

前島 一博, 今本 尚子
 (独立行政法人理化学研究所 中央研究所
 今本細胞核機能研究室)

Cell cycle dependent dynamics of nuclear pores
 Kazuhiro Maeshima and Naoko Imamoto (Cellular Dynamics
 Laboratory, RIKEN Institute, 2-1, Hirosawa, Wako-shi, Sai-
 tama, 351-0198 Japan)

DNA損傷トレランスの分子機構とその役割

はじめに

遺伝情報の中核であるゲノムを構成する核酸は、非常に反応性に富んだ化学的性質を備えている。このような化学的性質は、DNA複製や転写などの様々な生命機能に貢献している一方で、放射線や化学物質などの外的要因や、細胞内代謝の過程で生じる活性酸素及び細胞内pHの変化などの内的要因による膨大な数のDNA損傷を引き起こす原因ともなっている。これらのDNA損傷が修復される前にDNA複製フォークがその損傷箇所へ到達すると、塩基の誤対合や複製フォークの進行阻害が起こる。これらのDNA複製異常は、突然変異等のゲノム不安定性や細胞死を引き起こすことから、ヒトにおいては発がんや老化促進の原因となっている。DNA損傷に起因するDNA複製フォークの進行阻害が起こった場合、複製の再開にDNA損傷の修復を待っている間は、DNA複製完了にかかる時間は様々なDNA損傷の修復効率に依存し、さらにDNA修復機構自体が細胞増殖に必須の機能となってしまう。そのような事態を回避するために、損傷部位を修復することなく、“バイパス”する機能によりDNA複製フォークの進行を保証するRAD6 DNA損傷トレランス機構が存在する。本稿では、DNA損傷によるDNA複製の進行阻害の回避に働くDNA損傷トレランスに関して、出芽酵母の研究から明らかになってきた分子メカニズムについて解説する。

1. 出芽酵母におけるDNA損傷トレランス経路に関わる因子

紫外線等によって生じるDNA複製阻害の回避には、

RAD6経路に属するRad6-Rad18複合体が中心的な役割を果たしている。Rad6及びRad18は、それぞれ標的タンパク質のリジン残基へユビキチン(Ub)を結合する反応に関与するUb結合(E2)及びUbリガーゼ(E3)活性を有するタンパク質であり、さらに、Rad18は、DNA結合活性を持ち、増殖核抗原(PCNA)と物理的に相互作用する(図1)。PCNAは、DNAポリメラーゼの伸長反応の促進因子(DNAクランプ)であることから、Rad18は、E3酵素としての機能以外に、Rad6-Rad18複合体を停止したDNA複製装置上にリクルートする役割を持つと考えられる。

RAD6経路の下流には、大きく分けて二つの経路が存在する。一つは、損傷部位を乗り越えてDNA合成を行うことが出来るDNAポリメラーゼが関与する経路で、一般に、損傷乗り越え型DNA合成(translesion DNA synthesis, TLS)経路と呼ばれている(図1)。このようなDNAポリメラーゼとして、DNAポリメラーゼ ζ 及びDNAポリメラーゼ η が存在する。DNAポリメラーゼ η は、少なくとも紫外線によって生じるシクロブタン型ピリミジンダイマーのような損傷塩基に対しては、正しい塩基を対合させることが出来るため、TLSの中でもエラーフリーの働きを持っている^{1,2)}。DNAポリメラーゼ ζ は、REV3遺伝子によってコードされており、Rev7サブユニットと複合体として機能する。出芽酵母では、紫外線などのDNA損傷によって突然変異が誘発されることが知られているが、これらの大部分は、DNAポリメラーゼ ζ に依存している³⁾。

