

課題番号 30

DNA 二重鎖切断の末端結合反応に関わる 高次複合体の成分と形成過程

[1] 組織

代表者：松本 義久

(東京工業大学原子炉工学研究所)

対応者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：Mukesh Kumar Sharma

(東京工業大学原子炉工学研究所)

福地 命

(東京工業大学大学院総合理工学研究科)

研究費：物件費22万5千円，旅費2万5千円

[2] 研究経過 (以下10.5ポイント)

DNA 二重鎖切断は、放射線によって生じる種々のDNA 損傷の中で最も重篤なものであり、がん治療の成否、副作用の有無の鍵を握る。また、細胞増殖過程や酸化ストレス、組換えの過程で絶えず生じており、ゲノムの安定性と可塑性を支える。

哺乳動物細胞を含め、真核細胞において、DNA 二重鎖切断は主として、非相同末端結合(NHEJ)と相同組換え(HR)によって修復される。NHEJは空間的に最も近接するDNA 末端同士を結合する反応で、センサーであるKu86/70、DNA-PKcs、末端同士の結合を担うXRCC4/DNA ligase IVおよび2006年に発見されたXLF(Cernunnos)が中心的な役割を担うと考えられている。しかし、免疫系組織などにおける生理的な組換え過程でもDNA 切断の結合に先立って整形(processing)が行われる場合が多く、Artemis、WRN、pol μ 、pol λ 、PNKなど多くの酵素が関与する。放射線によって生じたDNA 損傷は末端の形状が様々で、整形過程はなおさら複雑であることが予想される。このような反応の場としてヌクレオソーム、クロマチンなどの高次構造、核マトリックスとの相互作用が重要である。また、DNA 損傷は修復機構とともに、細胞周期チェックポイントや、場合によっては、アポトーシスを引き起こす。更に、DNA 修復とDNA 複製や転写との協調機構の存在も考えられる。一般的に、NHEJはHRに比べて単純な反応機構であると考えられているが、実際には極めて多くの分子に関わる複雑な反応であると考えられる(図1)。

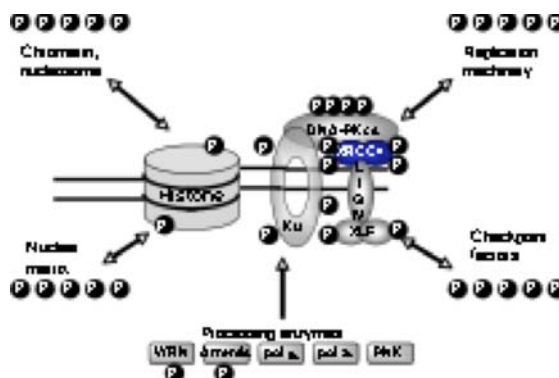


図1 NHEJによるDNA二重鎖切断修復機構の全体像

本研究は、この複雑なNHEJによるDNA二重鎖切断修復機構の全体像を明らかにするために、非相同末端結合反応を行う複合体を単離し、その成分を同定し、また、この複合体の形成過程を明らかにすることを目的として行った。具体的内容としては、XRCC4を含む複合体の単離、成分同定を試みた。

以下、研究活動状況の概要を記す。

メール連絡等で随時、討論を行いながら、研究を進めた。平成23年2月1日、13:30より、東北大学加齢医学研究所にて、代表者、対応者に加え、菅野新一郎博士、および分担者の福地命出席のもと、研究打合せを行った。代表者から、これまでに得られている基礎的データや研究材料などについて説明を行い、研究の進め方を討論し、必要な実験材料等の授受を行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第1に、これまでの結果を踏まえて、XRCC4のリン酸化状態とタンパク質間相互作用の相関を解析した。具体的には、NHS-activated FF beadsに非リン酸化型およびリン酸化型のペプチドを結合させ、これにヒト培養細胞の抽出液を加え、段階的にNaCl濃度を上げながら結合分子を溶出した。溶出分子をSDS-PAGEによって分離し、銀染色を行った結果、非リン酸化型ペプチド特異的なバンドを7本、リン酸化型ペプチド特異的なバンドを1本視認することができた(図2)。

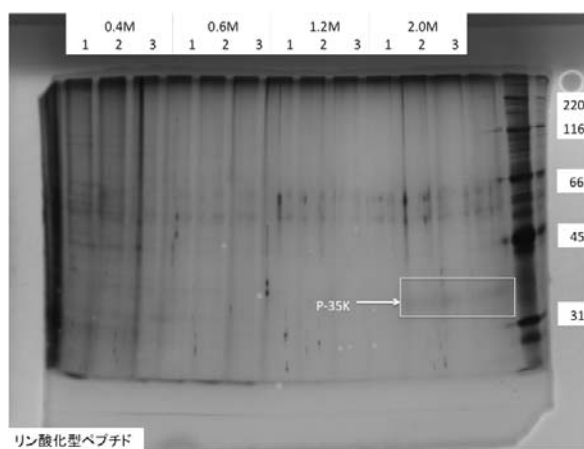
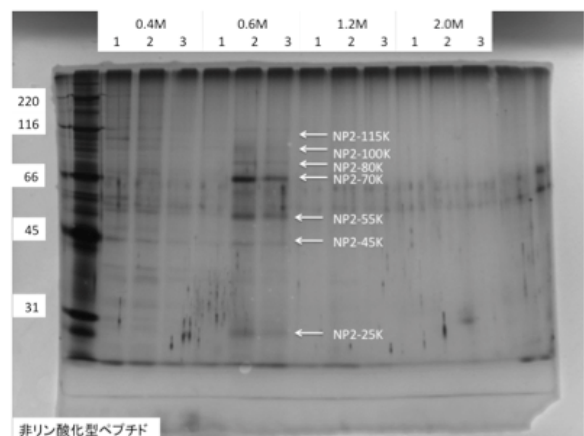
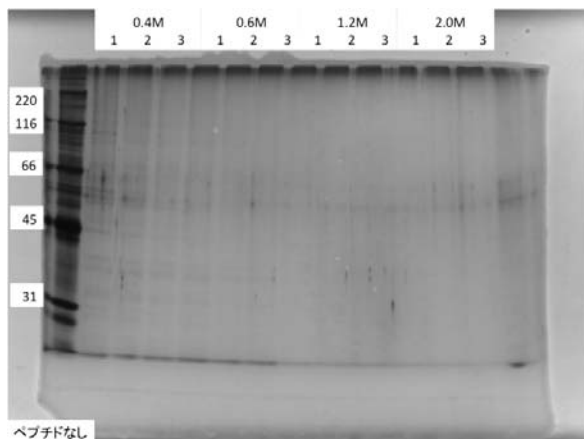


図2 XRCC4 のリン酸化状態依存的に結合するタンパク質の探索結果 上から、ペプチドなしビーズ、非リン酸化型ペプチド結合ビーズ、リン参加ペプチド結合ビーズに結合した分子を 0.4、0.6、1.2、2.0M の NaCl を含むバッファで順次溶出したもの。非リン酸化型ペプチド特異的なバンド(NP2-115K、100K、80K、70K、55K、40K、25K)およびリン酸化ペプチド特異的なバンド P-35K が認められた。

これらのバンドを切り出し、質量分析法による同定を試みた。その結果、非リン酸化型ペプチド結合分子の一部に細胞接着や小胞体機能に関わる分子が認められた。この結合が細胞内で実際に起こっているものであるか、意義があるものかについては、今後の検討が必要である。また、これらの分子は細胞内含量が高いものであり、より少量の成分の中に DNA 修復において重要な分子が存在する可能性も考えられる。そのような少量、微量成分の検出、同定、意義解明を引き続き行っていきたい。

第2に、生化学的分画法を用いて、放射線照射後の XRCC4 のクロマチンへの結合の解析を行った。siRNA や欠損細胞を用いた解析から、2つの分子が XRCC4 のクロマチンへの結合を促進することが明らかになった。また、XRCC4 の種々の変異体を作製し、同様の解析を行なった結果、一部の變異体でクロマチン結合の遷延が認められた。これらの結合を生細胞内でリアルタイムに解析するために、GFP 融合タンパク質を作製した。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究の成果の発表も含め、56th Radiation Research Society (米国放射線学会、マウイ、2010年9月25-29日)および日本放射線影響学会第53回大会(京都、2010年10月20-22日)において、DNA二重鎖切断修復に関するシンポジウム・ワークショップを行った。前者に関しては、日本学術振興会の国際学会等派遣事業に採択され、渡航費などの援助を受けた。

本研究では、特に XRCC4 に焦点を当て、新たな XRCC4 結合分子、DNA-PK による新たなリン酸化部位など、NHEJ 反応の新たな制御機構の端緒を見出した。今後の検討により、DNA 二重鎖切断修復機構の更なる理解とがんの診断・治療への応用につながる成果が期待される。

[4] 成果資料

(1) Kamdar, R.P. and Matsumoto, Y. DNA double-strand break repair through non-homologous end joining: recruitment and assembly of the players. In "DNA Repair Book 4", InTech, ISBN 979-953-307-187-8, in press (2011)

(2) 松本義久、Mukesh Kumar Sharma, Radhika Pankaj Kamdar 「非相同末端結合の素過程の解明と臨床応用への展望」 癌の臨床 56, 431-435 (2010).