

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25550024

研究課題名(和文) DNA二重鎖切断の「トリアージ」とその分子機構

研究課題名(英文) Triage of DNA double-strand break and underlying molecular mechanism

研究代表者

松本 義久 (Matsumoto, Yoshihisa)

東京工業大学・原子炉工学研究所・准教授

研究者番号：20302672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNA二重鎖切断(DSB)は最も重篤なDNA損傷であり、主として、非相同末端結合(NHEJ)と相同組換えで修復される。本研究は、DNA末端形状の違いによるNHEJの反応過程や難度の違い、この違いへの細胞の対応を「トリアージ機構」と呼び、これを再現する新しい試験管内(in vitro)実験系を構築し、分子機構の一端を明らかにすることを目的として行った。細胞抽出液に制限酵素で処理したプラスミドDNAを添加して反応させた後、PCRでの定量を試みた。細胞抽出液調製、DSB修復(結合)反応、反応産物解析法をいくつか試み、DNA末端形状によるDSB修復(結合)反応の違いを再現することができた。

研究成果の概要(英文)：DNA double-strand break (DSB) is considered the most critical type of DNA damage and repaired through two pathways, i.e., non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination. The process and difficulty of DSB repair through NHEJ may be different depending on the structure of DNA ends, which we call "trriage". This study aimed to construct an in vitro experimental system to reproduce this phenomenon and to clarify the underlying molecular mechanism. Restriction enzyme-digested plasmids were incubated with cell extract and the product was analyzed by PCR. We established the condition of extraction, reaction and product analysis, which reflected the difference in the efficiency of repair (joining), depending on the structure of DNA ends.

研究分野：分子放射線生物学

キーワード：放射線 DNA損傷 DNA修復

1. 研究開始当初の背景

DNA 二重鎖切断(DSB)は、放射線によって生じる種々の DNA 損傷の中で最も重篤なものと考えられている。真核細胞において DSB は主として、非相同末端結合(NHEJ)と相同組換え(HR)の2つの機構で修復されることが明らかになっている。NHEJ は HR に比べ精度が低く、誤りを起こしやすいと考えられている。しかし、HR は姉妹染色体が存在する S 期後半から G2 期に限定されるのに対し、NHEJ は細胞周期のどの時期においても可能である。ヒトを含む高等真核細胞では、ゲノム上でタンパク質を直接コードする領域が少なく、多少の塩基の挿入や欠失は許容される場合が多い。また、ほとんどの細胞が HR を行わない G1、G0 期に分布する。このようなことから、ヒトなどの細胞では、NHEJ の重要性が高いと考えられる。

NHEJ は空間的に最も近接する2つの DNA 末端を結合する反応で、以下の3段階で進行する(図1)。(1)DNA 末端の認識: Ku70、Ku86 のヘテロダイマー(以下、Ku)が二本鎖 DNA 末端に結合し、タンパク質リン酸化酵素 DNA-PKcs が動員され、活性化される。(2)DNA 末端のプロセッシング: DNA 末端が直ちに結合できない形状の場合、結合できる形に整形される。(3)DNA 末端の連結: DNA ligase IV(以下、LIG4)が2つの DNA 末端を連結する。XRCC4、XLF が LIG4 の機能を調節する。研究開始当初において、(1)、(3)の段階については、上記のように主要な分子や機能などが明らかになっていった。(2)の段階については、DNA 末端の形状によって、さまざまな分子の関与が予想され、Artemis、核酸レアーゼなど機能解明が進んだものもあるが、不明の部分も多かった。

当研究室では、NHEJ における DNA-PKcs のタンパク質リン酸化機能の意義、すなわち、DNA-PKcs によるどのタンパク質のリン酸化が、何のために必要かということに以前から注目していた。XRCC4 が放射線照射を受けた細胞内で DNA-PKcs によってリン酸化されることを見出して以来、その部位や意義を明らかにすることを目指してきた。DNA-PKcs による XRCC4 のリン酸化部位としては、他グループが2カ所を同定していたが、我々はさらに4カ所のリン酸化部位を同定し、リン酸化状態特異的抗体、リン酸化部位変異体発現細胞等を作製し、解析をおこなってきた。その結果、XRCC4 の各部位におけるリン酸化の放射線応答性が異なることが明らかとなった。さらに、DNA-PKcs の自己リン酸化が NHEJ から HR への切替えに関わるという報告や、DNA-PKcs が Artemis の活性を促進するという報告を考え合わせ、DNA 修復の難度によってリン酸化部位が使い分けられ、リン酸化状態に応じて必要なプロセッシング酵素が動員されているのではないかという、本研究の着想を得た(図2)。

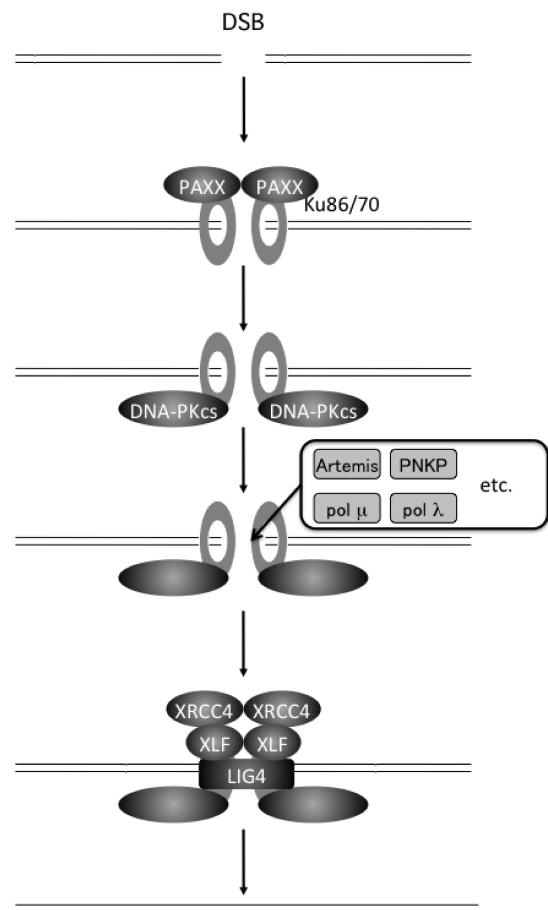


図1 非相同末端結合(NHEJ)の反応機構 本文左段参照。なお、PAXX は平成27年に発見された新しい NHEJ 関連因子で、Ku と相互作用し、その DNA 結合を促進すると考えられる。また、4段目の PNKP はポリヌクレオチドキナーゼホスファターゼで、DNA5'末端にリン酸基を付加し、3'末端のリン酸基を除去する。pol μ、pol λ は DNA ポリメラーゼでギャップを補完する。

2. 研究の目的

本研究は、DNA 末端形状の違いによる NHEJ の反応過程や難度の違い、この違いへの細胞の対応を「トリアージ機構」と呼び、これを再現する新しい試験管内(in vitro)実験系を構築し、分子機構の一端を明らかにすることを目的として行った。

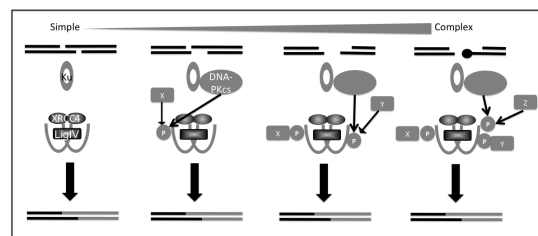


図2 DSB 修復のトリアージモデル 本文左段参照。右から左へ行くに従い、修復が難しい損傷となる。

3. 研究の方法

細胞(NHEJ 遺伝子欠損細胞およびその対照となる細胞を含む)の抽出液に制限酵素で処理したプラスミド DNA を添加し、37 で一定時間反応させた。この反応産物に対して、切断部位両側に設定したプライマーセットを用いた PCR を行い、アガロースゲル電気泳動にて解析した。また、本研究にて新規導入したリアルタイム PCR (Illumina 社、Real Time PCR “Eco”)によって増幅し、定量解析を行った(図 3)。

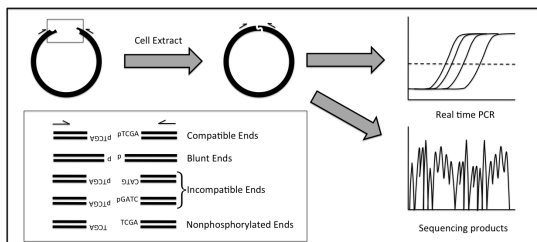


図 3 本研究の方法の概略 本文上参照。

4. 研究成果

平成 25 年度は、さまざまな末端形状を有するプラスミド基質を用いた反応系の構築を中心に行った。まず、既報(Baumann and West, PNAS, 1998)を参考に細胞抽出液の作製法(抽出バッファの組成等)、反応条件を検討した。その中で、制限酵素未消化 DNA の増幅が問題になることが分かった。この問題を解消するために、プライマーを 1 種類だけ加え、いわゆる head-to-head 型の増幅産物を検出することとした。さらに、リアルタイム PCR 法によって、より定量的に修復(結合)活性を評価する実験系を確立した。

平成 26 年度は、XRCC4 欠損細胞(マウス白血病由来 M10 細胞)およびこれに正常あるいは変異型 XRCC4 を導入した細胞を用いて、反応の XRCC4 依存性を調べた。また、前年度の実験系で副産物の生成の可能性が考えられたため、反応条件の再検討を行った。その結果、制限酵素の種類や組合せによっては放射線感受性と整合する結果が得られたが、一方で、予想に反して、XRCC4 欠損細胞で最も多く増幅が見られたものもあった。酵母を用いた研究でも類似の現象が報告されており、結合に誤りを伴いやすい形状の損傷では、正常な NHEJ 機構が逆に結合をブロックするような機構の存在も考えられた。

最終年度を 1 年延長した平成 27 年度は、まず、追加実験として、試験管内での DSB 修復(結合)反応との対比のため、細胞内での反応を制限酵素 I-SceI を用いた系で解析することを試みた。やはり、平成 27 年度までに行った試験管内での反応の場合と同様、XRCC4 等に依存しない非相同末端結合(A-NHEJ)反応が見られた。試験管内、細胞内の両方において、A-NHEJ 反応をいかに抑えるかが重要と考えられた。そこで、再度試験管内の反応系について細胞抽出液調製、

DSB 修復(結合)反応、反応産物解析の手法の見直しを行った。代表者が以前に細胞抽出液に照射/非照射プラスミド DNA を加え、照射依存的に DNA-PKcs による XRCC4 のリン酸化を再現した系を参考にした(Matsumoto et al., FEBS Lett., 2000)。これによって、DNA 末端形状による DSB 修復(結合)反応の違いを再現することができた。この系が XRCC4 等に依存した NHEJ (C-NHEJ)反応を特異的に捉えていることを確認するには、さらにいくつかの実験が必要であるが、確立すれば NHEJ の分子機構の詳細の解明に有用な系となることが期待される。

平成 27 年度には合わせて、平成 25 年に報告された新しいゲノム編集技術 CRISPER/Cas9 系を導入し、XRCC4 をはじめとする数種類の NHEJ 関連因子欠損細胞の作製を試みた。また、平成 27 年に新たに報告された PAXX (Paralog of XRCC4 and XLF)の遺伝子をクローニングし、タンパク質の発現・精製等を行った。

今後、本研究で構築された *in vitro* NHEJ 実験系をこれらと組み合わせることで、複雑な形状の DSB 修復機構や、そこにおけるタンパク質翻訳後修飾、タンパク質間相互作用の役割を明らかにしていきたい。これにより、DSB 修復制御機構の破綻やエラーによって修復の誤りが起こり、突然変異や染色体異常を介して発がんにつながる機構の理解の一助となることや、新たな放射線増感剤開発の糸口となることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1. 松本 義久. 「二つの DNA 二重鎖切断修復機構の賢い選択」 医学物理 34(2), 1-8 (2014). (Matsumoto, Y. Smart Choice between Two DNA Double-strand Break Repair Mechanisms. Japanese Journal of Medical Physics, 34, 1-8 (2014). [査読なし])

[学会発表](計 8 件)

(筆頭者が登壇者)

1. Ali Reza Amiri Moghani, Mukesh K Sharma, Yoshihisa Matsumoto. Chromatin-binding and Phosphorylation of XRCC4 and XLF Proteins in Response to Ionizing Radiation and DNA Damaging Agent Zeocin. 15th International Congress of Radiation Research, Kyoto (Kyoto International Conference Center), Japan, 25-29 May 2015, 2-PS3D-35 (Poster).
2. Mikoto Fukuchi, Mukesh Kumar Sharma, Rujira Wanotayan, Reiko Watanabe, Shoji Imamichi, Sicheng Liu, Shin-ichiro Kanno, Teruya Nakamura,

- Akira Yasui, Yoshihisa Matsumoto. Scanning Mutation Analysis of Conserved Lysine Residues in XRCC4. 15th International Congress of Radiation Research, Kyoto (Kyoto International Conference Center), Japan, 25-29 May 2015, 2-PS-LB-08 (Late-Breaking, Poster).
3. Yoshihisa Matsumoto. Recognition and Repair of DNA Double-strand Breaks - Molecular Mechanisms and Implication in Medicine. International Workshop on Ionizing and Non-ionizing Radiation Influence on Structure and Biophysical Properties of Living Cells, Tsughkadzor, Armenia (Hotel Russia), 25-27 September 2015, Session 2 (Plenary Talk).
 4. Yoshihisa Matsumoto. Mechanisms of the repair of DNA double-strand breaks. YITP & YIPQS Workshop Biological & Medical Science based on Physics: Radiation and physics, Physics on medical science, Modeling for biological system, Kyoto (Kyoto University Yukawa Memorial Center), 5-7 November 2015, Session 3-1: Biological effects of radiation (Invited Talk).
 5. 松本 義久. DNA 二重鎖切断の認識と修復のタンパク質翻訳後修飾による統御. JAEA 第 1050 回金曜セミナー「ストレス応答タンパク質のエピジェネティックな化学修飾と量子ビームによる立体構造変化の追跡」, いばらき量子ビームセンター(茨城・東海), 2015 年 12 月 1 日.
 6. 福地 命, Rujira Wanotayan, Mukesh Kumar Sharma, 今道 祥二, 松本 義久. DNA 二重鎖切断修復タンパク質 XRCC4 の点変異体の系統的作製と機能解析. 第 18 回癌治療増感研究シンポジウム, 奈良県文化会館(奈良), 2016 年 2 月 5-6 日, セッション 4-2 「癌治療増感における生物学的戦略」追加発言 40.
 7. 松本 義久. 放射線による DNA 損傷と修復. 第 6 回放射線生物学セミナー, 名古屋市立大学医学部(名古屋), 2016 年 2 月 20 日, 各論.
 8. 松本 義久. DNA 二重鎖切断の認識・修復の分子機構. アイソトープ薬学研究会, 横浜ベイホテル東急(横浜), 2016 年 3 月 27 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

1. 平成 25 年度 第二期「世界をリード・世界に羽ばたく 東工大の最先端研究」第 7 回. 「The end is the beginning -DNA の「端」から医療応用へ」. 平成 26 年 1 月 22 日(水) 19:00-20:30, 東京工業大学キャンパス・イノベーションセンター.
2. 第 9 回 四大学連合文化講演会「環境・社会・人間における「安全・安心」を探る-安全で安心の出来る社会-」. 「放射線から DNA を守る仕組み」. 平成 26 年 10 月 10 日(金) 15:40-16:20, 一橋講堂(東京).
3. 高大連携講座(千葉県立千葉東高等学校) 「放射線生物学講座」. 平成 27 年 11 月 3 日(火) 10:00-12:00, 千葉東高等学校(千葉); 平成 27 年 11 月 14 日(土) 10:00-17:00, 東京工業大学.

ホームページ:

<http://www.nr.titech.ac.jp/~yoshim/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 義久 (Matsumoto Yoshihisa)

東京工業大学・原子炉工学研究所(平成 28 年 4 月より・科学技術創成研究院)・准教授

研究者番号: 20302672

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし