

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03375

研究課題名(和文) 53BP1の生体維持機構：DNA損傷修復からアポトーシス細胞への免疫寛容誘導まで

研究課題名(英文) A role of DNA-damage repair protein 53BP1 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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：アポトーシス細胞の細胞膜表層に断片化されたクロマチンが露出することは、1994年に示されているが、露出の分子機構は不明である。我々は、アポトーシス細胞においてDNA損傷修復因子である53BP1がカスパーゼ依存性に切断され、残った53BP1断片の一部がアポトーシス細胞表層に露出することを見出した。本研究では、アポトーシス細胞における53BP1の機能を調べた。53BP1欠損細胞では、アポトーシス細胞表層へのクロマチン露出が、部分的ではあるが減少した。53BP1がアポトーシス細胞表層へのクロマチン露出に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アポトーシス細胞の表層にはクロマチンが露出する。体内に発生したアポトーシス細胞はマクロファージにより速やかに貪食され除去されるが、この貪食の進行に障害が起こると、細胞表層のクロマチンが自己抗体産生の自己抗原になるとされている。本研究の成果は、SLEを代表とする自己免疫疾患の発症メカニズムに大きな知見を与える可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Apoptotic cells express chromatin on the surface of cell membrane. Macrophages quickly removes apoptotic cells by phagocytosis. When this removal of apoptotic cells is inefficient, the histone and DNA on the surface of apoptotic cells are believed to become an auto-antigen to trigger auto-antibody production, which then leads to autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus. We found that deficiency of DNA repair protein 53BP1 slightly reduced the expression of chromatin on the cell surface of apoptotic cells.

研究分野：放射線影響学

キーワード：アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

53BP1 は、53BP1 の C 末にある BRCT ドメインを介して癌抑制蛋白質 p53 と結合する蛋白質として見出された。DNA 二重鎖切断(以下 DSB)が発生すると 53BP1 は、53BP1 の Tudor ドメインを介してクロマチンと結合することで、DSB 部位に集積する。DSB 部位に集積した 53BP1 は、相同組み換えによる修復を抑制し、非相同末端結合による修復を促進する。一方、DNA 損傷を完全に修復できない細胞はアポトーシスに陥るが、アポトーシス細胞において 53BP1 が何らかの役割を担っているかは不明である。

我々は、アポトーシスを誘導したヒト T 細胞系白血病細胞株 Jurkat において、53BP1 がカスパーゼ依存性に 60 kDa の C 末断片になること、この 53BP1C 末断片が細胞表層に露出することを見出した。

2. 研究の目的

本研究は、53BP1 の細胞表層への露出に着目し、アポトーシスにおける 53BP1 の機能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調製

ヒト T リンパ球由来白血病細胞株 Jurkat、および 53BP1 ノックアウトマウス胸腺から採取したリンパ球に、プロテインキナーゼ C 阻害剤スタウロsporin 処理を行いアポトーシスを誘導した。

(2) siRNA の細胞導入

細胞への siRNA 導入は、Amaza 4D-Nucleofector (Lonza 社)による electroporation 法で行った。Lonza 社の推奨するプロトコールに従った。

(3) 53BP1 欠損, CAD 欠損 Jurkat 細胞株の樹立

CRISPR-Cas9 システムを用いて、53BP1、および caspase-activated DNase (CAD)を欠損させた Jurkat 細胞株、Jurkat-53BP1 欠損細胞、Jurkat-CAD 欠損細胞を樹立した。

(4) アポトーシス細胞における 53BP1, クロマチンの検出

アポトーシス誘導後の細胞から細胞溶解液を抽出し、53BP1C 末に対する抗体を用いたウェスタンブロット法で、53BP1 の切断を検出した。細胞内の 53BP1 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、ヒストン、DNA は、細胞の固定処理、膜透過処理を行わずに、抗 53BP1 抗体、抗 DNA 抗体、抗ヒストン抗体を用いた免疫蛍光染色法で検出した。

4. 研究成果

(1) CAD 欠損細胞でのクロマチン表層露出

アポトーシス細胞では、クロマチンが断片化され、断片化されたクロマチンの一部はアポトーシス細胞の表層に露出する。アポトーシス細胞はマクロファージにより速やかに貪食されるが、この貪食の進行に障害が起きると、表層露出しているクロマチンが、アポトーシスボディと呼ばれる小胞の膜に取り込まれ、アポトーシス細胞から遊離する。アポトーシスボディ表層のクロマチンは、SLE などの自己免疫疾患を引き起こす抗 DNA 抗体や抗ヒストン抗体などの自己抗原になると考えられている。

アポトーシス細胞における細胞膜表層へのクロマチン露出が、クロマチンの断片化に依存するか否かを調べた。アポトーシス細胞でのヌクレオソーム切断において中心的な役割を果たすヌクレアーゼ caspase-activated DNase (CAD)を、CRISPR-Cas9 システムを用いて欠損させた Jurkat-CAD 欠損細胞を樹立した。CAD 欠損細胞では、アポトーシスを誘導しても、ゲノム DNA の断片化が全く見られないことをアガロースゲル電気泳動法で確認した。CAD 欠損細胞では、アポトーシス誘導後の細胞膜表層へのクロマチン露出がほとんど見られなくなることが分かった。アポトーシス細胞における細胞膜表層へのクロマチン露出には、CAD 依存性のヌクレオソーム切断が必要であることが明らかになった。

(2) 53BP1 欠損細胞でのクロマチン表層露出

我々は、アポトーシス細胞において、53BP1 がカスパーゼ活性依存性に断片化されるが、60kDa を示す C 末断片はアポトーシス細胞内に残存し、その一部がアポトーシス細胞の表層に

露出することを見出した。アポトーシス細胞の表層にはクロマチンも露出することから、このクロマチン露出に 53BP1 が関与しているか否かを調べた。

siRNA を用いて Jurkat 細胞で 53BP1 発現をノックダウンさせた細胞では、アポトーシス細胞表層へのクロマチン露出が部分的に低下した。しかし siRNA による 53BP1 の発現抑制は不十分であり、アポトーシス細胞表層へのクロマチン露出の 53BP1 依存性については解釈が難しかった。そこで、CRISPR-Cas9 システムを用いて Jurkat-53BP1 欠損細胞を樹立した。Jurkat-53BP1 欠損細胞では、53BP1 のアポトーシス細胞表層への露出は見られなかった。また、アポトーシス細胞表層へのクロマチン露出は Jurkat-53BP1 欠損細胞では部分的に減少した。

さらに、アポトーシス細胞表層へのクロマチン露出における 53BP1 の関与を明らかにするために、53BP1 ノックアウトマウスの胸腺リンパ球にアポトーシスを誘導して調べた。やはり、アポトーシス細胞表層へのクロマチン露出に対する 53BP1 欠損の影響は限定的であった。部分的ではあるが、53BP1 がアポトーシス細胞におけるクロマチンの細胞表層露出に関与していることが示唆された。

(3) クロマチン細胞表層露出の 53BP1 Tudor domain 依存性

53BP1 がアポトーシス細胞におけるクロマチンの細胞表層露出に関与しているか否かをさらに明らかにするために、戻し実験を行った。Jurkat-53BP1 欠損細胞に野生型 53BP1 を発現させると、部分的に減少していたクロマチンの細胞表層露出が完全に回復した。

DNA 二重鎖切断が発生した細胞において、53BP1 は Tudor domain を介して DNA 損傷部位のヒストンと結合する。そこで、53BP1 欠損によるクロマチンの細胞表層露出の部分的減少に、53BP1 の Tudor domain が関与しているか否かを調べた。

Jurkat-53BP1 欠損細胞に、野生型 53BP1 を発現させると、部分的に減少していたクロマチンの細胞表層露出が完全に回復したが、Tudor domain 変異型 53BP1 を戻したアポトーシス細胞では、部分的に減少していたクロマチンの細胞表層露出に変化が見られなかった。アポトーシス細胞におけるクロマチン細胞表層露出の一部は、53BP1 の Tudor domain 依存性であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shibata T, Ikawa M, Sakasai R, Ishigaki Y, Kiyokawa E, Iwabuchi K, Singh DP, Sasaki H, Eri Kubo E	4. 巻 169
2. 論文標題 Lens-specific conditional knockout of Tropomyosin 1 gene in mice causes abnormal fiber differentiation and lens opacity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mech Ageing Dev	6. 最初と最後の頁 111492
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mad.2021.111492	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Fujii A, Sunatani Y, Furuichi K, Fujimoto K, Adachi H, Iwabuchi K, Yokoyama H	4. 巻 10
2. 論文標題 DNA damage in human glomerular endothelial cells induces nodular glomerulosclerosis via an ATR and ANXA2 pathway.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 22206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79106-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsui M, Sakasai R, Abe M, Kimura Y, Kajita S, Torii W, Katsuki Y, Ishiai M, Iwabuchi K, Takata M, Nishi R	4. 巻 9
2. 論文標題 USP42 enhances homologous recombination repair by promoting Rloop resolution with a DNA-RNA helicase DHX9.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41389-020-00244-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okuda K, Watanabe N, Hashimoto M, Doai M, Kawai Y, Takahashi T, Arikawa T, Oiso K, Sunatani Y, Iwabuchi K, Kajinami K, Matoba M	4. 巻 154
2. 論文標題 Preliminary quantitative evaluation of radiation-induced DNA damage in peripheral blood lymphocytes after cardiac dual-isotope imaging.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Appl Radiat Isot	6. 最初と最後の頁 108890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.apradiso.2019.108890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto Y, Iwasaki WM, Kugou K, Takahashi KK, Oda A, Sato K, Kobayashi W, Kawai H, Sakasai R, Takaori-Kondo A, Yamamoto T, Kanemaki MT, Taoka M, Isobe T, Kurumizaka H, Innan H, Ohta K, Ishiai M, TakataM	4. 巻 46
2. 論文標題 Replication stress induces accumulation of FANCD2 at central region of large fragile genes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res	6. 最初と最後の頁 2932-2944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gky058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sunatani Y, Kamdar RP, Sharma MK, Matsui T, Sakasai R, Hashimoto M, Ishigaki Y, Matsumoto Y, Iwabuchi K	4. 巻 362
2. 論文標題 Caspase-mediated cleavage of X-ray repair cross-complementing group 4 promotes apoptosis by enhancing nuclear translocation of caspase- activated DNase.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Cell Res	6. 最初と最後の頁 450-460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2017.12.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 逆井 良, 松井 理, 砂谷優実, 篠原 彰, 岩淵邦芳
2. 発表標題 Top1-DNAクロスリンクによる転写ストレス応答とその破綻.
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujii A, Sunatani Y, Furuichi K, Fujimoto K, Adachi H, Iwabuchi K, Yokoyama H
2. 発表標題 The mechanism of DNA injury induced collagen type VI excretion in glomerular endothelial cell.
3. 学会等名 The 9th Chronic Kidney Disease Frontier Meeting in Nagoya 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松井 理, 橋本光正, 逆井 良, 砂谷優実, 岩淵邦芳
2. 発表標題 Plectinによるp53依存的p21発現の抑制.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 逆井 良, 松井 理, 砂谷優実, 篠原 彰, 岩淵邦芳
2. 発表標題 カンプトテシンによる転写ストレスに対するRecQL5の機能解析.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 逆井 良, 松井 理, 篠原 彰, 岩淵邦芳
2. 発表標題 Functional analysis of RecQL5 in response to transcription -mediated DNA strand breaks.
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇谷公一, 逆井 良, 岩淵邦芳, 樋口雅也
2. 発表標題 Deubiquitylase USP10 controls DNA damage response.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊直人, 道合万里子, 高橋知子, 的場宗孝, 岩淵邦芳, 奥田光一
2. 発表標題 ゾーフィゴ治療におけるリンパ球の放射線障害に関する検討.
3. 学会等名 日本核医学会第89回中部地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 逆井 良, 松井 理, 砂谷優実, 岩淵邦芳
2. 発表標題 One-ended DNA二本鎖切断の修復経路解析.
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61 回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 逆井 良, 砂谷優実, 松井 理, 岩淵邦芳
2. 発表標題 One-ended DSBの修復経路の解析.
3. 学会等名 第90回日本遺伝学会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakasai R, Sunatani Y, Matsui T, Iwabuchi K
2. 発表標題 Repair pathways for one-ended DNA double-strand breaks caused by camptothecin.
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 逆井 良
2. 発表標題 Repair-pathways of one-ended DNA double-strand breaks.
3. 学会等名 第7回DNA損傷応答ワークショップ
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	砂谷 優実 (SUNATANI Yumi) (70581057)	金沢医科大学・医学部・講師 (33303)	
研究分担者	逆井 良 (SAKASAI Ryo) (10549950)	金沢医科大学・医学部・講師 (33303)	
研究分担者	松井 理 (MATSUI Tadashi) (60288272)	金沢医科大学・医学部・助教 (33303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------