

DNA 損傷と DNA 修復 古くて新しい研究課題

真木 寿治

はじめに

大隅良典博士が2016年にノーベル医学生理学賞を受賞されたニュースは、我が国の生物学研究者を大いに元気づけた。出芽酵母の液胞の役割についての基礎研究から、タンパク質の分解・再利用の全体像を明らかにし、細胞の普遍的な機能としてのオートファジーがさまざまな生物現象に深く関わっていることを発見したことが評価された。この基礎研究の成果は医学・薬学はもちろん、生物学や農学などの応用的な研究分野にも大きな影響を与えたことはいままでのない。日本ではあまり注目されなかったかもしれないが、本稿のテーマであるDNA修復は2015年のノーベル化学賞の受賞対象となった¹⁾。これもオートファジーの研究と同様に、生物学や生化学のcuriosity-drivenの基礎研究が科学（応用も含めて）の世界で大きな果実を生んだ好例である。DNA修復は生物学や医学の重要な研究課題であるので、ノーベル医学生理学賞の対象ではと思う人が多いであろう。化学賞の受賞理由は、DNA修復の分子機構を明らかにしたことである。ただし、その分子機構は多数の経路と複雑な生化学的ステップからできており、さまざまな様式のタンパク質-DNA相互作用が絡んでいる。その全体像を明らかにするのは容易ではなかったが、分子遺伝学と生化学の両方のアプローチで、最終的には試験管内でDNA修復を再現（再構成）することにより成し遂げられた。生命の基盤である遺伝情報が、いかにして正確に維持されるのかについて、化学の言葉で見事に説明したことが化学賞受賞の所以である。

DNAはいつも傷ついている

化学物質としてのDNAはタンパク質やRNAよりも安定である。化学物質である以上、DNAは不死身ではないが、細胞からDNAを抽出して通常の方法で分析する限り、DNAの化学構造異常、すなわちDNA損傷は検出することが困難である。一方で、放射線・紫外線・特定の化学物質を細胞に作用させると、細胞内のDNAにDNA損傷を検出可能なレベルで誘発することができる。これらのDNA損傷誘発因子は、最終的に突然変異

を引き起こすことから、総称して変異原と呼ばれる。細胞に紫外線を照射すると、紫外線の光エネルギーをDNA中のピリミジン塩基が吸収して活性化し、ピリミジン同士が並んでいる場合には二つのピリミジン間で共有結合が生じる。チミン同士でできる二量体をもっとも安定であることから、紫外線によるDNA損傷の代名詞としてチミンダイマーがよく知られており、DNA修復研究においてもっともポピュラーなDNA損傷である。紫外線は太陽光線に含まれているので、ヒトが日光にさらされると、露出した皮膚の細胞では当然チミンダイマーが生まれる。しかし、紫外線の影響は皮膚の一部にとどまり、体の大部分の細胞には影響しない。また、自然界に存在する放射線や化学変異原のレベルは非常に低く、生物にDNA損傷を引き起こすことはほとんどないと考えられている。人類社会の産業活動などで生まれる人工的な化学変異原や放射能汚染を除けば、外的な要因で生じるDNA損傷はほとんどないと考えて良い。

それでは、DNA損傷は高レベルの変異原を用いた実験室でしか生まれぬものであろうか。実は、ヒトの1個の細胞内で24時間に発生するDNA損傷は少なくとも数千のレベルであることが推測されている。その原因はさまざまであるが、細胞中でのさまざまな代謝産物によるDNAの化学変化（自然DNA損傷）が主要な原因の一つである。特に、活性酸素による酸化DNA損傷の重要性が分かってきた。もう一つのDNA損傷の原因は、増殖している細胞に特異的であるが、DNA複製のエラーで生じる誤った塩基対（ミスマッチ）である。塩基は正常であるが、DNAとしては異常な塩基対ができていたので、DNA損傷として取り扱われる。盛んに分裂している細胞では、自然DNA損傷と同じくらいのミスマッチができていと推定されている。したがって、細胞の中でのDNAは常に損傷を受けているとって良い。DNA損傷のレベルは10~100万ヌクレオチドに1個程度ではあるが、その生物学的な影響は大きい。

DNA損傷はどのような影響をおよぼすか

DNAの塩基配列は遺伝情報として、DNA複製により次世代に伝達され、転写・翻訳による遺伝子発現を通じ

て細胞機能を働かせる。DNA損傷はDNA複製と転写の両方に影響を与えることになる。DNA損傷の大部分はDNA複製をブロックするので、細胞増殖を強く阻害したり、染色体異常や細胞死を引き起こしたりする。複製をブロックしない損傷も存在するが、多くの場合、DNA複製のエラーを誘発して突然変異が発生する。したがって、DNA損傷は分裂する細胞で突然変異や染色体異常を引き起こして、遺伝情報の伝達を不正確なものとする。遺伝情報の変化は生物進化には必要であるが、発がんや遺伝病の発生の原因にもなり、生物の寿命にも影響をおよぼす。一方で、DNA損傷はRNAポリメラーゼによる転写のブロックや、転写エラーを引き起こす。DNA損傷による遺伝子発現の阻害は、神経細胞や筋肉などの分化した細胞では大きな脅威である。これにより、細胞機能の阻害や異常、最終的には細胞死を引き起こされると考えられている。DNA損傷は神経細胞死の有力な原因の一つである。

DNA損傷の生物学的な影響は大きく、それを強く抑制しているのがDNA修復である。DNA修復はきわめて巧妙に、またきわめて効率よくできているので、通常はDNA損傷の影響は隠されてしまっている。

DNA修復研究のミニヒストリー

DNA損傷と修復の発見 不思議なことに、DNA損傷とその修復機構の存在は、DNAが遺伝物質であることが分かる以前に気づかれていた。1920年にMuller博士がX線を生物に照射すると突然変異が誘発されること、線量を上げると細胞が死ぬことを発見し、放射線により遺伝物質が傷つく可能性を最初に提唱した(この発見により1946年にノーベル医学生理学賞を受賞)。そのすぐ後には、化学物質や紫外線でも放射線と同様のことが起こり、特に紫外線の効果は照射された細胞に可視光をあてると強く抑制される(光回復)ことから、細胞には遺伝物質の傷害を修復する力が備わっていることが発見されている。このように、DNA損傷とDNA修復の基本コンセプトは分子生物学が誕生する前に確立されており、当時の科学の世界でもっともホットな研究課題の一つであった。しかし、DNA修復の研究が本格的になるには、遺伝物質としてのDNAの同定やワトソン・クリックのDNA二重らせんモデルの提唱まで待つ必要があった。

DNA修復関連遺伝子の発見 1960年代には、バクテリオファージや大腸菌を材料として、DNA損傷を引き起こす放射線・紫外線・化学物質に対して高い感受性を示す変異株の分離と遺伝解析により、DNA修復に関

与する遺伝子が次々と同定されていった。また、核酸化学の進展により、DNA損傷そのものの実体も明らかになり、細胞内でDNA損傷が元通りの正常なDNAに戻ることも実証されていった。だが、1970年代に入って遺伝子クローニングの技術を使って修復に関与する遺伝子が同定されたり、それらの遺伝子産物が精製されたりするようになって、DNA修復の分子機構の解明は容易ではなかった。ただ、唯一成功した研究者がいる。筆者の恩師でもある関口睦夫博士(九州大学名誉教授、現福岡歯科大学教授)は、バクテリオファージT4の修復遺伝子の産物を精製して、その酵素だけでDNAからチミンダイマーが(紫外線によるDNA損傷)が切り取られることを発見した²⁾。しかし、大腸菌からもヒト細胞からもこのような酵素活性は見いだされることはなかった。それは、細胞が持つ修復機構はファージの修復機構よりずっと複雑で、多数のタンパク質が共同作業を行う仕組みだったからである。もし、カロリンスカのノーベル賞委員会が修復酵素の発見を受賞理由にしたならば、関口博士も受賞者に加わっていたことだろう。2015年のノーベル医学生理学賞の3名の受賞者は、それぞれ異なる細胞内のDNA修復経路の全体像を明らかにしたが、これらの困難な問題の突破口となった実験結果が得られたのは1980年代に入ってからである。

DNA修復の分子機構の解明 生物学での大きなブレークスルーは研究技術の発展と結びついているケースが多い。DNA修復の場合は、新しい研究技術が開発された直後に真っ先にそれを適用して、他の分野に広がっていく契機になったり、研究技術の改良・発展につながったりすることが多く見られる。DNAシーケンスゲルでのDNA分析がその良い例である。これにより、DNAからDNA損傷が切り出されていく過程を細かく解析することができるようになった。もう一つの研究技術の適用では、硫酸分画法を用いた細胞粗抽出液でのDNA修復反応の検出と再構成があげられる。これは、1982年にスタンフォード大学のKornberg博士の研究室で大腸菌の染色体複製の開始過程を粗抽出液で検出・再現した実験³⁾の手法を各種のDNA修復反応に応用したものである。複製開始反応も修復反応も多数のタンパク質因子がDNAの特定の領域や構造に働きかけることが重要である。また、ATPが必要でADPは阻害的に働く点も共通である。タンパク質因子同士の相互関係やDNAとの相対的な濃度も重要である。細胞粗抽出液を用いた実験系には、当時の最先端の有機化学・生化学のエッセンスが詰まっている。このようなさまざまな研究領域の最新の技法を用いた総力戦により、2015年の3人のノーベル

賞受賞者をはじめとする多数の研究者が、1980年代のほぼ10年の期間でDNA修復、特にDNA損傷を除去する修復の分子機構を明らかにした。したがって、DNA修復がノーベル賞の対象として選ばれるのには30年以上かかったことになる。

塩基除去修復 DNA損傷の代表的なものはDNA中の塩基が加水分解により変化したり、メチル基などでアルキル化されたり、活性酸素により酸化されたりして生じる塩基損傷である。2015年ノーベル賞受賞者のLindahl博士は、DNAを水溶液中で加熱した時に生じる変化を解析して、シトシンがウラシルに変化することを見いだしたが、細胞内のDNAにはウラシルは検出レベル以下しか存在しないことから、DNA損傷としてのウラシルをDNAから除去する修復機構の存在を予想した。Lindahl博士は大腸菌の細胞抽出液中にDNAからウラシルを切り出す酵素活性を発見し、ウラシルDNAグリコシラーゼと名付けた⁴⁾。損傷塩基だけをDNAから切り出す酵素の最初の発見である。後に、さまざまな損傷塩基に対する多種多様なDNAグリコシラーゼが発見されたが、Lindahl博士はDNAグリコシラーゼが作用してできた脱塩基部位が修復されて行くプロセスも含めてウラシル修復の全体像を明らかにし、塩基除去修復の概念を確立した。DNA損傷の一つの特徴は化学構造的にきわめて多種類の損傷が生まれることである。塩基損傷だけに限っても数十種類が知られている。塩基除去修復の開始は損傷塩基に特異的なDNAグリコシラーゼが損傷塩基を切り取る段階であるが、それ以降の段階では、脱プリン/ピリミジン部位特異的なAPエンドヌクレアーゼあるいはAPリナーゼが脱塩基部位を切断して除去し、1塩基分だけのDNA合成を修復型のDNAポリメラーゼが行い、最後はDNAリガーゼがDNA鎖を結合して修復が完了する。多数種の塩基損傷に対応する巧妙な仕組みである。

