

紫外線照射で生じる DNA 損傷部に 特異的に結合するタンパク DDBp48 の発現調節

熊本大学 発生医学研究センター

山 泉 克

Cell strains from a subset (Ddb⁻) of individuals carrying XP complementation group E (XPE) lack a damage-specific DNA binding (DDB) activity. Because DDB was reported to recognize many types of DNA lesions and is inducible by treatment with DNA-damaging agents in a p53-dependent manner, DDB was originally expected to play a role in damage recognition prior to nucleotide excision repair. However, recent studies have reported that DDB is not required for nucleotide excision repair *in vitro*. Thus, its function is still remaining uncertain. Here, we reinvestigated the classification of three Ddb⁺ XPE cells and found that they belong to other complementation groups of XP and UVsS. We analyzed the putative p53 responsive element in the intron 4 of the DDB2 gene, and found that it has a weak binding activity to p53 as determined by a gel-shift assay, and that it stimulates transcription of a reporter gene containing the element when co-expressed with wild type p53.

1. 緒 言

太陽紫外線の被曝により、皮膚細胞の DNA にはピリミジン 2 量体や (6-4) 光産物に代表される傷が生じる。これらの傷の蓄積が加齢に伴う皮膚老化の重要な要因と考えられる。DDB (Damaged DNA binding protein) は太陽光による DNA の傷のうち、主として (6-4) 光産物に高い親和性で結合するタンパクとして見つかり、p127 (DDB1) と p48 (DDB2) のヘテロ 2 体であることが既に報告されている。このうち DDB1 は DNA 上の損傷部への結合に関与し、一方 DDB2 は DDB1 の結合活性化に関与しているといわれている。DNA 修復異常症である色素性乾皮症の E 群 (xeroderma pigmentosum E : XPE) の一部に DDB2 欠損が見つかることから、DDB は DNA 修復に関与していると考えられてきた¹⁾。しかし、DNA 修復反応を解析するために開発された *in vitro* での再構成系に DDB は不要なことから、その機能はごく最近まで不明であった。我々はこのタンパクが欠損すると (6-4) 光産物の修復効率が低下し、長時間にわたって傷が残存することを見出した²⁾。興味深いことに DDB は細胞周期の G1 期から S 期への移行に重要な役割を担う転写因子 E2F と結合してその転写活性を調節していること、更にがん抑制遺伝子 p53 により p48 自身の発現が調節されていることが相次いで見つかり、その発現調節機構が注目されている。我々は DDBp48 遺伝子の全塩基配列を決定する過程で、イントロンの 1 つに p53 結合配列 (p53 responsive element:

p53RE) に適合する配列を見出している。本研究は、XPE と DDB2 との関係を明らかにした上で DDBp48 の調節機構を解明し、これを基盤としてその発現を人為的にコントロールすることで皮膚の老化等の防止に応用可能かどうかを検討するために企画された。

2. 実 験

2.1 DNA 修復異常の検出

既に XPE と診断された患者のうち、DDB 活性 (+) の細胞株 3 株について、DNA 修復異常の指標ではある不定期 DNA 合成能 (UDS)、RNA 合成能の回復 (RRS)、S 期 DNA 合成能 (RDS)、及び複製後修復能 (PRR) を細胞レベルでのオートラジオグラフィ (UDS、RRS、RDS) ならびにアルカリ蔗糖密度勾配遠心法 (PRR) で解析した。また紫外線に対する感受性はコロニー形成法で調べた。DDB2 遺伝子の変異はゲノム DNA の各部分を PCR で増幅した後、センス鎖・アンチセンス鎖について塩基配列を決定して調べた。一部の細胞については既知相補性群に属する細胞との融合細胞を用いて UDS、RRS、RDS を指標として相補性テストを行った。

2.2 紫外線照射後の DDB2 の転写活性化

正常ヒト繊維芽細胞に 20 J/m² の UVC を照射し、その後の DDB2 mRNA の転写量の経時的変化を Northern blot により検討した。陽性コントロールとして p53 により転写活性化を受ける p21/WAF1 の mRNA 転写量の変化を観察した。

2.3 DDB2 の p53RE と GST-p53 との結合

ゲルシフトアッセイにより放射性同位元素で標識した (RI 標識) DDB2 の p53RE と大腸菌で作製した GST-p53 融合蛋白質との結合を検討した。RI 標識した DDB2 の p53RE をプローブとして、GST-p53 と混合した後、ゲル



Regulation of expression of the UV-induced damage-specific DNA binding protein, DDBp48

Masaru Yamaizumi

Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University

電気泳動で分離し、オートラジオグラフィー上で GST-p53 と DDB2p53RE との特異的結合の有無を調べた。陽性コントロールとしては既に p53 との結合が明らかになっている p21/WAF1 遺伝子に含まれる p53 コンセンサス配列 (p53CON) を用いた。

2. 4 DDB2 の p53RE の転写活性化能

ルシフェラーゼアッセイにより DDB2 の p53RE の転写活性化能を検討した。このため p53 を発現するプラスミドと、minimal heat shock promoter で制御されるホタルルシフェラーゼの発現プラスミドの 5' 側上流に DDB2 の p53RE を組み込んだものを骨肉腫由来細胞株 Saos2 (内因性の p53 を欠損する) に一過性に共発現させ、p53 による転写活性をルシフェラーゼの発光強度としてルミノメーターで計測した。この時、内部コントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼ (ホタルルシフェラーゼとは発光基質が異なる) を発現するプラスミドを同時に導入して、遺伝子導入効率のサンプル間での誤差を補正した。p53 は野性型及び 273 番目のアルギニンをヒスチジンに置換したもの (R273H; 転写活性を欠損する) を対照として用いた。p53 転写調節を受ける陽性コントロールとしては p21/WAF1 遺伝子の p53 RE を DDB2 と同様に組み込んだプラスミドを用いた。

3. 結果と考察

3. 1 DDB(+) の XPE 群について

これまで DDB(+) の XPE 細胞として報告されていた 3 株 (XP24TO, XP43TO, XP89TO) について、再度の詳細な細胞生物学的解析を行った³⁾。表 1 に示すように、XP24TO については UDS、RDS いずれも正常で、RRS の著明な低下が認められ、相補性テストの結果 UVsS と判定された。XP43TO は UDS、RRS は正常で RDS の低下が認められ、カフェイン存在下での紫外線感受性の増

加のあることから XPV と判定された。XP89TO は RRS、RDS は正常で UDS の低下があり、相補性テストの結果 XPF と判定された。従来 XPE には DDEB (+) のものと DDB (-) の明らかな生化学的な多様性があることから、DDB と XPE 遺伝子との対応が大問題となってきたが、今回得られた解析結果より、少なくとも我々の調べた範囲内ではすべての XPE については DDB2 遺伝子に異常が見つかり、DDB(+) の XPE については診断のまちがいによる可能性が高まった。このことは今後 XPE の原因及び病態を考える上で極めて重要な結果と考える。

3. 2 紫外線照射後の DDB2 の転写活性化

DDB2 mRNA の転写活性化は UVC 照射 16 時間後より認められた (図 1)。対照として p21/WAF1 mRNA の転写量を同時に観察したが、UVC 照射 8 時間後より増加が観察され、DDB2 は紫外線照射後、p21/WAF1 より遅れて転写が活性化されることがわかった。DDB2 の転写量が p21/WAF1 と同じく p53 によって制御されるのであればどのようにしてその転写活性化の遅延がもたらされるのか興味深い。

3. 3 DDB2 の p53RE と GST-p53 との結合

DDB2 遺伝子のほぼ全域にわたるゲノム塩基配列を決定して、p53 結合配列 (p53RE) を検索したところ、第 4 イントロン内に 1 ケ所 p53RE に合致する配列を見出した (図 2)。ゲルシフトアッセイではこの DDB2 の予想 p53RE と GST-p53 との結合、及び抗 p53(421) 抗体によるスーパーシフト、非 RI プローブによる競合阻害が確認された (図 3)。しかしながら DDB2 の p53RE と p53 との結合は p21/WAF1 の p53CON と比較して明らかに弱かった。

3. 4 DDB2 の p53RE の転写活性化能

ルシフェラーゼアッセイにより DDB2 の p53RE は p53

表 1 Ddb⁺ を示す XPE 細胞の特長と相補性テストのまとめ

Cell strain	NER ^a	PRR ^b	UV sensitivity ^c	DDB activity ^d	Mutations in DDB2 gene	Proposed complementation group
XP24KO	Normal	ND ^e	+	+ ^g	ND ^e	UV ^s S
XP43TO	Normal	Abnormal	+ ^f	ND ^e	ND ^e	XPV
XP82TO	Near normal	Normal	-	- ^{h,i}	A730G ^k	XPE
XP89TO	Significantly reduced	ND ^e	+	+ ^h	None ^k	XPF
GM02415B	Near normal	Normal	-	- ^j	G818A ^k	XPE

^aNER (nucleotide-excision-repair) determined by UDS (unscheduled DNA synthesis) levels.

