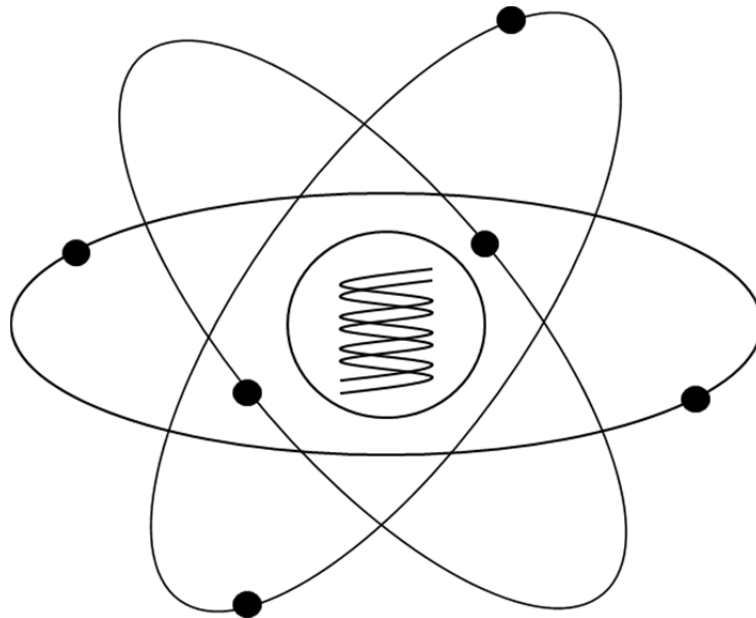


論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	DNA二重鎖切断修復に関わるXRCC4/DNA ligase IV複合体の制御機構に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	福地 命
Author(English)	Mikoto Fukuchi
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9922号, 授与年月日:2015年5月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:松本 義久,小栗 慶之,河野 俊之,松藤 成弘,岩崎 博史
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9922号, Conferred date:2015/5/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

DNA 二重鎖切断修復に関わる XRCC4/DNA ligase IV 複合体の 制御機構に関する研究



福地 命

総合理工学研究所 創造エネルギー専攻

指導教員 松本義久

目次

第 1 章—序論

1.1	放射線の生物作用	2
1.1.1	放射線の生物作用	2
1.1.2	放射線の標的分子 DNA	3
1.1.3	放射線による DNA 損傷	4
1.2	DNA 二重鎖切断修復の分子機構	6
1.2.1	相同組換え (HR) と非同末端結合 (NHEJ)	6
1.2.2	相同組換え (HR) の分子機構	7
1.2.3	非同末端結合 (NHEJ) の分子機構	7
1.3	XRCC4 の翻訳後修飾	12
1.4	本研究の目的	13
1.5	参考文献	14

第 2 章—投稿準備中のため概要のみ公開

第 3 章—XRCC4 K271R および K210R 変異体の解析

3.1	本章の目的	59
3.2	実験方法	61
3.2.1	使用した細胞とその培養方法	
6		1
3.2.2	XRCC4 K210R 変異体の作製	
6		1
3.2.2	siRNA	

6	1
3.2.3 Lipofection	
6	2
3.2.4 XRCC4 及び DNA ligase IV の細胞内局在の解析	
6	3
3.2.5 免疫沈降による XRCC4 と DNA ligase IV の相互作用の解析 . 64	
3.2.6 γ H2AX 蛍光免疫染色	
6	4
3.3 結果	66
3.3.1 内在性 XRCC4 ノックダウン	
6	6
3.3.2 XRCC4 K271R の核局在機能欠損	
6	8
3.3.3 XRCC4 K271R 変異体	
7	3
3.3.4 変異体 XRCC4 の DNA 二重鎖切断修復	
7	5
3.3.5 XRCC4 K271R 及び K210R 変異体	78
3.3.6 XRCC4 WT、K210R、K271R の Surviveing Fraction	79
3.3.7 XRCC4 WT、K210R、K271R の DNA 二重鎖切断修復の評 価	80
3.4 考察	83
3.5 参考文献	87

第 4 章—投稿準備中のため概要のみ公開

第 5 章—投稿準備中のため概要のみ公開

第 6 章—投稿準備中のため概要のみ公開

第 1 章

序論

1.1 放射線の生物作用

1.1.1 放射線の生物作用

今日、我が国において癌は 1981 年以来、死因の第一位であり、2007 年の統計では約 30%（年間死亡者数 1,108,334 人中 336,468 人）を占める[1]。この癌の治療において放射線は外科手術、化学療法と並んで重要な役割を担っている。一方で、広島、長崎における原子爆弾や東海村臨界事故などの事例が示すように、放射線が人体にとって重篤な影響を及ぼすこともある。

放射線の生物作用を考える際、その量は吸収線量で表されることが多い。吸収線量とは単位質量の物質に与えられるエネルギーである。吸収線量の単位はグレイ（Gy）であり、1 Gy=1 J/kg である[2]。ヒトが全身に 4 Gy の放射線をあびて、無菌治療、骨髄移植などの適切な処置を施さなければ、60 日以内に半数が死に至るといわれている。これを半数致死線量（LD_{50/60}）という。これをグラムあたりのカロリーに換算すると

$$4 \times 0.24 \div 1000 \div 0.001 \text{ [cal/g]}$$

となる。体の大部分が水であり、したがって、その比熱は水とほぼ等しいとすると、半数致死線量は、体温をわずか 0.001℃上昇させる熱エネルギーに相当する。また、力学的エネルギーとしては、

$$4 \div 9.8 \div 0.41 \text{ [m]}$$

だけ体を持ち上げるのに必要な力学的エネルギーに相当する。このように、放射線は極めて低いエネルギーで、生体に大きな影響をもたらす。

我々ヒトの体はさまざまな組織、臓器から構成されるが、組織、臓器ごとに放射線の影響の受けやすさが異なる。放射線の影響の受けやすさを「放射線感受性」という。一般に、細胞分裂がさかんな組織ほど放射線感受性が高く、一

方、分裂をほとんどしていない細胞は放射線感受性が低いとされる[2]。これは、1906年にBergonieとTribondeauによって報告され、Bergonie-Tribondeauの法則という。体内で最も放射線に敏感なのは白血球であり、0.25 Gy以上の放射線を浴びると数時間後から顕著な減少が認められる。生殖組織、すなわち、男性の精巣、女性の卵巣も放射線感受性が高く、男性では0.15 Gy以上、女性では0.65 Gy以上の被ばくで一時不妊を生じる。また、消化管も放射線感受性が高く、ヒトが一度に10～15 Gyの放射線を被ばくすると、2～3週間以内に消化管の傷害に起因する感染、出血で死亡する。一方で、筋肉組織、神経組織などは放射線の影響を受けにくい。

これらのことから、放射線は極めて小さなエネルギーで、細胞の増殖能力に著しい影響を与えること、言い換えれば、放射線は増殖に関連した特異的な標的にエネルギーを付与することによって作用を発揮することがうかがえる。この標的の具体的実体は遺伝情報を担うDNAであると考えられている。

1.1.2 放射線の標的分子 DNA

放射線は物質にエネルギーを付与し、励起または電離する。生体を構成する分子はDNAの他に、RNA、タンパク質、脂質、水などがあり、放射線はこれらすべての分子を励起または電離することができる。しかしながら、特にDNA分子の励起、電離は、他の分子の励起、電離に比べて、生体への影響が極めて大きいと考えられる。第一に、DNAは生命の設計図といわれる。RNAやタンパク質は細胞内に設計図が正確に残ってさえいれば、正しく作られ、機能を果たすことができる。一方で、放射線によって設計図自体が壊されると、これらの分子を作ることができなくなり、生存が脅かされることが考えられる。第二に、DNAは細胞内で唯一つの存在であり、同じものは存在しないということである。

ヒトは 46 本の染色体を持っており、半分を父親、残り半分を母親から受け継いでいる。男性の性染色体以外はほぼ同じものが二つ存在するが、わずかに異なるもの（相同染色体）と、DNA を複製してできた全く同じもの（姉妹染色体）とがある。このような特別な場合を除けば、DNA は基本的に同じものが二つと存在しない。このような性質を持つ DNA が失われる影響は大きいと考えられる。第三に、DNA は極めて長い分子である。ヒトゲノム DNA は約 60 億塩基対から構成される。1 塩基対あたりの長さは約 0.3 nm であり、総延長は約 2 m となる。ヒト細胞の場合、ゲノム DNA を格納する核は、約 10 μ m である。長い分子であるということは、どこかで切れる危険性が高いということである。第四に、DNA は少しでも切れることによって、遺伝情報の伝達に非常に重大な影響を与える。細胞は分裂するときに、対極する二箇所（中心体）から伸びる紡錘糸（実体は微小管）に染色体の一箇所（動原体）を結びつけて引っ張ることにより、染色体を正しく均等に分配する。ここで DNA が切れていると、染色体の分配が正しく行われず、新生細胞において遺伝情報の過不足が生じる。その結果として、細胞内で RNA やタンパク質が作り出せなくなるため細胞の生存が著しく脅かされると考えられる。

1.1.3 放射線による DNA 損傷

放射線によって生じる DNA 損傷にはさまざまなものがある。DNA の塩基が糖から外れる塩基脱離、塩基に異常な化学基が結合する塩基修飾、DNA の同一鎖の隣り合う塩基間などで共有結合が生じる鎖内架橋 (intrastrand crosslink)、相対する鎖間で共有結合が生じる鎖間架橋 (interstrand crosslink)、DNA とタンパク質の間で共有結合が生じる DNA-タンパク質間架橋などがある。さらに、DNA 二本鎖の一方が切断される一本鎖切断 (single-strand break; SSB)、両方

が切断される二重鎖切断（二本鎖切断ともいう、double-strand break; DSB）がある。ヒト正常二倍体細胞では、X 線 1 Gy あたり、塩基損傷が約 1,000 個、一本鎖切断が約 1,000 個、二重鎖切断が約 40 個生じるとされる[3]。この中で、二重鎖切断は、生成数としては最小であるものの、最も重篤であり、放射線の生物作用に最も密接に関わると考えられている。他の損傷では DNA 二本鎖の少なくとも一方がつながり止められているが、二重鎖切断では DNA 二本鎖が完全に切り離されており、修復が困難であるためと考えられる。

DNA 二重鎖切断をはじめとした DNA 損傷は放射線以外にもさまざまな薬剤によっても生じる。抗癌剤の中には、DNA 損傷によってその作用を発揮するものが少なくない。また、細胞が特に薬剤や放射線にさらされなくても、酸化ストレスや複製の際のエラーなどにより、DNA 損傷は常に起こっている。さらに、生殖系や免疫系の組織ではさかんに DNA の組換えが行われているが、これは DNA 二重鎖切断に始まる。DNA 二重鎖切断は放射線の生物影響理解の鍵であるばかりでなく、さまざまな生命現象の根幹に関わっている。DNA 二重鎖切断の修復、解消が不完全あるいは不正確であると、細胞が形質転換、増殖能の喪失などを起こし、癌や様々な疾患につながる。逆に、これを利用して癌をはじめいろいろな疾患を治療することもできる。

生体は DNA 損傷に対する防御機能を備えている[4,5]。まず、さまざまな DNA 損傷はそれぞれに特化した機構で修復される。また、DNA 損傷を持ったまま複製や分配を行うことを防ぐために細胞周期進行を一時停止する細胞周期チェックポイント機構が存在する。さらに、細胞が自ら死ぬことによって癌化や子孫への影響を防ぐアポトーシス機構も存在する。

1.2 DNA 二重鎖切断修復の分子機構

1.2.1 相同組換え (HR) と非相同末端結合 (NHEJ)

ヒトを含む真核生物において、DNA 二重鎖切断は主として二つの機構によって修復される[4,5]。一つは相同組換え (homologous recombination; HR)、もう一つは非相同末端結合 (non-homologous end-joining; NHEJ) である。HR は切れた DNA と類似、あるいは同一な DNA 配列を持つ DNA を探し出して、それを鋳型にして切断部位の配列を復元する反応機構である。NHEJ は近接する DNA の末端同士を必要に応じて整形を行った後、つなぎ合わせる反応機構である。二つを比べると NHEJ はやや精度に欠けると考えられる。例えば、結合の際に塩基が脱落したり、新しく加わったりして配列が変化する可能性がある。また、互いに近接して複数の DNA 二重鎖切断が存在した場合、本来とは異なる DNA 同士が結合されてしまう危険性がある。その一方で、HR は精度面では優れていると考えられるが、時期が限定される。類似あるいは、同一な配列をもつ DNA には、相同染色体と姉妹染色体が存在するが、動物細胞では姉妹染色体しか鋳型に使用することができない。従って、HR は複製後にしか行えず、細胞周期の S 期か G2 期に限られる。それ以外の時期では DNA 二重鎖切断修復は NHEJ に依存する。特に、ヒトの正常および癌組織を構成する細胞では、G0 期または G1 期にある細胞が最も多い。また、ヒトゲノムのうちタンパク質をコードしているのはごく一部であり、残りの部分は繰り返し配列、転写調節配列、イントロンなどであるため、多少の塩基の欠落、挿入などは許容される場合が多いと考えられる。そのため、特に、ヒトにおいては NHEJ の重要性が高いと考えられる。