ヌクレオチド除去修復 細胞の中では、小さな塩基損傷だけでなく大きなDNA損傷（チミンダイマー、発がん物質の結合、タンパク質の結合、DNAクロスリンクなど）も発生する。この場合には、より大きいDNA断片の切り出しを行うヌクレオチド除去修復が働く。1960年代にはDNA損傷を含むDNA断片の切り出しと修復DNA合成が細胞内で起きていることは示されており、1970年代にはヌクレオチド除去修復に関与する遺伝子群も同定されていた。しかし、試験管内でDNA損傷の切り出し反応を再現することは困難を極めた。上述したように、大腸菌粗抽出液画分とATP再成系を用いて、

複数の修復タンパク質が連続した一連の反応ステップを協同しながら進めて行くことを明らかにしたのは、2015年ノーベル賞受賞者のAziz Sancar博士である⁵⁾。塩基除去修復では1個の損傷塩基を切り出すのに対して、ヌクレオチド除去修復ではDNA損傷を含む10ヌクレオチドのDNA断片が切り出される。修復タンパク質がどのようにしてDNA損傷を認識するのかは、現在でも重要な問題である。ヌクレオチド除去修復では、DNA損傷を二本鎖DNAのゆがみとして直接認識する経路もあるが、認識効率は悪い。DNA損傷によりDNA上で停止したRNAポリメラーゼを認識する転写と共役した認識効率が高い経路も発見されている。

ミスマッチ修復 複製エラーの修復は特殊である。それは、DNA損傷としての複製エラーは正常な塩基同士がミスマッチを形成しているの、どちらが正しい情報なのかをDNA修復系が判断する必要があるからである。ミスマッチ修復に関与する遺伝子に欠損が生じると、複製エラーが修復されないため、自然突然変異頻度が大幅に上昇する。このことを利用して、1970年代に複数のミスマッチ修復関連遺伝子が発見されていたが、遺伝子産物の働きは簡単には分からなかった。ここでも、ブレークスルーとなったのは、大腸菌の粗抽出液画分を用いた生化学的実験であった。試験管内でのミスマッチ修復の再現に成功して、ミスマッチ認識タンパク質や新生鎖認識機構を解明したのが2015年ノーベル賞受賞者のModrich博士である⁶⁾。

DNA損傷が修復を誘導する 1980年代にもう一つ重要な発見がなされている。それは、DNA損傷応答(DNA damage response)と呼ばれる現象である。細胞に紫外線などの変異原を作用させてDNA損傷をたくさん作らせると、細胞はDNA修復関連遺伝子やそれ以外の遺伝子を発現誘導するようになる。これにより、DNA修復の能力を高めたり、細胞分裂やDNA複製の進行を一時的に停止してDNA修復が働く時間を確保して、DNA損傷による細胞死を防いだりする。大腸菌で最初に発見され、船舶の救難信号であるSOSをもじってSOS応答と名付けられた。これはノーベル賞級の発見であり、大腸菌では化学変異原であるアルキル化剤で生じるDNA損傷に対する損傷応答や、活性酸素を発生させる過酸化水素素に対するレドックス応答などの発見につながった。

ヒト細胞でのDNA修復の役割 1990年代は真核生物、特にヒト細胞でのDNA修復の研究が大きく展開する。基本的には、大腸菌でのDNA修復と共通した部分が多いが、より複雑なものとなっていること、クロマチン構造の動態と密接なリンクを持っていること、細胞周

期のチェックポイント制御とも関連していることなどが明らかになっている。また、ミトコンドリアでのDNA損傷とその修復の重要性も分かってきた。もう一つの重要な展開は、DNA修復が人の健康を支えていることが明確になってきたことである。色素性乾皮症というヒトの遺伝病の患者は、皮膚が紫外線に対して過敏になり、皮膚がんを高頻度で発症する。その原因は、紫外線が作るDNA損傷を修復する機構に関与する遺伝子に突然変異が生じ、修復機能が働かなくなるからである。また、ヒトの家族性（遺伝性）大腸がんの家系分析から、その高頻度発がんの原因がミスマッチ修復に関与する遺伝子の変異であることが明らかになり、遺伝性でないがんの発症過程にも高い頻度でミスマッチ修復関連遺伝子の機能欠損が関与することが分かった。これらのことから、DNA修復はDNA損傷によって生じる突然変異や染色体異常の発生を強く抑制することにより、発がんやそれ以外の遺伝子異常によって生じる疾病を未然に防止していることが広く知られるようになった。これが、1994年のScience誌のThe molecule of the yearにDNA修復が選ばれた理由である。話はこれで終わらない。2000年代に入ってからDNA修復研究は大きく展開する。DNA損傷により誘発される突然変異の発生機構が明らかになったからである。

