

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710064

研究課題名(和文) 53BP1を介したアポトーシス細胞表層へのヌクレオソーム露出の機構と意義の解明

研究課題名(英文) Roles of 53BP1 in apoptosis

研究代表者

砂谷 優実 (SUNATANI, Yumi)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：70581057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：アポトーシス誘導因子p53の結合蛋白質である53BP1は、DNA二本鎖切断修復を誘導する機能が報告されているが、アポトーシスにおける機能は不明であった。本研究では、53BP1がアポトーシス時に生じたヌクレオソームを核から細胞表層へ露出させる機構を明らかにし、その生理的意義として、マクロファージによるアポトーシス細胞の積極的な排除の促進を見出した。さらに、53BP1依存的にアポトーシス細胞表層へ露出したヌクレオソームには、補体制御因子が結合したことから、53BP1がアポトーシスに陥った自己細胞の自己抗原化を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：53BP1 was identified as one of the binding proteins of apoptosis-inducer p53. It has been reported that 53BP1 is involved in DNA double-strand break repair. However the function of 53BP1 in apoptosis has remained to be understood. In this study, we revealed that 53BP1 is localized on the surface of an apoptotic cell via binding to modified histones. Furthermore, we found that downregulation of 53BP1 reduces elimination of apoptotic cells by macrophages, and binding of some of regulators for complement pathways to the surface of apoptotic cells. These data suggest novel roles of 53BP1 for the clearance of apoptotic cells.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

p53 binding protein 1 (以降 53BP1) はアポトーシス誘導因子 p53 の結合タンパク質として同定された核タンパク質である。これまでに、53BP1 の機能としては、DNA への損傷ストレスで生じた DNA 二本鎖切断端に出現するジメチル化ヒストンへの結合を介して、切断端を認識し、DNA の非相同末端再結合修復を誘導すること、および DNA 損傷時に細胞周期を調節することが報告されていた。すなわち、53BP1 は、DNA 損傷の修復、特に最も重篤な DNA 損傷として知られる DNA 二本鎖切断の認識・修復において、非常に重要な役割を果たしていることが、多くの研究により明らかにされていた。一方、53BP1 はアポトーシス誘導因子である p53 への結合性を有することから、アポトーシスにも関与することが予想された。しかしながら、アポトーシスにおける 53BP1 の機能に関する研究は、未だ報告されていなかった。

これまでに、DNA 損傷修復に携わるタンパク質のうち、アポトーシスにおいて、DNA 損傷修復とは全く異なる機能を発揮するものがいくつか報告されていた。例えば、53BP1 と同様に非相同末端再結合修復に働くことで知られている Ku70 が挙げられる。Ku70 は、核に多く存在する一方で細胞質にも存在し、p53 の下流で発現が誘導されるアポトーシス誘導因子である Bcl-2-associated X protein のミトコンドリアへの局在を抑制することで、アポトーシスの進行を制御する。また、DNA 二本鎖切断端の認識において、53BP1 と密接な関係にある DNA 損傷修復タンパク質である Breast cancer susceptibility gene 1 (以降 BRCA1) も、DNA 損傷修復とは別にアポトーシスの誘導に関与することが報告されている。すなわち、BRCA1 の局在が核内から細胞質に変化すると、がん細胞にアポトーシスが誘導されるといった現象も報告されていた。このように、同じく DNA 損傷修復タンパク質である 53BP1 も、DNA 損傷修復とは異なる機構に働いて、アポトーシスに関与する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

前述のような背景を受けて、申請者は、53BP1 がアポトーシスへ関与するかどうかの手がかりを探すべく、本研究開始以前に、アポトーシス細胞における 53BP1 の発現状態と局在を検出した。その結果、53BP1 は、アポトーシス特異的タンパク分解酵素であるカスパーゼによって切断されて、ジメチル化ヒストン結合領域を残す C 末端部分 (以降 C 末端断片) となること、アポトーシス細胞内で生じるヌクレオソーム単位の DNA 断片と共に、細胞表層に検出されることを見出した。さら

に、アポトーシス細胞表層への DNA 露出が 53BP1 依存性であるとの結果を得た。そこで、本研究では、53BP1 を介したアポトーシス細胞表層へのヌクレオソーム露出の分子機構とその生理的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アポトーシス細胞の調製

アポトーシスにおける 53BP1 の働きが DNA 損傷に依存するか否かを区別するために、DNA 損傷性および DNA 非損傷性の両方の薬剤を使い分けてアポトーシスを誘導した。DNA 損傷性アポトーシス誘導剤としてトポイソメラーゼ I 阻害剤であるカンプトテシンを、DNA 非損傷性アポトーシス誘導剤としてプロテインキナーゼ C 阻害剤であるスタウロsporin をそれぞれ用いた。細胞は、ヒト T リンパ球由来白血病細胞株 Jurkat 細胞あるいは Molt-4 細胞を用いた。リンパ球由来細胞株への遺伝子導入は、導入効率が低いことがしばしば問題となる。この問題を解決するために、エレクトロポレーター (Lonza 社) を用いて遺伝子導入を行った。この導入方法により、8 割以上の細胞へ遺伝子を導入できること、さらにそのほとんど全ての細胞が生存していることを確認した。これらの細胞を前述のアポトーシス誘導剤でそれぞれ処理してアポトーシス細胞として用いた。

(2) マクロファージの調製

ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞を、分化誘導剤であるホルボール-12-ミリストート-13-アセタートで処理することで、マクロファージ様細胞への分化を誘導し、マクロファージとして用いた。

(3) アポトーシス細胞表層へのタンパク質および DNA 結合解析

アポトーシス細胞表層に局在した 53BP1、DNA、あるいはヒストンを検出するために、細胞の固定および細胞膜の透過処理を行わずに、抗 53BP1 抗体、抗 DNA 抗体、あるいは抗ヒストン抗体を用いた蛍光抗体法を行った。また、internalization による抗体の細胞表層からの消失を防ぐために、全ての反応は氷温下にて行った。そして、蛍光顕微鏡下で検出し、細胞表層に 53BP1、DNA あるいはヒストンを露出した細胞数を計測し、それらの存在割合を数値化した。

補体成分は、アポトーシス細胞を精製補体添加培地で培養あるいはマクロファージと

共培養することで結合させた。細胞表面に結合した補体成分は、前述と同様に固定および膜透過処理を行わずに、補体に対する抗体を用いた蛍光抗体法を氷温下にて行い、蛍光顕微鏡下で検出し、補体が結合したアポトーシス細胞数を計測し、それらの存在割合を数値化した。

(4) マクロファージによるアポトーシス細胞貪食解析

マクロファージにアポトーシス細胞を追加して共培養し、マクロファージにアポトーシス細胞を取りこませた。その後、氷冷することで取り込み反応を停止させ、貪食されずに培養液中に残ったアポトーシス細胞を除去した。マクロファージおよび貪食されたアポトーシス細胞は、ヘマトキシリン染色にて可視化させ、明視野顕微鏡下で検出した。マクロファージに貪食されたアポトーシス細胞、およびアポトーシス細胞を貪食したマクロファージの数を計測し、貪食程度を数値化した。

4. 研究成果

(1) 53BP1 を介したアポトーシス細胞表面へのヌクレオソーム露出機構

アポトーシス細胞表面への 53BP1 依存的なヌクレオソーム露出機構を明らかにする一環として、53BP1 が核内から細胞表面へヌクレオソームを輸送する因子であると予想した。DNA 損傷時の 53BP1 は、DNA 切断端のジメチル化ヒストンに結合することが報告されている。また、DNA 損傷の有無にかかわらず、アポトーシスに陥った細胞の核内では、ゲノム DNA が DNA 分解酵素により短く切断されて、DNA およびヒストンからなるヌクレオソームが出現することがわかっている。そこで、DNA と共にアポトーシス細胞表面へ露出したヒストンを調べると、53BP1 との結合性が報告されているヒストンが DNA 損傷の有無にかかわらず検出された。この結果から、53BP1 は、DNA 損傷時だけでなく、アポトーシス時もクロマチンに結合しうることが考えられた。そして、53BP1 は、ヒストンとの結合を介して核内から細胞表面へヌクレオソームを輸送する因子であることが示唆された。しかしながら、53BP1 自身にモータータンパク質としての活性があるという報告はない。今後の課題として、53BP1 結合ヌクレオソームが核から細胞質へと移行する機構、および細胞膜付近に移行した 53BP1 結合ヌクレオソームが細胞内から細胞外へ露出する機構の詳細を明らかにしていく予定である。

(2) 53BP1 依存性ヌクレオソーム露出の生理的意義

アポトーシス細胞の積極的な排除：

アポトーシス細胞表面に露出した DNA に結合した補体は、マクロファージの貪食活性を促進することが報告されている。そこで、アポトーシス時の 53BP1 は、ヌクレオソームの露出を介して、補体によるマクロファージの貪食促進作用を支持することで、アポトーシス細胞を積極的に排除する役割を担うのではないかと予想した。そこで、アポトーシス細胞への補体の結合、それに続くマクロファージによるアポトーシス細胞貪食の程度を調べた。その結果、いずれにおいても、53BP1 依存性がみられた。これらの結果から、53BP1 を介したアポトーシス細胞表面へのヌクレオソーム露出には、補体に結合して、マクロファージによる貪食除去を促進させる効果があると考えられた。

アポトーシス細胞への自己免疫応答の抑制：

アポトーシス細胞など自己細胞を排除する際には、免疫細胞による自己への攻撃を抑制する機構が働く。近年、その機構の構成成分も、アポトーシス細胞表面の DNA およびヒストンに結合することが報告された。そこで、53BP1 を介してアポトーシス細胞表面に露出したヌクレオソームが、補体抑制機構を活性化し、アポトーシス細胞が自己抗原となるのを抑制しているのではないかと予想した。この予想を検証するために、アポトーシス細胞への補体制御因子の結合を調べると、53BP1 依存性がみられた。この結果から、53BP1 を介したアポトーシス細胞表面へのヌクレオソーム露出は、4.(2) で示したアポトーシス細胞の積極的排除のみならず、自己抗原化を抑制する機構でもあることが示唆された。現在では、この自己免疫抑制効果を確認させるために、53BP1 を介してヌクレオソームを露出したアポトーシス細胞を貪食したマクロファージでは、炎症の惹起が抑制されていることを検証している。

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 8 件)

松井 理, 砂谷 優実, 逆井 良, 橋本光正, 岩淵 邦芳: 53BP1 による p53 機能の制御, 日本放射線影響学会第 56 回大会(青森, 2013.10.18)

砂谷 優実, カムダール ラディカ パンカジ, シヤルマ ムケシュ クマール, 松井 理, 逆井 良, 橋本 光正, 松本 義久, 岩淵 邦芳: カスパーゼによる XRCC4 切断と XRCC4 による CAD の核内移行促進機構の解明, 日本放射線影響学会第 56 回大会(青森, 2013.10.18)

Matsui T, Sunatani Y, Hashimoto M, Iwabuchi K: Regulation of p21-mediated G1/S Checkpoint by 53BP1, The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology of Japan (Fukuoka, 2012.12.13)

Sunatani Y, Kamdar R. P, Sharma M. K, Matsui T, Hashimoto M, Matsumoto Y, Iwabuchi K: Mechanism of Apoptosis Induction via Regulation of ASAP Complex by XRCC4, The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (Fukuoka, 2012.12.11)

橋本 光正, 松井 理, 橋本 優実, 立石 智, 岩淵 邦芳: テロメ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(仙台, 2012.09.08)

松井 理, 橋本 優実, 橋本 光正, 岩淵 邦芳: 53BP1 による p53 機能の制御, 日本放射線影響学会第 55 回大会(仙台, 2012.09.08)

橋本 優実, Kamdar R.P, Sharma M. K, 松井 理, 橋本 光正, 松本 義久, 岩淵 邦芳: アポトーシスで生じた XRCC4N 未断片による DNA 非損傷性アポトーシスの制御機構, 日本放射線影響学会第 55 回大会(仙台, 2012.09.06)

橋本 優実, Kamdar R.P, Sharma M. K, 松井 理, 橋本 光正, 松本 義久, 岩淵 邦芳: DNA 二本鎖切断修復タンパク質 XRCC4 を介したアポトーシス制御機構の解明, 第 48 回金沢医科大学医学会学術集会(石川県内灘町, 2012.07.21)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

砂谷 優実 (SUNATANI, Yumi)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70581057