

令和元年6月27日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00554

研究課題名(和文) クラスタDNA損傷が誘発するDSB末端のKuタンパク質による認識機構の解明

研究課題名(英文) Theoretical and experimental analysis of the binding efficiency of Ku protein to radiation induced clustered DNA damages

研究代表者

藤本 浩文 (Fujimoto, Hirofumi)

国立感染症研究所・品質保証・管理部・室長

研究者番号：60373396

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)：放射線によって生じるクラスタDNA損傷は狭い範囲に損傷が集中するために修復されにくく、DNA二本鎖切断(DSB)を誘発しやすいと考えられる。本研究では、DSB修復過程の初期段階において切断されたDNA末端を認識するKuタンパク質がクラスタDNA損傷によって誘発されるDSBをどのように認識し、結合するのかを、計算化学的手法、および分子細胞生物学的手法を用いて検討することで、Kuが認識・結合しやすい/しにくい末端形状の特徴を明らかにしたいと考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線被曝によって生じるDNA損傷は狭い範囲に集中しやすい特徴があり、単独損傷に比べて修復されにくいと言われている。複数の損傷が修復されないまま蓄積すると二本鎖切断(DSB)に発展しやすい。DSBは正常に修復されなければ強力な突然変異原となり細胞死の一因にもなることから、細胞にとって最も重篤な損傷の一つと考えられる。本研究課題を通してDSB修復酵素であるKuが認識・結合しやすい末端形状の特徴を明らかにすることができれば、放射線被曝によるDNA損傷が誘発する生物現象と、細胞内代謝や化学物質への曝露といった他の損傷誘発要因によって生じる現象との違いを明らかにできるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：Ionizing radiations generate multiple lesions along a single radiation track, that is known as a clustered DNA damage, and those multiple lesions are supposed to develop into DNA double strand breaks (DSBs). In the current project, we constructed models of the clustered DNA damage assembling several DNA lesions and estimated the binding efficiency between damaged DNA and Ku that is a key protein to recognize and bind to the DSB site, using both experimental and theoretical approaches. In addition, we examined the dynamics of Ku in the nucleus of canine cultured cells using the live cell imaging method, and succeeded in observing the accumulation of Ku70 and Ku80, subunits of Ku, at DNA damage sites produced by laser-microirradiation.

研究分野：放射線・化学物質影響科学

キーワード：クラスタDNA損傷修復 DNA二本鎖切断 Ku 分子シミュレーション ライブセルイメージング

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

1. 研究開始当初の背景

電離放射線による DNA 損傷には放射線の飛跡に沿って損傷が集中しやすい特徴があると考えられ、クラスターDNA 損傷と呼ばれる。単独の損傷の場合と比べるとクラスターDNA 損傷は修復酵素が作用しにくいために修復されにくく、また、複数の損傷が近傍に存在することから二本鎖切断 (double strand break: DSB)を誘発しやすいと考えられる。DSB は正常に修復されなければ強力な突然変異原となり細胞死の一因にもなることから、細胞にとって最も重篤な損傷の一つと考えられる。Ku は DSB 末端を認識し、これに結合するタンパク質であり、Ku の結合を発端として DNA-PKcs 等の修復関連酵素が誘導され、DSB 修復の主要な経路の一つである non-homologous end-joining (NHEJ)が開始されると考えられている。NHEJ における Ku 結合後の修復プロセスは生化学的、分子細胞生物学的実験により詳細な報告がなされているが、その最も初期の過程である Ku による DSB 末端認識結合機構には未だ不明な点が多い。そこで本研究では、クラスターDNA 損傷によって誘発される DSB を Ku タンパク質がどのように認識し結合するのかを、従来の分子細胞生物学的手法に加え計算化学的手法を導入することで明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

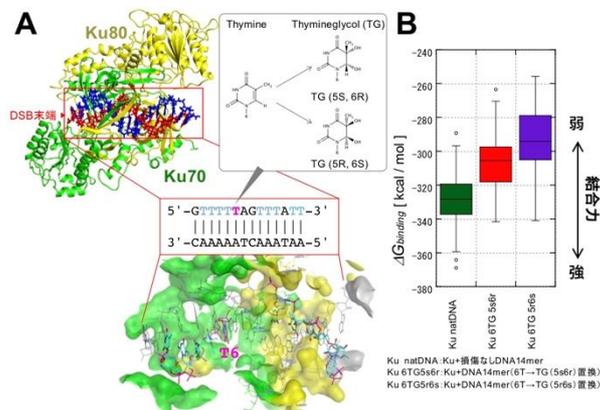
クラスターDNA 損傷によって生じた個々の損傷部位は、単独に損傷が生じた場合と比べると修復酵素が作用しにくく、修復されにくいことが知られている。このため数塩基以内に複数の損傷が生じた場合、その内のいくつかは修復されないまま放置されるか、または修復酵素が結合できたとしても塩基除去修復等の機構によって損傷塩基が取り除かれた脱塩基部位(apurinic/aprimidinic site: AP サイト)として残る可能性がある。AP サイトは放置されると自発的に一本鎖切断(single strand break: SSB)に変化しやすいことが知られており、クラスターDNA 損傷のように複数の損傷が狭い範囲に集中して発生した場合、数塩基の間隔において SSB が蓄積し、結果として DSB に発展しやすいと考えられる。これまでの研究では Ku タンパク質に作用させる DNA の末端構造には平滑末端を用いることが多かったが、実際の DSB 末端は上記の理由から一本鎖の突出、末端近傍塩基の損傷等、DNA 切断時の状況によって様々なバリエーションが考えられる。そこでクラスターDNA 損傷が生じた場合に想定される二本鎖切断末端構造をもつ DNA の分子モデルを Ku タンパク質と作用させ、Ku-DNA 間の相互作用を計算化学的手法を用いて解析し、各 DNA 末端と Ku タンパク質との結合能力を実験的に確認することで Ku タンパク質が結合しやすい、もしくは結合しにくい DNA 末端形状の特徴を明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

挿入する酸化損傷塩基にこれまでモデリングを行ってきた酸化損傷プリンである 8oxoG に加えて、酸化損傷ピリミジンの例として新たに Thymine glycol (TG) を含む DNA 分子のモデリングを行った。TG には2種類の光学異性体、TG (5R, 6S), TG (5S, 6R)が存在する事が報告されている。そこで、両異性体の分子構造に対して GAUSSIAN を用いて分子軌道計算を行い、得られた電子状態を反映させた力場パラメーターを作成、既報の Ku-DNA 複合体モデル中の Thymine と置換した分子モデルを作成した。非損傷 DNA と Ku との複合体モデルも加え、3種類の分子モデルに対して、AMBER を用いてそれぞれ 3 ナノ秒間の分子動力学計算を行い、得られた座標データから Ku-DNA 間の結合力を推定した。また、計算に用いた TG を含む DNA 配列を実際に合成し、Ku を作用させてゲルシフトアッセイを行い、DNA の末端形状が Ku タンパク質との結合力に与える影響の評価を行った。さらに、ライブセルイメージング法を用いて細胞内における Ku タンパク質の挙動を検証するためのモデルとして、マウス、ヒトに続きイヌの Ku タンパク質の挙動を追跡する実験系を確立した。

4. 研究成果

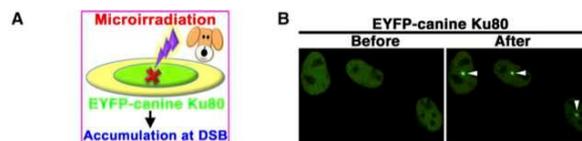
クラスターDNA 損傷が生じた場合に想定される二本鎖切断末端構造の例として、5'突出末端一本鎖上、もしくは二本鎖領域に損傷塩基を配置した DNA 分子のモデリングを行った。これまでモデリングを行ってきた SSB、8oxoG 等の力場パラメーターを利用し、5'側に 1 塩基~5 塩基突出した DNA 末端を設計し、二本鎖領域中に 8oxoG を配した DNA モデルを作成した。各分子モデルに対し数ナノ秒間 MD シミュレーションを行い、末端が平滑な DNA の計算結果と比較すると、突出末端側二本鎖領域中の塩基対が解離する等、やや不安定な挙動を示すものの明瞭な分子構造の崩壊は観察されなかった。TG の2種類の光学異性体、TG (5R, 6S), TG (5S, 6R)を導入した DNA 分子を設計し、Ku-DNA 複合体モデルに導入して分子動力学計算を実行し、得られた座標データを用いて分子力学計算を行い Ku-DNA 間の結合力を推定した。その結果、非損傷 DNA-Ku > TG (5S, 6R)を含む DNA-Ku > TG (5R, 6S)を含む DNA-Ku の順で両分子間の結合力がわずかに減少する傾向がみられた[図 1]が、計算結果の妥当性を検証するために、計算に用いた TG を含む DNA 配列と同じ構造を持つ DNA 分子を合成し、Ku を作用させてゲルシフトアッセイを行ったところ、Ku-DNA 間の結合力には大きな差異は観察されなかった。また、同様に 5'突出末端を有する DNA 分子を突出塩基数を 4 ~10 塩基変化させて設計し、分子シミュレーションとゲルシフトアッセイの両手法を用いて DNA-Ku 間の結合力を検証したが、実験的、



