

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15017

研究課題名(和文) DNA損傷修復ドメイン形成における核骨格タンパク質の役割

研究課題名(英文) The role of nucleoskeleton proteins in DNA damage repair foci formation

研究代表者

衣笠 泰葉 (Kinugasa, Yasuha)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 ヘルス・メディカル微生物研究センター・研究員

研究者番号：60852118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、DNA二本鎖切断によって形成されるDNA修復ドメインの形成過程における核骨格タンパク質の役割について解明するため、核骨格タンパク質Lamin B1と相同組換え修復因子RAD51に着目し、Lamin B1がDNA損傷時のRAD51凝集に関与していることからこれらの結合特性について解析を行った。その結果、Lamin B1は通常のDNA非損傷時においてRAD51とクロマチン結合性画分にてRAD51と相互作用することでRAD51の待機場所としての役割を持ち、DNA損傷発生時にはその結合を緩めることでDNA損傷修復ドメイン形成に向けたダイナミックな構造変化を促していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、核内タンパク質の核膜局在化や核膜直下のクロマチン発現制御など核ラミナにおけるラミンの役割は明らかになりつつあるが、核膜直下以外における機能はあまり知られておらず、核内ドメイン形成への関与は未だ不明な点が多い。本研究結果は、ラミンによる核内ドメイン形成を促進するメカニズムの解明のために重要な知見をもたらすものであり、核骨格タンパク質の新たな役割を提唱するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the role of nucleoskeleton proteins in the formation process of DNA repair domains formed by DNA double-strand breaks. We focused on the nucleoskeleton protein Lamin B1 and the homologous recombination repair factor RAD51. Since it was reported that Lamin B1 promotes RAD51 foci formation upon DNA damage, we analyzed the interaction between them. As a result, Lamin B1 interacted with RAD51 in the chromatin fraction, and the interaction was temporarily weakened upon DNA damage. These results suggest that Lamin B1 play a role as a scaffold for RAD51 under DNA non-damaged state and loosen the interaction to allow DNA repair foci to form dynamically.

研究分野：分子生物学

キーワード：クロマチン ラミン 核構造 DNA損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA では、1日1細胞あたり数十万回という頻度で損傷が発生するため、細胞には DNA 損傷を迅速正確に修復する機構が備わっている。中でも、DNA 二本鎖切断 (DSB) はゲノムの不安定化や癌化を引き起こす重篤な損傷であり、非同末端結合 (NHEJ) や相同組換え (HR) を中心とした複数の修復経路により適切に修復される。DSB が発生すると、DNA 切断箇所の認識から始まり、修復因子の集結、クロマチン構造変化を伴って、最大 100 万塩基にも及ぶ巨大な DNA 修復ドメインが形成される (図 1)。しかし、その修復ドメインが形成及び維持されるメカニズムは未だ不明な点も多い。