1.2.2 相同組換え (HR) の分子機構

HR では、まず、DSB の位置から一方の鎖が 5'→ 3'方向に分解され、一本鎖部分が形成される。これを resection と呼ぶ。Resection には、CtIP、Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) 複合体、ExoI/BLM (Bloom's syndrome mutated) 複合体が関与する[6]。MRN 複合体のうち、Mre11 がエンド／エキソヌクレアーゼ活性を持ち、CtIP がそれを促進する。Mre11 のエンドヌクレアーゼ活性により、二本鎖の 5'端を持つ方の鎖にニックが入る。次に、Mre11 のエキソヌクレアーゼ活性により、ニックから 3'→5'方向に分解が起こる。一方、ニックから 5'→3'方向にエキソヌクレアーゼ ExoI とヘリカーゼ BLM により分解が起こる。このようにしてできた一本鎖部分にまず RPA (Replication protein A) が結合して安定化する[6]。続いて、BRCA1、BRCA2 (FANCD1) などの作用により、RPA が Rad51 に置き換えられ、一本鎖 DNA 上に Rad51 が整列したフィラメントが形成される[6]。Rad51 は相同鎖の探索と鎖交換反応を行う。続いて切断部位から鋳型鎖に従って DNA polymerase δ (pol δ)、PCNA などの DNA 複製タンパク質による DNA 合成が行われる[6]。最後に、ヌクレアーゼである Mus81-Eme1、XPF-ERCC1、SLX1-SLX4 などの作用により、交差した 2 本の鎖が解離 (resolution) されて修復が完了する[6]。

1.2.3 非相同末端結合 (NHEJ) の分子機構

NHEJ においては、まず、Ku80 (Ku86 ともいう) と Ku70 のヘテロダイマー (以下、これを Ku と呼ぶ) が二本鎖 DNA の末端に結合する[4,5]。次に、タンパク質リン酸化酵素活性を有する DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) が Ku を介して二本鎖 DNA の末端に結合し、活性化

する[4,5]。DNA 末端の形状により直ちに結合できない場合には、結合に先立って整形が行われる[4,5]。これをプロセッシングという。例えば、エンド／エキソヌクレアーゼ Artemis は DNA 末端がヘアピン構造担っている場合にこれを開裂したり、オーバーハングを除去したりする。ギャップがある場合には、DNA polymerase μ および κ による合成が行われる。PNKP (polynucleotide kinase phosphatase) は 5'末端にリン酸基がない場合にこれを付加したり、3'末端にリン酸基がある場合にこれを加水分解して除去したりする。二つの DNA 末端は、最終的に XRCC4 と DNA ligase IV (以下、LigIV) の複合体によって結合される。XLF (XRCC4 like factor、別名 Cernunnos) は XRCC4 と結合し、ミスマッチやギャップがある DNA 末端同士の結合を促進すると考えられている。

本研究は NHEJ の分子機構に関するものであるので、上記の分子の発見の経緯や性質、機能などについて以下にやや詳しく述べる。

i) Ku

Ku は当初、三森らによって、膠原病患者の自己抗原として発見され[7]、抗体を用いたアフィニティー精製によって、分子量約 70,000 と 80,000 の 2 つのサブユニットからなる DNA 結合タンパク質であることが明らかになった[8]。これらのサブユニットをそれぞれ Ku70、Ku80 とよび、さらに、両者から構成される二量体タンパク質を Ku 抗原あるいは Ku という。フットプリント解析によって、Ku が DNA 配列に依存せず、二本鎖 DNA の末端に結合することが明らかになった[9]。この性質から DNA の組換えやトランスポジションによる役割が考えられたが、数年間明らかでなかった。

1992～1993 年にかけて、Ku が DNA-PK の成分であることが 2 つのグループによって明らかにされた[10-12]。さらに、Ku80 が X 線感受性を示すげっ歯類細胞の第 5 群で欠損している遺伝子 XRCC5 (X-ray repair

cross-complementing) の産物であることが明らかになった[13,14]。Ku80 を欠損する細胞は放射線高感受性に加えて、V(D)J 組換え異常を示す。

Ku80 遺伝子ノックアウトマウスは下記の *scid* マウスと同様、免疫不全、放射線高感受性に加え、発育に異常を示し、体重が同週齢の正常マウスの 40～60% である[15,16]。Ku70 遺伝子ノックアウトマウスは Ku80 ノックアウトマウスと同様、免疫不全、放射線感受性、発育異常を示すが、免疫不全はやや軽症であり、T 細胞の産生が一部見られる[17,18]。

X 線結晶解析により、Ku の構造はドーナツ状で、ドーナツの穴の部分で DNA に結合することが明らかにされた[19]。このため、端を持たない DNA には結合できないが、DNA の端があれば、穴に DNA を通すような形で結合できる[19]。

ii) DNA-PKcs

1985 年、ヒト HeLa 細胞、ウサギ赤芽球、カエル卵、ウニ卵などの抽出液中に二本鎖 DNA を添加するとヒートショックタンパク質 Hsp90 のリン酸化が促進されることが見出された[20]。1989～1990 年にかけて、2 つのグループが HeLa 細胞抽出液からこのタンパク質リン酸化活性を示す分子を精製し、分子量約 350,000 の大きな分子 (p350) であることが明らかになり、DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-dependent protein kinase, DNA-PK) と名付けられた[21,22]。1992～1993 年にかけて、上述のように DNA-PK が p350 だけでなく、Ku も含むことが明らかになった[10-12]。このことから、p350 は DNA-PK 触媒サブユニット (DNA-PK catalytic subunit, DNA-PKcs) と呼ばれるのが一般的になった。同時に、DNA-PK の活性の発現に DNA 末端が必要であることが明らかになったことから、DNA-PK は DNA の組換えや修復に関わるシグナル伝達分子である可能性が考えられた[11]。さらに、Ku80 が XRCC5 遺伝子産物であることが明らかになって間もなく、DNA-PKcs が X 線感受性を示すげっ歯

類細胞の第 7 群で欠損している遺伝子 XRCC7 の産物であることが明らかになった[23-25]。第 7 群には、B 細胞、T 細胞を欠損する重症複合免疫不全を示し、移植拒絶がないために腫瘍移植実験に頻用されていた *scid* (severe combined immunodeficiency) マウスが属する[26]。これとほぼ同時に、ヒト脳腫瘍バイオプシーから樹立された細胞 M059J において DNA-PKcs が欠損していることが発見された[27]。DNA-PKcs の変異による *scid* マウス様の症候群は、ウマ、イヌでも報告されている[28,29]。近年、ヒトの放射線高感受性・重症複合免疫不全 (radiosensitive-severe combined immunodeficiency, RS-SCID) 患者で、DNA-PKcs の変異が 2 例発見された[30,31]。うち 1 例では、重篤な脳神経発達異常が認められている[31]。

DNA-PKcs 遺伝子の全長クローニング、塩基配列決定は 1995 年に行われ、4,127 アミノ酸からなり、分子量はそれまで推定されていたより大きく、約 470,000 であることが明らかになった[32]。また、その触媒ドメインは、ホスファチジルイノシトール 3-リン酸キナーゼおよび直前に報告された毛細血管拡張性運動失調症原因遺伝子 (ataxia-telangiectasia mutated, ATM) [33]と相同性を示すことが明らかになった。

iii) XRCC4/DNA ligase IV

XRCC4 は X 線感受性げっ歯類細胞の第 4 群に属する細胞 XR-1 の V(D)J 組換え能を相補するヒト遺伝子として単離された[34]。発見時に知られていた他の分子との相同性は認められなかった。その後、免疫沈降法により、XRCC4 と DNA ligase IV が結合していることが明らかになった[35,36]。DNA ligase IV の変異は、放射線感受性の白血病患者[37]、発育不全、免疫不全を呈する患者[38]で同定されている。後者は、Ligase IV シンドロームと呼ばれる。XRCC4 あるいは DNA ligase IV 遺伝子のノックアウトマウスは、免疫不全に加え、脳神経

発生異常によって胎性致死となる[39-41]。

iv) XLF/Cernunnos

XRCC4 結合タンパク質の two hybrid 法によるスクリーニングで、XRCC4 と類似の 3 次構造が予測される分子が同定され、XRCC4-like factor (XLF) と命名された[42]。ほぼ同時に、ヒト RS-SCID の新たな原因遺伝子として Cernunnos が同定された[43]。また、XLF と Cernunnos は同一分子であることが明らかになった。

v) PAXX (Paralog XRCC4 and XLF)

PAXX は 2015 年 1 月に NHEJ にかかわるタンパク質として同定された[44,45]。Protein Data Bank (PDB) では C9orf142 と登録されている。PAXX は三次元構造が XRCC4 に非常によく似ていて、Ku70 と Ku80 に直接結合し、DNA 損傷部位にリクルートされる。薬剤によって誘導された DNA 損傷に対し、XRCC4 と XLF と共に DNA 修復、生存率の回復に寄与する。さらに、PAXX の 199 番目のバリンと 201 番目のフェニルアラニンをアラニンに置換すると Ku70 と Ku80 との相互作用が欠失する。この変異体を利用して PAXX が Ku 依存性の DNA Ligation を亢進することが試験管内の実験で実証された。ヒトゲノムの解読の終了が 2003 年に宣言され、12 年経った後に新たなタンパク質が同定されたのは驚くべきことである。このようなことが起こった理由として考えられるのは PAXX が比較的小さなタンパク質であったことが一因としてあげられる。

1.3 XRCC4 の翻訳後修飾による調節

DNA-PK は巨大な分子であり、触媒ドメインはその一部に過ぎないが、その活性中心に変異を導入すると、NHEJ が部分的にしか回復しないこと、すなわち、NHEJ 機能にリン酸化触媒機能が必須であることが示されている。DNA-PK は 1990 年代前半から多くの核タンパク質をリン酸化することが報告されているが、NHEJ においてどのタンパク質をリン酸化することが重要かは明らかになっていない。

当研究グループは以前、放射線照射された細胞内で DNA-PK が XRCC4 をリン酸化することを初めて示した[46]。その後、二つのグループが別々に Ser260、Ser320 をリン酸化部位として同定したが、これらの部位に変異を導入しても放射線感受性や V(D)J 組換え能への影響は認められなかった[47,48]。これらのことから、これらのグループは DNA-PK による XRCC4 のリン酸化は NHEJ に不要であると結論づけた。当グループでは他に 4 カ所のリン酸化部位を同定し、少なくともそのうち 3 カ所が放射線照射後にリン酸化され、DNA 修復において重要な役割を担うことを見出している (Sharma ら、投稿準備中)。

また、XRCC4 は、カゼインキナーゼ II によるリン酸化を受け、これによって PNKP との結合が促進されることが示されている[49]。さらに、ユビキチン化[50]、SUMO 化[51]を受けるという報告もある。DNA ligase IV については、DNA-PK によるリン酸化の報告が 1 件ある[52]。これらのことから、XRCC4 はさまざまな翻訳後修飾を受け、DNA ligase IV による DNA 末端結合を調節する可能性が考えられる。

1.4 本研究の目的

本研究では、XRCC4 (X-ray repair cross-complementing) タンパク質に注目した。当研究室では、主に DNA-PK のリン酸化基質という観点から XRCC4 の解析を行ってきたが、XRCC4 はカゼインキナーゼ II によるリン酸化、さらにはユビキチン化、SUMO 化などを受けることが報告されており、多数の翻訳後修飾による複雑な制御を受けていることが推察される。本研究は、動物種間で保存されているリジンに着目し、XRCC4 の制御機構を明らかにすることを目的として行った。

1.5 参考文献

- [1] 厚生労働省. 政策レポート がん対策について.
<http://www.mhlw.go.jp/seisaku/24.html> (21 March 2014, last accessed)
- [2] Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the radiologist*. Seventh Edition. Lippincott, Williams & Wilkins, 2011.
- [3] United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. UNSCEAR 2000 Report to the General Assembly, with Scientific Annexes Volume II: Effects. 2000.
- [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* 2011; 43: 4-8.
- [5] 松本義久. 放射線による DNA 損傷・修復と細胞死. 日本放射線腫瘍学会・日本放射線腫瘍学研究機構編, 臨床放射線腫瘍学: 南江堂, 2012, 40-44.
- [6] Polo SE, Jackson SP. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev* 2011; 25: 409-33.
- [7] Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, Inada S, Yoshida S, Homma M. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest* 1981; 68: 611-20.
- [8] Mimori T, Hardin JA, Steitz JA. Characterization of the DNA-binding protein antigen Ku recognized by autoantibodies from patients with rheumatic disorders. *J Biol Chem* 1986; 261: 2274-8.
- [9] Mimori T, Hardin JA. Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J Biol Chem* 1986; 261: 10375-9.
- [10] Dvir A, Peterson SR, Knuth MW, Lu H, Dynan WS. Ku autoantigen is

- the regulatory component of a template-associated protein kinase that phosphorylates RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11920-4.
- [11] Gottlieb TM, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 1993; 72: 131-142.
- [12] Dvir A, Stein LY, Calore BL, Dynan WS. Purification and characterization of a template-associated protein kinase that phosphorylates RNA polymerase II. *J Biol Chem* 1993; 268: 10440-7.
- [13] Taccioli GE, Gottlieb TM, Blunt T, Priestley A, Demengeot J, Mizuta R, Lehmann AR, Alt FW, Jackson SP, Jeggo PA. Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science* 1994; 265: 1442-5.
- [14] Smider V, Rathmell WK, Lieber MR, Chu G. Restoration of X-ray resistance and V(D)J recombination in mutant cells by Ku cDNA. *Science* 1994; 266: 288-91.
- [15] Nussenzweig A, Chen C, de Costa Soares V, Sanchez M, Sokol K, Nussenzweig MC, Li GC. Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* 1996; 382: 551-5.
- [16] Zhu C, Bogue MA, Lim D-S, Hasty P, Roth DB. Ku86-deficient mice exhibit severe combined immunodeficiency and defective processing of V(D)J recombination intermediates. *Cell* 1996; 86: 379-89.
- [17] Gu, Y., Seidl, K., Rathbun, G., Zhu, C., Manis, J., der Van, S., Davidson, L., Cheng, H., Sekiguchi, J., Frank, K., Stanhope-Baker, P., Schlissel, M.,

- Roth, D. & Alt, F. Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice. *Immunity* 1997; 7: 653-665.
- [18] Ouyang, H., Nussenzweig, A., Kurimasa, A., Soares, V., Li, X., Cordon-Cardo, C., Li, W., Cheong, N., Nussenzweig, M., Iliakis, G., Chen, D. & Li, G.. Ku70 is required for DNA repair but not for T cell antigen receptor gene recombination in vivo. *J Exp Med* 1997; 186: 921-929.
- [19] Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implication for double-strand break repair. *Nature* 2001; 412: 607-14.
- [20] Walker, A.I.; Hunt, T.; Jackson, R.J. & Anderson, C.W. Double-stranded DNA induces the phosphorylation of several proteins including the 90 000 mol. wt. heat-shock protein in animal cell extracts. *EMBO J* 1985; 4:139-45.
- [21] Carter, T.; Vancurova, I.; Sun, I.; Lou, W. & DeLeon, S. A DNA-activated protein kinase from HeLa cell nuclei. *Mol Cell Biol* 1990;10: 6460-71.
- [22] Lees-Miller, S.P.; Chen,Y.-R. & Anderson,C.W. Human cells contain a DNA-activated protein kinase that phosphorylates simian virus 40 T antigen, mouse p53, and the human Ku autoantigen. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 6472-81.
- [23] Kirchgessner, C.; Patil, C.; Evans, J.; Cuomo, C.; Fried, L.; Carter, T.; Oettinger, M. & Brown, M. DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. *Science* 1995 ;267:1178-83.
- [24] Blunt, T.; Finnie,N.; Taccioli, G.; Smith, G.; Demengeot, J.; Gottlieb, T.; Mizuta, R.; Varghese, A.; Alt, F.; Jeggo, P. & Jackson, S.P. Defective

- DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell* 1995; 80: 813-23.
- [25] Peterson, S., Kurimasa, A., Oshimura, M., Dynan, W., Bradbury, E. & Chen, D. Loss of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase in DNA double-strand-break-repair mutant mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3171-74.
- [26] Bosma G, Custer R, Bosma M. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983; 301: 527-30.
- [27] Lees-Miller S, Godbout R, Chan D, Weinfeld M, Day III R, Barron G, Allalunis-Turner J. Absence of p350 subunit of DNA-activated protein kinase from a radiosensitive human cell line. *Science* 1995; 267: 1183-5.
- [28] Wiler R, Leber R, Moore BB, VanDyk LF, Perryman LE, Meek K. Equine severe combined immunodeficiency: a defect in V(D)J recombination and DNA-dependent protein kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11485-9.
- [29] Meek K, Kienker L, Dallas C, Wang , Dark MJ, Venta PJ, Huie ML, Hirschhorn R, Bell,T. SCID in Jack Russell terriers: a new animal model of DNA-PKcs deficiency. *J Immunol* 2001; 167: 2142-50.
- [30] van der Burg M, IJspeert H, Verkaik NS, Turul T, Wiegant WW, Morotomi-Yano K, Mari P-O, Tezcan I, Chen DJ, Zdzienicka MZ, van Dongen JJM, van Gent DC. A DNA-PKcs mutation in a radiosensitive T-B-SCID patients inhibits Artemis activation and nonhomologous end-joining. *J Clin Invest* 2009; 119:91-8.

- [31] Woodbine L, Neal JA, Sasi N-K, Shimada M, Deem K, Coleman H, Dobyns WB, Ogi T, Meek K, Davies EG, Jeggo PA. PRKDC mutations in a SCID patient with profound neurological abnormalities. *J Clin Invest* 2013; 123: 2969-80.
- [32] Hartley K, Gell D, Smith C, Zhang H, Divecha N, Connelly M, Admon A, Lees-Miller S, Anderson C, Jackson S. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell* 1995; 82: 849-56.
- [33] Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Jaspers NGJ, Taylor AMR, Arlett CF, Miki T, Weissmn SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995; 268: 1749-53.
- [34] Li Z, Otevrel, T Gao Y, Cheng H, Seed B, Stamato T, Taccioli G, Alt F. The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell* 1995; 83: 1079-89.
- [35] Critchlow S, Bowater R, Jackson S. Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol* 1997; 7: 588-98.
- [36] Grawunder U, Wilm M, Wu X, Kulesza P, Wilson T, Mann M, Lieber M. Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* 1997; 388: 492-5.
- [37] Riballo, E., Kuhne, M., Rief, N., Doherty, A., Smith, G., Recio, M., Reis,

- C., Dahm, K., Fricke, A., Krempler, A., Parker, A., Jackson, S., Gennery, A., Jeggo, P. & Lobrich, M. A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell* 2004; 16: 715-24.
- [38] O'Driscoll M, Cerosaletti KM, Girard PM, Dai Y, Stumm M, Kysela B, Hirsch B, Gennery A, Palmer SE, Seidel J, Gatti RA, Varon R, Oettinger MA, Neitzel H, Jeggo PA, Concannon P. DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol Cell* 2001; 8: 1175-85.
- [39] Barnes D, Stamp G, Rosewell I, Denzel A, Lindahl T. Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. *Curr Biol* 1998; 8: 1395-8.
- [40] Frank K, Sekiguchi J, Seidl K, Swat W, Rathbun G, Cheng H, Davidson L, Kangaloo L, Alt F. Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature* 1998; 396: 173-7.
- [41] Gao Y, Sun Y, Frank K, Dikkes P, Fujiwara Y, Seidl K, Sekiguchi J, Rathbun G, Swat W, Wang J. et al. A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell* 1998; 95: 891-902.
- [42] Ahnesorg P, Smith P, Jackson S. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 2006; 124: 301-3.
- [43] Buck D, Malivert L, de Chasseval R, Barraud A, Fondanèche M, Sanal O, Plebani A, Stéphan J, Hufnagel M, le Deist F, Fischer A, Durandy A, de Villartay J, Revy P. Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor,

- is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* 2006; 124, 287-99.
- [44] Ochi T, Blackford AN, Coates J, Jhujh S, Mehmood S, Tamura N, Travers J, Wu Q, Draviam VM, Robinson CV, Blundell TL, Jackson SP. PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. *Science* 2015; 347: 185-8.
- [45] Xing M, yang M, Huo W, Feng F, Wei L, Jiang W, Ning S, Yan Z, Li W, Wang Q, Hou M, Dong C, Guo R, Gao G, Ji J, Xha S, Lan L, Liang H, Xu D. Interactome analysis identifies a new paralogue of XRCC4 in non-homologous end joining DNA repair pathway. *Nat Commun* 2015; 6: 6233.
- [46] Matsumoto Y, Suzuki N, Namba N, Umeda N, Ma X-J, Morita A, Tomita M, Enomoto A, Serizawa S, Hirano K, Sakai K, Yasuda H, Hosoi Y. Cleavage and phosphorylation of XRCC4 protein induced by X-irradiation. *FEBS Lett* 2000; 478: 67-71.
- [47] Yu Y, Wang W, Ding Q, Ye R, Chen D, Merkle D, Schriemer D, Meek K, Lees-Miller SP. DNA-PK phosphorylation sites in XRCC4 are not required for survival after radiation or for V(D)J recombination. *DNA Repair* 2003; 2: 1239-52.
- [48] Lee K-J, Jovanovic M, Udayakumar D, Bladen CL, Dynan WS. Identification of DNA-PKcs phosphorylation sites in XRCC4 and effects of mutation at these sites on DNA end joining in a cell-free system. *DNA Repair* 2003; 3: 267-76.
- [49] Koch C, Agyei R, Galicia S, Metalnikov P, O'Donnell P, Starostine A,

- Weinfeld M, Durocher D. Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *EMBO J* 2004; 23: 3874-85.
- [50] Yurchenko V, Xue Z, Sadofsky M. SUMO modification of human XRCC4 regulates its localization and function in DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 1786-94.
- [51] Foster RE, Nnakwe C, Woo L, Frank KM. Monoubiquitination of the nonhomologous end joining protein XRCC4. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341: 175-83.
- [52] Wang Y, Nnakwe C, Lane W, Modesti M, Frank K. Phosphorylation and regulation of DNA ligase IV stability by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2004; 279: 37282-90.

第 2 章

XRCC4 のリジン残基の中で種間保存性の高い残基に注目し、変異体を系統的に作製し、機能解析を行うことにより、重要なリジン残基の探索を行った。異種生物間の XRCC4 アミノ酸配列を比較し、保存性の高いリジンを調べた。このうち、K140 についてはオランウータンでそれぞれグルタミン酸になっているため、対象から除外した。一方、K210 を解析対象に加えた。K210 を加えた理由は Yurchenko らが 2006 年に、①K210 が SUMO 化修飾を受けること、②SUMO 化修飾が XRCC4 の核移行に必要十分であること、③K210 変異体が放射線感受性上昇と V(D)J 組換え能低下を呈することを報告したからである。これらのリジンをアルギニンに置換した変異体 XRCC4 と GFP の融合タンパク質を XRCC4 欠損細胞 M10 に導入し、放射線感受性を指標とした機能解析を行った。

第 3 章

XRCC4 K271R および K210R 変異体の解析

3.1 本章の目的

第2章で、XRCC4 K271R 変異体は DNA 二重鎖切断修復における機能が低下していることが明らかになった。K271 は核移行シグナルと考えられる配列の中に存在する(図 3.1)。そこで、本章では、まず、K271R 変異の核局在への影響を調べることを目的とした。また、K210R 変異体は前章で放射線感受性の上昇は K271R に比べてわずかであったが、K210 の SUMO 化修飾が核局在制御に関わることが報告されている[1]。そこで、K210R 変異の核局在制御への影響を調べた。核局在解析には蛍光免疫染色に適したヒト子宮頸癌細胞 HeLa を用いた。しかしながら、HeLa 細胞の内在性の XRCC4 があり、変異体 XRCC4 の核移行機能を相補する可能性が考えられたため、非翻訳領域に対する siRNA を用いたノックダウンを行った。また、第2章の K271R 変異体と K210R 変異体の DNA 二重鎖切断修復能の解析を行った。

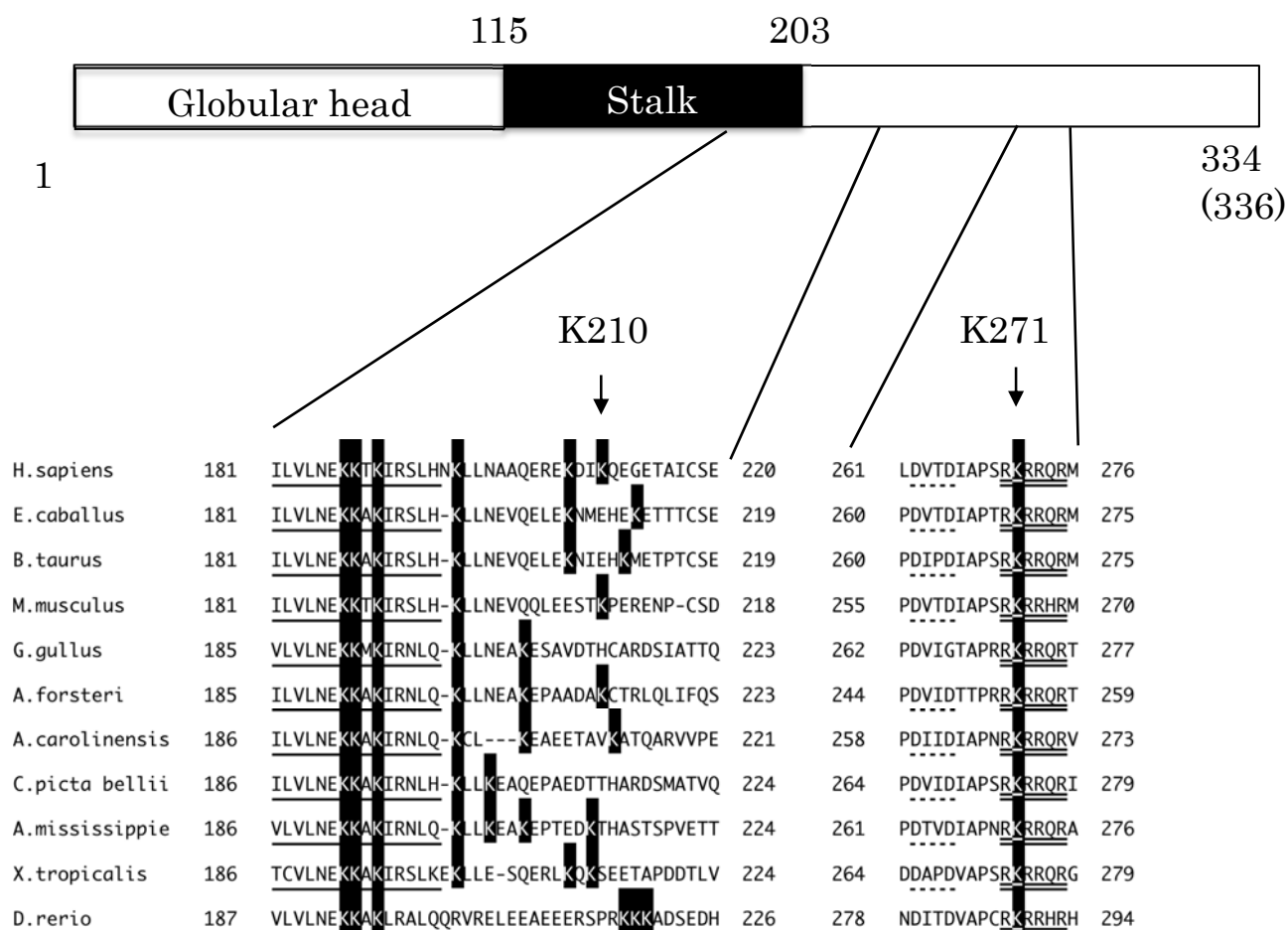


図 3.1 種々の脊椎動物の XRCC4 の K210、K271 周辺のアミノ酸配列の比較 リジン(K)残基は白黒反転で示している。K210 周辺のアミノ酸配列のうち、下線を施した部分は DNA ligase IV との結合領域である。また、K271 周辺のアミノ酸配列のうち、二重下線を施した部分は核移行シグナルと考えられる領域、点線下線を施した部分は Caspase の認識配列である。

