

学位論文

Doctor's Thesis

損傷乗り越え合成での DNA ポリメラーゼスイッチングにおける

Rad18 蛋白の役割

(The role of Rad18 in DNA polymerase switching on translesion synthesis)

渡邊 健司

Kenji Watanabe

指導教官

熊本大学大学院医学研究科博士課程外科学第一

川筋 道雄 教授

熊本大学大学院医学研究科博士課程組織制御学

山泉 克 教授

2004 年度

①. 要旨	2
②. 参考論文	4
③. 謝辞	5
④. 略語一覧	6
⑤. 研究の背景と目的	7
⑥. 実験方法	
-1. RAD18 ノックアウトマウス細胞の確立	12
-2. 免疫染色	13
-3. 免疫沈降反応	13
-4. 紫外線照射後の eGFP-pol η のフォーカス形成の解析	14
-5. 試験管内の PCNA のモノユビキチン化反応	15
-6. Pull down assay	15
-7. siRNA	15
-8. 試験管内でのモノユビキチン化 PCNA と pol η の結合反応	16
-9. Rad18 と pol η の結合部位の決定	16
-10. クロマチン分画の分離	18
-11. 紫外線照射後の細胞生存率の決定	18
⑦. 実験結果	
-1. Rad18, Rad6 依存性の PCNA のモノユビキチン化	18
-2. Rad18, PCNA の細胞内局在	23
-3. Rad18-Rad6 依存的な pol η の紫外線照射後の核内フォーカス形成	25
-4. Rad18 と pol η との結合	27
-5. Pol η とモノユビキチン化 PCNA との結合性	30
-6. pol η , pol δ および PCNA の細胞内局在	33
⑧. 考察	34
⑨. 結語	40
⑩. 参考文献	41

①要旨

核内 DNA は細胞内に発生する活性酸素や細胞外からの攻撃を常に受けており、そのため DNA に多くの損傷が生じる。その DNA の損傷は細胞がもつ修復機構によって細胞が分裂する前にその大半は修復されているが、DNA に損傷が存在した状態で DNA の合成が進むと、DNA 複製機構は銹型 DNA に損傷があればその場で停止しそこから 3'-方向へは合成が進まない。しかし、細胞内ではふつうそれまで合成を続けていたポリメラーゼに代わって、特別なポリメラーゼが DNA 合成を続けると考えられている。この特別なポリメラーゼによる損傷銹型 DNA に対する DNA 合成は損傷乗り越え合成 (Translesion synthesis :TLS) と呼ばれている。酵母においてこの TLS 活性をもつ *RAD30* は新規のポリメラーゼをコードしていることが最近わかった。このポリメラーゼはポリメラーゼ η (pol η) と命名されている。また、このポリメラーゼは色素性乾皮症バリエーション (Xeroderma Pigmentosum Variant:XPV) の原因タンパクであることがわかった。出芽酵母における遺伝学的な解析から *RAD30* と *RAD18* は同じエピスターシスグループに属していることが知られており、TLS 機構に Rad18 がどのように関与しているかを検討するために *RAD18* ノックアウトマウス (*RAD18*^{-/-}マウス) を作製した。ポリメラーゼ η (pol η) は紫外線照射後細胞内で、DNA 損傷部位に一致して核内にフォーカスを形成することが知られている。*RAD18*^{-/-}マウスは生存可能でありそのマウスの肺から細胞株を樹立し、その細胞に GFP を融合した pol η を導入した。その細胞に紫外線を照射し pol η の細胞内局在を観察した。*RAD18*^{-/-}マウス由来の細胞では紫外線照射後 pol η がフォーカスを形成しないことを示した。また、正常ヒト繊維芽細胞では

紫外線照射によって Rad18 は核内でその局在を変化させ、PCNA と共局在するようになる。以前の報告で酵母において Proliferating cell nuclear antigen(PCNA)は DNA 損傷後 Rad18/Rad6 依存性にユビキチン化されることがわかった。今回マウスおよびヒト細胞においても PCNA は Rad18/Rad6 依存性にユビキチン化されることを示した。また、pol η と Rad18 は細胞内で恒常的に結合していた。試験管内の実験系においてモノユビキチン化 PCNA はポリメラーゼ δ (pol δ)より pol η との親和性が高いことがわかった。これらの結果は紫外線損傷依存性に Rad18 が PCNA をモノユビキチン化し、同時に pol η を損傷部位によびこみ、その後、紫外線による DNA 損傷を効率よく乗り越えるため pol δ から pol η にスイッチする、ポリメラーゼスイッチングにおいて重要な役割を果たしていることを示唆している。

②参考論文

1. 関連論文 1編 1冊

Kenji Watanabe , Satoshi Tateishi, Michio Kawanishi, Toshiki Tsurimoto, Hirokazu Inoue

and Masaru Yamaizumi Rad18 guides pol η replication stalling sites through physical

interaction and PCNA monoubiquitination. *EMBO J* 23:3886–3896, 2004

③謝辞

本研究を行うにあたりご指導くださいました熊本大学大学院医学研究科外科学第一講座 川筋道雄教授、熊本大学発生医学研究センター再建医学部門組織制御分野 山泉克教授、ならびに同教室の皆様へ深く感謝いたします。

④略語一覧

TLS; Translesion synthesis

PRR; Postreplication repair

XPV; xeroderma pigmentosum variant

WT; wild type

PCNA; proliferating cell nuclear antigen

CPD; cyclobutane pyrimidine dimer

BrdU; bromodeoxyuridine

pol α ; polymerase α

pol δ ; polymerase δ

pol ϵ ; polymerase ϵ

pol η ; polymerase η

pol ι ; polymerase ι

pol κ ; polymerase κ

DTBP; dimethyl 3,3' -dithiobispropionimidate-2HCl

MMS; methylmethanesulfonate

DTT; dithiothreitol

MNase; micrococcal nuclease

NP-40; nonidet P-40

⑤研究の背景と目的

紫外線は DNA に損傷を与える細胞外ストレスの 1 つであり、紫外線照射によりに 6-4 光産物およびシクロブタン型ピリミジン 2 量体といった DNA 損傷がおもに生じる。これらの DNA 損傷の多くは、転写や複製を阻害するが、これらの損傷は生体内で様々な DNA 修復機構により修復されることが知られている。たとえば 6-4 光産物は塩基除去修復によって効率的に修復される。しかし 50%程度のシクロブタン型ピリミジン 2 量体は紫外線照射された細胞内で 24 時間以上経過した後も修復されずに存在している (Mitchell and Nairn, 1989)。DNA 複製時にこれらの損傷が修復されず存在していると DNA 複製の際、複製機構はその手前で停止し進行を阻害してしまう。複製の停止状態が続くと最終的には DNA 鎖に 2 本鎖切断が生じ細胞はアポトーシスにおちいてしまう。大腸菌や出芽酵母の遺伝学的解析から生物が複製機構の進行阻害を回避するおもな方法は複製後修復 (Postreplication repair: PRR) とよばれ、大腸菌からヒトに至るまで種々の生物で観察される。PRR は複製機構の停止を解消するために損傷乗り越え DNA 合成および組み換え修復によっておこなわれると考えられている (Broomfield et al 2001)。大腸菌では紫外線照射などにより DNA 損傷を受けると 30 以上の遺伝子の発現が誘導されて細胞の生存率を上げる SOS 応答という現象が知られている。SOS 応答依存性の突然変異発生率が低い変異大腸菌株より突然変異に関与する *UmuC*, *UmuD* および *Dinb* が同定された。これらの遺伝子がコードするタンパクは後に DNA 損傷を乗り越え合成することができる特別なポリメラーゼ pol V, pol IV である

ことがわかった(Tang et al, 1999;Reuven et al, 1999;Wagner et al, 1999)。これら大腸菌の *UmuC*, *UmuD* および *Dinb* がコードする遺伝子の相同性を検索することにより、原核生物や真核生物において多くのオルソログ、パラログが同定された。これらのポリメラーゼは共通の保存されたモチーフを持ち、その他のポリメラーゼとは異なっていた。そのため、これらのポリメラーゼを新たに Y-family と総称した(Burgers et al, 2001;Ohmori et al, 2001)。ほ乳類細胞では、S 期において鋳型 DNA の損傷にたいし、いったん損傷を乗り越えて複製を完了させる損傷乗り越え合成 (Translesion synthesis; TLS) は重要な役割を果たしていると考えられている。TLS は損傷 DNA にたいしても合成を継続させ細胞死を回避するのみだけでなく、結果として DNA の変異を誘発し、発ガンの危険性も増加させていることがわかっている。また TLS に関与するポリメラーゼがヒトにおいて最近次々と発見された。そのなかで日光露光部での色素沈着高頻度発ガンを特徴とする常染色体劣性遺伝疾患である色素性乾皮症 (Xeroderma pigmentosum :XP) の Variant 群の細胞にはこの TLS の欠損が認められ、その原因タンパク質が出芽酵母の *RAD30* の遺伝子産物と相同性をもつことがわかった。*RAD30* 遺伝子産物は試験管内でシクロブタン型ピリミジン 2 量体を乗り越えられる DNA ポリメラーゼ活性を持つ新しいポリメラーゼエータ ($pol\eta$) であった(Johanson et al, 1999;Masutani et al, 1999)。試験管内の実験で $pol\eta$ は損傷のない鋳型 DNA にたいして、数十から百ヌクレオチドに 1 回という高い頻度で誤ったヌクレオチドを重合してしまう(Matsuda et al, 2000)。しかし紫外線照射により DNA 上に生じるシクロブタン型ピリミジン 2 量体を効率よく、しかも正確に反体側に塩基を挿入することがわかった

(Johanson et al, 2000; McCulloch et al, 2004)。pol η には pol δ 、pol ϵ が持つ校正機能はなく誤って重合した塩基を自身で除去することはできない。そのため、重合した塩基が適切であった場合には DNA 合成を続けるが、誤った塩基を重合してしまった場合には DNA 合成を停止することによって忠実な TLS をおこなうと考えられる(Masutani et al, 2000)。その後の研究によって pol η は紫外線照射後の細胞の核内で紫外線照射量および照射後の経過時間依存的に foci を形成することが明らかになった。この foci は PCNA とも共局在し、また BrdU の取り込みとも共局在が認められることよりそれらの foci では紫外線でできた DNA 損傷に対して複製フォークが停止し、損傷乗り越え DNA 合成のために pol η がそこに呼び込まれたと考えられている(Kannouche et al, 2001)。

また、pol η の C 末端の 119 アミノ酸が foci 形成に必要なドメインであることが示されているが、XPV の患者由来の繊維芽細胞に foci を形成しない変異型 pol η を導入発現させ紫外線照射に対する感受性の回復を検討している。そこでは foci を形成しない変異型 pol η を導入した細胞株では紫外線感受性は回復しなかった(Kannouche et al, 2001)。実際の色素性乾皮症 Variant の患者の pol η の変異を解析してみるとその多くは C 末端を大きく欠損した変異であることがわかった(Broughton et al, 2002)。これらのことより生体内においても pol η が foci を形成することが紫外線照射による DNA 損傷にたいして重要なはたらきをしていることがうかがえる。

出芽酵母の紫外線感受性変異株の遺伝学的解析から、DNA 損傷からの回復機構に関与する遺伝子は 3 つの遺伝子群 (エピスターシス群) に分類されている(Friedberg et al, 1995)。そのう

ち *RAD6* エピスタシス遺伝子群による経路は *RAD6* および *RAD18* 遺伝子の両方を必要とする。

RAD6 エピスタシス遺伝子群にはさらに誤りのない TLS と誤りがちな TLS 経路に分類されるが、出芽酵母における遺伝学的な解析では *RAD30* は前者に属している。(McDonald et al, 1997)。出芽酵母において *RAD6* または *RAD18* を欠損した変異株では、紫外線 MMS などのアルキル化剤を含む種々の変異原にたいし非常に感受性が高くなることが知られている (Hynes and Kuntz, 1981)。

またこれらの変異株は紫外線に対し誘発突然変異の頻度が低くなることより DNA 損傷依存的な TLS は *RAD6/RAD18* によって制御されていると考えられている (Cassier-Chauvat and Fabre, 1991; Lawrence, 1994)。酵母の *RAD6* 遺伝子はユビキチン結合酵素である E2 をコードしている。試験管内の実験において Rad6 はユビキチン連結酵素 (E3) である UBR1 とともに基質であるヒストン H2A および H2B をユビキチン化することが知られている (Sung et al, 1988)。マウスの *RAD6* ホモログとして *mHR6A* と *mHR6B* が同定されているが *mHR6B* をノックアウトしたマウスは生存可能であるが、雄のマウスのみで不妊症が認められる (Roest et al, 1996)。ヒトの *RAD6* ホモログとして *hHR6A* と *hHR6B* の 2 種類が同定されており、いずれも酵母の *RAD6* と約 70% の相同性が認められる。また出芽酵母の *RAD6* 欠損変異株に *hHR6A* と *hHR6B* をそれぞれ導入した株では紫外線による抵抗性の回復および誘発突然変異率が高くなり、酵母 *RAD6* を相補できることがわかった (Koken et al, 1991)

酵母の *RAD18* 遺伝子は 55.5Kda のタンパクをコードしており特徴的な Zn フィンガーおよび RING フィンガーモチーフをもっている E3 である。恒常的に Rad18 は Rad6 とかなり強い親和性

をもって結合しているが、Rad6 自身には DNA 結合能は認めず Rad18-Rad6 複合体として 1 本鎖 DNA に結合できる (Bailly et al, 1994, 1997a)。出芽酵母で *RAD18* をノックアウトした株に *RAD18* 側の Rad6 との結合領域を欠損させた Rad18 を導入した変異株では紫外線感受性を回復できないことから、これら 2 つのタンパク相互作用が損傷乗り越え合成に重要なはたらきをしていることがわかった (Bailly et al, 1997b)。出芽酵母の *RAD18* のヒトホモログ *hRAD18* がクローニングされたが、酵母 *RAD18* との相同性は約 42% であった。そのタンパクは酵母と同様に Zn フィンガーおよび RING フィンガーモチーフをもっていた。また *hRad18* は細胞内で *hRad6A* および *hRad6B* とも結合した (Xin et al, 2000)。さらに不死化したヒト繊維芽細胞に *hRad18* の RING フィンガーモチーフに変異を導入したタンパクを発現させた安定株ではそのドミナントネガティブ効果により、複製後修復の欠損と紫外線を含めた種々の DNA 損傷に対してたかい感受性を示した (Tateishi et al, 2000)。*RAD18* をノックアウトしたニワトリの DT40 細胞や *RAD18* ノックアウトマウスが作製され、このマウスは生存可能であったが、*RAD18* ノックアウトマウス由来の ES 細胞においても複製後修復の欠損と紫外線を含めた種々の DNA 損傷に対して高い感受性を示した。これらの実験により脊椎動物細胞においても TLS における *RAD18* の重要性が示された (Tateishi et al, 2002; Yamashita et al, 2002)。

最近酵母における実験で DNA 損傷依存的に PCNA の 164 番目のリジン残基のモノユビキチン化が Rad18/Rad6 によって行われることがわかった。また 164 番目のリジン残基をアラニン残基に変異させた PCNA を導入した変異株では紫外線やアルキル化剤に対して高感受性を示した (Hoegel

et al, 2002; Stelter and Ulrich, 2003)。164 番目のリジン残基のモノユビキチン化が損傷乗り越え合成に関与することが示唆された。TLS に関与するいくつかのポリメラーゼ pol η 、pol ι および pol κ は PCNA との結合が認められ、この結合によって損傷 DNA に対するこれらの試験管内での TLS 活性があがることが示された (Haracska et al, 2001a, b, c)。

大腸菌の SOS 応答における TLS には以前より 2 つのポリメラーゼが関与するスイッチングモデルが提唱されているが (Bridges and Woodgate, 1985; Bridges et al, 2000)、ほ乳類の細胞では、TLS による損傷 DNA 修復に関する詳しい機構についてはいまだ不明なことが多い。これらのことより *RAD6* エピスタシス遺伝子群のなかで、とりわけ Rad18 がどのようなかたちで、損傷 DNA 修復に関する他のタンパクとかがかり、損傷乗り越え合成に関与しているかを明らかにすることをこの実験の主眼とした。

⑥実験方法

1. *RAD18* ノックアウトマウス細胞の確立: *RAD18* ヘテロマウス由来の ES 細胞を C57BL/6 マウスの杯盤胞に注入移植しキメラマウスを作製、ヘテロ変異マウス同士の交配により *RAD18* ノックアウトマウス (*RAD18*^{-/-}) をえた。*RAD18* ノックアウトマウスの肺繊維芽細胞を SV40 で形質転換した。また *RAD18*^{-/-} 細胞に N 末端に Flag tag を付けた野生型 *RAD18* および変異型 *RAD18* cDNA を組み込んだ pcDNA3.1 ベクター (Invitrogen) をトランスフェクションし 600 μ g/ml のハイグロマイシンを添加した培地で選択培養後それぞれを発現する安定株を得た。

et al, 2002; Stelter and Ulrich, 2003)。164 番目のリジン残基のモノユビキチン化が損傷乗り越え合成に関与することが示唆された。TLS に関与するいくつかのポリメラーゼ pol η 、pol ι および pol κ は PCNA との結合が認められ、この結合によって損傷 DNA に対するこれらの試験管内での TLS 活性があがることが示された (Haracska et al, 2001a, b, c)。

大腸菌の SOS 応答における TLS には以前より 2 つのポリメラーゼが関与するスイッチングモデルが提唱されているが (Bridges and Woodgate, 1985; Bridges et al, 2000)、ほ乳類の細胞では、TLS による損傷 DNA 修復に関する詳しい機構についてはいまだ不明なことが多い。これらのことより *RAD6* エピスタシス遺伝子群のなかで、とりわけ Rad18 がどのようなかたちで、損傷 DNA 修復に関する他のタンパクとかがかり、損傷乗り越え合成に関与しているかを明らかにすることをこの実験の主眼とした。

⑥実験方法

1. *RAD18* ノックアウトマウス細胞の確立: *RAD18* ヘテロマウス由来の ES 細胞を C57BL/6 マウスの杯盤胎に注入移植しキメラマウスを作製、ヘテロ変異マウス同士の交配により *RAD18* ノックアウトマウス (*RAD18*^{-/-}) をえた。*RAD18* ノックアウトマウスの肺繊維芽細胞を SV40 で形質転換した。また *RAD18*^{-/-} 細胞に N 末端に Flag tag を付けた野生型 *RAD18* および変異型 *RAD18* cDNA を組み込んだ pcDNA3.1 ベクター (Invitrogen) をトランスフェクションし 600 μ g/ml のハイグロマイシンを添加した培地で選択培養後それぞれを発現する安定株を得た。

2. 免疫染色: PCNA と Rad18 の細胞内局在をみるために SV40 で形質転換した正常ヒト繊維芽細胞 GM637 をもちいた。100%のメタノールで細胞を固定後、染色を行った。1次抗体は抗ヒト Rad18 抗体と抗 PCNA 抗体、2次抗体はそれぞれ抗ウサギ-FITC 抗体 (Cappel)、抗マウス-ローダミン抗体をもちいた。eGFP-pol η と Flag-Rad18 の共局在を観察するためにまず peGFP- pol η と pcDNA3 Flag-*RAD18* を GM637 に Fugene6 (Roche) をもちいてプロとコールどおりにトランスフェクションを行った。20 時間培養後 PBS で細胞を洗浄し、3.7%ホルマリンで固定後、80%メタノールで固定した。1次抗体は抗 Flag 抗体 (Sigma M2)、2次抗体は抗マウス-ローダミン抗体 (Cappel) を反応させた。eGFP- pol η と pol δ との共局在を観察するために GM637 細胞に peGFP- pol η をトランスフェクションしたのち、3.7%ホルマリン、80%メタノールで固定、1次抗体は抗 pol δ 抗体 (A-9, Santa Cruz)、2次抗体は抗マウス-ローダミン抗体 (Cappel) を反応させた。免疫染色した細胞は共焦点レーザー顕微鏡 (FV300, Olympus) で観察した。

3. 免疫沈降反応: hHR6A, hHR6B と RAD18, その変異体 Rad18 との結合をみるために COS-7 細胞に pCAGGST7-*hHR6A*, *hHR6B* を pcDNA3 Flag-*RAD18* および *RAD18DR6* とそれぞれ Fugene6 をもちいてトランスフェクションし、48 時間培養した。細胞を PBS で洗浄した後、lysis バッファー (50mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM NaCl, 0.5% NP-40, 8% glycerol, 0.5mM DTT, 50mM NaF, プロテアーゼ阻害剤) をもちいて溶解、遠沈したのち上清をえた。上清に抗 T-7 抗体または抗 Flag 抗体を加え 4°C, 1 時間反応させた。その後さらに Protein G Sepharose (Amersham Biosciences) を加え 1 時間反応させた。沈降物を lysis バッファーで 4 回洗浄した後、SDS-PAGE, Western プロット

で解析した。HA-pol η と Rad18 との結合をみるために GM637 細胞に pCAGGS HA-pol η をトランスフェクションし 48 時間培養後紫外線を 12.5J/m²を照射した。タンパク相互の架橋をするために 5mM の DTBP (Pierce) で氷上で 30 分間処理した (Pearson et al, 2000)。その後 lysis バッファ― (50mM Tris pH7.5, 1mM DTT, 150mM NaCl, 0.5% NP-40, プロテアーゼ阻害剤) をもちいて溶解、遠沈したのち上清をえた。上清に抗 HA マウス抗体、抗 Flag 抗体を加え 4°C, 1 時間反応させた。その後さらに Protein G Sepharose を加え免疫沈降を行った。沈降物を lysis バッファ―で 4 回洗浄した後、SDS-PAGE で分離、抗 pol η 抗体 (B-7, Santa Cruz), 抗 Rad18 抗体をもちいて Western ブロットで解析した。細胞内での pol η とユビキチン化 PCNA との結合をみるため、pCAGGS HA-pol η を GM637 細胞にトランスフェクションし 48 時間培養した。その後紫外線を 20J/m²照射しさらに 5 時間培養した。その後これらの細胞に氷上で 0.1%NP-40 で処理したのち、DTBP でタンパク相互の架橋をした。細胞を PBS で洗浄し lysis バッファ― (50mM Tris-HCl (pH7.5), 200mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.1% SDS, 0.1% Na-deoxycholic acid, プロテアーゼ阻害剤) をもちいて溶解しその上清を回収した。上清に抗 pol η 抗体をくわえ免疫沈降反応をおこなった。その免疫沈降産物を SDS-PAGE で分離、抗 PCNA 抗体をもちい Western ブロットで解析した。

4. 紫外線照射後の eGFP-pol η のフォーカス形成の解析： マウス *RAD18*^{-/-}細胞、野生型細胞に peGFP-pol η と pcDNA3*RAD18*または *RAD18DR6*を同時にトランスフェクションし 20 時間培養した。紫外線照射後に細胞を 3.7%のホルマリンで固定、少なくとも 200 個以上の GFP 蛍光細胞を観察解析した。各々の実験を少なくとも 3 回以上施行した。

5. 試験管内の PCNA のモノユビキチン化反応: hHR6B と hRad18 は組み換えバキュロウイルスを共感染させた Sf9 昆虫細胞で発現させ精製した。E1 酵素は Boston Biochem より購入したものをもちいた。大腸菌で発現精製した PCNA タンパクを E1, hHR6B および hRad18 を 50mM HEPES (pH 7.6), 0.05mM DTT, 1mM MgCl₂, 1mM ATP を含んだ反応液で, 5mM ユビキチン (Boston Biochem) または Flag-ユビキチン (Sigma) とともに 25°C で 1 時間反応させた。その反応物を SDS-PAGE で分離後 Western ブロットをおこない解析した。

6. Pull down assay: GST-pol η 組み換えバキュロウイルスを Sf9 昆虫細胞に感染させた後 72 時間培養した。Sf9 細胞をリン酸バッファー (20mM リン酸ナトリウム pH7.3, 10%グリセロール, 10mM β -メルカプトエタノール, 300mM NaCl, 1% NP-40, プロテアーゼ阻害剤) をもちいて溶解した。その上清に Glutathione Sepharose (Amersham Biosciences) を加え GST- pol η をビーズとともに回収しそのビーズを pull down assay にもちいた。また GST- pol δ は His-p125, GST-p66, His-p50 のヘテロ 3 量体ビーズとして同様に回収した。紫外線を照射した HeLa 細胞を lysis バッファー (50mM Tris pH7.5, 1mM DTT, 100-800mM NaCl, 1% NP-40, 50mM NaF, プロテアーゼ阻害剤) で溶解しその上清に GST- pol η , GST- pol δ ビーズをそれぞれ加え 4°C で 1 時間反応させた。沈降物を lysis バッファーで 4 回洗浄後 SDS-PAGE で分離、抗 PCNA 抗体で Western ブロットした。

7. siRNA: WI38VA13 (SV40 で形質転換した正常ヒト胎児肺繊維芽細胞) をもちいた。hHR6A, hHR6B をノックダウンするためにそれぞれ以下の 2 本鎖 siRNA をもちいた。

CGGGAAUAUAUGAAAAGUGU (TT), GAGUUUCGGCCAUUGUUGA (TT) 。 これら siRNA を Oligofectamine (Invitrogen) をもちいトランスフェクションし、48-72 時間後にそれぞれのタンパクを解析した。コントロール siRNA として Negative Control siRNA (QIAGEN) をもちいた。

8. 試験管内でのモノユビキチン化 PCNA と pol η の結合反応：試験管内の PCNA のユビキチン化反応系から抗 Rad18 抗体と Protein G Sepharose をもちいて Rad18 タンパクを immunodepletion した。その際、反応バッファー (50mM Tris pH7.5, 1mM DTT, 150mM NaCl, 1% NP-40, プロテアーゼ阻害剤) でこの操作を 5 回繰り返して完全に Rad18 タンパクが immunodepletion されたことを Western ブロットで確認した。その上清の一部を精製した GST-pol η , GST-pol η 355n とともに結合バッファー (20mM HEPES pH7.4, 2mM DTT, 1mM MgCl₂, 0.005% NP-40, プロテアーゼ阻害剤) に加え 4°C、1 時間反応させた。さらに Glutathione Sepharose を加え 1 時間反応させた後沈降物を結合バッファーで 4 回洗浄した。Western ブロットで PCNA を解析した。

9. Rad18 と pol η の結合部位の決定：昆虫細胞で発現させるための GST-pol η プラスミドは peGFP-pol η を 鑄 型 と し て gccaattcATGGCTACTGGACAGGATCG と gccaattcCTAATGTGTTAATGGCTTAAAAATGATT プライマーをもちいて PCR で得られたフラグメントを制限酵素 EcoRI で切断した。同じく EcoRI で切断した pAcGHLT-A ベクター (PharMingen) に挿入し得た。GST-pol η 355 および GST-pol η 350-590 のプラスミドを得るためにそれぞれ gccaattcATGGCTACTGGACAGGATCG と cgggatccTTAGTCTTTAGTCAGTCTCTCCTC、gccaattcGAGAGACTGACTAAAGACCG と gcagatctGCTTTAGAGGATTCTTCTAGC をプライマーとして用いた。

PCR で得られたフラグメントを制限酵素で切断し、同じく制限酵素で切断した pAcGHLT-A ベクター (PharMingen) に挿入した。GST-pol η 158c のプラスミドを得るため pAcGHLT-A-pol η を制限酵素 NcoI で切断してできた 3' 側の 477bp のフラグメントを回収し pAcGHLT-A ベクターに挿入した。Myc タグがその C 末についた全長を有する *RAD18* は cgggaattcATGGACTCCCTGGCC と cgggaattCTTACAAGTCCTCTTCAGAAATGAGCTTTTGCTCATTCTATTACGCT のプライマーを用い pcDNA3-*RAD18* (Tateishi et al, 2000) を鋳型として得たフラグメントを、pCAGGS ベクターに挿入し得た。*RAD18*DRG は Rad18 の 193-495 番目のアミノ酸をコードしており、pcDNA3-*RAD18* を鋳型としてサブクローニングした。*RAD18*DZ はアミノ酸 1-72, 343-495 に相当するフラグメントを PCR で合成したのちそれぞれをライゲーションし pCAGGS ベクターに挿入し得た。*RAD18*DR6 および *RAD18*DC2 はそれぞれ GTGGATTTTCATCTATTTCTG/ACCTCAGTAACAAACCAC と GTGGTTTGTACTGAGGTC/GACATCATAAGAGATCTTTTAGAAG のプライマーを用い pCAGGS-Myc-*RAD18* を鋳型とし、inverse PCR をおこない得られたフラグメントをセルフライゲーションし得た。まず Rad18 側の結合部位を決定するために、これら Myc タグの付いた *RAD18* を COS-7 細胞に導入発現させた。細胞を洗浄後 lysis バッファー (50mM Tris pH7.5, 1mM DTT, 100mM NaCl, 0.25% NP-40, プロテアーゼ阻害剤) をもちいて溶解し上清を得た。この上清に GST-pol η 158c ビーズを加え 4°C で 1 時間反応させた。沈降産物を SDS-PAGE で分離し、抗 c-Myc 抗体 (9E10 Santa Cruz) をもちい Western プロットで解析した。pol η 側の結合部位を決定するために、同様に GM637 細胞の上清と GST-pol η およびその変異体のビーズを反応させ、沈降産物を SDS-PAGE で分離し、抗 Rad18

抗体をもちい内在性の Rad18 を Western プロットで解析した。

10. クロマチン分画の分離 : HeLa 細胞に紫外線を $15\text{J}/\text{m}^2$ 照射し 6 時間培養した。これらの細胞を Mendez ら, (Mendez and Stillman, 2000) がおこなっている方法により分画をおこなった。

11. 紫外線照射後の細胞生存率の決定 : それぞれの細胞を $\Phi 60\text{mm}$ の培養皿にまき、8-9 時間培養後紫外線を照射した。6-7 日間培養した後 80%メタノールで固定、5% Giemsa 溶液でコロニーを染色しそのコロニー数を数えた。少なくとも、一点につき 3 回の同様の実験を行った。

⑦実験結果

1. Rad18, Rad6 依存性の PCNA のモノユビキチン化

Rad18 がどのように TLS に関与しているかを調べるために、*RAD18* ノックアウトマウスの肺繊維芽細胞を SV40 で形質転換した細胞株を樹立した。このセルラインでは野生型の細胞株とくらべて Rad18 タンパクは Western プロットによる解析では発現は認められなかった。しかし Rad6 タンパクはいずれの細胞株も同程度の発現を示した(図 1 A)。また成長率も野生型と同程度

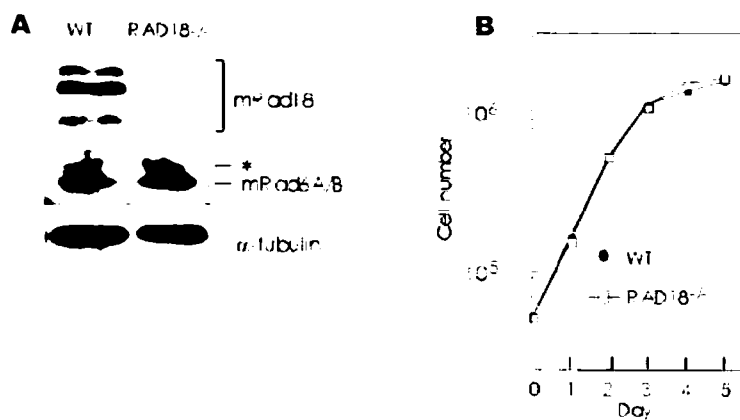


図 1 (A) *RAD18* ノックアウトマウスにおける Rad18 と Rad6A/B のタンパク量を Western プロットで確認した。α-tubulin はコントロールとして示した。アスタリスクは非特異的バンドを示している。

(B) 野生型および *RAD18* ノックアウトマウス細胞の成長曲線を示した。WT は野生型マウス細胞を、*RAD18*^{-/-} は *RAD18* ノックアウトマウス細胞を示す。

であった(図 1 B)。酵母における実験結果では MMS による DNA 損傷後の PCNA のユビキチン化は

抗体をもちい内在性の Rad18 を Western プロットで解析した。

10. クロマチン分画の分離 : HeLa 細胞に紫外線を $15\text{J}/\text{m}^2$ 照射し 6 時間培養した。これらの細胞を Mendez ら, (Mendez and Stillman, 2000) がおこなっている方法により分画をおこなった。

11. 紫外線照射後の細胞生存率の決定 : それぞれの細胞を $\Phi 60\text{mm}$ の培養皿にまき、8-9 時間培養後紫外線を照射した。6-7 日間培養した後 80%メタノールで固定、5% Giemsa 溶液でコロニーを染色しそのコロニー数を数えた。少なくとも、一点につき 3 回の同様の実験を行った。

⑦実験結果

1. Rad18, Rad6 依存性の PCNA のモノユビキチン化

Rad18 がどのように TLS に関与しているかを調べるために、*RAD18* ノックアウトマウスの肺繊維芽細胞を SV40 で形質転換した細胞株を樹立した。このセルラインでは野生型の細胞株とくらべて Rad18 タンパクは Western プロットによる解析では発現は認められなかった。しかし Rad6 タンパクはいずれの細胞株も同程度の発現を示した(図 1A)。また成長率も野生型と同程度

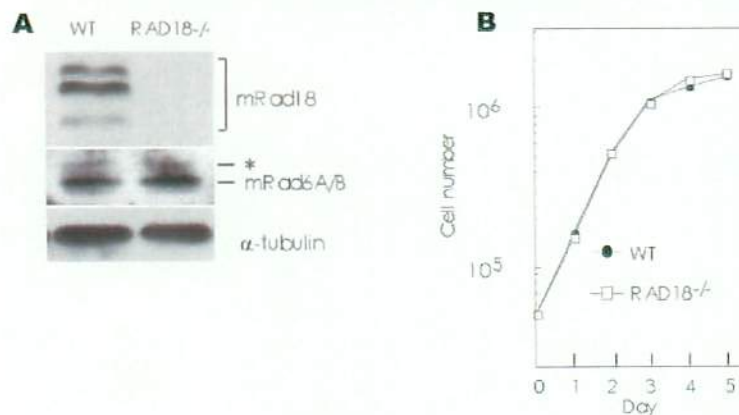


図 1 (A) *RAD18* ノックアウトマウスにおける Rad18 と Rad6A/B のタンパク量を Western プロットで確認した。 α -tubulin はコントロールとして示した。アスタリスクは非特異的バンドを示している。

(B) 野生型および *RAD18* ノックアウトマウス細胞の成長曲線を示した。WT は野生型マウス細胞を、*RAD18*^{-/-} は *RAD18* ノックアウトマウス細胞を示す。

であった(図 1B)。酵母における実験結果では MMS による DNA 損傷後の PCNA のユビキチン化は

Rad18 依存性にみられることが示されていたが、紫外線照射後のマウスの細胞ではどうかを検討した。野生型の細胞では紫外線照射後に照射量、照射後の時間依存性に PCNA のモノユビキチン化の漸増が認められたが、RAD18^{-/-}細胞では紫外線照射後 8 時間まで、40J/m²でも PCNA のユビキチン化は照射前と変わらなかった(図 2A, B)。

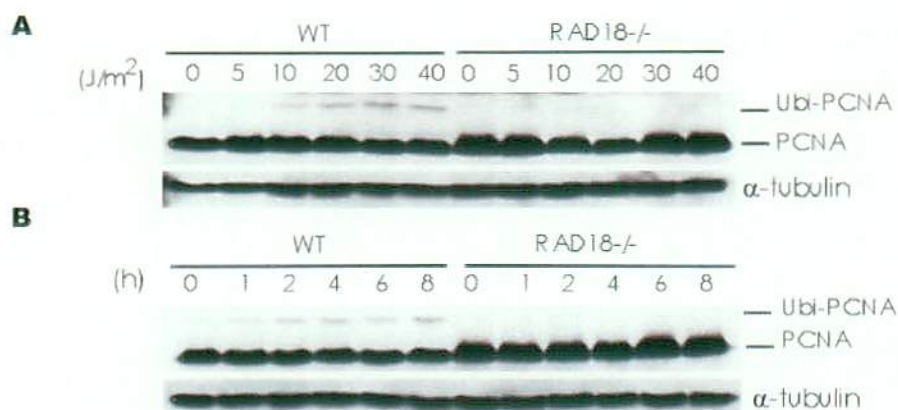


図 2 (A) 野生型細胞および RAD18 ノックアウトマウス細胞に図中に表示された紫外線量を照射し 5 時間培養した。全細胞融解液を回収してモノユビキチン化 PCNA のタンパク量を Western プロットで解析した。
 (B) 野生型細胞および RAD18 ノックアウトマウス細胞に 30J/m² の紫外線を照射後、図中に表示された時間培養した。その後全細胞融解液を回収して経時的なモノユビキチン化 PCNA のタンパク量の変化を Western プロットで解析した。α-tubulin はコントロールとして示した。

Western プロットの解析で 44kDa 付近の抗 PCNA 抗体に反応するバンドが PCNA のユビキチン化されたものであるということは以下の実験によって証明した。GM637 細胞に HA タグをその N 末端に付けたユビキチンの cDNA をトランスフェクションし抗 HA 抗体、抗 PCNA 抗体それぞれで免疫沈降しその沈降物を Western プロットで解析した。図 3 のレーン 2 とレーン 3 で同じ 46Kda 付近に抗 HA 抗体、抗 PCNA 抗体で認識されるバンドが認められ、このバンドは分子量から HA タグの付いたユビキチンが 1 つ付加された PCNA のモノユビキチンフォームであることがわかった。

また図3のレーン3の44Kdaのバンドは野生型マウスに紫外線を照射した細胞抽出液(図3レーン6)および試験管内でユビキチン化反応をさせたPCNA(図3レーン7)とおなじ分子量のタンパクであることからPCNAのモノユビキチンフォームであると判断した。

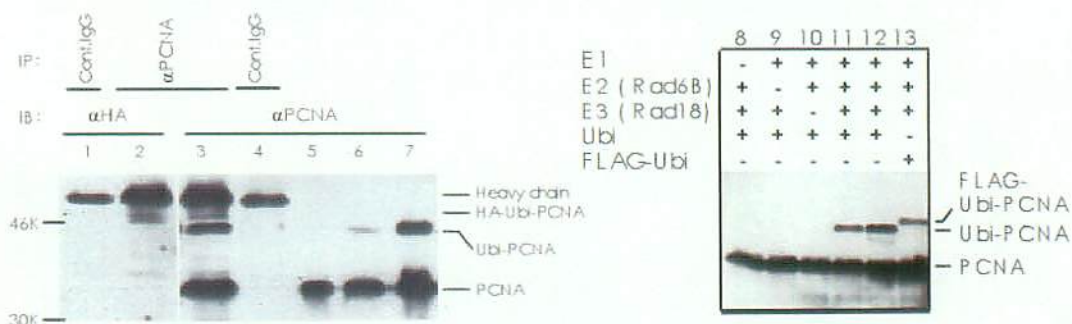


図3 細胞内(レーン1-6)および試験管(レーン7-13)でのPCNAのユビキチン化反応。GM637細胞にHAタグの付いたユビキチンを導入発現し、紫外線を13 J/m²照射し6時間培養した(レーン1-4)。細胞抽出液を図中に示した抗体でそれぞれ免疫沈降反応しその後Westernプロットで沈降産物を解析した。HA-ユビキチンを未導入のGM637細胞の紫外線未照射(レーン5)、紫外線13 J/m²照射し6時間培養した(レーン6)全細胞融解液および試験管内でのユビキチン化反応産物(レーン7)を対照マーカーとして示した。レーン12ではレーン11の2倍量のE2およびE3を反応系に加えた。左パネル左端に分子量マーカーを示した。

以前の酵母を用いた実験系においてRad18とRad6の相互の結合はきわめて強固で、しかも、酵母のRAD18欠損株(*rad18*; 紫外線に対して高感受性)においてRad18側のRad結合部位を欠損させた変異体RAD18を導入発現させた安定株では、野生型RAD18を導入発現させた安定株ほどには紫外線感受性を回復できないことがわかっていった。ほ乳類の細胞内においてもこれらRad18とRad6との相互作用が、これら2つのタンパク依存性にPCNAのモノユビキチン化に重要であり、紫外線に対して抵抗性を獲得しているのではないかと仮説のもと次の実験を行った。

RAD18^{-/-}細胞にヒトRAD18&DNAとその変異体を発現する安定株を作製し、紫外線による損傷でPCNAのモノユビキチン化および生存率が回復するかどうかを検討した。まず、ヒトRad18にお

ける Rad6A/B との結合部位を決定した。酵母における Rad18 の Rad6 との結合部位は様々な種において比較的保存されていた。ヒト Rad18 の C 末領域の比較的保存された 340~395 番目の約 60 アミノ酸を欠損させた変異体ヒト Rad18 (Rad18DR6) を作製した(図 4A)。この変異体に GFP タンパクを融合させた Rad18DR6-GFP を細胞内で発現させその細胞内局在を検討したところ、野生型 Rad18-GFP と同じ局在を示した(データ未提示)。FLAG タグをその N 末に付けた野生型 Rad18

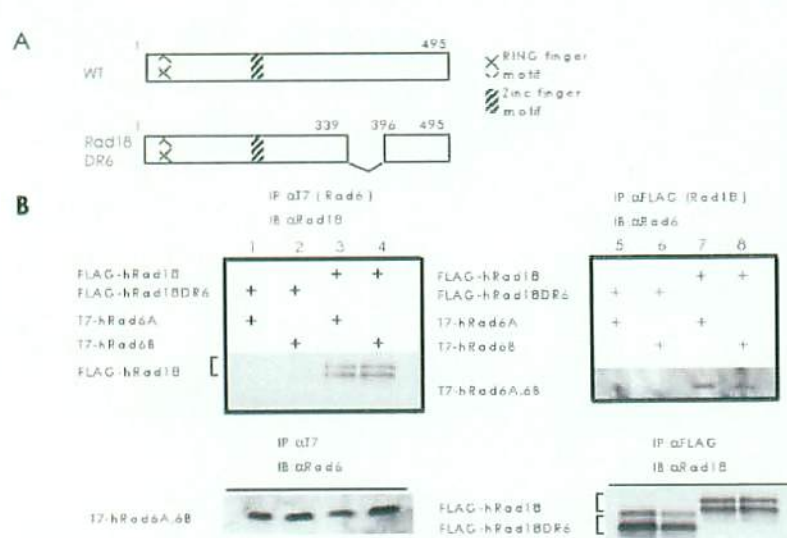


図 4(A) 野生型 Rad18,340~395 のアミノ酸領域を欠損させた変異体 Rad18DR6 のタンパク構造をそれぞれ示した。(B)COS-7 細胞に図中に示した組み合わせでそれぞれのプラスミドを共発現させた。左パネルでは抗 T7 抗体、右パネルでは抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降反応し、その沈降産物を Western プロットで解析した。左上下パネル、右上下パネルはそれぞれ同じ細胞抽出液を用いた実験系の結果を示した。

と変異体 Rad18DR6 を N 末に T7 タグを付けたヒト Rad6A/B それぞれを図 4B の上段パネルの組み合わせで COS-7 細胞内において共発現させ、免疫沈降反応をおこなった。FLAG-Rad18DR6 は T7-Rad6A/B いずれにも細胞内での結合は認められなかった(図 4B レーン 1, 2, 5 及び 6)。以上の結果よりヒト Rad18 の 340~395 アミノ酸領域はヒト Rad6A/B との結合部位であることがわかった。次に、野生型 *RAD18*、*RAD18DR6* 及び対照ベクターをマウス *RAD18*^{-/-}細胞に導入し、それぞれを発現する安定細胞株を得た。野生型ヒト Rad18 を発現させた安定株では紫外線 20J//m²を照射したところ経時的に PCNA のモノユビキチン化の漸増が認められたが、対照ベクターおよび

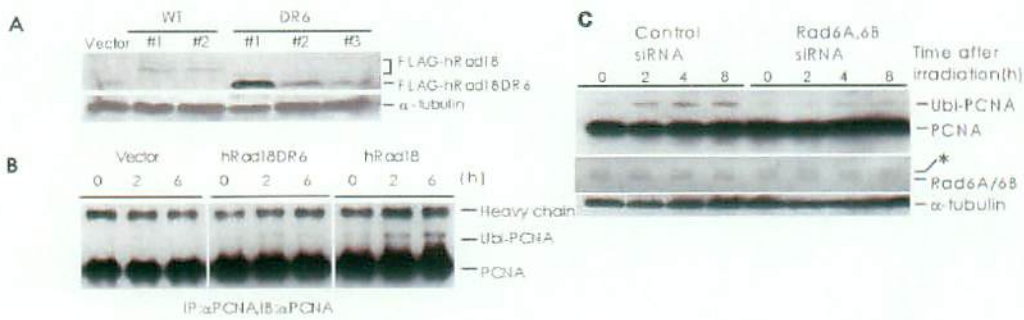


図5 (A)FLAG-Rad18,FLAG-Rad18DR6 および Vector を導入した *RAD18* ノックアウトマウス細胞の安定株の全細胞融解液を抗 Rad18 抗体をもちいて Western ブロットで解析した。(B) A で示した安定株をもちいて紫外線照射後の PCNA のモノユビキチン化の回復を検討した。安定株それぞれに 20 J/m^2 の紫外線を照射し図中に示した時間培養した。その後、細胞抽出液を回収し抗 PCNA 抗体で免疫沈降および Western ブロットをおこなった。(C) WI38VA13 細胞にコントロールおよび Rad6A/B siRNA を導入、4 日間培養した。その際 Rad6A/B のタンパク量を抗 Rad6 抗体をもちいて Western ブロットで解析した。アスタリスクは対照実験と比較して変化がないため非特異的なバンドと判断した。 10 J/m^2 の紫外線を照射した後全細胞融解液を回収し抗 PCNA 抗体をもちいて Western ブロットで解析した。また A,C の α -Tubulin はコントロールとして示した。

Rad18DR6 を発現させた安定株では紫外線照射後の PCNA のモノユビキチン化のバンドの回復は認められなかった(図 5B)。さらに siRNA を用い Rad6A/6B をノックダウンした WI38VA13 細胞に紫外線を照射したところ、PCNA のモノユビキチン化は対照群と比較して有意に抑制されていた(図 5C)。これらのことより、ほ乳類の細胞においても紫外線照射後の DNA 損傷では Rad18 と Rad6A/B 依存性に PCNA がモノユビキチン化されることがわかった。紫外線照射後の PCNA のモノユビキチン化の生物学的な意義を検討するため、

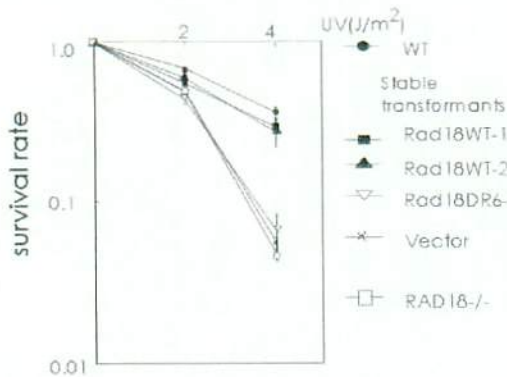


図 6
FLAG-Rad18, FLAG-Rad18DR6 および Vector を導入した *RAD18* ノックアウトマウス細胞の安定株を用いて紫外線にたいする感受性の回復をコロニー形成法で検討した。

これらの安定株の紫外線に対する感受性を検討した。*RAD18DR6* 及び対照ベクターをマウス *RAD18^{-/-}* 細胞に導入した安定株では、ほぼ親

細胞の *RAD18^{-/-}* 細胞と同等の紫外線感受性を示し、野生型 Rad18 を発現する安定株ほどの感受性

の回復は認めなかった(図 6)。

2. Rad18, PCNA の細胞内局在

次に紫外線照射後の Rad18 の細胞内局在について検討した。ヒト細胞では Rad18 を抗 Rad18 抗体で免疫染色すると、それ自身は核内にびまん性に存在しその一部は核内で不規則な大きさを呈する dot 状に認められる(図 7A 左)。紫外線照射後 15 分で核内全体に拡散し、照射前までみられた dot は消失する(図 7A 中央)。また 2~3 時間で照射前とは性状、数量とも異なった、均一の大きさを呈する foci として認められる(図 7A 右)。これらの foci はホルマリンによる前固定をせず 80%メタノールで直接細胞を固定することにより foci を形成していないびまん性の Rad18 が核内から消失し、より明らかとなる。このように紫外線照射により Rad18 は劇的に核内

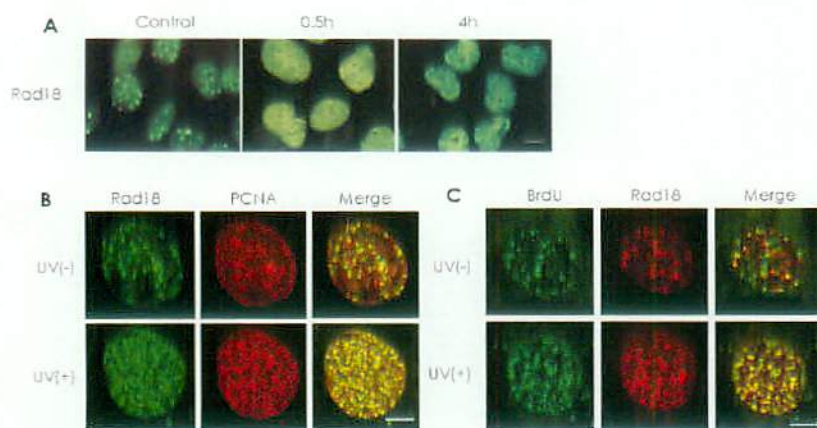


図 7(A)GM637 細胞に紫外線 15 J/m²を照射したのち図中に示した時間培養した。その後ホルマリンで細胞を固定後抗 Rad18 抗体を用いて免疫染色をおこなった。白線は 20μm を示す。(B)GM637 細胞に 15 J/m²の紫外線照射後 4 時間後に細胞をメタノールで固定した。Rad18 と

PCNA の細胞内局在を免疫染色で確認した。(C)未照射または 15 J/m²の紫外線照射後の GM637 細胞を BrdU で 2 時間ラベルしたのちメタノールで固定した。Rad18 と BrdU の細胞内局在を免疫染色で確認した。B,C 図中の白線は 10μm を示す。

局在を変化させることがわかった。Rad18 は細胞内および試験管内の反応系で PCNA をモノユビキチン化することがわかったが、両者の細胞内での局在を免疫染色で検討した。紫外線照射前、両者は核内に存在するがほとんど共局在を示さない(図 7B 上段)。観察されたほとんどの細胞に

において、紫外線照射後1時間ではすでにほとんどの Rad18 の foci は PCNA の foci と共局在していた(図 7B 下段)。この共局在は少なくとも4時間後まで続くことが観察された。

以前の PCNA の細胞内局在に関する研究において、紫外線照射後一部の PCNA はデタージェントに抵抗性となり免疫染色で foci の形成が観察されることが知られている。これは PCNA が DNA 複製および修復に必要な複合体に結合し機能しているためと考えられている。実際に細胞内において、紫外線照射後における Rad18 がその DNA 複製の現場に動員されているかどうかを確認するために、BrdU の取り込みと Rad18 の foci が共局在するかどうかを免疫染色で検討した。紫

外線照射前は両者はほとんど共局在を示さないが、紫外線照射後にはほとんどすべての細胞に

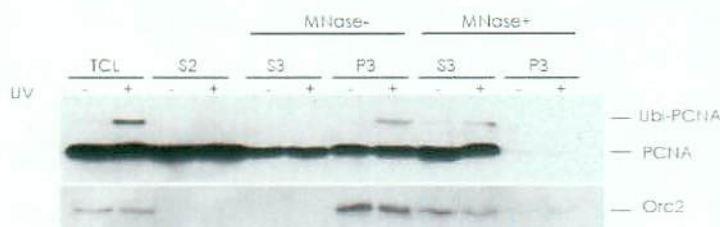


図8 15 J/m²の紫外線照射後6時間培養した HeLa 細胞のクロマチン分画を回収した。さらに Micrococcal nuclease(MNase) で処理したクロマチン分画を回収し抗PCNA抗体でWesternプロットした。Orc2はクロマチン分画

のマーカとして示した。TCL;全細胞融解液 S2;可溶化分画 S3;可溶化核分画 P3;クロマチン分画

において、Rad18 の foci は BrdU の取り込みを示す foci と共局在していた(図 7C)。これらの結果より紫外線照射後に Rad18 が DNA 複製の現場または、その近傍に動員されていると考えられた。この紫外線照射後の Rad18 と PCNA の細胞内共局在と PCNA のモノユビキチン化は XPV 由来の細胞においても観察されることより(データ未提示)、この現象には、pol η の機能は必要がないこともわかった。次にモノユビキチン化 PCNA が核内のどの分画に存在するかを検討した。紫外線照射前後の細胞分画、とくにクロマチン分画とそれ以外の細胞成分にわけて PCNA のモノユ

ビキチン化を Western ブロットにて解析した。モノユビキチン化 PCNA のバンドはクロマチン分画のみで確認された(図 8)。このことよりモノユビキチン化 PCNA は細胞内において遊離した状態で存在しているのではなく、クロマチン分画すなわち PCNA の性質上 DNA 上の複製フォークに存在していることを示唆している。細胞内での Rad18 と PCNA との結合をみるため免疫沈降反応を試みたが結合は確認できなかった。両者の結合はごく弱いか、あるいは一過性に結合するものと思われる。

3. Rad18-Rad6 依存的な pol η の紫外線照射後の核内フォーカス形成

Kanouche らのグループは GFP 融合 pol η を細胞内で発現させ、MMS 処理後や紫外線照射後の pol η の細胞内局在を観察したところ、pol η は核内で複製フォークに一致してフォーカスを形成し、そのフォーカスは PCNA および BrdU の取り込みを示めすフォーカスと一致することを示した。さらにこのフォーカス形成の有無は紫外線感受性に影響することを報告した。そこでこの pol η のフォーカス形成に、同じ RAD6 エピスタシスグループである Rad18 が関与しているかどうか

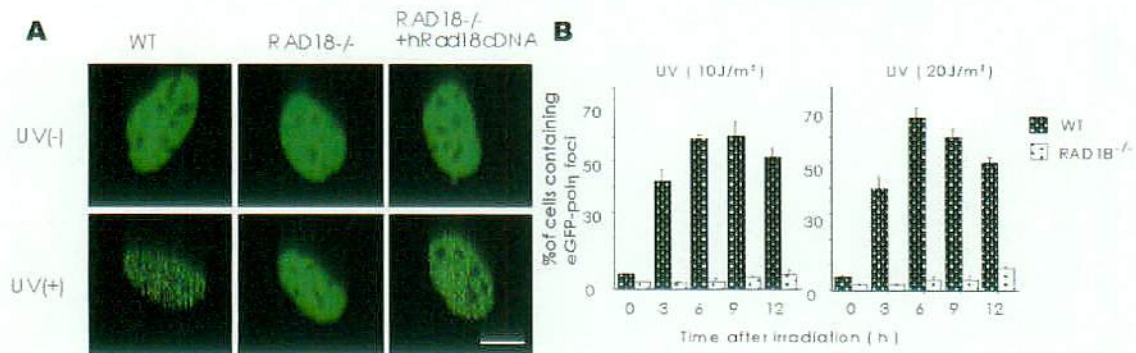


図9 (A)野生型細胞、RAD18 ノックアウトマウス細胞に eGFP-pol η を導入発現させ、紫外線 15 J/m²を照射し 6 時間後に細胞をホルマリンで固定した(左、中央パネル)。右パネルは RAD18 ノックアウトマウス細胞に eGFP-pol η と Rad18cDNA を同時に導入発現させた。白線は 10 μ m を示す。(B) 野生型細胞、RAD18 ノックアウトマウス細胞に eGFP-pol η を導入発現させ、紫外線照射後フォーカスを形成している細胞の割合経時的に示した。

を検討した。ノックアウトマウスの細胞に GFP-pol η を一過性に導入発現させその細胞に紫外線照射をした。ほとんどの RAD18 ノックアウトマウスの細胞では、野生型の細胞で認められるような微小なフォーカス形成は認めなかった(図 9A)。野生型および RAD18 ノックアウトマウスの細胞において紫外線照射後、時間経過とともに GFP-pol η がフォーカスを形成している細胞の割合を検討した。RAD18 ノックアウトマウスの細胞では優位な差を持って GFP-pol η のフォーカス形成を認める細胞の割合が少なかった。またこの GFP-pol η のフォーカス形成を認める細胞の割合は 10~20J/m²の紫外線照射後では6時間までは約70%程度まで徐々に増加し、その後は24時間まで一定の割合を呈した(図 9B)。RAD18 ノックアウトマウスの細胞に GFP-pol η と RAD18の cDNA を共発現させ紫外線を照射したところ、GFP-pol η のフォーカス形成を認める細胞の割合は、

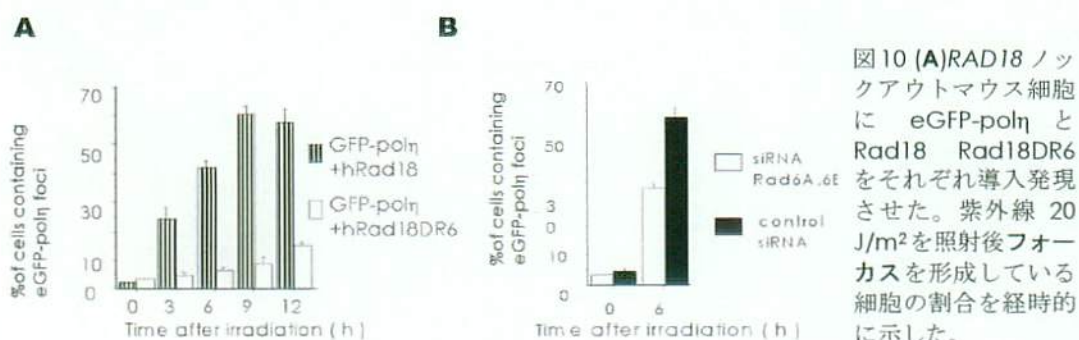


図 10 (A)RAD18 ノックアウトマウス細胞に eGFP-pol η と Rad18 Rad18DR6 をそれぞれ導入発現させた。紫外線 20 J/m²を照射後フォーカスを形成している細胞の割合を経時的に示した。

(B)WI38VA13 細胞に Rad6A/BsiRNA を導入し3日間培養した。その後さらに eGFP-pol η を導入発現させ、20 時間後、紫外線 10 J/m²を照射しフォーカスを形成している細胞の割合を示した。

野生型のマウスの細胞に GFP-pol η を一過性に導入発現させた時と同程度まで回復した(図 9A, 図 10A)。しかしながら GFP-pol η と RAD18DR6 の cDNA を共発現させ紫外線を照射したところ、野生型までには回復しなかった(図 10A)。次にこのフォーカス形成の回復が認められないという

現象が、Rad6 と Rad18 との相互作用がなくなったために生じたものかを検討するために、Rad6 siRNA をもちいて Rad6 をノックダウンしたヒト細胞において GFP-pol η を導入し紫外線を照射後の GFP-pol η のフォーカス形成を検討した。まずこの実験系において、siRNA によって実際に Rad6A/B の減少がみられることを Western ブロットで確認した(図 5C)。この siRNA を作用させた細胞に GFP-pol η を導入した後、紫外線照射し 6 時間後の GFP-pol η のフォーカス形成を認める細胞の割合を検討したところ、Rad6A/B の siRNA を作用させた細胞では明らかに、フォーカス形成を認める細胞の割合が減少していた(図 10B)。このことより紫外線照射後の GFP-pol η のフォーカス形成は Rad18 および Rad6A/B に依存的であることがわかった。

4. Rad18 と pol η との結合

内在性の pol η は免疫染色では確認できなかったため、ヒト細胞において GFP-pol η と Flag-Rad18 を同時に導入し、紫外線照射前後の両者の細胞内局在を免疫染色で確認した。紫外線照射前はいずれのタンパクも核内にび慢性に存在していた。照射後は核内に均一な微細フォ

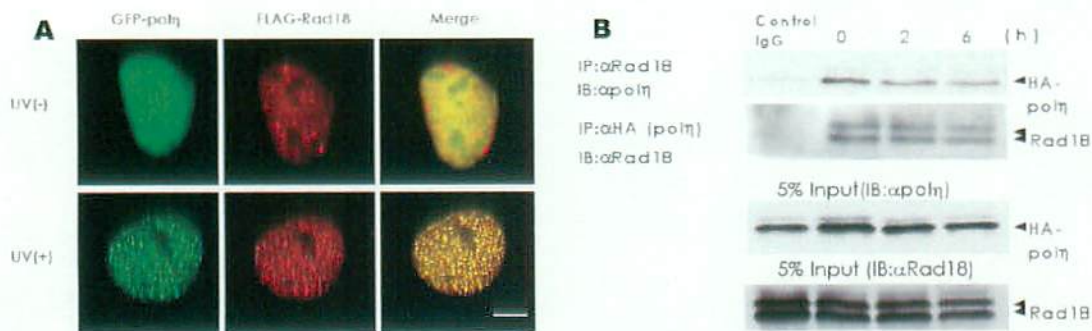


図 11 (A) GM637 細胞に eGFP-pol η と FLAG-Rad18 をともに導入発現させ、紫外線 10 J/m² を照射した。6 時間後に細胞を固定、抗 FLAG 抗体で免疫染色し両者の細胞内局在を確認した。白線は 10 μ m を示す。(B) GM637 細胞に HA-pol η を導入発現させ、紫外線 12.5 J/m² を照射した。6 時間後細胞抽出液を回収、抗 Rad18、抗 HA 抗体をもちいて免疫沈降反応をおこなった。沈降産物を抗 Rad18 抗体、抗 pol η 抗体をもちいて Western ブロットで解析した

—カスを形成し、ほぼ 100%の割合で同一の局在を呈していた(図 11A)。両者の結合をみるため HA タグをつけた pol η をヒト細胞に導入し内在性の Rad18 との結合を免疫沈降反応で検討した。pol η と Rad18 は相互に弱く結合しているためか、通常の免疫沈降反応では両者の結合は確認できなかった。そのため細胞をタンパク架橋剤である DTBP で処理後、免疫沈降反応をおこなった。その結果、Rad18 は紫外線照射の有無にかかわらず、pol η と恒常的に結合していた(図 11B)。紫外線照射後に 2 つのタンパク量の増加および結合性の増強はみとめられなかった。さらにこの

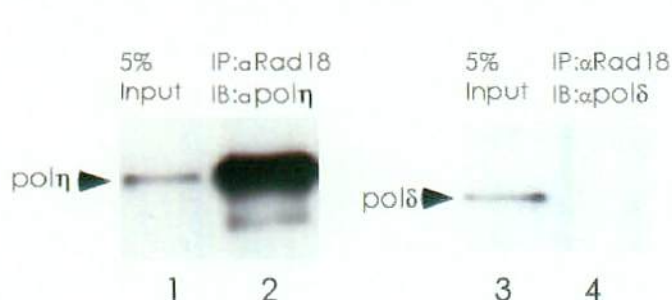


図 12 昆虫細胞で発現させ精製した Rad18, pol η および pol δ をもちいて試験管内で免疫沈降反応をおこなった。レーン 2 では Rad18 と pol η 、レーン 4 では Rad18 と pol δ を試験管内で混合し抗 Rad18 抗体で免疫沈降反応をおこなった。沈降産物を Western ブロットで解析した。

結合が直接的なものであるかどうかを検討するために、昆虫細胞より得たリコンビナント Rad18 及び pol η を用いて試験管内での結合を調べた。その結果、Rad18 と pol η の両タンパクは直接結合していることがわかった(図 12)。

次に pol η 側の Rad18 との結合部位について検討した。N 末に GST を融合させた pol η の変異体タンパクを昆虫細胞で発現させ精製した(図 13A)。これらの GST タンパクでヒト細胞の抽出液をもちいて pull down assay をおこなった。その結果、pol η 側の結合部位はその C 末 158 アミノ酸(556~713 番アミノ酸領域)の範囲にあることがわかった(図 13A)。同様にして、Rad18 側の結合部位についても検討した。COS-7 細胞に Myc タグをつけた Rad18 とその変異体を発現させたのち細胞抽出液を回収し、図 13B で用いた GST- pol η 158C をもちいて pull down assay をおこ

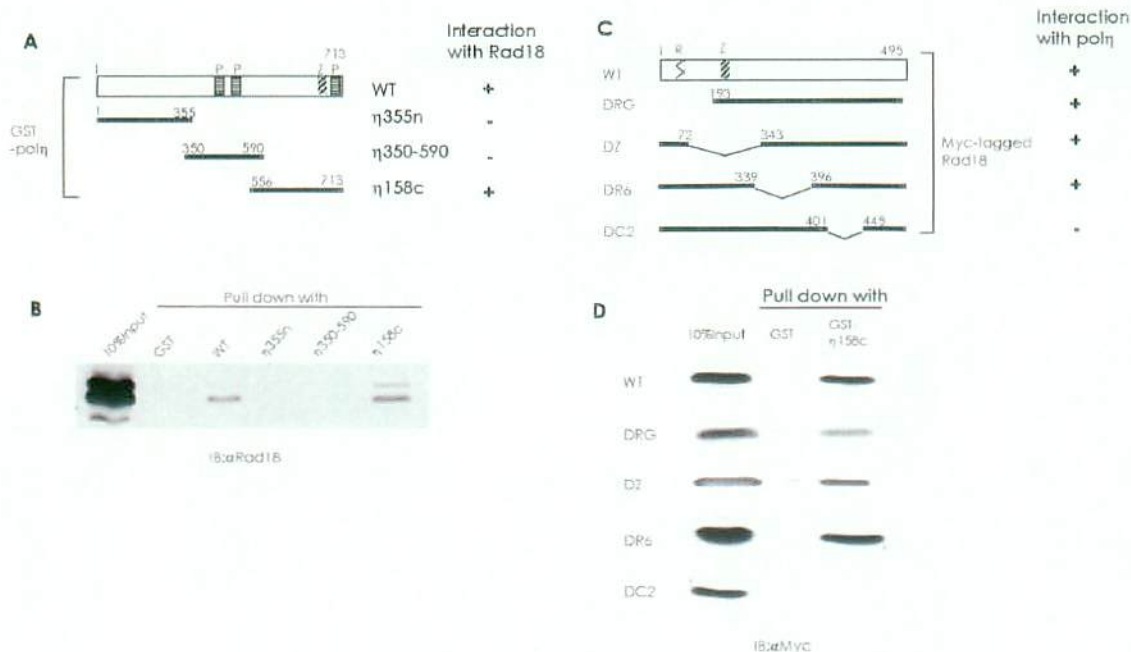


図 13 (A)N 末に GST タンパクを融合した polη と変異体 polη のタンパク構造を示す。P;PCNA 結合部位 Z; Zinc finger モチーフを示す。(B)GM637 細胞の細胞抽出液を A で示した GST 融合 polη タンパクおよび GST をもちいて pull down をおこなった。Rad18 抗体を用い GST 融合タンパクに結合した内在性の Rad18 タンパクを Western プロットで解析した。(C) C 末に Myc タグを付けた Rad18 と変異体 Rad18 のタンパク構造を示す。R;RING finger モチーフ Z; Zinc finger モチーフを示す(D)COS-7 細胞に C で示した Myc タグのついた Rad18 を導入発現させその細胞抽出液を GST 融合 polη158c タンパクおよび GST をもちいて pull down をおこなった。

なった。この結果 Rad18 の 402~444 番アミノ酸領域を欠損させた変異体のみが GST-polη 158C

との結合を示さなかった(図 13C, D)。以上の結果から polη の結合部位は Rad18 の 402~444 番

目のアミノ酸領域であることがわかった。

これらのタンパク結合の生物学的な重要性を検討するために RAD18 ノックアウトマウス細胞に

GFP-polη と Rad18DC2 を同時に導入し、紫外線照射前後の polη のフォーカスを形成している細

胞の割合を検討した。その結果 RAD18DC2 を導入したときには、野生型 RAD18 を同時に導入した

ときのような回復は認められなかった(図 14A)。さらに Rad18DC2 を発現する RAD18 ノックアウ

トマウス安定細胞株を作製し、紫外線照射に対する感受性およびその際の PCNA のモノユビキチ

ン化について検討した。Rad18DC2 と Rad6A/B との結合性は図 2 同様な COS-7 をもちいた免疫沈降反応の系で認められた(データ未提示)。これらの安定株では紫外線照射後の PCNA のモノユビキチン化は認められたが、紫外線に対する感受性は回復しなかった(図 14B, C)。これらの結果は Rad18 と pol η の相互の結合は pol η のフォーカス形成に重要であることを示している。

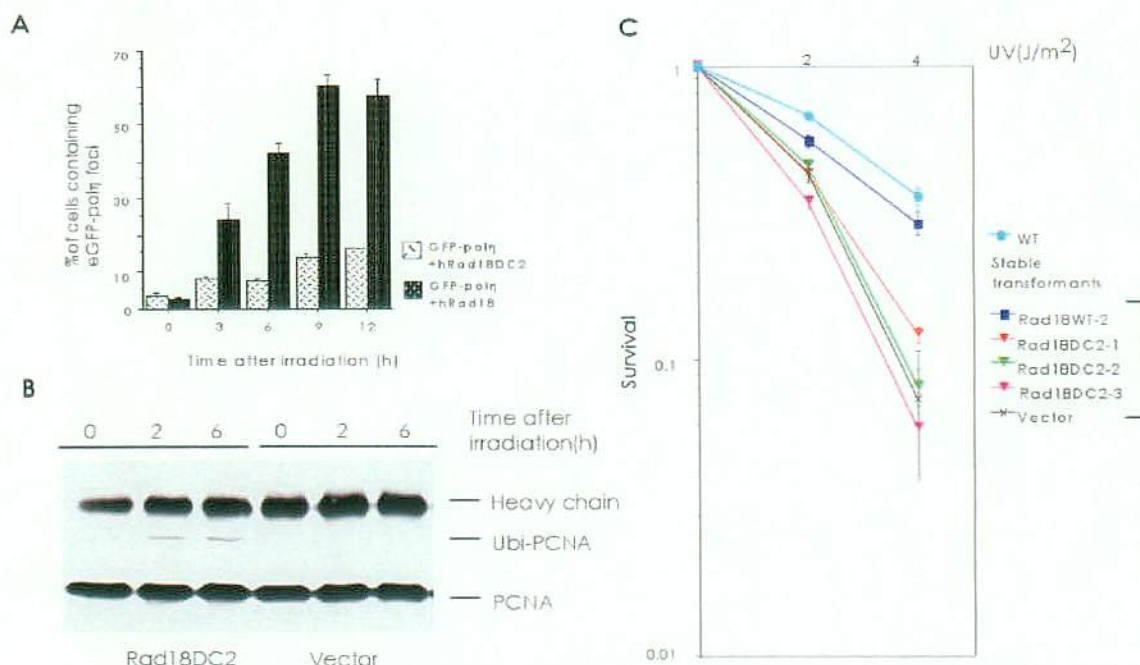


図 14 (A) RAD18 ノックアウトマウス細胞に eGFP-pol η と RAD18、RAD18DC2 をそれぞれ導入発現させ、紫外線 20 J/m² を照射後 foci を形成している細胞の割合経時的にを示した。(B) 安定株をもちいて紫外線照射後の PCNA のモノユビキチン化の回復を検討した。RAD18 ノックアウトマウス細胞に FLAG-Rad18DC2 を発現させた安定株に 20 J/m² の紫外線を照射し図中に示した時間培養した。その後、細胞抽出液を回収し抗 PCNA 抗体で免疫沈降および Western プロットをおこなった。対照実験として図 5A,B の Vector 発現安定細胞株を用いた。(C) FLAG-RAD18, FLAG-RAD18DC2 および Vector を導入した RAD18 ノックアウトマウス細胞の安定株を用いて紫外線に対する感受性の回復をコロニー形成法で検討した。FLAG-Rad18DC2 発現安定株は独立した 3 クローンをもちいて実験をおこなった。

5. Pol η とモノユビキチン化 PCNA との結合性

紫外線照射後に生じるモノユビキチン化 PCNA がポリメラーゼスイッチングにどのように関与しているのかを検討するために、まずモノユビキチン化 PCNA と pol η との結合を pull down assay

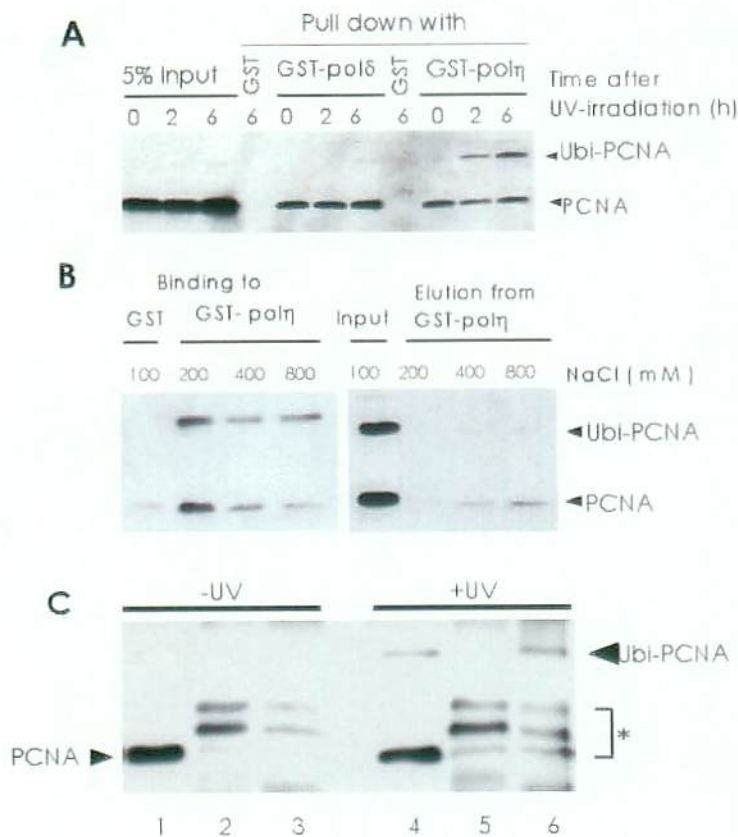


図 15 (A) HeLa 細胞に未照射または紫外線を 20 J/m² 照射し図中に示した時間培養した。その後細胞抽出液を回収し GST、GST-pol δ および GST-pol η で pull down をおこなった。沈降産物を抗 PCNA 抗体をもちい Western プロットで解析した。(B) 左パネルは異なる塩濃度で細胞抽出液を準備し GST-pol η で pull down をおこない、沈降産物を抗 PCNA 抗体をもちい Western プロットで解析した。右パネルは GST-pol η をもちい 100mM の塩濃度で pull down した沈降産物を図中の塩濃度バッファーで再抽出した。その上清を回収し抗 PCNA 抗体をもちい Western プロットで解析した。(C) GM637 細胞に HA-pol η を導入発現させ 20 J/m² の紫外線を照射後 5 時間培養した。細胞抽出液を準備するまえに細胞を NP-40 さらに DTBP で処理した。レーン 2,5 は対照 IgG, レーン 3,6 は抗 PCNA

抗体で免疫沈降反応をおこなった。レーン 1,4 は全細胞抽出液中の 5% を回収し抗 PCNA 抗体をもちい Western プロットで確認した。アスタリスクはそれぞれの対照実験で認められるため非特異的バンドと考えられる。

で検討した。その結果、pol η には未修飾の PCNA だけではなくモノユビキチン化 PCNA と

の結合も認められた(図 15A)。対照実験で用いた pol δ は未修飾の PCNA には結合が認められたが

モノユビキチン化 PCNA との結合はほとんどみられなかった。次に pol η と PCNA 及びモノユビキ

チン化 PCNA それぞれに対する親和性について検討した。図 15A で行った実験を異なる塩濃度で

調整した細胞抽出液を用いて pull down assay をおこなった。高い塩濃度で pull down assay

をおこなうと高分子側のモノユビキチン化 PCNA が未修飾の PCNA に比して優位に pol η に結合し

ていることがわかった(図 15B 左)。また、100mM の塩濃度で pull down assay をおこなった沈

降産物を異なる塩濃度で溶出した。その際モノユビキチン化 PCNA と比べて未修飾の PCNA は容

易に上清中に溶出されることがわかった(図 15B 右)。これらのことより pol η はモノユビキチン化 PCNA に対して強い親和性があると考えられた。一方 pol δ はモノユビキチン化 PCNA には親和性は認めなかった。次に細胞内での pol η とモノユビキチン化 PCNA との結合を免疫沈降反応で検討した。GM637 細胞に HA タグのついた pol η を導入発現させたのち紫外線照射した。その際、DNA 複製の場所でフォーカスを形成した pol η と PCNA との結合を調べるため、細胞抽出液を調整する直前に細胞を NP-40 で処理し核内で遊離している PCNA 及び pol η を除去した。細胞抽出液を抗 pol η 抗体で免疫沈降し、その沈降産物を Western blot で解析したところ、紫外線照射依存的に pol η と結合したモノユビキチン化 PCNA が検出されたが未修飾の PCNA は検出されなかった(図 15C)。これらのことより、紫外線照射した細胞の核内においてもモノユビキチン化 PCNA 及び pol η は結合し複合体を形成していることがわかった。このモノユビキチン化 PCNA 及び pol η 両者の結合が直接的か間接的な結合かを検討するために、図 3 で用いた試験管内の PCNA のユビキチン化実験の実験系を用いて PCNA をユビキチン化しておき、次にその反応液中から抗 Rad18 抗体を用いてユビキチン化反応にもちいた RAD18 タンパクを反応液から除去した。Rad6 は Rad18 と強固に結合していることが知られており、その際 Rad6B も同時に反応液中から除去できたことを Western プロットで確認した(図 16A)。この反応液中で PCNA 及びモノユビキチン化 PCNA と pol η の結合を pull down assay で確認した。GST- pol η をもちいて pull down assay をおこなった場合には PCNA 及びモノユビキチン化 PCNA との結合が認められたが、対照実験として C 末の PCNA との結合部位を欠損させた変異型の GST- pol η 355n では結合は認められなかった(図

16C)。

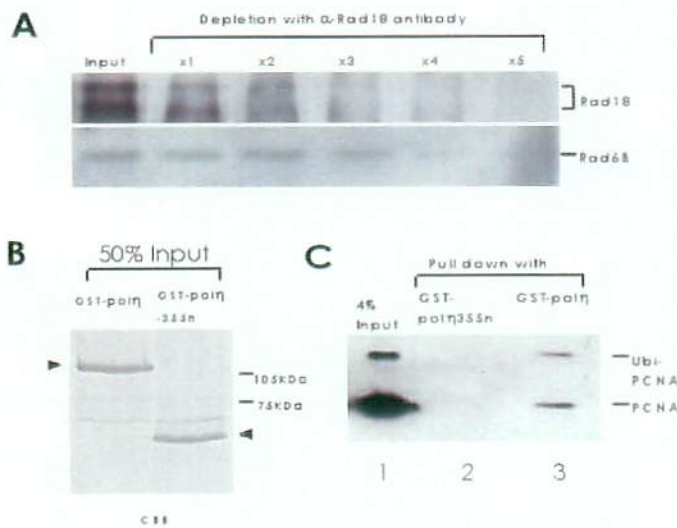


図 16 (A)試験管内で PCNA のユビキチン化反応をおこなった反応液から抗 Rad18 抗体をもちいて計 5 回の免疫沈降反応をおこない Rad18, Rad6B タンパクが反応液から除去されたことを確認した。(B) Pull down でもちいた GST-pol η , GST-pol η 355n の 50% 量を SDS-PAGE で分離し CBB 染色した。矢頭が精製タンパクを示す。右端に分子量マーカーを示した。CBB; Coomassie Brilliant Blue (C) A で 5 回の免疫沈降反応をおこなった反応液で GST-pol η , GST-pol η 355n をもちいて pull down をおこなった。レーン 1 は反応液の 4% を回収し抗 Rad18 抗体を用いて Western プロットをおこなった。

これらの結果より、pol η とモノユビキチン化 PCNA 両者の結合は直接的であることがわかった。

6. pol η , pol δ および PCNA の細胞内局在

最後に紫外線照射後の細胞内での Rad18, PCNA 及び pol η 3 者の細胞内局在を免疫染色にて検討

した。まず GM637 細胞に GFP-pol η を導入し、紫外線照射後の内在性の pol δ との局在を検討し

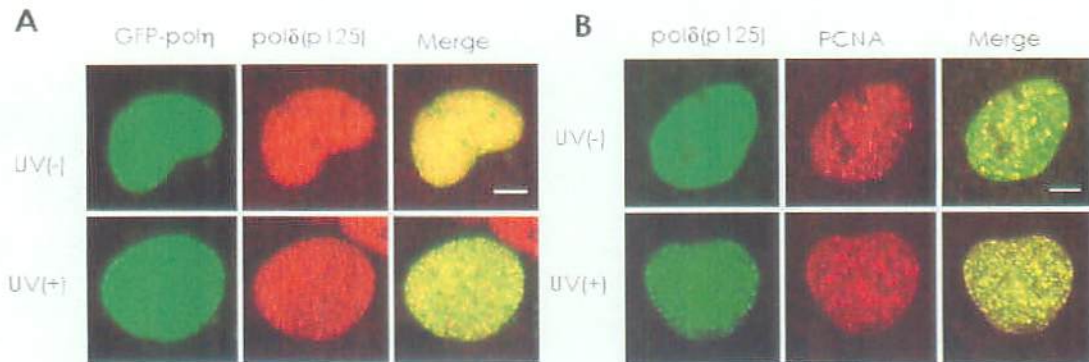


図 17 (A) GM637 細胞に GFP-pol η を導入発現させた。10 J/m²の紫外線照射し 5 時間培養後に細胞を固定した。抗 pol δ 抗体(catalytic subunit p125 に対する抗体)をもちい免疫染色した。(B) WI38VA13 細胞に 10 J/m²の紫外線照射し 5 時間培養後に固定した。抗 pol δ 抗体, 抗 PCNA 抗体をもちいて免疫染色した。白線はいずれも 5 μ m を示す。

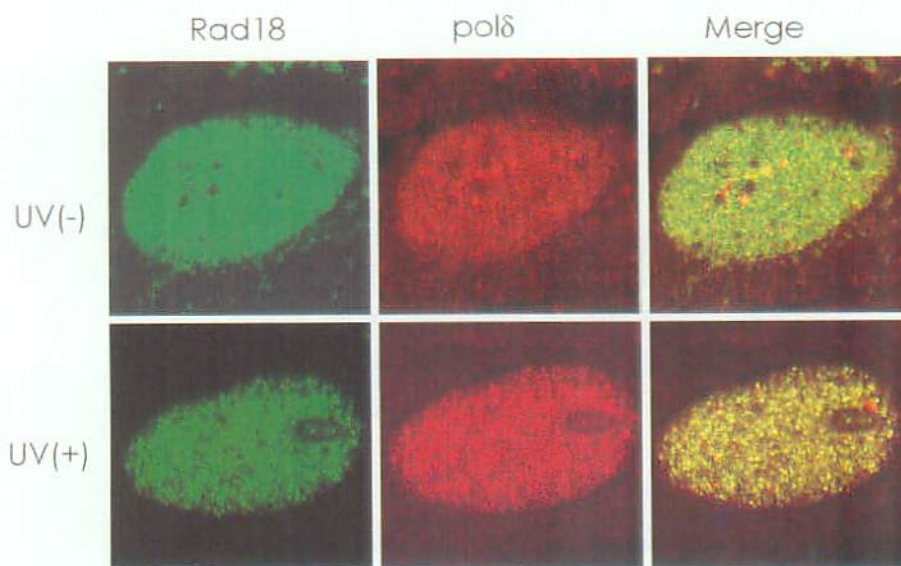


図 18 GM637 細胞 10 J/m^2 の紫外線照射し 5 時間培養後に細胞を固定した。抗 Rad18 抗体、抗 pol δ 抗体(catalytic subunit p125 に対する抗体)をもちい免疫染色した。白線は $5\mu\text{m}$ を示す

た。同一核内において 50%以上の GFP- pol η のフォーカスが pol δ との共局在を示した(図 17A)。

また、WI38VA13 細胞において内在性の pol δ と PCNA の局在を検討した。紫外線照射後には同一核内において、pol δ と PCNA の共局在を認めた(図 17B)。同様にして Rad18 と pol δ の細胞内局在を観察したところ、紫外線照射後には両者の局在がほぼ一致した(図 18)。これらの結果と図 11A より Rad18 は pol η と pol δ の両ポリメラーゼとともに紫外線によって生じた DNA 複製停止の場所またはその近傍に同時に局在すると考えられた。

⑧考察

pol η は損傷のない鋳型 DNA を合成する際かなり間違いが多く、 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ 個に 1 個の割合で誤った塩基を挿入することが知られている (Washington et al, 1999)。そのため、通常の複製の現

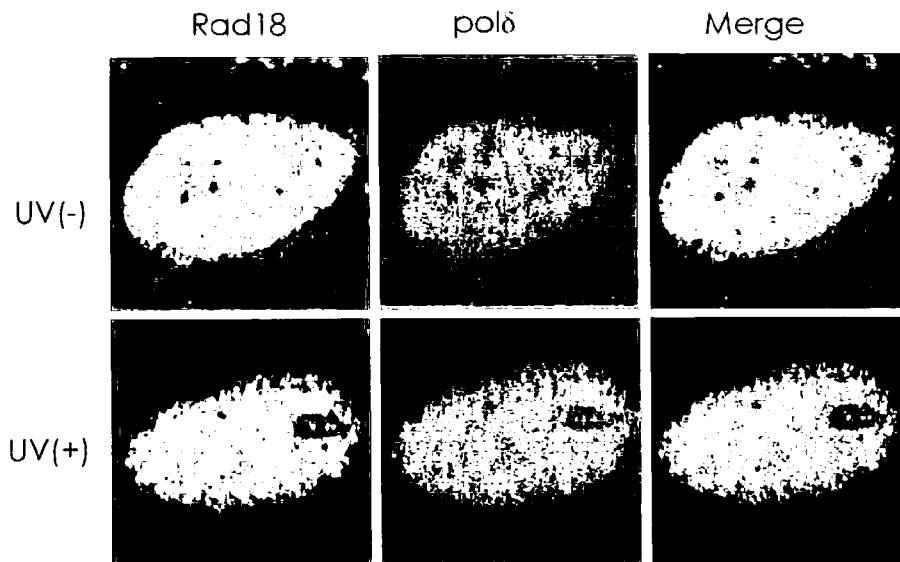


図 18 GM637 細胞 10 J/m²の紫外線照射し 5 時間培養後に細胞を固定した。抗 Rad18 抗体、抗 pol δ 抗体(catalytic subunit p125 に対する抗体)をもちい免疫染色した。白線は 5 μ m を示す

た。同一核内において 50%以上の GFP- pol η のフォーカスが pol δ との共局在を示した(図 17A)。

また、WI38VA13 細胞において内在性の pol δ と PCNA の局在を検討した。紫外線照射後には同一

核内において、pol δ と PCNA の共局在を認めた(図 17B)。同様にして Rad18 と pol δ の細胞内局在

を観察したところ、紫外線照射後には両者の局在がほぼ一致した(図 18)。これらの結果と図 11A

より Rad18 は pol η と pol δ の両ポリメラーゼとともに紫外線によって生じた DNA 複製停止の場所

またはその近傍に同時に局在すると考えられた。

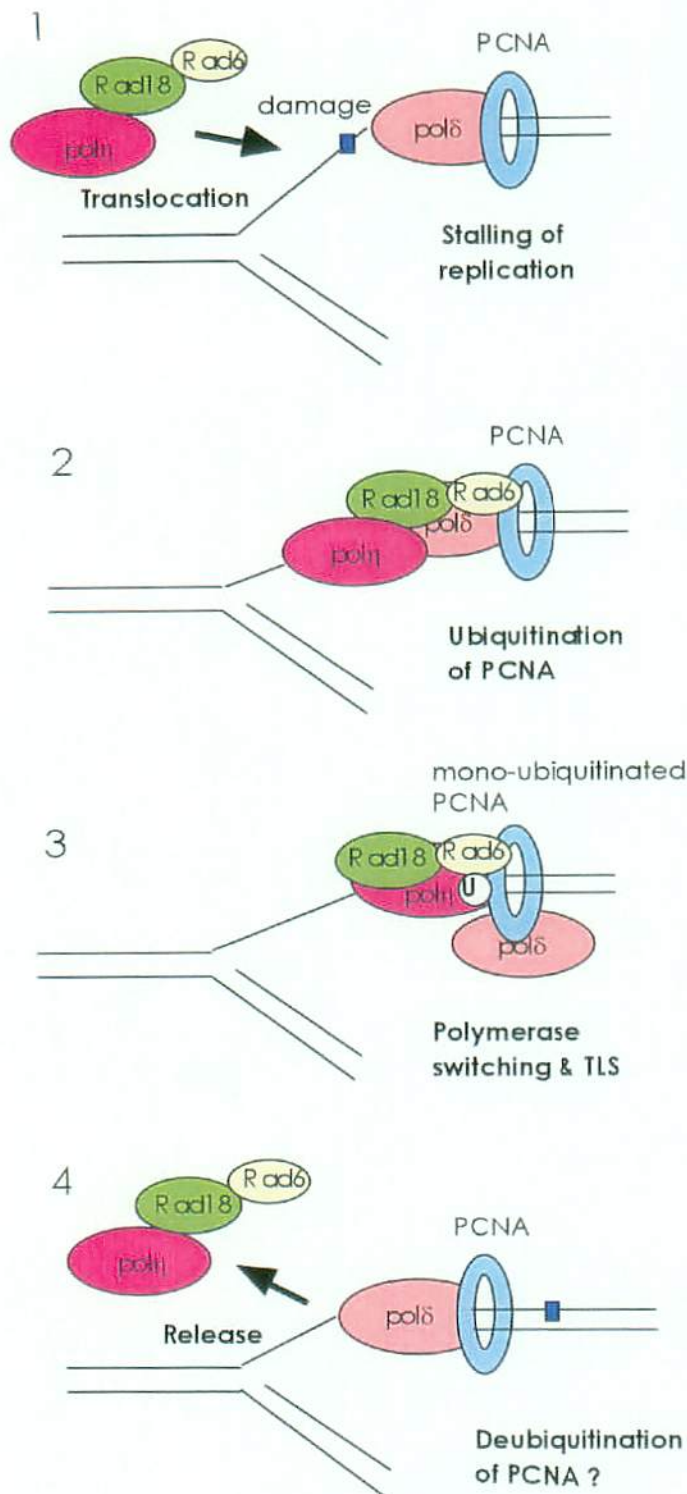
⑧考察

pol η は損傷のない鋳型 DNA を合成する際かなり間違いが多く、 10^{-2} ~ 10^{-3} 個に 1 個の割合で誤つ

た塩基を挿入することが知られている (Washington et al, 1999)。そのため、通常の複製の現

場ではその pol η の機能は抑制されていなければならないと考えられる。この pol η の機能にはその細胞内局在が深く関わっていると思われる。Kannouche らは紫外線や MMS などの変異原に細胞が暴露されると、通常は核内にび漫性に存在する pol η が、核内で微細なフォーカスを形成することを報告した。今回 pol η は紫外線照射の有無にかかわらず Rad18 と直接的に結合していたが、通常条件下で DNA 合成をおこなっている pol δ には結合していなかった(図 12)。Rad18 は紫外線照射依存的に核内全体に拡散し、再び核内に微細なフォーカスを形成した(図 7A)。この紫外線照射後に生じる Rad18 のフォーカスには pol η と PCNA が共局在していた(図 11A)。これらの結果から Rad18 と pol η が複合体を形成しながら、紫外線照射によって生じた DNA 複製の停止している現場に両者が集まりフォーカスを形成していると考えられた。さらに pol η のフォーカス形成には Rad6A/B が必要であることが以下の実験結果よりわかった。(i) RAD18 ノックアウトマウスの細胞に pol η と Rad6A/B との結合部位を欠損させた変異 Rad18DR6 を同時に発現させると GFP-pol η の紫外線照射後に核内にフォーカスを形成する細胞の割合が減少した(図 10A)。(ii) siRad6A/B を導入した細胞に GFP-pol η をさらに導入すると、対照 siRNA を導入した細胞に再導入したものに比して明らかに紫外線照射後のフォーカスを形成する細胞の割合が減少した(図 10B)。これらの結果は pol η のフォーカス形成には Rad18 と Rad6A/B がいずれも必要であることを示している。Rad18 と pol η はともに一本鎖 DNA に結合するタンパクであることがわかっている。Rad18 は CPD などの損傷塩基で複製が阻害された鋳型 DNA 上に生じた複製機構近傍の一本鎖 DNA に結合することが考えられる。Rad18 は通常は核内で、図 7A 左で示すように不均一な

比較的大きな dot 状に局在している。しかし、紫外線照射など細胞にひとたび損傷が加わると、短時間のうちに（30 分後より観察される）核内に均一に拡散しその局在は劇的に変化する。この Rad18 の劇的な局在変化は紫外線照射だけではなく Hydroxyurea で処理した細胞においても観察されるため、おそらく DNA に損傷が生じたためではなく、複製が停止することによって引き起こされると考えられる。また、Hydroxyurea で処理した細胞においても PCNA のモノユビキチン化が観察された（データ未提示）。この Rad18 の拡散は Cyclohexymide で処理した細胞でも観察される（データ未提示）ことより、新規のタンパク合成は必要ではなく、Rad18 の翻訳後修飾（たとえばリン酸化など）が関与している可能性が考えられる。今回の実験結果より、TLS におけるポリメラーゼスイッチングに関して次のようなモデルを考えた。紫外線照射により DNA に CPD などの障害が生じると、DNA 合成を続けていた PCNA と pol δ などの複製機構はその DNA 損傷のある領域で複製を遂行することができなくなる（図 19-1）。その複製の停止がきっかけとなり Rad18-Rad6-pol η の複合体が、おそらく何らかのキナーゼ（リン酸化または脱リン酸化酵素？）により活性化される。Rad18 は 1 本鎖 DNA 結合能を有するため、PCNA と pol δ の複製機構が停止することによって生じた 1 本鎖 DNA に Rad18-Rad6-pol η の複合体が結合すると考えられる。そこで PCNA と Rad18-Rad6 が結合することによって PCNA が DNA 上でモノユビキチン化される（図 19-2）。モノユビキチン化された PCNA から親和性の弱い（図 15A）pol δ がはずれてしまう。かわりにモノユビキチン化 PCNA に強い親和性を持った pol η が結合し、TLS をおこなう（図 19-3）。TLS が終了した後再びもとの pol δ に置き換わる必要がある。一つの可能性としてモノユビキチン化



PCNA が脱ユビキチン化されるこ
とが考えられる (図 19-4)。この
ように DNA の複製が停止すると、
Rad18 が PCNA をモノユビキチン
化することでポリメラーゼスイ
ッチングのきっかけをつくって
いるモデルが考えられた。

図 19 紫外線照射による DNA 損傷が生じ、DNA 複製機構が停止した際の Rad18/Rad6 によるポリメラーゼスイッチングモデル。4 は今回の実験ではその根拠は示していないが 1 つの仮説モデルとして示した。(本文参照)

PCNA がモノユビキチン化される場所は複製機構が停止した場所なのか、または別の場所でモノユビキチン化され複製機構が停止した場所に持ってこられるのかは現在のところはっきりとし

ない。また Rad6 は通常の状態では Rad18 だけではなく Ubr1, Bre1 といった他の E3 と結合していることが知られている (Dohmen et al, 1991; Watkins et al, 1993) が Rad6 そのものには一本鎖 DNA には結合能がない (Bailly et al, 1994)。そのため図 7A でみられるような紫外線照射後の Rad18 の核内拡散は Rad6 との結合の機会を増しているのではないかと考えられる。通常の複製における pol α と pol δ とのスイッチングでは pol δ は PCNA に結合できるが pol α はそれができないことから、PCNA が DNA にローディングされることが重要であった (Turimoto and Stillman, 1991)。しかし pol η と pol δ のスイッチングでは PCNA が DNA にローディングされることが重要であるとは考えにくい。なぜなら pol η と pol δ はいずれも PCNA と結合できるからである (Turimoto and Stillman, 1991; Haracska et al, 2001b)。今回の実験で pol η はモノユビキチン化 PCNA にたいし非常に強い親和性が認められたが、一方 pol δ では認められなかった。おそらくこのことが TLS における pol $\delta(\epsilon)$ から pol η へのポリメラーゼスイッチングの原動力となっているのではないかと推測される。

最近免疫グロブリン遺伝子の可変領域 (variable resion) には高頻度で転移型ヌクレオチドの変異が認められることがわかった (Gearhart and Wood, 2001)。これらの体細胞突然変異には Y-family のポリメラーゼが関与していることがわかってきた (Xeng et al 2001; Faili et al, 2002, 2004)。また pol η は細胞内で pol ι と複合体を形成していることがわかっている (Kannouche et al, 2002)。マウスでは Rad18 は組織特異性の発現が認められ精巣で高頻度に発現しているが、そのほか胸腺、脾臓にも中等度の発現が認められる (Laan et al, 2000)。これら

のことより Rad18 は pol η と複合体を形成し、さらにこれらの “誤りがちな” ポリメラーゼを hot spot に呼び込み、体細胞突然変異の発生率を上げている可能性が考えられる。

また臨床的には XPV の患者の遺伝子的解析によりその原因遺伝子である pol η の変異が解析され、その大部分が pol η の C 末端側のアミノ酸を欠損した変異であることが知られている。その変異の種類により Broughton らは Class I ~ Class III に分類しているが、全 713 アミノ酸のうちその C 末端の大部分を欠損した Class I と今回 Rad18 の結合部位と同定された C 末端約 120 アミノ酸を欠損した比較的欠損部位が少ないグループではほとんど臨床症状に差がみられない。また、試験管内でこれらの変異体 pol η のタンパクをもちいて TLS の活性を検討してみると Class I に属する変異体 pol η では TLS の活性は全く認めないが、Class III に属する変異 pol η ではその活性が認められる。このことより細胞内では pol η と Rad18 の結合が重要であることが示唆される。

今回の実験結果より細胞レベルでは pol η だけでなく Rad18 に変異が認められることにより紫外線感受性が増し、XPV 様の表現型が生じる可能性が示唆された (Rad18DR6, Rad18DC2 などの欠失変異 ; 図 10A, 図 14A) 。現在までのところ、文献的には色素性乾皮症バリエントの臨床症状を呈する患者の pol η には何らかの変異が確認されているが、今後 pol η には異常は認めないが色素性乾皮症バリエント様の臨床症状を呈し、原因が不明の患者では Rad18 の異常も念頭に置いた検索が必要になるかもしれない。

⑨結語

紫外線照射後の哺乳動物の細胞において、損傷 DNA によって複製機構が停止すると Rad18/Rad6A, B 依存性に PCNA がユビキチン化される。さらに DNA 損傷部に Rad18 によって pol η が動員されると、モノユビキチン化 PCNA とポリメラーゼとの親和性の違いにより pol δ から pol η へのポリメラーゼスイッチングがおこり損傷乗り越え合成がおこなわれると考えられる。このように損傷 DNA にたいする pol η による損傷乗り越え合成に Rad18 が初期の段階で関与していることがあきらかとなった。

⑩参考文献

Bailly V, Lamb J, Sung P, Prakash S, Prakash L (1994) Specific complex formation between yeast RAD6 and RAD18 proteins: a potential mechanism for targeting RAD6 ubiquitin-conjugating activity to DNA damage sites. *Genes Dev* 8: 811-820

Bailly V, Lauder S, Prakash S, Prakash L (1997a.) Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities. *J Biol Chem* 272: 23360-23365

Bailly V, Prakash S, Prakash L (1997b) Domains required for dimerization of yeast Rad6 ubiquitin-conjugating enzyme and Rad18 DNA binding protein. *Mol Cell Biol* 17: 4536-4543

Bridges BA, Woodgate R (1985) The two-step model of bacterial UV mutagenesis. *Mutat Res* 150:133-139.

Bridges BA (1999) DNA repair: Polymerases for passing lesions *Curr Biol* 9: R475-R477

Broomfield S, Hryciw T, Xiao W (2001) DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 486: 167-184

Broughton BC, Cordonnier A, Kleijer WJ, Jaspers NGJ, Fawcett H, Raams A, Garritsen VH, Sary A, Avril MF, Boudsocq F, Masutani C, Hanaoka F, Fuchs RP, Sarasin A, Lehmann AR (2002) Molecular analysis of mutation in DNA polymerase η in xeroderma pigmentosum-variant patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 815-820

Burgers PM, Koonin EV, Bruford E, Blanco L, Burtis KC, Christman MF, Copeland WC, Friedberg EC, Hanaoka F, Hinkle DC, Lawrence CW, Nakanishi M, Ohmori H, Prakash L, Prakash S, Reynaud CA, Sugino A, Todo T, Wang Z, Weill JC, Woodgate R (2001) Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature. *J Biol Chem*. 276: 43487-43490.

Cassier-Chauvat C, Fabre F (1991) A similar defect in UV-induced mutagenesis conferred by the rad6 and rad18 mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 254:247-253.

Dohmen RJ, Madura K, Bartel B, Varshavsky A (1991) The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7351-7355

Faili A, Aoufouchi S, Flatter E, Guéranger Q, Reynaud CA, Weill JC (2002) Induction of somatic hypermutation in immunoglobulin genes is dependent on DNA polymerase iota. *Nature* 419:944-947.

Faili A, Aoufouchi S, Weller S, Vuillier F, Sary A, Sarasin A, Reynaud CA, Weill JC (2004) DNA polymerase eta is involved in hypermutation occurring during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 199:265-270.

Friedberg EC, Walker GC, Siede W (1995) in DNA Repair and Mutagenesis pp.407-593, *ASM Press*, Washington, D.C.

Gearhart PJ, Wood RD (2001) Emerging links between hypermutation of antibody genes and DNA polymerases. *Nat Rev Immunol* 1:187-192

Haracska L, Kondratieck CM, Unk I, Prakash S, Prakash L (2001a) Interaction with PCNA is essential

for yeast DNA polymerase η function. *Mol Cell* **8**: 407-415

Haracska L, Johnson RE, Unk I, Phillips B, Hurwitz J, Prakash L, Prakash S (2001b) Physical and functional interactions of human DNA polymerase η with PCNA. *Mol Cell Biol* **21**: 7199-7206

Haracska L, Johnson RE, Unk I, Phillips BB, Hurwitz J, Prakash L, Prakash S. (2001c) Targeting of human DNA polymerase η to the replication machinery via interaction with PCNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:14256-14261.

Hoege C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S. (2002) *RAD6*-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**: 135-141

Hynes RH, Kunz BA (1981) In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces* Strathern JN, Jones EW, Broach JR, eds. (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), pp. 371-414.

Johnson RE, Prakash S, Prakash L (1999) Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase. Pol η . *Science* **283**: 1001-1004

Johnson RE, Washington MT, Prakash S, Prakash L (2000) Fidelity of human DNA polymerase η . *J Biol Chem* **275**:7447-7450

Kannouche P, Broughton BC, Volker M, Hanaoka F, Mullenders LH, Lehmann AR (2001) Domain structure, localization, and function of DNA polymerase η , defective in xeroderma pigmentosum variant cells. *Genes Dev* **15**: 158-172

Kannouche P, Fernandez de Henestrosa AR, Coull B, Vidal AE, Gray C, Zicha D, Woodgate R,

Lehmann AR (2002) Localization of DNA polymerases eta and iota to the replication machinery is tightly co-ordinated in human cells. *EMBO J* 21:6246-6256

Koken MH, Reynolds P, Jaspers-Dekker I, Prakash L, Prakash S, Bootsma D, Hoeijmakers JH. (1991) Structural and functional conservation of two human homologs of the yeast DNA repair gene RAD6. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8865-8869.

van der Laan R, Roest HP, Hoogerbrugge JW, Smit EM, Slater R, Baarends WM, Hoeijmakers JH, Grootegoed JA (2000). Characterization of mRAD18Sc, a mouse homolog of the yeast postreplication repair gene RAD18. *Genomics* 69:86-94

Lawrence C (1994) The RAD6 DNA repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: what does it do, and how does it do it? *Bioessays*. 16:253-258.

Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, Dohmac N, Yokoi M, Yuasa M, Araki M, Iwai S, Takio K,

Hanaoka F (1999) The *XPI* (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature* 399: 700-704

Masutani C, Kusumoto R, Iwai S, Hanaoka F (2000) Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase eta. *EMBO J* 19:3100-3109.

Matsuda T, Bebenek K, Masutani C, Hanaoka F, Kunkel TA (2000) Low fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase- η . *Nature* 404:1011-1013

McCulloch SD, Kokoska RJ, Masutani C, Iwai S, Hanaoka F, Kunkel TA (2004) Preferential *cis-sin*

thymine dimer bypass by DNA polymerase η occurs with biased fidelity. *Nature* **428**: 97-100

McDonald J, P. Levine AS, Woodgate R (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* RAD30 gene, a homologue of *Escherichia coli* dinB and umuC, is DNA damage inducible and functions in a novel error-free postreplication repair mechanism. *Genetics* **147**: 1557-1568

Mendez J, Stillman B. (2000) Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol* **20**: 8602-8612

Mitchell DL, Nairn RS (1989) The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol* **49**: 805-819

Ohmori H, Friedberg EC, Fuchs RP, Goodman MF, Hanaoka F, Hinkle D, Kunkel TA, Lawrence CW, Livneh Z, Nohmi T, Prakash L, Prakash S, Todo T, Walker GC, Wang Z, Woodgate R (2001) The Y-family of DNA polymerases. *Mol Cell* **8**: 7-8.

Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, Cioce M, Fagioli M, Saito S, Higashimoto Y, Appella E, Minucci S, Pandolfi PP, Pelicci PG (2000) PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* **406**: 207-210

Reuven NB, Arad G, Maor-Shoshani A, Livneh (1999) The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA, and SSB and is specialized for translesion replication. *J Biol Chem*. **274**:31763-6.

Roest HP, van Klaveren J, de Wit J, van Gurp CG, Koken MH, Vermeij M, van Roijen JH, Hoogerbrugge JW, Vreeburg JT, Baarends WM, Bootsma D, Grootegoed JA, Hoeijmakers JH. (1996) Inactivation of the HR23B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. *Cell* **86**:799-810.

Shikata K, Ohta S, Yamada K, Obuse C, Yoshikawa H, Tsurimoto T (2001) The human homologue of fission Yeast cdc27, p66, is a component of active human DNA polymerase δ . *J Biochem (Tokyo)* **129**: 699-708

Stelter P, Ulrich HD (2003) Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* **425**:188-191

Sung P, Prakash S, Prakash L. (1988) The RAD6 protein of *Saccharomyces cerevisiae* polyubiquitinates histones, and its acidic domain mediates this activity. *Genes Dev.* **2**:1476-1485.

Svoboda DL, Vos JM (1995) Differential replication of a single, UV-induced lesion in the leading or lagging strand by a human cell extract: fork uncoupling or gap formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 11975-11979

Tang M, Shen X, Frank EG, O'Donnell M, Woodgate R, Goodman MF (1999) UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8919-8924

Tateishi S, Niwa H, Miyazaki J, Fujimoto S, Inoue H, Yamaizumi M (2003) Enhanced genomic instability and defective postreplication repair in *RAD18* knockout mouse embryonic stem cells. *Mol*

Cell Biol **23**: 474-481

Tateishi S, Sakuraba Y, Masuyama S, Inoue H, Yamaizumi M (2000) Dysfunction of human Rad18 results in defective postreplication repair and hypersensitivity to multiple mutagens. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 7927-7932

Toschi L, Bravo R (1988) Changes in cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. *J Cell Biol* **107**: 1623-1628

Tsurimoto T, Stillman B (1991) Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. I. DNA structure-specific recognition of a primer-template junction by eukaryotic DNA polymerases and their accessory proteins. *J Biol Chem* **266**: 1950-1960

Wagner J, Gruz P, Kim SR, Yamada M, Matsui K, Fuchs RP, Nohmi T. (1999) The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. *Mol Cell* **2**:281-286

Washington MT, Johnson RE, Prakash S, Prakash L (1999) Fidelity and processivity of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase η . *J Biol Chem* **274**: 36835-36838

Watkins JF, Sung P, Prakash S, Prakash L (1993) The extremely conserved amino terminus of RAD6 ubiquitin-conjugating enzyme is essential for amino-end rule-dependent protein degradation. *Genes Dev* **7**: 250-261

Xin H, Lin W, Sumanasekera W, Zhang Y, Wu X, Wang Z (2000) The human *Rad18* gene product interacts with HHR6A and HHR6B. *Nucleic Acids Res* **28**: 2847-2854

Yamashita YM, Okada T, Matsusaka T, Sonoda E, Zhao GY, Araki K, Tateishi S, Yamaizumi M, Takeda

S (2002) *RAD18* and *RAD54* cooperatively contribute to maintenance of genomic stability in vertebrate cells. *EMBO J* **21**: 5558-5566

Zeng X, Winter DB, Kasmer C, Kraemer KH, Lehmann AR, Gearhart PJ. (2001) DNA polymerase eta is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes. *Nat Immunol* **2**:537-541.