

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340020

研究課題名(和文) 新規APエンドヌクレアーゼAPNXのアセチル基転移活性とTip60活性化の解明

研究課題名(英文) Human APNX protein is a dual function enzyme that have AP endonuclease activity and acetyltransferase activity.

研究代表者

菅野 新一郎 (Kanno, Shin-ichiro)

東北大学・加齢医学研究所・講師

研究者番号：10400417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はDNA修復機構であるNHEJに関わる新規DNA修復酵素PALFの発見からCYR domainを発見した。このCYR domainをもつ遺伝子を調べたところショウジョウバエで未知タンパク質を発見し、そのヒトオルソログ(APNX)を発見した。ショウジョウバエとヒトオルソログタンパク質がDNA修復酵素である可能性を前提にこれらのタンパク質の活性を調べた。その結果AP endonucleaseの活性をつこと、また、アセチル基転移酵素活性の二つの活性をもつ稀なdual function enzymeであることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The CYR motif was first identified in the human repair protein, PALF (ALPF), and found in various proteins of DNA metabolism, such as DNA repair and the DNA damage checkpoint. We found CG1218-PA and its human ortholog protein (APNX) that have CYR motif and DUF2228 domain, a domain of unknown function by searching database. We here analyzed the function of CG1218-PA in DNA damage response and found that CG1218-PA and its human ortholog APNX harboring DUF2228 are apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease. APNX interacts tightly with PARP1 and contributes to its activation after treatment of cells with alkylating agents. On the other hand, APNX have a partial similarity sequence of Tip60 and putative acetylCoA binding site. In vitro assay, APNX possess acetyltransferase activities against APNX itself and Tip60 protein. APNX plays an important role for the repair of DNA strand breaks and signaling of DNA damage in higher eukaryotic cells.

研究分野：DNA修復

キーワード：DNA修復酵素 AP endonuclease アセチル基転移酵素

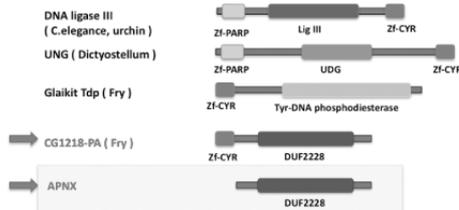
### 1. 研究開始当初の背景

ゲノムの安定性は様々な DNA 修復機構とチェックポイント機構により維持されている。DNA 損傷のうち二重鎖切断は最もゲノムを不安定化し細胞の老化やがん化に影響をあたえる損傷で、その修復機構の詳細な解明は重要な課題である。我々は PNK と Aprataxin の FHA domain と相同性を持つもつタンパク質のバイオインフォマティクス解析から新規の DNA 修復酵素 PALF を発見し、また、アミノ酸配列の解析から CYR domain (C2H2 type zinc finger) を発見した。CYR domain をもつタンパク質を調べると未知タンパク質を除くすべてのタンパク質が DNA 代謝酵素・修復酵素であった。CYR domain をもつ未知タンパク質としてショウジョウバエのタンパク質 CG-1218-PA を見いだしたが、さらに CG-1218-PA の配列からヒトオルソログ APNX (C4orf27) を同定した。APNX は線虫からヒトまでよく保存されたタンパク質で、ヒト APNX は CYR domain を欠損しているが、多くの種のオルソログが CYR domain をもつことから新規の DNA 代謝酵素・修復酵素であると考えられた。損傷を持った DNA を用いて解析したところ、PALF と同様な AP endonuclease の活性が確認され新規の DNA 修復酵素であることがわかった。一方、APNX のアミノ酸配列を詳細に解析すると一部に Tip60 と相同性のある配列があり、また acetylCoA 結合サイトと思われる配列が見つかったことからアセチル基転移酵素活性を持つと予想された。

#### (I) Tandem-CYR motif type



#### (II) Terminal mono-CYR motif type



### 2. 研究の目的

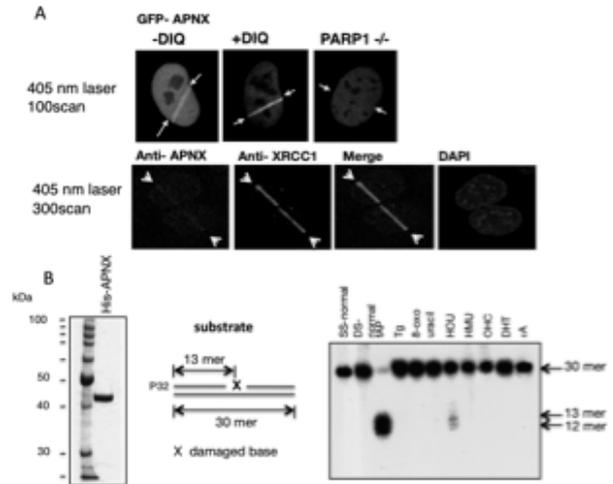
あらたに見いだされた APNX (C4orf27) は AP endonuclease 活性とアセチル基転移酵素活性を持つ新規 DNA 修復酵素で、その生理機能をタンパク質レベルや細胞レベルで解明し、ゲノムの安定性に対する役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

