

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04271

研究課題名(和文) DNA鎖のねじれ解消に働く酵素Top2がDNA二重鎖切断修復に果たす役割

研究課題名(英文) Role of the DNA-unwinding enzyme Top2 in the repair of DNA double-strand breaks

研究代表者

矢野 憲一 (Yano, Ken-ichi)

熊本大学・産業ナノマテリアル研究所・教授

研究者番号：70311230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：DNAトポイソメラーゼII (Top2) はDNA鎖のねじれを解消する酵素であり、細胞の核の中で様々な役割を担っている。放射線傷害の主要因であるDNA二重鎖切断 (DSB) の修復過程においてもDNA鎖のねじれは起こりうるが、それへのTop2の関与や役割は不明な点が多い。そこで本研究ではヒトTop2のDSB応答について解析した。その結果、Top2は素早くDSB部位へと集積すること、これはHDACやPARPの阻害剤で抑制されること、Top2阻害剤や細胞のATPレベルがTop2の核内動態に強く影響すること、遺伝病の原因となる変異でTop2のDSB応答と核内動態が変化すること、などを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最も重篤なDNA損傷であるDSBに対して細胞にどのような応答するかについてを詳細に解明することは、人体への放射線影響を理解するために重要である。本研究では生きたヒト細胞中にDSBが生成した際にTop2の挙動がどのように変わるかについて詳細な解析を行い、ヒト細胞のDSB応答に新たな知見を加えた。またヒトの遺伝病の原因となるTop2のアミノ酸置換の中に、Top2のDSB応答と核内動態に変化をもたらす初めての例を見いだした。

研究成果の概要(英文)：DNA topoisomerase II (Top2) is an enzyme that resolves extra-winding of DNA strands and plays critical roles in various nuclear processes. A DNA double-strand break (DSB) is the most severe DNA damage caused by ionizing radiation. In the process of DSB repair, extra-winding of DNA strands can occur, but the involvement of Top2 in DSB repair is poorly understood. In this study, we analyzed dynamic behaviors of human Top2 in response to DSB induction. We found rapid accumulation of Top2 at DSB sites, its suppression by inhibitors of HDAC and PARP, altered nuclear dynamics of Top2 by Top2 inhibitors, ATP-dependent nuclear dynamics of Top2, and a novel relationship between Top2 dynamics and a certain Top2 missense mutation that causes a human hereditary disease. These new observations indicate that human Top2 participates in cellular responses to DSB induction.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA損傷 DNA修復 DNA二重鎖切断 DNAのねじれ DNAトポイソメラーゼ ライブイメージング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) DNA トポイソメラーゼ II (Top2)

細胞の核内では、転写・複製・染色体分離といった様々な局面において DNA 鎖に過剰なねじれが生じうる。DNA トポイソメラーゼ II (DNA Topoisomerase II、以下 Top2) は DNA 鎖の切断と再結合によって DNA 鎖のねじれを解消する酵素であり、核内の諸過程において重要な役割を担っている。真核生物の Top2 は進化的に保存された構造を持ち、N 末端側から ATPase ドメイン、触媒ドメイン、C 末端ドメインより構成されている。ヒトや哺乳類の細胞は二つの Top2 (Top2A, Top2B) を持っており、その機能的な分担が知られている。Top2A は細胞周期の S 期から G2 期にかけて発現し、細胞増殖において重要な役割を担っている。Top2B は細胞周期とは関係なく発現しており、神経等の非分裂細胞における主要な Top2 である。

#### (2) ヒト Top2B の DNA 損傷応答

DNA 鎖の完全な切断である DNA 二重鎖切断 (DNA double-strand break, 以下 DSB) は、最も重篤な DNA 損傷である。染色体 DNA に DSB が生じると、細胞はすぐにそれを感知し、増殖を停止し、修復を試みる。過度な DSB 生成によって細胞死が引き起こされることから、DSB はヒトの放射線障害の主要因であると考えられている。DSB が生成することによって細胞にどのような応答反応が誘起され、どのように修復されるかについての詳細を明らかにすることは、人体への放射線影響を理解する上で重要である。

上述のように核内の様々な過程で DNA のねじれが生じるが、DSB 修復過程においても DNA のねじれが生じうると考えられる。しかし DNA ねじれ解消に働く主要因子である Top2 の DSB 修復への関与については不明な点が多かった。私達はこれまでの研究においてヒト Top2B が DSB 生成に素早く応答し、損傷部位へと集まることを観察してきた。また Top2B を欠損した細胞では、DSB 修復の主要経路の一つである相同組換えの効率が有意に低下することを見いだした。これらの知見は Top2 が DSB に応答して核内の挙動を変化させる分子であり、DSB 修復に関与することを示唆している。

### 2. 研究の目的

本研究は、ヒト細胞が持つ二つの Top2 の DSB 応答と DSB 修復における役割を解析することを通して、DSB 修復における DNA ねじれ解消の意義について検討し、放射線障害の主要因である DSB を感知・修復するメカニズムの理解を深めることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) EGFP-Top2 の DSB 応答のライブイメージング解析

EGFP を付加したヒト Top2A (EGFP-Top2A) ならびに EGFP-Top2B を発現するプラスミドを作製した。また各種の変異やアミノ酸置換を導入した EGFP-Top2A, EGFP-Top2B の発現プラスミドも作製した。これらのプラスミドを HeLa 細胞に導入し、EGFP-Top2A, EGFP-Top2B を一過的に発現させた。蛍光顕微鏡観察下で、生きた細胞の核内の任意の部位に 349 nm の UV パルスレーザーを照射することによって DSB を生成し、EGFP-Top2A, EGFP-Top2B の挙動を経時的に観察した。

#### (2) 内在性 Top2 の免疫染色

HeLa 細胞に上述の UV パルスレーザーを照射することで DSB を誘発した。一定時間の培養の後に細胞を固定し、内在性 Top2A, Top2B に対する特異抗体と、DSB 部位を染色する抗体 (DNA-PK p2609) で共染色した。蛍光標識二次抗体と反応させた後、顕微鏡観察を行った。

#### (3) EGFP-Top2 の核内動態の FRAP 解析

FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) 解析は次のように行った。EGFP-Top2 を発現している細胞核の一部分に 473 nm のレーザーを強く照射することで、その部分の EGFP の蛍光を退色させた。退色部位の蛍光の回復を経時的かつ定量的に観察することで、核内の EGFP-Top2 分子の流動性について解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト Top2 の DSB 応答のライブイメージング解析

ヒト細胞が持つ二種類の Top2 (Top2A, Top2B) のうち、既に Top2B に関しては一定の知見を得ていたため、ここでは Top2A について解析を行った。HeLa 細胞を UV パルスレーザー照射し、これを免疫染色・蛍光顕微鏡観察することにより、内在性 Top2A が損傷部位に集積することを明らかにした。次に EGFP-Top2A を一過的に発現している細胞を UV パルスレーザー照射して DSB 生成し、その部位へと EGFP-Top2A が集積するタイムコースを解析したところ、EGFP-Top2A は秒単位の速さで DSB 部位へと集まることが判明した。EGFP-Top2A と EGFP-Top2B の DSB 集積のタイムコースはほぼ同様であった。

## (2) ヒト Top2 の DSB 応答と、主要な核内調節因子の関連の解析

細胞内に DSB が生成すると、Top2A、Top2B とともにすみやかに損傷部位へと集積することが観察されたことから、DSB の感知と修復に重要な核内調節因子が Top2 の DSB 集積に関与しているかを阻害剤を用いて検討した。まず EGFP-Top2A を発現している細胞を、ATM、ATR、DNA-PKcs、PARP1、HDAC に対する阻害剤で処理した後、UV パルスレーザーによる DSB 生成と、EGFP-Top2A のライブイメージングを行った。その結果、PARP1 阻害剤や HDAC 阻害剤によって EGFP-Top2A の DSB 集積が有意に減弱することが判明した。同様の結果はヒト Top2B でも得られており、Top2A と Top2B は類似したメカニズムで DSB 部位に集積すると推測された。

Top2B は CTCF や cohesin を構成するサブユニットと相互作用して染色体上の特定部位に局在することが報告されていた。こういった Top2B 相互作用因子の中には Top2B と同様に DSB 部位に集積するものも存在する。そこで、Top2B 相互作用因子が Top2B の DSB 集積に必要であるかどうかを調べた。各種の Top2B 相互作用因子に対する siRNA を HeLa 細胞へ一過的に導入して RNA 干渉による機能阻害を行った上で、EGFP-Top2B を発現させ、UV パルスレーザー照射による DSB 生成、EGFP-Top2B のライブイメージング解析を実施した。その結果、CTCF や cohesin サブユニットの機能阻害は EGFP-Top2B の DSB 集積には影響しないことが判明した。これらの因子を介して染色体上に結合している Top2B とは異なる核内プールの Top2B が DSB 部位へと集まっている可能性が推察された。

## (3) ヒト Top2 の DSB 応答に対する Top2 阻害剤の効果の解析

Top2 は DNA 鎖に結合し、これを切断、再結合することで DNA 鎖のねじれを解消する。その一連の酵素反応はサイクルを形成しており、その各ステップに対する阻害剤が開発されている。そこで次に Top2 の酵素サイクルの各ステップの阻害剤が、Top2 の DSB 集積に与える影響を検討した。HeLa 細胞中で EGFP-Top2A、-Top2B を一過的に発現させ、各種阻害剤を作用させた後に FRAP 解析や、UV パルスレーザー照射による DSB 生成を行った。その結果、ICRF-187 や ICRF-193 といった Top2 阻害剤が Top2 の DSB 集積を阻害することを観察した。FRAP 解析を行ったところ、ICRF-187 や ICRF-193 は Top2 の核内流動性を著しく低下させることで DSB 集積を阻害していることが明らかになった。続いて Top2 の反応を阻害することで DNA 鎖の切断を誘発する薬物であるエトポシドに関して同様の解析を行ったところ、エトポシド処理では Top2 の核内流動性の低下はわずかであり、DSB 集積への阻害効果も限定的であった。最後にアクリラルピシンについて解析を行った。アクリラルピシン処理した細胞では EGFP-Top2 の核内流動性は著しく低下し、DSB 集積も阻害された。精製した Top2 タンパク質とアクリラルピシンを用いた無細胞系での研究から、アクリラルピシンは Top2 と DNA の相互作用を阻害するものとされてきた。しかし生きた細胞中での Top2 の挙動を FRAP 解析した本研究では、アクリラルピシン処理によって Top2 が核内構造体に強く結合するようになることが強く示唆され、無細胞系でのアクリラルピシンの作用とは異なる機序が生きた細胞中に存在すると推察された。

## (4) ATP レベルと Top2 の核内動態の関連の解析

ヒトや哺乳類の Top2 は核質と核小体の双方に存在することが知られている。上述の研究過程で、UV パルスレーザーを核質に照射して DSB を生成させると、Top2 が核質の DSB 部位に集積することに加えて、核小体にも集まる場合があることを観察した。FRAP 解析を行ったところ、Top2A と Top2B は共に核質と核小体の間で一定の平衡状態にあり、この平衡状態は細胞内 ATP レベルに影響を受けていた。Top2 の核小体局在には RNA ポリメラーゼ I (Pol I) の活性が必要であり、Pol I 阻害剤で Top2 の核小体局在は抑制された。Top2 依存的に DSB を生成する薬物であるエトポシドを細胞に作用させて生存率を測定したところ、低 ATP 状態ではエトポシドの細胞毒性が顕著に減弱することから、低 ATP 状態では Top2 の DNA 結合が低下していると推察された。核小体が相分離により形成されること、ATP がハイドロトロプとして作用して相分離を打ち消す作用があることから、Top2 の核内分布が ATP 依存的に変動する現象は相分離と関連して生じている可能性が推察された。

## (5) 遺伝性疾患の原因となる Top2B 一アミノ酸置換と DSB 応答の関連の解析

近年、Top2B の一アミノ酸置換が脳神経系の機能異常を伴う遺伝性疾患の原因となる例がいくつか報告されている。そこでこういった変異が Top2B の DSB 応答能に与える影響を解析した。遺伝性疾患の原因となっている一アミノ酸置換を持つ EGFP-Top2B の発現プラスミドを作製した。これを用いて、上述のような UV パルスレーザーによる DSB 生成と損傷部位への集積や、FRAP 法による核内挙動を解析した。その結果、これまでに報告されてきた変異の中に、DSB 集積の著しい低下をもたらすものがあることを同定した。FRAP 解析により、この変異を持つ Top2B は核内流動性が低下しており、正常型 Top2B に比べ、何らかの核内構造体に強く結合していると推察された。またこの一アミノ酸置換を持つ Top2B は Top2 阻害剤である ICRF-187 や ICRF-193 の作用を受けなかった。これらの新知見は、研究当初は予期していなかった Top2B の DSB 応答性と遺伝性疾患の関連を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Keiko Morotomi-Yano, Ken-ichi Yano	4. 巻 11
2. 論文標題 Nucleolar translocation of human DNA topoisomerase II by ATP depletion and its disruption by the RNA polymerase I inhibitor BMH-21	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21533
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-00958-4	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano
2. 発表標題 Dynamic behavior of DNA topoisomerase 2B in response to DNA double-strand breaks.
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野憲一、諸富桂子
2. 発表標題 DNA二重鎖切断に応答したDNAトポイソメラーゼ2Bの核内挙動
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 諸富桂子、矢野憲一
2. 発表標題 DNA二重鎖切断に応答したDNAトポイソメラーゼ2Bの核内挙動
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 矢野憲一、諸富桂子
2. 発表標題 ヒトDNAトポイソメラーゼ2の核小体局在は細胞内ATPレベルとRNAポリメラーゼI活性により制御される
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------