

機関番号：17401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20579003

研究課題名 (和文) XLF を介した DNA 損傷認識を制御する新しい細胞内情報伝達系の解析

研究課題名 (英文) Analysis of a novel signaling pathway that regulates DNA damage recognition mediated by XLF

研究代表者

矢野 憲一 (YANO KEN-ICHI)

熊本大学・バイオエレクトロクス研究センター・教授

研究者番号：70311230

研究成果の概要 (和文)：非相同末端連結 (NHEJ) はヒトにおける DNA 二重鎖切断 (DSB) の主要な修復経路であり、Ku と XLF はこの経路において DSB 認識に関与する。本研究では Ku 存在下での XLF の DSB 認識能をイノシトール 6 リン酸が著しく高めることを明らかにした。また DSB 上での NHEJ 基本因子群の分子集合において Ku-XLF 相互作用が重要な役割を担うことを示した。さらにヒト遺伝病に見られる XLF 遺伝子変異の生理的意義について解析した。以上の結果に基づき、NHEJ における DSB 認識機構の新しいモデルを提唱した。

研究成果の概要 (英文)：Non-homologous end-joining (NHEJ) is a major repair pathway of DNA double-strand breaks (DSBs) in human cells. Ku and XLF coordinately function in the recognition of DSBs in NHEJ. In this study, we showed that inositol-6-phosphate enhances the recognition of DSBs by XLF in the presence of Ku. Furthermore, we showed a critical role of Ku-XLF interaction in the molecular assembly of NHEJ factors on DSBs and biological significance of a genetic mutation found in patients of human genetic disorder. Based on these results, we proposed a new model for the DSB recognition in NHEJ.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	0	2,400,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、遺伝・ゲノム動態

キーワード：DNA 損傷、DNA 二重鎖切断、DNA 修復、非相同末端連結、XLF、Ku

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA 二重鎖切断修復研究の重要性

DNA 鎖の完全な切断である DNA 二重鎖切断 (DNA double-strand break, 以下 DSB) は最も重篤な細胞障害の一つであり、たった一箇所の DSB であっても細胞は増殖を停止して修復を試みる。全ての放射線治療と多くの抗癌

剤治療は、癌細胞に過剰な DSB を引き起こすことでアポトーシスを誘導することを主要な作用原理としている。よってヒト細胞が DSB をどのように認識し応答するのかを詳細に明らかにすることは、より効果的な癌治療や副作用の低減を考える上できわめて重要といえる。

(2) 非相同末端連結による DSB の修復
ヒト細胞において DSB は主に非相同末端連結 (Non-homologous end-joining, 以下 NHEJ) によって修復される。NHEJ は DSB 修復に加えて免疫グロブリン遺伝子の再編成にも重要なため、NHEJ に関与する遺伝子の異常は放射線高感受性と免疫不全を特徴とするヒト遺伝病を引き起こす。特に NHEJ 基本因子である XLF 遺伝子においてはわずかにアミノ酸の置換が遺伝病を引き起こす例が報告されている。

(3) NHEJ をつかさどる細胞因子
ヒト細胞内において、Ku タンパク質は NHEJ 経路における DSB センサーとして重要な役割を担っている。細胞内で DSB が生じるとまず Ku が DSB に直接結合し、次いで他の NHEJ 基本因子である DNA-PKcs, XRCC4/DNA-ligase IV, XLF が DSB 上に集合し、NHEJ による DSB 修復へと進行していく。

(4) NHEJ 因子群による DSB 認識
私はこれまでに NHEJ 基本因子である DNA-PKcs, XRCC4, XLF の DSB 応答反応をライブセルイメージングによって解析してきた。その結果、NHEJ 基本因子の DSB 上への集積は Ku 依存的反応であり、DNA-PKcs, XRCC4, XLF が互いに独立に挙動する過程の後に、各因子が DSB 上で協調的に作用する過程が続くことを明らかにし、これらの観察に基づいた新モデルを提唱するに至った。

(5) Ku と XLF のタンパク質間相互作用
私は XLF と Ku の相互作用が DNA 依存性の反応であることを見出し、XLF が DSB 認識においてもなんらかの役割を担っていることを報告した。さらにイノシトール 6 リン酸 (IP6) と呼ばれる化合物が、DSB 上での Ku-XLF 相互作用を促進することを見出した。この観察は、IP6 を介した DNA 修復の制御という全く新しい細胞内情報伝達経路が存在することを示唆している。

2. 研究の目的

(1) Ku と XLF のタンパク質間相互作用を解析することを通して、IP6 を介した DSB 認識制御の新しいメカニズムを明らかにする。

(2) Ku と XLF を中心とした NHEJ 因子群の分子集合機構の詳細を明らかにすることで、癌治療における重要な基盤知識である DSB 損傷認識について理解を深める。

(3) 放射線高感受性ヒト遺伝病を引き起こす XLF 遺伝子の一アミノ酸置換の生理的意義を探る。

3. 研究の方法

(1) ゲルシフト法による Ku-XLF 相互作用の解析

Ku は DNA の末端に結合するのに対し、XLF は DNA 端ではなく DNA 鎖に結合すると考えられる。そしてこの XLF の DNA への結合は DNA 鎖長に依存するという変わった性質を持つ。本研究ではこの性質を利用したゲルシフト法により Ku-XLF 相互作用の解析を行った。さらに様々な濃度の IP6 とその関連化合物が Ku-XLF 相互作用に及ぼす影響を解析した。

(2) Ku-XLF 相互作用のドメイン解析

Ku ならびに XLF の部分欠失体シリーズを作成し、これを用いて Ku-XLF 相互作用を担っているドメインを解析した。Ku は昆虫細胞中で発現させ、これを精製し、上記(1)のゲルシフト法に用いた。XLF の部分欠失体シリーズはヒト由来培養細胞中で発現させ、免疫沈降法による解析に供した。細胞内での DSB 応答の解析には、YFP タグをつけた各タンパク質を培養細胞中で発現させた。ここにレーザーマイクロビーム照射を行い、YFP タンパク質の挙動のリアルタイム解析を実施した。

(3) ヒト遺伝病で見られる XLF 変異の生理的意義の解析

ヒト遺伝病で報告されている一アミノ酸置換を持つ XLF の発現プラスミドを作成し、これを培養細胞中に導入して正常型との機能的な差を免疫染色法とウェスタンブロット法で探索した。

4. 研究成果

(1) IP6 が Ku-XLF 相互作用に与える影響
精製した Ku ならびに XLF タンパク質を用いたゲルシフト解析により、マイクロモル濃度の IP6 が Ku-XLF 相互作用を促進することを見出した。このような促進効果は他の関連化合物では検出されなかった。本知見は DSB 認識の重要なステップである Ku-XLF 相互作用を低分子化合物が制御するという全く新しい知見を示している。

(2) Ku タンパク質のドメイン解析

Ku タンパク質は Ku70 ならびに Ku80 より構成されるヘテロ二量体であり、中央の二量体形成領域と各サブユニットの C 末端領域の 3 つの構造単位から構成される。そこで各サブユニットの C 末端を欠く Ku タンパク質、両サブユニットの C 末端を欠く Ku タンパク質を昆虫細胞内で発現させ、これを精製し、ゲルシフト法によって精製 XLF との相互作用を検

討した結果、XLFはKuの二量体形成領域に結合することが判明した。またKu欠損細胞中でC末端を欠くKuサブユニットを発現させ、レーザーマイクロビーム照射とリアルタイムイメージングを行ったところ、2つのKuタンパク質のC末端領域は細胞内におけるDSB認識にはどちらも必須でないことが明らかとなった。

(3) XLFタンパク質のドメイン解析

YFPタグをつけたXLF欠失体のDSB応答反応をライブセルイメージング法により解析し、XLFの最もC末端側の10アミノ酸に限局される領域が、XLFのDSBへの集積に必須であることを同定した。この領域を欠失したXLFを培養細胞中で発現させ、免疫沈降法で回収し共沈タンパク質を解析したところ、Kuの共沈が見られず、この領域がKuとの相互作用にも重要であることを示した。

(4) Ku-XLF相互作用のNHEJ因子群の分子集合における重要性の解析

XLFはN末端領域を介してXRCC4と複合体を形成するが、Kuとの相互作用に必須であるC末端を欠失すると、免疫沈降法においてXLFと共沈するXRCC4の量が著しく減少することを見出した。リアルタイムイメージング法を用いたこれまでの研究からNHEJ因子のDSB上での分子集合においては複数のタンパク質間相互作用が相乗的に作用することで全体を安定化するという新モデルを提案してきた。Kuと相互作用しないXLF欠失体において、XRCC4との相互作用も低下しているという生化学的知見はこのモデルをさらに確認するものであった。(モデルについては右図参照)

