

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03374

研究課題名(和文)放射線が誘発するDNA-タンパク質クロスリンク損傷の生成および修復機構

研究課題名(英文)Formation and repair mechanisms of radiation-induced DNA-protein cross-links

研究代表者

井出 博 (IDE, Hiroshi)

広島大学・統合生命科学研究科(理)・教授

研究者番号：30223126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：生物の遺伝情報を担うDNAには様々なタンパク質が付随している。放射線照射された細胞では、DNAと付随タンパク質が架橋し離れなくなったDNA損傷(DNA-タンパク質架橋：DPC)が生成する。しかし、DPCの生成量や修復機構が分かっていないため、DNA損傷としての位置づけが明確ではない。本研究では、DPCに含まれるタンパク質を明らかにし、その生成機構を考察した。さらに、DNA鎖切断末端にトポイソメラーゼが架橋したDPCの修復に対するチロシン-DNAホスホジエステラーゼ1および2の関わりと両酵素の修復への寄与の違いを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA-タンパク質架橋(DPC)は、放射線、紫外線、ホルムアルデヒドなどの変異原物質で誘発される主要なDNA損傷の一つである。本研究により、DPCの生成機構と修復機構の一端が明らかになった。DNA損傷は、発がんや老化の原因となることが知られていることから、DPC形成に起因する発がんおよび老化機構の解明につながると予想される。また、カンプトテシンやエトポシドなどの抗がん剤は、DPCを形成することによりがん細胞を死滅させる。DPC修復に関わる酵素を標的とした阻害剤を分子設計することにより、効果の高いがん治療が可能となる。

研究成果の概要(英文)：DNA molecules that carry the genetic information of the cell are constantly associated with various proteins. DNA-associated proteins are covalently trapped in DNA to form DNA-protein cross-links (DPCs) when cells are irradiated with ionizing radiation or treated with other DNA-damaging agents. However, little is known about the amount of DPC damage resulting from the exposure to ionizing radiation and other DNA-damaging agents. Furthermore, how DPC damage is repaired in cells remains largely elusive. In the present study, we irradiated cells with X-rays and analyzed the proteins involved in DPCs. The possible mechanisms of DPC formation are discussed. We also used cells that were deficient in tyrosyl-DNA phosphodiesterases (TDP) 1 and 2 together with other enzymes, and elucidated the roles of these enzymes in the repair of DPCs that contained the cleavage complex of topoisomerases 1 and 2 (TOP1cc and TOP2cc).

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 DNA損傷 修復機構

## 1. 研究開始当初の背景

生物の遺伝情報を担う DNA には、様々な損傷が生じる。DNA 損傷は、突然変異誘発、発がん、老化に関わっていることから、DNA 損傷の細胞毒性や変異原性が精力的に研究されてきた。これまでに同定された損傷は、DNA 鎖切断、塩基損傷、DNA 鎖間架橋、DNA-タンパク質架橋 (DPC) に大別される。DNA 鎖切断、塩基損傷、DNA 鎖間架橋の生物影響については研究が進展しており、主要な修復機構も明らかにされた。一方、DPC は放射線が誘発されるほか、紫外線、ホルムアルデヒドなどのアルデヒド化合物、カンプトテシンやエトポシドなどの抗がん剤でも生成することが知られていたが (1)、生成量や修復機構が分かっていないため、他の損傷に比べ DNA 損傷としての位置づけが明確ではなかった。

研究代表者は、放射線が誘発する DPC に注目し研究を行い、蛍光標識を用いた DPC 検出法を確立した (図 1A 上段) (2, 3)。さらに、放射線は DNA 鎖切断を伴わない DPC (Type 1)、DNA 一本鎖切断 (SSB) に隣接した DPC (Type 2)、DNA 二本鎖切断 (DSB) に隣接した DPC (Type 3) の三つのタイプを誘発し (図 1B)、Type 2 DPC には DNA トポイソメラーゼ (TOP) 1、Type 3 DPC には TOP2 がかなり高い割合で含まれることが示唆された。以上の結果から、放射線誘発 DNA 損傷としての DPC の位置づけを明らかにするためには、Type 1~Type 3 DPC の生成機構を明らかにするとともに、これらのタイプの DPC のゲノム DNA における修復機構を明らかにする必要があると考えた。