そして、もう一つのRAD6経路として機能するのが、Ubc13-Mms2複合体及びRad5からなる複製後修復経路(post replication repair, PRR)であり、DNA複製フォークが損傷塩基部位を誤りなく乗り越える働きにおいて主要な役割を果たしている(図1)。Ubc13及びMms2は、Ub結合酵素(E2)に類似した構造を持つが、実際にはUbc13のみがその機能を有する。Rad5は、Swi-Snf2型ATPaseドメインを持つUbリガーゼ(E3)であり、Rad18及びUbc13と相互作用することから、Rad6-Rad18-PRRのユビキチン化修飾酵素からなる高次複合体形成に重要な役割を果たしている(図1)⁴⁾。PRR経路の詳細は未だ不明な点が多いが、DNA複製のリーディング鎖合成が停止した場合、新生ラギング鎖の相同鎖領域を鋳型として部分的にDNA合成が行われた後、この分岐点が複製の進行方向に移動することで損傷塩基箇所を乗り越える反応を行っていると考えられている(図1)。このような反応は、一時的にDNA合成の鋳型鎖を交換することからテンプレートスイッチ反応

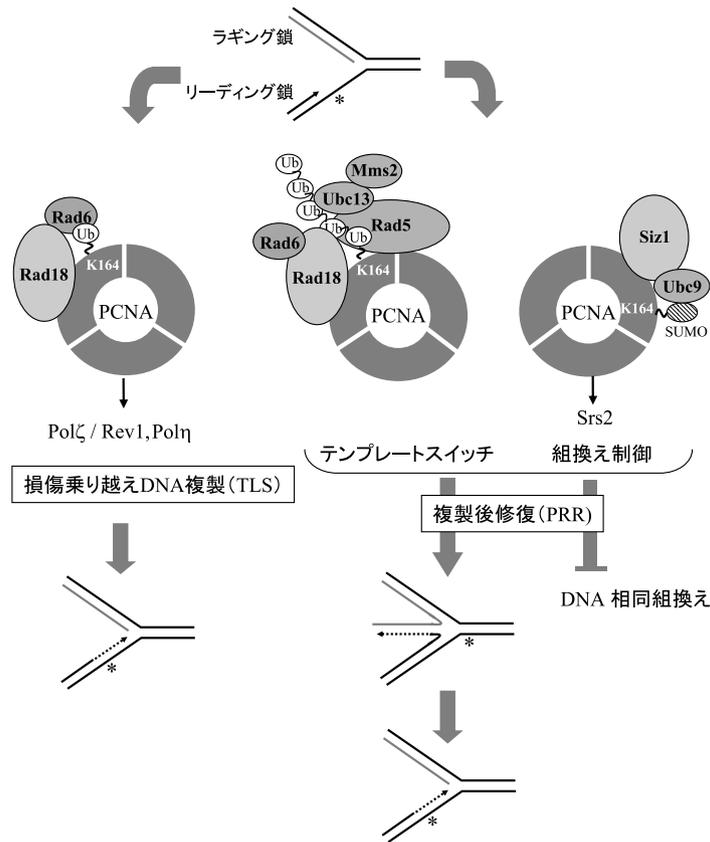


図1 DNA 損傷トレランスの分子機構

DNA 損傷によって引き起こされる DNA 複製阻害に対して働く PCNA のモノ及びポリユビキチン化修飾を介した DNA 損傷トレランスのマシナリーを示す。

DNA 損傷によって複製フォークの進行阻害が起こった場合、DNA ポリメラーゼの伸長反応の促進因子である PCNA の K164 が Rad6-Rad18 によってモノユビキチン化される。このモノユビキチン化 PCNA は、TLS に関与するポリメラーゼを損傷部位へリクルートし、それらが損傷部位を乗り越えて DNA 複製を行う。Rad6-Rad18 に続いて Mms2-Ubc13 と Rad5 が作用すると PCNA のポリユビキチン化が起こる。このポリユビキチン化 PCNA は、テンプレートスイッチ反応を促進すると考えられているが詳細は未だ不明である。さらに、PCNA の K164 は、Ubc9-Siz1 により SUMO 化修飾を受ける。SUMO 化 PCNA は、Srs2 DNA ヘリカーゼをリクルートすることである種の組換え反応を阻害し、これはテンプレートスイッチ反応の促進に役立っていると考えられる。

と呼ばれる。

2. ユビキチンによる DNA 損傷トレランスの制御

DNA 損傷トレランスに関与する RAD6 経路のタンパク質に特徴的なものが、それらの多くが Ub 化修飾酵素である点であり、その標的タンパク質が何であるのかは長年の謎であった。しかしながら、近年、S. Jentsch らのグループ

によって、意外なところからこの標的タンパク質の同定がなされた。彼らは、Ub と類似した反応機構によってタンパク質に共有結合する SUMO (small ubiquitin modifier) の標的タンパク質として酵母粗抽出液中から PCNA を同定し、その解析の過程で PCNA の Ub 化修飾を発見した⁵⁾。Rad6-Rad18 は、この Ub 化修飾に必須で、DNA 損傷に依存して PCNA の 164 番目のリジン残基 (K164) の mono-Ub

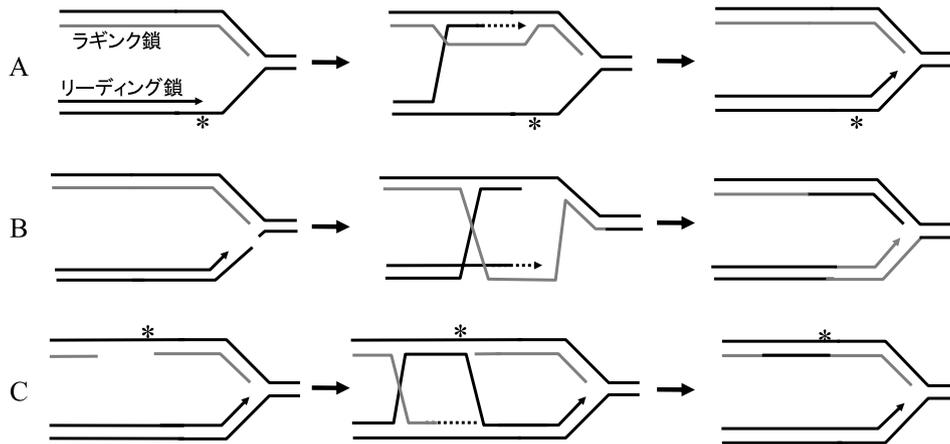


図2 DNA 相同組換えによる DNA 複製の再開モデル

- A. リーディング鎖上の損傷によって複製が停止した場合、新生リーディング鎖がラギング鎖と鎖交換反応を行い、その後新規 DNA 合成を行うことで損傷部位を乗り越える。
 B. 複製の進行によって生じた DNA 二重鎖切断は、姉妹染色体間の組換えによって複製フォークが再構築される。
 C. ラギング鎖上の損傷は、複製の停止を引き起こさないが、複製フォークの通過後に一本鎖 DNA 領域が生じる。この一本鎖 DNA は、組換えが働くことで修復される。
 A と C における * は、DNA 損傷を示す。

化を引き起こす (図1)。mono-Ub 化された PCNA は、DNA ポリメラーゼ ζ/η の複製阻害部位へのリクルートを促進することで TLS 経路を活性化する。一方、Rad6-Rad18 による mono-Ub 化に続いて Ubc13-Mms2, Rad5 が働くとき、Ub の 63 番目のリジン残基を介した poly-Ub 化が起こる (図1)⁵⁾。この poly-Ub 化は 26S プロテアソームによる分解を受けないため、標的タンパク質である PCNA の機能変換等に関与すると考えられているが、この poly-Ub 化修飾がどのようにして PRR 経路のテンプレートスイッチ反応を引き起こすのかは分かっていない。しかしながら、最近になって PRR 経路の Rad5 が、ユビキチンリガーゼ活性とは別に、二重鎖 DNA を巻き戻す DNA ヘリカーゼ活性を持っており、これがテンプレートスイッチ反応を促進している可能性が示された⁶⁾。したがって、PCNA の poly-Ub 化修飾は、停止した複製フォーク上の DNA 複製装置の配置や活性などを制御し、Rad5 によるテンプレートスイッチ反応の促進に役立っているのかもしれない。

3. SUMO による DNA 損傷トレランスの制御

S. Jentsch らのグループによって見いだされた PCNA の SUMO 化は、Ub 化と同様に PCNA の K164 で起こっており、またマイナーサイトとして K127 が同定されている⁵⁾。この SUMO 化修飾には、Rad6-Rad18 は関与せず、SUMO 化特異的 E2 酵素である Ubc9 と E3 リガーゼである Siz1

が関与している (図1)。一般に、同じリジン残基を Ub と SUMO が修飾する場合、これらの競合が見られるが、これまでの研究から、PCNA においてはこれらの競合は起きていないと考えられている。その理由として、Ub 化修飾が欠損する *rad18* 変異が SUMO 化修飾される PCNA の割合に影響せず、同様に、SUMO 化修飾が欠損する *siz1* 変異が Ub 化修飾される PCNA の割合に影響しないことが挙げられる。細胞内において、PCNA はホモ三量体として機能しているため、たとえ同じ PCNA を修飾する場合においてもそれぞれが競合することなく修飾することが可能であると推測される。

一方、*rad6*, *rad18*, *rad5* などの PRR 経路の変異株は、*siz1* や PCNA-K164R 変異によって DNA 損傷剤に対する高感受性が抑圧される⁵⁾。したがって、PCNA のユビキチン化が起こらない状況においては、むしろ PCNA の SUMO 化は DNA 損傷剤に対する高感受性を引き起こしていると考えられる。このような PRR 経路欠損細胞が示す DNA 損傷剤に対する高感受性の抑圧効果は、以前から Srs2 DNA ヘリカーゼの変異によって観察されている。Srs2 は DNA 相同組換え (RAD52 経路) に関わる Rad51 リコンビナーゼの機能を阻害することが示されており⁷⁾、したがって、*srs2* 変異による DNA 相同組換え反応の活性化が、PRR 経路の欠損した細胞における DNA 複製阻害の回避に機能していると考えられている。最近になって、

SUMO化PCNAがSrs2と特異的に結合することがわかり、これらの阻害効果が同一の経路によって行われていることが明らかになった^{8,9)}。つまり、野生型においては、PCNAのポリユビキチン化によるPRR経路が活性化する際に、PCNAのSUMO化を介したSrs2の働きによってある種の組換え反応が阻害されるが、そのような組換えの制御は、結果としてPRR経路によるDNA損傷トレランス反応の促進に役立っていると考えることが出来る(図1)。PCNAのUb化修飾と違い、SUMO化修飾及びSrs2ホモログは、ヒトにおいて未だ見いだされていない。しかしながら、最近、出芽酵母には存在しないヒトFBH1 DNAヘリカーゼを、出芽酵母内で発現させた場合、*srs2*変異株のDNA損傷剤感受性を相補するという報告がなされた¹⁰⁾。したがって、ヒトにおいては、FBH1がSrs2と類似した組換え制御に関わっている可能性が考えられる。

4. PRRとDNA相同組換え

DNA損傷により進行が阻害されたDNA複製の再開には、DNA損傷トレランス経路に加えてDNA相同組換えが重要な役割を果たしている。例えば、リーディング鎖上の損傷によって阻害されたDNA複製フォーク付近には相同組換えの開始に必要な一本鎖DNAが露出した領域が存在するため、ここにDNA相同組換えが作用するとラギング鎖との鎖交換反応および新規DNA合成により、PRRと類似したテンプレートスイッチを行うことが出来る(図2A)。さらに、DNA相同組換えはこの他にも、二重鎖DNA上のニックを含む領域をDNA複製フォークが進行することにより生じるDNA二重鎖切断から複製フォークを再構築する際や(図2B)、ラギング鎖上のDNA損傷によってDNA複製フォークの通過後に生じる一本鎖DNAギャップの主要な修復機構として機能していると考えられている(図2C)。バクテリアにおいては、これらDNA相同組換えを必要とする複製再開、修復機構に加えて、TLS及びPRRの機能もRecAリコンビナーゼが関与している。真核生物におけるTLS及びPRRの反応は、*RAD6*経路によるUb化修飾という真核生物に特異的な反応機構によって制御されているが、これは、おそらくRecAのDNA損傷トレランスに関する機能が、進化の過程で独立した機構として発展した結果だと考えられる。実際、最近のニトリDT40細胞や酵母の研究などからPRR経路にDNA相同組換え経路が共役して働くことが示されており^{11,12)}、*RAD6*及び*RAD52*経路はDNA複製の再開において部分的に重複または同一経路として機能していると考えられる。

5. DNA損傷トレランスとMgs1

出芽酵母Mgs1は、AAA⁺ATPaseファミリーに属するタンパク質で、大腸菌からヒトまで高度に保存されている¹³⁾。*mgs1*変異株は、組換えや突然変異頻度が若干上昇する以外ほとんど目立った表現型を示さないが、*rad6*や*rad18*変異との二重変異が合成致死性を示すことから、*mgs1*変異株においては、DNA損傷トレランスの機能を必要とする複製阻害が頻繁に生じている可能性がある¹⁴⁾。さらに、*mgs1 rad18*株の致死性は、*siz1*や*srs2*変異によって消失するため、ここでも相同組換え経路の活性化による複製阻害の解消が起こっていると考えられる¹⁴⁾。*mgs1*変異株は、*rad6*との二重変異によって致死となるが、*rad51*変異との二重変異は増殖に全く影響しない。一方、大腸菌のMgs1ホモログ*mgsA/rarA*は、*recA*変異との二重変異によって増殖阻害及び生存率の低下が顕著に見られる¹⁵⁾。このことも、真核生物においては、RecAの機能が*RAD6*経路(DNA損傷トレランス)と*RAD52*経路(DNA相同組換え)に分かれて発展してきたことを支持している。

*mgs1*変異は、DNA複製に関与するDNAポリメラーゼδの高温感受性(*pol3-13*)を抑圧することが出来る一方で、突然変異頻度の顕著な上昇を引き起こす¹⁴⁾。さらに、Mgs1は、PCNAやDNAポリメラーゼδのサブユニットの一つであるPol31と物理的に相互作用することから^{8,16)}、DNAポリメラーゼδによる異常な複製のブレーキ役としての働きが考えられる。このMgs1によるDNA複製の停止が起こっている間に、複製阻害要因の除去が行われれば、*RAD6*や*RAD52*経路に比べて小規模かつ正確な複製の進行が可能である。Mgs1がバクテリアからヒトまで保存されていることや、*mgs1*変異株は、様々なDNA損傷剤に対する感受性が見られないことを考慮すると、このようなMgs1のDNA複製を停止する働きは、自動車が高速道路や狭い道で速度を調節するように、そもそもDNA損傷が存在しないDNA-タンパク質複合体やDNA高次構造などのゲノム上に普遍的に存在する複製障害部位を誤りなく乗り越える際に機能しているのかもしれない。

おわりに

DNA損傷トレランスに働く*RAD6*経路の遺伝子の多くは、数十年前にすでに同定され、これらがユビキチン化修飾酵素をコードしていることが知られていた。21世紀に入ってようやくこのユビキチン化の標的タンパク質がPCNAであることが明らかになり、分子レベルでの解析が

可能になった。それまでに、*RAD6* 経路の破壊株と類似の表現型を示す変異が *POL30* (PCNA をコードする遺伝子) 遺伝子上に見ついていたにも関わらず発見が遅れた最も主要な原因は、ユビキチン化修飾を同定する技術的な問題であったと思われる。しかしながら、PCNA のユビキチン化修飾も、DNA 損傷トレランスを制御する役割の一端が明らかになったに過ぎない。どのようにして複製フォークの進行阻害を認識するのか、モノ及びポリユビキチン化の二つの経路はどのように制御されているのか、そして、それらがどのようにして複製の再開に機能しているのかなどが今後の課題である。

- Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K., & Hanaoka, F. (1999) *Nature*, 399, 700–704.
- Johnson, R.E., Prakash, S., & Prakash, L. (1999) *Science*, 283, 1001–1004.
- Nelson, J.R., Lawrence, C.W., & Hinkle, D.C. (1996) *Science*, 272, 1646–1649.
- Ulrich, H.D. & Jentsch, S. (2000) *EMBO J.*, 19, 3388–3397.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G., & Jentsch, S. (2002) *Nature*, 419, 135–141.
- Blastyak, A., Printer, L., Unk, L., Prakash, S. Prakash, L., & Haracksa, L. (2007) *Mol. Cell*, 28, 167–175.
- Krejci, L., Van Komen, S., Li, Y., Villemain, J., Reddy, M.S., Klein, H., Ellenberger, T., & Sung, P. (2003) *Nature*, 423, 305–309.
- Pfander, B., Moldovan, G.L., Sacher, M., Hoegge, C., & Jentsch, S. (2005) *Nature*, 436, 428–433.
- Hishida, T., Ohya, T., Kubota, Y., Kamada, Y., & Shinagawa, H. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, 26, 5509–5517.
- Chiolo, I., Saponaro, M., Baryshnikova, A., Kim, J.H., Seo, Y. S., & Liberi, G. (2007) *Mol. Cell. Biol.*, 27, 7439–7450.
- Yamashita, Y.M., Okada, T., Matsusaka, T., Sonoda, E., Zhao, G.Y., Araki, K., Tateishi, S., Yamaizumi, M., & Takeda, S. (2002) *EMBO J.*, 21, 5558–5566.
- Gangavarapu, V., Prakash, S., & Prakash, L. (2007) *Mol. Cell. Biol.*, 27, 7758–7764.
- Hishida, T., Iwasaki, H., Ohno, T., Morishita, T., & Shinagawa, H. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 8283–8289.
- Hishida, T., Ohno, T., Iwasaki, H., & Shinagawa, H. (2002) *EMBO J.*, 21, 2019–2029.
- Shibata, T., Hishida, T., Kubota, Y., Han, Y.W., Iwasaki, H., & Shinagawa, H. (2005) *Genes Cells*, 10, 181–191.
- Vijeh Motlagh, N.D., Seki, M., Branzel, D., & Enomoto, T. (2006) *DNA Repair*, 5, 1459–1474.

菱田 卓

(大阪大学微生物病研究所)

Molecular mechanisms of *RAD6* DNA damage tolerance pathway in *Saccharomyces cerevisiae*

Takashi Hishida (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

RAD18 による損傷トレランスの制御

1. はじめに

細胞に紫外線 (UV) などが照射されて DNA が損傷されると、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair: NER) などの修復機構により修復される。その後、DNA は複製酵素により複製されると考えられてきた (図1 上段)。しかし、実際には紫外線照射により形成される主要な DNA 損傷であるシクロブタン型ピリミジン二量体 (cyclobutane pyrimidine dimer: CPD) は、NER によって認識・修復されるのに長い時間 (約 12 時間以上) を要するため、DNA が複製時の鋳型 DNA 鎖に残存する可能性がある。通常の DNA 複製酵素であるポリメラーゼ δ (polymerase δ : Pol δ) は、鋳型鎖に残存する CPD などの損傷部位に遭遇すると、その部位を乗り越えて複製することができない。このため、複製が停止し、複製フォークの進行が止まってしまう¹⁾ (図1 下段)。大腸菌からヒトに至るまで生物には、この状態を回避するための機構として「損傷トレランス」と呼ばれる機構が存在する。損傷トレランスは、損傷乗り越え複製およびテンプレートスイッチ (鋳型鎖乗り換え) の二つの機構から構成される (図1 下段)。このミニレビューでは、主に損傷乗り越え複製について解説する (テンプレートスイッチについては、同じ号の菱田卓先生の項を参照してください)。損傷トレランスにより損傷部位を回避して DNA を複製した後に、Pol δ は通常の DNA 複製を再開すると考えられている。「損傷トレランス」は損傷を直接修復する機構ではなく、鋳型鎖に損傷が残っていても、その鋳型鎖の複製を行うための機構である。このため、損傷トレランスが終了した後でも、鋳型鎖には損傷が残っている。この損傷は、次の DNA 複製時期までに、