(5) ヒト遺伝病で見られるXLF遺伝子変異の生理的意義の解析

ヒト遺伝病で見られる一アミノ酸置換

(R57G)を導入したXLFをヒト細胞内で発現させたところ、この変異XLFタンパク質は核-細胞質間の分子輸送が細胞質方向へと傾いていることが判明した。さらにこの変異タンパク質は、正常型XLFではほとんど起こっていないユビキチン化が著しく亢進していた。核外輸送を阻害する薬物であるレプトマイシンを作用させると変異XLFは核内にとどまり、なおかつDSB誘発に応答できるようになることをレーザーマイクロビーム照射とリアルタイムイメージング解析によって見出した。これらの結果は、核内におけるタンパク質品質管理機構が、一アミノ酸置換によって生じた微細な構造変化を持つXLFタンパク質を異常タンパク質と認識してしまい、そのことが最終的に遺伝病の発症にまで至ることを強く示唆した。

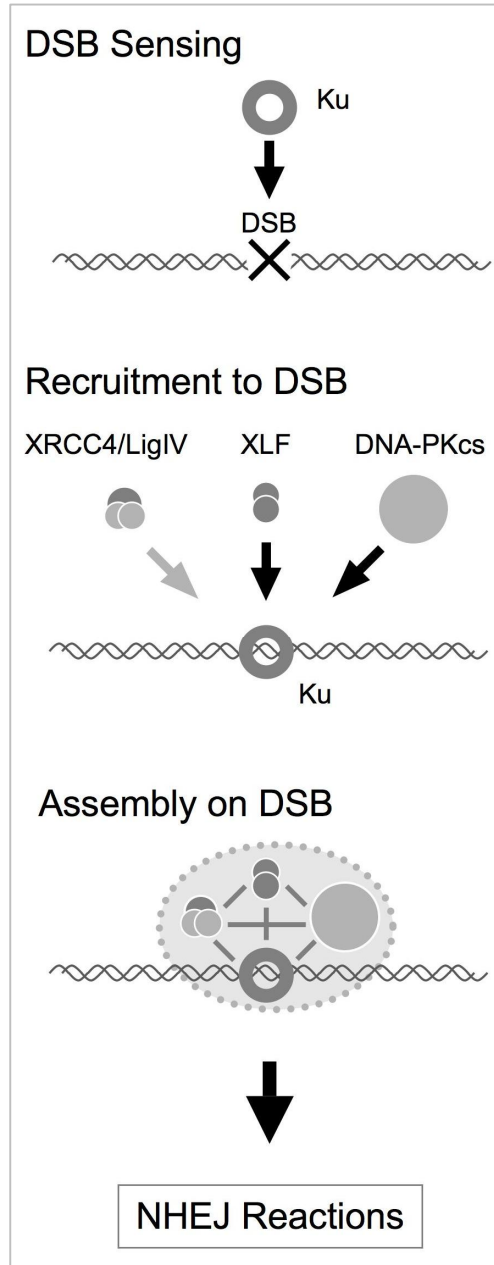


図 細胞内におけるNHEJ因子のDSB認識と分子集合の新しいモデル
従来、DSBが細胞内に生じるとKuがこれに結合し、その後、各因子が一つずつ順番に結合していくというモデルが広く信じられていた。しかし生きた細胞内でDSBが発生した際にNHEJの各因子が実際にどのように挙動しているかをレーザーマイクロビーム照射とリアルタイムイメージングを共役させた方法で解析すると従来モデルとは異なる新しいモデルが考えられた。DSBが生じ、ここにKuが結合すると、その他のNHEJ因子は一度にKu上に集合し、その後、複数のタンパク質間相互作用が協調的かつ相乗的に作用することでDSB上でのタンパク質複合体が安定化することが提案された。

(6) まとめと今後の展望

① 本研究ではヒト細胞内でのDSB認識において重要な役割を担っている二つのNHEJ因子に着目し、これらのタンパク質間相互作用を詳細に検討することを通じて、従来知られていなかった低分子化合物を介したDSB修復制御機構の存在を強く示唆する結果を得た。無細胞実験系を用いた解析からIP6がNHEJ全体の効率を上げることは以前から知られていたが、その作用点は長らく不明であった。本研究はIP6の作用部位がKu-XLF相互作用であることを明確にしたことに大きな意義がある。次の重要な研究テーマとして、IP6が細胞内でどのような状況下で作用するかを解明することが挙げられる。

② 本研究ではKuならびにXLFの様々な部分欠失体を作製しKu-XLF相互作用の解析に成果をあげた。IP6がKu-XLF相互作用にどの部分にどのようにして影響を及ぼすかをさらに検討する上で、これらの欠失体はきわめて有用であり、分子レベルでのIP6の作用機序のさらなる解明が期待される。

③ 放射性高感受性の遺伝病患者に見られる一アミノ酸置換を持つXLFの性状を明らかにしたが、この変異XLFの細胞内局在や機能にIP6を介した制御機構がどのように関連するかを分子レベルで明らかにすることは、NHEJ不全による遺伝病の理解に新たな視点をもたらすと期待される。

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7件)

①Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano, Kyung-Jong Lee, David J. Chen. (2011) Functional significance of the interaction between Ku in DNA double-strand break recognition of XLF. FEBS Letters Vol 585, pp 841-846. (査読あり)

②Jorn Splinter, Burkhard Jakob, Marion Lang, Ken-ichi Yano, Johann Engelhardt, Stefan W. Hell, David J. Chen, Marco Durante, Gisela Taucher-Scholz. (2010) Biological dose estimation of UVA laser microirradiation utilizing charged particle-induced protein foci. Mutagenesis Vol 25, pp 289-297. (査読あり)

③Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano, Noritaka Adachi, Hidenori Akiyama. (2009) Molecular mechanism of protein assembly on DNA double-strand breaks in the

non-homologous end-joining pathway. Journal of Radiation Research Vol 50, pp 97-108. (査読あり)

④Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano, and Hidenori Akiyama. (2009) Cernunnos/XLF: A new player in DNA double-strand break repair. International Journal of Biochemistry and Cell Biology Vol 41, pp 1237-1240. (査読あり)

⑤Yaping Yu, Brandi L Mahaney, Ken-ichi Yano, Ruiqiong Ye, Shujuan Fang, Pauline Douglas, David J. Chen, and Susan P Lees-Miller. (2008) DNA-PK and ATM phosphorylation sites in XLF/Cernunnos are not required for repair of DNA double strand breaks. DNA Repair Vol 7, pp 1680-1692. (査読あり)

[学会発表] (計11件)

①Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano, David J. Chen
Functional significance of Ku-XLF interaction in molecular assembly of NHEJ core factors.
Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Genomic Instability and DNA Repair, 2011-02-03
Keystone Resort, Keystone, Colorado, USA

②矢野憲一
非相同末端連結基本因子のDNA二重鎖切断認識機構
第33回日本分子生物学会第83回日本生化学会大会合同年会 ワークショップ「ATMファミリータンパク質をターゲットとしたDNA損傷応答研究の新たな展開」
2010-12-08 神戸市 神戸ポートアイランド

③Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano, David J. Chen
Real-time imaging reveals a novel view of protein assembly in the non-homologous end-joining pathway.
56th Annual Meeting of the Radiation Research Society, 2010-09-28
Grand Wailea Hotel, Maui, Hawaii, USA

④Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano
Functional significance of Ku-XLF

interaction in molecular assembly of NHEJ core factors.

第32回分子生物学会年会

2009-12-11 横浜市 パシフィコ横浜

⑤ Ken-ichi Yano and Keiko Morotomi-Yano
Real-time imaging of pulsed laser-induced DNA damage responses in living cells.

2009 International bioelectric symposium,
2009-06-25 University of Missouri at
Columbia, MO, USA

⑥ 矢野憲一、David Chen、秋山秀典
リアルタイム・イメージングから明らかにな

ったNHEJ経路におけるDNA損傷認識機構
第31回 日本分子生物学会年会・第81回 日本

生化学会 合同年会
2008-12-11 神戸市 神戸ポートアイランド

[図書] (計1件)

① 足立典隆、矢野憲一、黒沢綾 (2009)

ヒト染色体 DNA 切断の修復機構

蛋白質核酸酵素 共立出版社

Vol. 54, No. 4 pp. 472-478.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 憲一 (YANO KEN-ICHI)

熊本大学・バイオエレクトロニクス研究セン
ター・教授

研究者番号：70311230

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：