

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310037

研究課題名(和文) ヒト細胞でのDNA単鎖切断の除去修復と相同組換え

研究課題名(英文) Cellular response to DNA single-strand break and its repair

研究代表者

安井 明 (YASUI, Akira)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60191110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト細胞内には種々のDNA損傷が多数生じるが、その中でも最も頻度が高いのはDNAの単鎖切断(SSB)であるが、SSBが細胞内で如何に修復されるかは未だ充分には理解されていない。我々はヒト細胞内でのSSBに結合するPARP1に結合しPARP1の活性化を制御する新規蛋白を複数同定した。一つの蛋白の発現をsiRNAで抑制するとMMSで処理したU2OS細胞でのポリADPリボシル化が抑えられ細胞はMMSに感受性になる。この遺伝子の組み換え蛋白を作って調べるとAPサイトの5'側にニックを入れ、さらに5'側及び3'側にExoヌクレアーゼの活性がある。この活性がSSBの修復に必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：DNA single-strand break is thought to be the most frequent type of DNA damage, but its significance in biological function and its repair within human cell remain to be determined. Here we identified genes involved in the regulation of SSB repair in human cell. One gene encodes a protein, which interacts directly with PARP1 within human cell. When its expression was suppressed with siRNA, poly(ADP-ribosyl)ation was decreased after treatment of cells with MMS and cellular resistance to MMS decreased. Its recombinant protein has an endonuclease against AP site as well as exonuclease to both 5' and 3' directions. These data suggest that while PARP1 is able to bind SSB, for its effective activation PARP1 requires gap produced by this protein. Further analysis is required to elucidate the importance of this protein in cellular survival and oncogenesis.

研究分野：DNA修復と分子生物学

キーワード：single-strand break DNA repair PARP1 Poly(ADP-ribosyl)ation MMS Homologous recombination

1. 研究開始当初の背景

DNA 単鎖切断 (SSB) は細胞の中で生じる最も頻度の高い DNA 損傷と考えられ、主に活性酸素による DNA の化学変化により生じるが、DNA 修復の途中の産物として生じる事も多い。SSB は修復されずに複製に到達すると複製の過程で二重鎖切断になる事から、複製の手前で修復する事が重要と考えられる。しかしながら SSB の修復の解析は殆ど進まなかった。その理由は、単鎖切断を特異的に細胞内に作る技術がなく、活性酸素による DNA 損傷も塩基損傷が SSB と同時に出来、SSB の細胞応答が塩基損傷のものとは区別出来なかった。また、SSB が生じた時に PARP1 が SSB に結合すると考えられているが、それで十分に PARP1 が活性化し、XRCC1 を中心とする種々の修復蛋白が集積するのかどうかは確かでない。また、塩基の損傷の際に、PARP1 の活性化がどれほど必要なのかも良くわかっていない。

2. 研究の目的

ヒト細胞内で SSB が生じた時にどのような反応が起きるかを細胞と分子のレベルで解明する。まず SSB が生じた時に PARP1 が SSB に結合する事が知られている。PARP1 の活性化に single-strand DNA が必要であると言う論文があるが、その為には SSB から gap を作る必要がある。それはどのように起きるのか。次に XRCC1 がポリ ADP リボース (PAR) に結合するが、PAR の分子は多数生じ、XRCC1 も沢山の分子が結合する。その XRCC1 に LIGASEIII や APTX あるいは Pol が結合して来る。これらの蛋白はどのように損傷部位にリクルートされるのか。XRCC1 と結合する LIGASEIII は最後に必要である。XRCC1 と LIGASEIII の相互作用はどのように働くか、などが疑問点で、XRCC1 はハブ蛋白としてどのように蛋白機能を制御するかが一般的で重要な問題点である。

3. 研究の方法

我々は以前に単鎖切断をヒト細胞の核内に局所的に作製する方法を開発した。その方法は、分裂酵母やノイロスポラなどにありヒト細胞には無い紫外線損傷の 5' 側にニックを入れ単鎖切断修復として紫外線損傷を取り除く UVDE 酵素をヒト細胞で紫外線損傷のヌクレオチド除去修復を欠損する XPA 細胞に発現させ、直径 2- μm ほどの小さな孔を多数作ったフィルターを通して紫外線を当てると局所的に出来た紫外線損傷を UVDE が切り局所的な単鎖切断が出来る。この箇所を集積する蛋白を拾えば純粋の単鎖切断の細胞応答蛋白が同定出来る。その集積の PARP1 依存性は PARP 阻害剤を加える事により見る事ができる。また、404nm のレ

ーザーを低い線量で照射すれば出来る損傷のほとんどが単鎖切断である事も分っている。これらの方法を組み合わせれば信憑性の高いデータを得られる。

ヒト細胞内の相互作用蛋白の同定は FLAG タグを付けたベイト蛋白をヒト 293 細胞のゲノムの特定のローカスに組み込ませて発現させ、細胞のエキストラクトを FLAG 抗体カラムに掛けてベイト蛋白への結合蛋白を集め、それを elute させてゲルに展開し認められる蛋白バンドを質量分析で同定する方法を採用した。見つかった蛋白を siRNA でノックダウンさせ、その生物学的影響を調べた。

4. 研究成果

1) ポリ ADP リボース依存的な XRCC1 の SSB 領域への集積は XRCC1 の BRCT1 ドメイン依存的に起き、直ちに起きる PARG によるポリ ADP リボースの解離により XRCC1 は LIGASEIII と単鎖切断に結合することが示唆された。PARG 無しでは XRCC1 は SSB に到着出来ない。しかし、ポリ ADP リボースにやって来た XRCC1 のどの分子が SSB に到着する様に決まるのかは分っていない。SSB への結合には BRCTIII ドメインが重要であり、そこに結合する LIGASEIII もその際に重要である。APTX や POLB 等の修復蛋白の集積は直ちに起きて SSB の修復が素早く起きる。これらの結果はポリ ADP リボース依存的な XRCC1 の SSB 領域への集積の次のステップは、ほぼ同時に開始される PARG によるポリ ADP リボースの破壊により可能になることが明らかになった。これらは siPARG による PARG のノックダウンと PARG の欠損細胞を用いて証明した (論文 2)

2) これまでに我々は局所的に SSB のみを作る方法を開発したが、今回局所的な塩基損傷の作製方法を開発した。これは Killer Red として知られている長波長の光を当てると活性酸素を作る多数の蛋白分子を細胞のゲノムの特定の位置に結合させて細胞全体に本来無害な可視光を当ててその位置に塩基損傷を特異的に産出する事に成功した。これまでの結果から、塩基損傷と単鎖切断 (SSB) の生成は細胞内のクロマチンの凝集レベルにより異なっており、ヘテロクロマチンでは SSB がより多く作られて PARP1 の集積が多い事が分った (論文 1)。

3) 細胞内には多くの RNA 結合蛋白がありこれらは機能の不明な事が多い。そのうち、GFP を結合させて解析するとレーザー照射部位に強く集積する hnRPU1 を同定した。この蛋白はアデノウイルスの early region 1B に結合する蛋白として知られており、RNA の代謝に関わっている。解析の結果この蛋白をノック

ダウンすると PARP1 の損傷部位への集積が強くなり、PARP1 の集積を抑える機能があり、それは同時に細胞死を抑えていることが分った。過剰な PARP1 の活性化は NAD の枯渇を生み細胞死に繋がる事を考えると、この蛋白や他の幾つかの RNA 結合タンパクは細胞内のエネルギーバランスを調整する役割がある事が示唆される(論文 3)。

4) 3) の蛋白質と正に逆の機能を持ち PARP1 に結合してその活性化に重要な役割を持つ新規蛋白質を同定した。この蛋白の発現を siRNA で抑制すると MMS で処理した U2OS 細胞でのポリ ADP リボシル化が抑えられ細胞は MMS に感受性になる。この遺伝子の組み換え蛋白を作ると AP サイトの 5' 側にニックを入れ、さらに 5' 側及び 3' 側に Exoヌクレアーゼの活性があることが分った。この活性が SSB の修復に必要であると考えられる(論文準備中)。

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 4 件)

1. Lan L, Nakajima S, Wei L, Sun L, Hsieh CL, Sobol RW, Bruchez M, Van Houten B, Yasui A, Levine AS. Novel method for site-specific induction of oxidative DNA damage reveals differences in recruitment of repair proteins to heterochromatin and euchromatin. *Nucleic Acids Res.* **42**, 2330-45, 2014. (査読有り)
2. Wei L, Nakajima S, Hsieh CL, Kanno S, Masutani M, Levine AS, Yasui A, and Lan L. Damage response of XRCC1 at sites of DNA single strand breaks is regulated by phosphorylation and ubiquitylation after degradation of poly(ADP-ribose). *J Cell Sci.* **126**, 4414-23, 2013. (査読有り)
3. Hong Z, Jiang J, Ma J, Dai S, Xu T, Li H, and Yasui A. The role of hnRPU1 involved in DNA damage response is related to PARP1. *PLoS One*, **8**, 2013. (査読有り)

4. Yasui A. Alternative excision repair pathways, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, 2013 (査読有り)

[学会発表](計 6 件)

1. Yasui A. SWI/SNF chromatin-remodeling factors required for both NHEJ and NER are frequently silenced in cancer cell. 5th Japan-US DNA repair meeting, October 28-31, 2014, Tokushima (Japan)
2. 安井 明 クロマチンリモデリングと DNA 修復の接点 日本放射線影響学会シンポジウム 2013年9月 青森県民ホール (青森県青森市)
3. Yasui A. Process of recovery from damage visualized in live state. Japan-US DNA repair meeting, April 13, 2013, Sendai (Japan)
4. Yasui A. DNA damage response of chromatin remodeling factors in human cell, 3rd Erling Seeberg Symposium June 19-24, 2012, Trondheim (Norway)
5. Yasui A. Chromatin-remodeling factors for cellular resistance to DNA damage. Symposium for replication, repair and transcription; Integrity coupling mechanisms and chromatin dynamics for genome. Feb. 4-5, 2014, Kyoto (Japan)
6. Yasui A., Repair and chromatin remodeling factors required for cellular resistance to radiation damage, 13th International Workshop on Radiation Damage to DNA, MIT, June 14-18, 2014. Boston (USA)

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.idac.tohoku.ac.jp/ja/activities/research/Dyn_prot/index.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安井 明 (YASUI, Akira)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60191110