

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K19974

研究課題名(和文)チロシル DNAホスホジエステラーゼが関与する新規なDNA二本鎖切断修復経路

研究課題名(英文) Novel pathway for DNA double-strand break repair associated with tyrosyl-DNA phosphodiesterase

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)：Tyrosyl-DNA phosphodiesterase (TDP)1やTDP2が関与するDNA二本鎖切断(DSB)の修復機構は知られていなかった。そこで、TDP1やTDP2遺伝子が欠損したヒトTK6細胞株を用いて、DSB修復動態を解析した。その結果、放射線(X線)に対しては、これらの遺伝子欠損細胞は、野生型とほぼ同等のDSB修復動態であった。しかし、放射線類似作用物質であるブレオマイシンが誘発するDSBの修復動態は遅延した。本研究を通して、TDP1やTDP2が、放射線類似作用物質が誘発するDSBの修復経路へ関与することを明らかにできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブレオマイシンなどの放射線類似作用物質はがん治療に使われている。新規DSB修復経路でTDP1やTDP2が欠損している患者がいれば、ブレオマイシンタイプの抗がん剤が有効な治療薬となる可能性がある。TDP2遺伝子がホモ接合型に欠損している乳がんや前立腺がんが見つかった。このがん細胞に放射線類似作用物質とTDP1阻害剤を投与すれば、標的のがん細胞のみを特異的に殺傷できると推定される。

研究成果の概要(英文)：The present study reveals a synergistic sensitivity of cells depleted for tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) and TDP2 to radiomimetic drugs. These findings raise the possibility that TDP1 and TDP2 inhibitors could selectively target tumors with perturbed TDP2 and TDP1 expression, respectively. In fact, the homozygous deep deletion of the TDP2 gene was seen in 0.4% and 0.8% of 818 breast-invasive carcinomas and 333 prostate cancer patients, respectively. Based on this finding, the administration of a radiomimetic drug in TDP2-deficient cancer cells in combination with TDP1 inhibitors may also provide a new anti-cancer strategy to target a specific class of tumors. Target inhibition of TDP1 or TDP2 is an attractive tool for cancer therapy, since gene knockout experiments with mouse and human cells show that TDP1 or TDP2 is not essential for organismal survival.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNA二本鎖切断 放射線類似作用物質

## 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 1 (TOP1) やトポイソメラーゼ 2 (TOP2) は、DNA 複製や転写 (遺伝子発現) の際に生じる DNA の超らせん構造を解消するために必須の酵素である。TOP1 は一過的に 1 本鎖切断 (single-strand break: SSB)、TOP2 は 2 本鎖切断 (double-strand break: DSB) を発生させることで超らせんを解消する。TOP1 は反応中間体として、DNA の 3' 切断端と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。抗がん剤であるカンプトテシン (CPT) は TOP1cc を安定化し、TOP1 を DNA 切断末端にトラップすることにより 1 本鎖切断を蓄積させる。一方、TOP2 は DNA の 5' 切断端と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 を安定化させ DSB を蓄積させる。

(2) チロシル-DNA ホスホジエステラーゼ 1 (TDP1) は、チロシンと DNA の 3' 端リン酸の結合 (ホスホチロシン結合) を加水分解する活性をもつ。この活性が、DNA 末端に共有結合した TOP1cc を除去するために重要である。実際、*TDP1* 遺伝子を破壊した酵母や哺乳類細胞は、CPT に対して高い感受性を示すことが知られている。また、生化学的解析から、TDP1 タンパク質は全長の TOP1 タンパク-DNA を除去できないが、ペプチドレベルまで消化された TOP1cc は除去できる。この知見に一致して、X 線結晶回折から、TOP1 タンパクは非常に大きい為、TDP1 が DNA-TOP1 間のホスホチロシン結合にアクセスできないことが知られていた。一方、細胞へのカンプトテシン (CPT) 処理は、ポリユビキチン-プロテアソーム経路を介して TOP1cc のタンパク分解を引き起こす。これらの研究に基づき、TOP1cc の除去では、1 段階目に、プロテアソームによる TOP1cc のタンパク分解が起き、2 段階目に、ペプチドレベルになった TOP1-DNA のホスホチロシン結合が TDP1 によって加水分解されると推定されていた。研究代表者は、1 段階目と 2 段階目それぞれの修復動態を細胞レベルで計測できる実験系を確立し、このモデルが正しいことを証明した [論文 1]。

