

はじめに

眼球運動失行、低アルブミン血症を伴う早期発症型失調症 (early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia; EAOH) は、常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症の一型で、発症初期に眼球運動失行を伴い、進行期に低アルブミン血症を合併する遺伝性神経疾患である¹⁾²⁾。病理学的には小脳プルキンエ細胞の著明な脱落と脊髄後索および脊髄小脳路の変性、末梢神経においては有髄・無髄線維の高度の脱落を認める³⁾⁴⁾。連鎖解析により原因遺伝子の存在が9p13に絞られた後の2001年、Dateらにより原因遺伝子が同定され、Aprataxin (APTX) と命名された⁵⁾。現在までAPTXの生理機能に関し、核での局在が認められること⁶⁾、ホモロジー解析によりN末端にpolynucleotide kinase 3'-phosphatase (PNKP) 類似配列を、C末端にはHITモチーフを持っていることが示されている⁵⁾⁷⁾。ヒトPNKPは1999年にクローニングされ¹⁴⁾、DNA修復の過程で一本鎖DNAの断端をDNAポリメラーゼが作用できる形に処理することでSSBRを促進すると考えられている。分裂酵母において、PNKPのホモログであるPnk1の欠失株は通常条件では生育に変化が見られないが、ガンマ線などに対し著明な高感受性を示す¹⁵⁾。またHITモチーフと呼ばれる構造を持つタンパクのいくつかは脱リン酸化活性を持ち、HITモチーフは作用部位として重要であると考えられている¹⁶⁾。さらに最近になり、APTXをbaitとしたYeast two hybridシステムを用いたタンパク相互作用の研究にて一本鎖DNA修復 (DNA single-strand break repair; SSBR) 関連蛋白であるX-ray repair cross-complementing group 1 protein (XRCC1) との相互作用が証明された⁶⁾。以上より、APTXには5'末端のリン酸化活性と3'末端の脱リン酸化活性を持つ可能性があると考えられ、一本鎖DNA修復機能に関わり、神経細胞の機能維持に重要な役割を担っていることが推測される。

DNAは安定な化合物ではなく、細胞内の物質、外部からの毒物、紫外線や放射線などにより絶え

ず損傷を受けている。このためDNAには酸化・アルキル化、脱プリン反応、脱アミノ反応、チミンダイマー形成といった様々な異常が生じる⁸⁾。ヒトでは1日に数十万/ゲノム以上のDNA損傷が起こっていると推定される⁹⁾¹⁰⁾。DNAの損傷は自然突然変異を引き起こし¹¹⁾、細胞の老化や死、癌細胞の発生などの原因となると考えられている¹²⁾¹³⁾。またDNAの転写・複製の際にもDNAの切り出し・修復が必要なため、効率の良いDNA修復機構は生体の維持に必要不可欠である。

DNA損傷のパターンにより様々なDNA修復機構が存在するが、このうち塩基除去修復と呼ばれる機構は酸化・アルキル化による障害などを主に修復する。中枢神経系は他臓器に比べ重量あたりの酸素消費量が高く、このため発生する活性酸素による酸化ストレスはDNA障害の主要な原因である。このため、ヒトの神経細胞では酸化ストレスによるDNA損傷に対する効率の良いDNA修復機構がより要求されると考えられる。またDNA修復の異常による神経細胞死は、緩徐進行性で主として神経系が病変の主座である本疾患を説明しやすいと考えられる。しかしながら現在までのところ中枢神経系特異的な高効率のDNA修復の分子機構は明らかにされていない。同様にDNA修復機構の障害を原因とする神経変性疾患には毛細血管拡張性失調症、結節性硬化症、色素性乾皮症、コケイン症候群など知られているが、中枢神経障害を呈するタイプでは一本鎖DNA修復障害に伴う転写障害 (transcription coupled repairの障害) の存在が示唆されており、神経細胞死のメカニズム解明の重要なポイントの一つと考えられる。本研究では、中枢神経系におけるDNA修復機構に関連するAPTXの詳細な生理機能の解明を目的に、in vitroでの一本鎖DNA修復再構成実験系を確立し、APTXにおいてDNA損傷修復に必要な3'末端脱リン酸化/5'末端リン酸化活性を証明し得たので報告する。

