

令和元年6月12日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00546

研究課題名(和文)細胞骨格接着分子プレクチンの放射線誘発DNA損傷応答における新規機能の解明

研究課題名(英文)A novel role of Plectin in ionizing radiation-induced DNA damage response

研究代表者

松井 理 (MATSUI, Tadashi)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：60288272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：プレクチンは、細胞骨格どうしをつなぎ細胞の構造を維持することが知られている。本研究では、プレクチンがDNA損傷後の細胞応答にも関与していることを新たに明らかにした。放射線照射によって生じたDNA二重鎖切断によりATMが活性化し、その後、活性化ATMは多数の標的蛋白質をリン酸化することにより、細胞周期の停止、DNAの修復、細胞死を制御している。我々は、プレクチンがそのようなATMの標的蛋白質の一つであることを新たに見出し、その機能について調べたところ、プレクチンが癌抑制遺伝子産物p53の活性化を制御していること、さらにそれにより、DNA損傷後の細胞周期停止に関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線は、空から降り注ぐ宇宙線や、医療用のレントゲンやCTスキャンなどごく身近に存在しているものであるが、近年、原発事故による放射能漏れ等の報道により、放射線の人体に与える影響について社会的な関心が高まっている。本研究結果では、放射線により、代表的な癌抑制遺伝子産物であるp53蛋白質の活性化を調節する仕組みの一部が解明された。これにより、放射線の人体に与える影響の全容解明につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Plectin is known as a link between components of cytoskeletons to maintain cell structure. In this study, we found that Plectin also plays a role in DNA damage response in human cells. We identified Plectin as a substrate of ATM, which is activated by ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks and controls cell cycle arrest, DNA repair, and cell death. Furthermore, we found that Plectin regulates cell cycle arrest by controlling activation of tumor suppressor p53 after ionizing radiation.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：DNA損傷応答 プレクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の DNA 損傷応答において中心的な役割を担っている ATM キナーゼは、DNA 二重鎖切断を感知すると自己リン酸化により活性化し、その後、様々な標的蛋白質をリン酸化することで、DNA 損傷後の細胞周期停止、損傷 DNA の修復、細胞死への誘導を制御している。ATM の標的蛋白質は大規模なスクリーニングにより 700 個以上見出されているが() 個々のリン酸化の生理的意義については未だ不明なものが多い。

研究代表者は、ATM の自己リン酸化部位に対する抗体によるヒト細胞抽出物の Western blotting において、ATM よりもずっと高分子量 (400~500kDa) に、放射線照射依存的に強くリン酸化される蛋白質を見出し、ATM の標的蛋白質の一つではないかと予想した。そこで、X 線照射後の核抽出物を材料に、免疫沈降法と質量分析法により、この高分子量蛋白質がプレクチンであると同定した。

プレクチンは分子量約 500kDa の巨大蛋白質で、主に細胞骨格同士を結びつける接着分子として細胞構造を維持する働きをしている。したがって、プレクチンは主に細胞質領域において網目状構造物として観察される。しかし、研究代表者は核抽出物よりプレクチンを免疫沈降し、さらに共焦点レーザー顕微鏡による観察により、プレクチンの一部が核内に存在することを見出した。この核内におけるプレクチンについては現在まで他に全く報告がなく、その機能については全く不明である。研究代表者は、核内で ATM によってリン酸化される蛋白質としてプレクチンを見出したが、プレクチンが ATM の標的蛋白質の一つであることは、前述の大規模スクリーニングによって既に示唆されていた()。しかし、ATM によるプレクチンのリン酸化が DNA 損傷応答においてどのような生理的役割を果たしているかは全く不明であった。

研究代表者は、プレクチンの DNA 損傷応答における関与を調べるため、siRNA 処理によりプレクチンを欠損させた細胞について解析を行った。その結果、プレクチン欠損細胞では、X 線照射後の G1 期での細胞周期停止が抑制され、G1/S チェックポイントの異常が認められた。さらに、この細胞では X 線照射後、p53 依存的に誘導され G1 期での細胞周期停止に関与する p21 の発現が抑制された。以上の結果から、プレクチンが p53 依存的な p21 の発現に関与し、それにより G1/S チェックポイントを制御していることが示唆された。

以上のように、これまで細胞骨格接着分子として主に細胞の構造維持に働いていると考えられてきたプレクチンに、放射線照射によって誘発される DNA 損傷応答の制御における新たな機能的役割があることが明らかになった。

2. 研究の目的

ATM によるプレクチンのリン酸化と、プレクチンによる p53 転写活性化能の制御機構に着目して、DNA 損傷応答におけるプレクチンの役割を明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

- (1) 核内に存在するプレクチンのバリエーションを明らかにする。
様々なプレクチンバリエーション発現ベクターを細胞に導入し、細胞内局在を調べる。
- (2) プレクチンのリン酸化部位を同定し、その責任キナーゼが ATM か否かを明らかにする。
リン酸化部位を同定し、ATM 阻害剤や ATM 欠損によるリン酸化への影響を調べる。
- (3) プレクチンが核内において p53 の機能をどのように制御するのかを明らかにする。
プレクチンの有無により、p21 プロモーター領域への p53 の結合、p53 の修飾状態、転写補助因子の機能に違いがあるかどうかを調べる。
- (4) プレクチンのリン酸化が、p53 の機能制御に重要であるか否かを明らかにする。
リン酸化されないプレクチン変異体を導入した細胞について、p53 機能への影響を調べる。

4. 研究成果

(1) 核内に存在するプレクチンのバリエーションを明らかにするために、プレクチンの 8 種類のバリエーション (Plectin 1, 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g) について、それぞれ cDNA の全長をクローニングし、EGFP との融合蛋白質発現ベクターを構築した。これらを培養細胞に導入し、細胞内で発現させた蛍光蛋白質について、その細胞内局在を観察した。その結果、Plectin 1b, 1d, 1f, 1g についてはこれまでの報告にあるように、細胞質以外の局在は認められなかったのに対して、Plectin 1, 1a, 1c, 1e については細胞質内に加えて、核内にも存在することが新たに明らかになった。これらの核内プレクチンについて、放射線照射により核内における局在が変化するかどうかを調べたところ、変化は認められなかった。さらに細胞分画による解析を行ったところ、核内プレクチンは放射線照射の有無にかかわらずクロマチン画分にはほとんど認められず、主に核内の可溶性画分 (核質画分) に存在することが明らかになった。

(2) X 線照射後の p53 依存的な p21 の発現に関与するプレクチンのバリエーションを明らかにするため、siRNA 処理によりプレクチンを欠損させた細胞に、前述の各プレクチンバリエーション発現ベ

クターを個別に導入し、p21 発現が回復されるかどうかを調べた。その結果、Plectin 1, 1c の発現ベクターを導入した場合にのみ、X 線照射後の p21 発現の回復が認められた。また、これらのプレクチンバリエーションは、予想した通り、前述の核内にも局在するバリエーションに含まれるものであった。同様に核内にも局在する Plectin 1a, 1e については、p53 依存的 p21 発現の制御への関与は認められず、これ以外の未知の核内機能に関わっていることが予想された。

(3) 放射線照射後の p21 の転写に直接関わる p53 の機能制御のどの段階の制御にプレクチンが関与しているのかを明らかにするため、siRNA 処理によってプレクチンを欠損させた細胞について解析を行った。その結果、放射線照射後に誘導される p53 の蛋白量が大幅に低下することを見出した。このことから、プレクチンが放射線照射後の p53 の蛋白量の制御に関与していることが強く示唆された。そこで、p53 を直接リン酸化し、ユビキチン化の阻害、蛋白質の安定化に関与する ATM、Chk2 について調べたところ、プレクチンの欠損により Chk2 の蛋白量が激減することが判明した。プレクチンが Chk2 の蛋白量を制御していることは、siRNA 処理でプレクチンを欠損させたことにより Chk2 の蛋白量が低下した細胞に、前述の Plectin 1, 1c 発現ベクターを導入することにより、Chk2 の蛋白量が回復することから確認された。このことから、プレクチン欠損細胞において、Chk2 の減少により、放射線照射後の p53 蛋白質の安定化が抑制され、その結果、p21 の発現が抑制されたと予想された。そこで、次に、プレクチンの欠損により Chk2 の蛋白量が減少したことが、放射線照射後の p21 の発現の低下の直接的な原因なのかを検証するため、siRNA 処理により Chk2 を欠損させた細胞について解析を行った。その結果、予想に反して、Chk2 欠損細胞では放射線照射後の p21 の発現の低下は認められなかった。このことから、プレクチン欠損細胞における放射線照射後の p21 の発現の著しい低下は、単に Chk2 の蛋白量減少によるものではなく、別な原因があることが示唆された。同時に、Chk2 の減少はその原因による結果なのではないかと予想された。そこで、これまでに Chk2 の蛋白量の制御に関与し、なおかつ p53 依存的 p21 発現の制御にも関与するようなものについて報告があるか調べたところ、候補として USP28 を見出した。そこで、プレクチンと USP28 との関連を調べるため、siRNA により USP28 を欠損させた細胞について解析を行ったところ、プレクチン欠損細胞と同程度の Chk2 の蛋白量の減少が認められ、さらに、放射線照射後の p21 の発現においても、同様な発現の低下が認められた。さらに、抗プレクチン抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、USP28 が共沈したことから、両者が細胞内で相互作用していることが明らかになった。以上から、プレクチンは USP28 と相互作用しその機能を制御することにより、放射線照射後の p53 依存的な p21 の発現に関与しているのではないかと予想された。

