

生化学部門 Department of Biochemistry

現在、生化学部門では前年度から引き続き行なっている哺乳動物及び大腸菌の O⁶-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼに関する研究に加えて、医学部第一生化学教室と共同で哺乳動物と大腸菌の 8-oxodGTPase の研究と Fos, Jun による細胞複製の制御に関する研究が行なわれている。

人事面では助手の服部和枝が1991年4月1日より創価大学生命科学研究所の講師として転出し、別府生医研から西田純一が研究生として加わった。

A. 哺乳動物及び大腸菌の O⁶-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼに関する研究

DNA は外界あるいは細胞内に存在するアルキル化剤によって種々の損傷を受ける。

例えば、グアニンの 6 位の O がメチル化された O⁶-メチルグアニンは C の他に T とも対合できるようになり、その結果 G-C 塩基対から A-T 塩基対への突然変異を引き起こす。

この GC-AT トランジションは癌遺伝子である ras の活性化の原因の 1 つであると考えられている。遺伝情報である DNA の破壊や変更をひきおこすこのような修飾された塩基を修復するシステムを生物は持っている。

例えば、上に述べたの O⁶-メチルグアニンは細胞が持っている O⁶-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼによって修復される。この酵素は大腸菌からヒトに至るまで広く存在しており、遺伝情報の維持のために働いている基本的な酵素のひとつであると考えられている。

我々はヒト、マウス及びラットからこの O⁶-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼの cDNA をクローニング、解析している。これまでにそれぞれの塩基配列を決定し、コードされているタンパク質のアミノ酸配列が推定できた。これらの結果は現在までに明かにされている他の O⁶-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼのデータとともに表 1 に示した。

ヒトとマウスに関してはさらに cDNA を大腸菌内で大量生産させ精製を行ない、純粋なタンパク質標品を得ている。また精製したヒトの酵素を用いてウサギを免疫して抗血清を得ておりマウスの酵素に対する抗血清も作製中である。これらをさらにアフィニティー精製して得た抗血清を用いて、臨床的に簡単に細胞内の酵素量を測定することができないか検討中である。これまでの研究から O⁶-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼの欠損と発癌の関係が示唆されており、簡単な検査法が確立できれば潜在的な発癌のリスクや個人レベルで抗癌剤

の選択の基準の目安になるのではと期待している。

ヒトとマウスに関しては遺伝子のクローニングも進んでおり、それぞれ150kb以上の大きな遺伝子であることがわかっている。クローニングされた遺伝子を用いてヒトでは酵素欠損が生じるメカニズムを主に転写調節のレベルで解析中であり、またマウスではジーンターゲットイングを用いてO⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ欠損動物を作製中である。遺伝的にO⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼを欠損したマウスを用いればこの酵素の発癌抑制における役割がはっきりしてくるとともに、ヒトにおけるO⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼの欠損と発癌の関係も明らかになってくるのではないかと考えている。

大腸菌にはAdaとOgtという2種類のO⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼが存在する(表1)。このうちAda蛋白質は修復酵素としての働きに加えて“アルキル化剤に対する適応応答”という修復誘導システムにおける正の転写調節因子としての機能ももっている。この蛋白質は2個のメチル基受容部位をもっており、そのうちC末側321番目のシステイン残基がO⁶-メチルグアニンからのメチル基を受容する。N末側69番目のシステイン残基はO⁶-メチルグアニンではなく、リン酸基がメチル化されてできたメチルホスホトリエステルからメチル基を受容する。このメチルホスホトリエステルからのメチル基の受容がシグナルとなってAda蛋白質は転写調節因子として活性化され、“アルキル化剤に対する適応応答”で誘導される遺伝子のプロモーター(*ada*遺伝子や*alkA*遺伝子)の上流にある調節領域に結合できるようになる。このようにして結合したAda蛋白質はさらにRNAポリメラーゼのプロモ-

表1 DNA methyltransferases

methyltransferase	amino acids	M.W.	O ⁶ -methylguanine methyl acceptor	methylphosphotriester methyl acceptor
<i>Escherichia coli</i>				
<u>Ada protein</u>	354	39,385	Cys-321	Cys-69
<u>Ogt protein</u>	171	19,082	Cys-139	-----
<i>Bacillus subtilis</i>				
<u>Dat protein</u>	165	18,755	Cys-130	-----
<u>Ada A protein</u>	211	24,302	-----	Cys-85
<u>Ada B protein</u>	179	20,127	Cys-141	-----
<i>Salmonella typhimurium</i>				
<u>Ada protein</u>	352	39,217	Cys-320	Cys-68
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
<u>human MGMT protein</u>	207	21,618	Cys-145	-----
<u>mouse MGMT protein</u>	211	22,438	Cys-149	-----
<u>rat MGMT protein</u>	209	22,247	Cys-149	-----

当研究室でクローニングされている酵素の遺伝子(cDNA)はアンダーラインで示している。

ターへの結合を促進し、そのプロモーターからの転写量を増加させ、結果としてその遺伝子がコードしている DNA 修復酵素が誘導される。現在、Ada 蛋白質が結合する 2 つの遺伝子 (*ada*, *alkA*) の調節領域を比較し、重要と思われる配列に点突然変異を導入したミュータントプロモーターをつくり、Ada 蛋白質の結合、転写への影響等を *in vivo*, *in vitro* の両方から解析している。Ada 蛋白質は塩基配列だけでなく、より高次の構造 (例えば DNA の折れ曲がり) を認識している可能性があり、今後さらに解析を続けていく必要がある。

一方大腸菌の RNA ポリメラーゼは α , β , β' , σ という 4 種類のサブユニットからなるがこれらのミュータントを用いた解析から Ada 蛋白質は α サブユニットとプロモーター上で相互作用していることが明らかになってきた。この点に関しても国立遺伝研のグループと共同でより詳しい解析を進めている。

B. 哺乳動物と大腸菌の 8-oxo-dGTPase の研究

O⁶-メチルグアニンと同じように DNA 上に生じ突然変異の原因となる修飾塩基は他にも知られている。なかでもグアニンの 8 位の炭素にオキソ基がついた 8-oxo-G は最近特に注目をあびている。8-oxo-dG は dC とだけでなく dA とも対合するので、DNA 合成中に dA:8-oxo-dG ペアとして取り込まれたこの塩基 (8-oxo-dG) は修復されない限り、AT-CG トランスバージョンの原因になる。また DNA 中の dG:dC ペアの dG が 8-oxo-dG に変化すると、複製時にある頻度で 8-oxo-dG に対して dA が取り込まれて、今度は逆に GC-TA トランスバージョンが引き起こされると予想される。

大腸菌では自然突然変異頻度が上昇するミュータント (ミューテーター) が知られている。その中でも GC-TA トランスバージョンを生じる頻度が上昇するミューテーター *mutM* 変異株、およびその遺伝子産物の解析から、この遺伝子産物が DNA 上の 8-oxo-G を切り出す N-グリコシラーゼ活性と隣接するヌクレオチド間のホスホジエステル結合を切断するエンドヌクレアーゼ活性を合わせ持つ酵素らしいことが報告されている。

一方、我々は AT-CG トランスバージョンが 1000 倍以上上昇するミューテーター遺伝子 *mutT* をクローニングして、塩基配列の解析を行なった。更にその遺伝子産物 MutT 蛋白質を精製してその性質を解析した結果、MutT 蛋白質は dGTPase 活性を有し dA に対する dG のミスインコーポレーションを何らかの方法 (おそらく *syn* 型をとる dGTP を加水分解することによって) で抑制するものと結論した。

しかしながら、DNA 合成中にミスペアとしてとり込まれる量 dGTP の量に上限のあることや、一旦取り込まれるとプルーフリーディングによって修復されないなど説明できないこともあった。ところが、dGTP にはある程度の 8-oxo-dGTP が含まれており、8-oxo-dGTPこそがこれまでの分析で観察されていた MutT 蛋白質の主要な基質である、とすればデータをよりよく解釈できることが分かった。

実際に8-oxo-dGTPを合成してMutT蛋白質を作成させると、この酵素は8-oxo-dGTPを効率よく8-oxo-dGMPに加水分解することが明らかになった。8-oxo-dGTPに対するKm値はdGTPに比べて約2000分の1であり、MutT蛋白質の真の基質は8-oxo-dGTPであることが強く示唆された。今後これらの突然変異株 (MutT, MutM など) を用いて自然突然変異の生成における8-oxo-Gの役割やそのメカニズムについて調べていきたいと考えている。

さらに我々は、この8-oxo-dGTPase活性が大腸菌だけでなく、ヒトなど高等生物にも存在することも確認している。ヒトの8-oxo-dGTPaseに関しては培養細胞を材料に用いてこの酵素の精製をほぼ完了している。8-oxo-Gが大腸菌の複数のミューテーター遺伝子の遺伝子産物の基質であり自然突然変異に関して非常に重要な寄与をしていると考えられること、8-oxo-G生成の主因となる活性酸素は正常細胞内においても常に生成していることなどから、多細胞生物においても8-oxo-Gを体細胞突然変異の原因の1つとしてとらえてよいのではないかと考えている。これからはこの酵素のcDNAと遺伝子をヒトとマウスのライブラリーからクローニングし、ジーンターゲットングを用いて8-oxo-dGTPase欠損マウスを作って酵素欠損と発癌の関係について調べていきたいと考えている。

C. Fos, Jun による細胞複製の制御に関する研究

血清飢餓や接触阻止により増殖サイクルを離脱した細胞は、血清や細胞増殖因子で刺激すると速やかに前初期遺伝子群を発現し細胞複製を再開する。前初期遺伝子群のなかで、fos, jun, c-mycは癌原性を持つことから細胞複製を促進的に制御すると考えられる。これまでにc-Mycタンパク質は強制発現により、血清同様休止期の細胞を活性化することがすでに報告されている。しかし、Fos及びJunタンパク質に関してはこれらが単独で休止期の細胞を活性化できるか否か全く解析されていない。今回、我々は、Fosファミリーのタンパク質が単独で休止期の細胞を活性化するのかを明らかにするため以下の実験を行なった (図1)。

(1) FosBをエストロゲンレセプターとの融合タンパク質として発現するプラスミドを作製し、FosBの機能をエストロゲン依存性とした。このプラスミドをrat1a細胞に導入し、融

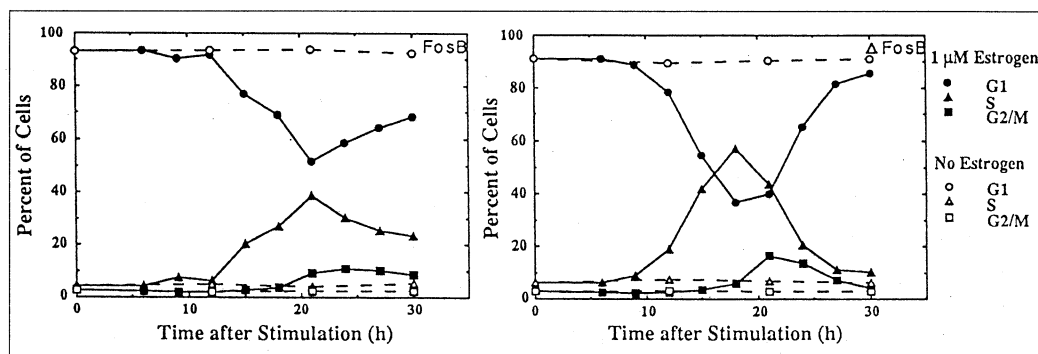


図1 エストロゲン依存性 FosB, ΔFosB による休止期細胞の細胞複製開始

合タンパク質を発現する細胞株を樹立した。融合タンパク質はエストロゲン非存在下では非常に不安定でほとんど検出できないが、エストロゲン処理により安定なタンパク質として核内に検出された。FosB 融合タンパク質を発現する細胞を接触阻止及び血清飢餓により休止期に同調し、これをエストロゲンで処理したところ、融合タンパク質の活性化にともない細胞複製が開始した。この時、休止期の細胞の約50%が同調してS期に移行し、全細胞周期を完了した。

(2) 我々は、以前に FosBmRNA のスプライシングの違いによって生じた Δ FosB タンパク質を発見し、これが、FosBと同じ様に血清で誘導されることを明らかにしている。 Δ FosB は FosB の C 末端101アミノ酸残基を欠くため、Jun タンパク質とヘテロダイマーを形成し AP-1 結合部位に結合するものの AP-1 依存性プロモーターを活性化しない。更に、FosB, c-Fos, Fra-1 タンパク質で抑制される c-fos プロモーターの発現を抑制しない。 Δ FosB タンパク質は Fos/Jun 複合体の転写制御能をネガティブに調節しているようである。そこで細胞増殖に於ける Δ FosB の役割を明らかにする目的で、(1) に述べたシステムを用いて Δ FosB が休止期の細胞を活性化するか否かを検討した。その結果、 Δ FosB は休止期の rat1a 細胞を60%以上同調して S 期に移行させ、且つ全細胞周期を完了させた。

以上の実験結果から、Fos ファミリーの FosB タンパク質が c-Myc 同様単独で休止期の細胞を活性化し、細胞複製を開始することが証明された。更に、Jun/Fos 複合体の転写調節機能をネガティブに制御する Δ FosB も細胞複製をポジティブに調節することが明らかになった。血清で活性化された休止期の細胞が正常な細胞複製を開始するのに、FosB と Δ FosB は c-Myc と同様に重要な役割を担っていると結論される。

原著論文

1. Takano, K., Nakamura, T. and Sekiguchi, M. 1991.
Roles of two types of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferases in DNA repair.
Mutation Res., 254, 37-44.
2. Maki, H., Mo, J-Y. and Sekiguchi, M. 1991.
A strong mutator effect caused by an amino acid change in the α subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem., 266, 5055-5061.
3. Nakatsuru, Y., Matsukuma, M., Sekiguchi, M. and Ishikawa, T. 1991.
Characterization of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in transgenic mice introduced with the *E. coli ada* gene.
Mutation Res., 254, 225-230.
4. Kondo, H., Shiratsuchi, K., Yoshimoto, T., Masuda, T., Kitazono, A., Tsuru, D.,

- Anai, M., Sekiguchi, M. and Tanabe, T. 1991.
Acetyl-CoA carboxylase from *Escherichia coli*: Gene organization and nucleotide sequence of the biotin carboxylase subunit.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88, 9730-9733.
5. Mizunoe, Y., Amano, K., Sekiguchi, M. and Kumazawa, J. 1991.
Identification and nucleotide sequence of the gene determining the adhesive ability of *Serratia marcescens*.
J. Bacteriol., 173, 3257-3260.
6. Habraken, Y., Carter, C.A., Sekiguchi, M. and Ludlum, D.B. 1991.
Release of N², 3-ethanoguanine from haloethylnitrosourea-treated DNA by *E. coli* 3-methyladenine-DNA glycosylase II.
Carcinogenesis, 12, 1971-1973.
7. Sakumi, K., Shiraishi, A., Hayakawa, H. and Sekiguchi, M. 1991.
Cloning and expression of cDNA for rat O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase.
Nucleic Acids Res., 19, 5597-5601.
8. Mo, J-Y., Maki, H. and Sekiguchi, M. 1991.
Mutational specificity of the *dnaE173* mutator associated with a defect in the catalytic subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol., 222, 925-936.
9. Suzuki, M., Takahashi, K., Kawazoe, Y., Sakumi, K. and Sekiguchi, M. 1991.
Inhibitory effect of cadmium and mercury ions on transcription of the *ada* gene.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 179, 1517-1521.
10. Maki, H. and Sekiguchi, M. 1992.
MutT protein specifically hydrolyzes 8-oxodGTP, a potent mutagenic substrate for DNA synthesis.
Nature, 355, 273-275.
11. Fukuhara, M., Hayakawa, H., Sakumi, K. and Sekiguchi, M. 1992.
Induced synthesis of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in rat hepatoma cells exposed to DNA damaging agents.
Japan J. Cancer Res., 83, 72-77.
12. Shiraishi, A., Sakumi, K., Nakatsu, Y., Hayakawa, H. and Sekiguchi, M. 1992.
Isolation and characterization of cDNA and genomic sequences for mouse O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase.
Carcinogenesis, 13, 289-296.

総説

1. 関口睦夫. 1991.
DNA 修復酵素遺伝子のクローニング.
最新医学, 46, 増刊, 956-962.
2. 関口睦夫. 1991.
メチルグアニン DNA メチルトランスフェラーゼ.
代謝, 28, 987-995.

学会発表

1. Sekiguchi, M., Hayakawa, H., Koike, G., Maki, H., Nakatsu, Y., Hattori, K. and Chue, L.-L. (1991, 1/21-23).
Expression and structures of cDNA and genomic DNA for a human enzyme that repairs O⁶-methylguanine, a mutagenic and cytotoxic lesion in DNA.
International Workshop "DNA Repair Mechanisms and Embryo Manipulation." Osaka, Japan.
2. Sekiguchi, M. (1991, 7/14-19).
Transcriptional control by methyl transfer to the Ada regulatory protein of *E.coli*.
FASEB Summer Conference "Positive Control of Transcription Initiation in Prokaryote." Vermont, USA.
3. 作見邦彦, 関口睦夫 (1991, 9/11-9/13).
抗 hMGMT 抗体を用いたヒト癌細胞株の解析.
第50回日本癌学会総会, 東京.
4. 福原正生, 早川 浩, 作見邦彦, 関口睦夫 (1991, 9/11-9/13).
ラット肝癌細胞 (H4IE) における O⁶-メチルグアニン DNA メチルトランスフェラーゼの誘導.
第50回日本癌学会総会, 東京.
5. 松隈章一, 許南浩, 関口睦夫, 中鶴陽子, 石川隆俊 (1991, 9/11-9/13).
O⁶-メチルグアニン DNA メチル基転移酵素遺伝子導入マウスの肝臓における DNA O⁶-メチルグアニンの脱メチル修復.
第50回日本癌学会総会, 東京.
6. 石川隆俊, 中鶴陽子, 松隈章一, 関口睦夫, 菅野晴夫 (1991, 9/11-9/13).
DNA 修復酵素メチルトランスフェラーゼ遺伝子導入マウスでのアルキル化発癌の抑制.
第50回日本癌学会総会, 東京.
7. Sekiguchi, M. (1991, 9/22-27).

Organization and expression of human and rodent genes for DNA methyltransferases.
Workshop on Repair of DNA Alkylation Damage. Courmayeur, Italy.

8. 関口睦夫 (1991, 10/2-10/5).
DNA 修復と発がんの抑制機構.
第64回日本生化学会大会, 東京.
9. 服部和枝, 中津可道, 早川浩, 清水憲二, 関口睦夫 (1991, 10/2-10/5).
ヒト O⁶-メチルグアニン DNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子の単離と発現調節.
第64回日本生化学会大会, 東京.
10. 真木寿治, 莫錦堯, 関口睦夫 (1991, 10/16-10/18).
大腸菌 *rpsL* 遺伝子における逆位を伴う重複変異.
第63回日本遺伝学会大会, 福岡.
11. 中村崇規, 伊藤隆康, 真木寿治, 関口睦夫 (1991, 10/16-10/18).
アルキル化剤による誘発変異のスペクトラム解析.
第63回日本遺伝学会大会, 福岡.
12. Sekiguchi, M., Hayakawa, H. and Maki, H. (1991, 12/1-6).
Enzymatic repair of O⁶-methylguanine and elimination of 8-oxoguanine-containing nucleotide.
AACR Special Conference in Cancer Research, "Cellular Responses to environmental DNA Damage. Banff, Canada.
13. 作見邦彦, 秋丸裕司, 関口睦夫 (1991, 12/17-12/20).
Ada 転写調節蛋白質の構造と機能.
第14回日本分子生物学会年会, 福岡.
14. 阪下日登志, 有吉真理子, 大久保忠恭, 森川耿右, 作見邦彦, 関口睦夫 (1991, 12/17-12/20).
大腸菌 Ada 蛋白質: 機能ドメインの構造.
第14回日本分子生物学会年会, 福岡.
15. 鈴木任, 高橋和彦, 川添豊, 作見邦彦, 関口睦夫 (1991, 12/17-12/20).
金属イオンによる Ada 蛋白質の転写促進活性の阻害.
第14回日本分子生物学会年会, 福岡.
16. 綾木仁, 原隆二郎, 石崎寛治, 早川浩, 関口睦夫, 池永満生 (1991, 12/17-12/20).
コケイン症候群 B 群細胞株からの紫外線抵抗株の分離.
第14回日本分子生物学会年会, 福岡.
17. 中別府雄作, 関口睦夫 (1991, 12/17-12/20).
FosB および Δ FosB タンパク質による細胞複製の活性化.

第14回日本分子生物学会年会, 福岡.

18. 中別府雄作, 織田信弥, 関口睦夫 (1992, 1/16-1/18).

Fos, Jun による細胞複製の制御.

「細胞制御」ワークショップ, 蒲郡.

19. Nakabeppu, Y., and Sekiguchi, M. (1992, 1/25-2/8).

Proliferative activation of resting cells by two forms of FosB proteins.

Keystone Symposia on Molecular & Cellular Biology.