

機関番号：24403
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008 年～2010 年
 課題番号：20510054
 研究課題名 (和文) 新しい DNA 損傷検出法による塩基除去修復の細胞周期依存性の解明
 研究課題名 (英文) Analysis of cell cycle-dependent base excision repair by a novel direct method for detecting the intracellular AP sites
 研究代表者
 久保 喜平 (KUBO KIHEI)
 大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授
 研究者番号：40117619

研究成果の概要 (和文)：

塩基除去修復 (BER) 関連酵素 $\text{pol}\beta$ 、APE-1、FEN-1、および XRCC-1 をノックアウトまたはノックダウンした細胞を用いて、その影響を調べた。これらの低下により、細胞のメチル化剤感受性は有意に増加した。一方、 $\text{pol}\beta$ 欠損細胞では、特に、G1 細胞においてグリコシラーゼの活性の低下が、新しい細胞内 AP 部位検出法により観察され、G1 期における $\text{pol}\beta$ 依存性 BER 重要性が示された。

研究成果の概要 (英文)：

The cell cycle dependent base excision repair of methylated base damage was investigated using a novel assay system for the detection of intranuclear abasic sites. In $\text{pol}\beta$ -KO MEF, the removal of methylated bases was significantly slower than wild type especially in G1 phase, suggesting the lack suppressed the glycosylase activity to bypass the accumulation of hazardous intermediate, AP sites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：塩基除去修復、AP 部位、ARP 法、FARP 法、細胞周期、グリコシラーゼ、RNAi

1. 研究開始当初の背景

塩基除去修復経路 (BER) は大腸菌からヒトに至るまで、高度に保存されており、これに関与する大腸菌の遺伝子群が早くからクローニングされてきた。近年、これらの哺乳類ホモログも機能ドメインの塩基配列の相同性を利用して次々にクローニングされつつある。さらに、X線結晶構造解析により、修復の最初に働くグリコシラーゼの作用機構の解明も急速に進んだ。BER の過程には、毒性の高い脱塩基部位 (Apyriminic/apurinic

sites、以下、AP 部位) や DNA 主鎖切断の形成が起こるために、これに関与する諸酵素はその産物と高い親和性を有し、次のステップを担う酵素の結合により解離するとする、いわゆる *pass-the-baton* モデルに基づき、中間産物の害を回避するとされている。BER の二つの主要経路である *long patch* (LP-BER) および *short patch* (SP-BER) 経路に関与する主なタンパク因子について、特性や互いの相互作用に関する理解は進んでいる。しかしながら、両経路の細胞周期各期における相対

的寄与や、それらの選択機構、また、他の修復系との優先度についてはほとんど解明されていない。この修復系に共通して、グリコシラーゼの作用による最初のステップの中間産物である AP 部位は、生理的条件下にあっても、1日に1細胞当たり約10,000個も形成されるが、突然変異や細胞死を引き起こし、時としてその毒性が塩基損傷を上回る重要な損傷である。BERでは、グリコシラーゼの作用以後、AP endonuclease1 (APE1) と DNA polymerase β (pol β) または Flap endonuclease-1 (FEN-1) によるギャップ形成まで、AP 部位が存在するため、その定量により BER の動態を追求することが可能である。応募者らは1991年に画期的な AP 部位の定量法である Aldehyde Reactive Probe (ARP) 法を開発し、その後の応用研究を通じて高い実用性を証明してきた。その感度は ARP 法と DNA のメンブレン固相化法の組み合わせにより、生理的条件下において生じる AP 部位を定量可能なレベルにまでに達している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下のような疑問に答えて、二つの BER 経路の選択に関与する諸要素とこれらの制御の細胞周期依存性を明らかにすることである。

1) LP-BER および SP-BER の選択の決定機構。

このために、methylmethanesulfoxide (MMS) と酸化損傷誘発剤である過酸化水素のよる処理後の pol β および FEN-1 knock down (KD) 細胞や knock out (KO) 細胞中の修復動態を正常細胞の場合と比較することにより解明する。

