

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03600

研究課題名（和文）放射線誘発アポトーシス細胞に見られる細胞膜表層へのヌクレオソーム露出の機序解明

研究課題名（英文）Mechanisms for cell surface expression of chromatin in apoptotic cells

研究代表者

岩淵 邦芳（IWABUCHI, Kuniyoshi）

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：10232696

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：アポトーシス細胞の細胞膜表層には断片化されたヌクレオソームが露出する。我々は、アポトーシス細胞においてDNA損傷修復因子である53BP1がカスパーゼ依存性に切断されるが、C末断片が残存し、これがアポトーシス細胞表層に露出することを見出した。53BP1欠損細胞では、アポトーシス細胞表層へのヌクレオソーム露出が減少した。さらに53BP1のTudorドメインがアポトーシス細胞表層へのヌクレオソーム露出に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内で死に陥った細胞はマクロファージにより速やかに貪食され除去される。このメカニズムに障害が起こると、死細胞の表面に露出しているDNAやタンパク質が抗原となり自己抗体が産生されるとされている。本研究の成果は、SLEを代表とする自己免疫疾患の発症メカニズムに大きな知見を与える可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Apoptotic cells express a variety of eat-me signals on the surface of cell membrane. Apoptotic cells are quickly removed by macrophages. When this apoptotic cell-removal is inefficient, the histone and DNA on the surface of apoptotic cells are believed to trigger auto-antibody production, which then leads to autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus. We found that deficiency of DNA repair protein 53BP1 slightly reduced cell surface chromatin, one of the eat-me signals, in apoptotic cells. Furthermore, 53BP1-Tudor domain was required for the chromatin exposure in apoptotic cells.

研究分野：生化学

キーワード：アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

53BP1 は、53BP1 の C 末にある BRCT ドメインを介して癌抑制蛋白質 p53 と結合する蛋白質として見出された。DNA 二重鎖切断(以下 DSB)が発生すると 53BP1 は、53BP1 の Tudor ドメインを介してクロマチンと結合することで、DSB 部位に集積する。DSB 部位に集積した 53BP1 は、相同組み換えによる修復を抑制し、非相同末端結合による修復を促進する。一方、DNA 損傷を完全に修復できない細胞はアポトーシスに陥るが、アポトーシス細胞において 53BP1 が何らかの役割を担っているかは不明である。

アポトーシス細胞の細胞膜表層に断片化されたヌクレオソームが露出することは、1994 年に示されているが、露出の分子機構は不明である。細胞表層のヌクレオソームも含めて、アポトーシス細胞表層には補体 C1q が結合する分子が複数存在し、アポトーシス細胞表層への C1q 結合は、食細胞(Phagocyte)によるアポトーシス細胞の貪食を助ける。アポトーシス細胞の速やかな貪食除去は、自己免疫疾患を防ぐうえで極めて重要である。

研究代表者は 53BP1 が、アポトーシス細胞においてカスパーゼ依存性に 60 kDa の C 末断片(以下 53BP1C)になること、この 53BP1C が細胞表層に露出すること、53BP1 欠損細胞ではアポトーシス細胞表層へのヌクレオソーム露出が減少することを見出した。

2. 研究の目的

本研究は、アポトーシスにおける 53BP1 の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) アポトーシス細胞の調製

ヒト T リンパ球由来白血病株 Jurkat 細胞をプロテインキナーゼ C 阻害剤スタウロsporin で処理しアポトーシスを誘導した。マウスリンパ腫株 L1210 細胞を抗がん剤カンプトテシンで処理しアポトーシスを誘導した。

(2) 細胞への遺伝子, siRNA の導入

細胞への遺伝子あるいは siRNA の導入は、4D-Nucleofector (Lonza 社) による electroporation 法で行った。Lonza 社の推奨するプロトコールに従った。

(3) 免疫沈降と質量分析

53BP1 の C 末端には BRCT ドメインが存在する。ヒト骨肉腫株 U2OS 細胞に Flag タグ付-BRCT を発現する細胞株、U2OS-53BP1BRCT を樹立した。U2OS-53BP1BRCT 細胞の細胞抽出液を用いて抗 Flag 抗体で免疫沈降を行った。共沈したタンパク質を質量分析にかけて、53BP1BRCT ドメインと複合体を形成するタンパク質 X を同定した。アポトーシス誘導前後の Jurkat 細胞から細胞抽出液を抽出し抗 53BP1 抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物中のタンパク質をウェスタンブロットングで検出した。

