

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月26日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590315

研究課題名（和文）DNA修復時に働くRNRの活性調節機構の解析

研究課題名（英文）Analysis for regulation of RNR activity during DNA damage repair

研究代表者

丹伊田 浩行 (NIIDA HIROYUKI)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20336671

研究成果の概要（和文）：

バランスの取れたデオキシリボヌクレオチド(dNTP)の供給はDNA修復に必須である。ここで、我々はリボヌクレオチドレダクターゼ(RNR)サブユニット RRM1 と RRM2 が非常に迅速にダメージ部位に集まることを見出した。RRM1 は Tip60 と生理的に結合した。I-SceI カセットを持つ細胞のクロマチン免疫沈降解析は RRM1 が Tip60 依存的にダメージ部位へ結合することを示した。Tip60 と結合できない活性を持つ RRM1 変異体は RRM1 を除去した G1 期の不完全な DNA 修復を補うことができなかった。RRM1 の C 末部位により RNR の集積を阻害すると DNA ダメージに対する細胞の感受性を敏感にした。我々は Tip60 依存的な RNR のリクルートは DNA 修復に対し dNTP を供給する必須の役割りを演じると提案する。

研究成果の概要（英文）：

A balanced deoxyribonucleotide (dNTP) supply is essential for DNA repair. Here, we found that ribonucleotide reductase (RNR) subunits RRM1 and RRM2 accumulated very rapidly at damage sites. RRM1 bound physically to Tip60. Chromatin immunoprecipitation analyses of cells with an I-SceI cassette revealed that RRM1 bound to a damage site in a Tip60-dependent manner. Active RRM1 mutants lacking Tip60 binding failed to rescue an impaired DNA repair in RRM1-depleted G1-phase cells. Inhibition of RNR recruitment by an RRM1 C-terminal fragment sensitized cells to DNA damage. We propose that Tip60-dependent recruitment of RNR plays an essential role in dNTP supply for DNA repair.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞医化学

1. 研究開始当初の背景

リボヌクレオチドレダクターゼ (RNR) は DNA 修復の際に原料となる dNTP を供給する経路の律速酵素である。dNTP プールは厳密に制御されていて不適当な供給は DNA に変異をもたらすことが明らかとなっている。出芽酵母からヒトに至るまで RNR は二つの大サブユニット RRM1 と小サブユニット RRM2 から構成される四量体として機能している。RRM1 には活性中心と dATP によるアロステリック調節部位がある。我々は単細胞真核生物である出芽酵母では DNA 修復時に細胞内の dNTPs プールが一過性に増大するのに対し、ヒトの細胞では修復時に顕著な dNTPs プールの増加は認められないことに着目し、ヒトにおいては DNA 修復時に核内局所での空間特異的 dNTP 産生が行われていることを想定し研究を開始した。

2. 研究の目的

同じ真核生物であっても出芽酵母とヒトを含む哺乳動物とでは DNA に障害を受けた後 DNA 修復を行う時の細胞内の dNTP 濃度に大きな違いが存在する。出芽酵母の場合 DNA 損傷後およそ 10 倍にまで細胞内の dNTP 濃度は上昇し DNA 修復を促す。一方哺乳動物細胞では DNA 損傷後に dNTP 濃度に顕著な差は認められない。DNA 損傷を修復する際に DNA 合成は必須であり、また DNA 修復に働く DNA ポリメラーゼの dNTP に対する Km 値は G1 期の細胞内の濃度の 10 倍であることから、G1 期の細胞内で DNA 修復を実行するためには DNA ダメージ部位近傍で高濃度の dNTP 産生を行う必要があるのではないかと考えられた。

dNTP 合成経路の律速酵素はリボヌクレオチドレダクターゼである。我々はこの酵素が DNA ダメージ部位にリクルートされる機構を明らかにすることとその活性修飾の可能性について検討を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 我々はまず RNR が予想した様に DNA ダメージ部位へリクルートされるのかについて検討を行った。方法として対数増殖期にあるヒト細胞株に X 線照射を行い、照射後細胞を Triton X 溶液で可溶性画分除去した後、ホルマリン溶液で固定し免疫染色を行った。染色は DNA ダメージ部位のマーカである γ H2AX と RNR のサブユニット RRM1 あるいは RRM2 について二重染色をした。

また、よりダメージ部位への RNR の局在を明らかに示すためにマイクロレーザーにより細胞核にダメージを導入し、 γ H2AX と RNR の共染色を行った。

(2) RNR が DNA ダメージ部位にリクルートさ

れることが明らかとなったため、その機構について検討を行った。まず損傷部位へ移行するためにはパートナーとなる因子が必要であろうと考え RNR の各サブユニット RRM1 および RRM2 と結合しうる分子の同定を Yeast two-hybrid 法を用いてスクリーニングをした。その結果候補となる分子の同定に至った。

(3) Yeast two-hybrid 法により同定した因子 Tip60 と RRM1 の結合部位を RRM1 の欠損変異体を作成し酵母内において結合実験を行い結合に必須な部位の決定をした。

(4) RNR の DNA ダメージ部位への局在が DNA 損傷修復に必要なかを、Tip60 と結合できない RRM1 変異体を用いて Comet assay により評価した。

(5) Tip60 と結合できず DNA 損傷部位ヘリクルートを阻害する RRM1 C 末 fragment を発現する細胞の DNA 二重鎖切断に対する感受性を colony formation assay により測定した。

4. 研究成果

(1) RNR の各サブユニット、RRM1 および RRM2 は DNA ダメージ部位ヘリクルートされる。

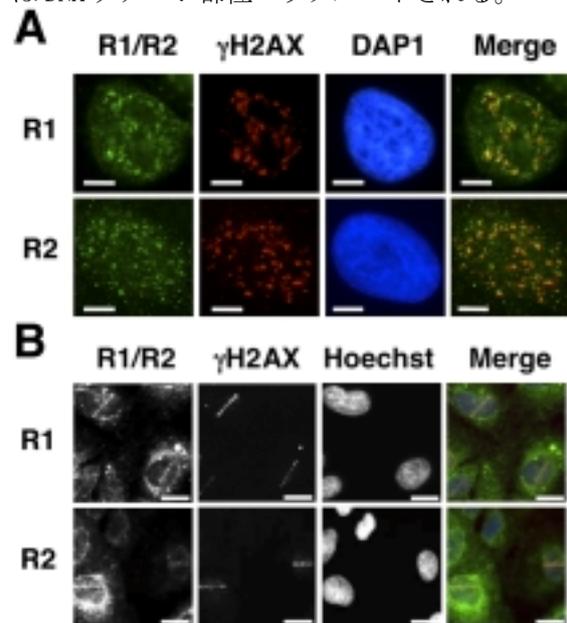


Fig. 1A, HeLa 細胞に X 線を照射し可溶性画分を Triton X で除去した後 γ H2AX と RRM1 (R1) あるいは RRM2 (R2) とで二重染色を行った。B, UV レーザーをもちいて染色体内に DNA ダメージを誘導した後、A と同様の二重染色を行った。

ことなる方法により誘導した DNA 二重鎖切断に対し RNR は γ H2AX と共局在することから損傷部位へ誘導されていることがわかる。

(2) RNR と会合する因子の探索を Yeast two hybrid 法により行い Tip60 を同定した。

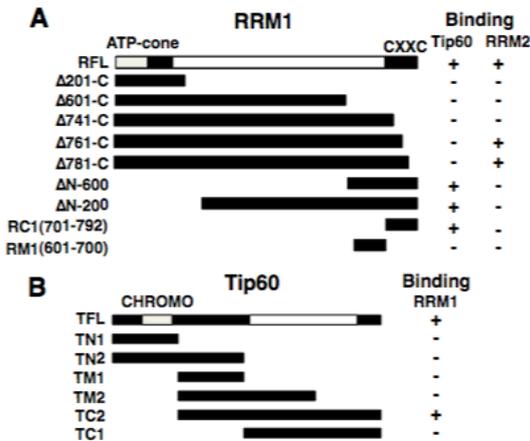


Fig.2A, B Yeast two-hybrid 法により RRM1 と結合する因子としてヒストンアセチルトランスフェラーゼ、Tip60 が同定された。

RRM1 および Tip60 それぞれの結合に必要な部位を特定するため欠損変異体を作成し酵母内で結合試験を行った。RRM1 については C 末端の 701-792 アミノ酸が結合に必要な部位であることが明らかとなった。また Tip60 においては Myst ドメインおよびその N 末部位が必要とされることがわかった。また RRM1 の変異体の中には RRM2 と結合できるが Tip60 とは結合できない変異体が存在した。

(3) RNR と Tip60 との結合が DNA 修復に必要なか Comet assay により検討した。

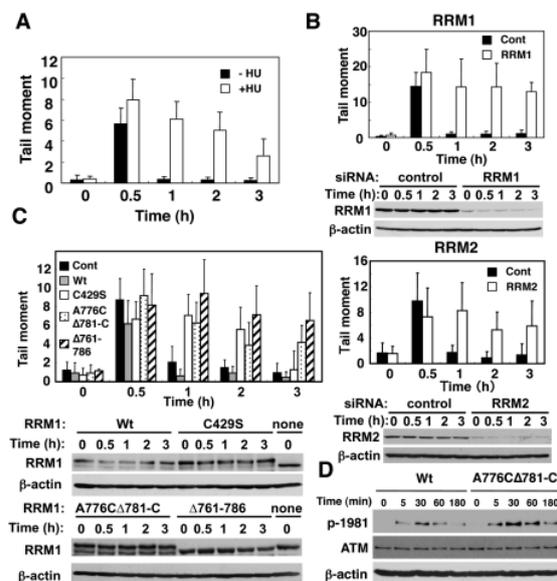


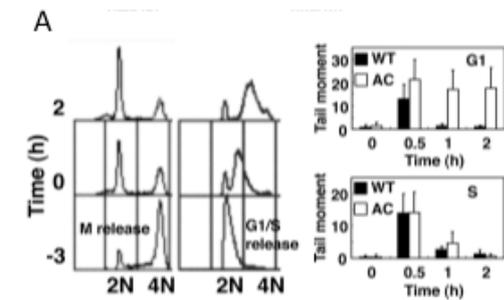
Fig.3A, X 線照射後の DNA 修復を RNR の inhibitor である HU の存在下において比較した。HU 存在下において DNA 修復はコントロールよりも 2 時間以上遅れ、DNA 修復に RNR 活性が必要とされることを示した。

B, RRM1 および RRM2 をノックダウンすることにより RNR を欠乏させ DNA 修復に対する影響を検討するとやはり RNR 欠乏は DNA 修復に遅延をきたすことが示された。

C, RRM2 とは会合し RNR 活性を示すが Tip60 と結合できない RRM1 変異体を内在性 RRM1 欠乏細胞に発現させ (ノックダウン・ノックイン) DNA 修復に対する影響を検討した。Tip60 と結合できない二つの変異体を発現する細胞では X 線により発生した DNA ダメージの修復に欠陥を示した。この結果は Tip60 依存的に RNR が DNA 損傷部位へリクルートされることが DNA 修復に必要なことを示唆する。

D, Tip60 と結合できない RRM1 発現細胞では DNA 修復が遅延する。

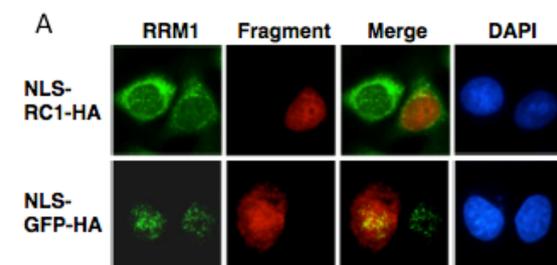
ATM は DNA 二重鎖切断を認識し活性化するチェックポイントキナーゼである。このとき ATM の Ser1981 は自己リン酸化することが明らかとなっており DNA 損傷のマーカーとなっている。変異体 RRM1 発現細胞では X 線による DNA ダメージが野生型 RRM1 発現細胞に比べ長い時間修復されない状態であることを ATP-Ser1981 抗体を用いて示した。この結果は Comet assay により示唆された結果を裏付けるものとなる。

