

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) 遺伝子上に見つかっ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。

- 1) 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.
- 2) Johnson, R.E., Prakash, S., & Prakash, L. (1999) *Science*, 283, 1001–1004.
- 3) Nelson, J.R., Lawrence, C.W., & Hinkle, D.C. (1996) *Science*, 272, 1646–1649.
- 4) Ulrich, H.D. & Jentsch, S. (2000) *EMBO J.*, 19, 3388–3397.
- 5) Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G., & Jentsch, S. (2002) *Nature*, 419, 135–141.
- 6) Blastyak, A., Printer, L., Unk, L., Prakash, S. Prakash, L., & Haracksa, L. (2007) *Mol. Cell*, 28, 167–175.
- 7) Krejci, L., Van Komen, S., Li, Y., Villemain, J., Reddy, M.S., Klein, H., Ellenberger, T., & Sung, P. (2003) *Nature*, 423, 305–309.
- 8) Pfander, B., Moldovan, G.L., Sacher, M., Hoegge, C., & Jentsch, S. (2005) *Nature*, 436, 428–433.
- 9) Hishida, T., Ohya, T., Kubota, Y., Kamada, Y., & Shinagawa, H. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, 26, 5509–5517.
- 10) Chiolo, I., Saponaro, M., Baryshnikova, A., Kim, J.H., Seo, Y. S., & Liberi, G. (2007) *Mol. Cell. Biol.*, 27, 7439–7450.
- 11) 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.
- 12) Gangavarapu, V., Prakash, S., & Prakash, L. (2007) *Mol. Cell. Biol.*, 27, 7758–7764.
- 13) Hishida, T., Iwasaki, H., Ohno, T., Morishita, T., & Shinagawa, H. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 8283–8289.
- 14) Hishida, T., Ohno, T., Iwasaki, H., & Shinagawa, H. (2002) *EMBO J.*, 21, 2019–2029.
- 15) Shibata, T., Hishida, T., Kubota, Y., Han, Y.W., Iwasaki, H., & Shinagawa, H. (2005) *Genes Cells*, 10, 181–191.
- 16) 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、

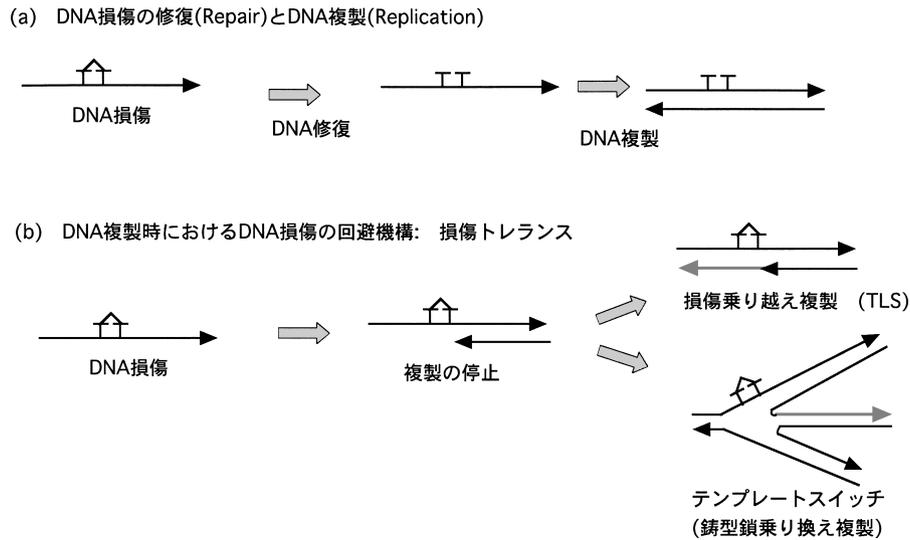


図1 損傷トレランスの説明

(a) DNA 損傷の修復 (Repair) と DNA 複製 (Replication)

(b) DNA 複製時における DNA 損傷の回避機構: 損傷トレランス (DNA damage tolerance)

損傷トレランスは、損傷乗り越え複製 (TLS) とテンプレートスイッチで構成される。

NER などの修復機構により修復されると考えられている。なお、損傷トレランスは、複製後修復 (postreplication repair) または損傷回避 (DNA damage avoidance) と呼ばれることもある。

2. 損傷乗り越え複製 (TLS)

高等真核生物では、損傷乗り越え複製が重要な役割をもつ。1996年になるまで、通常の複製酵素である Pol δ が損傷に遭遇した場合に、細胞がどのようにしてこれを乗り越えて複製してゆくのかわかっていなかった。常染色体劣性遺伝疾患である色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum) は、日光露光部での色素沈着、高頻度発がんなどを特徴とする。この疾患は、XP-A から XP-G と XP-V (バリエント) の八つの遺伝的相補性群に分類される。この中で XP-A から XP-G の7群は、NER に異常がある。このため XP-A から XP-G 群では、日光の紫外線により生じた DNA 損傷を修復することができないために日光過敏症となり、DNA 損傷による突然変異の発生頻度が上昇して、皮膚がんを発症する。これに対して、XP-V では NER が正常であるため、なぜ高頻度に皮膚がんを発症するのか興味をもたれていた。1999年に大阪大学の益谷、花岡らは、色素性乾皮症バリエント群の原因遺伝子を特定することに成功した²⁾。in vitro で CPD を含む DNA を鋳型鎖として用い、正常細胞抽出液を反応させる DNA 複製試験により、CPD に対し

て正しい塩基を対合させて複製する活性を検出した。これに対して、XP-V 細胞の抽出液では CPD の直前で複製が停止した。このことは、正常細胞には CPD などの DNA 損傷があっても塩基を対合させて複製する機構 (損傷乗り越え複製 translesion synthesis: TLS) が存在するのに対して、XP-V 細胞ではこの機構に欠陥があることを示している。彼らはこの欠陥を相補するタンパク質を正常細胞から精製し、CPD を効率良く乗り越えて複製を行う DNA 複製酵素であることを明らかにし、ヒト DNA ポリメラーゼ η (polymenase η : Pol η) と命名した。XP-V 患者由来の細胞で、Pol η をコードしている遺伝子に変異がみつかったことにより、XP-V の原因遺伝子であることが確定した。

Pol η は、どのようにして CPD を乗り越えて複製することができるのであるのか? Pol η は、鋳型鎖を複製する時に、高い頻度で誤ったヌクレオチドを挿入する性質があることがわかり、忠実度 (正確性) の低い複製酵素であることが判明した³⁾。Pol η を含む TLS 酵素では、ヌクレオチドを認識する結合ポケットが大きいため、TLS 酵素は損傷を乗り越えてヌクレオチドを対合させて複製できる代償として、忠実度が低い性質があると考えられた。したがって、生体内では TLS 酵素の機能は厳密に制御されており、損傷のない状態では機能しないように制御されていると考えられる。

3. RAD18 による PCNA のユビキチン化

出芽酵母を用いた遺伝学的解析により、RAD6 および RAD18 を中心とする遺伝子群 (RAD6 エピスタシス群) が損傷トレランスに関与しており、TLS は RAD18 により制御されている可能性が指摘されてきた⁴⁾。RAD6 および RAD18 は、それぞれ一次構造の特徴からユビキチン結合酵素 (E2) およびユビキチンリガーゼ (E3) と推測されてきた。2002 年に、出芽酵母の DNA に損傷が生じると、DNA 複製に必要な因子の一つである増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen: PCNA) が RAD6 および RAD18 遺伝子に依存してモノユビキチン化され、この反応が損傷トレランスで重要な役割を果たしていることが示された⁵⁾。また、ヒトの RAD18 遺伝子が特定され、損傷トレランスに関与していることがわかった⁶⁾。RAD18 遺伝子を欠損させたマウス ES 細胞は、UV 照射、メチル化剤、架橋化剤等に感受性を示し、また姉妹染色分体間組換え (SCE) 頻度および外来の DNA をゲノムに組み込む効率が上昇していた⁷⁾。このため、RAD18 遺伝子はゲノムの安定化の維持に貢献していると結論した。野生型マウス由来の細胞に UV を照射して DNA が損傷されると、PCNA がモノユビキチン化されるのに対して、RAD18 遺伝子を欠損させたマウス由来の細胞ではこの反応が検出されなかった。このため、哺乳類細胞でも RAD18 遺伝子の機能に依存して PCNA がモノユビキチン化されることがわかった⁸⁾。精製したヒト RAD6-RAD18 タンパク質複合体は *in vitro* で PCNA をモノユビキチン化する活性があることが示され、RAD6-RAD18 はそれぞれ、PCNA をモノユビキチン化する E2 および E3 酵素であることが確定した⁸⁾。

