

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510057

研究課題名(和文) DNA二重鎖切断修復におけるArtemisの機能発現メカニズム

研究課題名(英文) Analysis of nuclear dynamics of Artemis upon DNA-double stranded breaks

研究代表者

石合 正道 (ISHIAI MASAMICHI)

京都大学・放射線生物研究センター・准教授

研究者番号：90298844

研究成果の概要(和文)：

生細胞イメージングによりDNA二重鎖切断(DSB)修復に関与するヌクレアーゼArtemisの動態解析を行った。細胞核への局所レーザー照射によりDSB損傷を誘発すると、ヒトArtemisとGFPの融合タンパク質(Artemis-GFP)のDNA損傷部位への蓄積が観察された。変異体を用いた解析により、Artemisの集積には、ヌクレアーゼ活性は必要でなく、複数部位のリン酸化が重要であることが判明した。また、細胞をカフェイン処理するとArtemisの集積は抑制された。以上の結果はDSBによるリン酸化がArtemisの動態を制御していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：

Artemis is a nuclease that involves in the repair of DNA double stranded breaks (DSBs). We have analyzed the dynamics of Artemis using live cell imaging methods. After laser microbeam irradiation, human Artemis-GFP fusion proteins were accumulated at DNA damaged sites. By mutational analysis, the multiple phosphorylation sites, but not nuclease domain of Artemis required for its accumulation. Consistent with these observations, the accumulation of Artemis at DNA damaged sites markedly reduced in caffeine treated cells. Collectively, these results suggested that phosphorylation of Artemis regulates its dynamics upon DSBs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：基礎医学、生物学

科研費の分科・細目：環境学・放射線影響科学

キーワード：DNA損傷、DNA修復、レーザー照射、生細胞イメージング、リン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA は内的・外的要因より絶え間なく損傷を受けており、中でも DNA 二重鎖切断 (DSB) は生体への影響が最も大きい。DSB は主に放射線照射や薬剤等により生じることが知られている。DSB はそのまま放置されると細胞死やゲノムの変異・染色体転座の原因となる可能性があり、それゆえ DSB に対する防御メカニズムの研究は、発がんや先天性異常発生などの理解に非常に重要である。

DSB の主要な修復経路として、相同 DNA 組換え (HR) と非同源末端結合 (NHEJ) の二つの分子機構が知られている。ヒトをはじめとする高等真核生物では、後者の NHEJ の役割が大きい。DSB は正常な細胞の中でも生体反応の中間体として生成しており、事実、NHEJ はリンパ球の抗原受容体の多様性を生み出す V(D)J 組換えに重要な働きをしている。このため NHEJ 遺伝子異常の多くは、リンパ球を欠損する重症複合型免疫不全症 (SCID) を発症し、放射線感受性 (RS) となる。Artemis は RS-SCID 患者の原因遺伝子として同定された NHEJ に関わる重要な因子の一つである。Artemis はヌクレアーゼであり、*in vitro* で単独ではエキソヌクレアーゼ活性を示すが、DNA-PKcs の存在下では DNA のヘアピン構造を開裂させるエンドヌクレアーゼとして働く。V(D)J 組換えでは、DNA のヘアピン構造が形成されるため、Artemis はそれを開裂すると考えられる。一方、放射線照射後の DNA 末端はヘアピン構造を取っている訳ではなく、DSB 修復における Artemis の機能及びその制御はいまだに不明な点が多い。

放射線照射によりタンパク質リン酸化酵素 (キナーゼ) である ATM と DNA-PKcs により Artemis の複数の部位にリン酸化が起こることが報告されているが、これらのリン酸化部位変異体は *in vitro* の Artemis のヌクレアーゼ活性や *in vivo* の放射線感受性の相補や V(D)J 機能に影響がないとする報告がある。またその制御についても DNA-PKcs や Ku との相互作用が必要というデータもあるものの決着がつかない。さらに、Artemis に及ぼす ATM の作用機構は全く解明されていない。

研究代表者の作製したニワトリ DT40 細胞由来の *artemis* 欠損細胞はヒト Artemis と GFP の融合タンパク質 (Artemis-GFP) の発現で機能相補できることから、ヒト Artemis 解析のよいモデル系である。

## 2. 研究の目的

本研究では Artemis の細胞内動態解析を行うことで、Artemis の機能調節機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

ヒト Artemis のヌクレアーゼ欠損変異体として、報告されている D136N, H319A 変異を作製した。複数のリン酸化部位変異体は、Ser ないし Thr を Ala や Asp に置換し、作製した。既に樹立しているニワトリ DT40 細胞由来の *artemis* 欠損細胞を用い、Artemis-GFP やその変異体を安定発現する細胞を樹立した。生細胞イメージング解析には、Artemis-GFP やその変異体を一過性に発現させたヒト繊維芽細胞 GM02063 を用いた。

細胞内局所レーザー照射法による生細胞イメージングは、当初、広島大学原医研の田代聡 教授の研究室との共同研究で 364nm レーザー照射と共焦点レーザー顕微鏡を用いて行っていたが、京大放生研に新しい共焦点レーザー顕微鏡が整備された 2010 年以降は 405nm レーザー照射でも研究を行った。どちらの場合でも、細胞核への局所レーザー照射により、DSB 損傷が誘導される。

Artemis 変異体の機能検定は *artemis* 欠損 DT40 細胞の示す放射線感受性を利用し、メチルセルロース培地によるコロニー形成率の測定により行った。細胞内の Artemis のリン酸化はタグ付き Artemis 発現細胞を用い、放射線照射後、細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロットにより検討した。試験管内の Artemis リン酸化反応は 293T 細胞で発現させたタグ付き Artemis の部分精製タンパク質と精製 DNA-PKcs により行った。

## 4. 研究成果

研究代表者が以前作製していた *artemis* 欠損 DT40 細胞を用い、ヒト Artemis-GFP の野生型、変異体の安定発現細胞を樹立した。*artemis* 欠損細胞の示す放射線感受性は Artemis のヌクレアーゼ変異体や 6 個のリン酸化部位の変異体 (6M) では相補されず、Artemis の DSB 修復機能にはヌクレアーゼ活性や複数部位のリン酸化が関与することがわかった。また、細胞内の Artemis のリン酸化は 6M 変異体で著減しており、この部位への細胞内での Artemis のリン酸化を確認した。

生細胞イメージング解析には、当初の見込みに反し、樹立した Artemis-GFP 安定発現 DT40 細胞を用いたフォトブリーチング解析が困難であることが判明した。このため、細胞内局所レーザーマイクロ照射法での解析に切り替えた。条件検討の結果、Artemis-GFP を一過性に発現させたヒト繊維芽細胞を用い、細胞核局所へのレーザー照射により DSB 損傷を誘発させると、DNA 損傷部位への Artemis-GFP の集積が観察でき、解析が可能となった。

DNA 損傷部位への Artemis-GFP の集積に必要な領域を、Artemis 変異体を用いて検討し

た。ヌクレアーゼ活性の欠損変異体は野生型とほぼ同様の集積パターンを示し、ヌクレアーゼ活性は必要ではないと結論された。一方、6個のリン酸化部位変異体(6M)ではDNA損傷部位への集積が減少した。ATM, DNA-PK 両方の阻害剤である高濃度(1 mM) カフェインで細胞を処理すると Artemis の集積は阻害された。これらの結果から、リン酸化が DSB 後の Artemis の動態に重要であることが示唆された。しかし、カフェインによる阻害効果に比べると、Artemis 6M 変異体の DNA 損傷部位への集積の減少は弱い。加えて、精製 DNA-PKcs を用いた試験管内の Artemis リン酸化の検討では、Artemis の 6M 変異体は野生型と同程度のリン酸化が検出された。これらの結果から、DSB に伴う Artemis のリン酸化部位は 6M 変異体で置換した 6 個では不十分であり、さらにリン酸化される部位が存在する可能性が示唆され、リン酸化部位の見直しを行った。ATM, DNA-PKcs はいずれも Ser/Thr-Gln 配列をリン酸化することが知られているが、ヒト Artemis にはこの配列が全部で 12 個存在する。これらの Ser/Thr をすべて Ala に置換した変異体(12M)を作製した。予想通り、Artemis 12M 変異体では 6M 変異体よりもさらに DNA 損傷部位への集積が減少した。現在、*artemis* 欠損 DT40 細胞を用いて 12M 変異体の安定発現細胞を作製中であるが、前述のように 6M 変異体発現細胞では細胞内でのリン酸が著しく減少し、放射線感受性も相補しないため、同様の結果を 12M 変異体でも予想している。

さらに Artemis の集積に重要なリン酸化部位を同定する目的で、12M 変異体の Ala 置換を個別に Ser/Thr に戻す変異体やリン酸化状態をミミックすると予想される Asp 置換変異体を作製し、検討した。結果として、表現型に大きな影響を与える単一の変異部位は同定されず、Artemis のリン酸化は複数残基のリン酸化が蓄積することで効果を発揮すると考えられる。

また、ATM と DNA-PKcs のどちらのキナーゼが Artemis のリン酸化や局所集積に重要であるかを検討する目的で、ATM 特異的阻害剤 KU55993 と DNA-PKcs 特異的阻害剤 NU7026 を用いて検討した。それぞれ単独で、あるいは両者の組み合わせで使用した場合でもカフェインでみられたほどの阻害効果は観察されず、ATM と DNA-PKcs 以外のキナーゼとして、ATR が関与する可能性が考えられた。ATR はカフェインにより阻害され、ATM や DNA-PKcs と同様に DNA 損傷後 Ser/Thr-Gln 部位をリン酸化することが知られている。現在、ATR の変異細胞である Seckel 細胞や ATR に対する siRNA による ATR ノックダウン細胞等を用いて Artemis-GFP の動態解析を試みている。

これらの研究と並行して、我々は DSB 損傷後の細胞死(アポトーシス)反応への Artemis の寄与という予想外の結果を見だし、解析した。これまで、DNA トポイソメラーゼ II 阻害剤であるエトポシドにより DSB が誘導され、NHEJ 経路で修復されることが知られていた。我々は、東北大学大学院の榎本武美 教授(現、武蔵野大)、同 関政幸 准教授の研究室との共同研究により、今回新たに DT40 細胞を高濃度のエトポシドで処理すると 1 時間以内にアポトーシスが誘導されることを見出した。詳細な解析により、このエトポシド誘導性アポトーシスは、NHEJ の上流因子である Ku, DNA-PKcs, Artemis に依存し、それより下流の NHEJ 経路因子には依存しないことがわかった。加えて、Ku は DNA-PKcs の上流で、Artemis は DNA-PKcs の下流で機能することが示された。また、Artemis/SNM1C と同じく SNM1 ファミリーヌクレアーゼに属する SNM1A, Apollo/SNM1B も同様にエトポシド誘導性アポトーシスに関与することがわかった。以上の結果は論文として発表した。

#### 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 8 件)

- ① Hosono, Y., Abe, T., Ishiai, M., Takata, M., Enomoto T. and Seki, M. The role of SNM1 family nucleases in etoposide-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有、印刷中。
- ② Kometani K., Yamada, T., Sasaki, Y., Yokosuka, T., Saito, T., Rajewsky, K., Ishiai, M., Hikida, M., Kurosaki., T. CIN85 drives B cell responses by linking BCR signals to the canonical NF- $\kappa$ B pathway. *J. Exp. Med.*, 査読有、印刷中。
- ③ 石合正道、高田穰、ゲノム DNA 損傷応答ネットワーク解明の新展開, *メディカル・サイエンス・ダイジェスト*, 査読なし, 印刷中。
- ④ 石合正道, DNA 鎖間架橋 (ICL) の修復機構, *生化学*, 査読なし, Vol. 81, No11, 2009, pp. 998-1004.
- ⑤ Takata, M., Ishiai, M., Kitao, H., The Fanconi anemia pathway: Insights from somatic cell genetics using DT40 cell line. *Mut. Res.*, 査読有, Vol. 668, No. 1-2, 2009, pp. 92-102.
- ⑥ 松下暢子, 北尾洋之, 石合正道, 高田穰. ファンconi 貧血と DNA 損傷応答ネットワーク. *蛋白質核酸酵素*

増刊「染色体サイクル ゲノムの恒常性維持, 継承とダイナミクス」, 査読なし, 2009, Vol. 54, pp. 585-580.

- ⑦ Ishiai, M., Kitao, H., Smogorzewska, A., Tomida, J., Kinomura, A., Uchida, E., Saber, A., Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., Tashiro, S., Elledge, S. J. and Takata, M. FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. *Nature Struct. Mol. Biol.*, 査読有, Vol. 15, No. 11, 2008, pp. 1138-1146.
- ⑧ Abe, T., Ishiai, M., Hosono, Y., Yoshimura, A., Tada, S., Adachi, N., Koyama H., Takata, M., Takeda, S., Enomoto, T. and Seki, M. Ku70/80, DNA-PKcs, and Artemis are essential for the rapid induction of apoptosis after massive DSB formation. *Cell. Signal.*, 査読有, Vol. 20, No. 11, 2008, pp. 1978-1985.

[学会発表] (計 14 件)

- ① 石合正道, 島弘季, 田代聡, 高田穰: DNA ダメージにおける Artemis の核内動態制御、第 33 回日本分子生物学会第 83 回日本生化学会合同大会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸市。
- ② 石合正道, 島弘季, 田代聡, 高田穰: Artemis の核内動態制御機構の解析. ワークショップ「DNA 二重鎖切断修復研究の最前線」日本放射線影響学会第 53 回大会、2010 年 10 月 20-22 日、京都市 招待講演
- ③ 石合正道: FANCD2 と FANCI によるヌクレオソーム形成. 国立遺伝学研究所研究集会「ユビキチン・SUMO による DNA 複製および DNA 修復系の制御」、2010 年 9 月 30 日-10 月 1 日、静岡県三島市 招待講演
- ④ 石合正道, 富田純也, 茂地智子, 板谷亜希子, 高田穰: リン酸化・モノユビキチン化によるファンconi貧血・DNA 修復経路の活性化メカニズム、第 9 回核ダイナミクス研究会、2010 年 5 月 27-29 日、静岡県伊豆市
- ⑤ Ishiai M., Kitao H., Tomida, J., Itaya, A., Shigechi, T. and Takata M., FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway, International Conference on Radiation and Cancer Biology at Nagasaki 2010, 2010 年 2 月 17-20 日、長崎市 招待講演
- ⑥ 石合正道, 富田純也, 板谷亜希子, 茂地智子, 高田穰: 細胞周期によるファン

coni貧血経路の活性化制御、ワークショップ「ゲノム不安定性疾患の分子病態」第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9-12 日、横浜市 招待講演

- ⑦ 石合正道, 島弘季, 田代聡, 高田穰: Artemis の動態制御におけるリン酸化の役割、日本放射線影響学会第 52 回大会、2009 年 11 月 11-13 日、広島市
- ⑧ Ishiai M., Takata M., FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway, Global COE international meeting of Graduate School of Medicine, Kyoto University, 2009 年 11 月 6-8 日、兵庫県淡路市 招待講演
- ⑨ 石合正道: 細胞周期による FancD2 モノユビキチン化の分子制御機構、国立遺伝学研究所研究集会「ユビキチン・SUMO による DNA 複製および DNA 修復系の制御」、2009 年 10 月 7-8 日、静岡県三島市 招待講演
- ⑩ 石合正道, 富田純也, 板谷亜希子, 高田穰: 細胞周期によるファンconi貧血経路の活性化制御、「ゲノム不安定性」第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1-3 日、横浜市
- ⑪ 石合正道, 北尾洋之, 富田純也, 刀祿重信, 高田穰: DT40 細胞システムを用いた DNA 損傷応答研究. ワークショップ「京都大学放射線生物研究センターにおける共同利用研究」、放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 19-21 日、北九州市 招待講演
- ⑫ 石合正道, 北尾洋之, 高田穰: ユビキチン化とリン酸化によるファンconi貧血経路の制御機構、シンポジウム 17 「DNA 修復ネットワークの異常と発がん」第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28-30 日、名古屋市 招待講演
- ⑬ 石合正道: FancI のリン酸化によるファンconi経路の分子制御機構、国立遺伝学研究所研究集会「ユビキチン・SUMO による DNA 複製および DNA 修復系の制御」、2008 年 10 月 6-7 日、静岡県三島市 招待講演
- ⑭ Takata, M., Ishiai M. (発表者), Kitao, H., Kinomura, A., Smogorzewska, A., Kinomura, A., Uchida, E., Saber, A., Tashiro, S., Elledge, S. J., FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway, The international Ataxia-Telangiectasia workshop 2008, 2008 年 4 月 22-26 日、大津市

〔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〕

ホームページ等

<http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石合 正道 (ISHIAI MASAMICHI)

京都大学・放射線生物研究センター・

准教授

研究者番号：90298844