

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008年～2010年

課題番号：20510047

研究課題名(和文) 新規ヒト AP エンドヌクレアーゼの機能

研究課題名(英文) Characterization of new identified novel human AP endonuclease

研究代表者 菅野 新一郎 (Kanno Shin-ichiro)

東北大学・加齢医学研究所・講師

研究者番号：10400417

研究成果の概要(和文)： DUF2228 family は線虫からヒトまでの真核生物(酵母やカビを除く)に分布し、よく保存された配列を持つタンパク質で、機能が未知の protein family である。昆虫や線虫の一部では保存された配列以外にアミノ酸配列 N 端側に CYR motif (C2H2 zinc finger motif) を持っている。CYR motif は初め DNA 修復酵素の PALF (ALPF) で我々が同定したモチーフで、アミノ酸配列 N 端あるいは C 端に単独である CYR motif は DNA damage によって活性化された PARP1 によって作られる poly(ADP-ribose) 鎖(PAR) に結合する性質を持っている。我々は、この family メンバーのうちアミノ酸配列 N 端側に CYR motif をもつショウジョウバエの CG1218-PA と CYR motif を欠いたタイプのヒトの C4orf27(APNX) をクローニングしその機能を解析した。その結果、1) GFP-CG1218-PA は PAR 依存性に核内の DNA 損傷部位に集積するがヒト GFP-APNX は PAR 非依存性に損傷に集積する。2) APNX はヒト細胞内で PARP1 とヘテロダイマーを形成し、PARP1 依存的に損傷に集積する。3) CG1218-PA および APNX は脱塩基部位 (AP サイト) の 5' 側に 3'-OH のニックを入れる AP-endo/exonuclease 活性をもつ酵素であることなどが明らかになった。さらに APNX のノックダウンでヒト細胞がアルキル化剤 MMS に感受性になることからこのタンパク質は塩基除去修復や DNA 単鎖切断修復に関わる新規の DNA 修復酵素であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)： DUF2228 is a functionally unknown, conserved protein family distributed from worm to vertebrate including human. In insect and a part of worm DUF2228 protein has an additional domain containing a CYR motif (C2H2 zinc finger motif) in the N-terminal region. Since CYR motif was first identified in the human repair protein, PALF (ALPF), and found in various proteins of DNA metabolism, such as DNA repair and the DNA damage checkpoint, at their N- or C- termini, we hypothesized that DUF2228 family proteins have also DNA metabolism related functions. We isolated cDNA of Drosophila CG1218-PA and human C4orf27(APNX) belonging to DUF2228 and characterized these proteins. Here we show that; 1) a Drosophila CG1218-PA protein accumulates at DNA damaged site in a poly-ADP-ribose-dependent manner. 2) Human APNX protein that lacks a CYR motif forms a hetero dimer with PARP1 and accumulates at DNA damaged site in a PARP1-dependent manner. 3) CG1218-PA and APNX possess endo- and exonuclease activities against abasic site. 4) Suppression of the expression of APNX using siRNA in HeLa cells provided the cells with sensitivity to methyl methane sulfonate, which

produces methylated bases leading to single-strand breaks. These data suggest that DUF2228 protein CG1218-PA and APNX play important roles in the repair of DNA base damage and single-strand breaks.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	800,000円	240,000円	1,040,000円
平成21年度	1,400,000円	420,000円	1,820,000円
平成22年度	1,400,000円	420,000円	1,820,000円
年度			
年度			
総計	3,600,000円	1,080,000円	4,680,000円

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：AP endonuclease, PARP1, base excision repair (BER), single strand break repair (SSBR)

1. 研究開始当初の背景

ゲノムの安定性は様々なDNA修復機構とチェックポイント機構により維持されている。私は二重鎖切断のDNA修復機構であるnon-homologous end joining (NHEJ)に関わるタンパク質のバイオインフォマティクス解析から新規のDNA修復酵素PALFとCYR domain(C2H2 type zinc finger)を発見した。さらに、CYR domainの解析から新規DNA修復酵素としてショウジョウバエのCG-1218-PAを同定し、ヒトのオルソログとしてAPNX(C4orf27)を発見した。APNXは線虫からヒトまでよく保存されたタンパク質であり、また、CYR domainを持つタンパク質がすべてDNA複製・修復関連の酵素であることから、CG-1218-PA、APNXもDNA複製・修復関連のタンパク質であると予想された。

2. 研究の目的

バイオインフォマティクス解析から見いだされたAPNX(C4orf27)の生理機能を解明し、ゲノムの安定性に対する役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CG-1218-PA、APNXをクローニングし、GFP-tagの細胞発現用ベクターを構築する。これを用いてX線照射によるfoci formationや、*in situ*でレーザーを用いて細胞核内にDNA損傷部位をつくり、これらのタンパク質がリクルートされるかどうかを確認し、DNA修復タンパク質かどうかを調べる。

(2) CG-1218-PA、APNXのリコンビナントタンパク質を大腸菌で発現させ、精製し、*in vitro*でDNA損傷オリゴを用いたassay系で修復酵素活性が認められるかどうかを調べる。

(3) Flag-APNXの安定発現細胞株を樹立し、免疫沈降とnanoLC/MS/MSを用いてプロテオーム解析を行う。

(4) APNXのsiRNAを用いてノックダウンし、DNA損傷薬剤に対する耐性やその他のphenotypeを調べる。

4. 研究成果

(1) GFP-CG1218、GFP-APNXを作製し*in situ*でレーザーを用いて細胞核内にDNA損傷部位をつくり、集積を調べたところ、

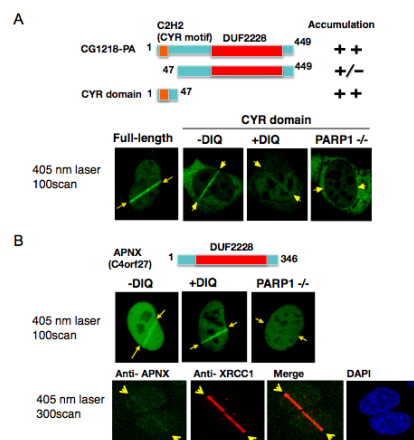


Fig.1 GFP-CG1218、GFP-APNXのDNA損傷部位への集積

Fig.1 に示すように GFP-CG1218、GFP-APNX は DNA 損傷部位にリクルートされることが分った。

(2) CG-1218-PA、APNX のリコンビナントタンパクを用いて in vitro で修復酵素活性が認められるかどうかを調べたところ、Fig.2 に示すように AP endonuclease の活性が認められた。

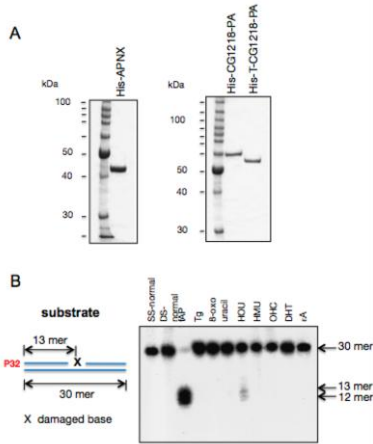


Fig.2 AP endonuclease activity

(3) Flag-APNX の安定発現細胞株を樹立し、免疫沈降と nanoLC/MS/MS を用いてプロテオーム解析を行った。その結果、Fig.3 に示すように APNX は PARP1 とヘテロダイマーを形成していることがわかった。

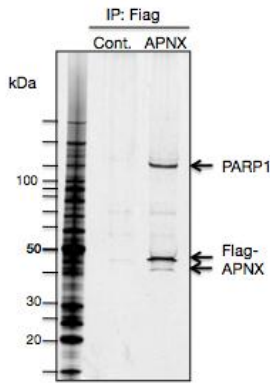


Fig.3 APNX interacts with PARP1

(4) APNX の siRNA を用いてノックダウンし、DNA 損傷薬剤に対する耐性を調べたところ、X 線やブレオマイシンなどの DNA 二本鎖切断を引き起こす薬剤に対しては感受性にならなかったが、酸化損傷や DNA 一本鎖切断を引き起こす MMS に対して感受性を示すことがわかった (Fig.4A)。また、PARP1 とヘテロダイマーを形成していることから MMS による酸化損傷や DNA 一本鎖切断で活性化される PARP1 の活性を poly(ADP ribosil)鎖に対する抗体で調べたところ、APNX のノックダウンで PARP1 の活性化が

著しく阻害されることが明らかになった (Fig.4B)。

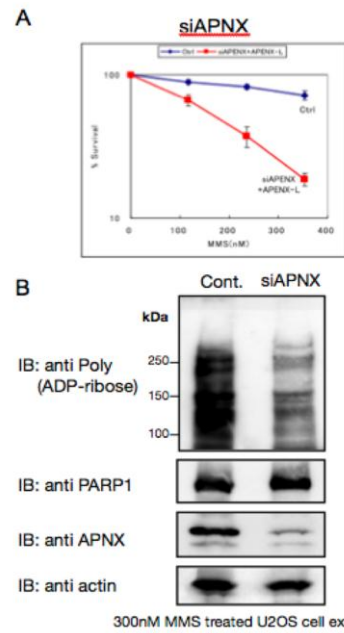


Fig.4 APNX ノックダウンによる MMS に対する sencitivity、PARP1 の活性化の阻害

以上 (1) ~ (4) の結果から、APNX は PARP1 とヘテロダイマーを形成し、酸化損傷や DNA 一本鎖切断で DNA 損傷部位にニックやギャップを導入し PARP1 の活性化を行うタンパク質であることが分った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Itoh, G, Kanno, S, Uchida, K, S, K, Chiba, S, Sugino, S, Watanabe, K, Mizuno, K, Yasui, A, Hirota, T, and *Tanaka, K. CAMP (C13orf8, ZNF828) is a novel regulator of kinetochore-microtubule attachment. *EMBO J*, 2011 Ja30(1):130-44. Epub 2010 Nov 9 査読あり (doi:10.1038/emboj.2010.276)

(2) Li Lan, Ayako Ui, Satoshi Nakajima, Kotomi Hatakeyama; Mikiko Hoshi, Reiko Watanabe, Susan Janicki, Hideaki Ogiwara, Takashi Kohno, Shin-ichiro Kanno, Akira

Yasui, The ACF1 complex is required for DNA double-strand break repair in human cells *Mol. Cell.* 2010 40(6):976-87 査読あり (DOI 10.1016/j.molcel.2010.12.003)

(3) Isogai S, Kanno S, Ariyoshi M, Tochio H, Ito Y, Yasui A, Shirakawa M.

Solution structure of a zinc-finger domain that binds to poly-ADP-ribose. *Genes Cells.* 15(2):101-10. 2010 査読あり

(DOI: 10.1111/j.1365-2443.2009.01369.x)

〔学会発表〕(計 1件)

第33回日本分子生物学会(2010年12月7日、神戸ポートアイランド)

DUF2228 family - Characterization of a novel human endo/exonuclease -
菅野 新一郎、渡邊 礼子、安井 明

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 新一郎 (Kanno Shin-ichiro)

東北大学・加齢医学・講師

研究者番号: 10400417

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: