

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590283
 研究課題名 (和文) 哺乳動物細胞の DNA 修復時に dNTPs 供給を担保する RNR 制御機構の解析
 研究課題名 (英文) Analysis of RNR regulatory mechanism to supply dNTPs at the DNA repair site in mammalian cells
 研究代表者
 丹伊田 浩行 (NIIDA HIROYUKI)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：20336671

研究成果の概要：ヒトをはじめとする哺乳動物の細胞は日常的に紫外線等による DNA 損傷を受けている。DNA 損傷が修復されないと癌などの発生を促すことになる為、効率的な修復は必須である。筆者は DNA 修復の際に原料となる核酸(dNTPs)を合成する経路の ribonucleotide reductase (RNR)がヒストンアセチルトランスフェラーゼ Tip60 により DNA 損傷箇所に集積されることを明らかにした。この機構は効率的な DNA 修復に必要であることを証明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞医化学、DNA 修復

1. 研究開始当初の背景

同じ真核生物でありながら下等生物の出芽酵母においては電離放射線 (IR) による DNA 損傷後に細胞内において DNA 修復の原料となるデオキシリボヌクレオチド (dNTPs) 濃度が増加するのに対し、高等生物のヒト細胞では dNTPs の顕著な増加は認められない。この違いからヒトをはじめとする哺乳動物には DNA 損傷応答において特異的な dNTPs の供給機構が存在するものと考えられた。細胞内のおけ

る dNTPs 濃度は細胞周期に依存して厳密にコントロールされており、過剰な dNTPs の存在は DNA に突然変異を誘発することが示されている。このため哺乳類細胞において効率的に DNA 修復を行うには損傷部位局所において dNTPs の産生を行う必要があると考えられた。

2. 研究の目的

真核多細胞生物が種を保存していくための

必須条件は、遺伝的な変異を最小限に抑えることである。遺伝情報をコードする DNA に変異をもたらす要因としては紫外線などに代表される外的な環境に由来するものと生体内の代謝過程において発生する活性酸素など内的要因のものに大別される。いずれの要因により DNA が損傷を受けた場合細胞は速やかに修復を行わなければならない。この修復過程において DNA の原料となる dNTPs を供給するシステムは生物種により異なる。

dNTPs 合成経路の律速酵素はリボヌクレオチドレダクターゼ (RNR) である。この酵素が DNA 損傷箇所へ局在する為に未だ同定されていない分子と特異的に相互作用し DNA 損傷箇所近傍へとリクルートされているものと予想した。そこで申請者は特に RNR の DNA 損傷箇所の集積機構に焦点を当てその解明に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) RNR が核のダメージ部位にリクルートされることを示す為に micro irradiation (MI) を用いた蛍光免疫染色を行った。

(2) RNR の活性が阻害されると DNA 修復に障害が起こることを RNR の阻害剤、R1 siRNA 等の処理の後 Comet assay を行い検討した。

(3) RNR と相互作用し DNA 損傷箇所へリクルートしうる分子の同定を試みた。方法として Yeast two hybrid 法を用い RNR の大サブユニット R1 と結合する分子の探索を行った。

(4) Yeast two hybrid スクリーニングの結果同定されたヒストンアセチルトランスフェラーゼ Tip60 と RNR の相互作用を昆虫細胞内にそれぞれの分子を発現させて pull down assay を行った。またヒト細胞株 HeLa に組み替えタンパクを強制発現させ相互作用を確認した。Tip60 に HA および FLAG tag を付け、HeLa S 細胞に安定に発現させた細胞

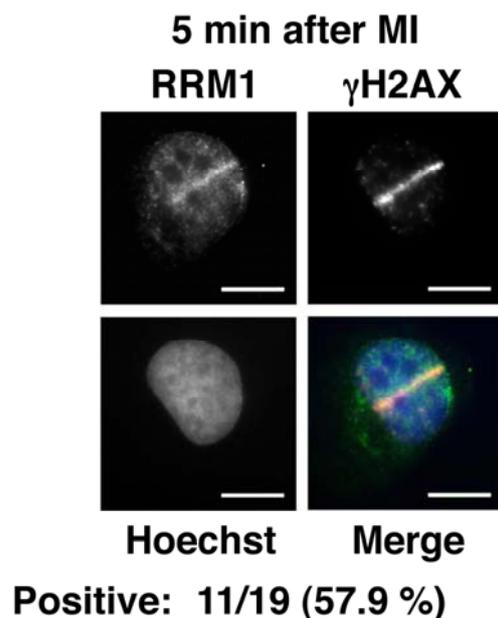
を用いて Tip60 複合体を精製し複合体中に RNR が存在することを確認した。最後に in vivo において内在性の Tip60 と RNR の結合を IP-Western blot により検討した。

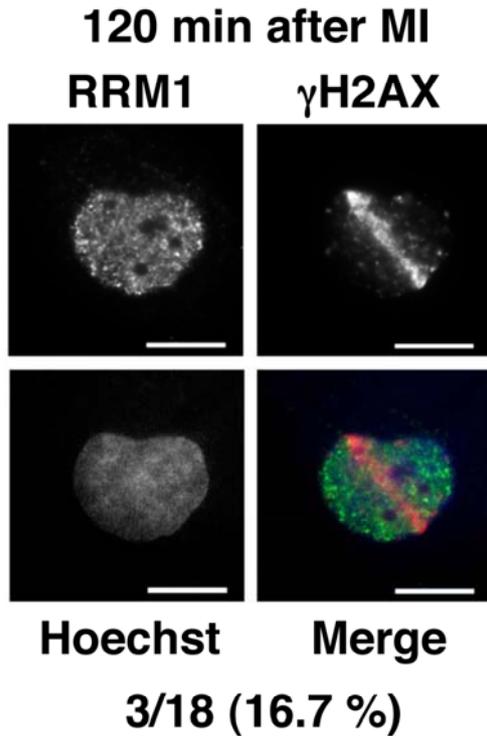
(5) RNR が Tip60 依存的に DNA 損傷箇所へリクルートされることを ChIP assay を行い証明した。この assay を哺乳動物細胞内で行う為にヒトゲノムには存在しない I-Sce I 制限酵素認識部位を安定に染色体内に導入した。アデノウイルスベクターを用いてこの細胞内に一過的に制限酵素 I-Sce I を発現させ染色体内の特定の部位に DNA 二重鎖切断を誘導し ChIP assay を行った。

4. 研究成果

(1) dNTPs 合成の律速酵素 RNR は DNA 損傷発生後初期に損傷部位へとリクルートされる。

仮説どおり DNA 損傷が発生したときにヒト細胞では DNA 損傷部位へ RNR が局在するのかを micro irradiation を行い、蛍光免疫染色で R1 の動態を継時的にモニターした。





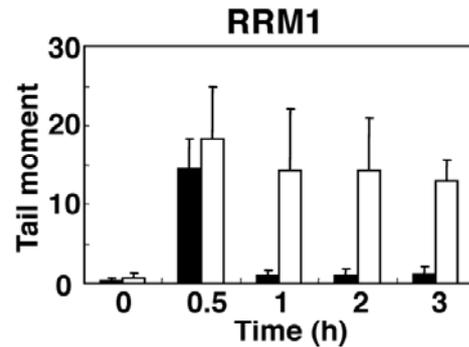
ヘキストを投与した DNA に紫外線を照射することで染色体内に二重鎖切断を誘導した。切断部位をそのマーカーである γ H2AX で染色した。R1 は抗 R1 抗体で間接的に染色しその動態を検討した。損傷発生後 5 分では R1 はおよそ 60% ダメージ部位に局在するのに対し 2 時間後ではその割合が 17% にまで減少している。このことから RNR は損傷部位へ損傷発生後初期にリクルートされるものと考えられる。

(2) RNR は効率的な DNA 修復に必須である。

RNR の活性が DNA 修復に必要であるかについて RNR の特異的阻害剤ヒドロキシウレア (HU) で活性を阻害することによって、および R1 siRNA により R1 を細胞内から除去することにより検討した。X 線照射後継時的に DNA の損傷度合いを Comet assay によりモニター

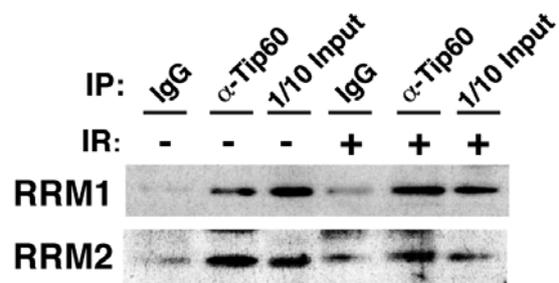
した。

Si RNA により R1 を欠乏させた細胞は以下のように著しく修復が阻害された。黒いバーは control si RNA、白いバーは R1 siRNA を処理した細胞の結果である。Comet assay を行い DNA に損傷が存在するとその程度は Tail moment の値として表される。データは示していないが HU で阻害した時も同様の結果となった。

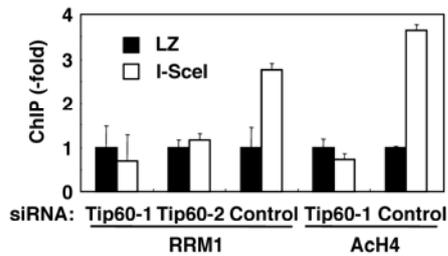


(3) RNR は Tip60 と相互作用し、Tip60 依存的に DNA 損傷箇所へリクルートされる。

Yeast two hybrid 法によるスクリーニングの結果 Tip60 が RNR と相互作用する分子として同定された。



内在性の R1 は Tip60 と特異的に結合していることが IP-Western blot により証明された。Tip60 依存的に R1 が DNA 損傷部位へリクルートされることを ChIP assay を行い明らかにした。



細胞内の特異的部位へ I-Sce I を発現させることで二重鎖切断を誘導した時（白いバー）、R1 は損傷部位へリクルートされるが、Tip60 siRNA 処理によりその局在が見られなくなる。このため RNR は Tip60 に依存して DNA 損傷部位へリクルートされるものと思われる。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

① 発表者：丹伊田 浩行

発表題名：Tip60 histone acetyl transferase-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage site is required for cell survival in response to DNA damage

学会名：BMB2007（第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会）

発表年月日：2007年12月11日～15日

発表場所：パシフィコ横浜

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹伊田 浩行 (NIIDA HIROYUKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：20336671

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者