

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510078

研究課題名(和文) Kuタンパク質が認識・結合可能なDNA二本鎖切断末端形状の解析

研究課題名(英文) Structural analysis of the binding mechanism of the Ku protein to DNA that contains overhangs in its end

研究代表者

藤本 浩文 (FUJIMOTO, HIROFUMI)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：60373396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：DNA修復酵素であるKuタンパク質のDNA二本鎖切断末端認識・結合機構を、計算化学的手法および細胞生物学的手法を用いて解析した。これまでの研究で構築したKu-DNA複合体の分子モデルを用い、従来研究に使用されてきた平滑末端以外のDNA末端形状に対するKuタンパク質の結合能力を分子シミュレーションを利用して検証を行い、突出末端を有するDNAと相互作用するアミノ酸残基を同定した。また、ライブセルイメージング法を用いてKuタンパク質が培養細胞核中の二本鎖切断損傷が発生した箇所に集積する様子をリアルタイムで観察する実験系を確立した。

研究成果の概要(英文)：The binding mechanism of the repair enzyme, Ku, to DNA that has overhangs in its 5'- or 3'- end was examined by both computational and experimental techniques. Comparing with the interaction between Ku and DNA with blunt ends, no significant differences were observed in the binding energy between Ku and DNA, but an amino acid residue of Ku that would interact with the terminal region with single-stranded DNA was identified. In addition, we established the system to examine the dynamics of Ku70 and Ku80, subunits of Ku protein, in the nucleus of cultured cells using the live cell imaging method, and succeeded in observing the accumulation of Ku70 or Ku80 at DNA damage sites produced by laser-microirradiation.

研究分野：放射線生物学, 計算化学

キーワード：DNA損傷修復 DNA二本鎖切断 Ku 分子シミュレーション ライブセルイメージング

1. 研究開始当初の背景

電離放射線等によって DNA が被る損傷のうち DNA 二本鎖切断 (DSB) はその修復の困難さから最も重篤な損傷の一つであると考えられる。DSB 修復の主要な経路の一つである non-homologous end-joining (NHEJ) の主要コンポーネントのうち Ku は DSB を認識し DNA の切断末端に最初に結合するタンパク質であり、Ku タンパク質の結合を足がかりとして DNA-PKcs, XRCC4, XLF, Ligase IV 等の修復関連酵素が誘導され、NHEJ 過程が開始されると考えられている。NHEJ における Ku タンパク質結合後のプロセスは生化学的・分子生物学的実験により詳細な報告がなされているが、その最も初期の過程である Ku タンパク質による DNA 切断末端認識の機構にはまだ具体的な知見が少ない。

これまで我々は、Ku-DNA 複合体分子モデルを用いて DNA の結合・解離のプロセスに関与すると考えられるアミノ酸を置換し、Ku タンパク質と DNA 分子間の結合力がどのように変化するかを推定することで、Ku タンパク質が DNA 末端を認識する機構を解析してきた。Ku タンパク質は内部にリング構造をもつ Ku70、および Ku80 の 2 つのサブユニットから構成され、二本鎖をリングに挿入することで DNA と結合することが結晶構造解析から判明している。しかし、2 つのサブユニットのうち Ku70 の N, C 両末端側には結晶構造解析では原子の位置が特定できない領域が存在する。そこで、両末端領域を補完し、さらにリング内に 40mer の 2 本鎖 DNA 分子を挿入した Ku-DNA 複合体モデルを設計し、分子動力学 (MD) シミュレーションにより 5 ナノ秒間の挙動を観察したところ、Ku70 の N 末端側が Ku タンパク質のリングに蓋をする形で DNA 末端と相互作用することが確認された。この事実は電子顕微鏡像を用いた単粒子解析において Ku タンパク質が DNA と結合するとリングが塞がれるという報告とも一致する。さらに、この領域を欠損させると *in vitro* では DNA との結合は可能だが細胞では損傷部位への蓄積が起らないという報告もあり、Ku70 の N 末端領域が損傷認識に関与している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

