

平成 2 6 年 6 月 1 1 日現在

機関番号 : 1 1 3 0 1

研究種目 : 基盤研究(C)

研究期間 : 2011 ~ 2013

課題番号 : 2 3 5 1 0 0 5 9

研究課題名 (和文) 2 つの新規ヒト A P エンドヌクレアーゼと新規ポリ A D P リボシル化酵素の機能

研究課題名 (英文) Characterization of the novel human AP endonuclease and poly-ADP-ribosyl transferase

研究代表者

菅野 新一郎 (Kanno, Shin-ichiro)

東北大学・加齢医学研究所・講師

研究者番号 : 1 0 4 0 0 4 1 7

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 4,200,000 円、(間接経費) 1,260,000 円

研究成果の概要 (和文) : ゲノムの安定性は DNA 修復機構とチェックポイント機構に支えられ維持されている。私たちは新規の DNA 修復酵素と考えられるショウジョウバエ CG1218 とそのヒト遺伝子 C4orf27 を見いだした。これらのタンパク質をクローニングしその性質を調べた結果、これらのタンパク質はレーザーで作った核ないの DNA 損傷部位に集積すること、また、AP endonuclease の活性があること、C4orf27 を免疫沈降したところ、PARP1 とヘテロダイマーを形成していることがわかった。また、siRNA でノックダウンした細胞は酸化ストレスに感受性を示すことから新規 DNA 修復酵素であることがわかった。

研究成果の概要 (英文) : The CYR motif was first identified in the repair protein, PALF (ALPF), and found in various proteins of DNA metabolism and DNA repair. We newly identified the CYR motif containing proteins, Drosophila CG1218 and its human ortholog C4orf27, which contained a conserved DUF2228 domain. We hypothesized that these proteins have DNA metabolism related functions. We isolated cDNA of CG1218 and human C4orf27, and characterized these proteins. Here we show that; 1) a CG1218 protein accumulates at DNA damaged site and human C4orf27 protein forms a hetero dimer with PARP1 and accumulates at DNA damaged site 2) CG1218 and C4orf27 possess endo/exonuclease activities against abasic site. 3) Suppression of the expression of C4orf27 using siRNA provided the cells with sensitivity to MMS, which produces methylated bases leading to single-strand breaks. These data suggest that DUF2228 protein CG1218-PA and C4orf27 play important role in the repair of DNA base damage and single-strand breaks.

研究分野 : 環境解析学

科研費の分科・細目 : 放射線・化学物質影響科学

キーワード : DNA 修復 AP エンドヌクレアーゼ

1. 研究開始当初の背景

ゲノムの安定性は様々な DNA 修復機構とチェックポイント機構により維持されている。DNA 損傷のうち二重鎖切断は最もゲノムを不安定化し細胞の老化やがん化に影響をあたえる損傷で、その修復機構とチェックポイント機構の詳細な解明は重要な課題である。

我々は FHA domain をもつタンパク質のバイオインフォマティクス解析から新規の DNA 修復酵素 PALF を発見し、また、アミノ酸配列の解析から新規の CYR domain (C2H2 type zinc finger) を発見した。CYR domain をもつタンパク質をデータベース上で調べると未知タンパク質を除くすべてのタンパク質が DNA 代謝酵素・修復酵素であった。CYR domain をもつ未知タンパク質としてショウジョウバエのタンパク質 CG-1218-PA を見いだしたが、さらに CG-1218-PA の配列からヒトオルソログ APNX (C4orf27) を同定した。APNX は線虫からヒトまでよく保存されたタンパク質で、ヒト APNX は CYR domain を欠損しているが、多くの種で CYR domain をもつことから新規の DNA 代謝酵素・修復酵素であると考えられた。

