

学位論文の要約

題目 Chemical and Biological Studies on Photoinduced DNA Damage and Repair and Subnucleosome Structures

(光照射に起因する DNA 損傷と修復、およびサブヌクレオソーム構造体に関するケミカルバイオロジー)

氏名 橋谷 文貴

序論

生体内において遺伝情報は DNA と呼ばれる化学物質に保持されている。DNA は化学反応の基質となり特に酸化損傷や光損傷を受けやすい。DNA に保持される遺伝情報の管理は非常に重要であり、種々の損傷修復メカニズムが確認されている。また真核生物と古細菌におけるヒストンや、ミトコンドリアにおける TFAM のように DNA と結合し安定性を付与するタンパク質が知られている。このようなタンパク質は DNA の安定の他に複製や転写に深く関わっており、細胞レベルでの生命現象を考える上で非常に重要なシステムとなっている。本研究において申請者は酸化損傷の原因となる DNA 内電子移動を 5-ブロモウラシルをプローブとして効率よく検知する手法を確立し、長鎖 DNA 並びにゲノム DNA における電子移動を確認した。また同様の手法を用いてミトコンドリアにおける DNA 結合タンパク質、TFAM から DNA への電子移動を確認し、これによるチミンダイマーの修復を観察した。さらに真核細胞における DNA 結合タンパク質、ヒストンと DNA の複合体について詳しく調べ、H3-H4 octasome の構造と特性について検討した。以下で各章について概要を説明する。

Locating the uracil-5-yl radical formed upon photoirradiation of 5-bromouracil-substituted DNA (5-ブロモウラシルを含む DNA への光照射によって生じたウラシルラジカル生成部位特定)

DNA 内には π 電子が豊富に存在しており、これを介した電子の移動が可能となっている。この電子移動は塩基の酸化損傷を引き起こすほか、光還元による修復にも関わっており DNA の安定性を考えるうえで重要な現象である。申請者らの研究室ではこの電子移動を 5-ブロモウラシル ($^{\text{Br}}\text{U}$)を用いて検討してきた。 $^{\text{Br}}\text{U}$ はチミンの類縁体であるため DNA の機能を損なうことなくチミンとの置換が可能であり、DNA 内で起こる電子移動を検知する上で理想的なプローブである。電子移動が起こると $^{\text{Br}}\text{U}$ は還元され反応性の高いウラシルラジカ

ルを生じるため、電子移動をラジカル反応の産物として確認することができる。先行研究において二本鎖 DNA 中の $5'\text{-d-(G/C)A}_{n=1,2,3}\text{BrU}^{\text{BrU}}\text{-3}'$ という配列に光照射を行うと G から BrU への電子移動が効率的に起こることがわかっており、hot-spot 配列として報告されている。申請者は本研究においてウラシルラジカルからの生成物、ウラシルを酵素処理によって選択的に検知することで効率のいい電子移動の検知手法を確立した。この過程で hot-spot 配列とは逆方向の配列 $5'\text{-d-BrU}^{\text{BrU}}\text{UA}_{n=1,2,3}\text{(G/C)-3}'$ でも同様の電子移動が起こることを確認し、reverse hot-spot 配列として報告した。さらに申請者は BrU が細胞中 DNA にも導入可能であることを利用し、大腸菌ゲノム DNA における電子移動の検知を試みた。光照射後、先の研究を利用しウラシル生成部位にビオチンによる化学修飾を施し、電子移動を起こした配列を含む DNA を選択的に回収した後、次世代シーケンサーで分析した。ピーク検索とモチーフ解析から $5'\text{-d-C}^{\text{BrU}}\text{BrUA}^{\text{BrU}}\text{(G/C)-3}'$ という配列において効率的なウラシルの生成が示唆された。あらかじめ断片化したゲノム DNA やこの配列単体では効率的なウラシルの生成が見られず、nucleosome を含む DNA ではウラシルの生成が確認できたことから、本配列はゲノム DNA や nucleosome において形成される負の超らせん構造依存的に光感受性が高まる特性を持つと予想される。

Electron injection from mitochondrial transcription factor A to DNA associated with thymine dimer photo repair (ミトコンドリア転写因子 TFAM から DNA への電子注入とチミンダイマー修復)

DNA における電子移動は塩基間だけではなく、タンパク質の芳香族アミノ酸から起こることが知られており、タンパク質-DNA 間の相互作用解析や電子移動を利用して DNA の修復を行う酵素、photolyase 等がこれまでに報告されている。本研究において申請者はミトコンドリア中に豊富に存在する DNA 結合性タンパク質、TFAM に着目し BrU を用いることで TFAM から DNA への電子移動を検知した。TFAM との高い親和性が報告されている DNA 配列、Light strand promoter (LSP) と Heavy strand promoter (HSP) 中の配列に BrU を挿入したものを用意し、光照射を行うと TFAM との複合体中で有意にウラシルの生成が起こり、電子移動が確認された。また TFAM は LSP, HSP といった配列だけではなく配列非選択的に DNA と結合することが知られており、ミトコンドリアとは関連のない長鎖 DNA においても TFAM の結合と電子移動が起こることがわかった。DNA への電子移動は一般的な光損傷産物であるチミンダイマーの修復方法の 1 つとして知られており、本研究においても TFAM からの電子移動によりチミンダイマーの修復が促進されることが確認された。TFAM はミトコンドリア DNA (mtDNA) への安定性付与に関わっており、TFAM の減少は mtDNA の減少を引き起こす。ミトコンドリア内での塩基除去によるチミンダイマーの修復は否定されて

いるが、チミンダイマーの蓄積がミトコンドリアに悪影響を与えることもまた知られている。本研究において TFAM によるチミンダイマー修復が確認できたため、ミトコンドリア中において TFAM がチミンダイマーの修復を通じて mtDNA の安定性に寄与しているものと思われる。

A property and structural analysis of H3–H4 octasome (H3–H4 オクタソームの特性と構造解析)

真核生物のゲノム DNA はヒストンタンパクに巻き取られ、クロマチン構造を形成する。ヒストンタンパクは H2A, H2B, H3, H4 の4つのバリエーションが知られており、2個の H2A–H2B dimer と1個の H3–H4 tetramer からなるヒストン八量体に DNA が巻き取られた複合体は nucleosome と呼ばれる。クロマチンは nucleosome が連続したものであり、核内における nucleosome の形成は DNA の合成と共に段階的に行われる。まず初めに H3–H4 tetramer が DNA と結合することで tetrasome を形成し、続いて H2A–H2B が挿入されることがこれまでの研究で判明している。申請者らの研究室では DNA に H3–H4 tetramer が1個結合した tetrasome の他に2個結合した octasome が形成されうることを報告しているが、その詳細な構造と特性は不明であった。本研究において申請者は分離精製した tetrasome, octasome を X線小角散乱とヌクレアーゼ処理によって分析し、その結果と MD 法から得られた複合体の予測構造と比較した。MD 法により得られた予測では tetrasome は tetramer が DNA に張り付いただけの構造、octasome は2つの tetramer の周りに DNA が巻き付いている構造であることが示され、両モデルは実際の分析結果と矛盾せず tetrasome, octasome の予測構造として有力なものであることがわかった。また octasome 形成による nucleosome の形成と転写活性への影響を確認すると、興味深いことに同条件における H2A–H2B dimer の取り込み効率は octasome の方が高く、転写活性への影響も nucleosome とほとんど差がないことが確認できた。クロマチン構造から H2A–H2B dimer を除去し H3–H4 tetramer のみを DNA 上に残すと tetrasome, octasome の両複合体が形成されることが示唆されている。一方で本研究において精製した octasome は徐々に tetrasome に分解していったことから DNA と H3–H4 複合体は tetrasome, octasome を含む平衡状態にあると思われる。MD 法によって構造が得られたため octasome は非常に短い時間で形成され、H2A–H2B dimer の取り込み効率が上がったことから核内における nucleosome 形成の際に重要な役割を果たすものと考えられる。