

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20241011

研究課題名 (和文) 蛋白質のポリ ADP リボシル化により制御される新しい DNA 損傷応答機構

研究課題名 (英文) Novel DNA damage responses and repair regulated by poly-ADP ribosylation and chromatin remodeling

研究代表者： 安井 明 (YASUI AKIRA)  
東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60191110

研究成果の概要 (和文)：最も発生頻度の高い DNA 単鎖切断と最も深刻な DNA 二重鎖切断がヒト細胞内でどのように修復されるかを解明した。単鎖切断ではポリ ADP リボースポリメラーゼ 1 (PARP1) が DNA のニック (単鎖切断) を見つけて結合する。PARP1 に結合して DNA のニックをギャップに変換する二種類の酵素をヒト細胞で発見した。それらの欠損が細胞を単鎖切断や二重鎖切断に感受性にする事が分った。二重鎖切断では、ATP 依存的なクロマチンリモデリング因子の ACF1 が KU70 と結合しており、その結合が二重鎖切断で更に強くなり、CHRAC 複合体を形成して KU770/80 複合体を二重鎖切断にロードして修復を開始させる事が分った。これらの発見はクロマチンリモデリングが DNA 鎖切断の修復に必須な機構である事を示した。

研究成果の概要 (英文)：Using laser micro-irradiation of living human cell and identification of protein complexes recruited to DNA damaged site by proteomics, we have analyzed and identified DNA damage response of proteins within human cell. For DNA single-strand breaks we have identified two novel human proteins with DNA end- and exo-nuclease activities, which activate poly(ADP-ribose polymerase 1 (PARP1) by creating gap at a nick in DNA. For DNA double-strand breaks (DSB) we identified an ATP-dependent chromatin remodeling complex belonging to ISWI family, CHRAC, which is required for the loading of KU complex at DSB. Especially, ACF1 becomes bound to KU70 more tightly by treatment of cells with chemical agents creating DSB and initiates non-homologous end joining of DSB. Thus, we showed that chromatin remodeling is essential for the initiation of repair of DNA strand breaks.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
2009年度	13,500,000	4,050,000	17,550,000
2010年度	13,500,000	4,050,000	17,550,000
総計	37,800,000	11,340,000	49,140,000

研究分野：DNA 修復

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：ポリ ADP リボース、DNA 修復、活性酸素、細胞老化、癌化

1. 研究開始当初の背景 DNA 損傷は損傷を見つける蛋白質が修復を開始して損傷を取り除き、取り除いた部分を再合成して元通りの DNA 配列を取り戻す除去修復という機

構で修復される。除去修復には活性酸素などによる塩基損傷を修復する塩基除去修復と紫外線によるより大きな損傷を修復するヌクレオチド除去修復がある。我々は 2007 年

に EMBO J に発表した論文で、種々の塩基損傷の直ぐ 5' 側にニックを入れる機能を持つヒトの酵素 PALF を発見した。この酵素が開始する修復は上記のいずれの除去修復にもあてはまらない Alternative Excision Repair であり、基本は最も頻繁に生じる DNA 単鎖切断の修復機構と考えられた。

2. 研究の目的 ヒト細胞内で実際に起きている DNA 修復の機構を明らかにする目的で、損傷修復の際の蛋白質のポリ ADP リボシレーションおよびクロマチンリモデリングの機構と機能について明らかにする。これまでに進めて来たヒト細胞内での種々の修復機構と複製での損傷乗り越え機構 (Translesion synthesis) についても研究を進め、ヒト細胞内で、塩基損傷、単鎖切断、二重鎖切断などの DNA 損傷がどのように修復されるかをさらに明らかにし、発癌や老化の理解、さらに癌治療の基礎とする。

3. 研究の方法 ヒト細胞内での DNA 損傷修復の理解の為に、ヒト細胞を顕微鏡のレンズを通してレーザー光を照射し、単一細胞の核の局所に単鎖切断、二重鎖切断、塩基損傷を作り、直ちに集積する修復蛋白質やクロマチンリモデリング因子をリアルタイムで解析する方法や、細胞内で DNA 損傷に伴い集積する蛋白質が形成する蛋白質複合体を免疫沈降と質量分析で同定する方法等を駆使する。

4. 研究成果 以下のような研究成果が得られた。発表した主な論文に対応して箇条書きで記述する。

(1) 我々が発見したヒト PALF 蛋白質は他の研究室でも解析されたが、我々の解析では DNA 塩基損傷の 5' 側にニックを入れる機能とニックの場所から 3' →5' に DNA を切り取る機能があり、他の研究者はこの酵素活性を見つけていない。PALF は二重鎖切断の修復に関わる KU 蛋白とも結合することから、PALF が non-homologous end joining (NHEJ) 修復でも働いている可能性がある。その機能を解析する為に NHEJ の in vitro での解析を USA の Michael Lieber と共同研究し、PALF が NHEJ で機能することを発見した (論文 1)。

(2) 複製の際のミスマッチを修復する MSH2/MSH6 複合体が活性酸素の塩基損傷で損傷乗り越えのポリメラーゼ Pol η や PCNA と共に働き除去修復に講演する事を発見 (論文 2)。

(3) ATP 依存的クロマチンリモデリングは転写や複製に伴うクロマチンの移動や DNA 鎖の弛緩に必須の機構で 4 つのファミリーに分かれ、それぞれ多数の蛋白質複合体により、細胞分化や個体発生にも重要な役割を果た

している。ISWI ファミリーはこれまで修復との関係が全く報告されていなかったが、その CHRAC 複合体が DNA 二重鎖切断の修復に必須の働きをする事を発見した。この複合体に含まれる ACF1 は直接 KU70 に結合し、KU70/80 複合体が二重鎖切断に結合するのを助ける。(論文 3)

(4) ヒト細胞での紫外線や単鎖切断および二重鎖切断の損傷部位に複製でのミスマッチの修復に関わる MSH2/MSH3 および MSH2/MSH6 の複合体が PCNA 依存的に集積する事を発見した。この集積はミスマッチ修復の場合と異なり MSH3 あるいは MSH6 が損傷部位の PCNA と結合する事により MSH2 との複合体を修復の現場にリクルートしさらに MLH1 も集積してくるので、修復合成のミスマッチ修復を行なうと考えられる。(論文 1 2)

(5) DNA 単鎖切断は PARP1 により見つけられるが、PARP1 の活性化にはニックではなく DNA のギャップが必要である。PARP1 に結合する PALF はニックをギャップに変える 3' →5' エキソヌクレアーゼの活性があり、in vitro の実験では PARP1 に PALF を加える事によりニックで PARP1 が活性化されポリ ADP リボシル化が起きる。我々は、PALF と同じような AP サイトの 5' 側にニックを入れる活性を持ち、さらに 5' 側に切り込みを入れギャップを作る新規の酵素をヒト細胞で発見した。この酵素を APENX と名付けた。APENX は PARP1 と結合し、単鎖切断部位に集積し、siRNA で発現を抑えると PALF のノックダウン以上に MMS に高感受性となり、ヒト細胞内での単鎖切断の修復とポリ ADP リボシル化に重要な働きをしている事が明らかとなった (論文準備中)

## 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 15 件)

1. Li S, Kanno SI, Watanabe R, Ogiwara H, Kohno T, Watanabe G, Yasui A, and Lieber MR. PALF acts as both a single-stranded DNA endonuclease and a single-stranded DNA 3' →5' exonuclease and can participate in DNA end joining in a biochemical system. *J Biol Chem*. 2011 Sep 1. 査読有り
2. Zlatanou A, Despras E, Braz-Petta T, Boubakour-Azzouz I, Pouvelle C, Stewart GS, Nakajima S, Yasui A, Ishchenko AA,

- Kannouche PL. The hMsh2-hMsh6 complex acts in concert with monoubiquitinated PCNA and Pol  $\eta$  in response to oxidative DNA damage in human cells. *Mol Cell*. 2011 Aug 19;43(4):649-62. 査読有り
3. Lan L, Ui A, Nakajima S, Hatakeyama K, Hoshi M, Watanabe R, Janicki S, Ogiwara H, Kohno T, Kanno SI, and Yasui A. The ACF1 complex is required for DNA double-strand break repair in human cells. *Mol Cell* 40, 976-987, 2010. 査読有り
  4. Ogiwara H, Ui A, Otsuka A, Satoh H, Ymi I, Nakajima S, Yasui A, Yokota J, and Kohno T, Histone acetylation by p300 at double-strand break sites facilitates SWI/SNF chromatin remodeling and the recruitment of non-homologous end joining factors. *Oncogene*, 18, 2135-2146, 2011. 2011. 査読有り
  5. Horibata K, Saijo M, Bay MN, Lan L, Kuraoka I, Brook PJ, Honma M, Nohmi T, Yasui A, and Tanaka K. Mutant Cockayne syndrome group B protein inhibits repair of DNA topoisomerase I-DNA covalent complex. *Genes Cells*, 16, 101-114, 2011. 査読有り
  6. Itoh G, Kanno SI, Uchida KS, Chiba S, Sugino S, Watanabe K, Mizuno K, Yasui A, Hirota T, and Tanaka K. CAMP (C13orf8, ZNF828) is a novel regulator of kinetochore-microtubule attachment. *EMBO J*. 30, 130-144, 2011. 査読有り
  7. Isogai S, Kanno SI, Ariyoshi M, Tochio H, Ito Y, Yasui A, and Shirakawa M. Solution structure of a zinc-finger domain that binds to poly-ADP-ribose. *Genes Cells* 15, 101-110, 2010. 査読有り
  8. Asagoshi K, Liu Y, Masaoka A, Lan L, Prasad R, Horton JK, Brown AR, Wang XH, Bdour HM, Sobol RW, Taylor JS, Yasui A, and Wilson SH. DNA polymerase beta-dependent long patch base excision repair in living cells. *DNA Repair*, 9, 109-119, 2010. 査読有り
  9. Mori H, Ouchida R, Hijikata A, Kitamura H, Ohara O, Li Y, Gao X, Yasui A, Lloyd RS, and Wang JY. Deficiency of the oxidative damage-specific DNA glycosylase NEIL1 leads to reduced germinal center B cell expansion. *DNA Repair (Amst)*. 8, 1328-1332, 2009 査読有り
  10. Ziv O, Geacintov N, Nakajima S, Yasui A, and Livneh Z. DNA polymerase zeta cooperates with polymerases kappa and iota in translesion DNA synthesis across pyrimidine photodimers in cells from XPV patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 11552-11557, 2009 査読有り
  11. Wei L, Lan L, Hong Z, Yasui A, Ishioka C, and Chiba N. Rapid recruitment of BRCA1 to DNA double-strand breaks is dependent on its association with Ku80. *Mol Cell Biol*. 28, 7380-7393, 2008. 査読有り
  12. Hong Z, Jiang J, Hashiguchi K, Hoshi M, Lan L, and Yasui A. Recruitment of mismatch repair proteins to the site of DNA damage in human cells. *J. Cell Sci*. 121, 3146-3154, 2008. 査読有り
  13. Niimi A, Brown S, Sabbioneda S, Kannouche P, Scott, A, Yasui A, Green CM,

and Lehmann AR. Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 16125-16130, 2008 査読有り

14. Petta TB, Nakajima S, Zlatanou A, Despras E, Sarasin A, Yasui A, and Kannouche P. Human DNA polymerase iota protects cells against oxidative stress. *EMBO J.* 27, 2883-2895, 2008. 査読有り
15. Hong Z, Jiang J, Lan L, Nakajima S, Kanno S, Koseki H, and Yasui A. A polycomb group protein, PHF1, is involved in the response to DNA double-strand breaks in human cell. *Nucleic Acids Res.* 36, 2937-2947, 2008. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

1. Yasui A. Roles of chromatin remodeling factors in DNA double-strand break repair in human cell. The 7<sup>th</sup> 3R Symposium, October 26-30, 2010, Toyama Conference Center, Toyama, Japan.
2. Yasui A, Lan L, Nakajima S, Hatakeyama K, Zehui H, and Kanno SI. Repair of DNA strand breaks in living human cells and implications for cancer therapy. 40<sup>th</sup> International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund, November 10-12, 2009, Tokyo, Japan.
3. Hong Z, and Yasui A. : Mismatch repair proteins at DNA single- and double-strand breaks and UV-lesions. US-EU Conference on Repair of Endogeneous Genome Damage, Galveston,

Texas, USA, February 21-25, 2009.

4. Lan L, Nakajima S, Hong S, Kanno SI, and Yasui A. : Spatio-temporal organization of DNA single-strand break repair by PARP, PARG and XRCC1 in human cell. DNA Repair and Mutagenesis, ASM Conference, Whistler, BC, Canada, May 30- June5, 2009
5. Kanno SI, Lan L, Nakajima S, and Yasui A. Novel AP endonuclease with exonuclease activity and DNA strand break repair in human cell. 10<sup>th</sup> International Workshop on Radiation Damage to DNA, Urabandai, Fukushima, Japan, June 8-12, 2008.
6. Kanno SI, Sasao S, Kuzuoka H, Suzuki C, Lan L, Nakajima S, and Yasui A. :Novel AP endonuclease with 3' -5' exonuclease and single-strand break repair activities in human cell. 6<sup>th</sup> 3R Symposium 2008, October 27-30, Awajishima Yumebutai, Japan.

[図書] (計 1 件)

分子生物学 丸善出版 共著 (59-71 ページ)。  
田沼靖一 (編) 平成 23 年 2 月

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称 : UVDE 発現による相同組換え頻度向上  
発明者 : 安井 明  
共同権利者 : 安井 明  
種類 : FI  
番号 : 特許第 4312478 号  
取得年月日 : 2009 年 05 月 22 日  
国内外の別 : 国内

[その他]

ホームページ等

[http://www.idac.tohoku.ac.jp/ja/activities/research/Dyn\\_prot/index.html](http://www.idac.tohoku.ac.jp/ja/activities/research/Dyn_prot/index.html)

プレス発表 (計 1 件)

Lan et al. のMol Cellの論文発表に際して  
平成23年12月23日毎日新聞全国紙、  
Yahoo news その他で報道された。  
毎日新聞の例：がん治療：妨害たんぱく質発  
見 メカニズムも解明-東北大グループ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安井 明 (YASUI AKIRA)  
東北大学・加齢医学研究所・教授  
研究者番号：60191110

### (2) 研究分担者

中嶋 敏 (NAKAJIMA SATOSHI)  
東北大学・加齢医学研究所・助教  
研究者番号：00375114

菅野 新一郎 (KANNO SHINICHIROU)  
東北大学・加齢医学研究所・講師  
研究者番号：10400417

田中 耕三 (TANAKA KOUZO)  
東北大学・加齢医学研究所・准教授  
研究者番号：00304452

高尾 雅 (TAKAO MASASHI)  
東北大学・加齢医学研究所・講師  
研究者番号：70216612