

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510066

研究課題名(和文)非相同末端連結によるDNA二重鎖切断修復の新しい制御機構

研究課題名(英文)Analysis of a novel regulatory mechanism for DNA double-strand break repair by non-homologous end-joining

研究代表者

矢野 憲一 (YANO, Ken-ichi)

熊本大学・パルスパワー科学研究所・教授

研究者番号：70311230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：非相同末端連結(NHEJ)はヒトにおけるDNA二重鎖切断修復の主要機構であり、KuとXLFはそこで中心的な役割を担う因子である。一アミノ酸置換(R57G)を生じるXLF遺伝子変異は放射線高感受性遺伝病の原因となる。本研究ではKuタンパク質上のXLF相互作用部位を解析するとともに、Ku-XLF相互作用がイノシトール6リン酸によって増強されることを明らかにした。細胞内においてDSB部位へXLFの集積はKu依存적であるが、R57G変異を持つXLFであっても正常型と同様にDSB部位に集積した。しかし正常型では生じないユビキチン化が変異型XLFに生じており、病態発症との関連が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ku and XLF are essential factors for non-homologous end-joining (NHEJ) that is a major mechanism for DNA double-strand break repair. An R57G substitution in XLF protein has been identified in patients with hereditary hypersensitivity to ionizing radiation. In this study, we performed detailed analysis of the interaction between Ku and XLF and evaluated the effects of inositol-6-phosphate, which is known to augment NHEJ in cell-free systems, on the Ku-XLF interaction. Live cell imaging demonstrated that XLF protein with the R57G substitution (XLF R57G) localizes in nucleus and accumulates at sites of DNA damage, similar to wild-type XLF. Ubiquitination was detected in XLF R57G, but not in wild-type XLF, suggesting the causal relationship with hyper-radiosensitivity in patients harboring this mutation.

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：修復 DNA損傷 非相同末端連結 DNA二重鎖切断

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝情報を担うゲノム DNA は、細胞の内外に起因する様々な要因によって常に損傷を受けており、その速やかな修復は生体の恒常性維持に必須である。多様な形態の DNA 損傷が起こりうるが、その中でも DNA 二重鎖の完全な切断である DNA 二重鎖切断 (DNA double-strand break、以下 DSB) は重篤な DNA 損傷と考えられている。DSB の修復は主に相同組換えと非同相末端連結の二つのメカニズムによって行われ、ヒト細胞では相同組換えは細胞周期 S 期以降に機能するのに対し、非同相末端連結は細胞周期を通して機能している。

非同相末端連結 (Non-homologous end joining、以下 NHEJ) は二つの DNA 切断端の連結反応によって DSB を修復する。細胞内に生じた DSB の感知から連結反応までの一連の過程においては比較的少数の基本因子が中心的な役割を担っている。Ku は Ku70 と Ku80 から構成されるヘテロ二量体であり、ドーナツ型構造をとることで DSB に結合して他の NHEJ 基本因子を呼び込む役割を担っている。DNA-PKcs はキナーゼであり、Ku と DNA 依存的に相互作用することで DSB 部位に呼び込まれ、DNA-PKcs 自身を含む様々な基質をリン酸化することを介して NHEJ を制御している。XRCC4/DNA ligase IV 複合体は NHEJ において DNA リガーゼとして機能する。XLF は DNA ligase IV の酵素活性を促進する機能を持つ基本因子である。XLF は放射線高感受性のヒト遺伝病の研究から同定されており、その遺伝病患者には XLF 遺伝子の欠失のみならず、XLF の一アミノ酸置換を持つ場合が知られている。XLF は Ku、DNA-PKcs、XRCC4 と相互作用して DSB 上で複合体形成することで機能を発揮する。特に Ku と XLF の相互作用は DNA 末端の存在が必要であることから、DSB 上での NHEJ 複合体の形成に重要であると考えられており、Ku-XLF 相互作用のさらなる詳細な解析は重要な課題の一つである。

さらに無細胞系での研究から、イノシトール化合物の一種であるイノシトール 6 リン酸 (IP6) が Ku と結合し、NHEJ 反応の全体的な効率を促進することが報告されている。しかしながら IP6 が具体的に NHEJ 中のどの過程にどのように関与しているかは全く不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では DSB 上での NHEJ 基本因子群による複合体形成に重要であると考えられる Ku-XLF 複合体形成に着目し、その詳細と IP6 との関連を解析することを通して NHEJ を制御する分子機構に新たな知見をもたらすことを目的とする。また放射線高感受性遺伝病において見られる一アミノ酸置換を持つ XLF の機能解析を行い、XLF 一アミノ酸置換がなぜ NHEJ 不全につながるかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) プラスミド DNA の構築

XLF、Ku70、Ku80 の全長 cDNA を組み込み FLAG タグを付加した発現プラスミド DNA を作製した。また PCR による部位特異的変異導入法によってヒト遺伝病に見られる XLF の一アミノ酸置換を導入した発現プラスミド DNA も作製した。

### (2) タンパク質の発現と解析

プラスミド DNA はリポフェクション法によりヒト培養細胞へ一過的に導入してタンパク質を発現させた。タンパク質間相互作用は抗 FLAG 抗体による免疫沈降法を行い、その際に共沈されるタンパク質をウェスタンブロット法で調べることで解析した。

### (3) DNA 上での Ku-XLF 相互作用の解析

Ku と XLF の精製タンパク質は Histidine タグを付加して昆虫細胞中で各々発現させ、そこから抽出・精製した。精製タンパク質を用いたタンパク質間相互作用の解析は放射標識した DNA プローブを用いたゲルシフト法によって行った。

### (4) XLF のユビキチン化の解析

ヒト由来 XLF 欠損細胞に発現プラスミドを一過的に導入することで XLF を発現させた。その後、細胞をプロテアソーム阻害剤 MG132 等の薬物で一定時間処理し、細胞抽出液を調製し、ウェスタンブロット法で XLF タンパク質の性状を解析した。また HA タグを付加したユビキチンもしくは SUMO1 発現プラスミドを共発現させて同様の実験を実施した。

### (5) ライブイメージング解析

培養細胞に EGFP を付加した XLF を一過的に発現させた。ライブイメージングは倒立型共焦点蛍光顕微鏡に UV パルスレーザー照射装置を共役させ、顕微鏡観察中に視野内の特定部位に UV パルスレーザーを照射して DNA 損傷を誘導することができる実験装置を利用した。

## 4. 研究成果

### (1) Ku-XLF 相互作用の解析

Ku と XLF のタンパク質間相互作用は NHEJ 複合体形成に重要であると考えられることから、その詳細な解析を行った。Ku は Ku70 と Ku80 からなるヘテロ二量体であり、Ku70、Ku80 とともに N 末端から中央部にかけてのヘテロ二量体ドメインと、C 末端領域から成る。FLAG タグを付加した全長 Ku70 もしくは C 末端領域を欠く Ku70 を一過的に発現させ、免疫沈降法で回収し、内在性 XLF が共沈するかどうかをウェスタンブロット法で調べた。また同様の実験を Ku80 に関しても実施した。

その結果、Ku の二量体ドメインに XLF が結合することを確認した。

無細胞系を利用した研究から、NHEJ の反応が IP6 によって促進されることが報告されている。さらに IP6 は Ku に結合することが明らかとなっている。Ku は DSB や DNA-PKcs と相互作用することが知られているが、IP6 はそれらの相互作用に影響を及ぼさずに NHEJ を促進することが知られており、IP6 が NHEJ のどの過程に作用しているかは不明であった。そこで IP6 が Ku-XLF の相互作用に何らかの影響を与える可能性を検討した。ヒスチジンタグを付加した Ku を昆虫細胞中で発現し、Ku タンパク質を抽出・精製した。別に XLF タンパク質も同様にヒスチジンタグを付加して昆虫細胞中で発現し精製した。これらの精製タンパク質を用いて、放射標識した DNA 上における Ku-XLF 複合体形成をゲルシフト法にて解析した。その結果、IP6 存在下において DNA 上での Ku-XLF 複合体形成が促進されることが明らかとなり、IP6 による NHEJ 促進作用は Ku-XLF 相互作用を増強することを介したものである可能性が強く示唆された。

細胞内において IP6 は Inositol 1,3,4,5,6-Pentakisphosphate 2-Kinase と呼ばれる酵素によってイノシトール5リン酸から合成される。イノシトール5リン酸は主に Inositol polyphosphate multikinase と呼ばれる酵素により合成される。これら2つのイノシトール関連酵素が DSB 上において機能する可能性を検討するため、DSB 誘導に反応した細胞内挙動を示すかどうかを検討した。まずこれらの cDNA を取得し、それらに EGFP を付加した発現プラスミドを作製した。これらの発現プラスミドをヒト培養細胞中にトランスフェクトすることで一過的に EGFP タンパク質を発現させた。次に UV パルスレーザーを利用した手法によって、EGFP タンパク質を発現している細胞の核内の特定部位に DSB を誘発し、EGFP が付加されたイノシトール代謝酵素の細胞内動態を検討した。その結果、これらの酵素は DSB の有無に関係なく、一定の局在を示した。この観察結果は、これらのイノシトール関連酵素自体は DSB 部位に直接集まることなく、低分子化合物であるイノシトール代謝産物の拡散が NHEJ に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

(2) 放射線高感受性遺伝病にみられる一アミノ酸置換を持つ XLF タンパク質の細胞内局在と DSB への応答の解析

XLF は放射線高感受性遺伝病の研究から同定された NHEJ 基本因子である。この遺伝病には XLF タンパク質の一部もしくは全体の欠失につながる遺伝子変異が見られる場合が多いが、一部の患者に一アミノ酸置換を生じる遺伝子変異が知られている (R57G 変異)。EGFP を付加した正常型の XLF タンパク質 (XLF

WT) は核内に局在するのに対し、この一アミノ酸を持つ XLF タンパク質 (XLF R57G) に EGFP を付加すると細胞質に局在することが報告されていた。また精製タンパク質を用いた実験から、XLF R57G は正常型タンパク質と同等の DNA Ligase IV 活性化能を持つことが報告されており、もしも XLF R57G が核内に存在するのであれば、正常に機能することが想像された。そこでまずヒト培養細胞中で EGFP-XLF R57G を一過的に発現させ、核外タンパク質輸送の阻害剤である Leptomycin B で処理したところ、EGFP-XLF R57G を核内に局在させることができた。次に Leptomycin B 存在下で EGFP-XLF R57G が核内局在している細胞に対し UV パルスレーザーによる DSB 損傷を与え、EGFP-XLF R57G の挙動を観察したところ、EGFP-XLF R57G が DSB 部位に集積することを観察した。XLF の DSB 部位への集積には Ku の存在が必須であるが、XLF R57G も正常型と同様に C 末端領域に Ku との結合に必須な部位を保持していることから、XLF R57G も Ku との相互作用を介して DSB 部位に集積すると推察される。さらに R57G 変異体であっても正常型と同等の DNA ligase IV 活性化能を持つという報告と合わせて考えると、R57G 変異体は DSB 修復に関しては正常型と同等の機能を保持していると考えられた。

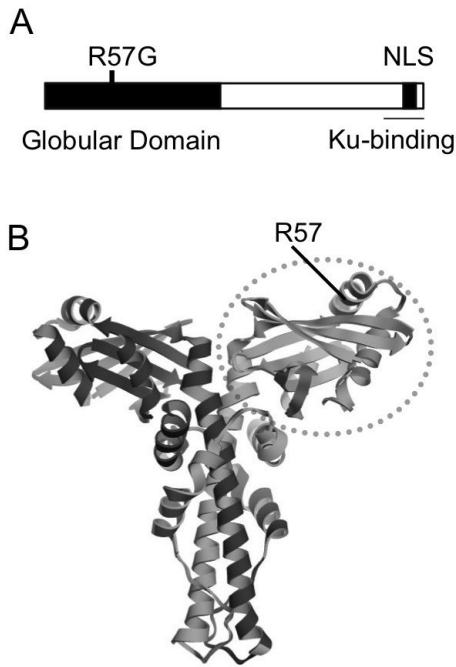
XLF R57G が細胞質に存在するという報告は、EGFP を付加したタンパク質を内在性の正常型 XLF が存在する細胞中で発現して行った解析に基づいている。そこでより小さなタグである FLAG を用いて免疫染色法で XLF R57G の細胞内局在を観察したところ、細胞質ではなく、正常型と同じく核内であった。さらに、内在性 XLF を持たない XLF 遺伝子を欠損するヒト培養細胞を入手することができたため、これを用いて EGFP-XLF R57G、FLAG-XLF R57G の細胞内局在を検討したところ、内在性の正常型 XLF が存在しない状況では XLF R57G は核内に局在することが判明した。以上の観察は、既に報告されている XLF R57G の細胞質局在という観察は内在性の正常型 XLF が存在する条件下での実験結果であり、ヒト遺伝病のように正常型 XLF が存在しない状況では XLF R57G は核内に存在することが強く示唆された。

#### 図 ヒト XLF タンパク質の構造

A. ヒト XLF タンパク質は 299 アミノ酸から成り、N 末端側に globular domain を持つ。放射線高感受性遺伝病患者にはこの領域中に一アミノ酸置換 (R57G) を持つものがある。C 末端側には核移行シグナル (NLS) ならびに Ku との結合に必須の領域が存在する。

#### B. ヒト XLF タンパク質の立体構造

XLF はホモ二量体を形成する。点線部分が globular domain であり、R57G 変異はこの領域に位置する。



(3) 放射線感受性遺伝病にみられる一アミノ酸置換を持つ XLF タンパク質の翻訳後修飾の解析

従来の報告とは異なり、XLF R57G が核内に存在することが強く示唆されたことから、この変異体による遺伝病発症のメカニズムはこれまでに唱えられてきたような XLF タンパク質の細胞内局在の異常ではなく、別の理由であることが考えられた。そこでより遺伝病患者の細胞に近い実験条件として、XLF R57G タンパク質をヒト由来 XLF 欠損細胞で発現させ、ウェスタンブロット法で検出することを試みた。その結果、正常型と同様の約 40 kDa のバンドに加えて、分子量の大きなシフトバンドが検出された。次に細胞をプロテアソーム阻害剤である MG132 や ALLN で処理してみるとこのシフトバンドのシグナル強度が増強された。また MG132 や ALLN 以外のプロテアーゼ阻害剤ではシフトバンドの増強は生じなかった。以上の観察からシフトバンドはユビキチンが XLF R57G に共有結合したために生じたと考えられた。

XLF R57G へのユビキチンの翻訳後修飾をさらに確認するために、HA タグを付加したユビキチンもしくは SUMO1 を XLF R57G と共に発現させると、ユビキチンを共発現した場合にのみ XLF R57G のシフトバンドのシグナルが増強され、シフトバンドがユビキチンが共有結合した XLF R57G であることが確認された。

続いて、同様の解析を正常型 XLF で実施したところ、MG132 処理や HA ユビキチンの共発現で正常型 XLF であってもシフトバンドが生じることは認められたが、そのシグナルは XLF R57G に比べて著しく弱く、正常な状態で

は XLF タンパク質のユビキチン化が生じることは稀であることが示された。よってこのユビキチン化は R57G 変異によって生じる病態と強く関連していると推定された。さらに解析を進めたところ、XLF R57G は正常型に比べて細胞内の存在量が低くユビキチン化を介して分解が促進されていることが推察された。さらに XLF R57G は正常型に比べてタンパク質の可溶性が著しく低下していることが判明した。

以上、XLF R57G に関してまとめると次のようになる。まずこれまでの研究から無細胞系において精製 XLF R57G は正常型と同等の DNA Ligase IV 活性促進能を持つことが知られていた。一方、EGFP タグを付加した XLF R57G は核内に局在することができないために放射線感受性遺伝病へつながると考えられていた。しかしこの観察は内在性の正常型 XLF が存在するという状況でのものであった。本研究で XLF 欠損ヒト細胞中で XLF R57G を発現させるという、より遺伝病患者の細胞に近い状態で解析を実施したところ、XLF R57G も核内に局在することが判明した。さらにライブイメージング法による解析から、正常型と同様に XLF R57G も DSB 部位に集積することが明らかとなった。DSB 部位への XLF の集積には Ku の存在が必須であることから、XLF R57G も Ku を介した DSB 部位への集積を起こすと考えられた。以上の結果は、XLF R57G も正常型と同様に核移行シグナルと Ku 相互作用部位を持つことから考えて妥当な結果といえる。一方、正常型ではほとんど生じることのないユビキチン化が XLF R57G に起こっており、これが病態発症の原因である可能性が強く示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Nanosecond pulsed electric fields induce poly(ADP-ribose) formation and non-apoptotic cell death in HeLa S3 cells.  
Ken-ichi Yano and Keiko Morotomi-Yano.  
 10th International Bioelectrics Symposium  
 Karlsruhe, Germany. 2013 年 9 月 17 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 憲一 (YANO, Ken-ichi)

熊本大学・パルスパワー科学研究所・教授  
 研究者番号：7 0 3 1 1 2 3 0