

課題番号 58

DNA複製や転写を介したDNA二本鎖切断の修復経路解析

[1] 組織

代表者：逆井 良

(金沢医科大学 医学部)

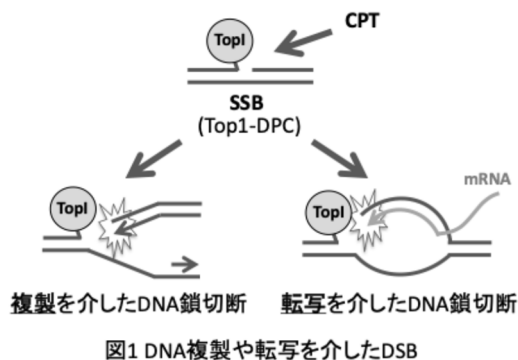
対応者：宇井 彩子

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 13 万円

[2] 研究経過

活性酸素や塩基修飾の修復過程により誘導されるDNAの一本鎖切断 (single-strand break: SSB) は、DNA複製や転写とぶつかることで、二次的にDNA二本鎖切断 (double-strand break: DSB) へと変換されることが知られている。抗がん剤としても利用されるカンプトテシン (CPT) は、DNAトポイソメラーゼ I (Top1) の阻害剤であり、Top1の反応をトラップするため、Top1がDNAと共有結合した反応中間体、Top1-DNA protein crosslink (DPC) が蓄積する。Top1-DPCはSSBを含むため、DNA複製や転写を介した二次的DSBを誘導することができる (図1)。



DNA複製を介したDSBは、放射線等によって誘導されるDSBと異なり、DNA断端が一つしかないと考えられる。これまでの研究から、相同組換え修復 (homologous recombination: HR) に欠損を持つ細胞はCPTに強い感受性を示すことから、DNA複製を介したDSBはHRで修復されると考えられている。しかし、実際にどのようにHR経路が優位に引き起こされるのか、その機序は不明な点が多い。一方、転写を介したDSBに関しては、その発生機序から修復過

程まで、まだ解析はあまり進んでいない。我々を含めたいくつかの研究グループが、CPT処理後に転写依存的に生じる γ H2AXや53BP1 fociに注目して解析した結果、DSBが誘導されていることを示し、塩基除去修復やヌクレオチド除去修復等の因子がDSBの発生に関与していることを報告している。さらに最近、DNAヘリカーゼであるRecQL5が、転写を介したDSBの発生に影響することを見出しており、その解析を進めているところである。これら、DNA複製や転写を介した二次的DSBがどのように生じ、どう修復されていくのか、その解明を大きな目的として、本研究を進めている。

本研究課題では、加齢医学研究所の宇井彩子准教授との共同研究を通して、上記の分子機序の解明に臨んだ。研究に先立ち、宇井准教授と数回に渡り対面およびZoomを用いたオンラインでのディスカッションを行った。本研究課題では特に、転写を介したDSBの発生、修復機序に焦点を当てて研究を進めることとし、現在解析途中であるRecQL5の相互作用因子の同定を試みた。CPT処理の有り無しでRecQL5に対して免疫沈降を行い、共沈してくる因子の中でもCPT処理により変動を示すものに対し、質量分析による相互作用因子の同定を試みる。メールやオンラインディスカッションにより、免疫沈降の条件や質量分析のサンプル調整等について打ち合わせを行なった。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本共同研究の実施により得られた研究成果を以下に記す。まず、RecQL5の免疫沈降を行うに際し、GFP-RecQL5を発現する細胞を作成した。GFP-RecQL5はテトラサイクリンで発現誘導できるようにし、GFP-RecQL5の免疫沈降は、GFP抗体がアガロースビーズに結合したGFP-trapを用いて行なった。

免疫沈降の結果、高分子量のタンパク質群の中に、CPT処理により出現するバンド、および、減少するバンドを認め、これらのバンドを切り出し、質量分析を行なった (図2A~Dのバンド)。その結果、CPT処理後に出現するバンドについては残念ながら同定には至らなかったが、減少するバンドに関してはProtein Xと同定できた (既知因子だが、データマネージメントの観点からXとする)。

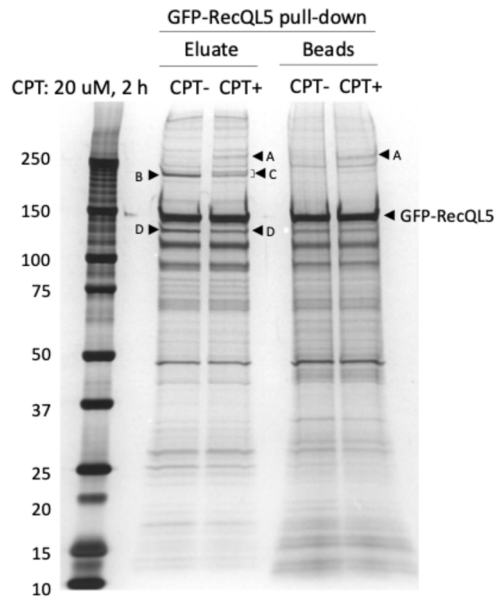


図2 RecQL5と共沈するタンパク質群と質量分析対象

質量分析で同定された X との相互作用を確認するため、再度 RecQL5 で免疫沈降し、ウェスタンブロットによる検出を試みた。X はリン酸化によりバンドが大きくシフトし、ダブルットとして検出される。CPT 処理により、非リン酸化フォームが減り、リン酸化フォームが増えることが報告されている。免疫沈降の結果、共沈した X においても、CPT 未処理では非リン酸化フォームが主に検出され、CPT 処理後には、リン酸化フォームが強く検出された。しかし、共沈される X の総量としては CPT 処理後に減っていた。したがって、CPT による転写ストレスが生じると、X がリン酸化されるが、RecQL5 はそこから解離していくことが示唆された。

(3-2) 波及効果と発展性など

CPT は古くから DNA 損傷誘導薬剤として基礎研究で使われ、臨床的にも抗がん剤として使用されてきており、現在においても多くのがんで適用が認められている。また最近では、がん特異的抗体に薬剤を結合させた抗体薬物複合体 (ADC) に Top1 阻害剤が利用され始めており、顕著な抗腫瘍効果が認められている。また、転写を介した DSB は、post-mitotic な細胞でのゲノム安定性に影響することが予想され、神経変性疾患等の病態解明につながる可能性が考えられる。実際、トラップされた Top1 を切り離す酵素である TDP1 の変異は、神経変性疾患の原因となることが知られている。したがって、Top1 阻害剤による二次的 DSB に対する細胞応答の理解は、生物学的のみならず、臨床的にも非常に重要であると考えられる。本共同研究により、Top1-DPC で転写が停止した際に、DSB が生じる

段階での RecQL5 の機能の理解が進む可能性が示された。本研究の進展は、転写を介したゲノム不安定化という新たな機構を解明する一端になると考えられる。

[4] 成果資料
なし