

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310041

研究課題名(和文) DNA二重鎖切断修復からアポトーシスへのシグナル変換における53BP1の機能解析

研究課題名(英文) Roles of 53BP1 in progression of apoptosis

研究代表者

岩淵 邦芳 (IWABUCHI, Kuniyoshi)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：10232696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：アポトーシス細胞において、カスパーゼ依存性に切断され残った53BP1断片が、アポトーシス細胞表面に露出することを明らかにした。53BP1が、マクロファージに対するfind-me signalやeat-me-signalとして働く可能性が示唆された。一方、53BP1の発現を抑制すると、X線照射後のp53標的遺伝子の転写が抑制された。しかし、53BP1発現抑制は、プロモーター領域へのp53結合に影響を与えなかった。53BP1は、プロモーター領域に結合したp53に起こる何らかの修飾を制御することで、p53の転写活性化能を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：p53 binding protein-1 (53BP1) facilitates non-homologous end joining repair of DNA double-strand breaks. In this study, we examined functional interaction between 53BP1 and p53 in apoptotic cells. We found that 53BP1 is cleaved into a fragment of 53BP1 in a caspase-dependent manner. 53BP1 cleavage is observed in both cells with wild-type and mutant p53. Some of the 53BP1 fragments are localized on the surface of apoptotic cells, suggesting a role of 53BP1 in elimination of apoptotic cells by a macrophage. Downregulation of 53BP1 reduces transcription of several p53 target genes. However, binding of p53 on the promoter in these genes is not affected by 53BP1 downregulation, suggesting that 53BP1 regulates transcriptional activity of p53 by regulating modification of p53 on the promoter in the target genes.

研究分野：複合新領域

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：アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

53BP1 は、癌抑制蛋白質 p53 と結合する蛋白質として見出された。転写因子として機能する p53 は、様々な細胞ストレスに応答して、細胞周期停止、細胞老化あるいはアポトーシスを引き起こすことが知られている。53BP1 は、ヌクレオソームとの結合を介して DNA 二重鎖切断部位に集積することで、相同組み換えによる修復を抑制し、非相同末端結合による修復を促進することが明らかになってきた。53BP1 と p53 との機能的関連については、53BP1 が p53 の転写活性化能を亢進させるとの報告があるものの、いまだ不明な点が多い。また、53BP1 のアポトーシスにおける機能についての報告は少ない。

2. 研究の目的

本研究は、特に 53BP1 と p53 との機能的な関連に着目しながら、アポトーシスにおける 53BP1 の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アポトーシス細胞の調製

ヒト T リンパ球由来白血病細胞株 Molt-4 (p53 は野生型) あるいは Jurkat (p53 は変異型) に、X 線照射あるいはプロテインキナーゼ C 阻害剤スタウロsporin 処理を行いアポトーシスを誘導した。

(2) アポトーシス細胞における 53BP1 の検出

アポトーシス誘導後の細胞から細胞溶解液を抽出し、53BP1N 末あるいは C 末に対する抗体を用いたウェスタンブロット法で、53BP1 の切断を検出した。細胞内の 53BP1 の局在は、細胞を固定し膜透過処理を行った後に免疫蛍光染色法で調べた。細胞表面の 53BP1、ヒストン、DNA は、細胞を固定後、膜透過処理を行わずに、免疫蛍光染色法で検出した。

(3) p53 転写活性化能の解析

野生型 p53 をもつヒト骨肉腫細胞株 U2OS に、Control siRNA あるいは 53BP1 に対する siRNA を取り込ませ、その後 X 線照射を行い、照射前および照射後継時的に細胞溶解液、total RNA 液を調整した。p21、Bax、Puma それぞれの蛋白量をウェスタンブロット法で、mRNA 量を RT-PCR 法で調べた。X 線照射前後の細胞からクロマチン分画を抽出し、p53、53BP1 それぞれに対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降法を行い、p21、Puma、Bax それぞれの遺伝子プロモーター領域に結合する p53、53BP1 の量を調べた。

