

# 複製と共役/非共役した DNA 鎖間架橋修復機構の解析

Analysis of replication-coupled/uncoupled  
DNA interstrand crosslink repair

2023年3月 修了

埼玉大学 大学院理工学研究科 理工学専攻  
生命科学コース 博士後期課程 (指導教員 田中秀逸)

塚田耕太郎

# 目次

要旨-----	p.1
序論-----	p.3
材料と方法-----	p.10
第一章 <i>mus-44</i> 欠損株における光回復能の解析-----	p.18
第二章 <i>mus-38</i> 及び <i>mus-44</i> の機能分離変異株の樹立-----	p.23
第三章 紫外線感受性株における DNA 鎖間架橋修復機構と光回復能の関連性-----	p.30
第四章 異なる核分裂周期における DNA 鎖間架橋修復機構の解析-----	p.37
結論-----	p.42
謝辞-----	p.43
参考文献-----	p.44

## 要旨

本研究はアカパンカビ (*Neurospora crassa*) をモデル生物として用いることで、生物が保持する DNA 修復機構の解明を目的として行われた。DNA の損傷は、多種多様な変異原によって絶えず生じており、細胞や個体の生存のためにはそれらを迅速かつ正確に修復する必要がある。太陽光に含まれる紫外線も、DNA に損傷を引き起こす代表的な変異原である。これらの損傷の修復機構の一つである光回復は、紫外線によって引き起こされたシクロブタン型ピリミジンダイマー (Cyclobutane pyrimidine dimer, CPD) や 6-4 光産物 (6-4 photoproduct, 6-4PP) といったピリミジン二量体を、光回復酵素が青色光の光エネルギーを介して直接的に修復するメカニズムである。アカパンカビにおいて、一部の紫外線感受性株が光回復の部分的な欠損 (Partial photoreactivation defect, PPD) を示すことが報告されているが、その原因は半世紀に渡り不明であった。そのため、私はまずその原因解明に着手した。

アカパンカビにおける *mus-38* 及び *mus-44* 遺伝子は、それぞれヒトにおける XPF 及び ERCC1 遺伝子のホモログとして同定された。これらの遺伝子は、ヌクレオチド除去修復 (Nucleotide excision repair, NER) 関連遺伝子であり、変異によって紫外線に感受性を示すだけでなく、PPD 表現型を示すことが知られている。まず、PPD 表現型を示す *mus-44* 遺伝子ノックアウト (Knockout, KO) 株 ( $\Delta mus-44$  株) において、光回復酵素の過剰発現や、異種生物由来の光回復酵素の強制発現を行ったが、PPD 表現型は相補されなかった。これらの結果から、PPD 表現型の原因が、修復されずに残存したピリミジンダイマーによるものではない可能性が示唆された。

$\Delta mus-44$  株の変異原感受性を網羅的に解析したところ、紫外線や 4-Nitroquinoline 1-Oxide (4NQO) に加え、Cisplatin などの DNA 鎖間架橋 (Interstrand crosslink, ICL) 剤に高感受性を示すことが明らかとなった。さらに、 $\Delta mus-44$  株及び  $\Delta mus-38$  株の ICL 剤感受性が、他の NER 関連遺伝子である *mus-40* や *mus-43* の KO 株よりも顕著に高いことが明らかとなり、MUS-38/MUS-44 の NER 非依存的な ICL 修復機構への関与が示唆された。そのため、XPF と ERCC1 の先行研究をもとに、*mus-38* 及び *mus-44* の NER と ICL 修復における機能分離変異株の樹立を試みた。その結果、両遺伝子において NER のみに欠損を示す変異株の樹立に成功した。これら変異株の光回復能を解析したところ、KO 株に比べて大きく上昇した。

紫外線損傷特異的除去修復酵素 (Ultraviolet-damage endonuclease, UVDE) をコードする *mus-18* 遺伝子の KO 株は、紫外線に感受性を示したが、光回復及び Cisplatin 感受性は野生株と同程度であった。*mus-18* と NER 関連遺伝子の二重 KO 株は紫外線に極めて高い感受性を示すことが明らかとなっているため、これらの二重 KO 株を樹立し、低線量の紫外線照射後の光回復能を解析したところ、 $\Delta mus-18 \Delta mus-38$  株及び、 $\Delta mus-18 \Delta mus-44$  株の光回復能は  $\Delta mus-18 \Delta mus-43$  株と同程度であり、 $\Delta mus-38$  及び  $\Delta mus-44$  単独 KO 株で見られる光回復能の顕著な低下は確認されなかった。このことから、PPD 表現型が、高線量の紫外線照射による DNA 損傷に起因している可能性が示唆された。T4 endonuclease V による CPD 修復能の解析を行ったところ、PPD 表現型を示す株の光回復処理後の CPD の修復能は、野生株と同程度であった。また、紫外線によって生じた ICL の検出を行ったところ、 $\Delta mus-38$  株では ICL の修復能に欠損が見られた。これらのことから、PPD 表現型の原因は紫外線によって生じた ICL の修復不全によるものであり、これにより光回復能の見かけ上の低下が生じていることが明らかとなった。

PPD 表現型の解析の過程で、MUS-38 と MUS-44 が NER とは異なる経路で複製と共役した ICL 修復機構に関与することが示唆された。その検証のため、ピコリン酸を用いてアカパンカビの核分裂周期を同調させる実験系を確立し、G1 期及び S 期のそれぞれの周期における特異的な薬剤感受性の測定法を構築した。これを用いて、ICL 損傷剤である 1,2,7,8-Diepoxyoctane (DEO) に対す

る感受性を解析したところ、*Δmus-43* 株では G1 期においてより高い感受性を示した一方で、*Δmus-38* 株では逆に S 期でより高い感受性を示した。この結果から、MUS-38 が実際に NER 非依存的に複製共役型 ICL 修復に関与していることが示された。

*XPF* を含めたファンコニ貧血 (Fanconi anaemia, FA) の原因遺伝子は、FA 経路とよばれる複製と共役した ICL 修復経路に関わることが明らかとなっている。そのため、本研究によりアカパンカビが高等真核生物と類似した ICL 修復機構を保持する可能性が示唆された。これらの結果を踏まえ、今後はアカパンカビをモデル生物として用いることで、ファンコニ貧血症などの難治性遺伝性疾患の解明やその治療法の改善に寄与できると期待される。

# 序論

## DNA 損傷とその修復機構

生命の遺伝情報を司る DNA は、環境中及び内因性の変異原により絶えず損傷を受け続けている。これらの損傷が正常に修復できない場合、ゲノムの不安定化、ひいては細胞や個体の死へとつながるため、生物は様々な損傷 DNA を効率的に修復する機構を多岐に渡って獲得している (Jackson and Bartek, 2009)。DNA 修復に関与する遺伝子に変異が生じると、DNA に損傷が生じた際に修復が行えなくなるため、特定の変異原に感受性を示すようになる。この性質を利用して、原核生物では大腸菌 (*Escherichia coli*)、真核生物では出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) や、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) を中心に、これまで多数の DNA 修復関連遺伝子が単離・解析されてきた。さらに、種々の変異原に対する感受性の比較やエピスタシス解析によって、複数の異なる修復経路の存在が明らかとなった。化学変異原や紫外線などによって引き起こされる塩基の修飾・損傷は、主に塩基除去修復 (Base excision repair, BER) や、ヌクレオチド除去修復 (Nucleotide excision repair, NER) といった除去修復系によって修復される。一方、これらの修復が完了する前に細胞が S 期に入った場合、損傷乗り越え DNA 合成 (Translesion synthesis, TLS) や、テンプレートスイッチといった複製後修復機構 (Post replication repair, PRR) が働くことで、一時的に損傷を残したまま複製を進めることができる。また、放射線や活性酸素種などによって生じた DNA 二本鎖切断 (Double strand break, DSB) は、相同組換え (Homologous recombination, HR) や、非相同末端結合 (Non-homologous end-joining, NHEJ) によって修復される。当研究室などの研究によって、アカパンカビ (*Neurospora crassa*) でもこれらの修復経路の解析が行われ、アカパンカビにおいても酵母やヒトなどの真核生物間で共通した機構が存在することが確認されている (Hatakeyama, 1998; Sakuraba, 2001; Sakai, 2004; Suzuki, 2005; Kawabata, 2007)。

## アカパンカビについて

歴史上において糸状菌類であるアカパンカビの最初の記述は 1843 年であり、「フランスのパン屋に生えるオレンジ色のカビ」として報告されている (Payen, 1843)。その後、Beadle と Tatum をはじめとした多くの研究者から、遺伝学研究の材料として 20 世紀初頭から広く用いられるようになった。菌糸中の隔壁を通してつながった細胞質内に複数の異なる遺伝子型の核を有することができる一倍体多核生物であり、同じ子囊菌門に属する出芽酵母や分裂酵母とは形態学的に全く異なる。ゲノムプロジェクトにより公開された予想ゲノムサイズ及び遺伝子数は、39 Mbp 及び 9826 個であり、出芽酵母 (12 Mbp, 6604 個) 及び分裂酵母 (12 Mbp, 4824 個) よりも圧倒的に多いことが明らかとなっている (Galagan et al., 2003)。これらのことから、酵母に比べてアカパンカビは系統的に上位であることが考えられる。当研究室で報告した NHEJ 欠損による遺伝子ターゲティングの高効率化の発見により (Ninomiya et al., 2004)、2023 年現在では糸状菌類で唯一ノックアウト (Knockout, KO) ライブラリーが整備されている。また、DNA メチル化による遺伝子サイレンシングや (Tamaru and Selker, 2001)、概日周期リズムに関する研究が (Liu and Bell-Pedersen, 2006)、他の生物に先行して進展している。

## 紫外線による DNA 損傷

太陽光に含まれる紫外線は DNA に損傷を引き起こす物理的変異原であり、一般的には、波長の長さによって UVC (100-280 nm)、UVB (280-315 nm)、UVA (315-400 nm) に分類される (Friedberg et al., 2006)。UVC はオゾン層で大気中に吸収されるため、UVB と UVA が地表に到

達する。細胞への UVB と UVA の照射は、フリーラジカルや活性酸素種を生じさせ、DNA の酸化損傷や鎖切断などを間接的に引き起こすことが知られているが (Rastogi et al., 2010), 最も直接的で影響の大きな損傷は、UVB によるシクロブタン型ピリミジンダイマー (Cyclobutane pyrimidine dimer, CPD) と、6-4 光産物 (6-4 photoproduct, 6-4PP) といったピリミジン二量体である (Sinha and Häder, 2002)。また、6-4PP の一部は、長波長の UVA によってデュワー型の異性体に変換される (Bucher et al., 2015)。これらのピリミジン二量体は、DNA 二重らせんに歪みを生じさせ、転写や複製といった DNA の本質的な機能を阻害する原因となる。多くの生物において、ピリミジン二量体のような損傷に対しては、主に NER がその修復を担っている。

## NER について

NER は、原核生物から高等真核生物まで遺伝子のホモログやメカニズムが高度に保存された修復系である。生命の誕生から現在に至るまで、多くの生物が太陽光による紫外線に曝露され続けてきたことを考えると、NER は極めて重要な修復系であるといえる (Friedberg et al., 2006)。NER は、紫外線によって生じるピリミジン二量体や、4-Nitroquinoline 1-Oxide (4NQO) によって生じるかさ高い塩基付加物等の、DNA 二重らせんに歪みを生じさせるような損傷を対象とした DNA 修復経路である。NER の修復過程は、損傷の認識、損傷 DNA 鎖の切断と除去、切除した損傷 DNA 部分の再合成といった一連のステップによって行われ、これらの過程には、真核生物においては 30 種類以上のタンパク質が協調して関与する (Friedberg et al., 2006)。

ヒトや出芽酵母による遺伝学的・生化学的な解析により、NER の詳細な分子メカニズムが明らかになっている。上流の損傷認識過程においては、CSA や CSB が関与する転写と共役した経路 (Transcription coupled NER, TCR) と、XPC や HR23B が関与する非転写鎖及びゲノム全体を修復する経路 (Global genome NER, GGR) の二つの経路が存在する。損傷が認識された後、RPA と XPA に続いて基本転写因子である TF II H が損傷部位に結合し、TF II H のヘリカーゼ活性によって損傷部位近傍の DNA が巻き戻される。その後、損傷部位 5'側を XPF-ERCC1 ヘテロ二量体が、3'側を XPG が、その構造特異的エンドヌクレアーゼ活性によって切断する。切除した部分を DNA ポリメラーゼが再合成し、最後に DNA リガーゼが新生鎖との間のニックを閉じる (Wood, 1997; Prakash and Prakash, 2000)。

アカパンカビにおいても、これまでに複数の NER 関連遺伝子が報告されている。最初に Ishii らによって *mus-38* 変異株が単離され (Ishii et al., 1998), Hatakeyama らによって *mus-38* 遺伝子がヒト *XPF*, 出芽酵母 *RAD1* のホモログであることが明らかとされた (Hatakeyama et al., 1998)。続いて、*XPG* 及び *RAD2* ホモログ *mus-40* が単離された (Hatakeyama, 1998)。これらの遺伝子変異株は、紫外線及び 4NQO に感受性を示すことや、先に報告のあった紫外線損傷特異的除去修復酵素 (Ultraviolet-damage endonuclease, UVDE) をコードする *mus-18* とは別の経路で働くことなどから、アカパンカビにおいても NER 経路が存在することが明らかとなった。アカパンカビのゲノムデータが公開された後には、その他多くの NER 関連遺伝子が存在することが明らかとなり (Galagan et al., 2003), Sato らによって、*XPA* 及び *RAD14* ホモログ *mus-43*, *ERCC1* 及び *RAD10* ホモログ *mus-44* 遺伝子などが解析された (Sato, 2008; Sato et al., 2008)。これらの研究成果によって、アカパンカビにおける NER の全貌が明らかとなった。

## 光回復について

紫外線によって生じるピリミジン二量体は、NER などによって除去修復されるほかに、多くの生物では光回復 (Photoreactivation) と呼ばれる修復系によって修復される。光回復は他の修復系

とは異なり、光回復酵素 (Photolyase) による高速な単一酵素反応によって修復が完了する (Sancar, 2000)。その際、光回復酵素が近紫外から青色光付近の波長の光エネルギーによって活性化され、ピリミジン二量体を直接的に開裂して修復する。具体的には以下の通りに反応が進む。まず、光回復酵素が DNA 二重らせんの歪みを認識し、ピリミジン二量体に基質特異的に結合する。この結合により、歪んだ DNA 二重らせんがさらに不安定になり、ピリミジン二量体が光回復酵素の活性中心に入り込み、この酵素基質複合体が安定化される。光回復酵素とピリミジン二量体との結合は光非依存的である一方、二量体開裂の際の触媒反応には、光回復酵素の補酵素である発色団 (Chromophore) による光子の吸収が必要となる。300 から 500 nm 付近の光子が、最初の発色団である 5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (5-MTHF) か、一部の生物種では 8-ヒドロキシ-7,8-ジデメチル-5-デアザリボフラビン (8-HDF) に吸収され、励起される。続いてこの励起エネルギーが、別の発色団であるフラビンアデニンジヌクレオチド (FADH<sup>-</sup>) に転移し、励起された FADH<sup>-</sup> の電子がピリミジン二量体に転移する。これにより、ピリミジン二量体が開裂し、フラビンラジカル (FADH<sup>•</sup>) が形成される。最終的に、転移した電子が FADH<sup>-</sup> に戻され基底状態となり、酵素反応サイクルが完了する (Friedberg et al., 2006)。

光回復酵素は、その基質特異性により、CPD 光回復酵素と 6-4PP 光回復酵素に大別される。さらに、CPD 光回復酵素は、アミノ酸配列の相同性から Class I と Class II に分類されている (Yasui et al., 1994)。Class I 光回復酵素は、真正細菌や真菌類といった下等生物のみで確認されている一方、Class II 光回復酵素は、真正細菌、古細菌、高等真核生物などの様々な生物で単離されている。原核生物や植物、菌類などすべての生物界で光回復酵素の存在が確認されているが、ヒトを含む胎盤性哺乳類では存在しないことが報告されている (Li et al., 1993)。これらの高等動物などでは、光回復活性は失っているが、6-4PP 光回復酵素のホモログとしてクリプトクロムが存在し、青色光受容体として機能することで概日リズムなどを制御している (Thompson and Sancar, 2002)。また、興味深いことにアカパンカビや出芽酵母などの多くの菌類には光回復酵素が存在する一方で、分裂酵母には存在が確認されていない。アカパンカビにおいては、*phr* 遺伝子がコードする CPD 光回復酵素のみが存在し、6-4PP 光回復酵素は存在しないことが報告された (Shimura et al., 1999)。

### アカパンカビにおける光回復の部分的な欠損について

光回復は光回復酵素が単独で行う反応である。しかしながら、アカパンカビの一部の紫外線感受性株が、正常な光回復酵素を保持しているにも関わらず、光回復の部分的な欠損を示すことがこれまでに報告されてきた (Tuveson and Mangan, 1970)。このような現象は他種生物では報告がなく、アカパンカビに特有の表現型であるとされている。この表現型は Partial photoreactivation defect (PPD) と呼ばれており、その原因については半世紀もの間未解明のままであった。

現在までに、*upr-1*, *uvs-3*, *mus-26*, *mus-38*, *mus-42* 及び *mus-44* 遺伝子の変異株が、PPD 表現型を示す株として報告されている。1967 年に初めてアカパンカビの紫外線感受性株が Chang らによって報告された (Chang and Tuveson, 1967)。その数年後の 1970 年に、Tuveson らによって光回復に異常を示す変異株として *upr-1* (*ultraviolet photoreactivation-1*) が取得された。当初はこの遺伝子産物がアカパンカビにおける光回復酵素であるとされた (Tuveson and Mangan, 1970)。しかし、同年に、Schroeder によって紫外線に感受性を示す *uvs-3* 変異株においても、*upr-1* 変異株と同様に光回復に異常を示すことが報告された (Schroeder, 1970)。さらに、1972 年に Tuveson によって、*upr-1* と *uvs-3* の二重変異株が紫外線に相加的な感受性を示す一方で、これら変異株の細胞粗抽出物による *in vitro* での光回復活性は野生株と同程度であるこ

とが報告された (Tuveson, 1972)。その後 1989 年に Ishii らによって, *upr-1* 変異株と光回復能及び変異原感受性がエピスタティックな関係を示す *mus-26* 変異株が単離された (Ishii and Inoue, 1989)。1991 年に Yajima らによって, 光回復酵素をコードする *phr* 遺伝子がクローニングされたが, 驚くべきことに, *phr* はそれまでに報告のあった光回復に異常を示す株の原因遺伝子とは異なる遺伝子であった (Yajima et al., 1991)。このことから, 他の修復系が光回復に間接的に関与している可能性に興味を持たれ, Ishii らは光回復に異常がある株のスクリーニングを試み, 1998 年に *mus-38* 変異株を報告した (Ishii et al., 1998)。さらに, Hatakeyama らによって *mus-38* 変異株の原因遺伝子が, NER 関連遺伝子であるヒト *XPF*, 出芽酵母 *RAD1* のホモログであることが明かされた (Hatakeyama et al., 1998)。1999 年に Shimura らによって *phr* 変異株が作製され, PHR が CPD の修復のみに機能し, 他の修復系などに影響を及ぼさないことが示された (Shimura et al., 1999)。2002 年に, Sakai らによって *upr-1* が TLS に関与する Pol $\zeta$  の触媒サブユニット *REV3* のホモログであることが示され (Sakai et al., 2002), 2003 年には同じく Sakai らが, *mus-26* が Pol $\zeta$  の調節サブユニット *REV7* のホモログであることを示した (Sakai et al., 2003)。同論文で, TLS に関与する *REV1* のホモログの探索も行われており, 新たに *mus-42* 遺伝子が発見され, *mus-42* 変異株も PPD 表現型を示すことが明かされた (Sakai et al., 2003)。2008 年には Ichiishi らの研究グループが, 公開されたアカパンカビのゲノムデータベースをもとに NER 関連遺伝子の解析を行い, ヒト *XPF* (出芽酵母 *RAD1*) とヘテロ二量体を形成して 3' flap 構造特異的エンドヌクレアーゼとして機能する *ERCC1* (出芽酵母 *RAD10*) ホモログである *mus-44* 遺伝子を単離し, *mus-38* 変異株と同様の変異原感受性及び PPD 表現型を示すことを報告した (Sato et al., 2008)。同年に, Kazama らにより *Uvs-3* が ATRIP のホモログであり, ATR のホモログである *mus-9* と同じエピスタシスグループで DNA 損傷チェックポイントに関与することが報告されたが, この論文では光回復や PPD 表現型に関して言及はされなかった (Kazama et al., 2008)。これ以降, アカパンカビの光回復や PPD 表現型に関する報告はない。

PPD 表現型の原因について Ishii らは, *mus-38* 変異株の単離を報告した論文において 6-4PP 光回復酵素が他の修復系と協調して機能している可能性を提案したが (Ishii et al., 1998), Shimura らによって, アカパンカビには 6-4PP 光回復酵素は存在しないことが示された (Shimura et al., 1999)。Shimura らはこの論文において, PPD 表現型の原因が, 他の修復系の変異によって引き起こされるクロマチン構造または DNA 結合タンパク質の二次変化によって, 光回復酵素がピリミジン二量体にアクセスできない可能性があると考えた。Sakai らは, TLS 関連遺伝子の変異株が PPD 表現型を示す理由として, TLS ポリメラーゼの欠損により 6-4PP に対するバイパス複製ができなくなるためであると結論付けた (Sakai et al., 2002, 2003)。一方, Sato は博士論文において *mus-38* 及び *mus-44* 変異株が示す PPD 表現型について, NER 酵素複合体と光回復酵素が損傷部位で競合するモデルを提唱した (Sato, 2008)。NER における除去過程では損傷部位の 5'側の切断が 3'側の切断の後に起こることに触れ, 5'側の切断活性を担う *MUS-38* と *MUS-44* が欠損すると 3'側に切断を入れた NER 複合体が基質と結合したままとなり, 光回復酵素と置き換われなくなってしまふと予想した。これらのように, PPD の原因については様々な考察がされてきたが, PPD 表現型を示す株の光回復による CPD 除去能は野生株と同程度であることや, ピリミジン二量体の大部分の修復を担っている *mus-18* 遺伝子の変異株の光回復能は正常であることなど, いくつかの点でこれらのモデルでは説明ができず, 原因の解明には至っていなかった (Ishii et al., 1991; Hatakeyama et al., 1998; Sato et al., 2008)。

## 構造特異的エンドヌクレアーゼ XPF-ERCC1 の分子機構

XPF-ERCC1 ヘテロ二量体は古くから知られている構造特異的エンドヌクレアーゼであり、NER、DNA 鎖間架橋 (Interstrand crosslink, ICL) 修復、HR の一種である Single-strand annealing (SSA) など、様々な修復経路に関与する。多様な修復経路に関わることと同様に、XPF や ERCC1 の変異が色素性乾皮症 (Xeroderma pigmentosum, XP)、ファンconi 貧血 (Fanconi anaemia, FA)、コケイン症候群 (Cockayne syndrome, CS) など、複数のヒトの疾患の原因となることが知られている (Schärer, 2017)。

XPF は、もともと NER において 5'側の切断を担うヌクレアーゼとして報告された。現在では、NER における XPF-ERCC1 の機能の詳細が明らかになっている。ERCC1 の Central domain と XPA の相互作用を介して、XPF-ERCC1 複合体が NER 基質の切断を行うことが示された (Orelli et al., 2010)。ERCC1 と XPA の相互作用が欠損した変異株は、NER 活性は低下するが ICL 修復活性は低下しないことから、この相互作用は NER 経路に特異的である。また、正確な切断反応は一本鎖 DNA 結合タンパク質である RPA により調節される (de Laat et al., 1998)。

一方で、XPF-ERCC1 が ICL 修復においてどのように機能するかは不明な点が多いが、足場分子として機能する SLX4 と XPF との相互作用が ICL 修復に必須であることが知られている。SLX4 は、少なくとも三つの構造特異的エンドヌクレアーゼ (XPF-ERCC1, MUS81-EME1 及び SLX1) と相互作用する。また、SLX4 における二つの XPF 相互作用ドメイン (MLR と BTB ドメイン) が ICL 修復に必須であることが示された (Guervilly et al., 2015)。さらに、FA 患者由来の XPF の変異部位が SLX4 との相互作用に関連していることが示され、相互作用部位の XPF 変異は、ICL の切断活性を欠損するが NER 活性には影響がないことが報告された (Bogliolo et al., 2013)。

## ICL 修復について

ICL とは DNA 二重鎖間に共有結合性の架橋が生じるような DNA 損傷である。これによって主に複製が阻害されることで、細胞にとって DSB に次ぐ重篤な損傷となる。実際、細菌や酵母では 1 個、哺乳類細胞では 40 個の ICL がゲノム中で修復されずに残るだけで致死となることが報告されている (Dronkert and Kanaar, 2001)。この性質が利用され、Cisplatin や Mitomycin C (MMC) などの ICL 剤が抗がん剤に利用されている。一方、内在的には代謝副産物である活性型アルデヒドが主に ICL を形成する要因となっている (Voulgaridou et al., 2011)。

NER とは対照的に、ICL 修復は損傷の認識から修復の完了まで、NER を含む複数の修復経路が関与する複雑な修復機構であり、そのメカニズムは生物種間で大きく異なる。大腸菌の場合、ICL 修復は主に NER と HR により協調的に行われる。出芽酵母では、NER、TLS、HR の 3 つの異なる経路が ICL 修復に独立して関与し、これら 3 経路が欠損することで ICL の修復が全く行えなくなる (Grossmann et

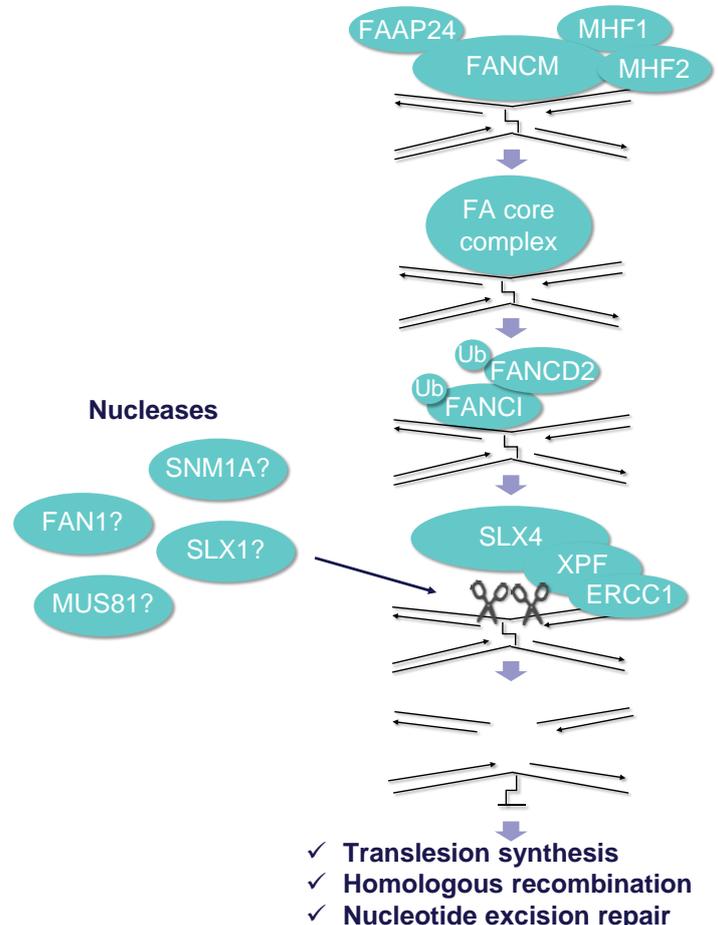


図 I-1. FA 経路の概要

al., 2001)。

高等真核生物の ICL 修復機構は下等生物に比べてさらに複雑である。ヒトにおける ICL 修復機構の研究は、FA 患者の原因遺伝子がすべて ICL 修復の同一の経路 (FA 経路) で機能しているという点に基づいて進められている。FA は骨髄不全、発達異常、悪性腫瘍の高発生率などを特徴とした常染色体劣性遺伝性疾患であり、現在までに *FANCA*, *-B*, *-C*, *-D1*, *-D2*, *-E*, *-F*, *-G*, *-I*, *-J*, *-L*, *-M*, *-N*, *-O*, *-P*, *-Q*, *-R*, *-S*, *-T*, *-U*, *-V* 及び *-W* の 22 の原因遺伝子が同定されている (Knies et al., 2017)。FA 経路の特徴としては、複製フォークが ICL に衝突した際に起こる複製と共役した修復経路であり、出芽酵母など下等生物には存在しないとされている (Seol et al., 2018)。図 I-1 に FA 経路の概略を示す。まず、FANCM-FAAP24-MHF 複合体により損傷が認識されることにより、多数の因子が FA コア複合体 (*FANCA*, *-B*, *-C*, *-E*, *-F*, *-G*, *-L*, *-M*, FAAP20 及び FAAP100 から構成される) として損傷部位に集積する。その後、FA コア複合体によって FANCD2-FANCI がモノユビキチン化され、さらにその下流で SLX4 (*FANCP*) がリクルートされる。SLX4 によって調節される ICL の切除は、FA 経路では XPF (*FANCO*)-ERCC1 が主な役割を担うが、他にも FAN1, SNM1A, MUS81 及び SLX1 など様々なヌクレアーゼが補助的に関与することが考えられている。ヌクレアーゼによる損傷部位の両側切断 (これにより DSB が生じる) の後に続いて TLS による損傷部位のバイパス複製、HR による DSB 修復、そして NER により切り出した ICL が除去され、修復が完了する (Mouw and D'Andrea, 2014)。FA 経路に加えて、近年グリコシラーゼである NEIL3 が、FA 経路による DSB 生成を避けるための、代替となる複製共役型 ICL 修復経路に関与することが明らかとなり (Semlow et al., 2016)、さらに FA 経路と NEIL3 経路の経路選択に、TRAIP が調節因子として機能することが示された (Wu et al., 2019)。

### **アカパンカビの核分裂周期について**

糸状菌類であるアカパンカビは、菌糸中でつながった細胞質で複数の異なる核を共有する多核体生物である。このことから、他の生物で確立されているような、細胞周期を同調させた上でそれぞれの周期の段階の細胞を解析することは困難であるとされていた。気中菌糸から生じるマクロコニディアも、そこに含まれる核数はランダムであり、単核であるとは限らない。また、コニディアの発芽から菌糸の生長の過程は、一般的な細胞分裂とは異なる。糸状菌の場合、菌糸の先端伸長により増殖し、核やミトコンドリアといったオルガネラはその中を流動的に移動する (Harris, 2001)。また、生育に伴ったそれぞれの核の分裂は非同調的である。この非同調的な核分裂は、休眠期のコニディアが発芽する時点から見られる (Serna and Stadler, 1978)。Serna らはこの非同調した核分裂について二つの仮説を考案した。一つは、コニディアに含まれるそれぞれの核は、核分裂周期の特定の段階で停滞しているが、周期の再開がそれぞれの核で異なりラグが生じるモデル。二つ目は、全てのコニディアの核分裂周期が生育の再開に伴って同時に再開したとしても、停滞している段階がそれぞれ異なるため同調しないというモデルである。Serna らはこの仮説を検証するために、核分裂周期が特定の段階で阻害される温度感受性株を用いて解析を行った (Serna and Stadler, 1978)。その結果後者の仮説が支持され、休眠期に入ったコニディアの核はそれぞれ異なる段階で停滞していることが明らかとなった。

ピコリン酸は、 $\text{NAD}^+$  の生合成前駆体となるニコチン酸と類似した構造を持つ金属キレート剤として知られている。ラット腎臓細胞を用いた解析によって、ピコリン酸が細胞分裂を G1 期において可逆的に阻害することが明らかとなった (Fernandez-Pol et al., 1977)。アカパンカビでも同様に、ピコリン酸処理により培養中の菌糸やコニディアの核は G1 期で停滞する。さらに、ピコリン酸処理からの回復培養によって、核分裂周期を同調させることが可能である (Martegani et al.,

1980)。この手法を用いて、同調させた菌糸の核の倍加時間を測定したところ、最少培地においては約 100 分 (G1 期 20 分, S 期 30 分, G2 期 40 分, M 期 10 分) であると推定された。なぜピコリン酸によって G1 期で停滞が起こるのか、そのメカニズムは明らかではないが、アカパンカビにおいてはピコリン酸により RNA のポリアデニル化が阻害されるため、S 期に進行するための特定の遺伝子産物の発現が減少するためであると考えられている (Martegani, 1981)。

## **本研究について**

本研究は当初 PPD 表現型の原因解明を目的として行われた。第一章では、PPD 表現型を示す *mus-44* 遺伝子 KO ( $\Delta mus-44$ ) 株において、光回復酵素の過剰発現や異種生物由来の光回復酵素の導入を行って光回復能を解析した。第二章では、MUS-44 が ICL 修復機構に関与することを見出したため、*mus-38* と *mus-44* の NER と ICL 修復における機能分離変異株の樹立を行い、機能解析を行った。第三章では、樹立したこれらの機能分離変異株の光回復能の解析を行った。さらに、紫外線感受性を示す  $\Delta mus-18$  株の ICL 剤感受性と光回復能を解析することで、ICL 修復と光回復の関係について考察した。また、紫外線によって生じる CPD や ICL の修復活性を直接検出する実験を行った。ここまでの結果により、アカパンカビの一部の紫外線感受性株が示す PPD 表現型の原因は紫外線によって生じた ICL の修復不全によるものであり、これにより光回復能の見かけ上の低下が生じていることが明らかとなった。

PPD 表現型の解析の過程で、アカパンカビにおける XPF と ERCC1 のホモログである MUS-38 と MUS-44 が、NER とは異なる経路で複製と共役した ICL 修復機構に関与することが示唆された。第四章では、これを解明するために、アカパンカビの核分裂周期を同調させた上で異なる周期における薬剤感受性測定法を確立した。この実験系を用いて解析を行ったところ、実際に MUS-38 が NER 非依存的に複製共役型 ICL 修復機構に関与することが示された。これらの結果から、アカパンカビには高等真核生物に特有であるとされていた FA 経路に類似した修復機構が保存されていることが示唆された。

本研究で得られた成果により、がんやファンconi貧血症などの難治性遺伝性疾患の解明に、アカパンカビが有用なモデル生物となることが期待される。

## 材料と方法

### 株, 培地, プライマー

本研究で使用したアカパンカビ株を表 MM-1 に示す。野生株は C1-T10-37A と C1-T10-28a, またはそれらの子孫株として作製した TSKD055 を用いた (Tamaru and Inoue, 1989)。KO 株は Fungal Genetics Stock Centre (Kansas City, MO) から入手するか, 本研究で作製したものをを用いた。プラスミドの増幅には大腸菌 DH5 $\alpha$  を用いた。通常のアカパンカビの培養には Vogel's 最少培地 (1  $\times$  Vogel, 1.2% sucrose, 1.2% agar) を用いた (Vogel, 1956)。交雑には Westergaard's 交雑培地を用いた (Westergaard and Mitchell, 1947)。変異原感受性試験など, アカパンカビのコロニー状の生育を必要とする実験にはコロニー形成培地 (1  $\times$  Vogel, 1% sorbose, 0.05% glucose, 0.05% fructose, 1.2% agar) を用いた。コニディアの回収用にはグリセロール完全培地 (1  $\times$  Vogel, 0.25% yeast extract, 0.1% casamino acid, 0.5% malt extract, 1% vitamin stock, 1% glycerol, 1.2% agar) を用いた。本研究で使用したプライマーは表 MM-2 に示した。

### アカパンカビのゲノム DNA 抽出

スクリュージュチューブにクオーツサンド約 200  $\mu$ l, Isolation buffer [5 mM Tris-HCl (pH 8.0), 170 mM EDTA (pH 8.0), 1% *N*-ラウロイルサルコシン] 500  $\mu$ l を入れ, そこにコニディアもしくは菌糸を入れた。Micro Smash<sup>TM</sup> MS-100 (TOMY) で破碎処理 (3,500 rpm, 3 min) を行い, 65°C で 10 分間の加熱処理を行った。遠心分離により泡を沈殿させ, 7.5 M 酢酸アンモニウムを 300  $\mu$ l 加えて転倒混和した後, 氷上で 10 分以上冷却した。遠心分離 (14,000 rpm, 5 min, 4°C) を行い, その上清 500  $\mu$ l を回収し, そこに等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを加えて転倒混和した。遠心分離 (14,000 rpm, 5 min, 4°C) を行い, 上層 300  $\mu$ l を回収し, そこに 2.5 倍量の 99.5% エタノールを加えて転倒混和し, -80°C で 10 分以上冷却した。遠心分離 (14,000 rpm, 10 min, 4°C) を行い, 上清を捨て, そこに 70% エタノールを 1,000  $\mu$ l 加えて転倒混和し, 遠心分離 (14,000 rpm, 2 min, 4°C) を行った。上清を捨ててチューブ内を乾燥させた後, 沈殿を TE (pH 8.0) に溶解させた。

### 交雑

pH を 6.5 に調整した交雑培地を試験管に分注し, 適当な長さに切ったろ紙を入れ, アルミキャップをしてオートクレーブにより滅菌した。滅菌済みの培地にそれぞれメイティングタイプの異なる株を植え, アルミキャップをパラフィルムで巻き, スポアが放出されるまで培養した。

### 子孫株の取得

試験管の壁面に付着したスポアを綿棒で回収し, 滅菌水に懸濁した。懸濁液を 16 ml のコロニー形成培地に加え, 60°C で 30 分間程度ヒートショック処理を行った。その際, 一緒に取れてきたコニディアや菌糸を熱により死滅させるため, 試験管の壁面に付着しないように注意し, 攪拌は行わずに穏やかにピペティングした。ヒートショック後に, 選抜用の薬剤 (ハイグロマイシン B とピアラフォスの場合は最終濃度 200  $\mu$ g/ml) を加えて攪拌し, 15 cm シャーレに広げて 30°C で 2 日間培養した。生育したシングルコロニーを竹串でピックアップし, 最少培地に植え替えて培養した。

## **アカパンカビの形質転換**

アカパンカビの形質転換は、以前の報告を一部改変して行った (Margolin et al., 1997; Ninomiya et al., 2004)。回収したコニディアを 1 M ソルビトールで 3 回洗浄した後、コニディア懸濁液 40  $\mu$ l と線状化したプラスミドの DNA 断片 (300 ng 以上) 5  $\mu$ l を混合し、氷上で 10 分間以上静置した。その後、混合液を氷上で冷却させたキュベットに移し、ECM<sup>®</sup> 630 Electroporation System (BTX Inc.) を用いて 1.5 kV, 200  $\Omega$ , 50  $\mu$ F の条件でエレクトロポレーションを行った。スポイトを用いて、1 ml の液体 Vogel's 最少培地で懸濁しながら全量を 1.5 ml チューブに回収し、30°C で 2 時間から 3 時間程度復帰培養した。その後選抜用の薬剤を加えたコロニー形成培地に懸濁液を加え、15 cm シャーレに広げて 30°C で 2 日から 3 日間程度培養し、生育したコロニーを竹串でピックアップし、最少培地に植え替えて培養した。PCR 法によりターゲティングの確認を行った後、コニディアをコロニー形成培地に撒いて、シングルコロニーアイソレーションを行い、ホモカリオン株を取得した。 $\Delta$ mus-52 株を形質転換に用いた場合は、得られたホモカリオン株を野生株と戻し交雑し、mus-52 の欠損を除いた。

## **紫外線感受性試験及び光回復試験**

紫外線感受性及び光回復試験は、以前の報告を一部改変して行った (Ishii et al., 1998)。7 日間培養したアカパンカビの培地内に滅菌水を加え、綿棒でコニディアを懸濁した後フィルターでろ過し、50 ml 遠沈管に移した。その後、ろ過した懸濁液を遠心分離 (3,500 rpm, 2 min) し、上清を捨てた。沈殿したコニディアをリン酸バッファー (0.067 M, pH 7.0) 5 ml に懸濁し、吸光度 (450 nm) によって濃度を測定して、 $1 \times 10^6$  個/ml の懸濁液をリン酸バッファーで調製した。火炎滅菌した攪拌子と調製した懸濁液 20 ml を 9 cm シャーレに入れ、殺菌用紫外線ランプ (TOSHIBA, GL10) を用いて、シャーレのふたを開けた状態でスターラーにより攪拌しながら一定時間照射した。照射後の懸濁液を 50 ml 遠沈管にすべて回収し、100  $\mu$ l を 10 ml のリン酸バッファーに加えて希釈した後、100  $\mu$ l ( $1 \times 10^3$  個) を 16 ml のコロニー形成培地に加え、15 cm シャーレに広げた。光回復試験は、回収した懸濁液を入れた 50 ml 遠沈管を、人工気象器 (Nippon Medical & Chemical Instruments, LH-60FL12-DT) に入れて、一定時間可視光照射した後に、同様にしてシャーレに広げた。意図しない光回復を避けるために、紫外線照射から培養までは赤色灯下か暗条件下で行った。30°C で 2 日培養し、生育したコロニーを計数した。一つの条件あたり 2 枚のシャーレの平均をとり、コントロールに対する生存率を算出した。

## **スポットテスト**

コニディアを 1 ml の滅菌水に懸濁し、吸光度 (450 nm) により濃度を測定して、リン酸バッファーで  $1 \times 10^6$  個/ml の懸濁液を作製した後、そこからさらに 1/4 ずつ 6 段階の希釈系列を作製した。16 ml のコロニー形成培地に、各図に示した最終濃度の薬剤を加えて攪拌し、シャーレに広げて固めた後、培地上に調製したコニディア懸濁液を 10  $\mu$ l ずつスポットした。30°C のインキュベーターで 2 日間の培養後に結果を撮影した。

## **定量的な薬剤感受性試験**

4NQO 感受性試験は、急性処理によって行った。 $1 \times 10^6$  個/ml のコニディア懸濁液 (調製方法は紫外線感受性試験と同様) 5 ml を、シリコン栓をして乾熱滅菌した 20 ml 三角フラスコに入れ、そこに滅菌水で各濃度に希釈した 4NQO を 50  $\mu$ l 加えて、室温で 60 分間振盪した。その後、10 ml のリン酸バッファーに 100  $\mu$ l 加えて希釈することでコニディアを洗浄した後、そこから 100

μl ( $1 \times 10^3$  個) を 16 ml のコロニー形成培地に加え、15 cm シャーレに広げた。

Cisplatin 感受性試験は、急性処理と慢性処理の 2 通りの方法で行った。急性処理では、 $1.5 \times 10^6$  個/ml のコニディア懸濁液 3.5 ml と、3.33 mM の Cisplatin 1.5 ml (最終濃度 1,000 μM) を、滅菌した 20 ml 三角フラスコに加え、室温で振盪した。経時的に 100 μl を採取し、10 ml のリン酸バッファーに 100 μl 加えて希釈することでコニディアを洗浄した後、そこから 100 μl ( $1 \times 10^3$  個) を 16 ml のコロニー形成培地に加え、15 cm シャーレに広げた。慢性処理では、各濃度の Cisplatin を 16 ml のコロニー形成培地に直接混ぜ、そこにコニディア懸濁液を加え、15 cm シャーレに広げた。

コニディアを撒いたシャーレは 30℃ のインキュベーターで 2 日間培養し、生育したコロニーを計数した。一つの条件あたり 2 枚の平均をとり、コントロールに対する生存率を算出した。

## **大腸菌のゲノム DNA 抽出**

大腸菌 DH5α 株を LB 液体培地で一晩振盪培養し、増殖した大腸菌からゲノム DNA を抽出した。溶菌バッファー (0.6% SDS, 0.12 mg/ml proteinase K, in TE) 600 μl を、遠心後の上清を除去した大腸菌の沈殿に加えることにより溶菌した。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールによるタンパク質除去とエタノール沈殿は、アカパンカビのゲノム抽出と同様に行った。

## **基本的な遺伝子工学的手法、試薬、酵素**

遺伝子のクローニングやシーケンスなど正確性を必要とする PCR 解析には、主に KAPA HiFi HotStart ReadyMix (日本ジェネティクス) か、Go-to DNA Polymerase (ニッポンジーン) を使用した。それ以外の PCR には、主に AmpliTaq Gold<sup>®</sup> 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を使用した。プラスミドへのクローニングには、In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning Kit (TaKaRa) を使用した。制限酵素などは、研究室ストックのものを使用した。いずれの試薬も、メーカーのマニュアルに従って使用した。DNA の電気泳動は、0.7% のアガロースゲルにより行った。プラスミドの抽出や大腸菌の形質転換は、Sambrook らの方法に従った (Sambrook et al., 1989)。

## **cDNA 合成**

シロイヌナズナの Total RNA 2 μl (約 100 ng, 吉原先生より譲受), dNTPs (10 mM each) 2 μl, 5 × RT Buffer (TOYOBO) 4 μl, Oligo dT primer (20 nt, 10 μM) 1 μl, Nuclease free water 9 μl を混合して全量 18 μl とし、65℃ で 5 分間処理した後、氷上で 5 分間冷却させた。RNase inhibitor (TOYOBO) 1 μl 及び ReverTra Ace (TOYOBO) 1 μl を加え、42℃ で 20 分間処理して逆転写反応させた後、99℃ で 5 分間処理した。

## **コンストラクトの作製**

*his-3* 遺伝子座へのターゲティング用コンストラクトには、pFLAGN1 を改変して作製した (Kawabata and Inoue, 2007)。まず、アカパンカビ野生株のゲノムを鋳型として *phr* 遺伝子を PCR により増幅し、この PCR 産物を pFLAGN1 に In-Fusion<sup>®</sup> によって 3 × FLAG の下流に導入した。次に、このプラスミドに *phr* の上流 1 kb のプロモーター領域を導入した。大腸菌光回復酵素 *Ecphr* は DH5α のゲノムを鋳型として、シロイヌナズナ光回復酵素 *AtUVR3* は合成した cDNA を鋳型として PCR を行い、同様の方法でクローニングを行った。コントロールベクターとしては、作製したこれらのプラスミドの ORF の外側から Inverse PCR を行うことで作製した。Inverse PCR を行ったサンプルを *DpnI* で処理して鋳型のプラスミドを消化した後、サンプルをフェノール

/クロロホルム/イソアミルアルコール処理及びエタノール沈殿により精製し、沈殿に 10 mM ATP 1  $\mu$ l, Buffer A (Thermo Fisher Scientific) 1  $\mu$ l, T4 Polynucleotide Kinase (Thermo Fisher Scientific) 0.5  $\mu$ l, 超純水 7.5  $\mu$ l を加え全量 10  $\mu$ l とし、37°C で 1 時間処理してリン酸化した。75°C, 10 分間の処理で酵素を失活させ、5  $\mu$ l を T4 DNA ligase 処理により自己環化させ、大腸菌に導入した。

内在性の遺伝子へのターゲティング用コンストラクトには、*AtUVR3* を組み込んだ pTSKD6 を改変して作製した。まず、pTSKD6 の *ccg-1* プロモーター領域を、目的遺伝子上流 1 kb 領域に置き換えた後、3 × FLAG の下流に ORF 領域、*bar* (ピアラフォス耐性遺伝子)、及び下流 1 kb 領域をつないだ。*HA-pcna* の作製には、クローニングした *pcna* の N 末端に HA を付加するようにプライマーを設計し、上記に示す Inverse PCR によって作製した。本研究で作製した *bar* による KO 株も、上記に示す方法で ORF 領域を Inverse PCR により除いた。部位特異的変異導入は、プライマーに目的の変異を導入して Inverse PCR を行うことで作製した。

### シーケンス解析

シーケンス解析するテンプレート 1  $\mu$ l, 5 × BigDye sequence buffer 2.4  $\mu$ l, BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Thermo Fisher Scientific) 0.6  $\mu$ l, プライマー (0.8  $\mu$ M) 0.6  $\mu$ l, 超純水 7.4  $\mu$ l を混合し全量 12  $\mu$ l とした。(96°C, 1 min) × 1 サイクル, (96°C, 10 sec: 50°C, 15 sec: 60°C, 4 min) × 35-45 サイクルの反応後、1.5 ml チューブ内に全量を移し、0.5 M EDTA 0.5  $\mu$ l, 3 M 酢酸ナトリウム 2  $\mu$ l, 超純水 9.5  $\mu$ l を加えて混合した。99.5 %エタノールを 55  $\mu$ l 加え、室温で 20 分間静置後、遠心分離 (14,000 rpm, 20 min, 4°C) を行い、上清を除去した。その後、70%エタノールを 70  $\mu$ l 加え、遠心分離 (14,000 rpm, 5 min, 4°C) を行い、上清を除去し、チューブ内を乾燥させた。沈殿をホルムアミド 20  $\mu$ l に溶解させて、95°C で 2 分間処理後、氷上で急冷させた。サンプルをプレートに全量移し、3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いてシーケンス解析を行った。

### アカパンカビのタンパク質抽出

コニディア懸濁液を遠心分離 (3,500 rpm, 2 min) により沈殿させた後、上清を除去し、タンパク質抽出バッファー [50 mM HEPES buffer pH 7.6, 10% glycerol, 137 mM NaCl, complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) 1 個/50 ml] 500  $\mu$ l に懸濁し、クオーツサンドを 200  $\mu$ l 程度入れたスクリュウチューブに移した。Micro Smash<sup>™</sup> MS-100 (TOMY) で破碎処理 (5,500 rpm, 100 sec, 4°C) を行った後、遠心分離 (14,000 rpm, 10 min, 4°C) して上清を移した。タンパク質濃度の定量は、TaKaRa BCA Protein Assay Kit (TaKaRa) を用いた。

### SDS-PAGE

10%アクリルアミド分離ゲル [1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 3.75 ml, 30%アクリルアミド 5 ml, 10% SDS 150  $\mu$ l, 10% APS 150  $\mu$ l, TEMED 10  $\mu$ l, 精製水 6 ml (2 枚分の組成)] を、組み立てたガラス板に注ぎ込み、メタノールを重層した。20 分程度静置して重合させた後、メタノールを除去し、6%アクリルアミド濃縮ゲル [0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 1.25 ml, 30%アクリルアミド 1 ml, 10% SDS 50  $\mu$ l, 10% APS 50  $\mu$ l, TEMED 10  $\mu$ l, 精製水 2.65 ml (2 枚分の組成)] を注ぎ込み、コームを差し込んで重合させた。泳動サンプルとしては、タンパク質溶液に等量のサンプル緩衝液 [0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% 2-メルカプトエタノール, 4% SDS, 10%スクロース, 0.01% BPB] を加えて、95°C で 5 分間加熱したものを使用した。泳動バッファーには、0.1% SDS

を含む Tris/Glycine バッファーを用いた。泳動後ゲルを取り出し、濃縮ゲルを除去してウエスタンブロッティングに用いた。

### **ウエスタンブロッティング**

ゲルからメンブレンへの転写は、PVDF メンブレン Immobilon-P™ Transfer Membrane (Pore size: 0.45 µm, Millipore) を使用し、セミドライ式トランスファー装置 BE-320 (BIO CRAFT) を用いて、定電圧 20 V で 20 分通電した。続いて、メンブレンを TBST (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 0.1% Tween 20) 20 ml で 5 分間の洗浄を 3 回行い、ブロッキングバッファー (5% skim milk in TBST) 20 ml を加え、室温で 30 分振盪してブロッキングした。その後、ブロッキングバッファー 20 ml で希釈した抗体を加え、室温で 1 時間振盪して反応させた。TBST 20 ml で 5 分間の洗浄を 3 回行い、化学発光用基質 (EzWestLumi plus, ATTO, WSE-7120S) にメンブレンを数秒間浸した後、ChemiDoc XRS (BIO-RAD) によって検出した。総タンパク質の検出はポンソー S か CBB によって行った。使用した抗体と濃度を以下に示す。抗 FLAG 抗体: proteintech, HRP-66008, 1/10,000, 抗 HA 抗体: proteintech, 66006-2-Ig, 1/20,000, 抗マウス IgG 抗体: Promega, W4021, 1/10,000

### **T4 endonuclease V による CPD の検出**

$1 \times 10^7$  個/ml のコニディア懸濁液を調製し、紫外線感受性試験と同様の方法で、 $300 \text{ J/m}^2$  の紫外線照射を行った。照射したコニディア懸濁液を 10 ml ずつ遠沈管に移し、一方を光回復試験と同様の方法で 60 分間光回復処理を行った。もう一方を光回復未処理のコントロールとした。コニディア懸濁液を回収した遠沈管をアルミホイルで遮光し、遠心分離 (3,500 rpm, 2 min) を行った。上清を捨て、沈殿に Isolation buffer 500 µl を加え、クオーツサンド約 200 µl を入れたスクリーチューブに移した。その後、Micro Smash™ MS-100 (TOMY) で破碎処理 (3,500 rpm, 3 min) を行い、65°C で 10 分間の加熱処理を行った。遠心分離以外のここまでの操作は赤色灯下で行った。以降の DNA 抽出操作は、上記に示した方法と同様に行った。抽出したゲノム DNA 35 µl (約 10 µg), T4 endonuclease V buffer (NEB) 10 µl, BSA (100 µg/ml) 10 µl, T4 endonuclease V (NEB) 2 µl, 超純水 43 µl を混合して全量 100 µl とし、37°C で一晩処理した。その後、アルカリアガロースゲル電気泳動を行うことで CPD を検出した。アルカリアガロースゲル電気泳動は、Sato の方法を一部改変して行った (Sato, 2008)。最終濃度 0.8% のアガロースを溶解させた後、60°C まで冷まし、NaOH と EDTA をそれぞれ 50 mM, 1 mM となるよう加えてゲルメーカーに流し込みアルカリアガロースゲルを作製した。作製したゲルは、サンプルを泳動する前にアルカリ電気泳動バッファー (50 mM NaOH, 1 mM EDTA) に 30 分間浸して平衡化した。T4 endonuclease V で処理したサンプルをエタノール沈殿し、10 µl のアルカリ電気泳動バッファーに溶解させた後、アルカリローディングバッファー (300 mM NaOH, 6 mM EDTA, 36% グリセロール, 0.25% キシレンシアノール) を 2 µl 加えて電気泳動した。泳動条件は定電圧、25 V で行い、約 18 時間泳動した。泳動後のゲルを中和バッファー (1 M Tris-HCl pH 7.6, 1.5 M NaCl) 50 ml に浸して、室温で 45 分間振盪した。中和バッファーを捨てた後、新しい中和バッファー 50 ml を加え、そこにエチジウムブロマイド (10 mg/ml) を 10 µl 加えて室温で 2 時間振盪した。その後、ゲルを UV トランスイルミネーターで露光し、泳動パターンを記録した。

### **ICL の検出**

サザンブロッティングによる ICL の検出は先行研究を一部改変して行った (Vos and Hanawalt,

1987)。20 ml のコニディア懸濁液 ( $1 \times 10^7$  個/ml) を Vogel's 最少液体培地に調製して、紫外線感受性試験と同様の方法で紫外線照射した後、全量を滅菌済みの三角フラスコに移して振盪培養した。照射後 0, 2, 4, 6 時間後に 4.5 ml ずつ採取し、3,500 rpm で 2 分間遠心してコニディアを回収した。回収したコニディアから DNA を抽出し、*Bsp*T104I で消化した後、エタノール沈殿し、8.1  $\mu$ l の TE バッファーに溶解した。サンプルに 5.4  $\mu$ l の 1 M NaOH を加えた後に、56°C で 10 分間熱変性させ、氷上で急冷した。その後変性させたサンプルに、アルカリローディングバッファーを 1.5  $\mu$ l 加えた。変性させない場合は、エタノール沈殿後 13.5  $\mu$ l の TE に溶解し、ローディングバッファー (5 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF, 30% glycerol) を 1.5  $\mu$ l 加えた。TBE バッファーを用い、1%アガロースゲルで 25 V, 4°C の条件で一晩泳動し、DNA を Hybond XL nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech) に転写した。サザンハイブリダイゼーションは Roche 社の DIG システムを用い、手順はユーザーマニュアルに従って行った。プローブは、pMF272 を his-3\_ICL\_F と、his-3\_ICL\_R の二つのプライマーで増幅させた DNA を鋳型としてランダムプライミング法により作製した。プロットの検出には ChemiDoc XRS (Bio-Rad) を用いた。

### **ピコリン酸による核分裂周期の同調**

滅菌した三角フラスコまたは遠沈管内で Vogel's 最少液体培地に調製したコニディア懸濁液 ( $2 \times 10^8$  個/ml) に、25 mM のピコリン酸を加えた。室温で 2 時間振とう培養した後、50 ml 遠沈管に移して遠心分離 (3,500 rpm、2 min) した。上清を除去し、コニディアのペレットを 40 ml リン酸バッファーに再懸濁させた。懸濁したコニディアを洗浄し、3,500 rpm で 2 分間遠心分離し、上清を除去した。ピコリン酸を完全に除去するためにさらにもう一度洗浄し、洗浄したコニディアを Vogel's 最少液体培地で最終濃度  $2 \times 10^8$  個/ml に再懸濁し、室温で振とう培養して増殖を再開させた。コニディア濃度及びその増殖は吸光度計 (SHIMADZU, UV-1800) を用いて、450 nm の吸光度で測定した。

### **DNA 量の測定**

培養中のコニディア懸濁液 50  $\mu$ l を、クオートサンド約 200  $\mu$ l と Isolation buffer 500  $\mu$ l を入れたスクリーチューブに加え、低温室にて Micro Smash™ MS-100 (TOMY) で破碎処理 (5,500 rpm, 100 sec) を行った。以降の DNA 抽出操作は上記と同様の方法で行い、RNase (最終濃度 20  $\mu$ g/ml) を加え、37°C で 30 分間インキュベートした後に DNA 濃度測定を行った。測定には NanoDrop One<sup>c</sup> (ThermoFisher) を使用し、2 サンプルの平均を測定値として計算した。

### **コニディアあたりの核数の測定**

1 ml の 99.5%エタノールを入れたマイクロチューブに、培養中のコニディア懸濁液 50  $\mu$ l を加え、室温で 30 分間固定した。遠心分離 (14,000 rpm, 20 min, 4°C) を行い、上清を捨てて乾燥させた後、PBS buffer で希釈した 50  $\mu$ g/ml の Hoechst 33342 (Nacalai Tesque) 10  $\mu$ l でペレットを再懸濁し、37°C で 30 分間処理した。5  $\mu$ l をスライドガラスにのせて上からカバーガラスをかけ、蛍光顕微鏡 (Olympus, BX51) を用いて観察し、コニディアあたりの核数を計測した。1 サンプルあたり少なくとも 100 個のコニディアの核数をカウントした。

### **G 期及び S 期における 1,2,7,8-Diepoxyoctane (DEO) 感受性試験**

上記の方法でコニディア懸濁液 ( $2 \times 10^8$  個/ml) を 2 時間ピコリン酸処理した後、懸濁液を半

分に分けた。一方は G1 期処理群として 2 ml ずつ 2 本の 15 ml 遠沈管に分注し、そのうちの一方に DEO を最終濃度 100 mM となるよう加えて室温で 30 分間振とう培養を行った。その後、遠心分離 (3,500 rpm、2 min) を行って上清を除去し、10 ml のリン酸バッファーで 2 回洗浄した後に 16 ml のコロニー形成培地に撒いた。S 期処理群としては、ピコリン酸を上記の方法で洗浄し、Vogel's 最少液体培地で最終濃度  $2 \times 10^8$  個/ml に再懸濁し、2 ml ずつ 2 本の 15 ml 遠沈管に分注して 1.5 時間の培養を行った後に、G1 期処理群と同様の方法で DEO 処理を行った。コニディアを撒いたシャーレは 30°C のインキュベーターで 2 日間培養し、生育したコロニーを計数した。シャーレ 2 枚の平均をとり、薬剤未処理のコントロールに対する生存率、G1 期と S 期のそれぞれの生存率の比を算出した。

表MM-1. 本研究で使用したアカパンカビ株

Strain	Genotype	Source, reference
C1-T10-37A	A	Tamaru and Inoue (1989)
C1-T10-28a	a	Tamaru and Inoue (1989)
TSKD055	A	This study
FGSC 16079	<i>a mus-11::hph</i> (heterokaryon)	FGSC*
TSKD089-1	<i>A mus-11::hph</i>	This study
FGSC 12357	<i>a mus-18::hph</i>	FGSC
FGSC 14432	<i>A mus-38::hph</i>	FGSC
FGSC 12062	<i>a mus-40::hph</i>	FGSC
FGSC 12167	<i>A mus-43::hph</i>	FGSC
FGSC 12166	<i>a mus-43::hph</i>	FGSC
FGSC 12165	<i>A mus-44::hph</i>	FGSC
TSKD001	<i>a mus-44::hph</i>	This study
FGSC 15968	<i>a mus-52::hph</i>	FGSC
FGSC 2356	<i>A his-3</i>	FGSC
FGSC 18983	<i>a phr::hph</i>	FGSC
TSKD038-1	<i>mus-18::hph mus-38::hph</i>	This study
TSKD039-9	<i>mus-18::hph mus-43::hph</i>	This study
TSKD040-20	<i>mus-18::hph mus-44::hph</i>	This study
TSKD002	<i>A phr::hph his-3</i>	This study
TSKD006	<i>A mus-43::hph his-3</i>	This study
TSKD008	<i>A mus-44::hph his-3</i>	This study
TSKD011	<i>A mus-43::hph phr::hph his-3</i>	This study
TSKD012	<i>A mus-44::hph phr::hph his-3</i>	This study
TSKD013	<i>A his-3<sup>+</sup>:Pphr-3 × FLAG-Ncphr</i>	This study
TSKD023	<i>A phr::hph his-3<sup>+</sup>:Pphr-3 × FLAG</i>	This study
TSKD014	<i>A phr::hph his-3<sup>+</sup>:Pphr-3 × FLAG-Ncphr</i>	This study
TSKD016	<i>A mus-44::hph his-3<sup>+</sup>:Pphr-3 × FLAG-Ncphr</i>	This study
TSKD018	<i>A mus-44::hph phr::hph his-3<sup>+</sup>:Pphr-3 × FLAG-Ncphr</i>	This study
TSKD019	<i>A phr::hph his-3<sup>+</sup>:Pphr-3 × FLAG-Ecphr</i>	This study
TSKD020	<i>A mus-43::hph phr::hph his-3<sup>+</sup>:Pphr-3 × FLAG-Ecphr</i>	This study
TSKD021	<i>A mus-44::hph phr::hph his-3<sup>+</sup>:Pphr-3 × FLAG-Ecphr</i>	This study
TSKD030	<i>A phr::hph his-3<sup>+</sup>:Pccg-1-3 × FLAG</i>	This study
TSKD024	<i>A phr::hph his-3<sup>+</sup>:Pccg-1-3 × FLAG-Ncphr</i>	This study
TSKD025	<i>A mus-44::hph phr::hph his-3<sup>+</sup>:Pccg-1-3 × FLAG-Ncphr</i>	This study
TSKD031	<i>A phr::hph his-3<sup>+</sup>:Pccg-1-3 × FLAG-AtUVR3</i>	This study
TSKD032	<i>A mus-43::hph his-3<sup>+</sup>:Pccg-1-3 × FLAG-AtUVR3</i>	This study
TSKD033	<i>A mus-44::hph his-3<sup>+</sup>:Pccg-1-3 × FLAG-AtUVR3</i>	This study
TSKD115-10	<i>A mus-38::bar</i>	This study
TSKD269-1	<i>A mus-43::bar</i>	This study
TSKD043-1	<i>A mus-44::bar</i>	This study
TSKD059-4	<i>a 3 × FLAG-mus-38<sup>WT</sup>:bar</i>	This study
TSKD057-3	<i>3 × FLAG-mus-38<sup>R719S</sup>:bar</i>	This study
TSKD061-1	<i>3 × FLAG-mus-38<sup>S824F</sup>:bar</i>	This study
TSKD041-2	<i>A 3 × FLAG-mus-44<sup>WT</sup>:bar</i>	This study
TSKD045-2	<i>3 × FLAG-mus-44<sup>V89E</sup>:bar</i>	This study
TSKD053-7	<i>3 × FLAG-mus-44<sup>N96A/Y131A</sup>:bar</i>	This study
TSKD049-8	<i>3 × FLAG-mus-44<sup>L185R</sup>:bar</i>	This study
TSKD051-6	<i>3 × FLAG-mus-44<sup>A192R</sup>:bar</i>	This study
TSKD537-7	<i>a HA-pcna:bar</i>	This study

\*Fungal Genetics Stock Center

表MM-2. 本研究で使用したプライマー

Discriptions	Primer name	Sequences (5'-3')
Construction of plasmids	phr_FLAG_F	GGG TTCAGGATCCCCGATGGCTCCAGTAAGCG
	phr_FLAG_R	AAAAGCTGGGTACCGGGCCCTCTTTCACAAATCCC
	Ecoli_phr_F	GGG TTCAGGATCCCCGATGACTACCCATCTGGTC
	Ecoli_phr_R	AAAAGCTGGGTACCGGGCCCTTATTTCCCCCTTC
	AtUVR3_if_F	GGG TTCAGGATCCCCCATGCAACGATTCTGCGTC
	AtUVR3_if_R	AAAAGCTGGGTACCGCTCTACCTATTTGAGTTTTGG
	phr_promoter_F	ACCGCGGTGGCGGCCAATATCCGACATGATCGATC
	phr_promoter_R	CCATACTAGTTCTAGTGTGGTCTTGAGCTTGAAG
	pFLAGN1_ApaI_F	CGGTACCCAGCTTTTGTTCC
	pFLAGN1_SmaI_R	GGGGATCCTGAACCCCTTGTC
	pFLAGN1_XbaI_F	CTAGAACTAGTATGGACTACAAAGACCATGACGG
	pFLAGN1_NotI_R	GGCCGCCACCGCGGTGG
	mus-44_up_F	ACCGCGGTGGCGGCCTATGAAGACGGTCAAGACC
	mus-44_up_R	CCATACTAGTTCTAGTTTGTCTGACTACCTAGAG
	mus-44_ORF_F	GGG TTCAGGATCCCCGATGGACGACGACTTTGAC
	mus-44_ORF_R	GTCTGATCCGAATTCTCAACCTCCTTGCCCTCAAT
	mus-44_dwn_F	GAAAATATCAAGACATTCGGACACGTTGTCTGG
	mus-44_dwn_R	TTAGGTGACACTATATTAGCTCACAGGGAAGAAAT
	mus-38_up_F	ACCGCGGTGGCGGCCAACAGGACTGATCCATCAG
	mus-38_up_R	CCATACTAGTTCTAGGACATGCGGGGCAGGGGCAG
	mus-38_ORF_F	GGG TTCAGGATCCCCGATGTCGGCTCCAGTGCCC
	mus-38_ORF_R	GTCTGATCCGAATTCTCACCCTGTAACTCTCC
	mus-38_dwn_F	GGACGAATGTGTATGTTGATGTGTGAG
	mus-38_dwn_R	TTAGGTGACACTATAAAAACATCTATAAAAACAAAG
	SV40-Bar_F	GAATTCGGATCAGACATGATAAGATACATTGATGA
	SV40-Bar_R	TGCTTTGATATTTCCACGCGTTTTCGGGTTTACC
	SV40-Bar_mus-38_R	CATACACATTTCGTCACGCGTTTTCGGGTTTACC
	pFLAGN1_SP6_F	TATAGTGTACCTAAATCGTATGTG
	SV40-Bar_vector_F	GAATTCGGATCAGACATGATAAGATAC
	FLAG_vector_R	GGGGATCCTGAACCCCTTGTC
	PCNA_up_F	ACCGCGGTGGCGGCCTATAATCTTACATGGCATC
	PCNA_ORF_R	GTCTGATCCGAATTCTTACTCCTCGTCGCCAATC
	Bar_F	GAATTCGGATCAGACATGATAAGATACATTGATG
	bar_PCNA_R	AGGTAATGGGGCGTTTCCAGATCTCGGTGACGGGC
	PCNA_dwn_F	ACGCCCCATTTACCTCCAACAAC
	PCNA_dwn_R	TTAGGTGACACTATAGATCAATTGAAATAGTATC
	PCNA_HA_F	TTCCAGATTACGCTCTTGAAGCACGGTTGGAGCAG
PCNA_HA_R	CATCGTATGGGTACATTTCTGTTGTTGTGGTAG	
Site-directed mutagenesis	mus-44_V89E	CTCCTCCATCCTCGAGTCCCCGCGCCAA
	mus-44_K174E	CTGCGCGAGCTGTCCGAGACGTGCGTTG
	mus-44_L184R	ACGTGACGGTCATCAGGTGCTGGTCGGC
	mus-44_A192R	GGTCGGCGCAGGAGAGGGCGCGCTACTT
	mus-44_N96A_F	GCCCCGTGCTCGCTCCATCAAG
	mus-44_N96A_R	GCCTTTTTGGCGCGGGGAGACGAG
	mus-44_Y131A_F	GCCCACCGTCTGCACCCAGAATAC
	mus-44_Y131A_R	CTTGAGAGACAGGAAAAGGGCGCAG
	mus-38_R719S_F	AGCGAGTTCGCTCCTCTTTGCC
	mus-38_R719S_R	CACGTGACGACTACGCGCGGTG
	mus-38_S824F_F	TCAAATCGTGCTGCTCACGC
	mus-38_S824F_R	ACTGCAAGTCGTTGGCCCCC
Southern blotting	his-3_ICL_F	TTGCCATCTCCACCATCCTC
	his-3_ICL_R	GTTGCTCTTGCTCATGTGCTC

## 第一章 *mus-44* 欠損株における光回復能の解析

アカパンカビにおける *mus-43* 遺伝子はヒト XPA 及び出芽酵母 *RAD14* の, *mus-44* 遺伝子はヒト *ERCC1* 及び出芽酵母 *RAD10* のホモログとして同定された。これらの遺伝子の変異株が紫外線と 4NQO に感受性を示すことや, *XPF* ホモログである *mus-38* とエピスタティックな関係を示すことから, アカパンカビにおいてもこれらの遺伝子産物は NER に関与しているとされている (Sato et al., 2008)。*mus-38* 及び *mus-44* 変異株は PPD 表現型を示す一方で, *mus-43* 変異株は, 回復に時間を要するものの *mus-38* 及び *mus-44* 変異株よりも高い光回復能を示す (Sato, 2008)。

本章では,  $\Delta$ *mus-44* 株に光回復酵素を導入して光回復能を解析した結果, PPD 表現型の原因はアカパンカビ光回復酵素 PHR の機能低下及びピリミジン二量体の修復能低下によって生じるものではないことが示された。さらに, 同量の紫外線であっても  $\Delta$ *mus-44* 株は高線量率の紫外線より生存率が低下することが明らかになり, PPD 表現型の原因が高線量率の紫外線照射によって生じるピリミジン二量体以外の損傷による可能性が示唆された。

### 結果

#### $\Delta$ *mus-44* 株は PPD 表現型を示す

$\Delta$ *mus-43* 株 (図 1-1A) と  $\Delta$ *mus-44* 株 (図 1-1B) の紫外線の感受性を解析したところ, これらの株は野生株に比べ感受性を示した。また,  $\Delta$ *mus-44* 株は  $\Delta$ *mus-43* 株よりも高感受性を示した。さらに, これらの株の光回復能を評価するために, それぞれの線量の紫外線を照射した後のコニディアに 60 分間の可視光照射を行う光回復試験を行った。 $\Delta$ *mus-43* 株の光回復能は野生株と同程度であった一方,  $\Delta$ *mus-44* 株においては, 完全に欠失してはいないものの, 野生株や  $\Delta$ *mus-43* 株に比べ顕著な光回復能の低下が確認された (図 1-1B)。これらの結果から, 以前の報告と合わせて *MUS-44* タンパク質の機能欠損による何らかの原因により, PPD 表現型が生じることが示唆された。

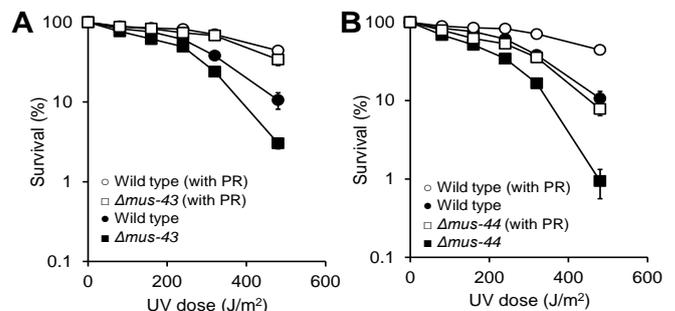


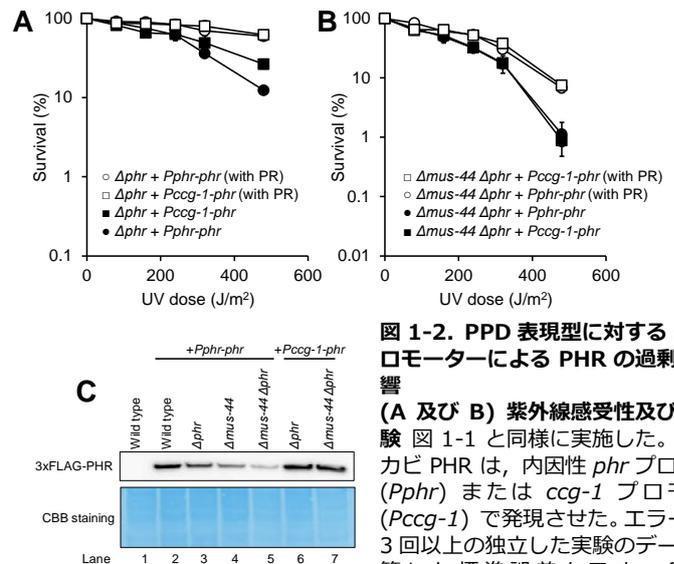
図 1-1.  $\Delta$ *mus-43* 及び  $\Delta$ *mus-44* 株の紫外線感受性と光回復能

コニディア懸濁液に 2.0 J/m<sup>2</sup>/s の線量率で紫外線照射し, すぐに培地に撒くか光回復 (PR) させるために撒く前に 60 分間可視光照射した。2 日間の培養後, 各シャーレのコロニーを数えた。エラーバーは, 3 回以上の独立した実験のデータから計算した標準誤差を示す。

#### PHR の過剰発現では $\Delta$ *mus-44* 株の PPD を相補しない

$\Delta$ *mus-44* 株の光回復能がどのような条件で補われるのか検討するために, PHR を *ccg-1* プロモーターにより過剰発現させるコンストラクトを作製し, *his-3* 遺伝子座に導入して解析した。コントロールとしては, *phr* の上流 1 kbp をプロモーター領域として PHR を発現させるコンストラクトを作製し, 同じく *his-3* 遺伝子座に導入した。 $\Delta$ *phr* 株において 3 × FLAG タグを付加した PHR による光回復が正常に行われることが確認された (図 1-2A)。意外なことに, 紫外線に対する耐性も PHR 過剰発現株で増加した。これは, *ccg-1* プロモーターにより PHR が恒常的に発現し, 紫外線ランプからのわずかな青色光によって光回復が引き起こされたためであると考えられる。 $\Delta$ *mus-44*  $\Delta$ *phr* 株においても同様に PHR の過剰発現を行った結果, *phr* プロモーターと *ccg-1* プロモーターのどちらによる発現においても光回復能に差は見られなかった (図 1-2B)。

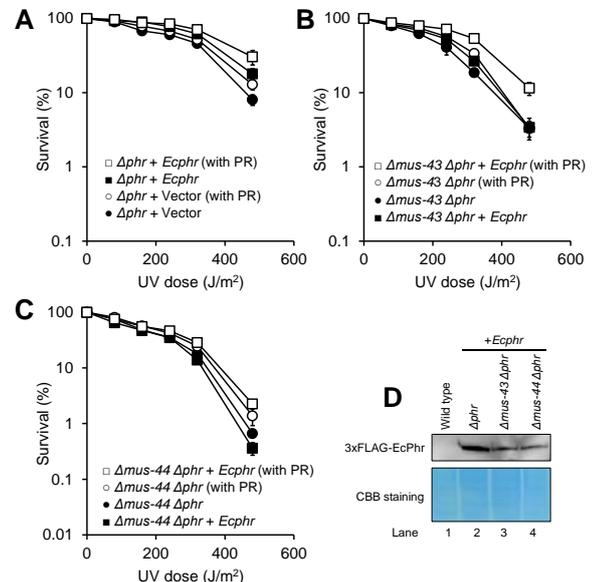
PHR の発現量を確認するために、200 J/m<sup>2</sup> の紫外線照射後に光回復処理をしたコニディアからタンパク質を抽出し、抗 FLAG 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。 *phr* プロモーターによる発現では、野生株 (図 1-2C, レーン 2) と比較して、 $\Delta phr$  及び  $\Delta mus-44$  株 (図 1-2C, レーン 3 及びレーン 4) で PHR の発現量が低下し、 $\Delta mus-44 \Delta phr$  株では相加的に減少した (図 1-2C, レーン 5)。この原因としては、アカパンカビ PHR が光によって発現誘導されることから (未発表データ)、DNA 修復タンパク質である PHR や MUS-44 の欠損により、紫外線照射による *phr* 遺伝子領域の損傷の修復が行われず、結果として可視光照射による誘導後の発現が低下したためだと考えられる。これに対して、*ccg-1* プロモーターによる過剰発現では二重 KO 株において PHR の発現低下は見られず、 $\Delta phr$  単独 KO 株と同程度であった (図 1-2C, レーン 7)。これらの結果より、 $\Delta mus-44$  株の光回復能は PHR の発現を増加させても相補されなかったため、PPD 表現型は PHR の修復活性の低下によるものではない可能性が示唆された。



**図 1-2. PPD 表現型に対する *ccg-1* プロモーターによる PHR の過剰発現の影響**  
(A 及び B) 紫外線感受性及び光回復試験 図 1-1 と同様に実施した。アカパンカビ PHR は、内因性 *phr* プロモーター (*Pphr*) または *ccg-1* プロモーター (*Pccg-1*) で発現させた。エラーバーは、3 回以上の独立した実験のデータから計算した標準誤差を示す。(C) 3 × FLAG-PHR の検出 紫外線照射後に可視光照射したコニディアからタンパク質を抽出し、ウエスタンブロットングで検出した。

### 大腸菌の CPD 光回復酵素は $\Delta mus-44$ 株の PPD を相補しない

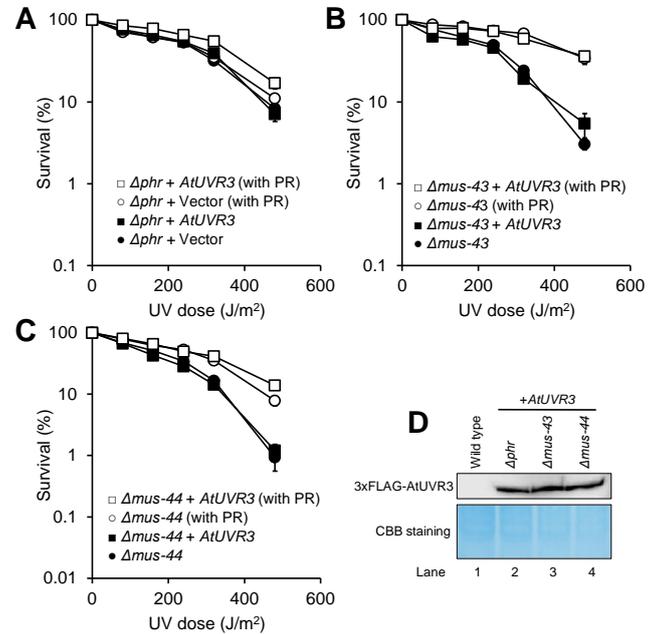
アカパンカビ PHR の過剰発現によっては  $\Delta mus-44$  株の光回復能は補われなかったことから、光回復酵素が MUS-44 や他の修復系と協調的に働いて CPD の除去に関与している可能性が示唆された。そのため、アカパンカビ同様に CPD を修復する大腸菌光回復酵素 (EcPhr) を導入することで光回復能が補われるか調べた。 $\Delta phr$  株において 3 × FLAG タグを付加した EcPhr を発現させたところ、ベクターコントロール株に対して光回復後の生存率がやや上昇した (図 1-3A)。このことから、アカパンカビにおいて EcPhr が機能することが確認された。 $\Delta mus-43 \Delta phr$  株において EcPhr を発現させたところ、同様に光回復後の生存率の上昇が確認された (図 1-3B)。一方で、 $\Delta mus-44 \Delta phr$  株においては、わずかな光回復能しか示さなかった (図 1-3C)。ウエスタンブロットングによる EcPhr の発現解析の結果、 $\Delta phr$  株における発現量に比べて、*mus-43* や *mus-44* の欠損を合わせ持つ株では発現量が低かった (図 1-3D)。これらの結果より、EcPhr の発現では  $\Delta mus-44$  株の PPD 表現型は相補されることが示された。すなわち、MUS-44 の欠損がアカパンカビ PHR の機能低下をもたらすのではなく、PHR の光回復活性は独立しているうえで PPD 表現型が生じていることが示唆された。



**図 1-3. EcPhr による光回復が PPD 表現型に及ぼす影響**  
(A から C) 紫外線感受性及び光回復試験 図 1-1 と同様に実施した。EcPhr は内因性 *phr* プロモーター制御下で発現させた。光回復能を比較するために、ベクターコントロール (A) または形質転換の宿主株 (B 及び C) を同じグラフに示した。エラーバーは、3 回以上の独立した実験のデータから計算した標準誤差を示す。(D) 3 × FLAG-EcPhr の検出 ウエスタンブロットングは、図 1-2 と同様に実施した。

## シロイヌナズナの 6-4PP 光回復酵素は $\Delta mus-44$ 株の PPD を相補しない

UVB の最も高頻度で直接的な損傷は、隣接するピリミジン塩基同士の二量体化である。それらは主に CPD であるが、低頻度で 6-4PP が形成されることが知られている (Friedberg et al., 2006)。このことから、6-4PP が PPD の原因となっている可能性が考えられる。そのため、 $\Delta mus-44$  株に 6-4PP 光回復酵素であるシロイヌナズナ (*A. thaliana*) UVR3 (AtUVR3) を導入して PPD 表現型が相補されるか検討した。過剰発現プロモーターである *ccg-1* プロモーターによって AtUVR3 を発現させたところ、 $\Delta phr$  株において光回復能がベクターコントロールに対して上昇した。このことから、AtUVR3 がアカパンカビにおいて機能することが確認された (図 1-4A)。しかし、 $\Delta mus-43$  及び  $\Delta mus-44$  株においては、AtUVR3 を発現させてもアカパンカビ PHR (CPD 光回復酵素) による光回復能に相加的な生存率の上昇は見られなかった (図 1-4B 及び 1-4C)。これらのことから、6-4PP の細胞の生存に対する影響は CPD よりも小さく、アカパンカビ PHR による CPD の修復後には表現型にほとんど現れなかったと考えられる。また、これらの株の AtUVR3 の発現量は *ccg-1* プロモーターによる過剰発現によって NER 欠損のバックグラウンドの有無に関わらず同程度であった (図 1-4D)。これらの結果より、紫外線照射による 6-4PP の影響は CPD に比べて小さく、AtUVR3 によって  $\Delta mus-44$  の光回復能は完全に補われなかったため、PPD 表現型の原因は残存した 6-4PP によるものではないことが示唆された。



**図 1-4. AtUVR3 による光回復が PPD 表現型に及ぼす影響 (A から C) 紫外線感受性及び光回復試験** 図 1-1 と同様に実施した。AtUVR3 は *ccg-1* プロモーター制御下で発現させた。光回復能を比較するために、ベクターコントロール (A) または形質転換の宿主株 (B 及び C) を同じグラフに示した。エラーバーは、3 回以上の独立した実験のデータから計算した標準誤差を示す。(D) 3 × FLAG-AtUVR3 の検出 ウェスタンブロットリングは、図 1-2 と同様に実施した。

## $\Delta mus-44$ 株は高線量率の紫外線に感受性を示す

以上の結果から、PPD 表現型の原因が紫外線により生じたピリミジン二量体ではないことが示唆された。紫外線は様々な損傷を引き起こし、それに多数の修復系が関与することが明らかとなっていることから (Rastogi et al., 2010)、ピリミジン二量体以外の損傷が PPD 表現型の原因となっている可能性がある。本研究の実験条件では、一定の線量率で紫外線照射を行い、照射時間によって線量を算出している。次の実験では、線量率を 2.0 J/m<sup>2</sup>/s から 2.5 J/m<sup>2</sup>/s に上げてより急性的な処理も行い、両者を比較した。野生株と  $\Delta mus-43$  株では、それぞれの線量率で差が見られなかったが、 $\Delta mus-44$  株では 2.5 J/m<sup>2</sup>/s の線量率の方が、より感受性を示した (図 1-5)。これらの結果から、高線量の紫外線を短時間で照射した際により多くできる損傷に、 $\Delta mus-44$  が NER 非依存的に関与していることが示唆された。

## 考察

アカパンカビの一部の紫外線感受性株が光回復能の低下を示すことが最初に報告されてから約半世紀が経つ (Tuveson and Mangan, 1970)。一方、PPD 表現型を示すこれらの原因遺伝子は、光回復酵素をコードする遺伝子ではないことが示された (Shimura et al., 1999)。さらに、このような PPD 表現型は他の生物では報告されていないため、この現象はアカパンカビに特有であると考えられている。したがって、アカパンカビには光回復と他の修復経路との間に独自の関係性が

あると考えられていたが、そのメカニズムは長い間未説明のままとなっていた。

先行研究において、リアルタイム PCR による転写レベルでの発現解析の結果、 $\Delta mus-44$  株の *phr* の発現量は、PPD 表現型を示さない  $\Delta mus-43$  株と差がないことが示された。このことから、PPD 表現型の原因が、*phr* の発現低下によるものではないことが示唆されていた (未発表データ)。本章では、内在性の *phr* プロモーター、または過剰発現 *ccg-1* プロモーターの制御下で、 $3 \times$  FLAG-PHR を  $\Delta mus-44 \Delta phr$  株に異所的に導入し、光回復能が相補されるかどうか解析した。結果として、光回復能の増加は確認されなかった (図 1-2B)。これは、光回復酵素による光回復は、一般的には高速な単一酵素反応であるため (Sancar, 2000)、CPD は 60 分間の可視光照射後に完全に除去されているためであると考えられる。すなわち、これらの結果は、 $\Delta mus-44$  株が示す PPD 表現型は、PHR の発現量の低下によるものではないことを示唆している。

出芽酵母において、光回復酵素 Phr1 が NER 関連タンパク質 Rad2 と協調して NER に関与しているという報告がある (Sancar and Smith, 1989)。このため、アカパンカビにおいても MUS-44 と PHR が同じ経路で機能する可能性が考えられた。その場合、異なる生物の光回復酵素による光回復は正常に行われると考えられる。そのため、次に *EcPhr* による光回復能を解析した。しかし、 $\Delta mus-44$  株の光回復能は、*EcPhr* 発現によっても増加しなかった (図 1-3C)。この結果は、アカパンカビ PHR は独立して機能しており、*mus-44* 欠損による光回復能の異常は、PHR の機能低下によって引き起こされるものではないことを示唆している。

アカパンカビ PHR は CPD を特異的に修復する光回復酵素であり、6-4PP を特異的に修復する酵素は保持していない (Shimura et al., 1999)。それに対して、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*)、シロイヌナズナなどの一部の生物には 6-4PP 光回復酵素の存在が確認されている (Todo et al., 1993, 1997; Nakajima et al., 1998)。本章では、シロイヌナズナの AtUVR3 を用いることで、 $\Delta mus-44$  株の光回復能が相補されるか解析した。導入した株において AtUVR3 の発現が確認され、 $\Delta phr$  株ではわずかに光回復後の生存率が上昇した (図 1-4A)。そのため、アカパンカビにおいて AtUVR3 が機能することが確認された。もし PPD 表現型の原因が 6-4PP であるならば、 $\Delta mus-44$  株で AtUVR3 を発現させた場合の光回復能は野生株と同程度になると考えられる。しかし、相加的な光回復能の増加はほとんど見られなかった (図 1-4C)。ヒト細胞において、UVB による損傷は、CPD が 6-4PP の約 5 倍であるという報告がある (Lo et al., 2005)。実際シロイヌナズナにおいても、CPD 光回復酵素である *uvr2* 変異体よりも、*uvr3* 変異体の方が、紫外線照射及び光回復処理後の感受性が低い (Jiang et al., 1997)。これらの結果から、PPD 表現型の原因は 6-4PP ではないと考えられる。

最後に、 $\Delta mus-44$  株は、野生株や  $\Delta mus-43$  株と異なり高い線量率の紫外線によって、より高い感受性を示すことを明らかにした (図 1-5)。出芽酵母とは異なり、アカパンカビと分裂酵母には紫外線損傷特異的除去修復酵素 (*mus-18* または UVDE) があり、NER と独立して紫外線損傷を特異的に修復する経路が存在する (Yasui and McCready, 1998)。出芽酵母の NER 変異株は、わずか  $10 \text{ J/m}^2$  の紫外線で 0.1%未満の生存率となるような高感受性を示す (Guzder et al., 2006)。一方で、所属研究室等の先行研究において、MUS-18 がピリミジン二量体の修復に大きく寄与する

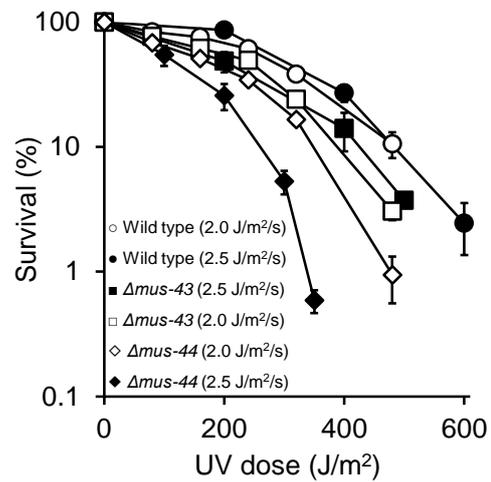


図 1-5. 異なる線量率での紫外線感受性

図 1-1 と同様に実施した。ただし、線量率は 2.0 及び 2.5  $\text{J/m}^2/\text{s}$  の 2 通りで行った。エラーバーは、3 回以上の独立した実験のデータから計算した標準誤差を示す。

ために、アカパンカビの NER 変異株は紫外線に対して比較的穏やかな感受性であることが示された (Hatakeyama et al., 1998; Sato et al., 2008)。すなわち、PPD がアカパンカビに特有の表現型であることを考慮すると、その原因は特に高線量の紫外線照射によって引き起こされるピリミジン二量体以外の DNA 損傷である可能性がある。自然界では、太陽光からの紫外線は、 $0.0017 \text{ J/m}^2/\text{s}$  といった穏やかな線量率である (Callegari and Kelly, 2006)。一方、実験条件下では、高線量率の紫外線が短時間で照射される。そのような急性的な照射では、高頻度でピリミジン二量体以外の損傷を誘発することが考えられる (Rastogi et al., 2010)。MUS-44 はこれらの損傷の修復に関与する可能性があるため、紫外線照射後に見かけ上の光回復能の低下が生じていることが考えられる。

結論として、本章では PPD 表現型を示す株の 1 つである  $\Delta mus-44$  株において、PPD 表現型が PHR の過剰発現によって相補されないことを示した。さらに、EcPhr や AtUVR3 といった異種生物の光回復酵素の強制発現によっても、 $\Delta mus-44$  株の PPD 表現型を相補できなかった。これらの結果は、PPD 表現型が、紫外線照射によって誘発される主要な DNA 損傷である CPD と 6-4PP の 2 種類のピリミジン二量体によって生じるものではないことを強く示唆している。

## 第二章 *mus-38* 及び *mus-44* の機能分離変異株の樹立

XPF-ERCC1 ヘテロ二量体は 3' flap 構造特異的なエンドヌクレアーゼとして NER などの様々な DNA 修復経路に関与する。アカパンカビにおけるホモログである MUS-38 と MUS-44 では生化学的な解析はされていないが、遺伝学的な解析から XPF-ERCC1 と同様に機能すると考えられている。第一章では、 $\Delta mus-44$  株の PPD 表現型の原因が、紫外線照射によって誘発される主要な DNA 損傷である CPD 及び 6-4PP の修復能低下によるものではない可能性を示した。NER 関連遺伝子である XPA ホモログ *mus-43* 遺伝子の KO 株では PPD 表現型が見られないことから、 $\Delta mus-38$  や  $\Delta mus-44$  株で見られる PPD 表現型の原因は、NER 以外の機能欠損による可能性が挙げられた。

本章では、まず  $\Delta mus-44$  株の変異原感受性を様々な薬剤を用いて解析した。その結果、ICL 剤に感受性を示すことを明らかにし、アカパンカビにおいても MUS-38/MUS-44 が ICL 修復経路で機能していることが示唆された。次に、XPF と ERCC1 の先行研究をもとに、*mus-38* 及び *mus-44* の NER と ICL 修復における機能分離変異株の樹立を試みた。樹立した変異株の変異原感受性を解析することで、MUS-38/MUS-44 が保持する、XPF-ERCC1 と共通及び異なる機能を明らかにした。

### 結果

#### $\Delta mus-44$ 株は ICL 剤に感受性を示す

*mus-44* 遺伝子は NER に関与するが、他の修復系への関与に関しては報告がない。しかし、他の生物のホモログ遺伝子では様々な修復経路に関与することが知られている。そのため、 $\Delta mus-44$  株の変異原感受性を様々な薬剤を用いて解析することで、*mus-44* の NER 以外への関与を解析した。4NQO は DNA にかさ高い付加物を生じさせることで DNA 二重らせんの歪みを引き起こす。DEO は DNA 鎖間に共有結合性の架橋を形成する ICL 剤である。Bleomycin (BLM) は DSB を引き起こす。Camptothecin (CPT) はトポイソメラーゼ I の阻害剤として DNA-タンパク質間架橋 (DNA-protein crosslink, DPC) 及び一本鎖切断を引き起こす。Methyl methanesulfonate (MMS) は DNA のアルキル化を引き起こす。

Hydroxyurea (HU) は細胞中の dNTP を枯渇させることで複製を阻害する。 $\Delta mus-44$  株は、4NQO と DEO に感受性を示した (図 2-1)。これまでに  $\Delta mus-44$  株が 4NQO に対して感受性を示す報告はあったが、DEO のような ICL 剤に対して感受性を示すことは報告されていなかった (Sato et al., 2008)。このことから、MUS-44 が新たに ICL 修復経路に関与することが示唆された。

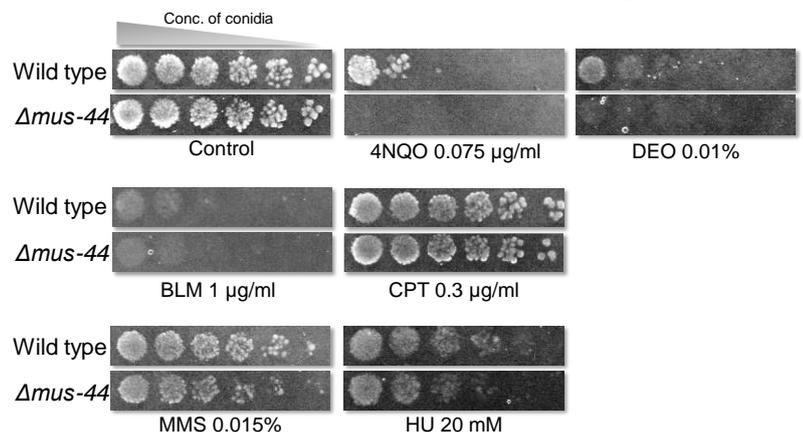


図 2-1.  $\Delta mus-44$  株の様々な変異原感受性

コニディア懸濁液 ( $1 \times 10^6$  個/ml から 1/4 ずつ希釈) 10  $\mu$ l を、図に示した薬剤を含むコロニー形成培地にスポットして 2 日間培養した。

#### MUS-38/MUS-44 は NER 非依存的に ICL 修復機構に関与する

MUS-38 及び MUS-44 はヘテロ二量体を形成することで、3' flap 構造特異的なエンドヌクレアーゼとして機能することが他種生物のホモログの先行研究から予想されている。 $\Delta mus-44$  株が ICL 剤に感受性を示したことから、MUS-38 が MUS-44 とのヘテロ二量体として ICL 修復に関与することが考えられる。MUS-38/MUS-44 の ICL 修復への関与が NER 依存的か非依存的かを明らか

にするため、 $\Delta mus-40$  及び  $\Delta mus-43$  株と感受性を比較した。 $mus-40$  及び  $mus-43$  遺伝子は、それぞれ NER に必須の遺伝子である XPA と XPG のホモログとして同定された (Hatakeyama, 1998; Sato et al., 2008)。これら 4 つの遺伝子欠損株の 4NQO に対する感受性は同程度であったため、これらの遺伝子が NER に同等に関与することが示された (図 2-2)。Cisplatin や DEO といった ICL 剤に対しては、 $\Delta mus-38$  及び  $\Delta mus-44$  株が  $\Delta mus-40$  及び  $\Delta mus-43$  株と比べて高感受性を示した。これらのことから、MUS-38/MUS-44 は NER とは独立した別の経路で ICL 修復に関与することが示された。

次に、これらの株の変異原感受性を定量的に解析した。紫外線に対しては、 $\Delta mus-38$  及び  $\Delta mus-44$  株は  $\Delta mus-43$  株に比べて高い感受性を示した (図 2-3A)。スポットテスト同様に、4NQO に対してはこれらの株の感受性は同程度であった (図 2-3B)。Cisplatin の感受性は急性処理と慢性処理の 2 通りの方法で行った。スポットテスト同様に培地中に直接薬剤を混ぜて処理する慢性処理では、 $\Delta mus-38$  及び  $\Delta mus-44$  株が  $\Delta mus-40$  及び  $\Delta mus-43$  株に対して高感受性を示した (図 2-3C)。一方で、コニディア懸濁液中で一時的に処理する急性処理では、慢性処理で見られるほどの大きな感受性の差は示さなかった (図 2-3D)。

### **mus-38 及び mus-44 の機能分離変異株の樹立**

アカパンカビの MUS-38/MUS-44 が哺乳類のホモログである XPF-ERCC1 と同様に、NER 非依存的に ICL 修復に関与することが示唆された。そこで、MUS-38/MUS-44 の機能を詳細に解析するため、site-directed mutagenesis によってアミノ酸を置換し、NER と ICL 修復における機能分離変異株の樹立を試みた。図 2-4A

に、これまでに明らかになっている XPF-ERCC1 の機能ドメインとタンパク質結合領域の概略図を示す (McNeil and Melton, 2012)。表 2-1 に、このモデルを参考に導入した変異と、欠損が予想される修復経路を示す。FA 患者から同定された XPF の R689S 変異及び、乳がん患者から同定された S786F 変異は、ICL 修復に欠損を示すが NER 活性は正常である (Bogliolo et al., 2013; Osorio et al., 2013)。これらの情報に基づいて、ICL 修復欠損の機能分離を予想して、アカパンカビにおいて同様の変異となる  $mus-38$  の R719S と S824F 変異株を作製した (表 2-1)。チャイニーズハムスター卵巣 (Chinese hamster ovary, CHO) の細胞系列 43-3B は、ERCC1 の V98E 変異が XPA との相互作用が欠損することにより NER に欠損を示す (Hayashi et al., 1998)。また、構造解析によりヒト ERCC1 の N110 と Y145 が XPA との結合に関与し、N110A/Y145A 二重変

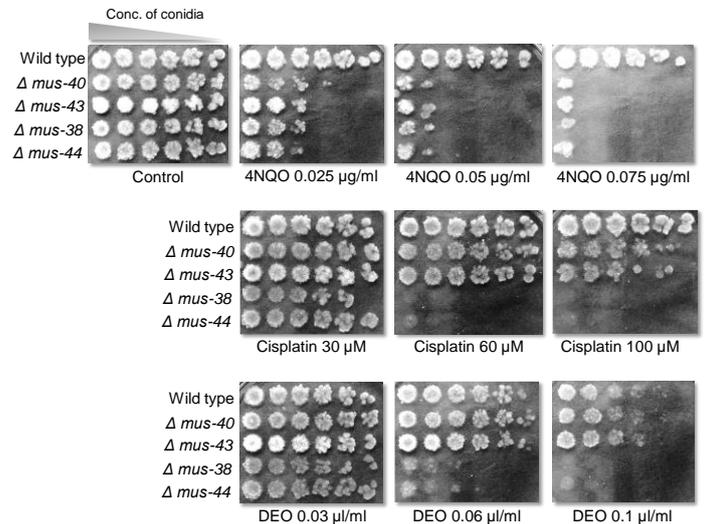


図 2-2. NER 関連遺伝子 KO 株の変異原感受性の比較  
図 2-1 と同様に行った。

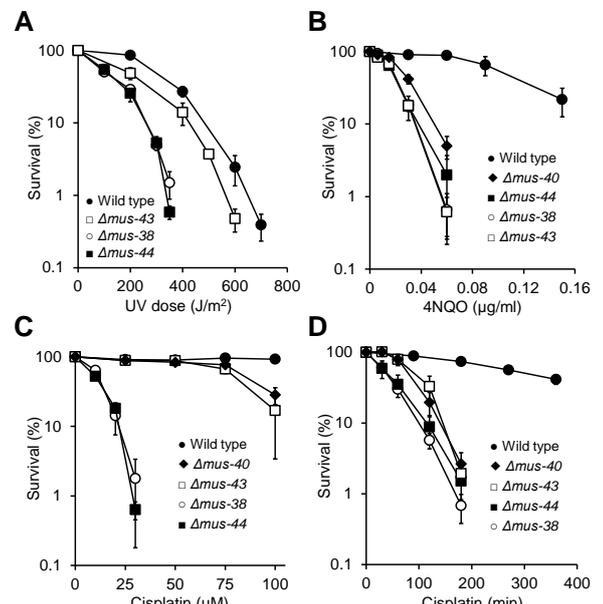


図 2-3. NER 関連遺伝子 KO 株の定量的な変異原感受性  
(A) 紫外線感受性 コニディア懸濁液に 2.5 J/m<sup>2</sup>/s の線量率で異なる時間紫外線照射した後、培地に撒いた。(B) 4NQO 感受性 コニディア懸濁液に異なる濃度の 4NQO を加えて 1 時間振盪後、培地に撒いた。(C) 慢性処理による Cisplatin 感受性 培地中に直接 Cisplatin とコニディアを加えて培養した。(D) 急性処理による Cisplatin 感受性 コニディア懸濁液に Cisplatin (最終濃度 1,000 µM) を加えて振盪し、経時的にサンプリングして培地に撒いた。2 日間の培養後、各シャーレのコロニーを数えた。エラーバーは、3 回以上の独立した実験のデータから計算した標準誤差を示す。

異細胞が NER にのみ欠損を示すことが明らかとなっている (Orelli et al., 2010)。そのため、NER 欠損の機能分離を予想して、アカパンカビにおいて同様の変異となる *mus-44* の V89E と N96A/Y131A 変異株を作製した (表 2-1)。ヒト ERCC1 は、FANCG や MSH2 と相互作用して ICL 修復に関与する報告がある (Lan et al., 2004; Wang and Lambert, 2010)。これらの予想結合領域の重複した領域の中で生物間で保存されているアミノ酸を 3 つ選択した (図 2-4B)。これらのアミノ酸置換による ICL 修復欠損の機能分離を予想して、K174E, L185R, A192R 変異を導入した (表 2-1)。それぞれ PCR 法による遺伝子ターゲティングの確認後、野生株と戻し交雑を行って子孫株を取得した。

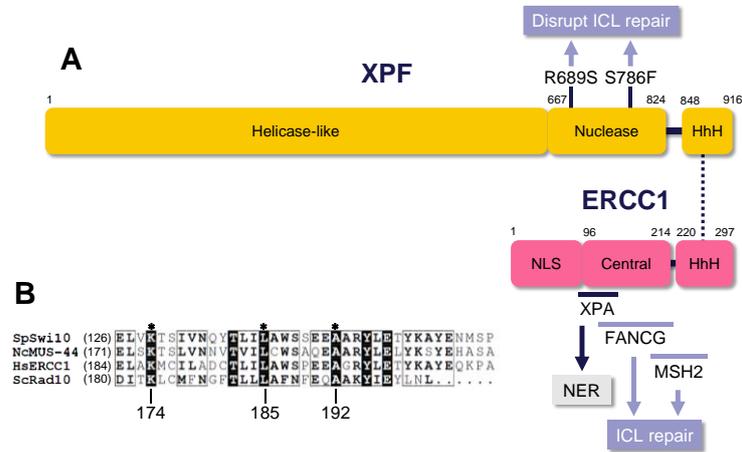


図 2-4. XPF-ERCC1 の機能ドメイン及びタンパク質結合領域 (A) XPF-ERCC1 ヘテロ二量体の概略図 (B) ERCC1 における FANCG と MSH2 の重複した結合領域の生物間での比較 アスタリスクは本章で変異導入したアミノ酸を示す。下側の数字は MUS-44 に対するアミノ酸番号を示す。Sp, *Schizosaccharomyces pombe*; Nc, *Neurospora crassa*; Hs, *Homo sapiens*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*

### mus-38 機能分離変異株の解析

樹立した *mus-38* 変異株の紫外線, 4NQO, Cisplatin, DEO の感受性を解析することで、変異タンパク質が示す NER と ICL 修復への寄与を確認した。紫外線に対しては、*mus-38*<sup>R719S</sup> 変異株が  $\Delta$ *mus-43* 株と同程度の穏やかな感受性を示した (図 2-5A)。また、4NQO に対しては、*mus-38*<sup>R719S</sup> 変異株が  $\Delta$ *mus-38* や  $\Delta$ *mus-43* 株に近い高感受性を示した (図 2-5B)。急性処理による Cisplatin 感受性試験では、*mus-38*<sup>R719S</sup> 変異株が  $\Delta$ *mus-38* や  $\Delta$ *mus-43* 株よりも低い比較的穏やかな感受性を示した (図 2-5C)。スポットテスト (慢性処理) による Cisplatin 及び DEO の感受性試験では、*mus-38*<sup>R719S</sup> 変異株が  $\Delta$ *mus-43* 株に近い感受性を示した (図 2-5D)。*mus-38*<sup>S824F</sup> 変異株はいずれの変異原にも感受性を示さなかった。これらの結果より、ICL 修復欠損の機能分離を予想した *mus-38*<sup>R719S</sup> 及び *mus-38*<sup>S824F</sup> 変異株は XPF の同様の変異とは異なる性質であり、意外なことに *mus-38*<sup>R719S</sup> 変異株は逆に NER 欠損型の機能分離株であることが示された。

表 2-1. 作製した変異株

遺伝子	導入した変異	予想される欠損
<i>mus-38</i>	R719S	ICL repair
	S824F	ICL repair
<i>mus-44</i>	V89E	NER
	N96A/Y131A	NER
	K174E	ICL repair
	L185R	ICL repair
	A192R	ICL repair

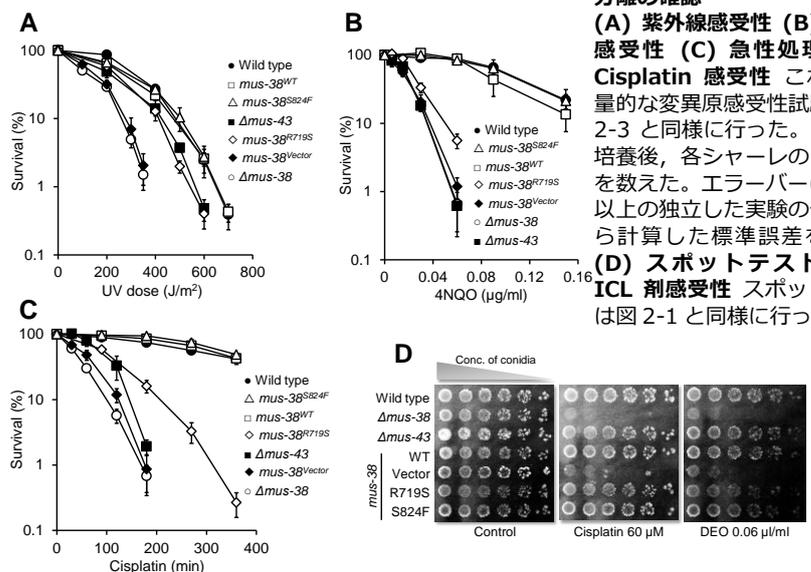


図 2-5. *mus-38* 変異株の機能分離の確認 (A) 紫外線感受性 (B) 4NQO 感受性 (C) 急性処理による Cisplatin 感受性 これらの定量的な変異原感受性試験は、図 2-3 と同様に行った。2 日間の培養後、各シャーレのコロニーを数えた。エラーバーは、3 回以上の独立した実験のデータから計算した標準誤差を示す。(D) スポットテストによる ICL 剤感受性 スポットテストは図 2-1 と同様に行った。

### mus-44 機能分離変異株の解析

次に、*mus-44* 変異株の変異原感受性を同様に解析した。紫外線に対しては、*mus-44*<sup>K174E</sup> 及び *mus-44*<sup>L185R</sup> 変異株は感受性を示さなかったのに対して (図 2-6A)、*mus-44*<sup>V89E</sup> 及び *mus-44*<sup>N96A/Y131A</sup> 変異株は  $\Delta$ *mus-43* と同程度の穏やかな感受性を示した (図 2-6B)。また、*mus-44*<sup>A192R</sup>

変異株はこれらに比べてさらに高い感受性を示した (図 2-6B)。4NQO に対しては, *mus-44*<sup>K174E</sup> 及び *mus-44*<sup>L185R</sup> 変異株は弱い感受性を示し (図 2-6C), *mus-44*<sup>V89E</sup>, *mus-44*<sup>N96A/Y131A</sup> 及び *mus-44*<sup>A192R</sup> 変異株は比較的高い感受性を示した (図 2-6D)。急性処理による Cisplatin 感受性試験では, *mus-44*<sup>K174E</sup> 変異株は感受性を示さず, *mus-44*<sup>L185R</sup> 変異株は穏やかな感受性を示した (図 2-6E)。また, *mus-44*<sup>N96A/Y131A</sup> 変異株も穏やかな感受性を示したが, *mus-44*<sup>V89E</sup> 及び *mus-44*<sup>A192R</sup> 変異株は比較的高い感受性を示した (図 2-6F)。急性処理とは異なり, スポットテスト (慢性処理) による Cisplatin 及び DEO の感受性試験では, *mus-44*<sup>V89E</sup> 及び *mus-44*<sup>A192R</sup> 変異株は  $\Delta$ *mus-43* 株よりも高い感受性を示した (図 2-6G)。これらの結果より, *mus-44*<sup>N96A/Y131A</sup> 変異株が NER 欠損型の機能分離株, *mus-44*<sup>V89E</sup> 及び *mus-44*<sup>A192R</sup> 変異株が NER と ICL 修復どちらにも欠損を示す KO 型に近い表現型であることが示された。

導入コンストラクトには *mus-44* の N 末端に 3 × FLAG タグをつけている。そのため, 抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより細胞内タンパク質量の解析を行った (図 2-7)。その結果, 変異型 MUS-44 のタンパク質量は野生型に比べて低く, N96A/Y131A 及び K174E 変異ではわずかに検出できたが, V89E, L185R 及び A192R 変異では検出ができなかった (図 2-7)。

### 考察

本章ではアカパンカビにおける XPF 及び ERCC1 ホモログである *mus-38* 及び *mus-44* の遺伝学的な解析を行うことで, MUS-38/MUS-44 ヘテロ二量体の DNA 修復における詳細な機能を明らかにしようと試みた。 $\Delta$ *mus-44* 株の変異原感受性を網羅的に解析したところ, ICL 剤である DEO に感受性を示し, MUS-38/MUS-44 が ICL 修復に関与することが示された。さらにその関与が XPF-ERCC1 と同様に NER 非依存的であることが明らかとなった。この結果を受けて, XPF-ERCC1 の先行研究をもと

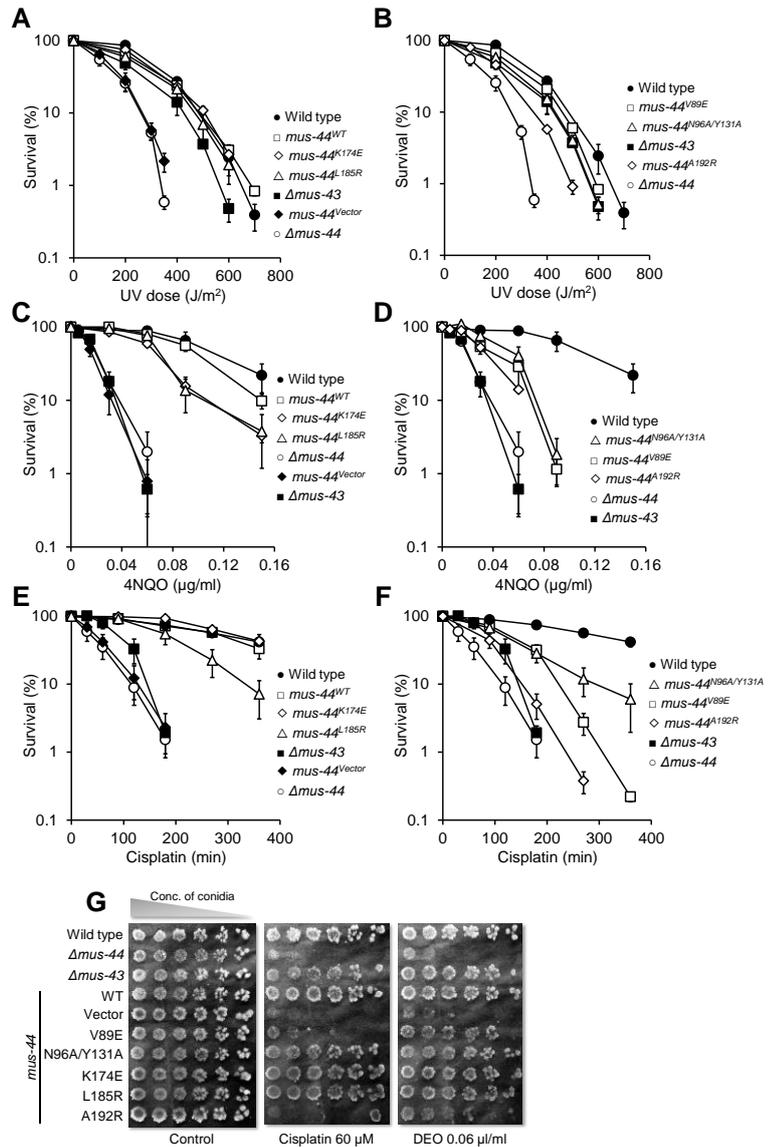


図 2-6. *mus-44* 変異株の機能分離の確認 (A 及び B) 紫外線感受性 (C 及び D) 4NQO 感受性 (E 及び F) 急性処理による Cisplatin 感受性 これらの定量的な変異原感受性試験は, 図 2-3 と同様に行った。2 日間の培養後, 各シャーレのコロニーを数えた。エラーバーは, 3 回以上の独立した実験のデータから計算した標準誤差を示す。(G) スポットテストによる ICL 剤感受性 スポットテストは図 2-1 と同様に行った。

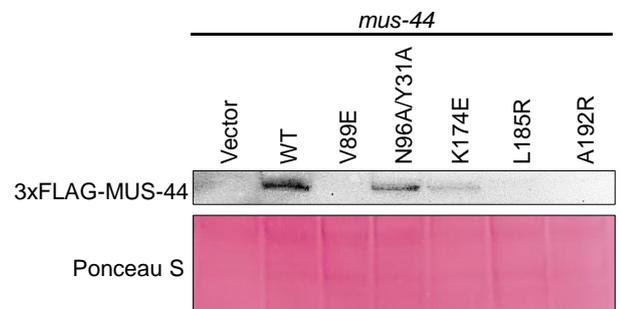


図 2-7. MUS-44 タンパク質の発現量解析 液体最少培地で培養した菌糸からタンパク質を抽出し, ウエスタンブロッティングによって 3 × FLAG-MUS-44 の検出を行った。Ponceau S 染色をローディングコントロールとして示す。

に、アミノ酸置換による NER と ICL 修復に対する機能分離変異株の樹立を行うことで、MUS-38/MUS-44 のタンパク質レベルでの機能を予測しようと試みた。その結果、NER 欠損型の機能分離変異株は樹立できたものの、ICL 修復欠損型の機能分離変異株は樹立できなかった。これらの結果は、MUS-38/MUS-44 が XPF-ERCC1 と共通の機能と異なる機能を持つ可能性を示唆している。

第一章で  $\Delta mus-44$  株が示す PPD 表現型が、NER 以外の修復経路の欠損によって生じている可能性が示されたが、これまで *mus-44* の NER 以外への関与は報告されていなかった。NER は DNA 二重らせんに歪みを生じさせるような損傷を対象とした DNA 修復経路である。そのため NER を欠損した細胞は、ピリミジン二量体を引き起こす紫外線や、かさ高い塩基付加物である 8-hydroxydeoxy-guanosine を生じさせる 4NQO に感受性となることが知られている (Arima et al., 2006; Friedberg et al., 2006)。 *mus-44* 変異株においても、これらの変異原に感受性であることが示されている (Sato et al., 2008)。本研究で用いた  $\Delta mus-44$  株も同様に 4NQO に感受性を示したことから、 $\Delta mus-44$  株は NER が欠損していることが示された (図 2-1)。これらに加えて  $\Delta mus-44$  株が DEO に感受性を示すことを明らかにした (図 2-1)。DEO は 5'-GNC 配列上で ICL を引き起こす ICL 剤であることから (Yunes et al., 1996)、この修復に MUS-44 が関与することが考えられる。一方で、DSB を引き起こす BLM には感受性を示さなかった。MMS は *in vivo* では DSB を引き起こさないという報告があるが、HR に欠損をもつ細胞は感受性を示す (Lundin et al., 2005)。XPF-ERCC1 は様々な修復経路に関わるヌクレアーゼであり、HR や BER に関与するという報告はあるが (Friedberg et al., 2006)、多くの生物で表現型にはほとんど現れない。アカパンカビでも BLM と MMS には感受性を示さなかったことから、たとえ HR に関与していたとしても、その寄与は小さいものであることが考えられる。CPT は DPC 及び DNA 一本鎖切断も引き起こし、HU は複製ストレスを引き起こす薬剤であるが、 $\Delta mus-44$  株のこれらに対する感受性は見られなかった。これらの結果と以前の報告をあわせると、MUS-38/MUS-44 は主に NER と ICL 修復の二つの修復経路に関与していることが考えられる。

XPA ホモログ *mus-43* 及び、XPG ホモログ *mus-40* の KO 株は、 $\Delta mus-38$  及び  $\Delta mus-44$  株と同程度の 4NQO 感受性を示したことから、アカパンカビにおいてこれらの遺伝子は NER に同等に寄与していることが示された (図 2-2)。しかし、ICL 剤である Cisplatin 及び DEO に対しては、 $\Delta mus-38$  及び  $\Delta mus-44$  株が  $\Delta mus-40$  及び  $\Delta mus-43$  株に比べて高感受性を示した (図 2-2)。これらの結果から、MUS-38/MUS-44 は XPF-ERCC1 同様に NER 非依存的に ICL 修復に関与することが示された。紫外線に対する定量的な感受性試験を行ったところ、 $\Delta mus-43$  株に比べて  $\Delta mus-38$  及び  $\Delta mus-44$  株はより高い感受性を示した (図 2-3A)。ヒト培養細胞や出芽酵母では、これらの NER 欠損株間での紫外線に対する感受性の違いは見られない。紫外線によって生じる主な損傷であるピリミジン二量体は NER によって修復される損傷であるが、アカパンカビのように紫外線に抵抗性を示す生物では、他生物とは異なり実験条件では高線量の紫外線を照射する必要がある。これまでのデータとあわせると、高線量の紫外線による損傷の影響はピリミジン二量体よりも ICL の方が高くなり、それゆえに  $\Delta mus-38$  及び  $\Delta mus-44$  株の高感受性が表現型として見られるのだと考えられる。

コニディア懸濁液中での一時的な急性処理による Cisplatin に対しては NER 欠損株間での感受性の違いはほとんど見られなかったが (図 2-5D)、培地中に直接薬剤を加えて細胞増殖の過程で穏やかな損傷を与え続ける慢性処理では  $\Delta mus-38$  及び  $\Delta mus-44$  株が他の NER 欠損株に比べ顕著な感受性を示した (図 2-5C)。この違いはおそらく、細胞周期によって ICL 修復の様式が異なるためであると思われる。出芽酵母では XPA ホモログである *RAD14* と、XPF ホモログである *RAD1* の KO 株は、すべての細胞周期で ICL 剤に同様の感受性を示す (Seol et al., 2018)。しかし、哺

乳類における XPF-ERCC1 は、複製と共役した ICL 修復機構である FA 経路に、NER 非依存的に関与することが知られている (Schärer, 2017)。コニディアは、形成されてから栄養環境に飛散して増殖を開始するまでは休眠期であり、DNA 複製が停止している状態である。急性処理ではほとんどの細胞がこの状態で一時的に損傷を受けていると考え、複製と非共役的な ICL 修復に NER が大きく関与しており、これによって感受性に差が生じなかったことが考えられる。一方で、培地中で細胞増殖と同時に損傷を与え続ける慢性処理では、複製と共役した ICL 修復が機能することから、これに関与する MUS-38/MUS-44 が欠損した株では高感受性を示したのだと考えられる。最近、出芽酵母においても Rad1-Rad10 が NER 非依存的に複製と共役した ICL 修復に関与する可能性が示唆されたが、*rad1* の単独欠損では他の NER 欠損株と表現型では差が見られないことから、細胞増殖が活発に行われている酵母細胞でさえも、ICL 修復の寄与には NER が大半を占めていると考えられている (Seol et al., 2018)。まとめると、アカパンカビには MUS-38/MUS-44 が関与する NER 非依存的な複製共役型 ICL 修復経路が存在し、下等真核生物には存在しないとされてきた FA 経路に類似する修復機構が存在する可能性があると考えられる。

本研究で樹立して解析した *mus-38* 及び *mus-44* 変異株の変異原感受性のプロファイルを表 2-2 にまとめた。ICL 修復機構に欠損を示すと予想した *mus-38*<sup>R719S</sup> 及び *mus-38*<sup>S824F</sup> 変異株は、生物種間で保存されているアミノ酸にも関わらず、XPF の同様の変異とは異なる表現型を示した (図 2-5)。これらの変異領域は、どちらもヌクレアーゼドメインに含まれる (図 2-4A)。そのため、NER 及び ICL 修復における基質 DNA の結合様式及び切断が MUS-38 と XPF では異なると考えられる。特に、*mus-38*<sup>R719S</sup> 変異株が NER 欠損型の機能分離を示したことは興味深い結果であった。ICL 修復において XPF-ERCC1 の足場タンパク質として機能する SLX4 の機能ホモログは、アカパンカビではこれまでに報告がなかった。出芽酵母や分裂酵母においては報告があるものの、相同性は低い上に、*slx4* の KO 株は ICL 剤にほとんど感受性を示さない (Coulon et al., 2004; Seol et al., 2018)。これらのことから、SLX4 により調節される XPF-ERCC1 の ICL 切断活性は生物種間で異なるため、ICL 修復に欠損を示さなかったと考えられる。

表2-2. 本研究で取得した*mus-38*および*mus-44*変異株の変異原感受性

遺伝子	変異	紫外線感受性	4NQO感受性	DEO感受性	Cisplatin感受性	
					急性処理	慢性処理
<i>mus-38</i>	R719S	+	++	-	+	-
	S824F	-	-	-	-	-
<i>mus-44</i>	V89E	+	+	+	+	+
	N96A/Y131A	+	-	-	-	-
	K174E	-	+	-	+	-
	L185R	-	+	-	+	-
	A192R	+	++	++	++	++

NER における XPF-ERCC1 の機能は、足場タンパク質である XPA によって調節される。NER が生物間で高度に保存されている修復系であり、MUS-43 と XPA のアミノ酸配列の相同性も高いため、NER 欠損型の機能分離を示した *mus-44*<sup>N96A/Y131A</sup> 変異株 (図 2-6) は、ヒト *ERCC1* における報告と同様に MUS-43 との相互作用に欠損が生じていると考えられる。一方で、同じく NER に欠損を持つと予想した *mus-44*<sup>V89E</sup> 変異株は ICL 剤にも比較的穏やかな感受性を示した (図 2-6G)。CHO 細胞の *ERCC1*<sup>V98E</sup> 変異株が XPA との相互作用を失うために NER に欠損を示すと報告されたが (Hayashi et al., 1998)、Cisplatin によるアポトーシスが高頻度で起こるという報告もあるため (Dunkern et al., 2001)、おそらく XPA (MUS-43) との相互作用だけでなく他の機能にも影響が生じている可能性がある。ウエスタンブロッティングによる細胞内タンパク質量の解析の結果、*mus-44*<sup>V89E</sup> 変異では検出が不可能であるほど低かった (図 2-7)。ERCC1 の安定性は XPF との結合に依存していることから (Biggerstaff et al., 1993)、この低下は、変異によって MUS-38 との結合が直接的に阻害されたか、MUS-44 タンパク質自体の 3 次構造に影響が生じている可能性がある。KO 型の表現型を示した *mus-44*<sup>V89E</sup> 及び *mus-44*<sup>A192R</sup> 変異株は、急性処理による Cisplatin の感受性は  $\Delta$ *mus-43* 株よりも低かったが、スポットテスト (慢性処理) による感受性は  $\Delta$ *mus-43* 株よりも高かった (図 2-6F 及び 2-6G)。この違いは、上述のように NER と独立した ICL 修復

にも欠損が生じているためであると考えられる。ERCC1 で報告されている FANCG と MSH2 との相互作用ドメインと重複した領域から選抜した *mus-44* の K174E, L185R, A192R 変異は、いずれも ICL 修復欠損型の機能分離を示さなかった (図 2-6)。 *mus-38* と同様に、 *mus-44* においても ICL 欠損型の機能分離変異株は得られなかったため、XPF-ERCC1 で報告された ICL に欠損を示す変異やタンパク質結合ドメインは、アカパンカビにおいては保存されていないようである。 *mus-44*<sup>K174E</sup> 及び *mus-44*<sup>L185R</sup> 変異株は変異原にわずかな感受性を示し、 *mus-44*<sup>A192R</sup> 変異株は  $\Delta$ *mus-44* 株とほぼ同様の高い感受性を示した (図 2-6)。さらに、これらの変異タンパク質の細胞内レベルは極めて低いことが示された (図 2-7)。この結果は、これらのアミノ酸部位が XPF-ERCC1 の相互作用ドメインである Helix-hairpin-helix (HhH) ドメインに近いために、MUS-38 との結合に影響が生じているためであることが考えられる。これらの結果をあわせると、MUS-38/MUS-44 による ICL の修復は、NER とは対照的に XPF-ERCC1 とは異なるメカニズムによって機能していることが推測される。尚、MUS-38 のタンパク質量解析も同様にウエスタンブロッティングによって行ったが、野生型の MUS-38 ですら検出ができなかった (データは示していない)。このことから、アカパンカビでは MUS-38/MUS-44 の発現量はもともと低い可能性がある。

図 2-8 に出芽酵母、ヒト及びアカパンカビの XPF-ERCC1 ホモログの機能モデルを示す。出芽酵母における ICL の修復の大部分は、Rad1-Rad10 が Rad14 を介して NER 依存的に行っている (Biggerstaff et al., 1993)。一方で、ヒトや高等真核生物のモデルでは XPF-ERCC1 が SLX4 を介する NER 非依存的な経路で ICL 修復に関与する (Schärer, 2017)。本章における MUS-38/MUS-44 の機能解析の結果、アカパンカビでも NER 非依存的な ICL 修復機構が存在することが明らかとなり、さらに、その修復が複製と共役している可能性が示唆された。

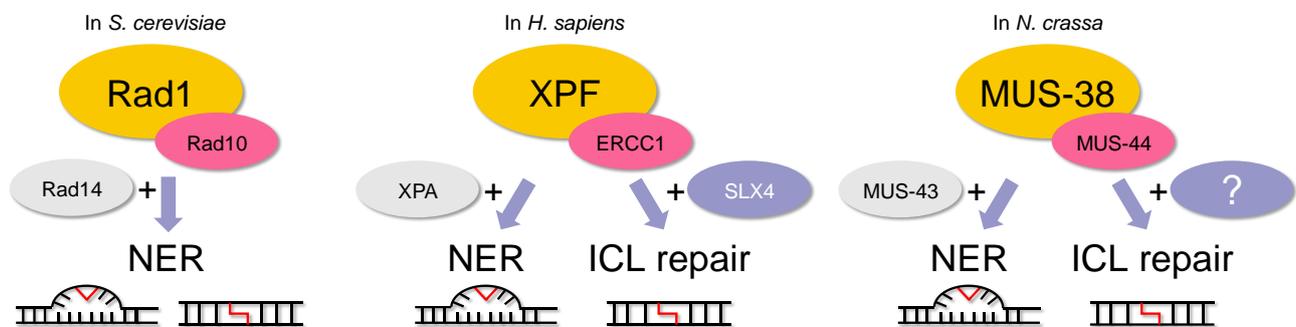


図 2-8. 真核生物間における XPF-ERCC1 ホモログの機能モデル

ヒトにおける XPF-ERCC1 は、XPA を介して NER に関与することで紫外線によって生じるピリミジンダイマーなどの DNA の同一鎖間にできる損傷の修復を行うだけでなく、NER 非依存的に SLX4 を介した ICL 修復機構にも関与する (中央)。一方、出芽酵母においては、XPF-ERCC1 ホモログ Rad1-Rad10 及び XPA ホモログ Rad14 を介する NER が、ICL 修復の大半を担う (左)。アカパンカビの XPF-ERCC1 ホモログ MUS-38/MUS-44 は、ヒトにおけるモデルと同様に、XPA ホモログ MUS-43 を介する NER とは異なる経路で ICL 修復に関与する (右)。

### 第三章 紫外線感受性株における DNA 鎖間架橋修復機構と光回復能の関連性

ICL とは DNA 二重鎖間に共有結合性の架橋が生じるような DNA 損傷であり，細胞にとっては DSB に次いで致命的な損傷となる。紫外線が引き起こす主な損傷である CPD や 6-4PP といったピリミジン二量体は DNA 鎖内架橋 (Intrastrand crosslink) であるが，紫外線による他の損傷として少ない割合で ICL も生じるという報告もある (Nejedlý et al., 2001)。第一章で PPD 表現型の原因がピリミジン二量体によるものではない可能性が示唆され，第二章で PPD 表現型を示す  $\Delta mus-38$  と  $\Delta mus-44$  株が，NER 非依存的に ICL 修復機構に関与することを示した。私はこれまでの結果を踏まえて，紫外線によって生じた ICL の修復能の低下が PPD 表現型の原因となっているのではないかと推測した。

本章では，第二章で樹立した  $mus-38$  と  $mus-44$  の機能分離変異株や，紫外線感受性を示す  $\Delta mus-18$  株の ICL 剤感受性と光回復能を解析した。さらに， $mus-18$  と NER 関連遺伝子の二重 KO 株を樹立し，低線量の紫外線照射による光回復試験を行った結果，光回復能の顕著な低下は見られなかった。また，紫外線によって生じる CPD や ICL の修復活性を直接検出した結果，PPD 表現型を示す株では CPD 修復活性に異常は示さない一方で，ICL 修復には異常が見られた。これらの結果より，PPD 表現型の原因は高線量の紫外線によって生じた ICL の修復不全によるものであり，これによって光回復能の見かけ上の低下が生じていることが明らかとなった。

### 結果

#### NER 関連遺伝子 KO 株の光回復能

NER 関連遺伝子として単離された  $mus-38$ ， $mus-43$  及び  $mus-44$  遺伝子の KO 株の光回復能を詳細に解析するために，紫外線照射後に継続的に可視光照射を行い，経時的な生存率を測定する光回復試験を行った (図 3-1)。野生株では光回復処理開始から 20 分後には大幅な生存率の上昇を示し，60 分後にはほぼ回復率が飽和したのに対して (図 3-1A)，光回復酵素をコードする  $phr$  遺伝子 KO 株では可視光照射による生存率の上昇は全く見られなかった (図 3-1B)。PPD 表現型を示すことが知られている  $\Delta mus-38$  及び  $\Delta mus-44$  株では，完全には欠損していないものの，可視光照射による生存率の上昇はわずかに見られるだけだった (図 3-1C 及び 3-1D)。一方で， $\Delta mus-43$  株の光回復能は， $\Delta mus-38$  及び  $\Delta mus-44$  株のような顕著な低下は示さなかったが，野生株ほど高くはなかった (図 3-1E)。これらの結果から，以前の報告と合わせて， $\Delta mus-38$  及び  $\Delta mus-44$  株は PPD 表現型を示すことが確認された。また， $\Delta mus-43$  株は PPD 表現型を示す株としての報告はされていないが，穏やかな光回復能の低下を示すことが確認された。

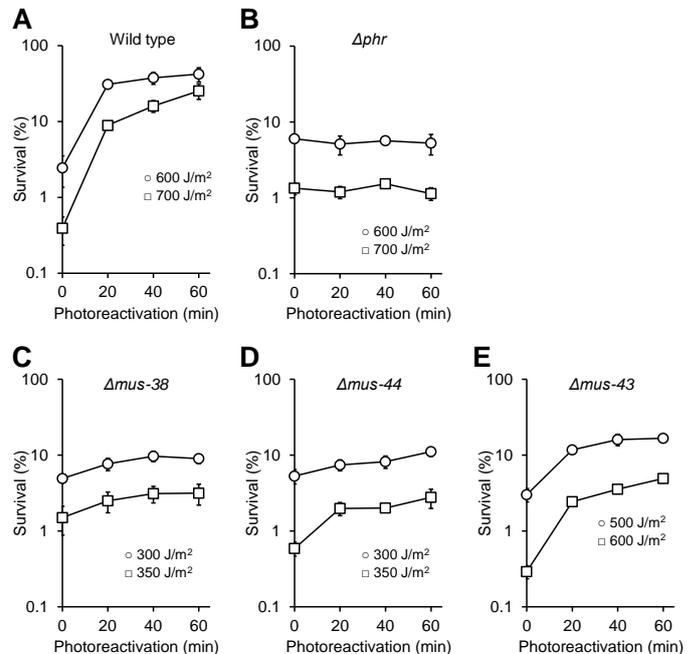


図 3-1. NER 関連遺伝子 KO 株の経時的な光回復能

(A から E) コニディア懸濁液に 2.5 J/m<sup>2</sup>/s の線量率で図中に示す線量の紫外線を照射後，継続的に可視光照射し，20，40，60 分後にサンプリングして培地に撒いた。2 日間の培養後，各シャーレのコロニーを数えた。エラーバーは，3 回以上の独立した実験のデータから計算した標準誤差を示す。

## mus-38 及び mus-44 の NER 欠損型機能分離変異株の光回復能

次に、第二章で樹立した *mus-38* 及び *mus-44* の機能分離変異株の光回復能を解析した。解析には、NER 欠損型機能分離を示す *mus-38*<sup>R719S</sup> 及び *mus-44*<sup>N96A/Y131A</sup> 変異株と、KO 型の表現型を示す *mus-44*<sup>A192R</sup> 変異株を用いた。第二章の結果と同様に、*mus-38*<sup>R719S</sup> 及び *mus-44*<sup>N96A/Y131A</sup> 変異株は 4NQO に感受性を示す一方で、Cisplatin や DEO といった ICL 剤にはほとんど感受性を示さなかった。一方で、*mus-44*<sup>A192R</sup> 変異株はこれらの変異原すべてに感受性を示した (図 3-2)。光回復試験の結果、*mus-38* 及び *mus-44* の野生型は正常な光回復能を示し (図 3-3A 及び 3-3D)、ベクターコントロール株は PPD 表現型を示した (図 3-3B 及び 3-3E)。一方で、NER 欠損型機能分離を示す *mus-38*<sup>R719S</sup> 及び *mus-44*<sup>N96A/Y131A</sup> 変異株の光回復能は大きく上昇した (図 3-3C 及び 3-3F)。しかし、KO 型の表現型を示す *mus-44*<sup>A192R</sup> 変異株の光回復能は、ベクターコントロールと同程度であった (図 3-3G)。これらの結果から、ICL 修復能の欠損が PPD 表現型の原因である可能性が示唆された。

### *Δmus-18* 株の ICL 修復及び光回復能は正常である

PPD 表現型の原因が ICL 修復能の欠損である可能性が示唆された。一方、PPD 表現型は紫外線に感受性を示す全ての株に見られるわけではないため、他の紫外線感受性株の ICL 剤感受性と光回復能を解析することでこの可能性を検証できると考えた。UVDE をコードする *mus-18* 遺伝子の変異株は紫外線に特異的に感受性を示すが、光回復能は正常である (Ishii et al., 1991)。本研究で用いた *Δmus-18* 株も紫外線に対して *Δmus-38* 株や *Δmus-44* 株と同程度の感受性を示したが (図 3-4A)、野生株に比べて光回復能は正常であった (図 3-1A 及び 3-4B)。

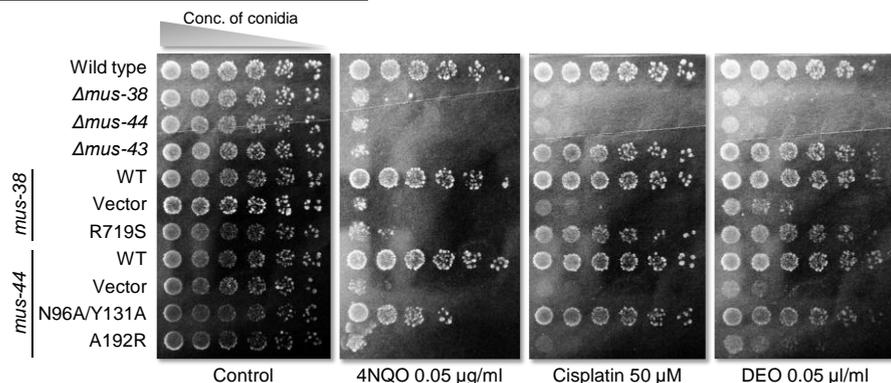


図 3-2. *mus-38* 及び *mus-44* 機能分離変異株の変異原感受性  
コニディア懸濁液 ( $1 \times 10^6$  個/ml から 1/4 ずつ希釈) 10  $\mu$ l を、図に示した薬剤を含むコロニー形成培地にスポットして 2 日間培養した。

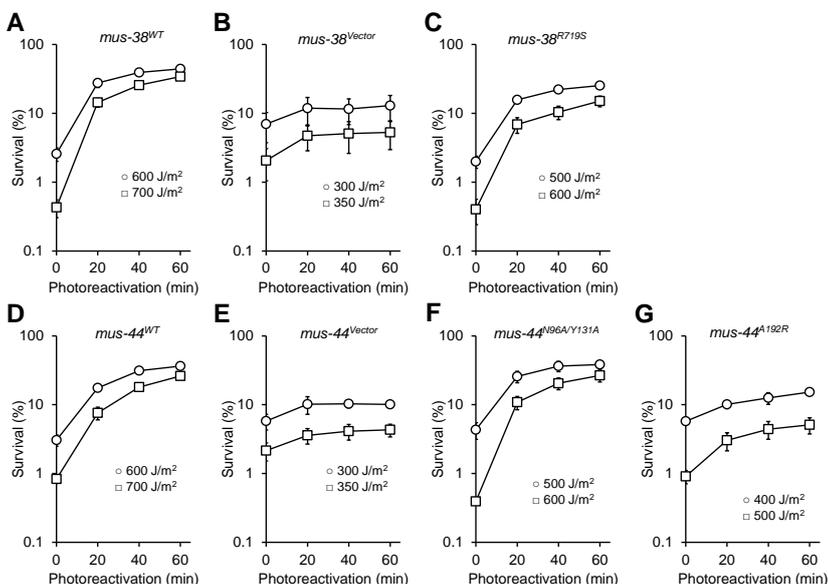


図 3-3. *mus-38* 及び *mus-44* 機能分離変異株の光回復能 (A から G) 光回復試験 図 3-1 と同様に行った。2 日間の培養後、各シャーレのコロニーを数えた。エラーバーは、3 回以上の独立した実験のデータから計算した標準誤差を示す。

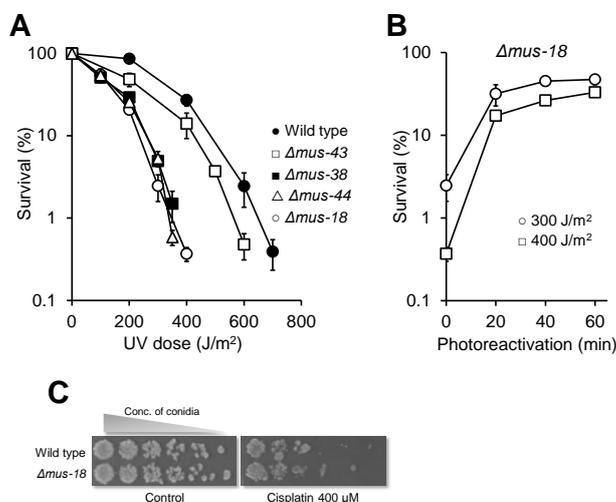


図 3-4. *Δmus-18* 株の変異原感受性と光回復能 (A) 紫外線感受性 コニディア懸濁液に 2.5 J/m<sup>2</sup>/s の線量率で異なる時間紫外線照射した後、培地に撒いた。(B) 光回復試験 図 3-1 と同様に行った。2 日間の培養後、各シャーレのコロニーを数えた。エラーバーは、3 回以上の独立した実験のデータから計算した標準誤差を示す。(C) スポットテスト 図 3-2 と同様に行った。

また, Cisplatin には感受性を示さなかった (図 3-4C)。

### 低線量の紫外線照射による光回復試験

アカパンカビは紫外線に高度に耐性を示す生物である。そのため, 実験条件では高線量の紫外線を照射する必要がある。PPD 表現型はアカパンカビ特有の表現型であることから, その原因が高線量の紫外線照射によって生じている可能性が考えられた。その可能性を検証するために, 低線量での光回復能の測定を試みた。先行研究において *mus-18* と NER 関連遺伝子の二重変異株は, ピリミジン二量体の修復が全く行えなくなり, 紫外線に高感受性を示すことが明らかとなっている (Hatakeyama et al., 1998)。そのため, 本研究でも *mus-18* と *mus-38*, *mus-43* 及び *mus-44* の二重 KO 株を樹立して解析した。これらの株は紫外線に顕著な高感受性を示した (図 3-5A)。そのため, 低線量の紫外線照射による光回復試験を行うことが可能となった。単独欠損による光回復能の低下は  $\Delta mus-38$ ,  $\Delta mus-44$  及び  $\Delta mus-43$  株で異なるにも関わらず (図 3-1C から 3-1E), これら 3 株の光回復能を測定したところ, 光回復能に差は見られなかった (図 3-5B から 3-5D)。これらの結果から, PPD 表現型は特に高線量の紫外線照射により生じることが示唆された。

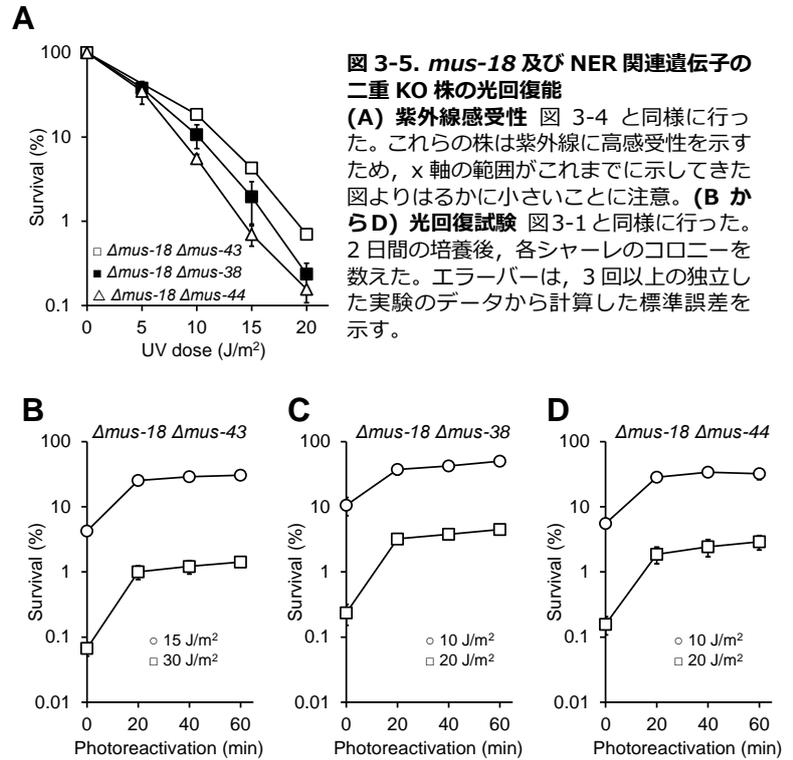


図 3-5. *mus-18* 及び NER 関連遺伝子の二重 KO 株の光回復能  
(A) 紫外線感受性 図 3-4 と同様に行った。これらの株は紫外線に高感受性を示すため, x 軸の範囲がこれまでに示してきた図よりはるかに小さいことに注意。(B から D) 光回復試験 図 3-1 と同様に行った。2 日間の培養後, 各シャーレのコロニーを数えた。エラーバーは, 3 回以上の独立した実験のデータから計算した標準誤差を示す。

### PPD 表現型を示す株の光回復による CPD 修復能は正常である

PPD 表現型の原因が ICL 修復能の低下による場合, 光回復の機能自体には影響がなく, CPD の修復は正常に行われていることになる。この仮説を検証するために, ゲノム DNA を抽出し, T4 endonuclease V 処理による光回復後の細胞内 CPD の検出を試みた。T4 endonuclease V は CPD の 5'末端のグリコシラーゼとして機能する (Nakabeppu et al., 1982)。これにより, CPD 部位にニックが入った状態でアルカリアガロースゲルによる変性条件での電気泳動を行うと泳動度が上がる。この原理を利用して, 紫外線照射後の光回復処理による CPD 修復能を測定した。野生株において  $300 \text{ J/m}^2$  の紫外線照射後のゲノム DNA は, 未照射コントロールに対して泳動度が上がったが, 60 分間の光回復処理により CPD が修復されることでコントロールと同様の泳動パターンを示した (図 3-6)。一方で,  $\Delta phr$  株では光回復処理によって泳動パターンに変化は見られなかった。さらに, これまで

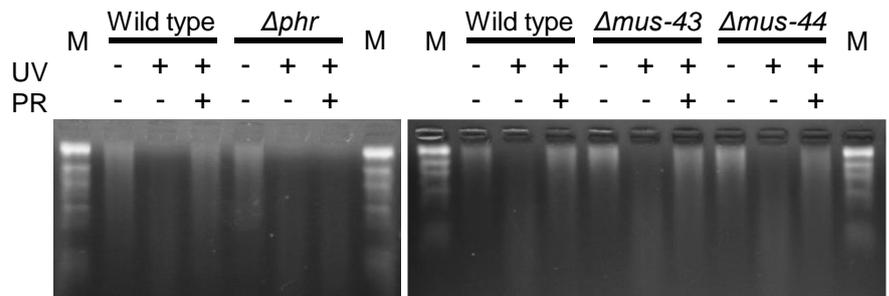
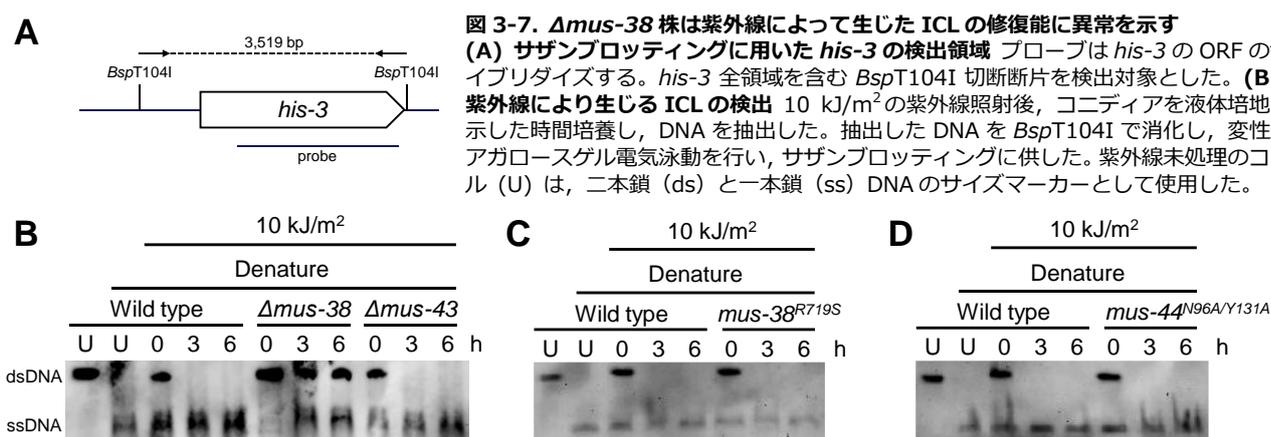


図 3-6. T4 endonuclease V による光回復後の CPD の検出  
コニディア懸濁液を  $300 \text{ J/m}^2$  の紫外線照射 (UV) 後すぐ, または 60 分間の可視光照射 (PR) 後に DNA を抽出して T4 endonuclease V で処理し, アルカリアガロースゲル電気泳動にかけて泳動パターンを比較した。M, DNA size marker ( $\lambda$  Hind III digest)

に解析してきた  $\Delta mus-43$  及び  $\Delta mus-44$  株の光回復処理による CPD 修復能は野生株と同程度であった。これらの結果から、PPD 表現型を示す株における光回復の機能自体は正常であり、表現型に現れる光回復能の低下は見かけ上のものであることが示された。

### MUS-38 は紫外線によって生じる ICL を修復する

紫外線によって ICL が生じるという報告がある (Pospíšilová and Kypr, 1997)。そのため、先行研究において報告された手法に基づきアカパンカビ *his-3* 遺伝子座における ICL の検出系を確立し、紫外線照射後の ICL 修復活性について解析を行った (Vos and Hanawalt, 1987)。コニディアからゲノム DNA を抽出して制限酵素 *BspT104I* で消化した後アガロースゲル電気泳動を行い、サザンブロッティングを行った。pMF272 に組み込まれている 5'-truncated *his-3* gene 領域をプローブに用いることで、*his-3* の ORF すべてを含む 3,519 bp の領域が検出できる (図 3-7A)。Native 条件で泳動を行った場合には二本鎖の DNA が検出されるが、変性処理を行った場合には一本鎖に解離するため泳動度が上がる (図 3-7B)。この際、検出領域内に ICL があると変性せずに二本鎖の DNA が検出される。紫外線未処理では二本鎖 DNA は検出されなかったが、10 kJ/m<sup>2</sup> の紫外線照射後 0 時間では変性条件においても二本鎖 DNA が検出された。この結果から、紫外線照射によって ICL が生じることが確認された。本実験では、生存率測定に用いた照射量の範囲 (300 J/m<sup>2</sup>) では ICL を検出することはできなかったため、高線量の紫外線を照射する必要があった (データは示していない)。ICL の修復活性を確認するために、紫外線照射後のコニディアを液体培養し 3 時間後と 6 時間後にゲノム DNA を抽出してサザンブロッティングを行った。その結果、野生株と  $\Delta mus-43$  株では 3 時間後には ICL が完全に修復されていた一方で、 $\Delta mus-38$  株においては 6 時間後にも ICL が残存していた。このことから、MUS-38 が紫外線によって生じた ICL の修復を担っていることが示された。さらに、NER 欠損型機能分離を示す *mus-38<sup>R719S</sup>* 及び *mus-44<sup>N96A/Y131A</sup>* 変異株についても同様に解析を行った結果、野生株や  $\Delta mus-43$  株と同様の結果を示した (図 3-7C 及び 3-7D)。この結果からも、MUS-38 の NER 非依存的な ICL 修復機構によって、紫外線による ICL の修復が行われることが示された。



### 考察

本章では、ICL 修復機構と PPD 表現型の関連性を解析してきた。紫外線によって誘発される DNA 損傷はピリミジン二量体が主なため、PPD 表現型の原因はピリミジン二量体の修復能に問題があるという点で議論が進められてきたが、紫外線を含め多くの変異原は生体内で多岐にわたる物質に作用し、様々な形の損傷を引き起こすため、表現型の原因を一義的に評価することは必ずしも適切ではない場合がある。私は、これまで着目されていなかった紫外線損傷として ICL に着目し、PPD 表現型を示す株が共通して ICL 剤に感受性を示すことを明らかにした。また、低線量の紫外線では高

線量の紫外線に比べると顕著な光回復能の低下は見られなかったことから、PPD 表現型がアカパンカビに特有の形質である理由として、紫外線に抵抗性を示すためであることが明らかとなった。

NER 関連遺伝子である *mus-38*, *mus-43* 及び *mus-44* の KO 株の光回復能を経時的に測定したところ、 $\Delta$ *mus-38* 株と  $\Delta$ *mus-44* 株では顕著な光回復能の低下を示し、 $\Delta$ *mus-43* 株では穏やかな低下が見られた (図 3-1)。これらの遺伝子は NER において必須の遺伝子であるために、 $\Delta$ *mus-38* 株と  $\Delta$ *mus-44* 株で見られる PPD 表現型は NER 以外の機構に欠損が生じているためであることはこれまでも論じてきた。第二章において、MUS-38/MUS-44 ヘテロ二量体が哺乳類における XPF-ERCC1 と同様に主に NER と ICL 修復の二つの経路で機能していることが示されたことから、PPD 表現型の原因が ICL 修復の機能不全であることが示唆された。一方で、 $\Delta$ *mus-43* 株は PPD 表現型を示す株としての報告はされていないが、これらの株に対して比較的穏やかな光回復能の低下を示した (図 3-1E)。MUS-43 のホモログである XPA や Rad14 は NER 以外の機能の報告はないため、 $\Delta$ *mus-43* 株が示す穏やかな光回復能の低下は NER のみの機能欠損によるものであると予想される。第二章において、 $\Delta$ *mus-38* 株と  $\Delta$ *mus-44* 株の Cisplatin 感受性は、慢性処理では  $\Delta$ *mus-40* 株と  $\Delta$ *mus-43* 株に比べて顕著であるが、急性処理ではその差がほぼ無くなることを示した。その理由として、MUS-38/MUS-44 ヘテロ二量体が NER 非依存的かつ複製共役型の ICL 修復機構に関与するためであり、さらに非増殖期における複製非共役型の ICL 修復には NER の寄与が大きいと考察した。これらの見解をあわせると、 $\Delta$ *mus-38* 株と  $\Delta$ *mus-44* 株では NER 及び NER 非依存的な ICL 修復機構に欠損があることで顕著な光回復能の低下、 $\Delta$ *mus-43* 株では NER のみが欠損することで穏やかな光回復能の低下が生じると考えられる。本研究では紫外線照射時のコニディア懸濁液には非栄養性のリン酸バッファーを使用しているが、この仮説が正しい場合、液体培地にて前培養後に紫外線照射及び光回復試験を行った場合、 $\Delta$ *mus-43* 株の光回復能は上昇することが予想される。第二章で樹立した *mus-38* 及び *mus-44* 変異株の光回復能を測定した結果、予想通り NER 欠損型機能分離を示す *mus-38*<sup>R719S</sup> 及び *mus-44*<sup>N96A/Y131A</sup> 変異株の光回復能は野生型に近かったのに対して、*mus-44*<sup>A192R</sup> 変異株はベクターコントロールに近かった (図 3-3)。これらの結果もまた、ICL 修復の機能低下と光回復の機能低下に明らかな相関があることを示している。

アカパンカビの紫外線感受性株の中で PPD 表現型を示すことが報告されている株はわずかである。 $\Delta$ *mus-18* 株は  $\Delta$ *mus-38* 株及び  $\Delta$ *mus-44* 株と同程度の紫外線感受性を示したが、光回復能は正常であり、Cisplatin に対する感受性も野生株と差がなかった (図 3-4)。MUS-18 は、生化学的な解析からピリミジン二量体の 5'側を特異的に切断する活性をもつ紫外線損傷に特異的なエンドヌクレアーゼとして機能することが明らかとなっている (Yajima et al., 1995)。すなわち、ICL の修復には関与しないため、紫外線によって生じた ICL の修復は正常に行われることで、光回復による生存率の上昇が正常に起こったのだと考えられる。先行研究で行われた ELISA による CPD と 6-4PP の修復能の定量的な解析により、MUS-18 がこれらの修復の大部分を担っていることが示されたことから (Sato et al., 2008)、ICL 修復に関与しないのにも関わらず  $\Delta$ *mus-38* 株及び  $\Delta$ *mus-44* 株と同程度の高い感受性を示した理由を説明できるであろう。逆に言えば、MUS-38/MUS-44 の紫外線による ICL の修復に対する寄与が、細胞の生存に極めて重要であることが、これらのデータによって示されたことになる。

紫外線と同様に、Cisplatin は ICL だけではなく様々な形の DNA 損傷を引き起こす。実際、Cisplatin では細胞内で形成される損傷の 90%は DNA 鎖内架橋であり、ICL はわずか 5%程度しか形成されない (Brabec and Kasparkova, 2002)。しかしながら、細胞にとっての致死性は ICL の方が大きいため、Cisplatin を含む ICL 剤の効果は、形成された ICL の影響が他の損傷よりも大きい (Lehoczký et al., 2007)。Cisplatin によって引き起こされる DNA 鎖内架橋は、紫外線によ

るピリミジン二量体と同様に NER で修復されると考えられるが、他の共通した損傷としては DNA とタンパク質間で生じる架橋である DPC が挙げられる。PPD 表現型の原因として ICL と同様に DPC の影響も考えられたが、第二章で  $\Delta mus-44$  株が DPC を引き起こす Camptothecin に感受性を示さなかったことや、XPF-ERCC1 が DPC の修復に主な働きをするという報告がないことから、PPD 表現型の原因は DPC ではなく ICL であると結論付けた。

PPD はアカパンカビでのみ報告されている表現型であり、他の生物では確認されていないことも、その原因が長い間解決されない一つの要因であった。この点に関して、私はこれまでの結果を踏まえてアカパンカビが他の生物に比べて紫外線に高い耐性を示す点に注目し、紫外線に高感受性を示す、 $mus-18$  と NER 関連遺伝子の二重 KO 株を樹立することで、低線量の紫外線照射による光回復の測定を可能にした。 $\Delta mus-18 \Delta mus-38$  株及び、 $\Delta mus-18 \Delta mus-44$  株の光回復能は  $\Delta mus-18 \Delta mus-43$  株と同程度であり、 $\Delta mus-38$  及び  $\Delta mus-44$  単独 KO 株で見られる光回復能の顕著な低下は確認されなかった (図 3-5)。

図 3-8 に、これらの結果から予想される紫外線によって生じる損傷と光回復能の関係を示す。野生株においては、光回復では修復できない ICL を修復できるため、光回復による生存率の上昇が正常に起こる。一方で、 $\Delta mus-38$  と  $\Delta mus-44$  株では ICL 修復能が欠損しているため、ICL が残存し、光回復後の生存率の上昇に大きな低下が生じる。第一章で  $\Delta mus-44$  株が線量率の増加に伴って感受性が増加することが明らかになったことから (図 1-6)、高線量の紫外線ではピリミジン二量体よりも ICL の方が生じやすく、結果として PPD 表現型が現れるのだと考えられる。これに対して、低線量の紫外線によっては、ICL の形成は比較的少ないと考えられる。そのため、 $mus-18$  と NER の二重 KO により紫外線に高感受性を示すが、光回復による生存率の上昇に、ICL 修復能の欠損による影響が表れないと考えられる。これらの二重 KO 株は、野生株ほど光回復による生存率の上昇は見られないが、この場合は 6-4PP が修復できないためであると予想される。これと同様な例として、 $uvs-2$  遺伝子変異株の表現型が挙げられる。 $RAD18$  ホモログである  $uvs-2$  の変異株は、ICL 損傷剤である MMC に感受性を示す (Tomita et al., 1993)。

$uvs-2$  変異株の光回復は正常に起こるが、紫外線への感受性が他の株に比べて極めて高いため (Chang and Tuveson, 1967)、本章で行った  $mus-18$  と NER の二重 KO 株同様に比較的線量の紫外線照射で光回復処理を行うことで光回復能の低下が見られなかったのだと考えられる。



Genotype	Wild type	$\Delta mus-43$	$\Delta mus-38/-44$	Genotype	$\Delta mus-18 \Delta mus-43$	$\Delta mus-18 \Delta mus-38/-44$
Operative pathways	NER UVER ICL repair* PR	UVER ICL repair* PR	UVER PR	Operative pathways	ICL repair* PR	PR
PR ability	Normal	Mildly less	Largely defective	PR ability	Comparable (Mildly less)	

図 3-8. 紫外線によって生じる DNA 損傷と光回復能の関係  
\*この表においては複製共役型の ICL 修復機構のみを示す。

これまでではアカパンカビの変異原感受性を指標にして解析を進めてきた。最後に、紫外線照射後に生じた損傷がどの程度修復されるのかを CPD と ICL についてそれぞれ直接検出を行った。T4 endonuclease V を用いた CPD 検出アッセイでは、野生株では 60 分間の光回復処理によって CPD の大半が修復されたが、 $\Delta phr$  株では修復が見られなかった (図 3-6)。すなわち、60 分間の可視光照射中での CPD の修復の大部分は光回復に依存していることが考えられる。また、予想通り  $\Delta mus-43$  や  $\Delta mus-44$  株では CPD の修復は野生株と同程度であった。一方で、サザンブロットングにより  $his-3$  遺伝子座における紫外線照射後の ICL を検出したところ、野生株や  $\Delta mus-43$  株では培養に伴い ICL が修復されたのに対して、 $\Delta mus-38$  株では修復が見られなかった (図 3-7)。これらの結果から、MUS-38/MUS-44 ヌクレアーゼが実際に紫外線によって生じる ICL の修復を行って

いることが示された。複製と非共役した ICL の修復系に、MUS-43 も関与する NER が機能している可能性を考えると、 $\Delta mus-43$  株においても野生株に対して修復の遅れが見られると考えたが、培養 3 時間後においては ICL が完全に修復されており差が確認できなかった。より短い培養時間で同様の解析を行うことで、 $\Delta mus-43$  株においても ICL 修復に異常が見られる可能性はあるが、少なくとも MUS-38 が MUS-43 と独立した経路で ICL 修復に関与していることは明らかである。これは上述したように、アカパンカビにおいて MUS-38 依存的な複製共役型 ICL 修復経路が存在することを示唆している。

本研究の結果と先行研究による見解を踏まえ、アカパンカビにおける紫外線損傷修復経路について新たなモデルを提唱する (図 3-9)。一般的には、紫外線による DNA 損傷の大半は CPD や 6-4PP といったピリミジン二量体であり、これらの修復経路はこれまで当研究室において広く研究が行われてきた。そのため、一部の紫外線感受性株が示す PPD 表現型は、このピリミジン二量体の修復能に原因があるとされていた。しかし、本研究において  $\Delta mus-38$  及び  $\Delta mus-44$  株が ICL 剤に感受性を示すことや NER 欠損型機能分離変異株の光回復能が正常に近くなることが示されたことなどから、特に高線量の紫外線によって ICL が生じ、この修復能の低下が PPD 表現型の原因となっていることが明らかとなった。また、 $\Delta mus-38$  及び  $\Delta mus-44$  株では顕著な PPD 表現型、 $\Delta mus-43$  株では穏やかな PPD 表現型を示した理由として、複製と共役/非共役した複数の ICL 修復経路が機能していることが考えられる。

本章までの結論として、PPD 表現型は高線量の紫外線によって生じる ICL の修復不全による、光回復能の見かけ上の低下であることが明らかとなった。

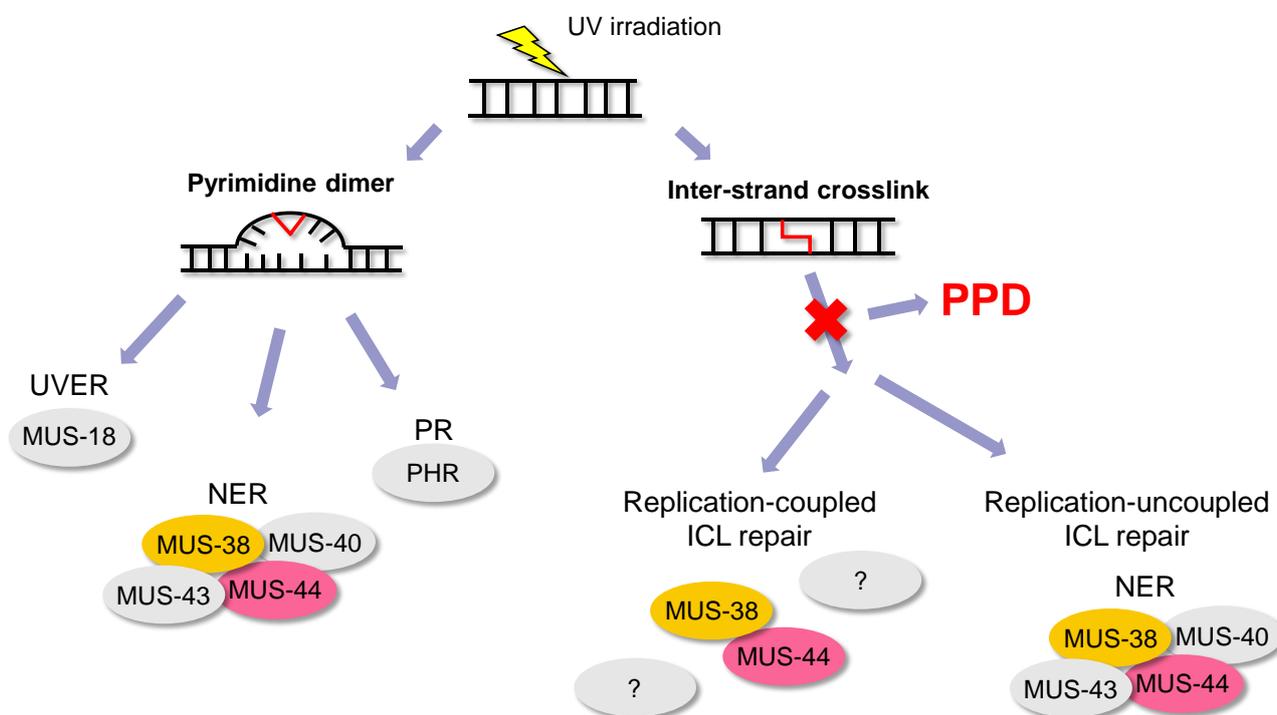


図 3-9. 本研究で明らかになったアカパンカビにおける紫外線損傷修復経路のモデル

紫外線によって主に生じるピリミジンダイマーは、紫外線損傷特異的除去修復 (UVER)、ヌクレオチド除去修復 (NER) 及び光回復 (PR) で修復される。一方、実験条件下における高線量の紫外線では ICL も生じ、この修復が正常に行われない場合、PPD 表現型を示す。また、ICL 修復には複製と共役/非共役した異なる経路が存在すると考えられる。NER は複製と非共役した経路で主に機能する一方で、MUS-38/MUS-44 は NER 非依存的に複製と共役した経路にも関与すると考えられ、これらの欠損により顕著な PPD 表現型を示す。MUS-38/MUS-44 と協調して、特に複製共役型 ICL 修復経路で機能すると考えられる他の因子は、アカパンカビでは未解明である。

## 第四章 異なる核分裂周期における DNA 鎖間架橋修復機構の解析

第三章までの結果、アカパンカビの一部の紫外線感受性株が示す PPD 表現型の原因が ICL 修復能の低下によって生じることが明らかとなった。さらに、アカパンカビにおける XPF と ERCC1 のホモログである MUS-38 と MUS-44 が複製と共役した ICL 修復に関与することが示唆された。これは、同じ子囊菌門に属する出芽酵母や分裂酵母では報告がなく、アカパンカビがより高等真核生物に近い ICL 修復機構を保持している可能性が考えられる。特に、高等真核生物にしか存在しないと考えられていた FA 経路では、XPF-ERCC1 が NER とは異なる経路で複製と共役した ICL 修復経路に関与することから、アカパンカビに FA 経路に類似した修復機構が存在する可能性が考えられる。そのため本章では、その可能性を検証するために、ピコリン酸を用いてアカパンカビの核分裂周期を同調させ、G1 期と S 期のそれぞれの周期で薬剤感受性を測定する実験系を構築した。この系を用いて ICL 剤感受性試験を行ったところ、NER の欠損により G1 期における感受性が大きく増加した一方で、*mus-38* の欠損では逆に S 期での感受性が増加した。これらの結果から、実際に MUS-38 は NER 非依存的に複製共役型 ICL 修復に関与することが示された。

### 結果と考察

#### ピコリン酸処理による実験系の確立

ピコリン酸はアカパンカビの核を G1 期で停滞させる (Martegani et al., 1980)。また、ピコリン酸処理からの回復培養によって、核分裂周期を同調させることができる。そこで本研究では、この手法を薬剤感受性試験などの表現型解析に応用するために、先行研究を基にコニディア濃度、ピコリン酸濃度及び培養時間の検討を行い、G1 期から S 期に進行するタイミングを検証した。

図 4-1A に実験の概略を示す (詳細は材料と方法を参照)。液体最少培地に  $2 \times 10^8$  個/ml の野生株のコニディア懸濁液を調製し、そこにピコリン酸 (最終濃度 25 mM) を加え、室温で 2 時間振盪培養した。その後、コニディアをよく洗浄して新しい最少培地に植え替え、回復培養を行った。培養液の吸光度を測定し増殖を確認したところ、ピコリン酸を加えたまま培養を続けた場合と比較して、回復培養を行うと約 2 時間後あたりから増加が見られた (図 4-1B)。

先行研究においては、コニディアに対してのピコリン酸処理濃度は 9 mM で行っているが (Martegani et al., 1980)、本研究の条件では 9 mM では増殖が停止しなかった (データは示していない)。これは、本研究では  $2 \times 10^8$  個/ml という極めて高い濃度でコニディアを調製しているためであると考えられる。また、25 mM 以上の濃度で処理すると、回復培養を行っても増殖が再開しなかった (データは示していない)。 $2 \times 10^8$  個/ml の懸濁液を十分量調製するためには、アカパンカビを大量の培地に植え出す必要があるため、必要に応じてスケールダウンさせるこ

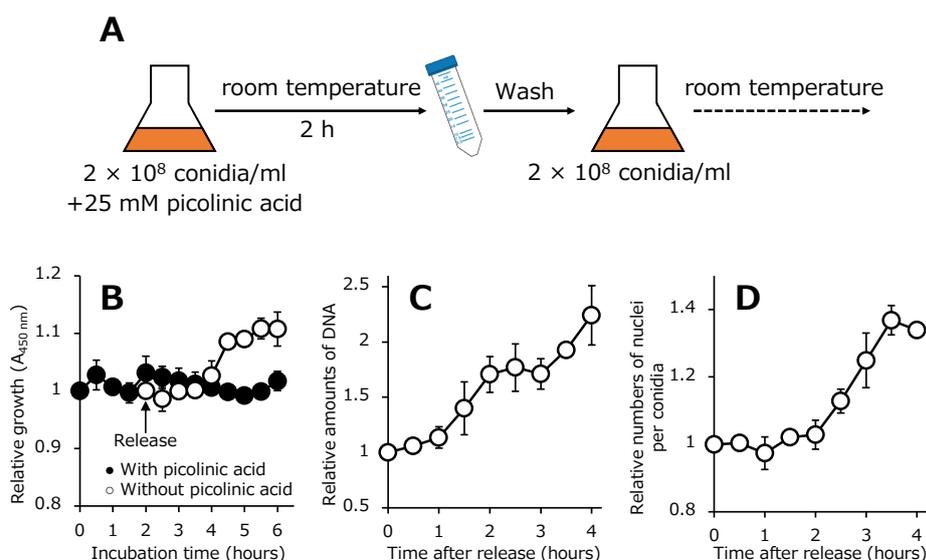


図 4-1. ピコリン酸による核分裂周期の同調

(A) 実験の概要 (B) 増殖の確認 ピコリン酸処理中または回復培養中のコニディア懸濁液をサンプリングし、450 nm で吸光度測定した。(C) DNA 量の測定 回復培養中のコニディアから DNA を抽出して濃度を測定した。(D) コニディアあたりの核数の測定 回復培養中のコニディアを Hoechst 33342 により核染色してコニディア 1 個あたりの核数を測定した。それぞれ培養開始点を 1 とした相対値の平均をプロットした。エラーバーは 3 回以上の独立した実験のデータから計算した標準誤差を示す。

とも可能かもしれないが、細胞濃度が増殖の速度に影響することは十分に考えられるので注意が必要である。休眠期のコニディアは、核分裂周期の様々な段階で停滞している (Martegani et al., 1980)。そのため、先行研究ではピコリン酸処理開始から全ての核が G1 期に揃うまで約 1 時間増殖が見られている (Martegani et al., 1980)。しかし本研究でははっきりとは確認できなかった。これもやはり、コニディアを高濃度で培養することによって、発芽の開始や生育の速度が遅くなったためであると考えられる。

核分裂周期の同調を確認するため、ピコリン酸除去後の培養液を経時的にサンプリングして DNA 量 (図 4-1C) とコニディアあたりの核数 (図 4-1D) を測定した。DNA 量はピコリン酸除去後 1 時間までは増加があまり見られなかったが、1.5 時間後の時点で急な上昇が見られた。その後、2 時間後から 3 時間後までは増加せず、3 時間後から 4 時間後にかけて再度急な上昇を示した。核分裂周期が同調している細胞集団の場合、DNA 量や核数のプロットは急な上昇とその両側のプラトーな状態を示すと予想されるため、この実験条件によって核分裂が同調していることが考えられる。コニディアあたりの核数においては、ピコリン酸除去から 2.5 時間後あたりから増加が確認された。すなわち、S 期が終了した核が G2 期、M 期に進行して核分裂が起きているため、DNA 量の増加と比較すると核数の増加には遅れが見られるのだと考えられる。もし全ての核が同調していた場合、S 期終了時において DNA 量は 2 倍になると予想されるが、本実験条件ではそこまでの増加は確認できなかった (図 4-1C)。また、コニディアあたりの核数は、3.5 時間後において約 1.4 倍で増加の停滞が見られた (図 4-1D)。これらのことから、ピコリン酸によって一定数の核が完全に G1 期で停止している可能性がある。あるいは、全ての核の周期がピコリン酸除去と同時に再開しているわけではないことが考えられる。これは、以下に示すようにアカパンカビのマクロコニディアに含まれる核数がそれぞれ異なり、ある程度のばらつきが生じているためであると予想される。

アカパンカビが形成するコニディアには、比較的大きくオレンジ色を呈すマクロコニディアと、それに対して小さく緑褐色のマイクロコニディアの 2 種類が存在する (Ramesh, 1999)。通常の実験で用いられるマクロコニディアは、各々に含まれる核数が均一ではない (1 から 4 個程度) ため、完全に均一な細胞集団に揃えて解析することは困難であると考えられる。一方で、マイクロコニディアは単核であるため、より精度の高い解析が行える可能性がある。しかし、マクロコニディアに対してマイクロコニディアの量は著しく少なく、十分量の採取が困難な上に、発芽率やコロニー形成率も極めて低いため (Ramesh, 1999)、表現型解析には不向きであると考えられる。

結論として、液体最少培地で調製した  $2 \times 10^8$  個/ml のコニディア懸濁液に、25 mM のピコリン酸を加えて室温で 2 時間処理後に回復培養を行うと、核分裂周期を同調させることが可能である。以降の解析はこの条件で行った。

## HA-PCNA の発現解析

増殖細胞核抗原 (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) は、DNA 複製の際に二本鎖 DNA や DNA ポリメラーゼをつなぎとめるクランプ分子として機能し、G1 後期から S 期にかけて発現が増加することが知られている (Bravo et al., 1987; Sasaki et al., 1993; Kisielewska et al., 2005; Bártová et al., 2017)。そこで、ピコリン酸により核分裂周期を同調させたアカパンカビの PCNA 発現パターンを解析することで、S 期のタイミングを詳細に検討した。

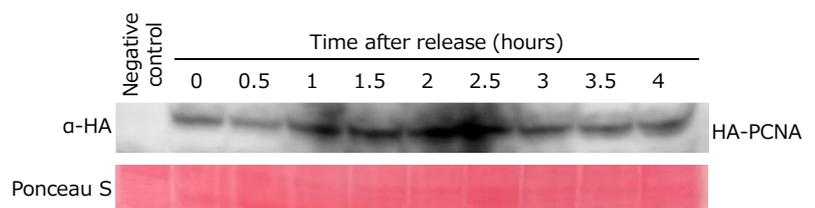


図 4-2. HA-PCNA の発現量解析

回復培養中のコニディアからタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティングによって HA-PCNA の検出を行った。Ponceau S 染色をローディングコントロールとして示す。α-HA: 抗 HA 抗体

確立した手法によってピコリン酸処理を行い、回復培養中のコニディア懸濁液を経時的にサンプリングしてタンパク質を抽出し、N 末端に HA タグを付加した PCNA (HA-PCNA) の発現をウェスタンブロットによって解析した (図 4-2)。HA-PCNA の発現は、ピコリン酸除去から約 1 時間後に増加し始め、2 時間から 2.5 時間後付近でピークに達し、その後は減少した。S 期に DNA 複製が進行して DNA 量が増加するため、この結果は実際に測定した DNA 量のプロットとおおよそ相関している (図 4-1C)。すなわち、同調した核分裂周期は、ピコリン酸除去後 1 時間から 1.5 時間あたりで G1 期から S 期に進行する。先行研究において、液体最少培地中で培養中の菌糸における核の倍加時間は約 100 分であり、そのうちの S 期は約 30 分と見積もられた (Martegani et al., 1980)。しかし、本研究においては HA-PCNA の発現量は、ピコリン酸除去後約 1 時間から約 2.5 時間の約 1.5 時間にかけて増加が見られたため、この条件では核分裂周期の進行速度は比較的遅い可能性が考えられる。あるいは、本研究では発芽前のコニディアを用いているため、発芽後の菌糸の核とは異なる核分裂周期のパターンを示すことも考えられる。また、本研究では実際と同調率を測定しておらず、どの程度の割合の核が同じタイミングで S 期に移り変わるかは定かではない。そのため、コニディアの大きさや核数などによって、S 期に進行する時間差が大きく出てしまっている可能性も否定できない。マクロコニディアの核数はランダムであるため、完全に均一にすることは不可能であるが、フィルターなどを使ってできるだけ同じサイズのコニディアを採取できるように工夫する必要があるかもしれない。また、同調率の測定には生細胞の核分裂を直接観察することが有用であると考えられるため、さらに詳細に解析を行う際にはライブイメージングによって条件検討をする必要があると考えられる。

結論として、構築した実験系によってアカパンカビの核分裂周期を同調させると、ピコリン酸除去後 1 時間から 2.5 時間にかけて S 期の核の割合が最も高くなることが示された。

### 異なる核分裂周期における薬剤感受性測定法の確立

本研究で構築した実験系を応用して、それぞれの核分裂周期でコニディアに薬剤処理を行うことで、核分裂周期特異的な薬剤感受性の測定を試みた。本研究では、複製と共役及び非共役した ICL 修復機構の解析を目的としているため、G1 期と S 期において ICL 損傷剤である DEO を処理し、それぞれの感受性を比較した。

これまでの結果より、ピコリン酸除去後 1 時間から 2.5 時間にかけて S 期が進行することが示

された (図 4-2)。すなわち、このタイミングで DEO 処理を行うと、複製と共役した修復経路で主に機能すると考えられる遺伝子の KO 株は、ピコリン酸と同時に DEO 処理を行った場合に比べて、より感受性を示すと考えられる。実験の概略を図 4-3A に示した。これまでと同じ条件でコニディアをピコリン酸で 2 時間処理し、そこに直ち

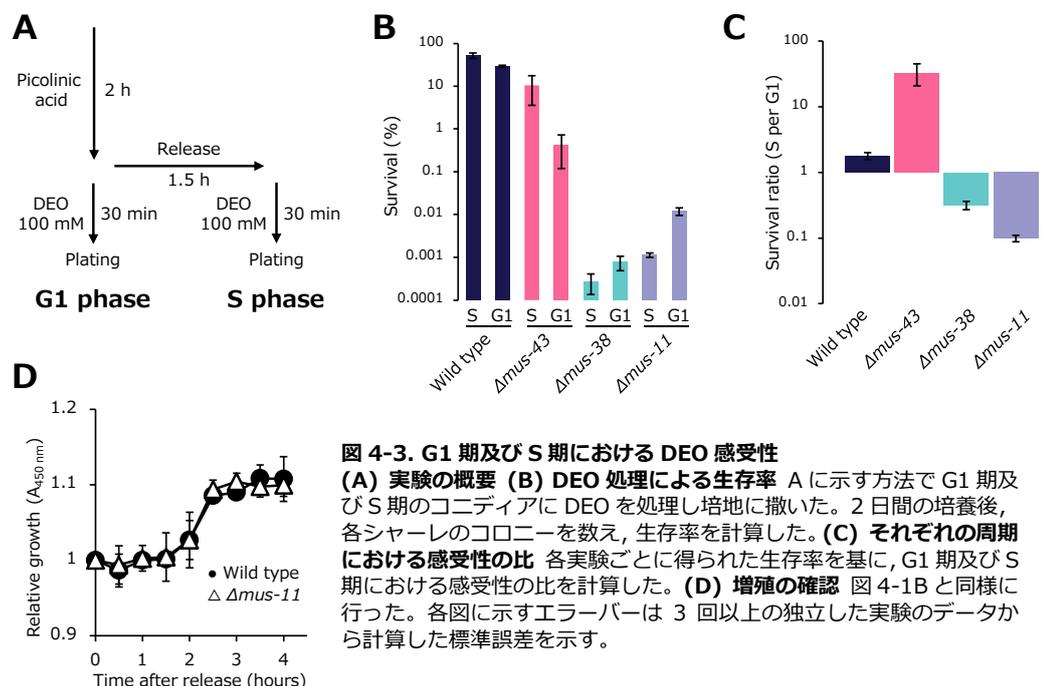


図 4-3. G1 期及び S 期における DEO 感受性 (A) 実験の概略 (B) DEO 処理による生存率 A に示す方法で G1 期及び S 期のコニディアに DEO を処理し培地に撒いた。2 日間の培養後、各シャーレのコロニーを数え、生存率を計算した。(C) それぞれの周期における感受性の比 各実験ごとに得られた生存率を基に、G1 期及び S 期における感受性の比を計算した。(D) 増殖の確認 図 4-1B と同様に行った。各図に示すエラーバーは 3 回以上の独立した実験のデータから計算した標準誤差を示す。

に DEO (最終濃度 100 mM) を加えて 30 分間処理を行う G1 期処理群と、ピコリン酸除去後に 1.5 時間回復培養を行った後、同様に DEO 処理を行う S 期処理群の二つの条件で感受性試験を行った。

図 4-3B にそれぞれの周期における生存率を、図 4-3C に G1 期に対する S 期の生存率の比を示す。野生株では、S 期及び G1 期における DEO 感受性はあまり差が見られなかったが、 $\Delta mus-43$  株では S 期における生存率と比較して G1 期では 20 倍以上の高い感受性を示した。MUS-43 は NER に関与することで、主に複製と非共役した ICL 修復経路で機能すると考えられる (Sato et al., 2008; Seol et al., 2018)。そのため、その欠損により G1 期における感受性が高くなったと考えられる。NER は複製と共役した ICL 修復機構である FA 経路の下流でも、部分的に関与するとされており、複製が完了した直後の残存した損傷ヌクレオチドを、最終的に除去すると考えられている (Mouw and D'Andrea, 2014)。しかし、他の生物と同様に、アカパンカビの NER においても、G1 期での修復活性が主であるために、 $\Delta mus-43$  株は G1 期でより高感受性を示したと考えられる。一方で、 $\Delta mus-38$  株は S 期と G1 期どちらにおいても顕著に高い感受性を示したものの、S 期の方でやや高い感受性を示した。また、 $\Delta mus-11$  株においても同様に S 期で高い感受性が見られた。RAD52 ホモログである MUS-11 は相同組換えに関与することで、姉妹染色分体の利用できる S/G2 期で機能する (Sakuraba et al., 2000; Seol et al., 2018)。これらの結果から、MUS-38 は MUS-11 と同様に、S 期において複製と共役した ICL 修復経路で機能することが示された。また、 $\Delta mus-38$  株は、 $\Delta mus-43$  株と  $\Delta mus-11$  株よりも高い感受性を示した上で、G1 期と S 期の差がこれらの株よりも小さかった。この結果から、MUS-38 は、主に複製と非共役した経路での修復を担う NER に加え、NER 非依存的な複製と共役した経路の、双方において機能することが考えられる。

本実験で確立した生存率の測定方法では、核分裂周期の特定の段階で一時的に薬剤処理を行っているが、薬剤を洗浄後すぐに寒天培地に撒いて培養を開始していることから、各遺伝子の各周期における活性を直接評価しているわけではない点に注意が必要である。つまり、処理した薬剤の影響が細胞にどの段階 (薬剤処理中あるいは寒天培地での培養中) で致死性を与えるかはわからないため、生存率の値を株間で比較することはできない。しかし、本研究で行ったように二つの条件で薬剤処理を行って G1 期における生存率の値で標準化することで、各遺伝子産物の G1 期及び S 期における相対的な活性を評価することは可能であると考えられる。