2) BER の細胞周期依存性の検討。

最近、PCNA は S 期特異的にアセチル化され、PCNA に付随して存在するヒストンアセチラーゼ CBP/p300 により FEN-1 および pol β はともにアセチル化されることが報告された。両者のアセチル化は、それぞれ endonuclease および AP lyase 活性の低下をもたらす。両酵素は二つの BER 経路に必須の酵素であることから、S 期における BER が何らかの負の制御下にある可能性が考えられる。そこで、ARP および FARP-1 法を利用して、G1 期および S 期細胞における BER 動態について検討を行い、その可能性を検証する。この際、pol β および FEN-1 の ノックダウン細胞を用いることにより、G1 期および S 期細胞における両 BER 経路の相対的寄与を解明し、その細胞周期依存性の有無を明らかにする。

(3) 非増殖細胞集団において主に選択される BER の様式は何か？

血清飢餓で増殖を停止した細胞集団中

の BER の動態を G1 期および S 期細胞のそれと比較する。pol β および FEN-1 の KO 時の BER 動態の比較により二つの BER 制御機構について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞核内 BER の直接検出システムの構築。

二つの BER 経路の細胞周期依存性を検討するために、G1 期および S 期の塩基損傷除去の経時的変化を追跡した。本研究では、まず、同調 HeLa 細胞を MMS 処理後、DNA を抽出し、その AP 部位を ARP 法により定量することにより、各期における BER 動態を検討した。さらに、細胞核内 BER を直接検討するために、MMS 処理細胞核 DNA 中の AP 部位生成を FARP-1 法により定量するため、フローサイトメトリー (FCM) 法、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。(研究方法)

① 同調細胞による条件検討。

HeLa 細胞を、血清飢餓法と mitotic selection 法の組み合わせによる同調細胞の細胞周期の進行を FCM 法により経時的に確認した。G1 期および S 期同調細胞を種々の濃度の MMS 処理直後およびその後経時的に細胞を回収して、DNA を抽出した。その後、各 DNA サンプル中の AP 部位を ARP 法により定量した。さらに、MMS 細胞核内のメチル損傷を調べるために、処理細胞よりの精製 DNA を熱処理することにより、AP 部位への変換し、ARP 法を用いて、損傷塩基を定量した。

② FARP-1 法による細胞核内 BER の解析。
HeLa 細胞を、上述のように、血清飢餓法と mitotic selection 法の組み合わせにより同調した。G1 期および S 期同調細胞を種々の濃度の MMS 処理し、処理直後およびその後経時的に細胞を回収して、Triton-X100 を含む細胞処理液にて細胞核を分離した。細胞核浮遊液に最終濃度 25 μ M の FARP-1 を加え、37°C にて 1 時間処理した後、洗浄した。染色した細胞核を PBS に再浮遊し、FARP-1 染色核を FCM アナライザーにより解析した。この結果を ARP 法によるものと比較し、FARP-1 法の感度および精度を明らかにした。

(2) BER の細胞周期依存性の検討1。

① 修復酵素欠損細胞を用いた検討。

G1 期および S 期に同調した正常マウスおよび pol β 欠損マウス胎児線維芽細胞 (MEF) を、種々の濃度の MMS 処理し、その後の BER 動態を、ARP 法および FARP-1 法にて評価した。さらに、非同調細胞を用いて、沃化プロピジウム (PI) と FARP-1 の二重染色を行い、BER の細胞周期依存性を検討し

た。これらにより MEF における pol β 依存性経路の相対的寄与とその細胞周期依存性を明らかにした。

② BER 関連酵素 KD の影響の検討。

siRNA 技術を応用して、MEF および HeLa 細胞を用いてマウスおよびヒト pol β 、APE-1、FEN-1 および XRCC-1 KD 細胞の作製を行う。これらの塩基配列をもとに作製したヘアピンオリゴヌクレオチドを作製し、psiRNA-7TK プラスミド (Invivogen) に組み込んだ。これらを HeLa 細胞に導入し、KD 細胞を選択し、ウェスタンブロット法によりタンパク発現レベル抑制を、確認した後、MMS および過酸化水素の感受性などの基礎的特性を調べた。

② 非増殖細胞集団における BER の説明。

pol β KO 細胞を血清飢餓により増殖を停止させ、FCM により確認した G0 細胞集団を用いて種々の濃度の MMS 処理を行った。処理直後およびその後継的に、細胞核内の AP 部位数を PI/FARP-1 法にて、また、抽出 DNA 中のメチル化損傷の修復動態を ARP 法により解析した。また、細胞内 AP 部位数および残存メチル化塩基数を測定した。

