

- 2) Ozaki, T. & Nakagawara, A. (2005) *Cancer Sci.*, 96, 729-737.
- 3) Ikawa, S., Nakagawara, A., & Ikawa, Y. (1999) *Cell Death Differ.*, 6, 1154-1161.
- 4) Lee, C.W. & La Thangue, N.B. (1999) *Oncogene*, 18, 4171-4181.
- 5) Zeng, X., Chen, L., Jost, C.A., Maya, R., Keller, D., Wang, X., Kaelin, W.G. Jr., Oren, M., Chen, J., & Lu, H. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, 19, 3257-3266.
- 6) Vousden, K.H. & Lu, X. (2002) *Nat. Rev. Cancer*, 2, 594-604.
- 7) Gong, J.G., Costanzo, A., Yang, H.Q., Melino, G., Kaelin, W. G. Jr., Levrero, M., & Wang, J.Y. (1999) *Nature*, 399, 806-809.
- 8) Ren, J., Datta, R., Shioya, H., Li, Y., Oki, E., Biedermann, V., Bharti, A., & Kufe, D. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 33758-33765.
- 9) Gonzalez, S., Prives, C., & Cordon-Cardo, C. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, 23, 8161-8171.
- 10) Rossi, M., De Laurenzi, V., Munarriz, E., Green, D.R., Liu, Y. C., Vousden, K.H., Cesareni, G., & Melino, G. (2005) *EMBO J.*, 24, 836-848.
- 11) Yamamoto, Y., Verma, U.N., Prajapati, S., Kwak, Y.T., & Gaynor, R.B. (2003) *Nature*, 423, 655-659.
- 12) Anest, V., Hanson, J.L., Cogswell, P.C., Steinbrecher, K.A., Strahl, B.D., & Baldwin, A.S. (2003) *Nature*, 423, 659-663.
- 13) Furuya, K., Ozaki, T., Hanamoto, T., Hosoda, M., Hayashi, S., Barker, P.A., Takano, K., Matsumoto, M., & Nakagawara, A. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 18365-18378.
- 14) Karin, M. (1999) *Oncogene*, 18, 6867-6874.
- 15) Yoshida, K., Ozaki, T., Furuya, K., Nakanishi, M., Kikuchi, H., Yamamoto, H., Ono, S., Koda, T., Omura, K., & Nakagawara, A. (2008) *Oncogene*, 27, 1183-1188.

尾崎 俊文, 中川原 章

(千葉県がんセンター研究所がん遺伝子研究室)

p53-independent apoptosis through a novel ATM/IKK- $\alpha$ /p73-mediated apoptotic pathway

Toshinori Ozaki and Akira Nakagawara (Laboratory of Oncogene Research, Chiba Cancer Center Research Institute, 666-2 Nitona, Chuoh-ku, Chiba 260-8717, Japan)

投稿受付: 平成 19 年 10 月 25 日

## 損傷DNA前駆体の誘発変異とヌクレオチドプール浄化酵素/DNA修復酵素による抑制

### はじめに

酸素呼吸を行う生物(細胞)は, エネルギー代謝の面で有利な反面, 内なる敵である活性酸素の絶え間なき産生という問題に直面している。また, 活性酸素はある種の化学

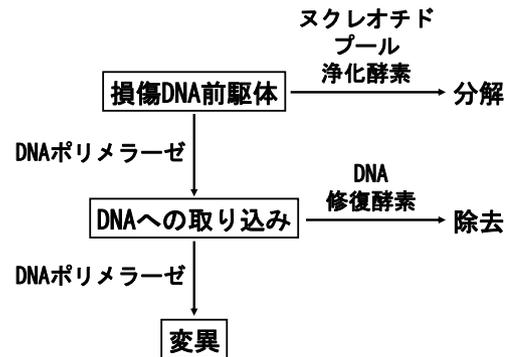


図1 損傷DNA前駆体の変異を誘発する経路とその抑制機構

物質や放射線的作用によっても生ずる。活性酸素により様々な種類のDNA損傷が生じ, 個々の損傷についての変異誘発能が調べられている<sup>1)</sup>。DNA損傷の生成は, 変異・発がん・神経変性・老化の過程と関係があると広く認識されている。

DNA前駆体であるデオキシリボヌクレオシド-三リン酸も活性酸素により酸化され, 種々の損傷DNA前駆体が生成すると考えられる。生じた損傷DNA前駆体は, DNAに取り込まれて変異を誘発する(図1)。本稿では, 活性酸素によってdGTPから生ずる8-ヒドロキシ-dGTP(8-OH-dGTP)とdATPから生ずる2-ヒドロキシ-dATP(2-OH-dATP)の変異誘発能について述べる。また, 損傷DNA前駆体が誘発する変異を抑制する, ヌクレオチドプール浄化酵素及びDNA修復酵素についても言及する(図1)。

### 1. 損傷DNA前駆体の重要性

著者らは, 試験管内酸化反応において, DNA前駆体(dGTP/dATP)がDNAよりも数倍~数十倍酸化されることを見出した<sup>2)</sup>。細胞内では, ヒストン等のタンパク質がDNAを保護しているため, DNAの反応性はさらに低下していると考えられる。したがって, 損傷DNA前駆体は従来考えられていた以上に, 活性酸素による変異の誘発に大きく関与している可能性がある。大腸菌DNA中の酸化塩基8-ヒドロキシグアニンの蓄積には, DNAの直接酸化とヌクレオチドプール中の8-OH-dGTPの取り込みが, 同程度に寄与している<sup>3)</sup>。布柴らは, 細胞内に活性酸素や鉄が蓄積していると考えられる *sodA sodB fur* 三重欠損大腸菌株で観察される自然突然変異は, 8-OH-dGTP及び2-OH-dATPが原因で生ずることを種々の実験から結論している<sup>4)</sup>。これらの結果は, 損傷DNA前駆体が生物学的に非常に重要であることを示している。

## 2. 損傷 DNA 前駆体の DNA ポリメラーゼによる取り込み

精製 DNA ポリメラーゼ (DNA pol) を用いる試験管内 DNA 合成反応における, 8-OH-dGTP の取り込みが調べられている。その結果, 8-OH-dGTP は鋳型 DNA 中の C に加え, 誤って A に対しても取り込まれることが明らかにされている (図 2)<sup>1)</sup>。清水らは, 損傷乗り越え DNA 合成に関与する Y-ファミリー DNA pol が, 8-OH-dGTP を非常に高い頻度で A に対して取り込むことを見出している<sup>5)</sup>。

著者らは, 精製 DNA pol による 2-OH-dATP の取り込みを同様に検討した。大腸菌の複製酵素 DNA pol III の場合には, 鋳型 DNA 中の T と G 残基に対して 2-OH-dATP が取り込まれた (図 2)<sup>6)</sup>。取り込みの kinetic parameters を算出したところ, T 及び G に対する取り込み効率は約 10:1 であった。一方, 哺乳類細胞の複製酵素 pol  $\alpha$  は, 2-OH-dATP を鋳型中の T と C 残基に対して取り込んだ<sup>2)</sup>。T 及び C に対する取り込み効率は約 4.5:1 であった。このように 8-OH-dGTP の場合とは異なり, 2-OH-dATP の誘発するミスマッチ塩基対形成には DNA pol 依存性が観察される。Y-ファミリー DNA pol による 2-OH-dATP の T と G

に対する取り込み頻度はほぼ同一であった<sup>5)</sup>。

## 3. 生細胞で損傷 DNA 前駆体により誘発される変異

著者は, 損傷 DNA 前駆体が生細胞で誘発する変異を明らかにする必要があると考えた。そこで, 合成した損傷 DNA 前駆体を塩化カルシウム処理した大腸菌懸濁液に添加して取り込ませ, 染色体上の標的遺伝子に生じた変異を解析するアッセイ系を開発し, 8-OH-dGTP 及び 2-OH-dATP が誘発する変異を調べた<sup>7)</sup>。8-OH-dGTP と 2-OH-dATP によって誘発された塩基置換変異は, それぞれ A:T→C:G 変異と G:C→T:A 変異であった。この変異は, *sodA sodB fur* 三重欠損大腸菌株で観察された自然突然変異<sup>4)</sup>と一致している。したがって, ヌクレオチドプール中に生じる 8-OH-dGTP や 2-OH-dATP は, 活性酸素が関与する変異に大きく寄与していることが示唆される。8-OH-dGTP と 2-OH-dATP が誘発した変異の生成機構としては, それぞれ鋳型 DNA 中の A と G 残基に対する取り込みが推定され, 大腸菌の DNA pol III を用いた試験管内 DNA 合成反応の結果と合致する (図 2)<sup>6)</sup>。

著者らは, 哺乳類細胞における変異誘発能を解明するために, COS-7 細胞を用いてアッセイする系を確立した。

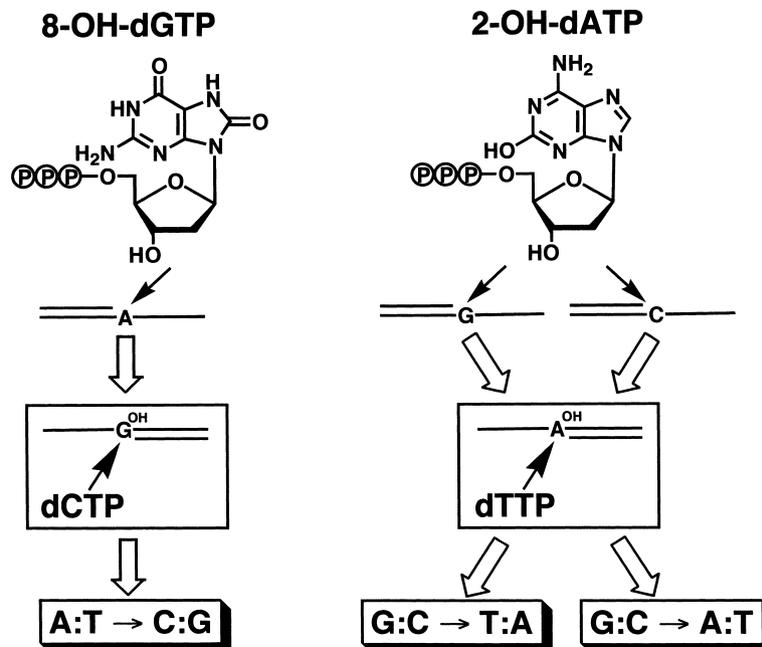


図 2 8-OH-dGTP と 2-OH-dATP の変異誘発機構

図中  $G^{OH}$  と  $A^{OH}$  は, 8-ヒドロキシグアニンと 2-ヒドロキシアデニン塩基を表す。哺乳類細胞の DNA pol  $\alpha$  は 2-OH-dATP を C に誤挿入するため, G:C→A:T 変異を誘発する可能性がある。

その結果、8-OH-dGTPは大腸菌の場合と同様に、A:T→C:G変異を誘発することを見出した<sup>8)</sup>。

#### 4. 損傷 DNA 前駆体の誘発する変異の抑制機構： ヌクレオチドプール浄化酵素

真木と関口は、欠損するとA:T→C:G変異頻度が著しく上昇する大腸菌 *mutT* (*nudA*) 遺伝子の産物が8-OH-dGTPを特異的に分解することを報告した<sup>9)</sup>。著者らは、MutTタンパク質が8-OH-dGTPによる変異誘発を細胞内で抑制していることを明らかとするために、*mutT* 遺伝子欠損株に8-OH-dGTPを導入し、変異誘発頻度を調べた<sup>10)</sup>。その結果、8-OH-dGTPの変異誘発能は *mutT* 遺伝子欠損株で野生株より約6倍高くなっていることを見出した。

著者らは、大腸菌のOrf135 (NudG)が2-OH-dATPと8-OH-dGTPを分解する活性を有することを見出した<sup>11)</sup>。2-OH-dATPの変異誘発能は *orf135* 遺伝子欠損株では野生株より3.5倍高くなることから、Orf135は大腸菌の主要な2-OH-dATP分解酵素であると思われる<sup>12)</sup>。また、*orf135* 遺伝子欠損株は、自然突然変異や過酸化水素が誘発する変異の頻度が野生株より高かった<sup>12)</sup>。

大腸菌のOrf17 (NudB)は8-ヒドロキシ-dATP、8-OH-dGTP、2-OH-dATPを分解し、*mutT* 遺伝子欠損株に *orf17* 発現プラスミドを導入すると変異率が低下する<sup>13,14)</sup>。Orf17はMutTのバックアップ酵素として作用する可能性がある。

リボフラビン合成に関与する大腸菌 RibA (GTPシクロヒドロラーゼII)は8-OH-dGTPを分解する活性を有する<sup>15)</sup>。RibAの大量発現により *mutT* 欠損による変異頻度の上昇が抑制され、また、*mutT ribA* 株が *mutT* 単独変異株よりも自然突然変異頻度が高いことから、RibAはMutTのバックアップ酵素として作用する可能性がある。

布柴らは、出芽酵母 PCD1 (YLR151c)が8-OH-dGTPと2-OH-dATPを分解することを見出した<sup>16)</sup>。PCD1の発現により、大腸菌 *mutT* 株のA:T→C:G変異が抑制され、酵母の *PCD1* 遺伝子の破壊は自然突然変異頻度を14倍上昇させる。したがって、酵母PCD1は、MutTと同様の働きをしていると思われる。

哺乳類細胞のMTH1は、8-OH-dGTPと2-OH-dATPを分解する活性を有する<sup>17)</sup>。續らは、MTH1-ノックアウトマウスは、肺・肝臓・胃における発がん頻度が野生型マウスに比較して3倍程度高いことを報告している<sup>18)</sup>。この結果は、MTH1の欠損により8-OH-dGTPや2-OH-dATPが蓄積し、変異を誘発してがんが形成されたことを示唆している。

上記の報告は、損傷DNA前駆体が誘発する変異の抑制に、ヌクレオチドプール浄化酵素が大きく寄与していることを示している(図1)。また、大腸菌、酵母、哺乳類細胞すべてにおいて2-OH-dATPを分解する酵素が見出されていることから、2-OH-dATPも8-OH-dGTPとともに重要な酸化損傷DNA前駆体であることが示唆される。

#### 5. DNA 修復酵素の役割

ヌクレオチドプール浄化酵素は、損傷DNA前駆体がDNAに取り込まれる前に分解して変異誘発を抑制する。変異抑制機構としては、取り込まれた後にDNA修復酵素が作用することも考えられる(図1)。最近、著者らは、この可能性を検討するために、DNA修復酵素を欠損する大腸菌株に、8-OH-dGTPや2-OH-dATPを導入した。その結果、塩基除去修復酵素のエンドヌクレアーゼIIIが、8-OH-dGTP誘発変異を抑制していることを見出した<sup>19)</sup>。これは、A塩基に対して取り込まれた8-ヒドロキシグアニンを除去しているものと推測される。一方、興味深いことに、ヌクレオチド除去修復に関与するUvrAとUvrBは損傷DNA前駆体の誘発変異を促進していた<sup>20)</sup>。この結果は、予想に全く反するものであり、その分子機構は現在のところ不明である。

#### おわりに

活性酸素によりヌクレオチドプール中に生じる損傷DNA前駆体は、変異の誘発に大きく寄与しており、その誘発する変異の抑制にヌクレオチドプール浄化酵素が重要な働きをしている。DNA修復酵素も損傷DNA前駆体が誘発する変異を抑制する可能性がある。また、本稿では僅かにしか触れなかったが、損傷乗り越えに関係する特殊なDNA polとの関連を明らかにすることも重要である(図1)。発がんの機構を明らかにするためには、哺乳類細胞を用いた研究を推進することが重要である。著者は今後ともこの領域で微力ながら貢献していきたいと思っている。

#### 謝辞

本稿中で述べた著者らの実験結果は多くの研究者との共同研究で得られたものであり、改めてここに感謝いたします。特に産業医科大学の葛西宏先生と北海道大学の原島秀吉先生に深謝いたします。

1) Kamiya, H. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 517-531.

2) Kamiya, H. & Kasai, H. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 19446-

- 19450.
- 3) Tajiri, T., Maki, H., & Sekiguchi, M. (1995) *Mutat. Res.*, 336, 257-267.
  - 4) Nunoshiba, T., Watanabe, T., Nakabeppu, Y., & Yamamoto, K. (2002) *DNA Repair*, 1, 411-418.
  - 5) Shimizu, M., Gruz, P., Kamiya, H., Kim, S.-R., Pisani, F.M., Masutani, C., Kanke, Y., Harashima, H., Hanaoka, F., & Nohmi, T. (2003) *EMBO Rep.*, 4, 269-273.
  - 6) Kamiya, H., Maki, H., & Kasai, H. (2000) *Biochemistry*, 39, 9508-9513.
  - 7) Inoue, M., Kamiya, H., Fujikawa, K., Ootsuyama, Y., Murata-Kamiya, N., Osaki, T., Yasumoto, K., & Kasai, H. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 11069-11074.
  - 8) Satou, K., Kawai, K., Kasai, H., Harashima, H., & Kamiya, H. (2007) *Free Rad. Biol. Med.*, 42, 1552-1560.
  - 9) Maki, H. & Sekiguchi, M. (1992) *Nature*, 355, 273-275.
  - 10) Kamiya, H., Ishiguro, C., & Harashima, H. (2004) *J. Biochem.*, 136, 359-362.
  - 11) Iida, E., Satou, K., Mishima, M., Kojima, C., Harashima, H., & Kamiya, H. (2005) *Biochemistry*, 44, 5683-5689.
  - 12) Kamiya, H., Iida, E., Murata-Kamiya, N., Yamamoto, Y., Miki, T., & Harashima, H. (2003) *Genes Cells*, 8, 941-950.
  - 13) Hori, M., Fujikawa, K., Kasai, H., Harashima, H., & Kamiya, H. (2005) *DNA Repair*, 4, 33-39.
  - 14) Hori, M., Asanuma, T., Inanami, O., Kuwabara, M., Harashima, H., & Kamiya, H. (2006) *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 1087-1091.
  - 15) Kobayashi, M., Ohara-Nemoto, Y., Kaneko, M., Hayakawa, H., Sekiguchi, M., & Yamamoto, K. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 26394-26399.
  - 16) Nunoshiba, T., Ishida, R., Sasaki, M., Iwai, S., Nakabeppu, Y., & Yamamoto, K. (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32, 5339-5348.
  - 17) Fujikawa, K., Kamiya, H., Yakushiji, H., Fujii, Y., Nakabeppu, Y., & Kasai, H. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 18201-18205.
  - 18) Tsuzuki, T., Egashira, A., Igarashi, H., Iwakuma, T., Nakatsuru, Y., Tominaga, Y., Kawate, H., Nakao, K., Nakamura, K., Ide, F., Kura, S., Nakabeppu, Y., Katsuki, M., Ishikawa, T., & Sekiguchi, M. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 11456-11461.
  - 19) Suzuki, T., Yamamoto, K., Harashima, H., & Kamiya, H. (2008) *DNA Repair*, 7, 88-94.
  - 20) Hori, M., Ishiguro, C., Suzuki, T., Nakagawa, N., Nunoshiba, T., Kuramitsu, S., Yamamoto, K., Kasai, H., Harashima, H., & Kamiya, H. (2007) *DNA Repair*, 6, 1786-1793.

紙谷 浩之

(北海道大学大学院薬学研究院)

Mutations induced by damaged DNA precursors and their prevention by nucleotide pool sanitization and DNA repair enzymes

Hiroyuki Kamiya (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Kita-12, Nishi-6, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan)

## 代謝型グルタミン酸受容体の細胞膜への輸送メカニズム

—足場タンパク質 Tamalin による自己阻害機構の構造機能解析を通じて—

### 1. はじめに

記憶・学習などの高次脳機能において、グルタミン酸を認識する受容体 (GluR) は、神経細胞間の興奮性神経伝達に重要な役割を担っている。GluR は、イオンチャネル型受容体 (iGluR) と代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) の2種類に大別され、これらが膜タンパク質として効率的に神経伝達を行うためには、適切に神経シナプス膜へ輸送されることが必要不可欠である。本稿では、mGluR のシナプス膜への局在に重要な役割を果たす足場タンパク質 Tamalin の構造解析を中心に、mGluR の細胞膜輸送の分子機構について紹介する。

### 2. mGluR 及びその膜輸送に関わる分子の構造・機能

mGluR はタイプC G タンパク質共役受容体であり、グルタミン酸依存的に神経細胞内でのセカンドメッセンジャーの代謝を変化させ、興奮性シナプス伝達を調節する。これまで、八つの mGluR サブタイプが報告されており、それらはアミノ酸配列の相同性、アゴニストの選択性、共役する細胞内エフェクターの違いなどに基づいて、三つのグループに分けられる。mGluR の構造は、グルタミン酸を結合する細胞外領域、7回膜貫通領域および細胞内領域からなり、ホモダイマーを形成している<sup>1)</sup>。細胞外領域については、これまでX線結晶構造解析や fluorescent resonance energy transfer (FRET) 法により、筆者らのグループの研究も含めて多くの解析が行われ、G タンパク質を結合できる活性化状態と結合できない不活性化状態の動的平衡が、グルタミン酸の結合により活性化状態にシフトし、セカンドメッセンジャーの代謝を変化させると考えられている<sup>2,3)</sup>。

細胞内領域については、マスマスペクトロメトリーや酵母ツーハイブリッド法などにより、Homer や Tamalin など多くの結合タンパク質が同定されている<sup>4)</sup>。Homer は、EVH1 ドメインを介して、グループI mGluR (mGluR1, 5) の細胞内領域に存在する PPXXF モチーフと結合する<sup>5)</sup>。また、Homer はコイルドコイル領域により多量体化し、mGluR