様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２４年５月１日現在

機関番号：１５４０１
研究種目：基盤研究（B）
研究期間：２００９～２０１１
課題番号：２１３１００３７
研究課題名（和文）　DNA-タンパク質クロスリンク損傷の修復および染色体損傷誘発機構

研究課題名（英文）　DNA-protein cross-links: Repair and chromosome damage induction
研究代表者
井出　博（IDE HIROSHI）
広島大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：３０２２３１２６

研究成果の概要（和文）：
DNA とタンパク質が架橋した DNA-タンパク質クロスリンク（DPC）損傷の細胞内動態や生物影響は十分理解されていない。本研究では，新規な DPC 定量法を確立し，哺乳類細胞におけるゲノム DPC の生成・除去動態を検討した。明確な除去修復の関与は認められず，DPC は加水分解機構でゲノムから除去されることが示された。さらに，DPC は染色体損傷を誘発し，DNA 損傷応答機構として ATR 経路がまず活性化され，次いで ATM 経路が活性化する機構が示唆された。

研究成果の概要（英文）：
Proteins are often covalently trapped on DNA, generating DNA-protein cross-links (DPCs), when cells are exposed to DNA-damaging agents. However, not much is known about how cells mitigate the adverse effects of DPCs. In the present study, we have developed novel methods for the detection of DPCs. Genomic DPCs were primarily eliminated by spontaneous hydrolysis, and excision repair played no significant role in the removal of DPCs. It was suggested that DPCs initially activated the ATR DNA-damage response pathway, followed by the ATM pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００９年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
２０１０年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
２０１１年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総　計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：ゲノム　損傷　修復

１．研究開始当初の背景

生物のゲノムには構造維持や遺伝情報発現に係わる様々なタンパク質が結合している。DNA 複製や転写の際には，これらのタンパク質は解離あるいは転移し，遺伝情報の読み出しを可能にしている。しかし，細胞が DNA 傷害性因子に曝されると，DNA とタンパク質が架橋し DNA-タンパク質クロスリンク（DPC）損傷が生じる。タンパク質が不可逆的に固定化された DPC は普遍的なゲノム損傷の一つであり，DPC を誘発する化学物質としては，アルデヒド化合物，アルキル化剤，DNA

methyltransferase 阻害剤など多数の因子が同定されている。また，DPC は低酸素下における放射線照射で特異的に形成され，低酸素性細胞を含む腫瘍の放射線応答や増感からも興味が持たれている。一方，ゲノム損傷としての認知度とは異なり，特殊なタイプのDPC(鎖切断に隣接した topoisomerase-DPC)を除き一般的なDPC修復機構は解明されていない。我々は，これまでの研究で，原核生物では，DPC に対しヌクレオチド除去修復と相同組換えが協調的に働くことを明らかにした。しかし，高等真核生物の一般的なDPC修復機構は解明されていない。

２．研究の目的
本研究では，哺乳類細胞を用いて，(1)DPC定量法，(2)DPC 除去機構，(3)DNA 損傷応答機構，(4)染色体損傷を検討し，高等真核生物のゲノムDPC修復機構とDPCに起因する染色体損傷を明らかにする。

３．研究の方法
(1)DPC定量法
DPC誘発剤処理した細胞から，塩化セシウム密度勾配遠心によりゲノムDNAを単離精製し，クロスリンクタンパク質を fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識した（図1)。DNAサンプルのFITC蛍光を測定しタンパク量を求めた（蛍光法)。別法として，FITC標識したDNAサンプルを膜にスロットブロットし，抗FITC抗体，HRP標識二次抗体処理後，化学発光を測定しタンパク量を求めた（Western 法)。

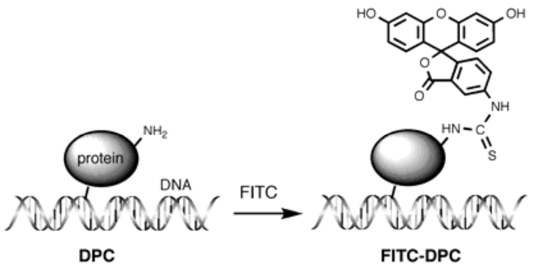

図１　DPCの構造とFITC標識反応
FITCはタンパク中のlysine側鎖と反応し，タンパク質を標識する。

(2)DPC除去機構
修復野生型細胞（MRC5-SV）およびヌクレオチド除去修復（NER）欠損細胞（XPA）を種々のアルデヒドで処理後，インキュベートし，経時的にゲノムを単離精製した。また，マウス移植腫瘍（SCCVII）を，常酸素状態および人為的に低酸素状態にし，放射線（炭素イオン線）照射した。マウスをインキュベートし，経時的にゲノムを単離精製した。細胞および腫瘍のクロスリンクタンパク質は，上記(1)の方法で定量した。

(3)DNA 損傷応答機構
DPC誘発剤処理した細胞（WI38VA13）から調製した細胞粗抽出物をSDS-PAGEで分離し，トランスデューサーであるCHK1およびCHK2のリン酸化状態をWestern法で調べた。

(4)染色体損傷
染色体損傷の指標として，DPC誘発剤処理した細胞（MRC5-SV）の姉妹染色分体交換（SCE）頻度を調べた。

４．研究成果
(1)DPC定量法
既存のDPC定量法としては,アルカリ溶出法，ニトロセルロース膜結合法，SDS/K^+沈殿法などがあるが，いずれの方法も得られるシグナルとDPC量の間に比例関係がないため，定性的な解析しかできない。本研究で新規に開発した蛍光法およびWestern法は，シグナルとDPC 量に比例関係があるため定量的な解析が可能であり，さらに，タンパクの種類によらず網羅的な検出が可能であることが示された。蛍光法およびWestern法のシグナルの間には良好な比例関係が認められた（図2)。また，プロテアーゼ処理によりシグナルが消失したことから，これがDPC中のタンパクに由来することが確認された。測定に必要なDNAは，蛍光法で 30 μg，Western 法では 0.3 μg であり，実験スケールと目的に応じて使い分けることができることが示された。

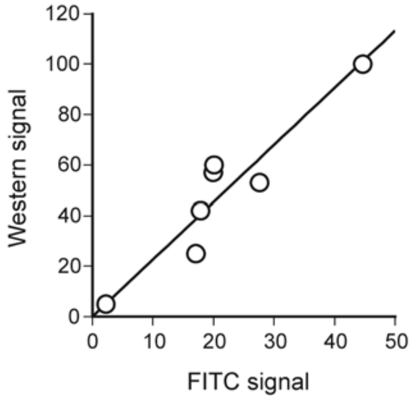

図 2　蛍光法および Western 法で測定したDPCシグナルの相関
種々のDPC誘発剤で処理した細胞から単離精製したゲノム DNA の DPC を蛍光法およびWestern法で定量した。

(2)DPC除去機構
MRC5-SVおよびXPA細胞を6種のアルデヒド化合物で処理し（生存率10%)，ゲノムDPCの経時変化を上記(1)の方法で調べた。いずれのアルデヒドでも，処理後 12 時間で DPC 量

は10-20%レベルまで減少した。また,MRC5-SVおよびXPA細胞では，ゲノムDPC減少速度に差は認められなかった（図3)。さらに，細胞から単離したゲノム DNA を用いた検討から，生理的な条件下でDPCの自発的な加水分解が進行することが明らかとなった。以上の結果から，細胞内におけるアルデヒド誘発DPC減少の主経路は自発的な加水分解であり，能動的な修復であるNERは関与していないことが明らかとなった。