2. 研究の目的

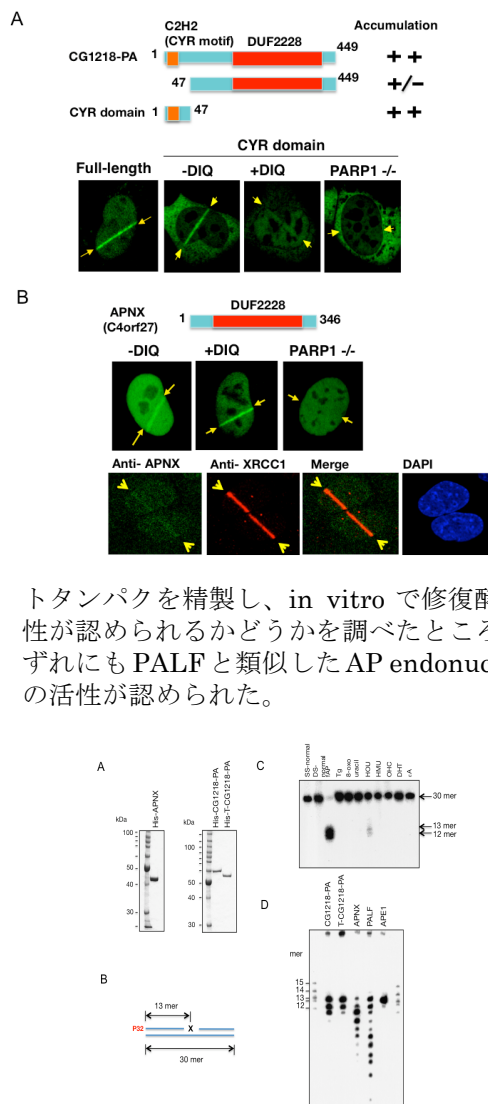
あらたに見いだされた CG-1218-PA とヒトオルソログ APNX (C4orf27) の生理機能をタンパク質レベルや細胞レベルで解明し、ゲノムの安定性に対する役割を明らかにする。

3. 研究の方法

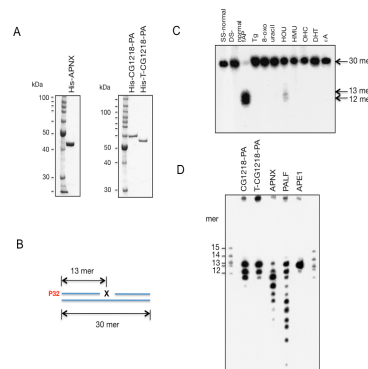
(1) CG-1218-PA、APNX をクローニングし、GFP-tag の細胞発現用ベクターを構築する。これを用いて GFP-タンパク質を作り細胞内に発現させ、*in situ* でレーザーを用いた実験系で DNA 損傷応答があるかどうかを調べる。
(2) CG-1218-PA、APNX のリコンビナントタンパク質を大腸菌で発現させ、精製し、*in vitro* で DNA 損傷オリゴを用いた assay 系で修復酵素活性やその他の活性が認められるかを検証する。
(3) Flag-APNX の安定発現細胞株を樹立し、免疫沈降と nano-LC/MS/MS を用いてプロテオーム解析を行い相互作用するタンパク質を同定し、その機能を解析する。
(4) APNX を siRNA を用いてノックダウンし、DNA 損傷薬剤に対する耐性および細胞周期に及ぼす影響を調べる。