材料と方法

組換えタンパク質の作製

APT_X, PNKP, DNA polymerase beta (Pol β), DNA ligase III (Lig3) についてそれぞれのタンパクをコードする ORF 全長を増幅できるように PCR プライマーをデザインし, (pnkp F2; 5'-aa-ggatcc (EcoRI)-agg-ATGGGCGAGGTGGAGGCCCGGGCCGCTTG-3', pnkp R2; 5'-aa-gcggcgc (NotI)-tca (stop)-gatcttatcgtcgtcatccttgtaatcat (FLAG)-gtcgac (SalI)-GCCCTCGGAGAACTGGCAGTACAGCCGCCCC-3', pollb F2; 5'-aa-ggatcc (BamHI)-GCC-ATGAGCAAACGGAAGGCGCCGAGGAGACTC-3', pollb R2; 5'-aa-gcggcgc (NotI)-tca (stop)-gatcttatcgtcgtcatccttgtaatcat (FLAG)-gtcgac (SalI)-TTCGCTCCGGTCTTGGGTTCCCGGTATTTCC-3', lig3a F2; aa-ggatcc (BamHI)-gag-ATGGCTGAGCAACGGT TCTGTGTGGACTATGC-3', lig3a R2; 5'-aa-gcggcgc (NotI)-tca (stop)-gatcttatcgtcgtcatccttgtaatcat (FLAG)-gtcgac (SalI)-GCAGGGAGCTACAGTCTCCGTTTCCGGATAC)-3', Clonetech 社の Marathon cDNA library (sperm, ovary, cereberum) を鋳型として PCR を行い, 目的蛋白質の cDNA 断片を得た⁶⁾.

APT_X の発現には Bac-to-Bac Baculovirus expression systems (Invitrogen 社) を用いた. 前述の APT_X cDNA 断片を pFastBac ベクター (Invitrogen) に挿入し, 精製したプラスミドを competent DH10BAC cell (Invitrogen) に形質転換させ, 組換えの起こったバキュロウイルスを持つ DH10BAC を color selection により選択した後, バキュロウイルスを抽出した. このウイルスを CELLECTIN Reagent (Invitrogen) を用いて Sf9 細胞に形質移入し, 96 時間培養してウイルスを増殖させた. 遠心分離した上清を Sf9 細胞に感染させ, 72 時間培養した. 採取した Sf9 細胞を Insect lysis buffer (Pharmingen 社) にて破碎後, ニッケルアガロースビーズを用いた固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー法により (MagExtractor - His - tag - (東洋紡社) 使用)

His タグ付き APT_X を得た.

PNKP, Pol β , Lig3 の発現に関しては, それぞれの cDNA 断片を pYNGHis 発現ベクターに挿入し, 精製したプラスミドをシステインプロテナーゼを欠失させたウイルス DNA に混和し, silkworm Bombyx mori 幼虫由来の BmN 細胞に Lipofectin Reagent (GIBCO - BRL 社) を用いて形質移入した. 抽出精製した組換えウイルスを silkworm B. mori 蛹態期 1 日目に注入により感染させた. 25 °C で 144 時間経過後, 冷凍した. 冷凍した B. mori を破碎し, 抽出液をニッケルアガロースビーズを用いた固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー法により発現した His タグ付きタンパクを得た.

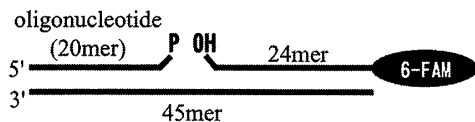
in vitro での一本鎖 DNA 修復再構成実験

45mer のオリゴヌクレオチド (5'-ctacgtcagatctgcggatg actctagcac ttgaggctat ccatg-3') と, 一塩基欠損してこれに相補的となる, 20mer (5'-ctacgtcagatctgcggatg-3') と 24mer (5'-ctactagcact tgaggctatc catg-3') の 2 本のオリゴヌクレオチドをニック入り DNA のモデルとした. 3' または 5' 末端は fluorescein isothiocyanate (FITC) または 6-FAM で蛍光ラベルした (図 1). また必要に応じ 3' または 5' 末端にリン酸化されたオリゴヌクレオチドを使用した. これらのオリゴヌクレオチドを, 50mM Tris-HCl (pH7), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.5mM ATP, 0.5mM dNTP および組換えタンパクと混和し 37 °C で 1 時間インキュベートした. ABI 社 PRISM 3100 Genetic Analyzer を使用し, GeneScan モードで蛍光ラベルされたオリゴヌクレオチドを測定した.

結 果

APT_X の 5' 末端のリン酸化活性と 3' 末端の脱リン酸化活性, および一本鎖 DNA 修復能について検討した. 図 1 のような蛍光ラベルされたオリゴヌクレオチドを一本鎖損傷 DNA のモデルとし, 組換えタンパクと反応させ, DNA のリン酸化・脱リン酸化, および SSB 反応を in vitro で再現した. これを ABI 社 PRISM 3100 Genetic Analyzer

substrate-1



substrate-2

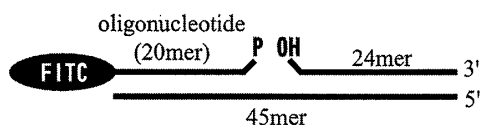


図1 1塩基ギャップを伴った損傷DNAのモデル

(以下 3100 自動シーケンサー) を使用し、蛍光ラベルされたオリゴヌクレオチドの泳動度の変化を測定した。3100 自動シーケンサーでの SSBR 反応の検出を図 2 に示す。泳動度の変化より、オリゴヌクレオチド長の変化に加え、リン酸化・脱リン酸化状態が検出可能である。

1. 脱リン酸化反応

substrate-1 に組換え蛋白である PNKP および APTX を混和し 37 °C で 1 時間 インキュベートし、3100 自動シーケンサーの GeneScan モードで、蛍光ラベルされた 20mer のオリゴヌクレオチドの泳動度の変化を見た (図 3)。PNKP および APTX のいずれもリン酸化されていない 20mer のオリゴヌクレオチドを示す新たなバンドが見ら

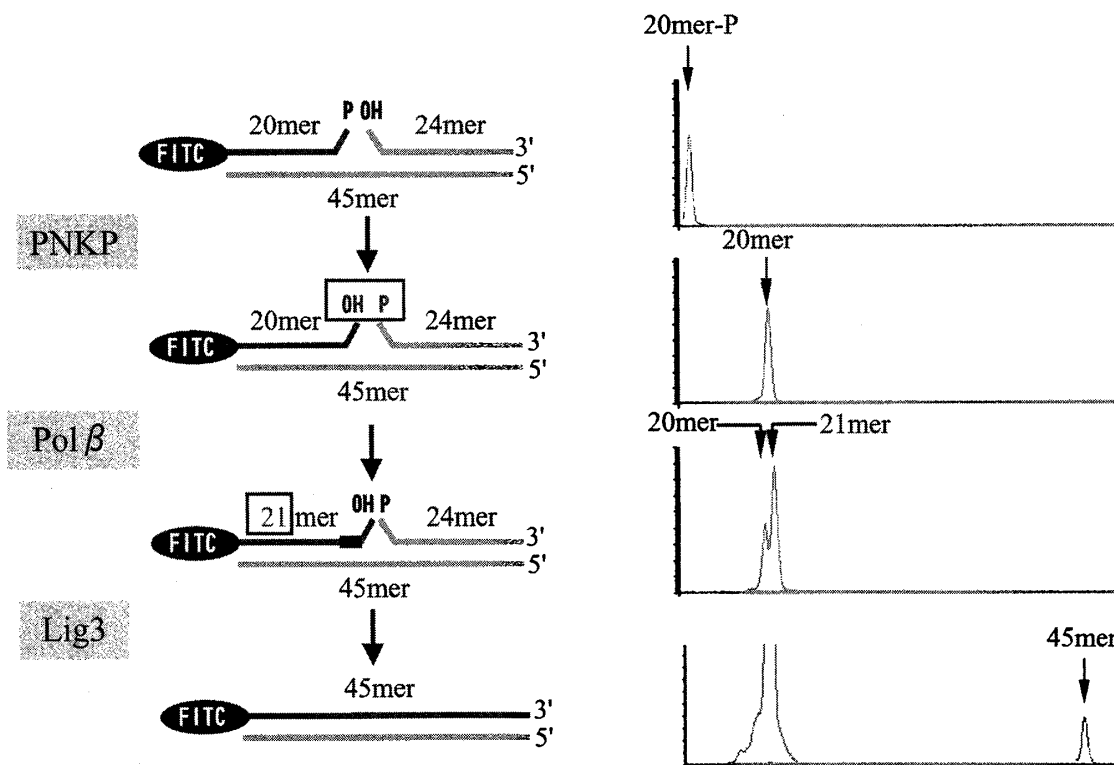


図2 SSBR 反応の模式図と自動シーケンサーによる検出

オリゴヌクレオチド長の変化を自動シーケンサーにより検出する。図の左方が泳動度が高く、右方は泳動度が低い。オリゴヌクレオチドのリン酸化により泳動度が高くなる。

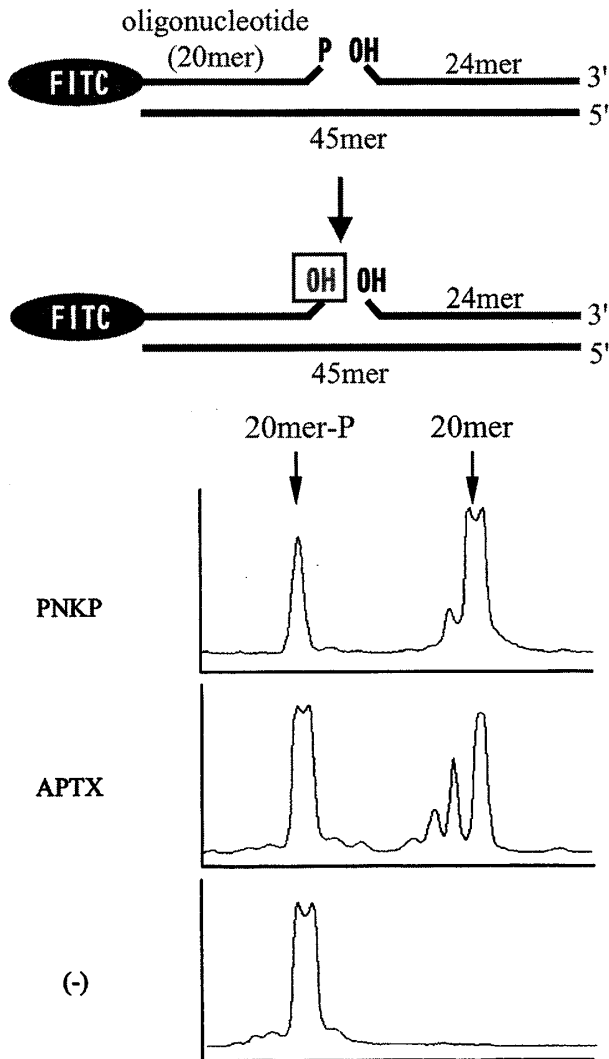


図3 脱リン酸化反応

DNA substrate-1 (30nM) とそれぞれのタンパクを混和し、37℃で1時間インキュベートした。反応生成物を3100自動シーケンサーのGeneScanモードで計測した。それぞれ、160nM PNKP (レーン1)、160nM APTX (レーン2)、タンパク無し (レーン3) の結果を示す。

れ、蛍光ラベルされた20merの3'末端が脱リン酸化されたものと考えられた。

2. リン酸化反応

substrate-2にPNKPおよびAPTXを混和し37℃で1時間インキュベートし、3100自動シーケンサーのGeneScanモードで蛍光ラベルさ

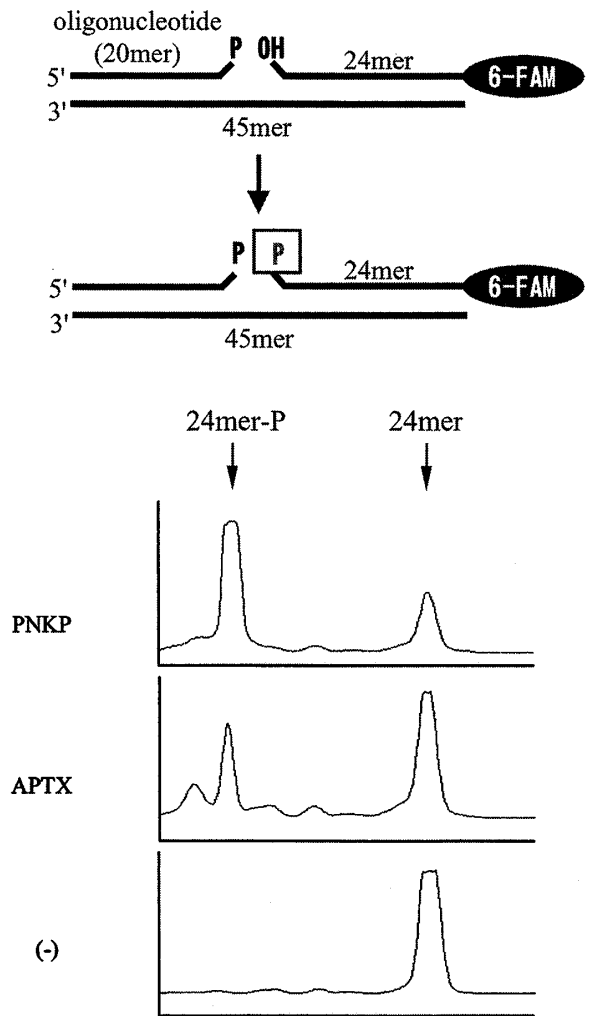


図4 リン酸化反応

DNA substrate-2 (30nM) とそれぞれのタンパクを混和し、37℃で1時間インキュベートした。反応生成物を3100自動シーケンサーのGeneScanモードで計測した。

それぞれ、160nM PNKP (レーン1)、160nM APTX (レーン2)、タンパク無し (レーン3) の結果を示す。

れた24merのオリゴヌクレオチドの泳動度の変化を見た(図4)。PNKPおよびAPTXのいずれもリン酸化された24merのオリゴヌクレオチドを示す新たなバンドが見られ、蛍光ラベルされた24merの5'末端がリン酸化されたものと考えられた。

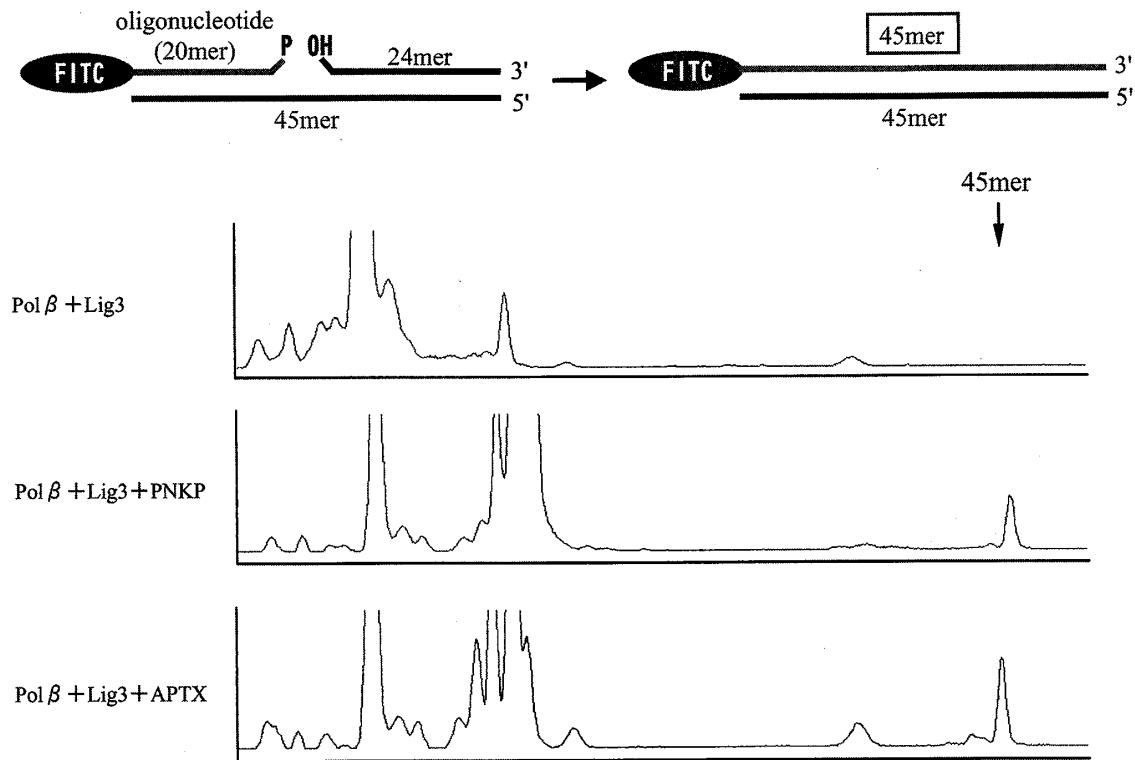


図5 SSBR 反応

DNA substrate-2 (30nM) とそれぞれのタンパクを混和し、37℃で1時間インキュベートした。反応生成物を3100自動シーケンサーのGeneScanモードで計測した。

それぞれ、タンパク無し (レーン1)、160nM APTX (レーン2)、160nM PNKP (レーン3)、80nM Pol β (レーン4)、80nM Lig3 (レーン5)、Pol β および Lig3 (レーン6)、PNKPと Pol β と Lig3 (レーン7)、APTXと Pol β と Lig3 (レーン8) の結果を示す。

3. APTXによる一本鎖DNA修復

substrate-1にSSBR関連タンパクであるPol β 、Lig3、PNKPおよびAPTXを混和し37℃で1時間インキュベートし、3100自動シーケンサーのGeneScanモードで蛍光ラベルされた20merのオリゴヌクレオチドの泳動度の変化を見た(図5)。Pol β ・Lig3とPNKPおよびPol β ・Lig3とAPTXの組み合わせのみで、一ヌクレオチドギャップが補われ、修復されたオリゴヌクレオチドの長さである45merを示すバンドが検出され、オリゴヌクレオチドの総量の一部ではあるがSSBRが行われたと考えられた。

考 察

合成オリゴヌクレオチドを用いたin vitro一本鎖DNA修復再構成実験系を確立し、DNA修復機構に関連する機能として、組換えAPTXタンパクがPNKP類似のDNA 3'末端脱リン酸化/5'末端リン酸化活性を有することを示した。SSBRの過程でDNA 3'末端脱リン酸化/5'末端リン酸化は、DNAポリメラーゼあるいはDNAライゲースを機能させる上で必要な過程であり、SSBRにおけるAPTXの位置づけが明らかにされつつある。

APTXは生体内でもSSBR反応に関わっていることが予想されるが、同様の働きを持つPNKPと

の違いが問題となる。PNKPは、損傷塩基をDNAグリコシラーゼが遊離させ、APエンドヌクレアーゼがDNA一本鎖を切断した後に作用すると考えられている。すなわちDNA鎖の断端を処理しPol β が作用できる状態にする。ところでヒトにおいてDNAグリコシラーゼは10以上が報告されており、Pol β ・Lig3も類似の作用を持つ複数の酵素が存在する¹⁷⁾。これらは損傷の種類によって使い分けられていると考えられており、未だ報告はないもののPNKPにも類似の活性を持つ酵素が存在する可能性は高い。APT β はPNKP類似の活性を持つが、3'末端・5'末端の状態により使い分けられている可能性が考えられる。また、DNA修復に関わる酵素には多機能のものが多く存在する(一例として、Pol β にはDNAポリメラーゼ活性に加えてデオキシリボースリン酸リナーゼ活性がある¹⁸⁾)。APT β には3'末端脱リン酸化/5'末端リン酸化活性以外にも機能がある可能性も考えられる。APT β には未解明の機能がある可能性が十分あり、今後もDNA修復関連の酵素活性を中心として検討が必要である。

酸化ストレスに常に曝されうる高等動物の中樞神経系のゲノムの安定性および転写の安定性維持機構は、十分に解明された段階には達していない。DNA修復機構の障害を原因とする神経変性疾患は毛細血管拡張性失調症、色素性乾皮症、コケイン症候群など多岐に及ぶが、DNA修復機構と神経細胞死ならびに中樞神経障害の関係も明らかにされていない。APT β のDNA修復機能を明らかにし、今後、本疾患のDNA損傷による神経細胞死のメカニズムを解明できれば、本疾患のみならず他のDNA修復機構障害による疾患の発病メカニズム解明と治療法開発にも大きく貢献できるものと考えられる。

謝 辞

最後に、本研究に御指導を頂きました新潟大学脳研究所 臨床神経科学部門 神経内科学分野教授 西澤正豊先生、新潟大学脳研究所 生命科学リソース研究センター 脳疾患リソース解析部門 分子神経疾患資源解析学分野助教授 小野寺 理先生および助手 五十嵐修一先生に

