

令和元年6月5日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K12210

研究課題名(和文) アポトーシス細胞におけるクロマチンの細胞表層露出のメカニズム解明

研究課題名(英文) Mechanisms of 53BP1 binding to chromatin in apoptotic cells

研究代表者

岩淵 邦芳 (IWABUCHI, Kuniyoshi)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：10232696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、アポトーシス細胞において53BP1がカスパーゼ依存性にTudor domainを含んだC末断片になること、この53BP1C末断片がクロマチンと共に細胞表層へ露出することを見出した。アポトーシス細胞において、53BP1のTudor domainがメチル化ヒストンH4(H4K20me2)と結合している可能性があるが、H4K20me2を覆っているJMJD2A、L3MBTL1が、アポトーシスの際どのような機序でH4K20me2から離れるかは不明であった。本研究で、アポトーシス細胞においてJMJD2Aはカスパーゼ依存性に分解され、L3MBTL1は核から細胞質に移動することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アポトーシス細胞においてクロマチンが細胞表層に露出することは、1994年にすでに見出されているが、核から細胞表層へ移動するメカニズムは全く不明である。一方、代表的自己免疫疾患であるSLEは、クロマチンの構成成分であるDNAやヒストンなどに対する自己抗体の出現がその原因であると考えられている。本研究は、SLEの発症機序の解明に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：DNA repair protein 53BP1 accumulates at DNA double-strand break (DSB) sites through binding to di-methylated histone H4 (H4K20me2). JMJD2A and L3MBTL1 also bind H4K20me2 and prevent 53BP1 from binding to H4K20me2. JMJD2A is degraded by the proteasome and L3MBTL1 is released from H4K20me2, following the DNA damage in an E3 ubiquitin ligases RNF8 and RNF168 dependent manner. We found that 53BP1 binds histone H4 after induction of apoptosis triggered by non-DNA damaging apoptosis-inducer staurosporine. After apoptosis induction, JMJD2A was degraded in a caspase-dependent manner, and L3MBTL1 altered its localization from the nucleus to the cytoplasm. These data suggest that there are apoptosis-specific mechanisms to unmask the 53BP1 binding site of histone H4.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

53BP1 は、Tudor domain を介して DNA 二重鎖切断(以下 DSB)部位に出現するメチル化ヒストン H4(以下 H4K20me2)と結合し、DSB 部位に集積する。H4K20me2 は JMJD2A または L3MBTL1 に覆われているが、DSB が発生すると、ユビキチンリガーゼである RNF8 と RNF168 依存性に、JMJD2A は分解され L3MBTL1 は H4K20me2 から離れる。我々は、アポトーシス細胞において 53BP1 がカスパーゼ依存性に Tudor domain を含んだ 60 kDa の C 末断片になること、この 53BP1C 末断片がクロマチンと共に細胞表層へ露出することを見出した。53BP1C 末断片が Tudor domain を含んでいることから、アポトーシス細胞においても 53BP1 は Tudor domain を介してヒストン H4 と結合している可能性があるが、クロマチンの細胞表層露出は、RNF8、RNF168 非依存性であった。もしアポトーシス細胞においても 53BP1 が Tudor domain を介してヒストン H4 と結合するならば、アポトーシス細胞においては、ユビキチン化非依存性に JMJD2A および L3MBTL1 が H4K20me2 から離れる機序が存在することが考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、H4K20me2 を覆っている JMJD2A および L3MBTL1 が、アポトーシス細胞において、どのようなメカニズムで H4K20me2 から離れるかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アポトーシス細胞の誘導

ヒト T リンパ球由来白血病細胞株 Jurkat を、プロテインキナーゼ C 阻害剤スタウロスポリンで処理し、アポトーシスを誘導した。カスパーゼ阻害剤 z-VAD-fmk は、スタウロスポリン添加 1 時間前に加えた。

(2) ウェスタンブロットングおよび免疫蛍光染色

アポトーシス誘導後の細胞から細胞溶解液を抽出し、JMJD2A に対する抗体を用いてウェスタンブロットングを行った。細胞内の L3MBTL1 の局在は、細胞を固定し膜透過処理を行った後に免疫蛍光染色法で調べた。細胞表層の 53BP1 及びヒストン H4 は、細胞を固定後、膜透過処理を行わずに免疫蛍光染色法で検出した。

(3) 免疫沈降

アポトーシス誘導前後の Jurkat 細胞から細胞抽出液を抽出し、抗 53BP1 抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物中のヒストン H4 をウェスタンブロットングで検出した。

4. 研究成果

(1) アポトーシス細胞における 53BP1 とヒストン H4 との相互作用

アポトーシス誘導前後の Jurkat 細胞から細胞抽出液を抽出し、抗 53BP1 抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物中のヒストン H4 をウェスタンブロットングで検出した。アポトーシス前細胞では、核質分画で 53BP1 とヒストン H4 が共沈した。一方、アポトーシス誘導後に出現する 60 kDa の C 末断片は、細胞質分画でヒストン H4 と共沈した。アポトーシスにより断片化したクロマチンが、53BP1 断片と複合体を形成していることが明らかになった。

(2) アポトーシス細胞における JMJD2A のカスパーゼ依存性の分解

Jurkat 細胞にアポトーシスを誘導し、JMJD2A の蛋白量の変化をウェスタンブロット法で調べた。アポトーシスの誘導に伴い、JMJD2A の蛋白量は経時的に減少し、アポトーシス誘導の 4 時間後には殆ど JMJD2A は検出されなくなった。このアポトーシス細胞で見られる JMJD2A 蛋白量の減少は、カスパーゼ阻害剤である z-VAD-fmk の存在下では部分的に抑制された。このことから、アポトーシス細胞において、JMJD2A はカスパーゼ依存性に分解されることが示唆された。JMJD2A は、JMJD2A の Tudor domain を介して H4K20me2 と結合するが、JMJD2A の Tudor domain には、少なくとも 6 ヶ所のカスパーゼ標的配列が見出されている。

(3) アポトーシス細胞における L3MBTL1 の細胞内局在の変化

Jurkat 細胞にアポトーシスを誘導し、L3MBTL1 の細胞内局在の変化を免疫蛍光染色法で調べた。アポトーシス誘導後も L3MBTL1 の蛋白量に変化は見られなかったが、細胞内での局在が変わった。即ち、アポトーシス誘導前には核内に広く分布していた L3MBTL1 が、アポトーシスの誘導後細胞質に移動し、細胞質に粒状に集積した。さらに L3MBTL1 は、細胞質の粒状部位でストレス顆粒タンパク質である TIA-1 と共局在した。以上より、L3MBTL1 はアポトーシス刺激後に、何らかの機序でクロマチンから離れてストレス顆粒に格納されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Sunatani Y, Kamdar RP, Sharma MK, Matsui T, Sakasai R, Hashimoto M, Ishigaki Y, Matsumoto Y, Iwabuchi K : Caspase-mediated cleavage of X-ray repair cross-complementing group 4 promotes apoptosis by enhancing nuclear translocation of caspase-activated DNase. *Exp Cell Res*, 362:450-460, (2018) DOI:10.1016/j.yexcr.2017.12.009. 査読有
2. Sakasai R, Isono M, Wakasugi M, Hashimoto M, Sunatani Y, Matsui T, Shibata A, Matsunaga T, Iwabuchi K : Aquarius is required for proper CtIP expression and homologous recombination repair. *Sci Rep*, 7(1)13808, (2017) DOI:10.1038/s41598-017-13695-4. 査読有
3. Baek HJ, Lee YM, Kim TH, Kim JY, Park EJ, Iwabuchi K, Mishra L, Kim SS : Caspase-3/7-mediated cleavage of α -spectrin is required for acetaminophen-induced liver damage. *Int J Biol Sci*, 12(2):172-183, (2016) DOI:10.7150/ijbs.13420. 査読有
4. Matsui Y, Sunatani Y, Hayashi N, Okino K, Okushi Y, Mukai K, Adachi H, Yamaya H, Iwabuchi K, Yokoyama H : DNA double-strand breaks induced intractable glomerular fibrosis in renal allografts. *Clin Exp Nephrol*, 20(3):479-488, (2016) DOI:10.1007/s10157-015-1174-3. 査読有
5. Sakasai R, Iwabuchi K : The distinctive cellular responses to DNA strand breaks caused by a DNA topoisomerase I poison in conjunction with DNA replication and RNA transcription. *Genes & genetic systems*, 90(4):187-194, (2016) DOI:10.1266/ggs.15-00023. 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 逆井良, 松井理, 砂谷優実, 岩淵邦芳 : One-ended DNA 二本鎖切断の修復経路解析. 日本放射線影響学会第 61 回大会 長崎 2018 年 11 月
2. 逆井良, 砂谷優実, 松井理, 岩淵邦芳 : One-ended DSB の修復経路の解析. 第 90 回日本遺伝学会 奈良 2018 年 9 月
3. 逆井良, 砂谷優実, 松井理, 岩淵邦芳 : Repair pathways for one-ended DNA double-strand breaks caused by camptothecin, Gordon Research Conference 香港 2018 年 7 月
4. 逆井良, 砂谷優実, 松井理, 岩淵邦芳 : ユビキチン化因子 UBE2E2 による DNA トポイソメラーゼ II の制御. 第 24 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 岐阜 2017 年 11 月
5. Sakasai R, Sunatani Y, Matsui T, Iwabuchi K : Analysis of repair pathway for one-ended DNA double-strand breaks. 日本放射線影響学会第 60 回大会 千葉 2017 年 10 月
6. 砂谷優実, 逆井良, 松井理, 橋本光正, 岩淵邦芳 : DNA 二本鎖切断修復タンパク質 53BP1 を介した神経前駆細胞の未分化性維持機構. 日本放射線影響学会第 60 回大会 千葉 2017 年 10 月
7. 逆井良, 砂谷優実, 松井理, 岩淵邦芳 : PARP- and TDP1-dependent repair pathways of one-ended DNA double-strand breaks caused by camptothecin. 第 76 回日本癌学会学術総会 横浜 2017 年 9 月
8. 逆井良, 磯野真由, 若杉光夫, 橋本光正, 砂谷優実, 松井理, 柴田淳史, 松永司, 岩淵邦芳 : RNA ヘリカーゼ Aquarius は DNA-RNA ハイブリッドを解消して相同組換え修復を促進する. 第 39 回日本分子生物学会年会 横浜 2016 年 12 月
9. 砂谷優実, 辰野貴則, 中村有香, 逆井良, 松井理, 橋本光正, 石垣靖人, 岩淵邦芳 : DNA 二本鎖切断修復タンパク質 53BP1 を介した神経前駆細胞の分化抑制効果. 日本放射線影響学会第 59 回大会 広島 2016 年 10 月

10. 逆井良, 磯野真由, 若杉光夫, 橋本光正, 砂谷優実, 松井理, 柴田淳史, 松永司, 岩淵邦芳: RNA ヘリカーゼ Aquarius は R-loop を解消して相同組換え修復を促進する. 日本放射線影響学会第 59 回大会 広島 2016 年 10 月
11. Sakasai R, Sunatani Y, Matsui T, Iwabuchi K: Topoisomerase II switching is regulated by ubiquitination. Gordon Research Conference, DNA Topoisomerase in Biology & Medicine Sunday River 2016 年 8 月
12. 砂谷優実, Kamdar RP, Sharma MK, 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 2015 年 12 月
13. 逆井良, 砂谷優実, 松井理, 橋本光正, 岩淵邦芳: Top2-poison に対する主要調節因子であるユビキチン化酵素の同定. 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 2015 年 12 月
14. 松井理, 逆井良, 砂谷優実, 橋本光正, 岩淵邦芳: p53 標的遺伝子発現における 53BP1 の機能的役割. 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 2015 年 12 月
15. Matsui Y, Sunatani Y, Iwabuchi K, Yokoyama H: DNA double-strand breaks accelerated collagen type VI secretion of glomerular endothelial cells. ERA-EDTA 52nd Congress London 2015 年 6 月
16. Sunatani Y, Sharma MK, Kamdar RP, Matsui T, Sakasai R, Hashimoto M, Matsumoto Y, Iwabuchi K: Phosphorylation-mediated Regulation of Apoptosis By NHEJ-protein XRCC4. 15th International Congress of Radiation Research Kyoto 2015年5月
17. Sakasai R, Sunatani Y, Matsui T, Hashimoto M, Iwabuchi K: Ubiquitin-dependent Activation of DNA-PKcs Leads to Chromosomal Aberration in Response to One-ended DNA Double-Strand Breaks. 15th International Congress of Radiation Research Kyoto 2015年5月
18. 渡邊直人, 道合万里子, 高橋知子, 利波久雄, 岩淵邦芳: 骨転移に対するRI 治療におけるリンパ球の放射線障害. 第74回日本医学放射線学会総会 横浜 2015年4月

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 砂谷 優実
 ローマ字氏名: SUNATANI, Yumi
 所属研究機関名: 金沢医科大学
 部局名: 医学部
 職名: 講師
 研究者番号(8桁): 70581057