(4) プレクチンのリン酸化が ATM 依存的であることは確認されたが、期間内にそのリン酸化部位を同定することはできなかった。このため、プレクチンのリン酸化が p53 の機能制御に重要かどうかについても検証することができなかった。これらに関しては、今後検証を進める予定である。

< 引用文献 >

Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ.
ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage.
Science, 316(5828): 1160-1166, 2007.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Sunatani Y, Kamdar RP, Sharma MK, Matsui T, Sakasai R, Hashimoto M, Ishigaki Y, Matsumoto Y, Iwabuchi K.
Caspase-mediated cleavage of X-ray repair cross-complementing group 4 promotes apoptosis by enhancing nuclear translocation of caspase-activated DNase.
Exp. Cell Res., 362(2): 450-460, 2018. 査読有
DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.12.009.
Sakasai R, Isono M, Wakasugi M, Hashimoto M, Sunatani Y, Matsui T, Shibata A, Matsunaga T, Iwabuchi K.
Aquarius is required for proper CtIP expression and homologous recombination repair.
Sci. Rep., 7(1):13808, 2017. 査読有
DOI: 10.1038/s41598-017-13695-4.

[学会発表] (計 11 件)

逆井 良、松井 理、砂谷優実、岩淵邦芳
One-ended DNA 二本鎖切断の修復経路解析
日本放射線影響学会第 61 回大会、2018
逆井 良、砂谷優実、松井 理、岩淵邦芳

One-ended DSB の修復経路の解析

第 90 回日本遺伝学会、2018

逆井 良、砂谷優実、松井 理、岩淵邦芳

Analysis of repair pathway for one-ended DNA double-strand breaks

日本放射線影響学会第 60 回大会、2017

砂谷優実、逆井 良、松井 理、橋本光正、岩淵邦芳

DNA 二本鎖切断修復タンパク質 53BP1 を介した神経前駆細胞の未分化性維持機構

日本放射線影響学会第 60 回大会、2017

逆井 良、砂谷優実、松井 理、岩淵邦芳

PARP- and TDP1-dependent repair pathways of one-ended DNA double-strand breaks caused by camptothecin

第 76 回日本癌学会学術総会、2017

逆井 良、磯野真由、若杉光夫、橋本光正、砂谷優実、松井 理、柴田淳史、松永 司、岩淵邦芳

RNA ヘリカーゼ Aquarius は DNA-RNA ハイブリッドを解消して相同組換え修復を促進する

第 39 回日本分子生物学会年会、2016

砂谷優実、辰野貴則、中村有香、逆井 良、松井 理、橋本光正、石垣靖人、岩淵邦芳

DNA 二本鎖切断修復タンパク質 53BP1 を介した神経前駆細胞の分化抑制効果

日本放射線影響学会第 59 回大会、2016

逆井 良、磯野真由、若杉光夫、橋本光正、砂谷優実、松井 理、柴田淳史、松永 司、岩淵邦芳

RNA ヘリカーゼ Aquarius は R-loop を解消して相同組換え修復を促進する

日本放射線影響学会第 59 回大会、2016

砂谷優実、R.P.Kamdar、M.K.Sharma、松井 理、逆井 良、橋本光正、松本義久、岩淵邦芳

DNA 修復タンパク質 XRCC4 のカスパーゼ依存性切断によるスプライシング調節を介したアポトーシスの促進

第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015

逆井 良、砂谷優実、松井 理、橋本光正、岩淵邦芳

Top2-poison に対する主要調節因子であるユビキチン化酵素の同定

第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015

松井 理、逆井 良、砂谷優実、橋本光正、岩淵邦芳

p53 標的遺伝子発現における 53BP1 の機能的役割

第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

研究室 HP : <http://kmu-bc1.jimdo.com>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。