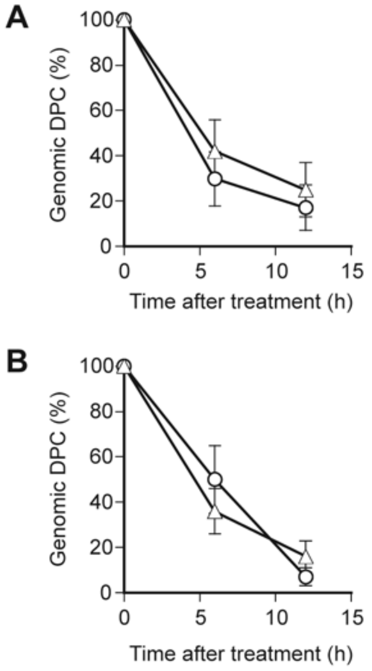

図3　MRC5-SVおよびXPA細胞におけるゲノムDPCの経時変化
MRC5-SV および XPA 細胞を(A)formaldehydeおよび(B)chloroacetoaldehydeで処理し，ゲノムに残るDPCを定量した。○：MRC5-SV,△：XPA

放射線照射した腫瘍でもDPCの生成が認められたが，常酸素に比べ低酸素腫瘍における生成量は4倍多かった。照射後，腫瘍中の DPC量は,6時間で約70%レベルまで減少したが，それ以降の減少速度は著しく低下した（図4)。したがって，放射線照射は，不安定なDPCと安定なDPCの2つのタイプのDPCを誘発することが示された。これと一致して，腫瘍から単離したゲノムDNAを用いた検討でも，加水分解が速やかに起こる不安定なDPC（40%）と分解が起こらない安定なDPC（60%）のがあることがわかった。この結果から，放射線が誘発するDPCの主成分（安定なDPC）はゲノムから能動的に除去されず，長期にわたり複製・転写に影響を与えることが示唆された。
　一方，DNA 二本鎖切断は，低酸素腫瘍で1/2.4に減少した。常酸素に比べ低酸素腫瘍におけるDPC生成量が4倍多かったことを合わせて考慮すると，低酸素性細胞の放射線致死には，DNA 二本鎖切断に加え DPC が関わっている可能性がある。

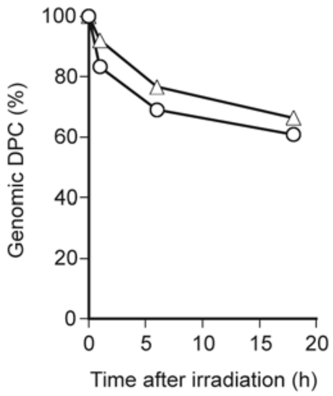

図4　照射腫瘍におけるゲノム DPC の経時変化
常酸素状態(△)および低酸素状態(○)の腫瘍を炭素イオン線照射し，ゲノムに残る DPCを定量した。

(3)DNA損傷応答機構
DPC誘発剤であるformaldehyde（FA）および5-aza-2’-deoxycytidine（azadC）で処理した細胞のDNA損傷応答活性化を検討した。FAでは，処理直後（3時間処理）にCHK1のリン酸化が既に認められ，さらに 12 時間後にはCHK2のリン酸化が認められた。azadCでは(24時間処理)，処理直後にCHK1およびCHK2のリン酸化が認められた。これらの結果から，複製フォークがDPCにより停止すると，センサーであるATRが活性化し，その後，複製フォークの切断により二本鎖切断末端が生じためATM経路が活性化する機構が推定された。

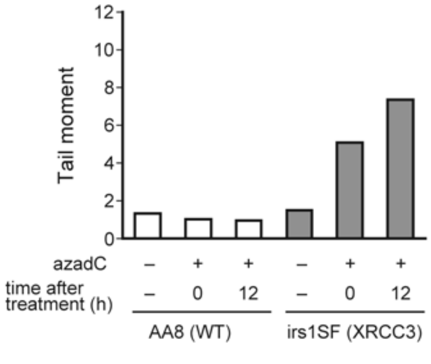

図5　azadC 処理した細胞における DNA 二本鎖切断の蓄積（中性コメットアッセイ）

DPC で停止した複製フォークの切断を検討した（図5)。azadC 処理した細胞における DNA二本鎖切断を中性コメットアッセイで分析

した結果，相同組換え野生型細胞（AA8）ではDNA二本鎖切断の蓄積は起こらなかったが，相同組換え欠損細胞（irs1SF）では，処理後に蓄積が認められた。この結果からも，DPCで停止した複製フォークの切断機構が支持された。

4)染色体損傷
DPC除去機構の検討で用いた6種のアルデヒド化合物でMRC5-SV細胞を処理し，SCE頻度を調べた。これと並行して，各アルデヒド化合物が誘発するゲノムDPCを定量した。ゲノムDPC量とSCE頻度の間には正の相関が認められたことから，DPCは染色体損傷を誘発し，その頻度はDPC量とともに増加することが示唆された。

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5件）

1. Nakano T., Ouchi R., Kawazoe J., Pack S.P., Makino K., and Ide H., T7 RNA polymerases backed up by covalently trapped proteins catalyze highly error prone transcription, J. Biol. Chem., 287, 6562-6572 (2012). DOI: 10.1074/jbc.M111.318410（査読有）
2. Ide H., Shoulkamy M.I., Nakano T., Miyamoto-Matsubara M, and Salem A., Repair and biochemical effects of DNA-protein crosslinks, Mutat. Res., 771, 113-122 (2011). DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2010.12.007（査読有）
3. 中野敏彰，宮本(松原)真由美，井出博，DNA-タンパク質クロスリンク損傷の修復と生物影響，放射線生物研究，46，160-176 (2011).（査読無）
4. Nakano T., Salem A., Terato H., Pack S.P., Makino K., and Ide H., Comparison of the activities of bacterial and mammalian nucleotide excision repair systems for DNA-protein crosslinks. Nucleic Acids Symp. Ser., 53, 225-226 (2009). DOI: 10.1093/nass/nrn029（査読無）
5. Nakano T., Katafuchi A., Matsubara M., Terato H., Tsuboi T., Masuda T., Tatsumoto T., Pack S.P., Makino K., Croteau D.L., Van Houten B., Iijima K., Tauchi H., and Ide H., Homologous recombination but not nucleotide excision repair plays a pivotal role in tolerance to DNA-protein crosslinks in mammalian cells. J. Biol., Chem., 284, 27065-27076 (2009). DOI: 10.1074/jbc.M109.019174（査読有）

〔学会発表〕（計7件）

1. Mahmoud Shoulkamy，大嶌麻妃子，光定雄介，中野敏彰，井出博，DNA-タンパク質クロスリンク損傷の新規な検出法，日本放射線影響学会 54回大会，神戸，2011.11.19
2. 井出博，中野敏彰，宮本(松原)真由美，Mahmoud Shoulkamy，平山亮一，鵜澤玲子，古澤　佳也，DNA-タンパク質クロスリンク損傷の生成と生物影響，日本放射線影響学会54回大会，神戸，2011.11.18
3. 井出博，DNA-タンパク質クロスリンクの修復および損傷許容機構，日本遺伝学会第82回大会，札幌，2010.9.21
4. Ide H., Genotoxic effects and repair of DNA-protein crosslink damage. NIRS International Symposium on Radiation Life Sciences, Chiba (Japan), 2010.6.11
5. Ide H., Damage response and repair mechanisms for DNA-protein crosslinks. 11th International Workshop on Radiation Damage to DNA, Atlanta (USA), 2010.5.16
6. 大嶌麻紀子，吉村友希，中野敏彰，井出博，アルデヒド化合物が誘発するゲノム損傷とその致死効果，日本放射線影響学会第52回大会，広島，2009.11.12
7. Ide H., Repair and tolerance mechanisms of DNA-protein crosslink damage. 10th International Conference on Environmental Mutagens, Florence (Italy), 2009.8.23

〔その他〕
研究室ホームページ
http://home.hiroshima-u.ac.jp/genechem/index.html

６．研究組織
(1)研究代表者
井出　博（IDE HIROSHI）
広島大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：30223126

(2)研究分担者
中野　敏彰（NAKANO TOSHIAKI）
広島大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：10526122

(3)連携研究者
なし