

DNA 損傷 3' 末端に対する aprataxin の修復機能

他 田 正 義

新潟大学医歯学総合研究科分子細胞医学専攻

分子情報医学講座神経内科学分野専攻

(主任：西澤正豊教授)

Repair Function of Aprataxin against Damaged DNA 3'-Ends

Masayoshi TADA

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science/

Course for Molecular and Cellular Medicine/

Molecular Neuroscience and Brain Disease/ Neurology

(Director: Prof. Masatoyo NISHIZAWA)

要 旨

眼球運動失行と低アルブミン血症を伴う早期発症型失調症の病因蛋白 aprataxin は、核酸分子の加水分解反応を触媒する histidine triad motif を有する核蛋白で、DNA 単鎖切断損傷修復 (single-strand break repair: SSBR) の足場蛋白として働く X-ray repair cross-complementing group 1 protein (XRCC1) と結合することから、DNA に対する加水分解作用を介して SSBR において何らかの役割を担っていると想定される。DNA 単鎖切断損傷 (single-strand breaks: SSBs) では、その発生過程で糖鎖切断の結果、切断部 3'-末端にリン酸基、ホスホグリコール酸 (phosphoglycolate: PG) 基、または不飽和アルデヒド基などの修飾基 (3'-ブロック) が形成される。SSBR の初期過程で、これら 3'-ブロックが加水分解され水酸基に変換されると、その後の修復反応、すなわち、DNA polymerase による DNA 合成と ligase によるニックの連結が可能となる。本研究では、SSBR における損傷 3'-末端のプロセッシングに aprataxin が関与しているか否かを明らかにするために、組み換えヒト aprataxin 蛋白を作製し、3'-末端に種々の修飾基を伴う DNA を基質として酵素学的検討を行った。その結果、全長型 aprataxin が DNA 3'-末端のリン酸基と PG 基の加水分解反応を触媒する活性、すなわち、DNA 3'-phosphatase 活性および 3'-PG hydrolase 活性を有すること、DNA polymerase と ligase の共存下で 3'-ブロックを伴う SSBs を修復可能であること、さらに、疾患関連変異体ではこの 3'-ブロック除去活性が失われることを明らかにした。これらの結果は、aprataxin が 3'-ブロックの除去活性を通して SSBR において直接的な役割を果たしていること、また、3'-ブロックを伴う SSBs が修復されずに蓄積することが本症の病態に深く関係していることを示唆している。

キーワード：劣性遺伝性脊髄小脳変性症、アプラタキシン、EAOH/AOA1、DNA 修復

Reprint requests to: Masayoshi TADA
Department of Neurology
Brain Research Institute Niigata University
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学脳研究所 神経内科学教室 他田正義

はじめに

眼球運動失行と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/ataxia with oculomotor apraxia type 1: EAOH/AOA1) は、幼少期発症の緩徐進行性小脳失調、病初期における眼球運動失行、進行期における低アルブミン血症と高度の末梢神経障害を臨床的特徴とする遺伝性神経疾患で^{1)–6)}、本邦における劣性遺伝性脊髄小脳変性症の約半数を占める重要な病型である⁷⁾。病理学的には、小脳プルキンエ細胞の高度の脱落、脊髄後索と脊髄小脳路の変性、末梢神経における有髄・無髄線維の高度の脱落を認める³⁾。本症は、9番染色体短腕に存在し aprataxin 蛋白をコードする APTX 遺伝子の変異により生じる¹⁾²⁾。

aprataxin には選択的スプライシングにより生じる数種のアイソフォームが存在する¹⁾が、このうち最も豊富で、かつ生理機能を担っていると考えられるのが全長型 aprataxin である。全長型 aprataxin は、342 アミノ酸からなる分子量 39 kDa の核蛋白で⁸⁾、N 末端に蛋白-蛋白間結合に重要な forkhead-associated (FHA) ドメイン、C 末側にヌクレオチド分子の加水分解反応を触媒する histidine triad (HIT) モチーフを有する²⁾⁹⁾。aprataxin の生理機能は現時点で十分明らかになっていないが、DNA 単鎖切断損傷修復 (single-strand break repair: SSBR) の足場蛋白として働く X-ray repair cross-complementing group 1 protein (XRCC1) と結合すること^{8)–10)}や、aprataxin 欠損リンパ芽球細胞が DNA 単鎖切断損傷 (single-strand breaks: SSBs) を生じる刺激に高い感受性を示すこと¹¹⁾から、SSBR に関与すると考えられている。加えて、aprataxin が HIT モチーフを有することから、DNA の加水分解反応を触媒することにより SSBR において何らかの役割を担っていると想定される。

SSBs とは、二本鎖 DNA の一方鎖の切断損傷である。細胞の DNA は活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) などの内的要因や電離放射線、化学物質などの外的要因により絶えず損傷の脅威

に曝されている¹²⁾¹³⁾。DNA の糖鎖損傷は直接的に、また、塩基損傷や塩基欠落 (apurinic/apyrimidinic: AP) 部位はその修復過程において修復酵素による糖鎖切断を受けて間接的に、SSBs を生じる¹²⁾¹³⁾。1日1細胞当たり数百万を超える SSBs が発生し¹³⁾、その多くは SSBR により修復される。

SSBR は主に4段階のプロセスから成る。すなわち、(1) poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP) による切断損傷認識と XRCC1 による足場形成、(2) 切断部 3'-末端を水酸基、5'-末端をリン酸基に変換するエンド・プロセッシング、(3) DNA polymerase による DNA 合成、(4) DNA ligase によるニックの連結である¹²⁾¹³⁾。DNA 合成と連結の反応には、切断部 3'-末端が水酸基、5'-末端がリン酸基であることが必要であるが、糖鎖損傷や塩基損傷の結果生じる SSBs はその発生過程でデオキシリボースが切断・開環されるため、3'-末端に数種類の修飾基が形成される。すなわち、ROS や電離放射線による糖鎖損傷では、3'-末端にリン酸基またはホスホグリコール酸 (phosphoglycolate: PG) 基が生じ、一方、酸化塩基損傷では、 β -elimination や $\beta\delta$ -elimination 活性を伴う2価の glycosylase による糖鎖切断の結果、3'-末端に不飽和アルデヒド (α , β -unsaturated aldehyde: UA) 基またはリン酸基が生じる^{12)–14)}。切断部 3'-末端に生じたリン酸基、PG 基、および UA 基は、その後の修復反応を阻害するため、3'-ブロックと呼ばれる。これまで、SSBR においてこれら 3'-ブロックを加水分解して除去する酵素として、apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) と 5'-polynucleotide kinase 3'-phosphatase (PNKP) が知られていた^{12)–14)}。しかしながら、APE1 はリン酸基、PG 基、不飽和アルデヒド基の3者全てを加水分解できるものの極端に活性が低い^{15)–17)}こと、PNKP は活性は強いもののリン酸基しか加水分解できない¹⁷⁾¹⁸⁾ことから、3'-ブロックを除去できる別な酵素が存在すると考えられてきた。

一方、DNA 損傷とは別に、生理的に生じる SSBs として、topoisomerase I (TOP1) 介在性 SSBs が知られる¹⁹⁾²⁰⁾。転写や複製の際に切断部

3'-末端に phosphotyrosine 基を介して共有結合した TOP1 は、プロテアソーム系により 3'-phosphotyrosine (3'-Y) 残基まで分解され、tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) による 3'-Y 残基から 3'-リン酸 (3'-PO₃⁻) 基への変換、引き続き、PNKP による 3'-PO₃⁻基から 3'-水酸 (3'-OH) 基への変換という一連のプロセッシングを受けて除去される¹⁹⁾⁻²¹⁾。3'-TOP1 や、その修復過程で生じる 3'-Y 基や 3'-PO₃⁻基も、速やかに除去されない場合には、3'-ブロックとなりうる。

本研究では、SSBR における 3'-ブロックのプロセッシングに aprataxin が関与しているか否かを明らかにするために、組み換えヒト aprataxin 蛋白を作製し、*in vitro* において酵素学的検討を行った。その結果、全長型 aprataxin が 3'-ブロックのうちリン酸基と PG 基を選択的に除去する活性、すなわち DNA 3'-phosphatase 活性および 3'-PG hydrolase 活性を有すること、DNA polymerase と ligase の共存下で 3'-ブロックを伴う SSBs を修復可能であること、さらに、疾患関連変異体ではこの 3'-ブロック除去活性が失われることを明らかにした。これらの結果は、aprataxin が 3'-ブロックの除去活性を通して SSBR において直接的な役割を果たしていること、また、3'-ブロックを伴う SSBs が修復されずに蓄積することが本症の病態に深く関係していることを示唆している。

材料と方法

1. 組み換えヒト aprataxin 蛋白の発現と精製

1) バキュロウイルス-蛋白産生系による His-tag 融合全長型ヒト aprataxin 蛋白 (His-tagged long-form aprataxin: His-LA) の作製と精製:

プライマーとして CCGGATCCATGATGCGGGTGTGCTGGTTGG および GGCTCGAGTCACTGTGTCAGTGCTTCCTG、鋳型として cDNA ライブラリー (Human Ovary Marathon-Ready cDNA: Clontech) を用いて、全長型ヒト aprataxin の cDNA (GenBank accession number NM_175073)

を PCR により増幅させた。得られた cDNA を pFastBac™ ドナープラスミドの *Bam*HI/*Xho*I サイトに挿入し、このプラスミドを DH10Bac™ コンピテント細胞に形質移入して、目的の cDNA を “Bacmids” に入れ替えた (Bac-to-Bac® Baculovirus Expression Systems, Invitrogen)。組み換え “Bacmids” を High Purity Plasmid Miniprep System (Marligen) を用いて精製し、Cellfection 試薬を用いて Sf9 細胞に感染させた。高力価のウイルス液を Sf9 細胞に感染させ、72 時間後に細胞を回収し、Complete Mini® (Roche Diagnostic Corporation) 含有の Insect Cell Lysis Buffer® (BD Pharmingen) を用いて 30 分間 4℃ で細胞を溶解した。His-LA は金属親和性クロマトグラフィー (MagExtractor® His-tag protein purification kit, TOYOBO) により精製後、ゲル濾過クロマトグラフィー (AKTA® explorer 10S with HiLoad 16/60 Superdex 75 pg column, GE Healthcare Bioscience) により分画化した。各分画は、Slide-A-Lyzer® (Pierce Biotechnology) を用いて脱塩後、変性 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により分離し、Coomassie brilliant blue (CBB) で染色した。また、抗 Tetra-His 抗体 (Quiagen) および抗 aprataxin 抗体 (ab31841, Abcam) を用いて Western blotting を行った。

2) 大腸菌-蛋白産生系による Glutathione S-transferase (GST)-tag 融合ヒト aprataxin 蛋白の作製と精製:

全長型ヒト aprataxin 変異体 (P206L および V263G) cDNA は GeneTailor Site-directed Mutagenesis System (Invitrogen) を用いて作成した。GST-tag 融合の全長型ヒト aprataxin (long-form aprataxin: LA), FHA ドメイン (1-114 アミノ酸, FHA domain: FHA), 短長型 (175-343 アミノ酸, short-form aprataxin: SA, GenBank accession number NP_7782411), P206L および V263G 変異体の各 cDNA を pGEX-6P-3 (GE Healthcare Bioscience) の *Bam*HI/*Xho*I サイトに挿入した。各々のプラスミドを Rosetta 2 (DE3) pLysS (Novagen) 細胞に形質移入し、isopropyl-

表1 用いたオリゴヌクレオチドの塩基配列

名称	塩基配列 (5'→3')
FITC-21-OH	[FITC]-CTACGTCAGATCTGCGGATGT
FITC-21-P	[FITC]-CTACGTCAGATCTGCGGATGT-[PO ₃]
FITC-21-PG	[FITC]-CTACGTCAGATCTGCGGATGT-[PG]
FITC-21-UA	[FITC]-CTACGTCAGATCTGCGGATGT-[phospho- α , β -unsaturated aldehyde: UA]
FITC-21-Y	[FITC]-CTACGTCAGATCTGCGGATGT-[phosphotyrosine: Y]
45/21(U)	[FITC]-CTACGTCAGATCTGCGGATGUUCTCTAGCACTTGAGGCTATCCATG
P23	[PO ₃]-TCTAGCACTTGAGGCTATCCATG
45	CATGGATAGCCTCAAGTGCTAGAGACATCCGCAGATCTGACGTAG

1-thio-D-galactopyranoside (IPTG, 1 mM) で発現誘導した. 37 °C で3時間培養後, 回収した細胞を EDTA Free Complete Protease Inhibitor Cocktail[®] (Sigma) 含有の BugBuster HT[®] (Novagen) で溶解し, 各 GST-tag 融合蛋白を Bulk GST Purification Modules[®] (GE healthcare) を用いて精製した. 各精製蛋白を Slide-A-Lyzer[®] (Pierce Biotechnology) を用いて脱塩後, SDS-PAGE により分離し, CBB で染色した. また, 抗 GST 抗体 (GE Healthcare Bioscience) および抗 aprataxin 抗体 (ab31841, Abcam) を用いて Western blot を行った.

3) バキュロウイルス-蛋白産生系による His-tag 融合ヒト DNA polymerase β (Pol β), PNKP および DNA ligase III (Lig3) の作製と精製:

組み換えヒト DNA polymerase β (Pol β), PNKP および DNA ligase III (Lig3) の cDNA を cDNA ライブラリー (Human Ovary Marathon-Ready cDNA: Clontech) を鋳型として PCR で増幅し, pYNGHis (Katakura) に挿入した. 精製したプラスミドベクターをシステイン蛋白分解酵素欠損の精製ウイルス DNA と混和し, *Bombyx mori* 蚕幼虫の BmN 細胞 (Katakura) に同時形質移入した. 得られた組み換えウイルス液は, *Bombyx mori* 蚕蛹 (Katakura) に感染させ, 感染蛹は 25.°C で飼育し, 144 時間後に回収した. 回収

した蛹を溶解後, His 融合組み換え蛋白は金属親和性クロマトグラフィーにより精製した (MagExtractor[®] His-tag protein purification kit, TOYOBO).

2. オリゴヌクレオチド基質

用いたオリゴヌクレオチドの塩基配列を表1に示す. 5'-末端を fluorescein isothiocyanate (FITC) 蛍光標識したオリゴヌクレオチドは合成後, high-performance liquid chromatography (HPLC) により精製した (Qiagen から購入). 5'-FITC 標識および 3'-PG 修飾したオリゴヌクレオチド (FITC-21-PG) は Thermo Electron Corporation から, 5'-FITC 標識および 3'-phosphotyrosine (3'-Y) 修飾したオリゴヌクレオチド (FITC-21-Y) は Midland Certified Reagent Corporation から各々購入した. 5'-FITC 標識および 3'- α , β -unsaturated aldehyde (3'-UA) 修飾したオリゴヌクレオチド (FITC-21-UA) は uracil DNA glycosylase (Invitrogen) および endonuclease III (BioLabs) を用いて準備した. すなわち, 5'-末端から 21 番目がウラシル基の 45-mer オリゴヌクレオチド (10 μ M) と uracil DNA glycosylase (2 単位) を 37 °C で1時間反応させ, AP 部位を作った. 反応産物をこれと相補的な 45-mer オリゴヌクレオチド (10 μ M) とアニーリングさせ, 得られた二本鎖 DNA (2 μ M) と endonuclease III を

反応させ、FITC-21-UA オリゴヌクレオチドを作製した。

3. 3'-エンド・プロセッシング・アッセイ

3'-リン酸 (3'-PO₃⁻) 基の除去活性を調べるために、5'-FITC 標識および 3'-PO₃⁻ 基修飾したオリゴヌクレオチド (FITC-21-P) (1 pmol) を 100 mM Tris-HCl (pH 6.0), 10 mM MgCl₂, 10 mM β-ME, 0.1 mg/ml BSA 溶液中で蛋白 (25, 50, および 100 nM の aprataxin, 50 nM の PNKP) と 37°C で 1 時間反応させた。また、3'-PG, 3'-UA, または 3'-Y の除去活性を調べるために、FITC-21-PG, FITC-21-UA, FITC-21-Y オリゴヌクレオチドを 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 0.5 mM ATP, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM DTT 溶液中で蛋白 (25, 50, および 100 nM の aprataxin, 45 nM の APE1, または TDP1) と 37°C で 1 時間反応させた。等量の gel-loading buffer (80% formamide, 10 mM EDTA, および 0.1% bromophenol blue) の添加および 95°C, 5 分間の加熱で反応を終了させ、反応産物は 8 M 尿素含有 20% 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、Typhoon 9400 スキャナー (GE Healthcare Bioscience) を用いて検出した。APE1 (TREVIGEN) および TDP1 (Abnova Corporation) は陽性コントロールとして用いた。

4. SSBR の再構成

基質として 3'-ブロックを伴う SSBs を有する二本鎖 DNA を準備した。まず、FITC-21-P オリゴヌクレオチド、5'-リン酸基の 23-mer (P23) オリゴヌクレオチド、および相補的な 45-mer オリゴヌクレオチドを 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM NaCl の溶液中でアニーリングし、1 ヌクレオチド・ギャップの SSBs で 3'-PO₃⁻ を伴う二本鎖 DNA を用意した。同様に、FITC-21-PG オリゴヌクレオチド、P23 オリゴヌクレオチド、および相補的な 45-mer オリゴヌクレオチドを用いて、1 ヌクレオチド・ギャップの SSBs で 3'-PG を伴う二本鎖 DNA を用意した。陽性コントロールとして、3'-水酸 (3'-OH)

基の SSBs を有する二本鎖 DNA を、同様の方法で用意した。これら SSBs を有する二本鎖 DNA を基質として、Pol β, Lig3 および aprataxin を 37°C で 90 分間反応させた。等量の gel-loading buffer の添加と 95°C, 5 分間の加熱で反応を終了させ、反応産物は前述のとおり尿素含有 20% 変性 PAGE で分離し、蛍光検出器で検出した。

結 果

1. aprataxin は DNA 3'-末端のリン酸基とホスホグリコール酸基を除去する

His-tag 融合ヒト全長型 aprataxin 蛋白 (histidine-tagged long-form aprataxin: His-LA) をバキュロウイルス-蛋白産生系により作製した (図 1-1)。組み換え蛋白は、金属親和性クロマトグラフィーで精製後、他の蛋白の混入を極力避けるためにゲル濾過クロマトグラフィーで分画化し、His-LA の最も多く含まれる分画を用いて酵素学的検討を行った (図 1-2, 1-3, 1-4, 分画 No. 15)。

DNA 損傷 3'-末端に対する aprataxin の作用を明らかにするために、3'-ブロックの付加したオリゴヌクレオチドを基質として His-LA の酵素活性を調べた。最初に、3'-PO₃⁻ 基のオリゴヌクレオチド (FITC-21-P) を基質とした場合、陽性コントロールの PNKP と同様に、aprataxin は濃度依存性に 3'-PO₃⁻ 基を 3'-OH 基に変換し、DNA 3'-phosphatase 活性を示した (図 2-1)。また、3'-PG 基のオリゴヌクレオチド (FITC-21-PG) を基質とした場合にも、陽性コントロールの APE1 と同様に、aprataxin は濃度依存性に 3'-PG 基を 3'-OH 基に変換し、DNA 3'-PG hydrolyase 活性を示した (図 2-2)。これと対照的に、aprataxin は 3'-UA 基、および 3'-Y 基の加水分解活性を示さなかった (図 2-3, 2-4)。これらの結果から、全長型 aprataxin は 3'-PO₃⁻ 基および 3'-PG 基に対する選択的な加水分解活性を有すると考えられた。

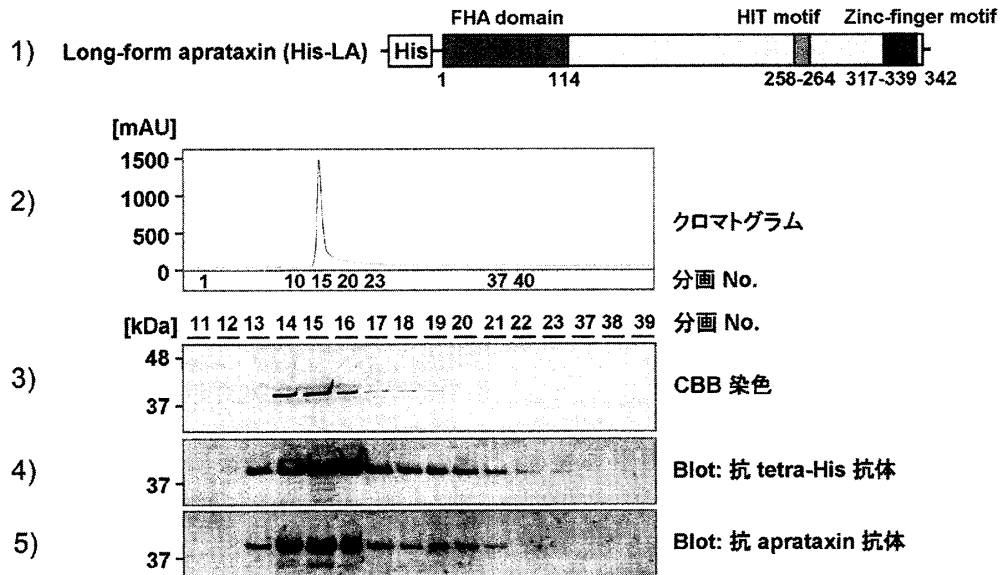


図1 バキュロウイルス-蛋白産生系による His-tag 融合全長型ヒト aprataxin 蛋白の作製と精製

- 1) 作製した組み換え全長型ヒト aprataxin 蛋白の構造を示す。
- 2) 組み換え蛋白は、金属親和性クロマトグラフィーで精製後、ゲル濾過クロマトグラフィーで分画化した。クロマトグラムでは、分画 13-20 に単一のピークを認める。
- 3) SDS-PAGE で分離した各分画の Coomassie brilliant blue (CBB) 染色を示す。分画 14-19 に分子量 39 kDa の単一バンドを認める。
- 4), 5) 抗 tetra-His 抗体 (4) および 抗 aprataxin 抗体 (5) を用いた Western-blotting では、分画 15 をピークにして、分画 13-21 に陽性バンドを認める。

