

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007~2008
 課題番号：19510060
 研究課題名 (和文) M 期に DNA 損傷を受けた細胞での新規損傷チェックポイントの研究
 : TLK1 の役割
 研究課題名 (英文) Essential role for TLK1 in DNA damage checkpoint during mitosis

研究代表者
 橋本 光正 (HASHIMOTO MITSUMASA)
 金沢医科大学・医学部・助教
 研究者番号：70293975

研究成果の概要：

ヒト培養細胞で TLK1 の発現を RNAi 法で抑制すると、増殖速度の低下、倍数性の異常、中心体の両極への移動抑制、姉妹染色体の不均等分裂の誘導、中心体分離と両極移動を担う MRLC のリン酸化が抑制されていることを見出した。リン酸基擬態型の MRLC を TLK1 枯渇細胞に導入すると上記の異常が劇的に減少した。以上より TLK1 は MRLC を制御することによって、姉妹染色体分配の正確さを保障する機構に関与していると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：放射線生物影響

1. 研究開始当初の背景

(1) 染色体 DNA に二本鎖切断が発生した時、その細胞が細胞周期のどの位置にいますか、その後の反応は大きく異なる。間期に DNA 損傷を受けた場合、細胞は直ちに G1、S、G2 期のいずれかに停止する。しかし M 期に DNA 損傷を受けた場合、M 期の進行が停止するの否かについては、詳しい知見がない。M 期で働く紡錘体形成チェックポイントは、動原体と紡錘体との結合、紡錘系の異常の有無を監視するためのものであり、DNA 損傷には反応しない。

(2) 私は、私たちが発見した TLK1/PKU-β (Gene 202, 193-201) の発現を RNAi 法で抑制すると、染色体凝縮、中心体の両極への移動が抑制されることを見出した。また他の研究室は、細胞への X 線照射後、中心的なチェックポイントキナーゼである ATM 及び Chk1 依存的に TLK1/PKU-β 活性が抑制されること (EMBO J. 22, 1676-1687, Oncogene 22, 5927-5937) を報告している。

(3) 以上より私は、TLK1/PKU-β は、M 期の DNA 損傷チェックポイントに関与する

のではないかという着想を得た。この着想を支持する実験結果として、TLK1/PKU-β欠損細胞は、放射線感受性が高くなる、染色体凝縮に關与する Histone H3 のリン酸化が低くなる、中心体の兩極への移動に關与する Aurora B の活性、Myosin II の活性が低くなる、M 期への移行の引き金となる CyclinB/Cdc2 の活性が低くなる。

2. 研究の目的

(1)本研究は、DNA二本鎖切断に対するM期のDNA損傷チェックポイントの存在を明らかにし、その分子機構を解明することを目的とする。特に、TLK1/PKU-βによるM期損傷チェックポイントの全容解明に向けて、以下のことを明らかにする。

M 期にDNA二本鎖切断を負った細胞の細胞周期チェックポイントと TLK1/PKU-βの働き。

上述のG2 期同調 TLK1/PKU-β発現抑制細胞と対照細胞において、経時的に X 線照射を行う。そして両細胞について、次の事を明らかにする。

1. 表現形(染色体凝縮の抑制、中心体の兩極への移動抑制)

2. M 期チェックポイントの起動している時間、その後通常周期に戻る能力と TLK1/PKU-βの關係

3. TLK1/PKU-β、ATM、Chk1、Aurora B、Histone H3、Myosin II、Cyclin B、Cdc2 の発現と活性

(2)TLK1/PKU-βと Aurora B の關係

線虫の TLK1/PKU-βホモログ、TLK-1 は Aurora B によってリン酸化され、その活性を増強する。またその逆に活性化した TLK-1 は Aurora B をリン酸化し、活性を上げることが報告されている (Current Biol. 15, 894-904)。そこでヒト培養細胞及びヒトのタンパク質を用いて、両タンパク質が双方向に制御しあうか検討する。

(3) Cyclin B/Cdc2 と TLK1/PKU-βの關係

TLK1/PKU-βの発現を抑制した細胞では、Cyclin B/Cdc2 の活性が抑制されている。このことから、Cyclin B/Cdc2 の活性促進に、TLK1/PKU-βが未知の役割を果たしていると推察される。そこで、その役割を検討する。

3. 研究の方法

(1)siRNA で TLK1/PKU-βの発現を抑制した細胞について

siRNA で TLK1/PKU-βタンパク質の発現を抑制した細胞を樹立した。この siRNA 配列を pSilnecr に組み込み細胞内に導入する

ことによって、TLK1/PKU-βの発現を抑制した細胞を樹立し、これを様々な解析に用いた。

(2) Myosin regulatory light chain II(MRLC)の野生型は GST 融合タンパク質として精製した。MRLC のリン酸化部位は 18 位のスレオニン(T)と 19 位のセリン(S)である。そこで下に示すように、野生型および変異型 MRLC タンパク質産生プラスミドを構築した。

野生型 MRLC (WT-MRLC)

非リン酸型 MRLC (AA-MRLC)

リン酸基擬態型 MRLC (DD-MRLC)

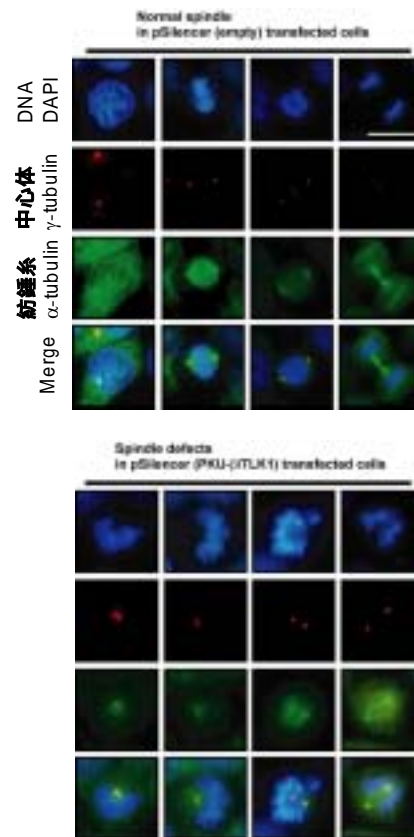
(3) 免疫染色

TLK1/PKU-βの発現を抑制細胞や適宜様々な発現プラスミドを導入した細胞について、適切な一次抗体、二次抗体を用いて染色し蛍光顕微鏡にて観察した。

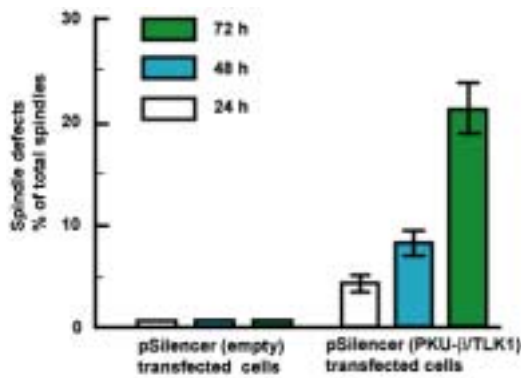
4. 研究成果

(1) TLK1/PKU-βの発現を抑制した細胞の特徴

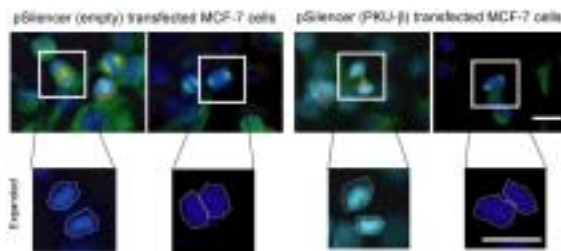
電離放射線 X 線、紫外線に対して、高感受性であること、細胞周期の G2 期から M 期への進行が遅延すること、細胞周期 M 期前期において、中心体の兩極移動が抑制されること(下図)。