(4) 細胞周期解析

X 線照射前後の U2OS 細胞を propidium iodide で染色し、細胞周期分布を FACS 法で解析した。

4. 研究成果

(1) アポトーシス細胞における 53BP1 の切断

Molt4 細胞に X 線照射を行い DNA 二重鎖切断を発生させると、当初 53BP1 は DNA 二重鎖切断部位に集積し foci を形成した。その後アポトーシス細胞の出現にともない 53BP1 は、カスパーゼにより切断され、ヌクレオソーム結合ドメイン Tudor と p53 結合ドメイン BRCT を含む C 末断片化されることを見出した。この現象は、Jurkat 細胞をスタウロsporin 処理することで誘導される DNA 損傷非依存性アポトーシスにおいてもみられたことから、アポトーシスの誘導因子や p53 変異の有無とは無関係に、カスパーゼの活性化に伴い出現する現象であることが示唆された。

(2) アポトーシス細胞における 53BP1C 末断片の局在

アポトーシス細胞で出現した 53BP1C 末断片は、核内に均一に存在するが、アポトーシスのステージが進行するに伴い、核内から細胞質に移行した。さらに 53BP1C 末断片の一部は、細胞質から細胞膜へと移行し、細胞表面に露出することが明らかになった。アポトーシス細胞の表面には、二本鎖 DNA 断片や各種ヒストンが露出し、これらがマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食において、マクロファージに対する find-me-signal あるいは eat-me-signal となることが知られている。細胞表面に露出した 53BP1C 末断片の一部は、二本鎖 DNA 断片や各種ヒストンと細胞表面で共局在した。これらの結果から 53BP1 も、マクロファージに対する find-me-signal や eat-me-signal として働く可能性が示唆された。

(3) 53BP1 による p53 転写活性化能の亢進

siRNA を用いて 53BP1 の発現を抑制すると、X 線照射後の細胞周期 G1 停止において中心的な役割を果たしている p21 蛋白質の増加が強く抑制され、アポトーシス誘導において重要な役割を果たしている Bax、Puma 蛋白質についても増加の遅延がみられた。X 線照射後の p21 蛋白質増加が抑制される現象に合致して、53BP1 発現抑制細胞では X 線照射後の G1 期停止が障害されていた。さらに 53BP1 発現抑制により、X 線照射後の p21、Bax、Puma それぞれの mRNA の増加が抑制された。この p53 標的遺伝子 mRNA の増加抑制の機序を明らかにするために、これらの遺伝子のプロモーター領域への p53 結合をクロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) で調べたところ、プロモーター領域への p53 の結合は、53BP1 発現抑制の有無にかかわらず、X 線照射後同程度に増加した。一方、53BP1 は X 線照射前にも p21 プロモーター領域に結合していたが、その結合量は X 線照射後に変化することはなかった。以上より 53BP1 は、X 線照射後プロモーター

領域に結合した p53 に起こる、何らかの修飾を制御することで、p53 の転写活性化能を制御している可能性が示唆された。

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 6 件)

1. Yoo JS, Takahashi K, Ng CS, Ouda R, Onomoto K, Yoneyama M, Lai JC, Lattmann S, Nagamine Y, Matsui T, Iwabuchi K, Kato H, Fujita T : DHX36 enhances RIG-I signaling by facilitating PKR-mediated antiviral stress granule formation. *PLoS Pathog*, 10(3):e1004012, (2014) 査読有
 2. Ishigaki Y, Nakamura Y, Tatsuno T, Hashimoto M, Iwabuchi K, Tomosugi N : RNA binding protein RBM8A (Y14) and MAGOH localize to centrosome in human A549 cells. *Histochem Cell Biol*, 141(1):101-109, (2014) 査読有
 3. Kurosawa A, Saito S, So S, Hashimoto M, Iwabuchi K, Watabe H, Adachi N : DNA Ligase IV and Artemis act cooperatively to suppress homologous recombination in human cells: Implications for DNA double-strand break repair. *PLoS One*, 8:e72253, (2013) 査読有
 4. Ishigaki Y, Nakamura Y, Tatsuno T, Hashimoto M, Shimasaki T, Iwabuchi K, Tomosugi N : Depletion of RNA-binding protein RBM8A (Y14) causes cell cycle deficiency and apoptosis in human cells. *Exp Biol Med*, 238(8), 889-897, (2013) 査読有
 5. Doai M, Watanabe N, Takahashi T, Taniguchi M, Tonami H, Iwabuchi K, Kayano D, Fukuoka M, Kinuya S : Sensitive immunodetection of radiotoxicity after iodine-131 therapy for thyroid cancer using -H2AX foci of DNA damage in lymphocytes. *Ann Nucl Med*, 27:233-238, (2013) 査読有
 6. Yoshida J, Iwabuchi K, Matsui T, Ishibashi T, Masuoka T, Nishio M : Knockdown of stromal interaction molecule 1 (STIM1) suppresses store-operated calcium entry, cell proliferation and tumorigenicity in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochem Pharmacol*, 84:1592-1603, (2012) 査読有
- [学会発表](計 22 件)
1. 松井理、砂谷優実、逆井良、橋本光正、岩淵邦芳 : 53BP1 による p53 機能の制御 日本放射線影響学会第 56 回大会 青森 2013 年 10 月 18 日 ~ 20 日
 2. 砂谷優実、Kamdar R.P., Sharma M. K., 松井理、逆井良、橋本光正、松本義久、岩淵邦芳 : カスパーゼによる XRCC4 切断と XRCC4 による CAD の核内移行促進機構の解明 日本放射線影響学会第 56 回大会 青森 2013 年 10 月 18 日 ~ 20 日
 3. Yoshida J, Iwabuchi K : Calcium sensor STIM1 plays an essential role in human epidermoid carcinoma cell growth, migration, and tumorigenicity. 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜 2013 年 10 月 3 日 ~ 5 日
 4. Yoshida J, Iwabuchi K, Ishibashi T, Masuoka T, Nishio M : Silencing of calcium sensor protein stromal interaction molecule 1 (STIM1) suppresses cell proliferation and tumorigenicity in human epidermoid carcinoma A431 cells. 第 86 回日本薬理学会年会 福岡 2013 年 3 月 21 日 ~ 23 日
 5. Matsui T, Sunatani Y, Hashimoto M, Iwabuchi K : Regulation of p21-mediated G1/S Checkpoint by 53BP1. 第 35 回日本分子生物学会年会 福岡 2012 年 12 月 11 日 ~ 14 日
 6. Sunatani Y, Kamdar R P, Sharma M K, Matsui T, Hashimoto M, Matsumoto Y, Iwabuchi K : Mechanism of Apoptosis Induction via Regulation of ASAP Complex by XRCC4. 第 35 回日本分子生物学会年会 福岡 2012 年 12 月 11 日 ~ 14 日
 7. 吉田純子、岩淵邦芳 : Silencing of STIM1 suppresses store operated calcium entry and cell growth of human epidermoid carcinoma A431 cells. 第 71 回日本癌学会学術総会 札幌 2012 年 9 月 19 日 ~ 21 日
 8. 橋本光正、松井理、橋本優実、立石智、岩淵邦芳 : テロメア末端融合における 53BP1 と Rad18 の機能解析 日本放射線影響学会第 55 回大会 仙台 2012 年 9 月 6 日 ~ 8 日
 9. 松井理、橋本優実、橋本光正、岩淵邦芳 : 53BP1 による p53 機能の制御 日本放射線影響学会第 55 回大会 仙台 2012 年 9 月 6 日 ~ 8 日