(4) 53BP1 欠損, タンパク質 X 欠損細胞株の樹立

CRISPR-Cas9 システムを用いて、53BP1 あるいはタンパク質 X を欠損させた Jurkat 細胞株、Jurkat-53BP1 欠損細胞株、Jurkat-タンパク質 X 欠損細胞株を樹立した。同様に、L1210-53BP1 欠損株を樹立した。さらに L1210-53BP1 欠損株に、53BP1C の野生型 53BP1 あるいは様々な 53BP1 変異体を戻した細胞株を樹立した。

(5) アポトーシス細胞における 53BP1, ヌクレオソームの検出

アポトーシス誘導後の細胞から細胞溶解液を抽出し、53BP1C 末に対する抗体を用いたウェスタンブロット法で、53BP1 の切断を検出した。細胞内の 53BP1 の局在は、細胞を固定し膜透過処理を行った後に免疫蛍光染色法で調べた。細胞表層の 53BP1、ヒストン、DNA は、細胞の固定処理、膜透過処理を行わずに、抗 53BP1 抗体、抗 DNA 抗体、抗ヒストン抗体を用いた免疫蛍光染色法で検出した。

(6) 遺伝子 X ノックアウトマウスの作製

金沢医科大学・総合医学研究所・西園啓文講師との共同研究で、遺伝子 X の一部を挟むように loxP 配列を組み込んだノックインマウス(X-loxP マウス)の作製を試みた。X-loxP マウスができれば、リンパ球特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス(Cre-リンパ球マウス)と交配させ、タンパク質 X 欠損リンパ球を作製する予定である。

4. 研究成果

(1) アポトーシス細胞で 53BP1C と結合するタンパク質の同定

U2OS-53BP1BRCT 細胞を用いて、53BP1BRCT ドメインと共沈するタンパク質 X を同定した。このタンパク質 X が、アポトーシス細胞で残存する 53BP1C 未断片 (53BP1C) と複合体を作るかどうか明らかにするために、アポトーシス誘導前後の Jurkat 細胞から細胞抽出液を抽出し抗 53BP1 抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物中のタンパク質 X を、抗タンパク質 X 抗体を用いてウェスタンブロットングで検出した。その結果タンパク質 X は、アポトーシス前には 53BP1 とは複合体を形成せず、アポトーシス後に出現する 53BP1C と複合体を形成することが分かった。

(2) タンパク質 X 欠損細胞での 53BP1C およびヌクレオソームの露出

Jurkat 細胞にスタウロスポリンでアポトーシスを誘導すると、一部の 53BP1C がアポトーシス細胞の表層に露出すること、Jurkat-53BP1 欠損細胞ではヌクレオソームの露出が減少することは既に確認されている。タンパク質 X が、53BP1C 露出、ヌクレオソーム露出に関与するかどうかを明らかにするために、siRNA を用いて Jurkat 細胞でタンパク質 X の発現を抑制した。その結果、タンパク質 X の発現抑制により 53BP1C 露出、ヌクレオソーム露出が減少した。しかし、siRNA でのタンパク質 X の発現抑制はたかだか 50%程度であった。

53BP1C 露出、ヌクレオソーム露出におけるタンパク質 X の関与をさらに確実なものとするために Jurkat-タンパク質 X 欠損細胞株を樹立した。この細胞でも、53BP1C 露出、ヌクレオソーム露出の減少が観察されたが、Jurkat-タンパク質 X 欠損細胞は増殖能やアポトーシス刺激に対する反応が野生型細胞とは異なっており、公正な比較ができなかった。

そこで、遺伝子 X ノックアウトマウスの作製を試みた。タンパク質 X 欠損リンパ球の作製を目的に、まず遺伝子 X の一部を挟むように loxP 配列を組み込んだノックインマウス (X-loxP マウス) の作製を試みた。X-loxP マウスができたら、リンパ球特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス (Cre-リンパ球マウス) と交配させ、タンパク質 X 欠損リンパ球を作製する予定である。しかし現在のところ、当初予定していた部位には loxP の挿入が困難であると判明したことから別の領域への loxP の挿入を検討している。

(3) ヌクレオソーム露出に必要な 53BP1C ドメイン

カスパーゼによる切断後に残る 60kDa の 53BP1C には、DNA 損傷部位の、ジメチル化ヒストン H4 と結合する Tudor ドメイン、ユビキチン化ヒストン H2A と結合する UDR ドメインに加え、p53 と結合する BRCT ドメインが含まれている。これらのどのドメインが、アポトーシス細胞でのヌクレオソーム露出に関与しているかを明らかにするために、戻し実験を行った。

CRISPR-Cas9 システムを用いて、L1210-53BP1 欠損株を樹立した。L1210-53BP1 欠損細胞に、53BP1C の 野生型、Tudor 変異型、UDR 変異型、BRCT 変異型を戻した細胞株を樹立した。53BP1C 野生型が、アポトーシス細胞の表層に露出することは確認した。ヌクレオソーム露出は Tudor 変異型細胞株では回復せず、他の細胞株では回復した。このことから、53BP1C の Tudor ドメインを介したメチル化ヒストン H4 の結合が、アポトーシス細胞におけるヌクレオソーム露出に必要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shibata T, Ikawa M, Sakasai R, Ishigaki Y, Kiyokawa E, Iwabuchi K, Singh DP, Sasaki H, Kubo E.	4. 巻 169
2. 論文標題 Lens-specific conditional knockout of tropomyosin 1 gene in mice causes abnormal fiber differentiation and lens opacity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mech Aging Dev	6. 最初と最後の頁 111492-111492
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mad.2021.111492	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 該当する
1. 著者名 Watanabe A, Togi M, Koya T, Taniguchi M, Sakamoto T, Iwabuchi K, Kato T Jr, Shimodaira S.	4. 巻 26
2. 論文標題 Identification of CD56dim subpopulation marked with high expression of GZMB/PRF1/PI-9 in CD56+ interferon- γ -induced dendritic cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 313-327
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12844	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 Sakasai R, Wakasugi M, Matsui T, Sunatani Y, Saijo M, Matsunaga T, Iwabuchi K.	4. 巻 113
2. 論文標題 Camptothecin compromises transcription recovery and cell survival against cisplatin and ultraviolet irradiation regardless of transcription-coupled nucleotide excision repair.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103318-103318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dnarep.2022.103318	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 Sakasai R, Matsui T, Sunatani Y, Iwabuchi K.	4. 巻 668
2. 論文標題 UbcH5c-dependent activation of DNA-dependent protein kinase in response to replication-mediated DNA double-strand breaks.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 42-48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.05.068	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 逆井 良, 若杉光夫, 松井 理, 砂谷優実, 西條将文, 松永司, 岩淵邦芳
2. 発表標題 カンプトテシンはDNA損傷後の転写の回復を阻害しスプラチンに対する殺細胞効果を増強する.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井 愛, 砂谷 優実, 古市 賢吾, 藤本 圭司, 足立 浩樹, 岩淵 邦芳, 横山 仁
2. 発表標題 ヒト糸球体内皮細胞DNA損傷によるVI型コラーゲン分泌機序の解明.
3. 学会等名 金沢医科大学医学会 第56回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井 愛, 砂谷優美, 沖野一晃, 林 憲史, 藤本圭司, 岩淵邦芳, 横山 仁, 古市賢吾
2. 発表標題 糖尿病性腎症と糸球体内 型膠原繊維(COL6)の蓄積に関する検討.
3. 学会等名 第33回日本糖尿病性腎症研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 逆井 良, 砂谷優実, 松井 理, 岩淵邦芳
2. 発表標題 53BP1- and BRCA2-dependent biphasic repair of replication-mediated one-ended DNA double-strand breaks. DNA複製を介した one-end DNA 二本鎖切断の 53BP1 と BRCA2 による 二相性修復.
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 逆井 良
2. 発表標題 53BP1- and BRCA2-dependent biphasic repair of replication-mediated one-ended DNA double-strand breaks.
3. 学会等名 第9回DNA 損傷応答ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宇谷公一, 逆井良, 岩淵邦芳, 樋口雅也
2. 発表標題 Regulation of DNA damage repair pathway by the deubiquitinating enzyme USP10.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 逆井 良, 松井 理, 砂谷優実, 岩淵邦芳
2. 発表標題 DNA複製を介したDNA二本鎖切断の修復機構とその破綻による核の断片化.
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kubo E, Shibata T, Ishida H, Sakasai R, Yoshitomi Y, Yonekura H, Iwabuchi K, Singh DP, Sasaki H.
2. 発表標題 Interaction between periostin and decorin to induce epithelial-mesenchymal transition in the lens.
3. 学会等名 Intenational Conference on the Lens 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究分担者	逆井 良 (SAKASAI Ryo) (10549950)	金沢医科大学・医学部・准教授 (33303)	
研究分担者	松井 理 (MATSUI Tadashi) (60288272)	金沢医科大学・医学部・助教 (33303)	
研究分担者	砂谷 優実 (SUNATANI Yumi) (70581057)	金沢医科大学・医学部・講師 (33303)	

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
---------	---------