損傷乗り越えDNAポリメラーゼの発見 1999年から2000年にかけて、日本、米国、フランス、イスラエルの複数の研究グループから、それまでに知られていたものとはまったく異なる構造と性質を持つDNAポリメラーゼの発見が報告された。その中でも、最初に報告したのは当時、大阪大学教授であった花岡文雄博士のグループであった⁷⁾。花岡博士はもともとほ乳類のDNAポリメラーゼの研究者であったが、大阪大学での新しい研究室の創設を契機に、ヒトDNA修復の研究を開始し、色素性乾皮症に関連するヒトのヌクレオチド除去修復の分子機構の研究で成果をあげていた。色素性乾皮症の原因遺伝子の中で、一つだけヌクレオチド除去修復には関係ないものが残っており、その遺伝子の産物の生化学的性質をさまざま調べているうちに、このタンパク質がDNAポリメラーゼの活性を持ち、しかも鋳型DNAに損傷があっても損傷を乗り越えてDNA合成を続けることができることを発見した。ただし、損傷を乗り越えた場合にはDNA合成のエラーが生じて、突然変異を引き起こすことになる。また、損傷のないDNAを鋳型にした

時にも、この新奇的なDNAポリメラーゼはDNA合成の誤りを高頻度で起こすことや、それまでに知られていた大部分のDNAポリメラーゼが持っているDNA合成の誤りをすぐに除去する校正機能が備わっていないことも分かった。これらの発見から、変異原による突然変異の発生機構が見事に解明されたわけである。大腸菌、酵母などからも同様の性質を示すDNAポリメラーゼが次々に同定され、花岡博士が発見したものも含めて、「損傷乗り越えDNAポリメラーゼ」と呼ばれるようになった。

活性酸素による酸化DNA損傷と修復 損傷乗り越えDNA合成が突然変異の誘発に関与するのは、DNA複製をブロックするDNA損傷が通常の修復機構で取り除かれない時である。そのような状況は変異原に強くさらされた時ぐらいで、通常はあまりない。それでも、低い頻度ではあるが通常的环境中で生きている生物に突然変異は生じる。これを自然突然変異というが、その原因を解明する過程で、酸素呼吸の副産物である活性酸素によって生じる酸化DNA損傷が突然変異の主要な原因であることが分かってきた。その端緒となったのは、筆者らによる8-oxoグアニンの変異誘発効果の発見である⁸⁾。酸化DNA損傷は発がんや老化の原因の本命と考えられるようになってきた。酸化DNA損傷の修復機構の研究は現在のホットな研究課題の一つとなっている。

おわりに

DNA損傷とその修復の全体像と研究の歴史を理解していただけたであろうか。多くの日本人研究者も重要な貢献を果たしてきた。その中から、将来のノーベル賞受賞者が出てくることが期待できることを記しておきたい。

文 献

- 1) The Nobel Prize in Chemistry 2015: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2015/ (2016/10/15)
- 2) Yasuda, S. and Sekiguchi, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**, 1839 (1970).
- 3) Fuller, R. S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7370 (1981).
- 4) Lindahl, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 3649 (1974)
- 5) Sancar, A. and Rupp, W. D.: *Cell*, **33**, 249 (1983).
- 6) Lu, A. L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4639 (1983).
- 7) Masutani, C. et al.: *Nature*, **399**, 700 (1999).
- 8) Maki, H. and Sekiguchi, M.: *Nature*, **355**, 273 (1992).