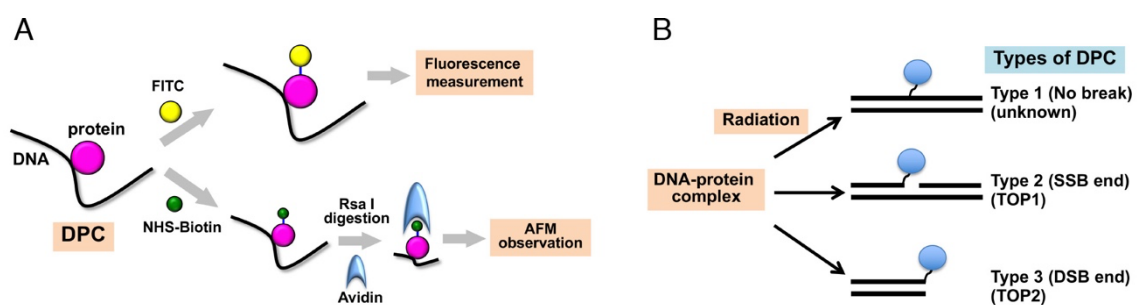


図 1 (A) 蛍光標識 (上段) および原子間力顕微鏡 (AFM, 下段) を用いた DPC 検出, (B) 放射線が誘発する Type 1~Type 3 DPC

## 2. 研究の目的

### (1) DPC の生成機構解明

DNA に対する放射線の作用機序および DNA とタンパク質との相互作用の観点から、Type 1~Type 3 DPC の非特異的/特異的生成機構を明らかにする。

### (2) DPC の修復機構解明

Type 1~Type 3 DPC のゲノム DNA における除去動態を解析し、各タイプの DPC の修復機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) クロスリンクタンパク質の検出

クロスリンクタンパク質の全体量は、細胞から精製したゲノム DNA に含まれるタンパク質を蛍光標識し定量した (図 1A)。ヒストン, poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP1), KU70 は、精製したゲノム DNA を DNase I で消化後、試料を SDS-PAGE で分離し、特異的抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。TOP1, TOP1 由来の DNA-peptide cross-link (DPepC), TOP2 は、精製したゲノム DNA を膜にスロットブロットし特異的抗体を用いて検出した。

### (2) 試験管内 DPC 除去反応

TK6 細胞をエトポシドで処理し、TOP2 を含む DPC をゲノム DNA に誘発した。細胞から精製した DNA と tyrosyl-DNA phosphodiesterase (TDP) 2 を試験管内でインキュベートし、DNA とクロスリンクした TOP2 を上記スロットブロット法で定量した。

### (3) 細胞の生存率

細胞を放射線照射あるいは薬剤処理後、メチルセルロース入りの培地に蒔き、コロニー形成法により生存率を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) DPC 生成機構

放射線が誘発するラジカルの非特異的な再結合 (非特異的反応) により生成する Type 1 DPC を検討した。X 線照射した細胞から精製したゲノム DNA を DNase I で消化し、DNA にクロスリンク

したタンパク質をウェスタンブロットにより調べた。その結果、DNA に結合しヌクレオソーム構造を形成しているコアヒストン (H2A, H2B, H3, H4) およびリンカーヒストン (H1) が DPC に含まれることが明らかとなった。X 線により生成した DNA ラジカルあるいはヒストンラジカルが、それぞれヒストンおよび DNA と反応し架橋したと考えた。

次に TOP1, TOP2 以外で Type 2 および Type 3 DPC を形成するタンパク質を検討した。DNA 修復に関わる PARP1 および KU70 タンパク質は DNA 鎖末端の脱塩基部位に不安定な Schiff 塩基を形成し、Type 2 および Type 3 DPC を形成する可能性がある。そこで、X 線照射した細胞から精製したゲノム DNA をウェスタンブロットで調べた。しかし、PARP1 および KU70 の DPC 形成は認められなかった。

