

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23510067

研究課題名(和文) 53BP1によるDNA二重鎖切断端の運動性亢進は、末端結合修復能を向上させるか

研究課題名(英文) Increasing DSB ends mobility with 53BP1 improve Non homologous end joining

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：1. 非保護テロメア端の末端結合修復と53BP1、Rad18の関係について調べた。53BP1-/-MEF、Rad18-/-MEF、野性株MEFを用いて非保護テロメア端の結合能を測定した。Rad18の関与は認められなかった。53BP1は大きな関与が認められた。

2. 非保護テロメア端の末端結合修復と細胞周期依存性について調べた。53BP1-/-MEFはRad18-/-MEF、野性株MEFと比較して、T-SCE(テロメア末端姉妹染色体分体組換)が高頻度で起こることがわかった。このことは、極めて相同性の高い部位における組換修復の機構を検討する上で重要な知見を与えてくれるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：53BP1 plays a key role in repair for DNA double strand breaks. 53BP1 binds ends of DSBs and facilitates rejoining of both ends. I and co-authors reported that (1) 53BP1 plays a role in a novel pathway distinct from the Ku-dependent and Artemis-dependent NHEJ (Non homologous end joining) pathways (Genes Cells, 11: 935, 2006). (2) RAD18 interacts with 53BP1 and is recruited to DSB sites in a 53BP1-dependent manner specifically during G1-phase. RAD18 monoubiquitinates 53BP1, consequently, enhances retention of 53BP1 at DSBs site (Nucleic Acids Res., 37: 2176, 2009). Depletion of TRF2 (one of shelterin components) arises dysfunctional and unprotected telomeres. Telomere deprotection activate ATM dependent DNA repair pathway and promote NHEJ. DNA repair proteins including 53BP1 recognize unprotected telomeres as DSBs. I investigated that the interaction between 53BP1 and Rad18 works in the rejoining of telomere ends.

研究分野：放射線生物学

キーワード：53BP1 Rad18 TRF2 DNA二重鎖切断 テロメア T-SCE

1. 研究開始当初の背景

53BP1 (Iwabuchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6098-6102, 1994) は、DNA 二重鎖切断が発生すると速やかにその断端に結合する。申請者は、遺伝子欠損を容易に導入できるニワトリ DT40 細胞を用いて、様々な遺伝子欠損細胞での G1 期の DNA 二重鎖切断修復活性を調べた。その結果、(1) G1 期には、既知の Ku70/Ku80/DNA-PKcs 経路 (下図の A 経路)、ATM/Artemis 経路 (下図の B 経路) とは異なる、53BP1 依存性の新規 DNA 二重鎖切断非同末端結合修復 (non-homologous end joining: NHEJ) 経路 (下図の C 経路: 53BP1 依存性経路) が存在すること (研究業績 8)、(2) 損傷乗り越え DNA 合成 (停止複製フォークや紫外線による損傷を S 期に修復する経路) に関する E3 ユビキチンリガーゼ Rad18 が、G1 期には 53BP1 依存性経路で機能していることを明らかにした: Rad18 は G1 期にのみ 53BP1 依存的に DNA 二重鎖切断端に集積し、その後 53BP1 をモノユビキチン化し 53BP1 のクロマチンへの結合能を高める (研究業績 1)。

一方 Dimitrova らは、繊維芽細胞でテロメア保護蛋白質である TRF2 を欠損させると、非保護 (deprotected) テロメアが DNA 二重鎖切断端様となり、NHEJ 蛋白質群により認識されて異なった染色体テロメア間でのテロメア-テロメア結合の原因となることを見出した。さらにこの結合の際には、二つのテロメアが近接するための染色体末端の運動性が必要であり、53BP1 を欠損させるとこの染色体末端運動性が低下しテロメア-テロメア結合の頻度が低下することを示した (Dimitrova et al., Nature 456: 524-528, 2008)。

以上の結果を考え合わせて申請者は、X 線照射による DNA 二重鎖切断の修復研究のモデルとして、TRF2 ノックダウン細胞を用いることを考えた。さらには申請者が見出した 53BP1 依存性経路の機能的本態は、切断端の運動性保持にあるのではないかと、Rad18 は 53BP1 のモノユビキチン化を介して切断端の運動性調節に関与しているのではないかと、という着想に至った。

2. 研究の目的

申請者は、DT40 細胞を用いて DNA 断端の運動性を観察する実験系の構築を目指したが、DT40 細胞の核自身の運動性のため失敗に終わった。そこで本研究では、original に近い実験系 (Deng et al., Nature 460: 914-918, 2009) を構築し、以下の点を明らかにする。

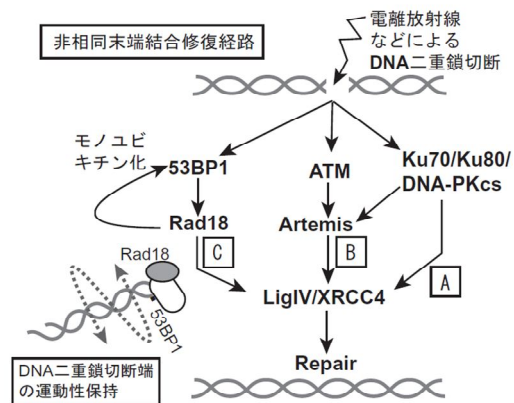
(1) 非保護テロメア端の運動性保持に 53BP1、Rad18 が必要であることを明らかにする。

非保護テロメア端の運動性を観察するための実験系の構築

53BP1^{-/-}-MEF (マウス胎児線維芽細胞)、Rad18^{-/-}-MEF を用いた非保護テロメア端運動性の検証

(2) 非保護テロメア端の運動性保持に必要な 53BP1 の機能ドメインを明らかにする。

(3) 非保護テロメア端の運動性保持における 53BP1 機能の調節機構を明らかにする。特に Rad18 による 53BP1 のモノユビキチン化が 53BP1 機能を調節しているかどうかに着目する。



3. 研究の方法

(1) 非保護テロメア端の運動性保持に 53BP1、Rad18 が必要であることを明らかにする。TRF1, TRF2 はテロメア結合蛋白質で、TRF2 をノックダウンするとテロメア端は非保護 (deprotected) となり DNA 二重鎖切断様構造となることが分かっている。不死化した MEF に、TRF2 に対する siRNA を導入する。経時的に染色体標本を作製し、染色体解析を CO-FISH (Telomere chromosome orientation-FISH) で行い、染色体が融合した細胞周期の時期と融合形式を明らかにする。

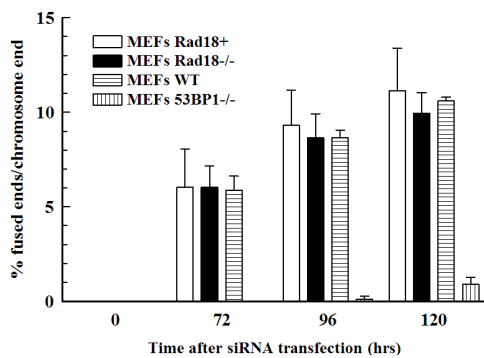
(2) 非保護テロメア端の運動性保持に必要な 53BP1 の機能ドメインを明らかにする。上述の実験で、53BP1^{-/-}-MEF に EGFP-TRF1 発現プラスミドを導入する際に、下図のような RFP-融合 53BP1 (野生型、および 53BP1 変異型 1,2,3) 発現プラスミドを同時に導入する。53BP1 の DNA 二重鎖切断端への集積能、53BP1 の BRCT ドメイン、53BP1 のリン酸化が、それぞれ非保護テロメア端の運動性保持に必須か否かを検証する。

4. 研究成果

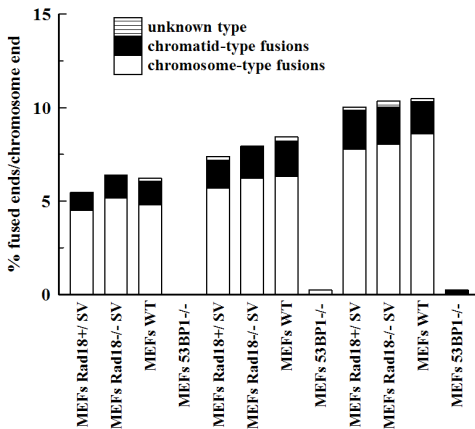
(1) 非保護テロメア端の末端結合修復と 53BP1、Rad18 の関係

実験系の構築について、染色体末端結合修復について、その結合の形式を定量的に評価する系を構築した。具体的には染色体末端保護タンパク TRF2 の siRNA を用いて染色体末端を露出した状態を誘導し、その末端の結合修復活性を Telomeric PNA FISH を用いて定量的に測定する系を構築した。

53BP1^{-/-}-MEF、Rad18^{-/-}-MEF、野性株 MEF を用いた非保護テロメア端の結合能について Rad18^{-/-}-MEF は野性株 MEF と同等の結合能を示した。53BP1^{-/-}-MEF の結合能は著しく低下することを示した。



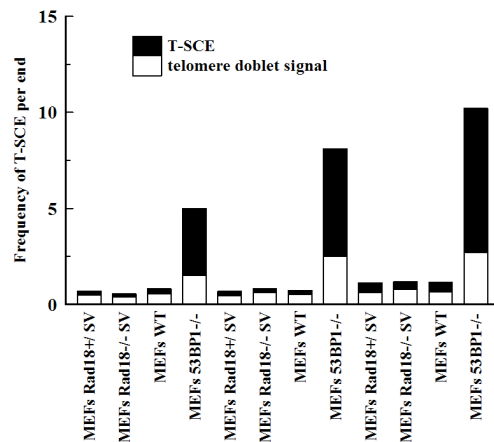
53BP1^{-/-}-MEF、Rad18^{-/-}-MEF、野性株 MEF を用いた非保護テロメア端の結合の形式 (chromosome type, chromatid type, それ以外) において、差は認められなかった。



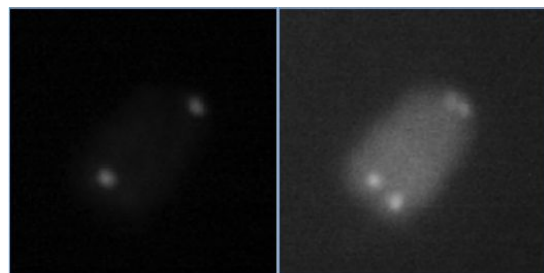
(2) 非保護テロメア端の末端結合修復と細胞周期依存性

Chromosome Orientation (CO)-FISH による末端結合の細胞周期依存性
CO-FISH を用いて、末端結合の細胞周期依存性を検討した。その結果、Rad18^{-/-}-MEF、野性株 MEF において、末端結合の約 80% は chromosome type、約 20% は chromatid type の結合であった。1 の結果と合せて Rad18 による末端結合の関与は認められないと考えられる。

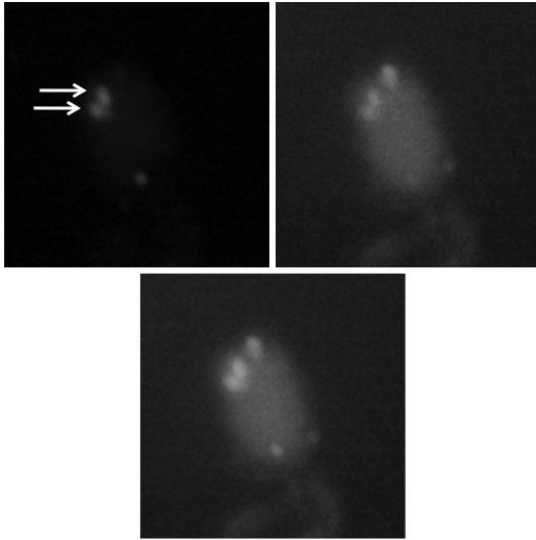
53BP1^{-/-}-MEF において、CO-FISH の結果から、Rad18^{-/-}-MEF、野性株 MEF と比較して、T-SCE (テロメア末端姉妹染色体分体組換) が高頻度に行われることがわかった。このことは、極めて相同性の高い部位における組換修復の機構を検討する上で重要な知見を与えてくれるものと考えられる。



53BP1^{-/-}-MEF において、CO-FISH の結果を詳細に検討すると、lagging strand と leading strand、lagging strand 同士、leading strand 同士の T-SCE に大差は認められなかった。このことから、T-SCE は細胞周期依存性はないと考えられる。

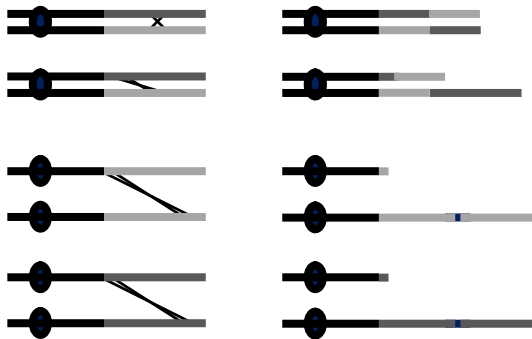


通常の染色体



ダブルレット型シグナルが観察された染色体

本研究で得られた知見を基に染色体末端融合と組換のモデルを検討すると、次のようになる。に示したような等分組換は観察されなかった。のような不均等組換が多くの割合を示した。



とに示したようなダブルレット型シグナルも高頻度に観察されたことから染色体末端の融合においては、不均等組換を経由した染色体末端融合の出現というパターンが高頻度に起こっていることを示唆している。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Hashimoto Mitsumasa

Analysis of the interaction between 53BP1 and Rad18 for telomere ends fusion
15th IUBMB-24th FAOBMB-TSBMB International Conference

2014 年 10 月 21 日～24 日

Taipei (台湾)

橋本光正

テロミ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

2012 年 9 月 8 日東北大学川内北キャンパス

(宮城県仙台市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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