

皮膚の老化における染色体構造の 変化と遺伝子修復機構に関する研究

理化学研究所

花岡文雄

Our previous experiments suggest that the length of the linker DNA which connects nucleosomal core particles becomes to be heterogeneous by aging, both *in vivo* and *in vitro* in human skin fibroblasts. In order to get some insight on the relation between growth capacity and the regularity of nucleosome structure, we examined the structural change of lymphocyte chromatin upon growth stimulation with PHA. When chromatin of lymphocytes from peripheral blood was digested with the nuclease, unclear pattern of electrophoresis was observed. However, discrete ladders of nucleosomal DNA were detected in the case of lymphocytes stimulated with PHA for 48h and 96h. Their digestion patterns were similar to those of lymphoma cell lines. These results indicate that the regularity of chromatin structure is closely related to the activity of cell proliferation.

As for the UV damage on the skin, we are investigating the mechanism of nucleotide excision repair. We have purified to homogeneity a repair complex by *in vitro* complementation of the XP-C defect in a cell-free repair system containing UV-damaged SV 40 minichromosomes. The complex has a high affinity for ssDNA and consists of two tightly associated proteins of 125 and 58kd. Subsequent cDNA cloning revealed that the 125kd subunit is a N-terminally extended version of previously reported XPCC gene product which is thought to represent the human homolog of the *S. cerevisiae* repair gene *RAD4*. The 58kd species turned out to be a human homolog of yeast *RAD23*. The 58kd species and yeast *RAD23* share a ubiquitin-like N-terminus. The nature of the XP-C defect implies that the complex exerts a unique function in the genome overall repair pathway which is important for prevention of skin cancer.

1. 緒言

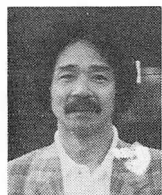
われわれ人間の体全体を覆っている皮膚は体の中で一番大きな器官であり、個体の維持に重要な役割を果たしている。すなわち、外界からの情報に敏感に反応し、体内の環境を一定に維持するための一種のセンサーの役割を果たすと同時に、外界からの物理的・化学的刺激に対して体内を保護

するバリアーとしても働いている。

この皮膚は、上皮組織としての表皮と、結合組織としての真皮からなる。表皮は、その大部分を占める表皮細胞と、そこで作られて、上述のバリアーとしての機能を果たす角質層（ケラチン層）、それに体表から日々剥離していく角質層を補うために、常に細胞分裂を繰り返している表皮最深部の基底細胞とから成り立っている。真皮は膠原繊維を中心とする繊維性結合組織で、ほかに弾性繊維、血管、神経、平滑筋繊維などを含んでいる。

既にわれわれはヒトの皮膚繊維芽細胞が老化に伴って、その細胞機能の中核である染色体構造に変化をきたすことを観察している¹⁾。本研究では、その原因が細胞の増殖能と関係しているかどうかを、ヒト末梢血リンパ球を用いて調べる。同時に紫外線などによる遺伝子の損傷に対し、皮膚

Studies on the Changes in Chromatin Structure during Aging of Human Skin Fibroblasts and the Mechanism of DNA Repair



Fumio Hanaoka

Riken Institute of Physical and Chemical Research

の細胞がどのような修復機構で対処しているかを分子レベルで明らかにするための一つのアプローチとして、われわれの確立した無細胞クロマチン修復系^{2, 3)}の応用を試みる。

2. 実験

2.1 ヌクレオソーム構造の規則性の解析

細胞を界面活性剤を含む等張緩衝液中でホモジナイズすることにより核を調整した。そこにマイクロコッカルヌクレアーゼを加え、37°Cで一定時間保温した。反応後、DNAを抽出・精製しアガロースゲル電気泳動法により分析した。

2.2 無細胞DNA修復系による修復能の検出

SV40のウイルス粒子を弱アルカリ処理することによって得られるミニ染色体に紫外線を照射し、ピリミジン二量体を主とするDNA塩基損傷を導入した。これを、ATPおよび $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPを含むデオキシヌクレオチド基質等の存在下、種々の細胞粗抽出液と反応させた。この時、反応液中には紫外線未照射のプラスミドpUC19を共存させ、内部標準とした。ヌクレオチド除去修復によって損傷が修復されれば、その部分に短いDNA合成が起こり、放射標識されたヌクレオチドが取り込まれることになる。この反応液からDNAを抽出し、制限酵素で直鎖状にした後、アガロースゲル電気泳動でSV40 DNAとpUC19を分離し、オートラジオグラフィを行った。ウイルスDNAへの放射活性の取り込みを、イメージアナライザーによって定量化した。

2.3 XP-C群を相補する蛋白質の精製

上記の無細胞系にXP-C群患者細胞の抽出液を適用し、HeLa細胞の核抽出液を出発材料としてXP-C群の修復欠損を相補する因子を精製した。ホスホセルロース、変性DNAセルロース、CMコスモゲルとMono Qの4段階のカラムクロマトグラフィにより、分子量125Kと58Kの二

