

- H., PoECK, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., Endres, S., & Hartmann, G. (2006) *Science*, 314, 994-997.
- 8) Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Naslund, T.I., Liljestrom, P., Weber, F., & Reis e Sousa, C. (2006) *Science*, 314, 997-1001.
- 9) Kato, H., Takeuchi, O., Mikano-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., & Akira, S. (2008) *J. Exp. Med.*, 205, 1601-1610.
- 10) Takahashi, K., Yoneyama, M., Nishihori, T., Hirai, R., Kumeta, H., Narita, R., Gale, M., Jr., Inagaki, F., & Fujita, T. (2008) *Mol. Cell*, 29, 428-440.
- 11) Cui, S., Eisenacher, K., Kirchhofer, A., Brzozka, K., Lammens, A., Lammens, K., Fujita, T., Conzelmann, K.K., Krug, A., & Hopfner, K.P. (2008) *Mol. Cell*, 29, 169-179.

米山 光俊^{1,2}, 藤田 尚志¹

(¹ 京都大学ウイルス研究所・分子遺伝学研究分野,

² 科学技術振興機構さきがけ研究員)

Non-self RNA-sensing mechanism of RIG-I RNA helicase Mitsutoshi Yoneyama^{1,2} and Takashi Fujita¹ (¹Laboratory of Molecular Genetics, Institute for Virus Research, Kyoto University, 53 Shogoinkawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan; ²PRESTO, Japan Science and Technology Agency, 4-1-8 Honcho Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan)

誘発突然変異と損傷乗り越え DNA 合成 —REV1 の構造と生化学的機能—

1. はじめに

誘発突然変異は、電離放射線や紫外線、化学物質などの変異誘発剤によって誘発される突然変異を指す。変異誘発剤は Watson-Crick 型の塩基対合を変化させるような DNA 損傷を引き起こすが、突然変異が誘発されるためには、DNA 損傷に加えて細胞内の積極的な機能が必要不可欠である。REV1 遺伝子 (reversionless) は、この突然変異誘発に必要不可欠な酵母の遺伝子として同定された。本稿では、酵母及びヒト REV1 の構造と生化学的特性から突然変異誘発における機能を概説する。

2. 誘発突然変異と損傷乗り越え DNA 合成

細胞に紫外線が照射されると、新生 DNA 鎖の断片化が観察される。これは、複製型の DNA ポリメラーゼ (pol δ または pol ϵ) が、紫外線損傷に対して DNA 伸長反応を停止することに起因する。その後、この断片化した DNA は

より大きな DNA に移行するが、この過程を複製後修復 (post-replication repair) と呼ぶ。複製後修復では、損傷塩基は除去せずに、断片化した DNA どうしを繋げることにより、複製過程で生じたギャップを修復する^{1,2)}。

酵母では、RAD (radiation sensitivity) 遺伝子群として同定された遺伝子の中で、複製後修復に関与する遺伝子群は RAD6 エピスタシス群として分類される。複製後修復経路は、ユビキチンリガーゼ E2-E3 である RAD6-RAD18 複合体による proliferating cell nuclear antigen (PCNA) のモノユビキチン化により制御される。損傷乗り越え DNA 合成 (translesion DNA synthesis, TLS) 経路は RAD6-RAD18 の下流で機能する複製後修復経路の一つである。TLS 経路では、特殊な DNA ポリメラーゼ (TLS ポリメラーゼ) が、損傷塩基を鋳型とした DNA 合成反応により、DNA 複製を回復する^{1,2)}。

酵母の REV1 遺伝子は、紫外線による突然変異の誘発が抑制される変異体として同定された。rev1 株では、紫外線や電離放射線をはじめ、様々な種類の薬剤による突然変異の誘発が抑制され、同時にそれら薬剤に対する感受性が増大する³⁾。Lawrence のグループは 1996 年に酵母の REV1 タンパク質が DNA 損傷の一つ、脱塩基部位 (DNA 上の塩基が脱離しデオキシリボースだけになった状態の DNA 損傷) に対して、dCMP を対合するデオキシシチジルトランスフェラーゼであることを発見した⁴⁾。

一方、色素性乾皮症バリエーション群 (XP-V) に分類される患者由来の細胞では、紫外線による誘発突然変異頻度が高いこと、紫外線照射後の複製後修復に欠損のあることが知られていた²⁾。花岡のグループは 1999 年に XP-V の責任遺伝子がシクロブタン型チミンダイマーに対して dAMP を対合する活性をもつ pol η をコードすることを明らかにした⁵⁾。TLS 経路で機能するこれらの酵素は構造的に類似しており、Y-ファミリーの DNA ポリメラーゼとして分類されている⁶⁾。XP-V の患者由来の細胞では pol η の代わりに、別の TLS ポリメラーゼが働き、dAMP 以外の塩基を挿入した結果、突然変異頻度が上昇すると考えられている²⁾。

Y-ファミリーの DNA ポリメラーゼは、原核生物から高等真核生物まで広く保存されており、ヒトでは pol η , pol ι , pol κ , REV1 の 4 種類が存在する (図 1)⁶⁾。REV1 は Y-ファミリーのメンバーではあるが、その活性は dCMP 転移活性に限られ、他の基質 dATP, dGTP, dTTP に対する親和性は極めて低く、実質上ポリメラーゼ活性はない。真核生物のポリメラーゼでは、触媒ドメイン以外にも多くの類似

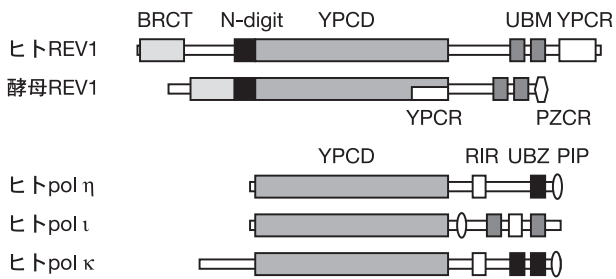


図1 Y-ファミリー DNA ポリメラーゼの構造

BRCT: BRCA1 C-terminus domain, YPCD: Y-family DNA polymerase catalytic domain, YPCR; Y-family DNA polymerase contacting region, PZCR: polymerase ζ contacting region, UBM: ubiquitin binding motif, UBZ: ubiquitin binding Zn finger, PIP: PCNA interacting protein box, RIR: REV1 interacting region.

点がある (図1)⁶⁾。ユビキチン結合ドメイン (UBM または UBZ)、PCNA と結合する配列 (PIP box) は、Y-ファミリーのポリメラーゼが損傷部位で機能する際、ユビキチン化された PCNA と相互作用するために必要であると考えられている。また、全てのポリメラーゼには REV1 と相互作用する領域が同定されているが、この相互作用の意義は今のところ不明である。

3. TLS 酵素としての REV1 の構造と機能

REV1 の dCMP 転移活性は、鋳型 G に対する効率が最も高いが、損傷部位としては脱塩基部位に対して効率よく dCMP を対合する^{4,7)}。REV1 が dCTP を認識する分子機構はとてもユニークである。REV1 は触媒ドメインの N 末端側に REV1 に特徴的なドメイン (N-digit) をもち、この中のアルギニン残基がシトシンとの水素結合により dCTP を認識する。一方、鋳型 G は外側に追い出され、空いた間隙はアルギニン残基に隣接するロイシン酸残基により占められる⁶⁾。脱塩基部位に対する結合もこのロイシン残基により安定化されるものと思われる。生体内では、DNA 上のあらゆる塩基が脱離することによって脱塩基部位が生じると考えられ、脱塩基部位に対する dCMP の取り込みは、塩基置換の原因となりうる³⁾。REV1 は dCTP の選択性に関してとても巧妙な構造をもつが、なぜ取り込まれる塩基が dCMP であるのか、その生物学的理由は明らかでない。

REV1 の dCMP 転移活性が、細胞内で TLS に機能しているという証拠は、酵母を使った研究から示されている。Dempfle のグループは、チミンまたはシトシン塩基を DNA から除去する活性を獲得した変異型 DNA グリコシラーゼを酵母で発現させ、生じた脱塩基部位に挿入される塩基を解析した⁸⁾。その結果、どちらのグリコシラーゼを発現さ

せた場合にも突然変異頻度が上昇し、その大部分に REV1 依存的な dCMP の挿入が観察された。

4. REV1 の第二の機能と構造

酵母では REV1 遺伝子が欠損すると様々な DNA 損傷に対して感受性となると同時に、突然変異の誘発が抑制される。実際に、T-T (6-4) 光産物を含むプラスミドを酵母に導入しその TLS を解析すると、約 7 割のケースで dAMP の取り込みによる正しい TLS が観察され、3 割のケースで dTMP または dGMP の挿入による誤った TLS が観察される。興味深いことに、どちらの TLS も REV1 依存的であるにもかかわらず、dCMP の挿入が観察されない。さらに、この TLS には REV1 の触媒活性は必要なく、むしろ BRCT ドメインが必要であることから、REV1 の第二の機能と呼ばれている³⁾。REV1 が関与する多くの TLS と突然変異誘発は、この第二の機能が関わっている。

酵母の遺伝学的解析では、REV1 は他の REV 遺伝子、REV3、REV7 とエピスタティックである。したがって、突然変異誘発における REV1 の機能 (REV1 の第二の機能) は REV3、REV7 と同一の生化学的過程にあると予想される³⁾。REV3 は pol ζ の触媒サブユニット、REV7 は非触媒サブユニットをコードし、安定な複合体 pol ζ を構成する。pol ζ は Y-ファミリーの TLS ポリメラーゼとは構造的に異なったもう一つの TLS ポリメラーゼである³⁾。酵母の REV1 では、pol ζ と相互作用する部位が同定され (図1)、REV1 による pol ζ の活性促進が観察される。また、その領域を欠失した REV1 では紫外線感受性を示すと同時に、突然変異の誘発が見られないことから、REV1 の第二の機能のある部分は、この相互作用を介した pol ζ の活性促進によるものであると考えられる⁹⁾。しかしヒトにおいては、REV1 と pol ζ との相互作用は明らかになっていない。

REV1 に特徴的なもう一つの構造として、他の Y-ファミリーのポリメラーゼと相互作用する領域が同定されている (図1)⁶⁾。この領域は、REV7 と結合することにより REV1-REV7 複合体の構成にも必要とされる^{10,11)}。不思議なことに REV7 は REV1 の dCMP 転移活性に全く影響を与えない¹¹⁾。また、REV7 の結合は REV1 と他の Y-ファミリーポリメラーゼとの相互作用を阻害する⁶⁾。これらの結果は、TLS におけるポリメラーゼの選択等の調節に REV7 が関与することを示唆するのかもしれない。

REV1 は他のポリメラーゼとは異なり、PCNA と相互作用する PIP box が見いだされない。実際に、酵母 REV1 は PCNA により活性化されないという報告があり¹²⁾、我々も

ヒト REV1 で同様の結果を得ている。一方で、PCNA が酵母 REV1 の C 末端側と相互作用し、活性化するという報告もある¹³⁾。この活性化は、ユビキチン化された PCNA によりさらに促進され、REV1 の UBM に依存する。この結果は酵母の遺伝学によっても支持され、UBM を欠失した *rev1* では紫外線感受性を示すと同時に突然変異が誘発されない。一方これらの結果に反して、マウス Rev1 では BRCT ドメインが PCNA と相互作用するとの報告もあり¹⁴⁾、これらの矛盾が解決されるためにはさらなる解析が必要である。

5. REV1 の単鎖 DNA 結合活性

我々は、REV1 が単鎖 DNA 結合活性をもつことを見いだした¹⁵⁾。この活性が REV1 の dCMP 転移反応にどのように作用するかを調べるために、長さの違う 3 種類のプライマーテンプレートを作成した (図 2Aa-c 下段)。これらのプライマーテンプレートと REV1 を反応させると全て同等に dCMP が重合された (図 2Aa-c)。また、短い鑄型からなる二つのプライマーテンプレートを同時に反応させると REV1 は両方のプライマー末端に同様に dCMP を重合した (図 2Ad)。ところが長い鑄型と短い鑄型からなるプライマーテンプレートを同時に反応させると、長い鑄型からなるプライマーに選択的に反応が観察された (図 2Ae) これらの結果は、単鎖 DNA に結合した REV1 はその単鎖 DNA 上にあるプライマー末端に選択的にターゲティング

されることを示しており、この過程で REV1 は単鎖 DNA 上をスライディングしていると思われる。この性質は欠失型 REV1 (M5) で消失し (図 2BC)、pol η では観察されないことから¹⁵⁾、REV1 特異的である。これらの結果は、REV1 の最初のターゲットが単鎖 DNA である可能性を示唆する¹⁵⁾。

おわりに

REV1 の構造とその生化学的特性は酵母からヒトまでとてもよく保存されていることが明らかとなった。REV1 は様々なタンパク質と相互作用し、Y-ファミリーのメンバーの中では、構造的、機能的に特殊な存在である。これらの相互作用は、TLS を制御するためのものであると考えられる。しかし、これまでに報告されている実験結果は依然断片的であり、REV1 と突然変異誘発機構の全体像解明にはさらなる研究が必要である。

- 1) Andersen, P.L., Xu, F., & Xiao, W. (2008) *Cell Res.*, 18, 162-173.
- 2) Lehmann, A.R., Niimi, A., Ogi, T., Brown, S., Sabbioneda, S., Wing, J.F., Kannouche, P.L., & Green, C.M. (2007) *DNA Repair (Amst.)*, 6, 891-899.
- 3) Lawrence, C.W. (2002) *DNA Repair (Amst.)*, 1, 425-435.
- 4) Nelson, J.R., Lawrence, C.W., & Hinkle, D.C. (1996) *Nature*, 382, 729-731.
- 5) Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K., & Hanaoka, F.

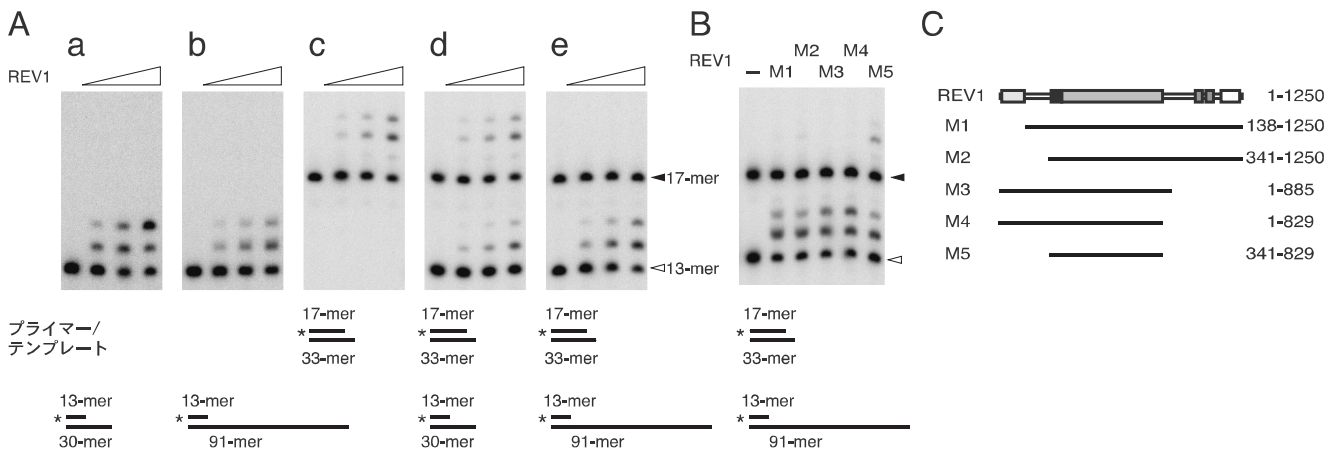


図 2 単鎖 DNA を介した REV1 のターゲティング

A. REV1 の dCMP 転移反応における選択的反応性。 ³²P で標識した (*) 様々な長さのプライマーテンプレート (下段に記載) と REV1 を反応させた。

B. 欠失型 REV1 の dCMP 転移反応における選択的反応性。下段に示したプライマーテンプレートと欠失型 REV1 を反応させた。反応産物は変性アクリルアミドゲル電気泳動後、オートラジオグラムにより解析した。

C. 欠失型 REV1 の構造。

- (1999) *Nature*, **399**, 700–704.
- 6) Yang, W. & Woodgate, R. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **104**, 15591–15598.
- 7) Masuda, Y. & Kamiya, K. (2002) *FEBS Lett.*, **520**, 88–92.
- 8) Auerbach, P., Bennett, R.A., Bailey, E.A., Krokan, H.E., & Demple, B. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **102**, 17711–17716.
- 9) Acharya, N., Johnson, R.E., Prakash, S., & Prakash, L. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 9555–9563.
- 10) Murakumo, Y., Roth, T., Ishii, H., Rasio, D., Numata, S., Croce, C.M., & Fishel, R. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 4391–4397.
- 11) Masuda, Y., Ohmae, M., Masuda, K., & Kamiya, K. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 12356–12360.
- 12) Haracska, L., Unk, I., Prakash, L., & Prakash, S. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **103**, 6477–6482.
- 13) Wood, A., Garg, P., & Burgers, P.M. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 20256–20263.
- 14) Guo, C., Sonoda, E., Tang, T.S., Parker, J.L., Bielen, A.B., Takeda, S., Ulrich, H.D., & Friedberg, E.C. (2006) *Mol. Cell*, **23**, 265–271.
- 15) Masuda, Y. & Kamiya, K. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 24314–24321.

