

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651056

研究課題名(和文) DNA損傷修復蛋白質53BP1は抗DNA抗体産生に対する免疫寛容を誘導するか

研究課題名(英文) Roles of 53BP1 in elimination of an apoptotic cell

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) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：p53結合蛋白質として見出された53BP1は、DNA二重鎖切断部位に集積することで、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。本研究で私たちは、アポトーシス細胞で53BP1がカスパーゼにより切断され、その断片がアポトーシス細胞の表層に露出することを明らかにした。本研究から、53BP1はアポトーシス細胞の貪食を制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：p53 binding protein-1(53BP1) accumulates at sites of DNA double-strand breaks, where it suppresses DNA end resection, and facilitates repair of DNA double-strand breaks by non-homologous end joining. In this study, we found that in apoptotic cells 53BP1 is cleaved to generate a fragment of 53BP1 in a caspase-dependent manner. This 53BP1 fragment is localized on the surface of apoptotic cells. Our data suggest that 53BP1 regulates clearance of apoptotic cells by a macrophage.

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：アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

53BP1 は、癌抑制蛋白質 p53 と結合する蛋白質として見出された。53BP1 は、ヌクレオソームとの結合を介して DNA 二重鎖切断部位に集積することで、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ことが明らかになってきた。我々は、アポトーシスにおける 53BP1 の機能を解析している過程で、53BP1 がカスパーゼにより切断され、ヌクレオソーム結合ドメイン Tudor と p53 結合ドメイン BRCT を含む C 末断片化されることを見出した。この 53BP1C 末断片は、アポトーシスのステージ進行に伴い、核から細胞質へと移行した。さらに細胞質の 53BP1C 末断片の一部は、細胞膜表層に露出することが分かった。アポトーシス細胞の表層に露出した蛋白質には、マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食において、マクロファージに対する find-me-signal あるいは eat-me-signal となるものがあることが知られている。

2. 研究の目的

本研究は、アポトーシス細胞の表層に露出した 53BP1 が、マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食に対して、どのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。

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細胞株 Jurkat を、プロテインキナーゼ C 阻害剤スタウロsporin で処理することでアポトーシスを誘導した。siRNA 法で 53BP1 の発現を抑制した。

(2) アポトーシス細胞における蛋白質、DNA 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、免疫蛍光染色法で検出した。

アポトーシス細胞培養液中に、各種精製補体因子あるいは補体抑制因子を添加し、アポトーシス細胞表層にこれらの因子を結合させた。その後、アポトーシス細胞表層に結合した補体因子あるいは補体抑制因子を、細胞の固定処理、膜透過処理を行わない免疫蛍光染色法で検出した。

(3) マクロファージの調製

ヒト単球由来細胞株 THP-1 をホルボール-12-ミリストート-13-アセートで処理し、

マクロファージ様細胞へ分化させた。

(4) マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食

マクロファージにアポトーシス細胞を添加し、X 時間の培養後、貪食されずに残ったアポトーシス細胞を除去した。その後、アポトーシス細胞を貪食したマクロファージ数を明視野顕微鏡下でカウントし、貪食程度を定量化した。

4. 研究成果

(1) アポトーシス細胞における 53BP1C 末断片の局在

アポトーシス細胞の表層には、二本鎖 DNA 断片や各種ヒストンが露出することが知られている。アポトーシス細胞表層の 53BP1 は、その一部が二本鎖 DNA 断片や各種ヒストンと共局在した。53BP1 の発現を抑制すると、アポトーシス細胞表層への二本鎖 DNA 断片や各種ヒストンの露出が部分的に抑制された。53BP1 が、二本鎖 DNA 断片やヒストンを細胞表面に露出させる「運び屋」としての機能を部分的に担っている可能性が示唆された。

(2) マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食における 53BP1 の役割

アポトーシス細胞の表層に露出した二本鎖 DNA 断片やヒストンは、マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食において、マクロファージに対する find-me-signal あるいは eat-me-signal となるものがあることが知られている。アポトーシスを誘導した Jurkat 細胞は、マクロファージにより効率よく貪食されたが、53BP1 の発現を抑制すると、部分的に貪食が抑制された。

(3) アポトーシス細胞表層への補体因子結合における 53BP1 の役割

アポトーシス細胞表層のクロマチンには、様々な補体因子や補体経路の抑制因子が結合することが知られている。また一部の補体因子は、アポトーシス細胞のマクロファージによる貪食を促進する。そこでアポトーシス細胞表層へのいくつかの補体因子、補体活性化抑制因子の結合量を調べたところ、53BP1 の発現抑制により、いくつかの補体因子、補体活性化抑制因子の結合が減少した。

以上の結果から 53BP1 は、アポトーシス細胞表層へのクロマチン露出と、細胞表層への補体活性制御因子の結合を制御することで、アポトーシス細胞のマクロファージによる貪食を制御している可能性が示唆された。

現在、貪食後マクロファージの分泌するサイトカインが、免疫抑制性のものであるか、またそれらサイトカインの分泌量が、53BP1 発現抑制により減少するかどうかを調べている。

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 6 件)

1. Yoo JS, Takahasi K, Ng CS, Ouda R, Onomoto K, Yoneyama M, Lai JC, Lattmann S, Nagamine Y, Matsui T, Iwabuchi K, Kato H, Fujita T : DHX36 enhances RIG-I signaling by facilitating PKR-mediated antiviral stress granule formation. *PLoS Pathog*, 10(3):e1004012, (2014) 査読有
2. Ishigaki Y, Nakamura Y, Tatsuno T, Hashimoto M, Iwabuchi K, Tomosugi N : RNA binding protein RBM8A (Y14) and MAGOH localize to centrosome in human A549 cells. *Histochem Cell Biol*, 141(1):101-109, (2014) 査読有
3. Kurosawa A, Saito S, So S, Hashimoto M, Iwabuchi K, Watabe H, Adachi N : DNA Ligase IV and Artemis act cooperatively to suppress homologous recombination in human cells: Implications for DNA double-strand break repair. *PLoS One*, 8:e72253, (2013) 査読有
4. Ishigaki Y, Nakamura Y, Tatsuno T, Hashimoto M, Shimasaki T, Iwabuchi K, Tomosugi N : Depletion of RNA-binding protein RBM8A (Y14) causes cell cycle deficiency and apoptosis in human cells. *Exp Biol Med*, 238(8), 889-897, (2013) 査読有
5. Doai M, Watanabe N, Takahashi T, Taniguchi M, Tonami H, Iwabuchi K, Kayano D, Fukuoka M, Kinuya S : Sensitive immunodetection of radiotoxicity after iodine-131 therapy for thyroid cancer using -H2AX foci of DNA damage in lymphocytes. *Ann Nucl Med*, 27:233-238, (2013) 査読有
6. Yoshida J, Iwabuchi K, Matsui T, Ishibashi T, Masuoka T, Nishio M : Knockdown of stromal interaction molecule 1 (STIM1) suppresses store-operated calcium entry, cell proliferation and tumorigenicity in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochem Pharmacol*, 84:1592-1603, (2012) 査読有

[学会発表](計 13 件)

1. 松井理、砂谷優実、逆井良、橋本光正、岩淵邦芳 : 53BP1 による p53 機能の制御 日

本放射線影響学会第 56 回大会 青森
2013 年 10 月 18 日 ~ 20 日

2. 砂谷優実、Kamdar R.P.、Sharma M. K.、松井理、逆井良、橋本光正、松本義久、岩淵邦芳 : カスパーゼによる XRCC4 切断と XRCC4 による CAD の核内移行促進機構の解明 日本放射線影響学会第 56 回大会 青森 2013 年 10 月 18 日 ~ 20 日
3. Yoshida J, Iwabuchi K : Calcium sensor STIM1 plays an essential role in human epidermoid carcinoma cell growth, migration, and tumorigenicity. 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜 2013 年 10 月 3 日 ~ 5 日
4. Yoshida J, Iwabuchi K, Ishibashi T, Masuoka T, Nishio M : Silencing of calcium sensor protein stromal interaction molecule 1 (STIM1) suppresses cell proliferation and tumorigenicity in human epidermoid carcinoma A431 cells. 第 86 回日本薬理学会年会 福岡 2013 年 3 月 21 日 ~ 23 日
5. Matsui T, Sunatani Y, Hashimoto M, Iwabuchi K : Regulation of p21-mediated G1/S Checkpoint by 53BP1. 第 35 回日本分子生物学会年会 福岡 2012 年 12 月 11 日 ~ 14 日
6. Sunatani Y, Kamdar R P, Sharma M K, Matsui T, Hashimoto M, Matsumoto Y, Iwabuchi K : Mechanism of Apoptosis Induction via Regulation of ASAP Complex by XRCC4. 第 35 回日本分子生物学会年会 福岡 2012 年 12 月 11 日 ~ 14 日
7. 吉田純子、岩淵邦芳 : Silencing of STIM1 suppresses store operated calcium entry and cell growth of human epidermoid carcinoma A431 cells. 第 71 回日本癌学会学術総会 札幌 2012 年 9 月 19 日 ~ 21 日
8. 橋本光正、松井理、橋本優実、立石智、岩淵邦芳 : テロメア末端融合における 53BP1 と Rad18 の機能解析 日本放射線影響学会第 55 回大会 仙台 2012 年 9 月 6 日 ~ 8 日
9. 松井理、橋本優実、橋本光正、岩淵邦芳 : 53BP1 による p53 機能の制御 日本放射線影響学会第 55 回大会 仙台 2012 年 9 月 6 日 ~ 8 日
10. 橋本優実、Kamdar R.P.、Sharma M. K.、松井理、橋本光正、松本義久、岩淵邦芳 : アポトーシスで生じた XRCC4N 未断片によ

る DNA 非損傷性アポトーシスの制御機構
日本放射線影響学会第 55 回大会 仙台
2012 年 9 月 6 日～8 日

11. 富田雅典、小林純也、岩淵邦芳、松本義久、足立典隆、高田穰、内海博司：低線量率放射線照射下における DNA2 重鎖切断修復因子の役割 日本放射線影響学会第 55 回大会 仙台 2012 年 9 月 6 日～8 日
12. 橋本優実、Kamdar R.P.、Sharma M. K.、松井理、橋本光正、松本義久、岩淵邦芳：DNA 二本鎖切断修復タンパク質 XRCC4 を介したアポトーシス制御機構の解明 第 48 回金沢医科大学医学会学術集会 内灘 2012 年 7 月 21 日
13. 道合万里子、渡邊直人、高橋知子、谷口充、利波久雄、岩淵邦芳、萱野大樹、福岡誠、絹谷清剛：アイソトープ治療におけるリンパ球の放射線組織障害評価に関する検討 第 71 回日本医学放射線学会総会 横浜 2012 年 4 月 12 日～15 日

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

中村 晃 (NAKAMURA, Akira)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：20344723

砂谷 優実 (SUNATANI, Yumi)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：70581057