4. 研究成果

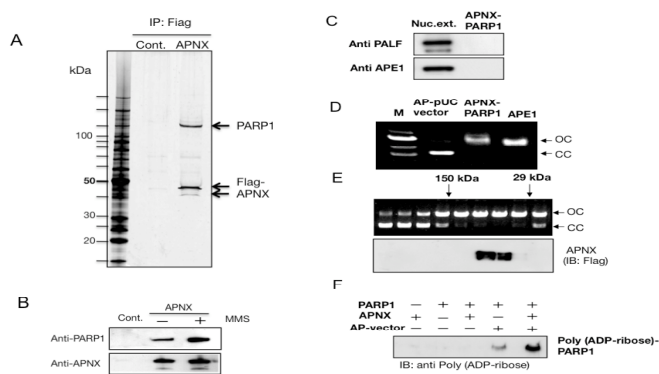
(1) GFP-CG1218-PA、GFP-APNX を作製し、細胞に導入後 *in situ* でレーザーを用いて細胞核内に DNA 損傷部位をつくり、集積を調べた。その結果 GFP-CG1218、GFP-APNX は DNA 損傷部位に DNA 損傷依存的にリクルートされ集積することが分った。
(2) CG-1218-PA、APNX のリコンビナント

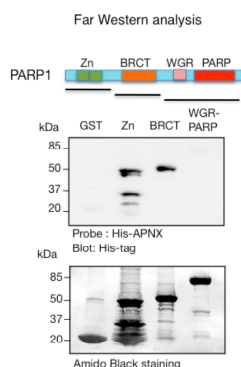


タンパク質を精製し、*in vitro* で修復酵素活性が認められるかどうかを調べたところ、いずれにも PALF と類似した AP endonuclease の活性が認められた。

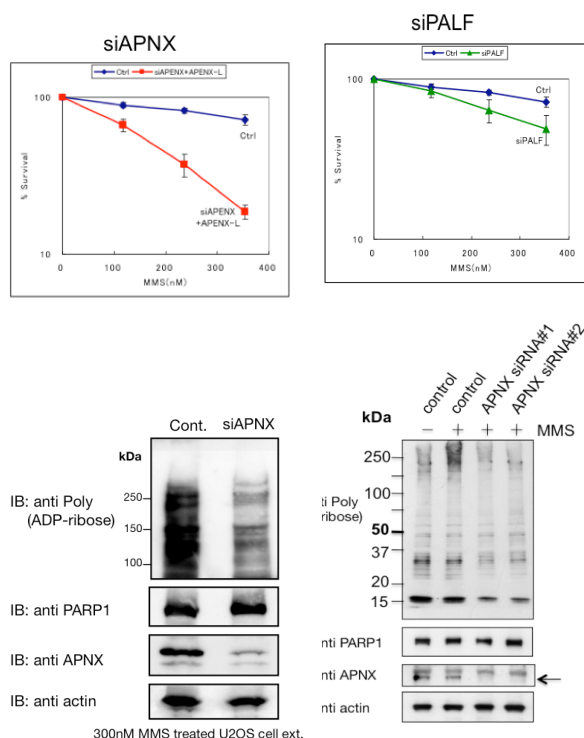


(3) Flag-APNX の安定発現細胞株を樹立し、免疫沈降と nanoLC/MS/MS を用いてプロテオーム解析を行った。その結果、(I) APNX は主に PARP1 とヘテロダイマーを形成している。(II) ゲル濾過カラムを用いて免疫沈降物を分離すると AP endonuclease 活性部位と APNX-PARP1 complex の溶出部位が一致する。(III) リコンビナントタンパク質を使った *in vitro* の実験で APNX は PARP1 を活性化することが示された。また、GST-PARP1 の欠損ミュータントと His-APNX を用いた Far Western analysis で APNX は PARP1 の N 端 (ZnF-BRCT) 部位に結合することが明らかになった。





(4) APNX の siRNA を用いてノックダウンし、DNA 損傷薬剤に対する耐性を調べたところ、X 線やブレオマイシンなどの DNA 二本鎖切断を引き起こす薬剤に対しては感受性にならなかったが、酸化損傷や DNA 一本鎖切断を引き起こす MMS に対して感受性を示すことがわかった。また、PARP1 とヘテロダイマーを形成していることから MMS による酸化損傷や DNA 一本鎖切断で活性化される PARP1 の活性を poly(ADP ribosil)鎖に対する抗体で調べた。その結果 APNX のノックダウンで PARP1 の活性化が著しく遅れ阻害されることが明らかになった。



