



# チミンDNAグリコシラーゼとヌクレオチド除去修復の 機能的相互作用の解析

中村, 知史

---

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2017-03-25

(Date of Publication)

2018-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6857号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006857>

※ 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

チミンDNAグリコシラーゼとヌクレオチド除去修復  
の機能的相互作用の解析

平成 29 年 1 月

神戸大学大学院理学研究科

中村 知史

## 【目次】

- 要旨 . . . . . p.3
- 略語 . . . . . p.5
- 第 1 章 序論 . . . . . p.7
- 第 2 章 実験材料と実験方法 . . . . . p.12
- 第 3 章 実験結果 . . . . . p.22
- 第 4 章 考察 . . . . . p.29
- 第 5 章 図表 . . . . . p.33
- 参考文献 . . . . . p.59
- 謝辞 . . . . . p.63

## 【要旨】

チミン DNA グリコシラーゼ (TDG) は、ゲノム DNA 中のシトシン及び 5-メチルシトシンの自発的脱アミノ化によって生じる G:U 及び G:T ミスマッチを解消する塩基除去修復 (BER) 反応の開始を担い、自然突然変異の抑制に寄与すると考えられてきた。所属研究室の先行研究により、ヌクレオチド除去修復 (NER) の損傷認識因子である XPC が TDG と相互作用し、TDG の酵素学的代謝回転を促進することが報告された。一方で、TDG はさまざまな転写制御因子と相互作用するほか、近年では TDG が開始する BER 反応が DNA の脱メチル化を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御において果たす役割が注目されている。このように、TDG はゲノムの安定性や遺伝子発現など広範な細胞機能に関与しており、その細胞内動態や機能制御に関わる分子機構の解明は非常に重要である。

TDG タンパク質は、細胞周期 S 期においてユビキチン-プロテアソーム系を介した分解を受けることが既に報告されているが、本研究では細胞を紫外線や DNA 損傷を誘起する種々の薬剤で処理した場合にも、TDG の分解が誘導されることを新たに見出した。色素性乾皮症 A 群患者由来線維芽細胞を用いた実験から、TDG の紫外線誘導性分解が細胞の NER 活性に依存することが示された。また、CDT2 を含む CUL4-RING ユビキチンリガーゼ複合体 (CRL4<sup>CDT2</sup>) は、DNA 複製ライセンス化因子 CDT1 をはじめ、いくつかのタンパク質の S 期における分解を担うことが知られているが、この CRL4<sup>CDT2</sup> が TDG の紫外線誘導性分解にも関与することを、siRNA による CDT2 の発現抑制及び無細胞ユビキチン化反応により示した。さらに、CRL4<sup>CDT2</sup> によるユビキチン化の標的となる基質タンパク質の認識には、DNA ポリメラーゼ補助因子である増殖細胞核抗原 (PCNA) との相互作用が重要であることが知られている。この相互作用を担うアミノ酸配列モチーフ (PIP degron) に変異を導入することにより、紫外線照射後の TDG タンパク質の分解が抑制されることを証明した。

このような TDG の安定性の変化は、細胞にどのような影響をもたらすのだろうか。Tdg 遺伝子欠損マウス胎仔線維芽細胞において、ヒト TDG を安定発現した実験から、TDG タンパク質の発現が細胞の紫外線感受性の上昇及び紫外線誘発 DNA 損傷の修復速度の低下を引き起こすことを新たに見出した。この効果は DNA グリコシラーゼ活性や DNA 結合活性など、BER 機能を損なうアミノ

酸置換を導入した変異 TDG では見られなかったことから、TDG がその BER 機能を介して紫外線誘発 DNA 損傷の修復や細胞応答に影響を与えている可能性が示唆された。生化学的な解析から TDG が NER 反応を直接阻害する可能性は低いと考えられた一方、次世代シーケンサーを用いた mRNA シーケンス解析の結果から、TDG の発現はその酵素活性には依存せずに広範な遺伝子発現に影響を与えることが見出された。一部の遺伝子については、TDG の DNA グリコシラーゼ活性に依存した発現変動が見られ、その中ではリン酸代謝系に関与する遺伝子が比較的多く見出された。それに対して、NER や細胞の紫外線損傷応答に直接関与することが知られている遺伝子は含まれていなかった。

DNA 複製や修復に伴って一時的に DNA が半メチル化状態になった時、さらなる脱メチル化によってエピゲノム情報が失われることを防ぐために TDG の分解が誘導されている可能性がある一方、紫外線誘導性の TDG 分解は NER や細胞の紫外線損傷応答に対する負の影響を排除する役割があるのかも知れない。TDG が引き起こす大規模な遺伝子発現の変動は、直接相互作用する XPC 及びその他の NER 因子の細胞内局在や動態を介して NER 活性に影響を与えている可能性が考えられる。

【略語】

AID	activation-induced cytidine deaminase
APE1	apurinic/aprimidinic endonuclease 1
ATP	adenosine 5'-triphosphate
BER	base excision repair
BSA	bovine serum albumin
CBP	CREB binding protein
CDT1	Cdc10-dependent transcript 1
CDT2	Cdc10-dependent transcript 2
CRL4	cullin 4-RING ubiquitin ligase
CUL4A	cullin-4A
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDB1	DNA damage-binding protein 1
DDB2	DNA damage-binding protein 2
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNMT1	DNA methyltransferase 1
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> - tetraacetic acid
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
FEN1	flap endonuclease 1
GST	glutathione S-transferase
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
MEF	mouse embryonic fibroblast
MUG	mismatch-specific uracil DNA glycosylase
NEM	<i>N</i> -ethylmaleimide
NER	nucleotide excision repair
Oct4	octamer-binding transcription factor 4
PBS	phosphate-buffered saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen

PIC	protease inhibitor cocktail
PIP degron	PCNA-interacting protein degron
Pipes	piperazine-1,4-bis (2-ethanesulfonic acid)
PKC $\alpha$	protein kinase C $\alpha$
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
Pol $\beta$	DNA polymerase $\beta$
Pol $\delta$	DNA polymerase $\delta$
Pol $\epsilon$	DNA polymerase $\epsilon$
RFC	replication factor C
ROC1	regulator of cullins 1
RPA	replication protein A
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
Sox2	SRY (sex determining region Y)-box 2
SUMO	small ubiquitin-like modifier
TDG	thymine DNA glycosylase
TET	ten-eleven translocation
TFIIH	transcription factor IIH
UBE1	ubiquitin activating enzyme E1
XPA	xeroderma pigmentosum complementation group A
XPB	xeroderma pigmentosum complementation group B
XPC	xeroderma pigmentosum complementation group C
XPF	xeroderma pigmentosum complementation group F
XPG	xeroderma pigmentosum complementation group G
XRCC1	X-ray repair cross complementing protein 1
5-caC	5-carboxylcytosine
5'-dRp	5'-deoxyribose phosphate
5-fC	5-formylcytosine
5-hmC	5-hydroxymethylcytosine
5-hmU	5-hydroxymethyluracil
5-mC	5-methylcytosine
6-4PP	pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct

# 第1章 序論

遺伝情報を担うゲノム DNA は、紫外線、放射線、活性酸素種や化学物質などによる損傷を恒常的に受けている。DNA に生じた損傷は、転写や複製、細胞分裂時における染色体分配等のゲノム機能を妨害することで突然変異や染色体異常、細胞死などを誘発し、癌や神経疾患、早期老化を含む様々な疾患の原因となることが知られている。一方、生物には DNA 損傷を取り除く修復機構が備わっており、生じる DNA 損傷の種類に応じて、塩基除去修復 (base excision repair : BER)、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair : NER)、ミスマッチ修復 (mismatch repair)、非相同末端再結合 (non-homologous end joining)、相同組換え修復 (homologous recombination repair) といった種々の DNA 修復機構が働く。中でも BER は、DNA 中のウラシルや酸化損傷塩基、ある種のメチル化損傷塩基などを対象とする主要な DNA 修復機構の一つである。

BER 反応は DNA グリコシラーゼと呼ばれる一群の酵素が異常塩基を認識し、除去することで開始される (1, 2)。ヒトではこれまでに 11 種類の DNA グリコシラーゼが報告されており (3)、一価性 DNA グリコシラーゼと二価性 DNA グリコシラーゼに分類される。一価性 DNA グリコシラーゼは、N-グリコシド結合の加水分解により異常塩基を除去し、脱塩基部位を生じる反応を触媒する。次に AP エンドヌクレアーゼ 1 (apurinic/aprimidinic endonuclease 1 : APE1) のエンドヌクレアーゼ活性により、脱塩基部位の 5'側のホスホジエステル結合が切断される (4-6)。これにより切断部位の 3'末端に OH 基、5'末端に 5'-デオキシリボースリン酸基 (5'-deoxyribose phosphate : 5'-dRp) が生じる。これに続く DNA 修復合成には二つの経路の存在が知られており、それぞれショートパッチ経路、ロングパッチ経路と呼ばれる (図 1)。ショートパッチ経路では、DNA ポリメラーゼβ (DNA polymerase β : Pol β) が 1 塩基の鎖伸長を行うとともに、それ自身もつ 5'-dRp リアーゼ活性により 5'-dRp 基が除かれ、5'-リン酸末端を生じる。最後に DNA リガーゼ IIIα/XRCC1 複合体によって DNA 鎖が連結され、修復が完了する (7-9)。一方、ロングパッチ経路では、増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen : PCNA) 及び複製因子 C (replication factor C : RFC) 依存的に DNA ポリメラーゼδ (Polδ) またはε (Polε) により DNA 鎖が数塩基分伸長され、それに伴って生じた 5'-末端をもつフラップ構造がフラップエンドヌクレアーゼ 1 (flap endonuclease 1 : FEN1) によって切除される (10-



13)。その後、DNAリガーゼIによってDNA鎖が連結され、修復が完了する (14)。一方、二価性 DNA グリコシラーゼの場合は *N*-グリコシド結合の加水分解により脱塩基部位を生じた後、自身の AP リアーゼ活性により脱塩基部位の 3' 側のホスホジエステル結合が切断され、5'-リン酸末端を生じる (5)。切断部位の 3' 末端に残った $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和アルデヒドは APE1 の 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性により除去され、これにより 3'-OH 末端と 1 塩基分のギャップを生じる (15)。その後の DNA 修復合成反応は一価性 DNA グリコシラーゼの場合と同様、ショートパッチ経路またはロングパッチ経路のいずれかにより進行するが、二価性 DNA グリコシラーゼの場合は切断部位に 5'-dRp 基を生じないため、ショートパッチ経路においても Pol  $\beta$  の 5'-dRp リアーゼ活性は必要とされない。

BER 反応の標的となる損傷の一例として、生体内で頻発するシトシン (C) 及び 5-メチルシトシン (5-methylcytosine : 5-mC) の自発的脱アミノ化が挙げられる。この脱アミノ化により、C はウラシル (U)、5-mC はチミン (T) にそれぞれ変換される。こうして生じた G:U 及び G:T ミスマッチが修復される前に DNA が複製されると、C:G から T:A への塩基置換変異が固定されることになる (16)。哺乳類細胞においてこのようなミスマッチを解消する酵素の一つとして、チミン DNA グリコシラーゼ (thymine DNA glycosylase : TDG) が知られている。TDG はウラシル DNA グリコシラーゼ (uracil DNA glycosylase) スーパーファミリーに属する一価性 DNA グリコシラーゼであり、脱アミノ化によって生じた G:U 及び G:T ミスマッチから U 及び T を除去する活性を持つ (17)。TDG は特に U に対して高い親和性を示し、T に対する親和性は比較的低い、これは TDG の活性中心付近の構造が T の 5'-メチル基との立体障害を生じさせるためであり、これにより DNA 上で正常に A と対合した T が除去されることを防いでいる (18)。以上のことから、TDG は生体内においても G:U 及び G:T ミスマッチを解消し、自然突然変異の抑制に寄与していると考えられてきた (図 2)。

TDG が実際に自然突然変異の抑制に寄与しているかどうかを調べるため、いくつかのグループによって *Tdg* 遺伝子欠損マウスが作製された (19–21)。その結果、予想に反して TDG の欠損は胎生致死を引き起こすことが明らかとなった。このことから、TDG は単に DNA 修復における機能だけでなく、高等動物の発生過程で重要な機能を担っていることが示された。*Tdg* 遺伝子欠損マウス胚から樹立された胎仔線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast : MEF) の抽出液を使った生化学的な解析から、TDG の欠損が無細胞系における G:T ミスマッチ

の除去活性を 90%以上低下させることが示されている (21)。しかし、マウスゲノム中に人為的に組み込まれた大腸菌グアノシンホスホリボシルトランスフェラーゼ (guanosine phosphoribosyl transferase) 遺伝子を指標として自然突然変異率を測定した結果によれば *Tdg* 遺伝子欠損 MEF と野生型 MEF とで明確な差は現れておらず (21)、生体内において TDG が本当に自然突然変異の抑制に寄与しているかどうかについては、未だに議論の余地が残されている。

一方で、TDG は自然突然変異の抑制だけでなく、能動的な DNA 脱メチル化を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御への関与が示唆されている。前述したように *Tdg* 遺伝子欠損マウスが胎生致死であったことに加え、*Tdg* 遺伝子欠損 MEF のゲノム DNA 中の少なくとも一部の遺伝子領域において、CpG アイランドが正常 MEF と比較して高メチル化状態にあることが示されている (19)。遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG アイランドは、C のメチル化及び脱メチル化によって遺伝子発現を制御している。DNA 複製や DNA 修復によってメチル化修飾を受けた DNA が一時的に半メチル化状態となる受動的脱メチル化に対して、能動的脱メチル化は積極的にメチル化修飾を除去して遺伝子発現を活性化する機構である (22)。高等植物では 5-mC を直接除去することによって DNA の脱メチル化を開始する DNA グリコシラーゼの存在が知られている。しかしながらこれまで調べられた限り、TDG を含む脊椎動物の DNA グリコシラーゼはいずれも 5-mC を直接除去する活性をもっておらず、複数の反応ステップを必要とする脱メチル化機構のモデルが考えられている (図 3) (19, 23–26)。

これらに加えて、TDG は様々な因子との相互作用や翻訳後修飾により、転写制御に関与するとともに、自身も種々の機能制御を受けることが報告されている。レチノイン酸受容体 (retinoic acid receptor)、レチノイド X 受容体 (retinoic X receptor)、エストロゲン受容体 $\alpha$  (estrogen receptor  $\alpha$ )、ステロイド受容体転写共役因子 1 (steroid receptor coactivator 1) などが TDG と相互作用し、これにより遺伝子発現が制御されることが示されている (27–29)。また共免疫沈降の結果から、TDG がヒストンアセチル化酵素 CBP (CREB binding protein) と相互作用することが示されており、出芽酵母 GAL4 の DNA 結合ドメインを融合した CBP を TDG と共発現させると、導入した TDG の cDNA 量に依存してレポーターとして用いたルシフェラーゼ遺伝子の転写活性が上昇する (30)。これらの知見は、TDG と CBP が共役因子として協調的に転写制御に関与する

ことを示唆している。さらに TDG の N 末端領域が CBP によってアセチル化されること、このアセチル化により CBP 及び APE1 との結合活性が低下することが示された (30)。これに関連して、TDG の N 末端領域はセリン・トレオニンキナーゼである PKC $\alpha$  (protein kinase C $\alpha$ ) によるリン酸化を受けることが報告されている (31)。無細胞系において、TDG の N 末端領域に対するアセチル化及びリン酸化は競合的な作用を示し、G:T ミスマッチを基質とする DNA グリコシラーゼ活性に対し、前者は抑制的、後者は促進的に機能する。これらの結果から、TDG と CBP の相互作用及び翻訳後修飾が、細胞内において DNA 修復と遺伝子発現制御における分子スイッチの役割を担っている可能性が考えられている。

TDG はその DNA グリコシラーゼ活性によりミスマッチ塩基を除去した後、自身の反応産物である脱塩基部位に強固に結合する性質があることが、生化学や構造生物学など、様々な解析によって明らかになっている (32)。G:T ミスマッチを含む二本鎖オリゴヌクレオチドを過剰量用い、精製した TDG と試験管内において反応させると、TDG 一分子あたりほぼ一個の T が除去されたところで反応の進行が停止する。このことから、TDG の脱塩基部位からの解離を助け、酵素学的代謝回転を促進する分子機構の存在が以前から想定されてきた (図 4)。

第 1 に、ユビキチン様タンパク質 SUMO (small ubiquitin-like modifier) による修飾が挙げられる。SUMO は 100 アミノ酸程度から成り、ユビキチンと類似の機構で標的タンパク質のリジン側鎖に共有結合する。SUMO-1、SUMO-2、SUMO-3、SUMO-4 の 4 つのアイソフォームが存在し、タンパク質の安定性、タンパク質間相互作用、タンパク質-DNA 間相互作用、細胞内局在などの幅広い機能制御に関与している。精製タンパク質を用いた免疫沈降実験の結果から、TDG は無細胞系において SUMO-1、SUMO-2、SUMO-3 による修飾を受けることが示されている (33)。TDG 分子内のさまざまなリジンをアラニンへ置換させることで SUMO 化部位の探索が行われた結果、ヒト TDG の SUMO 化部位として N 末端から 330 番目のリジン残基が同定された (33)。さらにこの SUMO 化によって、TDG が脱塩基部位や G:T ミスマッチを含むオリゴヌクレオチドへの結合活性を失うことが明らかとなっている。X 線結晶構造解析から、SUMO 化修飾により TDG に構造変化が生じ、これによって DNA 結合能が失われることが提唱されている (34, 35)。

第 2 に、APE1 との相互作用である。TDG を APE1 と共に G:T ミスマッチを

含む二本鎖オリゴヌクレオチドと反応させることで、TDG 単独の場合と比較して、より多くの T が除去されることが報告されている (36, 37)。APE1 自身が脱塩基部位に対して親和性を持つことから、TDG を脱塩基部位から競合的に解離させているものと考えられている。