4. 研究成果

(1) 新奇細胞内 BER 検出法の開発。

BER の定量システムとして、申請者が開発した ARP 法があり、広く国内外に普及しつつある。同法は、BER の第一段階のグリコシラーゼによる損傷塩基の結果形成された脱塩基部位 (AP 部位) のアルデヒド基に特異的に結合する ARP 試薬によりピオチン基を導入し、ABC 法により定量する。同法は、抽出 DNA 中の AP 部位を定量するために開発したことから、細胞内の AP 部位を直接定量するために、ARP を改変し、FITC を導入した蛍光 ARP (FARP-1) を新たに開発した。まず、血清飢餓法/分裂細胞選別法による同調細胞を用いた、各細胞周期における除去修復活性を比較検討した。FARP-1 法の諸条件の検討を行い、G1 および S 期においてアルキル化剤 (MMS) 処理を行った HeLa 細胞における細胞内 AP 部位の定量に成功した。次に、MMS 処理を行った非同調 HeLa 細胞を、FARP-1 と PI にて二重染色し、G1 および S 期のいずれにおいても、ほぼ同程度の BER が見られることを明らかにした。BER には、修復サイズによって SP-および LP-BER 経路が知られている。まず、主として SP-BER に必須とされる DNA ポリメラーゼ β の欠損マウス胎児線維芽細胞 (pol β -KD MEF) を用いてこれらの MMS 処理後の G1 および S 期における BER がいずれも野生型に比べて有意に低下するという事を明らかにした。加えて、MMS 処理、24 時間後に核内に残存するメチル損傷は、G1 および

S 期 pol β -KO MEF において有意に多く、その野生型細胞との差は G1 期処理の場合に著しいことが明らかとなった。したがって、pol β の欠損は明らかに BER 全体に影響し、メチル損傷の切り出しを妨げることを明らかにした。

(2) BER 酵素の KD 細胞株の作出。

① pol β ノックダウン (pol β -KD) マウス胎児線維芽細胞 (MEF) 株の作製。

pol β -KD MEF 株の pol β タンパクの発現は、WT の約 10% に低下していた。また、MMS 処理直後の AP 部位は、野生株より約 30% 減少しており、この結果は、pol β -KO 細胞株における場合と同様の傾向を示した。

② in vitro の修復系を再構成するために、BER の最後のステップを担うヒト XRCC1 および DNA Ligase III (Lig3) の相互作用を検討するために、その発現系を構築した。Lig3 は、N 末端側の 48 アミノ酸残基を欠くバリエーション (Lig3 Δ 48) が得られた。Lig3 Δ 48 は、活性に ATP を要求し、XRCC1 の共存下で、約 40% の活性増強を示した。

③ XRCC1 ノックダウン HeLa 細胞株を作製した。XRCC1-KD 細胞は、WT の約 60% の XRCC1 タンパク発現を示したが、MMS に対する生残率は、1.5mM 以上で有意な低下を示した。

④ 約 50% に発現量の低下した APE1-KD 細胞株では、2mM 以上の MMS に対し有意な高感受性を示したが、過酸化水素に対する感受性は変わらなかった。

⑤ FEN-1-KD MEF では、ウェスタンブロットでは、ほぼ FEN-1 の発現は認められなかった。MMS 感受性試験では、わずかに感受性の増加を示し (2.5mM 以上で有意)、AP 部位はわずかに低下したが、有意ではなかったことから、MEF の BER において、FEN-1 依存性修復は pol β 依存性経路ほど、寄与は大きくないことが明らかとなった。

(3) BER の細胞周期依存性の検討。

野生型 (WT) と pol β のノックアウト/ノックダウン (KO/KD) MEF を MMS 処理し、直後およびその後継的に、G1 および S 期細胞核内の AP 部位数を PI/FARP-1 法にて、また、抽出 DNA 中のメチル化損傷の修復動態を ARP 法により解析した。pol β -KO 細胞では、メチル損傷のグリコシラーゼ (MPG) の除去活性の低下は、G1 および S 両期において観察されるが、G1 期における除去能の低下が著しいことが分かった。pol β -KO 細胞における MPG 活性の低下が、APE1 と pol β の相互作用の喪失によるか検討するために、単一の AP 部位をオリゴヌクレオチド基質に親和性を有する MPG を結合させたのち、APE1 の Km を測定したが、いかなる変化もみられなかった。一方、WT 細胞と pol β -KO MEF の

