

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12170

研究課題名（和文）細胞内架橋分子Plectinの放射線誘発DNA損傷応答における新規機能の解明

研究課題名（英文）A novel role of Plectin in ionizing radiation-induced DNA damage response

研究代表者

松井 理（MATSUI, Tadashi）

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：60288272

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：Plectinは、細胞骨格どうしをつなぎ、細胞の構造を維持することが知られている。本研究では、PlectinのDNA損傷後の細胞応答における新たな役割について明らかにした。放射線照射によって生じたDNA二重鎖切断によって活性化されたATMは、多数の標的蛋白質をリン酸化することにより、細胞周期の停止、DNAの修復、細胞死を制御している。我々は、PlectinがそのようなATMの標的蛋白質の一つであることを新たに見出し、Plectinが53BP1との結合を介して癌抑制因子p53の活性化を制御していること、さらにそれにより、DNA損傷後の細胞周期停止に関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線は、空から降り注ぐ宇宙線や、医療用のレントゲンやCTスキャンなどごく身近に存在しているものであるが、近年、原発事故による放射能漏れ等の報道により、放射線の人体に与える影響について社会的な関心が高まっている。本研究により、放射線照射後に代表的な癌抑制因子であるp53が活性化される際の新たな制御機構の一端が明らかになった。本研究の成果は、放射線の人体に与える影響の全容解明につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Plectin is known to connect the components of cytoskeletons to maintain cell structure. In this study, we elucidated a novel role of Plectin in the cellular response after DNA damage. ATM, which is activated by ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks, regulates cell cycle arrest, DNA repair, and cell death by phosphorylating numerous target proteins. We newly found that Plectin is one of such ATM target proteins and that Plectin regulates the activation of the tumor suppressor p53 through binding to 53BP1, thereby playing a role in cell cycle arrest after DNA damage.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：DNA損傷応答 Plectin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の DNA 損傷応答において中心的な役割を担っている ATM キナーゼは、DNA 二重鎖切断 (DSB) を感知すると自己リン酸化により活性化し、その後、様々な標的蛋白質をリン酸化することで、DNA 損傷後の細胞周期停止、損傷 DNA の修復、細胞死への誘導を制御している。ATM の標的蛋白質は大規模なスクリーニングにより 700 個以上見出されているが ()、個々のリン酸化の生理的意義については未だ不明なものが多い。

研究代表者は、ATM の自己リン酸化部位に対する抗体によるヒト細胞抽出物の Western blotting において、ATM よりもずっと高分子量 (400~500kDa) に、放射線照射依存的に強くリン酸化される蛋白質を見出し、ATM の標的蛋白質の一つではないかと予想した。そこで、X 線照射後の核抽出物を材料に、免疫沈降法と質量分析法により、この高分子量蛋白質が Plectin であると同定した。

Plectin は分子量約 500kDa の巨大蛋白質で、主に細胞質において中間径フィラメントと他の細胞骨格蛋白質を結びつける接着分子として細胞構造を維持する働きをしている。研究代表者は前述のように核抽出物より Plectin を免疫沈降したが、核内では一部の Plectin が中間径フィラメントの一種である Lamin と結合することが知られている。しかし、Lamin との関連も含めて核内における Plectin の機能はこれまでに一切明らかにされていない。研究代表者は、核内で ATM によってリン酸化される蛋白質として Plectin を見出したが、Plectin が ATM の標的蛋白質の一つであることは、前述の大規模スクリーニングによって既に示唆されていた ()、しかし、ATM による Plectin のリン酸化が DNA 損傷応答においてどのような生理的役割を果たしているかは全く不明であった。

研究代表者は、Plectin の DNA 損傷応答における関与を調べるため、siRNA 処理により Plectin を欠損させた細胞について解析を行った。その結果、Plectin 欠損細胞では、X 線照射後の G1 期での細胞周期停止が抑制され、G1/S チェックポイントの異常が認められた。さらに、この細胞では X 線照射後、p53 依存的に誘導され G1 期での細胞周期停止に関与する p21 の発現が抑制された。以上の結果から、Plectin が p53 依存的な p21 の発現に関与し、それにより G1/S チェックポイントを制御していることが示唆された。

Plectin が p53 の機能制御に関与することから、Plectin と p53 関連蛋白質との相互作用について免疫沈降法によって調べたところ、研究代表者は新たに Plectin が p53 結合蛋白質として同定された 53BP1 と結合することを見出した。

以上から研究代表者は、Plectin は核内で 53BP1 とともに複合体を形成し、これを介して放射線照射後の p53 の機能制御に関与しているのではないかと、またその制御に ATM による Plectin のリン酸化が必要なのではないかと考えた。

2. 研究の目的

ATM による核内 Plectin のリン酸化、Plectin と他の蛋白質 (53BP1、Lamin) との相互作用、および Plectin による p53 転写活性化能の制御機構に着目して、放射線照射後の DNA 損傷応答における Plectin の役割を明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