増田 雄司, 神谷 研二
 (広島大学原爆放射線医科学研究所
 分子発がん制御研究分野)

Induced mutagenesis and translesion DNA synthesis—structure and function of REV1—

Yuji Masuda and Kenji Kamiya (Department of Experimental Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan)

[Fe]-ヒドロゲナーゼ (Hmd) の構造解析から見えてきたヒドロゲナーゼ活性中心の収斂進化

はじめに

ヒドロゲナーゼは水素ガス (H_2) を活性化し、ヒドリドとプロトンに分解する反応を触媒する酵素である。多くのヒドロゲナーゼはヒドリドをさらに分解し、二つの電子とプロトンにする。その触媒反応は可逆であり、逆反応では H_2 が生産される¹⁾。ヒドロゲナーゼのバイオテクノロジーへの応用として、燃料電池電極や水素生産の触媒としての活用が注目されている²⁾。

自然界において、ヒドロゲナーゼは微生物生態系の水素

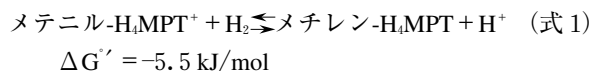
代謝で重要な役割を担っている。嫌気条件下、有機物は細菌や原生動物などによって分解され、有機酸や H_2 になる。ここで大量の H_2 が発生するが ($\sim 10^8$ トン/年)³⁾、 H_2 はメタンや酢酸の生産および硫酸塩の還元に使われるため、環境中に存在する H_2 濃度は低く保たれている。一部の H_2 は好気環境に分散し、そこで好気性細菌によって酸化される⁴⁾。ヒドロゲナーゼはこれらの水素代謝系で、 H_2 の生産と酸化を触媒する。

ヒドロゲナーゼはおよそ 80 年前に発見され、これまでに [NiFe]ヒドロゲナーゼと [FeFe]ヒドロゲナーゼという 2 種類がよく研究されてきた。名称からも明らかのように、活性中心に含まれる金属の種類が異なり、前者はニッケルと鉄を、後者は 2 原子の鉄を含んでいる (図 1)^{5–7)}。20 年ほど前、メタン菌から新しいタイプのヒドロゲナーゼが発見された。この新規酵素はひとつの鉄のみを活性中心に含んでいることから、[Fe]ヒドロゲナーゼ (Hmd) と呼ばれている (図 1)⁴⁾。

本稿では、Hmd の活性中心に関する知見を概説した後、ヒドロゲナーゼの特徴的な鉄錯体構造から、3 種類のヒドロゲナーゼの進化について述べる。

1. [Fe]-ヒドロゲナーゼ (Hmd) の機能と性質

[Fe]ヒドロゲナーゼの分類名は H_2 -forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase で、略称は Hmd である。その触媒反応では、 H_2 を活性化してヒドリドとプロトンに分解し、ヒドリドをメチレンテトラヒドロメタノプテリン (メチレン- H_2 MPT⁺) に転移し、メチレンテトラヒドロメタノプテリン (メチレン- H_2 MPT) をつくる。逆反応では、メチレン- H_2 MPT とプロトンから水素ガスを発生する (式 1)⁴⁾。



テトラヒドロメタノプテリンはメタン菌の C1 キャリヤーであり、Hmd の触媒する反応はメタン生成代謝に含まれる。Hmd は水素利用性のメタン菌のいくつかに見出されているが、*Methanothermobacter marburgensis* 由来の酵素がよく研究されている。このメタン菌では、培地中のニッケルが制限された条件 (50nM 以下) で Hmd が大量に生産され、全タンパク質の 5% を超えることが知られている⁸⁾。

Hmd は分子量 38,000 のサブユニットのホモ二量体となり、2 分子の鉄コファクター (FeGP コファクター) を含んでいる。FeGP コファクターはピリジノール環が GMP