

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26740020

研究課題名(和文) DNA損傷修復蛋白質XRCC4の脱リン酸化がアポトーシス促進の引き金となるか

研究課題名(英文) Does dephosphorylation of DNA-damage repair protein XRCC4 trigger enhancement of apoptosis?

研究代表者

砂谷 優実 (SUNATANI, Yumi)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：70581057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：DNA修復蛋白質XRCC4のDNA修復以外の機能はよくわかっていない。以前私は、XRCC4がThr233リン酸化依存性にアポトーシスを促進すること、そしてカスパーゼにより切断されて生じたXRCC4断片のThr233が脱リン酸化されることを見出した。本研究では、Thr233の脱リン酸化がXRCC4によるアポトーシスの促進を誘導すると予想し、検証した。その結果、XRCC4がアポトーシスを促進するには、リン酸化Thr233の脱リン酸化が必要であることが証明された。さらに、Thr233のリン酸化にはリン酸化酵素DNA-PKおよびCK2が、脱リン酸化には脱リン酸化酵素PP2Aが関与することが示された。

研究成果の概要(英文)：A role of DNA-damage repair protein XRCC4 in apoptosis is not well understood. I have revealed that XRCC4 enhances apoptosis after its cleavage by caspases, and this enhancing effect requires the phosphorylation of XRCC4Thr233. I have further shown that the cleaved fragment of XRCC4 is dephosphorylated during apoptosis. In this study, I asked whether the dephosphorylation of phosphorylated XRCC4Thr233 enhances apoptosis. The results showed that the dephosphorylation of XRCC4Thr233 leads to apoptosis enhancement. Furthermore, protein kinase DNA-PK and/or CK2 are/is involved in the phosphorylation, whereas protein phosphatase PP2A is involved in the dephosphorylation of XRCC4Thr233.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アポトーシス リン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

アポトーシスに陥った細胞において、DNA 損傷修復タンパク質の多くは、タンパク分解酵素であるカスパーゼにより切断されることで DNA 修復活性を失う。その一方で、カスパーゼにより切断されてきた DNA 修復タンパク質由来のポリペプチドが、アポトーシスを促進する例が報告されている。例えば、DNA 損傷を感知する Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 (MDC1) は、カスパーゼにより切断されると、DNA 修復タンパク質群の DNA 損傷部位への集積を抑制することで、アポトーシスを促進する。

X-ray repair cross complementing 4 (XRCC4) は、DNA 二本鎖切断 (DSB: double strand break) の非相同末端結合修復 (NHEJ: non-homologous end joining) において、セリン/スレオニンリン酸化酵素である DNA-PK から DSB 末端結合酵素である DNA リガーゼ IV へのシグナルを仲介するタンパク質である。XRCC4 は、233 番目のスレオニン (Thr233) がリン酸化されることで、DSB 断端処理タンパク質と結合し、NHEJ を促進するという機構が報告されている。しかし、DNA 損傷修復以外における XRCC4 の機能は不明であった。

アポトーシスに関連した XRCC4 のふるまいに関しては、これまでに、X 線や温熱で誘導されるアポトーシスで、カスパーゼにより切断されて XRCC4-N 末断片 (以下 p35、p35 はリン酸化標的残基である Thr233 を含む) となるという報告があったが、切断により生じたポリペプチドがアポトーシスに影響を及ぼすか否かは検証されていなかった。

## 2. 研究の目的

申請者は、所属する岩淵教授研究グループにおいて、XRCC4 の切断がアポトーシスに及ぼす影響を調べた。マウスリンパ腫由来 XRCC4 欠損細胞株 M10 と M10 に XRCC4 を発現させた細胞に、Protein Kinase C 阻害剤 Staurosporine (STS) でカスパーゼを活性化することで、アポトーシスを誘導した。その結果、以下を見出した。

- (1) XRCC4 は切断依存性にアポトーシスを促進すること
- (2) (1) の促進は、XRCC4 切断依存性の Inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) -S mRNA の減少と、それに伴う Caspase-activated DNase (CAD) の活性化促進に起因すること
- (3) (1) の促進は DNA-PK 活性依存性であること
- (4) (1) の促進はアポトーシス以前の XRCC4Thr233 のリン酸化に依存すること

- (5) カスパーゼによる切断で生じる p35 では Thr233 は脱リン酸化されていること

以上より申請者は、リン酸化された XRCC4Thr233 が、カスパーゼによる切断依存性に脱リン酸化されることが、アポトーシス促進の引き金になるという仮説を立てた。本研究は、この仮説を証明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) Thr233 非リン酸化型かつカスパーゼで切断されない XRCC4 発現細胞株の樹立

マウスリンパ腫由来 L5178Y 細胞株を親株とする XRCC4 欠損株である M10 細胞株において、野生型ヒト XRCC4 発現細胞株 (M10-XRCC4)、カスパーゼにより切断されない XRCC4 発現細胞株 (M10-D265A)、Thr233 がリン酸化されない XRCC4 発現細胞株 (M10-T233A)、コントロールとなるベクター導入 XRCC4 欠損細胞株 (M10-vector) を既に入手していた。そこで、Thr233 がリン酸化されず、かつカスパーゼで切断されない XRCC4 発現細胞株 (M10-T233AD265A) を、前述の変異型 XRCC4 発現細胞株と同様に、発現ベクターを構築し細胞に導入することで樹立した。

- (2) Thr233 強制リン酸化型 p35 発現ベクターの構築

XRCC4 がアポトーシス促進効果を発揮するのにリン酸化型 Thr233 (pThr233) の脱リン酸化が必要かを検証するために、Thr233 が脱リン酸化されない p35 発現ベクターを、Thr233 を強制的にリン酸化類似状態となるようグルタミン酸 (Glu) に置換することで構築した。また、当初の計画で予想された Thr から Glu の置換では強制的なリン酸化状態の効果を検出できないといった問題を避けるべく、Glu とは別の酸性アミノ酸であるアスパラギン酸へ置換した p35 発現ベクターも合わせて構築した。

- (3) Thr233 強制リン酸化型 XRCC4 発現細胞株の樹立

Thr233 が常にリン酸化類似状態となる、すなわち Thr233 強制リン酸化型の XRCC4 発現細胞株 (M10-T233E) を、前述の変異型 XRCC4 発現細胞株と同様に、発現ベクターを構築し細胞に導入することで樹立した。

#### 4. 研究成果

##### XRCC4Thr233 のリン酸化およびカスパーゼによる切断で生じた p35pThr233 の脱リン酸化の両反応が、XRCC4 によるアポトーシスの促進に必要であることの証明

##### (1)Thr233 の脱リン酸化はカスパーゼによる切断依存的かの検証

M10-XRCC4 および M10-D265A を、STS で処理することでアポトーシスを誘導した。その後、細胞粗抽出液について抗カスパーゼ抗体および抗 XRCC4pThr233 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。その結果、M10-D265A においても、M10-XRCC4 と同程度のカスパーゼの活性化が検出された。また、XRCC4 のリン酸化状態を検出したところ、アポトーシス前の M10-D265A においても、M10-XRCC4 と同程度の XRCC4Thr233 のリン酸化がみられた。一方、アポトーシス誘導後の M10-D265A および M10-XRCC4 において、同程度に XRCC4Thr233 が脱リン酸化されていた。この結果より、アポトーシスにおける XRCC4Thr233 の脱リン酸化には、カスパーゼによる切断が不要であることが証明された。

##### (2)Thr233 の脱リン酸化がアポトーシスの促進の引き金になるかの検証

M10-vector、M10-XRCC4、M10-T233A、および M10-T233E を、STS で処理することでアポトーシスを誘導した。その後、アポトーシス時に XRCC4 下流で誘導される ICAD-S mRNA の減少を定量的 RT-PCR 法で、アポトーシスで特異的に生じる DNA 切断を terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 法で検出した。その結果、ICAD-S mRNA の減少および TUNEL 陽性細胞群の増加は、M10-T233A と M10-T233E のいずれにおいても認められなかった。これらの結果から、XRCC4 によるアポトーシスを促進には、Thr233 のリン酸化および脱リン酸化の両方の現象が必要であることが示された。

##### (3)Thr233 リン酸化型の p35 を大量発現させるとアポトーシスが抑制されるかの検証

Thr233 強制リン酸化型 p35 発現ベクターを M10-XRCC4 にエレクトロポレーションで高効率に導入し、アポトーシスを TUNEL 法で解析した。その結果、TUNEL 陽性細胞の増加は検出されなかった。この結果から、XRCC4 がアポトーシス促進作用を発揮するためには、カスパーゼにより生じた p35 が脱リン酸化される必要があることが示唆された。

以上の結果から、XRCC4Thr233 のリン酸化、およびアポトーシスでカスパーゼに切断されて生じた p35 が脱リン酸化の両方が、XRCC4 のアポトーシス促進作用発揮の引き金になるという結論に至った。

##### アポトーシスにおける Thr233 の責任リン酸化酵素および脱リン酸化酵素の同定

XRCC4 による Thr233 リン酸化・脱リン酸化依存的なアポトーシス促進のメカニズムの詳細を明らかにするため、本機構に關与する責任リン酸化酵素・脱リン酸化酵素の同定を試みた。

##### (1) 阻害剤を用いた Thr233 の責任リン酸化酵素の探索

Thr233 のリン酸化を担うリン酸化酵素をスクリーニングした。候補には、既知のスレオニンリン酸化酵素である、Ataxia telangiectasia mutated (ATM)、Ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR)、DNA-PK、および XRCC4Thr233 をリン酸化することが報告されている Casein kinase 2 (CK2) を設定した。これらの酵素の阻害剤各種で予め処理した M10-vector および M10-XRCC4 を、STS で処理することでアポトーシスを誘導した。そして、アポトーシスを TUNEL 法で解析し、阻害剤処理により XRCC4 依存性アポトーシスの促進が抑制されるリン酸化酵素をスクリーニングした。その結果、DNA-PK あるいは CK2 の阻害剤で処理したときのみ、TUNEL 陽性細胞群の増加は認められなかった。この結果から、DNA-PK および/あるいは CK2 がアポトーシス促進に必要な XRCC4Thr233 のリン酸化を担うことが示唆された。

##### (2) 阻害剤を用いた pThr233 の責任脱リン酸化酵素の探索

pThr233 の脱リン酸化を担う脱リン酸化酵素をスクリーニングした。候補には、既知のスレオニン脱リン酸化酵素である Protein phosphatase (PP)1、PP2A、PP2B、および PP2C を設定した。これらの脱リン酸化酵素阻害剤各種を用いて、前述の(1)と同様の方法で責任脱リン酸化酵素をスクリーニングした。その結果、PP2A 阻害剤処理時にも、M10-XRCC4 における TUNEL 陽性細胞群の増加が認められなかった。この結果から、PP2A 活性がアポトーシス促進の引き金となる p35Thr233 脱リン酸化に必要なと考えられた。

以上の結果から、XRCC4 によるアポトーシス促進作用を引き起こすための Thr233 のリン酸化は DNA-PK および/あるいは CK2 が担い、p35Thr233 の脱リン酸化は PP2A が担うことが考えられた。それぞれの酵素が、XRCC4 の Thr233 リン酸化および p35Thr233 脱リン酸化を引き起こしたアポトーシス促進機構において、標的である Thr233 を実際にリン酸化・脱リン酸化していることの検証は今後の課題としたい。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

砂谷 優実, Kamdar R.P, Sharma M.K, 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 (神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市), 2015.12.3)

Sunatani Y, Sharma M.K, Kamdar R.P, Matsui T, Sakasai R, Hashimoto M, Matsumoto Y, Iwabuchi K: Phosphorylation-mediated Regulation of Apoptosis by NHEJ-protein XRCC4, 15<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research (Kyoto International Conference Center (Kyoto, Kyoto), 2015.5.26)

砂谷 優実, Kamdar R.P, Sharma M.K, 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 (国立京都国際会館 (京都府京都市), 2014.10.16)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

砂谷 優実 (SUNATANI, Yumi)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70581057