MMS 処理後、沃化プロピジウムと FARP-1 の二重染色を行い、核中の AP 部位を共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。対照群に比べて MMS 処理群では、FARP-1 のフォーカス状のシグナルが認められ、そのシグナル強度および数は WT 細胞において明らかに高かった。以上の結果より、pol β 依存性の塩基除去修復は、G1 期の細胞でより効率的であり、S 期における相対的寄与は小さく、したがって、その喪失の影響は小さいことが明らかとなった。一方、MPG および APE1 に見られる産物による阻害は、それぞれ APE1 および pol β によって、解除されることより、pass-the baton モデルによる修復系の制御と合わせて、G1 期の細胞においては、pol β による MPG 活性制御が塩基除去修復の調節に重要な役割を担っていると考えられる。また、GST-MPG によるプルダウンアッセイによって、MMS 処理細胞よりの抽出物を行った結果、PCNA、MBD1 に加えて、XRCC1 との著名な複合体形成が観察され、損傷時に両者が物理的相互作用を行うことが示された。

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 3 件)

- 1) R. Yamamoto 他 5 名 1,5,6 番目 A Novel Monofunctional DNA Glycosylase Activity Against Thymine Glycol in Mouse Cell Nuclei. J. Radiat. Res., 49(3), 249-259, 2008(査読あり)
- 2) S. Takenaka 他 4 名 5 番目、Metabolic Fingerprinting in Toxicological Assessment using FT-ICR MS. J. Toxicol. Pathol., 23(2), 67-74, 2010 (査読あり)
- 3) S. Takenaka 他 4 名 2 番目、A general expression of the polarization factor for multi-diffraction processes. Acta Crystallogr. A66, 438-440, 2010 (査読あり)

[学会発表] (計 11 件)

- 1) 坪居 穂佳 APE1 knockdown ヒト子宮頸癌細胞における塩基除去修復動態の検討、日本放射線影響学会第 53 回大会、2010 年 10 月 20 日、京都
- 2) 橋平 奈穂子 DNA 塩基損傷修復酵素 MPG と関連タンパク質の相互作用の検討、日本放射線影響学会第 53 回大会、2010 年 10 月 20 日、京都
- 3) 山本 亮平 マウス培養細胞からの 1 価性チミングリコール DNA グリコシラーゼ活性タンパクの分離と分析、日本放射線影響学会第 53 回大会、2010 年 10 月 20 日、京都
- 4) 奥田 洋三 XRCC1 knockdown HeLa 細胞におけるアルキル化損傷の修復、日本放射線影

響学会第 52 回大会 2009 年 11 月 11 日、広島
5) 坂下 奈津美 MPG が開始する BER 初期における XRCC1 の影響、日本放射線影響学会第 52 回大会 2009 年 11 月 11 日、広島

6) 傳田 有希 pol β および Fen1 knockdown マウス胎児線維芽細胞における DNA 塩基の修復動態 日本放射線影響学会第 52 回大会、2009 年 11 月 11 日、広島

7) 山本 亮平 イヌの 1 価性チミングリコール DNA グリコシラーゼ活性量、日本放射線影響学会第 52 回大会、2009 年 11 月 11 日、広島

8) R. Yamamoto, A Novel Monofunctional DNA Glycosylase Activity Against Thymine Glycol in Mouse Cell Nuclei 10th International Workshop Radiation Damage to DNA. 2008 年 6 月 8 日、福島

9) 藤森 良子 pol β knockdown 細胞と FEN-1 knockdown 細胞におけるメチル化損傷の修復動態、第 146 回日本獣医学会学術集会、2008 年 9 月 24 日、宮崎

10) 東條 瑞希 マウス正常臓器における NEIL1 variant mRNA の発現、日本放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 19 日、北九州

11) 山本 亮平 マウス 1 価性チミングリコール DNA グリコシラーゼの性質分析、日本放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 19 日、北九州

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 喜平 (KUBO KIHEI)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：40117619

(2) 研究分担者

松山 聡 (MATUYAMA SATOSHI)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：10254442

竹中 重雄 (TAKENAKA SHIGEO)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：10280067

山本 亮平 (YAMAMOTO RYOUHEI)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：20457998