第3に、NER における損傷認識因子である XPC (xeroderma pigmentosum complementation group C) との相互作用である。NER は、紫外線によって生じるピリミジン-ピリミドン (6-4) 光産物 [pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct : 6-4PP] やシクロブタン型ピリミジン二量体 (cyclobutane pyrimidine dimer) のほか、化学変異原等によって誘起される極めて多様な DNA 損傷を除去することができる DNA 修復機構である。XPC は出芽酵母 Rad23 のホモログ (RAD23A または RAD23B) 及び中心体タンパク質として知られる CETN2 (centrin 2) とヘテロ三量体を形成し、損傷部位を認識して結合することで NER 反応を開始させる (38, 39)。酵母 2 ハイブリッド法によって XPC と TDG の相互作用が見出され、APE1 と同様に XPC が TDG の脱塩基部位からの解離を促進することが無細胞系を用いた実験により示された (40, 41)。このように、TDG の酵素学的代謝回転を促進する複数の分子機構の存在が示唆されているが、これらが生体内でどのように TDG の機能制御に関わっているかについては未だに不明な部分が多く残されている。

以上のように TDG は多くの重要な細胞機能に関与しており、さまざまなレベルで厳密な制御を受けていると予想される。しかしながら生体内や細胞内における TDG の機能制御の詳細については未だに不明な点が多く残されている。本研究では、タンパク質分解を介した TDG の機能制御に加え、TDG と NER との相互制御関係に着目して詳細な分子機構の解析を行った。

## 第 2 章 実験材料と実験手法

### 細胞培養

ヒト正常線維芽細胞 WI38 VA13、XP-A 群患者由来線維芽細胞 XP2OSSV、ヒト胎児由来腎臓上皮細胞 HEK293T、*Tdg* 遺伝子欠損マウス胎仔線維芽細胞 MEF *Tdg*<sup>-/-</sup> (東北大学大学院医学研究科、小野哲也教授、上原芳彦博士より供与) は 10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum : FBS) を含む DMEM 培地 (日水製薬) (DMEM/10% FBS) を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。昆虫細胞 Sf9 は 10%非働化 FBS を含む TNM-FH 培地 (Sigma-Aldrich) を使用し、27°C で培養した。昆虫細胞 High Five は EX-CELL 405 培地 (SAFC Biosciences) を使用し、27°C で培養した。

### TDG 安定発現細胞株の樹立

野生型及び種々の変異型ヒト TDG の N 末端に FLAG タグを融合したタンパク質 (FLAG-hTDG) の cDNA (表 1 のプライマーを用いて作製) を哺乳類細胞発現用ベクター pIRESHyg 及びレトロウイルス発現ベクター pMMP-puro (Harvard Medical School、Richard Mulligan 博士より供与) に組み込んだ。

pIRESHyg ベクターによる形質転換細胞の作製では、100 mm ディッシュ 1 枚分の MEF *Tdg*<sup>-/-</sup> をトリプシン処理によって回収し、DMEM/10% FBS 250  $\mu$ l に懸濁した。FLAG-hTDG の cDNA を組み込んだコンストラクト 20  $\mu$ g を制限酵素 SspI 処理によって直鎖状にし、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。Gene Pulser II (Bio-Rad) を用い、120 V、1,070  $\mu$ F の条件で電気パルスを与えた後、室温で 10 分間静置した。この細胞懸濁液を 8 ml の DMEM/10% FBS で希釈した後、予め DMEM/10% FBS を 6 ml 入れておいた 100 mm ディッシュ 4 枚に 2 ml ずつ分注した。37°C で 24 時間培養後、200  $\mu$ g/ml hygromycin B (Thermo Fisher Scientific) を含む培地と交換し、形質転換細胞の選択を行った。3 日おきに hygromycin B を含む培地の交換を行い、約 2 週間培養を続けた後にコロニーを単離した。

レトロウイルス発現系による TDG 安定発現細胞株の作製では、組換えレトロウイルス産出用細胞 293GPG を 100 mm ディッシュ中で 30%コンフルエントになるまで培養し、FLAG-hTDG の cDNA を組み込んだ pMMP-puro コンストラクトを FuGENE HD (Promega) を用いて導入した。24 時間後から毎日培地交換を行い、3~9 日後の培養上清をウイルス液として回収した。100 mm ディッシュ中で 80%コンフルエントになるまで培養した MEF *Tdg<sup>fl</sup>* に、培地で希釈したウイルス溶液を添加し、最終濃度 8  $\mu\text{g/ml}$  ポリブレン (Sigma-Aldrich) 存在下で 6 時間培養した。その後、通常の培地に交換して 48 時間培養し、最終濃度 4  $\mu\text{g/ml}$  puromycin を含む培地に交換することで、形質転換細胞の選択を行った。

## XPA 安定発現細胞株の樹立

N 末端に FLAG タグ及び PreScission protease の認識配列を融合したヒト XPA (xeroderma pigmentosum complementation group A) タンパク質の cDNA を pMMP-puro ベクターに組み込んだコンストラクトを作製した。先述した TDG 安定発現細胞株を作製した際と同様の方法で、組換えレトロウイルスを産生、回収して XP2OSSV 細胞の感染を行った。感染後、通常の培地に交換して 48 時間培養し、最終濃度 1  $\mu\text{g/ml}$  puromycin を含む培地に交換することで、XPA 安定発現細胞の選択を行った。

## 細胞抽出液の調製

実験に用いた細胞はリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline : PBS) を用いて洗浄した後、トリプシン処理によりディッシュから剥離させ、1,000 rpm (トミー精工 TMS-21 ローター)、4°C で 5 分間遠心して回収した。得られた細胞ペレットを PBS で洗浄した後、0.3 M NaCl 及びプロテアーゼ阻害剤を含む CSK buffer [10 mM Pipes-NaOH (pH 6.8), 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 0.1% Triton X-100, 10% glycerol, 10 mM *N*-ethylmaleimide (NEM : 和光純薬)] を各細胞ペレット量に応じて加えた。プロテアーゼ阻害剤としては、以下の終濃度の混合物を用いた (以下、protease inhibitor cocktail : PIC と略す) : 0.25 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF : Sigma-Aldrich), 1  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin (Roche), 2  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin (Roche), 2  $\mu\text{g/ml}$  pepstatin (Roche),

50 µg/ml Pefabloc SC (AEBSF : Roche)。細胞が均一に懸濁されるようにチューブ中のバッファーを随時攪拌しながら、氷上にて1時間インキュベートした。15,000 rpm (トミー精工 TMA-300 ローター)、4°C で10分間遠心後の上清を、可溶性画分として使用した。

核抽出液の調製の際には、先述した方法で回収した細胞に低張バッファー [10 mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40, 10 mM NEM, PIC] を加えた。この懸濁液を随時攪拌しながら、氷上にて30分間インキュベートした後、10,000 rpm (トミー精工 TMA-300 ローター)、4°C で5分間遠心した。遠心により得られたペレットを低張バッファーで洗浄した後、高張バッファー [20 mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 0.4 M NaCl, 10% glycerol, 0.1% Nonidet P-40, 10 mM NEM, PIC] を加え、氷上にて1時間インキュベートした。15,000 rpm (トミー精工 TMA-300 ローター)、4°C で5分間遠心後の上清を、核抽出液として使用した。

## 免疫沈降

HEK293T 細胞を 60 mm ディッシュに  $1.5 \times 10^6$  個播種し、一晚培養した。C 末端に FLAG タグを融合したヒト TDG 及び SUMO-1 の cDNA を哺乳類細胞発現用ベクター pCAGGS に組み込んだコンストラクト、それぞれ 3 µg、1 µg を血清を含まない DMEM で希釈し、これに 1 mg/ml polyethylenimine を 12 µl 加えて全量を 500 µl とした混合物を培養上清 2 ml に加えることで transfection を行った。3 時間培養した後、DMEM/10% FBS を 2.5 ml 加えて、2 日間培養した後に回収した細胞を 0.15 M NaCl 及び PIC を含む CSK buffer (200 µl) で懸濁し、氷上 1 時間インキュベートした。15,000 rpm (トミー精工 TMA-300 ローター)、4°C で遠心を行い、可溶性画分を細胞抽出液として実験に用いた。

Anti-FLAG M2 Agarose Affinity Gel (Sigma-Aldrich) 30 µl に上記の細胞抽出液を加え、氷上で 4 時間インキュベートした。ビーズを 0.15 M NaCl 及び PIC を含む CSK buffer 400 µl で 3 回洗浄した後、0.1 mg/ml の FLAG peptide (Sigma-Aldrich) を含む同 buffer で 1 時間インキュベートすることで、結合したタンパク質を溶出した。

## 精製タンパク質

組換え CUL4A-ROC1 タンパク質複合体は、参考文献 (42) に従って精製されたものを Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research、Nicolas H. Thomä 博士より供与していただいた。His-TDG (41)、His-UBE1 (43)、PCNA (44) は各参考文献に従って精製されたものを用いた。His-MUG は参考文献 (41) と同様の方法で精製されたものを用いた。XPC-RAD23B、CETN2、TFIIH、XPA、RPA、ERCC1-XPF、XPG は参考文献 (45-47) に従って精製されたものを用いた。

## TDG と PCNA の結合実験

pGEX-6P-1 ベクター (GE Healthcare) を用い、N 末端にグルタチオン S-トランスフェラーゼ (glutathione S-transferase : GST) タグを融合した野生型及び変異型 TDG の cDNA を組み込んだコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトを大腸菌株 BL21 (DE3) に導入し、最終濃度 0.5 mM の isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG : Sigma-Aldrich) を含む培地 1 リットル中で、16°C で一晩培養した。細胞を 6,000 rpm (トミー精工 TA-24 BH ローター)、30 分間遠心して集めた後、30 ml の PBS で 1 回洗浄した。これを 1 M NaCl を含む buffer A [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol (DTT : 和光純薬), PIC] 30 ml に懸濁し、氷水中で冷却しながら超音波破碎 (30 秒 ON、30 秒 OFF、6 サイクル) (トミー精工 Ultrasonic Disruptor UD-201) を行った。これを 35,000 rpm (Beckman 50.2 Ti ローター)、30 分間遠心して得られた上清を粗抽出液とした。粗抽出液を 0.3 M NaCl を含む buffer A に対して透析後、同じ buffer で平衡化した GSTrap HP カラム (1 ml : GE Healthcare) に通した。溶出は GST elution buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.3 M NaCl, 20 mM glutathione (reduced; Sigma-Aldrich), 1 mM DTT] を用いて行った。

20 nM の GST-TDG タンパク質を含む Binding buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100, 100  $\mu$ g/ml ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin : BSA)] 200  $\mu$ l を Glutathione Sepharose 4 Fast Flow ビーズ (GE Healthcare) 20  $\mu$ l と混合し、4°C で一晩イ



ンキュベートした。ビーズを 10,000 rpm (トミー精工 TMA-300 ローター)、4°C、1 分間遠心することで回収し、Binding buffer 800  $\mu$ l で 3 回洗浄した。上清を取り除いたビーズに 40 nM PCNA を含む Binding buffer 200  $\mu$ l を加え、4°C で 3 時間インキュベートした後、Binding buffer 800  $\mu$ l で 6 回洗浄した。上清を取り除いたビーズに GST elution buffer 25  $\mu$ l を加え、4°C で 1 時間インキュベートすることにより GST-TDG タンパク質を溶出し、遠心後の上清をサンプルとした。

## CRL4<sup>CDT2</sup> E3 リガーゼ複合体の発現・精製

pFastBac Dual ベクターのポリヘドリンプロモーターの下流に FLAG-DDB1、p10 プロモーターの下流に HA-CDT2 をコードする cDNA をそれぞれ組み込んだコンストラクトを作製し、ヒートショック法により大腸菌 DH10Bac (Invitrogen) に導入した。形質転換した大腸菌を 50  $\mu$ g/ml kanamycin、7  $\mu$ g/ml gentamicin、10  $\mu$ g/ml tetracycline、100  $\mu$ g/ml Bluo-gal、40  $\mu$ g/ml IPTG を含む組換え bacmid 選択用 LB 寒天培地にまき、白色コロニーを単離した。目的の bacmid を含むクローンを 50  $\mu$ g/ml kanamycin、7  $\mu$ g/ml gentamicin、10  $\mu$ g/ml tetracycline を含む LB 液体培地 100 ml 中で培養し、Genopure Plasmid Midi Kit (Roche) を用いて bacmid DNA を精製した。精製した bacmid を Cellfectin Reagent (Invitrogen) と無血清培地 SF-900 II SFM (Invitrogen) を用いて昆虫細胞 Sf9 に導入した。5 時間後に培地交換し、27°C で 7 日間培養した後に培地を回収し、3,000 rpm (久保田商事 SF-720 ローター) で 10 分間遠心後、得られた上清を 1 次ウイルス液とした。ウイルスを増幅する際には、1 次ウイルス液を 10%非働化 FBS を含む TNM-FH 培地で 10 倍希釈した。Sf9 細胞 (150 mm ディッシュ、4 枚) から培地を吸引除去し、希釈したウイルス溶液をディッシュあたり 2 ml 加えて、27°C、2 時間感染させた。23 ml の TNM-FH 培地を加えた後、さらに 7 日間培養した。その後に培地を回収し、3,000 rpm (久保田商事 SF-720 ローター) で 10 分間遠心後、得られた上清を 2 次ウイルス溶液とした。

細胞培養コントローラーシステム (和研薬、セルマスター1700) を使い、昆虫細胞 High Five を EX-CELL 405 培地 1 リットル中、 $1 \times 10^6$ /ml の細胞濃度に達するまで、27°C、pH 6.2、溶存酸素濃度 8.00 ppm の条件で培養した。2 次ウ

ウイルス溶液 100 ml を加え、さらに 3 日間培養してタンパク質を発現させた。この感染細胞を 1,000 rpm (Beckman JS-4.2 ローター)、10 分間遠心して集めた後、25 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% Nonidet P-40, 1 mM DTT, PIC] 25 ml で懸濁し、8,000 rpm (トミー精工 TMA-300 ローター) で 20 分間遠心した。これにより得られた上清を粗抽出液とした。

粗抽出液を 0.1 M NaCl を含む Buffer PE [20 mM sodium phosphate (pH 7.8), 10% glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.25 mM PMSF] に対して一晚透析後、35,000 rpm (Beckman 50.2 Ti ローター) で 20 分間遠心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 PET (buffer PE に 0.01% Triton X-100 を添加したもの) で平衡化した HiLoad 16/10 SP Sepharose HP (GE Healthcare) カラムに通し、NaCl 濃度を 0.3 M、1 M と段階的に上げることにより溶出した。Anti-FLAG M2 Agarose Affinity Gel を詰めた Tricorn 5/50 カラム (GE Healthcare) を 0.3 M NaCl を含む buffer PET で平衡化し、DDB1-CDT2 複合体を含む SP Sepharose カラムの 0.3 M NaCl 溶出画分を通した。溶出は 0.1 mg/ml FLAG-peptide を含む buffer PT [20 mM sodium phosphate (pH 7.8), 0.3 M NaCl, 10% glycerol, 0.01% Triton X-100, 1 mM 2-mercaptoethanol, 0.25 mM PMSF] で行い、ピーク溶出画分の一部を、0.1 M NaCl を含む buffer PET に対して透析した。この DDB1-CDT2 複合体を別に精製された CUL4A-ROC1 と重量比 1 : 2 の割合で混合し、氷上で 1 時間静置した。この反応液を 0.1 M NaCl を含む buffer PET で平衡化した Superdex 200 PC 3.2/30 (GE Healthcare) カラムに通し、100  $\mu$ l ずつ分画した。

## 無細胞ユビキチン化反応

無細胞ユビキチン化反応は、以下の組成の反応液 (15  $\mu$ l) 中で行った。50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 0.01% Triton X-100, 1 mM DTT, 2 mM ATP, アセチル化 BSA (5.4  $\mu$ g), poly(dI-dC) (76.3 ng : Affymetrix), His-UBE1 (12.5 ng), UbcH5a (1.05  $\mu$ g : Boston Biochem), His-TDG (60 ng), PCNA (62.5 ng), ubiquitin (10  $\mu$ g : Sigma-Aldrich), CRL4<sup>CDT2</sup> E3 リガーゼ複合体 (62.7 ng)。反応溶液を 30°C で 30 分間反応させた後、0.5 M EDTA (pH 8.0) を 1  $\mu$ l 添加して反応を停止した。

所属研究室では、TDG を含め、ある種の精製タンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis : SDS-PAGE) に供すると、変性及び分離の過程で凝集によって一部が正常に泳動されず、特にタンパク質量が微量の場合、検出が困難になることを経験している (細胞粗抽出液中の TDG の検出では、同様の問題は認識されていない)。この問題を回避するため、無細胞ユビキチン化反応後の TDG をウェスタンブロットで検出する際には、反応後のサンプルに MEF *Tdg<sup>-/-</sup>* の細胞抽出液を添加した上で電気泳動を行った。

## ウェスタンブロット

タンパク質を SDS-PAGE で分離後、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Immobilon-P : Merck-Millipore) に転写した。転写した膜を Blocking buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5% skim milk, 0.1% Tween-20] に浸して 30 分間インキュベートした後、Blocking buffer で希釈した一次抗体と 4°C で一晩反応させた。次に TBS-T [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20] による洗浄を 4 回行い、Blocking buffer で希釈したペルオキシダーゼ標識二次抗体と室温で 30 分間反応させた。一次抗体の場合と同様に TBS-T による洗浄を 4 回行った後、ImmunoStar Zeta (和光純薬) を基質として化学発光法により検出を行った。いずれの場合も、検出はルミノイメージアナライザー ImageQuant LAS-4010 (GE Healthcare) 及び X 線フィルム (RX-U : 富士フィルム) を用いて行った。

## 抗体

His-TDG (41) を抗原としてウサギを免疫して得られた抗血清から硫酸アンモニウム沈殿により粗精製した IgG 画分を用いて、抗 TDG ポリクローナル抗体のアフィニティ精製を行った。精製した GST 及び GST-TDG それぞれ 1 mg を HiTrap NHS-activated HP カラム (1 ml : GE Healthcare) に共有結合させた。作製した 2 つのカラムを上流から GST カラム、GST-TDG カラムの順に連結し、PBS で平衡化した後に IgG 画分を通した。この操作によって GST と結合する抗体を GST カラムに吸着させ、素通りした抗体のうち TDG と反応する

ものを GST-TDG カラムで捕捉した。PBS で良く洗浄した後に GST カラムを外し、GST-TDG カラムに結合した抗体を 0.5 M NaCl を含む 100 mM glycine-HCl (pH 2.7) で溶出した。溶出画分に 1/10 量の 1 M Tris-HCl (pH 9.0) を直ちに加えて中和後、IgG を含むピーク画分を PBS に対して透析し、不溶物を遠心操作によって除去した。

抗 XPC 抗体はヒト XPC タンパク質の C 末端部分に相当する合成ペプチド (48)、抗 RAD23B 抗体は大腸菌で発現した組換えタンパク質 (46) をそれぞれ抗原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用了。抗 CDT2 抗体は、兵庫県立大学大学院生命理学研究科、西谷秀男教授より供与していただいた。抗 $\alpha$ -tubulin 抗体は Sigma-Aldrich、抗 SUMO-1 抗体は Santa Cruz、抗 PCNA 抗体は Abcam、抗 GST 抗体は GE Healthcare、抗 6-4PP 抗体はコスモバイオからそれぞれ購入した。

## siRNA の導入

細胞を 35 mm ディッシュに  $2 \times 10^5$  個播種し、37°C で一晩培養した。ScreenFect A (和光純薬) と混合した siRNA を最終濃度が 33 nM となるように培地に加えた。CDT2 に対する siRNA 及びネガティブコントロール siRNA は、参考文献 (49) に記載されたものを使用した。

## 免疫染色

細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュに  $1 \times 10^5$  個播種し、37°C で一晩培養した。0.2% FBS を含む PBS (FBS/PBS) で 2 回洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド溶液 (和光純薬) を加え、室温 10 分間静置して固定を行った。FBS/PBS で 2 回洗浄し、0.5% Triton X-100 を含む PBS を加えた後、室温で 15 分間静置して細胞膜透過処理を行った。FBS/PBS で 2 回洗浄した後、FBS/PBS で希釈した抗 TDG 抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。その後 FBS/PBS で 2 回洗浄し、FBS/PBS で希釈した Alexa Fluor 488 標識 2 次抗体 (Thermo Fisher Scientific) を加えて 1 時間反応させた。その後 FBS/PBS で 2 回洗浄し、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を含む Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories) を加え、円形カバーガラスで覆った。観察は Olympus

IX71 蛍光顕微鏡を用いて行った。

## 紫外線照射後の細胞生存率測定

細胞を 6 ウエルプレートに 1 ウエルあたり  $1 \times 10^5$  個播種し、 $37^\circ\text{C}$ で一晩培養した。その後、様々な線量の紫外線を照射し、4 日目まで培養を行った。培地を除去し、培地と Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagent (Promega) を 4:1 の割合で混合した溶液 1.5 ml を各ウエルに加え、 $37^\circ\text{C}$ で 2 時間反応を行った。反応後の溶液の 490 nm の吸光度を iMark マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で測定した。

## DNA 損傷の定量

DNA 複製による損傷の希釈を避けるため、最初に細胞を 6 mM チミジン (和光純薬) を含む培地中で 2 時間処理した。その後紫外線  $10 \text{ J/m}^2$  を照射し、さらに様々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。分光光度計を用いて DNA 濃度を算出し、PBS で  $6 \mu\text{g/ml}$  に希釈した後、 $95^\circ\text{C}$ で 10 分間 DNA の変性処理を行い、直後に氷上で急冷して 15 分間静置した。硫酸プロタミンでコートした 96 ウエルマイクロタイタープレートに、上記の変性ゲノム DNA を各ウエルあたり 300 ng 加え、 $37^\circ\text{C}$ で一晩乾燥付着させた。乾燥させたプレートを 0.05% Tween-20 を含む PBS (PBS-T) で 5 回洗浄した後、2% FBS を含む PBS を加え、 $37^\circ\text{C}$ で 30 分間ブロッキングを行った。PBS-T で 5 回洗浄し、PBS で希釈した抗 6-4PP 抗体を加え、 $37^\circ\text{C}$ で 30 分間反応させた。その後 PBS-T で 5 回洗浄し、PBS で希釈したビオチン標識抗マウス IgG 二次抗体を加え、 $37^\circ\text{C}$ で 30 分間反応させた。PBS-T で 5 回洗浄し、PBS で希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを加え、 $37^\circ\text{C}$ で 30 分間反応させた。PBS-T で 5 回洗浄した後、citrate-phosphate buffer (50 mM citric acid, 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) で 1 回洗浄した。その後、0.4 mg/ml o-phenylene diamine 及び 0.006%  $\text{H}_2\text{O}_2$  を含む citrate-phosphate buffer を加え、 $37^\circ\text{C}$ で 30 分間発色反応を行った。2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を加えることで反応を停止させ、490 nm の吸光度を iMark マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で測定した。

## 無細胞 NER 反応

無細胞 NER 反応は、以下の組成の反応液 (15  $\mu$ l) 中に行った。40 mM Hepes-KOH (pH 7.8), 5 mM  $MgCl_2$ , 0.5 mM DTT, 2 mM ATP, アセチル化 BSA (5.4  $\mu$ g), 70 mM NaCl, His-TDG (23, 46, 92 ng) あるいは His-MUG (9.3, 18.6, 37.2 ng), XPC-RAD23B (5 ng), CETN2 (5 ng), XPA (150 ng), TFIIH (258 ng), RPA (100 ng), ERCC1-XPF (25 ng), XPG (108.9 ng),  $^{32}P$  標識基質 DNA (~100,000 cpm)。反応溶液を 30°C で 1 時間反応させた後、EDTA、SDS、Proteinase K (タカラバイオ) を最終濃度がそれぞれ 8 mM、0.5%、0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l になるように添加し、さらに 56°C、1 時間反応させることでタンパク質を分解した。この反応液から、フェノール抽出及びエタノール沈殿によって DNA を回収した。得られた沈澱を 90%ホルムアミドを含む泳動色素混合液 (0.04% bromophenol blue, 0.04% xylene cyanol, 0.01% EDTA, 5% glycerol) 5  $\mu$ l に溶解し、95°C で 10 分間加熱して変性させた後、氷上で急冷した。この試料溶液のうち 2  $\mu$ l を 8 M 尿素を含む 10%変性ポリアクリルアミドゲル中で、30W、45 分間展開した。このゲルを 10%酢酸-10%メタノール混合液中で固定し、ゲルドライヤー (Bio-Rad) を用いて乾燥させた。こうして得たゲルをイメージングプレート (BAS IP MS : 富士フィルム)、もしくは X 線フィルム (RX-U : 富士フィルム) に露光して切り出し産物のシグナルを検出した。

## mRNA シーケンス解析

次世代シーケンサーを用いた mRNA シーケンス解析は、九州大学生体防御医学研究所、大川恭行教授のグループとの共同研究により行った。細胞を 100 mm ディッシュに  $2 \times 10^6$  個播種し、2 日間培養を行った後、total RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて精製した。NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit (New England Biolabs) を用いてライブラリーを作製し、HiSeq1500 システム (Illumina) でシーケンス解析を行った。得られたリードのリファレンスゲノムへのアライメントは HISAT2 (50) で行い、マッピング結果を featureCounts (51) でカウントした。発現変動遺伝子の同定は DESeq2 (52) で行い、オントロジー解析は PANTHER (53) を利用した。

## 第4章 実験結果

### DNA 損傷によって誘導される TDG の分解

TDG は、細胞周期 S 期において分解を受けることが報告されている (54)。脱塩基部位に強固に結合した TDG は DNA 複製の障害になり得るため、S 期での分解は複製フォークの進行を維持するためである、という説明がなされているが、正確な意義については不明な点も多い。一方、本研究でヒト正常線維芽細胞 WI38 VA13 に紫外線を照射したところ、TDG タンパク質の分解が誘導されることを新たに見出した (図 5A)。WI38 VA13 細胞をさまざまな線量の紫外線で処理したところ、この TDG の分解誘導が紫外線量に依存することが示された (図 5B)。他のグループの先行研究の結果と一致して、抗 TDG 抗体を用いたウェスタンブロットでは 2 本の主要なバンドが検出されたが、高分子量側のバンドは TDG の SUMO 化修飾体であると考えられている (33)。これを検証するため、FLAG タグを融合したヒト野生型 TDG (TDG WT) あるいは SUMO 化部位である 330 番目のリジンをアルギニンに置換した変異 TDG (TDG K330R) を SUMO-1 と共に HEK293T 細胞において一過的に過剰発現させ、抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行った (図 6)。その結果、TDG WT に対して TDG K330R を発現する細胞では抗 TDG 抗体と反応する高分子量側のバンドが消失していること、この高分子量側のバンドに相当する位置で抗 SUMO-1 抗体との反応が認められたことから、このバンドが SUMO 化 TDG であることが確かめられた。次に TDG の紫外線誘導性の分解と紫外線誘発 DNA 損傷の修復機構との関係性を調べるため、NER を完全に欠損した色素性乾皮症 A 群患者由来線維芽細胞株 XP2OSSV を親株として、FLAG タグを融合した XPA を安定に発現する細胞株を樹立した。これらの細胞で紫外線照射後の TDG の動態を比較したところ、XPA 発現細胞で見られる TDG の分解が親株細胞では顕著に減弱していた (図 7)。このことから紫外線誘導性の TDG の分解に NER が関与していることが示唆された。

さらに、紫外線以外のさまざまな DNA 損傷剤で細胞を処理した際の TDG の動態について調べた (図 8)。WI38 VA13 細胞を、酸化損傷を生じさせる過酸化水素水、アルキル化剤であるメチルメタンスルホン酸、DNA 鎖間架橋をはじめ

とするさまざまな損傷を引き起こすシスプラチンの存在下でさまざまな時間培養を行った結果、いずれの処理によっても内在性 TDG の分解誘導が観察された。このことから、紫外線損傷だけでなく、様々な DNA 損傷に応答して TDG の分解が誘導されることが明らかになった。

## TDG の紫外線誘導性の分解は CDT2 に依存する

TDG の S 期における分解はユビキチン-プロテアソーム系に依存することが、阻害剤を用いた実験等によって示されている (54)。一方、私は紫外線誘導性の TDG 分解にもユビキチン-プロテアソーム系が関与していることを、プロテアソーム阻害剤 MG132 を用いて明らかにした (図 9A)。プロテアソームは細胞質及び核内に存在するタンパク質分解酵素複合体で、ポリユビキチン化されたタンパク質の分解を介して、さまざまな細胞機能の制御に関与している (55)。このタンパク質分解系では、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチン転移酵素 (E3) が順次関わる一連の酵素反応を介して基質タンパク質のリジン残基側鎖のアミノ基とユビキチン C 末端のカルボキシル基がイソペプチド結合を形成するが、この基質タンパク質の選択性は E3 に依存している。TDG 分解の分子機構を検討するにあたり、TDG の分解を担う E3 の候補として CDT2 に着目した。

DNA 複製のライセンス化因子である CDT1 は S 期において分解されることが知られており、この分解がゲノム DNA の再複製阻止に重要な役割を果たしている (63)。一方、CDT1 は紫外線照射に応答して分解を受け、この点において TDG と類似した性質を示す。CDT1 の分解には DDB1-CDT2-CUL4-ROC1 から成る E3 複合体 (CRL4<sup>CDT2</sup>) が関与することが示されており、この複合体においてユビキチン化基質との相互作用を担うサブユニットが CDT2 である。CRL4<sup>CDT2</sup> によるユビキチン化には、基質タンパク質と DNA ポリメラーゼの補助因子である PCNA の相互作用が必要とされ、この相互作用には基質タンパク質が持つ PIP (PCNA-interacting protein) degron とよばれるアミノ酸配列モチーフが関わる。実際 TDG が CDT1 の PIP degron と類似性の高いアミノ酸配列を持つことが見出されており、CRL4<sup>CDT2</sup> が TDG の分解にも関与している可能性が考えられた (図 9B)。

そこで、CDT2 の有無が TDG タンパク質の安定性に与える影響を調べるため、



WI38 VA13 細胞に CDT2 に対する siRNA を導入し、さまざまな時間培養した。ウエスタンブロット解析によって CDT2 のタンパク質レベルの低下が確認された一方、TDG のタンパク質レベルは逆に上昇する傾向が見られたことから、通常の培養条件において CDT2 が TDG タンパク質の安定性を負に制御していることが示された (図 10A)。次に、内在性 CDT2 を発現抑制した WI38 VA13 細胞を用いて、紫外線照射後の TDG タンパク質の挙動を調べた (図 10B)。その結果、CDT2 の発現を抑制した細胞では、対照細胞と比較して紫外線誘導性の TDG 分解が顕著に抑制されることが明らかになった。

次に TDG が CDT1 の PIP degron と類似性の高いアミノ酸配列を持つことから、実際に TDG と PCNA が相互作用するかどうかを GST プルダウンアッセイを用いて検証した。まず PIP degron 相同配列中で PCNA との相互作用に関与すると予想される 3 か所のアミノ酸をすべてアラニンに置換した変異 TDG (TDG  $\Delta$ PIP) を設計した (図 11A)。TDG WT 及び TDG  $\Delta$ PIP を GST 融合タンパク質としてそれぞれ大腸菌内で発現・精製後、別に精製した組換え PCNA タンパク質に対するプルダウンアッセイに用いた (図 11B)。その結果、予想通り PCNA は TDG WT に結合した一方で、TDG  $\Delta$ PIP とは結合が見られなかったことから、TDG が PIP degron を介して PCNA と直接相互作用することが確かめられた。

## 無細胞系における TDG のユビキチン化

実際に CRL4<sup>CDT2</sup> E3 リガーゼ複合体により TDG がユビキチン化を受けることを確かめるため、無細胞系におけるユビキチン化反応の再構成を試みた。個別に精製した DDB1-DDB2 複合体と CUL4A-ROC1 複合体を試験管内で混合することにより、CRL4<sup>DDB2</sup> E3 リガーゼ複合体が再構成されることが以前から知られていたため (43)、新たに DDB1-CDT2 複合体を組換えタンパク質として発現・精製を行い、同様の方法で CRL4<sup>CDT2</sup> E3 リガーゼ複合体の調製を試みた。FLAG タグを融合した DDB1 及び HA タグを融合した CDT2 をバキュロウイルス発現系を用いて昆虫細胞で発現させ、DDB1-CDT2 複合体の精製を行った (図 12)。これを別に精製した CUL4A-ROC1 複合体と混ぜ、Superdex 200 ゲル濾過カラムに通すことでヘテロ 4 量体を精製した (図 13)。

精製した CRL4<sup>CDT2</sup> E3 リガーゼ複合体に加え、E1 (UBE1)、E2 (UbcH5a)、

ユビキチン、TDG、PCNA 及び DNA を用いて無細胞ユビキチン化反応を行った。PCNA は環状のホモ三量体構造を取り、クランプ状に DNA に結合することが知られている。一般に、PCNA は鋳型-プライマー構造を持つ DNA に結合し、DNA ポリメラーゼによる鎖伸長を補助すると考えられており、そのような構造を分子内で形成する人工ポリマーである poly(dI-dC)を DNA として用いて反応を行った (図 14)。反応溶液を用いたウエスタンブロットの結果、TDG のバンドシフトが見られたことから、CRL4<sup>CDT2</sup>は確かに TDG をユビキチン化する活性を持つことが示された。

## PIP degron の変異は TDG の紫外線誘導性分解を抑制する

PIP degron の変異が細胞内における TDG の安定性に与える影響を調べるため、MEF *Tdg*<sup>-/-</sup>を親株として N 末端に FLAG タグを融合した TDG WT 及び TDG ΔPIP をそれぞれ安定発現する形質転換細胞株を pIRES<sub>hyg</sub> ベクターを用いて作製した (図 15A)。これらの細胞株における TDG タンパク質の発現をウエスタンブロットにより比較したところ、TDG ΔPIP の方が TDG WT よりも定常状態における発現レベルが高い傾向が見られた (図 15B)。次に紫外線照射後の TDG タンパク質の挙動を比較したところ、TDG WT で見られた分解が TDG ΔPIP では顕著に抑制されていた (図 16)。さらに S 期における TDG の安定性についても解析を行った (図 17)。チミジン類似体である 5-エチニル-2'-デオキシウリジン (EdU) で細胞を処理することにより S 期細胞の核を標識した上で、抗 TDG 抗体による免疫蛍光染色を行った。TDG WT を発現する細胞については EdU で標識された S 期細胞で特異的に TDG のシグナルが低下していた一方、TDG ΔPIP のシグナルは S 期細胞とそれ以外の細胞で特に差が見られなかった。これらのことから、DNA 損傷時及び S 期において TDG が PIP degron を介して PCNA と相互作用し、CRL4<sup>CDT2</sup>によるユビキチン化を受けて分解されることが改めて示された。

## TDG の発現は細胞の紫外線応答に影響を与える

先述したように、TDG は NER の損傷認識因子である XPC と相互作用し、この相互作用が無細胞系において TDG の酵素学的代謝回転を促進することが示

されている。一方で、TDG が NER に何らかの影響を及ぼすかどうかは調べられていなかった。そこで、本研究で作製した TDG WT 発現細胞、TDG  $\Delta$ PIP 発現細胞及びその親株である MEF *Tdg*<sup>-/-</sup> にさまざまな線量の紫外線を照射したところ、TDG の発現によって紫外線感受性が上昇することがわかった (図 18A)。次に、TDG の発現の影響が DNA 損傷の修復機能の変化によるものかどうか検討するため、細胞に紫外線を照射した後、ゲノム DNA 中の 6-4PP の残存量の経時変化を測定した (図 18B)。その結果、TDG の発現によって、6-4PP の修復が有意に遅延することがわかった。これらのことから、TDG の発現が何らかのメカニズムによって細胞の紫外線応答に影響を与えている可能性が示された。

損傷認識は NER 反応の律速段階となっており、XPC タンパク質の発現レベルに依存して損傷修復速度が変化することがわかっている。しかしながら、TDG WT 及び TDG  $\Delta$ PIP 発現細胞における XPC タンパク質の発現レベルは、親株細胞と比較して顕著な低下は認められなかった (図 15B)。さらに、TDG が NER 反応を直接阻害するかどうかを生化学的に解析した (図 19)。精製タンパク質により再構成した無細胞 NER 反応系にヒト TDG タンパク質及び大腸菌の TDG ホモログであるミスマッチ特異的ウラシル DNA グリコシラーゼ (mismatch-specific uracil DNA glycosylase : MUG) を加えたところ、いずれについても有意な影響は認められなかった。以上の結果から、TDG が XPC の発現や NER 反応を直接阻害している可能性は低いと考えられる。

## 紫外線損傷応答における TDG の構造活性相関

TDG が持つさまざまな機能のうち、細胞の紫外線損傷応答に影響を与えるものを調べるため、MEF *Tdg*<sup>-/-</sup> を親株として種々の変異型 TDG を安定に発現する細胞株を新たに作製した (図 20A)。DNA グリコシラーゼ活性中心のアスパラギンをアラニンに置換した TDG N140A 変異体、DNA 結合活性を欠損した TDG M269H 変異体 (56) に加えて、TDG WT、TDG K330R 及び TDG  $\Delta$ PIP をレトロウイルスベクターを用いて MEF *Tdg*<sup>-/-</sup> で安定発現させた。対照として空ベクターのみを導入した細胞株 (VEC) を同時に作製した。これらの細胞株における TDG タンパク質の発現をウエスタンブロットにより確認したところ (図 20B)、SUMO 化 TDG のバンドが TDG K330R 発現細胞で予想通り消失したことに加え、TDG M269H 発現細胞でも著しい減弱が見られた。このことから、TDG の

SUMO 化が DNA との結合に依存する可能性が示された。また、XPC タンパク質の発現レベルについては、細胞株間で大きな違いは認められなかった。

これらの細胞にさまざまな線量の紫外線を照射して生存率を比較したところ、非 SUMO 化変異体である TDG K330R、BER 活性を欠損した TDG N140A 及び TDG M269H 変異体を発現する細胞では、TDG WT の発現により惹起された紫外線感受性の上昇が見られなかった (図 21A)。また 6-4PP の修復速度についても解析を行ったところ、紫外線感受性の結果と一致して、TDG K330R、TDG N140A 及び TDG M269H 変異体発現細胞では、損傷修復速度の低下が見られなかった (図 21B)。このことから TDG の BER 機能が、紫外線損傷修復活性の低下に関与している可能性が新たに示唆された。

## TDG の発現は大規模な遺伝子発現変動を引き起こす

図 19 の結果から、TDG が XPC の発現や NER 反応を直接阻害する可能性は低いと考えられた。一方で、先述したように、TDG は CBP などの転写制御因子との相互作用や DNA 脱メチル化機構などを介して遺伝子発現を制御すると考えられている。このことから TDG 発現による紫外線損傷修復活性の低下は、DNA 損傷応答関連遺伝子の発現制御によるものである可能性が考えられた。そこで、TDG WT 及び BER 活性を欠損した TDG N140A 変異体の発現細胞に加え、空ベクターを導入した VEC 細胞を用い、これらの細胞間における遺伝子発現パターンの網羅的な比較解析を行った。その結果、TDG WT 及び TDG N140A 発現細胞共に、対照の VEC 細胞と比較して遺伝子発現が大きく変動している一方、両者の遺伝子発現パターンは比較的類似していることがわかった (図 22A)。TDG WT 発現細胞及び TDG N140A 発現細胞では、VEC 細胞と比較してそれぞれ 3,330 個、2,599 個の遺伝子について有意な発現変動が見られ、このうち両者に共通して変動した遺伝子数は 2,071 個であった (図 22B)。さらにオントロジー解析の結果から、TDG の発現によって、様々な細胞機能に関わる遺伝子の発現が変動していることがわかった (表 2)。これらのことから、TDG は DNA グリコシラーゼ活性非依存的に広範な遺伝子の発現を制御しうることを示唆された。

TDG WT 発現細胞と TDG N140A 発現細胞の間で遺伝子発現プロファイルを比較したところ、85 個の遺伝子について有意な差が見られた (図 22B)。これら

の中では、リン酸代謝系に関わる遺伝子 (17 個) が最も多く見出された (図 22C)。また、NER に直接関わる因子としては、*Ercc3* (*Xpb*) 及び *Ercc1* 遺伝子の発現上昇が見られたが、この効果は TDG WT 及び TDG N140A 発現細胞に共通していた。以上のことから、TDG の DNA グリコシラーゼ活性は特定の遺伝子発現の制御に関与している可能性が考えられた。

## 第5章 考察

アフリカツメガエルの細胞抽出液を用いた解析から、DNA 架橋剤であるマイトマイシン C により損傷を与えた DNA を添加すると、抽出液中の TDG の分解が誘導されることが報告されている (57)。本研究では、ヒト生細胞において、紫外線やさまざまな DNA 損傷剤存在下で TDG が分解を受けることを新たに見出した (図 5, 8)。

TDG タンパク質は S 期において CRL4<sup>CDT2</sup> E3 リガーゼによるユビキチン化を介して分解されることが知られていたが、本研究において同じ E3 リガーゼが TDG の紫外線誘導性分解にも関与することが示された。PCNA は DNA 複製及び DNA 修復合成の際にクランプ状に DNA に結合して DNA ポリメラーゼの補助因子として働くが、この PCNA と基質タンパク質との相互作用が CRL4<sup>CDT2</sup> によるユビキチン化及びその後のプロテアソームによる分解に重要である。紫外線照射後の TDG の分解が NER 活性に依存することを考え合わせると (図 7)、TDG の分解は修復反応に伴う DNA 修復合成に依存する可能性が高いと思われる。過酸化水素水やメチルメタンスルホン酸、シスプラチン等の DNA 損傷剤は NER 以外の機構で修復される DNA 損傷を誘起する可能性があるが、いずれにしても PCNA に依存した DNA 修復合成を伴う点では共通していると思なすことができる。

本研究では、精製タンパク質を用いた無細胞ユビキチン化反応により、CRL4<sup>CDT2</sup> 依存的なユビキチン化によると思われる TDG のバンドシフトを観察することに成功した (図 14)。しかし、今回の実験で観察されたユビキチン化の効率は必ずしも高くなく、これがプロテアソームによるタンパク質分解を引き起こすのに十分なレベルかどうかについては検討の余地が残されている。細胞内でのポリユビキチン化には、今回の無細胞系には含まれない未知の因子や TDG タンパク質の翻訳後修飾が関与している可能性がある。実際、CRL4<sup>CDT2</sup> の基質の 1 つである p21 はリン酸化修飾によって安定性が制御されていることが知られており (58, 59)、TDG が S 期や DNA 損傷後にリン酸化を受けることで CRL4<sup>CDT2</sup> による認識が促進されている可能性についても検討する必要があると思われる。ヒト TDG は、SUMO 化修飾部位を含む C 末端領域、DNA グリコシラーゼ活性中心を含み様々なタンパク質と相互作用する中間領域、翻訳

後修飾を受ける N 末端領域から構成されている。このうち N 末端より 51 番目から 111 番目までのアミノ酸を含む制御ドメイン (regulatory domain: RD) と呼ばれる領域は CBP によるアセチル化及び PKC $\alpha$  によるリン酸化を受けることが報告されており (31)、これらの翻訳後修飾が TDG の塩基除去活性に影響を与える可能性が示されている。本研究において見出された TDG の PIP degron は N 末端から 100 番目のアミノ酸付近に存在し、この RD に含まれる。現在のところ、RD における翻訳後修飾が塩基除去活性以外の TDG の機能制御に関与することを示す報告はないが、TDG と PCNA の相互作用に何らかの影響を与え、TDG の安定性に関与している可能性もある。今後、RD における様々な翻訳後修飾が TDG の分解に及ぼす影響を解析する必要がある。

野生型及び変異型 TDG を安定発現する MEF *Tdg*<sup>-/-</sup> を用いた実験から、TDG  $\Delta$ PIP の発現レベルが TDG WT や他の変異型 TDG に比べて高い傾向が観察された (図 15, 20)。さらに TDG WT と比較して、 $\Delta$ PIP 変異の導入により TDG の S 期及び紫外線誘導性の分解が顕著に抑制された (図 16, 17)。これらのことから TDG が PIP degron 依存的に CRL4<sup>CDT2</sup> によるユビキチン化を経て分解を受けることが強く示唆された。興味深いことに、DNA 結合活性を欠損した TDG M269H 変異体では、SUMO 化レベルの顕著な低下が認められた (図 20)。TDG は異常塩基を除去した後、SUMO 化を介して自身の反応産物である脱塩基部位から解離するというモデルが提唱されている (図 4)。今後、TDG M269H が SUMO 化欠損を示す理由を明らかにするとともに、TDG SUMO 化の意義そのものを再検討する必要があると考えている。

本研究により、TDG の発現が細胞の紫外線感受性を上昇させることが新たに見出された (図 18, 21)。紫外線照射後の 6-4PP の修復速度についても TDG の発現レベルに依存して低下する傾向が見られており、TDG タンパク質の存在が細胞の紫外線応答に負の影響を与えている可能性が考えられる。一方で、TDG N140A 及び TDG M269H 変異体発現細胞における 6-4PP の修復は TDG WT 発現細胞よりも速く、親株である *Tdg* 遺伝子欠損細胞と同程度であった (図 21)。これより、TDG が持つ BER 機能が紫外線誘発 DNA 損傷の修復抑制に関与している可能性が考えられた。一方で、無細胞 NER 反応に TDG を添加してもまったく影響が見られなかったことから、TDG が NER の反応機構を直接阻害する可能性は低いと思われる (図 19)。XPC は DNA 修復だけでなく、TDG と同様、Oct4/Sox2 との相互作用を介して遺伝子発現制御に関与する可能性が示さ

れている (60, 61)。細胞内では、TDG との相互作用を介して XPC が転写制御領域に拘束されることで、DNA 損傷部位へのリクルートが阻害されている可能性も考えられる。

NER の律速となることが知られている XPC の発現レベルに対する TDG 発現の直接的な影響は見られなかったが (図 15)、TDG が何らかの因子の発現制御を介して細胞の NER 活性に影響を与えている可能性が考えられた。C 及び 5-mC の自発的脱アミノ化に起因する BER 反応が何らかの機構によって NER に影響を与えるかどうかは不明であるが、一方で DNA の脱メチル化を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御機構も TDG の BER 活性に依存すると考えられている。すなわち、5-mC が TET (ten-eleven translocation) ファミリータンパク質によってヒドロキシル化された結果、生じる 5-ホルミルシトシン (5-formylcytosine : 5-fC) や 5-カルボキシルシトシン (5-carboxylcytosine : 5-caC) が TDG の基質となり、BER 反応を介して CpG アイランドが非修飾状態に変換されるというモデルである (図 3)。一方で、TDG は DNA メチル化酵素 DNMT3B (DNA methyltransferase 3B) と相互作用してメチル化活性を低下させることが報告されている (62)。TDG がヒストンアセチル化酵素 CBP と相互作用して転写制御に関わるという報告と合わせ、TDG による DNA メチル化活性の低下は遺伝子発現の活性化に寄与しているかもしれない。

mRNA シーケンス解析の結果から、TDG は DNA グリコシラーゼ活性非依存的に広範な遺伝子の発現を制御しうることが明らかになった (図 22)。一方で、一部の遺伝子発現に関しては、TDG の DNA グリコシラーゼ活性の有無による影響が認められた。TDG の発現によって *Ercc3* や *Ercc1* など、一部の NER 因子の遺伝子発現の上昇が見られたが、これらの変動は TDG N140A 変異体発現細胞でも観察されたことから、TDG 発現による紫外線細胞応答への影響と関連する可能性は低いと思われる。一方で、TDG の DNA グリコシラーゼ活性に依存して、リン酸代謝などの細胞機能に関わる比較的限定された遺伝子の発現が変動することが示された。TDG はこれら遺伝子に関わる細胞内シグナルやエピゲノム情報を含めた転写環境を制御することで、細胞の紫外線損傷応答に関与しているのかもしれない。

これまでに同定された CRL4<sup>CDT2</sup> 依存的に分解を受けるタンパク質基質の多くは DNA 複製や修復に関与する因子であり、いくつかの基質については過剰発現により細胞周期の停止が引き起こされる (63)。TDG のタンパク質レベルは



細胞周期や DNA 損傷応答に対して厳密に制御される必要があり、その中で TDG の分解が重要な役割を担っていると考えられる。DNA 複製や修復に伴う DNA 合成の直後、半メチル化状態となった DNA は DNA 維持メチル化酵素によって再び完全にメチル化された状態になり、これにより DNA メチル化に依存したエピゲノム情報は維持される。TDG がこの維持メチル化に対して阻害的に作用するかどうかは不明であるが、TDG の分解が細胞のエピゲノム情報と遺伝子発現パターンの維持に寄与している可能性も考えられる (図 23)。一方、TDG タンパク質の発現が酵素活性非依存的にきわめて広範な遺伝子の発現に影響を与えることから、過剰な TDG の存在は不必要な遺伝子発現の変動を引き起こすことで細胞内の生理的、代謝的環境に悪影響をもたらすのかも知れない (図 24)。TDG の DNA グリコシラーゼ活性に依存した紫外線感受性の増強や NER 活性の低下の理由は本研究では明確になっていないが、XPC やその他の NER 因子が TDG 依存的に転写制御に関わる可能性を含めて今後のさらなる研究が必要である。

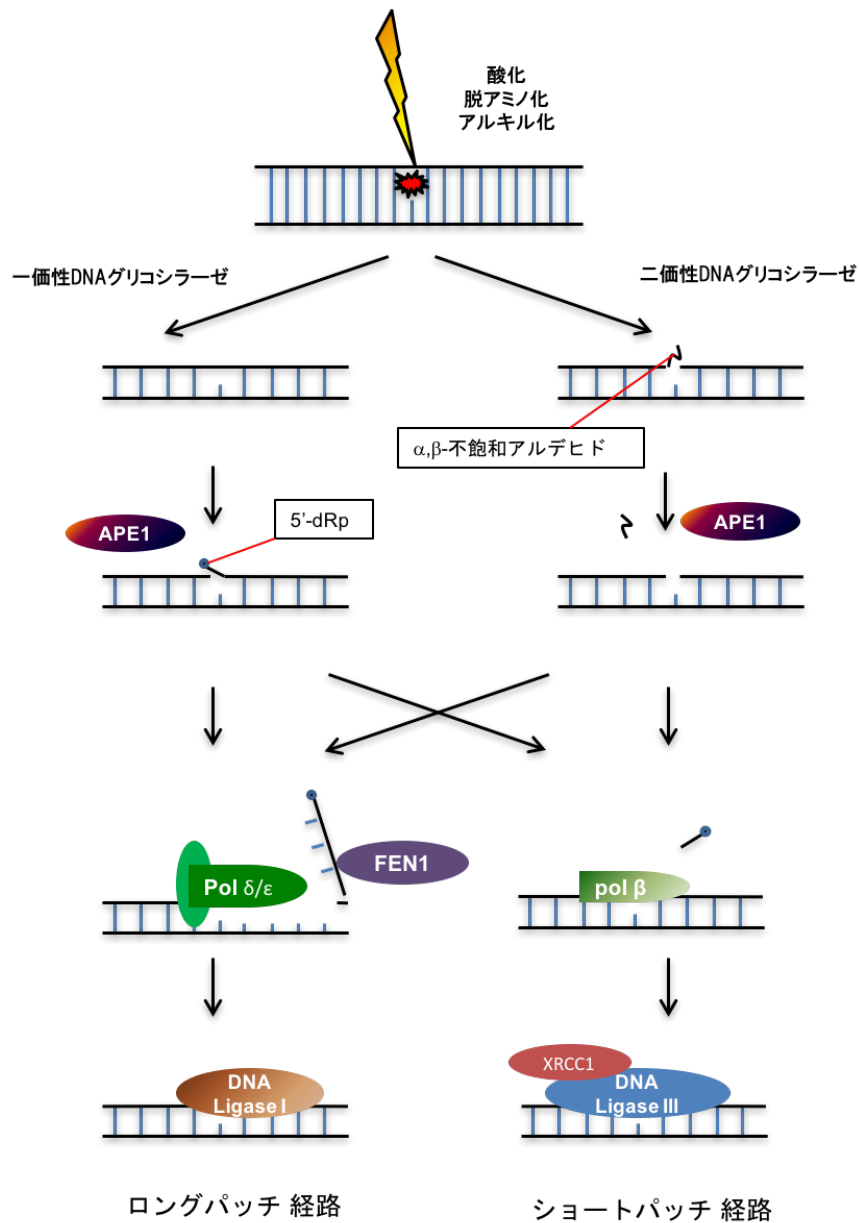


図 1. 塩基除去修復機構の反応モデル

塩基除去修復では、まず一価性または二価性の DNA グリコシラーゼによって DNA に生じた損傷塩基が認識されて除去される。次にロングパッチ経路及びショートパッチ経路のいずれかを介して、一本鎖 DNA ギャップが DNA ポリメラーゼにより埋められる。最後に DNA リガーゼによって DNA 鎖の連結が起こり、修復が完了する。

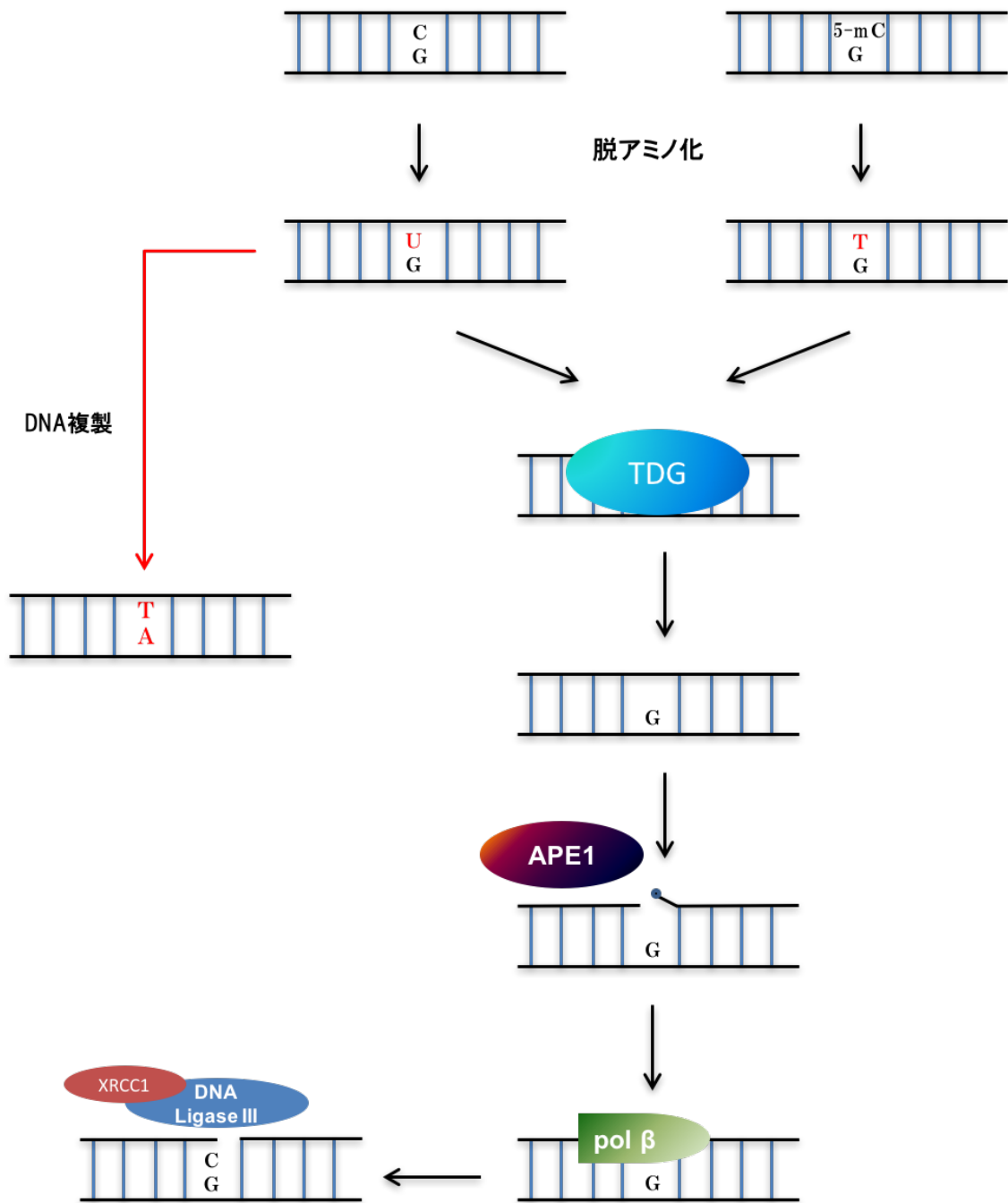


図 2. TDG によって開始される BER 反応

C 及び 5-mC は、脱アミノ化によって U 及び T に変換され、G:U、G:T ミスマッチが生じる。この状態で DNA 複製が起こると、C:G→T:A の突然変異が固定化される。TDG が U 及び T を認識して除去した後、APE1 によって脱塩基部位の 5'側の DNA 鎖が切断される。その後の修復経路について、この図ではショートパッチ経路のみを示している

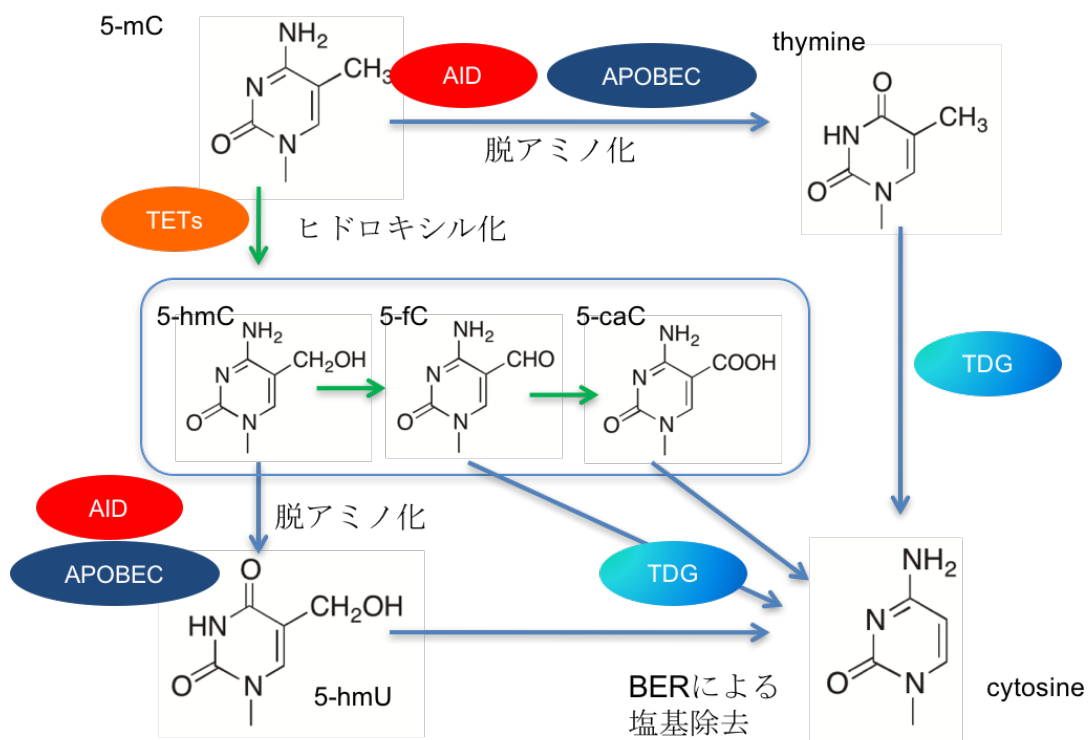


図 3. DNA の能動的脱メチル化の反応モデル

TDG は 5-mC やその TET によるヒドロキシル化産物である 5-ヒドロキシメチルシトシン (5-hmC) を直接認識して除去することができないが、さらなるヒドロキシル化や AID や APOBEC による脱アミノ化を経て生じる 5-ホルミルシトシン (5-fC)、5-カルボキシルシトシン (5-caC)、5-ヒドロキシメチルウラシル (5-hmU) などを除去することができる。DNA の能動的脱メチル化は、①5-mC のヒドロキシル化及び脱アミノ化、②これら反応産物に対して TDG が開始する BER 反応、という 2つの過程を経て行われると考えられている。

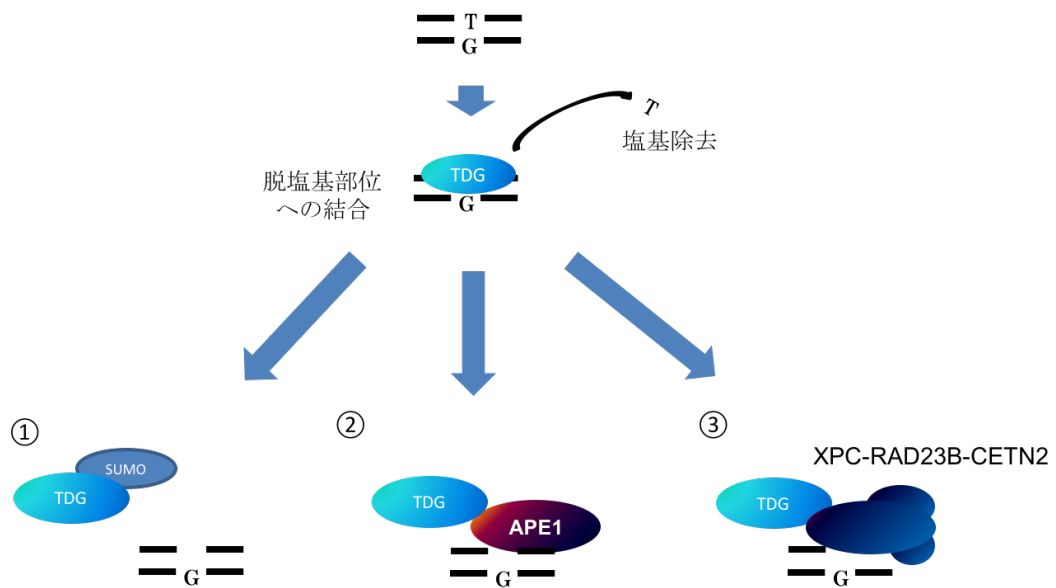
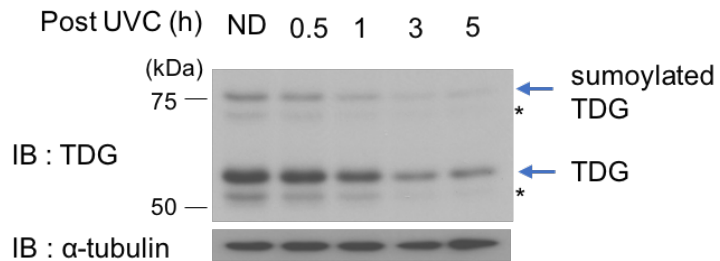


図 4. TDG の脱塩基部位からの解離機構

TDG は異常塩基を除去後、自身の反応産物である脱塩基部位に強固に結合し続けることが知られており、DNA からの解離を補助する様々な分子機構の存在が示唆されている。①SUMO 化によって TDG の立体構造が変化し、DNA との結合能が低下する。②APE1 が脱塩基部位と親和性を持つため、競合的に DNA から解離する。③XPC との相互作用により DNA からの解離が促進される。

(A)



(B)

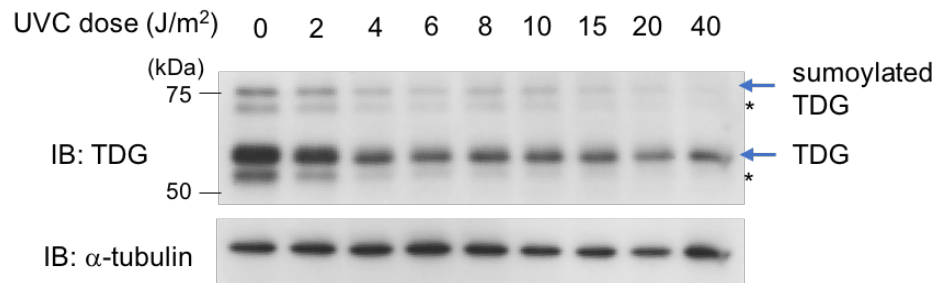


図 5. 紫外線照射に伴う TDG の分解誘導

(A) ヒト正常線維芽細胞 WI38 VA13 に紫外線  $10 J/m^2$  を照射し、様々な時間培養を行った後、抗 TDG 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。 $\alpha$ -tubulin をローディングコントロールとして用いた。\*は TDG の分解産物を示す。

(B) WI38 VA13 細胞にさまざまな線量で紫外線照射を行った。紫外線照射から 5 時間後に細胞を回収し、抗 TDG 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。 $\alpha$ -tubulin はローディングコントロールとして用いた。

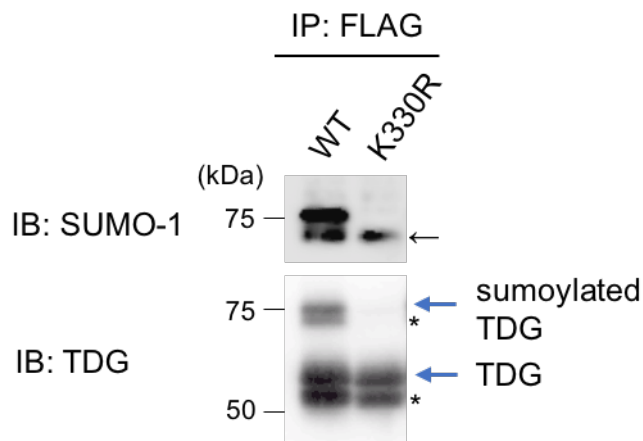


図 6. SUMO 化 TDG の確認

HEK293T 細胞において、FLAG タグを融合したヒト TDG (WT あるいは K330R) を SUMO-1 と共に一過性過剰発現させた。回収した細胞の可溶化画分から抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降及びウエスタンブロットを行った。黒色の矢印は抗 SUMO-1 抗体が反応する非特異的バンドを示す。

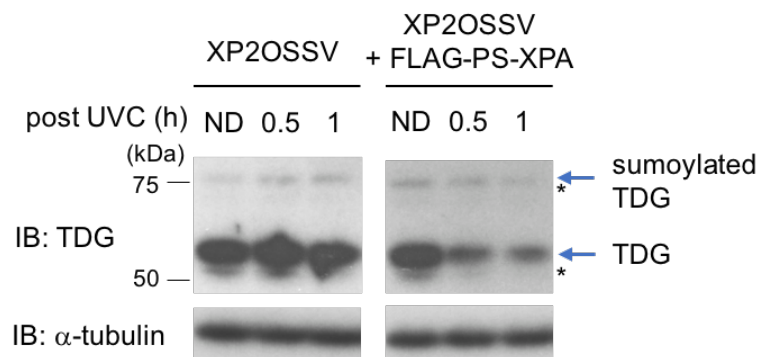


図 7. TDG の紫外線誘導性分解は NER 活性に依存する

XPA 遺伝子を安定発現する XP2OSSV 細胞及び親株である XPA 欠損細胞に紫外線  $40 \text{ J/m}^2$  を照射後、様々な時間培養を行い、TDG をウエスタンブロットにより検出した。 $\alpha$ -tubulin をローディングコントロールとして用いた。



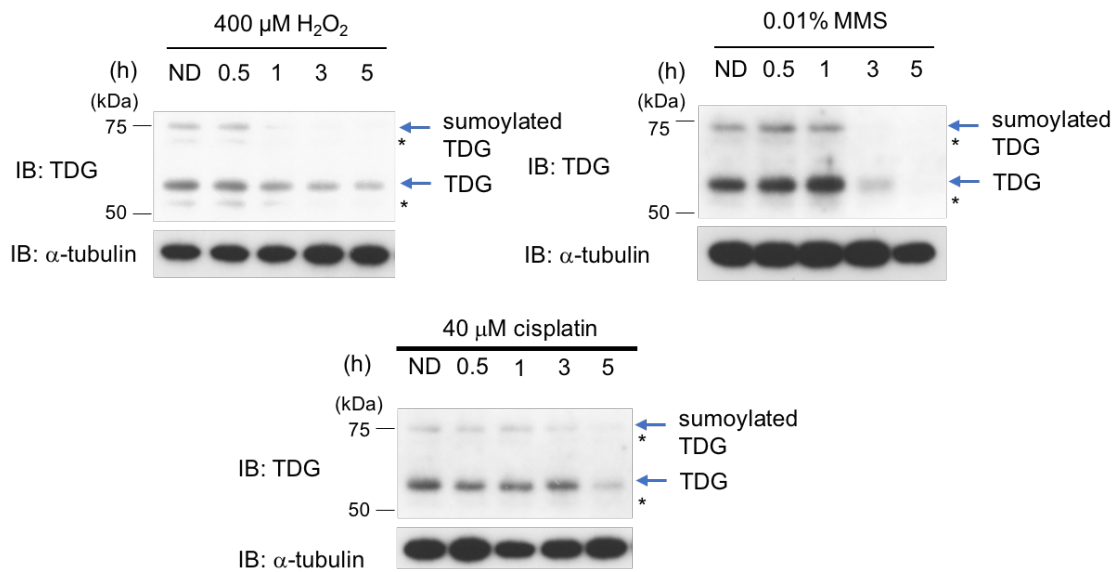
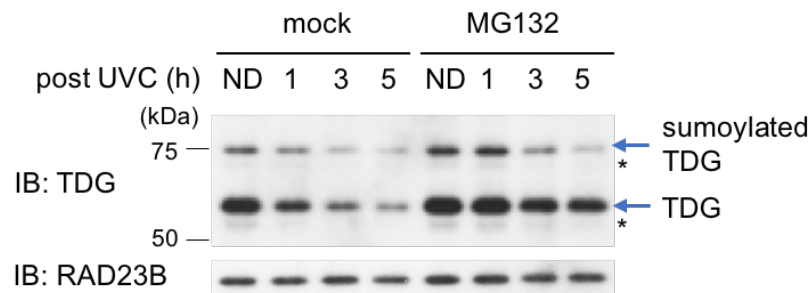


図 8. さまざまな DNA 損傷剤により誘起される TDG タンパク質の分解  
 WI38 VA13 細胞を図中に示す濃度の過酸化水素水 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、メチルメタンスルホン酸 (MMS)、シスプラチンの存在下、様々な時間培養を行った後、抗 TDG 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。α-tubulin をローディングコントロールとして用いた。

(A)



(B)

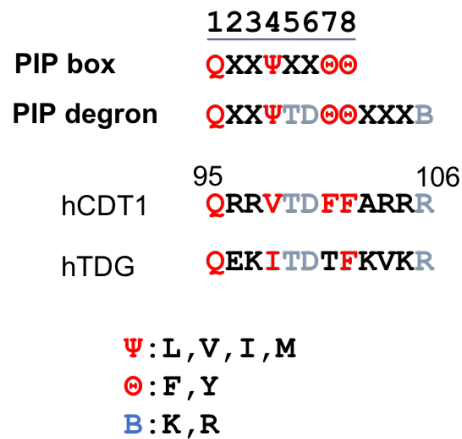
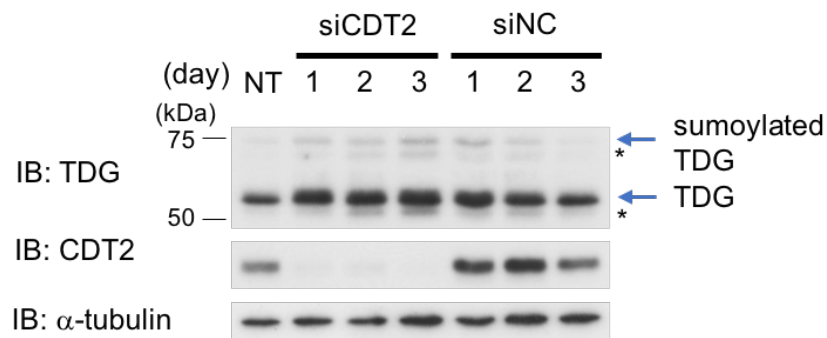


図 9. TDG の紫外線誘導性分解はユビキチン-プロテアソーム系に依存する  
(A) WI38 VA13 細胞を、プロテアソーム阻害剤 MG132 (20 μM) 存在下 (+) 及び非存在下 (-) で 2 時間培養した後、紫外線 10 J/m<sup>2</sup>を照射した。照射前と同じ条件でさらに様々な時間培養を行った後、細胞抽出液を調製してウェスタンブロットを行った。RAD23B をローディングコントロールとして用いた。  
(B) TDG において見出された PIP degron と類似性の高いアミノ酸配列を、CDT1 の PIP degron と並べて示した。番号は N 末端から数えた時のアミノ酸の位置、赤字及び青字は PIP degron のコンセンサス配列の構成アミノ酸を表す。

(A)



(B)

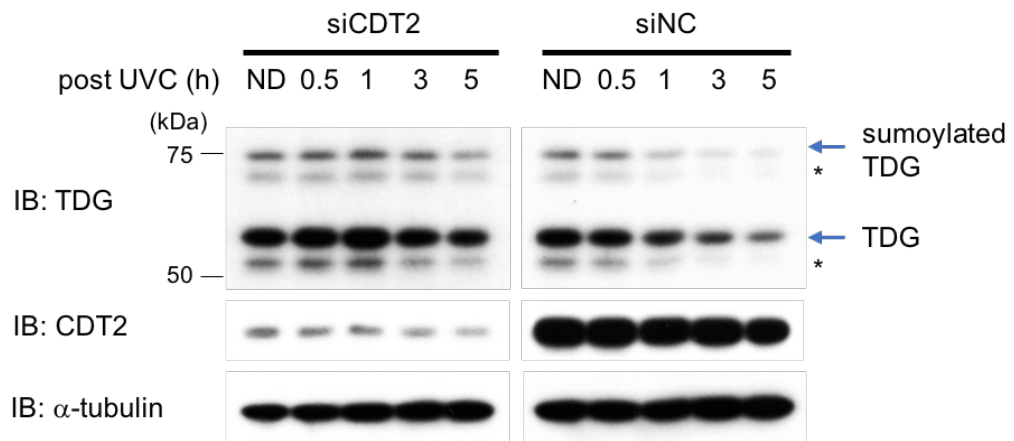


図 10. 内在性 CDT2 の発現抑制は TDG タンパク質を安定化する

(A) WI38 VA13 細胞に CDT2 に対する siRNA (siCDT2)、またはネガティブコントロール siRNA (siNC) を導入し、さまざまな時間培養を行った後、ウエスタンブロットを行った。 $\alpha$ -tubulin をローディングコントロールとして用いた。

(B) WI38 VA13 細胞に siCDT2 または siNC を導入し、2 日間培養を行った後に紫外線  $10 \text{ J/m}^2$  を照射した。さらにさまざまな時間培養した後、ウエスタンブロットを行った。 $\alpha$ -tubulin をローディングコントロールとして用いた。

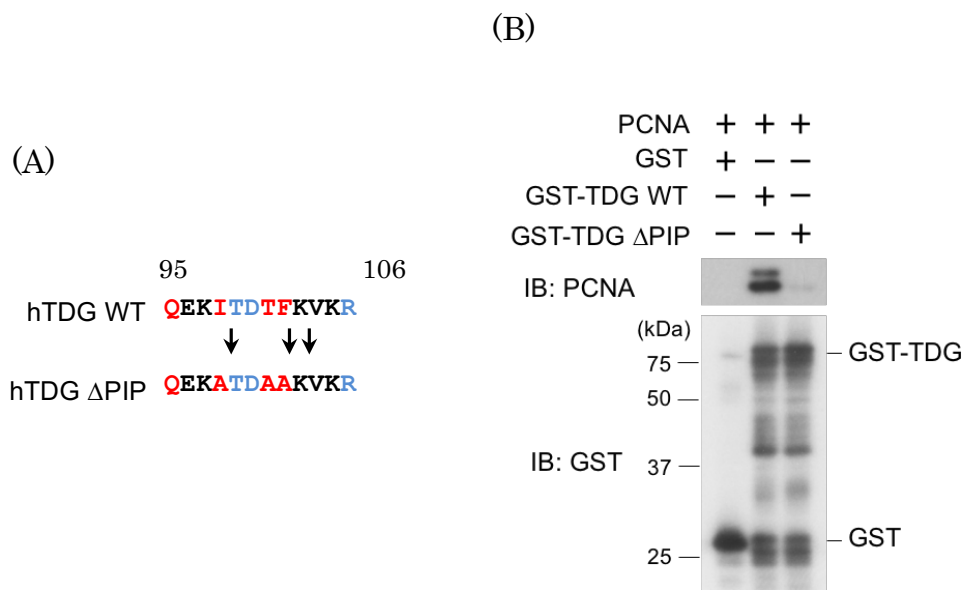
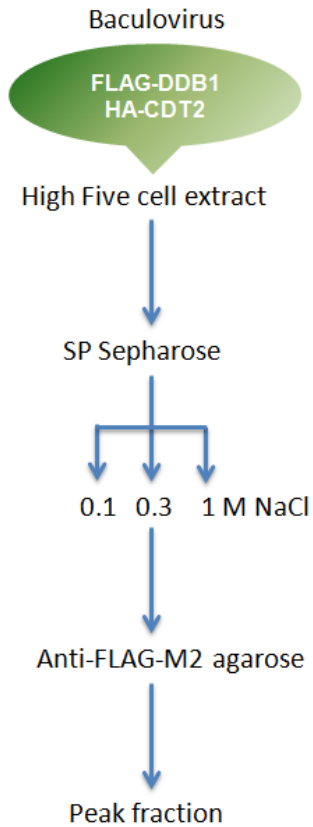


図 11. TDG と PCNA は PIP degron を介して直接相互作用する

(A) TDG の PIP degron 相同配列中に導入したアミノ酸置換を示す。

(B) GST タグを融合した TDG (WT またはΔPIP) 及び GST のみを結合した Glutathione Sepharose ビーズに、精製した PCNA を加えて反応させた。ビーズを洗浄後に結合タンパク質を溶出し、PCNA、及び GST に対する抗体を用いて、それぞれウエスタンブロットを行った。

(A)



(B)

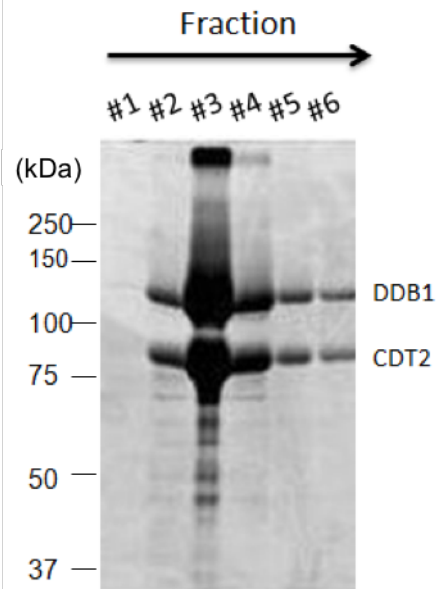


図 12. DDB1-CDT2 複合体の精製

(A) DDB1-CDT2 複合体の精製方法の概略

(B) 抗 FLAG 抗体カラムから溶出されたピーク画分各 10  $\mu$ l を SDS-PAGE で展開後、Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色により検出した。

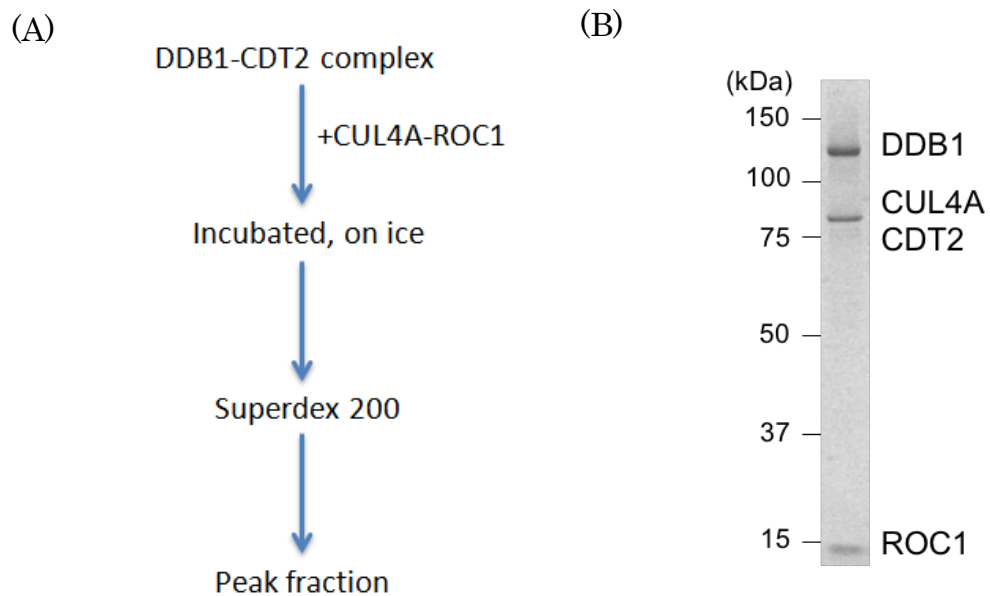


図 13. CRL4<sup>CDT2</sup> E3 リガーゼ複合体の再構成

(A) CRL4<sup>CDT2</sup> E3 リガーゼ複合体の精製方法の概略。

(B) Superdex 200 カラムから溶出されたピーク画分を SDS-PAGE で展開後、銀染色を行った。

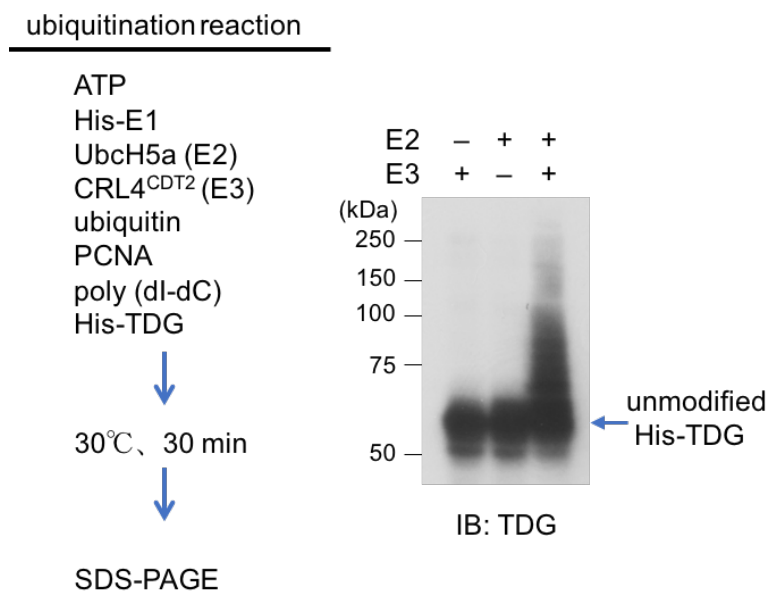
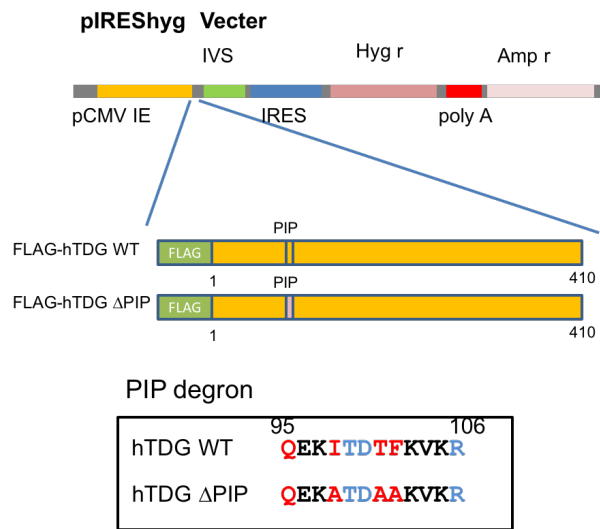


図 14. 無細胞系における TDG のユビキチン化反応

精製した E3 リガーゼ複合体を用いて無細胞ユビキチン化反応を行った。E2 及び E3 の存在下 (+) または非存在下 (-) で反応を行った後、SDS-PAGE で展開し、抗 TDG 抗体を用いたウエスタンブロットで検出した。

(A)



(B)

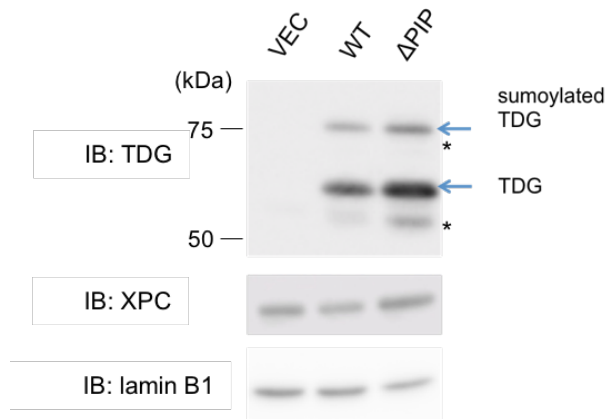


図 15. 野生型及び PIP degron 変異型 TDG を安定発現する細胞株の作製  
(A) TDG 発現用コンストラクトの概要。N 末端に FLAG タグを融合した TDG の cDNA を pIREShyg ベクターに挿入し、MEF *Tdg*<sup>-/-</sup> を親株として形質転換を行った。  
(B) 作製した形質転換細胞株から核抽出液を調製し、抗 TDG 抗体及び抗 XPC 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。lamin B1 をローディングコントロールとして用いた。



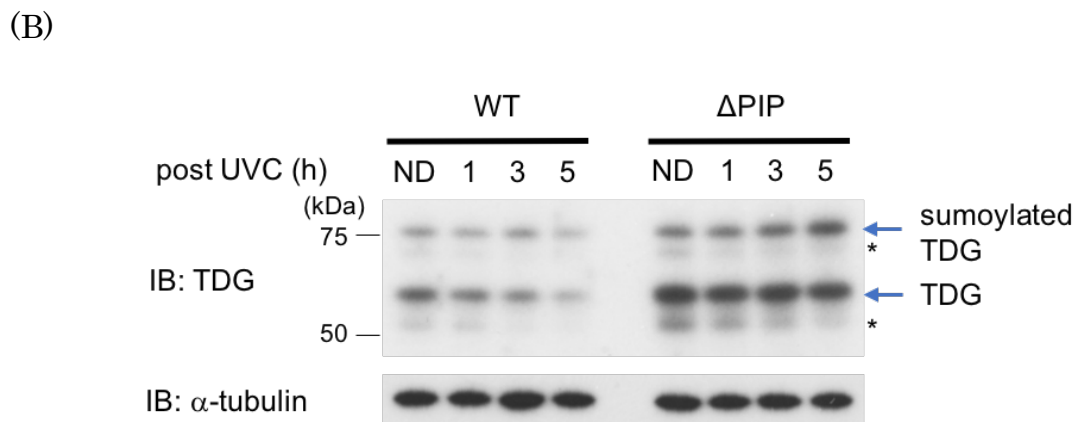
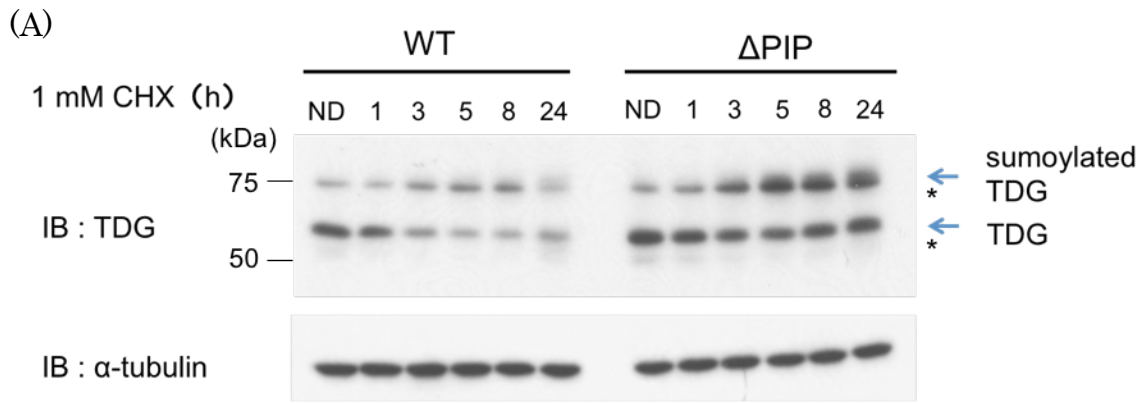


図 16. PIP degron の変異が TDG タンパク質の安定性に及ぼす影響

(A) それぞれの細胞株を 1 mM シクロヘキシミド存在下で様々な時間培養した後、ウエスタンブロットを行った。 $\alpha$ -tubulin をローディングコントロールとして用いた。

(B) それぞれの細胞株を 1 mM シクロヘキシミド存在下で 1 時間培養を行った後、紫外線  $10 \text{ J/m}^2$  を照射した。1 mM シクロヘキシミド存在下、さらに様々な時間培養を行い、ウエスタンブロットを行った。

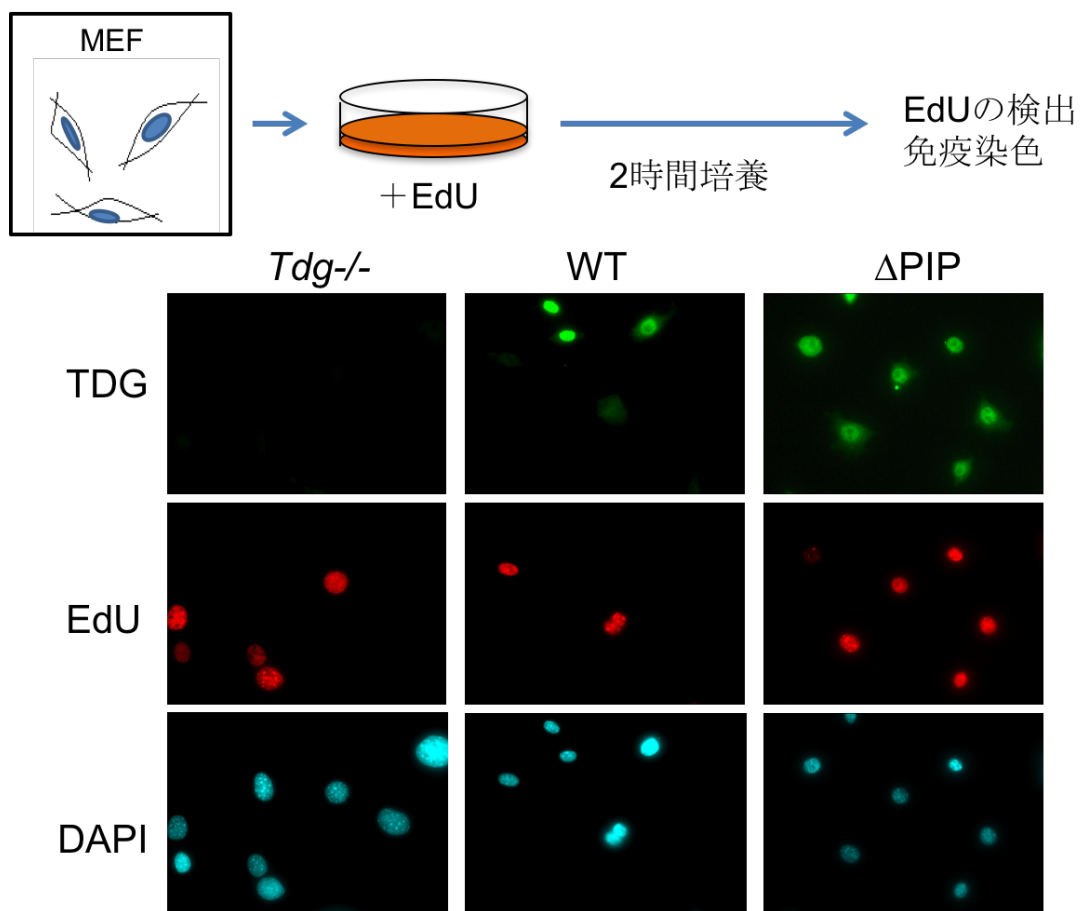
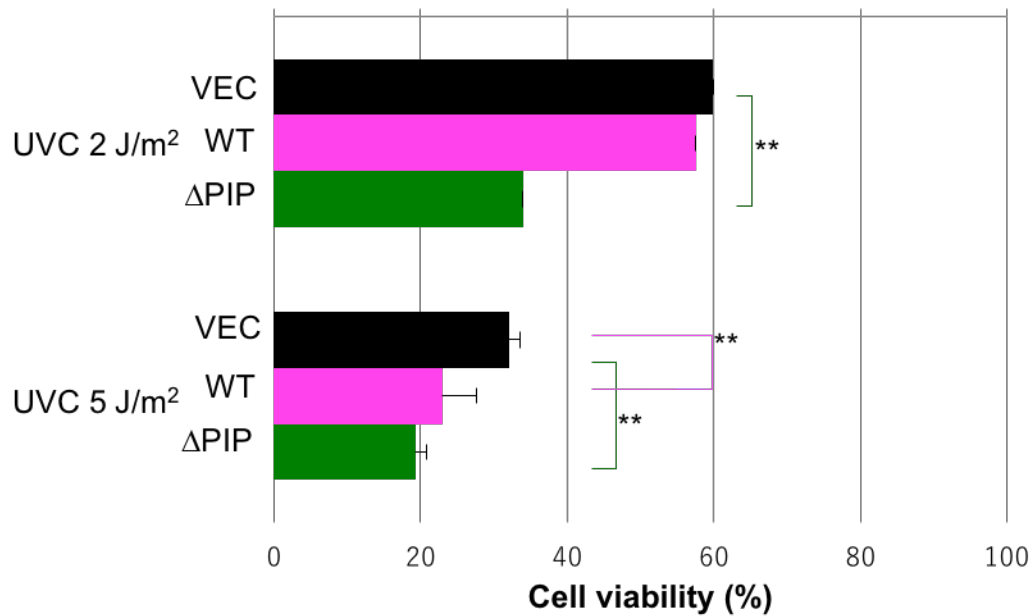


図 17. TDG の PIP degron 変異体は S 期においても消失しない

それぞれの細胞株を 10  $\mu$ M EdU 存在下で 2 時間培養を行うことで、S 期の細胞の核の標識を行った。その後、DNA 中に取り込まれた EdU を蛍光で検出するとともに、抗 TDG 抗体を用いて免疫染色を行って検出した。

(A)



(B)

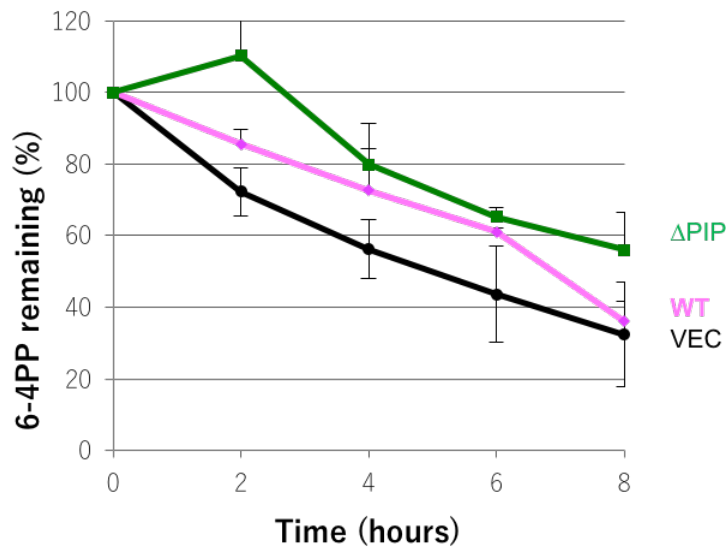


図 18. TDG の安定性の上昇は紫外線損傷修復を遅延させる

(A) それぞれの細胞株に様々な線量の紫外線を照射し、4 日後の細胞生存率を MTS アッセイにより測定した。

(B) それぞれの細胞株に 10 J/m<sup>2</sup> の線量の紫外線を照射した後、様々な時間培養を行った。回収した細胞からゲノム DNA を精製し、6-4PP の残存量を測定した。

(A)(B)ともに独立した 3 回の実験から平均を算出した。エラーバーは標準偏差を示す。統計的有意差を Student's t-test により検定した (\*\* $P < 0.01$ )。

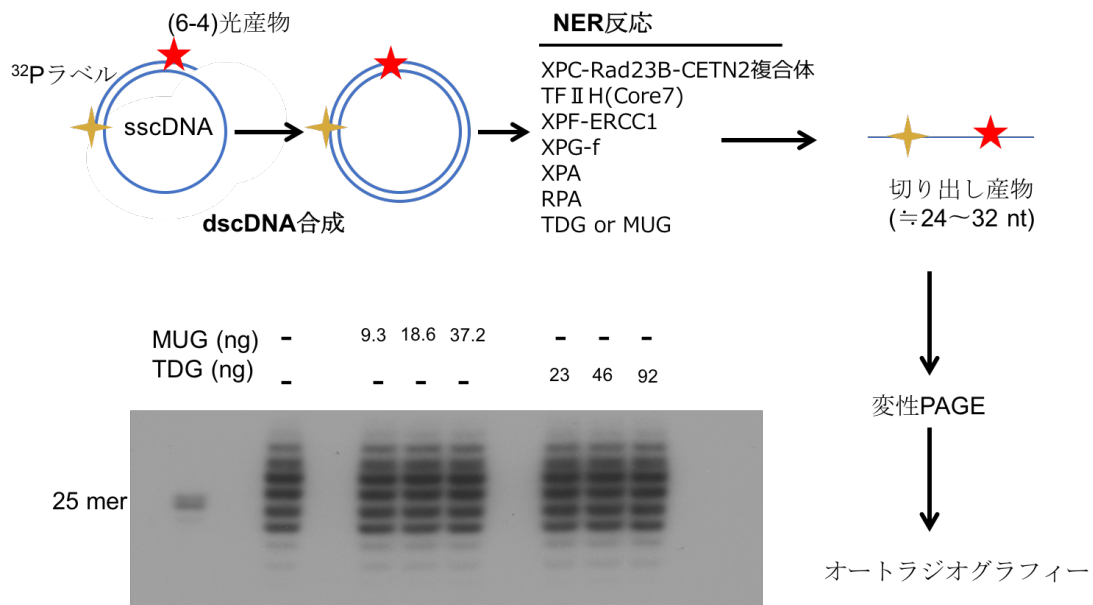
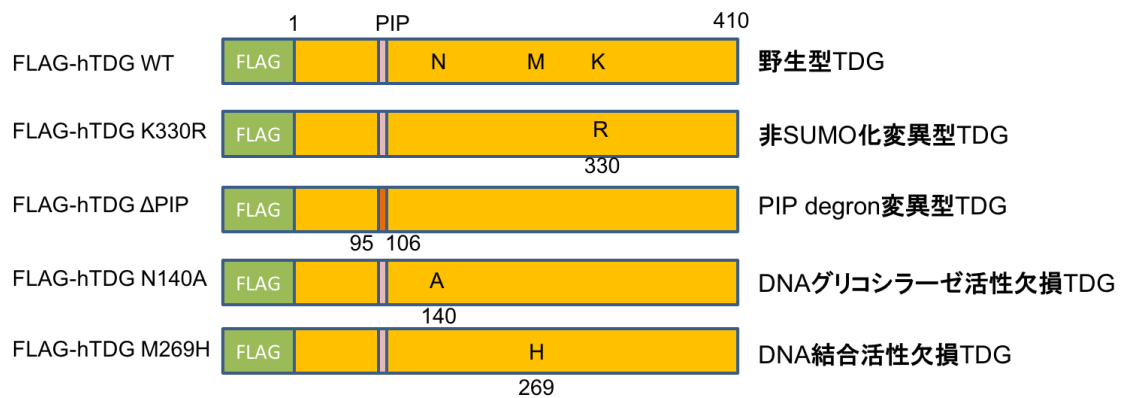


図 19. TDG は無細胞 NER 反応を阻害しない

一本鎖環状 DNA に対して 5'末端を  $^{32}\text{P}$  で標識した損傷入りオリゴヌクレオチドをアニールさせた。ここに DNA ポリメラーゼ、DNA リガーゼを反応させることで、部位特異的に単一の損傷を含んだ二本鎖閉環状 DNA 基質を得た。この基質 DNA を、精製 NER タンパク質及び TDG あるいは MUG と混合して NER 反応を行い、その反応液から DNA を精製後、変性 PAGE に供した。放射性同位体を含む切り出し産物を、オートラジオグラフィーによって検出した。

(A)



(B)

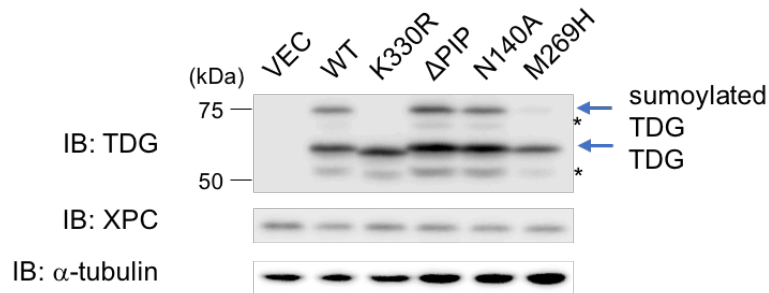


図 20. 様々な変異型 TDG を安定発現する細胞株の作製

(A) 野生型及び種々の変異型 TDG の N 末端に FLAG タグを融合したタンパク質の cDNA を pMMP-puro ベクターに挿入した。これをレトロウイルス産生用パッケージング細胞 292GPG に導入し、産生したウイルスを MEF *Tdg<sup>fl</sup>* に感染させることで形質転換を行った。

(B) 作製した形質転換細胞株から可溶性画分を抽出し、抗 TDG 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。 $\alpha$ -tubulin をローディングコントロールとして用いた。

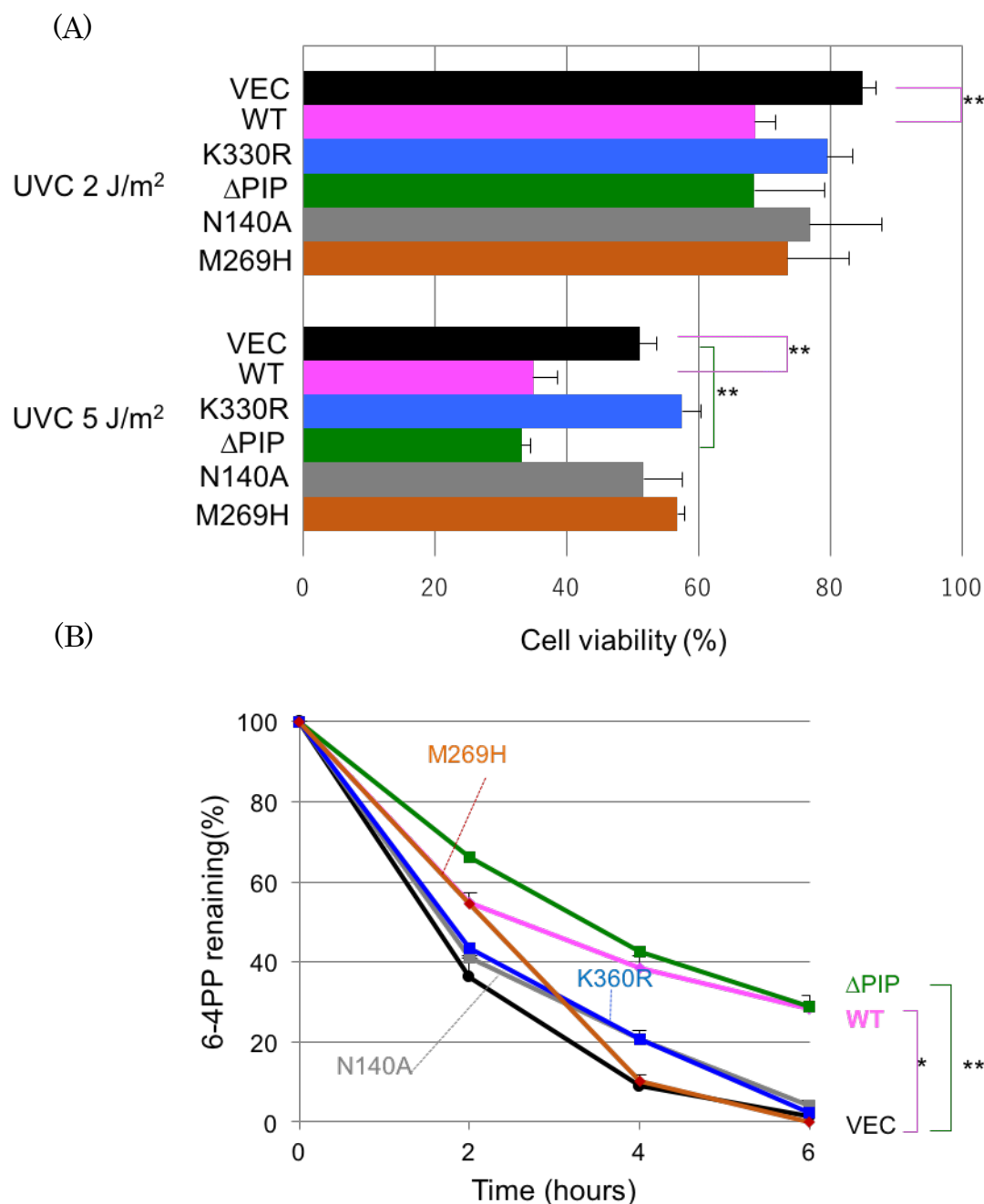


図 21. TDG の BER における機能が紫外線誘発 DNA 損傷の修復を抑制する  
 (A) それぞれの細胞株に様々な線量の紫外線を照射し、4 日後の細胞生存率を MTS アッセイにより測定した。  
 (B) それぞれの細胞株に 10 J/m<sup>2</sup> の線量の紫外線を照射した後、様々な時間培養を行った。回収した細胞からゲノム DNA を精製し、6-4PP の残存量を測定した。  
 (A)(B)ともに独立した 3 回の実験から平均を算出した。エラーバーは標準偏差を示す。統計的有意差を Student's t-test により検定した (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )。

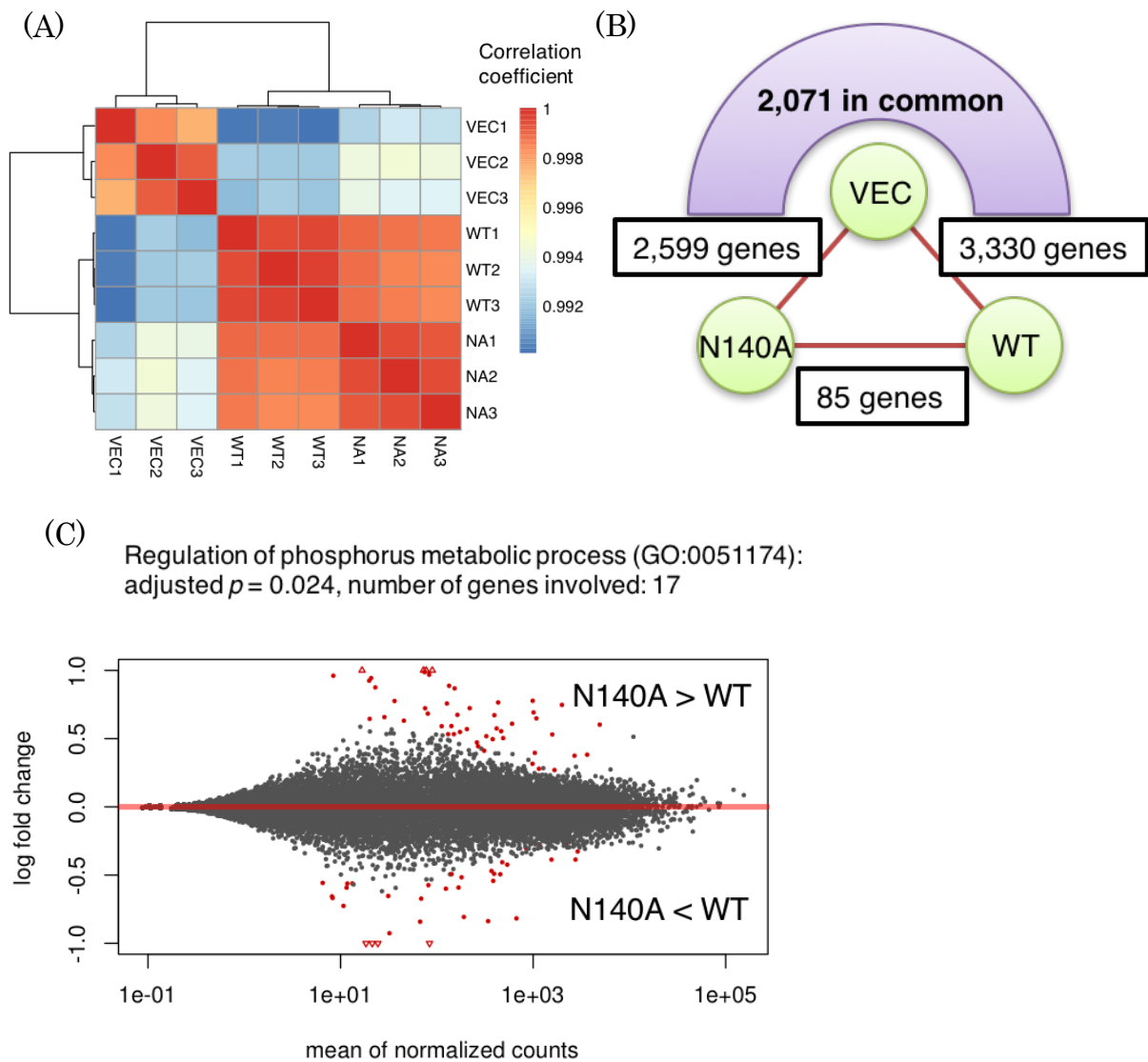


図 22. TDG 発現細胞を用いた RNAseq 解析

(A) それぞれの細胞株間における遺伝子発現変動をヒートマップで比較した。

(B) それぞれの細胞株間において発現が変動した遺伝子数。

(C) TDG WT 及び N140A 発現細胞間における遺伝子発現変動を比較した。

赤点は有意差  $P < 0.1$  の遺伝子を示す。

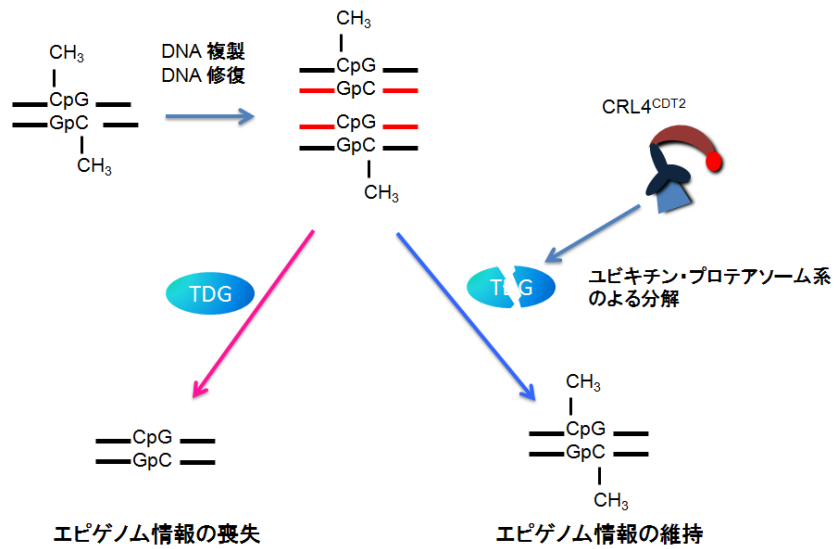


図 23. エピゲノム制御における TDG 分解の役割に関するモデル

メチル化修飾を受けた DNA は DNA 複製及び DNA 修復後、一時的に半メチル化状態となる。半メチル化状態となった DNA は、DNA 維持メチル化酵素 DNMT1 によって再びメチル化され、DNA のメチル化情報は維持される。仮に TDG が存在することで元のメチル化情報が失われるとすれば、TDG の分解は細胞のエピゲノム情報と遺伝子発現パターンの維持に寄与している可能性が考えられる。



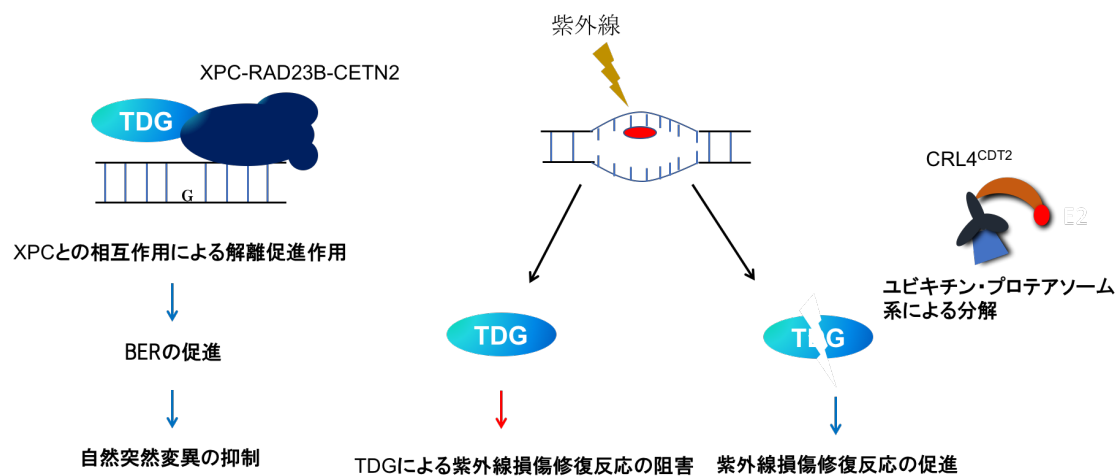


図 24. TDG とヌクレオチド除去修復の機能的相互作用

TDG によって開始される BER 反応は、NER の損傷認識因子である XPC 複合体との相互作用によって促進される。一方で、TDG の発現は紫外線誘発 DNA 損傷の修復及び細胞の生存に対して負の効果を示す。このような効果を回避するために TDG が分解を受けている可能性が考えられる。

# 表 1

変異型 TDG を作製する際に使用したプライマー

プライマー名	塩基配列
$\Delta$ PIP F	GAAAAACAAGAAAAAGCTACAGACGCAGCTAAAGTAAAAAGAA
$\Delta$ PIP R	TTCTTTTTACTTTAGCTGCGTCTGTAGCTTTTTCTTGTTTTTC
N140A F	CATTATTGGCATAGCCCCGGGACTAAT
N140A R	ATTAGTCCCGGGGCTATGCCAATAATG
M269H F	GAATTCCACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCATATGGAAGCGGAGAACGCGGG
M269H R	GAATTCTTAAGCATGGCTTTCTTCTTCTCCTGTTCTTG

表 2

TDG 発現によって遺伝子の変動した生物学的プロセス

<b>PANTHER GO-Slim Biological Process</b>	<b>Number of genes involved</b>	<b>Adjusted <i>P</i>-value</b>
anatomical structure morphogenesis (GO:0009653)	32	2.73E-03
cell adhesion (GO:0007155)	71	8.74E-04
biological adhesion (GO:0022610)	71	8.74E-04
death (GO:0016265)	63	3.40E-03
cell death (GO:0008219)	63	3.40E-03
cell cycle (GO:0007049)	118	2.37E-05
mesoderm development (GO:0007498)	61	4.47E-02
intracellular signal transduction (GO:0035556)	131	1.04E-04
catabolic process (GO:0009056)	100	3.04E-03
nervous system development (GO:0007399)	84	2.43E-02
developmental process (GO:0032502)	251	1.00E-08
phosphate-containing compound metabolic process	154	1.16E-04
system development (GO:0048731)	131	2.06E-03
cellular component organization or biogenesis	188	3.74E-02
nucleobase-containing compound metabolic process	319	8.86E-03
metabolic process (GO:0008152)	692	9.94E-08
primary metabolic process (GO:0044238)	571	7.05E-04
cellular process (GO:0009987)	832	1.00E-06

## 【参考文献】

- (1) T. Lindahl (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3649–3653.
- (2) T. Lindahl (1980) *Methods Enzymol.* 65, 284–290.
- (3) H.E. Krokan, R. Standal, G. Slupphaug (1997) *Biochem. J.* 325, 1–16
- (4) J. Laval (1977) *Nature* 269, 829–832.
- (5) T.R. O'Connor, J. Laval (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5222–5226.
- (6) C.N. Robson, I.D. Hickson (1991) *Nucleic Acids Res.* 19, 5519–5523.
- (7) Y. Matsumoto, K. Kim, D.F. Bogenhagen (1994) *Mol. Cell Biol.* 14, 6187–6197.
- (8) G. Frosina, P. Fortini, O. Rossi, F. Carrozzino, G. Raspaglio, L.S. Cox, D.P. Lane, A. Abbondandolo, E. Dogliotti (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 9573–9578.
- (9) K. Kim, S. Biade, Y. Matsumoto (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 8842–8848.
- (10) A. Klungland, T. Lindahl (1997) *EMBO J.* 16, 3341–3348.
- (11) Y. Matsumoto, K. Kim (1995) *Science* 269, 699–702.
- (12) R.K. Singhal, S.H. Wilson (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 15906–15911.
- (13) R.W. Sobol, J.K. Horton, R. Kuhn, H. Gu, R.K. Singhal, R. Prasad, K. Rajewsky, S.H. Wilson (1996) *Nature* 379, 183–186.
- (14) Y.F. Wei, P. Robins, K. Carter, K. Caldecott, D.J. Pappin, G.L. Yu, R.P. Wang, B.K. Shell, R.A. Nash, P. Schär (1995) *Mol. Cell Biol.* 15, 3206–3216.
- (15) D.M. Wilson, 3rd, D. Barsky (2001) *Mutat. Res.* 485, 283–307
- (16) B.K. Duncan, J.H. Miller (1980) *Nature* 287, 560–561.
- (17) U. Hardeland, M. Bentele, J. Jiricny, P. Schär (2003) *Nucleic Acids Res.* 31, 2261–2271.
- (18) M.T. Morgan, A. Maiti, M.E. Fitzgerald, A.C. Drohat (2011) *Nucleic Acids Res.* 39, 2319–2329.
- (19) S. Cortellino, J. Xu, M. Sannai, R. Moore, E. Caretti, A. Cigliano, M. Le Coz, K. Devarajan, A. Wessels, D. Soprano, L.K. Abramowitz, M.S. Bartolomei, F. Rambow, M.R. Bassi, T. Bruno, M. Fanciulli, C. Renner, A.J. Klein-Szanto, Y. Matsumoto, D. Kobi, I. Davidson, C. Alberti, L. Larue, A. Bellacosa (2011) *Cell* 14667–14679.
- (20) D. Cortazar, C. Kunz, J. Selfridge, T. Lettieri, Y. Saito, E. MacDougall,

- A. Wirz, D. Schuermann, A.L. Jacobs, F. Siegrist, R. Steinacher, J. Jiricny, A. Bird, P. Schär (2011) *Nature* 470, 419–423.
- (21) Y. Saito, T. Ono, N. Takeda, T. Nohmi, M. Seki, T. Enomoto, T. Noda, Y. Uehara (2012) *Tohoku J. Exp. Med.* 226, 75-83.
- (22) K. Rai, I.J. Huggins, S.R. James, A.R. Karpf, D.A. Jones, B.R. Cairns (2008) *Cell* 135, 1201–1212.
- (23) N. Bhutani, D.M. Burns, H.M. Blau (2011) *Cell* 146, 866–872.
- (24) S. Morera, I. Grin, A. Vigouroux, S. Couve, V. Henriot, M. Saparbaev, A. A. Ishchenko (2012) *Nucleic Acids Res.* 40, 9917–9926.
- (25) Y.F. He, B.Z. Li, Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Tang, J. Ding, Y. Jia, Z. Chen, L. Li, Y. Sun, X. Li, Q. Dai, C.X. Song, K. Zhang, C. He, G.L. Xu (2011) *Science* 333, 1303–1307.
- (26) A. Maiti, A.C. Drohat (2011) *J. Biol. Chem.* 286, 35334–35338.
- (27) Um, M. Harbers, A. Benecke, B. Pierrat, R. Losson, P. Chambon (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 20728–20736.
- (28) D. Chen, M.J. Lucey, F. Phoenix, J. Lopez-Garcia, S.M. Hart, R. Losson, L. Buluwela, R.C. Coombes, P. Chambon, P. Schär, S. Ali (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 38586–38592.
- (29) M.J. Lucey, D. Chen, J. Lopez-Garcia, S.M. Hart, F. Phoenix, R. Al-Jehani, J.P. Alao, R. White, K.B. Kindle, R.g. Losson, P. Chambon, M.G. Parker, P. Schär, D.M. Heery, L. Buluwela, S. Ali (2005) *Nucleic Acids Res.* 33, 6393–6404.
- (30) M. Tini, A. Benecke, S.J. Um, J. Torchia, R.M. Evans, P. Chambon (2002) *Mol. Cell* 9, 265–277.
- (31) R.D. Mohan, D.W. Litchfield, J. Torchia, M. Tini (2010) *Nucleic Acids Res.* 38, 1135–1148.
- (32) T.R. Waters, P. F. Swann (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 20007-20014.
- (33) U. Hardeland, R. Steinacher, J. Jiricny, P. Schär (2002) *EMBO J.* 21, 1456–1464.
- (34) D. Baba, N. Maita, J.-G. Jee, Y. Uchimura, H. Saitoh, K. Sugasawa, F. Hanaoka, H. Tochio, H. Hiroaki, M. Shirakawa (2005) *Nature* 435, 979–982.
- (35) D. Baba, N. Maita, J.-G. Jee, Y. Uchimura, H. Saitoh, K. Sugasawa, F. Hanaoka, H. Tochio, H. Hiroaki, M. Shirakawa, (2006) *J. Mol. Biol.* 359,

137–147.

- (36) T.R. Waters, P. Gallinari, J. Jiricny, P.F. Swann (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 67–74.
- (37) M.E. Fitzgerald, A.C. Drohat (2008) *J. Biol. Chem.* 283, 32680–32690.
- (38) T. Riedl, F. Hanaoka, J.-M. Egly (2003) *EMBO J.* 22, 5293–5303.
- (39) K. Sugasawa, J.M.Y. Ng, C. Masutani, S. Iwai, P.J. van der Spek, A.P.M. Eker, F. Hanaoka, D. Bootsma, J.H.J. Hoeijmaker (1998) *Mol. Cell* 2, 223–232.
- (40) Y. Shimizu, Y. Uchimura, N. Dohmae, H. Saitoh, F. Hanaoka, K. Sugasawa (2010) *J. Nucleic Acids* 2010, 805698.
- (41) Y. Shimizu, S. Iwai, F. Hanaoka, K. Sugasawa (2003) *EMBO J.* 22, 164–173.
- (42) E.S. Fischer, A. Scrima, K. Böhm, S. Matsumoto, G.M. Lingaraju, M. Faty, T. Yasuda, S. Cavadini, M. Wakasugi, F. Hanaoka, S. Iwai, H. Gut, K. Sugasawa, N.H. Thomä (2011) *Mol. Cell* 147, 1024–1039.
- (43) S. Matsumoto, E.S. Fischer, T. Yasuda, N. Dohmae, S. Iwai, T. Mori, R. Nishi, K. Yoshino, W. Sakai, F. Hanaoka, N.H. Thomä, K. Sugasawa (2015) *Nucleic Acids Res.* 43, 1700–1713.
- (44) K. Sugasawa, J.M.Y. Ng, C. Masutani, T. Maekawa, A. Uchida, P.J. van der Spek, A.P.M. Eker, S. Rademakers, C. Visser, A. Aboussekhra, R.D. Wood, F. Hanaoka, D. Bootsma, J.H.J. Hoeijmakers (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17, 6924–6931.
- (45) R. Nishi, Y. Okuda, E. Watanabe, T. Mori, S. Iwai, C. Masutani, K. Sugasawa, F. Hanaoka (2005) *Mol. Cell. Biol.* 25, 5664–5674.
- (46) K. Sugasawa, J. Akagi, R. Nishi, S. Iwai, F. Hanaoka (2009) *Mol. Cell* 36, 642–653.
- (47) K. Sugasawa, Y. Okuda, M. Saijo, R. Nishi, N. Matsuda, G. Chu, T. Mori, S. Iwai, K. Tanaka, K. Tanaka, F. Hanaoka (2005) *Cell* 121, 387–400.
- (48) K. Sugasawa, C. Masutani, A. Uchida, T. Maekawa, P.J. van der Spek, D. Bootsma, J.H.J. Hoeijmakers, F. Hanaoka (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16, 4852–4861.
- (49) Y. Shiomi, A. Hayashi, T. Ishii, K. Shinmyozu, J. Nakayama, K. Sugasawa, H. Nishitani (2012) *Mol. Cell. Biol.* 32, 2279–2288.

- (50) D. Kim, B. Langmead, S. Salzberg (2015) *Nature Methods* 12, 357-360.
- (51) Y. Liao, G. Smyth, W. Shi (2014) *Bioinformatics* 30, 923-30.
- (52) M. Love, W. Huber, S. Anders (2014) *Genome Biol.* 15, 550.
- (53) D. Thomas, M. Campbell, A. Kejariwal, H. Mi, B. Karlak, R. Daverman, K. Diemer, A. Muruganujan, A. Narechania (2003) *Genome Res.* 13, 2129-2141.
- (54) U. Hardeland, C. Kunz, F. Focke, M. Szadkowski, P. Schär (2007) *Nucleic Acids Res.* 35, 3859–3867.
- (55) J. Myung, K.B. Kim, C.M. Crews (2001) *Med. Res. Rev.* 21, 245–273.
- (56) U. Hardeland, M. Bentele, J. Jiricny, P. Schär (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 33449-33456.
- (57) T.J. Slenn, B. Morris, C.G. Havens, R.M. Freeman Jr., T.S. Takahashi, J.C. Walter (2014) *J. Biol. Chem.* 289, 23043-23055.
- (58) L. Rössig, C. Badorff, Y. Holzmann, A.M. Zeiher, S. Dimmeler (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 9684-9689.
- (59) J.Y. Lee, S.J. Yu, Y.G. Park, J. Kim, J. Sohn (2007) *Mol. Cell. Biol.* 27, 3187-3198.
- (60) N. Le May, D. Mota-Fernandes, R. Vélez-Cruz, I. Iltis, D. Biard, J.M. Egly (2010) *Mol. Cell* 38, 54-66.
- (61) Y.W. Fong, C. Inouye, T. Yamaguchi, C. Cattoglio, I. Grubisic, R. Tjian (2011) *Cell* 147, 120-131.
- (62) Y.Q. Li, P.Z. Zhou, X.D. Zheng, C.P. Walsh, G.L. Xu (2007) *Nucleic Acids Res.* 35, 390–400.
- (63) C.G. Havens, J.C. Walter (2011) *Genes Dev.* 25, 1568-1582.

## 【謝辞】

本研究は神戸大学バイオシグナル総合研究センター菅澤研究室にて行われました。研究にあたって、多くのご指導・ご助言をいただきました菅澤薫教授・横井雅幸准教授・酒井恒助教に心より御礼申し上げます。また、本論文をご審査いただきました坂本博教授・深城英弘教授に心より御礼申し上げます。

また本研究は、実験材料を提供して下さった西谷秀男教授（兵庫県立大学大学院生命理学研究科）、小野哲也教授、上原芳彦博士（東北大学大学院医学研究科）、RNA シークエンス解析にご協力いただいた大川恭行教授のグループ（九州大学生体防御医学研究所）、並びに多くの方々のご協力のもと、行うことができました。心より御礼申し上げます。

最後に、研究面のみならず日々の生活面においてもご指導下さいました菅澤研究室の皆様を重ねて御礼を申し上げると共に、今後の研究の益々の発展をお祈り申し上げます。