

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510077

研究課題名(和文)二つのKu80に依るパラダイムシフト：ヒト放射線誘発DNA損傷応答機構の新モデル

研究課題名(英文)A paradigm shift by two Ku80: New model of the radiation-induced DNA damage response mechanism in human cells

研究代表者

小池 学 (KOIKE, MANABU)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・主任研究員

研究者番号：70280740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：KuはNHEJ修復機構において必須の役割を担う。霊長類細胞では齧歯類細胞に発現していないKu80のアイソフォームが発現することが報告されている。また2つのアイソフォームに共通に存在するC末側の領域にNLSがあることが知られている。本研究の結果、霊長類細胞にのみ発現するとされているアイソフォームのN末側(1-88)にも局在を調節する領域が存在し、局在を介して機能を調節している可能性が示唆された。またGFP-KARP-1(1-88)を導入したトランスジェニックマウスとKu80変異マウスを作成した。これらの情報やマウスはKARP-1(1-88)の機能やDSB修復機構を解明するために有用である。

研究成果の概要(英文)：Ku (the heterodimer of Ku70 and Ku80) plays a pivotal role in the DNA double-strand break (DSB) repair pathway (non-homologous end-joining (NHEJ)). It has reported that two isoforms of Ku80 encoded by the same genes are expressed and function in primate cells, but not in rodent cells. In this study, our data suggested the possibility that nuclear localization signal of one isoform is localized not only in the C-terminal region, but also in the N-terminal region. In addition, we generated a transgenic mouse that were introduced GFP-KARP-1(1-88). These information and the mouse generated might be useful for study of KARP-1(1-88) functions and the DSB repair pathway.

研究分野：放射線生物学

キーワード：Ku80

1. 研究開始当初の背景

電離放射線は細胞核内の DNA に損傷を起こし、がんや遺伝病等の病気を誘発する。そのため、医療放射線、飛行環境、原子力事故等を主な線源とする放射線の人体への影響の解明は、安全性評価や放射線防護の実際に即して現在も最重要課題の一つである。他方、これまで主に実験動物由来細胞を材料とした解析により得られてきた分子レベルでの放射線応答機構の解析結果を実際の人体の放射線影響の解明とリスク評価の精度向上に役立てるには、分子疫学手法に貢献する橋渡し研究、即ち、ヒト遺伝子、ヒト正常細胞や組織を材料とした分子・細胞レベルでの解析が不可欠と考えられている。

電離放射線による DNA 二本鎖切断損傷 (DSB) は最も危険な DNA 損傷であると考えられている。DSB 修復機構は電離放射線や環境中の化学物質により損傷を受けた DNA を修復し遺伝情報を安定に維持する機構であり、齧歯類やヒト細胞では NHEJ 機構により、酵母やニワトリ細胞では相同組換え (HR) 機構により主に修復される。他方、誘発された DNA 損傷が NHEJ により不正確に修復されるとゲノム DNA 中の変異が発がん等の疾患の原因になりうるとされている。ヒトや齧歯類の細胞内では DNA に障害が起こると損傷の感知システムが働き、損傷 DNA の修復や細胞周期の進行を調節する機構が働く。下等な生物においても類似した機構が働くことが知られており、生物のゲノムの維持にとって重要なシステムであると考えられている。被ばく後の細胞が損傷 DNA を修復するには、初期応答として損傷 DNA を認識し結合する蛋白質がリン酸化やアセチル化等の修飾を受け、DNA 損傷部位に移動し、局在することが重要である。これらの機構がそれぞれの調節を受けると共に、各機構間でもクロストークしながらその進行の調和を保つことが重要であるが、その詳細は未解明のままである。修復機構の選択メカニズムや種間差に関しても、(1) 何故、同一の DSB 損傷を修復するのに 2 種類 (NHEJ と HR) の機構が必要なのか？ (2) 何故、ヒト細胞は正確度の低い NHEJ 機構で修復するのか？ (3) 何故、ヒトの NHEJ (DNA-PK) 活性は極端に高い必要があるのか？ 等、未だ不明瞭なままである。

高等真核細胞の NHEJ 機構モデルは主に齧歯類やニワトリの細胞を材料とした結果に基づいて提唱されている。即ち、Ku70/Ku80 が DNA 切断末端に結合することにより修復を開始する。次に Ku がリクルートすることで活性化したリン酸化酵素 DNA-PK が自己を含む修復酵素群の活性調節を行う。続いて XLF により活性化した XRCC4/DNA ligase IV (Lig IV) が Artemis 等によりプロセシングされた

DNA 末端を再結合し修復を終える。興味深いことに、ヒトを含む霊長類の Ku80 には同一遺伝子座から転写翻訳されるアイソフォームが存在することが報告されている。即ち、ヒトには齧歯類やニワトリ細胞にはないもう一つの Ku80 が発現するとされている。Ku86 Autoantigen Related Protein-1 (KARP-1) は、Ku80 の翻訳開始領域より約 8 kb 上流から翻訳される蛋白質で、ヒトでは Ku80 の N 末に 88 アミノ酸が付加される。その 88 アミノ酸領域の中には、アミノ酸配列から予測される推測上のロイシンジッパーと核移行シグナル様の配列がある。第 2 イントロンには p53 結合配列があり、p53 により転写を制御されることが知られている。また、ATM の下流因子として p53 依存的に電離放射線により誘導されることが報告されている。これまでに、ドミナントネガティブな効果が期待される KARP-1 特異的な 88 アミノ酸を細胞に過剰発現させると (a) DNA-PK 活性が低下すること、(b) 放射線感受性になることから、KARP-1 は DNA-PK 依存的な NHEJ 機構を制御する機能を持つことが提唱されているけれども、(1) 齧歯類等には存在せず、高度に進化したヒトを含む霊長類でのみ発現誘導されるので、マウスやニワトリ細胞による解析ができない、(2) オーバーラップしてコードされる Ku80 がヒト細胞の生存に必須な蛋白質なので、常法ではヒト KARP-1 ノックアウト細胞を樹立できない、(3) Ku80 siRNA は同時に KARP-1 の発現も抑制してしまうこと等の理由から、その機能はほとんど解析がなされていない。一方、KARP-1 は、(a) ストレス応答機構で重要な ATM-p53 シグナルにより発現誘導される可能性があること、(b) NHEJ 機構で不可欠な役割を担う Ku80 のドメイン構造を全て含むことから、ヒトの DSB 損傷応答機構において中心的な機能を担う可能性がある。

申請者らは、Ku 蛋白質の機能とその制御機構に注目して研究を行い、Ku の細胞内局在や挙動を解明すると共に、その制御機構が NHEJ の機能制御に重要であることを明らかにしてきた。加えて、Ku のヘテロダイマー形成、核局在化や DNA 結合に不可欠なアミノ酸領域を同定してきた。最近、Ku 蛋白質がマイクロレーザーで誘発した DNA 損傷部位に集積する様子を追跡するためのリアルタイムイメージング法の開発に成功し、集積のキネティクスと損傷 DNA への結合に必須なドメイン構造を明らかにした。さらに、Ku70 は Ku80, XRCC4, DNA-PKcs や XLF を DSB にリクルートするために不可欠であるが、Artemis や p21, Rad52 のリクルートには必要ない事を明らかにした。

以上の背景から、Ku80 と KARP-1 の機能やその制御機構について解析すること、

モデル細胞や動物を作製し DSB 損傷応答機構と修復機構での KARP-1 の機能を分子細胞生物学的に解析することは、放射線の人体への影響の解明するための研究の一つとして重要である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトの DSB 損傷応答機構と修復機構での KARP-1 の機能や制御機構を解明するために、KARP-1 の機能解析のための細胞モデルと動物モデルを作出し、(1)ヒト KARP-1 を細胞内で発現させて分子細胞生物学的に解析を行う、(2)ヒト KARP-1 全長(1-820)あるいはドミナントネガティブ型 KARP-1 (1-88)を発現するマウスを開発する。これらを通じて、放射線の人体への影響の解明に貢献するために必要な情報を得る。

3. 研究の方法

本研究は主に以下の様に行った。GFP-KARP-1 とドミナントネガティブ型 KARP-1 (1-88)や各種変異型 KARP-1 を細胞内に導入して、それらの発現、細胞内局在やその制御機構等を解析した。GFP-KARP-1 とドミナントネガティブ型 KARP-1(1-88)を皮膚表皮基底細胞で発現するマウスの作出を試みた。同時に、内在性のマウス Ku80 の影響を排除し解析を進めるために、Ku80 を発現しない Ku80 変異マウスの作製を試みた。

(1) 細胞培養とヒト KARP-1 の培養細胞への導入

ヒト正常線維芽細胞、ヒト子宮がん細胞 (HeLa) やハムスターの卵巣由来の細胞株等は、常法に従って、37 度、5%CO₂ の条件で培養した。培養細胞へ導入した発現ベクターには、プロモーター (CMV) の下流にある GFP の C 末側に外来遺伝子を融合するタイプのベクター (クローンテック) を使用した。精製後の EGFP-Ku80、EGFP-KARP-1、ドミナントネガティブ型 KARP-1 (1-88)、あるいは各種変異型 KARP-1 発現プラスミドベクターは、常法に従って、リポフェクション法によって細胞内に遺伝子導入した。また、以前に樹立した EGFP-Ku80、EGFP-KARP-1、EGFP をそれぞれ恒常的に発現する細胞株を使用した。

(2) KARP-1 の検出

細胞内に発現する GFP-KARP-1 の検出は、常法に従って、特異抗体を用いたウエスタン法、蛍光顕微鏡法や共焦点レーザー顕微鏡法で行なった。検出には、既存の抗体と作成したウサギポリクロナール抗体を使用した。

(3) GFP-KARP-1 とドミナントネガティブ型 KARP-1 (1-88)導入マウスの作出

発現ベクターの構築と導入遺伝子の精製

外来遺伝子導入動物を作成した場合に、導入した遺伝子の働きによって胎生致死になり、その後の解析ができないことがあることは良く知られている。そこで、導入した遺伝子の働きによって胎生致死になることを回避するために、また、形態学的な異常の観察がしやすい皮膚に発現させるために、妊娠中期以降から皮膚で外来性の遺伝子を発現するマウスの作製を試みた。また、生きたままの観察を可能にするために GFP 融合蛋白質として発現させることにした。ヒトと同様に、マウス上皮細胞では特異的なケラチンの発現が分化の状態により厳密に制御されている。そこで、GFP 融合蛋白質の発現を皮膚の表皮基底細胞で恒常的且つ特異的に誘導するプロモーターとして、他の遺伝子導入マウス作製時に使用した経験のある表皮基底細胞で発現するケラチンのプロモーターを選択した。遺伝子工学技法により、プロモーターの下流に GFP を融合した KARP-1、あるいは GFP-KARP-1(1-88)を連結した発現プラスミドベクターの構築を進めた。その結果、GFP-KARP-1(1-88)を連結した発現プラスミドベクターの構築はできたが、全長を含む KARP-1(1-820)発現プラスミドベクターは構築できなかった。そこで GFP-KARP-1(1-88)を連結した発現プラスミドベクターを大腸菌で大量複製した後に、制限酵素処理により、GFP-KARP-1(1-88)とプロモーター領域、TATA 配列、ポリ A シグナル等からなる発現に必要な最小限の遺伝子断片にした。次いで、カラムによる DNA 精製を行った。

GFP-KARP-1(1-88)トランスジェニックマウスの作出

常法に従って、上記の DNA 精製断片を含む溶液を C57BL/6J マウス前核期受精卵にマイクロインジェクション法により導入し、正常な発生を確認した後に、偽妊娠マウスに移植して仔マウスを得た。ファウンダーマウスのスクリーニングは導入遺伝子を検出する特異的 PCR プライマーセットによる PCR 法により行った。

(4) Ku80 変異マウスの作出

ゲノム編集法により、Ku80 変異マウスの作出を行なった。ゲノム編集の有無は塩基配列を決定し行なった。作出したファウンダーマウス系統をヘミ接合型マウスとして維持するために、同系統の野生型マウスと交配し、子孫を得た。尚、交配により導入遺伝子が子孫に遺伝することは、シーケンシングをして確認した。

4. 研究成果

低線量放射線の人体への影響の解明は喫緊の課題である。放射線により誘発された DNA DSB が NHEJ 機構で修復されると突然変異や発がんの原因になりうる。Ku(Ku70/Ku80)は NHEJ 機構に不可欠な

修復蛋白質である。これまで NHEJ 機構のモデリングは主に齧歯類やニワトリの細胞を材料に行われてきたが、ヒトとこれら生物種では修復機構の選択等に相違がある。例えば、ヒト細胞ではこれら生物種には存在しないもう一つの Ku80 が発現して NHEJ 機構の活性調節をしている可能性が報告されている。そこで、2 種類の Ku80 の機能やその制御機構を比較するために、それぞれの Ku80 やその変異体を細胞に導入し、解析を進めた。同時に、個体での機能を解析するために、GFP-KARP-1 を発現するマウスの作出を目指して実験を行った。また、内在性の Ku80 との競合を避けるために使用する Ku 変異マウスの作出を目指して実験を行なった。

(1) KARP-1 の発現解析

2 種類の Ku80 の機能やその制御機構を比較するために、それぞれの Ku80 やその変異体を細胞に導入し解析を行なった。まず、GFP-KARP-1 を検出できる抗体を選択するために、GFP-Ku80 発現プラスミドベクターあるいは GFP-KARP-1 発現プラスミドベクターを導入した細胞から蛋白質を粗抽出し、抗 GFP 抗体、抗 Ku80 抗体、抗 α -アクチン抗体を用いてウエスタン法による解析を行った(図 1)。一過性に発現させたヒト子宮がん細胞 (HeLa) の抽出物について 3 種類のヒト Ku80 を検出できる抗体を使用して解析した結果、内在性の Ku80 よりも高分子側の期待される位置に、GFP-KARP-1 と GFP-Ku80 が検出された。また、抗 Ku80 抗体で検出されたバンドは抗 GFP 抗体によっても検出された。他方、どちらを導入した場合にも内在性の Ku70 と Ku80 の発現量に大きな変化は検出されなかった(データ非公表)。尚、作成した抗 Ku70 ウサギ抗体によって、内在性の Ku70 の検出はできたが、同時に作成した (KARP-1 特異的な領域内のペプチド配列を免疫源とした)抗 KARP-1 ウサギ抗体によっては GFP-KARP-1 の検出はできなかった。次に、GFP-KARP-1 あるいは GFP-Ku80 を恒常的に発現する Ku80 欠損細胞株の抽出物を解析した結果、2 種類のヒト Ku80 抗体によって、GFP-KARP-1 あるいは GFP-Ku80 が検出できた。また、抗 Ku80 抗体で検出されたバンドは GFP 抗体によっても検出された。次に、GFP-KARP-1 を恒常的に発現する Ku80 欠損細胞を材料に、特異抗体を用いて蛍光顕微鏡法による検出を行なった。その結果、2 種類の抗 Ku80 抗体によって、細胞分裂の間期の細胞の核内に GFP-KARP-1 を検出できた。続いて、これらの抗体を使用して、X 線照射時に発現変化することが知られている DSB マーカー (H2AX) や p53 蛋白質の誘導が検出される条件でヒト正常線維芽細胞等を材料に KARP-1 の発現誘導の検証を行なった(データ非公表)。

(2) Ku80 アイソフォーム (KARP-1) の機能とその制御機構の解析

我々が構築した種々の野生型及び欠損変異型あるいは点突然変異型 KARP-1 発現プラスミドベクターを材料に、GFP を指標に生きたまま解析するライブセルイメージング法や各種分子細胞生物学的な解析を行なった(データ非公表)。その結果、期待される様に、EGFP-KARP-1 はヒト細胞の核に局在していた。また、Ku80 には存在しない KARP-1 にのみに存在する領域 KARP-1(1-88)だけでも細胞核に局在できることが明らかになった。KARP-1 の細胞内局在を制御する領域として、Ku80 にも共通に存在する C 末側の核移行シグナルが知られている。本研究の結果、細胞内局在を制御する領域が KARP-1 に特異的な領域にも存在することが実験によって示唆された。これらの結果から推測すると、KARP-1 の機能は細胞内の局在制御機構で制御されている可能性がある(投稿準備中)。尚、これらの解析を行う過程で、予想外にも EGFP を発現させた Ku80 欠損細胞株の放射線感受性が、親株よりも高い事がわかったので、その原因究明とコントロールに使用する細胞株について放射線未照射時と照射時の実験の諸条件の再検討を行った。その結果、Ku80 には GFP による細胞毒性を打ち消す役割がある可能性が示唆された。

(2) GFP-KARP-1 発現トランスジェニックマウスの作出

本研究では、プロモーターの下流に GFP を融合した KARP-1 遺伝子、あるいは GFP-KARP-1(1-88)を連結した発現プラスミドベクターの構築を進めたが、当初、優先的に進めることを予定していた全長を含む KARP-1(1-820)を発現するプラスミドベクターの構築ができなかったため、トランスジェニックマウスの作出は GFP-KARP-1(1-88)発現マウスの作出のみを行なった。マイクロインジェクション法により DNA 溶液を注入し生き残った C57BL/6J マウス前核期受精卵 (143 個)のうち、2 細胞期に発生したもの(95 個)を偽妊娠誘導したマウスの卵管に移植した結果、6 匹 (5、1) が生まれた。遺伝子型解析に供した週齢まで正常に発育した 6 匹のマウス尾から抽出・精製したゲノム DNA を材料に、導入遺伝子を検出する特異的 PCR プライマーセットによるスクリーニングを行った。その結果、1 匹のゲノム DNA から導入遺伝子が検出された(図 2)。1 例ではあるがこれまでのところ遺伝子導入が確認されたマウスの皮膚に形態学的な異常は認められていないので、ヒトの KARP-1 に特異的な領域(1-88)はマウスの生存や皮膚の形態形成に影響しない可能性がある。今後、自然交配によって繁殖や系統化を進める予定である。

(3) Ku80 変異マウスの作出

常法に従って、マウス初期胚でゲノム編集を行い、Ku80 変異マウスの作出を試みた。ファウンダーマウスのスクリーニングは PCR 法で増幅した遺伝子断片の塩基配列を決定して行なった。その結果、ゲノム編集された遺伝子変異のパターンには複数のパターンが見られた。また、個々のマウスのゲノムの中でも複数のパターンが見つかったことから、作出したファウンダーマウス系統をヘミ接合型マウスとして維持するために、同系統の野生型マウスと交配し、子孫を得た後に、上記の方法で再度塩基配列を調べた。その結果、交配によって導入した遺伝子が子孫に遺伝することが確認できたので、今後、基礎的な情報を得るための解析を進めてから、Ku80 欠損 GFP-KARP-1(1-88)トランスジェニックマウスを開発し、解析する予定である。

本研究でプロモーターの下流に GFP を融合した KARP1、あるいは KARP-1(1-88) を連結した発現プラスミドベクターの構築を進めたが、当初、優先的に進めることを予定していた全長を含む KARP-1(1-820) を発現させるプラスミドベクターの構築ができなかった。また、本研究で使用していたマウス飼育施設で発生した MHV (マウス肝炎ウイルス) 汚染事故による施設利用制限の影響が 1 年以上に渡った。これらの影響で、当初予定していたマウスを使用した研究を十分に進めることができなかった。一方、本研究で作出したマウスは、これまでに報告されていない。また、KARP-1(1-88)領域に結合する蛋白質をコードする遺伝子 (a rat homolog of KAB1 (KARP-1 binding protein 1 of human) が Do ら (2003) によって報告されている。さらに、導入した遺伝子には EGFP が融合してあるので、生体でのライブセルイメージング技術等を使用すれば、目的遺伝子の機能解析を進めるための基礎情報ばかりでなく、本研究に限らず様々な研究領域で活用されることが期待される。尚、本研究で得られた結果や情報に基づいて、今後、更に解析を進めることを検討している。

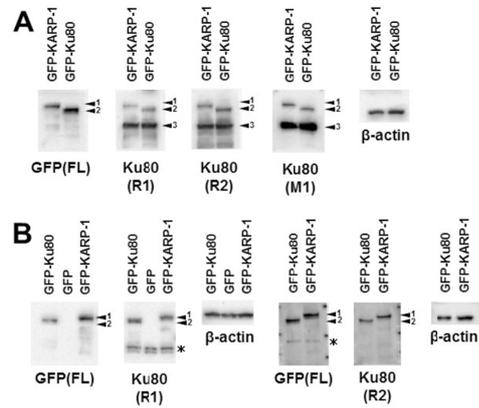


図1 ウェスタン法によるKARP-1の検出
A. 外来性のKARP-1の検出 (HeLa細胞)
B. 外来性のKARP-1の検出 (xrs6細胞)
バンド1, GFP-KARP-1;
バンド2, GFP-Ku80;
バンド3, 内在性のKu80;
*, 非特異バンド。

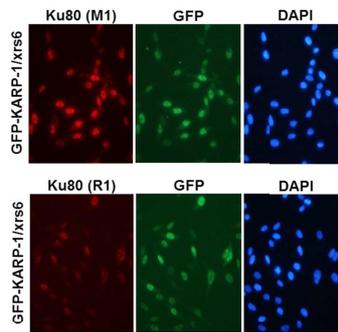


図2 蛍光顕微鏡法によるKARP-1の検出

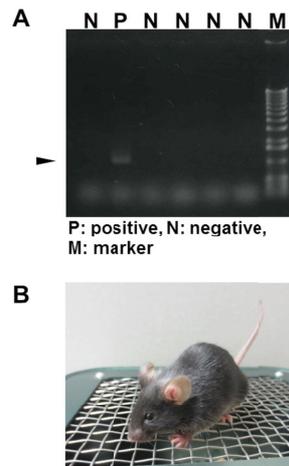


図3 トランスジェニックマウスの作製
A. トランスジェニックマウスの遺伝子型解析
B. GFP-KARP-1(1-88)トランスジェニックマウス

最後になりますが、本研究を遂行する上で、研究代表者が所属する放射線医学総合研究所の動物施設管理、照射施設管理、実験動物開発等に関わる研究者や技術者の方々に適切な助言や多大なる協力をして頂きました。この場を借りて厚く御礼を申し上げます。

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 1 件)

Koike M, Yutoku Y, Koike A., Ku80
attenuates cytotoxicity induced by green
fluorescent protein transduction
independently of non-homologous end
joining. 査読有, FEBS Open Bio, 2013,
Vol.3, 46-50.

6. 研究組織

(1)研究代表者

小池 学 (KOIKE MANABU)
独立行政法人放射線医学総合研究所
放射線防護研究センター・主任研究員
研究者番号：70280740

(2)連携研究者

小池 亜紀 (KOIKE AKI)
独立行政法人放射線医学総合研究所
放射線防護研究センター・技術員
研究者番号：50415410