

DNA 損傷の可視化を介した新規ゲノム修復機構の解明

所属：広島大学統合生命科学研究科数理生命科学プログラム

助成対象者：津田 雅貴

共同研究者：なし

概要

放射線は、DNA 二本鎖切断 (DSB) を誘発しゲノム DNA に重篤な損傷を与える。これまでに、多くの先行研究により放射線誘発 DSB の修復機構の詳細が明らかにされた。一方、抗がん剤として使われる放射線類似作用物質 (ブレオマイシンやカリケアミシン) も DSB を生成することが知られており、その修復機構は放射線誘発 DSB と同じと考えられてきた。本研究では、チロシル-DNA ホスホジエステラーゼ 1 (TDP1) および TDP2 による放射線類似作用物質誘発 DSB の修復への関与を明らかにした。さらに、TDP 標的損傷を特異的に標識する手法を開発した。

abstract

Ionizing radiations induce free radicals in DNA constituents and thereby produce DNA double-strand breaks (DSBs). The repair mechanism of radiation-induced DSBs has been clarified by the previous studies. Radiomimetic drugs such as bleomycin and calicheamicin also generate free radicals in DNA constituents and give rise to DSBs. However, the repair mechanism of DSBs induced by radiomimetic drugs remains largely elusive. In the present study, to identify the gene mutation which enhances the sensitivity to bleomycin and calicheamicin, we analyzed the sensitivity of human TK6 cells deficient in DNA repair genes. We found that tyrosyl-DNA phosphodiesterase (TDP) 1/2-double mutant cells show

hypersensitivity to radiomimetic drugs, but not to X-rays. This result suggests that radiomimetic drugs-induced, but not radiation-induced, DSBs are repaired by a novel pathway involving TDP1 and TDP2. In addition, I established the detection method for the DNA lesion removed by TDP1 and TDP2.

研究内容

【背景】

1、カンプトテシンは TOP1cc を形成させる

トポイソメラーゼ 1 (TOP1) やトポイソメラーゼ 2 (TOP2) は、DNA 複製や転写 (遺伝子発現) の際に生じる DNA の超らせん構造を解消するために必須の酵素である。TOP1 は一過的に 1 本鎖切断 (single-strand break: SSB)、TOP2 は 2 本鎖切断 (double-strand break: DSB) を発生させることで超らせんを解消する。TOP1 は反応中間体として、DNA の 3' 切断端と活性部位のチロシン残基が共有結合した複合体 (TOP1 covalent complex: TOP1cc) を形成する。抗がん剤であるカンプトテシン (CPT) は TOP1cc を安定化し、TOP1 を DNA 切断末端にトラップすることにより 1 本鎖切断を蓄積させる。一方、TOP2 は DNA の 5' 切断端と活性部位のチロシン残基が共有結合した複合体 (TOP2 covalent complex: TOP2cc) を形成する。抗がん剤であるエトポシド (ETP) は TOP2cc を安定化させ DSB を蓄積させる。

2、TOP1cc は 2 段階のステップを経て除去される

チロシル-DNA ホスホジエステラーゼ 1 (TDP1) は、チロシンと DNA の 3' 端リン酸の結合 (ホスホチロシン結合) を加水分解する活性をもつ。この活性が、DNA 末端に共有結合した TOP1cc を除去するために重要である。実際、*TDPI* 遺伝子を破壊した酵母や哺乳類細胞は、CPT に対して高い感受性を示すことが知られている。また、生化学的解析から、TDP1 タンパク質は全長の TOP1 タンパク-DNA を除去できないが、ペプチドレベルまで消化された TOP1cc は除去できる。この知見に一致して、X 線結晶回折から、TOP1 タンパクは非常に大きい為に、TDP1 が DNA-TOP1 間のホスホチロシン結合にアクセスできないことが知られていた。一方、細胞へのカンプトテシン (CPT) 処理は、ポリユビキチン-プロテアソーム経路を介して TOP1cc のタンパク分解を引き起こす。これらの研究に基づき、TOP1cc の除去では、1 段階目に、プロテアソームによる TOP1cc のタンパク分解が起き、2 段階目に、ペプチドレベルになった TOP1-DNA のホスホチロシン結合が TDP1 によって加水分解されると推

定されていた。研究代表者は、1段階目と2段階目それぞれの修復動態を細胞レベルで計測できる実験系を確立し、このモデルが正しいことを証明した[1]。

3、TDP2の反応機構

TDP2が関与するTOP2ccの除去経路には、プロテアソーム依存的経路と非依存的経路の2種類が存在することを明らかにした。プロテアソーム依存的経路は、TOP1cc除去と同様に2段階の反応が起きる。具体的には、1段階目にプロテアソームによるTOP2ccのタンパク分解が起き、2段階目に、ペプチドレベルになったTOP2-DNAのホスホチロシン結合がTDP2によって加水分解される。一方、プロテアソーム非依存的経路では、タンパク分解を受けていないTOP2ccがTDP2によって直接除去されることを明らかにした[2]。TDP2は、5'-チロシルDNAホスホジエステラーゼ活性の他に、弱い3'-ホスホジエステラーゼ活性を有する。マウスやニワトリの細胞を用いた研究から、3'-ホスホジエステラーゼ活性を有するTDP1が欠損した時に、TDP2の3'-ホスホジエステラーゼ活性がバックアップすることが示唆された。研究代表者も、この表現型がヒトTK6細胞でも再現できることを明らかにした。さらに研究を進め、TDP2の3'-ホスホジエステラーゼ活性がTOP1cc除去の2段階目で働くことを明らかにした[1]。

4、放射線および放射線類似作用物質が生成するDSB

放射線は、フリーラジカル反応により飛跡に沿ってDNA損傷を誘発し、その結果DNA二本鎖切断(DSB)が生成する。放射線が誘発するDSBの修復については精力的に研究が行われ、詳細な分子機構が明らかにされた。放射線類似作用物質であるブレオマイシン(BLM)やカリケアミシン(CLM)などもフリーラジカル反応により局所的な多重DNA損傷を誘発し、DSBを生じる。放射線類似物質の一本鎖切断(SSB)とDSBの生成比は5:1~20:1であり、この比は放射線によるSSBとDSBの生成比(20:1)に近い。それゆえ、放射線類似作用物質は放射線と同様な生物作用を示すと考えられている。しかし、TDP1やTDP2がDSBの修復に関与するのか不明である。

【目的】

TDP1やTDP2がDSB修復に関与するかを、ゲノム編集細胞を用いた遺伝学的解析から明らかにする。

【結果】

1、TDP1・TDP2は放射線類似作用物質が誘発するDSB修復に関与する

TDPがDSB修復に関与するかを調べる目的で、ヒトTK6細胞由来のTDP1遺伝子欠損細胞(TDP1-KO)、TDP2遺伝子欠損細胞(TDP2-KO)、TDP1/TDP2二重遺伝子欠損細胞(TDP1/TDP2-DKO)の放射線(X線)および放射線類似作用物質

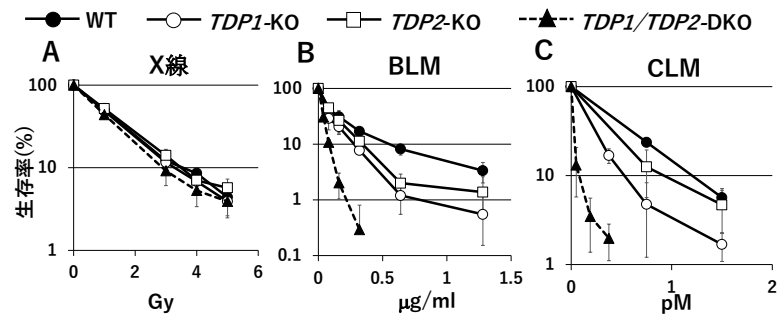


図1 TDP1・TDP2欠損細胞のX線・放射線類似作用物質 (BLM, CLM) に対する感受性

(BLM, CLM) に対する感受性を調べた。これらの遺伝子欠損細胞のX線感受性は、野生型細胞(WT)と同程度であった(図1)。一方、BLMおよびCLMに対しては、TDP1-KO・TDP2-KOともにWTより高い感受性を示し、TDP1/TDP2-DKOは単一遺伝子欠損細胞よりさらに高い感受性を示した(図1)。また、この感受性がDSB修復の遅延によるものなのかを調べるために、DSB修復動態を中性コメットアッセイで調べた。上記遺伝子欠損細胞の放射線誘発DSBの修復速度は、野生型と同じであった。一方、単一遺伝子欠損細胞のブレオマイシン誘発DSBの修復速度は野生型より遅延した。さらに、TDP1/TDP2-DKOのブレオマイシン誘発DSBの修復速度は、単一遺伝子欠損細胞より遅延した。この結果から、放射線と放射線類似作用物質が誘発するDSBには質的な違いがあり、後者はTDP1およびTDP2が共同する新規な経路により修復される可能性が示唆された。

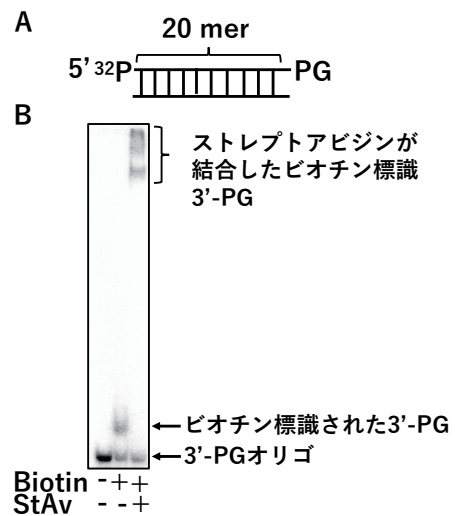


図2 3'-PG損傷のビオチン・ストレプトアビジン標識生成物の分析

(A) DNA損傷として3'末端に3'-PGをもつオリゴの5'末端を³²Pで放射性標識し、二本鎖DNAを調製した。ビオチン標識(Biotin)し、ストレプトアビジン(StAv)を反応させ、生成物をnative PAGE分析した。

(B) 反応生成物の電気泳動結果

2、DNAに生成した3'-PGを検出する手法の確立

ブレオマイシン・カリキアミシン特異的に誘発するDNA損傷として、3'-グリコールリン酸(3'-PG)が知られている。そこで、3'-PGのカルボン酸末端をcarbodiimide/sulfo-NHSで活性化し、ビオチン標識する方法を考え、この方法が有効かを調べた。ビオチン標

識効率は 70%であった(図 2)。さらに、3'末端ビオチンはストレプトアビジンと定量的に結合した。なお、本実験で用いた 3'-PG を含むオリゴヌクレオチドは、大阪大学の岩井教授・山元准教授と共同研究を行い、化学的に合成したものを使用した。

【引用文献】

- [1]: Tsuda M, Kitamasu K, Kumagai C, Sugiyama K, Nakano T, Ide H. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) repairs topoisomerase 1 DNA-protein crosslinks and 3' -blocking lesions in the absence of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1). *DNA Repair*. 91-92: 102849 (2020)
- [2]: Tsuda M, Kitamasu K, Hosokawa S, Nakano T, Ide H. Repair of trapped topoisomerase II covalent cleavage complexes: Novel proteasome-independent mechanisms. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 39(1-3):170-184 (2020)

【本助成に関わる成果物】

[論文発表]、[口頭発表]、[ポスター発表] 現時点では、いずれもなし

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり多大なご支援を賜りました公益財団法人住友電工グループ社会貢献基金に厚く御礼申し上げます。