

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510070

研究課題名(和文) 非相同末端結合におけるNBS1の分子機能と染色体不安定化のメカニズム

研究課題名(英文) Molecular function of NBS1 in non-homologous end joining and mechanisms of chromosome instability.

研究代表者

加藤 晃弘 (Kato, Akihiro)

京都大学・放射線生物研究センター・研究員

研究者番号：70423051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円

研究成果の概要(和文)：染色体不安定性症候群の一つであるナイミーヘン症候群の原因遺伝子産物NBS1は、電離放射線などによって生じたDNA二重鎖切断(DSB)に素早く応答し、染色体の不安定化や細胞の癌化、細胞死を防いでいる。その分子メカニズムについては不明な点が多く残されているが、本研究では、DSBの主要な修復経路の一つである非相同末端結合でNBS1タンパク質が機能していることを証明し、NBS1のある特定の領域がそれに特化した機能を担っていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Nijmegen breakage syndrome (NBS) is a member of chromosome instability syndromes. The responsible gene product of NBS, NBS1, quickly responds to DNA double strand breaks (DSBs) induced by ionizing radiation, and functions to prevent chromosome instability, carcinogenesis and cell death. However, molecular mechanisms of these functions remain largely unknown. In this study, we proved that NBS1 functions in non-homologous end joining (NHEJ), which is one of the major pathways of DSB repair. In addition, we also revealed that the specific region of NBS1 has a specialized function in NHEJ.

研究分野：DNA修復

キーワード：DNA修復 DNA二重鎖切断 放射線 NBS1

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の担い手である DNA は、生体外からの様々な刺激によって絶えず損傷を受けている。これらの損傷は DNA 修復機構と呼ばれる一連の細胞内メカニズムによって修復されることで遺伝情報の安定性が保たれている。DNA は二重らせん構造をとっており、これを構成する二本の鎖が両方とも切断される「DNA 二重鎖切断 (DSB)」は DNA 損傷の中で最も重篤な損傷であり、修復されなければ細胞は死んでしまい、誤った修復が行われると染色体異常やがんの原因にもなりうる。これまでの多くの研究から、ヒトを含めた多くの真核生物では DSB の修復は主に二つの経路で行われることが明らかとなっている。一方は組換え修復経路 (HR) と呼ばれ、もう一方は非相同末端結合経路 (NHEJ) と呼ばれる。NHEJ は誤りがちな修復経路として知られており、NHEJ の制御不良はしばしば染色体異常の原因となる。DNA 修復とともに重要な機能として、細胞は「DNA 損傷チェックポイント」と呼ばれるメカニズムを有している。増殖中の細胞は細胞分裂のために「細胞周期」と呼ばれる一連の過程を辿り、これを一周することで分裂を行っている。しかし、DNA 損傷をもったまま細胞周期を進行していくことは分裂の異常を引き起こす危険があるため、DNA 修復が完了するまで細胞周期を停止させる必要がある。この調整を行うのが DNA 損傷チェックポイント機構であり、この働きにより細胞周期が一時停止し DSB はきちんと修復される。これら DSB の発生によって活性化される一連の細胞内応答を DSB 応答と呼ぶ。ガンマ線や X 線などの電離放射線はその高いエネルギーで DSB を生じさせる。正常細胞では放射線照射によって DSB 応答が活性化し、DSB の修復が行われるが、DSB 応答で働く遺伝子が壊れている場合は DSB を十分に修復することができず、電離放射線に対して高感受性となる。

ナイミーヘン症候群は電離放射線高感受性と高発がん性を特徴とするまれな遺伝病であり、その原因遺伝子産物である NBS1 は DSB 応答で機能することがわかっている。NBS1 タンパク質の C 末端側には MRE11 タンパク質との結合ドメインが存在し、ここを介した MRE11 との結合が HR に必要であることがわかっていた。一方、NBS1 が NHEJ に必要であるかどうかは長年議論的であり、出芽酵母では必要とされるが、分裂酵母では必要でないと言われ、哺乳類ではどちら

なのか不明であった。しかし、最近細胞内での NHEJ の測定を行うレポーターアッセイ系が開発されたことで、NBS1 がヒト細胞において NHEJ に必要とされることがわかってきた。我々は NBS1 タンパク質の詳細な解析から、NHEJ に必要とされる機能ドメインを特定していた。しかしながら、このドメインが NHEJ でどのような機能を果たしているのか、また既知機能ドメインとの関係や放射線感受性との関係はどうなっているのかなど、多くの謎が残されていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DSB 応答タンパク質である NBS1 の機能解明により DSB 応答メカニズムの一端を明らかにすることである。具体的には、我々が最近発見した NBS1 の新規ドメインの機能を分子生物学的な手法により解析することで NHEJ における NBS1 の役割と分子レベルでの細胞内機能を明らかにし、ナイミーヘン症候群の特徴である放射線感受性や高発がん性あるいは染色体異常と新規機能ドメインとの関係、さらに既知機能ドメインとの関係を解明することである。

3. 研究の方法

新規ドメイン (以下ドメイン X と呼ぶ) が NHEJ に関与することを再確認するため、ナイミーヘン症候群患者細胞に NHEJ レポーターを組み込んだ細胞株を作製し、野生型 NBS1 とドメイン X 欠失 NBS1 を発現させた場合の NHEJ 効率を測定し比較した。また、別の方法でも確認するため、NHEJ レポーターを組み込んだ正常細胞で NBS1 タンパク質の発現を抑制し、その状態で野生型 NBS1 とドメイン X 欠失 NBS1 を発現させた場合の NHEJ 効率を比較検討した。

ドメイン X の機能解析のため、ドメイン X を欠いた NBS1 変異細胞株の作製を行った。細胞株の作製は、CRISPR-Cas9 による遺伝子ターゲティング法により行った。作製した細胞株の放射線照射後の生存率をコロニーアッセイ法により測定し、放射線感受性解析を行った。この細胞株における DSB 応答解析のため、DNA 損傷チェックポイント活性化の指標の一つである Chk2 タンパク質のリン酸化をウエスタンブロットングにより解析した。また、DSB への NBS1 タンパク質の集積について調べるため、免疫染色法により放射線照射後の NBS1 の局在変化を観察した。

分子間相互作用について解析するため、

FLAG 標識 NBS1 を 293E 細胞で発現させて細胞抽出液を調整し、免疫沈降法により NBS1 と相互作用するタンパク質の探索を行った。ドメイン X を介して相互作用するタンパク質があるかどうかを調べるため、野生型 NBS1 とドメイン X 欠失型 NBS1 とで同様の実験を行い、結果の比較を行った。ドメイン X の欠失により、DSB 応答に関わる既知の NBS1 相互作用タンパク質との結合に影響が見られるかどうか調べるため、免疫沈降-ウエスタンブロットングにより MRE11、RNF20、ATM との結合を解析した。また、既知の NHEJ タンパク質との相互作用について同様にウエスタンブロットングによって解析した。

4. 研究成果

まず、二種類の異なる NHEJ レポーター実験によりドメイン X が確かに NHEJ に関与することを示した。NBS1 が哺乳類細胞において NHEJ に必要とされるとする報告は数が限られているが、本研究の結果はその報告を支持する結果となった。

ドメイン X 欠失細胞株が樹立できたことで、この新規ドメインの欠失により引き起こされる細胞表現型の解析が可能となり、様々な機能解析が可能となった。作製したドメイン X 欠失 NBS1 変異細胞株は放射線に対して顕著な感受性を示した。ドメイン X の欠失は NHEJ による DSB 修復効率の低下をもたらすものの HR には影響を与えないため、この結果は NHEJ による DSB 修復欠損によって細胞死が引き起こされたことを示唆している。ナイミーヘン症候群は放射線高感受性を特徴の一つとするが、今回の研究結果からそれが NHEJ の機能欠損によりもたらされていることが明らかとなった。NHEJ の機能欠損は染色体不安定性の原因となるため、もう一つの特徴である高発がん性もこの機能欠損に起因する可能性が考えられる。

これまでの研究で、NBS1 と MRE11 との結合が DSB 修復に極めて重要であり、この結合ができないと放射線高感受性になることがわかっていたが、免疫沈降による解析ではドメイン X 欠失 NBS1 と MRE11 との結合は正常であった。それにもかかわらずドメイン X 欠失細胞は放射線感受性を示したことは、MRE11 との結合だけではなくこれまでに知られていない新たなメカニズムも DSB 修復において重要な役割を果たしていること物語っている。これは、DSB 応答における NBS1 の機能と分子間ネットワークを解明す

る上で重要な知見であり、既存モデルの再考を促すものである。さらに、RNF20 との結合、ATM との結合にも異常は認められず、放射線照射後の DSB への集積も正常であった。これら DSB 応答に参与する NBS1 の既知の機能がドメイン X の欠失によって影響を受けていないことから、ドメイン X は新たな機能ドメインであると結論づけられる。

ドメイン X が NHEJ に関与することから、NHEJ タンパク質がドメイン X に結合する可能性が考えられた。NHEJ には DNA-PKcs、KU70/80、XRCC4、DNA Ligase IV などのタンパク質が関与することが知られている。免疫沈降によりこれら既知の NHEJ タンパク質がドメイン X に結合するかどうか調べたが、どれも結果は陰性であった。FLAG 標識 NBS1 による NBS1 結合タンパク質の探索からは他の候補タンパク質が見つかっており、このタンパク質が NHEJ に関与するかどうか興味深い。

ドメイン X 欠失細胞は、放射線高感受性の他に、Chk2 のリン酸化レベルの顕著な低下を示した。この結果は、この細胞では DNA 損傷チェックポイントが正常に機能していない可能性を示している。Chk2 のリン酸化は ATM によって行われることから、ATM シグナル経路の一部に異常を来していることが予想される。今後の解析により ATM シグナル経路の解明にも貢献できることが期待される。

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 1 件)

- (1) Oliveira DV, Kato A, Nakamura K, Ikura T, Okada M, Kabayashi J, Yanagihara H, Saito Y, Tauchi H, Komatsu K
Histone chaperone FACT regulates homologous recombination by chromatin remodeling through interaction with RNF20.
J Cell Sci, 2014, vol. 127, p763-773
査読あり

[学会発表](計 9 件)

- (1) 小松賢志、加藤晃弘、柳原啓見、斎藤裕一朗、周慧、小林純也、相同組換え修復と損傷乗越え DNA 合成における NBS1 蛋白の役割、第 37 回日本分子生物学会年

- 会、2014年11月25日、パシフィコ横浜
(神奈川県、横浜市)
- (2) 小松賢志、加藤晃弘、柳原啓見、斎藤裕
一朗、周慧、小林純也、NBS1 蛋白 C 末
側ドメインと DNA 損傷応答における役
割、日本放射線影響学会第 57 回大会、
2014年10月1日、かごしま県民交流セ
ンター(鹿児島県、鹿児島市)
- (3) 加藤晃弘、柳原啓見、小松賢志、DNA 二
重鎖切断応答における NBS1 の新たな機
能、日本放射線影響学会第 57 回大会、
2014年10月1日-3日、かごしま県民交
流センター(鹿児島県、鹿児島市)
- (4) A Kato, H Yanagihara, J Kobayashi, Y
Saito, D Oliveira, C Weemaes, and K
Komatsu, NBS1 plays a role in UV
damage response through physical
interaction with RAD18. ZING
Conferences DNA Polymerases, 2014年
8月31日-9月3日、ケンブリッジ(イギ
リス)
- (5) A Kato and K Komatsu, Connection
between MRN complex and RAD51 in
homologous recombination.
Mechanisms of Recombination: 50th
Anniversary Meeting of the Holliday
Model, 2014年5月19日-23日、アリカ
ンテ(スペイン)
- (6) A Kato, H Yanagihara, J Kobayashi, Y
saito, D Oliveira, C Weemaes and K
Komatsu, NBS1 plays a role in UV
damage response through physical
interaction with RAD18. International
Symposium on Xeroderma
Pigmentosum and Related Diseases:
Disorders of DNA Damage Response –
Bench to Bedside, 2014年3月5日-7日、
神戸国際会議場(兵庫県、神戸市)
- (7) A Kato, H Yanagihara, K Komatsu,
Distinct domains of NBS1 separately
function in IR- and UV-damage
response. EMBO Conference The DNA
damage response in cell physiology and
disease, 2013年10月7日-11日、Cape
Sounio(ギリシャ)
- (8) 加藤晃弘、小松賢志、MRN 複合体と
RAD51 の物理的・機能的相互作用の解析、
第 70 回日本癌学会学術総会、2012年10
月5日、名古屋国際会議場(愛知県、名
古屋市)
- (9) Akihiro Kato, Kyosuke Nakamura,
Junya Kobayashi, Hiromi Yanagihara,

Shuichi Sakamoto, Hiroshi Tauchi,
Satoshi Tashiro, Lee Zou, Kenshi
Komatsu, RNF20-dependent H2B
ubiquitination modulates repair of
DNA double-strand breaks by
homologous recombination. 日本放射線
影響学会第 55 回大会、2012年9月8日、
東北大学(宮城県、仙台市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 晃弘 (KATO AKIHIRO)

京都大学・放射線生物研究センター
研究員

研究者番号：70423051