## (2) DPC 修復機構

Type 1~Type 3 DPC の修復機構は、それぞれのタイプの DPC を選択的に生成する系を用いて検討した。

### ① Type 1 DPC

放射線により生成した DNA ラジカルあるいはタンパク質ラジカルは、タンパク質および DNA と反応し Type 1 DPC を形成する。ホルムアルデヒドも DNA とタンパク質を架橋し、Type 1 DPC を誘発する (図 2A)。ニワトリ由来 DT40 細胞をホルムアルデヒド処理し生存率を調べた (図 2B)。TDP1 を欠損した DT40 細胞はホルムアルデヒド感受性を示し、さらに、野生型細胞に比べ DPC 除去が遅延した。TOP1 が DNA 一本鎖切断末端にトラップされた TOP1 cleavage complex (TOP1cc) は TDP1 の主要な基質であることから、ゲノム DNA における TOP1cc 生成を調べたが生成は認められなかった。TDP1 はホルムアルデヒドが誘発する未同定の Type 1 DPC の修復に関与していると予想した。一方、DPC 特異的プロテアーゼとして示唆されている SPRTN の欠損細胞は、ホルムアルデヒド感受性を示さなかった (図 2B)。ホルムアルデヒドが誘発する Type 1 DPC の修復に SPRTN は関与していないと考えられる。

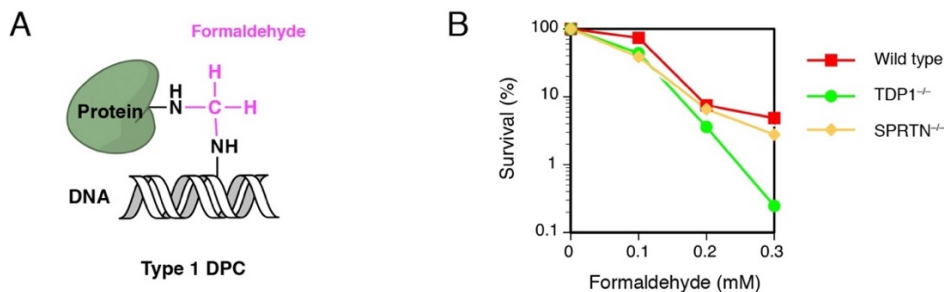
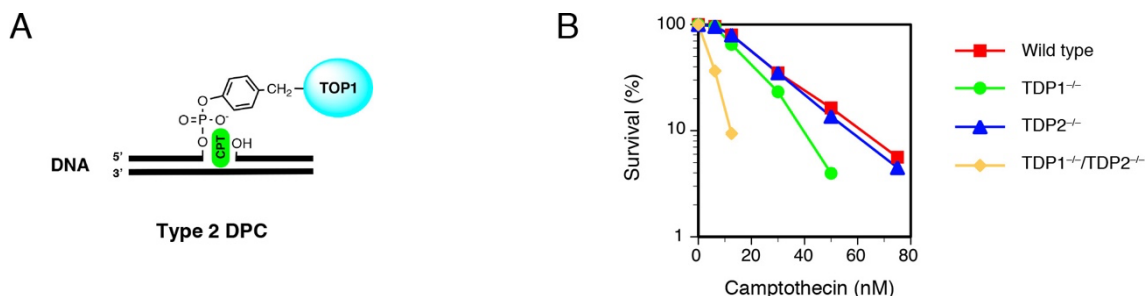


図 2 (A) ホルムアルデヒドが誘発する Type 1 DPC, (B) ホルムアルデヒド処理した DT40 細胞の生存率

### ② Type 2 DPC

TOP1 の反応部位近傍にある DNA 損傷は TOP1 反応中間体を阻害し、TOP1cc を含む Type 2 DPC を形成する。カンプトテシンも TOP1 反応中間体を阻害し、TOP1cc を含む Type 2 DPC を誘発する (図 3A)。TOP1cc はプロテアソームによりペプチドサイズに分解され、生じた DNA-peptide cross-link (DPepC) を TDP1 が除去すると考えられている。ヒト TK6 細胞由来の TDP1 欠損細胞、TDP2 欠損細胞、TDP1/TDP2 二重欠損細胞をカンプトテシン処理し、生存率 (図 3B) およびゲノム DNA における TOP1cc・DPepC の除去動態を調べた。その結果、TDP1 は主要な DPepC 除去酵素として働くが、TDP1 が欠損すると TDP2 がバックアップ酵素として働き DPepC を除去することが分かった (図 3C)。



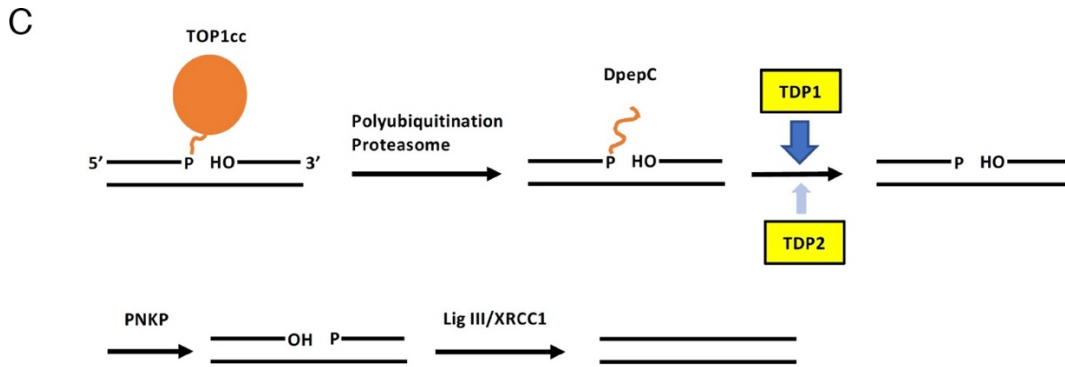


図3 (A) カンプトテシン (CPT) が誘発する Type 2 DPC, (B) カンプトテシン処理した TK6 細胞の生存率, (C) TOP1cc を含む Type 2 DPC の修復機構

### ③ Type 3 DPC

TOP2 の反応部位近傍にある DNA 損傷は TOP2 反応中間体を阻害し, TOP2 が DNA 二本鎖切断末端にトラップされた TOP2 cleavage complex (TOP2cc) を含む Type 3 DPC を形成する。エトポシドも TOP2 反応中間体を阻害し, TOP2cc を含む Type 3 DPC を誘発する (図 4A)。修復欠損 TK6 細胞をエトポシド処理し, 生存率およびゲノム DNA における TOP2cc 修復を調べた。その結果, TOP2cc は, 4 つの経路 (プロテアソーム依存・非依存経路および TDP2 依存・非依存経路) で修復されることが明らかとなった (図 4B)。さらに, *in vitro* 実験により, TDP2 がプロテアーゼ分解を受けていない TOP2cc を DNA から直接切除できることを確認した。

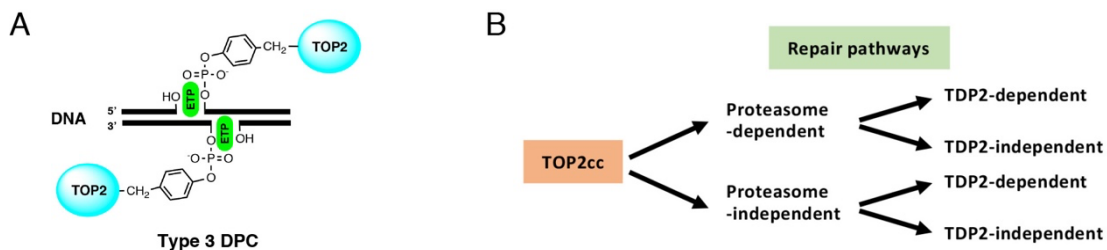


図4 (A) エトポシド (ETP) が誘発する Type 3 DPC, (B) TOP2cc を含む Type 3 DPC の修復機構

### ④ X 線誘発 DPC 修復に対する SPRTN の関与

SPRTN 欠損細胞を X 線照射し生存率を調べた。野生型細胞と同程度の生存率を示したことから, SPRTN は X 線が誘発する DPC の修復には関与していないと考えた。

### (3) DPC の直接観察

DPC に含まれるタンパク質はかさ高いため, 原子間力顕微鏡 (AFM) で直接可視化検出できる可能性がある。DPC のモデルとして, DNA 損傷部位をビオチン-アビジンタンパク質で標識し AFM で観察した。DNA 損傷部位が AFM で可視化できたことから, DPC の生成と修復を分子レベルで追跡できることが分かった (図 1B 下段)。

### <引用文献>

- ① Ide H et al., Repair and biochemical effects of DNA-protein crosslinks. *Mutat. Res.*, 711(1-2):113-122 (2011)
- ② Shoukamy M et al., Detection of DNA-protein crosslinks (DPCs) by novel direct fluorescence labeling methods: distinct stabilities of aldehyde and radiation-induced DPCs. *Nucleic Acids Res.*, 40(18):e143 (2012)
- ③ Nakano T et al., Induction of DNA-protein cross-links by ionizing radiation and their elimination from the genome. *Mutat. Res.*, 771:45-50 (2015)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Masataka Tsuda, Kaito Kitamasu, Chiho Kumagai, Kazuya Sugiyama, Toshiaki Nakano, Hiroshi Ide	4. 巻 91-92
2. 論文標題 Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) repairs topoisomerase 1 DNA-protein crosslinks and 3 - blocking lesions in the absence of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 102849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2020.102849	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toshiaki Nakano, Mahmoud I. Shoulkamy, Masataka Tsuda, Hiroyuki Sasanuma, Kouji Hirota, Minoru Takata, Shin-ichiro Masunaga, Shunichi Takeda, Hiroshi Ide, Tadayoshi Bessho, Keizo Tano	4. 巻 15
2. 論文標題 Participation of TDP1 in the repair of formaldehyde-induced DNA-protein cross-links in chicken DT40 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0234859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0234859	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masataka Tsuda, Kaito Kitamasu, Seiji Hosokawa, Toshiaki Nakano, Hiroshi Ide	4. 巻 39(1-3)
2. 論文標題 Repair of trapped topoisomerase II covalent cleavage complexes: Novel proteasome-independent mechanisms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2019.1674332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Xu Xu, Toshiaki Nakano, Masataka Tsuda, Ryota Kanamoto, Ryoichi Hirayama, Akiko Uzawa and Hiroshi Ide	4. 巻 48(3)
2. 論文標題 Direct observation of damage clustering in irradiated DNA with atomic force microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz1159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiroshi Ide, Toshiaki Nakano, Amir Salem, Mahmoud Shoukamy	4. 巻 71
2. 論文標題 DNA-protein cross-links: Formidable challenges to maintaining genome integrity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 190-197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2018.08.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 井出博, 中野敏彰, 津田雅貴, 瀬畑敬文, 久保山政弥
2. 発表標題 酸化剤によるDNA-タンパク質クロスリンク損傷生成
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津田雅貴, 北舛海斗, 山本あかね, 中野敏彰, 井出博
2. 発表標題 チロシル-DNA-ホスホジエステラーゼが関与する新規なDNA二本鎖切断修復経路
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津田雅貴, 北舛海斗, 中野敏彰, 井出博
2. 発表標題 チロシル-DNA ホスホジエステラーゼ2 (TDP2) はDNAにトラップされたトポイソメラーゼ1を修復する
3. 学会等名 第49回日本環境変異原学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井出博, 中野敏彰, 津田雅貴, 平山亮一, 鶴澤玲子
2. 発表標題 放射線が誘発するDNA-タンパク質クロスリンク損傷の定量
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津田雅貴, 北舩海斗, 中野敏彰, 井出博
2. 発表標題 DNAにトラップされたトポイソメラーゼ2の除去機構
3. 学会等名 6th Asian Congress on Environmental Mutagens (ACEM) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徐徐, 瀬畑敬文, 久保山政弥, 津田雅貴, 中野敏彰, 井出博
2. 発表標題 過酸化によるゲノム損傷 DNA-タンパク質クロスリンク形成
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津田雅貴, 北舩海斗, 中野敏彰, 笹沼博之, 武田俊一, 井出博
2. 発表標題 チロシルDNAホスホジエステラーゼ2 (TDP2)によるDNA切断端に共有結合したトポイソメラーゼ2の修復機構
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Ide
2. 発表標題 Direct observation of damage clustering in irradiated DNA
3. 学会等名 15th International workshop on radiation damage to DNA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津田雅貴, 井出博, 武田俊一, 廣田耕志
2. 発表標題 抗ガン治療薬シタラピン (Ara-C) の作用機序の解明
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金本僚太, 徐徐, 松坂智幸, 中野敏彰, 平山亮一, 鶴澤玲子, 井出博
2. 発表標題 原子間力顕微鏡を用いた放射線誘発DNA損傷の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤池春奈, Mahmoud Shoukamy, Amir Salem, 津田雅貴, 笹沼博之, 増永慎一郎, 武田俊一, 井出博, 田野 恵三
2. 発表標題 脊椎動物細胞における DNA-タンパク質クロスリンク損傷修復へのTDP1, TDP2遺伝子産物の関与
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平山 亮一  (HIRAYAMA Ryoichi)  (90435701)	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(定常)   (82502)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	田野 恵三  (TANO Keizo)		
研究協力者	津田 雅貴  (TSUDA Masataka)		
研究協力者	中野 敏彰  (NAKANO Toshiaki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------