

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651046

研究課題名(和文) DNA損傷シグナルの視覚化モジュールの作製の試み

研究課題名(英文) The construction of a module to visualize DNA damage signaling in live cells

研究代表者

古谷 寛治 (Furuya, Kanji)

京都大学・放射線生物研究センター・講師

研究者番号：90455204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：DNAチェックポイント機構は放射線等により生じたDNA損傷を検出すると活性化する細胞内シグナル伝達機構である。チェックポイント機構は発がんの抑制にも深く関わる事から、その活性化の有無を検出するツールの作製が強く望まれる。本研究課題ではチェックポイント機構の発動した細胞を生きのまま検出可能とするモジュールの作製に挑戦した。具体的にはDNA複製の異常を感知するチェックポイント機構が発動すると核の外へ蛍光タンパク質が排出されるように仕組んだモジュールを作製した。このツールを更に鋭敏な者に改良する事で生きのまま個体のなかでチェックポイント機構の発動がモニター可能になる事を期待している。

研究成果の概要(英文)：DNA checkpoint mechanism is activated when cells receive the DNA damage stress that arose from gamma-ray exposure. Not only the DNA damage responsive signaling cascade, DNA damage checkpoint could act as anti-tumour mechanism to protect us from cancer. Thus to detect which cells activate DNA checkpoint could help detect precancerous cells. Here we tackled to construct the module to detect checkpoint activation in live cells. We constructed the GFP-tagged peptide to express in the cells, and the module translocate outside the nucleus upon DNA replicative stress. Now we are modifying the module to make it more clear response so that we could apply to monitor checkpoint activated cells in live organism.

研究分野：分子生物

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：蛍光タンパク質 チェックポイント 細胞周期 ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

放射線等により DNA 損傷を受けた細胞は細胞分裂を一旦停止させ、その修復を待つ。この停止時期をチェックポイントと呼び、停止機構全体を DNA チェックポイント機構と呼ぶ。DNA チェックポイント機構はリン酸化を介した細胞内シグナル伝達機構であり、ゲノム不安定性の生じた細胞を排除する事から、発がんの抑制にも重要な役割をもつ事が明らかとなっている。したがってチェックポイント機構の活性化をモニター可能とする技術は非常に有用であり、とりわけ生きた細胞内でその活性の有無を検出するツールの作製はチェックポイント研究を大きく推進すると考えた。

申請者はこれまでにチェックポイント機構の活性制御を、リン酸化制御を中心に解析して来た。その過程でリン酸化依存的に Rad9 と Cut5 の二つのチェックポイントタンパク質が結合する事、また、その結合がチェックポイント発動時にのみ見られる事を見出した。そこで、この二つのタンパク質の結合を蛍光でモニター可能とする系の確立を試みる、という考えに至った。

2. 研究の目的

DNA チェックポイント機構は DNA 損傷を速やかに検出し発動する細胞内シグナル伝達機構である。ATR, ATM, Chk1, Chk2 といった複数のキナーゼを介したリン酸化に依存したシグナル伝達機構であり、その発動と共に細胞周期停止を引き起こす。高等生物においては細胞周期停止の制御を行なうだけでなく、老化、といった恒久的な細胞増殖停止や細胞死を引き起こすことで過剰な損傷を受けた細胞等を排除する。この様にチェックポイント機構は多様な応答を誘導するため、従来の分子生物学的手法のように細胞集団をまとめてウエスタンブロットティング等の手法で解析しては個々の細胞応答を区別する事ができない。一つ一つの細胞の中でのチェックポイント活性をモニターし、さらにそれらの細胞運命を追尾できるようなシステムを確立する事のみチェックポイント活性化の程度と細胞運命との相関関係を論じる事が出来る。

本研究課題では Rad9 タンパク質と Cut5 タンパク質というチェックポイントが発動した際に結合するタンパク質相互作用を利用した蛍光モジュールの作製を試みる。Rad9 タンパク質と Cut5 タンパク質の結合はチェックポイントキナーゼである、ATR と ATM キナーゼに依存したリン酸化に依存しており、Rad9-Cut5 間相互作用の程度の強さは細胞内 ATR/ATM キナーゼ活性とみなして良いと考えた。

3. 研究の方法

本研究課題では実際には二通りの手法をとった。

(Rad9-Cut5 タンパク質相互作用を利用した BiFc 法による蛍光検出)

前述の通り、Rad9 タンパク質と Cut5 タンパク質の相互作用は γ 線などの DNA 切断 (DNA 損傷) やヒドロキシウレアという DNA 複製阻害を引き起こす薬剤 (DNA 複製停止) により細胞がストレスを受けた際に、その相互作用が強くなる。二分子蛍光補完法では、二つのタンパク質が相互作用した際にのみ蛍光タンパクが成熟するように細工をする。具体的には蛍光タンパク質 GFP を N 末端部と C 末端部の二つに分け、C 末端部を Rad9 との融合遺伝子として、N 末端部を Cut5 との融合遺伝子として細胞内で発現させる。Rad9 と Cut5 が直接相互作用すると必然的にそれぞれに付加され発現する N 末端と C 末端の GFP 分子も近傍に来るため相互作用し、高確率で N 末端と C 末端が合わさった GFP 分子が形成される。従って、Rad9 と Cut5 タンパク質が相互作用すると GFP による蛍光が検出される仕組みである。DNA 損傷・複製ストレスを受けた細胞では Rad9 と Cut5 の相互作用が増大する。即ち GFP による蛍光も増大するはずである。

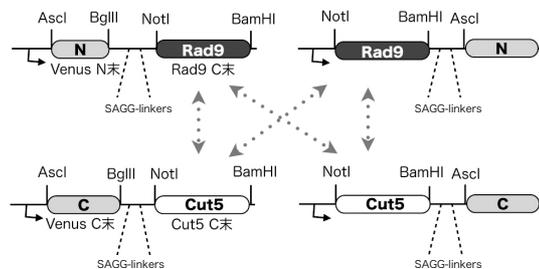
(リン酸化依存的な核内移行、核外移行のシステムを利用した蛍光プローブの作製)

DNA 損傷に応答して幾つかのタンパク質が細胞内局在を変える。これらの中にはチェックポイント機構のリン酸化酵素により直接リン酸化を受け、局在を変えるタンパク質がある。それらは Cop1 タンパク質と Cdc25 タンパク質であり、前者は ATM キナーゼに、後者は Chk2 キナーゼによりリン酸化を受ける事で核外に放出される。そこで本研究課題では Cop1 及び Cdc25 タンパク質の局在変化に必要な最小部分断片をクローニングし、GFP との融合遺伝子として発現させる。これによりチェックポイントが発動した細胞において蛍光が核外に検出されるはずである。

4. 研究成果

(Rad9-Cut5 タンパク質相互作用を利用した BiFc 法による蛍光検出)

下に示すようなプローブの作製を行なった。申請者はこれまで分裂酵母の Rad9 タンパク



質及び Cut5 タンパク質を用いて解析して来た。Rad9 タンパク質の C 末端部には ATR/ATM のリン酸化部位が二つ存在し、DNA 損傷・複製ストレスを受けた細胞内でそれらのリン酸化が増大する事をこれまで示して来た。ま

ストレスを与えない細胞に置いてても蛍光シグナルが観察され、また、発現レベルが高くなると Rad9 のリン酸化に依存しない蛍光が観察される為である。おそらくは BiFc の系は Rad9 及び Cut5 の発現量に影響を受けやすいためであろうと考えた。これは細胞種を変えたりする際に非常に不都合である。そこで発現変化に比較的頑強なシステムとして局在変化を利用するプローブの開発を試みた。具体的には、E3 リガーゼであり、ER 上で機能するが、普段は核内に局在しており、放射線を照射した細胞では核外へと排出される。Cop1 タンパク質の中央部分に NLS (核移行シグナル配列) と NES (核外排出シグナル配列) の二つが存在し、核移行シグナルの近傍に ATM キナーゼによりリン酸化を受ける部位が存在する。リン酸化依存的に 14-3-3 タンパク質が Cop1 に結合し、核移行シグナルが機能しなくなるため核外へと放出される。Cop1 部分断片に GFP を付加させ、骨肉腫由来のヒト培養細胞 U2OS にて発現させた。しかしながら、その発現は細胞に非常に毒性を与え、生育を著しく阻害したため有効な活用は出来ないと結論した。

さらに cdc25C 遺伝子も検討した。Cdc25 タンパク質はその N 末部分が制御ドメインとなっており、NLS と NES 配列が存在する。NLS 近傍配列に Chk2 によるリン酸化部位があり、これも 14-3-3 との相互作用を促進する事で核内移行を阻害する。Cdc25 断片を発現する細胞は比較的生育が良く、DNA 損傷を与えない細胞では核内にシグナルが観察出来た。複製ストレスを引き起こすヒドロキシウレアを添加した際にはほとんど変化は見られなかった。また、 γ 線を照射した際には一部の細胞で核外にシグナルが観察出来た。現在はリン酸化部位をアラニンに置換させ、リン酸化されないようにした変異遺伝子を発現させて観察している。また、リン酸化部位を ATM キナーゼの認識配列に置換させた変異遺伝子も作製中であり、より感受性の高いモジュールにするべく検討しているところである。

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 3 件)

Furuya, K., Aoki, K., & *Niki, H. (2012). Construction of an insertion marker collection of *Sz. japonicus* (IMACS) for genetic mapping & a fosmid library covering its genome. *Yeast* 29, 241-249.

Furuya, K., & *Niki, H. (2012) Hyphal differentiation induced via a DNA damage checkpoint-dependent pathway engaged in crosstalk with nutrient stress signaling in *Schizosaccharomyces japonicus*. *Curr Genet.* 2012 Dec;58(5-6):291-303

Okamoto S., Furuya K. (Equally Contributed First Author), Nozaki S., Aoki K., Niki H. (2013) Synchronous activation of cell division by light or temperature stimuli in the dimorphic yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. *Eukaryotic Cell*, Sep;12(9):1235-43.

[学会発表] (計 10 件)

古谷 寛治: 「チェックポイントタンパク質のダイナミクス制御」
遺伝研究集会「遺伝情報の安定性を支える分子メカニズム」2012 年 10 月 3-4 日、国立遺伝学研究所

古谷 寛治: 「チェックポイントタンパク質のダイナミクス制御」
日本分子生物学会年会、ワークショップ「染色体複製と核・細胞機能の接点」2012 年 12 月 13 日、九州大学

古谷 寛治 「DNA 修復・複製の連携役としてのチェックポイント機構とクロマチン制御の機能関連」
新学術領域 ゲノム普遍的制御 第 4 回領域班会議 2013 年 5 月 8-10 日 鳴門

古谷 寛治: 「チェックポイントタンパク質のダイナミクス制御」
遺伝研究集会「染色体 DNA の安定維持の分子メカニズム」2013 年 9 月 27-28 日、三島

古谷 寛治 「チェックポイントタンパク質 Rad9 のリン酸化による動態制御」
日本放射線影響学会第 56 回大会 2013 年 10 月 18-20 日 青森

古谷 寛治: 「Phosphorylation on Rad9 checkpoint clamp protein contributes to genomic stability」第 36 回日本分子生物学会年会、ワークショップ「DNA 複製開始制御とクロマチン構造変換の接点」2013 年 12 月 3-6 日、神戸

Kanji Furuya: “The regulation of chromatin binding of Rad9 via its phosphorylation”
International Symposium Kyoto, “Replication, repair and transcription: coupling mechanisms and chromatin dynamics for genome integrity” February, 4th and 5th, 2014, Kyoto

ポスター発表

Kanji Furuya: 「The dynamic behavior of checkpoint proteins」
The 8th 3R Symposium、25-28 November、Yumebutai, Awaji, Hyogo

Kanji Furuya, Yoshiharu Shiroiwa:
“Toward the reconstitution of dynamic
behavior of checkpoint clamp complex”
28th RBC-NIRS International Symposium,
“Radiation-Repair associated proteins
and the Repair Network” 29, 30 November,
COOP-INN Kyoto, Kyoto

古谷 寛治 「チェックポイントタンパク質
Rad9 のリン酸化による動態制御」
第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2013 年 11 月 20-22 日 仙台

〔図書〕(計 1 件)

古谷寛治、DNA 損傷部位上でのリン酸化フィードバック制御、生化学、2012 年、84 巻、第 7 号、551-555 項

〔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：
<http://house.rbc.kyoto-u.ac.jp/mutagenesis2/index2>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古谷 寛治 (FURUYA KANJI)
京都大学・放射線生物研究センター
研究者番号：90455204

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：