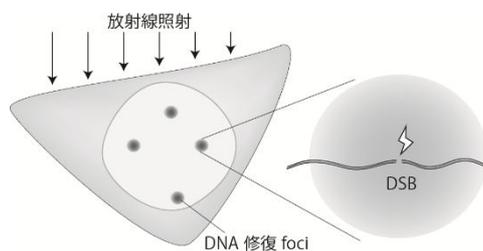


図 1. DSB 修復ドメインの形成

本研究では、DNA 修復ドメインの形成を担う因子の一つとして、核骨格タンパク質ラミンの存在に注目した。ラミンは後生動物細胞に見られる中間径フィラメントタンパク質で、核膜の内側に核ラミナと呼ばれる網目状の裏打ち構造を形成している。核ラミナは核の形状維持の他、クロマチン構造制御や転写、DNA 複製、ストレス応答といった様々な経路に関与していることが明らかになっており、核内機能を調整する足場の役割を持つと考えられている。脊椎動物では、Lamin A、Lamin C からなる A タイプラミンと、Lamin B1、Lamin B2 からなる B タイプラミンが存在し、それぞれ異なる核ラミナネットワークを形成している。先行研究において、Lamin A と Lamin B1 が、RAD51 フォーカスの形成に寄与することが示されている。酵母やショウジョウバエなどの核のサイズが比較的小さな生物種においては、DSB 箇所が核膜近傍へと移動する再配置が起こり、核膜を足場としたより安定的な修復が行うことができるが、哺乳類細胞ではヘテロクロマチンなど一部領域を除き、殆どはそのまま核質内で修復が行われる (図 2)。そのため、DNA 修復ドメイン形成を担うのは、核膜直下に位置する通常核ラミナではないと考えられる。核質中には、核質ラミンと呼ばれる核ラミナ以外のラミンの画分が少量存在している可能性が近年議論しているが、その役割については未だ不明である。

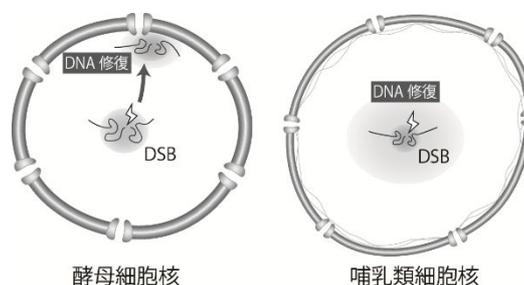


図 2. DSB の核内挙動

2. 研究の目的

本研究では、核骨格タンパク質と DNA 修復ドメイン形成過程の間に存在する分子メカニズムを解明し、DNA 修復ドメイン形成におけるラミン、および核骨格タンパク質の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト網膜色素上皮細胞株 (RPE1) を用い、相同組換え修復ドメイン形成の中核となる RAD51 と Lamin B1 の間に存在する分子メカニズムについて分子生物学・細胞生物学・生化学的手法を用いて解析するため、以下の手法で解析を行った。

(1) 【Lamin B1 と RAD51 の結合性の解析】

NaCl、TritonX-100 の濃度などを段階的に変えた溶出条件にて細胞抽出を行い、各条件下での Lamin B1 と RAD51 の結合性について Lamin B1 による共免疫沈降にて解析を行った。

(2) 【DNA 損傷時の Lamin B1 - RAD51 結合の変化の解析】

(1) で得られた条件下における Lamin B1 と RAD51 の結合性が DNA 損傷条件下でどのように変化するかを解析するため、RPE1 細胞に 5 Gy の放射線照射を行い、その後 30 分、1、2、3 時間後の細胞を用いて Lamin B1 による共免疫沈降により Lamin B1 と RAD51 の結合性の解析を行った。

(3) 【Lamin B1 - RAD51 結合メカニズムの解析】

Lamin B1 と RAD51 の結合を担う RAD51 のドメインを特定するために、GFP を融合した野生型 RAD51、自己結合ドメイン変異型 (F86E) 及び SUMO 結合ドメイン変異型 (V264K) RAD51 を RPE1 細胞に過剰発現させ、その結合性の変化を Lamin B1 による共免疫沈降により解析した。

4. 研究成果

まず初めに、細胞抽出液の溶出条件を段階的に変え、各可溶・不溶画分における Lamin A、Lamin B1 の割合を Western Blotting にて解析を行った (図 3)。Lamin A、Lamin B1 共に、弱い溶出条件ではほとんど溶出されず、強い溶出条件 (NaCl 300mM 以上、TritonX-100 0.5%) によってようやく過半数が溶出された。しかし、強い溶出条件下でも一部は不溶画分に残存していた。ヒストン等をはじめ、クロマチン周辺のタンパク質は

通常の細胞溶出条件では可溶化出来ず、細胞溶出時に DNA の分解を行うことで可溶化できることが多い。そこで、各溶出条件に DNase 処理を加え、同様に Lamin A、Lamin B1 の溶出度を確認すると、わずかに不溶画分に残存していたものが可溶画分へと移行していた。このことより、Lamin A、Lamin B1 には一部クロマチンに強く結合したものが存在することが示唆された。

