

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	APTX複合体のDNA損傷修復における役割
Title(English)	
著者(和文)	今村力也
Author(English)	Rikiya Imamura
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12676号, 授与年月日:2024年3月26日, 学位の種類:課程博士, 審査員:松本 義久,塚原 剛彦,片淵 竜也,鷹尾 康一郎,木村 宏
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12676号, Conferred date:2024/3/26, 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

令和5年度 博士論文

# APTX 複合体の DNA 損傷修復における役割

東京工業大学 環境・社会理工学院 融合理工学系

原子核工学コース 松本義久研究室

今村 力也

指導教員 松本義久 教授

# 目次

第1章 序論.....	8
1-1 細胞の恒常性と DNA 損傷.....	9
1-2 細胞内における DNA 損傷応答機構.....	12
1-2-1 細胞周期チェックポイント.....	12
1-2-2 アポトーシス.....	14
1-2-3 DNA 損傷修復.....	15
1-3 DNA 修復因子と遺伝性疾患.....	26
1-4 DNA 修復を標的とした化学療法.....	28
1-5 APTX 複合体.....	32
1-5-1 APTX.....	32
1-5-2 XRCC1.....	36
1-5-3 XRCC4.....	37
1-6 本研究の目的.....	38
第2章 原理・実験材料・実験方法.....	39
2-1 原理と実験材料.....	40
2-1-1 細胞.....	40
2-1-2 プラスミド DNA.....	41
2-1-3 細胞へのプラスミド DNA の導入(トランスフェクション).....	47
2-1-4 RNA 干渉による目的タンパク質発現抑制.....	49
2-1-5 CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術.....	50
2-1-6 薬品・溶液データ.....	53
2-1-7 抗体データ.....	54
2-1-8 プライマーデータ.....	55
2-2 細胞処理.....	56
2-2-1 放射線処理.....	56
2-2-2 薬剤処理.....	57

2-2-3	サンプル回収.....	59
2-3	実験方法.....	60
2-3-1	Western Blotting 法(WB).....	60
2-3-2	蛍光免疫染色法(Immunofluorescence staining: IF).....	62
2-3-3	Laser micro-irradiation および Live cell imaging 法.....	64
2-3-4	フローサイトメトリー法および End joining アッセイ.....	66
2-3-5	アガロースゲル電気泳動.....	68
2-3-6	免疫沈降法 (Immunoprecipitation: IP).....	69
2-3-7	コロニー形成法による細胞生存率測定.....	71
第3章	DNA 二本鎖切断修復における APTX 複合体の役割.....	72
3-1	第3章の目的.....	73
3-2	ゲノム編集による APTX ノックアウト細胞の樹立および表現型.....	74
3-3	APTX の DNA 損傷部位への集積挙動.....	93
3-4	DSB 修復における APTX と XRCC4 のエピスタシス(Epistasis).....	99
3-5	第3章のまとめ.....	107
第4章	PARP1/2 阻害剤による DNA 損傷修復における APTX 複合体の役割.....	110
第5章	結論.....	111
5-1	まとめ.....	112
5-2	本研究の将来展望.....	113
	謝辞.....	115

# 目次

図 1-1	細胞の構造(エッセンシャル細胞生物学より引用).....	10
図 1-2	内的・外的要因による様々な種類の DNA 損傷.....	11
図 1-3	DNA 損傷、複製ストレス誘発細胞周期チェックポイント.....	13
図 1-4	塩基除去修復(BER)と DNA 一本鎖切断修復(SSBR).....	16
図 1-5	グローバルゲノムヌクレオチド除去修復(Global genome NER)と転写共役型 ヌクレオチド除去修復(Transcription-Coupled NER).....	18
図 1-6	DNA 二本鎖切断修復の経路選択.....	20
図 1-7	非相同末端結合(NHEJ).....	21
図 1-8	相同組み換え修復(HRR).....	23
図 1-9	代替的末端結合(MMEJ).....	25
図 1-10	Camptothecin (CPT)による S 期依存的な DNA 二本鎖切断.....	29
図 1-11	PARP1/2 阻害剤による細胞障害性.....	31
図 1-12	APT <sub>X</sub> のドメインマップ.....	33
図 1-13	DNA ligase による Ligation 反応.....	34
図 1-14	SSBR および NHEJ における APT <sub>X</sub> の機能.....	35
図 1-15	AOA1 で報告されている APT <sub>X</sub> 変異部位[55].....	35
図 1-16	XRCC1 のドメインマップ.....	36
図 1-17	XRCC4 のドメインマップ.....	37
図 2-1	EGFP-APT <sub>X</sub> ベクター.....	42
図 2-2	mCherry2-XRCC1 ベクター.....	43
図 2-3	3xFLAG-XRCC1 ベクター.....	44
図 2-4	pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 ベクター.....	45
図 2-5	pCBASceI ベクター.....	46
図 2-6	ゲノム編集技術の原理[88].....	51
図 2-7	CRISPR-Cas9 システム[88].....	51
図 2-8	Zeiss 蛍光顕微鏡.....	63

図 2-9 Leica TCS SP8 LIGHTNING 共焦点レーザー顕微鏡 (国立がん研究センター)	65
図 2-10 フローサイトメーター(Beckman Coulter)	67
図 2-11 pEJ の模式図	67
図 2-12 コロニー形成法により 6-well plate 上で染色されたコロニー(紫色)	71
図 3-1 APTX 遺伝子座および対応するドメイン	78
図 3-2 U2OS <i>APTX</i> <sup>-/-</sup> 細胞における APTX exon 6 の 2 つのノックアウト(KO)対立遺伝子の DNA 配列	79
図 3-3 U2OS 野生型(WT)および <i>APTX</i> <sup>-/-</sup> 細胞における APTX および PARP1 タンパク質の Western Blotting による解析	80
図 3-5 U2OS WT、 <i>APTX</i> <sup>-/-</sup> および <i>APTX</i> <sup>-/-</sup> + GFP-APTX 細胞における APTX および GFP-APTX タンパク質の Western Blotting 解析	82
図 3-8 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 処理後の U2OS WT および <i>APTX</i> <sup>-/-</sup> 細胞における ADP-ribose 染色の代表的な画像	85
図 3-9 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 処理後の U2OS WT および <i>APTX</i> <sup>-/-</sup> 細胞の ADP-ribose 蛍光強度の定量化	86
図 3-10 $\gamma$ 線 5 Gy 照射後 4 時間培養(IR 4h)の U2OS WT、 <i>APTX</i> <sup>-/-</sup> 細胞における $\gamma$ H2AX と 53BP1 フォーカス残存数の代表的な画像	87
図 3-11 $\gamma$ 線 5 Gy 照射後 4 時間培養(IR 4h)の U2OS WT、 <i>APTX</i> <sup>-/-</sup> 細胞における細胞あたりの $\gamma$ H2AX と 53BP1 の残存フォーカス数	88
図 3-12 1 $\mu$ M CPT を 1 時間処理した後の U2OS WT、 <i>APTX</i> <sup>-/-</sup> 細胞における $\gamma$ H2AX 蛍光強度の代表的な画像	89
図 3-13 1 $\mu$ M CPT を 1 時間処理した後の U2OS WT、 <i>APTX</i> <sup>-/-</sup> 細胞における $\gamma$ H2AX 蛍光強度の定量化	90
図 3-14 1 $\mu$ M CPT を 1 時間処理した後の U2OS WT、 <i>APTX</i> <sup>-/-</sup> 細胞の 53BP1 蛍光強度の代表的な画像	91
図 3-15 1 $\mu$ M CPT を 1 時間処理した後の U2OS WT および <i>APTX</i> <sup>-/-</sup> 細胞の 53BP1 蛍光強度の定量化	92
図 3-16 免疫沈降(IP)による GFP-APTX と XRCC1 および XRCC4 との結合解析	95
図 3-17 U2OS GFP-APTX 安定発現細胞における siRNA による XRCC1 と XRCC4 発現抑制	96

図 3-18 XRCC1(siXRCC1)または XRCC4(siXRCC4)抑制下における U2OS GFP-APT <sub>X</sub> 安定発現細胞のレーザー照射(Photobleaching)後の代表的なライブセル画像.....	97
図 3-19 RNA 干渉後の各条件における相対的な GFP-APT <sub>X</sub> 蛍光強度.....	98
図 3-20 siRNA による XRCC4 抑制後の U2OS WT および APT <sub>X</sub> <sup>-/-</sup> 細胞における XRCC4 と APT <sub>X</sub> の Western blotting 解析.....	102
図 3-21 $\gamma$ 線 5 Gy 照射後 4 時間培養(IR 4h)における XRCC4 抑制下(siXRCC4)での U2OS WT、APT <sub>X</sub> <sup>-/-</sup> 細胞における細胞あたりの $\gamma$ H2AX の残存フォーカス数..	103
図 3-22 $\gamma$ 線 5 Gy 照射後 4 時間培養(IR 4h)における XRCC4 抑制下(siXRCC4)での U2OS WT、APT <sub>X</sub> <sup>-/-</sup> 細胞における細胞あたりの 53BP1 の残存フォーカス数.	104
図 3-23 siAPT <sub>X</sub> 、siXRCC4 またはその両方を導入した EJ-U2OS 細胞における APT <sub>X</sub> と XRCC4 の Western Blotting 解析.....	105
図 3-24 各条件における End joining (GFP positive)の割合.....	106
図 3-25 研究結果より予想される DSB 修復における APT <sub>X</sub> 複合体のワークモデル.....	109

## 表目次

表 2-1 SDS-PAGE 用のゲルの組成 .....	53
表 2-2 使用試薬の組成.....	53
表 2-3 実験でを使用した Primer .....	55

# 第 1 章 序論

## 1-1 細胞の恒常性と DNA 損傷

ヒト細胞などの真核生物細胞では、細胞核内に染色体 DNA が存在し、タンパク質翻訳が行われる細胞質から2層の核膜によって区切られている(図 1-1)。細胞がその恒常性を維持するためには、細胞核と細胞質間での様々な分子の移動が行われ、細胞内での正常な働きが保たれていることが求められる。これらの働きの担い手であるタンパク質は DNA→RNA→タンパク質という遺伝情報の流れ(セントラルドグマ)によって生産される[1]。すなわち、タンパク質の設計図となる DNA が正しい形で保存されていることが細胞内の恒常性につながる[2]。しかし、細胞内では様々な要因により多種多様な DNA 損傷が生じている(図 1-2)[3]。これらの DNA 損傷が放置されると、細胞は即座に致死的な DNA 異常を蓄積し機能を停止することが考えられる。

多種多様な DNA 損傷の由来は、内的・外的要因に大別される。内的要因の最たる例は細胞代謝による副産物である。ミトコンドリアでのアデノシン三リン酸(Adenosine-tri-phosphate: ATP)合成などの電子伝達系の過程、免疫反応の過程、食細胞がウイルスや細菌に感染した細胞を殺すために酸化バーストを起こす時、ペルオキシソームでの脂質過酸化の時など、多くの細胞プロセスでスーパーオキシドアニオン、OH ラジカル、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)などの活性酸素種(Reactive oxygen species: ROS)が生成され、これらの内因性 ROS は酸化的 DNA 損傷、主に塩基損傷を引き起こすことが知られている[4-7]。他には、生理的条件下で DNA の一部の化学結合が自然に崩壊することである。ヌクレオチドは加水分解して脱塩基部位(AP site)になることがあり、1日に1細胞当たり2000~10000回の脱プリンが起こると推定されている[3]。また、DNA 構成要素の一つであるシトシンは自然状態で脱アミノ化してウラシルに変換されることがあり、細胞内で1日に60~500回起こると推定されている[8]。加えて、DNA 複製、転写に起因して DNA 損傷が発生する場合がある。I 型トポイソメラーゼ(Top1)、II 型トポイソメラーゼ(Top2)は転写や DNA 複製の際に、DNA 二重らせん DNA のそれぞれ片方または両方の鎖にニックを入れ、それを解きほぐすことによって、スーパーコイル二重らせん DNA を弛緩させる。この間に一時的な内在性の DNA 一本鎖切断(Single-strand break: SSB)および DNA 二本鎖切断(Double-strand break: DSB)が誘導される。通常は Top1、Top2 によってニックは即座に再結合されるが、再結合が頓挫する可能性がある[9]。

外的要因の主な例は紫外線(Ultra violet: UV)である。UV は DNA の二重らせん構造を歪める鎖内架橋(Intra-strand crosslink)を誘発し、シクロブタンピリミジン二量体(CPD)や6-4 光生成物(6-4PP)を生じることが知られている[10]。また、γ線や X 線などの電離放射線(Ionizing radiation: IR)も DNA 損傷を引き起こす。IR によって

引き起こされる DNA 損傷は様々あり、塩基損傷、鎖内架橋、鎖間架橋(Inter-strand crosslink)、SSBおよびDSBと多くの損傷を誘発する。ヒト正常二倍体細胞では、放射線 1 Gy 当たり、塩基損傷が約 1,000~3,000 個、SSBが約 1,000 個、DSBが約 20~50 個生じると考えられている。DSBは生じる量としては最少ではあるが、その損傷の具合から全ての DNA 損傷の中で最も重篤であると考えられており、放射線の生物影響を考えるにあたり重要な位置を占める[11, 12]。他にも、タバコの煙に含まれる多環芳香族炭化水素や、加熱しすぎた食品に含まれる複素環アミンなどの外因性遺伝毒性物質も付加体を DNA に作用させることで DNA 損傷を誘導する可能性がある[10]。

我々が、DNA 損傷が生じても正常な細胞の状態を保つことができるのは、DNA 損傷の効率的な修復(DNA 損傷修復)、修復しきれない DNA 損傷をもった細胞を自主的に細胞死へ誘導(アポトーシス)するなどの細胞内の恒常性を保つための DNA 損傷応答が機能しているからである(1-2 章で述べる)。

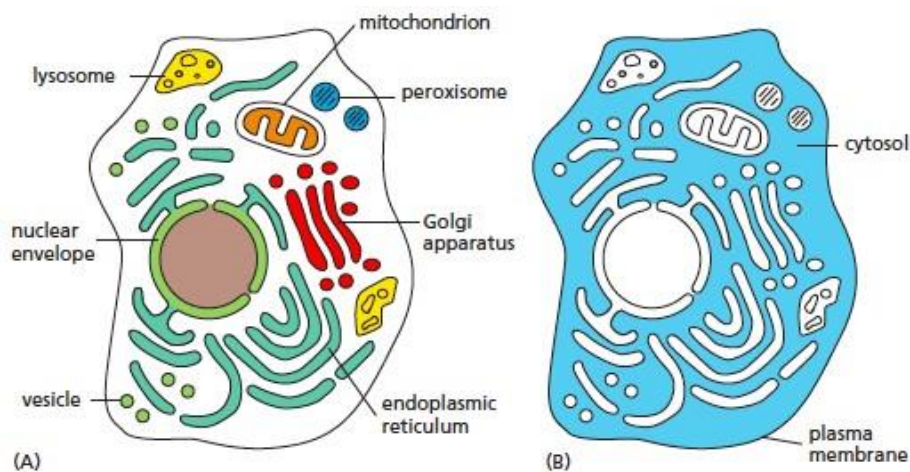


図 1-1 細胞の構造(エッセンシャル細胞生物学より引用)

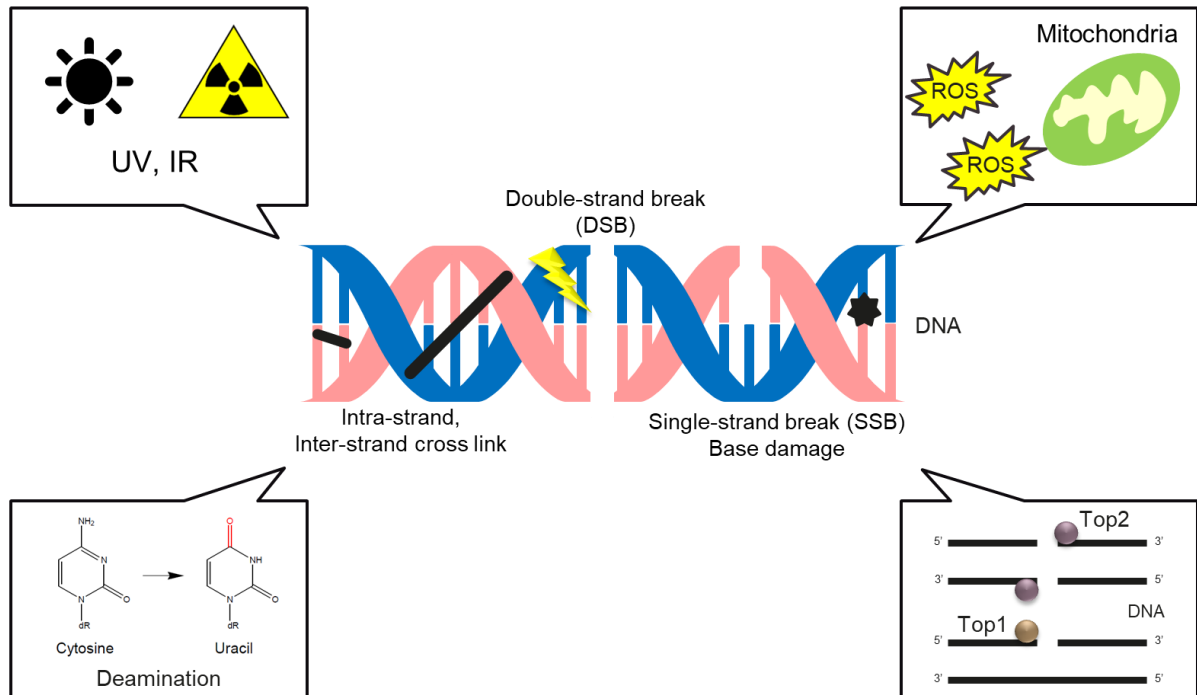


図 1-2 内的・外的要因による様々な種類の DNA 損傷

## 1-2 細胞内における DNA 損傷応答機構

1-1 章で述べたように、生体は DNA 損傷に対する様々な防御機構を備えている。この章ではそれらの、DNA 損傷応答機構について述べる。

### 1-2-1 細胞周期チェックポイント

細胞周期チェックポイントとは、細胞が細胞周期を停止させる機構のことを指す。中でも、DNA 損傷やゲノムストレスに応じて行われる G1/S チェックポイント、G2/M チェックポイントはよく知られている。G1/S チェックポイントでは、S 期に入る前に外部環境に適しているか、また、DNA に損傷がないかを確認している。細胞の外部環境が細胞にとって好ましくない場合や DNA 修復が必要な場合は G1 期の進行を停止、特殊な休止状態である G0 期に突入させ、細胞周期の流れを変える。主に、ATM、CHK2、p53 タンパク質のシグナル伝達経路を通して S 期進行に必要なタンパク質をダウンレギュレートすることが知られている(図 1-3)。また、G2/M チェックポイントでは、有糸分裂に入る前に DNA の修復と複製が完了しているかを確認する。主に、ATR、CHK1 タンパク質のシグナル伝達経路を通して M 期に必要なタンパク質をダウンレギュレートすることが知られている(図 1-3)。そして、他の細胞からのシグナルに応じて細胞周期を制御するのもこれらのチェックポイントのもつ役割である[13]。

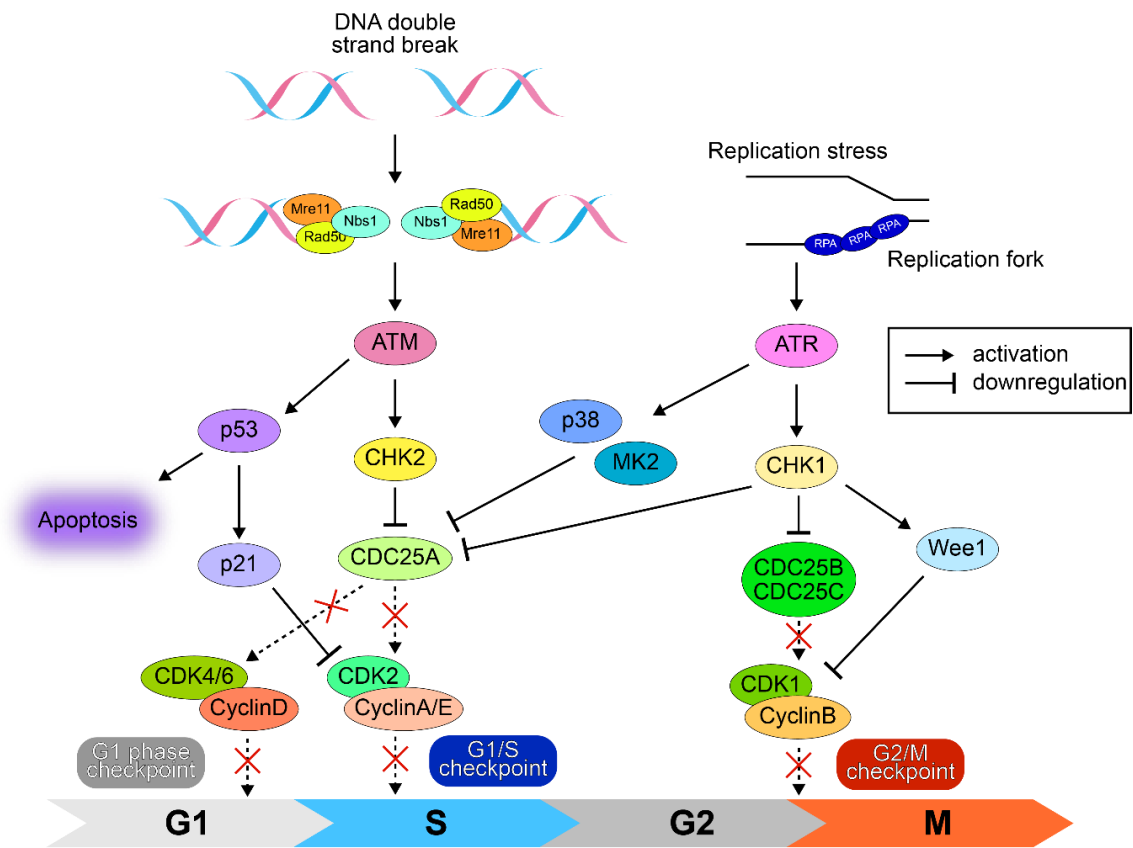


図 1-3 DNA 損傷、複製ストレス誘発細胞周期チェックポイント

## 1-2-2 アポトーシス

アポトーシスとは、細胞が自発的に死ぬ(プログラム細胞死)ことである。アポトーシスの発生時、細胞の収縮、核の凝集、DNA の断片化が起こり、細胞自体がいくつかに分裂し、アポトーシス小体が形成される。そして、アポトーシスを起こした細胞は、最終的にマクロファージにより貪食される。同じ細胞死にネクローシスというものがあり、細胞の膨大、溶解、崩壊などによって細胞が消失する現象である。しかし、ネクローシスはアポトーシスとは異なり外部要因による細胞の他殺なのでアポトーシスとは区別される。DNA 損傷を受けた細胞や、がん遺伝子を活性化した異常な細胞を生体から排除する機構であるアポトーシスは、細胞のがん化を抑制する上で最も重要な機構である。特に、DNA 損傷応答に関連したアポトーシスではがん抑制遺伝子である p53 を介した経路がよく知られている。p53 が正常に機能している細胞では、DNA 損傷誘導下で高頻度にアポトーシスが引き起こされる。DNA 損傷により p53 が安定化し、細胞内に蓄積することにより、転写因子としての活性が上昇するからである。p53 によって発現が調節される Bax、Noxa、PUMA などの遺伝子産物はミトコンドリアに局在して Cytochrome c をミトコンドリア内から流出させる機能を有している。Cytochrome c は Caspase-9 の活性化因子である Apaf-1 と結合し、これらの複合体内でカスパーゼ活性を有する Caspase-9 が作られ、下流のエフェクターカスパーゼを活性化 (Caspase-3、-6、-7 の切断) することによりアポトーシス関連分解反応が引き起こされる [14]。

### 1-2-3 DNA 損傷修復

DNA 損傷修復とは、何らかの原因で DNA への損傷が発生した場合に、その損傷を修復する機構である。損傷を受けた DNA は、細胞内で素早く損傷の検出ができるように形状を変化させる。そして、DNA 損傷修復に関連するタンパク質群が DNA 損傷の発生している部位、またはその周辺に動員・結合し、他の分子との結合や複合体を形成することによって DNA 修復が行われる。

#### 1. 塩基除去修復・一本鎖切断修復

細胞内で発生した塩基損傷並びに一本鎖切断は塩基除去修復 (Base excision repair: BER) および一本鎖切断修復 (Single-strand break repair: SSB) により修復される。両修復経路は図 1-4 に示すように、その大部分が重複している経路である。

SSB において、SSB は酵素 Poly ADP-ribose polymerase 1 (PARP1)、Poly ADP-ribose polymerase 2 (PARP2) によって検出され、同時に PARP1/2 は SSB 部位でポリ ADP リボシル化 (PARylation) を媒介する。この ADP リボシル化は足場タンパク質である X-ray repair cross complementing 1 (XRCC1) と相互作用し、XRCC1 の損傷個所への集積を可能にする。XRCC1 は細胞内で DNA Ligase III (LIG3)、DNA polymerase  $\beta$  (POLB)、Poly nucleotide kinase phosphatase (PNKP) および Aprataxin (APTX) といった酵素と物理的に結合していることから、SSB 関連因子の損傷部位への集積は XRCC1 依存的であることが分かっている [15]。SSB の損傷部位における DNA 末端が付加物などにより即座に結合できない場合は、XRCC1 と結合した PNKP および APTX により末端処理 (End processing) が行われる。その後、XRCC1 と結合した POLB 並びに LIG3 により鎖の合成および末端結合 (Ligation) が行われ、修復が完了する [15, 16]。

BER において、塩基損傷は DNA グリコシラーゼにより検知される。DNA グリコシラーゼは Monofunctional 型または Bifunctional 型に大別され、Monofunctional 型では塩基と糖の間の N-グリコシド結合を切断することで損傷した塩基を DNA 鎖の中から取り除き、脱塩基部位 (AP site) を作る。この AP サイトはヌクレアーゼ AP endonuclease 1 (APE1) により SSB に変換され PARP1/2 を刺激し、以降 SSB の経路を介して修復される。一方、Bifunctional 型は N-グリコシド結合の切断だけでなく AP リアーゼ活性を持ち、 $\beta, \gamma$  脱離反応を介して AP 部位を分解し、リン酸化 3' 末端を持つ塩基の脱落した SSB へと変換する。そして、PARP1/2 が媒介する PARylation による XRCC1 の損傷部位

への集積並びに PNKP による 3' 末端の脱リン酸化を経て、POLB および LIG3 によって DNA 末端が結合される [16, 17]。

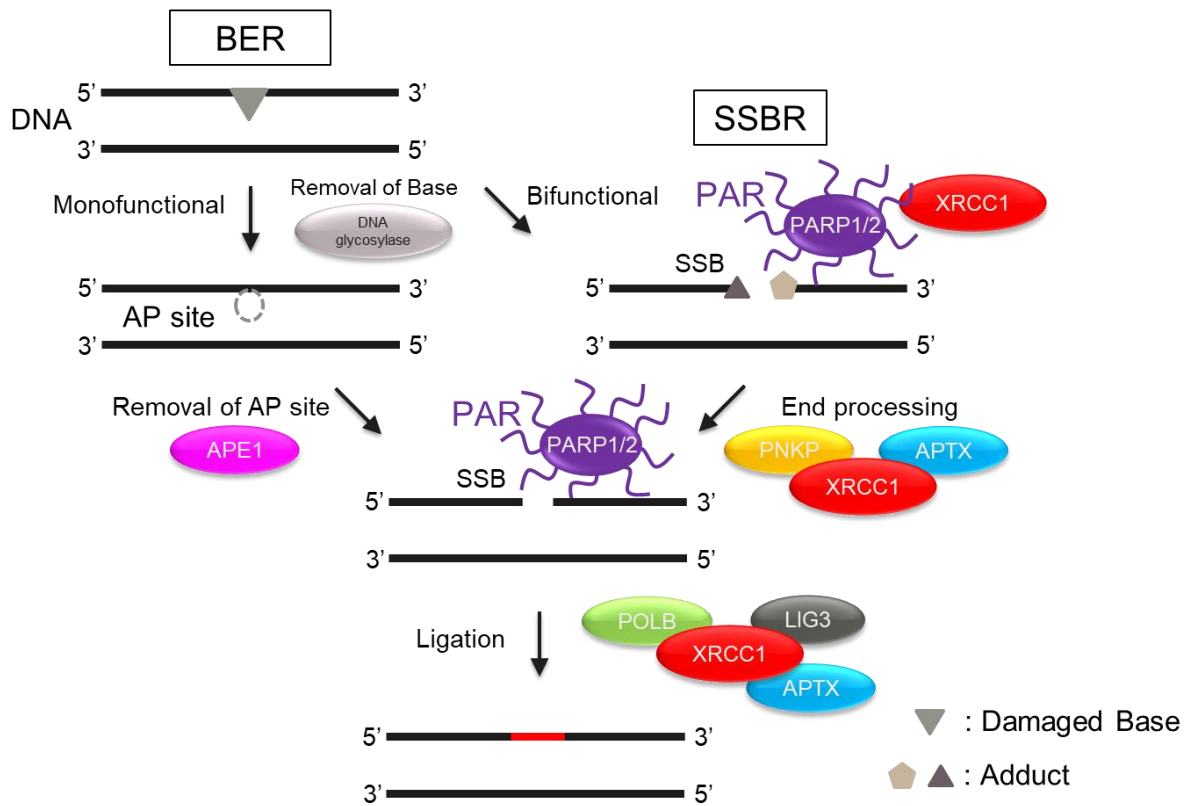


図 1-4 塩基除去修復 (BER) と DNA 一本鎖切断修復 (SSBR)

## 2. ヌクレオチド除去修復

ヌクレオチド除去修復(Nucleotide excision repair: NER) は、DNA の二重らせんを歪ませるような付加体や架橋を含む、様々な DNA 損傷を認識し修復する。特に UV 暴露により生成されるシクロブタンピリミジンダイマー (CPD) および 6-4 ピリミジン光生成物 (6-4PP) などの架橋に対する修復経路としてよく知られている。NER はグローバルゲノム NER(Global genome NER: GG-NER) および転写共役 NER(Transcription-coupled NER: TC-NER) の経路に大別される(図 1-5)。GG-NER は、ゲノムのあらゆる場所で二重らせん構造の歪みを引き起こす DNA 付加体を認識し修復する経路であり、主に 6-4PP は XPC 複合体に、CPD は XPE 複合体(DDB 複合体とも呼ばれる)によりそれぞれ検知される。TC-NER は転写を阻害する付加体を取り除く修復経路であり、伸長している RNA polymerase が付加体と遭遇した場合に CSA および CSB が損傷を認識し集積する。損傷の検出後、GG-NER と TC-NER は重複した経路をたどる。まず転写因子 TFIIH、ヘリカーゼ XPB および XPD 複合体により二重らせん構造の解きほぐしが行われる(バブル形成)。バブル形成後、ヌクレアーゼ XPG および XPF 複合体によりバブルの 3' 末端と 5' 末端にそれぞれ二重の切開が行われる。残った一本鎖 DNA(Single-strand DNA: ssDNA) ギャップは PCNA と結合した DNA polymerase  $\delta$  (POLD)あるいは DNA polymerase  $\epsilon$  (POLE) によって埋められ、PCNA-LIG1 複合体(または XRCC1-LIG3)によって末端が結合される(Ligation) [18]。最近の研究では 6-4PP の修復において、APE1 依存的 BER により修復されているという報告もある [19]。

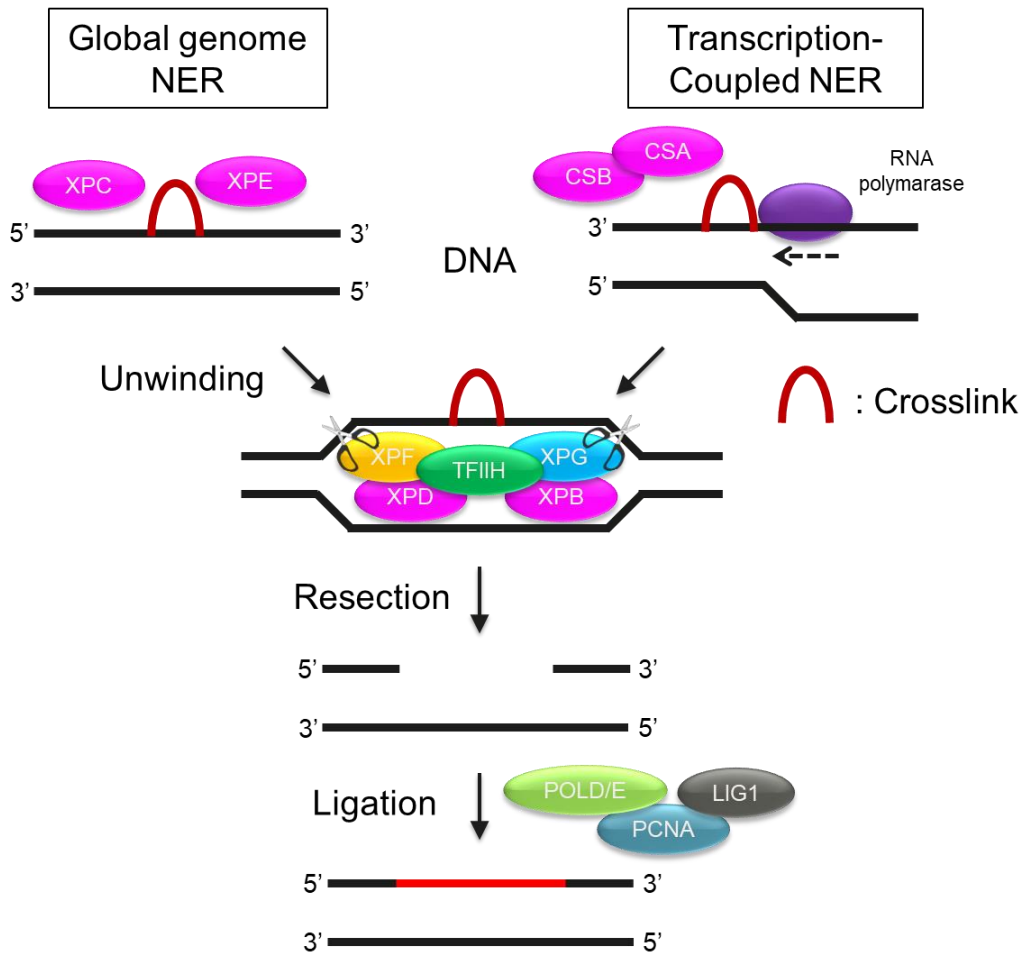


図 1-5 グローバルゲノムヌクレオチド除去修復(Global genome NER)と転写共役型ヌクレオチド除去修復(Transcription-Coupled NER)

