

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：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24687023

研究課題名(和文) DNA損傷の検出と修復の連携システムを担うリン酸化フィードバック制御の解明

研究課題名(英文) The investigation of the feedback regulation for interplay between DNA damage detection and repair

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) 21,200,000円

研究成果の概要(和文)：放射線等により私達の細胞のゲノムDNAが受けた損傷は、検出された後、修復される。DNA損傷の検出作業と修復作業は密接に連携する必要があるが、その詳細な分子制御機構はわかっていない。申請者は、細胞内のDNA損傷の検出機構であるチェックポイント機構に注目し、鍵と成る因子、Rad9タンパク質が受けるリン酸化修飾による制御機構がリン酸化という化学就職を介したフィードバック機構により制御を受けることに取り組んだ。精製システムにおいてRad9複合体と相互作用するRad17複合体とのATP依存的な結合を見出したほか、ヒトRad9タンパク質において負のフィードバック制御の分子詳細を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Ionizing irradiation and ultraviolets could alter genetic information by damaging genomic DNA. The damaged DNA should be detected and then repaired. For accurate and quick restoration of DNA information, DNA damage detection system and repair system must cooperate, however the underlying mechanism of that is still largely unknown. In this study, we focus on one of the checkpoint protein Rad9, and analyzed in order to understand the positive and negative feedback system that regulate Rad9 behavior from activation to inactivation, by phosphorylation. First, we constructed the in vitro reconstitution system to investigate the interaction between Rad9 complex and its loader complex to DNA damage site, Rad17 complex. The ATP dependent interaction is observed and suggested that ATP dependent conformational change govern the regulation. Furthermore we identified Pik1 as a negative regulator that phosphorylate human Rad9 orthologue.

研究分野：分子生物

キーワード：DNA損傷 チェックポイント DNA修復 放射線 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

細胞は常に DNA 損傷の危険にさらされている。ゲノム DNA の損傷を受けると、速やかにその損傷を“検出”する事で様々な損傷応答機構を発動する。同時にその損傷を“修復”する事でゲノム情報を元に戻す。これらの一連の作業はゲノムの安定維持のみならず、発がん抑制にも重要である。これらの DNA 損傷の検出機構と修復機構が DNA 損傷部位上で連携する必要があると考えられているが、その機構は分かっていない部分が多い。

DNA 検出機構のうちで重要な働きを担うのはチェックポイント機構である。ゲノム上の DNA 損傷を検出し、細胞周期の進行を特定の時期で一旦停止させる。障害が回復するのを待ち、続く分裂期進行を円滑に進めるために重要な役割を果たす。DNA チェックポイントの発動はキナーゼ複合体 (ATRIP 複合体) とクランプ複合体 (Rad9 複合体) の二つの複合体が別々の機構で DNA 損傷を検出する事から始まる。これら二つの複合体が DNA 損傷上で併さり、高次複合体を形成する。同時に、クランプ複合体がキナーゼ複合体の活性化を促し、リン酸化カスケードとしての DNA チェックポイントを発動する。

申請者はこれまでに、チェックポイントタンパク質を個別に解析して来た。Rad9 タンパク質 (クランプ複合体) が、段階的なリン酸化を受ける事で、DNA 損傷への結合から解離までが制御されている事を分裂酵母をモデル生物として用いることで見出して来た。段階的なリン酸化は Rad9 の活性をオン (DNA 損傷への結合) にすると自動的にオフ (DNA 損傷からの解離) の回路も働きだすフィードバック機構の存在を示すことを一連の解析から明らかにしてきた。これは同一タンパク質内で異なるリン酸化修飾がオンとオフの働きを担う極めて稀な例である。

興味深い事に ATRIP (キナーゼ複合体) も段階的なリン酸化制御を受けていることを示す結果を得た。ちなみに第一段階目のキナーゼは ATRIP 複合体に含まれる ATR キナーゼであるが、次段階のキナーゼはまだ同定できていない。ATRIP、および Rad9 がそれぞれ段階的なリン酸化制御を受けることで発動から不活化までが制御を受けると予想できた。

2. 研究の目的

Rad9 上で見られるリン酸化フィードバック制御は DNA 損傷をチェックポイント機構から修復機構への切り替えを促進する重要な制御と考えている。DNA チェックポイントには、効果的な DNA 損傷修復を促進する機能があり、その機能の破綻はゲノム不安定性をもたらし、発がんの原因となることがわかっている。その一方で DNA 損傷を直接修復する活性はなく、同様の様式で DNA 損傷部位を検出する Rad9、ATRIP あるいは修復因子である Rad52 などは状況に応じて共存する必要があると考えられる。同一の基質上におけるタンパク

質複合体の受け渡しは DNA 損傷応答のみならず、DNA 複製開始、転写制御、翻訳制御など核酸とタンパク質の反応全般に見られる機構であり、普遍的要素が高く、生物学的に意義があると考えている。

申請者らは Rad9 の最終段階のリン酸化が起こらないと DNA 損傷上に居残り、DNA 損傷修復等の他の活動を邪魔することを示す結果を報告してきた。本研究課題においてはこの知見をさらに発展させ、(i)試験管内での再構成系に挑戦し段階的なリン酸化の実現を目指し、(ii)制御因子の獲得を遺伝学的に試みることで普遍的な機構の解明に迫る。

3. 研究の方法

本申請課題は下記に示す 3 つの実験系に分けられる。これらを総合して進めることで DNA 損傷部位上での損傷検出機構の制御機構を明らかにすることを試みた。

(i) 試験管内再構成系の構築

組み換えタンパク質により Rad9 複合体及び、Rad17 複合体を単離し、DNA 損傷部位上へのローディングを目指した。Rad9 複合体は Rad1 及び Hus1 と共に環状ヘテロ三量体を構成し DNA 損傷部位を抱きかかえるようにして結合するクランプ機能を持つと考えられている。また、その環状構造を開環し、DNA 損傷基質へとロードするクランプローダーの役割を担うと考えられている。これら複合体は精製後、相互作用と DNA 基質との作用の検定を試みるためバイオセンサー法を用いた相互作用解析を行うことでそのダイナミクスを解析した。また、並行して ATR-ATRIP 複合体、また、ヒト Rad9 の研究から明らかとなった Plk1 タンパク質によるリン酸化反応の再構成も試みた。

(ii) フィードバック制御因子の遺伝学的手法による獲得の試み。

ATRIP もまた段階的なリン酸化制御を受ける。また、ATRIP はリン酸化酵素複合体であり、その制御もまた、チェックポイント機構の発動と不活化に重要な機能を持つと予想できた。分裂酵母の ATRIP タンパク質のドメイン解析を行う過程でリン酸化部位を含むアミノ末端部分の幾つかのアミノ酸に点変異を導入した際に DNA 複製阻害に対してのみ感受性を示すことを見出した。その一方でこのアミノ末端欠損遺伝子を分裂酵母内で大量発現した際には DNA 損傷を誘導するカンプトテシン (トポイソメラーゼ阻害剤) に対して感受性を示す興味深い表現系を示すことが明らかとなった。アミノ末端部の役割を明らかにするためこれらのヒドロキシウレアとカンプトテシン感受性を相補する遺伝子断片の獲得を目指すことで制御因子の同定を試みた。

4. 研究成果

(i)試験管内の再構成系の構築

当初は Rad9 複合体及び Rad17 複合体は大腸菌を系として用いることで精製を試みた。Rad9 はふたつのプロモーター配列を持つ単一のプラスミドから発現させ、Rad1 と Hus1 は内部翻訳開始配列を挟むことで異なるサブユニット間のコピー数のばらつきを抑えるようにした。また、rad17 に関しては二つのプラスミドから異なるプロモーターを用いることで五つのサブユニットをほぼ均等に発現させた。その後 Rad9 及び Rad17 のアミノ末端に付加させた GST タグを指標にタンパク質複合体を精製単離した。Rad9 及び、Rad17 複合体は精製できたものの、安定ではなく、精製途中で幾つかのサブユニットが落ちると共にすぐに凝集してグリセロール勾配遠心で沈殿してしまっ。そこで昆虫細胞での発現系へと移行した。

昆虫細胞での発現タンパク質はそれぞれ発現量は安定し、可溶性の画分として単離できた。また、サブユニット間の構成比も等 mol ずつ回収できた (Rad9 複合体に関して図 1 に示す)。しかしながらグリセロール勾配遠心時間が経つと共に沈殿し、また、非変性アクリルアミドゲルでの泳動度も非常に遅く、すぐに凝集体を作ってしまった。おそらくは複合体間での何かしらの相互作用があると思われた。

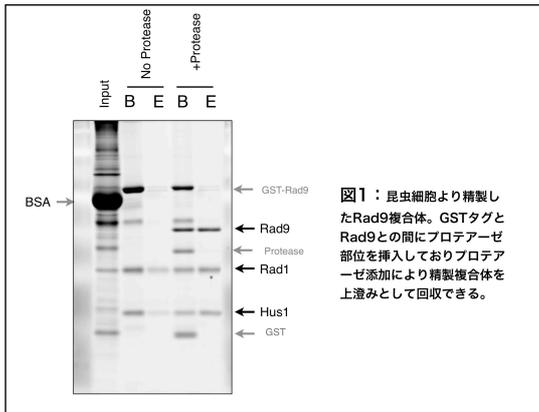


図 1 : 昆虫細胞より精製した Rad9 複合体。GST タグと Rad9 との間にプロテアーゼ部位を挿入しておりプロテアーゼ添加により精製複合体を上澄みとして回収できる。

それを解決するための手法としてブロッキング剤による非特異結合の緩和を検討した。BSA を高濃度に添加することで凝集作用を緩和することに成功した。また、原子間力顕微鏡等の邪魔にならないよう、低分子のブロッキング剤としてインシュリンも検討した。共に効率良く Rad9 複合体の凝集を抑え、非変

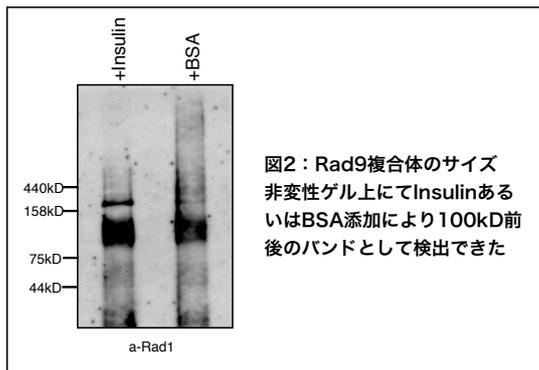


図 2 : Rad9 複合体のサイズ非変性ゲル上にて Insulin あるいは BSA 添加により 100kD 前後のバンドとして検出できた

性アクリルアミドゲル上で 100kD 前後のバンドとして検出することができた (図 2)。その一方で Rad17 複合体は等 mol ずつ各サブユニット因子の回収が可能となったものの、インシュリン、あるいは BSA の添加によっても凝集体の緩和ができなかった。Rad17 複合体の凝集の緩和ができなかったため、Rad17 複合体は GST-Rad17 の単離の際に用いる GSH-ビーズからの溶出を行わず、アガロースビーズに付着させたまま Rad9 複合体との相互作用を検討した。Rad17 複合体は ATP 分解活性を有するが、ATP あるいは加水分解が Rad9 複合体との結合にいるかどうかは結論が出ていない。Rad17 を

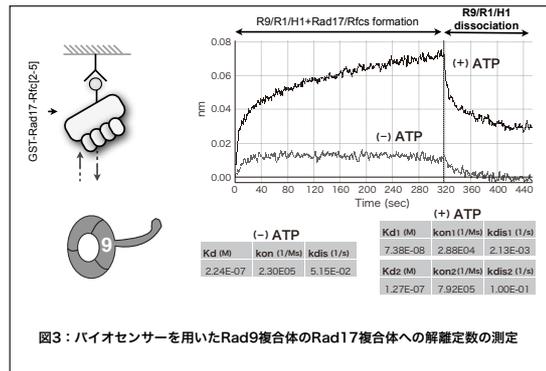


図 3 : バイオセンサーを用いた Rad9 複合体の Rad17 複合体への解離定数の測定

付加させたアガロースビーズに Rad9 複合体は ATP 非依存的に結合した。さらにより詳細な相互作用の変化を見るためバイオセンサー上に Rad17 複合体を付加し、Rad9 複合体の相互作用をセンサー上の光干渉の差によって検出する実験を行った (図 3)。興味深いことに ATP 存在下でも非存在下でも Rad9 複合体は Rad17 複合体と相互作用をしたものの Rad17 複合体に結合する Rad9 複合体の量は ATP 存在下の方が多かった。解離定数を算出したところ ATP 存在下では二つの解離定数が算出され、一方は ATP 非依存的に見られる解離定数 $1-2 \times 10^{-7}$ であり、もう一方は 7×10^{-8} と 2 倍程度低い値が出た。また、この低い値は速い結合 (k-on) と速い解離 (k-off) により構成されていた。ATP により Rad17 複合体の形が変わり Rad9 複合体と相互作用しやすくなるのかもしれない。並行して Rad9 タンパク質に対するリン酸化酵素の作用も検討した。我々の別の実験プロジェクトから Plk1 (ポロ様キナーゼ 1) というリン酸化酵素がヒト Rad9 のカルボキシル末端部に結合することを見出した。Plk1 はヒト Rad9 タンパク質の Thr292 番のリン酸化部位に依存して結合した。また、このリン酸化部位は我々が分裂酵母において見出した DNA 損傷部位からの解離のために必要なリン酸化部位と相同の位置にあり、配列も分裂酵母 Rad9 タンパク質の His-Ser-Ser-Thr-Pro、ヒト Rad9 タンパク質の His-Ser-Thr-Pro と非常によく似ている。Plk1 がヒト Rad9 において段階的リン酸化を担う可能性を検討するため Rad9 タンパク質断片を大腸菌にて発現、精製し、同じく大腸菌を用いて発現精製した

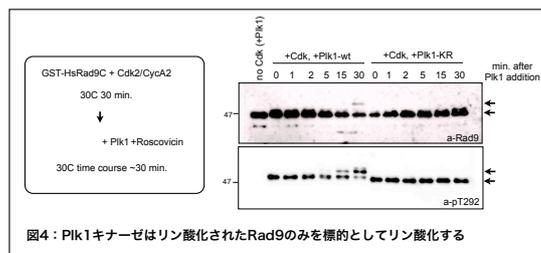


図4：Plk1キナーゼはリン酸化されたRad9のみを標的としてリン酸化する

組み換え Plk1 タンパク質とインキュベートした。この際にあらかじめ Cdk1-CyclinA により Rad9 タンパク質断片の Thr292 番残基をリン酸化しておいた。Plk1 は Cdk1 により予備的にリン酸化された Rad9 のみに結合することを試験管内の免疫沈降実験により明らかにした。Rad9-Plk1 の結合はリン酸化された Thr-292 を含むペプチドでのみコンペティションがかかったためリン酸化依存的に結合することを明らかにした。結合した Plk1 はさらなるリン酸化を Rad9 へと導入することがわかった (図 4)。このリン酸化部位は質量分析により解析同定した。ヒト Rad9 タンパク質に置ける Plk1 によるリン酸化部位は保存されている領域にあった。Rad9 は脊椎動物には体細胞型 (A 型) と減数分裂型 (B 型) の二種類存在する。興味深いことに Plk1 によるリン酸化部位は A 型においてのみ保存されており、B 型ではその部位は種間で保存度が非常に低い領域であった。この負のフィードバックと考えられるリン酸化部位は体細胞型の Rad9 のみで発達してきたものかもしれない。

(ii) 遺伝学的スクリーニング

並行して ATRIP のフィードバックを担う因子の同定を試みた。残念ながら当初期待していたフィードバック制御の根幹を担う因子は取れなかった。ただ、分裂酵母の ATRIP (Rad26) のヒドロキシウレア感受性を相補するクローンは幾つか同定できた。RNA 結合タンパク質である Byr3 が 3 クローン、また、他に cip1 (RNA 結合タンパク質)、cuf1 (転写因子)、pof8 (F-box タンパク質)、Arp8 (アクチン様タンパク質) がヒトクローンずつ単離された。もっとも相補能が強かったのは Byr3 であった。Byr3 は Zinc-finger のみにより構成される 400 アミノ酸程度のタンパク質である。神経変性疾患において凝集体を作るタンパク質として報告されているが、その詳細の機能はわかっていない。ストレスに応答して細胞増殖を支えることがわかっているものの、チェックポイント機構との関連も含めほとんどわかっていない。予備的ながらストレスがかかった細胞における細胞成長を促進する機能が示唆された。Byr3 を大量に発現した細胞は細胞サイズが大きくなった。このように新規の相互作用を見出すことができた。

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 1 件)

① Furuya, K., & *Niki, H., Hyphal differentiation induced via a DNA damage checkpoint-dependent pathway engaged in crosstalk with nutrient stress signaling in *Schizosaccharomyces japonicus*. *Curr Genet.* 2012, Vol. 58(5-6):291-303. (査読あり)

[学会発表] (計 13 件)

① 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」、遺伝研研究集会：遺伝情報の安定性を支える分子メカニズム、三島、2012 年 10 月 3-4 日

② Kanji Furuya, “The dynamic behavior of checkpoint proteins”, The 8th 3R Symposium, Awaji, 25-28 November

③ Kanji Furuya, Yoshiharu Shirowa: “Toward the reconstitution of dynamic behavior of checkpoint clamp complex” 28th RBC-NIRS International Symposium: Radiation-Repair associated proteins and the Repair Network, Kyoto, 29-30 November,

④ 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、博多、2012 年 12 月 13 日

⑤ 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」遺伝研研究集会：染色体 DNA の安定維持の分子メカニズム、三島 2013 年 9 月 27-28 日

⑥ 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、青森、2013 年 10 月 18-20 日

⑦ 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、仙台、2013 年 11 月 20-22 日

⑧ 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、神戸、2013 年 12 月 3-6 日

⑨ Kanji Furuya, “The regulation of chromatin binding of Rad9 via its phosphorylation” International Conference: Replication, repair and transcription; coupling mechanisms and chromatin dynamics for genome integrity,

Kyoto, February, 4th and 5th, 2014, (オーガナイザーとしても参画)

⑩古谷 寛治、「Phosphorylation on checkpoint protein Rad9 contribute to genomic stability」日本放射線影響学会 第57回大会、鹿児島、2014年10月1-3日

⑪ Kanji Furuya, “Cdk-Plk axis to destabilize a checkpoint protein Rad9” The 9th 3R symposium, Gotemba, 17th-21st November, 2014,

⑫郡司未佳、白岩義治、井倉毅、土生敏行、古谷寛治：「DNAチェックポイントタンパク質Rad9はPlk1依存的に分解を受ける」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、横浜、2014年11月25-27日、

⑬Kanji Furuya, “Cdk-Plk axis to destabilize a checkpoint protein Rad9” International Conference: The 4D nucleome 2014, Hiroshima, 17th-20th December, 2014

[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

放射線生物研究センター、HP;
<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、突然変異機構研究部門、細胞周期応答研究分野、講師

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：