Ku タンパク質が認識する DNA の形状のモデルとして平滑末端が用いられることが多い。しかし、実際の DSB 末端の形状は 5' 端側、もしくは 3' 端側の突出等、DNA 切断時の状況によって様々なバリエーションが考えられる。これまでゲルシフト等の実験的手法を用いて 5' 突出末端に対する Ku タンパク質の結合能を調査した報告はあるものの、Ku タンパク質のどの部位が突出末端の認識・結合プロセスに必要なかを詳細に調査した例はない。本研究では、種々の末端形状を持つ DNA と Ku タンパク質との相互作用を計算化学的手法を用いて解析し、Ku タンパク質と

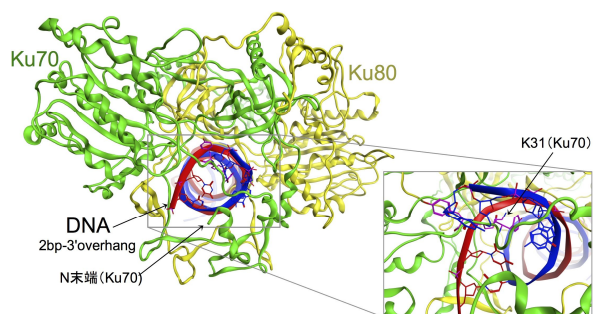
各 DNA 末端との結合能力を実験的に確認することで Ku タンパク質が認識しうる DNA 末端形状の特徴を明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

これまで我々は、Ku-DNA 複合体の分子モデルを用いて DNA の結合・解離のプロセスに関与すると考えられるアミノ酸を置換し、Ku タンパク質と DNA 分子間の結合力がどのように変化するかを推定することで、Ku タンパク質が DNA 末端を認識する機構を解析してきた。そこでまず、5' 端側、もしくは 3' 端側に 1~2 塩基突出した末端を持つ DNA 分子を設計し、Ku-DNA 複合体モデル中の DNA 分子を置換、これらの分子モデルに対して MD シミュレーションを行い、突出末端をもつ DNA と Ku タンパク質との相互作用を解析した。DSB が生じる原因には、2 本鎖が同時に切断される場合も考えられるが、生体内においては 1 本の電離放射線から生じるフリーラジカルによって 1 本鎖切断 (SSB) の近傍、相補鎖側に別の SSB が生じることで DSB 化する場合が多いと考えられている。そこで、2 種類の SSB、 β SSB (塩基が脱落し五炭糖が開環した SSB)、および β - δ SSB (塩基が五炭糖ごと脱落した SSB) を設計し、それらの損傷を含む DNA 分子に対し MD シミュレーションを行い、既報の実験結果と比較する事でモデルの妥当性を検証した。また、マウス培養細胞の核へ X 線マイクロ照射を行った際の Ku70、および Ku80 両タンパク質の挙動をライブセルイメージング法を用いて観察した。

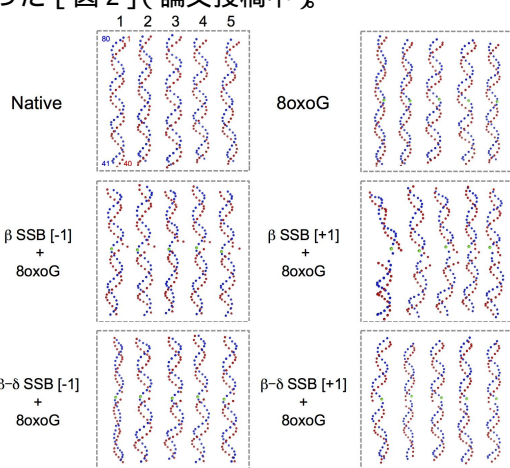
4. 研究成果

5' 端側、もしくは 3' 端側に 1~2 塩基突出した末端を持つ DNA 分子と Ku タンパク質との複合体に対し、数ナノ秒の MD シミュレーションを実行し DNA と Ku タンパク質との相互作用を観察した。平滑末端を持つ DNA と Ku タンパク質間の結合エネルギーと比較して、突出末端を持つ DNA と Ku タンパク質間の結合エネルギーには大きな差異は見られなかったものの、一部で Ku70 の N 末端領域中のリジン残基 (K31) が DSB の突出した領域に作用する様子が観察された [図 1]



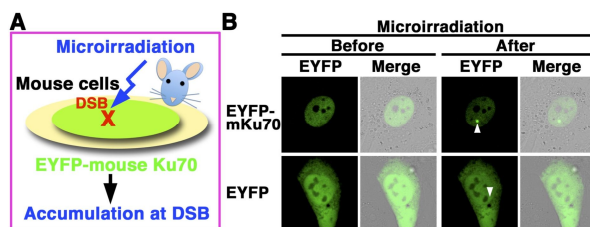
[図 1] DNA の 3' 突出末端と Ku70 の N 末端領域との相互作用

損傷部位を含む DNA 分子に対してシミュレーションを行う場合、あらかじめ分子軌道計算を行い損傷部位周辺の電子状態を計算しておく必要がある。今回モデリングを行った β SSB、および β - δ SSBの5'末端側、3'末端側の各モデルにおける分子軌道計算では、開環した五炭糖等の反応の中間段階にあたる分子構造や、反応性の高い酸素やリン原子が分子末端に位置するため収束解が得にくく、初期の原子配置を変えて計算を繰り返す必要があった。得られた計算結果が妥当かどうかを分子軌道計算以外の手法でも確認する必要があると考え、今回設計したSSBと他の損傷とを組み合わせたクラスター損傷を持つDNA分子を設計し、損傷修復酵素の結合能力の予測結果と修復酵素の既報の修復能とを比較し、各SSBモデルの妥当性の検証を行った[図2](論文投稿中)。



[図2] β SSB, β - δ SSB、および8oxoGが内部に生じたDNAの構造変化

また、X線マイクロ照射によってマウス培養細胞核にDSBを発生させると、Ku70、およびKu80タンパク質が数秒で照射位置に正確に移動することが確認された[図3]。Ku80において機能ドメインと考えられる領域のアミノ酸を置換するとこのDSB発生領域への集積が観察されなくなることから、本ライブセルイメージング法を用いて今回シミュレーションで予測された突出末端と相互作用するアミノ酸の機能を解析することがで



きると考えられる。

[図3] X線マイクロ照射を行ったサイト(パネルB:白矢印)にKu70が集積する様子のライブセルイメージング

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)

Koike M, Yutoku Y, Koike A., "The Defect of Ku70 Affects Sensitivity to X-Ray and Radiation-Induced Caspase-Dependent Apoptosis in Lung Cells." (2013) *J. Vet. Med. Sci.*, **75**, 415-420, 査読有。

DOI: 10.1292/jvms.12-0333

Koike M, Yutoku Y, Koike A., "Impact of amino acid substitutions in two functional domains of Ku80: DNA-damage-sensing ability of Ku80 and survival after irradiation." (2014) *J. Vet. Med. Sci.*, **76**, 51-56, 査読有。

DOI: 10.1292/jvms.13-0283

Koike M, Yutoku Y, Koike A., "Nuclear localization of mouse Ku70 in interphase cells and focus formation of mouse Ku70 at DNA damage sites immediately after irradiation." (2015) *J. Vet. Med. Sci.*, *Epub ahead of print*, 査読有。

DOI: 10.1292/jvms.14-0651

[学会発表](計3件)

小池学, 湯徳靖友, 小池亜紀「ヒト DNA 修復蛋白質が損傷 DNA を修復するために損傷部に集積する様子の可視化」第49回アイソトープ・放射線研究発表会(2012年7月, 東京)

小池学, 湯徳靖友, 小池亜紀「ヒトの DNA 修復蛋白質が損傷 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-たった1つの遺伝子変異の影響-」第50回アイソトープ・放射線研究発表会(2013年7月, 東京)

小池学, 湯徳靖友, 小池亜紀「ヒトの DNA 修復蛋白質が損傷 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-患者由来の XLF 遺伝子変異の影響-」第51回アイソトープ・放射線研究発表会(2014年7月, 東京)

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤本 浩文 (FUJIMOTO HIROFUMI)

国立感染症研究所・品質保証・管理部 第一室・室長

研究者番号: 60373396

(2)研究分担者

小池 学 (KOIKE MANABU)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射
線障害研究グループ・主任研究員

研究者番号：70280740