(3) TDP2 が関与する TOP2cc の除去経路には、プロテアソーム依存的経路と非依存的経路の 2 種類が存在することを明らかにした。プロテアソーム依存的経路は、TOP1cc 除去と同様に 2 段階の反応が起きる。具体的には、1 段階目にプロテアソームによる TOP2cc のタンパク分解が起き、2 段階目に、ペプチドレベルになった TOP2-DNA のホスホチロシン結合が TDP2 によって加水分解される。一方、プロテアソーム非依存的経路では、タンパク分解を受けていない TOP2cc が TDP2 によって直接除去されることを明らかにした [論文 2]。

(4) TDP2 は、5'-チロシル DNA ホスホジエステラーゼ活性の他に、弱い 3'-ホスホジエステラーゼ活性を有する。マウスやニワトリの細胞を用いた研究から、3'-ホスホジエステラーゼ活性を有する TDP1 が欠損した時に、TDP2 の 3'-ホスホジエステラーゼ活性がバックアップすることが示唆された。研究代表者も、この表現型がヒト TK6 細胞でも再現できることを明らかにした。さらに研究を進め、TDP2 の 3'-ホスホジエステラーゼ活性が TOP1cc 除去の 2 段階目で働くことを明らかにした [論文 1]。

(5) 一部の抗がん治療では、ヌクレオシドアナログと呼ばれる薬剤が使われる。典型例は Ara-C (シタラビン) である。このアナログは、DNA 合成酵素により DNA に取込まれ、それ以降の DNA 伸長を停止させる。TDP1 は、3' 末端に取り込まれたヌクレオシドアナログを取り除くことが知られていた。実際、*TDP1* 遺伝子欠損細胞は様々なヌクレオシドアナログに対して高い感受性を示す。さらに、研究代表者は、*TDP1/TDP2* 二重遺伝子欠損細胞は、*TDP1* 遺伝子欠損細胞や野生型細胞と比較して非常に高いヌクレオシドアナログ感受性を示すことを明らかにした [論文 1]。この実験結果は、*TDP1* 遺伝子欠損細胞では、TDP2 の 3'-ホスホジエステラーゼ活性がバックアップとして 3' 末端損傷 (ヌクレオシドアナログ) を除去することを意味する。

(6) 放射線は、フリーラジカル反応により飛跡に沿って DNA 損傷を誘発し、その結果 DNA 二本鎖切断 (DSB) が生成する。放射線が誘発する DSB の修復については精力的に研究が行われ、詳細な分子機構が明らかにされた。放射線類似作用物質であるブレオマイシンやカリケアミシンなどもフリーラジカル反応により局所的な多重 DNA 損傷を誘発し、DSB を生じる。放射線類似物質の一本鎖切断 (SSB) と DSB の生成比は 5 : 1 ~ 20 : 1 であり、この比は放射線による SSB と DSB の生成比 (20 : 1) に近い。それゆえ、放射線類似作用物質は放射線と同様な生物作用を示すと考えられている。しかし、TDP1 や TDP2 が DSB の修復に関与するのか不明である。

## 2. 研究の目的

TDP1・TDP2 が DSB 修復に関与するかを明らかにする。関与するのであれば、具体的にどのように関与するかを分子レベルで明らかにする。

## 3. 研究の方法

### ・TK6 ミュータントライブラリーを用いた感受性スペクトラムの解析

一連の TK6 修復遺伝子欠損細胞をブレオマイシン・カリキアミシンおよび X 線に対する感受性を調べた。X 線感受性は、2 mL の培地で  $2 \times 10^3$  個となるように調製し、X 線を照射し、各 5 mL のメチルセルロース入り培地が入った 6 ウェルプレートに播き、CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。メチルセルロース入り培地は、1.5% (w/v) のメチルセルロースと DMEM F-12 に 10% になるように血清を加え作製した。ブレオマイシンやカリキアミシンに対する感受性は、2 mL の培地で  $2 \times 10^3$  個の細胞を 37°C、3 時間薬剤の入った培地で培養し、X 線感受性と同様に、メチルセルロース培地に播いた。10~14 日間培養し、出現したコロニー数を数えた。DNA 修復遺伝子欠損細胞と野生型細胞の生存率を比較し、感受性スペクトラムを作製した。この結果から、TDP1・TDP2 に加えブレオマイシン・カリキアミシン特異的に感受性を高める遺伝子を同定した。

### ・中性コメットアッセイ

実験の前日に、フロストスライドガラス(松浪硝子工業株式会社)を 1% アガロースゲルでコーティングし、乾燥させた。116 mL の 1% アガロースをコーティングしたスライドガラスの上に乗せ、22×22 mm のカバーガラス(松浪硝子工業株式会社)をアガロースの上から乗せ、4°C で凝固させた。細胞に 20 Gy の X 線および、400 μg/mL のブレオマイシンを 37°C、30 分間処理し、薬剤の入っていない培地で 3 時間培養した。あらかじめ冷やした PBS を 1 mL 使用し、洗浄した。PBS に懸濁した  $3.4 \times 10^4$  個の細胞を取り、遠心した。PBS に溶かした 0.75% の低融点アガロースゲルを 37°C にして、48 μL 取り、細胞をピペッティングした。スライドガラス上のカバーガラスを取り除き、アガロースゲルの上に低融点アガロースゲルに懸濁した細胞を乗せ、その上からカバーガラスをかけ、4°C で、3 分間凝固させた。その後、スライドガラスはあらかじめ冷やしておいた細胞溶解バッファーに 90 分間浸した。細胞溶解バッファーの組成は 2.5 M NaCl、100 mM EDTA、10 mM Tris(pH 10)、1% Triton X-100、0.5% N-サルコシルである。冷えた PBS でスライドガラスを 5 分、2 回洗浄したのちに、冷えた電気泳動バッファーで 40 分間インキュベートした。その後、ATTO サブマリン型電気泳動装置(#AE-6125)を使い、30 V で 30 分間電気泳動を行った。スライドガラスを DNA precipitation solution で 30 分浸し、70% エタノールに 30 分間室温で固定した。スライドガラスを風乾させた後、エチジウムブロマイド(EtBr)で 60 分間染色を行った。スライドガラスを PBS で 10 分間洗浄し風乾した後、蛍光顕微鏡(IX81S1F-3、OLYMPUS)で撮影した。撮影は倍率を 200 倍に設定し行った。1 つのサンプルにつき 50 個の細胞の Tail Moment 値を Comet Assay IV(Perceptive Instruments)で計測した。

### ・TDP1・TDP2 標的損傷(3'-PG)の検出法の確立

ブレオマイシン・カリキアミシン特異的に誘発する DNA 損傷として、3'-グリコールリン酸(3'-PG) が知られている。そこで、3'-PG のカルボン酸末端を carbodiimide/sulfo-NHS で活性化し、ビオチン標識する方法を考え、この方法が有効かを調べた。なお、大阪大学の岩井教授・山元准教授と共同研究を行い、3'-PG を含むオリゴヌクレオチドを化学的に合成した。

## 4. 研究成果

### ・TDP1・TDP2 は放射線類似作用物質が誘発する DSB 修復に関与する

TDP が DSB 修復に関与するかを調べる目的で、ヒト TK6 細胞由来の *TDP1* 遺伝子欠損細胞(*TDP1*-KO)、*TDP2* 遺伝子欠損細胞(*TDP2*-KO)、*TDP1/TDP2* 二重遺伝子欠損細胞(*TDP1/TDP2*-DKO)の放射線(X 線)および放射線類似作用物質(ブレオマイシン、カリキアミシン)に対する感受性を調べた。これらの遺伝子欠損細胞の X 線感受性は、野生型細胞(WT)と同程度であった [論文 3]。一方、ブレオマイシンおよびカリキアミシンに対しては、*TDP1*-KO・*TDP2*-KO とともに WT より高い感受性を示し、*TDP1/TDP2*-DKO は単一遺伝子欠損細胞よりさらに高い感受性を示した。また、この感受性が DSB 修復の遅延によるものなのかを調べるために、DSB 修復動態を中性コメットアッセイで調べた。上記遺伝子欠損細胞の放射線誘発 DSB の修復速度は、野生型と同じであった。一方、単一遺伝子欠損細胞のブレオマイシン誘発 DSB の修復速度は野生型より遅延した。さらに、*TDP1/TDP2*-DKO のブレオマイシン誘発 DSB の修復速度は、単一遺伝子欠損細胞より遅延した。この結果から、放射線と放射線類似作用物質が誘発する DSB には質的な違いがあり、後者は TDP1 および TDP2 が共同する新規な経路により修復される可能性が示唆された。

・放射線および放射線類似作用物質が誘発する DNA 損傷の修復経路

これまで、ゲノム編集を用いてヒト TK6 細胞の遺伝子破壊やその表現型解析が行なわれてきた。DNA 修復に関わる遺伝子を欠損したミュータント細胞をおおよそ 40 種作製してきた (TK6 ミュータントライブラリー)。一つの親株から多数の遺伝子欠損細胞を作製しているため、効率よく分子間機能的相互作用を網羅的に解析できる。本研究では、表 1 に示した遺伝子欠損細胞株を用いた。X 線感受性に着目すると、相同組換え修復に関与する RAD54 遺伝子と非同末端連結に関わる LIG4 遺伝子の

Genotype	Function of deleted gene(s)
53BP1 <sup>-/-</sup>	DSB repair (NHEJ)
LIG4 <sup>-/-/-</sup>	DSB repair (NHEJ)
DNA-PKCS <sup>-/-</sup>	DSB repair (NHEJ)
RAD54 <sup>-/-</sup>	DSB repair (HR)
RAD54 <sup>-/-</sup> /LIG4 <sup>-/-/-</sup>	DSB repair (HR/NHEJ)
SPRTN <sup>-/-</sup>	DPC repair, TLS
TDP1 <sup>-/-</sup>	Removal of DPC containing TOP1
TDP2 <sup>-/-</sup>	Removal of DPC containing TOP2
TDP1 <sup>-/-</sup> /TDP2 <sup>-/-</sup>	(See above)
PARP1 <sup>-/-</sup>	BER
XRCC1 <sup>-/-</sup>	BER
POLβ <sup>-/-</sup>	BER
XPA <sup>-/-</sup>	NER
RAD18 <sup>-/-</sup>	TLS
POLη <sup>-/-</sup>	TLS
MLH1 <sup>-/-</sup>	MMR
MLH3 <sup>-/-</sup>	MMR

表 1：本研究で用いた遺伝子欠損細胞

二重遺伝子欠損細胞は、各一重遺伝子欠損細胞と比べて非常に高い感受性を示した。カリキアミシン感受性やブレオマイシン感受性に関しても、同様の表現型を示した。この結果は、放射線および放射線類似作用物質が誘発する DSB の修復には、相同組換えと非同末端連結の両方が関与することを意味する。さらに、非同末端連結に関わる DNA-PKCS 遺伝子欠損細胞でも、これらの DNA 損傷に対して感受性であった。興味深いことに、53BP1 遺伝子欠損細胞は、X 線に対してほとんど感受性を示さないが [論文 3]、カリキアミシンやブレオマイシンに対して高い感受性を示した。これは、放射線および放射線類似作用物質が生成する DNA 損傷の形状が異なることによって得られた結果であると推測される。今後、53BP1 はどのような DSB の形状の修復に関わるのかより詳細な解析が必要である。また、XRCC1 遺伝子欠損細胞も、放射線および放射線類似作用物質両方に対して感受性を示した。XRCC1 は、ポリ (ADP-リボシル) 化した PARP1 タンパク質と相互作用し、塩基除去修復を促進するタンパク質である。一方、Polymerase β は、XRCC1 の下流において、塩基損傷が取り除かれたあとに、gap-filling を行う DNA 合成酵素である。この Polymerase β 遺伝子欠損細胞は、放射線および放射線類似作用物質に感受性を示さなかった。ゆえに、XRCC1 遺伝子欠損細胞の感受性は、塩基除去修復不全による影響とは考えにくい。一方、XRCC1 は、非同末端連結に関わると報告がある (Horton JK et al, *Cell Res.* 2008)。このように、XRCC1 が DSB 修復へ貢献しているが故に、XRCC1 遺伝子欠損細胞が X 線に感受性を示した可能性がある。今後、詳細な解析を行なっていきたい。ミスマッチ修復に関わる MLH1 や MLH3 遺伝子の欠損細胞や、ヌクレオチド除去修復に関わる XPA 遺伝子の欠損細胞は、放射線および放射線類似作用物質に感受性を示さなかった。さらに、損傷乗越えに関わる Polymerase η 遺伝子や RAD18 遺伝子の欠損細胞も感受性を示さなかった。ゆえに、ミスマッチ修復、ヌクレオチド除去修復および損傷乗越えは、放射線および放射線類似作用物質による DNA 損傷の修復への関与が認められなかった。前述の通り、TDP1 や TDP2 遺伝子欠損した細胞の感受性スペクトルは、放射線と放射線類似作用物質で大きく異なった。したがって、放射線類似作用物質により生成する DSB の修復では、TDP1 および TDP2 により、何らかの DNA 損傷末端の除去反応が起き、その後、相同組換え修復あるいは非同末端連結により DSB として修復されることが推測できた。

・DNA に生成した 3'-PG を検出する手法の確立

3'-PG を含むモデル DNA の 3'末端カルボン酸を carbodiimide/ NHS で活性化し、ビオチン標識する方法を検討した (図 1)。ビオチン標識効率は 70% であった。さらに、3'末端ビオチンはストレプトアビジンと定量的に結合した。

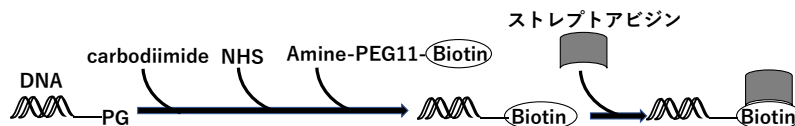


図 1 3'-PG 損傷のビオチン・ストレプトアビジン標識方法

【引用論文および発表論文】

[論文 1]: Tsuda M, 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*, 91-92: 102849 (2020)

[論文 2]: Tsuda M, 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)

[論文 3]: Tsuda M, Shimizu N, Tomikawa H, Morozumi R, Ide H. Repair pathways for radiation DNA damage under normoxic and hypoxic conditions: Assessment with a panel of repair-deficient human TK6 cells. *J Radiat Res*. 62(6): 999-1004 (2021)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2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 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) 10.1016/j.dnarep.2020.102849	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 津田 雅貴、井出 博	4. 巻 52
2. 論文標題 DNA にトラップされたトポイソメラーゼの除去機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 515-518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Tsuda Masataka, Shimizu Naoto, Tomikawa Hinako, Morozumi Ryoosuke, Ide Hiroshi	4. 巻 62
2. 論文標題 Repair pathways for radiation DNA damage under normoxic and hypoxic conditions: Assessment with a panel of repair-deficient human TK6 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 999-1004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rrab084	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 津田雅貴, 清水直登	4. 巻 53
2. 論文標題 トポイソメラーゼ阻害剤が引き起こすDNA損傷の修復機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊細胞	6. 最初と最後の頁 792-794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 津田 雅貴, 北舛 海斗, 中野 敏彰, 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) は DNA にトラップされたトポイソメラーゼ 1 を修復する
3. 学会等名 第49回 日本環境変異原学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津田雅貴, 諸角涼介, 北舛海斗, 山本あかね, 中野敏彰, 井出博
2. 発表標題 チロシル-DNAホスホジエステラーゼが関与する新規なDNA二本鎖切断修復経路
3. 学会等名 第63回 日本放射線影響学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津田雅貴, 北舛海斗, 山本あかね, 諸角涼介, 井出 博
2. 発表標題 DNA にトラップされたトポイソメラーゼ 1 の除去機構
3. 学会等名 第45回 中国地区放射線影響研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsuda M, Shimizu N, Nakano T, Ide H
2. 発表標題 Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) repairs topoisomerase 1 DNA-protein crosslinks and 3' -blocking lesions in the absence of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1)
3. 学会等名 Nucleic Acids 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsuda M, Shimizu N, Shoulkamy M, Salem A, Ide H
2. 発表標題 Effects of tritiated water on the early develop,ent of sea urchin and Xenopus
3. 学会等名 IER International Symposium Fukushima (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsuda M
2. 発表標題 Repair pathways of trapped topoisomerases covalent cleavage complexes
3. 学会等名 Nucleic Acids 2022 (招待講演) (国際学会)
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