以上 (1) ~ (4) の結果から、APNX は PARP1 とヘテロダイマーを形成し、PARP1 の相互作用タンパク質として酸化損傷や DNA 一本鎖切断で DNA 損傷部位にニックやギャップを導入して PARP1 の活性化を行うタンパク質で、まったく新しい DNA 修復酵素であることが明らかになった。

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 8 件)

(1) Matsuzawa A, Kanno S, Nakayama M, Mochiduki H, Wei L, Shimaoka T, Furukawa Y, Kato K, Shibata S, Yasui A, Ishioka C, and Chiba N. The BRCA1/BARD1-interacting protein OLA1 functions in centrosome regulation. *Molecular Cell*, 2014 53(1):101-14. doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.028.

(査読あり)

(2) Leizhen Wei, Satoshi Nakajima, Ching-Lung Hsieh, Shinichiro Kanno, Mitsuko Masutani, Arthur S. Levinel, Akira Yasui, Li Lan Damage response of XRCC1 at sites of DNA single strand breaks is regulated by phosphorylation and ubiquitination after degradation of poly (ADP) ribose *J. Cell Sci.* 2013, 126(Pt 19):4414-23. doi: 10.1242/jcs.128272. (査読あり)

(3) Tomoaki Nagai, Masanori Ikeda, Shuhei Chiba, Shin-ichiro Kanno and Kensaku Mizuno Furry promotes acetylation of microtubules in the mitotic spindle via inhibition of SIRT2 tubulin-deacetylase. *J Cell Sci.* 2013 126; 4369-80. doi: 10.1242/jcs.127209.

(査読あり)

(4) Go Itoh, Shiro Sugino, Masanori Ikeda, Mayumi Mizuguchi, Shin-ichiro Kanno, Mohammed A. Amin, Kenji Iemura, Akira Yasui, Toru Hirota and Kozo Tanaka, Nucleoporin Nup188 is required for chromosome alignment in mitosis. *Cancer Sci.* 2013 104(7), 871-9. doi: 10.1111/cas.12159. (査読あり)

(5) Zhang X, Horibata K, Saijo M, Ishigami C, Ukai A, Kanno S, Tahara H, Neilan EG, Honma M, Nohmi T, Yasui A, *Tanaka K, Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair. *Nat Genet.* 2012 May; 44(5): 593-7. doi: 10.1038/ng.2228.

(査読あり)

(6) Nomura H, Yoshimura A, Edo T, Kanno S, Tada S, Seki M, Yasui A, Enomoto T, WRNIP1 accumulates at laser light irradiated sites rapidly via its ubiquitin-binding zinc finger domain and independently from its ATPase domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 417(4): 1145-50. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.080. (査読あり)

(7) Li S, Kanno S, Watanabe R, Ogiwara H, Kohno T, Watanabe G, Yasui A, Lieber MR. Polynucleotide kinase and aprataxin-like forkhead-associated protein (PALF) acts as both a single-stranded DNA endonuclease and a single-stranded DNA 3' exonuclease and can participate in DNA end joining in a biochemical system. *J Biol Chem.* 2011; 286(42): 36368-77. doi: 10.1074/jbc.M111.287797. (査読あり)

(8) Itoh, G, Kanno, S, Uchida, K, S, K, Chiba, S, Sugino, S, Watanabe, K, Mizuno, K, Yasui, A, Hirota, T, and *Tanaka, K. CAMP(C13orf8, ZNF828) is a novel regulator of kinetochore-microtubule attachment. *EMBO J*, 2011; 30(1): 130-44. doi:10.1038/emboj.2010.276. (査読あり)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
東北大学加齢医学研究所ホームページ
http://www.idac.tohoku.ac.jp/ja/activities/research/Dyn_prot/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 新一郎 (Kanno Shin-ichiro)
東北大学・加齢医学研究所・講師
研究者番号 : 10400417

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :