と *SacI* で切り出し、発現ベクター pIREShyg の *BamHI* サイトに平滑末端ライゲーションにより挿入した。この pIREShyg/HA-DDB2-NdeI を鋳型とし、4 種類のプライマー (K146/151R, K187R, K233R, K278R: 表 1) と QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technology) を用いて 146、151、187、233、278 番目のリジンをすべてアルギニンに置換することで、pIREShyg/HA-DDB2-NdeI/BP5KR を作成した。

精製タンパク質

UV-DDB、XPC-RAD23B、centrin-2 は参考文献 (16) に従って精製されたものを西良太郎博士より供与していただいた。CUL4A-RBX1 は参考文献 (17) に従って精製されたものをフリードリッヒ・ミーシャー生物医学研究所・Nicolas H.

Thomä 博士から供与していただいた。

変異 DDB2 を含む UV-DDB の精製

大腸菌内で自律複製するバキュロウイルスゲノム DNA (bacmid) の作成は Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Life Technologies) を用いて行った。pFastBacDual ベクターのポリヘドリンプロモーター下流に FLAG-DDB1、p10 プロモーター下流に DDB2-NdeI をそれぞれ組み込んだコンストラクトを作成し、ヒートショック法により大腸菌 DH10Bac (Life Technologies) に導入した。形質転換した大腸菌を 50 µg/ml kanamycin、7 µg/ml gentamicin、10 µg/ml tetracycline、100 µg/ml Bluogal、40 µg/ml IPTG を含む LB 寒天培地にまき、白色コロニーを単離した。目的の bacmid を含む大腸菌クローンを 50 µg/ml kanamycin、7 µg/ml gentamicin、10 µg/ml tetracycline を含む LB 液体培地 100 ml 中で培養し、GenoPure プラスミドミディキット (Roche) を用いて bacmid DNA を精製した。精製した bacmid を Cellfectin Reagent (Life Technologies) と無血清培地 Grace's Insect Medium (Life Technologies) を用いて昆虫細胞 Sf9 に導入した。5 時間後に 10% 非働化 FBS を含む TNM-FH (Sigma) に培地を交換し、27°C で 7 日間培養した。細胞をかき集め 3,000 rpm で 10 分間遠心後、上清を一代目のウイルス溶液とした。昆虫細胞 High Five (150 mm dish 20 枚、80% confluency) の培地を吸引により除いた後、ディッシュ 1 枚あたりウイルス溶液 2 ml を加え、27°C で 2 時間感染させた (15 分に一度震盪した)。23 ml の EX-CELL405 培地 (Sigma) を加えた後、さらに 2 日間培養し、タンパク質を発現させた。この感染細胞をディッシュからかき取り、1,000 rpm で 10 分間遠心して集めた後、40 ml の PBS (-) で 2 回洗浄した。これを 0.3 M NaCl を含む NP lysis buffer [25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1% NP-40, 0.25 mM PMSF (Sigma), 1 µg/ml leupeptin (Roche), 2 µg/ml aprotinin (Roche), 1 µg/ml pepstatin (Roche), 50 µg/ml Pefabloc SC (AEBSF: Roche)] 80 ml で懸濁し、8,000 rpm で 20 分間遠心することで得られる上清を粗抽出液とした。可溶性画分を Buffer A [20 mM sodium phosphate (pH 7.8), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 0.25 mM PMSF, 1 mM DTT] に対して透析後 (Spectra/Por® 7 Membrane、MWCO: 8,000、Spectrum Laboratories)、35,000 rpm で 20 分間遠心 (Beckman 50.2 Ti ローター) して得られた上清を精製に用いた。上清を 0.1 M NaCl を含む Buffer B [20 mM sodium phosphate (pH 7.8), 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.01%

Triton X-100, 0.25 mM PMSF, 1 mM DTT] で平衡化した HiPrep Heparin FF 16/10 (GE Healthcare) カラムに通し、NaCl 濃度を 0.45 M、1 M と段階的に上げるにより溶出した。UV-DDB は 0.45 M NaCl 溶出画分に回収された。続いて、抗 FLAG M2 抗体アガロースビーズ (Sigma) を詰めた Tricorn 5/50 カラム (GE Healthcare) を 0.3 M NaCl を含む Buffer B で平衡化し、Heparin カラムから溶出された UV-DDB タンパク質を含む画分を通した。溶出は 100 µg/ml の FLAG ペプチド (Sigma) と 0.3 M NaCl を含む Buffer B で行い、1 ml ずつ分画した。次に UV-DDB を含む画分を、0.1 M NaCl を含む Buffer C [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.01% Triton X-100, 0.25 mM PMSF, 1 mM DTT] で平衡化した HiTrap Q カラム (1 ml、GE Healthcare) に通した。NaCl の直線濃度勾配 (0.1 M→0.6 M) により溶出し、1 ml ずつ分画した。UV-DDB は 0.34 M NaCl 付近で溶出された。全ての変異 DDB2 を含む UV-DDB も同様の方法で精製した。

E1 酵素 (His-UBA1) の精製

Bac-to-Bac Baculovirus Expression System を用いて昆虫細胞内で発現し、下記の方法で精製されたものを菅澤薫教授より供与していただいた。昆虫細胞 High Five の粗抽出液の調製は UV-DDB 精製時と同じ方法で行った。可溶性画分を Phosphate buffer [5 mM potassium phosphate (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, 20 mM KCl, 10% glycerol, 0.25 mM PMSF, 1 mM DTT] に対して透析後 (Spectra/Por® 7 Membrane、MWCO: 8,000)、35,000 rpm で 20 分間遠心 (Beckman 50.2 Ti ローター) して得られた上清を精製に用いた。上清を 20 mM KCl を含む Buffer F [5 mM potassium phosphate (pH 7.0), 10% glycerol, 0.01% Triton X-100, 0.25 mM PMSF, 1 mM β-ME] で平衡化した HiPrep DEAE FF (5 ml: GE Healthcare) カラムに通し、KCl 濃度を 0.5 M に上げて溶出した。続いて、ニッケルイオンを予め結合しておいた HiTrap Chelating HP (1 ml: GE Healthcare) カラムを 5 mM imidazole を含む Buffer D [5 mM potassium phosphate (pH 7.0), 0.3 M NaCl, 10% glycerol, 0.01% Triton X-100, 0.25 mM PMSF, 1 mM β-ME] で平衡化し、溶出された画分を通した。溶出は 20 mM, 100 mM, 250 mM imidazole を含む Buffer D で段階的に行った。His-UBA1 は 20 mM と 100 mM imidazole を含む画分に主に溶出された。次に His-UBA1 を含む画分を、0.1 M NaCl を含む Buffer C で平衡化した Mono Q

HR 5/5 カラム (GE Healthcare) に通した。NaCl の直線濃度勾配 (0.1 M→0.5 M) により溶出した。His-UBA は 0.2 M NaCl 付近で溶出された。

抗体

抗 XPC 抗体は N 末端のアミノ酸配列に相当する合成ペプチド (19)、抗 RAD23B 抗体はタンパク質全長を抗原 (20) としてウサギの免疫を行い、得られた抗体をアフィニティ精製したものをを用いた。抗 CUL4A 抗体 (H-66) と抗 laminB1 抗体 (C-20) は Santa Cruz、抗 DDB2 抗体は R&D Systems、抗 HA 抗体 (3F10) は Roche、抗 DDB1 抗体は BD Transduction Laboratories、抗 6-4PP 抗体 (64M-2) と抗 CPD 抗体 (TDM-2) はコスモバイオからそれぞれ購入した。

細胞培養

ヒト正常線維芽細胞 WI38 VA13、XP-C 群患者由来細胞 XP4PASV は 10% FBS を加えた DMEM 培地 (ニッスイ) を用い、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。昆虫細胞 High Five は EX-CELL 405 培地を用い、27°C で培養した。

HA タグを融合した DDB2 安定発現細胞株の樹立

ヒト正常線維芽細胞 (WI38 VA13) (プラスミド 1 種類につき 100 mm dish 1 枚分) をトリプシン処理によって回収し、それぞれ 250 μ l の DMEM/10% FBS 培地に懸濁した。pIRESHyg に HA-DDB2、HA-DDB2-Ndel、HA-DDB2-N7KR、HA-DDB2-N7KQ、HA-DDB2-Ndel/BP5KR をそれぞれ組み込んだコンストラクト 20 μ g を制限酵素 *Xho*I 処理により直鎖状にした。これをそれぞれ細胞懸濁液に添加したものをエレクトロポレーション用キュベット (電極間距離 0.2 cm、Bio-Rad) に移した。エレクトロポレーション装置 (Gene Pulser II、Bio-Rad) を用いて、120 V、1,070 μ F の条件下で細胞に DNA を導入した後、室温で 10 分間静置した。この細胞懸濁液を 8 ml の培地で希釈した後、予め培地を 6 ml 入れた 100 mm dish 4 枚に 2 ml ずつ分注した。37°C で 24 時間培養した後、200 μ g/ml の hygromycin B (Life Technologies) を含む培地と交換し、細胞の選択を行った。3 日おきに hygromycin B 入りの培地を交換し、約 2 週間培養を続けた後に、コロニーを単離した。

ELISA 法によるゲノム DNA 中の損傷の定量

DNA 複製による損傷の希釈を避けるため、まず細胞を 6 mM thymidine (和光純薬) で 2 時間処理した。その後、6-4PP を測定する場合は 10 J/m²、CPD を測定する場合は 2 J/m² 紫外線を照射し、さらに 6 mM thymidine 存在下、さまざまな時間培養した細胞のゲノム DNA を QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) を用いて精製した。コントロールとして紫外線非照射細胞のゲノム DNA を同様に調製した。分光光度計 (GeneQuant 1300、GE Healthcare) を用いて波長 260 nm の吸光度から DNA 濃度を算出し、PBS (-) で 6 µg/ml に希釈した後、95°C で 10 分間 DNA の変性処理を行い、氷上で 20 分静置した。硫酸プロタミンでコートした 96 穴マイクロタイタープレートに各サンプルにつき 6 ウェルずつ、各ウェルあたり 300 ng (6-4PP 測定時) または 50 ng (CPD 測定時) のゲノム DNA を分注した。37°C で一晩インキュベートし、DNA をプレートに乾燥付着させた。乾燥させたプレートを PBS-T (0.05% Tween 20 を含む PBS: 150 µl/well) で 5 回洗浄した後、PBS (-) で希釈した 2% FBS (150 µl/well) を分注し、37°C で 30 分間ブロッキングを行った。PBS-T (150 µl/well) による洗浄を 5 回行い、6-4PP または CPD と特異的に反応するモノクローナル抗体 [抗 6-4PP 抗体: PBS (-) で 5,000 倍希釈、抗 CPD 抗体: PBS (-) で 3,000 倍希釈] と 37°C で 30 分間反応させた。PBS-T (150 µl/well) で 5 回洗浄を行い、ビオチン標識抗マウス IgG 二次抗体 [PBS (-) で 5,000 倍希釈] と 37°C で 30 分間反応させた。PBS-T (150 µl/well) で 5 回洗浄を行い、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン [PBS (-) で 10,000 倍希釈] と 37°C で 30 分間反応させた。PBS-T (150 µl/well) で 5 回洗浄を行った後、citrate-phosphate buffer (50 mM citric acid, 50 mM Na₂HPO₄) で 1 回洗浄を行った。その後、基質溶液 (0.4 mg/ml *o*-phenylene diamine、0.006% H₂O₂、citrate-phosphate buffer に溶解) を 100 µl ずつ分注し、37°C で 30 分間反応させた。2 M H₂SO₄ を 50 µl ずつ加えることにより反応を停止し、490 nm の吸光度を iMark マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) を使用し測定した。

細胞抽出液調製

細胞を氷上に移し氷冷した PBS (-) で洗浄後、0.3 M NaCl を含む CSK バッファー [10 mM Pipes-NaOH (pH 6.8), 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1% Triton X-100, 33.3% sucrose, 10 mM NEM (和光純薬), 0.25 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin, 50 µg/ml Pefabloc SC

(AEBSF)] を細胞量に応じて加え、氷上にて 1 時間インキュベートした。細胞をバッファーごとかきとり 1.5 ml チューブに移し、20,400 x g、4°C で 10 分間遠心した後、上清を可溶性画分として使用した。遠心により生じたペレットを同じバッファーで 2 回洗浄した後、バッファーを可溶性画分の半分量加え、超音波発生機 UR-21P (トミー精工) を用いて破碎・懸濁 (出力 10W、10 秒間) したものを不溶性画分として使用した。

免疫沈降

細胞を 0.3 M NaCl を含む CSK バッファーで抽出した後、可溶性画分に抗 HA (3F10) 抗体アガロースビーズ (Roche) を 30 μ l 加えて、4°C で一晩振盪した。9,000 x g、1 分間、4°C で遠心した後、上清を取り除き、500 μ l の 0.3 M NaCl を含む CSK バッファーで 5 回洗浄を行い、 β -ME を含まない 2 x SDS-sample buffer [130 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 20% glycerol, 0.04% BPB] を 20 μ l 加えた。室温で一晩静置した後、9,000 x g、1 分間、室温で遠心し、得られた上清を免疫沈降画分とした。

ウェスタンブロット

SDS-PAGE は参考文献 (21) に従って行った。泳動後のゲルをセミドライ法 (4°C、1.3 mA/cm²、2 hr) により、PVDF 膜 (Pore size 0.45 μ m, Immobilon-P, Millipore) に転写した。ポリユビキチン化タンパク質を転写する場合はウェット法を用いて電圧固定 (32V) で 4°C、一晩転写した。転写した PVDF 膜は Blocking buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.02% I-Block (Tropix), 0.1% Tween 20, 0.02% NaN₃] で 30 分間ブロッキングし、Blocking buffer で希釈した一次抗体と 4°C で一晩反応させた。Blocking buffer による洗浄を 4 回を行い、次に Blocking buffer で 10,000 倍希釈したアルカリホスファターゼ標識二次抗体 (Sigma) と室温で 1 時間反応させた。一次抗体の場合と同様に Blocking buffer による洗浄を 4 回行った後、Assay buffer [100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl] で 5 分間、2 回震盪しバッファーを置換した。検出は CDP-Star (Tropix) を基質として用いた化学発光法により行い、X 線フィルム (RX-U: Fujifilm) に露光した。

紫外線照射

紫外線 (UVC) 照射にはアベ製作所製造の殺菌灯照射装置 VA-5 を使用した。照射 30 分前に紫外線ランプ (Toshiba GL15) を必要本数点灯させておき、照射直前に紫外線強度計 (UVP: 254 nm センサー使用) での実測値が 0.1 J/m²/sec、0.5 J/m²/sec または 1.0 J/m²/sec になるよう電圧を調整した。細胞をクリーンベンチに移し、培地を除去後、殺菌灯照射装置に移動させ、目標の線量に達するまで静置した。紫外線照射後、クリーンベンチ内で細胞に培地を添加し、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。

コロニー形成試験

細胞を 100 mm dish 8 枚に、それぞれ 200 個ずつ播き、37°C で一晩培養した。培地を除去した後、さまざまな線量の紫外線 (0、2、5、10 J/m²) を各線量につき 2 枚のディッシュに照射し、培地を 8 ml 加えた。3 日おきに培地を交換しながらコロニーが十分な大きさになるまで約 2~3 週間培養した。その後、5 ml の PBS (-) で 2 回洗浄し、Crystal Violet 溶液 [10% ethanol、0.01% Crystal Violet (Sigma)] を 6 ml 加えて 30 分間静置した。水道水で丁寧に洗浄して乾燥させた後、1 枚あたりのコロニーを数え、2 枚のディッシュのコロニー数の平均値を測定値とした。

免疫染色

細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュに 2×10^5 個撒き、37°C で一晩培養した。0.2% FBS を含む PBS (FBS/PBS) で二回洗浄した後、4% Paraformaldehyde (和光純薬: PBS で希釈) で室温 10 分静置して固定を行い、FBS/PBS で二回洗浄した後、0.5% Triton X-100 (PBS で希釈) で室温 10 分静置し、透過処理を行った。FBS/PBS で二回洗浄した後、抗 HA 抗体を Solution A (3% BSA, 0.05% Triton X-100, 0.04% NaN₃) に 1/200 になるよう希釈して加え、37°C で 30 分反応させた。その後同様に FBS/PBS で二回洗浄した後 Alexa Fluor 594 標識二次抗体 (Life Technologies) を同じ Solution A に 1/1000 に希釈して加え、37°C で 30 分反応させた。その後 FBS/PBS で二回洗浄し、DAPI を含む Vectashield (Vector Laboratories) に浸して上から丸形カバーガラス (Matsunami) で覆った。続いてこのディッシュを Olympus IX71 顕微鏡を用いて観察し、得られた画像をソフトウェア ZEN (Carl Zeiss) でコントラストを調整し、色付けを行っ

た。

ユビキチンリガーゼ複合体の再構成

精製した UV-DDB を 0.1 M NaCl を含む Buffer C に対して透析した (Oscillatory Cup、MWCO:8,000、コスモバイオ)。この UV-DDB を約 3 倍重量の CUL4A-RBX1 と混合し、氷上で 1 時間静置した。得られた混合溶液を 0.1 M NaCl を含む Buffer C で平衡化した Superdex 200 PC 3.2/30 (GE Healthcare) カラムに通し、100 μ l ずつ分画した。変異 DDB2 を含む CRL4^{DDB2} も同様の方法で精製した。

無細胞ユビキチン化反応

無細胞ユビキチン化反応は以下の組成の溶液 (15 μ l) 中で行った。50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM MgCl₂、200 μ M CaCl₂、1 mM DTT、0.01% Triton X-100、2 mM ATP、BSA (Sigma: 100 ng)、紫外線 (2 kJ/m²) 照射プラスミド DNA (pHM14: 100 ng)、His-E1 (12.5 ng)、UbcH5a (Boston Biochem: 1.05 μ g)、XPC-RAD23B-centrin 2 (4 ng)、野生型ユビキチン (Sigma: 10 μ g) あるいは変異ユビキチン (Boston Biochem: 10 μ g)、精製した CRL4^{DDB2} ユビキチンリガーゼ複合体 (25、50、100 ng)。混合溶液を 30°C で 30 分反応させた後、0.5 M EDTA (pH 8.0) を 1 μ l 添加して反応を止めた。

質量分析

タンパク質サンプルを SDS-PAGE (10% アクリルアミドゲル) で分離し、Silver Stain MS Kit (和光純薬) を用いて検出した。ゲルから目的タンパク質のバンドを切り出して 1.5 ml エッペンドルフチューブに移し、Silver Stain MS Kit 付属の脱色液を 1 ml 加え、色が抜けるまで室温で震盪した。その後、1 ml の水で 3 回洗浄した後、200 μ l の洗浄バッファー [25 mM ammonium bicarbonate (ABC), 50% acetonitrile (ACN)] と 100% ACN で 3 回ずつ交互に洗浄した。その後溶液を除いて還元バッファー (10 mM DTT, 25 mM ABC) を 200 μ l 加えて 50°C で 1 時間静置した。溶液を除いた後、アルキル化バッファー (100 mM iodoacetamide, 50 mM ACN) を 200 μ l 加えて遮光状態で 1 時間静置した。Wash buffer と ACN で再び 3 回ずつ洗浄した後、Sequencing Grade Modified Trypsin (Promega) を 20 μ g/ml になるように 50 mM ABC に溶かし、

ゲル片を含むチューブに 10 μ l 加えて 37°C、18 時間静置し、タンパク質をゲル内消化した。ゲル片を 50 mM ABC で洗浄した後、溶出液 (80% ACN, 0.5% trifluoroacetic acid) を 200 μ l 加えて 10 分静置した。溶液を別のエッペンドルフチューブに移した後、遠心濃縮機で 70 μ l に濃縮した。ペプチド断片を含む溶液を電場型フーリエ変換リニアイオントラップ質量分析計 LTQ Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific) を使用し質量分析を行い、解析ツール (MASCOT) を使用してユビキチン化部位を同定した。

【実験結果】

N 末端領域に変異を持つ DDB2 を安定発現する細胞株の樹立

先行研究で DDB2 の N 末端領域に存在する 7 か所のリジン残基がアセチル化を受けることが見出されたため、N 末端領域のリジン残基に対するアセチル化が DDB2 自身の何らかの機能制御に関わっている可能性が考えられた。そこでまず、ヒト正常線維芽細胞 (WI38 VA13) を親株として HA タグを融合した野生型 DDB2、N 末端領域を欠失した変異 DDB2 (DDB2-Ndel)、N 末端領域のリジン残基全てをアルギニン (DDB2-N7KR)、あるいはアセチル化ミミックであるグルタミン (DDB2-N7KQ) に置換した変異 DDB2 をそれぞれ安定発現する細胞株を樹立した。得られた細胞株についてそれぞれ 0.3 M NaCl を含む CSK バッファーで分画を行い、可溶性画分に対して抗 DDB2 抗体と抗 HA 抗体を用いて発現量の確認を行った。抗 DDB2 抗体を用いたブロットから野生型 DDB2 が内在性 DDB2 に加えて確かに発現していること、および抗 HA 抗体を用いたブロットから各変異体間における発現量の差があまりないことが示された (図 4)。抗 HA 抗体と抗 DDB2 抗体のウェスタンブロットを見比べると、抗 HA 抗体とは異なり抗 DDB2 抗体では野生型 DDB2 と比べて変異 DDB2 の量が少なく見えることがわかった。ここで用いた抗 DDB2 抗体はヒト DDB2 のタンパク質全長を抗原として作成されたものであるが、N 末端領域に変異を入れることで抗体の反応性が低下している可能性が考えられた。そこで安定発現した DDB2 は主に抗 HA 抗体を用いて検出することにした。次に、N 末端領域の欠失が CRL4^{DDB2} 複合体の構成に影響を与えるかどうかを調べるため、可溶性画分から抗 HA 抗体で免疫沈降を行い、安定発現した野生型 DDB2、あるいは DDB2-Ndel を濃縮した (図 5)。その結果、野生型 DDB2 と共沈する CUL4A の量と DDB2-Ndel と共沈する CUL4A の量に大差がないことが確認された。よって、DDB2 の N 末端領域の欠失は CRL4^{DDB2} 複合体の構成に大きな影響を与えないことが示唆された。続いて DDB2 は核に局在することがすでに見出されているため、N 末端領域に変異を入れることで DDB2 の細胞内局在が変化するかどうかを調べた。作成した細胞株に対して抗 HA 抗体を用いて免疫染色を行った結果、親株では HA が発現していないためほとんど蛍光シグナルが観察出来なかった一方、野生型 DDB2 および全ての変異 DDB2 は核に局在することが確認された (図 6)。よって、N 末端領域のリジン残基の変異は DDB2 の細胞内局在に影響を与えないことが示された。

N 末端領域のリジン残基の変異は細胞の紫外線抵抗性に影響を与える

次にこれらの細胞株の紫外線感受性をコロニー形成試験により測定した (図 7)。その結果、野生型 DDB2 発現株は親株と比べて顕著な紫外線抵抗性を示した。それに対して、N 末端領域を欠失することで紫外線抵抗性に与える効果は減弱し、N7KR 発現株は親株と同程度の紫外線感受性を示した。興味深いことに、アセチル化ミミックである N7KQ 発現株は親株と比較してむしろ紫外線感受性を示した。これら紫外線感受性の違いが損傷修復速度の違いによるものかどうかを調べるため、それぞれの細胞株に紫外線を照射した後、6-4PP および CPD の修復速度を、損傷を特異的に認識する抗体を用いた ELISA 法により測定した (図 8)。その結果、6-4PP はいずれの細胞株でも紫外線照射後 5 時間でほぼ完全に除去された一方、CPD 修復については、親株と比較して DDB2 発現細胞株における修復速度の上昇が見られた。しかし、いずれの損傷についても、DDB2 の変異による修復速度の変化は認められなかった。このことから、DDB2 N 末端領域における翻訳後修飾が、NER 反応とは独立して細胞の紫外線応答に関わっている可能性が考えられた。

N 末端領域のリジン残基は DDB2 の紫外線誘導性の分解に必要である

次に、N 末端領域における翻訳後修飾が DDB2 の細胞内動態に影響を与えるかどうかを調べた。まず DDB2 の代謝回転を調べるため、さまざまな変異 DDB2 を安定発現する細胞株にシクロヘキシミド (cycloheximide: CHX) を処理して新規タンパク質合成を阻害した条件でさまざまな時間培養し、ウエスタンブロットを行った (図 9)。その結果、野生型 DDB2 は CHX 処理によってタンパク質量が減少していくのに対して、DDB2-Ndel はほとんど減少しなかった。一方、DDB2-N7KR と DDB2-N7KQ はその中間程度の減少速度を示した。よって、N 末端領域のリジン残基は DDB2 の代謝分解に関わる可能性が示唆された。次に紫外線照射に伴う影響を調べるため、細胞に紫外線を照射した後、経時的に培養し、ウエスタンブロットで解析を行った (図 10)。安定発現した DDB2 はいずれも紫外線照射に伴って一過性にクロマチンを含む不溶性画分に移行したことから、N 末端領域の変異は DDB2 の損傷結合能に影響を与えない可能性が示唆された。一方、野生型 DDB2 は紫外線照射に伴って可溶性画分と不溶性画分の全体量が減少していくのに対して、全ての変異 DDB2 は全体量が減少していないように見えた。このことから N 末端領域のリジン残基が DDB2 の紫外線誘導