種類のポリペプチドを含む画分が得られた。p125/p58複合体をグアニジンによる変性条件下、ゲル濾過HPLCによって分離し、それぞれのポリペプチドをCNBrで分解した後、逆相HPLCによって展開した。p125については一ヶ所、p58については二ヶ所の部分アミノ酸配列を決定した。

2.4 XP-C群を相補する蛋白質のcDNAクローニング

決定されたアミノ酸配列をもとに、p125については2組のオリゴヌクレオチド混合物を合成し、それらを用いたRT-PCRによってDNAプローブを作成した。またp58については複数のオリゴヌクレオチドを合成し、プローブとした。以上のプローブを用い、HeLa細胞のcDNAライブラリーをスクリーニングし、ポジティブなクローンのなかでインサートの最も長いものについて塩基配列を決定した。

3. 結果と考察

3.1 細胞増殖とヌクレオソーム構造の規則性

正常ヒト末梢血リンパ球、T細胞由来CEM細胞、B細胞由来WILL II細胞についてクロマチン構造を比較した。CEM細胞、WILL II細胞の両がん細胞ではヌクレオソームの単量体から6、7量体までの明瞭な階段状のバンドが検出された。一方、正常リンパ球では3、4量体までのヌクレオソームDNAは確認できるものの、全体にバックグラウンドが上がり、不均一な分解様式を示した。正常リンパ球をPHA存在下、48時間、96時間と培養したところ、バンドの位置は変わらず、それぞれのピークの高さが増した(図1)。このことは、増殖能の低い細胞ではヌクレオソームの規則性が低下し、リンカーDNAの長さにバラつきが多くなるが、細胞分裂を繰り返すと、その間にヌクレオソーム間の長さがそろってくることを示している。したがって正常皮膚繊維芽細胞にお

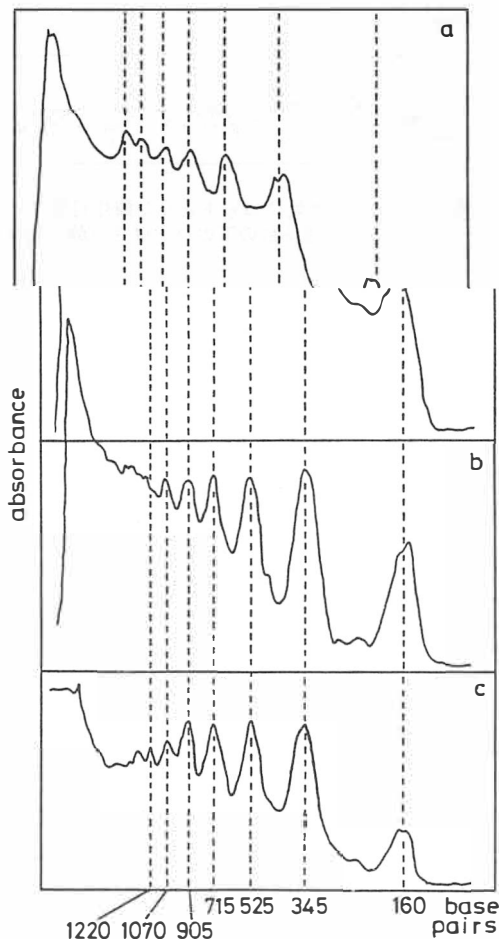


図1 ヒト正常リンパ球の増殖とヌクレオソームの規則性
無処理のヒト正常リンパ球 (a)、同じくPHA処理、48時間 (b) および96時間 (c) のサンプルについて、「実験」の項で述べた方法によりヌクレオソームの規則性を解析した。

いて観察された、老化細胞クロマチンのヌクレオソーム配列の不規則性は、細胞の増殖能の低下によって結果的に引き起こされたものと考えられる。

3.2 無細胞系を用いたXP-C群相補因子の精製

紫外線照射したSV40ミニ染色体を鋳型として用いる無細胞DNA修復系において、ヌクレオチド除去修復機構に欠陥を有するヒト遺伝病、色素性乾皮症 (XP) のAからGまでの七つの相補

性群の細胞抽出液いずれもが、修復正常なヒト293細胞抽出液に比べて低い活性しか示さなかった。また、異なる群のXP細胞抽出液を適当な割合で混合すると相互の欠損が相補され、修復合成活性の回復が見られた³⁾。そこで遺伝子、蛋白質の両方とも解析の遅れていたXP-C群について、相補因子の生化学的な同定を試みた。

修復正常なヒト細胞の核抽出液を出発材料として、4段階のカラムクロマトグラフィーにより得た精製標品は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動上、分子量125Kと58Kの二種類のポリペプチドを含んでいた。この二つのポリペプチドは、ゲル濾過およびグリセロール密度勾配遠心において活性と挙動を共にしたことから、物理的な複合体を形成しているものと考えられる。この因子はXP-C群の細胞抽出液の修復欠損を特異的に相補し、C群以外のXP細胞抽出液による修復合成には全く影響を与えなかった。このことから、本因子がXP-C群の原因因子である可能性が非常に高いと思われた。

3.3 XP-C群相補蛋白質のcDNAクローニング

我々の研究とは独立に、米国テキサス大学のグループがcDNA発現ライブラリーをXP-C群細胞に導入することにより、C群の修復欠損を相補する遺伝子XPCCを単離した⁴⁾。その塩基配列から予想される遺伝子産物は823個のアミノ酸からなる推定分子量93Kの蛋白質で、我々が生化学的に同定した125K、58Kのどちらとも合致しなかった。そこでXPCC遺伝子産物と我々のp125/p58との関係を明らかにするために、cDNAクローニングを行った。

スクリーニングの結果、p125について長さ3.6 kbのcDNAクローンが得られた。その塩基配列を決定したところ、XPCC遺伝子の配列とほぼ一致した。しかしながらp125のcDNAは、既に発表されているXPCCのcDNAよりもN末端が長く、我々が蛋白質レベルで決定したN末端の

アミノ酸配列がXPCCには含まれていなかった。p125のORFはXPCCよりも117個多い940個のアミノ酸からなり、推定分子量は106Kと計算された。

XPCC遺伝子とは出芽酵母のRAD4遺伝子と部分的な相同性を示すことが報告されているが、新たに同定されたN末端部分については既知の蛋白質との相同性は特に見い出されなかった。推定アミノ酸配列より、p125は極めて親水性に富み、またカゼインキナーゼII、Cキナーゼを初めとするプロテインキナーゼによってリン酸化を受ける可能性のある配列を非常に多く含むことが予想された(図2)。

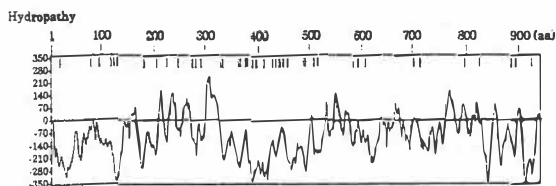


図2 p125の疎水性プロットとリン酸化可能部位
アミノ酸残基数の下のバーはリン酸化可能部位を示す。

一方、p58について2.9kbのcDNAクローンが得られた。その全塩基配列を決定したところ、アミノ酸数409からなる推定分子量43Kの未知の蛋白質をコードしていた。ホモロジー検索の結果、この蛋白質は出芽酵母の第V染色体上のSYGP2遺伝子のORF29と比較的高い相同性を示したが、これが実はDNA修復に関係した遺伝子、RAD23、であることが判明した⁵⁾。p58も酵母のRAD23も、N末端部分がユビキチンと似た配列をしており、その部分の機能に特に興味を持たれる。p125同様、p58についてもカゼインキナーゼII、およびCキナーゼでリン酸化されるアミノ酸配列が数ヶ所見い出された(図3)。そこで精製したXP-C群相補蛋白質を、アガロースビーズに固定したアルカリ性ホスファターゼで処理したところ、相補活性が失われた。このことから、本蛋白質の活性がリン酸化による制御を受け

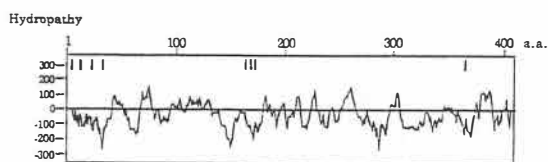


図3 p58の疎水性プロットとリン酸化可能部位
アミノ酸残基数の下のバーはリン酸化可能部位を示す。

ていることが示唆された。

本研究の結果、無細胞DNA修復系を用いて精製されたXP-C群の修復欠損を相補する蛋白質が、遺伝学的に同定されたXPCC遺伝子産物と一致することが分かった。このことは、我々の無細胞系が細胞内のヌクレオチド除去修復反応を忠実に反映していることを改めて示したものである。さらに、XP-C群相補蛋白質のnativeな形を明らかにできたこと、XPCCと新たな蛋白質との相互作用が見い出されたことは、無細胞系を利用することの有用性を証明した。今後、組み換え蛋白質の大量発現、および抗体の作成によって、ヌクレオチド除去修復におけるp125/p58の機能を明らかにしていく予定である。特にXP-C群の細胞は転写とカップルした修復に関しては正常で、転写と無関係に起こる修復に欠陥があることが分かっている。その分子レベルでの解析に興味を持たれる。また上述の脱リン酸化の効果がどちらのコンポーネントによるものなのかを明らかにできるはずである。さらに、この無細胞系を用いることによって、他のXP相補因子を初めとするDNA修復因子を同定することが可能であろう。

文 献

- 1) Ishimi, Y., Kojima, M., Takeuchi, F., Miyamoto, T., Yamada, M. and Hanaoka, F., *Exp. Cell Res.*, 169, 458-467 (1987).
- 2) Sugasawa, K., Masutani, C. and Hanaoka, F., *J. Biol. Chem.*, 268, 9098-9104 (1993).
- 3) Masutani, C., Sugasawa, K., Asahina, H., Taira, K. and Hanaoka, F., *J. Biol. Chem.*,

268, 9105-9109 (1993).

4) Legerski, R. and Peterson, C., Nature, 359, 70
-73 (1992).

5) Melnick, L. and Sherman, F., J. Mol. Biol.,
233, 372-388 (1993).