### 3. 二本鎖切断修復

生体、細胞にとって最も重篤な損傷である DSB はヒトを含む脊椎動物細胞において、主に 3 つの機構によって修復されることが分かっている [20, 21]。1 つ目が相同組換え修復 (Homologous Recombination repair: HRR) 、2 つ目が非相同末端結合 (Non-Homologous End-Joining: NHEJ)、3 つ目が代替的末端結合 (alternative End joining: alt-EJ , Theta-mediated end joining: TMEJ or Microhomology-mediated end joining: MMEJ) である。生じた DSB をどの経路で修復するかは細胞周期、損傷領域などに応じて選択されていることが示唆されている。以下の図 1-6 はそれぞれの経路についてのイニシエーションおよび促進する因子を表している。最初に、DSB 末端は Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1)、p53 binding protein 1 (53BP1) がそれぞれ媒介する末端切除 (End resection) または末端保護 (End protection) のどちらかの修飾を受け、End protection が選択された場合は NHEJ を介して修復される [20]。End resection が選択されると、DSB 末端から 3' 方向に約 100 塩基ほど下流の位置において 3' → 5' 方向で DNA が分解され、一本鎖 DNA (single-strand DNA: ssDNA) が露出する。ここから 2 つの経路に分岐し、ヘリカーゼ Bloom (BLM)、ヌクレアーゼ DNA replication helicase/nuclease 2 (DNA2) ら 5' → 3' 方向にさらなる End resection (分解) が行われると HRR に、露出した ssDNA に PARP1/POLQ が媒介するアニーリング (Annealing) が行われると MMEJ によって修復される [20, 21]。以下の項目でイニシエーション後のそれぞれの経路について述べる。

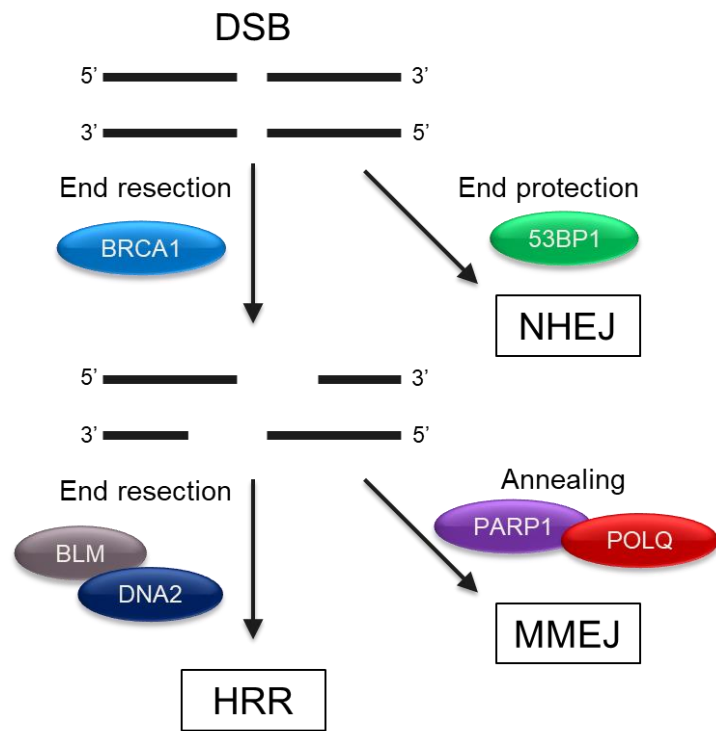


図 1-6 DNA 二本鎖切断修復の経路選択

## A) 非相同末端結合 (NHEJ)

NHEJ では、53BP1 による末端切除抑制の下で Ku70 および Ku80 から構成される Ku ヘテロダイマーにより損傷が検知され、DNA 末端が保護される (End protection) (図 1-7)。そして、Ku を指標にキナーゼ DNA-PKcs、足場タンパク質 Paralogue of XRCC4 and XLF (PAXX)、XRCC4-like factor (XLF)、X-ray repair cross complimenting 4 (XRCC4) および XRCC4 と結合した PNKP、APTX、DNA ligase IV (LIG4)、ヌクレアーゼ Artemis が DNA 末端に動員される (Synapsis 形成)。損傷末端の形状に応じて Artemis による DNA 末端の分解、PNKP および APTX による End processing が行われ、XRCC4-LIG4 複合体により末端が結合される (Ligation)。NHEJ は直接 DNA 末端をつなぎ合わせる修復方法 (End joining) であり、結合の際に約 0~5 塩基ほどの欠失、空間的に隣接する他の DNA 鎖との誤った結合 (染色体欠失、逆位、転座) が発生する可能性がある [20, 22]。また、NHEJ は M 期以外のどの細胞周期においても機能しており、最も選択される修復経路であることが示唆されている [23]。

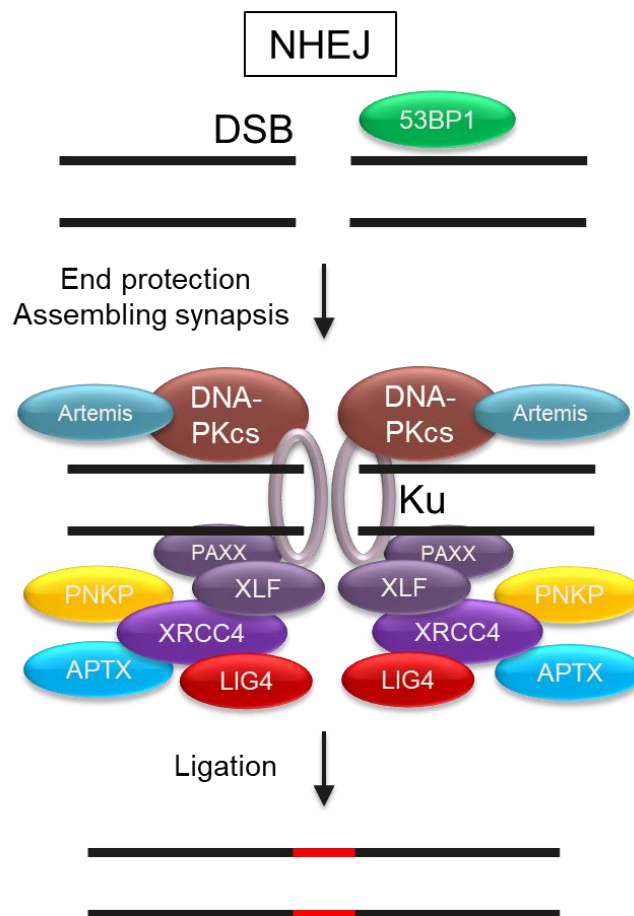


図 1-7 非相同末端結合 (NHEJ)

## B) 相同組換え修復(HRR)

HRRでは、ヌクレアーゼ Meiotic recombination 11(MRE11)によりDSB末端から3'方向に約100塩基ほど下流の位置において3'→5'方向でDNAが分解され、ssDNAが露出する(End resection)。露出したssDNAはさらにヘリカーゼBLM、ヌクレアーゼDNA2またはExonuclease 1(EXO1)によって5'→3'方向に拡張される。この間に、露出したssDNAはReplication protein A(RPA)にコーティングされる。これらの過程はBRCA1によって促進される。その後、ssDNAを覆うRPAはBreast cancer susceptibility gene 2(BRCA2)に媒介されRAD51に置換される。RAD51はフィラメントを形成し、相同鎖の探索と鎖交換が行われ、相同鎖を鋳型としたDNA合成が行われる(Recombination)(図1-8)。最終的には、相同鎖と修復されたDNAからなる2対の染色体が解離して修復が完了する。相同配列間のわずかな違いを除けば、塩基レベルで正確に復元するため、正確性の高い修復経路である。しかしながら、HRRで用いられる相同的なDNA鎖は相同染色体や姉妹染色体にあることが前提だが、ヒト・マウスなどの細胞では相同染色体はほとんど鋳型として機能せず姉妹染色体しか利用されない。つまり、HR活性はS期の後半からG2期に限定される[20, 24]。既往の研究では転写活性領域においてはHRRが優先して行われていることが示唆されている[25]。

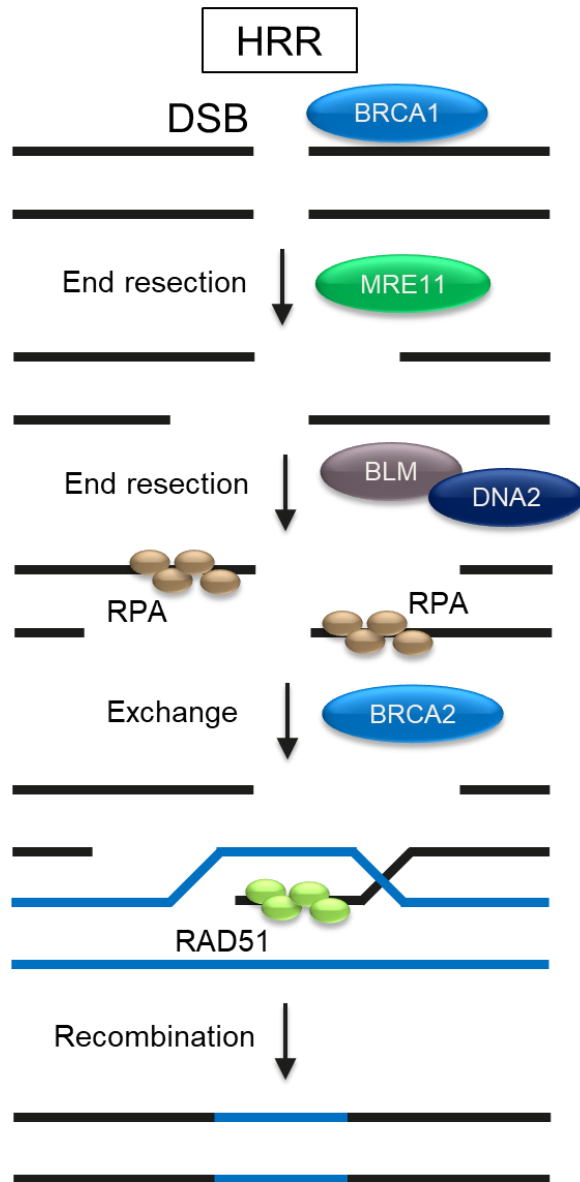


图 1-8 相同組換え修復 (HRR)

### C) 代替的末端結合(MMEJ)

代替的末端結合は他 2 経路と比べて比較的新たに発見された修復経路であり、英名称では alternative End joining (alt-EJ)、Theta-mediated end joining (TMEJ)、Microhomology-mediated end joining (MMEJ) の 3 つの名で呼ばれていることが多く、本論文では MMEJ で統一している(図 1-9) [21]。イニシエーションにおいて MRE11 により DSB 末端から 3' 方向に約 100 塩基ほど下流の位置において 3' →5' 方向で DNA が分解され ssDNA が露出するが、その後の 5' →3' 方向の拡張はされない。代わりに、ヘリカーゼ活性およびポリメラーゼ活性を持つ DNA polymerase  $\theta$  (POLQ) による微小相同鎖(Microhomology)のアニーリングおよび DNA 鎖の合成、開裂が行われる。これらの過程は PARP1 により促進されることが示唆されている。また、アニーリング時にフラップ構造を形成する場合があります、これはヌクレアーゼ Flap endonuclease 1(FEN1)によりフラップ部位が分解される。最後に、XRCC1-LIG3 複合体あるいは PCNA-LIG1 複合体により末端が結合される(Ligation および End joining)。MMEJ はフラップ部位が分解されることから、数十塩基ほどの欠失が発生する可能性がある [21]。最近の研究では M 期に機能する唯一の修復経路であることが示唆されている [26, 27]。

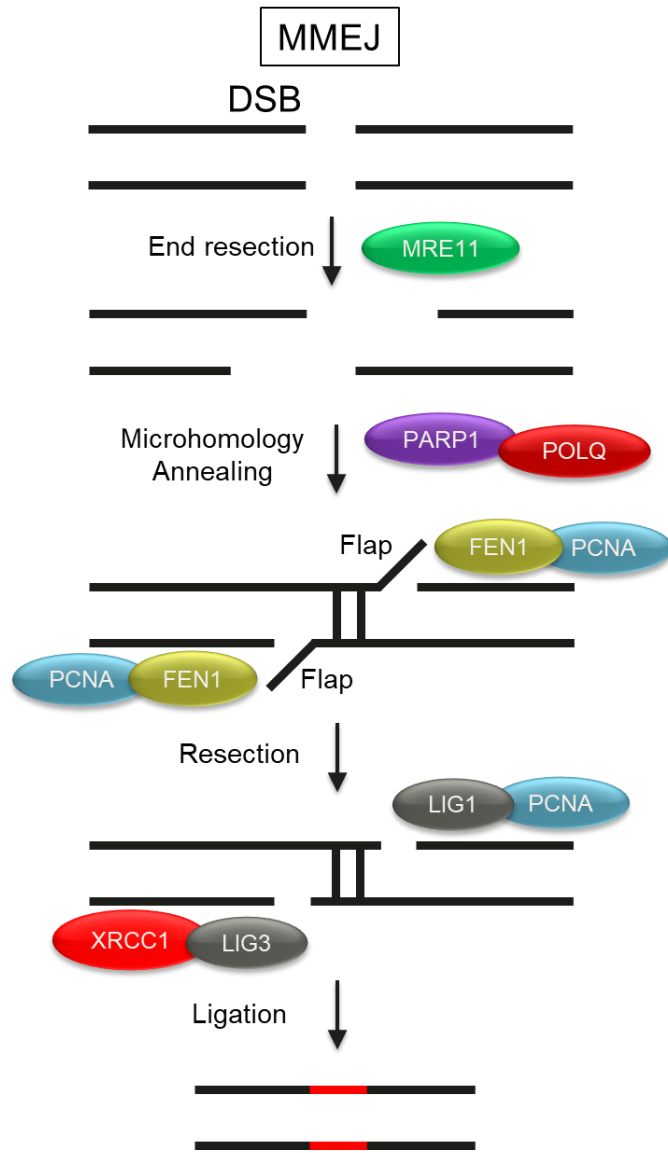


图 1-9 代替的末端结合 (MMEJ)

### 1-3 DNA 修復因子と遺伝性疾患

1-1 章で述べたように、細胞内における正常な代謝過程でも発生しており、一日一細胞あたり約数十万個の DNA 損傷が発生すると考えられている。そして、これらの DNA 損傷は DNA 損傷修復機構によって正しく修復され、ゲノムの安定性が保たれている。DNA 損傷修復に異常が生じると、これらの DNA 損傷が蓄積または、修復の失敗による突然変異が蓄積することで、細胞の恒常性の崩壊やゲノム不安定性に繋がり、病気の症状となって現れる。また、遺伝子変異が生殖細胞に生じた場合は、両親から子へと受け継がれる遺伝性疾患へと繋がる。これらのことから、DNA 損傷修復と遺伝性疾患は密接に関係していることがわかる。

実際に報告されている DNA 損傷修復因子の変異により発症する遺伝性疾患の例として以下のものなどが挙げられる。

#### 1) Microcephaly and Seizure (MCSZ)

小頭症やてんかんを呈する遺伝性疾患であり、原因遺伝子は BER、SSBR、NHEJ に関与する PNKP である [28]。MCSZ 患者由来細胞は SSB を誘導する薬剤に高感受性を示すことがわかっている [29]。

#### 2) Ataxia Oculomotor Apraxia 4 (AOA4)

神経変性および眼球運動失調症を呈する遺伝性疾患であり、原因遺伝子は PNKP である [30, 31]。AOA4 患者由来細胞は MCSZ 患者同様に SSB を誘導する薬剤に高感受性を示すことがわかっている [29]。

#### 3) Ataxia Oculomotor Apraxia 1 (AOA1)/Early onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia (EAOH)

神経変性、眼球運動失調症および低アルブミン血症を呈する遺伝性疾患であり、原因遺伝子は BER、SSBR、NHEJ に関与するとされている Aprataxin (APTX) である [32-35]。

#### 4) Bloom 症候群 (Bloom syndrome)

日光過敏症、免疫不全、低身長症、若年性悪性腫瘍発生率の上昇などの症状を呈する遺伝性疾患であり、原因遺伝子は HRR に関与するヘリカーゼ BLM である [36]。BLM は DSB 修復経路選択や DNA 複製に関わることが報告されている [37, 38]。

#### 5) 遺伝性乳がん卵巣がん (Hereditary breast and ovarian cancer: HBOC)

HBOC 患者は生殖細胞においてで HRR に関与する BRCA1、BRCA2 のヘテロ接合変異を有していることがよく知られている。BRCA1/2 変異は病的バリエントを保持していると乳がんおよび卵巣がんの生涯発症リスクが約 40-80%上昇することが分かっている[39]。他にもすい臓がん、前立腺がんの発症リスクが 3-7 倍に増加することが報告されている[40, 41]。既往の研究により、BRCA1/2 変異がん細胞は PARP1/2 阻害剤に高感受性を示すことが分かっている[42, 43]。

#### 6) 色素性乾皮症 (Xeroderma pigmentosum: XP)

日光過敏症、若年性皮膚がん発生率の上昇などの症状を呈する遺伝性疾患であり、原因遺伝子はヌクレオチド除去修復に関与する XP 遺伝子群(XPA-XPG, XPV)である[44]。

このように、DNA 修復因子と遺伝性疾患は密接に関係する。本研究で着目した APTX も遺伝性疾患の原因遺伝子として同定され、その後の研究により BER、SSBR、NHEJ に関与する DNA 修復因子であることが示唆されている。しかしながら、AOA1 由来患者細胞は DNA 損傷誘導剤に対する感受性が軽度であり、APTX の細胞内での役割と遺伝病との関連は不明な点が多い[34, 35, 45]。

## 1-4 DNA 修復を標的とした化学療法

三大がん治療法である手術・放射線療法・化学療法の中でも化学療法は「手術によって切除ができないがんの治療が可能である」こと、「放射線療法と併用時に放射線増感剤作用が見込める」などの様々なメリットがある。一般的に、化学療法の代表として抗がん剤治療が挙げられ、その作用機序としては、DNA 損傷、DNA 修復阻害、DNA 合成阻害、細胞分裂阻害、代謝拮抗などがある。その中でも、DNA 損傷を誘導する抗がん剤は、細胞の DNA を効率的に損傷させ細胞死を誘導できることから、がん治療の標的として幅広く利用されている。

以下に、本研究で使用した DNA 損傷や修復機構を標的とした抗がん剤を示す。

### A) Camptothecin (CPT)

CPT は二本鎖 DNA のらせん制御をする活性を持つ I 型 Topoisomerase (Topoisomerase I: Top1) の阻害剤である。1-1 で記載したように、Top1 は DNA 鎖を一度切断し、結合することで DNA 鎖の絡まりを解くが、CPT は切断後の DNA 末端に Topoisomerase poison と呼ばれる断片化した Top1 を残存させることで SSB を結合出来なくする [9, 46]。この Topoisomerase poison を持った SSB は、DNA 複製の際に複製フォークと衝突し、細胞への毒性の高い DSB となることから、有効な抗がん剤として使用されている (図 1-10)。それだけでなく、細胞周期の S 期特異的に DSB を誘導することから、DNA 修復の分子メカニズム解析のツールとして分子生物学の分野では幅広く使用されている。

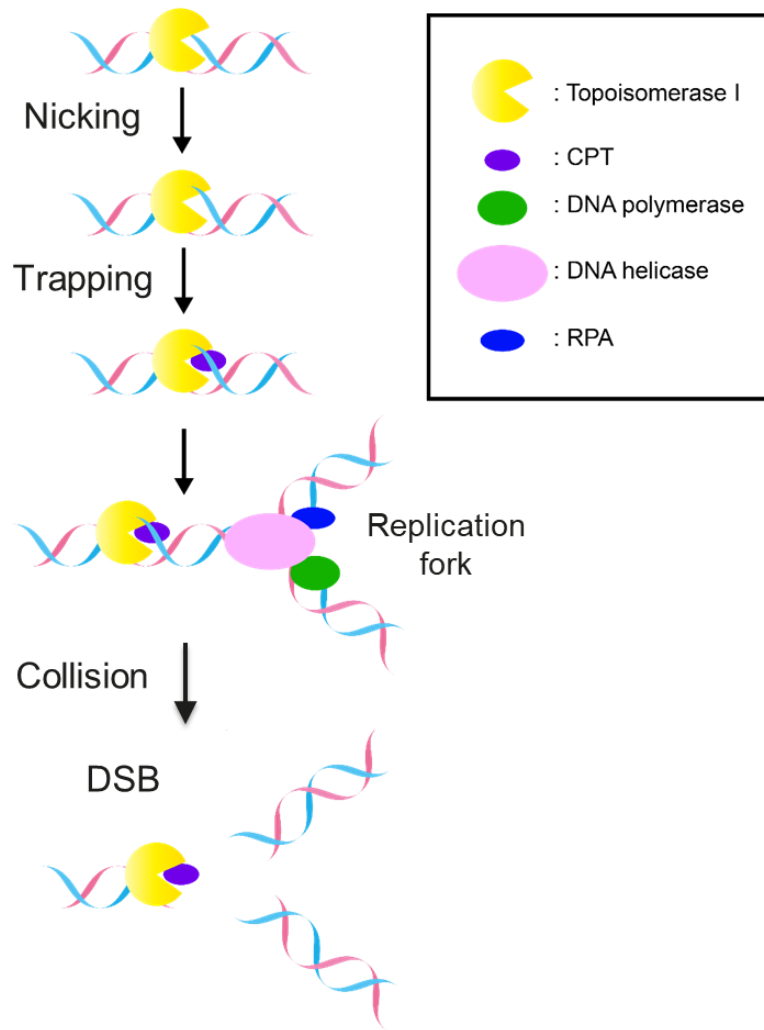


図 1-10 Camptothecin (CPT)による S 期依存的な DNA 二本鎖切断

## B) PARP1/2 阻害剤

PARP1/2 阻害剤は BER、SSBR に関連する PARP1/2 標的とした阻害剤である。既往の研究により PARP1/2 の阻害は HBOC などの BRCA1/2 変異がん細胞との合成致死関係にあることが分かっている [42, 43]。すなわち、PARP1/2 阻害剤を投与すると変異を持たない細胞にはほとんど影響を及ぼさず、BRCA1/2 変異がん細胞のみを選択的に細胞死へと誘導できる。現在までに、多数の PARP1/2 阻害剤が開発され、Olaparib、Talzoparib、Rucaparib が BRCA 変異陽性乳がんおよび卵巣がんに対して臨床応用されている [47]。また、PARP1/2 阻害剤は PARP1/2 の ADP リボシル化を阻害するだけでなく、PARP1/2 を DNA 損傷部位にトラップすることが分かっている [47-49]。CPT のように、この PARP トラッピングが複製フォークと衝突し、DSB に変換されることで細胞障害性を誘発することが示唆されている (図 1-11)。加えて、BRCA1/2 は HRR に関与することから HRR 経路の機能不全が PARP1/2 阻害に対する感受性の原因である可能性が示唆されているが、合成致死の詳細なメカニズムは明らかになっていない [47]。

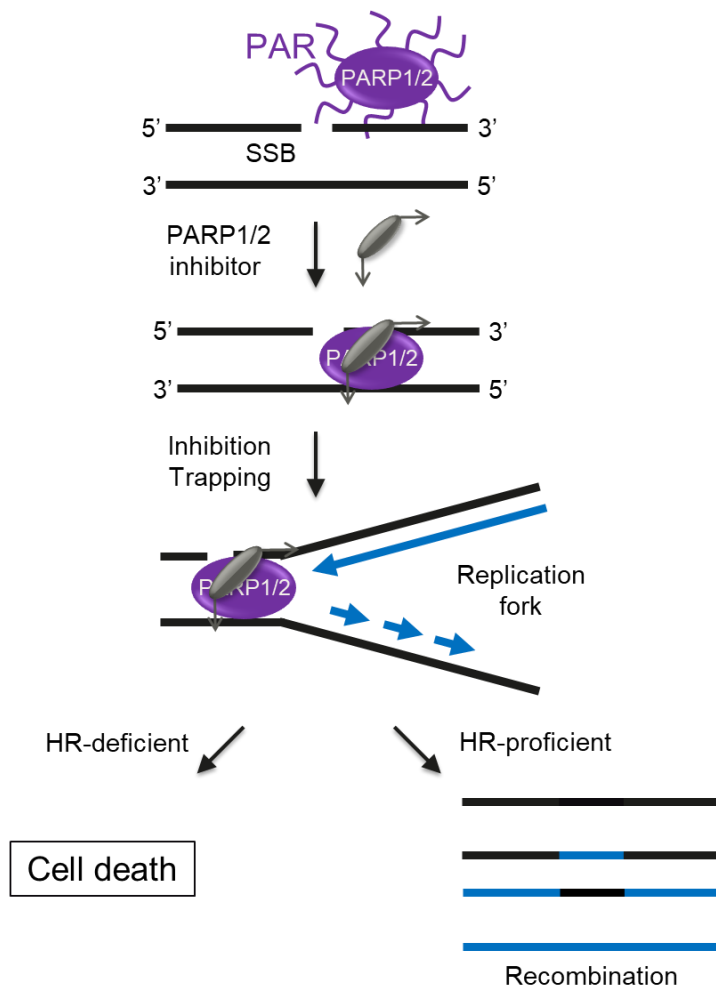


図 1-11 PARP1/2 阻害剤による細胞障害性

## 1-5 APTX 複合体

本研究で着目した APTX 複合体は APTX-XRCC1 および APTX-XRCC4 と細胞内で 2 つの複合体を形成しており、それぞれの複合体で DNA 損傷修復に寄与していると考えられている。以下に APTX、XRCC1 並びに XRCC4 の報告されている知見を述べる。

### 1-5-1 APTX

Apratxin (APTX) は、ヒトでは第 9 番染色体短腕上に存在する *APTX* 遺伝子から生産され、分子量約 40 kDa、8 個の exon、342 個のアミノ酸から構成されるタンパク質である(図 1-12)。APTX は主に核内に局在するが、N 末端に 14 アミノ酸が拡張されたアイソフォームは、ミトコンドリアにも局在する[50, 51]。APTX は 3 つのドメイン (FHA ドメイン、HIT ドメイン、ZNF ドメイン) および天然変性領域 (リンカー領域) から構成される。FHA ドメインは多くの DNA 損傷応答・修復タンパク質に共通して保存されているドメインであり、リン酸化された Threonine と特異的な結合をすることがわかっている[52]。既往の研究により、APTX はキナーゼ CK2 によって 519 番目の Threonine がリン酸化された XRCC1、233 番目の Threonine がリン酸化された XRCC4 と結合することがわかっている[35, 53, 54]。後述するが、それぞれ XRCC1 は BER および SSBP において、XRCC4 は NHEJ において足場として機能するタンパク質であり、このことから APTX は図 1-14 に示すように BER、SSBR および NHEJ に関与することが示唆されている[35]。リンカー領域は APTX が核への局在に必要な核局在シグナル(Nuclear localization signal: NLS)を含んでいると考えられている[45]。ZNF ドメインは APTX と DNA の相互作用を媒介することが分かっている[55]。HIT ドメインは APTX の酵素活性を媒介するドメインである[34, 55]。豊富な In vitro 研究により、APTX は HIT ドメインを介して DNA の 5' 末端からアデノシン一リン酸 (Adenosine-mono-phosphate: AMP) を除去する酵素活性(Deadenylation)を持ち、DNA ニック(Nick)、一本鎖および二本鎖 DNA 末端、RNA/DNA ジャンクションのアデニル化を解消することができることが示されている[34, 56-59]。このアデニル化末端は DNA 損傷修復において主に DNA 末端をつなぎ合わせる(Ligation)酵素 DNA ligase によって以下の図 1-13 のように媒介される[60]。Ligation において、最初に DNA ligase はアデノシン三リン酸 (Adenosine-tri-phosphate: ATP) と反応し、AMP がホスホアミド結合を介して活性部位の Lysine に共有結合した DNA ligase-AMP 中間体を形成する。次に、DNA ligase は AMP をリン酸化されている 5' 末端(5' P 末端)に転移し、AMP-DNA 中間体を形成する。さらに、DNA ligase は脱リン酸化されている 3' 末端(3' OH 末端)への AMP の求核攻撃を触媒し、AMP

の置換およびホスホジエステル結合により DNA を連結させることができる (Nick sealing)。しかしながら、Nick sealing は 3' 末端が脱リン酸化されていない場合や損傷塩基が 3' 末端に含まれていた場合に頓挫する可能性がある (Abortive ligation)。この場合、DNA ligase は DNA 末端から遊離し、AMP-DNA 中間体が残存する。こうした Abortive ligation に対して、APTX は SSBR では XRCC1 と、NHEJ では XRCC4 と結合して HIT ドメインを介した Deadenylation 活性により Ligation 反応をリセット (Proofreading) することで DNA 損傷修復に関与すると考えられている (図 1-14) [58, 61]。

前述したように、APTX 遺伝子の変異は AOA1/EAOH などの潜性遺伝性神経変性疾患を引き起こす [32, 33]。現在までに AOA1/EAOH では非常に多くの変異が見つかった (図 1-15) [16, 55]。これらの患者由来細胞は、メチルメタンスルホネート (MMS) や過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) などの塩基損傷および SSB 誘発剤に対して軽度な感受性を示し、DSB を誘発する電離放射線に対しては感受性を示していない [34, 35, 45]。また、マウスモデルでは *Aptx* ノックアウトマウスは明らかな表現型を示さず、これらのマウスの神経細胞はほぼ正常な DNA 修復機能を有していることが報告されている [34, 62]。Ligation 反応はほとんどの DNA 損傷修復経路の最終過程であるため、Abortive ligation の蓄積が AOA1/EAOH の病因に関与している可能性があるが、患者由来細胞やマウスモデルを用いた研究では明らかな表現型を得ることができていない。加えて、XRCC1 との結合が APTX の酵素活性、DNA 損傷部位への集積を促進するという報告がある一方で、細胞内での XRCC4 との結合の意義は未だ理解されておらず、二本鎖切断修復における APTX 複合体の役割は分かっていない [63]。

