

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26281025

研究課題名(和文) DNA修復蛋白質53BP1の細胞表層への露出とアポトーシス細胞の腫瘍免疫原性獲得

研究課題名(英文) A DNA damage-independent role for 53BP1 in apoptotic cells

研究代表者

岩淵 邦芳 (IWABUCHI, Kuniyoshi)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：10232696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：アポトーシス細胞において53BP1がカスパーゼ依存性に切断され、残った53BP1断片の一部がアポトーシス細胞表層に露出することを見出した。この現象は、X線照射によって誘導されるアポトーシスのみならず、DNA損傷を与えないアポトーシス誘導剤であるスタウロsporin処理で誘導されるアポトーシスにおいても観察された。53BP1のDNA二重鎖切断部位への集積に必要なユビキチンリガーゼであるRNF8およびRNF168の発現を抑制した細胞においても、53BP1断片の細胞表層露出がみられた。以上より、アポトーシス細胞において53BP1は、DNA損傷応答とは独立した機能を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：53BP1 accumulates at sites of DNA double-strand breaks (DSBs), and facilitates non-homologous end joining repair of DSBs. We found that 53BP1 is cleaved into a fragment in a caspase-dependent manner in apoptotic cells. This 53BP1 cleavage was observed in apoptosis induced by not only X-ray irradiation, but also treatment with staurosporine, a non-DNA damaging apoptosis-inducer. Some of the 53BP1 fragments are localized on the surface of apoptotic cells. The surface localization of the 53BP1 fragment was observed in apoptotic cells which lacked expression of RNF8 or RNF168, ubiquitin ligases required for accumulation of 53BP1 at DSB sites. These data suggest that in apoptotic cells, 53BP1 plays a role independent on the role of 53BP1 in DNA damage responses.

研究分野：放射線影響科学

キーワード：53BP1 DNA二重鎖切断 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

53BP1 は、53BP1 の C 末にある BRCT ドメインを介して癌抑制蛋白質 p53 と結合する蛋白質として見出された。DNA 二重鎖切断(以下 DSB)が発生すると 53BP1 は、53BP1 の Tudor ドメインを介してヌクレオソームと結合することで、DSB 部位に集積する。DSB 部位に集積した 53BP1 は、相同組み換えによる修復を抑制し、非相同末端結合による修復を促進する。一方、DNA 損傷を完全に修復できない細胞はアポトーシスに陥るが、アポトーシス細胞において 53BP1 が何らかの役割を担っているかは不明である。

我々は、スタウロスポリンでアポトーシスを誘導したヒト T 細胞系白血病細胞株 Jurkat において、53BP1 がカスパーゼ依存性に 60 kDa の C 末断片になること、この 53BP1C 末断片が細胞表層に露出することを見出した。

2. 研究の目的

本研究は、53BP1 の細胞表層への露出に着目し、アポトーシスにおける 53BP1 の機能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

ヒト T リンパ球由来白血病細胞株 Jurkat、Molt-4、およびヒト B 細胞白血病細胞株 Nalm-6 に、X 線照射あるいはプロテインキナーゼ C 阻害剤スタウロスポリン処理を行いアポトーシスを誘導した。

(2) siRNA の細胞導入

細胞への siRNA 導入は、Amaza 4D-Nucleofector (Lonza 社) による electroporation 法で行った。Lonza 社の推奨するプロトコールに従った。

(3) 阻害剤

微小管重合阻害剤として Nocodazole, アクチン重合阻害剤として Cytochalasin D, ROCK1/2 阻害剤として Y27632 を使用した。

(4) アポトーシス細胞における 53BP1 の検出

アポトーシス誘導後の細胞から細胞溶解液を抽出し、53BP1N 末あるいは C 末に対する抗体を用いたウェスタンブロット法で、53BP1 の切断を検出した。細胞内の 53BP1 の局在は、細胞を固定し膜透過処理を行った後に免疫蛍光染色法で調べた。細胞表層の 53BP1 は、細胞を固定後、膜透過処理を行わずに免疫蛍光染色法で検出した。