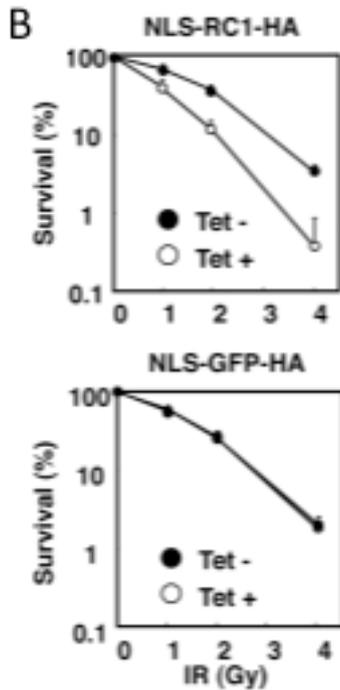


(4) Tip60 依存的な RNR リクルートは G1 期の DNA 修復に重要である。

Fig.4A RRM1 変異体発現細胞を nocodazole あるいは Thymidine で同調させた後リリースし、それぞれの細胞集団を G1 期および S 期へ誘導した。それぞれの細胞周期において DNA 損傷をあたえると dNTP 量の少ない G1 期細胞においては RNR のリクルートが DNA 修復に必須であるが dNTP 量の多い S 期細胞においては修復が rescue されることが示された。

(5) Tip60 依存的な RNR の DNA ダメージ部位へのリクルートを阻害すると X 線に対する細胞の感受性をより感受的にする。





A, RRM1のTip60結合領域(RC1-HA)を核内に過剰発現させると核内 RRM1 タンパク質が減弱する。一方、コントロールペプチド(GFP-HA)を過剰発現させても核内 RRM1 のタンパク質量に変化は認められない。

この結果より RC1-HA を細胞に導入することにより Tip60 と RRM1 の結合をドミナントネガティブ効果で阻害することが可能であることが示された。

B, RC1-HA を細胞内に Tet-on system を用いて発現させると細胞の X 線感受性が増した。

HeLa 細胞に tetracyclin 存在下で RC1-HA を発現させると A で示された様に内在性の RRM1 の核内局在を阻害する。この条件下で X 線照射を行い細胞の生存率を colony formation assay を行うことで検討した。コントロールの GFP-HA を発現させた細胞では tetracyclin の有無にかかわらず同様の X 線感受性を示した。対照的に RC1-HA 発現細胞では tetracyclin 存在下において顕著な感受性の増加が認められた。このことから DNA ダメージ部位への Tip60 依存的な RNR の集積は効率的な DNA 修復を促し、細胞の DNA ダメージに対する耐性を獲得させているものと示唆された。

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 2 件)

(1) Niida H, Shimada M, Murakami H,

Nakanishi M.

Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells.

Cancer Sci. 101:2505-2509. 2010

(2) Niida H, Katsuno Y, Sengoku M, Shimada M, Yukawa M, Ikura M, Ikura T, Kohno K, Shima H, Suzuki H, Tashiro S, Nakanishi M
Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase

Genes Dev. 24: 333-338, 2010

[学会発表] (計 3 件)

(1) 丹伊田浩行

Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase

第 8 4 回日本生化学会大会 2011. 9 京都国際会議場

(2) 丹伊田浩行

2, Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase

日本放射線影響学会第 5 3 回大会 2010. 10 京都テルサ

(3) 丹伊田浩行

Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase

第 3 2 回日本分子生物学会年会 2009. 12 パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹伊田 浩行 (NIIDA HIROYUKI)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20336671

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：