

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18200

研究課題名(和文) Mre11、BRCA1と非相同末端結合が共同する新規DNA修復経路の解析

研究課題名(英文) Analysis of a novel DNA repair pathway associated with Mre11/BRCA1 and non-homologous recombination end joining

研究代表者

津田 雅貴 (Tsuda, Masataka)

広島大学・統合生命科学研究科(理)・助教

研究者番号：00734104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：トポイソメラーゼ2(TOP2)という酵素は、絡まっているDNAのもつれを解消する酵素である。抗がん剤であるエトポシドはDNAの切断端にTOP2が共有結合した複合体(TOP2cc)を形成させる。その結果、がん細胞を殺す。TOP2ccの除去機構を明らかにできれば、新規の抗がん治療法の開発に役立つ。これまで、TOP2ccの除去機構にはMRE11などのヌクレアーゼが関わる経路とプロテアソームが関わる経路が存在することが分かっていた。本研究から、TOP2cc除去において、新規なプロテアソーム非依存的機構が存在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

本研究から、新規のTOP2cc除去経路の存在が明らかになった。この除去経路に、TDP2というタンパク質が中心的な役割を果たすことが分かった。これまで、TDP2はプロテアソームというタンパク質複合体と協調して働くことが分かっていたので、プロテアソーム阻害剤とエトポシドの暴露が抗がん治療の効果を高めると考えられていた。本研究結果から、TDP2阻害剤とエトポシドを併用した治療法の重要性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Topoisomerase II (TOP2) resolves topologically entwined duplex DNA. It generates a transient DNA double-strand break intermediate, known as TOP2 cleavage complex (TOP2cc), that contains a covalent link between TOP2 and the 5'-terminus of the incised DNA duplex. Etoposide freezes the intermediate and forms irreversible TOP2ccs. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) is thought to repair irreversible TOP2ccs by hydrolyzing the phosphodiester bond between TOP2 and DNA after the proteasomal degradation of trapped TOP2ccs. In this study, I revealed novel proteasome-independent mechanisms for the repair of Topoisomerase2 (TOP2) cleavage complex.

研究分野：DNA修復

キーワード：トポイソメラーゼ2 エトポシド プロテアソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1)トポイソメラーゼ 2 (TOP2) は、DNA の複製時に生じる DNA のもつれを解消する酵素である。反応中間体として、DNA の 5'切断端と TOP2 活性部位のチロシン残基が共有結合した複合体 (TOP2 covalent complex: TOP2cc) を形成する。抗がん剤であるエトポシド (ETP) は TOP2cc を安定化し、TOP2 を DNA 切断末端にトラップすることにより細胞死を引き起こす。DNA 末端から TOP2 を切断端から除去する必要がある。除去されて初めて非相同末端結合が切断を再結合できる。

(2) TOP2cc は、プロテアソームで分解された後、TOP2 と DNA の間のホスホジエステル結合が Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) によって加水分解され、DNA から除去されると考えられている。近年、新規の TOP2cc 除去酵素として MRE11 が見つかっており、プロテアソームによる TOP2 の分解を必要としないことが明らかになっている。

### 2. 研究の目的

MRE11 が関与するプロテアソーム非依存的な TOP2cc 除去経路の分子機構を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1)TOP2cc 検出系

ヒトリンパ芽球細胞 (TK6) をエトポシド (ETP) で処理後、ETP を除いた培地で培養し、細胞からゲノム DNA を塩化セシウム密度遠心勾配法で精製した。DNA に結合したタンパク質は、ウェスタンブロット法またはスロットブロット法で検出した。

#### (2)感受性試験

野生型または *TDP2* 遺伝子破壊細胞に、ETP で 3 時間暴露し、メチルセルロース入り培地にまき、10~14 日間培養し、コロニー数を計測した。

#### (3)*in vitro* TOP2cc 除去アッセイ

TOP2cc が結合したゲノム DNA は、ETP 処理後の野生型細胞から、前述の塩化セシウム密度遠心勾配法で精製した。このゲノム DNA に TDP2 タンパク質を添加し、生成物をウェスタンブロット法で検出した。

### 4. 研究成果

(1)野生型細胞にエトポシドを処理し、ゲノム DNA を精製した。ゲノム DNA に共有結合している TOP2 は、本来の分子量より高分子側にスメアしたバンドとして見られた。このスメアバンドは、ポリユビキチン抗体でも検出された。この結果から、TOP2cc はポリユビキチン化されることが分かった。次に、野生型および *TDP2* 遺伝子破壊 TK6 細胞の TOP2cc 除去動態をプロテアソーム 阻害剤の有無で比較した。その結果、TOP2cc はプロテアソーム依存的または非依存的な経路で修復されることが分かった。さらに、両経路は TDP2 依存的経路と非依存的経路に分かれていることが分かった。また、ETP 処理した細胞から抽出したゲノム DNA を