このような現象が観察できる頻度は下図の通りであった。

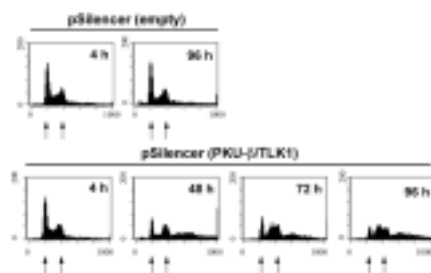


その結果として姉妹染色体分配が正確に完了されないで、姉妹染色分体の不均等な分裂が頻度高く起こる(下図)。

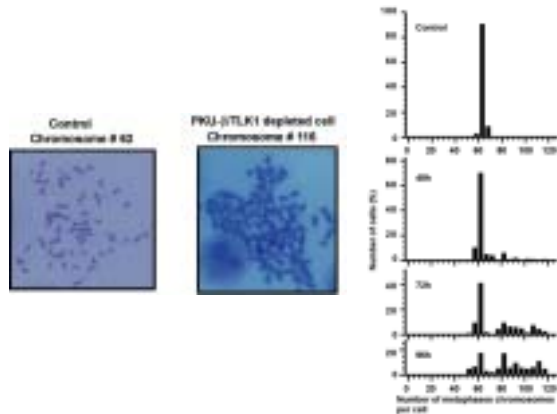


Anaphase DNA ratio (smaller : larger)	Transfection plasmids	
	pSilencer (empty)	pSilencer (PKU-β)
47.5 ~ 50.0 : 50.0 ~ 52.5	49	29
45.0 ~ 47.4 : 52.6 ~ 55.0	1	10
40.0 ~ 44.9 : 55.1 ~ 60.0	0	10
35.0 ~ 39.9 : 60.1 ~ 65.0	0	1
~ 35.0 : 65.0 ~	0	0
total	50	50

倍数性異常の細胞が高頻度に出現すること(下図)。

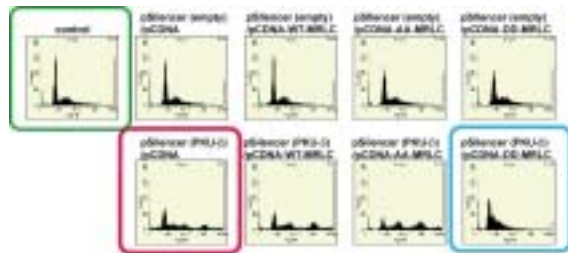


染色体モードが異常になること、が認められている(下図)。



(2) リン酸基擬態型 MRLC (DD-MRLC) を導入した細胞のみ TLK1/PKU-βの発現を抑制した細胞の特徴を緩和した。特に、中心体の両極移動が抑制とそれによる紡錘体形成の異常、倍数性異常の細胞の高頻度出現、姉妹染色分体の不均等な分裂、染色体モードの異常等の現象が抑制された。

DD-MRLC 導入/ TLK1/PKU-β発現抑制細胞のみ、倍数性異常の細胞が減少。(下図、赤枠と青枠のデータ比較)



DD-MRLC 導入/ TLK1/PKU-β発現抑制細胞のみ、中心体の両極移動が抑制とそれによる紡錘体形成の異常の緩和(表参照、赤枠と青枠のデータ比較)

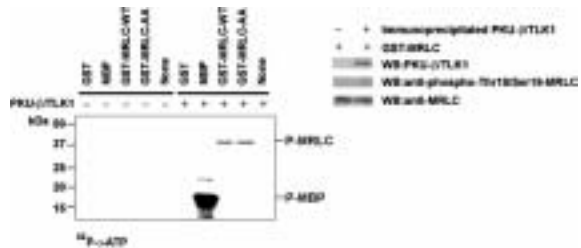
transfection plasmids	Spindle defects			
	asymmetry bipolar	monopolar	multipolar	multinodal
Mock control	0	0	0	0
pSilencer (PKU-β)	15	0	1	5
pSilencer (PKU-β) / pCDNA	17	0	1	1
pSilencer (PKU-β) / pCDNA-WT-MRLC	12	0	0	5
pSilencer (PKU-β) / pCDNA-AA-MRLC	11	3	5	11
pSilencer (PKU-β) / pCDNA-DD-MRLC	2	0	0	5
pSilencer (empty) / pCDNA	0	0	0	5
pSilencer (empty) / pCDNA-WT-MRLC	0	0	0	5
pSilencer (empty) / pCDNA-AA-MRLC	0	0	0	5
pSilencer (empty) / pCDNA-DD-MRLC	0	0	0	5

N=100 each transfectant

DD-MRLC 導入/TLK1/PKU-β発現抑制細胞のみ、姉妹染色分体の不均等な分裂が減少。(表参照、赤枠と青枠のデータ比較)

Transverse division (姊妹染色分体)	Mock Control	pkβ-lencer (PKU-β)	pkβ-lencer (PKU-β) / pCDNA	pkβ-lencer (PKU-β) / pCDNA-WT-MRLC	pkβ-lencer (PKU-β) / pCDNA-AA-MRLC	pkβ-lencer (PKU-β) / pCDNA-DD-MRLC	pkβ-lencer (empty) / pCDNA	pkβ-lencer (empty) / pCDNA-WT-MRLC	pkβ-lencer (empty) / pCDNA-AA-MRLC	pkβ-lencer (empty) / pCDNA-DD-MRLC
47.5-56.0-56.0-52.5	40	25	23	25	39	42	46	46	41	47
45.0-47.4-52.0-55.9	1	8	14	11	4	8	1	2	2	3
43.0-44.9-56.1-50.3	2	11	8	7	1	0	0	2	2	0
38.0-38.9-56.1-56.3	0	3	4	7	3	0	0	3	3	0
-38.0-56.0-	2	2	1	0	3	0	0	2	2	0
total	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

(3) TLK1/PKU-βの発現抑制細胞では MRLC の発現量に変化はないが、リン酸化が抑制されている。また免疫沈降実験や in vitro kinase assay の結果から、TLK1/PKU-βと MRLC の直接的な結合、相互作用は認められなかった。(下図左、in vitro phosphorylation kinase assay、TLK1/PKU-βは、WT-MRLC と DD-MRLC を同等にリン酸化している。下図右、TLK1/PKU-βは、WT-MRLC の Thr18/Ser19 を直接にはリン酸化していない。) TLK1/PKU-βは、何らかのタンパク質を介して間接的に MRLC の Thr18/Ser19 をリン酸化していることが予想される。



(4) TLK1/PKU-βの発現抑制細胞では Aurora B の発現量に変化はないが、リン酸化が抑制されている。

(5) 上述の結果から、TLK1/PKU-βは MRLC のリン酸化を Aurora B を介して間接的に行うことによって、細胞分裂時の姉妹染色分体の正確さを保障するシステムに重要な役割を果たしていると考えられる。また本研究で観察された結果をまとめると、次のように記述できる。



5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)
Watanabe K, Iwabuchi K, Sun J, Tsuji Y, Tani T, Tokunaga K, Date T, Hashimoto M, Yamaizumi M, Tateishi S. RAD18 promotes DNA double-strand break repair during G1 phase through chromatin retention of 53BP1. Nucleic Acids Res., 37, 2176-2193 (2009) 査読有

Hashimoto M, Matsui T, Iwabuchi K, and Date T. PKU-β/TLK1 regulates myosin II activities, and is required for accurate equaled chromosome segregation. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 657, 63-67 (2008) 査読無

Iwabuchi K, Hashimoto M, Matsui T, Kurosawa A, Adachi N, and Date T. Use of Cell Sorting for Studying Cell-Cycle Dependent X-ray Sensitivity in End Joining-Deficient Human Cells. Biochem. Biophys. Res. Communica., 372: 662-667 (2008) 査読有

Iwabuchi K, Matsui T, Hashimoto M, Matsumoto Y, Kurihara T, Date T. Characterization of a cancer cell line that expresses a splicing variant form of 53BP1: Separation of checkpoint and repair functions in 53BP1. Biochem. Biophys. Res. Communica., 376: 509-513 (2008) 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

橋本 光正、非相同末端結合修復能欠損ヒト細胞における細胞周期依存的X線感受性日本分子生物学会 第31回年会/日本生化学会大会 第81回大会(合同大会) 2008.12.10. 兵庫県

橋本 光正、セルソーターを用いた新しい細胞周期同調法の開発と、非相同末端結合修復の研究日本放射線影響学会第51回大会2008.11.20.福岡県

橋本 光正、PKU-β/TLK1の細胞周期M期における役割-中心体の移動と姉妹染色体均等分裂への関与日本生化学会北陸支部 第26回大会2008.5.31.石川県

橋本 光正、セルソーターによる細胞周期の同調と TLK1/ PKU-βによる細胞周期チェックポイント
30 回年会/日本生化学会大会 第 80 回大会(合同大会) 2007.12.12. 神奈川県

橋本 光正、PKU-β/TLK1 regulates myosin II activities, and required for centrosome separation and chromosome segregation, 8th International Symposium on Chromosome Aberrations
2007.10.5. 兵庫県

〔図書〕(計 1 件)

橋本 光正、他、
独立行政法人 放射線医学総合研究所
モデルが拓く放射線防護研究の新たな展開、G1期に機能する新規DNA二本鎖切断損傷の修復経路、2007, 148, 43-50.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

橋本 光正
(HASHIMOTO MITSUMASA)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号:70293975

(2)研究分担者

岩淵 邦芳
(IWABUCHI KUNIYOSHI)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10232696