

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450438

研究課題名(和文) 伴侶動物のDNA二本鎖切断修復の分子機構に基づく新しい放射線増感剤の開発基盤研究

研究課題名(英文) Fundamental study for the development of new radiosensitizers based on the molecular mechanism of DNA double strand break repair of companion animals

研究代表者

小池 亜紀 (KOIKE, AKI)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 加速器工学部・技術員(任非)

研究者番号：50415410

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)：放射線により誘導されたDNA二本鎖切断(DSB)は、哺乳類のがん細胞では主に非相同末端結合(NHEJ)機構により修復される。したがって、イヌのがん治療における新たな放射線増感剤を開発するために有益な情報を得るには、イヌのNHEJの分子機構を明らかにすることが重要である。本研究では、イヌのKu依存的なNHEJ修復の分子機構に基づく新しい放射線増感剤の開発のための研究を行い、開発の基盤となる情報を得た。

研究成果の概要(英文)：Understanding the molecular mechanisms of DNA double-strand break (DSB) repair is important for developing new radiosensitizers for companion animal cancers. Radiation-induced DSBs are mainly repaired by nonhomologous end joining (NHEJ) mechanisms in mammalian cancer cells. Therefore, it is important to clarify the molecular mechanisms of underlying NHEJ in order to get valuable information for the development of potential molecular targets for new radiosensitizers in the treatment of canine cancers. On the other hand, cDNAs of core NHEJ factors of canine species have not been cloned. Furthermore, the sequence, localization and control mechanisms of core NHEJ factors of canine species have not been published.

In this study, we performed fundamental study for the development of new radiosensitizers based on the molecular mechanism of Ku-dependent NHEJ of canine species.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 伴侶動物 増感剤 犬 Ku70 NHEJ XLF XRCC4

## 1. 研究開始当初の背景

(1) イヌは愛玩動物、盲導犬や警察犬としての役割に加えて、最近ではアニマルセラピー等の分野でも重要な役割を担っている。さらに、人間社会における高齢化や少子化に伴い、イヌは伴侶動物として重要な役割を担うようになってきている。したがって、伴侶動物イヌの健康寿命を延ばすことが喫緊の課題となっている。一方、飼育環境、栄養状態、診断・治療・予防技術の向上などによりフィラリア症等の感染症や事故死は減少したが、生活習慣の変化と寿命の延長により人間同様にがんへの罹患率が増加し、がんは死亡原因の第1位となると共に健康寿命短縮の原因となっている。

(2) 伴侶動物イヌ用に開発された化学療法剤は少なく、ヒト用の抗がん剤が伴侶動物に転用されているが、一部のがんを除きその治療効果は低い。また最新の化学療法剤の一つであるヒト用分子標的剤の多くはヒトの標的蛋白質への特異性が高く伴侶動物イヌへの転用が難しい。一方、伴侶動物イヌはヒトよりも寿命が短いために二次がん発生のリスクが低いので、優れた伴侶動物イヌ用分子標的剤の開発ができれば化学放射線療法が、健康寿命を延ばすための最も有効ながん治療法になりうる。

(3) 放射線により誘発された DNA 二本鎖切断(DSB)は、もし修復されなければ、がん細胞が死ぬ要因となる。一方、がん細胞の DSB は主に非相同末端結合 (NHEJ) 機構で修復されるので、分子標的により NHEJ 機構を阻害できれば様々な「がん」に放射線増感効果を持つ次世代新薬が開発できる可能性が高い。イヌ用の分子標的剤を開発するためにはイヌの DSB 修復機構を分子レベルで正確に理解する必要がある。しかし、これまでにイヌ細胞の NHEJ 機構に関する報告がないばかりか、NHEJ 機構で働く遺伝子のクローニングもされていない。従って、イヌ細胞の NHEJ 機構を解明するには、まず関連する遺伝子の同定やクローニングを行い NHEJ 機構の分子機構を明らかにすることが不可欠である。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、NHEJ を標的とする伴侶動物イヌ用の次世代放射線増感剤開発のための基盤を構築するために、イヌの NHEJ 機構で働くと予想される Ku70, Ku80, XLF, XRCC4 遺伝子をクローニングし、正確な遺伝子配列とアミノ酸配列を決定する。

(2) ヒトや齧歯類のオルソログとの間で、各蛋白質のアミノ酸配列の比較解析を行いドメイン構造と機能制御に関わる翻訳後修飾サイト(リン酸化等)を予測する。

(3) クローニングした(予定)イヌの各遺伝

子と緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を連結した融合型発現ベクターをそれぞれ作製して、各遺伝子産物(蛋白質)の細胞内局在と相互作用機序を解明する。

(4) 各遺伝子産物である標的候補蛋白質を DNA 損傷直後からライブセルで追跡する方法を開発する。

これらを通じて、イヌの NHEJ 機構を分子レベルで明らかにすると共に、新しい放射線増感剤の開発の基盤となる「標的蛋白質と標的アミノ酸部位」を提示する。

## 3. 研究の方法

(1) 遺伝子クローニングと塩基配列の決定: (a) イヌの Ku70, Ku80, XLF, XRCC4 遺伝子について、公開されているイヌゲノム配列からの推測情報とヒトオルソログの配列を参考に、PCR 用の各プライマーを設計する。そして、(b) PCR 法により cDNA ライブラリーから各遺伝子をクローニングする。それから、(c) クローニングした遺伝子のシーケンスを行い塩基配列とアミノ酸配列を決定する。

(2) 種間比較解析: 各遺伝子産物(蛋白質)の機能とその制御機構を解明するために、決定した(予定)各蛋白質のアミノ酸配列と報告されているヒトや齧歯類のオルソログとの間で比較解析を行う。

(3) GFP 融合型発現ベクターの構築と細胞内局在解析: (a) クローニングした(予定)イヌの各遺伝子と緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を連結した融合型発現ベクターをそれぞれ作製する。(b) リポフェクション法により、各発現ベクターをイヌ腎臓尿管上皮細胞由来細胞株 MDCK(Madin-Darby Canine Kidney cells)に導入し、発現させてから、共焦点レーザー顕微鏡法によって各遺伝子産物(蛋白質)の細胞内局在を調べる。

(4) ライブセルイメージング法: 融合した GFP を指標に、イヌの各遺伝子産物である標的候補蛋白質を DNA 損傷直後からライブセルで追跡する。

## 4. 研究成果

(1) イヌの NHEJ コア遺伝子のクローニングと塩基配列の決定: イヌの Ku70, Ku80, XLF, XRCC4 遺伝子について、公開されているイヌゲノム配列からの推測情報とヒトオルソログの配列を参考に、PCR 用の各プライマーを設計し、PCR 法によりイヌ由来の cDNA ライブラリーから各遺伝子をクローニングした。その後、クローニングした遺伝子のシーケンスを行い塩基配列とアミノ酸配列を決定した。その結果、イヌの Ku70 遺伝子は 608 アミノ酸を、XRCC4 遺伝子は 332 アミノ酸を、

XLF 遺伝子は 299 アミノ酸をコードしていることが明らかになった。これらの配列情報は国際塩基配列データベースに登録した(下記参照)。

(2) イヌの NHEJ コア蛋白質の種間比較解析：各遺伝子産物(蛋白質)の機能とその制御機構を解明するために、決定した各蛋白質のアミノ酸配列と報告されているヒトや齧歯類のオルソログとの間で比較解析を行った。その結果、アミノ酸配列は、イヌ Ku70 蛋白質とヒト Ku70 の間で約 87%が、イヌ XRCC4 とヒト XRCC4 の間で約 80%が、イヌ XLF とヒト XLF の間で約 82%が一致していた。また、3つの遺伝子の核移行シグナルの構造は、ヒト、マウス、イヌの間で保存されていた。一方で、これらのヒト遺伝子の機能に重要と考えられている翻訳後修飾サイトや蛋白質結合ドメインは完全には保存されていなかった。例えば、ヒト XRCC4 の細胞内の局在制御に重要であることが報告されている Sumo 化サイト(210 番目のリジン(K210))は、イヌ XRCC4 には保存されていなかった。また、ヒト XLF の SCF -TRCP を介したポリユビキチン化に関わると報告されている -TRCP-recognizable degron は、イヌ XLF とマウス XLF において、完全には保存されていなかった。さらに、ヒトの Ku70 の 5' dRP/AP lyase activity に重要とされている 31 番目のリジン(K31)は、イヌ Ku70 には保存されていなかった。これらの結果は、伴侶動物イヌの NHEJ 分子機構を正確に理解するためにはヒトや齧歯類で報告されている NHEJ コア蛋白質の機能や調節機構についても注意深く検証をする必要があることを示唆する。これらの情報は、NHEJ を標的とする伴侶動物イヌ用の次世代放射線増感剤開発のための標的蛋白質と標的アミノ酸部位を決定する上で、重要な情報となる。

(3) イヌの NHEJ コア蛋白質と GFP の融合型発現ベクターの構築と細胞内局在解析：クローニングしたイヌの各遺伝子と緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を連結した融合型発現ベクターをそれぞれ作製した。それから、リポフェクション法により、各発現ベクターをイヌ細胞株 MDCK に導入し、発現させた。そして、共焦点レーザー顕微鏡法によって各遺伝子産物(蛋白質)の細胞内局在を調べた。その結果、イヌ Ku70、イヌ XRCC4、イヌ XLF 蛋白質は、細胞周期の間期には主に細胞核内に、細胞分裂期には凝縮した染色体領域を除く細胞全体に局在することが明らかになった。これらの結果は、ここで解析したイヌの NHEJ コア蛋白質は細胞周期特異的に細胞内局在をダイナミックに変化させることを、示唆する。

(4) イヌの NHEJ コア蛋白質のライプセルイメージング法の開発：ヒトの NHEJ コア蛋白質

のライプセルイメージング法を応用して、それぞれのイヌの NHEJ コア蛋白質と融合した GFP を指標に、マイクロレーザーで狙った極局所領域に誘発した DNA 損傷(DSB)部位への蓄積の様子を DNA 損傷直後からライプセルで追跡する方法を構築した。その結果、イヌ Ku70、イヌ XLF、イヌ XRCC4 蛋白質は、マイクロレーザーで誘発した細胞内極局所の DSB 領域(H2AX 染色領域)に、損傷直後から集積することが明らかになった。

以上まとめると、計画していたイヌの NHEJ 遺伝子のうちの4つの遺伝子の全てのクローニングに成功し、正確な遺伝子配列を明らかにできた。また、アミノ酸配列の種間比較をすることで、種を超えて保存されている翻訳後修飾サイトと蛋白質結合ドメインを明らかにすることができた。さらに、イヌの NHEJ コア蛋白質のライプセルイメージング法の開発にも成功した。これらの情報や材料は、伴侶動物イヌの次世代放射線増感剤開発のためばかりでなく、ヒトの次世代放射線増感剤開発のためにも役立つことが期待される。さらに、NHEJ コア蛋白質は V(D)J 組み換え機構、テロメアー維持機構やゲノム安定化機構等の生命現象にも重要な役割をしていることから、本研究で得られた成果は伴侶動物イヌの NHEJ の分子機構の解明や創薬ばかりでなく、未解明な疾患の発見や治療法の開発に寄与することが期待される。

#### <引用文献>

Yurchenko, V., Xue, Z. and Sadofsky, M. J. 2006. SUMO modification of human XRCC4 regulates its localization and function in DNA double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* 26: 1786-1794.

Liu, P., Gan, W., Guo, C., Xie, A., Gao, D., Guo, J., Zhang, J., Willis, N., Su, A., Asara, J. M., Scully, R. and Wei, W. 2015. Akt-mediated phosphorylation of XLF impairs non-homologous end-joining DNA repair. *Mol. Cell* 57: 648-661.

Strande, N. T., Carvajal-Garcia, J., Hallett, R. A., Waters, C. A., Roberts, S. A., Strom, C., Kuhlman, B. and Ramsden, D. A. 2014. Requirements for 5' dRP/AP lyase activity in Ku. *Nucleic Acids Res.* 42: 11136-11143.

#### 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3件)

Manabu Koike, Yasutomo Yutoku, Aki Koike, 2017, Cloning, localization and focus formation at DNA damage sites

of canine Ku70, The Journal of Veterinary Medical Science, 査読有, Vol.79, No.3, pp.554-561.  
DOI : 10.1292/jvms.16-0649

Manabu Koike, Yasutomo Yutoku, Aki Koike, 2017, Cloning, localization and focus formation at DNA damage sites of canine XLF, The Journal of Veterinary Medical Science, 査読有, Vol.79, No.1, pp.22-28.  
DOI : 10.1292/jvms.16-0440

Manabu Koike, Yasutomo Yutoku, Aki Koike, 2016, Cloning, localization and focus formation at DNA damage sites of canine XRCC4, The Journal of Veterinary Medical Science, 査読有, Vol.78, No.12, pp.1865-1871.  
DOI : 10.1292/jvms.16-0381

〔学会発表〕(計2件)

第159回日本獣医学会学術集会  
発表者：小池 亜紀、湯徳 靖友、小池 学  
発表課題：伴侶動物のDNA二本鎖切断修復の分子機構に基づく新しい放射線増感剤開発の基盤研究-DNA修復蛋白質XRCC4が損傷DNAに集積する様子のライブセルイメージング  
会期：2016年9月6日～2016年9月8日  
発表場所：日本大学生物資源科学部(藤沢市)

第157回日本獣医学会学術集会  
発表者：小池 亜紀、湯徳 靖友、小池 学  
発表課題：DNA修復蛋白質XLF/NHEJ1が損傷DNAを修復するために損傷部に集積する様子のライブセルイメージングとDSB認識の分子機構の解明-人間、家畜、伴侶動物、実験動物-  
会期：2014年9月9日～2014年9月12日  
発表場所：北海道大学高等教育推進機構(札幌市)

〔その他〕

遺伝子登録 (計3件):

canine XLF 遺伝子(国際塩基配列データベース accession number: LC176889)

canine XRCC4 遺伝子(国際塩基配列データベース accession number: LC168634)

canine Ku70 遺伝子 (国際塩基配列データベース accession number: LC195221)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

小池 亜紀 (KOIKE, Aki)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機

構・放射線医学総合研究所・加速器工学部・技術員

研究者番号：50415410

(2)研究分担者

小池 学 (KOIKE, Manabu)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・分子イメージング診断治療研究部・主幹研究員

研究者番号：70280740