4. 研究成果

(1) X 線照射後のアポトーシス細胞におけ

る 53BP1 の細胞表面露出

Jurkat 細胞のスタウロスポリン処理で見られた 53BP1C 末断片の細胞表層露出が、異なる細胞株や異なるアポトーシス誘導刺激でも見られるか否かを調べた。Molt-4、Nalm-6 に X 線照射を行い DSB を発生させると、当初 53BP1 は DSB 部位に集積し foci を形成した。その後アポトーシスの進行にともない 53BP1 は、カスパーゼにより切断され、C 末断片が残った。一部の C 末断片はアポトーシス細胞の表層に露出した。すなわち、アポトーシス細胞において見られる 53BP1 の特異な挙動は、アポトーシスを誘導する機序には依存しない事が示唆された。一方、U2OS や HCT116 など非リンパ球系癌細胞株を用いた場合、アポトーシス細胞における 53BP1 の細胞表層露出が観察されなかった。53BP1C 末断片の細胞表層露出が、リンパ球系細胞に特異的な現象である可能性が示唆された。

(2) 53BP1 細胞表層露出の阻害

アポトーシス細胞における核内物質の移動に関与するとされている、微小管、アクチン/ミオシン、ROCK1/2 の機能が、53BP1C 末断片の細胞表層露出に必要なかを、それぞれに対する阻害剤を用いて調べた。53BP1 の細胞表層露出は、微小管重合阻害剤、ROCK1/2 阻害剤で抑制されたが、アクチン重合阻害剤では抑制されなかった。細胞膜近傍までの 53BP1 の輸送には微小管が、細胞膜内への取り込みには ROCK1/2 が必要なのではないかと予想している。

(3) DNA 損傷応答と 53BP1 の細胞表層露出

53BP1 の細胞表層露出は、DNA 損傷を起こさないアポトーシス誘発剤であるスタウロスポリンでも見られた。そこで、53BP1C 末断片の細胞表層露出が、53BP1 の DNA 損傷応答と関連しているか否かを調べた。53BP1 は、Tudor ドメインを介して DSB 部位に出現するメチル化ヒストン H4(以下 H4K20me2)と結合し、DSB 部位に集積する。H4 のメチル基は JMJD2A または L3MBTL1 に覆われているが、DSB が発生すると、ユビキチンリガーゼである RNF8 と RNF168 依存性に、JMJD2A は分解され L3MBTL1 は H4K20me2 から離れる。即ち DSB に応答した 53BP1 の DSB 部位集積は RNF8, RNF168 依存性である。そこで、53BP1C 末断片の細胞表層露出が、RNF8, RNF168 依存性であるか否かを調べたところ、siRNA で RNF8 あるいは RNF168 の発現を抑制した細胞においても、53BP1C 末断片の細胞表層露出がみられた。以上より 53BP1C 末断片の細胞表層露出は、53BP1 の DNA 損傷応答とは独立した機能であることが示唆された。

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 9 件)

1. Sunatani Y, Kamdar RP, Sharma MK, Matsui T, Sakasai R, Hashimoto M, Ishigaki Y, Matsumoto Y, Iwabuchi K : Caspase-mediated cleavage of X-ray repair cross-complementing group 4 promotes apoptosis by enhancing nuclear translocation of caspase-activated DNase. *Exp Cell Res*, 362:450-460,(2018) 査読有
2. Sakasai R, Isono M, Wakasugi M, Hashimoto M, Sunatani Y, Matsui T, Shibata A, Matsunaga T, Iwabuchi K : Aquarius is required for proper CtIP expression and homologous recombination repair. *Sci Rep*, 7(1): D0110.1038/s41598-017-13695-4,(2017) 査読有
3. Baek HJ, Lee YM, Kim TH, Kim JY, Park EJ, Iwabuchi K, Mishra L, Kim SS : Caspase-3/7-mediated cleavage of 2-spectrin is required for acetaminophen-induced liver damage. *Int J Biol Sci*, 12(2):172-183,(2016) 査読有
4. Iimori M, Watanabe S, Kiyonari S, Matsuoka K, Sakasai R, Saeki H, Oki E, Kitao H, Maehara Y : Phosphorylation of EB2 by Aurora B and CDK1 ensures mitotic progression and genome stability. *Nat Commun*, 7:11117,(2016) 査読有
5. Matsui Y, Sunatani Y, Hayashi N, Okino K, Okushi Y, Mukai K, Adachi H, Yamaya H, Iwabuchi K, Yokoyama H : DNA double-strand breaks induced intractable glomerular fibrosis in renal allografts. *Clin Exp Nephrol*, 20(3):479-488,(2015) 査読有
6. Sakasai R, Iwabuchi K : The distinctive cellular responses to DNA strand breaks caused by a DNA topoisomerase poison in conjunction with DNA replication and RNA transcription. *Genes & genetic systems*, 90(4):187-194,(2015) 査読有
7. Guerra B, Iwabuchi K, Issinger OG : Protein kinase CK2 is required for the recruitment of 53BP1 to sites of DNA double-strand break induced by radiomimetic drugs. *Cancer Lett*, 345:115-123,(2014) 査読有
8. Yoo JS, Takahashi K, Ng CS, Ouda R, Onomoto K, Yoneyama M, Lai JC, Lattmann

S, Nagamine Y, Matsui T, Iwabuchi K, Kato H, Fujita T : DHX36 enhances RIG-I signaling by facilitating PKR-mediated antiviral stress granule formation. *PLoS Pathog*, 10(3):e1004012,(2014) 査読有

9. Ishigaki Y, Nakamura Y, Tatsuno T, Hashimoto M, Iwabuchi K, Tomosugi N : RNA binding protein RBM8A (Y14) and MAGOH localize to centrosome in human A549 cells. *Histochem Cell Biol*, 141(1):101-109,(2014) 査読有

〔学会発表〕(計 24 件)

1. 逆井良, 砂谷優実, 松井理, 岩淵邦芳 : ユビキチン化因子 UBE2E2 による DNA トポイソメラーゼ II の制御. 第 24 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 岐阜 2017 年 11 月 27 日
2. 砂谷優実, 逆井良, 松井理, 橋本光正, 岩淵邦芳 : DNA 二本鎖切断修復タンパク質 53BP1 を介した神経前駆細胞の未分化性維持機構. 日本放射線影響学会第 60 回大会 千葉 2017 年 10 月 26 日
3. Sakasai R, Sunatani Y, Matsui T, Iwabuchi K : Analysis of repair pathway for one-ended DNA double-strand breaks. 放射線影響学会第 60 回大会 千葉 2017 年 10 月 26 日
4. 逆井良, 砂谷優実, 松井理, 岩淵邦芳 : PARP- and TDP1-dependent repair pathways of one-ended DNA double-strand breaks caused by camptothecin. 第 76 回日本癌学会学術総会 横浜 2017 年 9 月 28 日
5. 逆井良, 磯野真由, 若杉光夫, 橋本光正, 砂谷優実, 松井理, 柴田淳史, 松永司, 岩淵邦芳 : RNA ヘリカーゼ Aquarius は DNA-RNA ハイブリッドを解消して相同組換え修復を促進する. 第 39 回日本分子生物学会年会 横浜 2016 年 12 月
6. 砂谷優実, 辰野貴則, 中村有香, 逆井良, 松井理, 橋本光正, 石垣靖人, 岩淵邦芳 : DNA 二本鎖切断修復タンパク質 53BP1 を介した神経前駆細胞の分化抑制効果. 日本放射線影響学会第 59 回大会 広島 2016 年 10 月
7. 逆井良, 磯野真由, 若杉光夫, 橋本光正, 砂谷優実, 松井理, 柴田淳史, 松永司, 岩淵邦芳 : RNA ヘリカーゼ Aquarius は R-loop を解消して相同組換え修復を促進する. 日本放射線影響学会第 59 回大

- 会 広島 2016年10月
8. Sakasai R, Sunatani Y, Matsui T, Iwabuchi K: Topoisomerase II switching is regulated by ubiquitination. Gordon Research Conference, DNA Topoisomerase in Biology & Medicine Sunday River 2016年8月
 9. Sakasai R: R-loop-dependent DNA damage responses. 第5回 DNA 損傷応答ワークショップ 浜名湖ミーティング Hamamatsu 2016年4月
 10. 砂谷優実, Kamdar RP, Sharma MK, 松井理, 逆井良, 橋本光正, 松本義久, 岩淵邦芳: DNA 修復タンパク質XRCC4 のカスパーゼ依存性切断によるスプライシング調節を介したアポトーシスの促進. 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会合同大会 神戸 2015年12月
 11. 逆井良, 砂谷優実, 松井理, 橋本光正, 岩淵邦芳: Top2-poison に対する主要調節因子であるユビキチン化酵素の同定. 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会合同大会 神戸2015年12月
 12. 松井理, 逆井良, 砂谷優実, 橋本光正, 岩淵邦芳: p53標的遺伝子発現における53BP1 の機能的役割. 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会合同大会 神戸 2015年12月
 13. Matsui Y, Sunatani Y, Iwabuchi K, Yokoyama H: DNA double-strand breaks accelerated collagen type VI secretion of glomerular endothelial cells. ERA-EDTA 52nd Congress London 2015年6月
 14. 逆井良: Top1-poison に対するDNA-PK 活性化とDSB 修復. Genome Damage Network Workshop 2015 伊香保 2015年6月
 15. Sunatani Y, Sharma MK, Kamdar RP, Matsui T, Sakasai R, Hashimoto M, Matsumoto Y, Iwabuchi K: Phosphorylation-mediated Regulation of Apoptosis By NHEJ-protein XRCC4. 15th International Congress of Radiation Research Kyoto 2015年5月
 16. Sakasai R, Sunatani Y, Matsui T, Hashimoto M, Iwabuchi K: Ubiquitin-dependent Activation of DNA-PKcs Leads to Chromosomal Aberration in Response to One-ended DNA Double-Strand Breaks. 15th International Congress of Radiation Research Kyoto 2015年5月
 17. 渡邊直人, 道合万里子, 高橋知子, 利波久雄, 岩淵邦芳: 骨転移に対するRI 治療におけるリンパ球の放射線障害. 第74回日本医学放射線学会総会 横浜 2015年4月
 18. 逆井良: ユビキチン依存的なDNA-PK 活性化と染色体異常 第4回DNA損傷応答ワークショップ 浜名湖ミーティング 浜松 2015年4月
 19. Sakasai R, Sunatani Y, Matsui T, Hashimoto M, Iwabuchi K: Ubiquitin-dependent activation of DNA-PKcs in response to DNA replication-mediated DNA double-strand breaks. The 9th 3R Symposium Together with National Institute of Genetics 2014 International Symposium Gotenba 2014年11月
 20. Ishigaki Y, Nakamura Y, Tatsuno T, Hashimoto M, Shimasaki T, Iwabuchi K, Tomosugi N: Role of RNA binding protein in cell cycle progression and centrosome maturation in human tumor cells. 19th World Congress on Advances in Oncology & 17th International Symposium of Molecular Medicine Greece 2014年10月
 21. 砂谷優実, Kamdar RP, Sharma MK, 松井理, 逆井良, 橋本光正, 松本義久, 岩淵邦芳: XRCC4 のカスパーゼ依存的な切断によって引き起こされるアポトーシス促進の機構. 第87回日本生化学会大会 京都 2014年10月
 22. 逆井良, 松井理, 砂谷優実, 橋本光正, 岩淵邦芳: ユビキチン化を介したDNA-PKcs 活性化機構. 日本放射線影響学会第57回大会 鹿児島 2014年10月
 23. 逆井良, 砂谷優実, 松井理, 橋本光正, 岩淵邦芳: 抗ガン剤トポイソメラーゼ阻害剤が引き起こす二次的 DNA損傷に対する細胞応答. 金沢医科大学医学会第40回総会、第50回学術集会 内灘2014年7月
 24. Doai M, Watanabe N, Takahashi T, Tonami H, Iwabuchi K: Radiotoxicity after radioisotope therapy for bone metastases using γ -H2AX foci of

DNA damage in lymphocytes. The 73rd
Annual Meeting of the Japan
Radiological Society Yokohama 2014
年4月

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩淵 邦芳 (IWABUCHI, Kuniyoshi)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：10232696

(2)研究分担者

砂谷 優実 (SUNATANI, Yumi)
金沢医科大学・医学部・講師
研究者番号：70581057

(3)研究分担者

逆井 良 (SAKASAI, Ryo)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：10549950

(4)研究分担者

石垣 靖人 (ISHIGAKI, Yasuhito)
金沢医科大学・総合医学研究所・教授
研究者番号：20232275

(5)連携研究者

中村 晃 (NAKAMURA, Akira)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：20344723