

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340036

研究課題名(和文) タンパク質相互作用による細胞内塩基除去修復の制御機構

研究課題名(英文) Regulation of the initiation of base excision repair by the protein-protein interactions

研究代表者

久保 喜平 (KUBO, KIHEI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：40117619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：増殖細胞に比べて、増殖停止MEFはMMS抵抗性だが、メチル化塩基除去能は低かった。BER関連タンパク質発現量とメチル化塩基除去効率との関係では、増殖停止MEFやPol $\beta$ 欠損MEFのAPEXタンパク質量は、WTより低く、MPG量およびPCNA量は、Pol $\beta$ 欠損細胞や増殖停止細胞で大きく低下していた。MPGと相互作用をする13のタンパク質を新たに同定した。このうち、MPGとRPA2との結合は、MMSによるDSB形成に伴って、減少した。DSB形成後のリン酸化により、MPGはRPA2と共局在し、DSBの発生に伴って、PI3K関連キナーゼの作用により解離することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The regulation of initiation of base excision repair (BER) by MPG was investigated using mouse embryonic fibroblasts (MEF). In growth-arrested MEF, the excision of MMS-induced methylated bases was greatly suppressed while the sensitivity was significantly lower as compared with growing cells. The APEX protein content was reduced in growth-arrested MEF or Pol $\beta$ -deficient MEFs. Furthermore, MPG was also decreased in these cells. After the immunoprecipitation with FLAG-tagged MPG, co-precipitated proteins were analyzed by LC/MS/MS and 13 novel proteins were identified. After MMS-treatment, the enhanced interactions with 7 proteins including MLH1, a DnaJ homolog protein and proteasome-related proteins were observed, while the interaction with 5 proteins including Hsc70 were unchanged. Reduced interaction of MPG with RPA2 and increased interaction with p53 suggest that the production of DSB as a result of BER altered protein interaction with MPG via activation of PIKK.

研究分野：放射線生物学

キーワード：塩基除去修復 DSB MPG PIKK RPA2 タンパク質相互作用 ノックダウン Pol beta

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の塩基除去修復 (BER) に関する諸タンパク遺伝子は次々にクローニングされ、それらの機能の解明も急速に進んでいる。従来、損傷認識は専ら特異的グリコシラーゼが行い、その後の脱塩基部位 (AP 部位) の除去、修復合成およびライゲーションという各ステップは共通した因子により修復が完了すると考えられてきた。最近、BER の各ステップは細胞周期制御系や転写因子などの種々の因子により精細な調節を受けている可能性が指摘され、また、グリコシラーゼも、BER の各ステップのタンパク質との相互作用による活性制御を受けるものや、細胞周期依存性に、核内への局在や活性の調節を受けるものが知られている。これらのことは BER における損傷認識がグリコシラーゼのみによる単純な機構に委ねられるのではないことを示唆する。メチル化塩基、ethenoadenine、oxanine、ヒポキサンチンなどを除去する MPG は、その細胞内分子数は 20 万程度と推定されるが、主要な基質に対するミカエリス定数 ( $K_m$ ) は大きく、非損傷 DNA との非特異的結合も知られている。AP 部位の 5'側を切断する AP endonuclease 1 (APE1) による MPG 活性増強が知られており、応募者らにより、BER の各ステップに関する DNA polymerase beta (*PolB*) や XRCC1 などにより活性化されることが明らかにされたが、これらタンパク因子は専ら MPG の産物からの解離 (turnover) を促進する。一方、MPG は PCNA との相互作用が報告されており、複製複合体と連動して DNA の検証を行っている可能性も考えられる。グリコシラーゼの産物である AP 部位は、突然変異や細胞死を引き起こし、時としてその毒性が塩基損傷を上回る重要な損傷である。応募者らは画期的な AP 部位の定量法である Aldehyde Reactive Probe (ARP) 法を開発し、その後の応用研究を通じて高い実用性を証明してきた。

精製タンパクを用いた再構成系や無細胞抽出液系を用いた知見は BER 機構の理解は大きく寄与しつつあるが、当然ながら、そこで得られた知見と実際に細胞核の中で起こっている事象の異動については、常に検証されなければならない。応募者らは細胞内 AP 部位の直接定量のために Fluorescein-conjugated Aldehyde Reactive Probe-1 (FARP-1) 法を新たに開発し、Flow cytometry 法による細胞内 AP 部位の直接定量法およびレーザーコンフォーカル顕微鏡による観察法と定量法を確立した。同法の活用により、*pol β* 欠損細胞では MPG の活性低下がみられ、*pol β* の欠損が BER の第一段階の抑制を引き起こすことを明らかにした。また、G1 期および S 期における BER の動態を明らかにした。さらに、これらの研究の過程で、MMS 処理細胞核内にフォーカス状の FARP-1 集積領域が観察された。以上のことから、GST-MPG によるプルダ

ウンや免疫共沈法を活用し、各種 BER 関連タンパク質ノックダウン細胞株を用いて、MPG と細胞内において相互作用する因子を明らかにすることにより、DNA メチル損傷の認識機構と MPG による BER の開始制御機構の関連を解明することが可能であるとの着想に至った。

### 2. 研究の目的

研究の目的は、以下のような疑問に答えて、BER 経路の初期過程に関する諸要素とこれらの制御機構について明らかにすることである。

(1) 定常状態 (非損傷誘発時) において MPG による BER の開始時にいかなるタンパク質因子が共存するか？

GST-MPG によるプルダウン法により、これまで GST-MPG と物理的相互作用をしているタンパク質として XRCC1、MBD1、PCNA を同定したが、驚いたことに、精製タンパク同士では、MPG の活性増強をもたらす APE1 との結合は観察されなかった。本研究では、さらに、FLAG-MPG を強制発現した細胞の抽出液を用いて、免疫共沈法によりその確認および新奇共沈タンパク質因子の検索を行った。

(2) 損傷誘発時における MPG による BER の開始は損傷認識機構による制御を受けているか？

定常状態では、MPG がクロマチンの特定領域に格納されている可能性が示唆されており、また、MPG を強制発現させると細胞のアルキル化剤感受性は著しく増大する。したがって、MPG の核内挙動は何らかの機序により制御されていると考えられている。DNA 損傷時、MPG-MBD1 複合体は解消され、MPG はメチル化および非メチル化プロモーターの双方に存在し、修復完了後に再び MBD1 と複合体を形成すると報告されている (Watanabe ら、2003)。ATM、ATR、HR23、p53 および p21 は、他の修復系と同様、BER の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、本研究では、これらの損傷応答性の諸因子と MPG との相互作用の有無を明らかにし、さらに、未知の関与因子を含めた制御系の全容の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 各種 BER タンパク質ノックダウン (KD) 株の作出のために、psiRNA-hH1GFPzeo に shRNA 配列を組み込み、マウス胎児線維芽細胞 (MEF) に導入した。Western blotting 法 (WB) により抑制効率を求め、血清飢餓法による細胞周期同調および増殖停止させた各種 KD-MEF の MMS 感受性と BER 能の比較検討を行った。

(2) MEF 内にて FLAG タグ付きマウス MPG の強制発現のためのシステムを、新たに作製

した。BER 関連タンパク質など MPG と共局在する可能性のあるタンパク質 ATM、ATR、p53、p21、HR23 (MPG と複合体を形成し、基質結合能を増強)および MBD1 についてはその特異的抗体を用いた Western blotting 法による検出を行った。

(3) BER 関連タンパク質など MPG と共局在する可能性のあるタンパク質についてはその特異的抗体を用いた Western blotting 法による検出を行った。また、これ以外のタンパク質については、免疫共沈法と質量分析 (LC MS/MS) 法により網羅的に同定を行った。

(4) 損傷誘発に伴い、細胞内で内在性 MPG および相互作用を確認するために、抗 MPG 抗体による IP により、上記の複合体形成に及ぼす影響を検討した。

(5) MPG の活性の測定および MMS 誘発メチル損傷修復動態も解析は、ARP 法により、BER 中間産物の解析はアルカリコメット法により行った。

#### 4. 研究成果

(1) 精製タンパク質を用いて、POLB による MPG 活性増強が認められたことに加えて、POLB による APE1 活性の増強も明らかにされ、MPG-APE1-POLB の 3 者間の相互作用が実証された。さらに、XRCC1 の共存により、MPG の活性がさらに増強されたことにより、これらを含む修復複合体の存在の可能性が示唆された。

(2) *PolB* 欠損 (*PolB*-KO) MEF と野生株 (WT) MEF のそれぞれの対数増殖期 (Log) と血清飢餓条件下 (G0) における MMS 処理後の各タンパク質の発現動態を解析した。その結果、*PolB*-KO MEF での *Apex* mRNA およびタンパク質の大幅な発現低下、MPG および PCNA タンパク質の減少が観察された。これは MMS 処理 *PolB*-KO 細胞において、BER 中間体の蓄積が見られないこと、WT 細胞に比べてメチル化塩基の切り出しが遅いことと一致する。細胞増殖の有無にかかわらず *PolB*-KO 細胞の MMS 感受性は高いことが示された。また、G0 細胞においては Log 細胞に比べて有意なメチル化塩基除去効率の低下が認められた一方、MMS 誘発細胞死にたいする明らかな抵抗性が観察された。このことより、MMS の致死作用は主として BER 中間産物によるところが大きく、特に S 期にある細胞では複製フォークの進行に伴って起こる DSB の形成によることが強く示唆される。

(3) *Fen1*-KD MEF では、ほぼ FEN1 タンパク質の発現が見られなかったが、MMS 感受性に及ぼす影響は限定的であった。さらに、

*PolB*-KO 下の long-patch 修復の寄与を、その必須酵素である *Fen1* をノックダウンした *PolB*-KO/*Fen1*-KD 細胞により検討した。得られた *Fen1*-KD 細胞および *PolB*-KO/*Fen1*-KD 細胞のいずれにおいても *Fen1* は検出されなかった。*Fen1*-KD 細胞では *PolB*-KO 細胞ほど顕著ではないが、MMS 感受性の有意な増加が観察された。一方、*PolB*-KO/*Fen1*-KD 細胞は、*PolB*-KO 細胞に比べていかなる MMS 感受性増加も示さなかった。*PolB*-KO 細胞では、BER 関連タンパク質の著しい低下があることから、MMS 後の生存のために POLB 非依存性の long-patch 修復の寄与は極めて小さいと考えられる。この結果は、コメットアッセイによる両者の BER 中間産物量にも差がなかったことと一致する。一方、*Apex* ノックダウン (*Apex*-KD) MEF は MMS 感受性の有意な増加が認められたが、*Apex*-KD/*PolB*-KO 細胞では最も高い *Apex* ノックダウンレベルが得られるとともに、より高い MMS 感受性が認められた。*PolB*-KO 細胞の MMS 生存率に及ぼす *Apex*-KD 効果は、主として *PolB*-KO 細胞の低濃度領域の MMS 抵抗性の消失として観察された。また、これらの細胞の MMS 感受性と H2AX 形成量は相関していた。したがって、APEX は、POLB 関与 BER におけるとは別個の機能を担っていることが考えられる。

(4) MMS 処理時の MPG の活性制御について検討するために、FLAG-MPG を MEF に強制発現し、MPG 複合体領域に集簇するタンパク因子の解析を行った。FLAG-MPG と共沈したタンパク質を SDS-PAGE ゲルより回収し、LC-MS/MS により解析した結果、13 種の新奇タンパク質を同定した。このうち DNAJA1、MLH1 やプロテアソーム関連因子を含む 7 種は MMS 処理後に FLAG-MPG との結合が増加し、HSC70、HSP9A を含む 5 種と FLAG-MPG との共沈には MMS 処理の影響が見られなかった。一方、MMS 処理により結合が減少したタンパク質は、既知の PCNA 以外に RPA2 のみが同定された。そこで、MMS 処理に伴う、HSC70、RPA2 に加えて、MPG との結合が知られている p53 および PCNA との結合の変化を調べた結果、MMS 濃度 (0.25 ~ 0.75 mM) 依存的に DSB 形成を示す H2AX が検出された。また、PCNA および RPA2 の共沈量は MMS 濃度に依存して減少し、p53 の共沈量は増加した。これらの MMS 依存性変化は、同レベルの H2AX の形成が起こる MMS 濃度で比較した場合、*PolB*-KO MEF では大きく減少した。

(5) アルキル化剤 (MMS) 処理後、FLAG-MPG および RPA2 の細胞内局在を検討した結果、FLAG-MPG の核内局在が、RPA2 のそれと異なることが明らかとなった。また、パラホルムアルデヒドによる FLAG-MPG と相互作用タンパク質の RPA2 の共沈が

FLAG-MPG との直接の相互作用に起因すると考えられる。以上の結果より、MPG による BER 開始の制御は、基質損傷の有無のみならず、細胞周期および DSB のようなより hierarchy の高い致死損傷の存在により活性化されると考えられる。特に、DSB が形成される状況にあっては、RPA2 が MPG との結合を解消し、DSB 修復のための機能を活性化すること、また、p53 タンパクと MPG との結合の増加が起こり、p53 の転写活性制御が促進されることが考えられる。これらの相互作用は PIKK ファミリーの ATM、ATR および DNA-PKcs による RPA2、p53 および MPG のリン酸化により制御されるものと考えられる。

## 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 5 件)

Yamamoto, M., Yamamoto, R., Takenaka, S., Matsuyama, S. and Kubo, K. Abundance of BER-related proteins depends on cell proliferation status and the presence of DNA polymerase beta. J. Radiat. Res., 査読有, 56(4), 607-614, 2015.

山本亮平、山本瑞希、久保喜平、マウス細胞におけるメチル化損傷に対する BER 機構について、放射線生物研究、査読有、50(1), 226-241, 2015.

Kawabe M, Baba Y, Tamai R, Yamamoto R, Komori M, Mori T, Takenaka S. Profiling of plasma metabolites in canine oral melanoma using gas chromatography-mass spectrometry. J Vet Med Sci. 査読有, 77(8): 1025-1028. 2015

Yamamoto, R., Umetsu, M., Yamamoto, M., Matsuyama, S., Takenaka, S., Ide, H. and Kubo, K. AP endonuclease knockdown enhances methyl methanesulfonate hypersensitivity of DNA polymerase beta knockout mouse embryonic fibroblasts. J. Radiat. Res., 査読有, 56(3), 462-466, 2015.

Yamamoto, R.\*, Ohshiro, Y., Shimotani, T., Yamamoto, M., Matsuyama, S., Ide, H., Kubo, K. Hypersensitivity of mouse NEIL1-knockdown cells to hydrogen peroxide during S phase. J. Radiat. Res., 査読有, 55, 707-712, 2014

[学会発表](計 11 件)

山本瑞樹、松山聡、久保喜平、山本亮平、竹中重雄、メチル化剤がマウス MPG の

物理的相互作用に及ぼす影響の検討 日本放射線影響学会ワークショップ、富山大学(富山県富山市)2015年10月16日~10月17日

中山裕美、山本亮平、松山聡、久保喜平、マウス胎児線維芽細胞における DNA polymerase beta knockout と AP endonuclease I knockdown のアルキル化損傷修復への影響 日本放射線影響学会ワークショップ、富山大学(富山県富山市)2015年10月16日~10月17日

Yamamoto, M., Yamamoto, R., Takenaka, S., Matsuyama, S. and Kubo, K. Abundance of BER-related proteins depends on cell proliferation status and the presence of DNA polymerase beta. 15<sup>th</sup> international congress of radiation research, Kyoto International Conference Center (Kyoto), May 25-May 29, 2015,

山本亮平、梅津万記大、松山聡、久保喜平、DNA polymerase beta knockout マウス胎児線維芽細胞における AP endonuclease knockdown によるメチル化剤感受性の変化、第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道大学(北海道札幌市)2014年9月9日~12日

山本瑞希、山本亮平、竹中重雄、松山聡、久保喜平 細胞の増殖状態および DNA polymerase beta (Pol beta) の存在が他の BER 関連タンパク量に与える影響、第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年北海道大学(北海道札幌市)2014年9月9日~12日

鈴木紘史、山本亮平、松山聡、久保喜平 マウス DNA polymerase beta knockout 細胞における Flap endonuclease 1 knockdown のアルキル化損傷修復への影響、第 157 回日本獣医学会学術集会、北海道大学(北海道札幌市)2014年9月9日~12日

山本亮平、梅津万記大、山本瑞希、松山聡、久保喜平、DNA polymerase beta knockout マウス胎児線維芽細胞における AP endonuclease knockdown によるメチル化剤感受性の影響、日本放射線影響学会第 57 回大会、かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)2014年10月1日~3日

山本瑞希、山本亮平、竹中重雄、松山聡、久保喜平、Methypurine DNA glycosylase とその関連タンパク量は細胞の増殖状態および DNA polymerase beta の有無に影響される、日本放射線影響学会第 57 回大会、

かごしま県民交流センター（鹿児島県鹿児島市） 2014 年 10 月 1 日～3 日

橋本拓磨、永野綾子、山本亮平、松山 聡、久保喜平、マウス MPG の単離精製と特性解析、第 156 回日本獣医学会学術集会、岐阜大学（岐阜県岐阜市） 2013 年 9 月 20 日～22 日

山田彩容子、梅津万起大、山本亮平、松山 聡、久保喜平、マウス胎児線維芽細胞における APE1 knockdown によるアルキル化損傷修復への影響、第 156 回日本獣医学会学術集会、岐阜大学（岐阜県岐阜市） 2013 年 9 月 20 日～22 日

山本亮平、大城由香利、下谷竜彦、松山聡、久保喜平、Neill ノックダウンマウス細胞の細胞周期による過酸化水素感受性の差、第 157 回日本獣医学会学術集会、岐阜大学（岐阜県岐阜市） 2013 年 9 月 20 日～22 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久保喜平（KUBO KIHEI）  
大阪府立大学生命環境科学研究科・教授  
研究者番号：40117619

### (2) 研究分担者

竹中重雄（Takenaka Shigeo）  
大阪府立大学生命環境科学研究科・准教授  
研究者番号：10280067

#### 研究分担者

山本亮平（YAMAMOTO RYOHEI）  
大阪府立大学生命環境科学研究科・講師  
研究者番号：20457998