

論文の内容の要旨

論文題目 メダカ突然変異体 **RIC1** 系統を用いた

DNA 二本鎖切断修復制御機構の解析

氏 名 漆 原 佑 介

【序論】

放射線や DNA 複製過程等で生じる DNA 二本鎖切断 (Double-strand break: DSB) はゲノム情報の大規模な欠失や細胞分裂時の染色体分配の異常など、細胞に重篤な影響をもたらすため、生物は DSB 修復機構を働かせ、速やかに DSB を修復している。DSB 生成後、初期応答反応として ATM (Ataxia telangiectasia mutated) と DNA-PK (DNA dependent protein kinase) がいち早く DSB 近傍のヒストン H2A バリエントである H2AX を含む多くの修復因子のリン酸化を行い、活性化された多くの因子によって DSB 修復機構が誘導される。DSB 修復機構には Classical Non-homologous end joining (C-NHEJ)、Homologous recombination (HR)、Alternative NHEJ (A-NHEJ)、ATM 型 NHEJ の 4 経路の存在が報告されている。正常細胞では HR、A-NHEJ、ATM 型 NHEJ は抑制されていること、各修復経路の制御が DSB 生成後の初期応答により行われていることが示唆されているが、その制御メカニズムについては明らかとなっていない。

メダカ突然変異体 **RIC1** 系統は、培養細胞を用いた解析によってγ線照射による DSB 生成後の H2AX リン酸化、DSB 修復に異常を示すことが明らかとなっている。このことから、**RIC1** 系統では初期応答における DSB 修復制御機構の異常がこれらの原因であると考えられる。そこで、本研究では、**RIC1** 系統胚由来培養細胞を用いた解析から初期応答における DSB 修復制御機構の解明を目指した。

【結果と考察】

1. RIC1 細胞の H2AX リン酸化異常、DSB 修復遅延の原因解析

RIC1 細胞における H2AX リン酸化異常の原因を明らかにするために、ATM 阻害剤 (KU55933) 及び DNA-PK 阻害剤 (NU7026) 処理後の H2AX リン酸化への影響を解析した。野生型 (CAB) 及び RIC1 細胞に阻害剤を処理し、 γ 線照射後のリン酸化 H2AX (γ H2AX) のフォーカス数を計測したところ、野生型細胞では両阻害剤処理によって γ H2AX フォーカス数が減少したが、RIC1 細胞では NU7026 処理による γ H2AX フォーカス数の減少が見られなかった (図 1A)。また、RIC1 細胞は CAB 細胞より DNA-PK 活性が低下していた (図 1B)。これらの結果から、RIC1 細胞では DNA-PK 活性低下が H2AX のリン酸化異常をもたらしていることが示唆された。

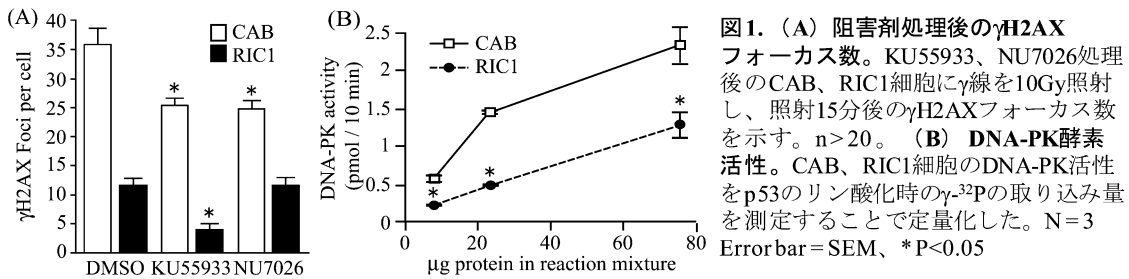


図1. (A) 阻害剤処理後の γ H2AX フォーカス数。KU55933、NU7026処理後のCAB、RIC1細胞に γ 線を10Gy照射し、照射15分後の γ H2AXフォーカス数を示す。n>20。(B) DNA-PK酵素活性。CAB、RIC1細胞のDNA-PK活性をp53のリン酸化時の γ - 32 Pの取り込み量を測定することで定量化した。N=3 Error bar = SEM、*P<0.05

DNA-PKの欠損や活性低下によってC-NHEJが阻害されることがこれまで明らかとなっている。また、RIC1細胞ではDSB修復の遅延が報告されている。したがって、RIC細胞においてC-NHEJが阻害されることでDSB修復の遅延が生じていると考えられる。そこで、DSB各修復経路の修復能を解析した。各修復能の解析には特殊なコンストラクトとエンドヌクレアーゼI-SceIを使用するHRアッセイ、EJアッセイを用いた。I-SceIによる人為的なDSBの誘導後、HRアッセイではHRにより修復された細胞の割合を、EJアッセイではEnd joining (C-NHEJ、A-NHEJ、ATM型NHEJ)により修復された細胞の割合を調べることができる。その結果、RIC1細胞ではCAB細胞に比べてHR修復能が有意に低下していた (図 2A)。RIC1細胞で見られたHR修復能の低下がDNA-PK活性の低下によるものなのかを検証するため、NU7026処理後のHR修復能を解析したところ、CAB細胞ではNU7026濃度の増加に伴ってHR修復率の低下がみられたが、RIC1細胞ではNU7026処理の影響が見られなかった (図 2C)。これらの結果から、RIC1細胞ではDNA-PK活性の低下がH2AXリン酸化、HR修復率の低下をもたらしていることが示唆された。一方で、RIC1細胞ではDNA-PK配列、mRNA発現量、タンパク質発現量は正常であった。このことから、RIC1細胞はDNA-PK配列、発現量は正常であるがDNA-PK活性が低下し

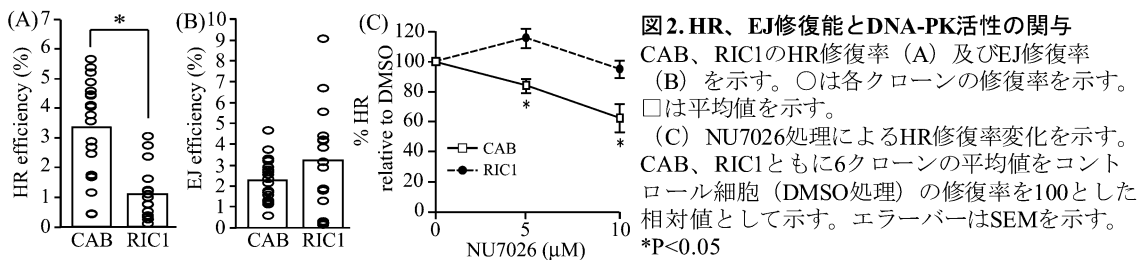


図2. HR、EJ修復能とDNA-PK活性の関与。CAB、RIC1のHR修復率 (A) 及びEJ修復率 (B) を示す。○は各クローンの修復率を示す。□は平均値を示す。(C) NU7026処理によるHR修復率変化を示す。CAB、RIC1ともに6クローンの平均値をコントロール細胞 (DMSO処理) の修復率を100とした相対値として示す。エラーバーはSEMを示す。*P<0.05

ている変異体であることが明らかとなった。

2. RIC1 細胞における DNA-PK 自己リン酸化、NBS1 挙動解析

Nickoloff らは DNA-PK 活性低下が HR を阻害するメカニズムを提案している。DNA-PK は DSB 生成後に、①DSB 部位へいち早く結合する、②DSB 部位と結合することで DNA-PK はリン酸化活性を持ち、数多くの標的因子のリン酸化を行う、③DNA-PK の標的因子には DNA-PK 自身も含まれ、DNA-PK の自己リン酸化が起こる、④自己リン酸化による構造変化によって DSB 末端から DNA-PK が解離する、というステップで DSB 末端と結合、解離する (図 3)。この DNA-PK の解離が遅延すると HR 修復に関わる因子の DSB 部位への集積が遅延することが報告されている。これらの報告から、Nickoloff らは DNA-PK 活性低下時には DNA-PK 自己リン酸化が阻害され、DNA-PK の解離の遅延によって HR が阻害されていることを示唆している (図 3)。

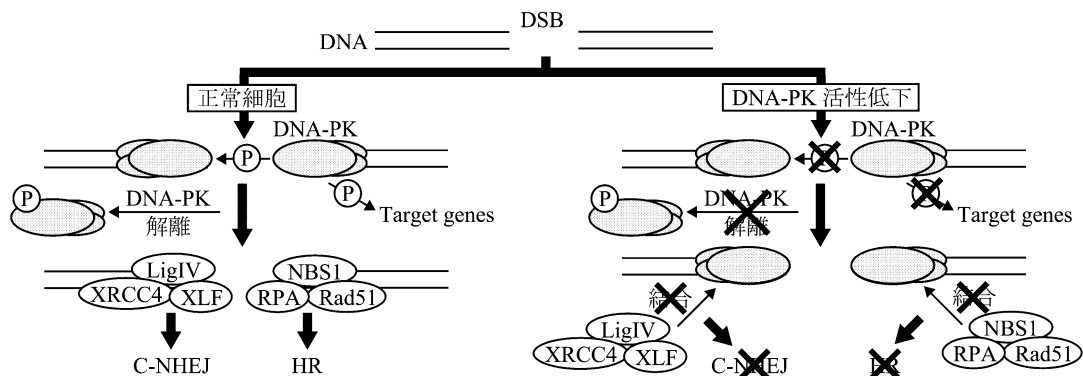


図3. DNA-PK自己リン酸化異常によるHR修復能低下モデル

RIC1 細胞においても DNA-PK の自己リン酸化が阻害されているのかを解析するために、DSB 部位から解離するために必要な DNA-PK の自己リン酸化部位である 2609 番目のスレオニンのリン酸化を、蛍光抗体染色法を用いて解析した。その結果、RIC1 細胞では DNA-PK の自己リン酸化フォーカス数が CAB 細胞に比べて有意に減少していた (図 4A)。次に、RIC1 細胞における HR 修復因子の DSB 部位への集積に遅延がみられるかを解析した。NBS1

(Nijmegen breakage syndrome 1) は HR 修復の進行に伴って DSB 上でフォーカスを形成する。そこで、Venus タグを付けた NBS1 を発現した RIC1 及び CAB 細胞における DSB 後の NBS1 フォーカス形成を比較した。その結果、RIC1 細胞では DSB 後の NBS1 フォーカス形成に遅延が見られた (図 4B)。これらの結果から、RIC1 細胞においても DNA-PK 自己リン酸化異常による DNA-PK の DSB 部位からの解離の阻害が、HR 修復因子の DSB 部位への集積を妨げ、HR の低下をもたらしていることが示唆された。

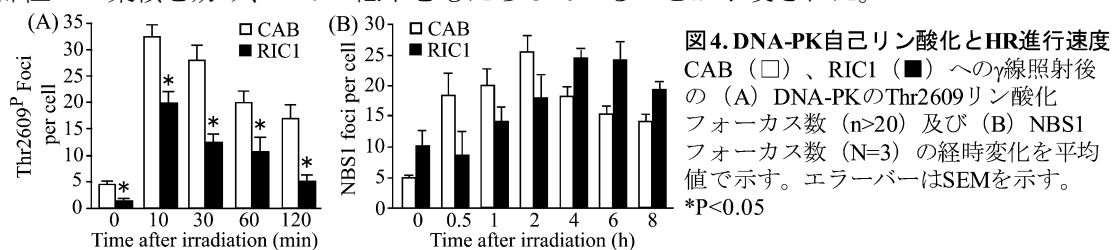


図4. DNA-PK自己リン酸化とHR進行速度
CAB (□)、RIC1 (■) へのγ線照射後の (A) DNA-PKのThr2609リン酸化フォーカス数 (n>20) 及び (B) NBS1フォーカス数 (N=3) の経時変化を平均値で示す。エラーバーはSEMを示す。
*P<0.05

3. RIC1 細胞における 53BP1 挙動解析

DNA-PK の解離は HR だけでなく C-NHEJ の進行にも必要であり、DNA-PK 活性低下時には C-NHEJ も阻害されていることが報告されている (図 3)。しかし、RIC1 細胞では EJ アッセイによって僅かな EJ 修復率の上昇がみられた (図 2B)。EJ アッセイは、C-NHEJ だけでなく A-NHEJ、ATM 型 NHEJ を検出していること、また DNA-PK の DSB 部位への結合が A-NHEJ 進行を阻害することが報告されていることから、DNA-PK 活性低下時に ATM 型 NHEJ が働くことで、HR 低下をもたらしているという仮説を立てた。53BP1 (p53 binding protein 1) は、ATM 型 NHEJ に関わる因子であり、DSB 部位へと結合することが報告されていることから、RIC1 細胞における 53BP1 の挙動を解析した。TagFP635 タグを付けた 53BP1 を発現した RIC1 細胞及び CAB 細胞に、405nm のレーザー照射により核内の特定の場所に DNA 損傷を多量に誘発し、損傷部位への 53BP1 集積を解析した。その結果、RIC1 細胞では DNA 損傷部位への 53BP1 の集積量が CAB に比べて有意に増加した (図 5)。これらの結果から、DNA-PK 活性低下時に ATM 型 NHEJ が強く働いていることが示唆された。p53 は 53BP1 と結合する。また、p53 は DNA-PK の有無、活性に依存せずに DSB 末端へと結合し、リン酸化される。一方で、53BP1 機能への p53 の寄与はこれまでに明らかとなっていない。したがって、p53 が DNA-PK に依存せずに 53BP1 の DSB 部位への集積を促すことで、DNA-PK 活性低下時に ATM 型 NHEJ 能が上昇していることが考えられる。そこで、p53 欠損細胞において 405nm のレーザー照射後の損傷部位への 53BP1 挙動を調べた。その結果、p53 欠損細胞では 53BP1 の損傷部位への集積量が野生型細胞に比べて有意に増加していた。これは哺乳類細胞でも報告のない知見である。これらの結果から、p53 が 53BP1 を介して ATM 型 NHEJ を制御していることが示唆された。

【結論】

本研究によって、DNA-PK 活性低下時に ATM 型 NHEJ 能が上昇していることが示唆された。また、これまでに 53BP1 の DSB 部位への集積は DNA-PK 欠損による影響を受けないことが報告されている。さらに、DSB 部位からの DNA-PK の解離が遅延するような DNA-PK 活性低下変異体では C-NHEJ、HR、A-NHEJ が阻害されるが、DNA-PK 欠損では HR、A-NHEJ による修復が可能であることが報告されている。このことから、ATM 型 NHEJ は DNA-PK の活性や有無に依存しない修復経路であるが、他の修復経路が働くことのできる状況下では抑制されていることが考えられる。また、p53 欠損によって 53BP1 の集積量が増加した。p53 は DNA-PK に依存せずに活性化され、DSB 末端と結合することが知られていることから、本研究により p53 が 53BP1 を介して ATM 型 NHEJ を制御しているモデルが提唱される (図 6)。

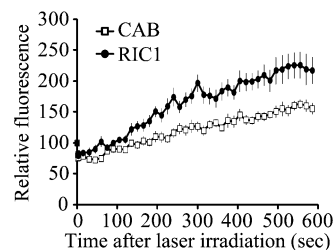


図5. レーザー照射点への53BP1集積

405nmレーザーを核内局所に照射後の照射点へのTagFP635-53BP1の集積量を、非照射時の蛍光強度を100とした相対値として示す。エラーバーはSEMを示す。n>20

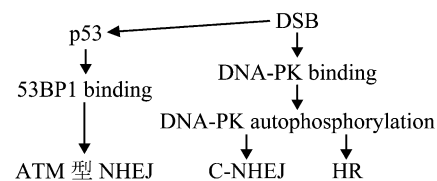


図6 DNA-PK自己リン酸化と53BP1の関係