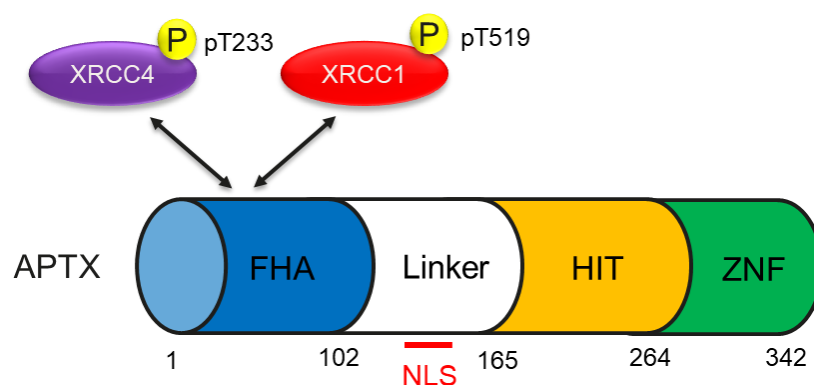


図 1-12 APTX のドメインマップ

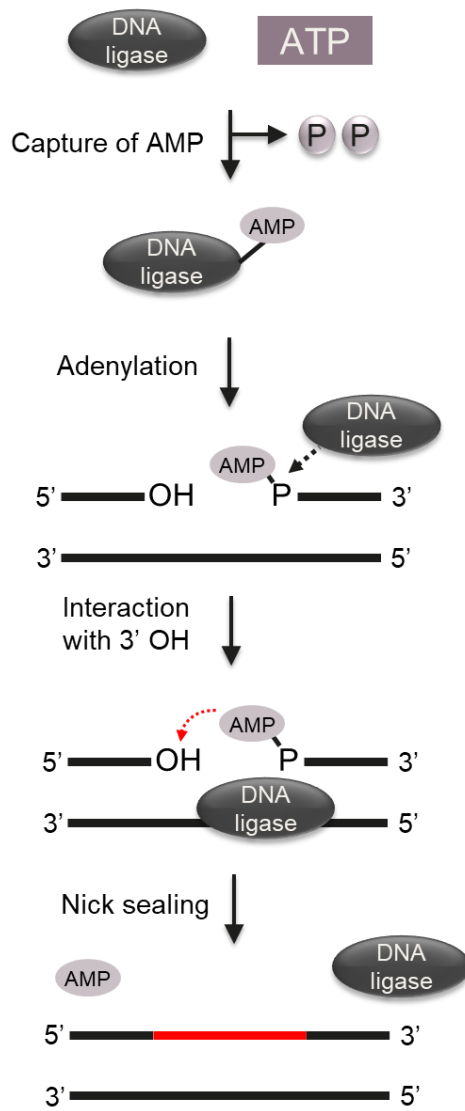


図 1-13 DNA ligase による Ligation 反応

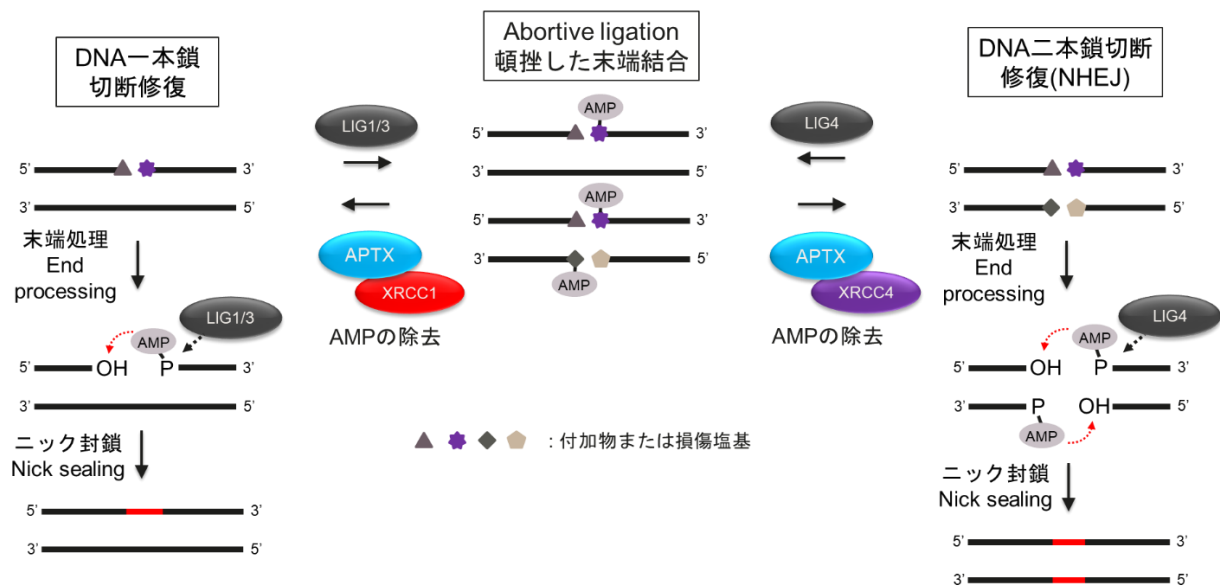


図 1-14 SSBR および NHEJ における APTX の機能

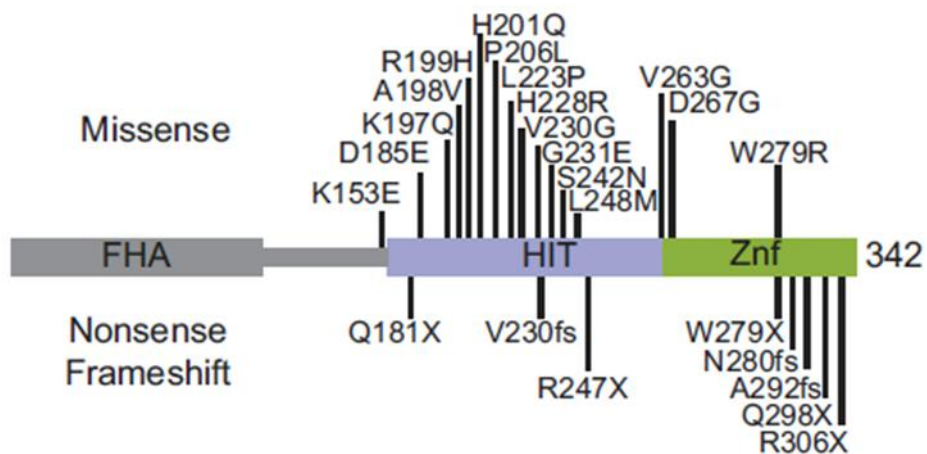


図 1-15 AOA1 で報告されている APTX 変異部位 [55]

## 1-5-2 XRCC1

XRCC1 はヒトでは第 19 番染色体長腕上に存在する *XRCC1* 遺伝子から生産され、分子量約 90 kDa、17 個の exon、633 個のアミノ酸から構成されるタンパク質である (図 1-16)。病的には、結合する APTX および PNKP と同様に、XRCC1 の変異は神経変性を誘発することが最近の研究で明らかされている [15]。XRCC1 は 3 つのドメイン (NT ドメイン、BRCT ドメイン×2) と 2 つの天然変性領域 (リンカー領域) から構成される [64]。NT ドメインでは POLB と物理的に結合するドメインである。中央の BRCT ドメインは PARylation との相互作用を媒介する。C 末端側の BRCT ドメインは LIG3 と物理的な結合に必要であり、LIG3 の細胞内でのタンパク質安定性を担っていることが示唆されている [65]。NT ドメインと中央の BRCT ドメインの間にあるリンカー領域には XRCC1 が核への局在に必要な NLS を含んでいることが分かっている [66]。また、中央の BRCT ドメインと C 末端側の BRCT ドメインの間にあるリンカー領域の多くの Serine および Threonine はキナーゼ CK2 によってリン酸化されることが分かっており、519 番目の Threonine のリン酸化を介して APTX および PNKP と物理的に結合している [53, 67]。他の結合因子と同様に BER、SSBR において XRCC1 は足場として機能することで APTX の DNA 損傷部位への集積および酵素活性を促進することが報告されている [63, 64]。また、既往の研究により XRCC1-LIG3 複合体が BER、SSBR だけでなく MMEJ を介した DSB 修復への関与が示唆されている [68, 69]。加えて、最近の研究では XRCC1 欠損細胞が BRCA1/2 変異がん細胞との合成致死を示す PARP1/2 阻害剤に対して高い感受性を示すことが報告されている [70, 71]。

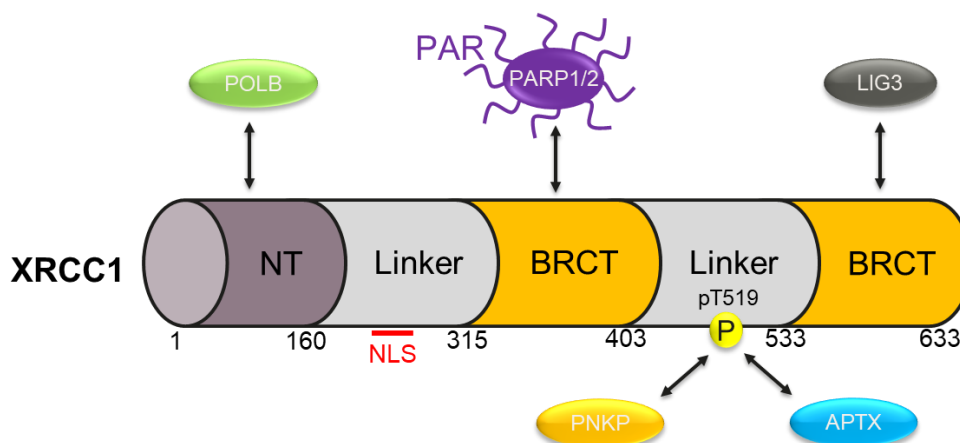


図 1-16 XRCC1 のドメインマップ

### 1-5-3 XRCC4

XRCC4 はヒトでは第 5 番染色体長腕上に存在する *XRCC4* 遺伝子から生産され、分子量約 55 kDa、7 個の exon、336 個のアミノ酸から構成されるタンパク質である (図 1-17)。病的には XRCC4 の変異は小頭症、成長障害を呈することが報告されている [72]。XRCC4 は 3 つのドメイン (Head ドメイン、Coiled-coil ドメイン、C-terminal ドメイン) で構成される。Head ドメインはパラログかつ NHEJ の Synapsis 構成因子 XLF と物理的に結合するドメインである [73]。Coiled-coil ドメインは LIG4 と物理的な結合に必要であり、LIG4 の細胞内でのタンパク質安定性を担っていることが示唆されている [74]。C-terminal ドメインは XRCC4 が核への局在に必要な NLS を含んでおり、CK2 にリン酸化された 233 番目の Threonine を介して APTX 並びに PNKP と物理的に結合する [54, 75, 76]。XRCC4 の足場機能は NHEJ 経路において LIG4 の安定性、XLF および PNKP の DNA 損傷部位への集積に必要であることが報告されているが、APTX との結合が細胞内において NHEJ にどのように関与するかは明らかになっていない [74, 77, 78]。

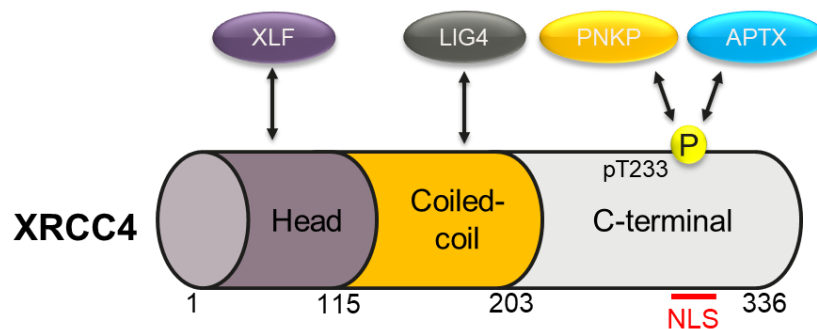


図 1-17 XRCC4 のドメインマップ

## 1-6 本研究の目的

本研究の目的は、“APT<sub>X</sub> 複合体の DNA 損傷修復における役割の解明”である。本研究では、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術により APT<sub>X</sub>、XRCC1 ノックアウト細胞を樹立する。従来の患者由来細胞を用いた解析では変異や樹立されたバックグラウンドの違いから、表現型の単純比較が困難であった。ノックアウト細胞ではバックグラウンドを統一できるため、純粋な表現型解析を行うことができる。また、APT<sub>X</sub> 複合体 DNA 損傷修復の時空間的反応を解明するために、Laser micro-irradiation および Live cell imaging 法を採用した。これは蛍光タンパク質をタグ付けした APT<sub>X</sub> を生細胞に発現させ、レーザーによる高密度な DNA 損傷誘導後、APT<sub>X</sub> の損傷部位への集積挙動を秒単位で解析できる手法である。さらに、細胞生物学・分子生物学・遺伝子工学的手法を駆使して、DNA 損傷修復における APT<sub>X</sub> 複合体の役割の解明を目指す。

本研究では、上記の目的を果たすために具体的に 2 つの研究テーマを遂行した。これらの結果はそれぞれ 3 章と 4 章において示す。

1. DNA 二本鎖切断修復における APT<sub>X</sub> 複合体の役割 (第 3 章)
2. PARP1/2 阻害剤による DNA 損傷修復における APT<sub>X</sub> 複合体の役割 (第 4 章)

将来的には、これらの研究を通して DNA 損傷修復の分子メカニズムの一端を解明する。さらに、APT<sub>X</sub>、XRCC1、XRCC4 を原因とした疾患発症メカニズムの解明、そして遺伝病の新規治療法開発などに繋がることが期待される。

## 第 2 章 原理・実験材料・実験方法

## 2-1 原理と実験材料

### 2-1-1 細胞

本研究で用いた細胞のデータを以下に示す。本研究では HCT116、U2OS を用いた。

第 4 章および第 5 章では CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術により *APTX*、*XRCC1* 遺伝子を欠損した U2OS 細胞 (*APTX*<sup>-/-</sup>、*XRCC1*<sup>-/-</sup>) または HCT116 細胞 (*XRCC1*<sup>-/-</sup>) を樹立し実験を行った。これらの細胞は全て、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% のインキュベーター内で培養した。培地はダルベッコ改変型イーグル培地 (DMEM High Glucose) (ナカライテスク) を適宜使用し、Bovine Calf Serum (BCS) (ナカライテスク) を 10% 濃度とし、さらに Penicillin + Streptomycin を適量添加したものをを用いて、基本的には 6 cm ディッシュを用いて培養した。

#### ◆ HCT116

ヒト結腸がん由来細胞。接着細胞。アラバマ大学の Brattin らによって 1981 年頃に 48 歳男性より樹立された。p53 野生型を保持。正常二倍体細胞に近い形質を有しているが Microsatellite instability がある (MLH1/PMS2 negative)。移植形成能あり。*CTNNB1* (β-catenin) (S45del)、*PIK3CA* (H1047R)、*KRAS* (G13N) のヘテロ接合変異がある。トランスフェクション効率は良く、ゲノム編集によく用いられる [79, 80]。

#### ◆ U2OS

ヒト中分化型骨肉腫由来細胞。接着細胞。15 歳女性より樹立された。p53 野生型を保持。Insulin like growth receptor I, II の発現および Chromosomal instability を有している。核構造はつきりしており、核内イベントの観察に向いている。トランスフェクション効率は良く、ゲノム編集によく用いられる [79, 81-83]。

## 2-1-2 プラスミド DNA

プラスミドは環状構造をした DNA 分子であり、細胞内で染色体 DNA とは独立して存在することができる。そして、プラスミドは、複製開始点を有し、自立的に増殖することができる。多くのプラスミドは、主として細菌において見出されている。また、同一プラスミドが 1 つの細胞内に複数存在することがあり、この時のプラスミドの分子数をコピー数という。遺伝子工学において、多コピー数のプラスミドは遺伝子やタンパク質を増幅させるためのベクター(運び屋)として広く利用されている。プラスミド DNA 上には、1 つ以上の遺伝子が存在し、そのプラスミドの宿主は抗生物質耐性、病原性など様々な特徴を示す。

本研究ではこのプラスミド DNA を利用し、緑色蛍光タンパク質 GFP、赤色蛍光タンパク質 mCherry2、人工ペプチド FLAG タグの付いた APTX、XRCC1 のそれぞれプラスミドを作製した。以下に本研究で作製・使用したプラスミドのベクターマップを示す。

### ◆ EGFP-APT X

EGFP-APT X を構築するにあたり、バックボーンとして pEGFP-C1 ベクターを用いた。使用する EGFP(Enhanced Green Fluorescence Protein)は、オワンクラゲ由来の GFP の変異体であり、GFP の蛍光をより明るくするために改良されたものである。488nm の波長で励起することで、最大蛍光波長 507nm の緑色蛍光を発する。EGFP と APT X の融合遺伝子を作製するために、制限酵素処理によって特定の塩基配列を認識して切断を行った。APT X フラグメントについては U2OS 細胞の APT X 遺伝子配列を PCR 法により増幅、アガロースゲル電気泳動法により分離・精製した。それぞれ、pEGFP-C1 ベクターの切断には *Bgl*II と *Bam*HI を用いた。その後、In-fusion 法によって、APT X フラグメントと pEGFP-C1 ベクターの間で遺伝子の組換えを起こさせ、EGFP-APT X ベクター(図 2-1) を作製した。導入確認には、アガロースゲル電気泳動によるベクター全長のサイズ確認と DNA シークエンシングによる配列確認を行なった。さらに、実際に細胞に遺伝子導入し GFP 蛍光が観察できるか、また細胞内局在の確認を行なった。

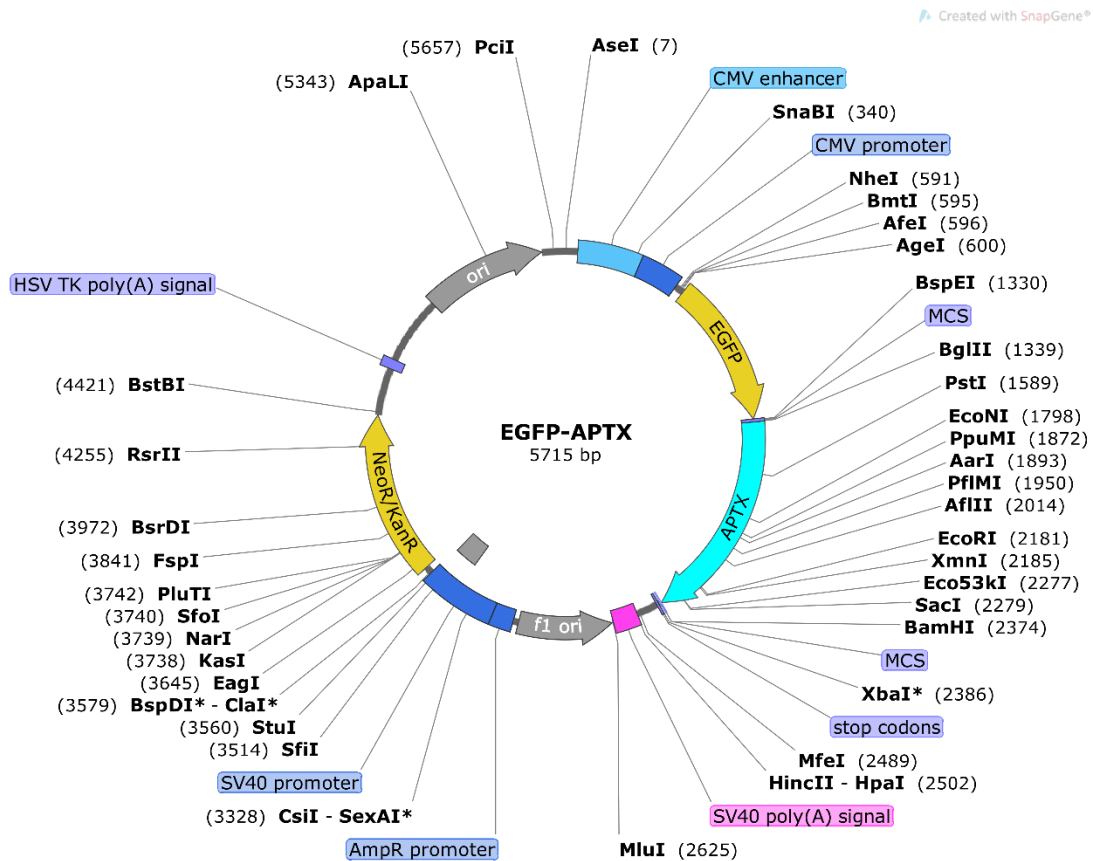


図 2-1 EGFP-APT-X ベクター (Snapgene により作製)

◆ mCherry2-XRCC1

pmCherry-C1 をバックボーンに XRCC1 配列を *KpnI*、*BamHI* 部位に In-fusion 法により導入したプラスミドである (図 2-2)。mCherry2 は 540-590 nm の波長で励起することで、最大蛍光波長 550-650 nm の赤色蛍光を発する。さらに mCherry2-XRCC1 T519A 変異は Mutagenesis 法により導入された。本研究では Tukada らに作製されたプラスミドを使用した [78]。

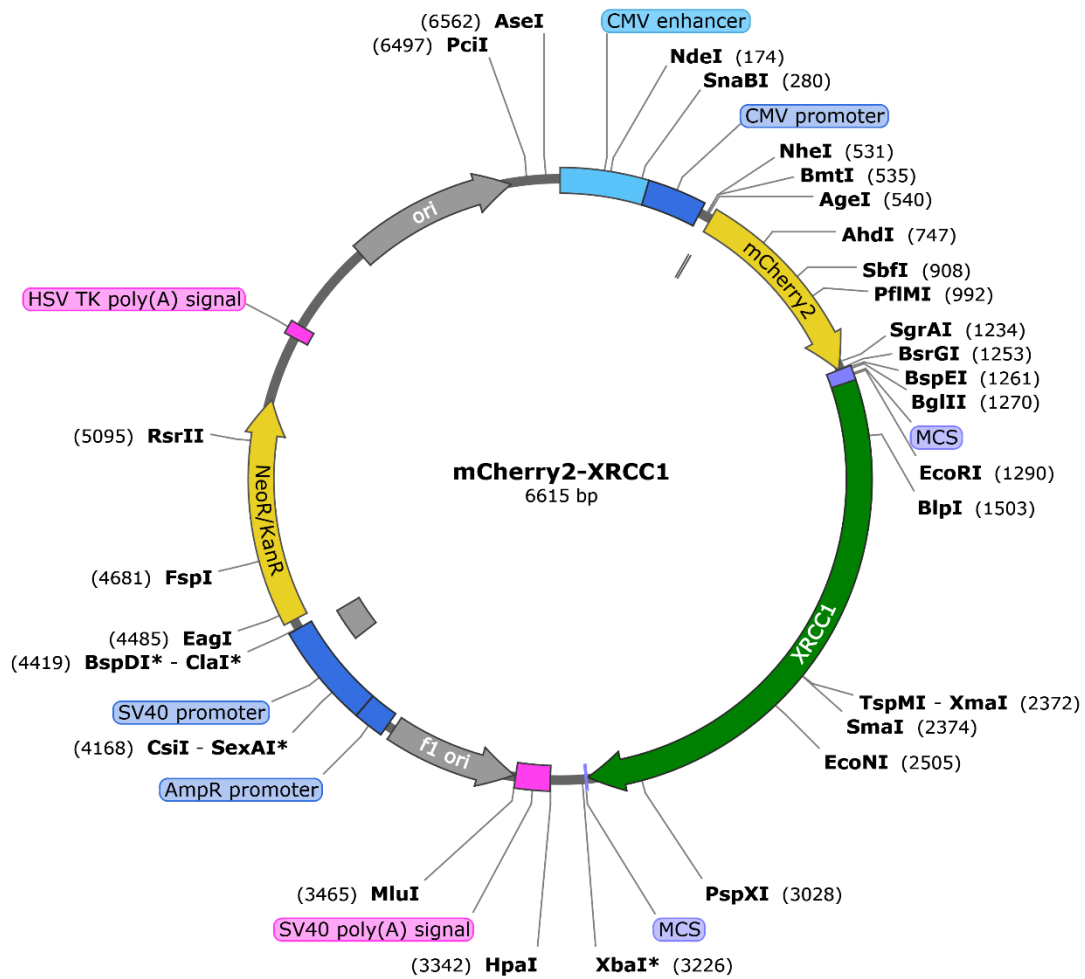


図 2-2 mCherry2-XRCC1 ベクター (Snapgene により作製)

#### ◆ 3xFLAG-XRCC1

p3xFLAG-CMV-10 ベクターをバックボーンに XRCC1 配列および XRCC1 T519A 配列を *EcoRI*、*BglII* 部位に In-fusion 法により導入したプラスミドである (図 2-3)。FLAG 配列は人為的に作られた配列でありアミノ酸では DYKDDDDK をコードする。p3xFLAG-CMV-10 は FLAG 配列が 3 連続で繰り返されている。それぞれの XRCC1 配列は上述の mCherry2-XRCC1 より取得し、クローニングした。

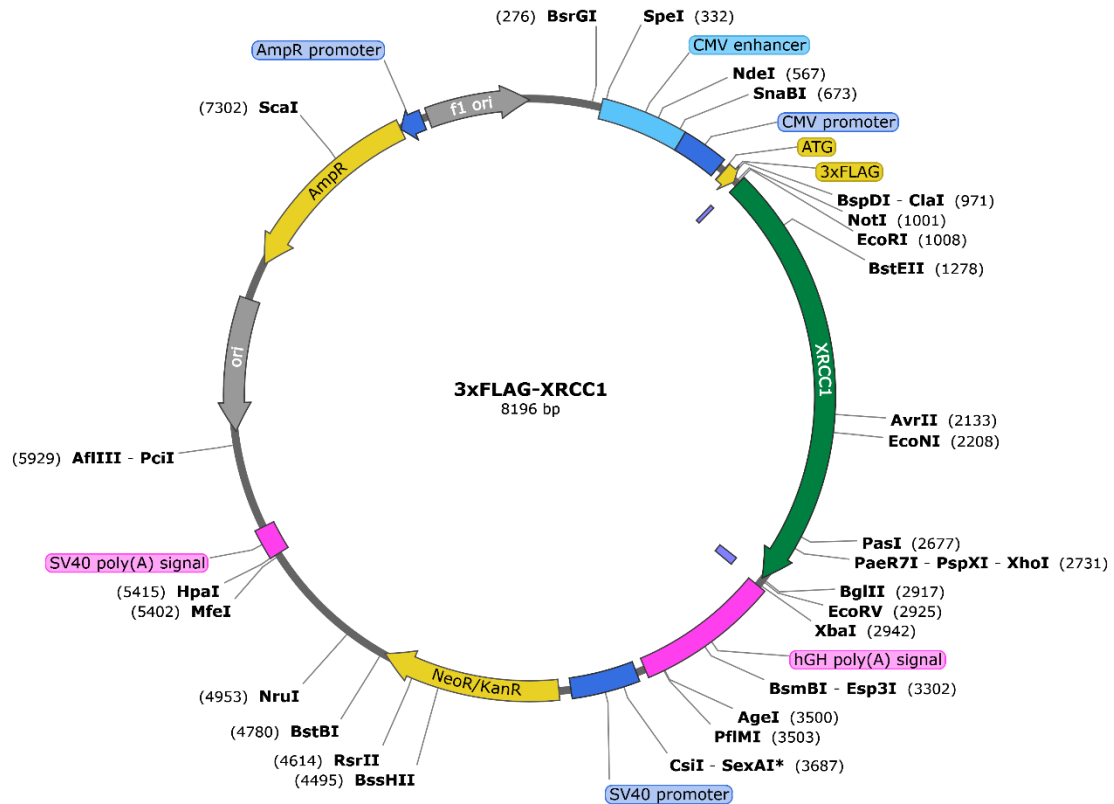


図 2-3 3xFLAG-XRCC1 ベクター (Snapgene により作製)

◆ pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0

pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 は後述する sgRNA、Cas9 および Puromycin 耐性遺伝子を発現するように構築されたベクターである(図 2-4)。Addgen より取得した。20 塩基の sgRNA のターゲット配列は、二本鎖 DNA oligo を用いて *BbsI* 部位に Golden Gate 法により導入した。

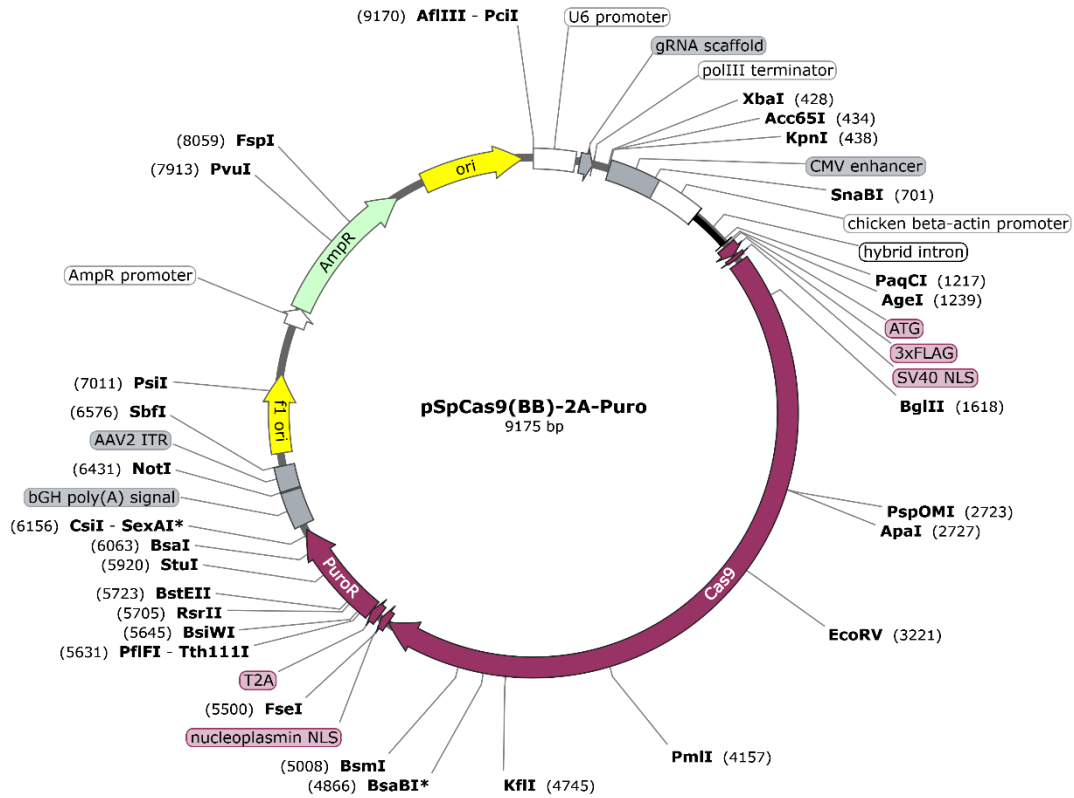


図 2-4 pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 ベクター (Snapgene により作製)

◆ pCBASceI

制限酵素 I-*SceI* を発現するように構築されたベクターである[84]。本研究では後述する End joining アッセイにおいて使用した。

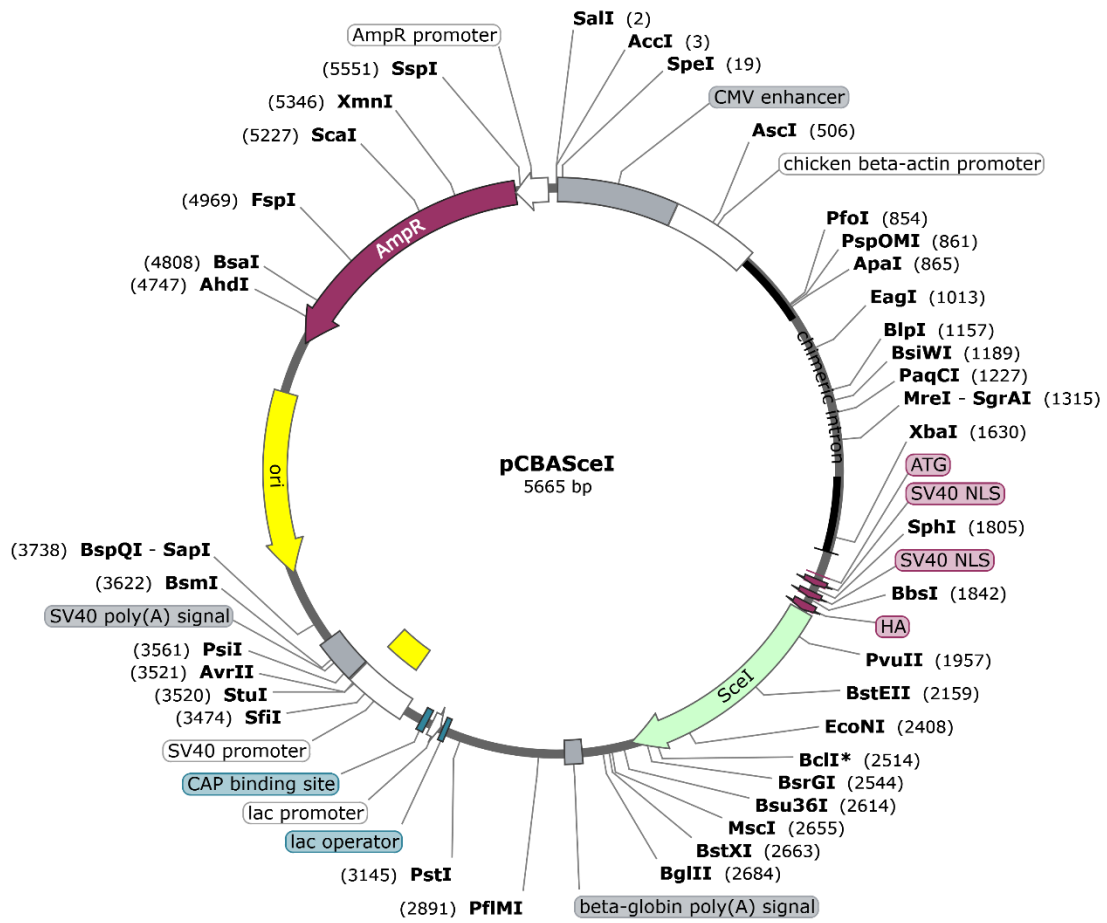


図 2-5 pCBASceI ベクター (Snapgene により作製)

### 2-1-3 細胞へのプラスミド DNA の導入(トランスフェクション)

今回使用したベクターには、目的遺伝子の他に薬剤耐性遺伝子が組み込まれている。遺伝子導入後に選択薬剤処理をすることで目的の遺伝子が発現する細胞のみを選択的に回収することができる。また、基本的に遺伝子導入したベクターは約 1 週間で細胞内から抜けていき、遺伝子の発現が消失すると言われている。このことから、遺伝子導入後に選択薬剤を長期間使用し続けることで、目的遺伝子が細胞の染色体上に導入(ランダムインテグレーション)され安定遺伝子発現細胞株を作製することができる(Stable Transfection)。これとは異なり、一過性の発現で留める場合は一過性発現細胞と表す(Transient Transfection)。

本研究では、実験に応じてそれぞれを使い分けて実験を行った。

#### ◆ 一過性発現

本研究においては、代表的な遺伝子導入法の一つであるリポフェクション法を用いて遺伝子導入を行った。基本原理は、負の電荷を持つ DNA を正の電荷を持つ陽イオン性物質で包み込み、エンドサイトーシス現象によって、細胞表面から細胞内に DNA を取り込ませるというものである。リポフェクションにはカチオンポリマーである PEI-MAX (Polysciences)を用いた。具体的には以下の方法で行った。今回のプロトコルは 6 cm ディッシュのものである。

細胞の準備として、リポフェクションの当日に細胞数が全体の 5-8 割のコンフルエント状態となるように、前日か前々日に細胞数を調節しつつ継代を行う。当日培養細胞の接着を確認後、1.5 ml のマイクロチューブを 2 本用意し、1 本目は 200  $\mu$ L の Opti-MEM® Medium と 10  $\mu$ L の PEI-MAX (ストック濃度 1 mg/mL)を混合する。2 本目は 200  $\mu$ L の Opti-MEM® Medium と導入する DNA が 約 3.33  $\mu$ g となるように混合し、2 分間静置することで DNA をなじませる。その後、2 つの調整液を緩やかに混合し、15 分間静置する。静置後、インキュベーターから細胞を取り出し、培地を取り除いた後、新鮮な DMEM + 10% BCS を 3.6 mL 加え、その後すぐに DNA を含んだ混合液を滴下し 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件で 6 時間インキュベートする。インキュベーションの後、再度培地を取り除き、一度 DMEM でリンスした後に DMEM + 10% BCS を加え、再び 37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件でインキュベーションした。

細胞種にもよるが、リポフェクション法は一般的に導入効率が 20-70%程で、24 時間程度の培養で遺伝子導入が完了すると言われている。なお、一過性発現細胞の実験には、リポフェクション 48-72 時間後の細胞を用いた。

◆ 安定遺伝子発現細胞株の樹立

安定発現細胞株の作製には、G418 (Geneticin 418、ナカライテスク)を用いた。G418 は、真正細菌の 70S リボソームによるタンパク質合成と真核生物の 80S リボソームによるタンパク質合成を阻害する薬剤である。pEGFP-C1 および pmCherry2-C1 ベクターには Neomycin 耐性遺伝子が含まれているため、正しく遺伝子導入が行われた場合は、G418 耐性になるはずである。リポフェクション 48 時間後の細胞を PBS で一度リンスし、0.5 mg/mL の濃度になるように G418 を含んだ DMEM + 10% BCS を加えて、10-14 日間培養した。その後、96-well plate に 1 ウェル当たり 0.5 個の細胞が入るように播種し、上記の G418 を含んだ培地で約 3 週間培養した。形成したコロニーをピックアップして拡大培養後、目的遺伝子の蛍光および局在をライブセルイメージングで、発現をウエスタンブロットティング法により確認した。

## 2-1-4 RNA 干渉による目的タンパク質発現抑制

RNA 干渉(RNA interference: RNAi)とは、二本鎖 RNA が複数のタンパク質と複合体を作り、相同な塩基配列をもつメッセンジャーRNA (mRNA)と特異的に対合・切断することで、遺伝子の発現を抑える現象である。RNAi は、生体内においてウイルス感染に対する防御機構や、ゲノム上を転移する動く遺伝子を抑制するなど、ゲノムの安定性を保つ上で重要な役割を担うことが知られている。そして RNAi は、特定の遺伝子の発現を人為的に抑制する手法として、遺伝子機能解析のためのツールとしても幅広く使用されている。

本研究では、21 塩基の二本鎖 RNA (short interfering RNA: siRNA)を細胞に遺伝子導入することで、細胞内で発現する特定の遺伝子の発現量を抑制した。細胞内に導入された siRNA は、RISC (RNA-induced silencing complex)タンパク質に取り込まれ、一方の RNA 鎖の中央が切断され一本鎖 RNA へと変換される。そして、一本鎖 siRNA は標的 RNA への対合が可能となり、対合された mRNA が分解を受けることにより特定遺伝子の発現抑制が可能となる [85-87]。

本研究では、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)を用いて siRNA の導入を行った。siRNA の最終濃度は 50 nM とし、導入後 48-72 時間後の細胞を用いて実験を行った。今回使用した siRNA 配列は siControl (siCON): GUGUUUAAGACAAAAACAdTdG (sense) and UGUUUUUGUCUAAAAACACdTdC (anti-sense), siXRCC1 3' -UTR: GAAGUAUGUGCUAUACACAdTdT (sense) and UGUGUAUAGCACAUACUUCdTdT (anti-sense), siXRCC4 3' -UTR: CUAUGUUUCUAUUCAUUUdCdT (sense) and AAAUGAAUAGAAAACAUAGdTdC (anti-sense), siAPTX 3' -UTR: CUACUCAUUUCCUAAAUUAdTdT (sense) and UAAUUUAGGAAAUGAGUAGdTdT (anti-sense)である。なお、d はデオキシリボースを表す。

## 2-1-5 CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術

### I. CRISPR-Cas9

ゲノム編集技術は、ヌクレアーゼを利用して、細胞の持つ DNA 中の標的配列を探し出して切断、そして、目的遺伝子を欠損(ノックアウト)、他の遺伝子を挿入(ノックイン)する技術である(図 2-6)。標的配列への特異性が極めて高いことから、ヒトでは約 2 万種類ある遺伝子の中からたった 1 つの目的遺伝子を探し出して編集することができる。よって、特定遺伝子の機能を直接的に解析できることから、世界中で急速に広がり、様々な分野で広く用いられている [89]。CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)-Cas9(Crisper associated protein 9)は、真正細菌や古細菌の獲得免疫(外来 DNA の排除機構)である CRISPR-Cas システムの一部を応用して作られた [90]。CRISPR-Cas システムでは、ウィルス(バクテリオファージ)などを介して外部から侵入してきた DNA を断片化、CRISPR 領域とよばれるゲノム領域へと取り込む(図 2-7 a①)。さらに、取り込んだ DNA 配列を鋳型として短鎖の RNA (CRISPR RNA : crRNA)を合成(図 2-7a②)、tracrRNA (trans-crRNA)とよばれるもう 1 つの短鎖 RNA と複合体を形成することで(図 2-7 a③)、再び同一ウィルスが侵入した場合に標的 DNA を認識して Cas を呼び込み・切断する。内在の CRISPR-Cas システムでは、外来 DNA の取り込みや、crRNA のプロセッシング、tracrRNA との複合体の形成など、多くのステップを必要とし、また多数の Cas タンパク質が関与する。しかし、ゲノム編集に適用するには、標的 DNA は自らデザインした合成オリゴ、短鎖 RNA は crRNA と tracrRNA をハイブリッドさせたキメラ RNA (small guide RNA : sgRNA)で代用が可能である(図 2-7 b)。また、Cas タンパク質に関しても、Cas9 タンパク質の一種のみでよい。標的配列に相補的な配列を含む sgRNA が Cas9 エンドヌクレアーゼを標的配列まで誘導し、Cas9 が狙った DNA 鎖を切断する。CRISPR-Cas9 の塩基認識機構は RNA-DNA の塩基対形成であり、1 つの sgRNA による塩基認識で二本鎖切断を導入する。sgRNA が認識する塩基配列は 20 塩基程であり、ゲノム上の塩基配列にはその 3' 末端側に PAM (Protospacer Adjacent Motif)とよばれる配列が必要である。現在広く用いられている化膿レンサ球菌(*Streptococcus pyogenes*)由来の Cas9 (SpCas9)が認識する PAM 配列は 5' -NGG-3' (N は任意の塩基)であり、それほど大きな制約にならない [91]。

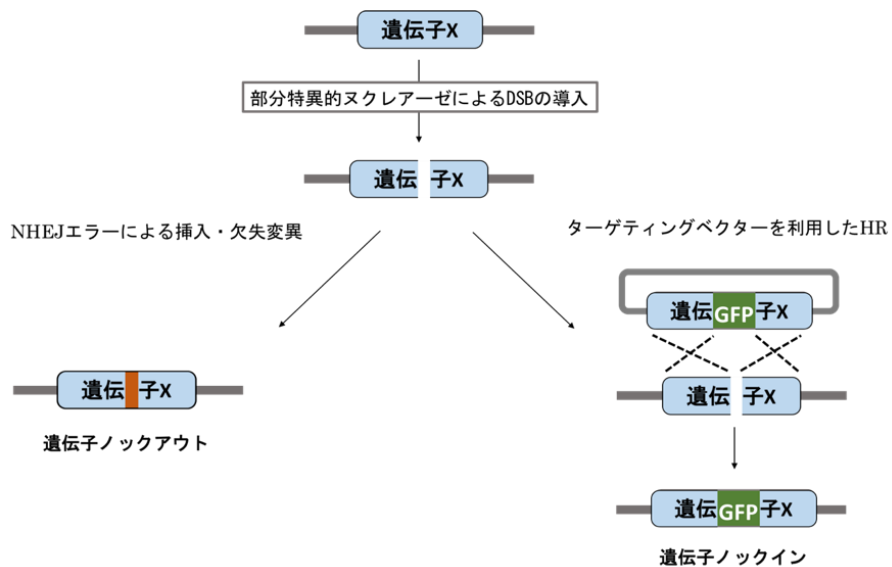


図 2-6 ゲノム編集技術の原理 [88]

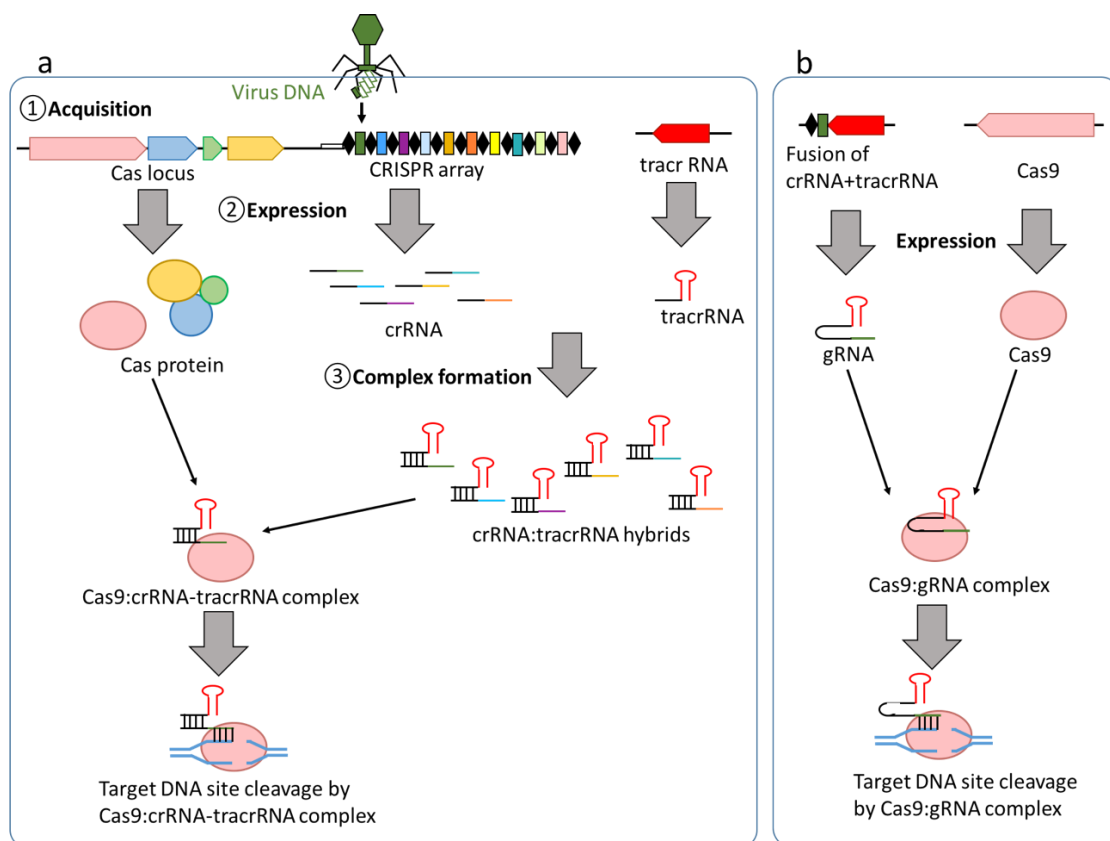


図 2-7 CRISPR-Cas9 システム [88]

## II. ノックアウト細胞株の樹立

U2OS および HCT116 細胞において、CRISPR-Cas9 システムを用いてゲノム編集を行い、ノックアウト細胞株を樹立した。

手順としては、ターゲット配列を導入した pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 ベクターを細胞に PEI-MAX を使用したリポフェクション法によって導入した。ベクターには Puromycin 耐性遺伝子が含まれているため、リポフェクション 48 時間後に培地を 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度になるように Puromycin を含んだ DMEM + 10% BCS に置換し、さらに 48 時間培養することでベクターが取り込まれた細胞のみを選択した。その後、96-well plate の 1 ウェル当たり U2OS が 0.5 個、HCT116 が 1 個となるようにそれぞれ細胞をプレーティングし、約 3 週間後にコロニーの形成を確認後、ピックアップして拡大培養後、遺伝子の発現解析をウエスタンブロットティング法によって行った。そして、目的タンパク質の発現が消失したクローンに対して、目的遺伝子のターゲット配列の前後約 350 塩基の領域を PCR 法により増幅し、pEGFP-C1 ベクターにクローニングおよびサンガー法による DNA シークエンス解析を行い、ゲノム DNA (gDNA) 配列にフレームシフトが生じているクローンをノックアウト細胞株として実験に用いた。

## 2-1-6 薬品・溶液データ

表 2-1 SDS-PAGE 用のゲルの組成

Separating gel							Stacking gel		
	4.5%	6%	7%	8%	10%	12.5%		1	2
蒸留水	6.7ml	5.8ml	5.55ml	5.3ml	4.8ml	4.2ml	蒸留水	3.65ml	7.3ml
1.5M Tris HCl pH 8.8	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	1.5M Tris HCl pH6.8	630μl	1.3ml
40% Acryl Amid gel	1.1ml	1.5ml	1.75ml	2ml	2.5ml	3.1ml	40% Acryl Amid gel	630μl	1.3ml
10% SDS	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	10% SDS	50μl	100μl
10% APS	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	10% APS	50μl	100μl
TEMED	10μl	10μl	10μl	10μl	10μl	10μl	TEMED	5μl	10μl
Total	10ml	10ml	10ml	10ml	10ml	10ml	Total	5ml	10ml

表 2-2 使用試薬の組成

10xPBS		10xTBS	
NaCl	1.37M	1M Tris HCl pH7.5	0.1M
KCl	27mM	NaCl	1.5M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	81mM		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15mM		

PBS-T		TBS-T	
PBS	1M	TBS	1M
Tween	0.05%	Tween	0.05%

2xRIPA Buffer		4xSDS Sample Buffer	
1M Tris HCl pH8.0	100mM	1M Tris HCl pH6.8	200mM
NaCl	300mM	SDS	8%
EDTA	2mM	BPB	0.4%
Triton X-100	2%	Glycerol	40%
SDS	0.2%		
Sodiumdeoxycholate	0.2%		

TE Buffer		Tank Blot Buffer	
NaCl	1.37M	Tris	3g
KCl	27mM	Glycine	14.4g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	81mM	超純水	800ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15mM	MeOH	200ml

## 2-1-7 抗体データ

本研究において使用した抗体データおよび希釈率を以下に示す。

### ◆ Western blotting 法

APTX (mouse, 1:750, Santa Cruz Biotechnology, Cat. No. sc-374 108), XRCC1 (mouse, 1:1000, Invitrogen in Thermo Fisher Scientific, Cat. No. MA5-13412), XRCC4 (rabbit, 1:500, Homemade), Ku80 (mouse, 1:2000, abcam, Cat. No. ab3715), PARP1 (mouse, 1:750, Santa Cruz Biotechnology, Cat. No. sc-74 470), GFP (mouse, 1:5000, Nacalai Tesque Inc, Cat. No. GF200), GFP (rabbit, 1:2000, Protein Tech, Cat. No. 50430-2-AP), KAP1 (rabbit, 1:4000, abcam, Cat. No. ab10484), PNKP (rabbit, 1:500, Novus, Cat. No. NBP1-87257), POLB (mouse, 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Cat. No. sc-376581), FLAG (mouse, 1:5000, Sigma-Aldrich, Cat. No. F1804), LIG3 (mouse, 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Cat. No. sc-135883), RFP (rabbit, 1:1000, MBL, Cat. No. PM005), Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (1:4000, Dako, Cat. No. P0447), and Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (1:5000, Dako, Cat. No. P0339)

### ◆ 免疫染色法

$\gamma$ H2AX (mouse, 1:2000, Merck Millipore, Cat. No. JBW301), 53BP1 (rabbit, 1:3000, Bethyl, Cat. No. A300-272A), pan-ADP-ribose binding reagent (rabbit, 1:2000, Merck, Cat. No. 9QQ12P), RPA2 (mouse, 1:1000, abcam, Cat. No. ab2175), BrdU (rat, 1:300, abcam, Cat. No. ab6326), Alexa Fluor™ 555-conjugated Goat anti-Mouse IgG (H+L) (1:1000, Invitrogen in Thermo Fisher Scientific, Cat. No. A28180), Alexa Fluor™ Plus 488-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (1:1000, Invitrogen in Thermo Fisher Scientific, Cat. No. A32731), Alexa Fluor™ Plus 594-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (1:1000, Invitrogen in Thermo Fisher Scientific, Cat. No. A32740) and Alexa Fluor™ 488-conjugated Goat anti-Rat IgG (H+L) (1:1000, Invitrogen in Thermo Fisher Scientific, Cat. No. A11005)

## 2-1-8 プライマーデータ

本研究において使用したプライマーの配列を以下に示す。なお、F は Forward、R は Reverse を表す。

**表 2-3 実験で使用した Primer**

Name		DNA sequences (5' -3' )
EGFP-APTX	F	ACAAGTCCGGACTCAGATCTATGATGCGGGTGTGCTGGTTGG
	R	TATCTAGATCCGGTGGATCCTCACTGTGTCCAGTGCTTCCTG
sgAPTX	F	CACCGCCAATGGTAACGGGCCTTT
	R	AAACAAAGGCCCGTTACCATTGGC
APTX sequencing primer	F	ATCTCGAGTGTACGTGTCACACAGTCTG
	R	GTGGATCCTCTGAGGATAATGAAGCTGC
3xFLAG-XRCC1	F	AAGCTTGCGGCCGGAATTCAATGCCGGAGATCCGCCTCCG
	R	CTGGTACCGATATCAGATCTTCAGGCTTGCGGCACCACCC
sgXRCC1	F	CACCGCCTCCGCCATGTCGTGCCT
	R	AAACAGGACACGACATGGCGGAGGC
XRCC1 sequencing primer	F	ACAAGTCCGGACTCAGATCTGGTAACTCCATCGTGCAATG
	R	TACCGTCGACTGCAGAATTCTCCAGCTCTCAGATGATTCC

## 2-2 細胞処理

### 2-2-1 放射線処理

放射線処理(Ionizing Radiation: IR)は、本学の千代田テクノロコバルト照射施設で依田功技術専門員の協力のもと行った。 $^{60}\text{Co}$  は 1 崩壊毎に 1.17 MeV、1.33 MeV のエネルギーを持つ  $\gamma$ 線を 1 個ずつ放出することが知られている。また、今回はほとんどが筐体のアルミニウムに吸収されるが、最大エネルギー0.318 MeV の $\beta$ 線も放射する放射線源である。半減期は5.27年である。線量率の測定は、指頭型電離箱C-110(応用技研)を用いて行い、計算によって減衰補正を行った。さらに、線源の上昇、下降に要する補正時間(11.2秒)を加えて照射を行った。2017年12月1日における線量率は気温15.5℃、気圧1012.9 hPa、補正係数0.01049、線源からの距離30 cmで0.0582 Gy/sで、放射能は88.5 TBqである。

測定時の2021年12月1日では、59.58 TBqで、線量は線源から距離30 cmで0.0392 Gy/sである。放射線処理は、照射時の移動時間と、準備時間を考慮し、照射処理は10分で行ったものとした。

## 2-2-2 薬剤処理

本研究では薬剤処理として、以下の薬剤を用いて実験を行った。薬剤の使用濃度および処理時間は先行研究において本研究で使用した細胞および解析手法が等しいものを参考にして決めている。結果において参考にした文献をそれぞれ記載している。

### 1. Camptothecin (CPT)

CPT は前述したとおり DNA 一本鎖切断と S 期特異的な DNA 二本鎖切断を誘導する薬剤である。免疫染色法において、使用濃度は 1  $\mu\text{M}$  で 1 時間の処理を行った。コロニー形成法では、7.5-30 nM で 24 時間の処理を行った。

### 2. 過酸化水素(Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ))

過酸化水素は、酸化ストレスにより細胞の DNA に多くの塩基損傷を与える。塩基損傷の修復と DNA 一本鎖切断の修復活性を解析するために用いた。使用濃度は、500  $\mu\text{M}$  で 10 分間の処理を行った。

### 3. PDD00017273 (PDD; PARC inhibitor),

PDD は PARylation を分解する酵素 PARC の阻害剤である [47]。内因性 PARylation は細胞内で即座に PARC により分解されるため、PDD 処理により内因性 PARylation の検出を可能にした。使用濃度は、10  $\mu\text{M}$  で 30 分間の処理を行った。

### 4. Emetine

Emetine は真核生物のリボソームの 40S サブユニットに結合することでタンパク質合成を阻害する薬剤である [92]。また、タンパク質合成阻害を介して DNA 損傷応答を誘発せずに DNA 複製をブロックする [93]。使用濃度は、10  $\mu\text{M}$  で 45 分間の処理を行った。

### 5. Talazoparib

Talazoparib は PARP1/2 の阻害剤である [47]。細胞内における PAR 合成の  $\text{EC}_{50}$  は 2.5 nM であり、強力な PARP1/2 トラップ能を有する [49]。免疫染色法において、使用濃度は 100 nM で 24 時間の処理を行った。コロニー形成法では、5-20 nM で 24 時間の処理を行った。

## 6. Veliparib

Veliparib は PARP1/2 の阻害剤である [47]。細胞内における PAR 合成の  $EC_{50}$  は 5.9 nM であり、比較的マイルドな PARP1/2 トラップ能を有する [49]。使用濃度は 10  $\mu$ M で 24 時間の処理を行った。

## 7. Palbociclib (Palbo)

Palbociclib は CDK4/6 の阻害剤である [94]。CDK4/6 は細胞の G1 期から S 期への遷移を促進するキナーゼであり、Palbo 処理をすると細胞は G1 期に停止する [94]。使用濃度は 1  $\mu$ M で 24 時間の処理を行った。

## 8. BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine)

BrdU は、チミジンのアナログである合成ヌクレオシドであり、増殖細胞において DNA 複製時にゲノム DNA に取り込まれる性質から、S 期細胞の標識によく使用される [95]。最近の研究ではゲノム上の一本鎖 DNA ギャップ検出に利用されている [96]。使用濃度は 10  $\mu$ M で 24 時間の処理を行った。

## 9. EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine)

EdU は BrdU と同様にチミジンのアナログである合成ヌクレオシドであり、増殖細胞において DNA 複製時にゲノム DNA に取り込まれる性質から、S 期細胞の標識によく使用される [97]。EdU の検出は変性処理や抗体反応を伴わずに検出できるシステムが開発されており、より簡単かつオフターゲットの影響を受けずに使用できる。使用濃度は 10  $\mu$ M で 30 分間の処理を行った。

### 2-2-3 サンプル回収

処理後の細胞は、Western Blotting 法では、セルリフターあるいはトリプシン処理をして回収をした。蛍光免疫染色法では、カバーガラス入りのプレートをそのまま回収し、PBS-T でリンス後、固定処理を行った。フローサイトサイトメトリー法を行う場合は、細胞をトリプシン処理により回収し、シングルセルの状態を実験を進めた。

## 2-3 実験方法

本実験では、以下の解析手法を用いて実験を行った。

### 2-3-1 Western Blotting 法(WB)

Western Blotting 法は、タンパク質の発現状態や塩基の翻訳後修飾を解析するための手法として用いた。それぞれの処理をした細胞入りディッシュを PBS でリンス後、セルリフターもしくはトリプシン処理で細胞を 1.5ml マイクロチューブに回収した。回収後、300 x g、4 °Cで2分間の遠心分離を行った。上清を除き、残った細胞ペレットに 50-200  $\mu$ L の RIPA Buffer(表 2-2 参照) + 1/200 倍希釈 Protease Inhibiter(ナカライテスク)を加えて懸濁し、氷上で 10 分以上放置した。その後、20000 x g、4 °C、20 分間の遠心分離を行い、上清を回収し、これをサンプルとして 4 °Cの冷蔵庫で保存した。すぐに Western Blotting を行わない場合は-30 °Cの冷凍庫に保存した。

次に、実験に用いるタンパク質量を均一にするために、タカラバイオ株式会社の TaKaRa BCA Protein Assay Kit (Cat# T9300A)を使用し、マイクロプレートリーダーを用いて 562 nm の吸光度を測定することでタンパク質濃度を測定した。タンパク質濃度を求めた後、サンプル溶液全量中のタンパク質量が 20  $\mu$ g となるように RIPA Buffer + Protease Inhibiter と、4 $\times$ SDS Sample Buffer (4 $\times$ SDS Sample Buffer + 20% 2-Mercaptoethanol (ナカライテスク)) を加えて調整を行った。4 $\times$ SDS Sample Buffer は濃度が全量の 1/4 となるように調整した。そして、調整後のサンプルを 98 °Cで 10 分間ボイルした。

得られたサンプルで SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis : SDS-PAGE) を行った。泳動時には Protein Ladder One, Triple-color(Broad range) for SDS-PAGE(ナカライテスク)を分子量のマーカースとして用いた。泳動後のゲルはホライズブロット転写装置(ATTO)もしくはミニトランスブロットセル(BIO-RAD)を用いて、セミドライ方式またはウェット方式で、転写膜(Polyvinylidene difluoride (PVDF); ポアサイズ 0.45  $\mu$ m; Millipore)へ転写した。転写後、膜を 100% メタノールで 4 °C、10 分間固定処理し、蒸留水でリンス後にポンソー溶液で染色することで転写ムラを確認した。TBS-T で二度リンスした後、膜を 1% (w/v) スキムミルク/TBS-T 溶液、または 1% 牛血清アルブミン(BSA)/TBS-T 溶液に 30 分以上浸すことでブロッキング処理を行った。次に、上記のブロッキング溶液によって適宜希釈した 1 次抗体(2-1-6 参照) に膜を浸した状態で 1 時間~Over night で放置した。放置後、TBS-

T で 3 分間の洗浄を 3 回以上行い、スキムミルク溶液で適宜希釈した 2 次抗体(2-1-6 参照) に浸した状態で 1 時間放置した。膜を蒸留水で 3 分間の洗浄を 5 回、TBS-T で 3 分間の洗浄を 2 回行った後、WesternSure® PREMIUM Chemiluminescent Substrate(LI-COR Biosciences)用いて処理したものを、現像機(LI-COR Biosciences)を用いて検出した。

### 2-3-2 蛍光免疫染色法 (Immunofluorescence staining: IF)

蛍光免疫染色法は、細胞内のタンパク質に免疫の特異性を利用して蛍光の標識を着け、蛍光顕微鏡で検出する解析方法である。今回は、細胞レベルでの目的タンパク質の発現の有無、局在状態を解析するために用いた。24-well plate にカバーガラスを設置したものを用意し、そこへ細胞を適当な数播種した。そして、播種後 48 時間ごろに細胞処理を行い回収した。回収したカバーガラス入りプレートを一度 PBS-T でリンスした後、0.5% (v/v) TritonX-100 を含む CSK バッファー (10 mM PIPES-KOH pH 6.7, 100 mM NaCl, 300 mM Sucrose, 1 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>) に浸し、5 分間室温で細胞膜穿孔処理を行った。その後、0.2% (v/v) TritonX-100 を含む 2% Paraformaldehyde/PBS (ナカライテスク) に浸し、10 分間室温に放置することで固定・透過処理を行った。PBS-T で 2 回洗浄後、1% BSA/PBS-T を用いて 30 分放置し、ブロッキング処理を行った。続いて、1% BSA 溶液で適宜希釈した 1 次抗体で 1 時間以上処理をした。PBS-T で 3 分間の洗浄を 3 回行った後、1% BSA で適宜希釈した 2 次抗体で 1 時間程度処理をした。2 次抗体による処理は暗所で行った。放置後、PBS-T で 3 分間の洗浄を 6 回行い、100 ng/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI (ナカライテスク))/PBS-T を加え、核染色を暗所かつ室温で 30 分間行った。最後に、Fluorescent Mounting Medium (Dako REF:S3023) を用いてカバーガラスをスライドグラスへ封入した。暗所で乾燥させた後、蛍光顕微鏡 (Zeiss) (図 2-7) を用いて観察・撮影を行った。蛍光強度やフォーカス数の定量解析は Cellprofiler を用いて解析した [98]。統計解析は Prism10 ソフトウェアまたは Excel を用いて、2 群間の有意差は対応の無い両側 t 検定で、多群間の有意差は Tukey 検定を伴った One-way ANOVA または Two-way ANOVA で決定した。有意水準は  $p = 0.05$  とした。

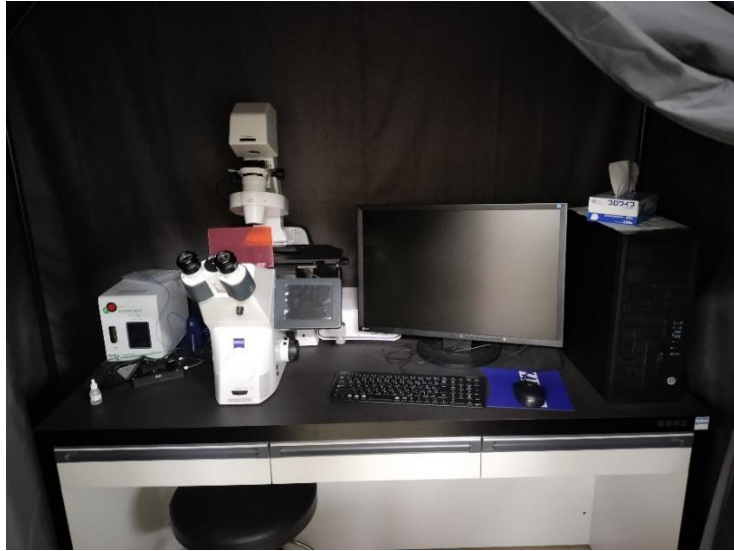


图 2-8 Zeiss 荧光显微镜

### 2-3-3 Laser micro-irradiation および Live cell imaging 法

蛍光タンパク質を発現させた生細胞内の一部にレーザーを照射し、局所的な DNA 損傷を誘導する方法である。レーザーにより誘導された DNA 損傷部位へ蛍光タンパク質が集積し、レーザートラックを形成するため、DNA 損傷応答の時間的な制御動態を確認するために適している。本研究では、GFP-APT<sub>X</sub> の遺伝子導入を行った U2OS 細胞を用いて実験を行った。細胞は 35 mm ガラスボトムディッシュ(マツナミガラス)に細胞観察の 2-3 日前に播種および siRNA 処理を行った。観察前日の夜に 50  $\mu$ M Xanthotoxin (8-MOP, Tokyo chemical industry) を含む Phenol red-free DMEM(ナカライテスク) + 10% BCS 培地に培地を交換した。Laser micro-irradiation には Leica TCS SP8 LIGHTNING 共焦点レーザー顕微鏡(Leica microsystems)の 63 x/1.40 の油浸レンズを用いて実験・観察を行った(図 2-8) [78]。レーザー照射部位での GFP 蛍光強度は Leica LASX ソフトウェアにより定量化した。レーザー照射について、100% 強度 50 mW の 405 nm レーザーを 0.25 秒で細胞核内の指定した領域に照射し、照射前から 0.5 秒毎に約 60 秒間の蛍光タンパク質のタイムラプス画像を撮影した。レーザーの顕微鏡からの減衰率を 90%と仮定すると、細胞に当たるのは 5 mW 程度になり約 0.005 J/s となる。顕微鏡の一秒当たりのフレーム数が 3.88 fps であることから、レーザー 1 scan 当たりの時間は 0.257 秒となり、約 0.0013 J のエネルギーが照射されたこととなる。また、今回の照射範囲が 1  $\mu$ m  $\times$  2  $\mu$ m であることから  $6.5 \times 10^8$  J/m<sup>2</sup> のエネルギーが生じていることがわかる。U2OS 細胞の UVC 照射に対する 50%生存率がおおよそ 5 J/m<sup>2</sup> であることが分かっている [99]。しかしながら、本実験では 8-MOP を増感剤として使用しているため、正確なエネルギーは計算できない。一方、既往の研究によると、U2OS 細胞において 100  $\mu$ M 8-MOP を 3 時間処理後に 405 nm レーザーで 100 scan (1 scan 当たり 8  $\mu$ W で合計 800  $\mu$ W) するとレーザーの照射領域には約 30 Gy 相当で 1000 個の DNA 二本鎖切断が発生することが報告されている [100]。これらのことから、本実験では少なくとも DNA 二本鎖切断を誘発するエネルギーが細胞のレーザー照射部位に働くことが考えられる。



図 2-9 Leica TCS SP8 LIGHTNING 共焦点レーザー顕微鏡 (国立がん研究センター)

#### 2-3-4 フローサイトメトリー法(Flowcytometry: FCM)および End joining アッセイ

フローサイトメトリー法は、細胞懸濁液を装置内で適当な速度で流すことで、細胞が一行で流れている状態にし、そこへレーザー光を当てて反射光を測定、またその光の強さを電気信号に変換し定量化することで、一つ一つの細胞の情報を自動的にサンプリングする方法である。一つの細胞単位での相対的大きさや形状、細胞種の同定やある細胞群に含まれる種々の細胞の割合を短時間で解析することが可能である。さらに、細胞に蛍光タンパク質を導入することで細胞内のタンパク質発現量を定量的に測定することが可能で、細胞の形状や形態の差としては現れない性質の差を識別することができる(図 2-9)。本研究では、End joining アッセイにおいて GFP 陽性(GFP+)細胞を計測するために用いた。

End joining アッセイは GFP レポータープラスミド(pEJ)を用いて、既報[101]を参考にした。pEJ は図 2-10 に示すように代替的開始コドン ATG により GFP 遺伝子の発現が抑制されるように設計されている。代替的開始コドン ATG の前後には制限酵素 I-SceI の認識切断配列が含まれており、I-SceI 発現時に代替的開始コドン ATG が切り落とされ、細胞内の End joining により DNA が結合されると下流の GFP が発現する仕組みとなっている。なお、End joining は DNA 二本鎖切断修復経路である NHEJ と MMEJ で行われると考えられている。本研究では U2OS を背景に pEJ がゲノム上に組み込まれた EJ-U2OS 細胞を用いて解析を行った[102]。手順としては、EJ-U2OS を siRNA による目的遺伝子発現の抑制後に pCBASceI を PEI-MAX を用いたリポフェクション法により導入した。導入 48 時間後に細胞をトリプシン処理で回収し、上記のフローサイトメトリー法により GFP 陽性(GFP+)細胞を定量解析した。統計解析は Prism10 ソフトウェアまたは Excel を用いて、One-way ANOVA および Welch 検定で有意差を決定した。有意水準は  $p = 0.05$  とした。



図 2-10 フローサイトメーター (Beckman Coulter)

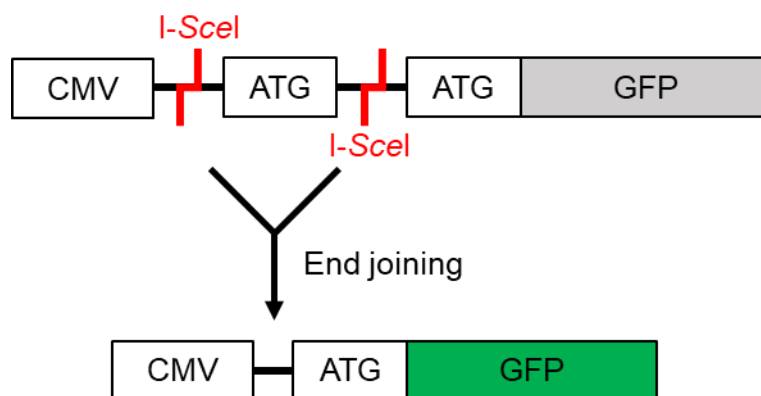


図 2-11 pEJ の模式図

CMV は CMV プロモーター、赤文字 I-SceI は I-SceI 認識切断配列、ATG は開始コドン、GFP は緑色蛍光タンパク質 GFP を表す。

### 2-3-5 アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動は、DNA フラグメントのサイズを確認・また切り出しをするために行う解析手法である。本実験においては、0.5-1%アガロースゲルを使用した。ゲルの作製は、0.25-0.5 g の Agarose (ナカライテスク)と 50 mL の 0.5×TAE (Tris-Acetic acid-EDTA Buffer)を三角フラスコに入れ、電子レンジを用いてアガロースを完全に溶かした。そして、50 °C前後まで冷ました後、核酸染色のため 0.5 μL の Gel Red(ナカライテスク)を添加し、ゲル作製専用のモールドに 50mL ずつ流し込み、その上からコームをセットした状態で約 30 分間、常温で放置し固まらせた。ゲルが固まったら、泳動槽へとセットした。適量の DNA サンプルと 1 kbp DNA Ladder one(ナカライテスク)の DNA ラダーマーカを 3 μL ウェルへアプライし、100 V で泳動を行った。その後、LED 装置で撮影後、目的部分のゲルを切り出し、マイクロチューブへ入れた。ゲルからの DNA 抽出は Fast Gene™ Gel/PCR エクストラクションキット(日本ジェネテイクス)を用いた。

### 2-3-6 免疫沈降法 (Immunoprecipitation: IP)

免疫沈降(IP: ImmunoPrecipitation)は抗原-抗体反応を利用して、溶液中から抗体特異的に結合してくるタンパク質を分離させる方法である。プルダウンアッセイとも呼ばれる。今回の実験では、GFP-APT<sub>X</sub>またはFLAG-XRCC1の融合タンパク質を細胞内で遺伝子導入により発現させ、GFP または FLAG と結合する磁気ビーズ、Protein G Agarose を用いることで目的タンパク質と結合するタンパク質を分離した。IP で回収したサンプルは Western Blotting 法により解析した。以下にそのプロトコルを示す。

まず GFP-APT<sub>X</sub> の IP について、U2OS 細胞に PEI-MAX によるリポフェクション法で GFP-APT<sub>X</sub> を導入した。導入 72 時間後、細胞を PBS で一度リンスし、氷上で Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.2% NP-40, 10% glycerol) + 1/200 protease inhibitor を dish に直接加え、セルリフターで細胞をマイクロチューブに回収した。その後、4 °C で 30 分間回しながら放置した。遠心分離機で 20000 x g、20 分間遠心後、上澄みを回収し、BCA Protein Assay Kit を用いてタンパク質量を調整した。調整後、一部を Input コントロールとして取り分け、残りを IP に用いた。IP には 1 サンプル当たり 10 μL の GFP-Trap 磁気ビーズ(ChromoTek, Cat# GmbH)を用いて、4 °C で 2 時間ローテーターを用いて回しながら放置した。GFP-Trap 磁気ビーズは使用前に Lysis buffer と磁気ステージにより 3 回洗浄を行った。放置後、磁気ステージを用いてサンプルを Lysis buffer で 5 回洗浄し、IP サンプルと Input コントロールに適量の 2 x SDS sample buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 0.01 % bromophenol blue, 10% 2-mercaptoethanol)加えて 10 分間 98 °C で溶出した。

次に FLAG-XRCC1 の IP について、HCT116 細胞に PEI-MAX によるリポフェクション法で FLAG-XRCC1 を導入した。導入 72 時間後、細胞を PBS で一度リンスし、氷上で Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.2% NP-40, 10% glycerol) + 1/200 protease inhibitor を dish に直接加え、セルリフターで細胞をマイクロチューブに回収した。その後、4 °C で 30 分間回しながら放置した。遠心分離機で 20000 x g、20 分間遠心後、上澄みを回収し、BCA Protein Assay Kit を用いてタンパク質量を調整した。調整後、一部を Input コントロールとして取り分け、残りを IP に用いた。IP サンプルに 1 サンプル当たり 2 μg の FLAG 抗体を加え、4 °C で Over night ローテーターを用いて回しながら抗体を反応させた。反応後、サンプルに 40 μL の Protein G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Cat# sc-2002)を加え、再度 4 °C で 6 時間ローテーターを用いて回しながら反応させた。Protein G PLUS-Agarose は使用前に Lysis buffer を加えて遠心(2000 x g、2 分)する洗浄を 3 回行った。反応後、サン

ルを Lysis buffer と遠心(2000 x g、2分)で5回洗浄し、IP サンプルと Input コントロールに適量の 2 x SDS sample buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 0.01 % bromophenol blue, 10% 2-mercaptoethanol)加えて10分間98 °Cで溶出した。

### 2-3-7 コロニー形成法による細胞生存率測定

放射線や種々の薬剤による細胞生存率(感受性)を定量的に解析する際に用いられる方法の一つがコロニー形成法である[103]。コロニーは1細胞が増殖を続けることで、一つの密集した細胞集落を作ることであり、コロニー形成法ではこのコロニー形成を利用して細胞の種々のストレスに対する感受性解析を行う。細胞に放射線などのDNA損傷誘導因子で処理をすると間期死・増殖死を起こした細胞はそれ以上細胞分裂せず、一定時間培養した後も明確なコロニーを形成しない(図 2-12)。コロニー形成法では、未処理の細胞と処理後の細胞のコロニー形成数を比較することで細胞生存率を算出する。

本研究ではU2OS細胞を用いて行った。放射線照射などの細胞処理の6-12時間前に適切な数の細胞を6-well plateに播種し、インキュベーターで培養した。薬剤による処理の場合は、薬剤入り培地で24時間培養した後通常の培地へと交換し、再度培養した。10~14日の培養後、十分なコロニー形成が確認出来たら、細胞をPBSでリンス後、99.5%エタノールで固定処理した。その後、細胞染色液(0.02% (w/v) crystal violet, 25% methanol)で細胞コロニーを紫色に染色し、水で洗浄を行った。乾燥後、それぞれの条件での細胞コロニー形成数を計測し、種々の細胞ストレス因子に対する細胞生存率を導出した。3回以上の独立した実験を平均して、統計的な差を算出した。統計解析はPrism10ソフトウェアまたはExcelを用いて、One-way ANOVAおよびWelch検定で有意差を決定した。有意水準は $p = 0.05$ とした。

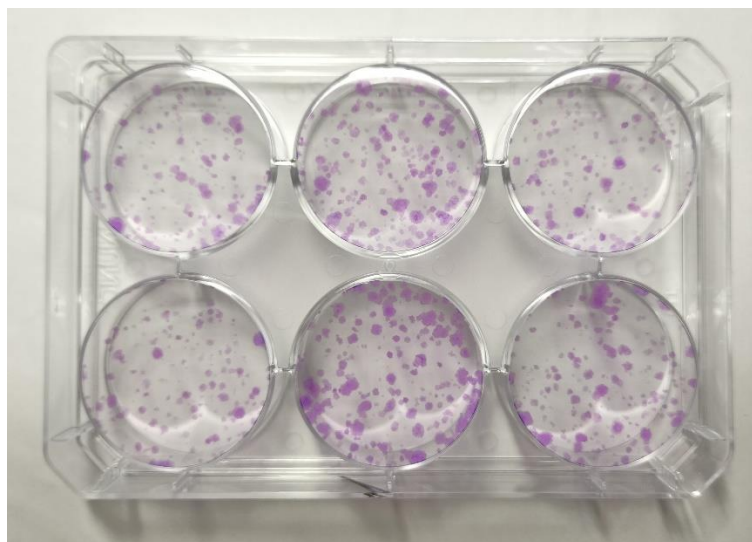


図 2-12 コロニー形成法により 6-well plate 上で染色されたコロニー(紫色)

# 第 3 章 DNA 二本鎖切断修復における APT<sub>X</sub> 複合体の役割

### 3-1 第3章の目的

DNA 二本鎖切断(DNA double-strand break: DSB)はヒト細胞において3つの経路により修復されるが、E. Coli に代表される原核生物は DSB を修復することができない[104]。これは DNA 損傷修復が原核生物から真核生物へ、単細胞生物から多細胞生物へ分化・進化の過程で高度に複雑化してきた1つの証拠と言えるだろう。複雑化した DNA 損傷修復は膨大な数のタンパク質が互いに相互作用することで厳密に制御されている。細胞内でタンパク質間相互作用はリン酸化などの翻訳後修飾やタンパク質の物理的な結合により媒介されていることが分かっている。

ヒト APTX は 1-5-1 章で述べたように FHA ドメインを介して塩基除去修復(Base excision repair: BER)および DNA 一本鎖切断修復(Single-strand break repair: SSB)に関わる足場タンパク質 XRCC1 または非相同末端結合(Non-homologous End joining: NHEJ)を介した DSB 修復に関わる XRCC4 と物理的に結合することで図 1-14 に示すように、それぞれの DNA 損傷修復経路において厳密に制御されていると考えられる[105]。また、単細胞真核生物である分裂酵母の APTX オルソログ hnt3 には FHA ドメインが存在しないことから、分化・進化の過程で FHA ドメインを介した足場タンパク質による制御が必要となった可能性がある[106]。しかしながら、APTX の XRCC4 との結合による NHEJ での役割は未だ解明されておらず、AOA1 患者由来細胞が DSB を誘発する電離放射線(Ionizing radiation: IR)に感受性を示していないことから細胞内で APTX が DSB 修復に関与するかは不明である[35, 45]。

これらのことを踏まえて、本章では” DSB 修復における APTX 複合体の役割を明らかにすること”を目的とした。上記の目的を達成するために、以下の3点を解析した。

1. ゲノム編集による APTX ノックアウト細胞の樹立および表現型(3-2 章)
2. APTX の DNA 損傷部位への集積挙動(3-3 章)
3. DSB 修復における APTX と XRCC4 のエピスタシス(Epistasis)(3-4 章)

3-5 章では結果を踏まえた考察を示す。

### 3-2 ゲノム編集による APTX ノックアウト細胞の樹立および表現型

AOA1/EAOHでは遺伝子背景の異なる20以上の変異が同定されており、ほとんどがHITドメインおよびZNFドメインに集中している[55]。これらの変異 APTX は In vitro 研究でタンパク質安定性、酵素活性、DNA へのアクセスおよび結合など、それぞれ異なる機能欠損を示すことが報告されている[55]。また、AOA1 患者由来細胞を用いた研究において、Guevenらの研究[45]では AOA1 患者由来リンパ芽球細胞 L136 (APTX フレームシフト変異：689insT/840delT)、L938 (APTX ミスセンス変異：P206L/P206L) および L939 (APTX ミスセンス変異：P206L/V263G) は塩基損傷を誘導する Methylmethanesulfonate (MMS) および塩基損傷と DNA 一本鎖切断を誘導する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に感受性を示すが、DNA 二本鎖切断を誘発する電離放射線、DNA 架橋を誘発する Mitomycin C (MMC) に対して感受性を示さないことが報告されている。さらに、Clementsらの研究[35]では AOA1 患者由来線維芽細胞で APTX ホモ接合ナンセンス変異 W279\*を持つ FD104、FD105、FD106 が MMS、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、電離放射線に感受性を示さないことが報告されている。両研究において、AOA1 患者由来細胞が電離放射線に感受性を示していないことは一致しているが、MMS や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> への感受性は一致していない。これらの異なる報告は、用いた細胞の形態、APTX の変異またはコントロールとして用いた正常細胞などにより APTX 本来の表現型がマスクされたことに起因する可能性がある。そこで、本研究では 2-1-5 章で述べた、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いたゲノム編集技術により同一細胞で純粋な表現型解析を可能とした。ゲノム編集について、sgRNA の標的配列は CHOP CHOP で決定した[107]。CHOP CHOP は CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術のオープンデータベースであり、遺伝子名を記入することでその遺伝子の最適標的配列、すなわち相同配列が存在せず CRISPR 効率が低下しない配列のランク付けした結果を検索することができる。APTX で検索すると、3 塩基以内のミスマッチが存在しないユニーク配列が APTX の HIT ドメインに相当する APTX 遺伝子座の exon 6 上に 4 つあることが分かった。その中でも最も N 末端側にある sgRNA 標的配列を選択した(図 3-1)。ゲノム編集を行う細胞は既知の培養細胞かつトランスフェクション効率が良く、ゲノム編集によく用いられる U2OS 細胞を使用した。手順は、2-1-5 章に記載の通りに行った。ノックアウトは Western Blotting 法でタンパク質発現の消失を確認し、DNA サンガーシーケンス法により DNA 配列を読むことで両対立アリの 1 塩基および 2 塩基欠損によるフレームシフトを確認した(図 3-2、3-3)。両フレームシフトにより U2OS 細胞における内在性 APTX の 196 番目のプロリン以降が別のアミノ酸に置き換わっており、それぞれアリンで 212 番目のバリン、220 番目のプロリンの次で終始コドンとなる(図 3-2)。すなわち、樹立した U2OS APTX 欠損 (APTX<sup>-/-</sup>) 細胞では HIT ドメインおよび ZNF ドメインを欠いた上記の

APT<sub>X</sub> トランケーション変異体が発現している可能性がある。しかしながら、タンパク質検出に用いた APT<sub>X</sub> 抗体はヒト APT<sub>X</sub> の C 末端に位置するアミノ酸 43-342 に対応しており、APT<sub>X</sub> 抗体のエピトープと sgRNA 標的配列が被っていることから、これらの APT<sub>X</sub> トランケーション変異体は検出できないと考えられる。Zheng らの研究[51]では、U2OS 細胞で APT<sub>X</sub> をノックアウトした細胞で PARP1 タンパク質発現レベルの低下を示すことが報告されている。本研究で作製した U2OS *APT<sub>X</sub><sup>-/-</sup>*細胞において、Ku80 発現量で PARP1 タンパク質発現レベルを規格化し解析したところ、発現量の低下は見られなかった (図 3-3、3-4)。

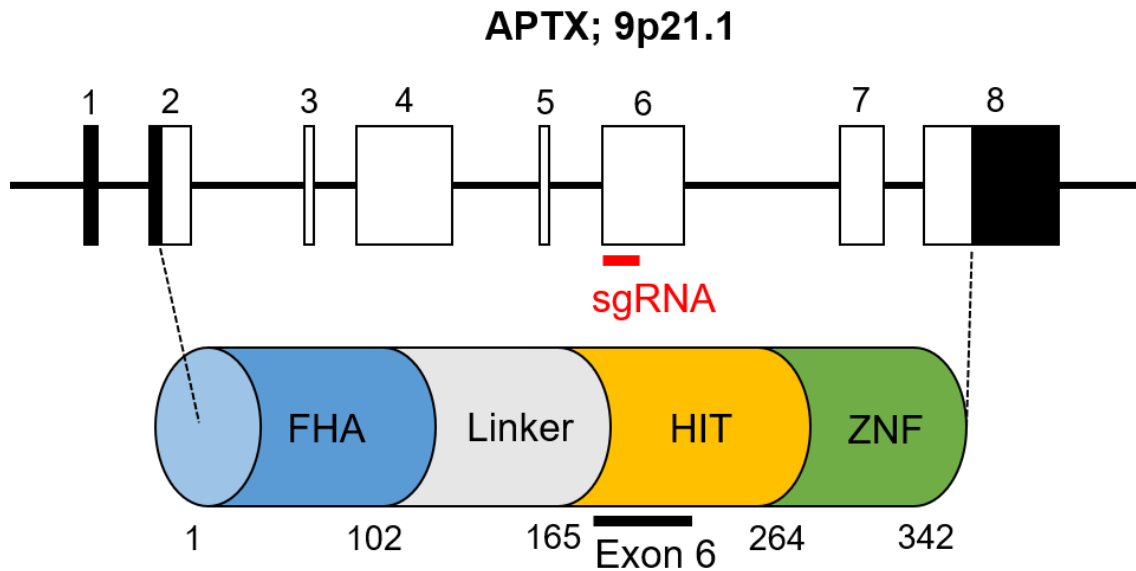
*APT<sub>X</sub><sup>-/-</sup>*細胞の DNA 損傷に対する表現型を解析するために、GFP タグ付き APT<sub>X</sub> (GFP-APT<sub>X</sub>) を発現するプラスミドベクターを構築し、*APT<sub>X</sub><sup>-/-</sup>*細胞に PEI-MAX を用いて一過性にトランスフェクトした後、GFP-APT<sub>X</sub> の発現を Western Blotting 法で確認した (図 3-5)。EGFP の分子量は約 28 kDa であり、APT<sub>X</sub> の分子量は約 40 kDa であることから、GFP-APT<sub>X</sub> の分子量は約 68 kDa であると予想される。実際に、*APT<sub>X</sub><sup>-/-</sup>*+GFP-APT<sub>X</sub> のレーンにおいて GFP 抗体により 75 kDa と 60 kDa の間の位置にバンドを検出した。位置から、このバンドが全長 GFP-APT<sub>X</sub> であると考えられる。一方で、*APT<sub>X</sub><sup>-/-</sup>*+GFP-APT<sub>X</sub> のレーンにおいて、内在性 APT<sub>X</sub> の全長サイズである 40 kDa 付近およびそれ以上のサイズにおいても、APT<sub>X</sub> 抗体によりいくつかのバンドが検出された。APT<sub>X</sub> 抗体はヒト APT<sub>X</sub> の C 末端に位置するアミノ酸 43-342 に対応していることから、40 kDa 以上のサイズのバンドは GFP-APT<sub>X</sub> がリンカー部位あるいは EGFP 上で分解された産物であると考えられる。また、EGFP-APT<sub>X</sub> 発現ベクターは APT<sub>X</sub> 遺伝子配列の開始コドンである ATG を含んで設計している。よって、U2OS 細胞内で内在性 APT<sub>X</sub> と同サイズの APT<sub>X</sub> が GFP-APT<sub>X</sub> ベクターから発現される可能性がある。このことから、40 kDa 付近で検出されたバンドは GFP-APT<sub>X</sub> ベクターから発現された GFP タグが付いていない APT<sub>X</sub> も含んでいると考えられる。これらの U2OS 野生型(WT)、*APT<sub>X</sub><sup>-/-</sup>*、*APT<sub>X</sub><sup>-/-</sup>*+GFP-APT<sub>X</sub> 細胞を用いて、細胞周期特異性の無い DNA 一本鎖切断(Single-strand break: SSB)および DNA 二本鎖切断(Double-strand break: DSB)を誘発する電離放射線(IR (γ線))、S 期特異的な DSB を誘発する I 型トポイソメラーゼ阻害 Camptothecin (CPT)に対する感受性をコロニー形成法で測定した。放射線処理は、U2OS WT 細胞の生存率が 10%-20%に収まる線量(4 Gy)を最大線量に設計して行った。また、CPT 処理においても U2OS WT 細胞の生存率が 10%-20%に収まる 24 時間処理濃度(30 nM)を最大濃度に設計して行った。IR 照射において、*APT<sub>X</sub><sup>-/-</sup>*細胞は WT 細胞に比べ、特に 4 Gy 照射後の細胞生存率が低下したが、*APT<sub>X</sub><sup>-/-</sup>*+GFP-APT<sub>X</sub> 細胞は *APT<sub>X</sub><sup>-/-</sup>*細胞に比べて生存率を回復させた (図 3-6)。CPT 処理においても、*APT<sub>X</sub><sup>-/-</sup>*細胞は WT 細胞に比べ、30 nM での生存率が低下したが、*APT<sub>X</sub><sup>-/-</sup>*+

GFP-APT<sup>X</sup> 細胞は APT<sup>X</sup><sup>-/-</sup>細胞と比べて生存率を回復させた (図 3-7)。IR 4 Gy 照射条件および 30 nM CPT 処理条件において、APT<sup>X</sup><sup>-/-</sup>+GFP-APT<sup>X</sup> 細胞は WT 細胞と比べると、One-way ANOVA および Welch 検定では有意差ではなかったが、生存率の平均値は同じ値とならなかった。これは GFP-APT<sup>X</sup> が APT<sup>X</sup><sup>-/-</sup>細胞において一過性過剰発現であり、全ての細胞が GFP-APT<sup>X</sup> を発現していないことが影響していることが考えられる。また、一過性発現は通常一週間ほどで発現が失われると考えられている。本実験では照射後 2 週間の培養を行ったことから、最後の一週間は GFP-APT<sup>X</sup> が発現していない状態であったと考えられる。コロニー形成法は増殖死を解析できる手法であるが、増殖を経るにつれて APT<sup>X</sup> の発現が失われることで DNA 損傷の残存や誤った修復が致死的な遺伝情報の不均等配分などを誘発し、細胞が生命活動を維持できなくなった可能性がある。よって、これらの寄与があったと推定される。また、本実験では、WT 細胞の内在性 APT<sup>X</sup> と APT<sup>X</sup><sup>-/-</sup>+GFP-APT<sup>X</sup> 細胞で導入した GFP-APT<sup>X</sup> の発現量の比較はできていない (図 3-5)。しかしながら、コロニー形成法の結果において APT<sup>X</sup><sup>-/-</sup>+GFP-APT<sup>X</sup> 細胞が WT 細胞に匹敵するほどに生存率を回復させたことから、GFP-APT<sup>X</sup> を発現した APT<sup>X</sup><sup>-/-</sup>+GFP-APT<sup>X</sup> 細胞では生存に十分な量の GFP-APT<sup>X</sup> が発現していたと考えられる (図 3-6、3-7)。まとめると、APT<sup>X</sup> が IR、CPT 処理した細胞の生存に必要であり、GFP-APT<sup>X</sup> は内在性 APT<sup>X</sup> を補うことができることが示された。

APT<sup>X</sup><sup>-/-</sup>細胞が IR および CPT 処理に感受性を示したことから、APT<sup>X</sup><sup>-/-</sup>細胞は DNA 損傷修復能が低下していることが考えられた。そこで、SSB のマーカーである ADP-ribose を指標として APT<sup>X</sup><sup>-/-</sup>細胞の SSBR 能を評価した [108]。Blessing らの研究 [49] において U2OS 細胞を用いて塩基損傷と SSB を誘導する過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を処理した後に ADP-ribose を免疫染色法により解析した条件を参考に、U2OS WT 細胞と APT<sup>X</sup><sup>-/-</sup>細胞に 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 10 分間処理した後、免疫染色法により解析した。その結果、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理により未処理 (NT) 条件と比べて WT 細胞と APT<sup>X</sup><sup>-/-</sup>細胞の両細胞において ADP-ribose 蛍光強度が増加することを確認した (図 3-8、3-9)。さらに、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理条件の WT 細胞と APT<sup>X</sup><sup>-/-</sup>細胞を比べると APT<sup>X</sup><sup>-/-</sup>細胞は WT 細胞よりも ADP-ribose 蛍光強度が有意に増加していた (図 3-8、3-9)。このことから、APT<sup>X</sup><sup>-/-</sup>細胞は BER または SSBR に欠陥があることが示され、APT<sup>X</sup> これらの修復経路に関与していることが支持された。次に、DSB マーカーである γH2AX と 53BP1 を指標として APT<sup>X</sup><sup>-/-</sup>細胞の DSBR 能を評価した [109]。Zhou らの研究 [110] において U2OS 細胞を用いて IR 照射後に γH2AX を免疫染色法により解析した条件を参考に、IR 5 Gy 照射後にインキュベーターで 4 時間培養後に免疫染色法により解析した。その結果、IR 照射 (IR 4h) により未処理 (NT) 条件と比べて WT 細胞と APT<sup>X</sup><sup>-/-</sup>細胞の両細胞において残存する γH2AX および 53BP1 フォーカス数が増加することを確認し

た(図 3-10、3-11)。さらに、IR 照射条件の WT 細胞と *APT*X<sup>-/-</sup>細胞の残存する $\gamma$ H2AX フォーカス数を比べると *APT*X<sup>-/-</sup>細胞は WT 細胞よりも有意に増加していた(図 3-10、3-11)。意外なことに、同条件下で残存する 53BP1 フォーカス数は、*APT*X<sup>-/-</sup>細胞と WT 細胞の間で識別できるほどの差がないことが確認された(図 3-10、3-11)。また、CPT 処理による S 期特異的 DSB に対する修復能も評価した。Sun らの研究[111]において U2OS 細胞を用いて CPT 処理後に $\gamma$ H2AX を免疫染色法により解析した条件を参考に、1  $\mu$ M CPT で 1 時間処理した後に免疫染色法により解析した。その結果、CPT 処理によりコントロール条件(DMSO)と比べて WT 細胞と *APT*X<sup>-/-</sup>細胞の両細胞において高い $\gamma$ H2AX および 53BP1 蛍光強度を示すことを確認した(図 3-12~3-15)。さらに、CPT 処理条件の WT 細胞と *APT*X<sup>-/-</sup>細胞の $\gamma$ H2AX 蛍光強度を比べると *APT*X<sup>-/-</sup>細胞は WT 細胞よりも有意に増加していた(図 3-12、3-13)。また IR 照射条件と同様に、CPT 処理条件下で 53BP1 蛍光強度は、*APT*X<sup>-/-</sup>細胞と WT 細胞の間で識別できるほどの差がないことが確認された(図 3-14、3-15)。これらの結果から、*APT*X<sup>-/-</sup>細胞はグローバルな DSB 修復が機能していないことが示され、*APT*X が DSB 修復に関与ことが明らかとなった。一方で、53BP1 は End resection を抑制することで NHEJ を促進することが知られているが、*APT*X が 53BP1 依存的 NHEJ を介した DSB 修復には関与していないことが示唆された[20]。

図 3-1 APTX 遺伝子座および対応するドメイン



9 番染色体短腕 21.1 (9p21.1) にあるヒトゲノム APTX 遺伝子座、CRISPR/Cas9 を介したゲノム編集のための sgRNA ターゲット、およびタンパク質のドメイン構造。ボックスは exon を表す。空部分はオープンリーディングフレームを表し、黒部分は 5' -または 3' -非翻訳領域を表す。sgRNA の標的は、APTX の HIT ドメインに対応する exon 6 に位置している。

		PAM	sgRNA	
Exon6_WT	1	GTTTACAAAGATGAGCAGGTGGTGGTGATAAAGGATAAATA	CCCAAGGCCCGTTAC	57
		V Y K D E Q V V V I K D K Y P K A R Y		
KO_allele1	1	GTTTACAAAGATGAGCAGGTGGTGGTGATAAAGGATAAATACCCAAAG-CCCGTTAC		56
		V Y K D E Q V V V I K D K Y P K P V T		
KO_allele2	1	GTTTACAAAGATGAGCAGGTGGTGGTGATAAAGGATAAATACCCA--GGCCCGTTAC		55
		V Y K D E Q V V V I K D K Y P G P L		
Exon6_WT	58	CATTGGCTGGTCTTACCGTGGACCTCCATTTCCAGTCTGAAGGCTGTGGCCAGGGAA		114
		H W L V L P W T S I S S L K A V A R E		
KO_allele1	57	CATTGGCTGGTCTTACCGTGGACCTCCATTTCCAGTCTGAAGGCTGTGGCCAGGGAA		113
		I G W S Y R G P P F P V *		
KO_allele2	56	CATTGGCTGGTCTTACCGTGGACCTCCATTTCCAGTCTGAAGGCTGTGGCCAGGGAA		112
		P L A G L T V D L H F Q S E G C G Q G		
Exon6_WT	115	CACCTTGAACCTCCTTAAGCATATGCACACTGTGGGGGAAAAGGTGATTGTAGATTTT		171
		H L E L L K H M H T V G E K V I V D F		
KO_allele1	114	CACCTTGAACCTCCTTAAGCATATGCACACTGTGGGGGAAAAGGTGATTGTAGATTTT		170
KO_allele2	113	CACCTTGAACCTCCTTAAGCATATGCACACTGTGGGGGAAAAGGTGATTGTAGATTTT		169
		T P *		
Exon6_WT	172	GCTGGGTCCAGCAAACCTCCGCTTCCGATTGGGCTACCACGCCATTCCGAGTATGAG		227
		A G S S K L R F R L G Y H A I P S M		
KO_allele1	171	GCTGGGTCCAGCAAACCTCCGCTTCCGATTGGGCTACCACGCCATTCCGAGTATGAG		226
KO_allele2	170	GCTGGGTCCAGCAAACCTCCGCTTCCGATTGGGCTACCACGCCATTCCGAGTATGAG		225

**図 3-2 U2OS *APT<sup>X</sup>*細胞における *APT<sup>X</sup>* exon 6 の 2 つのノックアウト (KO) 対立遺伝子の DNA 配列**

PAM と sgRNA の配列はそれぞれ水色と赤色で示されている。2 つの対立遺伝子はそれぞれ 1 塩基と 2 塩基の欠失を示し、-は欠損を表す。各配列はそのコドンに対応するアミノ酸を下部に含む。\*は終止コドンを表す。

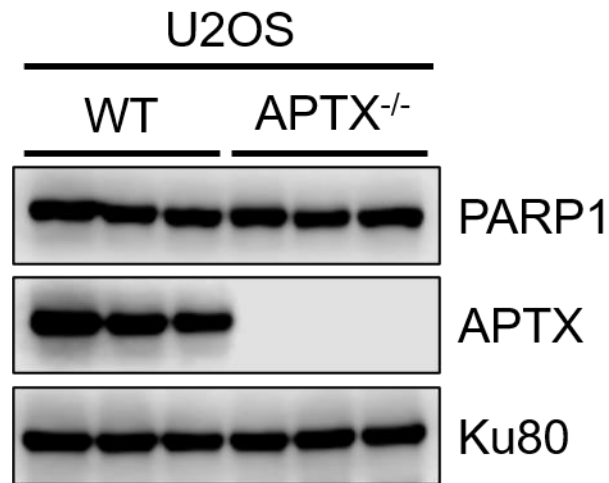


図 3-3 U2OS 野生型 (WT) および *APT*X<sup>-/-</sup> 細胞における APTX および PARP1 タンパク質の Western Blotting による解析

各レーンは生物学的複製からの独立したサンプルを示す。Ku80 はローディングコントロールとして示した。

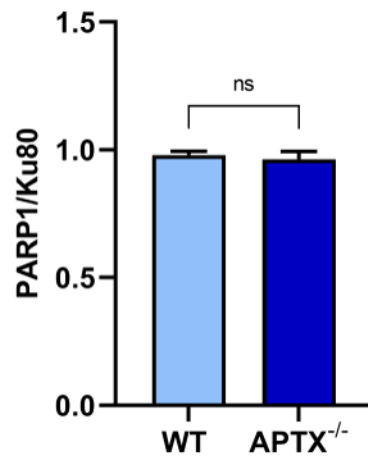


図 3-4 U2OS WT 細胞およびU2OS APTX<sup>-/-</sup>細胞における Ku80 発現量で正規化した PARP1 発現の定量解析

図 3-3 の PARP1 発現量を Ku80 発現量で規格化することでグラフ化した。各バーは 3 回の平均+SEM(標準誤差)を表す。有意差は Welch の t 検定で決定した。ns は  $p > 0.05$  を表す。

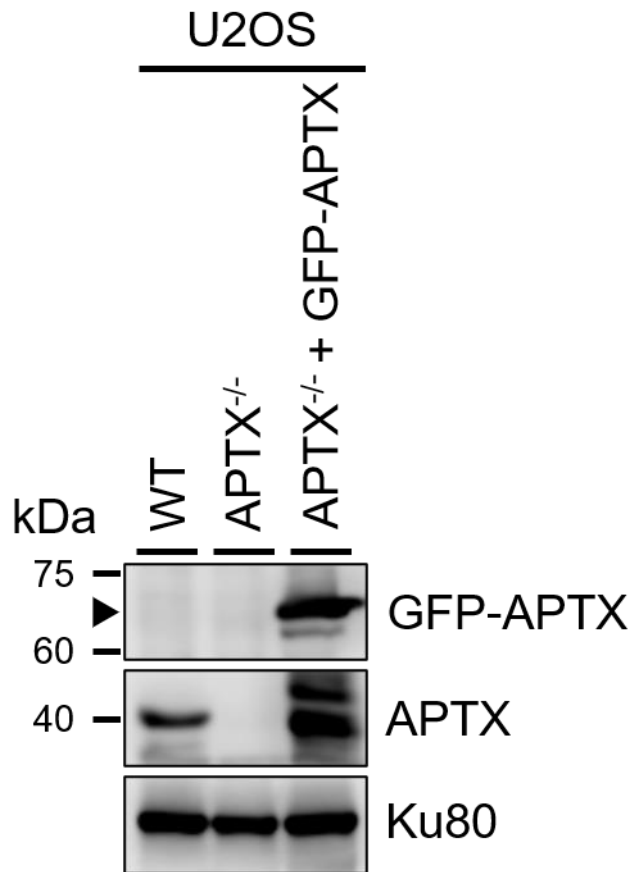


図 3-5 U2OS WT、*APT*<sup>-/-</sup>および *APT*<sup>-/-</sup> + GFP-APT 細胞における APT および GFP-APT タンパク質の Western Blotting 解析

矢印は GFP-APT の予測分子量 68 kDa を示す。GFP-APT は GFP 抗体で、APT は APT 抗体で検出している。Ku80 はローディングコントロールとして示した。

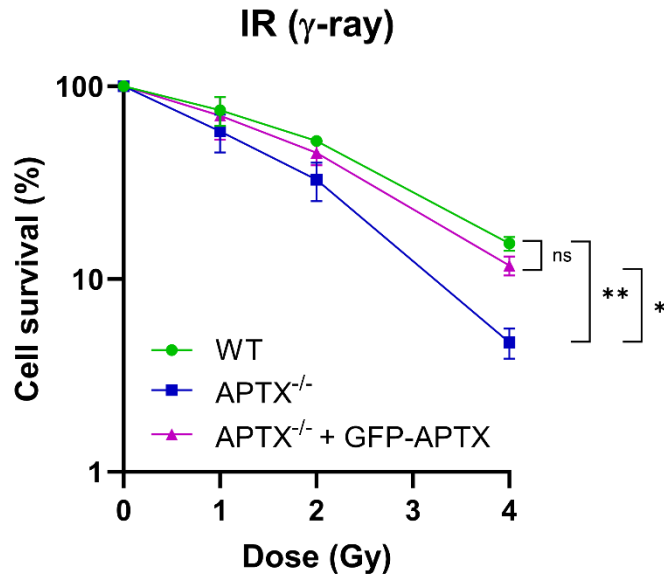
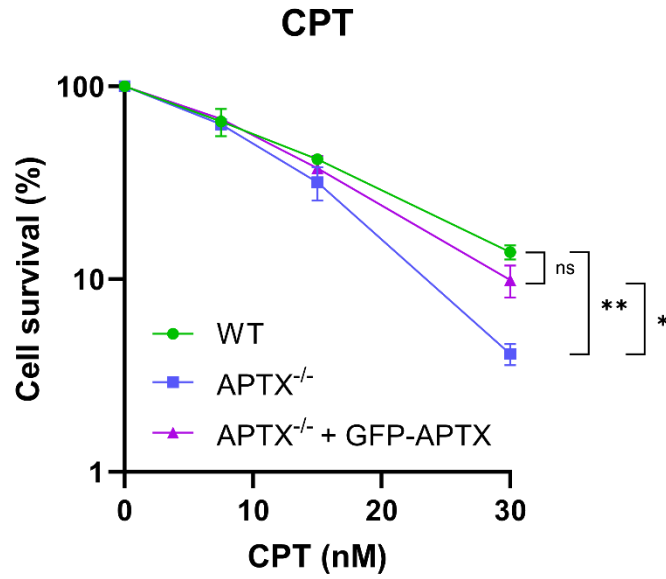


図 3-6 U2OS WT、*APTX*<sup>-/-</sup>、*APTX*<sup>-/-</sup>+GFP-APTX 細胞のコロニー形成法による放射線(Ionizing radiation: IR,  $\gamma$ -ray)感受性

細胞の生存率は未処理のコントロールに対するパーセンテージで表し、データは独立した実験を 3 回繰り返し行った結果の平均±SEM(標準誤差)を表す。有意差は One-way ANOVA および Welch 検定で決定した。ns は  $p > 0.05$ 、\*は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\*は  $0.005 < p \leq 0.01$  を表す。



**図 3-7 U2OS WT、*APTX*<sup>-/-</sup>、*APTX*<sup>-/-</sup>+GFP-APTX 細胞のコロニー形成法による Camptothecin (CPT)感受性**

細胞の生存率は未処理のコントロールに対するパーセンテージで表し、データは独立した実験を 3 回繰り返し行った結果の平均±SEM(標準誤差)を表す。有意差は One-way ANOVA および Welch 検定で決定した。ns は  $p > 0.05$ 、\*は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\*は  $0.005 < p \leq 0.01$  を表す。

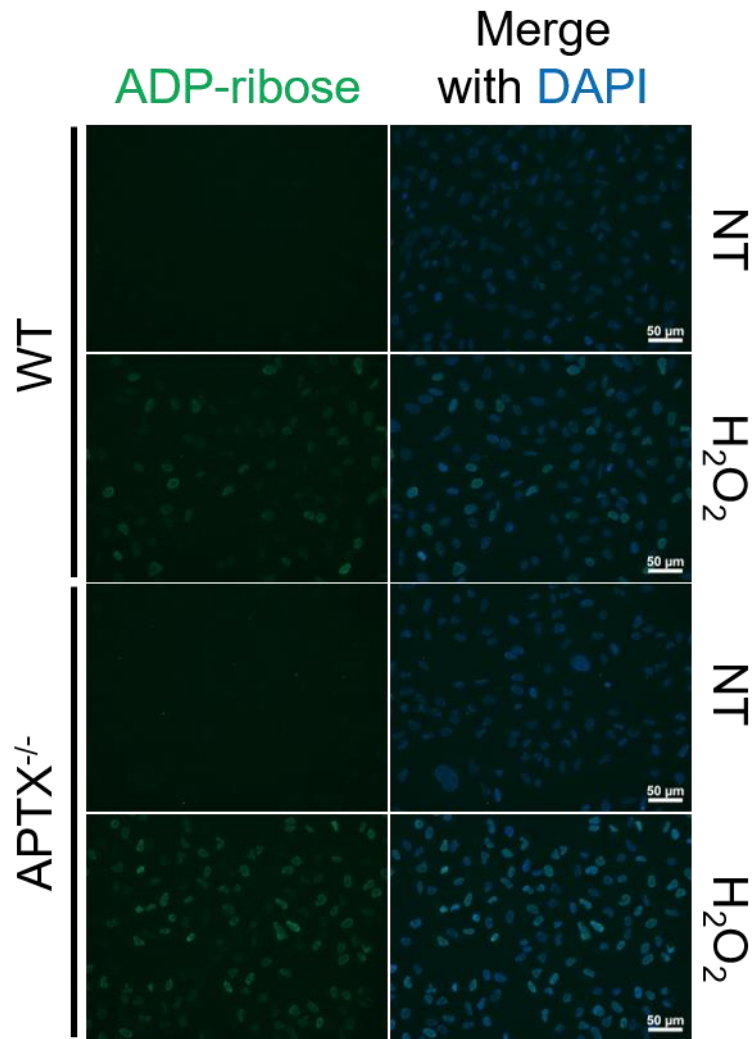


図 3-8 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理後の U2OS WT および APTX<sup>-/-</sup> 細胞における ADP-ribose 染色の代表的な画像

NT は未処理を表す。DAPI 処理は DNA を青色に染色している。Merge with DAPI は ADP-ribose および DPAI を重ね合わせた画像である。スケールバーは 50 μm を表す。

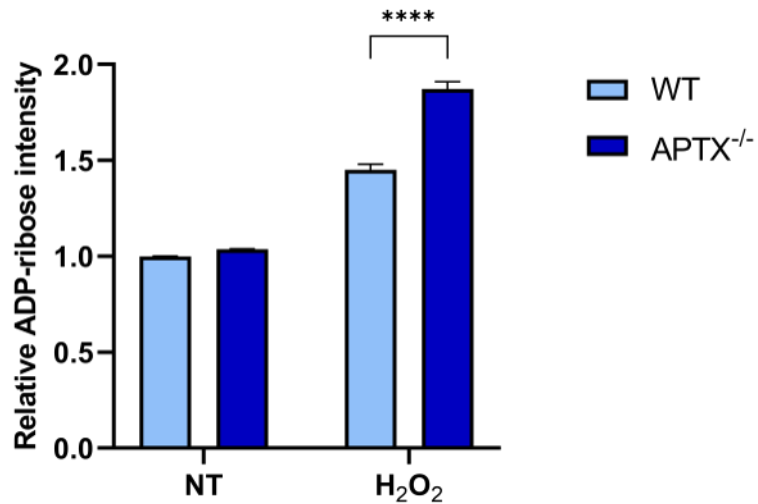


図 3-9 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理後の U2OS WT および APTX<sup>-/-</sup> 細胞の ADP-ribose 蛍光強度の定量化

各条件の ADP-ribose 蛍光強度を、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 非処理条件 (NT) での WT 細胞の蛍光強度で正規化した。各列は、3 つの独立したサンプルからのプール (300 細胞) の平均値 + SEM (標準誤差) を表す。有意差は対応の無い両側 t 検定で決定した。\*\*\*\* は  $p \leq 0.001$  を表す。

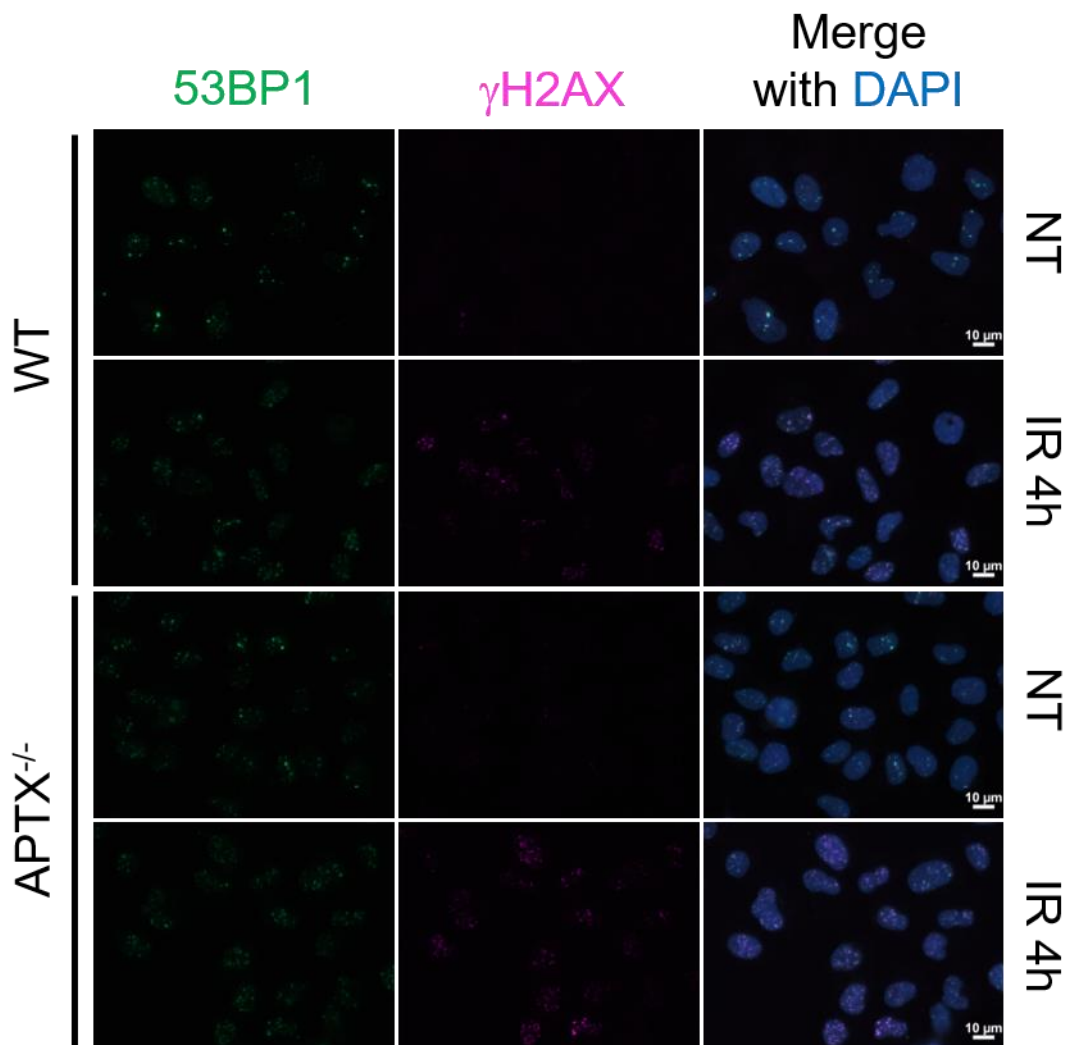


図 3-10  $\gamma$ 線 5 Gy 照射後 4 時間培養 (IR 4h) の U2OS WT、*APTX*<sup>-/-</sup>細胞における $\gamma$ H2AX と 53BP1 フォーカス残存数の代表的な画像

NT は未処理を表す。DAPI 処理は DNA を青色に染色している。Merge with DAPI は 53BP1、 $\gamma$ H2AX および DAPI を重ね合わせた画像である。スケールバーは 10  $\mu$ m を表す。

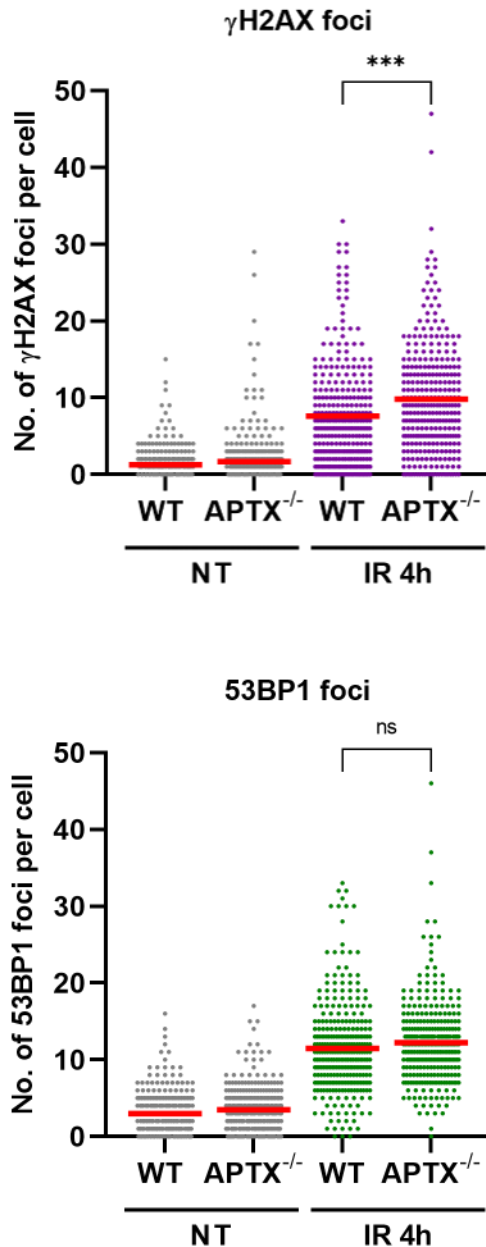


図 3-11 γ線 5 Gy 照射後 4 時間培養 (IR 4h) の U2OS WT、*APTX*<sup>-/-</sup>細胞における細胞あたりのγH2AX と 53BP1 の残存フォーカス数

ドットはそれぞれの条件におけるフォーカス数を表し、赤いバーはそれぞれの実験群におけるフォーカス数の平均を示す。3 つの独立したサンプルから得られたデータのプール (300 細胞) から平均を算出した。有意差は対応の無い両側 t 検定で決定した。ns は  $p > 0.05$ 、\*\*\*は  $0.001 < p \leq 0.005$  を表す。

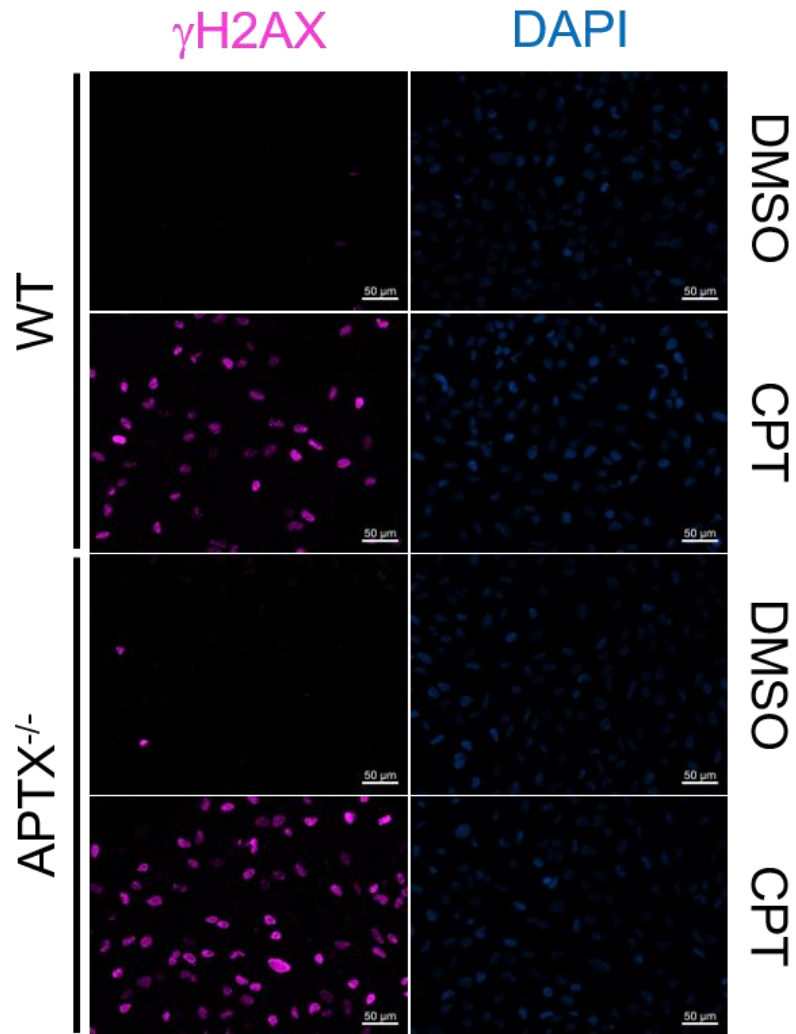
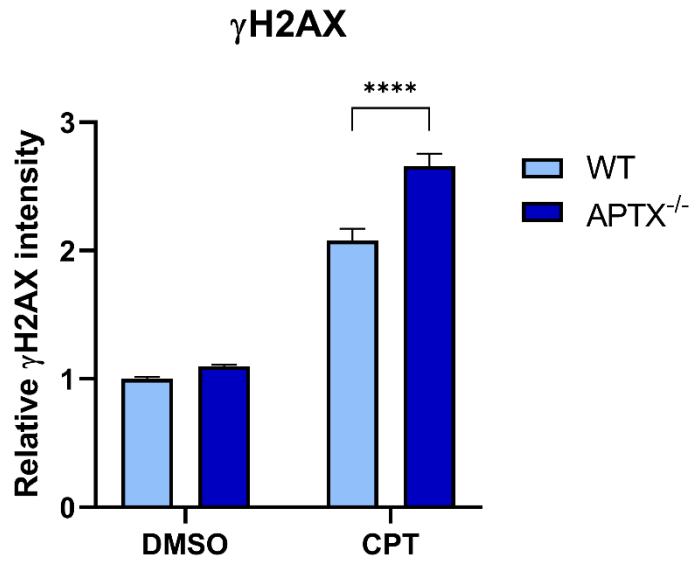


図 3-12 1  $\mu$ M CPT を 1 時間処理した後の U2OS WT、*APT*X<sup>-/-</sup>細胞における $\gamma$ H2AX 蛍光強度の代表的な画像

DMSO はコントロールを表す。DAPI 処理は DNA を青色に染色している。スケールバーは 50  $\mu$ m を表す。



**図 3-13 1  $\mu$ M CPT を 1 時間処理した後の U2OS WT、*APTX*<sup>-/-</sup>細胞における $\gamma$ H2AX 蛍光強度の定量化**

DMSO はコントロールを表す。各条件の $\gamma$ H2AX 蛍光強度を、DMSO 処理条件での WT 細胞の蛍光強度で正規化した。各列は、3 つの独立したサンプルからのプール(300 細胞)の平均値+SEM(標準誤差)を表す。有意差は対応の無い両側 t 検定で決定した。\*\*\*\*は  $p \leq 0.001$  を表す。

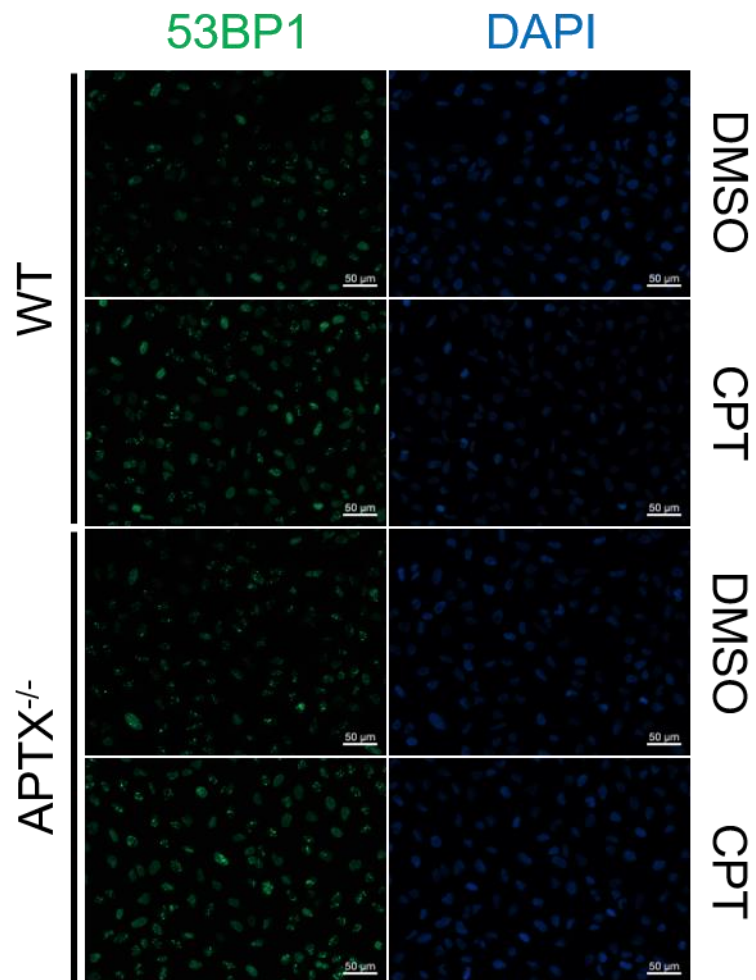
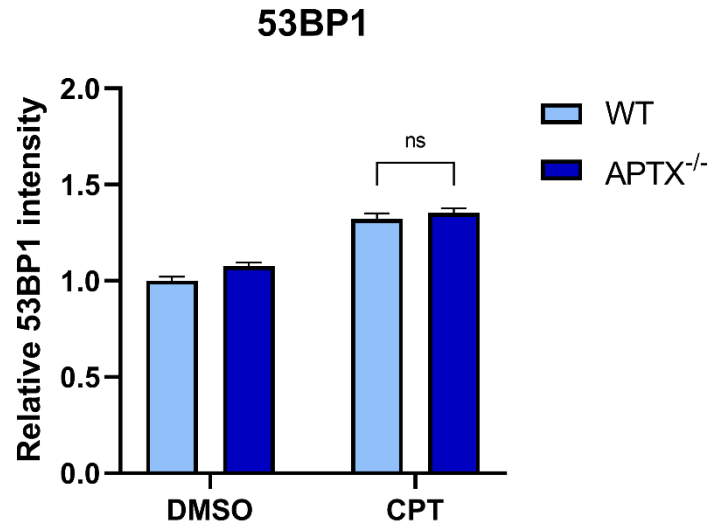


図 3-14 1  $\mu\text{M}$  CPT を 1 時間処理した後の U2OS WT、*APTX*<sup>-/-</sup>細胞の 53BP1 蛍光強度の代表的な画像

DMSO はコントロールを表す。DAPI 処理は DNA を青色に染色している。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を表す。



**図 3-15 1  $\mu$ M CPT を 1 時間処理した後の U2OS WT および *APTX*<sup>-/-</sup>細胞の 53BP1 蛍光強度の定量化**

DMSO はコントロールを表す。各条件の 53BP1 蛍光強度を、DMSO 処理条件での WT 細胞の蛍光強度で正規化した。各列は、3 つの独立したサンプルからのプール(300 細胞)の平均値+SEM(標準誤差)を表す。有意差は対応の無い両側 t 検定で決定した。ns は  $p > 0.05$  を表す。

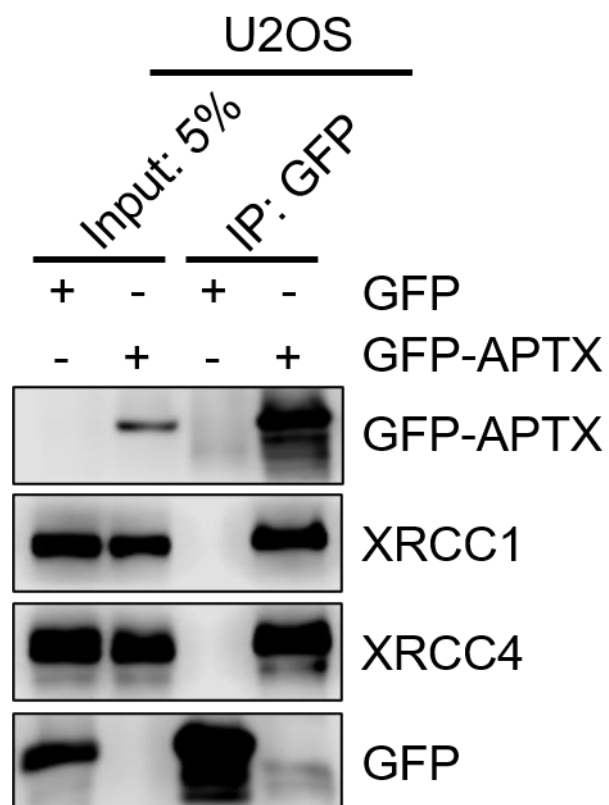
### 3-3 APTX の DNA 損傷部位への集積挙動

XRCC4 の足場機能は物理的に結合する XLF、PNKP の DNA 損傷部位への集積を促進することが分かっている [77, 78]。このことから、APTX においても XRCC4 との結合は DNA 損傷部位への集積を促進していることが予想される。そこで、APTX の DNA 損傷部位への集積を観測するために Laser-micro irradiation および Live cell imaging 法を導入した。

最初に、GFP-APTX が U2OS 細胞内で内在性 XRCC1 および XRCC4 と結合するかを確認した。GFP-APTX または GFP を PEI-MAX を用いて一過性に U2OS 細胞に発現させ、トランスフェクション 3 日後に回収および GFP をベイトとした免疫沈降法 (IP) を行い、Western blotting 法で解析した。その結果、GFP trap 磁気アガロースにより GFP および GFP-APTX がそれぞれ GFP または GFP-APTX 発現させた条件で沈降できていることを確認した (図 3-16)。さらに、XRCC1 抗体および XRCC4 抗体でそれぞれ XRCC1 および XRCC4 を検出すると、GFP を発現させた条件ではこれらのタンパク質は検出されなかったのに対して、GFP-APTX を発現させた条件では XRCC1 および XRCC4 が検出されることが分かった (図 3-16)。このことから、GFP-APTX は APTX 部位を介して内在性 XRCC1 および XRCC4 と結合していることが明らかとなった。また、本実験において外因性 DNA 損傷を誘発していない状態で行っていることから、APTX と XRCC1 および XRCC4 の結合は構成的であることが示唆された。

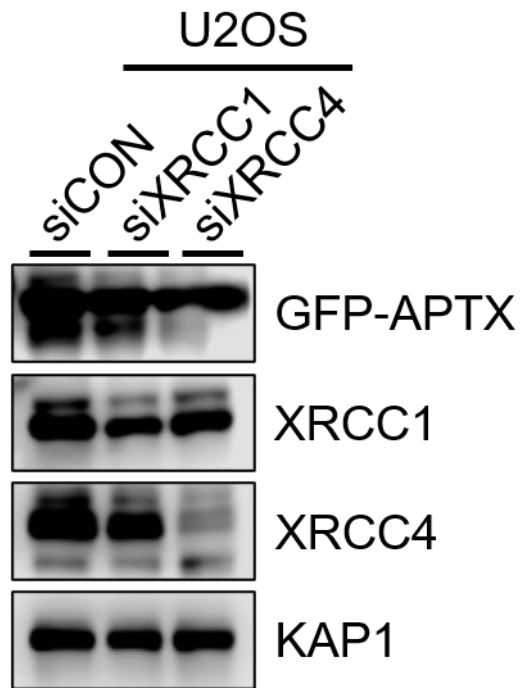
次に、U2OS 細胞に GFP-APTX を PEI-MAX を用いてトランスフェクションし、2-1-3 章に記載した方法で GFP-APTX を安定発現する U2OS 細胞を樹立した。樹立した U2OS GFP-APTX 安定発現細胞を用いて、2-1-4 章に記載した方法で RNA 干渉により内在性の XRCC1 および XRCC4 を抑制した (siXRCC1、siXRCC4)。そして、抑制後に Western blotting 法によりタンパク質発現を解析した。その結果、コントロール (siCON) と比べて siXRCC1 および siXRCC4 条件ではそれぞれ内在性 XRCC1 および XRCC4 の発現が抑制されていることを確認した (図 3-17)。XRCC1 および XRCC4 の発現抑制率は KAP1 の発現量で正規化するとコントロールと比べてそれぞれ 53% と 18% であった。また、XRCC1 または XRCC4 抑制下においても GFP-APTX の発現レベルは変化しないことを確認した (図 3-17)。そして、これらの内在性 XRCC1 または XRCC4 抑制下の条件で、Laser-micro irradiation および Live cell imaging 法に DNA 損傷部位に集積する GFP-APTX を共焦点レーザー顕微鏡で観測した。最初に、U2OS GFP-APTX 安定発現細胞の GFP-APTX の局在を Live cell imaging 法により確認すると、局在が強い領域と弱い領域があることが分かった (図 3-18)。Gueven らの研究 [45] では、GFP タグ付きヒト APTX を子宮頸がん由来細胞 HeLa に

発現させると核及び核小体に局在することを Live cell imaging 法により確認している。本実験で観測した GFP-APT<sub>X</sub> の局在は Gueven らの研究[45]と類似していることから、局在が強い領域では核小体と GFP-APT<sub>X</sub> が共局在していると考えられる。また、この GFP-APT<sub>X</sub> の局在は内在性 XRCC1 または XRCC4 抑制下の条件においても変化しないことを確認した(図 3-18)。これらの細胞を用いて、共焦点レーザー顕微鏡により Laser-micro irradiation を行った。サチュレーションを避けるため、レーザーは GFP-APT<sub>X</sub> の局在が弱い領域に照射した。結果として、siCON、XRCC1 抑制(siXRCC1)および XRCC4 抑制(siXRCC4)条件において GFP-APT<sub>X</sub> はレーザー照射領域にレーザー照射後即座に集積することが分かった(図 3-18、3-19)。加えて、siCON 条件では、レーザー照射後約 60 秒でプラトーに達することを確認した(図 3-18、3-19)。また、siXRCC1 条件において GFP-APT<sub>X</sub> は siCON と比較してレーザー照射領域への集積が抑制されることが分かった(図 3-18、3-19)。Horton らの研究[63]において、XRCC1 欠損 Mouse embryonic fibroblast (MEF)細胞では、GFP タグ付きマウス由来 APT<sub>X</sub> の DNA 損傷部位への集積が抑制されることを Laser-micro irradiation および Live cell imaging 法により確認している。本解析で得られた結果はこれと矛盾していないことが分かった。また、siCON 条件のレーザー照射後 60 秒後のレーザー照射領域の相対 GFP 蛍光強度が約 1.2 であるのに対して、siXRCC1 条件では約 0.5 であった(図 3-19)。siXRCC1 条件での発現抑制率が 53%であったことを考慮すると、GFP-APT<sub>X</sub> の DNA 損傷部位への集積は XRCC1 の発現量にほぼ全てが依存している可能性がある。一方、siXRCC4 条件において GFP-APT<sub>X</sub> は siCON と比較してレーザー照射領域への集積に明らかな差は見られなかった(図 3-18、3-19)。これらの結果から、GFP-APT<sub>X</sub> は内在性 APT<sub>X</sub> の機能を有しており、GFP-APT<sub>X</sub> を用いた解析から DNA 損傷部位への APT<sub>X</sub> の集積には XRCC4 ではなく XRCC1 が必要であることが示され、XLF および PNKP で確認された XRCC4 による結合する因子の DNA 損傷部位への促進は APT<sub>X</sub> では機能していないことが示唆された。



**図 3-16 免疫沈降 (IP) による GFP-APTX と XRCC1 および XRCC4 との結合解析**

IP には GFP-Trap 磁気アガロースビーズを用い、U2OS 細胞において結合するタンパク質を Western blotting で解析した。GFP-APTX および GFP は GFP 抗体で検出した。



**図 3-17 U2OS GFP-APTX 安定発現細胞における siRNA による XRCC1 と XRCC4 発現抑制**

U2OS GFP-APTX 安定発現細胞にそれぞれの siRNA (siXRCC1、siXRCC4) を導入した後、XRCC1、XRCC4、GFP-APTX の発現を Western Blotting 法により解析した。siCON はコントロールである。KAP1 はローディングコントロールとして用いた。siRNA 処理後の KAP1 発現量で正規化した XRCC1 および XRCC4 の発現レベルは、siCON に対してそれぞれ 53% および 18% であった。

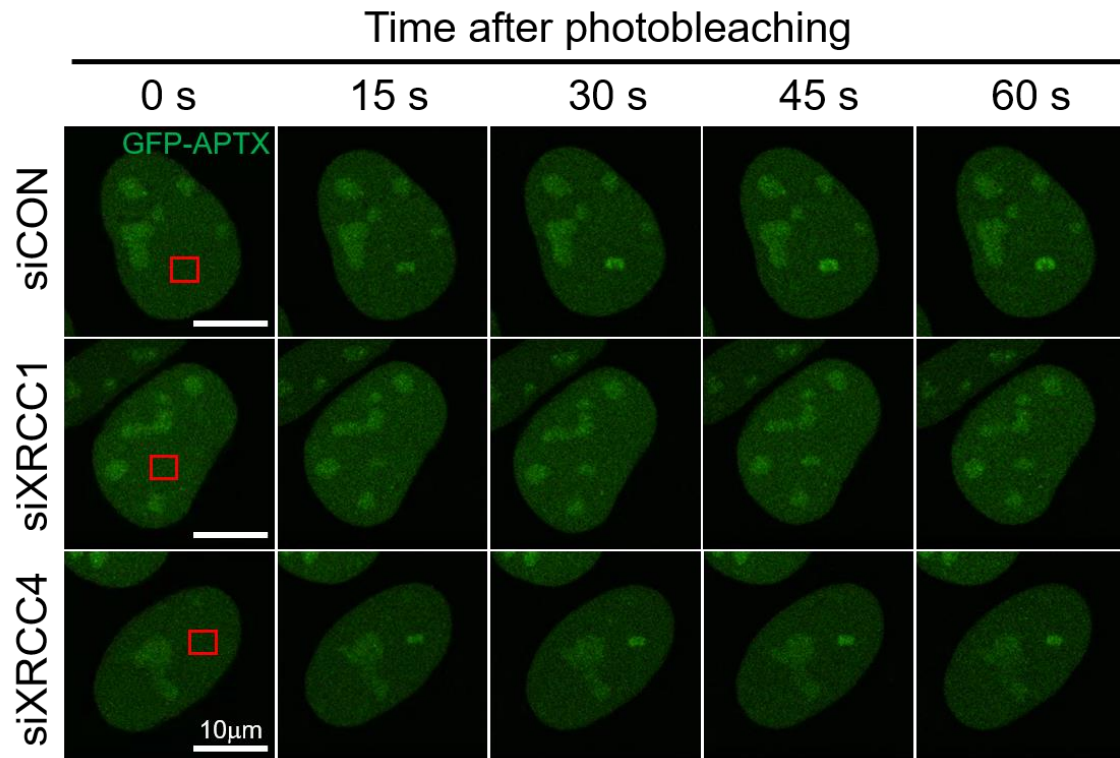


図 3-18 XRCC1 (siXRCC1) または XRCC4 (siXRCC4) 抑制下における U2OS GFP-APTX 安定発現細胞のレーザー照射 (Photobleaching) 後の代表的なライブセル画像

siCON はコントロールを表す。赤四角内 ( $1 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ ) の領域にレーザーを照射した。レーザー照射後の照射領域での緑色蛍光強度を観察した。スケールバーは  $10 \mu\text{m}$  を表す。

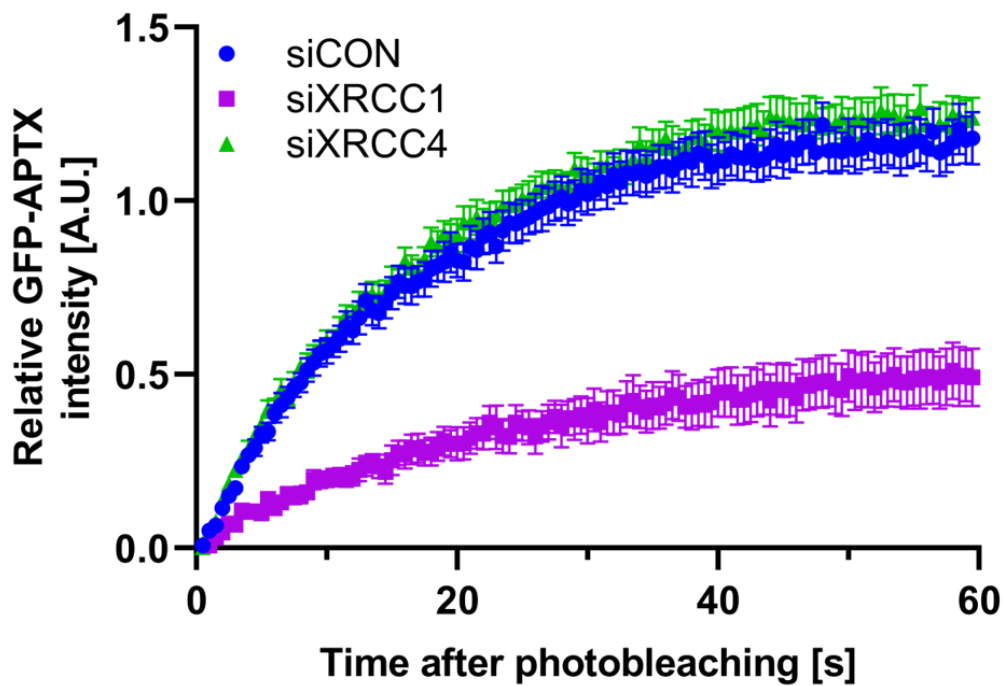


図 3-19 RNA 干渉後の各条件における相対的な GFP-APT X 蛍光強度

レーザー照射後 60 秒までを示している。各条件で 15 個の細胞を解析した。相対的な蛍光強度は、細胞内のバックグラウンド強度を差し引き、照射領域の強度で除算した後に取得した。データは平均値±SEM(標準誤差)を表す。

### 3-4 DSB 修復における APTX と XRCC4 のエピスタシス (Epistasis)

3-2 章の結果では、APTX 欠損細胞が DSB を誘導する IR および CPT に感受性を示し、IR または CPT 処理により DSB マーカーである  $\gamma$ H2AX の残存するフォーカス数および蛍光強度が増加することを確認し、APTX は DSB 修復に関与することを明らかにした。一方で、APTX 欠損細胞は IR または CPT 処理により DSB 修復の NHEJ 経路を表すマーカーである 53BP1 の残存するフォーカス数および蛍光強度が野生型細胞と比べて明らかな差がないことが分かった。加えて、3-3 章の結果から APTX の DNA 損傷部位への集積は XRCC4 に依存しないことを明らかにした。XRCC4 は DSB 修復の NHEJ 経路における Synapsis 形成において足場タンパク質として機能し、結合するタンパク質の動員を促すことが分かっている [20, 22]。実際に、XRCC4 ナンセンス変異 (R225\*/R225\*) 患者由来細胞および RNA 干渉による XRCC4 発現抑制細胞は IR に感受性を示し、IR 処理により残存する  $\gamma$ H2AX フォーカス数および 53BP1 フォーカス数が増加を示し、XLF および PNKP の DNA 損傷部位への集積が抑制されることが報告されている [77, 78, 112, 113]。53BP1 は 1-2-3 章で述べたように、DSB 修復のイニシエーションにおいて End resection を抑制することで NHEJ 経路を促進しており、53BP1 フォーカスは下流の NHEJ 経路が稼働中であることを表していると考えられている [20, 22]。すなわち、53BP1 フォーカスの残存は下流の NHEJ 経路が頓挫しているため、53BP1 フォーカスが解消されない状態を表している。APTX は XRCC4 と物理的に結合することから、図 1-14 の右側に示すように XRCC4 依存的であり XRCC4 と同経路つまり NHEJ 経路で機能していると考えられている [20, 105]。よって、APTX は DSB 修復において XRCC4 と類似した表現型を持つはずである。しかしながら、上記で述べたように APTX 欠損細胞は DSB に対して 53BP1 の挙動がコントロール細胞と比較して明らかな差がなく、APTX の DNA 損傷部位への集積は XRCC4 の発現量に依存しなかった。これらの結果は、APTX が XRCC4 と独立した経路で DSB 修復に関与していることを示唆するものである。よって、APTX と XRCC4 は異なる経路で DSB 修復に関与していると仮定した。

DSB 修復における APTX と XRCC4 のエピスタティックな関係性を調べるために、WT 細胞および *APTX*<sup>-/-</sup>細胞において RNA 干渉により内在性 XRCC4 抑制 (siXRCC4) し、Western blotting 法によりタンパク質発現を確認した。その結果、WT 細胞および *APTX*<sup>-/-</sup>細胞共にコントロール (siCON) 条件と比べて内在性 XRCC4 の発現量が低下していることを確認した (図 3-20)。また、WT 細胞と *APTX*<sup>-/-</sup>細胞の siCON 条件で内在性 XRCC4 の発現量に明らかな差が見られないことから、APTX の欠損は XRCC4 の発現に影響を及ぼさないことが示唆された。RNA 干渉による内在性 XRCC4 抑制 (siXRCC4) 後に、IR 5 Gy 照射を行い、

4時間培養後(IR 4h)に免疫染色法により $\gamma$ H2AX および 53BP1 を解析した。 $\gamma$ H2AX において、IR 照射により  $APT X^{-/-}$  + siCON(コントロール)および WT + siXRCC4 条件では、WT + siCON 条件よりも残存する $\gamma$ H2AX フォーカス数が増加していた(図 3-21)。これは  $APT X^{-/-}$  細胞および XRCC4 抑制細胞で DSB 修復能が低下していることを表し、APT X および XRCC4 が DSB 修復に関与していることを示していると考えられる。興味深いことに、 $APT X^{-/-}$  + siXRCC4 では、 $APT X^{-/-}$  + siCON および WT + siXRCC4 と比較して、 $\gamma$ H2AX フォーカス数の相加的な増加が確認された(図 3-21)。これは、APT X 欠損および XRCC4 抑制による DSB 修復能の低下が独立して寄与していることを表していると考えられ、APT X と XRCC4 が異なる経路で DSB 修復に関与していることを示唆している。53BP1 に関して、IR 照射により WT+siXRCC4 と  $APT X^{-/-}$ +siXRCC4 は WT+siCON と  $APT X^{-/-}$ +siCON よりも多くの 53BP1 フォーカスが残存することを確認した(図 3-22)。Rother らの研究[113]では、U2OS 細胞において RNA 干渉により内在性 XRCC4 を抑制後に IR 照射をすると残存する 53BP1 フォーカス数が増加することを報告している。本実験の結果は、これに矛盾しないことが分かり、XRCC4 の抑制により NHEJ 経路が頓挫していることを表していると考えられる。また、IR 照射後の WT+siXRCC4 と  $APT X^{-/-}$ +siXRCC4 の残存する 53BP1 フォーカス数を比較すると明らかな差がないことが分かった(図 3-22)。これは、XRCC4 と異なって APT X 欠損がコントロールと比較して NHEJ 経路を頓挫させていないことを示している。まとめると、これらの結果は IR 照射による残存する $\gamma$ H2AX フォーカス形成は APT X と XRCC4 の両方に依存し、53BP1 は XRCC4 のみに依存することを示し、APT X と XRCC4 が異なる表現型を示すことを明らかにした。

1-5-1 章で述べたように、APT X は Deadenylation 活性を持つ酵素であり、DNA ligase による abortive ligation 時に DNA 5' 末端より AMP を取り除くことで DNA 修復に関与していると考えられている[34, 58, 61]。実際に、In vitro で APT X は一本鎖 DNA 末端と二本鎖 DNA 末端の両方から AMP を取り除くことができる[34, 56, 57]。XRCC4 は LIG4 と物理的に結合し、LIG4 のタンパク質安定性、酵素活性を促進することが分かっている[74]。すなわち、APT X と XRCC4 は DSB 修復において DNA ligase が媒介する End joining に関与していることが考えられる。そこで、GFP レポーター(pEJ)介した End joining アッセイを用いて APT X と XRCC4 の End joining における関係性を調べた[101]。2-3-4 章で記載したようにレポータープラスミド pEJ は代替的開始コドンにより GFP が発現しないように設計されているが、制限酵素 I-SceI に代替的開始コドンが切り落とされることで DSB を誘発し、細胞が持つ End joining を介した DSB 修復により DNA 末端が繋ぎ合わされると GFP が発現する仕組みとなっている。なお、I-SceI による DSB 修復が HRR 経路で修復された場合は代替的開始コドンが切り落とされた状態にならな

いため GFP が発現しない。すなわち、End joining アッセイにおいて GFP の発現は I-SceI 依存的 DSB が HRR 以外の経路で修復されたことを表している。この pEJ をランダムインテグレーションにより取り込んだ U2OS 細胞 (EJ-U2OS) を用いて、RNA 干渉により内在性 APTX の抑制 (siAPTX)、内在性 XRCC4 の抑制 (siXRCC4) またはその両方の抑制 (siAPTX + siXRCC4) を行い、Western blotting 法によりタンパク質発現量を解析した。その結果、RNA 干渉により内在性 APTX、XRCC4 の発現が抑制されていることを確認した (図 3-23) [102]。これらの条件において、pCBASceI を PEI-MAX によって導入によりタンパク質発現抑制後の EJ-U2OS 細胞に I-SceI を一過性に発現させた後、フローサイトメトリー法で GFP 陽性 (GFP positive) 細胞の割合を解析した。結果として、siAPTX 条件および siXRCC4 条件ではコントロール (siCON) と比較して、GFP 陽性細胞の割合が減少することを確認した (図 3-24)。これは、APTX と XRCC4 が DSB 修復における End joining に関与していることを表していると考えられる。さらに、siAPTX + siXRCC4 条件では、siAPTX 条件および siXRCC4 条件と比較して、GFP 陽性細胞の割合が相加的に減少することが分かった (図 3-24)。これらの結果は、免疫染色法による IR 照射後の残存する  $\gamma$ H2AX フォーカス数の結果と呼応している。一方で、siCON、siAPTX、siXRCC4 および siAPTX + siXRCC4 条件の GFP 陽性細胞の割合平均はそれぞれ 15.5%、13.4%、12.6%、11.7% であった。siCON 条件と比べた siAPTX、siXRCC4 条件のそれぞれの減少率に対して siAPTX + siXRCC4 条件の減少率は単純な足し算とはならなかった (図 3-24)。これは、XRCC4 と APTX が DSB 修復において重複した機能の存在を示唆している。また、本実験の精度限界を表している可能性もある。さらに、siAPTX + siXRCC4 条件において、GFP 陽性細胞の割合は大きく減少しなかった (図 3-24)。これは XRCC4 が関与する NHEJ 経路、APTX が関与する DSB 修復経路以外の DSB 修復経路がバックアップした可能性がある。実際に、In vitro において abortive ligation はヌクレアーゼ FEN1 によっても解消されることが分かっている [61, 114]。

まとめると、本章において APTX と XRCC4 が DSB 修復においてそれぞれ独立して機能することを明らかにした。

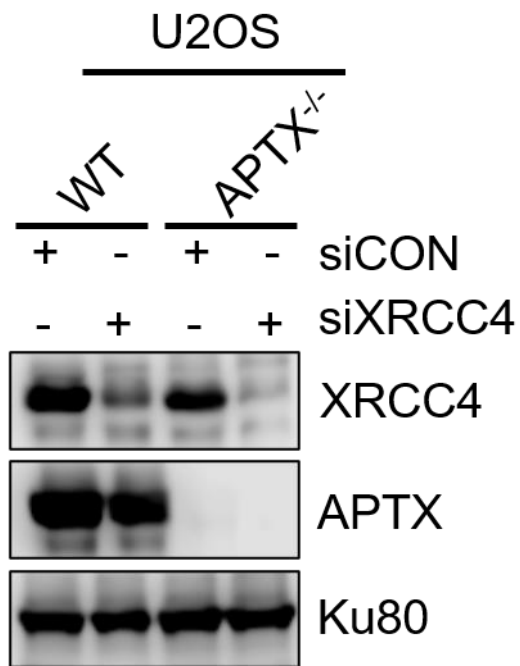


図 3-20 siRNA による XRCC4 抑制後の U2OS WT および APT<sup>X-/-</sup>細胞における XRCC4 と APT<sup>X</sup> の Western blotting 解析

siCON はコントロールを表す。Ku80 はローディングコントロールとして示した。



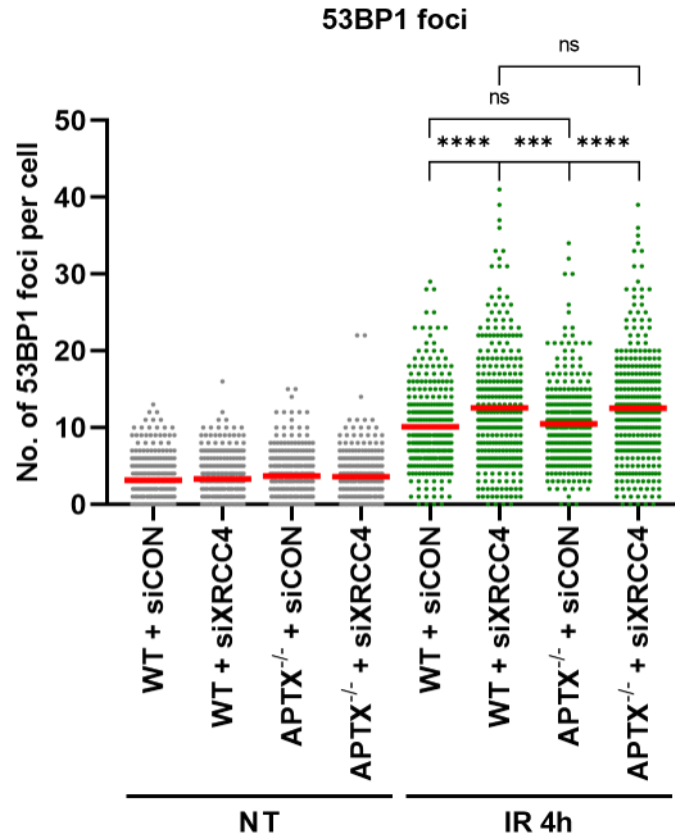


図 3-22  $\gamma$ 線 5 Gy 照射後 4 時間培養 (IR 4h) における XRCC4 抑制下 (siXRCC4) での U2OS WT、*APTX*<sup>-/-</sup> 細胞における細胞あたりの 53BP1 の残存フォーカス数

ドットはそれぞれの条件におけるフォーカス数を表し、赤いバーはそれぞれの実験群におけるフォーカス数の平均を示す。3 つの独立したサンプルから得られたデータのプール (300 細胞) から平均を算出した。有意差は One-way ANOVA および Tukey 検定で決定した。ns は  $p > 0.05$ 、\*\*\*は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\*は  $p \leq 0.001$  をそれぞれ表す。

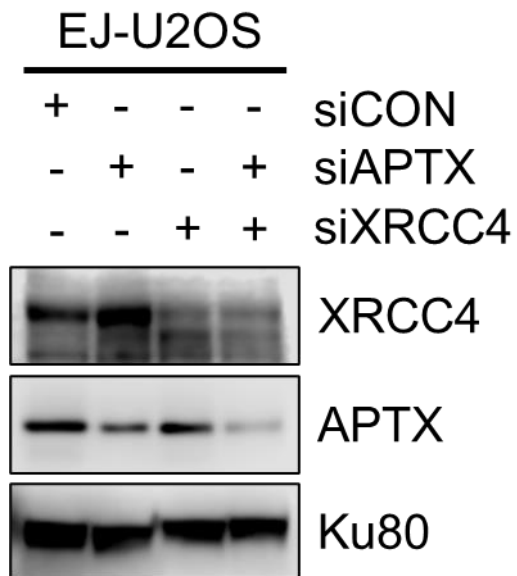


図 3-23 siAPT X、siXRCC4 またはその両方を導入した EJ-U2OS 細胞における APT X と XRCC4 の Western Blotting 解析

siCON はコントロールを表す。Ku80 はローディングコントロールとして示した。

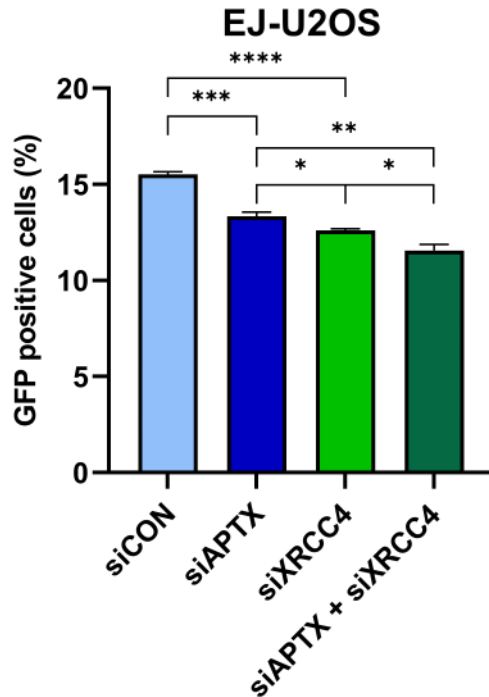


図 3-24 各条件における End joining (GFP positive) の割合

EJ-U2OS 細胞を siRNA により目的遺伝子の発現を抑制 (siAPTX、siXRCC4) した後に I-*SceI* を発現させ、フローサイトメーターで解析した。siCON はコントロールを表す。各列は 3 つの独立したサンプルによる平均+SEM (標準誤差) を示す。有意差は One-way ANOVA および Welch 検定で決定した。\*は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\*は  $0.005 < p \leq 0.01$ 、\*\*\*は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\*は  $0.0005 < p \leq 0.001$  をそれぞれ表す。

### 3-5 第3章のまとめ

本章では、”DSB 修復における APTX 複合体の役割を明らかにすること”を目的として、3つの実験項目を実行し、以下の内容を明らかにした。

#### I. ゲノム編集による APTX ノックアウト細胞の樹立およびその表現型

CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術により U2OS *APTX*<sup>-/-</sup>細胞を樹立し、DNA 損傷修復能を評価した。その結果、*APTX*<sup>-/-</sup>細胞の SSB 能および DSB 修復能の低下を確認し、IR および CPT に対して感受性を示すことを確認した。

#### II. DNA 損傷部位への APTX 集積挙動に対する XRCC1 または XRCC4 の役割

U2OS 細胞内で APTX は XRCC1 および XRCC4 と結合していることを免疫沈降法により示した。さらに、U2OS 細胞を背景に GFP-APTX 安定発現細胞株を樹立し、Laser-micro irradiation および Live cell imaging 法により GFP-APTX の DNA 損傷部位への集積挙動を評価した。その結果、APTX の DNA 損傷部位への集積は XRCC4 でなく XRCC1 依存的事であることを確認した。

#### III. DSB 修復における APTX と XRCC4 のエピスタティックな関係性

U2OS 野生型および *APTX*<sup>-/-</sup>細胞を XRCC4 抑制後に IR に対する DSB 応答を確認すると、 $\gamma$ H2AX のフォーカス形成は APTX と XRCC4 の両方に依存し、両抑制は相加的であった。一方、53BP1 のフォーカス形成は XRCC4 にのみ依存していることが分かった。また、End joining の割合も APTX と XRCC4 に依存し、両抑制は相加的な効果を示した。

本研究により、細胞内で APTX が DSB 修復に関与し、特に End joining に必要であることが示された。一方で、*APTX* 欠損細胞における DSB 誘導後の残存する 53BP1 フォーカス形成割合が野生型と差がなかったこと、APTX の DNA 損傷部位への集積が XRCC4 抑制により低下しなかったことは、図 3-25 の左側に示すような APTX の XRCC4 と結合して NHEJ に関与するモデルに矛盾している。加えて、APTX の DNA 損傷部位への集積が XRCC1 依存的事であったこと、さらに XRCC1 が代替的末端結合 (Microhomology-mediated end joining: MMEJ) に関与していることを考慮すると、APTX は図 3-25 の右側に示すよ

うな XRCC1 と結合して MMEJ 経路を介した DSB 修復に関与している可能性がある[68]。また、本章では検証できなかったが、Laser-micro irradiation および Live cell imaging 法において、第4章で樹立した U2OS *XRCC1*<sup>-/-</sup>細胞、U2OS *XRCC1*<sup>-/-</sup>細胞に XRCC1 野生型および APTX との結合能を欠損する XRCC1 T519A を安定発現させた *XRCC1*<sup>-/-</sup> + *RFP-XRCC1*<sup>WT</sup>細胞および *XRCC1*<sup>-/-</sup> + *RFP-XRCC1*<sup>T519A</sup>細胞を用いて GFP-APTX のレーザー照射部位への集積を解析すると、U2OS *XRCC1*<sup>-/-</sup>細胞および *XRCC1*<sup>-/-</sup> + *RFP-XRCC1*<sup>T519A</sup>細胞では siXRCC1 条件より GFP-APTX の集積が低下し、*XRCC1*<sup>-/-</sup> + *RFP-XRCC1*<sup>WT</sup>細胞ではコントロール条件と同程度まで集積が回復することが予想される。一方、本研究でもこれまでの研究と同様 APTX と XRCC4 の結合が確認されたが、この意義については今後の研究が必要である。また、DSB 修復において APTX が MMEJ 以外の経路に関与している可能性において、3-4 章の結果から APTX は End joining に関与していることを明らかにした。現在までに、DSB 修復において End joining の過程を経ることが分かっている経路は NHEJ と MMEJ である。このことから、やはり APTX は MMEJ 経路で機能していることが強く示唆される。しかしながら、1-5-1 章で述べたように、APTX の酵素活性は多くの DNA 修復経路で行われる Ligation 反応に関与することから、APTX が未知の DSB 修復経路に関わっている可能性が考えられる。

本研究では APTX が XRCC4 とは異なる経路で End joining を介した DSB 修復に関わることを明らかにした。

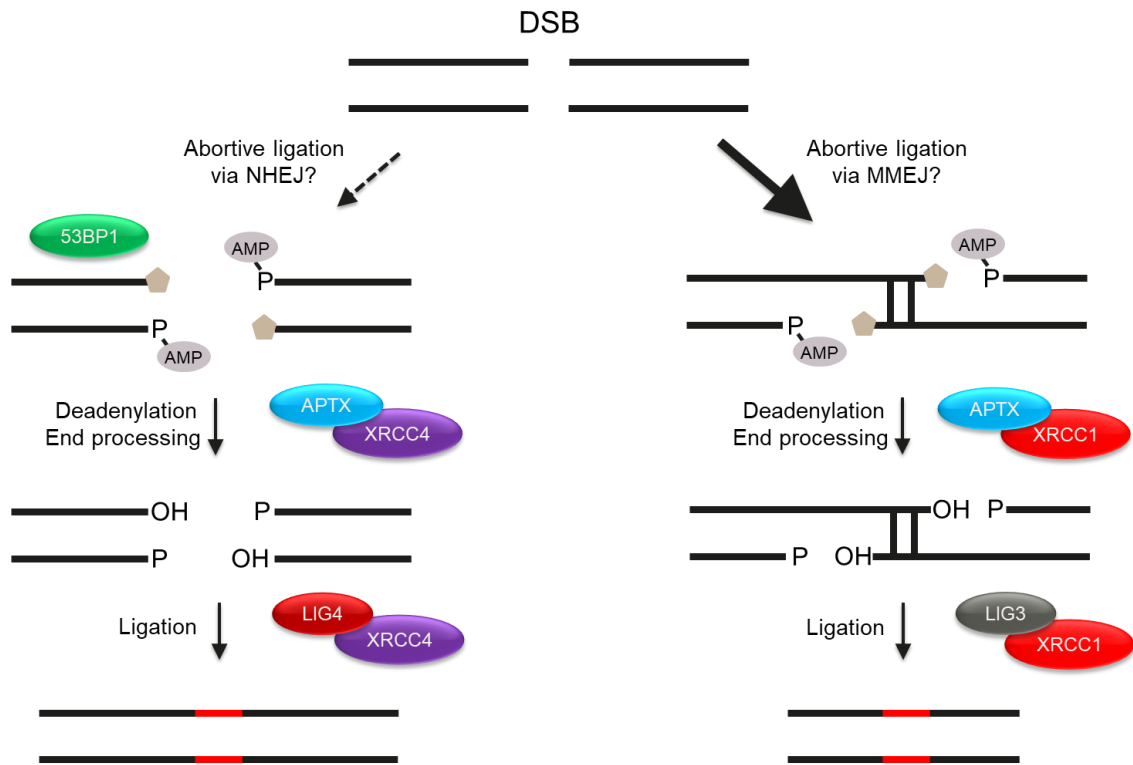


図 3-25 研究結果より予想される DSB 修復における APTX 複合体のワークモデル

DSB 修復において NHEJ と MMEJ 経路では DNA ligase により 5' P 末端がアデニル化される。これは、3' 末端が OH でない場合に Abortive ligation となり、それぞれ APTX-XRCC4 または APTX-XRCC1 複合体によるアデニル化の解消、さらに末端修飾により 5' P 末端と 3' OH 末端が形成され、最後にそれぞれ LIG4-XRCC4 または LIG3-XRCC1 複合体に末端が結合される (End joining)。細胞内では MMEJ 経路での APTX-XRCC1 によるアデニル化末端の解消が優位に作用していると考えられる。

## 第 4 章

# PARP1/2 阻害剤による DNA 損傷修復 における APTX 複合体の役割

## 第 5 章 結論

## 5-1 まとめ

本研究では、“APT<sub>X</sub> 複合体による DNA 損傷修復機構における役割の解明”を目的として研究を進めてきた。そのためにゲノム編集、バイオイメージング、細胞生物学、分子生物学、遺伝子工学的手法を駆使して、DNA 損傷修復における APT<sub>X</sub> 複合体の役割を明らかにすることを目指した。

具体的に本研究では、下記の研究項目を実行し、細胞内における APT<sub>X</sub> 複合体の役割を解明した。各章のまとめ(第3-5章、第4-6章)にて、研究成果の詳細は示している。

### 1. DNA 二本鎖切断修復(Double-strand break repair: DSBR)における APT<sub>X</sub> 複合体の役割

ゲノム編集により樹立した U2OS APT<sub>X</sub><sup>-/-</sup>細胞を用いて、APT<sub>X</sub> 欠損が電離放射線(Ionizing radiation: IR)および Camptothecin (CPT)に感受性を示し、APT<sub>X</sub> が DSBR に必要であることを明らかにした。さらに、DNA 損傷部位への集積は XRCC1 依存적であり、APT<sub>X</sub> が DSBR において XRCC4 とは異なる表現型を示すことを確認した。つまり、第3章では、APT<sub>X</sub> が XRCC4 とは異なる経路で DSBR に関与することを明らかにした。

以上のことから、本研究では APT<sub>X</sub>-XRCC1、APT<sub>X</sub>-XRCC4 の2つの複合体の細胞内の動態、DNA 損傷応答を解析し、それぞれの DNA 損傷修復における役割を明らかにした。

## 5-2 本研究の将来展望

本研究成果は、分子生物学、医学、原子核工学など幅広い分野に波及する可能性を秘めたものである。中でも、特に以下の 3 つの展望が見込める。将来的には、これらの研究を通して DNA 損傷修復の分子メカニズムの一端を解明し、抗がん剤治療および放射線治療の効率化や APTX 複合体のバイオマーカーとしての有用性を評価する。さらに、遺伝病の新規治療法開発などに繋がることも期待される。

### (1) APTX による DNA 二本鎖切断修復機構の解明

本研究により、APTX は XRCC4 と異なる経路で DNA 二本鎖切断 (DSB) 修復に関与することが明らかとなった。第 3 章の結果で、DNA 損傷部位への集積が XRCC1 依存性であったことを考慮すると、DSB 修復においても XRCC1 依存的に機能している可能性がある。Dutta らの研究[68]では In vitro の系で DSB 修復経路である MMEJ に XRCC1 が関与することを報告していることから、APTX は XRCC1 を介して MMEJ に関わっている可能性がある。APTX の MMEJ への関与を明らかにするために、GFP レポータープラスミドを用いて MMEJ 活性を解析することが挙げられる。既往の研究により、MMEJ 経路で修復されると GFP が蛍光を発するように設計された GFP レポータープラスミドが開発されている [130]。これを用いることで、第 3 章の End joining アッセイと同手順で APTX 抑制細胞の MMEJ 活性を解析できる。また、MMEJ は POLQ 依存的な修復経路であり、この POLQ フォーカスは MMEJ 経路を表し、MMEJ の頓挫によりフォーカスの解消が遅延すると考えられる。すなわち、IR 照射後の残存する POLQ フォーカスを解析することで、IR 誘発 DSB に対する APTX 欠損細胞の MMEJ 能を解析することができる。さらに、APTX 抑制細胞または APTX 欠損細胞に RNA 干渉、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いて XRCC1 の抑制あるいはノックアウトを行った後に上記の GFP レポーターによる MMEJ 活性および IR 照射後の残存する POLQ フォーカスを解析することで MMEJ 経路における APTX と XRCC1 のエピスタティックな関係性を明らかにすることができる。加えて、第 4 章で用いた APTX との結合能を欠損する XRCC1 T519A 変異体発現細胞を用いることで、MMEJ 経路に対する APTX と XRCC1 の結合の重要性を評価できると考える。

## (2) 遺伝性疾患発症メカニズムの解明

第1章で述べたように、*APT*Xの変異は神経変性を伴う遺伝性疾患 *AOA1/EAOH* の原因となる。また、結合する足場タンパク質である *XRCC1* または *XRCC4* の変異により誘発される臨床症状も報告されており、*XRCC1* は神経変性、*XRCC4* は小頭症および成長障害である。第3章の結果から、*APT*Xは*XRCC4*と異なる経路で機能し、またDNA損傷部位への集積が*XRCC1*依存的事であったことは、*APT*X変異と*XRCC1*変異が呈する臨床症状の類似性と呼応している。このことから、*AOA1/EAOH*の発症メカニズムは*APT*X-*XRCC4*複合体ではなく*APT*X-*XRCC1*複合体の機能が寄与している可能性がある。発症メカニズムの解明に向けて、今後は*APT*X-*XRCC1*複合体の機能を個体、臓器レベルで解析する必要があるが、マウスモデルにおいて、*APT*Xノックアウトマウスは明らかな表現型を持たず、*XRCC1*ノックアウトマウスは胚性致死であることが報告されている[34, 62, 130]。そこで、ヒト多能性幹細胞であるiPSC (Induced Pluripotent Stem Cells)を用いて、神経細胞や脳組織へ分化させることで、臓器レベルでの解析を行える可能性がある。実際に、本研究室では独自のiPS細胞を樹立しており、iPS細胞における放射線影響の研究を行っている[132]。本研究で用いたCRISPR-Cas9ゲノム編集技術を組み合わせることで、iPS細胞で*APT*X、*XRCC1*欠損細胞や*APT*X-*XRCC1*結合変異(*XRCC1* T519Aなど)細胞を樹立し、分化の過程で経時的なDNA損傷量の解析や、最終的に分化が可能なのかなどを解析することで遺伝性神経疾患と*APT*X複合体の関係性の詳細を明らかにすることができると思われる。

## 謝辞

本研究は東京工業大学科学技術創成院ゼロカーボンエネルギーエネルギー研究所松本義久研究室において博士課程論文研究として行われたものです。研究を進めるにあたり、多くの方にご指導・ご支援を賜りました。この場をお借りして心から御礼申し上げます。

中でも、国立がん研究センター研究所 RI 実験施設の石合正道施設長、松本義久研究室の先輩にあたる塚田海馬博士(現オックスフォード大学ジョンラドクリフ病院腫瘍部門 Andrew N. Blackford 研究室所属)には多大なるご助力を頂きました。石合施設長には Laser micro-irradiation および Live cell imaging 法についてのご協力だけでなく、所属研究室の資金難により本研究が幾度も停止の危機に見舞われたときに、RI 実験施設のリソース活用など多数の技術支援をして頂きました。また、石合施設長との様々なディスカッションを通して研究者として大きく成長することが出来たと感じております。塚田海馬博士には研究に関すること、関係ないことについてたくさんのアドバイスを頂きました。研究室内で研究に関して真正面から議論できる唯一の存在であり、その論理的思考力や洞察力は大いに参考となるものでした。石合施設長、塚田博士のお二方がいなければ本論文を書き上げることができず、博士号の取得もできなかったと思います。心から御礼申し上げます。

松本義久教授には指導教員として修士課程からご指導を賜りました。非常に扱いづらい学生だったと思いますが、博士号取得にご協力頂きありがとうございました。深く御礼申し上げます。

島田幹男助教には研究者として様々な事柄について学ばせて頂きました。博士号取得にご協力頂きありがとうございました。深く御礼申し上げます。

松本研究室メンバーの皆様には日々の研究生活でたくさんのお世話になりました。特に、齋藤瑞樹氏には本研究の様々なサポートをして頂きました。心から感謝致します。

そして、家族の皆様には学生生活をずっと支えて頂きました。新興ウイルス感染症蔓延による研究室の封鎖、所属研究室の資金難による研究の停止、父の急死とネガティブな出来事がたくさんありました。それでも、折れることなく研究を続けられたのは、研究者への道を応援し続けてくれる家族の存在があったからだと思います。支えて頂いたことを心から御礼申し上げます。

最後に、私はたくさんの人に支えられて、この論文を執筆することができました。  
今一度、皆様に心から深く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Crick FH. On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol.* 1958;12:138-63.
2. 松本義久 編. 『人体のメカニズムから学ぶ放射線生物学』 株式会社メジカルビュー. 2017
3. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 1993;362(6422):709-15.
4. Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res,* 2003;531(1-2):5-23.
5. Sander M, Cadet J, Casciano DA, Galloway SM, Marnett LJ, Novak RF, Pettit SD, Preston RJ, Skare JA, Williams GM, Houten BV, Gollapudi BB. Proceedings of a workshop on DNA adducts: biological significance and applications to risk assessment Washington, DC. *Toxicol Appl Pharmacol,* 2005;208(1):1-20.
6. Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem,* 1997;272(32):19633-6.
7. Evans MD, Griffiths HR, Lunec J. Reactive oxygen species and their cytotoxic mechanisms. Mechanisms of Cell Toxicity. *JAI Press,* 1997
8. Barnes DE, Lindahl T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet,* 2004;38:445-76.
9. Pommier Y, Nussenzweig A, Takeda S, Austin C. Human topoisomerases and their roles in genome stability and organization. *Nat Rev Mol Cell Biol,* 2022:407-427.
10. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature,* 2001;411(6835):366-74.
11. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet,* 2001;27(3):247-254.
12. Asainthanbly A, Chen DJ. Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose gamma-irradiation. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(12):3912-3923.

13. Matthews H, Bertoli C, de Bruin R. Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022;23(1):74-88.
14. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53, *Nat Rev Cancer*, 2002;2(8):594-604.
15. Caldecott KW. DNA single-strand break repair and human genetic disease. *Trends Cell Biol*, 2022;32(9):733-745.
16. Caldecott KW. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet*, 2008;9(8):619-31.
17. Caldecott, KW. Mammalian DNA base excision repair: Dancing in the moonlight. *DNA Repair (Amst)*, 2020;93:102921.
18. Marteijn J, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers J, Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014;15(7):465-81.
19. Gautam A, Fawcett H, Burdova K, Brazina J, Caldecott KW, APE1-dependent base excision repair of DNA photodimers in human cells. *Mol Cell*, 2023;83(20):3669-3678. e7.
20. Scully R, Panday A, Elango R, Willis N, DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019;20(11):698-714.
21. Ramsden D, Carvajal-Garcia J, Gupta G, Mechanism, cellular functions and cancer roles of polymerase-theta-mediated DNA end joining. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022;23(2):125-140.
22. Ghosh D, Raghavan S, Nonhomologous end joining: new accessory factors fine tune the machinery. *Trends Genet*, 2021;37(6):582-599.
23. Shibata A, Conrad S, Birraux J, Geuting V, Barton O, Ismail A, Kakarougkas A, Meek K, Taucher-Scholz G, Löbrich M, Jeggo P. Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J*, 2011;30(6):1079-92.
24. Piazza A, Heyer W, Homologous Recombination and the Formation of Complex Genomic Rearrangements. *Trends Cell Biol*, 2019;29(2):135-149.

25. Yasuhara T, Kato R, Hagiwara Y, Shiotani B, Yamauchi M, Nakada S, Shibata A, Miyagawa K. Human Rad52 Promotes XPG-Mediated R-loop Processing to Initiate Transcription-Associated Homologous Recombination Repair. *Cell*, 2018;175(2):558-570.
26. Brambati A, Sacco O, Porcella S, Heyza J, Kareh M, Schmidt J, Sfeir A. RHINO directs MMEJ to repair DNA breaks in mitosis. *Science*, 2023;381(6658):653-660.
27. Gelot C, Kovacs M, Miron S, Mylne E, Haan A, Boeffard-Dosierre L, Ghouil R, Popova T, Dingli F, Loew D, Guirouilh-Barbat J, Del Nery E, Zinn-Justin S, Ceccaldi R. Pol $\theta$  is phosphorylated by PLK1 to repair double-strand breaks in mitosis. *Nature*, 2023;621(7978):415-422.
28. Shen J, Gilmore EC, Marshall CA, Haddadin M, Reynolds JJ, Eyaid W, Bodell A, Barry B, Gleason D, Allen K, Ganesh VS, Chang BS, Grix A, Hill RS, Topcu M, Caldecott KW, Barkovich AJ, Walsh CA. Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair. *Nat Genet*, 2010;42(3):245-9
29. Kalasova I, Hailstone R, Bublitz J, Bogantes J, Hofmann W, Leal A, Hanzlikova H, Caldecott KW. Pathological mutations in PNKP trigger defects in DNA single-strand break repair but not DNA double-strand break repair. *Nucleic Acids Res*, 2020;48(12):6672-6684
30. Paucar M, Malmgren H, Taylor M, Reynolds JJ, Svenningsson P, Press R, Nordgren A. Expanding the ataxia with oculomotor apraxia type 4 phenotype. *Neurol Genet*, 2016;2(1):e49
31. Bras J, Alonso I, Barbot C, Costa MM, Darwent L, Orme T, Sequeiros J, Hardy J, Coutinho P, Guerreiro R, Mutations in PNKP cause recessive ataxia with oculomotor apraxia type 4. *Am J Hum Genet*, 2015;96(3):474-9
32. Moreira M, Barbot C, Tachi N, Kozuka N, Uchida E, Gibson T, Mendonça P, Costa M, Barros J, Yanagisawa T, Watanabe M, Ikeda Y, Aoki M, Nagata T, Coutinho P, Sequeiros J, Koenig M. The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nat Genet*, 2001;29(2):189-93.

33. Date H, Onodera O, Tanaka H, Iwabuchi K, Uekawa K, Igarashi S, Koike R, Hiroi T, Yuasa T, Awaya Y, Sakai T, Takahashi T, Nagatomo H, Sekijima Y, Kawachi I, Takiyama Y, Nishizawa M, Fukuhara N, Saito K, Sugano S, Tsuji S. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nat Genet*, 2001;29(2):184-8.
34. Ahel I, Rass U, El-Khamisy SF, Katyal S, Clements PM, McKinnon PJ, Caldecott KW, West SC. The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature*, 2006;443(7112):713-6
35. Clements P, Breslin C, Deeks E, Byrd P, Ju L, Bieganowski P, Brenner C, Moreira M, Taylor A, Caldecott K. The ataxia-oculomotor apraxia 1 gene product has a role distinct from ATM and interacts with the DNA strand break repair proteins XRCC1 and XRCC4. *DNA Repair (Amst)*, 2004;3(11):1493-502.
36. Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon DJ, Ciocci S, Proytcheva M, German J. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell*, 1995;83(4):655-66
37. van Wietmarschen N, Merzouk S, Halsema N, Spierings DCJ, Guryev V, Lansdorp PM. BLM helicase suppresses recombination at G-quadruplex motifs in transcribed genes. *Nat Commun*. 2018;9(1):271
38. Shorrocks A, Jones S, Tsukada K, Morrow C, Belblidia Z, Shen J, Vendrell I, Fischer R, Kessler B, Blackford A. The Bloom syndrome complex senses RPA-coated single-stranded DNA to restart stalled replication forks. *Nat Commun*. 2021;12(1):585.
39. Kuchenbaecker K, Hopper J, Barnes D, Phillips K, Mooij T, Marie-Roos-Blom J, Jervis S, Leeuwen F, Milne R, Andrieu N, Goldgar D, Terry M, Rookus M, Easton D, Antoniou A; BRCA1 and BRCA2 Cohort Consortium; McGuffog L, Evans D, Barrowdale D, Debra Frost D, Adlard J, Ong K, Izatt L, Tischkowitz M, Eeles R, Davidson R, Hodgson S, Ellis S, Nogues C, Lasset C, Stoppa-Lyonnet D, Fricker J, Faivre L, Berthet P, Hooning M, van der Kolk L, Kets C, Adank M, John E, Chung W, Andrulis I, Southey M, Daly M, Buys S, Osorio A, Engel

- C, Kast K, Schmutzler R, Caldes T, Jakubowska A, Simard J, Friedlander M, McLachlan S, Machackova E, Foretova L, Tan Y, Singer C, Olah E, Gerdes A, Arver B, Olsson H. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*, 2017;317(23):2402–2416.
40. Lai E, Ziranu P, Spanu D, Dubois M, Pretta A, Tolu S, Camera S, Liscia N, Mariani S, Persano M, Migliari M, Donisi C, Demurtas L, Pusceddu V, Puzzone M, Scartozzi M. BRCA-mutant pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer*, 2021;125(10):1321–1332.
41. Nyberg T, Frost D, Barrowdale D, Evans D, Bancroft E, Adlard J, Ahmed M, Barwell J, Brady A, Brewer C, Cook J, Davidson R, Donaldson A, Eason J, Gregory H, Henderson A, Izatt L, Kennedy M, Miller C, Morrison P, Murray A, Ong K, Porteous M, Pottinger C, Rogers M, Side L, Snape K, Walker L, Tischkowitz M, Eeles R, Easton D, Antoniou A. Prostate Cancer Risks for Male BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: A Prospective Cohort Study. *Eur Urol*, 2020;77(1):24–35.
42. Bryant H, Schultz N, Thomas H, Parker K, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin N, Helleday T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 2005;434(7035):913–7.
43. Farmer H, McCabe N, Lord C, Tutt A, Johnson D, Richardson T, Santarosa M, Dillon K, Hickson I, Knights C, Martin N, Jackson P, Smith G, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 2005;434(7035):917–21.
44. Black J. Xeroderma Pigmentosum. *Head Neck Pathol*, 2016;10(2):139–44.
45. Gueven N, Becherel O, Kijas A, Chen P, Howe O, Rudolph J, Gatti R, Date H, Onodera O, Taucher-Scholz G, Lavin M. Aprataxin, a novel protein that protects against genotoxic stress. *Hum Mol Genet*, 2004;13(10):1081–93.
46. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, 1985; 260(27):14873–8
47. Slade D. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. *Genes Dev*, 2020;34(5–6):360–394.

48. Murai J, Huang S, Das B, Renaud A, Zhang Y, Doroshow J, Ji J, Takeda S, Pommier Y. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res*, 2012;72(21):5588-99.
49. Blessing C, Mandemaker I, Gonzalez-Leal C, Preisser J, Schomburg A, Ladurner A. The Oncogenic Helicase ALC1 Regulates PARP Inhibitor Potency by Trapping PARP2 at DNA Breaks. *Mol Cell*, 2020;80(5):862-875. e6.
50. Sykora P, Croteau DL, Bohr VA, Wilson 3<sup>rd</sup> DM. ataxin localizes to mitochondria and preserves mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011;108:7437-42.
51. Zheng J, Croteau DL, Bohr VA, Akbari M. Diminished OPA1 expression and impaired mitochondrial morphology and homeostasis in aprataxin-deficient cells. *Nucleic Acids Res*, 2019;47:4086-110.
52. Durocher D, Taylor IA, Sarbassova D, Haire LF, Westcott SL, Jackson SP, Smerdon SJ, Yaffe MB. The molecular basis of FHA domain: phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms. *Mol Cell*, 2000;6(5):1169-82
53. Luo H, Chan DW, Yang T, Rodriguez M, Chen BP, Leng M, Mu JJ, Chen D, Songyang Z, Wang Y, Qin J. A new XRCC1-containing complex and its role in cellular survival of methyl methanesulfonate treatment. *Mol Cell Biol*, 2004;24(19):8356-65
54. Cherry AL, Nott TJ, Kelly G, Rulten SL, Caldecott KW, Smerdon SJ. Versatility in phospho-dependent molecular recognition of the XRCC1 and XRCC4 DNA-damage scaffolds by aprataxin-family FHA domains. *DNA Repair (Amst)*, 2015;35:116-25.
55. Tumbale PP, Schellenberg MJ, Mueller GA, Fairweather E, Watson M, Little JN, Krahn J, Waddell I, London RE, Williams RS. Mechanism of APTX nicked DNA sensing and pleiotropic inactivation in neurodegenerative disease. *EMBO J*, 2018;37:1-17.
56. Rass U, Ahel I, West SC. Actions of aprataxin in multiple DNA repair pathways. *J Biol Chem*, 2007;282:9469-74.

57. Kijas AW, Harris JL, Harris JM, Lavin MF. Aprataxin forms a discrete branch in the HIT (histidine triad) superfamily of proteins with both DNA/RNA binding and nucleotide hydrolase activities. *J Biol Chem*, 2006;281:13939-48.
58. Tumbale PP, Jurkiw TJ, Shellenberg MJ, Riccio AA, O'Brien PJ, Williams RS. Two-tiered enforcement of high-fidelity DNA ligation. *Nat Commun*, 2019;10:5431.
59. Tumbale PP, Williams JS, Shellenberg MJ, Kunkel TA, Williams RS. Aprataxin resolves adenylated RNA- DNA junctions to maintain genome integrity. *Nature*, 2014;506:111-5.
60. Sallmyr A, Rashid I, Bhandari SK. Human DNA ligases in replication and repair. *DNA Repair (Amst)*, 2020;93:102908.
61. Kamble P, Hall K, Chandak M, Tang Q, Melike Çağlayan M. DNA ligase I fidelity the mutagenic ligation of pol  $\beta$  oxidized and mismatch nucleotide insertion products in base excision repair. *J Biol Chem*, 2021;296:100427.
62. El-Khamisy SF, Katyal S, Patel P, Ju L, McKinnon PJ, Caldecott KW. Synergistic decrease of DNA single-strand break repair rates in mouse neural cells lacking both Tdp1 and aprataxin. *DNA Repair (Amst)*, 2009;8:760-6.
63. Horton JK, Stefanick DF, Caglayan M, Zhao ML, Janoshazi AK, Prasad R, Gassman NR, Wilson SH. XRCC1 phosphorylation affects aprataxin recruitment and DNA deadenylation activity. *DNA Repair (Amst)*, 2018;64:26-33.
64. Caldecott KW. XRCC1 protein; form and function. *DNA Repair (Amst)*, 2019;81:102664.
65. Taylor RM, Wickstead B, Cronin S, Caldecott KW. Role of a BRCT domain in the interaction of DNA ligase III-alpha with the DNA repair protein XRCC1. *Curr Biol*, 1998;8(15):877-80.
66. London RE. XRCC1-Strategies for coordinating and assembling a versatile DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*, 2020;93:102917.

67. Loizou JI, El-Khamisy SF, Zlatanou A, Moore DJ, Chan DW, Qin J, Sarno S, Meggio F, Pinna LA, Caldecott KW. The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks. *Cell*, 2004;117(1):17-28.
68. Dutta A, Eckelmann B, Adhikari S, Ahmed KM, Sengupta S, Pandey A, Hegde PM, Tsai M, Tainer JA, Weinfeld M, Hegde ML, Mitra S. Microhomology-mediated end joining is activated in irradiated human cells due to phosphorylation-dependent formation of the XRCC1 repair complex. *Nucleic Acids Res*, 2017;45(5):2585-2599.
69. Guangqing L, Duan J, Shu S, Wang X, Gao L, Guo J, Yu Zhang Y. Ligase I and ligase III mediate the DNA double-strand break ligation in alternative end-joining. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016;113:1256-60.
70. Ström CE, Johansson F, Uhlén M, Szigartyo CA, Erixon K, Helleday T. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate. *Nucleic Acids Res*, 2011;39(8):3166-75.
71. Hirota K, Ooka M, Shimizu N, Yamada K, Tsuda M, Ibrahim MA, Yamada S, Sasanuma H, Masutani M, Takeda S. XRCC1 counteracts poly(ADP ribose)polymerase (PARP) poisons, olaparib and talazoparib, and a clinical alkylating agent, temozolomide, by promoting the removal of trapped PARP1 from broken DNA. *Genes Cells*, 2022;27(5):331-344.
72. De Villartay JP. When natural mutants do not fit our expectations: the intriguing case of patients with XRCC4 mutations revealed by whole-exome sequencing. *EMBO Mol Med*, 2015;7:862-4.
73. Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 2006;124:301-313.
74. Grawunder U, Wilm M, Wu X, Mann M, Lieber MR. Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, 1997;388:492-5.

75. Fukuchi M, Wanotayan R, Liu S, Imamichi S, Sharma MK, Matsumoto Y. Lysine 271 but not lysine 210 of XRCC4 is required for the nuclear localization of XRCC4 and DNA ligase IV. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015;461:687-94.
76. Koch CA, 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(19):3874-85
77. Yano K, Morotomi-Yano K, Wang SY, Uematsu N, Lee KJ, Asaithamby A, Weterings E, Chen DJ. Ku recruits XLF to DNA double-strand breaks. *EMBO Rep*, 2008;9:91-6.
78. Tsukada K, Shimada M, Imamura R, Saikawa K, Ishiai M, Matsumoto Y. The FHA domain of PNKP is essential for its recruitment to DNA damage sites and maintenance of genome stability. *Mutat Res*, 2020;822:111727.
79. 秋山徹, 河府和義 編. 『細胞・培地活用ハンドブック：特徴、培養条件、入手法などの重要データがわかる』 株式会社羊土社, 2008
80. Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J, Brattain DE. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res*, 1981;41(5):1751-1756.
81. Ponten J, Saksela E. Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. *Int J Cancer*, 1967;2(5):434-447.
82. Heldin CH, Johnsson A, Wennergren S, Wernstedt C, Betsholtz C, Westermark B. A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains. *Nature*, 1986;319(6053):511-514.
83. Landers JE, Cassel SL, George DL, Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. *Cancer Res*, 1997;57(16):3562-3568.
84. Richardson C, Moynahan ME, Jasin M. Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations. *Genes Dev*, 1998;12:3831-42.

85. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe, *Nat Rev Genet*, 2009;10(2):94-108
86. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009;10(2):126-39
87. Siomi H, Siomi MC, On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 2009;457(7228):396-404
88. 松宮雅典. 東京工業大学大学院 創造エネルギー専攻 修士学位論文 (2017)
89. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014;346(6213):1258096.
90. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 2007;8:172.
91. Kleinstiver B.P., Prew M.S., Tsai S.Q., Topkar V.V., Nguyen N.T., Zheng Z., Gonzales A.P., Li Z., Peterson R.T., Yeh J.R., Aryee M.J., Joung J.K., Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities, *Nature* (2015) ;523(7561): 481-485.
92. Jiménez A, Carrasco L, Vázquez D. Enzymic and nonenzymic translocation by yeast polysomes. Site of action of a number of inhibitors. *Biochemistry* 1977;16(21):4727-30
93. Lukac D, Machacova Z, Moudry P. Emetine blocks DNA replication via proteosynthesis inhibition not by targeting Okazaki fragments. *Life Sci Alliance*. 2022;5(12):e202201560.
94. Sherr CJ, Beach D, Shapiro GI. Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer Discov*, 2016;6(4):353-67.
95. Magaud JP, Sargent I, Clarke PJ, Ffrench M, Rimokh R, Mason DY. Double immunocytochemical labeling of cell and tissue samples with monoclonal anti-bromodeoxyuridine. *J Histochem Cytochem*, 1989;37(10):1517-27.
96. Schrepf A, Bernardo S, Verge EAA, Otero MAR, Wilson J, Kirchhofer D, Timelthaler G, Ambros AM, Kaya A, Wieder M, Ecker GF, Winter GE, Costanzo

- V, Loizou JI. POL  $\theta$  processes ssDNA gaps and promotes replication fork progression in BRCA1-deficient cells. *Cell Rep*, 2022;41(9):111716.
97. Diermeier-Daucher S, Clarke ST, Hill D, Vollmann-Zwerenz A, Bradford JA, Brockhoff G. Cell type specific applicability of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for dynamic proliferation assessment in flow cytometry. *Cytometry A*, 2009;75(6):535-46.
98. Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, Guertin DA, Chang JH, Lindquist RA, Moffat J, Golland P, Sabatini DM. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol*, 2006;7:R100.
99. Sabatella M, Theil AF, Ribeiro-Silva C, Slyskova J, Thijssen K, Voskamp C, Lans H, Vermeulen W. Repair protein persistence at DNA lesions characterizes XPF defect with Cockayne syndrome features. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(18):9563-9577.
100. Lan L, Ui A, Nakajima S, Hatakeyama K, Hoshi M, Watanabe R, Janicki SM, Ogiwara H, Kohno T, Kanno S, Yasui A. The ACF1 complex is required for DNA double-strand break repair in human cells. *Mol Cell*, 2010;40:976-87.
101. Mansour WY, Schumacher S, Roskopf R, Rhein T, Schmidt-Petersen F, Gatzemeier F, Haag F, Borgmann K, Willers H, Dahm-Daphi J. Hierarchy of nonhomologous end-joining, single-strand annealing and gene conversion at site-directed DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res*, 2008;36:4088-98.
102. Zhou H, Kawamura K, Yanagihara H, Junya Kobayashi J, Zhang-Akiyama QM. NBS1 is regulated by two kind of mechanisms: ATM-dependent complex formation with MRE11 and RAD50, and cell cycle-dependent degradation of protein. *J Radiat Res*, 2017;58:487-94.
103. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C, Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 2006;1(5):2315-9
104. Kaplan SK. DNA-strand scission and loss of viability after x irradiation of normal and sensitized bacterial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1966;55(6):1442-6.

105. Williams GJ, Hammel M, Radhakrishnan SK, Ramsden D, Lees-Miller SP, Tainer JA. Structural insights into NHEJ: building up an integrated picture of the dynamic DSB repair super complex, one component and interaction at a time. *DNA Repair (Amst)*, 2014;17:110-20.
106. Tumbale P, Appel CD, Kraehenbuehl R, Robertson PD, Williams JS, Krahn J, Ahel I, Williams RS. Structure of an aprataxin-DNA complex with insights into AOA1 neurodegenerative disease. *Nat Struct Mol Biol*, 2011;18(11):1189-95.
107. Labun K, Krause M, Cleuren TY, Valen E. CRISPR genome editing made easy through the CHOPCHOP website. *Curr Protoc*, 2021;1:1-19.
108. Caldecott KW. Protein ADP-ribosylation and the cellular response to DNA strand breaks. *DNA Repair (Amst)*, 2014;19:108-13.
109. Vitor AC, Huertas P, Legube G, de Almeida SF. Studying DNA double-strand break repair: an ever-growing toolbox. *Front Mol Biosci*, 2020;7:24.
110. Zhou J, Gelot C, Pantelidou C, Li A, Yücel H, Davis RE, Färkkilä A, Kochupurakkal B, Syed A, Shapiro GI, Tainer JA, Blagg BSJ, Ceccaldi R, D'Andrea AD. A first-in-class Polymerase Theta Inhibitor selectively targets Homologous-Recombination-Deficient Tumors. *Nat Cancer*, 2021 Jun;2(6):598-610.
111. Sun Y, Chen J, Huang SYN, Su YP, Wang W, Agama K, Saha S, Jenkins LM, Pascal JM, Pommier Y. PARylation prevents the proteasomal degradation of topoisomerase I DNA-protein crosslinks and induces their deubiquitylation. *Nat Commun*, 2021;12(1):5010.
112. Bee L, Nasca A, Zanolini A, Cendron F, d'Adamo P, Costa R, Lamperti C, Celotti L, Ghezzi D, Zeviani M. A nonsense mutation of human XRCC4 is associated with adult-onset progressive encephalomyopathy. *EMBO Mol Med*, 2015;7(7):918-29.
113. Rother MB, Pellegrino S, Smith R, Gatti M, Meisenberg C, Wiegant WW, Luijsterburg MS, Imhof R, Downs JA, Vertegaal ACO, Huet S, Altmeyer M, van Attikum H. CHD7 and 53BP1 regulate distinct pathways for the re-ligation of DNA double-strand breaks. *Nat Commun*, 2020;11(1):5775.

114. Çağlayan M, Horton JK, Prasad R, Wilson SH. Complementation of aprataxin deficiency by base excision repair enzymes. *Nucleic Acids Res*, 2015;43(4):2271-81.
115. Visnes T, Grube M, Hanna BMF, Benitez-Buelga C, Cázares-Körner A, Helleday T. Targeting BER enzymes in cancer therapy. *DNA Repair (Amst)*, 2018;71:118-126.
116. Tubbs A, Nussenzweig A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell*, 2017;168(4):644-656.
117. Hopkins JL, Lan L, Zou L. DNA repair defects in cancer and therapeutic opportunities. *Genes Dev*, 2022;36(5-6):278-293.
118. Olivieri M, Cho T, Álvarez-Quilón A, Li K, Schellenberg MJ, Zimmermann M, Hustedt N, Rossi SE, Adam S, Melo H, Heijink AM, Sastre-Moreno G, Moatti N, Szilard RK, McEwan A, Ling AK, Serrano-Benitez A, Ubhi T, Feng S, Pawling J, Delgado-Sainz I, Ferguson MW, Dennis W, Brown GW, Cortés-Ledesma F, Williams RS, Martin A, Xu D, Durocher D. A Genetic Map of the Response to DNA Damage in Human Cells. *Cell*, 2020;182(2):481-496. e21.
119. Serrano-Benitez A, Wells SE, Drummond-Clarke L, Russo LC, Thomas JC, Leal GA, Farrow M, Edgerton JM, Balasubramanian S, Yang M, Frezza C, Gautam A, Brazina J, Burdova K, Hoch NC, Jackson SP, Caldecott KW. Unrepaired base excision repair intermediates in template DNA strands trigger replication fork collapse and PARP inhibitor sensitivity. *EMBO J*, 2023;42(18):e113190.
120. Juhász S, Smith R, Schauer T, Spekhardt D, Mamar H, Zentout S, Chapuis C, Huet S, Timinszky G. The chromatin remodeler ALC1 underlies resistance to PARP inhibitor treatment. *Sci Adv*, 2020;6(51):eabb8626.
121. Hoch NC, Hanzlikova H, Rulten SL, Tétreault M, Komulainen E, Ju L, Hornyak P, Zeng Z, Gittens W, Rey SA, Staras K, Mancini GMS, McKinnon PJ, Wang Z, Wagner JD, Yoon G, Caldecott KW. XRCC1 mutation is associated with PARP1 hyperactivation and cerebellar ataxia. *Nature*, 2017;541(7635):87-91.
122. Kilgas S, Kiltie AE, Ramadan K. Immunofluorescence microscopy-based detection of ssDNA foci by BrdU in mammalian cells. *STAR Protoc*, 2021;2(4):100978.

123. Chen R, Wold MS. Replication protein A: single-stranded DNA's first responder: dynamic DNA-interactions allow replication protein A to direct single-strand DNA intermediates into different pathways for synthesis or repair. *Bioessays*, 2014;36(12):1156-61.
124. Hanzlikova H, Kalasova I, Demin AA, Pennicott LE, Cihlarova Z, Caldecott KW. The Importance of Poly(ADP-Ribose) Polymerase as a Sensor of Unligated Okazaki Fragments during DNA Replication. *Mol Cell*, 2018;71(2):319-331. e3.
125. Cong K, Peng M, Kousholt AN, Lee WTC, Lee S, Nayak S, Kraiss J, VanderVere-Carozza PS, Pawelczak KS, Calvo J, Panzarino NJ, Turchi JJ, Johnson N, Jonkers J, Rothenberg E, Sharon B Cantor SB. Replication gaps are a key determinant of PARP inhibitor synthetic lethality with BRCA deficiency. *Mol Cell*, 2021;81(15):3128-3144. e7.
126. Simoneau A, Xiong R, Zou L. The trans cell cycle effects of PARP inhibitors underlie their selectivity toward BRCA1/2-deficient cells. *Genes Dev*, 2021;35(17-18):1271-1289.
127. Cornwell JA, Crncec A, Afifi MM, Tang K, Amin R, Cappell SD. Loss of CDK4/6 activity in S/G2 phase leads to cell cycle reversal. *Nature*, 2023;619(7969):363-370.
128. Gross LA, Baird GS, Hoffman RC, Baldrige KK, Tsien RY. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000;97(22):11990-5.
129. Hale A, Dhoonmoon A, Straka J, Nicolae CM, Moldovan GL. Multi-step processing of replication stress-derived nascent strand DNA gaps by MRE11 and EXO1 nucleases. *Nat Commun*, 2023;14(1):6265.
130. Bennardo N, Cheng A, Huang N, Stark JM. Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet*, 2008;4(6):e1000110.
131. Lee Y, Katyal S, Li Y, El-Khamisy SF, Russell HR, Caldecott KW, McKinnon PJ. The genesis of cerebellar interneurons and the prevention of neural DNA damage require XRCC1. *Nat Neurosci*, 2009;12(8):973-80.

132. Shimada M, Tsukada K, Kagawa N, Matsumoto Y. Reprogramming and differentiation-dependent transcriptional alteration of DNA damage response and apoptosis genes in human induced pluripotent stem cells. *J Radiat Res*, 2019;60(6):719-728
133. McNally JR, O'Brien PJ. Kinetic analyses of single-stranded break repair by human DNA ligase III isoforms reveal biochemical differences from DNA ligase I. *J Biol Chem*, 2017;292(38):15870-15879.
134. Fugger K, Hewitt G, West SC, Boulton SJ. Tackling PARP inhibitor resistance. *Trends Cancer*, 2021;7(12):1102-1118.