

平成 23 年 3 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791362

研究課題名 (和文)

抗腫瘍剤で誘発する DNA トポイソメラーゼの選択分解における SUMO 修飾の役割

研究課題名 (英文)

SUMOylation is involved in the degradation of DNA topoisomerase II β induced by antitumor drug treatment

研究代表者

佐野 訓明 (SANO KUNIAKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00294405

研究成果の概要 (和文)：

トポ II を標的とする複数の阻害剤がトポ II β の選択的な分解を引き起こす。トポ II β は分解に先立って 1259 番目のリジン残基が SUMO-2/3 により修飾され、その修飾が起きない変異体 (K1259R) では分解も起きなかった。一方、トポ II α は同様に阻害されるにも関わらず分解されない。強制発現実験や SUMO 修飾部位の解析から、両者の阻害後の処理のされ方の違いは発現時期・局在の違いに依るのではなく、SUMO 修飾部位の有無によると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

Degradation of DNA topoisomerase II (Topo II) was induced by Topo II inhibitors. The lysine residue at amino acid position 1259 of Topo II β was modified by SUMO-2/3 in advance of the degradation. The lysine-to-arginine substitution (K1259R), which was not modified by SUMO, prevented the degradation following its inhibition. On the other hand, the same drugs did not induce the degradation of Topo II α although its activity was inhibited similarly. Over-expression experiments and analysis of SUMOylation sites suggested that the difference in their fate after inhibition depends on the presence or absence of SUMOylation site, not on the expression timing or nuclear localization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			0
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：DNA トポイソメラーゼ II、抗がん剤、エトポシド、クランプ形成、二本鎖 DNA 切断、タンパク質分解、SUMO 化、ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

トポIIは、二本鎖DNAに結合、切断し、他の二本鎖を通過した後、再結合しDNAの高次構造を変化させる酵素であり、細菌からヒトまで広く存在する。酵母などではトポIIは一つであるが、脊椎動物のトポIIには α と β の二つのアイソザイムが存在し機能分化が起きている。トポII α は酵母トポIIと同様に分裂期の染色体分離に必須であり、トポII β は神経細胞の分化過程で一群の神経関連遺伝子を活性化する。

トポIIを標的とする阻害物質は2つに大別され、一つは二本鎖切断時の反応中間体 cleavable complex を安定化する“トポ毒”と呼ばれるもの、他方は cleavable complex を形成しない catalytic 阻害剤である(図1)。

【表1】	トポ毒	catalytic 阻害剤
薬剤 DSB トポII β 分解系	Etoposide 形成 促進 Proteasome	ICRF-193 非形成 促進 不明

トポ毒を使用すると細胞内には高頻度の二本鎖切断 (Double strand Break, DSB) が生じ、DNA修復が行われ、DNA修復が追いつかない場合は細胞死が引き起こされる。抗腫瘍剤として用いられるエトポシドは、トポ毒に分類される。一方、ICRF-193に代表される catalytic 阻害剤は、DNA切断を引き起こさずトポIIの活性を阻害することで、閉鎖クランプを形成させる。この閉鎖クランプは二本鎖の解離を抑制する為に、複製や転写などのクロマチンの機能に対して障害となる。このような“DNA損傷を伴わないクロマチン障害”の修復は殆ど解析されておらず、我々は、トポII β の分解をその修復の一部であると考え、解析を行ってきた。トポII β は分解に先

立ちSUMO-1,-2/3で修飾され、SUMO化の起こらない細胞株ではトポII β の分解が起きない事が明らかになった。

2. 研究の目的

トポ毒や catalytic 阻害剤によって誘導されるトポII β の選択的分解の機構を明らかにすることを目的とする。特に、トポII β 分解に先立つSUMOなどによる修飾が分解に必須であることから、これらの修飾がどのように分解に関与しているのかを解析する。また、同様に活性が阻害されるはずのトポII α では分解が起きないことから、両者を比較する事で活性阻害から分解に至る経路の解明につながると思っている。

3. 研究の方法

(1) トポII β のKR変異体作製

部位特異的変異導入法を用いてトポII β の潜在的SUMO修飾部位のリジン-アルギニン (KR) 変異体を作製し、分解に必要な修飾部位の同定をこころみた。

(2) 免疫沈降-ウエスタンブロット法でのKR変異体の修飾解析

トポII β のN末のFLAG抗体で免疫沈降し、抗SUMO抗体、抗ユビキチン抗体などでKR変異体の修飾の有無を検討した。

(3) RNF4 siRNAによる解析

SUMO依存的ユビキチン化酵素 (E3) である、RNF4の関与をRNF4 siRNAを用いてノックダウンして解析した。

(4) トポII α の強制発現による解析

ラットトポII α のcDNAを発現ベクターにクローニングし、解析用のFLAG/EGFPタグがついたトポII α を外因的に強制発現し解析した。

4. 研究成果

(1)、(2) KR変異体の解析

ICRF-193処理でトポII β がDNAにクランプを形成した後、トポII β のC末側側の1259番目のリジン残基が修飾していることが明らかとなった。そして、その修飾が起きないKR変異体では、分解が抑制されることも判明した。

(3) RNF4の関与について

SUMO修飾後の経路として、SUMO依存的ユビキチン化酵素(RNF4)の関与を想定した。RNF4 siRNAを用いてRNF4のノックダウンし、ICRF-193による分解が起きるか検討した。予想と反して、トポII β 分解は抑制されなかった。つまり、SUMO修飾から分解までの過程にRNF4の関与は無い可能性が高い。ただし、RNF4タンパク質の減少を特異抗体で確認していないため、確認のための実験が必要である。

(4) トポII α との比較

トポII α はトポII β と類似しているが、その機能時期や細胞内の局在が異なっている。ICRF-193による阻害でトポII α 分解が起きないのが、発現時期や局在の違いに依るかを検討した。外因的に強制発現したトポII α も内因性のものと同様に分解は起きなかった。つまり、トポII α の分解が起きない理由は機能時期や局在の為ではないことが示唆された。現在のところ、SUMO修飾部位の違いが主因であると考えている。

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3件)

① 筒井公子、佐野訓明、細谷修、宮本直、筒井研、Nuclear protein LEDGF/p75 recognizes supercoiled DNA by a novel DNA-binding domain、Nucleic Acids Research、査読有、印刷中、オンラインアクセス
<http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2011/02/22/nar.gkr088.long>

② 佐野訓明、宮地まり、筒井公子、筒井研、DNAトポイソメラーゼII β による神経関連遺伝子の活性化機構、岡山医学会雑誌、査読無、第121巻、2009、pp143-147

③ 筒井研、筒井公子、宮地まり、佐野訓明、DNAトポイソメラーゼII β による神経関連遺伝子の発現制御、蛋白質核酸酵素、査読無、第54巻、2009、pp1333-1343

[学会発表] (計7件)

①大西康博、酸化型/還元型グルタチオンによるII型DNAトポイソメラーゼ活性の制御、第33回分子生物学会年会、2010年12月7日、神戸

② 宮地まり、DNAトポイソメラーゼII β の神経関連遺伝子へのターゲット機構、第33回分子生物学会年会、2010年12月7日、神戸

③ 古田良平、DNAトポイソメラーゼIIbの遠位通過部位マッピング法(eTIP-HiC)の開発、

第33回分子生物学会年会、2010年12月7日、
神戸

④ 小野田彰久、DNA トポイソメラーゼ II β の
核内における移動メカニズム、第33回分子
生物学会年会、2010年12月7日、神戸

⑤ 筒井公子、LA 遺伝子の活性化機構と精神
疾患、日本解剖学会第64回中国・四国会支
部学術集会、2009年10月24日、高知

⑥ 佐野訓明、DNase I-定量PCR法による細
胞分化に伴うクロマチン構造変化の解析、第
82回日本生化学会、2009年10月23日、神
戸

⑦ 佐野訓明、DNA トポイソメラーゼ IIbによ
る神経関連遺伝子の発現制御機構、第32回
日本神経科学大会、2009年9月16日、名古
屋

[その他]

ホームページ等

<http://nbgp.med.okayama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 訓明 (SANO KUNIAKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助
教

研究者番号：00294405