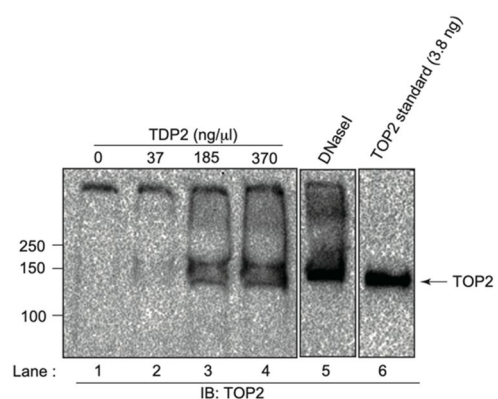


図 1 *in vitro* TOP2cc 除去アッセイの結果

用いて、TDP2 がタンパク分解なしに TOP2cc を除去することを生化学的に示した (図 1)。本研究から、TOP2cc 修復において、新規なプロテアソーム非依存的機構が存在することが明らかになった (文献 1)。また、野生型または、*TDP2* 遺伝子破壊細胞に、エトポシド単独ま

たは、エトポシドとプロテアソーム阻害剤を同時に 3 時間暴露した細胞を、メチルセルロースを用いて感受性試験を行った。その結果、TDP2 遺伝子破壊細胞では、プロテアソーム阻害剤を添加することにより、エトポシド感受性が高まった。これは、ゲノム DNA を用いた TOP2cc の除去動態の結果と、生化学実験の結果に一致する。すなわち、TDP2 がプロテアソームによる分解なしに、TOP2cc を除去することを意味する。本研究結果から、プロテアソームが関与せず、TOP2cc を除去する経路には、Mre11 による DNA 鎖切断を介する経路と TDP2 によるホスホジエステル結合を加水分解する経路の 2 つが存在することを明らかにできた。

(2) トポイソメラーゼ 1 (TOP1) は、反応中間体として、DNA の 3' 切断端と TOP2 活性部位のチロシン残基が共有結合した複合体 (TOP1 covalent complex: TOP1cc) を形成することが知られている。TOP1cc の除去は、プロテアソームによる分解が起きた後、TDP1 が数残基のペプチドを除去する。このように 2 段階で TOP1cc を除去すると推定されていたが、細胞レベルでこのような反応が起きているか分かっていなかった。そこで、TOP1cc の除去動態を 1 段階目と 2 段階目に分けて評価できる実験系を構築した。この実験系では、1 段階目を評価するために、TOP1 タンパク質の表面を認識する抗体を用いた。また、2 段階目を評価するために、TOP1 タンパク質の DNA と共有結合する付近のペプチド 10 残基程度を認識する抗体を用いた。その結果、プロテアソーム阻害剤の添加により、1 段階目と 2 段階目の除去が遅延していた。一方、TDP1 遺伝子破壊細胞では、1 段階目の遅延は検出されなかったが、2 段階目の遅延は検出された。これらの結果から、TOP1cc の除去において、1 段階目はプロテアソームによる分解を受け、2 段階目では TDP1 による数残基のペプチドの除去が行われることが確認できた。

TDP2 も 3' 末端に結合したチロシン残基を除去する活性があることが知られていたが、TOP1cc 除去において 1 段階目で働くのか、2 段階目で働くのか分かっていなかった。そこで、本研究で構築した実験系を用いて、TDP2 がどちらのステップに関与するのかを調べた。その結果、TDP1 が欠損している細胞において、TDP2 は TOP1cc の除去において、2 段階目で働くことが分かった (文献 2)。

さらに、TDP2 が 3' 末端に結合したチロシン以外にどのような DNA 損傷を取り除くのかを調べることにした。私は、以前に 3' 末端にヌクレオシドアナログである Ara-C (シタラビン) や FTD (トリフルリジン) がチェインターミネーターとして働くことを生化学的実験と細胞生物学的実験を用いて明らかにした (文献 3)。そこで、TDP2 がこれらのヌクレオシドアナログの除去に関与しているかを調べるために、野生型細胞、TDP1 遺伝子破壊細胞、TDP2 遺伝子破壊細胞、TDP1/TDP2 二重遺伝子破壊細胞を用いて、各ヌクレオシドアナログに対する感受性を評価した。その結果、二重遺伝子破壊細胞では、各一重遺伝子破壊細胞と比較して、これらのヌクレオシドアナログに対する感受性は高かった。この結果は、TDP2 は、TDP1 が存在しない時に、3' 末端に取り込まれたヌクレオシドアナログを除去しうることを意味する。

#### < 引用文献 >

文献 1: Tsuda M (筆頭著者兼責任著者), Kitamasu K, Hosokawa S, Nakano T, Ide H. Repair of trapped topoisomerase II covalent cleavage complexes: Novel proteasome-independent mechanisms. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 39(1-3):170-184 (2020)

文献 2: Tsuda M (筆頭著者兼責任著者), Kitamasu K, Kumagai C, Sugiyama K, Nakano T, Ide H. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) repairs topoisomerase 1 DNA-protein crosslinks and 3'-blocking lesions in the absence of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1). *DNA Repair*. in press (2020)

文献 3 : Tsuda M (筆頭著者), Terada K, Ooka M, Kobayashi K, Sasanuma H, Fujisawa R, Tsurimoto T, Yamamoto J, Iwai S, Kadoda K, Akagawa R, Huang SN, Pommier Y, Sale JE, Takeda S, Hirota K. The Dominant Role of Proofreading Exonuclease Activity of Replicative Polymerase in Cellular Tolerance to Cytarabine (Ara-C). *Oncotarget*. 8(20):33457-33474 (2017)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sasanuma Hiroyuki, Tsuda Masataka, Morimoto Suguru, Saha Liton Kumar, Rahman Md Maminur, Kiyooka Yusuke, Fujiike Haruna, Cherniack Andrew D., Itou Junji, Callen Moreu Elsa, Toi Masakazu, Nakada Shinichiro, Tanaka Hisashi, Tsutsui Ken, Yamada Shintaro, Nussenzweig Andre, Takeda Shunichi	4. 巻 115
2. 論文標題 BRCA1 ensures genome integrity by eliminating estrogen-induced pathological topoisomerase II-DNA complexes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E10642 ~ E10651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1803177115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Mohiuddin Mohiuddin, Evans Terry John, Rahman Md Maminur, Keka Islam Shamima, Tsuda Masataka, Sasanuma Hiroyuki, Takeda Shunichi	4. 巻 115
2. 論文標題 SUMOylation of PCNA by PIAS1 and PIAS4 promotes template switch in the chicken and human B cell lines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 12793 ~ 12798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1716349115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tsuda Masataka, Ogawa Saki, Ooka Masato, Kobayashi Kaori, Hirota Kouji, Wakasugi Mitsuo, Matsunaga Tsukasa, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Chikuma Shunsuke, Sasanuma Hiroyuki, Debatisse Michelle, Doherty Aidan J., Fuchs Robert P., Takeda Shunichi	4. 巻 14
2. 論文標題 PDIP38/PoIDIP2 controls the DNA damage tolerance pathways by increasing the relative usage of translesion DNA synthesis over template switching	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1371/journal.pone.0213383	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 Sassa Akira, Tada Haruto, Takeishi Ayuna, Harada Kaho, Suzuki Megumi, Tsuda Masataka, Sasanuma Hiroyuki, Takeda Shunichi, Sugasawa Kaoru, Yasui Manabu, Honma Masamitsu, Ura Kiyoe	4. 巻 9
2. 論文標題 Processing of a single ribonucleotide embedded into DNA by human nucleotide excision repair and DNA polymerase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50421-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuda Masataka, Kitamasu Kaito, Hosokawa Seiji, Nakano Toshiaki, Ide Hiroshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Repair of trapped topoisomerase II covalent cleavage complexes: Novel proteasome-independent mechanisms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 170 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1080/15257770.2019.1674332">https://doi.org/10.1080/15257770.2019.1674332</a>	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 Xu Xu, Nakano Toshiaki, Tsuda Masataka, Kanamoto Ryota, Hirayama Ryoichi, Uzawa Akiko, Ide Hiroshi	4. 巻 48
2. 論文標題 Direct observation of damage clustering in irradiated DNA with atomic force microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e18 ~ e18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1093/nar/gkz1159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuda Masataka, Kitamasu Kaito, Kumagai Chiho, Sugiyama Kazuya, Nakano Toshiaki, Ide Hiroshi	4. 巻 91-92
2. 論文標題 Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) repairs topoisomerase 1 DNA-protein crosslinks and 3 - blocking lesions in the absence of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 102849 ~ 102849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102849">https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102849</a>	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masataka Tsuda, Hiroshi Ide, Robert P. Fuchs, Shunichi Takeda
2. 発表標題 PDIP38/PoIDIP2 controls the DNA damage tolerance pathways by increasing the relative usage of translesion DNA synthesis over template switching
3. 学会等名 環境変異原学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津田雅貴, 北舛海斗, 中野敏彰, 笹沼博之, 武田俊一, 井出博
2. 発表標題 チロシルDNAホスホジエステラーゼ2(TDP2)によるDNA切断端に共有結合したトポイソメラーゼ2の修復機構
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masataka Tsuda, Kaito Kitamasu, Toshiaki Nakano, Hiroshi Ide
2. 発表標題 Repair of topoisomerase2 covalent cleavage complexes by tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2(TDP2)
3. 学会等名 Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津田雅貴, 井出博, Robert P. Fuchs, 武田俊一
2. 発表標題 PDIP38/PoIDIP2は損傷乗り越えの頻度を上昇させることでDNAダメージトレランスを制御する
3. 学会等名 第62回 日本放射線影響学会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----