

生化学部門

Department of Biochemistry

1990年1月から12月までの人事異動は以下の通りであった。

教授 関口睦夫 1990年1月就任

(九州大学医学部第一生化学教室と併任)

助手 服部和枝 1990年4月就任

助手 作見邦彦 1990年4月就任

その結果、助手の古市正人、技官の木下徳彦とあわせて教授1，助手3，技官1となった。現在、大学院生や研究生は在籍していない。

関口睦夫教授就任に伴い1990年1月より研究の中心は，“アルキル化剤で障害を受けたDNAの修復をつかさどる蛋白質のひとつ，O⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼの遺伝子の構造及びその発現機構の解明”に移った。現在大腸菌，ヒト，マウス及びラットのO⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼについて研究が進んでいる。

A. ヒトの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構造と発現調節

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、アデニンの3位がメチル化された3-メチルアデニンはDNA合成をストップさせるし、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もっている。例えば、上に述べた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。

ヒトの癌由来の細胞の10~20パーセントはO⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼの活性が低いか、あるいはまったく欠いていることが知られている。この現象が癌の原因なのか、それとも結果であるのかはまだ不明であるが、この酵素がras遺伝子の活性化を抑えることを考えると、O⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ活性の欠損は癌の原因になり得ると言えよう。

1989年、我々のグループによってヒトのO⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼのcDNAがクローニングされたことによって、染色体上にあるこの遺伝子の構造を探ること

が可能になった。cDNA をプローブとしてヒトの genomic DNA ライブラリーをスクリーニングし、得られた複数のコスミドクローンを解析した結果、ヒトの O⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼの遺伝子の全長は170kb以上あることがわかった。現在、この遺伝子のエクソン-イントロン構造、プロモーター領域の構造と機能等について研究を進めている。それらの構造を正常細胞と酵素活性を欠く（癌）細胞とで比較することによって、この遺伝子の発現調節のメカニズムが明らかになってくるだろう。それはまたこの酵素欠損がなぜおきるのか、そしてそれが癌の原因となりうるのか等の疑問に対する答えとなるかもしれない。これまでに、転写レベルの調節の異常が酵素欠損の原因と思われるケースがいくつかみつかり、哺乳類細胞の転写調節のひとつの新しいモデル系になるのではないかと期待している。

B. マウスおよびラットの O⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ cDNA のクローニングと解析

現在クローニングされ、その構造がわかっている O⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼは哺乳類ではヒトだけである。ヒトを材料とした場合、その結果がすぐに臨床と結びつけられるという利点がある半面、検証のための実験が行えないという欠点がある。そこで我々は実験動物として扱いやすく、しかも遺伝子導入の可能なマウスとラットからこの酵素の cDNA をクローニングした。

ヒトの O⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼの cDNA をプローブとしてマウスおよびラットの染色体DNA のサザンブロッティングをおこなったところ数本のバンドが確認できた。また polyA⁺RNA を用いたノーザンブロッティングでは約 1 kb の mRNA を検出できた。このプローブを用いてマウスの cDNA ライブラリーをスクリーニングして得られたマウスの O⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼの cDNA は、211個のアミノ酸からなる蛋白質をコードしており、そのアミノ酸配列はヒトの O⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼのそれと非常によく似ていた。特に、メチル基受容部位であるシステイン残基の周辺はほとんど同一であった (図. B)。

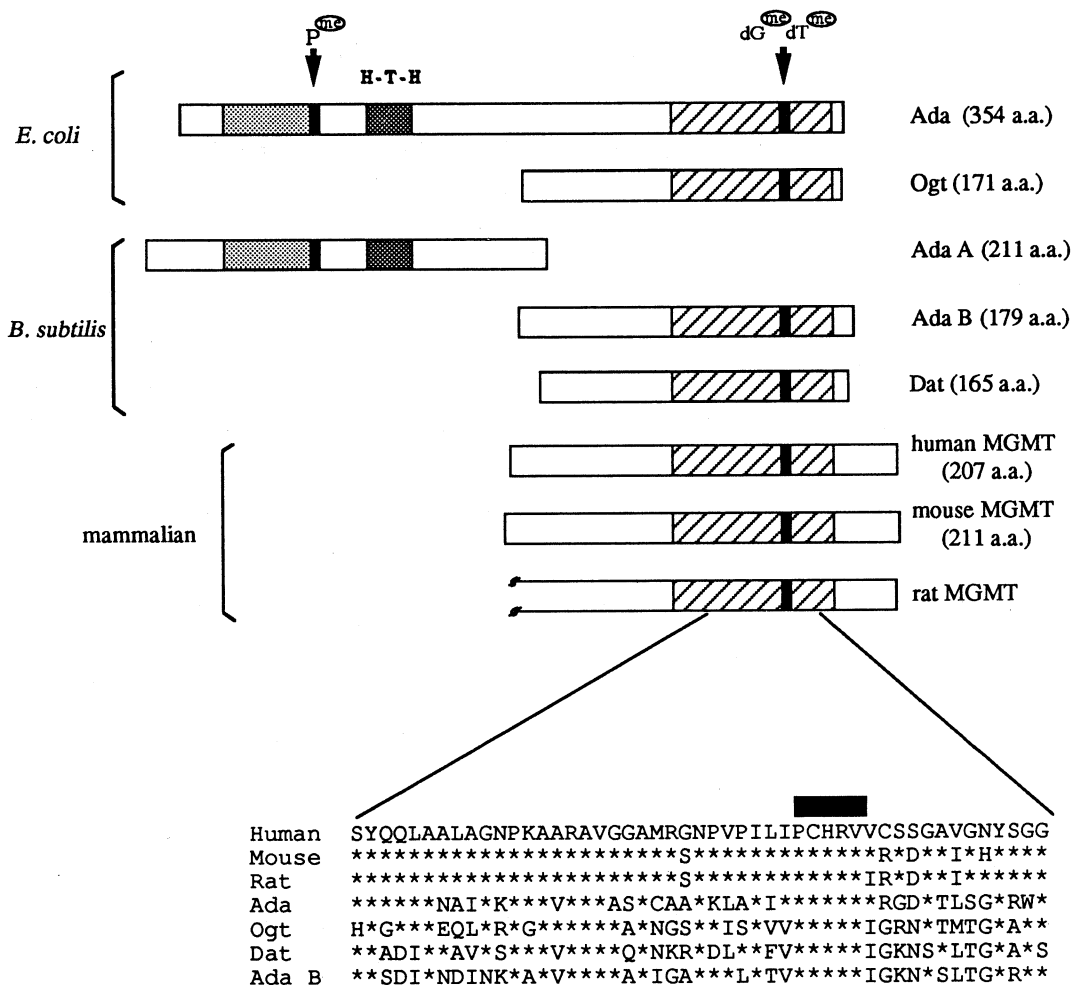


図. B DNA メチルトランスフェラーゼの構造

こうして得られたマウスのO⁶-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼのcDNAをプローブに用いて、現在マウスの染色体DNA ライブラリーをスクリーニング中である。これまでにこの遺伝子を含む100kb以上の領域をクローニングして、3'側の複数のエクソン-イントロン構造を明らかにした。残りの領域についても順次決定しつつある。

同様の方法でラットのcDNA ライブラリーをスクリーニングして、ラットのO⁶-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼのcDNAのクローニングを行なった。現在得られている

クローンは5'端が少し欠けているが、マウスやヒト、特にマウスと非常によく似たアミノ酸配列をもつことがわかっている。図. Bにこれまでに一次構造が決定されているDNAメチルトランスフェラーゼのアミノ酸数、ホモロジーのある領域、O⁶-メチルグアニンおよびO⁶-メチルチミンからメチル基を受け取るシステイン残基周辺のアミノ酸配列を示す。

C. ヒトのO⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼに対する抗体の作成

O⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼの細胞含量はあまり多くないため、この酵素をヒトの組織あるいは培養細胞から大量に調製することは難しい。そこでクローニングされたヒトのcDNAを大腸菌内で大量に発現させ、それからこの酵素を精製して抗体作成に用いた。精製したO⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼでウサギを免疫して得られた抗血清（抗hMGMT血清）を、さらに精製した酵素を用いてアフィニティー精製して抗hMGMT抗体を得た。この抗体は大腸菌や枯草菌の酵素とまったくcross-reactせず、さらにマウスやラットの酵素ともヒトの酵素と同じ条件では反応しなかった。この抗体を用いることによって、RIを使わず簡単にサンプル中の酵素を数ng（10⁻¹pmol）のオーダーでウエスタンブロットティングによって検出できるようになった。さらにこの抗体を用いてO⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼの細胞内での局在性を蛍光抗体法を用いて調べると、そのほとんどが核に存在していることがわかった。

今後この抗体を用いて酵素抗体法でヒトの癌組織の各正常組織におけるO⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼの分布状態や欠損の有無を調べ、この酵素活性の強さと癌の種類や悪性度との相関関係を調べる予定である。

D. 大腸菌のAda蛋白質による転写調節機構の解析

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（図. B）。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ー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。以上のことは過去数年にわたる研究で我々が明らか

にしてきたことであり，図Dにその1例を示す．*alkA* 遺伝子は3-メチルアデニン-DNA グリコシラーゼIIをコードする遺伝子であり，アルキル化剤にさらされたときに誘導される修復酵素の1つである．この遺伝子上流にはAda 蛋白質が結合する領域があり，Ada蛋白質（39 kDa）はメチル化されることによってこの領域に結合する．この様子をDNase Iフットプリンティングでみたのが図D.1である．この状態でRNAポリメラーゼを加えるとRNA

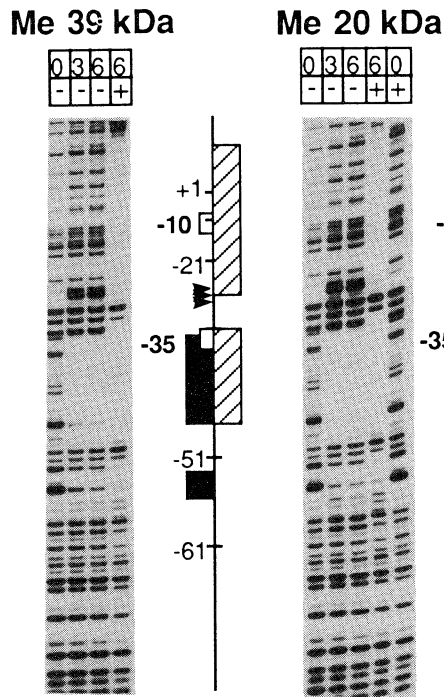


図. D. 1 Ada 蛋白質によるRNA ポリメラーゼの*alkA*プロモーターへの結合促進

ポリメラーゼは *alkA* プロモーターに結合し，転写が始まる．図D.2では *in vitro* 転写系を用いて，メチル化されたAda蛋白質（39kDa）を加えると *alkA* プロモーターからの転写が誘導されることを示している．これらの現象はメチルホスホトリエステルからのメチル基受容部位である69番目のシステイン残基を含むN末側半分の20kDaドメインだけでもおきることから，プロモーター上流の塩基配列を認識して結合し，さらにRNAポリメラーゼのプロモーターへの結合を促進するという基本的な転写促進因子としての活性はN末側のドメインに存在することがわかった．

適応応答では *alkA* 遺伝子だけではなくAda蛋白質をコードしている *ada* 遺伝子自身も誘導される．*ada* 遺伝子の転写調節のメカニズムは，メチル化されたAda蛋白質が調節領域に結

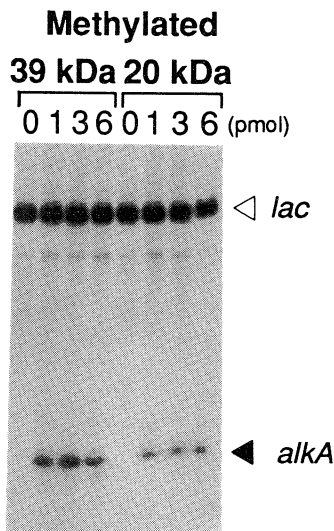


図. D. 2 Ada 蛋白質による *alkA* プロモーターの転写促進

合してさらに RNA ポリメラーゼのプロモーターへの結合を促進する，という基本的な現象は *alkA* 遺伝子で観察されたことと同じだが，N 末側半分の 20kDa 蛋白質に対する応答性は異なっていた．すなわち，メチル化されて結合した 20kDa 蛋白質は *ada* プロモーター上では RNA ポリメラーゼの結合を促進できず，逆に阻害したのである．

大腸菌内では特異的なプロテアーゼによって Ada 蛋白質の N 末側半分の 20kDa 蛋白質が生成していると考えられるが，このような *ada* 遺伝子の発現の阻害は，適応応答という生物学的な現象の終結に寄与していると考えている．この 20kDa 蛋白質が生成することによって，3-メチルアデニン-DNA グリコシラーゼ II という修復酵素を作り続けながら，一方では適応応答全体を終結に向かわせていると考えることができる．

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はなく，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．

業 績 目 録

原著論文

1. Takahashi, M., Sakumi, K. and Sekiguchi, M., 1990.

Interaction of Ada protein with DNA examined by fluorescence anisotropy of the

protein.

Biochemistry, 29, 3431-3436.

2. Hayakawa, H., Koike, G. and Sekiguchi, M., 1990.

Expression and cloning of complementary DNA for a human enzyme that repairs O⁶-methylguanine in DNA.

J. Mol. Biol., 231, 739-747.

3. Koike, G., Maki, M., Takeya, H., Hayakawa, H. and Sekiguchi, M., 1990.

Purification, structure and biochemical properties of human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase.

J. Biol. Chem., 265, 14754-14762.

4. Akimaru, H., Sakumi, K., Yoshikai, T., Anai, M. and Sekiguchi, M., 1990.

Positive and Negative regulation of transcription by a cleavage product of Ada protein.

J. Mol. Biol., 216, 261-273.

総 説

1. Sakumi, K. and Sekiguchi M., 1990.

Structures and functions of DNA glycosylases.

Mutation Res. 236, 161-172.

著 書

1. Maki, H., Akiyama, M., Horiuchi, T. and Sekiguchi, M., 1990.

Molecular mechanisms of replicational fidelity in *Escherichia coli*.

Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanism II (eds. Kuroda, Y., Shankel, D.M. and Waters, M.D.) Plenum Publishing Co., New York, 299-308.

学会発表

1. 関口睦夫 (1990, 5/19-5/20).

突然変異と発癌の抑制機構-DNA メチル転移酵素の役割.

日本生化学会九州支部例会シンポジウム, 福岡.

2. 小池城司, 真木寿治, 早川浩, 関口睦夫 (1990, 7/3-7/5).

ヒト O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase の構造と性質.

第49回日本癌学会総会, 札幌.

3. 関玲玲, 中村崇規, 中津可道, 早川浩, 関口睦夫 (1990, 7/3-7/5).

- ヒト正常および変異型O⁶-メチルグアニンDNA メチルトランスフェラーゼ.
第49回日本癌学会総会, 札幌.
4. Sekiguchi, M. (1990, 7/9-7/13).
Detailed mechanisms of accurate DNA repair : O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase.
Gordon Conference on Mutagenesis (Plymouth, N.H., U.S.A).
 5. 関口睦夫, 早川浩 (1990, 8/3-8/4).
DNA のアルキル化による発癌とその抑制機構.
第14回阿蘇シンポジウム, 熊本.
 6. Sekiguchi, M., Koike, G., Maki, H., Nakatsu, Y., Sakumi, K., Shiraishi, A. and Hayakawa, H., (1990, 8/16-8/22).
Structure and expression of the human gene for O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase.
15th International Cancer Congress, Hamburg, Germany.
 7. 関口睦夫, 作見邦彦, 秋丸裕司 (1990, 9/12-9/15).
メチル化による転写調節.
第63回日本生化学会, 大阪.
 8. Sekiguchi, M., Sakumi, K. and Akimaru, H. (1990, 9/16-9/22).
Adaptive response-Induced synthesis of DNA repair enzymes by alkylating agents.
IUMS Congress: Bacteriology and Mycology, Osaka.
 9. 真木寿治, 莫錦堯, 関口睦夫 (1990, 10/4-10/6).
大腸菌染色体上の IS1 挿入配列の可動性.
第62回日本遺伝学会, 東京.
 10. Sekiguchi, M. (1990, 10/24-10/26).
Expression of genes for DNA repair enzymes in *E. coli* and human cells.
3rd. Italy-Japan Joint Meeting: Regulation of Cell Differentiation and Eukaryotic Gene Expression, Fukuoka.
 11. 関口睦夫 (1990, 10/30).
自然および誘導突然変異の抑制機構.
第19回日本環境変異原学会特別講演, 福岡.
 12. 作見邦彦, 白石明子, 早川浩, 関口睦夫 (1990, 11/26-11/29).
DNA 修復酵素の相同性と種特異性: 抗血清を用いた解析.
第13回日本分子生物学会, 京都.
 13. 白石明子, 作見邦彦, 中津可道, 早川浩, 関口睦夫 (1990, 11/26-11/29).

- マウス 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解析.
第13回日本分子生物学会, 京都.
14. 中津可道, 早川浩, 服部和枝, 清水憲二, 関口睦夫 (1990, 11/26-11/29).
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構造およびその発現.
第13回日本分子生物学会, 京都.
15. 古市正人, 作見邦彦, 中村崇規, 穴井元昭, 関口睦夫 (1990, 11/26-11/29).
大腸菌 *alkA* 遺伝子の塩基置換変異体による Ada 蛋白質結合領域の解析.
第13回日本分子生物学会, 京都.
16. 関玲玲, 中村崇規, 中津可道, 早川浩, 関口睦夫 (1990, 11/26-11/29).
変異型のヒト O⁶-メチルグアニン DNA メチルトランスフェラーゼ解析.
第13回日本分子生物学会, 京都.
17. 真木寿治, 莫錦堯, 関口睦夫 (1990, 11/26-11/29).
大腸菌 DNA ポリメラーゼ III の忠実度制御の分子機構.
第13回日本分子生物学会, 京都.
18. 莫錦堯, 真木寿治, 関口睦夫 (1990, 11/26-11/29).
大腸菌 *rpsL* 遺伝子における自然突然変異のスペクトラム解析.
第13回日本分子生物学会, 京都.
19. Sekiguchi, M., Hayakawa, H., Koike, G. and Nakatsu, Y. (1990, 12/2-12/3).
Cloning of cDNA related to human genetic defect by expression vectors.
Beppu Harbor Symposium : Molecular Approach to Monogenic and Multifactorial
Diseases, Beppu.