- (1) Plectin と 53BP1 との相互作用が、p53 による p21 遺伝子の転写に必要などうかを明らかにする。
- (2) Plectin と Lamin A/C との結合が、p53 による p21 の転写制御に関与するかを明らかにする。
- (3) ATM による Plectin のリン酸化が、p53 による p21 の転写に必要などうかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 研究代表者はこれまでに Plectin と 53BP1 が細胞内で結合していることを見出している。この結合が p53 による p21 遺伝子の転写に必要などうかを解明する糸口を得るために、まず 53BP1 の Plectin との結合領域を調べることにした。53BP1 の機能に関わる領域として、p53 との結合に必要な領域、DSB 部位集積に必要な領域、DSB 修復の制御に必要な領域などが既に知られており、これらの領域を様々な組合せで欠失させた 53BP1 発現ベクターを作製した。これらをヒト培養細胞株に導入し Plectin との結合領域を調べようとしたところ、53BP1 には細胞内で自分自身が複数個集まってオリゴマーを形成する性質があるため、これらの発現ベクターから産生された組換え蛋白質のうち、いくつかは元々細胞にあった内在性の 53BP1 と結合し複合体を形成してしまうことが明らかになった。内在性 53BP1 は完全な状態なので、これが複合体中に存在する場合、Plectin が組換え蛋白質と結合しているのか、あるいは内在性 53BP1 と結合しているのか区別することができない。そこでこの問題を解決するために、内在性 53BP1 を欠失させた細胞の作製を試みた。2 種類の crRNA (cr53BP1-1、cr53BP1-2) を用いて CRISPR/Cas9 により 53BP1 欠

失細胞の作製を試みたところ、cr53BP1-1の方は調べた48クローン中1クローン、cr53BP1-2の方は調べた39クローン中2クローンの細胞が内在性53BP1を完全に欠失していた。得られた53BP1欠失細胞に前述の様々な発現ベクターを導入し、組換え蛋白質に付加されたFLAGタグについて免疫沈降を行い、Plectinが共沈するかどうかを調べた結果、Plectinが53BP1のC末端のp53との結合に必要な領域(BRCTドメイン)と結合することを新たに見出した。このことから、Plectinは53BP1のBRCTドメインとの結合を介してp53の機能制御に関与していることが示唆された。

(2) 研究代表者はこれまでの研究経緯から、Lamin A/CはPlectinとの結合によりp53によるp21の転写を抑制するのではないかと、また、この結合は放射線照射によって活性化されたATMによるPlectinのリン酸化によって解消されるのではないかとという仮説を考えた。そこでこの仮説を検証するために、X線照射の前後におけるPlectinとLamin A/Cとの結合を免疫沈降法によって調べた。その結果、X線照射の前後どちらにおいてもPlectinとLamin A/Cとの結合が認められた。このように、X線照射によってPlectinとLamin A/Cとの結合に変化がないことから、Lamin A/CがPlectinとの結合を介したp53によるp21の転写制御に関与している可能性は極めて低いと考えられた。

(3) (1)で明らかになったPlectinと53BP1のBRCTドメインとの結合について、X線照射の影響を調べた。その結果、X線照射により53BP1のBRCTドメインに結合するPlectin量が減少することが明らかになった。このことは、X線照射によって活性化されたATMによるPlectinのリン酸化によって、53BP1のBRCTドメインとの結合が抑制されたことを示唆する。このことを検証するため、Plectin分子内にあるATMによってリン酸化されるであろうSer/Thr残基を全てAlaに置換した変異体の作製を試みたが、期間内に変異体の作製およびそれを用いた実験を行うことができなかった。これに関しては、今後検証を進める予定である。

<引用文献>

Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. Science, 316(5828): 1160-1166, 2007.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakasai Ryo, Wakasugi Mitsuo, Matsui Tadashi, Sunatani Yumi, Saijo Masafumi, Matsunaga Tsukasa, Iwabuchi Kuniyoshi	4. 巻 113
2. 論文標題 Camptothecin compromises transcription recovery and cell survival against cisplatin and ultraviolet irradiation regardless of transcription-coupled nucleotide excision repair	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103318 ~ 103318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dnarep.2022.103318	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 逆井良、砂谷優実、松井理、岩淵邦芳
2. 発表標題 DNA 複製を介した one-end DNA 二本鎖切断の 53BP1 と BRCA2 による 二相性修復
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 逆井良、若杉光夫、松井理、砂谷優実、西條将文、松永司、岩淵邦芳
2. 発表標題 カンプトテシンはDNA損傷後の転写の回復を阻害しシスプラチンに対する殺細胞効果を増強する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 逆井良、松井理、砂谷優実、篠原彰、岩淵邦芳
2. 発表標題 Top1-DNAクロスリンクによる転写ストレス応答とその破綻
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------