

総説

DNAに傷があっても複製を続けるための分子メカニズム

橋本 博¹, 菱木麻美¹, 原 幸大¹, 菊池壮太郎²

¹静岡県立大学薬学部

²テキサス大学サウスウェスタンメディカルセンター

DNA damage tolerance (DTT) is a cell function to avoid replication arrest by DNA damage during DNA replication. DTT includes two pathways, translesion DNA synthesis (TLS) and template-switched DNA synthesis (TS), regulated by various molecular interactions. TLS is transient DNA synthesis using a damaged template by error-prone DNA polymerases specialized for DNA damage (TLS polymerases). TS, in which one newly synthesized strand is utilized as an undamaged template for replication by replicative polymerases, is error-free process. This review article describes recent progress in structural studies of proteins involved in TLS and TS.

Crystal structure / DNA damage tolerance / translesion DNA synthesis / template-switching

1. はじめに

私たちのDNAは、紫外線、食品や環境中の化学物質、体内で産生される代謝物や活性酸素などによって常に損傷の危険にさらされており、実際、1細胞あたり1日に何万もの塩基に損傷が生じている。このようにして生じたDNA損傷はミスマッチ修復、塩基除去修復、ヌクレオチド除去修復などによって元に戻すことができる。しかし、DNAの複製中の場合、損傷の修復にともなう複製の遅延は細胞死など好ましくない状況を招くため、修復を後回しにし、DNAの合成を優先することが強く求められる。DNAの複製に遅延が発生するのは、複製型のDNA合成を行う酵素（複製型DNAポリメラーゼ）にとって損傷が生じたDNAの塩基は迷惑な障害物となる場合があるからである。複製型DNAポリメラーゼは、正確なDNAの合成を行うために、活性部位がワトソン・クリック型の塩基対だけを収容できる形になっており、塩基対の形成を厳密にチェックしている。したがって、立体的に嵩高い損傷塩基の場合、複製型ポリメラーゼの活性部位に収まることができず、DNAの複製がそこで停止してしまう。

細胞には、この複製停止を回避しDNA合成を続けるための手段として、DNA損傷トレランスと呼ばれる仕組みが備わっており、損傷乗り越えとテンプレートスイッチという2種類の回避手段が存在する（図1）¹⁾。損傷乗り越えDNA合成では、特別なDNA合成酵素

（損傷乗り越え型DNAポリメラーゼ、TLSポリメラーゼ）を用いることによって、損傷があるDNAを鋳型としても停止することなく、DNAの合成が続けられる。TLSポリメラーゼの活性部位は、複製型DNAポリメラーゼと異なり、損傷塩基や非ワトソン・クリック型塩基対を収容できるだけの空間的な余裕があり、塩基対は厳しくチェックされない。そのためTLSポリメラーゼは損傷塩基を鋳型としてDNAを合成できるが、間違った塩基を結合してしまいがちである。一方、テンプレートスイッチによるDNA合成では複数のDNAヘリカーゼ（HLTFやZRANB3など）が関与

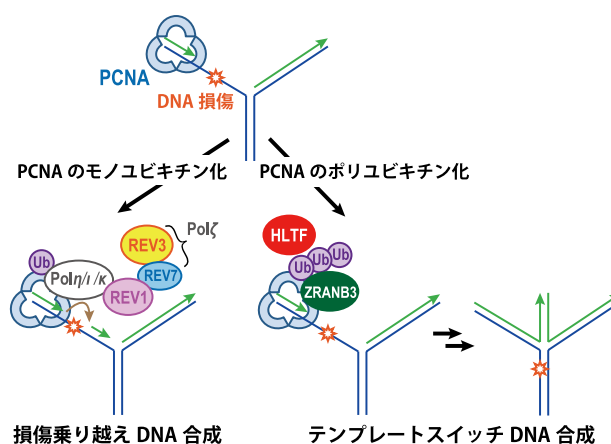


図1 DNA損傷トレランスを実現するための2種類の回避手段。鋳型鎖を青色、新生鎖を緑色で示す。Ubはユビキチンを示す。

Structural Basis for Molecular Interactions in DNA Damage Tolerance

Hiroshi HASHIMOTO¹, Asami HISHIKI¹, Kodai HARA¹ and Sotaro KIKUCHI²

¹School of Pharmaceutical Sciences, The University of Shizuoka

²University of Texas Southwestern Medical Center

し、損傷のある部分を鋳型にするのではなく、損傷のない相補鎖から新たに複製された部分を鋳型とすることで間違いのない DNA 合成が行われる。損傷を回避する手段として損傷乗り越えとテンプレートスイッチのどちらが選択されるかは、DNA 合成の足場となる増殖細胞核抗原 (PCNA) に付加されたユビキチン鎖の長さによって制御されている。PCNA がモノユビキチン化されると損傷乗り越え DNA 合成が、ポリユビキチン化されるとテンプレートスイッチによる DNA 合成が起こる。本総説では、DNA 損傷トレランスに関わるヒト由来タンパク質の構造と分子メカニズムについて、筆者らの研究を中心に紹介する。

2. 損傷乗り越え DNA 合成の分子メカニズム

損傷乗り越え DNA 合成は、損傷塩基を鋳型とした合成を行うインサーターと、その後の DNA 鎖の伸長を担うエクステンダーという 2 種類の DNA ポリメラーゼによって実現されている。エクステンダーによって DNA 鎖がある程度伸長されると通常の DNA 合成が可能となるため、連続的な DNA 合成に不向きなエクステンダーに代わって複製型 DNA ポリメラーゼが DNA 合成を行うようになる。したがって、損傷塩基の付近では DNA 合成を担うポリメラーゼが、複製型 DNA ポリメラーゼから TLS ポリメラーゼ (インサーター, エクステンダー), そして再び複製型 DNA ポリメラーゼへと交換される (DNA ポリメラーゼスイッチ)。ヒトにおいて、インサーターは Pol η , Pol ι , Pol κ , REV1 の 4 種類が、エクステンダーは Pol δ が知られている。このうち REV1 はインサーターとしてだけでなく、REV1 以外のインサーターとエクステンダーを結びつける役割も担っていることが明らかになってきた^{2), 3)}。このような複数の DNA ポリメラーゼが関わるポリメラーゼスイッチは複雑な分子間相互作用で制御されており、構造解析によってそのメカニズムが少しずつ明らかになってきた。ここでは、DNA 合成の足場である PCNA とインサーターとの相互作用⁴⁾、インサーターとエクステンダーの相互作用^{2), 5)}について紹介していく。

2-1 インサーターと PCNA の親和性制御メカニズム

複製型 DNA ポリメラーゼとインサーターは、PIP ボックス (PCNA Interacting Protein box) と呼ばれる PCNA 結合モチーフを持ち、PCNA と結合して DNA 合成を行う。DNA 損傷のない場合、塩基を誤りがちな TLS ポリメラーゼが DNA 合成を行うのは好ましくない。このような状況を回避するため、インサーターにある PIP ボックスは、複製型 DNA ポリメラーゼの

ものよりも PCNA との結合が弱くなっている。実際、典型的な PIP ボックスと PCNA との解離定数は数 nM ~ 数十 nM と言われているが、インサーターでは数百 nM 以上であった⁴⁾。インサーターの低い PCNA 親和性の構造基盤を明らかにするため、3 種類のインサーター (Pol η , Pol ι , Pol κ) の PIP ボックスを含むペプチドと PCNA の複合体を構造解析し、典型的な PIP ボックスである Pol δ との比較を行った⁴⁾。

PIP ボックスは多くのタンパク質で見つかっていて、グルタミン残基、疎水性アミノ酸残基、2つの芳香族アミノ酸残基の 4 残基が保存されており、それぞれの側鎖が PCNA のポケットに結合する (図 2a-d)。複製型 DNA ポリメラーゼ Pol δ は典型的な PIP ボックスを持ち、グルタミン残基が親水性ポケットに、イソロイシン残基と 2つのフェニルアラニン残基が疎水性ポケットに結合する (図 2c)⁷⁾。

一方、インサーターの PIP ボックスでは、興味深いことに親水性ポケットに結合するグルタミン残基は

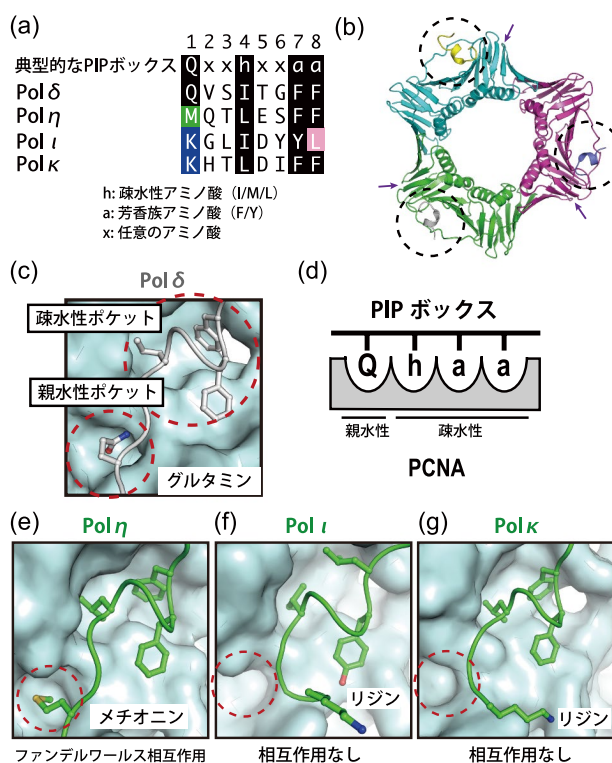


図 2

(a) PIP ボックスのアミノ酸配列。(b) PCNA-PIP ボックス複合体の全体構造 (PDB ID: 2ZVM)。PCNA はホモ三量体のリング構造をしており、点線で囲った部分に PIP ボックスが結合する。図では 3 つの PIP ボックスが結合しているが実際の機能時には 1 つしか結合しないと思われる。ユビキチン化されるリジン残基 (K164) の位置を紫色の矢印で示した。(c) Pol δ の典型的な PIP ボックス (灰色) と PCNA との複合体構造 (PDB ID: 1U76)。(d) 典型的な PIP ボックスと PCNA の間の相互作用の模式図。(e-g) インサーター (緑色) と PCNA との複合体構造。それぞれの PDB ID は (e) 2ZVK, (f) 2ZVM, (g) 2ZVL。

保存されておらず、別のアミノ酸残基になっている (図 2a)。Pol η では対応箇所はメチオニン残基になっており、Pol δ のグルタミン残基と同じく、親水性ポケットに挿入されていたが、形成される相互作用は、グルタミン残基の場合の静電相互作用と異なり、より弱いファンデルワールス相互作用をしていた (図 2e)。一方、Pol ι と Pol κ では対応箇所は親水的なリジン残基となっているため、親水性ポケットに入り込むと予想していたが、意外にもポケットとは相互作用をしていなかった (図 2f, g)。さらに、Pol η のメチオニン残基をグルタミン残基に変えたところ、PCNA との親和性が 4 倍程度上昇した⁴⁾。以上の結果から、インサーターと PCNA との親和性の低下は親水性ポケットにおける相互作用の弱化・喪失によって生じると考えられた。

インサーターが複製型 DNA ポリメラーゼに代わって DNA 合成を行うには、PCNA との親和性が高まる必要がある。PCNA は DNA 損傷に応答してユビキチンリガーゼである RAD18 によってモノユビキチン化されるが、インサーターはユビキチン結合ドメインを持っているので、修飾されたユビキチンと相互作用することで PCNA との親和性が向上すると考えられている⁶⁾。つまり、インサーターは親和性の低い PIP ボックスとユビキチン結合ドメインを持つことによって、PCNA がユビキチン化されたときのみ働くように制御されていると考えられる。

2-2 エクステンダーへの切り換えメカニズム

エクステンダーであるヒト Pol ζ は 2 つのタンパク質 REV3 と REV7 からなる複合体である⁸⁾。REV3 は Pol ζ の触媒サブユニットであり、DNA ポリメラーゼ活性を持つ。一方、REV7 は酵素活性を持たない補助サブユニットである。REV3 は 3130 アミノ酸残基からなる巨大なポリペプチド鎖であり、その構造機能研究はあまり進んでいないが、211 アミノ酸残基からなる REV7 に関しては、構造研究が大きく進展している^{2), 3), 5)}。REV3 の断片が結合した REV7 の構造を図 3a に示す⁵⁾。REV7 の C 末端領域はシートベルトの様に REV3 を抱え込み、REV7 の 2 つの芳香族アミノ酸残基 (Y63 と W171) がそれぞれ REV3 の 2 つのプロリン残基 (P1884 と P1880) と特徴的なスタッキング相互作用をしていた。また、REV7-REV3 相互作用を欠失させた細胞は、REV7 欠損細胞と同様に、抗がん剤であるシスプラチン曝露による DNA 損傷に対し、野生型と比較して、有意に生存率が低かった (図 3b)。このことは、Pol ζ の機能発現には REV7 と REV3 の相互作用が重要であることを示している。また、この相互作用を阻害すれば、がん細胞に対するシスプラチンの効果が促進されることを意味しており、REV7-REV3 相互作用が創薬

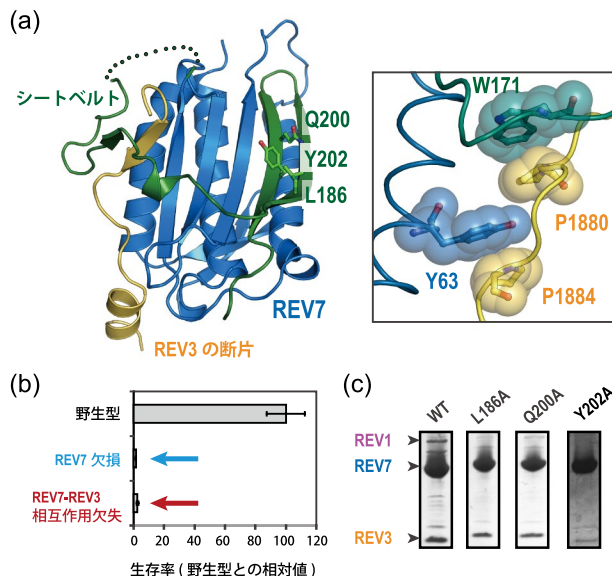


図 3 (a) REV7-REV3 複合体の構造 (PDB ID: 3ABD)。REV7 を青色、REV7 の C 末端領域を緑色、REV3 を黄色で示す。右図は REV7-REV3 相互作用部位の拡大図 (b) REV7 野生型および変異体の細胞におけるシスプラチン曝露後の生存率 (c) REV7-REV3 複合体と REV1 との相互作用解析。野生型 (WT) 以外の変異体では REV1 のバンドが消失しており、REV7 と REV1 の相互作用が変異によって弱まったことがわかる。

ターゲットとなり得る可能性を暗示している。

REV7 は、REV3 だけでなく、REV1 の C 末端ドメインとも相互作用する⁹⁾。そこで、分子表面のアミノ酸残基をアラニン残基に変えた REV7 変異体を網羅的に作成し、REV7-REV3 複合体と REV1 の相互作用に与える影響を調べた。その結果、REV1 との結合が減少する REV7 変異体を複数見出し、REV1 結合部位の同定に成功したとともに、REV1-REV7-REV3 三者複合体の形成が確認された (図 3c)⁵⁾。興味深いことに、REV1 との相互作用に重要であることが判明した REV7 の 3 つのアミノ酸残基 L186、Q200、Y202 は全て C 末端の β シート上に集中していた (図 3a)。REV7 の C 末端は REV3 を覆うように構造を形成しているため、REV3 非存在下では構造をとっていない可能性が示唆されている⁵⁾。したがって、三者複合体の形成には順番があり、REV7 が REV3 と複合体を形成した後、つまり Pol ζ の形成後に REV7 は REV1 と結合できると考えられる (図 4b)。これらの知見は、REV1-REV7-REV3 三者複合体の構造からも確認され、相互作用の詳細が明らかになった (図 4a)²⁾。REV1 と REV7 の C 末端の β シートとの相互作用は、REV1 の 3 つのアミノ酸残基 L1203、Y1244、L1248 からなる疎水性ポケットに、変異体実験で重要性が確認された REV7 の L186 が結合することで実現していた。REV1 変異体を用いた実験から、この疎水性相互作用が三者複合体の

形成に重要であることが示された。また、REV7 において REV1 との相互作用に重要なアミノ酸残基として同定された残り 2 つについては、Y202 が疎水性相互作用、Q200 が水素結合ネットワークの形成に関与していた。

また、REV1 はインサーターである Pol η , Pol ι , Pol κ とともに相互作用することが示されていたが (図 1)¹⁰⁾, REV1 の C 末端ドメインとインサーターの REV1 相互作用領域のペプチドとの複合体の構造が報告されたことで相互作用の詳細が明らかとなった^{11), 12)}。REV1 のインサーター結合部位は、REV7 結合部位とは異なっており (図 4a), インサーターを含む四者複合体の形成が示唆された²⁾。実際、Pol κ のペプチドを含むマウス由来の四者複合体の構造が報告されている³⁾。

以上の結果に基づき、損傷乗り越え DNA 合成は以下のようなメカニズムで起こると考えられる (図 4b): ① REV1 は PCNA をユビキチン化する RAD18 と相互作用することで損傷部位に局在しており、REV1 以外のインサーターを損傷部位に呼び込む; ②呼び込まれたインサーターと REV1 の複合体が損傷部位に塩基を挿入して、その部位を乗り越えた後、REV7 と REV3 からなる複合体 Pol ζ が REV7 と REV1 の相互作用によって損傷部位に呼び込まれる; ③やって来た Pol ζ は REV1 と相互作用することで四者複合体を形成し、

DNA 合成の担い手がインサーターからエクステンダーにスイッチすることで; ④損傷部位より後ろの DNA 鎖の伸長が行われる。

3. テンプレートスイッチの初期段階のメカニズム

近年、テンプレートスイッチを担う主要なタンパク質の一つである HLTf の構造研究が進展し、テンプレートスイッチの初期段階のメカニズムが明らかになりつつある¹³⁾⁻¹⁵⁾。HLTf はユビキチンリガーゼ活性と DNA ヘリカーゼ活性を持つタンパク質であり、PCNA のポリユビキチン化と DNA をほどく役割を担う。アミノ酸配列の解析から HLTf は N 末端に新規 DNA 結合ドメインである HIRAN ドメインを持つことが予想され¹⁶⁾, その構造解析から HLTf の DNA 認識メカニズムが明らかになった¹³⁾。HIRAN ドメインは、アミノ酸残基 D94 によって新生鎖 DNA の 3' 末端の水酸基を認識し、2 つのチロシン残基 Y72 と Y93 が新生鎖の 3' 末端からの 2 塩基 (Cyt12 と Cyt13) を挟み込むことで、二本鎖をほどくように結合していた (図 5a)。

得られた構造に基づき、テンプレートスイッチの初期段階のメカニズムは以下のものであると考えられる (図 5b): ① HLTf は DNA 合成の停止した新生鎖の 3' 末端に結合し、② RAD18 と協同的に PCNA をポリユビキチン化する; ③続いて、PCNA 結合モチーフとポリユビキチン結合ドメインを持つ ZRANB3 が、ポリユビキチン化された PCNA を認識し、損傷部位に呼び込まれる。以上の初期段階が完了した後、DNA ヘリカーゼである HLTf と ZRANB3 の働きによって DNA

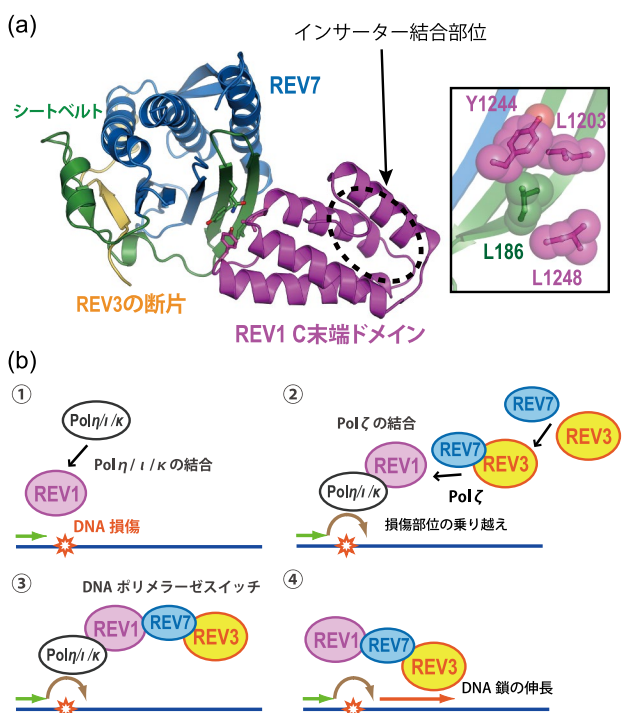


図 4 (a) REV1-REV7-REV3 複合体の構造 (PDB ID: 3VU7)。右図は REV1-REV7 相互作用部位の拡大図 (b) 損傷乗り越え DNA 合成のメカニズム。鋳型鎖を青色、新生鎖を緑色で示す。

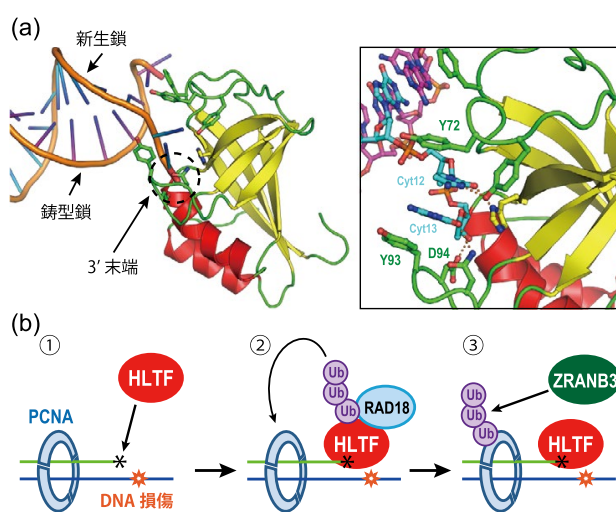


図 5 (a) HLTf の HIRAN ドメインと DNA の複合体の構造 (PDB ID: 4XZF)。右図は HLTf-DNA 相互作用部位の拡大図 (b) テンプレートスイッチ初期段階のメカニズムのモデル。鋳型鎖を青色、新生鎖を緑色で示す。また、新生鎖の 3' 末端をアスタリスクで示す。

がほどかれ、鋳型鎖が交換された後に DNA の合成が行われると考えられる。

4. おわりに

本総説では、DNA 損傷トレランスに関わるタンパク質の構造と相互作用、そこから推測されるメカニズムを紹介した。損傷乗り越え DNA 合成において、インサーターの構造や相互作用の詳細は明らかにされている。しかし、REV1 と PCNA との相互作用については未だ不明な点が多い。REV1 は他のインサーターとは異なり、PIP ボックスを持たないと予測されている。その代わりに、REV1 の N 末端に存在する BRCT ドメイン^{17), 18)} と中央に存在するポリマーゼドメインの C 末端側¹⁹⁾ が、それぞれ PCNA の異なる領域と相互作用することが報告されているが、PCNA-REV1 複合体の立体構造は明らかになっていない。今後、複合体の立体構造と構造に基づく詳細な分子メカニズムの解明が求められる。また、エクステンダーの活性を担う REV3 の全体構造については、酵母 Pol ζ を対象とした約 20 Å 分解能の電子顕微鏡によって決定された構造に限られ²⁰⁾、今後の構造研究が待たれる。一方、テンプレートスイッチに関しては、昨年 HLTf の HIRAN ドメインの構造研究が立て続けに報告されたが¹³⁾⁻¹⁵⁾、テンプレートスイッチは複数の DNA ヘリカーゼが関与しており、それらの構造機能研究が求められる。