4. DNA 複製酵素から TLS 酵素へのスイッチング

Pol η はどのようにして、損傷がある場合にのみ機能するように制御されているのであろうか？ ヒト細胞を UV 照射すると、GFP と融合させた Pol η は細胞核内の損傷部位に集積する。この集積反応のみられない変異 Pol η を発現させた細胞は、UV 照射に対して感受性を示すことから、損傷の形成に反応して起きる Pol η の集積反応は重要な反応である⁹⁾。UV 照射により、RAD18 も損傷部位へ集積する。これに対して、RAD18 欠損マウス細胞では、Pol η の集積反応がみられなかったことから、Pol η の細胞内局在は RAD18 により制御されている⁸⁾。RAD18 と Pol η は、DNA 損傷の有無に関係なく結合する性質をもつ^{8,10)}。この相互作用の重要性を検証するため、まず RAD18 にお

ける Pol η 結合ドメインを決定した。このドメインを欠失した RAD18 は、RAD18 欠損細胞の UV 感受性を相補する活性を失っていた。このため、RAD18 と Pol η の相互作用は、損傷トレランスの機能を発現するために重要である⁸⁾。DNA に損傷が形成されると複製が停止するため、停止した複製フォークに長い一本鎖 DNA 領域ができると考えられている。RAD18 は、一本鎖 DNA に結合する性質をもつため¹¹⁾、Pol η と結合した状態で停止した複製フォークに集積すると思われる⁸⁾。複製停止部位において Pol η は、どのようなメカニズムにより Pol δ と置き変わり (ポリメラーゼスイッチング)、TLS を開始するのであろうか？ PCNA はホモ三量体のリング状構造を形成し、DNA 複製酵素による DNA 鎖伸長を促進するクランプとして機能する。Pol η の DNA 複製活性も PCNA により促進されると報告されている。DNA 損傷に反応して集積した RAD18 により PCNA がモノユビキチン化されることにより、Pol η と PCNA の相互作用が増強されると仮定すると、それが原動力となり複製の場において Pol δ から Pol η へ置き変わる可能性がある。未修飾の PCNA とモノユビキチン化された PCNA を用いて Pol η との親和性を比較した結果、未修飾の PCNA に比べてモノユビキチン化された PCNA は、Pol η との親和性が高いことがわかった^{8,12)}。これに対して、Pol δ ではそのような PCNA に対する相互作用に差がみられなかった。このため、DNA 損傷に反応して集積した RAD18 により PCNA がモノユビキチン化されると、Pol η と PCNA の相互作用が増強され、それが原動力となり複製の場において Pol δ から Pol η へ置き変わるといふモデルが提唱された (図 2)。RAD18 は Pol η と結合した状態で、停止した複製フォークを認識して集積する。RAD18 は RAD6 と共同で PCNA をモノユビキチン化する。モノユビキチン化された PCNA は、Pol δ よりも Pol η との親和性が高いため、複製の場において Pol δ から Pol η へ置き変わりが起こる (ポリメラーゼスイッチング)。これにより Pol η による TLS が開始される。損傷が Pol η により乗り越えられた後に、再び Pol δ に置き変わり通常の複製に戻ると考えられる。

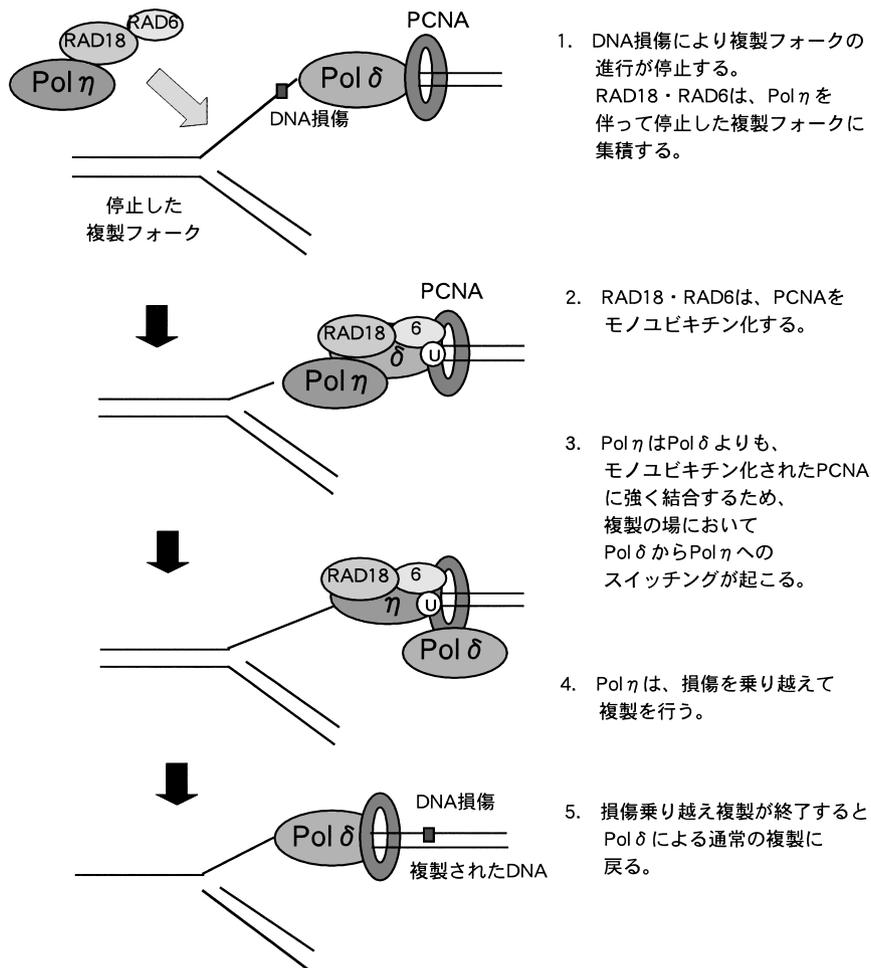
5. Y ファミリーに属する TLS 酵素

TLS 酵素は、Pol η の他に Pol ι 、Pol κ および Rev1 があり、これらは Y ファミリーに属する TLS 酵素に分類される¹³⁾。UBM または UBZ と呼ばれるユビキチン結合モチーフがあるため、ユビキチン化された PCNA に対して高い親和性を示す。DNA 損傷には、CPD の他にさまざまな種

類の損傷があるが、Yファミリーに属する TLS 酵素群は損傷の種類に応じて使い分けられている可能性が高い。一例として、Pol η が効率良くCPDを乗り越えて複製するのに対して、Pol κ はタバコに含まれるベンツパイレンにより損傷されたDNAを複製する。Yファミリーに属する TLS 酵素は、ユビキチン化されたPCNAと相互作用するが、RAD18と相互作用することが知られている TLS 酵素はPol η のみである。また、Rev1はPol η 、Pol ι 及びPol κ と相互作用する。Yファミリーに属する TLS 酵素がどのようにして、種々の損傷に対応してTLSを行うのかよくわかっていないが、RAD18が損傷により停止した複製フォークを認識して結合し、Pol η がRAD18とともに複製の場にリクルートされ、その後にRev1を介してPol ι またはPol κ が損傷の種類に応じて選択されることも予想される。

6. 精巣における RAD18 の機能

各臓器での RAD18 の発現量を比較すると、精巣で高い発現がみられる。精巣の生殖細胞で発現していることがわかった。精巣の組織を RAD18 抗体で染色すると、とくに sex body と呼ばれる構造体に強い発現がみられた^{14,15)}。精巣における精母細胞の減数分裂時に、父方由来および母方由来の各常染色体は対合する。これに対して、性染色体である X 染色体と Y 染色体は、構造的な違いがあり、完全に対合しないが、部分的に相同な領域があるため、その部位で対合する。この領域は、擬似常染色体領域と呼ばれ、パキテン期に sex body を形成する。また、パキテン期には性染色体の転写は抑制されている。RAD18 は、何故 sex body に集積して、どのような機能を果たしているのだろうか。van der Laan らは、常染色体の一部のゲノムを改



1. DNA損傷により複製フォークの進行が停止する。
RAD18・RAD6は、Pol η を伴って停止した複製フォークに集積する。
2. RAD18・RAD6は、PCNAをモノユビキチン化する。
3. Pol η はPol δ よりも、モノユビキチン化されたPCNAに強く結合するため、複製の場においてPol δ からPol η へのスイッチングが起こる。
4. Pol η は、損傷を乗り越えて複製を行う。
5. 損傷乗り越え複製が終了するとPol δ による通常の複製に戻る。

図2 RAD18による、Pol δ からPol η へのスイッチングの制御機構モデル

変することにより、減数分裂時に常染色体の一部で完全に染色体が対合しないマウスを作成した¹⁵⁾。このマウスの精巢の減数分裂時に、対合していない常染色体領域にRAD18が局在していることが観察された。また、その領域では転写が抑制されていることがわかった。このため、RAD18は不対合かつ転写が抑制されている染色体領域に集積する性質がある¹⁵⁾ことがわかった。一方、損傷トランスに参与する因子であるPolηまたはUBC13では、このような性質はみられないことから、RAD18は損傷トランスとは異なる役割を精巢で果たしていると考えられている¹⁵⁾。

7. おわりに (RAD18 とがんとの関係)

このように、RAD18には損傷トランスだけでなく、多様な機能があると思われる。RAD18とがんとの関係に関しても、今後の研究の進展が期待される。特に、RAD18ノックアウトマウスにUVを照射することにより、皮膚がんが形成されるか調べることは重要であり、今後の課題である。また、ヒトの初代培養細胞ではRAD18の発現量が少ないのに対し、この細胞をSV40ウイルス由来DNAを用いて細胞株(不死化)の状態にすると、RAD18の発現量が増大する。また、多くのヒトがん由来の細胞株でRAD18の発現量が高いことがわかった。マウスの皮膚組織においても、増殖が活発な領域でRAD18の高い発現が観察される。おそらくS期でRAD18の発現が正に制御されていると考えられる¹⁴⁾。ただし、マウス野生型細胞とRAD18欠損細胞を比較すると、通常の状態では増殖速度に差はみられない⁷⁾。RAD18は細胞増殖そのものではなく、複製フォークの進行を円滑に進めるために必要な因子であるためDNA複製時に発現が正に調節されていると推測される。このため、DNA損傷を形成させるタイプの抗がん剤に対する耐性に、RAD18の発現量が影響を及ぼしている可能性が考えられる。多くの分野の研究者に興味をもっていただけると、うれしく思います。

- 1) Broomfield, S., Hryciw, T., & Xiao, W. (2001) *Mutat. Res.*, 486, 167-184.
- 2) 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.
- 3) Matsuda, T., Bebenek, K., Masutani, C., Hanaoka, F., & Kunkel, T.A. (2000) *Nature*, 404, 1011-1013.
- 4) Prakash, L. (1981) *Mol. Gen. Genet.*, 184, 471-478.
- 5) Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G., & Jentsch, S. (2001) *Nature*, 419, 135-141.

- 6) Tateishi, S., Sakuraba Y., Masuyama, S., Inoue, H., & Yamaizumi, M. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 7927-7932.
- 7) Tateishi, S., Niwa, H., Miyazaki, J., Fujimoto, S., Inoue, H., & Yamaizumi, M. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, 23, 474-481.
- 8) Watanabe, K., Tateishi, S., Kawasuji, M., Tsurimoto, T., Inoue, H., & Yamaizumi, M. (2004) *EMBO J.*, 23, 3886-3896.
- 9) Kannouche, P., Broughton, B.C., Volker, M., Hanaoka, F., Mullenders, L.H., & Lehmann, A.R. (2001) *Genes Dev.*, 15, 158-172.
- 10) Yuasa, M.S., Masutani, C., Hirano, A., Cohn, M.A., Yamaizumi, M., Nakatani, Y., & Hanaoka, F. (2006) *Genes Cell's* 11, 731-744.
- 11) Bailly, V., Lauder, S., Prakash, S., & Prakash, L. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 23360-23365.
- 12) Kannouche, P.L., Wing, J., & Lehmann, A.R. (2004) *Mol. Cell*, 14, 491-500.
- 13) Ohmori, H., Friedberg, E.C., Fuchs, R.P., Goodman, M.F., Hanaoka, F., Hinkle, D., Kunkel, T.A., Lawrence, C.W., Livneh, Z., Nohmi, T., Prakash, L., Prakash, S., Todo, T., Walker, G. C., Wang, Z., & Woodgate, R. (2001) *Mol. Cell*, 8, 7-8.
- 14) Masuyama, S., Tateishi, S., Yomogida, K., Nishimune, Y., Suzuki, K., Sakuraba, Y., Inoue, H., Ogawa, M., & Yamaizumi, M. (2005) *Genes Cells*, 10, 753-762
- 15) van der Laan, R., Uringa, E.J., Wassenaar, E., Hoogerbrugge, J. W., Sleddens, E., Odijk, H., Roest, H.P., de Boer, P., Hoeijmakers, J.H., Grootegoed, J.A., Baarends, W.M. (2004) *J. Cell Sci.*, 117, 5023-5033.

立石 智

(熊本大学発生医学研究センター
器官形成部門組織制御分野)

RAD18 regulates DNA damage tolerance
Satoshi Tateishi (Cell Genetics, Institute of Molecular Embryology and Genetics (IMEG), Kumamoto University, Honjo 2-2-1, Kumamoto 860-0811, Japan)

酵素科学と理論化学との連携

—酵素研究の新しいパラダイムを求めて—

1. はじめに

1897年にBuchnerは酵母無細胞抽出液中でのアルコール発酵を発見した。これは生物体内の反応が生命のない生体触媒(酵素)によって進められることを最初に示したもので、現代酵素化学の基礎を成すとともに生化学の発展の端緒となった。それ以来、酵素学はまさに経験的な学問の代表として生化学の発展を先導してきたと言ってよい。近