3.2 実験方法

3.2.1 使用した細胞とその培養方法

この実験では第2章で用いた M10 細胞と、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞を使用した。M10 細胞の培養方法は第2章に記述した通りである。蛍光顕微鏡観察による XRCC4 および DNA ligase IV の細胞内局在の解析には、浮遊細胞である M10 細胞より付着細胞である HeLa 細胞が適していると考えた。

ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞の培養には、DMEM/Ham's F-12 混合液体培地（ナカライテスク）に 10%容の牛胎児血清（HyClone）、1%容の 10,000 U/ml ペニシリン・10,000 µg/ml ストレプトマイシン混合溶液を添加したものをを用いた。また、ヒト肺癌由来 H1299 細胞の培養には、RPMI1640 液体培地に 10%容の牛胎児血清、1%容の 10,000 U/ml ペニシリン・10,000 µg/ml ストレプトマイシン混合溶液、10 µM のβ-mercaptoethanol（ナカライテスク）を添加したものをを用いた。いずれも、温度 37.0±0.1℃、CO₂ 濃度 5.0±0.1%、湿度 95%以上のインキュベータ（SANYO）中で培養した。

3.2.2 siRNA

内在性 XRCC4 を選択的にノックダウンするため、非翻訳領域（untranslated region, UTR）をターゲットにした siRNA を作製した。RNAi 社（東京）が公開しているプログラム siDirect v.2.0 (<http://sidirect2.rnai.jp>, 21 March 2014 last access) に XRCC4 mRNA 配列を入力して検索を行い、出力された標的候補配列から、5'側 UTR の-34~-12（開始コドン ATG の A から 5'側に 34 塩基から 12 塩基の部分）および 3'側 UTR の 1036~1058（開始コドン ATG の A から数えて 1,036 塩基目から 1,058 塩基目、なお、ストップコドンは 1,009 塩基目から 1,011 塩基目）を選んだ。表 3.2 に示す 4 種のオリゴヌクレオチドを日本バ

イオサービス（さいたま、埼玉）に依頼して合成した。各オリゴヌクレオチドは 50 μ M の濃度で RNase free water に溶解し、小分けにして -85°C で保存した。二本鎖を形成させるため、5'-UTR-S と 5'-UTR-AS、または 3'-UTR-S と 3'-UTR-AS をそれぞれ 30 μ l と 5XAnnealing buffer（500 mM KOAc, 150 mM HEPES $\cdot$ KOH, pH 7.4, 10 mM Mg(OAc)₂）15 μ l を 90°C で 1 分間、37°C で 60 分間反応させた。これを小分けにして -30°C で保存した。

表 3.1 siRNA 作製のために合成したオリゴヌクレオチド

名称	配列（d はデオキシリボヌクレオチド、他はリボヌクレオチド）
5'-UTR-S	CUUUAAAUAACAAAAUCUdTdT
5'-UTR-AS	AGAUUUUUGUUAUUUAAAGdAdG
3'-UTR-S	CUAUGUUUUCUAUUCAUUUdCdT
3'-UTR-AS	AAAUGAAUAGAAAACAUAGdTdC

3.2.3 Lipofection

リン脂質二重膜のリポソームで環状 DNA を包み込み細胞膜を通過させることによって遺伝子を細胞内に導入する方法である。Electroporation 法と違い高額な装置や実験部品が不要であることや、レンチウイルスやレトロウイルスといったようなウィルスベクターを使用しないので、人体への被害が比較的少ないといった特徴がある。

遺伝子導入試薬として Lipofectamine 2000（Invitrogen）を使用した。遺伝子導入は Forward Transfection または Reverse Transfection のいずれかで行った。Forward Transfection は抗生物質が含まれない Opti MEM（Gibco）と第 2

章の手法で準備したプラスミドを混ぜ 10~20 分間室温でインキュベートする。その後、前日に 1×10^5 個程度の細胞数になるように調整した 10cm dish に培地と遺伝子が入った溶液を加えた。

3.2.4 XRCC4 及び DNA ligase IV の細胞内局在の解析

HeLa を固定しない場合は siRNA で内在性 XRCC4 をノックダウンした後、pEGFP-C1 ベクターに各 XRCC4 cDNA を組み込んだプラスミドを HeLa に HeLa を固定する場合は HeLa 細胞を使用する場合は前日に $1 \sim 5 \times 10^5$ 個の細胞を調整した後、細胞をインキュベータ ($0-30\text{min}$ $37^\circ\text{C} \pm 0.1$, $\text{CO}_2 \pm 0.1$) に置いた。4% Paraformaldehyde-PBS (ナカライテスク) で 30 分処理することにより、細胞を固定した。PBS (ナカライテスク) で洗浄後、70% EtOH で脱水、PBS で加水し、5% Albumin Bovine Immunoglobulin Free (BSA)、0.5% Triton (いずれもナカライテスク) を含む PBS (Blocking Buffer) でブロッキングを行った。XRCC4 antibody を Blocking Buffer で 1,000 倍に希釈し、Glass Base dish (Greiner, Germany) に加えた。0.05% Tween 20 を含む PBS (PBST) で 3 回洗浄後、Alexa Flour 594 を結合した抗ウサギ IgG 抗体 (Biolegend) を PBST で 1,000 倍に希釈し、Glass Base dish に加えた。再び PBST で 3 回洗浄後、4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (ナカライテスク) で核を染色し、PBS で洗浄後、Mount Quick (大道産業, 東京) とカバーガラスで封入した。10~20 分後に倒立型蛍光顕微鏡 IX71 の緑色蛍光透過フィルターを使用して撮影した。

3.2.5 免疫沈降による XRCC4 と DNA ligase IV の相互作用の解析

M10 細胞を 10^7 個回収し、Lysis Buffer (20mM Tris-HCl pH7.6, 150mM NaCl, 0.5% Triton X-100, Phosphatase Inhibitor 1/100, Protease Inhibitor 1/100) で細胞を溶解し、氷上で 30 分インキュベートした。15,000rpm, 7min 遠心分離機にかけ、上澄みを回収し、40uL Anti FLAG (M2) Mouse Agarose (Sigma-Aldrich) を加え、攪拌機に入れ 4°C ,overnight もしくは、室温で 2 時間インキュベートした。10,000rpm 1min 遠心分離機にかけ、上澄みを除去、1mL の Lysis Buffer without Phosphatase and Protease Inhibitor を加え、攪拌後、10,000rpm 1min 遠心分離機にかける工程を 3 回繰り返した。90uL の Sample Buffer を加え 100°C で 10min 加熱、15,000rpm 10min 遠心分離機にかけた後、Western Blotting した。

3.2.6 γ H2AX 蛍光免疫染色

HeLa 細胞を使用する場合は前日に $1\sim5 \times 10^5$ 個の細胞を準備し、M10 細胞を用いて行う場合は $1\sim5 \times 10^5$ 個の M10 細胞にコバルト線源の放射線 2Gy を照射した後、細胞をインキュベータ (0-30min 37°C $\pm$ 0.1、CO₂ $\pm$ 0.1) に置いた。SC-2 (トミー精工、東京) を用いて 1,200rpm、5min の遠心により、スライドガラス (松浪硝子、岸和田、大阪) に細胞を圧着した。Liquid Blocker (コスモ・バイオ) で細胞が圧着した部分を囲み、4% Paraformaldehyde-PBS (ナカライテスク) で 30 分処理することにより、細胞を固定した。PBS (ナカライテスク) で洗浄後、70% EtOH で脱水、PBS で加水し、5% Albumin Bovine Immunoglobulin Free (BSA)、0.5% Triton (いずれもナカライテスク) を含む PBS (Blocking Buffer) でブロッキングを行った。抗 γ H2AX ウサギポリク

ローナル抗体 (Millipore) もしくは XRCC4 antibody を Blocking Buffer で 1,000 倍に希釈し、スライド上に加えた。0.05% Tween 20 を含む PBS (PBST) で 5 回洗浄後、Alexa Flour 488 もしくは、Alexa Flour 594 を結合した抗ウサギ IgG 抗体 (Biolegend) を PBST で 1,000 倍に希釈し、スライド上に加えた。再び PBST で 5 回洗浄後、4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (ナカライテスク) で核を染色し、PBS で洗浄後、Mount Quick (大道産業, 東京) とカバーガラスで封入した。10~20 分後に蛍光倒立顕微鏡 IX71 の緑色蛍光透過フィルターを使用して撮影した。撮影後、フォーカスの数を目視または画像ソフトを利用してカウントした。

3.3 結果

3.3.1 内在性 XRCC4 のノックダウン

XRCC4 は二量体として機能するため、仮に変異体 XRCC4 の核移行機能が失われていても、内在性の正常 XRCC4 とともに核移行する可能性が考えられる。そこで、内在性 XRCC4 をノックダウンすることが必要と考えた。変異体 XRCC4 の発現に影響しないように、非翻訳領域を標的配列とする siRNA をデザインした。5'側と 3'側の非翻訳領域について 1 種類ずつ siRNA を合成して、効果を検討したところ、5'側の非翻訳領域に標的配列を持つ siRNA は内在性 XRCC4 の発現に影響しなかったが、3'側の非翻訳領域(3'-UTR、UTR: untranslated region)に標的配列を持つ siRNA は内在性 XRCC4 の発現をほぼ完全に抑制した(図 3.2)。さらに、pEGFP-C1-XRCC4WT プラスミドを導入すると予想される分子量の位置に GFP-XRCC4 の発現が認められた。

なお、バンドの濃さから、GFP-XRCC4 の発現は内在性 XRCC4 より高いと考えられた。また、内在性 XRCC4 が単一のバンドであるのに対し、GFP-XRCC4 は広い分子量にわたってバンドがスメア状となった。GFP-XRCC4 がさまざまなプロテアーゼによって分解を受けた可能性が考えられる。また、XRCC4 には 265 番目と 266 番目のアミノ酸の間に Caspase による切断部位があり、この部分で分解された可能性も考えられる。

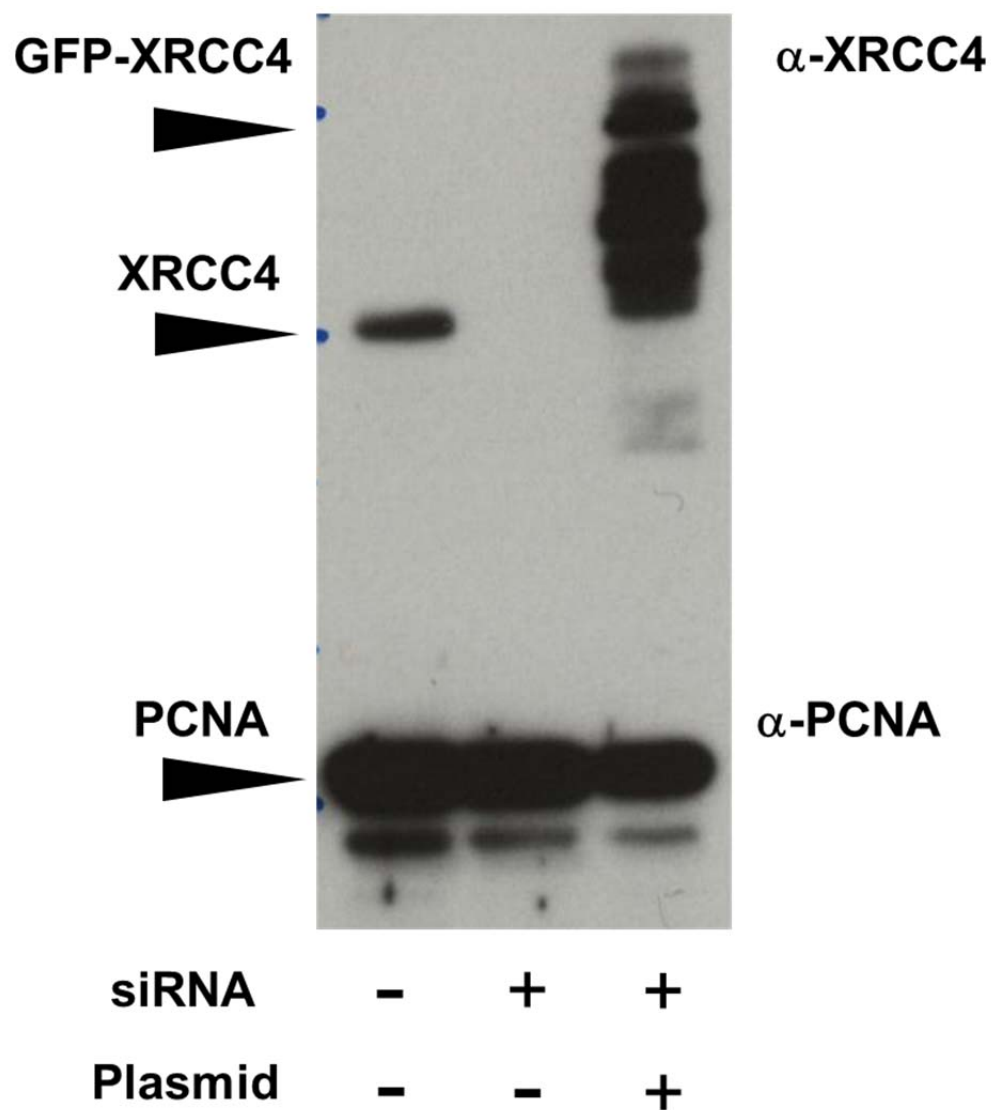


図 3.2 3'-UTR siRNA による内在性 XRCC4 のノックダウン HeLa 細胞に 3'-UTR を標的にした siRNA を transfection し、24 時間後 XRCC4 WT を組み込んだ pEGFP-C1 Vector を transfection した。24 時間後にウエスタンブロットを行った。PCNA はローディングコントロールとした。

3.3.2 XRCC4 K271R 及び K210R 変異体の核局在機能

K271R 変異体の核局在機能を調べるため、HeLa 細胞に XRCC4 3'-UTR siRNA と正常 XRCC4 あるいは K271R 変異体 cDNA を導入し、生きたままの状態 で GFP の蛍光を倒立型蛍光顕微鏡で観察した。その結果、正常 XRCC4 は核への局在が認められたが、K271R 変異体は細胞質に局在し、核への局在がほとんど認められなかった(図 3.3)。核を DAPI で染色すると、正常 XRCC4 の局在は核と一致し、一方、K271R 変異体がほとんど存在しない部分が核と一致した(図 3.4)。これらの結果から、XRCC4 の K271 が核局在に必要であると考えられる。

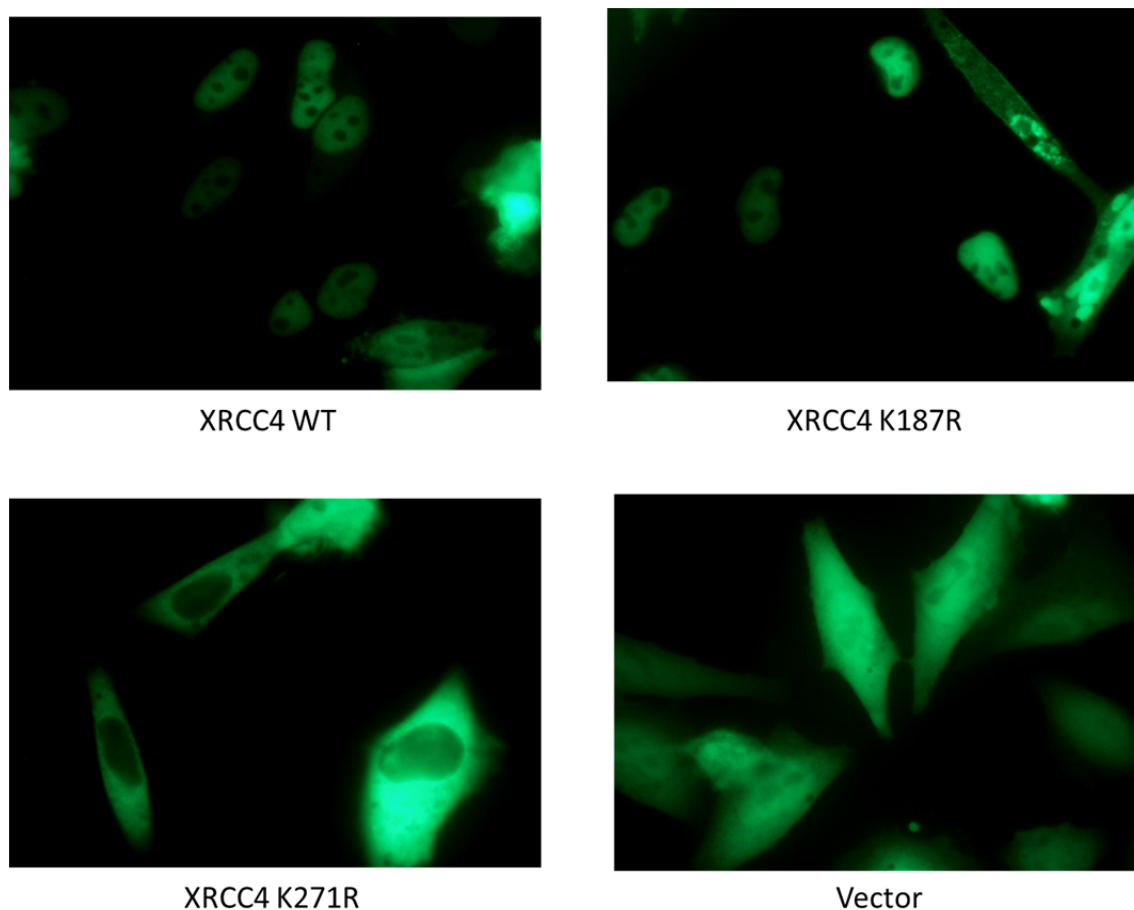


図 3.3 GFP-XRCC4 KR 変異体の核移行機能 3'-UTR を標的にした siRNA を

transfection し、24 時間後 XRCC4 WT, XRCC4 K187R, XRCC4 K271R, pEGFP-C1 Vector をそれぞれ transfection した。さらに 24 時間後に蛍光倒立顕微鏡 IX71(OLYMPUS)で緑色蛍光透過フィルターを使用して撮影した。

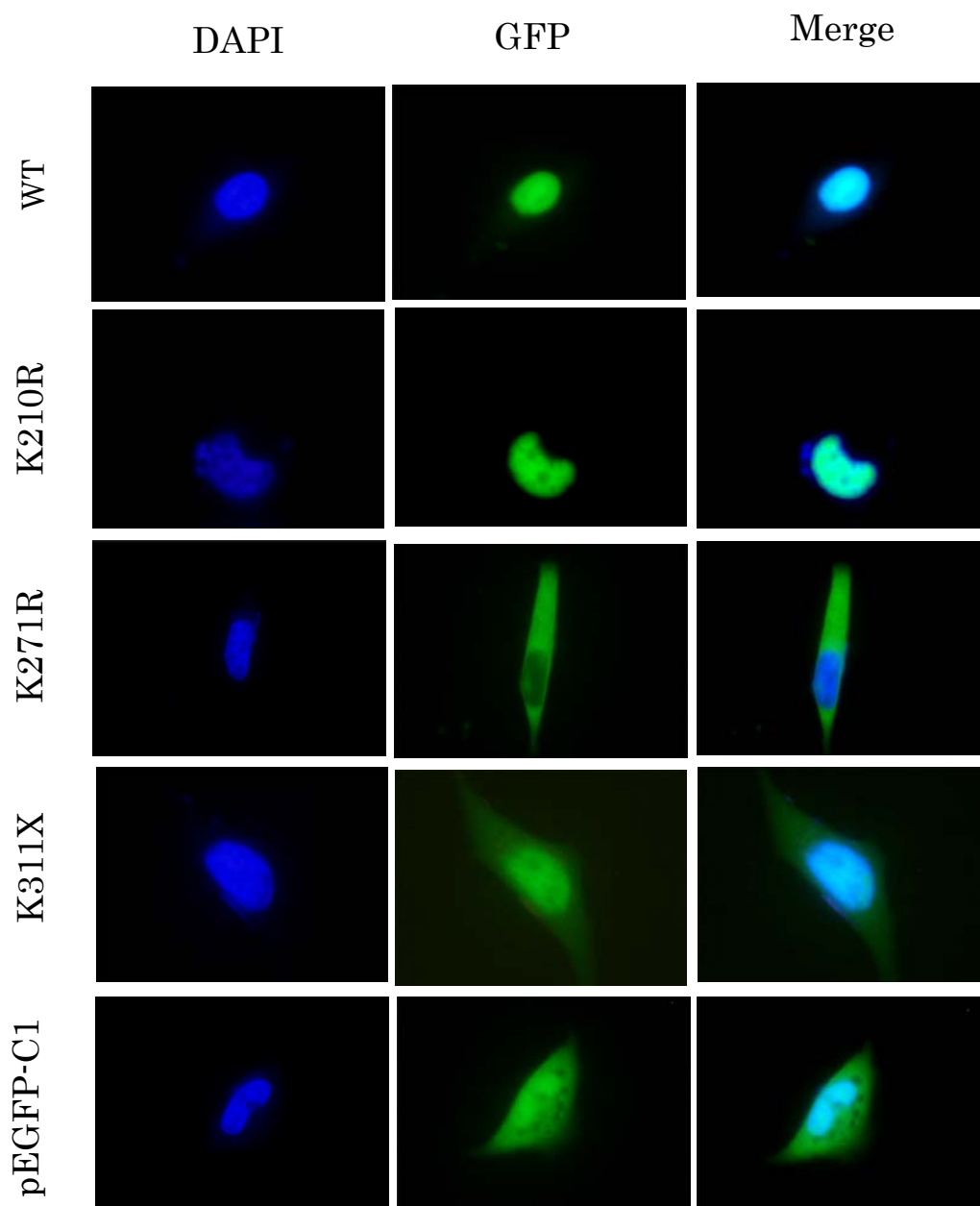


図 3.4 GFP-XRCC4 truncation 変異体の NLS 機能評価 3'-UTR を標的にした siRNA を transfection し、24 時間後 XRCC4 WT, XRCC4 K187R, XRCC4 K271R, XRCC4 K311X, pEGFP_C1 Vector をそれぞれ transfection した。24 時間後に 4', 6-Diamidino-2-phenylindole Dihydrochloride (DAPI) 試薬で染色し、蛍光倒立顕微鏡 IX71(OLYMPUS)で緑色蛍光透過フィルターを使用して撮

影した。XRCC4 WT、XRCC4 K187R、XRCC4 K271R、XRCC4 K311 truncation はそれぞれ WT、K187R、K271R, K311X, Vector と示した。

抗 XRCC4 抗体を用いた蛍光免疫染色

さらに、抗 XRCC4 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った(図 3.5)。コントロール pEGFP_C1 ベクターをトランスフェクトした細胞では抗 XRCC4 抗体による赤色蛍光が観察されなかったことから、内在性 XRCC4 の発現がほぼ完全に抑制されていると考えられた。この結果は、3.3.1 の図 3.1 で示したウェスタンブロッティングの結果と一致している。また、正常 XRCC4 と K271R 変異体において、GFP の緑色蛍光と抗 XRCC4 抗体による赤色蛍光はほぼ完全に重なった。以上の結果から、この siRNA、cDNA 導入条件においては、緑色蛍光は GFP-XRCC4 単独での空間的挙動を示していると考えた。

以前に核移行機能異常が報告されている K210 変異体は、ライブセル観察でも、蛍光免疫染色でも正常 XRCC4 と同様に核への局在が認められた。

なお、コントロール pEGFP-C1 ベクターを導入した場合、GFP の蛍光は核を含めて細胞全体に拡散した。このような現象は、他の論文でも指摘されており、GFP 単独であれば核膜孔をある程度透過できるのではないかと考えられる。。

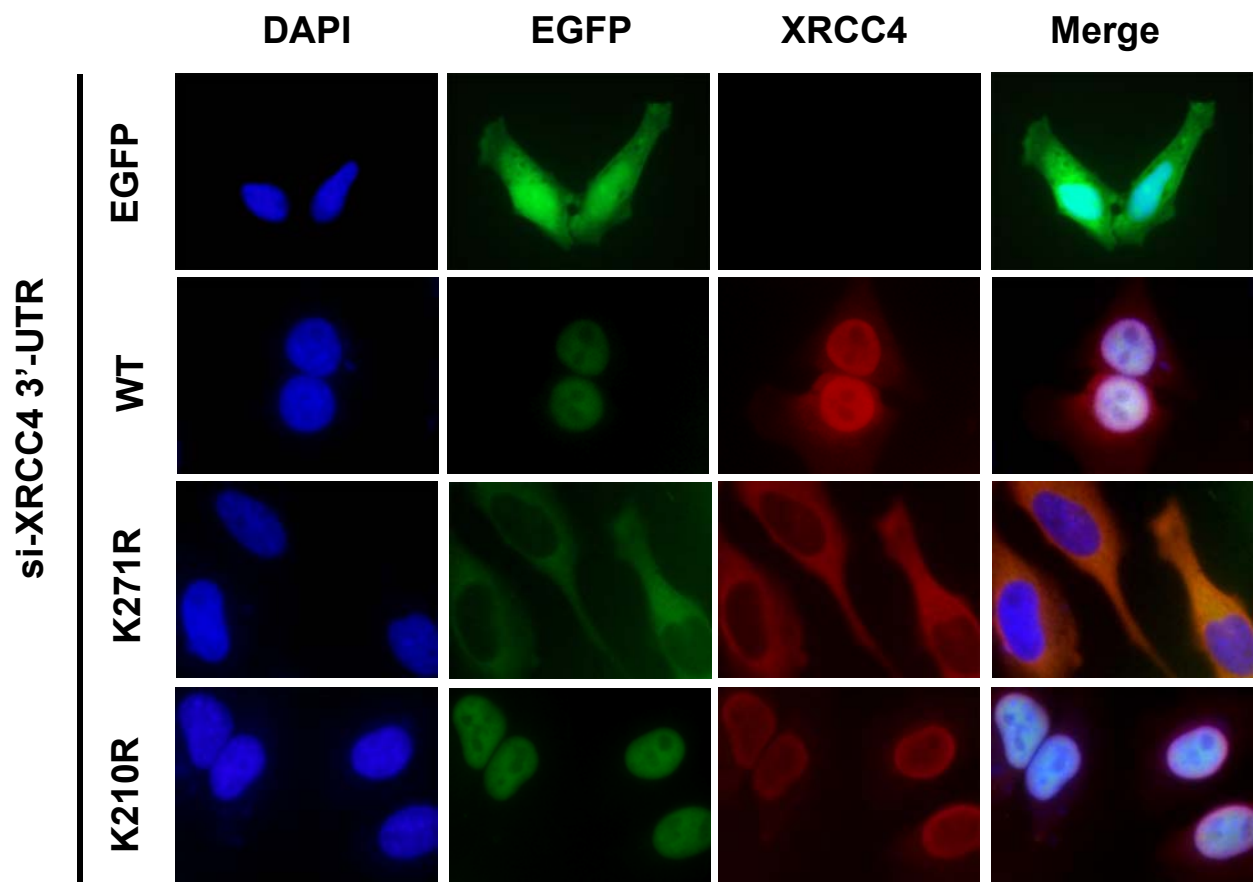


図 3.5 HeLa 細胞内の野生型または変異体 XRCC4 の核局在 siRNA を導入し内在性 XRCC4 をノックダウンした後、EGFP タグ付きの XRCC4 WT, XRCC4 K271R, XRCC4 K210R を発現するプラスミドを導入した。XRCC4 は GFP の緑色蛍光及び抗 XRCC4 抗体を用いた蛍光免疫染色によって可視化した。核は DAPI で染色した。

3.3.3 XRCC4 K271R 及び K210 変異体の DNA ligase IV 核局在制御機能

次に、抗 DNA ligase IV 抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、XRCC4 の DNA ligase IV 核局在制御機構を調べた(図 3.6)。この実験では、pCMV10 ベクターに挿入された DNA ligase IV cDNA を導入した。XRCC4 3'-UTR siRNA とコントロール pEGFP-C1 ベクターを導入した場合、抗 DNA ligase IV 抗体の染色は細胞全体にわたってごく弱く見られたが、正常 XRCC4 cDNA を導入した場合、核に強い蛍光が見られた。このことから、XRCC4 が DNA ligase IV の核局在と安定性に必要であることが分かった。K210R 変異体の場合、コントロール pEGFP-C1 ベクターを導入した場合と同様に、DNA ligase IV の染色は細胞全体にわたって弱く見られた。この結果から、XRCC4 の K271 が XRCC4 自身と DNA ligase IV の核局在及び安定性に必要であることが示された。また、K210R 変異体導入細胞においては、DNA ligase IV の核局在も正常 XRCC4 導入細胞と同等であった。

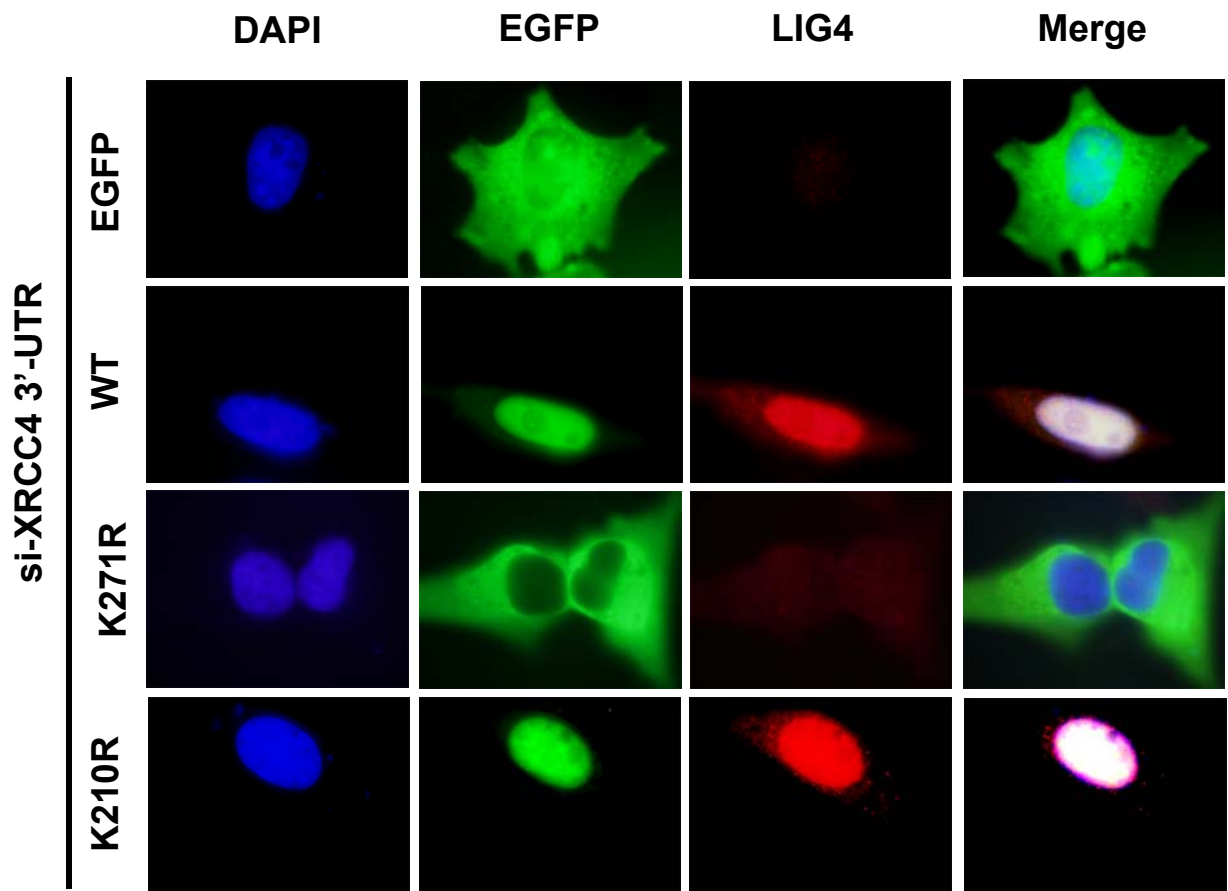


図 3.6 野生型または変異型 XRCC4 の Ligase IV 核局在制御機能 siRNA を導入し内在性 XRCC4 をノックダウンした後、EGFP タグ付きの XRCC4 WT, XRCC4 K271R, XRCC4 K210R を発現するプラスミドと FLAG タグ付き DNA ligase IV を発現するプラスミドを導入した。XRCC4 は GFP 蛍光、Ligase IV は抗 DNA ligase IV 抗体を用いた免疫染色によって観察した。

3.3.4 XRCC4 K271R 及び K210R 変異体と DNA ligase IV の相互作用

用

HeLa 細胞内での XRCC4 WT, XRCC4 K210R, XRCC4 K271R の発現レベルは XRCC4 K271R が他と比較して若干多かった。このことから、XRCC4 は核外環境のほうが寿命は長い、もしくは、核内では存在量が決まっていて XRCC4 K271R は核外に留まるので、核内の XRCC4 を規定量まで増やそうとして細胞内での XRCC4 K271R の発現が亢進すると考えた。DNA ligase IV (LIG4) の発現量については XRCC4 WT, XRCC4 K210R, XRCC4 K271R 発現細胞について目立った違いはなかったが、XRCC4 が存在しない環境では発現量が低かった (図 3.7)。

免疫沈降の結果 XRCC4 K271R は DNA ligase IV と相互作用を維持していたことがわかった (図 3.8)。図 3.6 の結果と併せて考えると XRCC4 K271R 発現株では DNA ligase IV は XRCC4 K271R と相互作用を維持しているのにもかかわらず、核への集積が起こらないという結果となった。この結果から DNA ligase IV が核への集積するために XRCC4 の核移行が必須という結論が得られた。DNA ligase IV と相互作用している XRCC4 の量は XRCC4 WT, XRCC4 K210R, XRCC4 K271R 発現細胞との間に顕著な差異は認められなかった (図 3.8)。

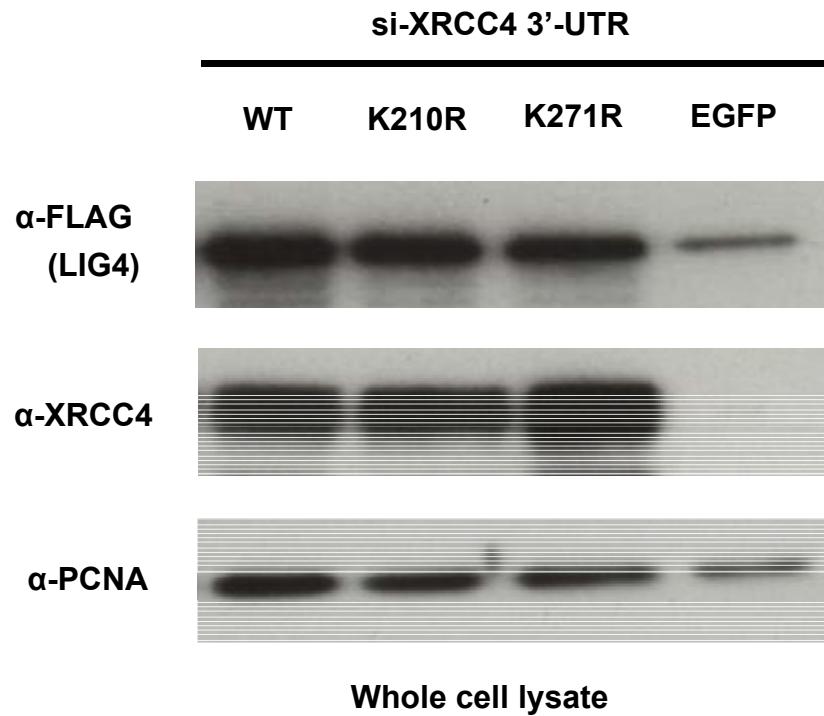


図 3.7 FLAG-LIG4 と EGFP-XRCC4 の発現レベル HeLa 細胞を図 3.6 と同じ条件下で処理し、抗 FLAG 抗体を使って免疫沈降を行い、Input として Whole Cell Lysate をサンプルとしてウエスタンブロットした。PCNA はローディングコントロールとした。

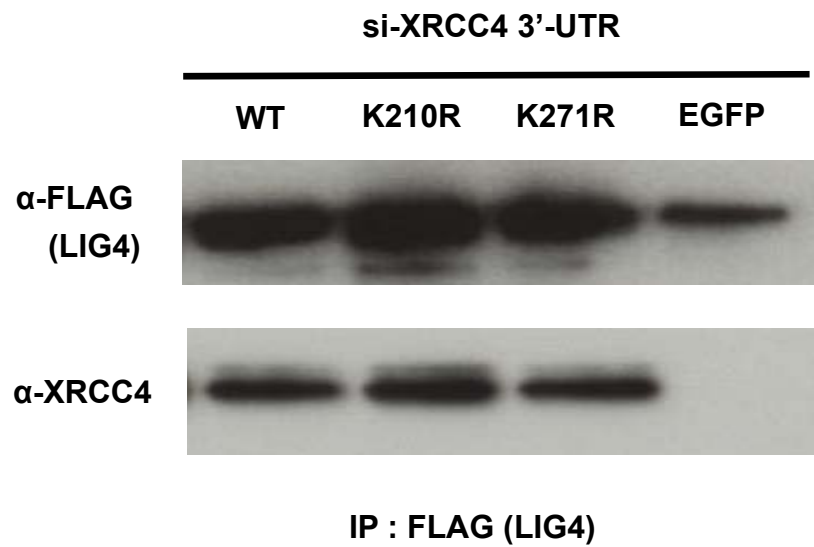


図 3.8 野生型または変異型 XRCC4 と LIG4 の相互作用 HeLa 細胞を図 3.6 と同じ条件下で処理し、抗 FLAG 抗体を使って免疫沈降を行い、ウェスタンブロットを行った。

3.3.5 XRCC4 K271R 及び K210R 変異体

M10細胞においてXRCC4 WT, XRCC4 K210R, XRCC4 K271Rの発現量に大きな違いはない(図 3.9)。これは、M10細胞の細胞質が小さいため図 3.7 で見られたようなXRCC4 K271Rの発現量が若干高くなるような差が結果に反映されにくいためである。

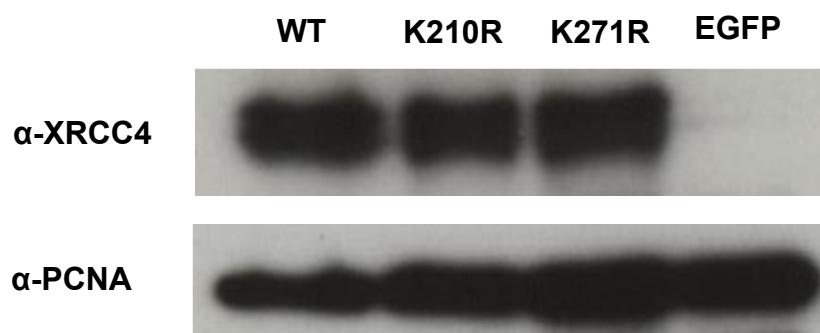


図 3.9 M10 細胞内の EGFP-XRCC4 発現レベル M10 細胞を用いて 2.2.3.3 の手法で XRCC4 WT, XRCC4 K210R, XRCC4 K271R の安定発現株をそれぞれ樹立し、ウエスタンブロットを行った。PCNA はローディングコントロールとした。

3.3.6 XRCC4 WT、K210R、K271R の Surviving Fraction

XRCC4 K210R 安定発現株の生存率は V. Yurchenko らの結果とは異なり、XRCC4 K210R 安定発現株の生存率と XRCC4 WT 安定発現株の生存率との間には有意差は見られなかった (図 3.10)。XRCC4 K271R 安定発現株の生存率と XRCC4 WT 安定発現株の生存率の間には有意差がみられた。図 3.6 の結果から XRCC4 K271R は核内に入れない分、生存率が落ちるのは一貫性があった。

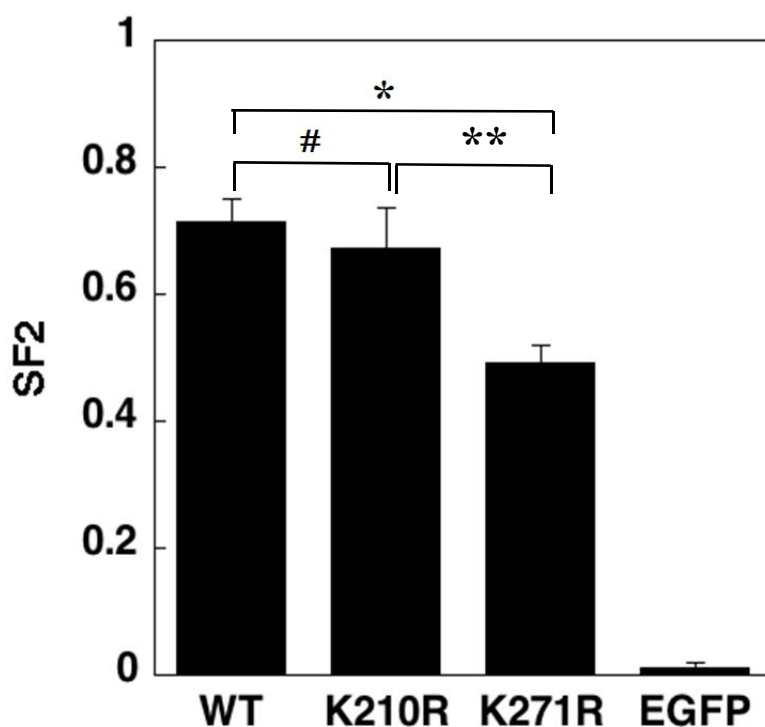


図 3.10 2Gy 照射後の XRCC4 変異体発現株の生存率 M10 細胞を使用し、第 2 章 2.2.6 の方法に準じてコロニー形成法を行い、生存率を評価した。ここでは 2Gy 照射後の Surviving Fraction を SF2 と表した。「*」は one-sided Welch's t-test の結果 $p < 0.001$ であること、「**」は one-sided Welch's t-test の結果 $p = 0.013$ であることを示す。一方、「#」は one-sided Welch's t-test の結果 $p = 0.20$ であることを示す。

3.3.7 XRCC4 WT、K210R、K271R の DNA 二重鎖切断修復の評価

M10 細胞 XRCC4 K271R, EGFP 安定発現株では 2Gy 照射後 2 時間が経過しても、 γ H2AX focus が残ったままである (図 3.12)。つまり、XRCC4 WT に比べて XRCC4 K271R は DNA 修復能が低下していた。XRCC4 K271R 安定発現株は DNA 修復機能が XRCC4 K271R 安定発現株よりも落ちている。これは 図 3.10 の結果と一致している (図 3.12)。

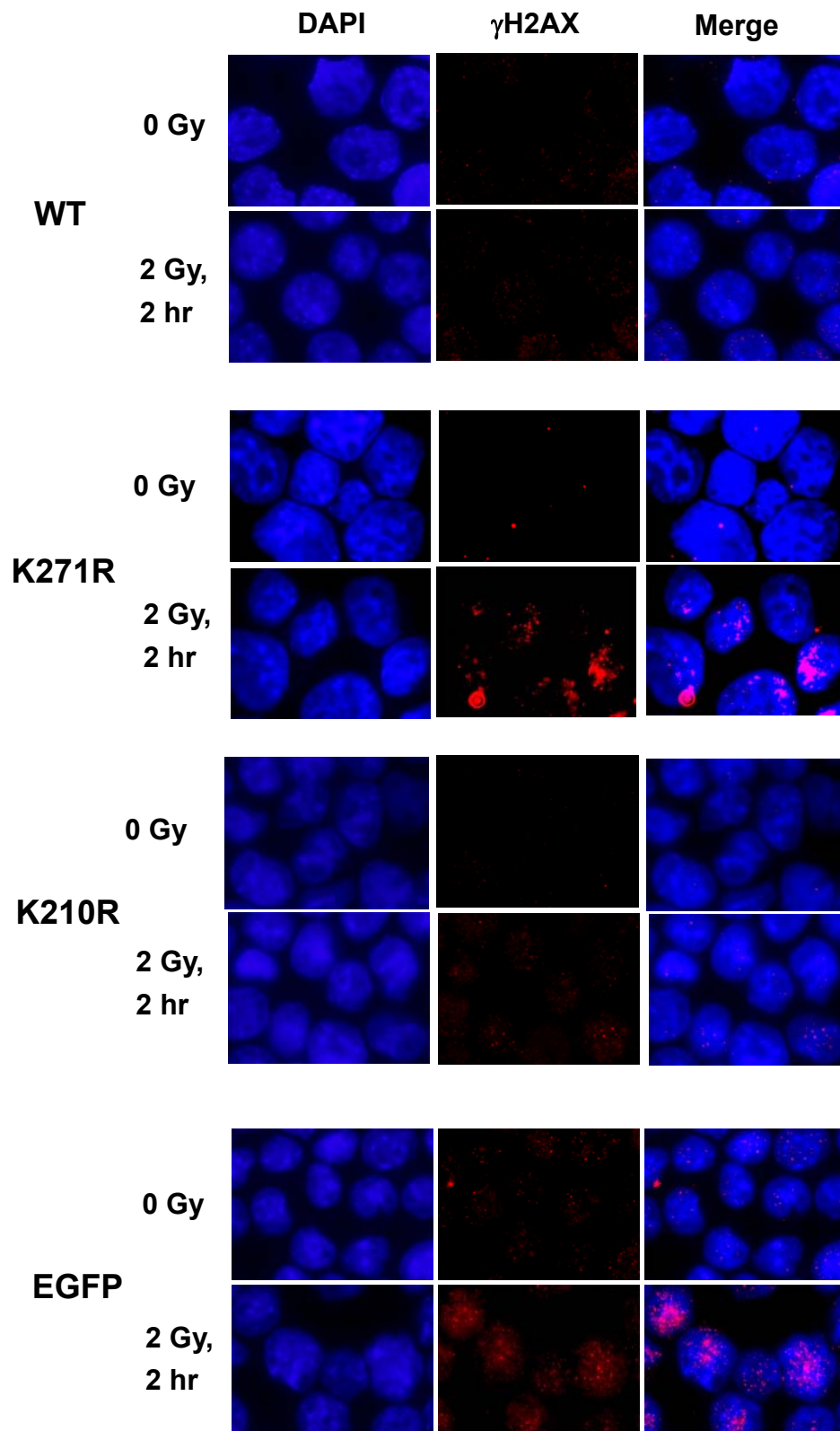


図 3.11 γ H2AX 免疫染色 M10 細胞 XRCC4 WT、XRCC4 K210R、XRCC4 K271R それぞれの安定発現株に 2Gy のガンマ線を照射し、2 時間インキュベ

トした細胞を遠心分離機でスライドガラスに圧着して γ H2AX 抗体を用いて免疫染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。核を DAPI で染色した。

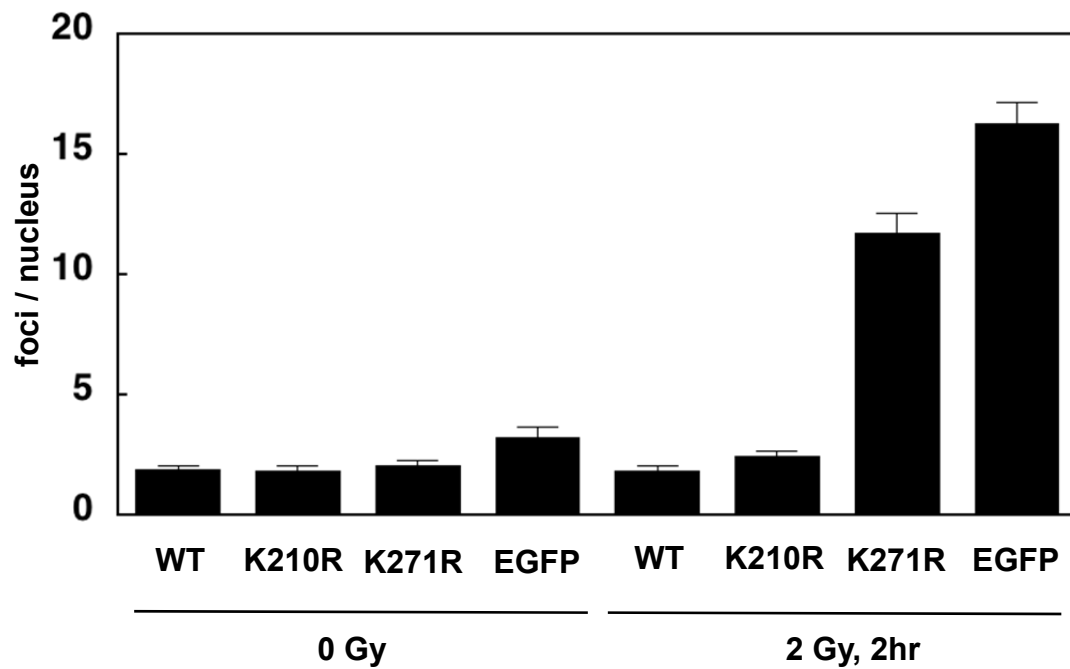


図 3.12 核一つあたりの γ H2AX のカウント数 図 3.11 の結果を解析した。DNA 修復能を核一つあたりに存在する γ H2AX focus 数で評価した。 γ H2AX focus 数は γ H2AX focus 数を核の数で除した数として定義した。三回以上の独立した実験から 100 個以上の細胞を計算対象とした。エラーバーは標準誤差を表す。

3.4 考察

これまでに DNA ligase IV の核局在に XRCC4 が不可欠であることが報告されているが[2]、反対に DNA ligase IV が XRCC4 の核局在に必要であるという報告もある[3]。従って、XRCC4/ligase IV 複合体を形成したときに XRCC4 が DNA ligase IV の核移行シグナル (Nuclear Localization Signal, NLS) のどちらかが正常であれば満足に XRCC4/ligase IV 複合体として機能するという報告も存在する[4]。ただし、コンピュータによるプログラム計算では DNA ligase IV のアミノ酸配列には代表的な核移行シグナルに該当する配列が存在しなかった。本研究では XRCC4 の 271 番目のリジンが XRCC4 自身と DNA ligase IV の核局在に必要であることを示した (図 3.5, 図 3.6)。タンパク質の核局在には二つの要素が必要であると考えている。それは核に移行する機能と核に移行した後のタンパク質の安定性である。そこで、理論的に考えられる核移行モデルを図 3.14, 図 3.15 にまとめた。一つ目のモデルは XRCC4/ligase IV 複合体を核外で形成し XRCC4 もしくは、DNA ligase IV の NLS が働くことで核に移行するというモデル (図 3.14 A)。二つ目は XRCC4 と DNA ligase IV はべつべつに核に移行した後で、核内で XRCC4/ligase IV 複合体を形成するというモデルである (図 3.14 B)。一つ目のモデルに従うと、XRCC4 自体に DNA 修復能が備わっていないが、DNA ligase IV の NLS によって XRCC4/ligase IV 複合体は核に移行する (図 3.15 C)。二つ目のモデルに従うと、DNA ligase IV は自身の NLS のおかげで核に移行する。しかし、XRCC4 K271R のように XRCC4 の核移行が正常に行われていない環境だと、DNA ligase IV が核内で安定して存在することができない (図 3.15 D)。

本研究では XRCC4 K271R の核移行機能の欠失と、核一つあたりに存在する γ H2AX focus 数によって XRCC4 K271R 発現 HeLa 細胞における DNA 修復機

能の低下を示した(図 3.10, 図 3.12, 図 3.13)。これらは 1999 年に Grawunder らが報告した、250 番目から 300 番目までのアミノ酸を欠いた XRCC4 を用いた実験の結果と整合する[5, 6]。本研究では XRCC4 の DNA 修復にかかわる部位をアミノ酸レベルで特定した。

また本研究では XRCC4 K210R に関して、これまで報告されている結果とは異なる結果となった。XRCC4 K210R に関係する論文は Yurchenko らが発表した 1 報だけである[7]。Yurchenko らが V(D)J 組換え異常 XRCC4 欠損細胞である XR-1 を用いて行った実験の結果では、XRCC4 K210R は核に局在しない上に、DNA 修復機能も XRCC4 欠損細胞と同程度まで低下すると報告されていた。しかし、本研究では XRCC4 K210R の核移行は正常で、 γ H2AX focus 数による評価では DNA 修復機能も XRCC4 WT に比べ顕著な低下は認められなかった(図 3.5, 図 3.6, 図 3.10, 図 3.12)。

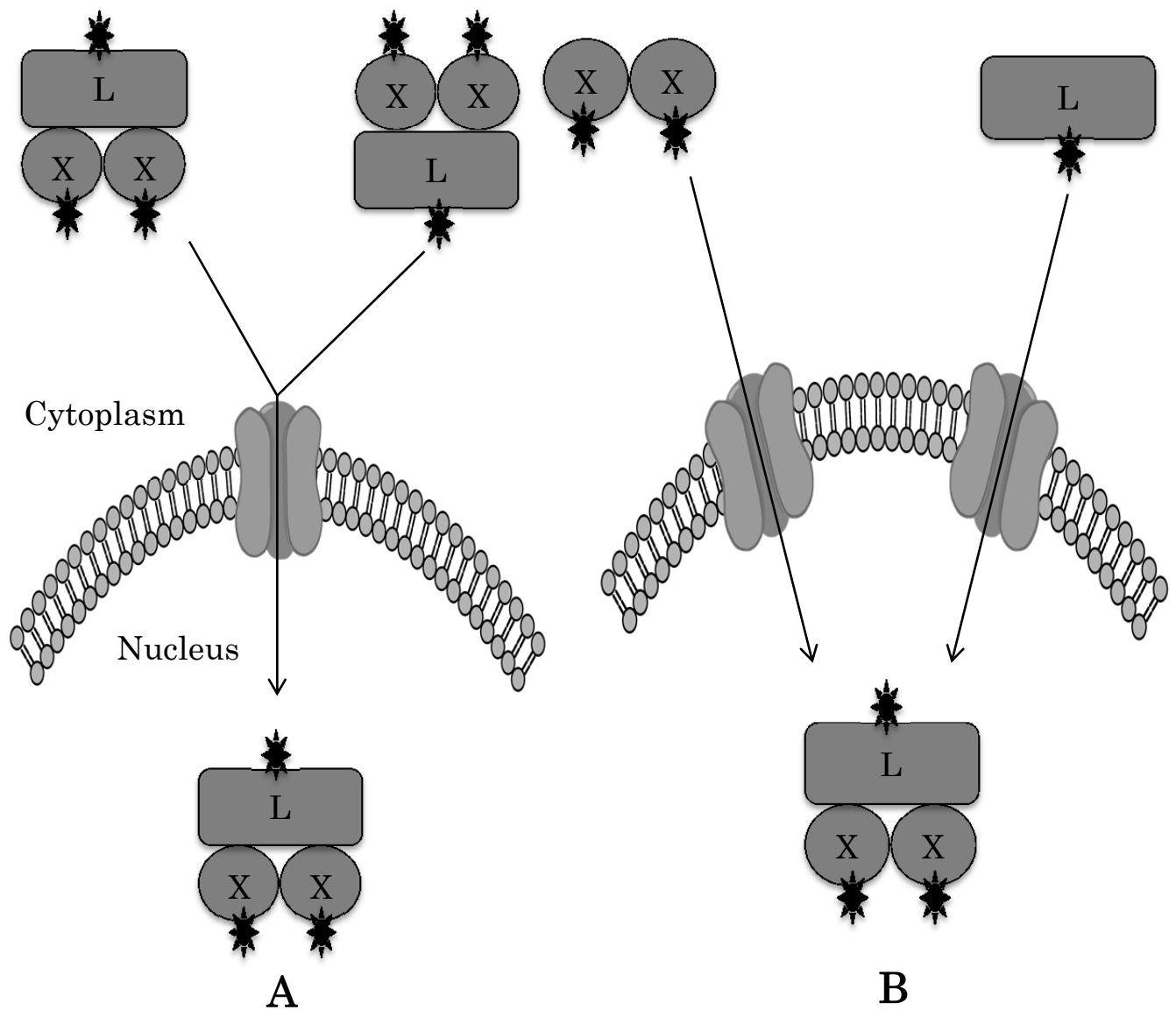


図 3.14 XRCC4 と ligase IV の考えられる核移行モデル

図 3.14 円状の X は XRCC4、長方形の L は DNA ligase IV、アステロイド型は正常に機能する NLS をそれぞれ表している。

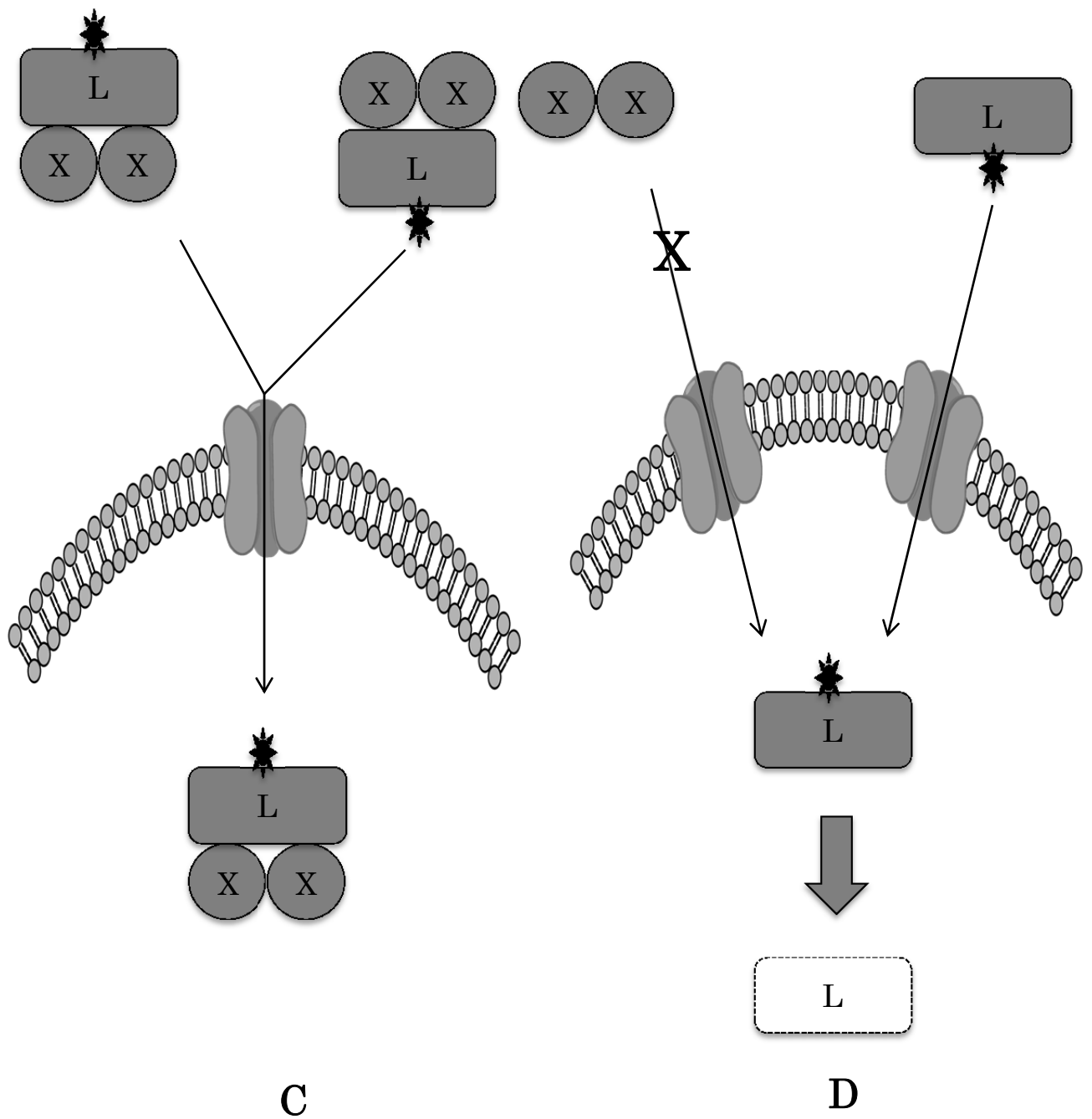


図 3.15 XRCC4 と ligase IV の考えられる核移行モデル

図 3.15 円状の X は XRCC4、長方形の L は DNA ligase IV、アステロイド型は正常に機能する NLS をそれぞれ表している。

3.5 参考文献

- [1] V. Yurchenko, Z. Xue, M. Sadofsky, SUMO modification of human XRCC4 regulates its localization and function in DNA double-strand break repair, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 1786-1794.
- [2] E. Berg, M.O. Christensen, R.I. Dalla, et al., XRCC4 controls nuclear import and distribution of Ligase IV and exchanges faster at damaged DNA in complex with Ligase IV, *DNA Repair (Amst.)* 10 (2011) 1232-1242.
- [3] J. Drouet, C. Delteil, J. Lefrancois, et al., DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 7060-7069
- [4] P.M. Girard, B. Kysela, C.J. Harer et al., Analysis of DNA ligase IV mutations found in LIG4 syndrome patients: the impact of two linked morphisms, *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004) 2369-2376.
- [5] U. Grawunder, D. Zimmer, P. Kulesza et al., Requirement for an interaction of XRCC4 with DNA ligase IV for wild-type V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in vivo, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 24708-24714.
- [6] M. Modesti, J. Hesse, M. Gellert, DNA binding of Xrcc4 protein is associated with V(D)J recombination but not with stimulation of DNA ligase IV activity, *EMBO J.* 18 (1999) 2008-2018.
- [7] V. Yurchenko, Z. Xue, M. Sadofsky, SUMO modification of human XRCC4 regulates its localization and function in DNA double-strand break repair, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 1786-1794.

第 4 章

第 2 章で放射線感受性を示した KR 変異体 XRCC4 に着目し、該当するリジンとその近傍のリジンをアルギニンに置換した KR 変異体 XRCC4 について機能を行った。KR 変異体の核局在、クロマチンへの結合、DNA ligase IV との相互作用、DNA 損傷修復能の評価、DNA 損傷部位への集積を野生型 XRCC4 と比較した。

第 5 章

第 2 章、第 4 章で得られた結果について PyMOL を使ってシミュレーションを行い、その結果を基に考察をした。

6 章

結論

本研究で示したことを総括した。

謝辞

研究活動全般にわたり格別なる御指導と御高配を賜りました松本 義久准教授には甚大なる深謝の意を表する。研究のみならず、事務業務、物事に取り組む姿勢や考え方など多くのことをご指導、ご教示してくださったことは学生、研究生活を越えて生涯大切にできることが多くありました。ここに深く感謝の意を表する。本学コバルト照射室の依田 功氏には照射に関して有益なご助言を戴いた。ここに感謝の意を表する。松本研究室の Mukesh Kumar Sharma 博士 (インド・R.R. Government College)、Radhika Pankaj Kamdar 博士、Ambika Sharma 博士、能村 悠司博士、今道 祥二氏、劉 嗣誠氏、Rujira Wanotayan 氏、木村 小督氏、梶本 響子氏、前 泰裕氏、国吉 真吾氏、吉田 和起氏、北村 雅美氏、Ali Reza Amiri Moghani 氏、谷田部 成一郎氏 福田 彬人氏には研究の遂行にあたり、日頃より有益な討論、助言や多くの協力を頂いた。ここに感謝の意を表する。

東北大学加齢医学研究所の安井 明先生、菅野新一郎先生、渡邊 怜子先生にはレーザー照射実験などの御指導を頂き、熊本大学薬学部・大学院薬学教育部の中村 照也先生には構造モデル解析の御指導を頂いた。

学生生活を支えていただいた家族に感謝の意を表する。父保には寛容な心で筆者を支えていただきました。母慶子には慈愛に満ちた精神で筆者を支えていただきました。筆者が研究に専念できたのはこのような素晴らしい家族が暖かく応援してくださったからである。ここに深く感謝の意を表する。