2. FHA ドメインおよび疾患関連変異体は DNA 3'-phosphatase 活性および 3'-PG hydrolase 活性を失う

DNA 3'-phosphatase 活性と 3'-PG hydrolase 活性の活性部位を明らかにするために、GST-tag 融合の全長型ヒト aprataxin (LA) に加え、短長型 (SA), N 末 FHA ドメイン (FHA), および全長型変異体を大腸菌-蛋白産生系により作製した (図 3-1, 3-2)。疾患関連変異体は蛋白が不安定であったが、日本人に多い 2 種の全長型変異体 (P206L および V263G) を得ることができた (図 3-2)。LA は、His-LA と同程度に強い DNA 3'-phosphatase 活性および 3'-PG hydrolase 活性を示した (図 3-3, 3-4)。SA も両活性を示したが、LA に比べ弱かった (図 3-3, 3-4)。一方、FHA, P206L, および V263G には活性を認めなかった (図 3-3, 3-4)。

各 GST-tag 融合組み換え蛋白の基質親和性と、加水分解の活性強度を表 2 に示す。これらの結果から、DNA 3'-phosphatase 活性および 3'-PG hydrolase 活性には HIT モチーフを含む C 末領域が必要であり、かつ疾患関連変異体は両活性を失うことが示された。

3. Aprataxin の GMP-および AMP-lysine hydrolase 活性は極めて弱い

HIT ファミリー蛋白の多くに認められるように²²⁾, aprataxin は GMP-および AMP-lysine hydrolase 活性を有することが、既に報告されている²³⁾⁻²⁵⁾。そこで、GpppBODIPY および ApppBODIPY を基質として、異なる 2 つの蛋白産生系で作製した aprataxin 蛋白の加水分解活性を調べた。DNA 3'-phosphatase 活性および 3'-PG hydrolase 活性を示すのと同様かそれ以上の高濃度であっても、

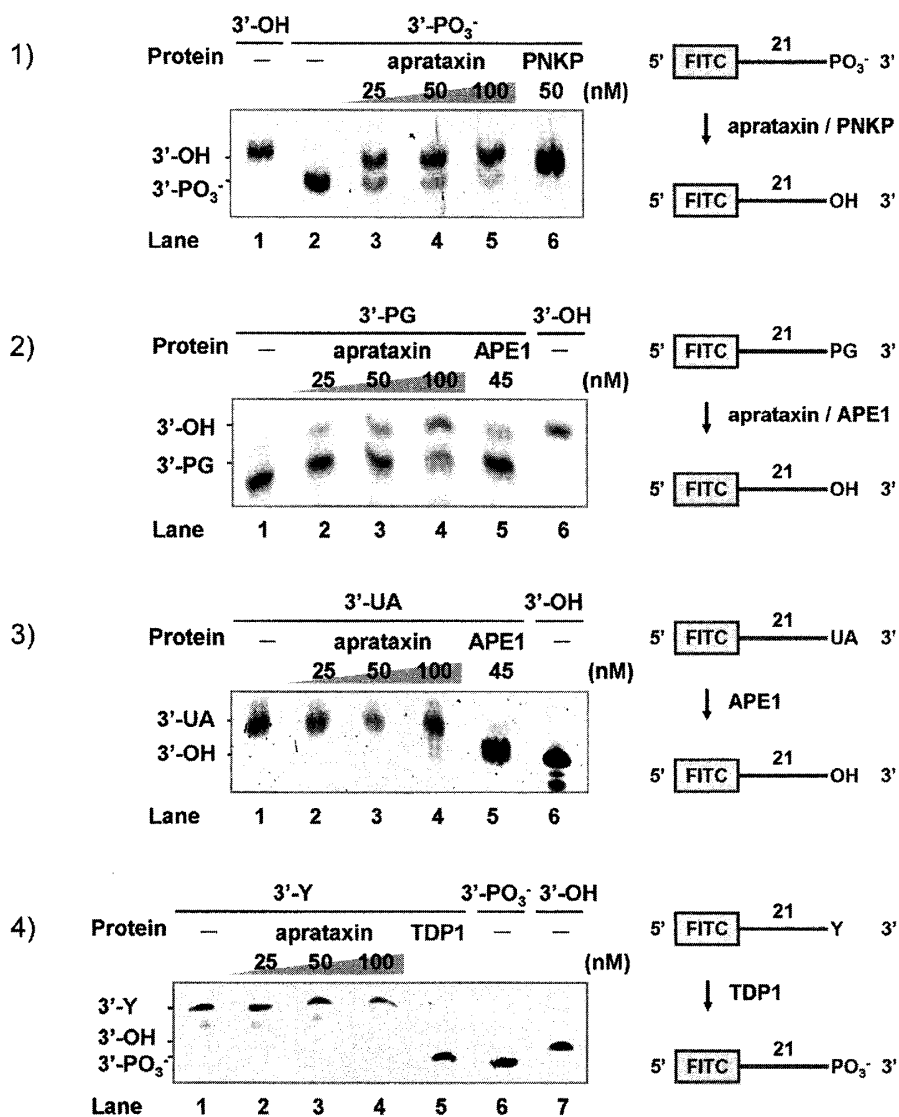


図2 DNA 3'-ブロックに対する aprataxin の加水分解活性

- 1) aprataxin の DNA 3'-phosphatase 活性を示す. 3'-リン酸 (3'-PO₃⁻) 基修飾したオリゴヌクレオチドを基質とした場合, 陽性コントロールの PNKP (レーン 6) と同様に, aprataxin は 3'-PO₃⁻ 基を 3'-水酸 (OH) 基に変換する (レーン 3-5).
- 2) aprataxin の DNA 3'-PG hydrolase 活性を示す. 3'-PG 基修飾したオリゴヌクレオチドを基質とした場合, 陽性コントロールの APE1 (レーン 5) と同様に, aprataxin は 3'-PG 基を 3'-OH 基に変換する (レーン 2-4).
- 3) aprataxin は 3'- α , β -unsaturated aldehyde (3'-UA) 基を除去できない. 3'-UA 基修飾したオリゴヌクレオチドを基質とした場合, 陽性コントロールの APE1 と異なり, aprataxin は 3'-UA 基に作用しない.
- 4) aprataxin は 3'-phosphotyrosine (3'-Y) 基を除去できない. 3'-Y 基修飾したオリゴヌクレオチドを基質とした場合, 陽性コントロールの TDP1 が 3'-Y 基を 3'-PO₃⁻ 基に変換できるのに対し, aprataxin は 3'-Y 基に作用しない.

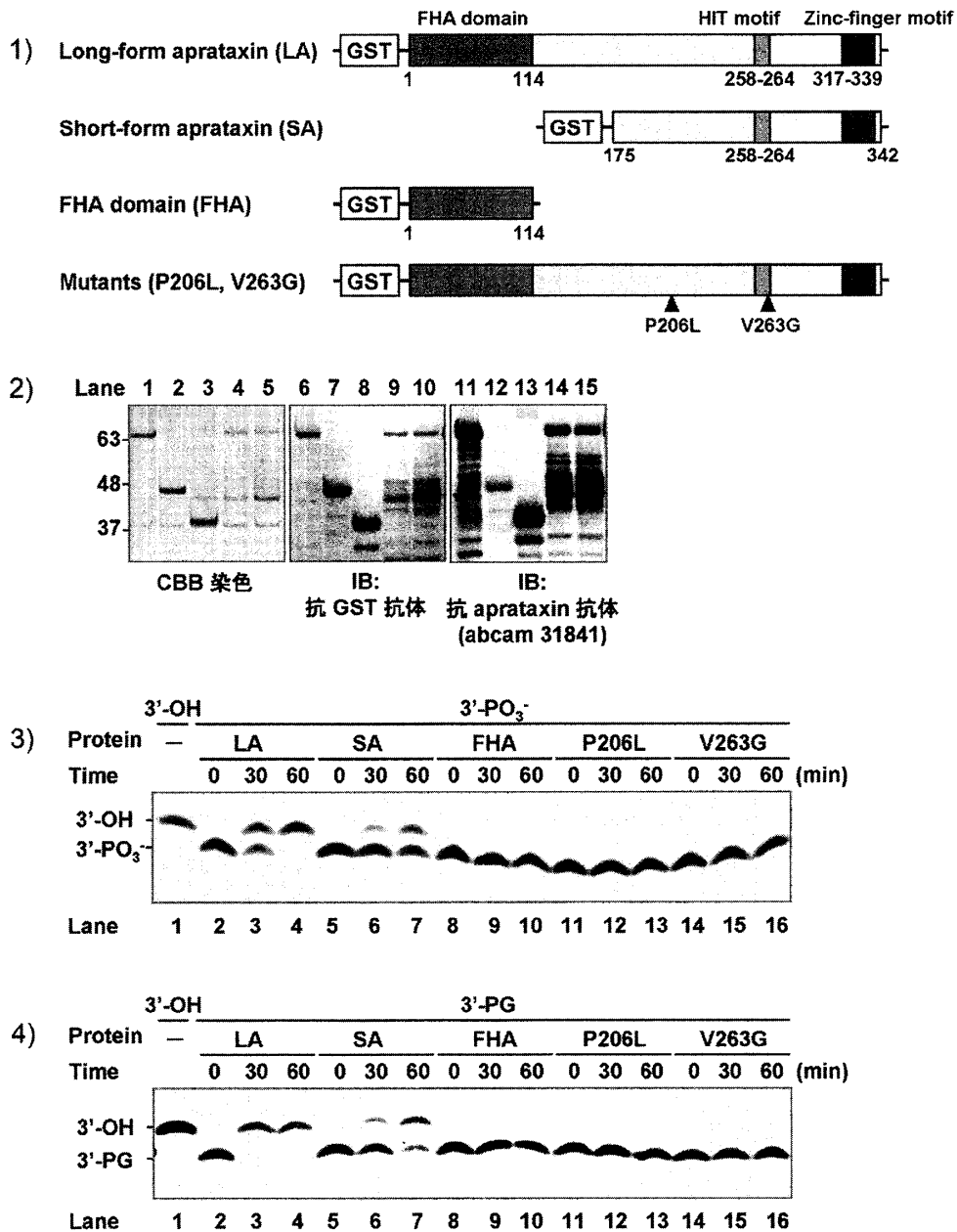


図3 GST-tag 融合組み換え蛋白の DNA 3'-phosphatase および 3'-PG hydrolase 活性

- 1) 作製した GST-tag 融合組み換え蛋白の構造を示す。
- 2) SDS-PAGE で分離した各精製蛋白の Coomassie brilliant blue (CBB) 染色 (左), 抗 GST 抗体 (中央) および抗 aprataxin 抗体 (右) を用いた Western-blotting を示す。LA: レーン 1, 6 および 11, SA: レーン 2, 7 および 12, FHA: レーン lanes 3, 8 および 13, P206L: レーン 4, 9 および 14, V263G: レーン 5, 10 および 15。
- 3) 各組み換え蛋白 (50 nM) の DNA 3'-phosphatase 活性を示す。活性は LA で最も強く (レーン 2-4), SA でも認められる (レーン 5-7) が, FHA (レーン 8-10) や疾患関連変異体 (レーン 11-16) ではほとんど認めない。
- 4) 各組み換え蛋白 (50 nM) の DNA 3'-PG hydrolase 活性を示す。3'-phosphatase 活性と同様に, 3'-PG hydrolase 活性は LA で最も強く (レーン 2-4), SA でも認められる (レーン 5-7) が, FHA (レーン 8-10) や疾患関連変異体 (レーン 11-16) ではほとんど認めない。

表 2 3'-リン酸基および 3'-ホスホグリコール酸基に対する組み換え aprataxin の加水分解活性

	LA	SA	FHA	P206L	V263G
3'-phosphate					
k_{cat} (s^{-1})	0.00027 ± 0.00007	0.00015 ± 0.00001	<0.00002	<0.00002	<0.00002
K_m (nM)	129 ± 76	251 ± 58			
3'-phosphoglycolate					
k_{cat} (s^{-1})	0.00287 ± 0.00039	0.00160 ± 0.00009	<0.00002	<0.00002	<0.00002
K_m (nM)	231 ± 37	292 ± 31			

His-LA, LA および SA とも, GMP- および AMP-lysine hydrolase 活性は極めて弱いものであった (図 4).

4. Aprataxin, Pol β および Lig3 による SSBR 再構成

Aprataxin の損傷 3'-末端の除去活性が DNA 修復において利用可能かどうかを確かめるために, 1ヌクレオチド・ギャップの SSBs で 3'-末端にブロックを伴う二本鎖 DNA を基質として用意し, aprataxin, Pol β および Lig3 による修復能を調べた (図 5). SSBs の 3'-末端が水酸基の場合には, Pol β および Lig3 のみで 45-mer DNA が形成され, 修復が完了した (図 5-1 および 6-2, レーン 2). 3'-末端がリン酸基の場合には, Pol β および Lig3 のみでは修復できない (図 5-1, レーン 5) が, aprataxin が加わると濃度依存性に 45-mer DNA が形成され, 修復が可能となった (図 5-1, レーン 6-8). 同様に, 3'-末端が PG 基の場合には, aprataxin は Pol β および Lig3 の共存下で 45-mer DNA を形成し, 修復を可能とした (図 5-2, レーン 6-8). これらの結果から, aprataxin は SSBR において 3'-末端のプロセッシングを行っている可能性が示唆された.

考 察

本研究では, 異なる 2つの系で作製した組み換えヒト aprataxin 蛋白を用いて, *in vitro* において酵素学的検討を行った. その結果, aprataxin が

DNA 3'-phosphatase 活性および 3'-PG hydro-lase 活性を有すること, DNA polymerase と lig-ase の共存下で 3'-ブロックを伴う SSBs を修復可能であること, さらに, 疾患関連変異体ではこの 3'-ブロック除去活性が失われることを明らかにした.