【図1】TGを含むDSB末端(A)に対するKuの結合力の推定(B)

計算化学的いずれの手法を用いた場合でも両分子間の結合力には大きな差異は観察されなかった。したがって、Ku はこれまで考えられているより多くの複雑な末端を認識して結合できる能力を有している可能性が高いと考えられる。

また、細胞内における Ku タンパク質の挙動を検証するためのモデルとして、マウス、ヒトに続きイヌの Ku タンパク質の挙動を追跡する実験系を確立し、マイクロビーム照射により誘発された DSB に Ku タンパク質が凝集される様子をライブセルイメージング法を用いて観察した[図 2]。



【図 2】イヌ培養細胞に対するマイクロビーム照射 (A)による Ku80 集積(B:白矢印)

本研究課題を遂行する過程で、計算化学的手法と、その結果を検証可能な分子細胞生物学的手法を確立することができたと考えている。今後は、本実験系を用いて DNA 二本鎖内、もしくは二本鎖間に架橋構造、末端塩基ミスマッチ、ループ構造等、さらに修復が困難だと想定される DNA 損傷に、これまで検証を行ってきた酸化損傷塩基や一本鎖切断や、5'もしくは 3'突出末端を組み合わせることで、引き続き Ku が結合する末端形状の特徴を明らかにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔 雑誌論文 〕(計 3 件)

Koike M, Yutoku Y, Koike A, (2017) Cloning, localization and focus formation at DNA damage sites of canine Ku70. *J Vet Med Sci.* **79**:554-561. doi: 10.1292/jvms.16-0649.

Koike M, Yutoku Y, Koike, A, (2017) Cloning of canine Ku80 and its localization and accumulation at DNA damage sites. *FEBS Open Bio.* **7**:1854-1863. doi: 10.1002/2211-5463.12311.

Koike M, Yutoku Y, Koike A, (2019) Feline XLF accumulates at DNA damage sites in a Ku-dependent manner. *FEBS Open Bio.* **9**: 1052-1062. doi: 10.1002/2211-5463.12589.

〔 学会発表 〕(計 7 件)

小池 学 DNA「修復蛋白質 Ku に関する研究」第 2 回 QST バイオ研究討論会(第 2 部 生命機能の根幹の解明:量子ビーム DNA 損傷研究) 千葉 2017 年 4 月 20-21 日

小池 学, 湯徳 靖友, 小池 亜紀 「細胞内の「放射線から DNA を守る仕組み」のビジュアル化—先端生命科学に基づくキャラクターを活用した教材化の可能性— The imaging of mechanisms to guard DNA from radiation in cells」第 54 回アイソトープ・放射線研究発表会 東京 2017 年 7 月 5 日

藤本 浩文, 生田 統悟, 小池 亜紀, 小池 学 「計算化学的手法を用いた Ku70 のアセチル化の効果の解析」第 60 回放射線影響学会 千葉 2017 年 10 月 28 日

小池 学, 「—先端生命科学への誘い—DNA 二本鎖切断損傷センサー-Ku 蛋白質の生体内分子イメージング 分子機構からベツサイドを目指して」東洋大学生命科学部 特別講義 千葉 2017 年 12 月 25 日

小池 学 「量子生命科学研究に向けたヒトと伴侶動物の DNA 修復タンパク質 Ku のライブセルイメージング:DSB 損傷認識と翻訳後修飾変化」生物学・光源・物性研究者による量子生物学勉強会(第 2 回) 茨城 2018 年 2 月 8 日 招待講演

湯徳 靖友, 大森 さくら, 小池 亜紀, 小池 学 「重粒子線治療研究に資する DSB センサー発現抑制細胞株を用いた細胞周期依存的な放射線感受性と DNA 二本鎖切断損傷修復」アイソトープ・放射線研究発表会 東京 2018 年 7 月 6 日

湯徳 靖友, 小池 亜紀, 大森 さくら, 小池 学 「有糸分裂期の DSB 誘導性の染色体分配異常への Ku の関与」日本分子生物学会 横浜 2018 年 11 月 28 日

〔 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
なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

小池 学 (KOIKE MANABU)

国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 重粒子線治療研究部

主任研究員

研究者番号:70280740