

- 2) Davis, R.J., D'Cruz, C.M., Lovell, M.A., Biegel, J.A., & Barr, F.G. (1994) *Cancer Res.*, 54, 2869-2872.
- 3) Nakae, J., Oki, M., & Cao, Y. (2008) *FEBS Lett.*, 582, 54-67.
- 4) Kodama, S., Koike, C., Negishi, M., & Yamamoto, Y. (2004) *Mol. Cell Biol.*, 24, 7931-7940.
- 5) Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K., Fukamizu, A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 11285-11290.
- 6) Kamei, Y., Mizukami, J., Miura, S., Suzuki, M., Takahashi, N., Kawada, T., Taniguchi, T., & Ezaki, O. (2003) *FEBS Lett.*, 536, 232-236.
- 7) Furuyama, T., Kitayama, K., Yamashita, H., & Mori, N. (2003) *Biochem. J.*, 375, 365-371.
- 8) Kamei, Y., Miura, S., Suganami, T., Akaike, F., Kanai, S., Sugita, S., Katsumata, A., Aburatani, H., Unterman, T.G., Ezaki, O., & Ogawa, Y. (2008) *Endocrinology*, 149, 2293-2305.
- 9) Kamei, Y., Miura, S., Suzuki, M., Kai, Y., Mizukami, J., Taniguchi, T., Mochida, K., Hata, T., Matsuda, J., Aburatani, H., Nishino, I., & Ezaki, O. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 41114-41123.
- 10) Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S.H., & Goldberg, A.L. (2004) *Cell*, 117, 399-412.
- 11) Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S.J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., Goldberg, A.L., Schiaffino, S., & Sandri, M. (2007) *Cell Metab.*, 6, 458-471.
- 12) Southgate, R.J., Neill, B., Prelovsek, O., El-Osta, A., Kamei, Y., Miura, S., Ezaki, O., McLoughlin, T.J., Zhang, W., Unterman, T.G., & Febbraio, M.A. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 21176-21186.
- 13) Kitamura, T., Kitamura, Y.I., Funahashi, Y., Shawber, C.J., Castrillon, D.H., Kollipara, R., DePinho, R.A., Kitajewski, J., & Accili, D. (2007) *J. Clin. Invest.*, 117, 2477-2485.
- 14) Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y., Watanabe, M., Magoori, K., Ioka, R.X., Tachibana, K., Watanabe, Y., Uchiyama, Y., Sumi, K., Iguchi, H., Ito, S., Doi, T., Hamakubo, T., Naito, M., Auwerx, J., Yanagisawa, M., Kodama, T., & Sakai, J. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 15924-15929.
- 15) Kamei, Y., Ohizumi, H., Fujitani, Y., Nemoto, T., Tanaka, T., Takahashi, N., Kawada, T., Miyoshi, M., Ezaki, O., & Kaki-zuka, A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 12378-12383.

亀井 康富¹, 小川 佳宏^{1,2}

(¹ 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野)

(² 東京医科歯科大学グローバル COE プログラム)

Skeletal muscle function and FOXO

Yasutomi Kamei and Yoshihiro Ogawa (¹Department of Molecular Medicine & Metabolism, Medical Research Institute, Tokyo Medical & Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan; ²Global COE Program, Tokyo Medical & Dental University)

タンパク質リン酸化を介した DNA 二重鎖切断修復制御のメカニズム

1. はじめに

生命のプログラムとしてのゲノムの情報がわずかにでも失われることは、生物にとって致命的である。そのため全ての生物は内的・外的要因によって生じる DNA 上の傷に対する様々な防御システムを備えている。DNA 二重鎖切断修復もその一つである。しかし、その防御機構もヒト等の多細胞生物で考えたとき、使う手段や場所を誤ると DNA 配列の改変や染色体転座を引き起こし最終的に発がんなど疾病の原因となってしまう危険性を含んでいる。このような事態を防ぐために細胞内では DNA 上の傷を認識し、傷の種類や細胞の状態を判断した上で、その場に応じた適切な修復酵素群を会合させて配置する制御メカニズムが存在すると考えられているが、その分子メカニズムは明らかではない。真核生物の細胞内では DNA 二重鎖切断 (DSB) はおもに非相同末端結合 (NHEJ) と相同組換え (HR) で修復されることが知られている (図 1)。相同組換えは、Rad52 グループ遺伝子群が中心的機能を果たし、同じ遺伝情報を持つ鋳型をコピーすることで変異等を伴うことなく DNA 二重鎖切断を元通りに修復できるエラーフリーの手段である。しかし、全く同一の遺伝情報を持つ鋳型 DNA として姉妹染色体を必要とするために、使うことのできる時期が S₂ 期に限定される。もしも、G₁ 期に相同組換えが活性化したら、異なる染色体間の繰り返し配列等の間で組換えが起きてしまい、染色体転座を招いてしまう危険性がある。一方、NHEJ は切れた DNA 末端同士をそのまま結合する反応であることから細胞周期を通じて使うことができるが、DSB 末端部分の遺伝情報が失われる危険性がある。そのため、NHEJ は HR を使うことのできない (つまり、姉妹染色体の存在しない) G₁ 期あるいは静止期において必須の修復機構であると考えられている。このように、G₁ と S/G₂ の間で DNA 二重鎖切断修復に機能する修復酵素群には違いがあると考えられるが、その制御の分子メカニズムについてはあまりわかっていない。そこで、我々は細胞周期を通じてどのように DSB 修復機構が選択されているか、そのメカニズムに焦点をあて解析を行っている。

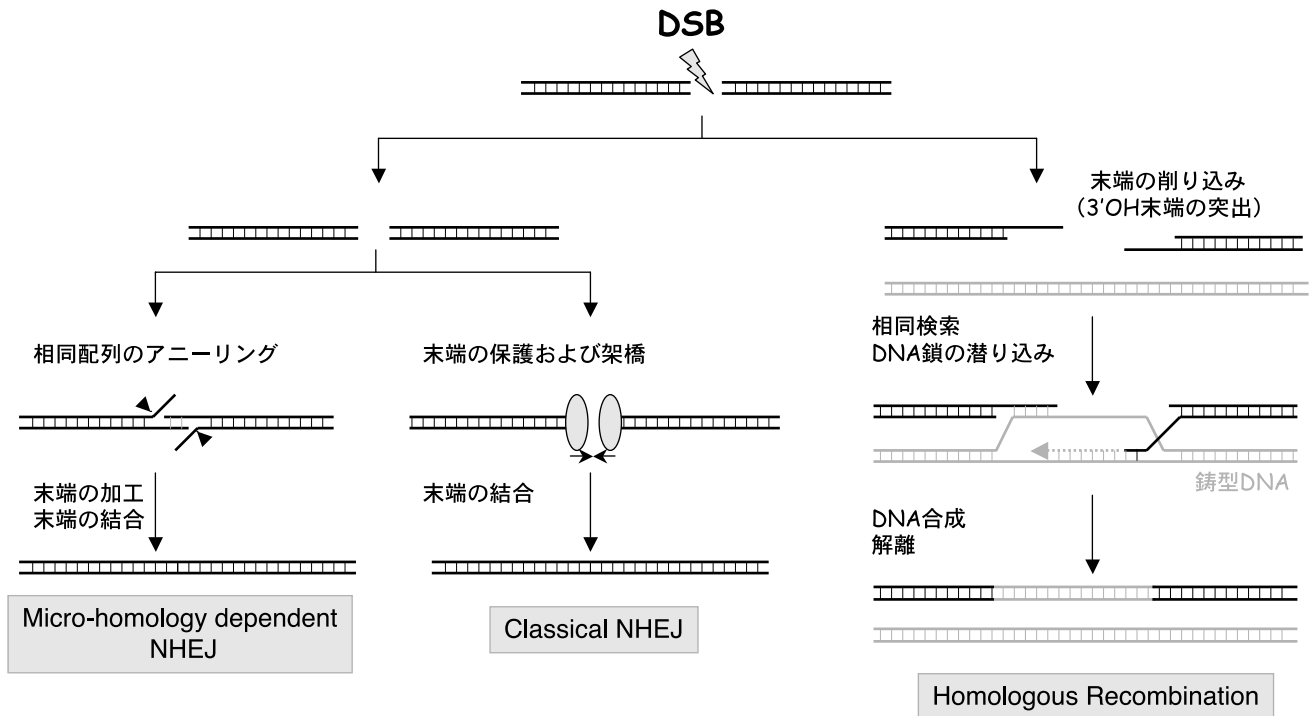


図1 DNA二重鎖切断修復経路

DSBはまず、大きく分けてHRとNHEJの二つの異なる経路により修復される。さらにNHEJは二つの経路に分かれ、それぞれの経路に特異的に機能するタンパク質群が存在する。

2. 非相同末端結合と相同組換え

NHEJの過程ではDSB末端はヌクレアーゼによる急激な分解から保護され、末端同士は遠く離れないように架橋され、そして、最終的にNHEJ特異的なDNAリガーゼ複合体(DNL複合体: DNA ligase IV-Nej1-Lif1)の結合反応によって元通りに修復される(図1)。例えば出芽酵母では、*YKU70/HDF1*, *YKU80/HDF2*, *LIF1*, *NEJ1*, *DNL4*, *MRE11*, *RAD50*, *XRS2*といった遺伝子が必要であり、これらは高等真核生物まで保存されている(表1)。また、最近、末端部分のマイクロホモロジーに依存した末端部分のアニーリング反応によるmicro-homology dependent NHEJに*POL4*, *RAD27*が機能していることがわかってきた¹⁾。この過程は前述のligase IVに依存した経路と機能するタンパク質が根本的に異なるため、お互いを区別するために従来のNHEJをclassical-NHEJと呼ぶようになっている。

HRについては、相同鎖検索に必要な一本鎖DNAを作るためのDSB末端のプロセッシングがサイクリン依存的キナーゼ(CDK)活性に依存して制御され、G₁期にプロセ

表1 NHEJに関わるタンパク質群

様々な機能を持つタンパク質がNHEJに関わっており、それらの多くは酵母からヒトまで広く保存されている。

出芽酵母	ヒト	機能
Mre11	Mre11	エキソ/エンドヌクレアーゼ
Rad50	Rad50	SMC様タンパク質
Xrs2	Nbs1	MRX(N)制御サブユニット?
Dnl4	DNA ligase IV	NHEJ特異的DNAリガーゼ
Lif1	Xrcc4	ligase IVの制御サブユニット
Nej1	XLF	ligase IVの制御サブユニット
Ku70/Hdf1	Ku70	DSB末端保護
Ku80/Hdf2	Ku80	DSB末端保護
—	DNA-PKcs	PI3タンパク質キナーゼ
Pso2	Artemis	DSB末端プロセッシング?
Pol4	Polμ	DNAポリメラーゼ
—	Polλ	DNAポリメラーゼ
Rad27	FEN-1	Flapエンドヌクレアーゼ

シングが抑制されることがわかっている²⁾。一方、NHEJの制御機構については、出芽酵母においてDNL複合体のサブユニットの一つであるNej1の発現が2倍体では抑制されることから、酵母2倍体ではNHEJが抑制されることがわかっている^{3,4)}。しかし、高等真核細胞では体細胞は通

常2倍体で維持されていることからこの制御様式は酵母特異的であると言える。そして、今のところ NHEJ がどのように制御を受けているのか（そもそも制御を受けているのか）はわかっていない。

3. 酵母 Xrs2 の FHA ドメインは NHEJ に必要である

Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX) 複合体（出芽酵母以外の生物種では Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) 複合体）は DSB 末端に結合し DSB 修復の初期過程に必要な因子であるが、こ

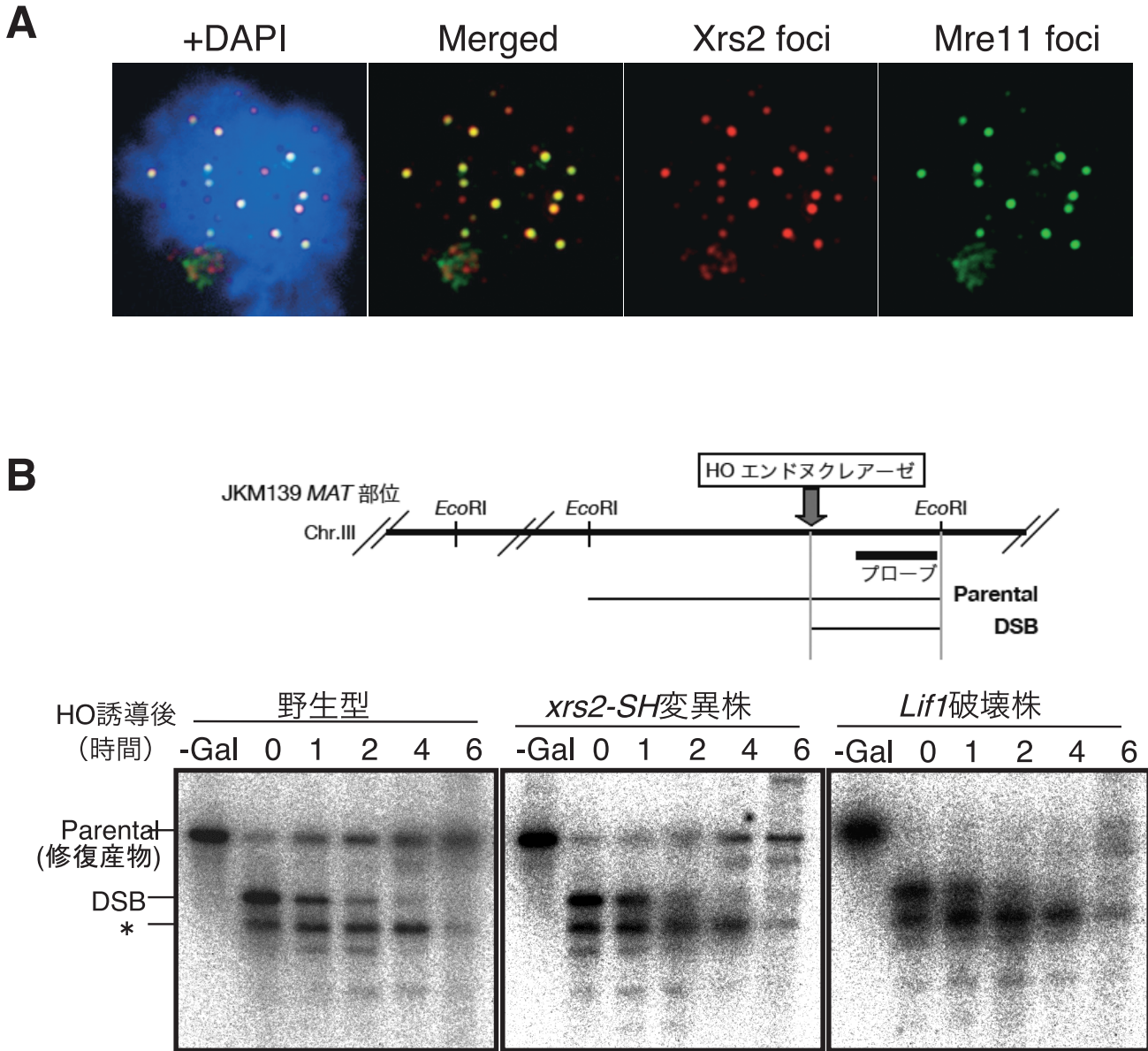


図2 *xrs2-SH* 変異株における MRX foci の形成および DSB 修復
 (A) 出芽酵母の減数分裂期クロマチン上での Xrs2 タンパク質と Mre11 タンパク質の局在について間接蛍光抗体法を用いて観察した。FHA ドメインの機能を欠く変異 Xrs2 タンパク質は DSB 部位において正常にフォーカスを形成することができ、Mre11 と共局在する。(B) 出芽酵母第三番染色体上にガラクトース誘導型の HO エンドヌクレアーゼで人工的に導入した DSB の修復過程を DSB 近傍の DNA 配列をプローブとしてサザンブロット法で検出した。FHA ドメインの変異株では NHEJ による修復の効率が低下していた。(*は、欠失を伴った組換えによる産物)

の複合体はDSB修復以外にテロメア維持、DNA損傷チェックポイントなどにも関わる多機能タンパク質複合体として知られている(図3)。しかし、その具体的な機能については不明な点が多い。そして、興味深いことに出芽酵母においてはMRX複合体がHRとNHEJの両方に必要であることがわかっている⁹⁾。しかし、ヒトにおいてMRN複合体がNHEJに機能しているという証拠は今のところ得られていない。

さて、Mre11とRad50タンパク質は大腸菌sbcCDのホモログである。それぞれ、エキソヌクレアーゼとstructural maintenance of chromosomes (SMC)様タンパク質としての機能を持ち、DSB末端のプロセッシングと架橋に必要なと考えられている⁶⁾。三つ目の因子であるXrs2(Nbs1)タンパク質は真核生物に特異的な因子であるが、その具体的な機能については全くわかっていなかった。そして、ヒトのゲノム不安定性症候群の一つであるNijmegen breakage syndrome (NBS)がNbs1のN末端の部分欠失によって引き起こされることから、我々はXrs2(Nbs1)のN末端部分がゲノム安定維持に必要なと考え、その機能に焦点を当て研究を行っている。

出芽酵母Xrs2とヒトNbs1タンパク質のN末端部分にはfork-head associated (FHA)ドメインが保存されている。FHAドメインはリン酸化タンパク質認識/結合活性があることで知られている。例えば、出芽酵母でDNA傷害チェックポイントに関わるRad53のFHAドメインはリン酸化されたRad9と相互作用することが知られている⁷⁾。そこでXrs2のFHAドメインのゲノム安定性維持における機能を明らかにするために出芽酵母を用いて解析を行った。以前の我々の解析からFHAドメインの部分欠失株および点変異株は、MRX複合体を形成することができ(図2A)、DNA傷害を与えるガンマ線やDNAアルキル化剤メチルメタンスルホン酸(MMS)などに対して感受性を示さないことがわかっている⁸⁾。出芽酵母では体細胞増殖期においてDNA二重鎖切断は主に相同組換えによって修復されることが知られている。そのため、出芽酵母ではNHEJに必須の因子を欠いてもDNA傷害修復に見かけ上は欠損を示さないことが知られている。そこで、我々はXrs2のFHAドメインがNHEJ特異的な機能をもつならば、ゲノム安定性維持に関わっているが、FHAドメインの部分欠失株が薬剤に耐性になる可能性があると考えた。そこで、XRS2のFHA変異株(FHAドメインを欠失した*xrs2*変異株(*xrs2-314M*)およびFHAドメインで保存されているアミノ酸をアラニンに置換した点変異株

(*xrs2-SH*)を作製して詳細な解析を行った。部位特異的なDNA切断活性を持つHOエンドヌクレアーゼの系を用いて、酵母染色体上の特定の1箇所部位に部位特異的なDSBを同調的かつ一過的に導入し、その修復過程の経時的解析を行った(図2B)。G₁期に同調した細胞では姉妹染色体が存在しないことからHOエンドヌクレアーゼによるDSBはNHEJによってのみ修復されることがわかっている。このような系を用いて解析を行った結果、LIF1遺伝子破壊株ではDSB修復が全く行われていなかったことから、この系でのDSB修復はNHEJに依存していることがわかる。一方、FHAドメインの変異株ではDSB修復の効率が野生株と比較して顕著に低下していることがわかった。この結果は、Xrs2タンパク質においてFHAドメインがNHEJ特異的な機能を担っており、効率の良いNHEJに必要であることを示している⁹⁾。

4. FHAドメインはLif1タンパク質との相互作用に機能する

前述したようにFHAドメインはタンパク質間相互作用に関わることが知られていることからNHEJに関わる因子との相互作用に必要な可能性が考えられる。そこで、NHEJに関わる因子とXrs2との相互作用について検討した。その結果、NHEJ特異的なDNAリガーゼとして機能する、DNL複合体の制御サブユニットの一つであるLif1タンパク質とXrs2がFHAドメインで相互作用することが明らかとなった^{9,10)}。この結果は、DSB修復の最も初期にDSB上に呼び込まれるMRX複合体がXrs2のFHAドメインを介してDNL複合体をDSB部位に効率よく呼び込む機能を持っている可能性を示している。また、我々はXrs2とLif1との間のFHAドメインに依存した相互作用がヒトのNbs1とXrcc4との間でも保存されていることを明らかにした。現在のところ、ヒトNbs1がNHEJにおいて機能しているという直接的な証拠は得られていないが、その可能性があることを示す結果であると考えている。

さて、我々はLif1側の相互作用部位の特定を行った結果、Lif1のC末端の領域にXrs2に対する相互作用部位を同定した(図3)。つまり、Lif1タンパク質はN末端側でNej1と相互作用し中央部分でDnl4と相互作用することが知られており、C末端でXrs2とそれぞれ独立して相互作用することがわかった。また、新しく同定したXrs2結合部位はカゼインキナーゼ2(CK2)によってリン酸化を受ける可能性があることを見いだしている。この結果は、Lif1タンパク質がCK2によりリン酸化された後に、リン

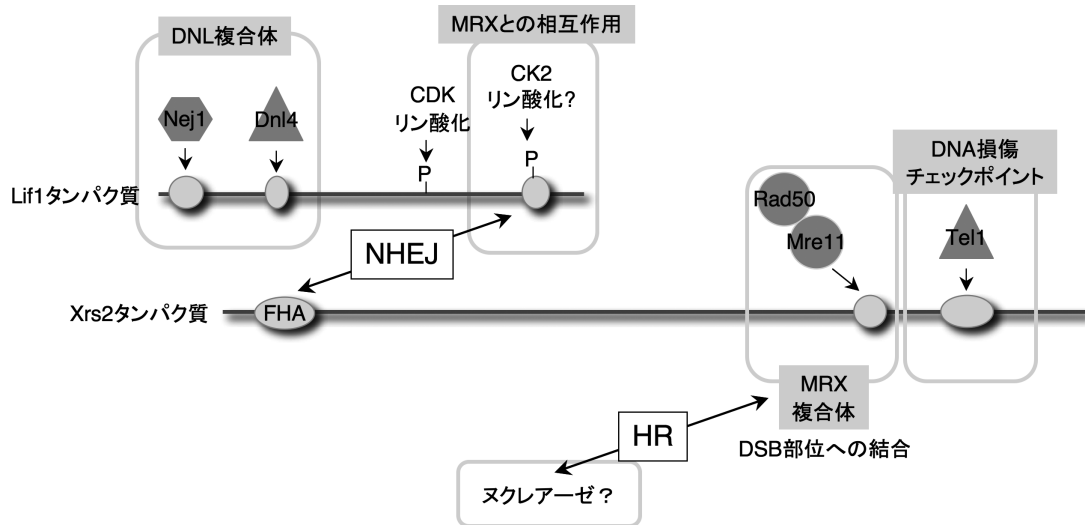


図3 Lif1タンパク質とXrs2タンパク質の機能ドメインそれぞれのタンパク質の機能ドメインとその他のDSB修復タンパク質群との関係。これらのタンパク質はネットワークを形成しDNA修復とそれに付随したDNA傷害に依存した応答反応を連携して行うと考えられる。

酸化タンパク質認識・結合活性を持つXrs2のFHAドメインと相互作用する可能性があることを示唆している。また、FHAドメインとの結合には必要ないが、Lif1タンパク質は細胞周期特異的にCDK活性に依存してリン酸化され、そのリン酸化がNHEJに必要なことを見いだしている (Matsuzaki *et al.*, unpublished result)。今後、どのような状況でXrs2結合部位がこれらのタンパク質キナーゼによってリン酸化されるのかを明らかにすることでNHEJの制御機構を明らかにできるのではないかと考えている。

- 1) Hefferin, M.L. & Tomkinson, A.E. (2005) *DNA Repair (Amst)*, 4, 639-648.
- 2) Ira, G., Pellicoli, A., Balijja, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N. M., Haber, J.E., & Foiani, M. (2004) *Nature*, 431, 1011-1017.
- 3) Valencia, M., Bentele, M., Vaze, M.B., Herrmann, G., Kraus, E., Lee, S.E., Schar, P., & Haber, J.E. (2001) *Nature*, 414, 666-669.
- 4) Frank-Vaillant, M. & Marcand, S. (2001) *Genes Dev.*, 15, 3005-3012.
- 5) Moore, J.K. & Haber, J.E. (1996) *Mol. Cell Biol.*, 16, 2164-2173.
- 6) Wiltzius, J.J., Hohl, M., Fleming, J.C., & Petrini, J.H. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12, 403-407.
- 7) Sun, Z., Hsiao, J., Fay, D.S., & Stern, D.F. (1998) *Science*, 281, 272-274.
- 8) Shima, H., Suzuki, M., & Shinohara, M. (2005) *Genetics*, 170, 71-85.
- 9) Matsuzaki, K., Shinohara, A., & Shinohara, M. (2008) *Genet-*

ics, 179, 213-225.
 10) Palmbo, P.L., Daley, J.M., & Wilson, T.E. (2005) *Mol. Cell Biol.*, 25, 10782-10790.

篠原 美紀
 (大阪大学蛋白質研究所蛋白質高次機能学研究部門
 ゲノム染色体機能研究室)

Regulation mechanism of non-homologous end joining through the Lif1 phosphorylation
 Miki Shinohara (Department of Integrated Protein Functions, Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Ymada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

植物二次代謝産物グリコシルトランスフェラーゼの構造と機能

1. はじめに

グリコシルトランスフェラーゼは糖ヌクレオチドなどの糖供与体から受容体に糖残基を転移する反応を触媒する。植物には二次代謝産物のグリコシル化 (グルコシル化, ガラクトシル化, アラビノシル化, グルクロノシル化, ラムノシル化など) をつかさどるグリコシルトランスフェラーゼ群 (plant secondary product glycosyltransferases, PSPG) の遺伝子が多数コードされており, シロイヌナズナ (*Arabi-*