3'-ブロックとなりうる修飾基の多様性から, SSBR における 3'-末端のプロセッシングは, おそらく, 多種の酵素が関与すると考えられる重要なプロセスである. DNA 損傷により生じる 3'-ブロックとしては, リン酸基, PG 基, UA 基が知られる. 例えば, ROS による酸化的糖鎖損傷では, 約 7 対 3 の割合で 3'-PO₃-基または 3'-PG 基が形成される¹³⁾. これに対し, 酸化的塩基損傷では, 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) や endonuclease III (NTH1) による糖鎖切断により 3'-UA 基が, endonuclease VIII-like 1 (NEIL1) や endonuclease VIII-like 2 (NEIL2) による糖鎖切断により 3'-PO₃-基が生じる¹²⁾⁻¹⁴⁾. 一方, 転写や複製の際に生じる TOP1 介在性 SSBs では, 3'-TOP1 やその修復過程で生じる 3'-Y 基や 3'-PO₃-基が 3'-ブロックとなりうる¹⁹⁾⁻²¹⁾. これら 3'-ブロックを除去する酵素として APE1, PNKP, TDP1 が既に知られているが, 基質選択性や活性強度の問題から, 他にも酵素が存在すると推定される. 本研究では, aprataxin が SSBR において 3'-ブロックの除去に関与する新たな酵素であることを示した. APE1, PNKP, TDP1 との機能的棲み分けが問題となるが, aprataxin は 3'-PO₃-基および 3'-PG 基を選択的に基質とする

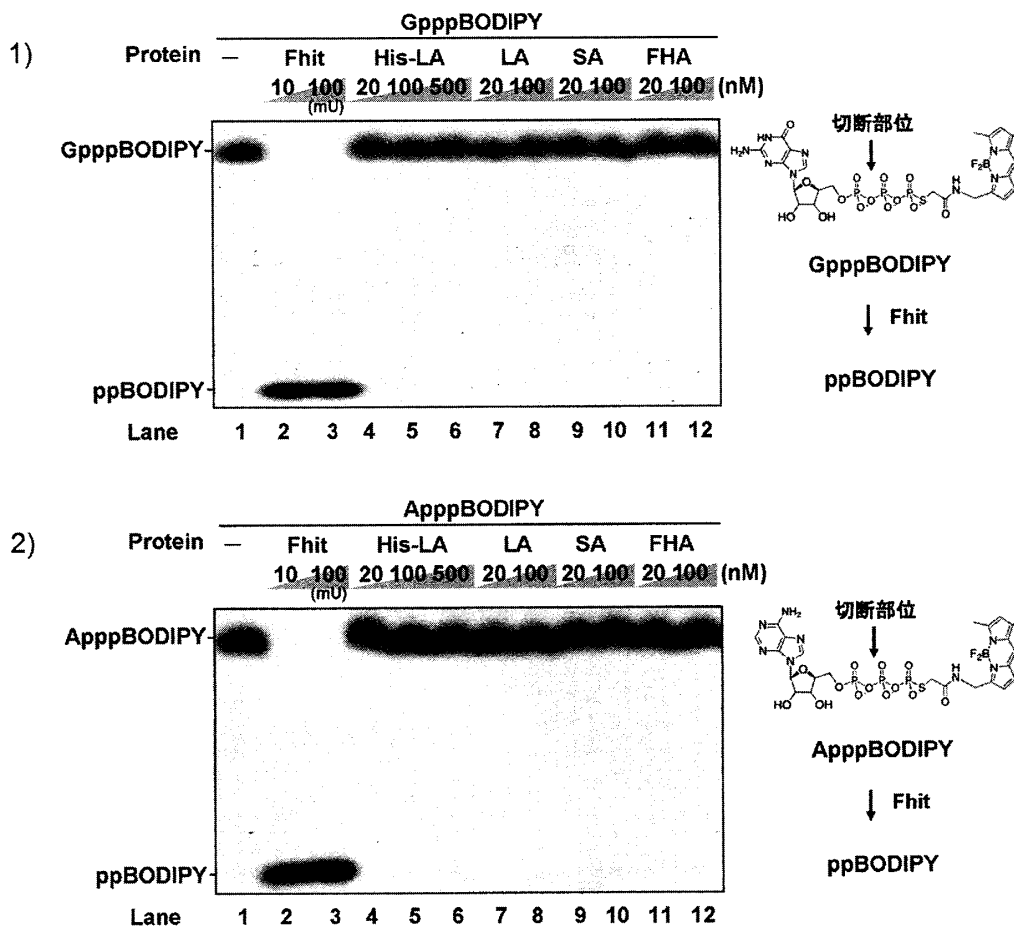


図4 GpppBODIPYおよびApppBODIPYに対するaprataxinの加水分解活性

GpppBODIPY (1) または ApppBODIPY (2) 基質に対する各組み換え蛋白の加水分解活性を示す。陽性コントロールのFhitがGMP-およびAMP-lysine hydrolase 活性を示すのに対し、His-LA (レーン4-6)、GST-tag融合のLA (レーン7および8)、SA (レーン9および10)、FHA (レーン11および12)は、高濃度(500 nM または 100 nM)であっても、加水分解活性を示さなかった。

ことから、特に糖鎖損傷により生じる3'-ブロックの修復に関与しているかもしれない(図6)。

DNA ligaseによって触媒されるDNAの連結反応は、切断部5'-末端へのadenosine monophosphate (AMP) 残基の付加、その後、3'-OH基の接触によるアデニル基の除去という中間プロセスを経て行われる²⁶⁾。ここで、3'-末端が非水酸基の場合、ligationの過程で生じた5'-末端のAMP(5'-AMP)残基は除去されず残留してしまう。最近、aprataxinがligationの中間産物として生じた5'-AMP残基を除去するという結果を、Ahel

らのグループが報告した²⁶⁾。この結果は、aprataxinが3'-末端のみならず、5'-末端のプロセッシングに関与していることを示唆するものであり、注目される。Aprataxinの酵素活性が本研究と他とで異なるのは用いた蛋白産生系の違いによるものかもしれないが、本研究では異なる2つの蛋白産生系で作製した蛋白を用いて同一の結果を得ている点で貴重と考える。

近年、複数の劣性遺伝性神経疾患において、その原因遺伝子産物がDNA修復に関与することが明らかになっている²⁷⁾が、概して、SSBRの障害

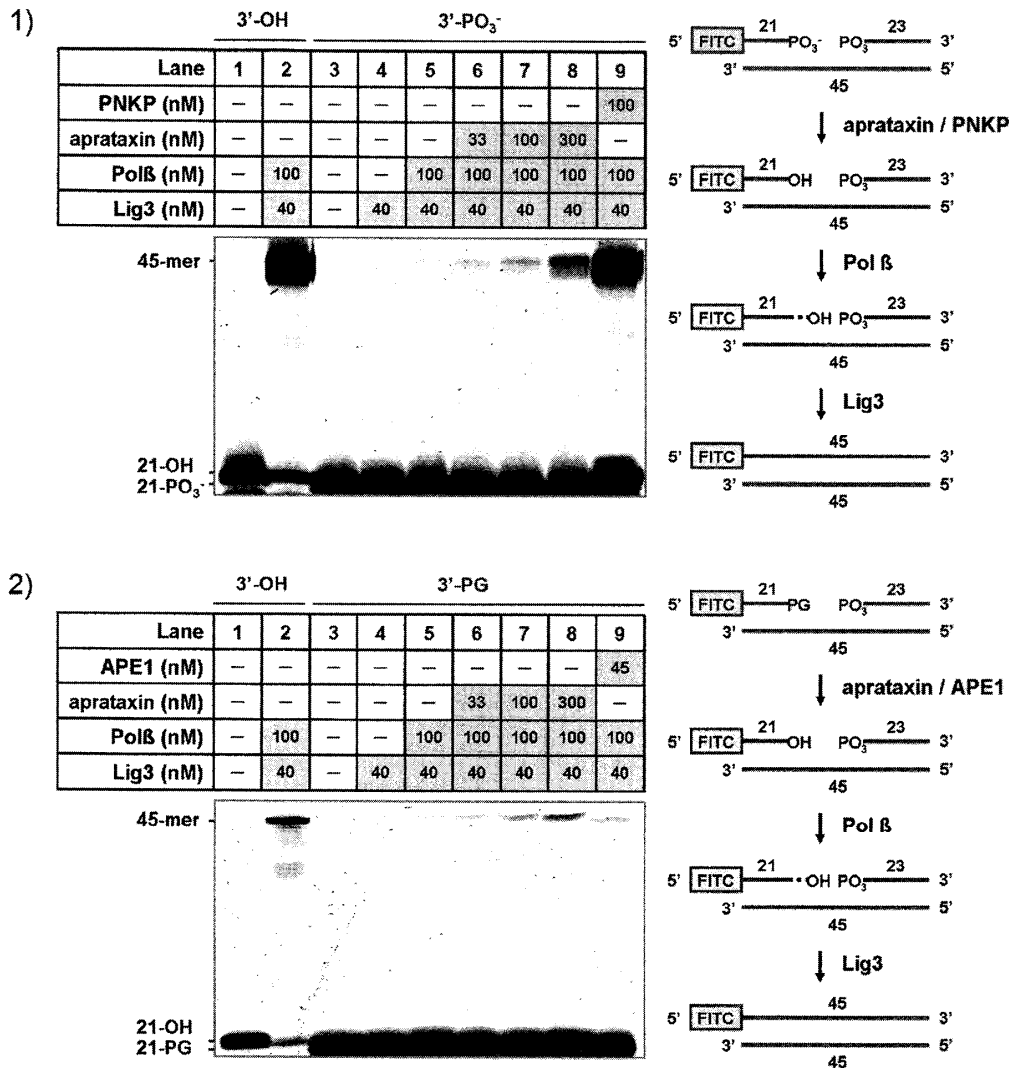


図5 aprataxin, Pol β, Lig3による3'-ブロックを伴うSSBsの修復

- 1) 切断部 3'-ブロックを伴う二本鎖 DNA を基質として, aprataxin, Pol β, Lig3 を反応させ, *in vitro* において SSB を再現した. 切断部が 3'-PO₃⁻ 基の場合, 陽性コントロールの PNKP (レーン 9) と同様, aprataxin は Pol β と Lig3 の共存下で SSBs を修復し, 45-mer オリゴヌクレオチドを形成した (レーン 6-8).
- 2) 同様に, 切断部が 3'-PG 基の場合, aprataxin は Pol β と Lig3 の共存下で SSBs を修復し, 45-mer オリゴヌクレオチドを形成した (レーン 6-8). APE1 は陽性コントロールとして用いた (レーン 9).

で生じる疾患では表現型が神経系に局限する傾向がある. EAOH/AOA1 の表現型も神経系にほぼ局限し, 皮膚の日光過敏や悪性腫瘍の発生増加などの神経外徴候は示さない. さらに, 神経系の中でも, 小脳 Purkinje 細胞や後根神経節細胞に強い障害を示す. 興味あることに, TDP1 の欠損により

生じる spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy type 1 (SCAN1) も, EAOH/AOA1 に酷似した表現型を示す²¹⁾. TDP1 は, 前述の 3'-Y 基の除去活性に加え, 3'-PG 基の除去活性も有し, 酸化ストレスにより生じた SSBs の修復にも関与していると推定されている¹⁹⁾²⁸⁾. 3'-ブロックのう

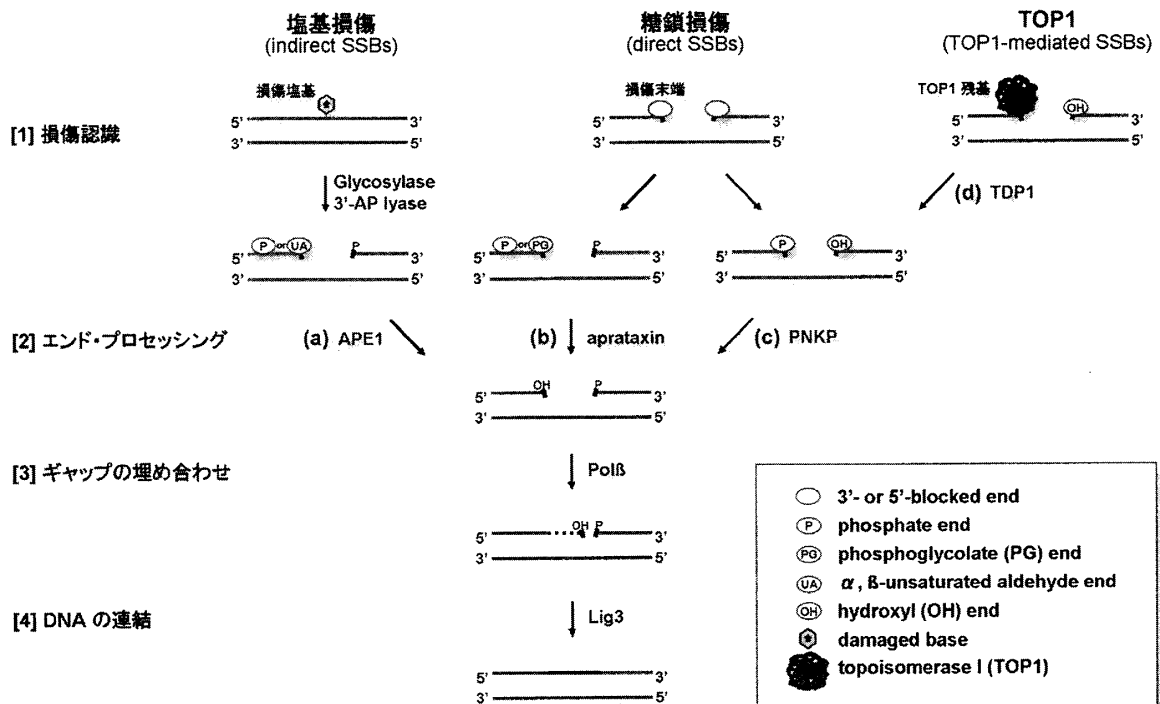


図6 aprataxinの介在するSSBRモデル

3'-ブロックを伴うSSBsは、酸化塩基損傷の修復過程で間接的に、または、活性酸素種による糖鎖損傷やtopoisomerase I (TOP1) 介在性の糖鎖切断により直接的に生じる。酸化塩基損傷から生じるSSBsでは3'- α , β unsaturated aldehyde基または3'-リン酸基が生じ、一方、糖鎖損傷から生じるSSBsでは3'-リン酸基または3'-phosphoglycolate基が生じる。また、TOP1介在性SSBsでは、3'-TOP1残基、3'-phosphotyrosine基、または3'-リン酸基が生じる。

- 1) 損傷認識と足場形成；PARPがSSBを認識して結合し、活性化する。PARPの活性化は、クロマチン修飾や他の修復関連蛋白の誘導など複数の役割を担う。その後、PARPはSSBsから離れ、XRCC1-Lig3複合体が足場を形成する(図示しない)。
- 2) エンド・プロセッシング；3'-および5'-末端が、それぞれ3'-水酸基、5'-リン酸基に変換される。3'-末端のプロセッシングは、修飾基の種類に依存して、APE1 (a)、aprataxin (b)、PNKP (c) またはTDP1 (d) によって触媒される。aprataxinは主に糖鎖損傷から生じたSSBsの修復に関与しているかもしれない。
- 3) ギャップの埋め合わせ；DNA polymerase β (Pol β) によるDNA合成により、1ヌクレオチドのギャップが埋め合わされる。ギャップが数ヌクレオチドの場合には、DNA polymerase δ/ϵ が関与するとされる。
- 4) DNAの連結；DNA ligase III (Lig3) がニックを連結する。Lig3はXRCC1と恒常的に結合し、安定化している。数ヌクレオチド・ギャップの修復には、DNA ligase Iが関与するとされる。

ち、とくに酸化ストレスにより生じる3'-ブロックの除去機能の障害が、両疾患における神経細胞死の病態に深く関与している可能性が考えられる。今後、aprataxinの欠損によって、3'-ブロックを伴うSSBsが修復できずに蓄積していることを、*in vivo*において証明する必要がある。

なぜSSBRの障害に対し神経系が脆弱なのか、その理由は明らかでないが、いくつかの可能性が想定される。神経細胞が最終分化した非分裂細胞であることが、最も重要な理由の一つと考えられる。分裂細胞においてSSBRが障害された場合、SSBsは細胞分裂の過程で相同組み換え修復によ

り代償的に修復される²⁹⁾。しかし、細胞周期の停止した非分裂細胞では、この代償機転が働かず、SSBs が修復されずに蓄積する。最終分化した非分裂細胞は、神経細胞のみならず筋細胞や脂肪細胞、肝細胞などがあるが、とくに神経細胞が影響を受けやすいのは、高レベルの酸化ストレスや高い転写要求、再生能の制限など神経系に特異的な条件が影響しているためかもしれない。

今後、aprataxin の欠損により 3'-ブロックを伴う SSBs が細胞内で蓄積することを証明するとともに、SSBs の蓄積がいかんにして選択的神経細胞死を来たすのか、その分子病態を明らかにする必要がある。

謝 辞

本研究全般にわたり、ご指導ご助言をいただきました、新潟大学脳研究所脳疾患リソース研究部門分子神経疾患資源解析学分野 小野寺理助教授、腎研究所構造病理学分野 吉田豊講師、東京大学大学院医学系研究科神経内科 辻省次教授、新潟大学脳研究所神経内科 西澤正豊教授、五十嵐修一講師、高橋哲哉先生、横関明男先生、大学院生 志賀篤君、小山哲秀君に心より深謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 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) 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.
- 5) Barbot C, Coutinho P, Choro R, Ferreira C, Barros J, Fineza I, Dias K, Monteiro J, Guimaraes A, Mendonca P, do Ceu Moreira M and Sequeiros J: Recessive ataxia with ocular apraxia: review of 22 Portuguese patients. *Arch Neurol* 58: 201-205, 2001.
- 6) 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.
- 7) 五十嵐修一：常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症：眼球運動失行と低アルブミン血症を伴う早発型脊髄小脳失調症。 *神経進歩* 50: 363-369, 2006.
- 8) 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 EAOH is a nuclear protein with a potential role as a DNA repair protein. *Ann Neurol* 55: 241-249, 2004.
- 9) Date H, Igarashi S, Sano Y, Takahashi T, Takano H, Tsuji S, Nishizawa M and Onodera O: The FHA domain of aprataxin interacts with the C-terminal region of XRCC1. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 1279-1285, 2004.
- 10) Clements PM, Breslin C, Deeks ED, Byrd PJ, Ju L, Bieganowski P, Brenner C, Moreira MC, Taylor AM and Caldecott KW: The ataxia-ocular apraxia 1 gene product has a role distinct from ATM and interacts with the DNA strand break repair proteins XRCC1 and XRCC4. *DNA Repair (Amst)* 3: 1493-1502, 2004.

- 11) Gueven N, Becherel OJ, Kijas AW, Chen P, Howe O, Rudolph JH, Gatti R, Date H, Onodera O, Taucher-Scholz G and Lavin MF: Aprataxin, a novel protein that protects against genotoxic stress. *Hum Mol Genet* 13: 1081 - 1093, 2004.
- 12) Caldecott KW: XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 2: 955 - 969, 2003.
- 13) Caldecott KW: Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ray affair. *Bioessays* 23: 447 - 455, 2001.
- 14) Hazra TK, Das A, Das S, Choudhury S, Kow YW and Roy R: Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: A new perspective. *DNA Repair (Amst)* *in press*.
- 15) Winters TA, Henner WD, Russell PS, McCullough A and Jorgensen TJ: Removal of 3'-phosphoglycolate from DNA strand-break damage in an oligonucleotide substrate by recombinant human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1. *Nucleic Acids Res* 22: 1866 - 1873, 1994.
- 16) Suh D, Wilson DM 3rd and Povirk LF: 3'-phosphodiesterase activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease at DNA double-strand break ends. *Nucleic Acids Res* 25: 2495 - 2500, 1997.
- 17) Wiederhold L, Leppard JB, Kedar P, Karimi-Busheri F, Rasouli-Nia A, Weinfeld M, Tomkinson AE, Izumi T, Prasad R, Wilson SH, Mitra S and Hazra TK: AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. *Mol Cell* 15: 209 - 220, 2004.
- 18) Sugimoto T, Igawa E, Tanihigashi H, Matsubara M, Ide H and Ikeda S: Roles of base excision repair enzymes Nth1p and Apn2p from *Schizosaccharomyces pombe* in processing alkylation and oxidative DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 4: 1270 - 1280, 2005.
- 19) El-Khamisy SF, Saifi GM, Weinfeld M, Johansson F, Helleday T, Lupski JR and Caldecott KW: Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1. *Nature* 434: 108 - 113, 2005.
- 20) Leppard JB and Champoux JJ: Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma* 114: 75 - 85, 2005.
- 21) Takashima H, Boerkoel CF, John J, Saifi GM, Salih MA, Armstrong D, Mao Y, Quioco FA, Roa BB, Nakagawa M, Stockton DW and Lupski JR: Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nat Genet* 32: 267 - 272, 2002.
- 22) 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.
- 23) Hirano M, Furiya Y, Kariya S, Nishiwaki T and Ueno S: Loss of function mechanism in aprataxin-related early-onset ataxia. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 380 - 386, 2004.
- 24) Seidle HF, Bieganski P and Brenner C: Disease-associated mutations inactivate AMP-lysine hydrolase activity of Aprataxin. *J Biol Chem* 280: 20927 - 20931, 2005.
- 25) Kijas AW, Harris JL, Harris JM and Lavin MF: Aprataxin forms a discrete branch in the HIT (histidine triad) superfamily of proteins with both DNA/RNA binding and nucleotide hydrolase activities. *J Biol Chem* 281: 13939 - 13948, 2006.
- 26) Ahel I, Rass U, El-Khamisy SF, Katyal S, Clements PM, McKinnon PJ, Caldecott KW and West SC: The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature* 443: 713 - 716, 2006.
- 27) Paulson HL and Miller VM: Breaks in coordination: DNA repair in inherited ataxia. *Neuron* 46: 845 - 848, 2005.
- 28) Plo I, Liao ZY, Barcelo JM, Kohlhagen G, Caldecott KW, Weinfeld M and Pommier Y: Association of XRCC1 and tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) for the repair of topoisomerase I-mediated DNA lesions. *DNA Repair (Amst)* 2: 1087 - 1100, 2003.
- 29) El-Khamisy SF and Caldecott KW: TDP1-dependent DNA single-strand break repair and neurodegeneration. *Mutagenesis* 21: 219 - 224, 2006.

(平成19年1月10日受付)