

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26740019

研究課題名(和文) マルチ機能タンパク質DNA-PKcsの神経発生における役割

研究課題名(英文) Role of DNA-PKcs in neurogenesis

研究代表者

黒沢 綾 (Kurosawa, Aya)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・客員研究員

研究者番号：70505867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNA修復機構の異常は先天性神経疾患の原因となるが、その分子メカニズムについては不明な点が多い。本研究では、DNA二本鎖切断修復にかかわるヒトDNA-PKの神経細胞への分化過程における役割の解析を目指し、ヒト遺伝子改変神経幹細胞を神経細胞へ分化させるために必要な、ヒトiPS細胞を用いた遺伝子ターゲティング法の確立や神経細胞への分化の系の確立に成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the role of the PRKDC, one of the causative genes for microcephaly, in neurogenesis. As human gene-knockout iPS cells are useful in understanding disease mechanisms, we established the protocol for generation of human gene-knockout iPS cells using a plasmid-based targeting vector.

研究分野：細胞生物学

キーワード：DNA repair NHEJ DNA-PKcs

1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA は、内的・外的要因によって常に損傷を受けている。ゲノム情報を正確に維持するため、細胞にはゲノム安定性維持機構が備わっており、DNA の損傷の認識や修復を行っている。また、ゲノム安定性維持に関わる遺伝子を原因遺伝子とする疾患は神経系への異常を伴うことから(表)、ゲノム安定性維持機構は神経細胞への分化に関与している可能性がある(McKinnon Nat. Neurosci. (2013) 16:1523-1529)。

DNA 依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニット(DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: DNA-PKcs)は、DNA 修復や細胞周期調節、テロメア維持などゲノム安定性維持機構全体に広く関わる分子量 470 kDa のタンパク質で、Ku70 と Ku80 から構成される Ku 複合体および二本鎖 DNA 依存的にタンパク質のセリン残基もしくはスレオニン残基をリン酸化する(Neal and Meek. Mut. Res. (2011) 711:73-86)。DNA-PKcs は、毛細血管拡張性運動失調症の原因遺伝子産物 ATM やセッケル症候群原因遺伝子産物 ATR と同じ PI3 キナーゼ様キナーゼファミリーに属している。これらのキナーゼは細胞内において重複した役割を担っていることもあり、リン酸化のターゲットとするタンパク質も、p53 やヒストン H2AX など重複するものがある。DNA-PKcs の細胞内の役割について最も研究が盛んに進められているのは、DNA 二本鎖切断修復機構の一つである非相同末端連結(nonhomologous end-joining: NHEJ)における役割の解析である。現在までに、NHEJ において DNA-PKcs は、Artemisヌクレアーゼに末端加工に重要なエンドヌクレアーゼ活性を与える(Ma et al. Cell (2002) 108:781-794)ほか、リン酸化を介した NHEJ 因子の働きの調節や足場タンパク質としての役割など、マルチ機能を有していることが示唆されている。私は最近、ヒト培養細胞を用いて遺伝子ターゲティング法により *PRKDC* 破壊株を作製した。この *PRKDC* 破壊株を用いて、DNA 損傷誘発剤への感受性を調べたところ、DNA-PKcs は NHEJ に必須ではないことを示唆するデータを得た。そのため、DNA-PKcs は NHEJ を中心にゲノム安定性維持においてマルチ機能を有しているが、その重要度はあまり高くない可能性がある(Kurosawa et al. 投稿準備中)。また、ヒト DNA-PKcs をコードする *PRKDC* 遺伝子を原因遺伝子とする疾患やノックアウトマウスにおいて、神経系への異常は確認されていない(van der Burg et al. J. Clin. Invest. (2009) 119:91-98, Gu et al. PNAS. (2000) 97:2668-2673)。このことから、DNA-PKcs は神経発生に関与していない可能性がある。しかし、マウス細胞における DNA-PKcs の発現量はヒト細胞よりも 50 倍低く、DNA-PKcs の重要度には種差がある可能性があることや、患者細胞において活性を一部保持した変異型 DNA-PKcs が発現しているこ

とから、神経発生におけるヒト DNA-PKcs の役割はいまだ明らかとなっていない。

2. 研究の目的

これまでに報告されているヒト *PRKDC* 遺伝子の変異は、6338_6340delGAG と 9185T G の二種類であるが、発現量や自己リン酸化能に変化のないことがわかっている(van der Burg et al. J. Clin. Invest. (2009) 119:91-98)。また、*Prkdc* 遺伝子をノックアウトしたマウスについても、標的領域が *Prkdc* 遺伝子の 3' 下流であるため、不完全長の DNA-PKcs の発現により症状が緩和されている可能性がある(Gu et al. PNAS. (2000) 97:2668-2673)。そこで、遺伝子ターゲティング法により *PRKDC* 遺伝子のヌル変異および PI3K ドメインを欠損させた DNA-PKcs を発現する iPS 細胞を作製して神経細胞への分化誘導を試み、遺伝子異常と神経分化の関係性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞を用いた遺伝子ターゲティング法の確立

ヒト iPS 細胞(TkDN 4-M)に、エレクトロポレーション法によりターゲティングベクターを導入後、選択薬剤により組換え体を取得した。単離した組換え体からゲノム DNA を抽出し、PCR やサザン解析により、相同組換えが正しく起きているかどうかを調べた。

(2) ヒト NaIm-6 細胞を用いた iPS 細胞の樹立
ヒト NaIm-6 細胞に、山中因子を組み込んだエピソーマルベクターをエレクトロポレーション法により導入した後、培養ディッシュに接着させた。N2B27 培地で培養し、iPS 細胞の取得を試みた。

(3) ヒト神経幹細胞を用いた神経細胞への分化誘導系の確立
ヒト神経幹細胞をマルチウェルプレートに 1×10^5 個/cm² の密度で播種した。B27 添加物を含む neurobasal 培地に交換し、3-4 日おきに培地交換をし、数日培養を行った。神経細胞特異的マーカーの発現を免疫染色により調べた。

(4) DNA 二本鎖切断修復における DNA-PKcs の役割の解析

DNA-PKcs 欠損による増殖能への影響を明らかにするため、ヒト NaIm-6 細胞より作製した *PRKDC* 破壊株および *LIG4/PRKDC* 二重破壊株の倍加時間を調べた。フローサイトメトリーによる細胞周期解析、コメットアッセイによる DNA 損傷の蓄積について調べた。また、DNA 修復における DNA-PKcs の役割の解析として、細胞を様々な濃度のプレオマイシンやエトポシド、カンプトテシンで処理後、72 時間培養し、細胞中の ATP 量を測定し、生存率を算出した。

4. 研究成果

(1)本研究では、プラスミドベクターを用いたターゲティングベクターによる遺伝子破壊株の作製を試みた。

エレクトロポレーション法によるヒト iPS 細胞 (TKDN 4-M) への遺伝子の導入条件は、すでに決定していたことから、本研究では NaIm-6 細胞や HT1080 細胞などのヒト培養細胞において遺伝子破壊の実績がある *HPRT* 遺伝子座を標的とするターゲティングベクターを用いて、選択薬剤の添加時期や濃度、播種する細胞密度などの検討を試みた。PCR 解析の結果、単離した細胞は組換え体であることがわかったが、組換え体の取得効率は低く、遺伝子破壊株の取得には至らなかった。そこで、導入条件の再検討を行ったところ、組換え体を多数取得することに成功し、遺伝子破壊株を取得の系を構築することができた。

PRKDC 遺伝子破壊や、DNA-PKcs の PI3K ドメインを欠損させるためのターゲティングベクターは作製済みであるため、引き続きこの系を用いて *PRKDC* 破壊株の取得を目指す。

(2) iPS 細胞は再生医療への利用を目的として作製された細胞であり、正常細胞から作製されることを前提としている。そのため、がん細胞を由来とする培養細胞を用いた iPS 細胞作製法は十分に確立されていない。そこで、すでに研究室で確立していたヒト正常線維芽細胞を用いて iPS 細胞を作製する系による樹立を試みた。NaIm-6 細胞はプレ B 細胞由来であるため浮遊細胞であるが、樹立した iPS 細胞は接着細胞である可能性があることや、樹立過程で行う培地交換を簡便に行うため、コーティング剤を用いて NaIm-6 細胞を培養ディッシュに接着させて樹立を試みた。正常線維芽細胞は、接触阻害やその分裂能の有限性から、iPS 細胞の樹立過程で増殖を停止するため、分裂の盛んな iPS 細胞のみを効率よく取得することができる。しかし、リンパ腫由来の NaIm-6 細胞は正常線維芽細胞のように増殖停止をしない。そこで、低分子化合物を培地に添加し、iPS 細胞とならなかった NaIm-6 細胞の増殖抑制を試みた。低分子化合物の種類や濃度を変更したが、NaIm-6 細胞から iPS 細胞を樹立することはできなかった。

(3) ヒト神経幹細胞を用いて、神経細胞への分化誘導条件を検討した。ヒト ES 細胞より作製したヒト神経幹細胞 (市販品) を、B27 を含む Neurobasal 培地で培養した。神経細胞特異的マーカーである β III チューブリンの発現を免疫染色法により調べ、神経細胞へ分化誘導できたことを確認した。現在、分化効率の測定法や分化した神経細胞の種類の確認法の系を整備中である。

(4) ヒト NaIm-6 細胞を用いて、遺伝子ターゲティング法により作製した *PRKDC* 破壊株および *LIG4* 破壊株、*LIG4/PRKDC* 二重破壊株を用いて、DNA 二本鎖切断修復における DNA-PKcs

の役割を調べた。

遺伝子破壊株の増殖能は、*LIG4* の有無に関わらず DNA-PKcs の欠損により野生株よりも低下することがわかった。フローサイトメトリーにより細胞周期パターンを解析したところ、*PRKDC* 破壊株では subG1 期の割合が野生株や *LIG4* 破壊株よりも増加していたが、*LIG4/PRKDC* 二重破壊株では、*PRKDC* 破壊株でみられたような subG1 期の増加は見られなかった。このことから、DNA-PKcs 欠損による増殖能の低下のメカニズムは、*LIG4* の有無によって異なることが示唆される。

次に DNA 損傷誘発剤への感受性を調べた。*PRKDC* 破壊株は、DNA 二本鎖切断誘発剤であるトポイソメラーゼ II 阻害剤エトポシドや放射線類似薬プレオマイシンに野生株よりも高感受性を示すが、*LIG4* を同時に欠損させると、その感受性が緩和された。また、トポイソメラーゼ I 阻害剤カンプトテシンへの感受性を調べると、いずれの破壊株も野生株よりも耐性を示し、その度合は *PRKDC* 破壊株、*LIG4* 破壊株、*LIG4/PRKDC* 二重破壊株の順に、高かった。これらの結果から、DNA-PKcs は NHEJ の一部に関わるほか、DNA-PKcs 欠損により NHEJ 以外の修復経路、すなわち相同組換えや代替経路 (alternative end-joining: a-EJ) がはたらきやすくなっている可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

Regulatory role of human DNA-PKcs in DNA double-strand break repair.
Haruka Watabe, Shinta Saito, Aya Kurosawa, Noritaka Adachi.
BMB2015 (神戸) 2015 年 12 月

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒沢 綾 (KUROSAWA, Aya)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・客員研究員

研究者番号: 70505867

(2) 研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

足立 典隆 (ADACHI, Noritaka)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究
科・教授

研究者番号：30264675