

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12337

研究課題名(和文) DNA二本鎖切断修復タンパク質Ku70の核移行制御機構の解明

研究課題名(英文) Theoretical and experimental analysis for the nuclear transport mechanism of double-strand break repair protein, Ku70

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・室長

研究者番号：60373396

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)：本研究では、DNA二本鎖切断修復酵素Ku70の細胞内における核移行を制御する機構を、主に分子細胞生物学的、計算化学的手法を用いて検証した。Ku70の核移行シグナル(NLS)の特定のリジン残基をグルタミンに置換すると野生型に比べてKu70の核局在性が顕著に減少することが判明した。さらに、Ku70 NLS中のリジン残基をアセチルリジンに置換すると、Ku70 NLSと核輸送タンパク質との結合力が減少することも確認された。これらの結果は、Ku70の核移行がKu70 NLSの特定のリジン残基のアセチル化によって制御されている可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Ku70が結合する核輸送タンパク質が認識可能なNLSは、Kuのもう一方のサブユニットであるKu80や他のNHEJコンポーネントにも存在している。Ku70の核移行がNLS中のリジン残基のアセチル化によって制御されているとすれば、Ku80を含む他のNHEJ関連タンパク質においても同様の解析を行うことで、NHEJ経路によるDSB修復の過程を詳細に追跡できると期待される。また、実験結果をシミュレーションによる理論的計算によって検証することで、これまで再現が困難であった翻訳後修飾によるタンパク質の構造や機能の変化を解析するための新たな研究方法を確立できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Ku70 participates in various intra- and extra-nucleic processes. For multifunctional control, machinery that precisely regulates the intracellular localization of Ku70 is essential. Recently, it was reported that the acetylation of Ku70 regulates its function. In this study, it was demonstrated that the level of nuclear localization of Ku70 was decreased when specific lysine residues in the nuclear localization signal (NLS) of Ku70 were substituted with glutamine to mimic acetylation, and that acetylation of lysine residues in the Ku70 NLS reduced the interaction with the nuclear transport factor, importin- β , using both experimental and theoretical approaches. These findings help further understanding of the molecular mechanisms of Ku70 nuclear transport and clarifying the spatiotemporal localization control mechanism that regulates a variety of functions of Ku70 and other DNA repair proteins.

研究分野：放射線・化学物質影響科学

キーワード：DNA二本鎖切断修復 Ku70 アセチルリジン 核移行シグナル(NLS) Importin 分子シミュレーション

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

電離放射線や代謝によって生じる DNA 損傷のうち DNA 二本鎖切断(DSB)は最も重篤な損傷の一つである。Ku は DSB 末端を認識・結合し、DSB 修復経路の一つである non-homologous end-joining (NHEJ)過程を開始するタンパク質であるが、そのサブユニットである Ku70 は NHEJ 過程における機能以外に様々な核内 / 核外の細胞機能に参与していることが報告されている。このような多機能性を発揮するためには、Ku70 の細胞内局在を正確に制御する機構が不可欠であると予想されるが、そのメカニズムは明らかになっていない。最近、アセチル化のターゲットとなるリジン残基が集中して存在する領域に Ku70 の核移行シグナル(NLS)が含まれることが報告された。本研究では、NLS を含む領域におけるリジン残基のアセチル化、脱アセチル化が Ku70 の細胞内局在を調整するスイッチとなっているのではないかという仮説を、主に分子細胞生物学的、計算化学的手法を用いて明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

Ku70 本体と Ku70 の C 末端側の SAP ドメインとを繋ぐリンカー領域は、タンパク質の核輸送因子である importin- α / importin- β 複合体 (Imp α /Imp β)と結合して細胞核周辺に移動することが確認されており、Ku70 の NLS がこの領域に存在する可能性が示唆されている。一方、Ku70 にはアセチル化されるリジン残基が少なくとも 8 箇所あることが確認され、このうち 5 箇所は前述のリンカー領域中に集中していることが報告されている。タンパク質の翻訳後修飾の一つであるリジン残基のアセチル化は、側鎖が持つ正電荷が消失することで分子間、もしくは分子内の相互作用を変化させるスイッチとして機能すると考えられている。アセチル化の効果を実験的に検証する場合、タンパク質中のリジン残基を個別にアセチル化することが困難であることから、リジンをグルタミンに置換した KQ 置換体をアセチルリジンのモデルとして、また、内因性のアセチル基転移酵素によるリジン残基の意図しないアセチル化を避けるためにリジンをアルギニンに置換した KR 置換体が非アセチルリジンのモデルとして用いられることが多い。しかし、計算化学的手法を用いてタンパク質におけるリジン残基のアセチル化の効果を検証したところ、KQ 置換体を用いるとアセチル化の効果を過大評価する可能性があることが示された。そこで本研究では、KQ 置換体、KR 置換体を用いて細胞内での Ku70 の挙動を観察し、Ku70 NLS 領域中のリジン残基が実際にアセチル化された場合の生物学的効果を分子シミュレーション、および pull-down assay 法等の分子生物学的手法によって検証することを目的とした。

3. 研究の方法

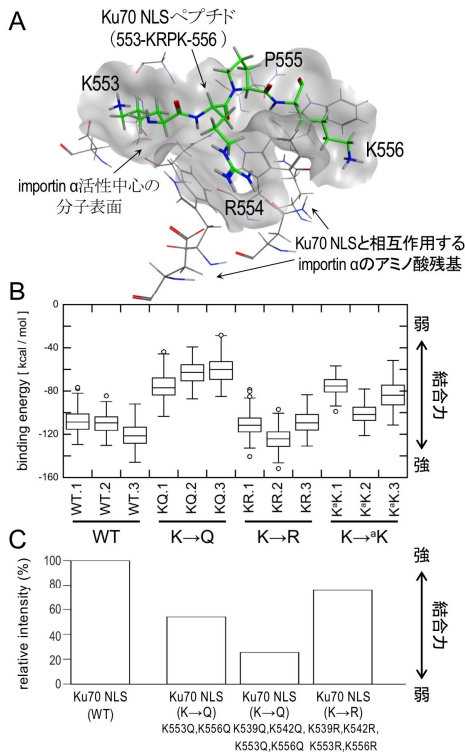
蛍光タンパク質(EGFP)によって標識した野生型 Ku70 NLS 領域中のリジン残基をグルタミンおよびアルギニンに置換した KQ 置換体、KR 置換体を作成し、野生型とあわせてライブセルイメージング法によって細胞内における Ku70 の局在を観察した。また並行して、既存の結晶構造 (PDB ID: 3RZX)を元に、Imp α と Ku70 リンカー領域の複合体のモデリングを行なった。各分子モデルに対して数ナノ秒レベルの分子動力学シミュレーションを実行し、得られた分子構造に対して分子力学的計算を行い Imp α -Ku70 リンカー領域間の結合力を推定した。続いて pull-down assay 法、および BLI (Bio-Layer Interferometry)法を用いて Imp α と Ku70 リンカー領域との結合力を実験的に測定し、計算値と比較することでシミュレーションの妥当性を評価した。実験、および分子シミュレーションに用いた Ku70 リンカー領域のアミノ酸配列には、Ku70 の細胞内局在の観察に用いた、野生型、KQ 置換体、KR 置換体に加えて、同じリジン残基をアセチルリジン (*N*-acetyl-lysine) に置換した変異体も作成し、実際にリジン残基がアセチル化された場合の Ku70 リンカー領域と Imp α との結合力も評価した。

4. 研究成果

EGFP-Ku70 融合タンパク質を Ku80 欠損細胞である *xrs-6* 細胞内で発現させると、細胞核において EGFP の蛍光が観察された。Ku70 の NLS と予想される領域に存在する5つのリジン残基を個別にグルタミン、もしくはアルギニンに置換した変異体を作成し、同様に細胞内における局在を観察すると、5箇所のうち2箇所のリジン (K553 および K556) をグルタミン置換すると Ku70 の核局在性が顕著に減少することが判明した [図1]。

一方、既存の結晶構造を元に Imp α と Ku70 NLS 領域との複合体モデルを作成し、分子シミュレーションを実行することで、

両分子間の結合力を推定したところ、KR 置換体では野生型と同程度の結合力を維持していたのに対し、KQ 置換体では両分子間の結合力が大きく減少することが判明した。これらの計算結果は、実際に Ku70 NLS のペプチド鎖を合成し、pull-down 法、および BLI (Bio-Layer Interferometry) 法を用いて



A. Ku70 NLSとimportin α の相互作用部位 (PDB ID: 3RZXを元に作成)
 B. 分子シミュレーションによるKu70 NLS - importin α 間の結合力の推定
 C. pull-down assay によるKu70 NLS - importin α 間の結合力の比較
 (WT: 野生型, *K: アセチルリジン)

図2 Ku70 NLS - importin α 間の結合力の推定

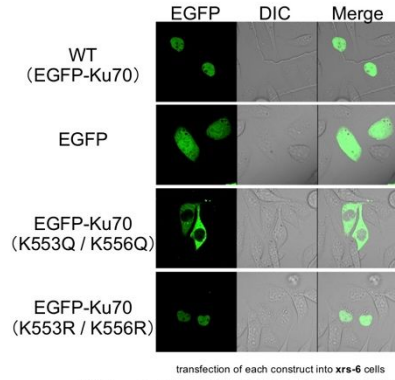


図1 Ku70の細胞内局在の観察

Imp α /Imp β との結合力を実験的に測定した場合でも同様の傾向が観察された [図2]。このことから、分子シミュレーションによる計算結果は実際の実験結果を反映していると考えられる。

さらに、実際に5箇所のリジン残基をアセチルリジンに置換したペプチド鎖を合成し、pull-down 法により Imp α との結合力を測定したところ、アセチルリジン置換体と Imp α との結合力は、KQ 置換体-Imp α 間の結合力よりは強く、野生型や KR 置換体と Imp α との結合力よりは弱いことが判明した。この結果は、分子シミュレーションによって推定された両分子間の結合力と強く相関していることも確認された。これらの結果から、Ku70 の核移行が Ku70NLS 中のリジン残基のアセチル化によって制御されている可能性が示唆される。

以上の結果をまとめ、論文を投稿した (投稿中)。

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 Koike M, Yutoku Y, Koike A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Feline XRCC4 undergoes rapid Ku-dependent recruitment to DNA damage sites.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio.	6. 最初と最後の頁 798-810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13363	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小池学, 大森さくら, 湯徳靖友, 藤井万紀子
2. 発表標題 重粒子線治療に資する難治性がんのDNA修復能の変化を指標とする基礎研究
3. 学会等名 平成30年度HIMAC共同利用研究成果発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujimoto H, Ikuta T, Koike A, Koike M
2. 発表標題 Acetylation of nuclear localization signal controls importin-mediated nuclear transport of Ku70
3. 学会等名 The 16th International Congress of Radiation Research (ICRR2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小池学
2. 発表標題 DNA 修復機構と重粒子線がん治療の高精度化と適応拡大
3. 学会等名 昭和大学学士会後援セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

伴侶動物とヒトに共通のメカニズムで生じるがんに対する治療法や診断法の開発に貢献
<https://www.qst.go.jp/site/qms/29590.html>

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	小池 学 (Koike Manabu) (70280740)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 重粒子線治療研究部・上席研究員(定常) (82502)	

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