

ヒトABHファミリー分子のDNA・RNA損傷修復とがん化



研究ノート

辻川 和 丈*

Repair of damaged DNA and RNA by hABH family molecules and oncogenesis

Key Words : alkylation damage, AlkB, oxidative demethylation, cancer

1. はじめに

細胞内のDNA, RNAや蛋白質のような巨大分子は, 細胞内物質や環境中因子により絶えず損傷を受けている. RNAや蛋白質と異なり, DNAは細胞内に予備をもたず, また合成により補充されることもないため損傷を修復する機構が必要不可欠となる. 細胞はこのDNA損傷に対して種々の巧妙な修復機構を構築してきた. DNAのメチル化損傷に対しても, 原核生物からヒト細胞まで保存された修復機構が機能していることが知られている. それらは alkylbase DNA glycosylaseによる塩基除去修復機構やO⁶-methylguanine methyltransferaseによるメチル基転移修復などである. 最近, DNAのメチル化損傷に対する第3の修復機構として重要な発見が相次いで報告された. それは大腸菌においてメチル化剤により発現誘導される蛋白質として発見された AlkBと, 当研究室で発見したPCA-1 (prostate cancer antigen-1) が機能する機構である.

2. PCA-1の発見と酸化的脱メチル化によるメチル化DNA, RNA脱メチル化修復

我々は, 欧米において男性がんの罹患率, 死亡率のトップを占め, 本邦においても食生活の欧米化と

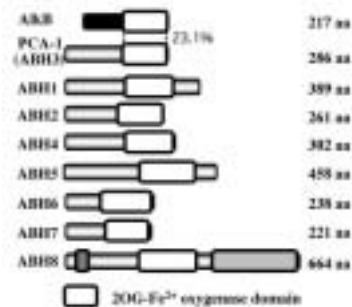


図1 PCA-1, AlkBとヒトABHファミリー分子の模式図.
2 OG-Fe²⁺ oxygenase domain: 2-oxoglutarate and Fe²⁺ oxygenase domain

高齢化により最も顕著な罹患率上昇が認められている前立腺癌に着目し, その診断・治療標的分子の探索を進めた. 前立腺癌患者術後病理組織の癌部, 非癌部間で発現変化が認められる遺伝子をディファレンシャル・ディスプレイ法により解析した結果, 癌部で高発現する新規遺伝子をクローニングし, PCA-1と命名した(図1)(1). ホモロジー解析の結果, PCA-1は機能不明であった大腸菌蛋白質 AlkBと, アミノ酸レベルで23%という高い類似性を示した. このことはPCA-1が生命に必須の機能を演じていることを推測させた. その後, 2つのグループからAlkBならびにPCA-1がメチル化DNAだけではなくメチル化RNAをも基質とし, 酸化的脱メチル化というまったく新しい機序により脱メチル化修復する酵素であることが報告された(2, 3).

酸化的脱メチル化機構とは, PCA-1 (AlkB)がDNAあるいはRNAの1-methyladenineあるいは3-methylcytosineを, 2-oxoglutarateをco-substrate, Fe²⁺をco-factorとしてhydroxymethylに変換後, 脱メチル化するというものである. この反応において副産物としてホルムアルデヒドが産生される. この酵素活性はPCA-1ならびにAlkBの2-oxoglutarate, Fe²⁺-oxygenase domainにより触媒されると考えら



* Kazutake TSUJIKAWA

1959年8月生
大阪大学大学院・薬学研究科・応用薬学,
課程終了(1984年)
現在, 大阪大学大学院薬学研究科細胞生
理学分野, 准教授, 薬学博士, 分子生物
学
TEL: 06-6879-8191
FAX: 06-6879-8191
E-mail: tsujikawa@phs.osaka-u.ac.jp

れている。

3. PCA-1によるメチル化RNAの修復

分子生物学のセントラルドグマでは、損傷DNAに対しては修復機構が働くが、修復できない場合には分解され、細胞はアポトーシスにより死を迎える(図2)。一方、RNAや蛋白質は次々と合成される

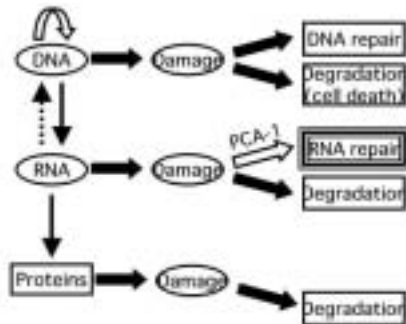


図2 損傷を受けたDNA, RNA, 蛋白質に対する細胞の処理機構。RNA損傷修復がPCA-1により制御されている可能性が示された (Nature 421, 795-796, 2003より引用)

ので、損傷を受けたものは分解されるのみで、修復はされないと考えられていた。しかしPCA-1やAlkBの研究により、このセントラルドグマを改変する重要な発見がもたらされた。それは、メチル化RNAに対しても修復機構が存在することである。PCA-1やAlkBは、メチル化されたtRNAやmRNAをも基質とし脱メチル化修復することが実験的に証明された(4)。これらの結果は、DNAだけではなくRNAにおいても損傷修復機構が存在することを初めて示したもので、分子生物学のセントラルドグマの改変につながるものと考えられる。

4. ABHファミリー分子の発見と機能解析

In silicoの解析により、PCA-1は2-oxoglutarate, Fe²⁺-oxygenase domainを有する他の分子とともにヒトAlkB homolog (hABH) familyを構成することが推測された(5)。そこで我々はヒトにおけるABHファミリー分子による損傷修復機構を解明するために、これらすべての分子の同定に着手した。その結果、新たにhABH6, hABH8遺伝子をクローニングすることに成功した(6)。それらのhABHファミリー分子の細胞内局在性解析により、hABH2は核内に、hABH5とhABH8は細胞質に、

その他のhABHファミリー分子は核と細胞質に局在することも明らかとした。また正常ヒト臓器におけるmRNA発現解析を行った結果、調べた16種の臓器ほぼすべてにABH mRNAの発現が検出された。これらの結果は、hABHファミリー分子が機能分担や多様性を持ち、細胞の損傷修復にあっていることを示唆した。

5. がん分子標的としてのhABHファミリー分子の解析

PCA-1は前立腺癌病理組織の90%で高発現を示し(図3A)、良性腫瘍である前立腺肥大では陽性例は認められなかった(図3B)。またhABH8は乳癌

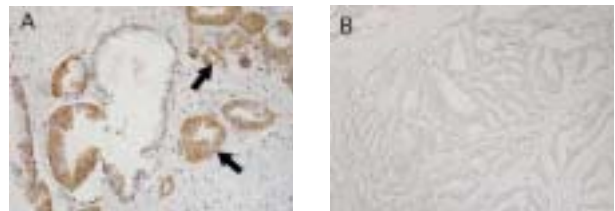


図3 前立腺癌におけるPCA-1の免疫組織化学染色。A: 前立腺癌病理組織, B: 前立腺肥大病理組織。PCA-1は前立腺癌のみで陽性を示す(矢印)

で90%、膀胱癌や前立腺癌で約50%という高い陽性率を示した。PCA-1やhABH8の高発現により、細胞内で酵素反応副産物のホルムアルデヒドが大量に産生されることや、脱メチル化による遺伝子発現制御異常の誘導が考えられる。それらが一因となり細胞のがん化につながると推測でき、現在分子レベルでの詳細な解析を進めている。一方siRNAを用いて前立腺癌細胞株DU145のPCA-1(図4)やhABH8のノックダウンを行った結果、顕著な細胞

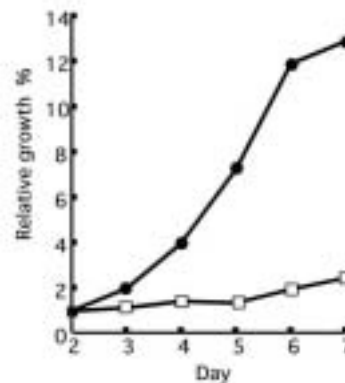


図4 PCA-1 siRNAによる前立腺癌細胞株DU145の増殖抑制。□: コントロールsiRNA, ●: PCA-1 siRNA

増殖抑制とアポトーシスの誘導を認めた。よって、PCA-1やhABH8分子標的とする化合物の探索が、前立腺癌や乳癌の治療創薬につながることも期待できる。

6. おわりに

PCA-1ノックアウトマウスが作製されたが、現在その表現型異常は見つかっていない(7)。このマウスではPCA-1の欠損を、他のhABHファミリー分子が代償していることも考えられる。この結果とPCA-1のノックダウンにより前立腺癌細胞の増殖が顕著に抑制されたという我々の知見から、PCA-1を分子標的とする化合物が、副作用の少ない前立腺癌治療薬のリード化合物となることが期待できる。一方、他のhABHファミリー分子の発現低下や機能の異常は、メチル化や酸化損傷を受けたDNAやRNAの蓄積をもたらす可能性もある。DNA損傷は遺伝子変異を誘導し、がん化へとつながる。また損傷RNAは変異蛋白質へと翻訳される結果、凝集や立体構造の異常を誘導する可能性がある。このような異常蛋白質の蓄積は、アルツハイマー病や神経疾患の原因となり得る。よってhABHファミリー分子の機能解析研究の展開は、DNAやRNAの損傷修復機構の解明と、がんや脳神経疾患の診断・治療への応用につながり、今後の研究進展が期待される。

謝 辞

本成果は、奈良県立医科大学病理病態学講座、小西登先生との共同研究と、大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野の特任研究員や大学院生の研究によるものであり、心より感謝します。また本研究は、文部科学省がん特定領域研究、JSTシーズ顕在化ステージ、日本化学工業協会LRI研究の助成金により進められています。

参考文献

1. Konishi N, M. Nakamura, E. Ishida, K. Shimada, E. Mitsui, R. Yoshikawa, H. Yamamoto, and K. Tsujikawa. 2005. High expression of a new marker PCA-1 in human prostate carcinoma. *Clin Cancer Res* 11:5090-7.
2. Trewick, S. C., T. F. Henshaw, R. P. Hausinger, T. Lindahl, and B. Sedgwick. 2002. Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature* 419:174-8.
3. Aas, P. A., M. Otterlei, P. O. Falnes, C. B. Vagbo, F. Skorpen, M. Akbari, O. Sundheim, M. Bjoras, G. Slupphaug, E. Seeberg, and H. E. Krokan. 2003. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature* 421:859-63.
4. Ougland, R., C. M. Zhang, A. Liiv, R. F. Johansen, E. Seeberg, Y. M. Hou, J. Remme, and P. O. Falnes. 2004. AlkB restores the biological function of mRNA and tRNA inactivated by chemical methylation. *Mol Cell* 16:107-16.
5. Kurowski, M. A., A. S. Bhagwat, G. Papaj, and J. M. Bujnicki. 2003. Phylogenomic identification of five new human homologs of the DNA repair enzyme AlkB. *BMC Genomics* 4:48.
6. Tsujikawa, K., K. Koike, K. Kitae, A. Shinkawa, H. Arima, T. Suzuki, M. Tsuchiya, Y. Makino, T. Furukawa, N. Konishi and H. Yamamoto. Expression and subcellular localization of human ABH family molecules. submitted.
7. Ringvoll, J., L. M. Nordstrand, C. B. Vagbo, V. Talstad, K. Reite, P. A. Aas, K. H. Lauritzen, N. B. Liabakk, A. Bjork, R. W. Doughty, P. O. Falnes, H. E. Krokan, and A. Klungland. 2006. Repair deficient mice reveal mABH2 as the primary oxidative demethylase for repairing 1meA and 3meC lesions in DNA. *EMBO J* 25:2189-98.