

DNA 二重鎖切断修復の分子機構と がん放射線治療への応用に関する研究

[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：坂田 耕一
 (札幌医科大学医学部)
 福地 命
 (東京工業大学大学院総合理工学研究科)
 劉 嗣誠
 (東京工業大学大学院理工学研究科)

研究費：物件費50万円

[2] 研究経過

DNA 二重鎖切断(DSB)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(図1)。NHEJにおいては、DSBセンサーであるKu86/70、DNA-PKcs、末端同士の間を担う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。我々は、これまでに、XRCC4において4カ所、XLFにおいて2カ所のDNA-PKによる新規リン酸化部位を同定した。XRCC4のリン酸化部位のうち3カ所については変異の導入による放射線感受性の上昇が認められており、DSB修復において重要な意義を担うことが予想される。また、我々は、最近、dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD)阻害剤で、5-FU増強剤として用いられているGimeracilが、HRを阻害することにより、放射線感受性を増強することを見出した(Takagi et al., 2010)。このことから、DPYDがHRにおいて何らかの役割を担うことが示唆された。

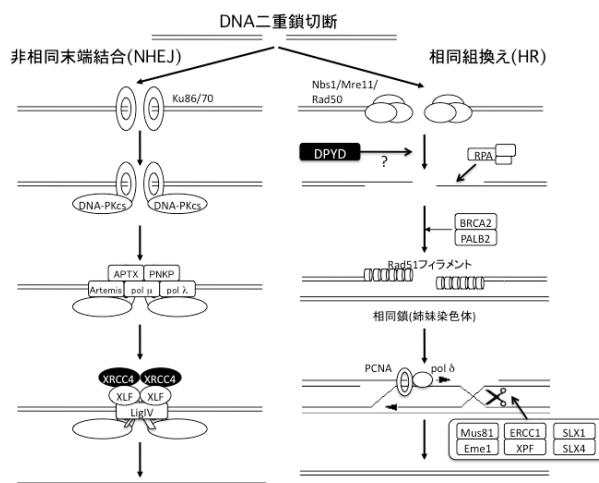


図1 DNA二重鎖切断修復機構とXRCC4, DPYDの役割

本研究は、上記の成果を進展させ、DNA二重鎖切断修復の分子機構の更なる理解とともに、がん放射線治療への応用、特に放射線増感剤の開発に向けた基盤を築くことを目的とする。具体的には、生細胞核局所照射技術、プロテオーム解析技術を用いて、①XRCC4のリン酸化によるタンパク質間相互作用調節の解析、②DPYDのHRにおける機能解明の一助とするための結合分子探索を行った。

以下、研究活動状況の概要を記す。

研究期間内の打合せは、代表者と対応者および協力者・菅野新一郎博士の間で、主にメールで行った。平成23年4月から5月にかけて、今年度の計画を確認した。また、①に関する第1回目の質量分析を行い、その結果について討議した。平成23年8月から9月にかけて、①に関する第2回目の質量分析を行い、その結果について討議した。平成23年12月に、②に関する研究材料の授受、質量分析の準備のための討議を行った。平成23年1月から3月にかけて、②に関してDPYD結合タンパク質の単離、質量分析による同定を行い、その結果について討議した。

[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、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。これをSDS-PAGEで展開し、銀染色を行った後、リン酸化状態によって違いが見られるバンドを切り出し、質量分析を行った。

第2に、DPYDに結合するタンパク質の探索を行った。まず、ヒト培養細胞cDNAプールからPCRによってDPYD cDNAを単離し、3X FLAG タグ付きの発現ベクターに挿入した。このベクターをHeLa細胞に導入したところ、予想される分子量の位置に発現が見られた(図2)。更に、tetracyclin promoterの制御下でFLAGタグ付きのDPYDを発現するベクターを構築し、Flp-in T-REx293細胞に導入し、安定発現株を樹立した。この細胞の細胞質からFLAG抗体を用いた免疫沈降を行い、SDS-PAGEで展開後、銀染色し、DPYD発現細胞でDoxycyclin処理後特異的に見られるバンド3本を切り出し、質量分析を行った(図3)。その結果、13種類のタンパク質が同定されたが、その中でRNAスプライシングに関連する因子が複数見られた。この結合が細胞内で実際に起こっているか、また、これらの分子がHRに関わっているかなどを今後検討していきたい。

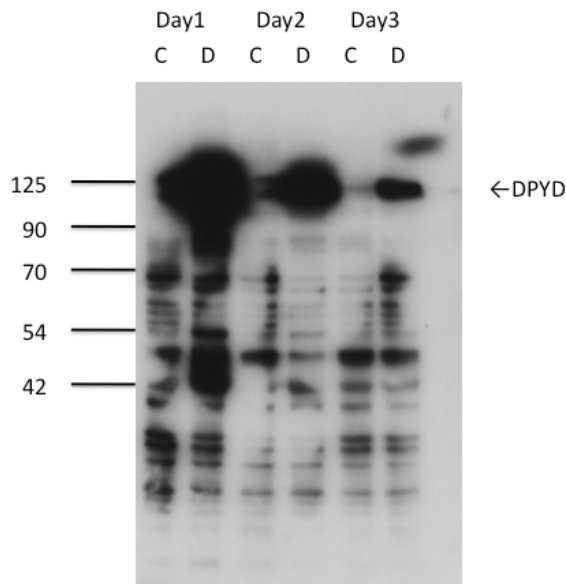


図2 HeLa細胞におけるDPYD強制発現

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究の成果は、DNA二重鎖切断修復の分子機構の理解の進展とともに、がん放射線治療への応用も期待される。XRCC4については、リン酸化を標的とした新たな放射線増感剤開発につながる可

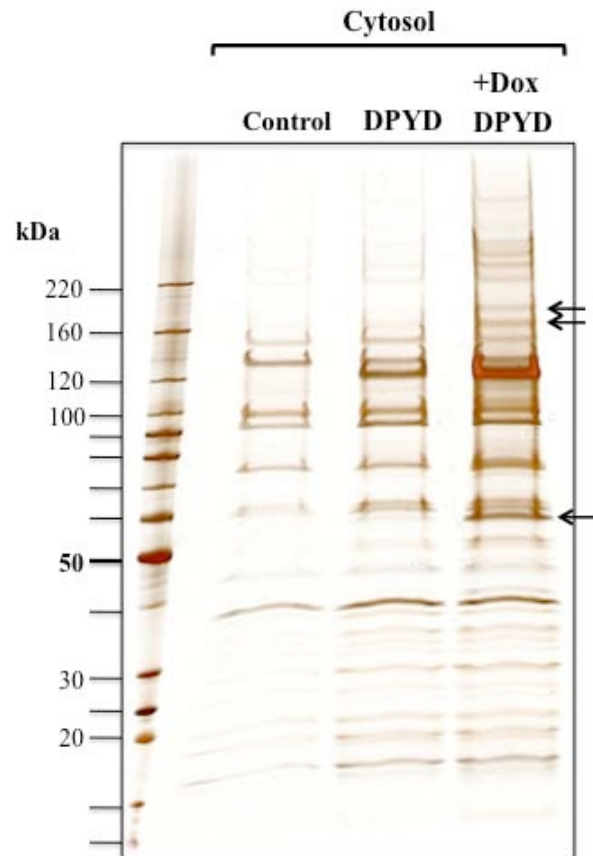


図3 DPYD結合タンパク質の探索

能性がある。また、DPYDについては、2010年に我々が放射線増感効果と相同組換え抑制効果を報告したときには、機構が全く不明であったが、本共同研究において結合分子が同定されたことにより、飛躍的進展が期待される。

[4] 成果資料

(1) Sakata, K., Someya, M., Matsumoto, Y., et al. Gimeracil, an inhibitor of dihydropyrimidine dehydrogenase, inhibits the early step in homologous recombination. *Cancer Sci.*, **102**, 1712-1716 (2011)

(2) Takagi, M., Sakata, K., Someya, M., Matsumoto, Y., et al. The combination of hyperthermia or chemotherapy with gimeracil for effective radiosensitization. *Strahlenther. Onkol.*, 2012 Feb 11 Epub ahead of print.

(3) 松本義久 「DNA二重鎖切断に対する生態防御機構と医療応用」 表面科学 32(9), 569-574 (2011).

(4) 松本義久 「DNA二重鎖切断の修復とシグナル伝達」 細胞 The CELL 43(6), 4-8 (2011).