

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 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22510206

研究課題名（和文） 高次クロマチン構造における塩基除去修復

研究課題名（英文） Base excision repair of DNA in chromatin structure

研究代表者

久保田 美子 (KUBOTA YOSHIKO)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30260102

研究成果の概要（和文）：細胞の核ゲノム DNA は通常の細胞生存条件下であっても損傷を受けている。これらの損傷 DNA が修復されないと細胞はがん化しやすくなるが、核ゲノム DNA は修復酵素がアクセスし難い構造をとっている。我々は、修復に関与するが酵素活性のないタンパク質 XRCC1 と新規に相互作用するタンパク質を見出したので、これらの相互作用の意義を解析した。核の特定の領域にこれらが局在することによって損傷 DNA の修復が効率よく進行すること、一方のタンパク質が減少すると修復が進行しないことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Genomic DNA is continuously suffered from modification including oxidation and hydrolysis. DNA repair is crucial system for maintaining genetic information, however, chromatin structure is obstacle for repair enzymes to access damage sites. We found a novel protein that interacts with XRCC1, a non-enzymatic DNA repair protein. These proteins localized to insoluble nuclear fraction and critical for chromosomal DNA repair.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：DNA 修復 クロマチン構造

1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA は遺伝情報を保持するためにその塩基配列を正確に維持することが重要であるが、通常の細胞生存条件下であっても酸化、加水分解などの損傷を受けている。これらの損傷を修復する能力が不十分な細胞はがん化する可能性が高いことは多型タンパク質の解析等からよく知られている。特に、

酸化や加水分解のような塩基の修飾は、ヒト細胞に 1 日当り 10^4 のオーダーで生成することが報告されており、最も多くゲノム DNA が曝されている損傷源である。このような塩基の修飾を修復する反応経路が塩基除去修復であるが、この反応の特徴は非常に効率よく素早くゲノム DNA の修復を行う点である。

我々は塩基除去修復の試験管内再構成系

を確立することによって、この反応系における個々の酵素による素反応の kinetics を解析し、さらに酵素活性を示さないために機能が未知であった XRCC1 タンパク質の塩基除去修復反応における役割を明らかにして来た。

XRCC1 は欠損細胞が高い DNA 損傷感受性を示すこと、1 本鎖切断が増加し S 期の進行が遅れることが報告されており、DNA ligase III α とヘテロダイマーを形成して DNA ligase を安定化していることが知られていたが、さらに DNA polymerase β と相互作用することによって DNA polymerase の活性を調節することを明らかにした。このように、XRCC1 は塩基除去修復に関与する酵素の安定性や活性を調節することによって DNA 修復に寄与していると考えられた。

しかし、最近になって DNA ligase III を発現しない細胞であっても DNA 損傷に対して感受性を示さず、これは XRCC1 欠損細胞の示す感受性と一致しないことが 2 つのグループから報告された。我々も以前に DNA ligase III と相互作用しない XRCC1 の変異体を発現する細胞は DNA ligase III が減少しているにも関わらず、DNA 損傷に対して感受性を示さないことを報告していた。これらのことは、XRCC1 と DNA ligase III との相互作用は DNA 損傷の修復や細胞の生存と関係がない可能性を示している。それでは一体 XRCC1 の機能は何なのか?なぜ、XRCC1 欠損細胞は高い DNA 損傷感受性を示すのか。この疑問に対する答えはまだ見つかっていない。

真核細胞の核ゲノム DNA はクロマチン構造をとっており、DNA 損傷を修復するタンパク質群がアクセスすることを困難にしている。そこでクロマチン構造を変化させて(クロマチンリモデリング)、修復反応を効率よく進行させるしくみが存在することが考えられて来た。実際、DNA 鎖切断を修復する反応経路や、紫外線による損傷を修復する反応経路にはクロマチンリモデリングタンパク質が関与していることがすでに示されていた。一方、細胞に非常に多く生じる酸化や加水分解による損傷を修復する塩基除去修復についてはクロマチンリモデリングの関与についてほとんど知見が無い状態であった。裸の DNA 基質とクロマチン構造をとらせた DNA 基質を比べて試験管内で塩基除去修復反応を行った実験ではクロマチン構造をとった DNA 基質では修復効率が低下していたことが報告されていたが、どのような因子が実際の細胞中で修復効率を上げる機能を果たしているかは分からなかった。