続いて、同じ条件下における RAD51 の溶出度を解析したところ、RAD51 は弱い条件下でもそのほとんどが可溶画分に存在しているにも関わらず、強い溶出条件下でも Lamin 同様一部が不溶画分に残存していた (図 4)。さらに、DNase 処理下では Lamin 同様に可溶画分への移行が見られ、RAD51 もその一部は Lamin 同様にクロマチンに強く結合していることが示唆された。

以上の結果より、Lamin と RAD51 はその一部が同じクロマチン結合性の画分に存在していることから、この画分の Lamin と RAD51 が結合し、機能している可能性を仮定した。そこで、各条件下における Lamin B1 と RAD51 の相互作用を、Lamin B1 による共免疫沈降により解析を行った。すると、クロマチン結合性画分の溶出条件下にて、Lamin B1 と RAD51 の相互作用が見られた (図 5)。

続いて、DNA 損傷時の LaminB1、RAD51 の相互作用を調べるため、細胞に 5Gy の放射線を照射し、照射後の各時点において Lamin B1 による共免疫沈降を行った。その結果、放射線照射後では Lamin B1 と RAD51 の相互作用は弱まり、3 時間後には再び強くなっていることが分かった (図 6)。さらに、Lamin B1 による共免疫沈降では、照射後に γ H2AX が検出され、こちらは逆に時間が経過するにつれて検出が弱まっていき、3 時間後にはほとんど検出されなかった。これらの結果より、一部の RAD51 は通常時から Lamin B1 に結合しており、DSB 発生時には一時的に結合が弱まり、DNA 損傷修復が進むにつれて再び強く結合し、修復複合体が安定化していることが考えられる。RAD51 を過剰発現すると、DNA 非損傷時においても核内に線状の凝集構造が見られることが報告されており、RAD51 は通常時から核内の特定の部位に集積していることが言われている。核膜直下の核ラミナでは、様々な核タンパク質と結合し、その足場となっていることが知られており、ここで見られた Lamin B1 と RAD51 の相互作用も、Lamin B1 は RAD51 が局在する足場となっていることが考えられる。

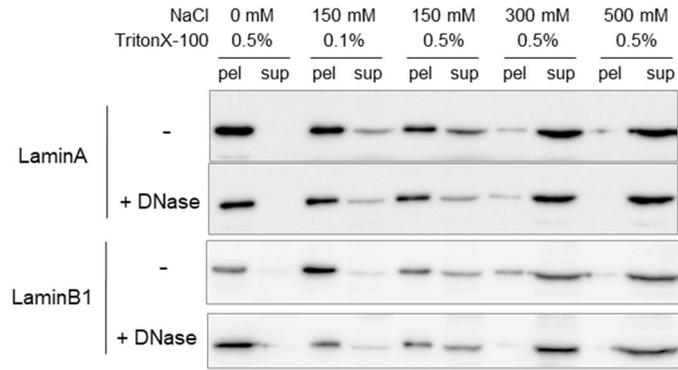


図 3. 各溶出条件下における Lamin の溶出度

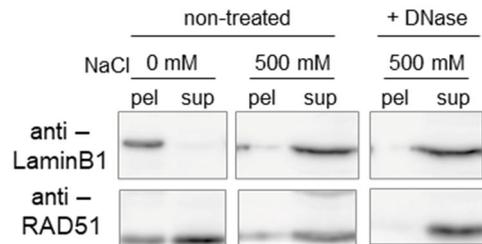


図 4. DNA 分解処理により Lamin B1 および RAD51 が可溶化される

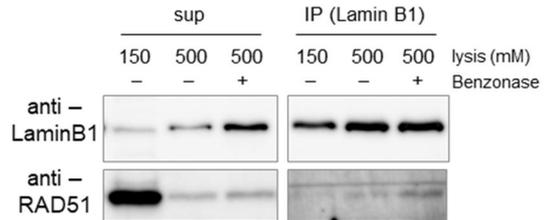


図 5. クロマチン結合性画分における Lamin B1 と RAD51 の相互作用

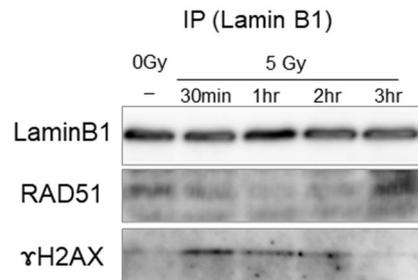


図 6. DNA 損傷下における Lamin B1-RAD51 相互作用の変化

さらに、Lamin B1 と RAD51 の相互作用を担う RAD51 のドメインを解析するため、野生型 (wt)、自己結合ドメインの変異型 (F86E)、及び SUMO 結合ドメイン変異型 (V264K) の RAD51 を細胞に発現させ、Lamin B1 による共免疫沈降を行った。その結果、wt および V264K では相互作用が見られたのに対し、F86E では見られなかった (図7)。このことより、Lamin B1 と RAD51 の相互作用には RAD51 の自己結合ドメインが必要であることが分かった。

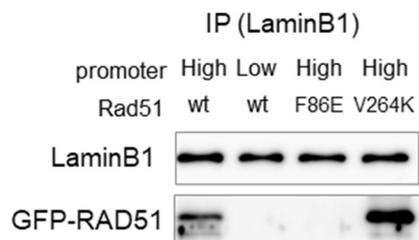


図7. RAD51 変異体の Lamin B1 結合性

以上の結果をまとめると、DNA 非損傷時、Lamin B1 はクロマチン結合性画分にて RAD51 の自己結合ドメインを介して RAD51 と結合し、RAD51 の核内局在の足場となっていることが示唆された。また、DSB 発生時には一時的に結合が弱まり、DNA 損傷修復が進行するにつれて、再び結合が強化されることから、DNA 損傷によって Lamin B1-RAD51 複合体の構造が緩むことで修復ドメイン形成に向けた再構成が行われることが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 0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 Nakayama Shinya, Sun Jiying, Horikoshi Yasunori, Kamimura Yoshitaka, Ike Takeshi, Fujino Shu, Kinugasa Yasuha, Sasaki Kensuke, Nakashima Ayumu, Masaki Takao, Tashiro Satoshi	4. 巻 online
2. 論文標題 Klotho protects chromosomal DNA from radiation-induced damage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvad001	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Hirano Yasuhiro, Kinugasa Yasuha, Kubota Yoshino, Obuse Chikashi, Haraguchi Tokuko, Hiraoka Yasushi	4. 巻 online
2. 論文標題 Inner nuclear membrane proteins Lem2 and Bqt4 interact with different lipid synthesis enzymes in fission yeast	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvad017	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Iwasaki Yuka W, Sriswasdi Sira, Kinugasa Yasuha, Adachi Jun, Horikoshi Yasunori, Shibuya Aoi, Iwasaki Wataru, Tashiro Satoshi, Tomonaga Takeshi, Siomi Haruhiko	4. 巻 40
2. 論文標題 Piwi-piRNA complexes induce stepwise changes in nuclear architecture at target loci	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e108345
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/emboj.2021108345	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Fujino Shu, Sun Jiying, Nakayama Shinya, Horikoshi Yasunori, Kinugasa Yasuha, Ishida Mari, Sakai Chiemi, Ike Takeshi, Doi Shigehiro, Masaki Takao, Tashiro Satoshi	4. 巻 197
2. 論文標題 A Combination of Iohexol Treatment and Ionizing Radiation Exposure Enhances Kidney Injury in Contrast-Induced Nephropathy by Increasing DNA Damage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Radiation Research	6. 最初と最後の頁 384-395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1667/RADE-21-00178.1	査読の有無 無
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0件

〔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
---------	---------