性分解に関わっている可能性が考えられた。そこで、タンパク質の新規合成の影響を排除した条件で DDB2 の紫外線照射に伴う挙動を調べるために、CHX を処理した状態で同様の実験を行った (図 11)。その結果、全ての DDB2 は図 10 で見られたように紫外線照射に伴って一過性に不溶性画分へ移行したが、その後、野生型 DDB2 では全体量が急激に減少した。一方、N 末端領域に変異を持つ DDB2 はいずれも不溶性画分へ移行した後、不溶性画分の DDB2 が減少していくに従って可溶性画分の量が増加しており、全体量がほとんど変化しないことが示された。すなわち DDB2 の N 末端領域のリジン残基を欠くことによって DDB2 の紫外線誘導性の分解が見られなくなることが示された。この違いがプロテアソーム依存的な分解によるものかどうかを調べるために、プロテアソーム阻害剤である MG-132 を処理して同様の実験を行った。その結果、DDB2-Ndel の挙動は CHX のみを処理した図 11 とほぼ同じ挙動を示したが、野生型 DDB2 の紫外線誘導性の分解は顕著に抑制されていることがわかった (図 12)。これらの結果より、DDB2 の紫外線誘導性のプロテアソームによる分解には N 末端領域のリジン残基が必要であることが示唆されたとともに、これらのリジン残基がユビキチン化の標的となっている可能性が考えられた。一方、DDB2 が損傷部位から解離するためには自身のポリユビキチン化が必要である可能性が見出されている (16)。N 末端領域のリジン残基を欠く変異 DDB2 はいずれも不溶性画分の量が、時間が経つにつれて減少していることから、N 末端領域以外のリジン残基もユビキチン化を受けており、損傷部位からの解離に重要な役割を担っている可能性が考えられた。

N 末端領域は CRL4^{DDB2} ユビキチンリガーゼの主な標的である

そこで、DDB2 の N 末端領域のリジン残基がユビキチン化の主な標的であるかどうかを調べるため、精製タンパク質を用いた無細胞系による実験を試みた。まず、DDB1 と DDB2 を共発現するバキュロウイルスを用いて DDB1-DDB2 複合体を精製した。その後、別に精製した CUL4A-RBX1 を混ぜてゲル濾過カラムに通すことにより、CRL4^{DDB2} ユビキチンリガーゼを再構成した。DDB2-Ndel についても同様の方法で精製を行い、得られた精製タンパク質を SDS-PAGE により展開し、銀染色による確認を行ったところ、DDB1、DDB2、CUL4A、RBX1 の 4 つの構成因子がそれぞれ検出された (図 13)。このユビキチンリガーゼに、紫外線を照射して損傷を与えたプラスミドの存在下でユビキ

チン化酵素 E1、E2、ATP、ユビキチン、XPC-RAD23B を加えることで無細胞ユビキチン化反応を行った (図 14 左)。野生型 DDB2、DDB2-Ndel はいずれもユビキチン化反応を行うことにより高分子量側へ大きくシフトしており、DDB2 は N 末端領域のリジン残基を欠いても少なくとも無細胞系ではユビキチン化を受け得ることが示唆された。また、このとき XPC のユビキチン化は DDB2-Ndel を用いた場合でも野生型 DDB2 を用いた場合と同程度であり、N 末端領域の欠失は CRL4^{DDB2} のリガーゼ活性自体には大きな影響を与えないことが示された。次にユビキチン化部位の数を推定するため、ユビキチンのリジン残基全てをアルギニンに置換することでポリユビキチン鎖が形成出来ないようにした変異ユビキチンを用いて同様の実験を行った (図 14 右)。その結果、いずれの DDB2 を用いた場合でもユビキチン化による XPC の高分子量側への移動が見られた。XPC は無細胞系において複数のリジン残基がユビキチン化されることがすでに見出されているため、ポリユビキチン鎖が形成出来なくても複数のリジン残基がモノユビキチン化されることで見かけの分子量が大きくなったものと考えられる。一方、野生型 DDB2 がモノユビキチン化によって約 70 kDa 程度 (ユビキチン 8, 9 個分に相当) 高分子量側へシフトしたのに対して、DDB2-Ndel は約 10 kDa 程度 (ユビキチン 1 個分に相当) の移動度変化であった。以上より DDB2 のユビキチン化は N 末端領域が主な標的であることが示唆されるとともに、N 末端領域以外の部位もいくつかユビキチン化を受けうるが見出された。

N 末端領域以外のユビキチン化部位の同定

N 末端領域以外のユビキチン化部位を同定するため、FLAG タグを融合した DDB1 と、野生型 DDB2 または DDB2-Ndel からなる UV-DDB をそれぞれ抗 FLAG 抗体アガロースビーズに結合させた。その後、CUL4A-RBX1 を加えて UV-DDB と結合させることによってビーズ上で CRL4^{DDB2} を再構成した。続いて、変異ユビキチンを用いて無細胞ユビキチン化反応を行い、ビーズをよく洗浄した後、UV-DDB を FLAG ペプチドで溶出した。溶出画分を SDS-PAGE で展開し、銀染色を行った (図 15)。DDB2-Ndel を用いた場合ではユビキチン化反応によって、DDB2-Ndel と思われるバンドの量が減った一方、高分子量側に新たなバンドが出現した (レーン 3 と 4)。このバンドがモノユビキチン化された DDB2-Ndel ではないかと考え、このバンドを含むゲルを切り取った。ゲル切片に含まれるタンパク質をトリプシンによりゲル内消化した後、溶出したペプ

チド断片に対して質量分析を行い、ユビキチン化部位の同定を試みた。その結果、ユビキチン化部位として少なくとも 6 か所のリジン残基 (K146、K151、K187、K233、K278、K362) が同定された。CRL4^{DDB2} は標的部位に指向性があることが X 線結晶構造解析の結果から明らかにされており、ユビキチン化の標的となり得る領域はユビキチン化ゾーンと呼ばれている。これは UV-DDB と結合している CUL4A-RBX1 が DDB1 結合部位を中心として動き得るためであり、その範囲には DDB2 の β -プロペラ領域の側面 1/3 程度の領域を含むことが報告されている (22)。同定されたリジン残基はいずれも DDB2 の β -プロペラ領域の側面に位置しているが、K362 はユビキチン化ゾーンの外に位置しているため、CRL4^{DDB2} が別の分子の CRL4^{DDB2} の K362 をユビキチン化している可能性が考えられた。これらのことから、残りの 5 か所のリジン残基が N 末端領域以外のユビキチン化部位であり、損傷部位からの解離に関わっているのではないかと考えた。そこで、 β -プロペラ領域のユビキチン化が担う機能を調べるため、同定された 5 か所のリジン残基をさらにアルギニンに置換した変異 DDB2 (DDB2-BP5KR, DDB2-Ndel/BP5KR) を新たに作成し、バキュロウイルスを用いてこれら 2 種類の変異 DDB2 を含む CRL4 ユビキチンリガーゼを精製した。次に作成した CRL4^{DDB2-Ndel/BP5KR} に対して図 14 と同様に野生型ユビキチン、あるいは変異ユビキチンを用いて無細胞ユビキチン化反応を行った (図 16)。その結果、いずれのユビキチンを用いた場合でも DDB2-Ndel と比較して DDB2-Ndel/BP5KR の自己ユビキチン化は顕著に抑制され、大部分が非修飾のバンドのまま残った。これらの結果から、DDB2 のユビキチン化は主に N 末端領域を標的としてプロテアソームによる分解に導くが、 β -プロペラ領域のいくつかのリジン残基も標的となり得ることが示唆された。

β -プロペラ領域のリジン残基をアルギニンに置換した DDB2-Ndel/BP5KR 安定発現株の樹立

細胞内において β -プロペラ領域のユビキチン化が担う機能を調べるため、ヒト正常線維芽細胞 (WI38 VA13) を親株として DDB2-Ndel/BP5KR を安定発現する細胞株を作成した (図 17)。複数のクローンを樹立したが、いずれも DDB2-Ndel/BP5KR の発現量は野生型 DDB2 と比較して低く、一方で内在性 DDB2 の発現量が上昇している傾向が見られた。DDB2-Ndel/BP5KR の安定発現が細胞に対して毒性があるため発現量が低く抑えられており、ドミナントネ

ガティブ効果を抑制するために内在性 DDB2 の発現量が高くなっているのではないかと考えている。続いて、樹立した細胞株の DDB2-Ndel/BP5KR の局在を免疫染色で調べたところ、DDB2-Ndel/BP5KR は他の変異 DDB2 と同様に核に局在しており、 β -プロペラ領域のリジン残基を欠いても DDB2 の局在に影響を与えないことが示された (図 6)。

β -プロペラ領域のリジン残基は細胞の紫外線感受性と損傷修復活性に重要である

DDB2-Ndel/BP5KR 安定発現株の紫外線抵抗性をコロニー形成試験により調べたところ、この発現株は親株と比べてむしろ紫外線感受性を示すことが見出された (図 7)。この紫外線感受性への影響が、損傷修復速度の低下によるものかどうかを調べるため、紫外線照射後の 6-4PP と CPD の残存量を ELISA 法により定量した (図 18)。その結果、DDB2-Ndel/BP5KR 発現株では内在性 DDB2 が多く発現しているにも関わらず、6-4PP および CPD のいずれも DDB2-Ndel 発現株と比較して、修復速度が有意に低下していることが示された。興味深いことに、外来性の DDB2 を発現していない親株よりも 6-4PP の修復速度が低下するとともに、CPD の修復速度も親株よりわずかに低下しているように思われた。この修復速度の低下は、内在性 DDB2 の機能が DDB2-Ndel/BP5KR の安定発現によって阻害されたために生じた可能性が考えられた。

そこで、紫外線照射に伴う DDB2-Ndel/BP5KR の細胞内動態を調べるため、図 11 と同様の方法で DDB2-Ndel/BP5KR の挙動をウェスタンブロットにより解析した (図 17)。DDB2-Ndel やその他の変異体では紫外線照射から 5 時間後ではほとんど不溶性画分から消失して再び可溶性画分に移行していたのに対し、DDB2-Ndel/BP5KR は紫外線照射から 3 時間経っても不溶性画分に存在する量はほとんど変化せず、5 時間後においても一部は不溶性画分に検出された。これは、単に損傷修復の遅延を反映したものである可能性が考えられる一方、DDB2-Ndel/BP5KR が正常に損傷に結合することは出来るが、その後の解離に障害が生じている可能性も考えられる。しかしながら、ほとんどユビキチン化が起こらない DDB2-Ndel/BP5KR でも、時間が経つとクロマチンからの解離が見られることから、ポリユビキチン化は損傷からの解離に必須ではなく、別の解離メカニズムが存在する可能性が考えられる。

DDB2 はポリユビキチン化の部位に関わらず損傷結合能を失う

DDB2 はポリユビキチン化されることで損傷結合能を失うことが無細胞系ですで見出されているが、損傷結合能に関わるユビキチン化部位については未だ明らかになっていない。そこで、DDB2 の損傷結合能がポリユビキチン化されるリジン残基によって変化するかどうかを調べるため、損傷 DNA ビーズを用いた無細胞ユビキチン化反応を行った。まず化学的に紫外線損傷 (6-4PP) を導入した一本鎖オリゴヌクレオチドと相補的な配列を持つ非損傷オリゴヌクレオチドをアニールさせた二本鎖 DNA を直鎖状に連結した後、末端をビオチン化標識し、これをストレプトアビジンでコートした磁気ビーズと反応させることで、損傷 DNA ビーズを作成した。損傷 DNA ビーズ存在下で無細胞ユビキチン化反応を行い、損傷 DNA ビーズに結合しなかった非結合画分と損傷 DNA ビーズを含む結合画分に分画し、ポリユビキチン化した DDB2 がどちらの画分に検出されるかを調べた (図 19)。N 末端領域と β -プロペラ領域、それぞれのリジン残基が DDB2 の損傷結合能に与える影響を評価するため、正常な N 末端領域を持つ CRL4^{DDB2-BP5KR}に加えて、野生型 CRL4^{DDB2}、CRL4^{DDB2-Ndel}、CRL4^{DDB2-N7KR}、CRL4^{DDB2-Ndel/BP5KR}を用いてそれぞれ損傷 DNA ビーズ存在下でユビキチン化反応を行った。その結果、野生型 DDB2 は結合画分に主に検出されたが (レーン 1 と 4)、ポリユビキチン化を行うことで DDB2 の大部分が非結合画分で検出された (レーン 2 と 5)。一方、変異ユビキチンを用いてモノユビキチン化だけ起こる条件にした場合、DDB2 はほとんど非結合画分では検出されず、主に結合画分で検出された (レーン 3 と 6)。また、UV-DDB のサブユニットである DDB1 も DDB2 と同じ画分に検出されていることが確認された。興味深いことに、N7KR、Ndel、BP5KR 変異 DDB2 を用いた場合でも野生型と同様の結果が見られた。DDB2-Ndel/BP5KR はユビキチン化部位をほとんど失っているため、ユビキチン化による分子量の変化がほとんど起こらず、ユビキチン化反応を行っても大部分が結合画分に検出された。この実験から DDB2 は N 末端領域、あるいは β -プロペラ領域のいずれのリジン残基がポリユビキチン化されても損傷に結合できなくなることが示唆された。

XPC は DDB2 の紫外線誘導性の分解を抑制する

図 11 の実験より、外来性の野生型 DDB2 は紫外線照射に伴って急速に分解されることが見出されたが、ヒト正常線維芽細胞 (WI38 VA13) の内在性 DDB2

は正常な N 末端領域を持つにも関わらず外来性の野生型 DDB2 ほど急速には分解されていないことがわかった (図 20 左)。CRL4^{DDB2} は DDB2 自身のみならず、XPC もユビキチン化することがすでに見出されている。そこで私は XPC がユビキチン化を介して DDB2 の何らかの機能制御に関わっているのではないかと考え、XP-C 群患者由来細胞 (XP4PASV) における内在性 DDB2 の紫外線照射後の挙動を比較検討した。その結果、XPC 欠損細胞における DDB2 は、紫外線照射に伴ってヒト正常線維芽細胞よりも速く分解されており (図 20 右)、DDB2 の紫外線誘導性分解を XPC が制御している可能性が考えられた。

そこで同じ細胞で、XPC が DDB2 の分解に与える影響を比較検討するため、XPC 欠損細胞を親株として、FLAG タグを融合したヒト XPC をヒト正常線維芽細胞の内在性 XPC と同程度のレベル (FLAG-XPC low)、あるいは過剰に発現する細胞株 (FLAG-XPC high) を用いて実験を行った (図 21)。これらの細胞株に CHX を処理して新規タンパク質合成を阻害した条件で、経時的な DDB2 量の変化を調べた。その結果、いずれの細胞株の内在性 DDB2 も CHX 処理後の量はほとんど変化しなかったため、DDB2 の代謝分解に XPC はほとんど影響を与えないことが示唆された (図 22)。次に、紫外線照射後の DDB2 の挙動を調べた結果、興味深いことに DDB2 の紫外線誘導性の分解は、XPC を相補することで抑制されることが見出された (図 23)。さらに、XPC 過剰発現細胞株では分解がより顕著に抑制され、紫外線照射から 5 時間後における DDB2 量は照射前と同程度であり、ほとんど分解を受けなかった。以上より XPC は DDB2 の紫外線誘導性の分解を抑制することが示唆された。

XPC 複合体は DDB2 のユビキチン化を阻害する

XPC タンパク質の発現レベルに応じて DDB2 の紫外線誘導性の分解が抑制されたことから、XPC は DDB2 の N 末端領域におけるユビキチン化を阻害することで、DDB2 の分解抑制に寄与しているのではないかと考えた。そこで、このことを確かめるため、DDB2 の無細胞ユビキチン化反応にさまざまな量の XPC を加えた時の影響を解析した (図 24, 25)。この実験では DDB2 のバンドシフトに対する影響を見やすくするために、通常のアッセイよりも低いユビキチン濃度を用いて反応を行った。DDB2 はユビキチン化反応を行うことにより高分子量側への移動度シフトが見られる一方 (図 24: レーン 1 と 2)、XPC を添加していくに従って、用量依存的に DDB2 のユビキチン化が顕著に抑制された (図 24:

レーン 7 から 9)。興味深いことに、この効果は XPC 複合体のサブユニットである centrin-2 を加えることでより増強された (図 24: レーン 3 から 6)。centrin-2 は XPC と損傷 DNA との相互作用を増強させることが報告されているため (23)、XPC による DDB2 のユビキチン化阻害には XPC の損傷結合活性が必要ではないかと考えられた。

DDB2 の分解抑制には XPC の損傷結合活性が必要である

そこで、DNA 損傷結合活性を持たないことが示されている患者由来の変異 XPC (XPC-W690S) が、DDB2 の紫外線誘導性の分解に与える影響を調べた (24)(図 26)。XPC 欠損細胞を親株として XPC-W690S を野生型 XPC と同程度安定発現する細胞株を用いて、図 23 と同様の実験を行った。その結果、野生型 XPC を相補することによって DDB2 の紫外線誘導性の分解が抑制されたのと比較して、XPC-W690S 発現株では DDB2 が紫外線照射に伴って急速に減少していくことが見出された。それぞれの細胞株における可溶性画分と不溶性画分の DDB2 の総和を定量化したところ、XPC-W690S 発現株における DDB2 の分解速度は XPC 欠損細胞と同程度であることが示された。よって、XPC による DDB2 の分解抑制効果には、XPC の DNA 損傷結合活性が必要であることが強く示唆された。この効果は、XPC が DDB2 の N 末端領域に特異的に結合して、N 末端領域におけるユビキチン化を抑制するために起こっているのではないかと考えた。そこで CRL4^{DDB2-N7KR} と CRL4^{DDB2-BP5KR} を用いて無細胞ユビキチン化反応を行い、XPC 複合体を加えることにより、変異 DDB2 のポリユビキチン化に与える影響を調べた (図 27)。その結果、DDB2-N7KR では主なユビキチン化部位である N 末端領域を欠いているため、ユビキチン化反応自体がほとんど起こらなかったが、いずれの変異 DDB2 を用いた場合でも XPC の添加によるユビキチン化の阻害が見られた。すなわち、XPC は DDB2 の N 末端領域、およびβ-プロペラ領域のいずれにおいても、ポリユビキチン化を阻害し得ることが示唆された。

【考察】

本研究により、DDB2 の安定発現がヒト正常線維芽細胞に紫外線抵抗性を与えることが見出された一方、DDB2-Ndel の安定発現による紫外線抵抗性に対する効果は減弱していた。さらに興味深いことに DDB2-N7KQ の安定発現はむしろ細胞に紫外線感受性を与えることが見出され、DDB2 の恒常的なアセチル化は紫外線応答に負の影響を与える可能性が示唆された。これら細胞株の損傷修復速度を調べたところ、6-4PP の修復速度はいずれの細胞株でも同程度であったが、CPD の修復速度は DDB2 を安定発現することにより増加した。6-4PP は XPC 単独でも認識して結合することが出来、DDB2 欠損細胞でも 6-4PP の修復が正常細胞と同様に行われることが知られている (25)。そのため、DDB2 安定発現による 6-4PP 修復速度への影響は非常に小さく、差が見られなかったと考えられる。一方、CPD は XPC 単独では認識することが出来ないため、DDB2 から XPC への損傷の受け渡しが必要であるが、外来性 DDB2 の発現によってこの過程が促進されたことにより CPD が効率的に修復されたと思われる。しかしながら、N 末端領域に変異を持つ DDB2 発現株と野生型 DDB2 発現株を比較した結果、CPD 修復速度にほとんど差が見られなかった。これより DDB2 の N 末端領域、およびそのリジン残基における翻訳後修飾が紫外線損傷修復とは独立して何らかの機能を担い、細胞の紫外線応答に影響を与えている可能性が考えられる。特にアセチル化ミミックである DDB2-N7KQ の安定発現は細胞に紫外線感受性を与えており、DDB2 のアセチル化が紫外線に対する細胞死誘導に関わっている可能性が考えられた。Ddb2 ノックアウトマウスを用いた実験から、DDB2 が p53 の転写を制御してアポトーシス制御に関わることが報告されているが (26)、その詳細なメカニズムについては理解が進んでおらず、不明な点が多く残されているのが現状である。また DDB2 は CBP/p300 と直接相互作用すること、および無細胞系でアセチル化を受けることが見出されてはいるものの、アセチル化の機能に関しては不明な点が多く残されている。本実験の結果とこれまでの報告を考え合わせると、DDB2 のアセチル化が紫外線照射に伴うアポトーシス誘導に、CBP/p300 や p53 などと協調して働く可能性が期待され、今後その詳細なメカニズムの更なる解析が求められる。

N 末端領域に変異を持つ DDB2 の細胞内動態を調べた結果から、N 末端領域を欠いても DDB2 は一過性に損傷部位へ結合すること、および N 末端領域のリジン残基が紫外線誘導性のプロテアソームによる分解に必要であることが見出

された。さらに精製タンパク質を用いた無細胞ユビキチン化反応の結果から DDB2 のユビキチン化の標的が主に N 末端領域のリジン残基であることが見出された一方、 β -プロペラ領域のいくつかのリジン残基もユビキチン化の標的となっている可能性が示唆された。これらのことから、CRL4^{DDB2} は紫外線照射に伴って DDB2 自身の N 末端領域のリジン残基を標的としてポリユビキチン化し、プロテアソームによる分解に導くと考えられる。無細胞系でモノユビキチン化した DDB2-Ndel を質量分析で解析した結果から、 β -プロペラ領域のユビキチン化部位として少なくとも 5 か所が同定された。以前に細胞内のユビキチン化タンパク質の網羅的解析が行われ、トリプシンによるユビキチン鎖切断断片を特異的に認識する抗体を用いたプロテオミクス解析により、DDB2 の K151、K187 が細胞内でのユビキチン化部位として検出されている (27)。このことから β -プロペラ領域におけるユビキチン化は細胞内で実際に起こっており、何らかの機能を担っている可能性が考えられる。私が作成した DDB2-Ndel/BP5KR 安定発現細胞株は顕著な紫外線感受性を示すとともに、6-4PP と CPD のいずれの損傷についても修復に遅延が見られた。これらのことから、DDB2 のリジン残基は効率的な損傷修復を行うのに重要な役割を担っている可能性が示唆された。細胞内における紫外線照射後の挙動を調べると、ユビキチン化に対して抵抗性を示す DDB2-Ndel/BP5KR は紫外線照射に伴ってクロマチンへ結合するものの、DDB2-Ndel と比較して損傷部位に留まっている時間が長いことが示された。また、DDB2-Ndel/BP5KR は紫外線照射から 5 時間経過すると少なくとも一部はクロマチンから解離することが見出された。これまで DDB2 が損傷部位から解離するためには DDB2 のポリユビキチン化が必要ではないかと考えていたが、今回の結果からポリユビキチン化非依存的に DDB2 の損傷結合能を制御する機構が存在している可能性が示唆された。近年、DDB2 が損傷部位から解離するためには VCP/p97 のセグリガーゼ活性によるユビキチン鎖除去が重要であることが報告された (28)。DDB2 が損傷部位から解離するメカニズムには未知の因子や経路が関与している可能性も考えられ、ポリユビキチン化非依存的に DDB2 が損傷部位から解離する何らかの機構が存在しており、それがバックアップとして機能し得る可能性が期待された。これらのことから、DDB2 のリジン残基は、主にプロテアソームによる分解と紫外線損傷修復を担う二つの機能を持つことが強く示唆された。今後、これら二つの機能がどのような制御で行われており、どのようなメカニズムで使い分けられているかを詳しく解析して

いく必要があると考えている。

内在性 DDB2 の挙動解析の結果から、外来性の DDB2 と比較して内在性 DDB2 では紫外線誘導性の分解が緩やかであり、特に XPC 欠損細胞における内在性 DDB2 は紫外線照射に伴って急速に分解されることが見出された。この分解は正常な XPC を相補することで発現量依存的に抑制されたことから、XPC が DDB2 の紫外線誘導性の分解を抑制することが示唆された。一方、DDB2 の無細胞ユビキチン化反応に XPC 複合体を添加したところ、用量依存的に DDB2 のポリユビキチン化が抑制されることが見出された。XPC は DDB2 と同様に CRL4^{DDB2} ユビキチンリガーゼの標的として知られているが、本実験結果から XPC は DDB2 によって適切にリクルートされることで DDB2 の N 末端領域におけるポリユビキチン化を吸収し、結果として DDB2 がプロテアソームによる分解を免れているのではないかと考えている。DDB2 はポリユビキチン化非依存的に損傷部位から解離し得る可能性が本実験結果から示されており、分解を免れた DDB2 は再び別の損傷を認識して XPC をリクルートすると考えられることから、このメカニズムが効率の良い損傷の認識と修復の持続に寄与している可能性が考えられる。また、興味深いことに、損傷結合能を欠く変異 XPC (XPC-W690S) を発現させても DDB2 の紫外線誘導性の分解を抑制することが出来ず、無細胞ユビキチン化反応系に XPC の損傷結合能を促進することが知られているサブユニット centrin-2 を添加すると、DDB2 のポリユビキチン化がより抑制された。これら二つの実験結果から、DDB2 のユビキチン化を吸収して分解を抑制するためには、XPC が損傷 DNA に結合する必要があることが強く示唆された。このことから、XPC が損傷部位に結合出来ない、つまり NER 反応が開始出来ない場合においては、たとえ XPC 複合体がリクルートされていても DDB2 が速やかに分解されることが考えられる。DDB2 から XPC への損傷の受け渡しが正しく行われず、DDB2 と XPC がその場に留まり続けることは損傷認識因子全体のモビリティの低下を引き起こすと同時に、損傷乗り越え修復などの他の修復機構の阻害を引き起こし、結果として複製停止による細胞死を誘発する可能性が考えられる。そこで、防御機構の一つとして DDB2 を速やかに分解することで NER 反応の開始に失敗した損傷認識因子の排除が起こり、効率的な損傷認識機構が機能しているのではないかと考えられる (図 28)。

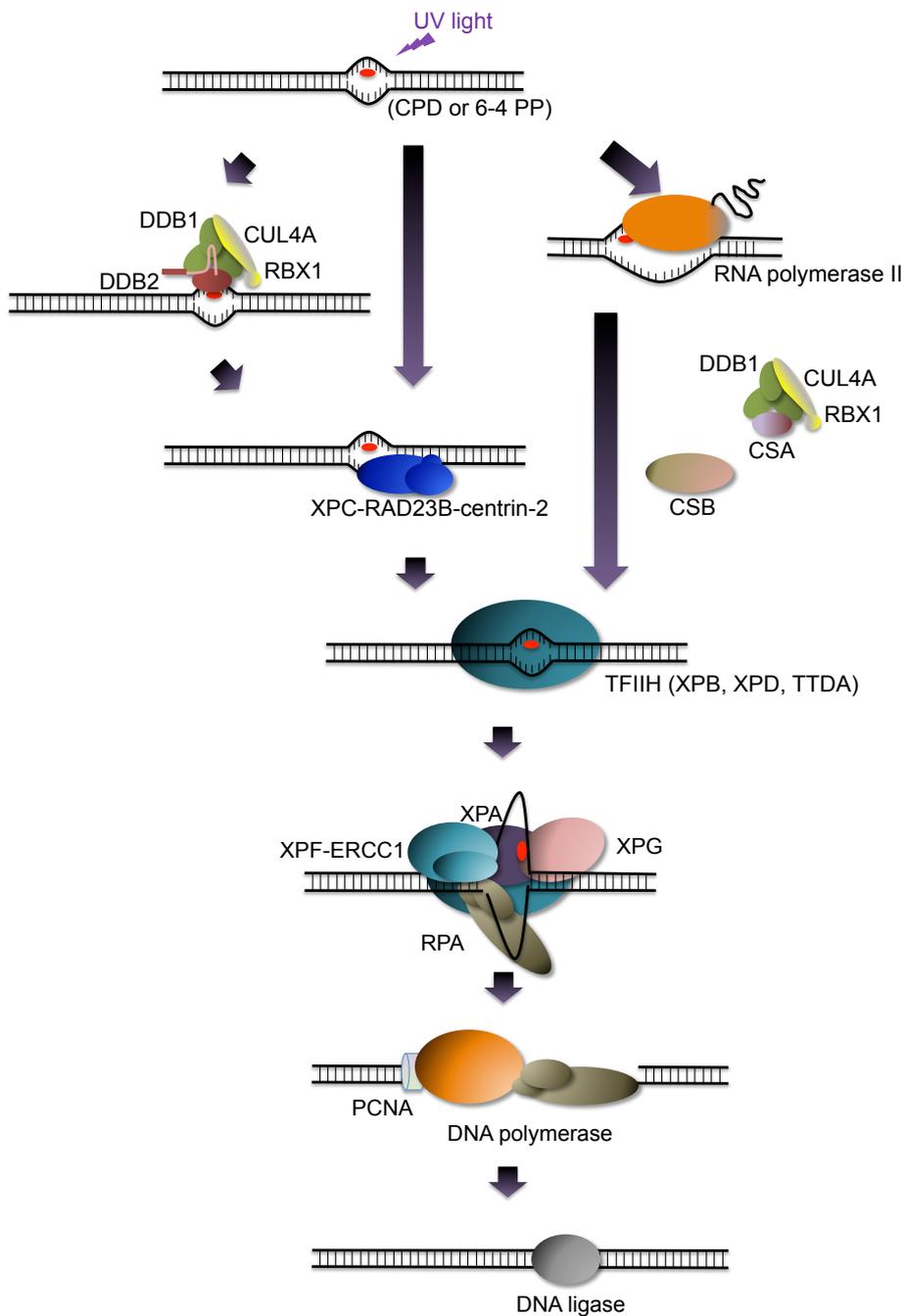


図 1 哺乳類における NER 反応機構

GG-NER 経路 (左) あるいは TC-NER 経路 (右) によって認識された損傷部位の DNA は TFIIH の持つヘリカーゼ活性により一本鎖に巻き戻され、XPG および XPF-ERCC1 の持つエンドヌクラーゼ活性により切り出される。その後生じた一本鎖ギャップが DNA ポリメラーゼによって埋め戻されることで修復が完了する。

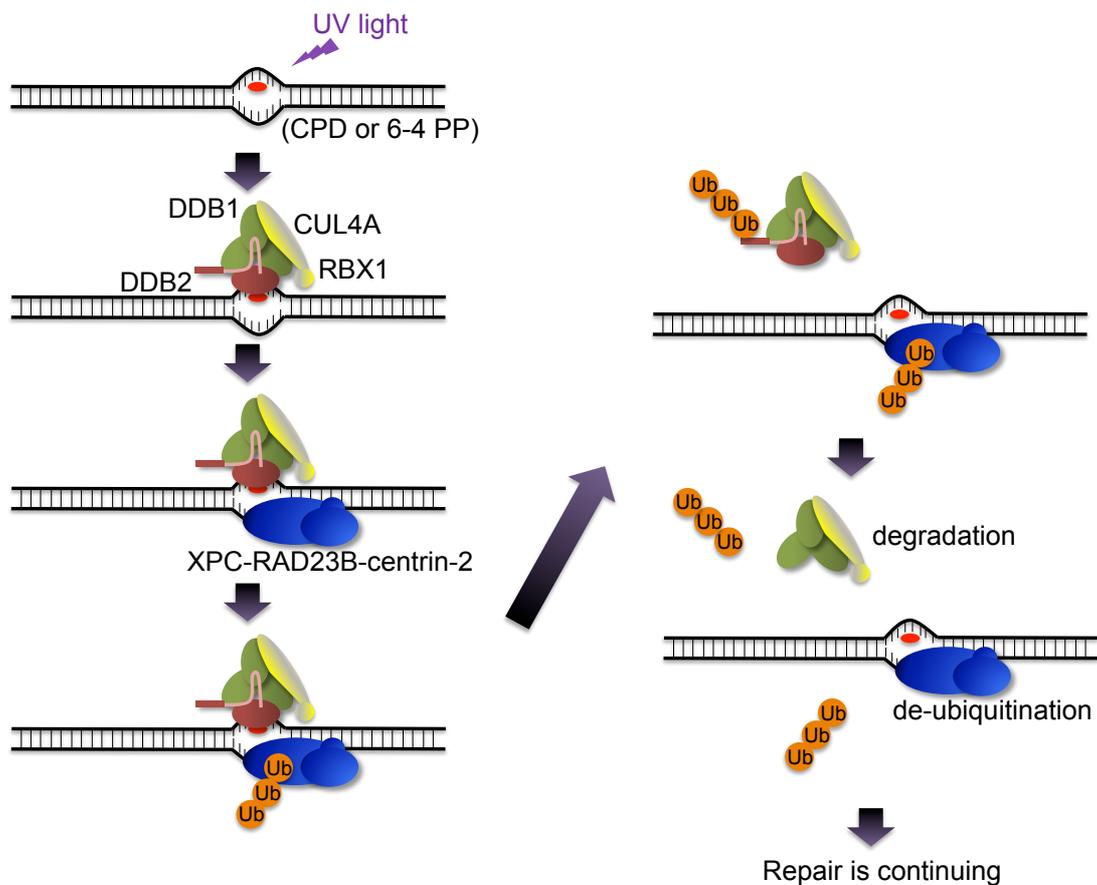


図 2 DDB2 から XPC への損傷受け渡し機構のモデル

UV-DDB が損傷部位を認識して結合し、XPC 複合体をリクルートした後、UV-DDB に結合した CUL4-RBX1 ユビキチンリガーゼが活性化され、これにより XPC、および DDB2 がポリユビキチン化される。DDB2 はポリユビキチン化を受けることで損傷部位から解離する一方、XPC は損傷部位に留まり NER 反応が開始される。DDB2 はその後プロテアソームにより分解されるのに対して、XPC は脱ユビキチン化を受けると考えられているが、これらの生物学的意義については不明な点が多く残されている。

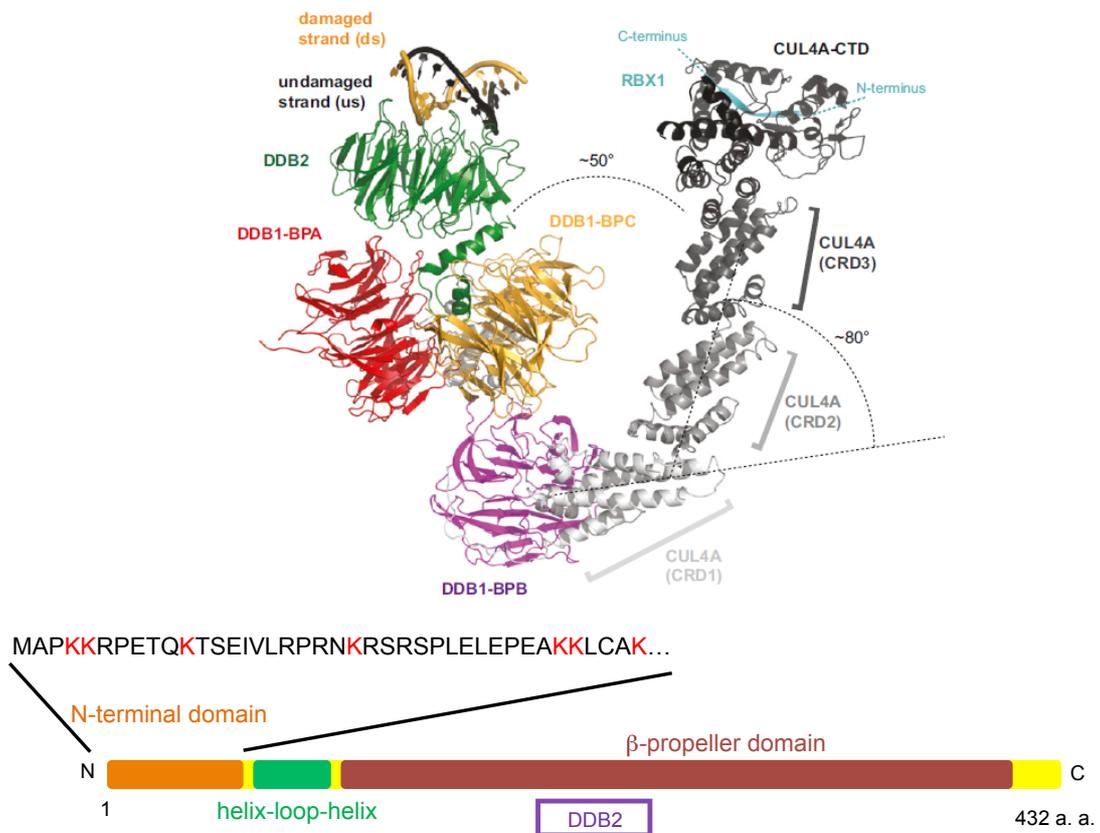


図 3 DDB2 の立体構造と N 末端領域のアミノ酸配列

DDB2 は C 末端側のβ-プロペラ領域、DDB1 との結合を担う helix-loop-helix 構造、N 末端側の特定の構造を取らない N 末端領域からなり、N 末端領域には 7 か所のリジン残基が存在している。

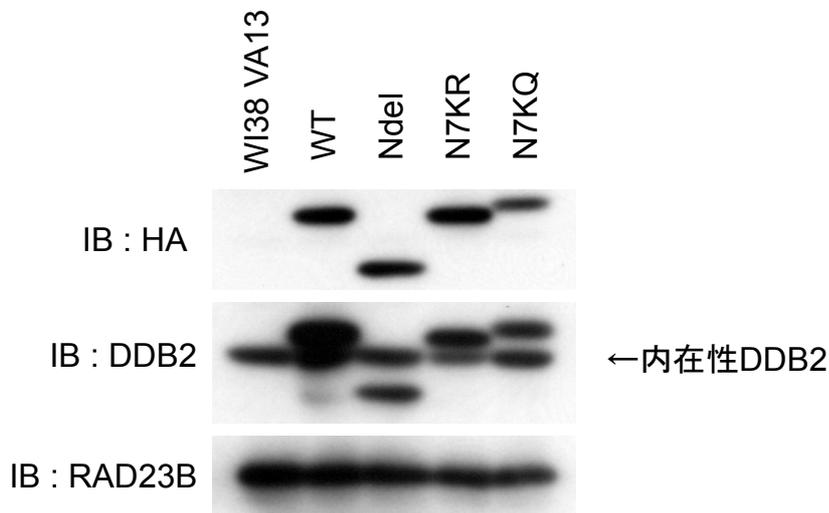
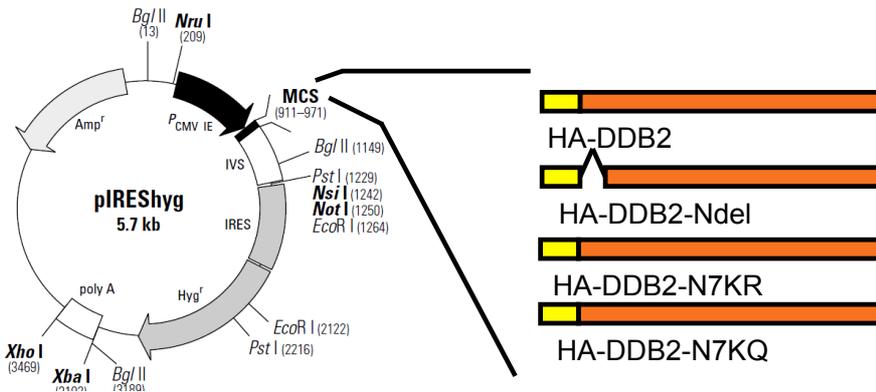


図 4 DDB2 安定発現細胞株の樹立

pIREShyg ベクターに HA タグを融合したさまざまな DDB2 変異体の cDNA を挿入し、ヒト正常線維芽細胞 (WI38 VA13) に形質転換した。ハイグロマイシンで選択することにより、DDB2 を安定発現する細胞株を樹立した。細胞株を 0.3 M NaCl を含む CSK バッファーで抽出し、可溶性画分に対して抗 HA 抗体および抗 DDB2 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。RAD23B は可溶性画分のローディングコントロールとして用いた。

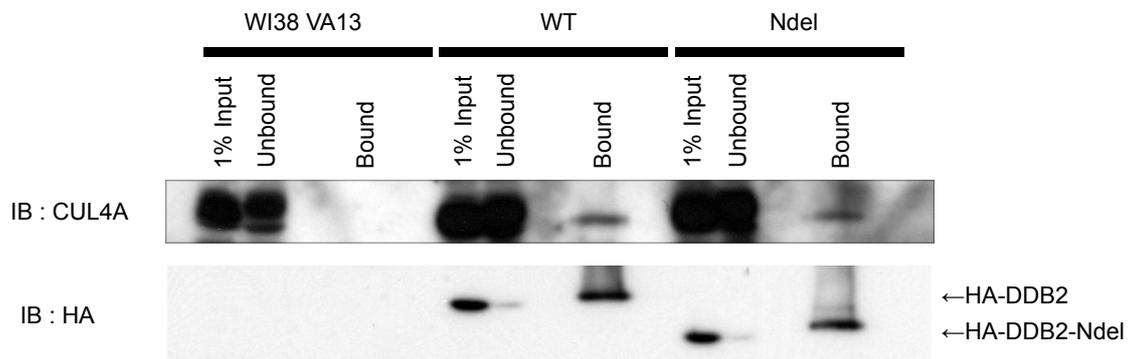


図 5 N 末端領域の欠失は $CRL4^{DDB2}$ 複合体形成に影響を与えない

樹立した細胞株を 0.3 M NaCl を含む CSK バッファーで抽出し、可溶性画分から抗 HA 抗体ビーズを用いて免疫沈降を行った。溶出画分に対して抗 CUL4A 抗体、抗 HA 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

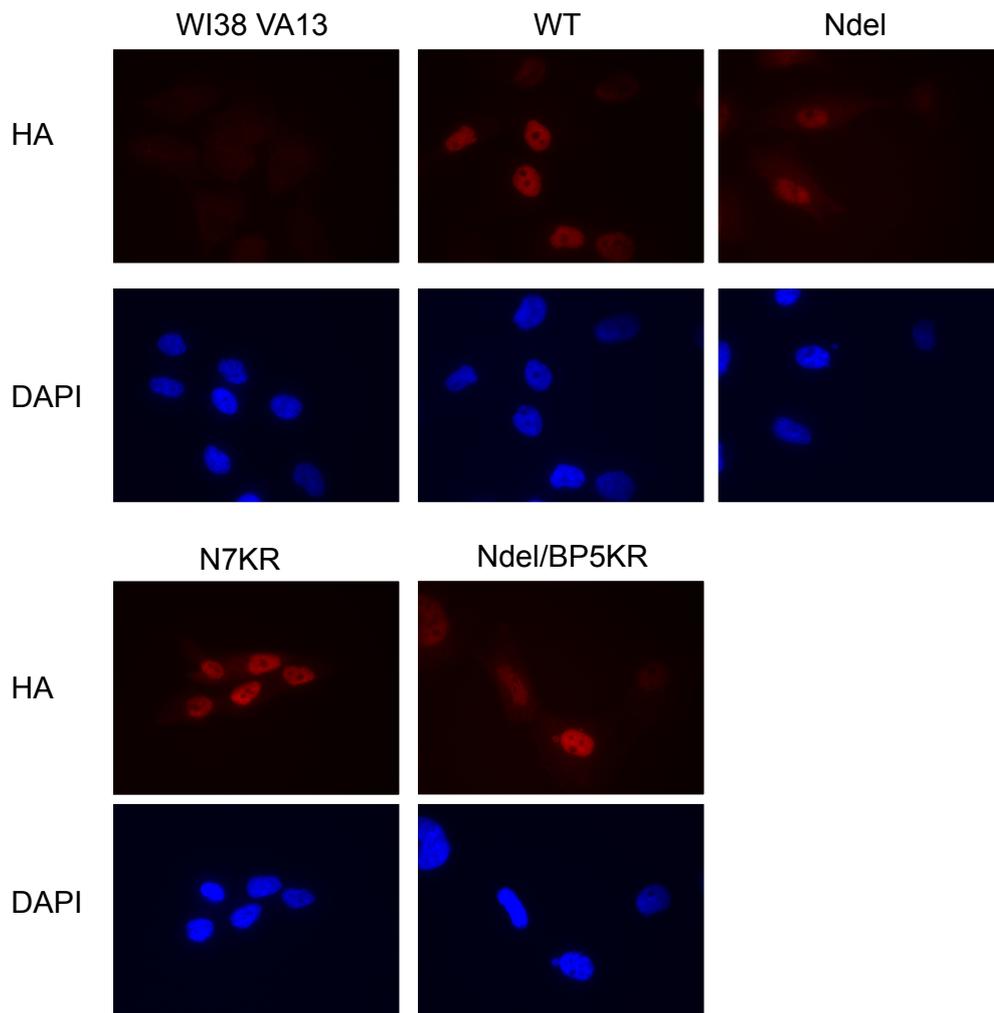


図 6 変異 DDB2 はいずれも核内に局在する

樹立した細胞株を 4% Paraformaldehyde で固定した後、0.5% Triton X-100 で透過処理を行い、抗 HA 抗体 (赤) を用いて免疫染色を行った。DAPI (青) は細胞核を染色するために使用した。

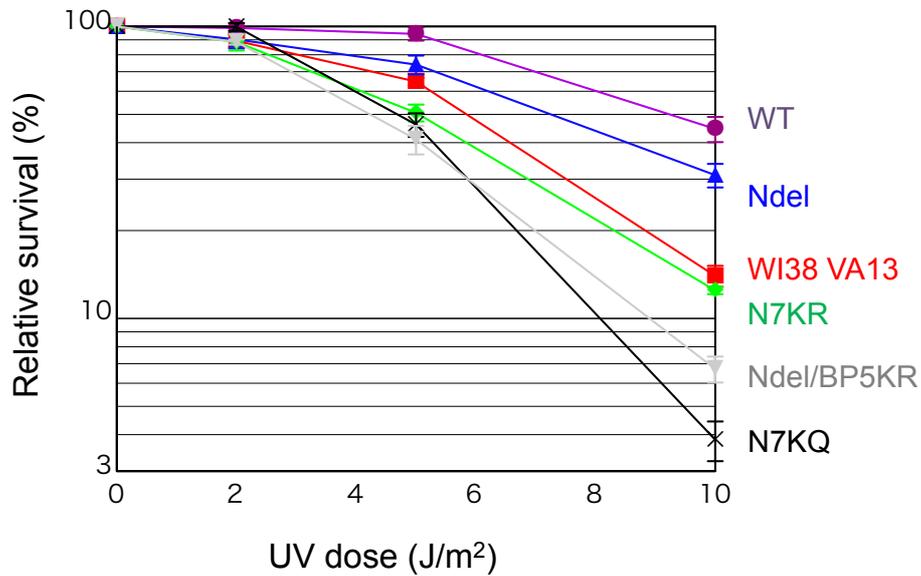


図 7 変異 DDB2 の安定発現が細胞の紫外線感受性に与える影響

ヒト正常線維芽細胞 (WI38 VA13)、野生型 DDB2 (WT)、DDB2-Ndel (Ndel)、DDB2-N7KR (N7KR)、DDB2-N7KQ (N7KQ)、DDB2-Ndel/BP5KR (Ndel/BP5KR) 安定発現細胞株をそれぞれ 200 個ずつ撒いて一晚培養した。次の日にさまざまな線量の紫外線を照射し、約 3 週間培養した後、crystal violet で染色を行い、コロニー数を計測した。エラーバーは独立して行った 3 回の実験の標準誤差を示す。

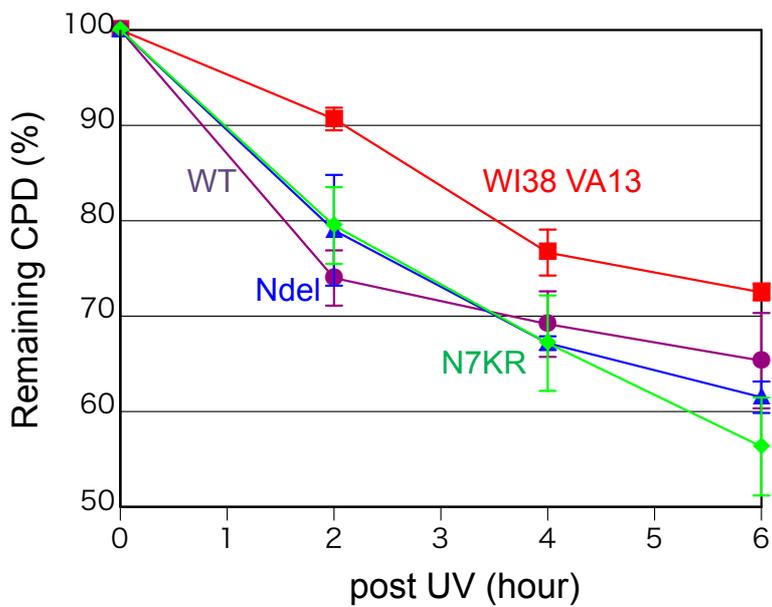
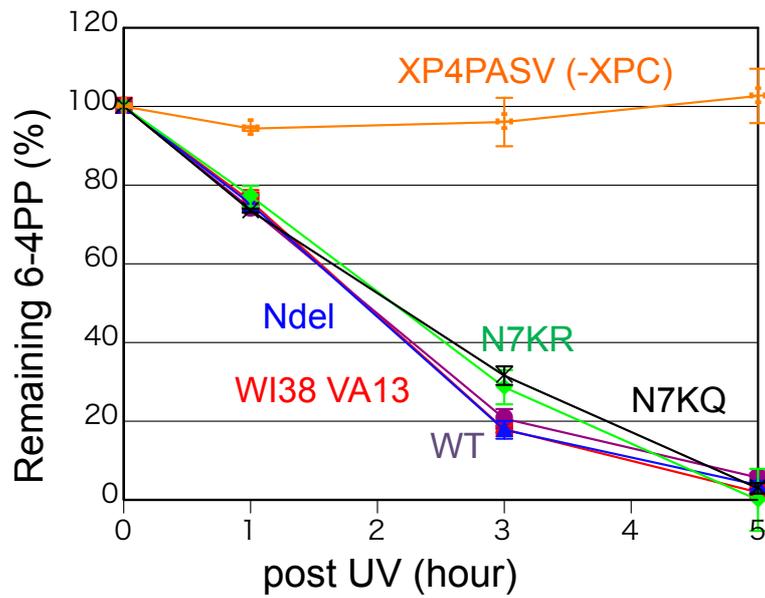


図 8 N 末端領域の変異は細胞の損傷修復活性に影響を与えない

それぞれの細胞株に紫外線を照射し、その後の損傷残存量を抗 6-4PP 抗体および抗 CPD 抗体を用いた ELISA 法により定量した。XP-C 群患者由来細胞 (XP4PASV) は損傷を修復出来ないネガティブコントロールとして使用した。エラーバーは独立して行った 3 回の実験の標準誤差を示す。

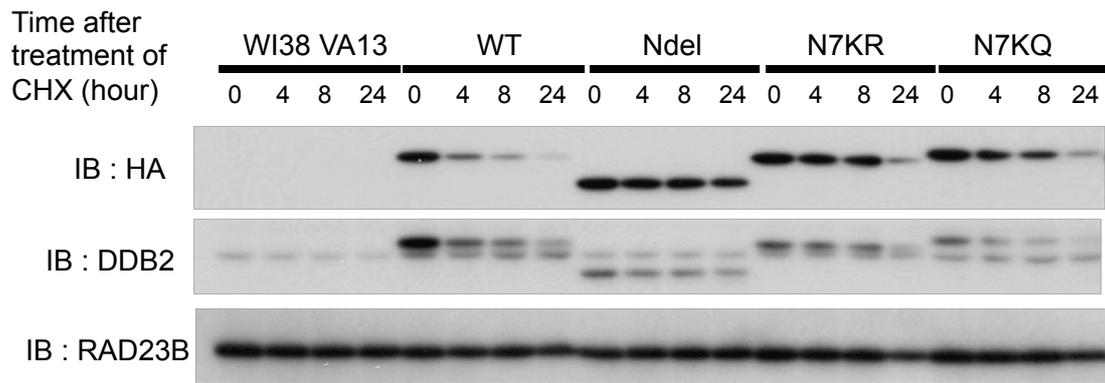


図 9 N 末端領域のリジン残基は DDB2 の代謝分解に関わる

それぞれの細胞株を 1 mM CHX 存在下で図に示す時間培養を行い、0.3 M NaCl を含む CSK バッファーを用いて細胞抽出液を作成した。抽出液に対して抗 HA 抗体、抗 DDB2 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

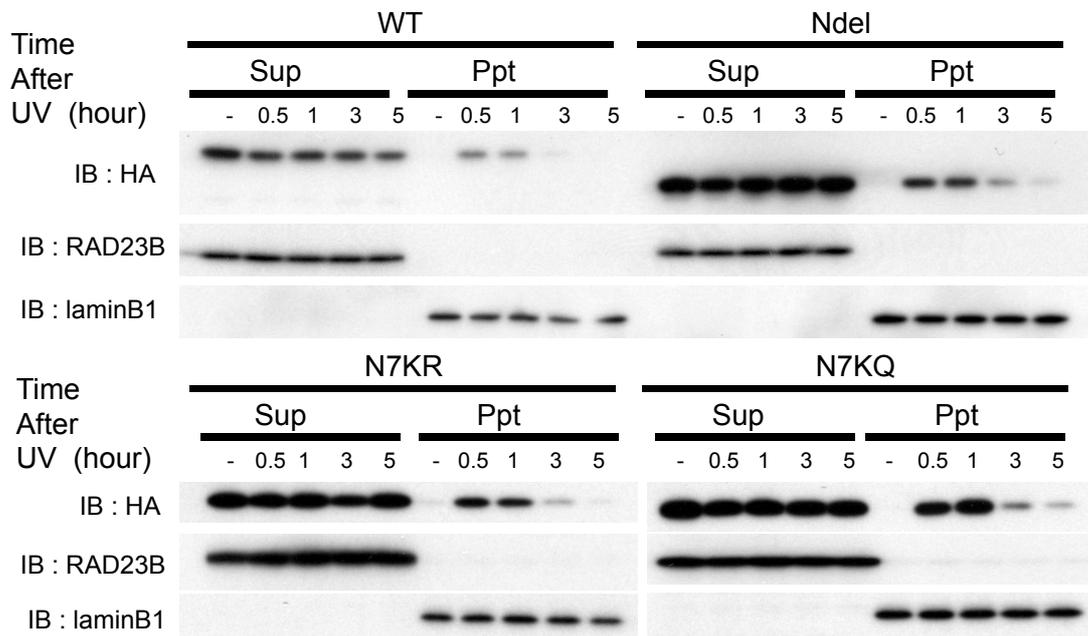


図 10 全ての DDB2 は紫外線照射に伴って一過性にクロマチンに結合する

細胞株に紫外線 (10 J/m^2) を照射してさまざまな時間培養した後、 0.3 M NaCl を含む CSK バッファーを用いて可溶性画分 (Sup) と不溶性画分 (Ppt) とに分画し、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットを行い、DDB2 を検出した。RAD23B は可溶性画分、laminB1 は不溶性画分のローディングコントロールとして用いた。「-」は紫外線非照射のレーンを示す。

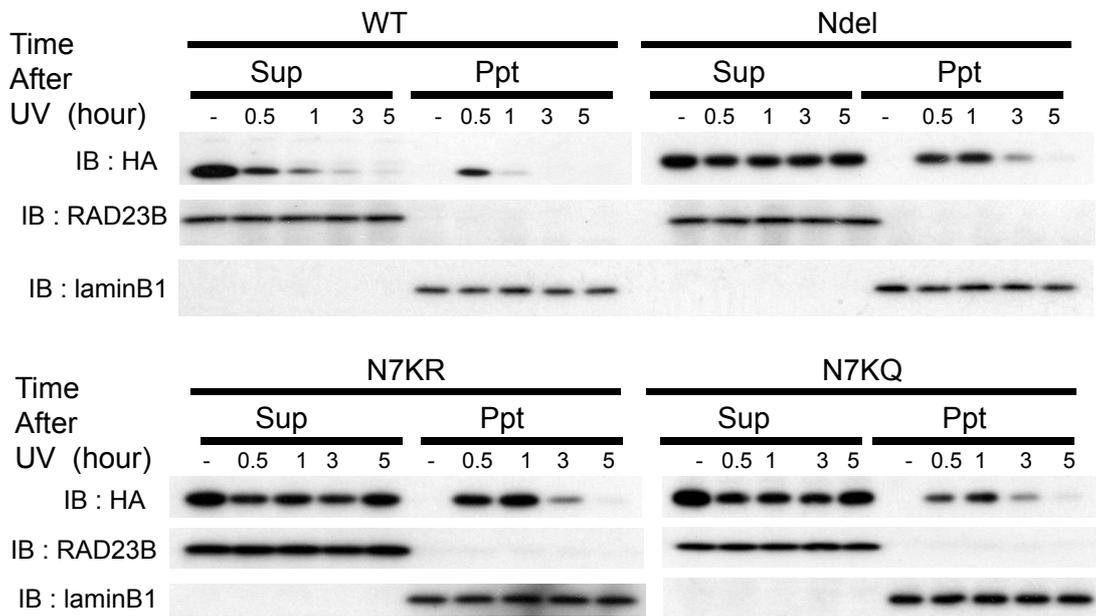


図 11 N 末端領域のリジン残基は DDB2 の紫外線誘導性の分解に必要である

細胞株に 1 mM CHX を 2 時間処理した後、紫外線 (10 J/m²) を照射してさまざまな時間培養した。0.3 M NaCl を含む CSK バッファーを用いて分画し、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットを行い、DDB2 を検出した。「-」は薬剤処理のみで紫外線非照射のレーンを示す。

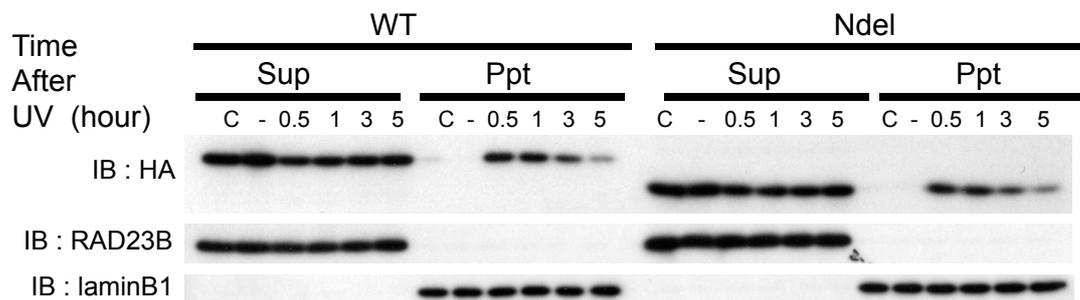


図 12 DDB2 は紫外線照射に伴ってプロテアソームにより分解される
 細胞株に 1 mM CHX と 5 μ M MG-132 を 2 時間処理した後、紫外線 (10 J/m²) を照射してさまざまな時間培養した。0.3 M NaCl を含む CSK バッファーを用いて分画し、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットを行い、DDB2 を検出した。「C」は薬剤処理を行わず紫外線も非照射のレーン、「-」は薬剤処理のみで紫外線非照射のレーンを示す。

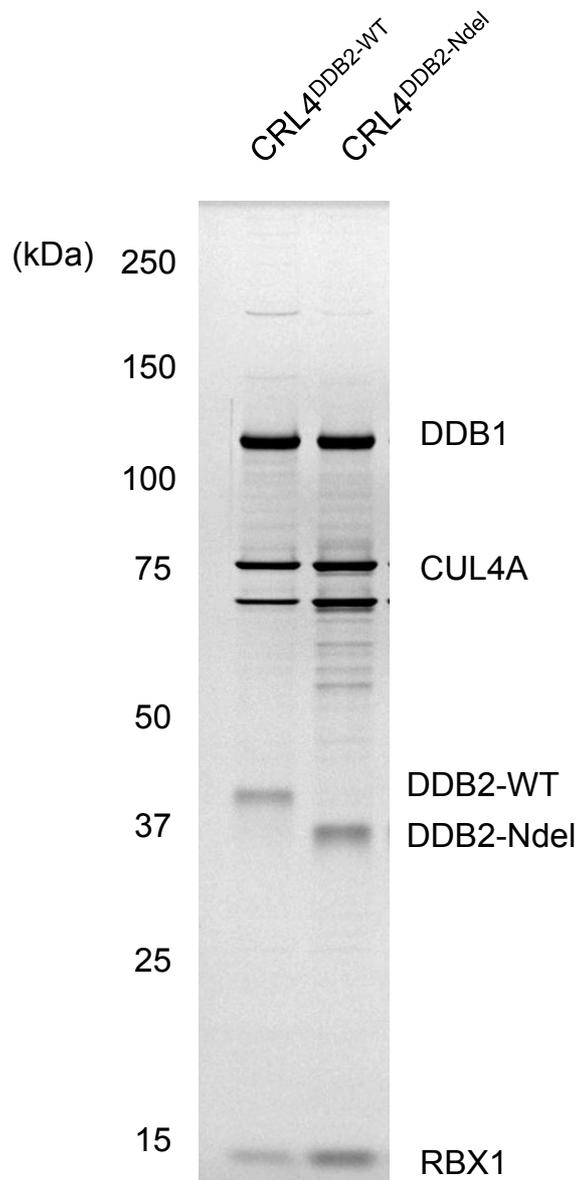


図 13 CRL4^{DDB2} ユビキチンリガーゼの再構成

精製した FLAG-DDB1 と DDB2-WT、あるいは DDB2-Ndel 複合体と、CUL4A-RBX1 複合体を混ぜ、ゲル濾過カラムを通すことで CRL4^{DDB2} を再構成した。CRL4^{DDB2} 300 ng を SDS-PAGE で展開し、銀染色を行った。

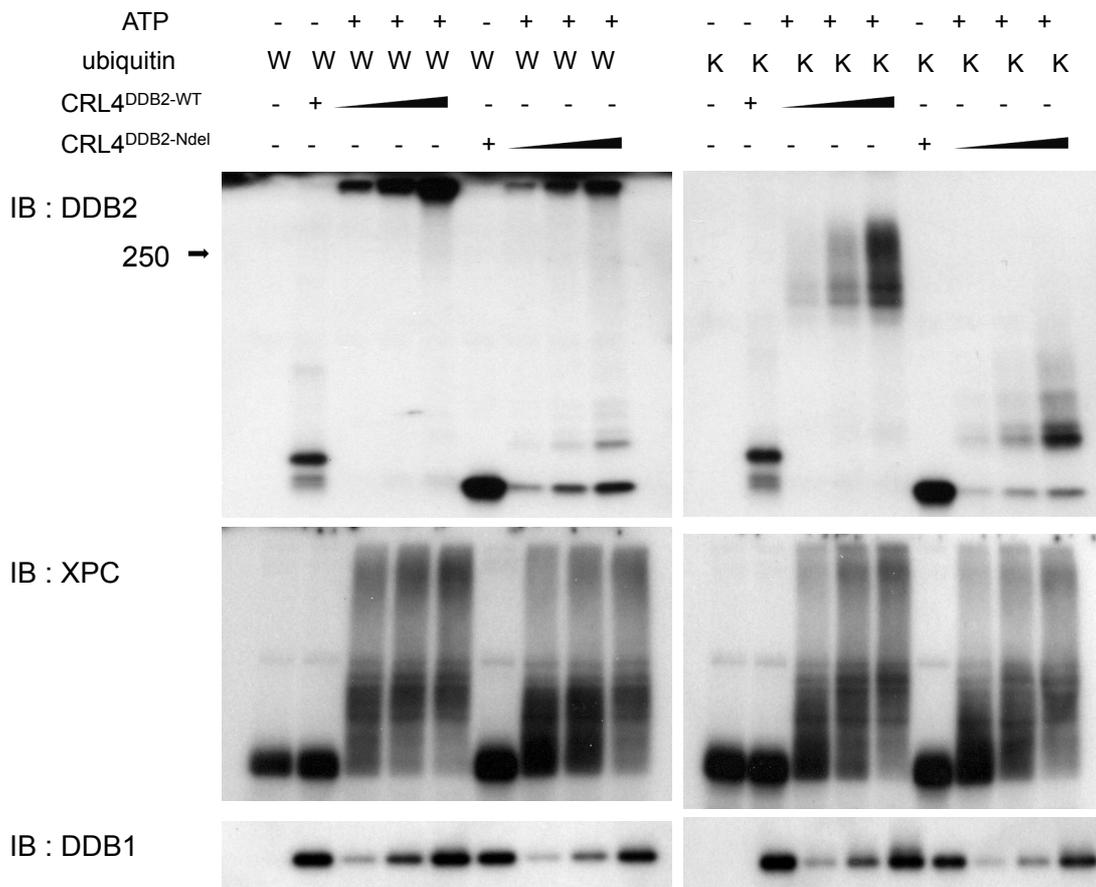


図 14 N 末端領域はユビキチン化の主な標的である

精製した CRL4^{DDB2}、あるいは CRL4^{DDB2-Ndel} (25, 50, 100 ng) に、E1、E2、XPC 複合体、ATP、野生型ユビキチン (W) あるいは全てのリジン残基をアルギニンに置換した変異ユビキチン (K) を加えることで無細胞ユビキチン化反応を行った。反応液を SDS-PAGE で展開した後、抗 DDB2 抗体、抗 XPC 抗体、抗 DDB1 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。DDB1 は、DDB2 とヘテロダイマーを形成しているため DDB2 全体量を示すコントロールとして検出した。

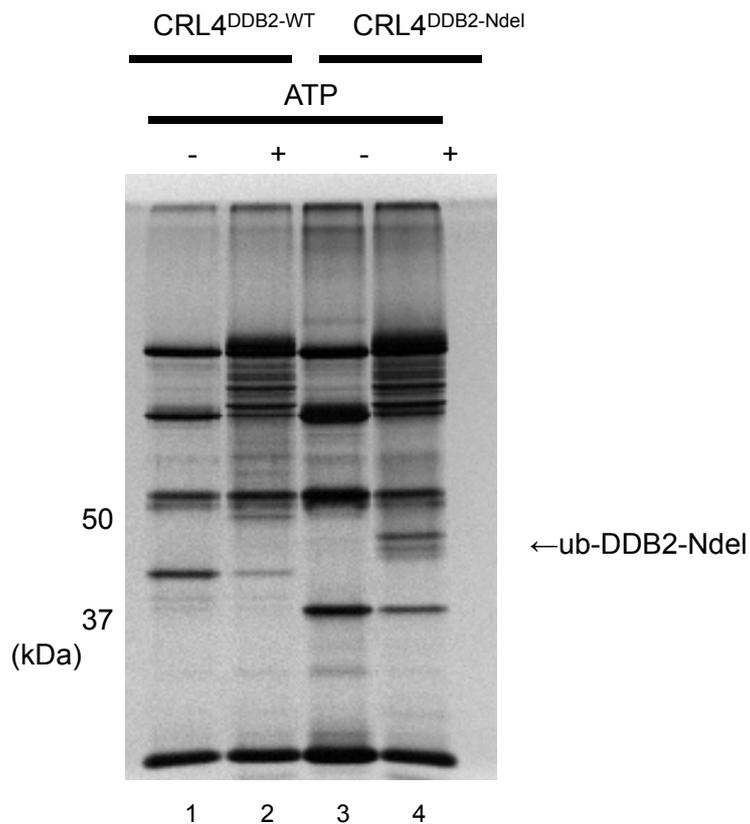


図 15 DDB2 の N 末端領域以外におけるユビキチン化部位の同定

10 μg の UV-DDB を抗 FLAG 抗体ビーズに結合させた状態で、30 μg の CUL4A-RBX1 を加えて複合体を形成させ、非結合画分を洗浄により除いた上で無細胞ユビキチン化反応を行った。ビーズをよく洗浄した後に FLAG ペプチドで DDB2 を溶出し、SDS-PAGE で電気泳動した後、銀染色を行った。

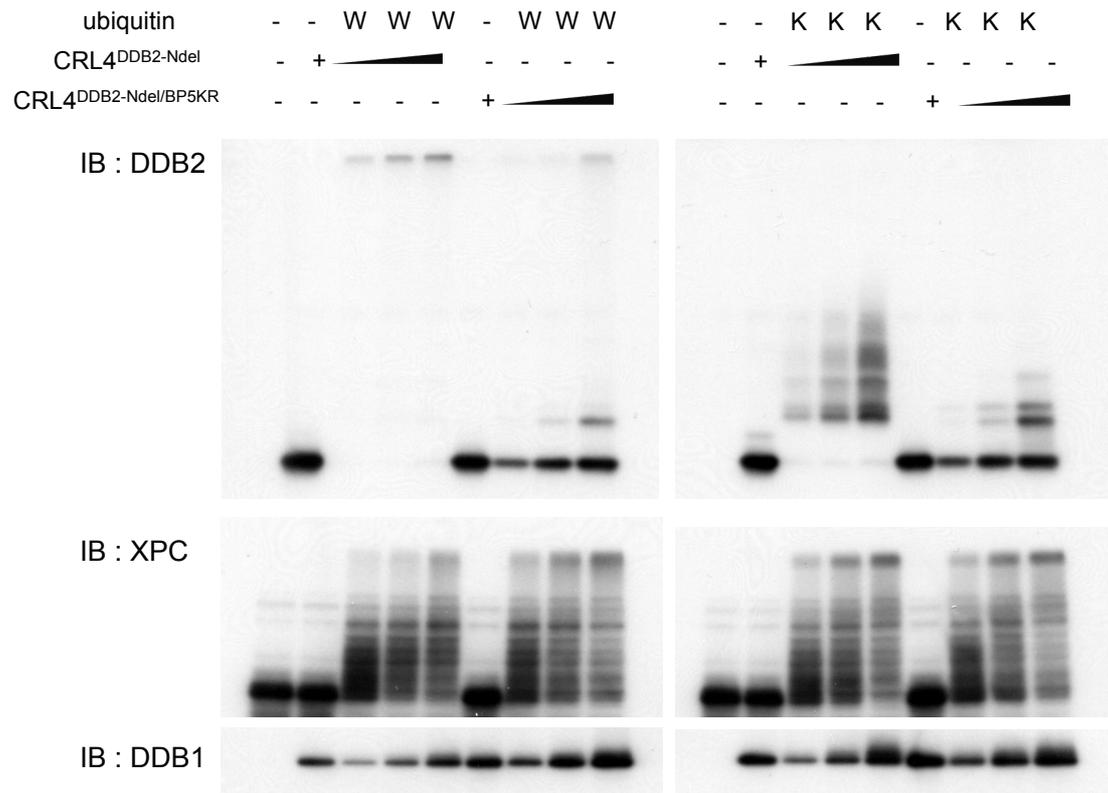


図 16 DDB2-Ndel/BP5KR 変異体はユビキチン化抵抗性を示す

精製した CRL4^{DDB2-Ndel}、あるいは CRL4^{DDB2-Ndel/BP5KR} (30, 60, 120 ng) に、E1、E2、XPC 複合体、ATP、野生型ユビキチン (W) あるいは変異ユビキチン (K) を加えることで無細胞ユビキチン化反応を行った。反応液を SDS-PAGE で展開した後、抗 DDB2 抗体、抗 XPC 抗体、抗 DDB1 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

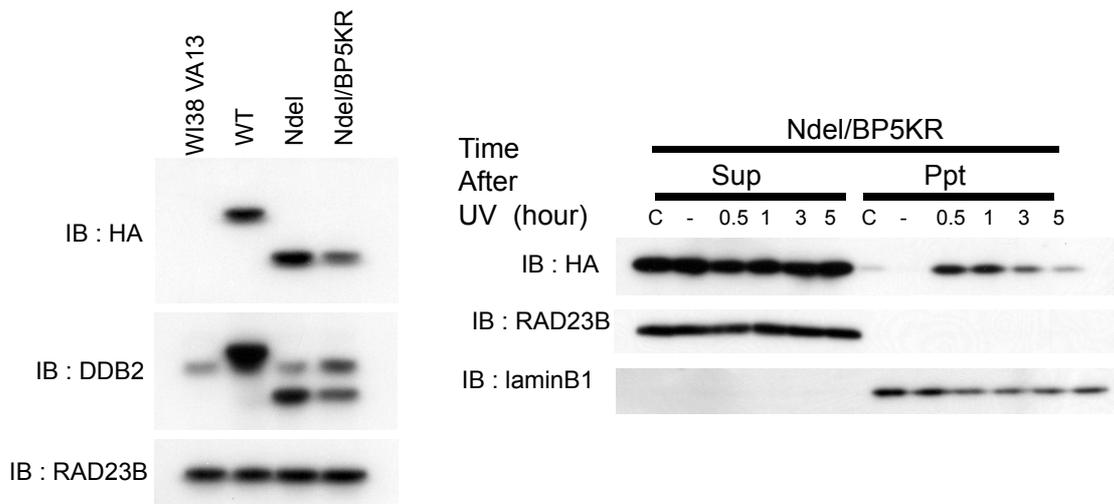


図 17 DDB2-Ndel/BP5KR 安定発現細胞株の樹立

ヒト正常線維芽細胞 (WI38 VA13) を親株として HA タグを融合した DDB2-Ndel/BP5KR を形質転換し、ハイグロマイシン選択によりコロニーを単離し、細胞株を樹立した。細胞株に 1 mM CHX を 2 時間処理した後、紫外線 (10 J/m^2) を照射してさまざまな時間培養した。0.3 M NaCl を含む CSK バッファーを用いて分画し、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットを行い、DDB2 を検出した。「C」は CHX 処理を行わず紫外線も非照射のレーン、「-」は薬剤処理のみで紫外線非照射のレーンを示す。

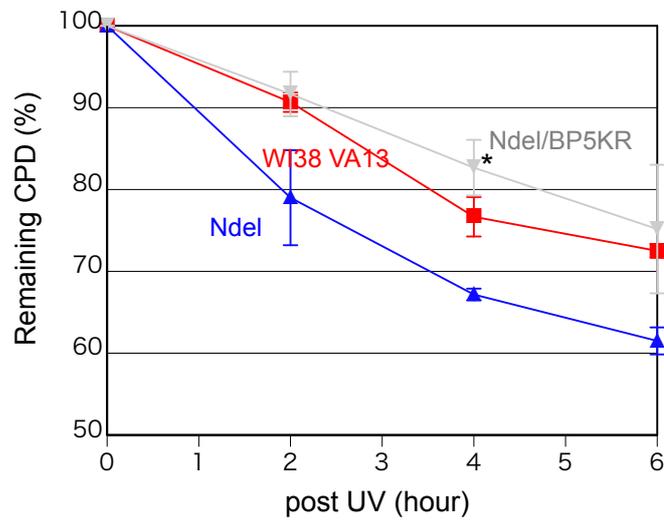
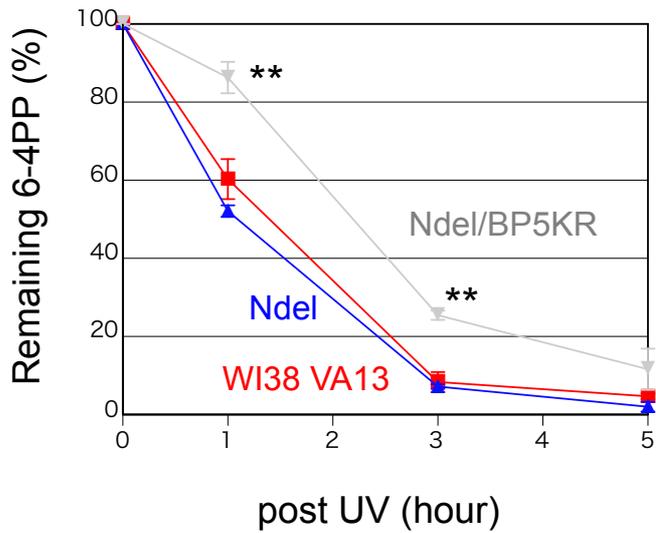


図 18 DDB2-Ndel/BP5KR の安定発現は細胞の紫外線損傷修復を抑制する

DDB2-Ndel/BP5KR を含むそれぞれの細胞株に紫外線を照射し、その後の損傷残存量を抗 6-4PP 抗体および抗 CPD 抗体を用いた ELISA 法により定量した。エラーバーは独立して行った 3 回の実験の標準誤差を示す。p 値は t 検定により算出した (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。

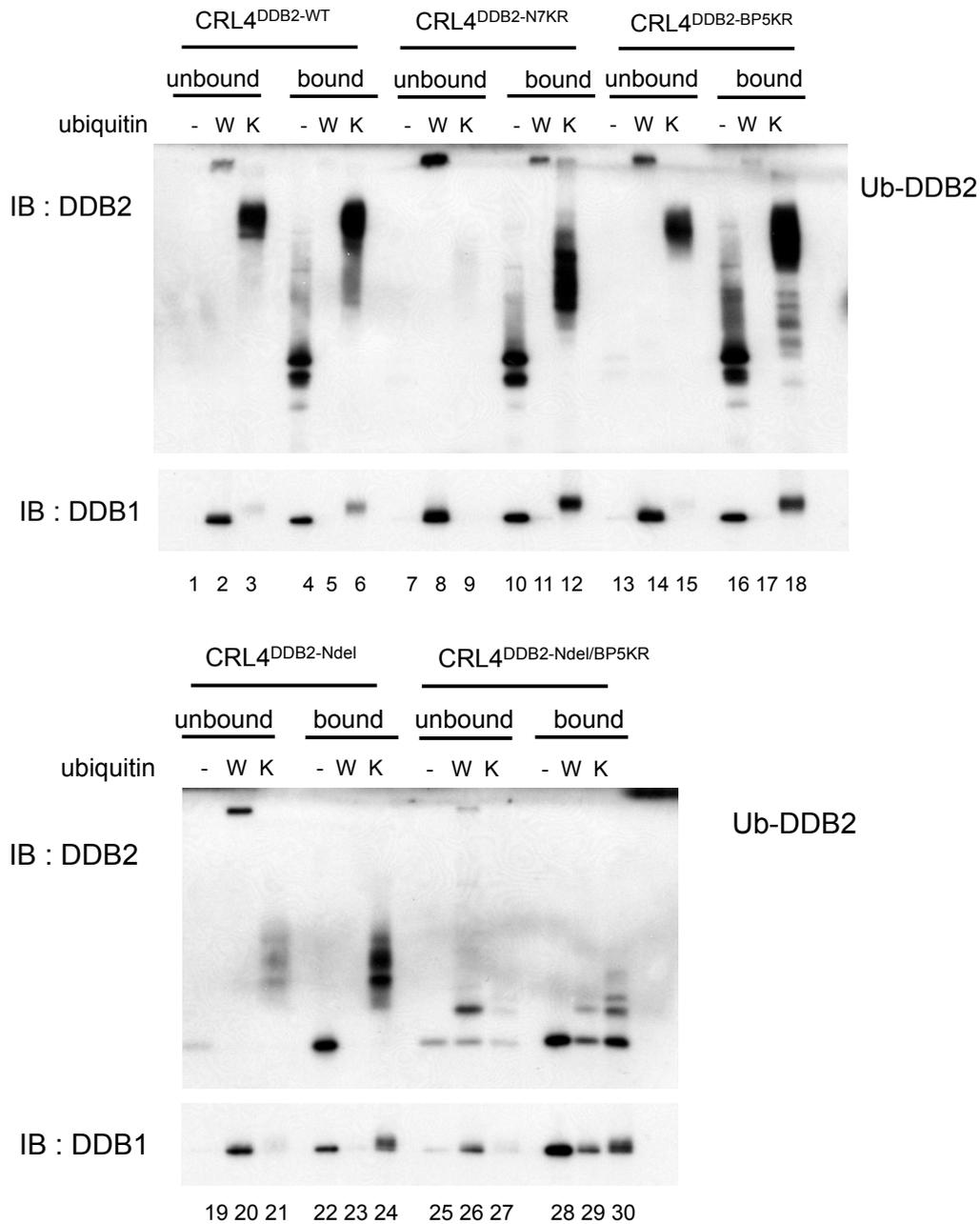


図 19 ポリユビキチン化による DDB2 の損傷結合能の低下はユビキチン化部位に依存しない

それぞれ変異 DDB2 を含む CRL4^{DDB2} を損傷 DNA ビーズに結合させた後、よく洗浄してから E1、E2、ATP、野生型ユビキチン (W)、あるいは変異ユビキチン (K) を加えて無細胞ユビキチン化反応を行った。反応を EDTA で停止した後、DNA ビーズに結合した画分と非結合画分に分けた。反応液を SDS-PAGE で展開し、抗 DDB2 抗体と抗 DDB1 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

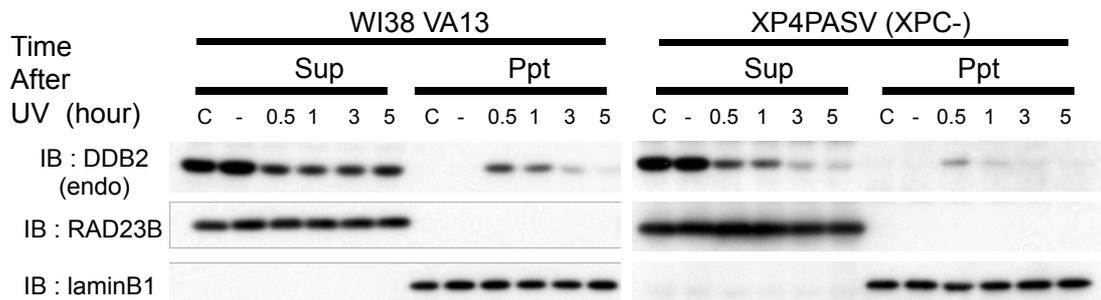


図 20 XPC 欠損細胞では内在性 DDB2 が紫外線照射に伴って急速に分解される

WI38 VA13 細胞と XP4PASV 細胞にそれぞれ 1 mM CHX を処理した後、紫外線 (10 J/m²) を照射してさまざまな時間培養した。0.3 M NaCl を含む CSK バッファーを用いて分画し、抗 DDB2 抗体を用いたウエスタンブロットを行い、内在性 DDB2 を検出した。「C」は CHX 処理を行わず紫外線も非照射のレーン、「-」は薬剤処理のみで紫外線非照射のレーンを示す。

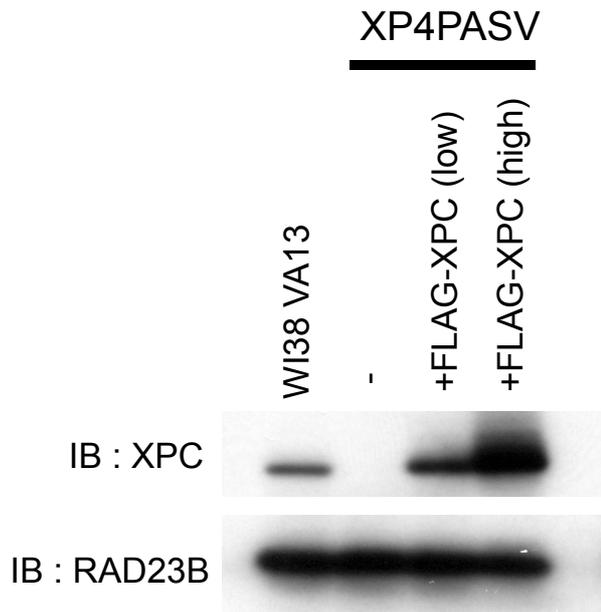


図 21 XPC を相補した細胞株における発現量の比較

XPC 欠損細胞 (XP4PASV) を親株として、XPC をヒト正常線維芽細胞と同程度、あるいは過剰発現する細胞株を樹立した。0.3 M NaCl を含む CSK バッファーを用いて分画し、可溶性画分に対して抗 XPC 抗体を用いたウエスタンブロットを行い、それぞれの細胞株における XPC 発現量を確認した。

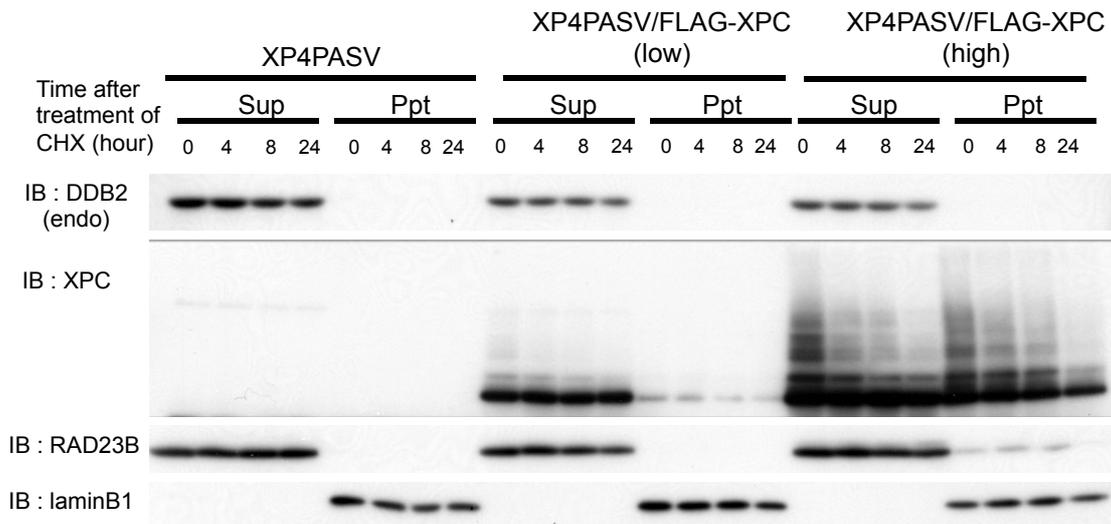


図 22 XPC は DDB2 の代謝分解には影響を与えない

それぞれの細胞株を 1 mM CHX 存在下で図に示す時間培養を行い、0.3 M NaCl を含む CSK バッファーを用いて分画し、可溶性画分に対して抗 DDB2 抗体、抗 XPC 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。

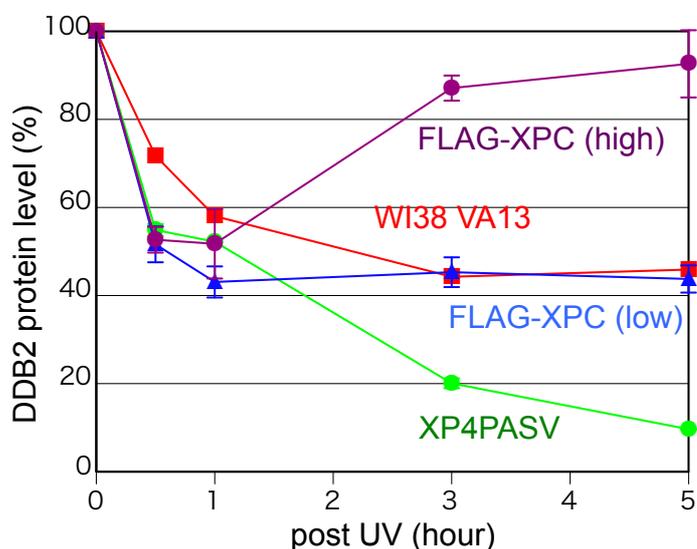
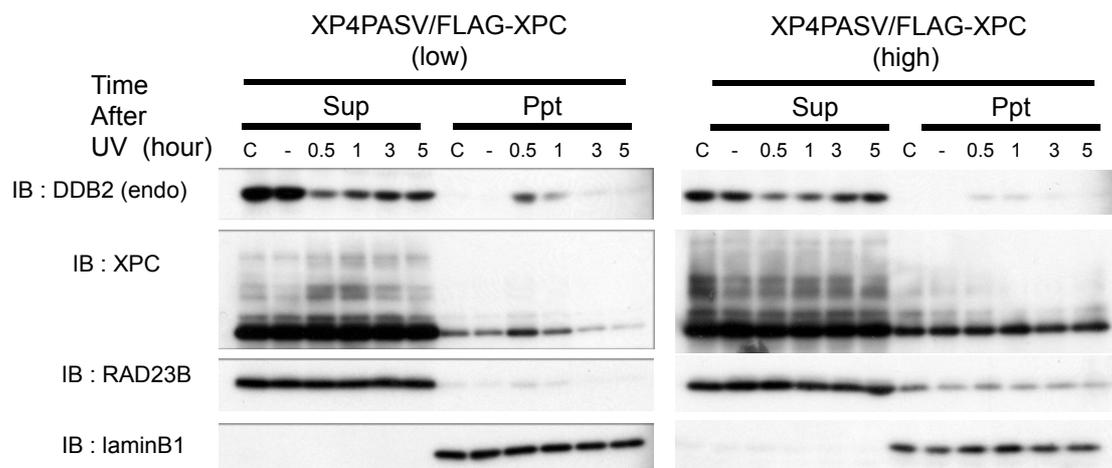


図 23 XPC 依存的に DDB2 の紫外線誘導性の分解が抑制される

XPC 発現細胞株を 1 mM CHX で処理した後、紫外線 (10 J/m²) を照射してさまざまな時間培養した。0.3 M NaCl を含む CSK バッファーを用いて分画し、抗 DDB2 抗体、抗 XPC 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。「C」は CHX 処理を行わず紫外線も非照射のレーン、「-」は薬剤処理のみで紫外線非照射のレーンを示す。DDB2 のバンド強度を定量し、「-」を 100%として定量値をグラフ化した。エラーバーは 2 回の独立した実験の標準誤差を示す。

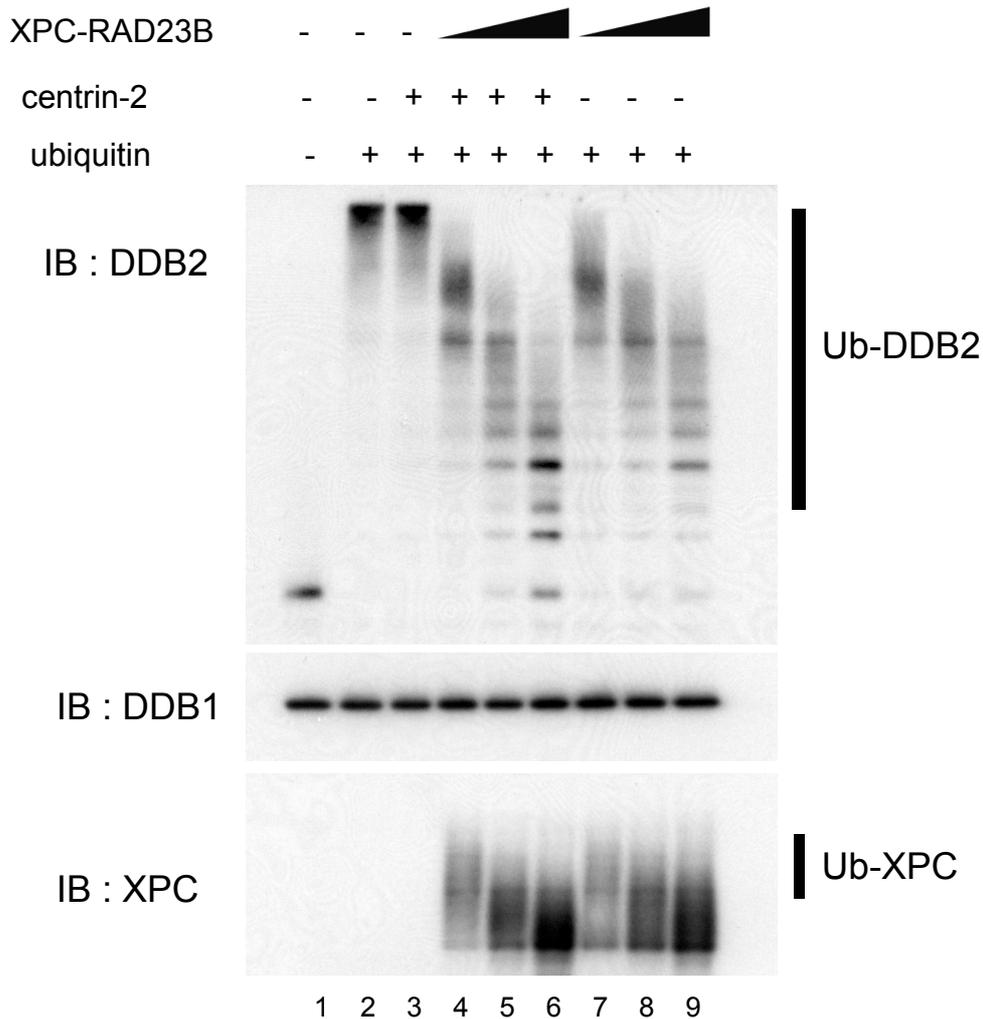


図 24 XPC 複合体は DDB2 のユビキチン化を抑制する

CRL4^{DDB2} に E1、E2、ATP、ユビキチン (63 ng)、XPC-RAD23B (82, 164, 328 ng)、centrin-2 (330 ng) を図に示すように加えて無細胞ユビキチン化反応を行った。反応を EDTA で停止させた後、反応液を SDS-PAGE で展開し、抗 DDB2 抗体、抗 DDB1 抗体、抗 XPC 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

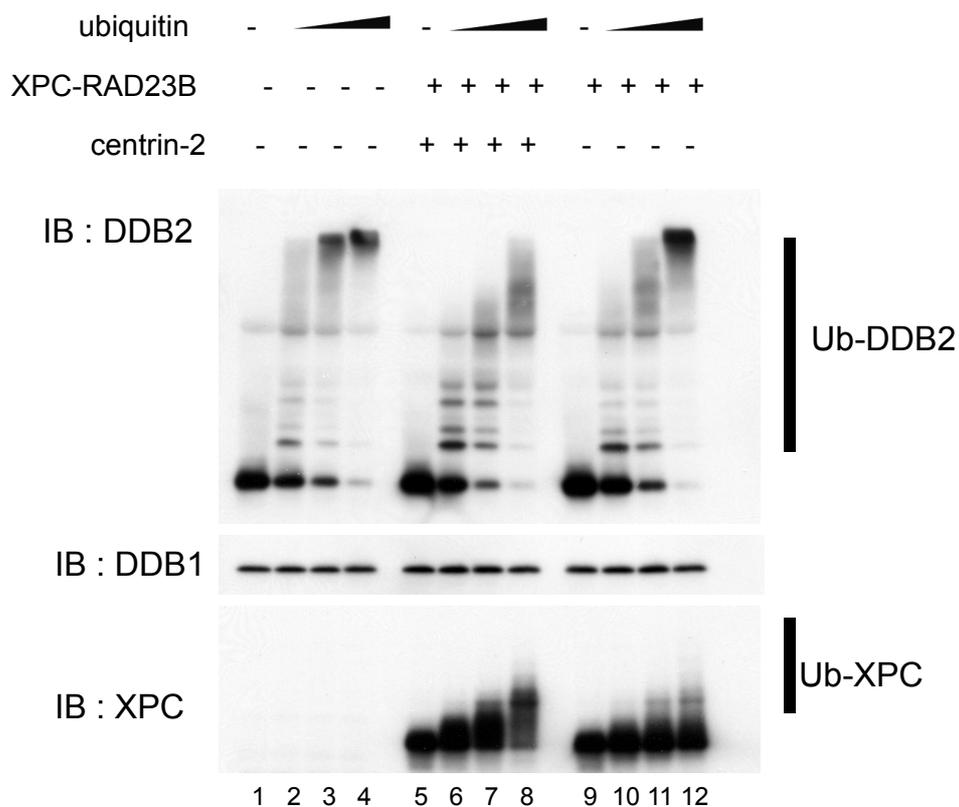


図 25 centrin-2 存在下では XPC による DDB2 ユビキチン化の阻害が亢進する

CRL4^{DDB2} に E1、E2、ATP、ユビキチン (31, 63, 125 ng)、XPC-RAD23B (328 ng)、centrin-2 (330 ng) を図に示すように加えて無細胞ユビキチン化反応を行った。反応を EDTA で停止させた後、反応液を SDS-PAGE で展開し、抗 DDB2 抗体、抗 DDB1 抗体、抗 XPC 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

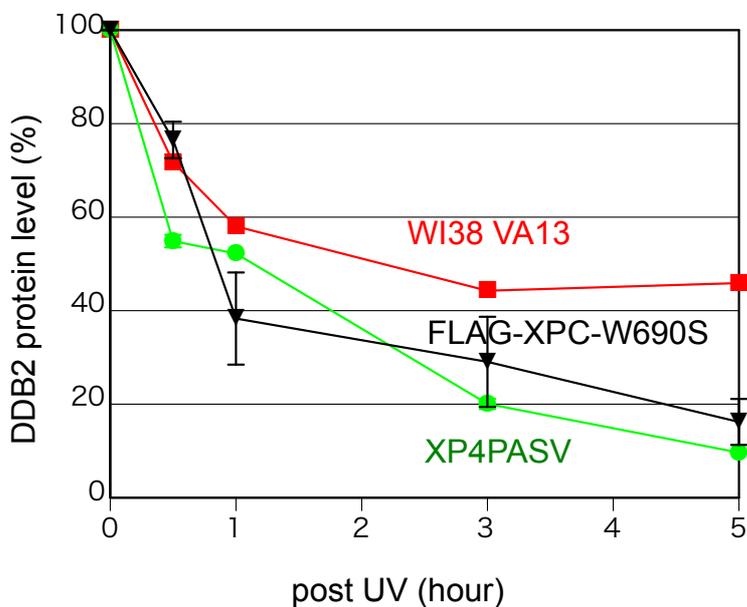
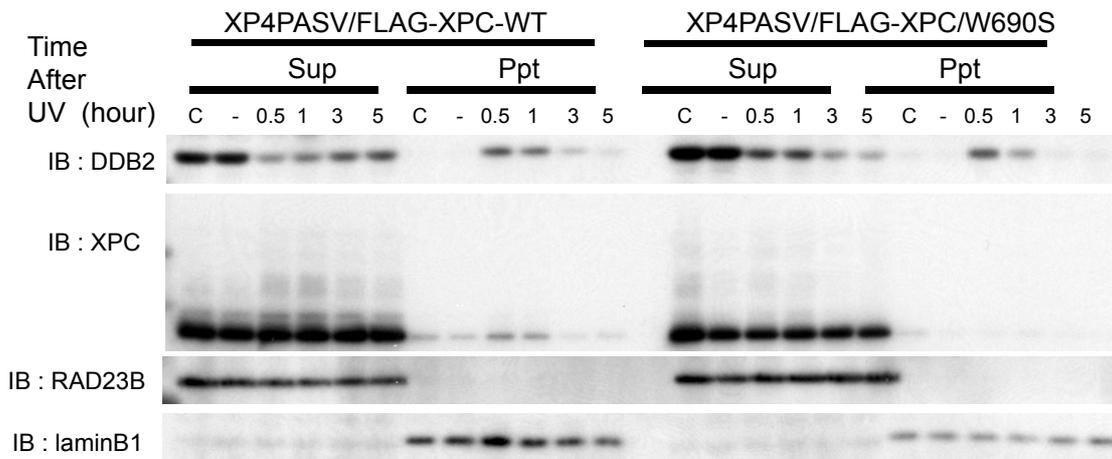


図 26 XPC-W690S 変異体は DDB2 の紫外線誘導性の分解を抑制出来ない

野生型 XPC および XPC-W690S 発現細胞株を 1 mM CHX で処理した後、紫外線 (10 J/m²) を照射してさまざまな時間培養した。0.3 M NaCl を含む CSK バッファーを用いて分画し、抗 DDB2 抗体、抗 XPC 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。「C」は CHX 処理を行わず紫外線も非照射のレーン、「-」は薬剤処理のみで紫外線非照射のレーンを示す。DDB2 のバンド強度を定量し、「-」を 100% として定量値をグラフ化した。エラーバーは 2 回の独立した実験の標準誤差を示す。

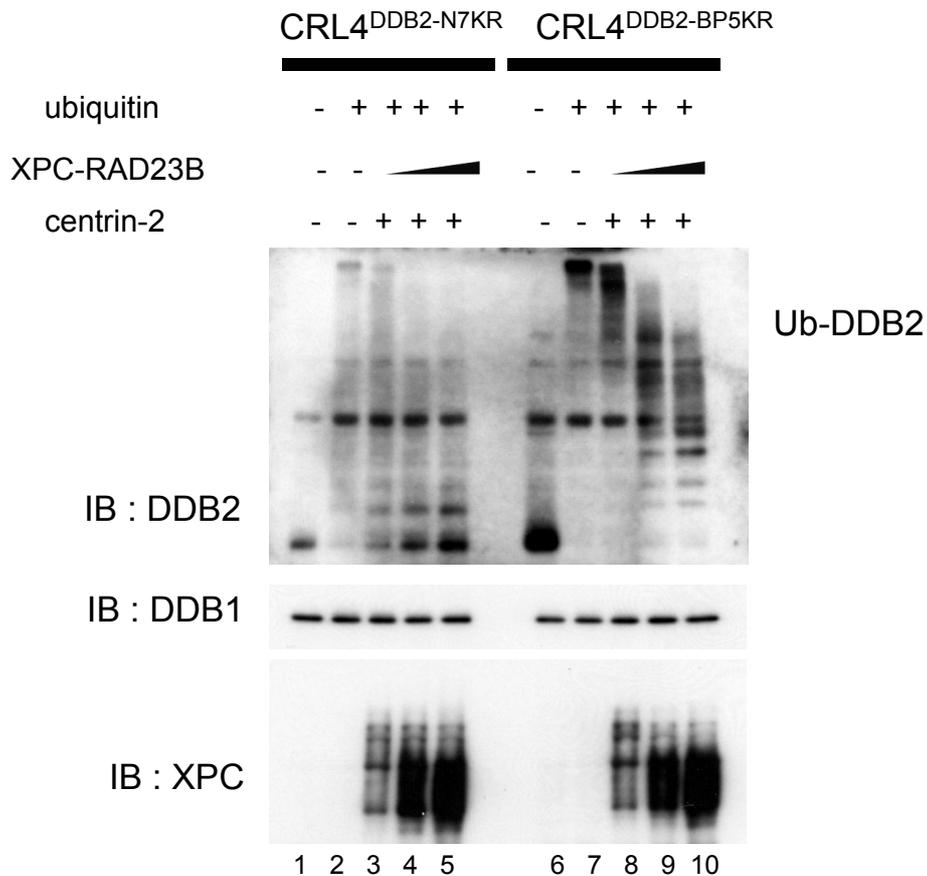


図 27 XPC は変異 DDB2 のユビキチン化も阻害する

CRL4^{DDB2} および CRL4^{DDB2-BP5KR} に E1、E2、ATP、ユビキチン (125 ng)、XPC-RAD23B (82, 164, 328 ng)、centrin-2 (330 ng) を図に示すように加えて無細胞ユビキチン化反応を行った。反応を EDTA で停止させた後、反応液を SDS-PAGE で展開し、抗 DDB2 抗体、抗 DDB1 抗体、抗 XPC 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

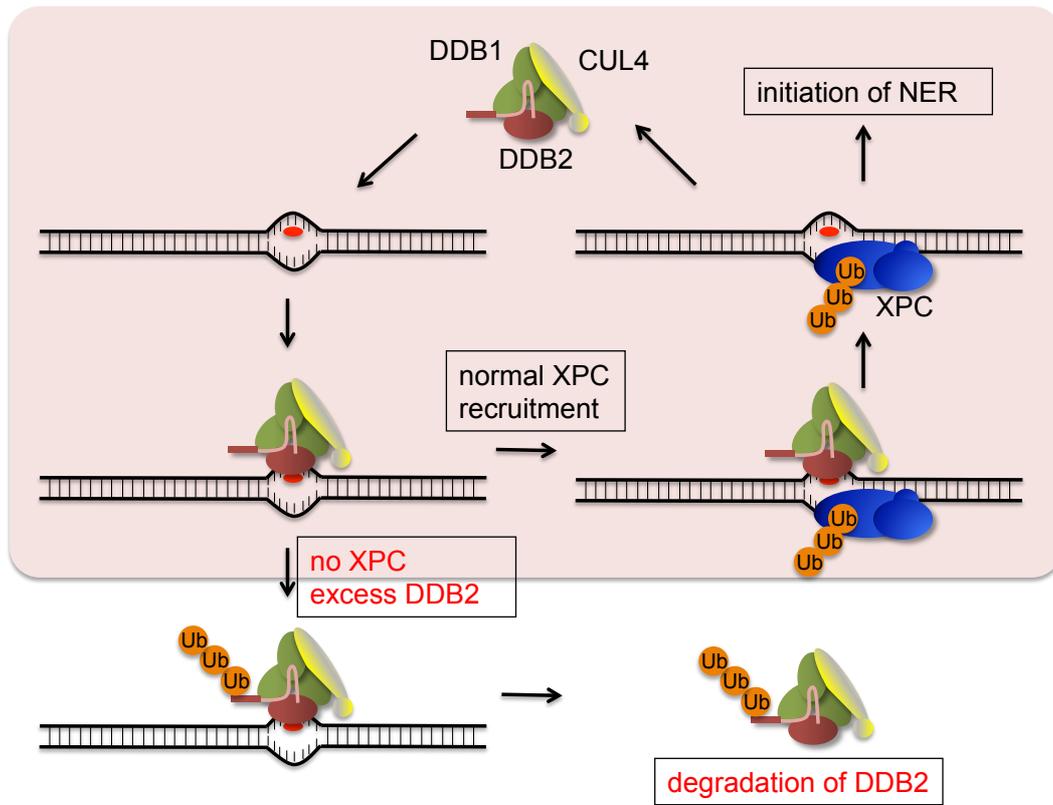


図 28 XPC による UV-DDB の機能制御モデル

DDB2 が損傷を認識した後、XPC が適切にリクルートされれば XPC が DDB2 のユビキチン化を吸収することで DDB2 は分解を免れ、再び損傷を認識することが出来ると考えられる。一方、XPC のリクルートに失敗して修復反応が開始出来ない場合、DDB2 は自身をポリユビキチン化することで速やかに分解される。

Primer name	
DDB2-Ndel #1	forward CCCATATGGGCTCCGGTCCTAGCAGAAGA
DDB2-Ndel #2	reverse GGACTAGTTCACTTCCGTGTCCTGGCTTCCTCC
K146/151R	forward GGCATCAAGGACAGACCCACCTTCATCAGAGGGATTGGAGC
K187R	forward ACAACTAGGCTGCAAGACTTTAGAGGCAACATTCTACG
K233R	forward TGCTGAACATGGACGGCAGAGAGCTTTGGAATCTC
K278R	forward CTGCGCCAGGTTAGAGGGAGAGCCAGCTTC

表 1 本研究で使用したプライマーリスト

【参考文献】

- (1) Friedberg EC. *Nat Rev Cancer*. 1(1):22-33 (2001)
- (2) Volker M, Moné MJ, Karmakar P, van Hoffen A, Schul W, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, van Driel R, van Zeeland AA, Mullenders LH. *Mol Cell*. 8(1):213-24 (2001)
- (3) Sugasawa K, Hanaoka F. *Nat Struct Mol Biol*. 14(10):887-8 (2007)
- (4) Svejstrup JQ. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3(1):21-9 (2002)
- (5) Tornaletti S, Hanawalt PC. *Biochimie*. 81(1-2):139-46 (1999)
- (6) Sugasawa K, Ng JM, Masutani C, Iwai S, van der Spek PJ, Eker AP, Hanaoka F, Bootsma D, Hoeijmakers JH. *Mol Cell*. 2(2):223-32 (1998)
- (7) Riedl T, Hanaoka F, Egly JM. *EMBO J*. 22(19):5293-303 (2003)
- (8) Schaeffer L, Moncollin V, Roy R, Staub A, Mezzina M, Sarasin A, Weeda G, Hoeijmakers JH, Egly JM. *EMBO J*. 13(10):2388-92 (1994)
- (9) Missura M, Buterin T, Hindges R, Hübscher U, Kaspárková J, Brabec V, Naegeli H. *EMBO J*. 20(13):3554-64 (2001)
- (10) O'Donovan A, Davies AA, Moggs JG, West SC, Wood RD. *Nature*. 371(6496):432-5 (1994)
- (11) Sijbers AM, de Laat WL, Ariza RR, Biggerstaff M, Wei YF, Moggs JG, Carter KC, Shell BK, Evans E, de Jong MC, Rademakers S, de Rooij J, Jaspers NG, Hoeijmakers JH, Wood RD. *Cell*. 86(5):811-22 (1996)
- (12) Matsunaga T, Mu D, Park CH, Reardon JT, Sancar A. *J Biol Chem*. 270(35):20862-9 (1995)
- (13) Aboussekhra A, Biggerstaff M, Shivji MK, Vilpo JA, Moncollin V, Podust VN, Protić M, Hübscher U, Egly JM, Wood RD. *Cell*. 80(6):859-68 (1995)
- (14) Takao M, Abramic M, Moos M Jr, Otrin VR, Wootton JC, McLenigan M, Levine AS, Protić M. *Nucleic Acids Res*. 21(17):4111-8 (1993)
- (15) Imoto K, Kobayashi N, Katsumi S, Nishiwaki Y, Iwamoto TA, Yamamoto A, Yamashina Y, Shirai T, Miyagawa S, Dohi Y, Sugiura S, Mori T. *J Invest Dermatol*. 119(5):1177-82 (2002)
- (16) Sugasawa K, Okuda Y, Saijo M, Nishi R, Matsuda N, Chu G, Mori T, Iwai S, Tanaka K, Tanaka K, Hanaoka F. *Cell*. 121(3):387-400 (2005)

- (17) Scrima A, Konícková R, Czyzewski BK, Kawasaki Y, Jeffrey PD, Groisman R, Nakatani Y, Iwai S, Pavletich NP, Thomä NH. *Cell*. 135(7):1213-23 (2008)
- (18) Datta A, Bagchi S, Nag A, Shiyanov P, Adami GR, Yoon T, Raychaudhuri P. *Mutat Res*. 486(2):89-97 (2001)
- (19) Sugasawa K, Masutani C, Uchida A, Maekawa T, van der Spek PJ, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Hanaoka F. *Mol Cell Biol*. 16(9):4852-61 (1996)
- (20) Sugasawa K, Akagi J, Nishi R, Iwai S, Hanaoka F. *Mol Cell*. 36(4):642-53 (2009)
- (21) Laemmli U. K. *Nature* 227:680-85 (1970)
- (22) Fischer ES, Scrima A, Böhm K, Matsumoto S, Lingaraju GM, Faty M, Yasuda T, Cavadini S, Wakasugi M, Hanaoka F, Iwai S, Gut H, Sugasawa K, Thomä NH. *Cell*. 147(5):1024-39 (2011)
- (23) Nishi R, Sakai W, Tone D, Hanaoka F, Sugasawa K. *Nucleic Acids Res*. 41(14):6917-29 (2013)
- (24) Yasuda G, Nishi R, Watanabe E, Mori T, Iwai S, Orioli D, Stefanini M, Hanaoka F, Sugasawa K. *Mol Cell Biol*. 27(19):6606-14 (2007)
- (25) Hwang BJ, Ford JM, Hanawalt PC, Chu G. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(2):424-8 (1999)
- (26) Itoh T, Cado D, Kamide R, Linn S. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(7):2052-7 (2004)
- (27) Kim W, Bennett EJ, Huttlin EL, Guo A, Li J, Possemato A, Sowa ME, Rad R, Rush J, Comb MJ, Harper JW, Gygi SP. *Mol Cell*. 44(2):325-40 (2011)
- (28) Puumalainen MR, Lessel D, Rütthemann P, Kaczmarek N, Bachmann K, Ramadan K, Naegeli H. *Nat Commun*. 5:3695 (2014)

第二章

【略語】

ABC	ammonium bicarbonate
ACN	acetonitrile
BPB	bromophenol blue
BSA	bovine serum albumin
CHX	cycloheximide
CPD	cyclobutane pyrimidine dimer
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
MEF	mouse embryonic fibroblast
NEM	<i>N</i> -ethylmaleimide
NER	nucleotide excision repair
NP-40	Nonidet P-40
PBS	phosphate-buffered saline
Pipes	piperazine-1,4-bis (2-ethanesulfonic acid)
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	polyvinylidene difluoride
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering RNA
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
UV-DDB	UV-damaged DNA-binding protein
6-4PP	pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct

【序論】

DDB2 は損傷認識因子としての機能だけでなく、p53 の発現量に影響を与えることでさまざまな DNA 損傷応答に関わる可能性が指摘されている。Ddb2 遺伝子欠損マウス胎仔線維芽細胞では p53 の発現量が低下していること、およびそのマウスでは紫外線照射による皮膚の腫瘍形成が促進されることが報告されており、p53 を介して p21 や MDM2 といった p53 下流因子の発現に影響を受けることが示唆されている (1)。逆に、アポトーシス関連因子の発現を促進、または抑制することにより、損傷修復活性が制御されることも指摘されており、抗アポトーシス因子である CC3/TIP30 を過剰発現させると、紫外線誘発 DNA 損傷の修復遅延が生じることが報告されている (2)。さらに、XP-E 群患者由来細胞では p21 の発現量が増加しているが、この p21 を抑制することによりヌクレオチド除去修復 (NER) 活性が上昇することが示されている (3, 4)。このように、DDB2 は損傷認識因子以外の機能に関しても注目を浴びつつあるとともに、アポトーシス制御機構と NER 反応機構が相互に影響し合う可能性も指摘されている。さらに、DDB2 の N 末端領域への翻訳後修飾に関しても当研究室により見出された CBP/p300 によるアセチル化やポリユビキチン化に加えて、poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) によってポリ ADP リボシル化を受けること (5)、質量分析を用いた解析からヒストンメチル化酵素 NRMT によって α -N-メチル化を受けることが無細胞系で示されている (6)。加えて、細胞を p38 MAP キナーゼの阻害剤で処理することで DDB2 のプロテアソームによる分解が抑制されることが見出されており、DDB2 の N 末端領域が p38 MAP キナーゼによってリン酸化を受ける可能性も示唆されている (7)。これらのことから、近年 DDB2 は他のタンパク質と協調して幅広い機能を担っている可能性が考えられている。しかしながら、DDB2 が細胞応答に関わる具体的なシグナル伝達機構については明らかになっておらず、損傷認識段階から細胞応答へ至るまでの DDB2 の機能の全体的な理解が細胞の紫外線に対する応答の全容を明らかにする上で重要である。一方、NER 反応のコア部分においては、 ^{32}P で標識した環状の損傷 DNA を基質として、XPC-RAD23B、XPA、XPG、XPF-ERCC1、RPA、TFIIH、ATP を加えることによる試験管内損傷切り出し反応の再構成が行われており、それぞれの必須因子が NER 反応系で担う役割の理解が進んできている。しかしながら、この NER 再構成系に UV-DDB あるいは CRL4^{DDB2} を加えても、むしろ NER 反応を阻害することが見出されており、培養細胞を用いた実験で報

告されているような DDB2 による CPD 修復促進効果は未だに再現出来ていない。これら NER 再構成系では裸の DNA を基質として用いており、ヌクレオソーム上の損傷に対する NER 反応機構や、クロマチンリモデリング因子が NER 反応においてどのような役割を担っているかについては不明な点が多く残されている。

ヒト RUVBL2/TIP49B (RuvB-like protein 2) は INO80 をはじめとするさまざまなクロマチンリモデリング因子のサブユニットとして知られている必須遺伝子産物の一つであり、*Ruvbl2* 遺伝子ノックアウトマウスは胚性致死になることが報告されている (8, 9)。RUVBL1/TIP49A と RUVBL2 は互いに 60% のアミノ酸相同性を持っており、原核生物に存在する AAA+ ATPase ヘリカーゼ RuvB タンパク質のホモログとしてそれぞれ同定された。細胞内ではそれぞれ 3 分子ずつが交互に結合することでリング状の六量体を構成し、それが二つ重なることでヘテロ 12 量体を形成している。この複合体はヘリカーゼ活性を持っており、一方をノックダウンすることでもう一方の発現量も低下することが知られている (10)。RUVBL1 と RUVBL2 は共に INO80 などのクロマチンリモデリング因子の構成因子として存在しているが (11-14)、一方でさまざまな転写因子との相互作用を介して転写制御に関与するとともに、c-Myc や β -catenin などのがん遺伝子産物との相互作用も報告されている (15-17)。RUVBL1 はヒストンアセチル化酵素 TIP60 複合体の必須構成因子の一つとしても知られており、TIP60 のアセチル化酵素活性に必要であると共に、DNA 二重鎖切断のシグナルとして知られるヒストン H2AX のリン酸化の抑制において重要な役割を担っている (18)。また、RUVBL2 を siRNA によりノックダウンすると、細胞は中波長紫外線 (UVB) 感受性を示し、H2AX のリン酸化が亢進することが見出されている (19)。このように、RUVBL タンパク質はさまざまな因子と相互作用しながら多彩な機能を発揮しており、RUVBL2 の欠損が紫外線感受性を示すことから NER 反応に RUVBL タンパク質が何らかの機能を担っている可能性が期待されるが、RUVBL タンパク質と NER 反応の関係についてはほとんど理解が進んでいない。

がん遺伝子として近年注目を浴びつつあるタンパク質の一つとして、解糖系律速酵素でありピルビン酸合成に必須である pyruvate kinase protein (PK) が知られている。PK は組織特異的なアイソフォームが存在することがわかっており、ほとんどの組織では M1 型 (PKM1) と M2 型 (PKM2) の二つのアイソフ

オームのどちらかが発現している (20)。PKM2 はほとんどのがん細胞で高発現しており、がん細胞の指標として近年注目されつつある。PKM2 は PKM1 と比較してより高いピルビン酸キナーゼ活性を持つことが報告されており、がん細胞においては PKM1 の代わりに PKM2 が活性化されている。ほとんどのがん細胞では解糖系が活性化しており、嫌気条件下でも盛んに増殖を行うように代謝変化が起こることが古くから知られている (ワーバーク効果と呼ばれる)。ワーバーク効果はスプライシングの変化により PKM1 から PKM2 への発現のスイッチングが起こる結果、PKM2 が過剰に解糖系の進行を促進するために引き起こされると考えられている (21, 22)。最近になって、PKM2 はピルビン酸キナーゼとしての機能のみならず、DNA 損傷に伴って核内へ移行し、細胞のアポトーシスを制御している可能性が指摘されている (23, 24)。PKM2 は二量体を形成してプロテインキナーゼとして機能することが見出され、Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) のチロシン 705 番のリン酸化を促進し、*c-Myc* や *cyclin D1* 遺伝子の転写を促進すること、さらにはヒストン H3 のトレオニン 11 番のリン酸化に関与し、H3 の 9 番目のリジン残基のアセチル化を促進することが報告されている (25-27)。これらのことから PKM2 は細胞内の転写制御やアポトーシス制御において多彩な機能を発揮している可能性が期待されているが、PKM2 の機能の全容については不明な点が多く残されている。

N 末端領域のリジン残基に変異を持つ DDB2 の安定発現が、細胞の紫外線感受性をさまざまに変化させることが第一章の結果から示されており、DDB2 は DNA 損傷修復とは独立して細胞の紫外線応答に関わっている可能性が考えられた。特に N 末端領域のリジン残基を欠失した DDB2 よりもむしろアルギニンやグルタミンに置換した方がより紫外線感受性を示すようになることから、DDB2 にはこれまでに知られていない相互作用因子が存在しており、N 末端領域における変異が相互作用因子の結合に影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで私は DDB2 の新規相互作用因子の探索を試みた。本章では新規相互作用因子として同定された RUVBL2 と PKM2 を介した DDB2 の新たな細胞応答制御機構の解明を目的として研究を行った。

【実験材料と実験手法】

プラスミドコンストラクト

pBS/DDB2を鋳型として二種類のプライマー (DDB2C-XhoI #1, #2: 表1) を用いて PCR を行い、N 末端側に *NcoI* 認識配列、C 末端側に *XhoI* 認識配列が付加された DDB2 をコードする PCR 産物を得た。この PCR 産物を制限酵素 *XhoI* (Takara Shuzo) で切断した pBS/HA につなぎ、C 末端側に HA タグが付加された pBS/DDB2-HA を作成した。二種類の一本鎖オリゴ (FLAG-PS #1, #2: 表1) をアニールすることで、FLAG タグと PreScission protease (PS) 認識配列をコードする DNA 断片を作成し、これを DDB2 と HA タグの配列の間の *XhoI* サイトに挿入することで、C 末端に FLAG タグ、PS 認識配列、HA タグが順次融合された DDB2 (pBS/DDB2-FLAG-PS-HA) を作成した。その他の変異 DDB2 についても同様に FLAG タグと HA タグを融合した。これらを PCR 時に付加した *NcoI* 制限酵素サイトを利用して *NcoI* と *BamHI* で切断し、同じ酵素で切断した pMMP レトロウイルスベクターに挿入することで、pMMP/DDB2-FLAG-PS-HA、pMMP/DDB2-Ndel-FLAG-PS-HA、pMMP/DDB2-N7KQ-FLAG-PS-HA をそれぞれ作成した。pMMP ベクターは当研究室の酒井恒助教より供与していただいた。

細胞培養

ヒト骨肉腫細胞 U2OS、XP-C 群患者由来細胞 XP4PASV、および HEK293GPG 細胞は 10% FBS を加えた DMEM 培地 (ニッスイ) を用い、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。HeLa S3 細胞の浮遊培養は、10% FBS を加えた RPMI1640 培地 (Life Technologies) を用いて行った。

FLAG タグと HA タグを融合した DDB2 安定発現細胞株の樹立

レトロウイルス・パッケージング細胞 HEK293GPG に FuGENE 6 (Promega) を用いて pMMP、pMMP/DDB2-FLAG-PS-HA、pMMP/DDB2-Ndel-FLAG-PS-HA、pMMP/DDB2-N7KQ-FLAG-PS-HA をそれぞれ導入した。10% FBS を含む DMEM 培地を用い、毎日培養上清の回収、培地の交換をしながら 9 日間培養した。実際には、6 日目に回収した培養上清をウイルス溶液として使用した。HeLa S3 細胞 (100 mm dish : 50% confluent) に 10% FBS を含む RPMI1640 培地 8 ml、ウイルス溶液 2 ml、Polybrene 500 ng/ml を加えて 37°C で 6 時間培

養した。その後、10% FBS を含む RPMI1640 培地で 37°C、24 時間培養し、1 µg/ml のピューロマイシン入りの培地と交換し、2 週間細胞の選択を行った。

抗体

抗 XPC 抗体は N 末端のアミノ酸配列に相当する合成ペプチド (28)、抗 RAD23B 抗体はタンパク質全長を抗原 (29) としてウサギの免疫を行い、得られた抗体をアフィニティ精製したものをを用いた。抗 laminB1 抗体 (C-20) は Santa Cruz、抗 DDB2 抗体は R&D Systems、抗 HA 抗体 (3F10) は Roche、抗 DDB1 抗体は BD Transduction Laboratories、抗 6-4PP 抗体 (64M-2) と抗 CPD 抗体 (TDM-2) はコスモバイオ、抗 PKM2 抗体と抗 RUVBL2 抗体は Cell Signaling からそれぞれ購入した。

細胞抽出液調製

細胞を氷上に移し氷冷した PBS (-) で洗浄後、0.3 M NaCl を含む CSK バッファー [10 mM Pipes-NaOH (pH 6.8), 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1% Triton X-100, 33.3% sucrose, 10 mM NEM (和光純薬), 0.25 mM PMSF (Sigma), 1 µg/ml leupeptin (Roche), 2 µg/ml aprotinin (Roche), 1 µg/ml pepstatin (Roche), 50 µg/ml Pefabloc SC (AEBSF: Roche)] を細胞量に応じて加え、氷上にて 1 時間インキュベートした。細胞をバッファーごとにかきとり 1.5 ml チューブに移し、20,400 x g、4°C で 10 分間遠心した。遠心後、上清を可溶性画分として使用した。遠心により生じたペレットを同じバッファーで 2 回洗浄した後、バッファーを可溶性画分の半分量加え、超音波発生機 UR-21P (トミー精工) を用いてペレットを破碎・懸濁 (出力 10W、10 秒間) したものを不溶性画分として使用した。

免疫沈降

HA タグを利用する場合は、細胞の可溶性画分に抗 HA (3F10) 抗体アガロースビーズ (Roche) を 30 µl 加えて、4°C で一晩振盪した。9,000 x g、1 分間、4°C で遠心した後上清を取り除き、500 µl の 0.3 M NaCl を含む CSK バッファーで 5 回洗浄を行い、β-ME を含まない 2 x SDS-sample buffer [130 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 20% glycerol, 0.04% BPB] を 20 µl 加えて室温で一晩静置した。FLAG タグを利用する場合は、可溶性画分に抗 FLAG M2 抗体アガロース

ビーズ (Sigma) を 50 μ l 加えて 4°C で一晩振盪した。その後 HA タグを利用するときと同様の操作を行い、100 μ g/ml になるように 0.15 M NaCl を含む CSK バッファーに FLAG ペプチドを溶解したものを 50 μ l 加えて、4°C で 30 分静置して溶出した。その後、9,000 x g、1 分間遠心し、得られた上清を免疫沈降画分とした。

Crystal Violet 試験

細胞を 6 ウェルプレートに、それぞれ 5×10^4 個ずつ播き、37°C で一晩培養した。培地を除去した後、さまざまな線量の紫外線 (0、1、2、5 J/m²) を各線量につき 2 つのウェルに照射し、培地を 3 ml 加えた。二日後、2 ml の PBS (-) で洗浄し、固定液 (10%メタノール、10%酢酸) を 1 ml 加えて室温で 5 分静置した。固定液を除去し、Crystal Violet 溶液 [1% Crystal Violet (Sigma) をメタノールに溶解したもの] を 1 ml 加えて 3 分間静置した。水道水で丁寧に洗浄して乾燥させた後、溶出液 (1% SDS をメタノールに溶解したもの) を 0.5 ml 加えて二時間室温で振盪し、595 nm の吸光度を iMark マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) を使用し測定した。2 つのウェルの平均値を測定値とした。

ウェスタンブロット

泳動後のゲルをセミドライ法 (4°C、1.3 mA/cm²、2 hr) により、PVDF 膜 (Pore size 0.45 μ m、Immobilon-P、Millipore) に転写した。転写した PVDF 膜は Blocking buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.02% I-Block (Tropix), 0.1% Tween 20, 0.02% NaN₃] で 30 分間ブロッキングし、Blocking buffer で希釈した一次抗体と 4°C で一晩反応させた。Blocking buffer による洗浄を 4 回を行い、次に Blocking buffer で 10,000 倍希釈したアルカリホスファターゼ標識二次抗体 (Sigma) と室温で 1 時間反応させた。一次抗体の場合と同様に Blocking buffer による洗浄を 4 回行った後、Assay buffer [100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl] で 5 分間、2 回震盪しバッファーを置換した。検出は CDP-Star (Tropix) を基質として用いた化学発光法により行い、X 線フィルム (RX-U、Fujifilm) に露光した。

紫外線照射

紫外線 (UVC) 照射にはアベ製作所製造の殺菌灯照射装置 VA-5 を使用した。照

射 30 分前に紫外線ランプ (Toshiba GL15) を必要本数点灯させておき、照射直前に紫外線強度計 (UVP: 254 nm センサー使用) での実測値が 0.1 J/m²/sec または 0.5 J/m²/sec になるよう電圧を調整した。細胞をクリーンベンチに移し、培地を除去後、殺菌灯照射装置に移動させ、目標の線量に達するまで静置した。紫外線照射後、クリーンベンチ内で細胞に培地を添加し、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。

新規相互作用因子を含む DDB2 複合体の精製

HeLa S3 細胞を 10% FBS を含む RPMI1640 培地 3 リットル中で 1 x 10⁶ 個/ml 以上の密度になるまで培養し、1,000 rpm で 10 分間遠心して集めた後、40 ml の PBS (-) で 2 回洗浄した。これを 10 mM NaCl を含む Buffer E [10 mM Tris-HCl (pH7.4), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM β-ME, 10% glycerol, 0.2 mM PMSF, 1 μg/ml leupeptin, 2 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml pepstatin, 50 μg/ml Pefabloc SC (AEBSF)] 40 ml で懸濁した後 20 ml ずつ分け、Dounce 型ホモジナイザーを使用して 20 ストローク (pestle A) 処理することで破碎した。破碎した懸濁液に 1.65 M NaCl 溶液を 10 分の 1 量加えて 4°C、1 時間攪拌した。これを 35,000 rpm で 20 分間遠心 (Beckman 50.2 Ti ローター) して得られた上清を全細胞抽出液として精製に用いた。抗 HA 抗体を固定化させた HiTrap NHS-activated カラム (1 ml: GE Healthcare) を 0.1 M NaCl を含む PET buffer [20 mM sodium phosphate (pH 7.8), 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.01% Triton X-100, 0.25 mM PMSF, 1 mM DTT] で平衡化し、これに上清を通した。十分洗浄した後、8.5 μg/ml PreScission protease と 0.1 M NaCl を含む PET バッファー 1 ml をカラム内に充填させ、4°C で一晩放置して HA タグを切断した後、0.1 M NaCl を含む PET バッファーを通して溶出した。続いて抗 FLAG M2 抗体アガロースビーズを詰めた Tricorn 5/50 カラムを 0.1M NaCl を含む PET バッファーで平衡化し、HA カラムから溶出された DDB2 を含む画分を通した。溶出は 100 μg/ml の FLAG ペプチドと 0.1 M NaCl を含む PET バッファーで行い、1 ml ずつ分画した。

質量分析

タンパク質サンプルを SDS-PAGE [5-20% SuperSep Ace (和光純薬)] で分離し、Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 (Bio-Rad) を用いて染色した。泳動した

レーンを適当な大きさのバンドに切り分けて 96 well プレートにそれぞれ移し、150 μ l の洗浄バッファー [25 mM ammonium bicarbonate (ABC), 50% acetonitrile (ACN)] で 2 回、100% エタノールで 1 回それぞれ洗浄した。その後溶液を除いて還元バッファー (10 mM DTT, 50 mM ABC) を 30 μ l 加えて 50°C で 1 時間静置した。溶液を除いた後、アルキル化バッファー (50 mM iodoacetamide, 50 mM ACN) を 25 μ l 加えて遮光状態で 45 分静置した。洗浄バッファーと 100% エタノールで 2 回ずつ交互に洗浄した後、Sequencing Grade Modified Trypsin (Promega) を 12.5 μ g/ml になるように 50 mM ABC で希釈し、各ウェルにそれぞれ 20 μ l 加えて 37°C、18 時間静置し、タンパク質をゲル内消化した。ゲル片を 50 mM ABC で洗浄した後、溶出液 (80% ACN, 0.5% trifluoroacetic acid) を 30 μ l 加えた。溶出後、ゲル片に 100 μ l のエタノール溶液を加えて再び溶出させた。さらに溶出液を 30 μ l 加えて溶出し、続いて 100 μ l の 100% エタノール溶液を加えて溶出させ、合計 260 μ l の溶出サンプルを混ぜ合わせた。これを遠心濃縮機で 30 μ l に濃縮した後、0.1% formic acid で湿らせた Empore C18 filter (3M) に吸着させた。100 μ l の 0.1% formic acid で洗浄した後、溶出液で溶出し、遠心濃縮機で 3 μ l まで濃縮した。ペプチド断片を含む溶液を飛行時間型質量分析装置 (Q-TOF LC/MS) を使用し質量分析を行い、解析ツール (MASCOT) を使用してタンパク質を同定した。

siRNA トランスフェクション

RUVBL2 のコーディング領域内の二か所の配列 (#1: CCGTGATGTAACAAGGATTGA, #2: TTCCTCTTCAACGAACTCAA) を標的として設計したセンス鎖とアンチセンス鎖のオリゴ (50 μ M), 30 μ l をそれぞれ混ぜた後、5 x annealing buffer (日本バイオサービス) を 15 μ l 加えて 90°C で 1 分間処理してから 37°C で 1 時間静置して、RUVBL2 に対する siRNA を作成した。1 x 10⁶ 個の細胞を 60 mm ディッシュに撒いて 37°C で一晩培養した。無血清培地 Opti-MEM (Life Technologies) と DharmaFECT (GE Healthcare) を用い、siRNA の最終濃度が 50 nM になるよう、DharmaFECT 付属のプロトコールに従って細胞を処理した。ネガティブコントロールは control siRNA (Qiagen) を用いて同様の濃度と手法で処理した。

【実験結果】

二重タグを融合した DDB2 安定発現細胞株の樹立

第一章で行った実験から、DDB2 の N 末端領域における翻訳後修飾が、損傷修復活性とは独立して、細胞の紫外線抵抗性に影響を与えることが示唆された。そこで、DDB2 が N 末端領域を介して種々の相互作用因子と協調して働くことで、さまざまな細胞応答の制御に関わっているのではないかと考え、DDB2 相互作用因子のスクリーニングを試みた。FLAG タグ、PreScission protease 認識配列、HA タグを順次融合した DDB2 を使用し、PreScission protease により HA タグを切断できるようにした。このタグを C 末端側に融合した野生型 DDB2、あるいは DDB2-Ndel、DDB2-N7KQ を pMMP ベクターに挿入し、293GPG 細胞に形質転換させて DDB2 を発現するレトロウイルスを作成した。作成したウイルスを浮遊状態で増殖する HeLa S3 細胞に感染させ、ピューロマイシンで選択することにより、DDB2-FLAG-HA、DDB2-Ndel-FLAG-HA、DDB2-N7KQ-FLAG-HA を安定発現する細胞株を作成した。この細胞株に対してウエスタンブロットを行い、いずれの DDB2 も同程度発現していることを確認した (図 1)。

相互作用因子を含む DDB2 複合体の単離

それぞれの細胞株を大量培養し、 3×10^9 個以上集めた。ホモジナイザーを用いて細胞を物理的に破碎した後、0.15 M NaCl を含むバッファーで抽出を行った。得られた全細胞抽出液をそれぞれ抗 HA 抗体カラムに結合させた後、PreScission protease により HA タグを切断して溶出した。次に溶出画分を抗 FLAG 抗体カラムに通し、FLAG ペプチドを用いて相互作用因子を含む DDB2 複合体を単離した。変異 DDB2 発現株について同様の操作を行って DDB2 複合体を単離し、溶出された画分のうち最も DDB2 の濃度が高かった画分をそれぞれ SDS-PAGE で展開した後、銀染色を行った (図 2)。いずれの細胞株から得た DDB2 複合体も、UV-DDB サブユニットである DDB1 に加えて多数のバンドが確認出来た。これらの画分をさらに濃縮するために、最終精製画分 500 μ l に硫酸アンモニウムを 80%飽和になるよう加えてタンパク質を沈殿させた。最終的に 15 μ l に濃縮した画分をそれぞれ SDS-PAGE で展開し、CBB 染色を行った (図 3)。染色後のゲルを図 3 に示すように切り分け、それぞれのゲル切片を 1 mm^2 以下になるよう細かく切断した。ゲル切片を還元アルキル処理した後にトリ

プシンを処理することによりゲル内消化した。その後、質量分析を行いそれぞれのゲル切片に含まれるタンパク質を同定した。

DDB2 複合体構成成分の同定

質量分析結果より、RUVBL2 と PKM2 が野生型 DDB2 を含む全てのサンプルで検出された (表 2)。また、野生型 DDB2 を含む画分と比較して、DDB2-Ndel および DDB2-N7KQ を含む画分に特異的な因子も複数得られた。ここではまず、全ての画分に含まれていた RUVBL2 と PKM2 の解析を試みた。濃縮前の最終精製画分を SDS-PAGE で展開し、抗 RUVBL2 抗体と抗 PKM2 抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ、いずれのタンパク質も野生型 DDB2 および DDB2-Ndel を含む複合体中に存在することが確認された。一方、DDB2-N7KQ を含む複合体における RUVBL2、PKM2 の存在量は、野生型、Ndel に比べてかなり低いように見受けられた (図 4)。続いて、樹立した HeLa S3 細胞の抽出液から抗 HA 抗体あるいは抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、よく洗浄した後、溶出した画分を SDS-PAGE で展開し、ウエスタンブロットを行った (図 5)。その結果、精製画分と同様に RUVBL2 および PKM2 が野生型 DDB2 と DDB2-Ndel と共沈していることが確認出来た。一方、DDB2-N7KQ との相互作用は RUVBL2 と PKM2 のいずれにおいても野生型 DDB2 と比べて弱いことが示された。このことから、DDB2 の N 末端領域は RUVBL2 や PKM2 との相互作用に必要ではないものの、N 末端領域のアセチル化が N 末端以外の領域に結合する因子との相互作用に影響を与えている可能性が考えられた。以上のことから DDB2 は細胞内で RUVBL2 と PKM2 との相互作用を介して何らかの機能に関わっている可能性が示唆された。RUVBL2 はさまざまなクロマチンリモデリング因子のサブユニットとして存在しており、クロマチンリモデリング因子の一つである INO80 と UV-DDB は細胞内で相互作用することが報告されている (30)。また、INO80 をノックダウンすることで、DDB2 の損傷部位への集積が低下することが見出されており、DDB2 が細胞内で損傷を効率的に修復する上でのクロマチンリモデリングの必要性が指摘されている。そこで、DDB2 が RUVBL2 と結合することで、クロマチンリモデリング因子と協調して働き、それにより効率的な損傷修復に寄与しているのではないかと考えた。

RUVBL2 の発現抑制により細胞は紫外線感受性を示す

NER 反応機構において RUVBL2 が担う機能を調べるため、siRNA を用いて RUVBL2 のノックダウンを試みた。細胞に 2 種類の siRNA を処理した後、3 日後に細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロットによる確認を行った。その結果、ネガティブコントロールと比較して siRUVBL2 を処理した場合に RUVBL2 のタンパク質量の低下が見られたため (図 6)、以降の実験には#1 と#2 を同時に処理することにした。RUVBL2 が NER 反応機構に関わっているかどうかを調べるため、RUVBL2 をノックダウンした条件で、6-4PP と CPD が主要な損傷として生じる短波長紫外線 (UVC) をさまざまな線量で照射し、細胞の紫外線感受性を測定した (図 7)。その結果、ネガティブコントロールと比較して RUVBL2 をノックダウンすることで細胞は紫外線感受性を示した。よって、RUVBL2 は DDB2 と協調して NER 反応に関与し、細胞の紫外線応答に関わる可能性が考えられた。

RUVBL2 の発現抑制は細胞の損傷修復速度を低下させる

RUVBL2 のノックダウンにより細胞が紫外線感受性を示すことから、RUVBL2 が紫外線損傷修復反応に関わっているのではないかと考えた。そこで RUVBL2 をノックダウンさせた状態で紫外線を照射し、6-4PP あるいは CPD に特異的な抗体を用いた ELISA 法により、損傷修復速度を調べた (図 8)。その結果、RUVBL2 をノックダウンすることにより 6-4PP の修復にわずかに遅延が見られる一方、CPD の修復速度についても有意に低下することが示された。このことから、RUVBL2 は紫外線損傷修復、特に CPD の修復を促進している可能性が示唆された。

【考察】

本章の結果から、DDB2 の新規相互作用因子として RUVBL2 と PKM2 が同定された。RUVBL2 は INO80 のサブユニットの一つとしても知られており、UV-DDB と INO80 が細胞内で相互作用することが報告されていることから、DDB2 が RUVBL2 との相互作用を介して INO80 をはじめとするさまざまなクロマチンリモデリング因子と協調して働く可能性が考えられた。RUVBL2 をノックダウンすることで細胞が短波長紫外線 (UVC) に対して感受性を示すこと、および紫外線損傷修復速度の低下が見られることから、RUVBL2 が DDB2 やクロマチンリモデリング因子と協調して NER 反応を促進している可能性が示唆された。特に CPD の損傷修復に大きな差が見られたことから、XPC が単独で認識出来ない損傷については DDB2 だけでは十分ではなく、RUVBL2 タンパク質や RUVBL2 と相互作用するさまざまなクロマチンリモデリング因子の存在が必要である可能性が考えられる。もしクロマチンリモデリング因子が DDB2 と協調して損傷修復反応を促進しているならば、損傷部位周辺のヌクレオソームの状態を変化させることで、NER 因子のリクルートを促進しているかもしれない (図 9)。今後は細胞の損傷部位におけるクロマチンやヌクレオソームの状態と、RUVBL2 を介したクロマチンリモデリング因子との関係性に焦点を当て、より詳しく調べる必要があるだろう。

一方、これまで裸の損傷 DNA を基質として用いた無細胞系による NER 反応機構の研究が進められて来たが、実際の細胞では DNA はヒストンに巻き付いた高次構造をとっており、無細胞 NER 反応系で解析が進められている損傷認識から切り出しに至るまでの機構に加えて、損傷認識より前段階の反応機構への理解も極めて重要である。将来的にクロマチン構造を取った損傷 DNA を基質とした、より細胞内の状態に近い無細胞 NER 再構成系の確立が必要であり、その場合、DDB2、RUVBL2、INO80 などのクロマチンリモデリング因子とそのサブユニットを加えることにより DDB2 による修復促進効果が再現出来る可能性が考えられる。

RUVBL2 がクロマチンリモデリングのみならず、細胞増殖やアポトーシスに関わっているという報告から、DDB2 と RUVBL2 との相互作用が損傷修復促進効果だけでなく、細胞の紫外線応答に関わっている可能性も考えられた。DDB2-N7KQ と RUVBL2 との相互作用が減弱しているように見えることから、DDB2 のアセチル化が RUVBL2 との相互作用を弱めることで、転写因子として

の機能や、c-Myc や β -catenin などとの相互作用が促進されることにより、結果的にアポトーシスが誘導される可能性も考えられる。また、PKM2 は解糖系酵素として知られているが、近年 PKM2 がプロテインキナーゼとして働き、ヒストン H3 や STAT3 を標的としてリン酸化することで下流の遺伝子発現を制御することが報告され、細胞内シグナルとして重要な役割を担っていることが示唆されている。さらに DNA 損傷に応答して核内へ移行してアポトーシスを促進することも示唆されており、DDB2 と PKM2 との相互作用が紫外線に応答した細胞死誘導に関わっている可能性も考えられる。特に DDB2-N7KQ と PKM2 との相互作用が減弱することから、DDB2 と PKM2 の相互作用を介した何らかの機能制御に N 末端領域のアセチル化に関わっているかもしれない。今後、DDB2 の過剰発現、あるいはノックアウトが PKM2 経路に与える影響を調べるとともに、N 末端領域の翻訳後修飾がどのような影響を与えるかを調べる必要があるだろう。細胞は修復不能なほど重度の DNA 損傷を受けた場合、積極的にアポトーシスに向かうことが知られているが、修復とアポトーシスとの運命決定にどのような因子が関わっているかはほとんどわかっていない。もし DNA 損傷に応答して細胞の運命決定を行うとすれば、修復反応の早期の段階で細胞周期の停止や、転写調節を行う必要があると考えられる。今回の研究結果を踏まえると、DDB2 が損傷を認識すると同時に PKM2 や RUVBL2 との相互作用を介してアポトーシスを制御し、細胞の運命を決定している可能性があるのではないかと考えている。

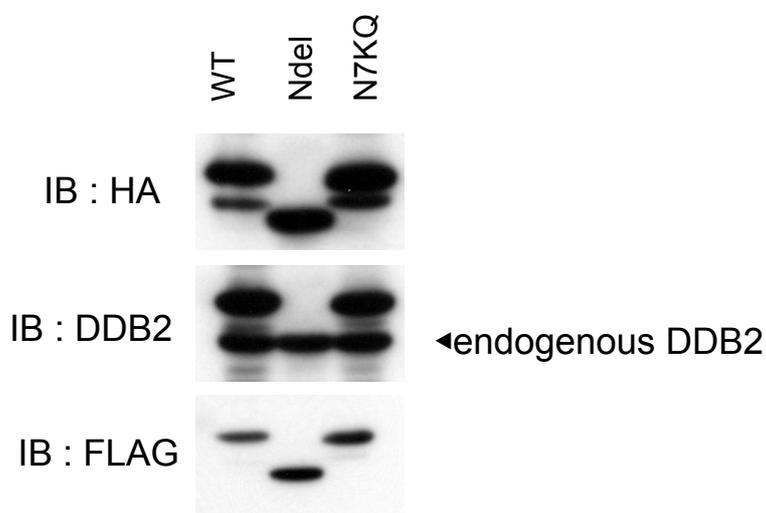
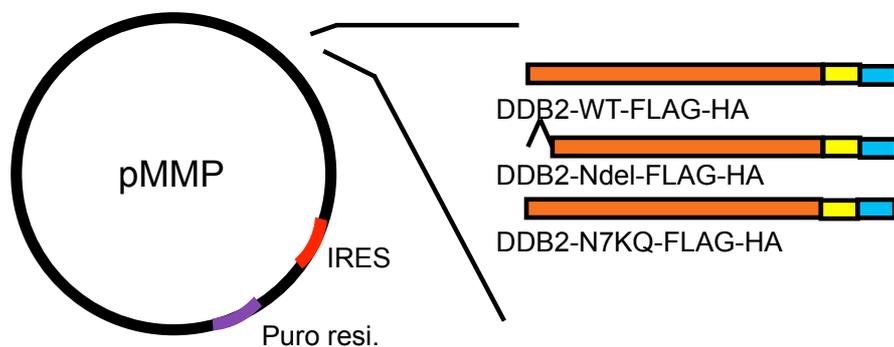


図 1 HA-FLAG 二重タグを融合した DDB2 安定発現細胞株の樹立
 C 末端側に HA、FLAG タグを融合した DDB2 を pMMP ベクターに挿入し、293GPG 細胞に形質転換することによりレトロウイルスを作成した。このウイルスを HeLa S3 細胞に感染させ、ピューロマイシン選択を行うことで DDB2-FLAG-HA を発現する細胞株を樹立した。樹立した細胞株を 0.3 M NaCl を含む CSK バッファーで抽出した後、可溶性画分を抗 HA 抗体、抗 DDB2 抗体、抗 FLAG 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

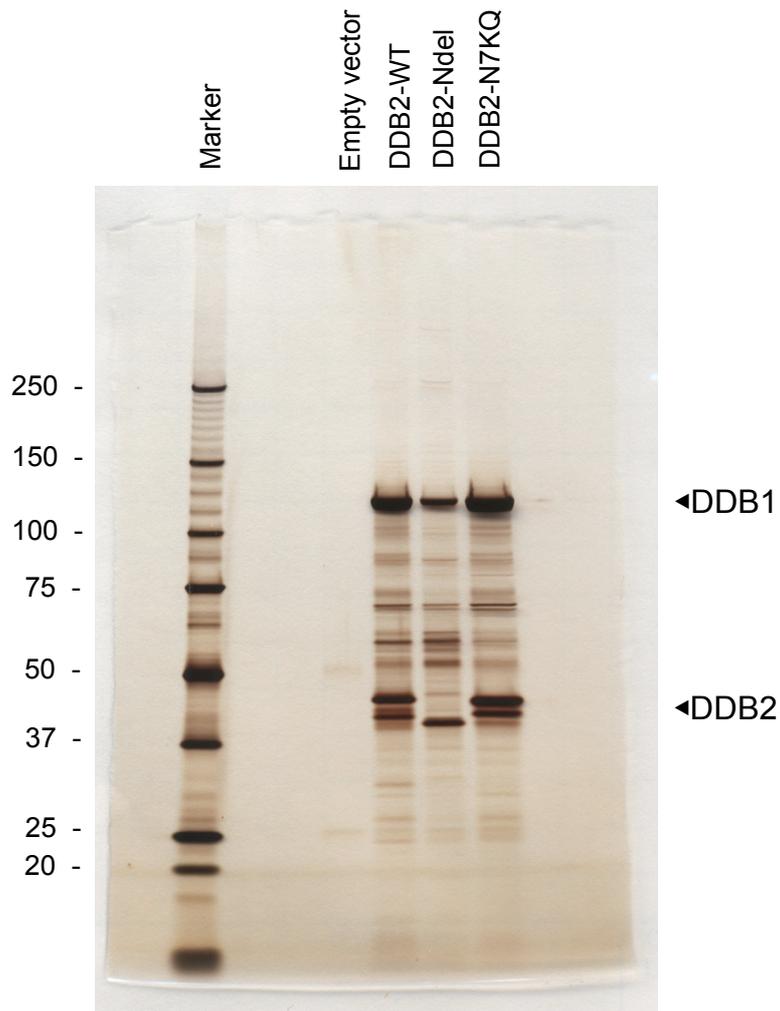


図 2 HeLa S3 細胞から単離した DDB2 複合体

浮遊状態で増殖する HeLa S3 細胞を 3×10^9 個以上になるまで大量培養した後、10 mM NaCl を含む buffer E に懸濁してホモジナイザーで破碎し、NaCl を最終濃度 0.15 M になるよう加えて抽出した後、可溶性画分をそれぞれ抗 HA 抗体カラム、抗 FLAG 抗体カラムを通すことにより DDB2 複合体を単離した。最終精製画分 10 μ l を SDS-PAGE で展開した後、銀染色を行った。

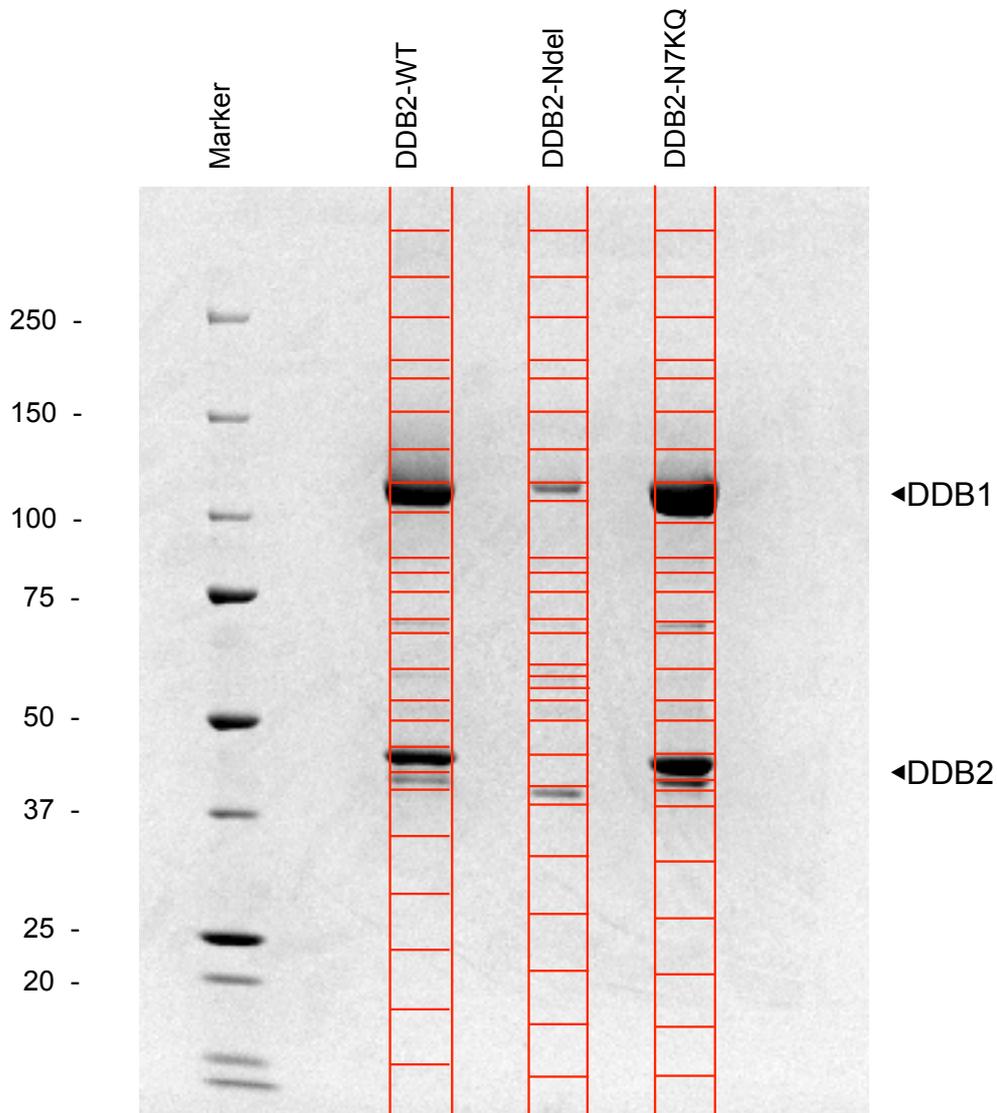


図 3 濃縮した最終精製画分の CBB 染色

図 2 で示した画分 500 μ l を 80%飽和硫酸によりタンパク質の沈殿を行い、15 μ l の 0.1 M NaCl を含む PET バッファーに溶解した後、同じバッファーで透析した。得られたサンプルを全量 SDS-PAGE で展開し、CBB 染色を行った。赤で囲まれた部分は質量分析のために切り分けたゲルの位置を示す。

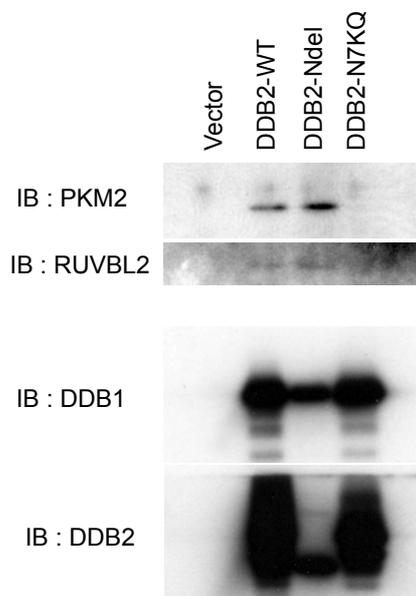


図 4 最終精製画分から PKM2 と RUVBL2 がそれぞれ検出された
 最終精製画分 10 μ l を SDS-PAGE で展開し、抗 PKM2 抗体、抗 RUVBL2 抗体
 を用いたウエスタンブロットを行った。

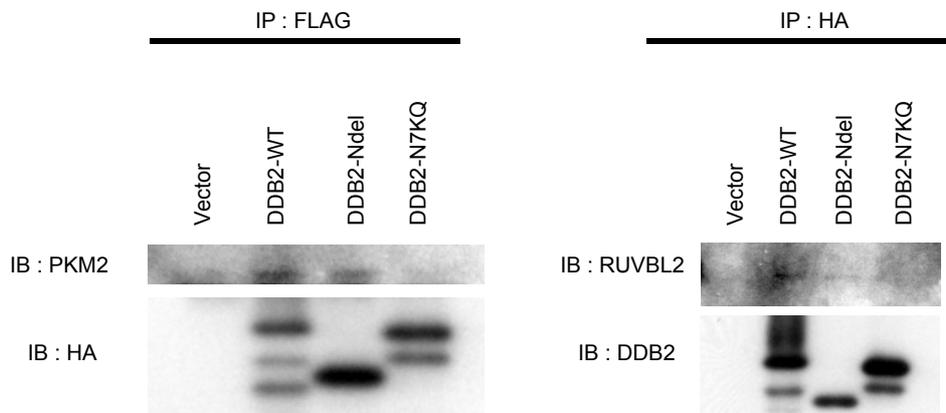


図 5 PKM2 と RUVBL2 はいずれも DDB2 と共沈する

樹立した HeLa S3 細胞を 0.15 M NaCl を含む CSK バッファーで分画を行い、可溶性画分から抗 FLAG 抗体、あるいは抗 HA 抗体で免疫沈降を行った。0.3 M NaCl を含む CSK バッファーでよく洗浄してから溶出し、SDS-PAGE で展開後、抗 PKM2 抗体と抗 RUVBL2 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。

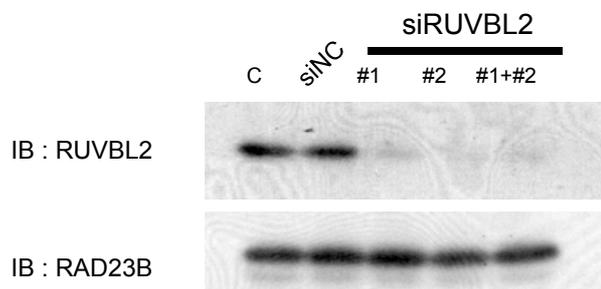


図 6 siRNA を用いた内在性 RUVBL2 ノックダウン

U2OS 細胞をネガティブコントロール siRNA (siNC) あるいは RUVBL2 に対する二種類の siRNA (siRUVBL2 #1, #2) をそれぞれ単独、または両方処理して三日間培養を行った。その後 0.3 M NaCl を含む CSK バッファーを用いて抽出し、可溶性画分に対して抗 RUVBL2 抗体を用いてウエスタンブロットを行い、RUVBL2 がノックダウンされていることを確認した。「C」は siRNA 未処理を示す。

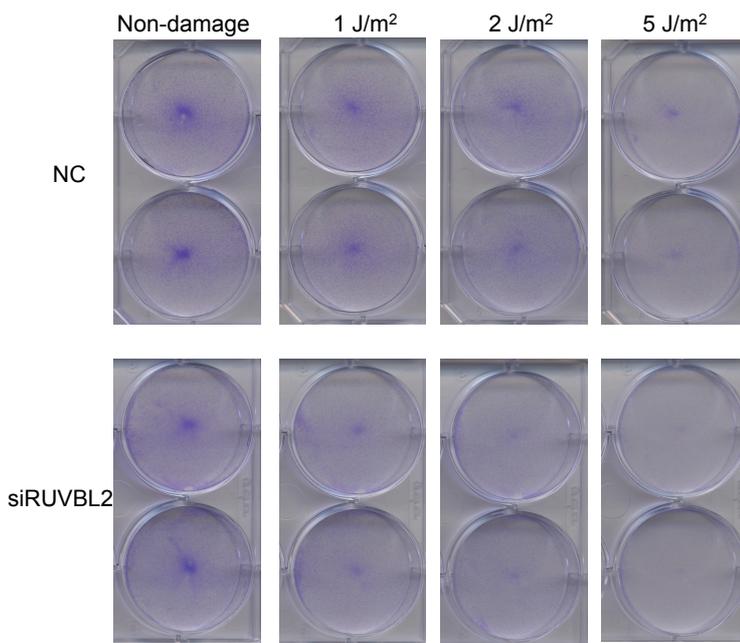
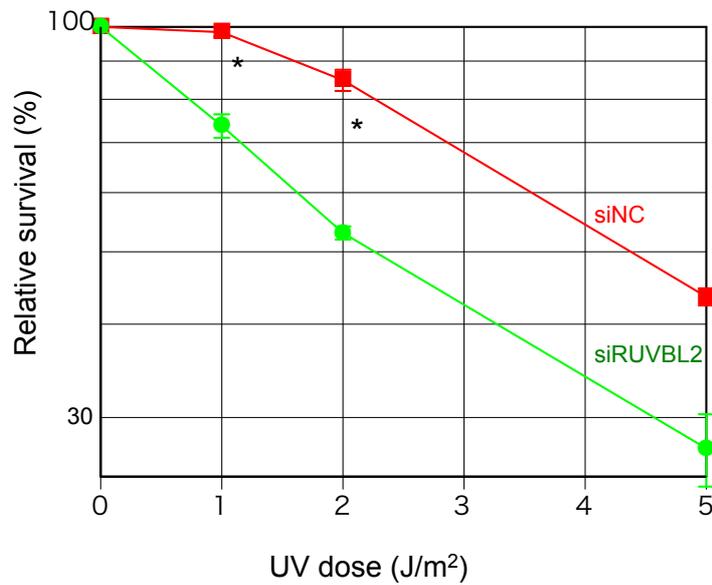


図 7 RUVBL2 のノックダウンにより細胞は紫外線感受性を示す

U2OS 細胞に siNC あるいは siRUVBL2 を処理して 3 日間培養を行った。その後、さまざまな線量の紫外線を照射して二日間培養してから Crystal Violet 溶液で細胞の染色を行い、十分に洗浄した後に残存した色素を可溶化した。得られた溶液について波長 595 nm の吸光度を測定してグラフ化した。エラーバーは独立して行った 2 回の実験の標準誤差を示す。p 値は t 検定により算出した (*p<0.05)。

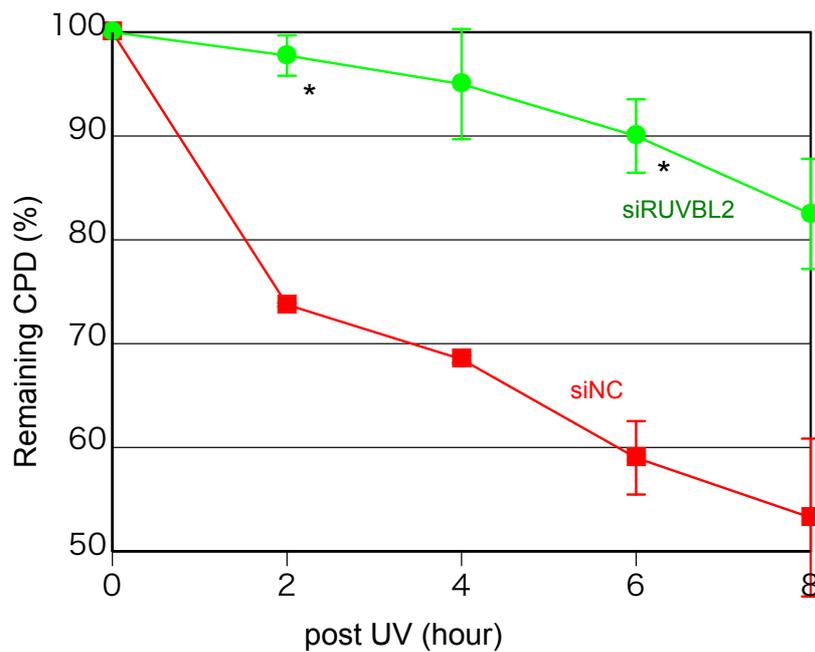
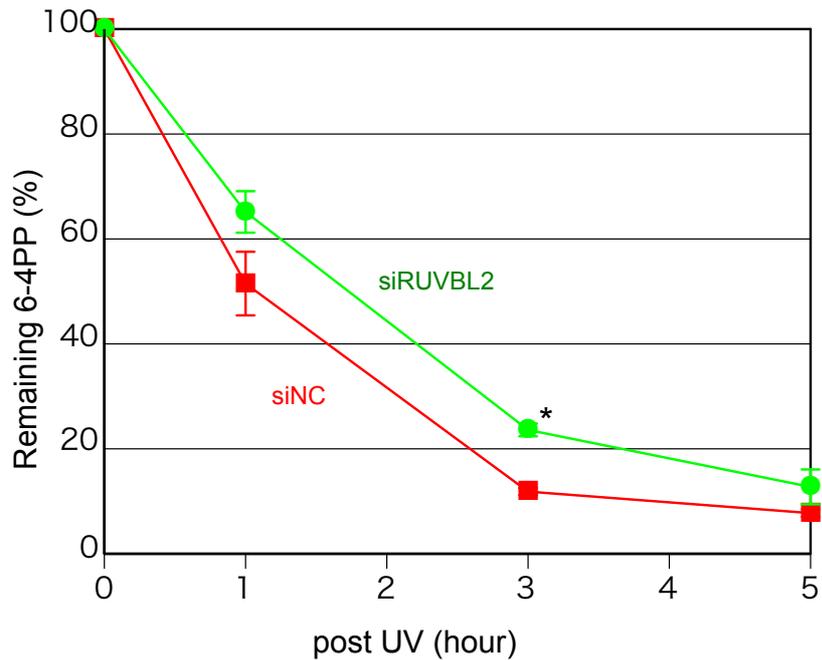


図 8 RUVBL2 ノックダウンは損傷修復速度を低下させる

U2OS 細胞に siNC あるいは siRUVBL2 を処理して 3 日間培養を行った。その後、紫外線を照射してさまざまな時間培養してから損傷残存量を、抗 6-4PP 抗体、あるいは抗 CPD 抗体を用いた ELISA 法により定量した。エラーバーは独立して行った 2 回の実験の標準誤差を示す。p 値は t 検定により算出した (* $p < 0.05$)。

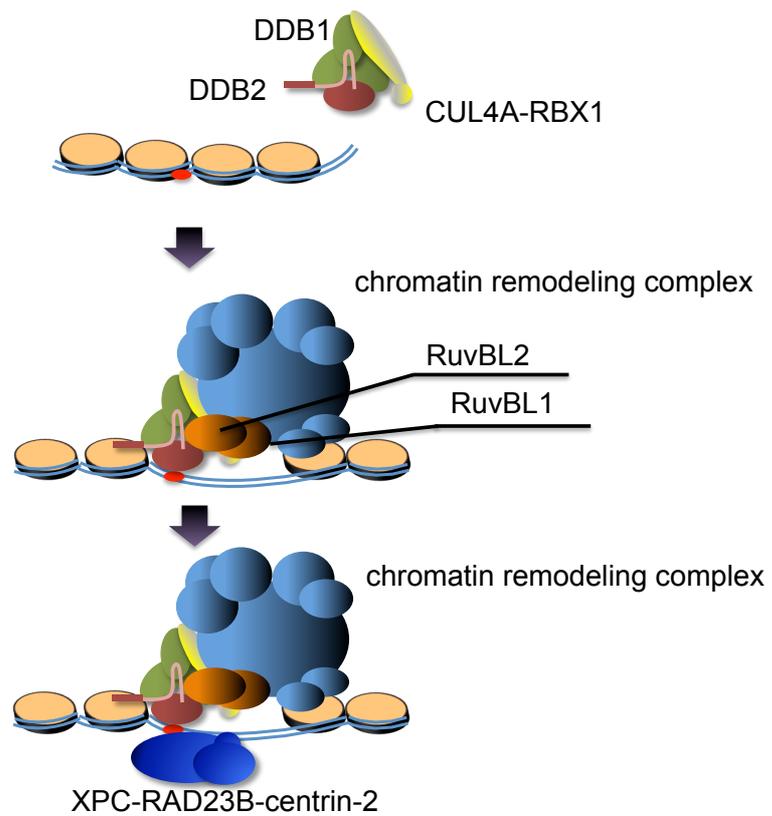


図 9 RUVBL2 を介した DDB2 のクロマチンリモデリング促進機構のモデル

DDB2 は RUVBL2 との相互作用を介してクロマチンリモデリング因子と協調して働き、クロマチンを弛緩させることで、XPC や TFIIH を始めとする種々の NER 因子のリクルートを促進して修復反応を亢進している可能性が考えられる。

Primer name			
DDB2C-XhoI #1	forward	CCCCATGGGCTCCGGTCCTAGCAGAAGA	
DDB2C-XhoI #2	reverse	GGCTCGAGCTTCCGTGCTCCTGGCTTCTCTCC	
FLAG-PS #1	forward	TCGAGGACTACAAGACGATGACGACAAGCATATTCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCC	
FLAG-PS #2	reverse	TCGAGGGGCCCTGGAACAGAACTTCCAGAATATGCTTGTCTGTCATCGTCTTTGTAGTCC	
RUVBL2-NdeI #1	forward	GGCATATGGCAACCGTTACAGCCACAACC	
RUVBL2-NdeI #2	reverse	GGACTAGTTCAGGAGGTGCCATGGTCTCG	

表 1 本研究で使用したプライマーリスト

WT	NdeI	N7KQ	
KPYM	KPYM	KPYM	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4
RUVB1			RuvB-like 1 OS=Homo sapiens GN=RUVBL1 PE=1 SV=1
RUVB2	RUVB2	RUVB2	RuvB-like 2 OS=Homo sapiens GN=RUVBL2 PE=1 SV=3
GNB1L			Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=GNB1L PE=1 SV=2
EIF4A1			Eukaryotic initiation factor 4A-1 OS=Homo sapiens GN=EIF4A1 PE=1 SV=1
	IF2A		Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 OS=Homo sapiens GN=EIF2S1 PE=1 SV=3
	CCDC57		Coiled-coil domain-containing protein 57 OS=Homo sapiens GN=CCDC57 PE=2 SV=2
PCBP1	PCBP1		Poly(rC)-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PCBP1 PE=1 SV=2
DDA1		DDA1	DET1- and DDB1-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=DDA1 PE=1 SV=1
	PGK1		Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens GN=PGK1 PE=1 SV=3
	MCE1	MCE1	mRNA-capping enzyme OS=Homo sapiens GN=RNMT PE=1 SV=1
	PCNA		Proliferating cell nuclear antigen OS=Homo sapiens GN=PCNA PE=1 SV=1
	SLAF9		SLAM family member 9 OS=Homo sapiens GN=SLAMF9 PE=2 SV=2
	SCAFB		Protein SCAF11 OS=Homo sapiens GN=SCAF11 PE=1 SV=2
	WNT7A	WNT7A	Protein Wnt-7a OS=Homo sapiens GN=WNT7A PE=1 SV=2
		CUL4A	Cullin-4A OS=Homo sapiens GN=CUL4A PE=1 SV=3
		GRP78	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2
		RASA1	Ras GTPase-activating protein 1 OS=Homo sapiens GN=RASA1 PE=1 SV=1
		RS27A	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Homo sapiens GN=RPS27A PE=1 SV=2
		TITIN	Titin OS=Homo sapiens GN=TTN PE=1 SV=4
		MXRA5	Matrix-remodeling-associated protein 5 OS=Homo sapiens GN=MXRA5 PE=2 SV=3
		REC04	Endogenous retrovirus group K member 104 Rec protein OS=Homo sapiens GN=HERV-K104 PE=1 SV=1
		IL25	Interleukin-25 OS=Homo sapiens GN=IL25 PE=1 SV=1
		BAG2	BAG family molecular chaperone regulator 2 OS=Homo sapiens GN=BAG2 PE=1 SV=1
		DCD	Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2

表 2 最終精製画分に含まれていた因子リスト

最終精製画分を濃縮し、それぞれ切り出したゲル切片をトリプシンで消化した後、質量分析による解析を行った。WT は野生型 DDB2 を含む複合体から検出された相互作用因子を示し、NdeI、N7KQ はそれぞれの変異 DDB2 を含む複合体から検出された相互作用因子を示す。因子はそれぞれ gene symbol で表記した。

【参考文献】

- (1) Itoh T, O'Shea C, Linn S. *Mol Cell Biol.* 23(21):7540-53 (2003)
- (2) Fong S, King F, Shtivelman E. *BMC Cell Biol.* 11:23 (2010)
- (3) Stoyanova T, Yoon T, Kopanja D, Mokyr MB, Raychaudhuri P. *Mol Cell Biol.* 28(1):177-87 (2008)
- (4) Stoyanova T, Roy N, Bhattacharjee S, Kopanja D, Valli T, Bagchi S, Raychaudhuri P. *J Biol Chem.* 287(5):3019-28 (2012)
- (5) Pines A, Vrouwe MG, Marteijs JA, Typas D, Luijsterburg MS, Cansoy M, Hensbergen P, Deelder A, de Groot A, Matsumoto S, Sugasawa K, Thoma N, Vermeulen W, Vrieling H, Mullenders L. *J Cell Biol.* 199(2):235-49 (2012)
- (6) Cai Q, Fu L, Wang Z, Gan N, Dai X, Wang Y. *J Biol Chem.* 289(23):16046-56 (2014)
- (7) Zhao Q, Barakat BM, Qin S, Ray A, El-Mahdy MA, Wani G, Arafa el-S, Mir SN, Wang QE, Wani AA. *J Biol Chem.* 283(47):32553-61 (2008)
- (8) Jha S, Dutta A. *Mol Cell.* 34(5):521-33 (2009)
- (9) Rajendra E, Garaycochea JI, Patel KJ, Passmore LA. *Nucleic Acids Res.* 42(22):13736-48 (2014)
- (10) Haurie V, Ménard L, Nicou A, Touriol C, Metzler P, Fernandez J, Taras D, Lestienne P, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Prats H, Zucman-Rossi J, Rosenbaum J. *Hepatology.* 50(6):1871-83 (2009)
- (11) Kanemaki M, Kurokawa Y, Matsu-ura T, Makino Y, Masani A, Okazaki K, Morishita T, Tamura TA. *J Biol Chem.* 274(32):22437-44 (1999)
- (12) Puri T, Wendler P, Sigala B, Saibil H, Tsaneva IR. *J Mol Biol.* 366(1):179-92 (2007)
- (13) Matias PM, Gorynia S, Donner P, Carrondo MA. *J Biol Chem.* 281(50):38918-29 (2006)
- (14) Torreira E, Jha S, López-Blanco JR, Arias-Palomo E, Chacón P, Cañas C, Ayora S, Dutta A, Llorca O. *Structure.* 16(10):1511-20 (2008)
- (15) Gallant P. *Trends Cell Biol.* 17(4):187-92 (2007)

- (16) Rousseau B, Ménard L, Haurie V, Taras D, Blanc JF, Moreau-Gaudry F, Metzler P, Hugues M, Boyault S, Lemièrè S, Canron X, Costet P, Cole M, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J, Rosenbaum J. *Hepatology*. 46(4):1108-18 (2007)
- (17) Bauer A, Chauvet S, Huber O, Usseglio F, Rothbächer U, Aragnol D, Kemler R, Pradel J. *EMBO J*. 19(22):6121-30 (2000)
- (18) Jha S, Gupta A, Dar A, Dutta A. *Mol Cell Biol*. 33(6):1164-74 (2013)
- (19) Ni L, Saeki M, Xu L, Nakahara H, Saijo M, Tanaka K, Kamisaki Y. *J Cell Biochem*. 106(5):920-8 (2009)
- (20) Mazurek S. *Int J Biochem Cell Biol*. 43(7):969-80 (2011)
- (21) David CJ, Chen M, Assanah M, Canoll P, Manley JL. *Nature*. 463(7279):364-8 (2010)
- (22) Clower CV, Chatterjee D, Wang Z, Cantley LC, Vander Heiden MG, Krainer AR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(5):1894-9 (2010)
- (23) Gumińska M, Stachurska MB, Ignacak J. *Biochim Biophys Acta*. 966(2):207-13 (1988)
- (24) Weinberger R, Appel B, Stein A, Metz Y, Neheman A, Barak M. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 16(4):333-7 (2007)
- (25) Gao X, Wang H, Yang JJ, Liu X, Liu ZR. *Mol Cell*. 45(5):598-609 (2012)
- (26) Yang P, Li Z, Fu R, Wu H, Li Z. *Cell Signal*. 26(9):1853-62 (2014)
- (27) Yang W, Xia Y, Hawke D, Li X, Liang J, Xing D, Aldape K, Hunter T, Alfred Yung WK, Lu Z. *Cell*. 150(4):685-96 (2012)
- (28) Sugasawa K, Masutani C, Uchida A, Maekawa T, van der Spek PJ, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Hanaoka F. *Mol Cell Biol*. 16(9):4852-61 (1996)
- (29) Sugasawa K, Akagi J, Nishi R, Iwai S, Hanaoka F. *Mol Cell*. 36(4):642-53 (2009)
- (30) Jiang Y, Wang X, Bao S, Guo R, Johnson DG, Shen X, Li L. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(40):17274-9 (2010)

【謝辞】

本研究は神戸大学・菅澤研究室においてなされたものです。菅澤薫教授にはお忙しい中多くのご指導を賜りました。また、非常に恵まれた研究環境を与えて下さったことも併せ、心より御礼申し上げます。

直接実験をご指導くださいました西良太郎博士、酒井恒助教には、実験手法を一から教えていただき、さまざまなご助言をいただきました。

本研究は質量分析を行っていただきました宮本昌明准教授、松田知成准教授、吉野健一助教、松田俊博士、また実験材料を供与して下さった Nicolas H. Thomä 博士、安田武嗣博士をはじめ多くの方々のご協力のもと行うことができました。

最後にお忙しい中、本論文の副査をしていただきました坂本博教授、前川昌平教授、影山裕二准教授に心より御礼申し上げます。皆様に心より感謝するとともに、今後のご研究の発展をお祈り申し上げます。

【研究業績】

- Fischer ES, Scrima A, Böhm K, Matsumoto S, Lingaraju GM, Faty M, Yasuda T, Cavadini S, Wakasugi M, Hanaoka F, Iwai S, Gut H, Sugasawa K, Thomä NH.
The molecular basis of CRL4^{DDB2/CSA} ubiquitin ligase architecture, targeting, and activation.
Cell. 147(5):1024-39 (2011)
- Pines A, Vrouwe MG, Marteijn JA, Typas D, Luijsterburg MS, 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(2):235-49 (2012)
- Matsumoto S, Fischer ES, Yasuda T, Dohmae N, Iwai S, Mori T, Nishi R, Yoshino K, Sakai W, Hanaoka F, Thomä NH, 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(3):1700-13 (2015)
- Akita M, Tak YS, Shimura T, Matsumoto S, Okuda Y, Shimizu Y, Nishi R, Saitoh H, Iwai S, Mori T, Ikura T, Sakai W, Hanaoka F, and Sugasawa K.
SUMOylation of xeroderma pigmentosum group C protein regulates DNA damage recognition during nucleotide excision repair.
Sci Rep. 5:10984 (2015)
- Osakabe A, Tachiwana H, Kagawa W, Horikoshi N, Matsumoto S, Hasegawa M, Matsumoto N, Toga T, Yamamoto J, Hanaoka F, Thomä NH, Sugasawa K, Iwai S, Kurumizaka H.
Structural basis of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct recognition by UV-DDB in the nucleosome
Submitted