2. 研究の目的

以上のような背景から、我々は XRCC1 の未知の機能が細胞中における DNA 修復の効率化すなわち高次クロマチン構造における修復

効率に寄与しているのではないかと考えた。特に、XRCC1 自身には酵素活性が認められないこと、損傷 DNA との親和性が高いこと、他の複数の DNA 修復酵素との相互作用が報告されていることなどを考えあわせると、XRCC1 が損傷 DNA 部位に結合し、ここにクロマチンリモデリングタンパク質をリクルートしてクロマチン構造を修復に適した形にしたうえで修復反応を進めるのではないかという作業仮説をたてた。

3. 研究の方法

上記の作業仮説を検証するため、まず XRCC1 と相互作用する新規のタンパク質をスクリーニングし、ここにクロマチンリモデリングタンパク質が現れるか調べることにした。具体的には酵母 2 ハイブリッドシステムを利用し、XRCC1 の発現の高いヒト精巣由来 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果 91 個のポジティブクローンが得られ、そのうち 11 個が同一の遺伝子の一部であった。この遺伝子の産物は既にクロマチンリモデリングタンパク質であることが報告されているタンパク質であった(論文未発表のため、ここでは X タンパク質とする)。

この遺伝子 X の全長 cDNA を既にその塩基配列を報告していた研究者から分与してもらい、これを用いて相互作用の確認のための発現ベクターの作成を行った。試験管内転写・翻訳システムによってタンパク質を合成し、XRCC1 と X の相互作用を確認し、更に欠失変異体を作成して相互作用に必要な領域を決定した。また、X の抗体は市販のものが入手できたので、これを用いて HaLa 細胞の核抽出液における XRCC1 との相互作用を免疫沈降によって確認した。さらに核抽出液における XRCC1 と X を含む複合体の存在を確認するため、ゲル濾過カラムによる分画を行い、各フラクションについてウエスタンブロットティングを行った。また、HaLa 細胞に DNA 損傷処理を行った後、クロマチン画分から核マトリックス画分に XRCC1 が移行することを報告していたので、同様の移行が X についても見られるか細胞タンパク質を分画してウエスタンブロットティングにより解析した。さらに、核マトリックスに DNA 損傷後 XRCC1 やその他の修復酵素が foci を形成することが知られているので、これらと同様に X も foci を形成するかを免疫染色によって解析した。また、修復酵素の foci 形成が X の foci 形成に依存しているかどうかを調べるため、siRNA を用いて X をノックダウンしたときの foci 形成についても解析した。さらに、siRNA によって X をノックダウンした細胞の DNA 損傷に対する感受性が XRCC1 をノックダウンした細胞の感受性と同等に高いかどうかを細胞内の NAD(P)H 量を定量することによって解

析した (DNA 鎖切断によって poly (ADP ribose) polymerase が活性化するので、細胞内 NAD、ひいては NAD(P)H が減少することを利用して DNA 損傷の定量をする方法が報告されている)。

4. 研究成果

酵母 2 ハイブリッドシステムによって、XRCC1 と相互作用するクロマチンリモデリングタンパク質 X が同定されたので、これについて詳細な解析を行った。まず、酵母 2 ハイブリッドシステムで拾えたのは X 遺伝子の同一ドメイン (SNF2 family N-terminal domain) を含むクローンだったので、他のクロマチンリモデリングタンパク質のこのドメインとの相互作用について確認した。BRG1 や INO80 について調べたところ、XRCC1 との相互作用は検出されず、X の SNF2 family N-terminal domain のみに相互作用が認められた。

HeLa 細胞抽出液において実際に XRCC1 と X の相互作用が認められるか免疫沈降を行って調べたところ、抗 XRCC1 抗体で免疫沈降を行った沈殿物には X が、抗 X 抗体で免疫沈降を行った沈殿物には XRCC1 が認められた。さらに、試験管内転写・翻訳システムによって生成した欠変異体の XRCC1 や X を用いた免疫沈降実験の結果、両者の相互作用に必要な領域は、XRCC1 の N 末端領域、X の SNF2 family N-terminal domain 領域であることが分かった。

また、HeLa 核抽出液をゲル濾過カラムによって分画し、XRCC1 と X を含む複合体の存在を確認したところ、約 700kDa の分画に XRCC1 と X とが共存していることが分かった。これは各々の分子量の和よりも大きいことから、これら以外のタンパク質と巨大な複合体を形成している可能性が考えられた。

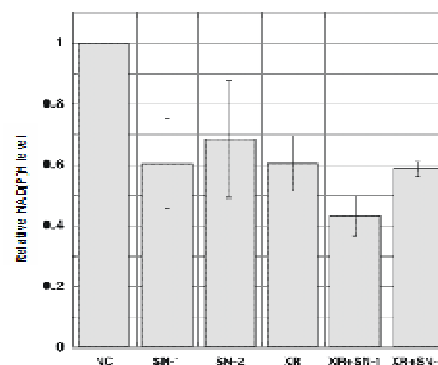
これまで我々は、XRCC1 が DNA 損傷の誘発とともに可溶性のクロマチン分画から、不溶性の核マトリックス分画に移動することを見出していた。この X タンパク質も DNA 損傷の誘発とともに核マトリックスに移行するか確認したところ、XRCC1 と同様の移行を示すことが分かった。

in situ で細胞を可溶化、DNase 処理することによって核マトリックスにおける foci を観察した。X は、元々 DNA 損傷を与えない細胞でも核マトリックスで foci を形成していることが分かった。この foci は DNA 損傷後に数は顕著に増加しないが、個々の foci の免疫染色のシグナルは増加していた。また、損傷誘発後形成される修復酵素の foci は X の foci と共局在していた。siRNA によって X をノックダウンした細胞では DNA 損傷後の修復酵素 foci の数は著しく減少していた。

siRNA によって細胞内の X 量を減じた細胞は DNA 損傷後の NAD(P)H 量が減少していた。

これも XRCC1 をノックダウンした細胞と同様の傾向であった。

B



以上の結果から、X は細胞内で一部クロマチンに、大部分核マトリックスに存在し、DNA 損傷後にクロマチンから核マトリックスに移行することが推測された。XRCC1 と X が相互作用することと、XRCC1 が損傷 DNA とともに核マトリックスに移行して foci を形成することを考え合わせると、DNA に損傷が生じると XRCC1 と損傷 DNA 部位が相互作用し、さらに他の修復酵素 (X も含む) も結合しながら元々存在していた核マトリックス上の X foci に集合するのではないかと考えた。

これまでの知見から、DNA 損傷後に修復酵素が foci を形成することが修復反応が進行していることの指標として広く認められている。実際 XRCC1 も他の修復酵素とともに核マトリックスで foci を形成する。foci を形成できない変異体 XRCC1 を発現する細胞では修復反応が十分進行しないことが確認されている。塩基除去修復は多数の損傷を効率よく素早く修復するが、このためにはゲノム DNA 中に散在している損傷を個別に修復するよりも、核マトリックスという足場の上に損傷部位を集めて、クロマチン構造を変化させ、修復酵素も複合体を形成した状態で次々と反応ステップを進めることは重要な意味がある。このような複合体形成による反応ステップの効率的進行は、mRNA 産生時の RNA polymerase II の CTD に RNA プロセッシングタンパク質が結合する例をはじめ、よく知られた機構である。

塩基除去修復は DNA 組み換えなど他の修復反応に比べて簡潔である印象が強いため、調節機構などの解析はほとんど行われていない。しかし、実際はゲノム DNA が曝されている DNA 損傷の量の大部分は塩基除去修復反応で修復されるものである。したがって塩基除去修復の効率的な進行は細胞にとって重要な問題である。本研究では XRCC1 タンパク質の新規の相互作用タンパク質の検索と機能解析をとおして、塩基除去修復反応の高次核内構造、クロマチン構造における協調的機能

調節機構の存在を明らかにすることが出来たと考えている。現在論文投稿準備中である。今後は、ゲノム DNA のヘテロクロマチン領域の DNA 修復には XRCC1 への依存が高いのか、XRCC1 や他の修復タンパク質の翻訳後修飾と foci 形成の関係、X の多型とがん化傾向などについて解析したいと考えている。

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)

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 柳田充郎、久保田美子. Base excision repair in active DNA demethylation pathways 第 35 回日本分子生物学会年会. 2012 年 12 月 11-14 日. 福岡.
- (2) 堀内三郎、久保田美子. XRCC1 タンパク質の核マトリックス局在 ビタミン B 研究委員会第 423 回研究協議会研究発表. 2011 年 2 月. 東京.
- (3) Yoshiko Kubota, Suburu Amano, Miyuki Ishiyama, Ayako Ujiie, Shinji Shimizu, Saburo Horiuchi. . Methyl-methanesulfonate induced DNA damage responses in base excision repair deficient cells. 第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会. 2010 年 12 月 7-10 日. 神戸.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 美子 (KUBOTA YOSHIKO)
岩手医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30260102