

哺乳類の塩基除去修復酵素遺伝子の研究

Studies on mammalian base excision repair genes

(2000年3月31日受理)

関 周司* 板野 道弘* 嶋田 義弘* 関 雄一**
Shuji Seki Michihiro Itano Yoshihiro Shimada Yuichi Seki

Key words : APEX 遺伝子, NTHL1 遺伝子, 塩基除去修復

はじめに

各個体は約60兆箇の細胞によって構成されているが、それぞれが基本的には同じDNAをもっている。DNAは細胞の遺伝物質であり、生きていくのに必須の情報源でもある。DNAの重要な役割からしても常に安定に保持されなければならないが、DNA自体は安定なものではなく、内外の要因によって絶えず損傷を受けている。そこで細胞は、損傷を受けたDNAを修復して、遺伝情報を安定に保つ事が出来るようにDNA修復機構を備えている。このDNA修復系の異常が遺伝的不安定性の一因となり、突然変異、発がん、一部の難病、老化等に関与していることが知られている¹⁾。哺乳類細胞のDNA修復機構には、ミスマッチ修復、塩基除去修復、ヌクレオチド除去修復、組み換え修復(複製後修復)等の存在が知られているが、さらに最近になって大腸菌で明らかにされているSOS応答や適応応答の存在も示唆されている。

本稿では、これらDNA修復機構の中で、1塩基損傷のような小さな損傷の修復に関与している塩基除去修復に関与する酵素とその遺伝子について筆頭者らが行ってきた研究を中心にまとめ、考察した。

塩基除去修復の基本的過程は、大腸菌ですでに明らかにされている過程とほぼ同じと考えられる¹⁾。すなわち、損傷塩基を特異的なDNA N-glycosylaseで除去し、AP endonucleaseあるいはAP lyaseで一本鎖切断を入れ、生じた5' blockあるいは3' blockを酵素的に除去し、生じたギャップをDNA polymeraseで修復し、修復DNA断片をDNA ligaseで連結して修復を修了する。毎日多数(1細胞DNA当たり約10,000箇所)生じている塩基欠落部位(AP sites)やDNA一本鎖切断の修復も塩基除去修復系酵素によって行われており、塩基除去修復の部分反応とみなされる。

*中国短期大学人間栄養学科, **岡山大学医学部医学科生理学第一講座

方 法

これまでの筆頭者らの研究を基礎にして、文献を参照しながら各種の遺伝子ゲノムデータベースを検索した。データベースの検索は Internet Explorer 4.5 を使用し、使用した主なデータベースは The National Center for Biotechnology Information の GenBank Database Query Form (http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/query__form.html), Online Mendelian Inheritance in Man (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.html>), Blast Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>), GenomeNet WWW server (<http://www.genome.ad.jp/>), Entrez-PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/query.fcgi?>) 等によった。遺伝子の解析は、The Genetyx package developed by Software Development Co., Ltd. でおこなった。遺伝子 (ゲノム DNA および cDNA) の引用は、本文中に Data base accession nos. で示した。また、これに関係した論文は、この accession no. を用いて GenBank Database Query Form 等のデータベースを検索することで得られるので、本文と関係深いもの以外は省略した。

結果および考察

1) DNA N-グリコシラーゼ遺伝子 (hOGG1, hMYH, hTDG, hAAG/hMPG, hUNG/hUDG)

DNA 塩基の損傷は、活性酸素などによる酸化的 DNA 損傷によることが最も多いと考えられている。その他にも、メチル化、アミノ化、脱アミノ化、付加体形成等がおきる。X線やガンマ線等のイオン化放射線による DNA 損傷は、酸化的 DNA 損傷と類似の DNA 損傷を惹起する。塩基の損傷で多いのは、プリン塩基の損傷特に突然変異を起こしやすいことで注目されている 8-オキシグアニン残基で、その修復開始に関わる酵素 (8-oxyguanine DNA glycosylase) の遺伝子 (hOGG1 cDNA とゲノム遺伝子) は既に数研究室から独立に報告されている (Data base accession nos. AF088282, AB000410, AF003595, Y11731, Y13277, U96710)²⁻⁴⁾。hOGG1には多数の splice variants が検出されているが、それらの中で hOGG1-type 1a が核局在型の修復酵素と考えられている⁴⁾。細胞器官の一つミトコンドリアにも DNA があり、核 DNA よりもさらに活性酸素に曝される機会が多いことから、ミトコンドリア DNA の修復酵素も検索されている。hOGG1の splice variants 全てにミトコンドリア局在シグナルが認められているが、現在までのところ、どの型の hOGG1 (hOGG1-type 2a, hOGG1-type 1a?) がミトコンドリアの DNA 修復に関与しているのかわかりにされていない。マウスの Ogg1 遺伝子も報告されている (Data base accession nos. Y13479, AF003596, U96711)。Ogg1 遺伝子欠損マウス (Ogg1^{-/-}) も作成されており、DNA 上の 8-オキシグアニン残基の増加と突然変異率の上昇が観察されている⁵⁾。

DNA 上に生じた 8-oxyguanine に誤って対合した adenine (8-oxoG/A ミスマッチ) を除く酵素、アデニン特異的 ミスマッチ DNA グリコシラーゼ (adenine DNA-glycosylase) 遺伝子 (大腸菌 MutY 遺伝子のヒトホモログ; hMYH) も単離されている (Data base accession nos. M74905,

U63329, AB025227)⁶⁾。正常DNAにも存在するメチルシトシンが、酸化的脱アミノを受けてチミンに変化することがある。その結果、G:T mismatchesを生じる。この mismatches している T を除いて修復を開始する酵素 [thymine (T:G)-mismatch DNA glycosylase] の遺伝子もクローニングされている (TDG; Data base accession nos. U51166, AF069519)。グアニンと対合しているシトシンが酸化的脱アミノを受けてウラシルに変化することはもっと頻回に生じている。このウラシルが残った状態でDNA複製が始まると、ウラシルはアデニンと対合するため突然変異をきたす。これを避けるためにウラシルを除いて修復を開始する酵素が uracil DNA glycosylase (UNG/UDG) で、本酵素遺伝子もクローニングされている (Data base accession nos. X15653, X89398)⁷⁾。

メチル化を受けたプリン塩基の修復に関与する methyl purine DNA glycosylase/3-methyl adenine DNA glycosylase (MPG/ AAG; Data base accession nos. U42217, U10420) もすでにヒトやマウスからクローニングされている。本遺伝子欠損マウス (Aag^{-/-}) も作製されており、本酵素の欠損によってアルキル化剤に対する感受性の増大が示されている⁸⁾。

2) チミングリコール DNA グリコシラーゼ (NTHL1/NTH1)

ピリミジン塩基の損傷で多発するものとして thymine glycol がある。DNA 上に生じた thymine glycol を除去して修復を開始する酵素として、大腸菌では endonuclease III が知られている。最近、この endonuclease III の哺乳類ホモログの遺伝子が、ヒト (NTHL1/NTH1; Data base accession nos. for cDNA, AB001575, NM_002528 RefSeq, U79718, U81285, Y09687; for genomic, AB014460, AC005600) やマウス (Nthl1/Nth1; Data base accession no. AB009371) からクローニングされ、本哺乳類酵素の性状が解明された⁹⁾。哺乳類の本酵素は、thymine glycol のみでなく、5-hydroxy-cytosine, 5, 6-dihydroxy-cytosine, 5-hydroxy-6-hydro-thymine, 5-hydroxy-uracil, urea, abasic site 等の修復にも関与することが明らかにされている。また、本酵素の反応機構も解明されている¹⁰⁾。本酵素遺伝子破壊マウスが既に作製されているが (未発表)、短期間の観察では外見上対照マウスと同じであることから、バックアップ酵素の存在が示唆されている。

3) DNA N-グリコシラーゼの類別

塩基の損傷は、数十種類以上あると考えられており、その修復開始に関与する DNA glycosylase (DNA N-glycosylase) も多種類あると推定されるが、哺乳類でアミノ酸配列まで明らかにされている DNA glycosylase は上述の6種類である。DNA glycosylase は図1のようにその酵素機能から2つの型に類別される。一価性の酵素 (monofunctional DNA glycosylase) は損傷塩基を N-グリコシド結合で加水分解して除き塩欠落部位 (apurinic/apyrimidinic sites; AP サイトと略す) 生成するが、二価性の酵素 (bifunctional DNA glycosylase) は損傷塩基をその DNA glycosylase 活性で DNA 上から除去し、生じた AP サイトの3'側に同じ酵素の AP lyase 活性で切れ目 (一本鎖切断) を入れることができる。先に述べた hMYH, hTDG, hAAG/hMPG, hUNG/hUDG などは一価性酵素と考えられている。hOGG1と NTHL1/NTH1は二価性酵素であることが証明されている。

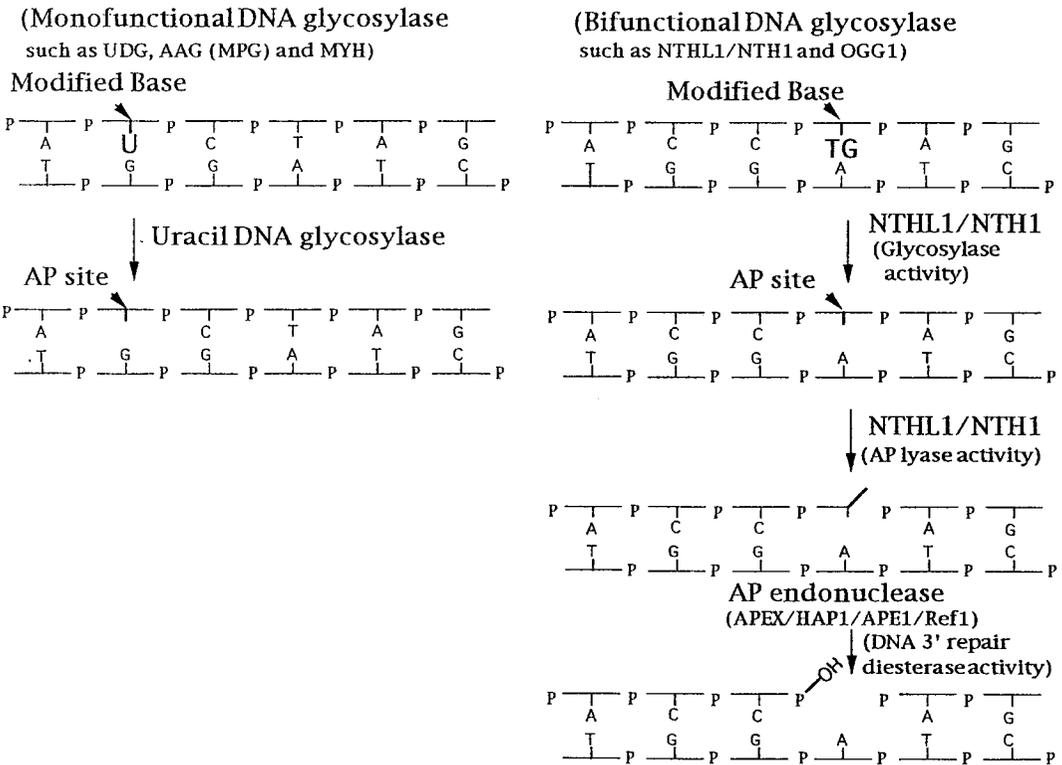


図1 哺乳類の一価性および二価性 DNA-グリコシラーゼの DNA 損傷除去過程。ウラシル DNA グリコシラーゼおよび NTHL1/NTH1 の場合を例示した。U, ウラシル; TG, チミングリコール。

4) 哺乳類の主要な AP エンドヌクレアーゼ (APEX nuclease ; APEX/HAP1/APE/Ref1/APE1)

AP サイトは、DNA 損傷の中でも最も多い損傷と考えられており、特別な損傷刺激を加えない自然な状態でも、一日1細胞当たり約1万箇所の塩基が脱落して AP サイトを生成していると推計されている。塩基欠落の原因は、原子の熱運動で N-グリコシド結合が加水分解されるためと考えられる。さらに、損傷塩基が一価の DNA グリコシラーゼで除かれた場合も AP サイトが生成される。AP サイトの修復は、大腸菌では通常エキソヌクレアーゼ III とエンドヌクレアーゼ IV の酵素作用で、AP サイトの5'側のホスホジエステル結合を加水分解し、3'-OH が自由端になるような切れ目（一本鎖切断）を入れることによって開始される。哺乳類でも同様な酵素のクローニングが試みられた結果、エキソヌクレアーゼ III の哺乳類ホモログが3つのグループ (Seki ら, Hickson ら, Demple ら) から報告され、この酵素をそれぞれのグループが APEX (APEX nuclease), HAP1, APE と命名した¹¹⁻¹³⁾。さらに、Curran のグループは転写調節因子 fos, jun やがん抑制遺伝子 p53 等の因子を還元活性化する機能が本酵素にあることを見出し、redox factor 1 (Ref1) と命名した¹⁴⁾。現在遺伝子名は APEX に統一されており、酵素タンパク質は報告者によって APEX, APE, APE1, HAP1, Ref1 等の名前では呼ばれている。多くの研究者が努力してきたにも拘わらず、これまでのと

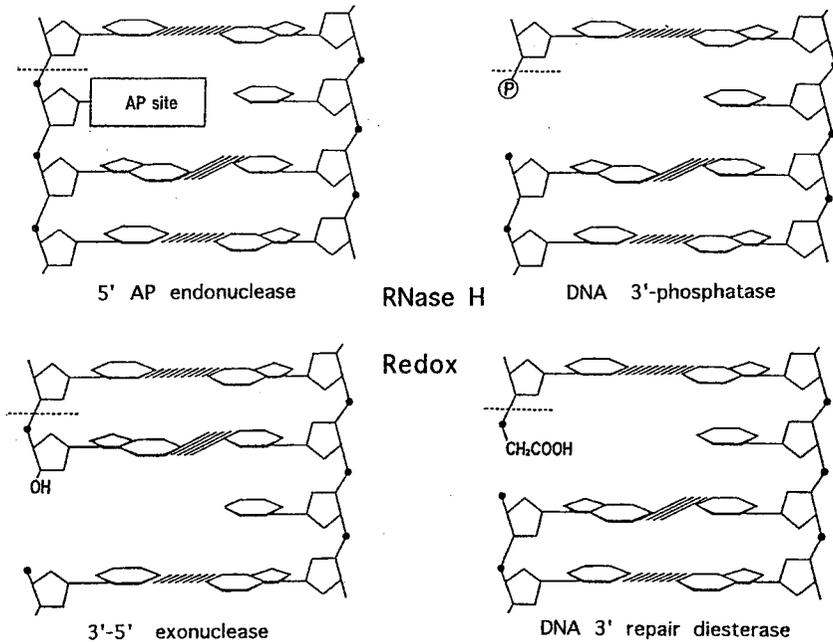


図2 哺乳類の主要な AP エンドヌクレアーゼ (APEX ヌクレアーゼ; APEX/HAP1/APE/Ref1) の6つの機能。点線 (---) は APEX で加水分解される結合を示す。

ころ、大腸菌のエンドヌクレアーゼ IV のホモログは哺乳類では見出されていない。

APEX/HAP1/APE/Ref1は、上記4グループの研究結果から図2のように6つの機能 (AP endonuclease, 3',5'-exonuclease, DNA 3'-repair diesterase, DNA 3'-phosphatase, ribonuclease H, redox factor 1) をもった多機能 DNA 修復酵素であることが明らかにされてきた。多くの研究者の研究結果を総合すると、APサイトの修復は図3の様な2つの経路でなされると考えられ、APEXはその最初のステップに必要である¹⁵⁾。

DNAの一本鎖切断もイオン化放射線、活性酸素、二価性DNAグリコシラーゼ等の作用によって頻々生成される。これらの一本鎖切断では、切断箇所の3'端デオキシヌクレオチドの3'-OHが自由端で無く、ここに deoxyribosephosphate の破片 (phosphoglycolate, phosphate, unsaturated aldehyde phosphate 等) が結合している。DNAポリメラーゼによってDNA修復合成をするには、これらを除いて、3'-OHが自由端にならない。APEX nucleaseは、そのDNA 3'-repair diesterase 活性やDNA 3'-phosphatase 活性によって、これらの3'ブロックを除き修復DNA合成を開始することができる (図2)。実際に、APEX nucleaseが、このような3'ブロックを除き、一本鎖切断の修復を開始する主要な酵素であることが示されている。APEX nuclease の ribonuclease H 活性の役割については、これまでのところ明らかにされていない。

APEX 遺伝子はヒト、マウス、ラットなどからクローニングされており、これらの間におけるAPEXタンパク質の1次構造上のアミノ酸の一致率は90%以上であった (Data base accession nos. for human cDNA, D90373, M80261, M81955, NM __001641 RefSeq, S43127, U79266,

X59764: for human genomic, D13370, M92444, M99703: for mouse cDNA, D90374: for mouse genomic, D38077: for rat cDNA, D44495: for rat genomic, AB023065)。

APEX 類似遺伝子を遺伝子クローニングとデータベース検索で調べた結果、タンパク質の一次構造におけるアミノ酸の一致率20~30%の遺伝子が数種検出された。哺乳類の細胞 DNA には散在型反復配列 (long interspersed repetitive sequence-LINE1または L1と呼ばれている) が存在しており、それぞれは5000~7000塩基対の長さで、半数体ゲノム当たり約10万コピー存在しているが、その内30~60が活性な L1 elements として機能している¹⁶⁾。この L1 ORF2の N 末に APEX と homology を示す配列が認められ、endonuclease 活性が認められた¹⁷⁾。別に、APEX2 (APEXL2) が APEX 類似の遺伝子として登録されている (accession no. for human cDNA, AB021260)。本遺伝子産物 APEX2の機能はまだ明らかにされていない。このように APEX 類似遺伝子は存在するが、これらが APEX 遺伝子に代わり得ないことは、APEX 遺伝子をノックアウト (欠損) したマウス胎芽が胎生 5 日目で退縮することからも明らかである¹⁴⁾。また、APEX 遺伝子の突然変異と疾患との関係も研究されている。ヒトの遺伝性疾患である筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis) に APEX 遺伝子の突然変異が高頻度に認められており、Amyotrophic lateral sclerosis と APEX 遺伝子異常との関連が示唆されている^{18, 19)}。

5) AP サイトの APEX 作用後の2つの修復経路

AP サイトに APEX nuclease が作用し5' 側に切れ目 (一本鎖切断) を入れると、3'-OH が自由端になるが、切断部位の5' 端にはデオキシリボースリン酸またはその修飾されたもの (デオキリボースの酸化されたもの等) が残る。この状態は5' ブロックの状態、これが除かれないとリガーゼが作用できず、DNA 修復は完了できない。この修復経路に、図3のように、(a) DNA polymerase β に依存する経路と (b) Flap structure-specific endonuclease 1 (FEN1/MF1/ DNase IV) と proliferative cell nuclear antigen (PCNA) に依存する経路とがある。この2つの経路についてはすでに報告したので¹⁵⁾、ここでは Data base accession nos. (for DNA polymerase β cDNA, D29013, L11607, M13140, NM_002690 RfSeq; for DNA polymerase β genomic DNA, J04201, U10526, X68633: for FEN1, L37374) の記載にとどめる。

6) NTHL1, APEX および FEN1遺伝子の染色体座位

染色体座位の決定は、塩基配列上判明した近接遺伝子の遺伝子座がすでに決定されているものについては、当該遺伝子が1ゲノム当たり1個のみであることを Southern hybridization で確認した上で、近接遺伝子と同じ座位に局在すると考えた。また、当該遺伝子を北海道大学理学部附属動物染色体研究施設 吉田道弘教授に送り、遺伝子座の決定を依頼した。その結果は表1のごとくで、ヒト APEX は14番染色体長腕 q11.2-q12, ヒト NTHL1は16番染色体短腕 p13.2-13.3, ヒト FEN1は11番染色体長腕 q12であった。これら遺伝子のマウスおよびラット染色体上の遺伝子座も表のように決定した。

DNA塩基除去修復

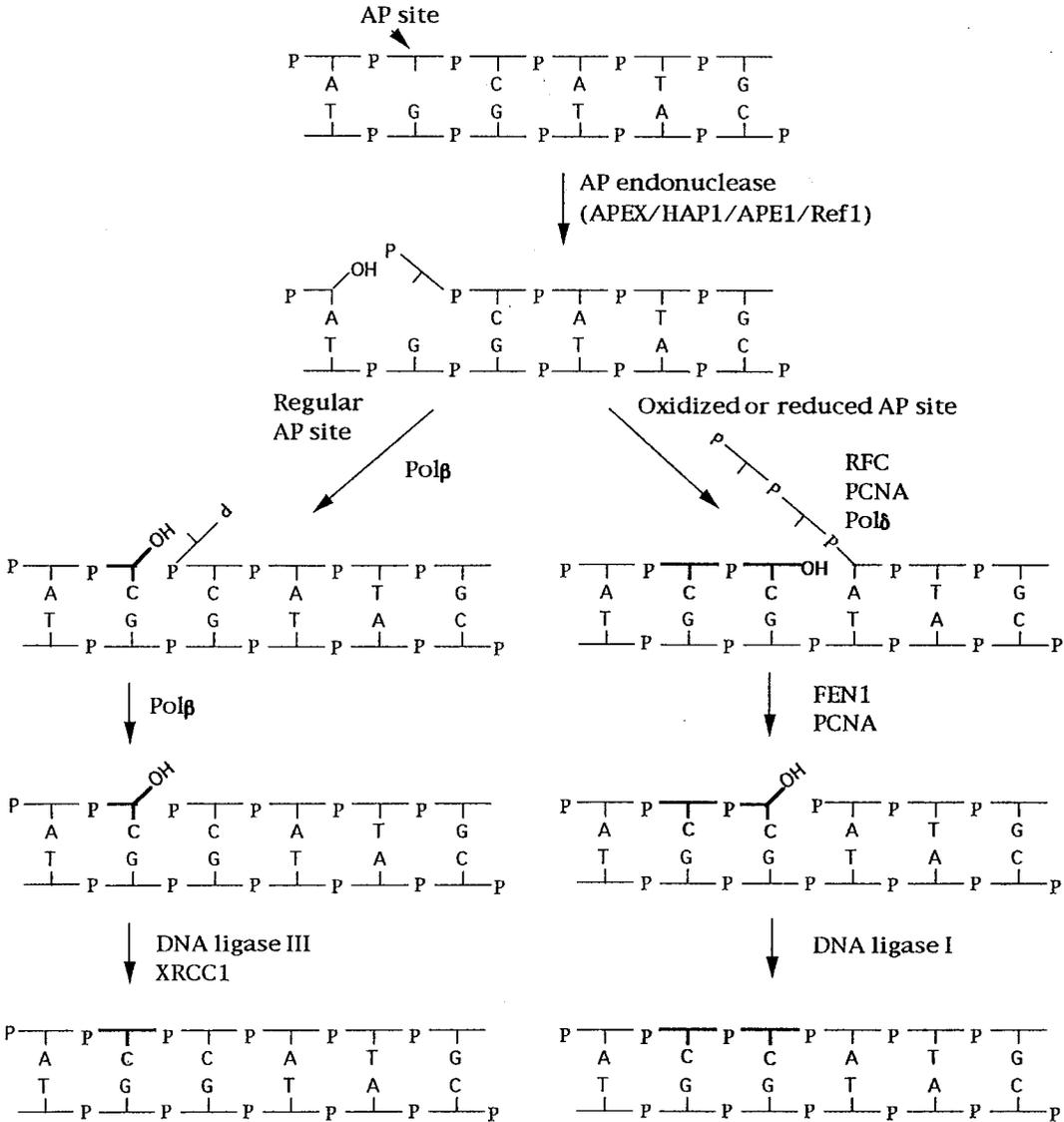


図3 塩基欠落部位 (AP site) 修復の二つの経路。APEXヌクレアーゼで一本鎖切断が入れられたのち生じる5'ブロックを除く過程で、5'ブロックの構造によってDNAポリメラーゼβが関与する経路とPCNA (proliferative cell nuclear antigen)-FEN1が関与する経路とに分かれる。経路によって修復DNA合成に関与するDNAポリメラーゼもDNAリガーゼも異なる。挿入塩基数 (repair patch) もDNAポリメラーゼβ経路は1塩基、PCNA-FEN1経路は2塩基 (または数塩基) である。

表1 ヒト, マウス, ラットのAPEX, NTHL1 およびFEN1遺伝子の染色体座位

Gene	Human	Mouse	Rat
APEX	HSA14q11.2-q12	MMU14C2-D1	RNO15p12
NTHL1	HSA16p13.3	MMU17A3	
FEN1	HSA11q12	MMU19D1	

ま と め

哺乳類の塩基除去修復過程に関与する酵素APEX, NTHL1, DNA polymerase β およびFEN1について、これまでの研究成果をもとにして、ゲノムデータベースと関連文献を参考にして解析、検討した。

まとめとして、図4にこれら酵素が関与する塩基除去修復の初期過程を模式的に示した。多機能DNA修復酵素APEXは①の過程に関与する。図のようにAPEXはすべての塩基除去修復経路において、何処かのステップに関与しており、塩基除去修復において必須の酵素と推定される。DNA修復酵素NTHL1は二価性DNAグリコシラーゼで②のステップ（グリコシラーゼとリアーゼのステップ）に関与している。5'ブロックは、③の過程でFEN1で除去されるか、④の過程でDNA polymerase β のリアーゼ活性によって除かれるかどちらかである。

これら塩基除去修復酵素遺伝子の異常と病気（がん、遺伝病、難病等）や老化との関連が今後の重要な課題と考えられる。

文 献

- 1) Friedberg, E.C., Walker, G.C. and Siede, W. (1995) DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, DC.
- 2) Aburatani, H., Hippo, Y., Ishida, T., Takashima, R., Matsuba, T., Kodama, M., Takao, M., Yasui, A., Yamamoto, K., Asano, M., Fukasawa, K., Yoshinari, T., Inoue, H., Ohtsuka, E. and Nishimura, S. (1997) Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue. *Cancer Res.* 57, 2151-2156.
- 3) Arai, K., Morishita, K., Shinmura, K., Kohno, T., Kim, S.-R., Nohmi, T., Taniwaki, S., Ohwada, S. and Yokota, J. (1997) Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage. *Oncogene* 14, 2857-2861.
- 4) Monden, Y., Arai, T., Asano, M., Ohtsuka, E., Aburatani, H. and Nishimura, S. (1999) Human MMH (OGG1) type 1a protein is a major enzyme for repair of 8-hydroxyguanine lesions in human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 605-610.
- 5) Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T. And Barnes, D.E. (1999) Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13300-13305.
- 6) Slupska, M.M., Bikloc, X., Luther, W.M., Chiang, J-H., Wei, Y-F. And Miller, J.H. (1996) Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the *Escherichia coli* mut Y gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.* 178, 3885-3892.

- 7) Olsen, L.C., Aasland, R., Wittwer, C.U., Krokan, H.E. and Helland, D.E. (1989) Molecular cloning of human uracil-DNA glycosylase, a highly conserved DNA repair enzyme. *EMBO J.* 8, 3121-3125.
- 8) Engelward, B.P., Weeda, G., Wyatt, M.D., Broekhof, J.L.M., Wit, J., Donker, I., Allan, J.M., Gold, B., Hoeijmakers, J.H.J. and Samson, L.D. (1997) Base excision repair deficient mice lacking the Aag alkyladenine DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13087-13092.
- 9) Sarker, A.H., Ikeda, S., Nakano, H., Terato, H., Ide, H., Akiyama, K., Tsutsui, K., Bo, Z., Kubo, K., Yamamoto, K., Yasui, A., Yoshida, M.C., and Seki, S. (1998) Cloning and characterization of a mouse homologue (mNth1) of Escherichia coli endonuclease III. *J. Mol. Biol.* 282, 761-774.
- 10) Ikeda, S., Biswas, T., Roy, R., Izumi, T., Boldogh, I., Kurosky, A., Sarker, A.H., Seki, S., and Mitra, S. (1998) Purification and characterization of a human homolog (hNTH1) of Escherichia coli endonuclease III: Direct identification of nucleophilic residue. *J. Biol. Chem.* 273, 21585-21593.
- 11) Seki, S., Akiyama, K., Watanabe, S., Hatsushika, M., Ikeda, S. and Tsutsui, K. (1991) cDNA and deduced amino acid sequence of a mouse DNA repair enzyme (APEX nuclease) with significant homology to Escherichia coli exonuclease III. *J. Biol. Chem.* 266, 20797-20802.
- 12) Robson, H. and Hickson, I.D. (1991) Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/aprimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in E. coli xth (exonuclease III) mutants. *Nucleic Acids Res.* 19, 5519-5523.
- 13) Demple, B., Herman, T. And Chen, D.S. (1991) Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: Definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 11450-11454.
- 14) Xanthoudkis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y.C.E. and Curran, T. (1992) Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzymes. *EMBO J.* 11, 3323-3335.
- 15) 関 周司, 秋山公祐 (1998) 塩基除去修復 実験医学 16, 1082-1088.
- 16) Sassaman, D.M., Dombroski, B.A., Moran, J.V., Kimberland, M.L., Naas, T.P., DeBerardinis, R.J., Gabriel, A., Swergold, G.D. and Kazazian, H.H.Jr. (1997) Many L1 elements are capable of retrotransposition. *Nature genetics* 16, 37-43.
- 17) Feng, Q., Moran, J.V., Kazazian, H.H.Jr. and Boeke, J.D. (1996) Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell* 87, 905-916.
- 18) Olkowski, Z.L. (1998) Mutant AP endonuclease in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *NeuroReport* 9, 239-242.
- 19) Hayward, C., Colville, S., Swingler, R.J. and Brock, D.J. (1999) Molecular genetic analysis of the APEX nuclease gene in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 52, 1899-1901.