本研究では、野生株を用いて核分裂周期の同調を確認することで実験系を確立した。ただ、生育に遅延の見られる変異株などでは、野生株に対して G1 期停滞後の S 期進行のタイミングが遅れる可能性がある。そのため、明らかに生育異常を示す株では薬剤処理開始時間を検討する必要があるかもしれない。しかし、本研究で使用した  $\Delta mus-11$  株は、他の株に対してコロニー形成培地上でのコロニーの生育がやや遅いものの、本研究で構築した実験スケールでは、ピコリン酸除去後の液体培地での増殖は野生株と同程度であった (図 4-3D)。また、もし核分裂周期の進行が遅いために S 期の開始がピコリン酸除去から 1.5 時間以降であったとしたら、生存率の差は G1 期と同程度となることが考えられる。しかし、 $\Delta mus-11$  株の S 期における DEO 感受性は G1 期に対して 10 倍程度高くなった (図 4-3C)。この結果から、多少生育に遅れの見られる株であっても、S 期の期間が十分に長いために、30 分間の薬剤処理では S 期における影響を解析できると考えられる。これは、簡易的に細胞周期の確認ができないアカパンカビにとっては大きな利点である。しかし、ピコリン酸は RNA のポリアデニル化を阻害することで遺伝子の転写を抑制することが示唆されているため (Martegani, 1981)、RNA プロセッシングなどに関与する遺伝子の変異株においては、ピコリン酸による G1 期の停滞や、その後の同調のメカニズムが異なる可能性は考えられる。

本章の結論として、ピコリン酸を用いてアカパンカビの核分裂周期を同調させ、G1 期及び S 期における薬剤感受性を測定する実験系を構築した。これにより ICL 損傷剤である DEO の感受性解析を行ったところ、*Δmus-43* 株と異なり、*Δmus-38* 株は S 期においてより高い感受性を示した。これらの結果から、実際に MUS-38 は、NER に加えて NER 非依存的な複製共役型 ICL 修復にも関与することが示された。

## 結論

アカパンカビの一部の紫外線感受性株が示す PPD 表現型の原因は、ICL 修復機構の機能不全によるものであることが本研究により明らかとなった。1970 年に初めて光回復に異常を示す株として *upr-1* が報告されてから半世紀以上が経ち、その原因を本研究で解明することに成功した。これまでの PPD 表現型の原因解明の過程で、NER や光回復など生物の紫外線抵抗性に関して多くの知見がアカパンカビによる研究によって広がった。これらに加え、本研究で私は、これまでアカパンカビでは着手されていなかった ICL 修復機構の解析を行った。その結果、XPF-ERCC1 ホモログである MUS-38/MUS-44 ヌクレアーゼが、NER とは異なる経路で ICL 修復機構に関与することが示された。高等真核生物においては、XPF-ERCC1 は NER 非依存的な経路で複製共役型 ICL 修復に関与するため、私は MUS-38/MUS-44 が XPF-ERCC1 と類似した機能を保持するのではないかと考えた。そのため、アカパンカビの核分裂周期を同調させて、異なる周期における薬剤感受性の測定法を確立し解析を行ったところ、実際に  $\Delta mus-38$  株は S 期においてより高い ICL 損傷剤の感受性を示した。すなわち、アカパンカビにおいても MUS-38/MUS-44 ヌクレアーゼによる複製共役型の修復活性が、ICL 修復において重要な役割を担っていることが示された。これらの結果は、高等真核生物に特有であると考えられていた FA 経路が、糸状菌類であるアカパンカビにおいても存在することを示唆する初の報告である。今後は、アカパンカビにおける ICL 修復関連遺伝子のスクリーニングに加え、本研究で確立した異なる核分裂周期における解析法を用いることで、アカパンカビの ICL 修復と FA 経路の関連についてより詳細に解明できると考える。

最後に、本研究で明らかになった知見を基にして、ファンconi貧血症などの難治性遺伝性疾患の解明やその治療法の改善に、アカパンカビが新たなモデル生物として寄与できると期待する。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり埼玉大学大学院理工学研究科の田中秀逸教授，畠山晋准教授，吉原亮平助教，量子科学技術研究開発機構の小池学教授，東洋大学生命科学部の一石昭彦教授，藤村真教授から御指導を受けました。審査員として埼玉大学大学院理工学研究科の竹澤大輔教授，川村哲規准教授から御助言をいただきました。感謝申し上げます。

本研究は 2021 年度及び 2022 年度東洋大学井上円了記念研究助成，2022 年度日本科学協会笹川科学研究助成の助成を受けて行われました。

## 参考文献

- Arima, Y., Nishigori, C., Takeuchi, T., Oka, S., Morimoto, K., Utani, A., Miyachi, Y., 2006. 4-Nitroquinoline 1-oxide forms 8-hydroxydeoxyguanosine in human fibroblasts through reactive oxygen species. *Toxicol. Sci.* **91**, 382–392. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj161>
- Bártová, E., Suchánková, J., Legartová, S., Malyšková, B., Hornáček, M., Skalníková, M., Mašata, M., Raška, I., Kozubek, S., 2017. PCNA is recruited to irradiated chromatin in late S-phase and is most pronounced in G2 phase of the cell cycle. *Protoplasma* **254**, 2035–2043. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1076-1>
- Biggerstaff, M., Szymkowski, D.E., Wood, R.D., 1993. Co-correction of the ERCC1, ERCC4 and xeroderma pigmentosum group F DNA repair defects in vitro. *EMBO J.* **12**, 3685–3692. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06043.x>
- Bogliolo, M., Schuster, B., Stoepker, C., Derkunt, B., Su, Y., Raams, A., Trujillo, J.P., Minguillón, J., Ramírez, M.J., Pujol, R., Casado, J.A., Baños, R., Rio, P., Knies, K., Zúñiga, S., Benítez, J., Bueren, J.A., Jaspers, N.G.J., Schärer, O.D., de Winter, J.P., Schindler, D., Surrallés, J., 2013. Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. *Am. J. Hum. Genet.* **92**, 800–806. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.04.002>
- Brabec, V., Kasparkova, J., 2002. Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs. *Drug Resist. Updat.* **5**, 147-161. [https://doi.org/10.1016/S1368-7646\(02\)00047-X](https://doi.org/10.1016/S1368-7646(02)00047-X)
- Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A., Macdonald-ravo, H., 1987. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- $\alpha$ . *Nature.* **326**, 515–517.
- Bucher, D.B., Pilles, B.M., Carell, T., Zinth, W., 2015. Dewar Lesion Formation in Single- and Double-Stranded DNA is Quenched by Neighboring Bases. *J. Phys. Chem. B* **119**, 8685–8692. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.5b04694>
- Callegari, A.J., Kelly, T.J., 2006. UV irradiation induces a postreplication DNA damage checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 15877–15882. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607343103>
- Chang, L.T., Tuveson, R.W., 1967. Ultraviolet-sensitive mutants in *Neurospora crassa*. *Genetics.* **56**, 801–810.
- Coulon, S., Gaillard, P.-H.L., Chahwan, C., Mcdonald, W.H., Yates III, J.R., Russell, P., 2004. Slx1-Slx4 are subunits of a structure-specific endonuclease that maintains ribosomal DNA in fission yeast. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 71–80. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-08>
- de Laat, W.L., Appeldoorn, E., Sugasawa, K., Weterings, E., Jaspers, N.G.J., Hoeijmakers, J.H.J., 1998. DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair. *Genes Dev.* **12**, 2598–2609. <https://doi.org/10.1101/gad.12.16.2598>
- Dronkert, M.L.G., Kanaar, R., 2001. Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat. Res. - DNA Repair.* **486**, 217-247. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(01\)00092-1](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(01)00092-1)
- Dunkern, T.R., Fritz, G., Kaina, B., 2001. Cisplatin-induced apoptosis in 43-3B and 27-1 cells defective in nucleotide excision repair. *Mutat. Res. - DNA Repair.* **486**, 249–258. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(01\)00095-7](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(01)00095-7)
- Fernandez-Pol, J.A., Bono, V.H., Johnson, G.S., 1977. Control of growth by picolinic acid: differential response of normal and transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 2889–2893. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.7.2889>

- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., Ellenberger, T., 2006. *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM press. Washington, DC. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000232588.61871.ff>
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Borkovich, K.A., Selker, E.U., Read, N.D., Jaffe, D., Fitzhugh, W., Ma, L.-J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C.B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M.A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C.P., Kinsey, J.A., Braun, E.L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G.O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzenberg, R.L., Perkins, D.D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catchside, D., Li, W., Pratt, R.J., Osmani, S.A., DeSouza, C.P.C., Glass, L., Orbach, M.J., Berglund, J.A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D.O., Alex, L.A., Mannhaupt, G., Ebbole, D.J., Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M.S., Lander, E.S., Nusbaum, C., Birren, B., 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*. **422**, 859–868.
- Grossmann, K.F., Ward, A.M., Matkovic, M.E., Folias, A.E., Moses, R.E., 2001. *S. cerevisiae* has three pathways for DNA interstrand crosslink repair. *Mutat. Res. - DNA Repair*. **487**, 73–83. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(01\)00106-9](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(01)00106-9)
- Guervilly, J.H., Takedachi, A., Naim, V., Scaglione, S., Chawhan, C., Lovera, Y., Despras, E., Kuraoka, I., Kannouche, P., Rosselli, F., Gaillard, P.H.L., 2015. The SLX4 complex is a SUMO E3 ligase that impacts on replication stress outcome and genome stability. *Mol. Cell*. **57**, 123–137. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.014>
- Guzder, S.N., Sommers, C.H., Prakash, L., Prakash, S., 2006. Complex formation with damage recognition protein Rad14 is essential for *Saccharomyces cerevisiae* Rad1-Rad10 nuclease to perform its function in nucleotide excision repair in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 1135–1141. <https://doi.org/10.1128/mcb.26.3.1135-1141.2006>
- Harris, S.D., 2001. Septum formation in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 736–739.
- Hatakeyama, S., 1998. アカパンカビにおける除去修復系の解析. 博士論文, 埼玉大学.
- Hatakeyama, S., Ito, Y., Shimane, A., Ishii, C., Inoue, H., 1998. Cloning and characterization of the yeast RAD1 homolog gene (*mus-38*) from *Neurospora crassa*: evidence for involvement in nucleotide excision repair. *Curr. Genet.* **33**, 276–283. <https://doi.org/10.1007/s002940050337>
- Hayashi, T., Takao, M., Tanaka, K., Yasui, A., 1998. ERCC1 mutations in UV-sensitive Chinese hamster ovary (CHO) cell lines. *Mutat. Res. - DNA Repair*. **407**, 269–276. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(98\)00013-5](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(98)00013-5)
- Ishii, C., Inoue, H., 1989. Epistasis, photoreactivation and mutagen sensitivity of DNA repair mutants *upr-1* and *mus-26* in *Neurospora crassa*. *Mutat. Res. Repair*. **218**, 95–103. [https://doi.org/10.1016/0921-8777\(89\)90015-3](https://doi.org/10.1016/0921-8777(89)90015-3)
- Ishii, C., Nakamura, K., Inoue, H., 1998. A new UV-sensitive mutant that suggests a second excision repair pathway in *Neurospora crassa*. *Mutat. Res. - DNA Repair*. **408**, 171–182. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(98\)00030-5](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(98)00030-5)
- Ishii, C., Nakamura, K., Inoue, H., 1991. A novel phenotype of an excision-repair mutant in *Neurospora crassa*: Mutagen sensitivity of the *mus-18* mutant is specific to UV. *Mol. Gen. Genet.* **228**, 33–39. <https://doi.org/10.1007/BF00282444>
- Jackson, S.P., Bartek, J., 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. **461**, 1071–1078 <https://doi.org/10.1038/nature08467>

- Jiang, C.Z., Yee, J., Mitchell, D.L., Britt, A.B., 1997. Photorepair mutants of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 7441–7445. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7441>
- Kawabata, T., 2007. アカパンカビ (*Neurospora crassa*) における複製後修復関連遺伝子の解析. 博士論文, 埼玉大学.
- Kawabata, T., Inoue, H., 2007. Detection of physical interactions by immunoprecipitation of FLAG- and HA-tagged proteins expressed at the his-3 locus in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Rep.* **54**, 5–8. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1096>
- Kazama, Y., Ishii, C., Schroeder, A.L., Shimada, H., Wakabayashi, M., Inoue, H., 2008. The *Neurospora crassa* UVS-3 epistasis group encodes homologues of the ATR/ATRIP checkpoint control system. *DNA Repair.* **7**, 213–229. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.09.011>
- Kisielewska, J., Lu, P., Whitaker, M., 2005. GFP-PCNA as an S-phase marker in embryos during the first and subsequent cell cycles. *Biol. Cell.* **97**, 221–229. <https://doi.org/10.1042/bc20040093>
- Knies, K., Inano, S., Ramírez, M.J., Ishiai, M., Surrallés, J., Takata, M., Schindler, D., 2017. Biallelic mutations in the ubiquitin ligase RFD3 cause Fanconi anemia. *J. Clin. Invest.* **127**, 3013–3027. <https://doi.org/10.1172/JCI92069>
- Lan, L., Hayashi, T., Rabeya, R.M., Nakajima, S., Kanno, S.I., Takao, M., Matsunaga, T., Yoshino, M., Ichikawa, M., te Riele, H., Tsuchiya, S., Tanaka, K., Yasui, A., 2004. Functional and physical interactions between ERCC1 and MSH2 complexes for resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in mammalian cells. *DNA Repair.* **3**, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2003.10.005>
- Lehoczký, P., McHugh, P.J., Chovanec, M., 2007. DNA interstrand cross-link repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 109–133. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00046.x>
- Li, Y.F., Kim, S.T., Sancar, A., 1993. Evidence for lack of DNA photoreactivating enzyme in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 4389–4393. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.10.4389>
- Liu, Y., Bell-Pedersen, D., 2006. Circadian rhythms in *Neurospora crassa* and other filamentous fungi. *Eukaryot. Cell.* **5**, 1184–1193. <https://doi.org/10.1128/EC.00133-06>
- Lo, H.-L., Nakajima, S., Ma, L., Walter, B., Yasui, A., Ethell, D.W., Owen, L.B., 2005. Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest. *BMC Cancer.* **5**. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-5-135>
- Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A.S.H., Helleday, T., 2005. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* **33**, 3799–3811. <https://doi.org/10.1093/nar/gki681>
- Margolin, B.S., Freitag, M., Selker, E.U., 1997. Improved plasmids for gene targeting at the his-3 locus of *Neurospora crassa* by electroporation. *Fungal Genet. Rep.* **44**. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1281>
- Martegani, E., 1981. Inhibition of RNA Synthesis in *Neurospora crassa* Hyphae Treated with Picolinic Acid. *Eur. J. Biochem.* **121**, 71–76. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb06431.x>
- Martegani, E., Levi, M., Trezzi, F., Alberghina, L., 1980. Nuclear division cycle in *Neurospora crassa* hyphae under different growth conditions. *J. Bacteriol.* **142**, 268–275.

- McNeil, E.M., Melton, D.W., 2012. DNA repair endonuclease ERCC1-XPF as a novel therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer therapy. *Nucleic Acids Res.* **40**, 9990–10004. <https://doi.org/10.1093/nar/gks818>
- Mouw, K.W., D'Andrea, A.D., 2014. Crosstalk between the nucleotide excision repair and Fanconi anemia/BRCA pathways. *DNA Repair.* **19**, 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.019>
- Nakabeppu, Y., Yamashita, K., Sekiguchi, M., 1982. Purification and characterization of normal and mutant forms of T4 endonuclease V. *J. Biol. Chem.* **257**, 2556–2562.
- Nakajima, S., Sugiyama, M., Iwai, S., Hitomi, K., Otsoshi, E., Kim, S.-T., Jiang, C.-Z., Todo, T., Britt, A.B., Yamamoto, K., 1998. Cloning and characterization of a gene (UVR3) required for photorepair of 6-4 photoproducts in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **26**, 638–644. <https://doi.org/10.1093/nar/26.2.638>
- Nejedlý, K., Kittner, R., Kypr, J., 2001. Genomic DNA regions whose complementary strands are prone to UV light-induced crosslinking. *Arch. Biochem. Biophys.* **388**, 216–224. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2280>
- Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C., Inoue, H., 2004. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 12248–12253. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402780101>
- Orelli, B., McClendon, T.B., Tsodikov, O. V., Ellenberger, T., Niedernhofer, L.J., Schäfer, O.D., 2010. The XPA-binding domain of ERCC1 is required for nucleotide excision repair but not other DNA repair pathways. *J. Biol. Chem.* **285**, 3705–3712. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.067538>
- Osorio, A., Bogliolo, M., Fernández, V., Barroso, A., de la Hoya, M., Caldés, T., Lasa, A., Ramón y Cajal, T., Santamariña, M., Vega, A., Quiles, F., Lázaro, C., Díez, O., Fernández, D., González-Sarmiento, R., Durán, M., Piqueras, J.F., Marín, M., Pujol, R., Surrallés, J., Benítez, J., 2013. Evaluation of Rare Variants in the New Fanconi Anemia Gene ERCC4 (FANCO) as Familial Breast/Ovarian Cancer Susceptibility Alleles. *Hum. Mutat.* **34**, 1615–1618. <https://doi.org/10.1002/humu.22438>
- Payen, A., 1843. Extrait d'un rapport adresse' a' M. Le Marechal Duc de Dalmatie, Ministre de la Guerre, President du Conseil, sur une alteration extraordinaire du pain du munition. *Ann. Chim. Phys. 3rd Ser.* **9**, 5–21.
- Pospíšilová, Š., Kypr, J., 1997. UV Light-induced Crosslinking of the Complementary Strands of Plasmid pUC19 DNA Restriction Fragments. *Photochem. Photobiol.* **65**, 945–948.
- Prakash, S., Prakash, L., 2000. Nucleotide excision repair in yeast. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **451**, 13–24. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00037-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00037-3)
- Ramesh, M., 1999. Microconidia of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* **26**, 1–18.
- Rastogi, R.P., Richa, Kumar, A., Tyagi, M.B., Sinha, R.P., 2010. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J. Nucleic Acids.* <https://doi.org/10.4061/2010/592980>
- Sakai, W., 2004. アカパンカビのDNA修復と突然変異生成に関わるDNAポリメラーゼの変異株の単離と解析. 博士論文, 埼玉大学.
- Sakai, W., Ishii, C., Inoue, H., 2002. The upr-1 gene encodes a catalytic subunit of the DNA polymerase  $\zeta$  which is involved in damage-induced mutagenesis in *Neurospora crassa*. *Mol. Genet. Genomics.* **267**, 401–408. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0671-8>

- Sakai, W., Wada, Y., Naoi, Y., Ishii, C., Inoue, H., 2003. Isolation and genetic characterization of the *Neurospora crassa* REV1 and REV7 homologs: Evidence for involvement in damage-induced mutagenesis. *DNA Repair*. **2**, 337–346. [https://doi.org/10.1016/S1568-7864\(02\)00223-9](https://doi.org/10.1016/S1568-7864(02)00223-9)
- Sakuraba, Y., 2001. アカパンカビにおけるDNA二重鎖切断修復機構の解析. 博士論文, 埼玉大学.
- Sakuraba, Y., Schroeder, A.L., Ishii, C., Inoue, H., 2000. A *Neurospora* double-strand-break repair gene, *mus-11*, encodes a RAD52 homologue and is inducible by mutagens. *Mol. Gen. Genet.* **264**, 392–401. <https://doi.org/10.1007/s004380000342>
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Cold Spring Harbor, NY.
- Sancar, G.B., 2000. Enzymatic photoreactivation: 50 Years and counting. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **451**, 15–37. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00038-5)
- Sancar, G.B., Smith, F.W., 1989. Interactions between yeast photolyase and nucleotide excision repair proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 4767–4776. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.11.4767>
- Sasaki, K., Kurose, A., Ishida, Y., 1993. Flow cytometric analysis of the expression of PCNA during the cell cycle in hela cells and effects of the inhibition of DNA synthesis on it. *Cytometry*. **14**, 876–882. <https://doi.org/10.1002/cyto.990140805>
- Sato, M., 2008. アカパンカビ (*Neurospora crassa*) における紫外線損傷修復関連遺伝子の解析. 博士論文, 東洋大学.
- Sato, M., Niki, T., Tokou, T., Suzuki, K., Fujimura, M., Ichiishi, A., 2008. Genetic analysis of the *Neurospora crassa* RAD14 homolog *mus-43* and the RAD10 homolog *mus-44* reveals that they belong to the *mus-38* pathway of two nucleotide excision repair systems. *Genes Genet. Syst.* **83**, 1–11. <https://doi.org/10.1266/ggs.83.1>
- Schärer, O.D., 2017. ERCC1-XPF endonuclease—positioned to cut. *EMBO J.* **36**, 1993–1995. <https://doi.org/10.15252/embj.201797489>
- Schroeder, A.L., 1970. Ultraviolet-sensitive mutants of *Neurospora* II. Radiation studies. *Mol. Gen. Genet.* **107**, 305–320. <https://doi.org/10.1007/BF00441193>
- Semlow, D.R., Zhang, J., Budzowska, M., Drohat, A.C., Walter, J.C., 2016. Replication-dependent unhooking of DNA interstrand cross-links by the NEIL3 glycosylase. *Cell*. **167**, 498–511. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.008>
- Seol, J.H., Holland, C., Li, X., Kim, C., Li, F., Medina-Rivera, M., Eichmiller, R., Gallardo, I.F., Finkelstein, I.J., Hasty, P., Shim, E.Y., Surtees, J.A., Lee, S.E., 2018. Distinct roles of XPF-ERCC1 and Rad1-Rad10-Saw1 in replication-coupled and uncoupled inter-strand crosslink repair. *Nat. Commun.* **9**. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04327-0>
- Serna, L., Stadler, D., 1978. Nuclear division cycle in germinating conidia of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **136**, 341–351.
- Shimura, M., Ito, Y., Ishii, C., Yajima, H., Linden, H., Harashima, T., Yasui, A., Inoue, H., 1999. Characterization of a *Neurospora crassa* photolyase-deficient mutant generated by repeat induced point mutation of the *phr* gene. *Fungal Genet. Biol.* **28**, 12–20. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1158>
- Sinha, R.P., Häder, D.P., 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 225–236. <https://doi.org/10.1039/b201230h>

- Suzuki, K., 2005. DNA損傷により停止した複製フォークを再開するメカニズムの解析. 博士論文, 埼玉大学.
- Tamaru, H., Inoue, H., 1989. Isolation and Characterization of a Laccase-Derepressed Mutant of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **171**, 6288–6293. <https://doi.org/10.12980/jclm.2.201414j46>
- Tamaru, H., Selker, E.U., 2001. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature.* **414**, 277–283. <https://doi.org/10.1038/35104508>
- Thompson, C.L., Sancar, A., 2002. Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. *Oncogene.* **21**, 9043–9056. <https://doi.org/10.1038/sj.onc>
- Todo, T., Kim, S.T., Hitomi, K., Otoshi, E., Inui, T., Morioka, H., Kobayashi, H., Ohtsuka, E., Toh, H., Ikenaga, M., 1997. Flavin adenine dinucleotide as a chromophore of the *Xenopus* (6-4)photolyase. *Nucleic Acids Res.* **25**, 764–768. <https://doi.org/10.1093/nar/25.4.764>
- Todo, T., Takemori, H., Ryo, H., Lhara, M., Matsunaga, T., Nikaido, O., Sato, K., Nomura, T., 1993. A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4)photoproducts. *Nature.* **361**, 371–374. <https://doi.org/10.1038/361371a0>
- Tomita, H., Soshi, T., Inoue, H., 1993. The *Neurospora* *uvs-2* gene encodes a protein which has homology to yeast RAD18, with unique zinc finger motifs. *Mol. Gen. Genet.* **238**, 225–233. <https://doi.org/10.1007/BF00279551>
- Tuveson, R.W., 1972. Comparison of two transformation systems for the assay of the *Neurospora* photoreactivating enzyme. *Genet. Res.* **20**, 9–18. <https://doi.org/10.1017/S0016672300013550>
- Tuveson, R.W., Mangan, J., 1970. A UV-sensitive mutant of *Neurospora* defective for photoreactivation. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **9**, 455–466. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(70\)90029-1](https://doi.org/10.1016/0027-5107(70)90029-1)
- Vogel, H., 1956. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Genet. Bull.* **13**, 42–47.
- Vos, J.M.H., Hanawalt, P.C., 1987. Processing of psoralen adducts in an active human gene: Repair and replication of DNA containing monoadducts and interstrand cross-links. *Cell.* **50**, 789–799. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90337-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90337-0)
- Voulgaridou, G.P., Anastopoulos, I., Franco, R., Panayiotidis, M.I., Pappa, A., 2011. DNA damage induced by endogenous aldehydes: Current state of knowledge. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **711**, 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.006>
- Wang, C., Lambert, M.W., 2010. The Fanconi anemia protein, FANCG, binds to the ERCC1-XPF endonuclease via its tetratricopeptide repeats and the central domain of ERCC1. *Biochemistry.* **49**, 5560–5569. <https://doi.org/10.1021/bi100584c>
- Westergaard, M., Mitchell, H., 1947. *Neurospora* V. A Synthetic Medium Favoring Sexual Reproduction. *Am. J. Bot.* **34**, 573–577. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1947.tb13032.x>
- Wood, R.D., 1997. Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 23465–23468. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.23465>
- Wu, R.A., Semlow, D.R., Kamimae-Lanning, A.N., Kochenova, O. V, Chistol, G., Hodskinson, M.R., Amunugama, R., Sparks, J.L., Wang, M., Deng, L., Mimoso, C.A., Low, E., Patel, K.J., Walter, J.C., 2019. TRAIIP is a master regulator of DNA interstrand crosslink repair. *Nature.* **567**, 267–272. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1002-0>

- Yajima, H., Inoue, H., Oikawa, A., Yasui, A., 1991. Cloning and functional characterization of a eucaryotic DNA photolyase gene from *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5359–5362. <https://doi.org/10.1093/nar/19.19.5359>
- Yajima, H., Takao, M., Yasuhira, S., Zhao, J.H., Ishii, C., Inoue, H., Yasui, A., 1995. A eukaryotic gene encoding an endonuclease that specifically repairs DNA damaged by ultraviolet light. *EMBO J.* **14**, 2393–2399. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07234.x>
- Yasui, A., Eker, A.P., Yasuhira, S., Yajima, H., Kobayashi, T., Takao, M., Oikawa, A., 1994. A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals. *EMBO J.* **13**, 6143–6151. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06961.x>
- Yasui, A., McCready, S.J., 1998. Alternative repair pathways for UV-induced DNA damage. *BioEssays.* **20**, 291–297. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199804\)20:4<291::AID-BIES5>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199804)20:4<291::AID-BIES5>3.0.CO;2-T)
- Yunes, M.J., Charnecki, S.E., Marden, J.J., Millard, J.T., 1996. 1,2,5,6-Diepoxyhexane and 1,2,7,8-Diepoxyoctane Cross-Link Duplex DNA at 5'-GNC Sequences. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 994–1000.