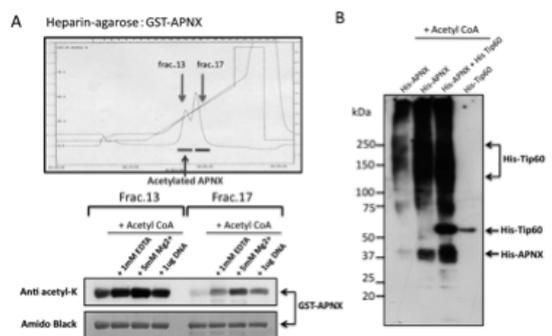
(1) CG-1218-PA、APNX をクローニングし、GFP-tag の細胞発現用ベクター、GST-tag, His-tag のリコンビナントタンパク質作成用ベクターを構築する。これらを用いて GFP-タンパク質を作り細胞内に発現させ、in situ でレーザーを用いた実験や酵素活性について解析する。(2) Flag-tag APNX の安定発現細胞を樹立し、相互作用タンパク質の同定を行いその生理機能を解析する。(3) APNX を siRNA を用いてノックダウンし、DNA 損傷薬剤に対する耐性など細胞に及ぼす影響を解析する。

### 4. 研究成果

1) GFP-CG1218-PA、GFP-APNX を作製し、細胞に導入後 in situ でレーザーを用いて細胞核内に DNA 損傷部位をつくと GFP-CG1218、GFP-APNX は DNA 損傷部位に DNA 損傷依存的にリクルートされ集積することが分った。また、損傷部位を含む DNA を用いた in vitro assay でそれぞれのタンパク質に AP endonuclease の活性が確認された。

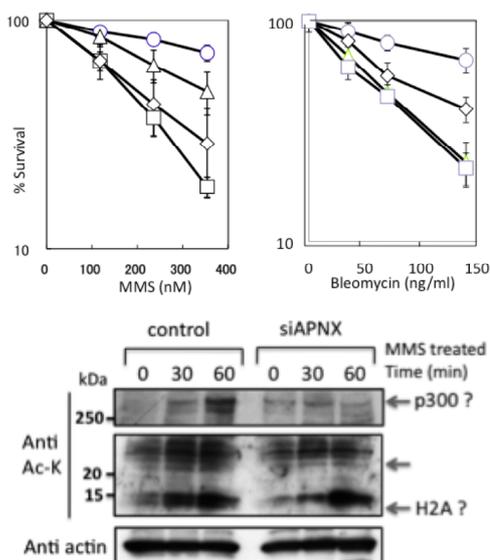


(2) APNX のアミノ酸配列を 2 次構造比較プログラムの HHpred や 3 次元構造予測ソフト phyre2, またアミノ酸配列相同性を BLAST で調べたところ DNA 結合部位と予想される配列以外にアセチル基転移酵素 Tip60 と相同性がある配列とアセチル CoA の結合部位と予想される配列を見出した。そこで in vitro assay でアセチル基転移酵素活性を調べたところ、自己アセチル化が認められ Tip60 をアセチル化することが分かった。



(3) Flag-APNX の安定発現細胞株を樹立し、免疫沈降と nanoLC/MS/MS を用いてプロテオーム解析を行った結果、APNX は PARP1 とヘテロダイマーを形成していることが分かった。また、酸化ストレスを与えると RNA クオリティー維持に働く RACK1 と結合することが分かった。(4) APNX の siRNA を用いてノックダウンし、DNA 損傷薬剤に対する耐性を調べたところ、酸化損傷や DNA 二本鎖切断を引き起こす MMS と DNA 二本鎖切断を起こ

す Bleomycin に対して感受性を示すことがわかった。また、PARP1 とヘテロダイマーを形成していることから MMS による酸化損傷や DNA 一本鎖切断で活性化される PARP1 の活性を poly(ADP ribosil)鎖に対する抗体で調べた。その結果 APNX のノックダウンで PARP1 の活性化が著しく遅れ阻害されることが明らかになった。また、酸化損傷で誘導される核タンパクのアセチル化の一部が阻害され細胞内で APNX がアセチル基転移酵素として働くことが示された。



以上 (1) から (4) までの結果から、APNX は PARP1 とヘテロダイマーを形成し、PARP1 の相互作用タンパク質として酸化損傷や DNA 一本鎖切断で DNA 損傷部位にニックやギャップを導入して PARP1 の活性化を行うタンパク質であること、また、酸化ストレス依存的に核タンパク質をアセチル化するまったく新しい DNA 修復酵素であることが明らかになった。

## 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 10 件)

- (1) Watanabe R, Kanno S, Mohamadi A, Ui A, Yasui A. Nucleosome remodeling, DNA repair and transcriptional regulation build negative feedback loops in cancer and cellular aging. *Philos. Trans. Biology* 2017 in press 査読あり
- (2) Tetsuro Matsushashi1, Takeya Sato, Shin-ichiro Kanno, Takehiro Suzuki, Akihiro Matsuo, Yuki Oba, Motoi Kikusato, Emi Ogasawara, Tai Kudo, Kosuke Suzuki, Osamu Ohara, Hiroko Shimbo, Fumika Nannto, Hiroaki Yamaguchi, Daisuke Saigusa1, Yasuno Mukaiyama, Akiko Watabe, Koichi Kikuchi, Hisato Shima, Eikan Mishima, Yasutoshi Akiyama, Yoshitsugu Oikawa, Hsin-Jung HO, Yukako Akiyama, Chitose Suzuki, Mitsugu Uematsu, Masaki Ogata, Naonori Kumagai, Masaaki Toyomizu6, Atsushi Hozawa, Nariyasu Mano, Yuji Owada, Setsuya Aiba, Teruyuki Yanagisawa, Yoshihisa Tomioka, Shigeo Kure1, Sadayoshi Ito, Kazuto Nakada, Ken-ichiro Hayashi, Hitoshi Osaka and Takaaki Abe Mitochondrial Acid 5 (MA-5) facilitates ATP synthase oligomerization and cell survival in various mitochondrial diseases. *EBioMedicine* 2017 in press 査読あり
- (3) Katsunori Takahashi, Haruka Okabe, Shin-ichiro Kanno, Tomoaki Nagai, Kensaku Mizuno A pleckstrin homology-like domain is critical for F-actin binding and cofilin-phosphatase activity of Slingshot-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 482: 686-692. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.095> 査読あり
- (4) Suzuki T, Yamaguchi H, Kikusato M, Hashizume O, Nagatoishi S, Matsuo A, Sato T, Kudo T, Matsuhashi T, Murayama K, Ohba Y, Watanabe S, Kanno SI, Minaki D, Saigusa D, Shinbo H, Mori N, Yuri A, Yokoro M, Mishima E, Shima H, Akiyama Y, Takeuchi Y, Kikuchi K, Toyohara T, Suzuki C, Ichimura T, Anzai JI, Kohzaki M, Mano N, Kure S, Yanagisawa T, Tomioka Y, Tohyomizu M, Tsumoto K, Nakada K, Bonventre JV, Ito S, Osaka H, Hayashi KI, Abe T. Mitochondrial Acid 5 Binds Mitochondria and Ameliorates Renal Tubular and Cardiac Myocyte Damage. *J Am Soc Nephrol.* 2015 Nov 25. pii: ASN.2015060623. *J Am Soc Nephrol.* 2016 Jul;27(7):1925-32. doi: 10.1681/ASN.2015060623. 査読あり
- (5) Takahashi K, Kanno SI, Mizuno K. Activation of cytosolic Slingshot-1 phosphatase by gelsolin-generated soluble actin filaments. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Oct 27; 454(3):471-477. doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.108. 査読あり
- (6) Homma Y, Kanno S, Sasaki K, Nishita M, Yasui A, Asano T, Ohashi K, Mizuno K. Insulin receptor substrate-4 binds to Slingshot-1 phosphatase and promotes cofilin dephosphorylation. *J Biol Chem.* 2014 Sep 19; 289(38):26302-13. doi: 10.1074/jbc.M114.565945. 査読あり
- (7) Homma Y, Kanno S, Sasaki K, Nishita M, Yasui A, Asano T, Ohashi K, Mizuno K. Insulin receptor substrate-4 binds to Slingshot-1 phosphatase and promotes cofilin dephosphorylation. *J Biol Chem.* 2014 Sep 19; 289(38):26302-13. doi:10.1074/jbc.M114.565945. 査読あり
- (8) Watanabe R, Ui A, Kanno S, Ogiwara H, Nagase T, Kohno T, Yasui A. SWI/SNF factors required for cellular resistance to DNA damage include ARID1A and ARID1B and show interdependent protein stability. *Cancer Res.*

2014 May 1;74(9):2465-75. doi: 10.1158 /0008-5472.CAN-13-3608. 査読あり

(9) Zaytseva OI, Tenis N, Mitchell N, Kanno S, Yasui A, Heierhorst J, Quinn LM. The novel zinc finger protein dASCIZ regulates mitosis in *Drosophila* via an essential role in dynein light-chain expression. *Genetics*. 2014 Feb; 196(2):443-53. doi: 10.1534/ genetics. 113.159541. 査読あり

(10) Leizhen Wei, Satoshi Nakajima, Ching-Lung Hsieh, Shinichiro Kanno, Mitsuko Masutani, Arthur S. Levine1, Akira Yasui, Li Lan  
Damage response of XRCC1 at sites of DNA single strand breaks is regulated by phosphorylation and ubiquitination after degradation of poly (ADP) ribose *J. Cell Sci*. 2013, 126(Pt 19):4414-23 査読あり

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
東北大学加齢医学研究所ホームページ  
[http://www.idac.tohoku.ac.jp/ja/activities/research/Dyn\\_prot/index.html](http://www.idac.tohoku.ac.jp/ja/activities/research/Dyn_prot/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 新一郎 (Kanno Shin-ichiro)  
東北大学・加齢医学研究所・講師  
研究者番号：10400417

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )