

DNA 修復酵素の遺伝子のクローニング と DNA 修復欠損遺伝病の解析

関 口 睦 夫
(九州大学理学部教授)

A. 研 究 目 的

DNA に生じた損傷は細胞内の種々の機構によって修復されているが、なかでも除去修復はエラーの少ない効率的な機構として知られている。除去修復はいくつかの反応段階よりなるが、これまで主としてその第一段階に集中して研究が進められてきた。それはこの段階を欠損した突然変異体が、大腸菌からヒトに至るまで多くの生物で、見いだされたからである。われわれは先にこの反応を触媒する酵素 (T4 エンドヌクレアーゼ V) を T4 感染大腸菌から分離し、それをヒトの色素性乾皮症 (相補性群 A~E) の患者由来の細胞に注入することにより、それらの細胞に欠けている DNA 修復能を回復させることに成功した。

ところでヒトの遺伝病のなかにはコッケイン症候群のように除去修復の第一段階は正常であるにもかかわらず紫外線感受性が高いものが知られており、また色素性乾皮症のなかでも相補性群 F に属する細胞は除去修復の第一段階の他に第二段階以降にも異常があることを示唆する結果が得られている。しかし除去修復の第二段階以降の反応については、モデルは提出されているものの、実際にどのような酵素が関与するかなど詳しいことはわかっていない。

われわれはこの問題を明らかにするには、まず解析の容易な大腸菌で研究を進め、それに基づいて複雑なヒトの細胞を解析するのが有効と考えた。そこで大腸菌のなかで除去修復の第二段階に関与すると考えられる遺伝子 *uvrD* をクローニングし、その遺伝子産物を同定するとともにその酵素活性を明らかにした。さらに同様な酵素活性がヒトの細胞にも存在するかどうか調べた。

B. 研 究 成 果

われわれは *in vivo* および *in vitro* の DNA 組換え実験を併用して、*uvrD* 遺伝子のクローニングを試みた。その結果 *uvrD* 遺伝子をもつ 12kb の大腸菌染色体断片をバクテリオファージ λ に挿入し、*uvrD* 形質導入ファージ (λ *uvrD*⁺) を得ることができた。このファージが溶原化した *uvrD* ミュータントは、紫外線感受性、ミューテーター活性、条件致死性のいずれにおいても *uvrD*⁺ 株と同じ性質を示した。

uvrD 遺伝子をもつ DNA 断片は別にプラスミド pKY2289 に挿入し、クローニングした。*uvrD*⁺ プラスミドをもつ菌の場合にも、紫外線抵抗性が増したが、その増加の程度はファージ

の場合に比べて低く、 $uvrD^+$ プラスミドをもつ $uvrD^-$ 株の紫外線感受性はプラスミドをもたない $uvrD^-$ 株と野生株のほぼ中間であった。また $uvrD^+$ プラスミドを野生株に移入するとその紫外線感受性が増すことがわかった。 $uvrD^-$ プラスミドは細胞内に10コピー以上存在し、その結果遺伝子産物の量も増すので、過剰の $uvrD$ 遺伝子産物は細胞の DNA 修復能を低めるのではないかと考えられる。

$uvrD^+$ プラスミドをもつ大腸菌の抽出液から硫酸分画、ホスホセルロースおよび DEAE セルロースのクロマトグラフィーを通じてほぼ純粋な段階まで $uvrD$ 蛋白を精製した。この標品を SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかけたところ、75,000の分子量に相当する単一のバンドが検出された。

精製した $uvrD$ 蛋白は $\phi X174$ フェージの DNA、加熱して変性した二本鎖 DNA あるいはポリ (dT) が存在すると ATP を分解したが、二本鎖の $\phi X174$ の DNA (RF) 存在下では ATPase 活性を示さなかった。 $uvrD$ 蛋白は一本鎖 DNA に結合する能力をもっていた。しかし DNA を分解するヌクレアーゼ活性はもっていなかった。

$uvrD$ 蛋白は ATP のエネルギーを使って DNA の構造変換を行っている可能性があるの、次に DNA の二本鎖をほどいて一本鎖にするヘリカーゼ活性を調べた。アイソトープでラベルした $\phi X174$ の RF の制限酵素断片を環状一本鎖 $\phi X174$ DNA にアニールしたものを基質として、2つの方法でヘリカーゼ活性を測定した。第一の方法ではアイソトープでラベルした DNA が SI ヌクレアーゼ感受性になるかどうかを調べ、第二の方法では短鎖 DNA 断片が大きな環状 DNA から遊離するかどうかを蔗糖勾配遠心で調べた。その結果いずれの方法でも $uvrD$ 蛋白がヘリカーゼ活性をもつことが示された。SI ヌクレアーゼ法による測定の結果から、 $uvrD$ 蛋白の濃度が増すにつれて一本鎖の部分が増すこと、反応には ATP が必要なことがわかった。

大腸菌にはこれまで DNA ヘリカーゼ活性を示す蛋白が4種知られている。そのうち rep 蛋白質は rep 遺伝子の産物であることが示されており、最近ヘリカーゼ I は F プラスミドの tra I でコードされていることがわかった。ヘリカーゼ II とヘリカーゼ III の遺伝子は知られていないが、分子量やクロマトグラフィーの性質からみて、 $uvrD$ 蛋白はヘリカーゼ II とよく似ている。そこで、ヘリカーゼ II に対する抗体を西独マックスプランク研究所の Hoffmann-Berling 博士から供与をうけ、 $uvrD$ 蛋白に対する作用を調べた。その結果 $uvrD$ 蛋白の ATPase 活性、ヘリカーゼ活性ともに抗ヘリカーゼ II 抗体で特異的に失活することがわかった。

上に述べた実験から DNA 依存性 ATPase が DNA の修復に関与していることが示唆された。 $uvrD^-$ ミュータントの性質から考えると、この活性は DNA の組換えや複製にも関与している可能性が高い。そこで同様な活性がヒトの細胞に存在するかどうか調べた。

培養細胞 KB 株の抽出液を DEAE セルロースにかけ、その汙液をホスホセルロースに吸着し、リン酸カリウムの直線濃度勾配で溶出した。各サンプルについて DNA 依存 ATPase 活

性を測定したところ、3つのはっきりした酵素活性のピークが見い出された。これはヒトの細胞には少なくとも3種の DNA 依存性 ATPase が存在することを示唆する。今後さらに精製を進めて、この点を明確にする必要がある。

C. 研究の考察・将来への展望

大腸菌の *uvrD* 遺伝子の産物は DNA の修復、組換え、複製などの過程に関与することが種々の遺伝的な研究から示唆されていたが、その実体は不明であった。われわれは *uvrD* 遺伝子をクローニングし、それを用いてその遺伝子産物を同定することに成功した。すなわち種々の生化学的、遺伝学的解析の結果、*uvrD* 遺伝子の産物は分子量 75,000 の蛋白質で、DNA 依存性 ATPase とヘリカーゼ活性をもつことが明らかになった。また *uvrD* 蛋白は構成的につくられるが、いわゆる SOS 機構の支配をもうけており、DNA に損傷を与えるような処理によって誘導されることも明らかになった。

大腸菌には少なくとも4種の DNA ヘリカーゼが存在することが知られているが、分子の大きさ、酵素的性質およびクロマトグラフィーにおける挙動、さらに抗ヘリカーゼ II 血清による失活から、*uvrD* 蛋白はヘリカーゼ II と同一であることが明らかになった。これによって除去修復およびミスマッチ修復の過程にヘリカーゼが関与していることが明らかになり、その分子機構を解く重要な手がかりが得られた。

uvrD 蛋白と同様な蛋白質が哺乳動物の細胞でも DNA 修復などにおいて重要な機能を果している可能性があるので、ヒトの細胞における DNA 依存性 ATPase 活性について調べた。その結果ホスホセルロースに吸着する蛋白質のなかに少なくとも3種の異なった溶出パターンを示す酵素が存在することが明らかになった。DNA 修復などに異常をもつミュータントあるいは遺伝病の細胞株と正常のヒトの細胞株の間に、これらの活性の量的あるいは質的な違いがないかどうか調べることは有意義と考えられる。またコッケイン症や色素性乾皮症（相補性群 F など）患者由来の細胞に精製した *uvrD* 蛋白質を移入することによって、遺伝病細胞の病状が緩和されるかどうか調べることは意義があると考えられる。このような点は次年度に研究したい。

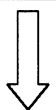
D. 研 究 成 果

The *uvrD* gene of *E. coli*: Molecular cloning and expression, K. Kumura, K. Oeda, M. Akiyama, T. Horiuchi and M. Sekiguchi, Cellular Responses of DNA Damage (eds. E.C. Frienberg and B.R. Bridges), Alan R. Liss, Inc., New York, p. 51~62 (1983).



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



A. 研究目的

DNA に生じた損傷は細胞内の種々の機構によって修復されているが、なかでも除去修復はエラーの少ない効率的な機構として知られている。除去修復はいくつかの反応段階よりなるが、これまで主としてその第一段階に集中して研究が進められてきた。それはこの段階を欠損した突然変異体が、大腸菌からヒトに至るまで多くの生物で、見いだされたからである。われわれは先にこの反応を触媒する酵素(T4 エンドヌクレアーゼ V)を T4 感染大腸菌から分離し、それをヒトの色素性乾皮症(相補性群 A~E)の患者由来の細胞に注入することにより、それらの細胞に欠けている DNA 修復能を回復させることに成功した。

ところでヒトの遺伝病のなかにはコッケイン症候群のように除去修復の第一段階は正常であるにもかかわらず紫外線感受性が高いものが知られており、また色素性乾皮症のなかでも相補性群 F に属する細胞は除去修復の第一段階の他に第二段階以降にも異常があることを示唆する結果が得られている。しかし除去修復の第二段階以降の反応については、モデルは提出されているものの、実際にどのような酵素が関与するかなど詳しいことはわかっていない。

われわれはこの問題を明らかにするには、まず解析の容易な大腸菌で研究を進め、それに基づいて複雑なヒトの細胞を解析するのが有効と考えた。そこで大腸菌のなかで除去修復の第二段階に関与すると考えられる遺伝子 *uvrD* をクローニングし、その遺伝子産物を同定するとともにその酵素活性を明らかにした。さらに同様な酵素活性がヒトの細胞にも存在するかどうか調べた。