文 献

- 1) Branzai, D., Psakhye, I. (2016) Curr. Opin. Cell Biol. **40**, 137-144. DOI: 10.1016/j.ceb.2016.03.015.
- 2) Kikuchi, S. *et al.* (2012) J. Biol. Chem. **287**, 33847-33852. DOI: 10.1074/jbc.M112.396838.
- 3) Wojtaszek, J. *et al.* (2012) J. Biol. Chem. **287**, 33836-33846. DOI: 10.1074/jbc.M112.394841.
- 4) Hishiki, A. *et al.* (2009) J. Biol. Chem. **284**, 10552-10560. DOI: 10.1074/jbc.M809745200.
- 5) Hara, K. *et al.* (2010) J. Biol. Chem. **285**, 12299-12307. DOI: 10.1074/jbc.M109.092403.
- 6) Stelter, S., Ulrich, H. D. (2003) Nature **425**, 188-191. DOI: 10.1038/nature01965.
- 7) Bruning, J. B., Shamoo, Y. (2004) Structure **12**, 2209-2219. DOI: 10.1016/j.str.2004.09.018.
- 8) Murakumo, Y. *et al.* (2000) J. Biol. Chem. **275**, 4391-4397. DOI: 10.1074/jbc.275.6.4391.
- 9) Murakumo, Y. *et al.* (2001) J. Biol. Chem. **276**, 35644-35651. DOI: 10.1074/jbc.M102051200.
- 10) Ohashi, E. *et al.* (2004) Genes Cells **9**, 523-531. DOI: 10.1111/j.1356-9597.2004.00747.x.
- 11) Pozhidaeva, Y. *et al.* (2012) Biochemistry **51**, 5506-5520. DOI: 10.1021/bi300566z.
- 12) Wojtaszek, J. *et al.* (2012) J. Biol. Chem. **287**, 26400-26408. DOI: 10.1074/jbc.M112.380998.
- 13) Hishiki, A. *et al.* (2015) J. Biol. Chem. **290**, 13215-13223. DOI: 10.1074/jbc.M115.643643.
- 14) Kile, A. C. *et al.* (2015) Mol. Cell **58**, 1090-1100. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.05.013.
- 15) Achar, Y. J. *et al.* (2015) Nucleic Acid Res. **43**, 10277-10291. DOI: 10.1093/nar/gkv896.
- 16) Iyer, L. M. *et al.* (2006) Cell Cycle **5**, 775-782. DOI: 10.4161/cc.5.7.2629.
- 17) Guo, C. *et al.* (2006) Mol. Cell **23**, 265-271. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.05.038.
- 18) Pustovalova, Y. *et al.* (2013) J. Mol. Biol. **425**, 3091-3105. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.05.029.
- 19) Sharma, N. M. *et al.* (2011) J. Biol. Chem. **286**, 33557-33566. DOI: 10.1074/jbc.M110.206680.
- 20) Gomez-Llorente, Y. *et al.* (2013) Cell Rep. **5**, 79-86. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.08.046.



橋本 博

橋本 博 (はしもと ひろし)

静岡県立大学薬学部教授

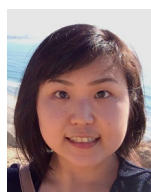
2000 年大阪大学大学院修了。博士 (工学)。同年 JSPS 特別研究員。01 年横浜市立大学総合理学研究科助手、09 年同生命ナノシステム科学研究科助教、准教授。13 年より現職。

研究内容: タンパク質の構造と機能

連絡先: 〒422-8002 静岡県駿河区谷田 52-1

E-mail: hash@u-shizuoka-ken.ac.jp

URL: w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/bukka/



菱木麻美

菱木麻美 (ひしき あさみ)

静岡県立大学薬学部助教

2009 年横浜市立大学大学院修了。博士 (理学)。同年同博士研究員、14 年米国サンフォードバーナム医学研究所博士研究員、16 年より現職。

研究内容: タンパク質の構造と機能

E-mail: ahishiki@u-shizuoka-ken.ac.jp



原 幸大

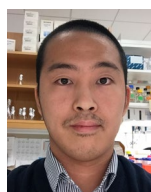
原 幸大 (はら こうだい)

静岡県立大学薬学部助教

2010 年横浜市立大学大学院修了。博士 (理学)。同年米国ミネソタ大学博士研究員、11 年米国テキサス大学サウスウエスタンメディカルセンター博士研究員、14 年より現職。

研究内容: タンパク質の構造と機能

E-mail: khara@u-shizuoka-ken.ac.jp



菊池壮太郎

菊池壮太郎 (きくち そうたろう)

米国テキサス大学サウスウエスタンメディカルセンター博士研究員

2014 年横浜市立大学大学院修了。博士 (理学)。同年より現職。

研究内容: タンパク質の構造と機能

E-mail: Sotaro.Kikuchi@UTSouthwestern.edu