深謝致します。silkworm B. moriを用いた蛋白発現は片倉工業株式会社に御協力頂きました。

また、本研究は椿神経疾患研究基金より御支援頂きました。心より厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Aicardi J, Barbosa C, Andermann, E, Andermann F, Morcos R, Ghanem Q, Fukuyama Y, Awaya Y and Moe P: Ataxia - ocular motor apraxia: a syndrome mimicking ataxia - telangiectasia. *Ann Neurol* 24: 497 - 502, 1988.
- 2) 植川和利, 湯浅龍彦, 川崎渉一郎, 卷瀧隆夫, 出田 透: 低アルブミン血症と高脂血症を伴ったFriedreich病型の遺伝性運動失調症 *臨床神経学* 32: 1067 - 1074, 1992.
- 3) Fukuhara N, Nakajima T, Sakajiri K, Matsubara N and Fujita M: Hereditary motor and sensory neuropathy associated with cerebellar atrophy (HMSNCA): a new disease. *J Neurol Sci* 133: 140 - 151, 1995.
- 4) Sekijima Y, Ohara S, Nakagawa S, Tabata K, Yoshida K, Ishigame H, Shimizu Y and Yanagisawa N: Hereditary motor and sensory neuropathy associated with cerebellar atrophy (HMSNCA): clinical and neuropathological features of a Japanese family. *J Neurol Sci* 158: 30 - 37, 1998.
- 5) Date H, Onodera O, Tanaka H, Iwabuchi K, Uekawa K, Igarashi S, Koike R, Hiroi T, Yuasa T, Awaya Y, Sakai T, Takahashi T, Nagatomo H, Sekijima Y, Kawachi I, Takiyama Y, Nishizawa M, Fukuhara N, Saito K, Sugano S and Tsuji S: Early - onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nat Genet* 29: 184 - 188, 2001.
- 6) Sano Y, Date H, Igarashi S, Onodera O, Oyake M, Takahashi T, Hayashi S, Morimatsu M, Takahashi H, Makifuchi T, Fukuhara N and Tsuji S: Aprataxin, the causative protein for early - onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia, is a nuclear protein with a potential role as a DNA repair protein. *Ann*

- Neurol 55: 238-246, 2004.
- 7) Moreira MC, Barbot C, Tachi N, Kozuka N, Uchida E, Gibson T, Mendonca P, Costa M, Barros J, Yanagisawa T, Watanabe M, Ikeda Y, Aoki M, Nagata T, Coutinho P, Sequeiros J and Koenig M: The gene mutated in ataxia - ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn - finger protein aprataxin. *Nat Genet* 29: 189 - 193, 2001.
 - 8) Lindahl T and Wood RD: Quality control by DNA repair. *Science* 286: 1897 - 1905, 1999.
 - 9) Kunkel TA: The high cost of living. *Trends Genet* 15: 93 - 94, 1999.
 - 10) Beckman KB and Ames BN: Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 272: 19633 - 19636, 1997.
 - 11) Maki H and Sekiguchi M: MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* 355: 273 - 275, 1992.
 - 12) Loveless A: Possible relevance of O - 6 alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. *Nature* 223: 206 - 207, 1969.
 - 13) Sukumar S, Notario V, Martin - Zanca D and Barbacid M: Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso - methylurea involves malignant activation of H - ras - 1 locus by single point mutations. *Nature* 306: 658 - 661, 1983.
 - 14) Jilani A, Ramotar D, Slack C, Ong C, Yang XM, Scherer SW and Lasko DD: Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage. *J Biol Chem* 274: 24176 - 24186, 1999.
 - 15) Meijer M, Karimi - Busheri F, Huang TY, Weinfeld M and Young D: Pnkl, a DNA kinase/phosphatase required for normal response to DNA damage by gamma - radiation or camptothecin in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 277: 4050 - 4055, 2002.
 - 16) Brenner C: Hint, Fhit, and GalT: function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases. *Biochemistry* 41: 9003 - 9014, 2002.
 - 17) Wood RD, Mitchell M, Sgouros J and Lindahl T: Human DNA repair genes. *Science* 291: 1284 - 1289, 2001.
 - 18) Sobol RW, Prasad R, Evenski A, Baker A, Yang X - P, Horton JK and Wilson SH: The lyase activity of the DNA repair protein beta - polymerase protects from DNA - damage - induced cytotoxicity. *Nature* 405: 807 - 810, 2000.

(平成 16 年 1 月 22 日受付)