

## My Clare Hall memories

大阪大学大学院・基礎工学研究科

倉岡 功\*

## My Clare Hall memories

Graduate School of Engineering Science, Osaka University

Isao Kuraoka\*

「美しさに心を囚われてはいけないよ。本質に眼を向けないとね」。15年前に Tomas Lindahl 博士から言われた一言を僕は思い出しました。

僕は、1996年9月から2001年の3月まで、英国のクレアホール研究所でポスドクとして研究をしていました。その時の所属は、Tomas 博士のラボではなく、Rick Wood 博士のラボでしたが、ある理由があつて Tomas 博士と一緒に研究することになりました。その理由というのは、その当時 Tomas 博士が興味があつた DNA 酸化損傷の修復機構の研究内容が僕に降ってきたからです。もともと Rick 博士自身が Tomas 博士のラボ出身だったこともあり、Tomas 博士の仕事を手伝うという意味もありました。また実際、Rick 博士自身もやってみたい仕事だったと思います。こういうわけで、変な感じもしますが、僕自身は2つのラボのプロジェクトを又いで研究することになりました。今思えばとてもラッキーだったと思います。1回の留学で2つのラボの体験ができるという感じです。幸運にも成果を生み出すことができ、Tomas 博士との共著論文が生み出されたわけです。

冒頭の言葉は、この論文のデータについて二人でディスカッションしている時に、彼に言われたことです。彼は研究所長ということもあつて、ディスカッションは彼のオフィスのソファで行いました。また、同じゲルの図を見るために真横に座って話をしていた、そのときのことです。僕は、重要な実験結果であるゲルの図にシミがついて汚くなったので、「もう一度実験をしたい。」と彼に言いました。そのとき彼はこう言ったのです。「美しさに心を囚われてはい

---

\* 〒560-8531 大阪府豊中市待兼山町 1-3

1-3 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-8531 Japan

TEL: +81-6-68506240, FAX: +81-6-68506240, E-mail: kuraoka@chem.es.osaka-u.ac.jp

けないよ。本質に眼を向けないとね」。その当時、実験で良いデータを出すことが重要だった僕としては、美しさを求めているつもりではなかったのですが、完璧にしたいという思いがとても強かったと思います。しかし、彼にとって追求したいのは、美しさよりも本質だということを僕は強く感じました。(まあここでの美しさは、僕の好みでしかなかったとも言えますが・・・) Tomas 博士の印象を語るなら、とてもフェアで優しいスウェーデン紳士といった感じ です。競争心よりは探究心が勝る人物です。

今回 Tomas 博士は DNA decay と Base excision repair のメカニズムの解析でノーベル賞を受賞しました。しかし、個人的にはもう一つ重要な成果があると思います。それはクレアホール研究所を設立したことです。ロンドンの少しはずれにある、この研究所には Tomas 博士が目をつけた DNA 修復だけでなく、複製、転写、組換え、細胞周期における一流の研究者が集まりました。彼らは驚くべきファシリティーを兼ね備えた研究所を運営しながら、高いサイエンスを生み出してきました。さらに、この研究所を成立するほどの彼の情熱も評価されることかも知れません。

個人的には、今年の 12 月 10 日の授賞式を楽しみにしています。

追伸

もしゲルの図のシミが気になる方は、Kuraoka et al PNAS 2000 Fig.5a の右上をご覧ください。

<特集：ノーベル賞>

Nobel Prize Special Issue

Aziz Sancar 博士と  
紫外線誘発 DNA 損傷の修復機構

金沢大学医薬保健研究域薬学系  
若杉光生、松永 司\*

Mechanistic study of the repair systems for UV-induced DNA damage  
by Dr. Aziz Sancar

Faculty of Pharmacy, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences,  
Kanazawa University  
Mitsuo Wakasugi, Tsukasa Matsunaga\*

Aziz Sancar, Sarah Graham Kenan Professor of Biochemistry at the University of North Carolina School of Medicine is one of the 2015 Nobel Laureates in Chemistry for his pioneering studies on DNA repair against ultraviolet (UV)-induced DNA damage. He has uncovered the molecular mechanism of two types of repair systems in *E. coli*, nucleotide excision repair (NER) and photoreactivation (PR). Following the first cloning of the gene encoding photolyase in 1976, he has identified three gene products, UvrA, UvrB and UvrC, required for NER. In 1983, he has finally reconstituted the “dual incision” reaction of NER *in vitro* using the purified Uvr proteins, establishing a ground framework of the NER process, applicable to the eukaryotic system. Moreover, he also greatly contributes to our mechanistic understanding of human NER reaction as well as the identification of two photolyase homologs lacking PR activity in humans, which function in the circadian clock as integral components.

Key words: photoreactivation, nucleotide excision repair, reconstitution, cryptochrome, circadian rhythm

---

\* 〒920-1192 石川県金沢市角間町

Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-1192 Japan

TEL: +81-76-234-4487, FAX: +81-76-234-4427, E-mail: matsukas@p.kanazawa-u.ac.jp

## 受賞研究及び関連研究の内容

Aziz Sancar 博士のノーベル化学賞の対象となった研究は、最も身近な環境変異原である太陽光に含まれる紫外線で生じる DNA 損傷の修復機構に関するものであり、まずは彼が「生化学者」として歩んできた道を振り返りながら、その受賞研究と関連研究の内容を紹介したい。彼はトルコ出身で、イスタンブール大学を卒業後に医師として勤務していたが、細菌が致死量の紫外線を浴びても、可視光を照射すると生存率が回復する「光回復」という不思議な現象(1)に興味をもち、1973年に生化学を志してアメリカに移住した。「光回復」の研究を行っていた米国 University of Texas in Dallas の C. Rupert 博士のグループに博士課程学生として参加し、研究生生活をスタートした。当時、大腸菌や出芽酵母の粗抽出液中に「光回復」を担う酵素が存在することが示されていたもののその実態は不明であったが(2, 3)、1978年にその活性をコードする大腸菌遺伝子のクローニングに成功し、過剰発現系を構築した(4)。その研究により学位を取得したが、研究拠点を移したため、光回復酵素研究の進展は PI として独立した後になる。

一方、紫外線による DNA 損傷は光に依存せず修復されることも R. B. Setlow 博士のグループと P. Howard-Flanders 博士のグループによって明らかにされており(5, 6)、上記の「光回復」と対比して「暗回復(後のヌクレオチド除去修復 nucleotide excision repair; NER)」と呼ばれていた。その修復酵素の同定には、紫外線照射後の複製の回復に異常をもつ大腸菌変異株 (*uvrA*, *uvrB*, *uvrC*) を用いた遺伝学的解析の寄与が大きく、紫外線照射 DNA に切断を入れる活性が存在すること、それが *uvrA*, *B*, *C* 遺伝子に依存することが示唆されていた(7-10)。その活性を担うタンパク質は未同定だったが、Yale University School of Medicine の W. D. Rupp 博士のラボに入った Sancar 博士は、巧妙な“Maxicell technique”を用いてその状況を打破した(11)。それは紫外線損傷の修復を欠損した大腸菌株を利用する方法で、目的のプラスミドで形質転換した後、紫外線を照射すると、サイズの大きい染色体 DNA は細かく分断されてしまうが、紫外線から逃れたプラスミドのみが複製してコードタンパク質を発現し、放射性標識されたアミノ酸を加えることで検出可能となる。Sancar 博士はこの方法を利用して、*uvrA*, *uvrB*, *uvrC* 遺伝子にコードされたタンパク質を次々と同定し(12-14)、1983年には精製した3つのタンパク質を用いてヌクレオチド除去修復の初期ステップを再構成することに成功した(15)。これらのタンパク質は、協調して DNA 損傷の 5' 側 8 番目と 3' 側 4~5 番目の 2 箇所のホスホジエステル結合を切断し (dual incision)、損傷を含む 12 - 13 ヌクレオチドの DNA 断片を除去することを明らかにした。その後、現在の University of North Carolina at Chapel Hill に PI として独立したラボをもち、UvrD (helicase II) と DNA polymerase I (Pol I) が切断で生じた DNA 断片の除去と新生 DNA 鎖の合成を行うことで、除去効率を高めることを見つけた(16、図 1)。また、研究を始めるきっかけとなった光回復酵素 (photolyase) の解析も再開し、2つの chromophore (FADH<sup>-</sup>と MTHF) が関与することを示し、その

メカニズムを明らかにしていった(17-19、図 2)。このように初期の DNA 修復研究の中で、大腸菌において紫外線 DNA 損傷に対する 2 つの修復系である光回復と NER (暗回復) の関連遺伝子を同定し、各産物の生化学的解析を通して両修復系の分子メカニズムを解明したことが、今回のノーベル化学賞で評価された。

その後、大腸菌からヒトに研究対象を移し、NER 因子と photolyase のホモログを中心に研究を展開した。ヒトの NER 機構の解析は、その後期過程である修復合成を指標にしたアッセイ系(20)を中心に研究が進んでいたが、Sancar 博士のグループは除去された DNA 断片を直接検出する” Excision assay” を独自に開発し、ヒトにおいても大腸菌と同様に” dual incision” 様式で DNA 損傷が除去されることを示した(21)。1995 年には精製したタンパク質を用いて初めてヒト NER 反応(切断過程まで)を再構成し、その基本反応に必要な十分なタンパク質群(XPC-RAD23B, TFIIH, XPA, RPA, XPG, ERCC1-XPF)を明らかにした(22)。同年内に、R. D. Wood 博士のグループが NER の全過程を再構成し(23)、S. Prakash 博士のグループが出芽酵母のタンパク質で再構成を達成しており(24)、1995 年が NER 研究の黄金年の一つであったことは間違いない。

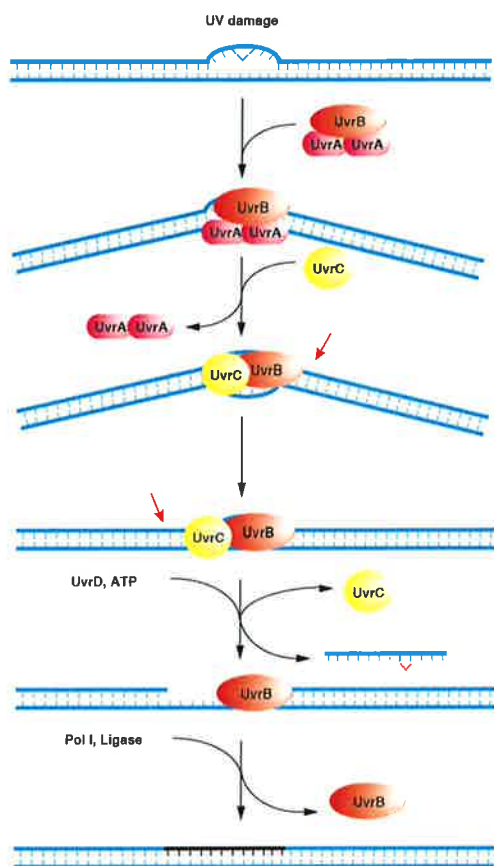


図 1 大腸菌におけるヌクレオチド除去修復の分子機構

UvrA<sub>2</sub>B 複合体により DNA 損傷が認識され、UvrC のリクルート後に UvrB が損傷 3' 側の 4~5 番目のホスホジエステル結合を切断し、引き続き UvrC が損傷 5' 側の 8 番目のホスホジエステル結合を切断する。UvrD により損傷を含む DNA 断片(12~13 ヌクレオチド)が遊離された後、新生 DNA 鎖の合成と連結により修復反応が完了する。

一方、photolyase については、ヒトにおける存在が長年議論になっていたが、ヒトではその活性が欠如していることを明確に示した(25)。また、ヒトのゲノム上にも photolyase に相同性のある遺伝子が2種類存在することを発見し、それらが photolyase としてではなく、サーカディアンリズム(体内時計)の維持に機能していることを明らかにした(26, 27)。この予想外な発見は、ほぼ同時期に複数のグループから報告が相次ぎ(28-31)、当時の大きなトピックの一つであった。近年はヌクレオチド除去修復もサーカディアンリズムにより制御されることを見出し、彼が追求してきた2つの生命機構がリンクしていることも明らかになってきた(32)。

### Aziz Sancar 博士の思い出

筆者らが Aziz Sancar ラボにポスドクとして所属していたのは、1994年から1999年(松永; 1994~1996年、若杉; 1996~1999年)の間になる。1994年は、"DNA Repair" が Science 誌の Molecule of the year に選ばれた年であり、1995年にはヒトにおける NER 反応の再構成が達成され、DNA 修復研究が活気づいていた頃である。筆者の一人の留学当時のエピソードを交えながら、Aziz (ここからこう呼ばせていただく)の人となりをご紹介します。

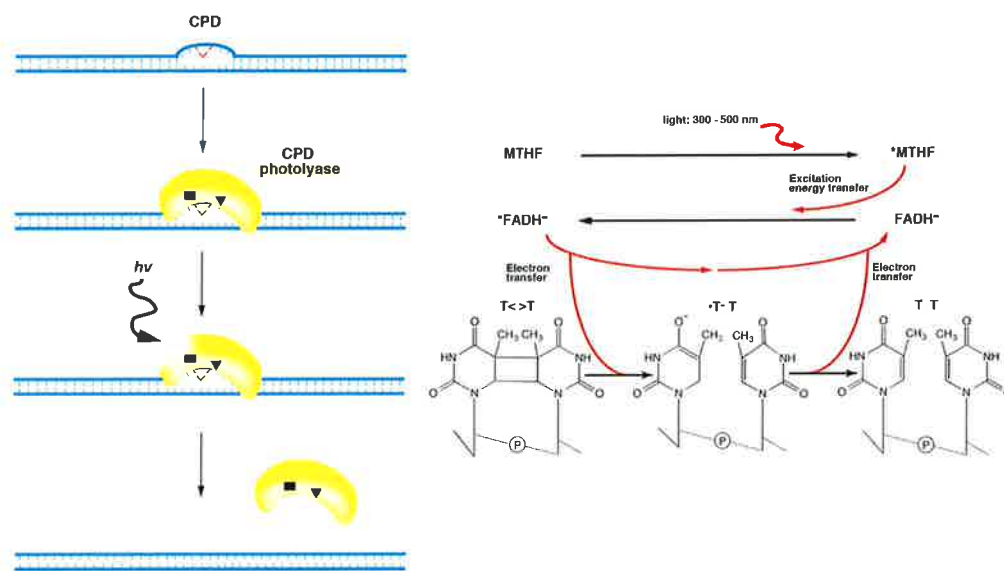


図2 大腸菌 photolyase の作用機構

シクロブタン型ピリミジン二量体に結合した photolyase に可視光が照射されると、そのエネルギーが Chromophore の1つである MTHF に吸収され、もう1つの FADH を介して電子が伝達されることで、シクロブタンリングの開環が起こり、元のピリミジン塩基に戻る。

当時 DNA 修復分野で著名な海外の研究者が度々日本にも訪れ、セミナーを聞くことのできる機会は多かったが、Aziz を目にする機会はなく、実際に渡米するまでは非常に不安だった。しかし、そんな不安は幸いにも杞憂に終わり、当時の Aziz の印象は、研究そのものが本当に好きで、ほぼ全ての時間を費やしているという感じであった。午前 8 時から 9 時頃にラボに現れ、夜 9 時から 10 時頃に帰宅するという規則正しい生活で、ランチもカフェでゆっくりということはなく、リング等の果物をかじっていただけのような気がする。会議にでている様子は全くないし、学会等に招待されることも多かったはずであるが、長期間不在にすることはほとんどなく、まさに大部分をラボで過ごす毎日であった。その一方で、土曜の午前中はトルコから移住してきた人々の子供達にトルコ語を教えており、いつもと違い(?) 非常にやさしく穏やかな表情で接していたのが印象的で、その時間を非常に大切にしていた。現在も、移住してきたトルコ人の援助をしており、そのための財団を設立して宿泊施設を建設するなど、とても優しい一面を持つ。

上記のようにボスがほとんどラボにいるとなると、強要的に働くよう言われることはなかったが、ラボのメンバーは自然によく働いた。ノースカロライナ州に壊滅的な被害をもたらしたハリケーン (Fran) が直撃した時もラボの日常に変わりはない。今調べてみてもノースカロライナ史上 2 番目に大きなハリケーンで、木はもちろん電柱までもなぎ倒され、2 日ほど停電が続く中、非常電源が働くラボで普通に実験して、Aziz もいつも通りの生活を送っていたのは、今考えると少し異様だったかもしれない。

Aziz は何よりポストドクや学生の話をよく聞いてくれた。ラボのほぼ全員が競うようにデータを見せ、毎日意見を交わし、その上で実験を進める。それゆえ無駄な実験がなくなり、研究のスピードも当然速い。完全に独立した研究者には煩わしいことかもしれないが、博士号を取りたての経験の浅い私にとっては毎日が楽しく、必然的に集中力も高まり、実験におけるその重要性を再認識した時でもあった。特に再構成反応をする時の緊張や高揚感は特別で、オートラジオグラムが現像機から出てくる瞬間の感覚を今でも忘れない。

彼の研究に対する情熱は随所に感じられたが、photolyase のヒトホモログである cryptochrome (cry) がサーカディアンリズムに関与することを明らかにした時期は特別だった。重要な実験を担当していたポストドクのもとに 30 分間隔で訪れ「What's going on?」と尋ねることを何度か繰り返し、聞かれた側は最後にはただ「Please trust me!」と言うしかなく、しぶしぶ戻っていったのを覚えている。ここまでやられるとさすがにしんどいと思うが、興味ある仕事に取り組む時の彼の集中力と情熱はすさまじく、この姿勢こそが彼のラボの推進力となっていることは間違いない。

ラボを離れない Aziz が、昨年サバティカルで台湾の Academia Sinica 滞在中に、日本に立ち寄ってくれた。既に 20 年近くの歳月が流れていたが、会った瞬間に昔に戻ったような気がした。以前のように緊張はしたが、とても優しく、最近のデータを見せながらディスカッションした時もしっかり耳を傾けてくれ、非常に嬉しくありがたかった。最近では、RNAi やゲノム編集技術を用いて

ノックダウン（アウト）した時の表現型を見る実験が増え、純粋な生化学的研究が減ってきていると話した時に、きっぱりと「Every reaction needs the reconstitution!」と言ったのはとても彼らしく、耳に鮮明に残っている。これまで私を奮い立たせてくれた Aziz に感謝するとともに、心から今回の受賞をお祝いしたい。

### おわりに

ここまでお読みいただいた読者はすでにお気づきのことと思うが、筆者の一人は「Aziz Sancar」に完全に魅了されている（信者と言ってもよい）。それくらいカリスマ的な魅力を持った研究者である。誤解されがちな研究者でもあるが、すべては研究に対する情熱と真摯な態度から来るものと理解していただければありがたい。1994年、私がポスドクとして彼のラボに参加したのははや20年以上前のことになるが、① DNA 修復の生化学、② 日本人が不在、③ アメリカ、のラボという3条件で探してここしかない！と決めた。私の留学時代の思い出話は控えるとして、それ以降、何人かの日本人（若杉氏や現在ネブラスカ大の別所忠昌氏など）が Sancar ラボに参加し、ブラックボックスだった Sancar ラボと日本人研究者の架け橋になれたとすれば、誠に嬉しい限りである。

昨年3月下旬に滞在中の台湾から会いに来ないかというメールが突然届き、むしろ日本に来たら Mitsuo や wife も会えるからと誘ったら快く応じてくれた。桜咲く兼六園などを案内した後、自宅に招いて食事をし、大学ではディスカッションや講演をしてもらって、4泊5日（うち1泊2日は福岡歯科大の関口睦夫先生を訪問）という慌ただしい日程だったが、再会を楽しんだ。今年の5月から10月までの半年間、当研究室 M2 の学生を受け入れてもらうなど、今もたいへんお世話になっている。心から尊敬して止まず、健康に留意してもらいながら今後の益々の活躍を期待したい。

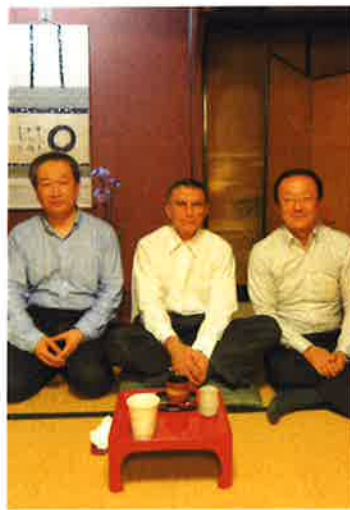


写真1 日本滞在中のスナップ



## 参考文献

1. Kelner, A. Photoreactivation of Ultraviolet-Irradiated Escherichia Coli, with Special Reference to the Dose-Reduction Principle and to Ultraviolet-Induced Mutation. *J Bacteriol.* 1949; 58: 511-22.
2. Rupert, CS, Goodgal, SH, Herriott, RM. Photoreactivation in vitro of ultraviolet-inactivated Hemophilus influenzae transforming factor. *J Gen Physiol.* 1958; 41: 451-71.
3. Rupert, CS. Photoreactivation of transforming DNA by an enzyme from bakers' yeast. *J Gen Physiol.* 1960; 43: 573-95.
4. Sancar, A, Rupert, CS. Cloning of the phr gene and amplification of photolyase in Escherichia coli. *Gene.* 1978; 4(4): 295-308.
5. Setlow, RB, Carrier, WL. The Disappearance of Thymine Dimers from DNA: An Error-Correcting Mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1964; 51: 226-31.
6. Boyce, RP, Howard-Flanders, P. Release of Ultraviolet Light-Induced Thymine Dimers from DNA in E. Coli K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1964; 51: 293-300.
7. Rupp, WD, Howard-Flanders, P. Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of Escherichia coli following ultraviolet irradiation. 1968. *DNA Repair (Amst).* 2005; 4: 620-33.
8. Shimada, K, Ogawa, H, Tomizawa, J. Studies on radiation-sensitive mutants of E. coli. II. Breakage and repair of ultraviolet irradiated intracellular DNA of phage lambda. *Mol Gen Genet.* 1968; 101: 245-56.
9. Seeberg, E, Rupp, WD, Strike, P. Impaired incision of ultraviolet-irradiated deoxyribonucleic acid in uvrC mutants of Escherichia coli. *J Bacteriol.* 1980; 144: 97-104.
10. Seeberg, E, Nissen-Meyer, J, Strike, P. Incision of ultraviolet-irradiated DNA by extracts of E. coli requires three different gene products. *Nature.* 1976; 263: 524-6.
11. Sancar, A, Hack, AM, Rupp, WD. Simple method for identification of plasmid-coded proteins. *J Bacteriol.* 1979; 137: 692-3.
12. Sancar, A, Wharton, RP, Seltzer, S, *et al.* Identification of the uvrA gene product. *J Mol Biol.* 1981; 148: 45-62.
13. Sancar, A, Clarke, ND, Griswold, J, *et al.* Identification of the uvrB gene product. *J Mol Biol.* 1981; 148: 63-76.
14. Sancar, A, Kacinski, BM, Mott, DL, *et al.* Identification of the uvrC gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981; 78: 5450-4.
15. Sancar, A, Rupp, WD. A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of Escherichia coli cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell.* 1983; 33: 249-60.
16. Husain, I, Van Houten, B, Thomas, DC, *et al.* Effect of DNA polymerase I and DNA helicase II on the turnover rate of UvrABC excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82: 6774-8.

17. Sancar, GB, Smith, FW, Reid, R, *et al.* Action mechanism of Escherichia coli DNA photolyase. I. Formation of the enzyme-substrate complex. *J Biol Chem.* 1987; 262: 478-85.
18. Jorns, MS, Baldwin, ET, Sancar, GB, *et al.* Action mechanism of Escherichia coli DNA photolyase. II. Role of the chromophores in catalysis. *J Biol Chem.* 1987; 262: 486-91.
19. Sancar, GB, Jorns, MS, Payne, G, *et al.* Action mechanism of Escherichia coli DNA photolyase. III. Photolysis of the enzyme-substrate complex and the absolute action spectrum. *J Biol Chem.* 1987; 262: 492-8.
20. Wood, RD, Robins, P, Lindahl, T. Complementation of the xeroderma pigmentosum DNA repair defect in cell-free extracts. *Cell.* 1988; 53: 97-106.
21. Huang, JC, Svoboda, DL, Reardon, JT, *et al.* Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers from DNA by incising the 22nd phosphodiester bond 5' and the 6th phosphodiester bond 3' to the photodimer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89: 3664-8.
22. Mu, D, Park, CH, Matsunaga, T, *et al.* Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system. *J Biol Chem.* 1995; 270: 2415-8.
23. Aboussekhra, A, Biggerstaff, M, Shivji, MK, *et al.* Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell.* 1995; 80: 859-68.
24. Guzder, SN, Habraken, Y, Sung, P, *et al.* Reconstitution of yeast nucleotide excision repair with purified Rad proteins, replication protein A, and transcription factor TFIIH. *J Biol Chem.* 1995; 270: 12973-6.
25. Li, YF, Kim, ST, Sancar, A. Evidence for lack of DNA photoreactivating enzyme in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 4389-93.
26. Hsu, DS, Zhao, X, Zhao, S, *et al.* Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. *Biochemistry.* 1996; 35: 13871-7.
27. Thresher, RJ, Vitaterna, MH, Miyamoto, Y, *et al.* Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses. *Science.* 1998; 282: 1490-4.
28. Kobayashi, K, Kanno, S, Smit, B, *et al.* Characterization of photolyase/blue-light receptor homologs in mouse and human cells. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26: 5086-92.
29. van der Horst, GT, Muijtjens, M, Kobayashi, K, *et al.* Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature.* 1999; 398: 627-30.
30. Griffin, EA, Jr., Staknis, D, Weitz, CJ. Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science.* 1999; 286: 768-71.
31. Kume, K, Zylka, MJ, Sriram, S, *et al.* mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell.* 1999; 98: 193-205.
32. Sancar, A, Lindsey-Boltz, LA, Kang, TH, *et al.* Circadian clock control of the cellular response to DNA damage. *FEBS Lett.* 2010; 584: 2618-25.