10. 橋本優実、Kamdar R.P.、Sharma M. K.、松井理、橋本光正、松本義久、岩淵邦芳：アポトーシスで生じた XRCC4N 未断片による DNA 非損傷性アポトーシスの制御機構 日本放射線影響学会第 55 回大会 仙台 2012 年 9 月 6 日～8 日
11. 富田雅典、小林純也、岩淵邦芳、松本義久、足立典隆、高田穰、内海博司：低線量率放射線照射下における DNA2 重鎖切断修復因子の役割 日本放射線影響学会第 55 回大会 仙台 2012 年 9 月 6 日～8 日
12. 橋本優実、Kamdar R.P.、Sharma M. K.、松井理、橋本光正、松本義久、岩淵邦芳：DNA 二本鎖切断修復タンパク質 XRCC4 を介したアポトーシス制御機構の解明 第 48 回金沢医科大学医学会学術集会 内灘 2012 年 7 月 21 日
13. 道合万里子、渡邊直人、高橋知子、谷口充、利波久雄、岩淵邦芳、萱野大樹、福岡誠、絹谷清剛：アイソトープ治療におけるリンパ球の放射線組織障害評価に関する検討 第 71 回日本医学放射線学会総会 横浜 2012 年 4 月 12 日～15 日
14. Tateishi S, Watanabe K, Sun J, Iwabuchi K, Yomogida K : Rad18 is required for double-stranded break repair and long-term spermatogenesis. 第 34 回日本分子生物学会年会 横浜 2011 年 12 月 13 日～16 日
15. 若杉光生、佐々木琢磨、猪部学、岩淵邦芳、松永司：休止期のヌクレオチド除去修復に伴う二重鎖切断の生成と ATM シグナリング経路の活性化 第 34 回日本分子生物学会年会 横浜 2011 年 12 月 13 日～16 日
16. 橋本優実、松井理、橋本光正、岩淵邦芳：Function of DNA repair protein 53BP1 in apoptosis. 第 34 回日本分子生物学会年会 横浜 2011 年 12 月 13 日～16 日
17. 松井理、橋本優実、橋本光正、岩淵邦芳：p53 の活性化制御における 53BP1 の機能的役割 日本放射線影響学会第 54 回大会 神戸 2011 年 11 月 17 日～19 日
18. 若杉光生、佐々木琢磨、猪部学、岩淵邦芳、松永司：休止期細胞におけるヌクレオチド除去修復に依存した二重鎖切断の生成と ATM シグナリング経路の活性化 日本放射線影響学会第 54 回大会 神戸 2011 年 11 月 17 日～19 日
19. 橋本優実、Kamdar R.P.、松井理、橋本光正、松本義久、岩淵邦芳：XRCC4 のアポト
- ーシスにおける役割 日本放射線影響学会第 54 回大会 神戸 2011 年 11 月 17 日～19 日
20. 橋本光正、松井理、橋本優実、立石智、岩淵邦芳：テロメア-テロメア結合における 53BP1、Rad18 の機能解析 日本放射線影響学会第 54 回大会 神戸 2011 年 11 月 17 日～19 日
21. 掘田絵理香、岡田茜、宮野佳子、富松望、岩淵邦芳、Chen D.J.、栗政明弘：U2OS 細胞における DNA2 本鎖切断損傷フォーカスのライブイメージングとその動態 日本放射線影響学会第 54 回大会 神戸 2011 年 11 月 17 日～19 日
22. 栗政明弘、掘田絵理香、富松望、岩淵邦芳、Chen D.J.：U2OS 細胞における DNA2 本鎖切断損傷フォーカスのライブイメージングとその動態 第 70 回日本癌学会学術総会 名古屋 2011 年 10 月 3 日～5 日
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
岩淵 邦芳 (IWABUCHI, Kuniyoshi)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：10232696
- (2) 研究分担者
橋本 光正 (HASHIMOTO, Mitsumasa)
金沢医科大学・一般教育機構・准教授
研究者番号：70293975
- 石垣 靖人 (ISHIGAKI, Yasuhito)
金沢医科大学・総合医学研究所・准教授
研究者番号：20232275
- (3) 連携研究者
砂谷 優実 (SUNATANI, Yumi)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：70581057