

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 6月 7日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710061

研究課題名（和文） DNAトポイソメラーゼIとDNA修復のクロストークの網羅的解析

研究課題名（英文） Comprehensive analyses of DNA Topoisomerase I and relating DNA repair

研究代表者

堀端 克良（HORIBATA KATSUYOSHI）

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・主任研究官

研究者番号：40402995

研究成果の概要（和文）：DNA topoisomerase I (Top1) は通常 DNA に共有結合して一本鎖 DNA 切断 (single strand DNA break; SSB) を入れることで DNA 複製や転写の際に生じる DNA 超ラセンを解消し、SSB を閉じて DNA から解離するが、何らかの原因で SSB を閉じることができなくなると Top1 自身が DNA に共有結合したままになり、内在性 DNA 損傷のように振る舞うことが知られる。このように Top1 の酵素活性中に形成される“Top1-DNA 間共有結合体”(Top1-DNA covalent complex; Top1-cc)の修復機構は DNA 複製、転写、組換え DNA 修復、プロテアソームによるタンパク質分解機構などと密接に関連していることが知られるが、それぞれがどのように相関しているのかなどの詳細は不明である。Top1 とそれぞれの因子の相関関係の詳細を、遺伝学的、生化学的および細胞生物学的手法により網羅的に解析し、その詳細を明らかにする。

研究成果の概要（英文）：DNA topoisomerase I (Top1) is an essential enzyme involved in resolving the torsional stress associated with DNA replication and transcription. Top1 have a deleterious effect on cells in these processes. In the event, when the final re-ligation step of the reaction cycle is prevented, the covalent topoisomerase I-DNA intermediate becomes a toxic DNA lesion, called topoisomerase I-DNA covalent complex (Top1-cc). These lesions must be repaired. The molecular mechanisms of repair of Top1-cc seem to be complicated with DNA replication, transcription, recombination and protein degradation. However, detailed mechanisms are not clear. Here we purified and analyzed Top1 protein complexes to know molecular mechanisms of repair of Top1-cc, Top1 itself and interaction proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,400,000	0	1,400,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	0	3,100,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：修復

1. 研究開始当初の背景
“Top1-DNA 間共有結合体”(Top1-DNA covalent complex; Top1-cc)の修復異常は

進行性の神経細胞変性とそれに伴う小脳の萎縮、運動失調を示す劣性遺伝性疾患の原因となる。これらの遺伝性疾患の発症機構とし

て、Top1-cc の修復異常だけではなく、DNA 複製、DSB 修復、転写、TC-NER および突然変異・染色体不安定性などと、Top1 そのものおよび Top1-cc 修復機構が密接に関連すると考えられるが、どのようなメカニズムで関連しているのか、各修復系に Top1 が直接的に必要であるのか、また、Top1-cc の修復機構に各修復因子がどのように必要であるかなど全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

DNA topoisomerase I (Top1) は通常 DNA に共有結合して一本鎖 DNA 切断 (single strand DNA break; SSB) を入れることで DNA 複製や転写の際に生じる DNA 超ラセンを解消し、SSB を閉じて DNA から解離するが、何らかの原因で SSB を閉じることができなくなると Top1 自身が DNA に共有結合したままになり、内在性 DNA 損傷のように振る舞うことが知られる。このように Top1 の酵素活性中に形成される "Top1-DNA 間共有結合体" (Top1-DNA covalent complex; Top1-cc) の修復機構は DNA 複製、転写、組換え DNA 修復、プロテアソームによるタンパク質分解機構などと密接に関連していることが知られるが、それぞれがどのように関連しているのかなどの詳細は不明である。Top1 とそれぞれの因子の相関関係の詳細を、遺伝学的、生化学的および細胞生物学的手法により網羅的に解析し、その詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

Top1-cc の形成に必要な因子を明らかにするために、DNA 損傷誘発時の Top1-cc の定量的解析、細胞内での Top1 の挙動解析、Top1 が受ける生化学的な変化の解析を網羅的に行った。また、Top1 そのものが各 DNA 修復系に必要であるかどうかを知るために、Top1 自身を発現抑制した条件下での DNA 損傷誘発による影響を解析した。Top1 機能の場を明らかにするために、Top1 タンパク質複合体を精製し、相互作用因子を同定し、解析をおこなった。

4. 研究成果

Top1-cc は、Top1 阻害剤である CPT により形成されることが知られている。紫外線を照射した培養細胞の Top1-cc を解析した結果、CPT のみならず紫外線照射によっても Top1-cc が誘導されることを確認した。次に、細胞内 Top1 を siRNA によりノックダウンした場合の紫外線照射細胞生存率を解析した結果、コントロール群と比べて、Top1 をノックダウンした細胞では生存率の上昇が確認できた。これは、紫外線照射によってこれまでに知られる CPD などの紫外線 DNA 損傷のみならず、Top1-cc という DNA 損傷が生じ、そ

れによっても細胞死が引き起こされることを意味する。一方、siRNA によるノックダウンの実験では DNA 損傷としての Top1-cc の可能性以外に、Top1 の機能そのものが抑制されることで紫外線照射による生存率が上昇した可能性も考えられる。他方、Top1 の細胞内の機能の詳細を知るために、Top1 タンパク質複合体をタンデムアフィニティー法により精製し、質量分析によりそれぞれを同定した。その結果、Top1 はクロマチン制御に関わる因子や転写因子と相互作用していることを明らかにした。その後、それらの相互作用因子の rDNA 制御機構を ChIP 法により解析した。Top1 を含めた複合体構成因子は、DNA 損傷に応じて rDNA 上で特異的な挙動を示すことを明らかにした。

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 5 件)

- ① Xue Zhang*, Katsuyoshi Horibata*, Masafumi Saijo*, Chie Ishigami, Akiko Ukai, Shin-ichiro Kanno, Hidetoshi Tahara, Edward G Neilan, Masamitsu Honma, Takehiko Nohmi, Akira Yasui and Kiyoji Tanaka
*these authors contributed equally to this work. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair, 査読有, Nature Genetics, 44(5):593-597 (2012)
- ② Arnold D. Bailey, Lucas T. Gray, Thomas Pavelitz, John C. Newman, Katsuyoshi Horibata, Kiyoji Tanaka and Alan M. Weiner, The conserved Cockayne syndrome B-piggyBac fusion protein (CSB-PGBD3) affects DNA repair and induces both interferon-like and innate antiviral responses in CSB-null cells, 査読有, DNA repair, 11(5):488-501 (2012)
- ③ Takafumi Kimoto, Satsuki Chikura, Kumiko Suzuki, Xiao mei Kobayashi, Yasuhiro Itano, Katsuyoshi Horibata, Masamitsu Honma, Vasily N. Dobrovolsky, Robert H. Heflich, Daishiro Miura and Yoshinori Kasahara, Further Development of the Rat Pig-a Mutation Assay: Measuring Rat Pig-a Mutant Bone Marrow Erythrocytes and a High Throughput Assay for Mutant Peripheral Blood Reticulocytes, 査読有, Environmental and Molecular Mutagenesis, 52:774-783 (2011)
- ④ Katsuyoshi Horibata, Akiko Ukai, Naoki

Koyama, Atsuya Takagi, Jun Kanno, Takafumi Kimoto, Daishiro Miura, Akihiko Hirose, and Masamitsu Honma, Fullerene (C60) is negative in the in vivo Pig-A gene mutation assay, 査読有, Genes and Environment, 33(1):27-31 (2011)

- ⑤ Katsuyoshi Horibata, Masafumi Saijo, Mui Nee Bay, Li Lan, Isao Kuraoka, Philip J. Brooks, Masamitsu Honma, Takehiko Nohmi, Akira Yasui and Kiyoji Tanaka, Mutant Cockayne syndrome group B protein inhibits repair of DNA topoisomerase I-DNA covalent complex, 査読有, Genes to Cells, 16(1):101-14 (2011)

[学会発表] (計 18 件)

- ① Katsuyoshi Horibata, Akiko Ukai, Takafumi Kimoto, Tetsuya Suzuki, Nagisa Kamoshita, Kenichi Masumura, Takehiko Nohmi and Masamitsu Honma, Evaluation of in vivo genotoxicity induced by N-ethyl-N-nitrosourea, benzo[a]pyrene and 4-nitroquinoline-1-oxide by Pig-a and gpt assays, Society of Toxicology 51st Annual Meeting, March 15, 2012, San Francisco
- ② 大波冴子, 曹永晩, 豊田武士, 堀端克良, 本間正充, 能美健彦, 西川秋佳, 小川久美子, glycidol と 3-MCPD 及びこれらのエステル化合物におけるラット 28 日間反復投与試験の影響について, 第 28 回日本毒性病理学会総会, 2012 年 2 月 3 日
- ③ Xue Zhang, Katsuyoshi Horibata, Masafumi Saijo, Chie Ishigami, Akiko Ukai, Shinichiro Kanno, Edward G Neilan, Hidetoshi Tahara, Masamitsu Honma, Takehiko Nohmi, Akira Yasui and Kiyoji Tanaka, Molecular cloning of the gene for UV-sensitive syndrome with deficiencies in transcription-coupled DNA repair, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 15 日
- ④ Masafumi Saijo, Xue Zhang, Katsuyoshi Horibata, Chie Ishigami, Akiko Ukai, Shin-ichiro Kanno, Hidetoshi Tahara, Edward G. Neilan, Masamitsu Honma, Takehiko Nohmi, Akira Yasui and Kiyoji Tanaka, UVSSA and USP7 cooperate to stabilize CSB in transcription-coupled DNA repair, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 15 日
- ⑤ 堀端克良, 鶴飼明子, 木本崇文, 鈴木哲矢, 鴨下渚, 能美健彦, 本間正充, Pig-a
- アッセイとトランスジェニック突然変異試験の組合せに関する研究, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 2011 年 11 月 22 日
- ⑥ 木本崇文, 堀端克良, 武藤重治, 真田尚和, 橋本和之, 伊東悟, 宇野芳文, 本間正充, ラット末梢血を用いる Pig-a アッセイ共同研究: 測定技術の共有化と施設間差に関する研究報告, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 2011 年 11 月 21 日
- ⑦ Katsuyoshi Horibata, Akiko Ukai, Kenichi Masumura, Takehiko Nohmi and Masamitsu Honma, In Vitro Genotoxicity Tests Using Primary Hepatocytes, Environmental Mutagen Society 42nd Annual Meeting, October 17, 2011, Montreal
- ⑧ Takafumi Kimoto, Satsuki Chikura, Kumiko Suzuki, Xiao mei Kobayashi, Yasuhiro Itano, Katsuyoshi Horibata, Masamitsu Honma, Vasily N. Dobrovolsky, Robert H. Heflich, Daishiro Miura and Yoshinori Kasahara, Further Development of the Rat Pig-a Mutation assay: Measuring Rat Pig-a Mutant Bone Marrow Erythrocytes and a High Throughput Assay for Mutant Peripheral Blood Reticulocytes, Environmental Mutagen Society 42nd Annual Meeting, October 17, 2011, Montreal
- ⑨ Takafumi Kimoto, Katsuyoshi Horibata, Shigeharu Muto, Hisakazu Sanada, Kazuyuki Hashimoto, Satoru Itoh, Yoshifumi Uno and Masamitsu Honma, A Japanese Collaborative Study on Rat Pig-a Assay: Report on a Transferability of the Assay Method and Interlaboratory Difference, Environmental Mutagen Society 42nd Annual Meeting, October 16, 2011, Montreal
- ⑩ 堀端克良, 増村健一, 能美健彦, 本間正充, In vitro genotoxicity assay using primary hepatocytes derived from gpt delta transgenic mouse, 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 5 日
- ⑪ 大波冴子, 曹永晩, 豊田武士, 堀端克良, 本間正充, 能美健彦, 西川秋佳, 小川久美子, Evaluation of in vivo genotoxicity of glycidol and 3-MCPD and associated esters, using Pig-A and micronucleus assays, 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 5 日
- ⑫ 木本崇文, 千蔵さつき, 鈴木久美子, 小林小梅, 板野泰弘, Vasily N. Dobrovolsky, Robert H. Heflich, 堀端克良, 本間正充, 三浦大志郎, 笠原義典, 新規 in vivo 遺伝子突然変異評価系 (Pig-a アッセイ) の検

討:骨髓エリスロイド及び末梢血網状赤血球を用いる Pig-a アッセイの開発, 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2011 年 7 月 11 日

- ⑬ Xue Zhang, Katsuyoshi Horibata, Masafumi Saijo, Chie Ishigami, Akiko Ukai, Shinichiro Kanno, Edward G. Neilan, Hidetoshi Tahara, Masamitsu Honma, Takehiko Nohmi, Akira Yasui and Kiyoji Tanaka, Molecular cloning of the gene for UV-Sensitive Syndrome with deficiencies in Transcription-coupled DNA repair, Conference: Response to DNA damage: from molecular mechanism to human disease, April 4, 2011, Egmond aan Zee, Netherlands
- ⑭ 堀端克良, 鶴飼明子, 木本崇文, 三浦大志郎, 本間正充, In vivo gene mutation assay using endogenous Pig-A gene, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 8 日
- ⑮ Zhang Xue, 石上智愛, 堀端克良, 鶴飼明子, 本間正充, 能美健彦, 田原英俊, 田中亀代次, Molecular cloning of the gene for UV-sensitive syndrome with deficiencies in transcription-coupled DNA repair, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 8 日
- ⑯ 本間正充, 安井 学, 堀端克良, 鈴木哲矢, 谷田貝文夫, DNA2 本鎖切断修復に対する低線量放射線等の環境ストレスの影響, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 7 日
- ⑰ 堀端克良, 鶴飼明子, 増村健一, 能美健彦, 本間正充, gpt delta トランスジェニックマウス由来初代培養肝細胞を用いた in vitro 遺伝毒性試験, 日本環境変異原学会第 39 回大会, 2010 年 11 月 16 日
- ⑱ Masamitsu Honma, Katsuyoshi Horibata, Toshitaka Takahashi, Shin Asada, Takumi Hara, Yuzuki Nakagawa, Atsuko Ikeda, Kohji Yamakage and Akihiko Hirose, IN VITRO CHROMOSOME ABERRATION AND CELL TRANSFORMATION TESTS ON FULLEREN AND MALTI-WALL CARBON NANOTUBES, 40th Meeting of European Environmental Mutagen Society, September 16, 2010, Oslo, Norway

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀端 克良 (HORIBATA KATSUYOSHI)
国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・主任研究官

研究者番号 : 40402995

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

本間 正充 (HONMA MASAMITSU)
国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・室長
研究者番号 : 30250179