^bPRR determined by PRR and RDS (recovery of replicative DNA synthesis) assays.

^cUV sensitivity measured by a colony-forming assay with/without caffeine.

^dDDB (damage-specific DNA binding) activity assayed by an electrophoretic mobility shift assay.

^eNot determined.

^fUV sensitivity was observed in the presence of caffeine.

^gKataoka and Fujiwara, 1991.

^hKeeney *et al.*, 1992.

ⁱItoh *et al.*, 1999.

^jChu and Chang, 1988.

^kNichols *et al.*, 1996.

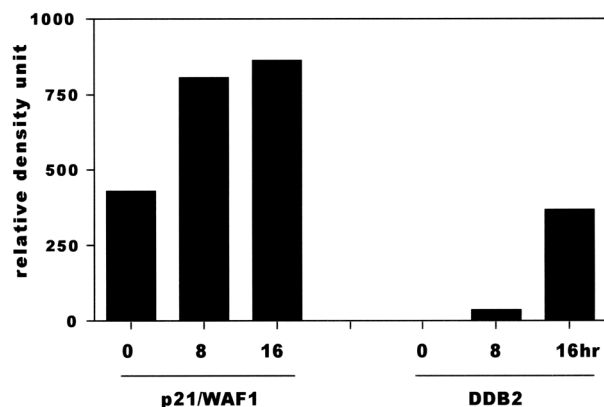


図1 紫外線照射後の DDB2 の転写活性化

ヒト繊維芽細胞に 20J/m² の UVC を照射し、各時間毎に回収した total RNA による Northern blot により観察される DDB2, p21 のバンド濃度をデンストメーターで測定したもの。

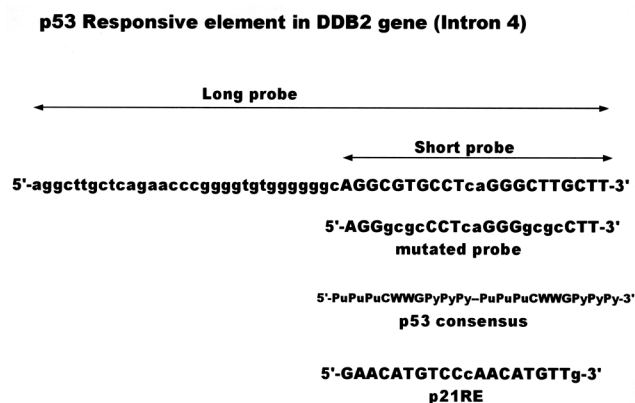


図2 ゲルシフトアッセイ、ルシフェラーゼアッセイに用いた DDB2, p21 由来の p53-responsive element (p53RE)。DDB2 では p53 consensus に相当するショートプローブとその近傍の配列も含むロングプローブを用いた。参考のため p53 コンセンサス塩基配列と p21/WAF1 の p53RE(p53CON) を示す。

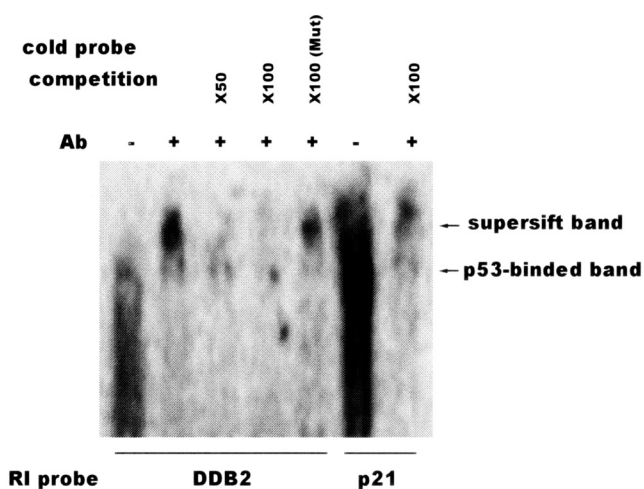


図3 DDB2・p21/WAF1 の p53RE をプローブとして用いたゲルシフトアッセイ。非 RI プローブによる競合、抗 p53 抗体 (421Ab) 添加によるスーパーシフトが観察される。

の発現に伴い転写が増大することがわかった。しかしながらその活性化能は p21/WAF1 の p53CON による転写活性化能よりかなり弱かった (図4)。さらに DDB2 の p53RE の 5' 側の近傍に p53CON の片側に合致する 10 塩基の配列が見つかるが、この部分まで含む配列を用いた場合には p53RE が全く挿入されていないルシフェラーゼ発

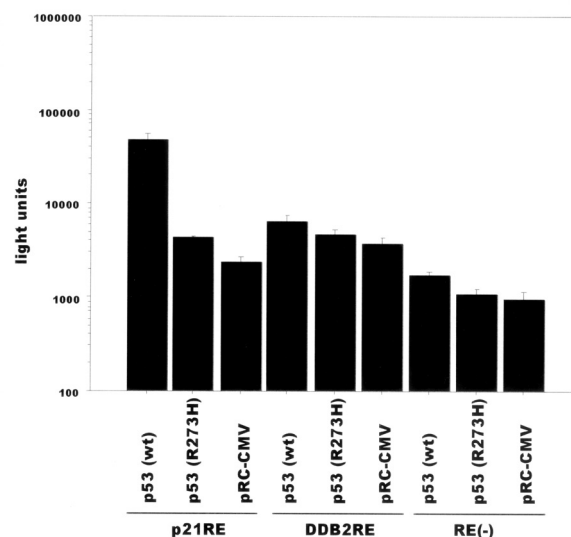


図4 DDB2 由来の p53RE をエンハンサーとして用いた場合の p53 による転写活性化をルシフェラーゼ活性として測定した。陽性コントロールは p21/WAF1 由来の p53CON。陰性コントロールはエンハンサーを持たないルシフェラーゼ発現プラスミドを使用している。p53 は野生型 (wt) の他、転写活性化能が低下する変異体 (R273H)、p53ORF を持たないベクターのみ (pRC-CMV) を同時に Saos-2 に導入している。

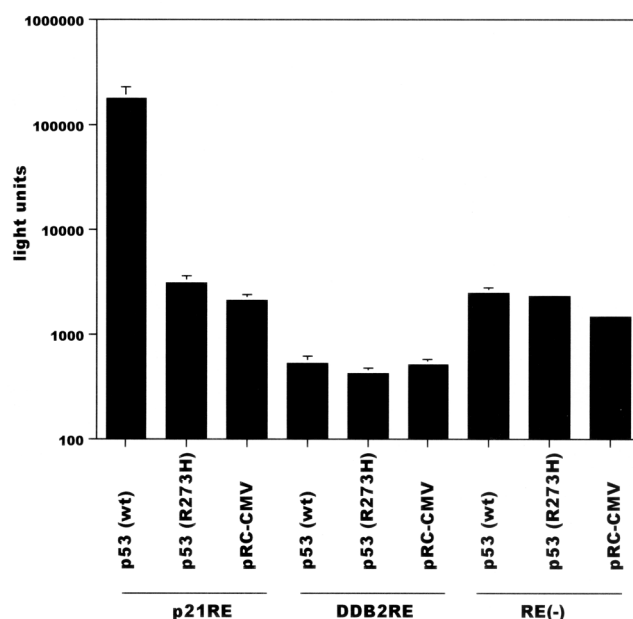


図5 DDB2 由来の p53RE の周辺領域をエンハンサーとして用いた場合の p53 による転写活性化をルシフェラーゼ活性として測定。

現プラスミドを陰性コントロールとして用いた場合以下のルシフェラーゼ活性を呈した (図5)。

4. 総 括

紫外線照射後の DDB2 の転写活性化は、同じく p53 により転写の活性化を受ける p21/WAF1 よりかなり遅れて起こっていた。DDB2 遺伝子のイントロン4に存在する p53 RE の p53 結合性はゲルシフトアッセイにより確認され、その転写活性化能もルシフェラーゼアッセイにより確認されたが、その活性化能は p21/WAF1 の p53CON と比較すると相当弱く、更に DDB2 遺伝子の p53RE 近傍の配列も含めてルシフェラーゼアッセイを行うと陰性コントロール以下の転写活性化能を示した。これらのことから、DDB2 遺伝子のイントロン4に存在する p53RE は、活性化した p53 により弱い活性化を受け、しかも p53 近傍の配列により抑制的な調節を受けていることが考えられた。p21/WAF1 の p53CON と比較した場合、DDB2 の p53RE としての活性は弱く、しかもその周辺の配列により抑制的な調節を受けていることが、紫外線照射後の DDB2mRNA 転写量の増加が p21/WAF1 の場合と比較して微弱で、しかもかなり遅く起こることの原因である可能性が考えられる。

DDB2 は E2F1 (DNA 合成関連遺伝子の発現を positive に制御する転写因子) の co-activator であることが報告されている⁴⁾。細胞周期の進行を止める方向に働く p53 により何故 E2F1 の co-activator といわれる DDB2 の転写が誘導されるのか、一見矛盾しているようであるが、DNA 損傷後の p53 と DDB2 の発現のタイムコースのズレがここで重要なものかもしれない。DDB2 による E2F1 の活性化は、E2F1 の抑制機能を持つ Rb 蛋白の共存下でも認められる事より、通常の細胞周期中でも何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。

ヒト培養細胞において紫外線で傷害された DNA の global genomic repair に p53 が要求されるが、そのメカニズムの詳細は不明である。本研究は独自に得た DDB2 遺伝子の塩基配列情報をもとに、その CON 配列の機能を解析する事でヌクレオチド除去修復系の制御に於ける p53 の役割を明らかにする足がかりを与えるものと考え。

今後の課題としては、

1) DDB2 転写調節機構の解析：

ヒト初代培養線維芽細胞に DNA 損傷を伴わない細胞ストレス (熱ショック、浸透圧ショック等) で p53 を誘導した場合と、逆にテトラサイクリンで p53 の発現を誘導できる培養細胞に UV 照射した場合の DDB2 発現の

タイムコース及び E2F1 制御下の DNA ポリメラーゼ α 、dihydrofolate reductase 等の mRNA、もしくは蛋白の発現のタイムコースを調べ、DNA 傷害の有無により DDB2 発現や E2F1 活性が p53 により誘導されるタイムコースに違いが生じないか確認する。

2) DDB2 転写調節機構の解析：

1. 細胞周期や DNA 損傷で DDB2 の転写が正・負に調節されている事がわかれば、これに関与するシス・及びトランスエレメントの解析を行う。すなわち DDB2 遺伝子のプロモーター領域の紫外線照射前後の細胞抽出液を用いたフットプリント解析、サウスウェスタン法によりその発現を制御する p53 以外の転写因子の同定を試みる。

2. Yeast two-hybrid system により DDB2 と結合する蛋白質を検索し、その中から DDB2 の E2F1 転写活性化能に影響を与える転写調節因子を同定する。指標には E2F1 プロモーターにより制御されるルシフェラーゼ活性を用いて、DDB2 と共発現させた場合にその活性が修飾されるものを探す。

3) 細胞周期に伴う発現パターンの解析：

ヒト初代培養線維芽細胞の血清除去による同調系を用いて、細胞周期特異的な UV-DDB 活性の変動がないか、特に G1/S 期での増加の有無を検討する。

といった研究が必要と思われる。

(参考文献)

- 1) Nichols A.F, itoh T, Graham J.A, Liu W., Yamaizumi M, Linn S: Human damage-specific DNA binding protein p48. J. Biol. Chem., 275, 21422-1428, 2000.
- 2) Itoh T, Mori T, ohkubo H, Yamaizumi M: A newly identified patient with clinical xeroderma pigmentosum phenotype has a non-sense mutation in the DDB2 gene and incomplete repair in (6-4) photoproducts. J. Invest. Derm., 113, 251-257, 1999.
- 3) Itoh T, linn S, ono T, Yamaizumi M: Reinvestigation of the classification of five cell strains of xeroderma pigmentosum group E with reclassification of three of them. J. Invest. Derm., 114, 1022-1029, 2000
- 4) Hayes S, Shiyanov p, Chen X, Raychaudhuri P: DDB, a putative DNA repair protein, can function as a transcriptional partner of E2F1. Mol. Cell. Biol., 18, 240-249, 1998